

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Instituto de Química
Departamento de Química Orgânica

THAÍS PEZZA DE SOUZA

**Estudo químico e atividade antirradicalar da
fração acetato de etila das folhas de
Actinocephalus divaricatus (Koern.) Sano
(Eriocaulaceae)**

ARARAQUARA – S.P.
2016

THAÍS PEZZA DE SOUZA

**Estudo químico e atividade antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de
Actinocephalus divaricatus (Koern.) Sano (Eriocaulaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado no Instituto de Química, Universidade
Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Química.

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

ARARAQUARA – S.P.
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S719e Souza, Thaís Pezza de
Estudo químico e atividade antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) / Thaís Pezza de Souza. – Araraquara : [s.n.], 2016
67 f. : il.

Trabalho de conclusão (bacharelado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

1. Ácido fenólico. 2. Eriocaulaceae. 3. Metabólitos.
4. Flavonoides. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência.
I. Título.

THAÍS PEZZA DE SOUZA

**Estudo químico e atividade antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de
Actinocephalus divaricatus (Koern.) Sano (Eriocaulaceae)**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado no Instituto de Química, Universidade
Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara,
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Bacharel em Química.

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

Data da entrega: ____/____/____

MEMBROS COMPONENTES DA BANCA EXAMINADORA:

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

Membro Titular: Prof^a. Dr^a. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

Membro Titular: Prof^a. Dr^a. Isabele Rodrigues Nascimento

Local: Universidade Estadual Paulista
UNESP – Instituto de Química de Araraquara

À Deus, aos meus pais e a todos aqueles que acreditaram em mim em todos esses árduos anos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, porque sem Ele eu não teria conseguido nada em minha vida e porque em todas as dificuldades Ele sempre esteve presente.

Aos meus pais Elisa Helena Pezza de Souza e Mauro Sérgio de Souza, por sempre me apoiarem, estarem comigo todos os dias apesar de todos os empecilhos e aguentarem todo o meu estresse com calma e paciência.

À minha família, minhas avós, meus tios e tias e meus primos, que sempre me incentivaram a ir mais longe e seguir meus sonhos.

À minha orientadora Lourdes Campaner dos Santos, por todos os ensinamentos e por ter aberto as portas do seu laboratório para que eu realizasse o meu trabalho e as portas do seu coração para que eu me sentisse como parte de uma grande família.

A todos os integrantes do Laboratório de Fitoquímica, principalmente à Ana Caroline Zanatta Silva, pela paciência, pelos ensinamentos, e por todo o acompanhamento nos experimentos realizados.

Aos colegas Alexander, Carla, Daylin, Felipe Gregório, Felipe Hilário, Giulia, Marcelo, Talita, Thayná e Weslei, por terem me dado uma segunda família e por sempre estarem dispostos a me ajudar no que eu precisasse, ensinando-me a evoluir pessoal e profissionalmente a cada dia.

Aos meus amigos, sejam eles meus veteranos, integrantes da minha turma ou meus “bixos” por estarem comigo sempre que precisei, sendo motivo de alegria e um dos porquês de eu ter força para chegar até o fim deste curso.

Obrigada por fazerem esses anos inesquecíveis Gabriel Alvarenga, Luis Felipe Bricks, Naira, Renan, Rodrigo, Samir, Douglas, Adrielle, Flávia, Giovanni, Debora, Ana Clara,

Karina, Nágila, Aline, Bianca, Bruna, Lucas Portero, Luiz Moreira, Maíra, Mayara, Mariana, Melany, Noelle, Paloma, Paulo, Pedro Augusto, Stéphanie, Caio, Eduardo (Barney), João Victor (Chico), Victor (Xerxes), Guilherme (Sumido), Guilherme (Tripode), Jessyka (Ky), Nicole (Kenga), Thiago Catelani, Carlos Moris, Carlos Sérgio, Naiara Gabriela, Maycon, Yago, André, Roberto, Gabriel Nunes, Gabriel Rodrigues, Rodrigo (Jataí), Denis, Marisa Capela e tantas outras pessoas que, de alguma forma, estiveram presentes em minha vida.

Àqueles que mais que amigos, foram quase como irmãos Joana Souza Oliveira Galavotti, Thamiris Costa dos Santos, Rodrigo César Costa e Weslei Bruno Botero, por serem aqueles para quem eu sabia que podia contar os meus problemas, dividir as minhas alegrias e compartilhar meus medos e sonhos.

Às outras famílias que tive nos cursos de Italiano no Circulo Ítalo-Brasileiro e de Inglês no CNA, pois sem elas teria sido muito mais difícil esta jornada.

A todos os meus professores que a cada dia mais faziam emergir esta Química que me torno, em especial aos professores Marco Aurélio Cebim e Maria Helena Sebastiana Sahão Bizelli por terem feito com que desde o primeiro semestre eu não quisesse desistir do curso e tentasse me espelhar nesses dois profissionais incríveis, encantando-me com a Química.

A todos os servidores do Instituto de Química, principalmente ao Nivaldo e à Lucineia por todas as análises de RMN e pela ajuda, pois sem os mesmos este trabalho nunca teria sido concretizado. Aos funcionários da biblioteca, que tanto me auxiliaram e me aguentaram durante a graduação.

Ao CNPQ-PIBIC e CNPQ-Reitoria pela bolsa concedida. As agências financiadoras do Projeto FAPESP pelo auxílio à pesquisa.

Ao Instituto de Química e ao Laboratório de Fitoquímica, pela infraestrutura oferecida para a realização deste projeto.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

Charles Chaplin

RESUMO

A família Eriocaulaceae possui 1.400 espécies divididas em 10 gêneros, sendo que muitas plantas são endêmicas ao Brasil. Um desses gêneros é o *Actinocephalus*, que até 2004 era uma subseção do gênero *Paepalanthus* e que, devido a estudos cladísticos e análises morfológicas de várias espécies, foi elevado a gênero *Actinocephalus*. Portanto, atualmente este gênero conta com 49 espécies, sendo *Actinocephalus divaricatus* a estudada neste trabalho. As partes aéreas de *A. divaricatus* foram separadas em escapos, capítulos e folhas. Com as folhas foi preparado o extrato metanólico e, posteriormente, foi realizada uma partição com água e acetato de etila e, com a fração aquosa obtida, foi realizada uma partição com *n*-butanol. A fração acetato de etila, devido principalmente ao seu alto rendimento, foi escolhida para fracionamento em sephadex LH-20. Com as frações obtidas foi realizada CCD, propiciando a fração 24 (1,5 mg) que, por apresentar somente um *spot*, foi analisada por RMN de ^1H , sendo identificada a 6-hidroxi-7-metoxiquecertina (AdFa1). Também foi obtida a fração 12 (129,5 mg), que foi purificada por HPLC-PDA semipreparativo, resultando no isolamento de outras quatro substâncias, que após análise por RMN foram identificadas como sendo: ácido 3,4-diidroxibenzóico (AdFa2), ácido *p*-hidroxibenzóico (AdFa3) e ácido 4-hidróxi-3-metoxibenzóico (AdFa4) e ao flavonoide 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (AdFa5). Com (AdFa5) foi realizada a quantificação por HPLC-PDA, sendo determinado na amostra $25,65 \pm 0,43 \text{ mg g}^{-1}$ do flavonoide (AdFa5) na fração acetato de etila. Além disso, foi realizado o ensaio antirradicalar, com os padrões de ácido gálico, que apresentou $\text{IC}_{50} = 30,69 \pm 4,9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e de quercetina, que apresentou IC_{50} de $50,96 \pm 5,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que o IC_{50} de fração acetato de etila foi de $440,66 \pm 24,27 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. O teor de fenóis totais na fração acetato de etila foi de $274,61 \text{ } \mu\text{g mg}^{-1}$, enquanto o teor de flavonoides totais foi de $13,14 \text{ } \mu\text{g.mg}^{-1}$ de fração acetato de etila. Desta forma, foi possível verificar que a fração acetato de etila, apresenta menor atividade antirradicalar, quando comparada com o valor obtido para os padrões de ácido gálico e de quercetina. Este resultado é justificado pela presença dos flavonoides glicosilados presentes na fração.

Palavras – chave: Ácidos fenólicos. Atividade antirradicalar. Fitoquímica. Flavonoides. Quantificação.

ABSTRACT

The Eriocaulaceae family has 1.400 species divided into 10 genera, with many plants being endemic in Brazil. One of these genera is the *Actinocephalus*, which until 2004 was a subsection of the genre *Paepalanthus* and, because of cladistic studies and morphological analyzes of several species, was elevated to genus *Actinocephalus*. Therefore this genus currently has 49 species and the specie studied in this work was *Actinocephalus divaricatus*. The aerial parts of *A. divaricatus* were separated into scapes, capitula and leaves. A methanolic extract was made with the leaves, and after a partition with wather and ethyl acetate was made and with the aqueous fraction a partition with n-butanol was made. The ethyl acetate fraction was studied, mainly due to its high yield, and then a fractioning in sephadex LH-20 was made. With the obtained fractions was made a TLC, providing the fraction 24 (1,5 mg) that, by presenting only one spot, was analyzed by NMR of ^1H , and was identified like 6-hydroxy-7-methoxiquecertin (AdFa1). The fraction 12 (129,5 mg) was also obtained and was purified and separated by HPLC-PDA preparative, resulting in four other substances that, after analysis, were identified like being: 3,4-dihydroxybenzoic acid (AdFa2), *p*-hydroxybenzoic acid (AdFa3) e 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (AdFa4) and a flavonoid derivated from quercetin: 6-hydroxy-7-methoxyquercetin-3-*O*- β -D-glicopyranoside (AdFa5). With AdFa5 was made the quantification by HPLC-PDA, being determined in the sample $25,65 \pm 0,43 \text{ mg g}^{-1}$ of flavonoid (AdFa5) in the ethyl acetate fraction. In addition, the antiradicalar test was performed using standard gallic acid, which showed IC_{50} of $30,69 \pm 4,9 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, and with the standart quercetin, it showed a IC_{50} of $50,96 \pm 5,6 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$, while the fraction IC_{50} was $440,66 \pm 24,27 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. The total phenol content in the ethyl acetate fraction was $274,61 \text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$, while the total flavonoids content was $13,14 \text{ }\mu\text{g mg}^{-1}$ of ethyl acetate fraction. Thus, was possible verify that ethyl acetate fraction shows smaller antiradicalar activity, when compared with the values obtained to the gallic acid and quercetin standarts. This result is justified by the presence of the glycosylated flavonoids present in the fraction.

Keywords: Phenolic acids. Antiradicalar activity. Phytochemistry. Flavonoids. Quantification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Localização da Cadeia do Espinhaço, que abrange os estados de Minas Gerais e Bahia.	18
Figura 2 - Divisão morfológica de uma espécie do gênero <i>Actinocephalus</i> pertencente à família Eriocaulaceae.	19
Figura 3 - Cladograma da família Eriocaulaceae com ênfase na espécie <i>A. divaricatus</i>	20
Figura 4 - Padrões de arquitetura em espécies de <i>Actinocephalus</i> . 1. <i>A. brachypus</i> . 2. <i>A. polyanthus</i> . 3. <i>A. falcifolius</i> . 4. <i>A. rigidus</i> .	21
Figura 5 - Exemplificação das espécies químicas reclassificadoras do gênero <i>Actinocephalus</i> .	22
Figura 6 - Detalhes da espécie em estudo <i>Actinocephalus divaricatus</i> .	23
Figura 7 - Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos folhas de <i>A. divaricatus</i> .	29
Figura 8 - Coluna contendo gel sephadex LH-20 utilizada na separação da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> .	30
Figura 9 - Cromatograma HPLC-PDA da fração <i>n</i> -butanólica das folhas de <i>A. divaricatus</i> .	36
Figura 10 - Cromatograma HPLC-PDA fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> .	37
Figura 11 - Representação da estrutura da quercetina.	38
Figura 12 - Análise por CCD das frações obtidas por Sephadex após reunião.	39
Figura 13 - Fluxograma de fracionamento da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> .	40
Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa1 .	41
Figura 15 - Espectro de absorção no UV do flavonoide AdFa1 .	42
Figura 16 - Estrutura do flavonoide AdFa1 (6-hidroxi-7-metoxiquercetina).	42

Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa2 .	43
Figura 18 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico AdFa2 .	44
Figura 19 - Estrutura do ácido fenólico AdFa2 (ácido 3,4-diidroxibenzóico).	44
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa3 .	45
Figura 21 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico AdFa3 .	46
Figura 22 - Estrutura do ácido fenólico AdFa3 (ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico).	46
Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa4 .	47
Figura 24 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico AdFa4 .	47
Figura 25 - Estrutura do ácido fenólico AdFa4 (ácido 4-hidróxi-3-metoxibenzóico).	48
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa5 .	49
Figura 27 - Mapa de contorno HMBC de AdFa5 .	50
Figura 28 - Espectro de absorção no UV do flavonoide AdFa5 .	50
Figura 29 - Estrutura do flavonoide AdFa5 (6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3- <i>O</i> - β -D-glicopiranosídeo).	51
Figura 30 - Estrutura da quercetina onde destacam-se: a) Grupo catecol; b) Ligação 2,3 do anel C conjugada com a função 4-oxo; c) Hidroxilas nas posições 3 e 5.	52
Figura 31 - Reação do padrão de quercetina com o DPPH e estrutura de ressonância do radical da quercetina.	53
Figura 32 - Porcentagem de inibição do DPPH no padrão de quercetina e na fração acetato de etila.	54
Figura 33 - Exemplo da reação ocorrida entre ácidos fenólicos e o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.	55
Figura 34 - Exemplo da reação de oxido-redução ocorrida com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.	55
Figura 35 - Gráfico do padrão de ácido gálico utilizado para interpolar a fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> .	56

Figura 36 - Formação do complexo flavonoide-Al em solução metanólica de $AlCl_3$.	57
Figura 37 - Gráfico do padrão de quercetina utilizado para interpolar a fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> .	58
Figura 38 - Curva analítica obtida pelo método de calibração externa das solução padrão.	58
Figura 39 – Método para obtenção dos valores de LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação).	59
Figura 40 - Cromatograma contendo o perfil cromatográfico da fração AcOEt das folhas de <i>A. divaricatus</i> comparado com padrão de 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (pico 2 em azul).	60
Figura 41 - Espectro de UV do composto 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo na fração acetato de etila e como padrão (AdFa5).	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenças entre as colunas analítica e preparativa utilizadas em HPLC-PDA	26
Tabela 2 - Rendimento das frações obtidas a partir da partição do extrato metanólico das folhas	35
Tabela 3 - Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 300 MHz) de AdFa1 isolado da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> e o valor teórico da literatura. e o valor teórico da literatura.	42
Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 300 MHz) de AdFa2 isolado da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> e o valor teórico da literatura. e o valor teórico da literatura.	44
Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 300 MHz) de AdFa3 isolado da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> e o valor teórico da literatura. e o valor teórico da literatura.	46
Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 300 MHz) de AdFa4 isolado da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> e o valor teórico da literatura. e o valor teórico da literatura.	48
Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H ($\text{DMSO}_{\text{d}6}$, 600 MHz) de AdFa5 isolado da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i>	51
Tabela 8 - Parâmetros da curva analítica do padrão do derivado da quercetina	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>n</i> -BuOH	n-Butanol
CCD	Cromatografia em camada delgada
AcOEt	Acetato de etila
DPPH	2,2-difenilpicrilidrazina
EMeOH	Extrato metanólico
EtOH	Etanol
Fr.	Fração
HMBC	Gradient Heteronuclear Multiple Bond Correlations
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HPLC-IR	High Performance Liquid Chromatography – Index Refraction (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Índice de Refração)
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com Detector de Arranjo de Fotodiodos)
MeOH	Metanol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RP18	Reversed Fase octadecylsilan (Fase reversa octadecilsilano)
TFA	Trifluor acetic acid (Ácido Trifluoracético)
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A família Eriocaulaceae	17
1.2	O gênero <i>Actinocephalus</i>	21
1.3	A espécie <i>Actinocephalus divaricatus</i>	22
2	OBJETIVOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Instrumentos	25
3.2	Materiais, reagentes e soluções	26
3.3	Metodologia	27
3.3.1	<i>Etapa botânica</i>	27
3.3.2	<i>Etapa Farmacognóstica</i>	27
3.3.2.1	<u>Secagem</u>	27
3.3.2.1	<u>Moagem</u>	28
3.3.3	<i>Etapa Química</i>	28
3.3.3.1	<u>Extração</u>	28
3.3.3.2	<u>Partição líquido-líquido</u>	28
3.3.4	<i>Etapa Cromatográfica</i>	29
3.3.4.1	<u>Separação por Sephadex</u>	29
3.3.4.2	<u>Separação da fração 12 utilizando HPLC-PDA semipreparativo</u>	30
3.3.4.3	<u>Análise das frações por HPLC-PDA analítico</u>	31
3.3.4.4	<u>Quantificação</u>	31
3.3.5	<i>Avaliação do potencial antiradicalar, fenóis totais e flavonoides totais da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i></i>	33

3.3.5.1	<u>Avaliação do potencial antirradicalar</u>	33
3.3.5.1	<u>Determinação do teor de fenóis totais</u>	33
3.3.5.1	<u>Determinação do teor de flavonoides totais</u>	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Obtenção dos perfis cromatográficos das frações acetato de etila e <i>n</i>-butanol das folhas de <i>A. divaricatus</i>	35
5.2	Separação da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i> por Sephadex	39
5.3	Identificação estrutural por RMN	41
5.3.1	<i>Identificação da molécula AdFa1</i>	41
5.3.2	<i>Identificação da molécula AdFa2</i>	43
5.3.3	<i>Identificação da molécula AdFa3</i>	45
5.3.4	<i>Identificação da molécula AdFa4</i>	46
5.3.5	<i>Identificação da molécula AdFa5</i>	48
5.4	Avaliação do potencial antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i>	52
5.5	Avaliação do teor de fenóis totais da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i>	54
5.6	Avaliação do teor de flavonoides totais da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i>	57
5.7	Quantificação	58
5.7.1	<i>Linearidade e sensibilidade</i>	58
5.7.2	<i>Seletividade</i>	59
5.7.3.	<i>Análise da fração acetato de etila das folhas de <i>A. divaricatus</i></i>	61
6	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais podem ser quaisquer moléculas biológicas provindas de plantas, microrganismos e outras fontes naturais (QUEIROZ, 2012), sendo diferenciados em metabólitos primários e secundários. Os metabólitos primários são responsáveis pelos processos vitais da planta como o crescimento e a reprodução, enquanto que os metabólitos secundários são responsáveis pela proteção e adaptação da planta em determinado local e clima (NICOLAOU et al., 2012).

