

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

Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul

ANA PAULA MACHADO BERNARDI

PORTO ALEGRE, 2007.

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

Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul

Tese apresentada por **Ana Paula Machado Bernardi** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser

Co-orientador: Profa. Dr. Sandra Beatriz Rech

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 09/04/2007, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Alexandra Latini

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

B523a Bernardi, Ana Paula Machado

Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul / Ana Paula Machado Bernardi – Porto Alegre, UFRGS : 2007. - xxii, 342 p. il., gráf., tab.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Hypericum*. 2. Guttiferae. 3. Atividade antioxidante. 4. Compostos fenólicos. I. Von Poser, Gilsane Lino. II. Rech, Sandra Beatriz. III. Título.

CDU: 615.322:582.824

Bibliotecárias responsáveis:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira, CRB 10/480

Heloísa do Canto Canabarro, CRB 10/1036

*Descobri como é bom chegar quando se tem paciência,
e para chegar onde quer que seja,
aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão.*

É PRECISO, ANTES DE MAIS NADA, QUERER.

Amyr Klink

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que cruzaram e que ainda hão de cruzar em meu caminho.

À querida professora Dr. Gilsane Lino von Poser, pela amizade, confiança e orientação iniciados com a iniciação científica e fortalecidos com a pós-graduação.

À querida professora Dr. Sandra Beatriz Rech, igualmente pela amizade, orientação e dedicação no auxílio ao desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. Eduardo Lissi, pela oportunidade de desenvolvimento de parte deste trabalho no Departamento de Ciências Químicas da Facultad de Química y Biología da Universidad de Santiago de Chile, e Dr. Raquel Bridi, cujos conhecimentos dos mecanismos antioxidantes foram imprescindíveis para o entendimento dos resultados apresentados.

Ao querido botânico Dr. Sérgio Bordignon, pela identificação do material vegetal utilizado neste trabalho e, principalmente, pela alegria e bons momentos compartilhados na época das coletas.

À querida amiga Natasha Maurmann, pela sempre disponível ajuda nos experimentos de cultivo *in vitro*, e auxílio nas análises estatísticas.

Aos meus grandes amigos do coração Alexandre Ferraz, Carolina Nör e Daniela Albring, pela troca de conhecimentos, amizade e terapia em grupo realizada durante os momentos difíceis.

Às minhas amigas especiais e autênticas “gnosetes” Camila Sebben, Ana Cristina Fonseca e Liziane da Luz, pela alegria e descontração de sempre, cuja amizade iniciada na faculdade foi fortalecida pela iniciação científica.

Às queridas amigas e incansáveis ajudantes, Juliana Hass, Kênia Figueredo, e Jéssica Nunes, pelo auxílio dedicado para a realização dos experimentos.

À grande amiga Marga, pelos cuidados dedicados desde o meu nascimento, pela torcida ao meu sucesso e pelos ensinamentos cristãos e palavras de apoio durante os momentos de necessidade.

Aos meus amados padrinhos, tio Neri e tia Vanda, pela torcida de minhas conquistas e pelo orgulho sempre declarado.

À minha família chilena, Pedro, Nicole e Valentina, pelos dois meses de casa, comida e alegria, em Santiago do Chile, durante minha estadia para a realização dos experimentos, e pela confiança ao me permitirem fazer parte da família Molina.

Um agradecimento especial ao meu amor, Matias Molina, por acreditar que o amor é paciente e esperar o término dessa tese para que a distância não seja mais algo presente em nossas vidas e, principalmente, pela confiança e crédito sempre depositado em mim.

Finalmente, agradeço à minha família. Vó e mana, que acompanharam o meu desenvolvimento acadêmico de perto, sempre com orgulho de minhas conquistas e vitórias e suportando as alterações de humor provocadas por momentos difíceis. Tia Vera, pela dedicação e comidinhas gostosas sempre preparadas com muito amor. Pai e mãe, pelo amor dedicado ao longo do meu crescimento, pela oportunidade do ensino de qualidade, pelo incentivo ao estudo em uma universidade federal, e pelo respeito nas minhas decisões.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS.....	xiii
	LISTA DE TABELAS.....	xvii
	RESUMO.....	xix
	ABSTRACT.....	xxi
1	INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2	CAPÍTULO 1 – ANÁLISE FITOQUÍMICA DE <i>HYPERICUM TERNUM</i> A. ST. HIL. E <i>HYPERICUM MYRIANTHUM</i> CHAM. & SCHLTDL.....	7
2.1	INTRODUÇÃO.....	9
2.2	OBJETIVOS.....	10
2.3	REVISÃO.....	11
2.3.1	Generalidades sobre o gênero.....	11
2.3.2	Aspectos botânicos.....	12
2.3.2.1	Taxonomia.....	12
2.3.2.2	Morfologia.....	13
2.3.3	Aspectos químicos.....	13
2.3.3.1	Constituição química.....	14
2.3.3.1.1	Quinonas policíclicas.....	14
2.3.3.1.2	Xantonas.....	15
2.3.3.1.3	Benzofenonas.....	16
2.3.3.1.4	Benzopiranos.....	17
2.3.3.1.5	Derivados de floroglucinol.....	17
2.3.3.1.6	Flavonóides.....	18
2.3.3.1.7	Ácidos fenólicos.....	20
2.3.3.1.8	Taninos.....	20
2.3.3.1.9	Óleos voláteis.....	20
2.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
2.4.1	Material Vegetal.....	21
2.4.2	Preparação dos extratos.....	22
2.4.3	Análise cromatográfica.....	22
2.4.4	Isolamento e purificação.....	23
2.4.5	Identificação dos produtos.....	24

2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
2.5.1	Análise da constituição química de <i>Hypericum ternum</i> e de <i>Hypericum myrianthum</i>	25
2.5.1.1	Análise cromatográfica qualitativa das frações de <i>Hypericum ternum</i>	25
2.5.1.1.1	Partes aéreas.....	25
2.5.1.1.2	Raízes.....	26
2.5.1.2	Isolamento de compostos fenólicos de <i>Hypericum ternum</i>	26
2.5.1.3	Análise estrutural das substâncias isoladas.....	27
2.5.1.3.1	Substância HT1	27
2.5.1.3.2	Substância HT2.....	29
2.5.1.3.3	Substância HT3.....	30
2.5.1.3.4	Substância HT4.....	32
2.5.1.3.5	Substâncias HT5, HT6 e HT7.....	34
2.5.1.3.6	Substância HTR1.....	36
2.5.1.4	Análise cromatográfica qualitativa das frações de <i>Hypericum myrianthum</i>	41
2.5.1.4.1	Partes aéreas.....	41
2.5.1.4.2	Raízes.....	42
2.5.1.5	Isolamento de compostos fenólicos de <i>Hypericum myrianthum</i>	42
2.5.1.6	Análise estrutural das substâncias isoladas.....	42
2.5.1.6.1	Substância HM1.....	43
2.5.1.6.2	Substância HM2.....	44
2.5.1.6.3	Substância HMR1.....	44
2.5.1.6.4	Substância HMR2.....	45
2.6	CONCLUSÕES.....	47
3	CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE <i>HYPERICUM</i>	49
3.1	INTRODUÇÃO.....	51
3.2	OBJETIVOS	52
3.3	REVISÃO.....	52
3.3.1	Mecanismos antioxidantes.....	52
3.3.2	Antioxidantes de origem natural.....	54
3.3.3	Compostos fenólicos.....	55

3.3.4	Atividade antioxidante de espécies de <i>Hypericum</i>	57
3.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	69
3.4.1	Preparação dos extratos.....	70
3.4.2	Obtenção de substâncias purificadas.....	70
3.4.3	Determinação de fenóis totais.....	71
3.4.4	Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP).....	72
3.4.5	Avaliação da capacidade de reação com radicais peroxila (ORAC-PGV).....	74
3.4.6	Avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH*).....	75
3.4.6.1	Ensaio bioautográfico.....	75
3.4.6.2	Ensaio espectrofotométrico.....	76
3.4.7	Análise estatística dos resultados.....	76
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
3.5.1	Rendimento dos extratos.....	77
3.5.2	Determinação de fenóis totais.....	77
3.5.3	Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP).....	80
3.5.4	Avaliação da capacidade de reação com radicais peroxila (ORAC-PGV).....	85
3.5.5	Avaliação da capacidade de reação com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH*).....	89
3.5.6	Avaliação da correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante.....	104
3.6	CONCLUSÕES.....	105
4	CAPÍTULO 3 – CULTURA <i>IN VITRO</i> DE CÉLULAS E TECIDOS DE ESPÉCIES DE <i>HYPERICUM</i> NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL.....	109
4.1	INTRODUÇÃO.....	111
4.2	OBJETIVOS.....	111
4.3	REVISÃO.....	112
4.3.1	Cultura <i>in vitro</i>	112
4.3.2	Regeneração e propagação de espécies do gênero <i>Hypericum</i>	115
4.3.3	Produção de metabólitos secundários por células ou tecidos de espécies de <i>Hypericum</i> cultivadas <i>in vitro</i>	118
4.3.3.1	Quinonas policíclicas.....	119
4.3.3.2	Xantonas.....	122
4.3.3.3	Flavonóides	124
4.3.3.4	Floroglucínóis.....	126

4.3.3.5	Outros metabólitos secundários.....	127
4.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	128
4.4.1	Procedimentos gerais.....	128
4.4.2	Material vegetal.....	129
4.4.3	Estabelecimento do cultivo <i>in vitro</i>	129
4.4.3.1	Seleção e preparação dos explantes.....	129
4.4.3.2	Composição dos meios de cultura.....	130
4.4.3.3	Indução da regeneração <i>in vitro</i> de segmentos apicais.....	131
4.4.3.4	Avaliação da concentração de sais do meio de cultivo.....	132
4.4.3.4.1	Estudo da cinética de crescimento <i>in vitro</i> de <i>Hypericum polyanthemum</i>	132
4.4.3.5	Aclimação das plântulas.....	132
4.4.3.5.1	Estudo da ontogenia de <i>Hypericum polyanthemum</i> aclimatizada.....	133
4.4.3.6	Indução e estabelecimento de culturas de calos.....	134
4.4.3.7	Análise de crescimento dos calos.....	135
4.4.4	Análise fitoquímica do material vegetal obtido por cultivo <i>in vitro</i>	135
4.4.4.1	Análise cromatográfica.....	135
4.4.4.2	Avaliação da presença de taninos.....	136
4.4.4.3	Análise química das raízes de <i>Hypericum campestre</i> e <i>Hypericum polyanthemum</i> micropropagadas.....	136
4.4.4.3.1	Análise cromatográfica.....	136
4.4.4.3.2	Análise espectroscópica.....	137
4.4.4.4	Análise estatística dos resultados.....	137
4.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	137
4.5.1	Regeneração <i>in vitro</i> de espécies de <i>Hypericum</i>	137
4.5.2	Avaliação da concentração de sais do meio de cultivo no desenvolvimento <i>in vitro</i> de espécies de <i>Hypericum</i>	143
4.5.3	Estudo da cinética de crescimento <i>in vitro</i> de <i>Hypericum polyanthemum</i>	147
4.5.4	Aclimação das plântulas.....	148
4.5.4.1	Estudo da ontogenia de <i>Hypericum polyanthemum</i> aclimatizada.....	152
4.5.5	Indução e estabelecimento das culturas de calos.....	154
4.5.6	Análise fitoquímica do material vegetal obtido por cultivo <i>in vitro</i>	159

4.5.6.1	Análise cromatográfica e caracterização de substâncias tanantes.....	160
4.5.6.2	Análise das raízes de <i>Hypericum campestre</i> e <i>Hypericum polyanthemum</i> micropropagadas.....	162
4.6	CONCLUSÕES.....	165
5	CAPÍTULO 4 – DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE BENZOPIRANOS EM EXTRATO <i>n</i>-HEXANO DE <i>HYPERICUM POLYANTHEMUM</i>.....	169
5.1	INTRODUÇÃO.....	171
5.2	OBJETIVOS.....	171
5.3	REVISÃO.....	172
5.3.1	Validação de metodologia analítica.....	172
5.3.2	Benzopiranos.....	174
5.4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	176
5.4.1	Material vegetal.....	176
5.4.2	Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de benzopiranos em extrato <i>n</i> -hexano de <i>Hypericum polyanthemum</i>	177
5.4.2.1	Preparação da solução extrativa.....	177
5.4.2.2	Condições cromatográficas.....	177
5.4.2.3	Validação do método de doseamento de benzopiranos por CLAE.....	178
5.4.2.3.1	Avaliação da linearidade.....	178
5.4.2.3.1.1	Curva padrão dos benzopiranos.....	178
5.4.2.3.2	Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	179
5.4.2.3.3	Teste de Repetibilidade.....	179
5.4.2.3.4	Teste de Precisão intermediária.....	180
5.4.2.3.5	Teste de recuperação.....	180
5.4.3	Quantificação de benzopiranos em diferentes órgãos de <i>Hypericum polyanthemum in natura</i> , micropropagada e aclimatizada.....	181
5.4.4	Análise estatística dos resultados.....	181
5.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	181
5.5.1	Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de benzopiranos em extrato <i>n</i> -hexano de <i>Hypericum polyanthemum</i>	181
5.5.2	Quantificação de benzopiranos em diferentes órgãos de <i>Hypericum polyanthemum in natura</i> , micropropagada e aclimatizada.....	189
5.5.2.1	<i>Hypericum polyanthemum in natura</i>	190
5.5.2.2	<i>Hypericum polyanthemum</i> micropropagada.....	192
5.5.2.2.1	Avaliação da influência da concentração de sais do meio de cultivo	

	na produção de benzopiranos.....	193
5.5.2.2.2	Estudo da cinética de produção de benzopiranos <i>in vitro</i>	194
5.5.2.3	<i>Hypericum polyanthemum</i> aclimatizada.....	195
5.5.2.3.1	Estudo da ontogenia de <i>Hypericum polyanthemum</i> aclimatizada.....	196
5.6	CONCLUSÕES.....	206
6	DISCUSSÃO GERAL.....	209
7	CONCLUSÕES GERAIS.....	215
8	REFERÊNCIAS.....	219
9	ANEXOS.....	245
10	BIOGRAFIA.....	339

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Teor de compostos fenólicos, expresso em miligramas de quercetina por grama de extrato seco (EQ/g) em extratos e frações de espécies de <i>Hypericum</i>	78
Figura 2.2: Intensidade de quimioluminescência, medida após adição de concentrações crescentes dos extratos brutos metanólicos de espécies de <i>Hypericum</i> e quercetina.....	81
Figura 2.3: (A) Efeito na intensidade de quimioluminescência, promovido por extratos brutos metanólicos de espécies de <i>Hypericum</i> e quercetina; (B) Percentual de inibição da quimioluminescência, no tempo de 900 s.....	83
Figura 2.4: (A) Efeito na intensidade de quimioluminescência, promovido por carifenona A, carifenona B, quercetina e trolox. (B) Percentual de inibição da quimioluminescência, no tempo de 700 s.....	84
Figura 2.5: Consumo de PGV, na ausência (controle) e presença de trolox, quercetina e dos flavonóides guaijaverina, hiperosídeo e isoquercitrina.....	87
Figura 2.6: Consumo de PGV, na ausência (controle) e presença dos extratos brutos metanólicos de espécies de <i>Hypericum</i>	88
Figura 2.7: Consumo do radical DPPH [•] , por extratos brutos metanólicos e frações metanólicas e <i>n</i> -hexânicas de <i>H. carinatum</i> e <i>H. caprifoliatum</i> , respectivamente.....	92
Figura 2.8: Consumo do radical DPPH [•] por extratos brutos metanólicos e frações metanólicas e <i>n</i> -hexânicas de <i>H. myrianthum</i> e <i>H. polyanthemum</i> , respectivamente.....	93
Figura 2.9: Consumo do radical DPPH [•] pelos flavonóides guaijaverina, hiperosídeo, isoquercitrina e 3-metil quercetina.....	94
Figura 2.10: Consumo do radical DPPH [•] pelos derivados de floroglucinol hiperbrasílo B, japonicina A, e uliginosina B e benzofenonas carifenona A e carifenona B.....	95
Figura 2.11: Comparação entre consumo do radical DPPH [•] (consumo total, consumo aos 50 s e consumo aos 600 s) para os diferentes extratos das espécies de <i>Hypericum</i>	97
Figura 2.12: Comparação entre consumo do radical DPPH [•] (consumo total, consumo aos 50 s e consumo aos 600 s) para os extratos bruto MeOH e frações <i>n</i> -hexano e MeOH das espécies de <i>Hypericum</i>	98
Figura 2.13: Comparação entre consumo do radical DPPH [•] (consumo total, consumo aos 50 s e consumo aos 600 s) para as substâncias isoladas.....	99
Figura 2.14: Percentual de consumo total do radical DPPH [•] por quercetina.....	101
Figura 3.1: <i>H. ternum</i> micropropagada em meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento.....	139
Figura 3.2: <i>H. carinatum</i> , <i>H. myrianthum</i> e <i>H. polyanthemum</i> micropropagadas em meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento.....	140
Figura 3.3: <i>H. campestre</i> micropropagada em meio M Δ suplementado com 0,2 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D e em meio M Δ , sem adição de reguladores de crescimento.....	141
Figura 3.4: Aspecto das raízes de plântulas de <i>H. campestre</i> e <i>H.</i>	

<i>polyanthemum</i> , cultivadas em meio M Δ e em meio MS 25% e M Δ , mantidas no mesmo meio de cultura por de três meses.....	143
Figura 3.5: Análise de crescimento de espécies de <i>Hypericum</i> micropropagadas em meios MS 25%, MS 100% e M Δ	145
Figura 3.6: Análise de crescimento de <i>H. polyanthemum</i> micropropagada em meio M Δ , durante o período de 6 a 14 semanas.....	147
Figura 3.7: <i>H. ternum</i> aclimatizada, após 6 semanas de crescimento em sala climatizada.....	149
Figura 3.8: <i>H. carinatum</i> aclimatizada, após 8 semanas de cultivo a campo.....	149
Figura 3.9: <i>H. campestre</i> aclimatizada, após 8 semanas de cultivo a campo.....	149
Figura 3.10: <i>H. caprifoliatum</i> aclimatizada, após 6 semanas de crescimento em sala climatizada.....	150
Figura 3.11: <i>H. myrianthum</i> aclimatizada, após um ano de transferência <i>ex-vitro</i>	150
Figura 3.12: <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada, após 6 semanas de crescimento em sala climatizada e 16 semanas de cultivo em campo.....	150
Figura 3.13: Análise da produção de biomassa de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada durante o período de 18 semanas, considerando o tempo de manutenção, antes da transferência para condição <i>ex vitro</i>	151
Figura 3.14: Proporção de partes aéreas, botões florais, flores e frutos em <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada, durante o período de 14 a 22 semanas.....	152
Figura 3.15: Diferentes estágios de ontogênese floral de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada.....	153
Figura 3.16: Análise do peso fresco e peso seco das diferentes partes reprodutivas de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada.....	153
Figura 3.17: Análise de crescimento dos calos de <i>H. myrianthum</i> em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN; 2,4-D/BAP e 2,4-D/CIN/ANA, representado através do índice de crescimento.....	155
Figura 3.18: Análise de crescimento dos calos de <i>H. polyanthemum</i> em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN; 2,4-D/BAP e 2,4-D/CIN/ANA, representado através do índice de crescimento.....	156
Figura 3.19: Aspecto dos calos de <i>H. polyanthemum</i> cultivados em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN; 2,4-D/BAP e 2,4-D/CIN/ANA, sob fotoperíodo de 16 h.....	157
Figura 3.20: Aspecto dos calos de <i>H. ternum</i> cultivados em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN.....	157
Figura 3.21: Espectro de absorção na região do UV do extrato das raízes de <i>H. polyanthemum</i> e da amostra purificada.....	164
Figura 4.1: Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato <i>n</i> -hexano das flores de <i>H. polyanthemum in natura</i> e dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3.....	182
Figura 4.2: Curvas padrão de HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C), obtidas por CLAE.....	185
Figura 4.3: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato <i>n</i> -hexano de diferentes órgãos de <i>H. polyanthemum in natura</i> , em diferentes épocas de coleta.....	191
Figura 4.4: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato <i>n</i> -hexano de plântulas de <i>H. polyanthemum</i> micropropagado em diferentes meios de cultura...	193
Figura 4.5: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato <i>n</i> -hexano de plântulas de <i>H. polyanthemum</i> cultivadas em meio M Δ , em diferentes estágios	

de desenvolvimento.....	195
Figura 4.6: Teor de benzopiranos HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C) em extrato <i>n</i> -hexano de flores totais e partes aéreas de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada em diferentes épocas de desenvolvimento.....	197
Figura 4.7: Teor de benzopiranos totais em extrato <i>n</i> -hexano de partes aéreas (A) e flores totais (B) de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada em diferentes épocas de desenvolvimento.....	199
Figura 4.8: Teor de benzopiranos HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C) em extrato <i>n</i> -hexano de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada em diferentes estágios de desenvolvimento reprodutivo.....	200
Figura 4.9: Teor de benzopiranos totais em extrato <i>n</i> -hexano de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada em diferentes estágios reprodutivos.....	201
Figura 4.10: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato <i>n</i> -hexano de flores totais e partes aéreas de <i>H. polyanthemum</i> com 18 semanas de aclimatização, considerando o período de cultivo <i>in vitro</i>	205

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1a: Valores máximos de absorção no UV da substância HT1.....	287
Tabela 1.1b: Valores máximos de absorção no UV da substância HT2.....	288
Tabela 1.1c: Valores máximos de absorção no UV da substância HT3.....	289
Tabela 1.1d: Valores máximos de absorção no UV da substância HT5.....	290
Tabela 1.1e: Valores máximos de absorção no UV da substância HT6.....	291
Tabela 1.1f: Valores máximos de absorção no UV da substância HT7.....	292
Tabela 1.1g: Valores máximos de absorção no UV da substância HM1.....	293
Tabela 1.2: Dados de RMN de ¹³ C dos compostos HT1, HT2, HT5, HT6 e HT7.....	294
Tabela 1.3: Dados de RMN de ¹ H dos compostos HT1, HT2, HT5, HT6 e HT7.....	295
Tabela 1.4: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H do composto HT3.....	296
Tabela 1.5: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H do composto HT4.....	296
Tabela 1.6: Contantes de acoplamento do H1' anomérico.....	35
Tabela 1.7: Dados de RMN de ¹ H do composto HTR1 e das substâncias estruturalmente relacionadas isouliginosina B, drumondina C e hiperbrasilol B.....	297
Tabela 1.8: Dados de RMN de ¹³ C do composto HTR1, isolado e das substâncias estruturalmente relacionadas isouliginosina B, drumondina C e hiperbrasilol B.....	298
Tabela 1.9: Dados de RMN de ¹³ C e de ¹ H do composto HMR2.....	299
Tabela 2.1: Dados sobre a coleta do material vegetal e registro em herbário.....	70
Tabela 2.2: Rendimento em porcentagem das frações <i>n</i> -hexânica, diclorometânica e metanólica das espécies de <i>Hypericum</i>	77
Tabela 2.3: Valores de absorvância obtidos para quercetina nas soluções padrão, analisadas por espectrofotometria no UV.....	78
Tabela 2.4: Índices ORAC-PGV, expresso em µMol de Trolox/g de extrato seco (ET/g), obtidos para extratos brutos metanólicos das espécies de <i>Hypericum</i> avaliadas através do ensaio com PGV.....	86
Tabela 3.1: Dados sobre a coleta do material vegetal e registro em herbário.....	129
Tabela 3.2: Composição dos meios de cultura MS e MΔ.....	131
Tabela 3.3: Meios de cultura utilizados para indução de calogênese das espécies de <i>Hypericum</i>	134
Tabela 3.4: Indução da regeneração <i>in vitro</i> de segmentos apicais de espécies de <i>Hypericum</i> em meio MΔ suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento.....	138
Tabela 3.5: Análise da calogênese de <i>H. polyanthemum</i>	156
Tabela 4.1: Áreas dos picos de HP1 nas soluções padrão analisadas por CLAE..	183
Tabela 4.2: Áreas dos picos de HP2 nas soluções padrão analisadas por CLAE..	183
Tabela 4.3: Áreas dos picos de HP3 nas soluções padrão analisadas por CLAE..	184
Tabela 4.4: Valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos para os benzopiranos HP1, HP2 e HP3.....	186

Tabela 4.5: Teores de HP1, em solução extrativa de <i>H. polyanthemum</i> , analisadas por CLAE, nos testes para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.....	187
Tabela 4.6: Teores de HP2, em solução extrativa de <i>H. polyanthemum</i> , analisadas por CLAE, nos testes para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.....	187
Tabela 4.7: Teores de HP3, em solução extrativa de <i>H. polyanthemum</i> , analisadas por CLAE, nos testes para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.....	188
Tabela 4.8: Valores dos percentuais de recuperação de HP1, HP2 e HP3, em solução extrativa de <i>H. polyanthemum</i>	188
Tabela 4.9: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato <i>n</i> -hexano de plântulas de <i>H. polyanthemum</i> micropropagada subdivididas em folhas, ramos e raízes.....	192
Tabela 4.10: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato <i>n</i> -hexano de <i>H. polyanthemum</i> aclimatizada subdivididas em folhas, ramos e raízes.....	196

RESUMO

Aproximadamente vinte espécies do gênero *Hypericum* (Guttiferae) têm ocorrência natural no Brasil, e concentram-se principalmente na região Sul do País. Considerando a importância deste gênero como fonte de substâncias com variadas atividades biológicas, tais como analgésica, antidepressiva, antimicrobiana, antiviral, antiproliferativa, entre outras, o presente trabalho teve como objetivos analisar a constituição química e o potencial antioxidante de espécies de *Hypericum*, desenvolver protocolos para manutenção de algumas espécies nativas através de culturas de tecidos e células e validar metodologia para quantificação de benzopiranos em *H. polyanthemum* proveniente de cultivo a campo, *in vitro* e aclimatizado. Utilizando-se métodos cromatográficos e espectroscópicos, foram isolados e identificados o ácido fenólico ácido 5-O-cafeoil-1-metoxi-quínico e os flavonóides 3,7-dimetil-quercetina, 3-O-metil-quercetina, 13,118-biapigenina, guaijaverina, isoquercitrina e hiperosídeo, todos derivados da quercetina e obtidos da fração acetato de etila das partes aéreas de *H. ternum*. Ainda desta espécie, porém da fração *n*-hexano das raízes, obteve-se o derivado de floroglucinol uliginosina B. De *H. myrianthum* foram isolados e identificados os flavonóides quercetina e hiperosídeo, da fração metanólica das partes aéreas, bem como os derivados de floroglucinol japonicina A e uliginosina B, fração *n*-hexano das raízes. Através do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, foram quantificados os teores de fenólicos totais das espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, verificando-se teores variando entre 37,40 a 228,36 mg EQ/g de extrato seco. Utilizando as técnicas de TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*), ORAC-PGV (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e reação bioautográfica e espectrofotométrica com radicais DPPH* (2,2 difenil-1-picril-hidrazil) evidenciou-se que extratos brutos metanólicos, e frações metanólicas e *n*-hexânicas das espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, bem como produtos isolados de espécies de *Hypericum* nativas do Estado apresentam potencial antioxidante. A regeneração *in vitro* foi obtida em meio Murashige & Skoog modificado (M Δ) para as espécies *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum* utilizando diferentes combinações e concentrações dos reguladores de crescimento 6-benzilamino-purina (BAP), ácido

naftaleno-acético (ANA) e ácido 2,4 dicloro-fenóxi-acético (2,4-D). Plântulas dessas espécies foram posteriormente aclimatizadas com sucesso, sendo cultivadas a campo. As espécies micropropagadas demonstraram perfis químicos qualitativamente similares aos apresentados pelas plantas desenvolvidas no campo, de modo que o cultivo *in vitro* apresenta-se como uma alternativa interessante aos métodos convencionais de produção de biomassa para extração de metabólitos secundários bioativos. Culturas de calos foram estabelecidas em meio M Δ para *H. myrianthum*, *H. polyanthum* e *H. ternum*, utilizando diferentes combinações e concentrações dos reguladores de crescimento cinetina (CIN), BAP, ANA e 2,4-D. Considerando-se as importantes atividades biológicas de produtos obtidos de *H. polyanthum* foi estabelecida uma metodologia para quantificação, através da técnica de CLAE, de benzopiranos no extrato apolar desta planta, espécie de ocorrência restrita. A validação analítica foi avaliada conforme o preconizado por normas reconhecidas internacionalmente, com análise dos parâmetros linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação, demonstrando resultados coerentes com os exigidos pela legislação vigente. Foram evidenciadas variações no teor de benzopiranos na planta micropropagada, aclimatizada e desenvolvida a campo, provavelmente devido a fatores, que vão desde a regulação endógena de processos fisiológicos até variações sazonais no cultivo.

Palavras-chaves: *Hypericum*, compostos fenólicos, atividade antioxidante, cultivo *in vitro*, aclimatização, benzopiranos.

ABSTRACT

Chemical analysis, evaluation of the antioxidant activity and development of *in vitro* cultures of *Hypericum* species native of Rio Grande do Sul.

Approximately twenty species of *Hypericum* genus (Guttiferae) are native of Brazil, occurring mainly in the South region. Considering the importance of the genus as a source of compounds with different biological activities, such as analgesic, antidepressant, antimicrobial, antiviral, antiproliferative, among others, the objectives of this work were to evaluate the phytochemistry and antioxidant potential of some *Hypericum* species, to develop protocols for the maintenance of the species through *in vitro* cultures and to validate a technique to quantify the benzopyrans in *H. polyanthemum* grown in field, *in vitro* and acclimatized plants. Chromatographic and spectroscopic techniques were used for the isolation and identification of the phenolic acid 5-O-caffeoyl-1-methyl ester-quinic acid and the flavonoids quercetin 3,7-dimethyl ether, quercetin 3-methyl ether, 13,118-biapigenin, guaijaverin, isoquercitrin and hyperoside, all of them quercetin derivatives and obtained from ethyl acetate fraction of *H. ternum* aerial parts. From *n*-hexane fraction of the roots of this species the phloroglucinol derivative uliginosin B was obtained. The flavonoids quercetin and hyperoside (from aerial parts of methanolic fraction), and the phloroglucinol derivatives japonicin A and uliginosin B (from *n*-hexane fraction of roots) were isolated from *H. myrianthum*. Total phenol concentration ranging from 37.40 to 228.36 mg QE/g dry extract (Folin–Ciocalteu colorimetric method) in *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* and *H. polyanthemum* was measured. The antioxidant potential of the extracts obtained from *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* and *H. polyanthemum* and isolated compounds was determined using TRAP (Total Radical-trapping Antioxidant Parameter), ORAC-PGR (Oxygen Radical Absorbance Capacity) and bioautographic and spectrophotometric reaction with DPPH^{*} (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical techniques). *In vitro* regeneration of *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* and *H. ternum* was obtained in Murashige & Skoog modified medium (M Δ) supplemented with different combinations and concentrations of the growth regulators 6-benzylaminopurine (BAP), α -naphthalene-

acetic acid (ANA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Plantlets were acclimatized and transferred to open field. The micropropagated species showed chemical pattern qualitatively similar to field grown plants, demonstrating that the *in vitro* cultures are an alternative to conventional methods for biomass production of bioactive secondary metabolites. Callus cultures of *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* and *H. ternum* were established in M Δ medium using different combinations and concentrations of kinetin (CIN), BAP, ANA and 2,4-D. Considering the important biological activities of the benzopyrans isolated from *H. polyanthemum*, an HPLC quantification methodology was established. Analytical validation was performed according to international rules (linearity, selectivity, precision, accuracy, detection and quantitation limits) showing results coherent with those required by the current legislation. Variation of the benzopyrans concentration was observed among the micropropagated plantlet, acclimatized and field grown plants, probably due to factors as endogenous regulation of physiological process and seasonal variation of the culture.

Key-words: *Hypericum*, phenolic compounds, antioxidant activity, *in vitro* culture, acclimatization, benzopyrans.

1. INTRODUÇÃO GERAL

Estudos científicos na área de produtos naturais vêm sendo desenvolvidos há séculos. No entanto, apesar do considerável volume de pesquisas existentes na identificação de produtos de origem vegetal, esta área permanece com seu potencial parcialmente explorado. Apenas uma pequena parcela das espécies vegetais estimadas mundialmente foi investigada quanto a sua constituição química e uma fração ainda menor submetida a estudos biológicos (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991; VERPOORTE, 1998; BALUNAS & KINGHORN, 2005; JONE *et al.*, 2006).

Muitos pesquisadores têm direcionado seus estudos para espécies nativas do Brasil, com a perspectiva de encontrar propriedades semelhantes às de plantas exóticas do mesmo gênero já utilizadas na terapêutica. Dentro deste contexto, pesquisas envolvendo espécies do gênero *Hypericum* têm sido desenvolvidas, uma vez que, no mercado farmacêutico atual, preparações a base de *Hypericum perforatum* vêm sendo responsáveis por uma parcela significativa das vendas de fitoterápicos em todo o mundo (BILIA *et al.*, 2002; LAWVERE & MAHONEY, 2005).

Aproximadamente vinte espécies deste gênero têm ocorrência natural no Brasil, e concentram-se principalmente na Região Sul do país (ROBSON, 1990). Algumas das espécies nativas do Rio Grande do Sul foram avaliadas quanto à constituição química, verificando-se a produção de compostos fenólicos, tais como xantonas (ROCHA *et al.*, 1994), benzofenonas (BERNARDI *et al.*, 2005), benzopiranos (FERRAZ *et al.*, 2001), floroglucínóis (ROCHA *et al.*, 1995; FERRAZ *et al.*, 2002a; NÖR *et al.*, 2004), flavonóides e taninos (DALL'AGNOL *et al.*, 2003), bem como ausência de hipericina e derivados (FERRAZ *et al.*, 2002b), consideradas juntamente com hiperforina, as substâncias marcadoras químicas de *Hypericum perforatum* (BILIA *et al.*, 2002; LAWVERE & MAHONEY, 2005).

Além disso, algumas propriedades farmacológicas vêm sendo reveladas por estudos biológicos. Dentre essas destacam-se os benzopiranos de *H. polyanthemum*, para os quais foi demonstrado ação antiproliferativa (FERRAZ *et al.*, 2005c), citotóxica frente às células envolvidas no processo de angiogênese (NÖR, 2006) e antimicrobiana

(DALL'AGNOL *et al.*, 2005), além da atividade inibitória da monoamino oxidase (IMAO) inicialmente investigada (GNERRE *et al.*, 2001). Dentre os derivados de floroglucinol isolados, uliginosina B de *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a), *H. carinatum* e *H. polyanthemum* (NÖR *et al.*, 2004) apresentou atividade antimicrobiana (DALL'AGNOL *et al.*, 2005); hiperbrasilol B, presente em *H. caprifoliatum*, *H. connatum* (NÖR *et al.*, 2004) e *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995), assim como japonicina A, isolada de *H. myrianthum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2005), também possuem ação antimicrobiana (ROCHA *et al.*, 1995; DALL'AGNOL *et al.*, 2005). Além dos produtos isolados, muitos extratos e frações vêm apresentando atividades interessantes, como antidepressiva (DAUT *et al.*, 2000; VIANA *et al.*, 2005) antiviral (SCHMITT *et al.*, 2001; FRITZ *et al.*, 2006), analgésica (VIANA *et al.*, 2003), antifúngica (FENNER *et al.*, 2005) e antiproliferativa (FERRAZ *et al.*, 2005b), de modo que a continuidade nos estudos, tanto químicos quanto biológicos, dessas espécies de *Hypericum* torna-se necessária.

Recentemente, muitos trabalhos têm avaliado os efeitos benéficos de compostos fenólicos como antioxidantes naturais, contribuindo para a captura de radicais livres (ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; ŠKERGET *et al.*, 2005; KATALINIC *et al.*, 2006). Uma vez que o gênero *Hypericum* apresenta abundância nessa classe de substâncias, é interessante também avaliar o potencial antioxidante das espécies nativas, bem como dos produtos isolados das mesmas.

Apesar do considerável número de trabalhos envolvendo avaliação química e farmacológica das espécies nativas, dentre as espécies brasileiras verificou-se cultivo *in vitro* apenas para *Hypericum brasiliense* (CARDOSO & DE OLIVEIRA, 1996), planta a partir da qual foram isoladas xantonas com atividade antifúngica e IMAO (ROCHA *et al.*, 1994), e floroglucinóis com atividade antimicrobiana (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996).

A crescente demanda pela utilização de plantas na cura ou prevenção de doenças, bem como a exploração das mesmas visando a obtenção de substâncias de interesse, tem resultado em uma intensa exploração da flora nativa, o que pode levar a

reduções das populações naturais dessas espécies, colocando-as em risco de extinção. O extrativismo vegetal resulta no desaparecimento de germoplasmas ainda não estudados, o que pode significar a perda de componentes químicos interessantes que poderiam tornar-se novos fármacos (FRANÇA, 2003). Desta forma, é relevante o desenvolvimento de métodos que possibilitem a propagação de plantas, bem como o melhoramento e conservação das mesmas. O cultivo *in vitro* dessas espécies nativas aparece então como uma opção para a obtenção de matéria-prima de interesse farmacêutico e redução do extrativismo predatório.

Considerando a importância do gênero *Hypericum* como fonte de substâncias com diferentes atividades biológicas, a variedade de compostos fenólicos verificados nas espécies nativas do Rio Grande do Sul, bem como a possibilidade de conservação, propagação de espécies e produção de metabólitos secundários através do cultivo *in vitro*, o presente trabalho tem como objetivos gerais analisar a constituição química e o potencial antioxidante de espécies de *Hypericum*, assim como a possibilidade de manutenção de algumas espécies nativas através de culturas de tecidos e células.

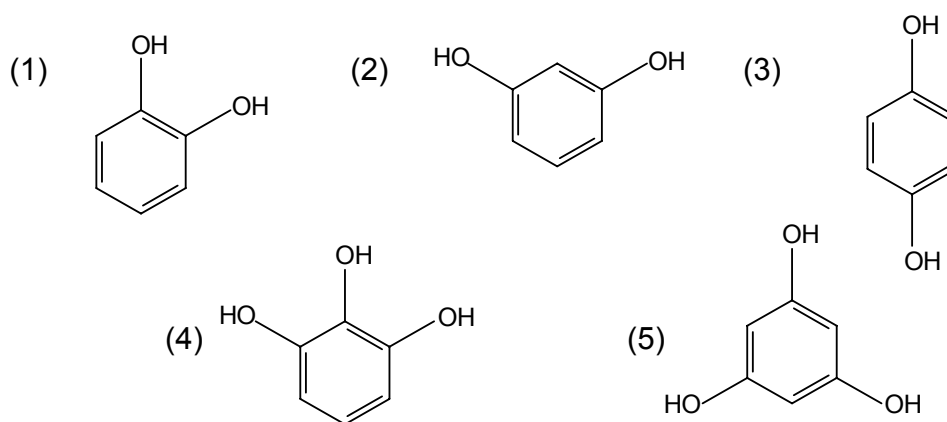
Visando um ordenamento dos assuntos abordados, este trabalho encontra-se dividido em 4 capítulos. O primeiro contém dados sobre a avaliação química de *H. ternum* A. St. Hil e de *H. myrianthum* Cham. & Schltdl. No segundo capítulo é abordada a avaliação do potencial antioxidante de extratos e compostos fenólicos isolados das espécies nativas. O terceiro capítulo trata do desenvolvimento de protocolos para estabelecimento do cultivo *in vitro* das espécies *H. campestre* Cham. & Schltdl., *H. caprifoliatum* Cham. & Schltdl., *H. carinatum* Griseb., *H. myrianthum* Cham. & Schltdl., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *H. ternum* A. St. Hil. No quarto capítulo encontram-se descritas a validação de metodologia para quantificação de benzopiranos em *H. polyanthemum* por CLAE, bem como a análise dos teores dessas substâncias em plantas proveniente de diferentes cultivos.

2. CAPÍTULO 1

**ANÁLISE FITOQUÍMICA DE *HYPERICUM TERNUM* A. ST. HIL. E
HYPERICUM MYRIANTHUM CHAM. & SCHLTDL.**

2.1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos pertencem a um grupo de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas. O termo fenólico pode ser definido quimicamente como uma estrutura que possui pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogênio encontra-se substituído por um grupamento hidroxila, incluindo funções derivadas, como éster, metiléter, glicosídeos, entre outros. No entanto, uma definição puramente química de fenóis como metabólitos secundários de plantas não é totalmente satisfatória, sendo necessário considerar a origem biossintética para a classificação dessas substâncias. Cada classe de composto apresenta ampla variação estrutural, principalmente pela presença de diferentes substituintes em um esqueleto aromático comum. Muitas classes de polifenóis encontrados na natureza apresentam-se como derivados dos grupos catecol (1), resorcinol (2), hidroquinona (3), pirogalol (4) ou floroglucinol (5) (HARBORNE, 1989; CARVALHO *et al.*, 2003; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005).



