

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Isolamento de derivados diméricos de floroglucinol e avaliação da
capacidade proliferativa da fração lipofílica de espécies de *Hypericum* do
sul do Brasil**

HENRIQUE BRIDI

PORTO ALEGRE, 2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Isolamento de derivados diméricos de floroglucinol e avaliação da
capacidade proliferativa da fração lipofílica de espécies de *Hypericum* do
sul do Brasil**

**Dissertação apresentada por Henrique Bridi para a
obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas**

Orientador: Prof^ª Dr^ª Gilsane Lino von Poser

PORTO ALEGRE, 2015

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Mestrado Acadêmico, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 12.03.2015, aprovada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz

Universidade Luterana do Brasil

Profa. Dra. Amélia Teresinha Henriques

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Ana Cristina Stein

Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

CIP - Catalogação na Publicação

Bridi, Henrique
Isolamento de derivados diméricos de
floroglucinol e avaliação da capacidade proliferativa
da fração lipofílica de espécies de *Hypericum* do sul
do Brasil / Henrique Bridi. -- 2015.
158 f.

Orientador: Gilsane Lino von Poser.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa
de Pós-Graduação em Assistência Farmacêutica, Porto
Alegre, BR-RS, 2015.

1. Derivados de Floroglucinol. 2. *Hypericum*. 3.
Atividade antinociceptiva. 4. Atividade
proliferativa. I. Lino von Poser, Gilsane, orient.
II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Produção de Matéria Prima, no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, na Central Analítica I e II, no Laboratório de Psicofarmacologia Experimental da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório Regional de Nanociência e Nanotecnologia- LRNANO da UFRGS, com financiamento do CNPq e FAPERGS. O autor recebeu bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

**Ao meu irmão Roberto,
por me ensinar a ser mais amável,
carinhoso e a sempre buscar
superar meus limites.**

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade de sempre aprender nesta caminhada chamada, vida.

À Professora Dra. Gilsane Lino von Poser, minha orientadora, muito obrigada pela confiança em me receber em seu laboratório, por seu carinho, generosidade, amizade e principalmente pelo incentivo e pela indicação do caminho nas horas difíceis.

Às Professoras Dra. Stela Rates e Dra. Andréia Buffon, pela confiança, apoio e conhecimento transmitido na realização dos ensaios biológicos apresentados neste trabalho.

Ao Professor Dr. Sérgio Bordignon, pela dedicação na coleta e identificação do material vegetal utilizado.

A todos que fazem parte do PPGCF, por seu empenho em manter a excelência no ensino e na formação de novos mestres e doutores;

Aos colegas do Laboratório de Psicofarmacologia Experimental e do Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, especialmente a Eveline Stolz e Aline Beckenkamp;

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia (Lab. 504): Gari, Maikon, Gabriela Meirelles, Gabriela Alerico, Jéssica, Fernando, Aline, Letícia e Bruna, pela amizade, pelos momentos de descontração e principalmente pelo conhecimento passado, transformando este tempo em um momento ímpar de aprendizado e de crescimento pessoal.

À minha amada namorada Letícia, muito obrigado por estar sempre presente e me apoiar nos momentos de incertezas, insucesso. Muito obrigado por seu amor e carinho. Te amo!

E finalmente, aos meus queridos e amados pais Carlos e Marlene e também ao meu irmão Roberto, muito obrigado pelo apoio, pela confiança, pelo carinho, pela preocupação e principalmente pelo incentivo a buscar novos desafios, trilhar novos caminhos e alcançar objetivos cada vez maiores.

RESUMO

Produtos naturais são uma importante fonte de fármacos e muitos vegetais têm sido explorados na busca de substâncias potencialmente ativas. Dentre estas, destacam-se as espécies do gênero *Hypericum*, principalmente *H. perforatum*, utilizado há séculos com diversos fins terapêuticos, principalmente no tratamento de feridas. Mais recentemente, a planta está em evidência devido à comprovada atividade antidepressiva, sendo extensamente utilizada em várias partes do mundo no tratamento de depressões leve a moderada. Ambas as atividades citadas se devem a presença de derivados do floroglucinol. As espécies de *Hypericum* encontradas no sul do Brasil são fonte de floroglucinóis com diversas atividades biológicas descritas. Um dos objetivos deste estudo foi investigar a atividade proliferativa de frações enriquecidas em floroglucinóis de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, visando indicar possível atividade cicatrizante. Outro objetivo foi ampliar o conhecimento fitoquímico acerca das frações lipofílicas de *H. austrobrasiliense* e *H. caprifoliatum*. As partes aéreas, coletadas na época de floração, foram secas, moídas e extraídas com *n*-hexano. Para os ensaios de proliferação celular foi utilizada uma linhagem de queratinócitos (HaCaT) cultivada *in vitro*. Os extratos *n*-hexano das espécies de *Hypericum* foram caracterizados por CLAE, mostrando a presença majoritária de floroglucinóis. Entre as amostras testadas, as frações de *H. carinatum* e *H. polyanthemum* foram as mais promissoras, promovendo uma proliferação 20 a 40% superior àquela obtida com o controle, indicando uma indução no processo de crescimento celular. Os processos cromatográficos realizados com os extratos *n*-hexano de *H. austrobrasiliense* levaram ao isolamento de austrobrasilol A, austrobrasilol B e iso-austrobrasilol B, derivados de floroglucinol com estruturas inéditas, do extrato *n*-hexano de *H. caprifoliatum* foram obtidos hiperbrasilol B e iso-hiperbrasilol B. Os novos derivados de floroglucinol foram submetidos ao teste da placa aquecida e rotarod, onde demonstraram serem efetivos, provocando uma redução na percepção da dor nos mesmos níveis apresentados pelo floroglucinol dimérico uliginosina B, e não provocaram prejuízo motor. Os resultados obtidos reforçam a importância de vegetais deste gênero como fontes potenciais de compostos biologicamente ativos; neste caso,

induzindo a proliferação de células envolvidas na cicatrização e reduzindo a nocicepção, podendo futuramente servir como protótipos de novos agentes cicatrizantes e analgésicos.

Palavras-chave: *Hypericum*, atividade cicatrizante, floroglucínóis diméricos, atividade antinociceptiva.

ABSTRACT

Natural products are an important source of vegetable drugs and have been explored in the search for potentially active substances. Among these, there are the species of the genus *Hypericum*, especially *H. perforatum*, used for centuries for various therapeutic purposes, highlighting the use in the treatment of wounds. More recently, the plant has received high attention due to the antidepressant activity and is widely used all over the world to treat mild to moderate depression. Both activities could be attributed to the presence of phloroglucinol derivatives. The species of *Hypericum* native to southern Brazil are a source of phloroglucinols with diverse biological activities. One goal of this study was to investigate the proliferative activity of phloroglucinol enriched fractions of *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum* and *H. polyanthemum*, aiming to indicate possible wound healing activity. Another objective was to expand the phytochemical knowledge of lipophilic fractions of *H. austrobrasiliense* and *H. caprifoliatum*. The aerial parts collected at flowering time were dried, ground and extracted with *n*-hexane. For cell proliferation assays, keratinocyte cells (HaCaT) were used, grown *in vitro*. The *n*-hexane extract of *Hypericum* species were characterized by HPLC, showing predominant presence of phloroglucinols. Among the tested samples, the fractions of *H. carinatum* and *H. polyanthemum* were the most promising, promoting a proliferation 20 to 40% higher than that obtained with the control, indicating the induction of cell growth. The chromatographic process carried out the *n*-hexane extracts of *H. austrobrasiliense* led to the isolation of austrobrasilol A, austrobrasilol B and iso-austrobrasilol B, new phloroglucinol derivatives, and to the *n*-hexane extract of *H. caprifoliatum* were obtained hyperbrasilol B and isohyperbrasilol B. The new phloroglucinol derivatives were tested in hot plate and rotarod tests, proving to be effective, causing a reduction in pain perception at the same levels provided by dimeric phloroglucinol uliginosin B and did not cause motor impairment. The results emphasize the importance of this kind of plants as potential sources of biologically

active compounds; in this case inducing the proliferation of keratinocyte cells and reducing the nociception, and may eventually serve as prototypes of new wound healing and analgesic agents.

Key-words: *Hypericum*, wound-healing activity, dimeric phloroglucinols, antinociceptive activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura do floroglucinol monomérico hiperforina (1) e da naftodiantrona, hipericina (2) relatadas para *H. perforatum* e do floroglucinol dimérico uliginosina B (3), encontrado somente nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys* deste gênero..... 20
- Figura 2.** Exemplos de metabólitos identificados em espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*. Flavonoides, hiperosídeo (4); benzopiranos, HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano)(5); carifenonas, carifenona A (6); xantonas, 6-desoxijacareubina (7); óleos voláteis, β -cariofileno (8). ... 21
- Figura 3.** CCD das frações obtidas na CCP com a SbFr. 2, eluída com hexano-diclorometano-ácido fórmico (60:40:0.25%) e revelada com anisaldeído-sulfúrico. . 123
- Figura 4.** Estrutura química proposta para os compostos 3 e 4. 124
- Figura 5.** Principais fragmentos obtidos a partir da fragmentação dos compostos 3 e 4 através da ponte metilênica..... 125
- Figura 6.** Rota biossintética proposta para a formação dos derivados de floroglucinol isolados de espécies de *Hypericum* nativas do Sul do Brasil 146
- Figura 7.** Estrutura química de austrobrasilol A (1), austrobrasilol B (2), isoaustróbrasilol B (3) e uliginosina B (4); 147

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	17
2 CAPÍTULO 1	23
2.1 INTRODUÇÃO.....	25
MANUSCRITO I	29
3 CAPÍTULO 2	61
3.1 INTRODUÇÃO.....	63
MANUSCRITO II.....	67
4 RESULTADOS ADICIONAIS.....	119
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	141
6 REFERÊNCIAS	149

1 INTRODUÇÃO GERAL

A natureza vem sendo utilizada ao longo dos tempos pelo ser humano como fonte de produtos que possam suprir suas necessidades básicas. Nessa perspectiva incluem-se também os fármacos, utilizados desde então no tratamento de uma ampla gama de doenças (NEWMANN *et al.*, 2000; BUTLER, 2004; CRAGG & NEWMANN, 2013).

Os produtos naturais são principalmente obtidos de plantas, micro-organismos (como actinomicetos) e mais recentemente de organismos marinhos (CRAGG & NEWMANN, 2013). As plantas desempenham um papel importante no processo de obtenção de produtos naturais com efeitos farmacológicos e desta busca surgiram importantes fármacos como ácido acetilsalicílico, morfina, digitoxina e quinina (BUTLER, 2004).

A descoberta de uma substância com potencial terapêutico é um processo complexo que envolve diversas áreas do conhecimento, como química, farmacologia e ciências clínicas. Estes esforços vem beneficiando a população mundial ao longo dos últimos 100 anos (DREWS, 2000; BUTLER, 2004). Como prova disso, as melhorias das condições sanitárias, avanços médicos e uma gama mais ampla de fármacos contribuíram para que a expectativa de vida no Brasil passasse de 43 para 74 anos entre os anos de 1950 a 2012 (IBGE, 2000; WHO, 2014).

Mesmo com aumento na busca de fármacos puramente através de técnicas sintéticas, os produtos naturais continuam sendo uma importante fonte de novos fármacos e padrões moleculares para a obtenção dos mesmos. Em um período de 30 anos (1981-2010), 1130 novas entidades químicas foram aprovadas para os mais diversos fins terapêuticos e, interessante, 297 (26,3%) delas foram derivadas de produtos naturais, tanto diretamente quanto através de semissíntese. Dentre as novas opções terapêuticas, os produtos naturais destacam-se no tratamento de neoplasias, infecções bacterianas, processos inflamatórios e hipertensão (NEWMANN & CRAGG, 2012).

Na busca por novas entidades químicas que possam ter importância terapêutica alguns táxons se destacam, como por exemplo, o gênero *Hypericum*, representado por

sua espécie mais estudada *H. perforatum*, empregada na medicina tradicional como agente cicatrizante (WÖLFLE *et al.*, 2014) e atualmente utilizada como antidepressivo em casos leves ou moderados (KASPER *et al.*, 2010; SARRIS, 2013).

Contudo, o gênero *Hypericum* (Hypericaceae), além de *H. perforatum*, compreende aproximadamente 500 espécies, subdivididas em 36 seções taxonômicas, distribuindo-se por todos os continentes do mundo com exceção da Antártica. No sul do Brasil ocorrem espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, sendo que estas possuem o maior número de representantes do gênero (CROCKETT & ROBSON, 2011; ROBSON, 2012).

Tratando-se da composição química das espécies destas seções, nota-se uma interessante diferença com a espécie *H. perforatum* que produz derivados monoméricos de floroglucinol (hiperforina; *ad*-hiperforina) e naftodiantronas (hipericina) (AVATO, 2005; CROCKETT & ROBSON, 2011). Entretanto, espécies destas seções destacam-se por serem fontes de derivados diméricos de floroglucinol (31 estruturas relatadas até o momento para o gênero *Hypericum*) (**Figura 1**) (CCANA-CCAPATINTA *et al.*, 2013) e por não ter sido detectada a produção de naftodiantronas (FERRAZ *et al.*, 2002; CROCKETT & ROBSON, 2011), as últimas provavelmente pela ausência de glândulas escuras, estruturas celulares responsáveis por sua produção e acúmulo (ZOBAYED *et al.*, 2006).

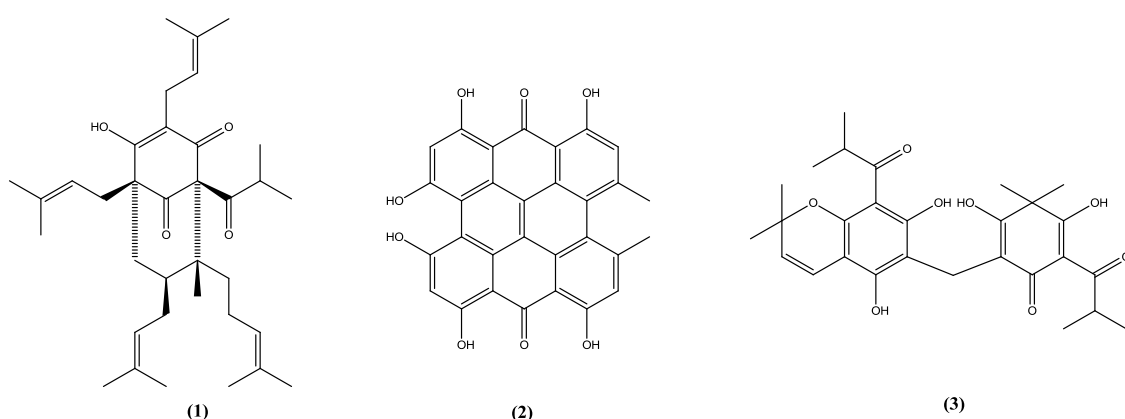


Figura 1. Estrutura do floroglucinol monomérico hiperforina (1) e da naftodiantrona, hipericina (2) relatadas para *H. perforatum* e do floroglucinol dimérico uliginosina B (3), encontrado somente nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys* deste gênero.

Além dos derivados diméricos de floroglucinol, são relatados outros metabólitos secundários para espécies do gênero. Flavonoides, como hiperosídeo (**4**) (NUNES *et al.*, 2010; BARROS *et al.*, 2013); benzopiranos, como HP1 (**5**) (6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano); HP2 (7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano) e HP3 (5-hidroxi-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano) (FERRAZ *et al.*, 2001); benzofenonas, como carifenonas A (**6**) e B (BERNARDI *et al.*, 2005), xantonas (**7**) (ROCHA *et al.*, 1994) e óleos voláteis (**8**) (FERRAZ *et al.*, 2005) (**Figura 2**).

Para estes compostos isolados, diversas atividades biológicas são descritas como antidepressiva, antinociceptiva, antimicrobiana, antiproliferativa e antioxidante (von POSER *et al.*, 2006).

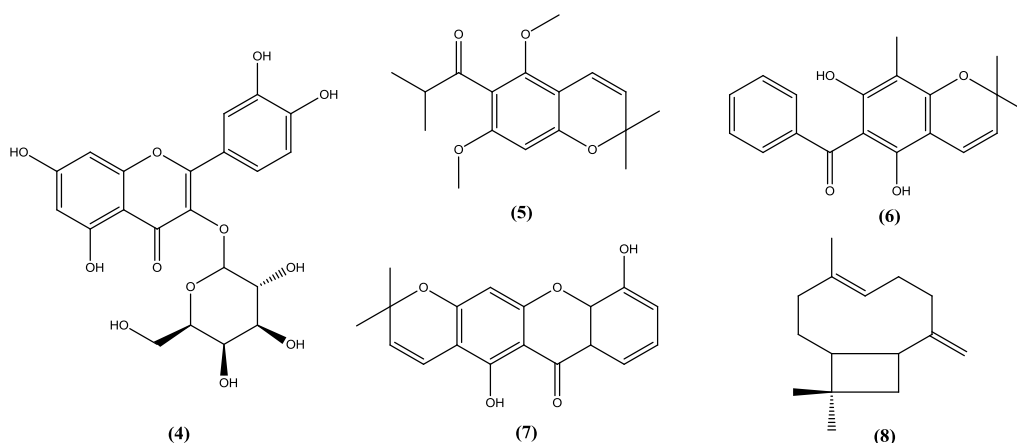


Figura 2. Exemplos de metabólitos identificados em espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*. Flavonoides, hiperosídeo (**4**); benzopiranos, HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano)(**5**); carifenonas, carifenona A (**6**); xantonas, 6-desoxijacareubina (**7**); óleos voláteis, β -cariofileno (**8**).

Devido à importância desse gênero de plantas como fonte de novas moléculas de interesse farmacêutico, este trabalho tem como objetivo geral estudar o potencial poder cicatrizante de extratos lipofílicos de algumas espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Além disso, isolar derivados diméricos de floroglucinol, com o intuito de reforçar o valor do gênero como fonte destas estruturas, importantes por suas atividades do tipo antidepressiva e antinociceptiva.

Desta forma o trabalho está dividido em dois capítulos:

O **Capítulo 1** apresenta a caracterização química das frações lipofílicas de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* e os efeitos das mesmas na proliferação de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT).

O **Capítulo 2** relata o isolamento e elucidação estrutural através de técnicas espectroscópicas (UV-Vis; 1D- e 2D-RMN) e espectrométricas (MS) de três derivados diméricos de floroglucinol inéditos isolados do extrato lipofílico das flores de *H. austrobrasiliense* e determinação da sua atividade antinociceptiva através do teste da placa aquecida. Este capítulo ainda apresenta alguns resultados adicionais, que tratam do isolamento e elucidação estrutural de derivados diméricos de floroglucinol isolados do extrato *n*-hexano das flores de *H. caprifoliatum*.

2 CAPÍTULO 1

Caracterização da fração enriquecida em floroglucínóis de espécies brasileiras de *Hypericum* e avaliação da proliferação em queratinócitos humanos imortalizados.

2.1 INTRODUÇÃO

A função primária da pele é servir como uma barreira protetora contra o ambiente. A perda de largas porções dessa resulta em lesões ou doenças que podem levar a uma deficiência grave ou até mesmo a morte (SINGER & CLARK, 1999). Quando ocorre uma lesão, os tecidos humanos são capazes de cicatrizar por regeneração ou reparo. A regeneração é a substituição dos tecidos lesados pelo mesmo tipo celular e o reparo é quando a substituição ocorre com tecido conectivo o qual forma a cicatriz (FLANAGAN, 2000).

A cicatrização cutânea é um processo fisiológico dinâmico e complexo que em termos gerais pode ser dividido em três fases complementares: inflamação, formação do tecido de granulação e remodelamento. Neste processo, muitos tipos celulares são requeridos como os leucócitos que participam do processo de inflamação e limpeza da área ferida e os queratinócitos e fibroblastos que são responsáveis pela reepitelização. As plaquetas irão participar deste processo facilitando a homeostase sanguínea (SINGER & CLARK, 1999; JONES *et al.*, 2004).

A fase inflamatória inicia-se logo após a lesão, levando ao tamponamento dos vasos sanguíneos lesados pela deposição das plaquetas, que por sua vez, irão formar uma matriz que alicerçará a migração de células responsáveis pelo processo de reparo. Além disso, liberarão quimiocinas necessárias para a migração principalmente de neutrófilos, os quais tem a função básica de eliminar possíveis micro-organismos por fagocitose (WILGUS *et al.*, 2013).

Monócitos presentes na circulação chegam ao local 2-3 dias após a lesão e se transformam em macrófagos, desempenhando um papel crítico no processo de reparo. Além de auxiliar os neutrófilos no processo de fagocitose, os macrófagos formam um elo entre o sistema imune adaptativo e o inato e produzem fatores de crescimento (SINDRILARU 2013; ZIELINS *et al.*, 2014).

Após a liberação dos fatores de crescimento pelos macrófagos, a migração e ativação dos fibroblastos são intensificadas. Os fibroblastos irão começar a produzir

colágeno e dessa forma a matriz primeiramente formada pelas plaquetas será substituída por um tecido conjuntivo mais forte e elástico. Em paralelo a isso a ferida é novamente vascularizada. Dessa forma, no final do processo de reepitelização a ferida estará completamente preenchida com tecido de granulação, os vasos sanguíneos estarão formados e lentamente o tecido de granulação começa a apresentar maior quantidade de fibras colágenas, gerando a aparência de cicatriz (BALBINO *et al.*, 2005; ENOCH *et al.*, 2005).

Na última fase do processo observa-se a apoptose de fibroblastos e células endoteliais e o início do processo de maturação e modelagem da matriz celular com a digestão, síntese e reorientação das fibras de colágeno. Este é um processo longo, podendo durar meses ou até anos (BALBINO *et al.*, 2005; WYNN, 2012). Os produtos naturais foram a primeira forma de combate as doenças que atacavam os seres humanos. Desta mesma forma encontraram-se compostos que eram utilizados no tratamento de feridas e queimaduras (LINDBLAD, 2008).

Uma das plantas mais relatadas para esse fim é *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae). A maceração de suas partes aéreas floridas com azeite de oliva fornece um produto avermelhado chamado de *Hyperici oleum*. Apesar da coloração, a preparação não apresenta a naftodiantrona hipericina e sim, contém o floroglucinol hiperforina, ao qual é creditada sua atividade cicatrizante (MAISENBACHER & KOVAR, 1992; ISACCHI *et al.*, 2007). Este óleo é utilizado desde a antiguidade para o tratamento externo de feridas e queimaduras, pela população de vários países, principalmente na Europa (YESILADA *et al.*, 1993, 1995; ÖZTURK *et al.*, 2007; SADDIQA *et al.*, 2010; ÖZKAN & MAT, 2013; ZLATKOVIC *et al.*, 2014).

Hypericum perforatum é a mais conhecida espécie desta família de plantas, tanto pelas suas propriedades químicas quanto farmacológicas. Entretanto, a atividade de cicatrização de feridas é menos estudada quando comparada a antidepressiva e outras doenças do sistema nervoso central (ÖZTURK *et al.*, 2007; WÖLFLE *et al.*, 2014). Diversos estudos realizados com esta espécie demonstraram sua efetividade na aceleração do processo de cicatrização, em culturas celulares (fibroblastos) e em modelos animais, reduzindo o tempo de reepitelização em 40% (ÖZTURK *et al.*, 2007; PRISĂCARU *et al.*, 2013). Em ensaios clínicos mostrou-se efetivo em reduzir a

extensão das lesões, além disso, os pacientes relataram diminuição da dor e prurido (LAVAGNA *et al.*, 2001; SAMADI *et al.*, 2010).

Os relatos não se restringem somente a *H. perforatum*, mas outras como *H. patulum*, *H. hookerianum* e *H. mysorensis* também demonstraram significativos efeitos no processo de cicatrização com testes em animais (MUKHERJEE *et al.*, 2000; MUKHERJEE & SURESH, 2000a; MUKHERJEE & SURESH, 2000b).

Das espécies de *Hypericum* nativas do Sul do Brasil, *H. connatum* é utilizado popularmente no tratamento de aftas e feridas na boca (MENTZ *et al.*, 1997), além disso, outras espécies demonstraram atividades como antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória (DALL'AGNOL *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2013; BERNARDI *et al.*, 2005). Estas atividades são particularmente importantes no processo de cicatrização, pois bactérias e fungos podem infectar a ferida dificultando e retardando a cura. Além disso, as atividades antioxidantes e anti-inflamatórias são importantes na cura de úlceras causadas pelo diabetes (JONES *et al.*, 2004; SADIQQE *et al.*, 2010; KASUYA & TOKURA, 2014).

Devido à importância de se buscar agentes que possam promover uma cicatrização mais rápida e eficiente é interessante pesquisar o efeito que as frações lipofílicas de *Hypericum* nativas do sul do Brasil produzem em queratinócitos humanos, pois estas frações são ricas em derivados de floroglucinol. Os resultados desta busca estão descritos e discutidos no **Manuscrito I**.

MANUSCRITO I

Characterization of phloroglucinol enriched fractions of Brazilian *Hypericum* species and evaluation of their effect on human keratinocyte proliferation

Manuscrito em preparação

Characterization of Phloroglucinol Enriched Fractions of Brazilian *Hypericum* Species and Evaluation of Their Effect on Human Keratinocytes Proliferation

Henrique Bridi^a, Aline Beckenkamp^a, Gari Vidal Ccana Ccapatinta^a, Sérgio Augusto de Loreto Bordignon^b, Andréia Buffon^a, Gilsane Lino von Poser^{a,*}

^a*Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b*Programa de Pós Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, UNILASALLE, Av. Victor Barreto, 2288, Canoas, 92010000, Brazil.*

*Author for correspondence: Gilsane Lino von Poser

Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga 2752, Bairro Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55 51 33085529

e-mail:gilsane@farmacia.ufrgs.br

Abstract

In this study a phytochemical and biological investigation on five South Brazilian *Hypericum* species (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum* and *H. polyanthemum*) was carried out. The phloroglucinol enriched fractions (PEF) of the flowering aerial parts were analyzed by HPLC for the content of the dimeric acylphloroglucinols uliginosin A (1), japonicin A (2), uliginosin B (3), hyperbrasilol B (4) and to the monomeric phloroglucinols 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP1) (5), 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP2) (6) and 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP3) (7). After chemical characterization, the PEF were assayed for cell proliferation on human keratinocyte cell line by MTT assay. The *H. carinatum* and *H. polyanthemum* PEF demonstrated better results with an increase in cell proliferation up to about 40%. The cell counting and Ki-67 assay with *H. carinatum* PEF confirmed the MTT results, indicating its possible use as a healing agent.

Keywords: *Hypericum* species; wound healing; HaCaT cells; phloroglucinol derivatives.

1. Introduction

Olive oil solutions of some *Hypericum* species, known as *Hyperici oleum*, have been used since ancient times for the treatment of wounds and burns in the folk medicine of several countries, especially in Europe [1-6]. *Hyperici oleum* is traditionally prepared by macerating the flowering parts of *Hypericum perforatum* in olive oil and exposing the macerating to the sunlight for forty days and applied externally as home-remedy for recovery of wounds and burns [1,2,7].

Hypericum perforatum L. (Hypericaceae) is the most known species of this family, both for its chemical composition and pharmacological properties. Nevertheless, the wound healing effect is lesser investigated when compared to antidepressant and other central nervous system activities [3,7]. Chemically, *Hyperici oleum* do not presents neither hypericin nor flavonoids in considerable amounts but presents substantial concentrations of the polyprenylated acylphloroglucinol derivative hyperforin which is considered the responsible for the effectiveness of *Hyperici oleum* [8,9].

The wound healing activity of *H. perforatum* and *Hyperici oleum* seems to be due to the increase in the stimulation of fibroblast migration, collagen production and reduction of inflammation, which are important in wound repair contributing to the closure of the damaged area [3, 10, 11]. Recently, a mixture of oily and ethanolic (1:1) extract of *H. perforatum* demonstrated to be efficient for wound healing, reducing the time of reepithelialization of 21 days to 12 days [12]. Additionally, methanol extracts from *H. patulum* and *H. hookerianum* also demonstrated activity *in vivo* with effects comparable to that of the positive control drug, nitrofurazone ointment (0.2% w/w) [13,14].

Research in humans also supports the effectiveness *H. perforatum* and *Hyperici oleum* and, from this perspective, some clinical trials were performed. The results demonstrated an important effect on cesarean wounds and plaque type psoriasis with faster heal and reduction of pain and pruritus [15,16,17].

Among the Southern Brazilian *Hypericum* species, *H. connatum* is traditionally used for mouth sores [18], and other species as *H. caprifoliatum* and *H. polyanthemum* present antibacterial activity [19] while *H. carinatum* and *H. myrianthum* demonstrated

antifungal effect [20,21]. These activities are especially important in the wound healing process since bacteria and fungi can infect the wound and reduce the healing speed [4,22].

Hypericum species could constitute new drugs for wound healing. Therefore, the aim of this study was to evaluate the activity of phloroglucinol enriched fractions of five South Brazilian *Hypericum* species in the proliferation of human keratinocytes, indicative of wound healing activity, and characterize their phloroglucinol content by HPLC.

2. Materials and Methods

2.1. General

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), trypsin/EDTA solution, penicillin/streptomycin, fungizone and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were supplied by Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Ki-67 antibody (sc-23900 PE) was supplied by Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Reagent grade acetone and *n*-hexane (F. Maia, São Paulo, Brazil) were regularly used in the preparation of phloroglucinol enriched fractions. HPLC grade methanol, acetonitrile (Merck, Darmstadt, Germany), formic acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and distilled water purified by a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) were used in HPLC to characterization procedures.

2.2. Plant material

The aerial parts of *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht., *H. carinatum* Griseb., *H. connatum* Lam., *H. myrianthum* Cham. & Schlecht. and *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt were collected in the Rio Grande do Sul state, south Brazil, between September and November, 2012. The plants were identified by Dr. Sérgio Bordignon (UNILASSALE, RS, Brazil) and voucher specimens were deposited in the herbarium of

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (Bordignon *et al.* 2287; Bordignon & Ferraz 2309; Bordignon *et al.* 3317; Bordignon *et al.* 3059 and Bordignon *et al.* 3118, respectively). The plant collection was authorized by IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis) (no. 003/2008; Protocol 02000.001717/2008-60). *Hypericum perforatum* L. used in this study was provided by the Granadiet Company (lot. n. 2524, Granada, Spain) and consists in aerial parts dried and powdered.

2.3. Preparation of phloroglucinol enriched fractions (PEF)

The air dried and powdered aerial parts of the *Hypericum* species were subjected to extraction with *n*-hexane over 24 h (plant-solvent ratio 1:5) until exhaustion. The *n*-hexane extracts were evaporated to dryness under reduced pressure and then treated with cold acetone to obtain the phloroglucinol enriched fractions (PEF) and an insoluble fatty residue. The PEF were stored in the dark and under refrigeration (-20 °C) until biological evaluation and HPLC analysis.

2.4. HPLC analysis

Uliginosin A (1), japonicin A (2) uliginosin B (3), hyperbrasilol B (4), 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP1) (5), 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP2) (6) and 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP3) (7) (**Fig. 1**) were isolated from *Hypericum* species as described elsewhere [23,24,25]. The identity and purity of compounds were confirmed by ¹H and ¹³C NMR (Supplementary data). The PEF were dissolved in methanol (HPLC grade), filtered (0.22 µm pore size) and analyzed by HPLC using a Waters Nova-Pack column 60Å C18 (4 µm, 150 mm x 3.9 mm) on a Shimadzu equipment (SYNC[®], São Paulo, SP, Brazil).

To analyze the dimeric acylphloroglucinols, a mobile phase gradient system consisting of acetonitrile-methanol (8:2 v/v) (solvent B) and water (solvent A), both acidulated with 0.1% of formic acid at 220 and 350 nm was used. The monomeric phloroglucinols analysis was performed with an isocratic system of acetonitrile-water

(6:4 v/v) at 270 nm. Both analyses were performed at 25 °C, at a flow rate 1 mL.min⁻¹ and a volume of 20 µL and three injections were performed for each sample [26,27].

Constituents of PEF were identified by comparison with retention times of reference compounds. The retention times obtained for the dimeric acylphloroglucinols were 2.9; 16.77; 18.70 and 20.35 minutes for **1**, **2**, **3** and **4**, respectively and to monomeric phloroglucinols were 9.1; 12.9 and 21.6 minutes for **5**, **6** and **7**, respectively.

2.5. Evaluation of cell proliferation

2.5.1. Cell culture

HaCaT, a spontaneously immortalized human keratinocytes cell line, was kindly donated by Dr. Luisa L. Villa (ICESP, School of Medicine, University of São Paulo) and Dr. Silvy S. Maria-Engler (Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo). The cells were maintained in a culture flask in high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin and fungizone at 37 °C, in 5% CO₂/95% air.

2.5.2. Preparation of PEF for proliferation assay

The PEF previously produced were utilized in the proliferation assay. A stock solution was prepared by dissolving the PEF in a mixture of 50% sterile distilled water and 50% DMSO. Following test samples (1, 5, 10, 15 and 20 µg/mL) were obtained by dilution with DMEM. The final DMSO concentration was lower than 0.5% (v/v).

2.5.3. Cell viability assay

The determination of HaCaT cell growth was performed using the MTT assay. Cells were seeded in 96-well plates (3.5 x10³ cells/well) grown to semi-confluence and treated with PEF at different concentrations.

After 24 hours of incubation, the treatment was withdrawn, 0.5 mg/mL MTT solution was added to each well, and plates were incubated for 3 h at 37 °C. Formazan crystals formed by tetrazolium cleavage were dissolved with DMSO and quantified at 570 and 630 nm using a microplate reader (Spectramax M2e, SoftMax Pro Software Interface 5.4.1, USA). Three independent experiments were performed in quintuplicate for each test. Results were expressed as percentage of cell proliferation, where cells treated with only DMEM/10% FBS were considered as 100% of cell viability.

2.5.4. Cell counting

Cell proliferation was confirmed by counting of viable cells with Trypan Blue dye exclusion. Suspensions of cells were seeded in 96-well plates (3.5×10^3 cells/well), grown to semi-confluence and treated with *H. carinatum* PEF at concentrations of 5, 10 and 15 µg/mL. After 24 hours of incubation, the treatments were removed, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and 0.25% trypsin/EDTA solution was added to detach the cells. DMEM/10% FBS was added, the suspension of cells were diluted with Trypan Blue (1:1 v/v) to selectively stain dead cells, and viable cells (trypan blue negative) were counted immediately by Neubauer chamber in an optical microscope (Olympus, CX21 model, Tokyo, Japan). The results were expressed compared to control (DMEM/10% FBS) that represents 100% of viability.

2.5.5. Ki-67 assay

Cells were seeded in 24-well plates (1.5×10^4 cells/well) and grow to semi-confluence. The cells were treated with *H. carinatum* PEF at concentrations of 5, 10 and 15 µg/mL. Control cells were treated with only DMEM/10% FBS. After 24 hours of incubation, the treatment was withdrawn; the cells were trypsinized and centrifuged to obtain a pellet of cells. Cells were fixed with ethanol 70%, permeabilized with a 1% SFB and 0.09% NaN₃, PBS solution and 10 µL of Ki-67 antibody was added to each tube. After 20 minutes of incubation at room temperature, protected from light, the cells were centrifuged and resuspended in PBS. In parallel, a sample was processed in the same way except for the addition of the Ki-67 antibody (unlabelled control). The

samples were analyzed using a FACSVerser flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

2.6. Statistical analysis

The data were evaluated using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post-hoc* test. All results were expressed in mean \pm SD of three experiments in quintuplicate. The analyses were performed using GraphPad Prism 5 software. Differences were considered statistically significant if $p < 0.05$.

3. Results and discussion

In the present study, the PEF of five *Hypericum* species, natives to south Brazil, were evaluated for the dimeric and monomeric phloroglucinols derivatives composition, and influence on the HaCaT cells proliferation. In order to determine they effect, HaCaT cells were treated with five different concentrations 1, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{g/mL}$ and after an incubation time of 24 hours the cell viability was assessed by MTT assay. Considering that *H. perforatum* is utilized in folk medicines to treat wounds, burns and several studies confirm this activity on *in vitro* and *in vivo* assays [3, 5-7], the PEF of this species was included as a positive control.

The MTT results demonstrated that all extracts, except *H. caprifoliatum*, led to an increase in cell proliferation with a similar pattern, characterized by an increase at lower concentrations followed by a decrease in cell proliferation when treated with higher concentrations (**Table 1**). Furthermore, *H. caprifoliatum* and *H. myrianthum* demonstrated a reduction in the cell viability, indicating a cytotoxic effect at the highest concentrations tested. The PEF of *H. carinatum* at 15 $\mu\text{g/mL}$ showed an important increase in cell proliferation, around 40%. Other studies carried out with *H. perforatum* extracts in fibroblasts cell lines demonstrated that wound healing activity occurs probably by increase in the mitotic cells and in the collagen granules. At higher concentrations cytotoxic effects also were observed [3, 10].

Interestingly, the antiproliferative effect was previously demonstrated by the *n*-hexane extracts of six *Hypericum* species in tumor cells and the most active were *H.*

caprifoliatum and *H. myrianthum* with IC₅₀ between 4-16 µg/mL [28]. In the present study these species showed cytotoxic signals at concentrations above 15 µg/mL, suggesting that PEF is more aggressive to tumor than normal cells.

