

FELIPE GREGÓRIO IGNÁCIO

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos

Araraquara – SP
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

I24e Ignácio, Felipe Gregório
Estudo químico e biológico do extrato metanólico dos
capítulos de *Paepalanthus acanthophyllus* (Eriocaulaceae) /
Felipe Gregório Ignácio. – Araraquara : [s.n.], 2016
79 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Lourdes Campaner dos Santos

1. Flavonóides. 2. Citotoxicidade. 3. Cromatografia líquida
de alta eficiência. 4. Eriocaulaceae. 5. Atividade antifúngica.
I. Título.

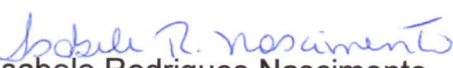
FELIPE GREGÓRIO IGNACIO

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

Araraquara, 17 de agosto de 2016.

BANCA EXAMINADORA


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


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


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

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais:

Nascimento: 02/03/1987

Filiação: Ednilson Ignácio e Maria do Carmo Gregório Ignácio

Naturalidade: Araraquara - SP

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

Telefone: (16) 3337-9670

E-mail: fgregorio@yahoo.com

Formação Acadêmica:

Graduação: Licenciatura em Química.

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

Instituto de Química

Local: Araraquara - SP

Período: 2007-2013

Trabalhos apresentados em congressos:

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

Ao Felipe Hilário, por sempre me ajudar em tudo.

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

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

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

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

A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

Figura 25 - Estrutura de Pa2 (6-metoxicanferol-3-O-(6"-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo).....	48
Figura 26 - Espectro de RMN ^1H de Pa3 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).	50
Figura 27 - Experimento TOCSY 1D irradiado em δ 5,46 da substância Pa3 (11,7 T, DMSO- d_6).	50
Figura 28 - Espectro gHSQC Pa3 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).....	51
Figura 29 - Espectro gHMBC Pa3 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).....	51
Figura 30 - Estrutura de Pa3 . (6-metoxicanferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo)..	52
Figura 31 - Espectro de RMN ^1H de Pa1 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).	53
Figura 32 - Espectro ESI-MS, modo negativo de Pa1	53
Figura 33 - Estrutura de Pa1 . (6-metoxicanferol-3,7-di-O- β -D-glucopiranosídeo).	53
Figura 34 - Espectro no UV de Pa4	55
Figura 35 - Espectro de RMN ^1H de Pa4 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).	56
Figura 36 - Espectro de RMN ^{13}C de Pa4 (em DMSO- d_6 , 11,7 T).....	57
Figura 37 - Espectro TOCSY 1D de Pa4 (11,7 T, DMSO- d_6) com irradiação em δ 5,07.	57
Figura 38 - Espectro gHMBC de Pa4 (11,7 T, DMSO- d_6).	58
Figura 39 - Estrutura de Pa4 (Paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo).	58
Figura 40 - Espectros de RMN de ^1H da Pa5 – (11,7 T, $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$).....	59
Figura 41 - Estrutura de Pa5 (Paepalantina).	59
Figura 42 - Curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão.	62
Figura 43 - Curva de calibração utilizando a quercetina como padrão.	63
Figura 44 - Cromatograma representativo da separação por HPLC-PDA analítico para quantificação de Pa1 , Pa2 , Pa3 e Pa4 do extrato metanólico dos capítulos <i>P. acanthophyllus</i>	64
Figura 45 - Curva analítica utilizada para a quantificação a) dos flavonoides Pa1 , Pa2 e Pa3 ; b) da naftopiranona Pa4	66

LISTA DE TABELAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

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

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

SUMÁRIO

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

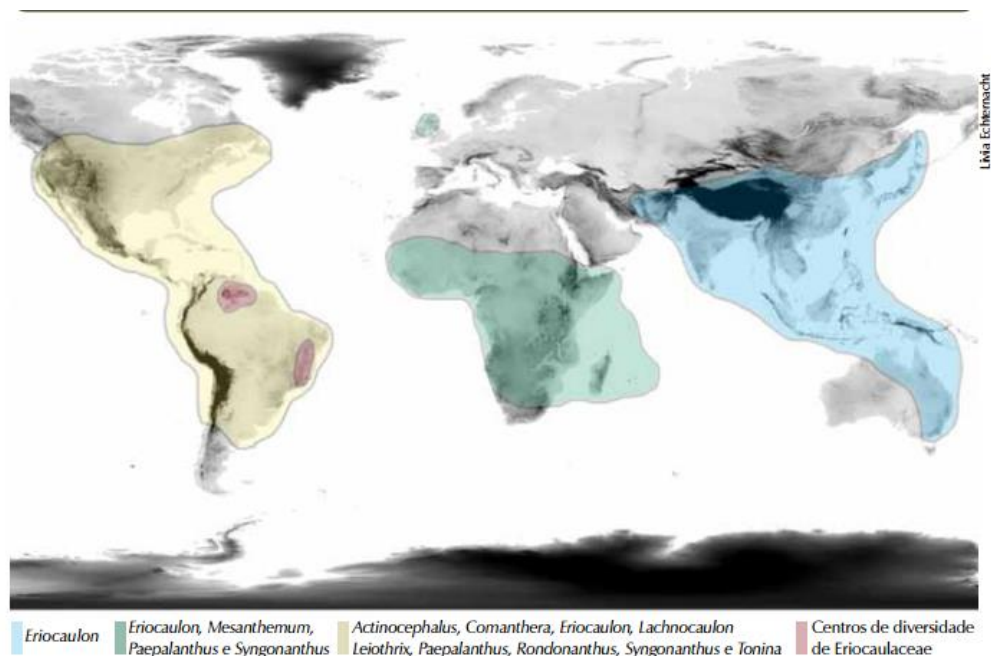
Na literatura (COSTA, *et al.*, 2008, ANDRADE *et al.*, 2011; GIULIETTI *et al.* 2012) ainda existem dados informando que esta família possui uma complicada taxonomia, sendo as espécies divididas em gênero, subgênero, seção e subseção.

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

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

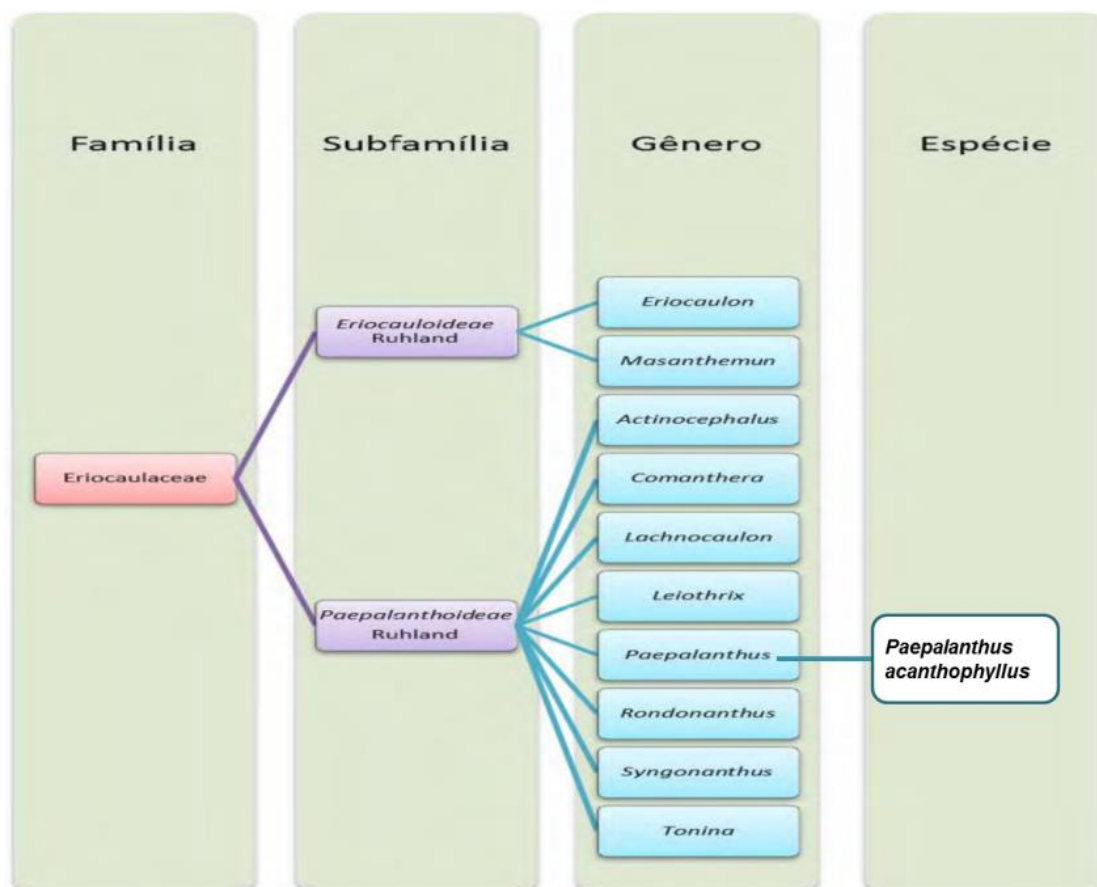
sendo alguns deles endêmicos à Serra do Cipó, Minas Gerais (GIULIETTI et al., 1990, SANO et al., 2015). A Figura 1, apresenta o mapa de distribuição dos gêneros de Eriocaulaceae no mundo, onde destaca-se os que dos 10 gêneros presentes na família, 8 deles ocorrem no Brasil (INSTITUTO CHICO MENDES DE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

Figura 1 - Mapa de distribuição da família Eriocaulaceae.



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

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

Figura 2 - Cladograma simplificado de Eriocaulaceae

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

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

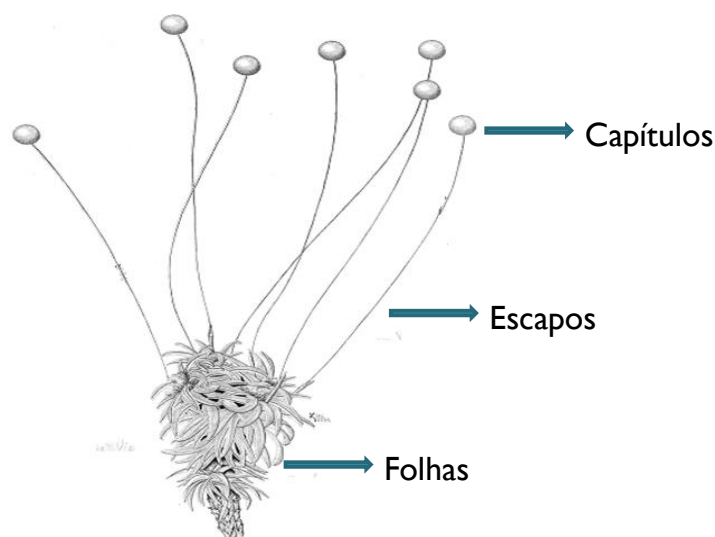
O ambiente onde sobrevivem estas espécies são constituídos, principalmente por afloramentos de arenito, quartzíticos, com altitudes superiores a 1.000 m de altitudes, onde as espécies precisam se adaptar com pouca água e muito calor durante o dia (ANDRADE et al., 2011, GIULIETTI, 2012, SANO et al., 2014).

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

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

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

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



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

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

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

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

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

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

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

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



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

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

1.1 Gênero *Paepalanthus*

Paepalanthus é o maior gênero da família Eriocaulaceae com cerca de mais de 500 espécies distribuídas entre a América Central e Sul (GIULIETTI et al., 2012). No Brasil existe cerca de 340 espécies, das quais 95% restritas ao país, com um elevado número espécies endêmicas (GIULIETTI et al., 2010; FORZZA, et al., 2010, SANO et al., 2015). Novas espécies são frequentemente descritas, especialmente para áreas mal amostradas (GIULIETTI et al.; 2009; TROVO, et al.; 2009; TROVO et al., 2011).

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

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

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

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

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

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

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

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



Fonte: Foto de Marcelo Trovó Lopes de Oliveira

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- Traçar o perfil por HPLC-PDA do extrato metanólico dos capítulos *P. acanthophyllus*;
- Purificar os metabólitos secundários do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*;
- Identificar/elucidar os principais metabólitos isolados do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* por técnicas espectrométricas (EM) e espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, UV, IR);
- Quantificar por HPLC-PDA os principais metabólitos secundários isolados e identificados no extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*;
- Avaliar o teor de flavonoides e fenóis totais do extrato metanólico dos capítulos;
- Avaliar as atividades antitumoral e antimicrobiana do extrato metanólico dos capítulos.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Coleta e identificação da espécie vegetal

As partes aéreas de *P. acanthophyllus* (capítulos, escapos e folhas) foram coletadas e identificadas pelo Prof. Dr. Paulo Takeo Sano do Instituto de Biociências da USP de São Paulo em Alto Paraíso de Goiás - GO e a localização por posicionamento global por satélite de 14°01'39.35"S, 47°31'43.32"W, elev. 1517 m. Uma exsicata de número SANO 3965 foi depositada no IB – USP. O Prof. Paulo Takeo Sano possui autorização de coleta registrado no IBAMA e a Prof^a. Lourdes C. dos Santos possui Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico, Número: 33512-3, Data da Emissão: 04/05/2014.

3.2. Preparação do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*.

O material botânico coletado e identificado foi seco em estufa a 40 °C e posteriormente triado para a separação de capítulos e folhas. Em seguida os capítulos foram finamente divididos em um moinho de facas (com rotor vertical MAO 90CF), com um tamanho médio de partículas de 1 a 3 mm a fim de facilitar a extração de seus constituintes químicos. Os pós obtidos foram pesados em uma balança (Gehaka[®], BG 4000 - com capacidade para 4040 g e precisão de 0,01 g). Em seguida, foram submetidas à percolação (PRISTA, 1995).

Quantidade do pó foi intumescida com quantidade de solvente extrator (metanol) durante 2 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. Durante a percolação foi determinado o procedimento operacional padrão visando a padronização desta etapa, de forma que a obtenção da razão droga vegetal de extratos : solvente extrator fosse mantida constante. Após a extração, o líquido extrator foi rotaevaporado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (modelo Laborota 4001 – efficient marca Heidolph, equipado com bomba a vácuo modelo Rotavac valve control Heidolph), em temperatura menor que 40 °C. O extrato metanólico (5,12 g) foi transferido para vidro tarado e deixado em capela até completa eliminação do solvente

3.3. Fracionamento em Sephadex® LH-20

A fração metanólica (2,30 g) dos capítulos foi solubilizado em MeOH/ H₂O (9:1, v/v) (20,0 mL), utilizando-se banho ultrassom por 10 minutos, em seguida centrifugado por 15 minutos, separando-se o precipitado (0,30 g) do sobrenadante (2,00 g). O sobrenadante foi filtrado e fracionado em coluna de Sephadex LH-20 (85 x 2,5 cm d.i.), eluída com MeOH/ H₂O (9:1, v/v).

As frações com aproximadamente 10 mL foram coletadas em coletor automático Redifrac (Pharmacia). Foram obtidas 82 frações, as quais foram eluídas em CHCl₃/MeOH/H₂O, (43:37:20:), v/v/v, fase orgânica) e reveladas com luz UV, iodo e também borrifadas com solução de anisaldeído/H₂SO₄, sendo a placa posteriormente levada a uma estufa a 130 C°. Estas frações foram reunidas por CCDC, de acordo com a coloração e o R_f.

Para uma maior obtenção de massa, o procedimento descrito acima foi realizado mais de uma vez, sendo observado uma reprodutibilidade nos resultados.

3.4. Clean-up dos extratos

O *clean-up* de todas as frações deste trabalho foi realizado em cartucho de SPE RP18 (500 mg). O cartucho foi previamente ambientado com 5,0 mL de MeOH/H₂O (9:1, v/v). Em seguida, a amostra foi filtrada através do cartucho, o qual foi em sequência eluída com 5,0 mL da mesma mistura de MeOH/H₂O. A solução obtida foi seca em temperatura ambiente e o sólido resultante redissolvido em MeOH/H₂O (9:1, v/v) filtrado em filtro de PTFE (0,22 µm) e armazenado em vial de vidro.

3.5. Análises por HPLC-PDA de extratos

Com o objetivo de traçar o perfil cromatográfico do extrato metanólico dos capítulos, 1 mg do extrato foi solubilizado em 1,0 mL de MeOH/H₂O 9:1m(v/v), filtrado em cartucho SPE RP 18 e em membrana de 0,22 µm e diluídos com MeOH/H₂O 9:1 (v/v) até obtenção de solução de concentração de 1 mg/mL. A análise do perfil cromatográfico do extrato metanólico bruto dos capítulos foi realizada por HPLC-PDA. Para este perfil foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (analítico gradiente quaternário) modelo PU-2089 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2018 (Jasco®) e a um injetor automático modelo AS-2055 (Jasco®). Foi utilizada uma coluna Thermo Hypersil

GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min.

3.6. Fracionamento por HPLC-PDA semi-preparativo

A fração 2 (296 mg) proveniente do fracionamento do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* por sephadex LH-20 foi solubilizada em 5,0 mL de MeOH: H₂O (9:1, (v/v), passou por um *clean-up* em cartucho SPE utilizando a mesma metodologia item 3.4, sendo posteriormente filtrada em em filtro de PTFE (0,22 μ m).

A separação dos compostos foi realizada em um HPLC-PDA (semi-preparativo) modelo PU-2086 (Jasco®), acoplado a um detector de arranjo de foto diodos, modelo MD-2010 (Jasco®). Foi utilizada uma coluna de fase reversa RP 18 imobilizada com octadecilsilano, Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 10 mm i.d.; 5 μ m), vazão 13,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente consistindo de 32-64 % de B em 40 min. e 64-100 % de B até 60 minutos. O volume de cada injeção foi de 200 μ L. O fracionamento forneceu as substâncias: **Pa1** (2,7 mg, Tr = 6,88 min.); **Pa2** (7,2 mg, Tr = 16,99 min.); **Pa3** (11,4 mg, Tr = 20,21 min.); **Pa4** (8,3 mg, Tr = 28,79 min.) e **Pa5** (2,9 mg, Tr = 54,59 min.).

3.7. Análise de frações por CCD

Nas triagens das frações foram usadas placas de camada delgada de sílica-gel em suporte de alumínio (Merck®, Aldrich®), sendo usados como reveladores: Iodo, Anisaldeído/H₂SO₄ e NP/PEG.

3.8. Análise por Espectrometria de Massas

Os espectros de massas foram realizados em espectrômetro de massas LCQ FLEET (Thermocientific®), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). Algumas substâncias estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações (MS²) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos (MS²), sob a seguintes condições:

voltagem do capilar – 4 V, voltagem do *spray* – 5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N₂) fluxo 60 (unidades arbitrárias).

3.9. Análise por RMN

Os experimentos de ¹H-NMR e ¹³C-NMR, obtidos em dimetil sulfóxido hexadeuterado (DMSO-*d*₆, Sigma Aldrich®), foram realizados em espectrômetro de ressonância magnética nuclear de 11,7 T (Varian® Inova). Os deslocamentos químicos são dados em δ (ppm) usando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

3.10. Avaliação do teor de fenóis e flavonoides totais dos extratos metanólicos de capítulos de *P. acanthophyllus*

O teor de fenóis totais e flavonoides totais foram realizados em triplicata utilizando o equipamento Thermo Plate TP-READER Basic para a leitura das absorbâncias para cada ensaio.

3.10.1. Determinação do teor de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada a partir do método colorimétrico padrão de *Folin-Ciocalteu* (KÄHKÖNEN et al., 1999; GHASEMZADEH et al., 2010).