A complexidade da análise dos metabólitos secundários se dá pela diversidade e quantidade de seus constituintes químicos que correspondem a menos de 0,0001% da biomassa do organismo (BHAT et al., 2005).

No que diz respeito aos metabólitos secundários advindos de plantas, podem ser citadas substâncias pertencentes à classe dos flavonoides e saponinas (NEGRI; TABACH, 2013) e, embora o uso das plantas que os contêm seja registrado há milênios (CRAGG; NEWMAN, 2012), somente a partir do século XVIII iniciou-se o estudo químico das mesmas para o isolamento das substâncias (SNEADER, 2005).

Dentre as aplicações dessas classes de compostos citadas, pode-se citar a utilização dos flavonoides, que possuem atividade antioxidante, antimutagênica, antialérgica e antimicrobiana (LIMA; BEZERRA, 2012); as saponinas, que inibem o crescimento de células tumorais, auxiliam na redução do colesterol no sangue e apresentam atividade antifúngica e citotóxica (NEGRI; TABACH, 2013).

Desta forma, o estudo químico das plantas mostra-se importante, de modo que o isolamento das substâncias e a posterior avaliação de suas atividades biológicas auxiliam na verificação de seu potencial uso como fármaco.

1.1 A família Eriocaulaceae

A família Eriocaulaceae possui aproximadamente 1.400 espécies e 10 gêneros, ocorrendo principalmente no Brasil (GIULIETTI et al., 2012; HENSOLD, 2016).

As espécies da família Eriocaulaceae possuem maior ocorrência na Serra do Cipó, compreendendo os estados de Minas Gerais e da Bahia (Figura 1). Essas plantas crescem na

região dos “campos rupestres” em altitudes elevadas com cerca de 800 a 1000 m, sob ampla variação de temperatura, altas taxas de radiação solar, ventos fortes e em terrenos rochosos e ácidos, pobres de nutrientes e com baixa capacidade de retenção de água (SCATENA et al., 2005).

Figura 1 - Localização da Cadeia do Espinhaço, que abrange os estados de Minas Gerais e Bahia.

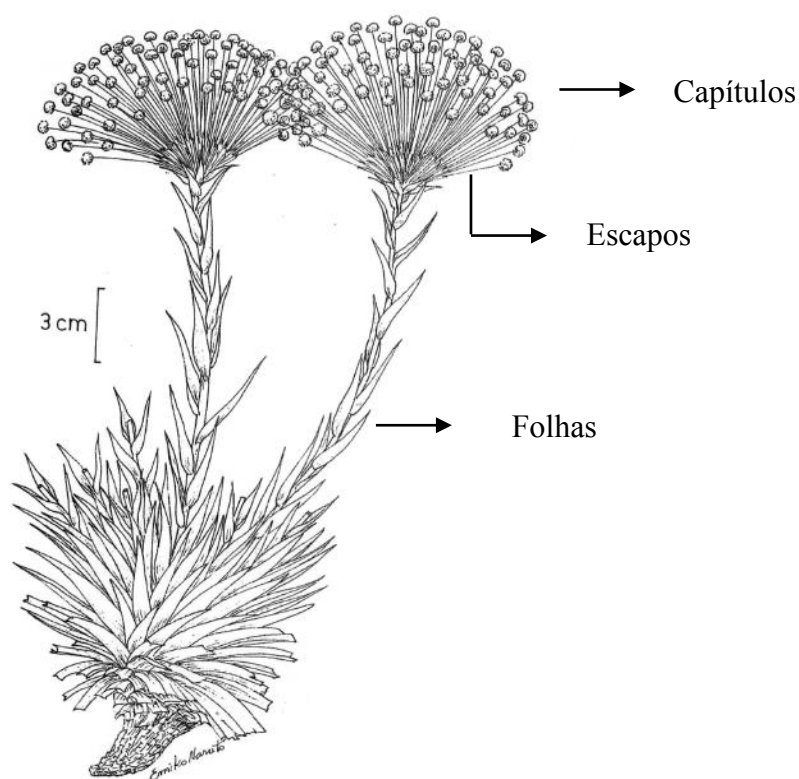


Fonte: modificado de PEREIRA, V. ; 2012.

Por conta das condições extremas que as plantas estão sujeitas, seus capítulos e escapos mantêm a mesma aparência mesmo após terem sido colhidos e secos, sendo utilizados para fins ornamentais. Por conta disto, tais plantas são conhecidas como “semprevivas” e têm elevada importância econômica para as populações locais (COSTA et al., 2008). No entanto, isso fez com que algumas espécies entrassem na lista de espécies em risco de extinção, bem como fez com que alguns táxons fossem considerados extintos (COSTA et al., 2008).

De maneira geral as plantas da família Eriocaulaceae apresentam uma divisão morfológica característica em capítulos, escapos e folhas (Figura 2).

Figura 2 - Divisão morfológica de uma espécie do gênero *Actinocephalus* pertencente à família Eriocaulaceae.

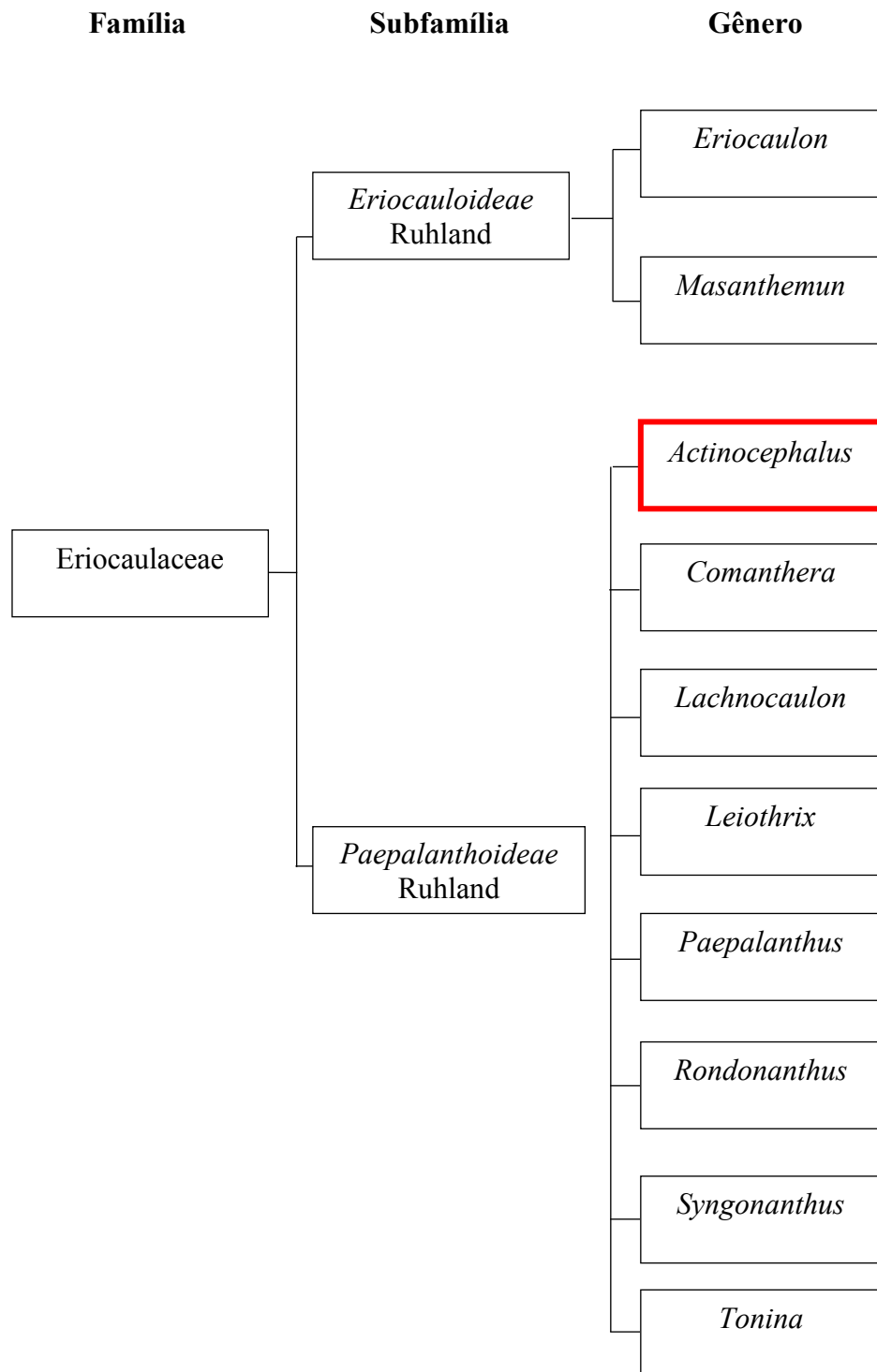


Fonte: COSTA; TROVÓ, 2008 (modificado).

As espécies pertencentes à família possuem estudos na literatura que comprovam a existência das seguintes atividades: antirradicalar (AMARAL, et al., 2012; AMORIM et al., 2014), antiúlcera (MORAES et al., 2010; ZANUTTO, 2013), antimicrobiana (SILVA et al., 2009), antioxidante (DEVIIENNE et al., 2007; ZANUTTO, 2013) citotóxica (COELHO et al., 2000), mutagênica (VARANDA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2013), entre outras.

A classificação taxonômica de espécies da família apresenta-se em constante atualização, de modo que atualmente podemos exemplificar a posição do gênero de estudo segundo o cladograma representado na Figura 3.

Figura 3 - Cladograma da família Eriocaulaceae com ênfase no gênero *Actinocephalus*



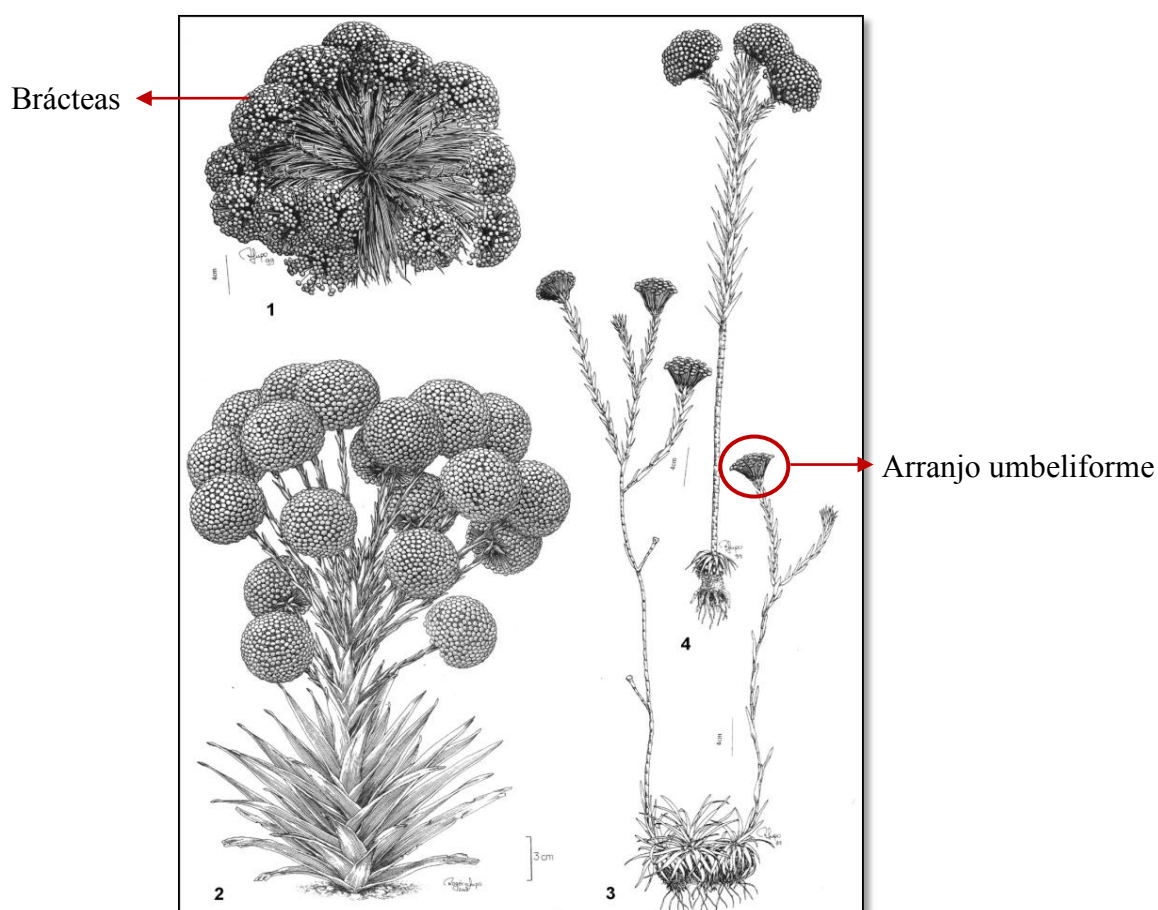
Fonte: ANDRADE et al., 2011; GIULIETTI et al., 2012; ZANUTTO, 2013 (modificado)

1.2 O gênero *Actinocephalus*

O gênero *Actinocephalus*, anteriormente descrito como uma seção do gênero *Paepalanthus*, foi elevado ao status de gênero por Sano (2004). O gênero ainda teve uma nova recircunscrição, em que foram incluídas novas espécies, assim, o gênero *Actinocephalus* passou a ter 49 espécies, com ocorrência na Cadeia do Espinhaço (COSTA; SANO 2013).

A principal característica morfológica para a diferenciação do gênero é a presença de paracládeos cobertos por brácteas com um escapo ou vários escapos em um arranjo umbeliforme no topo (Figura 4) (COSTA et al., 2008).

Figura 4 - Padrões de arquitetura em espécies de *Actinocephalus*. 1. *A. brachypus*. 2. *A. polyanthus*. 3. *A. falcifolius*. 4. *A. rigidus*.



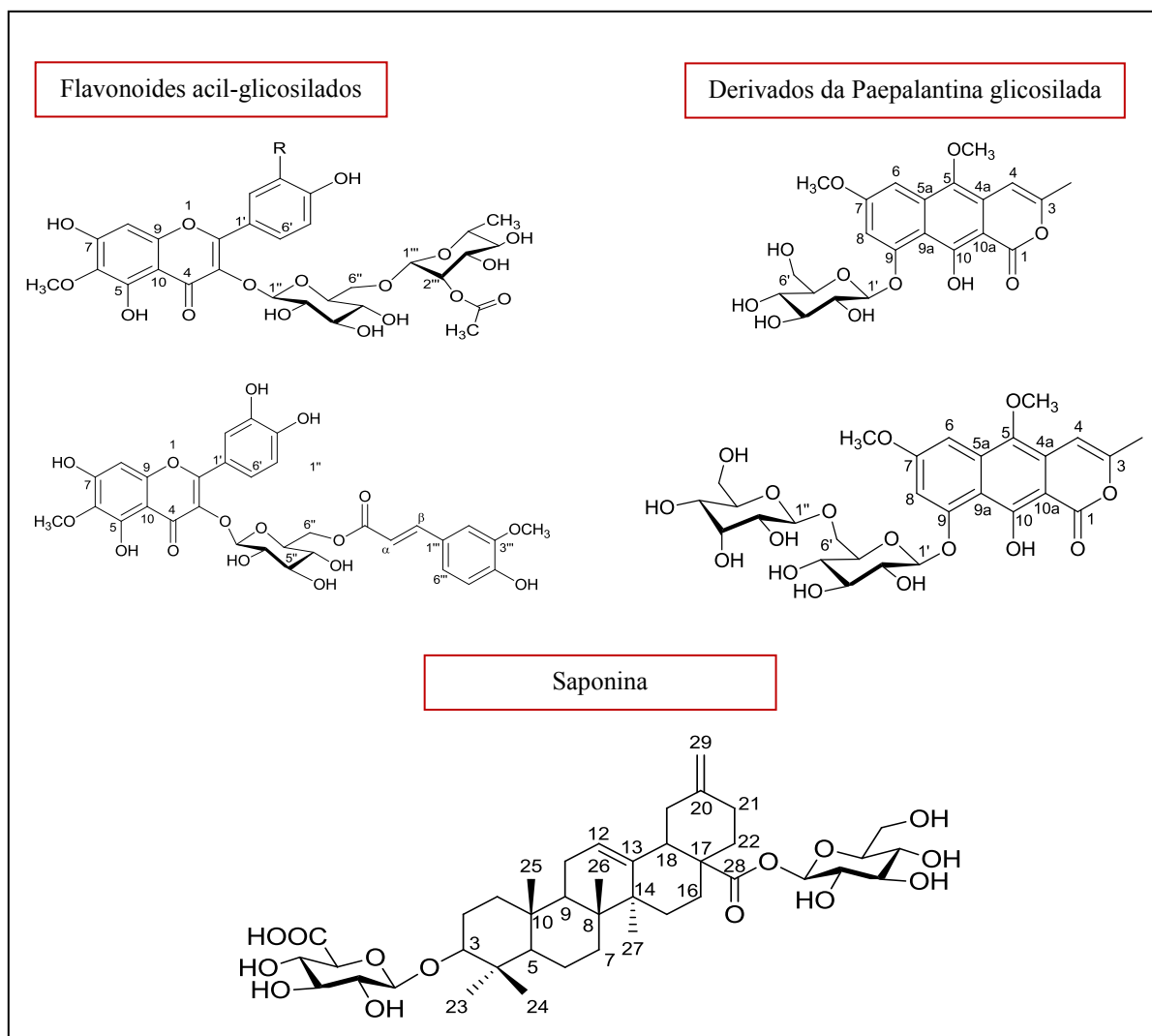
Fonte: ORIANI et al, 2008.