The increase in keratinocytes (HaCaT) proliferation is an important function in the wound healing process, mainly in the reepithelialization and granulation tissue formation [29]. Therefore, an increase in cells proliferation can be indicative of faster wound healing.

When comparing the effect of South Brazilian *Hypericum* species with *H. perforatum* it was observed that *H. carinatum* had a greater effect on cell proliferation (**Table 1**). So, in order to confirm the results obtained for *H. carinatum* by the MTT assay, the viable cells were counted using the Trypan Blue dye method. In this test, the cells were treated with PEF at 5, 10 and 15 µg/mL and the results confirm those obtained in the MTT method (**Fig. 2**).

Also, in order to ensure that this increase in the cell number in presence of *H. carinatum* PEF is due to an increase in cell proliferation, the Ki-67 analysis was carried out. The Ki-67 has been used as a marker for cell proliferation, being a nuclear protein that is expressed in proliferating cells. A significant increase in the Ki-67 expression was observed in cells treated with *H. carinatum* at 10 and 15 µg/mL (**Fig. 3**).

HPLC analysis was performed to determine the content of major phloroglucinols derivatives present in the PEF of native *Hypericum* species and the results are shown in **Table 2**. The dimeric acylphloroglucinols that were detected in most species was uliginosin B at concentrations of 0.57 - 2.84% (mg/100 mg PEF) and japonicin A at concentrations of 0.71 - 5.40%. The three monomeric phloroglucinols were detected only in *H. polyanthemum*. The *H. myrianthum* PEF had the highest overall content of dimeric phloroglucinol and was the most cytotoxic species, demonstrating that these phloroglucinols derivatives, in elevated concentrations, can be aggressive to cultured cells (in this case keratinocytes), as demonstrated previously in cancer cell lines [28].

The phloroglucinols derivatives analysed in this study possess other important activities that could contribute to accelerate the wound healing process. Japonicin A (**2**), uliginosin B (**3**) and hyperbrasilol B (**4**) have demonstrated antimicrobial activity [30, 31]. The active PEF of *H. carinatum*, besides the phloroglucinol derivatives, contains

the benzophenones carifenone A and carifenone B, compounds with antioxidant activity [32].

4. Conclusions

Treatments that accelerate the wound healing process are important to improve the quality of life of affected people, mainly in chronic cases. In this work an increase in the proliferation of the keratinocytes cells when treated with *Hypericum* PEF, was demonstrated. Among the species tested, *H. carinatum* and *H. polyanthemum* demonstrated interesting results in cell proliferation, greater or similar than those obtained with the positive control *H. perforatum*. These results extend the knowledgment about the use of *Hypericum* species to treat wounds and burns and suggest that the phloroglucinol derivatives can be used in future research to find new therapies to aid in wound healing.

Declaration of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to Gabriela C. Alerico for technical assistance in the bioassays, to Dr. Luisa L. Villa and Dr. Silvy S. Maria-Engler for donating the HaCaT cells and to the Brazilian agencies CAPES, CNPq, FAPERGS for the financial support.

Appendix A. Supplementary data

NMR spectra of compounds 1-7.

References

- [1] Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Goto K, Ikeshiro Y. Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. *J Ethnopharmacol* 1993; 39:31-8.
- [2] Yeşilada E, Honda G, Sezik E, Tabata M, Fujita T, Tanaka T, Takeda Y, Takaishi Y. Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J Ethnopharmacol* 1995; 46:133-52.
- [3] Öztürk N, Korkmaz S, Öztürk Y. Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 2007; 111:33-9.
- [4] Saddiqe Z, Naeem I, Maimoona, A. A review of antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. *J Ethnopharmacol* 2010; 131:511-21.
- [5] Zlatković BK, Bogosavljević SS, Radivojević AR, Pavlović MA. Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. *J Ethnopharmacol* 2014; 151:704-13.
- [6] Özkan EE, Mat A. An overview on *Hypericum* species of Turkey. *J Pharmacognosy Phytother* 2013; 5:38-46.
- [7] Wölflle U, Seelinger G, Schempp CM. Topical application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med* 2014; 80:109-20.
- [8] Masembacher P, Kovar KA. Analysis and stability of *Hyperici oleum*. *Planta Med* 1992; 58:351-4.
- [9] Isachii B, Bergonzi MC, Carnevali F, van der Esch SA, Vincieri FF, Bilia AR. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. *J Pharm Biomed Anal* 2007; 45:756-61.
- [10] Dikmen M, Öztürk Y, Sagratini G, Ricciutelli M, Vittori S, Maggi F. Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. *Phytoter Res* 2011; 25:208-14.

- [11] Suntar I, Akkol EK, Yilmazer D, Baykal T, Kırmızıbekmez H, Yeşilada E. Investigations on the *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. J Ethnopharmacol 2010; 127:468-77.
- [12] Prisăcaru AI, Andrițoiu CV, Andriescu C, Hăvârneanu EC, Popa M, Motoc AGM, Sava A. Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. Rom J Morphol Embryol 2013; 54:1053-9.
- [13] Mukherjee PK, Verpoorte R, Suresh B. Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. J Ethnopharmacol 2000; 70:315-21.
- [14] Mukherjee PK, Suresh B. The evaluation of wound-healing potential of *Hypericum hookerianum* leaf and stem extracts. J Altern Complement Med 2000; 6:61-9.
- [15] Lavagna SM, Secci D, Chimenti P, Bonsignore L, Ottaviani A, Bizzarri B. Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. Il Farmaco 2001; 56:451-3.
- [16] Samadi S, Khadivzadeh T, Emami A, Moosavi NS, Tafaghodi M, Behnam HR. The effect of *Hypericum perforatum* on the wound healing and scar of cesarean. J Altern Complement Med 2010; 16:113-7.
- [17] Najafizadeh P, Hashemian F, Mansouri P, Farshi S, Surmaghi MS, Chalangari R. The evaluation of the clinical effect of topical St John's wort (*Hypericum perforatum* L.) in plaque type psoriasis vulgaris: A pilot study. Australas J Dermatol 2012; 53:131-5.
- [18] Mentz LA, Lutzemberguer LC, Schenkel EP. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). Caderno de Farmácia 1997; 13:25-48.
- [19] Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, Sarmiento L, Lamb L, Hass M, von Poser G, Schapoval EES. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. Phytomedicine 2003;10:511-16.
- [20] Fenner R, Sortino M, Kuze Rates SM, Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nör C, von Poser G, Schapoval E, Zacchino S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. Phytomedicine 2005; 12:236-40.

- [21] Barros FMC, Pippi B, Dresch RR, Dauber B, Luciano SC, Apel MA, Fuentefria AM, von Poser GL. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. *Ind Crop Prod* 2013; 44:294-9.
- [22] Jones SG, Edwards R, Thomas DW. Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immune-regulation of wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2004; 3:201-8.
- [23] Ferraz ABF, Bordignon SAL, Staats C, Schripsema J, von Poser GL. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry* 2001; 57:1227-30.
- [24] Nör C, Albring D, Ferraz ABF, Schripsema J, Pires V, Sonnet P, Guillaume D, von Poser GL. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. *Biochem Syst Ecol* 2004; 32:517-9.
- [25] Ccana-Ccapatinta GV, Barros FMC, Bridi H, von Poser GL. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from *Brathys* and *Trigynobrathys* sections. *Phytochem Rev* 2015; 14:25-50.
- [26] Nunes JM, Pinto PS, Bordignon SAL, Rech SB, von Poser GL. Phenolic compounds in *Hypericum* species from the *Trigynobrathys* section. *Biochem Syst and Ecol* 2004; 38:224-8.
- [27] Ccana-Ccapatinta GV, Flores CS, Soria EJU, Pari JC, Sánchez WG, Crockett SL, von Poser GL, Jimenez CC. Assessing the phytochemical profiles and antidepressant-like activity of four Peruvian *Hypericum* species using the murine swimming test. *Phytochem Lett* 2014; 10:107-12.
- [28] Ferraz A, Faria DH, Benneti MN, da Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques A, von Poser GL. Screening for antiproliferative activity of six Southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine* 2005; 12:112-5.
- [29] Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med* 1999; 341:738-46.
- [30] Rocha L, Marston A, Potterat O, Kaplan MAC, Hostettmann K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. *Phytochemistry* 1996; 42:185-8.

[31] França HS, Kuster RM, Rito PN, de Oliveira AP, Teixeira LA, Rocha L. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choisy. Quim Nova 2009; 32:1103-6.

[32] Bernardi APM, Ferraz ABF, Albring DV, Borignon SAL, Schripsema J, Bridi R, Dutra-Filho CS, Henriques AT, von Poser GL. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. J Nat Prod 2005; 68:784-6.

Table 1. Data of cell proliferation measured by MTT assay on HaCaT cells (concentrations in $\mu\text{g/mL}$)

	Control	DMSO	1	5	10	15	20
<i>H. caprifoliatum</i>	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.4	103.0 \pm 3.3	96.2 \pm 3.3	99.8 \pm 0.8	88.5 \pm 7.4 [#]	83.2 \pm 3.1 [#]
<i>H. carinatum</i>	100.0 \pm 0.0	99.8 \pm 0.5	98.4 \pm 3.0	99.6 \pm 2.4	129.4 \pm 5.2 ^{***α}	138.7 \pm 5.4 ^{***α}	119.0 \pm 3.0 ^{***}
<i>H. connatum</i>	100.0 \pm 0.0	99.6 \pm 0.6	114.9 \pm 6.9 [*]	117.8 \pm 1.1 ^{**}	117.2 \pm 6.3 ^{**}	112.0 \pm 5.1 [*]	105.7 \pm 3.6
<i>H. myrianthum</i>	100.0 \pm 0.0	101.3 \pm 1.4	119.4 \pm 5.0 ^{**}	116.7 \pm 4.1 [*]	106.4 \pm 6.4	90.1 \pm 7.9	70.7 \pm 6.6 [#]
<i>H. polyanthemum</i>	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.8	120.6 \pm 6.6 ^{***}	120.5 \pm 5.8 ^{***}	118.0 \pm 3.7 ^{**}	119.4 \pm 5.7 ^{**}	114.0 \pm 3.8 [*]
<i>H. perforatum</i>	100.0 \pm 0.0	100.0 \pm 0.3	117.3 \pm 5.7 ^{***}	120.0 \pm 7.0 ^{***}	116.5 \pm 3.4 ^{**}	112.7 \pm 1.4 [*]	114.1 \pm 0.9 ^{**}

Data were represented in mean \pm SD (n=5, three independent tests). Significantly different values were detected by one-way ANOVA followed by Tukey's; * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, indicate an increase in the cell proliferation, compared to control group; α p<0.05, indicate an increase in the cell proliferation, compared to *H. perforatum* at same concentration; # p<0.05, indicate an reduction in the cell viability, compared to control group.

Table 2. Contents of phloroglucinol derivatives in PEF of *Hypericum* species.

<i>Hypericum</i> species	Content (%)*						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>H. caprifoliatum</i>	0.37 ± 0.02	0.71 ± 0.03	0.90 ± 0.08	1.14 ± 0.02	n.d.	n.d.	n.d.
<i>H. carinatum</i>	n.d.	1.14 ± 0.02	2.71 ± 0.03	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>H. connatum</i>	n.d.	n.d.	0.57 ± 0.0003	0.48 ± 0.01	n.d.	n.d.	n.d.
<i>H. myrianthum</i>	3.27 ± 0.12	5.40 ± 0.13	2.84 ± 0.05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>H. polyanthemum</i>	n.d.	n.d.	0.53 ± .0.06	n.d.	16.60 ± 0.015	19.30 ± 0.02	14.96 ± 0.005

*mg/100mg of phloroglucinol enriched fraction (PEF); n.d.- not detected; **1-** uliginosin A; **2-** japonicin A; **3-** uliginosin B; **4-** hyperbrasilol B; **5-** HP1; **6-** HP2; **7-** HP3.

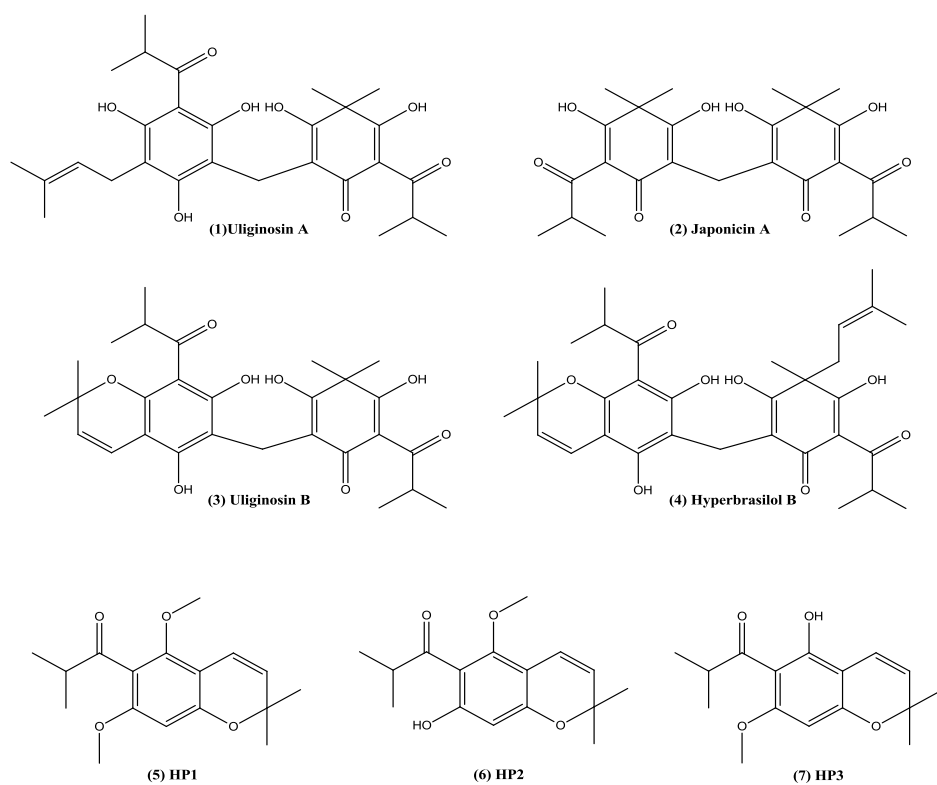


Figure 1. Dimeric acylphloroglucinols (**1-4**) and monomeric phloroglucinols (**5-7**) investigated in the PEF of *Hypericum* species.

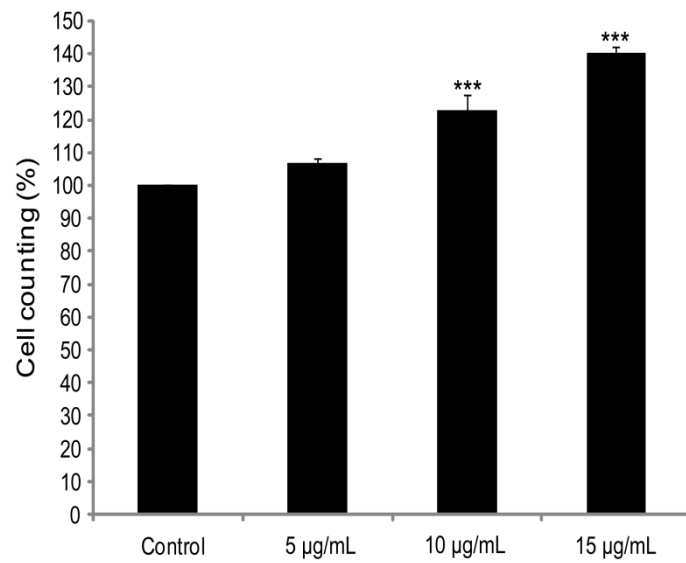


Fig. 2. Cellular viability evaluated by cell counting after 24 h of treatment of HaCaT cells with *H. carinatum* PEF at concentrations of 5, 10 and 15 µg/mL. Results are mean values \pm SD (n = 3). Significantly different values were detected by one-way ANOVA followed by Tukey's test; *** p<0.001, indicates an increase in the cell counting compared to control group (DMEM).

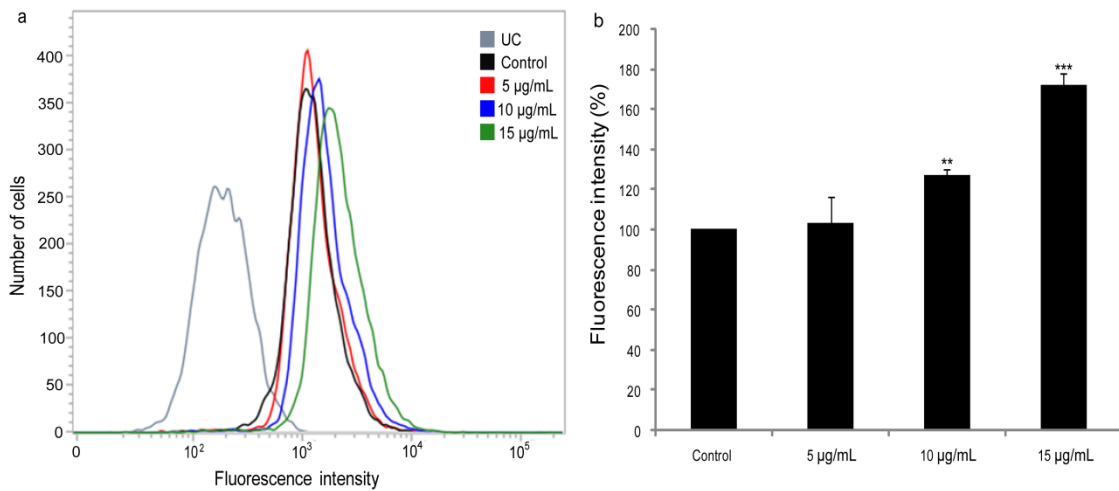


Fig. 3. Ki-67 assay evaluated after 24h of treatment of HaCaT cells with *H. carinatum* PEF at concentrations of 5, 10 and 15 µg/mL. **(a)** Flow cytometry histogram. UC indicates unlabeled control. **(b)** % fluorescence intensity compared to the control, considered as 100%. Results are mean values \pm SD (n = 3). Significantly different values were detected by one-way ANOVA followed by Tukey's test; ** p<0.01 and *** p<0.001, indicate an increase in the fluorescence intensity compared to control group (DMEM).

SUPPORTING INFORMATION

Characterization of phloroglucinol enriched fractions of Brazilian *Hypericum* species and evaluation of their effect on human keratinocyte proliferation

Henrique Bridi^a, Aline Beckenkamp^a, Sérgio Augusto de Loreto Bordignon^b, Gari Vidal Ccana Ccapatinta^a, Andréia Buffon^a, Gilsane Lino von Poser^a✉

^aPrograma de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, UNILASALLE, Av. Victor Barreto, 2288, Canoas, 92010000, Brazil.

✉Corresponding Author: Gilsane Lino von Poser

Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, UFRGS

Av. Ipiranga 2752, Bairro Santana

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Phone: + 55 51 33085529

e-mail: gilsane@farmacia.ufrgs.br

Supporting Information

S1. ^1H NMR spectrum of uliginosin A in CDCl_3 ;

S2. ^1H NMR spectrum of japonicin A in CDCl_3 ;

S3. ^1H NMR spectrum of uliginosin B in CDCl_3 ;

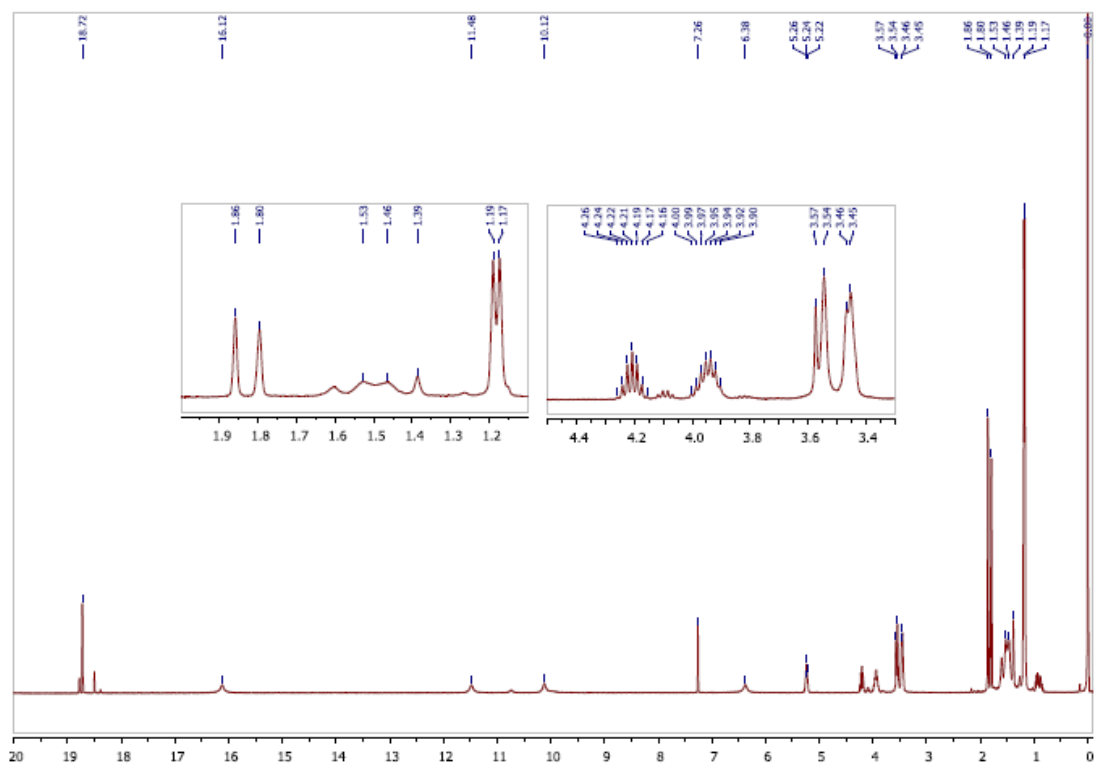
S4. ^1H NMR spectrum of hyperbrasilol B in CDCl_3 ;

S5. ^1H NMR spectrum of HP1 in CDCl_3 ;

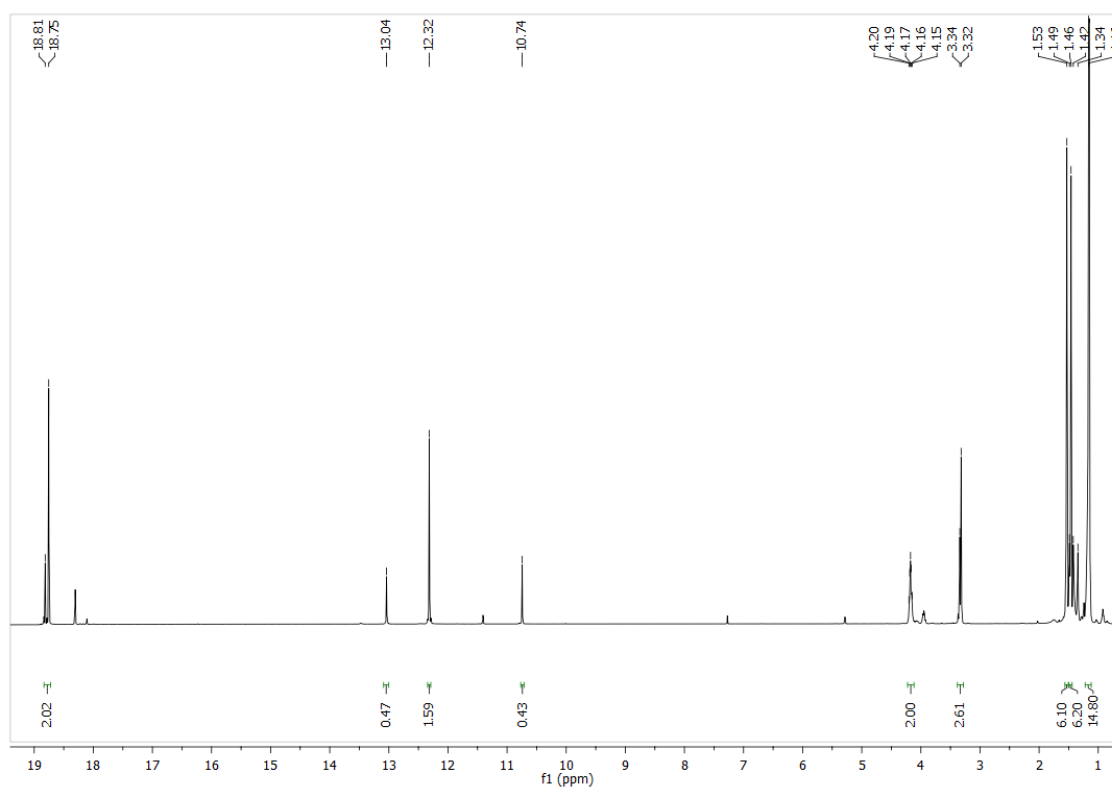
S6. ^1H NMR spectrum of HP2 in CDCl_3 ;

S7. ^1H NMR spectrum of HP3 in CDCl_3 ;

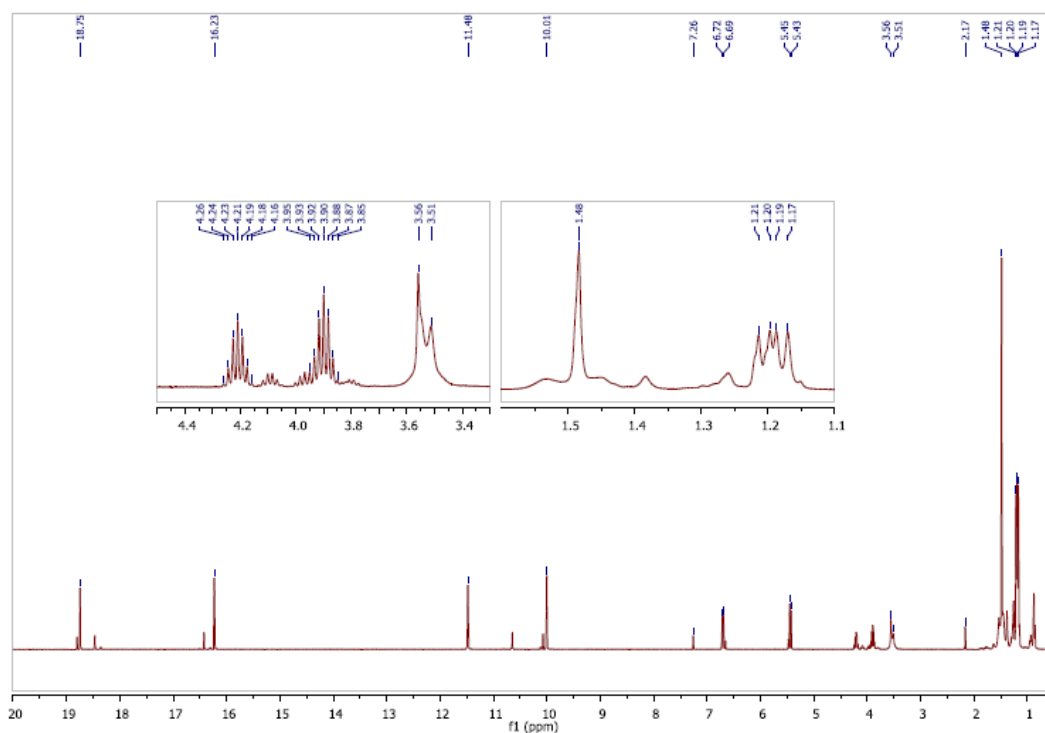
S8. TLC analysis of commercial *Hypericum perforatum*.



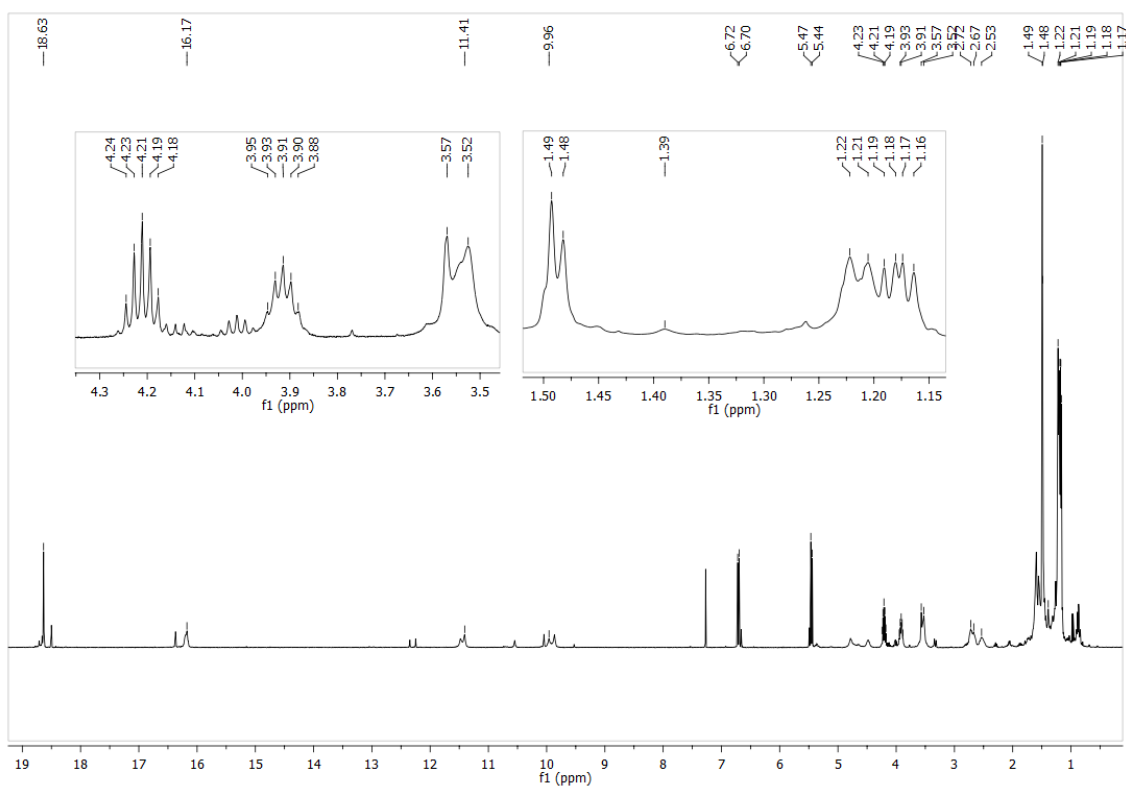
S1. ^1H NMR spectrum of uliginosin A in CDCl_3 ;



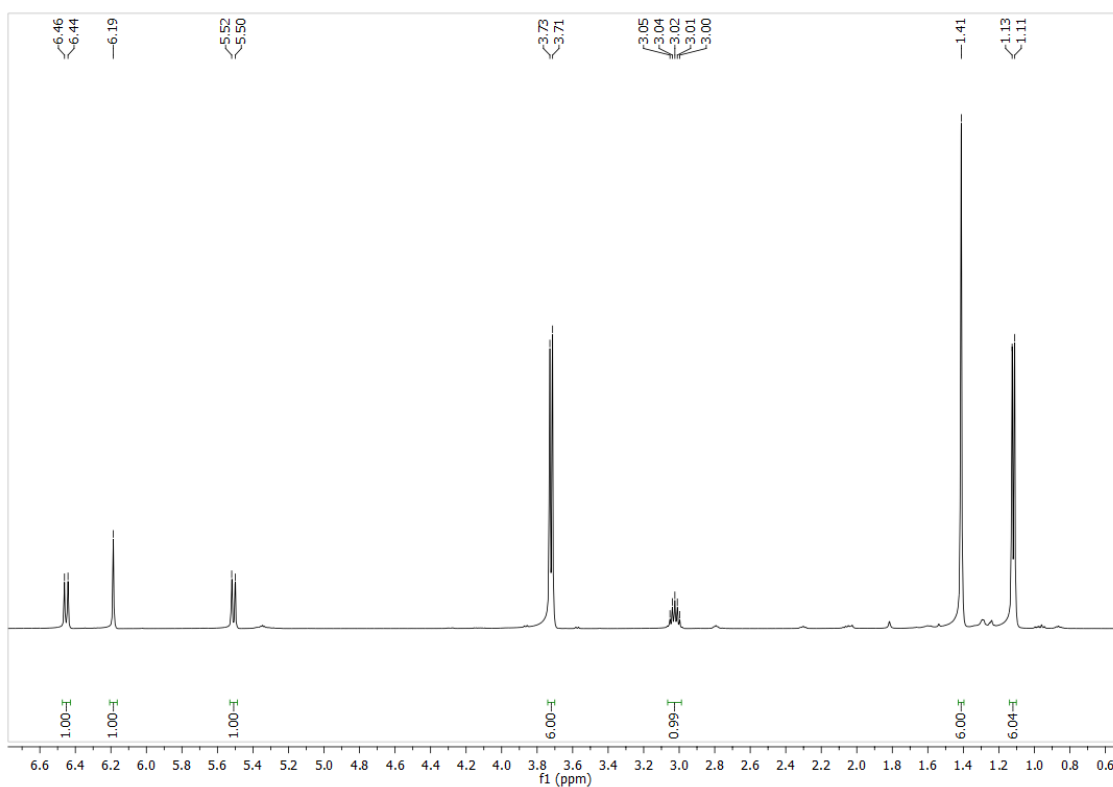
S2. ^1H NMR spectrum of japonicin A in CDCl_3 ;



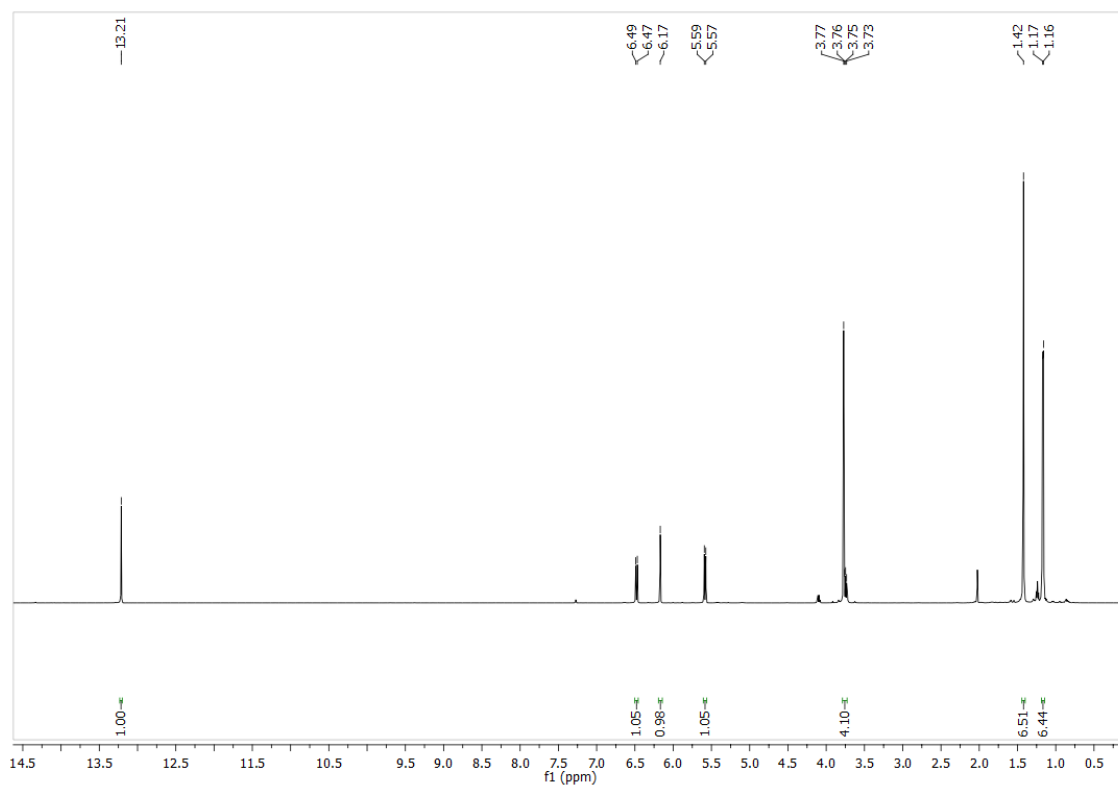
S3. ^1H NMR spectrum of uliginosin B in CDCl_3 ;



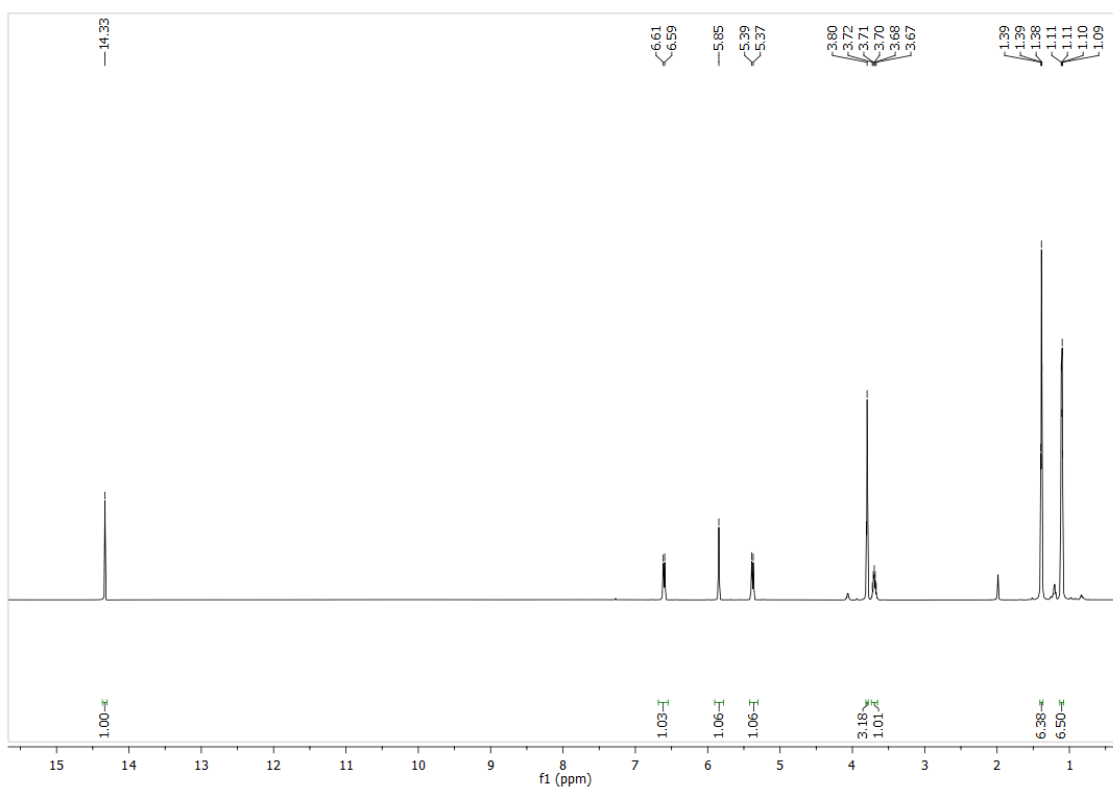
S4. ^1H NMR spectrum of hyperbrasilol B in CDCl_3 ;



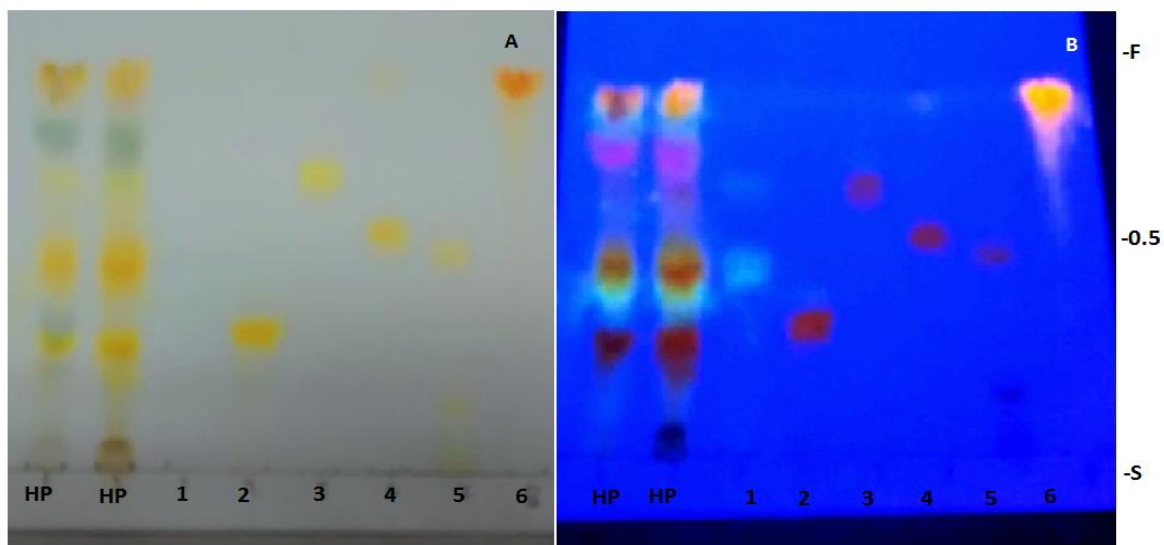
S5. ¹H NMR spectrum of HP1 in CDCl₃;



S6. ¹H NMR spectrum of HP2 in CDCl₃;



S7. ^1H NMR spectrum of HP3 in CDCl_3 ;



S8. TLC analysis of flavonoids and phenolic acids presents in the methanol extract of commercial *Hypericum perforatum*. Separation on aluminum sheets precoated with silica gel 60 F₂₅₄ with ethyl acetate : formic acid : glacial acetic acid : water (100:11:11:26 v/v) as mobile phase. (A) visible after spraying NP/Peg reagent; (B) UV 365 nm after spraying NP/PEG reagent. HP, *Hypericum perforatum*; 1, chlorogenic acid; 2, rutin; 3, quercetrin; 4, isoquercetrin; 5, hyperoside; 6, quercetin.