No gênero *Hypericum*, essa diversidade de estruturas fenólicas é ilustrada pela grande maioria de metabólitos secundários produzidos por plantas desse grupo. A ocorrência desse tipo de substância em *Hypericum* abrange desde compostos fenólicos amplamente distribuídos, como os derivados de ácidos cinâmicos, flavonóides e taninos, como também compostos fenólicos de distribuição restrita, como naftodiantronas, xantonas, derivados de floroglucinol, sendo também encontrados, mais recentemente, benzopiranos e benzofenonas.

Em função das promissoras propriedades biológicas que essas substâncias vêm demonstrando, o gênero *Hypericum* tem sido alvo de muitas pesquisas, direcionadas para o estudo fitoquímico e farmacológico de muitas de suas espécies.

Dentre as espécies ainda pouco trabalhadas, destaca-se *Hypericum ternum* A. St. Hil., um sub-arbusto nativo do Rio Grande do Sul. Esta planta foi avaliada, juntamente com outras espécies do gênero, quanto à constituição química de seu óleo volátil (FERRAZ *et al.*, 2005a) e quanto ao teor de substâncias tanantes (DALL'AGOL *et al.*, 2003). Estudos biológicos detectaram atividades antifúngica (FENNER *et al.*, 2004) e antiproliferativa (FERRAZ *et al.*, 2005b) para as frações apolares dessa espécie. No entanto, não há estudos envolvendo uma avaliação mais detalhada da sua composição química. Em função disso evidencia-se o interesse em analisar a constituição química dessa espécie.

Hypericum myrianthum Cham. & Schltldl., outra espécie nativa, é uma planta sub-arbustiva bastante ramificada desde a base. Seu nome faz referência às inflorescências terminais multifloras, sendo proveniente do grego *myrios* (inúmeros) e *anthos* (flor) (JIMÉNEZ, 1980; ROBSON, 1990). Desta espécie foram obtidos os derivados de floroglucinol uliginosina B (FERRAZ *et al.*, 2002a) e japonicina A (DALL'AGNOL *et al.*, 2005), que em estudos bioautográficos apresentaram atividade antimicrobiana (DALL'AGNOL *et al.*, 2005). No entanto, apesar de *H. myrianthum* já ter sido investigada quimicamente, essa espécie ainda demonstra a presença de compostos fenólicos minoritários na fração apolar, bem como apenas trabalhos preliminares avaliando sua composição química polar, o que motiva o estudo dessa planta.

2.2 OBJETIVOS

Caracterização, isolamento, purificação e elucidação estrutural de substâncias fenólicas presentes nos extratos apolares e polares das partes aéreas e raízes de *Hypericum ternum* A. St. Hil. e *Hypericum myrianthum* Cham. & Schltldl.

2.3 REVISÃO

2.3.1 Generalidades sobre o gênero

O nome *Hypericum* deriva de duas palavras de origem grega, *hyper* que significa “sobre”, e *eikon* traduzida como “imagem”, referindo-se às plantas colocadas pelos gregos, em épocas remotas, sobre suas figuras religiosas para espantar espíritos malignos e proteger contra possessões demoníacas (ROBSON, 1977).

A espécie *H. perforatum* L. era conhecida, na antiguidade, como uma planta com propriedades sobrenaturais, sendo posteriormente atribuídas a ela propriedades medicinais (HOBBS, 1990). O nome *perforatum* deriva do latim, baseado na aparência perfurada das folhas quando estas são visualizadas contra a luz, em função da presença de glândulas translúcidas. Acredita-se que o nome popular dado a esta espécie, erva-de-São-João, seja decorrente da época de floração do vegetal, sendo suas flores tradicionalmente coletadas para a festa de São João Baptista, no dia 24 de junho (BILIA *et al.*, 2002). Além disso, há referências ao fato de que os pigmentos vermelhos, liberados por atrito das flores e botões, foram associados ao sangue de São João Baptista (VEROTTA, 2003).

O uso das espécies deste gênero é relatado desde o século II a.C., sendo o nome *Hypericum* originalmente documentado por Hipócrates, Dioscórides, Galeno e Plínio, que descreveram propriedades medicinais para estas plantas (ROBSON, 1977; BILIA *et al.*, 2002; VEROTTA, 2003).

Há muito tempo espécies de *Hypericum* vêm sendo utilizadas popularmente. Desde a época de Paracelso têm sido empregadas para o tratamento de distúrbios psíquicos, sendo por séculos usado na medicina tradicional europeia para ansiedade, neuroses e depressão (BILIA *et al.*, 2002). Relatos informam que *H. perforatum* era empregado desde a Grécia antiga para o tratamento de inflamações do trato geniturinário, contra dismenorréia e como agente emenagogo, diurético e antimalárico.

Além destes usos, *Hypericum sp.* era comumente empregado em dispepsias, úlceras e neuralgias (BOMBARDELLI & MORAZZONI, 1995; WHO, 2002). *H. perforatum* foi abandonado como remédio durante os séculos XVIII e XIX, retornando o seu uso medicinal e sendo descrito em muitas farmacopéias no início do século XX (VEROTTA, 2003).

Exemplos de outras espécies do gênero empregadas tradicionalmente para a cura ou alívio de enfermidades incluem: *H. androsaemum*, em preparações com uso diurético e anti-hepatotóxico (VALENTÃO *et al.*, 2002), *H. brasiliense*, *H. connatum*, *H. caprifoliatum* e outras espécies relatadas nativas da região sul do Brasil, utilizadas popularmente como adstringentes e para tratamento de distúrbios dermatológicos (JIMÉNEZ, 1980; MENTZ *et al.*, 1997).

2.3.2 Aspectos botânicos

2.3.2.1 Taxonomia

A família Guttiferae apresenta cerca de 1200 espécies, distribuídas em 50 gêneros de larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (CRONQUIST, 1981). Dentre esses, o gênero *Hypericum* (subfamília *Hypericoideae*; tribo *Hypericeae*) abrange aproximadamente 450 espécies, acomodadas em 36 diferentes seções taxonômicas, sendo também encontrado nas regiões temperadas do hemisfério norte (ROBSON, 1977; ROBSON, 1981; BENNETT & LEE, 1989; ROBSON, 2003).

Guttiferae divide-se em 6 sub-famílias, sendo *Hypericoideae* considerada por alguns taxonomistas como uma família distinta, devido ao grau de diversidade morfológica que apresenta. Porém, a presença de xantonas em muitas espécies desse grupo sustenta a sua inclusão nesta família, caracterizada pela presença dessa classe de metabólitos secundários. O gênero *Hypericum* apresenta características tão distintas em sua subfamília que, por vezes, é considerado como uma família independente, denominada Hypericaceae (CRONQUIST, 1981; ROBSON, 1981; BENNETT & LEE, 1989).

2.3.2.2 Morfologia

As plantas do gênero *Hypericum* apresentam, de modo geral, inflorescências terminais ou, raramente, axilares, unifloras ou cimosas. As flores são hermafroditas, actinomorfas, apresentando cálice de cinco, ou raramente quatro, sépalas desiguais, imbricadas ou valvadas, e corolas com 4-5 pétalas assimétricas amarelas, vermelhas ou alaranjadas. As folhas são opostas, raramente verticiladas, sésseis ou curtamente pecioladas, simples e inteiras (JIMÉNES, 1980; ROBSON, 1981).

O gênero é caracterizado pela presença de diferentes tipos de estruturas secretoras, incluindo glândulas translúcidas, glândulas negras e canais secretores. Porém, nem sempre todas estas estruturas estão presentes nas espécies de *Hypericum*, e a sua presença e/ou frequência variam com os órgãos do vegetal. Caracterizam-se por ser local de síntese e/ou acúmulo de substâncias biologicamente ativas, sendo importantes na discriminação entre os táxons (ROBSON, 1977; ROBSON, 1981; CICCARELLI *et al.*, 2001; ROBSON, 2003; KORNFIELD *et al.*, 2007). Enquanto glândulas pálidas estão presentes em todas as espécies, isso não ocorre de modo equivalente para glândulas negras, que apresentam restrita dispersão, sendo sua ocorrência um forte indicativo da presença de hipericina e derivados nessa estrutura glandular (ROBSON, 1977; ROBSON, 1981; ROBSON, 2003). As espécies nativas do Brasil pertencem às seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, e assim como outras plantas desse mesmo grupo são caracterizadas pela ausência de glândulas negras (ROBSON, 1990).

2.3.3 Aspectos químicos

Hypericum perforatum caracteriza-se por ser a espécie mais conhecida, sendo amplamente investigada na última década devido a sua utilização na produção de extratos para preparação de fitoterápicos, empregados no tratamento de depressão leve a moderada. De fato, a erva-de-São-João, como é conhecida popularmente, tem se tornado uma alternativa de tratamento para pacientes depressivos por apresentar eficácia clínica comparável a antidepressivos clássicos, como fluoxetina e sertralina

(KASPER, 2001; BILIA *et al.*, 2002; VEROTA, 2003).

As naftodiantronas hipericina e *pseudo*-hipericina foram inicialmente consideradas como responsáveis pela atividade antidepressiva de *H. perforatum* (BUTTERWECK *et al.*, 1998). Porém, outros estudos sugerem essa atividade para os flavonóides (BUTTERWECK *et al.*, 2000; NÖLDNER & SCHÖTZ, 2002), e principalmente para hiperforina, um derivado de floroglucinol (CHATTERJEE *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 2001).

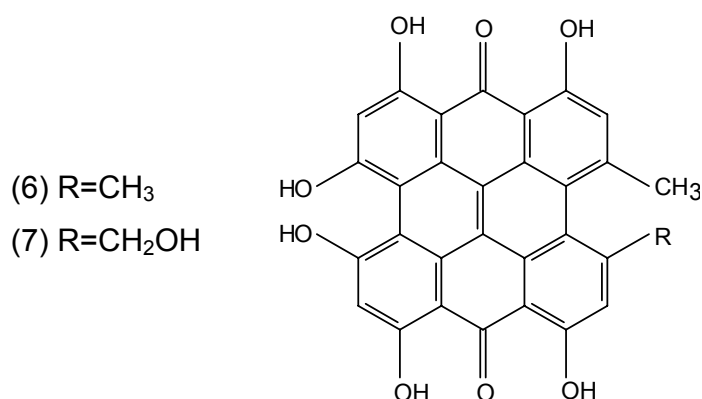
2.3.3.1 Constituição química

Estudos com outras espécies do mesmo gênero têm sido estimulados pelo grande interesse científico e valor econômico agregado a *H. perforatum*, encontrando-se como característica química comum a presença de compostos fenólicos (KARTNIG *et al.*, 1989; KITANOV & NEDIALKOV, 1998; HU *et al.*, 2000; DALL'AGNOL *et al.*, 2003; CROCKETT *et al.*, 2005).

2.3.3.1.1 Quinonas policíclicas

As naftodiantronas hipericina (6) e *pseudo*-hipericina (7) são os principais constituintes desta classe de substâncias, encontradas em espécies de *Hypericum* e aparentemente restritas às plantas deste gênero, sendo importantes do ponto de vista quimiotaxonômico (KITANOV, 2001; CROCKETT *et al.*, 2005).

Estudos fitoquímicos revelaram a presença de hipericina em muitas espécies do gênero, tais como *H. barbatum*, *H. bithynicum*, *H. glandulosum*, *H. hirsutum*, *H. humifusum*, *H. maculatum*, *H. montanum*, *H. perforatum*, *H. tetrapterum* e *H. tomentosum* e ausência dessa substância em *H. calycinum*, *H. olympicum* e *H. patulum* (KARTNIG *et al.*, 1989; KARTNIG & GÖBEL, 1992; KARTNIG *et al.*, 1996; KITANOV, 2001; CROCKETT *et al.*, 2005), bem como nas espécies *H. brasiliense*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. cordatum*, *H. myrianthum*, *H. piriai* e *H. polyanthemum*, nativas do Sul do Brasil (FERRAZ *et al.*, 2002b).



2.3.3.1.2 Xantonas

O grande valor taxonômico de xantonas na família Guttiferae tem despertado interesse nessa classe de compostos (BENNET & LEE, 1989; KITANOV & NEDIALKOV, 1998).

No gênero *Hypericum* a presença de xantonas é bastante relatada, sendo estes compostos encontrados em todos os órgãos desses vegetais (NIELSEN & ARENDS, 1979; CARDONA *et al.*, 1990; RATH *et al.*, 1996). A família Guttiferae apresenta agliconas xantônicas e derivados C-glicosilados, não possuindo derivados O-glicosilados. A maioria das agliconas desta família é do tipo prenilada, que podem se apresentar com cadeia aberta ou ciclizada, formando o derivado benzopirânico correspondente (KUSTER & ROCHA, 2003).

Mangiferina (8) é o derivado C-glicosilado de maior ocorrência em *Hypericum* (BENNET & LEE, 1989). Embora um grande número de xantonas tenha sido encontrado em mais de 100 espécies pertencentes a diferentes subfamílias de Guttiferae, a presença desta substância, bem como de seu isômero isomangiferina (9) tem sido relatada apenas para os gêneros *Hypericum* e *Cratoxylum*, ambos pertencentes ao táxon *Hypericoideae* (KITANOV & NEDIALKOV, 1998).

Em uma avaliação de 36 espécies do gênero quanto à presença de mangiferina e isomangiferina verificou-se a produção destas substâncias pela grande

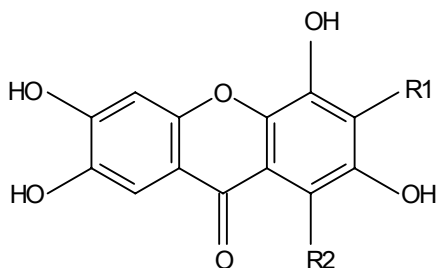
maioria das plantas investigadas, sendo o maior conteúdo de mangiferina observado em *H. aucheri*, *H. montanum*, *H. perforiatum* e *H. rochellii*, não sendo detectadas apenas em *H. empetrifolium* e *H. japonicum* (KITANOV & NEDIALKOV, 1998).

(8) R1=glucose

R2= H

(9) R1= H

R2 = glucose

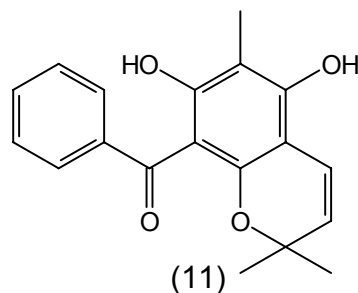
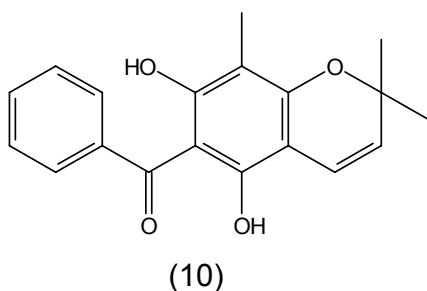


2.3.3.1.3 Benzofenonas

As benzofenonas são precursores biossintéticos de xantonas, de modo que a presença dessa classe de metabólitos secundários é freqüente em Guttiferae devido à ampla ocorrência de xantonas em espécies dessa família (BENNET & LEE, 1989; KITANOV & NEDIALKOV, 2001).

A identificação de benzofenonas em plantas do gênero *Hypericum* não é comum, sendo relatadas para poucas espécies, tais como *H. annulatum* (KITANOV & NEDIALKOV, 2001), *H. androsaemum* (SCHMIDT & BEERHUES, 1997; PETERS *et al.*, 1998) e *H. scabrum* (TANAKA *et al.*, 2004).

De *H. carinatum*, espécie nativa do Rio Grande do Sul, foram isoladas duas benzofenonas, denominadas de carifenona A (10) e carifenona B (11) (BERNARDI *et al.*, 2005).



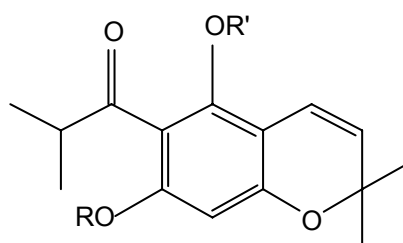
2.3.3.1.4 Benzopiranos

A ocorrência desta classe de substâncias é menos comum em *Hypericum*. Até o momento, estes compostos foram identificados apenas em quatro espécies: *H. japonicum* (ISHIGURO *et al.*, 1990), *H. revolutum* (DÉCOSTERD *et al.*, 1986), *H. annulatum* (NEDIALKOV & KITANOV, 2002) e na espécie nativa *H. polyanthemum*, da qual foram isolados três compostos denominados 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1) (12), 7-hidroxi-6-isobutiril-5-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) (13) e 5-hidroxi-6-isobutiril 7-metoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP3) (14).

(12) R=CH₃ e R'=CH₃

(13) R=H e R'=CH₃

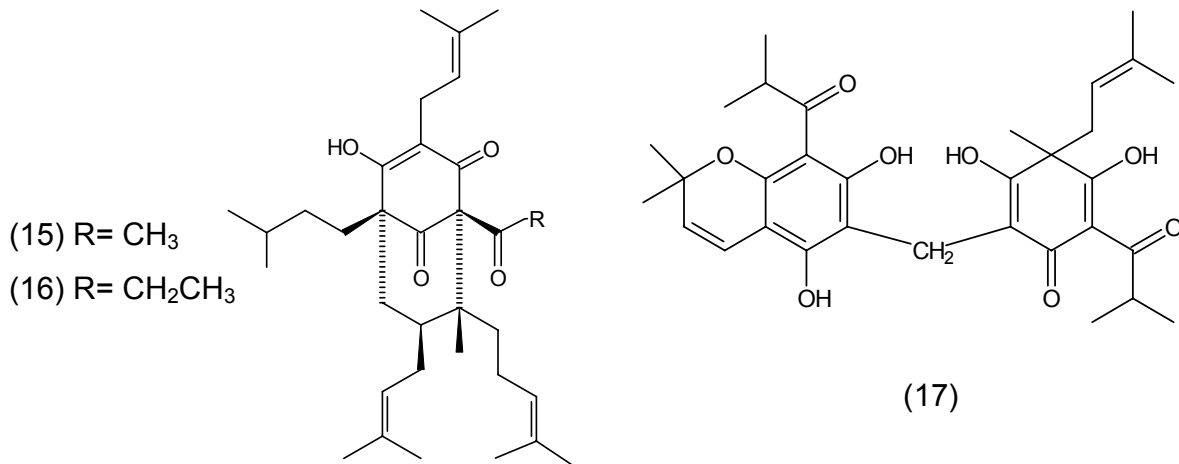
(14) R=CH₃ e R'=H



2.3.3.1.5 Derivados de floroglucinol

Os derivados de floroglucinois encontrados no gênero *Hypericum* pertencem a dois grupos biogênicos principais, os monoméricos (aromáticos ou não) e os diméricos (com um ou ambos núcleos não aromáticos) (NÖR, 2006).

Muitos derivados prenilados de floroglucinol vêm sendo isolados das espécies de *Hypericum*, podendo ser divididos em dois grupos estruturais, os poliprenilados semelhantes à hiperforina (15) e *ad*-hiperforina (16) presentes em *H. perforatum* (JENSEN *et al.*, 2001; MÜLLER *et al.*, 2001; JÜRGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002; CROCKETT *et al.*, 2005) e os dímeros, constituídos por uma unidade de floroglucinol ligada através de uma ponte metilênica a uma unidade de ácido filicínico como, por exemplo, hiperbrasilol B (17) e japonicina A, encontrados em espécies nativas do Brasil (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996; FERRAZ *et al.*, 2002b; NÖR *et al.*, 2004; DALL'AGNOL *et al.*, 2005).



Recentemente, em um trabalho de revisão quimiotaxonômica foi evidenciado que os derivados de floroglucinol podem ser considerados bons marcadores químicos para o gênero *Hypericum*. As seções com espécies americanas nativas do Sul do Brasil (*Brathys* e *Trigynobrathys*) demonstram especialização nos derivados diméricos que são restritos a esses táxons, o que pode ser resultante do seu isolamento geográfico, de modo que derivados diméricos poderiam ser considerados marcadores taxonômicos dessas seções (NÖR, 2006).

2.3.3.1.6 Flavonóides

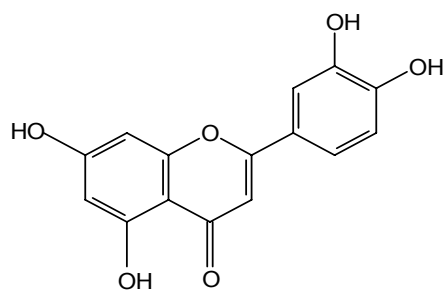
O gênero *Hypericum* apresenta abundância nessa classe de substâncias, sendo os flavonóides luteolina (18), canferol (19), quercetina (na forma de aglicona livre), quercitrina, isoquercitrina, hiperosídeo e rutina (glicosídeos derivados da quercetina) os produtos de maior frequência nas espécies do gênero (KARTNIG *et al.*, 1996; DIAS *et al.*, 1998; BILIA *et al.*, 2002; JÜRGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002; ZOU *et al.*, 2004; CROCKETT *et al.*, 2005; ŠKERGET *et al.*, 2005, SILVA *et al.*, 2005a).

Estudos têm demonstrado uma preponderância de flavonóis em *Hypericum*, sendo os glicosídicos da quercetina frequentemente encontrados em muitas espécies. No entanto, verifica-se uma menor ocorrência de flavonas e flavonas C-glicosiladas (CALIE *et al.*, 1983).

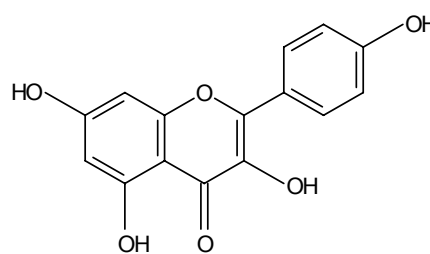
Em um estudo de taxonomia, CROCKETT e colaboradores (2005) analisaram o extrato metanólico de setenta e quatro espécies de *Hypericum*, entre elas, *H. perforatum* para verificar a presença de flavonóides. Foi verificado que, entre as espécies analisadas, hiperosídeo caracteriza-se por ser a substância de maior ocorrência, seguido de isoquercitrina, quercitrina, rutina, quercetina e amentoflavona, presentes em 52, 48, 44, 17, 13 e 11 espécies, respectivamente. Embora essas substâncias tenham sido relatadas para muitas espécies do gênero, padrões de ocorrência destes compostos entre as espécies não parecem ter relevância quimiotaxonômica, quando consideradas evidências morfológicas e moleculares.

Biflavonóides como amentoflavona (20) e biapigenina já foram isolados de diversas espécies (BERGHÖFER & HÖLZL, 1987; KARTNIG *et al.*, 1996; BILIA *et al.*, 2002; JÜRGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002; CROCKETT *et al.*, 2005).

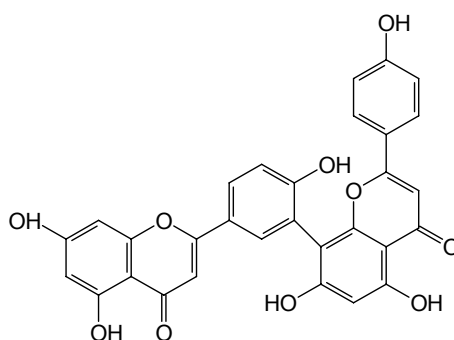
Derivados de quercetina e biflavonóides de apigenina são os principais constituintes das flores de *H. perforatum* (BROLIS *et al.*, 1998; TEKEL'OVÁ *et al.*, 2000).



(18)



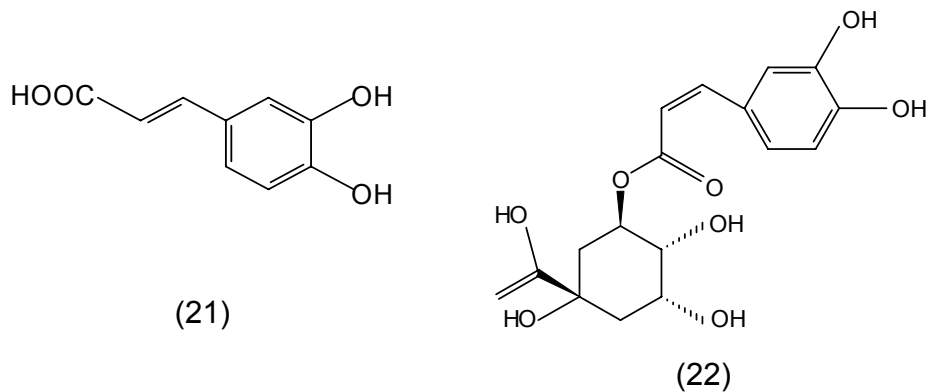
(19)



(20)

2.3.3.1.7 Ácidos fenólicos

Representantes deste grupo como ácido caféico (21), bem como seus derivados esterificados, ácido clorogênico (22) e isoclorogênico, têm sido relatados para diversas espécies de *Hypericum*, incluindo algumas das nativas do Rio Grande do Sul (SEABRA & ALVES, 1989; COULADIS *et al.*, 2002; DALL'AGNOL *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005a).



2.3.3.1.8 Taninos

Taninos são freqüentemente encontrados em espécies de *Hypericum*, podendo-se verificar elevados teores que variam de 5 a 16%, com níveis aumentados durante o período de floração. Dentre estes, os taninos condensados contendo 3 a 7 unidades de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol são os mais comuns (KARTNIG *et al.*, 1989; NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

A quantificação da fração tanante de algumas espécies nativas do Rio Grande do Sul revelou os maiores teores de taninos para *H. connatum* (11,5%) e *H. ternum* (16,7%) (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

2.3.3.1.9 Óleos voláteis

As substâncias voláteis no gênero *Hypericum* são encontradas em pequenas concentrações, que variam de 0,05 a 0,9%. Consistem principalmente de

hidrocarbonetos saturados, monoterpenos e sesquiterpenos (BARNES *et al.*, 2001). Dentre os constituintes do óleo volátil de *Hypericum perforatum*, verifica-se maior abundância de 2-metil-octano e α -pineno, estando também presentes traços de β -pineno, mirceno, limoneno, 2-metil-decano, *n*-alcanos (C₁₁, C₁₆ e C₂₉) e *n*-alcanóis (C₂₄, C₂₆ e C₂₈) (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997).

Estudo recente com as espécies nativas do Rio Grande do Sul demonstrou a presença de óxido de cariofileno como principal constituinte de *H. connatum*, bem como nonano, undecano e o benzopirano HP1 como principais constituintes de *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, respectivamente, e β -cariofileno em *H. ternum* e *H. carinatum* (FERRAZ *et al.*, 2005a).

2.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos de preparação do material vegetal e obtenção dos extratos, bem como o isolamento e purificação de metabólitos secundários, foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

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

Para um melhor entendimento, um esquema da metodologia está apresentado em anexo (Anexo I, página 247).

2.4.1 Material Vegetal

O material vegetal utilizado na análise fitoquímica consistiu nas partes aéreas (folhas, ramos e flores) e raízes das espécies *H. ternum* e *H. myrianthum*. Estas plantas, de ocorrência natural nos municípios de São Francisco de Paula e Paraíso do Sul (Rio Grande do Sul), respectivamente, foram coletadas nessas localidades, durante o período de floração do vegetal (entre os meses de dezembro a janeiro).

As amostras foram identificadas pelo botânico Dr. Sérgio Bordignon, (Departamento de Botânica da ULBRA) e uma exsicata para registro do material vegetal foi depositada no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com números de registro Bordignon 1717 para *H. ternum* e Bordignon 1402 para *H. myrianthum*.

Após a coleta, o material vegetal foi selecionado, seco em ambiente arejado ao abrigo da luz e triturado em moinho de facas.

2.4.2 Preparação dos extratos

O material vegetal seco (partes aéreas e raízes) foi submetido a fracionamento por extração via maceração estática a frio, utilizando-se solventes em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano e metanol) por períodos de 24 horas até o esgotamento. Após a eliminação do solvente, as frações *n*-hexânicas foram tratadas com acetona para a remoção de cera (através de precipitação) e filtradas, sendo novamente concentradas (ROCHA *et al.*, 1995).

Visando o isolamento de substâncias com características mais polares, a fração metanólica das partes aéreas, após a eliminação do solvente, foi dissolvida em água destilada, sendo essa porção aquosa particionada com acetato de etila.

A eliminação do solvente e concentração dos extratos foi realizada sob pressão reduzida, em aparelho de evaporação rotatório Fisatom[®], utilizando-se temperatura não superior a 55°C. Depois de concentradas, as diferentes frações foram submetidas à análise cromatográfica.

2.4.3 Análise cromatográfica

Extratos obtidos com as raízes e partes aéreas de *H. ternum* e *H. myrianthum* foram previamente analisados quanto à constituição química através de cromatografia

em camada delgada (CCD) analítica, utilizando-se cromatofolhas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄ Merck®. A visualização e análise dos cromatogramas foram efetuadas através da utilização de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação através da nebulização com reagentes cromogênicos, tais como anisaldeído sulfúrico (produtos apolares) e reagente natural (produtos polares), com posterior aquecimento a 100°C , até o desenvolvimento máximo de coloração.

Para análise cromatográfica das frações *n*-hexânica, diclorometânica e metanólica, foram utilizados eluentes variando entre diclorometano: *n*-hexano (50:50-60:40); diclorometano 100% e diclorometano:metanol (90:10-80:20) ou acetato de etila:metanol:água 100:13,5:10), respectivamente.

2.4.4 Isolamento e purificação

Para o isolamento das substâncias foram realizados sucessivos processos cromatográficos preparativos, sendo utilizado primeiramente coluna cromatográfica para o fracionamento do extrato. As frações que continham produtos de interesse foram reunidas e submetidas à CCD, para sua purificação.

Para a preparação de colunas cromatográficas foram utilizados como adsorvente gel de sílica 60 Merck®, com tamanho de partícula de 63-200 μm (70-230 mesh).

Na cromatografia em camada delgada utilizou-se placas de vidro 20 x 20 cm, preparadas no laboratório com auxílio de conjunto Desaga®, tendo como adsorvente gel de sílica GF₂₅₄ Merck®, em espessura de 0,50 mm.

Para fracionamento através de coluna cromatográfica das frações *n*-hexânica e metanólica das raízes de *H. ternum* foram utilizados gradientes entre *n*-hexano: diclorometano e acetato de etila: metanol, respectivamente, como eluente.

Da mesma forma, para fracionamento da porção acetato de etila das partes aéreas, foi utilizado como eluente um gradiente entre acetato de etila:metanol.

A análise das frações resultantes deste processo e dos produtos purificados foi efetuada por CCD analítica da mesma forma descrita no item 2.4.3.

2.4.5 Identificação dos produtos

Na identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foram utilizados métodos espectroscópicos (espectroscopia na região do ultravioleta e ressonância magnética nuclear de hidrogênio -RMN¹H- e de carbono -RMN¹³C-).

Os espectros na região do UV foram obtidos em espectrofotômetro Hewlett Packard[®] UV-VIS, modelo HP 8452-A, com varredura de diodos em série entre 200 e 400 nm. Essa análise foi realizada na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em equipamento gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick.

Os espectros de RMN de ¹H (400 ou 500 MHz) e de RMN de ¹³C (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).

Os espectros utilizados na elucidação estrutural dos compostos estão apresentados em anexo (Anexo II, página 251).

2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.5.1 Análise da constituição química de *Hypericum ternum* e de *Hypericum myrianthum*

A determinação do perfil químico de uma determinada espécie vegetal fornece informações importantes que podem ser fundamentais para a explicação do comportamento ecológico do vegetal, e também de suas atividades biológicas. Visando caracterizar os metabólitos secundários produzidos por *H. ternum* e *H. myrianthum*, uma avaliação preliminar foi realizada através de cromatografia em camada delgada, seguindo-se posteriormente com o isolamento de compostos fenólicos majoritários.

2.5.1.1 Análise cromatográfica qualitativa das frações de *Hypericum ternum*

2.5.1.1.1 Partes aéreas

Nas frações *n*-hexânica e diclorometânica, não foi possível visualizar a presença de compostos fenólicos majoritários. Mesmo com a eliminação do material ceroso presente nessas frações, através de processamento com acetona, pôde-se observar no perfil cromatográfico a presença de grande quantidade de clorofilas e um acúmulo de terpenóides, assinalados pela reação de coloração (rósea) típica frente ao agente cromogênico anisaldeído sulfúrico. O perfil químico dessa planta diferencia-se, então, daquele de outras espécies do gênero, uma vez que das frações *n*-hexânica e diclorometânica muitos compostos fenólicos de interesse biológico foram isolados (ROCHA *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996; FERRAZ *et al.*, 2001; FERRAZ *et al.*, 2002a; NÖR *et al.*, 2004).

Devido às dificuldades enfrentadas na tentativa de isolamento de substâncias a partir dos extratos apolares das partes aéreas, buscou-se uma alternativa que permitisse a obtenção de outras substâncias fenólicas dessa planta. Para tal, a fração metanólica, foi solubilizada em água e posteriormente particionada com acetato de etila.

A observação do comportamento cromatográfico da fração acetato de etila mostrou uma predominância de compostos fenólicos, que, juntamente com o grande rendimento dessa fração em relação às demais, indica uma maior prevalência de compostos fenólicos mais polares nessa planta. Na análise do perfil cromatográfico da fração acetato de etila pode-se visualizar a presença de substâncias majoritárias com características de flavonóides (coloração amarelo-esverdeada, após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico). Posteriormente, essa fração foi, então, submetida a técnicas cromatográficas visando o isolamento de substâncias.

2.5.1.1.2 Raízes

Na análise do perfil cromatográfico da fração *n*-hexânica observou-se a presença de uma substância majoritária, apresentando comportamento semelhante ao de derivados de floroglucinol, através do desenvolvimento de coloração marrom avermelhada, quando revelada com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. Da mesma forma, no perfil cromatográfico da fração metanólica evidenciou-se a presença de substâncias fenólicas, através da coloração laranja formada pela reação com anisaldeído sulfúrico. Em função disso, essas duas frações foram submetidas a cromatografias preparativas visando o isolamento de substâncias.

2.5.1.2 Isolamento de compostos fenólicos de *Hypericum ternum*

Através de técnicas de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa foi possível o isolamento e purificação de 9 produtos, sendo HT1, HT2, HT3, HT4, HT5, HT6 e HT7 provenientes da fração acetato de etila das partes aéreas e HTR1 da fração *n*-hexânica das raízes. A substância HTR2 foi isolada da fração metanólica das raízes, porém a purificação não promoveu quantidades adequadas para a análise estrutural.

Dentre as substâncias isoladas da fração acetato de etila das partes aéreas

HT1, HT2, HT3 e HT4 foram purificadas por CCD preparativa de sílica gel, utilizando-se como eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (90:10), enquanto HT5, HT6 e HT7 foram obtidos diretamente da coluna cromatográfica, em satisfatório grau de pureza, com misturas de polaridade crescente de acetato de etila e metanol como eluente.

HTR1 e HTR2 foram purificadas por CCD preparativa de sílica gel, utilizando-se como eluente diclorometano:*n*-hexano (60:40) e acetato de etila:*n*-hexano (80:20), respectivamente.

2.5.1.3 Análise estrutural das substâncias isoladas

Através de dados espectroscópicos, comparados com os disponíveis na literatura, foi possível a identificação das estruturas de HT1, HT2, HT3, HT4, HT5, HT6, HT7 e HTR1, descritas a seguir. Os dados obtidos a partir dos espectros de UV, RMN¹H e de RMN¹³C estão apresentados em anexo (Anexo III, página 285) nas tabelas 1.1a, 1.1b, 1.1c, 1.1d, 1.1e, 1.1f, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.7 e 1.8.

2.5.1.3.1 Substância HT1

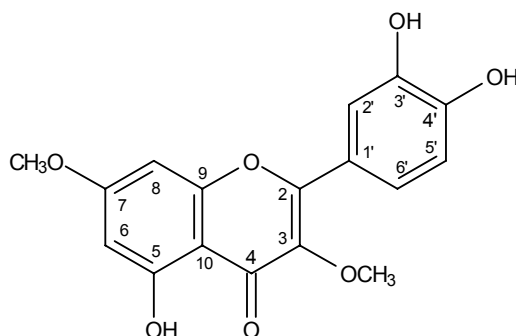
A interpretação dos espectros no UV da substância HT1 (tabela 1.1a) propõe a estrutura de um flavonol tri-hidroxilado nas posições C5, C3' e C4', apresentando também duas hidroxilas ocupadas nas posições C3 e C7. A primeira (C3) é evidenciada pela posição da banda I (358 nm) do espectro de UV em metanol e pela estabilidade da intensidade de absorção da banda I na presença de NaOH, e a segunda (C7) é demonstrada pelo pequeno deslocamento batocrômico da banda II e presença de um ombro em 420 nm no espectro de NaOAc.

Flavonóis contendo um grupamento 3-OH metilado ou glicosilado apresentam um deslocamento hipsocrômico de 12 a 17 nm da banda I, em relação à mesma banda do flavonol correspondente não metilado (no caso específico a quercetina, cujo $\lambda_{\text{máxMeOH}}=370$), sendo a banda II não afetada de modo apreciável. Da mesma forma,

flavonóis que possuem 4'-OH livre e não possuem 3-OH ou 7-OH livres usualmente apresentam um pronunciado ombro no lado de λ mais longo da banda I, na presença de NaOAc (MABRY *et al.*, 1970). O espectro metanólico aponta uma estrutura flavônica com anel B *orto* di-hidroxilado tipicamente nas posições C3' e C4'. Nesses casos, a banda II apresenta um máximo de absorção entre 250 e 265 nm (banda II b), seguida de um ombro entre 265-270 (banda II a) (VOIRIN, 1983). Esse padrão de hidroxilação no anel B foi confirmado pela adição de ácido bórico à solução metanólica na presença de acetato de sódio, o que promoveu um deslocamento batocrômico de 20 nm da banda I, bem como pelo desvio hipsocrômico da mesma banda, após adição de HCl, em relação ao espectro AlCl_3 , resultante da decomposição do complexo ácido-lábil de cloreto de alumínio formado com o grupo *o*-di-OH (MARKHAM, 1982). O deslocamento batocrômico remanescente relativo ao espectro MeOH, com a adição de ácido à solução metanólica já contendo AlCl_3 , foi indicativo da presença de 5-OH livre, uma vez que o complexo formado entre AlCl_3 e as funções 4-ceto e 5-OH (e/ou 3-OH) é estável na presença de ácido (MABRY *et al.*, 1970).

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C (tabela 1.2) verifica-se a presença de 17 sinais, podendo-se sugerir, pelo valor dos deslocamentos característicos, a presença de um núcleo flavônico oxigenado nas posições C3, C4, C5, C7, C3' e C4', sendo as posições C3 e C7 substituídas por grupamentos metoxila. Isso é evidenciado pelos sinais em δ_{H} 3,82 e δ_{H} 3,89 ppm no espectro de RMN de ^1H (tabela 1.3), ambos singletos correspondentes a 3H cada, e também pelos sinais em δ_{C} 60,5 e 56,7 ppm.

A partir dos resultados obtidos através das análises espectroscópicas, conclui-se que a substância HT1 é o flavonóide 3,7-dimetil-quercetina (23), cujos dados espectroscópicos estão de acordo com os relatados na literatura (MABRY *et al.*, 1970; JAY *et al.*, 1975; AGRAWAL *et al.*, 1989; BOUKTAIB *et al.*, 2002).



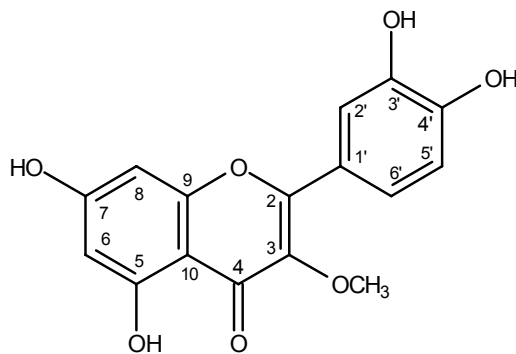
(23)

2.5.1.3.2 Substância HT2

Através da análise dos dados espectrais de ultravioleta da substância HT2 (tabela 1.1b), verifica-se que a mesma difere da substância HT1 apenas pela presença de uma hidroxila livre em C7. Isso é evidenciado pelo deslocamento batocrômico de 18 nm da banda II, bem como pela ausência de um ombro no lado de λ mais longo da banda I, após a adição de NaOAc na solução metanólica em análise (MABRY *et al.*, 1970; WOLLENWEBER, 1982). Confirma-se também mediante o aparecimento de um ombro em 327 nm, na presença de NaOH, o que é indicativo de um grupamento hidroxila livre nessa posição (MARKHAM, 1982).

O espectro de RMN de ¹³C (tabela 1.2) mostra 16 sinais, podendo-se sugerir, pelo valor dos deslocamentos característicos, a presença de um núcleo flavônico oxigenado nas posições C3, C4, C5, C7, C3' e C4', sendo a posição C3 substituída por um grupamento metoxila. Isso é evidenciado pelo singlete correspondente a 3H em δ_H 3,98 ppm no espectro de RMN de ¹H (tabela 1.3), e também pelo sinal em δ_C 60,5 ppm no espectro de RMN de ¹³C.

