

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

**ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *HYPERICUM*
CARINATUM (GUTTIFERAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA
DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM***

DANIELA VICENTINI ALBRING

Porto Alegre, 2006.

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

**ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *HYPERICUM*
CARINATUM (GUTTIFERAE) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA
DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM***

Dissertação apresentada por
Daniela Vicentini Albring
para obtenção do **grau de Mestre**
em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. GILSANE LINO VON POSER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aprovada em 31.08.2006, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Berta Maria Heinzmann
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Jarbas Alves Montanha
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

A342e Albring, Daniela Vicentini
Estudo da constituição química de *Hypericum carinatum* (Guttiferae) e avaliação da atividade inseticida de *Hypericum polyanthemum* / Daniela Vicentini Albring – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - 104 p.: il.

Dissertação (Mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Fitoquímica. 2. *Hypericum carinatum*. 3. Guttiferae. 4. *Hypericum polyanthemum*. 5. Atividade inseticida. I. Poser, Gilsane Lino von. II Título.

CDU: 547.9:582.824

Bibliotecária Responsável:
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Proteínas Tóxicas do Departamento de Biofísica, ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Agradecemos ao CNPq pelo suporte financeiro e pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.

“O futuro pertence
aos que acreditam na beleza
dos seus próprios sonhos”

Agenor Henrique Albring

Dedico este trabalho

aos meus pais, Agenor e Teresinha, pela presença inconstante, pelo incentivo e
por acreditarem nas minhas escolhas;

à mana Deisi, meu exemplo de luta e força.

Agradecimentos

À excelente orientadora, Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser, e Dr. Alexandre Ferraz, pelo ensino e incentivo ao longo de seis anos de pesquisa, desde a iniciação científica. Por sempre estarem dispostos a acrescentar, bem como pela valiosa amizade.

À Profa. Dra. Célia Carlini, pela parceria formada entre o Laboratório de Proteínas Tóxicas da UFRGS (Laprottox) e a Farmacognosia, tornando possível a realização de grande parte deste trabalho. Obrigada pela supervisão dos experimentos, pela competência, auxílio e pelo fornecimento de subsídios.

Ao Prof. Sergio Bordignon, com quem muito aprendi sobre botânica e a apreciar a pesquisa desde o trabalho de campo.

Agradeço de coração as minhas queridas amigas Ana Paula Bernardi, Carolina Nör, Ana Cristina e Daniela Fritz, colegas de iniciação científica e pós, por todo o trabalho em conjunto, pelas trocas de conhecimento e principalmente pela preciosa amizade.

As bolsistas e amigas, Juliana, Kênia, Bruna e Simone, pelo auxílio prático, disposição e por alegrarem nosso ambiente de trabalho.

Aos colegas de laboratório, Rafaela, Melissa, Marina, Dudu, Mirian, e demais amigos, pela ajuda muitas vezes necessária e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de farmacologia, Gilda, Raquel, Leonardo, Profa. Stela, pela amizade e parceria no desenvolvimento do trabalho.

À animadíssima e competentíssima equipe do Laprottox, sempre dispostos a auxiliar nos experimentos inseticidas. Fernanda, Juliana, Deiber, German, Melissa, Ângela, Martha, Anne, e todos os demais, obrigada por todo empenho e carinho.

Às minhas grandes amigas e colegas de mestrado, Clarissa, Maria e Fernanda, por todas as confidências, cumplicidade e conselhos ao longo de mais essa trajetória.

À minha amiga e colega de apartamento, Rafaela, pela amizade, bom humor e apoio emocional.

Por fim, agradeço o apoio de toda minha família, essencial à realização desta pós-graduação. Meus pais, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e por valorizarem os estudos. Minha irmã, cunhado e sobrinho, tios e primos, por estarem sempre presentes mesmo eu estando distante para realizar este trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE TABELAS.....	xvii
RESUMO.....	xix
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO 1. ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE <i>HYPERICUM CARINATUM</i> (GUTTIFERAE).....	7
1.1. INTRODUÇÃO.....	9
1.2. OBJETIVOS.....	10
1.3. REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.3.1. DADOS TAXONÔMICOS.....	11
1.3.2. DADOS QUÍMICOS.....	11
1.3.2.1. BENZOFENONAS.....	13
1.3.2.1.1. BIOSÍNTESE.....	13
1.3.2.1.2. OCORRÊNCIA.....	14
1.3.2.1.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	16
1.3.2.2. DERIVADOS DE FLOROGLUCINOL.....	17
1.3.2.2.1. BIOSÍNTESE.....	17
1.3.2.2.2. OCORRÊNCIA.....	17
1.3.2.2.3. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	18
1.3.2.3. FLAVONÓIDES.....	20
1.3.2.3.1. PROPRIEDADES BIOLÓGICAS.....	21
1.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
1.4.1. PROCEDIMENTOS GERAIS.....	23
1.4.2. MATERIAL VEGETAL.....	24
1.4.3. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	25
1.4.4. ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES.....	25
1.4.5. IDENTIFICAÇÃO DOS PRODUTOS.....	25
1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27

1.5.1. ANÁLISE DO EXTRATO HEXANO DE <i>HYPERICUM CARINATUM</i>	27
1.5.1.1. SUBSTÂNCIA HCARI1.....	27
1.5.1.2. SUBSTÂNCIA HCARI2.....	32
1.5.1.3. SUBSTÂNCIA HCARI3.....	34
1.5.2. ANÁLISE DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DE <i>HYPERICUM CARINATUM</i>	39
1.5.2.1. SUBSTÂNCIA HCARI4.....	39
CAPÍTULO 2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE <i>HYPERICUM POLYANTHEMUM</i>.....	41
2.1. INTRODUÇÃO.....	43
2.2. OBJETIVOS.....	46
2.3. REVISÃO DA LITERATURA.....	46
2.4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.4.1. MODELO DE INSETO UTILIZADO: <i>DYSDERCUS PERUVIANUS</i>	51
2.4.2. SUBSTÂNCIAS A TESTAR.....	52
2.4.3. SEMENTES DE ALGODÃO.....	52
2.4.4. SEMENTE ARTIFICIAL.....	52
2.4.5. BIOENSAIOS.....	53
2.4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
2.5.1. AVALIAÇÃO DO EXTRATO HEXANO DE <i>H. POLYANTHEMUM</i> A 0,5 E 1%.....	56
2.5.2. AVALIAÇÃO DO EXTRATO HEXANO DE <i>H. POLYANTHEMUM</i> A 1 E 2%.....	57
2.5.3. AVALIAÇÃO DOS PRODUTOS ISOLADOS: HP1, HP2 E HP3.....	58
2.5.4. AVALIAÇÃO DO PRODUTO HP2.....	61
DISCUSSÃO GERAL.....	65
CONCLUSÕES.....	73
REFERÊNCIAS.....	77
ANEXOS.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ^{13}C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
δH	Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de RMN- ^1H
δC	Valor de deslocamento químico em ppm no espectro de RMN- ^{13}C
ppm	Partes por milhão
J	Constante de acoplamento
Hz	Hertz
s	Singleto
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
t	Tripleto
m	Multipleto
br	Broad
$\delta\text{H}-\delta\text{H}$	Correlação de hidrogênio-hidrogênio no espectro de RMN- ^1H
$\delta\text{H}-\delta\text{C}$	Correlação de hidrogênio-carbono nos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
DEPT	Realce não distorcido por transferência de polarização
COSY	Espectroscopia de correlação homonuclear $^1\text{H}-^1\text{H}$
HMBC	Correlação heteronuclear a longa distância $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
HMQC	Correlação heteronuclear $^1\text{H}-^{13}\text{C}$
MS	Espectrometria de massa
$[\text{M}]^+$	Íon do pico molecular
CCD	Cromatografia em camada delgada

LISTA DE FIGURAS

Figura	Legenda	
Figura 1	Substâncias isoladas de espécies nativas de <i>Hypericum</i> , apresentando núcleo benzopirano.....	45
Figura 2	Ninfas de <i>Dysdercus peruvianus</i> Guérin-Menéville.....	51
Figura 3	<i>Dysdercus peruvianus</i> Guérin-Menéville e semente artificial....	53
Figura 4	Relação do aumento de peso dos insetos no teste com os extratos <i>H. polyanthemum</i> a 1% e a 0,5% após 12 dias.....	56
Figura 5	Mortalidade dos grupos no teste com os extratos <i>H. polyanthemum</i> a 1% e a 0,5% após 12 dias.....	57
Figura 6	Relação do aumento de peso dos insetos no teste com os extratos <i>H. polyanthemum</i> a 1% e a 2% após 11 dias.....	58
Figura 7	Mortalidade dos grupos no teste com os extratos <i>H. polyanthemum</i> a 1% e a 2% após 15 dias.....	59
Figura 8	Relação do aumento de peso dos insetos no teste com os produtos HP1, 2 e 3 a 0,1% (peso após 17 dias).....	60
Figura 9	Mortalidade dos grupos no teste com os produtos HP1, 2 e 3 a 0,1% (após 17 dias).....	61
Figura 10	Relação do aumento de peso dos insetos no teste com produto HP2 a 0,2% (peso após 17 dias).....	62
Figura 11	Mortalidade dos grupos no teste com produto HP2 a 0,2%, após 17 dias.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	
Tabela 1	Divisões e subdivisões da família Guttiferae.....	12
Tabela 2	Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ¹ H de Hcari1 , isouliginosina B, drumondina C e hiperbrasilol B (<i>J</i> em Hz).....	30
Tabela 3	Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ¹³ C de Hcari1 , isouliginosina B, drumondina C e hiperbrasilol B.....	31
Tabela 4	Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ¹ H de Hcari2 , vismiafenona B, Hcari3 e isovismiafenona B (<i>J</i> em Hz).....	36
Tabela 5	Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ¹³ C de Hcari2 , vismiafenona B, Hcari3 e isovismiafenona B.....	37

RESUMO

O gênero *Hypericum*, família Guttiferae, engloba uma grande variedade de espécies, tendo para várias delas relatos de uso popular na terapêutica. Na região sul do Brasil ocorrem cerca de 20 espécies. Algumas delas vêm sendo estudadas e compostos de interesse farmacológico vêm sendo obtidos. Desta forma, para aprofundar estudos pré-existentes, deu-se continuidade à análise química de *Hypericum carinatum* e a investigação do potencial inseticida de *Hypericum polyanthemum*, ambas espécies nativas do RS. A partir do extrato hexânico de *Hypericum carinatum*, foram isolados e identificados, por métodos espectroscópicos, o derivado de floroglucinol uliginosina B e as benzofenonas carifenona A e carifenona B, as duas últimas de ocorrência restrita a esta espécie até o momento. Os demais compostos, isolados em menor quantidade, foram insuficientes para identificação espectroscópica. Da fração acetato de etila desta mesma espécie, dois flavonóides foram identificados, um deles o hiperosídeo, confirmado por CCD comparativa com padrão, e quercitrina, identificada por RMN ^1H . Nos experimentos para avaliação da atividade inseticida foi utilizado o inseto *Dysdercus peruvianus*, uma praga do algodoeiro. Testes realizados com o extrato hexano de *Hypericum polyanthemum* demonstraram uma potencial atividade inseticida, visto que existe uma tendência a fagoinibição a partir da concentração de 1%. O fato de haver na literatura relatos de atividade inseticida para compostos derivados de benzopiranos, como o precoceno I e II, encecalina e desmetilencecalina, impulsionou a realização de ensaios com os benzopiranos isolados do extrato acima. Foram então analisados os produtos HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano), HP2 (7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano) e HP3 (5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano), sendo que apenas HP2 apresentou perfil inseticida, na concentração de 0,2%.

Palavras-chave: Fitoquímica, *Hypericum carinatum*, Guttiferae, *Hypericum polyanthemum*, Atividade inseticida

ABSTRACT

Study of chemical constituents from *Hypericum carinatum* (Guttiferae) and insecticidal activity value from *Hypericum polyanthemum*

The genus *Hypericum*, family Guttiferae encompasses a great number of species many of them used in the popular medicine. In the southern Brazil there are approximately 20 species. Some of these species have been studied and interesting compounds in the pharmacological point of view have been isolated. In this way, aiming to continue the studies with the *Hypericum* species, in this work we investigated the chemical composition of *H. carinatum* and evaluated the potencial insecticide of *H. polyanthemum*, both species native to south Brazil. From the hexane extract of *Hypericum carinatum* we isolated and identified by spectroscopic methods the phloroglucinol derivative uliginosin B and the benzophenones carifenone A e carifenone B, both restrict to this species until now. The other compounds, isolated in very small amount were not sufficient for the spectroscopic analysis. From the ethyl acetate fraction of this species there were obtained two flavonoids, one of them identified as hyperoside by chromatographic comparison with authentic sample and the other, quercitrin, identified by NMR spectroscopy. In the insecticidal experiments it was used the cotton stainer, *Dysdercus peruvianus*. Tests performed with the hexane extract demonstrated a potential insecticidal activity since it was observed a tendency of phago-inhibition in concentrations up to 1%. The well established insecticidal activity of benzopyran derivatives as precocene I, precocene II, enecalinal and demethylenecalinal led us to investigate the activity of the benzopyrans isolated from the above extract. There were analysed the compounds HP1 (6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran), HP2 (7-hydroxi-6-isobutyryl-5-methoxi-2,2-dimethyl-benzopyran) and HP3 (5-hydroxi-6-isobutyryl-7-methoxi-2,2-dimethyl-benzopyran). Only HP2 presented insecticidal activity at the concentration of 0,2%.

Keywords: Phytochemical, *Hypericum carinatum*, Guttiferae, *Hypericum polyanthemum*, Antiinsect.

Desde tempos remotos plantas do gênero *Hypericum*, família Guttiferae, especialmente *Hypericum perforatum* L., vêm sendo utilizadas popularmente no tratamento de ansiedade, neuroses e depressão (BILIA *et al.*, 2000). Durante os séculos XVIII e XIX, *Hypericum perforatum* L. foi abandonado como remédio, retornando o seu uso medicinal no início do século XX (VEROTTA, 2003) sendo sua ação antidepressiva comprovada no final do século (SOMMER & HARRER, 1994; VORBACH *et al.*, 1994; CHATTERJEE *et al.*, 1998; LAAKMANN *et al.*, 1998; JENSEN *et al.*, 2001).

Várias outras espécies do gênero *Hypericum* são empregadas tradicionalmente como recurso terapêutico, destacando-se *H. patulum*, utilizada na medicina popular chinesa para o tratamento de doenças bacterianas, hepatite infecciosa, tumores e hemorragias nasais (ISHIGURO *et al.*, 1987; ISHIGURO *et al.*, 1998). O mesmo ocorre na medicina popular da Nova Guiné, onde *H. papuanum* Riedley é usado no tratamento de feridas (WINKELMANN *et al.*, 2000) e em Zagori, uma região da Grécia, onde uma solução extraída com óleo de oliva das flores de *H. perforatum* é popularmente indicada em casos de *Herpes zoster* e para ferimentos de pele (MALAMAS & MARSELOS, 1992). No Nepal, as raízes de *H. elaeoides* Choisy, *H. uralum* Buch.-Ham. e *H. cordifolium* Choisy são indicadas como antipirético. Esta última também é conhecida por ser tóxica para animais (TAYLOR *et al.*, 1996). *H. brasiliense*, *H. connatum* e *H. caprifoliatum* são algumas das espécies nativas da região sul do Brasil cujos usos populares são como adstringentes e no tratamento de problemas dermatológicos (JIMÉNEZ, 1980; MENTZ *et al.*, 1997).

O estudo químico de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul tem demonstrado a ocorrência de compostos fenólicos. São eles: xantonas em *Hypericum brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1994), benzofenonas em *Hypericum*

carinatum Griseb (BERNARDI *et al.*, 2005) e benzopiranos em *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (FERRAZ *et al.*, 2001), para os quais foi demonstrada ação antiproliferativa (FERRAZ *et al.*, 2005b) e antimicrobiana (DALL'AGNOL *et al.*, 2005), além de atividade IMAO (GNERRE *et al.*, 2001). Derivados de floroglucínóis, como uliginosina B e japonicina A (FERRAZ *et al.*, 2002b) foram isolados de *Hypericum myrianthum* Cham & Schlecht, e também apresentaram atividade antimicrobiana (DALL'AGNOL *et al.*, 2005). Os teores de flavonóides e taninos nas espécies nativas (DALL'AGNOL *et al.*, 2003), bem como a ausência de hipericina e derivados (FERRAZ *et al.*, 2002a) também foram determinados. Além dos produtos acima citados, muitos extratos e frações vêm apresentando atividades interessantes, como antiviral (SCHMITT *et al.*, 2001), analgésica (VIANA *et al.*, 2003), antifúngica (FENNER *et al.*, 2005) e antiproliferativa (FERRAZ *et al.*, 2005c).

Levando em consideração as atividades acima citadas, bem como outras relatadas para substâncias isoladas de diferentes gêneros da família *Guttiferae*, tais como, antioxidante (SANG *et al.*, 2002; SELVI *et al.*, 2003), antimicrobiana (RUBIO *et al.*, 1999; LOKVAM, *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2002), anti-HIV (GUSTAFSON *et al.*, 1992; FULLER *et al.*, 1999a; FULLER *et al.*, 1999b) e antiproliferativa (SEO *et al.*, 1999; SEO *et al.*, 2000; CHATURVEDULA *et al.*, 2002; SANG *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2003), percebe-se a relevância em dar seguimento aos estudos químico e biológico das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.

Deste modo, nesse trabalho, é dada continuidade ao estudo acerca da constituição química de *Hypericum carinatum*. Além disso, considerando a ampla ocorrência de grupamento benzopirânico nas substâncias isoladas das espécies de *Hypericum* e a sua analogia estrutural com produtos reconhecidamente inseticidas, como precoceno I e II (PROKSCH *et al.*, 1987) e enecalina (ISMAN & PROKSCH, 1985), torna-se interessante avaliar o potencial inseticida de extratos e compostos isolados das espécies nativas.

A fim de ordenar os assuntos abordados, este trabalho apresenta-se dividido em dois capítulos. O primeiro refere-se ao estudo da constituição química de *Hypericum carinatum*. No segundo capítulo, é apresentada a avaliação da atividade inseticida do extrato hexano e de substâncias isoladas de *Hypericum polyanthemum*.