3 CAPÍTULO 2

Isolamento de derivados diméricos de floroglucinol de *Hypericum austrobrasiliense* e avaliação da atividade antinociceptiva.

3.1 INTRODUÇÃO

A dor é descrita como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual, real ou potencial. Além disso, apresenta um complexo sistema de modulação que envolve os sistemas opióides, glutamatérgicos e monoaminérgicos (MERSKEY & BOGDUK, 1994).

A dor é dividida em três tipos principais: transitória, aguda e crônica. Dor transitória é aquela que ocorre na ausência de lesão tecidual e está relacionada à proteção do ser humano de qualquer dano físico. Dor aguda é desencadeada por uma substancial lesão tecidual, que perdura até que a cura da lesão inicial, intervenções médicas são úteis com o intuito de reduzir a dor e promover uma cura da lesão mais rapidamente (LOESER & MELZACK, 1999).

Dor crônica é geralmente desencadeada por uma lesão, mas que se perpetua por fatores diferentes dos causadores da dor inicial. As dores crônicas são inflexíveis, assim condições de estresse, o ambiente e fatores emocionais contribuem na intensidade e persistência da dor, sobrepondo até mesmo a lesão inicial (LOESER & MELZACK, 1999). A dor crônica pode causar muitos déficits nas funções físicas, sociais, ocupacionais e recreacionais, sendo de grande impacto no indivíduo e até mesmo nos sistemas de saúde (ZALE *et al.*, 2013).

As opções terapêuticas que podem ser utilizadas no tratamento da dor, tanto aguda quanto crônica, incluem diversas classes de fármacos, como anti-inflamatórios não esteroides, opioides, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes. Entretanto, as dores crônicas devem ser tratadas com terapias contínuas e tendo uma reavaliação periódica do quadro clínico para obtenção de melhores resultados (ASHBURN & STAATS, 1999).

Devido à importância que o alívio da dor tem para a população, a busca de novos agentes analgésicos é de grande valia e as plantas medicinais são uma fonte interessante, considerando a descoberta da morfina (isolada de *Papaver somniferum* L.)

e o desenvolvimento do ácido acetilsalicílico a partir do ácido salicílico (isolado de *Salix alba* L.), que ainda permanecem como valiosas opções terapêuticas (MCCURDY & SCULLY, 2005).

Nesta perspectiva de busca de analgésicos a partir de fontes naturais pode-se enquadrar *Hypericum perforatum*. Esta planta é reconhecida principalmente por suas aplicações populares no tratamento de feridas, queimaduras (WÖLFLE *et al.*, 2014) e na utilização de extratos padronizados para o tratamento de casos de depressão leve a moderada (BILIA *et al.*, 2002; MENNINI & GOBBI, 2004; KASPER *et al.*, 2010). Entretanto, outra linha de pesquisa vem se desenvolvendo com essa planta que é a sua utilização no tratamento da dor. Os estudos realizados até o momento demonstram efeito no controle da dor aguda, dor neuropática e da neuropatia diabética. A naftodiantrona hipericina e o derivado de floroglucinol hiperforina parecem ser os compostos ativos responsáveis pelas atividades descritas, sendo os flavonoides, nestes casos, inefetivos (GALEOTTI *et al.*, 2010a; 2010b; 2013; 2014).

Na busca por novos agentes para o tratamento da dor destacam-se os trabalhos de isolamento e identificação de derivados diméricos de floroglucinol, substâncias encontradas principalmente em espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys* do gênero *Hypericum*. Até o momento, trinta e um diferentes compostos foram identificados nestas plantas, sendo considerados marcadores quimiotaxonômicos. (CCANA-CCAPATINTA *et al.*, 2013). A estes compostos têm sido relatadas diversas atividades biológicas, como antidepressiva (STEIN *et al.*, 2012), antinociceptiva (STOLZ *et al.*, 2012; 2014a; 2014b), antimicrobiana (JAYASURIYA *et al.*, 1989; 1991) e citotóxica contra linhagens de câncer (JAYASURIYA *et al.*, 1989; PINHATTI *et al.*, 2013).

Utilizar fontes naturais na busca por novas estruturas químicas que tenham atividades terapêuticas e/ou sirvam de protótipos para identificação dos grupos farmacofóricos continua sendo uma importante fonte de descoberta de fármacos, mesmo com o crescimento da participação de fármacos estritamente sintéticos (CRAGG & NEWMANN, 2012).

Tendo em vista a importância de se pesquisar novas fontes de compostos com atividade antinociceptiva e ampliar o conhecimento sobre a ocorrência de derivados

diméricos de floroglucinol o presente capítulo tem por objetivo realizar procedimentos de isolamento e elucidação estrutural de floroglucinóis diméricos presentes no extrato *n*-hexano de *H. austrobrasiliense* e *H. caprifoliatum* e testar os compostos isolados em um modelo animal de nocicepção. Os resultados estão apresentados no Manuscrito II e na seção Resultados Adicionais.

MANUSCRITO II

Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibit antinociceptive activity in mice.

Submetido ao periódico *Journal of Natural Products*

Dimeric Acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* Exhibit Antinociceptive

Activity in Mice

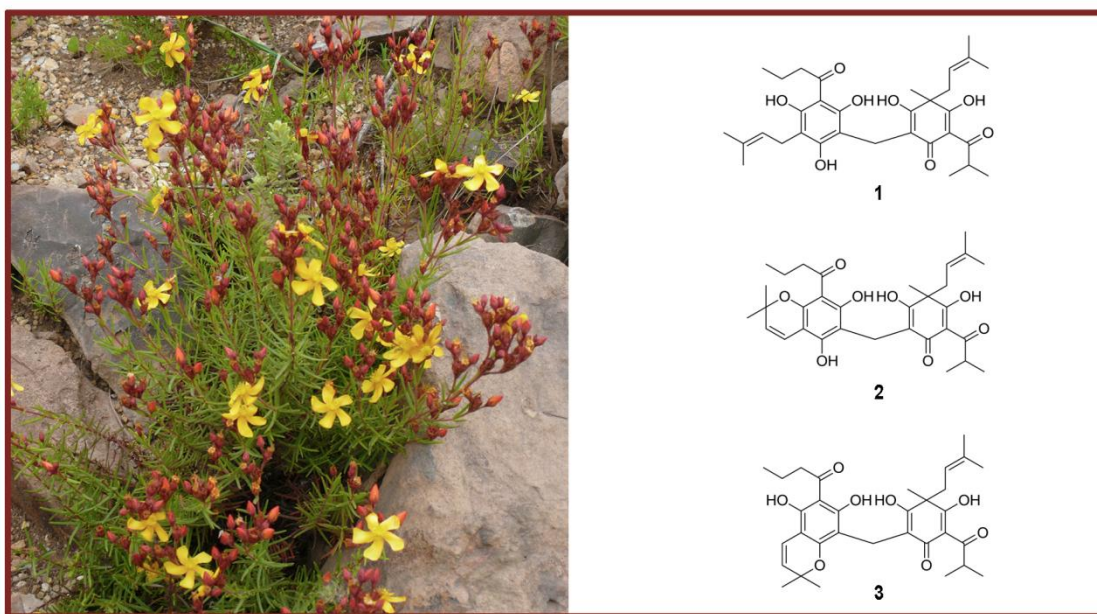
Henrique Bridi,[†] Gari V. Ccana-Ccpatinta,[†] Eveline D. Stolz,[†] Gabriela C. Meirelles,[†]
Sérgio A. L. Bordignon,[‡] Stela M. K. Rates,[†] Gilsane L. von Poser^{*,†}

[†]Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 2752, Porto Alegre/RS 90610-000, Brazil

[‡]Programa de Pós Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, UNILASALLE, Av. Victor Barreto, 2288, Canoas/RS 92010000, Brazil

ABSTRACT

Three new dimeric acylphloroglucinols, austrobrasilol A (**1**), austrobrasilol B (**2**) and iso-austrobrasilol B (**3**) were isolated from the flowers of *Hypericum austrobrasilense*. Their structures were elucidated using mass spectrometry and NMR experiments (1D and 2D), and by comparison with previously reported data for other dimeric acylphloroglucinols isolated from *Hypericum* and *Elaphoglossum* genera. The three compounds were orally administered in mice at equimolar doses to uliginosin B (15 mg/kg, po) displaying antinociceptive activity at the hot-plate test. The compounds did not induce motor impairment in the rotarod apparatus.



Species of *Hypericum* have been widely recognized for their biological properties. *Hypericum perforatum* (Hypericaceae, section *Hypericum*) (St. John's wort) is the most studied, especially regarding its use to treat mild to moderate depression.¹⁻³ In addition, pre-clinical studies demonstrated the antinociceptive activity of *H. perforatum* extracts.^{4,5} The antidepressant and antinociceptive effects are attributed to flavonoids, naphthodianthrones, as hypericin, and especially to monomeric acylphloroglucinols, as hyperforin and adhyperforin.^{1,4-6}

In species of the genus *Hypericum* belonging to sections *Brathys* and *Trigynobrathys*, polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols have not been found. Instead, dimeric acylphloroglucinols are typically described and proposed as chemotaxonomic markers.⁷ Pre-clinical studies on dimeric acylphloroglucinols suggest that this natural molecular scaffold might be promising for the development of new analgesic⁸⁻¹⁰ and antidepressant drugs.¹¹⁻¹⁴

Uliginosin B, a common dimeric acylphloroglucinol found in many species of *Hypericum* from sections *Brathys* and *Trigynobrathys*⁷, has been studied for its antidepressant-like¹² and antinociceptive⁸ effects by our group. The mechanism of action is not yet completely elucidated, but seems to be related to the inhibition of neuronal monoamine reuptake.⁸⁻¹⁰

In this context, considering to the chemotaxonomic importance and pharmacological properties of these metabolites, the present study was aimed to isolate dimeric

acylphloroglucinols from the flowers of *Hypericum austrobrasiliense* Vog.Ely, Boldrini & Bordignon¹⁵ (*Trigynobrathys* section), a recently described new species from Southern Brazil, and evaluate their antinociceptive activity.

The air-dried flowers of *H. austrobrasiliense* were subject to maceration at room temperature with *n*-hexane. The extract was fractioned as described in **Experimental Section**, affording three new dimeric acylphloroglucinols, austrobrasilol A (**1**), austrobrasilol B (**2**) and isoaustrobrasilol B (**3**).

The HRESIMS of compound **1** exhibited a pseudomolecular ion peak $[M+H]^+$ at m/z 555.2974, consistent with a molecular formula of $C_{32}H_{42}O_8$. The intense peaks at 1600-1642 cm^{-1} in the IR experiment and a signal at very low field (δ_H 18.70) in the 1H NMR spectrum of compound **1** (Table 1), were suggestive of a hydrogen bond between an enolic proton and an acyl side chain. Additionally, the presence of carbon signals of a carbonyl (C-1, δ_C 187.5), four enolic carbons (C-2, δ_C 109.0; C-3, δ_C 169.3; C-5, δ_C 198.1; C-6, δ_C 113.6) and a disubstituted quaternary carbon (C-4, δ_C 48.9) in the ^{13}C NMR spectrum of **1** confirmed the presence of an acylfilicinic acid moiety. A methyl (δ_H 1.52) and a C-prenyl groups were determined as the substituents at C-4, confirmed by key HMBC correlations between H-9 and C-10, C-11, C-4 and C-5 (Figure 1). These observations together with the HMBC correlation between OH-5 and C-4, C-5, C-6 and C-14, confirm the presence of an acyl side chain linked to C-6. An isobutyryl group was identified as the acyl moiety linked to C-6 by the presence of a 1H NMR signal at δ_H 4.19 (H-15) and its HMBC correlations (low intensity) with C-14, C-16 and C-17. The broad singlet signal at δ_H 3.56 was suggestive of methylene bridge that links the

acylfilicinic acid moiety to an aromatic ring. The phloroglucinol moiety was inferred as the second ring of compound **1** by the presence of three proton signals corresponding to hydroxyl groups (OH-6', δ_{H} 11.22; OH-8', δ_{H} 14.10; OH-10', δ_{H} 6.52) and the respective signals of oxygen-bearing aromatic carbons (C-6', δ_{C} 159.1; C-8', δ_{C} 160.4; C-10', δ_{C} 158.8). Signals indicative of a second C-prenyl side chain, linked to C-11', were seen in the ^1H and ^{13}C NMR spectra of compound **1**, which resembled the prenyl signals reported for uliginosin A¹⁶ and to hyperbrasilol C.¹⁷ Different to the acetyl, *n*-propionyl, *iso*-butyryl or 2-methylbutyryl functionalities reported until now in *Hypericum* dimeric acylphloroglucinols⁷, compound **1** presents a *n*-butyryl side chain located at C-9'. This side chain has been previously found in dimeric acylphloroglucinols isolated from the fern *Elaphoglossum crassipes*.¹⁴ Compound **1** was identified by spectroscopic analysis as 2-((2,4,6-trihydroxy-3-(3-methylbut-2-enyl)-5-*n*-butyryl)-phenyl-methyl)-3,5-dihydroxy-6-isobutyryl-4-methyl-4-(3-methylbut-2-enyl)cyclohexa-2,5-dienone, and trivially named austrobrasilol A.

The circular dichroism (CD) spectrum of austrobrasilol A (**1**) showed positive Cotton effects at $\Delta\epsilon_{204} +2.72$, $\Delta\epsilon_{267} +0.48$, $\Delta\epsilon_{353} +1.11$ and negative Cotton effects at $\Delta\epsilon_{239} -2.13$, $\Delta\epsilon_{293} -0.67$ (Supporting Information S.10). The absolute configuration of C-4 was established as *R* by comparing the experimental circular dichroism of austrobrasilol A to experimental and simulated CD spectra (*R* and *S* enantiomers) of crassipin A.¹⁴

The HRESIMS of compound **2** exhibited a pseudomolecular ion peak $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 553.2824, consistent with a molecular formula of $\text{C}_{32}\text{H}_{40}\text{O}_8$. The ^1H and ^{13}C NMR data of **2** (Table 1) indicated a structural similarity to hyperbrasilol B, a compound first

isolated from *H. brasiliense*¹⁷ and to austrobrasilol A (**1**). In the ¹H NMR spectrum a pair of doublets at δ_{H} 5.56 and δ_{H} 6.65, two singlets (δ_{H} 1.50; 1.51), related to geminal methyl groups, and proton signals due to two hydroxyl groups (OH-6', δ_{H} 11.40; OH-8', δ_{H} 16.30), together with the ¹³C NMR signals of three oxygen-bearing carbons (C-6', δ_{C} 159.1; C-8', δ_{C} 161.4; C-10', δ_{C} 155.6), indicated the presence of a 2,2-dimethyl chromene ring. Hence, compound **2** was identified by spectroscopic analysis as 2-((5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-8-*n*-butyryl)chroman-6-yl)methyl)-3,5-dihydroxy-6-isobutyryl-4-methyl-4-(3-methylbut-2-enyl)cyclohexa-2,5-dienone, and trivially named austrobrasilol B.

The HRESIMS of the compound **3** exhibited a pseudomolecular ion peak $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 553.2815, consistent with a molecular formula of C₃₂H₄₀O₈. The ¹H and ¹³C NMR data of compound **3** (Table 1) greatly resembled those data of austrobrasilol B (**2**), with main differences occurring in the proton signals of OH-8', δ_{H} 11.70 and OH-10', δ_{H} 14.12. These proton signals chemical shifts of **3** are in agreement with data described for isohyperbrasilol B¹⁷, isouliginosin B¹⁸ and isodrummondin D¹⁹, suggesting that the cyclization pattern must involve OH-6' instead of OH-10'. Hence, this compound is an isomer of compound **2** and was identified by spectroscopic analysis as 2-((5,7-dihydroxy-2,2-dimethyl-6-*n*-butyryl)chroman-8-yl)methyl)-3,5-dihydroxy-6-isobutyryl-4-methyl-4-(3-methylbut-2-enyl)cyclohexa-2,5-dienone, and trivially named iso-austrobrasilol B (**3**).

Austrobrasilols have significant structural similarities with uliginosin B. The presence of a prenyl and a *n*-butyryl side chains are the main differences between uliginosin B and austrobrasilol B (**2**) and iso-austrobrasilol B (**3**). In addition,

austrobrasilol A (**1**) differs from uliginosin B in the presence of a C-prenyl side chain linked to the phloroglucinol moiety, instead of an benzopyran ring.

Uliginosin B has been proposed as a prototype for developing drugs with analgesic and antidepressant actions.^{8-10,12} These effects seem to be consequence of its capacity to increase the availability of monoamines in the synaptic cleft in a different manner of classical antidepressants.¹² The antinociceptive effect also involves the activation of glutamatergic and opioid receptors.^{8,10} Recently, it was demonstrated that uliginosin B could be a potential drug to reduce the dosage of morphine in clinical practice.⁹

In this context, the effect of the treatments with austrobrasilol A (**1**), austrobrasilol B (**2**) and isoaustrobrasilol B (**3**) in the antinociceptive and motor coordination assays were evaluated in mice treated by gavage with doses of 3.0 mol/kg, equimolar to the uliginosin B dose with antinociceptive effect.⁸

Austrobrasilol A (**1**), austrobrasilol B (**2**) and isoaustrobrasilol B (**3**), as well the positive control (morphine) presented antinociceptive effect in the hot-plate test (Figure 2; two way RM ANOVA: $F_{\text{treatment}} (4,99) = 7.741, p < 0.001$; $F_{\text{exposition}} (1,99) = 66.263, p < 0.001$; $F_{\text{interaction}} (4,99) = 13.841, p < 0.001$). *Post-hoc* analysis indicated a significant increase in the latency response in mice treated with austrobrasilol A (**1**) and isoaustrobrasilol B (**3**) in comparison with vehicle at second exposition (T60 – $p < 0.05$). Additionally, all the three new dimeric acylphloroglucinols increased the latency time compared to respective basal exposition (austrobrasilol A (**1**): $p < 0.05$; austrobrasilol B (**2**): $p < 0.05$; isoaustrobrasilol B (**3**): $p < 0.01$). The magnitude of antinociceptive effects of austrobrasilol A (25.4 ± 6.4), austrobrasilol B (20.2 ± 7.8) and isoaustrobrasilol B

(31.7 ± 10.3) are comparable to previously described for uliginosin B (21.8 ± 2.4), at equimolar dose.⁸

In addition, the treatment with austrobrasilol A (**1**), austrobrasilol B (**2**), isoaustrobrasilol (**3**) did not induced motor impairment in mice subjected to the rotarod test, indicating that the antinociceptive effects are not associated with sedative, muscle relaxant or hypotensive actions. Two way RM ANOVA revealed that only the positive control (haloperidol) increased the number of falls (Figure 3A: $F_{\text{treatment}}(5,95) = 16.723$, $p < 0.001$; $F_{\text{exposition}}(1,95) = 12.672$, $p < 0.001$; $F_{\text{interaction}}(5,95) = 15.808$, $p < 0.001$) and reduced the permanence time (Figure 3B; $F_{\text{treatment}}(6,95) = 6.532$, $p < 0.001$; $F_{\text{exposition}}(1,95) = 5.236$, $p < 0.05$; $F_{\text{interaction}}(6,95) = 15.504$, $p < 0.001$) when compared to vehicle group.

In summary, in the present study three new dimeric acylphloroglucinols from *H. austrobrasiliense* were identified and their antinociceptive properties in mice were demonstrated, reinforcing the potential of the dimeric acylphloroglucinols natural molecular scaffolds for developing new analgesic drugs.

EXPERIMENTAL SECTION

General Procedures. Optical rotations were recorded using a Perkin Elmer model 341 polarimeter. UV spectra were recorded in a Hewlett-Packard model 8452A diode array spectrophotometer. ECD spectra were recorded on a Jasco J-810 spectropolarimeter. IR spectra were obtained on a Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR spectrometer. 1D- and 2D-NMR spectra were measured at 25 °C on a Varian MR400 spectrometer (at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C). Spectra were recorded in acetone- d_6 (99.9%, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) referenced against residual non-deuterated solvent (acetone- d_6 : δ_{H} 2.05/ δ_{C} 29.8). 1D- (^1H , ^{13}C , APT) and 2D-NMR (COSY, HMBC and HSQC) spectra were obtained by using the standard pulse sequences from the Varian user library. Spectra of isolated compounds are provided as **Supporting Information.** HRESIMS were acquired in positive-ion mode on a Waters Q-TOF Premier spectrometer equipped with a nanospray ion source. Reagent grade acetone, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-hexane, methanol (F. Maia, São Paulo, Brazil) and formic acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) were regularly used in the extraction and isolation procedures. In order to visualize the isolation development, the extract and the fractions were submitted to thin-layer chromatography (TLC) in precoated silica gel 60 F₂₅₄ plates (Merck, Darmstadt, Germany) as stationary phase, using *n*-hexane: ethyl acetate (95:5) as mobile phase. After elution the plates were observed under 254 and 356 nm UV light and revealed by spraying with anisaldehyde - sulfuric reagent with subsequent heating. Vacuum liquid chromatography (VLC) was carried out on silica gel 60 (0.06-0.2 mm; Acros Organics, New Jersey, USA) and column chromatography (CC) on silica gel 60 (0.035-0.07 mm; Acros Organics, New

Jersey, USA). Centrifugal planar chromatography (CPC) was carried out on silica gel 60 G F₂₅₄ (1 mm plates) using a ChromatotronTM instrument (model 7924T, Harrison Research, San Bruno, CA, USA).

Plant Material. The aerial parts of *Hypericum austrobrasiliense* were collected in São José dos Ausentes, South Brazil (October, 2012). The plant was identified by Dr. Sérgio Bordignon (UNILASSALE, RS, Brazil) and voucher specimens are deposited in the herbarium of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (Bordignon & von Poser 3454). The plant collection was authorized by IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis) (no. 003/2008; Protocol 02000.001717/2008-60).

Extraction and Isolation. The air dried and powdered flowers (ca. 400 g) were successively extracted by maceration with *n*-hexane over 24 h (plant-solvent ratio 1:5) until exhaustion. The extract was evaporated to dryness under reduced pressure and then treated with cold acetone to obtain the acetone-soluble fractions (18 g) and an insoluble fatty residue.

The acetone-soluble fraction (18 g) of *H. austrobrasiliense* was subjected to VLC using a gradient elution of *n*-hexane:CH₂Cl₂ (100:0→0:100) to afford 16 fractions (Fr. 1-16). The Fr. 1-5 (*n*-hexane:CH₂Cl₂, 100:0→20:80) were subjected to repeated CPC using a gradient elution of *n*-hexane:acetone (100:0→90:10) as mobile phase to obtain **2** (*n*-hexane:acetone, 100:0→97:3) (80 mg) and **3** (*n*-hexane:acetone, 95:5→92:8) (50 mg). The Fr. 7-10 (*n*-hexane:CH₂Cl₂, 75:25→50:50) were further fractionated by CC using a gradient elution of *n*-hexane:CH₂Cl₂ (100:0→0:100) to yield 12 subfractions (SbFr. 1-

12). The SbFr. 2-6 (*n*-hexane:CH₂Cl₂, 90:10→70:30) were fractioned on CPC using gradient elution of *n*-hexane:CH₂Cl₂ (90:10→50:50) with 0.25 formic acid to obtain **1** (60 mg) (*n*-hexane:CH₂Cl₂ (75:25→65:35) with 0.25 formic acid).

Austrobrasilol A (1): yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ -18.5 (*c* 1.0, CHCl₃); UV (EtOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ 226 (4.24), 300 (4.22), 350 (4.06) nm; IR (neat) ν_{\max} 3154, 2966, 2932, 1639, 1605, 1433, 1376, 1199, 1139 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR see Table 1; ESIMS *m/z* 555 [M+H]⁺(3), 499 (4), 431 (6), 333 (3), 291 (4), 277 (100), 223 (20) 209 (6); HRESIMS *m/z* 555.2974 [M+H]⁺(calcd for C₃₂H₄₂O₈, 555.2958).

Austrobrasilol B (2): yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ -40.9(*c* 1.0, CHCl₃); UV (EtOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ 226 (4.34), 288 (4.30), 358 (4.09) nm; IR (neat) ν_{\max} 3240, 2966, 2932, 1641, 1599, 1428, 1361, 1300, 1236, 1199, 1171, 1132 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR see Table 1; ESIMS *m/z* 553 [M+H]⁺(10), 485 (2), 331 (6), 275 (100), 263 (15), 223 (11); HRESIMS *m/z* 553.2824 [M+H]⁺(calcd for C₃₂H₄₀O₈, 553.2801).

Isoaustrobrasilol B (3): yellow oil; $[\alpha]_D^{20}$ -29.6 (*c* 1.0, CHCl₃); UV (EtOH) $\lambda_{\max}(\log \epsilon)$ 228 (4.30), 278 (4.43), 356 (4.13); IR (neat) ν_{\max} 3241, 2968, 2935, 2358, 1641, 1603, 1462, 1431, 1289, 1236, 1197, 1141 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR see Table 1; ESIMS *m/z* 553 [M+H]⁺(5), 485 (3), 427 (4), 279 (9), 275 (100), 263 (14), 223 (20); HRESIMS *m/z* 553.2815 [M+H]⁺(calcd for C₃₂H₄₀O₈, 553.2801).

Animals. Adult male CF1 mice (25-35 g) were purchased from Universidade Federal de Santa Maria-RS colony. The animals were housed 6 mice per plastic cages

(L: 28 cm, W: 17 cm, H: 13 cm) under a 12 h light/dark cycle (lights on at 7:00 A.M.) at constant temperature (23 ± 1 °C) with free access to standard certified rodent diet (Nuvilab CR-1[®]) and tap water. All experiments were approved by a local research ethical committee (UFRGS, number 23825/2012) and were in compliance with Brazilian law.²⁰⁻²²

Drugs and Treatments. Haloperidol by Sigma-Aldrich co. (St. Louis, MO, USA), Morphine-Dimorf[®] by Cristália (São Paulo, Brazil), and polysorbate 80 by Merck (Darmstadt, Germany). The isolated compounds were suspended in saline with 2% of polysorbate 80 immediately before using. The compounds were administered by oral (gavage) route, sixty minutes before the behavioral experiments. The animals were treated with $3.0 \cdot 10^{-3}$ mol/kg yielding a suspension concentration of austrobrasilol A (**1**) (16.7 mg/kg), austrobrasilol B (**2**) (16.6 mg/kg) and iso-austrobrasilol B (**3**) (16.6 mg/kg). The doses were based on equimolar doses of uliginosin B, a dimeric acylphloroglucinol with antinociceptive activity at 15 mg/kg (po).⁸ All treatments were administered at 10 mL/kg body weight.

Hot-Plate Test. Firstly, mice were habituated to nonfunctioning hot-plate apparatus (Ugo-Basile) for 1 min. Thirty minutes later the animals were placed on the functioning hot-plate (55 ± 1 °C) to determine the baseline responsiveness. The time elapsed until the animal licked one of its hind paws or jumped was recorded in seconds. Mice that presented a baseline reaction of more than 20 s were excluded from the test. Subsequently the animals were treated with the isolated compounds (16.7 mg/kg for **1**; 16.6 mg/kg, for **2** and **3**, po), morphine (10 mg/kg, po) and vehicle (10 mL/kg, po).

Sixty minutes after the gavage, mice were placed on the hot-plate. A maximum latency time of 40 s was imposed.

Motor Coordination Test: Rotarod. The apparatus consisted of a cylinder of 3 cm of diameter rotating at 5 rpm. One day before testing, the animals were trained once during 5 min. On the test day, the mice were placed in the apparatus again to determine the baseline responsiveness. Only mice that were able to stay 90 s balanced on the rotarod were selected for testing. The selected mice received the isolated compounds (16.7 mg/kg for **1**; 16.6 mg/kg, for **2** and **3**, po), morphine (10 mg/kg, po), haloperidol (4 mg/kg, po) and vehicle (10 mL/kg, po) treatment and sixty minutes after the performance was measured. The integrity of motor coordination was assessed on the basis of the longest time of permanence and the number of falls in a 5 min period.

Statistical Analysis. The data were evaluated using two-way repeated measures (RM) analysis of variance (ANOVA), followed by Student-Newmann-Keuls post-hoc test. All results were expressed as mean \pm S.E.M. The analyses were performed using Sigma Stat 3.2 software (Jandel Scientific Corporation). Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. IR, HRESIMS, 1D and 2D NMR spectra of compounds **1-3** are available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (+55) 51 33085529. Fax: (+55) 51 33085437. E-mail:
gilsane@farmacia.ufrgs.br

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to the Brazilian agencies CAPES, CNPq and FAPERGS for financial support. The LRNANO/CNANO laboratory of UFRGS is acknowledged for NMR facilities. The authors thank to Dr. M. H. Holzschuh (Analytic Central, Pharmacy Faculty, UFRGS), for recording the mass spectra.

REFERENCES

- (1) Mennini, T.; Gobbi, M. *Life Sci.* **2004**, *75*, 1021-1027.
- (2) Kasper, S.; Caraci, F.; Forti, B.; Drago, F.; Aguglia, E. *Eur. Neuropsychopharm.* **2010**, *20*, 747-765.

- (3) Sarris, J. *Psychiatr. Clin. N. Am.* **2013**, *36*, 65–72.
- (4) Galeotti, N.; Vivoli, E.; Bilia, A.; Bergonzi, M.; Bartolini, A.; Ghelardini, C. *J. Pain* **2010**, *11*, 149-159.
- (5) Hatanaka, J.; Shinme, Y.; Kuriyama, K.; Uchida, A.; Kou, K.; Uchida, S.; Yamada, S. *Drug. Metab. Pharmacokinet.* **2011**, *26*, 551-558.
- (6) Crockett, S.L.; Robson, N.K.B. *Med Aromat Plant Sci Biotechnol.* **2011**, *5*, 1-13.
- (7) Ccana-Ccapatinta, G.V.; Barros, F.M.C.; Bridi, H.; von Poser, G.L. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 25-50.
- (8) Stolz, E.D.; Viana, A.F.; Hasse, D.R.; von Poser, G.L.; do Rego, J.C.; Rates, S.M.K. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2012**, *39*, 80-87.
- (9) Stolz, E.D.; Müller, L.G.; Antonio, C.B.; Da Costa, P.F.; von Poser, G.L.; Noël, F.; Rates, S.M.K. *Phytomedicine* **2014a**, *21*, 1684–1688.
- (10) Stolz, E.D.; Hasse, D.R.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. *J. Pharm. Pharmacol.* **2014b**, *66*, 1774-1785.
- (11) Viana, A.; do Rego, J.C.; von Poser, G.; Ferraz, A.; Heckler, A.P.; Costentin, J.; Rates, S.M.K. *Neuropharmacology* **2005**, *49*, 1042-1052.

- (12) Stein, A.C.; Viana, A.F.; Müller, L.G.; Nunes, J.M.; Stolz, E.D.; Do Rego, J.C.; Costentin, J.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. *Behav. Brain Res.* **2012**, 228, 66-73.
- (13) Centurião, F.B.; Sakamoto, S.; Stein, A.C.; Müller, L.G.; Chagas, P.M.; von Poser, G.; Nogueira, C.W.; Rates, S.M.K. *Eur. J. Med. Plan.* **2014**, 4, 1268-1281.
- (14) Socolsky, C.; Rates, S.M.; Stein, A.C.; Asawaka, Y.; Bardón, A. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 1007-1017.
- (15) Ely, C.V.; Boldrini, I.I.; Bordignon, S.A.L. *Phytotaxa* **2015**, 192, 290-295.
- (16) Parker, W.L.; Johnson, F. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90, 4716-4723.
- (17) Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1996**, 42, 185-188.
- (18) Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K. *Phytochemistry* **1995**, 40, 1117-1452.
- (19) Jayasuriya, H.; Clark, A.M.; Mc Chesney, J.D. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54, 1314-1320.
- (20) Brasil, Congresso Nacional. Lei procedimentos para o uso científico de animais. **2008**, Lei n. 11.794.

(21) Brasil, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CONCEA. Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos – DBCA. **2013**, Portaria n. 465

(22) Brasil, Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CONCEA. Diretrizes da prática de eutanásia do CONCEA. **2013**, Portaria n. 596.

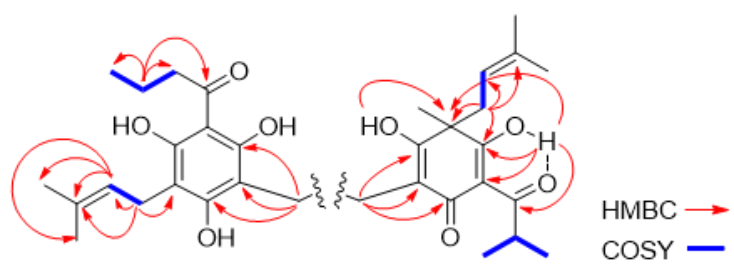


Figure 1. Key COSY and HMBC correlations of austrobrasilol A (**1**).