A interpretação dos espectros de HT2 conduz à estrutura do flavonóide 3-metil-quercetina (24), estando de acordo com os dados espectroscópicos descritos para essa substância na literatura (NAIR *et al.*, 1978; VOIRIN, 1983; AGRAWAL *et al.*, 1989).



(24)

2.5.1.3.3 Substância HT3

A interpretação dos espectros no UV da substância HT3 (tabela 1.1c) propõe a estrutura de uma flavona, evidenciada através do espectro em metanol, cuja banda I apresenta absorção máxima em 326 nm, sendo característica desse tipo de composto (banda I entre 304-350 nm) (MABRY *et al.*, 1970).

Verifica-se ainda uma substituição 4'-OH no anel B, sugerida no espectro em metanol através da presença de um único pico de absorção na banda II (270 nm) e confirmada com a adição de NaOH à solução metanólica, o que promoveu um grande deslocamento batocrômico da banda I ($\Delta\lambda = 60$ nm) no espectro de metanol, sem diminuição na intensidade do pico de absorção.

Evidencia-se ainda a presença de hidroxila livre em C7, através do deslocamento batocrômico de 8 nm da banda II, após a adição de NaOAc na solução metanólica em análise (MABRY *et al.*, 1970; WOLLENWEBER, 1982). Confirma-se também mediante o aparecimento de um ombro em 327 nm, na presença de NaOH, o que é indicativo de um grupamento hidroxila livre nessa posição (MARKHAM, 1982).

A ausência de um padrão de hidroxilação *o*-di-OH no anel B foi confirmada pela adição de ácido bórico à solução metanólica na presença de acetato de sódio, o que manteve o mesmo $\lambda_{\text{máx}}$ de absorção da banda I, em relação ao espectro MeOH (MABRY

et al., 1970; MARKHAM, 1982). Essa característica foi evidenciada ainda através do espectro de AlCl_3/HCl , onde observou-se a manutenção do deslocamento batocrômico de 34 nm em relação ao espectro de metanol, indicando a ausência do complexo ácido-lábil de cloreto de alumínio formado com grupos *o*-di-OH (MARKHAM, 1982).

Esse deslocamento batocrômico relativo ao espectro MeOH, com a adição de ácido à solução metanólica já contendo AlCl_3 , foi indicativo da presença de 5-OH livre, uma vez que o complexo formado entre AlCl_3 e as funções 4-ceto e 5-OH é estável na presença de ácido. Verifica-se ainda o aparecimento de ombros nas bandas I e II no espectro AlCl_3/HCl , típicos de flavonas 5-hidroxiladas (MABRY *et al.*, 1970).

Analisando-se o espectro de RMN de ^{13}C (tabela 1.4) verifica-se a presença de 24 sinais, sendo 8 sinais de (CH) e 16 (Cq) dos quais dois têm deslocamento químico característico de carbonilas (δ_{C} 183,9 e 182,8 ppm). Pelo valor dos deslocamentos, pode-se sugerir, a presença de um núcleo flavônico na forma dimérica oxigenado nas posições C4, C5, C7 e C4' em ambos os monômeros.

Observa-se ainda a presença de um sinal referente a 3 átomos de C e 4 sinais referentes à dois átomos de C, o que completa o total de 30 carbonos, característico de um dímero flavônico. Esses sinais sobrepostos são correspondentes aos pares de C-2'/6' e C-3'/5' do anel B (em ambos os monômeros) que apresenta apenas uma hidroxila em posição *para* em relação ao anel C, caracterizando a equivalência dos deslocamentos químicos destes sinais, tanto no espectro de ^{13}C quanto no de ^1H .

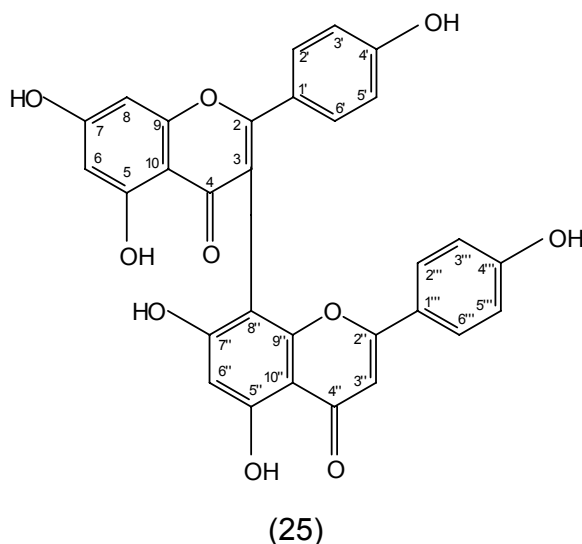
A presença de quatro sinais no espectro de ^1H (tabela 1.4) com deslocamentos químicos de δ_{H} 6,63; 7,32; 6,76 e 7,53 ppm (cada um correspondente a 2H, *d*, $J = 8,8$ Hz), foram atribuídos aos H-2'/6' e H-3'/5' (monômeros I e II, respectivamente), caracterizando a presença de um padrão de substituição *p*-OH em ambos os anéis B.

O dubleto em δ_{H} 6,47 ppm ($J=1,8$) correspondente à posição 8 demonstra a presença de apenas um H *meta* acoplado, o que indica que a ligação entre os dímeros

de flavona ocorre nesta posição do monômero II, que apresenta um carbono quaternário nesta posição (δ_C 101,2 ppm).

O espectro de HMBC foi importante na avaliação das correlações existentes para atribuir os sinais referentes a cada monômero, bem como para avaliar a posição da ligação entre os mesmos. Evidenciou-se as seguintes correlações entre 1H e ^{13}C : δ_H/δ_C 7,53-129,1; 163,1 e 165,9 ppm - δ_H/δ_C 7,32-131,0; 161,3 e 165,9 ppm - δ_H/δ_C 6,76-117,0; 123,2 e 163,1 ppm - δ_H/δ_C 6,63-116,1; 125,5 e 161,3 ppm - δ_H/δ_C 6,52-105,2; 123,2 e 165,9 e 182,8 ppm - δ_H/δ_C 6,47-100,4; 104,6; 159,6 e 167,2 ppm - δ_H/δ_C 6,26-95,1; 101,2; 104,6; 105,2; 161,3; 162,8; 165,9 e 167,2 ppm.

A partir dos resultados obtidos através das análises espectroscópicas, conclui-se que a substância HT3 é o biflavonóide I3,I18-biapigenina (25), cujos dados espectroscópicos estão de acordo com os relatados na literatura (BERGHÖFER & HÖLZL, 1987; AGRAWAL & BANSAL, 1989a; HANSEN *et al.*, 1999).



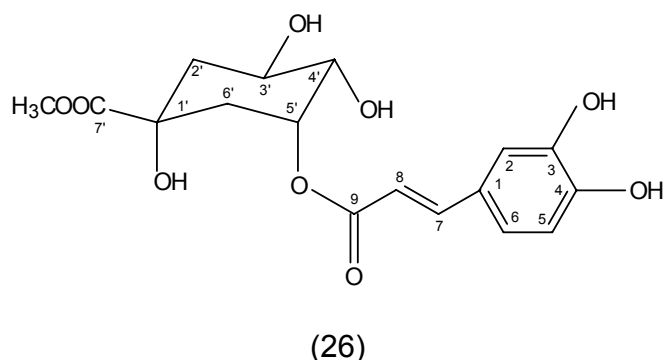
2.5.1.3.4 Substância HT4

A substância HT4 foi isolada como um sólido marrom escuro. O espectro de RMN de 1H (tabela 1.5) sugere a presença de uma unidade derivada do ácido caféico devido aos sinais dos grupos de hidrogênios olefínicos *trans* em δ_H 7,37 e 6,07 ppm

(com constantes de acoplamento $J=16,1$ e $J=15,8$ respectivamente), e dos sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos em δ_H 7,01, 6,93 e 6,73 ppm. Os sinais para três hidrogênios metínicos em δ_H 5,01, 3,88 e 3,61 ppm e para hidrogênios metilênicos, na faixa de δ_H 1,93 a 2,12 ppm sugerem a presença de uma unidade derivada do ácido quínico. Além disso, é possível evidenciar a presença de um grupamento metoxila, devido ao sinal intenso observado em δ_H 3,58 ppm integrando em três prótons. O espectro de HMBC demonstra a correlação entre os sinais δ_H 3,58 e δ_C 173,6 ppm, o que sugere a esterificação do ácido quínico por um grupamento metila.

A confirmação do grupo cafeoíl e do esqueleto do ácido metoxiquínico foi baseada nos espectros de RMN de ^{13}C (tabela 1.5), especialmente pelos sinais referentes ao grupamento carbonila da unidade cafeoíl em δ_C 165,4 ppm e ao grupamento carboxila em δ_C 173,6 ppm, bem como ao sinal em δ_C 51,8 ppm, correspondente à metoxila. Além disso, observa-se a presença de dois carbonos metilênicos em δ_C 37,2 e 35,1 ppm e do carbono tetrassubstituído em δ_C 73,0 ppm. Os dados de deslocamento químico da unidade metoxiquínica foram comparados e estão de acordo com valores disponíveis na literatura (SADHU *et al.*, 2006).

Na literatura, os valores das constantes de acoplamento entre os hidrogênios da unidade ácido quínico, bem como as correlações a longa distância entre carbono e hidrogênio, podem fornecer informações importantes em relação à posição da unidade cafeoíl (PAULI *et al.*, 1998). Na elucidação desta estrutura foram encontradas dificuldades em relação a essas informações, devido à baixa resolução do espectro e à sobreposição dos sinais. Deste modo, sugere-se para HT4 a estrutura do ácido 5-O-cafeoil-1-metoxi-quínico (26).



2.5.1.3.5 Substâncias HT5, HT6 e HT7

Através da análise dos dados espectrais de ultravioleta das substâncias HT5, HT6 e HT7 (tabelas 1.1d, 1.1e e 1.1f), verifica-se que todas apresentam o mesmo comportamento da substância HT2, quando submetidas ao tratamento com os reagentes de deslocamento, apresentando, portanto, o mesmo padrão de substituição do flavonóide 3-metil-quercetina.

No entanto, através dos dados espectrocópicos de RMN de ^{13}C e ^1H (tabelas 1.2 e 1.3), é possível constatar que o grupamento metoxila não mais existe nessas substâncias, sendo a hidroxila do C3 substituída por açúcares.

Em função de que os deslocamentos químicos dos carbonos de açúcares ocorrem bem claros em relação ao dos carbonos do núcleo de um flavonóide, o espectro de RMN de ^{13}C é utilizado para avaliação do açúcar ligado a um flavonóide glicosilado (MARKHAM & MOHAN CHARI, 1982). Os dados de RMN de ^{13}C são de grande importância no estabelecimento da natureza e posição do açúcar ligado, do tipo de ligação, e até mesmo da configuração e conformação do açúcar (HARBORNE & WILLIAMS, 1982).

Para HT5 verifica-se no espectro de RMN de ^{13}C a presença de 20 sinais, sendo 15 correspondentes ao núcleo flavônico e 5 relativos a ose ligada na posição 3, conseqüentemente identificada como uma pentose (δ_{C} 104,7; 74,2; 72,9; 69,1; 66,9

ppm). Por comparação com os dados disponíveis na literatura verifica-se que se trata de arabinose, na forma pirano (MARKHAM & MOHAN CHARI, 1982; MARKHAM, 1982; AGRAWAL & BANSAL, 1989b).

Para HT6 e HT7 observa-se pelos dados espectrais de ^{13}C além dos 15 sinais relacionados com os carbonos da estrutura básica de um flavonóide, 6 sinais referentes às hexoses substituintes do hidrogênio do grupamento -OH da posição 3 do flavonol (δ_{C} 104,5; 78,4; 78,1; 75,7; 71,2; 62,6 ppm e δ_{C} 105,4; 77,2; 75,1; 73,2; 70,0; 62,0 ppm). Através de comparação com dados da literatura (MARKHAM & MOHAN CHARI, 1982; MARKHAM, 1982; AGRAWAL & BANSAL, 1989b) concluiu-se tratar de glicose e galactose, respectivamente, ambas em sua forma piranosídeo.

Com os dados do espectro de RMN de ^1H foi possível determinar a natureza da ligação das oses na posição 3 dos flavonóis, através da constante de acoplamento do H1' (anomérico) (tabela 1.6), bem como confirmar a forma piranosídeo em todos os açúcares em questão (MARKHAM *et al.*, 1989).

HT5, HT6 e HT7 apresentam, nos respectivos espectros de ^1H , dupletos em δ_{H} 5,16; 5,28 e 5,18 ppm, referentes ao H1' anomérico com constantes de acoplamento (J) de 6,5; 7,7 e 7,4 Hz. Conseqüentemente, HT5, HT6 e HT7 são substituídas na posição 3 pelas oses α -L-arabinopiranosídeo, β -D-glicopiranosídeo e β -D-galactopiranosídeo, respectivamente.

Tabela 1.6: Constantes de acoplamento do H1' anomérico.

Açúcar		Constante de acoplamento (J)	
		β -D	α -D
glicose, galactose	piranosídeos	7-8 Hz	3-4 Hz
	furanosídeos	0-2 Hz	4-4,5 Hz
arabinose	piranosídeo furanosídeo	β -L	α -L
		2,5 Hz 4 Hz	8 Hz 1Hz

Esses resultados indicam para HT5 a estrutura de guaijaverina (27), sendo os dados espectroscópicos dessa amostra de acordo com os descritos na literatura para essa substância (AGRAWAL & BANSAL 1989b; FRAISSE *et al.*, 2000).

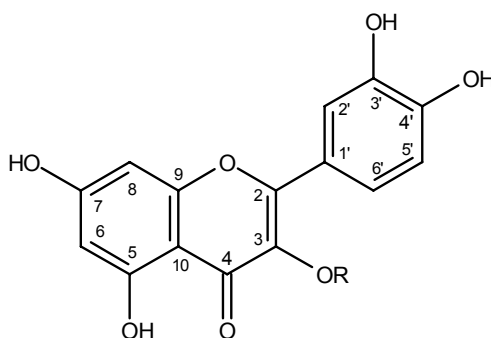
A partir dos resultados obtidos através das análises espectroscópicas, conclui-se que a substância HT6 é o flavonóide glicosilado isoquercitrina (28), cujos dados espectroscópicos coincidem com os relatados na literatura (AGRAWAL & BANSAL 1989b; KAZUMA *et al.*, 2003).

Da mesma forma, a interpretação dos espectros de HT7 conduz à estrutura do flavonóide glicosilado hiperosídeo (29) estando de acordo com os dados espectroscópicos descritos para essa substância na literatura (AGRAWAL & BANSAL 1989b; DINI *et al.*, 2004).

(27) R= α -L-arabinopiranosil

(28) R= β -D-glicopiranosil

(29) R= β -D-galactopiranosil



2.5.1.3.6 Substância HTR1

A avaliação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para o produto codificado HTR1 revelou a presença de uma mistura de dois compostos majoritários, em proporção de aproximadamente 1:1,3. Com os dados disponíveis foi possível a elucidação de apenas uma das moléculas desta mistura.

Através dos dados de RMN de ^1H (tabela 1.7) verifica-se a presença de quatro grupos de sinais. O primeiro grupo ocorre em campo alto onde os sinais de δ_{H} 1,20 e 1,21 ppm, ambos dubletos ($J=6,7$), correspondem aos hidrogênios dos grupamentos -CH_3 das posições 9 e 12'; e os sinais δ_{H} 1,48 e 1,49 ppm (correspondentes à 12H e 6H,

respectivamente) referem-se aos hidrogênios das metilas ligadas a C4 e C2'.

O segundo grupo, é composto por sinais com deslocamento químico de δ_H 3,51, 3,84-3,95 e 4,15-4,26 ppm, referentes a um singleto alargado e dois multipletos, respectivamente, referentes aos hidrogênios da ponte metilênica; e aos hidrogênios das posições 9 e 12'.

A presença de um grupamento vinílico é evidenciada pela ocorrência do par de dubletos em δ_H 5,44 e 6,70 ppm. No quarto grupo de sinais do espectro verifica-se o deslocamento de quatro sinais intensos em campo baixo (δ_H 10,01; 11,50; 16,22 e 18,76 ppm) que se referem às hidroxilas.

O sinal encontrado em campo muito baixo (δ_H 18,76 ppm) no espectro de RMN de 1H , refere-se ao sistema enolizável formado pela hidroxila de C5 e a carbonila da posição C8, característico de floroglucínóis conjugados com unidades de ácido filicínico (JAYASURIYA *et al.*, 1989, ISHIGURO *et al.*, 1994; YAMAKI *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995).

Um anel dimetilbenzopirano na molécula é indicado, no espectro de RMN de 1H , pela presença de um par de dubletos em δ_H 5,38 e 6,64 ppm com $J=10, 35$ e $9,75$ Hz (atribuídos aos hidrogênios vínlicos) e um singleto referente a duas metilas (δ_H 1,48 ppm). Outro sinal característico de dimetilbenzopiranos é verificado em δ_C 78,2 ppm no espectro de RMN de ^{13}C e refere-se ao carbono quaternário do anel pirano ligado a um grupamento dimetila geminal (JAYASURIYA *et al.*, 1989; ROCHA *et al.*, 1996).

Analisando os dados do espectro de RMN de ^{13}C (tabela 1.8) pode-se sugerir, pelo valor dos deslocamentos característicos de carbonos aromáticos oxigenados (δ_C 155,4; 159,4 e 162,2 ppm) e (δ_C 171,6; 187,3 e 199,4 ppm), a presença de dois núcleos com padrão de substituição de floroglucinol e ácido filicínico, respectivamente. O sinal característico do núcleo dimetilbenzopirano é verificado em δ_C 78,1 ppm e refere-se ao carbono quaternário do anel pirano ligado a um grupo dimetila geminal.

A posição das metilas geminais em C4 na porção ácido filicínico é confirmada pelo deslocamento químico característico em δ_C 44,3 ppm. Quando nesta posição encontram-se ligados grupamentos prenila, como nas substâncias drumondina D e hiperbrasilol B, esse valor desloca-se para δ_C 49 ppm (JAYASURIYA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1996).

De acordo com estruturas similares relatadas na literatura, pode-se supor que o sinal em δ_C 16,1 ppm, refere-se ao C7 da ponte metilênica ligando o ácido filicínico ao grupo benzopirano (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996).

Através da análise do espectro de RMN de ^{13}C (APT) propõe-se para HTR1 uma estrutura constituída por 8 (CH_3), 1 (CH_2), 4 (CH) e 15 (Cq) dos quais, três apresentam deslocamento químico característico de carbonilas (δ_C 199,4; 210,8 e 211,2 ppm) referentes a C1, C8 e C11', nesta ordem.

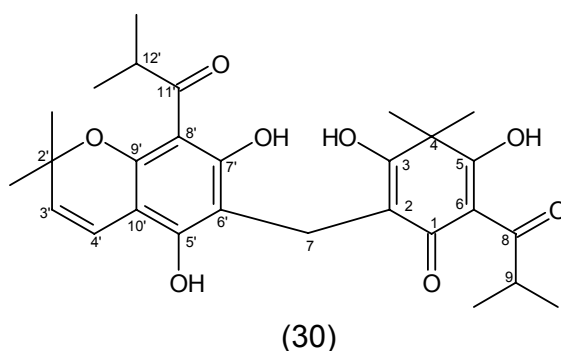
Importantes correlações extraídas do espectro de HMBC foram fundamentais para a determinação da posição dos substituintes de HTR1, bem como para avaliar quais sinais desta mistura de compostos eram referentes à esta substância. Dentre essas correlações: δ_H/δ_C 1,20; 1,21/19,4; 39,0; 36,6 e 210 - 1,48/24,3; 27,9; 44,3; 78,2 e 124,6 - 1,49/25,9; 44,3; 171,6 e 199,4 - 3,51/107,1; 111,2; 159,4; 162,2 e 171,6 - 3,84 a 3,95/19,4 e 211,2; 4,15 a 4,26/ 19,4 - 5,44/27,9; 78,2; 103,5; 117,3 - 6,71/78,2; 124, 6; 155,4 e 159,4 - 10,01/44,3; 111,2 e 171,3 - 11,50/103,5; 107,1 e 159,4 - 16,22/103,5; 107,1 e 162,2 - 18,76/44,3; 107,6, 199,4 e 210,8 ppm.

A determinação da orientação da ciclização do anel pirano foi proposta a partir do espectro de correlação a longa distância, HMBC, na qual se verificam os acoplamentos entre o hidrogênio da hidroxila δ_H 11,50 ppm em C5' com os deslocamentos em δ_C 159,4 e 103,5 ppm, além das correlações dos hidrogênios da ponte metilênica (δ_H 3,51 ppm) com os carbonos em δ_C 107,1; 111,2; 159,4 e 162,2.

Os demais deslocamentos químicos obtidos dos espectros de RMN de 1H e ^{13}C

para HTR1 foram comparados com aqueles de substâncias estruturalmente semelhantes como drumondina C, isouliginosina B e hiperbrasilol B (tabelas 1.7 e 1.8).

Em função dos dados apresentados, o produto HTR1 foi identificado como uliginosina B (30).



Das partes aéreas de *H. ternum* foram isoladas, a partir da fração acetato de etila, 7 substâncias sendo 6 delas identificadas como flavonóides derivados da quercetina. Dentre essas, as agliconas livres 3-metil-quercetina e 3,7-dimetil-quercetina não haviam sido anteriormente encontradas no gênero *Hypericum*, sendo relatadas para plantas de famílias variadas.

Foi identificado ainda um derivado dimérico de flavona, 13,118-biapigenina, biflavonóide descrito em algumas espécies do gênero, tais como *Hypericum perforatum* (BERGHÖFER & HÖLZL, 1986; BROLIS *et al.*, 1998; HANSEN *et al.*, 1999, TEKEL'OVÁ *et al.*, 2000), *H. hyssopifolium* (CAKIR *et al.*, 2003), *H. triquetrifolium* (COULADIS *et al.*, 2002) e *H. calycinum* (GRONQUIST *et al.*, 2001).

As outras três substâncias isoladas foram identificadas como sendo os glicosídeos isoquercitrina e hiperosídeo (também conhecido por hiperina), comumente encontrados em espécies de *Hypericum* (ROCHA *et al.*, 1995; COFORTI *et al.*, 2002; CAKIR *et al.*, 2003; CROCKETT *et al.*, 2005) e guaijaverina, relatada apenas para *H. brasiliensis* (ROCHA *et al.*, 1995) e *H. perforatum* (JURGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002). A presença de hiperosídeo e isoquercitrina já havia sido caracterizada nessa espécie por

cromatografia em camada delgada por DALL'AGNOL e colaboradores (2003).

Considerando ainda as partes aéreas desta planta, foi isolado, a partir da fração acetato de etila, um derivado de ácido caféico, cujos dados sugerem a estrutura do ácido 5-O-cafeoil-1-metoxiquínico. A ocorrência de ácidos fenólicos, principalmente ésteres do ácido caféico é relatada para espécies do gênero *Hypericum* (SEABRA & ALVES, 1989; COULADIS *et al.*, 2002; DALL'AGNOL *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005a).

Da fração apolar das raízes de *H. ternum* obteve-se o floroglucinol uliginosina B. Este composto, encontrado apenas nas raízes dessa planta, foi previamente isolado das partes aéreas de outras espécies de *Hypericum*, sendo todas pertencentes à seção *Trigynobrathys*. Em contraste com os dados de NAHRSTEDT e BUTTERWECK (1997), que afirmaram que acilfloroglucinóis ocorrem exclusivamente nas partes reprodutivas das plantas, muitos trabalhos demonstram esse tipo de substância nas partes aéreas e, como aqui demonstrado, também presente nas raízes. Da mesma maneira, isouliginosina B foi detectada nas raízes de *H. brasiliense* (ABREU *et al.*, 2004)

Uliginosina B foi primeiramente isolada a partir de *H. uliginosum* HBK (nome válido *H. thesiifolium* HBK) (PARKER & JOHNSON, 1968; TAYLOR & BROOKER, 1969), sendo encontrada também nas espécies nativas do Rio Grande do Sul *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a), *H. polyanthemum* e *H. carinatum* (NÖR *et al.*, 2004).

No gênero *Hypericum*, muitos floroglucinóis como os derivados poliisoprenilados hiperforina e *ad*-hiperforina vêm sendo isolados. Estes parecem ter importância taxonômica, pois essas substâncias são frequentemente encontradas em *Hypericum* além de espécies pertencentes a outros gêneros de *Guttiferae*, como *Clusia* e *Garcinia*.

Por outro lado, derivados de floroglucinol conjugados ao ácido filicínico também têm sido descritos para espécies de *Hypericum*, apresentando, porém, pequena dispersão neste gênero. Sua ocorrência tem sido relatada para espécies das seções

Brathys (*H. drumommdii*) (JAYASURIYA *et al.*, 1989; JAYASURIYA *et al.*, 1991) e *Triginobrathys*, como *H. uliginosum* (PARKER & JOHNSON, 1968; TAYLOR & BROOKER, 1969), *H. japonicum* (ISHIGURO *et al.*, 1986; ISHIGURO *et al.*, 1987), *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995, ROCHA *et al.*, 1996), *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a), *H. polyanthemum* e *H. carinatum* (NÖR *et al.*, 2004), o que permite supor uma íntima proximidade filogenética entre estas seções.

Devido ao fato de que todos os dímeros de floroglucínóis relatados para o gênero *Hypericum* ocorrem apenas em espécies classificadas nestas duas seções, a distribuição deste tipo de floroglucinol vem apontando para a possibilidade de se utilizar estas substâncias como marcadores taxonômicos das seções *Brathys* e *Triginobrathys* (NÖR, 2006).

2.5.1.4 Análise cromatográfica qualitativa das frações de *Hypericum myrianthum*

2.5.1.4.1 Partes aéreas

No cromatograma da fração *n*-hexânica foi possível verificar a presença de duas bandas majoritárias, com o mesmo perfil cromatográfico das substâncias uliginosina B e japonicina A, previamente isoladas das partes aéreas desta planta (FERRAZ *et al.*, 2002b; DALL'AGNOL *et al.*, 2005). No entanto, observou-se ainda substâncias minoritárias com características químicas semelhantes a estes dois derivados diméricos de floroglucinol, quando submetidos à revelação com o reagente cromogênico anisaldeído sulfúrico (coloração alaranjada). Desta maneira, métodos cromatográficos preparativos foram aplicados a esta fração visando o isolamento destes produtos.

A análise cromatográfica da fração metanólica evidenciou uma predominância de compostos fenólicos, sendo as substâncias majoritárias com características de flavonóides (coloração amarelo-alaranjada após revelação com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico e fluorescente quando reveladas com reagente natural). Após esse

processo, este extrato foi submetido à cromatografia em coluna objetivando o isolamento destas substâncias.

2.5.1.4.2 Raízes

O cromatograma da fração *n*-hexânica das raízes mostrou a presença de compostos fenólicos com o comportamento cromatográfico característico de derivados de floroglucinol. Verificou-se um padrão de produção nas raízes desta planta diferente do encontrado para as partes aéreas, com predomínio de um composto, e outros produtos minoritários. Em função disso, esta fração foi submetida à coluna cromatográfica visando o isolamento destas substâncias.

2.5.1.5 Isolamento de compostos fenólicos de *Hypericum myrianthum*

Através de técnicas de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa foi possível o isolamento e purificação de 4 substâncias desta espécie, sendo HM1 e HM2 obtidos da fração metanólica das partes aéreas e HMR1 e HMR2, da fração apolar das raízes.

Da fração *n*-hexânica das partes aéreas foi isolado um derivado de floroglucinol, em conjunto com as duas substâncias majoritárias uliginosina B e japonicina A, previamente relatadas para esta espécie. No entanto, devido às dificuldades de purificação deste composto, os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C não apresentaram resolução suficiente para possibilitar a elucidação de sua estrutura.

2.5.1.6 Análise estrutural das substâncias isoladas

Através de dados espectroscópicos, comparados com os disponíveis na literatura, foi possível a identificação das estruturas de HM1, HM2, HMR1 e HMR2, descritas a seguir. Os dados obtidos a partir dos espectros de UV, RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados em anexo (Anexo III, página 285) nas tabelas 1.1g e 1.9.

2.5.1.6.1 Substância HM1

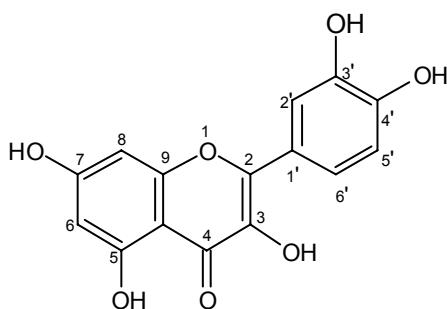
Das primeiras frações da coluna cromatográfica realizada com a fração metanólica das partes aéreas de *H. myrianthum*, isolou-se um produto amarelo, o qual foi denominado de HM1. A caracterização de HM1 foi realizada através de cromatografia em camada delgada comparativa e cromatografia em camada delgada bidimensional, frente a diferentes padrões de flavonóides, o que indicou um perfil cromatográfico semelhante ao da quercetina.

Para a confirmação da estrutura de HM1, foram obtidos espectros no UV (tabela 1.1g). O espectro desta substância em metanol exibiu dois picos de absorção majoritários na região de 240-400 nm, os quais se referem à banda I em 356 nm e à banda II em 254 nm, respectivamente, típicas de flavonóis (MABRY *et al.*, 1970; MARKHAM, 1982).

A presença de um ombro próximo ao comprimento de onda mais longo da banda II (270 nm) indica que as posições 3' e 4' do anel B são oxigenadas (MABRY, 1970). Esse padrão de hidroxilação no anel B foi confirmado pela adição de ácido bórico à solução metanólica na presença de acetato de sódio, o que promoveu um deslocamento batocrômico de 16 nm da banda I (MARKHAM, 1982).

O desvio batocrômico de 44 nm da banda I após a adição de NaOH em relação ao espectro em MeOH, indica a presença de hidroxilas livres nas posições C4' e C3 (MABRY *et al.*, 1970). A hidroxila livre em C3 também pode ser comprovada pelo desvio batocrômico de 50-60 nm da banda I, típico de 3-hidróxi- flavonas.

A partir dos resultados obtidos através das análises espectroscópicas, das semelhanças destes com os espectros da quercetina padrão e sabendo-se que derivados deste flavonol são comuns no gênero *Hypericum*, sugere-se a substância HM1 sendo a quercetina (31) (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; CROCKETT *et al.*, 2005).



(31)

2.5.1.6.2 Substância HM2

A substância HM2 caracterizou-se por ser o componente majoritário da fração metanólica das partes aéreas de *H. myrianthum*, devido a sua precipitação espontânea no extrato, sob a forma de grãos friáveis amarelos.

Para a sua purificação, a fração metanólica foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro e lavada com metanol. O precipitado recolhido foi, então, ressuspenso em metanol e novamente precipitado em temperatura de 4°C. O produto puro codificado de HM2, foi analisado por CCD frente a diferentes padrões e detectou-se um perfil cromatográfico semelhante ao do flavonóide hiperosídeo.

Para a confirmação da estrutura de HM2, foram obtidos espectros de UV desta substância. O espectro em metanol, bem como aqueles resultantes do tratamento da amostra com diferentes reagentes de deslocamento demonstraram o mesmo perfil da substância hiperosídeo, isolada da espécie *H. ternum* e cuja discussão da elucidação de sua estrutura encontra-se descrita no item 2.5.1.4.5 deste capítulo.

2.5.1.6.3 Substância HMR1

O composto codificado HMR1 e isolado da fração *n*-hexânica das raízes de *H. myrianthum* mostrou o mesmo perfil cromatográfico e os mesmos sinais de deslocamento químico nos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C de uliginosina B, um

derivado de floroglucinol ligado a uma molécula de ácido filicínico, também presente nas partes aéreas desta planta (FERRAZ *et al.*, 2002a). Esta substância foi isolada das raízes de *H. ternum*, como descrito anteriormente, de modo que a descrição da elucidação de sua molécula encontram-se apresentadas no item 2.5.1.4.6 deste capítulo.

2.5.1.6.4 Substância HMR2

O composto HMR2 foi obtido como o constituinte majoritário da fração *n*-hexânica das raízes de *H. myrianthum*. A avaliação dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C revelou a presença de uma estrutura dimérica, constituída de duas unidades de ácido filicínico ligadas através de uma ponte metilênica.

Analisando os dados do espectro de RMN de ^{13}C (tabela 1.9) pode-se sugerir, pelo valor dos deslocamentos característicos de carbonos aromáticos oxigenados (δ_{C} 173,2; 187,6; 199,8; 210,5 ppm) a presença de dois núcleos com padrão de substituição de ácido filicínico.

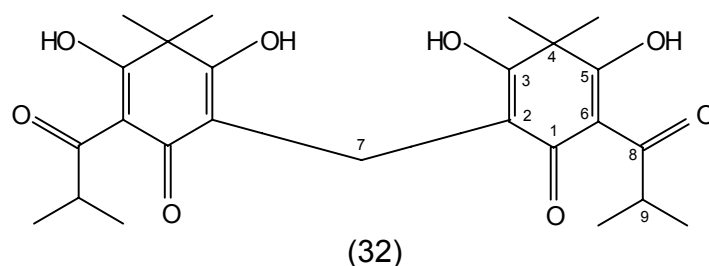
Através dos dados de RMN de ^1H (tabela 1.9) verifica-se a presença de um sinal em campo muito baixo (δ_{H} 18,73 ppm), característico de um sistema enolizável formado pela hidroxila de C5 e a carbonila da posição C8, comumente presente em derivados de floroglucinol conjugados (JAYASURIYA *et al.*, 1989, ISHIGURO *et al.*, 1994; YAMAKI *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995).

O singlete alargado em δ_{H} 3,32 ppm indica a presença de uma ponte metilênica ligando os dois anéis aromáticos, característica dessas estruturas diméricas de floroglucinol. Analisando-se o espectro de correlação a longa distância verificou-se acoplamentos entre os hidrogênios correspondentes a esta ponte metilênica e os sinais em δ_{C} 107,0; 110,8; 173,2 e 187,6 ppm, o que sugere uma estrutura dimérica simétrica. De acordo com estruturas similares relatadas na literatura, pode-se supor que o sinal em δ_{C} 18,1 ppm, refere-se ao C7 da ponte metilênica (ROCHA *et al.*, 1995).

As correlações extraídas do espectro de HMBC foram importantes para a determinação da posição dos substituintes de HMR2. Dentre essas, as de maior relevância estão aqui listadas: δ_H/δ_C 1,16/18,7; 19,3; 36,6; 210,5 - 1,41/25,4; 44,5; 173,2; 199,8 - 1,46/24,3; 44,5; 173,2; 199,8 - 3,31/107,0; 110,8; 173,2; 187,6 - 4,15/18,7; 19,3.

Em ambos espectros (RMN de ^1H e de ^{13}C) verifica-se sinais de menor intensidade correspondentes aos produtos formados devido ao tautomerismo ceto-enólico (ROCHA *et al.*, 1995).

A partir dos resultados obtidos com a análise espectroscópica, conclui-se que a substância HMR2 é o floroglucinol japonicina A (32), cujos dados coincidem com os relatados na literatura (ROCHA *et al.*, 1995).



Das partes aéreas de *H. myrianthum* foram isolados, a partir da fração metanólica, dois flavonóides, comumente encontrados nas espécies deste gênero (CROCKETT *et al.*, 2005).

Segundo TEKEL'OVÁ e colaboradores (2000), os flavonóides derivados da quercetina em *H. perforatum* estão localizados principalmente nas sépalas e pétalas. *H. myrianthum* é caracterizado pelas inflorescências numerosas, o que poderia explicar a abundância em hiperosídeo nesta espécie.

Da fração apolar das raízes de *H. myrianthum* foram obtidos os floroglucinóis uliginosina B e japonicina A, que já haviam sido descritos nas partes aéreas desta planta (FERRAZ *et al.*, 2002a; DALL'AGNOL *et al.*, 2005). Estes dados, mais uma vez

contrariam a afirmação de NAHRSTEDT e BUTTERWECK (1997), de que acilfloroglucínóis ocorrem exclusivamente nas partes reprodutivas das plantas.

2.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo descrito neste capítulo 1 permitem concluir que:

√ A análise cromatográfica das frações apolares das partes aéreas de *H. ternum* revelou a presença de grande quantidade de clorofilas e um acúmulo de terpenóides, sem compostos fenólicos majoritários. A observação do comportamento cromatográfico da fração acetato de etila mostrou uma predominância de compostos fenólicos, principalmente da classe dos flavonóides.

√ A partir da fração acetato de etila das partes aéreas de *H. ternum*, seis flavonóides derivados da quercetina foram identificados. Destes 3,7-dimetil-quercetina e 3-metil-quercetina e o biflavonóide 13,118-biapigenina encontram-se na forma de aglicona livre, enquanto guajaverina, isoquercitrina e hiperosídeo encontram-se como glicosídeos. Desta mesma fração foi, ainda, identificado o ácido fenólico denominado ácido 5-O-cafeoil-1-metoxi-quínico.

√ Na análise do perfil cromatográfico da fração *n*-hexânica das raízes desta espécie, observou-se a presença de uma substância majoritária, apresentando comportamento semelhante ao de derivados de floroglucinol, identificado como uliginosina B.

√ A análise cromatográfica da fração metanólica das partes aéreas de *H. myrianthum* evidenciou uma predominância de compostos fenólicos, sendo as substâncias majoritárias com características de flavonóides. Desta fração foram isolados e identificados os flavonóides quercetina e hiperosídeo.

√ Na fração apolar das raízes de *H. myrianthum* verificou-se um padrão de produção diferente do encontrado para as partes aéreas. Foi evidenciada a presença majoritária de japonicina A, sendo também identificado uliginosina B, ambos derivados diméricos de floroglucinol.

3. CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES DE *HYPERICUM*

3.1 INTRODUÇÃO

A produção de radicais livres ocorre continuamente em todas as células vivas, como consequência de numerosos processos fisiológicos e bioquímicos. Durante o metabolismo celular aeróbio há a geração de produtos secundários (radical ânion superóxido - $O_2^{\bullet-}$, radical hidroxila - $\bullet OH$, peróxido de hidrogênio - H_2O_2) na ordem de 2 % dos produtos finais (água e gás carbônico). Esses intermediários da redução parcial do oxigênio são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROs), que possuem reatividades químicas marcadamente acentuadas (CHEESEMAN & SLATER, 1993; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; VALKO *et al.*, 2006).

As células aeróbicas possuem mecanismos de defesa para proteger-se dos danos causados pelas espécies reativas. Os danos podem ocorrer quando a produção dessas substâncias excede sua eliminação através dos sistemas antioxidantes de defesa. Este desequilíbrio entre a produção e a habilidade das células em inativar estas espécies é chamado estresse oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; SIES, 2000).

Muitas evidências têm sugerido o envolvimento do estresse oxidativo na fisiopatologia de várias doenças crônicas, tais como arteriosclerose, câncer, e doenças neurodegenerativas (COOK & SAMMAN, 1996; BILICI *et al.*, 2001; BEAL, 2002; EL SHERBINY *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; MARIANI *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006). Dessa forma, a utilização de substâncias com capacidade antioxidante pode ser de grande relevância na prevenção e terapêutica de doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo.

Apesar do uso terapêutico de plantas ser tão antigo quanto a própria espécie humana, o conhecimento de suas propriedades antioxidantes é relativamente recente. Observa-se nas últimas décadas um enorme crescimento da investigação científica nessa área, envolvendo o efeito de extratos brutos, de frações purificadas ou de componentes isolados (DESMARCHELIER *et al.*, 1997; ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005b), destacando-se compostos fenólicos que, em muitos estudos,

têm demonstrado essa atividade (RICE-EVANS *et al.*, 1997; NG *et al.*, 2000; ŠKERGET *et al.*, 2005).

Para o gênero *Hypericum*, fonte abundante de substâncias fenólicas, a atividade antioxidante de extratos ou substâncias purificadas tem sido recentemente relatada em muitas publicações (HUNT *et al.*, 2001; VALENTÃO *et al.*, 2002; HEILMANN *et al.*, 2003; ATHANASAS *et al.*, 2004; GAMIOTEA-TURRO *et al.*, 2004; VALENTÃO *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005a).

3.2 OBJETIVOS

Investigar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos brutos metanólicos e frações enriquecidas (*n*-hexânica, diclorometânica e metanólica) de quatro espécies de *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*) nativas do Rio Grande do Sul, bem como avaliar o teor de substâncias fenólicas totais presentes nos extratos das espécies estudadas. Dentre as espécies de *Hypericum* avaliadas por nosso grupo de pesquisa, estas são as que apresentam melhor potencial farmacológico, o que motivou a escolha destas para essa etapa do trabalho.

