

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

**Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de extratos de
Hypericum polyanthemum Klotzsh ex Reichardt aclimatizado**

Jéssica de Matos Nunes

Porto Alegre, junho de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA

**Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de extratos de
Hypericum polyanthemum Klotzsh ex Reichardt aclimatizado**

Jéssica de Matos Nunes

Trabalho de Conclusão de Curso em Farmácia

Orientador: Prof. Dr. José Cláudio Fonseca Moreira

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – UFRGS

Departamento de Bioquímica

Co-orientadora: Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFRGS

Departamento de Produção de Matéria-Prima

Porto Alegre, junho de 2010.

*“Para ser grande, sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim, em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive”*

Fernando Pessoa

Agradecimentos

A Deus, por permitir a vida, a força e as ferramentas do conhecimento para que a vivamos, e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e o que ele significa.

Ao professor José Cláudio, meu orientador do TCC, que me recebeu no Centro de Estudos em Estresse Oxidativo do Departamento de Bioquímica, ou, simplesmente, no “Lab 32”, onde realizei grande parte dos experimentos.

Ao Gui, pela importante e divertida, mas principalmente incansável ajuda ao longo de todas as etapas do trabalho.

Ao Guto, pelo carinho e dedicação ocupando algumas noites com a elaboração de um programinha, muito útil, para o cálculo de planilhas com aproximadamente 12 colunas e 396 linhas (!), resultantes de cada análise de TRAP.

Às minhas duas professoras queridas, que desde o segundo semestre de graduação me orientam na Iniciação Científica, e para as quais agradecer é mandatório e gratificante: professora Gilsane Lino von Poser, a “Gil”, que neste trabalho me co-orientou, e profa. Sandra Beatriz Rech. Obrigada pelo estímulo e confiança que sempre recebi, pelo apoio e oportunidades que sempre me proporcionaram e por serem, de forma tão carinhosa, essenciais para a formação e conhecimento científico que hoje tenho.

A todos os meus colegas dos “labs” de Biotecnologia Vegetal e Farmacognosia, sempre divertidos e companheiros: Amanda, Simone, Maikon, Flávia, Gabi, Paula, Sati, Jaque, Ju, Ismael...

A Profa. Dr. Tereza Cristina Dalla Costa, por gentilmente ceder o CLAE para as análises cromatográficas.

E, por último, mas de forma alguma menos importante, àqueles que desde sempre dedicam suas vidas a me estimularem e a fornecerem todo o necessário para que eu alcance meus objetivos: meu pai, Alex, minha mãe, Simoni, e minha avó, Eva. Aos meus queridos irmãos Alexandre, Pâmela e Carolina por fazerem parte desta preciosa família.

SUMÁRIO

Resumo	6
1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 Material vegetal	11
3.2 Extrações	12
3.3 Quantificação de compostos fenólicos totais.....	12
3.4 Quantificação de metabólitos por CLAE.....	13
3.4.1 Quantificação de benzopiranos.....	13
3.4.2 Quantificação de uliginosina B	13
3.4.3 Quantificação de ácido clorogênico e flavonóides	14
3.5 Avaliação do potencial antioxidante	14
3.5.1 TRAP	14
3.5.2 Potencial <i>scavenger</i> de peróxido	15
3.5.3 Atividade <i>GST like</i>	16
3.5.4 TBARS	16
3.6 Análise estatística	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
4.1 Quantificação de metabólitos por CLAE.....	19
4.1.1 Quantificação de benzopiranos e uliginosina B	19
4.1.2 Quantificação de ácido clorogênico e flavonóides	20
4.2 Quantificação de compostos fenólicos totais.....	22
4.3 Atividade antioxidante das frações e extratos de <i>H. polyanthemum</i>	23
4.3.1 TRAP	24
4.3.2 Potencial <i>scavenger</i> de peróxido e atividade <i>GST like</i>	29
4.3.3 TBARS	30
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS	33

Resumo

O uso de plantas na prevenção e no tratamento de doenças é uma prática corrente e crescente, resultando na aplicação deste recurso pelas indústrias alimentícia e farmacêutica. Entre os benefícios decorrentes do emprego de material vegetal para estes fins está a obtenção de substâncias antioxidantes provenientes do seu metabolismo secundário, relacionadas à prevenção de doenças crônicas como a arteriosclerose, o câncer e algumas doenças degenerativas. Inicialmente, guiando-se pela atividade antidepressiva apresentada por *Hypericum perforatum*, espécie nativa da América do Norte, Europa e Ásia, espécies nativas do sul do Brasil tem sido estudadas quanto à sua composição química e atividades biológicas, destacando-se os resultados obtidos com *H. polyanthemum*. Esta planta produz, além de compostos fenólicos intimamente relacionados à atividade antioxidante, benzopiranos e um derivado do floroglucinol, uliginosina B, os quais apresentam atividades farmacológicas comprovadas. Os benefícios trazidos por esta espécie levaram ao desenvolvimento e otimização de protocolos de cultivo. Considerando a importância dos mecanismos antioxidantes na prevenção de doenças, a projeção das plantas medicinais como recurso terapêutico e, em especial, os promissores resultados até o momento obtidos com *H. polyanthemum*, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a composição fitoquímica e o perfil antioxidante de diferentes extratos desta planta a partir de material vegetal proveniente de protocolo de cultivo. A quantificação de metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou que os benzopiranos e uliginosina B concentram-se nas frações apolares, enquanto compostos fenólicos como os flavonóides hiperosídeo, quercitrina, isoquercitrina e guaijaverina concentraram-se nas frações acetato de etila e metanólica. Quanto à avaliação em diferentes sistemas antioxidantes, os flavonóides parecem ser os responsáveis pela pronunciada capacidade *scavenger* de radicais peroxil apresentada pelas frações acetato de etila e metanol na análise do potencial antioxidante total e na proteção à peroxidação lipídica, avaliada pelo doseamento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. A lipofilia inerente às frações *n*-hexano provavelmente contribuiu para o bom desempenho destas amostras na proteção ao dano lipídico neste mesmo experimento. Os dados levantados com este trabalho revelam o potencial uso de *H. polyanthemum* como fonte de compostos antioxidantes e reforçam a aplicabilidade e utilidade do emprego de matéria-prima de qualidade proveniente de cultivo controlado. Estes resultados, no entanto, são preliminares e devem ser aprofundados.

1. INTRODUÇÃO

O emprego de plantas como ferramenta para preservação, manutenção e reparo da saúde é prática estabelecida entre os homens e sua aplicação estende-se desde o seu consumo na forma *in natura*, como o caso das frutas, até na forma de produtos isolados, quando metabólitos vegetais são purificados a partir de uma matriz vegetal. Este último caso é de especial interesse para a indústria farmacêutica que tem encontrado, na utilização de produtos naturais como matéria-prima, interessante apelo terapêutico e comercial (Canter *et al.*, 2005; Passalacqua *et al.*, 2007). Com este crescente uso de plantas na medicina para o tratamento e alívio de sintomas (Canter *et al.*, 2005), cresce também a necessidade de pesquisa por compostos naturais bioativos candidatos a fármacos, bem como estudos farmacológicos detalhados a respeito da ação das plantas e seus produtos no organismo.

O uso de plantas na terapêutica

Entre as principais plantas tradicionalmente empregadas com fins terapêuticos encontram-se as espécies do gênero *Hypericum*, há séculos utilizadas com diferentes finalidades como o tratamento de pequenas queimaduras externas, inflamações de pele e nevralgias (Greeson *et al.*, 2001). Embora com diferentes aplicabilidades, é a ação antidepressiva de preparações a base de *H. perforatum*, espécie nativa da Europa, Ásia e África, a responsável pela importância terapêutica do gênero (Kasper, 2001; Bilia *et al.*, 2002). A atividade antidepressiva de *H. perforatum* foi inicialmente atribuída às naftodiantronas hipericina e *pseudo*-hipericina, supostamente envolvidas com os mecanismos do sistema dopaminérgico (Butterweck *et al.*, 1998). Com a continuidade dos estudos, acumularam-se evidências de que a ação terapêutica dependeria de mais de um constituinte, entre os quais os derivados de floroglucinol hiperforina e *ad*-hiperforina (Chatterjee *et al.*, 1998; Kaehler *et al.*, 1999), xantonas (Wagner e Bladt, 1994) e flavonóides (Butterweck *et al.*, 2000). Outras espécies do gênero também têm sido avaliadas quanto ao potencial antidepressivo, demonstrando atividade no modelo animal de depressão, teste do nado forçado (Sánchez-Mateo *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2010). Na perspectiva de encontrar, em espécies de ocorrência natural no Brasil, propriedades semelhantes às de plantas do mesmo gênero já

utilizadas na terapêutica, estudos têm sido direcionados para espécies nativas e interessantes resultados vem sendo obtidos.

Espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil

No sul do Brasil existem mais de 20 espécies de *Hypericum* distribuídas entre as regiões sul e sudeste. Algumas das espécies estudadas compreendem *H. campestre* Cham. & Schlecht., *H. carinatum* Griseb., *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht., *H. myrianthum* Cham. & Schlecht., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *H. ternum* A. St Hill. A avaliação fitoquímica destas espécies revelou a produção de compostos fenólicos como xantonas (Rocha *et al.*, 1994), benzofenonas (Bernardi *et al.*, 2005), floroglucinóis (Rocha *et al.*, 1995, 1996; Ferraz *et al.*, 2002a; Nör *et al.*, 2004; 2008), flavonóides e taninos (Dall'agnol *et al.*, 2003), assim como ausência de hipericina e seus derivados (Ferraz *et al.*, 2002b), consideradas, juntamente com hiperforina, as substâncias químicas marcadoras de *Hypericum perforatum* (Bilia *et al.*, 2002; Lawvere & Mahoney, 2005). Os benzopiranos 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP1), 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP2) e 5-hidroxi-6-isobutiril-7-metoxi-2,2-dimetilbenzopirano (HP3) foram isolados das partes aéreas de *H. polyanthemum* (Ferraz *et al.*, 2001; 2005a).

Propriedades biológicas também são descritas em diversos estudos com estes exemplares nativos (von Poser *et al.*, 2006). Extratos e frações destas espécies apresentaram atividade antidepressiva (Daudt *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2005), antiviral (Schmitt *et al.*, 2001; Fritz *et al.*, 2007), analgésica (Mendes *et al.*, 2002; Viana *et al.*, 2003), antifúngica (Fenner *et al.*, 2005), antiproliferativa (Ferraz *et al.*, 2005b) e acaricida (Ribeiro *et al.*, 2007). Para os compostos isolados, destacam-se as atividades demonstradas pelos benzopiranos de *H. polyanthemum*: antiproliferativa (Ferraz *et al.*, 2005b), citotóxica frente à células envolvidas no processo de angiogênese (Nör, 2006) e inibitória da monoamina oxidase (IMAO) (Gnerre *et al.*, 2001). Dentre os derivados de floroglucinol isolados, foi descrita atividade antimicrobiana para uliginosina B, hiperbrasilol B e japonicina A (Dall'Agnol *et al.*, 2005, Franca *et al.*, 2009). Além disso, extratos, frações e compostos isolados apresentaram considerável atividade antioxidante (Bernardi *et al.*, 2005; 2007a,b; 2008a).

Hypericum polyanthemum

Em vista da carência de estudos para cultivo em larga escala de plantas medicinais no país, em especial das espécies de *Hypericum* nativas, protocolos de cultivo *in vitro* para *H. campestre*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum* foram estabelecidos, garantindo a manutenção de germoplasma e a continuidade de investigações científicas (Bernardi, 2007; Pinhatti *et al.*, 2010).