CAPÍTULO 1

ESTUDO DA CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DE *HYPERICUM* *CARINATUM* (*GUTTIFERAE*)

1.1. INTRODUÇÃO

Plantas da família Guttiferae contêm muitos constituintes com diversas atividades biológicas (MCKEE *et al.*, 1998; FULLER *et al.*, 1999a, 199b; VEROTTA *et al.*, 1999). O gênero *Hypericum* tem recebido atenção especial devido à comprovada atividade antidepressiva de *H. perforatum* L. Muitas espécies deste gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional como antiséptico, diurético, digestivo, cicatrizante e no tratamento de algumas desordens microbiológicas (ISHIGURO *et al.*, 1986; JAYASURIYA *et al.*, 1991).

Espécies de *Hypericum* têm uma forte tendência em acumular compostos fenólicos com o padrão de substituição de floroglucinol. Os compostos mais comuns isolados de plantas deste gênero foram quinonas policíclicas (KARTNIG *et al.*, 1996), xantonas (BENNETT & LEE, 1989), flavonóides (ROCHA *et al.*, 1995), derivados de floroglucinóis (BHATTACHARYA *et al.*, 1998; VEROTTA *et al.*, 1999) e menos freqüentemente, benzopiranos (DECORTERD *et al.*, 1986; ISHIGURO *et al.*, 1990) e benzofenonas (KITANOV *et al.*, 2001b).

Em torno de 20 espécies de *Hypericum* são nativas do Brasil; destas, cerca da metade foi analisada recentemente. Das folhas e flores de *Hypericum brasiliense* Choisy foram isolados xantonas e derivados de floroglucinol, sendo os extratos constituídos por estas substâncias possuidoras de atividade IMAO (ROCHA *et al.*, 1994, 1995, 1996). Das partes aéreas de *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt (FERRAZ *et al.*, 2001), foram obtidos benzopiranos. Derivados de floroglucinol foram isolados de *H. myrianthum* Cham & Schlecht (FERRAZ *et al.*, 2002b), *H. carinatum* Griseb, *H. polyanthemum*, *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht e *H. connatum* Lam. (NOR *et al.*, 2004) e benzofenonas de *H. carinatum* (BERNARDI *et al.*, 2005). Todas estas espécies apresentam flavonóides e taninos (DALL'AGNOL *et al.*, 2003), e óleos essenciais em pequenas quantidades (FERRAZ *et al.*, 2005a).

Em outro estudo, realizou-se um *screening* para verificar a presença de hipericina em oito espécies nativas, o qual demonstrou que estes compostos não ocorrem em tais plantas (FERRAZ *et al.*, 2002b).

Estudos farmacológicos demonstraram, para *H. caprifoliatum*, atividade antidepressiva e antinociceptiva em roedores (DAUDT *et al.*, 2000; VIANA *et al.*, 2003, 2005). *H. polyanthemum* também apresentou efeito antinociceptivo em camundongos e ratos (VIANA *et al.*, 2003). Extratos, frações e compostos isolados destas e outras espécies foram analisados também para atividade IMAO (GNERRE *et al.*, 2001), antiviral (SCHMITT *et al.*, 2001), antibacteriana (DALL'AGNOL *et al.*, 2003, 2005), antifúngico (FENNER *et al.*, 2005) e antiproliferativo (FERRAZ *et al.*, 2005b e 2005c).

1.2. OBJETIVOS

Considerando as importantes atividades farmacológicas citadas para constituintes isolados de espécies do gênero *Hypericum* e os promissores resultados que vem sendo obtidos com as espécies nativas, objetivou-se dar continuidade ao isolamento e identificação dos constituintes químicos de *Hypericum carinatum* Griseb.

1.3. REVISÃO DA LITERATURA

O levantamento bibliográfico para a elaboração desse trabalho foi efetuado nas seguintes bases de dados: SCIENCE DIRECT (<http://www.sciencedirect.com/science>), WEB OF SCIENCES (<http://isi3.isiknowledge.com/portal>), THIEME-CONNECT (<http://www.thieme-connect.com>), SCIRUS (<http://www.scirus.com/srsapp>) e PUBMED.

1.3.1. Dados taxonômicos

A família *Guttiferae* é composta por 25 gêneros e cerca de 1200 espécies distribuídas em seis subfamílias (Tabela 1). O gênero *Hypericum* está incluído na tribo *Hypericeae*, subfamília *Hypericoideae* (CRONQUIST, 1981; BENNETT & LEE, 1989) e apresenta em torno de 400 espécies, acomodadas em 30 seções (ROBSON, 1977; ROBSON, 1981). ROBSON (1981; 1990) descreveu a ocorrência de aproximadamente 20 espécies de *Hypericum* nativas da Região Sul do Brasil, sendo muitas destas ainda pouco exploradas. Todas estas espécies pertencem a apenas duas seções, *Brathys* e *Trigynobrathys*.

1.3.2. Dados químicos

Diversos são os constituintes químicos relatados para espécies de *Hypericum*, verificando-se ampla ocorrência de compostos fenólicos. De fato, espécies da família *Guttiferae* apresentam forte tendência em acumular compostos fenólicos com o padrão de substituição de floroglucinol, como os derivados 2,4,6-tri-hidroxilados, como benzofenonas e xantonas correspondentes, derivados de floroglucinol e flavonóides, entre outros (HENRY *et al.*, 1996; RUBIO *et al.*, 2001). Esses compostos são freqüentemente substituídos por grupamentos

prenila que podem ocorrer na forma livre ou então ciclizar com uma hidroxila adjacente formando os derivados benzopirânicos correspondentes.

Tabela 1: Divisões e subdivisões da família *Guttiferae* (Fonte: BENNETT & LEE, 1989)

Sub-família	Tribo	Gênero	Número de espécies
<i>Kielmeyeroideae</i>	<i>Kielmeyereae</i>	<i>Kielmeyera</i>	20
		<i>Mahuera</i>	8
	<i>Caraipeae</i>	<i>Caraipa</i>	20
		<i>Haploclathra</i>	4
	<i>Bonnetiaceae</i>	<i>Bonnetia</i>	18
		<i>Archytaea</i>	2
<i>Calophylloideae</i>	<i>Calophylleae</i>	<i>Calophyllum</i>	110
		<i>Mesua</i>	40
		<i>Manea</i>	50
<i>Clusioideae</i>	<i>Clusieae</i>	<i>Clusia</i>	145
		<i>Tovomita</i>	60
	<i>Garcinieae</i>	<i>Allanblackia</i>	8
		<i>Garcinia</i>	200
		<i>Pentaphalangium</i>	7
		<i>Rheedia</i>	45
<i>Moronoboideae</i>		<i>Moronobea</i>	7
		<i>Pentadesma</i>	4
		<i>Platonia</i>	1-2
		<i>Symphonia</i>	20
<i>Lorostemmonoideae</i>		<i>Lorostemon</i>	3
<i>Hypericoideae</i>	<i>Cratoxyleae</i>	<i>Cratoxylum</i>	6
	<i>Hypericeae</i>	<i>Hypericum</i>	400
	<i>Vismieae</i>	<i>Harungana</i>	1
		<i>Psorospermum</i>	40

1.3.2.1. Benzofenonas

Como produtos naturais de plantas, as benzofenonas são importantes tanto do ponto de vista biossintético, pois estão envolvidas na biossíntese de xantonas, quanto do ponto de vista farmacológico, uma vez que muitas ações têm sido descritas para essa classe de substâncias. Em função da ampla ocorrência de xantonas em espécies das famílias Guttiferae e Gentianaceae, e o fato de que as benzofenonas são precursores biossintéticos de xantonas, a grande maioria de trabalhos envolvendo o isolamento ou avaliação farmacológica de benzofenonas se dá com espécies de plantas dessas duas famílias (BENNET & LEE, 1989).

Benzofenonas simples são raras na família Guttiferae e caracterizam-se por um padrão de substituição com -OH ou -OMe, sendo usualmente encontradas no vegetal juntamente com a xantona análoga. Por exemplo, MACLURINA (2,3',4,4',6 penta-hidroxibenzofenona) ocorre com 1,3,6,7 tetra-hidroxixantona em *Garcinia mangostana*). As benzofenonas encontradas em espécies da família Guttiferae são mais complexas, usualmente substituídas por prenilas (DELLE MONACHE *et al.*, 1991; DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; FULLER *et al.*, 1999b).

1.3.2.1.1. Biossíntese

O característico padrão de oxigenação de benzofenonas de plantas superiores é proveniente biossinteticamente a partir da via mista chiquimato-acetato. Os estudos de biossíntese demonstram que o núcleo benzofenona é formado a partir do acetato (anel A) e uma unidade C6-C1 derivada da fenilalanina (chiquimato).

Estudos com espécies de *Garcinia* e *Hypericum*, da família Guttiferae, e *Gentiana*, da família Gentianaceae, demonstraram que os ácidos cinâmico, benzóico e 3-hidroxibenzóico são eficientes precursores da benzofenona 2,3',4, 6-

tetra-hidroxibenzofenona, que está envolvida na biossíntese de xantonas com 4 padrões de oxidação diferentes (1,3,5-, 1,3,7-, 1,3,6,7- e 1,3,5,8-) sugerindo que esta benzofenona pode ser um intermediário na biossíntese da maioria das xantonas de plantas superiores (KUSTER & ROCHA, 2000).

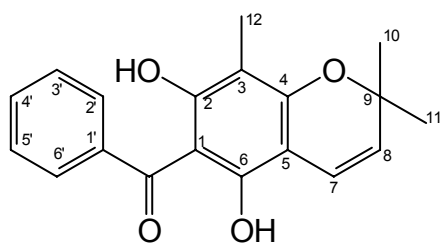
1.3.2.1.2. Ocorrência

A ocorrência de benzofenonas em espécies de *Hypericum* é mais restrita em relação a outros gêneros da família Guttiferae: apenas quatro espécies do gênero mostraram, até o momento, a presença destas substâncias.

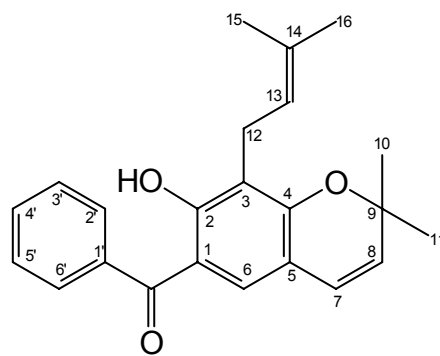
A partir de *H. annulatum* Moris foram obtidos anulatofenosídeo, acetil anulatofenosídeo, anulatofenona e hiperfenosídeo (KITANOV *et al.*, 2001; NEDIALKOV *et al.*, 2002). Outros trabalhos relatam o isolamento de 13 benzofenonas de *H. sampsonii* Hance (HU & SIM, 1998; HU & SIM, 1999; HU & SIM, 2000).

Do extrato metanólico das folhas de *Hypericum styphelioides*, planta de ocorrência em Cuba, foi isolada a benzofenona de estrutura inédita hiperinona (3,5-diidróxibenzofenona-4- β -D-glucosídeo (GAMIOTEA-TURRO *et al.*, 2004).

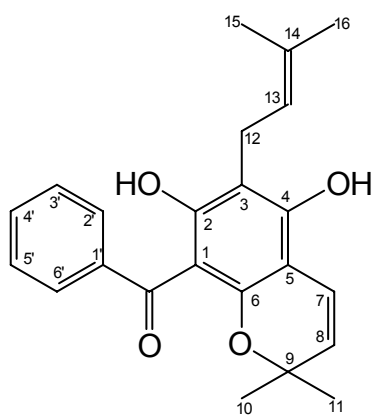
A partir do extrato hexânico de *H. carinatum*, planta nativa do Brasil, foram isolados dois isômeros, de estrutura química inédita, denominados carifenona A e carifenona B, pertencentes à classe química das benzofenonas. Exceto pela ausência dos sinais característicos de uma prenila ligada a C3, os deslocamentos químicos de ambas moléculas são muito semelhantes aos descritos na literatura para vismiafenona B, comparada a carifenona A, e isovismiafenona, comparada a carifenona B (DELLE MONACHE *et al.*, 1980; OLIVARES *et al.*, 1994; BERNARDI *et al.*, 2005).



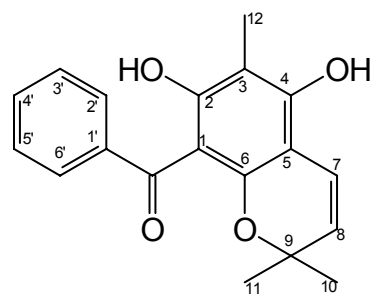
carifenona A



vismiafenona B



isovismiafenona



carifenona B

1.3.2.1.3. Propriedades biológicas

Benzofenonas constituem uma promissora classe de produtos naturais por apresentar importantes atividades biológicas. Destacam-se, nos produtos isolados de *Guttiferae*, os efeitos antioxidante (SANG *et al.*, 2002; CHIANG *et al.*, 2003; SELVI *et al.*, 2003), antimicrobiano (Bakana *et al.*, 1987; RUBIO *et al.*, 1999; LOKVAN, *et al.*, 2000; ZANG *et al.*, 2002), anti-HIV (GUSTAFSON *et al.*, 1992; FULLER *et al.*, 1999a; FULLER *et al.*, 1999b) e antiproliferativo (SEO *et al.*, 1999; SEO *et al.*, 2000; CHATURVEDULA *et al.*, 2002; SANG *et al.*, 2002; ITO *et al.*, 2003).

O estudo de espécies da família *Guttiferae* tem revelado importantes fontes de compostos naturais inibidores do HIV como gutiferonas, benzofenonas preniladas, que foram encontradas em espécies dos gêneros *Garcinia*, *Clusia* e *Symphonia*. Em um *screening* quimiotaxonômico do gênero *Vismia*, o extrato orgânico de *Vismia cayennensis* apresentou um perfil cromatográfico sugestivo de gutiferona, sendo identificadas quatro novas benzofenonas preniladas, vismiafenonas D a G (FULLER *et al.*, 1999).

1.3.2.2. Derivados de floroglucinol

1.3.2.2.1. Biossíntese

Os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biogénicas: pela via do ácido chiquímico a partir de carboidratos, ou pela via do acetato-polimalato que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A (CARVALHO *et al.*, 2003).

O principal elemento de construção do núcleo floroglucinol, na biossíntese policetídica, é o acetato na forma de acetil-ScoenzimaA, embora a maior parte é convertida primeiramente em malonil-ScoenzimaA por uma reação de carboxilação. A síntese policetídica acontece através de uma condensação de Claisen, na qual o carbono nucleofílico é formado a partir da descarboxilação do malonato. O processo de formação de metabólitos está sob o controle de enzimas conhecidas como policetídeo sintases (VEROTTA, 2003).

1.3.2.2.2. Ocorrência

Em *Hypericum*, muitos derivados de floroglucinol vêm sendo isolados. Alguns deles são compostos dímeros, outros poliisoprenilados, como a hiperforina e *ad*-hiperforina, isoladas de *H. perforatum* (MEDINA *et al.*, 2006; BOUBAKIR *et al.*, 2005).

Entre as espécies de *Hypericum* nativas do Sul do Brasil, pertencentes à seção *Trigynobrathys*, foram obtidos dois floroglucinóis diméricos, constituídos por uma unidade de ácido filicínico e uma unidade de floroglucinol. São eles: uligonosina B, de *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002b) e *H. polyanthemum* e hiperbrasilol B de *H. caprifoliatum* e *H. connatum* (NOR *et al.*, 2004).

Estes tipos de compostos já haviam sido encontrados anteriormente em outras espécies desta mesma seção do gênero, tais como, *H. brasiliensis* (ROCHA *et al.*, 1995, 1996), *H. uliginosum* HBK (TAYLOR e BROOKER, 1969), *H. japonicum* Thunb. (syn. *Sarothra japonica*) (ISHIGURO *et al.*, 1986), e da seção Brathys - *H. drummondii* (Grev. E Hook; T. e G.S.) (JAYASURIYA e MCCHESENEY 1989; JAYASURIYA *et al.*, 1991).

As seções Brathys e Trigynobrathys são fontes dos 25 derivados de floroglucinol com estrutura dimérica constituídos por ácido filicínico e padrão de floroglucinol já encontrados em *Hypericum*. Desta forma, estes compostos podem ser tomados como marcadores quimiotaxonômicos destas seções.

1.3.2.2.3. Propriedades biológicas

Em estudo realizado por DAUDT (2000) com as espécies *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum*, detectou-se atividade antidepressiva na fração lipofílica da última espécie. Nesta fração foi evidenciada a presença de uma substância majoritária, caracterizada através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono como um derivado de floroglucinol.

Aos floroglucinóis hiperforina e ad-hiperforina (CHATTERJEE *et al.*, 1998), de *H. perforatum*, é atribuída esta atividade, inicialmente relacionada à presença de hipericina (SUZUKI *et al.*, 1984; WAGNER & BLADT, 1994).

Os floroglucinóis freqüentemente encontrados na fração lipofílica de várias espécies do gênero têm demonstrado atividade cicatrizante, antifúngica e antibacteriana frente a vários microrganismos (ISHIGURO *et al.*, 1986; ARISAWA *et al.*, 1991; DÉCOSTERD *et al.*, 1991; JAYASURIYA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1995; TRIFUNOVIC *et al.*, 1998).

Substâncias isoladas de algumas espécies do gênero apresentam esta atividade, tais como os floroglucínóis de *H. brasiliense*, japonicina, uliginosina e hiperbrasílol, ativos contra *Bacillus subtilis* (ROCHA *et al.*, 1995).

Estudos com bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Nocardia gardenen* e *Micrococcus luteus*, e fungos *Mycobacterium smegmatis* têm levado ao isolamento de muitos floroglucínóis de estruturas inéditas com atividade antimicrobiana como as drumondinas e albaspindinas (JAYASURIYA *et al.*, 1989; JAYASURIYA *et al.*, 1991), otogirina e otogirona (TADA *et al.*, 1991), hiperbrasílol B, iso-hiperbrasílol B e hiperbrasílol C (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996), além das ialibionas (WINKELMANN *et al.*, 2000).

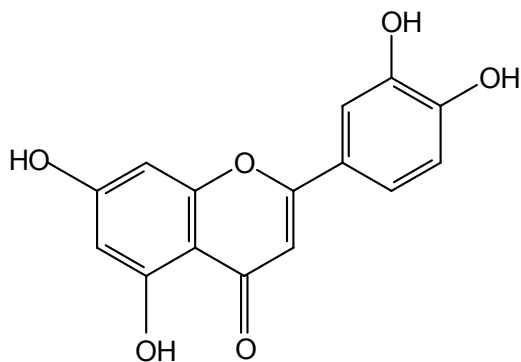
Assim, a presença de derivados de floroglucínol em espécies do gênero *Hypericum* poderia justificar o uso popular dessas espécies como cicatrizante e em doenças de origem microbiológica (ISHIGURO *et al.*, 1986; ISHIGURO *et al.*, 1987; JAYASURIYA *et al.*, 1989; YAMAKI *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995).