Investigar o potencial antioxidante *in vitro* de compostos puros (benzopiranos HP1, HP2 e HP3, benzofenonas carifenona A e carifenona B, derivados de floroglucinol hiperbrasilol B, japonicina A e uliginosina B, e flavonóides guajaverina, hiperosídeo, isoquercitrina e 3-metil quercetina), sendo todas substâncias isoladas das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.

3.3 REVISÃO

3.3.1 Mecanismos antioxidantes

Segundo HALLIWELL (2001), antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação a substratos oxidáveis (carboidratos,

lipídios, ácidos nucleicos ou proteínas), retardam ou previnem de modo significativo a oxidação dessas moléculas, através da inibição de reações oxidativas em cadeia de diferentes maneiras.

Dentre as defesas antioxidantes endógenas desenvolvidas por organismos aeróbios para reduzir o acúmulo intracelular de EROs, destacam-se:

√ Enzimas que cataliticamente removem radicais livres e outras espécies reativas, tais como superóxido dismutases, catalases e peroxidases.

√ Metaloproteínas que minimizam a disponibilidade de agentes pró-oxidantes (íons ferro e cobre e moléculas do grupo “*hemo*”), tais como transferrinas, haptoglobinas, hemopexinas, metalotioneínas e ferritina.

√ Proteínas que protegem biomoléculas contra danos (inclusive danos oxidativos) através de outros mecanismos, tais como proteínas choque térmico.

√ Agentes que atuam como “*scavenger*” de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ou seja, seqüestram ou neutralizam radicais livres oxidando-se nesse processo, tais como glutathione, α -tocoferol, bilirrubina e ácido úrico (LARSON, 1988; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; MANCUSO *et al.*, 2003; SUZUKI, 2007).

Antioxidantes exógenos ingressam no organismo humano através dos alimentos, e atuam através de mecanismos não enzimáticos. O sistema endógeno de defesa pode ser auxiliado favoravelmente com a introdução dessas substâncias por meio da dieta (SILVA *et al.*, 2005b; VALKO *et al.*, 2006).

Em geral as reações antioxidantes envolvem passos múltiplos incluindo a iniciação, propagação e terminação de radicais livres. Os antioxidantes classificam-se em dois grupos de mecanismos: aqueles que inibem ou retardam a formação de radicais livres a partir de seus precursores instáveis (iniciação) são chamados antioxidantes preventivos; aqueles que interrompem a reação radicalar em cadeia (propagação) chamam-se antioxidantes “*chain-breaking*”. Esse é o grupo mais estudado de antioxidantes e o mecanismo pelo qual atuam é através da transferência de átomos

de hidrogênio. Especificamente, um antioxidante “*chain-breaking*” (AH) doa seu átomo de hidrogênio lábil a radicais peroxila (ROO^\bullet) muito mais rapidamente que ROO^\bullet reage com o substrato. O radical A^\bullet formado é estável e é incapaz de continuar a autoxidação da cadeia (OU *et al.*, 2001).

3.3.2 Antioxidantes de origem natural

A partir do início dos anos 80 tem aumentado consideravelmente o interesse na busca de antioxidantes de origem natural para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, com o intuito de substituir antioxidantes de origem sintética (ZHENG & WANG, 2001; SOBRATTEE *et al.*, 2005). Além disso, este interesse deve-se principalmente ao fato de que radicais livres estão relacionados ao desenvolvimento de várias desordens orgânicas (WILLCOX *et al.*, 2004). O consumo de substâncias antioxidantes, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo (RICE-EVANS *et al.*, 1997; ARREDONDO *et al.*, 2004).

As propriedades antioxidantes de substâncias de origem natural apresentam várias perspectivas relacionadas ao cuidado da saúde humana. Estudos indicam que muitos dos compostos antioxidantes presentes na dieta possuem atividades antiinflamatória, antiaterosclerótica, antitumoral, antimutagênica, anticarcinogênica, antibacteriana e antiviral. A prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas tem sido associada com a ingestão de frutas frescas, infusões e vegetais ricos em antioxidantes naturais, o que sugere que um maior consumo de tais compostos poderia diminuir o risco de mortalidade relacionado a essas enfermidades (COOK & SAMMAN, 1996; DE RIJK *et al.*, 1997; VELIOGLU *et al.*, 1998; YODIM *et al.*, 2002; CAI *et al.*, 2004; WILLCOX *et al.*, 2004; SOBRATTEE *et al.*, 2005; VALKO *et al.*, 2006).

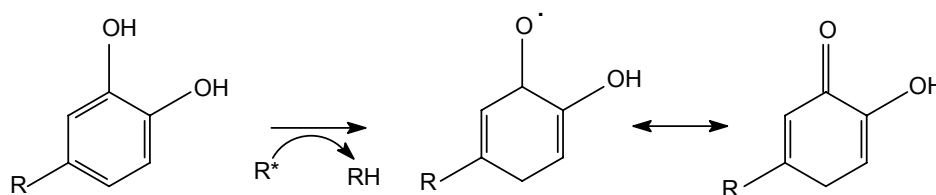
Além disso, embora poucas plantas medicinais sejam utilizadas como “antioxidantes”, suas propriedades terapêuticas podem ser em parte devidas à capacidade que as mesmas apresentam em neutralizar espécies reativas de oxigênio,

envolvidas no desenvolvimento de enfermidades para as quais a planta é indicada (DESMARCHELIER *et al.*, 1999; DESMARCHELIER *et al.*, 2000). Na busca de novas substâncias com ação antioxidante, muitas plantas têm sido avaliadas quanto a sua capacidade de neutralização de radicais livres (DESMARCHELIER *et al.*, 1997; DESMARCHELIER *et al.*, 2000; PAREJO *et al.*, 2003; VELÁSQUEZ *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005b).

Espécies vegetais podem apresentar uma ampla variedade de moléculas capazes de inativar radicais livres, tais como compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas, estilbenos, taninos, etc), compostos nitrogenados (alcalóides, aminas), vitaminas (E, C), terpenóides (carotenóides), bem como muitos outros metabólitos endógenos que exercem ação antioxidante (LARSON, 1988; VELIOGLU *et al.*, 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001; DESMARCHELIER *et al.*, 2000; NG *et al.*, 2000; ZHENG & WANG, 2001; SOBRATTEE *et al.*, 2005; O'BRIEN *et al.*, 2006).

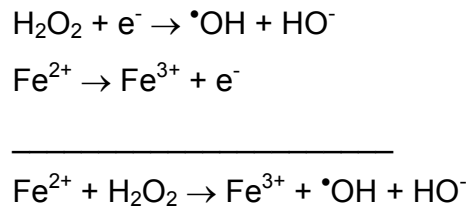
3.3.3 Compostos fenólicos

Muitos estudos têm demonstrado uma relação direta entre a atividade antioxidante e o conteúdo de substâncias fenólicas em plantas (VELIOGLU *et al.*, 1998; PAREJO *et al.*, 2003; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; KATALINIC *et al.*, 2006). Polifenóis apresentam estrutura química adequada para produzir ação antioxidante devido as suas propriedades redox, uma vez que possuem anéis aromáticos com substituintes hidroxílicos, que atuam como doadores de H ou elétrons, desempenhando um importante papel na captação e neutralização de radicais livres, tais como o oxigênio triplete e singlete e peróxidos (esquema 2.1) (RICE-EVANS *et al.*, 1997; ZHENG & WANG, 2001).



Esquema 2.1: Mecanismo de redução de substâncias fenólicas

Além disso, fenóis com dois grupamentos hidroxílicos adjacentes ou outros substituintes com capacidades quelantes, podem ligar-se a íons de metal de transição, tal como o ubíquo Fe^{2+} dos sistemas biológicos, inibindo a reação de Fenton (esquema 2.2), uma importante fonte de EROs (YOKOZAWA *et al.*, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2001).



Esquema 2.2: Reação de Fenton

Compostos fenólicos podem prevenir o câncer através da ação antioxidante e/ou modulação de muitas proteínas, podendo ainda inibir a carcinogênese atuando nos processos moleculares de iniciação, promoção e progressão (YANG *et al.*, 2001). Estudos com plantas utilizadas tradicionalmente na prevenção do câncer demonstraram forte correlação entre a ação antioxidante destas espécies e o conteúdo de substâncias fenólicas, revelando que ácidos fenólicos, flavonóides, taninos, cumarinas, lignanas, estilbenos e curcuminóides são os componentes antioxidantes dominantes nas plantas testadas (CAI *et al.*, 2004).

Em relação ao potencial antioxidante, os flavonóides constituem o grupo mais representativo desta classe, para os quais muitos trabalhos destacam a relação existente entre a sua estrutura química com a ação antioxidante (COOK & SAMMAN, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1997; AMIC *et al.*, 2003). Essas substâncias, abundantes em frutas, vegetais e plantas medicinais, apresentam uma forte capacidade de neutralizar radicais livres, além de serem considerados menos tóxicos do que antioxidantes sintéticos tais como butil-hidroxi-anisol (BHA) e butil-hidroxi-tolueno (BHT) (HOLLMAN & KATAN, 1997; PIETTA, 2000).

Estudos têm demonstrado que a peroxidação lipídica pode ser inibida por

flavonóides, que atuam como fortes moléculas seqüestrantes de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e radical hidroxila ($^{\bullet}OH$) e *quencher* do oxigênio singlete (1O_2), sendo esta atividade intimamente associada com sua estrutura química, especialmente ao número de grupamentos hidroxila ligados ao esqueleto básico e também a sua configuração. Tem sido proposto que estes compostos atuam como doadores de átomos de hidrogênio ao radical peroxila, inibindo, então, a autooxidação de ácidos graxos através da terminação da reação em cadeia (COOK & SAMMAN, 1996; SOOBRAATTEE *et al.*, 2005). Estes compostos podem ainda prevenir o dano oxidativo através de suas propriedades quelantes de íons metálicos que participam da produção de EROs via reação de Fenton, bem como mediante a inibição de enzimas tais como lipoxigenase, cicloxigenase, xantina oxidase, entre outras (COOK & SAMMAN, 1996).

Considerando a crescente importância de plantas e de produtos naturais na proteção contra danos promovidos pelo estresse oxidativo, espécies com elevados teores de substâncias fenólicas estimulam o interesse da comunidade científica, como é o caso das plantas do gênero *Hypericum*.

3.3.4 Atividade antioxidante de espécies de *Hypericum*

Nos últimos anos, estudos relatam atividade antioxidante para espécies de *Hypericum*, o que é esperado, uma vez que a presença de compostos fenólicos é comum nestas plantas. *Hypericum perforatum* é a espécie que apresenta o maior número de trabalhos relacionados à investigação das propriedades antioxidantes, principalmente na tentativa de relacionar esse efeito com a ação antidepressiva associada a esta planta. Isso porque há muitas evidências de que alterações em lipídios podem provocar a superprodução de EROs, e, em consequência, a atividade de enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica, e que estes fenômenos podem estar relacionados a fisiopatologia da depressão (BILICI *et al.*, 2001; KHANZODE *et al.*, 2003; YANIK *et al.*, 2004)

As propriedades antioxidantes demonstradas por extratos de *H. perforatum*

podem ser em parte responsáveis por alguns efeitos terapêuticos atribuídos a esta planta, nos quais a geração de radicais livres está implicada, tais como as propriedades antiinflamatórias e a ação no sistema nervoso central (SILVA *et al.*, 2005a). Vários trabalhos demonstram a capacidade de diferentes extratos desta espécie em seqüestrar radicais livres. O extrato hidroetanólico de *H. perforatum* padronizado em hipericinas apresentou capacidade de reação com o radical estável DPPH[•] (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BENEDÍ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005a).

Esta mesma ação foi verificada para um extrato enriquecido em flavonóides (ZOU *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005a), bem como para flavonóides isolados dessa fração, que apresentaram atividade de modo dose-dependente. Nessa fração, a presença majoritária dos flavonóides quercetina e hiperosídeo contribuiu para a atividade antioxidante como *scavenger* de radicais DPPH[•], superando o efeito promovido por α -tocoferol. Além da ação frente a esses radicais, esta fração apresentou forte capacidade de neutralizar radicais ânion superóxidos, gerados por oxidação do NADH, bem como radicais hidroxila, evidenciado através do efeito inibitório na degradação da desoxirribose induzida por essas espécies reativas (ZOU *et al.*, 2004). Considerando um extrato hidroetanólico padronizado em hipericinas, a neutralização de radicais hidroxila somente ocorreu em concentrações elevadas (BENEDÍ *et al.*, 2004).

A habilidade de *H. perforatum* em exibir poder de redução e capacidade de reação com radicais DPPH[•] sugere que seus componentes fitoquímicos atuem como doadores de elétrons e podem reagir com radicais livres, convertendo-os a produtos mais estáveis e terminar reações radicalares em cadeia (BENEDÍ *et al.*, 2004).

Em um estudo visando verificar a capacidade da infusão aquosa de *H. perforatum* em neutralizar radicais hidroxila, através do método do radical ABTS^{•+} (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiozolina-6-sulfonato), verificou-se considerável capacidade antioxidante expressa em equivalentes de Trolox, correlacionada ao alto teor de conteúdo fenólico desta infusão (IVANOVA *et al.*, 2005). Este estudo já havia sido previamente conduzido por SLOLEY e colaboradores (2000), onde extratos das folhas e

flores dessa planta demonstraram, através desse mesmo ensaio, capacidade em neutralizar radicais livres, que foi correlacionada com o conteúdo de flavonóides, entre eles quercetina e hiperosídeo. Esta atividade não foi correlacionada ao teor de hiperforina e hipericina, observando-se que uma amostra com alto conteúdo em hipericina, porém sem flavonóides, não apresentou capacidade de neutralizar radicais hidroxila.

Para esta planta também é relatada ação na inibição da peroxidação lipídica através de diferentes mecanismos, tanto em sistemas livres de células (HUNT *et al.*, 2001; BENEDÍ *et al.*, 2004; ZOU *et al.*, 2004) quanto na presença de células (HUNT *et al.*, 2001; JANG *et al.*, 2002; BENEDÍ *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005a), indicando que extratos de *H. perforatum* possuem a habilidade de proteger o dano oxidativo neuronal enzimático e não-enzimático.

Um extrato de *H. perforatum* enriquecido em flavonóides exibiu ação inibitória na peroxidação do ácido linoléico, utilizando o método do tiocianato, bem como preveniu de modo eficiente a peroxidação lipídica de lipossomas, induzida através do radical hidroxila, gerado via reação de Fenton (sistema redox ácido ascórbico/cloreto férrico), ou através do radical peroxila, gerado por ABAP, verificada através do ensaio do ácido tiobarbitúrico. Além disso, demonstrou eficiente poder redutor, ação que pode servir como um reflexo da atividade antioxidante (ZOU *et al.*, 2004). Da mesma maneira, o extrato hidroetanólico (80%) e frações acetato de etila e butanólica, contendo principalmente flavonóides glicosilados derivados da quercetina e agliconas de flores de *H. perforatum*, (SILVA *et al.*, 2005a), bem como extrato padronizado em hipericina (BENEDÍ *et al.*, 2004) exerceram efeito inibitório de maneira dose-dependente na peroxidação lipídica em sinaptossomas corticais de rato, induzida através da reação de Fenton, utilizando a formação de malondialdeído como índice do colapso oxidativo de membranas lipídicas (ensaio do ácido tiobarbitúrico).

Esses mesmos autores demonstraram inibição pelo extrato hidroetanólico padronizado em hipericina frente a peroxidação lipídica induzida através do sistema

NADPH, bem como inibição da atividade enzimática de xantina oxidase em homogenatos de cérebros de ratos. Utilizando vários experimentos *in vitro*, foi demonstrado proteção ao dano oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em linhagens celulares de feocromocitoma (PC12), através da avaliação da viabilidade celular frente à citotoxicidade e apoptose induzida por H_2O_2 (atividade enzimática de lactato desidrogenase e caspase-3, bem como acúmulo de espécies reativas nas células) (BENEDÍ *et al.*, 2004). Esta ação na proteção contra a apoptose induzida por H_2O_2 também foi demonstrada em linhagens celulares (SK-N-MC) de neuroblastoma humano (JANG *et al.*, 2002).

HUNT e colaboradores (2001) avaliaram o efeito antioxidante de preparações desta planta frente ao ânion superóxido. Extratos padronizados de *H. perforatum*, tanto em hipericina (Nature Plus[®]), quanto em hiperforina (Movana[®]), dissolvidos em solução aquosa alcalina, demonstraram significativa inibição na produção de peróxidos induzidos através do sistema xantina/xantina oxidase *in vitro*, tanto em um meio livre de células quanto em tecido vascular humano, através de uma relação dose-resposta inversa, onde a concentração mais diluída promoveu a maior inibição na geração dos radicais. Em concentrações elevadas (1:1) foi verificado um efeito pró-oxidante, que acredita-se não ser exercido no organismo em doses normais, devido à diluição na corrente sanguínea (HUNT *et al.*, 2001).

Estes autores postularam que os efeitos antioxidantes apresentados pelas preparações de *H. perforatum* poderiam estar relacionados ao conteúdo de hipericina uma vez que o extrato padronizado nesta substância pareceu apresentar propriedades antioxidantes mais significativas (HUNT *et al.*, 2001). No entanto, para SILVA e colaboradores (2005a) outros compostos, tais como derivados de ácidos fenólicos e flavonóides, são mais relevantes para esta atividade, pois frações contendo hiperforina e hipericinas foram inefetivas na redução da peroxidação lipídica, em todas as concentrações testadas.

Da mesma forma que no trabalho desenvolvido por HUNT e colaboradores

(2001), concentrações elevadas das frações acetato de etila, butanólica e aquosa de *H. perforatum*, ricas em flavonóides e ácidos fenólicos demonstraram um comportamento pró-oxidante, evidenciado pela diminuição da eficiência na proteção da peroxidação lipídica em sinaptossomas corticais de rato, induzida pelo sistema ascorbato/Fe⁺². No entanto quando avaliado o extrato hidroetanólico esse efeito não foi evidenciado, mesmo em altas concentrações (SILVA *et al.*, 2005a).

Em um modelo animal, o tratamento de ratos com baixas concentrações do extrato hidroetanólico (80%) desta planta resultou em um efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo comum no estado de demência. Isto foi demonstrado através da diminuição nas concentrações de malondialdeído no cérebro, uma vez que seu nível elevado apresenta-se como um índice da peroxidação lipídica *in vivo*. Além disso, foi observado aumento na concentração de glutathiona cerebral, tripeptídeo que participa na manutenção da homeostasia oxidante e a detoxificação de EROs em células cerebrais, cuja depleção têm sido considerada um índice relevante do estresse oxidativo nas células nervosas. O efeito protetor foi evidenciado ainda com uma diminuição na atividade enzimática de glutathiona peroxidase, uma vez que a expressão aumentada e conseqüentemente a atividade das enzimas antioxidantes endógenas SOD e glutathiona peroxidase é indicativo de quadros oxidativos (EL-SHERBIN *et al.*, 2003). Da mesma forma, utilizando camundongos para avaliar a participação do estresse oxidativo na síndrome da fadiga crônica, o extrato de *H. perforatum* administrado oralmente reduziu de modo significativo a peroxidação lipídica, evidenciado por avaliações bioquímicas através do aumento na concentração de glutathiona cerebral (SINGH *et al.*, 2002).

Muitos autores sugerem que em função da ação neuroprotetora, o extrato padronizado de *H. perforatum*, utilizado como antidepressivo e possuindo propriedades antioxidantes, apresenta uma vantagem em pacientes depressivos com desordens induzidas por estresse oxidativo nas quais a geração de radicais livres está implicada (HUNT *et al.*, 2001; JANG *et al.*, 2002; EL SHERBINY *et al.*, 2003; BENEDÍ *et al.*, 2004).

Levando em consideração os vários trabalhos que avaliam os extratos de *H.*

perforatum frente à atividade antioxidante, é possível concluir que seus efeitos neuroprotetores se relacionam ao conteúdo de compostos fenólicos, que apresentam habilidade em atuar na neutralização de radicais livres. Como foi demonstrado, é possível ainda inferir que esta ação está muito mais relacionada ao teor de flavonóides, do que ao conteúdo de hipericina e hiperforina nos extratos.

Outras espécies do gênero têm apresentado, em muitos sistemas experimentais, a capacidade de reação com espécies reativas de oxigênio, bem como inibição ao dano oxidativo no DNA e peroxidação lipídica.

O extrato metanólico de *H. triquetrifolium*, bem como flavonóides isolados desta espécie, apresentaram atividade antioxidante avaliada através dos métodos de bioautografia com DPPH[•] e de inibição da peroxidação lipídica lipossomal (CONFORTI *et al.*, 2002; COULADIS *et al.*, 2002a; COULADIS *et al.*, 2002b). Outras cinco espécies do gênero foram avaliadas quanto à proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico, demonstrando-se que extratos metanólicos de *H. triquetrifolium*, *H. empetrifolium* e *H. rumeliacum* apresentaram ação similar à de α -tocoferol (COULADIS *et al.*, 2002a).

A avaliação do potencial antioxidante de frações éter de petróleo, clorofórmica, acetato de etila e aquosa de *H. hyssopifolium*, frente à inibição na produção de peróxidos pelo ensaio do tiocianato demonstrou efeito pró-oxidante das frações acetato de etila e aquosa. No entanto, todas apresentaram capacidade de reação com o radical DPPH[•], sendo a fração acetato de etila a mais ativa, e com maior conteúdo de compostos fenólicos. Além disso, embora não tenha sido verificada ação inibitória sobre peróxidos, da fração acetato de etila foram isoladas substâncias com essa atividade. Isso pode ser explicado pela presença de muitos outros componentes na fração acetato de etila, muitos dos quais podem atuar como pró-oxidantes, enquanto outros como antioxidantes, sendo a soma dessas atividades determinante para o efeito exercido. Nesse caso, há o predomínio de compostos pró-oxidantes, atividade exercida pela fração (CAKIR *et al.*, 2003).

H. fasciculatum e *H. styphelioides* demonstraram efeito hepatoprotetor quando avaliados frente à peroxidação lipídica hepática induzida por tetracloreto de carbono, em ratos. A ação protetora das tinturas hidroalcólicas (50%) destas plantas foi evidenciada mediante avaliações bioquímicas, observando-se menores valores sanguíneos das enzimas TGO e TGP, indicativas de danos hepáticos, e menor dano visualizado por exame anatomopatológico nos grupos tratados com os extratos (RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

Infusões aquosas de *H. androsaemum* também apresentaram efeito protetor em hepatócitos isolados de ratos, contra danos oxidativos induzidos por hidroperóxido de *tert*-butil (*t*-BHP), verificados através da avaliação da viabilidade celular e inibição da peroxidação lipídica promovida por radicais peroxila e alcoxila gerados durante o metabolismo hepático de *t*-BHP (VALENTÃO *et al.*, 2004).

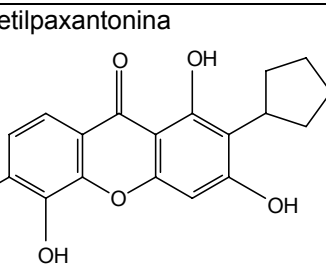
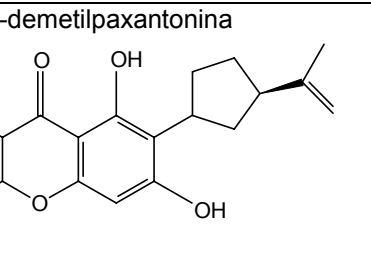
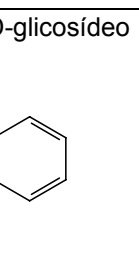
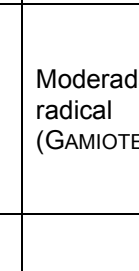
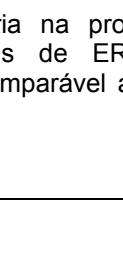

Foi demonstrado, ainda, para essa mesma infusão, atividade seqüestrante de ânion superóxido e do radical hidroxila, bem como de ácido hipocloroso (HOCl), uma potente ERO produzida no organismo por oxidação dos íons Cl^- em neutrófilos, nos sítios de inflamação (VALENTÃO *et al.*, 2002). A ação antioxidante desta planta foi relacionada ao conteúdo de fenólicos, tais como ácidos 3- e 5-cafeilquínicos, quercetina e seus derivados glicosilados (VALENTÃO *et al.*, 2002; VALENTÃO *et al.*, 2004).

A capacidade de neutralizar o radical $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi demonstrada tanto através de um sistema de avaliação não enzimático, onde o radical é gerado por oxidação do NADH, quanto em um modelo enzimático, onde o mesmo é gerado através do sistema xantina/xantina oxidase (VALENTÃO *et al.*, 2002). O efeito antioxidante da infusão deu-se de modo concentração-dependente. No entanto, em concentrações elevadas foi evidenciado um efeito pró-oxidante no ensaio para verificação da ação sobre os radicais hidroxila, gerados através da reação de Fenton. Fenólicos com potencial de oxidação menor que o do Fe^{+3} e Cu^{+2} e seus complexos podem reduzir esses metais, sendo potencialmente pró-oxidantes, tendo em vista que o Fe^{+2} e o Cu^+ participam da reação de Fenton (VALENTÃO *et al.*, 2002).

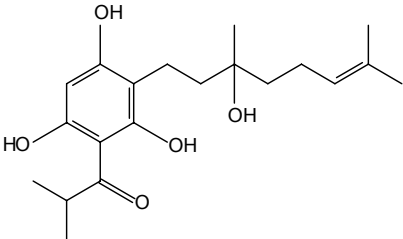
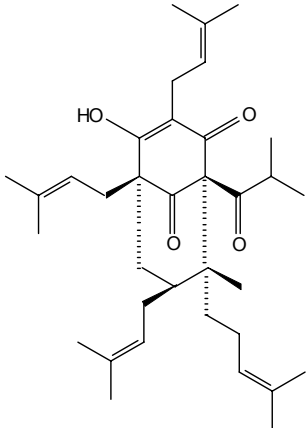
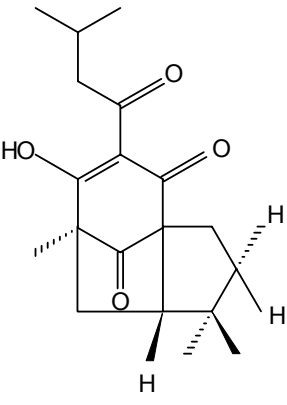
Extratos aquoso, metanólico e diclorometânico de *H. jovis* apresentaram capacidade de reação com o radical DPPH*, sendo a fração metanólica mais ativa nesse ensaio. Além disso, foi verificada ação inibitória na produção endógena de níveis basais de EROs em fibroblastos humanos, sendo a fração diclorometânica mais efetiva em reduzir a concentração de espécies reativas nessas células (ATHANASAS *et al.*, 2004).

Além de extratos e frações enriquecidas, o potencial antioxidante vem sendo demonstrado também para compostos fenólicos isolados das espécies do gênero. O quadro (2.1) a seguir apresenta atividades relacionadas a algumas dessas substâncias.

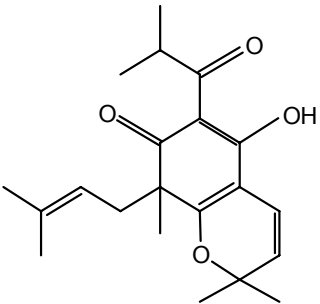
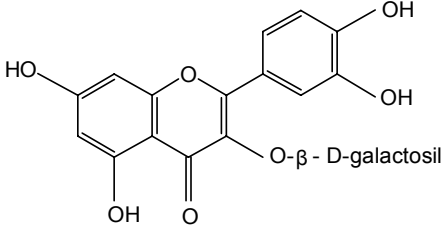
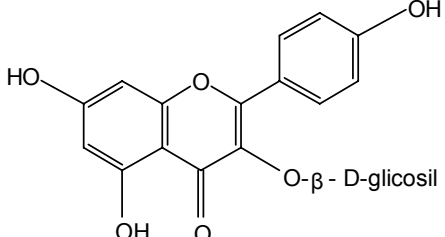
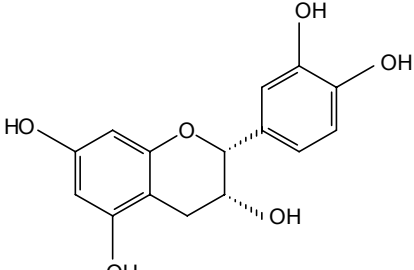
Quadro 2.1: Atividades relacionadas ao potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados das espécies de *Hypericum*.

Espécie	Substância	Atividade
<i>Hypericum chinensis</i>	3,4-diidroxil-1-metoxi-xantona 	Reatividade frente ao radical DPPH* (MASUDA <i>et al.</i> , 2003).
<i>Hypericum styphelioides</i>	5-O-desmetilpaxantonina 	Atividade de captura do cátion radical ABTS** e de radicais peroxila, comparável à quercetina e rutina (GAMIOTEA-TURRO <i>et al.</i> , 2004).
<i>Hypericum styphelioides</i>	6-desoxi-5-O-demetilpaxantonina 	Atividade de captura do cátion radical ABTS** e de radicais peroxila, comparável à quercetina e rutina (GAMIOTEA-TURRO <i>et al.</i> , 2004).
<i>Hypericum styphelioides</i>	3,5-diidroxibenzofenona-4-β-D-glicosídeo 	Moderada atividade de captura do cátion radical ABTS** e de radicais peroxila (GAMIOTEA-TURRO <i>et al.</i> , 2004).
<i>Hypericum styphelioides</i>	3-geranil-1-(3-metilbutanoil)-floroglucinol 	Moderada atividade de captura do cátion radical ABTS** e de radicais peroxila (GAMIOTEA-TURRO <i>et al.</i> , 2004).
<i>Hypericum jovis</i>		Ação inibitória na produção endógena de níveis basais de EROs em fibroblastos humanos, comparável ao Trolox (ATHANASAS <i>et al.</i> , 2004).

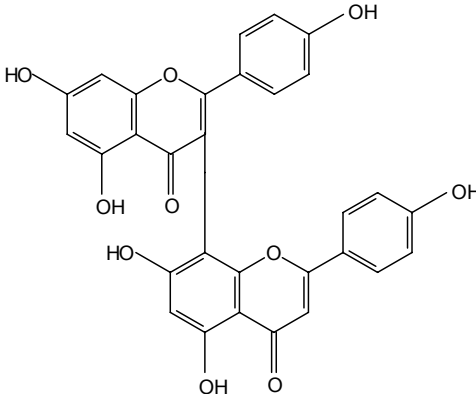
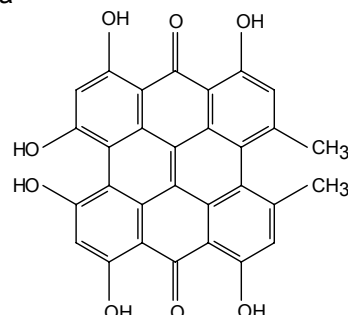
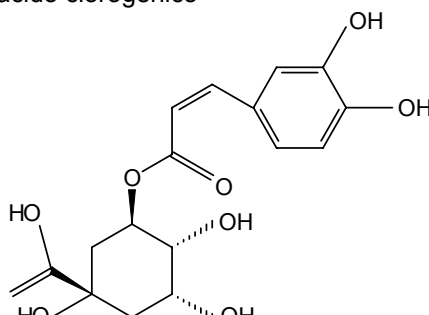
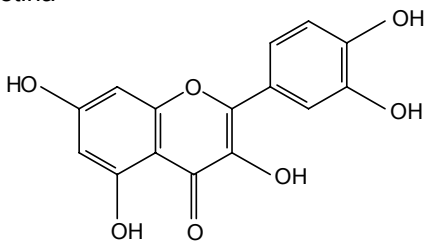
Continuação do quadro 2.1

<i>Hypericum jovis</i>	hiperjovinol A 	<p>Ação inibitória na produção endógena de níveis basais de EROs em fibroblastos humanos, comparável ao Trolox. Prevenção na produção de EROs em fibroblastos humanos induzida exogenamente por H₂O₂ (ATHANASAS <i>et al.</i>, 2004).</p>
<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperforina 	<p>Proteção da lise oxidativa de células polimorfonucleares humanas, estimulada por N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLF), através da redução na formação de espécies reativas, mas não quando as células foram estimuladas com zimosan opsonizado, o que sugere que atua sobre um mecanismo específico de geração de radicais livres na cascata oxidativa induzida por FMLF (HEILMANN <i>et al.</i>, 2003).</p>
<i>Hypericum papuanum</i>	ialibinona E 	<p>Proteção da lise oxidativa de células polimorfonucleares humanas, estimulada por FMLF, através da redução na formação de espécies reativas, mas não quando as células foram estimuladas com zimosan opsonizado. Inativo frente ao radical DPPH[•]. Atividade frente ao radical ânion superóxido dependente da fonte de O₂^{•-} e do alvo de ataque deste radical: inibição da produção de radicais ânion superóxido nos sistemas enzimáticos peroxidase/ H₂O₂ e xantina oxidase/hipoxantina; porém inativo na proteção da atividade da fosfatase calcineurina contra os efeitos inibitórios de O₂^{•-}. Os dados sugerem que atua sobre o mecanismo específico de geração de radicais livres na cascata oxidativa induzida por FMLF e não apenas por uma atividade inespecífica de neutralização de espécies reativas (HEILMANN <i>et al.</i>, 2003).</p>

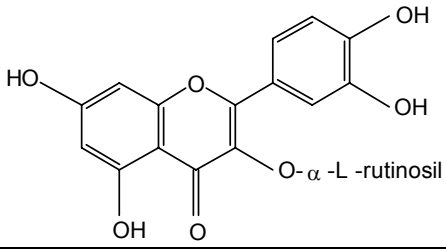
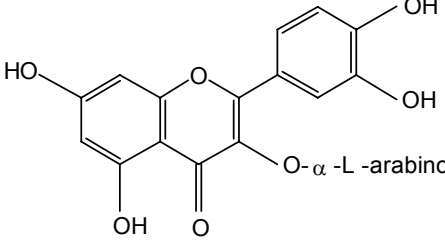
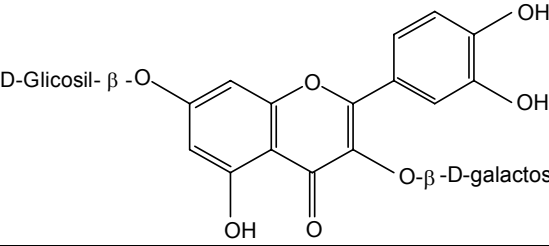
Continuação do quadro 2.1

<i>Hypericum papuanum</i>	hiperguirona B 	Proteção da lise oxidativa de células polimorfonucleares humanas, estimulada por FMLF, através da redução na formação de espécies reativas, mas não quando as células foram estimuladas com zimosan opsonizado, o que sugere que atua sobre um mecanismo específico de geração de radicais livres na cascata oxidativa induzida por FMLF. Inativo frente ao radical DPPH [•] . Inativo na captação de radicais ânion superóxido nos sistemas enzimáticos peroxidase/ H ₂ O ₂ e xantina oxidase/hipoxantina, bem como na proteção da atividade da fosfatase calcineurina contra os efeitos inibitórios de O ₂ ^{•-} . Os dados sugerem que atua sobre o mecanismo específico de geração de radicais livres na cascata oxidativa induzida por FMLF e não apenas por uma atividade inespecífica de neutralização de espécies reativas (HEILMANN <i>et al.</i> , 2003).
<i>Hypericum triquetrifolium</i> <i>Hypericum hyssopifolium</i>	quercetina-3-O-β-galactosídeo 	Potente atividade antioxidante frente ao radical DPPH [•] - método da bioautografia (CONFORTI <i>et al.</i> , 2002) e fotolorimétrico (CAKIR <i>et al.</i> , 2003) - e na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico (CONFORTI <i>et al.</i> , 2002) Inibição na peroxidação lipídica do ácido linoléico, no ensaio do tiocianato (CAKIR <i>et al.</i> , 2003). Forte capacidade de neutralizar radicais ânion superóxidos, gerados por oxidação do NADH. Poder redutor (ZOU <i>et al.</i> , 2004).
<i>Hypericum triquetrifolium</i>	canferol-3-O-glicosídeo 	Potente atividade antioxidante frente ao radical DPPH [•] (método da bioautografia) e na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico (CONFORTI <i>et al.</i> , 2002).
<i>Hypericum triquetrifolium</i>	(-)-epicatequina 	Potente atividade antioxidante frente ao radical DPPH [•] (método da bioautografia) e na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico. A presença da -OH livre na posição 3 contribui fortemente para essa ação (CONFORTI <i>et al.</i> , 2002).

Continuação do quadro 2.1

<p><i>Hypericum triquetrifolium</i></p> <p><i>Hypericum hyssopifolium</i></p>	<p>13,118-biapigenina</p> 	<p>Molécula com 6 hidroxilas fenólicas, responsáveis pela atividade antioxidante: frente ao radical DPPH* - método da bioautografia (CONFORTI <i>et al.</i>, 2002) e fotolorimétrico (CAKIR <i>et al.</i>, 2003); na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, verificada através do ensaio com ácido tiobarbitúrico (CONFORTI <i>et al.</i>, 2002), comparável ao α-tocoferol (COULADIS <i>et al.</i>, 2002b); na inibição da produção de peróxidos pelo ensaio do tiocianato (CAKIR <i>et al.</i>, 2003)</p>
<p><i>Hypericum triquetrifolium</i></p> <p><i>Hypericum hyssopifolium</i></p>	<p>hipericina</p> 	<p>Molécula com 6 hidroxilas fenólicas, com forte inibição na produção de peróxidos pelo ensaio do tiocianato (CAKIR <i>et al.</i>, 2003), porém com baixa atividade na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico, provavelmente devido a sua hidrofobicidade (CONFORTI <i>et al.</i>, 2002) Baixa atividade frente ao radical DPPH* (CAKIR <i>et al.</i>, 2003).</p>
<p><i>Hypericum triquetrifolium</i></p>	<p>ácido clorogênico</p> 	<p>Potente atividade na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico (COULADIS <i>et al.</i>, 2002b).</p>
<p><i>Hypericum triquetrifolium</i></p> <p><i>Hypericum hyssopifolium</i></p> <p><i>Hypericum perforatum</i></p>	<p>quercetina</p> 	<p>Proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico (COULADIS <i>et al.</i>, 2002b). Inibição na produção de peróxidos (ensaio do tiocianato). Alta capacidade de reação com o radical DPPH* (CAKIR <i>et al.</i>, 2003; ZOU <i>et al.</i>, 2004). Forte capacidade de neutralizar radicais ânion superóxidos, gerados por oxidação do NADH. Elevado poder redutor (ZOU <i>et al.</i>, 2004). Proteção hepática contra a citotoxicidade induzida por hidroperóxido de tert-butil (<i>t</i>-BHP), verificados através da avaliação da viabilidade celular e inibição da peroxidação lipídica promovida por radicais peroxila e alcóxila gerados durante o metabolismo hepático de <i>t</i>-BHP (VALENTÃO <i>et al.</i>, 2004).</p>

Continuação do quadro 2.1

<p><i>Hypericum triquetrifolium</i></p> <p><i>Hypericum perforatum</i></p>	<p>rutina</p>  <p>O-α-L-rutinosil</p>	<p>Potente atividade na proteção contra a peroxidação lipídica de lipossomas, no ensaio do ácido tiobarbitúrico (COULADIS <i>et al.</i>, 2002b). Forte capacidade de reação com o radical DPPH[*]; Forte capacidade de neutralizar radicais ânion superóxidos, gerados por oxidação do NADH. Poder redutor (ZOU <i>et al.</i>, 2004).</p>
<p><i>Hypericum hyssopifolium</i></p>	<p>quercetina-3-O-α-arabinofuranosídeo</p>  <p>O-α-L-arabinofuranosil</p>	<p>Potente atividade frente ao radical DPPH[*] e capacidade de inibição da produção de peróxidos pelo ensaio do tiocianato (CAKIR <i>et al.</i>, 2003)</p>
<p><i>Hypericum hyssopifolium</i></p>	<p>quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo-7-O-β-D-glicopiranosídeo</p>  <p>D-Glicosil-β-O-</p> <p>O-β-D-galactosil</p>	<p>Inibição na produção de peróxidos pelo ensaio do tiocianato. Alta capacidade de reação com o radical DPPH[*] (CAKIR <i>et al.</i>, 2003)</p>

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos para avaliação do potencial antioxidante foram realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob supervisão dos professores Dr. Raquel Bridi e Dr. Carlos Severo Dutra Filho e no Departamento de Ciências Químicas da Facultad de Química y Biología da Universidad de Santiago de Chile sob supervisão do professor Dr. Eduardo G. Lissi.

Para um melhor entendimento, um esquema da metodologia está apresentado como anexo (Anexo IV, página 301).

3.4.1 Preparação dos extratos

As espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, avaliadas em relação ao potencial antioxidante, foram coletadas em diferentes localidades do Rio Grande do Sul durante o período de floração dos vegetais, entre os meses de setembro a março. As exsicatas para a devida identificação e registro do material vegetal foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (tabela 2.1).

Tabela 2.1: Dados sobre a coleta do material vegetal e registro em herbário.