Apesar do grande número de estudos com espécies da família Eriocaulaceae, o gênero *Actinocephalus* ainda apresenta pouco estudo citado na literatura, sendo, portanto, o estudo químico da espécie *Actinocephalus divaricatus* (Koern) Sano muito importante para contribuir com o estudo químico do gênero *Actinocephalus*.

1.3 A espécie *Actinocephalus divaricatus*

O estudo químico das espécies do gênero *Actinocephalus* corroborou com a sua reclassificação genérica permitindo diferenciá-lo do gênero *Paepalanthus* por possuir flavonoides acil-glicosilados, derivados da paepalantina glicosilados (DOKKEDAL et al., 2008) e, atualmente, também saponinas (SILVA, 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Exemplificação das espécies químicas reclassificadoras do gênero *Actinocephalus*.



Desta forma, este trabalho visa contribuir para o maior enriquecimento de dados e discussões da química do gênero *Actinocephalus*, desta vez, estudando a espécie *Actinocephalus divaricatus* (Figura 6).

Figura 6 - Detalhes da espécie em estudo *Actinocephalus divaricatus*.



Fonte: Foto cedida pelo Professor Paulo Takeo Sano.

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Contribuir para o maior enriquecimento de dados e discussões da química do gênero *Actinocephalus*.

Objetivos específicos

- a) Preparo das frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *A. divaricatus*;
- b) Traçar o perfil por HPLC-PDA das frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *A. divaricatus*;
- c) Fracionar a fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* para isolamento dos metabólitos secundários;
- d) Identificar os metabólitos secundários isolados da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*;
- e) Quantificar por HPLC-PDA a substância majoritária presente na fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*;
- g) Realizar a avaliação do potencial antirradicalar e determinar o teor de fenóis e flavonoides totais da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentos

A concentração dos extratos e frações foi feita por rotoevaporação sob pressão reduzida em evaporador rotativo (Heidolph®, Laborota 4001 – efficient) equipado com bomba a vácuo (Heidolph®, Rotavac valve control), em temperatura menor que 40 °C.

A balança analítica SHIMADZU® AY-220 (capacidade 220 g e precisão de 0,1 mg) foi usada na pesagem do extrato e das frações.

A moagem das folhas foi realizada utilizando um moinho de facas com rotor vertical MAO 90 CF.

A extração do pó foi realizada por meio da percolação com metanol, sendo que o pó foi intumescido com o solvente extrator (metanol) por duas horas. Em seguida o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + metanol) e o efluente foi coletado na vazão de 1,0-2,0 mL/min/Kg.

A partição líquido-líquido, tanto para a separação das frações água e acetato de etila, como para as frações água e *n*-butanol foram realizadas em funil de separação de 500 mL.

A fração acetato de etila obtida da partição líquido-líquido foi solubilizada em metanol com auxílio do ultrassom e deixada na centrífuga CELM® COMBATE, a 1.578,28 rpm, para que o sobrenadante obtido fosse fracionado em uma coluna de vidro com 85 cm de altura por 2,5 cm de diâmetro interno, empacotada com Sephadex® LH-20 (Pharmacia).

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com bomba quaternária (analítico, modelo PU-2089s (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2018 (Jasco®) sendo que para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o *software ChromNAV*. A coluna utilizada era de fase reversa RP18 modelo Aquasil Gold aQ (Thermo®) imobilizadas com octadecilsilano, de 250 x 4,6 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm. Amostras foram injetadas em um *loop* de 20 µL (modo analítico), sendo o volume de injeção de 10 µL.

A separação por HPLC-PDA da fração 12 (129,5 mg) obtida da separação por Sephadex LH-20 foi realizado em cromatógrafo líquido de alta eficiência (semipreparativo,

gradiente binário modelo PU-2086 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos com faixa de varredura de 195-650 nm e intervalo mínimo de 1 nm, modelo MD-2010 (Jasco®) sendo que para a aquisição e processamento dos dados cromatográficos foi utilizado o *software ChromNAV*. A coluna utilizada era de fase reversa RP18 modelo Aquasil Gold aQ (Thermo®) imobilizadas com octadecilsilano, de 250 x 30 mm d.i., apresentando partículas com tamanho médio de 5 µm. Amostras foram injetadas em um *loop* de 500 µL (modo analítico), sendo o volume de injeção de 300 µL.

As diferenças apresentadas entre as colunas analítica e preparativa podem ser sintetizadas na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Diferenças entre as colunas analítica e preparativa utilizadas em HPLC-PDA

Parâmetro	Coluna Analítica	Coluna Preparativa
Comprimento (mm)	250	250
Concentração da amostra (mg mL ⁻¹)	5	10
Diâmetro (mm)	4,6	30
Diâmetro da partícula (µm)	5	5
Vazão (mL min ⁻¹)	1	13
Volume de injeção (µL)	10	300

As análises de RMN monodimensional ¹H foram realizadas em espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear de 300 MHz no equipamento Bruker Fourier 300 com uma bobina de 7,1 T e em 600 MHz no equipamento Bruker Avance III 600 com uma bobina de 14,1 T. As substâncias foram dissolvidas em dimetilsulfoxido deuterado (DMSO-d₆ (Aldrich)). Os deslocamentos químicos são dados em δ (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

O *software MestReNova* versão 6.0.2 foi utilizado durante aquisição dos deslocamentos químicos de cada espectro.

3.2 Materiais, Reagentes e Soluções

Cartuchos de extração em fase sólida (SPE) de fase reversa à base de octadecilsilano (RP18) com 500 mg 6 mL⁻¹ (33 µm, Supelco®) foram usados na etapa de *clean-up* dos

extratos, sendo as soluções resultantes filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*®, Millipore®) com poro de 0,45 ou 0,22 µm.

Na triagem das frações, placas de camada delgada de sílica gel 60 em suporte de alumínio (Merck®) (20 x 20 cm x 0,2 mm) foram utilizadas e redimensionadas de acordo com o número de frações analisado. Com o uso de capilares, as frações foram aplicadas em sua superfície e eluídas em cuba saturada com o sistema CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20 v/v/v), CHCl₃:MeOH:H₂O (80:18:02 v/v/v) ou CHCl₃/MeOH/*n*-propanol/H₂O (5:6:1:4, v/v/v/v, fase orgânica). A revelação das placas foi feita com luz UV (Câmara com luz UV 254 nm - Prodicil) e anisaldeído/H₂SO₄, nesta ordem.

Durante os experimentos foram utilizados os solventes água Milli-Q (Millipore®), MeOH P.A. (Merck) e MeOH HPLC (Tedia).

3.3 Metodologia

3.3.1 Etapa Botânica

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

Para este trabalho foram selecionadas as folhas para preparo do extrato metanólico, e na sequência foram realizadas a partição com acetato de etila, e o fracionamento da mesma.

3.3.2 Etapa Farmacognóstica

3.3.2.1 Secagem

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

3.3.2.2 Moagem

Nesta etapa, o material botânico foi finamente dividido em moinho de facas a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos.

3.3.3 Etapa Química

3.3.3.1 Extração

O pó obtido na moagem foi extraído com metanol por meio da percolação usando o metanol para intumescer o pó por duas horas.

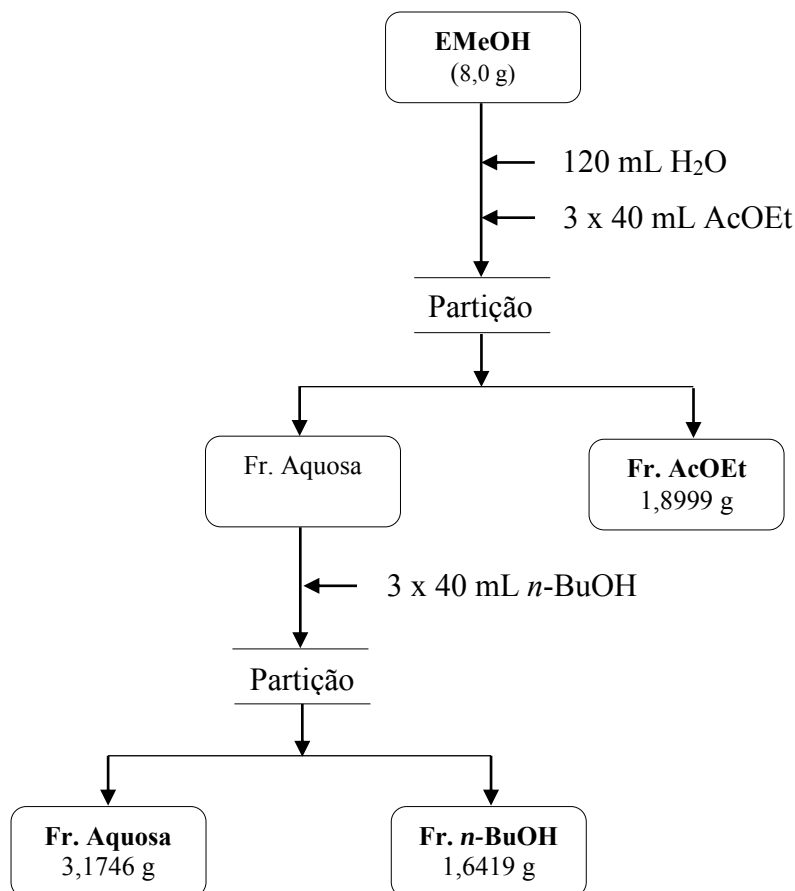
Feito isso, o percolador foi empacotado homogeneamente com a mistura (pó + metanol) e o efluente foi coletado na vazão de 1,0-2,0 mL/min/Kg, mantendo-se constante a razão material vegetal:solvente extrator durante toda a extração.

Após a extração, o líquido extrator foi rotaevaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo em temperatura inferior a 40 °C e o extrato foi transferido para vidro tarado e deixado em capela até completa eliminação do solvente.

3.3.3.2 Partição líquido-líquido

O extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Para isso, foram solubilizados 8 g do extrato das folhas em 120 mL de água. Esta solução aquosa foi particionada e após isto a fração aquosa foi separada da fração acetato de etila, sendo que este processo foi repetido por três vezes (40 mL de acetato de etila por vez) a fim de extrair o máximo de substâncias solúveis nesse solvente. Em seguida, a solução aquosa foi particionada com *n*-butanol, conforme descrito anteriormente para a fração acetato de etila (adição de 40 mL de *n*-butanol adicionados em cada uma das partições realizadas). As frações obtidas foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, transferidas para vidros tarados e deixadas em capela até completa eliminação dos solventes. A forma como a separação foi realizada pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7 - Partição líquido-líquido dos extratos metanólicos das folhas de *A. divaricatus*.



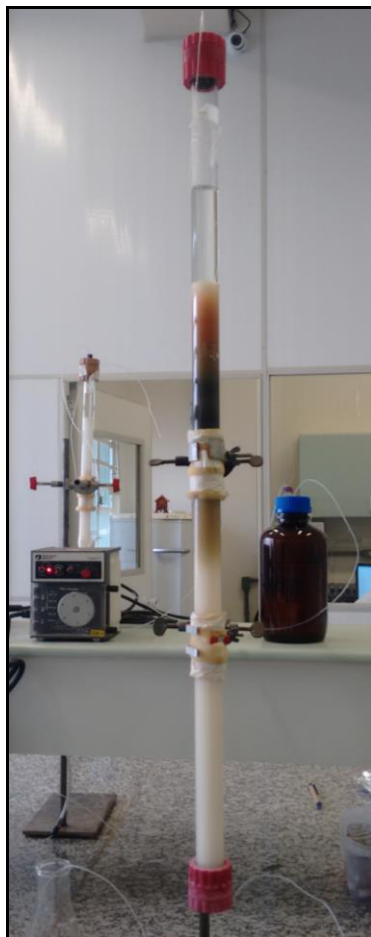
3.3.4 Etapa Cromatográfica

3.3.4.1 Separação por Sephadex

A fração acetato de etila (cerca de 1 g) foi solubilizada em 10,0 mL de metanol e levada ao ultrassom por 10 minutos e depois à centrifuga por 15 minutos, sendo o precipitado separado do sobrenadante. A amostra (em forma de sobrenadante) foi então eluída em coluna empacotada com Sephadex LH-20 (Figura 8), utilizando como solvente de eluição o metanol. Deste fracionamento, obteve-se 279 frações que foram reunidas, considerando-se seus valores de R_f quando analisadas por CCD (usando como fase estacionária sílica gel, como fase móvel o sistema de solvente CHCl₃:MeOH:H₂O (43:37:20 v/v/v) e como revelador a luz UV (254 nm) e anisaldeído/H₂SO₄), resultando em 36 frações. A fração 24, **AdFa1**, apresentou um

único “spot” sendo então analisada por RMN de ^1H .

Figura 8 - Coluna contendo gel sephadex LH-20 utilizada na separação da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*



Fonte: Próprio autor.

3.3.4.2 Separação da fração 12 utilizando HPLC-PDA semipreparativo

A fração 12 (129,5 mg) foi solubilizada em 12,5 mL da solução MeOH:H₂O (1:1 v/v), filtrada em microfiltro de PTFE Millex (0,22 μm). A solução resultante foi fracionada por HPLC-PDA preparativo. Para este fracionamento foi utilizada uma coluna de fase reversa RP18 Aquasil Gold aQ 250 cm x 30 mm x 5,0 μm (Thermo®). O volume injetado foi de 300 μL , e a vazão de 13,0 mL min⁻¹.

A condição inicial da fase móvel utilizada consistiu de água 72% (eluente A) e metanol 28% (eluente B) contendo 0,1% de TFA. O método de eluição foi o gradiente com

uma rampa de eluição de 40 min, variando a proporção de MeOH de 28 a 85%. Este procedimento de separação forneceu três ácidos fenólicos, **AdFa2** (4,9 mg), **AdFa3** (1,1 mg) e **AdFa4** (1,3 mg) e um flavonoide, **AdFa5** (2,4 mg) que, foram identificados conforme os dados obtidos nos experimentos de RMN mono e bidimensionais.

3.3.4.3 Análise das frações por HPLC-PDA analítico

As frações 12 e 24 resultantes do fracionamento por Sephadex da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* e as frações 1 (**AdFa2**), 3 (**AdFa3**), 4 (**AdFa4**) e 5 (**AdFa5**) resultantes da separação por HPLC-PDA preparativo foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. As amostras (cerca de 1 mg) foram preparadas realizando-se o *clean-up* em um cartucho Sep-Pak (Sigma, RP18) e filtradas em membranas de PTFE (politetrafluoroetileno, *teflon*®, Millipore®), utilizando MeOH como eluente. A eluição cromatográfica foi realizada utilizando água (eluente A) e metanol (eluente B), ambos acidificados com 0,1% de TFA. O programa gradiente foi de 5 a 100% MeOH em 60 min com um vazão de 1 mL min⁻¹.

3.3.4.4 Quantificação

- Solução padrão

A quantificação ocorreu pela interpolação da amostra fração acetato de etila na curva construída com o padrão do flavonoide existente no laboratório isolado do extrato metanólico das folhas de *A. divaricatus* (6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, **AdFa5**).

A solução do padrão foi utilizada no ensaio de linearidade e na construção da curva analítica, sendo realizadas diluições seriadas a partir de uma solução estoque de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (500 - 7,81 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), utilizando-se como diluente MeOH:H₂O (70:30, v/v).

As soluções preparadas foram filtradas em microfiltro de PTFE Millex® (0,22 μm de poro e 25 mm de diâmetro) antes de serem injetadas no cromatógrafo líquido e o ensaio foi realizado em triplicata para cada concentração do padrão. As áreas dos picos cromatográficos

foram obtidas pela integração de cada pico analisado, monitorado pelo detector PDA em 270 nm, e foram utilizadas na construção do gráfico de área *versus* concentração.

- Preparo da amostra

A preparação da fração acetato de etila das folhas consistiu em uma etapa de *clean up* por extração em fase sólida em cartucho de RP18 que foi ativado com metanol (4 mL) e equilibrado com água (5 mL). A fração (24,2 mg) a ser aplicada no suporte de SPE foi previamente solubilizada em 3 mL de MeOH, levada ao ultrassom, filtrada e seca. Posteriormente, 10 mg da fração foi solubilizada em 1 mL da solução MeOH/H₂O (90:10, v/v), sendo que o volume final da solução foi aferido em um balão volumétrico de 2 mL fornecendo uma solução com uma concentração de 10 mg.mL⁻¹. A solução final foi filtrada em microfiltro de PTFE Millex PTFE Millex® com tamanho de poro 0,22 µm.