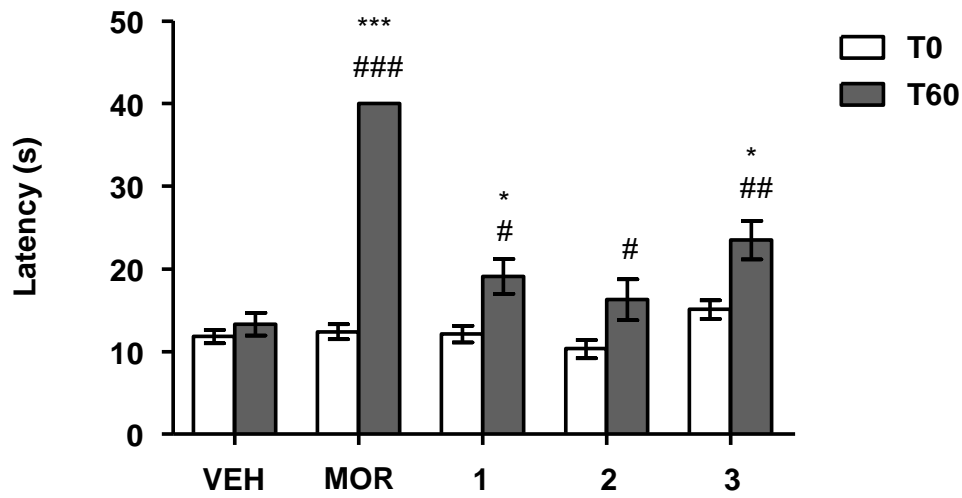


Figure 2. Effect of the treatment with austrobrasilol A (16.7 mg/kg, po) (**1**), austrobrasilol B (16.6 mg/kg, po) (**2**), isoaustrobrasilol B (16.6 mg/kg, po) (**3**) and morphine (10 mg/kg, po) on the mice hot-plate test. Data presented in mean \pm SEM ($n=10$ mice/group). Significantly different values were detected by two-way RM ANOVA followed by Student-Newmann-Keuls test: *** $p<0.001$, * $p<0.05$ compared to vehicle (VEH), ### $p<0.001$, ## $p<0.01$, # $p<0.05$ compared to basal latency.

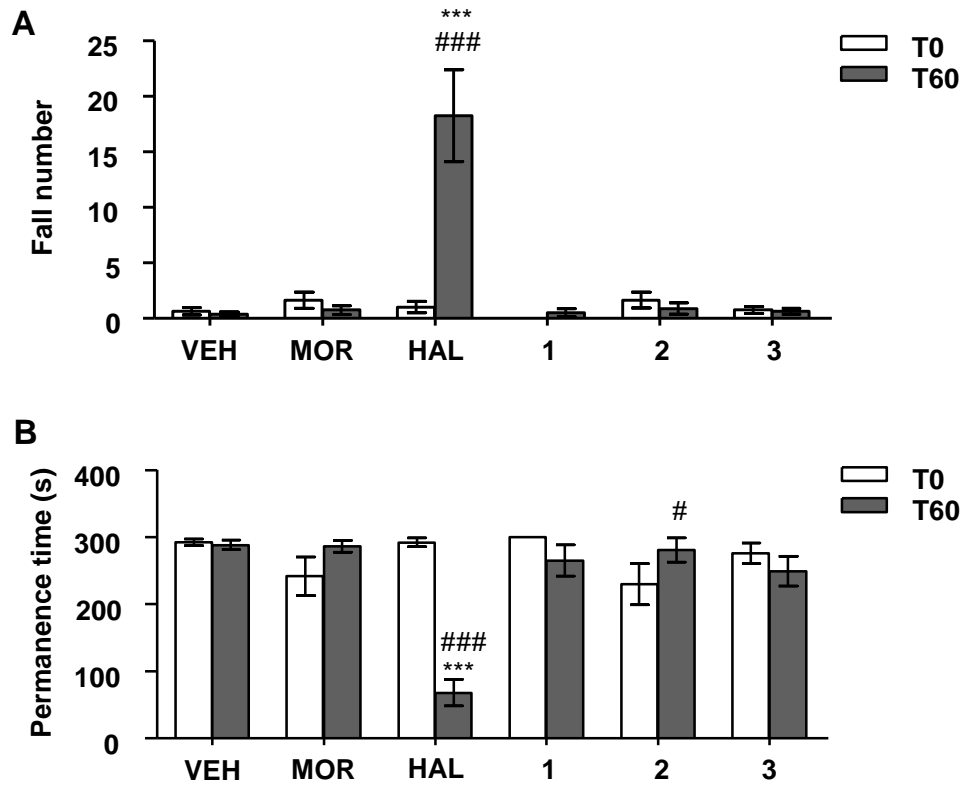


Figure 3. Effect of the treatment with austrobrasilol A (16.7 mg/kg, po) (**1**), austrobrasilol B (16.6 mg/kg, po) (**2**), isoastrobrasilol B (16.6 mg/kg, po) (**3**), morphine (MOR) (10 mg/kg, po) and haloperidol (HAL) (4 mg/kg, po) on the number of falls (Panel A) and the highest permanence time (Panel B) of mice on rotarod test. The results are presented as mean \pm SEM ($n=8$ mice/group). Significantly different values were detected by two-way RM ANOVA followed by Student-Newmann-Keuls test: *** $p<0.001$, compared to vehicle SAL, ### $p<0.001$, compared to baseline responsiveness.

Chart

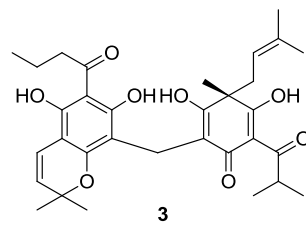
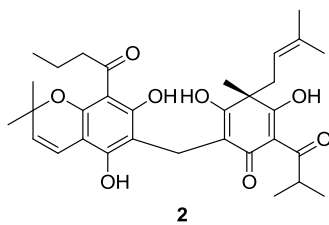
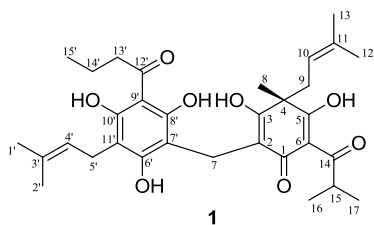


Table 1. NMR spectroscopic data for compounds 1, 2 and 3 in acetone-*d*₆.^a

Position	1			2			3		
	δ_C , type	δ_H (<i>J</i> in Hz)	HMBC	δ_C , type	δ_H (<i>J</i> in Hz)	HMBC	δ_C , type	δ_H (<i>J</i> in Hz)	HMBC
1	187.5, C			187.6, C	-		187.7, C	-	
2	109.0, C			108.9, C	-		108.9, C	-	
3	169.3, C			169.7, C	-		169.3, C	-	
4	48.9, C			48.9, C	-		48.8, C	-	
5	198.1, C			198.3, C	-		198.1, C	-	
6	113.6, C			113.3, C	-		113.2, C	-	
7	16.5, CH ₂	3.56 br s	1, 2, 3, 6', 7', 8'	16.0, CH ₂	3.53 br s	1, 2, 3, 6', 7', 8'	16.2, CH ₂	3.58 br s	1, 2, 3, 6', 7', 8'
8	21.4, CH ₃	1.52 s	4, 5, 9	22.0, CH ₃	1.50 s	4, 5, 9	22.0, CH ₃	1.54 s	3, 4, 5, 9
9	38.3, CH ₂	2.5-2.8 m	4, 5, 10, 11	38.4, CH ₂	2.5-2.8 m	4, 5, 10, 11	38.4, CH ₂	2.6-2.8 m	3, 4, 5, 10, 11
10	117.3, CH	4.62 br t		117.4, CH	4.60 br t	12, 13	117.4, CH	4.64 br t	9, 12, 13
11	135.7, C			135.6, C	-		135.6, C	-	
12	16.6, CH ₃	1.32 s	10, 11	16.7, CH ₃	1.31 s	10, 11	16.7, CH ₃	1.32 s	10, 11
13	24.7, CH ₃	1.34 s	10, 11	24.7, CH ₃	1.33 s	10, 11	24.7, CH ₃	1.39 s	10, 11
14	209.9, C			209.9, C	-		210.0, C	-	
15	36.4, CH	4.19 unres.	14, 16, 17	36.4, CH	4.18 sep (13.5; 6.8)	14, 16, 17	36.5, CH	4.18 sep (13.4; 6.7)	14, 16, 17
16	18.6, CH ₃	1.14 d (2.5)	14, 15	18.0, CH ₃	1.16 d (3.2)	14, 15	17.9, CH ₃	1.14 d	14, 15
17	18.9, CH ₃	1.16 d (2.5)	14, 15	18.6, CH ₃	1.17 d (3.2)	14, 15	18.6, CH ₃	1.16 d	14, 15
1'	17.1, CH ₃	1.63 s	3', 4'	27.0, CH ₃	1.50 s	3', 4'	26.7, CH ₃	1.55 s	2', 3', 4'
2'	24.9, CH ₃	1.75 s	3', 4'	27.2, CH ₃	1.51 s	3', 4'	27.1, CH ₃	1.63 s	2', 3', 4'

3'	122.4, C			78.2, C	-		80.5, C	-	
4'	131.7, CH	5.12 br t (6.7)	1', 2', 3'	125.2, CH	5.56 d (10.0)	3', 10', 11'	124.8, CH	5.61 d (10.0)	1', 2', 3', 11'
5'	22.4, CH ₂	3.38 br d (4.5)	3', 4', 11'	116.7, CH	6.65 d (10.0)	3', 10', 11'	116.3, CH	6.66 d (10.0)	3', 6', 10', 11'
6'	159.1, C			159.1, C	-		159.8, C	-	
7'	107.9, C			106.1, C	-		106.1, C	-	
8'	160.4, C			161.4, C	-		160.3, C	-	
9'	104.9, C			104.1, C	-		105.2, C	-	
10'	158.8, C			155.6, C	-		154.9, C	-	
11'	105.7, C			103.5, C	-		101.8, C	-	
12'	206.8, C			206.5, C	-		207.0, C	-	
13'	45.5, CH ₂	3.14 m	9', 12', 14'	45.5, CH ₂	3.11 m	12', 14', 15'	46.1, CH ₂	3.12 m	12', 14', 15'
14'	18.0, CH ₂	1.70 (q), buried	12', 13', 15'	18.2, CH ₂	1.73 sex (7.4)	12', 13', 15'	18.2, CH ₂	1.70 sex (7.4)	12', 13', 15'
15'	13.3, CH ₃	0.95 t (7.6)	13', 14'	13.4, CH ₃	1.01 t (7.4)	13', 14'	13.4, CH ₃	1.00 t (7.4)	13', 14'
3-OH	-	9.92 s ^b	4	-	9.90 s	2, 3, 4	-	9.08 s	1, 3, 5
5-OH	-	18.70 s	4, 5, 6, 14	-	18.70 s	4, 5, 6	-	18.73 s	4, 5, 6, 14
6'-OH	-	11.22 s ^b	11'	-	11.40 s	6', 11'	-	-	
8'-OH	-	14.10 s	12'	-	16.30 s	7', 8', 9'	-	11.70 s	7', 8', 9'
10'-OH	-	6.52 s ^b		-	-		-	14.12 s	9', 10', 11'

^a Data were measured at 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C, respectively. The assignments were based on COSY, HSQC and HMBC experiments.

^b Observed in a 60 MHz NMR equipment in CDCl₃

SUPPORTING INFORMATION

Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibit antinociceptive activity in mice

Henrique Bridi[†], Gari Vidal Ccana Ccapatinta[†], Eveline Dischkaln Stolz[†], Gabriela de Carvalho Meirelles[†], Sérgio Augusto de Loreto Bordignon[‡], Stela Maris Kuze Rates[†], Gilsane Lino von Poser^{*.†}

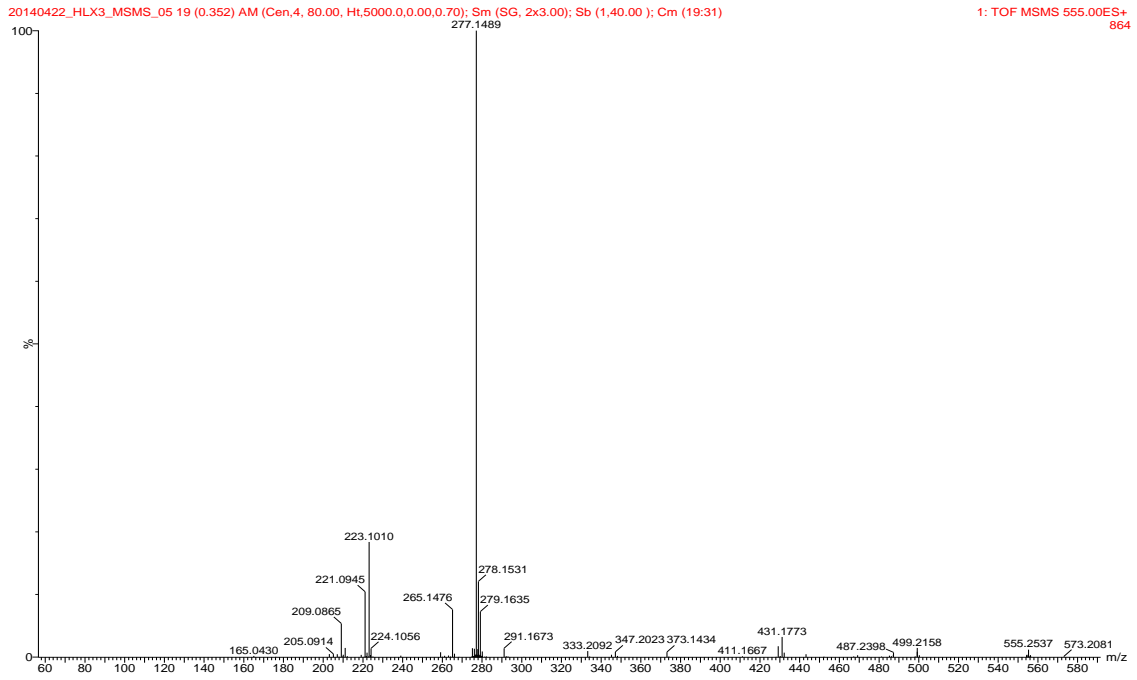
[†]Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga 2752, Porto Alegre-RS, Brazil.

[‡]Programa de Pós Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, UNILASALLE, Av. Victor Barreto, 2288, Canoas, 92010000, Brazil.

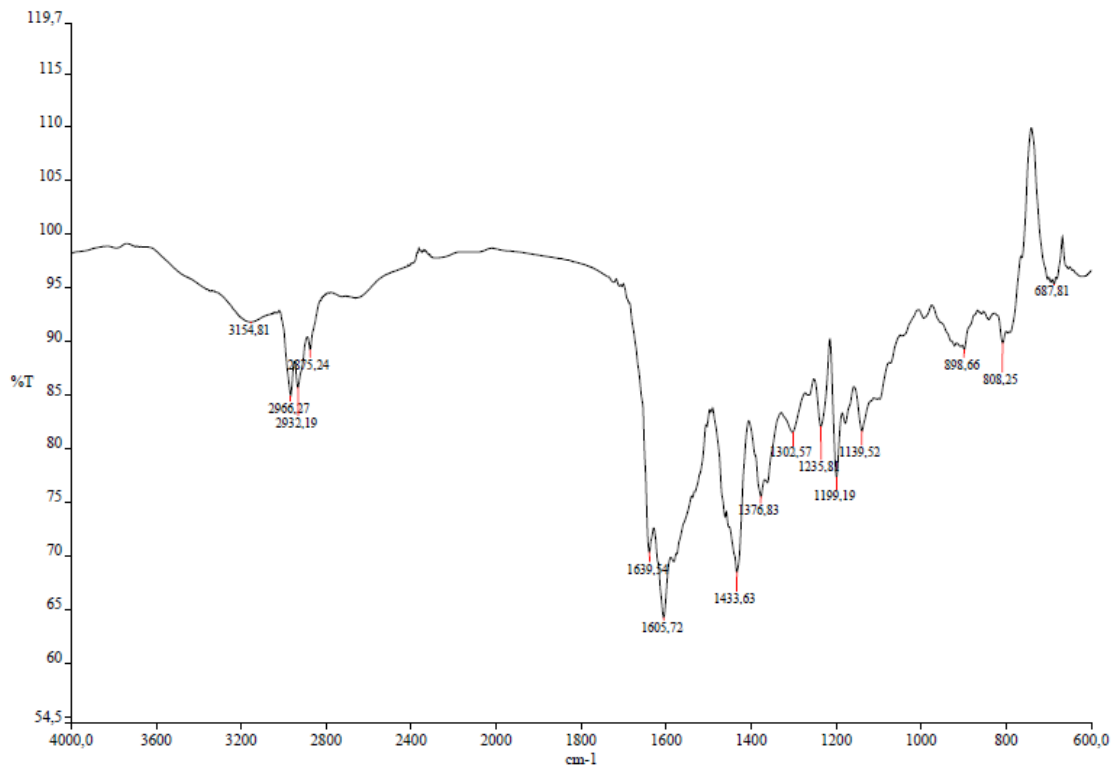
Supporting Information

- S1. ESIMS spectrum of austrobrasilol A (**1**)
- S2. IR spectrum of austrobrasilol A (**1**)
- S3. ^1H NMR spectrum of austrobrasilol A (**1**) (acetone- d_6 , 400 MHz)
- S4. ^1H NMR spectrum of austrobrasilol A (**1**) (CDCl_3 , 60 MHz)
- S5. ^{13}C NMR spectrum of austrobrasilol A (**1**) (acetone- d_6 , 100 MHz)
- S6. APT spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6
- S7. ^1H - ^1H COSY spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6
- S8. HSQC spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6
- S9. HMBC spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6
- S10. CD spectrum of austrobrasilol A (**1**) in ethanol
- S11. ESIMS spectrum of austrobrasilol B (**2**)
- S12. IR spectrum of austrobrasilol B (**2**)
- S13. ^1H NMR spectrum of austrobrasilol B (**2**) (acetone- d_6 , 400 MHz)
- S14. ^{13}C NMR spectrum of austrobrasilol B (**2**) (acetone- d_6 , 100 MHz)
- S15. APT spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6
- S16. ^1H - ^1H COSY spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6
- S17. HSQC spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6
- S18. HMBC spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6
- S19. CD spectrum of austrobrasilol B (**2**) in ethanol

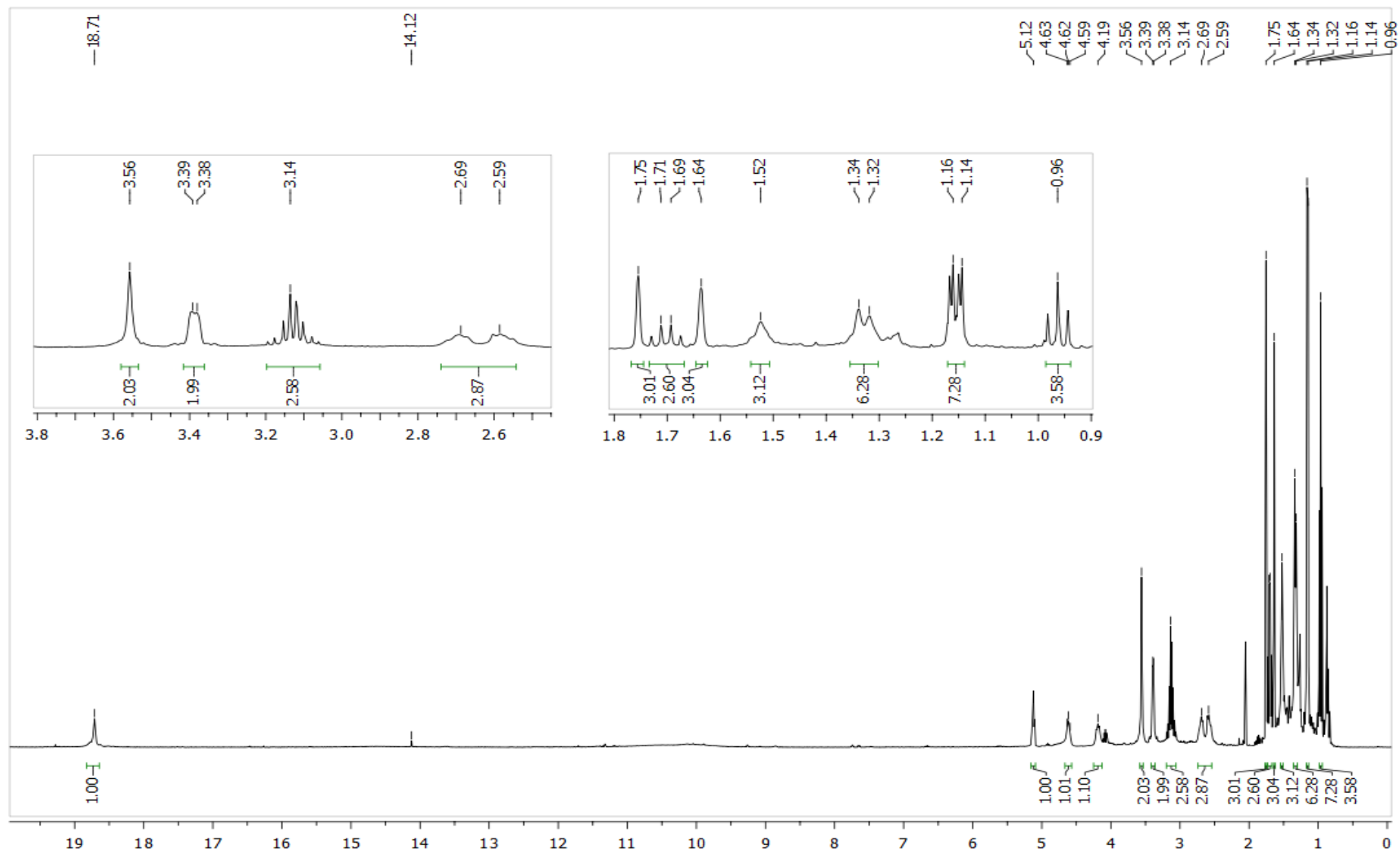
- S20. ESIMS spectrum of isoastrobrasilol B (**3**)
- S21. IR spectrum of isoastrobrasilol B (**3**)
- S22. ^1H NMR spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) (acetone- d_6 , 400 MHz)
- S23. ^{13}C NMR spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) (acetone- d_6 , 100 MHz)
- S24. APT spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6
- S25. ^1H - ^1H COSY spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6
- S26. HSQC spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6
- S27. HMBC spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6
- S28. CD spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in ethanol



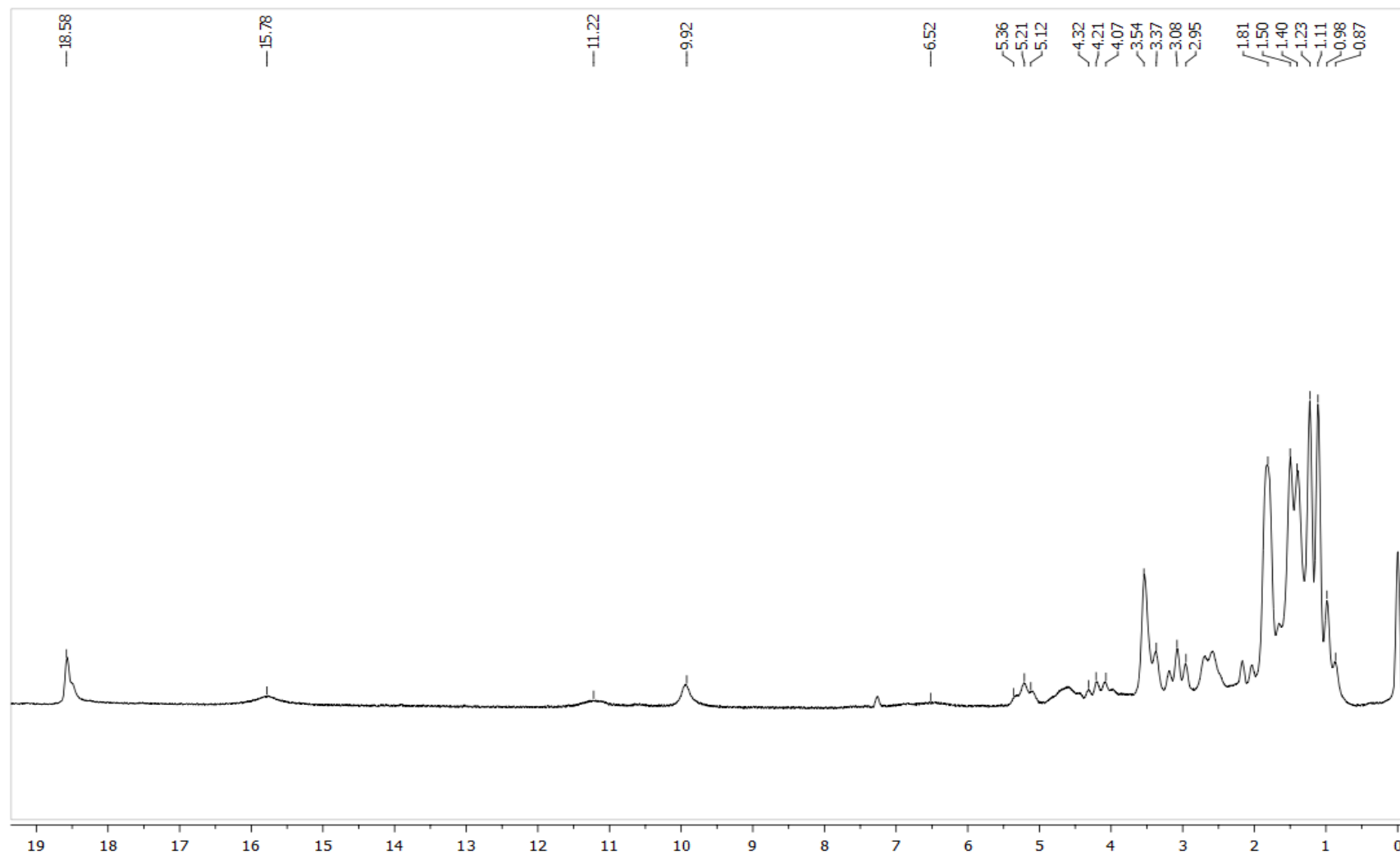
S1. ESIMS spectrum of austrobrasilol A (1)



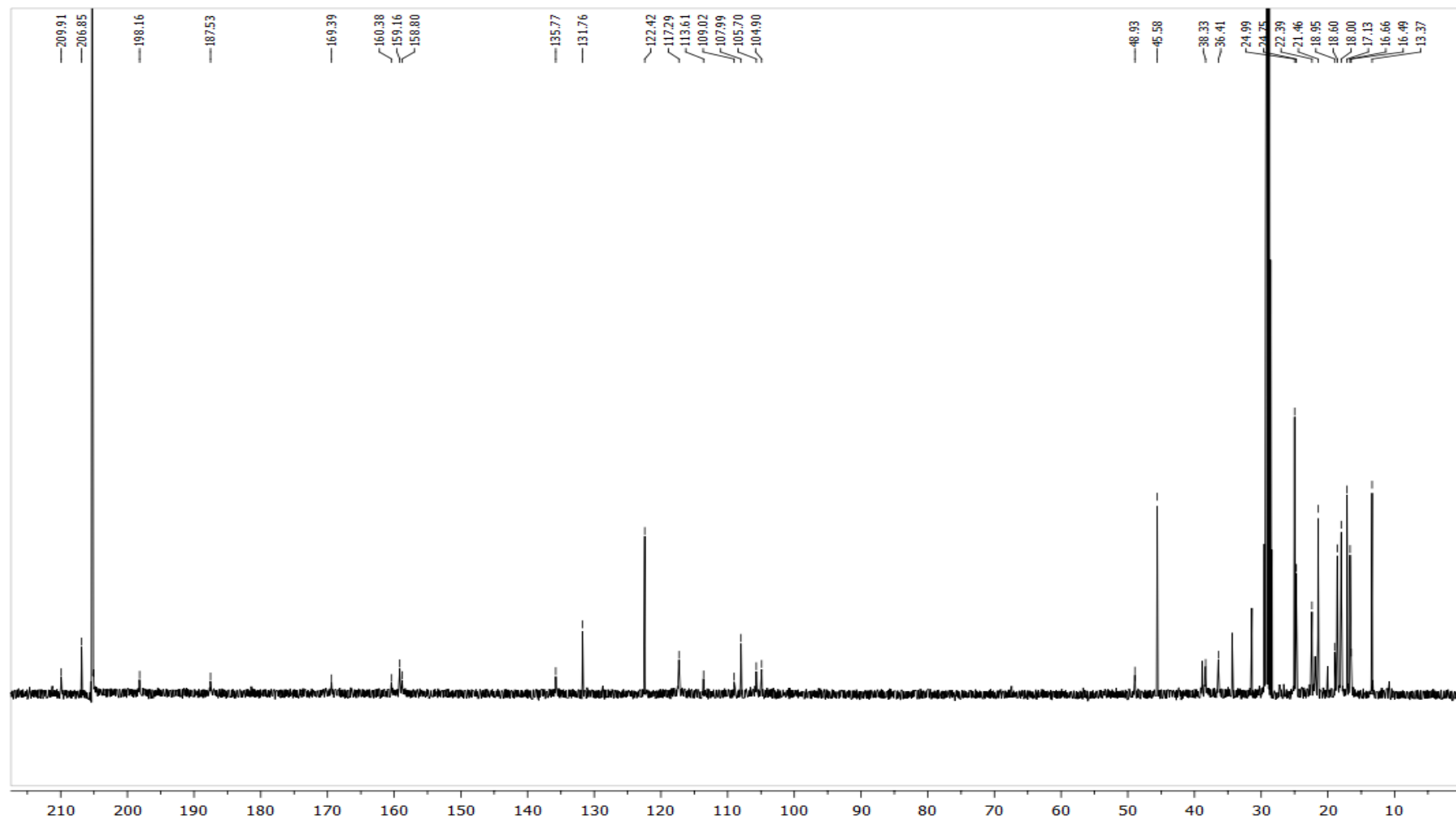
S2. IR spectrum of austrobrasilol A (1)



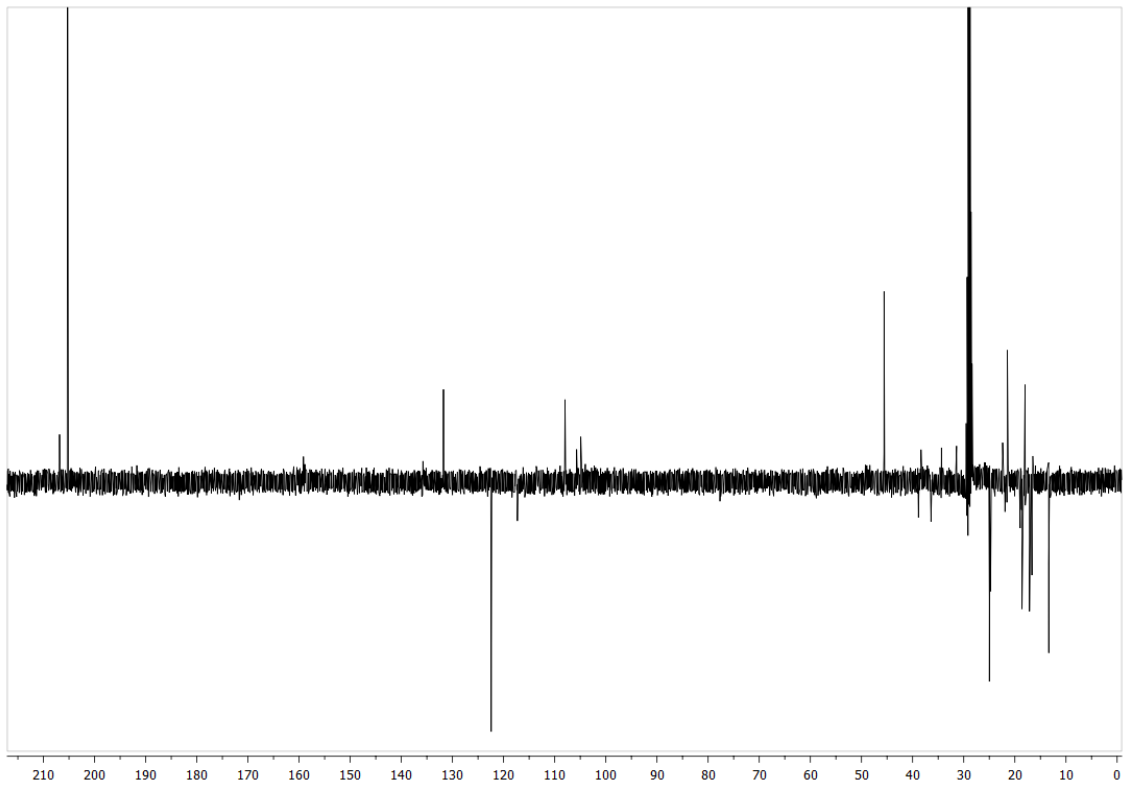
S3. ^1H NMR spectrum of austrobrasilol A (1) (acetone- d_6 , 400 MHz)



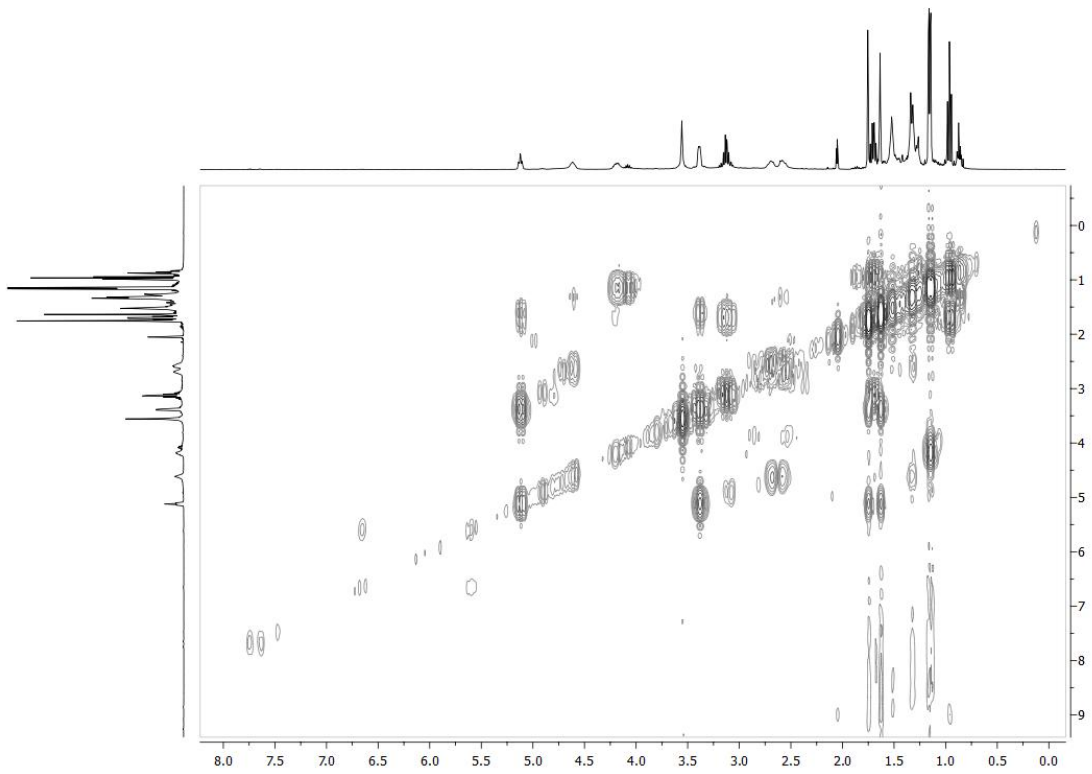
S4. ^1H NMR spectrum of austrobrasilol A (**1**) (CDCl_3 , 60 MHz)