Espécie	Local e Data de coleta	ICN
<i>H. caprifoliatum</i> Cham. & Schltdl.	Morro Santana, Porto Alegre novembro 2004	Bordignon 1400
<i>H. carinatum</i> Griseb.	Glorinha dezembro, 2004	Bordignon 1520
<i>H. myrianthum</i> Cham. & Schltdl.	Paraíso do Sul dezembro, 2004	Bordignon 1402
<i>H. polyanthemum</i> Klotzsch ex Reichardt.	Guaritas, Caçapava do Sul novembro, 2004	Bordignon 1429

As partes aéreas das plantas secas sob ambiente arejado sem incidência de luz solar direta, trituradas em moinho de facas, foram divididas em duas porções para preparo do extrato bruto e das frações. O extrato bruto foi obtido submetendo uma porção do material vegetal seco à extração com metanol, por maceração estática (3 x 24 horas). Em paralelo, a outra parte da amostra foi fracionada por extração em aparelho de Soxhlet (5 x 6 horas), utilizando-se solventes em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano e metanol). A eliminação do solvente foi realizada em evaporador rotatório de pressão reduzida, em temperatura não superior a 55°C.

3.4.2 Obtenção de substâncias purificadas

As substâncias a serem analisadas foram obtidas mediante isolamento a partir da planta de origem. Para tal, a metodologia utilizada foi a previamente descrita na literatura. Os benzopiranos HP1 (12), HP2 (13) e HP3 (14) foram isolados de *H. polyanthemum* (FERRAZ *et al.*, 2001); as benzofenonas carifenona A (10) e carifenona B (11) de *H. carinatum* (BERNARDI *et al.*, 2005), os floro-glucinos japonicina A (32) e

uliginosina B (30) de *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a; DALL'AGNOL *et al.*, 2004) e hiperbrasilol B (17) de *H. caprifoliatum* (NÖR *et al.*, 2004) e os flavonóides guaijaverina (27), hiperosídeo (29), isoquercitrina (28) e 3-metil quercetina (24), isolados de *H. ternum*, como descrito previamente no capítulo 1.

3.4.3 Determinação de fenóis totais

As concentrações de fenóis totais nos extratos bruto metanólico, e frações metanólica, diclorometânica e *n*-hexânica de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* foram determinadas de acordo com o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON & ROSSI, 1965), utilizando quercetina como substância de referência (IVANOVA *et al.*, 2005). O reagente de FOLIN-CIOCALTEAU é formado por uma solução de íons poliméricos complexos formados a partir dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico, que oxida fenolatos e com sua redução forma complexos de cor azul (SINGLETON & ROSSI, 1965). Brevemente, a amostra (em diluição apropriada para a medida espectrofotométrica) foi oxidada com 5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (Merck® 2N diluído em água destilada 1:10) sendo essa reação neutralizada com volumes variáveis de solução saturada de carbonato de sódio (7,5 %), necessário para completar o volume final de reação em 10 mL. Esta mesma mistura, substituindo-se o reagente de Folin-Ciocalteu por água destilada, foi utilizada como branco no espectrofotômetro. Após incubação por 45 minutos à temperatura ambiente, a absorvância da solução de coloração azul resultante do processo foi medida a $\lambda=765$ nm em espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard 8451^a. A quantificação foi realizada com base em uma curva padrão de quercetina (soluções metanólicas nas concentrações de 0; 0,65; 1,30; 1,95; 3,25 e 6,5 $\mu\text{g/mL}$) e os resultados foram expressos como equivalentes de quercetina (EQ/g: miligramas de quercetina por grama de extrato seco, utilizando para o cálculo a seguinte equação (2.1):

$$(2.1) C=cV/m$$

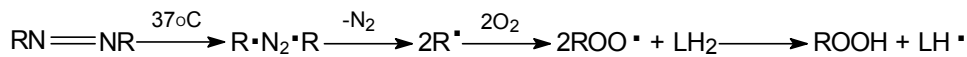
Onde, "C" é o conteúdo total de fenólicos presente na amostra (mg de

quercetina /g de extrato seco); “c” é a concentração de quercetina estabelecida através da curva padrão (mg/mL), “V” é o volume final de reação (mL) e “m” é a massa de extrato utilizado na leitura de absorvância (g) (MILIAUSKAS *et al.*, 2004).

3.4.4 Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP)

A medida do TRAP (*Total Radical-trapping Antioxidant Parameter*), que avalia a capacidade antioxidante total de misturas complexas, foi realizada segundo LISSI e colaboradores (1992), com algumas modificações. Este é um método sensível e reprodutível, podendo ser utilizado para determinar a capacidade antioxidante de misturas, tais como extratos de plantas (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).

Esta determinação foi realizada pela medida da intensidade de quimioluminescência do luminol induzida na presença de radicais peroxila formados pela decomposição térmica de 2,2'-azobis-(2-amidinopropano) (ABAP) (esquema 2.3) (LISSI *et al.*, 1992; EVELSON *et al.*, 2001).



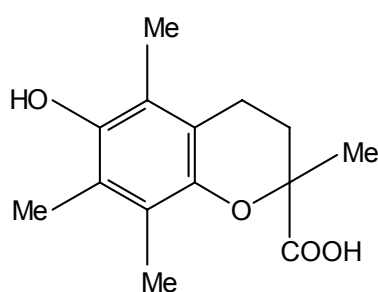
Esquema 2.3: Mecanismo de quimioluminescência do luminol

A adição de misturas complexas de antioxidantes, tais como fluidos biológicos e extratos de plantas a uma solução contendo radicais peroxila produzidos pelo ABAP, leva a uma diminuição na quimioluminescência, por determinado período, denominado tempo de indução, que é proporcional à concentração de antioxidantes presentes na amostra (LISSI *et al.*, 1992).

A mistura de reação (3 mL) foi constituída por uma solução contendo a fonte de radicais livres (ABAP 10 mM) em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 e 10 µL da solução de luminol (4 mM, preparada em NaOH 0,1 M), utilizado como amplificador do sinal de quimiloluminescência. Os tubos utilizados para o ensaio permaneceram vazios no escuro por pelo menos 30 minutos. Após a contagem basal de luminescência dos

tubos vazios por 80 segundos (contagens a cada 20 segundos), adicionou-se a mistura de reação, sendo a leitura realizada por mais 80 segundos, sendo essa medida considerada o valor inicial.

Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) (33), um análogo hidrossolúvel de α -tocoferol, e quercetina foram utilizados como substâncias antioxidantes de referência. Amostras foram testadas separadamente (10 μ L) usando-se diferentes concentrações de trolox, quercetina (320, 160, 120 e 80 μ M), carifenona A, carifenona B, uliginosina B (1,0 e 0,5 mg/mL) e extratos brutos das espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (1,0; 0,75; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL). Os resultados foram expressos considerando a concentração final na mistura de reação. As amostras testadas foram dissolvidas em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4 contendo 10% de tween 80 (compostos isolados), ou em metanol (extratos brutos e quercetina). O efeito dos solventes foi analisado no procedimento experimental, não ocorrendo diferença entre a quimioluminescência produzida pelo solvente e a quimioluminescência basal.



(33)

A medida de quimioluminescência foi realizada em cintilador Wallac 1409, como contagens a cada 20 segundos, por um período que promovesse o retorno da quimioluminescência a valores superiores a 20 % dos valores iniciais. Estes foram posteriormente transformados em contagens por minuto (CPM).

3.4.5 Avaliação da capacidade de reação com radicais peroxila (ORAC-PGV)

A avaliação da capacidade de reação com radicais peroxila e determinação do índice ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) foi realizada segundo a metodologia descrita LÓPEZ-ALARCÓN & LISSI (2006). Os radicais peroxila foram gerados mediante a termólise de ABAP, utilizando pirogalol vermelho (PGV) como molécula alvo.

Esse ensaio mede a habilidade de compostos antioxidantes em competir com o PGV na captura de radicais peroxila, onde substâncias de maior reatividade inibem o consumo de PGV. Esse consumo é monitorado mediante um declínio na absorvância da molécula alvo, quando incubado na presença de uma fonte de radical. Soluções de extratos brutos metanólicos das espécies de *Hypericum* foram preparadas em metanol imediatamente antes do uso (*H. caprifoliatum* 2,5 mg/mL; *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthum* 5 mg/mL). Os resultados foram expressos considerando a concentração final das amostras na mistura de reação. Dentre as substâncias puras isoladas avaliou-se os flavonóides glicosilados guaijaverina, hiperosídeo e isoquercetrina, na concentração final de 100 µM, preparadas em metanol imediatamente antes do uso. Soluções estoque de ABAP (600 mM) e de PGV (0,1 mM) foram preparadas diariamente em tampão fosfato:metanol (60:40) 75 mM a pH 7,4. A mistura contendo ABAP (10 mM) e PGV (5 µM), em tampão fosfato:metanol (60:40) (75 mM) a pH 7,4, com (25 µL), ou sem (controle) a amostra avaliada ou a substância referência como antioxidante (trolox e quercetina) (volume final de 3,0 mL) foi incubada a uma temperatura de 37°C, em cubeta termostatizada de espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard 8453. O consumo de PGV, associado a sua incubação na presença de ABAP foi avaliado a partir de uma diminuição progressiva da absorvância (A), observada no comprimento de onda de 540 nm. Valores de (A/A_0) , onde A_0 = absorvância inicial, foram plotados em função do tempo. Para a obtenção do índice ORAC foram calculadas áreas sobre a curva (ASC), onde a integração foi representada até o tempo em que (A/A_0) alcançava um valor 0,2. Os resultados finais foram calculados através da equação 2.2, e expressos como equivalentes de trolox (ET/g:

μMol de trolox por grama de extrato seco). É importante salientar que o valor de ORAC é independente da concentração de antioxidante avaliada, uma vez que observa-se uma relação linear entre a ASC obtida e a concentração de amostra antioxidante avaliada.

$$(2.2) \text{ ORAC} = (ASC_{\text{Amostra}} - ASC_0) / (ASC_{\text{Trolox}} - ASC_0) \times [\text{Trolox}] / [\text{Amostra}]$$

Onde, “ASC_{Amostra}” é a área sobre a curva na presença da amostra avaliada, integrada entre o tempo zero e 80% do consumo da molécula alvo (PGV), “ASC₀” é a área sobre a curva do controle e “ASC_{Trolox}” é a área sobre a curva na presença de trolox.

3.4.6 Avaliação da capacidade de reação com 2,2 difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•])

3.4.6.1 Ensaio bioautográfico

O ensaio com DPPH[•] foi realizado preliminarmente como um método rápido de *screening*, utilizando bioautografia em placas de CCD (CONFORTI *et al.*, 2002). Através dessa técnica é possível uma avaliação da atividade antioxidante das amostras testadas, em função da capacidade das mesmas em neutralizar o radical livre estável DPPH[•], de coloração violeta, e cuja redução promove a formação de coloração amarela, devido a formação de difenil-picril-hidrazina. Para tanto, utilizou-se 20 μL de uma solução 20 mg/mL das frações *n*-hexânica, diclorometânica e metanólica, aplicadas em placas cromatográficas de sílica gel. O sistema eluente foi constituído de *n*-hexano:diclorometano (60:40) para a fração *n*-hexânica, diclorometano:metanol (95:5) para a fração diclorometânica acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10) para a fração metanólica. Após a eluição e secagem das placas, essas foram nebulizadas com solução de DPPH[•] 0,2% e examinadas alguns minutos após a nebulização. Compostos com capacidade de redução do DPPH[•] apareceram como manchas amarelas contra o fundo de cor violeta.

3.4.6.2 Ensaio espectrofotométrico

A avaliação qualitativa e quantitativa da atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] foi realizada através de medidas espectrofotométricas do consumo do radical, na presença de substâncias antioxidantes (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995). Para tanto, alíquotas de 25 µL de soluções etanólicas dos extratos e frações, em diferentes concentrações, bem como volumes variáveis de solução etanólica dos compostos purificados (para a obtenção de uma concentração final de análise entre 12,5 e 400 µM) foram adicionados em cubetas contendo solução etanólica 60 µM do radical (controle) (Coeficiente de absorção molar_{517nm}: 11500 M⁻¹cm⁻¹), com volume final de reação de 3,0 mL. A medida de absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-visível Hewlett Packard 8453, iniciando imediatamente após a mistura das soluções. O decréscimo de absorvância foi avaliado a $\lambda=517$ nm e em temperatura de 25°C, com um tempo total de reação de 600 segundos para todas as amostras. Etanol foi utilizado como branco no espectrofotômetro. Quercetina foi utilizada como substância antioxidante de referência. Os dados experimentais da cinética de consumo de DPPH[•] na presença das amostras avaliadas foram ajustados para avaliar a quantidade total de compostos antioxidantes em extratos, frações e produtos isolados (do consumo extrapolado a tempo infinito) e o percentual de compostos de alta e baixa reatividade presentes.

3.4.7 Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada por análise de variância One-Way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software para cálculos estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0[®]. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Rendimento dos extratos

O rendimento das frações *n*-hexânica, diclorometânica e metanólica das quatro espécies de *Hypericum* avaliadas em relação à atividade antioxidante estão apresentados na tabela 2.2. Para os cálculos de rendimento empregou-se a massa seca de material vegetal. Dentre os extratos brutos metanólicos, *H. polyanthemum* apresentou o maior rendimento. Considerando o fracionamento, a fração metanólica apresentou o maior rendimento em todas as espécies, seguindo uma ordem crescente para *H. myrianthum*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum* e *H. polyanthemum*. A fração de menor rendimento foi a diclorometânica da espécie *H. caprifoliatum* ($p < 0,0001$).

Tabela 2.2: Rendimento em porcentagem dos extratos brutos metanólicos e frações metanólicas, diclorometânicas e *n*-hexânicas das espécies de *Hypericum*.

Espécie	Bruto (% ± dp, n=3)	Metanólica (% ± dp, n=3)	Diclorometânica (% ± dp, n=3)	<i>n</i> -Hexânica (% ± dp, n=3)
<i>H. caprifoliatum</i>	27,02 ± 1,37 ^c	21,70 ± 1,23 ^d	0,68 ± 0,10 ^h	2,66 ± 0,18 ^{fg}
<i>H. carinatum</i>	33,61 ± 1,14 ^{ab}	27,54 ± 1,94 ^c	2,76 ± 0,51 ^{fg}	2,23 ± 0,27 ^{fg}
<i>H. myrianthum</i>	27,71 ± 2,32 ^c	15,25 ± 1,44 ^e	1,23 ± 0,29 ^{gh}	4,47 ± 0,31 ^f
<i>H. polyanthemum</i>	36,12 ± 1,06 ^a	32,18 ± 1,29 ^b	2,04 ± 0,14 ^{fg}	3,37 ± 0,18 ^{fg}

^{a,b,c,d,e,f,g,h} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,01$).

3.5.2 Determinação de fenóis totais

Considerando as altas concentrações de substâncias fenólicas presentes em diversos produtos naturais com ação antioxidante, os teores de fenólicos totais dos extratos brutos metanólicos e das frações foram comparados para uma avaliação prévia sobre o possível potencial antioxidante das mesmas.

Os resultados obtidos através do método de Folin-Ciocalteu para a quantificação de compostos fenólicos presentes nas espécies de *Hypericum* analisadas estão apresentados na figura 2.1. Os valores correspondem a uma média de 3

experimentos, obtidos com base na curva padrão de quercetina, e estão expressos em EQ/g. A curva padrão ($y = 0,1375x + 0,0417$) mostrou-se linear na faixa de concentração empregada, apresentando coeficiente de determinação de 0,9993. A tabela 2.3 apresenta as absorvâncias médias encontradas para o padrão quercetina, nas diferentes concentrações.

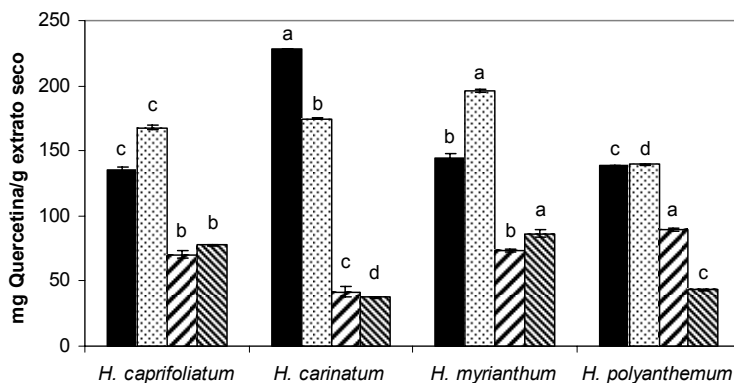


Figura 2.1: Teor de compostos fenólicos, expresso em miligramas de quercetina por grama de extrato seco (EQ/g) em extratos e frações de espécies de *Hypericum*. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c,d} Considerando o mesmo extrato avaliado, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$). (■ Bruto; ▨ MeOH; ▩ CH₂Cl₂; ▧ n-hexano)

Tabela 2.3: Valores de absorvância obtidos para quercetina nas soluções padrão, analisadas por espectrofotometria no UV.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Absorvância (média \pm dp, n=3)
0	0,0418 \pm 0,016
0,65	0,1208 \pm 0,001
1,30	0,2235 \pm 0,002
1,95	0,3095 \pm 0,003
3,25	0,5023 \pm 0,002
6,50	0,9288 \pm 0,050

Os polifenóis apresentam-se como uma classe de substâncias amplamente distribuída no reino vegetal, podendo estar presentes em altas concentrações em determinados gêneros e espécies (HARBORNE, 1993). Entre as espécies de *Hypericum* avaliadas o teor de substâncias fenólicas variou entre 37,40 a 228,36 mg EQ/g extrato seco, sendo estes extremos encontrados dentro de uma mesma espécie, *H. carinatum*, para fração *n*-hexânica e extrato bruto metanólico, respectivamente. A fração

metanólica de *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum* foi a mais rica nessa classe de substâncias, contrariando os resultados encontrados para as outras espécies, onde o extrato bruto metanólico foi superior (*H. carinatum*) ou equivalente (*H. polyanthemum*) a essa fração. O maior conteúdo de fenólicos nessa fração metanólica em relação ao extrato bruto dessas duas espécies pode ser devido à presença de compostos não fenólicos menos polares (tais como terpenóides) que estariam somando massa no extrato bruto metanólico dessas duas espécies. Além disso, essas duas espécies apresentam a particularidade de ocorrer precipitação espontânea de hiperosídeo em suas frações metanólicas, devido ao elevado teor dessa substância na planta. A purificação e concentração desse tipo de composto mediante o processo de fracionamento poderia contribuir, portanto, para o maior conteúdo destes na fração metanólica. O menor conteúdo de substâncias fenólicas foi verificado para as frações *n*-hexânicas de *H. polyanthemum* e *H. carinatum* e fração diclorometânica desta última espécie ($p < 0,0001$).

A fração *n*-hexânica de *H. polyanthemum* apresentou um dos menores teores de fenólicos, o que pode ser explicado pela presença majoritária dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 (FERRAZ *et al.*, 2001) nesse extrato, cujas estruturas apresentam apenas uma ou nenhuma hidroxila fenólica.

ZHENG & WANG (2001) determinaram o teor de fenólicos de um extrato aquoso bruto de *H. perforatum* em 2,78 mg de equivalentes em ácido gálico, porém por grama de peso fresco da planta. Quando avaliado o extrato metanólico dessa planta, obteve-se um teor de 191 mg de ácido gálico por grama de extrato (ŠKERGET *et al.*, 2005). Os teores de fenólicos totais em extratos aquoso e etanólico de dezoito espécies de *Hypericum* foram determinados utilizando pirocatecol como substância de referência. Os autores verificaram teores variando entre 10,73 µg de pirocatecol/g de planta para a espécie *H. lydum* e 54,28 µg de pirocatecol/g de planta para *H. androsaemum*, ambos em extratos etanólicos. No entanto, considerando o extrato aquoso, o maior teor foi observado para a espécie *H. heterophyllum* (45,31 µg de pirocatecol/g de planta) (OZEN *et al.*, 2005).

De acordo com SINGLETON & ROSSI (1965), vários compostos fenólicos apresentam diferentes respostas nesse ensaio. A resposta molar desse método é aproximadamente proporcional ao número de grupamentos hidroxila presentes em uma amostra, mas a capacidade redutora é aumentada quando duas hidroxilas fenólicas encontram-se em orientação *orto* ou *para* na molécula (FRANKEL *et al.*, 1995).

3.5.3 Avaliação do potencial antioxidante total (TRAP)

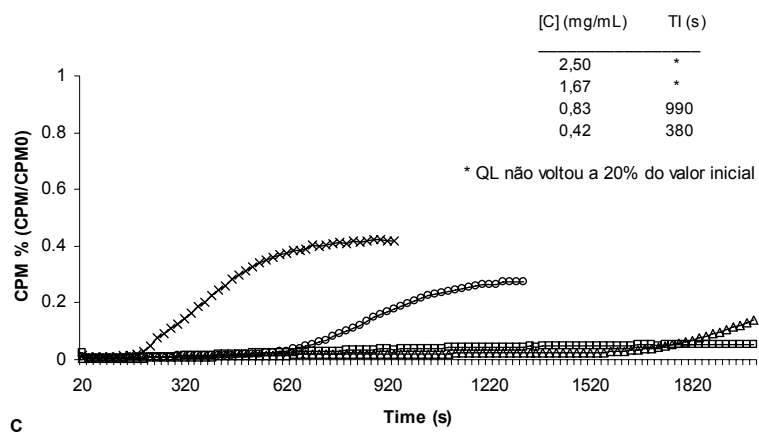
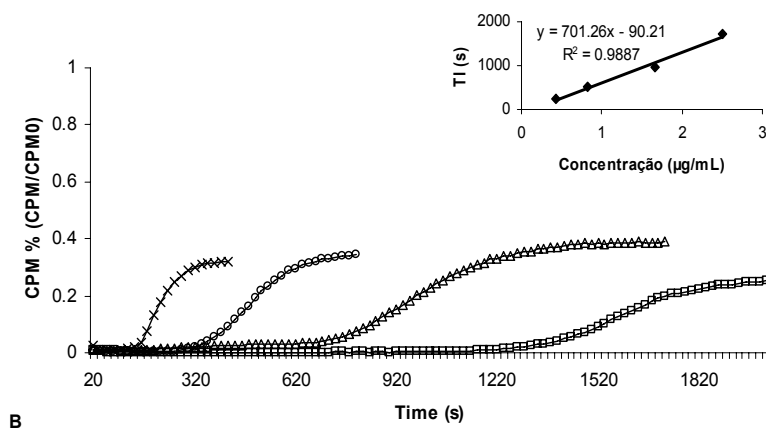
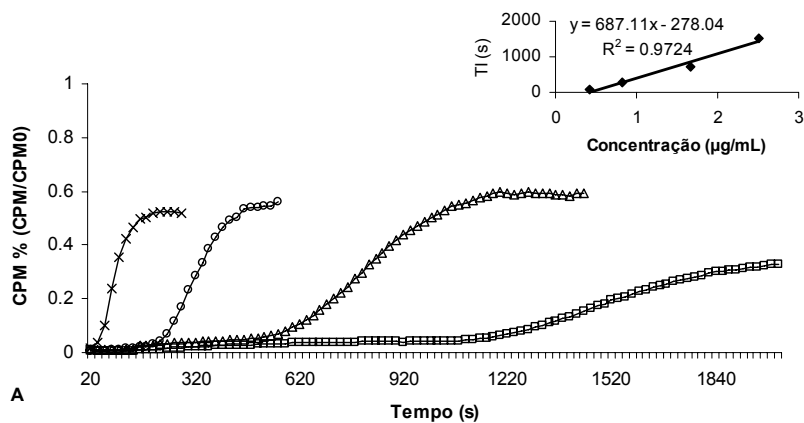
O mecanismo da quimioluminescência do luminol, induzida através da termólise de ABAP é dirigido pela produção de radicais derivados do luminol gerados pela reação do luminol com radicais peroxila. A capacidade de uma amostra em inibir a quimioluminescência induzida por luminol pode, então, ser relacionada a sua capacidade em capturar radicais derivados do luminol (LISSI *et al.*, 1992).

A intensidade da quimioluminescência dos radicais luminol formados foi empregada para monitorar o potencial antioxidante total de extratos brutos metanólicos das espécies de *Hypericum* e substâncias isoladas das mesmas, utilizando trolox e quercetina como substâncias de referência.

A adição dos extratos com capacidade antioxidante promoveu uma diminuição na quimioluminescência, por um determinado período (tempo de indução - TI), proporcional à concentração de antioxidantes presentes nessa amostra (figura 2.2).

Como é possível verificar na figura (2.3), o decaimento na quimioluminescência após a adição dos extratos das plantas e de quercetina no meio de reação, mostra-se qualitativamente diferente do decaimento obtido empregando trolox. Esse comportamento pode ser resultado da presença de antioxidantes eficientes e não eficientes no extrato, e também devido à presença de hidroxilas mais ou menos reativas na molécula de quercetina (DESMARCHELIER *et al.*, 1997; DESMARCHELIER *et al.*, 1999). Enquanto a velocidade do decaimento inicial está relacionada com a presença de antioxidantes eficientes na amostra, a variação na quimioluminescência medida após

um longo período pode estar relacionada ao total de antioxidantes (eficientes e não eficientes) presentes na amostra (DESMARCHELIER *et al.*, 1997).



Continuação da figura 2.2

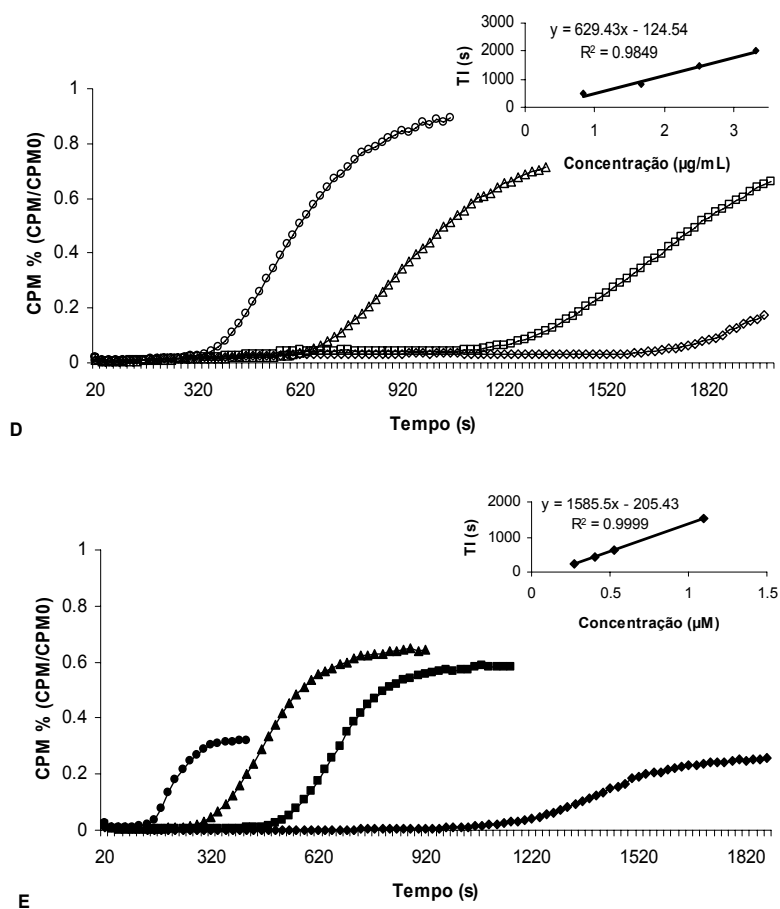


Figura 2.2: Intensidade de quimioluminescência (contagens por minuto), medida após a adição de concentrações crescentes dos extratos brutos metanólicos de *H. caprifoliatum* (A), *H. carinatum* (B), *H. myrianthum* (C) e *H. polyanthum* (D), bem como de quercetina (E) (-◇- 3,33; -□- 2,5; -△- 1,67; -○- 0,83; -×- 0,42 µg extrato seco/mL; -◆- 1,1; -■- 0,53; -▲- 0,4 e -●- 0,27 µM).

Comparando-se os extratos brutos metanólicos das quatro espécies avaliadas, na concentração final de 1,67 µg/mL, verificou-se que *H. myrianthum* apresenta uma maior capacidade de capturar os radicais peroxila formados (figura 2.3). Ao comparar a inibição da quimioluminescência no tempo de 900 segundos (próximo ao tempo de indução promovido por trolox na concentração final de 1,1 µM = 925 s), verificou-se que o extrato de *H. myrianthum* apresenta o mesmo potencial antioxidante de quercetina e de trolox, ambos na concentração de 1,1 µM. A redução na intensidade da quimioluminescência pelos extratos brutos de *H. carinatum*, *H. polyanthum* e *H. caprifoliatum*, nessa mesma concentração final de 1,67 µg/mL, foi superior à inibição da

quimioluminescência promovida por 0,53 μM de quercetina ($p < 0,0001$).

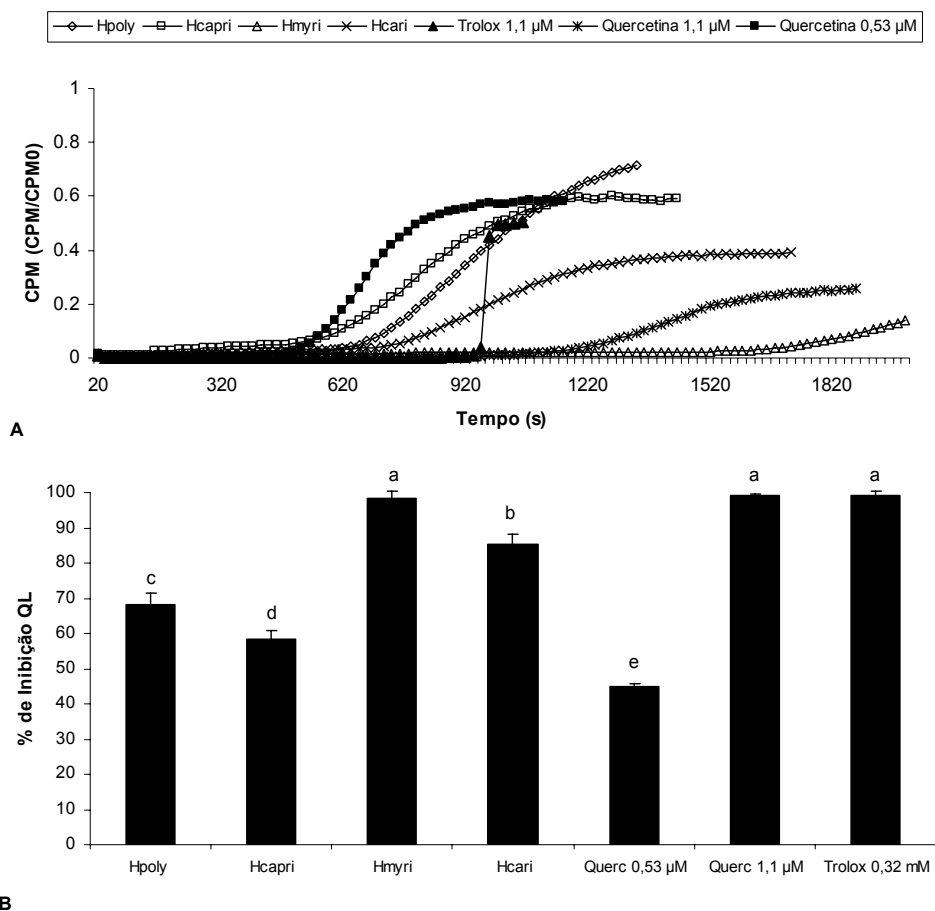


Figura 2.3: (A) Efeito na intensidade de quimioluminescência (CPM), após a adição de 1,67 mg/mL extratos brutos metanólicos de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthum*, bem como quercetina nas concentrações de 0,53 e 1,1 μM e trolox na concentração de 0,53 μM . (B) Percentual de inibição da quimioluminescência, no tempo de 900 s. Hpoly: *H. polyanthum*; Hcapri: *H. caprifoliatum*; Hmyri: *H. myrianthum*; Hcari: *H. carinatum*; Querc: quercetina. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c,d,e} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).

Dentre as substâncias isoladas avaliadas quanto ao potencial antioxidante, as benzofenonas A e B apresentaram capacidade em inibir a quimioluminescência. A figura 2.4 mostra o efeito de carifenona A (5,33 e 10,7 μM), carifenona B (10,7 μM), quercetina (0,53 e 1,1 μM) e trolox (0,53 μM) nas medidas do TRAP. Pode ser visualizado que ambas benzofenonas exibiram atividade sequestrante dos radicais peroxila, manifestado na redução da intensidade da luminescência. Carifenona A e B na concentração de 10,7 μM apresentaram uma inibição da quimioluminescência

equivalente a de 1,1 μM de quercetina, substância considerada como potente agente antioxidante. Uliginosina B não apresentou capacidade antioxidante através desse método. Estes resultados estão publicados no periódico *Journal of Natural Products*, em artigo intitulado “Benzophenones from *Hypericum carinatum*” (Anexo V, página 305).

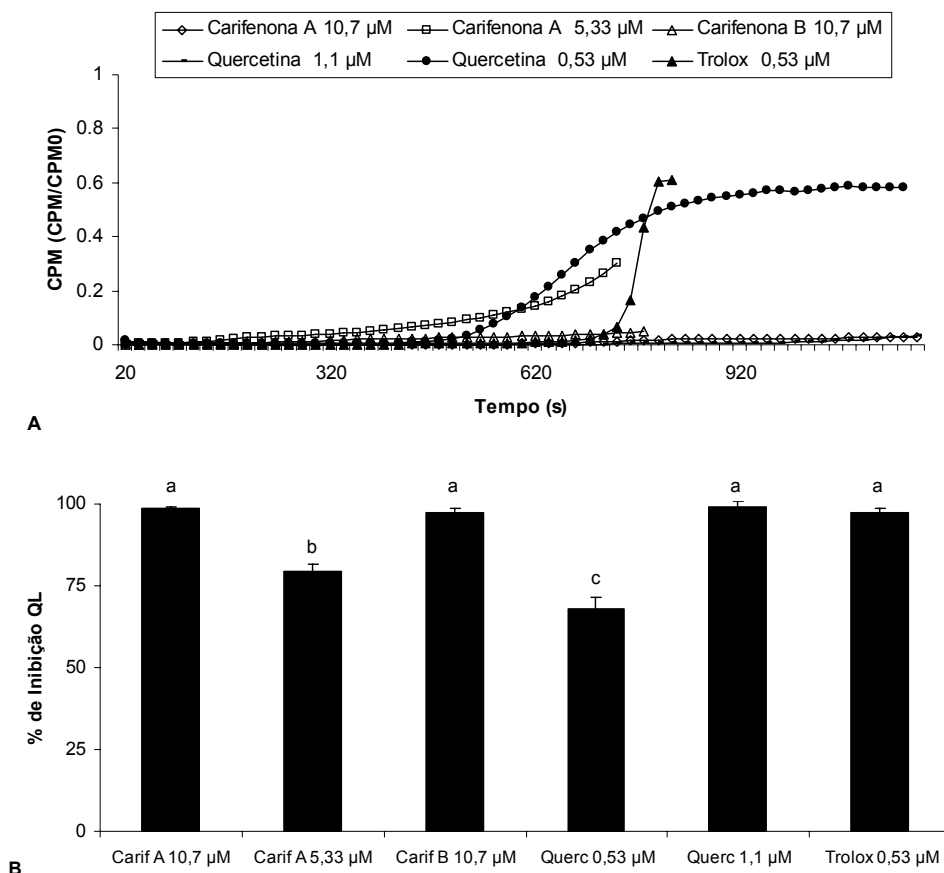


Figura 2.4: (A) Efeito na intensidade de quimioluminescência (CPM), após a adição de carifenona A (5,33 e 10,7 μM), carifenona B (5,33 μM), quercetina (0,53 e 1,1 μM) e trolox (0,53 μM). (B) Percentual de inibição da quimioluminescência, no tempo de 700 s. Carif A: carifenona A; Carif B: carifenona B; Querc: quercetina. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).

Devido ao perfil observado para o decaimento na quimioluminescência, após a adição das amostras avaliadas, é possível concluir que o potencial antioxidante dos extratos metanólicos das espécies de *Hypericum* deve-se à presença de antioxidantes de alta e de baixa reatividades, sendo esses últimos em maior concentração.

3.5.4 Avaliação da capacidade de reação com radicais peroxila (ORAC-PGV)

Dentre as técnicas amplamente utilizadas na avaliação da atividade antioxidante, destaca-se a metodologia de ORAC, desenvolvida por CAO e colaboradores (1993), através da qual é possível a obtenção do índice ORAC, que está relacionado à capacidade de uma molécula com ação antioxidante em retardar o consumo de uma molécula alvo. Esse consumo é monitorado através da diminuição de fluorescência da molécula alvo empregada (ficoeritrina, fluoresceína e c-ficocianina) quando esta é incubada na presença de uma fonte de radical livre. A avaliação da capacidade de reação com radicais peroxila foi realizada segundo metodologia proposta por LÓPEZ-ALARCÓN & LISSI (2006), que apresenta um diferencial em relação a metodologia clássica, uma vez que se baseia na medida da absorvância para monitorar o consumo de pirogalol vermelho, utilizado como molécula alvo. A relação linear entre a ASC e a concentração de antioxidante foi avaliada utilizando diferentes concentrações de trolox, obtendo-se o coeficiente de determinação de 0,9974 para a equação da reta $y=412,12 + 26,4x$. Através da integração das áreas sobre as curvas de decaimento na absorvância de PGV, foi possível quantificar a capacidade de inibição dos radicais peroxila pelas amostras em análise, expresso através do índice de ORAC-PGV (tabela 2.4).

A figura 2.5 mostra o consumo de PGV (5 μM), monitorado pela diminuição de absorvância dessa substância a $\lambda=540$ nm, induzido por sua incubação na presença de ABAP (10 mM), ambos na ausência (controle) e presença de concentrações crescentes de trolox (A), 10 μM de quercetina (B) e 100 μM dos flavonóides guajaverina (C), hiperosídeo (D) e isoquercitrina (E). Na figura 2.6 estão ilustradas as curvas de decaimento na absorvância de PGV na presença dos extratos brutos metanólicos de *H. caprifoliatum* (A), *H. carinatum* (B), *H. myrianthum* (C) e *H. polyanthemum* (D).

Tabela 2.4: Índices ORAC-PGV, expresso em μMol de Trolox/g de extrato seco (ET/g), obtidos para extratos brutos metanólicos das espécies de *Hypericum* avaliadas através do ensaio com PGV (dp: desvio padrão).

Amostra	ORAC-PGV (ET/g \pm dp n=3)
<i>Hypericum caprifoliatum</i>	820,3 \pm 79,1 ^a
<i>Hypericum carinatum</i>	347,36 \pm 24,60 ^b
<i>Hypericum myrianthum</i>	260,91 \pm 63,67 ^b
<i>Hypericum polyanthemum</i>	239,76 \pm 33,00 ^b

^{a,b} Letras diferentes são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,01$).

Dentre as 4 espécies avaliadas, o maior índice de ORAC foi verificado para o extrato bruto de *H. caprifoliatum*, sendo significativamente diferente das outras espécies avaliadas *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* ($p < 0,0001$).

Os flavonóides guaijaverina, hiperosídeo e isoquercitrina, testados na concentração de 100 μM , não promoveram a proteção do consumo de PGV. Isso foi evidenciado através da ASC obtida na presença dos flavonóides, estatisticamente equivalente à ASC do controle, como pode ser visualizado na figura 2.6, onde a cinética do consumo de PGV na presença dos flavonóides é similar a do controle. A ausência de atividade dos flavonóides estudados contrasta com a alta atividade apresentada por quercetina. Provavelmente, estas diferenças podem estar relacionadas com a substituição na posição 3 destes derivados da quercetina. Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados quando rutina foi avaliada nesse mesmo sistema utilizando pirogalol vermelho como molécula alvo (LÓPEZ-ALARCÓN & LISSI, 2006). Em geral, flavonóides contendo múltiplos grupamentos hidroxila apresentam alta atividade antioxidante contra radicais peroxila. No entanto, glicosídeos, tais como rutina, naringina e hesperidina, usualmente apresentam baixos valores de ORAC (ROBARDS *et al.*, 1999). Devido ao fato de que a concentração de 100 μM é considerada elevada, em relação às concentrações de trolox utilizadas, e a não proteção pelos flavonóides, em 100 μM , ao consumo de PGV, estes foram avaliados apenas nesta concentração.