A análise foi realizada utilizando-se uma solução padrão de ácido gálico na concentração de 500 µg.mL⁻¹. As soluções do padrão utilizadas na construção da curva analítica consistiram na preparação de diluições seriadas a partir da solução estoque nas concentrações de 250,00 µg.mL⁻¹, 125,00 µg.mL⁻¹, 62,50 µg.mL⁻¹, 31,25 µg.mL⁻¹, 15,63 µg.mL⁻¹, 7,81 µg.mL⁻¹, 3,91 µg.mL⁻¹ e 1,95 µg.mL⁻¹. Os extratos analisados foram preparados na concentração de 1000 µg.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 analisadas, incluindo a solução de ácido gálico em diferentes concentrações. Aguardou-se 3 minutos e adicionou-se 50 µL de uma solução de Na₂CO₃ 200 mg.mL⁻¹. Após a adição de todos os reagentes, aguardou-se o tempo para reação de 2 horas e realizou-se a medida das absorbâncias a λ = 750 nm.

3.10.2. . Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada de acordo o método colorimétrico baseado na metodologia descrita por Peixoto Sobrinho et al. (2008) e Jurd & Geissman (1956).

A análise foi realizada utilizando-se uma solução padrão de quercetina na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As solução do padrão utilizada na construção da curva analítica consistiu na preparação de diluições seriadas a partir da solução estoque nas concentrações de 250,00, 125,00, 62,50, 31,25, 15,63, 7,81, 3,91 e $1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O extrato analisado foi preparado na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Uma solução de AlCl_3 2% (m/v) também foi preparada em $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ 80:20 (v/v). Os reagentes foram adicionados em uma placa de 96 poços na seguinte ordem: 100 μL da solução de AlCl_3 2% (m/v), 100 μL de cada extrato e as soluções nas diferentes concentrações do padrão. O tempo de reação foi de 1 hora sendo após isto realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a $\lambda = 415 \text{ nm}$.

4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

4.1. Determinação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima foi realizada no laboratório de Fisiologia de Micro-organismo da FCFAr. Unesp Araraquara sob a supervisão da Profa. Dra. Taís Maria Bauab.

4.1.1. Cepas microbianas

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foram empregadas três cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Salmonella setubal* ATCC 19196. As cepas foram mantidas em caldo Mueller Hinton (CMH) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foram repicadas em CMH e incubadas a 37°C por 24 horas. Para a avaliação da atividade antifúngica foi empregada uma cepa de *Candida albicans* ATCC 18804. A cepa foi mantida em Caldo Sabouraud Dextrose (CSD) acrescido de 20% de glicerol a -20° C, e, para o uso foi repicada em CSD e incubada a 37°C por 48 horas.

4.1.2. Padronização dos inóculos bacterianos

As suspensões bacterianas de foram padronizadas a partir de uma cultura de 24 horas, em CMH, adicionando-se meio de cultura estéril até atingir turvação igual à suspensão do tubo 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente $1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Em seguida foi verificada a leitura espectrofotométrica a 620 nm para confirmação da concentração de micro-organismos. Posteriormente, foi realizada uma diluição 1:10 em CMH, obtendo-se uma suspensão de $1,0 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹, a qual foi utilizada nos ensaios (CLSI, 2006; ARAÚJO et al., 2012).

4.1.3. Padronização do inóculo fúngico

A suspensão fúngica de *Candida albicans* foi padronizada a partir de uma cultura de 48 horas em CSD diluídas até escala 0,5 de McFarland (10^6 UFC/mL). A concentração das células leveduriformes foi confirmada por leitura espectrofotométrica a 620 nm. Desta suspensão foi realizada uma diluição 1/1000 obtendo-se uma suspensão de 10^3 UFC.mL⁻¹ a qual foi utilizada nos experimentos (CLSI, 2008; ARAÚJO et al., 2013).

4.1.4. Determinação da CIM para as cepas bacterianas

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita segundo a norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) com modificações.

Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 80 µL de CMH. Em seguida foram acrescentados 100 µL das soluções das amostras vegetais e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg.mL⁻¹. Adicionalmente foram distribuídos 20 µL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas. Como controle positivo foi empregado o fármaco a ampicilina (200 µg.mL⁻¹). Também foram realizados o controle do meio de cultura, o controle de crescimento bacteriano, o controle de esterilidade das amostra vegetal e o controle negativo (solventes).

As microplacas foram incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

4.1.5. Determinação da CIM para a cepa fúngica

A avaliação da atividade antifúngica e determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição de acordo com a metodologia descrita segundo o documento M27-A3 da CLSI (2008), com modificações.

Em cada orifício das microplacas (96 poços) foi acrescentado meio de cultura RPMI 1640, ajustado ao pH 7,0 com tampão MOPs (ácido 3-[N-morfolino] propanossulfônico) e esterilizado por membrana filtrante.

Adicionalmente foram acrescentados 100 µL da solução da amostra vegetal e realizada a diluição seriada de 1000 a 7,8 µg.mL⁻¹. Em seguida foram distribuídos 100 µL das suspensões dos micro-organismos previamente padronizados em cada orifício das microplacas.

Como controle positivo foi utilizado anfotericina B (16,0 a 0,06 µg.mL⁻¹) e o fluconazol (512 a 1,0 µg.mL⁻¹). Também foi realizado o controle do meio de cultura, do crescimento leveduriforme, esterilidade da amostra vegetal e solvente. As microplacas foram incubadas em estufa microbiológica à 37°C por 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata.

4.1.6. Leituras espectrofotométricas

Após o período de incubação de ambos os ensaios (bactérias e levedura), as microplacas foram submetidas à leitura de absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro de microplacas (Epoch 2- Biotek®). Os valores obtidos foram considerados para a realização de cálculos que expressaram a porcentagem de viabilidade dos micro-organismos de acordo com GUDIÑA et al. (2010). A CIM foi considerada como a concentração da amostra vegetal capaz de inibir o crescimento de 90% das cepas (HÖRNER et al., 2008).

4.1.7. Leituras com revelador

Nos testes com as bactérias foram realizadas leituras com o revelador resazurina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) do qual 30 μL foram adicionados em cada orifício das microplacas. No decorrer de 2 horas a presença de cor azul representa ausência de crescimento e de cor rosa, presença de crescimento bacteriano (PALOMINO et al., 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea). A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células bacterianas e até células de mamíferos (O'BRIEN et al., 2000, O'BRIEN et al., 2005).

Para os ensaios com a cepa fúngica foram adicionados 20 μL de solução aquosa de 2% de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC), e incubação a 37°C por 3 horas. A ausência de crescimento do micro-organismo mantém as soluções dos poços incolores, enquanto a coloração vermelha representa crescimento do mesmo (ARAÚJO et al., 2013). O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles não ativos, principalmente relacionado com a viabilidade celular. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada) em tecidos vivos devido à atividade de várias desidrogenases, enzimas importantes na oxidação de compostos orgânicos e portanto no metabolismo celular (GABRIELSON et al., 2002).

4.2 Avaliação da atividade citotóxica pela técnica de MTT

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da FCFAr, Unesp, Araraquara sob a supervisão da Prof^a. Dr^a. Iracilda Zeppone Carlos.

4.2.1. Ajuste das concentrações das suspensões das células tumorais

As linhagens tumorais de murinos LM3 e LP07 foram cedidas pelo Instituto de Oncologia Angel H. Roffo, Buenos Aires, Argentina.

As células LM3 e LP07 foram mantidas em meio MEM, suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 2 mM L-glutamina e 80 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de gentamicina, em frascos plásticos (Corning) em estufa a 37 °C, com atmosfera úmida e tensão constante de 5% de CO₂. Foram realizados repiques três vezes por semana. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco), utilizando corante Azul de Tripán, a 0,04 % em PBS, e ajustado a uma concentração de 5×10^4 células.mL⁻¹.

4.2.2. Ajuste das amostras avaliadas

A solução-mãe do extrato avaliado foi preparada em concentração máxima de DMSO de 5% v/v, conforme os métodos convencionais. As soluções foram diluídas em MEM (Minimum Essential Medium) por diluição sucessiva nas concentrações de 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,2, 15,7 e 7,8 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

4.2.3. Ensaio de viabilidade celular de células tumorais LM3 e LP07

A determinação da citotoxicidade do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthopyllus* sobre as células tumorais foi quantificado pelo método baseado na capacidade das células viáveis de reduzirem o MTT (Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolium) pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa formando cristais de formazana. Amostras (200 µL) de LM3 e LP07 (5×10^4 células.mL⁻¹) foram adicionadas em placas de 96 poços e então pré-incubadas na ausência dos extratos investigados por 24 h para que as células se adaptem antes da adição dos agentes de teste. Após 24 h de incubação, formado o tapete celular, os sobrenadantes foram removidos e os extratos foram adicionados (200 µL; 1000 à 7,8 µg.mL⁻¹). Os efeitos dos extratos sobre as células foram determinados após 24 h de incubação. Os sobrenadantes foram removidos, e a solução de MTT (100 µL; 1 mg.mL⁻¹) foi adicionada a cada poço contendo as amostras. O ensaio de MTT foi realizado e as placas foram incubadas durante 3 horas, o conteúdo da placa foi novamente vertido e 100 µL de álcool isopropílico foram adicionados a cada orifício para solubilizar os cristais formados. Somente células e meio de cultura foram utilizados como controle, equivalendo a 100% de viabilidade celular. A leitura da absorbância foi realizada no Fotocolorímetro multicanal UV-Vis Multiscan Ascent (Labsystems), em comprimento de onda de 540 nm e filtro de referência 620 nm.

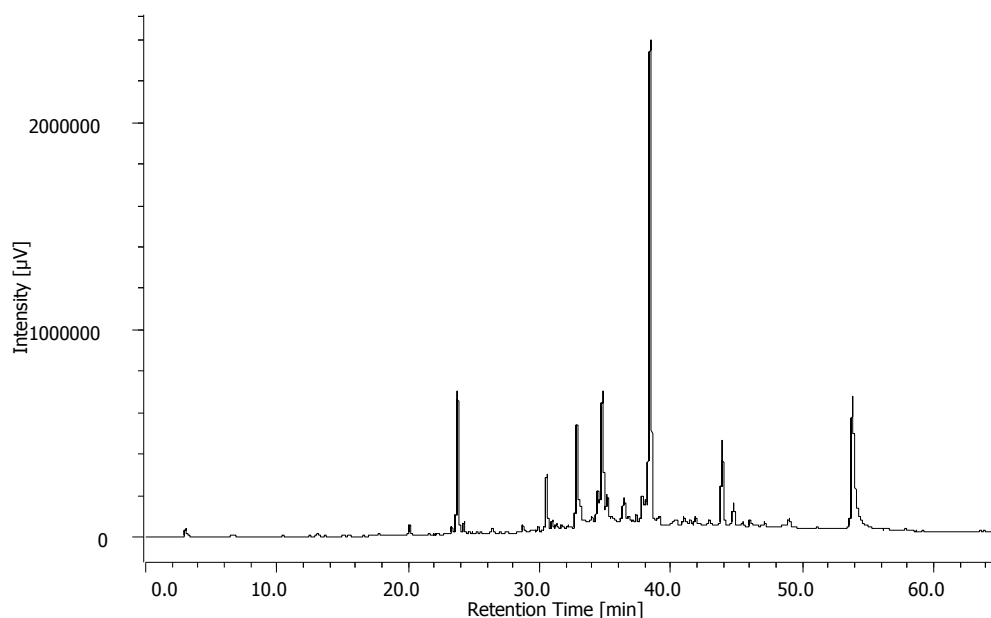
Os valores correspondentes à concentração que reduz em 50% a viabilidade celular (IC₅₀) dos compostos foram quantificados através de curvas dose-resposta Concentração da Amostra x Viabilidade Celular utilizando o software Origin[®] 5.0. O experimento foi realizado em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração dos constituintes químicos dos capítulos de espécies de Eriocaulaceae, utilizando metanol por maceração já foi muito utilizada por nosso grupo de pesquisa com outras espécies estudadas, porém estudos realizados por Zanutto et al., (2012) e por Pacífico et al. (2010) revelaram-se melhores, com maiores rendimentos quando utilizada a percolação. Por este motivo, a percolação foi o método de extração escolhido para a extração dos constituintes químicos do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*. Foi obtido 5,21 g de extrato.

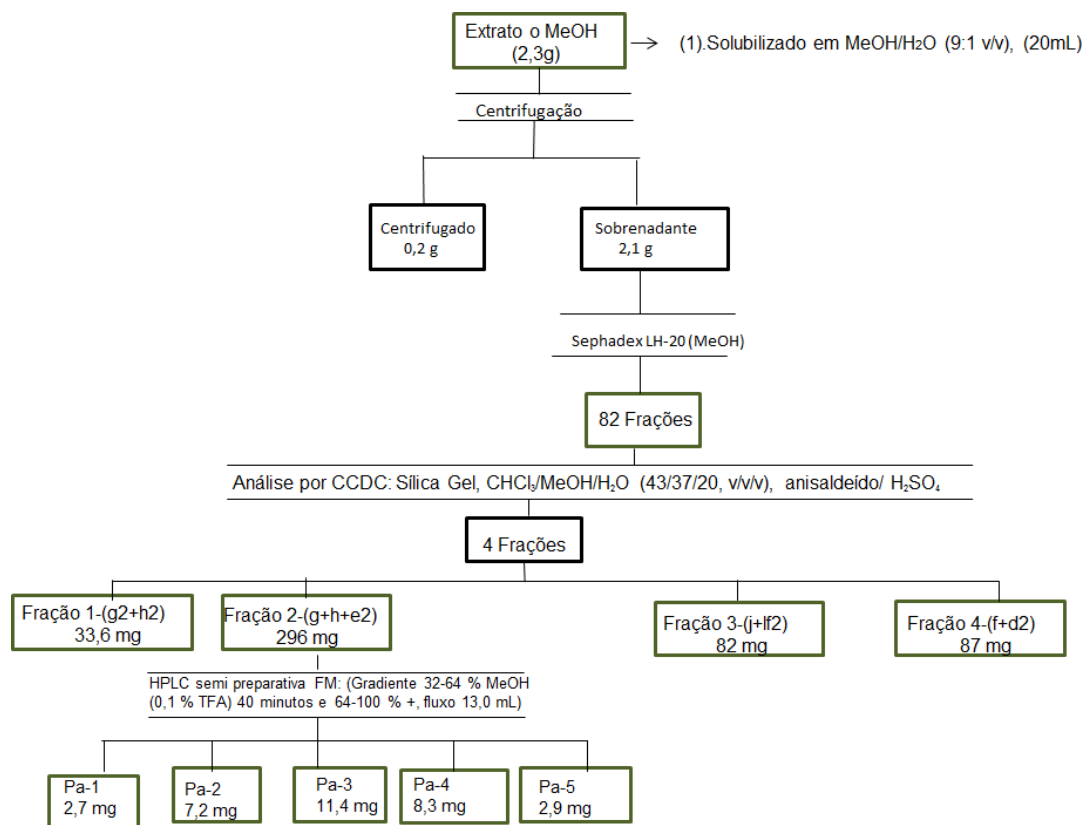
O extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* foi analisado por HPLC-PDA modo analítico. O cromatograma apresenta picos bem separados na região entre 20 e 55 minutos, Figura 5. O extrato metanólico foi analisado em vários comprimentos de onda, porém, como descrito na literatura que as espécies de *Paepalanthus* possuem naftopiranonas e flavonoides (VILEGAS, et al., 1998, SANTOS, et al., 2001, ZANUTTO et al, 2012, AMARAL et al., 2012), os comprimentos de onda destas substâncias foram então selecionados para registrar o perfil cromatográfico do extrato. Como apresentado na Figura 6, os picos mais intensos, são destas substâncias, e serão confirmados nas discussões seguintes.

Figura 6 - Cromatograma HPLC-PDA analítico do extrato MeOH dos capítulos de *P. acanthophyllus* (coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min volume de injeção de 20 μ L. λ = 270 nm.



O extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* foi fracionado por sephadex LH-20. Deste fracionamento foi escolhida a fração **2** (296 mg) para isolamento de seus metabólitos. Esta fração possuía uma razoável quantidade de massa e uma boa separação entre os picos no cromatograma por HPLC-PDA, facilitando assim o isolamento dos mesmos por HPLC-PDA semi-preparativo. O fracionamento por HPLC-DAD semi-preparativo resultou no isolamento de 5 substâncias (Figura 7).

Figura 7 - Fluxograma de fracionamento do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*



Fonte: o Autor

Após cromatografia de permeação em gel (Sephadex LH-20) do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*, as frações foram reagrupadas de acordo com as suas semelhanças em 4 subfrações. As figuras 8 e 9 mostram algumas das análises realizadas das subfrações por CCDC, utilizando reveladores de iodo e anisaldeído/H₂SO₄.

Figura 8 - Análise por CCDC das frações obtidas após separação em Sephadex LH-20 do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* (Sílica-gel), CHCl_3 /MeOH / H_2O [43:37:20], v/v/v], Iodo).

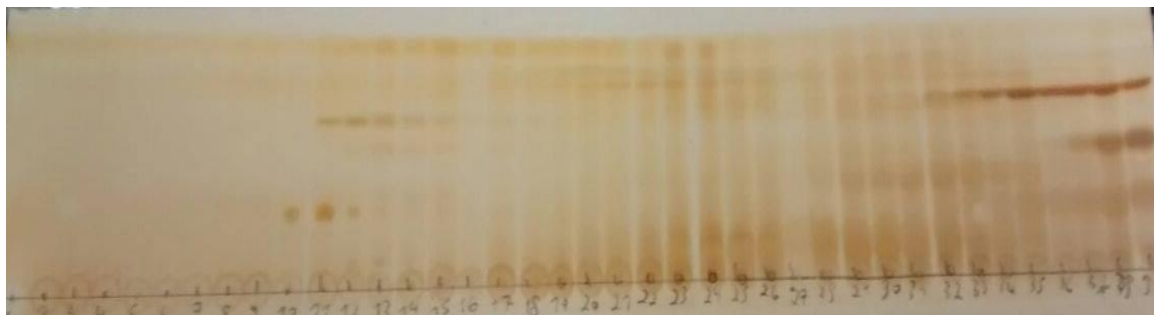
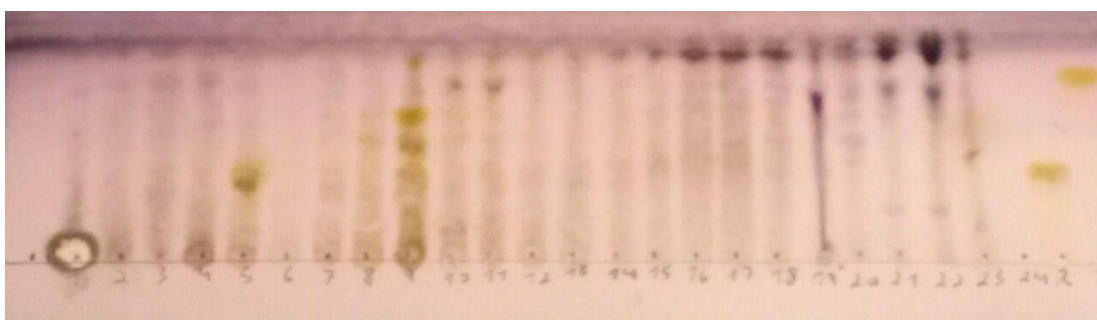


Figura 9 - Análise por CCDC das frações obtidas após separação em Sephadex LH-20 do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*. (Sílica-gel), CHCl_3 /MeOH / H_2O [43:37:20:], [v/v/], anisaldeído/ H_2SO_4).