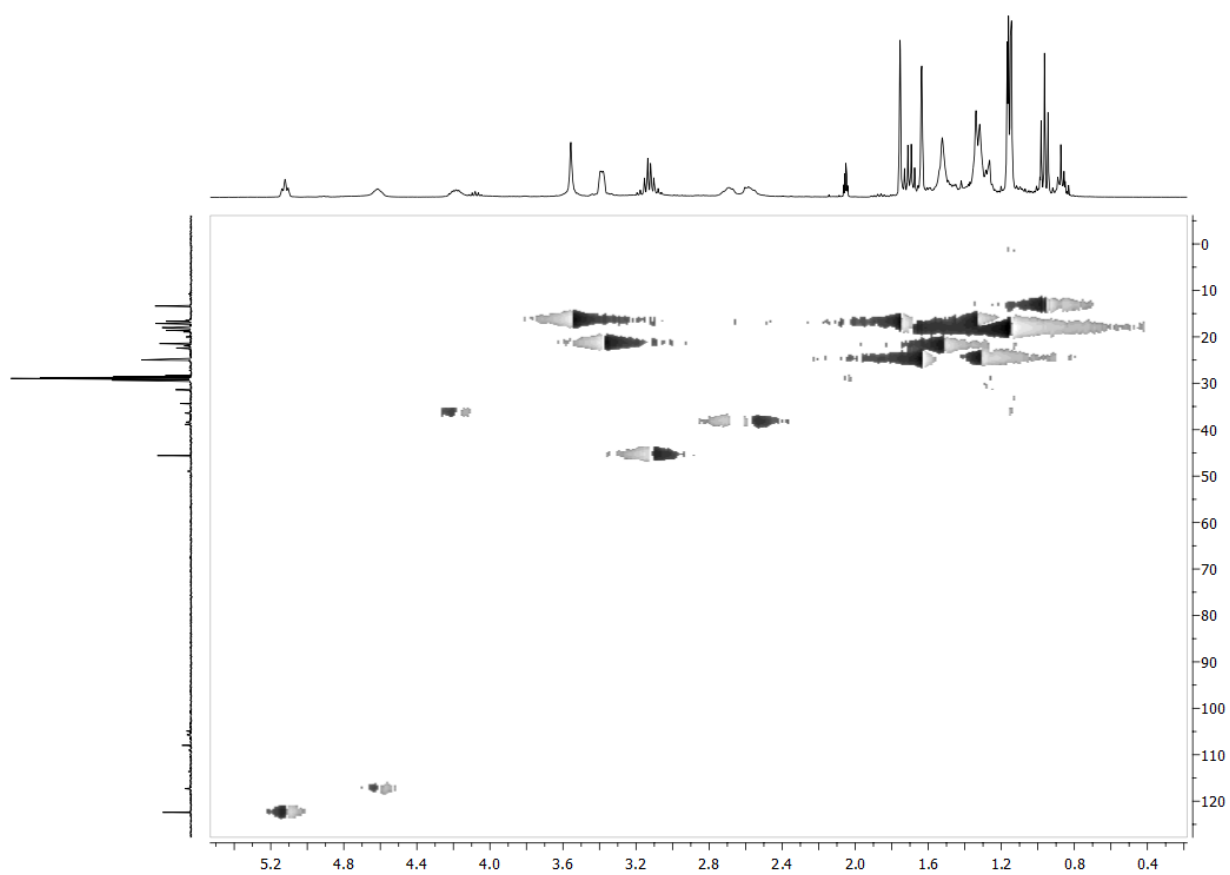
S5. ^{13}C NMR spectrum of austrobrasilol A (**1**) (acetone- d_6 , 100 MHz)



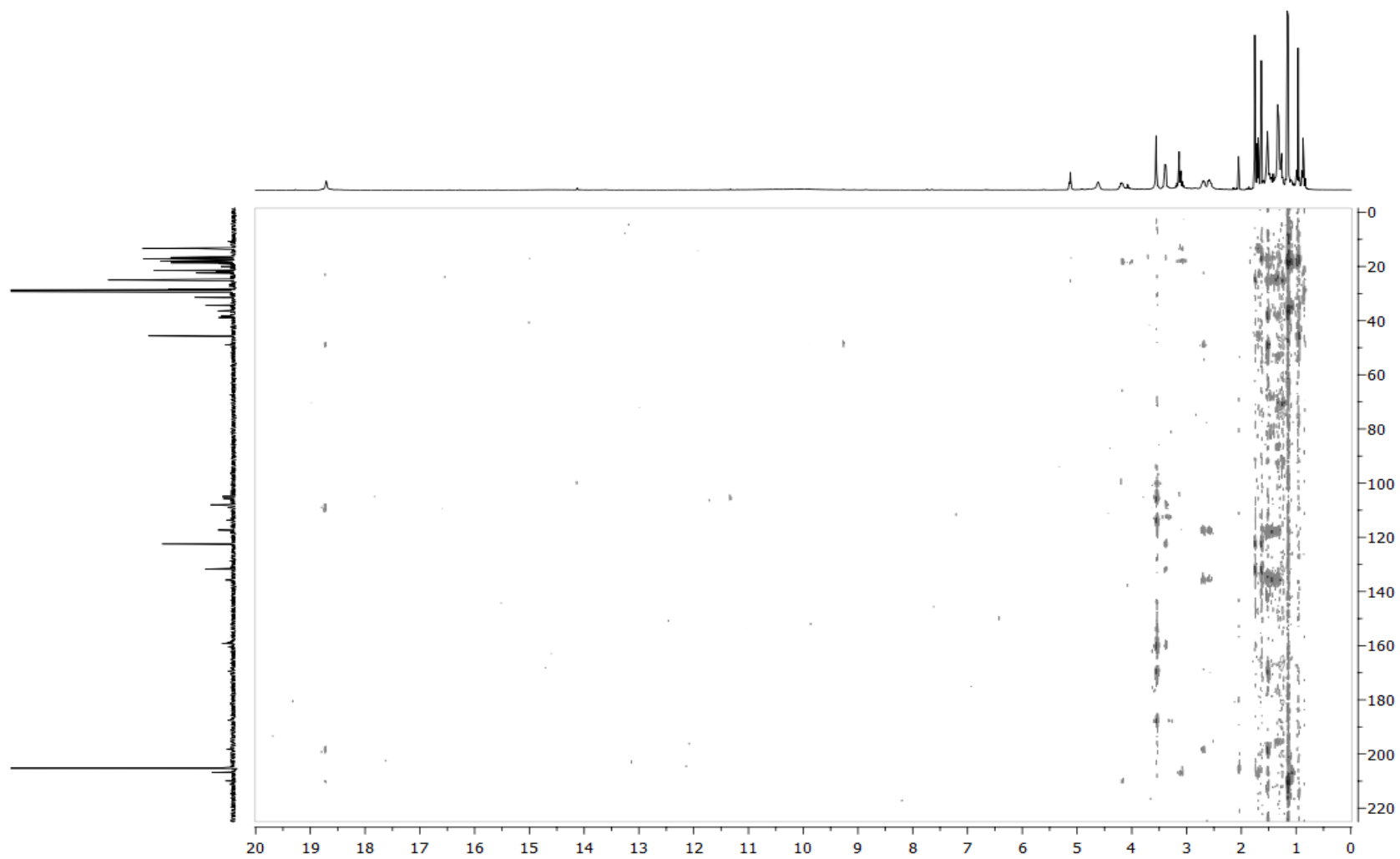
S6. APT spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6



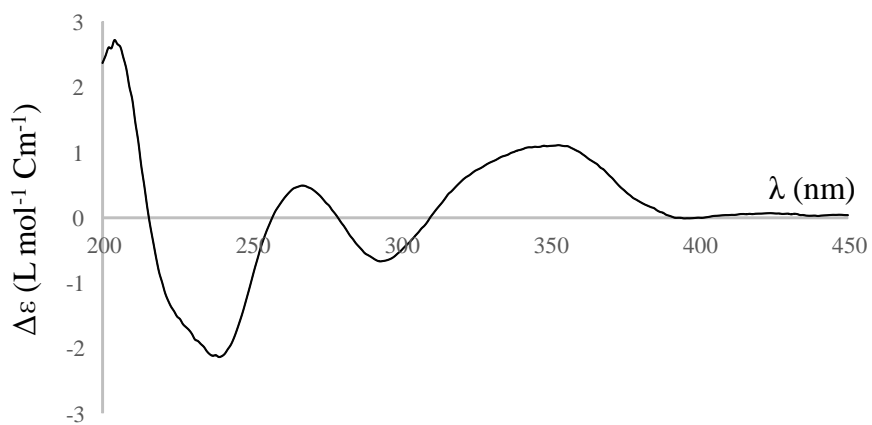
S7. ^1H - ^1H COSY spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6



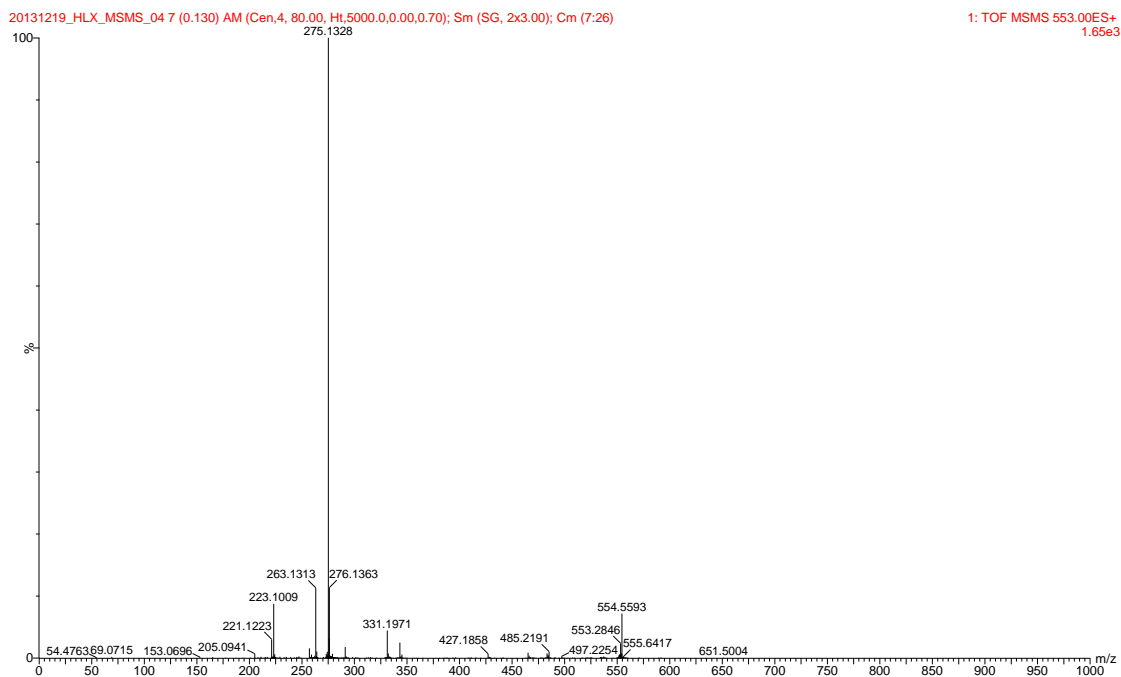
S8. HSQC spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6



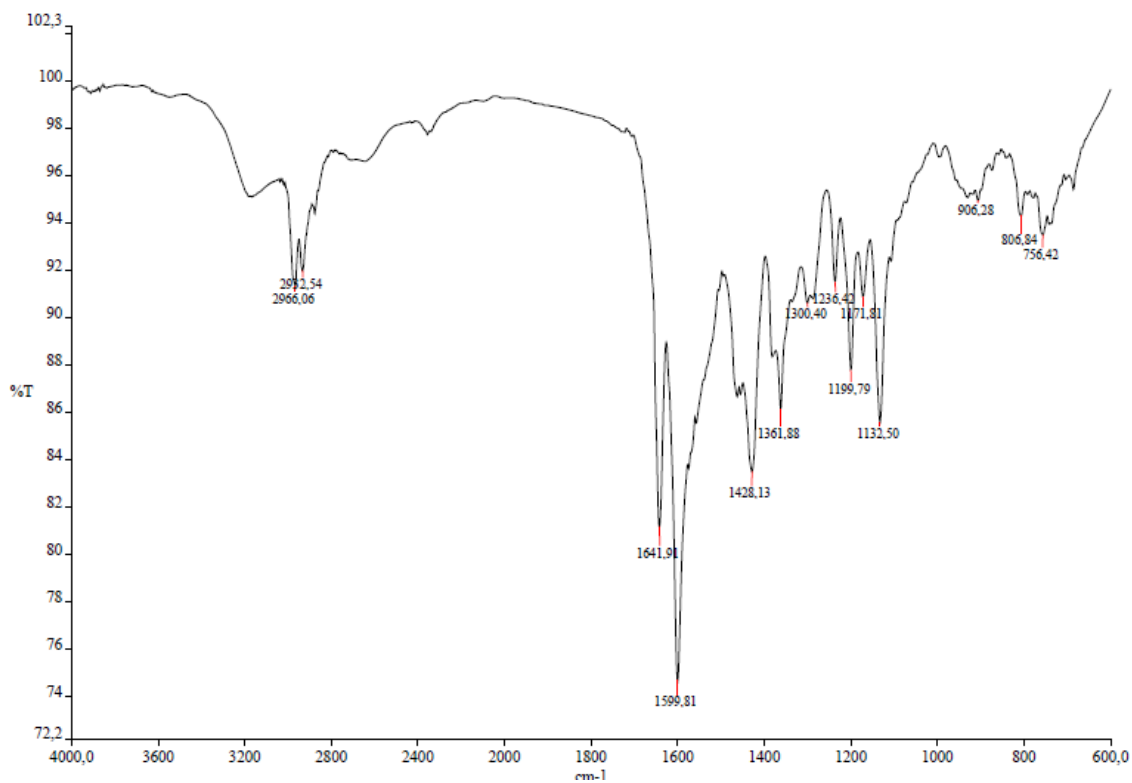
S9. HMBC spectrum of austrobrasilol A (**1**) in acetone- d_6



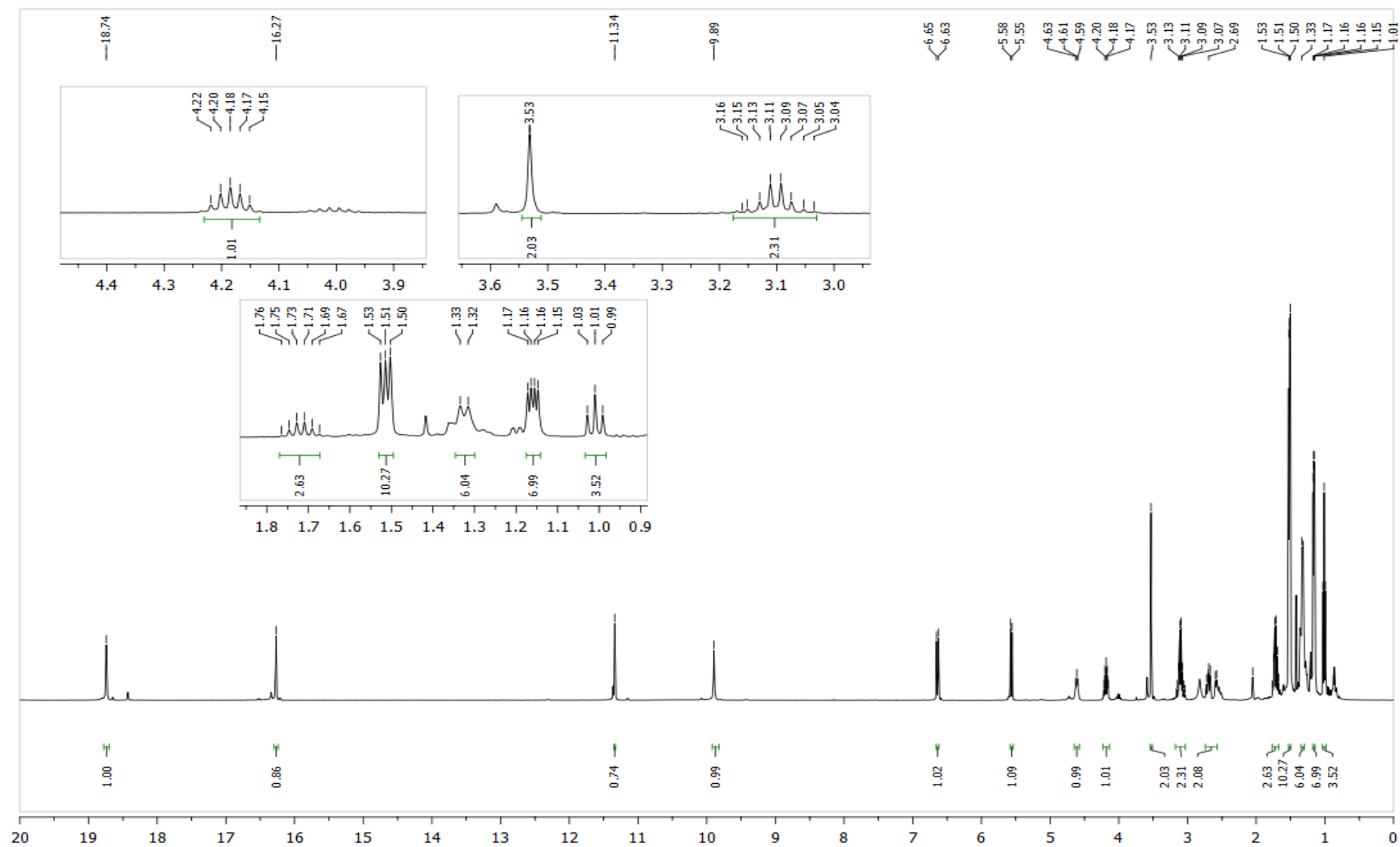
S10. CD spectrum of austrobrasilol A (**1**) in ethanol (5.95×10^{-5} mol/L)



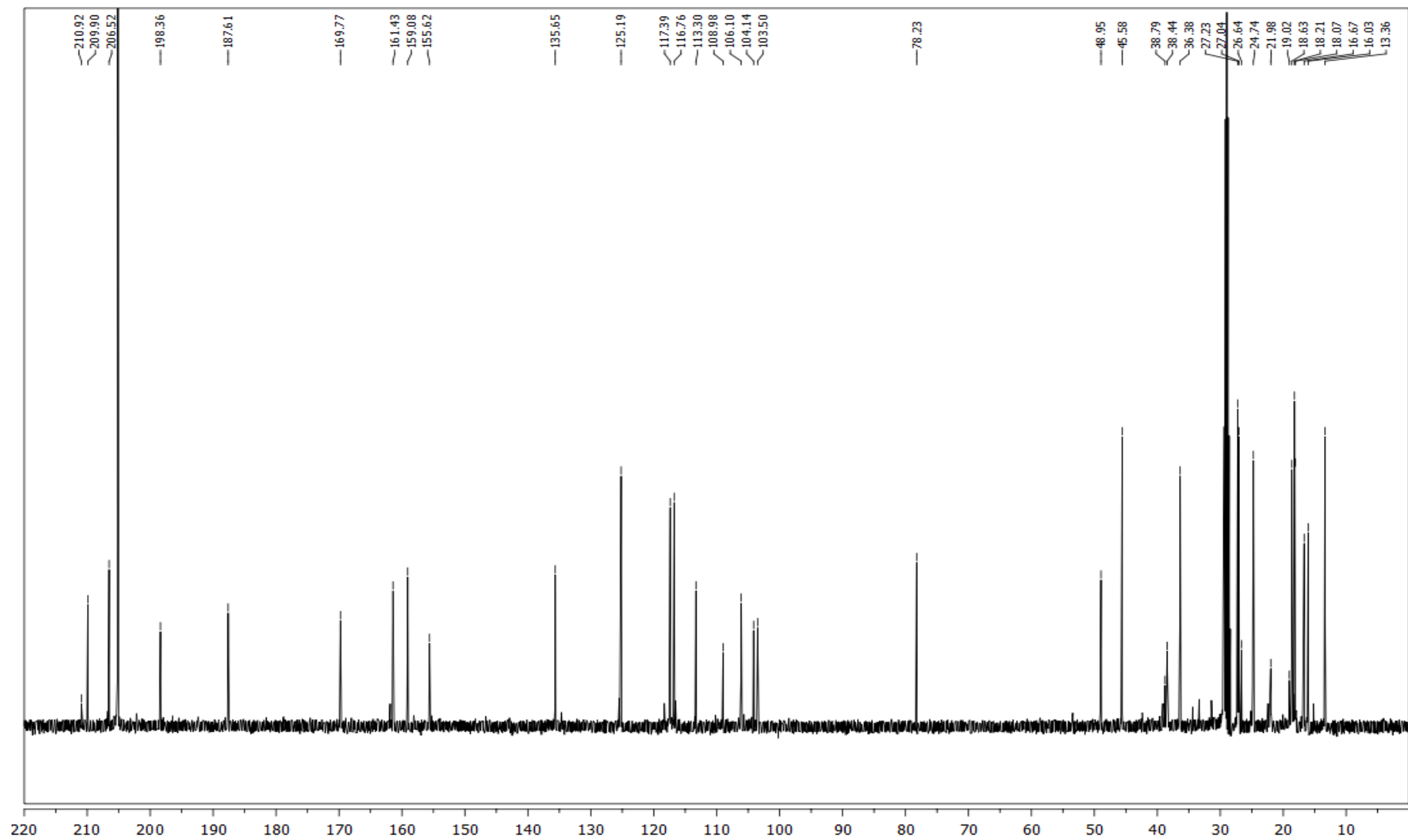
S11. ESIMS spectrum of austrobrasilol B (2)



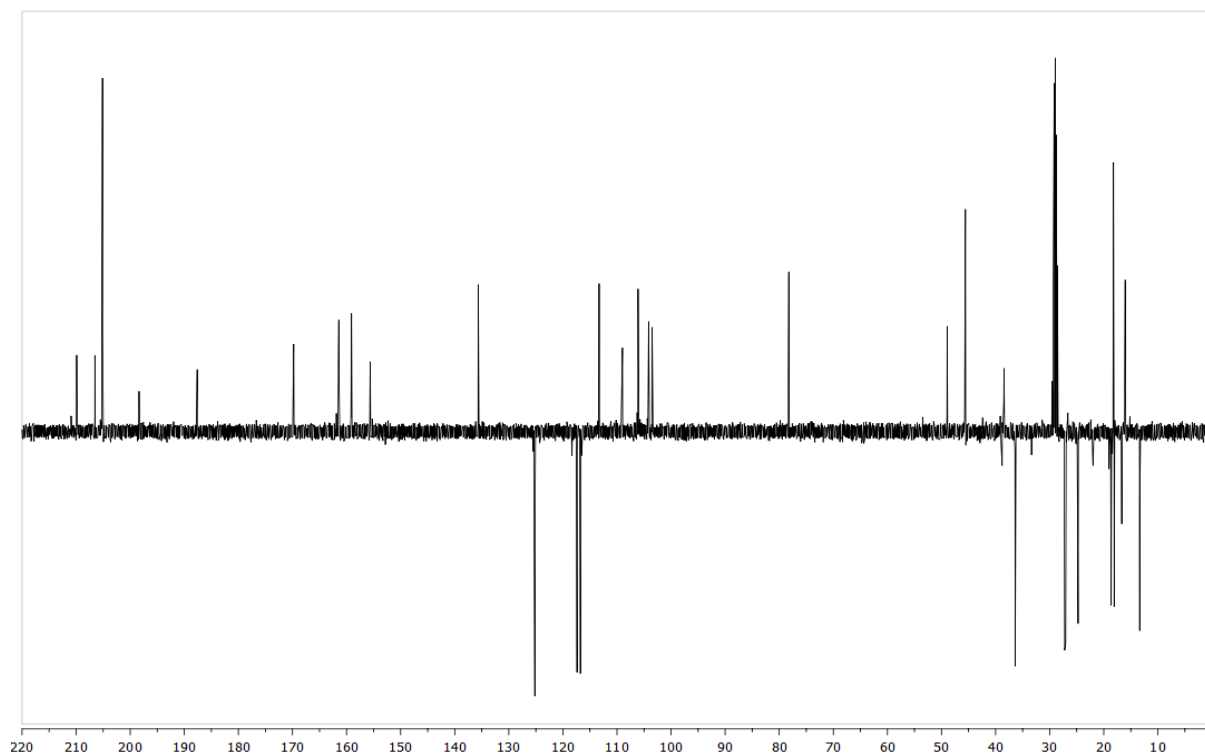
S12. IR spectrum of austrobrasilol B (2)



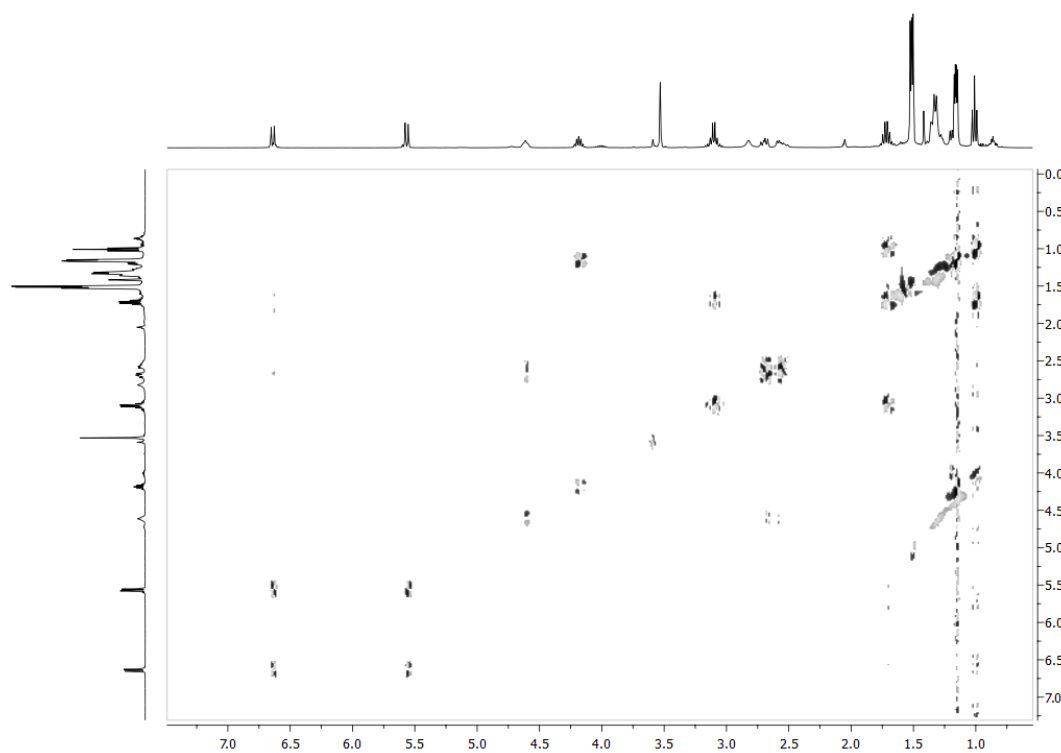
S13. ^1H NMR spectrum of austrobrasilol B (2) (acetone- d_6 , 400 MHz)



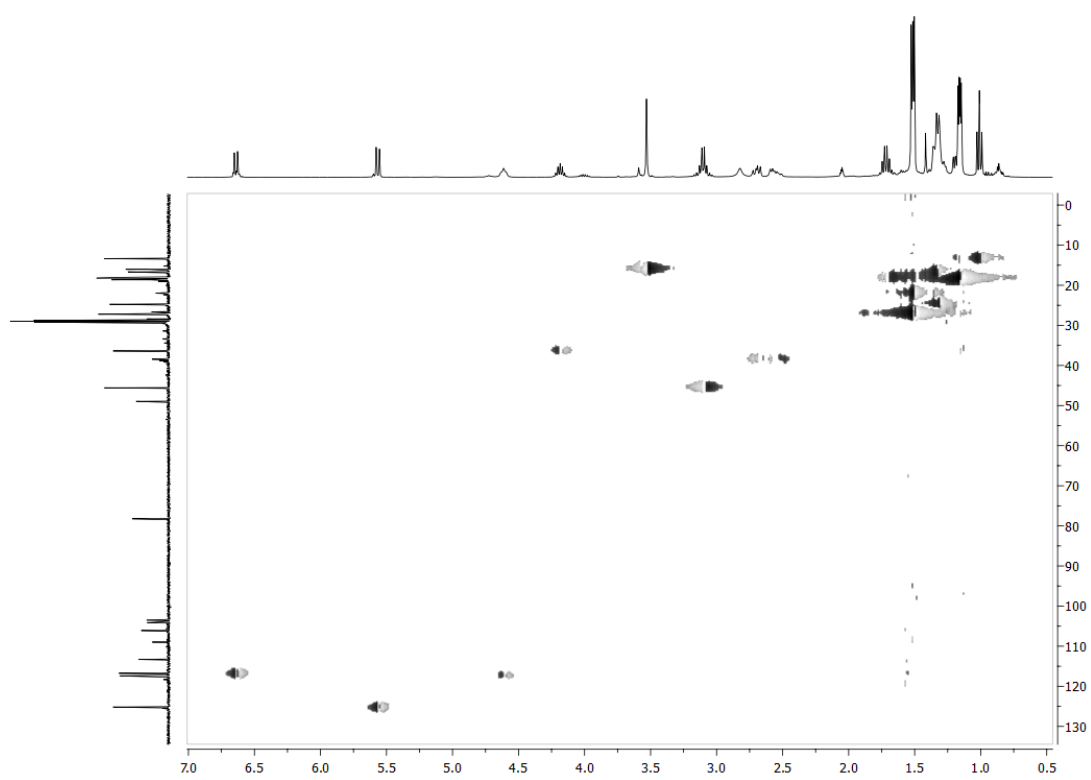
S14. ^{13}C NMR spectrum of austrobrasilol B (**2**) (acetone- d_6 , 100 MHz)



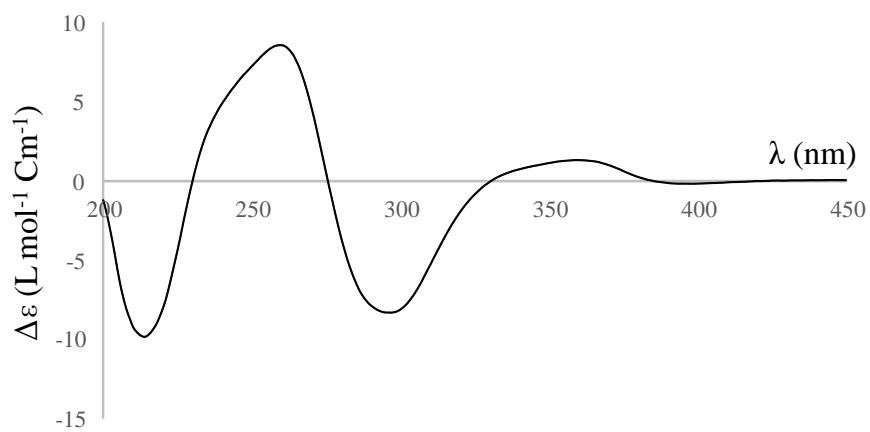
S15. APT spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6



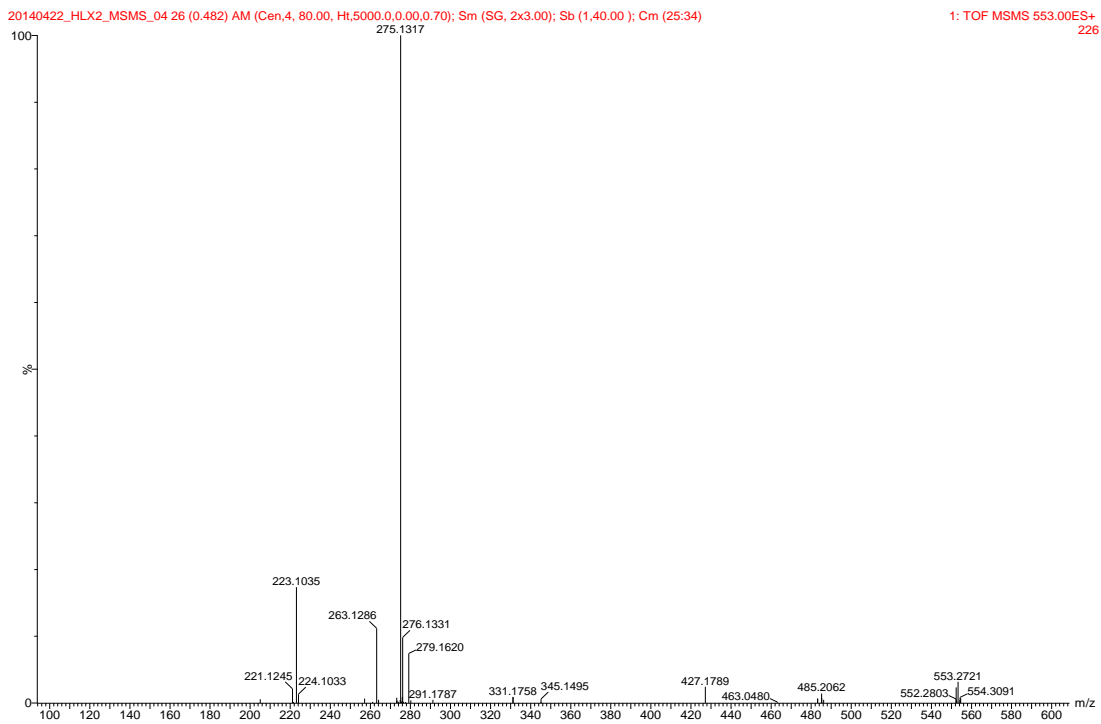
S16. ^1H - ^1H COSY spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6



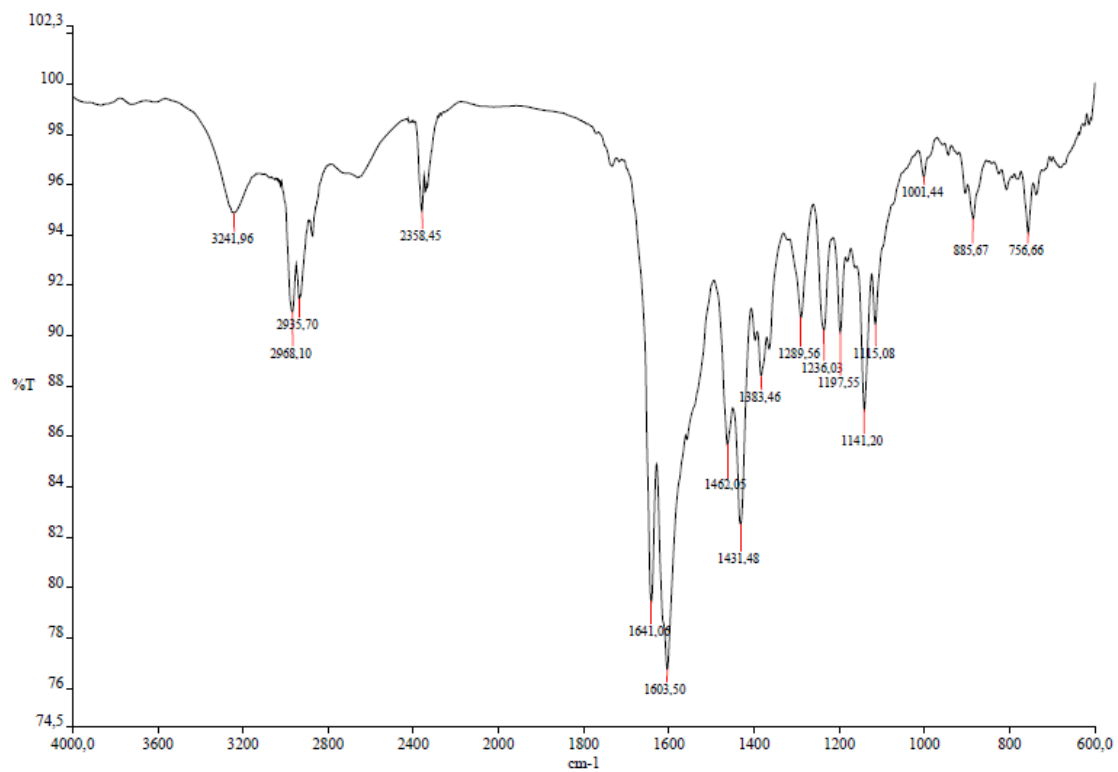
S17. HSQC spectrum of austrobrasilol B (**2**) in acetone- d_6