Embora as diversas espécies de *Hypericum* apresentem rica composição fitoquímica, os resultados obtidos com *H. polyanthemum* mostram sua relevância como potencial recurso medicinal. Estudos recentes destacam o efeito antinociceptivo de compostos isolados de *H. polyanthemum*, atividade mais relevante do ponto de vista farmacológico. Inicialmente, o extrato *n*-hexano apresentou tal efeito mediado pelo sistema opióide (Viana *et al.*, 2003) e, em um segundo momento, estudos mostraram que o floroglucinol uliginosina B não atuava por este mecanismo de ação (Heckler *et al.*, 2005; Stoltz *et al.*, 2008). Os benzopiranos também foram analisados e HP1 demonstrou ser o responsável pela ação mediada pelo sistema opióide (Haas *et al.*, 2010).

A demanda crescente pela utilização de plantas na cura ou prevenção de doenças, assim como o emprego das mesmas com vistas à obtenção de substâncias de interesse farmacêutico, tem resultado em uma intensa exploração da flora nativa, o que pode levar a redução das populações naturais dessas espécies colocando-as em risco de extinção. O extrativismo vegetal contribui de forma relevante para o desaparecimento de germoplasma ainda não estudado, o que pode significar a perda de componentes químicos interessantes que poderiam tornar-se novos fármacos (França, 2003). Desta forma, o desenvolvimento de métodos que possibilitem a propagação de plantas em larga escala e simultâneo melhoramento e conservação das mesmas é fundamental. O estabelecimento de protocolos de cultivo otimizado que viabilizam a produção de biomassa vegetal das espécies nativas é uma opção para a obtenção de matéria-prima de interesse para a indústria farmacêutica, de forma sustentável, contribuindo para a redução do extrativismo predatório.

O destacado potencial terapêutico demonstrado por extratos apolares e substâncias isoladas de *H. polyanthemum* levou ao desenvolvimento de protocolos de cultivo otimizado para a espécie. A micropropagação foi realizada a partir de plantas coletadas em Caçapava do Sul, no estado do Rio Grande do Sul (Bernardi *et al.*, 2007b), e o posterior cultivo a campo

conduzido com sucesso (Bernardi *et al.*, 2008b). Além disso, nestes estudos demonstrou-se que as plantas cultivadas são capazes de manter a biossíntese dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3, quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), bem como a de compostos fenólicos. Com o cultivo a campo já estabelecido, estudos com plantas de *H. polyanthemum* provenientes de diferentes tempos de cultivo *in vitro* mantiveram-se viáveis ao longo do desenvolvimento em campo aberto, por dois anos consecutivos, obtendo-se significativamente maior biomassa das plantas completas, assim como maior produção do benzopirano HP3 pelas flores, a partir de plantas aclimatizadas após micropropagação por um período de 12 semanas (Nunes *et al.*, 2009a). Seguindo os estudos de cultivo com a espécie, verificou-se que a aplicação do modelo experimental de fertilização com diferentes concentrações de solução nutritiva foi capaz de promover o aumento da produção de biomassa e de metabólitos secundários bioativos em plantas aclimatizadas (Nunes *et al.*, 2009b).

Os relevantes resultados farmacológicos obtidos em experimentos com os benzopiranos e uliginosina B, produzidos pela espécie, destacaram o promissor emprego da planta como um recurso medicinal natural, resultando em um processo de patente (PI0900614-1).

Antioxidantes

De uma forma geral, “antioxidantes” são compostos que inibem ou retardam a oxidação de um substrato quando em baixíssimas concentrações (Halliwell e Gutteridge, 2007). A inativação de espécies reativas de oxigênio (EROs) é um dos possíveis mecanismos de ação. Outros mecanismos incluem a prevenção da formação de EROs por ligação a metais ou inibição enzimática. Os antioxidantes que quebram reações radicalares em cadeia previnem dano por interferirem na propagação dos radicais em cascata (Matkowski, 2008).

Além de estar presente em processos patológicos como diabetes, câncer e inflamação, a produção de radicais livres ocorre continuamente em todas as células vivas como consequência de numerosos processos fisiológicos e bioquímicos (Jensen, 2003). Sob circunstâncias normais, os radicais livres gerados no corpo humano podem ser removidos pelas defesas antioxidantes naturais do organismo, por exemplo, o conjunto das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase (Halliwell e Gutteridge, 2007). O estresse oxidativo ocorre por um desbalanço entre a produção de espécies reativas e a efetividade das defesas antioxidantes. As ações terapêuticas dos fenóis são atribuídas,

principalmente, por sua capacidade antioxidante, *scavenger* de radicais livres, por atuarem como reguladores da expressão gênica e por estarem envolvidos nos mecanismos de sinalização celular (Rice-Evans, 2004). As defesas antioxidantes endógenas não são completamente eficientes e, conseqüentemente, antioxidantes dietéticos como polifenóis, carotenóides, vitaminas C e E são requeridos para diminuir os efeitos cumulativos dos danos oxidativos no organismo (Lim e Murtijaya, 2007).

Diversos extratos de plantas apresentam notória atividade antioxidante relacionada à presença de substâncias provenientes do metabolismo secundário da planta, principalmente compostos fenólicos (Yesil-Celiktas *et al.*, 2007).

Em estudo anterior, no qual avaliou-se o extrato bruto metanólico das partes aéreas (folhas, flores e ramos moídos) de *H. polyanthemum* quanto ao potencial antioxidante no (TRAP) e capacidade de reação com radicais peroxila (ORAC-PGV) e 2,2-difenil-picril-hidrazil (DPPH), foi verificada certa atividade antioxidante das amostras (Bernardi, 2007), ressaltando a importância da continuidade dos estudos com a espécie.

2. OBJETIVOS

Com base em sua rica composição fenólica e na necessidade da continuidade dos estudos com *H. polyanthemum*, este trabalho teve por objetivo avaliar o perfil antioxidante de extratos e frações das partes aéreas vegetativas e reprodutivas da espécie.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado foi obtido a partir de plantas aclimatizadas de *H. polyanthemum* (Bernardi *et al.*, 2008b). Plântulas cultivadas *in vitro* (Bernardi *et al.*, 2007b)

por 8 semanas em meio semi-sólido Murashige e Skoog modificado, M Δ (Maurmann *et al.*, 2008), foram adaptadas ao meio *ex vitro* por 30 dias, em sala climatizada (temperatura de 25 \pm 1 °C e intensidade luminosa de 70 $\mu\text{mol/m}^2\text{s}^{-1}$), sendo posteriormente transferidas para cultivo em campo aberto na Faculdade de Agronomia da UFRGS (aclimatização). Com 18 semanas de cultivo, quando já apresentavam flores em diferentes estágios ontogênicos, as plantas foram coletadas e suas partes reprodutivas (flores) e vegetativas (folhas) separadas para liofilização.

3.2 Extrações

Todos os extratos e frações foram obtidos por maceração dinâmica em *shaker*, ao abrigo da luz, com renovação diária das alíquotas dos solventes utilizados até o esgotamento do material vegetal, verificado quando não mais se somou massa à quantidade de extrato anterior. A partir de folhas e flores obteve-se um extrato bruto e 4 frações de cada uma das partes da planta.

Os extratos brutos foram preparados a partir de 5 g de material vegetal, extraídos com 100 mL de metanol, resultando em um extrato bruto metanólico de flores (Br-met FLOR) e um de folhas (Br-met FOLHA).

As frações foram obtidas a partir de 15 g de planta extraídos com solventes em polaridade crescente: *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foi utilizada a alíquota de 250 mL de cada um dos solventes, resultando em uma fração *n*-hexano de flores (Fr-hex FLOR) e uma de folhas (Fr-hex FOLHA), uma fração diclorometano de flores (Fr-dic FLOR) e uma de folhas (Fr-dic FOLHA), uma fração acetato de etila de flores (Fr-ace FLOR) e uma de folhas (Fr-ace FOLHA) e uma fração metanólica de flores (Fr-met FLOR) e uma de folhas (Fr-met FOLHA).

3.3 Quantificação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi quantificado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (Singleton e Rossi, 1965) modificado. Alíquotas de 30 μL de soluções na concentração de 10 mg/mL foram oxidadas com 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N. Após 5 minutos, a reação foi parada com a adição de solução de carbonato de sódio 75 g/L em volume suficiente para completar 10 mL como volume final. Após 45 minutos de reação ao

abrigo da luz, a intensidade da cor azul resultante foi medida em espectrofotômetro Biospectro SP-200 em comprimento de onda de 765 nm.

O teor de compostos fenólicos totais foi obtido a partir de uma curva padrão de quercetina, e expresso em EQ/100 mg de extrato, ou seja, miligramas de equivalentes de quercetina (EQ) por 100 mg de extrato.

3.4 Quantificação de metabólitos por CLAE

Uliginosina B, um derivado do floroglucinol, os benzopiranos HP1, HP2 e HP3, ácido clorogênico e os flavonóides hiperosídeo, guaijaverina, isoquercitrina e quercitrina foram quantificados por CLAE nas frações e extratos obtidos de *H. polyanthemum*. Cada amostra foi cuidadosamente pesada e ressuspensa em volume adequado de metanol grau CLAE e filtrada por membrana de acetato celulose (poro de 0,22 µm). As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento com sistema quaternário de bombas Waters 600, detector com comprimento de onda duplo Waters 2487, injetor automático Waters 717 e coluna Waters Nova Pack C₁₈ acoplada à pré-coluna Waters Nova Pack C₁₈ 60A. Foram utilizados três diferentes sistemas cromatográficos conforme metodologias previamente validadas.

3.4.1 Quantificação de benzopiranos

Para a determinação do teor dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 utilizou-se método previamente validado (Bernardi *et al.*, 2007) com eluições isocráticas de uma mistura de acetonitrila:água (60:40; v:v) sob fluxo constante de 1 mL/min e detecção em 270 nm. A concentração de cada benzopirano foi expressa por uma curva de calibração a partir de padrões isolados das partes aéreas da planta e expressa em miligramas de benzopirano por 100 mg de extrato seco (mg/100 mg).

3.4.2 Quantificação de uliginosina B

Uliginosina B foi analisada sob condições isocráticas com eluente acetonitrila:água (95:5; v:v + 0,01% TFA) em condições de fluxo constante de 1 mL/min e detecção UV em comprimento de onda de 220 nm. O teor do metabólito foi calculado a partir de uma curva padrão, da substância purificada, com excelente linearidade na faixa de concentrações de 2 a 800 µg/mL ($R^2 = 0.999$) (Nunes *et al.*, 2009b) e referido como miligrama de uliginosina B por 100 mg de extrato seco (mg/100 mg).

3.4.3 Quantificação de ácido clorogênico e flavonóides

Ácido clorogênico e os flavonóides hiperosídeo, guajaverina, isoquercitrina e quercitrina foram quantificados em um sistema de eluição isocrático utilizando como fase móvel uma mistura de acetonitrila:água (14:86; v:v + 0,05% TFA) em condições de fluxo constante de 1 mL/min e detecção UV em comprimento de onda de 254 nm (Pinhatti *et al.*, 2010). O teor de ácido clorogênico foi obtido através curva padrão da substância purificada (Sigma[®]) com excelente linearidade na faixa de concentrações entre 3,91 e 2000 µg/mL ($R^2 = 0,9981$) e expresso em miligrama de ácido clorogênico por 100 mg de extrato (mg/100 mg). Os flavonóides foram quantificados a partir de uma curva de calibração de hiperosídeo, construída a partir do metabólito purificado das partes aéreas de *H. polyanthemum*, com excelente linearidade na faixa de concentrações entre 36,25 e 2320 µg/mL ($R^2 = 0,9994$). Todos os flavonóides foram expressos em miligramas de hiperosídeo por 100 mg de extrato.

3.5 Avaliação do potencial antioxidante

3.5.1 TRAP

O TRAP, sigla do inglês *total reactive antioxidant potential* (potencial antioxidante reativo total), é um dos métodos mais utilizados para avaliação do potencial antioxidante total de uma amostra (Lissi *et al.*, 1995; Dresch *et al.*, 2009). Este método baseia-se na medida da capacidade que um analito (amostra) tem de capturar os radicais alquil-peroxil gerados, a uma taxa constante, a partir do 2,2'-azo-bis(2-aminopropano)dihidrocloridrato (AAPH). Neste mesmo meio reacional é adicionado luminol, substância que atua como um indicador reagindo com os radicais disponíveis, produzindo luminescência. Esta luminescência pode, então, ser monitorada como um indicativo da quantidade de radicais produzidos.