Pode-se observar manchas de colorações marrom-parda e de colorações roxas quando reveladas com o revelador anisaldeído/ H_2SO_4 . Devido a esta diferenciação e comparação do espectro de UV no cromatograma por HPLC-PDA, pode-se sugerir que as manchas de coloração marrom-parda pertencem a classe dos flavonoides.

Depois de reagrupadas, as frações foram secas e suas massas obtidas. A tabela 3 mostra a distribuição das massas das frações obtidas após o procedimento de separação cromatográfica do extrato metanólico dos capítulos usando Sephadex LH-20, eluida com metanol.

Tabela 1 - Distribuição das massas das frações após separação por permeação em gel em Sephadex LH-20 e agrupamentos por CCDC.

Capítulos	Agrupamento	Massa (mg)
	j+l+f2 (1)	82,0
	g+h+e2 (2)	296,0
	g2+h2 (3)	33,6
	f+d2 (4)	90,0

Com o fracionamento realizado, pode-se observar uma concentração de massa maior na fração 2, sendo esta escolhida para o fracionamento em HPLC semi-preparativo. As Figuras 10-13 mostra o perfil por HPLC-PDA destas frações.

Figura 10 - Cromatograma HPLC-PDA da fração 1 (j+l+f2). Coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min volume de injeção de 20 μ L. λ = 270 nm.

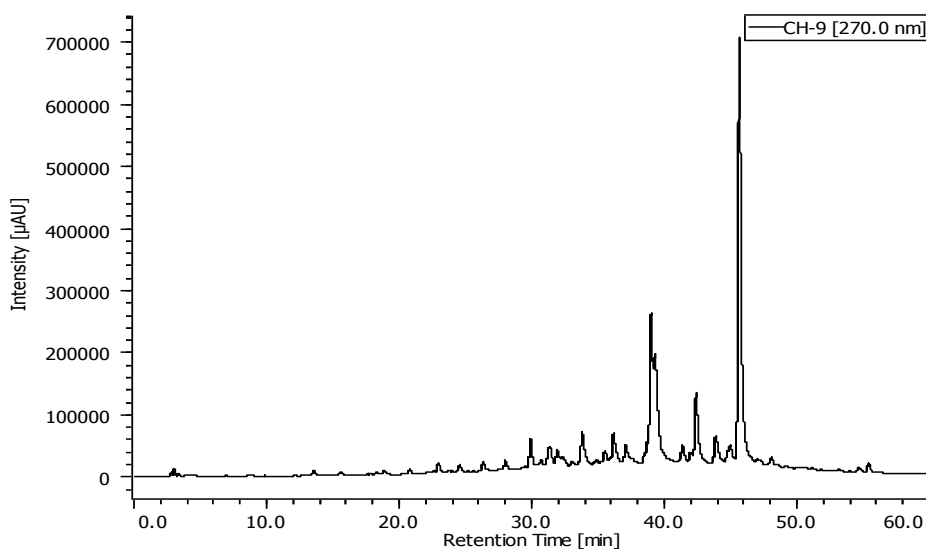


Figura 11 - Cromatograma HPLC-PDA da fração 2 (g2+h2). Coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min volume de injeção de 20 μ L. λ = 270 nm.

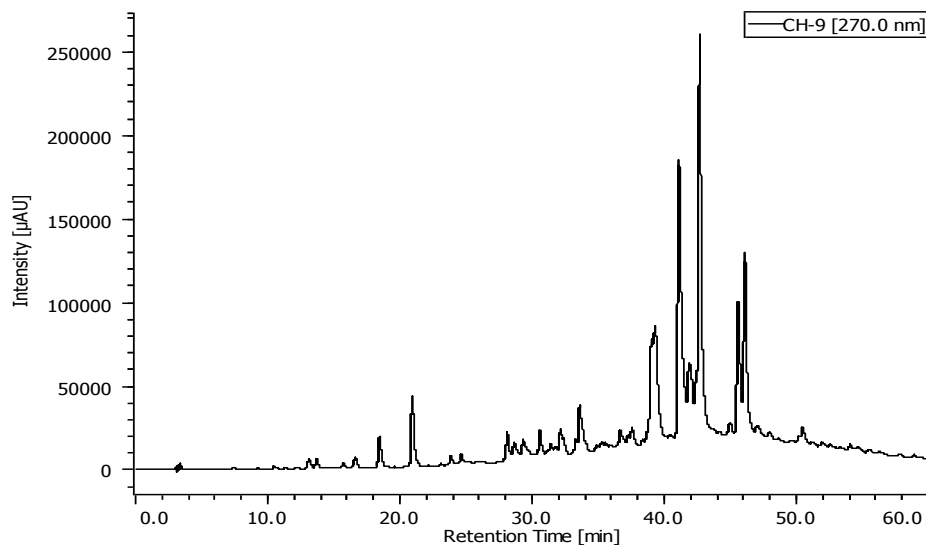


Figura 12 - Cromatograma HPL-PDA da fração 3 (g+h+e2). Coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min volume de injeção de 20 μ L. λ = 270 nm.

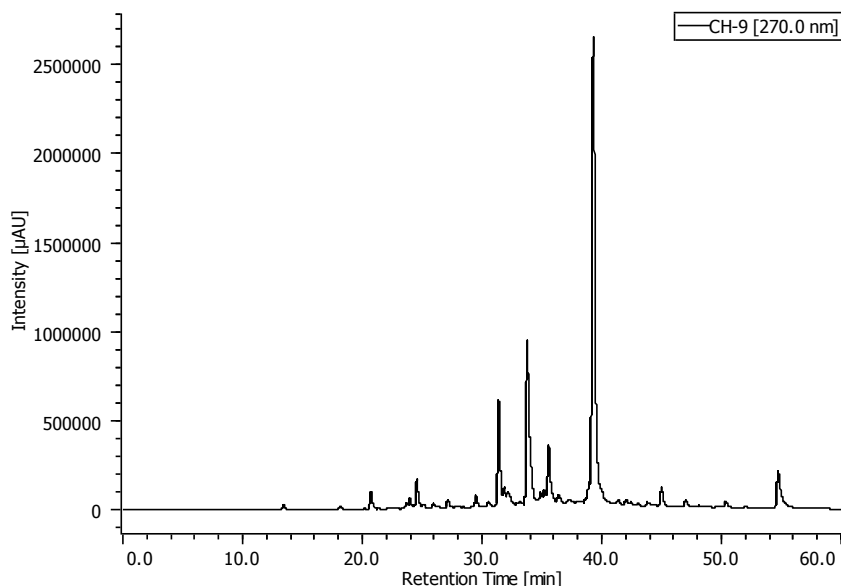
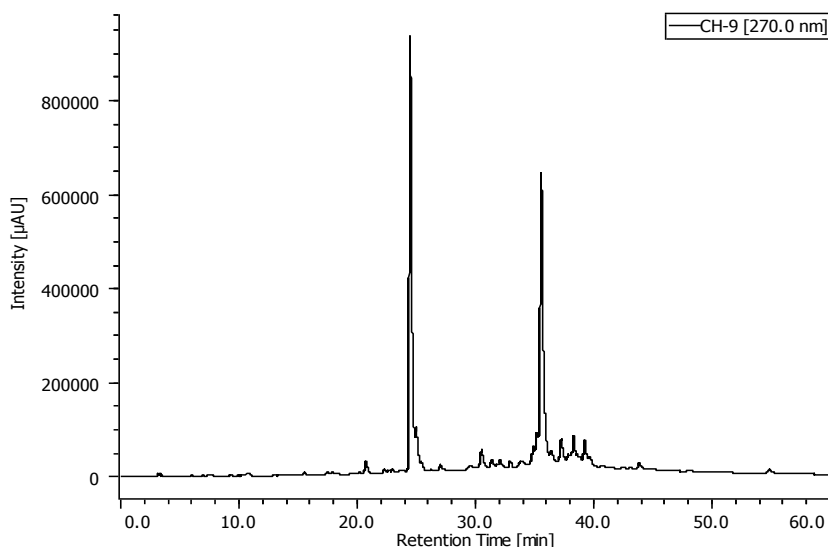
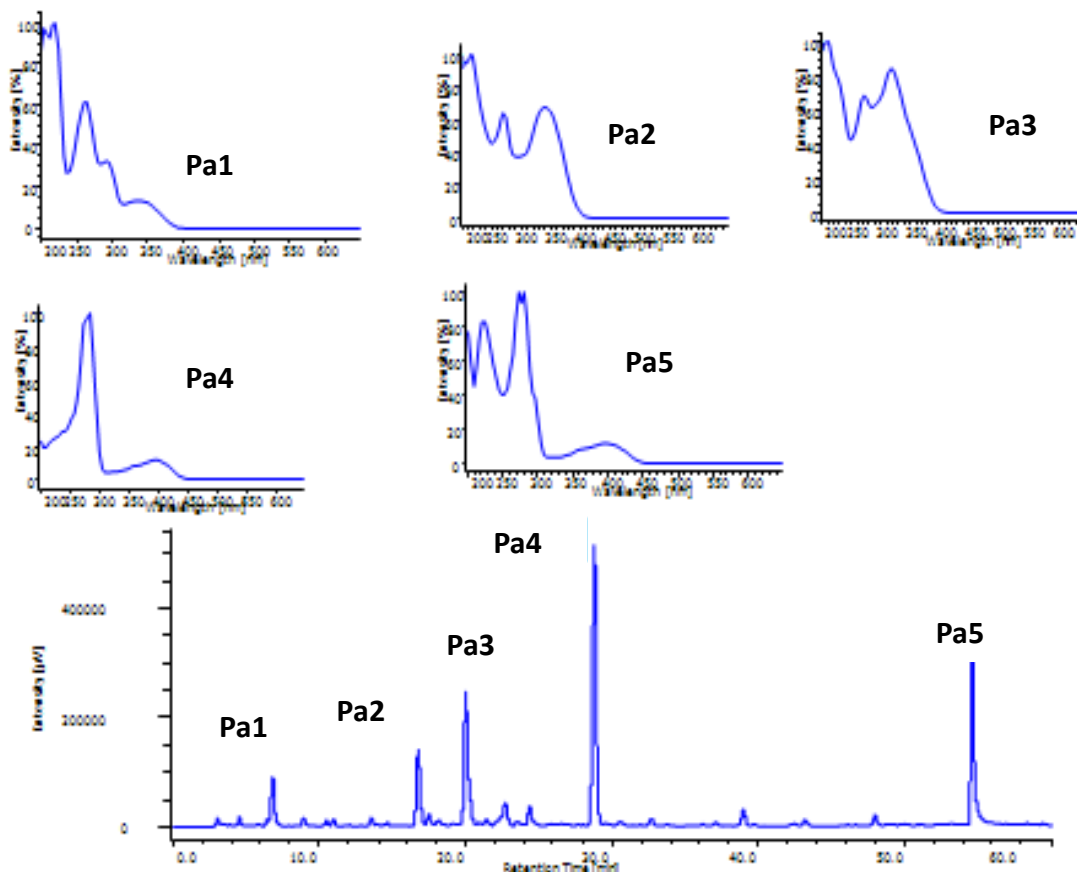


Figura 13 - Cromatograma HPLC-PDA da fração 4 (f+d2). Coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 5-100% de B em 60 min volume de injeção de 20 μ L. λ = 270 nm.



Os espectros na região de UV/Vis das substâncias contidas no cromatograma da Figura 14 são típicos de flavonoides derivados do canferol. A análise dos espectros no UV destes compostos em MeOH apresentam bandas, que dependendo da substituição, apresentam o máximo de absorção $\lambda_{\text{máx}}$ entre 330-380 nm Banda I, enquanto que a Banda II apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ entre 250-280 nm, (MABRY et al., 1980). As naftopiranonas apresentam espectros no UV com uma banda bipartidas em 273 nm (VILEGAS et al., 1997, SANTOS et al., 2001, ZANUTTO et al., 2012). Como pode ser observado, o espectro no UV das substância **Pa1** apresentou bandas em ($\lambda_{\text{máx}}$ 264, 293 e 336 nm). A substância **Pa2** mostrou apresentou bandas em ($\lambda_{\text{máx}}$ 273 e 318 nm) enquanto que **Pa3** mostrou apresentou bandas em ($\lambda_{\text{máx}}$ 268 e 338 nm). Todas estas substâncias, portanto, apresentaram perfil no UV de derivados do canferol.

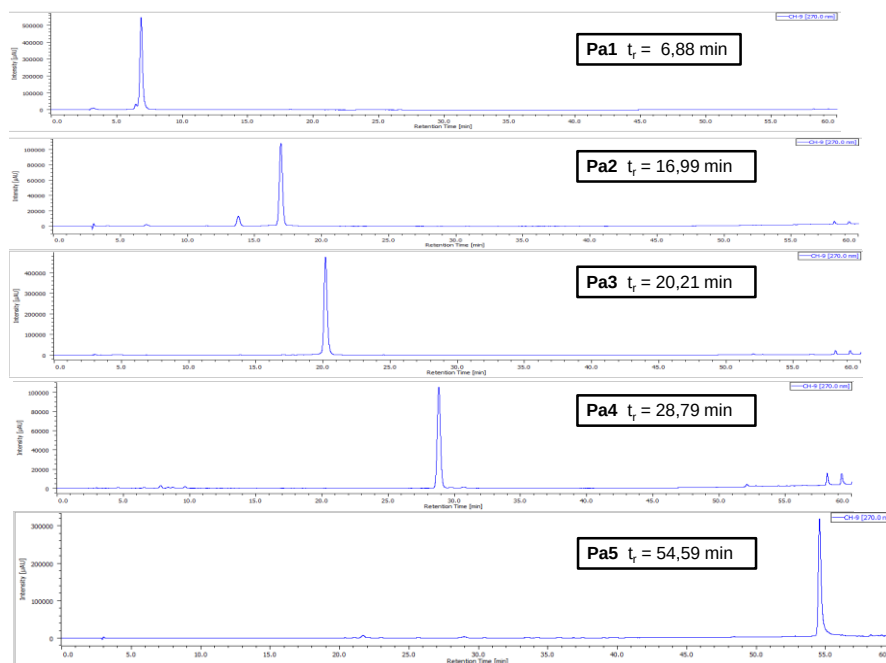
Figura 14 - Otimização do cromatograma HPLC-PDA da fração 2 (g+h+e2). Coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 32-64% de B em 40 minutos e 64-100% em 60min. volume de injeção de 20 μ L. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos das substâncias **Pa1**, **Pa2**, **Pa3**, **Pa4**, **Pa5**.



As condições da análise HPLC-PDA analítico (Figura 14) foram utilizadas em HPLC-PDA semipreparativo, modificando apenas a coluna e fluxo, fornecendo as substâncias Pa1, Pa2, Pa3, Pa4, Pa5.

A Figura 15 apresenta os cromatogramas HPLC-PDA analítico das substâncias isoladas por HPLC-PDA semi-preparativo, mostrando os tempos de retenção de cada composto. Observa-se que houve uma boa separação dos picos e que a maioria das substâncias, no comprimento de onda analisado, apresentaram um único pico no cromatograma.

Figura 15 - HPLC-PDA (analítico das substâncias isoladas por HPLC-PDA semi-preparativo. Coluna: Thermo Hypersil GOLD AQ RP-18 (250 x 4,6 mm i.d.; 5 μ m), vazão 1,0 mL.min⁻¹, Solventes: A = H₂O, B = MeOH, ambos com TFA 0,01%. Sistema de eluição gradiente linear 32-64% de B em 40 minutos e 64-100% em 60min. volume de injeção de 20 μ L. Espectros de absorção no UV ($\lambda_{\text{máx.}}$) dos picos cromatográficos das substâncias **Pa1**, **Pa2**, **Pa3**, **Pa4**, **Pa5**.



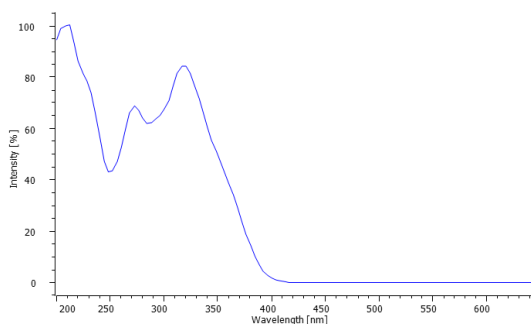
5.1. Identificação das substâncias

5.1.1. Substância Pa2

A substância **Pa2** foi isolada da fração 2, como um sólido amorfo. A revelação da CCDC com vapores de iodo e com anisaldeído/H₂SO₄ apresentaram manchas de cor marrom parda, Figuras 8 e 9.

A Figura 16 apresenta o espectro de UV de **Pa2**, onde é possível observar duas bandas de absorção sendo uma em 273 nm e outra em 318 nm. Comparação com dados da literatura (MABRY et al., 1980) estabelecem que as bandas de derivados do canferol são visualizadas em : banda I com $\lambda_{\text{máx}}$ entre (330-380 nm) enquanto que a Banda II apresentam $\lambda_{\text{máx}}$ entre (250-280 nm).

Figura 16 - Espectros de absorção no UV ($\lambda = 270\text{nm.}$) da substância **Pa2**.



Análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 17, Tabela 3, de **Pa2**) apresentou sinais de deslocamentos químicos de hidrogênios acoplados em *orto*, um em $\delta 8,00$ (d , $J = 8,8$ Hz) referentes à H-2'/H-6' e outro em $\delta 6,86$ (d , $J = 8,8$ Hz) referentes a H-3'/H-5' típicos do anel B do canferol (HARBONE *et al.*, 1996).

O singlete em $\delta 6,95$ foi atribuído ao H-8 do anel A do flavonoide. Este sinal de deslocamento químico é característico deste hidrogênio, quando a posição 7 do Anel A do flavonoide está substituída (HARBONE *et al.*, 1996).

O espectro de RMN de ^{13}C , Figura 18, apresentou dois sinais intensos sendo um em $\delta 130,9$ e outro em $\delta 115,8$, atribuídos a H2'/H6' e H3'/H5', respectivamente. Os sinais em $\delta 120,7$ e $\delta 160,2$ são típicos do anel B de uma estrutura como a do canferol (AGRAWAL, 1989). O singlete em $\delta 3,71$ no espectro de RMN de ^1H é referente à presença de um grupo metoxila. Análise do mapa de contorno *g*HSQC (Figura 19) mostrou a correlação a 1J de hidrogênios com seus respectivos $\delta^{13}\text{C}$. O mapa de contorno *g*HMBC (Figura 20) estabeleceu a 3J que a metoxila está localizada na posição C-6 do flavonóide, devido a correlação do sinal dos hidrogênios em $\delta 3,71$ com o carbono em $\delta 132,3$.

Na região de hidrogênios aromáticos, observou-se dois dubletos sendo um em $\delta 7,46$ e outro em $\delta 6,78$ ($J = 8,7$ Hz) que foram atribuídos ao H-2'''/H6''' e H-3'''/H-5''' de uma unidade *p*-cumaroil respectivamente.

Os dubletos em $\delta 7,38$ e $\delta 6,17$ foram designados ao H α e H β da dupla ligação *p*-cumaroil com estereoquímica em *trans* ($J = 15,7$ Hz).

Observou-se ainda os sinais de deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios anoméricos em $\delta 5,11$ e $\delta 5,46$. Análise das constantes de acoplamentos ($J = 7,3$ Hz e $7,6$ Hz) possibilitaram atribuir as unidades a configuração em β para ambos glicosídeos.