Atividade antiinflamatória também foi relatada para derivados de floroglucínol. Hiperforina, por exemplo, demonstrou ser capaz de inibir tanto a 5-lipoxigenase (5-LO) como a ciclooxigenase 1 (cox-1), enzimas chave na formação de eicosanóides pró-inflamatórios a partir do ácido araquidônico. A comparação com substâncias de referência mostrou que a inibição produzida pela hiperforina é semelhante à relatada para zileuton (inibidor da 5-LO) e superior àquela da aspirina (inibidor da cox-1). Os autores sugerem o uso de hiperforina como potencial agente terapêutico em doenças inflamatórias e alérgicas relacionadas aos eicosanóides (ALBERT *et al.*, 2002).

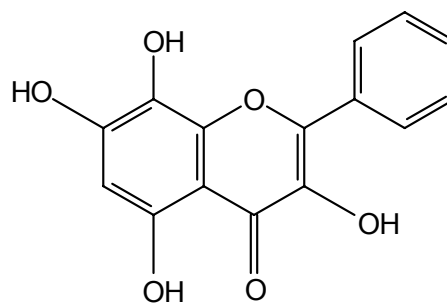
1.3.2.3. Flavonóides

Flavonóides são um diversificado grupo de metabólitos secundários presentes em quase todos os vegetais superiores, geralmente ocorrendo em altas concentrações. Em espécies de *Hypericum* são abundantes, representando 11% nas flores e 7% nas folhas de *H. perforatum* (KARTNIG *et al.*, 1989).

O gênero *Hypericum* apresenta abundância nessa classe de substâncias, sendo os flavonóides de maior frequência as agliconas: luteolina, canferol e quercetina e os glicosídeos derivados da quercetina: quercitrina, isoquercitrina, hiperosídeo e rutina. Biflavonóides como amentoflavona e biapigenina também estão presentes em diversas espécies (KARTNIG *et al.*, 1996; DIAS *et al.*, 1998; BILIA *et al.*, 2002; JÜRGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002).



luteolina



canferol

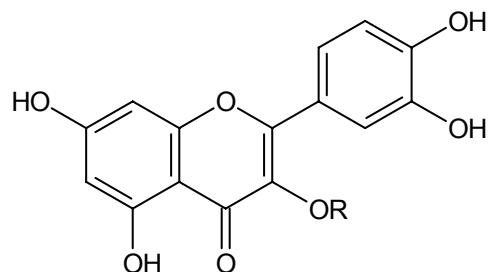
(quercetina) R= H

(quercitrina) R= α -L-ramnosil

(isoquercitrina) R= β -D-glicosil

(hiperosídeo) R= β -D-galactosil

(rutina) R= α -L-rutinosil



Em algumas espécies de *Hypericum* do Brasil, foi realizado um estudo para glicosídeos flavônicos, demonstrando a presença de compostos usualmente relatados, tais como: hiperosídeo, quercitrina, isoquercitrina, guaijaverina e traços de rutina. Entre estes, hiperosídeo possui sempre os maiores teores (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

1.3.2.3.1. Propriedades biológicas

Nos últimos anos, o interesse pelas propriedades farmacológicas e bioquímicas de flavonóides tem crescido bastante, principalmente no que se refere à atividade antioxidante (ZUANAZZI, 2005). O efeito dos flavonóides sobre enzimas, sua capacidade de quelar metais, como o ferro, e sua atuação como *scavenging* de radicais de oxigênio têm sido objeto de recentes investigações (PROESTOS *et al.*, 2006; KACHADOURIAN & DAY, 2006; KIM *et al.*, 2006).

A atividade antioxidante dos flavonóides tem sido considerada mais importante que a atividade antioxidante da vitamina C, α -tocoferol ou β -caroteno. Devido a esta propriedade, os flavonóides podem proteger as células das atividades dos compostos carcinogênicos por estimular a atividade das enzimas detoxificadoras. Estudos com animais demonstraram que os antioxidantes bloqueiam as fases de iniciação e desenvolvimento da carcinogênese. O

mecanismo, pelo qual os radicais livres interferem nas funções celulares, não está totalmente esclarecido, mas um dos eventos importantes parece ser a peroxidação lipídica, que pode provocar danos às membranas celulares (COOK & SAMMAN, 1996; NIJVELDT et al. 2001; YODIM et al., 2002).

Tem sido demonstrado que os radicais livres são capazes de iniciar reações de peroxidação nas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, inativar proteínas e enzimas por reações com os aminoácidos e, também, causar lesões no RNA e DNA pela interação com a guanina. Os flavonóides inibem a peroxidação lipídica *in vitro* por atuar na eliminação de ânions superóxidos e radicais hidroxilas. Em adição a sua propriedade antioxidante, alguns flavonóides têm a capacidade de quelar íons metálicos, reduzindo assim, a peroxidação induzida por metais. A atividade biológica dos flavonóides e seus metabólitos dependem de sua estrutura química e também dos grupos ligados na molécula (COOK & SAMMAN, 1996).

Pesquisas demonstraram que os flavonóides interagem com vários sistemas de enzimas. Nijveldt e colaboradores (2001) relataram que espécies reativas de oxigênio, na presença de ferro, resultam na peroxidação lipídica. Alguns flavonóides, como a quercetina, podem quelar o ferro e assim, contribuir para inibição da peroxidação lipídica.

1.4. MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1. Procedimentos gerais

Os equipamentos empregados rotineiramente no laboratório foram: conjunto para placas Desaga[®], cuba cromatográfica Desaga[®] e evaporador rotatório Fisatom[®].

Os solventes e reagentes empregados no desenvolvimento deste trabalho foram de procedência Nuclear[®], Quimex[®], Dinâmica[®], Synth[®] e Merck[®].

As cromatografias em coluna foram realizadas sob gel de sílica 60, procedência Merck[®], com tamanho de partícula entre 63-200 μm (70-230 mesh).

As cromatografias em camada delgada preparativas foram realizadas em placas de vidro 20 x 20 cm, preparadas em laboratório com auxílio do conjunto Desaga[®], tendo como adsorvente gel de sílica GF₂₅₄ (Merck[®]), em espessura de 0,50 mm.

Na realização de cromatografia em camada delgada (CCD) analítica foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄, de procedência Merck[®]. Os cromatogramas foram analisados sob luz UV_{254/365 nm} e revelados através de nebulização com agentes cromogênicos tais como anisaldeído sulfúrico e reagente natural com posterior aquecimento a 100°C, até o desenvolvimento máximo de coloração.

A eliminação do solvente extrator foi realizada sob pressão reduzida, em aparelho de evaporação rotatório, em temperatura não superior a 55°C. Os extratos secos foram então particionados com acetona, em pêra de decantação, para retirada de compostos cerosos, a fim de facilitar o isolamento de compostos.

Na identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizados métodos físico-químicos e espectroscópicos (espectroscopia na região do ultravioleta e infravermelho, ressonância magnética nuclear de hidrogênio - RMN¹H- e de carbono -RMN¹³C-, e espectrometria de massas). Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro de ultravioleta Hewlett Packard® UV-VIS, modelo HP 8452-A, com varredura de diodos em série entre 200 e 400 nm. Os espectros de RMN¹H (200, 400 ou 500 MHz) e de RMN¹³C (100 ou 125 MHz) foram obtidos em espectrômetro Jeol® Eclipse 400 e Bruker® Avance 500, respectivamente, através da colaboração com os professores Prof. Dr. Dominique Guillaume da Faculté de Pharmacie de Amiens (França), e Prof. Dr. Jan Schripsema da Universidade Estadual do Norte Fluminense (Rio de Janeiro) e no Instituto de Química da UFRGS. A análise de espectrometria de massas foi realizada na Universidade Estadual do Norte Fluminense, em aparelho GC-MS-QP 5050 Shimadzu® utilizando coluna DB-1 com temperatura programada de 100 a 280 °C sob aumento de 4°C/min e temperatura de 280 °C no injetor e na linha de transferência. HREIMS: 70 eV. A análise de espectrometria de massas de alta resolução foi realizada na Universidade de Campinas (UNICAMP).

1.4.2. Material vegetal

As partes aéreas de *Hypericum carinatum* Griseb utilizadas no desenvolvimento desse trabalho, foram coletadas no município de Glorinha, Rio Grande do Sul, durante o período de floração do vegetal. As amostras foram identificadas pelo botânico Sérgio Bordignon, do Departamento de Botânica da ULBRA, sendo depositada uma exsicata para registro do material vegetal no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Bordignon 1520). Após, o material foi selecionado, seco em ambiente arejado, ao abrigo da luz direta e triturado em moinho de facas.

1.4.3. Preparação dos extratos

Para extração dos constituintes químicos, o material vegetal foi submetido à extração com hexano, diclorometano e metanol, sucessivamente, por maceração estática, na proporção de 1:10 (m/v), por 36h (3 vezes).

Posteriormente à evaporação do solvente, o extrato hexânico foi particionado com acetona (ROCHA *et al.*, 1995) para remoção de compostos cerosos, a fim de facilitar o isolamento de compostos fenólicos.

1.4.4. Isolamento dos constituintes

Para o isolamento de compostos fenólicos lipofílicos os extratos obtidos foram submetidos primeiramente à cromatografia em coluna, utilizando como eluente misturas de hexano, diclorometano e metanol em polaridade crescente. As frações resultantes foram monitoradas por CCD analítica, sendo as com perfil semelhante reunidas e então purificadas por nova cromatografia em coluna ou CCD preparativa.

Para isolamento de flavonóides a fração metanólica de *H. carinatum* foi evaporada até *secura*, retomada em água e submetida à partição em pêra de separação com acetato de etila. A fração obtida foi submetida à cromatografia em coluna, eluída com diclorometano e metanol em polaridade crescente.

1.4.5. Identificação dos produtos

Os produtos isolados foram identificados através dos métodos habituais (espectroscopia no infravermelho e ultravioleta, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas).

1.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.5.1. Análise do extrato hexânico de *H. carinatum*

A partir da coluna cromatográfica do extrato hexano das partes aéreas de *H. carinatum*, foram obtidos quatro compostos de ocorrência majoritária, Hcari1, Hcari2, Hcari3 e Hcari4, além de outros em menores quantidades. A identificação destes compostos minoritários foi dificultada por problemas de instabilidade quando na tentativa de melhor purificação, bem como por não ter quantidade suficiente para uma análise estrutural. A instabilidade pode ser devida ao calor, à luz ou contato com solvente. Pode-se observar também um acúmulo de terpenóides, caracterizados pela reação de coloração (rósea) típica frente ao agente cromogênico anisaldeído sulfúrico.

1.5.1.1. Substância Hcari1

Através de cromatografia em coluna seguida de cromatografia em camada delgada preparativa foi isolada uma substância codificada como **Hcari1**.

A análise do espectro no ultravioleta (UV) de **Hcari1** revelou absorções máximas em 357, 287 e 226 nm. O espectro de infravermelho (IV) apresentou larga absorção na região de 3000 cm^{-1} , além de picos intensos em $1666\text{-}1650\text{ cm}^{-1}$, sugerindo a presença de um sistema 1,3-dicetoenólico ou 2-hidroxiarilcetona (ISHIGURO *et al.*, 1987; JAYASURIYA *et al.*, 1989; ISHIGURO *et al.*, 1994).

O espectro de massas de **Hcari1** foi obtido em CG-EM por impacto eletrônico sendo $[M]^+ = 498\text{ m/z}$ referente ao íon molecular. Os demais fragmentos principais são os de massas 219 m/z (53%), 229 (33), 247 (100), 262 (41), 275 (20), 484 (30) e 498 (55).

Através do espectro de RMN de ^1H (tabela 2), verificou-se a presença de 11 sinais divididos em quatro grupos. No primeiro, em campo alto, há dois sinais (δ_{H} 1,20 e 1,50 ppm) referentes a grupamentos metila. Após este grupo, encontram-se três sinais com deslocamento químico de δ_{H} 3,55; 3,90 e 4,25 ppm, referentes a um singlete (CH_2) e dois multipletos (CH), respectivamente. A presença de um grupo vinílico é suposta pela presença do par de dubletos em δ_{H} 5,50 e 6,75 ppm. No último grupo do espectro, em campo muito baixo, aparecem quatro sinais intensos (δ_{H} 10,00; 11,55; 16,30 e 18,80 ppm) sugestivos de presença de grupos hidroxilados.

No espectro de RMN de ^{13}C (tabela 3), foram identificados 22 sinais, seis destes referentes a dois átomos de carbono [δ_{C} 110,1 (C_2 e C_6), 103,59 (C_8 e C_{10}), 27,77 (2 Me- C_2), 24,29 e 25,37 (2 Me- C_4), 19,14 (2 Me- C_{12} ou 2 Me- C_9), 18,91 (2 Me- C_9 ou 2 Me- C_{12}) ppm]. Outra análise sugere a presença de dois núcleos com padrão de substituição de floroglucinol, em decorrência do valor dos deslocamentos característicos de carbonos aromáticos oxigenados (δ_{C} 155,43; 159,38 e 162,16 ppm) e (δ_{C} 171,68; 187,28 e 199,41 ppm).

O espectro de **DEPT** sugere que a molécula de **HCARI1** seja composta por 8 metilas, 1 (CH_2), 4 (CH) e 15 carbonos quaternários, três destes com deslocamentos químicos característicos de carbonilas.

Ainda no espectro de RMN ^1H , em campo muito baixo (δ_{H} 18,80 ppm) caracteriza-se o grupo de floroglucínóis conjugados com unidades de ácido acilfilicínico. Este sinal refere-se ao sistema enolizável formado pela hidroxila e carbonila nas posições C_5 e C_8 , respectivamente (JAYASURIYA *et al.*, 1989).

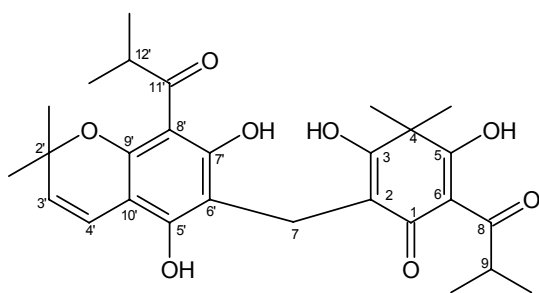
O par de dubletos, no espectro de RMN ^1H , em δ_{H} 5,50 e 6,75 ppm ($J=10$ Hz) e um singlete referente a seis hidrogênios (δ_{H} 1,50 ppm), indica a presença de um anel dimetilbenzopirano na molécula, o qual acopla com o próton de menor

deslocamento químico. Outro sinal característico de dimetilbenzopiranos é verificado em δ_C 78,16 ppm no espectro de RMN de ^{13}C e refere-se ao carbono quaternário do anel pirano ligado a um grupo dimetila (JAYASURIYA *et al.*, 1989; ROCHA *et al.*, 1996).

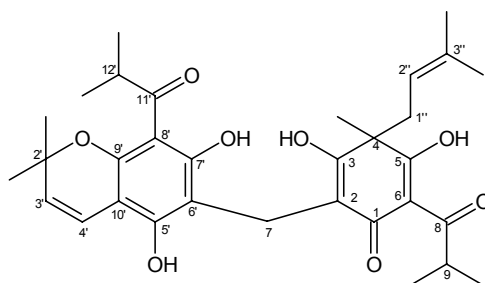
Através do espectro de RMN ^{13}C , nota-se um deslocamento químico em δ_C 44,31 ppm característico da posição de metilas geminais em C4 na porção ácido filicínico. Quando nesta posição encontram-se ligados grupamentos prenila, como nas substâncias drumondina D e hiperbrasílo B, esse valor desloca-se para δ_C 49 ppm (JAYASURIYA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1996).

A comparação do perfil de absorção de estruturas similares relatadas na literatura supõe que o sinal em δ_C 16,88 ppm, detectado no espectro de RMN de ^{13}C , seja referente à ponte metilênica ligando o ácido filicínico ao grupo benzopirano (Rocha *et al.*, 1995; Rocha *et al.*, 1996).

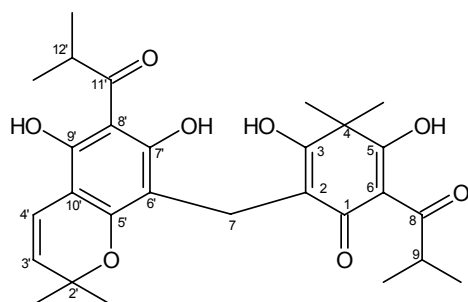
Os demais deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C para **HCARI1** foram comparados aos de substâncias estruturalmente semelhantes como drumondina C, isouliginosina B e hiperbrasílo B (Tabelas 2 e 3). Assim, o produto **HCARI1** foi identificado como **uliginosina B**, anteriormente isolada de *H. uliginosum* HBK (nome válido *H. thesiifolium* HBK) e *H. japonicum* (PARKER, 1968; TAYLOR & BROOKER, 1969; ISHIGURO *et al.*, 1986).



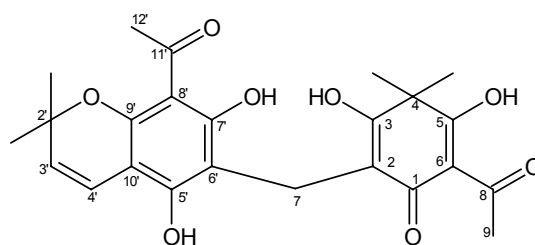
uliginosina B



hiperbrasílo B



isouliginosina B



drumondina C

Tabela 2: Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ^1H de **Hcari1**, isouliginosina B, drumondina C e hiperbrasilol B (J em Hz).

