

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
JÚLIO DE MESQUITA FILHO
CAMPUS DE ARARAQUARA – INSTITUTO DE QUÍMICA

ANNE LÍGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO

**Estudo Fitoquímico e Implicação Taxonômica em
Paepalanthus Mart. (Eriocaulaceae)**

Tese apresentada ao Instituto de Química
de Araraquara, Universidade Estadual
Paulista “Julio de Mesquita Filho”, como
parte dos requisitos para a obtenção do
Título de Doutor em Química.

Araraquara, 2000

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Wagner Vilegas (Orientador) – Instituto de Química – UNESP/Araraquara

Prof. Dr. Paulo Takeo Sano – Instituto de Biociências – USP/São Paulo

Prof. Dr. Antonio Salatino - Instituto de Biociências – USP/São Paulo

Prof. Dr. João Batista Fernandes – Universidade Federal de São Carlos/São Carlos

Prof. Dr. Alberto José Cavaleiro - Instituto de Química – UNESP/Araraquara

DADOS CURRICULARES

ANNE LÍGIA DOKKEDAL BOSQUEIRO

1. DADOS PESSOAIS

1.1. Nascimento: 22 de dezembro de 1963.

1.2. Nacionalidade: brasileira

1.3. Naturalidade: Araraquara

1.4. Estado Civil: casada

1.5. Filiação: Pai: Eyvind Preben Dokkedal

Mãe: Erlenne Jensen Dokkedal

1.6. Profissão: bióloga

1.7. Documento de Identidade: 16 558 586-9

1.8. Cadastro de Pessoa Física: 062 290 798-01

1.9. Endereço: Av. Mário Ranieri, 4-45 casa G-30.

Cond. Residencial Jardins do Sul

CEP 17053-902 Bauru – SP

1.10. Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Bauru/ Faculdade de Ciências – Depto. C. Biológicas

2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

2.1. Bacharel em Ciências Biológicas

Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas Concluído em 05/12/1996
no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de São José do Rio Preto

2.2. Mestre em Botânica

Curso de Pós-Graduação em Botânica
Área de Concentração: Taxonomia, concluído em 03/08/1990
no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, SP

2.3. Doutor em Química

Curso de Pós-Graduação em Química

Área de Concentração: Química Orgânica, concluído em 06/04/2000, no Instituto de Química de Araraquara, SP.

3. TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

Andrade, F.D.P., Santos, L.C., Dokkedal, A.L., Vilegas, W. 1999. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. *Phytochemistry*, **5**: 411-415.

Dokkedal, A.L., Salatino, A. Flavonoids of brazilian species of *Leiothrix* (Eriocaulaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, v.20, n.1, p. 31-2, 1992.

Vilegas, W., Dokkedal, A.L., Rastrelli, L., Piacente, S., Pizza, C. 1999. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides* e *Paepalanthus latipes*. *J. Nat. Prods.*, **62(5)**: 746-749.

Vilegas, W., Nehme, C.J., Dokkedal, A.L., Piacente, S., Rastrelli, L. 1999. Quercetagetin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus bromelioides* e *Paepalanthus latipes*. *Phytochemistry*, **51**: 403-409.

Santos, L.C., Andrade, F.D.P., Vasconcelos, E.C., Coelho, R.G., Dokkedal, A.L., Garcia, A.C.L., Sano, P.t., Vilegas, W. 1999. Separation of flavonoids and naphthopyrones from four brazilian *Paepalanthus* species by droplet countercurrent chromatography. *Rev. Brasil. Pl. Med.*, **2(1)**:43-37.

4. ATIVIDADES DIDÁTICAS

Docente responsável pela disciplina de Sistemática Vegetal junto ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas.

5. LINHA DE PESQUISA ATUAL

Química de espécies de *Paepalanthus* Martius e implicação taxonômica

Química Biológica

Tese de Doutorado realizada sob orientação do

Prof. Dr. Wagner Vilegas

**Ao meu marido Beto e ao meu filho Heitor,
pelo amor, carinho, dedicação, por serem as
pessoas mais importantes de minha vida.**

ÍNDICE

Agradecimentos	iii
Abreviaturas	iv
Resumo	v
Abstract	vi
I.Objetivos	vii
II. Introdução	1
1. A Cadeia do Espinhaço	1
2. Eriocaulaceae	5
2.1. <i>Paepalanthus</i> Mart.	9
2.1.1 <i>Paepalanthus</i> subg. <i>Xeractis</i> Koernicke	11
2.1.2 <i>Paepalanthus</i> subg. <i>Paepalocephalus</i> sect. <i>Eriocaulopsis</i> subsect. <i>Aphorocaulon</i> Ruhland	14
3.Química de Eriocaulaceae	14
III. Material e Métodos	20
1. Obtenção de Material Botânico	20
2. Preparo dos Extratos	20
3. Fracionamento, Isolamento, Purificação	20
3.1. Cromatografia por Permeação em Gel (GPC)	20
3.2. Cromatografia em Contracorrente por Gotejamento (DCCC)	21
3.3. Cromatografia em Coluna de Polivinilpolipirrolidona (PVPP)	21
3.4. Cromatografia em Coluna de XAD ₂	21
3.5. Cromatografia em Camada Delgada (TLC)	22
4. Identificação Através de Métodos Espectrométricos	23
4.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	23
4.2. Electrospray-Espectrometria de Massas (ES-MS)	23
4.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	23
4.4. Espectrometria no Infravermelho (IR)	24
4.5. Espectrometria no Ultravioleta (UV)	24

IV. Desenvolvimento, Resultados e Discussão	25
1. Estudo Químico	25
1.1. <i>Paepalanthus denudatus</i> Koernicke	25
1.2. <i>Paepalanthus chlorocephalus</i> Silveira	38
1.3. <i>Paepalanthus argenteus</i> var. <i>argenteus</i> (Bong.) Hensold	42
1.4. <i>Paepalanthus macrocephalus</i> (Bong.) Koernicke	51
1.5. <i>Paepalanthus vellozioides</i> Koernicke e <i>Paepalanthus latipes</i> Silveira	55
2. Estudo Quimiotaxonômico	70
2.1. Abordagem Taxonômica	70
2.2. Abordagem Química e Quimiotaxonômica	75
V. Conclusões	85
VI. Referências Bibliográficas	86
VII. Anexos	93

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, mais do que pela orientação, por acreditar em mim e me aceitar no seu grupo de pesquisa, por me respeitar como profissional e por ter sido sempre um grande amigo, por quem tenho o maior carinho, respeito e admiração.

Ao Prof. Dr. Paulo Takeo Sano, pela identificação das espécies de *Paepalanthus* e pela contribuição a este trabalho, com sugestões e direcionamentos sempre tão importantes.

À Dra Nancy Hensold, pela identificação das espécies de *Paepalanthus* subg. *Xeractis*.

Aos colegas de laboratório, Roberta, Fábio, Regina, Eliane, pela constante ajuda e paciência que tiveram comigo, me socorrendo com os equipamentos e com o computador, especialmente à Lourdes, que se mostrou sempre muito amiga e absolutamente disponível para me ajudar nas tantas dificuldades que enfrentei.

Ao Nivaldo e ao Alberto, pela realização dos espectros, pela paciência e ajuda.

À Hélia e à Ana Lúcia, pela ajuda e amizade.

À Isolina, Sandra e Vilma, da seção de Pós-Graduação, que sempre foram muito atenciosas e carinhosas comigo.

Aos técnicos do Departamento de Ciências Biológicas, pelo auxílio no desenvolvimento da parte prática executada em Bauru.

Aos meus alunos, queridos, que passaram pelo meu laboratório e me ajudaram de tantas formas, com o trabalho prático, com a organização de meus dados, com paciência e carinho nas horas difíceis: Alessandra, Cristiane e especialmente minhas meninas, Ana Maria e Caroline, muito obrigada.

À minha mãe, que me recebeu em sua casa semanalmente, cuidou do Heitor com a maior dedicação e de mim também, sempre me apoiando e acreditando na minha capacidade.

Ao meu amigo Dr. João Henrique G. Borges, pelo apoio, incentivo, ajuda nas dificuldades com a Química Orgânica.

Ao meu filho Heitor, que tantas vezes teve que abrir mão de minha presença e atenção e enfrentar estrada semanalmente para que este trabalho pudesse ser realizado. Espero que você entenda e me perdoe.

Ao Beto, meu marido e maior amigo, sem o qual eu não teria tido forças para chegar até aqui.

ABREVIATURAS

Allo	Alose
BAW	<i>n</i> -Butanol-Ácido Acético –Água
BPI	Base Peak Ion
Caff	Cafeoil ou Ácido Caféico
CC	Cromatografia em Coluna
CHCORR	C-H Correlation
COSY	Correlation Spectroscopy
DCCC	Droplet Countercurrent Chromatography/Cromatografia em Contracorrente de gotejamento
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DFQ-COSY	Double Quantum Filtered COSY
DMSO	Dimetilsulfóxido
ES	Electrospray
Gli/Glu	Glicose
Glc	Ácido Glicurônico
GPC	Gel Permeation Chromatography/Cromatografia por Permeação em Gel
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HOHAHA	Homonuclear Hartmann-Hahn Spectroscopy
HPLC	High Performance Liquid Chromatography/ Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HSQC	Heteronuclear Shift Quantum Correlation
IR	Infra Red/Infra Vermelho
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitrila
MS	Mass Spectrometry/Espectrometria de Massas
NP/PEG	Natural Products/Polyethyleneglycol Reagent
<i>p</i> -coum	Ácido <i>p</i> -cumárico ou <i>p</i> -coumaroil
PI	Positive Ion/Modo Positivo
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
R _f	Retention Factor/Fator de Retenção
rham	Rhamnose
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TIC	Total Ion Current
TLC	Thin Layer Chromatography/ Cromatografia em Camada Delgada
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
UV	Ultravioleta

RESUMO

Paepalanthus Mart. (Eriocaulaceae) tem sido considerado um gênero polifilético que deve ser dividido em grupos menores mais naturais. Os perfis de flavonóides e naftopironas têm se mostrado de grande utilidade para apoiar ou não este realinhamento. Neste trabalho foram investigadas quimicamente espécies de *P.* subg. *Xeractis* (*P. chlorocephalus* e *P. argenteus* var. *argenteus*), *P.* subsect. *Aphorocaulon* (*P. macrocephalus*), *P.* subg. *Platycaulon* (*P. vellozioides* e *P. latipes*) e *P.* sect. *Actinocephalus* (*P. denudatus*). Podemos observar que os perfis químicos são muito distintos nos diferentes *taxa*, embora não sejam exclusivos. *P.* sect. *Actinocephalus* e *P.* subsect. *Aphorocaulon* caracteristicamente apresentam naftopiranonas, além de flavonóis glicosilados e/ou acilados. *P.* subg. *Xeractis* apresenta majoritariamente flavonas; *P.* subg. *Platycaulon* apresenta principalmente naftopiranonas. É apresentada ainda uma compilação da investigação química realizada até o momento para os gêneros de Eriocaulaceae. Os resultados químicos obtidos com este estudo nos permitem postular o *status* de gênero para *Paepalanthus* subg. *Xeractis*, reforçando a análise cladística. A presença de flavonas em *P.* subg. *Xeractis* pode aproximar este *taxon* do clado *Leiothrix-Syngonanthus*, quimicamente caracterizado pela presença de flavonas ao invés de flavonóis.

ABSTRACT

Paepalanthus Mart. (Eriocaulaceae) is a polyphyletic genus and must be divided into various monophyletic smaller groups. The flavonoids and naphthopyranones profiles have been proved to be of importance in order to support this consideration. In this work we have studied *P.* subg. *Xeractis* (*P. chlorocephalus* and *P. argenteus* var. *argenteus*), *P.* subsect. *Aphorocaulon* (*P. macrocephalus*), *P.* subg. *Platycaulon* (*P. vellozioides* and *P. latipes*) and *P.* sect. *Actinocephalus* (*P. denudatus*). We have observed that the chemical profiles are quite distinctives in the different *taxa*, although not necessarily exclusives. *P.* sect. *Actinocephalus* and *P.* subsect. *Aphorocaulon* are characterized by the presence of naphthopyranones and glycosilated and/or acylated flavonols; in *P.* subg. *Xeractis* flavone derivatives are major constituents; the presence of naphthopyranones is markedly in *P.* subg. *Platycaulon*. We are also presenting a compilation of the chemical investigation of Eriocaulaceae. Based on chemical results we suggest here a status of genus for *Paepalanthus* subg. *Xeractis*, reinforcing the cladistic analysis. The presence of flavones in this latter group may bring it closer to the clade *Leiothrix-Syngonanthus*, which are chemically characterized by the presence of flavones instead of flavonols.

I. OBJETIVOS

- Realizar o estudo fitoquímico de espécies de *Paepalanthus* Kunth., através de preparo de extratos, isolamento e identificação das substâncias isoladas. As espécies de *P.* subg. *Xeractis* e *P.* subsect. *Aphorocaulon* foram estudadas com a finalidade de se conhecer o perfil químico destes *taxa*, já que não há relato anterior de trabalhos com esses grupos.
- A partir do conhecimento químico, contribuir para um melhor alinhamento infragenérico de *Paepalanthus* e desse em Eriocaulaceae, uma vez que esse gênero tem sido considerado polifilético e muitas vezes com problemas de difícil solução.

II. INTRODUÇÃO

1. A Cadeia do Espinhaço

A Cadeia do Espinhaço ou Serra Geral compreende um grupo de serras entre os limites 20°35'S e 11°11'S, que segundo Derby (1906 *apud* Giuliatti *et al.*, 1987) constitui o divisor de águas entre a Bacia do Rio São Francisco e o Oceano Atlântico, indo de Ouro Preto (MG) até a Bahia, onde recebe a denominação de Chapada Diamantina. Segundo Moreira (1965), a extensão total da Cadeia do Espinhaço é de 1100 Km e a largura variável entre 50 e 100 Km, com altitudes superiores a 800m. A Cadeia do Espinhaço foi formada por soerguimentos intermitentes, a partir do Paleozóico, sendo os restos de superfícies aplainadas mais antigos hoje representados pelos altos picos (ca. de 1800m de altitude), constituindo a mais antiga superfície de denudação aí encontrada (King, 1956, *apud* Giuliatti *et al.*, 1987). O mesmo autor refere ainda que tal superfície foi desenvolvida no Cretáceo inferior e em sua base encontra-se conservada, em grandes áreas, a superfície anterior a esse período, que forma as amplas áreas elevadas da região, até cerca de 1400m de altitude. De acordo com estudos geomorfológicos mais recentes (Abreu, 1984), a origem dos blocos estruturais da Cadeia do Espinhaço remonta ao Pré-Cambriano, apresentando amplos dobramentos no eixo NW-SE, os quais, após terem sido submetidos a um longo processo de erosão, foram remodelados pela tectônica mais recente, do início do Terciário. Disto resultou uma superfície arqueada, com presença de dois sistemas de fraturamento, um deles paralelo e outro perpendicular às estruturas dobradas, responsáveis pela complexidade das feições estruturais (Mauro *et al.* 1982, *apud* Giuliatti *et al.*, 1987; figura II.1. a, b, c).

A Cadeia do Espinhaço é uma região peculiar, com condições especiais de solo e clima, que propiciaram o desenvolvimento de uma flora típica, representando um mosaico de diferentes comunidades vegetais, intimamente associados (Giuliatti *et al.*, 1987). O tipo de vegetação que domina nas serras da Cadeia do Espinhaço é o de campos rupestres, um dos componentes deste mosaico, onde as plantas crescem em solos arenosos de textura fina ou grossa, ou sobre solos pedregosos decorrentes de desintegração de rochas, ou ainda, sobre as próprias rochas (Figura II.1. c, d, e). Nos campos rupestres, as altitudes são superiores a 1000m e os afloramentos rochosos de

quartzito e arenito são comuns por toda a área (Joly, 1970). O clima da região apresenta verões brandos com temperatura média variando entre 17,4 °C e 19,8 °C; a estação chuvosa registra precipitação anual em torno de 160mm (Magalhães, 1954, *apud* Giulietti *et al.*, 1987), que dura de três a quatro meses; o verão é seco. A flora dos campos rupestres exhibe numerosas adaptações devido às características do substrato, induzindo as plantas à necessidade de retenção de água. É comum, em diferentes famílias vegetais, verificar que as folhas apresentam caracteres de xeromorfismo, como cutícula espessa, paredes das células epidérmicas espessadas, presença de parênquima aquífero, como demonstrado por Handro *et al.* (1970) e Sajo e Menezes (1986) com espécies de Asteraceae, Menezes (1971a) com espécies de Velloziaceae e Monteiro *et al.* (1985) em espécies de Eriocaulaceae. Nos locais onde a profundidade do solo impede a rápida drenagem originam-se brejos temporários, habitados por espécies capazes de sobreviver em solos ácidos e oligotróficos (Giulietti e Pirani, 1988). Scatena e Menezes (1996 b) verificaram que espécies de *Syngonanthus* (Eriocaulaceae) que se desenvolvem em pequenos vales dos campos rupestres submetidas a solos encharcados durante uma boa época do ano apresentam raízes com estrutura dotada de corredores de ar, que são espaços intercelulares para o armazenamento do mesmo. Por outro lado, em espécies que crescem em pequenas encostas, onde o solo é arenoso e seco e a água escoar rapidamente, não são encontrados esses espaços intercelulares.

A Serra do Cipó constitui a área de estudos mais intensos de toda a Cadeia do Espinhaço. É uma área delimitada pelo rio Cipó e seus afluentes do leste, especialmente o rio Paraúna, compreendendo as áreas montanhosas situadas entre a Serra das Bandeirinhas, em Santana do Riacho, ao sul, e as serras próximas à Gouveia, ao norte (Giulietti, *et al.*, 1987). Os primeiros estudos botânicos realizados na Serra do Cipó datam do século passado (p. ex., Spix e Martius, 1823; Saint-Hilaire, 1833; Gardner, 1846, *apud* Giulietti *et al.*, 1987). Estudos botânicos mais recentes foram iniciados em 1968, com trabalhos anatômicos sobre as famílias Compositae (Handro *et al.*, 1970) e Velloziaceae (Menezes, 1970, 1971a, 1971b). Em 1972, o pesquisador Aylton Brandão Joly planejou e iniciou o projeto de levantamento da flora da Serra do Cipó, contando para tanto com a colaboração da pesquisadora Nanuza Luiza de Menezes e de pós-graduandos da Universidade de São Paulo, Universidade de Campinas e Instituto de Botânica de São Paulo; desde então, várias dissertações, teses e trabalhos foram realizados com plantas da Serra do Cipó. Em

1987, Giulietti *et al.* apresentaram uma lista de espécies pertencentes a 125 famílias de angiospermas, além de 1 de gimnospermas, 10 de pteridófitas e 11 de briófitas, num total de 1600 espécies listadas. Até a atualidade, são inúmeros os trabalhos que vêm sendo realizados nessa região, enfocando aspectos taxonômicos e complementando o trabalho de Giulietti e colaboradores (supra citado), além de estudos de várias sub-áreas da botânica.

Em diversas famílias de plantas, grande parte de seus representantes tem distribuição restrita à Cadeia do Espinhaço ou mesmo é endêmica de pequenas áreas. Entre as famílias que predominam nos campos rupestres, especialmente da Serra do Cipó, está Eriocaulaceae, cuja presença é constante ao longo de toda a cadeia do Espinhaço.



Fig.II.1. Aspectos dos Campos Rupestres. a) antiga pedreira; b) Paredão da Fazenda Palácio; c) Rochas inclinadas a 45° ; d) vegetação; e) uma das muitas cachoeiras locais.

2. Eriocaulaceae

Eriocaulaceae possui cerca de 1200 espécies em 10-14 gêneros de distribuição pantropical. O centro de diversidade genética da família está no sudeste do Brasil, na Cadeia do Espinhaço e o centro de origem é discutível (Giulietti e Hensold, 1990). A família é bem característica das monocotiledôneas e segundo Dahlgren *et al.* (1985) está incluída na ordem Commelinales, juntamente com Xyridaceae, Mayacaceae, Rapateaceae e Commelinaceae, principalmente pela presença de sementes com reserva de amido e hábito em roseta em Eriocaulaceae, Xyridaceae e Rapateaceae. Essas três famílias são também elementos marcantes na vegetação de montanhas do Brasil e da Venezuela (Giulietti e Hensold, 1990).

Eriocaulaceae inclui plantas anuais de pequeno porte, como *Paepalanthus scleranthus* Ruhland (1-2 cm de altura) assim como plantas perenes de até 2 m de altura, como *P. speciosus* (Bong.) Koernicke. A maioria das espécies ocorre em solos arenosos úmidos ou secos, de pH ácido. Espécies de *Eriocaulon* e algumas de *Syngonanthus* e *Lachnocaulon* são aquáticas ou de locais pantanosos. A família é caracterizada pelo hábito em roseta (morfologicamente) de onde partem escapos, portando inflorescências do tipo capítulo, talvez a característica mais importante da família (figura II.2). As inflorescências são monóicas, constituídas por pequenas flores díclinas (Giulietti e Hensold, 1990).

Ruhland (1903) dividiu Eriocaulaceae em duas subfamílias: Eriocauloideae, incluindo os gêneros *Eriocaulon* e *Mesanthemum* e Paepalanthoideae, incluindo *Blastocaulon*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Paepalanthus*, *Philodice*, *Syngonanthus* e *Tonina*. A subfamília Eriocauloideae foi caracterizada por apresentar espécies com o número de pétalas igual ao dobro do número de estames e Paepalanthoideae por apresentar o número de estames igual ao de pétalas ou terem estas reduzidas. Como pode ser visto, a separação das subfamílias é baseada exclusivamente nos caracteres florais. Fato similar acontece com a separação dos gêneros; Giulietti e Hensold (1991) apontam controvérsias na delimitação neste nível hierárquico. As mesmas autoras descrevem que neste caso são utilizados basicamente o número de estames, a união ou não das pétalas e o número de tecas das anteras (Giulietti e Hensold, 1990).

Ainda de acordo com Ruhland (1903), os 7 gêneros da subfamília Paepalanthoideae são separáveis com base em caracteres florais. O autor aproximou *Lachnocaulon* e *Tonina*, pela redução ou ausência das pétalas, *Paepalanthus*, *Blastocaulon* e *Leiothrix* por apresentarem as pétalas das flores pistiladas livres e *Syngonanthus* e *Philodice* por apresentarem as pétalas das flores pistiladas unidas na porção mediana. Giuliatti (1978) considera as Eriocaulaceae com 1100 espécies em 13 gêneros: *Eriocaulon* L., *Paepalanthus* Mart., *Syngonanthus* Ruhland, *Leiothrix* Ruhland., *Lachnocaulon* Kunth, *Philodice* Mart., *Blastocaulon* Ruhland, *Mesanthemum* Körn., *Carptotepala* Moldenke, *Wurdackia* Moldenke, *Rondonanthus* Herzog, *Tonina* Aublet e *Comanthera* Smith. Em 1988 Hensold definiu Eriocaulaceae como uma família predominantemente herbácea com 14 gêneros e cerca de 1100 espécies de acordo com Moldenke e Smith (1976), que atribuíram a maioria das espécies a *Eriocaulon*, *Paepalanthus* e *Syngonanthus*.

Mais recentemente, Giuliatti e Hensold (1991) reavaliaram a posição sistemática de *Carptotepala* e *Comanthera*, gêneros monotípicos das Guianas. As autoras demonstraram que esses taxa têm grande afinidade com algumas seções de *Syngonanthus* e que eles não possuem nenhum caráter de especialização que justifique sua distinção em gêneros. Assim, *Carptotepala jenmanii* (Gleason) Moldenke é colocado em *Syngonanthus* sect. *Thysanocephalus* sob o nome de *S. jenmanii* (Gleason) Giuliatt & Hensold, enquanto que *Comanthera kegeliana* (Koern.) Moldenke é colocado em *Syngonanthus* sect. *Eulepis*, como *S. kegelianus* (Koern.) Ruhland. Hensold e Giuliatti (1991) revisaram e redefiniram o gênero *Rondonanthus*, de acordo com um grande número de caracteres. Cinco espécies adicionais, incluindo o gênero monotípico *Wurdackia*, foram transferidas para *Rondonanthus*, e uma espécie desse gênero foi removida para *Paepalanthus*. Nesse trabalho, as autoras consideraram *Rondonanthus* um gênero de grande interesse do ponto de vista da filogenia em Eriocaulaceae, já que parece combinar caracteres de Eriocauloideae com os de dois núcleos de Paepalanthoideae, *Paepalanthus* e *Syngonanthus*. Em seu trabalho de revisão das Eriocaulaceae da Venezuela, Hensold (1991) propôs um novo subgênero, *Paepalanthus* subg. *Monosperma*. Esse novo taxon compreende 23 espécies, endêmicas da Guiana venezuelana, Amazônia brasileira e Guiana. O subgênero é melhor caracterizado pela produção aparentemente consistente de frutos indeiscentes (aquênios) com uma única semente em contraste com os frutos capsulares produzidos por todos os outros taxa conhecidos da família.

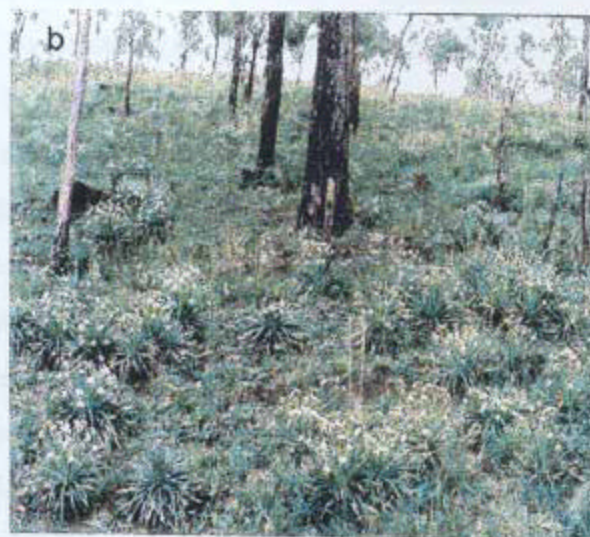
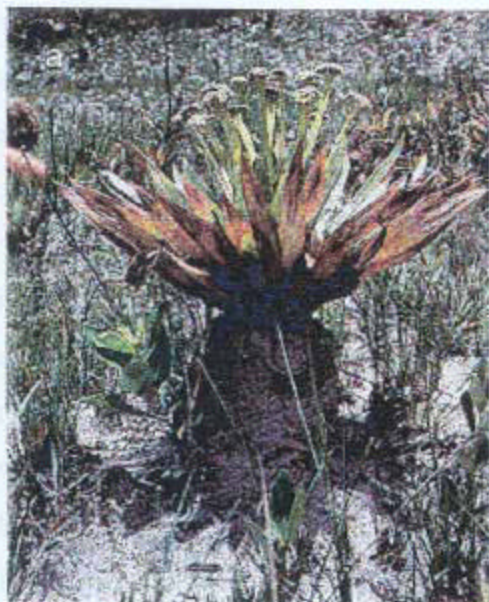


Fig.II.2. a) *P. bromelioides*; b) *P. latipes*;
c) capítulos de *P. macrocephalus*;
d) capítulos de *P. denudatus*.

Giulietti (1997) a partir da análise histórica da taxonomia de Eriocaulaceae e da discussão da evolução do reconhecimento genérico na família considera que a classificação de Ruhland (1903) é ainda hoje a mais utilizada, com poucas alterações. A autora reconhece dez gêneros para a família: *Rondonanthus* Herzog (1931), que foi acrescentado aos nove propostos por Ruhland (1903), quais sejam, *Eriocaulon*, *Tonina*, *Philodice*, *Paepalanthus*, *Mesanthemum*, *Lachnocaulon*, *Leiothrix*, *Blastocaulon* e *Syngonanthus* (Tabela II. 1).

Giulietti e Hensold (1991) referem que as Paepalanthoideae possuem dois centros de diversidade, sendo o principal nas montanhas do Brasil Central, especialmente na Cadeia do Espinhaço e o outro nas montanhas do norte da América do Sul, especialmente na Venezuela. Apesar da família ser pantropical, a maior concentração dos gêneros e espécies está nessas regiões (Giulietti e Hensold, 1990). É aí que ocorre também a maior diversificação morfológica da família, incluindo flores monóclinas e díclinas, flores trímeras e dímeras, entre outros. Na Venezuela e no Brasil ocorrem as maiores taxas de endemismo da família. Giulietti *et al.* (1987) referem que 68,7% das espécies de Eriocaulaceae da Serra do Cipó em MG são restritas à Cadeia do Espinhaço e que 32,5% são exclusivas desta serra. *Eriocaulon* é o único gênero da família de ocorrência no continente asiático, com poucas espécies na União Soviética e Mongólia e 66 espécies na Índia, além da ocorrência nas Américas.

Para uma análise da delimitação genérica da família é necessário um estudo detalhado ao nível das espécies, procurando reuni-las em grupos naturais. Isso deve ser feito principalmente para *Paepalanthus* e *Syngonanthus*, utilizando-se outros caracteres além da morfologia das flores (Giulietti e Hensold, 1990). Esses gêneros, muito grandes e diversificados, incluem vários grupos mais uniformes, caracterizados, por exemplo, pelos mesmos padrões de morfologia e ramificações caulinares, ou pela mesma organização das inflorescências, ou ainda pela escultura da semente.

Tabela II.1. Classificação dos taxa de Eriocaulaceae segundo Giulietti (1997), baseado em Ruhland (1903).

Eriocaulaceae				
Subfamílias	Gêneros	Subgêneros	Seções	Subseções
Eriocauloideae	<i>Eriocaulon</i>			
	<i>Mesanthemum</i>			
Paepalanthoideae	<i>Leiothrix</i>	<i>Leiothrix</i>		
		<i>Rheocaulon</i>		
		<i>Eleutherandra</i>		
		<i>Stephanophyllum</i>		
	<i>Tonina</i>			
	<i>Lachnocaulon</i>			
	<i>Philodice</i>			
	<i>Syngonanthus</i>		<i>Syngonanthus</i>	
			<i>Carphocephalus</i>	
			<i>Thysanoccephalus</i>	
			<i>Eulepis</i>	
	<i>Rondonanthus</i>			
	<i>Blastocaulon</i>			
	<i>Paepalanthus</i>	<i>Platycaulon</i>		
		<i>Thelxinoe</i>		
		<i>Xeractis</i>	<i>Xeractis</i>	
			<i>Chrysostegis</i>	
			<i>Gymnostegis</i>	
			<i>Pleurophyllon</i>	
		<i>Paepalocephalus</i>	<i>Actinocephalus</i>	
			<i>Diphyomene</i>	
			<i>Eriocaulopsis</i>	<i>Aphorocaulon</i>

2.1 *Paepalanthus* Mart.

Paepalanthus Mart. foi proposto pela primeira vez em 1835 por Martius como subgênero de *Eriocaulon* L., juntamente com o subgênero *Nasmythia* Huds. Na mesma publicação, o autor propõe a segregação de Eriocaulaceae como família independente de Juncaceae (Martius, 1835). Kunth (1841) eleva o subgênero *Paepalanthus* Mart. à categoria de gênero, mantendo a mesma caracterização proposta por Martius (1835).

Koernicke (1863) em seu tratamento para Eriocaulaceae na *Flora Brasiliensis*, foi o primeiro autor a considerar concretamente as subdivisões de *Paepalanthus*. O autor baseou-se principalmente em caracteres florais e reconheceu 14 subgêneros nos quais se encontravam 215 espécies brasileiras, incluindo as que hoje pertencem aos gêneros *Leiothrix*, *Syngonanthus* e *Blastocaulon*, desmembrados posteriormente de *Paepalanthus* por Ruhland (1903). Embora Ruhland (1903) tenha referido várias características na descrição do gênero, há muitas exceções aos caracteres apresentados, sendo os únicos comuns a todo o *taxon* a presença de pétalas livres nas flores pistiladas e unidas nas estaminadas e de anteras bitecas e dorsifixas. Com exceção desse último caráter e de estiletos e apêndices separando-se em alturas diferentes, todos os anteriores estão presentes também em *Leiothrix* (Giulietti, 1984).

O gênero se distribui nas Américas Central e do Sul. Porém, cinco espécies são encontradas na África e duas são disjuntas entre esse continente e as Américas; na América Central ocorrem treze espécies. A maior concentração de espécies, no entanto, ocorre na América do Sul, com 480 distribuídas em praticamente todos os países (Giulietti e Hensold, 1990). Para o Brasil são referidas 407 espécies, das quais 67% são restritas a Minas Gerais.

Ruhland (1903) dividiu *Paepalanthus* em 6 subgêneros, 7 seções, 6 subseções e 5 séries, baseado principalmente em caracteres morfológicos como hábito, padrão de ramificação e organização da inflorescência. Os 6 subgêneros propostos apresentam as seguintes características:

Paepalanthus subg. *Xeractis*: caracterizado por brácteas involucreais pilosas na porção interna e ultrapassando o capítulo, assim como a presença de flores estaminadas com tubo da corola piloso internamente.

Paepalanthus subg. *Platycaulon*: caracterizado por apresentar os escapos unidos entre si e espatas truncadas.

Paepalanthus subg. *Thelxinoë*: com apenas duas espécies, apresenta plantas pequenas e muito ramificadas, com flores dímeras em capítulos sésseis e brácteas involucrais ausentes.

Paepalanthus subg. *Psilandra*: caracteriza-se pela ausência de brácteas florais e presença de capítulos glabros, estigmas simples e pétalas das flores pistiladas livres. Com exceção da presença de pétalas livres nas flores pistiladas, todas as demais características são típicas de *Syngonanthus*, o que leva Giulietti e Hensold (1990) a considerarem a necessidade de estudos mais detalhados nesse subgênero e em sua posição. Assim como *Thelxinoë*, *Psilandra* apresenta apenas duas espécies.

Paepalanthus subg. *Bostrychophyllum*: caracterizado pela presença de capítulo glabro e hábito aquático. Hensold e Giulietti (1991) incluíram a única espécie desse subgênero, *P. capillaceus* Klotzch ex Koernicke, em *Rondonanthus*, pela presença de estaminódios típicos deste gênero.

Paepalanthus subg. *Paepalocephalus*: é o maior subgênero de *Paepalanthus* e reúne caracteres morfológicos muito diversos, que não se enquadram nos subgêneros anteriores. Apresenta 5 seções, separadas basicamente pelos padrões de ramificação e organização floral.

A seção *Dyostiche* conta com uma única espécie, *P. distichophyllum* Mart., muito característica por apresentar caule alongado e filotaxia dística.