- Condições cromatográficas utilizadas

As análises do padrão e da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* foram realizadas em uma coluna de fase reversa RP18 imobilizadas com octadecilsilano, modelo Thermo Scientific® (250 x 4,6 mm d.i.; 5 µm), com coluna de guarda de mesma fase estacionária (4,0 x 3,0 mm d.i.). O volume de injeção foi de 10 µL, a vazão utilizada de 1 mL.min⁻¹ e a temperatura do forno ajustada para 25°C.

A composição da fase móvel utilizada foi: água (eluente A) e metanol (eluente B), ambos acidificados com 0,1% de TFA, na proporção de 20-80% de MeOH, com rampa de eluição de 60 minutos.

- Identificação e quantificação

A identificação do composto na fração foi feita por comparação de seu tempo de retenção (t_R) e espectros no UV do padrão analisado. A quantificação do analito foi feita pelo método de calibração externa, permitindo assim a quantificação do padrão utilizado, que apresentou a mesma resposta de absorção no PDA.

3.3.5 Avaliação do potencial antirradicalar, fenóis totais e flavonoides totais da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*

3.3.5.1 Avaliação do potencial antirradicalar

A avaliação do potencial antirradicalar foi realizada com base nas metodologias de Pauletti et al. (2003) e Brand-Williams et al. (1995). Inicialmente foi preparada em um balão volumétrico de 250 mL uma solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina) 4% em metanol. Posteriormente, preparou-se a amostra (fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*) e os padrões de ácido gálico e quercetina na concentração de 1000,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foi diluída em 500,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 250,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 125,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Feito isto, adicionou-se em uma placa de 96 poços 100 μL de cada uma das soluções preparadas e para o branco de metanol, sendo que todas elas foram analisadas em triplicata. Por último foi realizada a adição de 200 μL da solução de DPPH e a reação ocorreu por 30 minutos sem a presença de luz, e posteriormente, a absorbância foi medida a 517 nm no espectrofotômetro ELISA.

3.3.5.2 Determinação do teor de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada a partir do método colorimétrico Folin-Ciocalteu (KÄHKÖNEN et al., 1990; GHASEMZADEH et al., 2010). Inicialmente, foi preparada em um balão volumétrico de 10 mL a solução de Folin-Ciocalteu, utilizando-se 0,667 mL do reagente e cerca de 9,333 mL de água destilada. Também foi preparada a solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) na concentração de 200 mg mL^{-1} , que foi preparada em um balão volumétrico de 5 mL.

Por último, foram preparadas a solução padrão de ácido gálico na concentração de 1000,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foi diluída em 500,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 250,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 125,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a amostra (fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*) na concentração de 62,50 mg mL^{-1} .

Em uma placa de 96 poços adicionou-se 150 μL de uma solução de Folin-Ciocalteu 6,67% em água e 50 μL das amostras a serem analisadas, incluindo a solução padrão,

realizando a análise em triplicata e utilizando o MeOH como branco. Aguardando-se 3 minutos para posterior adição de 50 μL de uma solução de Na_2CO_3 200 mg mL^{-1} .

Posteriormente, aguardaram-se 2 horas para a ocorrência da reação, medindo-se a absorbância em 750 nm pelo espectrofotômetro ELISA.

3.3.5.3 Determinação do teor de flavonoides totais

A concentração de flavonoides totais foi determinada com base na metodologia de Peixoto Sobrinho et al., 2008. Inicialmente foi preparada a solução de cloreto de alumínio (AlCl_3) em balão de 10 mL que foi completado com uma solução MeOH: H_2O (80:20 v/v).

Posteriormente, foi preparada uma solução com o padrão de quercetina na concentração de 1000,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foi diluída em 500,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 250,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 125,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e a amostra (fração de acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*) foi preparada em uma concentração de 62,50 mg mL^{-1} .

Em uma placa de 96 poços adicionou-se 100 μL de uma solução de AlCl_3 2% (m/v) e 100 μL das amostras a serem analisadas, incluindo a solução padrão, sendo que as medidas foram realizadas em triplicata. Feito isto, aguardando-se 1 hora para posterior medida da absorbância em 750 nm pelo espectrofotômetro ELISA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Obtenção dos perfis cromatográficos das frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *A. divaricatus*

O extrato metanólico das folhas da planta foi submetido à partição líquido-líquido com acetato de etila, e posteriormente com *n*-butanol conforme descrito no item 3.3.3.2 (YUNES; CALIXTO, 2001). Os rendimentos obtidos para cada fração estão apresentados na tabela abaixo.

Tabela 2 - Rendimento das frações obtidas a partir da partição do extrato metanólico das folhas.

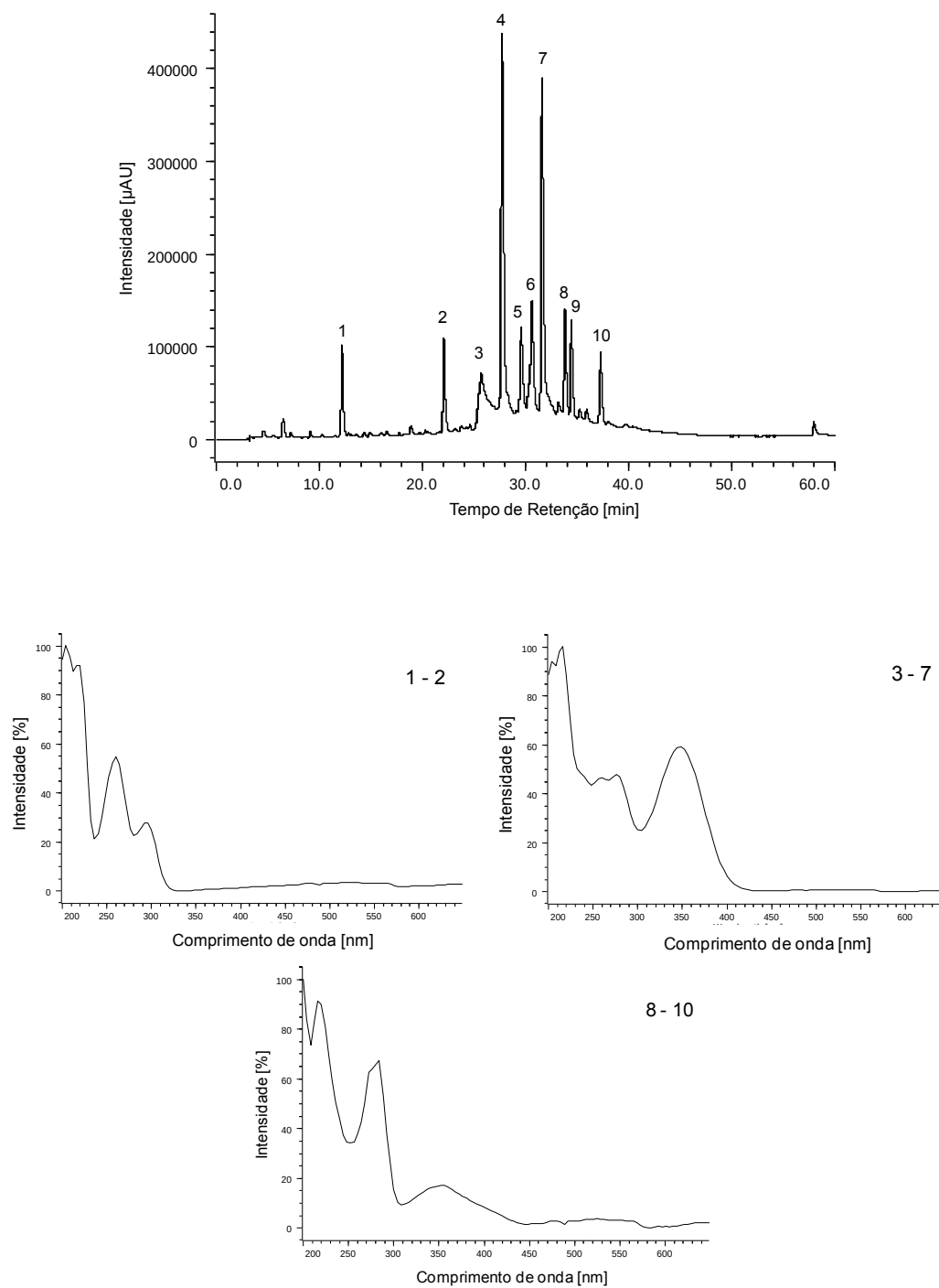
	Fração AcOEt	Fração <i>n</i> -BuOH
Massa obtida	1,8999 g	1,6419 g
Rendimento	23,71%	20,52%

O rendimento obtido foi maior para a fração acetato de etila, que para a fração *n*-butanólica. A fração aquosa não foi utilizada na etapa de caracterização, pois sua composição contém moléculas muito polares como açúcares que poderiam dificultar o trabalho com a amostra (maior chance de proliferação de fungos e microrganismos e maior dificuldade na secagem, por exemplo) (CERVEZAN; 2013).

Com o objetivo de realizar uma triagem fitoquímica rápida dessas frações, realizou-se um perfil cromatográfico por HPLC-PDA para a determinação das classes de compostos presentes nas frações acetato de etila e *n*-butanol das folhas de *A. divaricatus* por meio dos espectros de UV dos picos cromatográficos obtidos a fim de delimitar estratégias para o isolamento de substâncias de interesse químico.

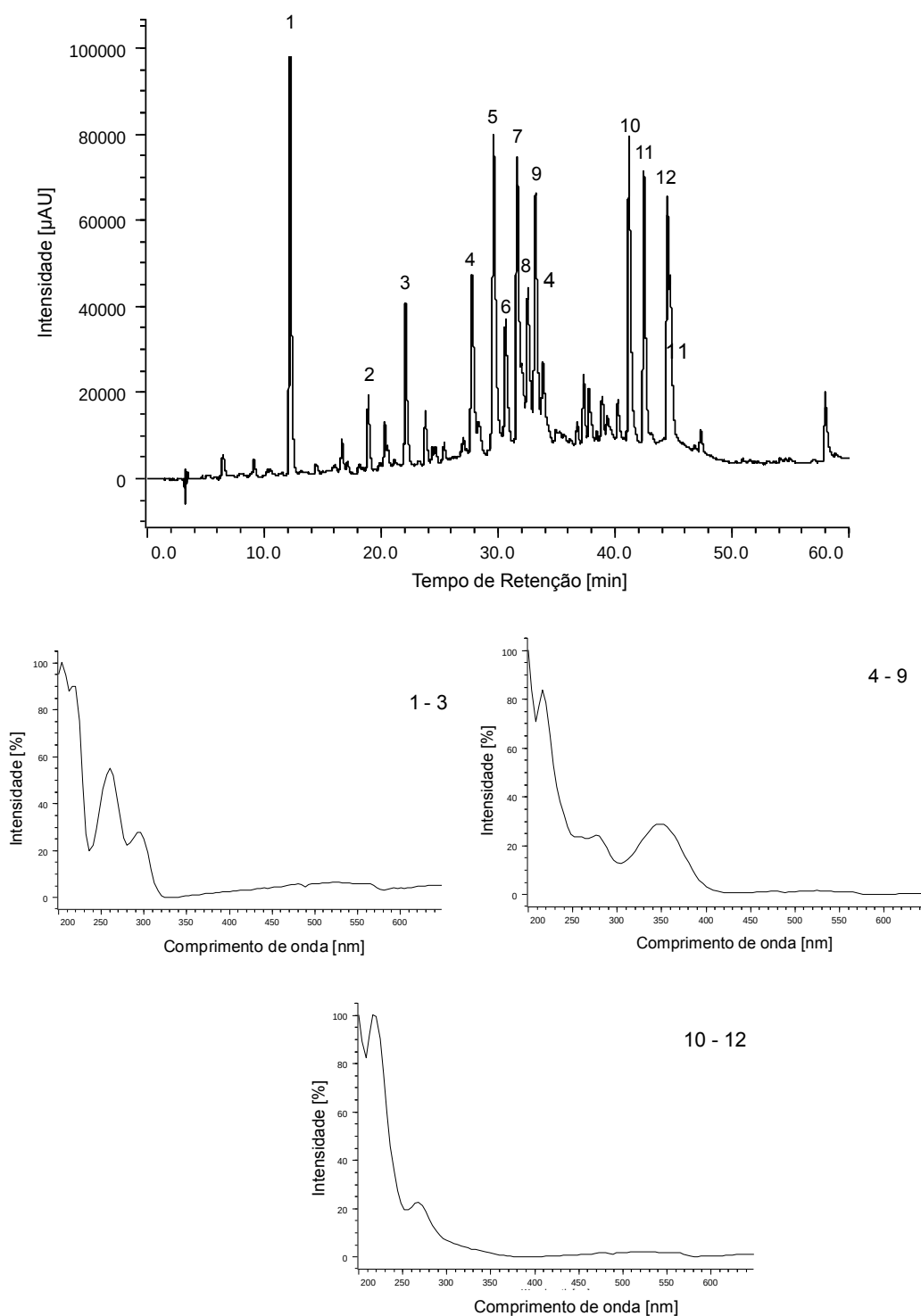
As Figuras 9 e 10 apresentam os cromatogramas monitorados em 270 nm para avaliar a presença dos seus principais metabólitos secundários.

Figura 9 - Cromatograma HPLC-PDA da fração *n*-butanólica das folhas de *A. divaricatus*.



Condições cromatográficas: coluna Thermo (250 x 4.60 mm, 4 micron) Vazão de 1 mL min⁻¹. Método gradiente de 5% a 100% MeOH, 60 min. 270 nm com espectros no UV representativos.

Figura 10 - Cromatograma HPLC-PDA fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.



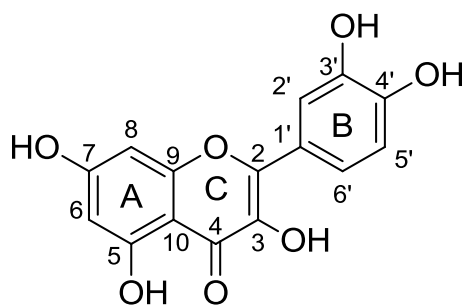
Condições cromatográficas: coluna Thermo (250 x 4.60 mm, 4 micron) Vazão de 1 mL min⁻¹. Método gradiente de 5% a 100% MeOH, 60 min. 270 nm com espectros no UV representativos.

A análise do perfil cromatográfico e os seus respectivos espectros no UV, (Figuras 9 e 10) das frações acetato de etila e *n*-butanólica, permitiu sugerir a presença de derivados de ácidos fenólicos (picos 1 e 2, na Figura 9 e picos de 1 a 3, na Figura 10), flavonoides (picos 3 a 7 na Figura 9 e picos de 4 a 9, na Figura 10) e naftopiranonas (picos de 8 a 10, na Figura 9 e picos 10 a 12, na Figura 12).

Os ácidos fenólicos são evidenciados no espectro de UV pela presença de uma banda entre 260-293 nm (Rodrigues et al., 2008) e as naftopiranonas são identificadas por uma banda bipartida entre 270-273 nm (VILEGAS et al., 1999, PACIFICO et al., 2011).

Os flavonoides são identificados pela presença da banda II com máximo em torno de 240-290 nm, atribuído à conjugação do anel A com o anel C e pela presença da banda I em torno de 300-390 nm, atribuída à conjugação do anel B com o anel C dos flavonoides como a quercetina apresentada abaixo (Figura 11).

Figura 11 - Representação da estrutura da quercetina.



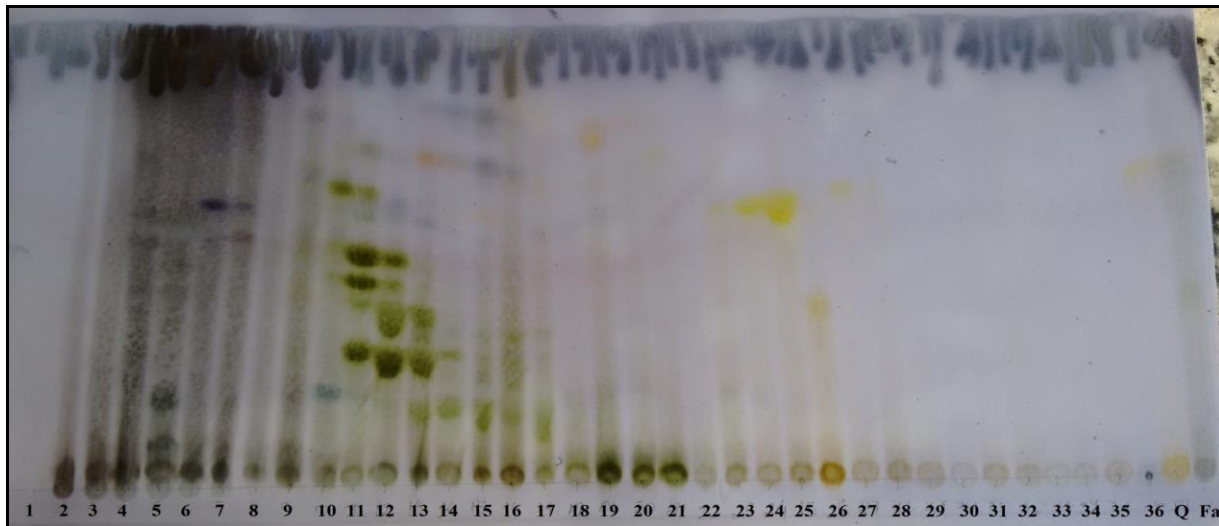
Fonte: SIMÕES, et al., 2013.