Após a adição do agente antioxidante (amostra) ao sistema (tampão glicina 100 mM com pH = 8,6, AAPH 10mM e luminol 0,01 mM) é possível observar uma queda brusca na emissão de luminescência, resultado da captura dos radicais livres disponíveis. O tempo necessário para que se restabeleça a condição de quimiluminescência inicial (antes da adição da amostra) é proporcional à capacidade antioxidante da substância testada, ou seja, quanto

maior o tempo para o retorno do sistema ao valor anterior de luminescência, maior a capacidade antioxidante da amostra.

Para avaliar a atividade dos diferentes extratos e frações de *H. polyanthemum* foram primeiramente preparadas soluções de extrato a 10% em dimetilsulfóxido (DMSO) e, posteriormente, por diluições seriadas, cada amostra foi ajustada para uma faixa adequada de concentração que permitisse a avaliação do comportamento antioxidante frente aos radicais peróxido produzidos. A concentração final máxima de DMSO nestas soluções foi de 1% e, para assegurar que o solvente não interfere na resposta obtida, uma solução controle com DMSO a 1% foi juntamente preparada e analisada, não apresentando poder antioxidante algum.

O acompanhamento do potencial antioxidante das amostras frente aos radicais se fez em placa de 96 poços. Em cada poço foram adicionados 200 µL de sistema e diferentes concentrações das soluções de extrato, de forma a obter-se uma relação entre a concentração de amostra utilizada e a capacidade antioxidante por ela apresentada. Para quantificação da luminescência foi utilizado o equipamento MicroBeta TriLux, Perkin Elmer, os resultados obtidos em contas por minuto (CPM) e expressos em porcentagem (%) de radicais produzidos em relação ao total de radicais produzidos pelo sistema sem amostra (branco). O parâmetro utilizado para relativizar as respostas apresentadas pelo branco, padrões e amostras foi a área sob a curva (ASC) do gráfico tempo (em segundos) *versus* contas por minuto.

Para os experimentos de avaliação da atividade *scavenger* de peróxido (item 3.5.2) e atividade *GST like* (item 3.5.3) foram utilizadas soluções de extrato a 0,1% dissolvidas em DMSO 1%. Para eliminar a possibilidade de interferência do diluente nos resultados obtidos, o mesmo foi avaliado juntamente com as amostras. Estas quantificações foram feitas em leitor de placa SpectraMax 190, Molecular Devices.

3.5.2 Potencial scavenger de peróxido

Esta técnica baseia-se na capacidade que uma amostra tem de reagir com o peróxido de hidrogênio e diminuir sua quantidade no sistema montado (tampão fosfato, amostra e peróxido de hidrogênio).

Em placa de 96 poços foram adicionados 185 µL de tampão fosfato 100 mM e 20 µL de amostra em diferentes concentrações. Após leitura em 240 nm para verificar a absorvância prévia ao início da medida da atividade, foram adicionados 5 µL de peróxido de hidrogênio

(H₂O₂) 1 M. A atividade *scavenger* de peróxido das amostras foi avaliada monitorando-se o decaimento da absorvância em 240 nm (Li *et al.*, 2007).

3.5.3 Atividade GST like

A glutationa (GSH) é um aminoácido envolvido principalmente com os mecanismos de detoxificação do organismo frente a xenobióticos, ligando-se aos mesmos em reações catalizadas pela enzima glutationa S-transferase (GST). Para avaliar a capacidade dos extratos em atuar de forma semelhante à enzima (atividade GST *like*), utilizou-se protocolo previamente validado (Habig e Jakoby, 1981), no qual a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a substância GST *like* forma um complexo do tipo CDNB-GST que pode ser medido espectrofotometricamente (Halliwell e Gutteridge, 2007).

Em placa de 96 poços foram adicionados 190 µL de tampão fosfato de potássio 0,1 M com pH = 6,5; 10 µL de amostra em diferentes concentrações; 10 µL de GSH 20 mM e 10 µL de CDNB 20 mM. A cinética de formação do complexo GSH-CDNB foi monitorada em 340 nm durante 5 minutos.

3.5.4 TBARS

O TBARS, sigla do inglês *thiobarbituric acid reactive species* (espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), é um método bastante empregado para analisar a capacidade de uma amostra em prevenir o dano a lipídios (peroxidação lipídica). Para avaliar e quantificar a presença desta propriedade nos diferentes extratos de *H. polyanthemum*, utilizou-se uma adaptação do método *in vitro* empregando gema de ovo como fonte lipídica (Esternbauer e Cheeseman, 1990).

3.5.4.1 Fonte lipídica

Lipídios foram isolados a partir de gema de ovo homogeneizada, diluída à 1% (p:v) em tampão TBARS (KCl 120 mM:Na₂HPO₄ 50 mM, 1:1, pH = 7,4) e posteriormente sonicada por 10 segundos em potência 4 (Silva *et al.*, 2007). As soluções de lipídios foram preparadas imediatamente antes ao uso e receberam o nome de “substrato lipídico”.

3.5.4.2 Indutor de dano

Para verificar o comportamento das diferentes frações frente à proteção contra peroxidação lipídica, induziu-se dano oxidativo à matriz lipídica na presença das amostras testadas. Como indutor de dano utilizou-se uma solução do AAPH, também conhecido como 2,2'-azo-bis(2-amidinopropano)hidrocloridrato (ABAP), na concentração de 0,12 M.

3.5.4.3 Preparo dos extratos

Os extratos avaliados foram dissolvidos a uma concentração de 10% em DMSO e, posteriormente, por diluições seriadas, levados à concentração de 0,1% em água Milli-Q. A concentração final de DMSO nestas soluções foi de 1% e, para eliminar a possibilidade de interferência do diluente na resposta obtida, uma solução controle com DMSO a 1% foi juntamente preparada e analisada, não apresentando potencial antioxidante algum.

3.5.4.4 Procedimento

À matriz lipídica foram adicionados 100 µL de tampão TBARS (controle-matriz lipídica e controle induzido), de DMSO 1% (controle do diluente), ou das soluções das frações de *H. polyanthemum* em diferentes concentrações. À reação do controle induzido e das amostras foram adicionados 100 µL de solução de AAPH 0,12 M como indutor de dano e, nas demais, onde a peroxidação não ocorre, adicionou-se 100 µL de tampão TBARS. O espectrofotômetro foi calibrado com uma solução branco, composta por 1 mL do diluente da gema de ovo (tampão TBARS), no qual a matriz lipídica estava ausente, e 200 µL de tampão TBARS (Tabela 1).

Tabela 1 Esquema da adição de reagentes para cada uma das amostras do experimento de TBARS.

	Matriz lipídica	Amostra teste	Indutor de dano
Controle - matriz lipídica	1 mL de matriz lipídica	100 µL tampão TBARS	100 µL tampão TBARS
Controle Induzido	1 mL de matriz lipídica	100 µL tampão TBARS	100 µL AAPH 0,12 M
Controle - diluente	1 mL de matriz lipídica	100 µL de DMSO 1%	100 µL AAPH 0,12 M
Controle - amostra	1 mL de matriz lipídica	100 µL de extrato	100 µL tampão TBARS
Amostra	1 mL de matriz lipídica	100 µL de extrato	100 µL AAPH 0,12 M

Após a adição do AAPH as amostras foram incubadas à 37 °C durante 30 minutos para promover a indução do dano peroxidativo, pelo AAPH, às micelas lipídicas disponíveis. Subsequentemente, 300 µL de cada uma das amostras foram transferidos para *eppendorfs* e à este volume foram adicionados 600 µL de TCA 15%, para que ocorresse a precipitação das proteínas em suspensão. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g durante 10 minutos para

a clarificação das mesmas e 500 µL do sobrenadante resultante transferidos para tubos de ensaio. A este volume foram adicionados 500 µL de TBA 1% e as amostras incubadas em banho de água fervente à 100 °C durante 30 minutos. Este tempo de incubação é necessário para que o TBA ligue-se aos produtos formados após a peroxidação lipídica, sendo o principal deles o malondialdeído (MDA), que conferem uma coloração rosa à solução que, por sua vez, pode ter sua absorvância medida no espectrofotômetro em comprimento de onda de 532 nm.

3.5.4.5 Curva padrão de TMP

A quantidade de espécies reativas ao TBA foi quantificada através de uma curva de tetrametoxipropano (TMP) construída entre 0,06 e 0,36 nmol ($R^2 = 0,9902$). A diferentes alíquotas de uma solução de TMP 2 mM foram adicionados volumes de água Milli-Q suficiente para completar 500 µL. Nestas quantidades de padrão seguiu-se a adição de 500 µL de TBA 1% e os demais procedimentos conforme descrito no item 3.5.4.4 (Procedimento) para as amostras.

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi calculada pelo programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 10.0, com nível de significância menor ou igual a 5% ($p \leq 0,05$) e expressos como média \pm desvio padrão (DP).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Considerando o potencial terapêutico até o momento apresentado por estudos com *H. polyanthemum*, bem como o envolvimento de mecanismos de estresse oxidativo no desenvolvimento de diversas doenças, no presente trabalho foram avaliados extratos e frações da planta quanto à sua composição fitoquímica e ao seu potencial antioxidante em diferentes técnicas. A atividade antioxidante encontrada para algumas frações sugere o envolvimento de seus compostos fenólicos nestes mecanismos.

4.1 Quantificação de metabólitos por CLAE

As frações de *H. polyanthemum* foram analisadas por CLAE em três diferentes métodos analíticos para quantificação de (1) benzopiranos, (2) uliginosina B, (3) ácido clorogênico e flavonóides. Os perfis cromatográficos, tanto qualitativos quanto quantitativos, variaram de acordo com a polaridade de cada uma das frações.

4.1.1 Quantificação de benzopiranos e uliginosina B

Os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 são compostos até o momento descritos apenas para a espécie *H. polyanthemum*. Pelo método de CLAE no qual foram quantificados apresentam tempo de retenção (t_r) de 9,1 min (HP1), 12,9 min (HP2) e 21,6 min (HP3) (Bernardi, 2007). A presença do derivado do floroglucinol, uliginosina B, é também relatada em extratos lipofílicos de algumas espécies de *Hypericum* do sul do Brasil (Ferraz *et al.*, 2001; Ferraz *et al.*, 2002; Nör *et al.*, 2004; Cargnin *et al.*, 2010) e pelo método no qual é quantificada apresenta t_r de 21,76 min (Nunes *et al.*, 2009b).

Pela análise comparativa entre o perfil dos cromatogramas obtidos a partir das frações (Figura 1) e dos padrões avaliados, verificou-se que os benzopiranos e uliginosina B possuem o mesmo padrão de distribuição entre as diferentes frações em questão.

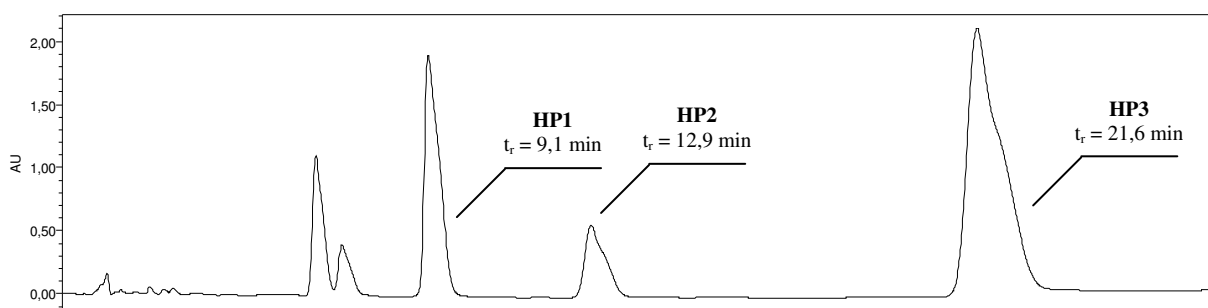


Figura 1a Perfil cromatográfico da fração *n*-hexano de folhas de *H. polyanthemum* aclimatizado, obtido por CLAE, em sistema de fase reversa com eluição isocrática de acetonitrila:água, 60:40, (v:v) e detecção em λ de 270 nm.