A seção *Diphyomene* apresenta espécies com flores dímeras e caule alongado. A seção *Conodiscus* possui flores dímeras, porém em capítulos com receptáculos hemisféricos e cônicos.

A seção *Eriocaulopsis* é a de caracterização mais complexa e difícil (Giulietti e Hensold, 1990), sendo que Ruhland (1903) a subdivide em 6 subseções e 5 séries. Essa é a seção que reúne o maior número de espécies do gênero.

A seção *Actinocephalus* é caracterizada por Ruhland (1903) pela presença de caule estéril ramoso, com os escapos e capítulos dispostos em umbelas, flores trímeras, estigmas simples e tricomas freqüentemente tuberculados.

2.1.1 *Paepalanthus* subg. *Xeractis* Koernicke

Desde o trabalho de Ruhland (1903) para as Eriocaulaceae, *P.* subg. *Xeractis* tem sido considerado um dos poucos *taxa* infragenéricos inquestionavelmente naturais. Como um grupo, é reconhecido desde 1831 por Bongard e foi definido por

Koernicke (1863) por suas brácteas involucrais grandes freqüentemente ultrapassando os capítulos e pelas corolas internamente pilosas nas flores masculinas (figura II.3). Em relação à morfologia vegetativa assim como à maioria dos caracteres florais, *P.* subg. *Xeractis* é considerado relativamente pouco especializado por Hensold (1988).

Em seu trabalho de monografia sobre o *taxon*, Hensold (1988) modificou a classificação das espécies consideradas válidas para esse grupo, removendo algumas, reduzindo várias a sinonímias, ou ainda incluindo espécies e descrevendo espécies e variedades novas. A classificação desse *taxon*, de acordo com esse tratamento é a seguinte:

Paepalanthus subg. *Xeractis*

sect. *Xeractis* series *Albidi* – 7 espécies, uma variedade

sect. *Xeractis* series *Fuscati* – 12 espécies, 7 variedades

sect. *Chrysostegis* – 5 espécies, 1 variedade

sect. *Gymnostegis* – 1 espécie

sect. *Pleurophyllon* – 2 espécies

Assim, nesse trabalho são considerados como *taxa* válidos, 27 espécies de *Paepalanthus* subg. *Xeractis*. Essas espécies são endêmicas da Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais, entre Ouro Preto e Diamantina. A maioria das espécies possui distribuição muito restrita. Em seu trabalho para a Flora da Serra do Cipó, Hensold (1998) encontrou 10 espécies na área delimitada pelo estudo, sendo 7 endêmicas dessa região.

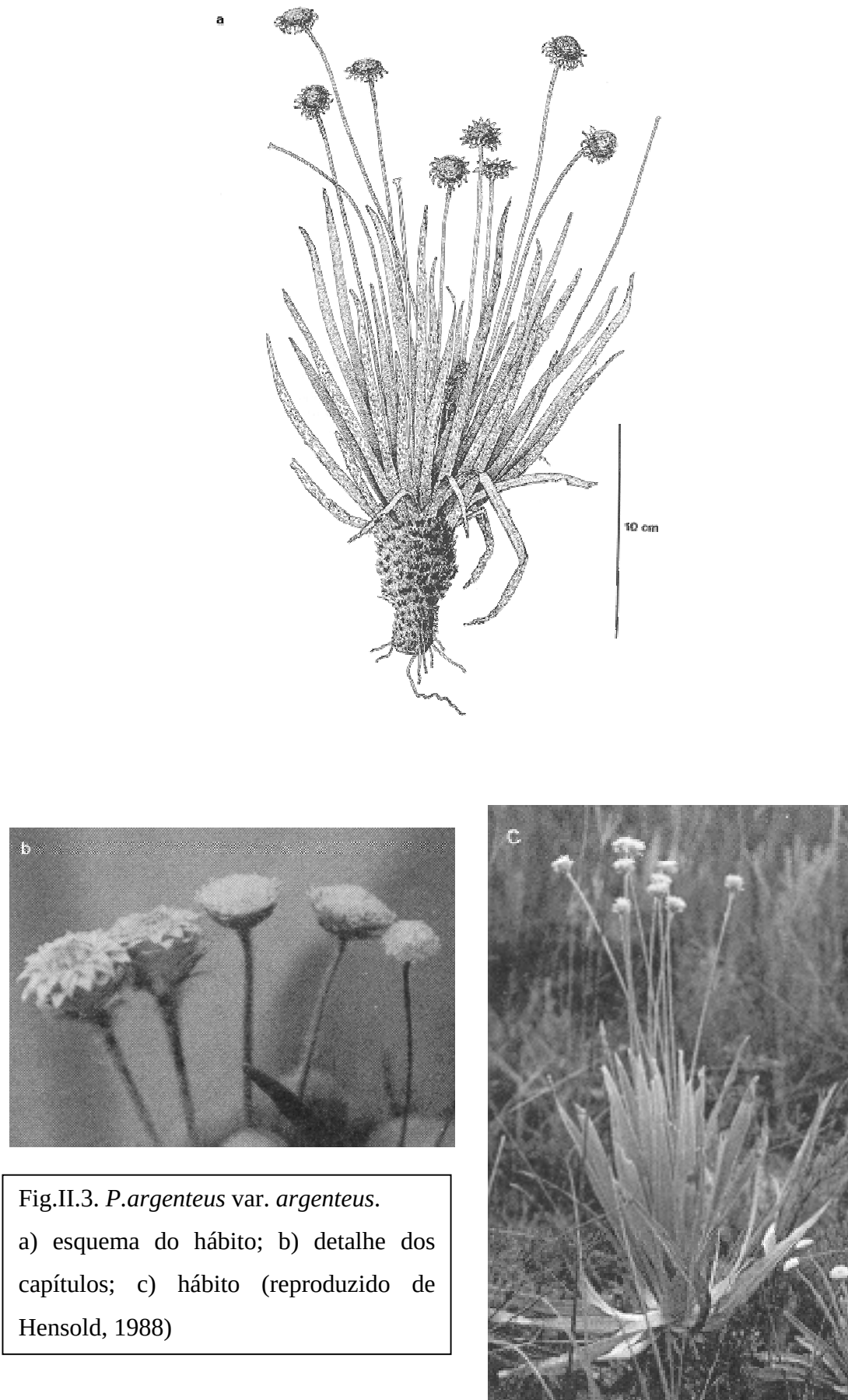


Fig.II.3. *P.argenteus* var. *argenteus*.
a) esquema do hábito; b) detalhe dos
capítulos; c) hábito (reproduzido de
Hensold, 1988)

2.1.2 *Paepalanthus* subg. *Paepalocephalus* sect. *Eriocaulopsis* subsect. *Aphorocaulon* Ruhland

Paepalanthus macrocephalus (Bong.) Koernicke (figura II.2c) foi a única espécie estudada de *P.* subsect. *Aphorocaulon* no presente trabalho. Até o momento, não foi realizado trabalho taxonômico mais detalhado envolvendo esta espécie; desta forma, não há na literatura nenhuma descrição atualizada deste *taxon*, razão pela qual não podemos apresentar aqui sua caracterização de forma mais detalhada.

3. Química de Eriocaulaceae

Quimicamente as Eriocaulaceae têm sido pouco exploradas. O primeiro relato descrito na literatura é o de Augier (1956), onde o autor analisou as folhas e rizomas de *Mesanthemum radicans* Koernicke em busca de derivados poliméricos da frutose. Concluiu pela ausência de frutanos e pela pequena quantidade de açúcares e amido. Em 1968, Bate-Smith relatou a presença de quercetagetina em *Eriocaulon nilagirens* Steud. e em *E. septangulare*. No ano seguinte, Bate-Smith e Harborne (1969) realizaram análise de folhas frescas de algumas espécies, identificando o mesmo flavonol 6-oxigenado em *E. decangulare* L., *E. brownianum* Mart., *E. sexangulare* L. e *E. wightianum* Mart. e sua ausência em *E. truncatum* Ham. Contudo, os autores verificaram a ausência de quercetagetina em *E. decangulare* e *E. septangulare* em espécimens secos provenientes de herbários, obtendo resultados irregulares quanto à presença/ausência desse metabólito. A patuletina também foi encontrada em *E. brownianum*, sendo esse o primeiro relato da ocorrência de quercetagetina e seu 6-metil éter em outra família além de Asteraceae. Tal resultado estabeleceu uma curiosa similaridade entre estas duas famílias. Além disso, os autores detectaram também a presença de quercetina como um constituinte minoritário em *E. brownianum*.

Em 1984 Teixeira *et al.* realizaram uma triagem química em capítulos e escapos de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhland e de *Paepalanthus pseudoelongatus* Ruhland, detectando saponinas, antraquinonas, ácidos, fenóis, esteróides e flavonóides, distribuídos desigualmente nas duas espécies. No ano seguinte, os mesmos autores (Teixeira *et al.*, 1985) apresentaram um estudo químico de

hidrocarbonetos de *Leiothrix flavescens*, identificando uma mistura de *n*-alcanos com cadeias que variavam de 21 a 33 átomos de carbono.

Um trabalho envolvendo 19 espécies de Eriocaulaceae foi apresentado por Salatino *et al.* (1988). Os autores realizaram uma triagem buscando informações a respeito dos perfis de alcanos das ceras epicuticulares de capítulos de 4 espécies de *Leiothrix*, 9 de *Paepalanthus* e 5 de *Syngonanthus*. Tendo como base o comprimento da cadeia carbônica, os autores concluíram que *Leiothrix* apresenta cadeias mais curtas e *Syngonanthus* mais longas, ficando *Paepalanthus* em situação intermediária. Além disso, o trabalho forneceu indícios de que *Paepalanthus* aproxima-se mais de *Leiothrix*, uma vez que ambos os gêneros apresentam como um dos hidrocarbonetos principais o homólogo C₂₇, ao passo que o homólogo C₃₁ só está presente como alcano principal em *Syngonanthus*.

Salatino *et al.* (1990) realizaram um estudo envolvendo 86 espécies de 8 gêneros de Eriocaulaceae, determinando o teor de fenóis totais dos capítulos através de extração com etanol 70% e subsequente aplicação do método de Follin-Denis. Dentre os gêneros estudados, os que apresentaram teores mais baixos e menor variabilidade foram *Leiothrix* (0,2-1,4%), seguido por *Syngonanthus* (0,3-1,7%) e *Eriocaulon* (1,3-1,8%). Os maiores teores e a maior variabilidade foram obtidos com *Paepalanthus*, com valores entre 0,7-8,9%. Dentro de *Paepalanthus*, as espécies pertencentes a *Paepalanthus* subg. *Platycaulon* foram as que apresentaram os maiores teores (3,6-8,4%), enquanto que as de *Paepalanthus* subg. *Xeractis* apresentaram os menores teores (0,7-3,6%). Do ponto de vista evolutivo, segundo os autores, estes resultados apontam para uma posição basal de *Paepalanthus* e uma posição mais avançada de *Leiothrix*, pois os teores mais baixos de fenóis indicam maior simplificação química e grande variabilidade entre espécies é consistente com posições hierarquicamente menos evoluídas.

Uma série de trabalhos com flavonóides tem sido desenvolvida sob a orientação dos professores Antonio Salatino e Maria Luiza Salatino (IB-USP). Em um deles, Dokkedal e Salatino (1992) investigaram a presença desses metabólitos em folhas de 6 espécies de *Leiothrix* pertencentes a 3 subgêneros. A composição dessas espécies parece ser baseada principalmente em flavonas O- e C- glicosiladas. É interessante notar a ocorrência de luteolina C-glicosilada em todas as espécies avaliadas, uma vez que C-glicosídeos são de ocorrência muito mais restrita que os derivados O-glicosilados (Harborne & Mabry, 1982; Harborne, 1996). Ricci *et al.*

(1996), em seu estudo envolvendo 22 taxa de 4 seções de *Syngonanthus*, encontraram apenas O- e C- glicosídeos de flavonas, especialmente de luteolina. De acordo com os autores, este perfil flavonoídico aproxima *Syngonanthus* de *Leiothrix*, o que confirma a proposição de Ruhland (1903) e Giulietti *et al.* (1995). Ao nível de seção foi observado que derivados de 6-hidroxiluteolina (a maioria composta de diglicosídeos) ocorrem aparentemente apenas em espécies de *Syngonanthus* sect. *Carphocephalus* e *Syngonanthus* sect. *Dimorphocaulon*. Nestas seções, C-glicosídeos foram identificados raramente. Em espécies das outras duas seções, *Syngonanthus* sect. *Eulepis* e *Syngonanthus* sect. *Thysanocephalus* derivados de 6-hidroxiluteolina não foram detectados e C-glicosídeos predominaram, mais freqüentemente como derivados de luteolina. Desta forma, os resultados químicos sugeriram um realinhamento das seções do gênero, com a combinação, de um lado, de *Syngonanthus* sect. *Carphocephalus* e *Syngonanthus* sect. *Dimorphocaulon*, e de outro, *Syngonanthus* sect. *Eulepis* e *Syngonanthus* sect. *Thysanocephalus*. Esta observação está de acordo com evidências morfológicas e anatômicas discutidas por Scatena e Menezes (1995).

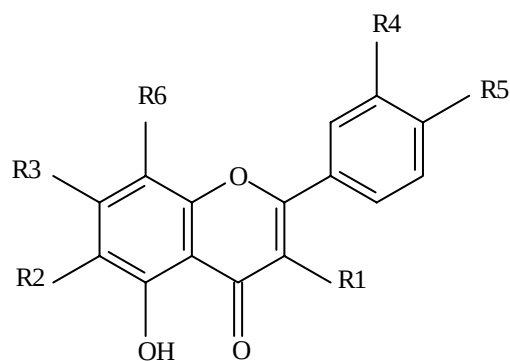
O grupo de Química de Produtos Naturais coordenado pelo Prof. Wagner Vilegas vem desenvolvendo trabalhos com Eriocaulaceae desde 1990, quando identificou, a partir de extrato clorofórmico de capítulos de *Paepalanthus bromelioides* Silveira, um metabólito não usual em planta, uma isocumarina, que foi denominada de paepalantina (Vilegas *et al.* 1990). Ensaio biológicos *in vitro* indicaram forte atividade antibiótica contra *Bacillus cereus* (7,5 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (7,5 µg/mL), *S. epidermidis* (15 µg/mL) e *Escherichia coli* (250 µg/mL). A partir desse trabalho, vários estudos com diferentes espécies de Eriocaulaceae, pertencentes a *Paepalanthus* e *Syngonanthus* vêm sendo realizados. Andrade (1997) estudando *P. vellozioides* isolou e identificou a paepalantina e o flavonóide nepetina; Santos (1997) estudando capítulos de *P. hilairei* Koern. isolou e identificou a paepalantina e flavonóides 6-metoxilados derivados do kaempferol e da quercetina; nos escapos encontrou flavonóis 6-hidroxilados derivados da quercetina. Nehme (1997) identificou, a partir de escapos de *P. bromelioides* e *P. latipes*, o flavonóide 5,6,3',4'-tetraidroxi-7-metoxiflavonol e a paepalantina, além dos ácidos ferúlico e caféico. Coelho *et al.* (1999 a, b) apresentaram dados de flavonóides de

Syngonanthus bisulcatus (Koern.) Ruhland, a partir de estudo de capítulos e escapos; os autores identificaram flavonas O- e C-glicosiladas.

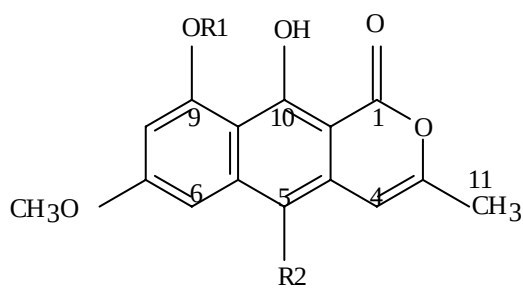
A taxonomia de Eriocaulaceae, graças às suas flores extremamente pequenas e delicadas e à morfologia vegetativa generalizada, é notoriamente difícil. Em *P.* subg. *Xeractis* esses problemas são complicados por uma pronunciada diferenciação local das populações e de padrões reticulados de variação. Dessa forma, trabalhos de campo, associados à análise minuciosa dos caracteres florais, assim como da anatomia floral têm se mostrado de grande utilidade. A química desse grupo certamente poderá contribuir para uma melhor compreensão do *taxon*.

Aliado ao estudo fitoquímico realizado com espécies de *Paepalanthus*, em especial de *P.* subg. *Xeractis* e *P.* subsect. *Aphorocaulon*, foi realizada análise abrangendo todas as informações a respeito da química de Eriocaulaceae obtidas até o momento pelo grupo de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica, coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas, a fim de contribuir para a discussão taxonômica de *Paepalanthus* e seus *taxa* infragenéricos, bem como sua posição na família.

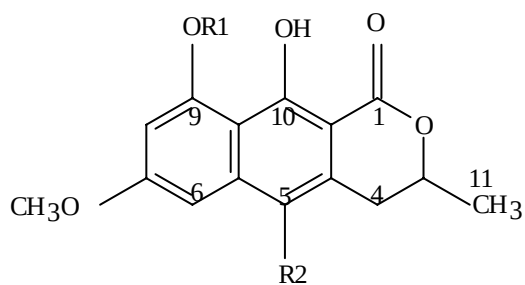
A numeração das substâncias isoladas durante o desenvolvimento desse trabalho seguirá aquela apresentada nas figuras abaixo, destacadas em azul; as em preto, são referentes à compilação do trabalho do grupo. Optamos por não apresentar todos os espectros obtidos de todas as substâncias identificadas, uma vez que alguns são constituintes muito conhecidos ou mesmo já publicados por nós. Assim, são apresentados os espectros de algumas substâncias, como exemplo da determinação estrutural realizada.



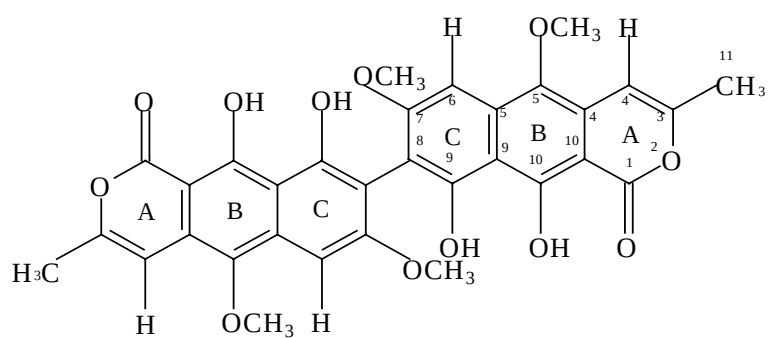
	R1	R2	R3	R4	R5	R6
1	H	OCH ₃	OH	OH	OH	H
2	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH	H
3	H	OCH ₃	O-glu	OCH ₃	OH	H
4	H	H	OH	OH	OH	H
5	H	OH	OH	OH	OH	H
6	H	OH	O-glu	OH	OH	H
7	H	-glu	OH	OH	OH	H
8	H	-glu	O-glu	OH	OH	H
9	OH	OCH ₃	OH	H	OH	H
10	O-glu	OCH ₃	OH	H	OH	H
11	O-glu- <i>p</i> - coum	OCH ₃	OH	H	OH	H
12	OH	OH	OH	OH	OH	H
13	OH	OH	O-glu	OH	OH	H
14	OH	OH	OH	OH	OH	OH
15	O-glu- <i>p</i> - coum	OCH ₃	OH	OH	OH	H
16	OH	OCH ₃	OH	OH	OH	H
17	O-glu	OCH ₃	OH	OH	OH	H
18	O-rut	OCH ₃	OH	OH	OH	H
19	O-glu- glu	OCH ₃	OH	OH	OH	H
20	OH	OH	OCH ₃	OH	OH	H
21	O-glu	OH	OCH ₃	OH	OH	H
22	OH	OH	OCH ₃	OH	O-glu	H
23	O-glu- glu	OH	OCH ₃	OH	OH	H
24	O-glu- rham	OH	OCH ₃	OH	OH	H
25	O-glu- glu- caff	OH	OCH ₃	OH	OH	H
26	OH	OCH ₃	O-glu	OCH ₃	OH	H



	R1	R2
27	H	OCH ₃
28	-glu	OCH ₃
29	-glu-allo	OCH ₃
34	-glu	H
35	-glu-glu	H
36	H	H
37	-glu-glu	OCH ₃



	R1	R2
31	-glu	H
32	-glu-glu	H
33	-allo-glu	H



III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção de Material Botânico

As espécies estudadas de *Paepalanthus* (*P. chlorocephalus* Silveira, *P. argenteus* var. *argenteus* (Bongard) Hensold, *P. macrocephalus* (Bongard) Koernicke, *P. denudatus* Koernicke, *P. vellozioides* Koernicke e *P. latipes* Silveira) foram coletadas entre fevereiro de 1995 e fevereiro de 1998, com o suporte do Prof. Dr. Paulo Takeo Sano, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Para todos os espécimens coletados foram confeccionadas exsicatas, que foram incluídas no Herbário SPF do IB/USP.

A identificação botânica foi realizada pela Dra Nancy Hensold (Field Museum, Chicago), especialista em *Paepalanthus* subg. *Xeractis*, e pelo Dr Paulo T. Sano, supra citado.

2. Preparo dos Extratos

O material botânico foi seco em estufa a 60°C e posteriormente triado para a separação de capítulos, escapos e folhas. Em seguida os mesmos foram pulverizados a fim de facilitar a extração de seus constituintes.

O pó obtido foi submetido ao processo de extração por maceração, ficando em contato com cada solvente orgânico por uma semana. Após cada extração o solvente foi filtrado em papel de filtro pregueado, concentrado sob pressão até à secura e pesado.

3. Fracionamento, isolamento e purificação

3.1 Cromatografia por permeação em gel (GPC)

O fracionamento através de cromatografia por permeação em gel foi realizado utilizando coluna de vidro de 1m x 3cm (d.i.), empacotada com sephadex LH-20 (Pharmacia). 1-2g de cada extrato foi dissolvido em metanol PA em banho ultrassônico por 15 minutos e em seguida centrifugado 2 vezes. O sobrenadante foi aplicado no topo da coluna de Sephadex LH-20 com uma pipeta. O solvente foi injetado na coluna por

meio de uma bomba peristáltica (Pharmacia) a um fluxo de 0,5ml/min. As frações, de 15ml cada, foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia).

3.2 Cromatografia em contracorrente por gotejamento (DCCC)

O fracionamento através de cromatografia em contracorrente por gotejamento foi efetuada em cromatógrafo Tokyo Rikakikai CO., equipado com 300 colunas de vidro 2mm (d.i.) X 400mm, conectadas através de tubos de teflon. O sistema de solventes utilizado foi preparado com CHCl_3 :MeOH:H₂O 43:37:20 (v:v:v), em funil de separação. A fase móvel utilizada foi a orgânica, no modo descendente. Após agitação a mistura ficou em repouso por 12 horas para a separação das fases, que foram separadas, obtendo-se aproximadamente 50% da fase orgânica e 50% da aquosa.

Para o fracionamento da amostra dissolveu-se 2g do extrato EtOH em 20ml do eluente, sendo 10ml da fase superior e 10ml da fase inferior. Inicialmente, as colunas do equipamento foram cheias com a fase superior do sistema de solventes, que atuou como fase estacionária. Injetou-se na sequência os 20ml da solução da amostra etanólica na câmara da amostra. Em seguida, bombeou-se a fase móvel (inferior) para a câmara em direção às colunas (modo descendente). Foram coletadas frações de 8ml cada.

3.3 Cromatografia em coluna de polivinilpolipirrolidona (PVPP)

A cromatografia em coluna utilizando PVPP (Sigma, P-6755) como adsorvente foi realizada após o fracionamento através de GPC ou DCCC, para isolamento e purificação das substâncias, utilizando colunas de vidro de diferentes diâmetros, de acordo com a necessidade. De modo geral, utilizou-se cerca de 1g de PVPP/mg de amostra. O solvente utilizado foi MeOH. Foram coletadas frações de 2,5ml cada.

3.4 Cromatografia em coluna com XAD2

A cromatografia em coluna de Amberlite XAD-2 (Aldrich, USA) foi realizada com 61g de extrato bruto dissolvido em 5L de H₂O. A amostra foi suspendida em água, deixada em banho ultrassônico por 10 minutos e filtrada em papel de filtro pregueado. Em seguida, a parte solúvel foi filtrada através de uma coluna de aproximadamente 40cm de altura X 3cm de diâmetro, com fluxo de aproximadamente 1ml/min. Após

eluição total do extrato, a coluna foi lavada com 1L de água destilada. Em seguida, foi eluída com 1L de metanol PA, para dessorção dos componentes. As frações aquosa e metanólica foram concentradas em rotaevaporador, transferidas para frascos e secadas completamente sob corrente de ar na capela. Foram feitas análise por TLC de cada uma das frações e, de modo geral, a fração metanólica mostrou ser mais rica nos componentes de interesse. Na fração aquosa restaram principalmente açúcares livres que não foram investigados.

3.5 Cromatografia em Camada Delgada (TLC)

As frações isoladas e purificadas foram analisadas através de TLC comparativa. As placas foram preparadas aplicando uma suspensão de sílica gel 60 G (Merck) em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v), sobre placas de vidro medindo 5cm x 20cm ou 20cm x 20cm, de espessura de adsorvente de 0,25mm. As placas foram ativadas em estufa a 120°C durante cerca de 30 min antes de sua utilização. Foram utilizadas também placas preparadas de sílica gel 60 (Merck), de tamanho de 20cm x 20cm e 0,2mm de espessura, com suporte de acetato ou vidro. A cromatografia foi realizada utilizando como solvente o mesmo sistema do DCCC (supra citado) ou BAW (*n*-BuOH:HOAc:H₂O, 6:1:2). A análise das frações foi realizada por comparação com amostras autênticas como padrão; as de mesmo R_f foram reunidas para serem analisadas por RMN e/ou ES-MS, se consideradas puras. As frações que apresentaram misturas sofreram novas etapas de purificação em coluna utilizando diferentes adsorventes, de acordo com a necessidade.

As placas foram inicialmente visualizadas sob luz UV (345nm) e depois submetidas à vaporização com vapores de iodo ou reagente NP/PEG (Wagner *et al.*, 1984). Nesse caso, as placas foram nebulizadas com mistura de 1% de difeniletilaminoborato em metanol (NP), acrescido de solução 5% de polietilenoglicol 2000 etanólico (PEG), 10ml e 8ml, repectivamente. A detecção dos flavonóides foi obtida imediatamente, ou após 15 min, sob luz UV de 345nm. As manchas apresentaram-se com fluorescência intensa, alaranjadas ou amareladas, dependendo da estrutura dos flavonóides.

4. Identificação através de métodos espectrométricos

4.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em espectrômetro Brucker AC-200 F, operando a 200MHz para o hidrogênio e 50 MHz para o carbono em um campo de 4,7 T. Os espectros foram registrados com amostras dissolvidas em DMSO-d₆, usando TMS como padrão interno. Foram também realizados experimentos de RMN utilizando um espectrômetro Brucker DRX-600 operando a 599.19MHz para o hidrogênio e 150.86MHz para o carbono. Nesses casos, o solvente utilizado para foi CD₃OD. Esses experimentos foram realizados na Universidade de Salerno, Itália, em colaboração com o Prof. Dr. Cosimo Pizza, a quem agradecemos.

4.2 Electrospray - Espectrometria de Massas (ES-MS)

As análises por espectrometria de massas foram realizadas em equipamento Fisions VG Platform de quadrupolo simples. As amostras foram transferidas para a fonte de electrospray através de uma bomba Rheo 4000 (Flux Instruments) com fluxo de 30µl/min, através de injetor Rheodine com “loop” de 1µl, quando por injeção direta e fluxo de 50µl/min, quando por HPLC. Foi utilizado nitrogênio como gás secante e também para nebulização, com fluxos de 250L/h e 17L/h, respectivamente. A temperatura de interface foi mantida a 70°C. A região analisada variou de m/z 100 a 1200 Da/e, sendo que foi tomada a medida dos sinais produzidos em 180s para produzir cada espectro de massas. Para a obtenção dos espectros no modo positivo foi usado ácido fórmico 1%.

4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

As análises cromatográficas utilizando HPLC - Electrospray – MS foram utilizadas em equipamento HPLC/UV Waters, provido de duas bombas do tipo pistão Waters 501, injetor de válvulas Waters U6K, detector UV/visível Waters 486 com comprimento de onda 254nm, integrador/registrator Waters 746 e coluna radial PAK Liquid Chromatography Cartridge (8mm d.i. x 10cm) – com partículas de 4µm. As

amostras foram injetadas com seringa Hamilton de 10µl. Os filtros utilizados para a purificação das amostras foram de membrana de celulose regenerada de 0,45µm Sartorius ou de membranas filtrantes de polietileno de 0,45µm Millex, conectada a uma seringa plástica.

4.4 Espectrometria no Infravermelho (IR)

Os espectros no infravermelho foram realizados em espectrômetro de Infravermelho FT-IR-Nicolet-IMACT-400 em pastilhas de KBr.

4.5 Espectrometria no Ultravioleta (UV)

Os espectro de UV foram registrados em espectrômetro Lambda 14 UV/VIS - Perkin Elmer. Os espectros foram obtidos em solução metanólica.

IV. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Estudo químico

1.1. *Paepalanthus denudatus* Koernicke

Os extratos de *P. denudatus* foram obtidos de acordo com a figura IV.1. 2g do extrato etanólico foram submetidos à GPC, como descrito no item anterior (III); as frações foram analisadas por TLC de sílica gel, utilizando como solvente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, fase inferior). As placas foram reveladas sob luz UV e nebulizadas com NP/PEG (ver item III).

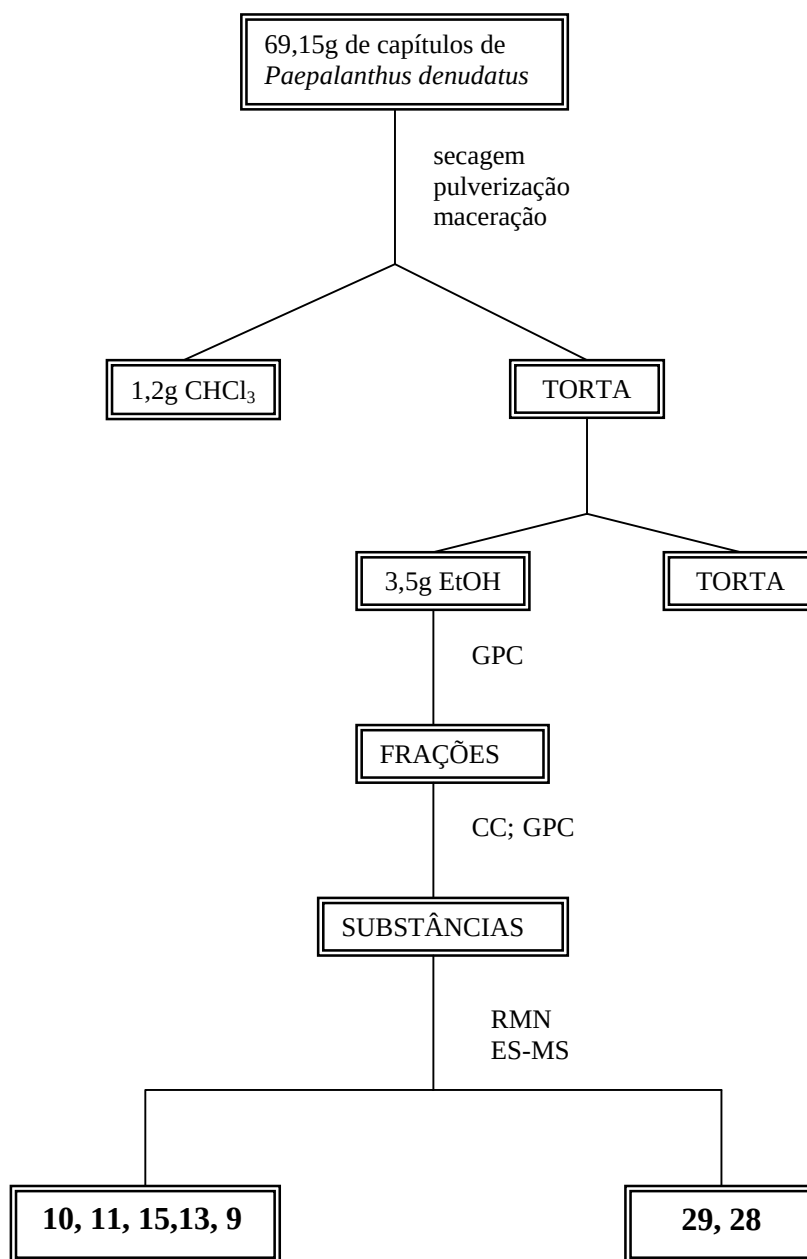


Fig. IV.1. Extração e fracionamento de capítulos de *P. denudatus*

A análise por TLC sob luz UV (345nm) seguida por revelação sob luz UV (345nm) antes e após utilização de reagente NP/PEG (Wagner *et al.*, 1984) indicou a presença de agliconas e glicosídeos de flavonóides, o que foi indicado por seus Rf's e manchas de coloração laranja ou amarela. Manchas azuis ou amarelo-esverdeadas detectadas sob luz UV indicaram a presença de naftopiranonas (Vilegas *et al.*, 1998, 1999a). Após isolamento das substâncias através de GPC ou de CC utilizando-se PVPP (item III), as estruturas das substâncias foram elucidadas através do uso combinado de técnicas de RMN em 200 MHz e espectrometria de massas (ES-MS). Para completa elucidação estrutural da substância **11** foi realizado experimento de RMN de correlação a longa distância, HMBC, em CD₃OD em 600MHz. Os valores de deslocamentos químicos de todos os prótons e carbonos foram assinalados e comparados com os da literatura (Harborne, 1994, 1996; Agrawal, 1989).

O espectro de RMN de ¹H da substância **11** (Fig. IV.2) apresenta um singlete (1H) de um grupo OH na posição 5 da aglicona, quelado à carbonila (12.7 δ). Dois dubletos em 7,98 δ (J = 8,0 Hz) e 6,85 δ (J = 8,0 Hz) são relativos ao anel B do flavonóide (Harborne, 1982). O singlete em 6,49 δ pode ser atribuído ao H8. Os outros dois dubletos em 6,78 δ (J = 8,0 Hz) e 7,37 δ (J = 8,0 Hz) são atribuídos a H3'''/H5''' e H2'''/H6''' da unidade *p*-cumaroil, respectivamente. Os dois dubletos em 6,14 δ e 7,35 δ (J = 16 Hz) são atribuídos ao Hα e Hβ da unidade *p*-cumaroil com estereoquímica *trans*, respectivamente. O dubleto em 5,43 δ (J = 7,0Hz) pode ser atribuído à unidade de D-glicose com configuração beta. O singlete em 3,70 δ (3H) é referente à metoxila (Harborne e Mabry, 1982).