H	Hcari1 ¹	Isouliginosina B ²	Drumondina C ³	Hiperbrasilol B ⁴
4Me	1,50 (br s)*	1,50 (s)	1,49 (br s)	1,51 (s)
7	3,55 (br s)	3,52 (br m)	3,52 (br s)	3,55 (s)
9	4,25(m)	4,19 (m)	-	4,19 (m)
9Me	1,20 (d, $J=6,3$)*	1,17 (d, $J=7$)	2,74 (s)	1,17 (d, $J=7$)
2'Me	1,50 (s)*	1,55 (s)	1,49 (br s)	1,53 (s)
3'	5,50 (d, $J=10$)	5,46 (d, $J=10$)	5,44 (d, $J=9,9$)	5,59 (d, $J=10$)
4'	6,75 (d, $J=10$)	6,71 (d, $J=10$)	6,68 (d, $J=9,9$)	6,66 (d, $J=10$)
12'	3,90 (m)	4,05 (m)	-	4,00 (m)
12'Me	1,20 (d, $J=6,3$)*	1,17 (d, $J=7$)	2,69 (s)	1,20 (d, $J=7$)
3OH	10,00 (s)	9,05 (s)	9,94 (s)	9,90(s)
5OH	18,80 (s)	18,80 (s)	18,42 (s)	18,80 (s)
5'OH	11,55 (s)	-	11,47	11,40 (s)
7'OH	16,30 (s)	11,69 (s)	15,88 (s)	16,35 (s)
9'OH	-	14,14 (s)	-	-
1''	-	-	-	2,8-2,5 (m)
2''	-	-	-	4,60 (br t)
3''	-	-	-	1,31 (s)
3''Me	-	-	-	1,34 (s)

1-Dados experimentais de Hcari1 medidos a 300 MHz em CDCl_3

2-Dados medidos a 200 MHz em CDCl_3 ROCHA *et al.* (1995)

3-Dados medidos a 300 MHz em CDCl_3 JAYASURIYA *et al.* (1989)

4-Dados medidos a 200 MHz em acetona- d_6 ROCHA *et al.* (1996)

*Os valores dos sinais assinalados podem estar trocados entre si

Tabela 3: Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ^{13}C de **Hcari1**, isouliginosina B, drumondina C e hiperbrasilot B.

C	Hcari1 ¹	Isouliginosina B ²	Drumondina C ³	Hiperbrasilot B ⁴
1	199,41	199,1	198,7	199,2
2	110,10*	106,9	108,5	109,8
3	171,68	170,0	171,8	170,7
4	44,31	44,1	44,4	49,8
4-Me	24,29	24,5	24,8	22,8
	25,37	25,0	-	-
5	187,28	187,2	187,3	188,5
6	110,10*	111,3	111,2	114,2
7	16,88	17,0	16,8	17,9
8	210,80*	211,9	207,1	211,9
9	36,61	36,8	29,3	37,2
9-Me	19,14	18,9	-	19,4
	19,34	18,9	-	19,5
2'	78,16	80,5	78,2	79,2
2'- Me	27,77	27,7	28,2	27,8
	27,77	27,7		27,9
3'	124,56	124,1	124,7	124,1
4'	117,32	117,1	117,2	117,5
5'	159,38	154,6	159,4	160,0
6'	107,10	104,9	106,0	107,2
7'	162,16	160,1	161,2	162,7
8'	103,5	105,7	104,8	104,3
9'	155,43	160,4	155,9	156,1
10'	103,48	102,1	103,6	104,2
11'	210,80*	210,9	203,5	210,8
12'	39,03	39,5	32,2	39,7
12'-Me	19,14	19,2	-	18,9
	19,34	19,2	-	19,8
1''	-	-	-	39,3
2''	-	-	-	118,2
3''	-	-	-	136,5
3''Me	-	-	-	17,5

1-Dados experimentais de Hcari1 medidos a 75 MHz em CDCl_3

2-Dados medidos a 50 MHz em CDCl_3 ROCHA *et al.* (1995)

3-Dados medidos a 75 MHz em CDCl_3 JAYASURIYA *et al.* (1989)

4-Dados medidos a 50 MHz em acetona- d_6 ROCHA *et al.* (1996)

*Os valores dos sinais assinalados podem estar trocados entre si

1.5.1.2. Substância Hcari2

Na continuidade da cromatografia em coluna com o extrato hexano de *H. carinatum*, da qual obteve-se a carifenona A, foi isolada a substância codificada como **Hcari2**.

O espectro de massas deste produto, realizado em CG-EM por impacto eletrônico, determinou $[M]^+$ de 310 (23). Outros fragmentos obtidos foram 295 (100), 257 (19), 255 (10), 217 (49), 179 (12), 105 (7), 84 (25), 77 (11), 49 (9). O espectro de massas de alta resolução (HREIMS) de **Hcari2** apresentou $[M]^+$ no valor de 310,1207 m/z , compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_4$ sugerida para este produto.

No espectro de infravermelho (IV) de **Hcari2**, aparecem absorções características de hidroxila (3250 cm^{-1}), dimetila geminal (1340 e 1320 cm^{-1}), carbonila (1630 cm^{-1}) e grupo aromático (1470 cm^{-1}). Nota-se que o grupo carbonila apresentou baixa absorção no IV (1630 cm^{-1}), provavelmente por estar quelada ao hidrogênio de um grupo hidroxila (MEI *et al.*, 1997).

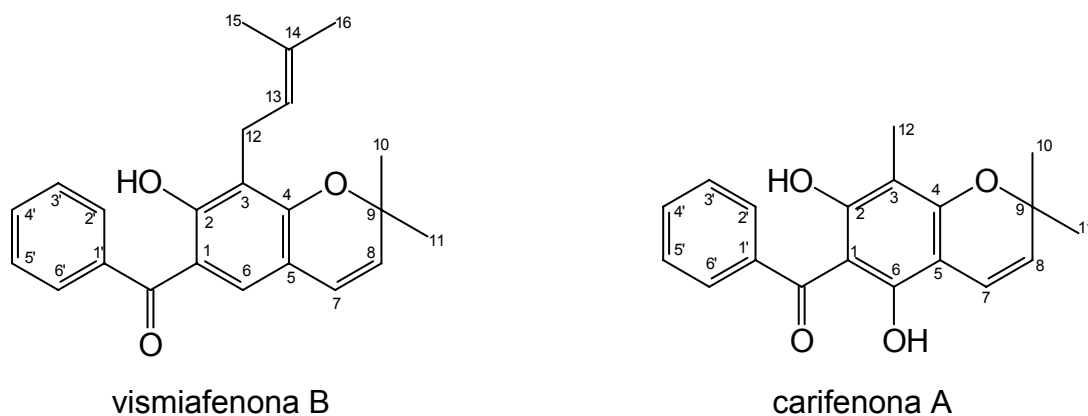
No espectro de RMN ^1H (tabela 4) de **Hcari2**, verifica-se a presença dos sinais δ_{H} 1,46 (s, 6H); 1,99 (s, 3H); 5,49 (d, $J=9,7$); 6,59 (d, $J=10,2$); 7,54 (s, 2H); 7,60 (s, 1H); 7,64 (s, 2H); 8,79 (s, 1H) e 9,09 (s, 1H) ppm. Os sinais na faixa de δ_{H} 7,54-7,64 ppm sugerem um anel benzênico monossustituído.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C (tabela 5) demonstrou a existência de 19 átomos de carbono na molécula, sendo eles diferenciados por DEPT. Foram identificados sete grupos CH [δ_{C} 116,09; 125,88; 127,77 (2); 129,49 (2) e 132,35 ppm], três metilas [δ_{C} 7,17 e 28,47(2) ppm], ausência de grupo CH_2 e a presença de nove carbonos quaternários [δ_{C} 77,87; 102,21; 103,95; 104,87; 139,76; 154,5 159,41, 159,64 e 197,24 ppm].

Os sinais de grupos CH com deslocamento químico em δ_C 127,77 (2); 129,49 (2) e 132,35 ppm corroboram a sugestão de anel aromático monossustituído, conforme o espectro de RMN- 1H . Um anel aromático com padrão de substituição de floroglucinol também é sugerido a partir dos deslocamentos químicos observados para os carbonos quaternários aromáticos oxigenados (δ_C 159,6, 159,4, e 154,5 ppm) e não-oxigenados (δ_C 102,2; 103,9 e 104,8 ppm).

Ainda no espectro de RMN de 1H , observa-se um duplo dubleto em δ_H 6,59 e 5,49 ppm (1H, $J=9,7$ e $10,2$ Hz, respectivamente) que, juntamente com um singlete de seis hidrogênios em δ_H 1,46 ppm, é indicativo da presença de um núcleo dimetilbenzopirano. Em campo mais baixo, dois singletos em δ_H 9,09 e 8,78 ppm sugerem a presença de duas hidroxilas na molécula. Estes perfis de deslocamentos químicos assemelham-se aos descritos na literatura para hidroxilas queladas em 2,6-diidróxibenzofenonas (DELLE MONACHE *et al.*, 1980; SEO *et al.*, 1999; SEO *et al.*, 2000).

Comparando as análises acima expostas, bem como CCD analítica com padrão, sugere-se que a molécula **Hcari2** trata-se da benzofenona carifenona A, previamente isolada desta planta (BERNARDI *et al.*, 2005). Comparando com a literatura, nota-se uma grande semelhança desta com o composto vismiafenona B, diferindo apenas no substituinte do C3 (DELLE MONACHE *et al.*, 1980; OLIVARES *et al.*, 1994).



1.5.1.3. Substância Hcari3

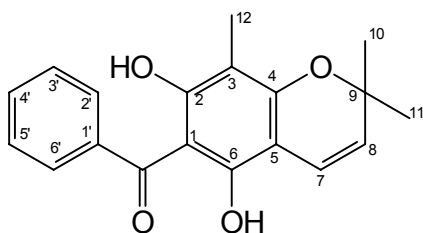
O produto **Hcari3** foi obtido na seqüência da coluna cromatográfica citada para Hcari 1, seguida de cromatografia em camada delgada para purificação.

O espectro de massas, realizado em CG-EM por impacto eletrônico, determinou $[M]^+$ de 310 para **Hcari3**. Apesar de possuir a mesma massa de **carifenona A**, nota-se diferenças nas fragmentações: M^+ 310 (20), 295 (100), 217 (58), 147 (14), 105 (23), 83 (10), 77 (48), 43 (23). O espectro de massas de alta resolução (HREIMS) de **Hcari3** apresentou $[M]^+$ no valor de 310, 1209 m/z , compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{18}O_4$ sugerida para estes produtos.

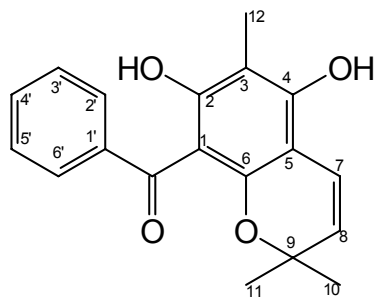
O espectro de RMN de 1H de **Hcari3** (Tabela 4) apresentou o mesmo número de hidrogênios e um perfil muito semelhante ao obtido para **Hcari2**, uma vez que os deslocamentos químicos de todos os sinais aparecem em campo mais baixo. Contudo, não se verifica diferença importante nos espectros de RMN de ^{13}C (Tabela 5), DEPT, massas e IV. Assim, pode-se inferir que **Hcari3** seja uma molécula isômera de carifenona A.

Da mesma forma que para carifenona A, a comparação com a literatura dos deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio obtidos para **Hcari3** demonstrou semelhança com isovismiafenona B, diferindo novamente no substituinte em C3 (DELLE MONACHE *et al.*, 1980, OLIVARES *et al.*, 1994). No espectro de RMN de 1H de **Hcari3**, os sinais em δ_H 12,7 e 5,38 ppm indicaram a presença de duas hidroxilas, estando apenas o hidrogênio desta última quelado ao grupo carbonila da benzofenona. Os valores dos deslocamentos químicos obtidos para 2OH (δ_H 9,09 ppm) em 2-6-hidroxibenzofenonas são visivelmente diferentes dos encontrados em 2-4-hidroxibenzofenonas, os quais apresentam sinais em campo mais baixo (δ_H 12,7 ppm) (DELLE MONACHE *et al.*, 1980, SEO *et al.*, 2000). Com a análise dos espectros, pode-se inferir que as duas hidroxilas estão nas posições C2 e C4, estando o anel pirano ciclizado no grupo hidroxila em C6. Considerando

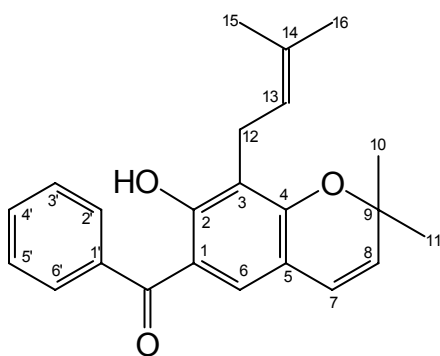
os dados expostos, sugere-se que a substância **Hcari3** trata-se da carifenona B, uma benzofenona isômera da carifenona A.



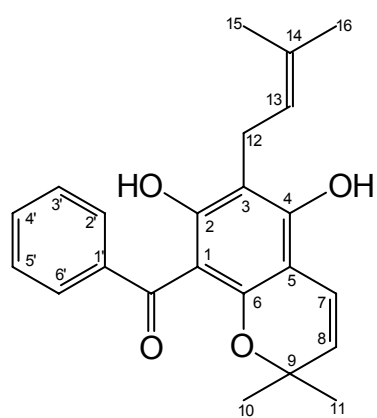
carifenona A



carifenona B



(vismiafenona B)



(Isovismiafenona B)

Tabela 4: Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ^1H de **Hcari2**, vismiafenona B, **Hcari3** e isovismiafenona B (J em Hz).

H	Hcari2 ¹	Vismiafenona B ²	Hcari3 ¹	Isovismiafenona B ²
H7	6,59(1H, <i>d</i> , $J=9,7$)	6,57(1H, <i>d</i> , $J=10$)	6,49(1H, <i>d</i> , $J=9,8$)	6,50 (1H, <i>d</i> , $J=10$)
H8	5,49(1H, <i>d</i> , $J=10,2$)	5,45(1H, <i>d</i> , $J=10$)	5,31(1H, <i>d</i> , $J=10,3$)	5,23 (1H, <i>d</i> , $J=10$)
9Me	1,46 (6H, <i>s</i>)	1,41(6H, <i>s</i>)	0,98 (6H, <i>s</i>)	0,97 (6H)
H12(Me)	1,99 (3H, <i>s</i>)	3,22 (2H, <i>d</i> , $J=7$)	2,10 (3H, <i>s</i>)	3,41(2H, <i>d</i> , $J=7$)
H13	-	5,15 (1H, <i>t</i> , $J=7$)	-	5,25 (1H, <i>t</i> , $J=7$)
H15/ H16	-	1,75(3H) /1,67(3H)		1,77(6H)
2OH	9,09 (1H, <i>s</i>)	9,20	12,70 (1H, <i>s</i>)	12,80
4OH	-	-	5,38 (1H, <i>s</i>)	6,30
6OH	8,79 (1H, <i>s</i>)	8,78	-	-
H2'	7,64 (1H, <i>s</i>)	7,70-7,30	7,47 (1H, <i>d</i>)	7,60-7,30
H3'	7,54 (1H, <i>s</i>)	7,70-7,30	7,37 (1H, <i>t</i>)	7,60-7,30
H4'	7,60 (1H, <i>s</i>)	7,70-7,30	7,44 (1H, <i>t</i>)	7,60-7,30
H5'	7,54 (1H, <i>s</i>)	7,70-7,30	7,37 (1H, <i>t</i>)	7,60-7,30
H6'	7,64 (1H, <i>s</i>)	7.70-7,30	7,47 (1H, <i>t</i>)	7.60-7,30

1 Dados experimentais de **Hcari2 e Hcari3** medidos a 400 MHz em CDCl_3

2 Dados medidos a 60 MHz em CDCl_3 (DELLE MONACHE *et al.*, 1980)

Tabela 5: Deslocamentos químicos (ppm) para os espectros de RMN ^{13}C de **Hcari2**, vismiafenona B, **Hcari3** e isovismiafenona B.

C	Hcari2 ¹	Vismiafenona B ²	Hcari3 ¹	Isovismiafenona B ²
C1	103,95	104,3	105,49	105,1
C2	159,64 [§]	158,9	162,49	154,5
C3	104,87	108,5	101,88	101,8
C4	159,41 [§]	155,1	156,09	162,0
C5	102,21	102,4	101,22	105,3
C6	154,50	159,4	154,13	157,9
C7	116,09	116,2	115,83	115,9
C8	125,88	121,8	125,50	125,2
C9	77,87	77,9	77,33	77,3
C10	28,47	28,3	27,19	27,3
C11	28,47	28,3	27,19	27,3
C12	7,17	21,4	7,03	21,7
C13	-	122,2	-	121,7
C14	-	132,4	-	136,6
C15	-	17,9	-	17,9
C16	-	25,8	-	25,8
CO	197,24	197,5	200,54	199,5
C1'	139,76	140,1	142,84	142,9
C2'	127,77	129,2	127,12	127,5
C3'	129,49	127,8	127,55	127,1
C4'	132,35	132,1	129,98	129,9
C5'	129,49	127,8	127,55	127,1
C6'	127,77	129,2	127,12	127,5

1 Dados experimentais de **Hcari2** e **Hcari3** medidos a 100 MHz em CDCl_3

2 Dados medidos a 100 MHz em CDCl_3 (OLIVARES *et al.*, 1994)

§ Os valores dos sinais assinalados podem estar trocados entre si

1.5.2. Análise do extrato acetato de etila de *H. carinatum*

A fração metanólica de *H. carinatum* foi evaporada até *secura*, retomada em água e submetida à partição em pêra de separação com acetato de etila, verificando-se na fração resultante a presença de diversos flavonóides. Este extrato submetido à cromatografia em coluna forneceu dois flavonóides principais. Um deles foi identificado como hiperosídeo por comparação cromatográfica com amostra autêntica. Esse flavonóide é bastante comum em espécies de *Hypericum*. Nas espécies nativas também esse produto já havia sido caracterizado por cromatografia em camada delgada (Dall'Agnol *et al.*, 2003). O outro produto obtido foi codificado como **Hcari4**.

1.5.2.1. Substância Hcari4

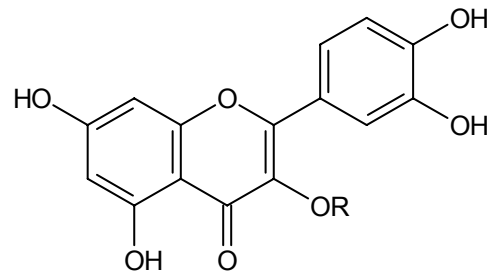
Através de dados espectroscópicos e espectrométricos, comparados com os disponíveis na literatura, foi possível a identificação da substância **Hcari4**.

A interpretação dos espectros no UV da substância **Hcari4** propõe a estrutura de um flavonol tri-hidroxilado nas posições C5, C3' e C4', apresentando também hidroxila ocupada na posições C3 e presença de uma hidroxila livre em C7 (MABRY *et al.*, 1970; WOLLENWEBER, 1982).

No espectro de RMN de ^1H da substância **Hcari4** (200 MHz, MeOD) os principais sinais observados são δ_{H} 0,97 nm (dubleto referente a C-CH₃ da ramnose), 5,46 nm (1H, *d*, $J=1,55$ Hz, Ra H-1), 6,20 nm (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-6) e 6,38 nm (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-8).