A fração acetato de etila foi escolhida como fração de trabalho por apresentar maior variedade de compostos com picos cromatográficos presentes em toda região do cromatograma com compostos de alta a média polaridade. Além disso, o maior rendimento calculado também foi considerado na escolha.

5.2 Separação da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* por Sephadex

A separação da fração acetato de etila resultou em 36 frações que foram submetidas à análise por CCD (Figura 12).

Figura 12 - Análise por CCD das frações obtidas por Sephadex após reunião.



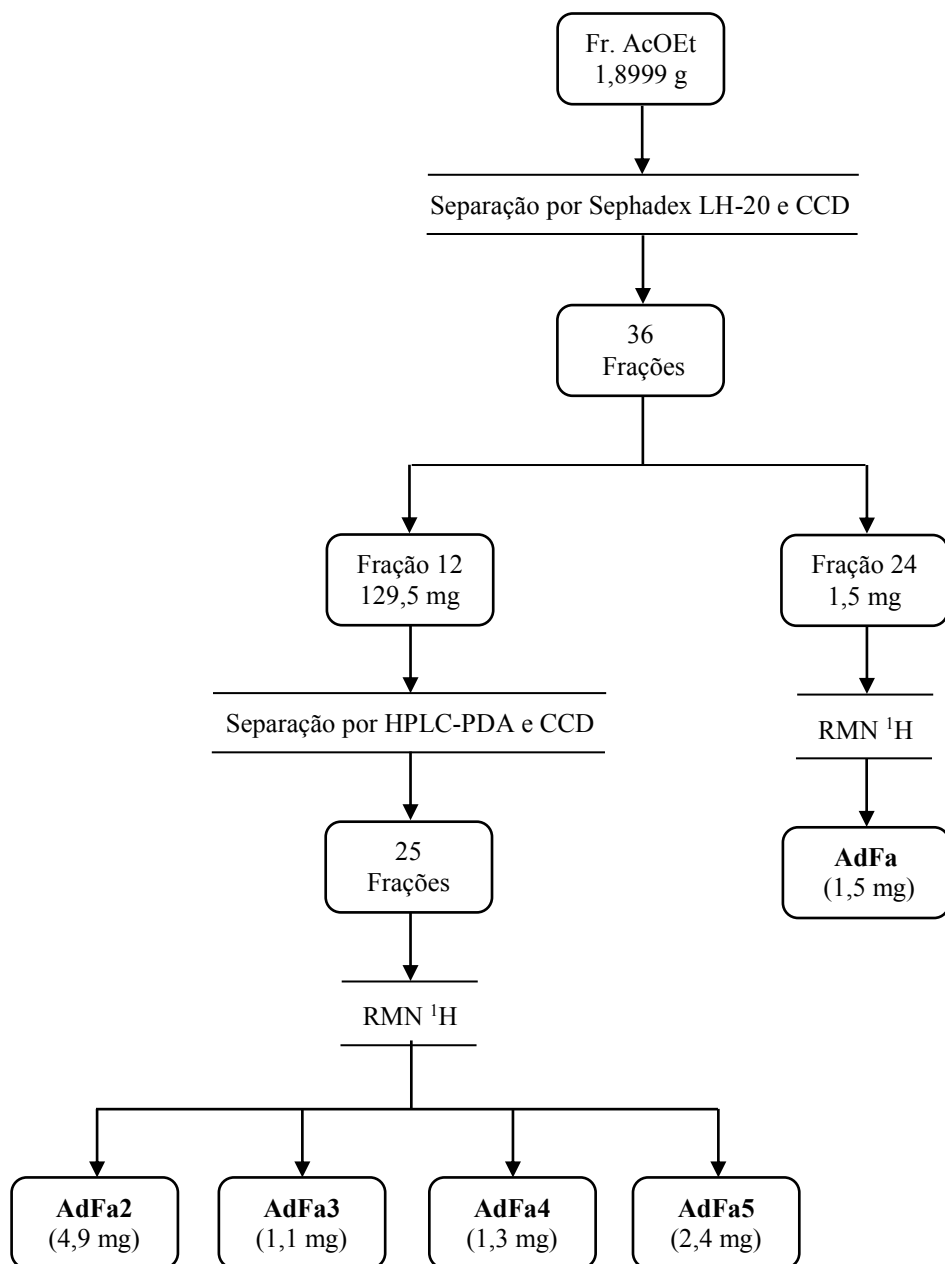
Condições cromatográficas: Fase Estacionária = sílica gel; Fase Móvel = CHCl_3 :MeOH:H₂O (80:18:02, v/v/v), Revelador = anisaldeído.

Deste fracionamento, a fração 24 (2,6 mg), um “spot” amarelo atribuído aos flavonoides (CHAVES, 1997), foi analisada por HPLC-PDA e identificada por RMN ¹H e denominada como **AdFa1**.

Além disso, a fração 12 (121,4 mg) foi analisada por HPLC-PDA analítico, sendo que posteriormente foi realizada a transposição do método para o HPLC-PDA semipreparativo, onde foram isolados os compostos **AdFa2**, **AdFa3**, **AdFa4** e **AdFa5**.

As amostras obtidas foram analisadas por CCD, eluída em CHCl_3 :MeOH:H₂O (43:37:20 v/v/v) e revelada com solução anisaldeído/H₂SO₄ e, com os dados obtidos, os compostos foram identificados por RMN ¹H. Uma forma resumida do trabalho realizado nesta etapa encontra-se na abaixo (Figura 13):

Figura 13 - Fluxograma de fracionamento fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.



5.3 Identificação estrutural por RMN

5.3.1 Identificação da molécula AdFa1

O espectro de RMN de ^1H de **AdFa1** (Figura 14), apresentou um sinal de hidrogênio acoplado em *meta* em δ 7,72 (d, $J = 2,2$ Hz) referentes a H-2', e um sinal de hidrogênio acoplado em *orto* em δ 6,89 (d, $J = 8,5$ Hz) referentes a H-5'. Outro sinal de hidrogênio acoplado em *orto-meta* em δ 7,57 (dd, $J = 2,2, 8,5$ Hz) foi atribuído ao H-6', do anel B, típico de derivados da quercetina. A ausência dos dois dupletos em *meta* entre 6,4 e 6,8 sugeriu que o anel A do flavonoide fosse pentassubstituído. O singlete obtido em δ 6,81 foi atribuído ao hidrogênio da posição 8 do anel A (HARBORNE, 1996). Um singlete (3H) em δ 3,91 foi atribuído ao grupo metoxila. O deslocamento químico do hidrogênio na posição H-8 do flavonoide confirma a presença de um grupo metoxílico na posição 7 do anel A (VILEGAS et al., 1999). Estes dados (Tabela 3) comparados com o UV (Figura 15) e com os da literatura (MABRY, 1970) confirmaram que esta substância é a 6-hidroxi-7-metoxiquercetina (Figura 16).

Figura 14 - Espectro de RMN de ^1H de **AdFa1**.

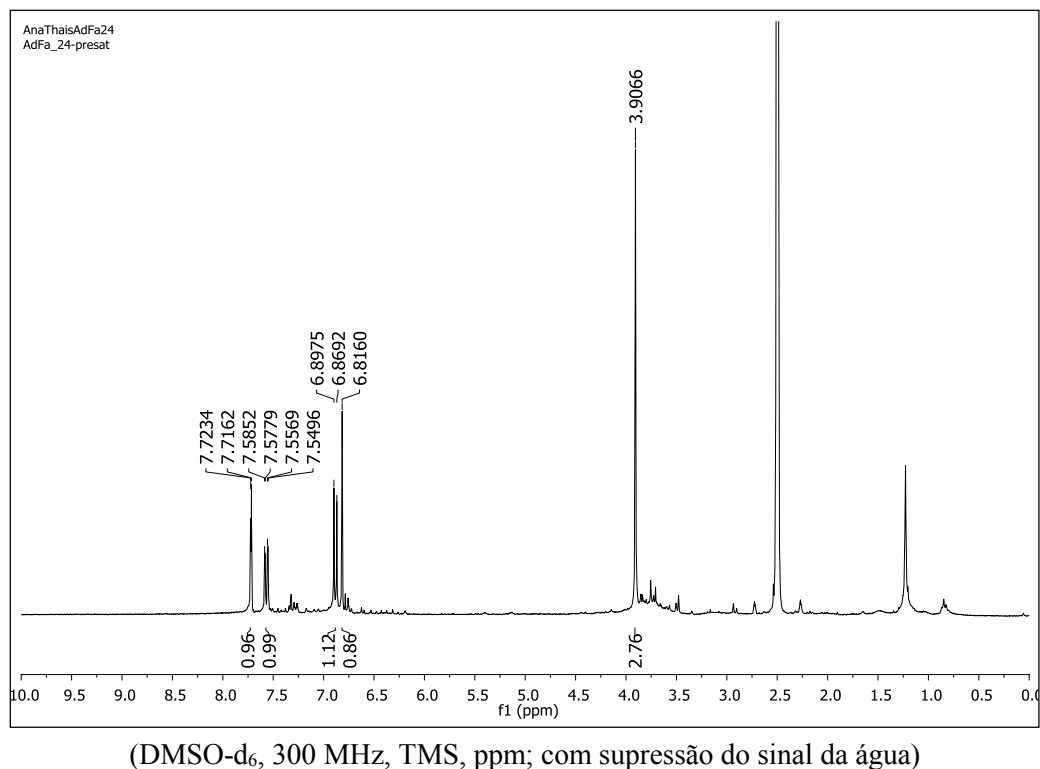
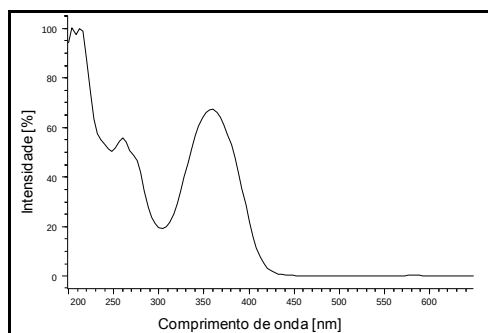
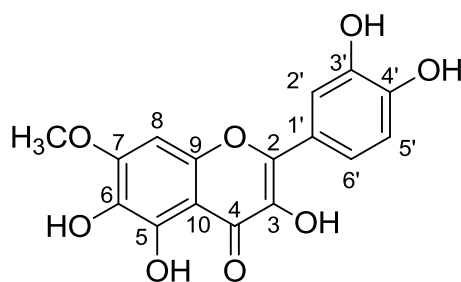


Figura 15 –Espectro de absorção no UV do flavonoide **AdFa1**.**Tabela 3** - Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz) de **AdFa1** isolado da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* e o valor teórico da literatura.

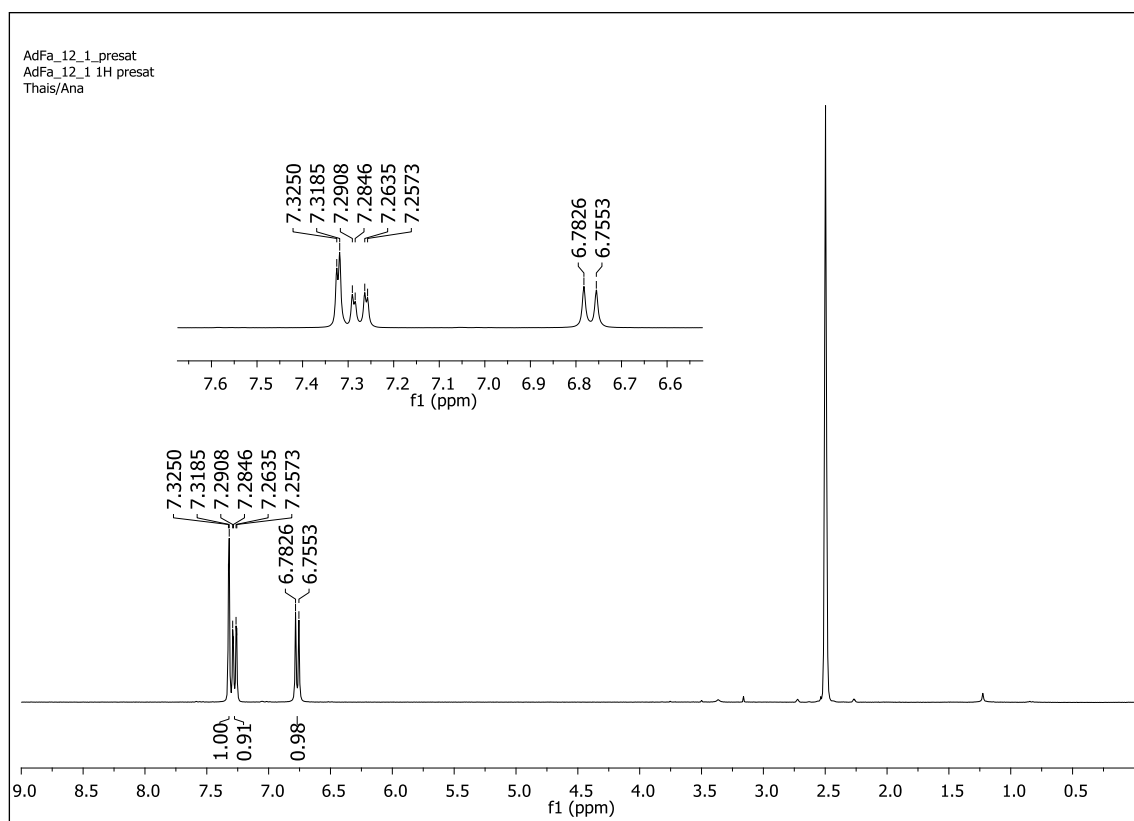
Posição	^1H (J in Hz)	^1H Teórico
2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	6,81 s	6,7-7,0
9	-	-
10	-	-
1'	-	-
2'	7,72 d (2,2)	7,7
3'	-	-
4'	-	-
5'	6,89 d (8,5)	6,5-7,1
6'	7,57 dd (2,2; 8,5)	7,6
7-OCH ₃	3,91 s	3,5-4,1

(DMSO- d_6 , 300 MHz)**Figura 16** - Estrutura do flavonoide **AdFa1** (6-hidroxi-7-metoxiquecertina).

5.3.2 Identificação da molécula AdFa2

O espectro de ^1H (Figura 17) de **AdFa2** mostra um sinal de hidrogênio acoplado em *meta* em δ 7,32 (d, $J = 1,9$ Hz; H2) e um sinal acoplado em *orto* referente ao hidrogênio com δ 6,77 (d, $J = 8,2$ Hz; H5) e os sinais referentes a um sinal de hidrogênio acoplado em *orto-meta* em δ 7,27 (dd, $J = 1,9; 8,2$ Hz; H6). Os dados de RMN de ^1H estão apresentados na Tabela 3. Com isto, foi possível com o auxílio da literatura (OU, et al.; 2012) e do espectro de UV (Figura 18) identificar esta substância como sendo o ácido 3,4-diidroxibenzóico (ácido protocatecuico) (Figura 19).

Figura 17 - Espectro de RMN de ^1H de **AdFa2**.



(DMSO- d_6 , 300 MHz, TMS, ppm; com supressão do sinal da água)

Figura 18 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico **AdFa2**.

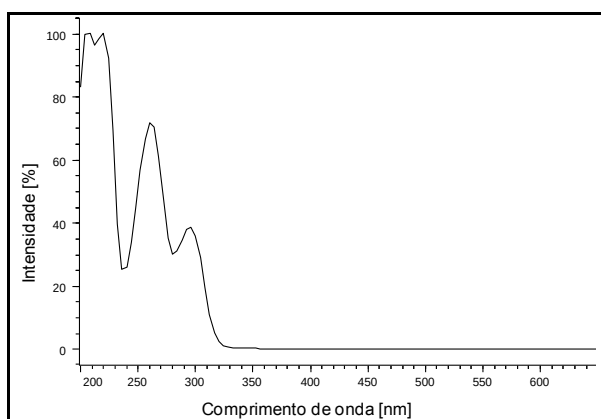
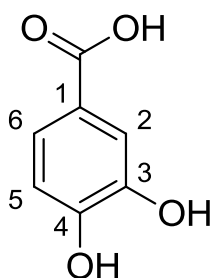


Tabela 4 - Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz) de **AdFa2** isolado da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* e o valor teórico da literatura.

Posição	^1H (J in Hz)	^1H Teórico
1	-	-
2	7,32 d (1,9)	7,33
3	-	-
4	-	-
5	6,77 d (8,2)	6,76
6	7,27 dd (1,9; 8,2)	7,27

(DMSO- d_6 , 300 MHz)

Figura 19 - Estrutura do ácido fenólico **AdFa2** (ácido 3,4-diidroxibenzóico).



5.3.3 Identificação da molécula AdFa3

O espectro de ^1H (Figura 20) de **AdFa3** mostra os deslocamentos referentes aos acoplamentos em *orto* em δ 7,78 (2H, d, $J = 8,7$ Hz; H-2/H-6) e em δ 6,81 (2H, d, $J = 8,7$ Hz; H-3/H-5).

O espectro no UV desta substância (Figura 21) apresentou banda com $\lambda_{\text{máx}}$ em 260-293 nm (RODRIGUES et al., 2008) similar ao espectro apresentado na Figura 15. Por meio de comparação destes dados com os da literatura (ZHANG et al.; 2012) foi possível identificar esta substância como sendo o ácido *p*-hidroxibenzóico (Figura 22).

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H de **AdFa3**.