No espectro de RMN de ¹³C da substância **11** (Fig. IV.3) 6 sinais podem ser atribuídos à uma unidade β-glucopiranosídica (Agrawaal, 1989). Outros 16 sinais são compatíveis com os do 6-metoxikaempferol (Agrawaal, 1989). Os outros 9 sinais são compatíveis com uma unidade *p*-cumaroil (Agrawaal, 1989). Os deslocamentos químicos de C2 (156,9 δ), C3 (132,8 δ) e C4 (177,8 δ) são compatíveis com a substituição pelo açúcar (glicose) na posição 3 (Agrawaal, 1989). O deslocamento químico do C6 da glicose (63,1 δ) mostra que esta é a posição do açúcar onde está ligada a unidade *p*-cumaroil (Agrawaal, 1989).

A atribuição de cada sinal foi feita baseada em espectros bidimensionais COSY ¹H/¹H (Fig. IV.4), espectro COSY ¹H/¹³C de correlação direta (Fig. IV.5), ambos em DMSO-d₆ em 200MHz e espectro de correlação a longa distância HMBC em CD₃OD

em 600MHz (Fig. IV.6). No espectro HMBC observa-se correlação entre o proton em 5,28 δ (H1-gli) com o C3 da aglicona (135,11 δ), bem como entre os protons em 4,36 δ (H6a-gli) e 4,24 δ (H6b-gli) com a carbonila da unidade *p*-cumaroil (169,18 δ), além das relações entre H e C vizinhos de toda a molécula.

O ES-MS de **11** (Fig IV.7) mostrou o íon pseudo-molecular $[M+H]^+$ em m/z 625, condizente com a fórmula molecular $C_{31}H_{28}O_4$. O aduto com sódio $[M+Na]^+$ e com potássio $[M+K]^+$ ocorreu respectivamente em m/z 647 e m/z 663. Observamos a aglicona protonada $[A+H]^+$ em m/z 317, assim como seu aduto com sódio $[A+Na]^+$ em m/z 339 e com potássio $[A+K]^+$ em m/z 335.

O espectro de UV exibiu λ em 320nm e 272nm, correspondentes às bandas I e II em MeOH.

Assim, **11** pôde ser identificado como sendo 6-metoxikaempferol-3-O- β -D-6''(E-*p*-cumaroil)glucopiranosídeo, uma substância relatada pela primeira vez na literatura pelo grupo (Andrade *et al.*, 1999. Anexo 1). Os deslocamentos químicos de RMN de 1H e ^{13}C desse e dos outros flavonóides isolados de *P. denudatus* são apresentados nas tabelas IV.1 e IV.2, respectivamente. Para as isocumarinas, os dados de 1H e ^{13}C são apresentados nas tabelas IV.3 e IV.4, respectivamente.

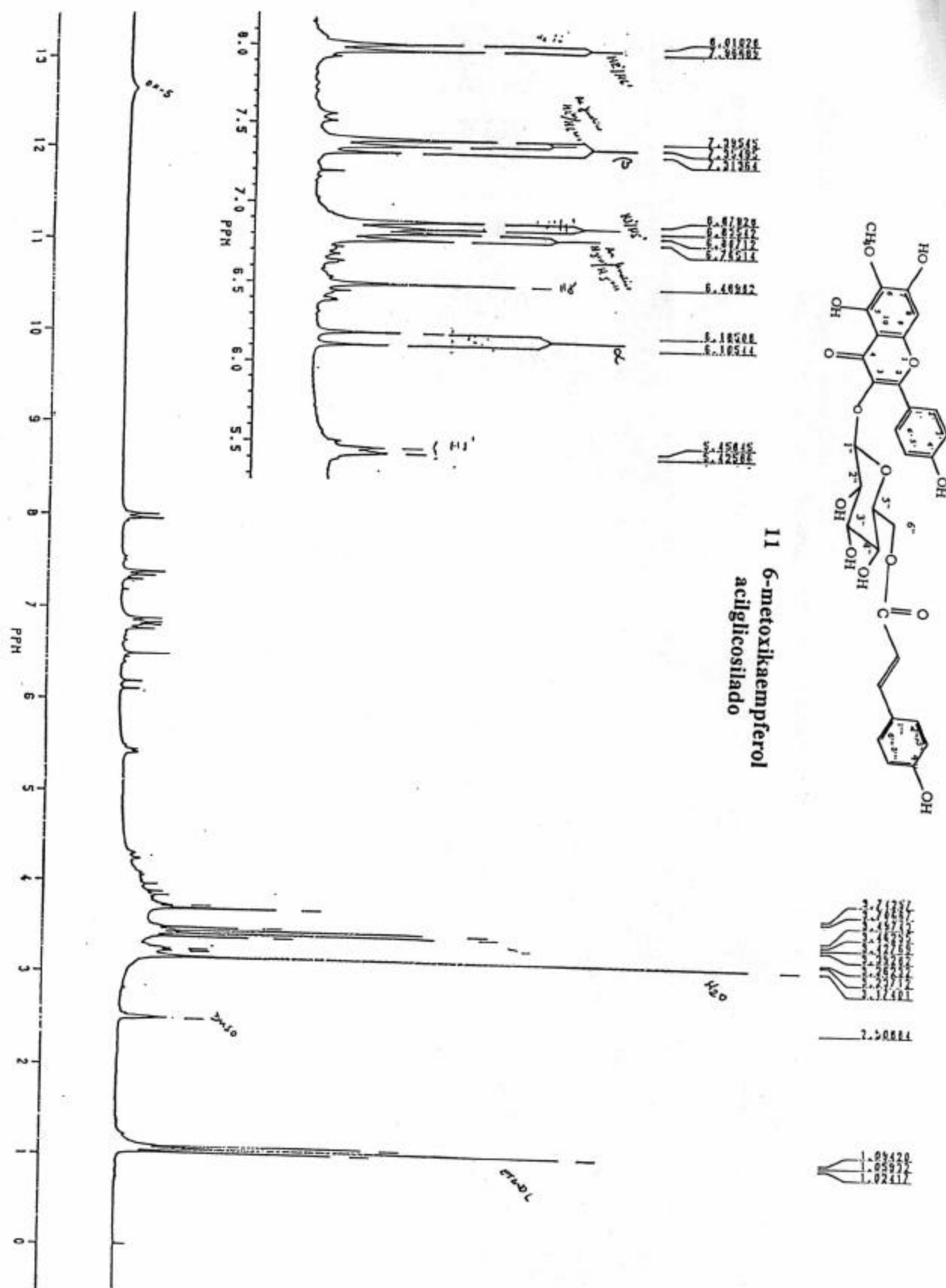


Figura IV.2 Espectro de RMN ¹H de 11 (200 MHz, DMSO-d₆, TMS, ppm).

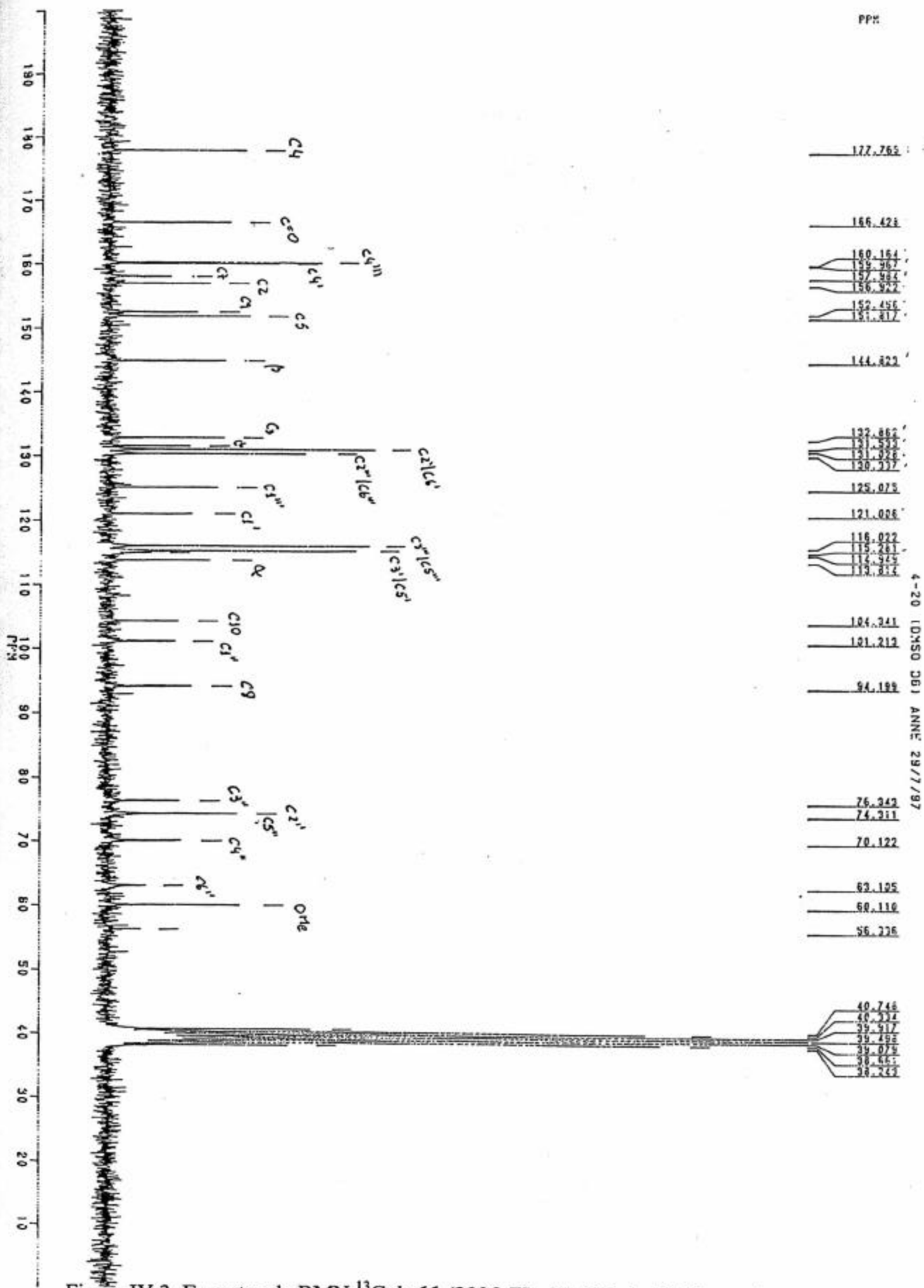


Figura IV.3. Espectro de RMN ^{13}C de **11** (200 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm)

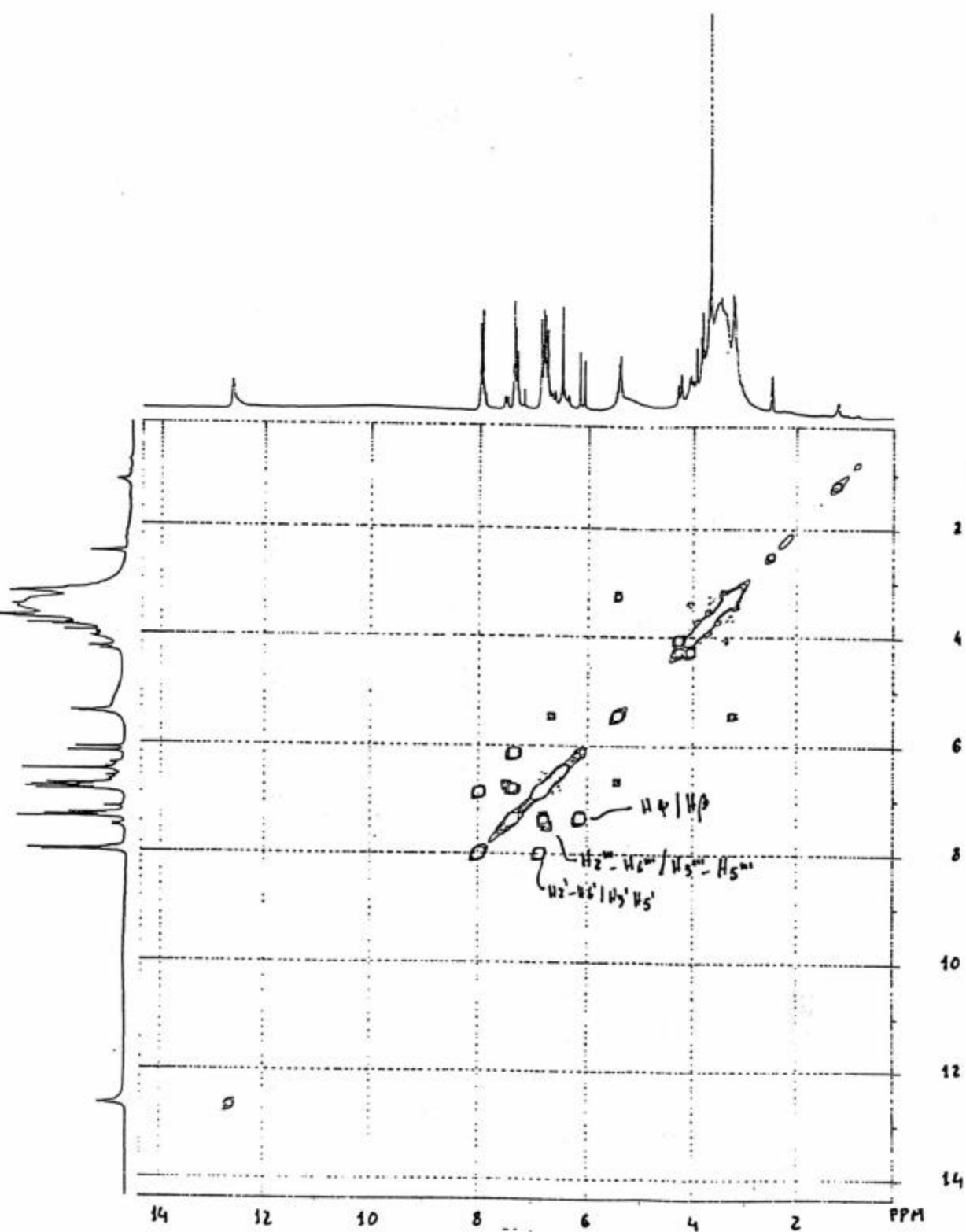


Figura IV.4. Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de 11 (200 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm)

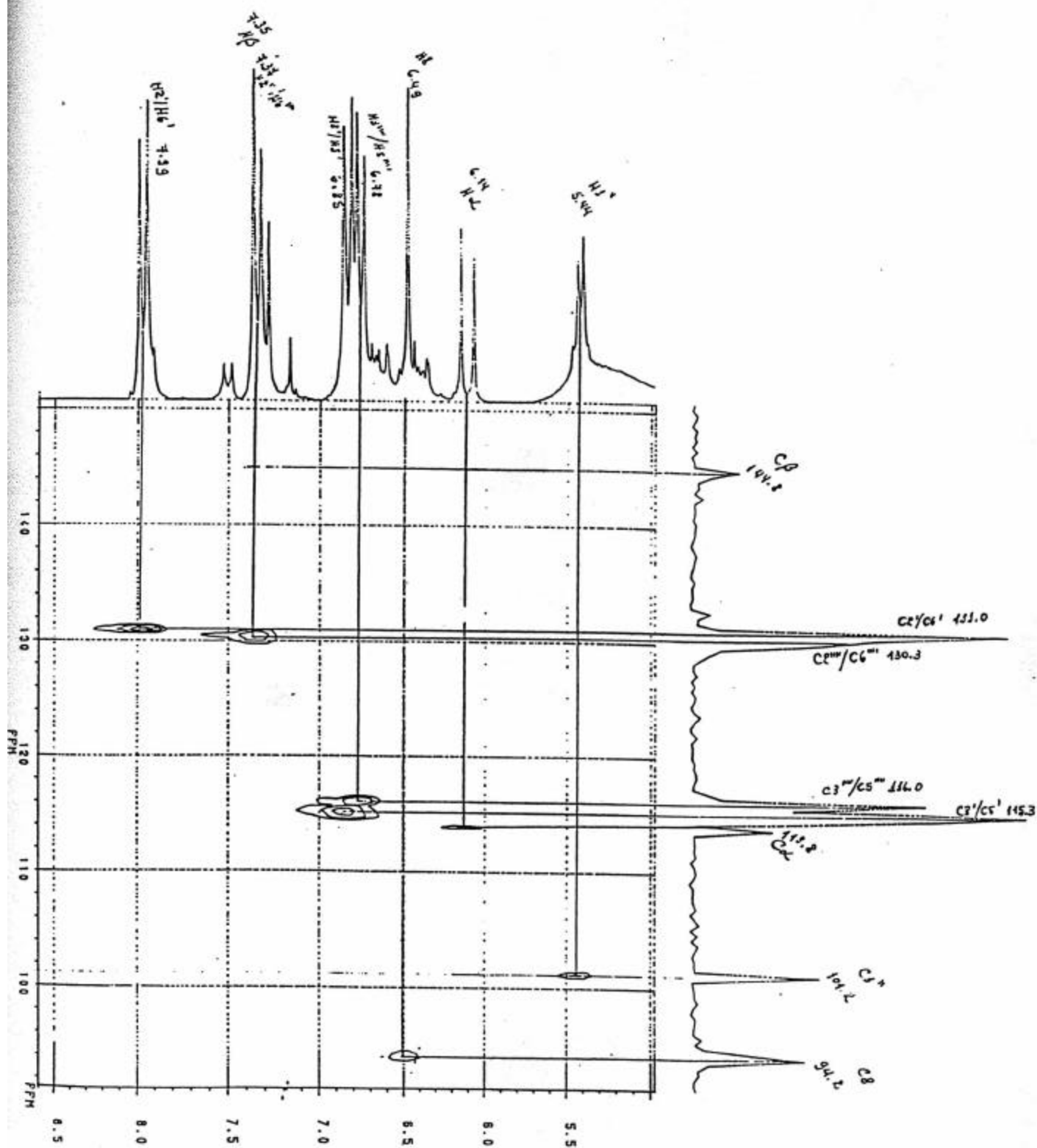
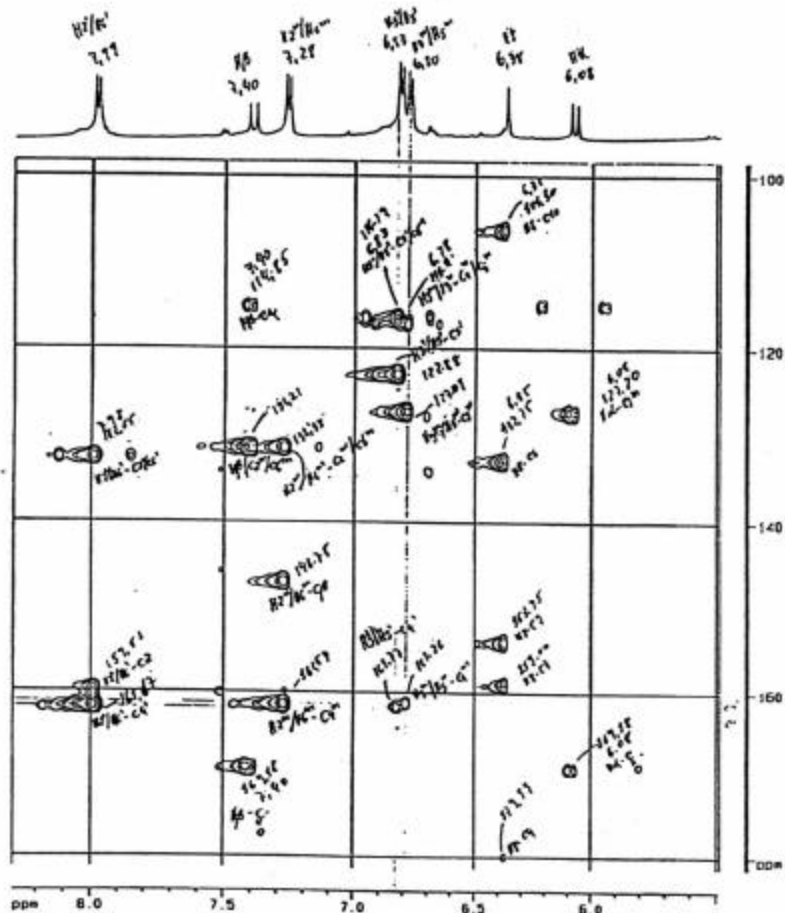
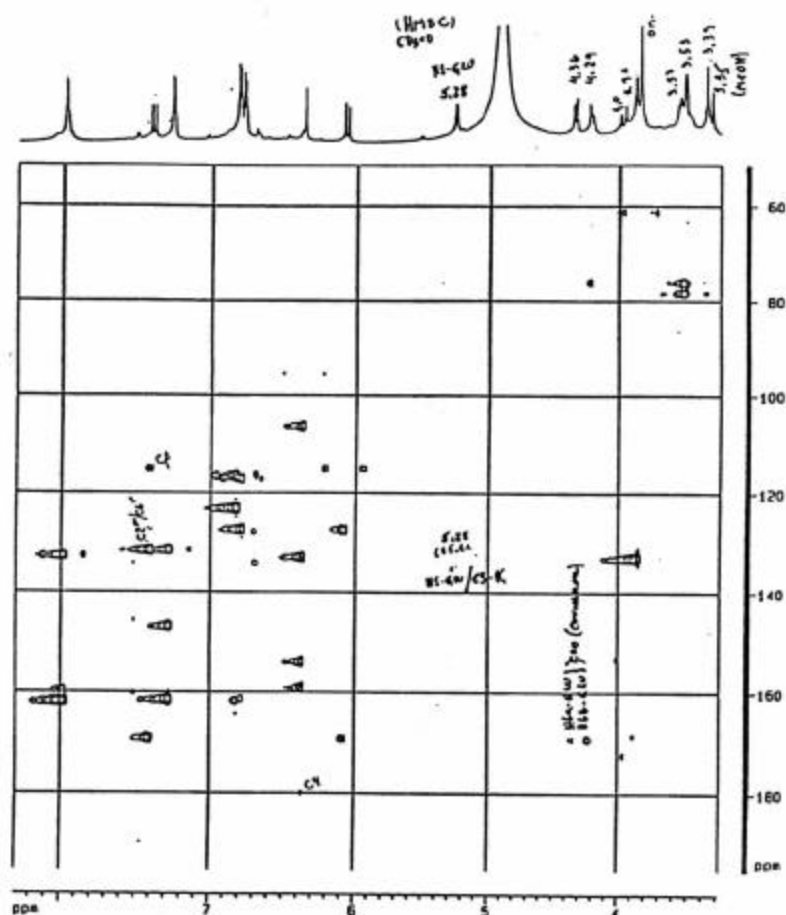


Figura IV.5. Espectro COSY $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ de correlação direta de **11** (200 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm)

Figura IV.6. Espectro HMBC de 11 (600MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

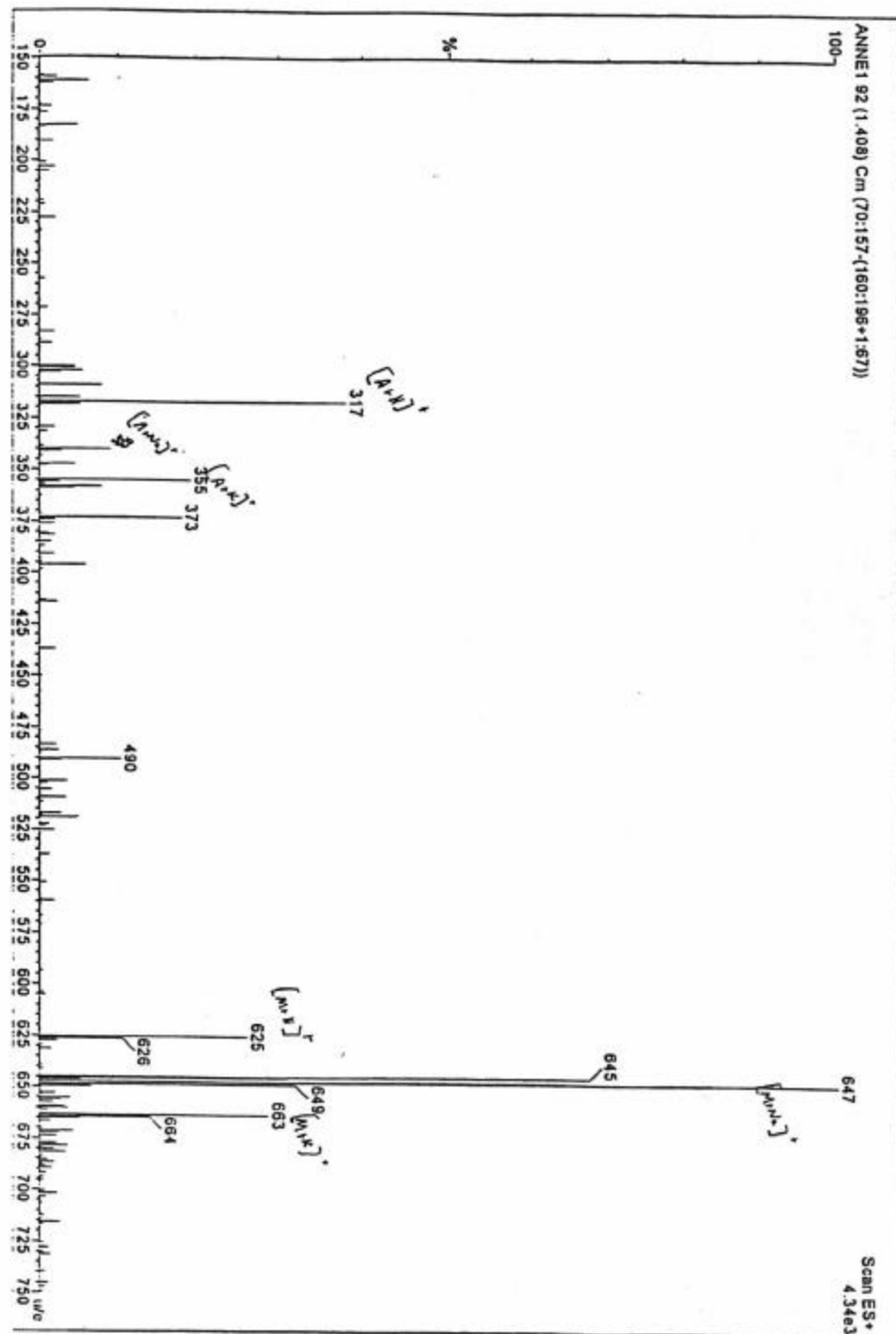


Figura IV.7. ES-MS de 11 (100V, PI).

Tabela IV.1 – Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H das substâncias identificadas nos capítulos de espécies de *Paepalanthus* (200 MHz, DMSO- D_6 , TMS)

1H	1	2	3	9	10	11	13	15	16
3	6,65 s	6,85 s	7,11						
8	6,54 s	6,59 s	7,01s	6,53 s	6,64 s	6,49 s	6,90 s	6,47 s	6,44 s
2'	7,38 s*	7,51 sl	7,64 sl *	8,00 d J=8,7 Hz	8,00d J=8,6 Hz	7,98 d J=8,0 Hz	7,68 d J=1,8 Hz	7,55 d J=2,0 Hz	7,71 sl
3'				6,90 d J=8,6 Hz	6,90 d J=8,6 Hz	6,85 d J=8,0 Hz			
5'	6,87 d J=8,2 Hz	6,91 d J=8,8Hz		6,90 d J=8,6 Hz	6,90d J=8,6 Hz	6,85 d J=8,0 Hz	6,85 d J=8,4 Hz	6,76 d J=8,0 Hz	6,83 d J=8,0 Hz
6'	7,40 d J=8,00 Hz	7,54 sl	7,64 d * J=7,2Hz	8,00 d J=8,7 Hz	8,00 d J=8,6 Hz	7,98 d J=8,0 Hz	7,52 dd J=8,0 e 2,0Hz	7,51 dd J=8,0 e 2,0 Hz	7,00d J=8,0 Hz
1''			5,18 d J=7,0Hz		5,41 d J=6,9 Hz	5,43 d J=7,0 Hz	4,99 d J=6,7 Hz	5,48 d J=7,0 Hz	
2'' a 6''*			3,0 e 4,0		3,0 e 4,0	3,0 e 4,0	3,0 e 4,0	3,0 e 4,0	
OMe-6	3,73 s	3,73s		3,73 s	3,73 s	3,70 s		3,69 s	3,89 s
OMe-3		3,87s							
α						6,14 d J=16,0 Hz		6,15 d J=16,0 Hz	
β						7,35 d J=16 Hz		7,33 d J=16,0 Hz	
2'''						7,37 d J=8,0 Hz		7,35 d J=8,0 Hz	
3'''						6,78 d J=8,0 Hz		6,83 d J=8,0 Hz	
5'''						6,78 d J=8,0 Hz		6,83 d J=8,0 Hz	
6'''						7,37 d J=8,0 Hz		7,35 d J=8,0 Hz	

* sinais sobrepostos; s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto; sl - singleto largo

Tabela IV.2 – Deslocamentos químicos (ppm) de RMN de ^{13}C das substâncias identificadas nos capítulos de espécies de *Paepalanthus* (200 MHz, DMSO- D_6).

^{13}C	1	2	3	9	10	11	15	16
2	164	163,7	164,3	147,1	156,6	156,9	156,6	147,1
3	102,4	102,7	103,1	135,4	132,9	132,8	132,7	135,4
4	182,1	182,2	182,4	176,2	177,8	177,8	177,6	176,0
5	152,8	152,8	152,5	151,8	152,4	151,8	151,5	151,7
6	131,4	131,4	132,6	130,9	131,3	131,5	131,3	130,9
7	157,3	157,3	156,6	157,3	157,7	157,9	157,4	157,7
8	94,2	94,4	94,6	93,9	94,1	94,2	93,8	93,7
9	152,4	152,4	152,1	151,5	151,6	152,4	152,4	151,4
10	104,1	104,1	105,8	103,4	104,4	104,3	104,3	103,3
1'	121,6	121,6	121,5	121,8	120,9	121,0	121,2	122,0
2'	113,4	110,2	110,3	129,6	130,9	131,0	116,2	115,1
3'	145,8	150,8	151,0	115,6	115,3	115,3	144,6	145,1
4'	149,7	148,0	148,0	159,3	160,2	159,9	148,5	147,8
5'	116,1	115,8	115,8	115,6	115,3	115,3	115,2	115,7
6'	119,0	120,4	120,6	129,6	130,9	131,0	121,6	120,0
1''			100,4		101,0	101,2	100,8	
2''			73,3		74,3	74,3	74,0	
3''			77,5		77,5	76,3	76,3	
4''			69,7		69,9	70,1	69,9	
5''			76,8		76,5	74,3	74,2	
6''			60,7		60,8	63,1	63,1	
α						113,8	113,7	
β						144,8	144,9	
C=O						166,4	166,4	
1'''						125,0	124,9	
2'''						130,3	130,2	
3'''						116,0	115,9	
4'''						160,1	159,8	
5'''						116,0	115,9	
6'''						130,3	130,2	
OMe – 6	60,0	60,0	60,4	60,1	60,1	60,1	59,9	60,0
OMe - 3'		56,0	56,0					

Tabela IV.3. Deslocamentos químicos de ^1H das isocumarinas identificadas nos capítulos e folhas das espécies de *Paepalanthus* (200MHz, DMSO- d_6 , TMS; * 600 MHz, CD_3OD).

^1H	28	29	31*	32*	33*
3			4,76 m	4,81 m	4,76 m
4a	6,64 s	6,64 s	2,97 dd J=11,4 e 16,2Hz	3,0 dd J=11,4 e 16,2Hz	3,07 dd J=11,4 e 16,0Hz
4b			3,11 dd J=2,6 e 16,2Hz	3,10 dd J=2,6 e 16,2Hz	2,91 dd J=2,6 e 16,0Hz
5			6,99 s	7,05 s	6,96 s
6	6,86 d J=2,5 Hz	6,94 d J=2,5 Hz	6,87 d J=1,5 Hz	6,90 d J=1,5 Hz	6,81 d J=1,5 Hz
8	6,96 d J=2,5 Hz	6,86 d J=2,5 Hz	7,04 d J=1,5Hz	7,05 d J=1,5 Hz	6,97 d J=1,5 Hz
11	2,25	2,22	1,53 d J=6,1 Hz	1,53 d J=6,1 Hz	1,53 d J=6,1 Hz
Glicose					
1'	5,10 d J=7,5 Hz	4,98 d J=7,9 Hz	5,01 d J= 7,5 Hz	5,06 d J=7,5 Hz	5,03 d J=7,5 Hz
2'	3,3 – 3,9 Hz#	3,42 dd J=7,9; 9,0 Hz	3,67 dd J=7,5; 9,0Hz	3,68 dd J=7,5; 9,0Hz	3,70 dd J=7,9; 9,0Hz
3'	3,3 – 3,9 Hz#	3,30 dd J=9,0; 9,0 Hz	3,55 dd J=9,0; 9,0Hz	3,56 dd J=9,0; 9,0Hz	3,59 dd J=9,0; 9,0Hz
4'	3,3 – 3,9 Hz#	3,26 dd J=9,0; 9,0 Hz	3,47 dd J=9,0; 9,0Hz	3,48 dd J=9,0; 9,0Hz	3,55 dd J=9,0; 9,0Hz
5'	3,3 – 3,9 Hz#	3,65 m	3,55 m	3,84 m	3,84 m
6a'	3,3 – 3,9 Hz#	4,02 dd J=2,5; 11,0 Hz	3,77 dd J=5,0; 11,0Hz	3,90 dd J=5,0; 11,4Hz	3,91 dd J=5,0; 11,4Hz
6b'			3,98 dd J=2,5; 11Hz	4,22 dd J=2,5; 11,4Hz	4,26 dd J=2,5; 11,4Hz
Glicose					
1''				4,41 d J=7,9 Hz	
2''				3,29 dd J=7,9; 9,0Hz	
3''				3,35 dd J=9,0; 9,0Hz	
4''				3,39 dd J=9,0; 9,0Hz	
5''				3,29 m	
6a''				3,68 dd J=5,0; 11,4Hz	
6b''				3,90 dd J=2,5; 11,4Hz	
Alose					
1'''		4,51 d J=7,4 Hz			4,78 d J=7,4 Hz
2'''		3,16 dd J=7,4; 2,5 Hz			3,45 dd J=2,8; 7,4Hz
3'''		3,83 dd J=2,5; 4,0 Hz			4,13 dd J=2,8; 2,8Hz
4'''		3,28 dd J=4,0; 9,2 Hz			3,55 dd J=2,8; 9,2Hz
5'''		3,49 m			3,76 m
6a'''		3,64 dd J= 3,0; 12,0 Hz			3,69 dd J=5,0; 12,0Hz
6b'''					3,89 dd J=3,0; 12,0Hz
OMe-5	3,79 s	3,77 s			
OMe-7	3,92 s	3,90 s	3,93 s	3,95 s	3,93 s
OH-10	12,48 s	12,47 s			

s = singleto, d = dubleto, dd = duplo dubleto, m = multipeto, # = sinais sobrepostos

Tabela IV.4. Deslocamentos químicos de ^{13}C das isocumarinas identificadas nos capítulos e folhas de espécies de *Paepalanthus* (200MHz, DMSO- d_6 , TMS; * 600 MHz, CD_3OD).