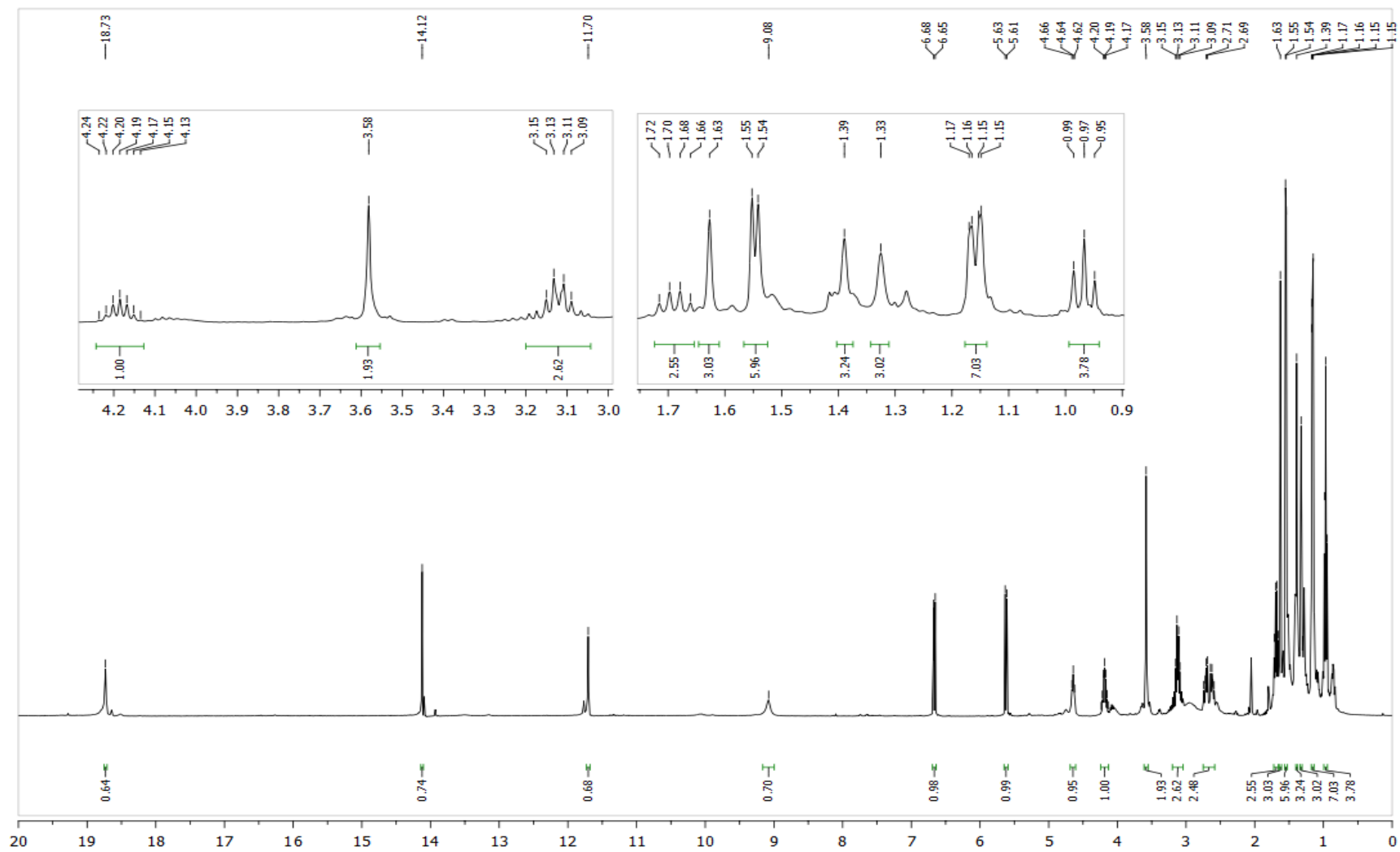
S19. CD spectrum of austrobrasilol B (**2**) in ethanol (5.98×10^{-5} mol/L)



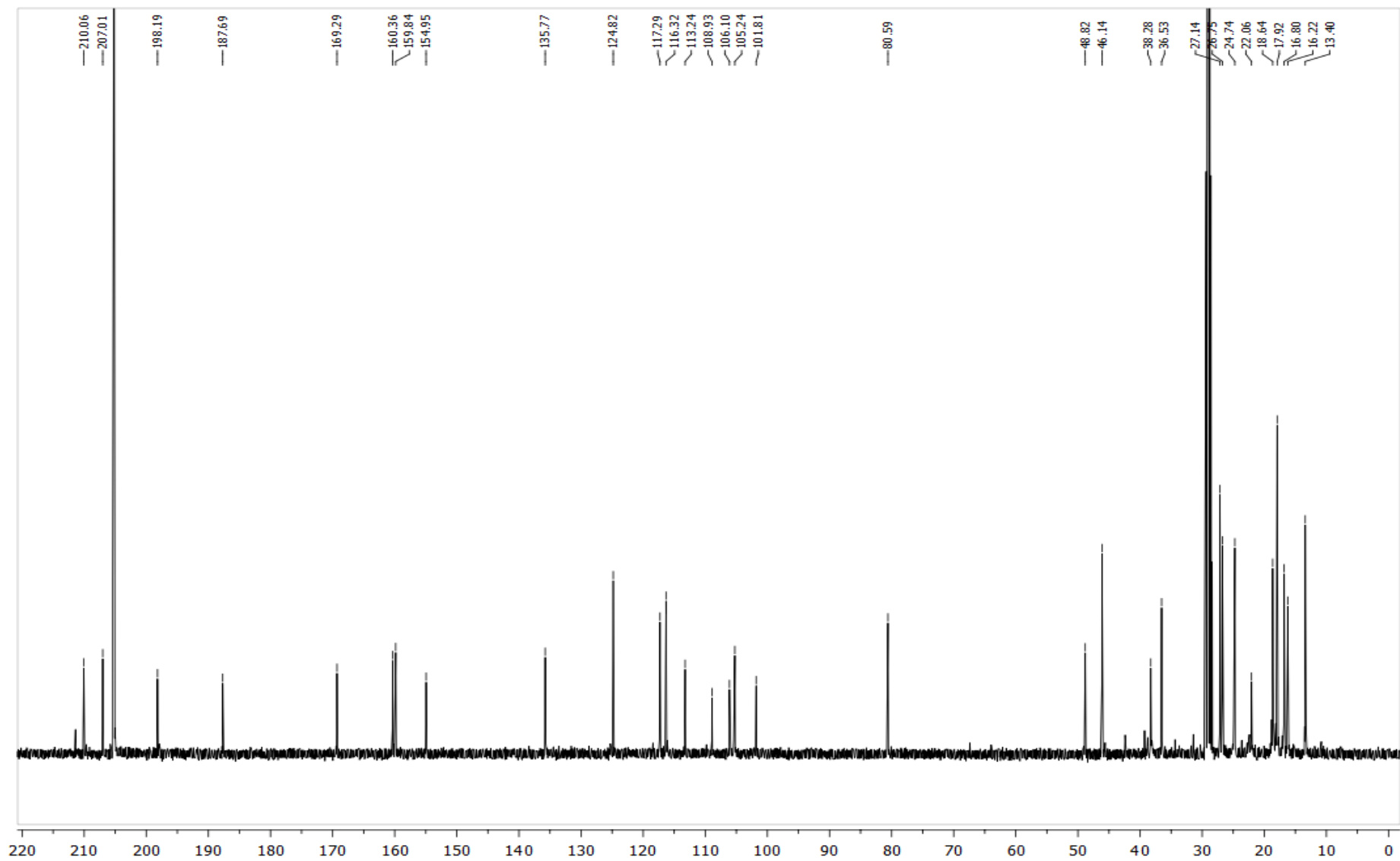
S20. ESIMS spectrum of isoastrobrasilol B (3)



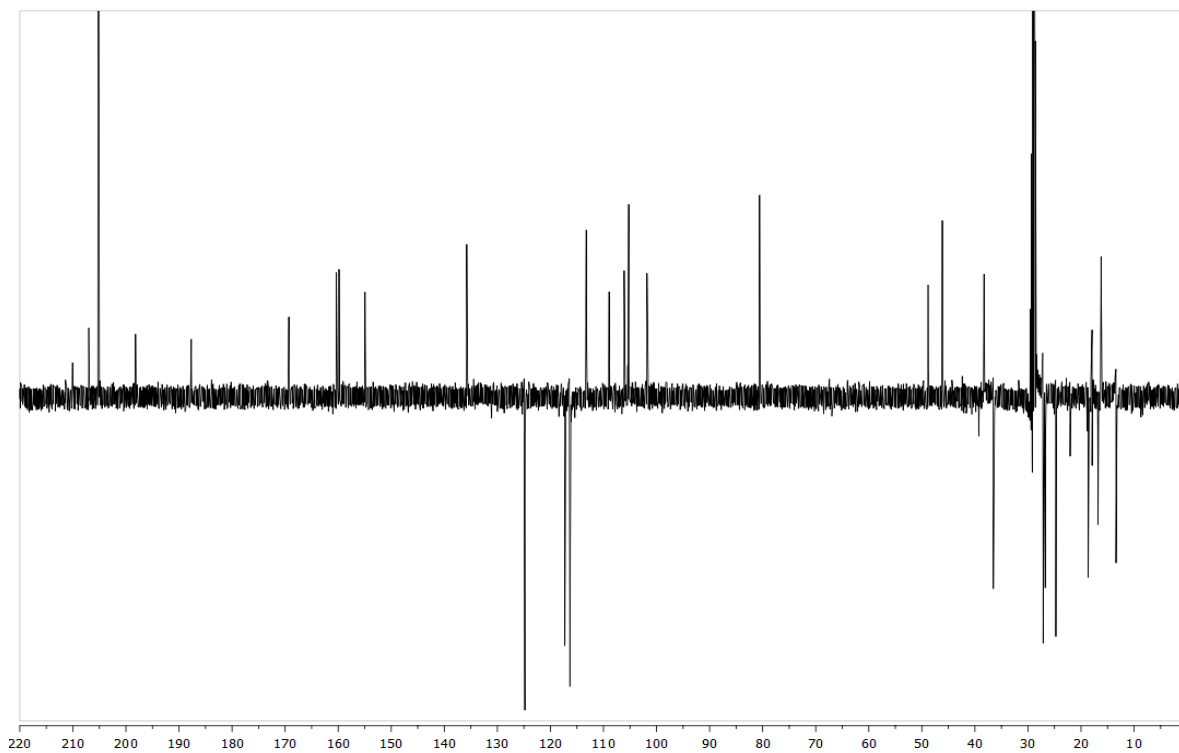
S21. IR spectrum of isoastrobrasilol B (3)



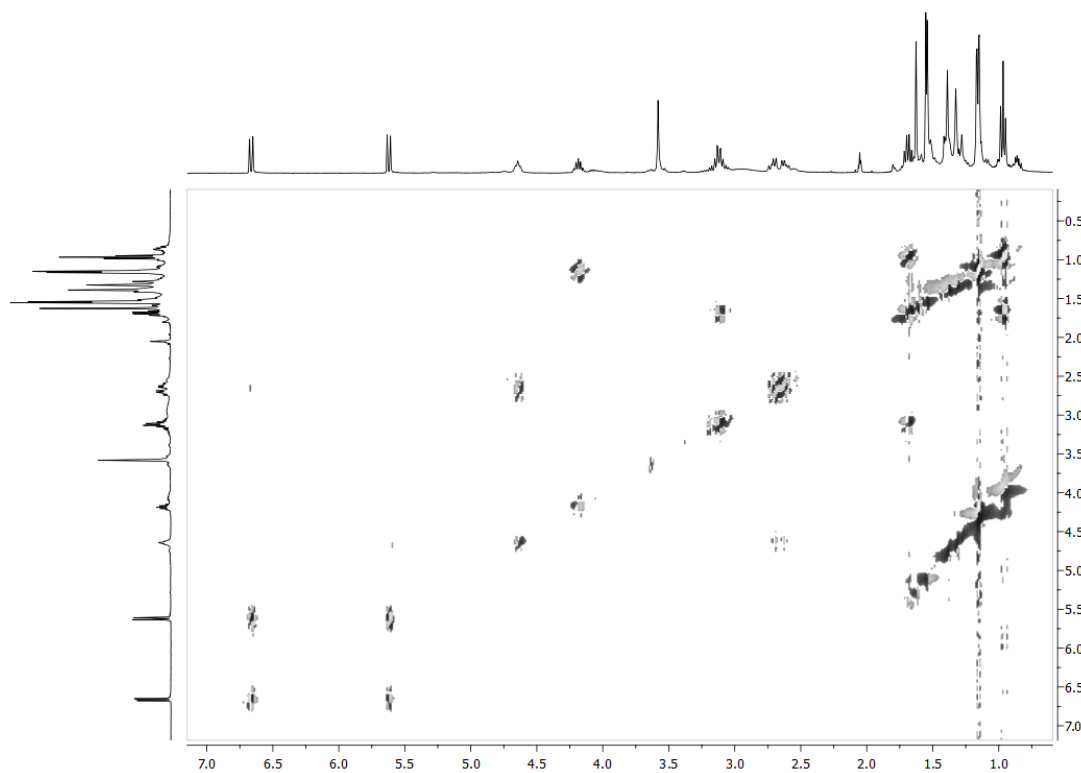
S22. ^1H NMR spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) (acetone- d_6 , 400 MHz)



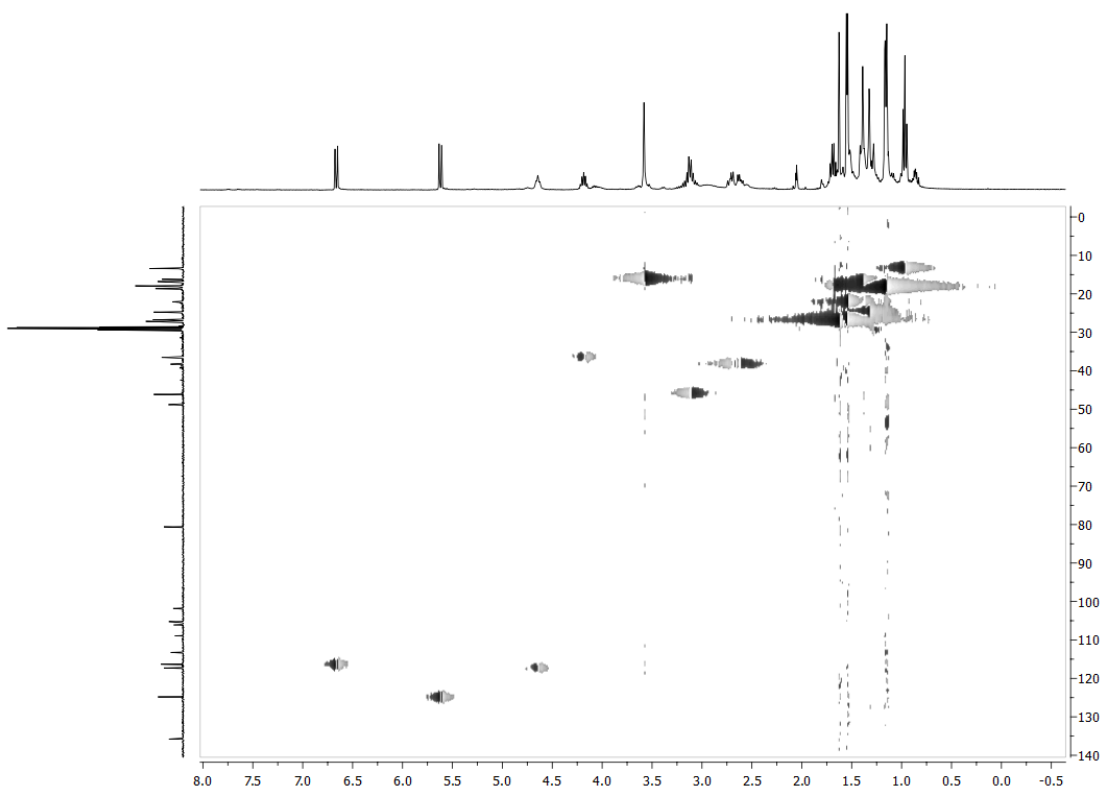
S23. ^{13}C NMR spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) (acetone- d_6 , 100 MHz)



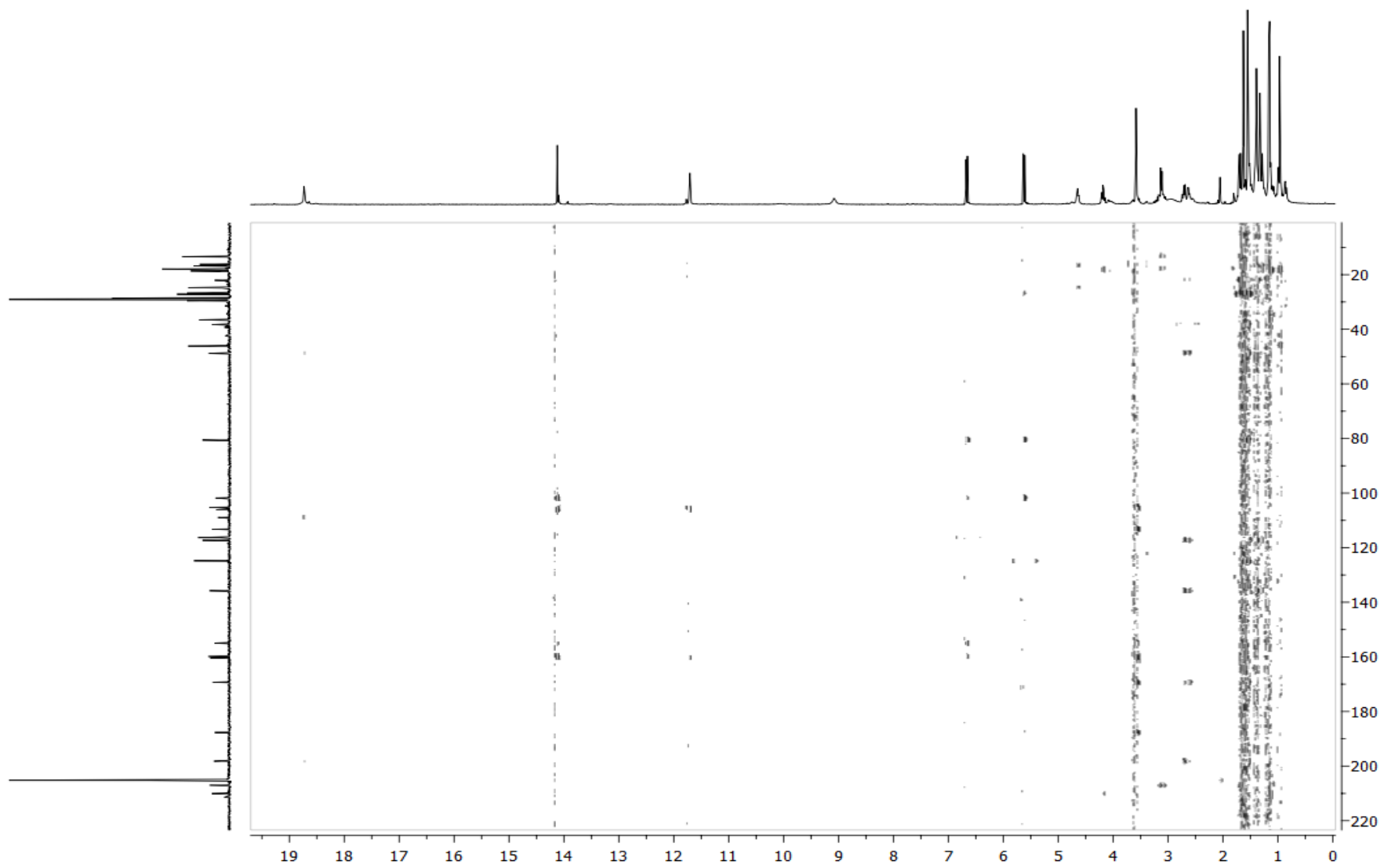
S24. APT spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6



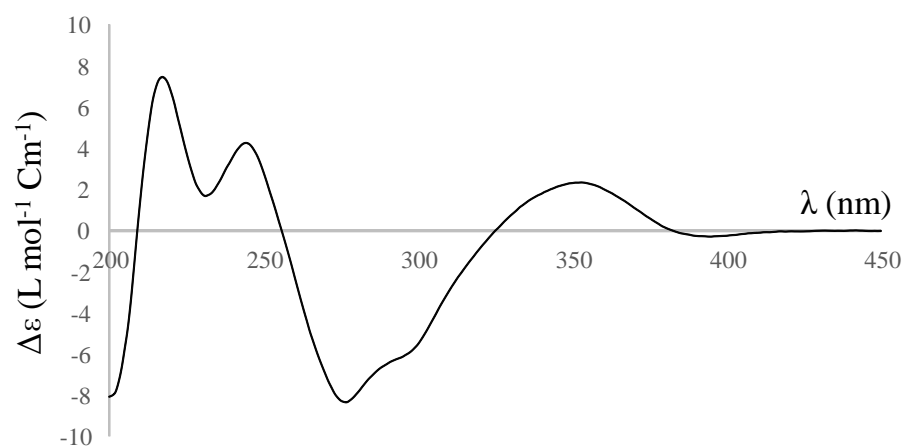
S25. ^1H - ^1H COSY spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6



S26. HSQC spectrum of isoastrobrasilol B (**3**) in acetone- d_6



S27. HMBC spectrum of isoastrobrasilol B (3) in acetone- d_6



S28. CD spectrum of isoastrobrasilol B (**2**) in ethanol (5.98×10^{-5} mol/L)

Além do isolamento de floroglucínóis diméricos da espécie *H. austrobrasiliense* durante o desenvolvimento deste trabalho foram também investigadas as partes aéreas de *H. caprifoliatum*, levando ao isolamento de hiperbrasilol B (**1**) e iso-hiperbrasilol B (**2**) e uma mistura de dois floroglucínóis (compostos **3** e **4**) cujas estruturas não estão, até o momento, completamente elucidadas.

Materiais e métodos

Procedimentos gerais

Os espectros de 1D- e 2D-RMN foram obtidos em um espectrômetro Varian MR400 (operando a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C). Os espectros foram realizados em acetona- d_6 (99,9%, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e clorofórmio deuterado (CDCl_3) (99,5 %, Merck, Darmstadt, Alemanha) mantendo como referência o sinal residual do solvente não deuterado (δ_{H} 2.05/ δ_{C} 29.8 para acetona- d_6 e δ_{H} 7.27/ δ_{C} 77.0 para CDCl_3). Espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro Waters Q-TOF Premier equipado com uma fonte nanospray de íons operando em modo positivo.

Acetona, diclorometano, *n*-hexano, acetato de etila, (F. Maia, Cotia, São Paulo, Brasil) e ácido fórmico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foram utilizados no processo de extração e isolamento. Para visualizar o processo de isolamento, as frações obtidas após os processos cromatográficos foram submetidos à análise por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatoplasmas de alumínio revestidas com sílica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase estacionária e *n*-hexano- acetato de etila (95:5) como fase móvel. Após a eluição as placas foram analisadas sob luz UV (254 e 356 nm) e reveladas com a aplicação de anisaldeído sulfúrico e posterior aquecimento. Cromatografia líquida a vácuo (CLV) foi realizada com sílica gel 60 (0.06-0.2 mm; Acros Organics, New Jersey, USA) e cromatografia centrífuga planar (CCP) for realizada com sílica gel 60 G F₂₅₄ (placas de 1 mm) utilizando o equipamento ChromatotronTM (modelo 7924T, Harrison Research, San Bruno, CA, USA).

Material vegetal

As partes aéreas em floração de *H. caprifoliatum* foram coletadas em Porto Alegre – RS (Outubro de 2012). A planta foi identificada pelo Dr. Sérgio Bordignon (UNILASSALE, RS, Brazil) comparando a planta coletada com a exsicata depositada no herbário da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (Bordignon *et al.*, 2287). A coleta foi autorizada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis) (no. 003/2008; Protocolo 02000.001717/2008-60).

Extração e isolamento

As flores secas e moídas (aproximadamente 500 g) foram maceradas sucessivamente com *n*-hexano em ciclos de 24h (relação planta-solvente 1:5) até a exaustão. O extrato livre de solventes foi tratado com acetona gelada para obter a fração solúvel em acetona (aprox. 25 g) e um resíduo graxo insolúvel.

A fração solúvel em acetona (aprox. 15 g) foi submetida a CLV utilizando-se um gradiente de eluição de *n*-hexano:diclorometano (100:0-0:100) como fase móvel, obtendo-se 12 frações (Fr.1-12). As Fr. 1-4 foram submetidas a repetidas CCP utilizando um gradiente de eluição de *n*-hexano-acetona (100:0-90-10) como fase móvel, obtendo dessa forma o composto **1** (70 mg). No processo de isolamento do composto **1** foram obtidas duas sub-frações (SbFr. 1-2). A SbFr. 1 foi submetida a CCP utilizando o gradiente de eluição *n*-hexano-acetato de etila (100:0-90:10) como fase móvel, para a obtenção do composto **2** (35 mg). A SbFr. 2 foi submetida a CCP eluído com *n*-hexano-diclorometano-ácido fórmico (100:0:0,25-50:50:0,25) obtendo-se, dessa forma, a mistura dos compostos **3** e **4** (SbFr. 2.1) (250 mg).

RESULTADOS

Das flores de *Hypericum caprifoliatum* foram isolados dois floroglucínóis diméricos identificados através de técnicas de RMN (^1H e ^{13}C) (**Dados em Material Suplementar 1-6**) e espectrometria de massas como hiperbrasilol B (**1**) e iso-hiperbrasilol B (**2**), comparando-se dados previamente relatados na literatura. Além dos dois compostos previamente identificados, foi realizada a tentativa de isolamento do floroglucínol dimérico HC1.

Trabalhos anteriores do grupo descrevem que o composto codificado como HC1 seria um derivado de floroglucínol dimérico com uma porção acilfilicínica ligado por uma ponte metilênica à porção floroglucínol. Além disso, na porção floroglucínol não haveria a presença do anel benzopirano, pois a prenila ligada no carbono C-11' não estaria ciclizada na hidroxila 10' (da mesma forma que ocorre na uliginosina A e hiperbrasilol C). Esta substância teria

massa provável de 554, correspondente a fórmula molecular $C_{32}H_{42}O_8$ (DAUDT *et al.*, 2000; NÖR, 2007).

No processo de isolamento chegou-se a uma fração (SbFr. 2.1) que apresenta características cromatográficas (Fração nº 8 da CCD; **Figura 3**) semelhantes as encontradas no trabalho anterior como sendo do composto HC1. Desta forma, foram realizadas espectrometria de massas e espectroscopia de RMN 1D- (1H , ^{13}C , APT) e 2D-(HSQC, HMBC).

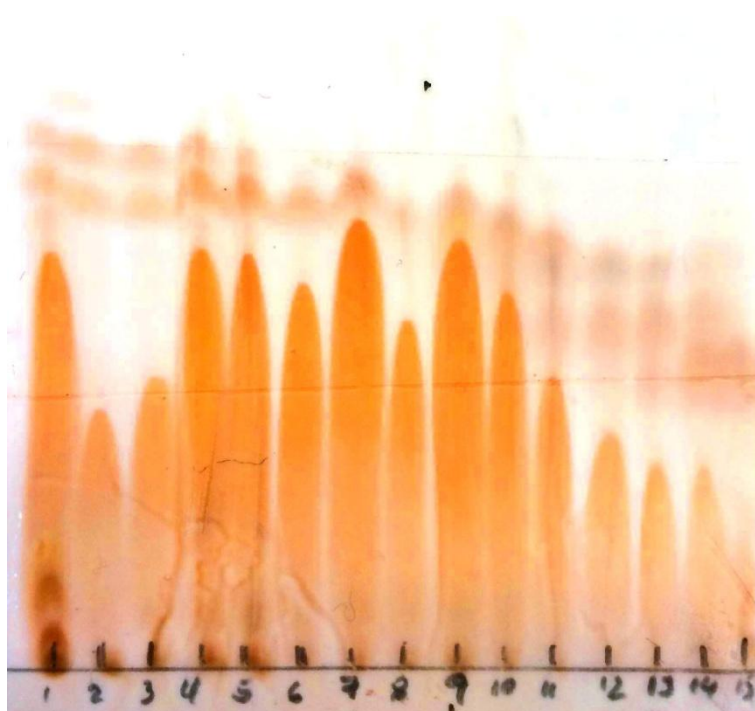


Figura 3. CCD das frações obtidas na CCP com a SbFr. 2, eluída com hexano diclorometano-ácido fórmico (60:40:0.25%) e revelada com anisaldeído-sulfúrico.

A análise do espectro de massas revelou dois fragmentos principais de m/z 623 e m/z 555. A partir de então o composto de m/z 623 foi denominado composto **3** (correspondente a fórmula molecular $C_{37}H_{50}O_8$) e o composto de m/z 555 de composto **4** (correspondente a fórmula molecular $C_{32}H_{42}O_8$).

Os espectros de RMN de 1H demonstram sinais que sugerem a presença de floroglucínóis diméricos na amostra, como o sinal em δ_H 18.73, característico do sistema enolizável β -tricetona, o sinal em δ_H 3.55 relativo à ponte metilênica e os sinais em δ_H 4.08 e

4.19, relativos a H-15 e H-13' presentes nas isobutirilas. Entretanto, quando é realizada a integração destes picos os mesmos encontram-se duplicados, sugerindo-se novamente a presença de dois compostos na mistura.

Com os dados de RMN e massas acima citados sugere-se que os compostos **3** e **4** sejam floroglucinóis diméricos com estruturas químicas ainda inéditas na literatura e que teriam como principal diferença a presença de uma geranila ligada no C-4 no composto **3** e uma prenila neste mesmo carbono no composto **4** (**Figura 4**).

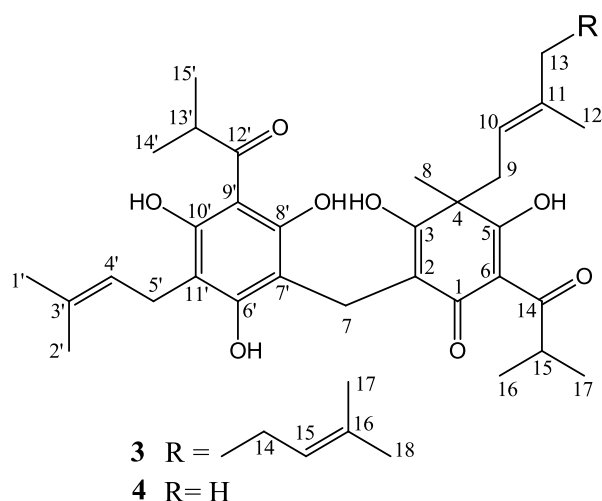


Figura 4. Estrutura química proposta para os compostos **3** e **4**.

Além dos dados de RMN, os espectros de massas foram de grande valia na tentativa de elucidação destas novas estruturas, pois o composto **4** tem o perfil cromatográfico e fragmento de massas (m/z 555) previamente relatado como sendo do composto HC1. Além disso, a m/z 623 apresentada pelo composto **3** tem o acréscimo de 68 u.m.a., sendo esta massa adicional relativa a presença de uma geranila ligada em C-4, diferentemente do composto **2** que apresenta uma prenila nesta posição.

Ainda analisando o espectro de massas, a fragmentação das substâncias apresenta principalmente dois fragmentos de m/z 277 e m/z 345. Levando em consideração que frequentemente os floroglucinóis diméricos fragmentam-se na ponte metilênica, gerando dois fragmentos mais estáveis, esse é um dado adicional que reforça a estrutura proposta (**Figura 5**).

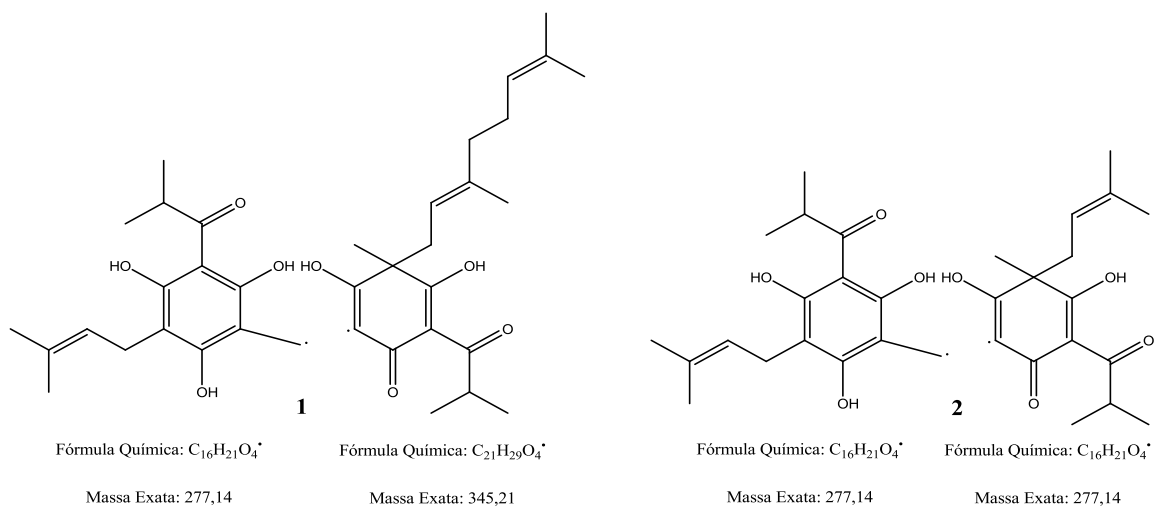
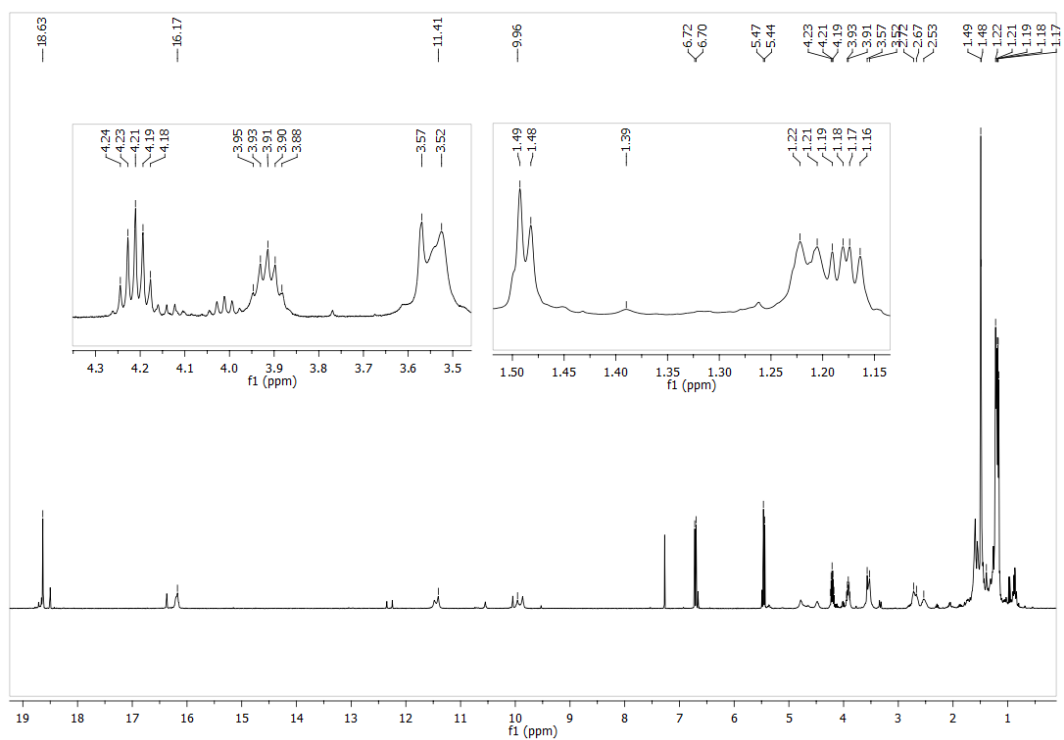


Figura 5. Principais fragmentos obtidos a partir da fragmentação dos compostos **3** e **4** através da ponte metilênica.