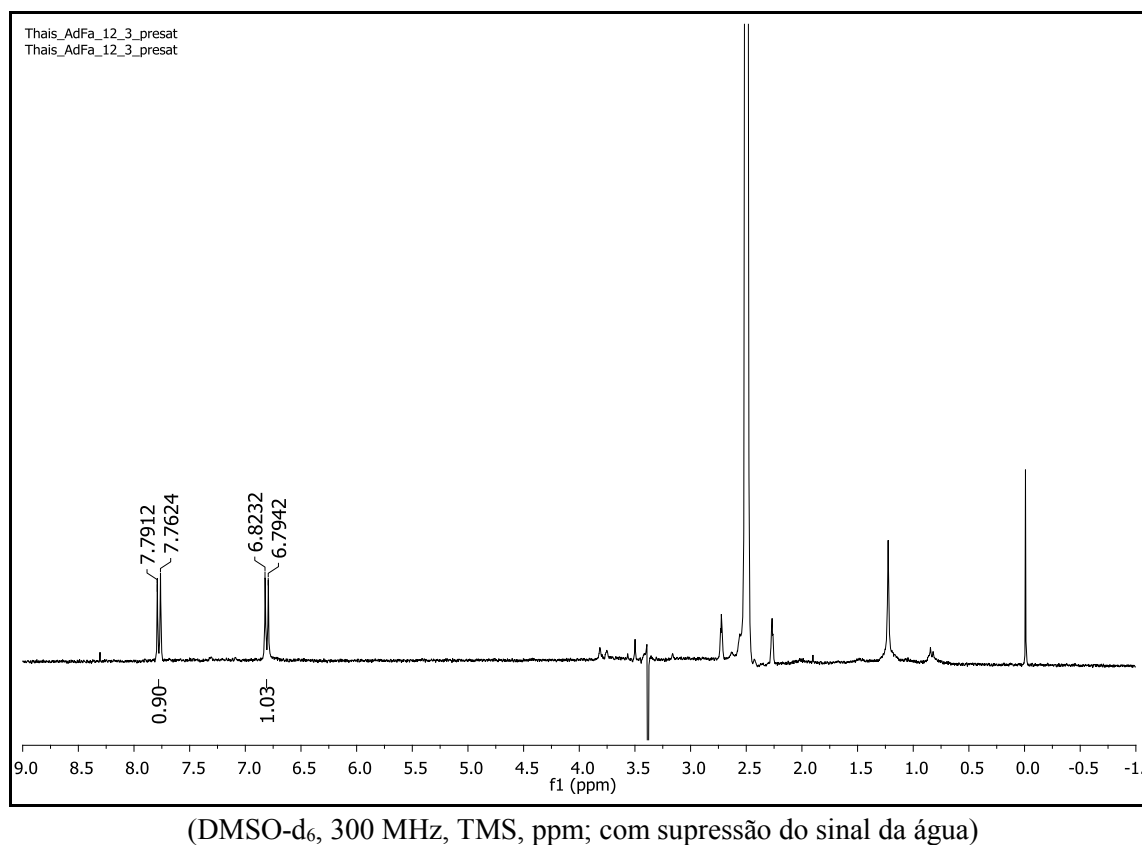


Figura 21 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico **AdFa3**.

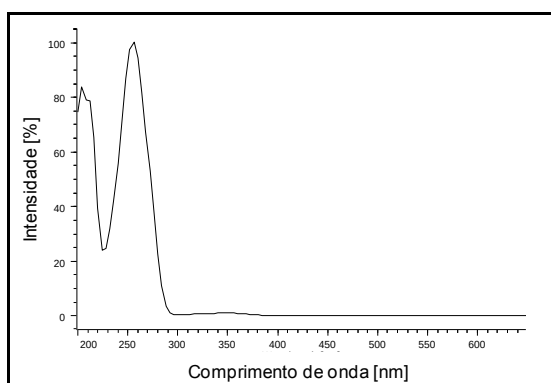
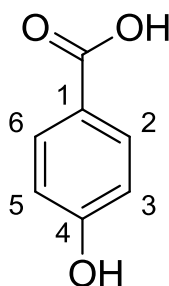


Tabela 5 - Dados de RMN de ^1H de **AdFa3** isolado da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* e o valor teórico da literatura.

Posição	^1H (J in Hz)	^1H Teórico
1	-	-
2	7,78 d (8,7)	7,87
3	6,81 d (8,7)	6,92
4	-	-
5	6,81 d (8,7)	6,92
6	7,78 d (8,7)	7,87

(DMSO- d_6 , 300 MHz)

Figura 22 - Estrutura do ácido fenólico **AdFa3** (ácido *p*-hidroxibenzóico).



5.3.4 Identificação da molécula *AdFa4*

O espectro no UV (Figura 24) da substância **AdFa4** apresentou banda com $\lambda_{\text{máx}}$ em 260-293 nm (RODRIGUES et al., 2008) nm similar ao espectro apresentado na Figura 15. A Figura 23 mostra um sinal de hidrogênio com acoplamento em *orto* em δ 6,80 (d, $J = 8,2$ Hz;

H-5), um sinal de acoplamento em *meta* em δ 7,34 (2H, d, $J = 2,0$ Hz; H-2) e um sinal de acoplamento *orto-meta* em δ 7,30 (dd, $J = 2,0$; 8,2 Hz; H-6). Também foi possível verificar um simpleto (3H) em δ 3,75, correspondendo a um grupo metoxílico. A partir da comparação destes dados com os da literatura (GONZÁLEZ-BARO, 2008), foi possível identificar esta substância como sendo o ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (Figura 25).

Figura 23 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa4.

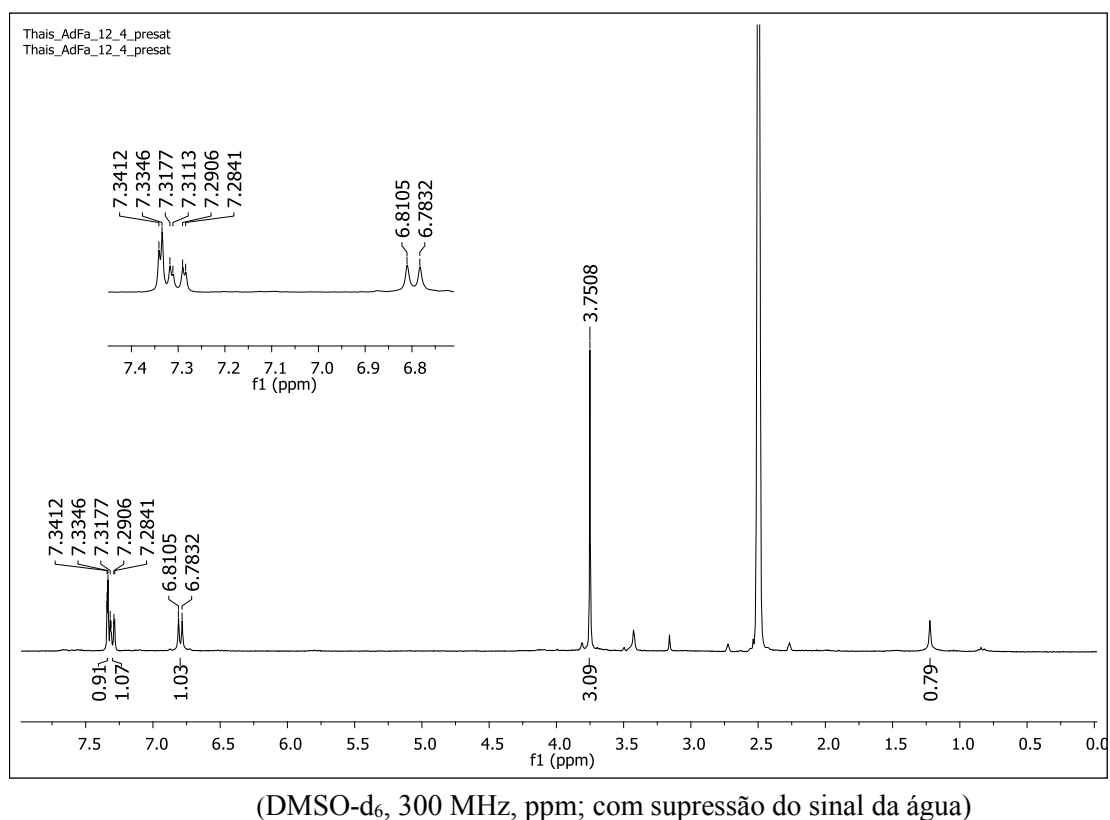


Figura 24 - Espectro de absorção no UV do ácido fenólico AdFa4.

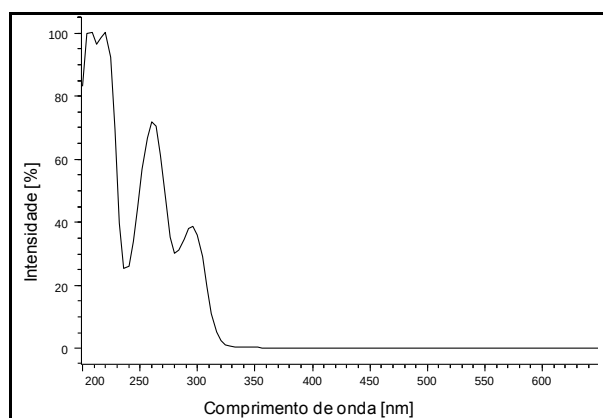
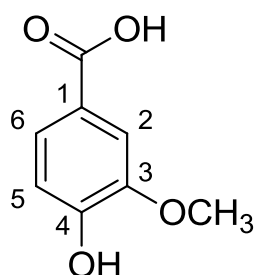


Tabela 6 - Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 300 MHz) de **AdFa4** isolado da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* e o valor teórico da literatura.

Posição	^1H (J in Hz)	^1H Teórico
1	-	-
2	7,34 d (2,0)	7,44
3-OCH ₃	3,75 s	3,92
4	-	-
5	6,80 d (8,2)	6,86
6	7,30 dd (8,2; 2,0)	7,44

(DMSO-d₆, 300 MHz)

Figura 25- Estrutura do ácido fenólico **AdFa4** (ácido 4-hidróxi-3-metoxibenzóico).



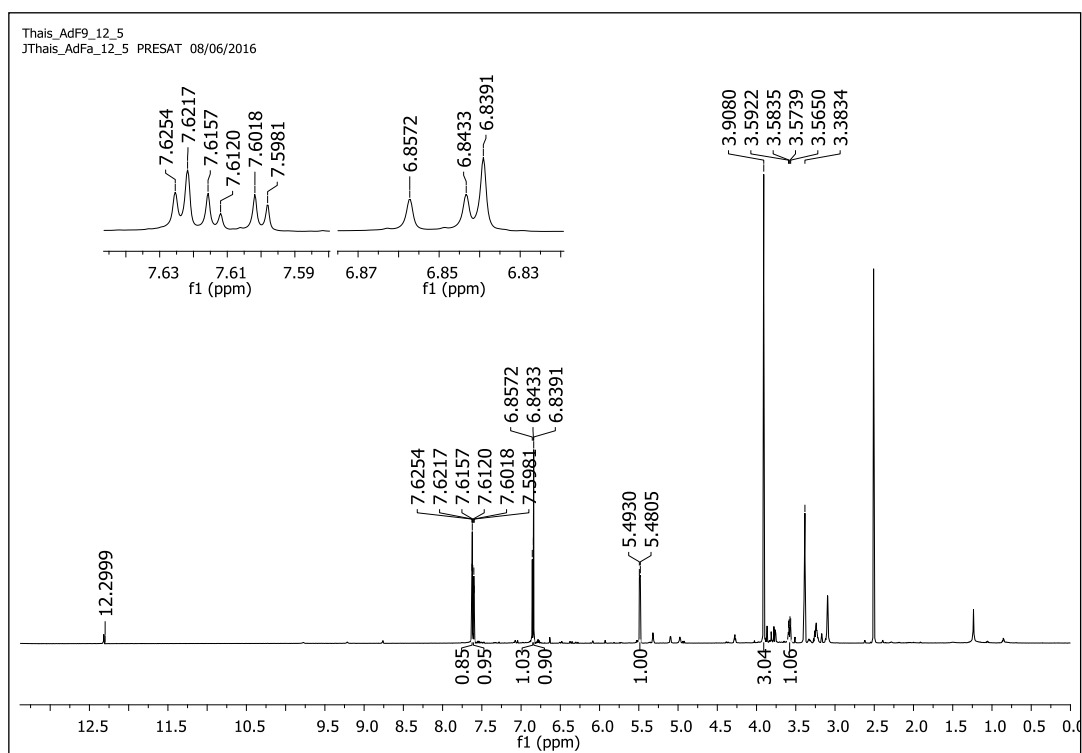
5.3.5 Identificação da molécula AdFa5

O espectro de ^1H de **AdFa5** (Figura 26) mostra um sinal de hidrogênio acoplado em *meta* em δ 7,62 (1H, d, $J = 2,2$ Hz, H-2'), um sinal de hidrogênio acoplado em *orto* em δ 6,85 (1H, d, $J = 8,3$ Hz, H-5') e um sinal de hidrogênio acoplado em *orto-meta* em δ 7,61 (1H, dd, $J = 2,2; 8,3$ Hz, H-6') referentes ao anel B. O singlete obtido em δ 6,84 refere-se ao H-8 quando o anel A é substituído na posição 6, indicando que este está pentasubstituído (HARBORNE, 1996). Observou-se ainda o sinal do hidrogênio anomérico em 5,48 (1H, d, 7,5 Hz) com configuração em β . Em δ 12,1 observa-se o sinal do hidrogênio da hidroxila na posição 5 do flavonoide quelada com a carbonila da posição 4.

O experimento HMBC (Figura 27) forneceu o acoplamento a 3J dos hidrogênios da metoxila em 3,91 com o carbono em δ 155,4 (Tabela 7), confirmando a posição desta metoxila na posição C-7 do anel A do flavonoide. A correlação do hidrogênio em δ 5,44 com o carbono em δ 134,1 confirma que o açúcar está na posição C-3 do flavonoide. A comparação destes dados com os da literatura (MABRY, 1970) e com o UV (Figura 28)

permitiu obter os demais dados necessários de ^1H e ^{13}C para identificar este flavonoide como sendo o 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (Figura 29). Também foi realizada a co-injeção do padrão isolado dos capítulos por HPLC-PDA com o extrato acetato de etila das folhas, confirmando assim ser a mesma substância.

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de AdFa5.



(DMSO- d_6 , 600 MHz, ppm; com supressão do sinal da água)

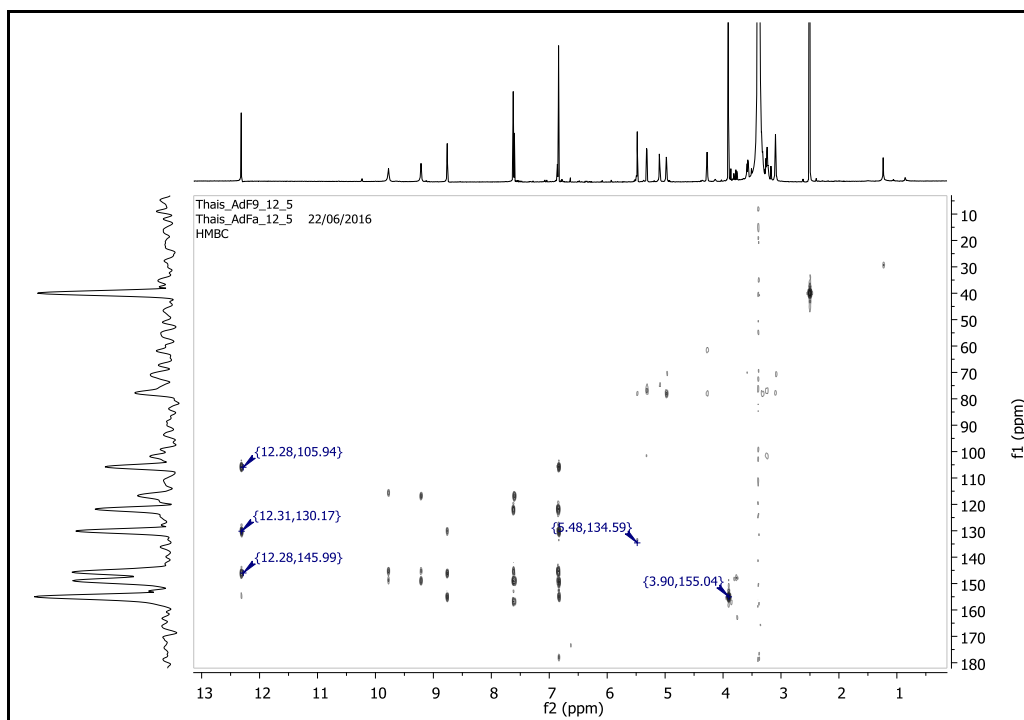
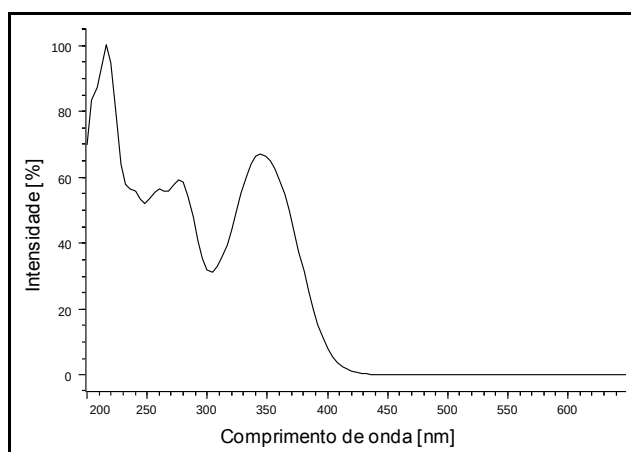
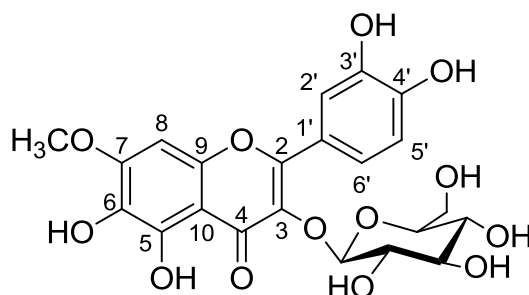
Figura 27 - Mapa de contorno HMBC de **AdFa5**.**Figura 28** –Espectro de absorção no UV do flavonoide **AdFa5**.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^1H (DMSO-d_6 , 600 MHz) de **AdFa5** isolado da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* e o valor teórico da literatura.