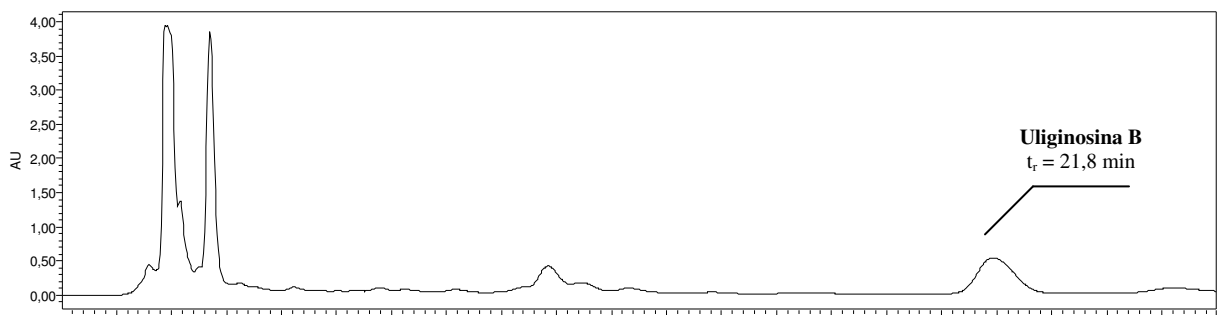


Figura 1b Perfil cromatográfico da fração *n*-hexano de flores de *H. polyanthemum* aclimatizado, obtido por CLAE, em sistema de fase reversa com eluição isocrática de acetonitrila:água, 95:5, (v:v + 0,01% ATF) e detecção em λ de 220

A quantificação dos metabólitos demonstra que o maior acúmulo dos mesmos ocorreu nas frações *n*-hexano de flores e folhas, a mais apolar entre as frações preparadas, e menor concentração também foi verificada nas frações diclorometano destas partes da planta (Tabela 2).

Tabela 2 Quantificação de benzopiranos e uliginosina B (mg%), por CLAE, nas diferentes frações e extratos de *H. polyanthemum* analisados.

	Benzopiranos			Uliginosina B
	HP1	HP2	HP3	
Fr-hex FLOR	16,47 ± 0,84	1,69 ± 0,05	12,11 ± 0,35	7,33 ± 0,08
Fr-hex FOLHA	25,76 ± 0,98	2,96 ± 0,15	4,96 ± 0,23	4,74 ± 0,09
Fr-dic FLOR	0,97 ± 0,10	0,12 ± 0,03	1,17 ± 0,14	0,52 ± 0,05
Fr-dic FOLHA	3,21 ± 0,37	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,002	0,59 ± 0,02
Fr-ace FLOR	nd	nd	nd	nd
Fr-ace FOLHA	nd	nd	nd	nd
Fr-met FLOR	nd	nd	nd	nd
Fr-met FOLHA	nd	nd	nd	nd
Br-met FLOR	3,67 ± 0,07	1,74 ± 0,35	10,07 ± 0,26	3,15 ± 0,31
Br-met FOLHA	5,56 ± 0,60	2,92 ± 0,28	3,52 ± 0,16	1,33 ± 0,34

nd: não detectado

É interessante ressaltar, ainda, que menor teor destes metabólitos foi também quantificado nos extratos bruto metanólico das flores e folhas (Tabela 2). Um extrato bruto é caracterizado como o resultado de uma extração utilizando-se um único solvente, geralmente de elevada polaridade, sendo o extrato resultante uma mistura complexa com maior variedade de compostos e menor quantidade relativa de cada um quando comparado à uma fração enriquecida. Dessa forma, ainda que com característica fortemente polar, o metanol é capaz de extrair compostos lipofílicos que se encontrem em proporções majoritárias em uma matriz vegetal. Já nas frações acetato de etila e metanólicas não verificou-se esta situação, pois benzopiranos e uliginosina B já haviam sido extraídos nas frações *n*-hexano e diclorometano processadas anteriormente à partição com metanol, realizada utilizando-se o mesmo material vegetal previamente esgotado com os solventes lipofílicos.

4.1.2 Quantificação de ácido clorogênico e flavonóides

Comparando-se o tempo de retenção dos picos obtidos no cromatograma das diferentes frações (Figura 2) com o de substâncias puras isoladas foi possível verificar a presença dos flavonóides hiperosídeo ($t_r = 17,8$ min), isoquercitrina ($t_r = 20,4$ min), guaijaverina ($t_r = 26,6$ min) e quercitrina ($t_r = 37,7$ min) nas frações acetato de etila e metanol e nos extratos bruto metanólico da planta. Ácido clorogênico ($t_r = 3,5$ min), substância

analisada pelo mesmo método cromatográfico dos flavonóides, por sua vez, foi identificado apenas nas frações metanol e no extrato bruto metanólico.

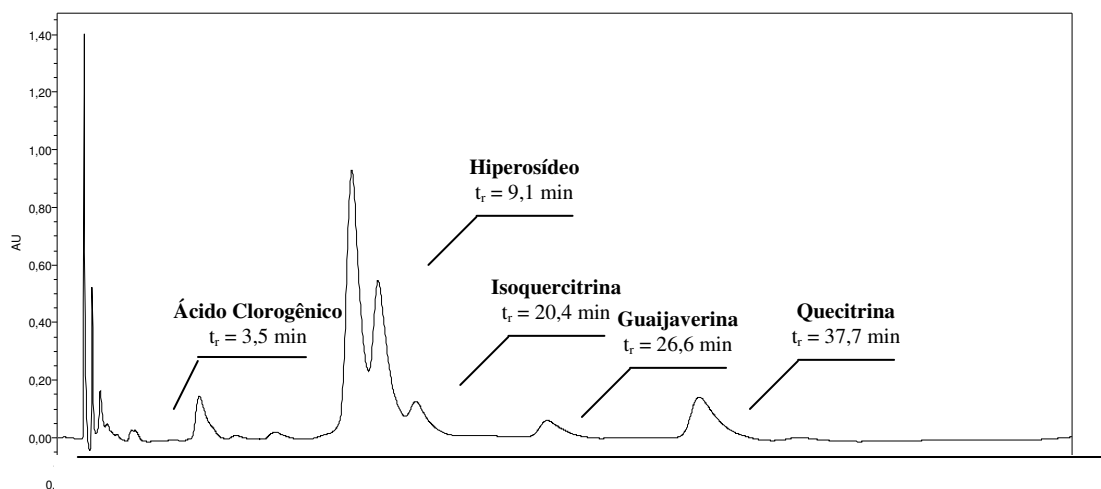


Figura 2 Perfil cromatográfico da fração acetato de etila de folhas de *H. polyanthemum* acimatizado, obtido por CLAE, em sistema de fase reversa com eluição isocrática de acetonitrila:água, 14:86, (v:v + 0,05% ATF) e detecção em λ de 254 nm.

A quantificação dos flavonóides revelou que estes compostos acumularam-se principalmente nas frações acetato de etila tanto das flores quanto das folhas, atingindo mais do que o dobro da concentração verificada nas demais frações (Tabela 3). Este é um perfil quantitativo esperado uma vez que flavonóides são polifenóis relativamente polares, de baixo peso molecular, facilmente extraídos de uma matriz vegetal com o uso de solventes de média a alta polaridade como mistura hidroalcoólica a 70%, *n*-butanol, acetato de etila e metanol (Harborne, 1998; Simões *et al.*, 2003).

O ácido clorogênico, de polaridade superior, foi verificado apenas nas frações metanólica e extrato bruto metanólico, conforme normalmente verificado para procedimentos extrativos com outras plantas (Zgórka e Głowniak, 2001; Jin *et al.*, 2005; Marques e Farah, 2009, Nunes *et al.*, 2010).

Tabela 3 Quantificação de ácido clorogênico e flavonóides (mg%), por CLAE, nas diferentes frações e extratos de *H. polyanthemum* analisados.

	Ac. Clorogênico	Flavonóides			
		Hiperosídeo	Isoquercitrina	Guaijaverina	Quercitrina
Fr-hex FLOR	nd	nd	nd	nd	nd
Fr-hex FOLHA	nd	nd	nd	nd	nd
Fr-dic FLOR	nd	1,28 ± 0,40	nd	nd	nd
Fr-dic FOLHA	nd	1,28 ± 0,39	nd	nd	nd
Fr-ace FLOR	nd	7,27 ± 0,38	1,83 ± 0,08	1,21 ± 0,03	7,06 ± 0,10
Fr-ace FOLHA	nd	11,10 ± 1,36	2,94 ± 0,04	1,46 ± 0,23	8,91 ± 1,74
Fr-met FLOR	0,27 ± 0,05	3,67 ± 0,53	1,07 ± 0,13	0,30 ± 0,02	0,52 ± 0,13
Fr-met FOLHA	1,05 ± 0,03	2,14 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,63 ± 0,08
Br-met FLOR	0,07 ± 0,03	2,60 ± 0,14	0,74 ± 0,11	0,32 ± 0,03	0,50 ± 0,02
Br-met FOLHA	0,40 ± 0,03	2,13 ± 0,25	1,01 ± 0,17	0,28 ± 0,01	0,75 ± 0,04

nd: não detectado

4.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi quantificado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu modificado. Por este método, a intensidade da cor azul resultante da redução do reagente de Folin-Ciocalteu é proporcional à quantidade de grupamentos hidroxila disponíveis na amostra. Quanto mais intensa a cor azul desenvolvida com a reação, maior a concentração destes compostos, que foi quantificada por uma curva padrão utilizando quercetina como substância de referência ($R^2 = 0,9951$) e expressa em miligramas de equivalentes de quercetina por 100 mg (EQ/100 mg) de extrato.

As frações com maior quantidade de compostos fenólicos, tanto para as flores quanto para as folhas, foram as obtidas com acetato de etila, atingindo teor de metabólitos quase três vezes superior ao quantificado para as frações metanólicas e para o extrato bruto destas mesmas partes (Figura 3). As frações *n*-hexano e diclorometano, como esperado, apresentaram apenas pequena quantidade destas substâncias, que por serem predominantemente polares possuem afinidade maior por outros tipos de solvente extrator.

Como dito anteriormente, o acetato de etila possui afinidade por compostos fenólicos em geral, principalmente com flavonóides glicosilados, que uma vez ligados a moléculas de açúcar adquirem polaridade compatível com este solvente. A característica das frações acetato de etila, metanol e dos extratos brutos metanólicos explica o maior acúmulo de compostos fenólicos nelas verificado, tornando-se possível estabelecer algumas relações entre estes teores.

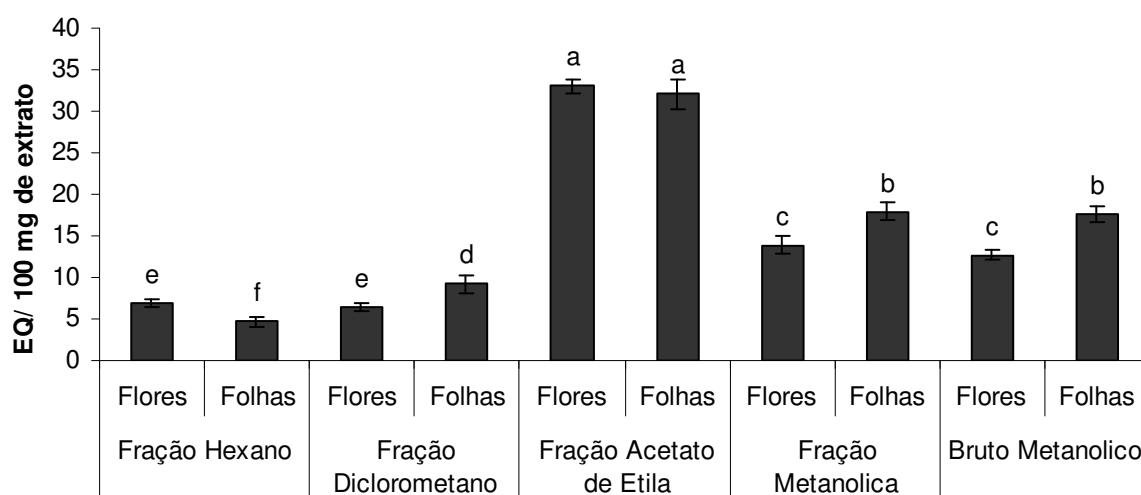


Figura 3 Concentração de compostos fenólicos totais quantificada nas frações e no extrato bruto de folhas e flores de *H. polyanthemum* aclimatizado. As barras verticais representam o valor da média \pm DP de três experimentos independentes.