^{13}C	28	29	31*	32*	33*
1	166,6	166,9	172,8	172,8	172,8
3	152,8	152,4	77,3	77,3	77,3
4	98,5	98,3	35,0	35,0	35,3
4a	123,1	123,3	136,0	136,0	135,9
5	138,8	139,0	116,9	116,8	117,0
5a	135,7	135,9	142,2	142,0	142,4
6	94,5	94,8	102,0	102,0	102,2
7	161,7	161,3	163,0	163,0	162,8
8	101,9	102,2	104,6	104,8	104,5
9	158,4	158,4	159,4	159,4	159,0
9a	109,7	109,8	111,2	111,0	111,2
10	159,4	159,6	163,8	163,9	163,9
10a	97,4	97,5	102,0	102,0	101,9
11	18,9	19,0	20,9	20,9	20,9
Glicose					
1'	101,1	101,0	103,6	103,5	103,5
2'	73,4	73,6	74,8	74,8	74,9
3'	77,3	76,4	77,4	77,2	77,1
4'	69,7	69,7	71,4	71,4	71,2
5'	76,4	75,6	78,2	77,3	77,1
6'	60,7	68,8	62,9	70,2	69,9
Glicose					
1"				104,6	
2"				75,0	
3"				77,4	
4"				71,8	
5"				77,8	
6"				62,6	
Alose					
1''		101,6			102,5
2''		70,6			72,1
3''		71,4			72,6
4''		67,5			68,6
5''		74,5			75,3
6''		61,3			62,7
OMe - 5	61,6	61,3			
OMe - 7	55,4	55,4	56,1	56,1	55,9

1.2. *Paepalanthus chlorocephalus* Silveira

O extrato etanólico de *P. chlorocephalus* sofreu fracionamento por DCCC, de acordo com a figura IV.8, uma vez que trata-se de técnica adequada para a separação de constituintes polares (Hostettmann *et al.*, 1986). De acordo com a metodologia já descrita (item III, 3.2) coletou-se 304 frações de cerca de 8 ml cada. As amostras obtidas em quantidades suficientes (**1** e **16**) foram analisadas através de RMN (tabelas IV.1 e IV.2).

O espectro de RMN de ^1H da fração **1** (Fig. IV.9, tab. IV.1) apresenta sinais de prótons ligados ao anel aromático B: o dubleto em 7,38 δ ($J = 1,9$ Hz) refere-se ao acoplamento *meta* de H2' com o H6'; o duplo dubleto em 7,40 δ ($J = 8,0$ Hz e indeterminado) sugere o acoplamento *orto* referente ao H6' com o H5' e o *meta* referente ao H6' com H2'; em 6,87 δ ($J = 8,0$ Hz), o acoplamento *orto* referente ao H5' com o H6'. O singlete em 6,54 δ corresponde ao H8 do anel A; um outro singlete em 6,65 δ deve corresponder ao H3, indicando que esse composto trata-se de uma flavona (Harborne e Mabry, 1982). O sinal em 13,07 δ refere-se à hidroxila na posição 5, e em 3,73, δ encontra-se o sinal indicando metoxila em 6. A ausência de sinais entre 4,0 e 5,0 ppm, região do próton anomérico, indica que este composto trata-se de uma aglicona.

No espectro de RMN de ^{13}C (Fig. IV.10, tab. IV. 2) observam-se sinais de carbonila em 182,1 δ , característico de flavona (Harborne e Mabry, 1982, Markham, 1982). Observa-se também o sinal da metoxila em 60,0 δ , indicando que esta se encontra no C6. O sinal de C2 em 164 δ sugere que a posição 3 não possui hidroxila, reforçando tratar-se de flavona (Agrawaal, 1989). Os sinais de C3' e C4' em 145,8 δ e 149,7 δ , respectivamente, indicam tratar-se de derivados O-di-OH no anel B, portanto um derivado de luteolina. Assim podemos sugerir que a fração **1** é uma nepetina, ou seja, 6-metoxiluteolina.

A fração **16** foi identificada de modo similar (tabelas IV.1 e IV.2), como sendo a 6-metoxiquercetina, ou patuletina (Harborne, 1994, Agrawaal, 1989).

Uma outra etapa realizada foi a análise do extrato etanólico por cromatografia de sephadex LH-20; uma alíquota de 2g do extrato etanólico foi submetida à essa técnica, utilizando MeOH como solvente. O objetivo foi o de comparar a eficiência desse

método de isolamento com o de DCCC. Foram coletadas 20 frações, as quais foram analisadas por TLC, seguida de RMN. Além das substâncias identificadas a partir do DCCC foi identificada a substância **9**, 6-metoxikaempferol.

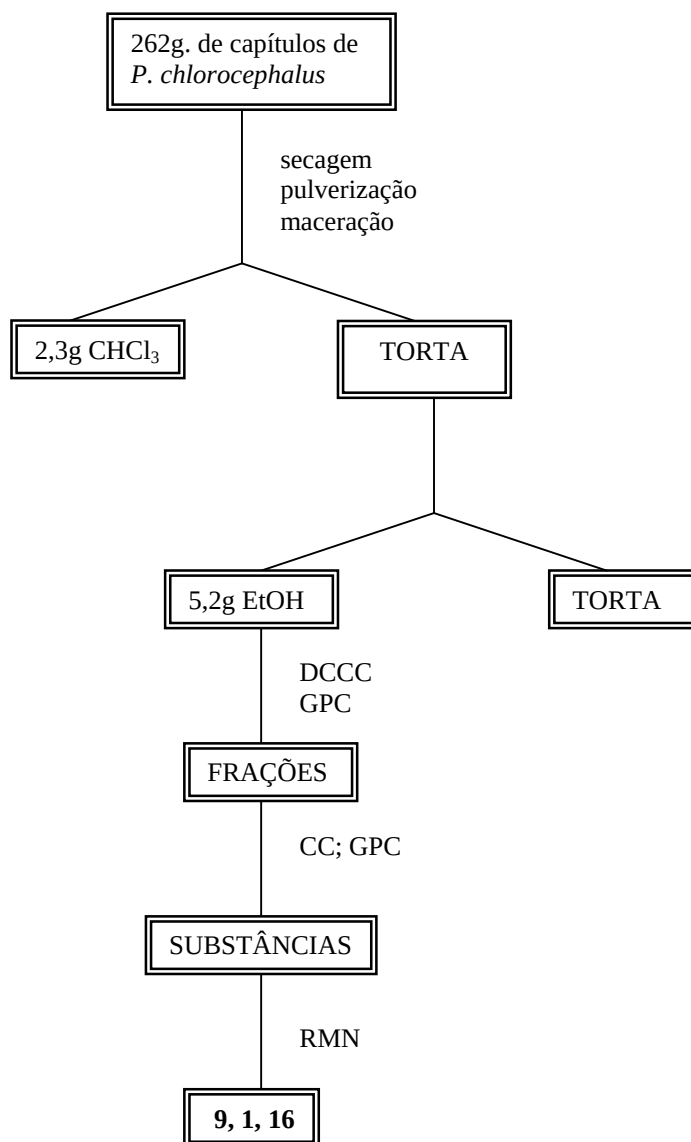
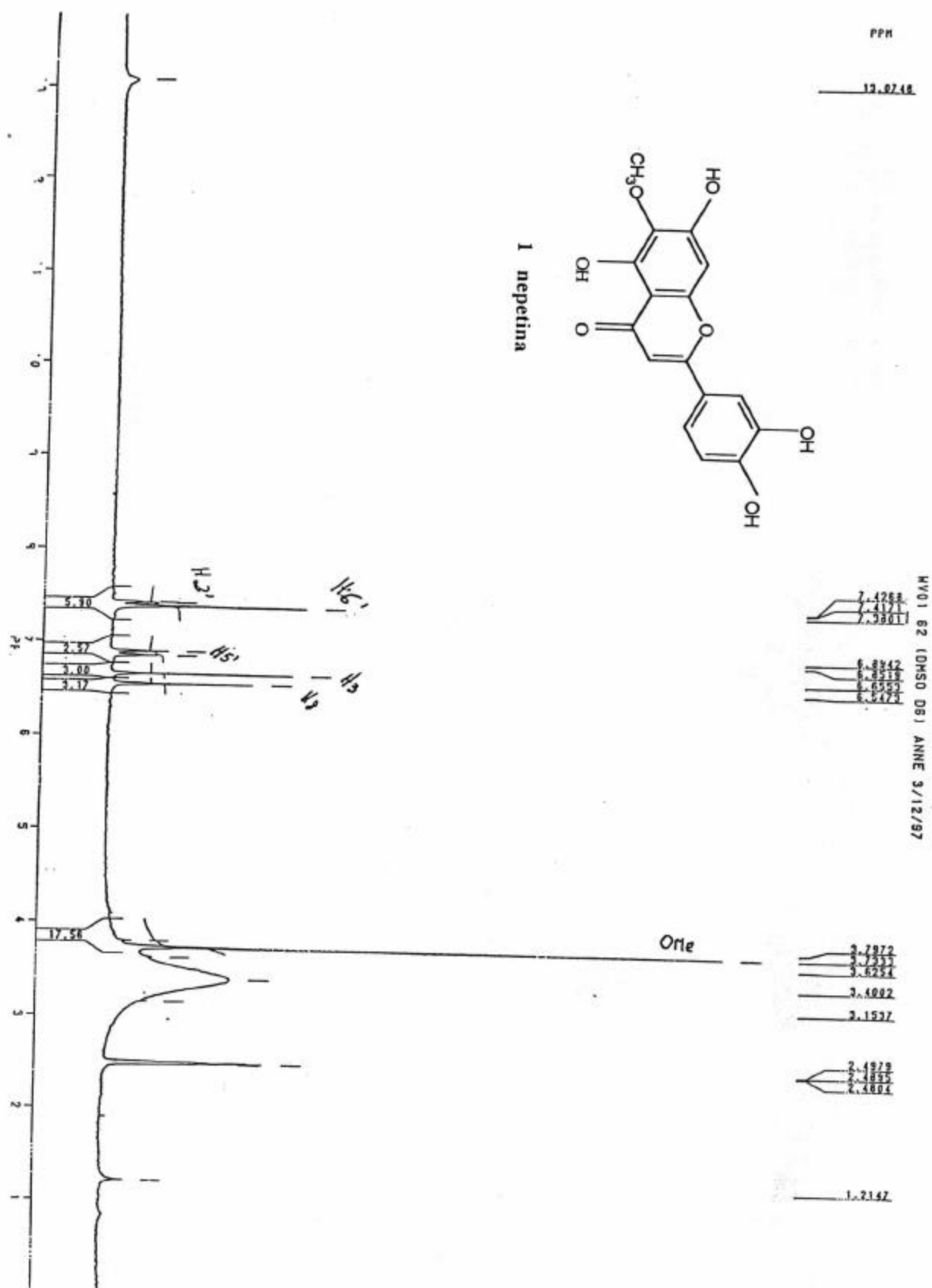
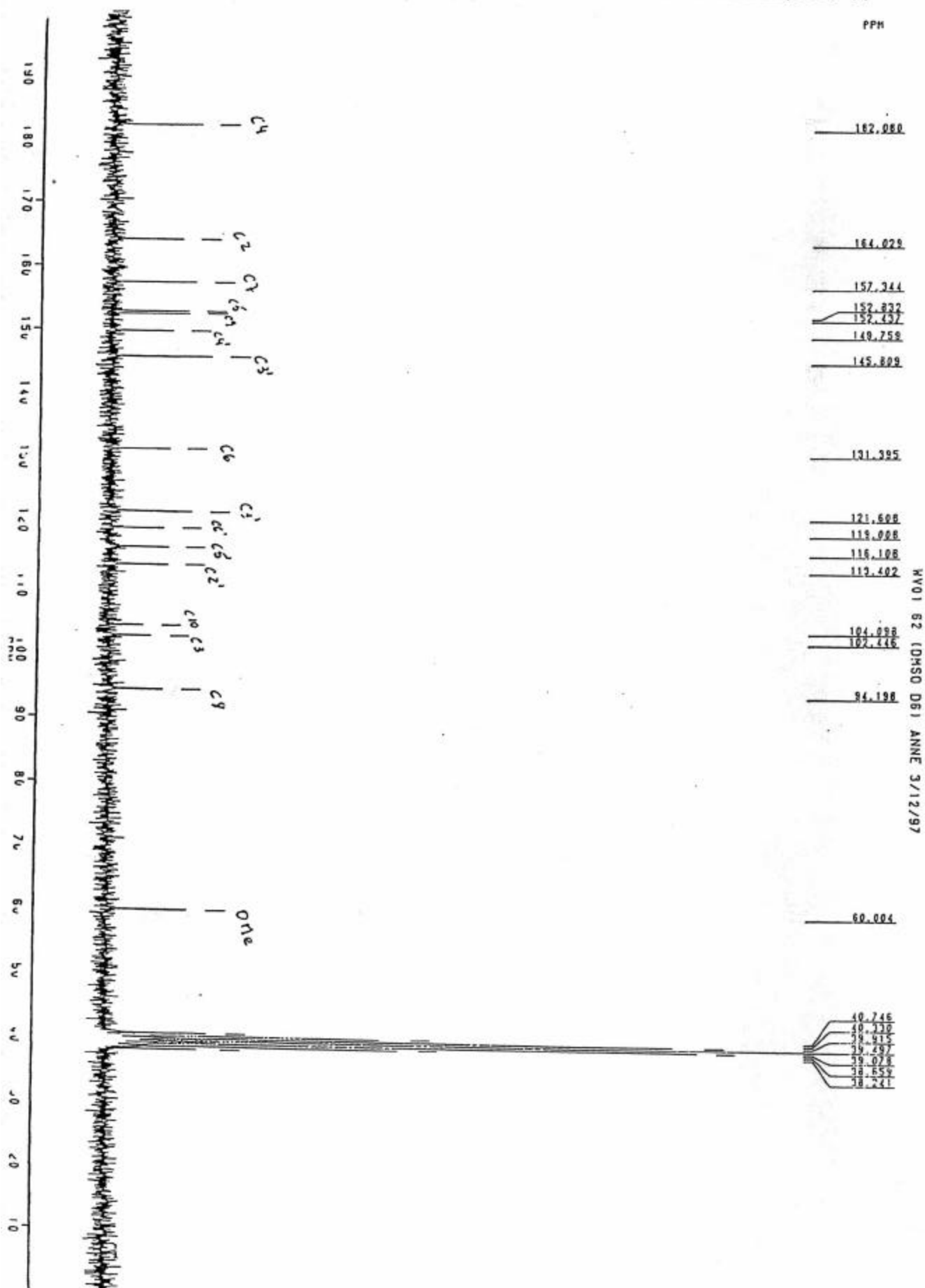


Figura IV.8. Extração e fracionamento de capítulos de *Paepalanthus chlorocephalus*.



Figura IV.10. Espectro de RMN ¹³C de 1 (200MHz, DMSO-d₆, TMS, ppm)

1.3. *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus* (Bong.) Hensold

Para essa espécie foram estudados dois espécimens separadamente, SANO 920 e SANO 812, já que o estudo fitoquímico foi realizado antes da identificação botânica e não foi possível distinguir as espécies. O que se verificou foi a confirmação do perfil, e portanto, a reprodutibilidade do estudo. Em ambos os espécimens foram identificadas as mesmas substâncias.

2g do extrato etanólico obtido de acordo com o procedimento apresentado na figura IV.11 foi submetido à GPC, utilizando MeOH como eluente. As frações coletadas foram submetidas à TLC de sílica gel (item III), utilizando como sistema de solventes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (43:37:20, fase inferior). Foram eluídas 172 frações de SANO 920 e 137 de SANO 812.

As placas foram visualizadas sob luz UV e reveladas com vapores de iodo. As amostras de mesmo R_f foram reunidas e, quando necessário, submetidas a novas etapas de isolamento e purificação, em CC, utilizando diferentes adsorventes (PVPP, celulose) e diferentes sistemas de solventes (BAW, HOAc 15%).

As amostras que apresentaram apenas uma mancha em TLC após revelação com vapores de iodo foram analisadas por RMN de ^1H e/ou ^{13}C . Para as amostras com massa insuficiente para análise utilizando RMN, foram realizados experimentos de HPLC-MS.

O espectro de RMN de ^1H de **2** (Fig. IV.12, Tab. IV.1) mostra 2 singletos (3H) em 3,87 δ e 3,73 δ referentes a duas metoxilas; observa-se um singlete em 6,59 δ e outro em 6,85 δ , referentes a H8 e H3, respectivamente (Harborne, 1996); um dubleto em 6,91 δ de $J = 8,8$ Hz é referente ao acoplamento *orto* do H5' com o H6', no anel B; os sinais em 7,54 δ e 7,51 δ , sobrepostos, referem-se a H2' e H6'. O sinal em 13,06 δ sugere que a OH em 5 esteja quelada à carbonila.

O espectro de RMN de ^{13}C (Fig. IV.13, Tab. IV.2) apresenta 15 sinais referentes à unidade de flavonóide mais 2 sinais de metoxila. A carbonila apresenta deslocamento químico em 182,2 δ , característico de flavona (Harborne e Mabry, 1982; Agrawal, 1989). O sinal da metoxila em 60 δ indica sua posição em C6; a outra metoxila, em 55,9 δ sugere que sua posição seja no anel B, provavelmente em 3'. O sinal de C2 em 163,78 δ sugere que a posição 3 não possui hidroxila, reforçando tratar-se de uma flavona (Agrawal, 1989). Comparando o espectro de RMN de ^{13}C desta substância com a

literatura (Agrawal, 1989) podemos sugerir que trata-se da jaceosidina, ou seja, 6-3'-dimetoxiluteolina.

A figura IV.14 mostra um DEPT 135 da jaceosidina, que confirma as posições de CH, de acordo com a estrutura proposta; os espectros COSY ^1H - ^1H (Fig. IV.15) e CHCORR (Fig. IV.16) forneceram a completa atribuição de sinais.

A substância **3** apresenta em seus espectros de RMN de ^1H e ^{13}C (tabelas IV.1 e IV.2) os mesmos sinais da aglicona **2**, acrescidos de sinais de uma unidade de glicose. No espectro de RMN ^1H podemos observar o sinal do próton anomérico em 5,18 δ ; o açúcar deve estar na posição 7, uma vez que houve uma desproteção do H8, passando de 6,59 δ em **2** para 7,11 δ em **3** (Harborne, 1996). No espectro de RMN ^{13}C podemos observar sinais de açúcar na região entre 60,74 δ e 77,46 δ .

A substância **16** foi identificada por comparação com os dados anteriormente obtidos (tabelas IV.1 e IV.2) e por comparação com os dados da literatura.

As substâncias **31**, **35** e **37** estavam contidas numa mesma fração em pequena quantidade de massa e assim, foram analisadas através de HPLC-MS (coluna RP 18 Supelcosil, 25cmX2,1mmX5 μm ; MeCN, 100 μl /min.).

Na tabela IV.5a são apresentados os dados dos principais fragmentos obtidos através de ES-MS para as substâncias **31**, **35** e **37**. O cromatograma da figura IV.17 mostra o TIC e os espectros de massas das moléculas.

Tabela IV.5a. Principais fragmentos obtidos através de HPLC-MS do extrato de *P. argenteus* var. *argenteus*

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	PRINCIPAIS FRAGMENTOS	SUBSTÂNCIA PROPOSTA
0.655	m/z 597 – $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 619 – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 435 – $[\text{M-gli}]^+$ m/z 273 – $[\text{A}+\text{H}]^+$	5-desmetoxipaepalantina -9-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)glucopiranosídeo (35)
1.355	m/z 627 – $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 650 – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 465 – $[\text{M-gli}]^+$ m/z 303 – $[\text{A}+\text{H}]^+$	paepalantina -9-O- β -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)glucopiranosídeo (37)
3.350	m/z 437 – $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 459 – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 275 – $[\text{A}+\text{H}]^+$	5-desmetoxi-3,4-diidropaepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo (31)

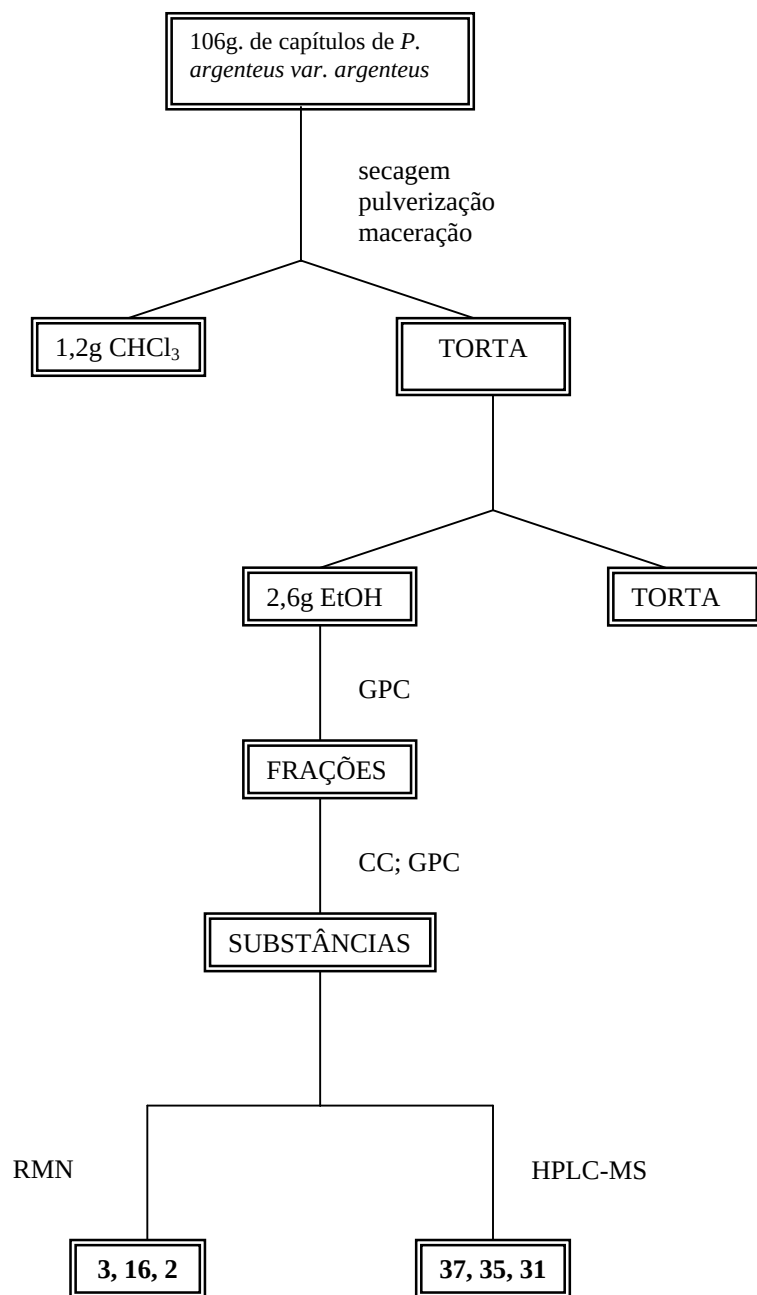
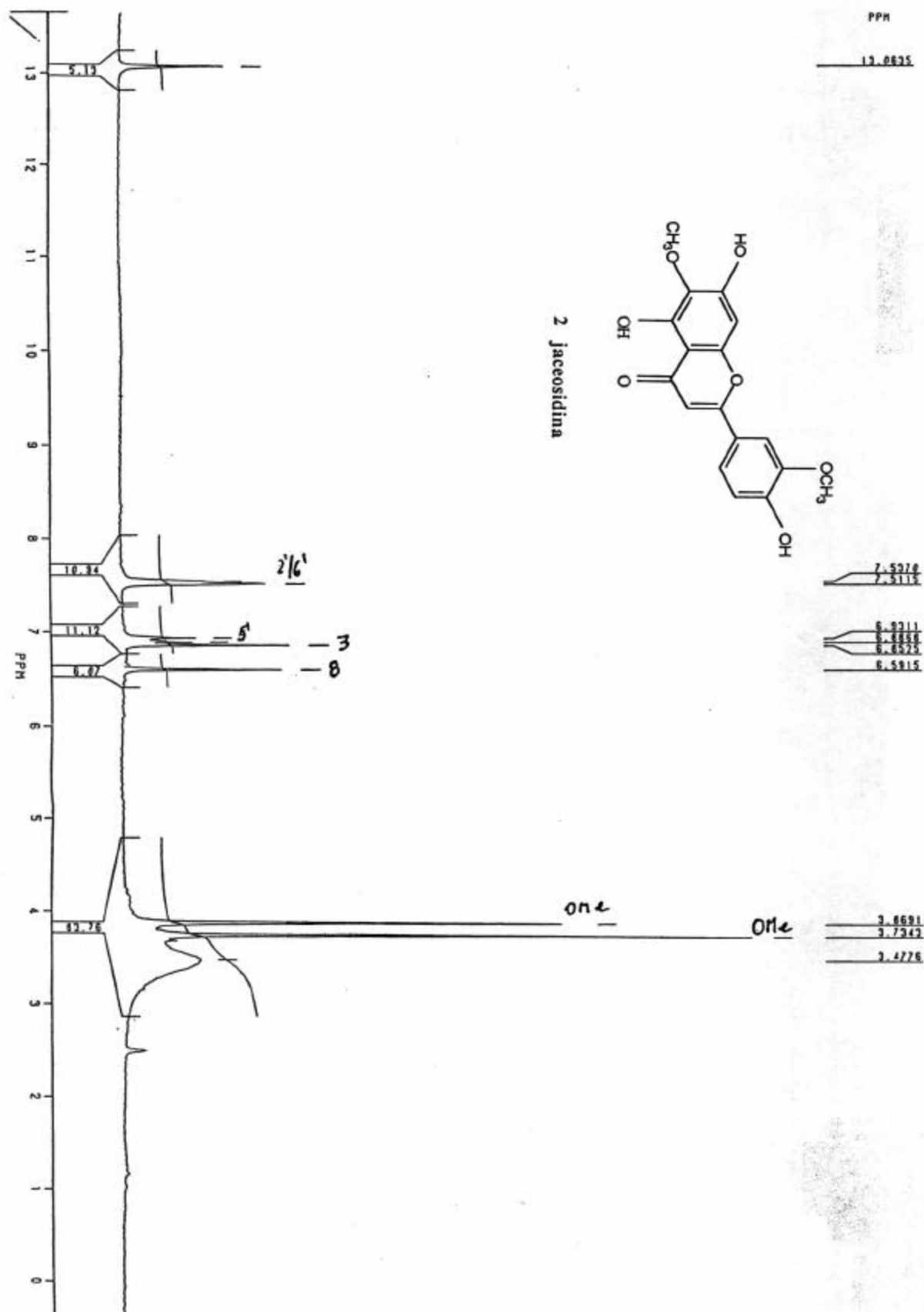


Figura IV.11. Extração e fracionamento de capítulos de *Paepalanthus argenteus* var. *argenteus*.

Figura IV.12. Espectro de RMN ^1H de **2** (200 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm)

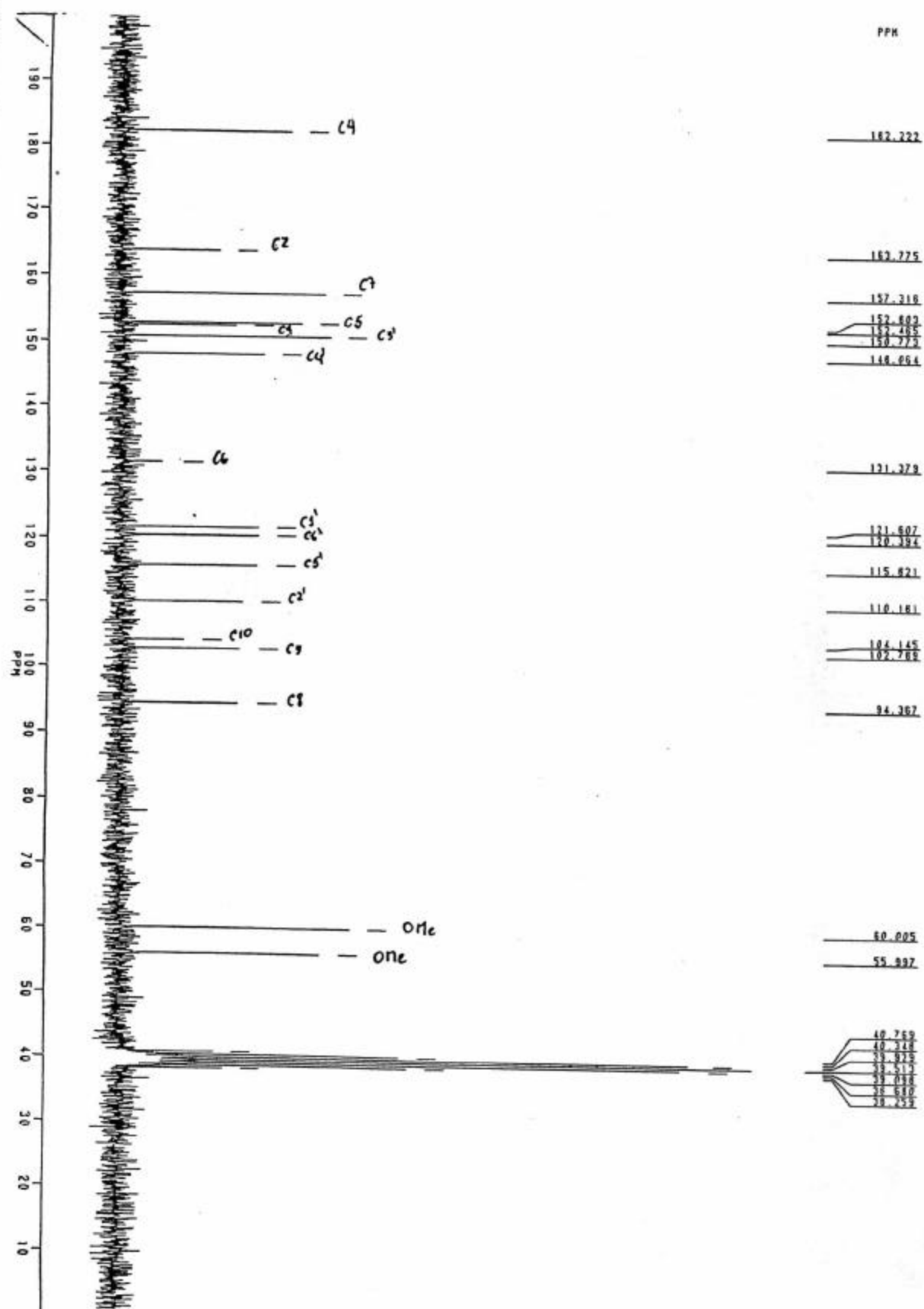
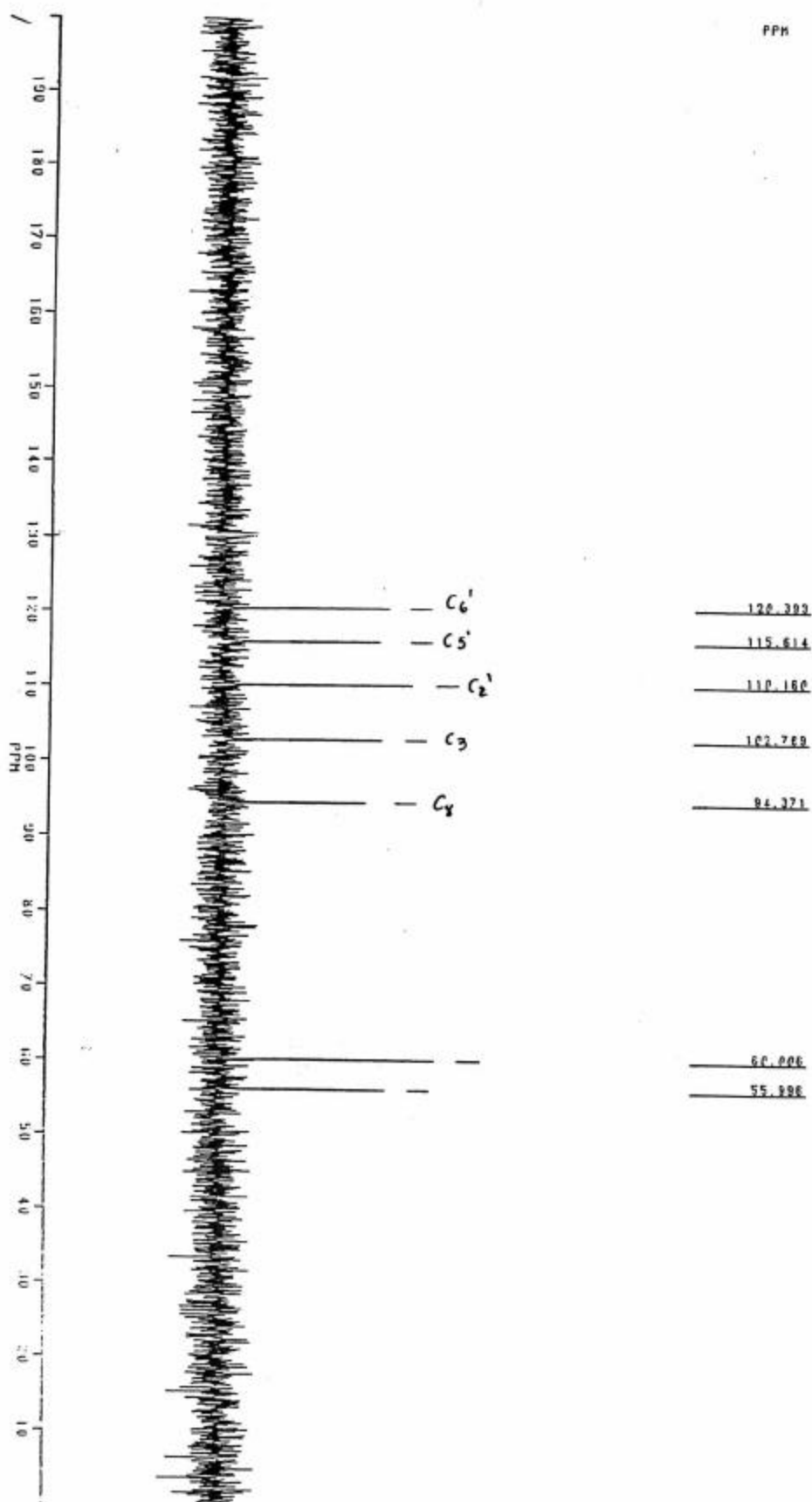