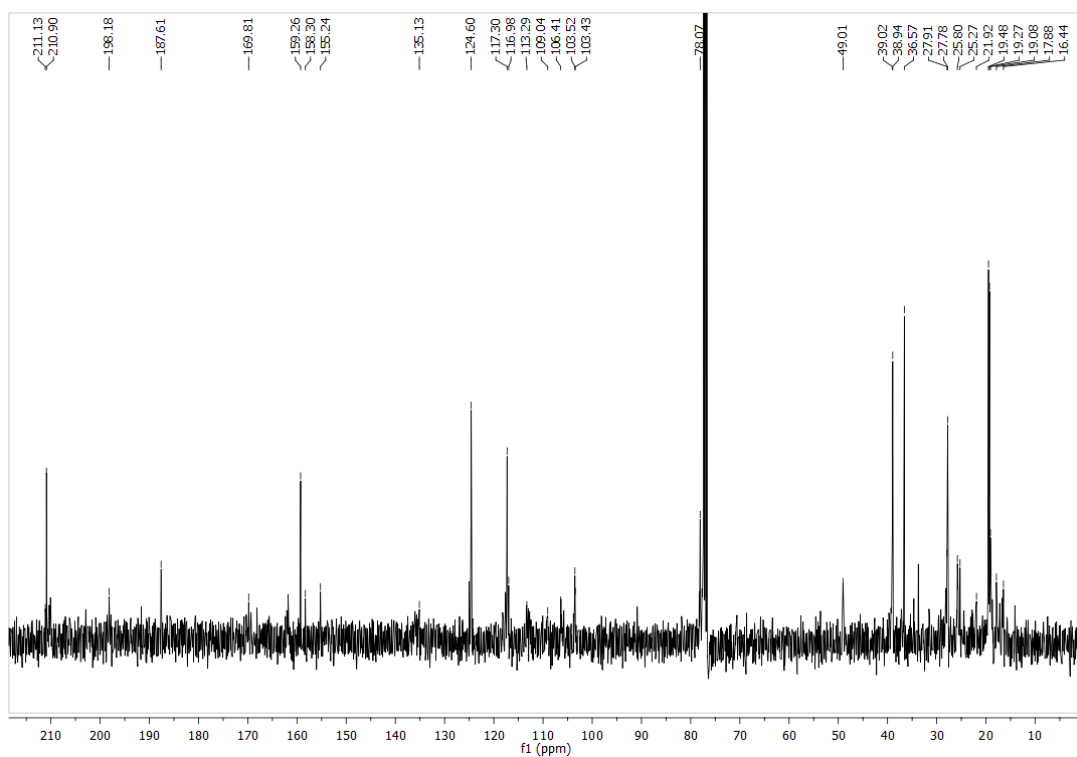
RESULTADOS ADICIONAIS

MATERIAL SUPLEMENTAR

- MS 1. ^1H RMN de hiperbrasilol B em CDCl_3 ;
- MS 2. ^{13}C RMN de hiperbrasilol B em CDCl_3 ;
- MS 3. Espectro de massas de iso-hiperbrasilol B;
- MS 4. ^1H RMN de iso-hiperbrasilol B em acetona- d_6 ;
- MS 5. ^{13}C RMN de iso-hiperbrasilol B em acetona- d_6 ;
- MS 6. Espectro de massas da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;
- MS 7. Fragmentação do composto **1** (m/z 623);
- MS 8. Fragmentação do composto **2** (m/z 555);
- MS 9. ^1H RMN da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;
- MS 10. ^{13}C RMN da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;
- MS 11. APT da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;
- MS 12. HSQC da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;
- MS 13. HMBC da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;
- MS 14. HMBC ampliado da mistura dos compostos **1** e **2** em acetona- d_6 ;



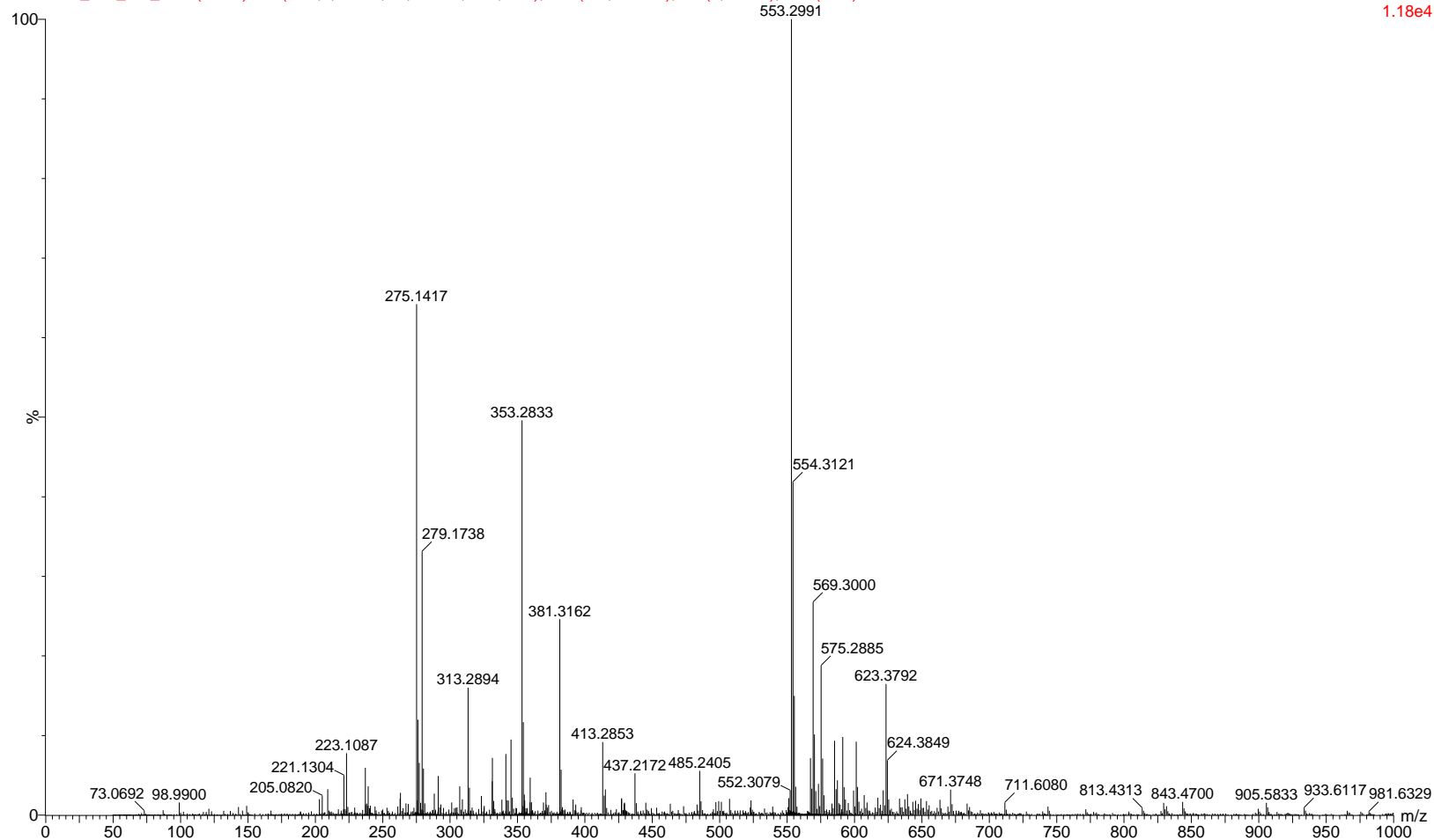
MS 1. ^1H RMN de hiperbrasilol B em CDCl_3 ;



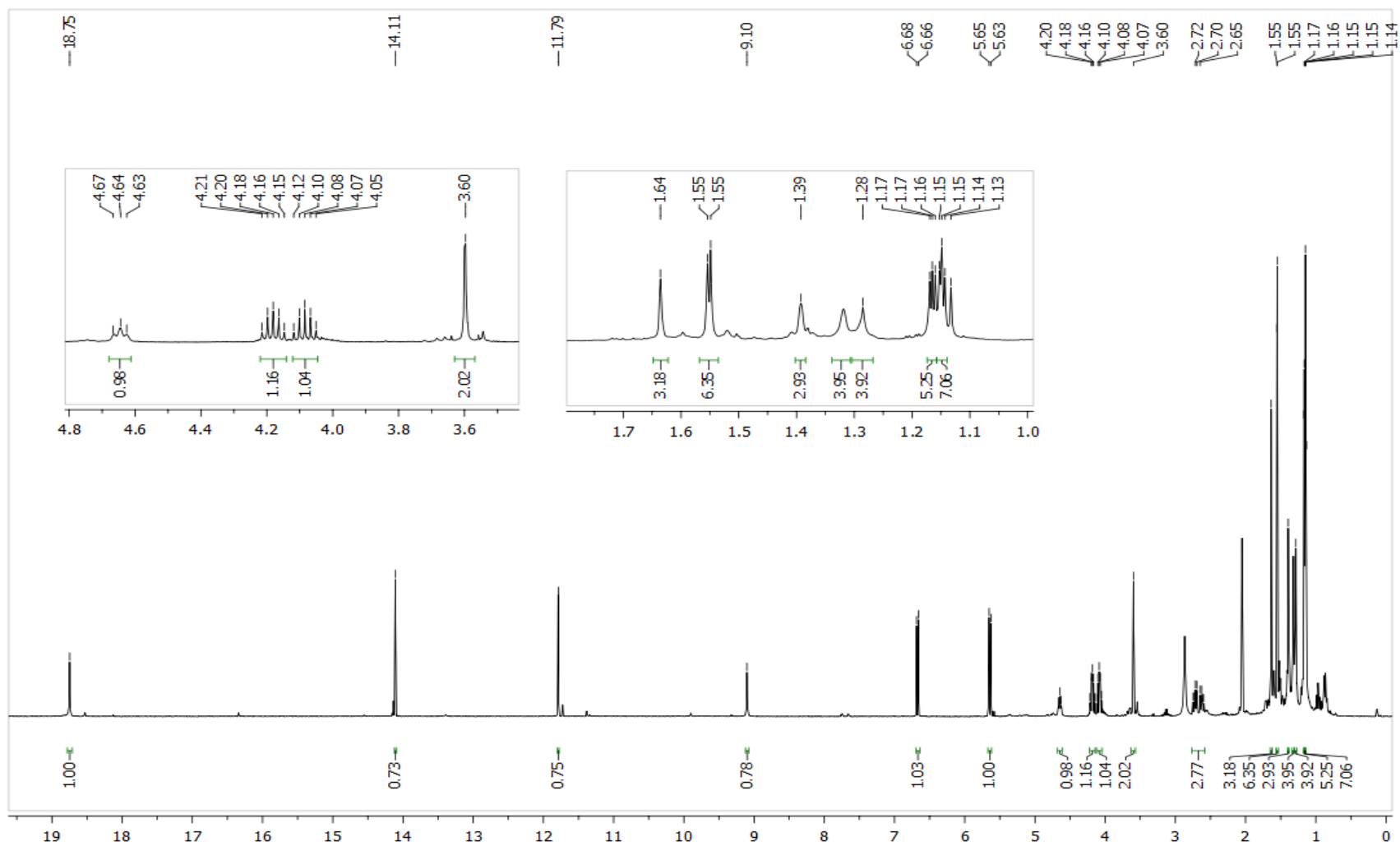
MS 2. ^{13}C RMN de hiperbrasilol B em CDCl_3

20140728_IHB_MS_11 9 (0.167) AM (Cen,4, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.70); Sm (SG, 2x3.00); Sb (1,40.00); Cm (2:20)

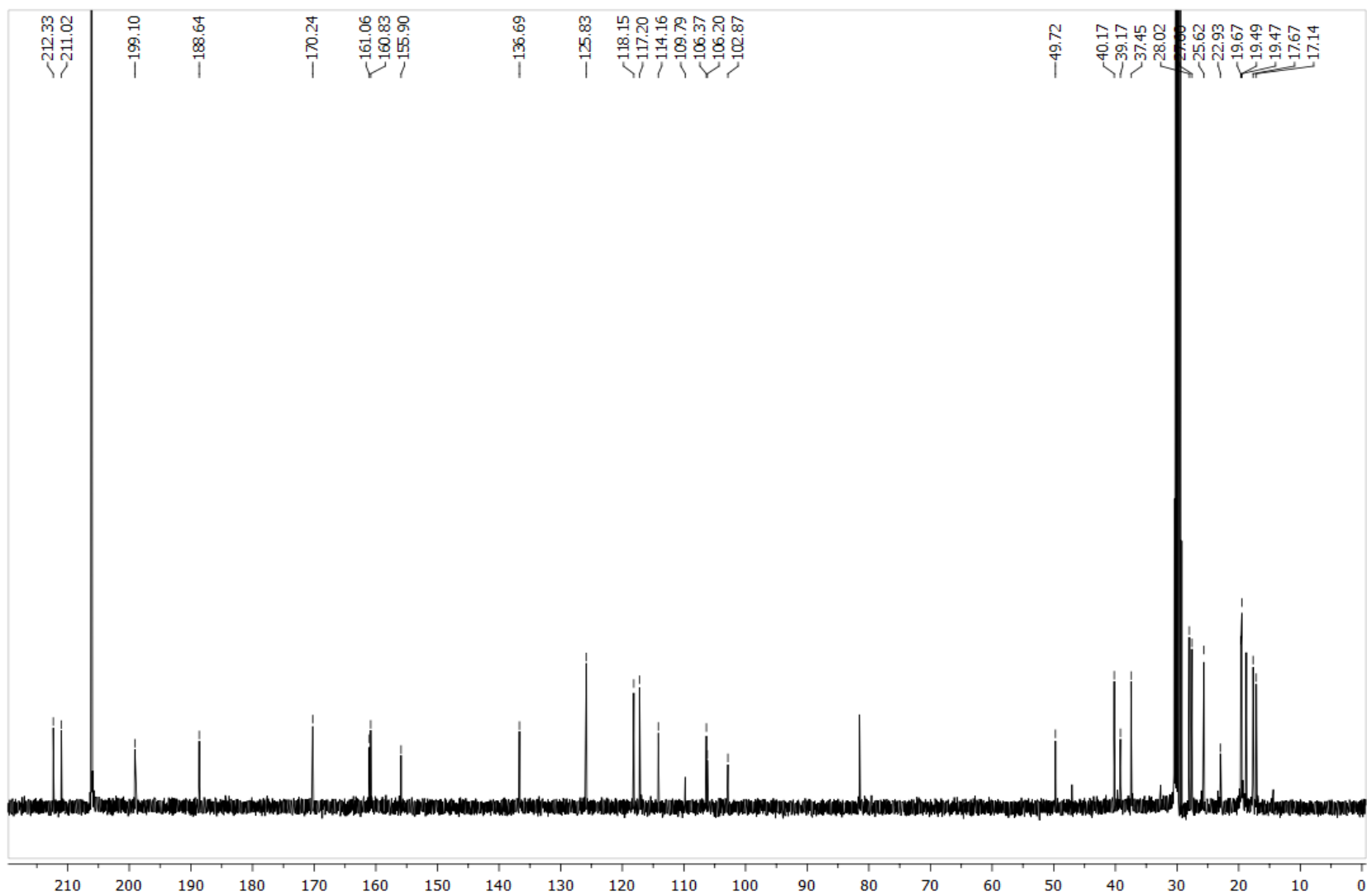
1: TOF MS ES+
1.18e4



MS 3. Espectro de massas de iso-hiperbrasilol B;



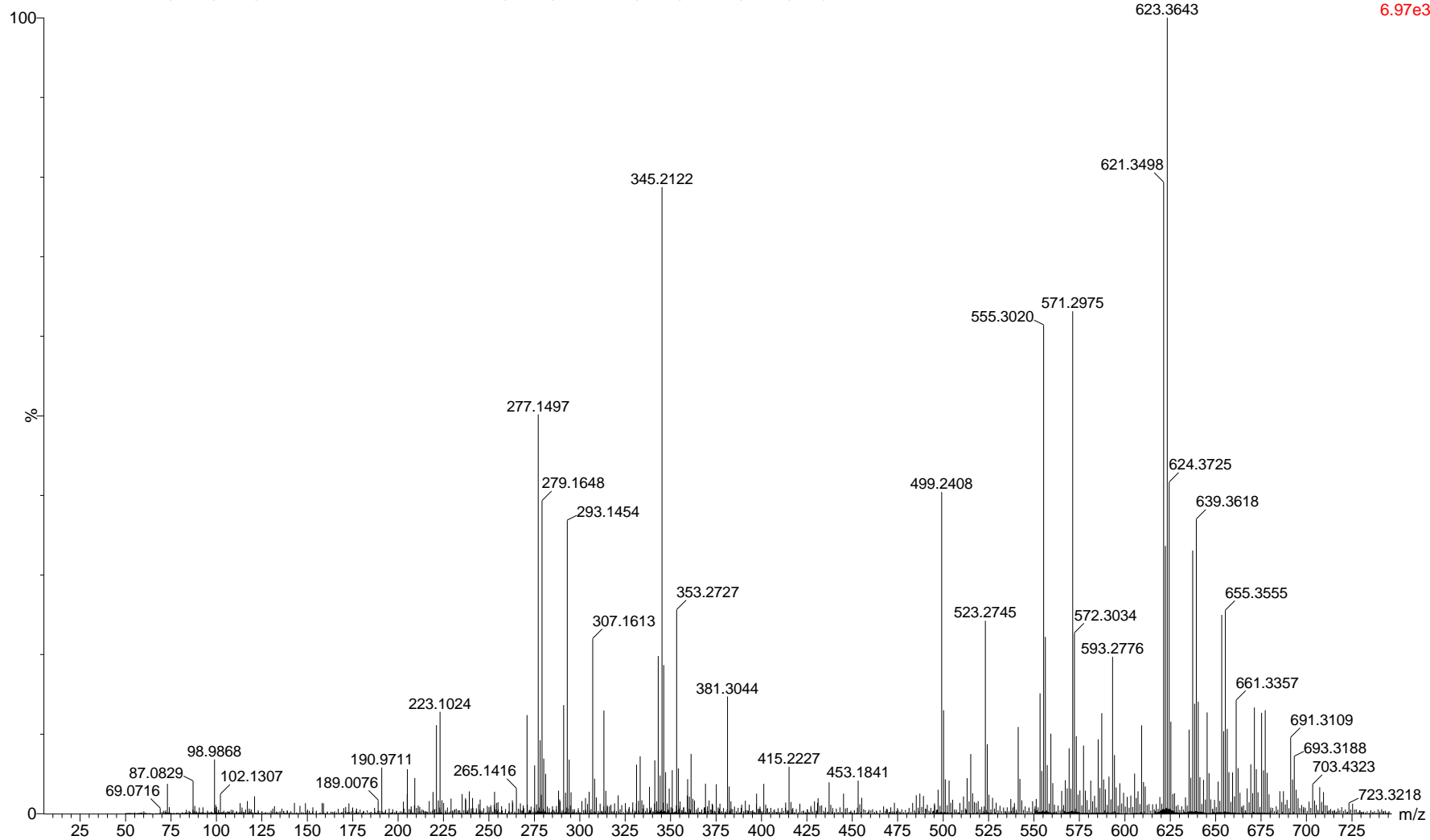
MS 4. ^1H RMN de iso-hiperbrasilol B em acetona- d_6 ;



MS 5. ^{13}C RMN de iso-hiperbrasilol B em acetona- d_6 ;

20140728_HC1_01 2 (0.037) AM (Cen,4, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.70); Sm (SG, 2x3.00); Sb (1,40.00); Cm (2:23)

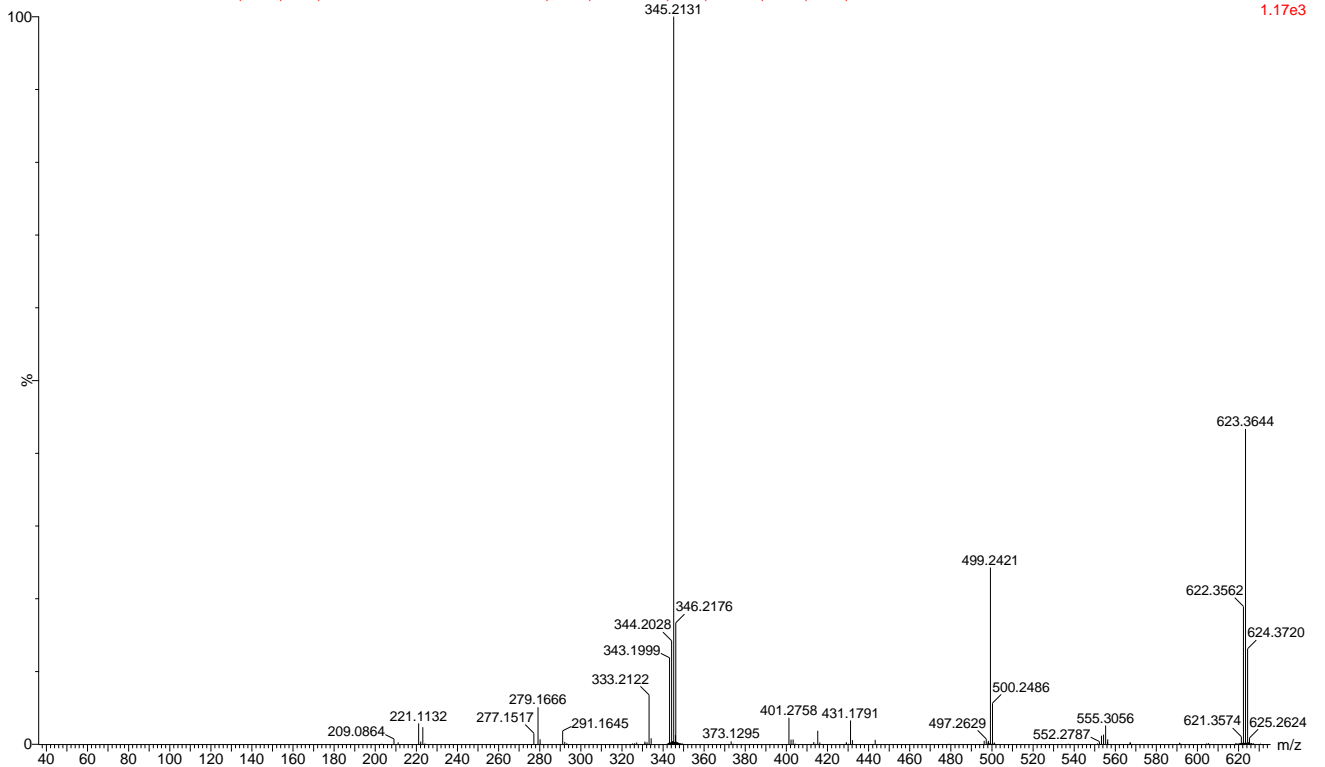
1: TOF MS ES+
6.97e3



MS 6. Espectro de massas da mistura dos compostos 1 e 2;

20140728_HC1_MSMS623_02 23 (0.427) AM (Cen,4, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.70); Sm (SG, 2x3.00); Sb (1,40.00); Cm (21:26)

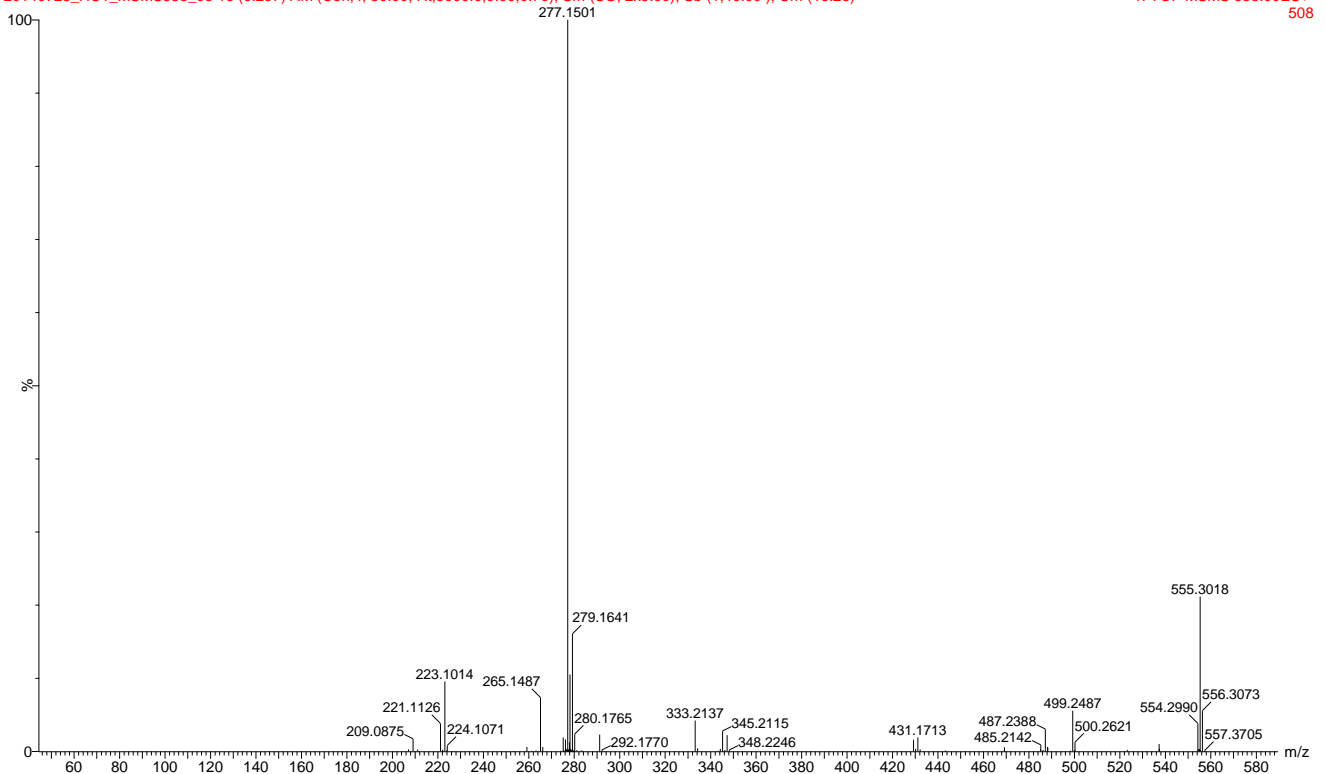
1: TOF MSMS 623.00ES+
1.17e3



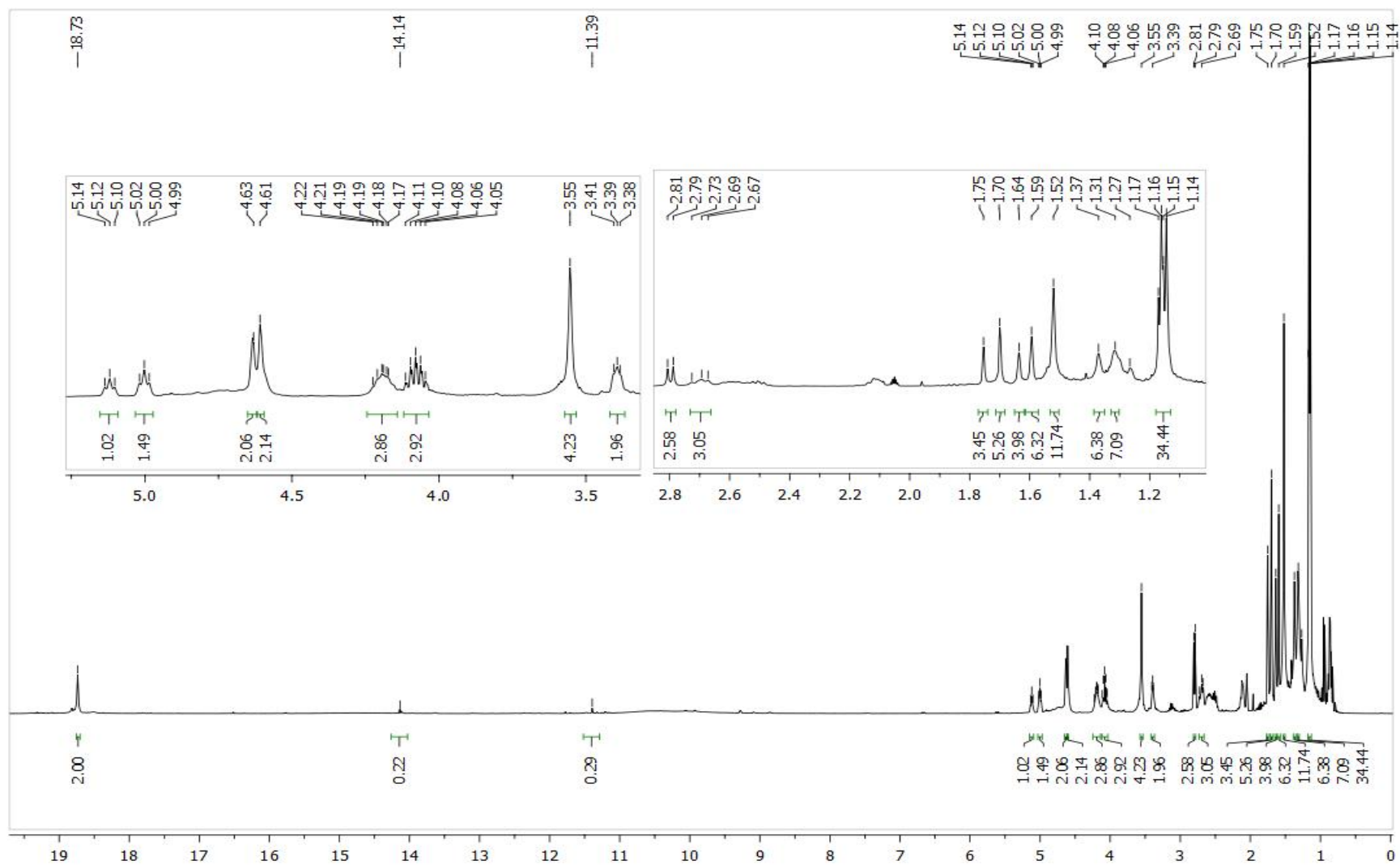
MS 7. Fragmentação do composto 1 (m/z 623);

20140728_HC1_MSMS555_03 16 (0.297) AM (Cen,4, 80.00, Ht,5000.0,0.00,0.70); Sm (SG, 2x3.00); Sb (1,40.00); Cm (16:26)

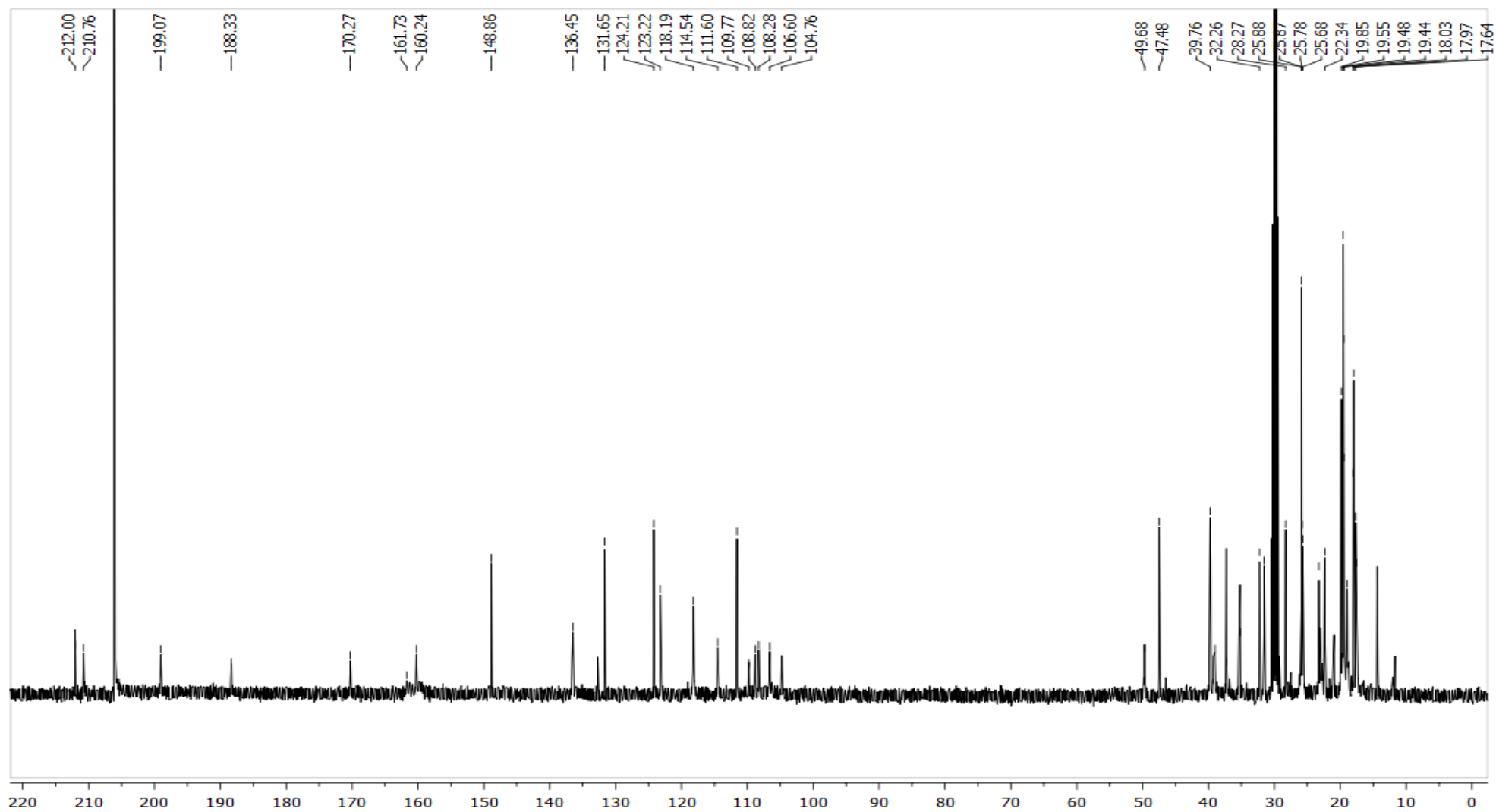
1: TOF MSMS 555.00ES+
508



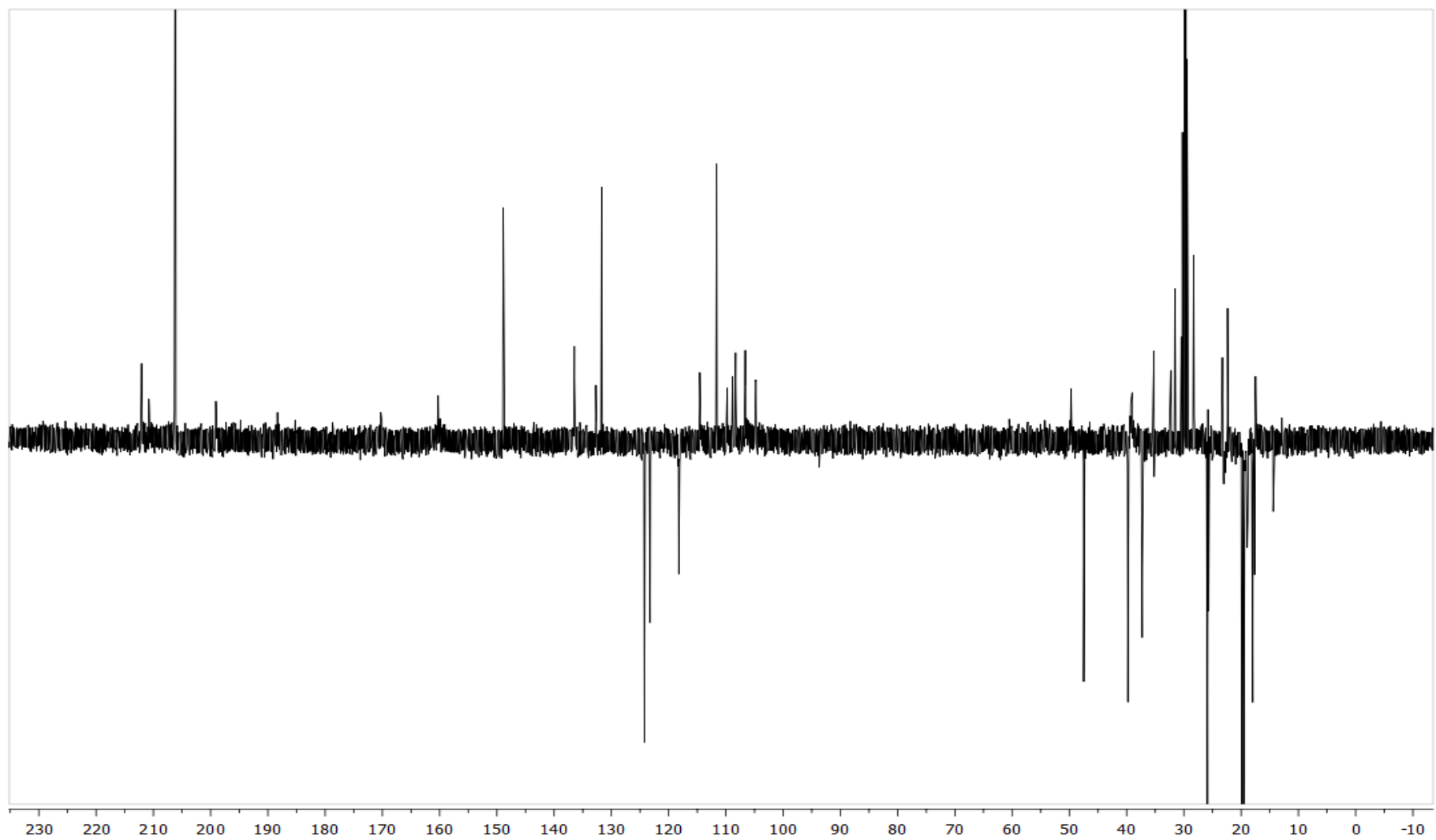
MS 8. Fragmentação do composto 2 (m/z 555);



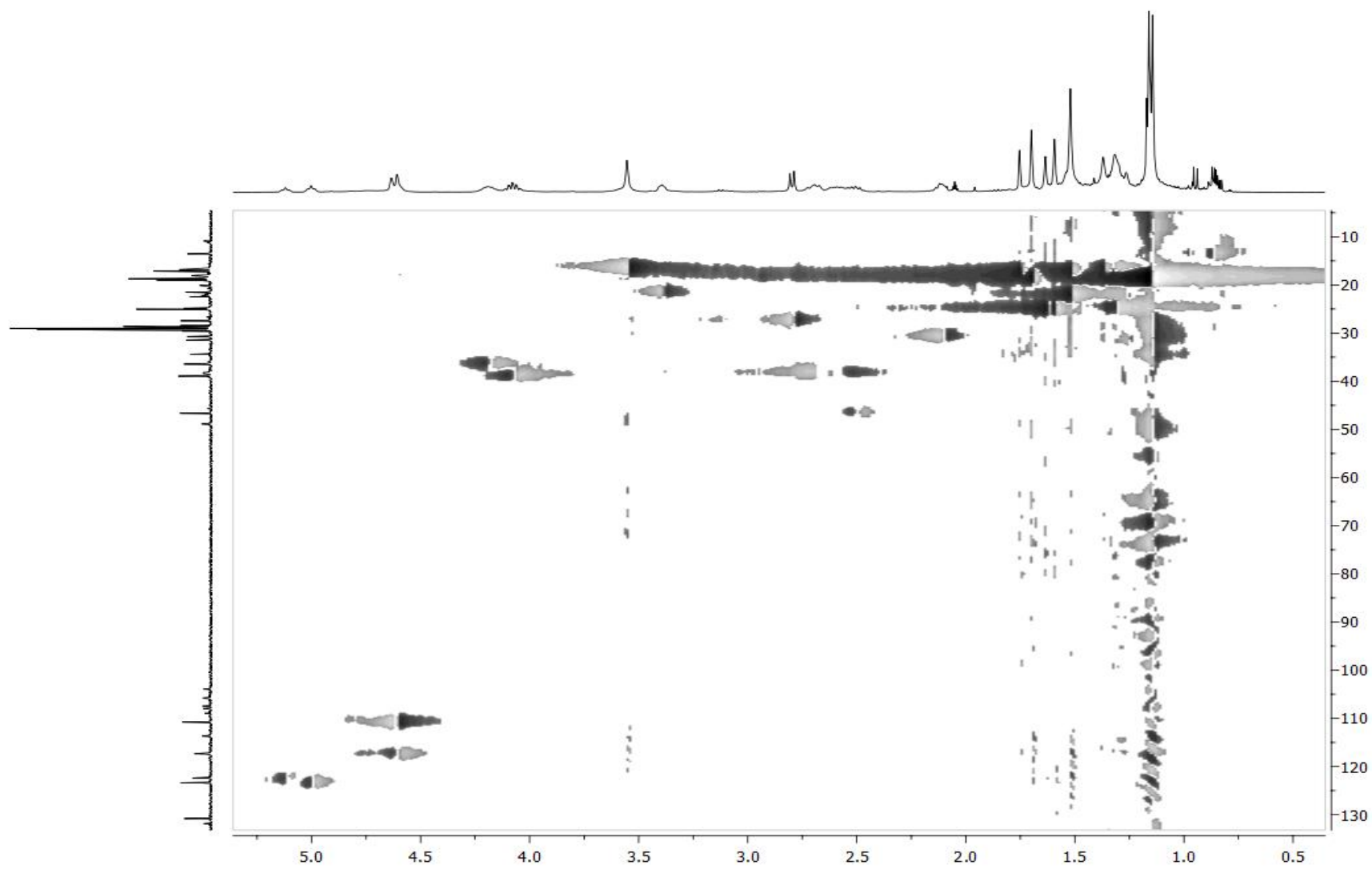
MS 9. ^1H RMN da mistura dos compostos **3** e **4** em acetona- d_6 ;