Posição	^1H (J in Hz)	^{13}C
2	-	156,4
3	-	134,1
4	-	177,9
5	-	146,6
6	-	130,0
7	-	155,4
8	6,83 s	91,8
9	-	150,9
10	-	105,9
1'	-	122,0
2'	7,62 d (2,2)	117,3
3'	-	145,8
4'	-	149,7
5'	6,85 d (8,3)	115,5
6'	7,59 dd (2,2; 8,3)	122,1
7-OCH ₃	3,91 s	56,8
OH - 5	15,2	-
Açúcar	Glicose	
1"	5,48 d (7,5)	102,1
2"	4,27 dd (7,5 e 9,5)	75,4
3"	3,46 dd (9,5 e 9,5)	77,3
4"	3,21 dd (9,5 e 9,5)	71,1
5"	3,38 m	78,5
6"	3,61 dd (12,0 e 2,5)	62,4
	3,74 dd (12,0 e 5,0)	

(DMSO-d₆, 600 MHz)

Figura 29 - Estrutura do flavonoide **AdFa5** (6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo)

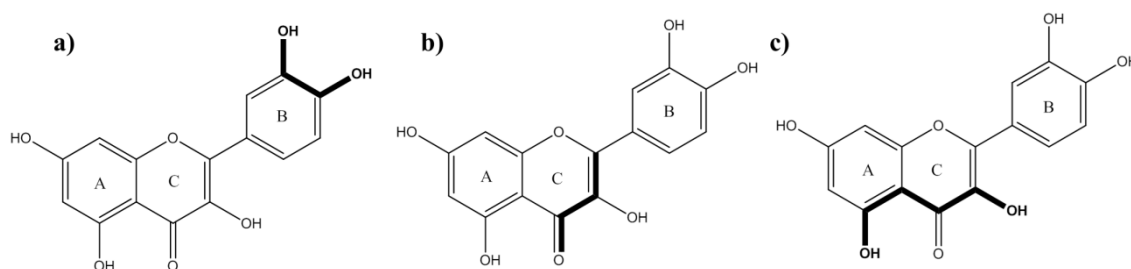


5.4 Avaliação do potencial antirradicalar da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.

A avaliação do potencial antirradicalar foi realizada segundo o procedimento experimental descrito em 3.3.5.1, sendo que o mesmo resultou na mudança de coloração do violeta para o amarelo nos poços em que houve a reação (SOUZA et al., 2007).

A reação ocorreu devido ao arranjo das hidroxilas presentes nos derivados de compostos fenólicos, sendo que nos flavonoides, como a quercetina, o sequestro de radicais livres é facilitado pela estrutura *o*-dihidroxi do anel B (grupo catecol) e a ligação 2,3 em conjugação com a função 4-oxo no anel C, bem como a presença de hidroxilas nas posições 3 e 5 (PANNALA et al., 2001), de acordo com a Figura 30.

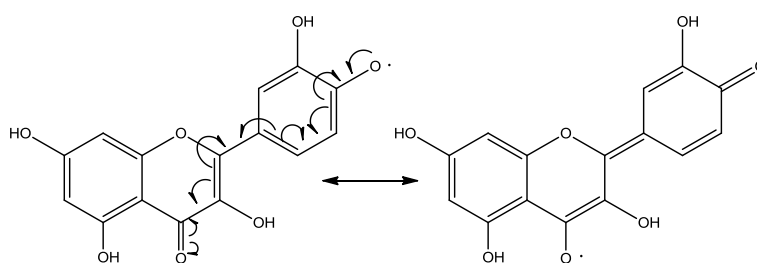
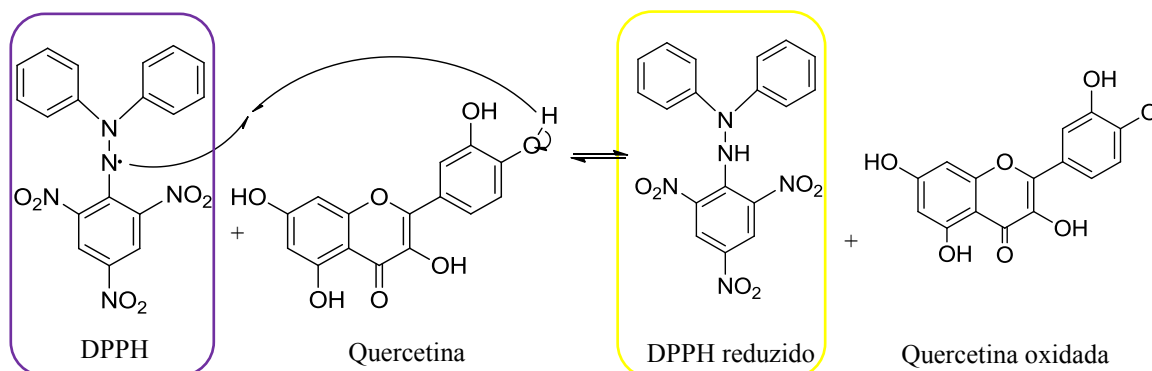
Figura 30 - Estrutura da quercetina onde destacam-se: **a)** Grupo catecol; **b)** Ligação 2,3 do anel C conjugada com a função 4-oxo; **c)** Hidroxilas nas posições 3 e 5.



Fonte: Imagem modificada de EDENHARDER et al., 1997.

Desta forma, como a quercetina apresenta todas as características acima para ter um bom potencial antirradicalar, esta substância foi utilizada como padrão e, com ela foi possível verificar a reação abaixo (Figura 31), onde a mesma apresenta ressonância que consegue estabilizar o radical formado.

Figura 31 - Reação do padrão de quercetina com o DPPH e estrutura de ressonância do radical da quercetina.

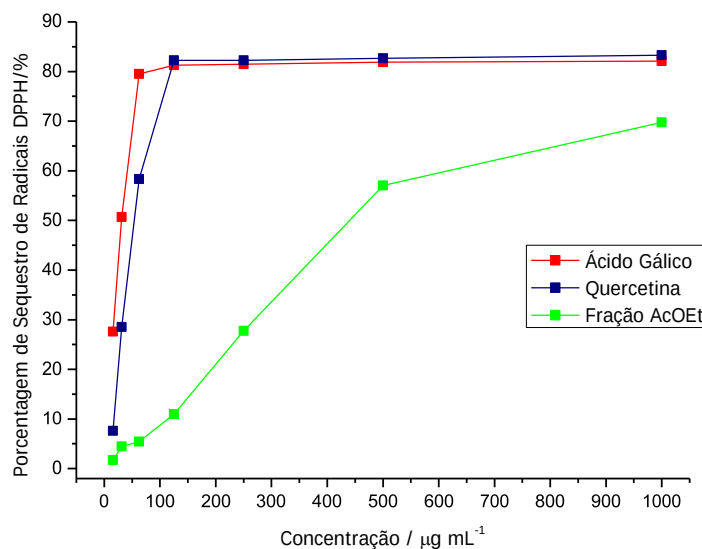


Ressonância do radical da quercetina

Fonte: Adaptado de (BRAND-WILLIANS et al., 1995).

Após a realização do experimento foi possível analisar os dados obtidos para os padrões de ácido gálico e de quercetina e para a fração acetato de etila plotando os dados da porcentagem de captura de radical pela concentração em um gráfico construído no *software* OriginPro 8.0 (OriginLab®). Com isto, interpolaram-se os pontos através de uma equação polinomial de segundo grau e pode-se obter o IC₅₀ para a fração acetato de etila (Figura 32), que é a concentração mínima necessária para a redução de 50% do DPPH presente na solução.

Figura 32 - Porcentagem de inibição do DPPH nos padrões de ácido gálico e de quercetina e na fração acetato de etila.



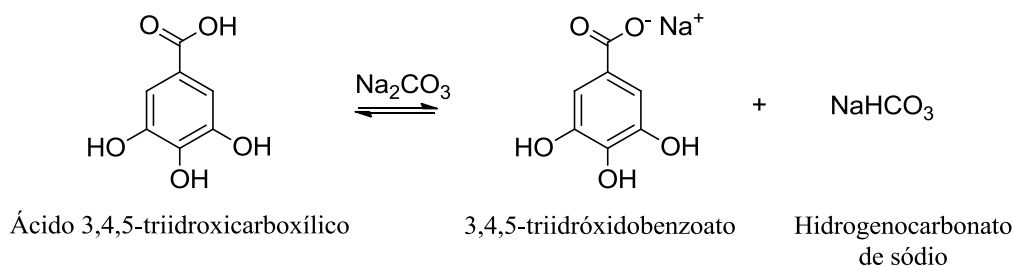
O padrão de ácido gálico $\text{IC}_{50} = 30,69 \pm 4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ quercetina apresentou um IC_{50} de $50,96 \pm 5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto que a fração acetato de etila apenas apresentou resultado para um valor superior que o das concentrações analisadas para o padrão, sendo o valor de $\text{IC}_{50} = 440,66 \pm 24,27 \mu\text{g mL}^{-1}$, o que corresponde a um baixo potencial antirradicalar quando comparado ao padrão da quercetina.

5.5 Avaliação do teor de fenóis totais da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.

A avaliação do teor de fenóis totais foi feita de acordo a metodologia já descrita no 3.3.5.2, sendo que a mesma consiste na redução do Mo^{+6} para o Mo^{+5} , em que se verifica a formação da coloração azul resultante da reação de redução (Figura 34). A reação é iniciada pela desprotonação dos fenóis pelo Na_2CO_3 , sendo que as hidroxilas desprotonadas reagem com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu, provocando a mudança de coloração da solução, que é medida pelo espectrofotômetro em um comprimento de onda de 750 nm.

Desta forma, inicialmente ocorre uma reação ácido-base entre o grupo ácido carboxílico do composto fenólico e a base Na_2CO_3 , gerando o ânion 3,4,5-triidróxidobenzoato (Figura 33).

Figura 33 - Exemplo da reação ácido-base ocorrida entre ácidos fenólicos e carbonato de sódio.

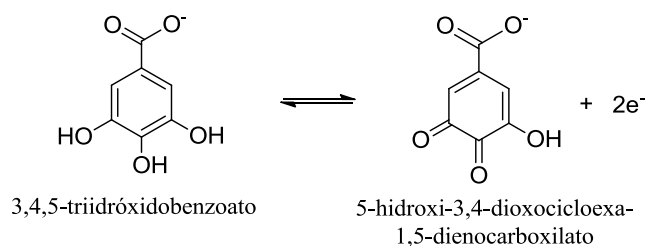


Fonte: Adaptado de AMERICAN., 2005.

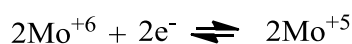
Posteriormente o ânion gerado reage por uma reação de oxido-redução com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu (solução de íons formada por heteropolí-ácidos fosfomolibdicos e fosfotungstícos) (NEVES, 2009), gerando o composto 3,4,5-triidróxidobenzoato (Figura 36).

Figura 34 - Exemplo da reação de oxido-redução ocorrida com o molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu.

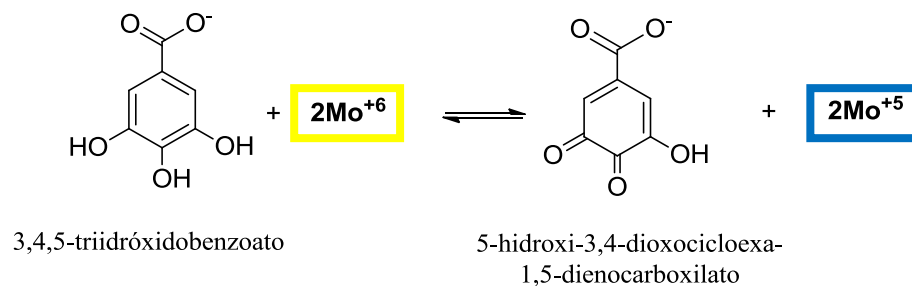
Reação de Oxidação



Reação de Redução

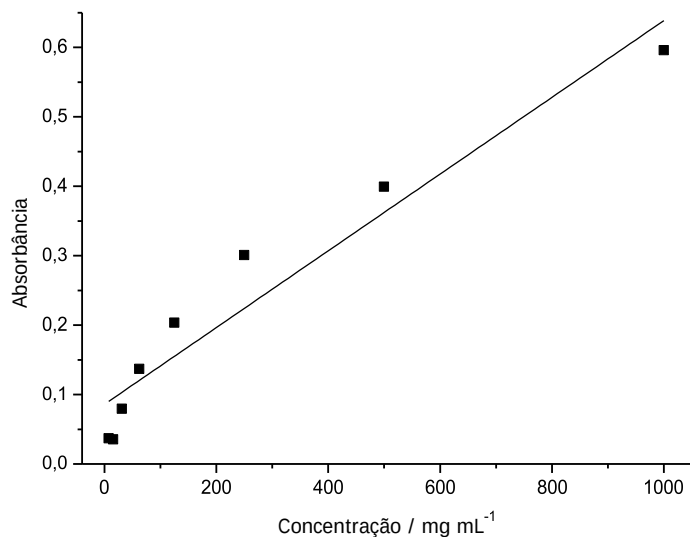


Reação Global



A partir dos dados obtidos, foi possível construir um gráfico de absorvância por concentração por onde se obteve a equação da reta do padrão de ácido gálico (Figura 35), onde se interpolou a absorvância da fração analisada, obtendo-se uma concentração de fenóis totais de $274,61\mu\text{g mg}^{-1}$ da fração acetato de etila.

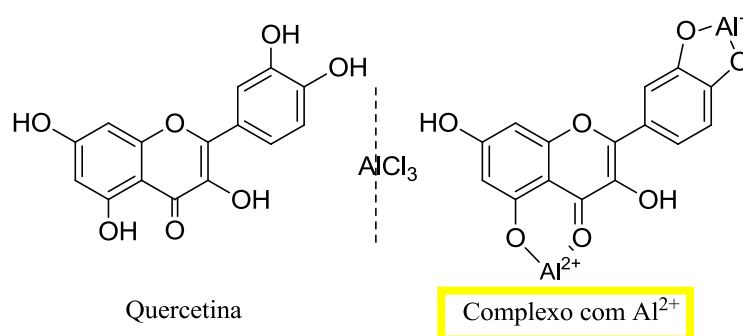
Figura 35 - Gráfico do padrão de ácido gálico utilizado para interpolar a fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.



5.6 Avaliação do teor de flavonoides totais da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*

A avaliação do teor de flavonoides totais foi realizada a partir do procedimento experimental previamente descrito, sendo que a reação forma um complexo estável entre o cátion Al^{2+} e os flavonoides (Figura 36), também se complexando nas posições do catecol (3' e 4'), gerando uma coloração amarela para o complexo e um deslocamento batocrômico (deslocamento para comprimentos de onda maiores) do flavonoide, que tem absorvância medida em 415 nm.

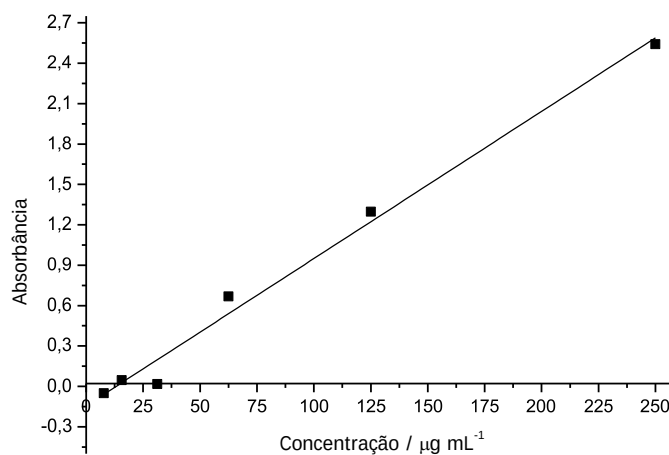
Figura 36 - Formação do complexo flavonoide-Al em solução metanólica de AlCl_3 .



Fonte: Adaptado de MARKHAM, 1982.

A partir dos dados obtidos, foi possível construir um gráfico de absorvância *versus* concentração afim de se obter a equação da reta para o padrão quercetina (Figura 37), sendo que as medições só puderam ser realizadas a partir da concentração de $250,00 \mu\text{g mg}^{-1}$ pois, pela leitura do aparelho, esta foi a concentração máxima detectada. A concentração de flavonoides totais foi obtida pela interpolação da medida de absorvância na equação da reta, obtendo-se o valor de $13,14 \mu\text{g mg}^{-1}$ de fração acetato de etila.

Figura 37 - Gráfico do padrão de quercetina utilizado para interpolar a fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*.