Análise dos experimentos de RMN TOCSY 1 D (Figura 20), com irradiação em δ 5,11, possibilitou atribuir o sistema de *spin* referente a uma das unidades do glicosídeo (δ 3,33 $\rightarrow$ δ 3,27 $\rightarrow$ δ 3,19 $\rightarrow$ δ 3,45 $\rightarrow$ δ 4,45 $\rightarrow$ δ 3,69). Irradiação no sinal em δ 5,46 (Figura 21) possibilitou atribuir o sistema de *spin* referente ao segundo glicosídeo (δ 3,22 $\rightarrow$ δ 3,32 $\rightarrow$ δ 3,19 $\rightarrow$ δ 3,30 $\rightarrow$ δ 4,45 $\rightarrow$ δ 4,05).

Análise dos experimentos de gHMBC (Figura 22) possibilitaram estabelecer as ligações interglicosídicas das duas unidades de glicose como sendo uma na posição C-7 devido a correlação a 3J entre o hidrogênio em δ 5,11 (H1'') com o C-7 em δ 156,5. A posição do segundo glicosídeo foi estabelecida pela observação a 3J entre o hidrogênio em δ 5,46 (H1''') com o C-3 em δ 133,1.

Para posicionar a unidade *p*-cumaroil, o experimento gHMBC também forneceu a correlação do sinal do hidrogênio em δ 4,27 (H6a''') com a carbonila da unidade *p*-cumaroil em δ 166,2.

O espectro ESI-MS no modo negativo de **Pa2** (Figura 23) mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 785 $[M-H]^-$. Análise do espectro ESI-MS² (Figura 24) permitiu evidenciar a presença do um íon produto em m/z 623, atribuído a perda de uma unidade de glicose $[M-162-H]^-$ localizada na posição 7 do anel A do flavonoide. Portanto esta substância foi elucidada como sendo a estrutura do 6-metoxicanferol-3-O-(6''-*p*-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo (Figura 25).

Flavonoides acil glicosilados são substâncias que já foram anteriormente identificadas em algumas espécies de *Paepalanthus* como em *P. ramosus*, *P. hilairei*, *P. polyanthus* (SANTOS et al., 2002, ANDRADE et al., 1999). Porém este é o primeiro relato na literatura de um flavonoide acil diglicosilado, derivado do canferol com uma unidade de açúcar ligado na posição 7 do flavonoide.

Tabela 2 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C ($\text{DMSO-}d_6$, 11,7 T) de **Pa2**.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	Posição	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	-		Cumaroil		
2	157,2		1'''	124,9	
3	133,1		2'''	130,3	7,46 $d = 8,7$
4	177,8		3'''	115,1	6,78 $d = 8,7$
5	152,0		4'''	160,0	
6	132,3		5'''	115,1	6,78 $d = 8,7$
7	156,5		6'''	130,3	7,46 $d = 8,7$
8	94,1	6,95 s	C=O	166,2	-
9	151,3		C α	113,1	6,17 $d = 15,7$
10	105,9		C β	144,7	7,38 $d = 15,7$
1'	120,7				
2'	130,9	8,00 $d = 8,8$			
3'	115,8	6,86 $d = 8,8$			
4'	160,2				
5'	115,8	6,86 $d = 8,8$			
6'	130,9	8,00 $d = 8,8$			
OCH ₃ - 6	60,3	3,71 s			
OH	-	12,7 s			
Gli C-3			Gli C-7		
1''	101,0	5,46 $d = 7,6$	1'''	100,1	5,11 $d = 7,3$
2''	74,3	3,22 $dd = 7,6; 9,0$	2'''	73,7	3,30 $dd = 7,3; 9,0$
3''	76,7	3,32 $dd = 9,0; 9,0$	3'''	76,2	3,27 $dd = 9,0; 9,0$
4''	69,6	3,19 $dd = 9,0; 9,0$	4'''	69,6	3,19 $dd = 9,0; 9,0$
5''	74,2	3,30 m	5'''	77,3	3,45 m
6a''	62,7	4,27 $dd = 1,9; 12,0$	6a'''	60,7	4,45 $dd = 5,5; 11,0$
6b''	62,7	4,05 $dd = 1,9; 12,0$	6b'''	60,7	3,69 $dd = 5,0; 11,0$

Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

Figura 17 - Espectro de RMN ^1H de Pa2 (em DMSO- d_6 , 11,7 T) com expansão na região (δ 6,7-8,0).

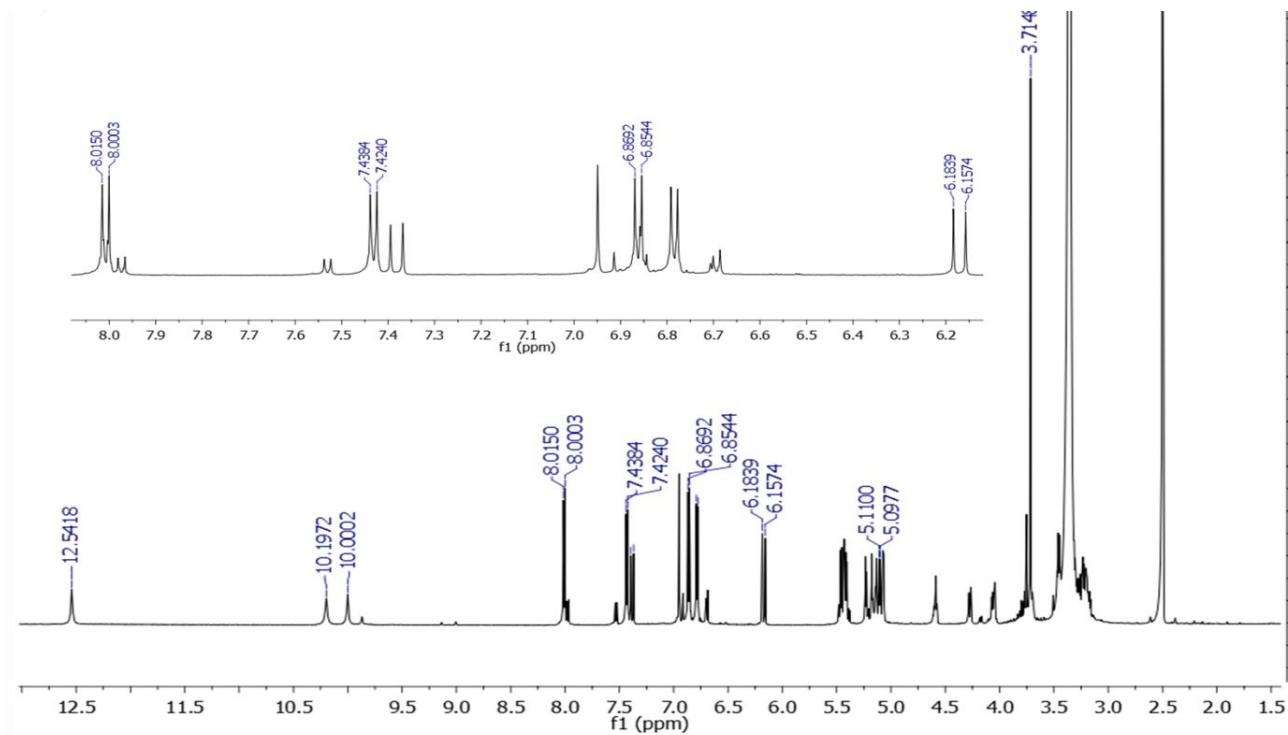


Figura 18 - Espectro RMN ^{13}C de Pa2 (11,7 T, DMSO- d_6).

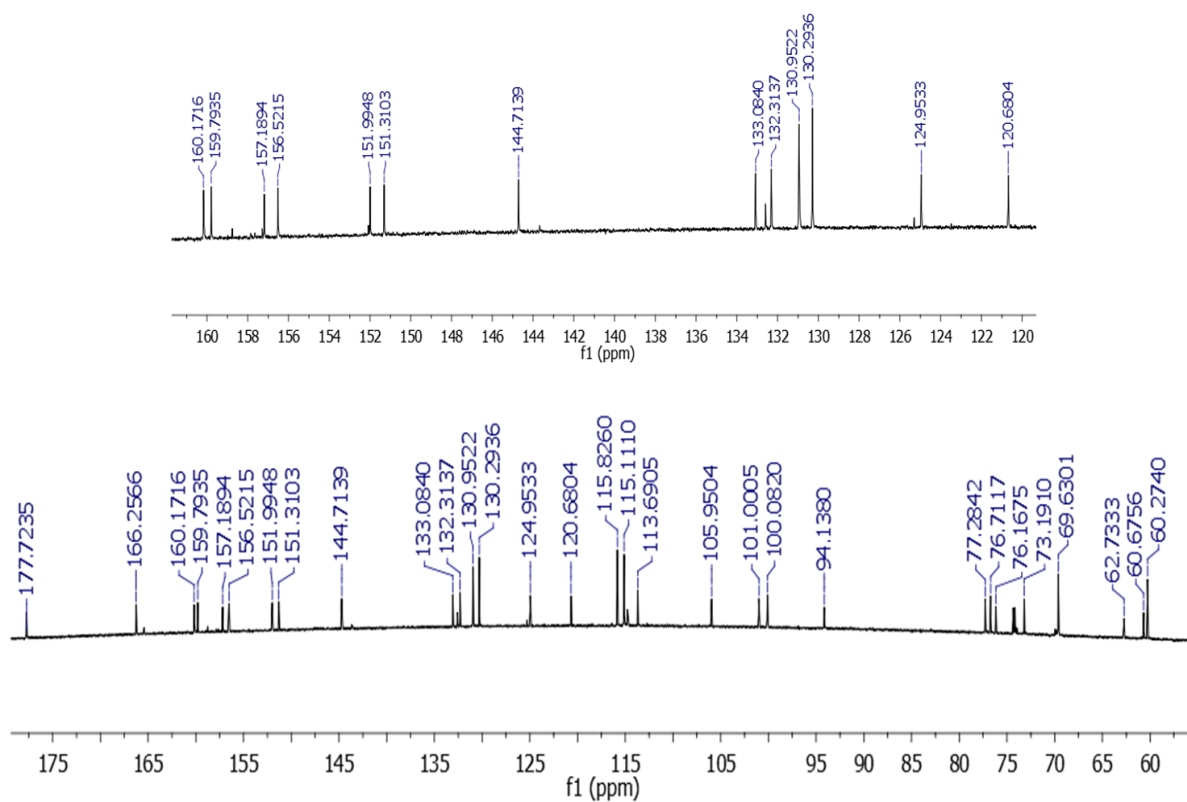


Figura 19 - Espectro *g*HSQC de **Pa2** (11,7 T, DMSO-d₆).

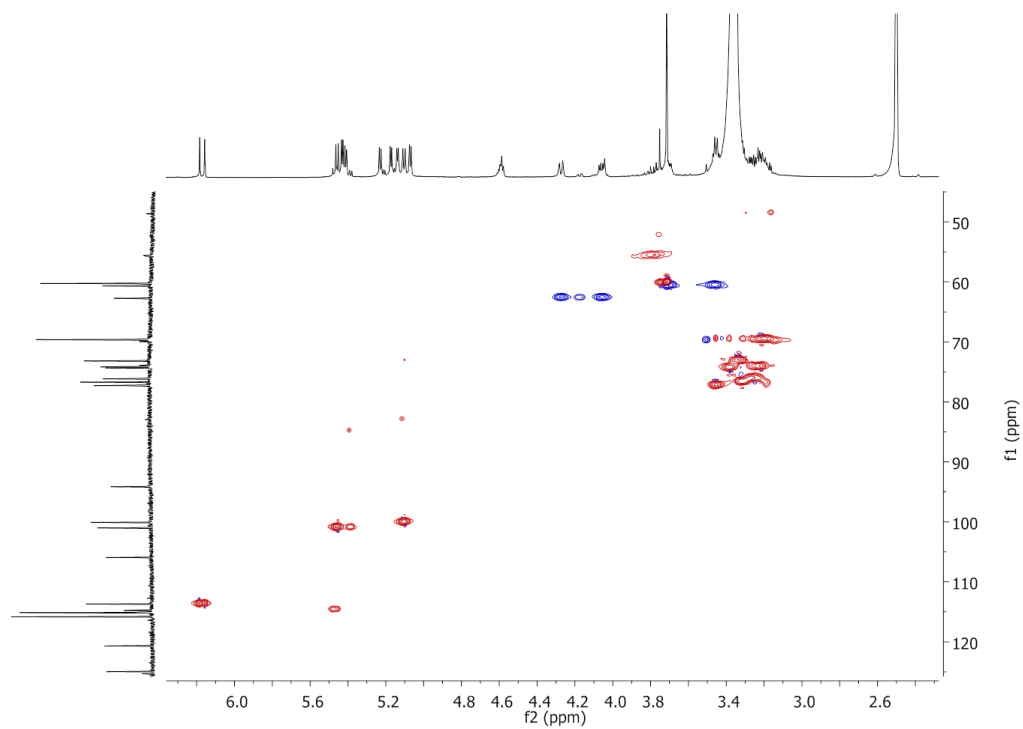


Figura 20 - Espectro *g*HMBC de **Pa2** (11,7 T, DMSO-d₆).

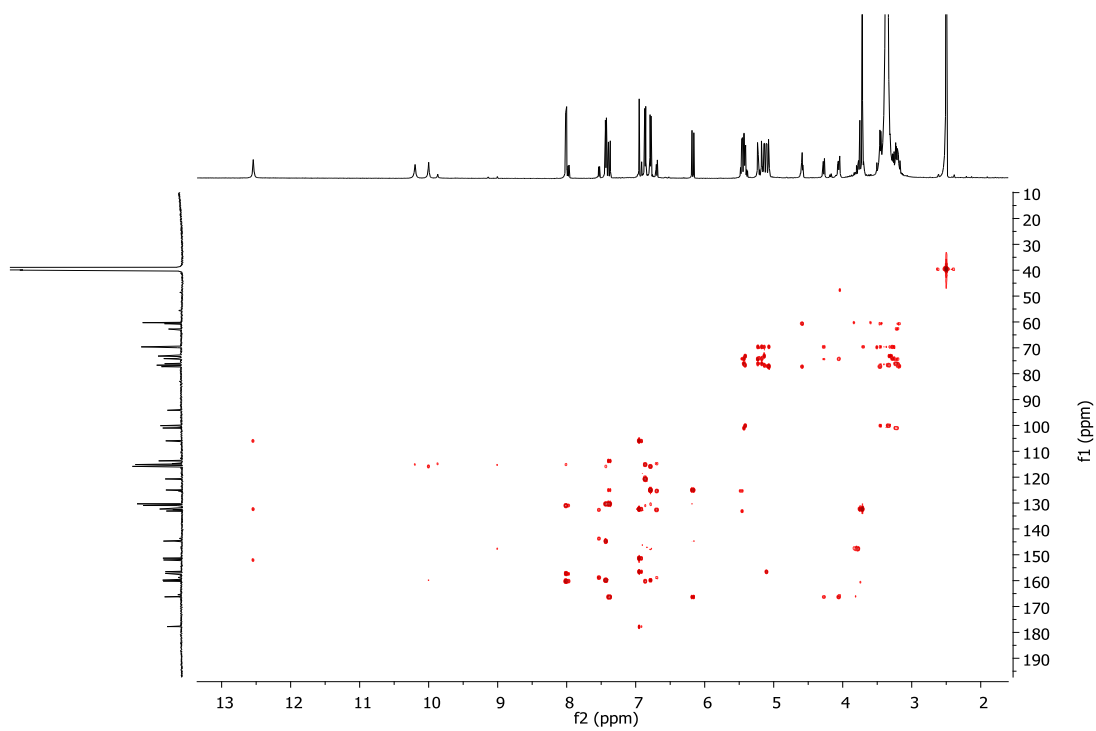


Figura 21 - Experimento TOCSY 1D irradiado em δ 5,11, da substância **Pa2** (11,7 T, DMSO- d_6).

Felipe_PA_subst_2
Felipe_PA_subst_2 23/04/2015
TOCSY1D 5.112 ppm

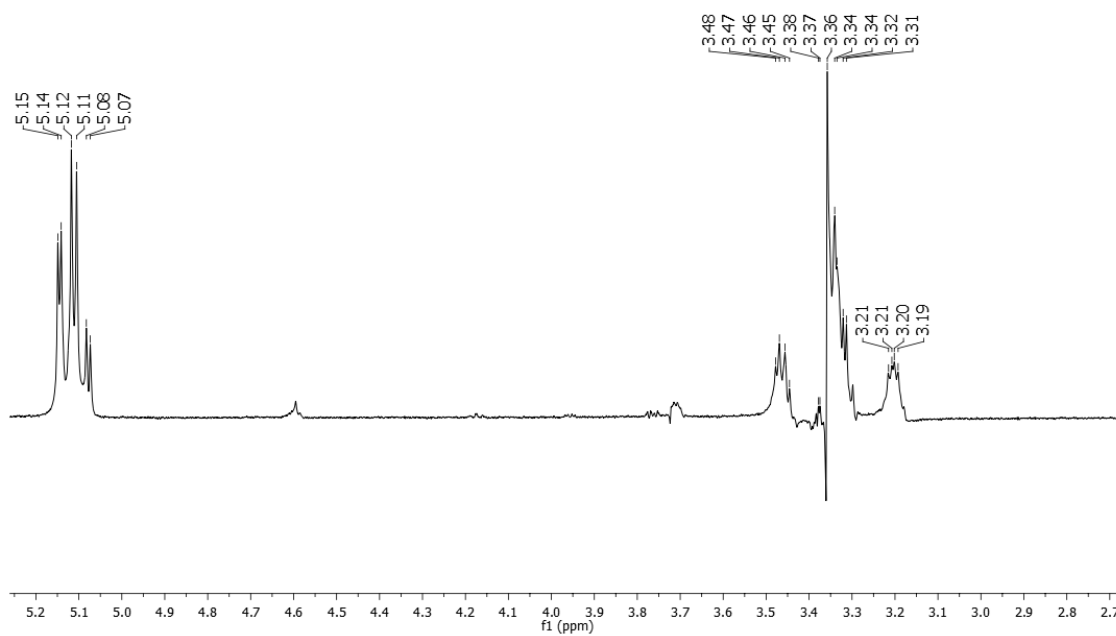


Figura 22 - Experimento TOCSY 1D irradiado em δ 5,46, da substância **Pa2** (11,7 T, DMSO- d_6).

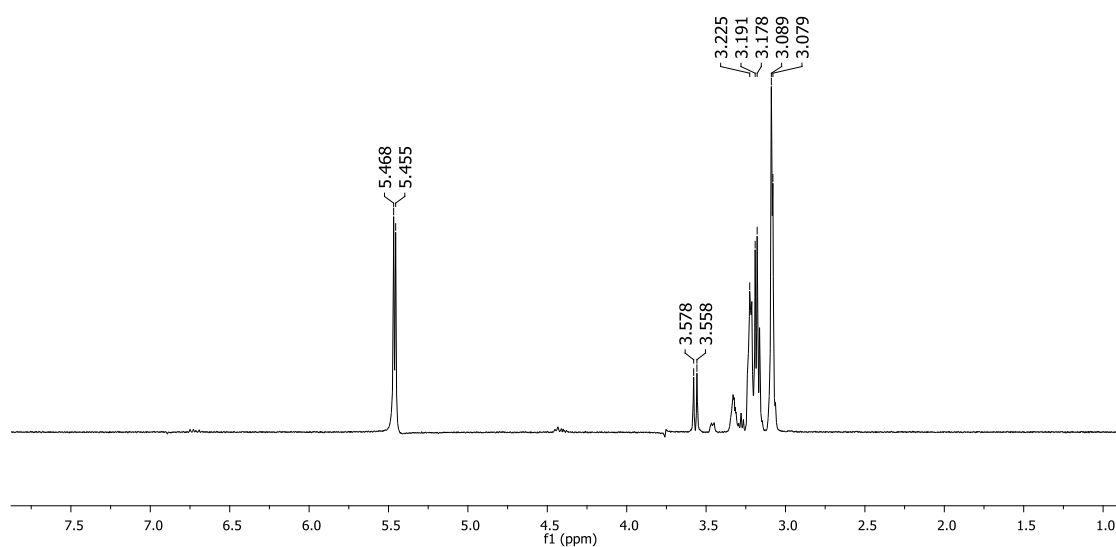


Figura 23 - Espectro de ESI-MS (modo negativo) registrado para o íon de m/z 785,1 da substância **Pa2**.