A comparação estabelecida entre os valores de polifenóis de cada fração, obtidos pelo método colorimétrico, e a concentração dos metabólitos quantificados isoladamente por CLAE demonstra existir moderada e forte correlação entre a concentração de compostos fenólicos totais e ácido clorogênico ($R^2 = 0,6696$), hiperosídeo ($R^2 = 0,7767$), isoquercitrina ($R^2 = 0,7573$), guaijaverina ($R^2 = 0,8982$) e quercitrina ($R^2 = 0,9206$). Comparando-se, ainda, a quantidade de compostos fenólicos totais com a soma da concentração dos flavonóides quantificados separadamente, verifica-se que os últimos representam de 22% a 76% da massa de polifenóis quantificada nestas frações. Isso sugere que estes flavonóides são os constituintes majoritários da composição fenólica destas amostras, o que pode estar relacionado ao perfil antioxidante observado para as mesmas nos experimentos realizados e discutidos na seqüência.

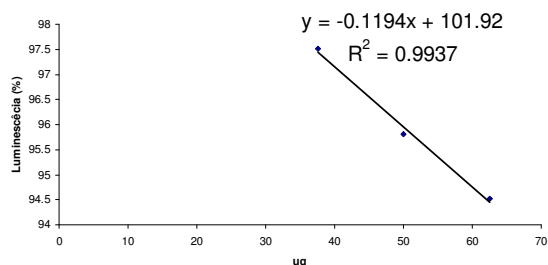
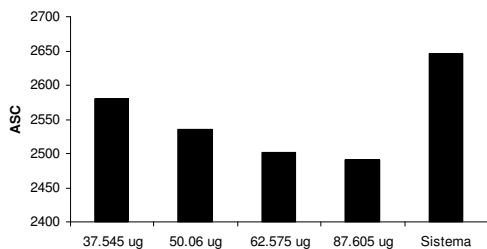
4.3 Atividade antioxidante das frações e extratos de *H. polyanthemum*

O perfil antioxidante das frações e extratos de *H. polyanthemum* foi investigado quanto à capacidade de reatividade antioxidante total no TRAP, potencial *scavenger* de peróxido, atividade *GST like* e capacidade de proteção de dano lipídico frente ao dano induzido com AAPH. .

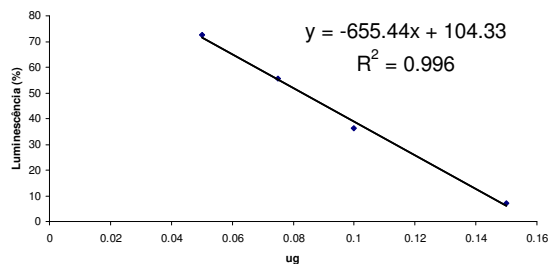
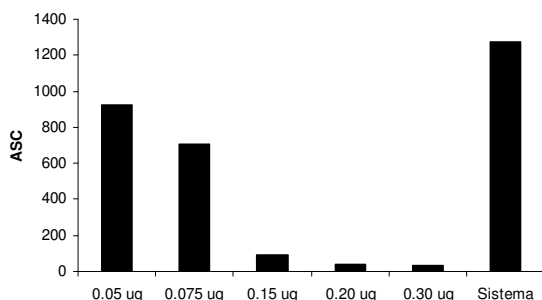
4.3.1 TRAP

O TRAP é um método de avaliação do potencial antioxidante de uma amostra baseado na capacidade que esta apresenta em capturar radicais derivados de um substrato, neste caso gerados a partir da termólise do AAPH (radicais peroxil). A queda na emissão de quimioluminescência pelo sistema após a adição da amostra está relacionada com o potencial antioxidante que esta possui. A adição das soluções dos padrões e extratos foi capaz de promover queda na luminescência monitorada, e a relação entre esta diminuição (em %) observada e a quantidade de amostra (em μg) utilizada mostrou que, para todas as amostras, o seqüestro de radicais peroxila é diretamente proporcional à quantidade de amostra empregada (Figura 4). O parâmetro que permitiu relacionar a inibição resultante e a quantidade de analito foi a área sob a curva (ASC) do perfil de restabelecimento da luminescência do sistema após a adição das amostras, calculada pelo programa *GraphPad Prism* versão 5.01. Dessa maneira, quanto menor a área quantificada, maior o potencial antioxidante.

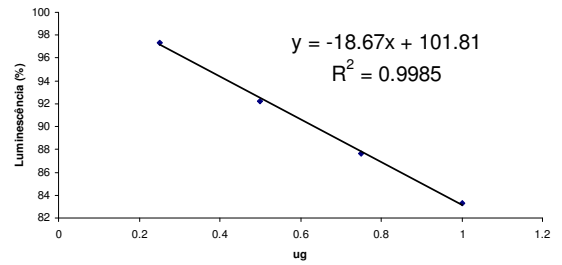
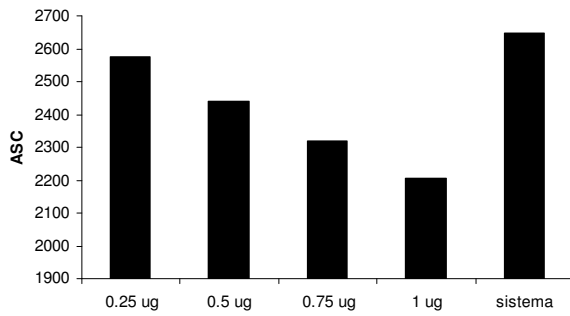
Trolox



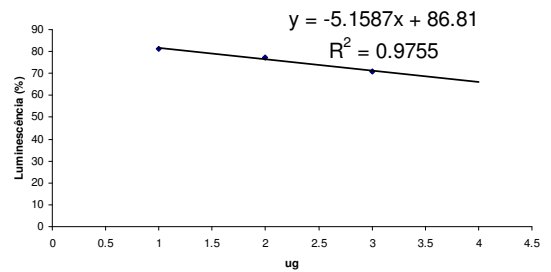
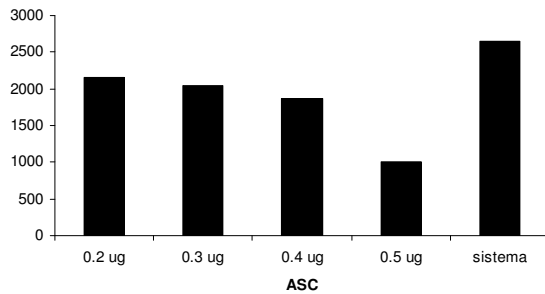
Hiperosídeo



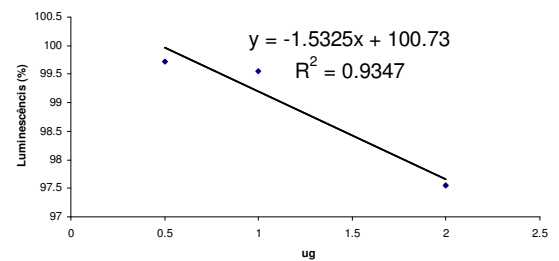
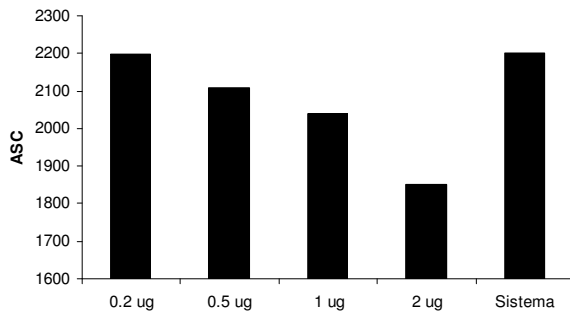
Uligosina B



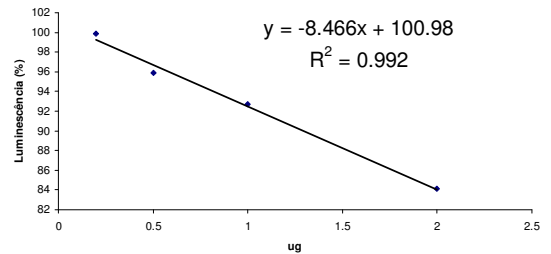
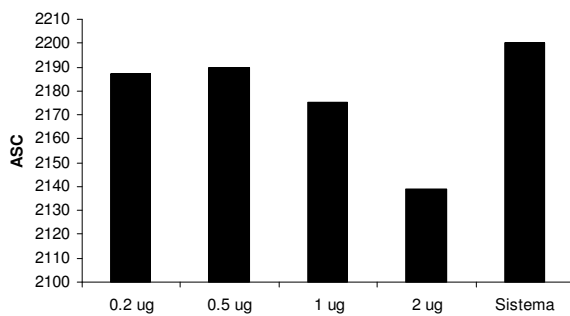
Ácido Clorogênico



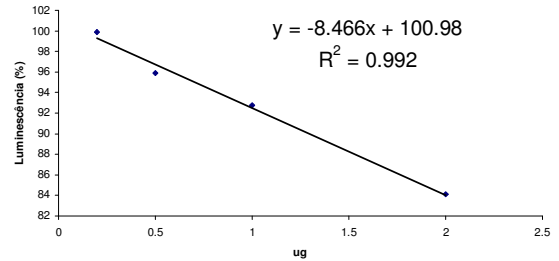
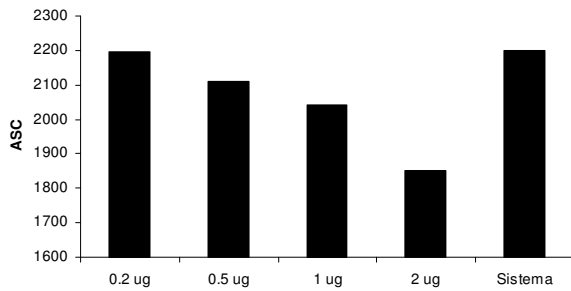
Fração n-hexano - FLORES



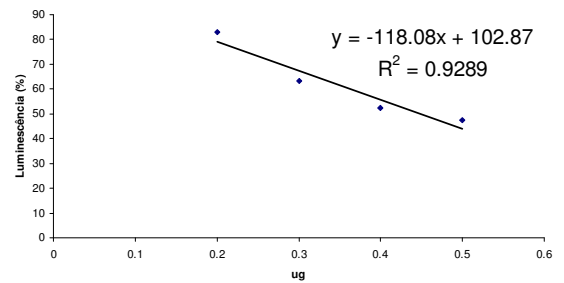
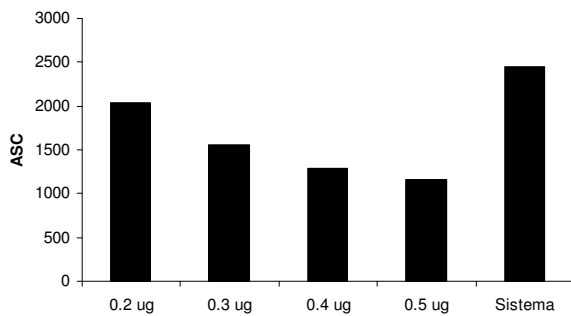
Fração n-hexano - FOLHAS