Figura IV.13. Espectro de RMN ^{13}C de 2 (200 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm)

Figura IV.14. DEPT de 2 (200 MHz, DMSO-d₆, TMS, ppm)

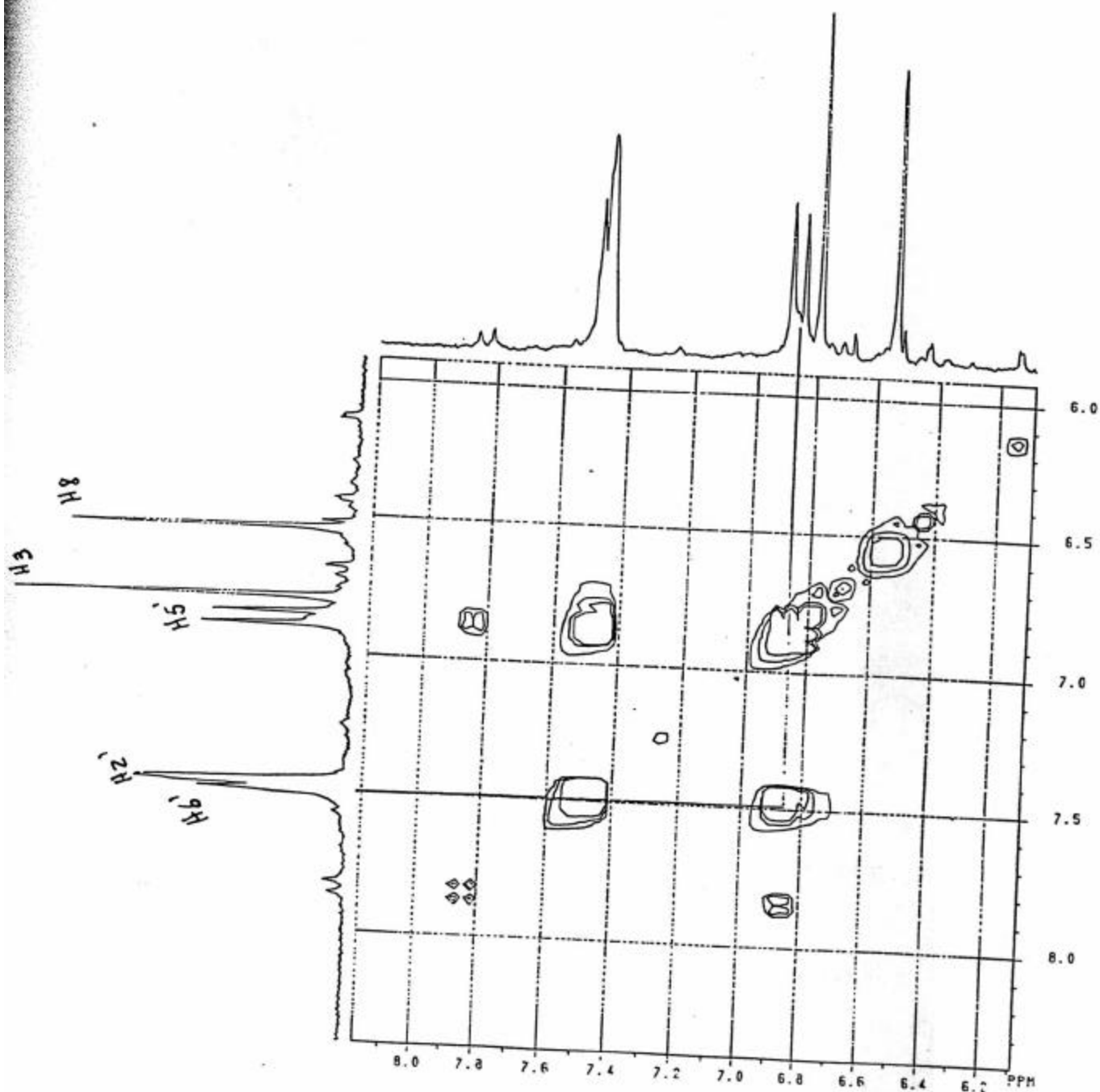


Figura IV.15 Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de **2** (200 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm)

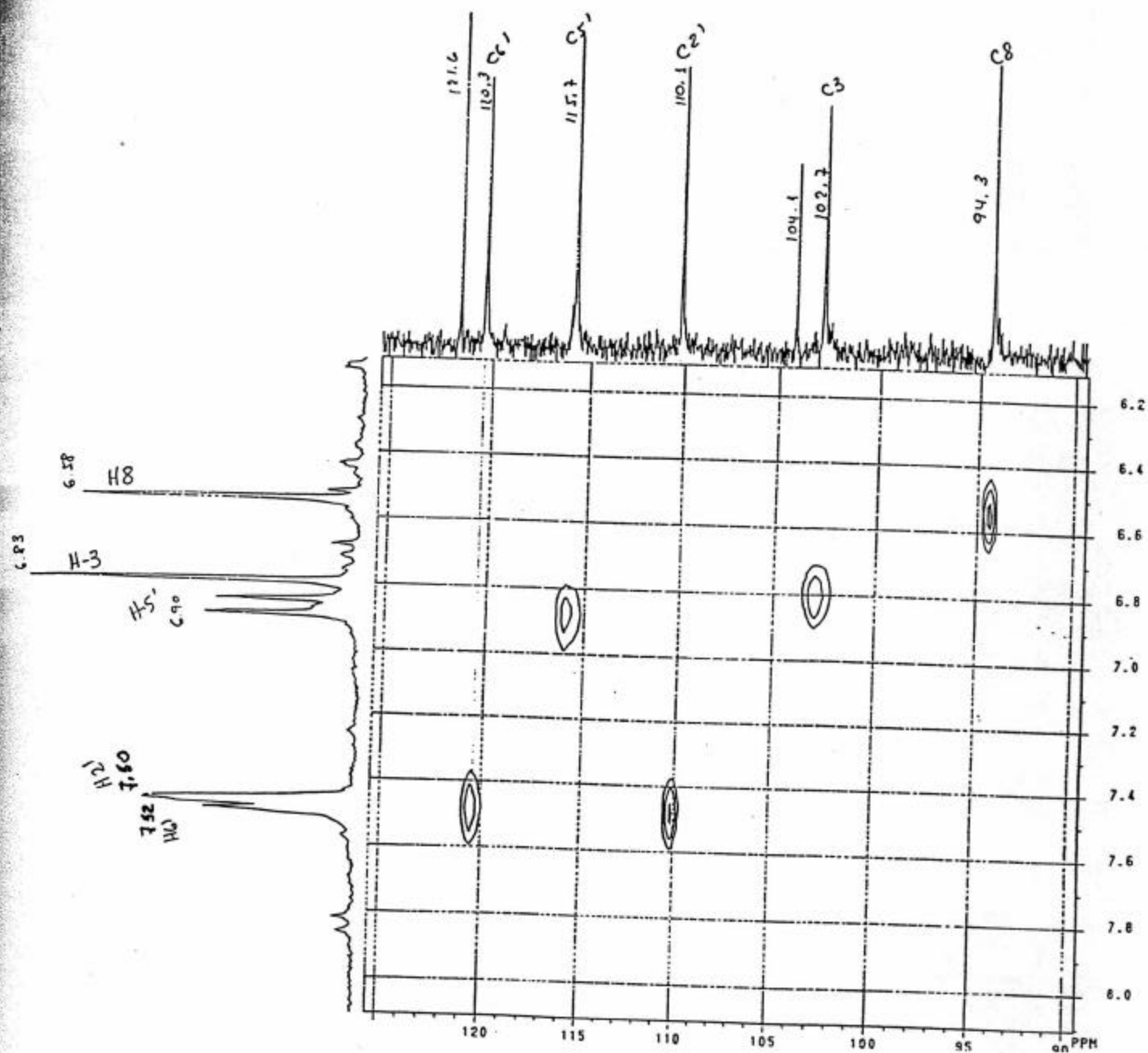


Figura IV.16. Espectro CHCORR de 2 (200 MHz, DMSO-d_6 , TMS, ppm)

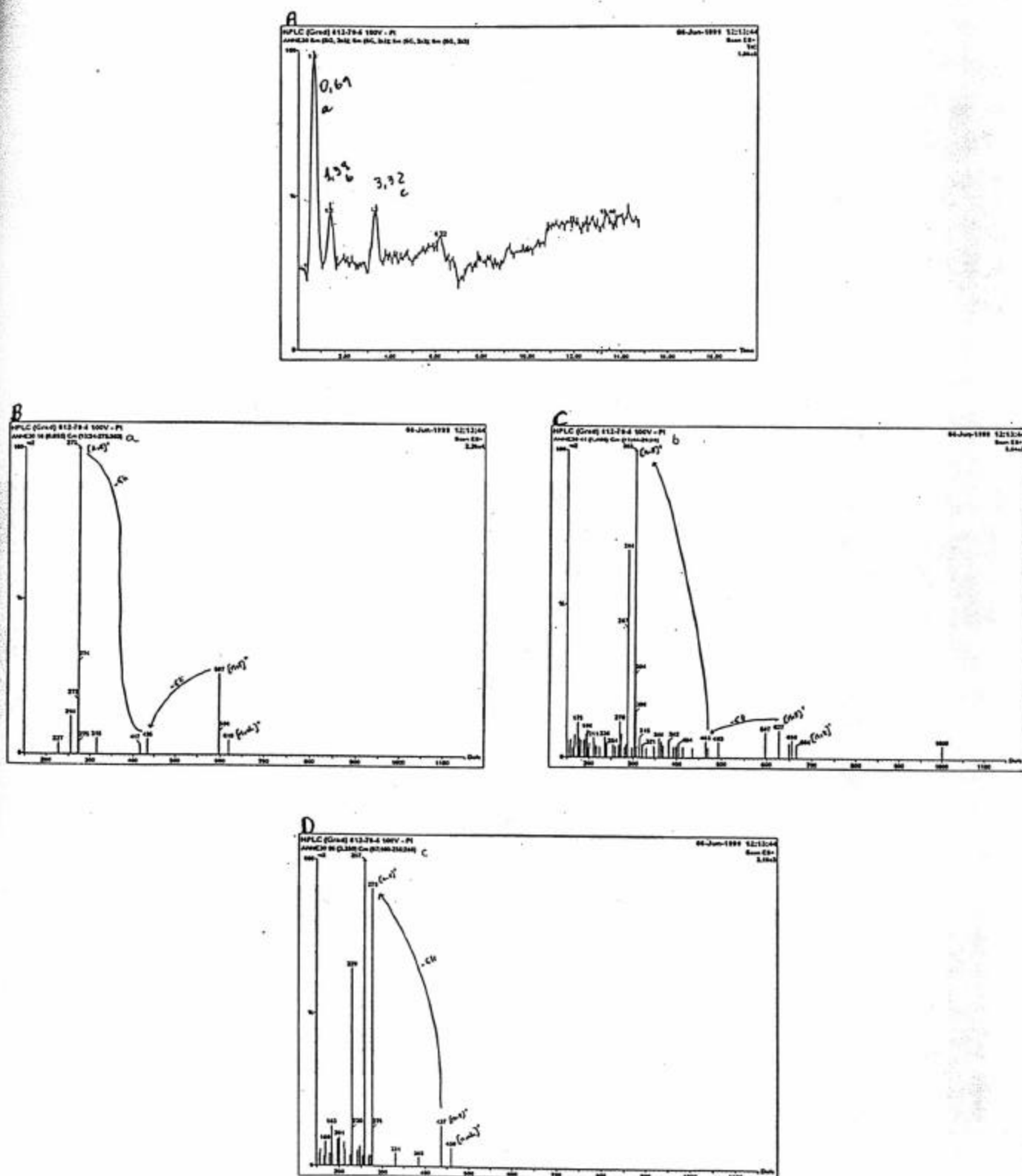


Figura IV.17. HPLC-ES-MS de capítulos de *P. argenteus* var. *argenteus*. A – TIC; B-D – ES-MS de a.b.c; B-ES-MS de 35; C- ES-MS de 37; D-ES-MS de 31

1.4. *Paepalanthus macrocephalus* (Bong.) Koernicke

O extrato etanólico de capítulos de *P. macrocephalus* foi submetido à DCCC, utilizando-se como sistema de solventes $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O}$ (43:37:20, fase inferior, modo descendente). Foram coletadas 180 frações, que foram submetidas à TLC; as frações idênticas foram reunidas, e quando apresentaram misturas, foram submetidas aos procedimentos de cromatografia de sephadex LH-20 para separação dos constituintes (figura IV.18). A fração de 106-109 apresentou uma única mancha de coloração amarela à luz UV, de R_f semelhante ao 6-OMe-kaempferol ligado à unidade de açúcar e de *p*-coumaroil, identificado previamente em *P. denudatus*. Para confirmar esta indicação, a fração foi submetida à ^1H RMN e verificamos tratar-se realmente de **11**.

O extrato etanólico dos capítulos de *P. macrocephalus* foi ainda submetido à análise por HPLC-ES-MS utilizando-se coluna RP 18 (Supelcosil 25cm X 2,1mm X 5 μm), como sistema de solventes, $\text{MeCN/H}_2\text{O}$ (30:70% + 1% HCOOH), 100V, PI, em dois fluxos diferentes: 50 $\mu\text{l/min}$ e 100 $\mu\text{l/min}$.

Os dados obtidos a partir de HPLC-ES-MS do extrato de *P. macrocephalus* são apresentados na tabela IV.5b. O cromatograma da figura IV.19, obtido com fluxo de 50 $\mu\text{l/min}$ mostra o BPI e os cromatogramas extraídos para os íons em m/z 273 e m/z 275 referentes a **32**, **35**, **36**. Os espectros de massas de cada um destes picos são mostrados na figura IV.20.

Na análise a 100 $\mu\text{l/min}$ foram identificadas as substâncias **26** e **17** (tabela IV.5b).

Tabela IV.5b. Principais fragmentos obtidos através de HPLC-MS do extrato de *P. macrocephalus*

TEMPO DE RETENÇÃO (min)	PRINCIPAIS FRAGMENTOS	SUBSTÂNCIA PROPOSTA
8.499	m/z 508 – $[\text{M}]^+$ m/z 531 – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 547 – $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 346 – $[\text{A}+\text{H}]^+$	6,3'-dimetoxiquercetina- 7-O- β -D-glucopiranosídeo (26)
16.876	m/z 495 – $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 517 – $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 533 – $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 33 – $[\text{A}+\text{H}]^+$	6-metoxiquercetina 3-O- β -D-glucopiranosídeo (17)
21.202	m/z 599 – $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 275 – $[\text{A}+\text{H}]^+$	5-desmetoxi -3,4-diidropaepalantina- 9-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)glucopiranosídeo (32)
24.935	m/z 597 - $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 619 - $[\text{M}+\text{Na}]^+$ m/z 635 - $[\text{M}+\text{K}]^+$ m/z 434 - $[\text{M-gli}]^+$ m/z 273 - $[\text{A}+\text{H}]^+$	5-desmetoxipaepalantina-9-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)glucopiranosídeo (35)
44.069	m/z 273- $[\text{M}+\text{H}]^+$	5-desmetoxipaepalantina (36)

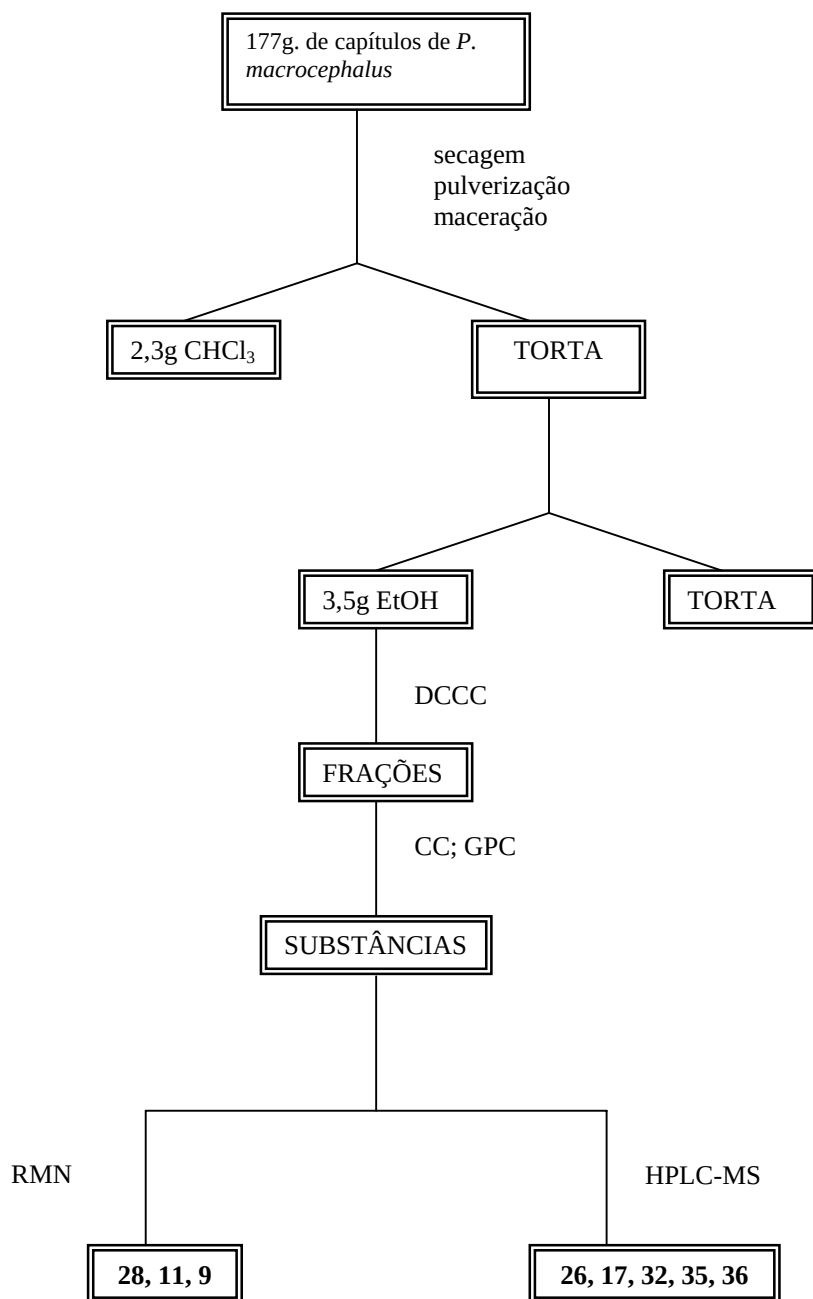


Figura IV.18. Extração e fracionamento de capítulos de *Paepalanthus macrocephalus*.

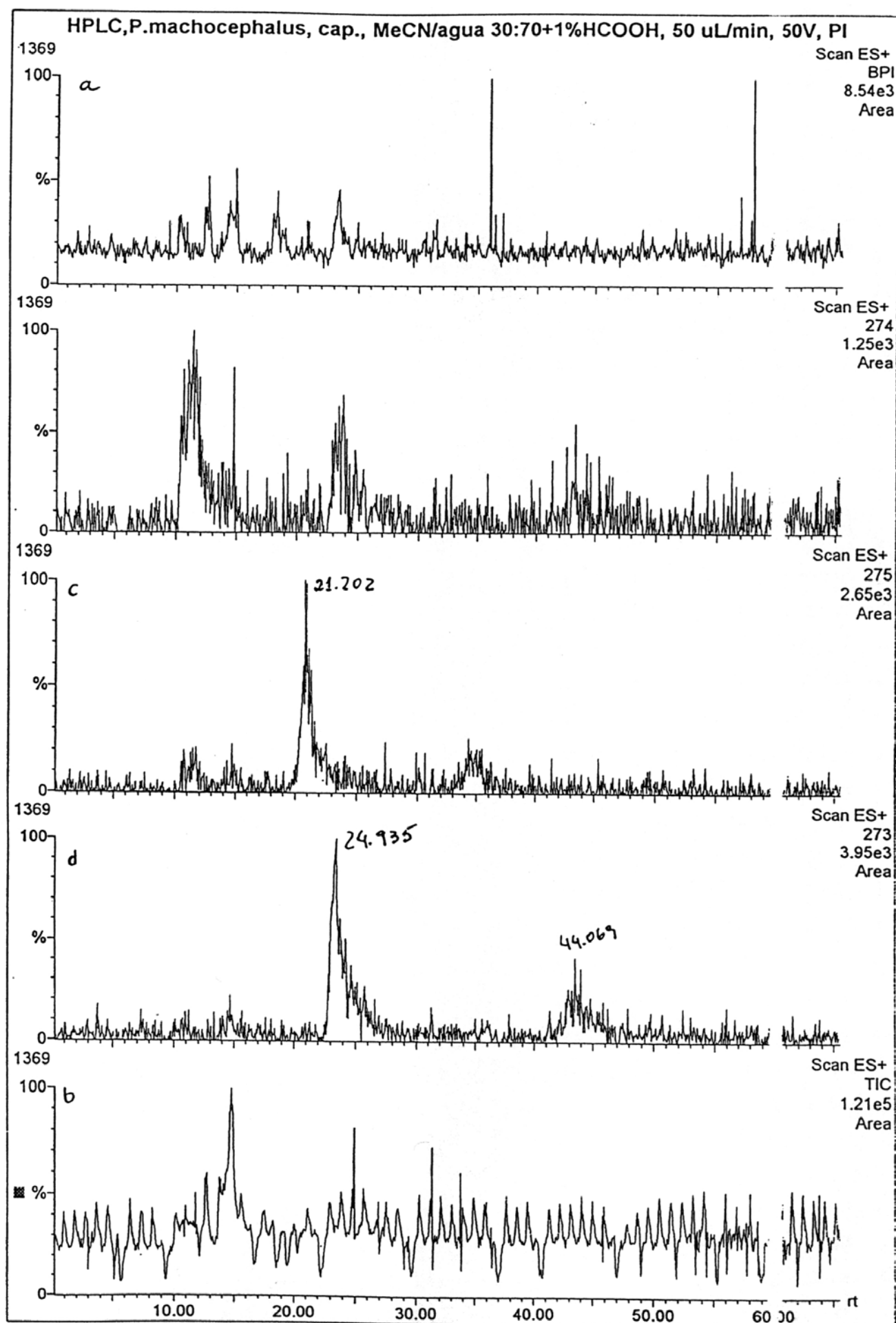


Figura IV.19. HPLC-ES-MS de capítulos de *P. macrocephalus*. a – BPI; b – TIC; c, d – cromatogramas extraídos dos íons de m/z 275 (c) e m/z 273 (d).

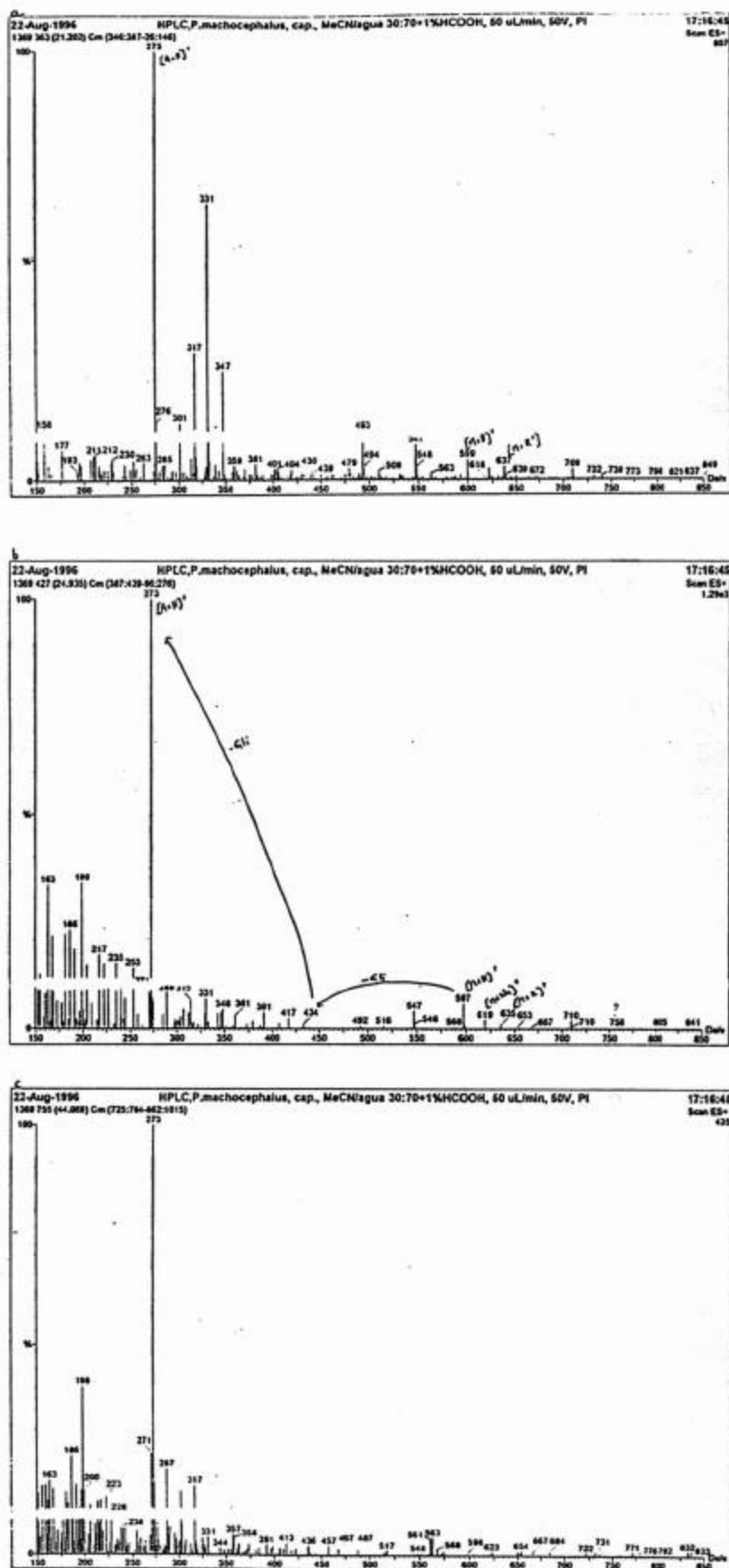


Figura IV.20. ES-MS dos constituintes de *P. macrocephalus*. a – m/z 275, 32; b – m/z 273, 35; c – m/z 273, 36.

1.5. *Paepalanthus vellozioides* Koernicke e *Paepalanthus latipes* Silveira

O trabalho desenvolvido com *P. vellozioides* e *P. latipes* utilizou folhas, a fim de verificar a constituição química desses órgãos vegetais, já que a morfologia e anatomia das folhas são consideradas essenciais para a diferenciação dos gêneros (Castro, 1986; Castro e Menezes, 1990, 1995; Monteiro *et al.*, 1984, 1985; Scatena e Menezes, 1993, 1996; Scatena e Rocha, 1995). Essas espécies foram escolhidas por suas folhas grandes, que poderiam fornecer com mais facilidade quantidade suficiente de material para os estudos fitoquímicos. As substâncias isoladas foram identificadas através de técnicas modernas de RMN mono e bidimensionais a 600 MHz, em conjunto com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Cosimo Pizza, da Universidade de Salerno, Itália. Desse convênio com a Itália resultou a identificação de novos derivados isocumarínicos e flavonóides glicosilados (Vilegas *et al.*, 1999a e b, Anexos 2 e 3).

Para a análise através de RMN a 600 MHz os espectros foram obtidos em CD₃OD. Os experimentos realizados para completa elucidação estrutural das moléculas envolveram ¹H-¹H DFQ-COSY (Bodenhausen *et al.*, 1977, *apud* Vilegas *et al.*, 1999b), ¹H-¹³C HSQC (Bodenhausen and Ruben, 1980, *apud* Vilegas *et al.*, 1999b), HMBC (Martin and Crouch, 1991, *apud* Vilegas *et al.*, 1999b) e 1D-TOCSY (Davis and Bax, 1985, *apud* Vilegas *et al.*, 1999b).

O extrato MeOH de cada planta foi dissolvido em água, filtrado e submetido à CC de XAD₂, eluída inicialmente com H₂O, seguida de MeOH. 6g do resíduo metanólico foi submetido à GPC de sephadex LH-20 eluído com MeOH (figura IV.21). Nas tabelas IV.6 e IV.7 são apresentados os dados de RMN de ¹H e ¹³C, respectivamente, para os flavonóides identificados. Para as isocumarinas, os dados de RMN de ¹H e ¹³C são apresentados nas tabelas IV.3 e IV.4, respectivamente.

Os 6 flavonóides identificados foram glicosídeos de 7-metilquercetagina. Desses, apenas **20** já havia sido citado na literatura, embora sua identificação envolvesse apenas dados de espectrometria no UV/visível, sem nenhum dado de RMN (Bohm e Choy, 1987). Para exemplificar o processo de identificação dos flavonóides, serão discutidos os espectros obtidos para a substância **23**.

O espectro de RMN ¹H (figura IV.22) mostra um dubleto em 7,75 δ (J=1,8 Hz), um duplo dubleto em 7,62 δ (J=1,8 e 8,3 Hz) e um dubleto em 6,91 δ (J=8,3 Hz), devido ao anel B de um flavonol 3', 4'dioxigenado; o singlete em 6,78 δ é referente ao H8. O sinal intenso em 4,0 δ é relativo a um grupo metoxi. Os dois dubletos em 5,34 δ

($J=7,5$ Hz) e em $4,42 \delta$ ($J=7,5$ Hz), assim como os sinais entre $3,25 \delta$ e $3,92 \delta$, indicam a presença de duas unidades sacarídicas. O espectro de RMN ^{13}C (Figura IV.23) apresenta 16 sinais, referentes à aglicona, além de 12 sinais adicionais representando as duas unidades de açúcar. Os espectros HOHAHA (figura IV.24) com irradiação nos prótons anoméricos em $5,32 \delta$ (H1''-gli) e em $4,42 \delta$ (H1'''-gli) evidenciaram todo o sistema de spin associados a eles, caracterizando duas unidades de glicose. O espectro HSQC (figura IV.25) forneceu os deslocamentos químicos necessários para a identificação da aglicona e para a comprovação das unidades adicionais. O espectro HMBC (figura IV. 26) mostra a correlação entre o próton em $5,32 \delta$ (H1''-gli) e o carbono 3 da aglicona ($135,5 \delta$), e entre o próton em $4,42 \delta$ (H1'''-gli) com o C4'' da primeira glicose. Dessa forma, o flavonóide teve sua estrutura completamente determinada como sendo 5,6,3',4'-tetraidro-7-metoxiflavanol-3-O- β -D-glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucuronopiranosídeo.

Para discussão das isocumarinas são apresentados os espectros de **32**. O espectro de RMN de ^1H (figura IV.27) forneceu o perfil básico da molécula: uma aglicona com três prótons aromáticos ($7,05 \delta$, s, H5, sobreposto ao dubleto meta do H8; $6,89 \delta$, d, $J=1,5$ Hz, H6), que possui um sistema $-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_3$ ($2,98 \delta$ dd, H4a e $3,12 \delta$ dd, H4b; $4,76 \delta$, m, H3, $1,53 \delta$, d, $J=6,1$ Hz, CH3), uma metoxila ($3,95 \delta$) e dois açúcares ligados a ela, uma vez que se observam dois prótons anoméricos em $5,05 \delta$ (H1'-gli , d, $J=7,5$ Hz) e $4,40 \delta$ (H1''-gli , d, $J=7,9$ Hz), cujas constantes de acoplamento indicam configuração β , além de sinais correspondendo a duas unidades de açúcar entre $3,29 \delta$ e $4,22 \delta$. O espectro de RMN de ^{13}C (figura IV.28) forneceu dados que, comparados à literatura, permitiram estabelecer a estrutura da aglicona. O espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ (figura IV.29) mostrou as conectividades entre os prótons da molécula. O espectro HSQC (figura IV.30) forneceu os acoplamentos entre os ^1H e ^{13}C da molécula. Especialmente importante é o espectro HMBC, que forneceu as interações a longa distância. A partir do HMBC (figura IV.31) verificou-se os acoplamentos entre o próton em $5,06 \delta$ (H1'-gli) e o C-9 da aglicona ($159,4 \delta$), entre o próton em $4,41 \delta$ (H1''-gli) com o C6'-gli ($70,2 \delta$). Assim, essa substância pôde ser identificada como sendo 10-hidroxi-7-metoxi-3-metil-1H-3,4-diidronafto-[2,3c]-piran-1-on-9-O- β -D-glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopiranosídeo **32**.