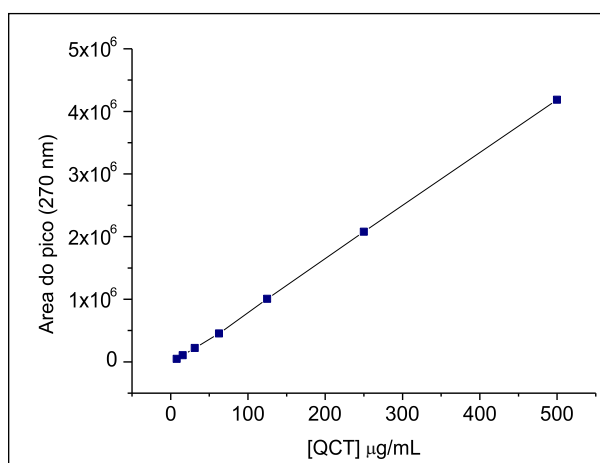


5.7 Quantificação

5.7.1 Linearidade e sensibilidade

Os valores das áreas dos picos cromatográficos foram relacionados com as concentrações utilizadas 7,81, 15,63, 31,25, 62,50, 125,00, 250,00 e 500,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a construção da curva analítica do padrão de quercetina (Figura 38).

Figura 38 - Curva analítica obtida pelo método de calibração externa das solução padrão.



No intervalo de linearidade avaliado para o padrão, a regressão linear apresentou coeficiente de correlação (r^2) superior a 0,99, estando dentro dos valores exigidos pela ANVISA, indicando assim uma boa proporcionalidade entre a concentração do padrão e a área do pico cromatográfico no intervalo de concentração analisado (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003).

Os parâmetros estatísticos que determinaram a linearidade da curva analítica estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Parâmetros da curva analítica do padrão do derivado da quercetina.

Padrão	Coeficiente linear (a)	Coeficiente angular (b)	Fator de correlação (r^2)	Faixa linear ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
AdFa5	40333	8448,2	0,9998	7,77 - 500	2,56	7,77

AdFa5: 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo

Os valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) foram calculados com base na curva de calibração do padrão (RIBANI et al., 2004). As equações utilizadas estão apresentadas abaixo (Figura 39):

Figura 39 – Método para obtenção dos valores de LD (limite de detecção) e LQ (limite de quantificação).

$$\text{LD} = \frac{3,3 \cdot b}{a} \quad \text{LQ} = \frac{10 \cdot b}{a}$$

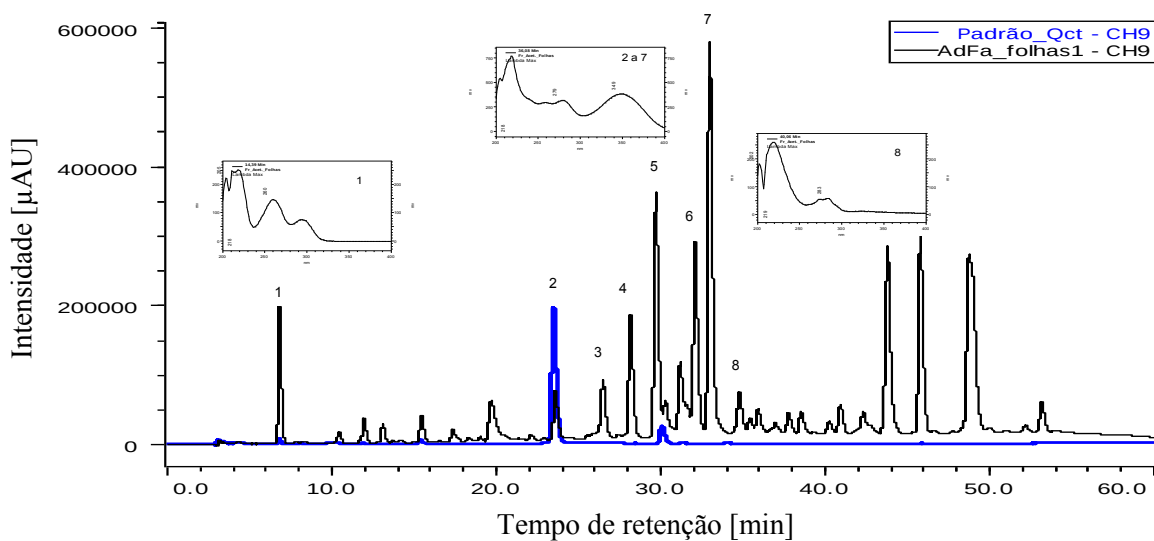
Onde **b** é o coeficiente angular da reta que descreve a curva analítica, ou seja, onde a curva analítica intercepta o eixo y e **a**, o coeficiente linear da reta, sendo a inclinação da curva analítica.

5.7.2 Seletividade

O padrão quantificado pôde ser identificado no extrato por meio da comparação dos tempos de retenção nos cromatogramas analisados. A substância analisada apresenta t_r de 18,87 min para as condições cromatográficas utilizadas (Figura 40). Já, a seletividade do método permitiu medir exatamente o composto de interesse em presença de outros

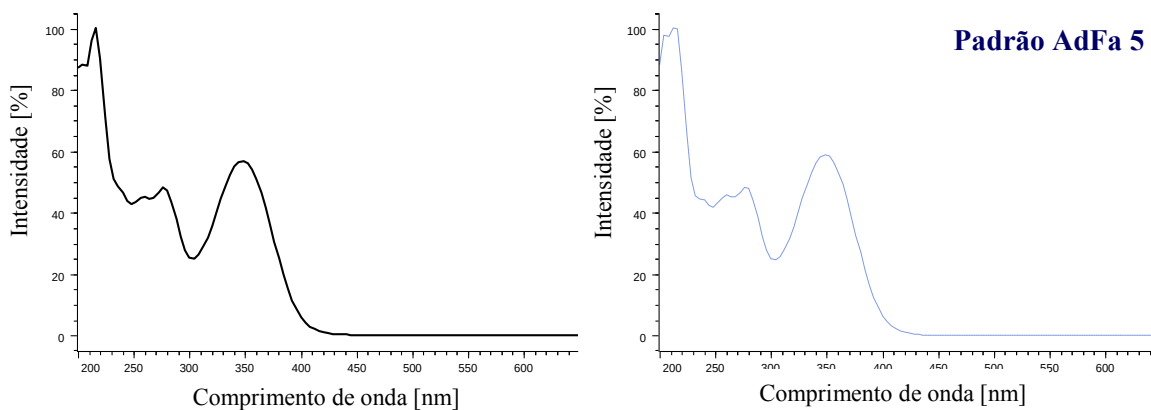
componentes da matriz complexa (extrato vegetal) (RIBANI et al., 2004). Nesse caso, a seletividade pôde ser comprovada pela similaridade entre os espectros de absorção no UV do padrão com o pico obtido pela análise da fração acetato de etila no comprimento de onda de 270 nm.

Figura 40 - Cromatograma contendo o perfil cromatográfico da fração AcOEt das folhas de *A. divaricatus* comparado com padrão de 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo (pico 2 em azul).



Condições cromatográficas: Coluna Thermo (250 x 4,60 mm, 4 micron). Vazão de 1 mL.min⁻¹. Método gradiente de 20% a 80% MeOH, 60 min. Volume de injeção de 10 μ L; λ = 270 nm.

Figura 41 - Espectro de UV do composto 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo na fração acetato de etila e como padrão (AdFa5).



5.7.3 Análise da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*

A quantificação por HPLC-PDA foi feita pela construção da curva analítica das áreas dos picos cromatográficos pela concentração do padrão. A concentração do flavonoide 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo na fração acetato de etila foi determinada pela interpolação da área do pico cromatográfico na curva padrão, sendo o teor do flavonoide de $25,65 \pm 0,43 \text{ mg.g}^{-1}$ de fração acetato de etila.

6 CONCLUSÕES

O perfil cromatográfico por HPLC-PDA da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus* permitiu identificar a presença de ácidos fenólicos, flavonoides e naftopiranonas.

O estudo químico da fração acetato de etila das folhas permitiu isolar e identificar 2 flavonoides, a 6-hidroxi-7-metoxiquercetina e a 6-hidroxi-7-metoxiquercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo e três ácidos fenólicos, o ácido 3,4-diidroxibenzóico, o ácido *p*-hidroxibenzóico e o ácido 4-hidróxi-3-metoxibenzóico.

A avaliação quantitativa da fração acetato de etila permitiu verificar os teores de fenóis totais ($274,61 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$) e flavonoides totais ($13,14 \mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$), bem como a atividade antirradicalar da fração acetato de etila ($\text{IC}_{50} = 440,66 \pm 24,27 \mu\text{g mL}^{-1}$) que, se comparada com os padrões de ácido gálico ($\text{IC}_{50} = 30,69 \pm 4,9 \mu\text{g mL}^{-1}$) e quercetina ($\text{IC}_{50} = 50,96 \pm 5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), mostrou-se como tendo um baixo potencial antirradicalar.

A quantificação por HPLC-PDA gerou um resultado de $25,65 \pm 0,43 \mu\text{g mg}^{-1}$ para o derivado de quercetina glicosilado para a fração acetato de etila, o que pôde auxiliar na explicação do resultado da atividade antirradicalar acima expresso, pois o mesmo é influenciado pelo teor de compostos glicosilados, visto que os critérios para a ocorrência da reação (item 5.4) não são preenchidos, sendo que, na posição 3 do flavonoide há um glicosídeo ao invés de uma hidroxila e, na posição 7, uma metoxila ao invés da hidroxila (AMORIM, et al.; 2014), o que reduz a atividade da fração.

Desta forma, com o estudo realizado foi possível a análise química da fração acetato de etila das folhas de *A. divaricatus*. E, além disto, este estudo corrobora com estudos anteriores, pois a presença de naftopiranonas e flavonoides nas folhas de espécies de *Paepalanthus* e agora de *Actinocephalus* são importantes para caracterizar esses gêneros.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Disponível em: <http://redsang.ial.sp.gov.br/site/docs_leis/vm/vm1.pdf>. Acesso em: 20 jul. 2016.
- AMARAL, F. P.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; SANTOS, L. C.; PIZZA, C.; VILEGAS, W.; PIACENTE, S. HPLC-ESIMSⁿ profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 547-556, 2012.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; WATER ENVIRONMENT FEDERATION. **Standard methods for examination of water and wastewater**. 21st. ed. Washington, DC, 2005. 1496 p.
- AMORIM, M. R.; RINALDO, D.; AMARAL, F. P.; VILEGAS, W.; MAGENTA, M. A. G.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; SANTOS, L. C. HPLC-DAD based method for the quantification of flavonoids in the hydroethanolic extract of *Tonina fluviatilis* Aubl. (Eriocaulaceae) and their radical scavenging activity. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1122-1127, 2014.
- ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; VAN DEN BERG, C. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011.
- BHAT, S. V.; NAGASAMPAGI, B. A.; SIVAKUMAR, M. **Chemistry of natural products**. New York: Springer, 2005. 840 p.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CERVEZAN, T. C. M. **Avaliação fitoquímica e microbiológica da espécie *Artemisia annua* L., submetida a tratamentos de armazenamento e condições de ambiente**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina “Química Orgânica”. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560-562, 1997.
- COELHO, R. G.; VILEGAS, W.; DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. G. A new cytotoxic naphthopyrone dimer from *Paepalanthus bromelioides*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 497-500, 2000.
- COSTA, F. N.; SANO, P. T. New circumscription of the endemic brazilian genus *Actinocephalus* (Eriocaulaceae). **Novon: A Journal for Botanical Nomenclature**, v. 22, n. 3, p. 281-287, 2013.
- COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**, v. 4, n. 1, p. 89-97, 2008.

- CRAGG, G. M., KATZ, F., NEWMAN, D. J.; ROSENTHAL, J. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 12, p. 1407-1423, 2012.
- DEVIIENNE, K. F.; CÁLGARO-HELENA, A.F.; DORTA, D. J.; PRADO, I. M.; RADDI, M. S.; VILEGAS, W.; UYEMURA, S. A.; SANTOS, A. C.; CURTI, C. Antioxidant activity of isocoumarins isolated from *Paepalanthus bromelioides* on mitochondria. **Phytochemistry**, v. 68, n. 7, p. 1075-1080, 2007.
- DOKKEDAL, A. L.; SANTOS, L. C.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. Chemistry in Eriocaulaceae. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 63, n. 3, p. 169-175, 2008.
- EDENHARDER, R.; RAUSCHER, R.; PLATT, K. L. The inhibition by flavonoids of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline metabolic activation to a mutagen: a structure-activity relationship study. **Mutation Research**, v. 379, p. 21-32, 1997.
- GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z.; RAHMAT, A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4324-4333, 2010.
- GIULIETTI, A. M.; HENSOLD, N.; PARRA, L. R.; ANDRADE, M. J. G.; VAN DEN BERG, C.; HARLEYA, R. M. The synonymization of *Philodice* with *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 60, p. 50-56, 2012.
- GONZÁLEZ-BARÓ, A. C., PARAJÓN-COSTA, B. S., FRANCA, C. A., PIS-DIEZ, R. Theoretical and spectroscopic study of vanillic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 889, n. 1, p. 204-210, 2008.
- HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. New York: Chapman and Hall, 1996. 676 p.
- HENSOLD, N. The Andean *Paepalanthus pilosus* complex (Eriocaulaceae): a revision with three new taxa. **PhytoKeys**, v. 64, p. 1-57, 2016.
- KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 3954-3962, 1999.
- LIMA, F. O.; BEZERRA, A. S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**, v. 13, n. 1, p. 111-124, 2012.
- MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. London: Academic Press, 1982. 113 p.
- MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer, 1970.

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

NEGRI, G; TABACH, R. Saponins, tannins and flavonols found in hydroethanolic extract from *Periandra dulcis* roots. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 851-860, 2013.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**, VII BMCFB, p. 107-110, 2009.

NICOLAOU, K. C.; HALE, C. R.; NILEWSKI C.; IOANNIDOU, H. A. Constructing molecular complexity and diversity: total synthesis of natural products of biological and medicinal importance. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 15, p. 5185-5238, 2012.

OLIVEIRA, A. P. S.; SOUZA, J. F.; SILVA, M. A.; HILARIO, F.; RESENDE, F. A.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthones and flavones of *Syngonanthus* (Eriocaulaceae). **Steroids**, v. 78, n. 11, p. 1053-1063, 2013.

OU, C. B.; PANG, Q.; CHEN, X.; HOU, N.; HE, C.; Protocatechuic acid, a new active substance against the challenge of avian infections bursal disease virus. **Poultry science**, v. 91, n. 7, p. 1604-1609, 2012.

ORIANI, A.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T. Morphological architecture of *Actinocephalus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae-Poales). **Flora**, v. 203, n. 4, p. 341-349, 2008.

PACIFICO, M.; NAPOLETANO, A.; HILARIO, F.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Metabolite fingerprinting of capim dourado (*Syngonanthus nitens*), a basis of Brazilian handcrafts. **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 2, p. 488-496, 2011.

PANNALA, A. S.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P. J.; RICE-EVANS, C. A. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001.

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

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T. L. B.; CARDOSO, K. C. M.; AMORIM, E. L. C. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

PEREIRA, V. **Cadeia do Espinhaço**. In: Nanuza e sua vida entre os campos floridos da Serra do Cipó. 18 set. 2012. Disponível em: <<http://www.jornaldocampus.usp.br/index.php/2012/09/nanuza-e-sua-vida-entre-os-campos-floridos-da-serra-do-cipo/>>. Acesso em: 28 abr. 2016.

QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L. Modern approaches in the search for new active compounds from crude extracts of natural sources. In: Cechinel-Filho, V. (Ed.). **Plant bioactives and drug discovery: principles, practice, and perspectives**. Hoboken: John Wiley & Sons Inc., 2012. p. 43-80.

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

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

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

SCATENA, V. L.; ORIANI, A.; SANO, P. T. Anatomia de raízes de *Actinocephalus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 4, p. 835-841, 2005.

SILVA, A. C. Z. **Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Körn.) Sano (Eriocaulaceae)**. 2016. 141 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

SILVA, M. A.; CARDOSO, C. A. L.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. High-Performance Liquid Chromatographic quantification of flavonoids in Eriocaulaceae species and their antimicrobial activity. **Molecules**, v. 14, n. 11, p.4644-4654, 2009.

SIMÕES, V. N.; FAVARIN, L. R. V.; CABEZA, N. A.; OLIVEIRA, T. D.; FIORUCCI, A. R.; STROPA, J. M.; RODRIGUES, D. C. M.; CAVALHEIRO, A. A.; ANJOS, A. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga (III). **Química Nova**, vol. 36, n. 4, p. 495-501, 2013.

SNEADER, W. E. **Drug discovery (the history)**. Chichester, John Wiley & Sons, Inc., 2005. 468 p.

SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M. A.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

VARANDA, E. A.; VARELLA, S. D.; RAMPAZO, R. A.; KITAGAWA, R. R.; RADDI, M. S. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Mutagenic and cytotoxic effect of planifolin: a naphthopyranone dimer isolated from *Paepalanthus planifolius*. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 5, p. 664-668, 2006.

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

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

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

ZHANG, H.; CONTE, M. M.; HUANG, X. C.; KHALIL, Z.; CAPON, R. J.; A search for BACE inhibitors reveals new biosynthetically related pirrolidones, furanones and pyrroles from a southern Australian marine sponge *Iantella* sp. **Organic and biomolecular chemistry**, v. 10, n. 13, p. 2656-2663, 2012.