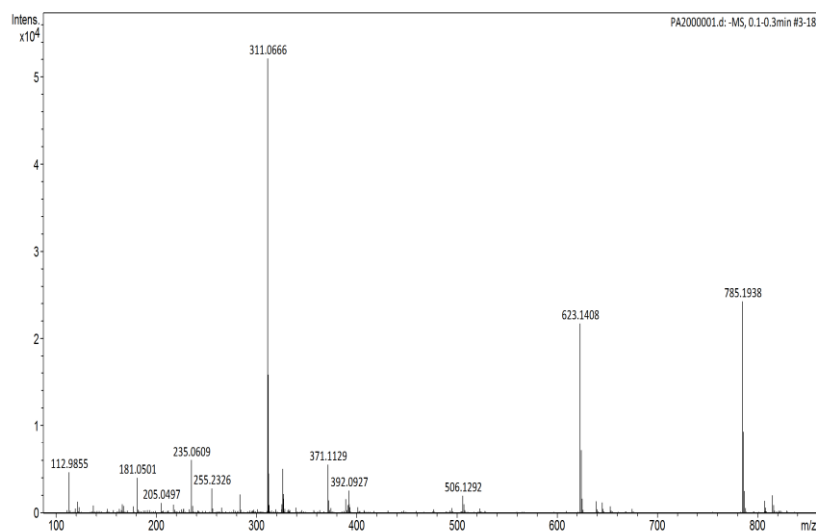


Figura 24 - Espectros de ESI-MS² (modo negativo) registrado para o íon de m/z 785,1 da substância **Pa2**.

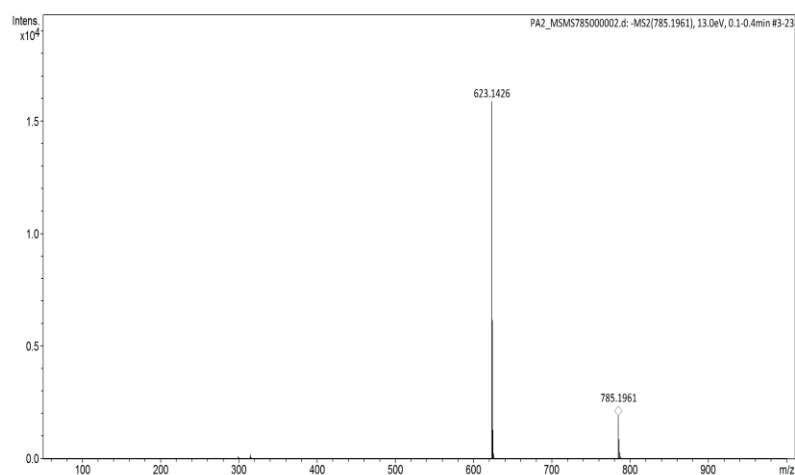
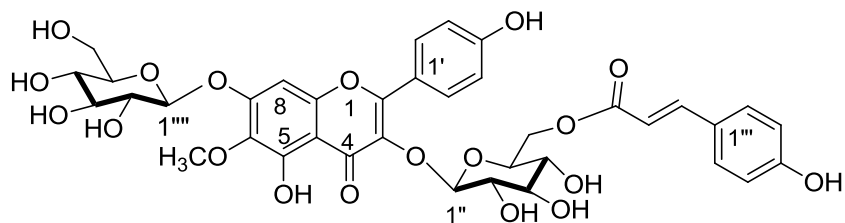


Figura 25 - Estrutura de **Pa2** (6-metoxicanferol-3-O-(6''-p-cumaroil)- β -D-glucopiranosil-7-O- β -D-glucopiranosídeo).



5.1.2. Substância Pa3

Análise do espectro de RMN ^1H (Figura 26, Tabela 3), de **Pa3** apresentou sinais de deslocamentos químicos de dois hidrogênios acoplados em *orto*, sendo um em δ 8,03 (*d*, $J = 8,8$ Hz) referentes à H-2'/H-6' e outro em δ 6,84 (*d*, $J = 8,8$ Hz) referentes à H-3'/H-5' típicos do anel B do canferol. O singlete em δ 6,54 foi atribuído ao H-8, do anel A do flavonoide. O singlete (3H) em δ 3,75 confirma a presença de um grupo metoxila. O sinal em δ 5,46 (*d*, $J = 7,3$ Hz) foi atribuído ao hidrogênio anomérico da unidade glucopiranosil com configuração em β (HARBONE et al., 1986).

O experimento TOSCY 1D (Figura 27) possibilitou atribuir o sistema de spins dos hidrogênios do glicosídeo, com irradiação no sinal em δ 5,46 (δ 3,22 $\rightarrow$ δ 3,32 $\rightarrow$ δ 3,19 $\rightarrow$ δ 3,30 $\rightarrow$ δ 4,45 $\rightarrow$ δ 4,05).

O espectro *g*HSQC (Figura 28) mostrou as correlações a 1J dos hidrogênios com seus respectivos carbonos (Tabela 4).

A posição da metoxila foi atribuída mediante a correlação existente no espectro *g*HMBC (Figura 29) dos hidrogênios em δ 3,74 com o carbono em δ 131,6 (C-6) enquanto que a posição do açúcar foi atribuída na posição C-3 do flavonoide devido a correlação do hidrogênio anomérico em δ 5,46 com o carbono em δ 133,2 (C-3). Comparação destes resultados com os obtidos na literatura (MERFORT et al., 1987) confirmaram que esta substância é o 6-metoxicanferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo (Figura 30).

Figura 26 - Espectro de RMN ^1H de **Pa3** (em DMSO-d_6 , 11,7 T).

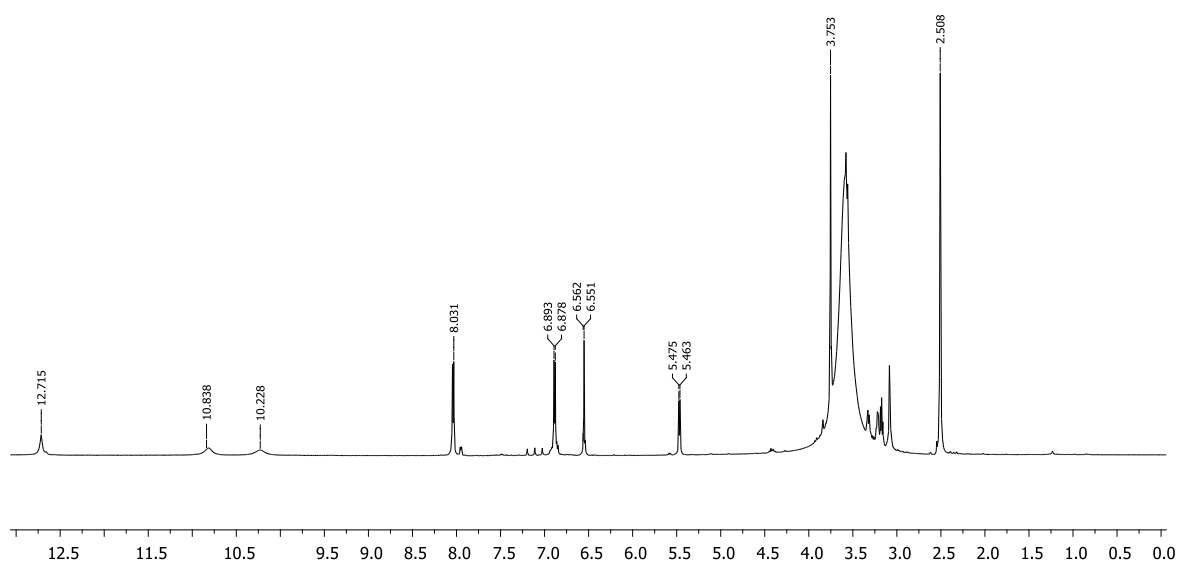


Figura 27 - Experimento TOCSY 1D irradiado em δ 5,46 da substância **Pa3** (11,7 T, DMSO-d_6).

Felipe_PA_subs_3
Felipe_PA_subs_3 1H 10/04/2015
tocsy1d - seldigp 5.46 ppm

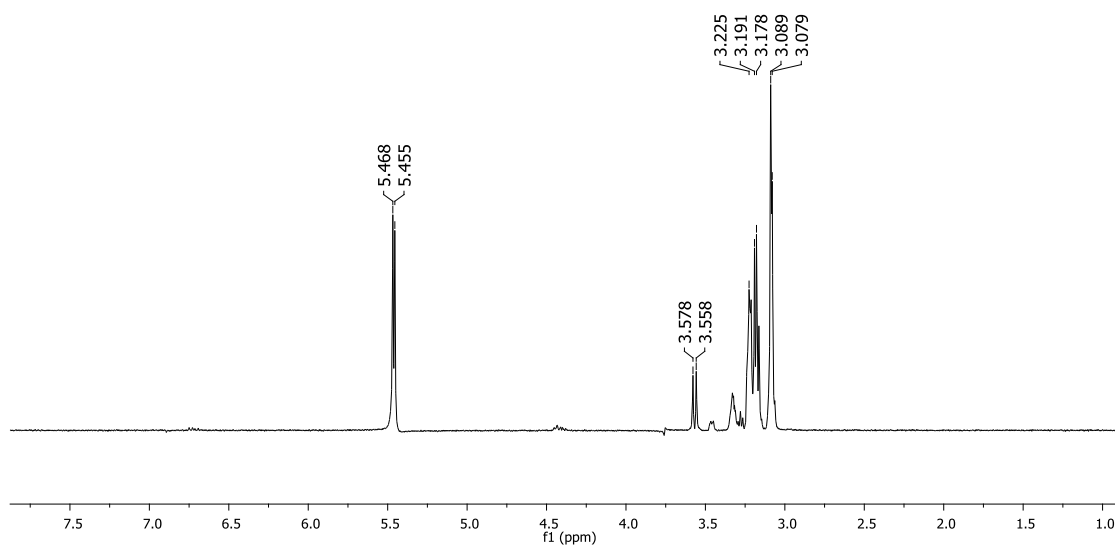


Figura 28 - Espectro *g*HSQC **Pa3** (em DMSO-_d6, 11,7 T).

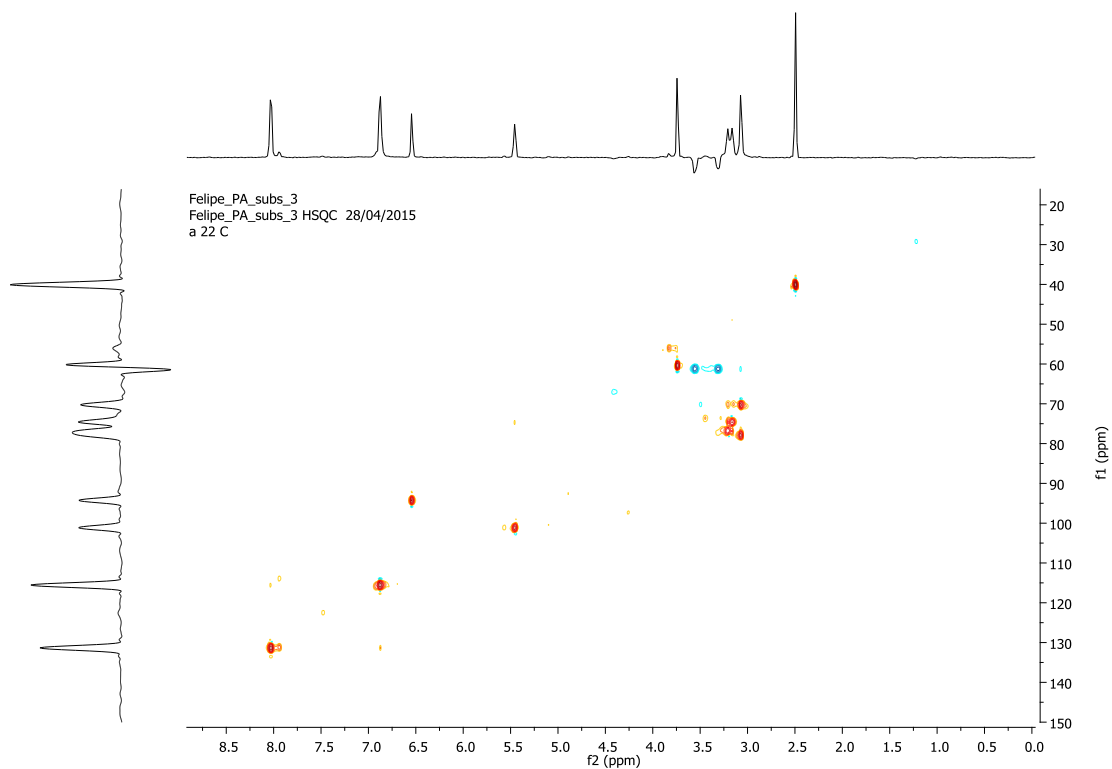


Figura 29 - Espectro *g*HMBC **Pa3** (em DMSO-_d6, 11,7 T).

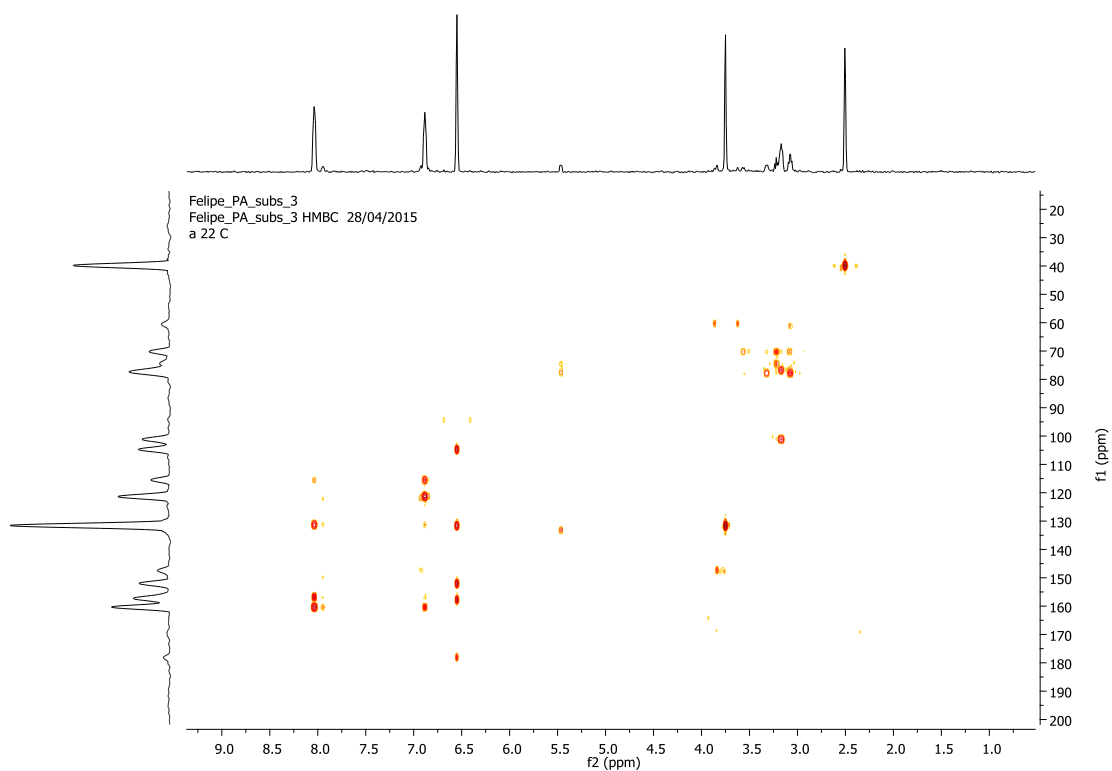
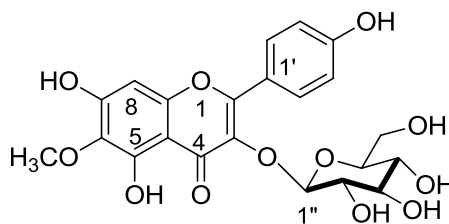


Figura 30 - Estrutura de **Pa3**. (6-metoxicanferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo).



5.2.3. Substância Pa1

A análise comparativa dos valores de deslocamentos químicos de RMN ^1H da substância **Pa3** (Tabela 3) com o espectro RMN ^1H de **Pa1**, permitiu-nos estabelecer as diferenças entre as substâncias. Observou-se no espectro de RMN ^1H que **Pa1** (Figura 31) a presença de dois hidrogênios anoméricos, sendo um em δ 5,47 (d , $J = 7,6$ Hz) e outro em δ 5,13 (d , $J = 7,3$ Hz) sugerindo a presença de duas hexoses com configuração em β . Espectro de ESI-MS, modo negativo (Figura 32) mostrou o íon da molécula desprotonada em m/z 639, evidenciando a fórmula molecular ($\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{O}_{17}$), confirmando que esta substância possui duas hexoses. Comparação com o deslocamento químico de RMN de ^1H de H-8 de **Pa3** (δ 6,54) observa-se que este está mais blindado devido a ausência da glicose na posição 7 desta substância. O deslocamento químico do hidrogênio em δ 6,95 de **Pa1** que foi atribuído ao H-8 do anel A do flavonoide, sugere portanto, que a posição C-7 do flavonoide esteja, portanto, substituída pelo segundo glicosídeo.

Os dois dubletos com acoplamento em *orto* em δ 8,05 e em δ 6,89 (d , $J = 8.8$ Hz) foram atribuídos aos H2'/H6' e H3'/H5' do anel B do flavonoide respectivamente, confirmando que esta substância também é um derivado do canferol. O singlete em δ 3,71 confirmou a presença da metoxila.

Com base nas evidências apresentadas até o momento nos experimentos de RMN realizados e comparados com dados da literatura (Amaral et al., 2012), e com os dados das substância **Pa3**, concluímos que a substância **Pa1** é a 6-metoxicanferol-3-7-di-O- β -D-glucopiranosídeo (Figura 33).

Figura 31 - Espectro de RMN ^1H de **Pa1** (em DMSO-d_6 , 11,7 T).