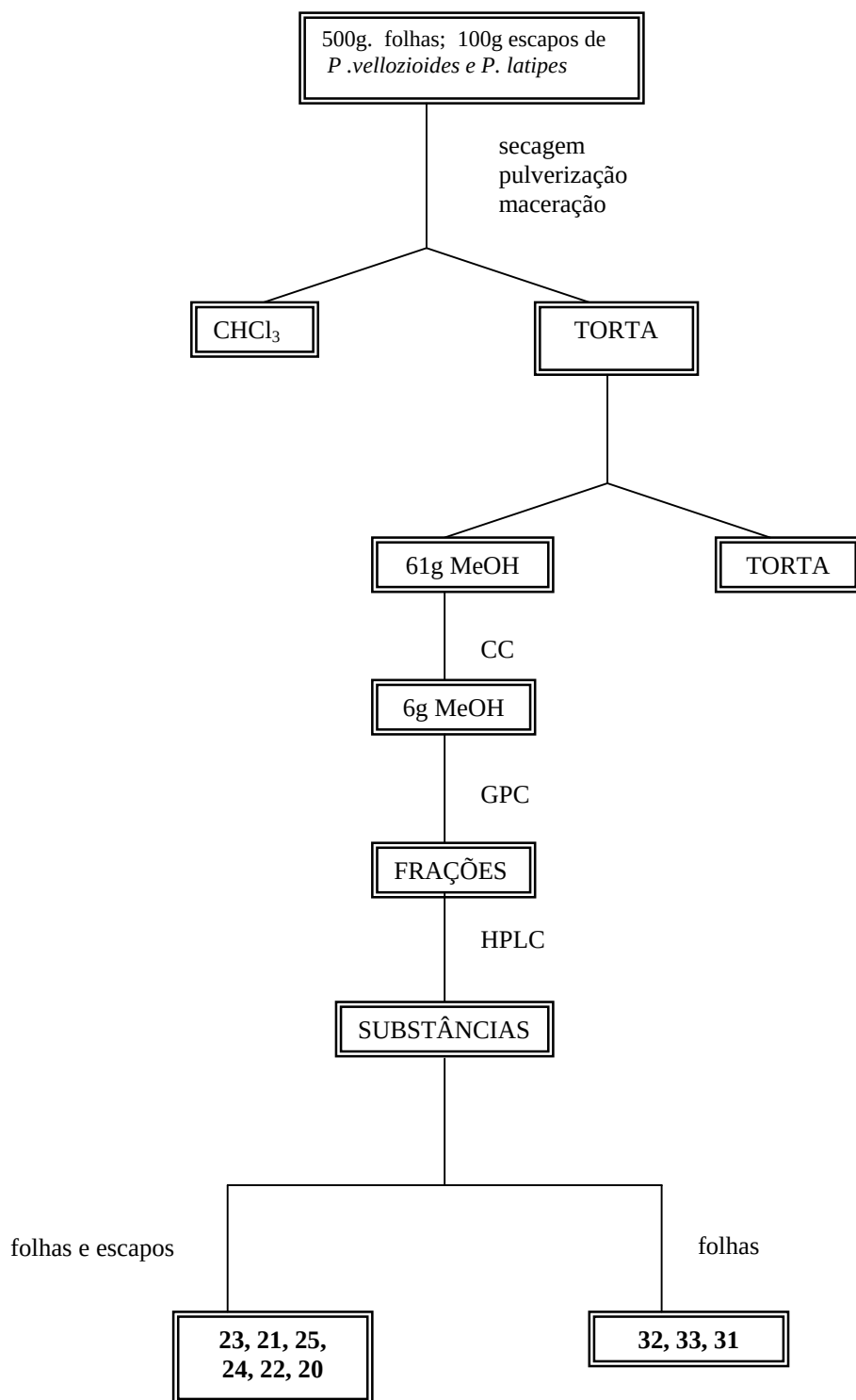
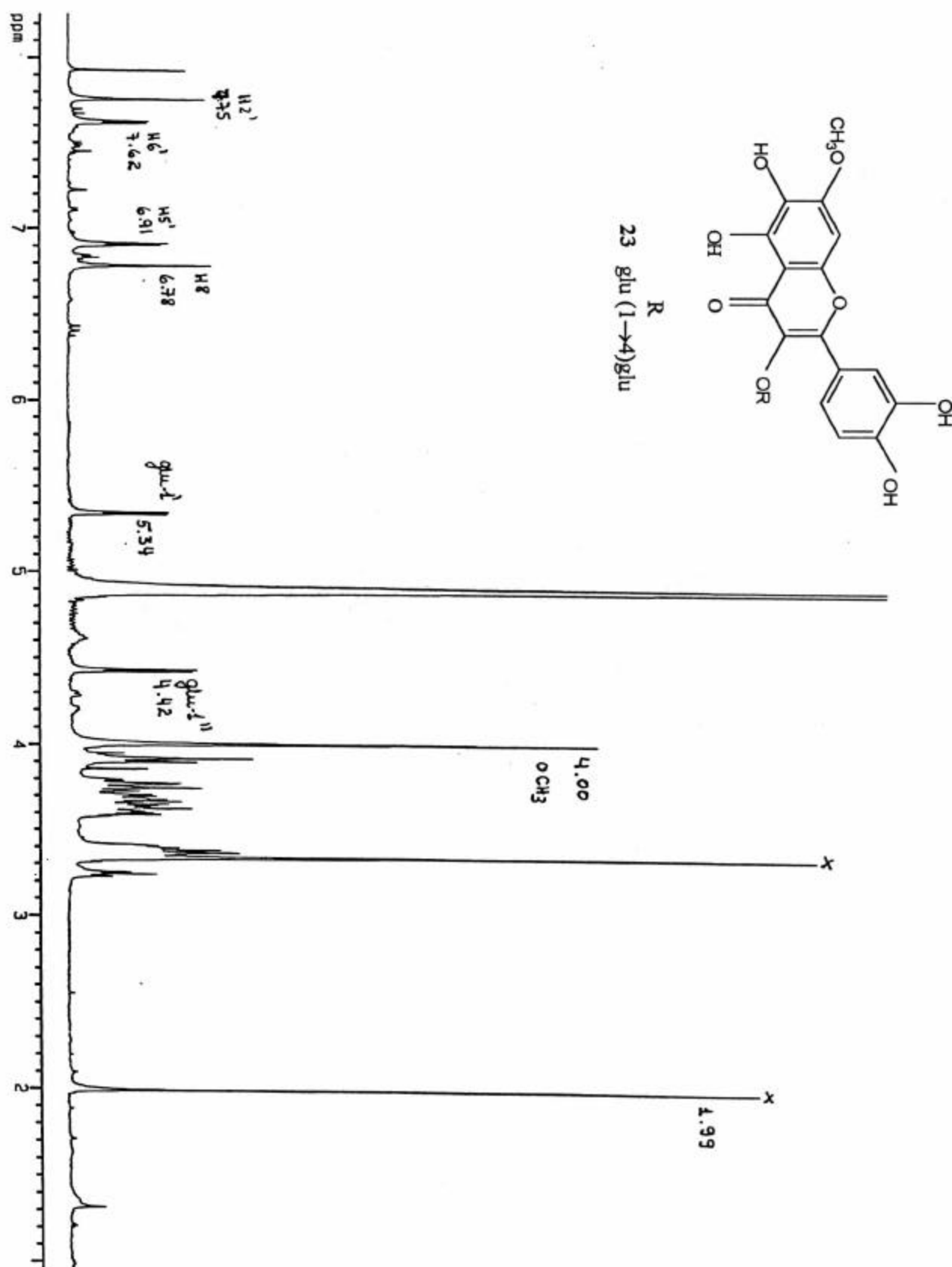


Figura IV.21. Extração e fracionamento de folhas e escapos de *P. vellozioides* e *P. latipes*.

Figura IV.22. Espectro de RMN ^1H de **23** (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

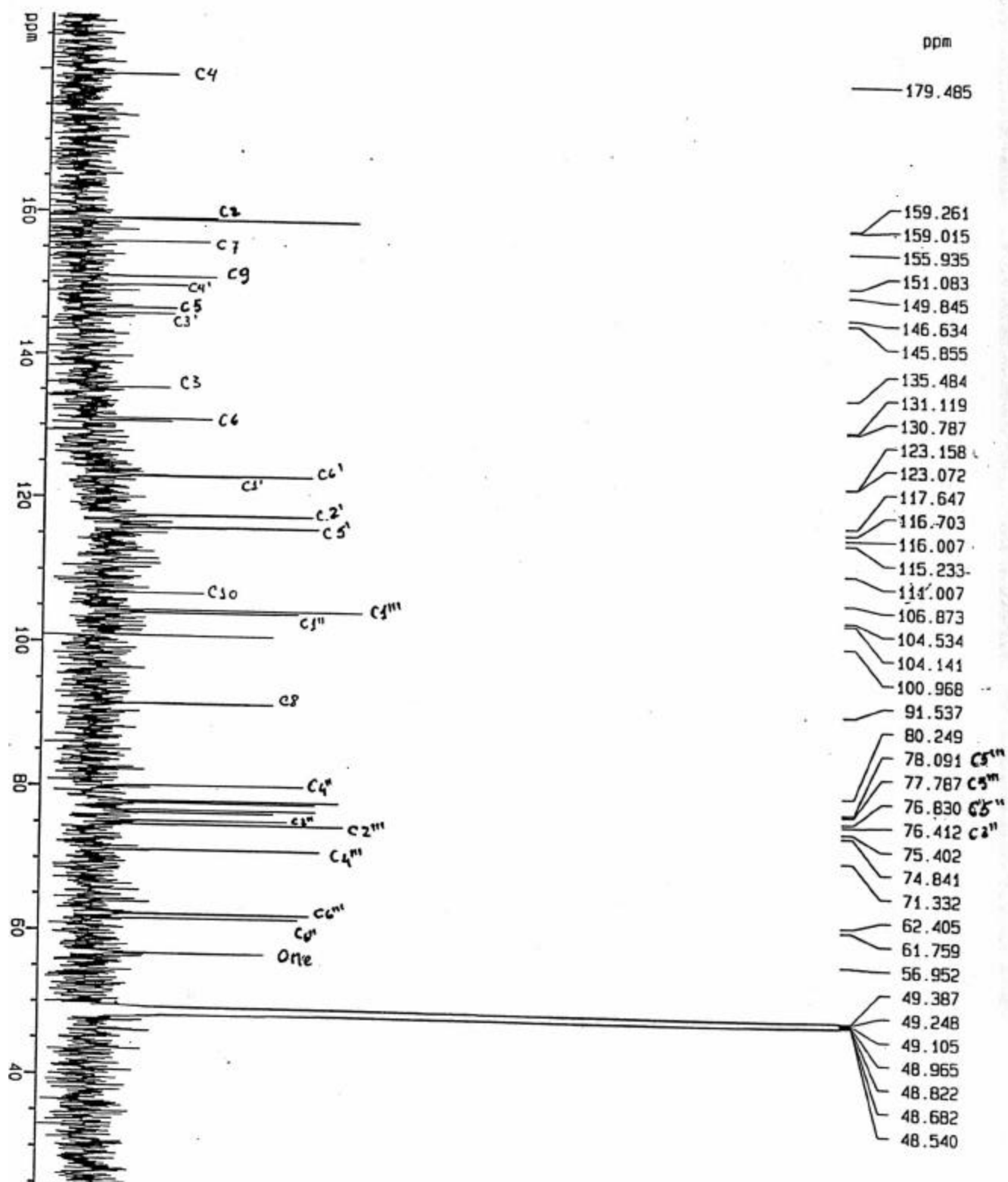


Figura IV.23. Espectro de RMN ^{13}C de 23 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

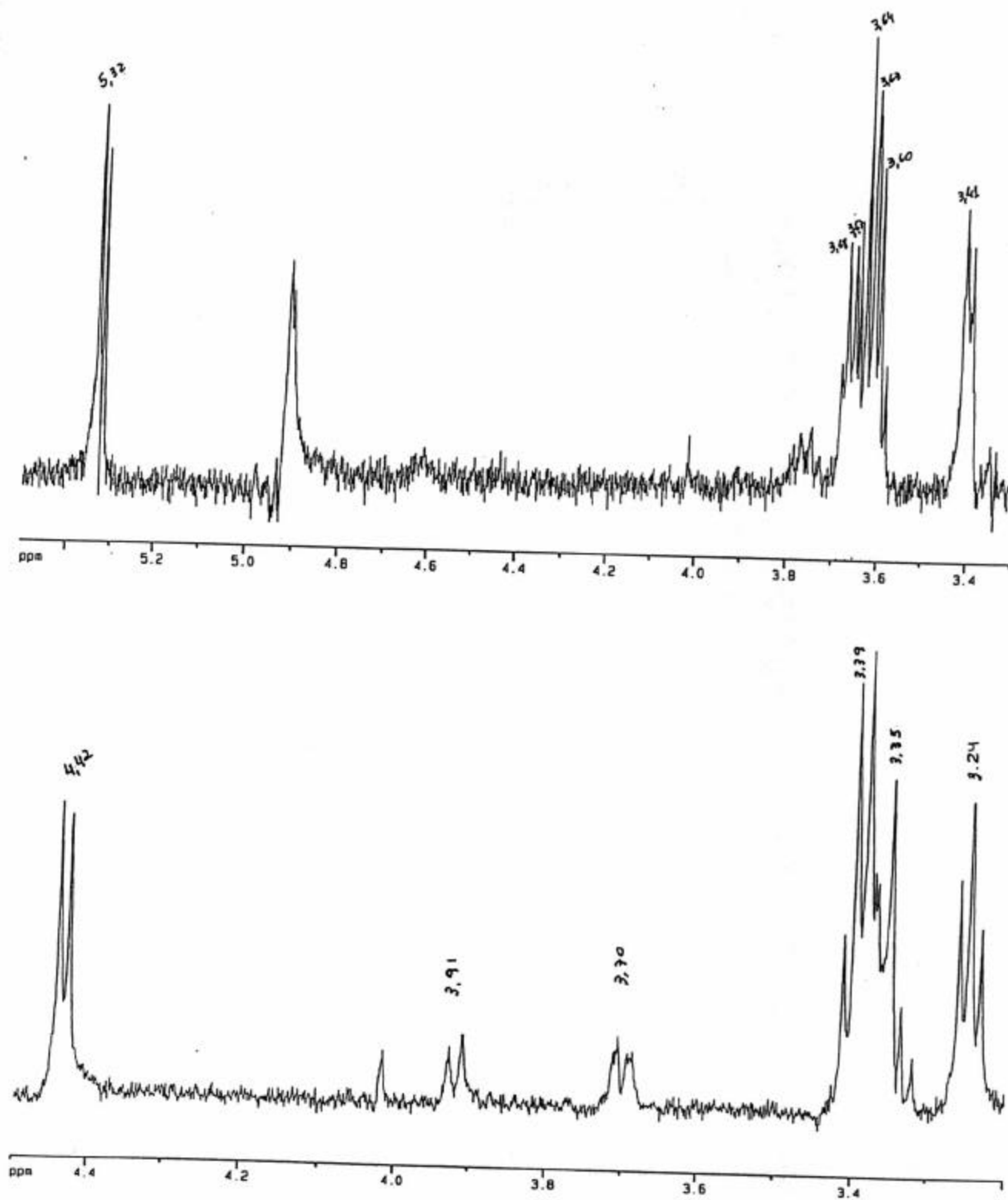
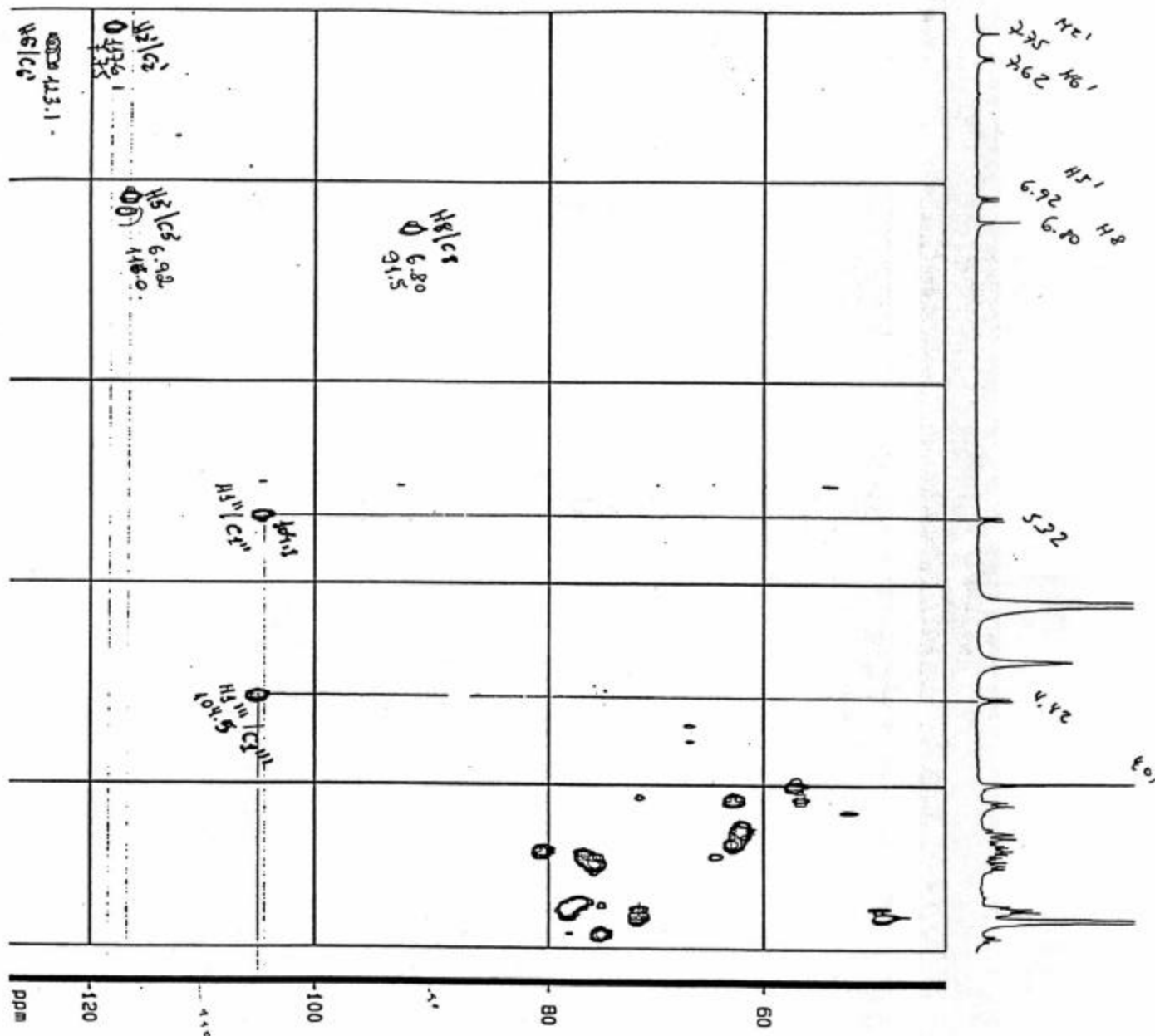
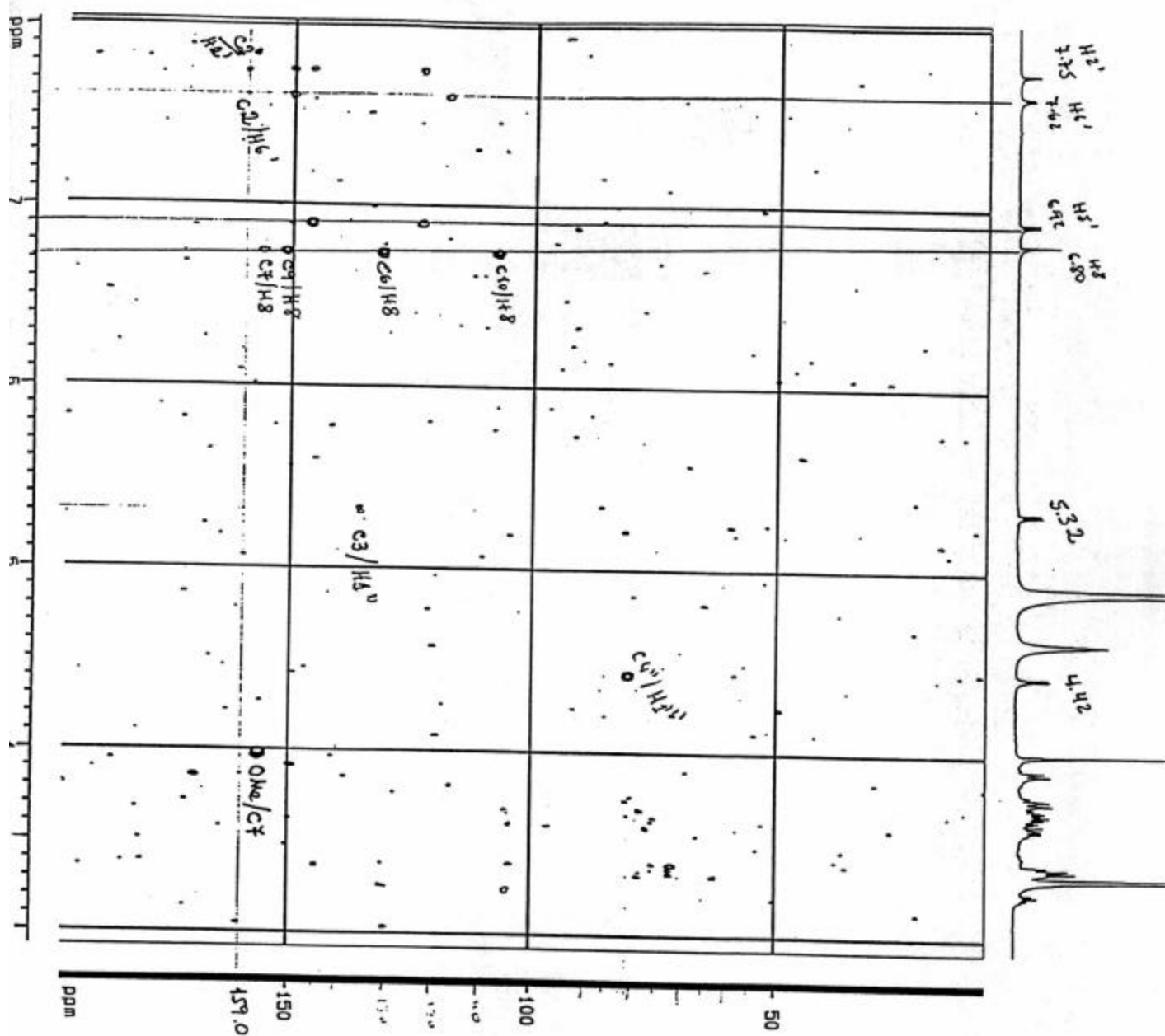


Figura IV.24. Espectro HOHAHA de 23 (600 MHz, CD₃OD, TMS, ppm)

Figura IV. 25. Espectro HSQC de 23 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

Figura IV. 26. Espectro de HMBC de 23 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

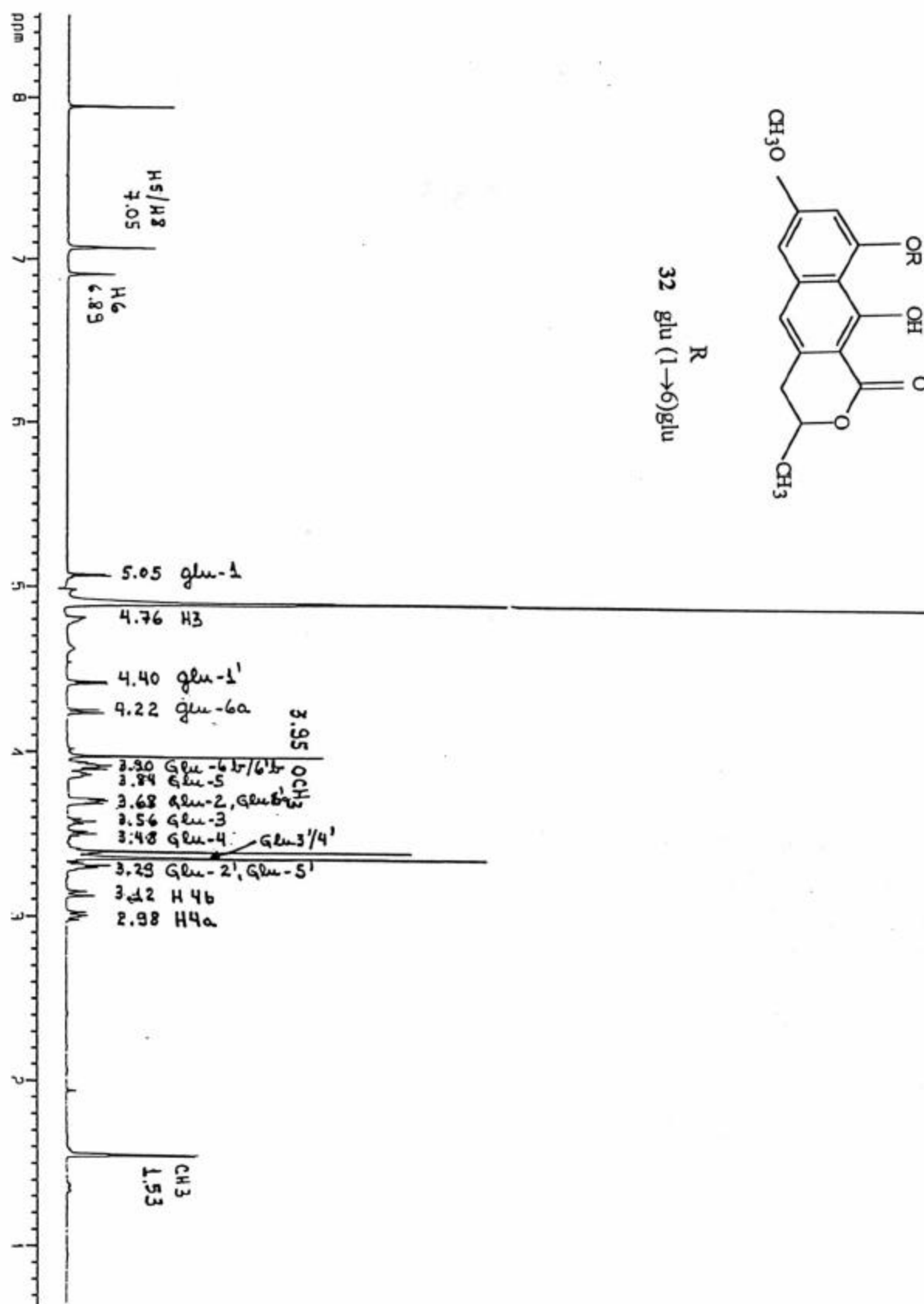


Figura IV. 27. Espectro de RMN ^1H de 32 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

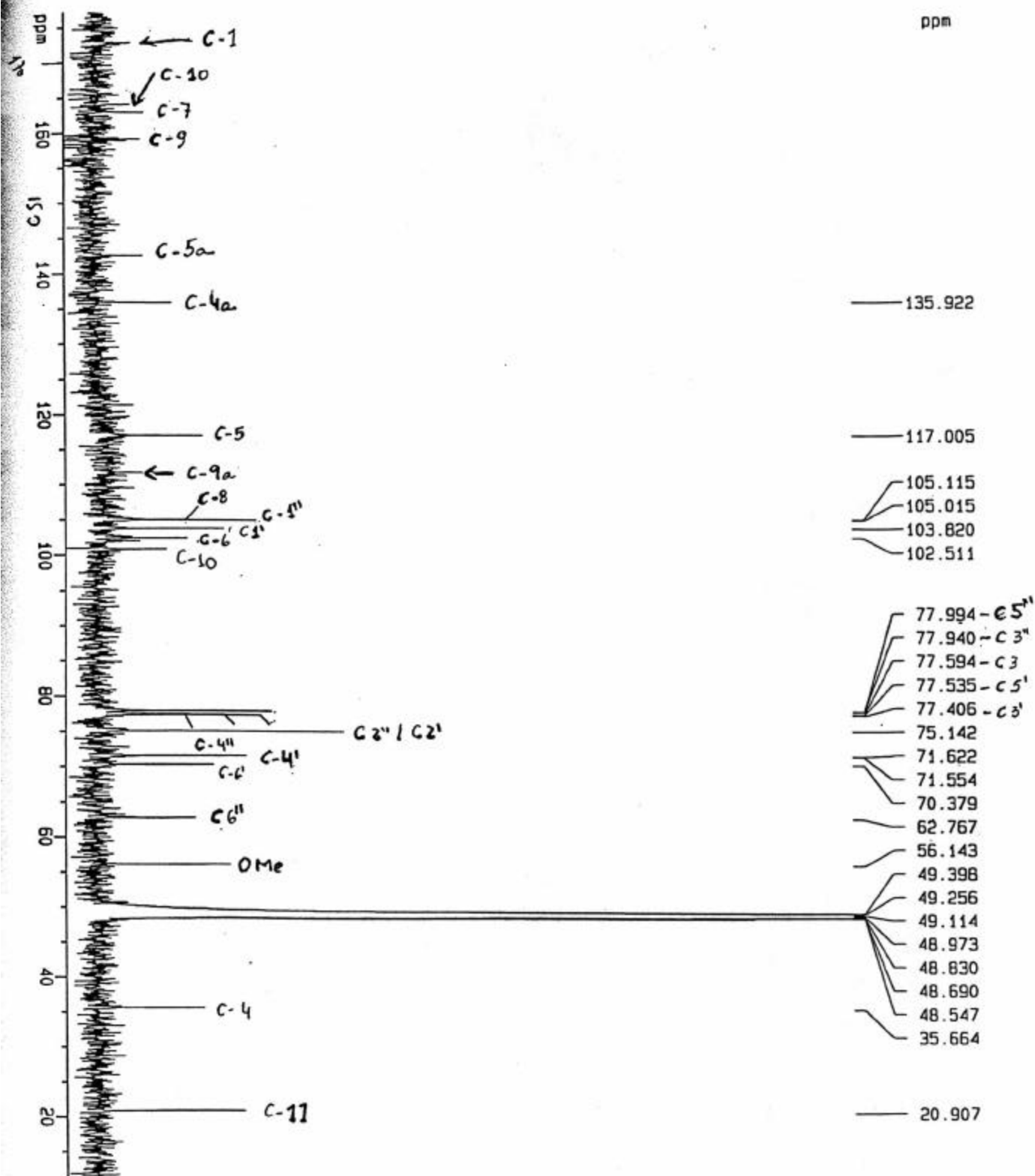
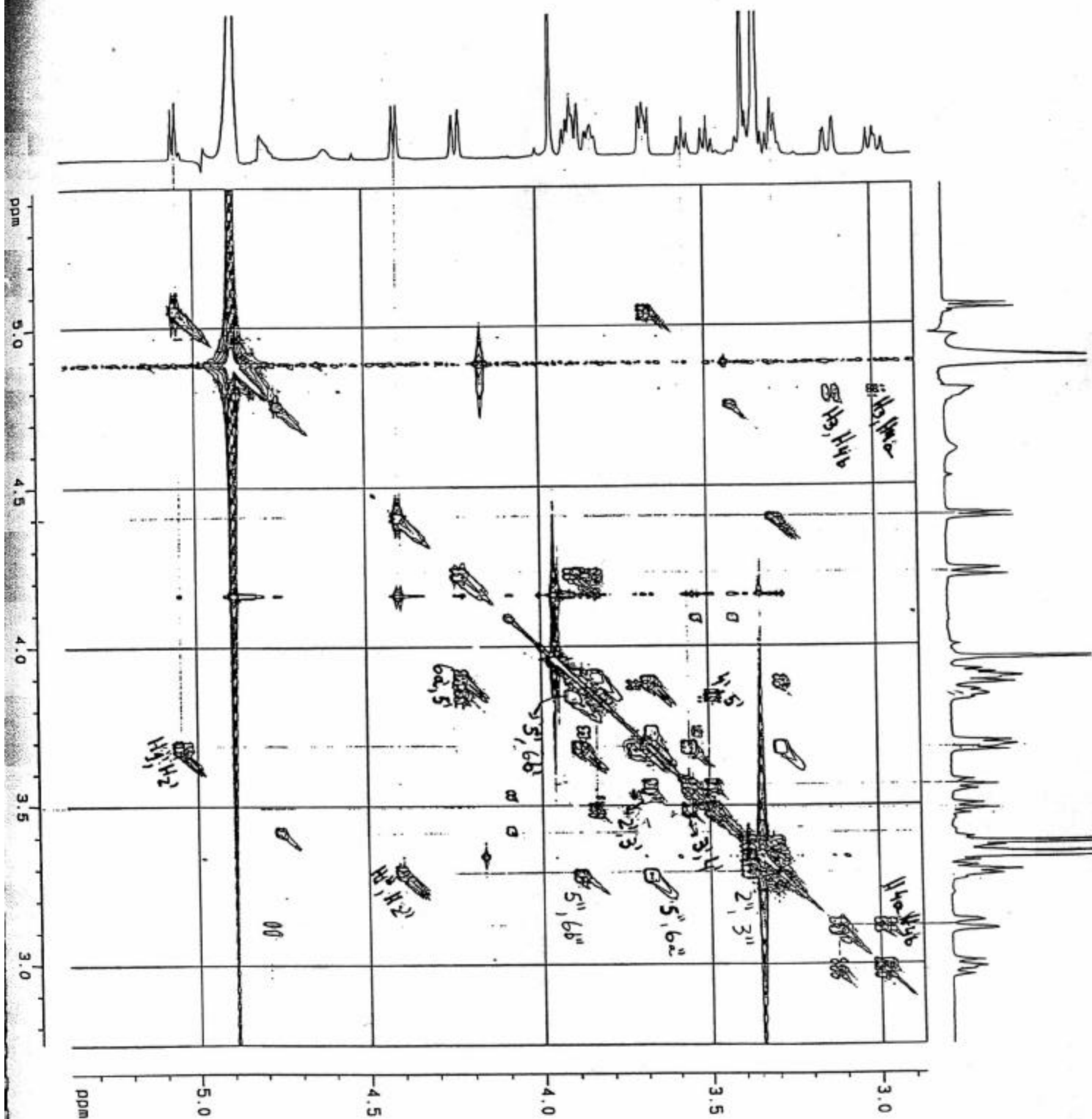
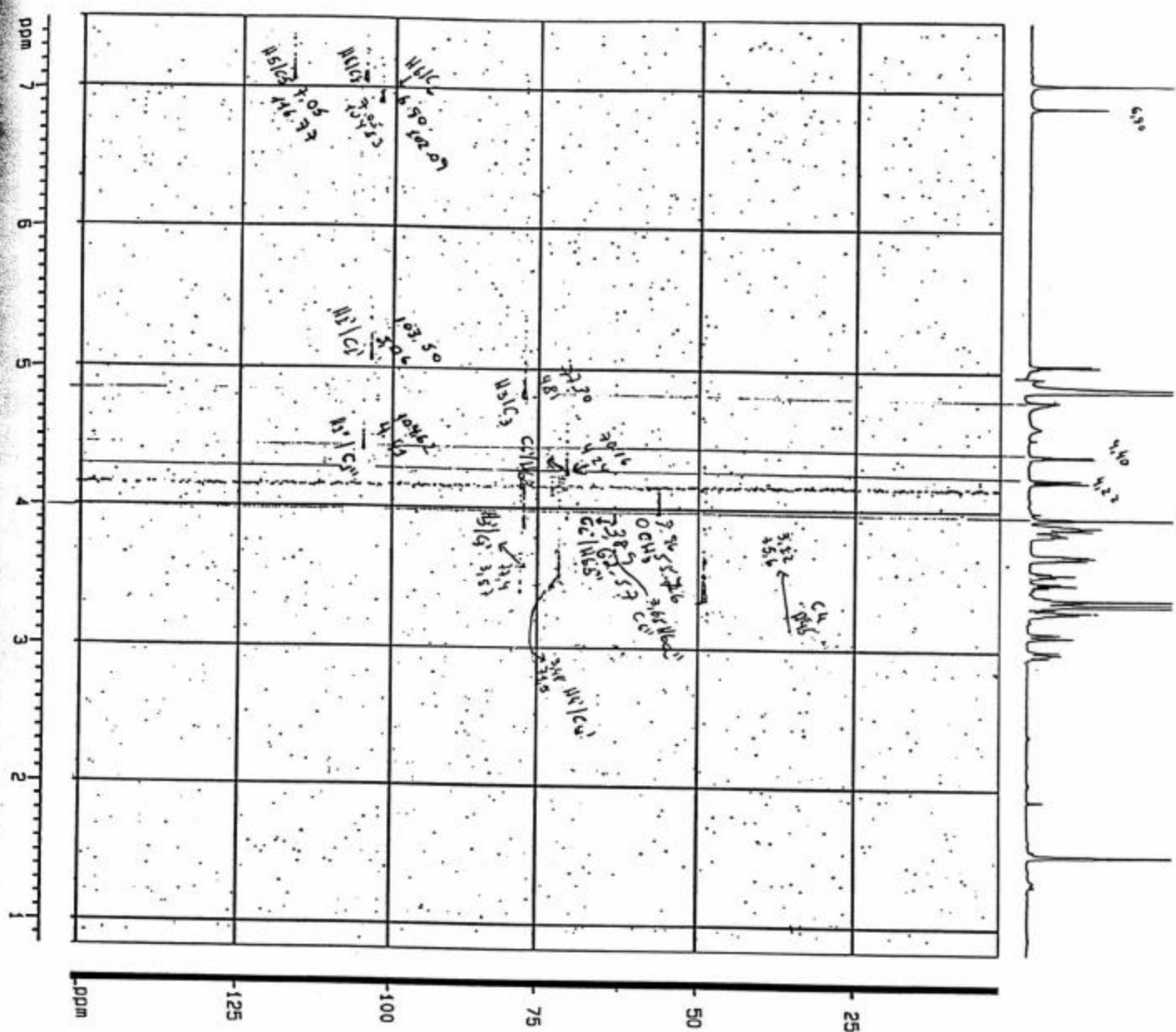