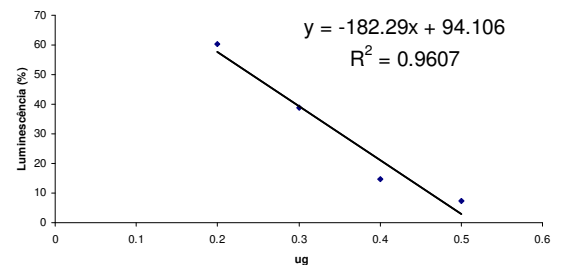
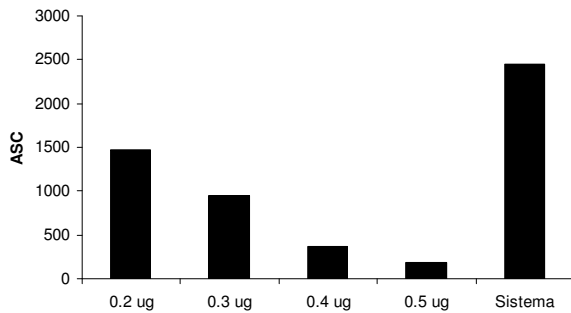
Fração diclorometano - FLORES



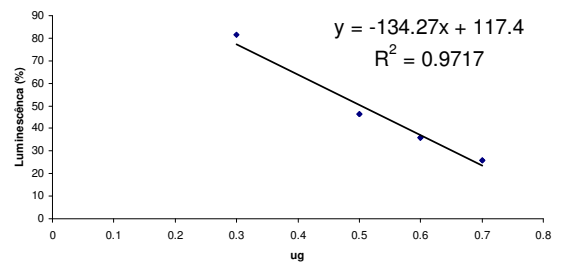
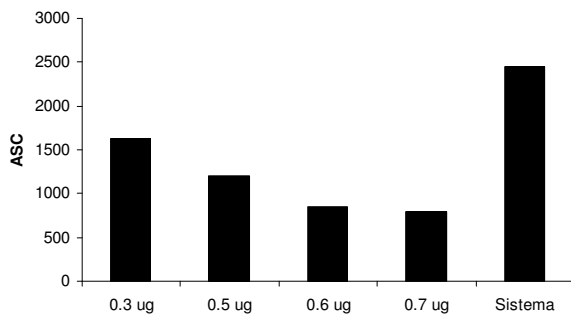
Fração acetato de etila - FLORES



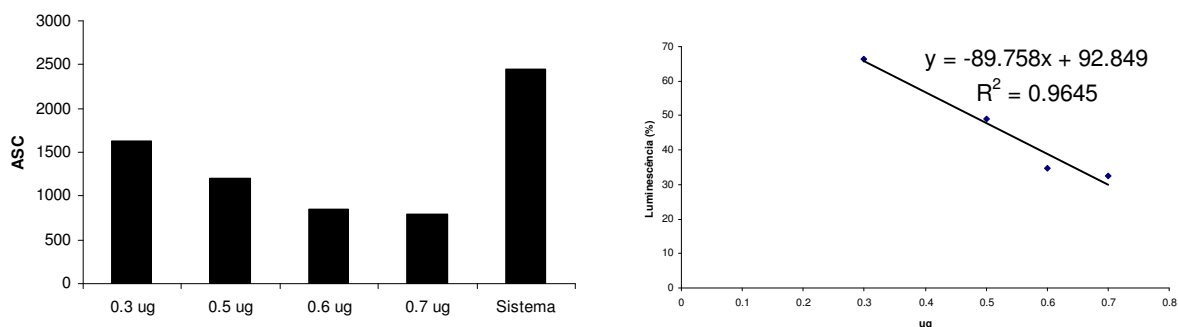
Fração acetato de etila FOLHAS



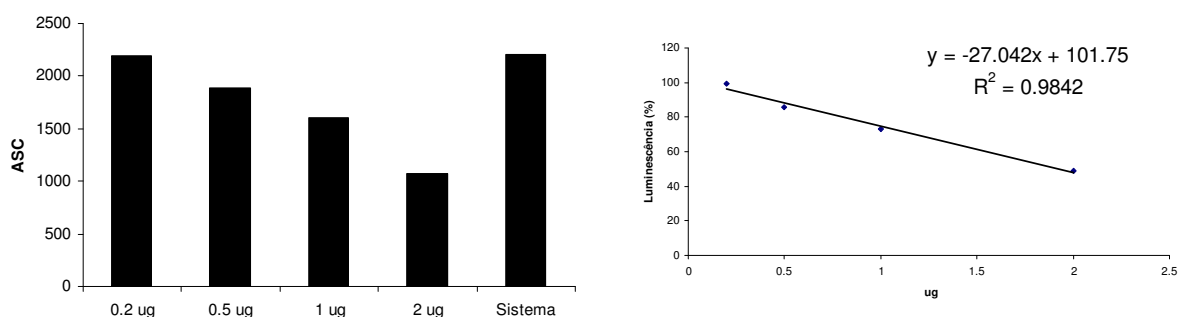
Fração metanol - FLORES



Fração metanol - FOLHAS



Bruto metanol - FLORES



Bruto metanol - FOLHAS

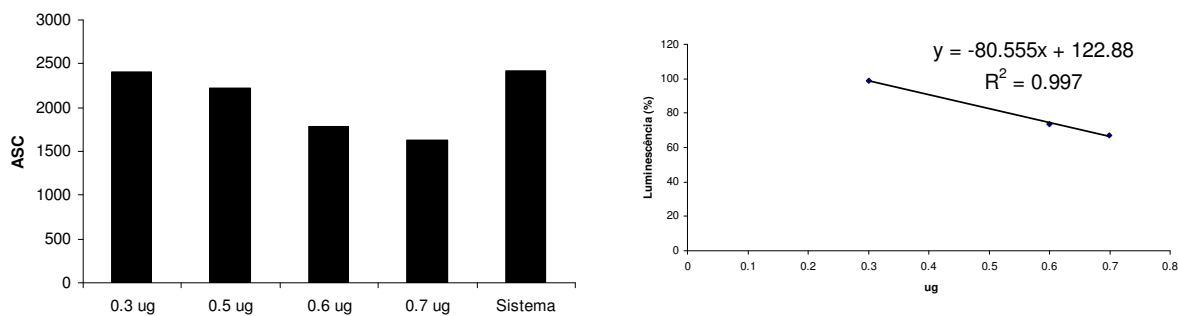


Figura 4 Esquerda: Gráficos ilustrativos da área sob a curva (ASC) obtida pelo perfil de restabelecimento da luminescência do sistema de radicais peroxil (AAPH e luminol) após a adição das amostras. Direita: Correlação entre a quantidade (em μg) de amostra utilizada e a respectiva luminescência (em %) resultante, calculadas a partir da relativização da ASC da amostra e ASC do sistema. Observe que os extratos encontram-se indicados em quantidade crescente e em diferentes escalas, com amostras variando entre 0,2 e 0,5 μg , e outras entre 0,2 e 2 μg .

A mais efetiva atividade antioxidante frente à avaliação dos padrões pelo TRAP foi registrada para o hiperosídeo e, entre os extratos, pelas frações acetato de etila de flores e folhas. Estas amostras foram as que, em menor quantidade ($I_{50\%}$), inibiram em 50% a luminescência emitida pelo sistema. A fração diclorometano das folhas de *H. polyanthemum* não apresentou atividade no TRAP em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 4).

Analisando-se a Tabela 4 é possível verificar, ainda, que as mesmas amostras que apresentaram maior atividade antioxidante no TRAP são também aquelas com maior teor de flavonóides quantificados isoladamente por CLAE. Entre estes compostos, hiperosídeo, isolado dos extratos da planta, apresentou capacidade *scavenger* de radicais peroxil superior, inclusive, do que a apresentada pelo trolox, análogo da vitamina E com reconhecida atividade antioxidante e frequentemente utilizado como substância de referência nestes tipos de teste (Raspor *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Dresch *et al.*, 2009; Zulueta *at al.*, 2009).

Os flavonóides são moléculas com estrutura química ideal para o desempenho da captura de radicais livres, demonstrando atividade *in vitro* superior até mesmo àquelas apresentadas pelas vitaminas C e E na mesma concentração molar (Rice-Evans *et al.*, 1997). As propriedades de uma molécula isolada, entretanto, podem sofrer alterações qualitativa e quantitativa quando em uma matriz complexa como os extratos vegetais (Romano *et al.*, 2009). A partir dos dados apresentados na Tabela 4 é possível verificar que a quantidade de hiperosídeo presente nas frações acetato de etila de flores (0,033 µg) e folhas (0,027 µg) é menor do que a quantidade de hiperosídeo purificado necessária para inibir em 50% a luminescência emitida pelo sistema. Partindo-se do pressuposto de que os flavonóides, em especial o hiperosídeo, sejam as principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante observada para as frações de *H. polyanthemum* no momento avaliadas, infere-se que a atividade antioxidante destas amostras ocorre por um mecanismo de sinergismo entre os compostos nelas presentes, e não apenas por ação de um composto majoritário com excelente atividade, isoladamente. Esta propriedade é percebida quando ocorre diferença entre a atividade antioxidante calculada e a observada, e é frequentemente observada em extratos vegetais (Hidalgo *et al.*, 2010).

Tabela 4 Valores da massa de amostra necessária para inibir em 50% a quimioluminescência emitida pelo sistema ($I_{50\%}$, em μg), concentração de compostos fenólicos totais (CFT, em EQ/100mg) e quantificação de ácido clorogênico e flavonóides (em mg%) nas frações e extratos de *H. polyanthemum* avaliadas.

	$I_{50\%}$	CFT	Ác. Clorogênico	Hiperosídeo	Isoquercitrina	Guajaverina	Quercitrina
Trolox	0,43 ± 0,003	---	---	---	---	---	---
Hiperosídeo	0,08 ± 0,00	---	---	---	---	---	---
Uliginosina B	2,78 ± 0,004	---	---	---	---	---	---
Ác. clorogênico	7,08 ± 0,17	---	---	---	---	---	---
Fr-hex FLOR	33,10 ± 2,16	6,39 ± 0,51e	nd	nd	nd	nd	nd
Fr-hex FOLHA	32,32 ± 0,06	4,34 ± 0,55f	nd	nd	nd	nd	nd
Fr-dic FLOR	6,02 ± 0,05	6,45 ± 0,40 ^c	nd	1,28 ± 0,40	nd	nd	nd
Fr-dic FOLHA	sa	9,72 ± 1,06 ^d	nd	1,28 ± 0,39	nd	nd	nd
Fr-ace FLOR	0,45 ± 0,03	33,06 ± 0,87 ^a	nd	7,27 ± 0,38	1,83 ± 0,08	1,21 ± 0,03	7,06 ± 0,10
Fr-ace FOLHA	0,24 ± 0,009	32,10 ± 1,61 ^a	nd	11,10 ± 1,36	2,94 ± 0,04	1,46 ± 0,23	8,91 ± 1,74
Fr-met FLOR	0,51 ± 0,01	13,87 ± 1,08 ^c	0,27 ± 0,05	3,67 ± 0,53	1,07 ± 0,13	0,30 ± 0,02	0,52 ± 0,13
Fr-met FOLHA	0,56 ± 0,01	17,96 ± 1,06 ^b	1,05 ± 0,03	2,14 ± 0,03	0,90 ± 0,03	0,27 ± 0,01	0,63 ± 0,08
Br-met FLOR	1,91 ± 0,03	12,69 ± 0,64 ^c	0,07 ± 0,03	2,60 ± 0,14	0,74 ± 0,11	0,32 ± 0,03	0,50 ± 0,02
Br-met FOLHA	0,90 ± 0,003	17,21 ± 0,98 ^b	0,40 ± 0,03	2,13 ± 0,25	1,01 ± 0,17	0,28 ± 0,01	0,75 ± 0,04

nd: não detectado; sa: sem atividade

Quando comparados o conteúdo de compostos fenólicos totais e o $I_{50\%}$, encontra-se apenas uma fraca correlação entre estas duas propriedades ($R^2 = 0,3768$). Esta relação incerta entre a atividade antioxidante e a concentração de compostos fenólicos pode ser explicada de diversas maneiras, uma vez que o conteúdo destas substâncias não é o único fator responsável pelas propriedades antioxidantes apresentadas por uma amostra. Além disso, o sinergismo entre compostos de um extrato faz com que sua atividade antioxidante não seja dependente apenas da concentração dos mesmos, mas sim, resulte de suas estruturas e capacidade de interação intermolecular (Djeridane *et al.*, 2006). Isto provavelmente explica a baixa dependência encontrada entre conteúdo de compostos fenólicos totais e $I_{50\%}$, claramente percebido, por exemplo, pelas frações metanol, nas quais a diferença significativa no conteúdo de compostos fenólicos entre flores e folhas não é capaz de diferenciar seus valores de $I_{50\%}$, que se apresentam praticamente iguais, e na fração diclorometano das folhas, na qual, embora contendo compostos fenólicos, não apresentou valor para $I_{50\%}$.