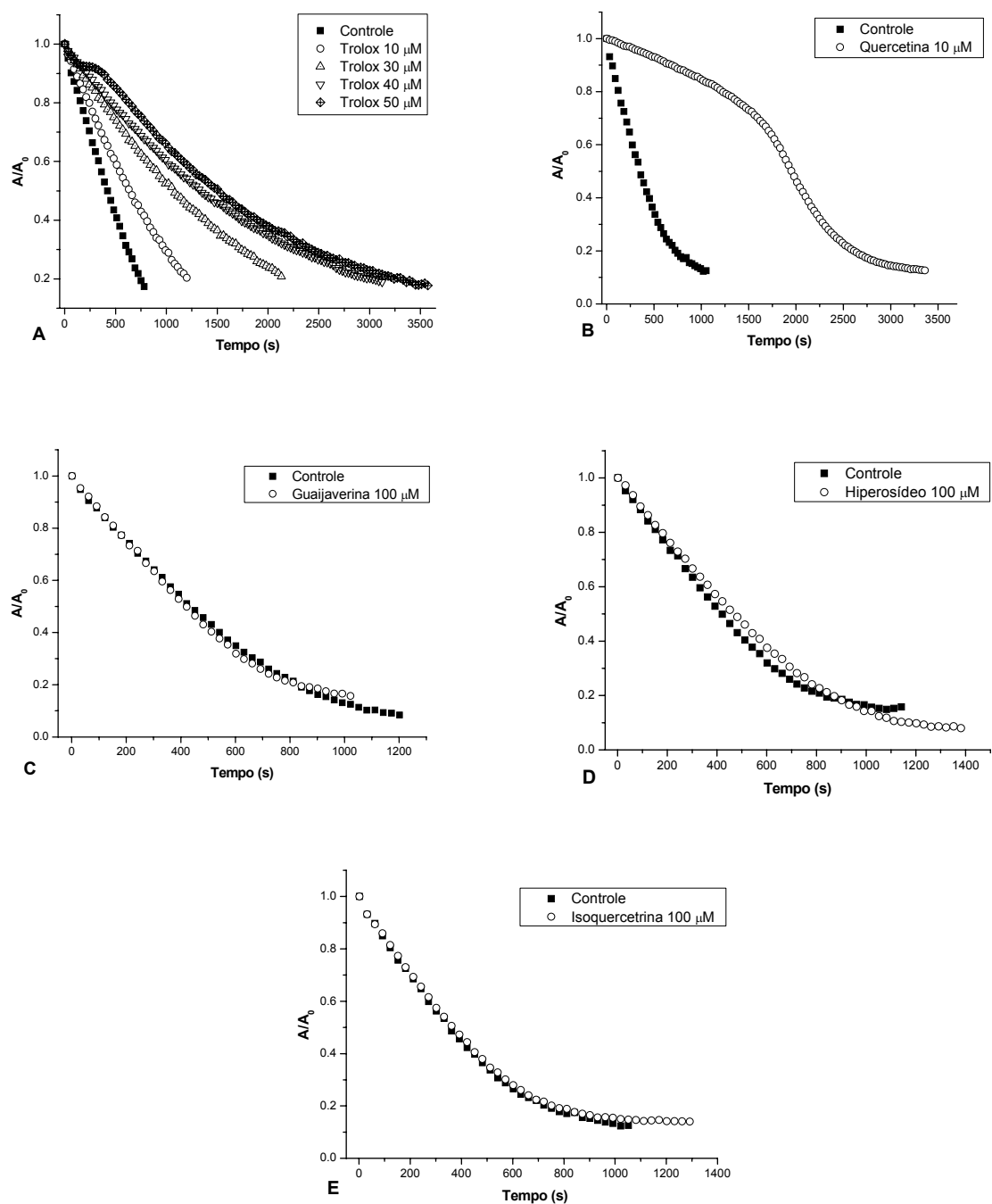


Figura 2.5: Consumo de PGV, monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=540$ nm, na ausência (controle) e presença de concentrações crescentes de trolox (A), 10 μM de quercetina (B) e 100 μM dos flavonóides guajajaverina (C), hiperosídeo (D) e isoquercitrina (E).

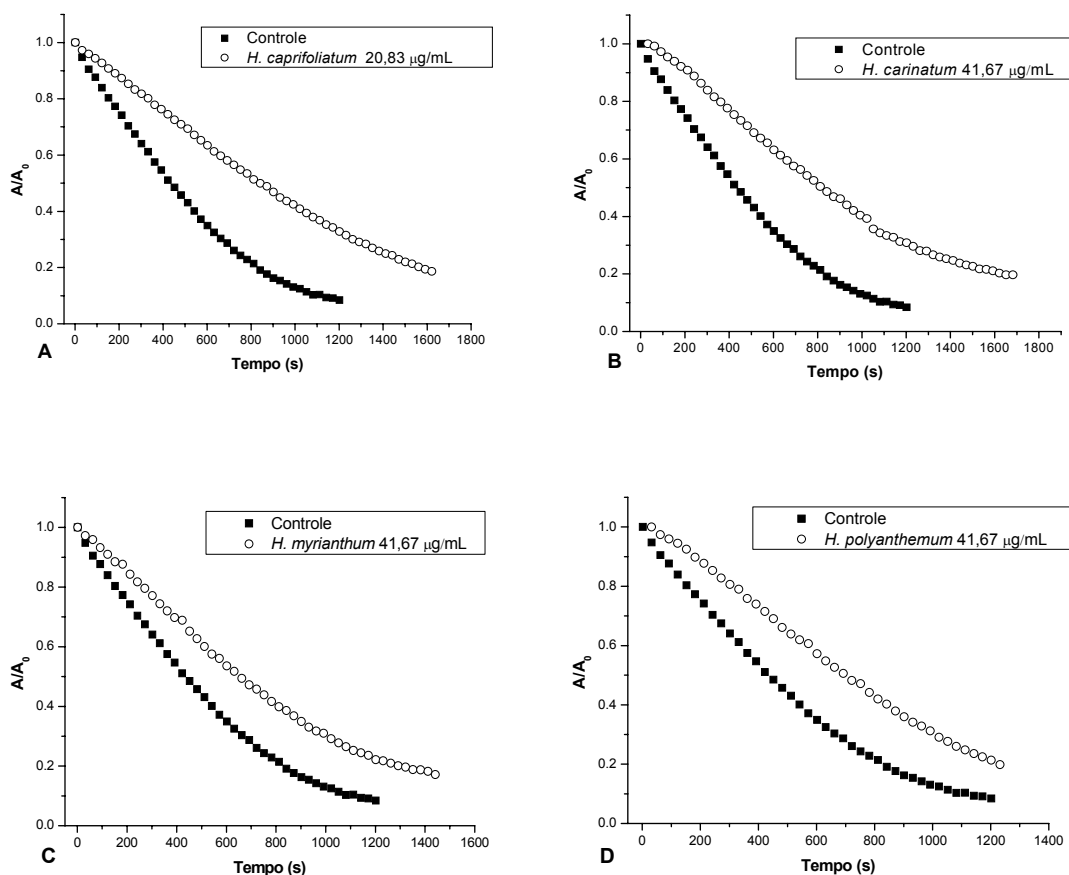


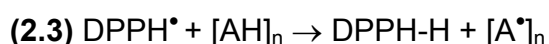
Figura 2.6: Consumo de PGV, monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=540$ nm, na ausência (controle) e presença de 25 μL dos extratos brutos metanólicos de *H. caprifoliatum* (20,83 $\mu\text{g/mL}$) (A), *H. carinatum* (41,67 $\mu\text{g/mL}$) (B) *H. myrianthum* (41,67 $\mu\text{g/mL}$) (C) e *H. polyanthemum* (41,67 $\mu\text{g/mL}$) (D).

Um índice ORAC de 16,77 μM de ET/g de peso fresco, obtido com (R)-ficoeritrina como molécula alvo, foi obtido para o extrato bruto aquoso de *H. perforatum* (ZHENG & WANG, 2001). O valor de índice de ORAC é fortemente dependente da molécula alvo empregada. A eficiência da amostra avaliada nessa metodologia é consideravelmente menor na proteção de PGV do que com o uso de outras moléculas alvo, uma vez que nessas condições experimentais, a competição pelos radicais peroxila é dificultada pois a substância em análise não inibe o consumo da molécula alvo, mas apenas reduz a taxa deste consumo (LÓPEZ-ALARCÓN & LISSI, 2006). O uso de PGV como molécula alvo amplia a escala do índice ORAC (LÓPEZ-ALARCÓN & LISSI,

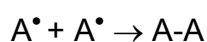
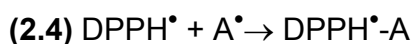
2006), de modo que os valores obtidos para as espécies estudadas são relativamente maiores do que o valor encontrado para *H. perforatum* por ZHENG & WANG (2001).

3.5.5 Avaliação da capacidade de reação com 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH[•])

O modelo para avaliação da atividade antioxidante utilizando DPPH[•] é baseado na capacidade do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazil em reagir com substâncias doadoras de hidrogênio (2.3), incluindo compostos fenólicos (ROGINSKY & LISSI, 2005), sendo um método amplamente utilizado e relativamente rápido quando comparado a outras técnicas (SÁNCHEZ-MORENO *et al.*, 1998; MENSOR *et al.*, 2001).



O novo radical formado (A[•]) pode seguir a interação radical-radical para gerar moléculas estáveis, através da colisão de radicais com a abstração de um átomo de um radical para outro (2.4), embora essas reações secundárias sejam dificultadas. O consumo de DPPH[•] é, portanto, um índice para estimar a capacidade antioxidante na captura de radicais livres presentes no meio. No ensaio espectrofotométrico, a absorvância a 517 nm diminui como um resultado de uma alteração na coloração violeta característica para amarelo, uma vez que o radical é capturado por antioxidantes presentes na amostra através da doação de um átomo de hidrogênio para formar a molécula estável DPPH-H (ESPÍN *et al.*, 2000).



Neste trabalho, realizou-se preliminarmente um ensaio bioautográfico por CCD com as amostras testadas, para avaliação de sua capacidade de reação com o radical DPPH[•]. As amostras utilizadas para essa análise foram obtidas através do fracionamento do material vegetal com solventes em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano e metanol), com a finalidade de avaliar a natureza das substâncias

responsáveis pela atividade antioxidante. Compostos isolados das espécies nativas também foram avaliados. Após nebulização do cromatograma com uma solução de DPPH•, compostos com capacidade antiradical apareceram como bandas amarelas. Através da análise verificou-se a presença de compostos antioxidantes em todas as frações de *Hypericum*. Valores de fator de retenção (Rf) das bandas foram comparados com o de substâncias isoladas. Na fração metanólica foi verificada a presença de flavonóides, sendo hiperosídeo uma das principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante desta fração, nas quatro espécies estudadas. Nas frações *n*-hexânica e diclorometânica observou-se bandas com fraca atividade antioxidante.

Posteriormente, foram realizadas cinéticas do consumo do radical DPPH• para extratos e frações de espécies de *Hypericum*, bem como de produtos isolados das mesmas, uma vez que foi verificada a capacidade de reação com o radical DPPH•, através da bioautografia. As cinéticas de consumo foram ajustadas através de regressão não-linear a uma equação de decaimento bi-exponencial (2.5) com a qual se obtiveram os valores de A1, T1, A2 e T2, a partir dos quais foram calculados os parâmetros consumo total (A1 + A2), consumo 50s (Abs_{inicial} - Abs_{50s}) e consumo 600s (Abs_{inicial} - Abs_{600s}).

$$(2.5) y = y_0 + A1 \exp^{(-x/T1)} + A2 \exp^{(-x/T2)}$$

Onde, A1 representa o consumo de DPPH• por antioxidantes de alta reatividade; T1⁻¹ é uma medida da reatividade dos antioxidantes de alta reatividade; A2 representa o consumo de DPPH• por antioxidantes de baixa reatividade; T2⁻¹ é uma medida da reatividade dos antioxidantes de baixa reatividade; A1 + A2 representa a concentração total de compostos capazes de reagirem com DPPH•; Consumo aos 50 s é uma medida dos antioxidantes de alta reatividade e se relaciona com A1; Consumo aos 600 s proporciona uma estimativa de A1 + A2.

O perfil cinético do consumo de radicais DPPH• apresentou duplo comportamento. Nos primeiros segundos observou-se um rápido decaimento da

absorvância e, posteriormente, um decaimento mais lento. DPPH• reage com compostos doadores de hidrogênio através da equação 2.3, o que pode explicar por que os dados experimentais podem ser melhor ajustados em uma equação bi-exponencial, uma vez que o subíndice “n” na equação está relacionado à presença de dois grupos de antioxidantes (alta e baixa reatividades) que diferem em suas velocidades (rápida e lenta) para neutralizar o radical (ESPÍN *et al.*, 2000). Em função disso, arbitrariamente foram avaliados os parâmetros de consumo rápido e lento do radical DPPH• nos tempos de 50 e 600 segundos, respectivamente.

A adição das amostras na solução de DPPH• induziu uma rápida diminuição na absorvância a $\lambda=517$ nm. Nas figuras 2.7 e 2.8 estão representadas as curvas de decaimento, obtidas durante o consumo do radical DPPH• ao agregar diferentes concentrações do extrato bruto metanólico e das frações metanólicas e *n*-hexânicas das espécies de *Hypericum* em análise. Os resultados da fração diclorometânica não são apresentados pois não foram representativos devido a grande quantidade de clorofila presente nesta fração, o que interferia nas análises. As figuras 2.9 e 2.10 mostram as cinéticas obtidas ao agregar diferentes concentrações dos flavonóides guajaverina, isoquercitrina, hiperosídeo e 3-metil quercetina, dos derivados de floroglucinol hiperbrasilol B, japonicina A e uliginosina B, bem como das benzofenonas carifenona A e B. O consumo de radicais DPPH• pelas amostras avaliadas resultou em um padrão similar nas curvas de decaimento da absorvância do radical *versus* tempo, sendo este consumo dependente da concentração de amostra adicionada no meio de reação.

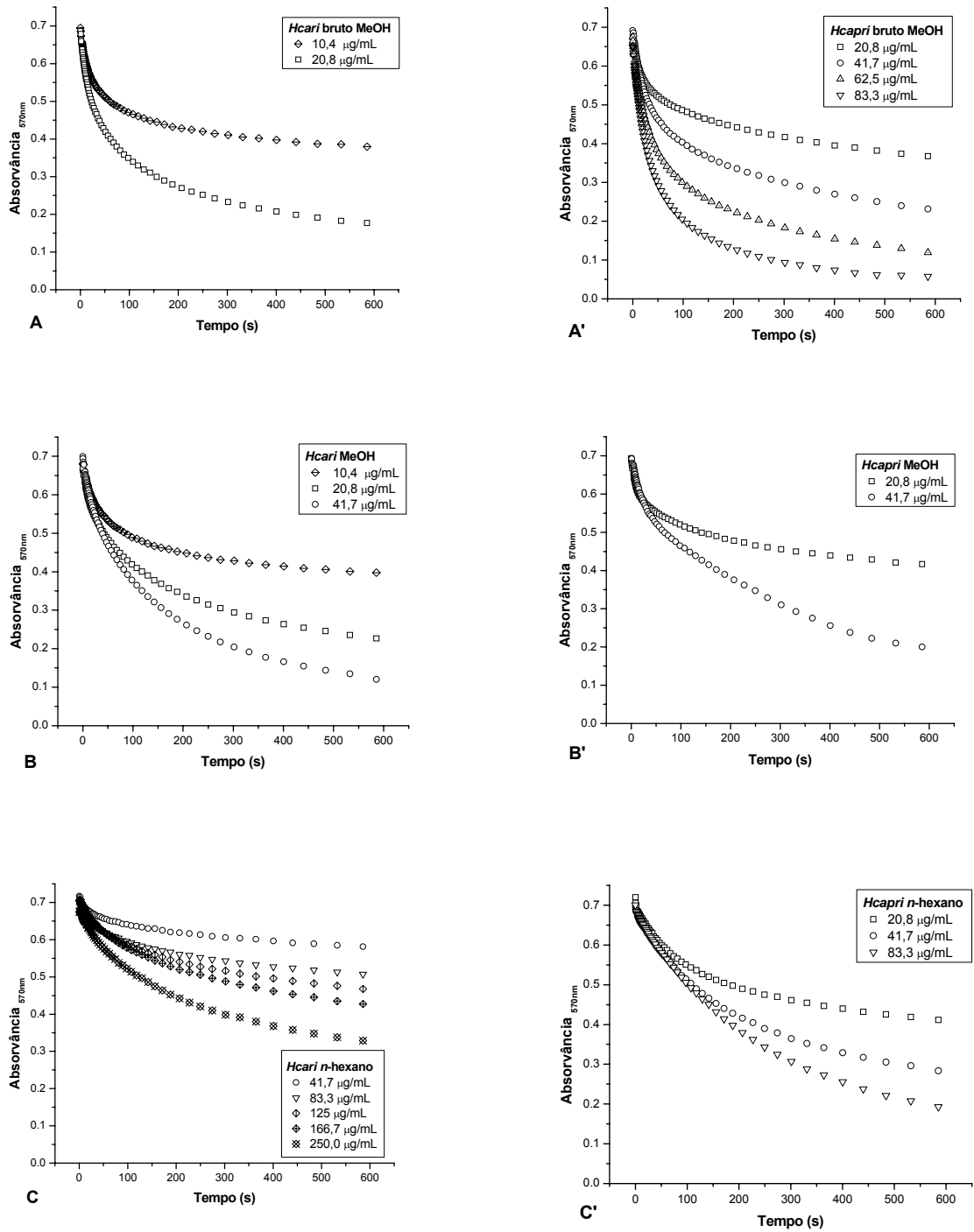


Figura 2.7: Consumo do radical DPPH* (60 μM), monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=517\text{ nm}$, ao agregar diferentes concentrações dos extratos brutos metanólicos (A, A') e das frações metanólicas (B, B') e *n*-hexânicas (C, C') de *H. carinatum* e *H. caprifoliatum*, respectivamente.

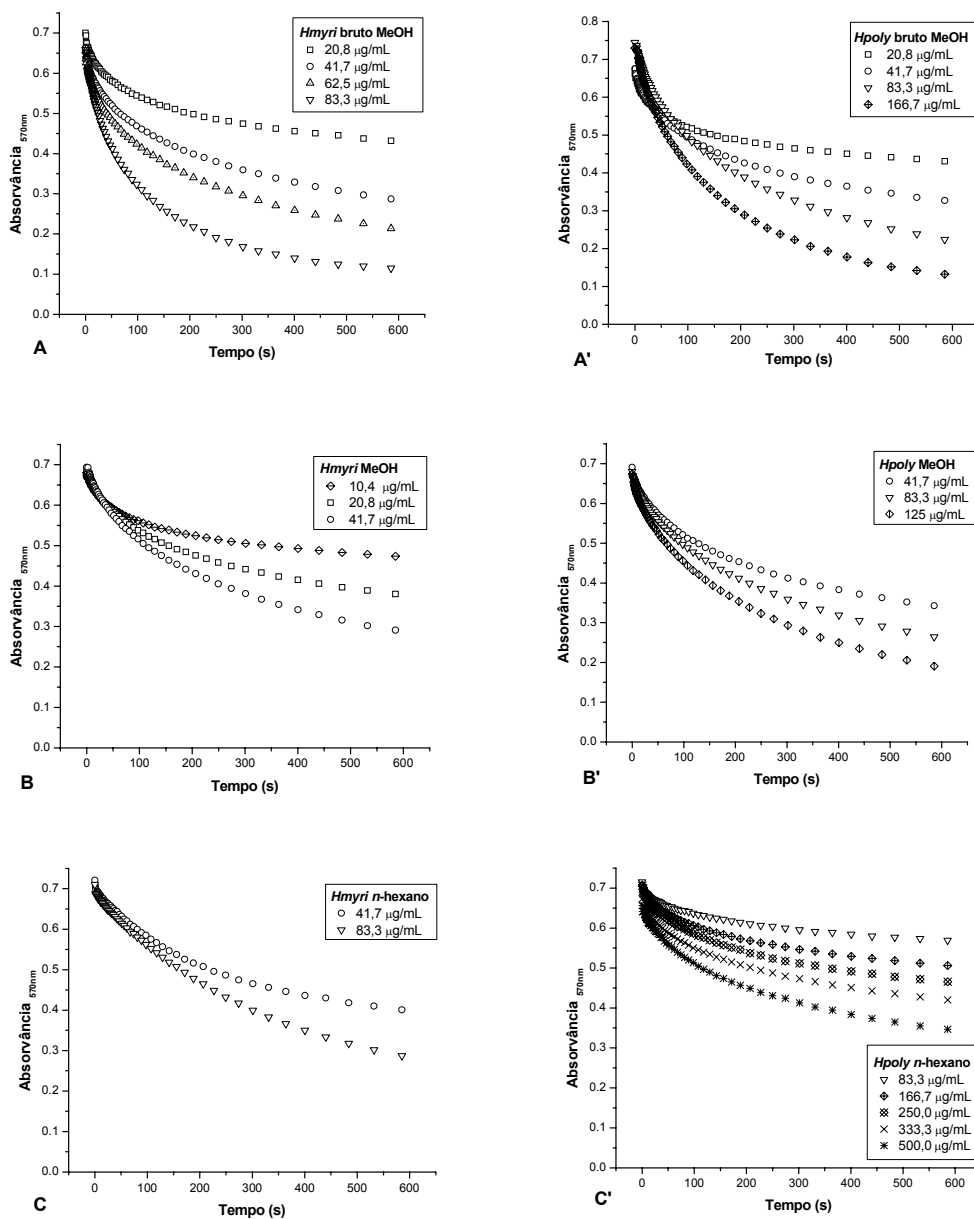


Figura 2.8: Consumo do radical DPPH* (60 µM), monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=517$ nm, ao agregar diferentes concentrações dos extratos brutos metanólicos (A, A') e das frações metanólicas (B, B') e n-hexânicas (C, C') de *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, respectivamente.

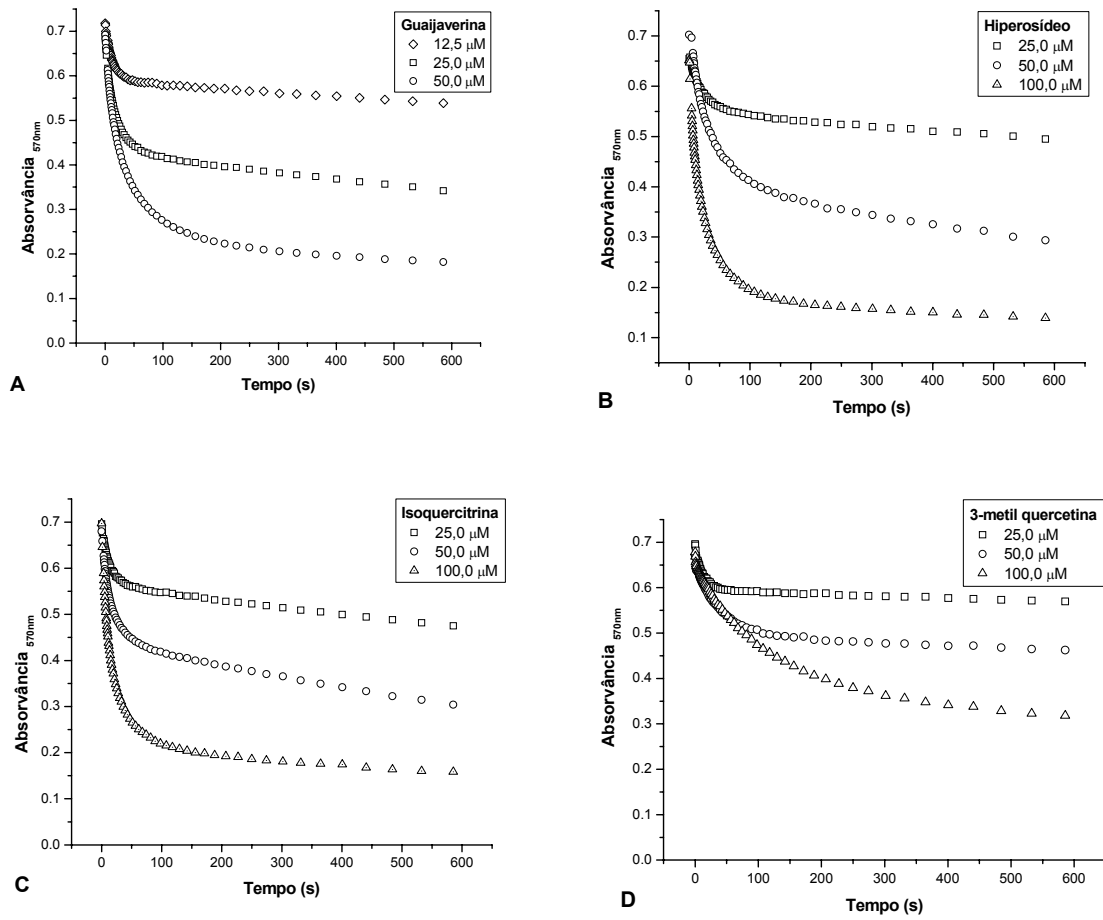


Figura 2.9: Consumo do radical DPPH* (60 μM), monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=517$ nm, ao agregar diferentes concentrações dos flavonóides guajaverina (A), hiperosídeo (B), isoquercitrina (C) e 3-metil quercetina (D).

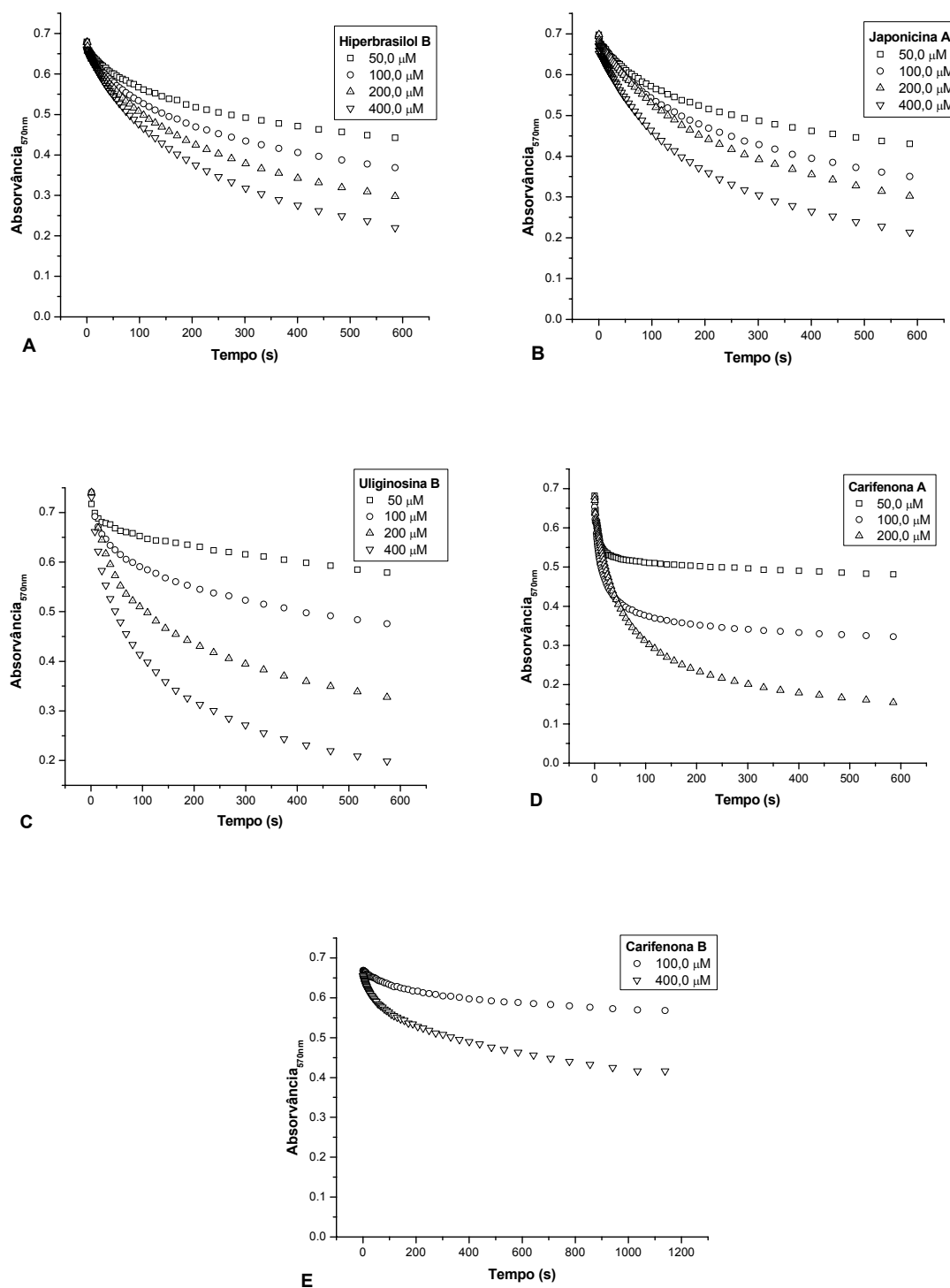


Figura 2.10: Consumo do radical DPPH* (60 μM), monitorado pela diminuição de absorvância a $\lambda=517$ nm, ao agregar diferentes concentrações dos derivados de floroglucinol hiperbrasilot B (A), japonicina A (B), e uliginosina B (C) e das benzofenonas carifenona A (D) e carifenona B (E).

Foram realizadas leituras com diferentes concentrações de amostra, tanto para os produtos isolados quanto para as misturas complexas. As medidas foram realizadas em triplicatas apenas com concentrações que promovessem um decaimento da absorvância do DPPH* próximo aos 50%, ou que pudessem ser utilizadas para medidas de comparação entre os diferentes extratos ou entre as substâncias. Os dados obtidos para as amostras em estudo que foram utilizadas para medidas de comparação estão apresentados em anexo (Anexo VI, página 311) nos quadros 2.2, 2.3, 2.4 e 2.5.

A quantidade de DPPH* removida do meio, acompanhada pela diminuição na absorvância da solução do radical, é proporcional à atividade da amostra, sendo possível, portanto, assumir que o consumo de DPPH* é equivalente à capacidade antioxidante pelas substâncias presentes na amostra (ESPÍN *et al.*, 2000). O percentual de consumo do radical DPPH* foi calculado de acordo com a equação 2.6.

$$(2.6) \%Consumo = [(Consumo^*)/Abs_0] \times 100;$$

$$*Consumo\ Total = A1 + A2; \text{ Consumo } 50s = Abs_0 - Abs_{50s}; \text{ Consumo } 600s = Abs_0 - Abs_{600s}$$

Onde, Abs_0 é a absorvância do controle a $t=0s$, Abs_{50s} é a absorvância após 50s de reação e Abs_{600s} é a absorvância após 600 s de reação.

O percentual de consumo total, de consumo 50 s e de consumo 600 s foi comparado entre os diferentes extratos de uma mesma planta (figura 2.11), entre o mesmo extrato de diferentes plantas (figura 2.12), bem como entre as substâncias isoladas (figura 2.13).

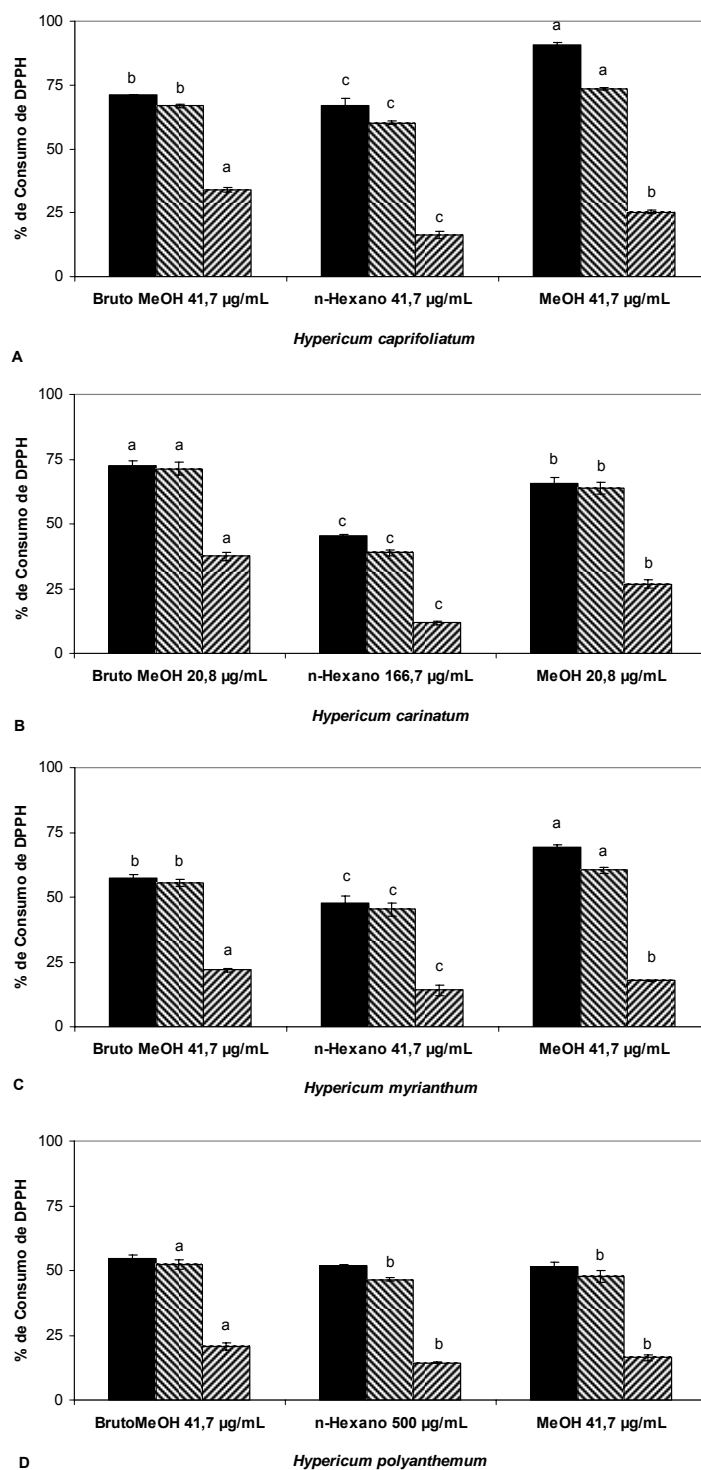


Figura 2.11: Comparação entre consumo do radical DPPH* (consumo total, consumo aos 50 s e consumo aos 600 s) para os diferentes extratos das plantas *H. carinatum*, *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthum*. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c} Considerando o mesmo tempo de reação, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).

(■ Consumo total; ▨ Consumo 600 s; ▩ Consumo 50 s)

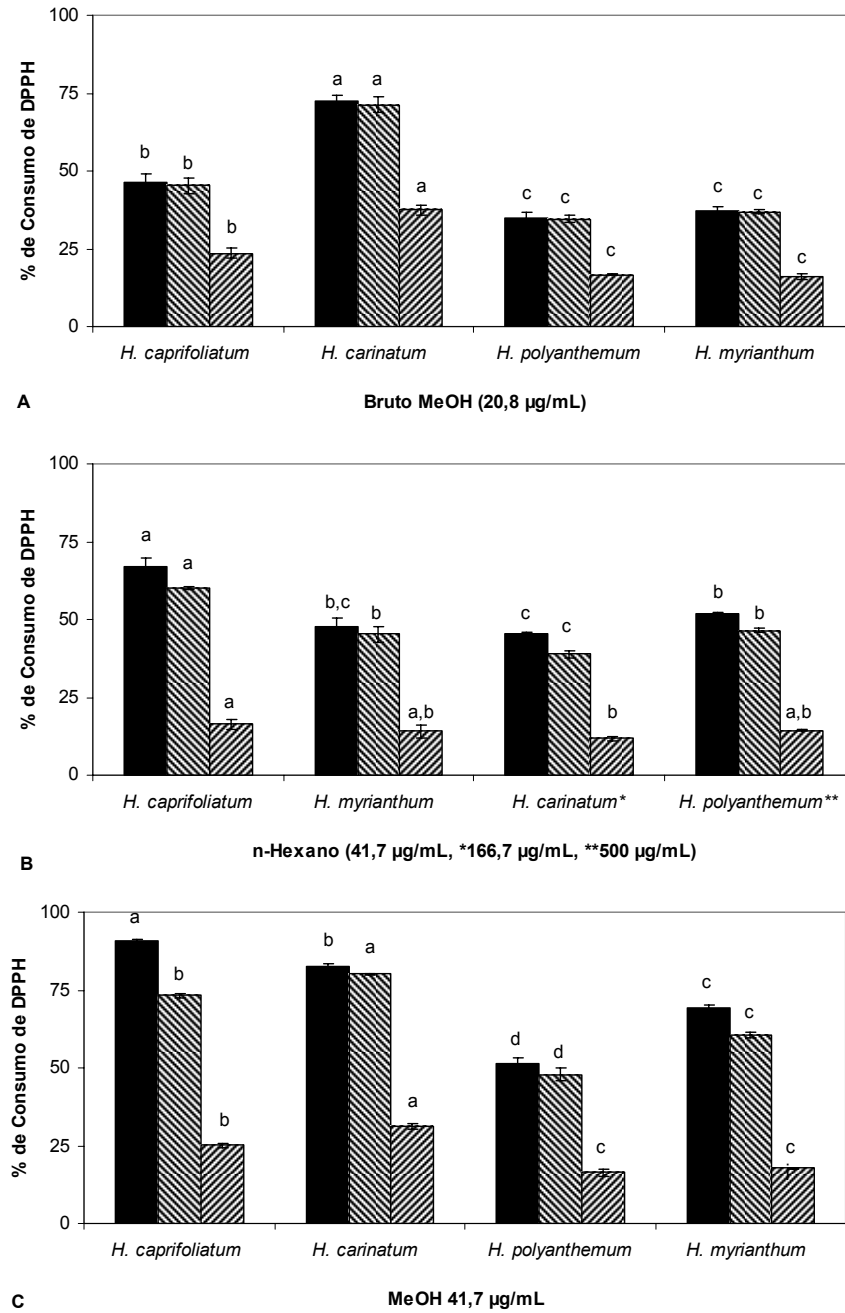


Figura 2.12: Comparação entre consumo do radical DPPH* (consumo total, consumo aos 50 s e consumo aos 600 s) para os extratos bruto MeOH e frações *n*-hexânica e MeOH das espécies de *Hypericum*. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c} Considerando o mesmo tempo de reação, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$). (■ Consumo total; ▨ Consumo 600 s; ▩ Consumo 50 s)

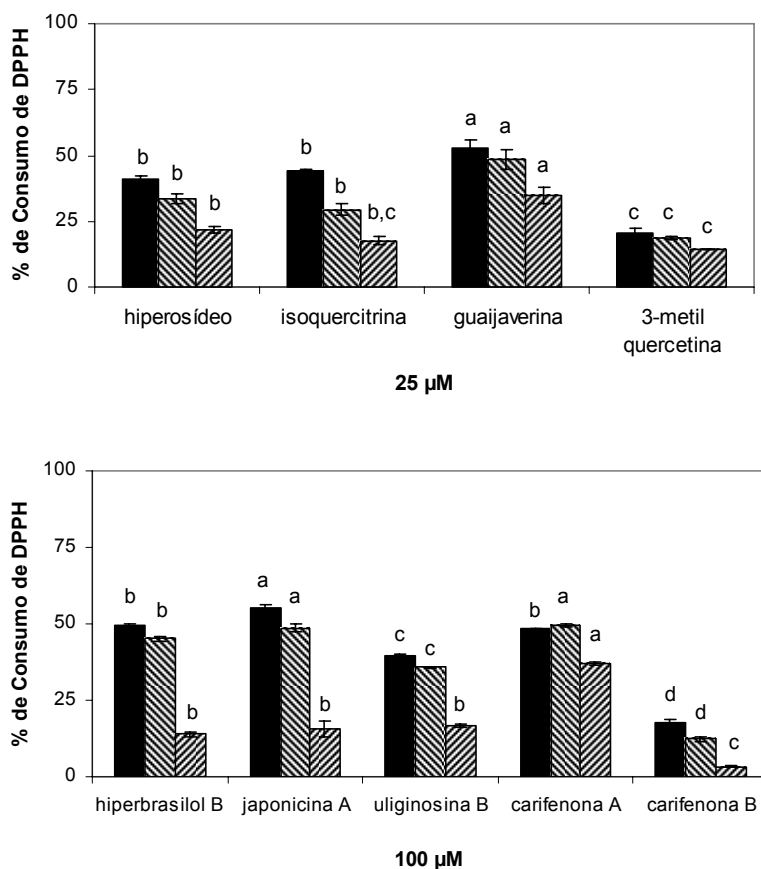


Figura 2.13: Comparação entre consumo do radical DPPH* (consumo total, consumo aos 50 s e consumo aos 600 s) para as substâncias isoladas, sendo os flavonóides, avaliados na concentração de 25 µM e entre floroglucínóis e benzofenonas, na concentração de 100 µM. Os dados representam a média ± dp. ^{a,b,c} Considerando o mesmo tempo de reação, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).
 (■ Consumo total, ▨ Consumo 600 s, ▩ Consumo 50 s)

Os resultados obtidos demonstram que todos os componentes isolados, extratos e frações, com exceção dos benzopiranos, apresentaram atividade antioxidante em maior ou menor proporção, medida em termos de consumo do radical DPPH*.