Figura IV. 28. Espectro de RMN ^{13}C de 32 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

Figura IV. 29. Espectro COSY $^1\text{H}/^1\text{H}$ de 32 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

Figura IV. 30. Espectro HSQC de 32 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

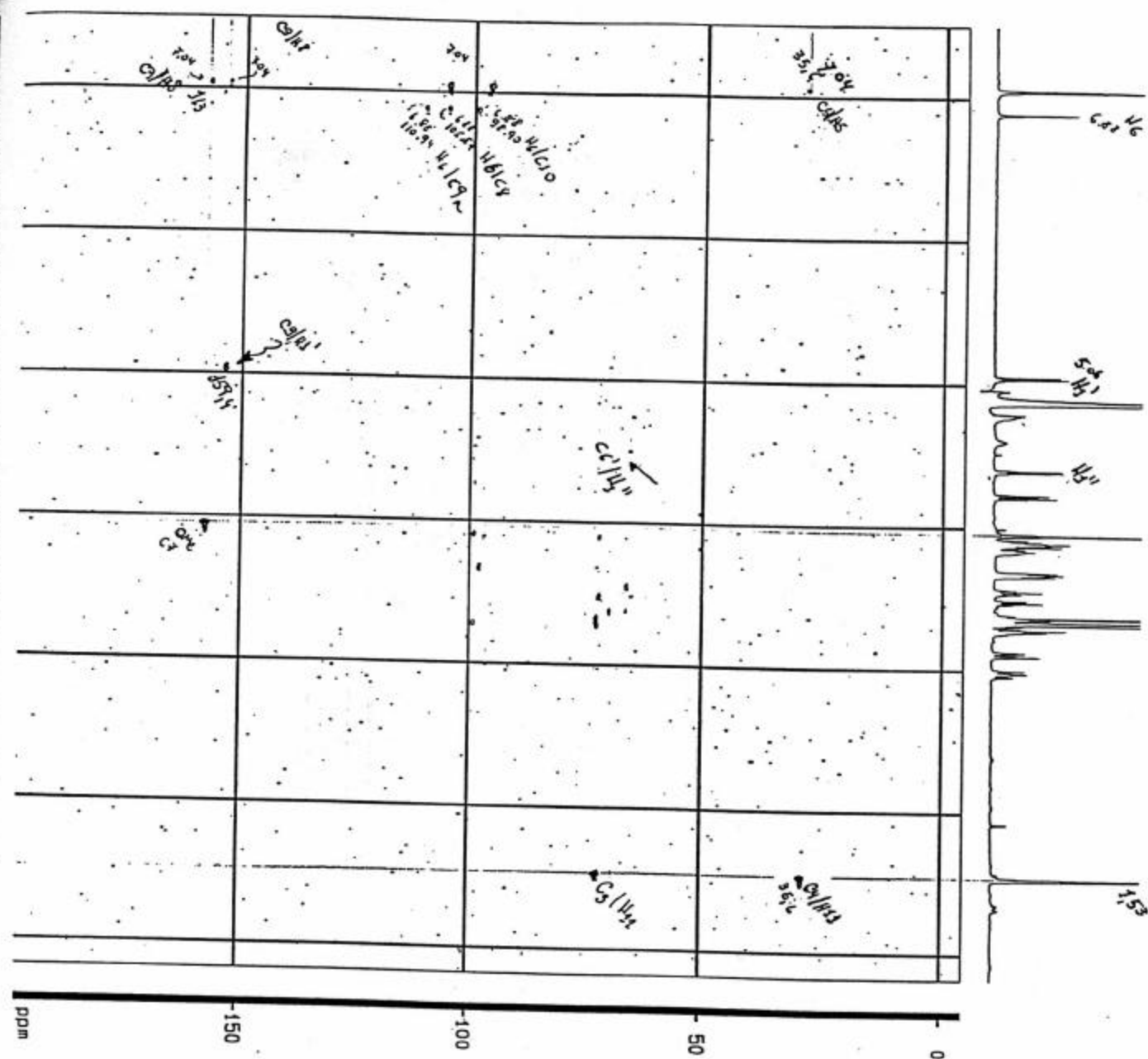
Figura IV. 31. Espectro HMBC de 32 (600 MHz, CD_3OD , TMS, ppm)

Tabela IV.6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN de ^1H das substâncias identificadas nas folhas de *Paepalanthus vellozioides* e *P. latipes* (600 MHz, CD_3OD , TMS).

1H	20	21	22	23	24	25
2'	7,79 d J=1,8Hz	7,76 d J=1,8Hz	7,79 d J=1,8Hz	7,75 d J=1,8Hz	7,68 d J=1,8Hz	7,76 d J=1,8Hz
5'	6,91 d J=8,3Hz	6,92 dd J=8,3Hz	J=8,3Hz J=8,3Hz	6,90 d J=8,3Hz	6,90 d J=8,3Hz	6,88 d J=8,3Hz
6'	7,68 dd J=1,8 e 8,3Hz	7,63 dd J=1,8 e 8,3Hz	7,73 dd J=1,8 e 8,3Hz	7,60 dd J=1,8 e 8,3Hz	7,61 dd J=1,8 e 8,3Hz	7,59 dd J=1,8 e 8,3Hz
8	6,74 s	6,79 s	6,72 s	6,72 s	6,76 s	6,72 s
OMe-7	4,0 s	4,01 s	4,0 s	3,97 s	3,99 s	3,99 s
		Glicose	Glicose	Glicose	Glicose	Ácido glucurônico
1''		5,26 d J=7,5Hz	4,94 d J=7,5Hz	5,32 d J=7,5Hz	5,80 d J=7,5Hz	5,27 d J=7,5Hz
2''		3,52 dd J=7,5 e 9,5Hz	3,59 dd J=7,5 e 9,5Hz	3,60 dd J=7,5 e 9,5Hz	3,70 dd J=7,5 e 9,5Hz	3,57 dd J=7,5 e 9,5Hz
3''		3,46 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,50 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,64 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,60 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,53 dd J=9,5 e 9,5Hz
4''		3,38 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,48 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,67 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,38 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,64 dd J=9,5 e 9,5Hz
5''		3,25 ddd J=9,5;5,0 e 3,0Hz	3,54 ddd J=9,5;5,0 e 3,0Hz	3,41 ddd J=9,5;5,0 e 3,0Hz	3,26 ddd J=9,5;5,0 e 3,0Hz	3,28 d J=9,5 Hz
6a''		3,73 dd J=12,0 e 3,0Hz	3,77 dd J=12,0 e 3,0Hz	3,58 dd J=12,0 e 3,0Hz	3,58 dd J=12,0 e 3,0Hz	
6b''		3,93 dd J=12,0 e 5,0Hz	3,92 dd J=12,0 e 5,0Hz	3,68 dd J=12,0 e 5,0Hz	3,76 dd J=12,0 e 5,0Hz	
				Glicose	Rhamnose	Glicose
1'''				4,43 d J=7,5 Hz	5,26 d J=1,5Hz	4,70 d J=7,5 Hz
2'''				3,25 dd J=7,5 e 9,5Hz	4,04 dd J=1,5 e 3,5Hz	4,88 dd J=7,5 e 9,5Hz
3'''				3,39 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,81 dd J=3,5 e 9,5Hz	3,62 dd J=9,5 e 9,5Hz
4'''				3,34 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,36 dd J=9,5 e 9,5Hz	3,44 dd J=9,5 e 9,5Hz
5'''				3,36 ddd J=9,5;5,0 e 3,0Hz	4,08 dd J=9,5 e 6,0Hz	3,45 ddd J=9,5;5,0 e 3,0Hz
6a'''				3,70 dd J=12,0 e 3,0Hz	0,98 d J=6,0 Hz	3,74 dd J=12,0 e 3,0Hz
6b'''				3,92 dd J=12,0 e 5,0Hz		3,95 dd J=12,0 e 5,0Hz
						Cafeoil
2						7,04 d J=1,5 Hz)
5						6,77 d J=7,5 Hz
6						6,95 dd J=1,5 e, 7,5Hz
α						6,30 d J=16,0 Hz
β						7,60 d J=16,0 Hz

s - singlete; d - dublete; dd - duplo dublete; ddd - duplo duplo dublete

Tablea IV.7. Deslocamentos químicos (ppm) de RMN de ^{13}C das substâncias identificadas nas folhas de *Paepalanthus vellozioides* e *P. latipes* (600 MHz, CD_3OD).

13C	20	21	22	23	24	25
2	145,8	159,2	145,3	159,3	158,9	159,3
3	136,9	135,3	137,3	135,5	134,5	135,6
4	177,1	179,0	177,0	179,0	179,6	179,6
5	148,5	146,2	147,8	146,6	147,0	146,7
6	130,1	131,0	129,9	131,1	131,0	131,2
7	155,7	155,6	155,7	155,9	155,7	156,0
8	91,3	91,1	91,3	91,5	91,4	91,6
9	150,7	150,9	150,7	151,1	151,1	151,1
10	105,5	106,7	105,3	106,9	107,3	106,9
1'	124,1	123,4	127,0	123,1	123,6	123,1
2'	116,1	117,4	116,3	117,6	117,3	117,7
3'	145,8	145,8	146,9	145,8	146,1	145,9
4'	148,5	149,8	147,1	149,8	149,6	149,9
5'	116,3	115,9	116,9	116,0	116,0	116,0
6'	121,9	122,9	121,5	123,1	123,2	123,2
OMe -7	57,0	56,9	57,0	56,9	57,0	57,0
		Glicose	Glicose	Glicose	Glicose	Ác. glicurônico
1"		104,1	102,6	104,1	100,2	104,2
2"		75,4	74,5	75,6	80,0	75,1
3"		78,0	77,2	76,5	78,6	78,1
4"		71,0	71,0	80,5	71,5	80,0
5"		78,1	77,8	77,1	78,1	76,5
6"		62,2	62,0	61,8	62,2	176,0
				Glicose	Rhamnose	Glicose
1'''				104,5	102,6	102,5
2'''				75,0	72,2	75,0
3'''				77,7	72,2	76,2
4'''				71,2	73,8	71,3
5'''				78,3	69,7	78,2
6'''				62,2	17,5	62,2
						Cafeoil
1						127,7
2						115,2
3						146,7
4						149,7
5						116,5
6						123,1
α						146,7
β						114,8
C=O						168,2

2. Estudo quimiotaxonômico

2.1 Abordagem taxonômica

Eriocaulaceae tem sido considerado um *taxon* muito distinto, sendo muitas vezes colocada numa ordem separada, Eriocaulales (Takhtajan, 1969, 1980; Cronquist, 1968, 1981). Dahlgren e Clifford (1982) agregaram Xyridaceae e Rapateaceae à Eriocaulales, considerando que o grupo havia tido uma evolução paralela com Commelinales. Finalmente, Dahlgren *et al.* (1985) incluíram Xyridaceae, Rapateaceae e Eriocaulaceae em Commelinales, juntamente com Commelinaceae e Mayacaceae.

Estudos mais recentes acrescentando dados moleculares aos morfológicos têm também permitido discussão a respeito do posicionamento de Eriocaulaceae dentro de categorias taxonômicas mais elevadas. Linder e Kellogg (1995 *apud* Sano,1999) utilizando o método cladístico para dados morfológicos e moleculares (sequência de *rbcL*) concluíram sobre a proximidade entre Eriocaulaceae e Xyridaceae como grupos irmãos, confirmando o que já havia sido apresentado no cladograma gerado utilizando-se apenas dados morfológicos (Linder e Kellogg, 1995). Stevenson e Loconte (1995 *apud* Sano,1999) por outro lado concluíram pelo monofiletismo do clado Xyridaceae-Mayacaceae, tendo Eriocaulaceae como o grupo mais próximo. Chase *et al.* (1995 *apud* Sano,1999) também combinando dados morfológicos e moleculares (*rbcL*) obtiveram como resultado um grupo monofilético formado por Eriocaulaceae, Cyperaceae, Juncaceae e *Thurnia* (Thurniaceae).

Assim como a classificação de Eriocaulaceae em níveis superiores tem sido passível de discussão, as relações infrafamiliares estão insatisfatoriamente resolvidas. As primeiras hipóteses a respeito das relações entre os gêneros da família foram baseadas em poucos caracteres e assim, são necessários estudos mais amplos envolvendo o maior número de caracteres possível.

Uma análise cladística para Eriocaulaceae considerada preliminar foi realizada por Giulietti *et al.* (1995); para tanto, todo dado disponível na literatura foi pesquisado e os caracteres com valor potencial para o estudo foram assim obtidos. A fim de viabilizar a análise cladística, os autores subdividiram *Paepalanthus* em quatro grupos informais, considerando que muito provavelmente esse gênero seja artificial. “*Paepalanthus* 2” incluiu o gênero *Blastocaulon* e espécies de *Paepalanthus* com anteras monotecas; “*Paepalanthus* 3” abrangeu as espécies da seção *Actinocephalus*; “*Paepalanthus* 4” foi

formado pelas espécies de *P.* subg. *Xeractis*; “*Paepalanthus* 1” teve as demais espécies do gênero não incluídas entre 2 e 4. No total foram utilizados 11 taxa terminais de 8 gêneros. Xyridaceae s.lat. foi utilizado como grupo externo (“outgroup”) para polarizar os estados dos caracteres como plesiomórfico/apomórfico.

O cladograma obtido para Eriocaulaceae decorrente desse estudo está reproduzido na figura IV.32. Pode-se deduzir que Eriocaulaceae é um *taxon* monofilético, apresentando várias sinapomorfias: flores muito pequenas, unissexuais, brancas, reunidas em densos capítulos, com um óvulo por lóculo e pólen espiraperturado. Uma dicotomia basal da família em um clado incluindo *Eriocaulon* e *Mesanthemum* e outro incluindo os outros gêneros da família é bem apoiado, o que suporta a subdivisão de Ruhland (1903). É importante salientar que a topologia da árvore apresentada não significa que qualquer gênero possa ser considerado como “mais primitivo” que outro (Giulietti *et al.*, 1995) e sim, mais distante ou mais próximo a outro.

Embora algumas relações infrafamiliares mantiveram-se ainda não totalmente resolvidas, algumas conclusões puderam ser tiradas: *Paepalanthus* pode ser realmente considerado um grupo polifilético, já que os subgrupos tratados se encontram em quatro clados distintos do cladograma, o que indica pouca afinidade entre eles. A colocação de *Leiothrix* como grupo-irmão de *Syngonanthus* é muito bem sustentada. As sinapomorfias para os gêneros incluem a presença de flavonas e ausência de flavonols, o que foi verificado por Dokkedal e Salatino (1992), Ricci *et al.* (1996) e Coelho *et al.* (1999 a, b), além de caracteres morfológicos. “*Paepalanthus* 3”, formado pelas espécies de *P.* sect. *Actinocephalus* é grupo-irmão do clado *Leiothrix-Syngonanthus*, tendo como única sinapomorfia o estigma comissural simples. “*Paepalanthus* 4”, *P.* subg. *Xeractis*, apresenta-se como um grupo precocemente separado do clado maior graças à uma autapomorfia: brácteas involucrais maiores que as flores.

Sano (1999), considerando a ocorrência de vários caracteres, tais como a organização das inflorescências, a presença de pétalas suculentas nas flores masculinas, de estiletos simples nas flores femininas e de estaminódios escamiformes, elevou *P.* sect. *Actinocephalus* à condição de gênero.

Nesse mesmo ano, Giulietti *et al.* (1999) realizaram um novo tratamento cladístico amplificando a análise anterior. O número de taxa terminais aumentou para 25, já que houve divisão de grupos dentro de alguns gêneros, representando assim agrupamentos mais homogêneos. Isto foi feito para *Paepalanthus*, *Syngonanthus* e

Leiothrix, que foram incluídos juntamente com os demais aceitos para a família. Esta divisão permitiu que se utilizasse um maior número de caracteres (de 29 no trabalho anterior para 49), muitos dos quais haviam resultado previamente em estados de caráter extremamente variáveis dentro dos *taxa*, reduzindo enormemente a resolução.

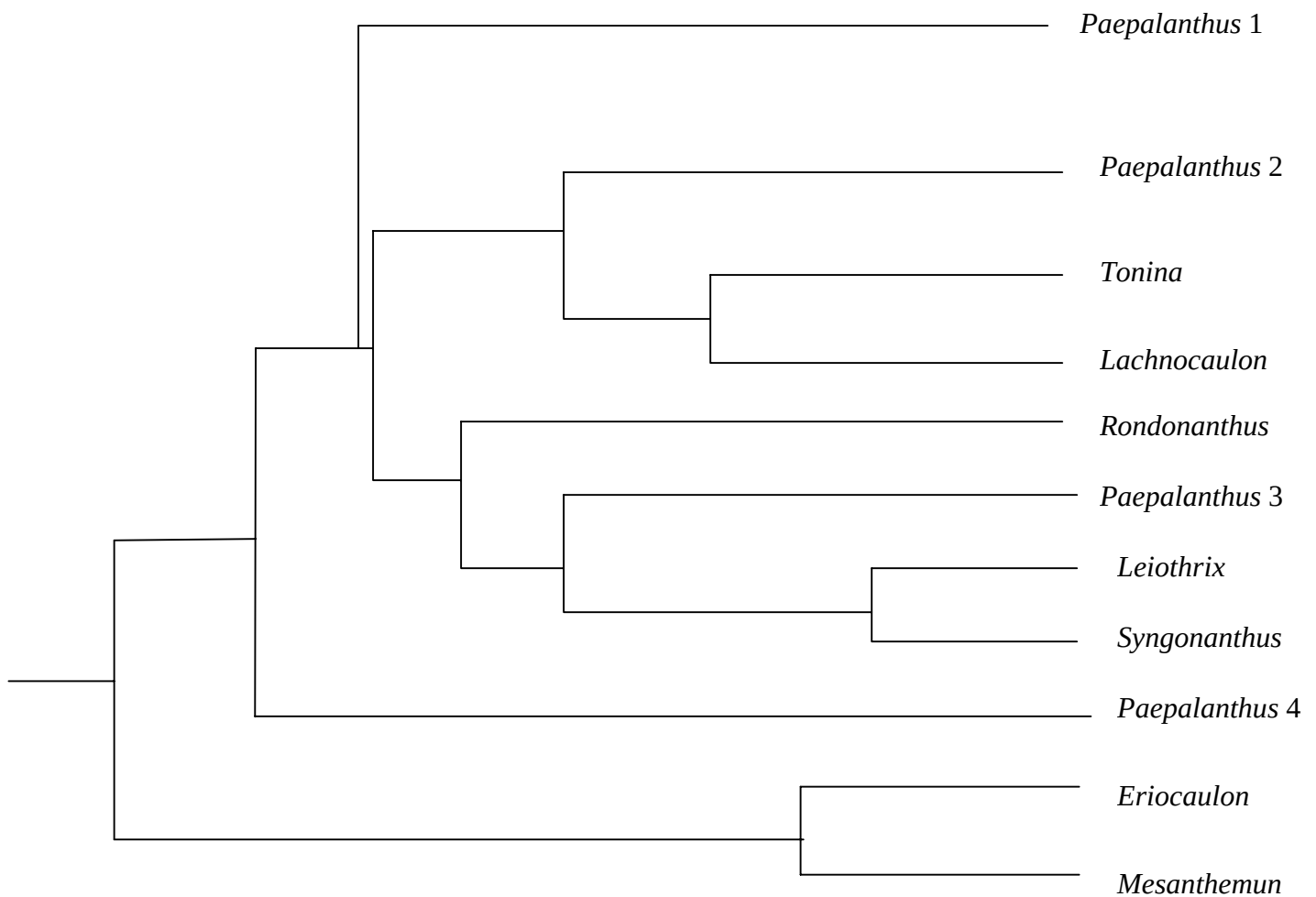


Figura IV.32 Cladograma de Eriocaulaceae (modificado de Giulietti *et al.*, 1995)

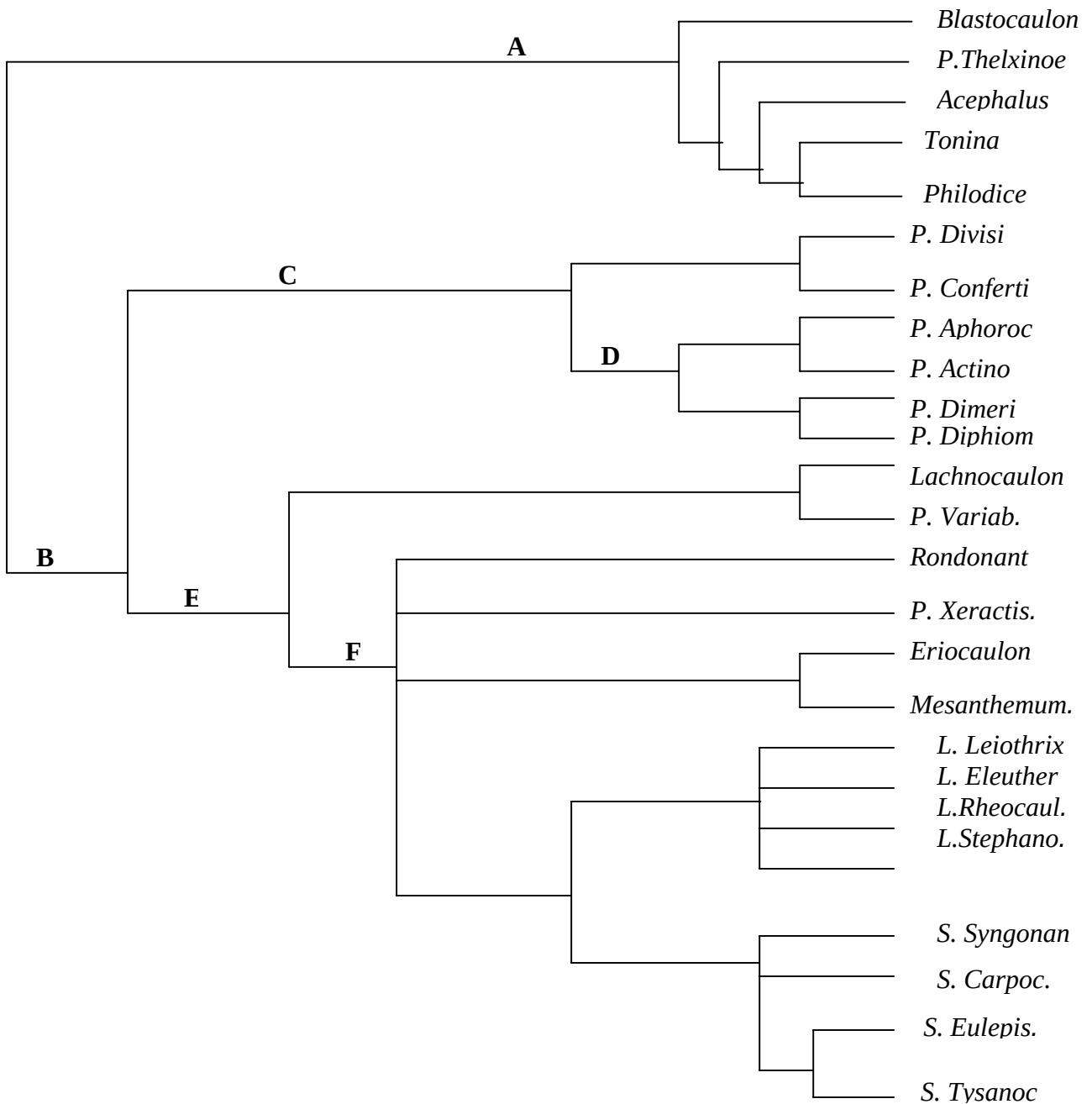


Figura IV.33. Árvore de consenso estrito da análise combinada de dados anatômicos e macromorfológicos de *Eriocaulaceae* (modificado de Giuliett *et al.*, 1999).

Além disso, o fato de se dividir os gêneros maiores num número de unidades menores permitiu que se avaliasse se estes *taxa* são realmente monofiléticos. Para polarizar os caracteres dessa vez foi utilizado o gênero *Xyris* e não *Xyridaceae s. lat.* como no trabalho anterior.

A árvore de consenso estrito obtida está reproduzida na figura IV.33. Para obtenção desse cladograma foram utilizados dados anatômicos e macromorfológicos. Serão discutidos a seguir os pontos relevantes para a abordagem quimiotaxonômica.

O clado **A** é formado por *Blastocaulon*, *P. subg. Thelxinoë*, *S. acephalus*, *Tonina* e *Philodice*, e é definido pelo hábito (caule ereto e ramificado). **A** é grupo-irmão do resto da família. A presença de *P. subg. Thelxinoë* nesse clado é a primeira evidência da natureza polifilética de *Paepalanthus*, o que já havia sido questionado anteriormente (Giulietti *et al.*, 1995). Assim, esse *taxon* é separado dos outros grupos do gênero pela primeira divisão do cladograma.

No clado **B** é indicado que *Leiothrix* seja monofilético, assim como *Syngonanthus*, e o relacionamento entre eles, de grupo-irmão, é confirmado. Dentro de *Syngonanthus* as seções *Eulepis* e *Tysanocephalus* formam um clado suportado por caracteres anatômicos: presença de hipoderme e parênquima aquífero ausente, como demonstrado por Scatena (1990), além de caracteres macromorfológicos, como sépalas menores que pétalas.

Eriocaulon e *Mesanthemum* formam um clado sustentado pela presença de flores diplostêmones e pétalas internamente pilosas. A íntima relação entre esses gêneros já havia sido reconhecida por Ruhland (1903) que os colocou juntos na subfamília Eriocauloideae. Entretanto, a análise cladística obtida não suporta esta subdivisão de Eriocaulaceae, já que não se observa a dicotomia vista anteriormente (figura IV.32).

P. subg. Xeractis encontra-se no clado **F**, num nó não resolvido, o qual também inclui *Rondonanthus* e o clado *Eriocaulon-Mesanthemum*. Esse grupo pode ser caracterizado pelas pétalas internamente pilosas, flores sem estaminódios e estames epipétalos. À parte disso, *P. subg. Xeractis* apresenta duas autapomorfias: brácteas involucrais internamente pilosas e sépalas unidas. Estes caracteres suportam fortemente a consideração de que este grupo é muito distinto de *Paepalanthus* (Giulietti *et al.*, 1999).

Clado **C** reúne grupos diferentes de *Paepalanthus*, se tomarmos por base a classificação de Ruhland (1903). Esse clado é sustentado por caracteres anatômicos

(presença de hipoderme e parênquima aquífero ausente). *P. subg. Platycaulon* forma um clado baseado em 2 autapomorfias: condescência dos escapos e capítulos fasciculados e é composto por dois *taxa* terminais, os quais formam um grupo: series *Divisi* e *Conferti*. Diante disto, *P. subg. Platycaulon* é considerado monofilético.

O clado **D**, que é grupo-irmão de *P. subg. Platycaulon* inclui *P. sect. Actinocephalus*, *P. subsect. Aphorocaulon*, *P. series Dimeri* e *P. sect. Diphyomene*. Em todas as análises realizadas, *P. sect. Actinocephalus* e *P. subsect. Aphorocaulon* formam um clado, caracterizado pela presença de paracládios e estilete simples. (Giulietti *et al.*, 1999). Similarmente, *P. series Dimeri* e *P. sect. Diphyomene* são monofiléticos, com flores dímeras. Esses dois subclados são altamente discordantes da classificação de Ruhland (1903) e demonstra que *P. sect. Eriocaulopsis* por ele proposta é polifilética, já que *P. subsect. Aphorocaulon* e *P. series Dimeri* formam clados com *taxa* de outras seções. É interessante notar que na análise cladística anterior (Giulietti *et al.*, 1995) o *taxon* de *Paepalanthus* que apresentava-se como grupo-irmão do clado *Leiothrix-Syngonanthus* era *P. sect. Actinocephalus* (figura IV.32). A situação na última análise (Giulietti *et al.*, 1999) é completamente divergente, com *P. sect. Actinocephalus* no clado **D**, como grupo-irmão de **C**, ou seja, próximo a *P. subg. Platycaulon*, enquanto que *P. subg. Xeractis* é quem agora se aproxima de *Leiothrix-Syngonanthus* (figura IV.33).

2.2 Abordagem química e quimiotaxonômica

Flavonóides têm sido considerados marcadores taxonômicos importantes graças à sua ocorrência universal em plantas superiores (Harborne, 1972). Interpretar sua ocorrência como marcador filético, entretanto, tem sido uma tarefa difícil. Harborne (1972) sugeriu uma linha evolutiva da ocorrência dessas substâncias para as angiospermas como um todo. Considerando a evolução desse grupo, de plantas arbóreas para herbáceas, o autor sugere que:

- plantas lenhosas caracteristicamente apresentam flavonols em suas folhas, especialmente miricetina, um flavonol tri-hidroxilado no anel B, e que essas substâncias estariam ausentes em plantas herbáceas.
- famílias herbáceas apresentam predominantemente flavonas, apigenina e luteolina, as quais parecem substituir os flavonóis como principais constituintes foliares nos principais grupos avançados de angiospermas. Tricetina, uma flavona equivalente à

miricetina, curiosamente não ocorre nesses grupos avançados. Parece que a perda da tri-hidroxilação no anel B está associada à substituição de flavonol por flavona.

- a presença de C-glicoflavonas parece indicar uma posição intermediária na série evolutiva entre flavonol e flavona, embora haja exceções.
- filogeneticamente, parece que a hidroxilação da posição 8 precede à da posição 6, já que 8-OH é mais comum em subclasses mais basais e 6-OH, em subclasses mais avançadas.
- em relação às monocotiledôneas, parece que a hidroxilação na posição 8 também ocorre entre as plantas mais primitivas. Como exemplo, relata a presença de flavonol 6-OH em *Eriocaulon* e de flavonas e flavonols 8-OH em Restionaceae, e conclui pela posição mais derivada de Eriocaulaceae.

Crawford (1978) discute as generalizações a respeito da evolução do padrão de distribuição do flavonóides para as angiospermas proposto por Harborne (1972). Seu argumento baseia-se no fato de que, à medida que um número maior de plantas foi sendo investigado, mais e mais exceções foram surgindo. A distribuição das substâncias geralmente ocorre correlacionada com caracteres morfológicos, confirmando a afinidade entre as plantas. O autor discute que a investigação dos flavonóides é diferente, se o considerarmos como marcador taxonômico ou filético; nesse caso, a investigação deve ser mais profunda (analisando a ocorrência das modificações, se houve pressão seletiva para tanto, qual a função envolvida).

A presença de hidroxilação na posição 6 em derivados de luteolina é reportada para famílias herbáceas, assim como em Hamamelidae (predominantemente arbórea) e Caryophyllidae (arbustiva e herbácea), além de Cyperaceae (monocotiledônea). Portanto, pode-se, segundo o autor, considerar que luteolina 6-hidroxilada seja uma substância mais comum em grupos mais avançados; entretanto, essa ocorrência sugere que tenha surgido independentemente algumas vezes em grupos não relacionados. Dessa forma, o autor conclui que parece ser mais correto utilizar os constituintes flavonoídicos de folhas ao nível de família e de *taxa* inferiores do que como marcadores filéticos para as angiospermas. Na verdade, conceitos de primitivo e avançado são baseados na ocorrência dos flavonóides nos *taxa* primitivos ou avançados (ver também Crawford e Giannasi, 1982). Flavonóides não devem ser utilizados isoladamente para inferir um sistema de classificação.

Inúmeros são os trabalhos corroborando a validade de se utilizar flavonóides como marcadores taxonômicos e as discussões a respeito da variação dos constituintes

nos diferentes *taxa* têm-se restringido aos níveis hierárquicos inferiores. Por exemplo, em trabalho investigando flavonóides de Bignoniaceae de cerrado, Blatt *et al.* (1998) encontraram perfis flavonoídicos distintos entre as tribos *Bignoniae* e *Tecomae*. A presença de flavonóides 6-hidroxilados pode ser um caráter distintivo para *Tecomae*, uma vez que não foram encontrados flavonóides 6-hidroxilados em membros de *Bignoniae*. É comumente sugerido que uma considerável variação estrutural nos flavonóides seja uma característica primitiva e que a evolução levaria a perfis flavonoídicos mais simples (Averett *et al.*, 1991; Blatt *et al.*, 1994). Baseado nessa suposição a maior complexidade química de *Tecomae* torna esta tribo plesiomórfica em relação à *Bignoniae*.