A partir dos resultados obtidos, sugere-se, então, que a substância **Hcari4** seja o flavonóide quercitrina, cujos dados espectroscópicos estão de acordo com os relatados na literatura (MABRY *et al.*, 1970; ISHIGURO *et al.*, 1991; JAY *et al.*, 1975; AGRAWAL *et al.*, 1989; BOUKTAIB *et al.*, 2002).

R= Ramnose



Quercitrina

Esse flavonóide, juntamente com diversos derivados da quercetina, tem sido freqüentemente obtidos de espécies de *Hypericum* e já havia sido caracterizado em espécies nativas através de cromatografia em camada delgada (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

CAPÍTULO 2
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE
HYPERICUM POLYANTHEMUM

2.1. INTRODUÇÃO

Inseticidas são substâncias químicas utilizadas para atrair, repelir e matar insetos, sendo sua descoberta, isolamento, síntese, avaliação toxicológica e de impacto ambiental um vasto tópico de pesquisa no mundo inteiro (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

A proteção contra insetos, tanto no cultivo como na estocagem de plantas e grãos, é de importante repercussão nos aspectos econômico e ecológico (VIEIRA & FERNANDES, 2003). Companhias agroquímicas vêm direcionando estudos para o desenvolvimento de novos inseticidas a partir de substâncias naturais. A descoberta de compostos ativos que sejam mais seletivos e menos persistentes pode ser benéfica, tanto para o meio ambiente quanto para os consumidores de produtos agrícolas, embora estes não devam ser assumidos completamente sem riscos (PASCUAL-VILLALOBOS & ROBLEDO, 1999).

Os produtos naturais inseticidas foram muito utilizados até a década de 40, quando os inseticidas sintéticos passaram a ganhar espaço. Com as pesquisas iniciadas a partir da Segunda Guerra Mundial, foi demonstrada uma atividade mais potente destes produtos sintéticos sobre pragas agrícolas, vindo a substituir o uso de compostos naturais (VIEGAS JUNIOR, 2003).

Tradicionalmente, os inseticidas mais utilizados têm sido os piretróides, seguido dos fosforados e organoclorados. Estes produtos, entretanto, possuem amplo espectro de ação exterminando os insetos indiscriminadamente, aumentando o risco da aquisição de resistência, o que leva a aplicação de maiores quantidades de inseticidas causando danos ecológicos. Os efeitos ambientais adversos e a necessidade de proteger o meio ambiente têm impulsionado a pesquisa por inseticidas alvos-específicos e degradáveis (VIEIRA &

FERNANDES, 2003). A descoberta de novas substâncias é necessária para o controle efetivo de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica e aplicabilidade em programas integrados de controle de insetos e baixo impacto ambiental (VIEGAS JUNIOR, 2003).

As principais plantas das quais foram obtidas substâncias com atividades inseticidas pertencem aos gêneros *Nicotiana* (Solanaceae), produtoras de nicotina e *nor-nicotina*; *Derris*, *Lonchocarpus*, *Tephrosia* e *Mundulea* (Leguminosae), produtoras de rotenóides; *Chrysanthemum* (Asteraceae), produtoras de piretrinas e *Azadirachta* (Meliaceae), produtoras de azadiractina (VIEIRA & FERNANDES, 2003).

Dentre as diversas classes de substâncias isoladas de plantas, com marcante atividade inseticida, podem-se citar também os cromenos, igualmente denominados benzopiranos e os benzofuranos, comuns e característicos de *Asteraceae*, principalmente no gênero *Encelia* (PROKSCH & RODRIGUEZ, 1983a, b).

Em vista da semelhança estrutural entre os compostos contendo núcleo benzopirano com as substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do RS (Figura 1), torna-se relevante avaliar a atividade inseticida destas. A investigação utilizando extratos brutos, visando uma futura aplicação prática, é também de interesse.

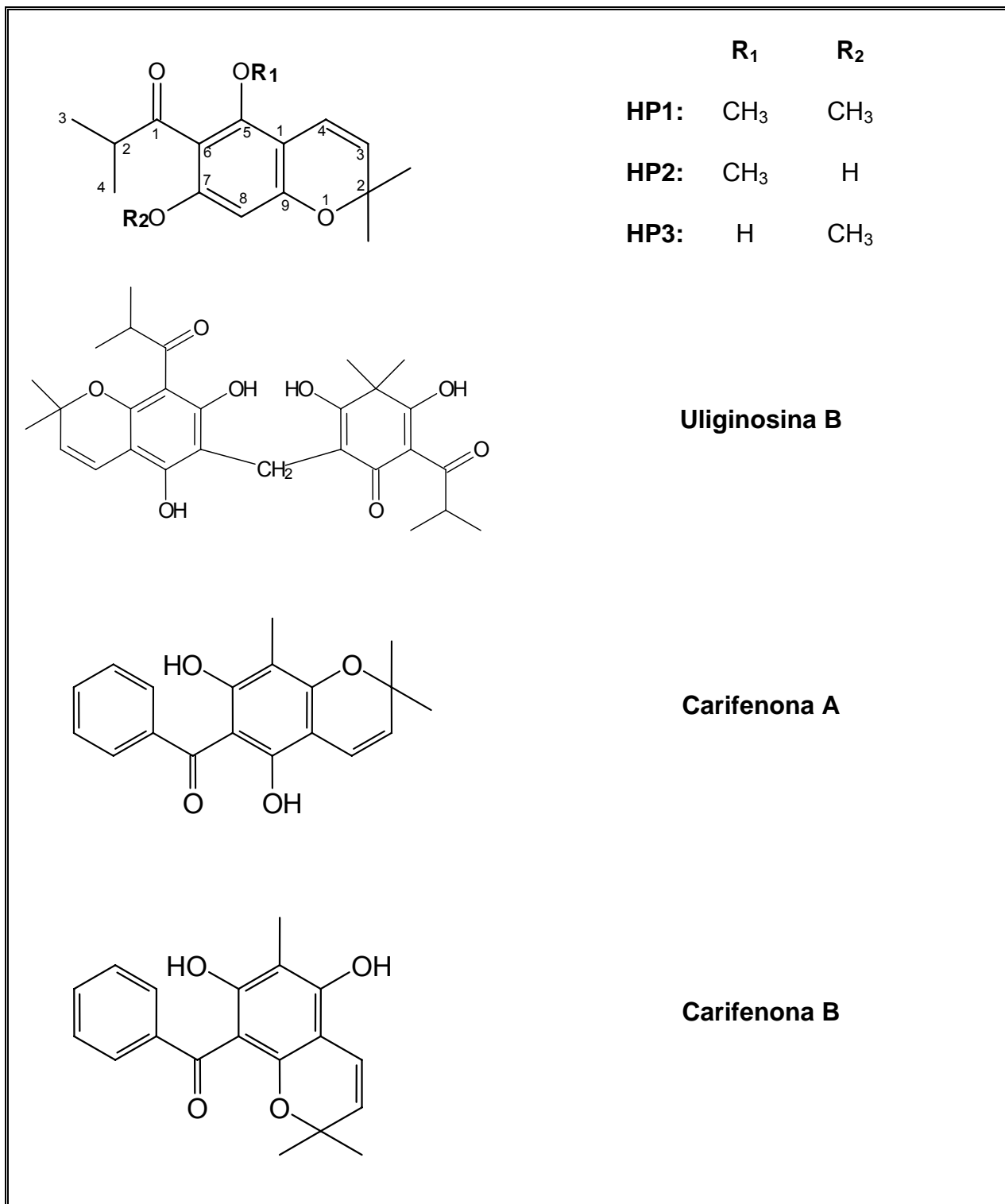


Figura 1: Substâncias isoladas de espécies nativas de *Hypericum*, apresentando núcleo benzopirano.

2.2. OBJETIVOS

Em vista do anteriormente exposto, os objetivos desta etapa do trabalho foram avaliar o extrato hexano e substâncias contendo núcleo benzopirano isoladas de *Hypericum polyanthemum* quanto à atividade inseticida. Esta etapa do projeto foi desenvolvida no Laboratório Proteínas Tóxicas, do Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob supervisão da Profa. Dra. Célia Carlini.

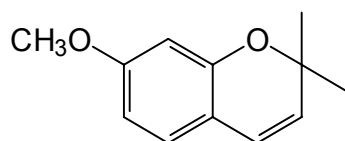
2.3. REVISÃO DA LITERATURA

A produção de metabólitos secundários nas plantas é consequência de um requerimento para a defesa química contra insetos, fungos, bactérias e vírus. Estudos evidenciam o papel de defesa destes compostos, de diversas estruturas, agindo como inseticidas (SOSA *et al.*, 1994; JAYASINGHE *et al.*, 2002).

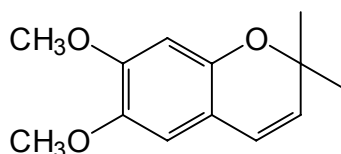
Produtos inibidores de crescimento, de origem natural ou sintética, despertam especial interesse na busca por novas substâncias químicas objetivando uma maior seletividade em relação àqueles atualmente em uso, que apresentam atividade neurotóxica. Um modelo interessante é aquele que atua seletivamente no sistema hormonal, podendo causar distúrbios de forma direta, através da aplicação de análogos de hormônios como os juvenóides, ou de forma indireta, pela interferência na formação do exoesqueleto (VIEGAS JUNIOR, 2003).

As funções do hormônio juvenil estão associadas com a reprodução, atuando sobre a regulação da maturação do aparelho reprodutor, tanto em fêmeas quanto em machos, bem como sobre a síntese de vitelogenina nas fêmeas (exceto em Diptera e em alguns Lepidoptera e Hymenoptera) e regulação das funções da glândula acessória de machos (MANETTI *et al.*, 1997).

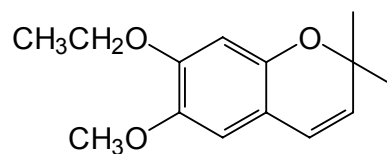
Cromenos como precocenos I e II, isolados inicialmente de *Ageratum houstonianum*, Asteraceae, são conhecidos por sua capacidade de induzir a metamorfose antecipada em alguns insetos pela destruição da glândula que secreta os hormônios juvenilizantes (PROKSCH *et al.*, 1983b; PROKSCH *et al.*, 1987; CARRIZO *et al.*, 1998; VIEIRA & FERNANDES, 2003). A atividade anti-hormônio juvenil de precoceno I e II tem sido demonstrada em uma variedade de insetos, incluindo *Sitophilus oryzae*, *Thlaspidia japonica*, *Leptocarsia chinesis* e *Dysdercus flavidus* (OKUNADE, 2002). Pesquisa com etóxiprecoceno (análogo do precoceno), demonstrou que este produto causa efeitos juvenilizantes no quinto e último estágio de desenvolvimento de larvas *Spodoptera litura*, os quais são revertidos com aplicação de hormônio juvenil (SRIVASTAVA & KUMAR, 1999).



(precoceno I)



(precoceno II)



(etóxiprecoceno)

Precocenos também ocorrem em *Ageratum conyzoides*, planta com importante atividade inseticida. Para o óleo volátil desta planta, constituído majoritariamente por precocenos, foi demonstrada toxicidade aguda em adultos de *Callosobruchus maculatus* principal praga da cultura do feijão-de-corda (*Vigna unguiculata*). O extrato hexânico de toda a planta mostrou atividade contra larvas de *Musca domestica*, enquanto o extrato metanólico das folhas frescas produziu deficiência de hormônio juvenil no quarto estágio de *Chilo partellus*, uma peste do sorgo (OKUNADE, 2002).

Encecalina, principal acetilcromeno encontrado em várias espécies de girassóis pertencentes ao gênero *Encelia* (Asteraceae), possui atividade inseticida contra *Oncopeltus fasciatus*, e atividade fagoinibitória contra lagartas de *Heliothis zea*, larvas de mariposas de *Peridroma saucia* e larvas de *Plusia gamma* até sua

adicionais indicaram que enecalina, quando adicionada em dietas artificiais, em concentrações naturalmente presente em *Encelia farinosa*, age como um forte deterrente alimentar no inseto *Heliothis zea* (PROKSCH *et al.*, 1983b).

Das partes aéreas de *Rhyncholacis penicillata* foi obtido um novo cromeno, 7-hidroxi-6-(3-metilbutiril)-5-oximetil-cromeno, chamado de rinchonina A. Este apresentou amplo potencial inseticida, acaricida e nematicida sendo a atividade inseticida forte em concentrações menores que 2 ppm no ensaio tópico, contra *Heliothis zea*, um organismo sensível a certos cromenos (BURKHARDT *et al.*, 1994).

2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1. Modelo de inseto utilizado: *Dysdercus peruvianus*

O modelo de inseto utilizado neste trabalho é uma praga da cultura do algodão, *Dysdercus peruvianus* Guérin-Ménéville (Hemiptera: *Pyrrhocoridae*) (Figura 2), conhecido popularmente como percevejo manchador do algodoeiro. Este inseto causa danos como a queda ou mau desenvolvimento dos frutos, manchas das fibras, introdução de fungos e bactérias, levando a perdas totais da cultura do algodão (GALLO *et al.*, 1988). A colônia deste inseto é mantida no Departamento de Biofísica da UFRGS, em sala climatizada, com temperatura entre 22 a 25°C e umidade relativa de 75%, sendo o fotoperíodo de 16:8 h (claro: escuro). Os insetos são mantidos em frascos de Tereftalato de Polietileno (PET), com uma camada de areia no fundo e fechados com tela de tecido serigráfico. Os insetos têm livre acesso à água, mantida em bebedouros de plástico, e são alimentados com sementes de algodão (*Gossypium hirsutum*). Estas sementes são mantidas dentro dos frascos durante o período de reprodução e postura, até o primeiro estágio de ninfa. Após este período, as sementes são colocadas sob o tecido que fecha os frascos, a fim de evitar contato com as fezes dos insetos. Para os estudos com este modelo, foi desenvolvida uma nova metodologia para alimentação que permitisse a introdução de substância-teste na dieta (STANISÇUASKI, 2005).

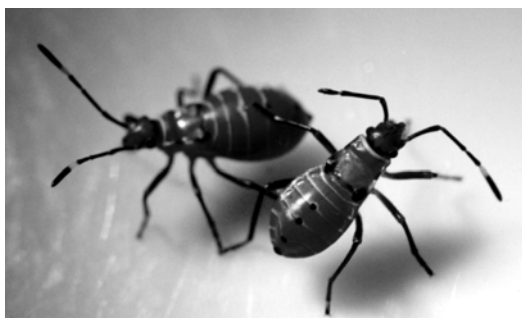


Figura 2: Ninfas de *Dysdercus peruvianus* Guérin-Ménéville.

2.4.2. Substâncias a testar

Foram testados o extrato hexânico e substâncias contendo núcleo benzopirano isoladas de *H. polyanthemum*, em diferentes concentrações. Estes foram obtidos pelos mesmos métodos descritos anteriormente nos itens 1.4.3 e 1.4.4 do capítulo I.

2.4.3. Semente de algodão

As sementes de algodão utilizadas para os experimentos foram doadas pelo Dr. Antônio Poletti do Núcleo de Produção de Sementes de Aguai - São Paulo. Os cotilédones das sementes foram submetidos a um processo de moagem e posterior tamisação para obter homogeneidade de partículas. O pó resultante foi utilizado no preparo das sementes artificiais.

2.4.4. Semente artificial

Constitui-se de cápsulas de gelatina, tamanho 0, preenchidas com a farinha da semente do algodão, contendo ou não substância amostra (Figura 3). As soluções das amostras, em concentração conhecida, bem como o controle, foram adicionadas à farinha de cotilédones de algodão. A mistura era então congelada e submetida à liofilização por um período de um a dois dias. Após a liofilização, a farinha resultante foi utilizada para o preenchimento de cápsulas de gelatina.

As concentrações das substâncias teste são expressas em porcentagem de massa de farinha (270 mg por cápsula). As sementes artificiais de controle foram preparadas da mesma forma, com o volume equivalente de solvente com o qual foram preparadas as soluções amostra.



Figura 3: *Dysdercus peruvianus* Guérin-Ménéville e semente artificial.

2.4.5. Bioensaios

Para os experimentos, grupos de 10 ninfas de *Dysdercus peruvianus*, em segundo estágio de desenvolvimento, foram utilizados em 5 replicações. Os insetos permaneceram em jejum por um dia anterior ao experimento.

Dois grupos referem-se aos controles: um alimentado apenas com farinha do algodão. O outro grupo controle foi alimentado com semente artificial contendo o solvente utilizado na solubilização das amostras. Os demais grupos foram alimentados com sementes artificiais contendo a amostra a ser analisada.

Acompanhou-se a mortalidade e o peso dos insetos durante um período máximo de 15 dias.

2.4.6. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste *t*-student (ANOVA, $p=0.05$).

2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para avaliação da atividade inseticida de extratos e produtos isolados, contou-se com a parceria do Laboratório de Proteínas Tóxicas, que já contava com uma metodologia de alimentação validada. Porém, foi necessário fazer uma adaptação inicial desta, visto que foi validada para substâncias hidrofílicas, como as proteínas (STANISÇUASKI, 2005). Esta metodologia foi escolhida por já ser validada pelo Laprotox, e também pelo fato de ser mencionada em outros estudos a ação de precocenos via dieta artificial (PROKSCH *et al.*, 1983b; PROKSCH *et al.*, 1987).

A etapa inicial foi marcada pela adaptação dos ensaios com as mudanças de solvente e pela investigação das doses a serem triadas. O extrato hexano, de caráter apolar, mostrou-se difícil de trabalhar no que diz respeito à preparação das sementes artificiais, pela não solubilização total na mistura água/etanol e pela dificuldade de liofilização da semente artificial, resultando num aspecto molhado e oleoso da farinha. Não se pode afirmar se o perfil sugestivo de atividade do extrato seja devido à toxicidade deste ou se pelo aspecto final da semente, que poderia estar dificultando a digestão pelos insetos, agindo como fagoínibidor.

Para a dissolução do extrato hexano nos primeiros experimentos e posterior incorporação na semente artificial, utilizou-se solventes orgânicos. Porém, percebeu-se um insucesso dos experimentos, visto que acarretava uma mortalidade acentuada dos grupos controle e amostra. A partir de então, as amostras passaram a ser solubilizadas em uma mistura de 90% água e 10% etanol PA, a fim de diminuir a toxicidade e favorecer também a liofilização do solvente.