Para *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum* a maior atividade antioxidante, medida através da capacidade de reação com o radical DPPH* foi verificada para a fração metanólica. Dentre as frações metanólicas das plantas avaliadas, a menor atividade foi verificada para *H. polyanthemum*. Baseado no mecanismo de redução da molécula de

DPPH[•] e no conhecimento prévio da constituição química das espécies avaliadas, é possível inferir que a ação antioxidante apresentada pela fração metanólica deve-se, ao menos em parte, à presença de substâncias com grupamentos hidroxila disponíveis, tais como os flavonóides (MENSOR *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2005a).

A fração *n*-hexânica demonstrou a menor atividade em neutralizar radicais DPPH[•], principalmente para as espécies *H. polyanthemum* e *H. carinatum*, cujas concentrações necessárias para a obtenção de uma atividade semelhante a de *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum* foi muito superior. No entanto, *H. carinatum* apresentou a maior atividade para o extrato bruto, sendo essa atividade principalmente devida a compostos fenólicos mais polares, uma vez que a avaliação da fração *n*-hexânica mostrou baixa atividade para a mistura de compostos lipofílicos dessa planta. No entanto, o maior consumo do radical pelo extrato bruto desta planta, em relação à fração metanólica, sugere um possível efeito sinérgico da fração polar com as substâncias mais apolares. Além disso, o extrato bruto desta espécie apresentou o maior conteúdo de fenólicos totais, podendo sugerir uma correlação entre a atividade antioxidante deste extrato e a composição química do mesmo.

Nas quatro espécies avaliadas, o extrato bruto apresentou a maior proporção de antioxidantes de alta reatividade, evidenciado pelo maior consumo do radical DPPH[•] nos primeiros 50 s de reação. Dentre estas, *H. carinatum* apresentou a maior proporção desse tipo de substâncias. Todos os extratos brutos metanólicos apresentaram um consumo de cerca de 50% do consumo total nos primeiros 50 s de reação, o que indica que de todas as plantas são extraídas com esse solvente substâncias de alta reatividade com o radical DPPH[•]. O percentual consumido nos primeiros 50 s diminuiu com o fracionamento, indicando a possibilidade de ocorrência de uma interação entre compostos mais polares e compostos apolares.

Entre os compostos isolados (figura 2.13), verificou-se maior atividade antioxidante para os flavonóides guaijaverina, hiperosídeo e isoquercitrina. Dentre esses, guaijaverina apresentou maior reatividade, sendo hiperosídeo e isoquercitrina

similares na capacidade de reagir com o DPPH[•]. A atividade do flavonóide 3-metil quercetina foi comparável a das outras classes de substâncias fenólicas avaliadas nesse trabalho. Considerando o percentual de consumo total do radical DPPH[•] apresentado pela substância de referência quercetina (figura 2.14), todas as substâncias avaliadas apresentaram atividade consideravelmente inferior a este flavonóide.

A atividade antioxidante de flavonóides está correlacionado a sua estrutura química (COOK & SAMMAN, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996; YOKOZAWA *et al.*, 1997; SON & LEWIS, 2002; SOOBATTEE *et al.*, 2005; TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU, 2006). Em geral, a capacidade de neutralizar radicais livres e a atividade antioxidante depende da estrutura molecular do flavonóide e do padrão de substituição de grupamentos hidroxila doadoras de hidrogênio (número e posição), uma vez que essas propriedades influenciam na disponibilidade de hidrogênios fenólicos e na possibilidade de estabilização, via ponte de hidrogênio ou deslocalização eletrônica, do radical fenoxila resultante (AMIC *et al.*, 2003).

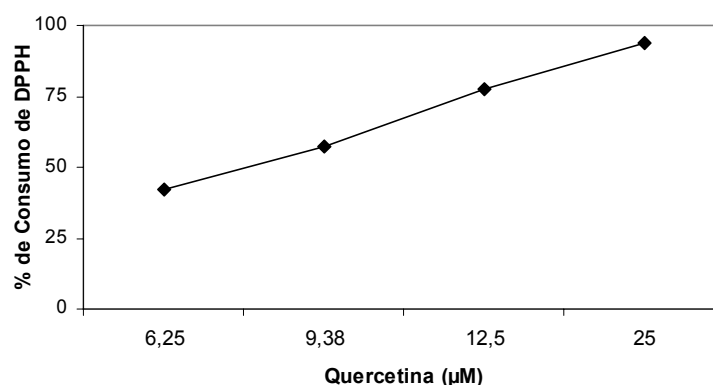


Figura 2.14: Percentual de consumo total do radical DPPH[•], avaliado em concentrações crescentes de quercetina.

Considerando os flavonóis, classe de flavonóides avaliada nesse trabalho, a presença de uma -OH livre na posição C-3 aumenta a capacidade antioxidante, que é consideravelmente reduzida com a glicosilação ou metoxilação deste grupamento. Da mesma maneira, hidroxilas nas posições C-5 e C-7 do anel A e C-3' e C-4' do anel B

parecem contribuir para a atividade antioxidante (COOK & SAMMAN, 1996; RICE-EVANS *et al.*, 1996; AMIC *et al.*, 2003). Os quatro flavonóides avaliados no presente trabalho são derivados da quercetina, diferindo entre si com relação à substituição na posição C-3, onde guaijaverina, hiperosídeo e isoquercitrina apresentam açúcar e 3-metil quercetina um grupamento metoxila. O açúcar ligado na posição C-3 parece afetar a capacidade neutralizadora de radicais livres em flavonóis através de alterações na distribuição eletrônica e da participação na deslocalização de elétrons, ou ainda através de mecanismos desconhecidos (YOKOZAWA *et al.*, 1997).

Apesar de ser bem estabelecido que a presença da posição 3 livre em flavonóides é importante para a ação antioxidante, quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, cuja posição 3 está protegida por uma pentose, diferindo de guaijaverina (quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo) apenas na conformação do anel do açúcar, apresentou maior capacidade de reação com o radical DPPH^{*} em relação à quercetina e também ao hiperosídeo (CAKIR *et al.*, 2003). Segundo YOKOZAWA e colaboradores (1997), a configuração da molécula de flavonóis e flavonas, sejam agliconas ou glicosídeos, parece ser importante na determinação de sua atividade antioxidante.

Segundo vários autores, a capacidade de neutralização de radicais livres por compostos fenólicos aumenta com o número total de grupamentos hidroxilas, provavelmente devido a perda de um hidrogênio vulnerável e estabilidade do radical assim formado devido à ressonância eletrônica. No entanto, apenas japonicina A apresentou uma atividade significativamente superior quando comparada com os outros derivados de floroglucinol e benzofenonas, cujas estruturas químicas possuem 4 e 2 hidroxilas fenólicas, respectivamente. Considerando ainda este aspecto, através do ensaio de TRAP, verificou-se atividade antioxidante apenas para carifenona A e carifenona B, onde simultaneamente avaliou-se a atividade do floroglucinol uliginosina A, com baixa capacidade de reagir com radicais peroxila, gerados por ABAP. Utilizando o ensaio de DPPH^{*}, garcinol, uma benzofenona poliisoprenilada, apresentou forte atividade antioxidante, com ação superior a de α -tocoferol (YAMAGUCHI *et al.*, 2000).

A avaliação do consumo de DPPH[•] nos estágios rápido e lento pode revelar a contribuição de diferentes grupos funcionais na reação de captura do radical livre (TSIMOGIANNIS & OREOPOULOU, 2006). Carifenona A apresentou um maior consumo de DPPH[•] nos primeiros 50 s (76,9%), o que pode indicar a presença de grupamentos hidroxila altamente reativos. Apesar de essa substância apresentar estrutura isômera a de carifenona B, nesta última verificou-se menor capacidade antioxidante.

Os benzopiranos HP1 e HP3 não apresentaram atividade frente ao radical DPPH[•] na máxima concentração de trabalho (400 µM). O composto HP2 apresentou um leve consumo de radical no ensaio espectrofotométrico e uma fraca atividade no ensaio bioautográfico, onde apenas HP2 promoveu a alteração da cor violeta característica do DPPH[•] para amarelo.

A fração *n*-hexânica de *H. polyanthemum* apresentou um consumo de DPPH[•] próximo aos 50% apenas com 500 µg/mL, uma concentração 10 vezes superior à essa mesma fração de *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum* e 3 vezes superior a de *H. carinatum*. Esse comportamento pode estar relacionado à presença majoritária dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 na fração *n*-hexânica (FERRAZ *et al.*, 2001). Essa fraca atividade pode ser, então, devida à presença do floroglucinol uliginosina B, cujo teor é baixo nessa planta. Da mesma maneira, *H. carinatum* não apresentou boa atividade para a fração *n*-hexânica, de onde foram extraídas as benzofenonas, provavelmente devido à baixa concentração dessas substâncias na planta. A boa atividade antioxidante da fração *n*-hexânica para *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum* pode estar relacionada a presença majoritária de derivados de floroglucinol extraídos por esse solvente nessas plantas, como japonicina A, hiperbrasilol B e uliginosina A (FERRAZ *et al.*, 2002a; DALL'AGNOL *et al.*, 2004; NÖR *et al.*, 2004) bem como a substâncias não identificadas ou então interações sinérgicas (ZHENG & WANG, 2001).

3.5.6 Avaliação da correlação entre o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante

Em geral, extratos ou frações com alta atividade antioxidante e capacidade de neutralizar radicais livres apresentam um alto conteúdo de substâncias fenólicas. Ao submeter os resultados (ação antioxidante e conteúdo de fenólicos) de todos os extratos e frações de cada espécie à análise de regressão, pode-se verificar uma correlação linear entre esses dois parâmetros em muitos trabalhos (ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; KATALINIC *et al.*, 2006).

Flavonóides derivados da quercetina, ácidos fenólicos e taninos são os componentes predominantes das frações metanólicas das espécies de *Hypericum* nativas do RS (DALL'AGNOL *et al.*, 2003), e as propriedades antioxidantes dessas substâncias fenólicas já vem sendo descritas na literatura (CONFORTI *et al.*, 2002; ÇAKIR *et al.*, 2003; ZOU *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2005). No entanto, houve uma baixa correlação linear entre a atividade antioxidante, expressa em percentual de DPPH[•] consumido, e o conteúdo de fenólicos totais para o extrato bruto ($R^2 = 0,6635$) e para a fração metanólica ($R^2 = 0,3816$). Em relação à fração *n*-hexânica, não houve correlação linear ($R^2 = 0,0028$). Essa discordância entre a atividade antioxidante de extratos vegetais e o conteúdo de substâncias fenólicas já foi previamente relatado (MAILLARD & BERSET, 1995; HEINONEN *et al.*, 1998; AKOWUAH *et al.*, 2004; ŠKERGET *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante de extratos vegetais não é limitada às substâncias fenólicas. A presença de diferentes componentes no extrato, tais como açúcares e outros compostos que funcionam como doadores de H, podem erroneamente contribuir para a concentração de fenólicos totais determinada através do método de Folin-Ciocalteu (AKOWUAH *et al.*, 2004). Além disso, métodos para a avaliação da atividade antioxidante de extratos não eliminam a possibilidade de interações entre substâncias e efeitos sinérgicos ou inibitórios com o sistema utilizado. O sinergismo de flavonóides com tocoferóis e ácido cítrico já foi descrito (ŠKERGET *et al.*, 2005; DAWIDOWICZ *et al.*, 2006). Desse modo, não há uma simples relação entre a concentração de fenólicos totais e a atividade antioxidante quando compara-se extratos de plantas (AKOWUAH *et al.*, 2004; ŠKERGET *et al.*, 2005).

3.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo descrito neste capítulo 2 permitem concluir que:

√ Considerando o fracionamento do processo de extração, a fração metanólica apresentou o maior rendimento em todas as espécies, seguindo uma ordem crescente para *H. myrianthum*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum* e *H. polyanthemum*. As frações diclorometânica e *n*-hexânica apresentaram rendimentos similares entre si.

√ Considerando o mesmo extrato avaliado, os maiores teores de fenólicos totais foram evidenciados para o extrato bruto de *H. carinatum*, para a fração metanólica de *H. myrianthum*, para a fração diclorometânica de *H. polyanthemum* e para a fração *n*-hexânica de *H. myrianthum*. Dentre as espécies avaliadas, *H. carinatum* foi a única cujo teor de fenólicos totais do extrato bruto foi superior aos demais extratos da planta.

√ No ensaio de TRAP, o extrato bruto metanólico da espécie *H. myrianthum* apresentou a maior capacidade de capturar os radicais peroxila formados. Na concentração final de 1,67 µg/mL, esse extrato apresenta o mesmo potencial antioxidante de quercetina e de trolox, ambos na concentração de 1,1 µM.

√ Nesse mesmo ensaio, o efeito dos extratos brutos de *H. carinatum*, *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum*, na concentração final de 1,67 µg/mL, foi superior à inibição da quimioluminescência promovida por 0,53 µM de quercetina.

√ As substâncias carifenona A e B, na concentração de 10,7 µM, apresentaram no ensaio de TRAP, uma inibição da quimioluminescência equivalente à de 1,1 µM de quercetina. Uliginosina B não apresentou capacidade antioxidante através desse método.

√ O maior índice de ORAC-PGV foi verificado para o extrato bruto de *H. caprifoliatum* (820,3 ET/g extrato seco).

√ No ensaio de ORAC-PGV, os flavonóides guaijaverina, hiperosídeo e isoquercetrina, testados na concentração de 100 µM, não promoveram a proteção do consumo de PGV.

√ A presença de compostos antioxidantes foi evidenciada em todas as frações das espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, quando avaliadas através da capacidade de reação com o radical DPPH[•], no ensaio bioautográfico por CCD. Hiperosídeo foi considerada uma das principais substâncias responsáveis pela atividade antioxidante da fração metanólica nas quatro espécies estudadas. Substâncias com fraca atividade antioxidante foram detectadas nas frações *n*-hexânica e diclorometânica, através desta técnica bioautográfica.

√ Considerando os extratos avaliados no ensaio espectrofotométrico as frações metanólicas de *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum* apresentaram a maior atividade antioxidante, medida através da capacidade de reação com o radical DPPH[•]. Dentre as frações metanólicas das plantas avaliadas, a menor atividade foi verificada para *H. polyanthemum*.

√ A fração *n*-hexânica demonstrou a menor atividade em neutralizar radicais DPPH[•], principalmente para as espécies *H. polyanthemum* e *H. carinatum*.

√ *H. carinatum* foi a única espécie cujo extrato bruto apresentou a maior atividade em neutralizar radicais DPPH[•] em comparação à fração metanólica, principalmente devido a compostos fenólicos mais polares.

√ Nas quatro espécies avaliadas, principalmente na espécie *H. carinatum*, o extrato bruto apresentou a maior proporção de antioxidantes de alta reatividade frente ao radical DPPH[•]. O percentual consumido nos primeiros 50 s diminuiu com o

fracionamento, indicando a possibilidade de ocorrência de uma interação entre compostos mais polares e compostos apolares.

√ Dentre as substâncias isoladas, a maior capacidade de reação com DPPH[•] foi evidenciada para os flavonóides guajaverina, hiperosídeo e isoquercitrina. Guajaverina apresentou maior reatividade, sendo hiperosídeo e isoquercitrina similares na capacidade de reagir com esse radical, indicando uma possível interferência do açúcar ligado na posição C-3 na capacidade neutralizadora de radicais livres em flavonóis.

√ Japonicina A apresentou uma atividade antioxidante frente ao radical DPPH[•] significativamente superior quando comparada com hiperbrasilol B, uliginosina B, carifenona A e carifenona B.

√ Carifenona A apresentou um maior consumo de DPPH[•] nos primeiros 50 s de reação (76,9%), inferindo a presença de grupamentos hidroxila altamente reativos.

√ Os benzopiranos, HP1 e HP3 não apresentaram atividade na máxima concentração de trabalho (400 μM). O composto HP2 apresentou um leve consumo de radical DPPH[•] no ensaio espectrofotométrico e bioautográfico.

√ Uma baixa correlação linear foi evidenciada entre a atividade antioxidante, expressa em percentual de DPPH[•] consumido, e o conteúdo de fenólicos totais para o extrato bruto ($R^2= 0,6635$) e para a fração metanólica ($R^2= 0,3816$). Em relação à fração *n*-hexânica, não houve correlação linear ($R^2= 0,0028$).

4. CAPÍTULO 3

**CULTURA *IN VITRO* DE CÉLULAS E TECIDOS DE ESPÉCIES DE *HYPERICUM*
NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL**

4.1 INTRODUÇÃO

Os promissores resultados biológicos revelados para extratos e substâncias isoladas das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul, têm ocasionado uma crescente demanda por estas plantas, visando a continuidade nos estudos iniciados. No entanto, as espécies de *Hypericum* brasileiras apresentam uma distribuição restrita, com pequenas populações dispersas ou, ainda, restritas a uma única localidade (ROBSON, 1990; VON POSER *et al.*, 2006). Conseqüentemente, a exploração da flora nativa pode levar a reduções drásticas das populações naturais dessas espécies, colocando-as em risco de extinção.

Desta forma, métodos de cultivo *in vitro* que possibilitem a propagação e conservação das espécies de *Hypericum* apresentam-se como uma opção para a obtenção de matéria-prima de interesse e redução do extrativismo.

Estudos de cultivo *in vitro* haviam sido realizados com uma única espécie brasileira. Protocolos para a propagação em massa, bem como para indução de calos visando a obtenção de metabólitos secundários foram desenvolvidos para *H. brasiliense* (CARDOSO & DE OLIVEIRA, 1996).

H. polyanthemum é uma das espécies nativas do Rio Grande do Sul que se encontra criticamente ameaçada, estando incluída na lista de espécies do sul do Brasil em extinção (VON POSER *et al.*, 2006). Considerando o aspecto ecológico e, principalmente, as propriedades biológicas relacionadas aos extratos e produtos isolados dessa planta, esse trabalho está direcionado a um estudo mais detalhado desta espécie.

4.2 OBJETIVOS

Estabelecimento de protocolos de micropropagação *in vitro* para as espécies *H. campestre* Cham. & Schltdl., *H. caprifoliatum* Cham. & Schltdl., *H. carinatum* Griseb., *H.*

myrianthum Cham. & Schltdl., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt e *H. ternum* A. St. Hil.

Avaliar a influência da concentração de sais do meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* das espécies micropropagadas *H. campestre*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*.

Avaliar a influência de reguladores de crescimento na indução de calos em culturas *in vitro* das espécies *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*.

Análise química comparativa, através de cromatografia em camada delgada, entre as substâncias produzidas *in vitro* pelas culturas de células e tecidos e as substâncias produzidas pelas espécies *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*, desenvolvidas *in natura*.

Análise química das raízes de *H. campestre* e de *H. polyanthemum* mantidas sob cultivo *in vitro* durante período superior a três meses, sem transferência para meio de cultura fresco.

4.3 REVISÃO

4.3.1 Cultura *in vitro*

A biotecnologia vegetal utiliza como recurso a capacidade que as plantas apresentam de regenerar-se totalmente a partir de suas células ou tecidos. Segundo a teoria da totipotencialidade proposta por GOTTLIEB HABERLANDT, cada célula é autônoma, contendo o potencial necessário para originar um organismo inteiro. Essa habilidade de totipotência permite que as células somáticas vegetais se dividam, se diferenciem em plântulas e expressem capacidades bioquímicas especializadas quando cultivadas sob condições apropriadas (FRANÇA, 2003).

A cultura de calos e a suspensão celular envolvem a manutenção de células desorganizadas em um meio nutritivo. No entanto, órgãos vegetais diferenciados podem desenvolver-se em cultura, sem perda da integridade (GEORGE, 1993). O calo se apresenta como uma massa celular indiferenciada, formado quando as células vegetais multiplicam-se continuamente e de modo desorganizado (BARRUETO CID, 2001). A indução do crescimento de um calo e de sua subsequente diferenciação e organogênese é efetuada pelo controle das condições, manipulação de nutrientes e aplicação de reguladores de crescimento no meio de cultura (RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002).

A micropropagação é assim denominada devido ao emprego de porções de tecido bastante pequenas como explantes, como é chamado o material vegetal removido da planta íntegra e utilizado para dar início a uma cultura *in vitro* de células ou tecidos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Utilizada freqüentemente para a obtenção de clones que mantêm todas as características da planta-mãe, a regeneração de plântulas *in vitro* através da cultura de brotos apresenta-se como uma técnica especialmente vantajosa para a preservação de genótipos produtores de compostos medicinais (ROUT *et al.*, 2000; FRANÇA, 2003).

O sucesso do cultivo *in vitro* de diferentes plantas depende de inúmeros fatores. Por essa razão, cada espécie em particular requer um protocolo de micropropagação diferenciado, visto que ocorre variabilidade na resposta morfogênica *in vitro* não apenas entre espécies do mesmo gênero, mas também entre genótipos da mesma espécie (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; ROUT *et al.*, 2000). Cada espécie ou clone apresenta características únicas, determinadas por fatores genéticos, de modo que as necessidades para seu cultivo *in vitro* também tendem a ser únicas. A capacidade de regeneração e crescimento *in vitro* parece estar associada não apenas ao genótipo, mas também à atividade fisiológica na planta matriz, sob o controle de diversos fatores endógenos (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Dentre os fatores que afetam esse processo pode-se incluir influências

ambientais, como intensidade luminosa e qualidade da luz empregada, temperatura e umidade relativa, bem como a composição do meio nutriente. A literatura apresenta diferentes meios de cultura, como os meios de White, MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) e B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), que possuem diferenças quanto à composição e concentração dos componentes. O meio MS, juntamente com o B5, é usado na cultura de tecidos da grande maioria das espécies, podendo apresentar algumas modificações, tanto qualitativas quanto quantitativas (CALDAS *et al.*, 1998). Além dos nutrientes básicos, reguladores de crescimento são necessários para iniciar e manter a divisão celular (REINERT & YEOMAN, 1982; ROUT *et al.*, 2000; RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Dentre os reguladores de crescimento, as citocininas desempenham papel fundamental no crescimento e morfogênese em cultura de tecidos, estimulando a divisão celular, bem como a indução e proliferação de brotações adventícias (GEORGE & SHERRINGTON, 1984). As citocininas, em especial a 6-benzilamino-purina (BAP), produzem crescimento das gemas laterais e das folhas, e antagonizam os efeitos das auxinas, como o ácido indol-acético (AIA), ácido indol-butírico (AIB) e ácido naftaleno-acético (ANA). As auxinas também são responsáveis pelo crescimento, inibindo o desenvolvimento das gemas laterais (RAVEN *et al.*, 1985). Quantidades excessivas dessas substâncias promovem crescimento de calos. O ácido 2,4 dicloro-fenóxi-acético (2,4-D), uma auxina sintética, tende a estimular a produção de calos, mesmo em baixas concentrações, e o AIB é muito eficaz para o enraizamento. As giberelinas, como o ácido giberélico, são úteis ao alongamento do caule, mas são pouco utilizadas (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Técnicas de biotecnologia celular vegetal vêm sendo desenvolvidas para a propagação, regeneração e melhoramento de plantas, destacando-se entre elas a micropropagação, embriogênese somática, cultura de calos, cultura de células em suspensão, cultura de ápices caulinares, anteras ou raízes. Esses métodos de cultivo *in vitro* de células, tecidos e órgãos vegetais em meios nutritivos, estão sendo amplamente utilizados para a propagação de um grande número de espécies de plantas, sendo

muitas das quais de uso medicinal (ROUT *et al.*, 2000; RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Após o desenvolvimento de protocolos de cultivo *in vitro*, a aclimatização constitui uma etapa fundamental na produção de plantas obtidas por cultura de tecidos, uma vez que as condições de cultura *in vitro* modificam características bioquímicas, anatômicas e morfológicas das plantas, alterando os processos fisiológicos normais (NETO *et al.*, 2004).

Em função das potenciais atividades biológicas agregadas aos extratos ou produtos isolados das espécies do gênero *Hypericum*, estudos têm sido direcionados ao desenvolvimento de culturas *in vitro*, como uma alternativa para multiplicação e para produção de metabólitos secundários destas espécies (CARDOSO & DE OLIVEIRA, 1996; KARTNIG *et al.*, 1996; BAIS *et al.*, 2002; MCCOY & CAMPER, 2002; MURCH *et al.*, 2002; ZOBAYED *et al.*, 2004; GADZOVSKA *et al.*, 2005; COUCEIRO *et al.*, 2006).

4.3.2 Regeneração e propagação de espécies do gênero *Hypericum*

O desenvolvimento de um processo de propagação *in vitro* apresenta três estágios. Nos sistemas de micropropagação, o estágio I envolve a seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas. No estágio II ocorre a multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas em meio próprio para multiplicação. Finalmente, o estágio III é caracterizado pela transferência das partes aéreas produzidas para um meio de enraizamento, que induz a formação de raízes adventícias nas partes aéreas provenientes da multiplicação, permitindo o posterior transplante das plantas obtidas para substrato ou solo, mantendo-se uma condição *ex vitro* (BHOJWANI & RAZDAN, 1992; GEORGE, 1993; GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Este esquema permite alterações conforme as características de cada espécie. Pode ser necessária uma fase adicional de alongamento das partes aéreas antes do enraizamento. Também é possível eliminar a etapa de enraizamento *in vitro* através da manipulação das partes aéreas como

microestacas, as quais enraízam diretamente no substrato de transplântio (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

O uso mais popular da micropropagação é como uma alternativa aos métodos convencionais de propagação vegetativa, com o objetivo de aumentar a taxa de multiplicação. Através desta técnica, plantas inteiras podem ser formadas a partir de pequenos explantes. Esta taxa de proliferação e multiplicação não pode ser esperada por qualquer um dos métodos de propagação *in vivo*. Uma vantagem da propagação por cultura *in vitro* é que o ciclo de multiplicação é muito curto (2-6 semanas), e cada ciclo resulta em um aumento logarítmico no número de brotos (BHOJWANI & RAZDAN, 1992). Além disso, a multiplicação das plantas em culturas pode continuar durante o ano inteiro, independente de época e de variações sazonais (WARREN, 1991).

Inicialmente, os estudos envolvendo a aplicação de técnicas de cultura *in vitro* ao gênero foram direcionados a *H. perforatum*, o que é justificado por ser esta a espécie que mais se destaca quanto às propriedades farmacológicas de seus extratos e constituintes. Mais recentemente, outras espécies também têm sido exploradas nesse sentido.

H. perforatum tem sido micropropagada com sucesso utilizando como fonte de explante plântulas obtidas em condições assépticas (ZDUNEK & ALFERMANN, 1992; MURCH *et al.*, 2002; GADZOVSKA *et al.*, 2005; COUCEIRO *et al.*, 2006), tecidos organizados removidos da planta matriz (PRETTO & SANTAREM, 2000; MCCOY & CAMPER, 2002; SANTARÉM & ASTARITA, 2003) e também através de organogênese indireta, a partir de calos iniciados *in vitro* (KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a; PRETTO & SANTARÉM, 2000; PASQUA *et al.*, 2004; GADZOVSKA *et al.*, 2005).

CELLAROVÁ e colaboradores (1992) desenvolveram um eficiente sistema para regeneração de plantas a partir de culturas *in vitro* de tecidos de *H. perforatum*. Esses autores observaram uma variabilidade aumentada de várias características morfológicas, bem como aumento no conteúdo de hipericinas (CELLAROVÁ *et al.*, 1994)

nas plantas regeneradas.

ZOBAYED e SAXENA (2003) compararam o potencial de regeneração de *H. perforatum*, utilizando diferentes tipos de explantes (folhas, raízes, brotos, hipocótilo, extremidades de brotos e ramos) obtidos de sementes germinadas em condições de luz e escuro. Este estudo demonstrou claramente a variabilidade de regeneração desta espécie em função apenas do material utilizado para iniciar a cultura, uma vez que posteriormente todas foram mantidas sob as mesmas condições. Dentre os explantes testados, a maior frequência de organogênese foi obtida utilizando-se os brotos. Explantes obtidos a partir de raízes produziram o segundo maior número de regenerantes, sendo a regeneração afetada pela luminosidade utilizada para germinação das sementes. Enquanto explantes de raízes obtidos de sementes cultivadas sob luz apresentaram um número de regenerantes significativamente maiores do que aqueles obtidos de sementes germinadas no escuro, o inverso foi observado para todos os outros explantes analisados.

Estudos também demonstram o cultivo *in vitro* como uma opção para a multiplicação e conservação de outras espécies do gênero, tais como *H. erectum* (YAZAKI & OKUDA, 1990), *H. canariense* (MEDEROS, 1991; MEDEROS *et al.*, 1997), *H. foliosum* (MOURA, 1998), *H. patulum* (BARUAH *et al.*, 2001), e *H. brasiliense* (CARDOSO & DE OLIVEIRA, 1996).

H. patulum foi regenerado com sucesso a partir de culturas de brotos desta planta em meio MS, suplementado com 6-benzilaminopurina e cinetina, sendo a melhor formação de brotos alcançada com a adição de vitaminas (tiamina, pantotenato de cálcio e biotina). Após enraizamento e transferência para solo, as culturas foram mantidas por longo período com morfologia normal, demonstrando-se a possibilidade de propagação desta espécie (BARUAH *et al.*, 2001).

Muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas para propagação *in vitro* de *H. perforatum*, porém a maioria descrevendo protocolos de cultivo para uma escala

laboratorial. Entretanto, pesquisas vêm sendo realizadas para a regeneração em larga escala desta espécie utilizando-se culturas hidropônicas (MURCH *et al.*, 2002) e culturas de raízes em meio líquido em um sistema de biorreator (ZOBAYED & SAXENA, 2004), demonstrando fontes alternativas para obtenção de biomassa de *H. perforatum*, as quais poderão ser utilizadas para extração de metabólitos secundários desta espécie.

4.3.3 Produção de metabólitos secundários por células ou tecidos de espécies de *Hypericum* cultivadas *in vitro*

O uso de culturas vegetais *in vitro* tem sido amplamente discutido como uma fonte para a produção de substâncias de origem natural, sendo o cultivo em larga escala uma alternativa tecnologicamente viável para produção comercial de metabólitos secundários de importância para a indústria (VERPOORTE, 2000; RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002). Em função disso, estudos visando a avaliação da produtividade *in vitro* de espécies de *Hypericum* têm sido relatados.

Como descrito anteriormente, as espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul não apresentam hipericina na sua composição. No entanto, a maioria dos trabalhos envolvendo a análise de metabólitos secundários em culturas *in vitro* descreve a avaliação da produção de hipericina e seus derivados, uma vez que essas substâncias foram por muito tempo consideradas as principais responsáveis pela atividade antidepressiva de *H. perforatum* (WAGNER & BLADT, 1994; BUTTERWECK *et al.*, 1998). Além disso, apresentam atividade antiviral (MERUELO *et al.*, 1988; WOOD *et al.*, 1990; AXARLIS *et al.*, 1998) e inibidora da MAO (SUZUKI *et al.*, 1984; THIEDE & WALPER, 1994), bem como propriedades citotóxicas e antitumorais (VANDENBOGAERDE & DE WITTE, 1995; AGOSTINIS *et al.*, 2002; MARTÍNEZ-POVEDA *et al.*, 2005).

Devido à grande frequência de xantonas em *Hypericum*, muitos trabalhos encontrados na literatura descrevem o estabelecimento de culturas de algumas espécies desse gênero, com o objetivo de estudar o metabolismo biossintético dessas substâncias, o que têm conduzido ao isolamento de xantonas de estruturas inéditas ou

de ocorrência não descrita em *Hypericum* (ISHIGURO *et al.*, 1993; ISHIGURO *et al.*, 1995). Trabalhos mais recentes têm relatado a produção *in vitro* de derivados de floroglucínóis, principalmente de hiperforina (MURCH *et al.*, 2002; SIRVENT & GIBSON, 2002; KOSUTH *et al.*, 2003; PASQUA *et al.*, 2004; KLINGAUF *et al.*, 2005), uma vez que atualmente essa substância é considerada o principal componente envolvido na atividade antidepressiva de *H. perforatum* (MEDINA *et al.*, 2006).

4.3.3.1 Quinonas policíclicas

A produção *in vitro* das naftodiantronas hipericina e *pseudo*-hipericina por culturas de espécies do gênero *Hypericum* têm sido investigada com maior frequência entre os trabalhos descritos na literatura, verificando-se produção tanto por cultivo de células (KARTNIG & GÖBEL, 1992; KARTNIG *et al.*, 1996; BAIS *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006) quanto por plântulas regeneradas (ZDUNEK & ALFERMANN, 1992; KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a; KIRAKOSYAN *et al.*, 2000b; SIRVENT & GIBSON, 2002; SANTARÉM & ASTARITA, 2003; COUCEIRO *et al.*, 2006). No entanto, PASQUA e colaboradores (2004) acreditam que a síntese de hipericina e derivados não ocorra em culturas de células indiferenciadas, como nas suspensões celulares e nas culturas de calos, sendo essencial a diferenciação dos órgãos.

A análise de culturas celulares de *H. perforatum* e *H. maculatum*, mantidas em meio MS modificado, revelou em um primeiro momento, uma pequena produção de hipericina (cerca de 1 % do teor das plantas desenvolvidas *in natura*), sendo que *pseudo*-hipericina não foi produzida em quantidades detectáveis (KARTNIG & BRANTNER, 1990). Estudos posteriores, com diferentes subtipos destas mesmas espécies, revelaram uma extrema variabilidade nas concentrações dessas substâncias, embora todas as amostras tenham sido submetidas às mesmas condições de cultivo *in vitro* (KARTNIG & GÖBEL, 1992; KARTNIG *et al.*, 1996).

É comum verificar-se uma produção de *pseudo*-hipericina significativamente maior que a de hipericina tanto nas culturas de células em suspensão quanto em

culturas de brotos (KARTNIG & GÖBEL, 1992; KARTNIG *et al.*, 1996; KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a). Este padrão de produção de naftodiantronas também é verificado nas plantas de cultivo *in natura*, onde, em geral, as concentrações de *pseudo*-hipericina são maiores que as de hipericina (UMEK *et al.*, 1999).

Pesquisas utilizando a regeneração de plântulas de *H. perforatum* a partir de culturas celulares demonstram que o conteúdo total de hipericina e *pseudo*-hipericina em diferentes estruturas celulares correlaciona-se com o grau de diferenciação celular e alcança os maiores valores durante a morfogênese foliar (KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a), de modo que plântulas regeneradas demonstram maior produção de *pseudo*-hipericina do que os calos (KARTNIG *et al.*, 1996; SANTARÉM & ASTARITA, 2003). As plântulas regeneradas apresentaram glândulas negras similares às presentes nas folhas da planta íntegra, o que demonstra que a biossíntese de hipericina está relacionada com a morfogênese e formação dessas estruturas celulares (ZDUNEK & ALFERMANN, 1992; KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a; KIRAKOSYAN *et al.*, 2000b).

Demonstrou-se também que o crescimento de células em suspensão e a produção de hipericina são regulados pelas condições de cultivo. As culturas mantidas sob luz permanente apresentaram menor acúmulo deste metabólito, quando comparadas com as submetidas ao crescimento no escuro (BAIS *et al.*, 2002; WALKER *et al.*, 2002).

Estudos relacionados à estimulação da produção destes metabólitos secundários através do uso de elicitores em *H. perforatum* também têm sido relatados (KIRAKOSYAN *et al.*, 2000b; WALKER *et al.*, 2002; CONCEIÇÃO *et al.*, 2006). A elicitação é utilizada para induzir a expressão de genes associados a enzimas responsáveis pela síntese de metabólitos secundários (ROBERTS & SHULER, 1997). A aplicação exógena de elicitores nas culturas *in vitro* é utilizada para o estudo da resposta da planta ao ataque de microrganismos ou insetos, bem como para aumentar a produção biotecnológica de metabólitos secundários (BOURGAUD *et al.*, 2001; RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002).

Diferentes elicitores foram avaliados quanto à estimulação da biossíntese de quinonas policíclicas em culturas de brotos de *H. perforatum*. A adição de extrato de levedura ao meio de cultura inibiu a produção de hipericina e *pseudo*-hipericina, bem como o crescimento dos brotos. No entanto, a adição de manano, estimulou a síntese de ambas as substâncias, sendo o aumento na produção de *pseudo*-hipericina maior do que na de hipericina. A utilização de β -1,3-glicano e de pectina não demonstrou efeito sobre a produção de hipericina, porém estas substâncias estimularam a produção de *pseudo*-hipericina de maneira menos significativa, quando comparado com o efeito obtido pelo manano. Além disso, não foi observada qualquer inibição no crescimento das culturas com a adição de manano, β -1,3-glicano ou pectina (KIRAKOSYAN *et al.*, 2000b).

Com a adição dos elicitores ácido jasmônico, ácido salicílico e parede celular de *Phytophthora cinnamoni* em culturas de células em suspensão de *H. perforatum*, apenas ácido jasmônico levou a um aumento na produção de biomassa, bem como na produção de hipericina. O crescimento celular foi verificado tanto para culturas mantidas sob condição de luminosidade quanto para as submetidas a escuro total, porém as culturas submetidas ao escuro apresentaram crescimento celular e acúmulo de hipericina superior. Nas concentrações testadas, nem o ácido salicílico (50-200 μ M) nem elicitores presentes na parede celular de *P. cinnamoni* (0,1-0,5%) intermediaram a elicitação desse metabólito de interesse (WALKER *et al.*, 2002).

Avaliando a possibilidade de esses compostos fenólicos serem parte de algum sistema específico de defesa mediado por metil jasmonato ou ácido salicílico, SIRVENT & GIBSON (2002) utilizaram culturas de meristemas de *H. perforatum* para verificar o efeito da aplicação exógena destes elicitores na produção de hipericinas. Deste modo foi constatado que a produção dessas substâncias aumentou em resposta a ambos os elicitores. Estes mesmos autores avaliaram o efeito de *Colletotrichum gloeosporioides*, um fungo patogênico para *H. perforatum*, em plantas cultivadas em casa de vegetação, verificando nível duas vezes maior de hipericinas nas plantas inoculadas com os esporos fúngicos. Um estudo avaliando a elicitação de culturas de células em

suspensão de *H. perforatum* por esse mesmo patógeno, não resultou na acumulação de hipericinas (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006)

Estudos de otimização de parâmetros físicos e químicos para a obtenção de biomassa e de maiores teores de metabólitos secundários têm sido relatados. Em culturas de plântulas de *H. perforatum* em bioreator, foi verificado que o aumento da concentração de sacarose no meio de cultivo levou à diminuição da biomassa e à manutenção dos teores de hipericina e de *pseudo*-hipericina (ZOBAYED *et al.*, 2003). Foi verificado ainda que plantas de *H. perforatum* cultivadas a campo em solo com baixa concentração de nitrogênio (BRISKIN *et al.*, 2000, 2001), bem como plântulas mantidas sob a presença de níquel (MURCH *et al.*, 2003) e cromo (TIRILLINI *et al.*, 2006) no meio de cultura, apresentaram aumento na concentração de hipericinas.

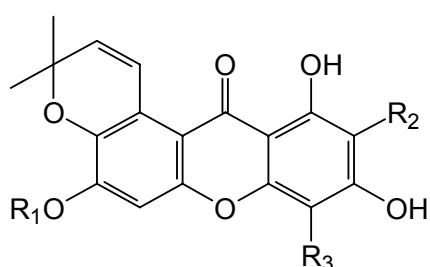
Considerando a variabilidade na produção de hipericinas em diferentes materiais vegetais, recentemente foi avaliada a influência da época de coleta, da temperatura de cultivo e da origem do germoplasma em *H. perforatum* mantido sob condição *ex-vitro* após micropropagação, verificando-se uma significativa variação no teor destas substâncias (COUCEIRO *et al.*, 2006).

4.3.3.2 Xantonas

A produção de xantonas do tipo 1,3,6,7- e 1,3,5,6-oxigenadas foi descrita para culturas de calos e suspensões celulares de *H. perforatum*. A acumulação destes metabólitos apresentou-se fortemente influenciada pela suplementação do meio de cultura com reguladores do crescimento. A maior produção de xantonas foi verificada em culturas de calos mantidas em meio acrescido de ácido 2,4-D e cinetina (CIN). A produção de xantonas foi reduzida com a substituição de cinetina por BAP, porém este efeito foi atenuado quando ambas estavam presentes no meio. Além disso, verificou-se uma relação linear positiva entre as concentrações de ANA analisadas (variando de 4,5 a 22,5 μM) e a acumulação de xantonas pelas culturas. Porém, a produção de 1,3,5,6-xantonas foi semelhante em todas as concentrações de ANA avaliadas (DIAS *et al.*,

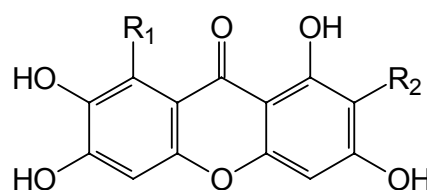
2001).