Petrovic *et al.* (1999) analisaram extratos metanólicos de sete espécies de *Hieracium* subg. *Hieracium* (Asteraceae), identificando dez substâncias, entre elas derivados de flavonas e flavonols, predominantemente flavonas. Todas as espécies de *Hieracium* examinadas, exceto *H. rotundatum*, apresentaram um padrão flavonoídico muito similar, sustentando sua classificação taxonômica no subgênero *Hieracium*. Mais que isso, a ocorrência predominantemente de flavonas suporta o *status* avançado dessas espécies.

Em relação às Eriocaulaceae os trabalhos de química de produtos naturais coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas tiveram início com o isolamento e identificação de uma isocumarina inédita, a partir de capítulos de *P. bromelioides*, denominada de paepalantina (Vilegas *et al.*, 1990). A partir desse, vários trabalhos envolvendo diferentes espécies e gêneros da família têm sido desenvolvidos, resultando na identificação de diversos flavonóides e isocumarinas, alguns inéditos. Dessa forma, o estudo quimiotaxonômico tornou-se viável, à medida que um número maior de espécies foi sendo estudada.

Nas tabelas IV.8 e IV.9 são apresentados os flavonóides e as isocumarinas, respectivamente, identificadas até o momento nas espécies já estudadas. O que se verifica é que, muito embora os perfis químicos não sejam exclusivos para determinados *taxa*, eles podem ser muito distintos.

Quanto aos flavonóides, pode-se perceber que existem duas classes distintas presentes nas espécies, flavonas e flavonóis.

[illegible]

[illegible]

As flavonas são constituintes majoritários em *P. chlorocephalus* e *P. argenteus* var. *argenteus*, espécies de *P. subg. Xeractis* (substâncias **1, 2 e 3**) e em *Syngonanthus bisulcatus*, única espécie desse gênero estudada até o momento (**4, 6, 7, e 8**). As espécies de *P. sect. Actinocephalus* (*P. polyanthus*, *P. hilairei*, *P. robustus*, *P. ramosus* e *P. denudatus*) são caracterizados principalmente pela presença de flavonóis acilados (**11 e 15**) e flavonóis glicosilados (principalmente **9, 10, 12, 13**).

Paepalanthus subg. Platycaulon apresentou uma quantidade menor de flavonóides, tendo como constituintes majoritários as isocumarinas. Mesmo assim, em *P. vellozioides* e *P. latipes* são encontrados glicosídeos de 7-metoxiquercetagina, isolados a partir de folhas e escapos (**20-25**); algumas dessas substâncias também foram encontradas em *P. bromelioides*. Em *P. subg. Platycaulon*, assim como em *P. sect. Actinocephalus*, a presença de flavonas é incomum.

No que diz respeito às isocumarinas podemos observar (tabela IV.9) que a predominância desses constituintes se encontra em espécies de *P. subg. Platycaulon* (**27, 28, 29, 30**), embora vários deles estejam presentes também em *P. sect. Actinocephalus*, em menor quantidade (**28 e 29**).

Em *Syngonanthus* não foi detectada a presença de isocumarinas e em *P. subg. Xeractis*, foram isoladas algumas dessas substâncias, em pequena quantidade (**31, 35, 37**).

A ocorrência de flavonóides em Eriocaulaceae parece seguir a proposição de Salatino *et al.* (2000, aceito). Naquele trabalho, os autores discutem que as relações entre os *taxa* da família, apresentadas na figura IV.33, refletem na quantidade de substâncias fenólicas encontradas (Salatino *et al.* 1990). Assim, para *Paepalanthus*, as quantidades de fenóis totais são maiores, enquanto que para *Leiothrix* e *Syngonanthus*, são menores. Dessa forma, os autores interpretam que a evolução parece ter sido no caminho da redução na quantidade de substâncias fenólicas em Eriocaulaceae. Do mesmo modo, parece haver uma correlação entre altos conteúdos de fenóis e predominância de flavonol e baixos conteúdos de fenóis e predominância de flavonas.

De acordo com os nossos dados de distribuição dos flavonóides (tabela IV.8) podemos observar que, realmente, a maior ocorrência de flavonóis se encontra nos *taxa* mais distantes de *Paepalanthus*, como *P. subg. Platycaulon* e *P. sect. Actinocephalus* (figura IV.33). Em *P. subg. Xeractis* há predominância de flavonas, com pequena quantidade de flavonóis. Finalmente, em *Syngonanthus*, ocorrem apenas flavonas. Dessa forma, podemos concordar com Salatino *et al.* (2000), que a evolução levou à

substituição de flavonols por flavonas. A esse respeito, é interessante notar a coerência da proximidade de *P. subg. Xeractis* com *Leiothrix* e *Syngonanthus* e não *P. sect. Actinocephalus*, como proposto anteriormente por Giulietti *et al.* (1995), graças à predominância de flavonas naquele *taxon* (figura IV.34).

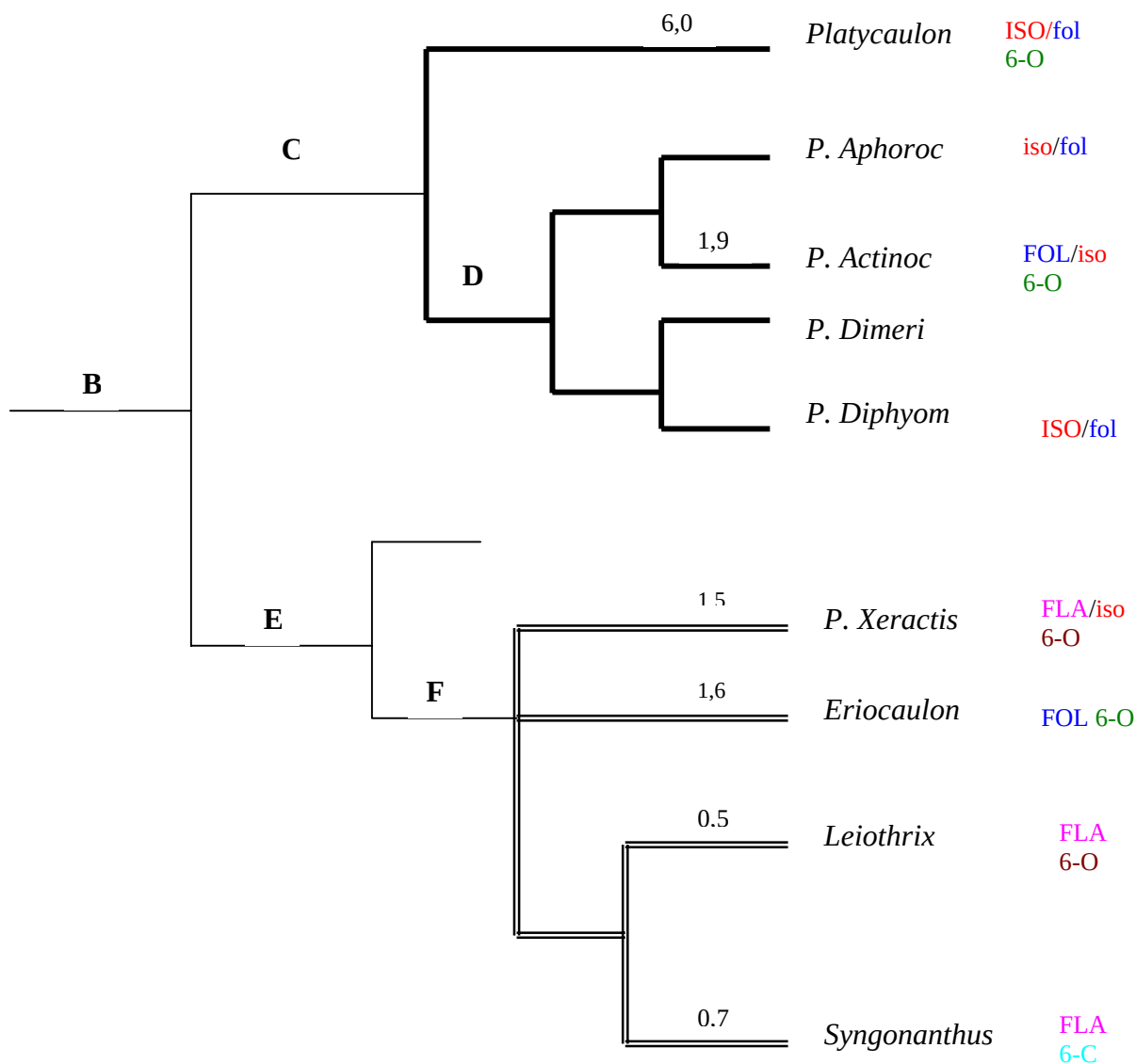
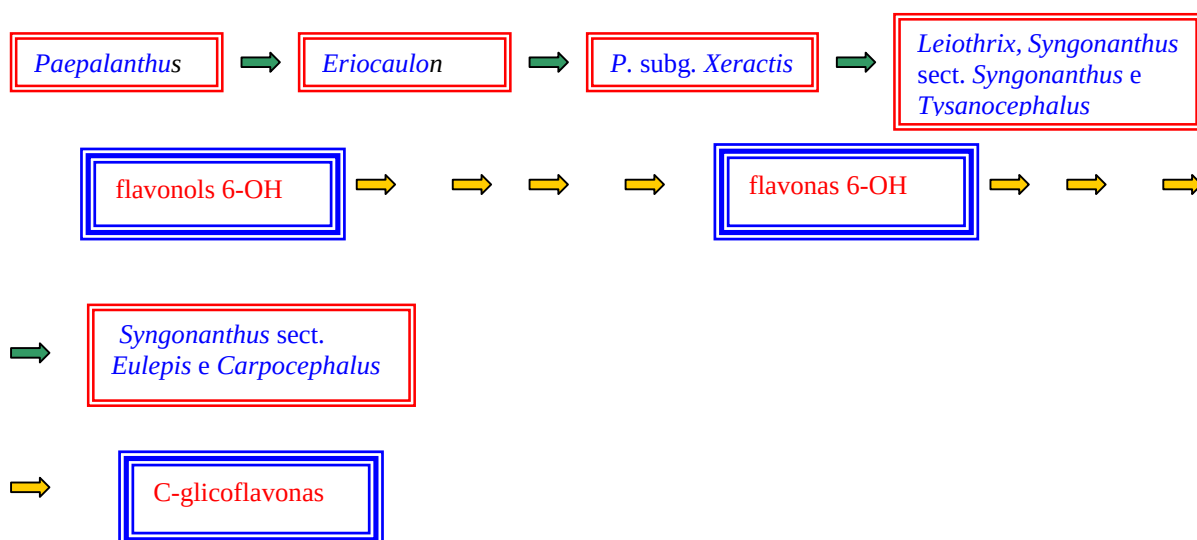


Figura IV.34. Ocorrência dos constituintes químicos em Eriocaulaceae. ISO - isocumarina majoritária; FOL - flavonol majoritário; FLA - flavona majoritária; as mesmas siglas em minúsculas representam os constituintes minoritários; os números indicam as porcentagens de fenóis totais (Salatino *et al.*, 1990); 6-O = derivados 6-hidroxilados; 6-C = derivados C-glicosilados (cladograma modificado de Giulietti *et al.*, 1999)

Outro aspecto estrutural dos flavonóides discutido por Salatino *et al.* (2000) diz respeito à presença de substâncias 6-oxigenadas. Evidências sugerem que em Eriocaulaceae a oxigenação em 6 foi substituída durante a evolução: em grupos com caracteres considerados plesiomórficos (com flavonols) como *Paepalanthus* e *Eriocaulon*, 6-oxigenação predomina. Nos grupos com caracteres considerados mais apomórficos (com flavonas), como *Syngonanthus*, as seções mais avançadas, *Eupelis* e *Tysanocephalus*, não apresentam derivados com esse padrão de oxigenação, enquanto nas seções mais plesiomórficas, *Carphocephalus* e *Syngonanthus*, derivados 6-oxigenados predominam. É surpreendente notar que, nas seções mais avançadas, predominam C-glicoflavonas, já que esta é uma substância associada normamente à condição de primitividade (Harborne, 1972; figura IV.34).

Novamente, se nos remetermos aos nossos dados (tabela IV.8), essa proposição parece ser coerente. A presença de derivados de flavonóis 6-oxigenados realmente predomina em *Paepalanthus*, o que é considerado uma evidência de plesiomorfia para o gênero. Em *P.* subg. *Xeractis*, entretanto, ocorrem derivados de flavonas 6-oxigenados, o que mais uma vez aproxima esse *taxon* do clado *Leiothrix-Syngonanthus* na linha evolutiva da família (figura IV.34). De acordo com as relações filogenéticas encontradas na figura IV.33, o posicionamento de *Eriocaulon* é próximo a grupos mais avançados, como *Leiothrix-Syngonanthus*. Em relação ao conteúdo de fenóis os índices para *Eriocaulon* não são tão altos quanto os presentes em grupos mais distantes de *Paepalanthus*, como *P.* subg. *Platycaulon* ou *P.* sect. *Actinocephalus*. De fato, os grupos que apresentaram teores mais baixos de constituintes fenólicos foram *Leiothrix* (0,5%), seguido por *Syngonanthus* (0,7%), *P.* subg. *Xeractis* (1,5%) e *Eriocaulon* (1,6%) (figura IV.34). Assim, podemos sugerir, baseados na discussão de Salatino *et al.* (2000) que a evolução dos flavonóides em Eriocaulaceae seguiu o seguinte caminho:



No que diz respeito às isocumarinas podemos observar que o caminho evolutivo parece ter levado à perda dessas substâncias (tabela IV.9). Enquanto em *P. subg. Platycaulon* elas predominam, em *P. sect. Actinocephalus* são comuns, mas não os constituintes majoritários, em *P. subg. Xeractis* são de pouca ocorrência e em *Leiothrix-Syngonanthus* estão ausentes (figura IV.34).

Como já comentado, baseado em caracteres morfológicos, Sano (1999) elevou *P. sect. Actinocephalus* a gênero *Actinocephalus*. Todas as espécies estudadas desse grupo apresentaram um perfil homogêneo, tipicamente constituído por flavonóis acilados e glicosilados. Dessa forma, a química de flavonóides corrobora a proposição de Sano (1999).

De acordo com Giulietti (1997) os caracteres taxonômicos encontrados em *P. subg. Platycaulon* poderiam suportar a nova condição de gênero desse *taxon*. As isocumarinas são os constituintes majoritários dos extratos alcoólicos das espécies desse *taxon*, tanto de capítulos quanto de folhas, podendo ser considerado um importante marcador taxonômico para o grupo. Baseado no perfil de isocumarinas do *taxon* e considerando sua condição monofilética (figura IV.33), concordamos com a proposição de Giulietti (1997) e sugerimos que realmente *P. subg. Platycaulon* seja elevado ao *status* de gênero.

O clado **D** descrito anteriormente é formado por *taxa* pouco relacionados, de acordo com o sistema de classificação proposto por Ruhland (1903) e se apresenta como grupo-irmão de *P. subg. Platycaulon*. Quimicamente podemos perceber, analisando as tabelas IV.8 e IV.9 que há similaridade entre os perfis desses grupos: a presença de isocumarinas é comum a *P. subg. Platycaulon*, onde são constituintes majoritários, e aos

outros taxa já analisados quimicamente, *Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*, *P. subsect. Aphorocaulon*, *P. sect. Diphyomene*, embora ocorram aqui em quantidades menores. Em relação aos flavonóides, em todos os grupos foram identificados flavonols, derivados de kaempferol e quercetina. *P. sect. Actinocephalus* e *P. subsect. Aphorocaulon*, que se mantêm como grupo-irmão em todos os tratamentos cladísticos, apresentam o perfil de flavonóides muito similar, e a presença de **28** é comum aos dois. Esses dados são muito coerentes com a proposição cladística de Giulietti *et al.* (1999) e reforçam a posição de *P. subg. Platycaulon* como um gênero independente, muito próximo ao clado **D**, que abrange *P. sect. Actinocephalus*, *P. subsect. Aphorocaulon*, *P. sect. Diphyomene* e *P. series Dimeri*.

Na primeira análise cladística realizada por Giulietti *et al.* (1995) *P. subg. Xeractis* apresentava-se como um grupo precocemente separado do clado maior constituído pelos outros de Eriocaulaceae (figura IV.32), graças a uma autapomorfia (brácteas involucrais mais longas que as flores). No tratamento posterior proposto por Giulietti *et al.* (1999) esse *taxon* se encontra num nó não resolvido no clado **F**, próximo a *Leiothrix-Syngonanthus* e *Eriocaulon-Mesanthemum* (figura IV.33). Já foi discutida anteriormente a evidência morfológica de que *P. subg. Xeractis* parece ser um *taxon* muito distinto dos outros de *Paepalanthus*. Quimicamente, podemos observar (tabela IV.8) que os constituintes majoritários dos extratos das duas espécies estudadas são derivados de flavona (**1, 2, 3**), assim como os constituintes de *Leiothrix* e *Syngonanthus*. Numa família onde o perfil químico é tão diversificado, a presença de uma classe de flavonóides restrita a um número pequeno de taxa deve ser considerado um marcador taxonômico importante. A presença de flavonas é um caráter marcante, utilizado para definir o clado *Leiothrix-Syngonanthus*, juntamente com caracteres morfológicos.

Podemos concluir, baseados no estudo químico e na análise do cladograma apresentado na figura IV.34, que *P. subg. Xeractis* deva ser um gênero independente de *Paepalanthus*, muito próximo ao clado *Leiothrix-Syngonanthus*. A consideração dos dados químicos para *P. subg. Xeractis* num próximo tratamento cladístico pode ser crucial para resolver as relações entre esse grupo e o clado *Leiothrix-Syngonanthus*.

V. CONCLUSÕES

Apesar de sabermos que ainda há um grande número de *taxa* a serem estudados, não há dúvidas de que *Paepalanthus* é um gênero polifilético e que deve ser realmente dividido em grupos menores e mais naturais. Pudemos perceber a importância da interdisciplinaridade para o estudo da família, e que mais e mais dados são necessários para reconstruir a filogenia de Eriocaulaceae. O estudo químico provou ser de grande importância para contribuir para esse conhecimento; os perfis são muito distintos nos diferentes *taxa*, apesar de não necessariamente exclusivos.

De qualquer modo, a presença das isocumarinas em *P.* subg. *Platycaulon* é marcante, assim como os derivados de flavonas são claramente os constituintes majoritários de *P.* subg. *Xeractis*. Assim, a inclusão dos dados químicos referentes a esse grupo numa próxima análise cladística poderá ser de relevante importância para auxiliar a resolver as relações entre *P.* subg. *Xeractis* e o clado *Leiothrix-Syngonanthus*.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, A.A. **O planalto de Diamantina: um setor da Serra do Espinhaço em Minas Gerais**. São Paulo: Instituto de Geografia, USP, 1984.
- AGRAWAL, P.K. (ed). **Carbon 13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989 p.564.
- ANDRADE, F.D.P. **Estudo químico de plantas com atividade biológica**. Araraquara, 1997. 61p. (Monografia apresentada ao Instituto de Química de Araraquara para obtenção do título de Bacharel em Química).
- ANDRADE, F. D. P. **Investigação química de plantas da família Eriocaulaceae**. Araraquara, 1999. 93p. Dissertação (Mestrado). Inst. Química, Araraquara – Univ Est. Paulista.
- ANDRADE, F. D. P., SANTOS, L.C., DOKEDAL, A.L., VILEGAS, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. **Phytochemistry**, v. 52, p. 411-5, 1999.
- AUGIER, J. Les glicides de quelques monocotylédons de l'ordre des farinosae. **Bull. Soc. Bot. Fr.**, v 103, n. 1-2, p. 251-52, 1956.
- AVERETT, J.E., WAGNER, W.L., HUANG, S. The flavonoids of *Oenothera* sect. *Megapterium* (Onagraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 19, p. 87-9, 1991.
- BATE-SMITH, E. C.. The phenolic constituents of plants and their taxonomic significance. II. Monocotyledons. **J. Linn. Soc. (Bot.)**, v. 60, p. 325-56, 1968.
- BATE-SMITH, E. C., HARBORNE, J. B. Quercetagenin and patuletin in *Eriocaulon*. **Phytochemistry**, v. 8, p.1035-37, 1969.
- BLATT, C.T.T., SALATINO, A, SALATINO, M.L.F., MARTÍNEZ, M.A.P., CAVALCANTI, T.B. Flavonoids of *Diplusodon* (Lythraceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 22, p. 101-7, 1994.
- BLATT, C.T.T., SANTOS, M.D., SALATINO, A. Flavonoids of Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Plant Syst. Evol.**, v. 210, p. 289-92. 1998.
- BOHM, B.A., CHOY, J.B. Flavonoids of *Balsamorhiza deltoidea* and *Wyethia mollis*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.15, p. 541, 1983.

- CASTRO, N.M. **Estudos morfológicos dos órgãos vegetativos de espécies de *Paepalanthus* Kunth (Eriocaulaceae) da Serra do Cipó (Minas Gerais)**. São Paulo, 1986. Dissertação (Mestrado). Inst. Bioc. Univ. S. Paulo.
- CASTRO, N.M., MENEZES, N.L. Considerações sobre a natureza das células altas da epiderme abaxial das folhas de *Paepalanthus* Kunth – Eriocaulaceae. **Bol. Bot. Univ. S. Paulo**, v. 12, p. 95-100, 1990.
- CASTRO, N.M., MENEZES, N.L. Aspectos da anatomia foliar de algumas espécies de *Paepalanthus* Kunth, Eriocaulaceae da Serra do Cipó (Minas Gerais). **Acta Bot. Bras.**, v. 9, n. 2, p. 213-29, 1995.
- COELHO, R.G., VILEGAS, W., PARRA, L.R. Flavonóides C-glicosilados de *S. bisulcatus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 22., 1999, Poços de Caldas. **Resumos...** Poços de Caldas: SBQ, 1999a, p.17.
- COELHO, R.G., VILEGAS, W., PARRA, L.R., SANO, P.T. Estudo químico dos escapos de *S. bisulcatus*. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE LATINO-AMERICANA DE FITOQUÍMICA, 3, 1999. **Resumos...** 1999b, p. 71.
- CRAWFORD, D.J. Flavonoid chemistry and angiosperm evolution. **Bot. Rev.**, v. 44, n. 4, p. 431-56, 1978.
- CRAWFORD, D.J, GIANNASI, D.E. Plant chemosystematics. **Bioscience**, v. 32, n. 2, p. 114-24, 1982.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. Boston: Houghton Mifflin Company, 1968.
- CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.
- DAHLGREN, R.M., CLIFFORD, H.T. **The Monocotyledons – a comparative study**. London: Academic Press, 1982.
- DAHLGREN, R.M.T., CLIFFORD, A.T., YEO, P.F. **The families of the Monocotyledons: structure, evolution and taxonomy**. London: Springer-Verlag, 1985.
- DOKKEDAL, A L., SALATINO, A.. Flavonoids of brazilian species of *Leiothrix* (Eriocaulaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 20, n 1, p. 31-2, 1992.
- GIULIETTI , A.M. **Análise crítica da evolução da morfologia e da sistemática das Eriocaulaceae**. Feira de Santana, 1997. 161p. Tese (Titular) - Univ. Est. Feira de Santana.

- GIULIETTI, A.M. **Os gêneros *Eriocaulon* L. e *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) na Serra do Cipó.** São Paulo, 1978. Tese (Doutorado) - Inst. Bioc., Univ. S Paulo.
- GIULIETTI, A.M. **Estudos taxonômicos no gênero *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae).** São Paulo, 1984. Tese (Livre-Docência) - Inst. Bioc., Univ. S Paulo.
- GIULIETTI, A. M., AMARAL, M. C., BITTRICH, V. Phylogenetic analysis of inter- and infrageneric relationships of *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae). **Kew Bull.**, v. 50. p. 55-71, 1995.
- GIULIETTI, A.M., HENSOLD, N. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. **Acta Bot. Bras.**, v 4, n. 1, p. 133-58, 1990.
- GIULIETTI, A.M., HENSOLD, N. Synonymization of the genera *Comanthera* and *Carptotepala* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v 78, p. 460-4, 1991.
- GIULIETTI, A.M., MENEZES, N.L., PIRANI, J.R., MEGURO, M., WANDERLEY, M.G.L. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: caracterização e lista de espécies. **Bol. Bot.** v 9, p. 1-152, 1987.
- GIULIETTI, A.M., PIRANI, J.R. Patterns of geographical distribution of some plant species from the Espinhaço Range, Minas Gerais and Bahia, Brazil. In: VANZOLINI, P.E. and Heyer, W.R. (eds.). **Proceedings of a workshop on neotropical distribution patterns held 12-16.** January 1987, Rio de Janeiro. Acad. Bras. Cien. Rio de Janeiro, 1988, p. 39-69.
- GIULIETTI, A. M., SCATENA, V. L., SANO, P. T., PARRA, L. R., QUEIROZ, L. P., HARLEY, R. M., MENEZES, N. L., YSEPPON, A. M. B., SALATINO, A., SALATINO, M. L., VILEGAS, W., SANTOS, L. C., RICCI, C. V., BONFIM, M. C. P., MIRANDA, E. B. **Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae.** In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF MONOCOTYLEDONS. 2000.
- HANDRO, W., CAMPOS, J.F.B.M., OLIVEIRA, Z.M. Sobre a anatomia foliar de algumas Compostas dos campos rupestres. **Ciênc. Cult.**, v 22, p.107-26, 1970.
- HARBORNE, J.B. Evolution and function of flavonoids in plants. **Rec Adv. Phytochem.**, v.4, p. 107-41, 1972.
- HARBORNE, J.B. **The flavonoids: advances in research.** New York. Chapman and Hall, 1994.
- HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986.** New York, Chapman and Hall, 1996.

- HARBORNE, J. B., MABRY, T. J. **The flavonoids: advances in research**. New York, Chapman and Hall, 1982.
- HENSOLD, N. Morphology and systematics of *Paepalanthus* subgenus *Xeractis* (Eriocaulaceae). **Syst. Bot. Monogr**, v 23, p. 1-150, 1988.
- HENSOLD, N. Revisionary studies in the Eriocaulaceae of Venezuela. **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v 78, p. 424-40, 1991.
- HENSOLD, N. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: *Paepalanthus* subg. *Xeractis* (Eriocaulaceae). **Bol Bot. Univ. São Paulo**, v 17, p. 207-18, 1998.
- HENSOLD, N., GIULIETTI, A.M. Revision and redefinition of the genus *Rondonanthus* Herzog (Eriocaulaceae). **Ann. Miss. Bot. Gard.**, v 78, p. 441-59, 1991
- HERZOG, T. Neue und weniger bekannte Eriocaulaceae aus Nord Brasilien und dem angrenzenden **Venezuela**. In: Fedde, F. (ed.). **Repertorium specierum novarum vegetabilis**. [s.l.: s.n.], 1931. v. 25, p. 202-13.
- HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN, M., MARSTON, A. **Preparative chromatography applications in natural products isolation**. Berlin: Springer-Verlag, 1986.
- JOLY, A.B. **Conheça a vegetação brasileira**. São Paulo: EDUSP. 1970.
- KOERNICKE, F. Eriocaulaceae In: C.P. von Martius & A.W. Eichler (eds.) **Flora Brasiliensis**, v.3, n.1, p. 273-307, 1863.
- KUNTH, C.S. **Enumeratio Plantarum**. Stutgardias: J.G. Cotta. 1841. v. 3.
- MARKHAM, K.R. **Techniques of flavonoid identification**. Tokyo: Academic Press, 1982.
- MARTIUS, C.F.P. Die Eriocaulaceae als selbständige Pflanzenfamilie aufgestellt und erläutert. **Nova Acta Acad. Leop. Carol.**, v. 17, n. 1, p. 1-72, 1835.
- MENEZES, N.L. **Aspectos anatômicos e a taxonomia da família Velloziaceae**. São Paulo, 1970.. Tese (Doutorado). Inst. Bioc. Univ. S. Paulo.
- MENEZES, N.L. Traqueídes de transfusão no gênero *Vellozia* Vand. **Ciênc. Cult.** v. 23, p. 389-409, 1971a.
- MENEZES, N.L. New *taxa* e new combinations in Velloziaceae. **Ciênc. Cult.**, v 23, p. 421-2, 1971b.
- MOLDENKE, H.N., SMITH, L.B. Eriocauláceas. In: P.R.REITZ (ed.) **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1976.

- MONTEIRO, W.R, CASTRO, M.M., GIULIETTI, A.M. Aspects of leaf structure of some species of *Leiothrix* Ruhl. (Eriocaulaceae) from the Serra do Cipó (Minas Gerais, Brasil). **Rev. Bras. Bot.**, v 8, p. 109-25, 1985.
- MONTEIRO, W.R., GIULIETTI, A.M., CASTRO, M.M. Aspects of leaf structure of some species of *Eriocaulon* L. (Eriocaulaceae) from the Serra do Cipó (Minas Gerais, Brazil). **Rev. Bras. Bot.**, v. 7, n. 2, p. 137-47, 1984.
- MOREIRA, A.N. Relevô In: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Geografia do Brasil-Grande região Leste**. Rio de Janeiro: IBGE, 1965. v.5, p. 5-54.
- NEHME, C.J. **Estudo químico de plantas da família Eriocaulaceae - Escapos – *P. bromelioides* e *P. latipes***. Araraquara, 1997. 73p. Dissertação (Mestrado). Inst. Química Araraquara – Univ Est. Paulista.
- PETROVIC, S.D., LÖSCHER, R., GORUNOVIC, M.S, MERFORT, I. Flavonoid and phenolic acid patterns in seven *Hieracium* species. **Biochem. Syst. Ecol**, v. 27, p. 651-6, 1999.
- RICCI, C. V.; PATRÍCIO, M.C.; SALATINO, M.L.; SALATINO, A, GIULIETTI, A M. Flavonoids of *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae): taxonomic implications. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 24, n. 6, p. 577-83, 1996.
- RUHLAND, W. Eriocaulaceae. In: Engler, A. **Das Pflanzenreich**. Werinheim: H.R. Engelmann, v 13 (IV-30), 1903.
- SAJO, M.G., MENEZES, N.L. Anatomia do rizóforo em espécies de *Vernonia* Scrb. (Compositae) da Serra do Cipó, MG. **Rev. Bras. Biol.** V. 46, p. 189-96, 1986.
- SALATINO, A; SALATINO, M. L. F., GIULIETTI, A M. Contents of soluble phenolic compounds of capitula of Eriocaulaceae. **Quím. Nova**, v. 13, n.4, p. 289-92, 1990.
- SALATINO, A., SALATINO, M.L.F., SANTOS, D.Y.A.C., PATRÍCIO, M.C.B. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, Lythraceae and Velloziaceae from campos rupestres. **Gen. Mol. Biol.**. 2000. (aceito).
- SALATINO, M. L. F.; PEREIRA, H. B.; SALATINO, A., GIULIETTI, A M. Alcanos dos capítulos de algumas espécies de Eriocaulaceae. **Bol. Bot. Univ. S. Paulo**, v. 10, p. 55-64, 1988.
- SANO, P.T. **Revisão de *Actinocephalus* (Koern.) Sano – Eriocaulaceae**. São Paulo, 1999. 241 p. Tese (Doutorado) - Inst. Bioc. Univ. S. Paulo.
- SANTOS, L.C. **Estudo químico de *Paepalanthus hilairei* Koern. (Eriocaulaceae)**. Araraquara, 1997. 117p. Dissertação (Mestrado) - Inst. Química Araraquara – Univ Est. Paulista.

- SCATENA. V.L. **Morfoanatomia de espécies de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae) dos campos rupestres do Brasil.** São Paulo, 1990. Tese (Doutorado) - Inst. Bioc. Univ. S. Paulo.
- SCATENA, V.L., MENEZES, N.L. Considerações sobre a natureza da câmara subestomática e das células epidérmicas das folhas de *Syngonanthus* Ruhl. secção *Thysanocephalus* Koern. – Eriocaulaceae. **Rev. Bras. Bot.**, v. 16, n. 2, p. 159-65, 1993.
- SCATENA, V.L., MENEZES, N.L. Aspectos morfológicos e anatômicos do caule em espécies de *Syngonanthus* Ruhl. Eriocaulaceae. **Bol. Bot. Univ. S. Paulo**, v. 14, p. 91-107, 1995.
- SCATENA, V.L., MENEZES, N.L. Anatomia de escapos e folhas de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae) de campos rupestres. **Rev. Bras. Biol.**, v. 56, n. 2, p. 317-32, 1996a.
- SCATENA, V.L., MENEZES, N.L. Anatomia de raízes de *Syngonanthus* Ruhl. (Eriocaulaceae). **Rev. Bras. Biol.**, v. 56, n.2, p.333-43, 1996b.
- SCATENA, V.L., ROCHA, C.L.M., Anatomia do órgãos vegetativos e do escapo floral de *Leiothrix crassifolia* (Bong.) Ruhl., Eriocaulaceae, da Serra do Cipó – MG. **Acta Bot. Bras.**, v. 9, n. 2, p.195-211, 1995.
- TAHKTAJAN, A.L. **Flowering plants, origin and dispersal.** Edinburgh: Oliver and Boyd. 1969.
- TAHKTAJAN, A.L. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). **Bot. Rev.**, v. 46, n. 3, p. 225-359, 1980.
- TEIXEIRA, M. A; RIBEIRO, A., GIULIETTI, A M. Sempre-vivas do cerrado mineiro - cromatografia gás-líquido de hidrocarbonetos de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhl. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA*, 36, 1984. São Paulo. **Resumos...** São Paulo, Universidade de São Paulo, 1984. p.549.
- TEIXEIRA, M. A; RIBEIRO, A., GIULIETTI, A M. Sempre-vivas das serras de Minas Gerais - misturas de dióis de *Leiothrix flavescens* (Bong.) Ruhl. **Ciênc. Cult.**, v. 37, supl. P. 1-498, 1985.
- VILEGAS, W., DOKKEDAL, A. L., RASTRELLI, L., PIACENTE, S., PIZZA, C. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *P. latipes*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 5, p. 746-49, 1999a.

- VILEGAS, W., NEHME, C. J., DOKKEDAL, A. L. PIACENTE, S., RASTRELLI, L., PIZZA, C. Quercetagenin 7-methyl ether glycosides from *Paepalanthus vellozioides* and *P. latipes*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 3, p. 403-09, 1999b.
- VILEGAS, W, ROQUE, N.F., SALATINO, A., GIESBRECHT, A.M., DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v.29, n. 97, p. 2299-301, 1990.
- VILEGAS, W., SANTOS, L. C., ALÉCIO, A. C., PIZZA, C., PIACENTE, S., DEPAWL, E., SANO, P.T. Naphtopyranones glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207-10, 1998.
- WAGNER, H.M., BLADT, S., ZGAINSKI, E.M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, p.303., 1984.