Considerando-se que o extrato hexano de *Hypericum polyanthemum* apresenta as substâncias estruturalmente mais semelhantes aos precocenos, optou-se por testar essa amostra assim como os benzopiranos dela obtidos.

A seguir são apresentados os resultados obtidos nos experimentos.

2.5.1. Avaliação do extrato hexano de *H. polyanthemum* a 0,5 e 1%

Foi realizado um experimento inicial com o extrato hexano de *H. polyanthemum* nas concentrações de 0,5 e 1%. Na figura 4 abaixo, está representado o ganho de peso dos insetos, em relação ao peso no início do experimento. Desta forma, o extrato na concentração de 1% mostrou-se significativamente diferente ao grupo controle solvente (ANOVA, $p= 0,05$). Em outras palavras, observa-se que o extrato afetou o aumento de peso dos insetos. Esse fato pode sugerir que a amostra tenha um efeito fagoinibidor.

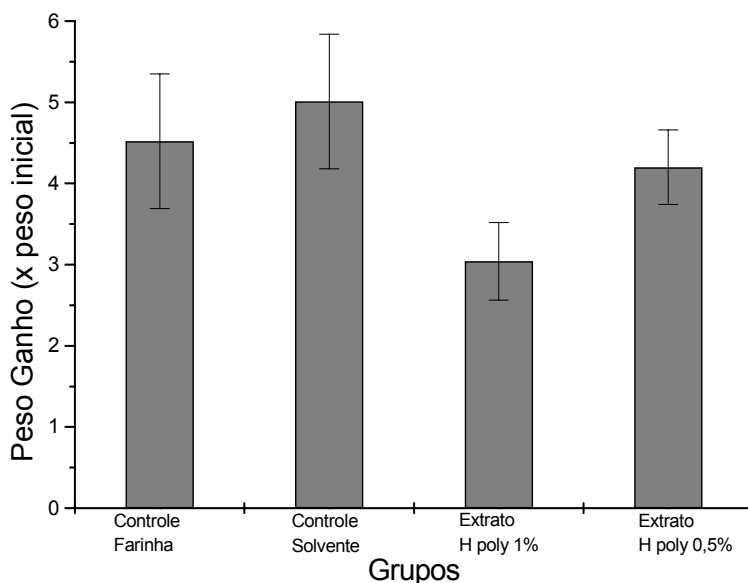


Figura 4- relação do aumento de peso dos insetos no teste com os extratos *H. polyanthemum* a 1% e a 0,5% após 12 dias

Na figura 5, está ilustrada a mortalidade dos grupos, após 12 dias de acompanhamento do experimento. Não houve diferenças significativas em relação à porcentagem de sobrevivência dos grupos, o que fortalece a sugestão de que somente a alimentação foi inibida, não afetando a sobrevivência.

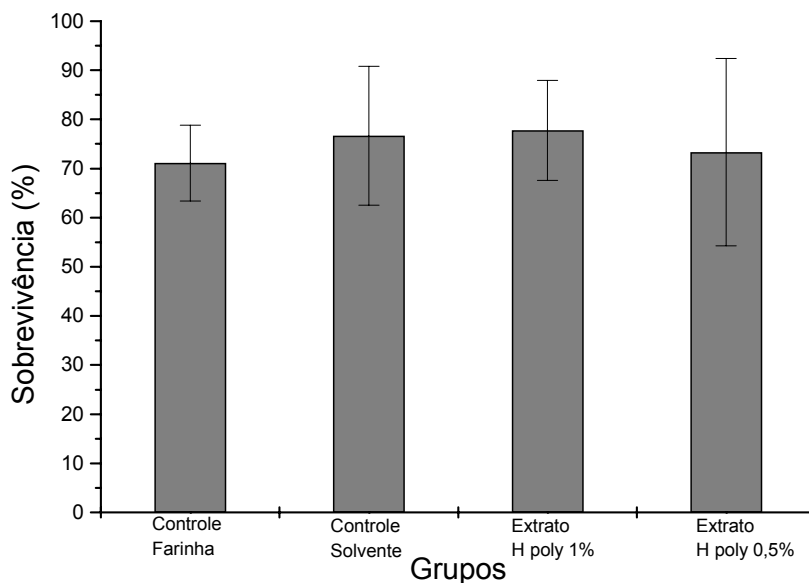


Figura 5: mortalidade dos grupos no teste com os extratos *H. polyanthemum* a 1% e a 0,5% após 12 dias

2.5.2. Avaliação do extrato hexano de *H. polyanthemum* a 1% e 2%

Na continuidade dos experimentos com o extrato hexano de *H. polyanthemum*, foi re-testada a dose de 1% e uma dose de 2% foi avaliada. Os resultados estão ilustrados nas figuras 6 e 7.

Como se percebe na figura 6, ambos grupos experimentais são significativamente diferentes dos grupos controle (ANOVA, $p=0,05$) em relação ao peso ganho.

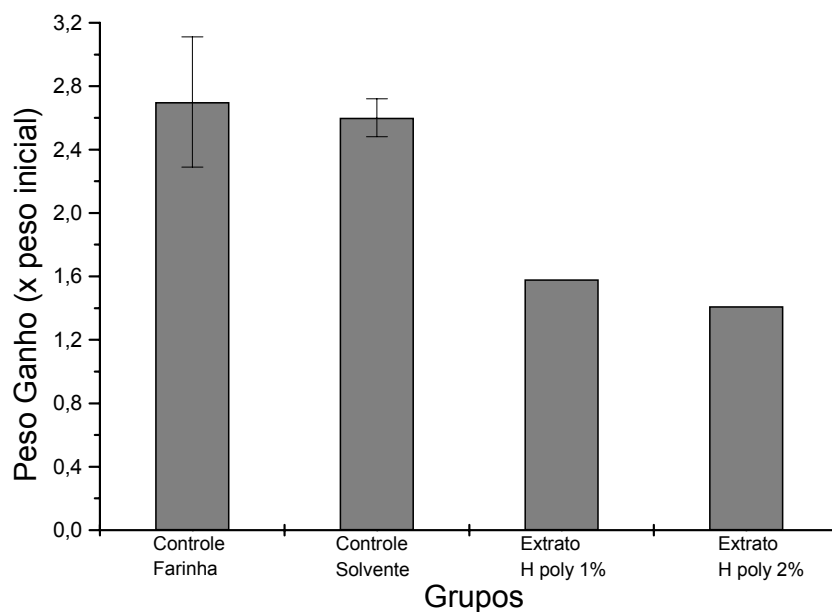


Figura 6: relação do aumento de peso dos insetos no teste com os extratos *H. polyanthemum* a 1% e a 2% após 11 dias

Na figura 7 também é visível que os grupos experimentais são diferentes dos grupos controles, porém como somente um “subgrupo” de cada grupo amostra estava vivo no 11º dia, não há desvio padrão, não sendo possível aplicar teste estatístico. Comparando com o experimento anterior, há a confirmação de que o grupo *H. polyanthemum* a 1% é diferente do grupo controle solvente. Aparentemente, em doses maiores que 1% não há relação entre dose e nível de mortalidade.

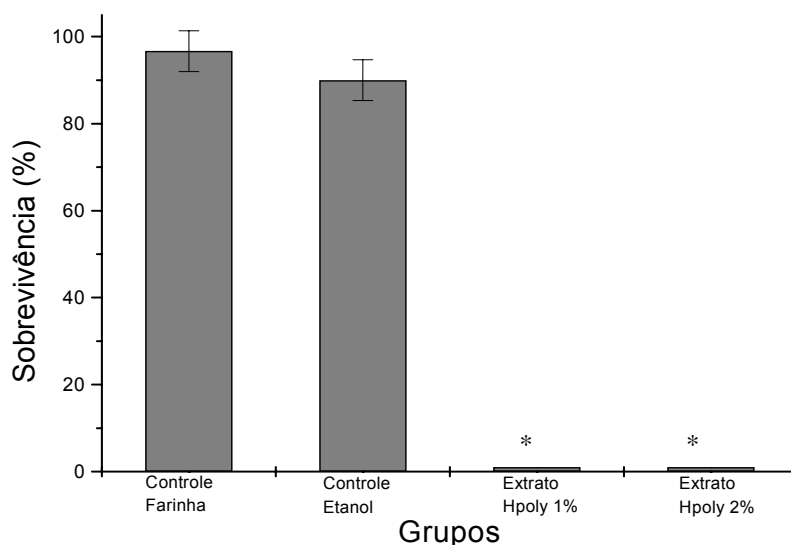


Figura 7: mortalidade dos grupos no teste com os extratos *H. polyanthemum* a 1% e a 2% após 15 dias

2.5.3. Avaliação dos produtos isolados: HP 1, HP 2 e HP 3

A fim de avaliar a atividade dos produtos isolados do extrato hexano de *H. polyanthemum*, realizou-se o experimento a seguir, com os produtos HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano), HP2 (7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano) e HP3 (5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano) em uma concentração de 0,1%, dez vezes menor que a primeira concentração com perfil de atividade para o extrato.

Quanto ao ganho de peso pelos insetos (figura 8), não há diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0.05$), porém verifica-se uma tendência a diminuir o peso, novamente sugerindo-se um efeito fagoinibidor.

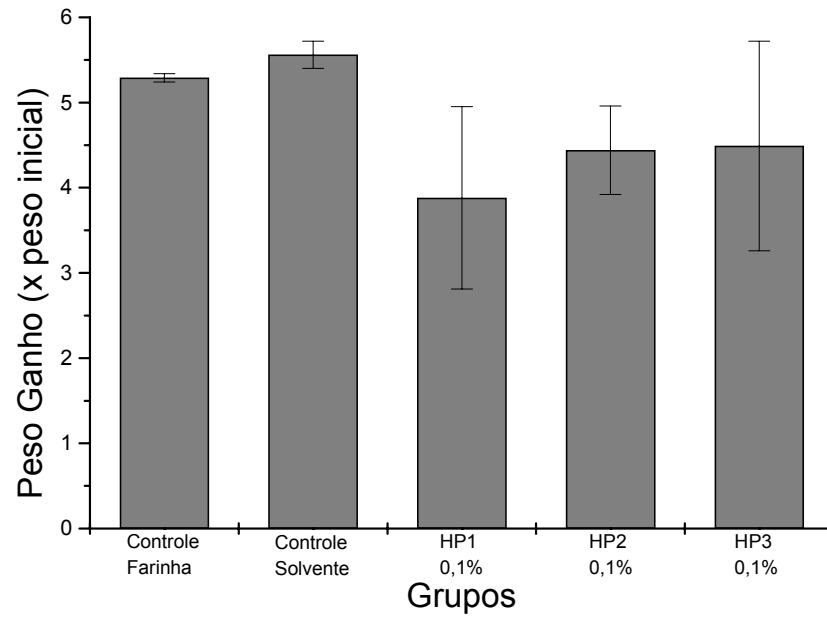


Figura 8: relação do aumento de peso dos insetos no teste com os produtos HP1, 2 e 3 a 0,1% (peso após 17 dias)

Na análise da mortalidade dos insetos, também não houve diferença significativa entre os grupos (ANOVA, $p=0.05$).

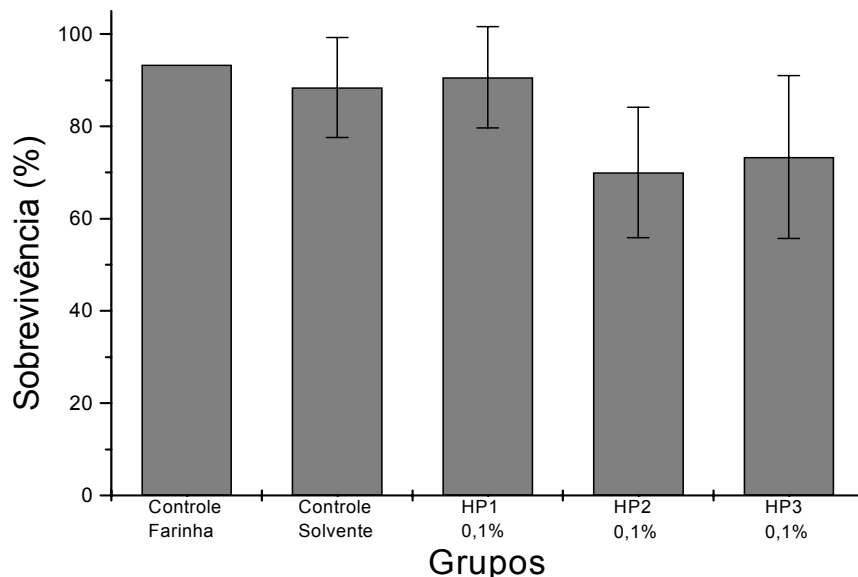


Figura 9: mortalidade dos grupos no teste com os produtos HP1, 2 e 3 a 0,1% (após 17 dias)

Após este experimento, outro com as mesmas concentrações dos três compostos foi realizado na tentativa de reproduzir e confirmar estes resultados, porém, houve alta mortalidade, tanto dos grupos controle quanto dos grupos amostra. Assim, os dados não foram estatisticamente analisados.

2.5.4. Avaliação do produto HP2

Devido ao fato do produto HP2 ter aparentemente causado maior mortalidade no experimento anterior, apesar de não significativa, optou-se por fazer outro experimento testando apenas este produto. Fez-se isso devido ao custo de todo o experimento, tempo de preparo e quantidade restrita de produtos isolados, o que dificultava a repetição por várias vezes de cada experimento.

Neste teste, analisou-se o produto HP2 a 0,2%: Este experimento demonstra uma tendência do produto HP2 a ter uma atividade inseticida.

Ao final deste experimento, somente um “subgrupo” do grupo HP2 estava vivo, então não foi possível aplicar teste estatístico, como mostra a figura 10, quanto ao ganho de peso. Porém este resultado demonstra o perfil inseticida deste produto, visto que de cinco subgrupos, apenas 1 não apresentou mortalidade de 100%.

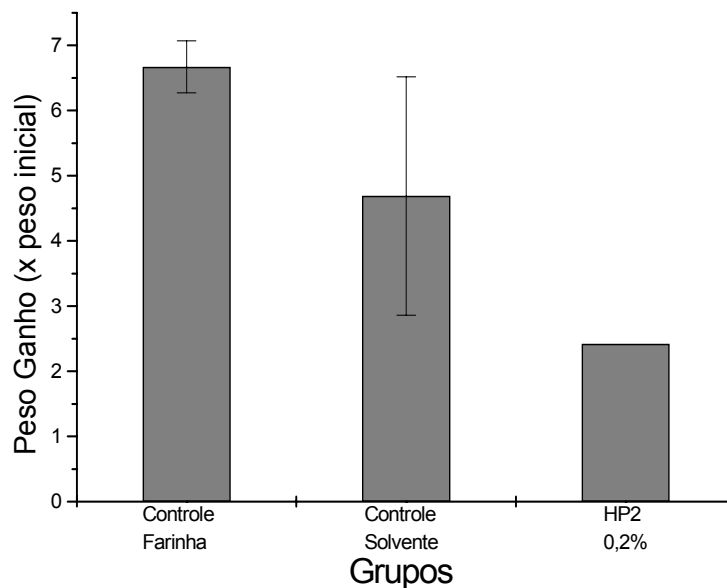


Figura 10: relação do aumento de peso dos insetos no teste com produto HP2 a 0,2% (peso após 17 dias)

Na figura 11, novamente nota-se uma tendência de atividade do produto, visto que a mortalidade dos insetos foi estatisticamente significativa, em comparação aos grupos controle (ANOVA, $p= 0.05$).

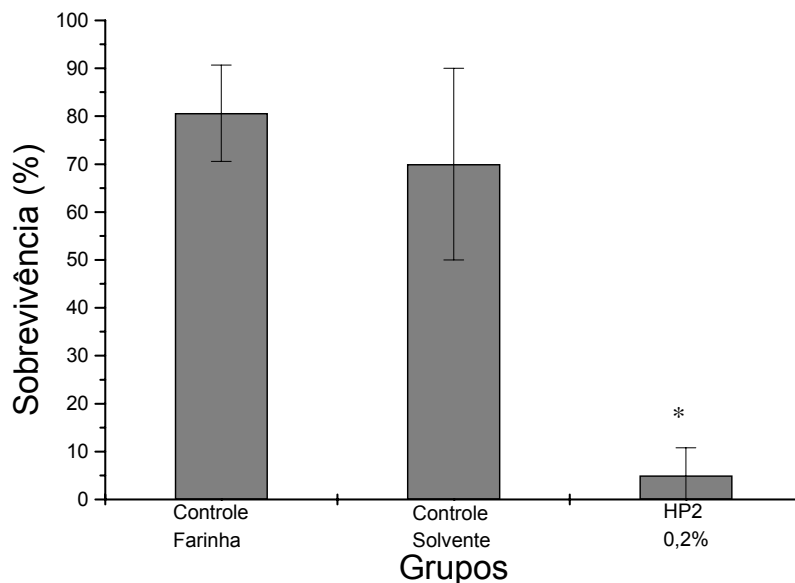


Figura 11: mortalidade dos grupos no teste com produto HP2 a 0,2%, após 17 dias.

Baseando-se nos resultados dos experimentos acima apresentados, verifica-se uma tendência de toxicidade do extrato hexânico e de um dos produtos purificados do mesmo, de *H. polyanthemum*. Isso demonstra a importância de dar continuidade aos testes, talvez em outro modelo animal, visto que muitas dificuldades foram encontradas para se trabalhar com essa metodologia. Ensaios tópicos também são interessantes, uma vez que são amplamente relatados para cromenos na literatura, porém sua realização requer técnicas mais elaboradas.

Em alguns países, como por exemplo, a Alemanha, *Hypericum perforatum* tornou-se o produto líder em prescrições para pacientes com quadros depressivos, superando, inclusive, as indicações da fluoxetina. Utilizada tradicionalmente desde a Idade Média, a planta conhecida como “St. John’s Wort” tornou-se popular nas décadas de 80 e 90, quando sua eficácia foi comprovada, fazendo com que as vendas passassem de um patamar de US\$ 10 milhões para mais de US\$ 250 milhões até 1998. Atualmente, estima-se que o mercado mundial gire em torno de US\$ 60 bilhões (MARSON, 2006).

Considerando-se essa ampla utilização de *Hypericum perforatum*, torna-se interessante avaliar o gênero *Hypericum* na busca por outras espécies ativas. Em vista disso, nos últimos anos, as espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul vêm sendo avaliadas dos pontos de vista químico e farmacológico e interessantes resultados têm sido obtidos. No Sul do Brasil, cerca de 20 espécies do gênero foram encontradas. Destas, a metade vem sendo estudada no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

No presente trabalho, deu-se continuidade ao estudo químico de *H. carinatum* e também se iniciou a investigação do potencial inseticida de espécies que apresentam compostos com grande similaridade estrutural com precocenos, substâncias com reconhecida atividade anti-hormônio juvenilizante.