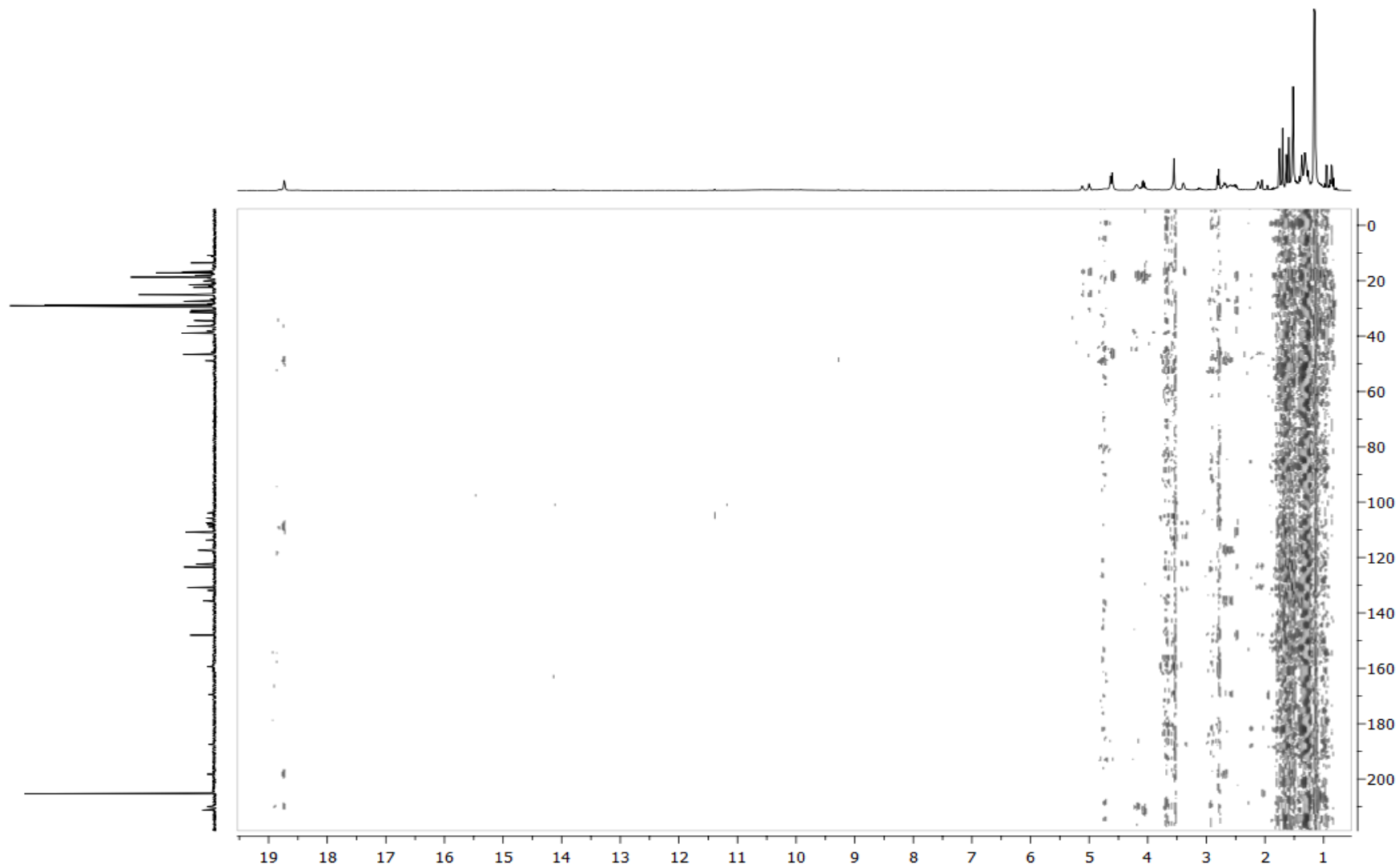
MS 10. ^{13}C RMN da mistura dos compostos **3** e **4** em acetona- d_6 ;



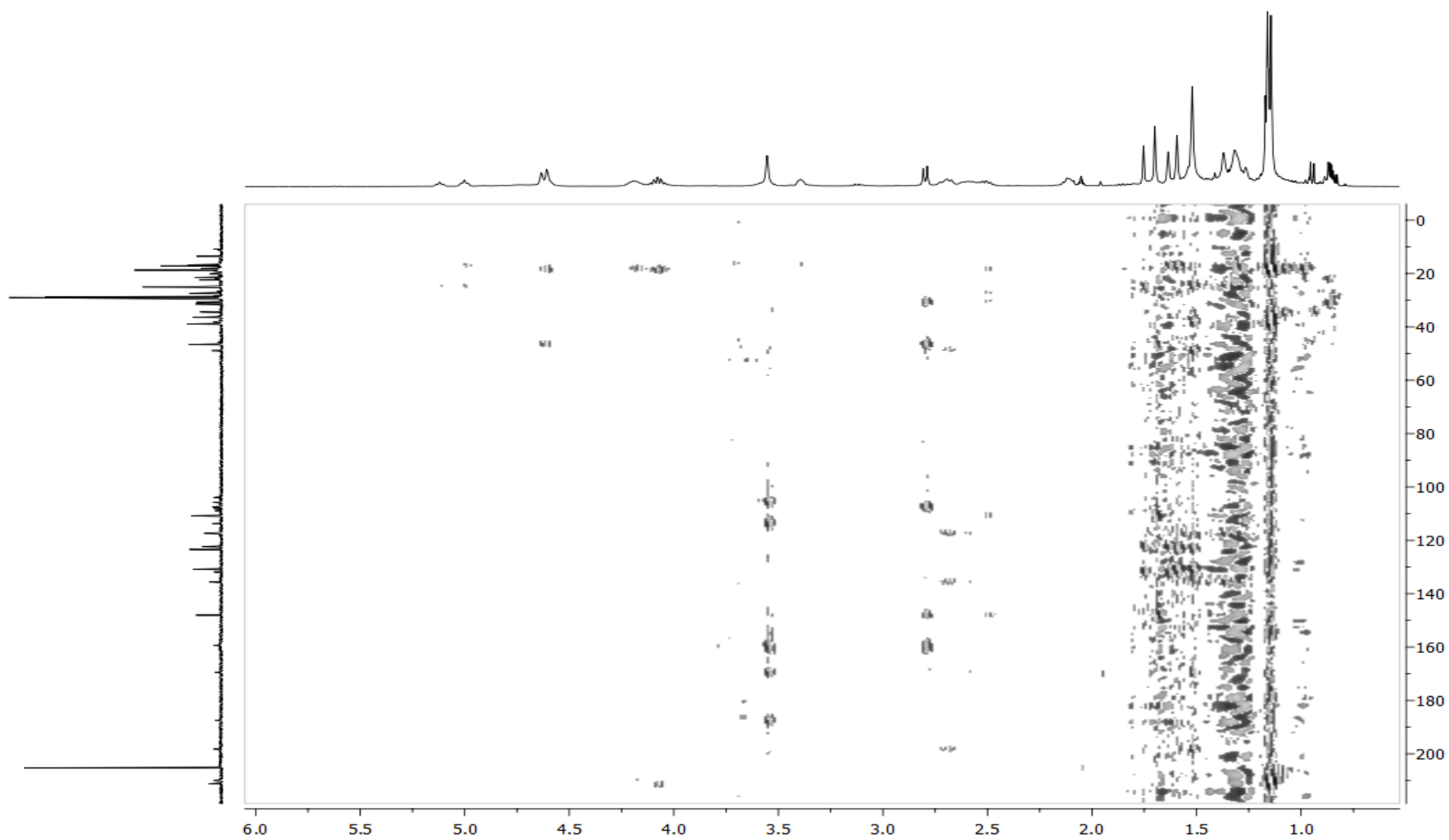
MS 11. APT da mistura dos compostos **3** e **4** em acetona- d_6 ;



MS 12. HSQC da mistura dos compostos **3** e **4** em acetona- d_6 ;



MS 13. HMBC da mistura dos compostos **3** e **4** em acetona-*d*₆;



MS 14. HMBC ampliado da mistura dos compostos **3** e **4** em acetona-*d*₆;

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Historicamente, a maceração de *Hypericum perforatum* com óleo de oliva gera um óleo denominado *Hyperici oleum*, que é utilizado popularmente como auxiliar no processo de cicatrização de feridas e queimaduras (WÖLFLE *et al.*, 2014). A caracterização química deste produto demonstrou que os principais compostos identificados são os derivados de floroglucinol (ISACCHI *et al.*, 2007). Tratando-se das espécies que ocorrem no sul do Brasil, os relatos da utilização popular para o tratamento de feridas são escassos; somente *H. connatum* foi citado para tal finalidade (MENTZ *et al.*, 1997).

Mesmo com os relatos escassos, avaliar estas espécies em um modelo indicativo de cicatrização é justificado pela importância que o processo cicatricial tem na melhora dos pacientes e também por apresentarem em sua porção lipofílica (*n*-hexano) derivados de floroglucinol, monoméricos e diméricos, como compostos majoritários.

A caracterização da porção lipofílica das cinco espécies testadas comprovou que os floroglucinóis diméricos são os componentes majoritários presentes em quatro delas com exceção de *H. polyanthemum* que tem os benzopiranos como majoritários. Para o ensaio de proliferação celular foram utilizadas culturas de células de queratinócitos (HaCaT), pois o incremento na proliferação celular destas é particularmente importante na redução do tempo de cura de feridas e queimaduras (SINGER & CLARK, 1999).

Os resultados obtidos nestes procedimentos de proliferação celular demonstraram que quatro de um total de cinco espécies testadas provocaram um aumento significativo na proliferação em pelo menos uma concentração testada sugerindo que os extratos ricos em floroglucinóis promovem a proliferação deste tipo celular.

Dentre as diferentes espécies, *H. carinatum* e *H. polyanthemum* demonstraram as maiores taxas de proliferações (20 - 40%). Nas concentrações de 15 a 20 µg/mL ocorreu uma redução na proliferação induzida pelos tratamentos de até 20%. As espécies *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum* tiveram reduções significativas, comprovando um efeito citotóxico.

Uma amostra comercial de *H. perforatum* foi escolhida para ser utilizada como um padrão positivo, que induzisse a proliferação. Para esta amostra a proliferação celular foi 20% superior ao controle. Dentre as espécies nativas testadas, *H. carinatum* superou significativamente as taxas de proliferação obtidas pelo controle positivo nas doses de 10 e 15 µg/mL. Com os resultados promissores obtidos com frações enriquecidas em floroglucínóis para o seu uso como agentes capazes de acelerar o processo cicatricial fez surgir o interesse pelo estudo fitoquímico destas frações, por sua potencial fonte de fármacos e de protótipos para os mesmos.

Atualmente o gênero *Hypericum* engloba cerca de 500 espécies, distribuídas em praticamente todos os continentes (exceção da Antártica). Nestas espécies, é frequentemente relatada uma ampla gama de metabólitos secundários, normalmente, policetídeos do tipo III como naftodiantronas, flavonoides, xantonas, benzofenonas e derivados de floroglucinol (CROCKETT & ROBSON, 2011).

A espécie *H. perforatum*, que além de ser utilizada na medicina popular como cicatrizante vem sendo amplamente empregada no tratamento de depressões leves a moderadas (KASPER *et al.*, 2010). Recentemente foi relatada sua eficácia no controle da dor, sendo as naftodiantronas e os floroglucínóis monoméricos poliprenilados (hiperforina e *ad*-hiperforina) os metabólitos responsáveis pelo efeito terapêutico (GALEOTTI *et al.*, 2010a; 2010b). As espécies de *Hypericum* do sul do Brasil (provenientes das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*), assim como *H. perforatum* têm relatadas atividades do tipo antidepressiva (STEIN *et al.*, 2012) e antinociceptiva (STOLZ *et al.*, 2012; 2014a; 2014b).

Quanto aos metabólitos secundários relatados para as espécies nativas destaca-se a ausência das naftodiantronas (FERRAZ *et al.*, 2002; CROCKETT & ROBSON, 2011), a presença dos flavonoides (ácido clorogênico, hiperosídeo, quercitrina, guaijaverina e isoquercitrina) (NUNES *et al.*, 2010) e dos derivados de floroglucinol, que com exceção das estruturas monoméricas encontradas em *H. polyanthemum* (FERRAZ *et al.*, 2001) os demais relatos são de estruturas diméricas. O isolamento de derivados de floroglucinol é um importante processo na busca de novos conhecimentos sobre a rica composição química destas plantas. Neste trabalho foram elucidadas três estruturas diméricas inéditas

denominadas austrobrasilol A, austrobrasilol B e isoaustrobrasilol B, isoladas a partir do extrato *n*-hexano das flores de *H. austrobrasilense*. Além disso, foram isolados e identificados hiperbrasilol B e iso-hiperbrasilol B de *H. caprifoliatum*, sendo o segundo composto, o primeiro relato para a espécie.

Os metabólitos secundários encontrados em espécies de *Hypericum* são metabolizados por enzimas poliketídicas sintases (PKS) do tipo III, que atuam na biossíntese pela condensação de várias unidades acetila derivadas do malonil-CoA, a moléculas específicas, que dão início a síntese dos metabólitos (JEZ *et al.*, 2002). Assim, são geradas as diversas classes de metabólitos citados anteriormente.

A biossíntese dos floroglucínóis diméricos (**Figura 6**) de ocorrência nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys* parecem ter uma via comum aos derivados monoméricos (como a hiperforina). Estes metabólitos têm como precursores os aminoácidos ramificados como a valina e a isoleucina (KARPPINEN *et al.*, 2007). Os aminoácidos dão origem a isobutiril-CoA, que através da condensação com três moléculas de malonil-CoA dá origem a floroisobutirofenona (KLINGAUF *et al.*, 2005). Após a formação da floroisobutirofenona os compostos passam pelo processo de prenilação (BOUBAKIR *et al.*, 2005).

A formação dos floroglucínóis diméricos e monoméricos seguem esta mesma via de biossíntese. Entretanto, os floroglucínóis encontrados nas espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys* estão na sua forma dimérica, unidos por uma ponte metilênica. O sistema enzimático responsável por essa dimerização é ainda desconhecido, mas a enzima EC 1.21.3.3 (caracterizada em culturas de *Berberis beaniana*) catalisa a formação de uma ponte metilênica entre dois anéis aromáticos (KUTCHAN & DITTRICH, 1995).

No processo de elucidação estrutural dos floroglucínóis diméricos austrobrasilol A, austrobrasilol B e isoaustrobrasilol B constatou-se a presença de uma *n*-butirila ligada em C-9'. Esta alteração pode ter ocorrido através de um rearranjo intramolecular da isobutiril-CoA para a *n*-butiril CoA, previamente relatado em culturas de *Streptomyces cinnamomensis*, responsáveis pela produção do antibiótico monensina (REYNOLDS & ROBINSON, 1985; RATNATILLEKE *et al.*, 1999).

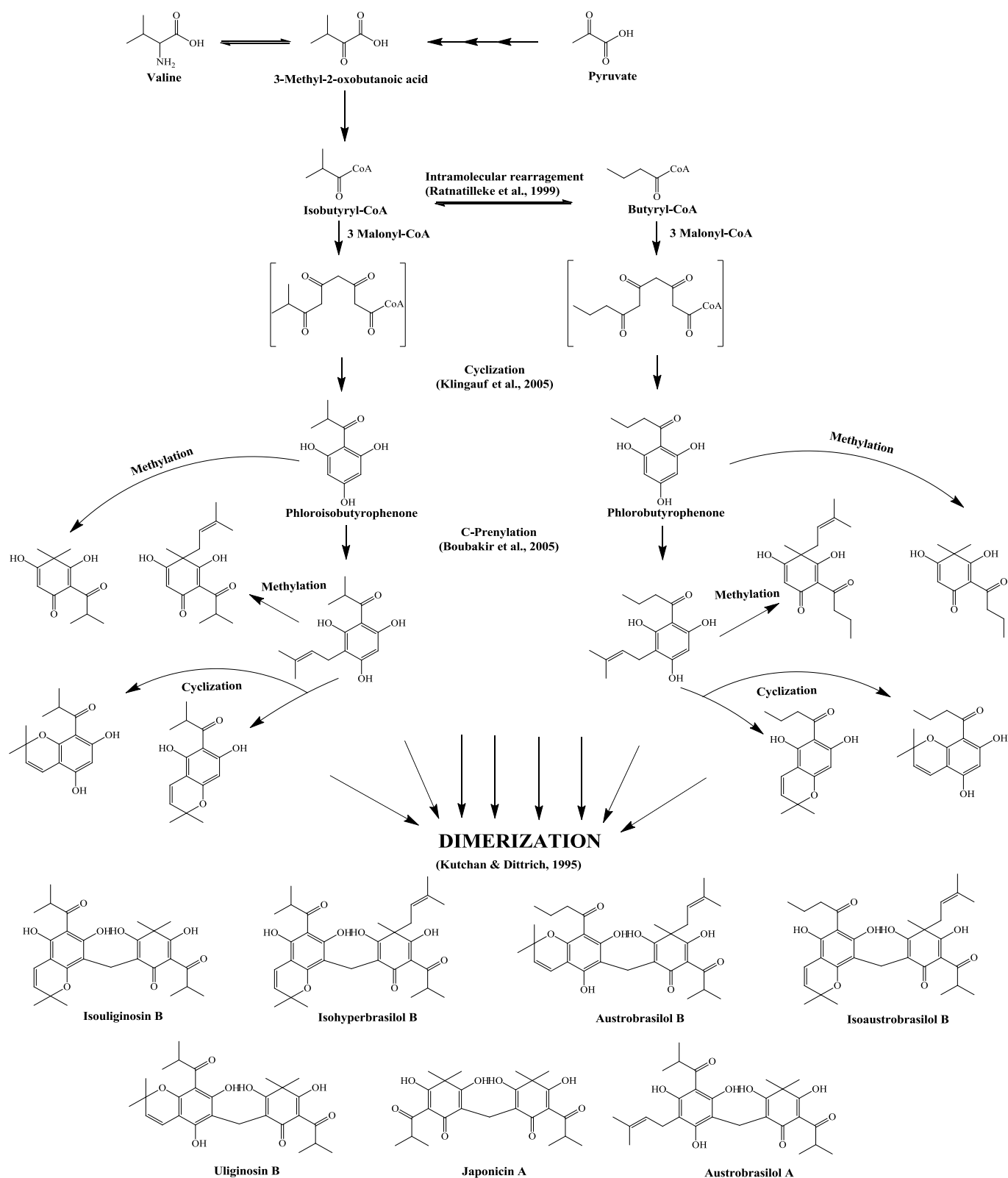


Figura 6. Rota biossintética proposta para a formação dos derivados de floroglucinol isolados de espécies de *Hypericum* nativas do Sul do Brasil

O isolamento de três novos floroglucínóis diméricos nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, reforça a ideia de que a diversidade estrutural destes metabólitos ainda não foi totalmente esgotada. A descrição de um novo arranjo de cadeia lateral já foi relatada em outros gêneros como *Dryopteris* e *Elaphoglossum* (PENTTILÄ & SUNDMAN, 1970; SOCOLSKY *et al.*, 2012), mas é inédita em *Hypericum* e suplementa a importância de continuar realizando pesquisas de caráter fitoquímico com espécies destas seções, com o intuito de se buscar novos padrões moleculares, importantes para aumentar o conhecimento sobre compostos biologicamente ativos, podendo gerar uma discussão sobre a relação estrutura-atividade.

Recentemente extratos e compostos isolados de *Hypericum* (hipericina, hiperforina e uliginosina B) vem sendo relacionados ao controle da dor, com resultados significativos até mesmo na redução da dor crônica (GALEOTTI *et al.*, 2010a; 2014; STOLZ *et al.*, 2012; 2014a; 2014b).

Austrobrasilol A, austrobrasilol B e isoaustrobrasilol B são estruturalmente semelhantes à uliginosina B (**Figura 7**) e, dessa forma, a atividade antinociceptiva foi testada em doses equimolares a 15 mg/kg de uliginosina B por via oral, dose ativa do composto (STOLZ *et al.*, 2012).

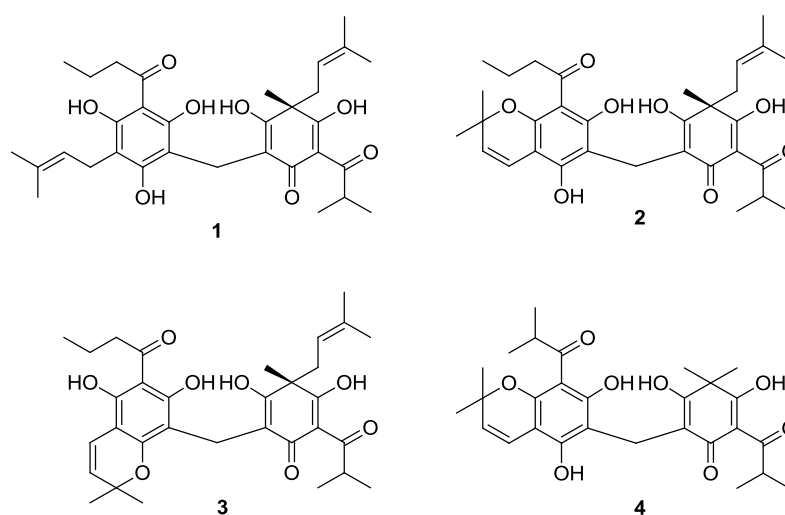


Figura 7. Estrutura química de austrobrasilol A (1), austrobrasilol B (2), isoaustrobrasilol B (3) e uliginosina B (4);

Os novos floroglucinóis demonstraram no teste da placa aquecida um potencial efeito antinociceptivo com magnitude comparável à uliginosina B. As alterações estruturais presentes entre eles não provocaram alterações significativas na magnitude do efeito, podendo sugerir que o grupo farmacofórico responsável pela atividade está mantido.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que as frações ricas em floroglucinóis são promissoras para a pesquisa de fármacos que possam ser auxiliares no processo cicatricial. Ainda, o isolamento de floroglucinóis diméricos gerou uma ampliação de conhecimento sobre a diversidade estrutural de compostos que ocorrem nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, sendo esta uma importante fonte de potenciais produtos analgésicos.

ASHBURN, M.A.; STAATS, P.S. Management of chronic pain. **The Lancet**, v. 353, p. 1865-1869, 1999.

AVATO, P. A survey on the *Hypericum* genus: Secondary metabolites and bioactivity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 30, p. 603-634, 2005.

BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 27-51, 2005.

BARROS, F.M.C.; PIPPI, B.; DRESCH, R.R.; DAUBER, B.; LUCIANO, S.C.; APEL, M.A.; FUENTEFRIA, A.M.; VON POSER, G.L. Antifungal and antichemotactic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 294-299, 2013.

BERNARDI, A.P.M.; FERRAZ, A.B.F.; ALBRING, D.V.; BORIGNON, S.A.L.; SCHRIPEMA, J.; BRIDI, R.; DUTRA-FILHO, C.S.; HENRIQUES, A.T.; VON POSER, G.L. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, p. 784-786, 2005.

BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. St. John's wort and depression. Efficacy, safety and tolerability –an update. **Life Sciences**, v. 70, p. 3077-3096, 2002.

BOUBAKIR, Z.; BEUERLE, T.; LIU, B.; BEERHUES, L. The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, p. 51-57, 2005.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CCANA-CCAPATINTA, G.V.; BARROS, F.M.C.; BRIDI, H.; VON POSER, G.L. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from *Brathys* and *Trigynobrathys* sections. **Phytochemistry Reviews**, DOI 10.1007/s11101-013-9332-2. 2013.

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

CROCKETT, S.L.; ROBSON, N.K.B. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 5, p. 1-13, 2011.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 511-516, 2003.

DAUDT, R.; VON POSER, G.L.; NEVES, G.; RATES, S.M.K. Screenig for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. **Phytoterapy Research**, v. 14, p. 344-346, 2000.

- DREWS, J. Drug discovery: A historical perspective. **Science**, v. 287, p. 1960-1964, 2000.
- ENOCH, S.; LEAPER, D.J. Basic science of wound healing. **Surgery**, v. 23, p. 37-42, 2005.
- FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D.R.A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Screening for the presence of hypericins in Southern Brazilian species of *Hypericum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 294-297, 2002.
- FERRAZ, A.B.F.; BORDIGNON, S.A.L.; STAATS, C.; SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1227-1230, 2001.
- FERRAZ, A.B.F.; LIMBERGER, R.P.; BORDIGNON, S.A.L.; VON POSER, G.L.; HENRIQUES, A.T. Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 335-339, 2005.
- FLANAGAN, M. The physiology of wound healing. **Journal of Wound Care**, v. 9, p. 299-300, 2000.
- GALEOTTI, N.; GHELARDINI, C.; St. John's wort reversal of meningeal nociception: A natural therapeutic perspective for migraine pain. **Phytomedicine**, v. 20, p. 930-938, 2013.
- GALEOTTI, N.; MAIDECCHI, A.; MATTOLI, L.; BURICO, M.; GHELARDINI, C.; St. John's Wort seed and feverfew flower extracts relieve painful diabetic neuropathy in a rat model of diabetes. **Fitoterapia**, v. 92, p. 23-33, 2014.
- GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A.; BERGONZI, M.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C.A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's wort in mice. **The Journal of Pain**, v. 11, p. 149-159, 2010a.
- GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A.R.; VINCINERI, F.F.; GHELARDINI, C. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C γ and ϵ activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1327-1336, 2010b.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Tendências demográficas no período de 1950/2000**. 63 páginas, 2000.
- ISACCHI, B.; BERGONZI, M.C.; CARNEVALI, F.; VAN DER ESCH, S.A.; VINCIERI, F.F.; BILIA, A.R. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 756-761, 2007.
- JAYASURIYA, H.; CLARK, A.M.; MCCHESENEY, J.D. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1314-1320, 1991.
- JAYASURIYA, H.; MCCHESENEY, J.D.; SWANSON, S.M.; PEZZUTO, J.M. Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 325-331, 1989.

JEZ, J.M.; BOWMAN, M.E.; NOEL, J.P. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 5319-5324, 2002.

JONES, S.G.; EDWARDS, R.; THOMAS, D.W. Inflammation and wound healing: the role of bacteria in the immune-regulation of wound healing. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 3, p. 201-208, 2004.

KARPPINEN, K.; HOKKANEN, J.; TOLONEN, A.; MATTILA, S.; HOHTOLA, A. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1038-1045, 2007.

KASPER, S.; CARACI, F.; FORTI, B.; DRAGO, F.; AGUGLIA, E. Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. **European Neuropsychopharmacology**, v. 20, p. 747-765, 2010.

KASUYA, A.; TOKURA, Y. Attempts to accelerate wound healing. **Journal of Dermatological Science**, v. 76, p. 169-172, 2014.

KLINGAUF, P.; BEUERLE, T.; MELLENTIN, A.; EL-MOGHAZY, S.A.M.; BOUBAKIR, Z.; BEERHUES, L. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 66, p. 139-145, 2005.

KUTCHAN, T.M.; DITTRICH, H. Characterization and mechanism of the berberine bridge enzyme, a covalently flavinylated oxidase of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis in plants. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 24475-24481, 1995.

LAVAGNA, S.M.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; BONSIGNORE, L.; OTTAVIANI, A.; BIZZARRI, B. Efficacy of *Hypericum* and *Calendula* oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. **Il Farmaco**, v. 56, p. 451-453, 2001.

LINDBLAD, W.J. Considerations for determining if a natural product is an effective wound-healing agent. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 7, p. 75-81, 2008.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

MASEMBACHER, P.; KOVAR, K.A. Analysis and stability of *Hyperici oleum*. **Planta Medica**, v. 58, p.351-354, 1992.

MCCURDY, C.R.; SCULLY, S.S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MENNINI, T.; GOBBI, M. The antidepressant mechanism of *Hypericum perforatum*. **Life Sciences**, v. 75, p. 1021-1027, 2004.

MENTZ, L.A.; LUTZEMBERGUER, L.C.; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: Notas sobre a obra de D'Ávila (1910). **Caderno de Farmácia**, v. 13, p. 25-48, 1997.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain**. 2.ed. Seattle: IASP Press, 1994, 1-222.

MUKHERJEE, P.K.; SURESH, B. Studies on *in-vivo* wound healing activity of leaf extract of *Hypericum mysorense* with different wound model in rats. **Natural Product Sciences**, v. 6, p. 73-78, 2000a.

MUKHERJEE, P.K.; SURESH, B. The evaluation of wound-healing potential of *Hypericum hookerianum* leaf and stem extracts. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 6, p. 61-69, 2000b.

MUKHERJEE, P.K.; VERPOORTE, R.; SURESH, B. Evaluation of in-vivo wound healing activity of *Hypericum patulum* (Family: Hypericaceae) leaf extract on different wound model in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 315-321, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Products Reports**, v. 17, p. 215-234, 2000.

NÖR, C. **Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica**. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2007.

NUNES, J.M.; PINTO, P.S.; BORDIGNON, S.A.L.; RECH, S.B.; VON POSER, G.L. Phenolic compounds in *Hypericum* species from the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 224-228, 2010.

ÖZKAN, E.E.; MAT, A. An overview on *Hypericum* species of Turkey. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v.5, p. 38-46, 2013.

ÖZTÜRK, N.; KORKMAZ, S.; ÖZTÜRK, Y. Wound-healing activity of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) on chicken embryonic fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 33-39, 2007.

PENTILLÄ, A.; SUNDMAN, J. The chemistry of *Dryopteris* acylphloroglucinols. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 22, p. 393-404, 1970.

PINHATTI, A.V.; DE BARROS, F.M.; DE FARIAS, C.B.; SCHWARTSMANN, G.; POSER, G.L.; ABUJAMRA, A.L. Antiproliferative activity of the dimeric phloroglucinol and benzophenone derivatives of *Hypericum* spp. native to southern Brazil. **Anticancer Drugs**, v. 24, p. 699-703, 2013.

PRISĂCARU, A.I.; ANDRIȚOIU, C.V.; ANDRIESCU, C.; HĂVÂRNEANU, E.C.; POPA, M.; MOTOC, A.G.M.; SAVA, A. Evaluation of the wound-healing effect of a novel *Hypericum perforatum* ointment in skin injury. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 54, p. 1053-1059, 2013.

RATNATILLEKE, A.; VRIJBLOED, J.W.; ROBINSON, J.A. Cloning and sequencing of the coenzyme B₁₂-binding domain of isobutyryl-CoA Mutase from *Streptomyces cinnamonesis*, reconstitution of mutase activity, and characterization of the recombinant enzyme produced in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, 31679-31685, 1999.

REYNOLDS K.; ROBINSON, J.A. Biosynthesis of monensin. The intramolecular rearrangement of isobutyryl-CoA to *n*-butyryl-CoA. **Journal of Chemical Society, Chemical Communications**, v. 24, p. 1831-1832, 1985.

ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 9. Addenda, corrigenda, keys, lists and general discussion. **Phytotaxa**, v. 72, p. 1-111, 2012.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M.A.C.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTSMANN, K. An antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

SADDIQE, Z.; NAEEM, I.; MAIMOONA, A. A review of antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 511-521, 2010.

SAMADI, S.; KHADIVZADEH, T.; EMAMI, A.; MOOSAVI, N.S.; TAFAGHODI, M.; BEHNAM, H.R. The effect of *Hypericum perforatum* on the wound healing and scar of cesarean. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, p. 113-117, 2010.

SARRIS, J. St. John's wort for the treatment of psychiatric disorders. **Psychiatric Clinics of North America**, v. 36, p. 65-72, 2013.

SINDRILARU, A.; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, K. Disclosure of the culprits: Macrophages-versatile regulators of wound healing. **Advances in Wound Care**, v. 2, p. 357-368, 2013.

SINGER, A.J.; CLARK, R.A.F. Cutaneous wound healing. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, p. 738-746, 1999.

SOCOLSKY, C.; RATES, S.M.K.; STEIN, A.C.; ASAWAKA, Y.; BARDÓN, A. Acylphloroglucinols from *Elaphoglossum crassipes*: Antidepressant – like activity of crassipin A. **Journal of Natural Products**, v. 75, 1007-1017, 2012.

STEIN, A.C.; VIANA, A.F.; MÜLLER, L.G.; NUNES, J.M.; STOLZ, E.D.; DO REGO, J.C.; COSTENTIN, J.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. **Behavioral Brain Research**, v. 228, p. 66-73, 2012.

STOLZ, E.D.; HASSE, D.R.; VON POSER, G.L.; RATES, S.M.K. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, presents a multimediated antinociceptive effect in mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1774-1785, 2014a.

STOLZ, E.D.; MÜLLER, L.G.; ANTONIO, C.B.; DA COSTA, P.F.; VON POSER, G.L.; NOËL, F.; RATES, S.M.K. Determination of pharmacological interactions of uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative, with amitriptyline, clonidine and morphine by isobolographic analysis. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1684-1688, 2014b.

STOLZ, E.D.; VIANA, A.F.; HASSE, D.R.; VON POSER, G.L.; DO REGO, J.C.; RATES, S.M.K. Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 39, p. 80-87, 2012.

VON POSER, G.L.; RECH, S.B.; RATES, S.M.K. Chemical and pharmacological aspects of Southern Brazilian *Hypericum* species. In: **Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology**, UK: Global Science Books, 2006, 510-516.

WILGUS, T.A.; ROY, S.; MCDANIEL, J. C. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. **Advances in Wound Care**, v. 2, p. 379-388, 2013.

WÖLFLE, U.; SEELINGER, G.; SCHEMP, C.M. Topical application of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Planta Medica**, v.80, p. 109-120, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **World Health Statistics 2014**. 180 páginas, 2014.

WYNN, T.A.; RAMALINGAM, T.R. Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. **Nature Medicine**, v. 18, p. 1028-1040, 2012.

YEŞİLADA, E.; HONDA, G.; SEZİK, E.; TABATA, M.; FUJITA, T.; TANAKA, T.; TAKEDA, Y.; TAKAISHI, Y. Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 133-152, 1995.

YEŞİLADA, E.; HONDA, G.; SEZİK, E.; TABATA, M.; GOTO, K.; IKESHIRO, Y. Traditional medicine in Turkey IV. Folk medicine in the Mediterranean subdivision. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, p. 31-38, 1993.

ZALE, E.L.; LANGE, K.L.; FIELDS, S.A.; DITRE, J.W. The relation between pain-related fear and disability: A meta-analysis. **The Journal of Pain**, v. 14, p. 1019-1030, 2013.

ZIELINS, E.R.; ATASHROO, D.A.; MAAN, Z.N.; DUSCHER, D.; WALMSLEY, G.G.; MARECIC, O.; HU, M.; SENARATH-YAPA, K.; MCARDLE, A.; TEVLIN, R.; WEARDA, T.; PAIK, K.J.; DULDULAO, C.; HONG, W.X.; GURTNER, G.C.; LONGAKER, M.T. Wound healing: an update. **Regenerative Medicine**, v. 9, p. 817-830, 2014.

ZLATKOVIĆ, B.K.; BOGOSAVLJEVIĆ, S.S.; RADIVOJEVIĆ, A.R.; PAVLOVIĆ, M.A. Traditional use of the native medicinal plant resource of Mt. Rtanj (Eastern Serbia): Ethnobotanical evaluation and comparison. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 704-713, 2014.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; GOTO, E.; KOZAI, T. Plant-Environment interactions: Accumulation of hypericin in dark glands of *Hypericum perforatum*. **Annals of Botany**, v. 98, p. 793-804, 2006.