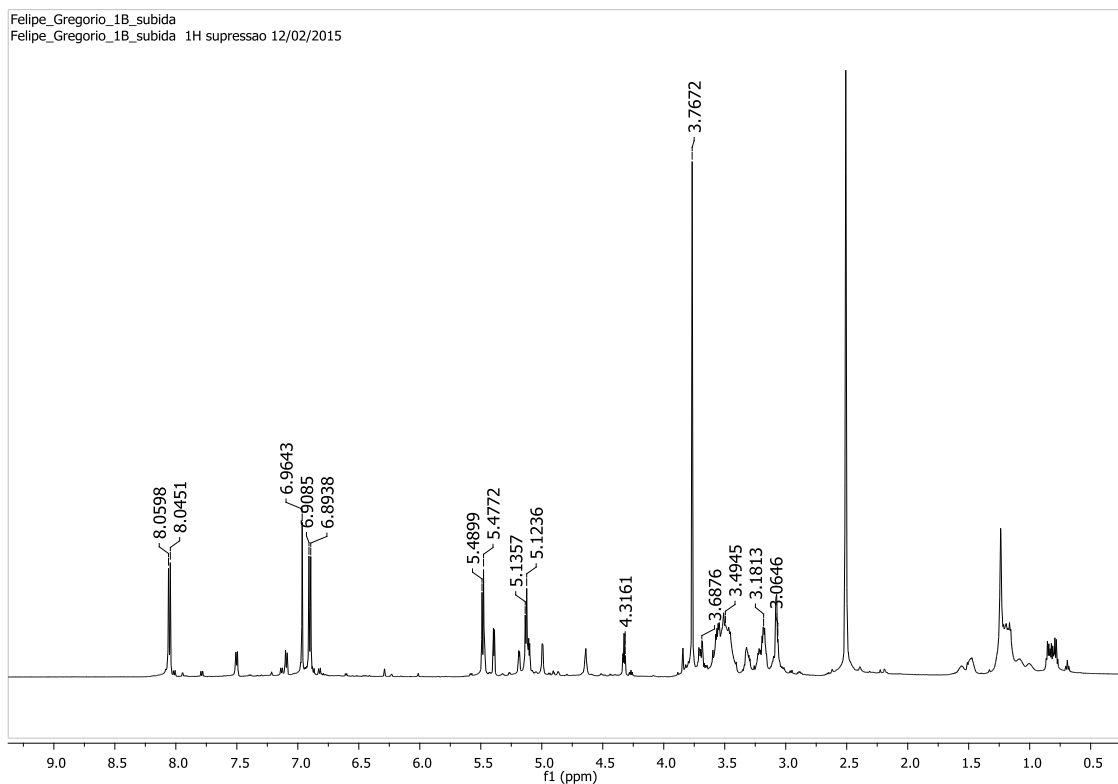


Figura 32 - Espectro ESI-MS, modo negativo de **Pa1**.

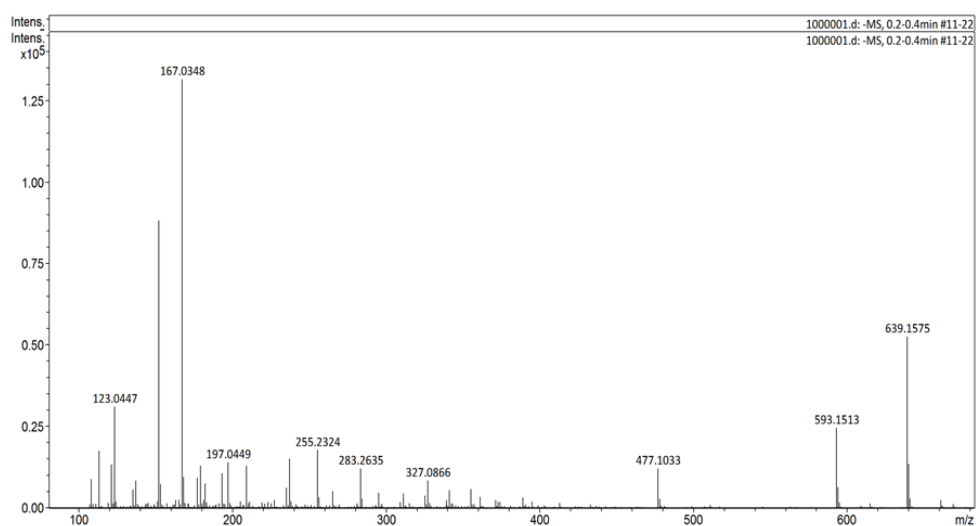


Figura 33 - Estrutura de **Pa1**. (6-metoxicanferol-3,7-di-O- β -D-glucopiranosídeo).

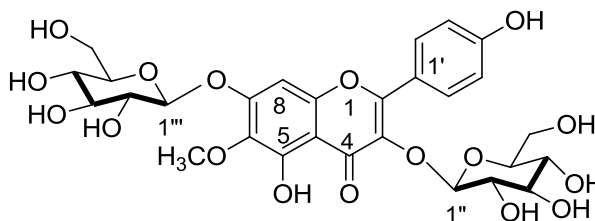


Tabela 3 - Dados RMN ^1H e ^{13}C (11,7 T, DMSO- d_6) dos flavonoides (**Pa1** e **Pa3**).

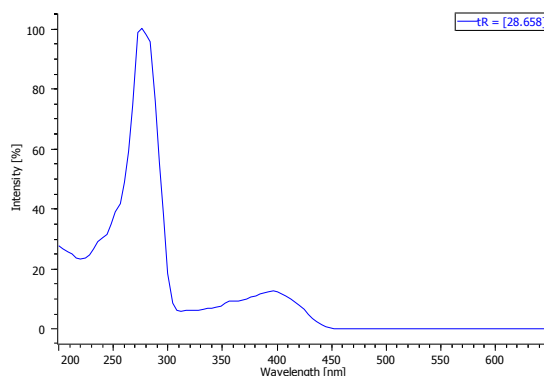
Posição	Pa3		Pa1	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
2	156,8			
3	133,2			
4	178,1			
5	152,8			
6	131,6			
7	157,8			
8	94,3	6,54 s		6,95 s
9	152,0			
10	104,8			
1'	121,2			
2'	131,3	8,03 $d = 8,8$		8,05 $d = 8,8$
3'	115,6	6,84 $d = 8,8$		6,89 $d = 8,8$
4'	160,5			
5'	115,6	6,84 $d = 8,8$		6,89 $d = 8,8$
OCH ₃ -6	60,4	3,75 s		3,71 s
OH-5		12,7 s		12,7 s
1''	101,2	5,47 $d = 7,3$		5,48 $d = 7,6$
2''	74,7	3,17 $dd = 7,3$ e 9,0		3,22
3''	76,8	3,21 $dd = 9,0$ e 9,0		3,32
4''	70,2	3,07 $dd = 9,0$ e 9,0		3,19
5''	77,7	3,19 m		3,38
6a''	61,2	3,55 $dd = 2,5$ e 11,0		4,27 $dd = 1,9$ e 12,2
6b''		3,22 $dd = 5,0$ e 11,0		4,05 $dd = 5,5$ e 12,0
1'''				5,13 $d = 7,3$
2'''				3,33 $dd = 7,3$ e 9,0
3'''				3,27 $dd = 9,0$ e 9,0
4'''				3,19 $dd = 9,0$ e 9,0
5'''				3,45 m
6a'''				4,45 $dd = 5,5$ e 11,0
6b'''				3,69 $dd = 5,0$ e 11,0

Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

5.2.3. Substância Pa4

A substância **Pa4** apresentou no espectro de UV (Figura 34) bandas características de naftopiranonas (Vilegas et al., 1998). Este dado pode ser confirmado, pois as naftopiranonas apresentam no espectro no UV bandas bipartidas características em 270-273 nm (ZANUTTO, et al., 2012, PACIFICO et al., 2011).

Figura 34 - Espectro no UV de **Pa4**.



O espectro de RMN de ^1H de **Pa4** (Figura 35) mostrou dois sinais de hidrogênios acoplados em *meta* (1H, *d*, $J = 2,00$ Hz) sendo um sinal em δ 7,00 e outro em δ 6,87 atribuídos aos H-7 e H-6 respectivamente. O sinal em δ 6,67 (1H, *s*) corresponde a um singlete do H-4 de uma naftopiranona. O singlete em δ 2,27 (3H) corresponde ao grupo metila da posição CH_3 -11, e dois sinais de hidrogênios δ 3,81 (3H, *s*) e δ 3,93 (3H, *s*), que foram atribuídos a dois grupos metoxílas. Estes dados são consistentes aos de naftopiranonas identificadas em outras espécies de *Paepalanthus* (VILEGAS et al., 1998, SANTOS et al., 2001, ZANUTTO et al., 2012).

A análise dos experimentos TOCSY 1D (Figura 36) foi feita através da irradiação do hidrogênio anomérico em δ 5,07 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz) possibilitando assim visualizar o sistema de *spin* de uma glicose cuja constante de acoplamento indica uma configuração em β (HARBONE et al., 1986). A figura 34 apresenta o espectro de ^{13}C , onde observa-se a presença de carbonos carbonílicos, alifáticos e aromáticos (Tabela 4).

A partir do mapa de contorno gHMBC (Figura 37), verificou-se a correlação a longa distância entre o sinal de hidrogênio em δ 7,00 (H-8) e os sinais referentes aos carbonos em δ 94,4 (C-6), 158,5 (C-9) e 161,9 (C-7); o sinal do hidrogênio em 6,87 (H-6) e os carbonos δ 101,2 (C-8), 139,0 (C-5) e 161,7 (C-7); o hidrogênio em δ 6,67

(H-4) e o sinal dos carbonos δ 19,1 (C11), 152,9 (C-3), 139,0 (C-5); o sinal da metila em δ 2,27 (CH_3 -11) e o carbono a 98,7 (C-4).

A posição da glicose na molécula foi estabelecida observando-se as correlações entre o hidrogênio anomérico δ 5,07 (H-1' glicose) e o sinal em δ 159,9 (C-9 da aglicona).

Através do gHMBC (Figura 38) também foram confirmamos a posição das metoxilas, mostrando as correlações entre o sinal do hidrogênio em δ 3,94 e o C-7 da aglicona (δ 161,9), e entre o sinal do hidrogênio δ 3,82 e o C-5 da aglicona (δ 139,0).

Portanto, a estrutura de **Pa4** (Figura 39) foi determinada como sendo Paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosideo. Esta substância já foi identificada em várias espécies de *Paepalanthus* (VILEGAS *et al.*, 1989, SANTOS *et al.*, 2001, ZANUTTO *et al.*, 2012, AMARAL *et al.*, 2012), sendo considerada o marcador taxonômico do gênero *Paepalanthus*.

Figura 35 - Espectro de RMN ^1H de **Pa4** (em DMSO-d₆, 11,7 T).

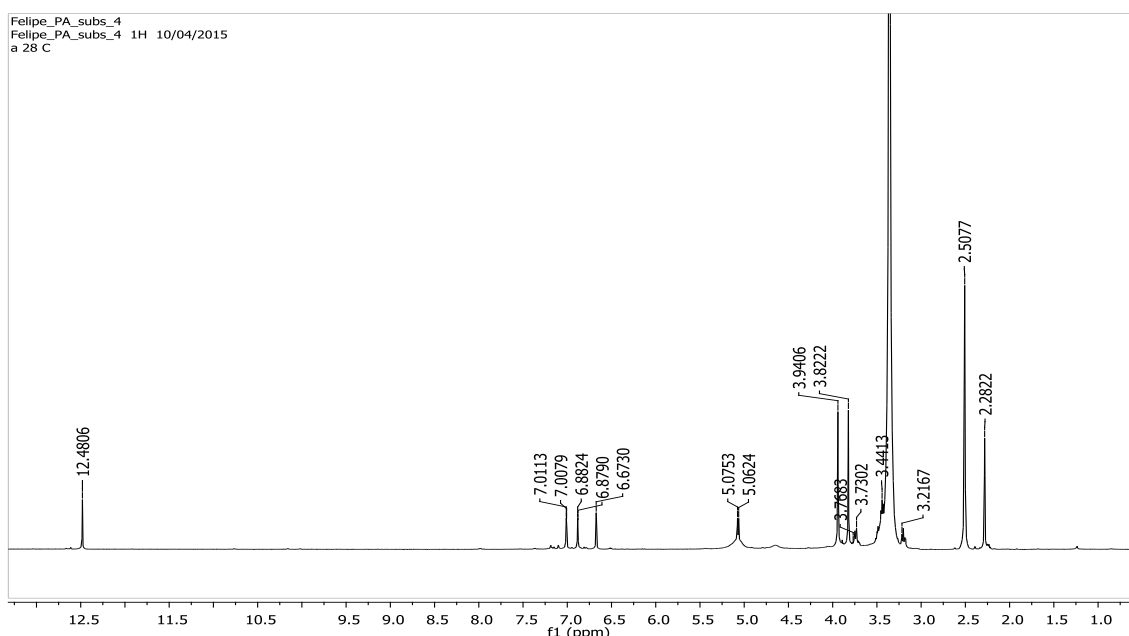


Figura 36 - Espectro de RMN ^{13}C de **Pa4** (em DMSO-d₆, 11,7 T).

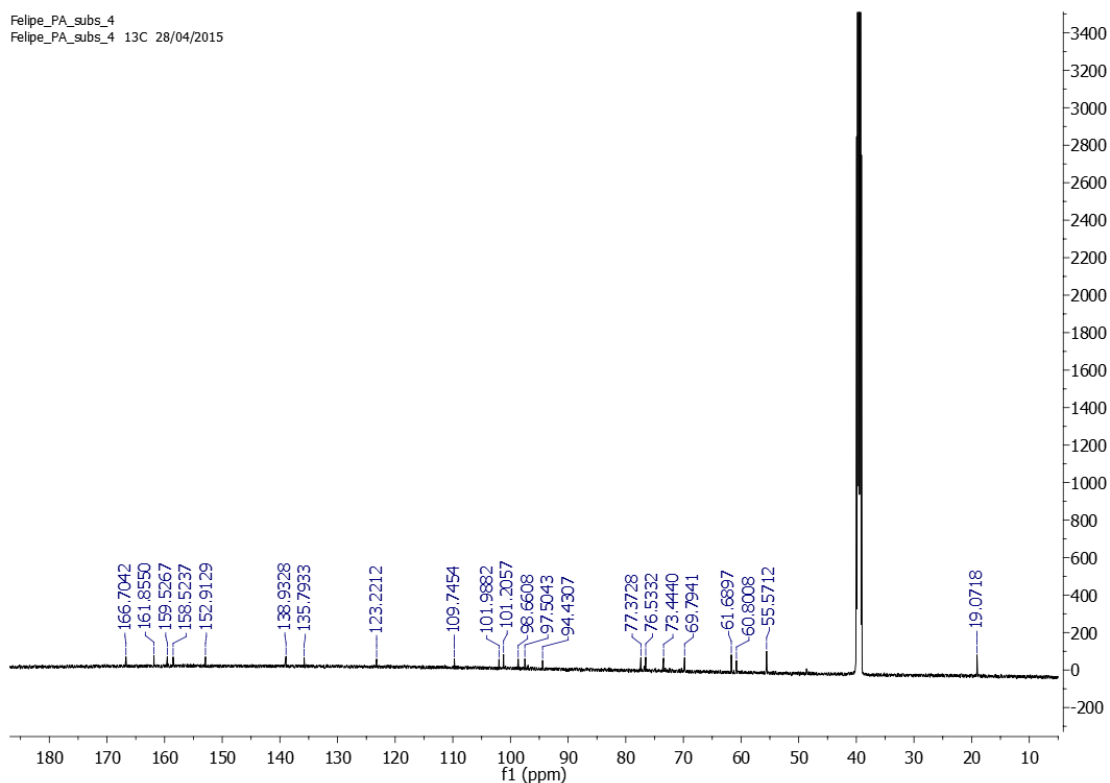


Figura 37 - Espectro TOCSY 1D de **Pa4** (11,7 T, DMSO-d₆) com irradiação em δ 5,07.

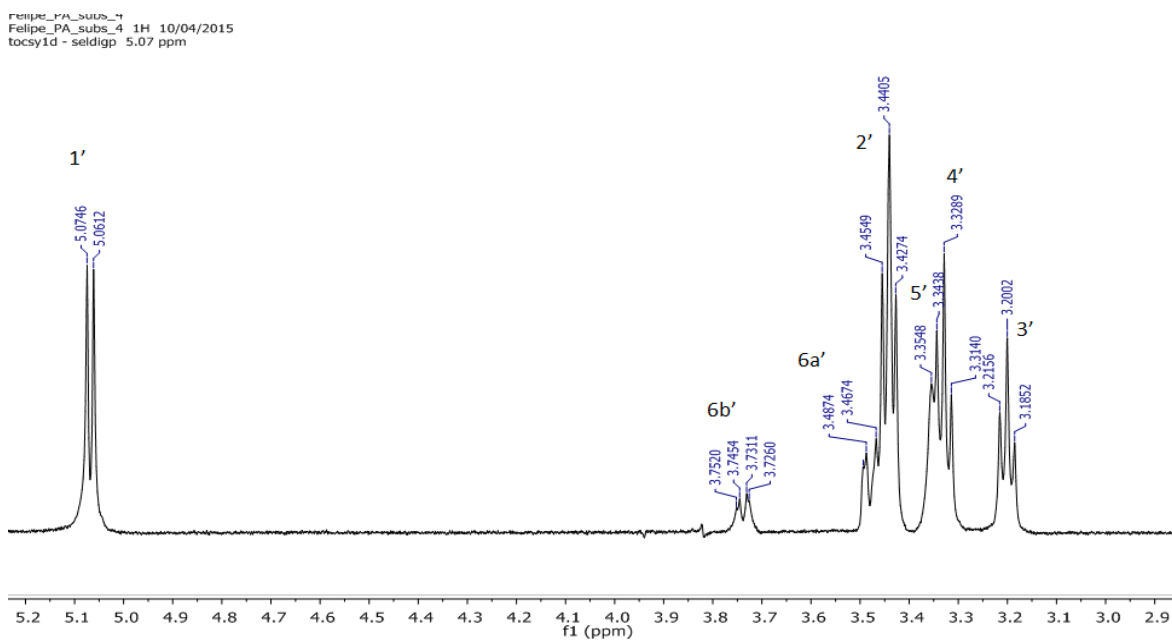


Figura 38 - Espectro *g*HMBC de **Pa4** (11,7 T, DMSO-d6).

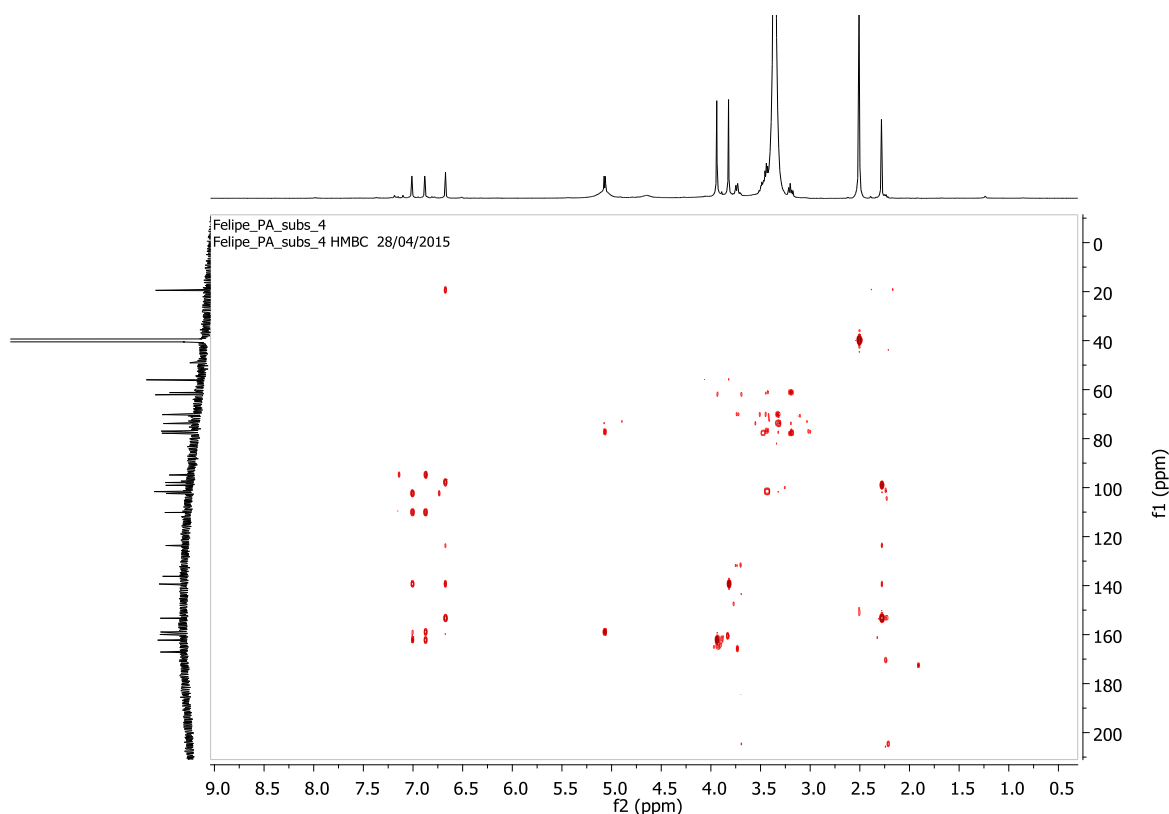
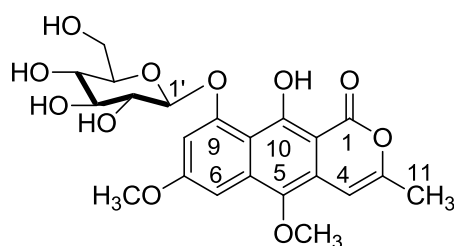


Figura 39 - Estrutura de **Pa4** (Paepalantina-9-O- β -D-glucopiranosídeo).