4.3.2 Potencial scavenger de peróxido e atividade GST like

Antioxidantes que apresentam atividade em um método de avaliação podem não apresentar o mesmo desempenho em outros, como por exemplo, compostos que são capazes de impedir a peroxidação de estruturas lipídicas mas não são efetivos em proteger outras moléculas, como proteínas, que também são alvo de dano oxidativo (Silva *et al.*, 2009). Visando iniciar o aprofundamento do estudo da capacidade antioxidante de *H. polyanthemum*, os extratos foram também avaliados quanto a sua capacidade *scavenger* de peróxido de hidrogênio e atividade GST like.

Em nenhuma das concentrações testadas as frações foram capazes de diminuir a concentração de peróxido de hidrogênio, sugerindo que as amostras não possuem a capacidade de serem *scavenger* desta espécie reativa.

4.3.3 TBARS

Os lipídios são moléculas com funções biológicas tão diferentes quanto suas características químicas. As gorduras e os óleos são as principais formas de armazenamento de energia em muitos organismos. Os fosfolipídios e os esteróis são elementos estruturais de grande importância nas membranas biológicas. Outros lipídios, embora presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham funções cruciais como cofatores transportadores de elétrons, pigmentos que absorvem luz, âncoras hidrofóbicas para proteínas, “moléculas guias” que ajudam o dobramento de moléculas protéicas de membranas celulares, agentes emulsificantes no trato digestivo, hormônios e mensageiros intracelulares (Nelson e Cox, 2006). Quando estes lipídios são alvos de alguma espécie reativa, podem sofrer alterações químicas capazes de comprometer seu desempenho na fluidez e permeabilidade de membranas, causando dano à proteínas, inativando enzimas e canais iônicos (Halliwell e Gutteridge, 2007). Considerando a importância das estruturas lipídicas no organismo, a atuação de substâncias capazes de prevenir este tipo de prejuízo torna-se interessante.

Neste experimento, o dano peroxidativo induzido na matriz lipídica pelo AAPH foi medido através da quantificação da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, em comprimento de onda de 532 nm. Com a metodologia adotada, o dano do controle induzido (CI) foi claramente diferenciado da condição do tratamento controle (C), possibilitando a adequada avaliação do comportamento protetor das amostras frente à peroxidação (Figura 5). A curva padrão de TMP quantificou este dano, mensurando-o em equivalentes de nmol de TMP. Dessa forma, apenas dois tipos de frações apresentaram atividade protetora neste ensaio: *n*-hexano e acetato de etila. Estas frações foram capazes de reduzir em aproximadamente 50% o dano induzido pelo AAPH, provavelmente cada uma por um mecanismo distinto.

As frações acetato de etila mostram-se superiores quanto à concentração de compostos fenólicos totais, dos flavonóides quantificados isoladamente e na atividade antioxidante pelo ensaio não enzimático do TRAP. Os flavonóides são polifenóis com estrutura que possibilita o desempenho de diferentes mecanismos antioxidantes tais como a atuação como agentes

redutores, estabilizadores de elétrons desemparelhados, doadores de hidrogênio ou quelantes de íons metálicos (Rice-Evans *et al.*, 1997). Dessa forma, as frações acetato de etila podem ter sua atividade protetora (Figura 5) atribuída ao elevado teor destas substâncias. A atividade de flavonóides frente à peroxidação lipídica também é descrita em outros estudos (van der Berg *et al.*, 2000).

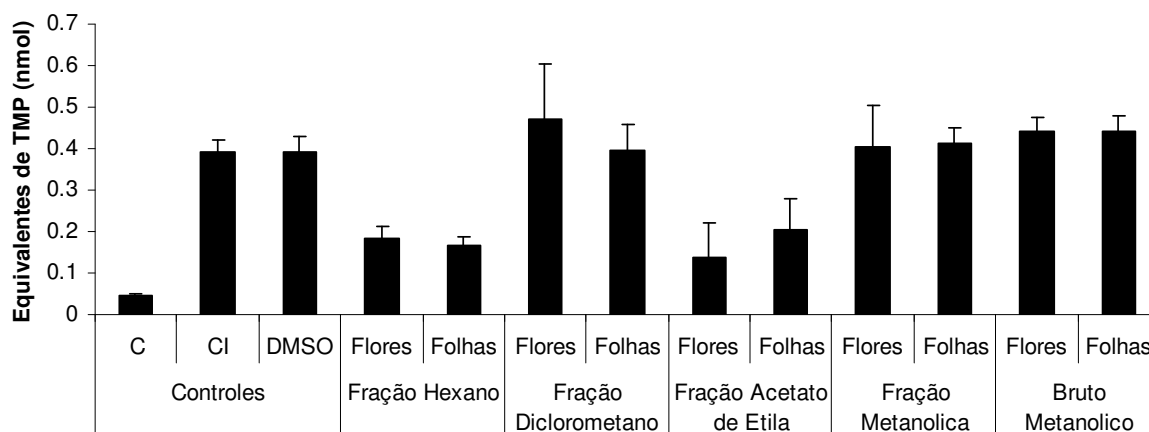


Figura 5 Teor de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico indicando o dano peroxidativo induzido por AAPH frente as frações e extratos de *H. polyanthemum*.

As frações *n*-hexano, por sua vez, não apresentaram os flavonóides quantificados por CLAE, embora ainda possuam pequena quantidade de compostos fenólicos. Entretanto, é relatado que as características hidrofílicas e/ou lipofílicas do meio reacional, bem como da amostra em questão, influenciam na atividade antioxidante por ela apresentada (Arnão *et al.*, 2003). Para ensaios de peroxidação lipídica, a hidrofília dos compostos deve também ser levada em conta, visto que a baixa polaridade e alto coeficiente de partição de estruturas mais lipofílicas possibilita melhor interação com a matriz lipídica e conseqüente proteção ao dano (Schroeter *et al.*, 2000). Assim sendo, o bom desempenho das frações *n*-hexano de flores e folhas de *H. polyanthemum* pode ser atribuído às características extremamente lipofílicas deste extrato, caracterizado por conter, além de benzopiranos e uliginosina B, a presença de alcanos, ácidos graxos e ceras (Cargnin *et al.*, 2010).

6. Conclusão

Entre as plantas medicinais do sul do Brasil com potencial emprego na terapêutica encontra-se *H. polyanthemum*, com diversos resultados a respeito de sua composição fitoquímica, atividades biológicas e estratégias de cultivo controlado descritos. Dando

seguimento aos estudos já desenvolvidos com esta planta, o presente trabalho caracterizou quimicamente o perfil fitoquímico de diferentes extratos de *H. polyanthemum*, bem como o potencial antioxidante frente à técnicas como TRAP e TBARS.

A quantificação de compostos fenólicos totais e a análise por CLAE demonstrou que a atividade antioxidante apresentada pelos extratos nos ensaios não enzimáticos de TRAP e de peroxidação lipídica pode estar intimamente ligada à presença destes compostos fenólicos, em especial à dos flavonóides hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina e guaijaverina. A avaliação comparativa entre o teor destes metabólitos e os valores de $I_{50\%}$ obtidos no TRAP pode, também, ser um indicativo da existência de sinergismo entre os compostos, que embora contidos em uma maior massa de extrato para inibir em 50% a formação de radicais peroxil, encontram-se individualmente em menor massa do que a do composto isolado.

Os compostos com as atividades biológicas mais importantes descritas para a espécie concentraram-se nas frações *n*-hexano e, em menor quantidade, nas frações diclorometano e nos extratos bruto metanólico. As frações *n*-hexano apresentaram baixo poder antioxidante no TRAP, entretanto, foram bastante eficientes quanto à capacidade de proteção frente à peroxidação lipídica.

Torna-se relevante ressaltar, ainda, que o material vegetal utilizado neste trabalho foi todo proveniente de protocolo de cultivo controlado desenvolvido para a espécie, visando qualidade e sustentabilidade na obtenção de matéria-prima. Os resultados iniciais obtidos com a avaliação antioxidante da planta corroboram a necessidade da continuidade de estudos com a espécie, direcionados à otimização do seu emprego como um real recurso medicinal na prevenção da saúde e tratamento de doenças.

7. Referências

- Arnão, M.B.; Cano, A.; Acosta, M. The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 73, p. 239-244, 2003.
- Bernardi, A.P.M.; Ferraz, A.B.F.; Albring, D.V.; Bordignon, S.A.L.; Schripsema, 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.
- Bernardi, A.P.M. Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. TESE DE DOUTORADO. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, UFRGS, 2007.
- Bernardi, A.P.M.; López-Alarcón, C.; Aspée, A.; Rech, S.B.; von Poser, G.L.; Bridi, R.; Lissi, E.C. Antioxidant activity of flavonoids isolated from *Hypericum ternum*. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 52, p. 1126-1129, 2007a.
- Bernardi, A.P.M.; Maurmann, N.; Rech, S.B.; von Poser, G.L. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 29, p. 165-170, 2007b.
- Bernardi, A.P.M.; López-Alarcón, C.; Aspée, A.; von Poser, G.L.; Bridi, R.; Dutra Filho C. S.; Lissi, E.C. Antioxidant activity in Southern Brazilian *Hypericum* species. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 53, p. 1658-1662, 2008a.
- Bernardi, A.P.M.; Nunes, J.M.; Marchioro, M.K.; Rosa, L.M.G.; von Poser, G.L.; Rech, S.B. Phenolic compounds profiles during *ex vitro* acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 694-700, 2008b.
- Bilia, A.R.; Gallori, S.; Vincieri, F.F. St. John's wort and depression, efficacy, safety and tolerability – an update. **Life sciences**, p. 3077-3096, 2002.

- Butterweck, V.; Petereit, F.; Winterhoff, H.; Nahrstedt, A.; Solubilized which other constituents of St. John's wort contribute to its hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v. 64, p. 291–294, 1998.
- Butterweck, V.; Jürgenliemk, G.; Nahrstedt, A.; Winterhoff, H.; Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v. 66, p. 3-6, 2000.
- Canter, P.H.; Thomas, H.; Ernst, E. Bringing medicinal plants into cultivation: opportunities and challenges for biotechnology – Review. **Trends in Biotechnology**, v. 23, p. 180-185, 2005.
- Cargnin, S.T.; Nunes, J.M.; Haas, J.S.; Baladão, L.F.; Cassel, E.; Vargas, R.F.; Rech, S.B.; von Poser, G.L. Supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatographic determination of benzopyrans and phloroglucinol derivative in *Hypericum polyanthemum*. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p. 83-87, 2010.
- Chatterjee, S., Nöldner, M., Koch, E.; Erdelmeier, C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hiperforin: the neglected possibility. **Pharmacopsychiatry**, v. 31, p. 7-15, 1998.
- Dall'Agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nör, C.; Sarmiento, 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.
- Dall'Agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A.P.; Albring, D.; Nör, C.; von Poser, G.; Schapoval, E.E.S. Bioassay guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 291-293, 2005.
- Daudt, R.; von Poser, G. L.; Staats, C.; Neves, G.; Rates, S. M. K. Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 344-346, 2000.