A partir da coluna cromatográfica do extrato hexânico das partes aéreas de *H. carinatum*, foram obtidos quatro compostos de ocorrência majoritária, **Hcari1**, **Hcari2**, **Hcari3** e **Hcari4**, cujas estruturas foram identificadas por métodos espectroscópicos.

O primeiro composto isolado, **Hcari1**, foi identificado como sendo um derivado de floroglucinol. Através do espectro de UV e IV, verificou-se a presença de um sistema 1,3-dicetoenólico ou 2-hidroxiarilcetona.

Um sinal característico de floroglucínóis conjugados com unidades de ácido acilfilicínico encontrado em campo muito baixo (δ_{H} 18,80 ppm) no espectro de RMN ^1H , refere-se ao sistema enolizável formado pela hidroxila e carbonila nas posições C5 e C8, respectivamente (JAYASURIYA *et al.*, 1989). A presença de outros sinais em campo baixo (δ_{H} 9,94; 12,25 e 16,16 ppm) no espectro de RMN de ^1H caracteriza a presença de uma substância poli-hidroxilada.

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C , nota-se a presença de 22 sinais, seis destes referindo-se a dois átomos de carbono [δ_{C} 110,1 (C₂ e C₆), 103,59 (C₈ e C_{10'}), 27,77 (2 Me-C_{2'}), 24,29 e 25,37 (2 Me-C₄), 19,14 (2 Me-C_{12'} ou 2 Me-C₉), 18,91 (2 Me-C₉ ou 2 Me-C_{12'}) ppm]. Neste espectro, pode-se sugerir, pelo valor dos deslocamentos característicos de carbonos aromáticos oxigenados (δ_{C} 155,43; 159,38 e 162,16 ppm) e (δ_{C} 171,68; 187,28 e 199,41 ppm), a presença de dois núcleos com padrão de substituição de floroglucinol.

Os sinais, par de dubletos, em δ_{H} 5,38 e 6,64 ppm e um singlete referente a seis prótons em δ_{H} 1,48 ppm que acopla com o carbono quartenário de δ_{C} 78,2 ppm, caracterizam a presença de um grupo 2,2 dimetilbenzopirano. Assim, o produto **Hcari1** foi identificado como um derivado de floroglucinol denominado uliginosina B, substância já isolada de outras espécies de *Hypericum*.

Outros dois compostos foram isolados do mesmo extrato hexânico de *H. carinatum*, **Hcari2** e **Hcari3**. Através da comparação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C dessas substâncias, constatou-se muitas semelhanças sugerindo tratar-se de produtos isômeros.

No espectro de RMN de ^1H de **Hcari2** verificou-se a presença de um núcleo dimetilbenzopirano, caracterizado no pelo par de dubleto em δ_{H} 6,59 e 5,49 ppm. Complementar a essa observação, um anel benzênico monossustituído foi evidenciado nos sinais na faixa de δ_{H} 7,54-7,64 ppm, referentes a cinco hidrogênios. Com os sinais de cinco grupos CH com deslocamento químico em δ_{C}

127,77 (2); 129,49 (2) e 132,35 ppm no espectro de RMN de ^{13}C , esta hipótese é reforçada. Novamente, um padrão de substituição de floroglucinol é sugerido a partir dos deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C para os carbonos quartenários aromáticos oxigenados (δ_{C} 159,6, 159,4, e 154,5 ppm) e não-oxigenados (δ_{C} 102,2; 103,9 e 104,8 ppm).

A grande diferença entre os deslocamentos dos sinais das hidroxilas de **Hcari2** em δ_{H} 8,79 e 9,09 ppm, e **Hcari3** em δ_{H} 5,37 indica que apenas o hidrogênio desta última não estava ligado ao grupo carbonila da benzofenona. Com base na literatura, pode-se concluir que os diferentes deslocamentos químicos encontrados para as hidroxilas de **Hcari2** e **Hcari3** estejam relacionados com ao padrão de substituição de 2,6-di-hidróxibenzofenonas e 2-4 hidróxibenzofenonas, respectivamente (DELLE MONACHE *et al.*, 1980; SEO *et al.*, 1999; SEO *et al.*, 2000).

Concluiu-se, assim, que as estruturas de **Hcari2** e **Hcari3** referem-se às benzofenonas carifenona A e carifenona B, respectivamente. Através do que consta na literatura, tem-se uma restrita ocorrência das substâncias dessa classe das benzofenonas em *Hypericum*, porém se destacam em gêneros como *Alanblackia* (FULLER *et al.*, 1999a), *Symphonia* (GUSTAFSON *et al.*, 1992), *Ochrocarpos* (CHATURVEDULA *et al.*, 2002), *Tovomita* (SEO *et al.*, 1999; ZHANG *et al.*, 2002), *Clusia* (OLIVARES *et al.*, 1994; HENRY *et al.*, 1996; DE OLIVEIRA *et al.*, 1999; HENRY *et al.*, 1999; LOKVAM *et al.*, 2000; CHRISTIAN *et al.*, 2001; RUBIO *et al.*, 2001b), *Garcinia* (KRISHNAMURTHY *et al.*, 1981; BAKANA *et al.*, 1987; ALI *et al.*, 2000; HUANG *et al.*, 2001; CHIANG *et al.*, 2003) e *Vismiae* (DELLE MONACHE *et al.*, 1980; DELLE MONACHE *et al.*, 1983; DELLE MONACHE *et al.*, 1991a; DELLE MONACHE *et al.*, 1991b, FULLER *et al.*, 1999b; Seo *et al.*, 2000).

A análise da fração acetato de etila de *H. carinatum* resultou em dois flavonóides. Um deles foi identificado como hiperosídeo por comparação cromatográfica com amostra autêntica. Esse flavonóide é bastante comum em

espécies de *Hypericum* sendo que já havia sido caracterizado por cromatografia em camada delgada nas espécies nativas (Dall' Agnol *et al.*, 2003).

O outro flavonóide isolado, de comportamento cromatográfico similar ao de hiperosídeo, foi codificado como **Hcari4**. Através da interpretação do espectro no UV foi proposta a estrutura de um flavonol tri-hidroxiado nas posições C5, C3' e C4', apresentando também hidroxila ocupada na posições C3 e presença de uma hidroxila livre em C7.

No espectro de RMN de ^1H da substância **Hcari4** os principais sinais observados foram δ_{H} 0,97 nm (dubleto referente a C- CH_3 de ramnose), 5,46 nm (1H, *d*, $J=1,55$ Hz, Ra H-1), 6,20 nm (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-6) e 6,38 nm (1H, *d*, $J=2,1$ Hz, H-8).

A partir dos resultados obtidos, sugere-se, então, que a substância **Hcari4** seja o flavonóide quercitrina, cujos dados espectroscópicos estão de acordo com os relatados na literatura (MABRY *et al.*, 1970; ISHIGURO *et al.*, 1991; JAY *et al.*, 1975; AGRAWAL *et al.*, 1989a; BOUKTAIB *et al.*, 2002).

Esse flavonóide, juntamente com diversos derivados da quercetina, têm sido freqüentemente obtidos de espécies de *Hypericum* e já havia sido caracterizado em espécies nativas através de cromatografia em camada delgada (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

A partir dos resultados obtidos, sugere-se, então, que a substância **Hcari4** seja o flavonóide quercitrina, cujos dados espectroscópicos estão de acordo com os relatados na literatura (MABRY *et al.*, 1970; ISHIGURO *et al.*, 1991; JAY *et al.*, 1975; AGRAWAL *et al.*, 1989a; BOUKTAIB *et al.*, 2002).

Em vista da semelhança estrutural entre os compostos contendo núcleo benzopirano com marcante atividade inseticida (PROKSCH & RODRIGUEZ, 1983a, b)

com as substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do RS, realizaram-se ensaios para avaliar a atividade inseticida de *H. polyanthemum* e seus compostos isolados.

Os experimentos com o extrato hexano de *H. polyanthemum* mostraram que a amostra a 1%, com relação ao ganho de peso dos insetos, foi significativamente diferente ao grupo controle solvente (ANOVA, $p= 0,05$). Esse resultado demonstra que o extrato afetou o aumento de peso dos insetos, sugerindo um provável efeito fagoinibidor. Em referência à mortalidade dos grupos, não houve diferenças significativas com relação à porcentagem de sobrevivência, o que fortalece a sugestão de que somente a alimentação foi inibida.

Outro experimento realizado com o mesmo extrato, nas concentrações de 1 e 2%, demonstrou que ambas concentrações são significativamente diferentes dos grupos controle (ANOVA, $p=0,05$) em relação ao peso ganho pelos insetos e mortalidade. Comparando com o experimento anterior, há a confirmação de que o grupo *H. polyanthemum* a 1% é diferente do grupo controle solvente. Aparentemente, em doses maiores que 1% não há relação entre dose e nível de mortalidade.

Estes dois experimentos fortalecem a suposição de uma possível atividade inseticida do extrato hexano de *H. polyanthemum*.

Após, foram testados os benzopiranos de *H. polyanthemum*, HP1, HP2 e HP3 em uma concentração de 0,1%. As amostras não afetaram significativamente (ANOVA, $p=0.05$) o ganho de peso pelos insetos, em relação aos grupos controle, porém verificou-se uma tendência a diminuir o peso, sugerindo-se um efeito fagoinibidor. A mortalidade dos insetos também não foi significativamente diferente entre os grupos (ANOVA, $p=0.05$).

Em vista do produto HP2 ter apresentado algum efeito sobre a mortalidade dos insetos, ainda que não significativo, analisou-se novamente este produto, porém numa concentração de 0,2%. Dos cinco subgrupos da amostra de HP2, apenas 1 não apresentou mortalidade de 100%, sendo esta então considerada estatisticamente significativa dos grupos controle (ANOVA, $p= 0.05$). Este resultado demonstra uma tendência inseticida deste produto.

Os experimentos citados demonstram uma tendência de toxicidade do extrato hexânico de *H. polyanthemum* e de um de seus constituintes, o HP2. Como mencionado na revisão da literatura, a similaridade estrutural dos benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* com compostos tóxicos já caracterizados, como precoceno I e II, encecalina e desmetilencecalina, reforça a importância do aprofundamento da investigação de uma possível atividade inseticida dos benzopiranos de *H. polyanthemum*.

CONCLUSÕES

*A partir do extrato hexano de *H. carinatum*, foram isolados três compostos fenólicos, o derivado de floroglucinol uliginosina B e as benzofenonas carifenona A e carifenona B;

*Da fração acetato de etila de *H. carinatum* foram isolados dois flavonóides, hiperosídeo e quercitrina, identificada por RMN de ^1H ;

*O extrato hexano de *H. polyanthemum* apresentou perfil de atividade inseticida;

*Os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 não apresentaram atividade inseticida significativa, porém o efeito observado sugere uma atividade fago-inibidora;

*O benzopirano HP2 foi significativamente diferente dos grupos controle em relação ao ganho de peso e mortalidade, demonstrando um perfil inseticida.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.K.; VERMA, S.; SINGH, S.S.; KUMAR, S.; KESHRI, G. Antifertility Chromene from *Blepharispermum subsessile*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 435-437, 1999.

AGARWAL, S. K.; VERMA, S.; SINGH, S. S.; TRIPATHI, A. K.; KHAN, Z. K.; KUMAR, S. Antifeedant and Antifungal Activity of Chromene Compounds Isolated from *Blepharispermum subsessile*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 231-234, 2000.

AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S.; BANSAL, M. C. Flavonoids. In: Agrawal, P. K. Carbon-13 NMR of Flavonoids. **The Netherlands: Elsevier Science Publishers**, c. 3, p. 95-182, 1989.

ALBERT, D.; ZÜNDORF, I.; DINGERMANN, T.; MÜLLER, W.E.; STEINHILBER, D.; WERZ, O. Hyperforin is a Dual Inhibitor of Cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1767-1775, 2002.

ALI, S.; GOUNDAR, R.; SOTHEESWARAN, S.; BEAULIEU, C.; SPINO, C. Benzophenones of *Garcinia pseudoguttifera* (*Clusiaceae*). **Phytochemistry**, v. 53, p. 281-284, 2000.

ARISAWA, M.; FUJITA, A.; SAGA, M.; HAYASHI, T.; MORITA, N.; KAWANO, N.; KOSHIMURA, S. Studies on Cytotoxic Constituents in Pericarps of *Mallotus japonicus*, Part II. **Journal of Natural Products**, v. 49, p. 298-302, 1986.

BAKANA, P.; CLAEYS, M.; TOMB, J.; PIETERS, L.A.C.; HOOF, L.V.; VEMBA, T.; VAN DEN BERGHE, D.A. VLIETINCK, A.J. Structure and Chemotherapeutical Activity of a Polyisoprenylated Benzophenone from the Stem Bark of *Garcinia Huillensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 75-84, 1987.

BENNETT, G.J.; LEE, H.H. Xanthonenes from *Guttiferae*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 967-998, 1989.

BERNARDI, A.P.; FERRAZ, A.B.F.; ALBRING, D.V.; BORDIGNON, 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.

BHATTACHARYA, S.; CHAKRABARTI, A.; CHATTERJEE, S. Activity Profiles of two Hyperforin-Containing *Hypericum* Extracts in Behavioral Models. **Pharmacopsychiatry**, v. 31, s. 1, p. 22-29, 1998.

BILIA, A.R.; YUSUF, A.W.; BRACA, A.; KEITA, A.; MORELLI, I. New Prenylated Anthraquinones and Xanthonenes from *Vismia guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p.16-21, 2000.

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

BOUBAKIR, Z.; BEUERLE, T.; LIU, B.; BEERHUES, L. The First Prenylation Step in Hyperforin Biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, n. 1, p. 51-57, 2005.

BOUKTAIB M., LEBRUN S., ATMANIB A., ROLANDO C. Hemisynthesis of all the O-monomethylated analogues of quercetin including the major metabolites, through selective protection of phenolic functions. **Tetrahedron**, v.58, p.10001-10009, 2002.

BURKHARDT, G.; BECKER, H.; GRUBERT, M.; THOMAS, J.; EICHER, T. Bioactive Chromenes from *Rhyncholacis penicillata*. **Phytochemistry**, v. 37, nº 6, p.1593-1597, 1994.

CARRIZO F., R.; SOSA, M.E.; FAVIER, L.S.; PENNA, F.; GUERREIRO, E.; GIORDANO, O.S.; TONN, C.E. Growth-Inhibitory Activities of Benzofuran and Chromene Derivatives toward *Tenebrio molitor*. **Journal of Natural products**, v. 61, p. 1209-12111, 1998.

Carvalho, J.C.T.; Gosmann, G.; Schenkel, E.P. Composto Fenólicos Simples e Heterosídicos In: Simões *et al.* (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5.ed., Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003.

CHATTERJEE, S.; NÖLDNER, M.; KOCH, E.; ERDELMEIER, C. Antidepressant Activity of *Hypericum perforatum* and Hiperforin: the Neglected Possibility. **Pharmacopsychiatry**, v. 31, n.1, p. 7-15, 1998.

CHATURVEDULA, V.S.P.; SCHILLING, J.K.; KINGSTON, D.G.I. New Cytotoxic Coumarins and Prenylated Benzophenone Derivatives from the Bark of *Ochrocarpos punctatus* from the Madagascar Rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 965-972, 2002.

CHIANG, Y.M.; KUO, Y.H.; OOTA, S.; FUKUYAMA, Y. Xanthonenes and Benzophenones from the Stems of *Garcinia multiflora*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1070-1073, 2003.

CHRISTIAN, O.E.; HENRY, G.E.; JACOBS, H.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F. Prenylated Benzophenone Derivatives from *Clusia havetiodes* var. *stenocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 23-25, 2001.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, and Dietary Sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-76, 1996.

CRONQUIST, A. **An Integrated System of Classification of Flowering Plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.L.; 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. 291-292, 2005.

DAUDT, R.; VON POSER, G.L.; 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.

DÉCOSTERD, L.; STOECKLI-EVAN, H.; MSONTHI, J.D.; HOSTETTMANN, K. A New Antifungal Chromene and a Related Dichromene from *Hypericum revolutum*. **Planta Medica**, v. 55, p. 429, 1986.

DÉCOSTERD, L.A.; HOFFMANN, E.; KYBURZ, R.; BRAY, D.; HOSTETTMANN, K. A new Phloroglucinol Derivative from *Hypericum calycinum* with Antifungal and *in vitro* Antimalarial Activity. **Planta Medica**, v. 57, p. 548-551, 1991.

DELLE MONACHE, G.; GONZALEZ, G.J.; DELLE MONACHE, F.; BETTOLO, G.B.M. Prenylated Benzophenones from *Vismia decipiens*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 2025-2028, 1980.

DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE G.; GACS-BAITS E. Prenylated Benzophenones from *Clusia sandiensis*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2003-2005, 1991.

DE OLIVEIRA, C.M.A., PORTO, A.M.; BITTRICH, I.V.; MARSAIOLI, A.J. Two Polyisoprenylated Benzophenones from the Floral Resins of three *Clusia* species. **Phytochemistry**, v. 50, p. 1073, 1999.

DIAS, A.C.P.; BARBERÁN, F.A.T.; FERREIRA, M.F.; FERRERES, F. Unusual flavonoids produced by *callus* of *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 7, p. 1165-1168, 1998.

FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S.M.K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; VON POSER, G.L.; 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.; STAATS, C. SCHRIPEMA, J.; VON POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, n.8, p.1227-1230, 2001.

FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D.R.A.; SCHMITT, A.C.; RAVAZOLLO, 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, 2002a.

FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPEMA, J.; POHLMANN, A.R.; VON POSER, G.L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum* Cham. & Schltidl. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 30, p. 989-991, 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**, 2005a.

FERRAZ, A.; GRIVICICH, I.; VON POSER, G.L.; HENRIQUES, A.T.; SCHWARTSMANN, G.; DA ROCHA, A.B. Antiproliferative Activity of three Benzopyrans Isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Fitoterapia**, 2005b.

FERRAZ, A.; FARIA, D.H.; BENNETI, M.N., DA ROCHA, A.B; SCHWARTSMANN, G., HENRIQUES, A., VON POSER, G. Screening for the Antiproliferative Activity of six Southern Brazilian Species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, 2005c.

FULLER, R.W.; WESTERGAARD, C.K.; COLLINS, J.W.; CARDELLINA II, J.H.; BOYD, M.R. Vismiaphenones D-G, new Prenylated Benzophenones from *Vismia cayennensis*. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 67-69, 1999a.