5.2.5. Substância Pa5

No espectro de RMN ^1H de **Pa5** (Figura 40) observa-se sinais referentes à mistura de duas substâncias, sendo que os sinais da substância majoritária mostrou-se semelhante ao da substância **Pa4** (ver Tabela 4), tratando-se também de uma naftopiranona. A diferença observada foi apenas na ausência de sinais na região do hidrogênio anomérico, evidenciando que se tratava da aglicona da paepalantina (Figura 41). Os deslocamentos químicos em δ 9,51 e δ 13,3 evidencia que as hidroxilas das posições OH-9 e OH-10 estão livres. Os dubletos com acoplamento em meta em δ 6,89 e δ 6,58 são referentes a H-6 e H-8 respectivamente e o singlete em δ 6,53 refere-se a H-4. O sinal da metila em CH_3 -11 foi observado em δ

2,30. Os hidrogênios das metoxilas foram observados em δ 3,87 (OCH₃-5) e δ 3,94 (OCH₃-7).

Esta substância já anteriormente isolada de *P. bomelioides* e outras espécies de *Paepalanthus* que segundo relatos da literatura apresentam atividade antioxidante (PACIFICO *et al.*, 2011), citotóxica (COELHO, *et al.*, 2000, SANTOS *et al.*, 2001), antiúlcera (COELHO *et al.*, 2006), mutagênica (VARANDA *et al.*, 1997, ZANUTTO, 2012) e para o tratamento de doença de *Chron* (DI STASI *et al.*, 2004).

Figura 40 - Espectros de RMN de ^1H da **Pa5** – (11,7 T, CDCl₃-d₆).

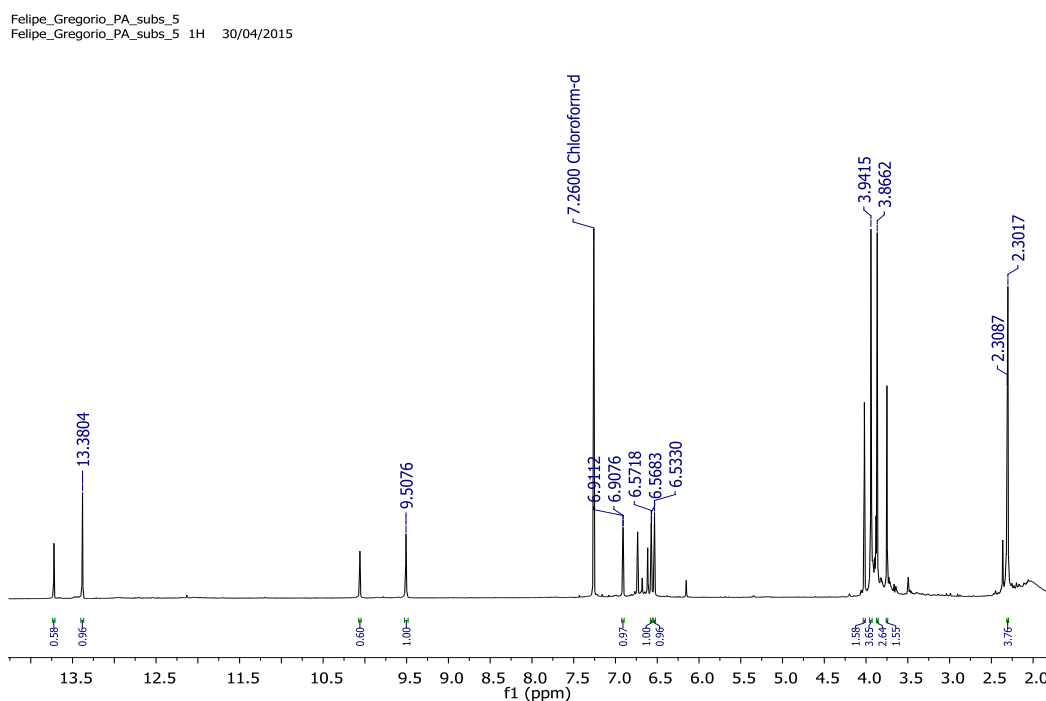


Figura 41 - Estrutura de **Pa5** (Paepalantina).

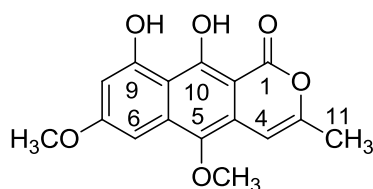


Tabela 4 - Dados de RMN ^1H e de ^{13}C (11,7 T, $\text{DMSO-}d_6$) de **Pa4** e **Pa5**
Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

Posição	Pa4		Pa5	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$
1	166,7		168,2	
2				
3	152,9		153,0	
4	98,7	6,67s	99,7	6,53 s
5	139,0		140,3	
6	94,4	6,87d = 2,0 Hz	96,7	6,89 d = 2,1Hz
7	161,9		163,4	
8	101,2	7,00 d = 2,0 Hz	104,9	6,58 d = 2,1Hz
9	158,5		159,0	
10	159,5		160,5	
11	19,1	2,25 s	19,7	2,30 s
OH - 9				9,51 s
OH-10		12,4 s		13,3 s
$\text{OCH}_3 - 5$	61,7	3,82 s	61,8	3,87 s
$\text{OCH}_3 - 7$	55,6	3,94 s	55,6	3,94 s
1'	102,0	5,07 d = 8,0 Hz		
2'	73,4	3,42 dd = 8,0 ; 9,0; Hz		
3'	76,5	3,18 dd = 9,0; 9,0Hz		
4'	75,4	3,32 dd = 9,0; 9,0Hz		
5'	77,3	3,35 m		
6a'	69,8	3,46 dd J = 3,0; 12,0 Hz		
6b'		3,79 dd J = 4,0; 12,0 Hz		

Deslocamentos químicos (δ) em ppm e constantes de acoplamento (J) em Hz.

De *Paepalanthus acanthophyllus* foram isolados e identificados os flavonóides (**Pa1**, **Pa2** e **Pa3**) e as naftopiranonas derivadas da paepalantina (**Pa4** e **Pa5**). A substância **Pa2** não foi descrita na literatura até o exato momento. Percebe-se, porém, que o padrão de flavonóis e naftopiranonas continuam a definir a taxonomia para o gênero *Paepalanthus*.

A presença majoritária de flavonóides 6-oxigenados, e de flavonoides acilados são informações relevantes para o estudo do gênero *Actinocephalus*. Em *P. acanthophyllus* foram identificados flavonoides com metoxilações na posição em C-6, além do flavonoide acilado contendo a unidade *p*-cumaroil.

Os flavonoides acilglicosilados foram identificados em algumas espécies pertencentes à antiga seção *Actinococephalus*, (ANDRADE et al., 1999, SANTOS et al., 2002;) hoje denominado gênero *Actinocephalus* (SANO, 2014). Observa-se que estes flavonoides acilados são característicos deste gênero e que, portanto, pode-se sugerir que um estudo mais aprofundado para reclassificação da espécie de *P. acanthophyllus* possa ser feito.

A presença das naftopiranonas **Pa4** e **Pa5** em *P. acanthophyllus* foi também muito importante, uma vez que a aglicona é a mesma da paepalantina existente em quase todas as espécies de *Paepalanthus* estudadas, corroborando, portanto, com as considerações realizadas até então por (VILEGAS et al., 1989; GIULIETTI et al., 2000; SANTOS et al., 2001; DOKKEDAL et al., 2008; e PACÍFICO et al., 2011). Porém em espécies do gênero *Actinocephalus*, as naftopiranonas existem nos capítulos em concentrações menores que nos capítulos de espécies do gênero *Paepalanthus* (Silva, 2016).

As substâncias químicas encontradas em espécies de Eriocaulaceae fornecem informações que podem auxiliar na taxonomia, auxiliando na delimitação dos gêneros. Estes dados também reforçam os estudos morfológicos (SCATENA et al., 1996; GIULIETTI et al., 2000; DOKKEDAL et al., 2008, SANO, et al., 2014, SANO, et al., 2015), mostrando a integração dos caracteres morfológicos, químicos e anatômicos na tentativa de elucidar os problemas em Eriocaulaceae.

5.2 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação de fenóis totais baseia-se na reação do reagente de *Folin-Ciocalteu* com os fenóis presentes na amostra e na subsequente oxidação desses fenóis formando assim um composto azul (LENORE et al., 2005).

Para o mesmo, foi elaborada uma curva de calibração (Figura 42), utilizando como padrão o ácido gálico. A partir da curva, foi determinado o teor de fenóis, que é dado em concentração de mg.g^{-1} .

Figura 42 - Curva de calibração utilizando o ácido gálico como padrão.

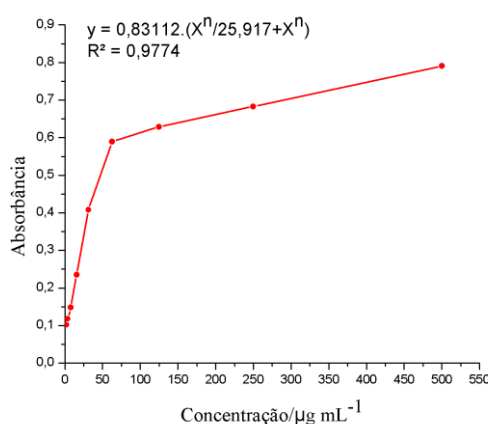


Tabela 5 - Teor de Fenóis Totais expressos em mg.g^{-1} de extrato metanólico.

Fenóis Totais	Capítulos
Média $\pm$ DESVPAD (mg.g^{-1})	133,19 $\pm$ 4,31

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK et al., 2014).

Os resultados obtidos na determinação dos fenóis totais pelo método *Folin Ciocalteu*, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato bruto, são apresentados na Tabela 5. O extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* avaliado apresentou alto teor de compostos fenólicos, quando

comparados a dados de outras espécies de Eriocaulaceae descritos na literatura. Silva, (2016) avaliou o teor de fenóis totais nos capítulos de *Actinocephalus divaricatus* encontrando o valor de $126,41 \pm 4,45 \text{ mg.g}^{-1}$. Em *Paepalanthus chiquitensis* o teor de fenóis totais expressos em mg/g de extrato metanólico foi de $25,96 \text{ mg.g}^{-1}$ (ZANUTTO et al., 2012, ZANUTTO, 2013).

5.3 Determinação do teor de flavonoides totais

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

A Figura 43 apresenta a curva de calibração utilizando a quercetina como padrão, enquanto que a Tabela 6 apresenta o teor de flavonoides totais expressos em mg.g^{-1} de extrato metanólico.

Figura 43 - Curva de calibração utilizando a quercetina como padrão.

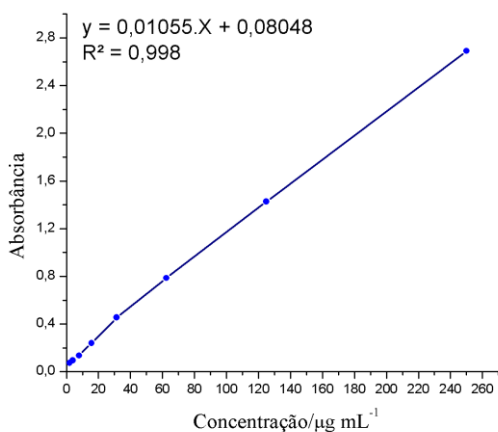


Tabela 6 - Teor de Flavonóides Totais expressos em mg.g^{-1} de extrato metanólico.

Flavonoides Totais	Capítulos
Média $\pm$ DESVPAD (mg.g^{-1})	122,15 $\pm$ 15,94

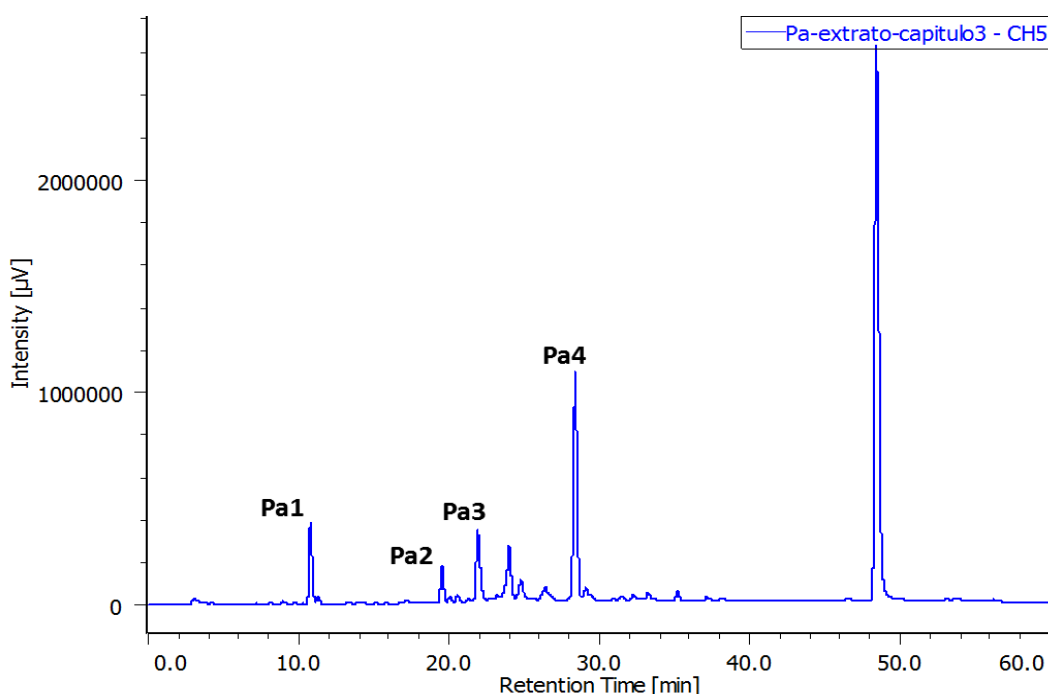
Os teores de flavonoides totais expressos em mg.g^{-1} de extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* mostraram-se maiores a outras espécies de Eriocaulaceae analisadas. Para o extrato metanólico de *P. chiquitensis* este valor foi

de $15,8 \text{ mg.g}^{-1}$ de flavonoides totais expressos em mg/g de extrato metanólico (ZANUTTO, et al., 2012, ZANUTTO, 2013).

5.4 Quantificação das substâncias **Pa1**, **Pa2**, **Pa3** e **Pa4** no extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*

A quantificação das substâncias isoladas foi realizada através de HPLC-PDA. Primeiramente, as condições cromatográficas foram otimizadas a fim de se obter uma melhor resolução na separação das substâncias **Pa1**, **Pa2**, **Pa3** e **Pa4** sendo a melhor condição apresentada no cromatograma da Figura 44.

Figura 44 - Cromatograma representativo da separação por HPLC-PDA analítico para quantificação de **Pa1**, **Pa2**, **Pa3** e **Pa4** do extrato metanólico dos capítulos *P. acanthophyllus*. Coluna Thermo® Hypersil GOLD aQ RP18 (250 x 4.6 mm d.i.: 5 μm), $\lambda = 270 \text{ nm}$, vazão 1,0 mL/min.



A quantificação dos flavonoides derivados do canferol (**Pa1**, **Pa2** e **Pa3**) foi realizada por HPLC-PDA, utilizando curva de calibração do canferol como padrão externo. Já para a quantificação da naftopiranona **Pa4**, foi realizada como padrão externo a própria substância isolada.

A equação linear da curva analítica obtida para cada padrão é dada pela equação: $y = ax + b$, onde a = coeficiente angular; b = intersecção com eixo y , onde obteve-se os valores de a e b apresentadas na tabela 8. As injeções foram realizadas em triplicata para cada concentração das curvas analíticas.

5.4.1. Linearidade, limite de detecção e limite de quantificação

A linearidade foi obtida a partir do coeficiente de correlação da regressão linear dentro da faixa de concentrações estudadas. Todos os analitos apresentaram excelente linearidade dentro da faixa analisada (31,25 - 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o que pôde ser verificado pelos valores do coeficiente de correlação (r^2) das curvas analíticas superiores a 0,999. Tabela 8.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram determinados a partir dos parâmetros analíticos das curvas analíticas pelas equações apresentadas a seguir:

$$LOD = \frac{3,3 \sigma}{S} \qquad LOQ = \frac{10 \sigma}{S}$$

O parâmetro σ corresponde ao desvio padrão da curva de calibração e S à inclinação da curva (RIBANI et al., 2004). Os resultados foram apresentados como concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ na Tabela 7.

Tabela 7 - Dados obtidos a partir da regressão linear da curva analítica usando canferol e a naftopiranona (**Pa4**) isolada como padrões externo.

Substâncias	Coeficiente angular (a)	Coeficiente linear (b)	Coeficiente de correlação (r^2)	LOD $\mu\text{g.mL}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Pa1, Pa2 e Pa3	19208	317027	0,9999	12,22	30,03
Pa4	15833	93062	0,9997	25,54	77,39

As curvas analíticas apresentaram coeficientes de correlação (r^2) com valores superiores a 0,999 indicando boa linearidade da correlação entre as áreas dos picos no cromatograma e as concentrações estudadas, permitindo utilizar a metodologia para quantificação destes analitos no extrato.