- Djeridane, A.; Yousfi, M.; Nadjemi, B.; Boutassouna, D.; Stocker, P.; Vidal, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 97, p. 654-660, 2006.
- Dresch, M.T.K; Rossato, S.B.; Kappel, V.D.; Biegelmeier, R.; Hoff, M.L.M, Mayorga, P. Zuanazzi, J.A.S.; Henriques, A.T.; Moreira, J.C.F. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 107-114, 2009.
- Esterbauer, H.; Cheeseman K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.
- Falkenberg, M.B. Santos, R.I., Simões, R.I. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C. M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C. P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, c. 10, p. 229-245, 2003.
- Fenner, R.; Sortino, M.; Rates, S. M. K.; Dall'agnol, R.; Ferraz, A.; Bernardi, A. P.; Albring, D.; Nör, C.; Von Poser, G.; Schapoval, E. E. S., Zacchino, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 12, p. 236-240, 2005.
- Ferraz, A.B.F; Bordignon, S.A.L; Staats, C.; Schripsema J.; von Poser, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1227-1230, 2001.
- Ferraz, A.B.F; Schripsema J.; Pohlman, A.R; von Poser, G.L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 989-991, 2002a.
- 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* (Guttiferae). **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 294-297, 2002b.

- Ferraz, A. B. F.; Limberger, R. P.; Bordignon, S. A. L.; von Poser, G. L.; Henriques, A. T. Essential oil in composition of six *Hypericum* species from Southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 335-339, 2005a.
- Ferraz, A.; Faria, D.H.; Benneti, M.N., da Rocha, A.B; Schwartzmann, G., Henriques, A., von Poser, G. Screening for the antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v. 12, p. 112-115, 2005b.
- França, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, c. 7, p. 123-146, 2003.
- França, H.S.; Kuster, R.M.; Rito, P.N.; Oliveira, O.P.; Teixeira, L.A.; Rocha, L. Atividade antibacteriana de floroglucínóis e do extrato hexânico de *Hypericum brasiliense* Choisy. **Química Nova**, v. 32, p. 1103-1106, 2009.
- Fritz, D.; Venturi, C.R.; Cargnin, S.; Schripsema, J.; Roehle, P.M.; Montanha, J.A.; von Poser, G.L. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat mouth wound. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 517-529, 2007.
- Gnerre, C.; von Poser, G.L.; Ferraz, A.; Viana, V.; Testa, B.; Rates, S.M.K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1273-1279, 2001.
- Greeson, J.M.; Sanford, B.; Monti, D.A. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. **Psychopharmacology**, v. 153, p. 401-414, 2001.
- Haas, J.S.; Viana, A.F.; Heckler, A.P.M.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. The antinociceptive effect of a benzopiran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test blocked by naloxone. **Planta Medica**, v. 76, p. 1-5, 2010.

- Habig, W.H.; Jakoby, W.B. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 398-405, 1981.
- Halliwell, B.; Gutteridge J.M. **Free radicals in biology and medicine**. 4ª edição. Londres: Oxford University Press, 2007.
- Harborne, J.B. **Phytochemical Methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. 3ª edição. Londres: editora Chapman & Hall, 1998.
- Heckler, A.P.M; Viana, A.F.; Fenner, R.; Nör, C.; Kliemann, M.; do Rego, J.C.; Costentin, J.; von Poser, G.L, Rates, S.M.K. Atividade antinociceptiva de uliginosina B isolada de *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). 20a Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia, Brasil, 2005.
- Hidalgo, M.; Sánchez-Moreno, C.; Pascual-Teresa, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 121, p. 691-696, 2010.
- Jensen, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 666-667, p. 387-392, 2003.
- Jin, U.H.; Lee, J.Y.; Kang, S.K.; Kim, J.K.; Park, W.H.; Kim, J.G.; Moon, S.K.; Kim, C.H. A phenolic compound, 5-caffeoylquinic acid (chlorogenic acid), is a new type and strong matrix metalloproteinase-9 inhibitor: Isolation and identification from methanol extract of *Euonymus alatus*. **Life Sciences**, v. 77, p. 2760-2769, 2005.
- Kaehler, S.T.; Sinner, C.; Chatterjee, S.S.; Philippu, A. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in rat locus coeruleus. **Neurosciences Letters**, v. 262, p. 199-202, 1999.
- Kasper, S. *Hypericum perforatum* – a review of clinical studies. **Pharmacopsychiatry**, v. 34, p. S51-S55, 2001.
- Lawvere, S.; Mahoney, M.C. St. John's Wort. **American Family Physician**, v. 72, p. 2249-2254, 2005.

- Li Y.; Schellhorn H.E. Rapid kinetic microassay for catalase activity. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 18, p. 185-187, 2007.
- Lim, Y.Y; Murtijaya, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus marus* extracts as affected by different drying methods. **LWT**, v. 40, p. 1664-1669, 2007.
- Lissi E.; Salim-Hanna M.; Pascual C.; Del Castillo M. D. Evaluation of total antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity from luminol-enhanced chemiluminescence measurements. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, p. 153-158, 1995.
- Marques, V.; Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.
- Matkowski, A. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants - A review. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548-560, 2008.
- Maurmann, N., Rech, S.B., Fett-Neto, A.G. Improved nutrient medium for biomass and valepotriate production in extended period stock cultures of *Valeriana glechomifolia*. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 44, p. 209–215, 2008.
- Mendes F.R., Mattei, R., Carlini, E.L.A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 462–471, 2002.
- Nelson, D.L.; Cox, M.M. Lehninger Princípios de Bioquímica. 4ª edição. São Paulo: editora Sarvier, 2006.
- Nör, C.; Albring, D.; Ferraz A.B.F.; Schripsema, J.; Pires, V.; Sonnet, P.; Guillaume, D.; von Poser, G.L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 517-519, 2004.

- Nör, C. Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre: UFRGS, 2006.
- Nör, C.; Bernardi, A.P.; Haas J.S.; Schripsema, Rech, S.B.; von Poser, G.L. Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. **Natural Products Communication**, v. 3, p. 237-240, 2008.
- Nunes, J.M.; Pinhatti, A.V.; Rosa, L.M.G.; von Poser, G.L.; Rech, S.B. St. Roles of *in vitro* plantlet age and growing period in the phenolic constituent yields of acclimatized *Hypericum polyanthemum*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, p. 204-208, 2009a.
- Nunes, J.M.; Pinhatti, A.V.; von Poser, G.L.; Rech, S.B. Promotive effects of long term fertilization on grown of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plants during acclimatization. **Industrial Crops and Products**, v. 30, p. 329-332, 2009b.
- 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.
- Passalacqua, N.G.; Guarrera, P.M.; De Fine, G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). **Fitoterapia**, v. 78, p. 52-58, 2007.
- Pinhatti, A.V.; Nunes, J.M.; Maurmann, N.; Rosa, L.M.G.; von Poser, G.L.; Rech, S.B. Phenolic compounds accumulation in *Hypericum ternum* propagated *in vitro* and during plant development acclimatization. **Acta Physiology Plantarum**, v. 32, p 675-681, 2010.
- Raspor, P.; Plesničar, S.; Gazdag, Z.; Pesti, M.; Miklavčič, M.; Lah, B.; Logar-Marinsek, R.; Poljšak, B. Prevention of intracellular oxidation in yeast: the role of vitamin E analogue, trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylkroman-2-carboxyl acid). **Cell Biology International**, v. 29, p. 57-63, 2005.
- Ribeiro, V.L.S.; Toigo, E.; Bordignon, S.A.L.; Gonçalves, K.; von Poser, G.L. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 199-203, 2007.

Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

Rice-Evans, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, p. 838-849, 2004.

Rocha, L.; Marston, A.; Kaplan, M.A.C.; Stoeckli-Evans, H.; Thull, U.; Testa, B.; Hostettmann, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Stoeckli-Evans, H.; Hostettmann, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1447-1452, 1995.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Hostettmann, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 185-188, 1996.

Romano, C.S.; Abadi, K.; Repetto, V.; Vojnov, A.A.; Moreno, S. Synergistic antioxidant and antibacterial activity of rosemary plus butylated derivatives. **Food Chemistry**, v. 115, p. 456-461, 2009.

Sánchez-Mateo, C. C.; Prado, B.; Rabanal, R. M. Antidepressant effects of the methanol extracts of several *Hypericum* species from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 119-127, 2002.

Schroeter, H.; Williams, R.J.; Matin, R.; Iversen, L.; Rice-Evans, C.A. Phenolic antioxidants attenuate neuronal cell death following uptake of oxidized low-density lipoprotein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 29, p. 1222-1233, 2000.

Schmitt, A.C.; Ravazzolo, A.P.; von Poser, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 77, p. 239-245, 2001.

Silva, B.A.; Ferreres, F.; Malva, J.O.; Dias, A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, p. 157-167, 2005.

Silva, E.G.; Behr, G.A.; Zanotto-Filho, A.; Lorenzi, R.; Pasquali, M.A.B.; Ravazolo, L.G.; Bordignon Jr., C.L.; Silva, F.A.; Aboy, A.L.; Bassani, V.L.; Henriques, A.T.; Reginatto, F.H.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J.C.F. Antioxidant activities and free radical scavenging potential of *Bauhinia microstachya* (RADDI) MACBR. (Caesalpinaceae) extracts linked to their polyphenol content. **Biological and Pharmaceutica Bulletin**, v. 30, p. 1488-1496, 2007.

Silva, C.G.; Raulino, R.J.; Cerqueira, D.M.; Mannarino, S.C.; Pereira, M.D.; Panek, A.D.; Silva, J.F.M.; Menezes, F.S.; Eleutherio, E.C.A. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. **Phytomedicine**, v. 16, p. 761-767, 2009.

Singleton, V. L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

Stolz, E.D.; Haas, J.S.; Graziotin, L.; Wild, L.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K. Uliginosina, um floroglucinol isolado de *Hypericum polyanthemum*, apresenta efeito antinociceptivo mediado pela neurotransmissão dopaminérgica. V Oficina de neurociências – Fronteiras da Investigação. Garibaldi, Brasil, 2008.

van der Berg, R.; Haenen, G.R.M.M.; van den Berg, H.; van der Vijgh, W.; Bast, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, v. 70, p. 391-395, 2000.

- Viana, A. F.; Heckler, A. P.; Fenner, R.; Rates, S. M. K. Antinociceptive activity of *Hypericum* spp. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 631-634, 2003.
- Viana, A.; do Rego, J. -C.; von Poser, G.; Ferraz, A.; Heckler, A. P.; Costentin, J.; Rates, S. M. K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 1042-1052, 2005.
- von Poser, G. L.; Rech, S. B.; Rates, S. M. K. Chemical and pharmacological aspects of southern Brazilian *Hypericum* species. In: Teixeira da Silva, J. A. (Ed.). **Floriculture and Ornamental Plant Biotechnology. Advances and Tropical Issues**, London: Global Science Book, 2006.
- Wagner, H.; Bladt, S. Pharmaceutical quality of *Hypericum* extracts. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. S65-S68, 1994.
- Wang, D.; Bai, J.; Sun, F.; Yang, D. Chemical constituents and antidepressant activity of the new species *Hypericum enshiense* occurring in China. **Phytomedicine**, v. 17, p. 410-413, 2010.
- Yesil-Celiktas, O.; Nartop, P.; Gurel, A.; Bedir, E.; Vardar-Sukan, F. Determination of phenolic content and antioxidant activity of extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*' calli. **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 1536-1542, 2007.
- Zgórka, G.; Głowniak, K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 79-87, 2001.
- Zulueta, A.; Esteve, M.J.; Frígola, A. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. **Food Chemistry**, v. 114, p. 310-316, 2009.