FULLER, R.W.; BLUNT, J.W.; BOSWELL, J.L.; CARDELLINA II, J.H.; BOYD, M.R. Guttiferone F, the first Prenylated Benzophenone from *Allanblackia Stuhlmannii*. **Journal of Natural Products**. v. 62, p. 130-132, 1999b.

GALLO, D. **Manual de Entomologia Agrícola**. 2ª ed. São Paulo: CERES, p. 649, 1988.

GAMIOTECA-TURRO, D.; CUESTA-RUBIO, O.; PRIETO-GONZÁLEZ, S.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Antioxidative Constituents from the Leaves of *Hypericum styphelioides*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 869-871, 2004.

GNERRE, C.; POSER, G.L.V.; FERRAZ, A.B.F.; VIANA, A.; TESTA, B.; RATES, S.K. Monoamine Oxidase Inhibitory Activity of some *Hypericum* Species Native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GUSTAFSON, K.R.; BLUNT, J.W.; MUNRO, M.H.G.; FULLER, R.W.; MCKEE, T.C.; CARDELLINA II, J.H.; MCMAHON J.B.; CRAGG, G.M.;BOYD, M.R. The Guttiferones, HIV-Inhibitory Benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10093-10102, 1992.

HENRY, G.E.; JACOBS, H.; CARRINGTON, C.M.S.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F. Plukenetione A. an Unusual Adamantyl Ketone from *Clusia plukenetii* (Guttiferae). **Tetrahedron Letters**, v. 37, p. 8663-8666, 1996.

HENRY, G.E.; JACOBS, H.; CARRINGTON, C.M.S.; MCLEAN, S.; REYNOLDS, W.F. Prenylated Benzophenone Derivatives from Caribbean *Clusia* Species (Guttiferae). Plukenetiones B-G and Xerophenone A. **Tetrahedron**, v. 55, p. 1581-1596, 1999.

HUANG, Y.L.; CHEN, C.C.; CHEN, Y.J.; HUANG, R.L.; SHIEH, B.J. Three Xanthonenes and a Benzophenone from *Garcinia mangostana*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 903-906, 2001.

HU, L.H., SIM, K.Y. Complex Caged Polyisoprenylated Benzophenone Derivatives, Sampsoniones A and B, from *Hypericum sampsonii*. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 7999-8002, 1998.

HU, L.H., SIM, K.Y., Sampsoniones C-H, a Unique Family of Polyprenylated Benzophenone Derivatives with the Novel tetracyclo [7.3.1.1^{3,11}.O^{3,7}] tetradecane-2,12,14-trione Skeleton, from *Hypericum sampsonii* (Guttiferae). **Tetrahedron Letters**, v. 40, p. 759-762, 1999.

HU, L.H.; SIM, K.Y. Sampsoniones A-M, a Unique Family of Caged Polyprenylated Benzoylphloroglucinol Derivatives, from *Hypericum sampsonii*. **Tetrahedron**, v. 56, p. 1379-1386, 2000.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S. Sarothralen A and B, new Antibiotic Compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**, v. 52, p. 288-290, 1986.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S. Soroaspindin A, B, and C: Additional Antibiotic Compounds from *Hypericum japonicum*, **Planta Medica**, v. 53, p. 415-417, 1987.

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; FUKUMOTO, H.; YAMAKI, M.; ISOI, K.; YAMAGATA, Y. A 2-pyrone Derivative from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v. 37, p. 283-284, 1994.

ISHIGURO, K.; NAGAREYA, N.; FUKUMOTO, H. A Phloroglucinol Derivative from Cell Suspension of *Hypericum patulum*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1041-1043, 1998.

ISMAN, M.B.; PROKSCH, P. Deterrent and Insecticidal Chromenes and Benzofurans from *Encelia* (Asteraceae). **Phytochemistry**, v.24, p. 1949-1951, 1985.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; MIYAMOTO, Y.; ONODA, S.; RAO, K.S.; MUKAINAKA, T.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; HIROSHI FURUKAWA, H. Polyprenylated Benzophenones from *Garcinia assigu* and their Potential Cancer Chemopreventive Activities. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 206-209, 2003.

JAY, M.; GONNET, J.; WOLLENWEBER, E.; VOIRIN, B. Sur l'analyse qualitative des aglycones flavoniques dans une optique chimiotaxinomique. **Phytochemistry**, v. 14, p. 1605-1612, 1975.

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.

JAYASURIYA, H.; CLARK, A.M.; MCCHESENEY, J.D. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v. 54, p. 1324-1320, 1991.

JAYASINGHE, U.L.B.; KUMARIHAMY, B.M.M.; BANDARA, A.G.D.; WAIBLINGER, J.; KRAUS, W. Antifeedant Activity of some Sri Lankan Plants. **Natural Product Research**, v. 17, n. 1, p. 5-8, 2002.

JENSEN, A.G.; HANSEN, S.H.; NIELSEN, E.O. Adhyperforin as a Contributor to the Effect of *Hypericum perforatum* L. in Biochemical Models of Antidepressant Activity. **Life Sciences**, v. 68, p. 1593-1605, 2001.

JIMÉNES, C.R. Hipericaceae. **Flora Ilustrada Catarinense**. Editora IOESC: Florianópolis, 1980.

JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A. Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v. 68, p. 88-91, 2002.

KACHADOURIAN, R.; DAY, B.J. Flavonoid-Induced Glutathione Depletion: Potential Implications for Cancer Treatment. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 65-76, 2006.

KARTNIG, T.; GRUBER, A.; SAUER, H. Comparative Phytochemical Investigations of *Hypericum* species. **Planta Medica**, v. 55, p. 215, 1989.

KARTNIG, T.; GÖBEL, I.; HEYDEL, B. Production of Hypericin, Pseudohypericin and Flavonoids in Cell Cultures of Various *Hypericum* Species and their Chemotypes. **Planta Medica**, v. 62, p. 51-53, 1996.

KIM, M.R.; LEE, J.Y.; LEE, H.H.; ARYAL, D.K.; KIM, Y.G; KIM, S.K; WOO, E.R; KANG, K.W. Antioxidative Effects of Quercetin-Glycosides Isolated from the Flower Buds of *Tussilago farfara* L. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 8, p. 1299-1307, 2006.

KITANOV, G.M.; NEDIALKOV, P.T. Benzophenone O-glucoside, a Biogenic Precursor of 1,3,7-trioxygenated Xanthenes in *Hypericum annulatum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1237-1243, 2001.

KITANOV, G.M.; NEDIALKOV, P.T. Benzophenone O-glucoside, a Biogenic Precursor of 1,3,7-trioxygenated Xanthenes in *Hypericum annulatum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1237–1243, 2001b.

KRISHNAMURTHY, N.; LEWIS, Y.S.; RAVINDRANATH, B. On the Structures of Garcinol, Isogarcinol and Camboginol. **Tetrahedron Letters**, v. 22, p. 793-796, 1981.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, Cromonas e Xantonas. In: SIMÕES, C. M.O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, cap. 21, P. 451- 469, 2000.

LAAKMANN, G.; SCHULE, C.; BAGHAI, T.; KIESER, M. St. John's Wort in Mild to Depression: the Relevance of Hyperforin for the Clinical Efficacy. **Pharmacopsychiatry**, v. 31, p. 54-59, 1998.

LOKVAM, J.; BRADDOCK, J.F.; REICHARDT, P.B.; CLAUSEN, T.P. Two Polyisoprenylated Benzophenones from the Trunk Latex of *Clusia grandiflora* (*Clusiaceae*). **Phytochemistry**, v. 55, p. 29-34, 2000.

MABRY T. J., MARKHAM K. R., THOMAS M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Spring-Verlag, 1970.

MALAMAS, M.; MARSELOS, M. The Tradition of Medicinal Plants in Zagori, Epirus (northwestern Greece). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 37, p. 197-203, 1992.

MANETTI, A.G.O.; ROSETTO, M.; FILIPPIS, T.; MARCHINI, D; BALDARI, C.T.; DALLAI, R. Juvenile Hormone Regulates the Expression of the Gene Encoding Ceratoxin A, an Antibacterial Peptide from the Female Reproductive Accessory Glands of the Medfly *Ceratitis capitata*. **Journal Insect Physiology**, v.43, n. 12, p. 1161-1167, 1997.

MARSON, D. Consumo do *Hypericum perforatum* cresce em escala internacional. **Phytomedica**, v.1, 2006. Disponível em www.ache.com.br. Acessado em junho, 2006.

MCKEE,T.C.; COVINGTON, C.; FULLER, R.W.; BOKESCH, L.R.; YOUNG, S.; CARDELLINA, J.H.; KADUSHIN, M.R.; SOEJARTO, D.D.; STEVENS, P.F.; CRAGG, G.M.; BOYD, M.R. Pyranocoumarins from Tropical Species of the Genus *Calophyllum*: a Chemotaxonomic Study of Extracts in the Natural Cancer Institute Collection. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1252-1256, 1998.

MEDINA, M.A.; MARTÍNEZ-POVEDA, B.; AMORES-SÁNCHEZ, M.I.; QUESADA, A.R. Hyperforin: More than an Antidepressant Bioactive Compound? **Life Sciences**, v. 79, n. 2, p. 105-111, 2006.

MEI, I.G.C.; MEI, H.L.; MING, H.Y.; RU, R.; WU, C.N.L. Phenolics from *Hypericum geminiflorum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 943-947, 1997.

MENTZ, L.A.; LUTZEMBERGER, L.C.; SCHENKEL, E.P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Avila (1910). **Cadernos de Farmácia**, v. 15, p. 25-47, (1997).

NEDIALKOV, P.; KITANOV, G. Two Benzophenone O-Arabinosides and a Chromone from *Hypericum annulatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 867-871, 2002.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E. VAN; HOORN, D.E.C. VAN; BOELENS, P.G.; NOOREN, K. VAN; LEEUVEN, P.A.M. VAN. Flavonoids: a Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 418-425, 2001.

NÖR, C.; FERRAZ, A.B.F.; ALBRING, D.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILHAUME, D.; VON POSER, G.L. Chemotaxonomic Features of Phloroglucinol Derivatives Occurring in *Hypericum* Species Belonging to the Trigynobrathys Section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 517-519, 2004.

OKUNADE, A.L. *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 73, p. 1-16, 2002.

OLIVARES, E.M., GONZALEZ, J.G., DELLE MONACHE, F. Benzophenones from *Clusia ellipticifolia*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 413-415, 1994.

PARKER, W.L. The Structure Determination of Antibiotic Compounds from *Hypericum uliginosum*. **Journal of American Chemical Society**, v. 90, p. 4716-4723, 1968.

PASCUAL-VILLALOBOS, M.J; ROBLEDOS, A. Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 1-10, 1999.

PROESTOS, I.S.C.; BOZIARIS, G.J.; NYCHAS, E.; KOMAITIS, M. Analysis of Flavonoids and Phenolic Acids in Greek Aromatic Plants: Investigation of their Antioxidant Capacity and Antimicrobial Activity. **Food Chemistry**, v. 95, n. 4, p. 664-671, 2006.

PROKSCH, P., PROKSCH, M.; TOWERS, G.H.N.; RODRIGUEZ, E. Phototoxic and Insecticidal Activities of Chromenes and Benzofurans from *Encelia*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 3, p. 331-334, 1983a.

PROKSCH, P.; RODRIGUEZ, E. Chromenes and Benzofurans of the *Asteraceae*, their Chemistry and Biological Significance. **Phytochemistry**, v 22, n. 11, p. 2335-2348, 1983b.

PROKSCH, P.; ISMAN, M.B.; WITTE, L.; HARTMANN, T. Metabolites of Insecticidal Chromenes from the Migratory Grasshopper *Melanoplus sanguinipes*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 8, p. 2227-2230, 1987.

ROBSON, N.K.B. Studies in the Genus *Hypericum* L. (Guttiferae). Infrageneric classification. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. **Botany series**, v. 5, p. 293-355, 1977.

ROBSON, N.K.B. Studies in the Genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the Genus. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. **Botany Series**, v. 8, n. 2, p. 55-226, 1981.

ROBSON, N.K.B. Studies in the Genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. *Brathys* (part 2) and 30. *Trigynobrathys*. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*. **Botany Series**, v. 20, n. 1, p. 1-151, 1990.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M.A.C.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An Antifungal Gamma-Pyrone and Xanthonones with Monoamine Oxidase Inhibitory Activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 6, 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.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. More Phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 185-188, 1996.

RUBIO, O.C.; CUELLAR, A.C.; ROJAS, N.; CASTRO, H.V.; RASTRELLI, L.; AQUINO, R.A. Polyisoprenylated Benzophenone from Cuban Propolis. **Journal of Natural Products**, v. 62, p.1013-1015, 1999.

RUBIO, O.C.; PADRON, A.; CASTRO, H.V.; PIZZA, C.; RASTRELLI, L. Aristophenones A and B. A New Tautomeric Pair of Polyisoprenylated Benzophenones from *Garcinia aristata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 973-975, 2001.

SANG, S.; LIAO, C.H.; PAN, M.H.; ROSEN, R.T.; SHIAU, S.Y.L.; LINB, J.K.; HO, C.T. Chemical Studies on Antioxidant Mechanism of Garcinol: Analysis of Radical Reaction Products of Garcinol with Peroxyl Radicals and their Antitumor Activities. **Tetrahedron**, v. 58, p.10095-10102, 2002.

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**, v. 77, p. 239-245, 2001.

SELVI, A.T.; JOSEPH, G.S.; JAYAPRAKASHA, G.K. Inhibition of Growth and a Toxin Production in *Aspergillus flavus* by *Garcinia indica* Extract and its Antioxidant Activity. **Food Microbiology**, v. 20, p. 455-460, 2003.

SEO, E.K.; WALL, M.E.; WANI, M.C.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D. Cytotoxic Constituents from the Roots of *Tovomita brevistaminea*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 669-674, 1999.

SEO, E.K.; WANI, M.C.; WALL, M.E.; NAVARRO, H.; MUKHERJEE, R.; FARNSWORTH, N.R.; KINGHORN, A.D. New Bioactive Aromatic Compounds from *Vismia guianensis*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 35-42, 2000.

SOMMER, H.; HARRER, G. Placebo-Controlled Double-Blind Study Examining the Effectiveness of an *Hypericum* Preparation in 105 Mildly Depressed Patients. **Journal of Geriatry Psychiatry and Neuropharmacology**, v. 1, p. 9-11, 1994.

SOSA, M.E.; TONN, C.E.; GIORDANO, O.S. Insect Antifeedant of Clerodane Diterpenoids. **Journal of Natural Products**, v.57, n. 9, p. 1262-1265, 1994.

SRIVASTAVA, S.; KUMAR, K. Juvenilizing Effects of Ethoxyprococene in a *Lepidopteran* Insect. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 37, p. 379-383, 1999 (*abstracts*).

STANISÇUASKI, F.; FERREIRA-DA-SILVA, C.T.; MULINARI, F.; PIRES-ALVES, M.; CARLINI, C.R. Insecticidal Effects of Canatoxin on the Cotton Stainer Bug *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera: Pyrrhocoridae). **Toxicon**, v. 45, p. 753-760, 2005.

SUZUKI, O.; KATSUMATA, Y.; OYA, M.; BLADT, S.; WAGNER, H. Inhibition of Monoamine oxidase by Hypericin. **Planta Medica**, v. 50, p. 272-274, 1984.

TADA, M.; CHIBA, K.; YAMADA, H.; MARUYAMA, H. Phloroglucinol Derivatives as Competitive Inhibitors Against Thromboxane A₂ and Leukotriene D₄ from *Hypericum erectum*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2559-2562, 1991.

TAYLOR, H.L.; BROOKER, R.M. The Isolation of Uliginosin A and Uliginosin B from *Hypericum uliginosum*. **Lloydia**, v. 32, p. 217-219, 1969.

TAYLOR, R.S.; MONANDHAR, N.P.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Antiviral Activities of Nepalese Medicinal Plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 157-163, 1996.

TRIFUNOVIC, S.; VAJS, V.; MACURA, S.; JURANIC, N.; DJARMATI, Z.; JANKOV, R.; MILOSAVLJEVIC, S. Oxidation Products of Hyperforin from *Hypericum perforatum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1305-1310, 1998.

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; BELLORO, E.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E. Furohyperforin, a Prenylated Phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 770, 1999.

VEROTTA, L. *Hypericum perforatum*, a Source of Neuroactive Lead Structures. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 187-201, 2003.

VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.; FENNER, R.; RATES, S.M.K. Antinociceptive Activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae), 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.; KUZE RATES, S.M. 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, n. 7, p. 1042-1052, 2005.

VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B. Plantas inseticidas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade, p. 739-754, 2003.

VORBACH, E.U.; HUBNER, W.D.; ARNOLDT, K. H. Effectiveness and Tolerance of the *Hypericum* Extracts L1 160 in Comparison with Imipramine: Randomized Double-Blind Study with 135 Outpatients. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neuropharmacology**, v. 1, p. 19-23, 1994.

WAGNER, H.; BLADT, S. Pharmaceutical quality of *Hypericum* extracts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 7, s.1, p. S65-S68, 1994.

WINKELMANN, K.; HEILMANN, J.; ZERBE, O.; RALI, T.; STICHER, O. New Phloroglucinol Derivates from *Hypericum papuanum*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 104-108, 2000.

WINKELMANN, K.; HEILMANN, J.; ZERBE, O.; RALI, T.; STICHER, O. New Prenylated bi and tricyclic Phloroglucinol Derivatives from *Hypericum papuanum*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 701-706, 2001.

WOLLENWEBER, E. Flavones and flavonols. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J. (Eds). **The flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, c. 4, p. 189-259, 1982.

YAMAKI, M.; MIWA, M.; ISHIGURO, K.; TAKAGI, S. Antimicrobial Activity of Naturally Occurring and Synthetic Phloroglucinol against *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 112-114, 1994.

YOUDIM, K. A.; McDONALD, J.; KALT, W.; JOSEPH, J. A. Potencial Role of Dietary Flavonoids in Reducing Microvascular Endothelium Vulnerability to Oxidative and Inflammatory Insults. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 282-288, 2002.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H.N.; JACOB, M.R.; PASCO, D.S.; WALKER, L.A.; CLARK, A.M. Natural Products Inhibiting *Candida albicans* Secreted Aspartatic Proteases from *Tovomita Krukovii*. **Planta Medica**, v. 58, p. 49-54, 2002.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com Atividade Inseticida: uma Alternativa para o Controle Químico de Insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