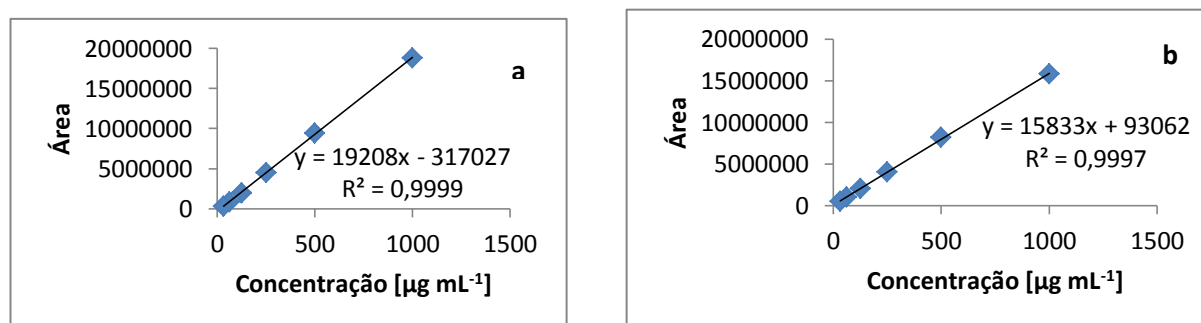
A sensibilidade do método foi satisfatória, pois os limites de detecção para o método apresentaram-se menores que as concentrações utilizadas para as construções das curvas analíticas. Dessa forma, o método pôde ser utilizado para quantificação destes analitos no extrato.

5.4.2. Construção das curvas analíticas e quantificação

A quantificação dos flavonoides foi realizada utilizando calibração com padrão externo canferol (Sigma®), sendo esta aglicona utilizada para a quantificação de seus derivados. Seis níveis de concentração (31,25; 62,5, 125; 250; 500 e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em triplicatas e a resposta de absorção obtida em 270 nm.

A quantificação da naftopiranona seguiu o mesmo procedimento, porém utilizando como padrão externo a própria substância isolada (**Pa4**). Ao final, a área sob os picos cromatográficos dos padrões foi calculada e os valores obtidos foram interpolados em função da concentração usando regressão linear (Figura 45).

Figura 45 - Curva analítica utilizada para a quantificação a) dos flavonoides **Pa1**, **Pa2** e **Pa3**; b) da naftopiranona **Pa4**.



A fim de se obter o teor de cada substância no extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*, esses resultados foram então convertidos para uma relação de $\mu\text{g mg}^{-1}$. O teor das substâncias **Pa1**, **Pa2**, **Pa3** e **Pa4** na matriz foram determinados com base na seguinte equação:

$$(\text{Teor}) \% = \frac{[\mu\text{g/mL}] \times \text{volume de diluição (mL)}}{\text{massa amostra (g)} \times 10^6} \times 100$$

Todos os dados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão das injeções. Tabela 8.

Tabela 8 - Concentração das substâncias e teor no extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*.

Substâncias	Concentração $\pm$ DP*	Concentração $\pm$ DP*	Teor
	[] ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	(mg.g^{-1}) de extrato	(%)
Pa1	238,76 $\pm$ 6,01	23,9 $\pm$ 0,6	2,39
Pa2	122,84 $\pm$ 13,11	12,2 $\pm$ 1,3	1,22
Pa3	252,49 $\pm$ 20,09	25,2 $\pm$ 2,0	2,52
Pa4	838,19 $\pm$ 14,40	83,8 $\pm$ 14,4	8,38

*DP: desvio padrão para n = 3.

A concentração de quercetina encontrados para o extrato metanólico dos capítulos de *Paepalanthus giganteus* (sinonímia de *P. chiquitensis*) foi de 335 $\pm$ 2,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ enquanto que o da paepalantina (aglicona, foi de 455 $\pm$ 3,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), (CARDOSO, et al., 2012). Para o extrato metanólico dos capítulos de *A. divaricatus* (SILVA, 2016) encontrou valores de 34,26 $\pm$ 0,45 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, enquanto que os capítulos de *P. acanthophyllus* apresentam um teor de paepalantina superior às espécies já estudadas com uma concentração de 838,19 $\pm$ 14,40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

É importante ainda destacar que para validação da metodologia por HPLC-PDA faz-se necessário ainda avaliar todos os parâmetros recomendados pelo ICH

(INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, 2005) para a validação de procedimentos analíticos e a resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003, determinada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) intitulada “Guia para a validação de métodos analíticos e bioanalíticos” (AGÊNCIA..., 2003).

Portanto, parâmetros como precisão, exatidão, recuperação, especificidade e seletividade, necessitam ser realizados para a validação dos métodos utilizados na determinação dos padrões analisados.

5.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.5.1 Atividade antimicrobiana do extrato metanólico de *P. acanthophyllus*

A importância na triagem biológica para a descoberta de novos compostos que apresentem atividade antimicrobiana contra uma variedade de linhagens de fungos e bactérias é relevante, pois a resistência antimicrobiana é um fator de preocupação na sociedade (CRAGG et al., 2013). Neste sentido, foi realizado o ensaio antimicrobiano do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*. A tabela 10 mostra os resultados obtidos com as bactérias *Gram*-negativas, *Gram*-positivas e leveduras ensaiadas.

Tabela 9 - Atividade antibacteriana e antifúngica do extrato metanólico *P. acanthophyllus*.

Amostras Avaliadas	CIM ^a			
	Bactéria		Bactéria	Levedura
	<i>Gram</i> -negativa		<i>Gram</i> -positiva	
	<i>E. coli</i>	<i>S. setubal</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
Capítulos	1000	>1000	1000	>1000

^a valores em $\mu\text{g.mL}^{-1}$; (–) CIM > 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Segundo Aligiannis et al. (2001) valores de CIM igual ou inferior a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são classificados como inibidores potentes; CIMs entre 600 e 1500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como inibidores moderados e acima de 1600 $\mu\text{g/mL}$ como inibidores fracos. Outros autores como Holetz et al, (2002) realizou *screening* com 13 extratos hidroalcoólicos de plantas, com ambas bactérias *gram*-positiva e *gram*-negativas, usando método de microdiluição e considerou resultados de CIM menores de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como satisfatórios, ou seja, uma boa atividade antimicrobiana; valores entre 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$, uma moderada atividade antimicrobiana; de 500 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ uma fraca atividade antimicrobiana e valores superiores a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ os extratos foram considerados inativos.

Portanto, existem parâmetros diferentes de avaliação para atividade antimicrobiana para extratos de plantas e com estas informações, podemos

considerar que a triagem deste estudo inicial mostrou resultados fracos, ou seja, as linhagens não apresentam sensibilidade frente ao extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*, uma vez que este extrato apresentou inibição em concentrações igual ou superiores a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para todas as bactérias e levedura avaliadas.

5.5.2. Atividade antitumoral do extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus*

O câncer, também denominado de neoplasia maligna e tumor maligno, é uma doença caracterizada pela multiplicação e propagação descontroladas no corpo de formas anormais das próprias células corporais (LEMKE; et al., 2008).

Os produtos naturais têm sido uma importante fonte de componentes antineoplásicos. Existem, no mínimo, 250.000 espécies de plantas no mundo, sendo que mais de 1000 plantas apresentam propriedades antitumorais significantes (LIMA et al., 2006, FERRAZ et al, 2005; MUKHERJEE et al, 2001).

Durante os anos 60 o National Cancer Institute (EUA) realizou uma extensiva pesquisa com extratos de plantas com atividade antitumoral (MONKS et al, 2002). Desde então, tem aumentado o interesse na pesquisa de compostos isolados de plantas medicinais, como uma rica fonte de novos fármacos antitumorais (GOMES, 2008).

Um dos ensaios colorimétricos para a avaliação de proliferação celular ou citotoxicidade (IC_{50}) mais comumente utilizados na atualidade é o ensaio de MTT descrito por Mosmamm (1983).

O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo. Desta forma esta reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas, configurando-se assim um ensaio versátil e quantitativo (MOSMAMM, 1983).

O ensaio biológico do efeito inibitório pelo método MTT de crescimento celular causado pelo extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* e a cisplatina (controle positivo) foram realizados *in vitro* contra linhas de células de tumores de murinos LM3 (adenocarcinoma mamário) e LP07 (adenocarcinoma de pulmão), sendo também realizados com células de tumores humana MCF-7 (câncer da mama

humana). A dose citotóxica para 50% das células (IC_{50}) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal e estão apresentados na Tabela 10.

O melhor resultado que causou uma redução significativa do número de células foi para o extrato metanólico dos capítulos ($IC_{50} = 34,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$) contra MCF7 (cancro da mama humana), quando comparado com a cisplatina.

Tabela 10 - Valores de citotoxicidade para o extrato metanólico dos capítulos de *P. acanthophyllus* em comparação com a cisplatina.

Extrato	$IC_{50} \pm (\text{Desvio Padrão}) [\mu\text{g mL}^{-1}]$		
	LM3	LP07	MCF-7
Capítulos	$132,66 \pm 4,5$	$121,37 \pm 0,5$	$34,81 \pm 0,3$
Cisplatina	$9,09 \pm 1,1$	$1,30 \pm 0,1$	$5,88 \pm 1,4$

LP07 (adenocarcinoma de pulmão); LM3 (adenocarcinoma mamário) e MCF7 (cancro da mama humana).

Os resultados aqui apresentados são promissores uma vez que outros extratos metanólicos de capítulos de *Actinocephalus divaricatus* (Eriocaulaceae) apresentou resultados de 498.63 ± 1.03 (LP07); $246,02 \pm 0,43$ (LM3) e $66,98 \pm 4,5$ (MCF7) (SILVA, 2016). Ensaio com o dímero simétrico da paepalantina e da paepalantina isolados dos capítulos de *P. bromelioides* utilizando teste de Ames em MTT-tetrazolium modificado, utilizando linhagens de células McCoy evidenciou CIM de 55,9 e 128,1 μM para estas substâncias respectivamente (COELHO, et al., 2000).

Pode-se então sugerir que o resultado para este ensaio seja devido ao alto teor de naftopiranonas (8,38 %) no extrato de *P. acanthophyllus*.

6 CONCLUSÕES

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

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

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

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

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

A citotoxicidade dos extratos foi considerada promissora, quando comparado com o padrão de controle cisplatina, sendo o melhor resultado encontrado para o extrato metanólico dos capítulos ($\text{IC}_{50} = 34,81 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) contra MCF7 (cancro da mama humana). Este resultado pode ser atribuído ao alto teor de naftopiranonas neste extrato, visto que esta classe de metabólito possui atividade antitumoral comprovada na literatura.

Os resultados apresentados contribuem para o conhecimento da composição química dos capítulos de *P. acanthophyllus*, sendo os dados aqui obtidos relevantes pois poderão auxiliar na discussão taxonômica do gênero *Paepalanthus*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Brasília, 2003. 15 p. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/349509/Consolidado%2Bde%2Bnormas%2BCOBIO.pdf/3122249b-48cb-47aa-be78-76f3129a62ba>>. Acesso em: 25 ago. 2016
- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989. 564 p.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, J. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4168-4167, 2001.
- AMARAL, F. P.; NAPOLITANO, A.; MASULLO, M.; SANTOS, L. C.; FESTA, M.; VILEGAS, W.; PIZZA, C.; PIACENTE, S. HPLC-ESIMSⁿ profiling, isolation, structural elucidation, and evaluation of the antioxidant potential of phenolics from *Paepalanthus geniculatus*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 547-556, 2012.
- ANDRADE, F. D. P.; SANTOS, L. C.; DOKKEDAL, A. L.; VILEGAS, W. Acyl glucosylated flavonols from *Paepalanthus* species. **Phytochemistry**, v. 51, p. 411-415, 1999.
- ANDRADE, M. J. G.; GIULIETTI, A. M.; VAN DEN BERG, C.; HARLEY, R. *Blastocaulon* (Eriocaulaceae), a synonym of *Paepalanthus*: morphological and molecular evidence. **Taxon**, v. 60, n. 1, p. 178-184, 2011.
- ARAÚJO, M. G. F.; HILÁRIO, F.; NOGUEIRA, L. G.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; BRUNETTI, I. L.; SOTOMAYOR, C. H.; BAUAB, T. M. Correlation among antioxidant, antimicrobial, hemolytic, and antiproliferative properties of *Leiothrix spiralis* leaves extract. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 9260-927, 2012.
- ARAÚJO, M. G. F.; PACÍFICO, M.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ICELY, P. A.; MIRÓ, M. S.; SCARPA, M. V. C.; BAUAB, T. M.; SOTOMAYOR, C. E. Evaluation of *Syngonanthus nitens* (Bong.) Ruhl. extract as antifungal and in treatment of vulvovaginal candidiasis. **Medical Mycology**, v. 51, p. 673-682, 2013.
- CARDOSO, C. A. L.; ZANUTTO, F. V.; VARANDA, E. A.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Quantification of flavonoids, naphthopyranones and xanthenes in Eriocaulaceae species by LC-PDA. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 138-146, 2012.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M07-A6**: methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6th ed. Wayne, 2006.

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

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

COSTA, F. N.; TROVÓ, M.; SANO, P. T. Eriocaulaceae na Cadeia do Espinhaço: riqueza, endemismo e ameaças. **Megadiversidade**. v. 4, n. 1, p. 89-97, 2008.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

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

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

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

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

FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E.; CARVALHO JUNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; NADRUZ COELHO, M. A.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 1.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 22-26, 2003.

GABRIELSON, J.; HART, M.; JARELÖV, A.; KUHN, I.; MCKENZIE, D.; MÖLLBY, R. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 63-73, 2002.

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

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

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

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

GIULIETTI, A. M.; SCATENA, V. L.; SANO, P. T.; PARRA, L. R.; QUEIROZ, L. P.; HARLEY, R. M.; MENEZES, N. L.; YSEPPON, A. M. B.; SALATINO, A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; RICCI, C. W.; BONFIM, M. C. P.; MIRANDA, E. B. Multidisciplinary studies on neotropical Eriocaulaceae. In: WILSON, K. L.; MORRISON, D. A. (Ed.). **Monocots: systematics and evolution**. Melbourne: CSIRO, 2000. p. 580-592.

GIULIETTI, A. M.; SANO, P. T.; COSTA, F. N.; PARRA, L. R.; CHTERNACHT, L.; TISSOT-SQUALI, M. L.; TROVÓ, M.; WATANABE, M. T. C.; FREITAS, M. P.; HENSOLD, N. Eriocaulaceae. 2010. In: FORZZA, R. C.; BAUMGRATZ, J. F. A.; BICUDO, C. E.; CARVALHO JUNIOR, A. A.; COSTA, A.; COSTA, D. P.; HOPKINS, M.; LEITMAN, P. M.; LOHMANN, L. G.; MAIA, L. C.; MARTINELLI, G.; MENEZES, M.; MORIM, M. P.; NADRUZ COELHO, M. A.; PEIXOTO, A. L.; PIRANI, J. R.; PRADO, J.; QUEIROZ, L. P.; SOUZA, V. C.; STEHMANN, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; WALTER, B. M. T.; ZAPPI, D. (Org.). **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 2, p. 938-958.

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

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

GUDIÑA, E. J.; ROCHA, V.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from *Lactobacillus paracasei* ssp. Paracasei A20. **Letters in Applied Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 419-424, 2010.
HARBORNE, J. B. **The flavonoids: advances in research since 1986**. London: Chapman and Hall, 1986. 676 p.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HÖRNER, M.; GIGLIO, V. F.; SANTOS, A. J. R. W. A.; WESTPHALEN, A. B.; INGLESIAS, B. A.; MARTINS, P. R.; AMARAL, C. H.; MICHELOT, T. M.; REETZ, L. G. B.; BERTONCHELI, C. M.; PARAGINSKI, G. L.; HORNER, R. Triazenos e atividade antibacteriana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 441-449, 2008.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

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

- PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.
- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. da S.; GOMES, T. de L. B.; CARDOSO, K. C. de M.; AMORIM, E. L. C. de. Otimização de metodologia analítica para o doseamento de flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) teudel. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.
- PIACENTE, S.; SANTOS, L. C.; MAHMOOD, N.; ZAMPELLI, A.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. New naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 5, p. 680-682, 2001.
- PRISTA, L. V. N. **Tecnologia farmacêutica**. 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1995. v. 1-2.
- RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; SCHOEN, F. J. **Patologia estrutural e funcional**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.
- RUHLAND, W. Eriocaulaceae. **Das Pflanzenreich**, v. 13, p. 1- 294, 1903.
- SANO, P. T. *Actinocephalus* (Körn.) Sano (*Paepalanthus* sect. *Actinocephalus*), a new genus of Eriocaulaceae, and other taxonomic and nomenclatural changes involving *Paepalanthus* Mart. **Taxon**, v. 53, p. 99-107, 2004.
- SANO, P. T.; COSTA, F. N.; TROVO, M.; ECHTERNACHT, L. *Paepalanthus magistrae* (Eriocaulaceae), a remarkable new species in honor of a Ana Maria Giulietti-Harley. **Rodriguésia**, v. 66, n. 2, p. 299-303, 2015.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; DE RICCARDIS, F.; ELETTO, A. M.; PIZZA, C.; VILEGAS, W. Xanthonés and flavonoids from *Leiothrix curvifolia* and *Leiothrix flavescens*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 8, p. 853-856, 2001.
- SANTOS, L. C.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; TORO, R.; SANO, P. T.; VILEGAS, W. 6-Methoxyquercetin-3-O-(6"-E-feruloyl)--D-glucopyranoside from *Paepalanthus polyanthus* (Eriocaulaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 451-456, 2002.
- SCATENA, V. L.; MORAES, A. R. S. Anatomia de raízes, folhas e escapos de *Paepalanthus*, subgênero *Platycaulon* (Eriocaulaceae). **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 39, n. 4, p. 1021-1035, 1966.
- SEMPRE-VIVAS. **Comércio e economia**. Disponível em: <<http://semprevivasufvjmlab4.blogspot.com.br/p/grupo-03.html>>. Acesso em: 18 ago. 2016.

- SILVA, A. C. Z. **Padronização dos extratos polares das partes aéreas de *Actinocephalus divaricatus* (Koern.) Sano (Eriocaulaceae) por HPLC-PDA.** 2016. 135 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, UNESP, 2016.
- SILVA, M. A.; OLIVEIRA, A. P. S.; SANNOMIYA M.; SANO, P. T.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Flavonoids and a naphthopyranone from *Eriocaulon ligulatum* and their mutagenic activity. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 11, p. 1635-1639, 2007.
- TROVÓ, M.; SANO, P. T. Taxonomic survey of *Paepalanthus* section *Diphyomene* (Eriocaulaceae). **Phytotaxa**, v. 14, n. 1, p. 49-55, 2010.
- VARANDA, E. A.; RADDI, M. S. G.; DIAS, F. de L. P.; ARAUJO, M. C. S. P.; GIBRAN, S. C. A.; TAKAHASHI, C. S.; VILEGAS, W. Mutagenic and cytotoxic activity of an isocoumarin (paepalantine) isolated from *Paepalanthus vellozioides*. **Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis**, v. 17, n. 2, p. 85-95, 1997.
- VILEGAS, W.; ROQUE, N. F.; SALATINO, A.; GIESBRECHT, A. M.; DAVINO, S. Isocoumarin from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2299-2301, 1990.
- VILEGAS, W.; SANTOS, L. C.; ALECIO, A. C.; PIZZA, C.; PIACENTE, S.; PAUW, E.; SANO, P. T. Naphthopyranone glycosides from *Paepalanthus bromelioides*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 207-210, 1998.
- ZANUTTO, F. V. **Estudo químico e atividades mutagênica e antiradicalar de *Paepalanthus chiquitensis* Herzog (Eriocaulaceae).** 2013. 262 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- ZANUTTO, F. V.; BOLDRIN, P. K.; VARANDA, E. A.; SOUZA, S. F.; SANO, P. T.; VILEGAS, W.; SANTOS, L. C. Characterization of flavonoids and naphthopyranones in methanol extracts of *Paepalanthus chiquitensis* Herzog by HPLC-ESI-IT-MSⁿ and their mutagenic activity. **Molecules**, v. 18, n. 1, p. 244-262, 2012.