A análise de extratos obtidos a partir de culturas celulares *in vitro* da espécie *H. patulum* tem levado ao isolamento de diversas xantonas, tais como garcinona B (34), toxiloxantona B (35), γ -mangostina (36), e 1,3,6,7-tetra-hidróxi-8-(3-metil-2-butenil)-9H-xanten-9-ona (37) (ISHIGURO *et al.*, 1993; ISHIGURO *et al.*, 1995)



(34) R1=H; R2= ; R3=H

(35) R1=R2=R3= H



(36) R1= ; R2=

(37) R1= ; R2=H

Além dos estudos direcionados ao padrão biossintético dos calos de *H. patulum*, o tratamento das culturas por elicitores do tipo levedura demonstrou a redução de 1,3,6,7-tetra-hidroxi-8-(3-metil-2-butenil)-9H-xanten-9-ona e γ -mangostina (sem o anel cromeno), bem como aumento na produção de toxiloxantona e garcinona B. Isto demonstra uma resposta induzida por estresse ambiental estimulando a ciclização do grupamento isoprenila ou a ativação de enzimas ciclases que catalizam a transformação de prenila em cromeno (ISHIGURO *et al.*, 1995).

H. androsaemum é outra espécie do gênero cujas culturas celulares apresentam acúmulo desta classe de metabólitos. Estudos com culturas celulares desta planta mantidas em meio LINSMAIER-SKOOG (LS) demonstraram-se pouco eficientes na biossíntese de metabólitos secundários, enquanto as células cultivadas em meio B5 (GAMBORG) apresentaram produção de um notável espectro de xantonas na forma de agliconas ou glicosídeos. Esse dado evidenciou a influência da composição do meio de cultura no padrão de produção *in vitro* de metabólitos secundários (SCHMIDT *et al.*,

2000). Os meios MS/LS ou B5 apresentam na sua composição nitrato e amônio como fontes de nitrogênio, com diferenças relacionadas à proporção de amônio/nitrato e à concentração total de nitrogênio, o que têm demonstrado afetar de modo marcante a produção de metabólitos secundários (RAMACHANDRA RAO & RAVISHANKAR, 2002).

A manutenção das culturas sob ausência total de luz demonstrou aumento no crescimento celular, bem como no conteúdo de xantonas. No entanto, a formação dessas substâncias em culturas celulares de *H. androsaemum* é inibida pela luz (SCHMIDT *et al.*, 2000).

O estudo da indução de compostos fenólicos em culturas de células em suspensão de *H. perforatum* elicitadas com *Colletotrichum gloeosporioides* demonstrou um aumento de 12 vezes na concentração de xantonas, quando as células foram tratadas previamente com metil jasmonato (100 μ M) ou com ácido salicílico (25 μ M) (CONCEIÇÃO *et al.*, 2006).

4.3.3.3 Flavonóides

A produção dessa classe de metabólitos secundários por culturas *in vitro* de algumas espécies do gênero *Hypericum* também tem sido relatada. Trabalhos com culturas celulares em suspensão de *H. perforatum*, *H. maculatum*, *H. tomentosum*, *H. bithynicum*, *H. glandulosum* e *H. balearicum* demonstraram produção de flavonóides, assim como na planta de desenvolvimento *in natura* (KARTNIG *et al.*, 1996).

A análise de culturas de calos e brotos de *H. erectum* demonstrou a produção dos glicosídeos flavônicos hiperosídeo e quercitrina. Foi demonstrada a presença de maiores teores dessas substâncias nas culturas de brotos, quando comparado com a cultura de células indiferenciadas, porém este conteúdo foi inferior ao encontrado na planta desenvolvida *in natura* (YAZAKI & OKUDA, 1990).

A produção de flavonóides também foi constatada em culturas de calos de *H.*

perforatum (DIAS *et al.*, 1998). No entanto, segundo PASQUA e colaboradores (2004), a produção *in vitro* de flavonóides em *H. perforatum* parece estar relacionada com estágios mais desenvolvidos de crescimento, uma vez que rutina, quercetina e hiperosídeo não foram detectados em culturas de calos, e sim apenas em culturas de brotos com 10-12 cm de altura.

Suspensões celulares estabelecidas a partir de calos provenientes de plântulas obtidas assepticamente, em meio MS/2 líquido contendo BAP (10^{-6} M) e ANA (10^{-7}) demonstraram produção do mesmo grupo de flavonóides previamente relatados para as espécies desse gênero. Diferentes variedades de *H. perforatum* e de *H. maculatum*, assim como as espécies *H. bithynicum* e *H. glandulosum* produziram, em concentrações variáveis, a aglicona quercetina e seus heterosídeos rutina, hiperosídeo, isoquercitrina e quercitrina, bem como os biflavonóides amentoflavona e 13,118-biapigenina. Para a espécie *H. balearicum* verificou-se produção de todas as substâncias anteriormente citadas, exceto de 13,118-biapigenina. As culturas de *H. tomentosum* produziram apenas quercitrina e amentoflavona, enquanto *H. olympicum* produziu apenas amentoflavona. Dentre as espécies analisadas, as culturas celulares de *H. perforatum* e de *H. maculatum* demonstraram a melhor produção desses metabólitos secundários. Além disso, regenerantes de *H. perforatum* demonstraram maior produção de quercitrina e amentoflavona do que calos (KARTNIG *et al.*, 1996).

O extrato metanólico de uma biomassa de calos liofilizados de *H. perforatum* apresentou na sua constituição os flavonóides luteolina, luteolina 5-glicosídeo, luteolina 3'-glicosídeo, luteolina 5,3'-dimetiléter e 6-C-prenil luteolina. Essas substâncias produzidas *in vitro* apresentaram estrutura química diferente e acumularam-se em menor quantidade, quando comparados com os flavonóides usualmente produzidos por essa mesma espécie quando cultivada *in natura*. A ocorrência de flavonóides prenilados em *H. perforatum* ainda não havia sido relatada, de modo que a produção de 6-C-prenil luteolina por cultura de calos dessa espécie demonstra a produção de um flavonóide não usualmente produzido pelas plantas cultivadas a campo (DIAS *et al.*, 1998).

No estudo realizado por CONCEIÇÃO e colaboradores (2006) avaliando a eliciação sobre culturas de células em suspensão de *H. perforatum*, observou-se que o padrão de produção de flavonóides foi alterado. O pré-tratamento das culturas com metil jasmonato ou com ácido salicílico e posteriormente com *Colletotrichum gloeosporioides* reduziu o acúmulo de flavonóides, enquanto essas substâncias não foram detectadas em células expostas apenas ao elicitor fúngico. Foi evidenciado ainda que as células expostas apenas a metil jasmonato produziram flavonas, uma classe de flavonóides que não foi detectada nos outros tratamentos.

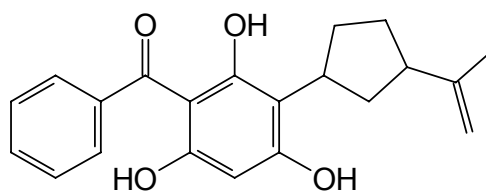
4.3.3.4 Floroglucinóis

Avaliando-se a produção de hiperforina por culturas *in vitro* de *H. perforatum* na forma de células em suspensão e calos, bem como brotos e raízes regeneradas, foi demonstrado que apenas as plântulas regeneradas a partir dos calos foram capazes de sintetizar esta substância, sendo o seu conteúdo aumentado durante o desenvolvimento foliar (PASQUA *et al.*, 2004).

A síntese de floroglucinóis foi estudada com o cultivo *in vitro* de plântulas de *H. perforatum* em estágios de desenvolvimento iniciais, verificando-se a produção de hiperforinas. No entanto, foram verificadas variações significativas no conteúdo dessas substâncias quando avaliadas diferentes plântulas originadas de sementes de uma mesma planta-mãe, demonstrando a influência genética no acúmulo de hiperforinas (KOSUTH *et al.*, 2003).

A indução da produção de hiperforina por elicitores químicos e bióticos em culturas *in vitro* de meristemas apicais de *H. perforatum* foi recentemente avaliada. Demonstrou-se um aumento nas concentrações de hiperforina quando as plântulas foram tratadas tanto com ácido salicílico (1 mM) ou metil-jasmonato (50 μ M), quanto com o patógeno *Colletotrichum gloeosporioides* (SIRVENT & GIBSON, 2002). No entanto, em culturas de células em suspensão de *H. calycinum*, os teores de hiperforinas não foram afetados pela adição de metil-jasmonato e jasmonil-isoleucina (100 μ M/L).

A investigação do extrato clorofórmico de células de *H. patulum* cultivadas em suspensão levou ao isolamento e elucidação estrutural de um novo derivado de floroglucinol, que foi denominado paglucinol (38) (ISHIGURO *et al.*, 1998).



(38)

A avaliação da produção de floroglucinóis em culturas de células em suspensão de *H. calycinum* mantidas no escuro demonstrou o acúmulo de *ad*-hiperforina em teores cerca de dez vezes maiores aos de hiperforina. Essas substâncias não haviam sido previamente detectadas em culturas diferenciadas nesta espécie. As culturas foram mantidas na ausência de luz, uma vez que foi evidenciado que a luz reprime a formação destes derivados de floroglucinol, como previamente observado por SCHMIDT e colaboradores (2000) na produção de xantonas em culturas celulares de *H. androsaemum*. Esse sistema de cultura celular de *H. calycinum* foi utilizado, ainda, como ferramenta para o estudo do metabolismo biossintético desses derivados de floroglucinol (KLINGAUF *et al.*, 2005).

Estudos envolvendo a otimização de parâmetros físicos e químicos para a obtenção de maiores teores nos derivados de floroglucinol também vêm sendo realizados. Em culturas de plântulas de *H. perforatum* em bioreator, foi evidenciado um aumento na produção de hiperforina com a utilização de sacarose na concentração de 45 g/L (ZOBAYED *et al.*, 2003).

4.3.3.5 Outros metabólitos secundários

A presença de taninos em culturas *in vitro* de espécies do gênero também é relatada para células em suspensão de *H. perforatum* e *H. maculatum* (KARTNIG &

BRANTNER, 1990). Culturas de calos e brotos de *H. erectum* demonstraram produção de taninos condensados e compostos relacionados, tais como epicatequina e seus derivados condensados. Demonstrou-se maiores teores destes polifenóis nos tecidos diferenciados, sendo o conteúdo superior ao encontrado nas plantas desenvolvidas *in natura* (YAZAKI & OKUDA, 1990). A análise de calos de *H. patulum* também revelou síntese de epicatequina (ISHIGURO *et al.*, 1997).

Além da ocorrência dos compostos fenólicos já relatados no decorrer deste trabalho, verificou-se produção de ácido oleanólico e β -sitosterol por culturas de células em suspensão de *H. patulum* (ISHIGURO *et al.*, 1997).

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento e aplicação dos protocolos de cultivo *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob orientação da Prof. Dr. Sandra Beatriz Rech.

Para um melhor entendimento, um esquema da metodologia está apresentado como anexo (Anexo VII, página 317).

4.4.1 Procedimentos gerais

Os equipamentos utilizados rotineiramente no laboratório foram um agitador orbital Innova 2350 New Brunswick[®], Capela de Fluxo Laminar Trox do Brasil[®] FHL 449 e autoclave Phenix[®].

Os reagentes empregados no desenvolvimento deste trabalho foram de procedência Nuclear[®], Gibco BRL[®], Sigma[®], Jansen Química[®] e Merck[®].

4.4.2 Material vegetal

O material vegetal utilizado para o desenvolvimento dos protocolos de cultivo *in vitro* consiste nos ápices dos ramos (aproximadamente 0,5 cm) das espécies *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*. As espécies foram coletadas em diferentes localidades do Rio Grande do Sul durante o período de floração dos vegetais. As exsicatas para a devida identificação e registro do material vegetal foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (tabela 3.1).

Tabela 3.1: Dados sobre a coleta do material vegetal e registro em herbário.

Espécie	Local e Data de coleta	ICN
<i>H. campestre</i> Cham. & Schldl.	Guaritas, Caçapava do Sul novembro, 2005	Bordignon 1894
<i>H. caprifoliatum</i> Cham. & Schldl.	Morro Santana, Porto Alegre Março e julho, 2004	Bordignon 1400
<i>H. carinatum</i> Griseb.	Glorinha dezembro, 2003	Bordignon 1520
<i>H. myrianthum</i> Cham. & Schldl.	Paraíso do Sul dezembro, 2003	Bordignon 1402
<i>H. polyanthemum</i> Klotzsch Reichardt.	ex Guaritas, Caçapava do Sul setembro, 2003	Bordignon 1429
<i>H. ternum</i> A. St. Hil.	São Francisco de Paula janeiro, 2003	Bordignon 1717

4.4.3 Estabelecimento do cultivo *in vitro*

Para o desenvolvimento *in vitro* foram utilizados métodos de cultivo através da regeneração de plântulas via micropropagação e culturas de calos.

4.4.3.1 Seleção e preparação dos explantes

Ápices caulinares do vegetal recém coletado foram submetidos aos processos de lavagem e desinfestação e, então, selecionados para obtenção de explantes adequados ao cultivo.

Inicialmente, o material coletado foi mantido em água corrente abundante e, posteriormente, em água destilada para uma lavagem superficial e eliminação de partículas de poeira e outras fontes de contaminação.

Após a realização do processo de lavagem, partiu-se para a desinfestação, que foi efetuada sob condições assépticas, em capela de fluxo laminar horizontal e utilizando-se vidraria previamente esterilizada. O material vegetal foi imerso em diferentes soluções esterilizantes (etanol comercial 70°GL; hipoclorito de sódio a 1,5%) e enxaguado sucessivas vezes com água destilada estéril até a completa remoção do agente desinfetante.

Concluída a desinfestação, meristemas apicais do vegetal foram isolados asepticamente em câmara de fluxo laminar, utilizando-se bisturis e pinças estéreis.

4.4.3.2 Composição dos meios de cultura

Foram utilizados para o estabelecimento do cultivo *in vitro* o meio de cultura contendo sais e vitaminas de MURASHIGE & SKOOG (1962), bem como sua forma modificada (MAURMANN, 2006), denominado M Δ , contendo 75% dos macro-nutrientes: KH₂PO₄; KNO₃; CaCl₂.2H₂O; MgSO₄.7H₂O; (NH₄)₂NO₃; 75% dos micro-nutrientes: NaH₂EDTA.2H₂O; ZnSO₄.7H₂O; FeSO₄.7H₂O; H₃BO₃; MnSO₄.7H₂O; 150% dos micro-nutrientes: Na₂MoO₄.2H₂O; KI; CuSO₄.5H₂O; CoCl₂.6H₂O e 150% de meso-inositol, conforme descrito na tabela 3.2, acrescido de 30 g/L de sacarose, 6 g/L de ágar como agente gelificante e suplementado com diferentes combinações de concentrações de auxinas e citocininas como reguladores de crescimento. O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem do meio a 121°C por 20 minutos.

Tabela 3.2: Composição dos meios de cultura MS e M Δ .

Sais utilizados	MS (g/L)	M Δ (g/L)
Inorgânicos		
KH ₂ PO ₄	0,17	0,1275
KNO ₃	1,9	1,4250
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,00025	0,000374
NaH ₂ EDTA.2H ₂ O	0,0373	0,027975
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,44	0,330
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,3737	0,2775
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0086	0,00645
KI	0,00083	0,001425
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,0278	0,021
(NH ₄) ₂ NO ₃	1,65	1,24
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,000025	0,0000375
H ₃ BO ₃	0,0062	0,00465
MnSO ₄ . 7H ₂ O	0,0223	0,012675
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,000025	0,0000375
Orgânicos		
Meso-inositol	0,1	0,15
Piridoxina-HCl	0,0005	0,0005
Tiamina-HCl	0,0001	0,0001
Ác. Nicotínico	0,00005	0,00005
Glicina	0,002	0,002

4.4.3.3 Indução da regeneração *in vitro* de segmentos apicais

Foram testadas quatro concentrações (0,04; 0,2; 0,4 e 1 mg/L) de BAP isoladas e combinadas com 0,2 mg/L de ANA ou, ainda, a combinação de 1 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de BAP. O meio de cultura M Δ sem adição de reguladores de crescimento foi utilizado como tratamento controle. Após o isolamento dos explantes, esses foram seccionados e transferidos para frascos de 175 mL contendo 25 mL de meio M Δ e mantidos a 25° C, com fotoperíodo de 16 horas (fluxo de fótons de 45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$).

Para regeneração dos brotos induzidos *in vitro* em plântulas completas, os brotos desenvolvidos no melhor tratamento foram subculturados para os diferentes meios de indução avaliados e, quando necessário, para o meio M Δ sem a adição de reguladores de crescimento e para o mesmo meio suplementado com AIA (0,5 ou 1 mg/L) ou com ANA (0,5 ou 1 mg/L). A avaliação de desenvolvimento foi realizada ao final de quarenta e cinco de cultivo, com a observação do número médio de brotos e de raízes por explante. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com duas repetições com quinze explantes para cada tratamento.

4.4.3.4 Avaliação da concentração de sais do meio de cultivo

Com a finalidade de otimizar o desenvolvimento *in vitro* das espécies de *Hypericum* estudadas, plântulas mantidas a ciclos de 45 dias em meio M Δ sólido foram subculturadas para este mesmo meio M Δ , para o meio MS com sua concentração íntegra de sais, bem como para meio contendo 25% da concentração de sais do MS. No momento do subcultivo, todos explantes tinham 4 folhas e permaneceram nas mesmas condições descritas no item 4.4.3.3. Após o cultivo destas plântulas durante três ciclos de 45 dias no novo meio, foram determinados os seguintes parâmetros de crescimento:

- √ massa fresca, após as plântulas serem secas em papel filtro;
- √ número de brotos e de raízes;
- √ comprimento dos brotos e das raízes.

4.4.3.4.1 Estudo da cinética de crescimento *in vitro* de *Hypericum polyanthemum*

Para avaliação do desenvolvimento *in vitro* de *H. polyanthemum* em meio M Δ , foram medidos os parâmetros de crescimento massa fresca (após as plântulas serem secas em papel filtro), massa seca e massa seca das partes aéreas (após liofilização de 48 horas). Este estudo foi realizado durante o período de 6 a 14 semanas, sem subcultura para meio nutriente fresco, tendo como principal propósito avaliar a relação entre o crescimento desta espécie e a produção de benzopiranos em meio sólido. Para tanto, as plântulas coletadas foram armazenadas para posterior quantificação de benzopiranos, que encontra-se descrita no capítulo 4.

4.4.3.5 Aclimatização das plântulas

A aclimatização de plântulas desenvolvidas nos tratamentos foi iniciada após um ano de cultivo *in vitro*. Plântulas cultivadas por 6 a 8 semanas em meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento foram retiradas do ágar, lavadas com água

destilada para retirada dos resíduos, e transplantadas para potes plásticos contendo como substratos vermiculita expandida (Plant Max, Eucatex[®]) e solo não fertilizado, misturados na proporção de 2:1 (solo:vermiculita). Estes foram previamente esterilizados em autoclave, e cobertos por filme de PVC, para evitar estresse hídrico nas primeiras semanas de transplântio.

O experimento foi realizado em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 5 °C, sob fotoperíodo de 16 h, aproximadamente com intensidade luminosa de $70 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, durante 30 dias. Posteriormente, estas foram transferidas para potes plásticos (13 cm de diâmetro X 11 cm de altura) contendo terra vegetal para jardim (Adubão[®]) e transferidas para campo, no Departamento de Agrometeorologia da Faculdade de Agronomia (UFRGS), com a colaboração do Prof. Dr. Luís Mauro Rosa. A irradiação luminosa medida foi de $500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ no nível da planta, em dias ensolarados sem nuvens com o sensor Quantum Li-cor[®]. As plantas foram irrigadas com água e a temperatura, nas suas variações máxima e mínima, registradas diariamente. Foram utilizados doze explantes para cada tratamento e ao final do experimento, foi avaliado o percentual de sobrevivência das plantas.

4.4.3.5.1 Estudo da ontogenia de *Hypericum polyanthemum* aclimatizada

Plantas aclimatizadas desta espécie foram coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento, para avaliação da proporção de partes vegetativas e reprodutivas. Este estudo foi realizado com plantas desenvolvidas na primavera, durante o período de 14 a 22 semanas, sendo quinzenalmente coletadas partes vegetativas, inflorescências e frutos, quando disponíveis.

Após a coleta do material (sempre próximo a 9 h da manhã), os indivíduos foram pesados e esse material foi liofilizado e armazenado para a posterior quantificação de benzopiranos.

4.4.3.6 Indução e estabelecimento de culturas de calos

Concluída a desinfestação e/ou isolamento dos explantes (segmentos foliares e/ou caulinares provenientes de plantas *in natura* ou plântulas micropropagadas), estes foram colocados em frascos de vidro de 175 mL contendo 25 mL de meio M Δ suplementado com diferentes combinações de concentrações de auxinas (2,4-D e/ou ANA) e citocininas (BAP ou cinetina) (tabela 3.3) com delineamento de blocos ao acaso, perfazendo 10 repetições de cada combinação e incubados a 25°C na ausência de intensidade luminosa ou com fotoperíodo de 16 horas (45 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Os calos foram subculturados a cada 30 dias para os mesmos meios de cultura.

Tabela 3.3: Meios de cultura utilizados para indução de calogênese das espécies de *Hypericum*.

Meio M Δ			
2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)	cinetina (mg/L)	BAP (mg/L)
1,0	-	-	-
1,0	-	0,2	-
1,0	-	0,5	-
1,0	-	-	0,2
1,0	-	-	0,5
2,0	-	-	-
2,0	-	0,2	-
2,0	-	0,5	-
2,0	-	-	0,2
2,0	-	-	0,5
-	0,2	-	-
-	0,2	0,2	-
-	0,2	0,5	-
-	0,2	-	0,2
-	0,2	-	0,5
-	1,0	-	-
-	1,0	0,2	-
-	1,0	0,5	-
-	1,0	-	0,2
-	1,0	-	0,5
-	2,0	-	-
-	2,0	0,2	-
-	2,0	0,5	-
-	2,0	-	0,2
-	2,0	-	0,5
1,0	0,2	0,2	-

4.4.3.7 Análise de crescimento dos calos

A percentagem dos explantes que induziram calogênese, bem como os aspectos dos calos desenvolvidos *in vitro* foram avaliados após 30 dias de cultivo. Os calos desenvolvidos nos melhores tratamentos foram pesados (peso fresco) e transferidos individualmente para frascos contendo o mesmo meio de cultura. O desenvolvimento foi verificado pelo índice de crescimento de cada amostra (IC = peso final do calo subtraído do peso inicial do calo, dividido pelo peso inicial), realizado em três avaliações independentes após 6 meses de desenvolvimento *in vitro* dos calos.

4.4.4 Análise fitoquímica do material vegetal obtido por cultivo *in vitro*

4.4.4.1 Análise cromatográfica

A análise dos metabólitos secundários produzidos pelas culturas *in vitro* foi efetuada por cromatografia em camada delgada analítica empregando-se as mesmas condições de análise utilizadas para o estudo químico da planta desenvolvida *in natura*.

Para preparação dos extratos, o material vegetal *in natura* e cultivado *in vitro* foi liofilizado e submetido a extrações sucessivas de 20 minutos até o esgotamento, com solventes em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano e metanol) em banho de sonificador. Os extratos foram reunidos e evaporados até *secura* sob pressão reduzida.

Para análise cromatográfica das frações *n*-hexânica e metanólica das espécies *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, e *H. ternum*, foram utilizados eluentes variando entre diclorometano: hexano (50:50-60:40); diclorometano: metanol (90:10-80:20) ou acetato de etila:metanol:água 100:13,5:10), respectivamente. A visualização e análise dos cromatogramas foram efetuadas através da utilização de luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm) e revelação através da nebulização com reagentes cromogênicos, tais como anisaldeído sulfúrico (produtos apolares) e reagente natural

(produtos polares), com posterior aquecimento a 100°C, até o desenvolvimento máximo de coloração.

4.4.4.2 Avaliação da presença de taninos

A presença de taninos nos extratos aquosos das plântulas micropropagadas foi verificada pelo método de precipitação com solução de gelatina 1%. A caracterização foi realizada mediante reação com solução aquosa de FeCl₃ 1%.

4.4.4.3 Análise química das raízes de *Hypericum campestre* e *Hypericum polyanthemum* micropropagadas

As raízes das plântulas destas duas espécies foram separadas, e após a remoção do meio de cultura aderido ao material vegetal com papel filtro, estas foram secas e submetidas à extração com solução metanol/HCl 1% a 5°C sob o abrigo da luz, durante um período de 20 horas. Posteriormente, o extrato foi concentrado através de evaporador rotatório sob pressão reduzida a menos de 40°C.

Considerando a suspeita do acúmulo de antocianinas nas raízes e a sensibilidade dessa classe de substâncias frente a variações no pH, avaliou-se a influência do pH sobre o extrato solubilizado em metanol, utilizando-se ácido clorídrico concentrado e amônia concentrada.

4.4.4.3.1 Análise cromatográfica

A avaliação do comportamento cromatográfico do extrato das raízes de *H. polyanthemum* e *H. campestre* foi realizada utilizando-se cromatografia em papel filtro Whatman n°1 e em cromatofolhas de celulose microcristalina. Foram utilizados três diferentes sistemas eluentes: HCl:água (1:99), BAW (*n*-butanol: ácido acético:água, 4:1:5; porção sobrenadante), e Forestal (ácido acético: ácido clorídrico conc.: água (30:3:10). Após a secagem dos cromatogramas, os valores de R_f foram calculados e o

pigmento foi isolado do papel extraído do papel utilizando solução metanol/HCl 1%, sendo mantido a 5°C.

4.4.4.3.2 Análise espectroscópica

Os espectros de absorção na região do UV-VIS foram obtidos em espectrofotômetro Hewlett Packard® UV-VIS, modelo HP 8452-A, com varredura de diodos em série entre 200 a 600 nm. Foram analisados os picos máximos de absorção da solução metanol/HCl (0,01%) e a ocorrência de deslocamentos no comprimento de onda, com a adição de AlCl₃, tanto para o extrato das raízes quanto para a substância extraída do papel após cromatografia.

4.4.4.4 Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média ± desvio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada por análise de variância One-Way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software para cálculos estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0®. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.5.1 Regeneração *in vitro* de espécies de *Hypericum*

A regeneração *in vitro* das espécies de *Hypericum* analisadas foi induzida em ápices caulinares isolados das plantas desenvolvidas *in natura*, em meio M Δ , livre de reguladores de crescimento, ou suplementado com diferentes combinações de BAP e ANA. A tabela 3.4 mostra os resultados obtidos no estágio de iniciação das culturas.

Tabela 3.4: Indução da regeneração *in vitro* de segmentos apicais de espécies de *Hypericum* em meio M Δ suplementado com diferentes concentrações de reguladores de crescimento.

Reguladores de crescimento (mg/L)	<i>H. ternum</i>	<i>H. polyanthemum</i>	<i>H. carinatum</i>	<i>H. myrianthum</i>	<i>H. caprifoliatum</i>	<i>H. campestre</i>
	# (01/2003)	# (09/2003)	# (12/2003)	# (12/2003)	# (07/2004)	# (11/2005)
0,0	+	-	-	-	-	-
0,04 BAP	+	-	-	+	-	-
0,2 BAP	*	+	+	+	-	-
0,4 BAP	*	+	+	+	-	-
1,0 BAP	*	-	-	-	-	-
0,04 BAP + 0,2 ANA	*	+	+	-	-	-
0,2 BAP + 0,2 ANA	*	+	+	+	-	-
0,4 BAP + 0,2 ANA	*	+	+	+	+	-
0,2 BAP + 1,0 2,4-D	*	*	*	*	*	+

* Meios não testados

época de início das culturas

A freqüência organogênica entre as espécies de *Hypericum* em estudo, bem como o número de brotos induzidos, variaram de acordo com os reguladores de crescimento utilizados.

Para *H. ternum*, a indução dos novos brotos a partir de segmentos apicais foi verificada em meio M Δ sem a adição de reguladores de crescimento e promovida com a adição de 0,04 mg/L BAP, sendo visível o crescimento das gemas axilares uma semana após a inoculação do explante em ambos os meios analisados. A regeneração em plântulas completas ocorreu nos mesmos meios utilizados para indução da formação de brotos a partir dos ápices caulinares, verificando-se melhor proliferação no meio suplementado com BAP. No entanto, a formação de raízes foi favorecida no meio M Δ livre de reguladores de crescimento. Em função disso, os brotos cultivados no meio suplementado com 0,04 mg/L BAP foram transferidos para o meio M Δ , com a manutenção das plântulas formadas (figura 3.1). A baixa resposta ao enraizamento no meio suplementado com BAP parece estar relacionada ao efeito inibidor das citocininas na formação de raízes, enquanto o desenvolvimento de brotos foi significativamente promovido por este regulador de crescimento, conhecido por induzir a formação de brotos e uma alta taxa de multiplicação em muitos sistemas de micropropagação (CALDAS *et al.*, 1998).



Figura 3.1: *H. ternum* micropropagada em meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento.

A formação de brotos e de raízes no mesmo meio de cultura elimina o passo de transferência de meio na propagação desta espécie, reduzindo o tempo total e custos necessários para a regeneração de plantas, sendo um sistema de micropropagação muito conveniente para a rápida produção de plantas. Esse comportamento foi previamente relatado para *H. brasiliense*, outra espécie nativa do estado, onde a indução e proliferação de brotos, bem como o enraizamento, deu-se no mesmo meio MS sem adição de reguladores de crescimento, resultando em plântulas completas (CARDOSO & DE OLIVEIRA, 1996).

Para o estabelecimento de culturas *in vitro* de *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, considerando o tipo de hormônio, bem como as diferentes concentrações avaliadas, a suplementação do meio M Δ com 0,4 mg/mL de BAP foi a mais eficiente em promover a diferenciação e a proliferação dos brotos. Em função disso, os brotos desenvolvidos nesse tratamento foram utilizados para induzir a regeneração de plântulas completas. Brotos das três espécies foram transferidos para meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento, onde desenvolveram raízes e se mantiveram normalmente (figura 3.2).

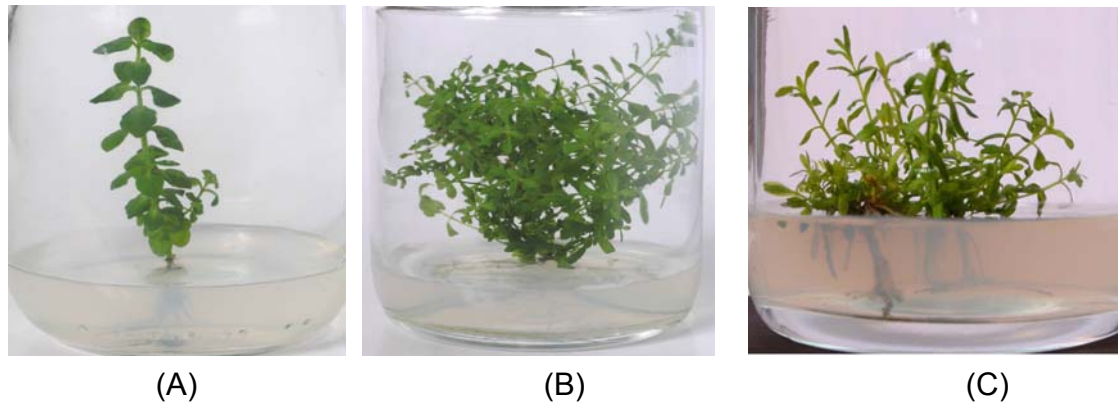


Figura 3.2: *H. carinatum* (A), *H. myrianthum* (B) e *H. polyanthemum* (C) micropropagadas em meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento.

Nenhuma resposta organogênica foi obtida em explantes de *H. caprifoliatum*, coletados em março de 2004. Estes foram inoculados em todos os meios avaliados, não verificando-se a indução de brotos. Entre os fatores que afetam a organogênese inclui-se o estágio de crescimento da planta matriz, o tipo de explante, o meio de cultura e reguladores de crescimento utilizados, bem como as condições de cultura (FLICK *et al.*, 1983). Em uma segunda tentativa, explantes de plantas coletadas em julho do mesmo ano desenvolveram-se em meio M Δ suplementado com 0,4 mg/L BAP e 0,2 mg/L ANA, e foram, posteriormente, transferidos para meio M Δ , sem adição de reguladores de crescimento, originando plântulas completas. Entretanto, as mesmas não sobreviveram após 4 subculturas, possivelmente pela necessidade de manutenção dos hormônios de crescimento no meio de cultura.

A indução de brotos a partir de segmentos apicais de *H. campestre* foi verificada apenas em meio M Δ , suplementado com 0,2 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D, observando-se ainda a indução de calos neste meio. Este mesmo meio foi o que apresentou melhor desenvolvimento *in vitro* para o estabelecimento de culturas de calos em *H. perforatum* (BAIS *et al.*, 2002). Os brotos cultivados no meio M Δ suplementado com 0,2 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D, foram transferidos para este meio na ausência de reguladores de crescimento, originando plântulas completas (figura 3.3).

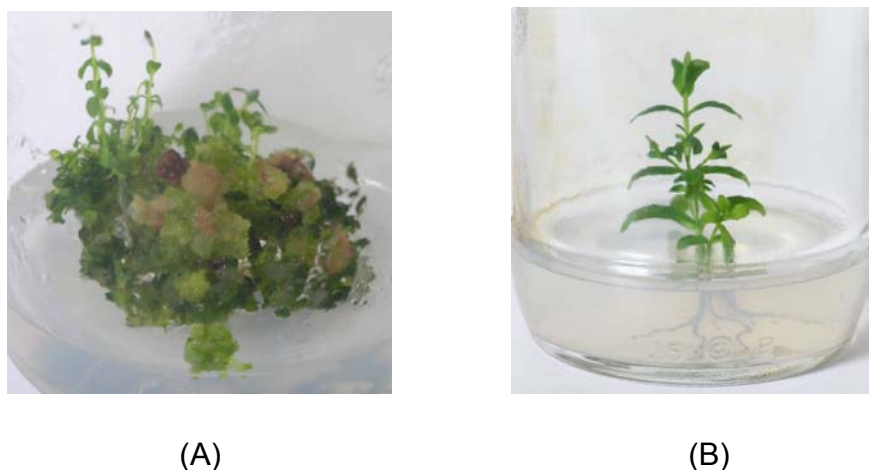


Figura 3.3: *H. campestre* micropropagada em meio M Δ suplementado com 0,2 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D (A) e em meio M Δ , sem adição de reguladores de crescimento (B).

Entre as espécies regeneradas, o enraizamento deu-se com a transferência dos brotos para meio de cultura livre de reguladores de crescimento, sem a necessidade de adição de AIA ou de ANA, normalmente utilizados para induzir a formação de raízes. A presença de meso-inositol em concentração mais elevada no meio M Δ poderia explicar essa característica. Essa substância apresenta potencial efeito na homeostasia de auxinas, uma vez que uma das formas de armazenamento de AIA endógeno seria na forma de conjugados com meso-inositol (LJUNG *et al.*, 2002). O enraizamento de plântulas de *H. perforatum* em meio sem adição de auxinas também foi relatado (GADZOVSKA *et al.*, 2005).

Muitos trabalhos envolvendo cultivo *in vitro* de espécies do gênero consideram o meio de MURASHIGE & SKOOG como o mais adequado para a regeneração dessas plantas. Em 1991, MEDEROS, desenvolvendo a micropropagação de *H. canariense* considerou o meio MS suplementado com BA (6-benzil adenina) e ANA como o mais efetivo para propagar a espécie. Da mesma maneira, muitos brotos adventícios foram obtidos com a inoculação de explantes de *H. perforatum* em meio MS suplementado com BAP (CELLÁROVA *et al.*, 1992).

O efeito das auxinas e citocininas na indução e multiplicação de brotos tem sido

demonstrado para espécies de *Hypericum*. Entre os trabalhos envolvendo micropropagação de plantas do gênero, a maior eficiência na diferenciação de explantes em brotos, em meios suplementados com um único regulador de crescimento, foi verificada com a utilização de BAP (CELLÁROVÁ *et al.*, 1992), TDZ (tidiazuron) (MURCH *et al.*, 2000) ou BA (PRETO & SANTARÉM, 2000; SANTARÉM & ASTARITA, 2003) para *H. perforatum* e BA para *H. foliosum* (MOURA, 1998).

Na utilização de TDZ para indução de brotos adventícios a partir de hipocótilos de *H. perforatum*, MURCH e colaboradores (2000) demonstraram a maior eficiência com a utilização dessa citocinina, em comparação ao BA. No entanto, SANTARÉM e ASTARITA (2003) verificaram que a adição de TDZ ao meio de cultura resultou na menor frequência organogênica e número médio de brotos por explante (segmentos nodais), indicando que a resposta organogênica pode estar relacionada ao explante inicial usado para micropropagação.

Os melhores resultados utilizando uma combinação entre citocininas e auxinas ocorreram em meios suplementados com BA e ANA, para *H. canariense* (MEDEROS, 1991), *H. foliosum* (MOURA, 1998) e *H. perforatum* (SANTARÉM & ASTARITA, 2003). Para a última espécie também foi relatado para regeneração o uso de BAP combinada com AIA, a partir de brotos germinados de sementes em condições assépticas (ZDUNEK & ALFERMANN, 1992) e a partir de segmentos nodais, gemas axilares e folhas (MCCOY & CAMPER, 2002). Através de organogênese indireta, calos obtidos de anteras de *H. perforatum* foram induzidos à formação de brotos utilizando-se BAP e ANA simultaneamente (KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a). De fato, BAP sozinha ou em combinação com ANA foi relatada como sendo eficiente em promover a diferenciação de brotos em muitas espécies (BLAKESLEY & CONSTANTINE, 1992).

Assim como para *H. foliosum* (MOURA, 1998), o aumento na concentração de citocinina no cultivo das espécies de *Hypericum* avaliadas nesse trabalho não promoveu melhores resultados. Para todas as espécies avaliadas, a suplementação do meio com 1 mg/L de BAP resultou na formação de brotos incompletos, apresentando

um aspecto de calos esverdeados, não sendo, portanto, adequado para regeneração *in vitro* dessas plantas. Em *H. perforatum* a suplementação do meio com 1 mg/L de citocinina (BA ou BAP) tem resultado em resposta organogênica e formação de brotos (CELLÁROVÁ *et al.*, 1992; PRETTO & SANTARÉM, 2000; SANTARÉM & ASTARITA, 2003; GADZOVSKA *et al.*, 2005). No entanto, a utilização de altas concentrações de BA (2,5 a 5 mg/l) induziu a formação de calos em culturas de *H. perforatum*, enquanto níveis abaixo de 0,05 mg/mL de BA não foram efetivos na multiplicação dos explantes desta espécie (GADZOVSKA *et al.*, 2005).

Uma particularidade foi evidenciada durante a micropropagação de *H. campestre* e de *H. polyanthemum*, onde após 3 meses de manutenção no mesmo meio de cultura verifica-se uma alteração na coloração das raízes desenvolvidas *in vitro*. As raízes, inicialmente verdes e amarronzadas, adquirem uma cor vermelha intensa (figura 3.4). Foi observada inclusive a presença de raízes adventícias com esse mesmo aspecto nos tufos de partes aéreas. A análise química das raízes encontra-se descrita no item 4.5.6.2.



Figura 3.4: Aspecto das raízes de plântulas de *H. campestre* (A) e *H. polyanthemum* (B), cultivadas em meio MΔ (A, direita) e em meio MS 25% (A, esquerda) e MΔ (B), durante um período de três meses, mantidas no mesmo meio de cultura.

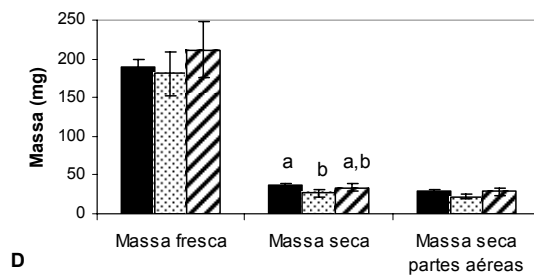
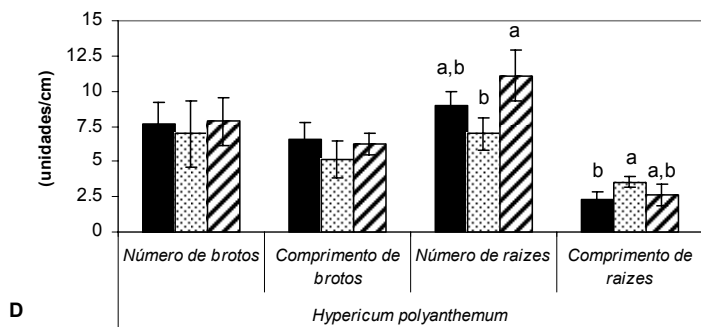
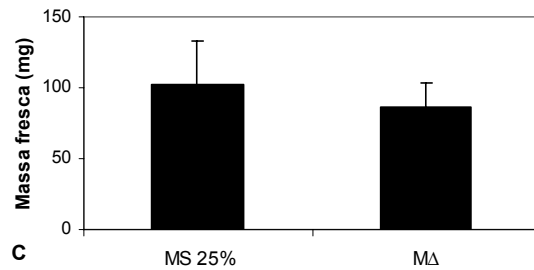
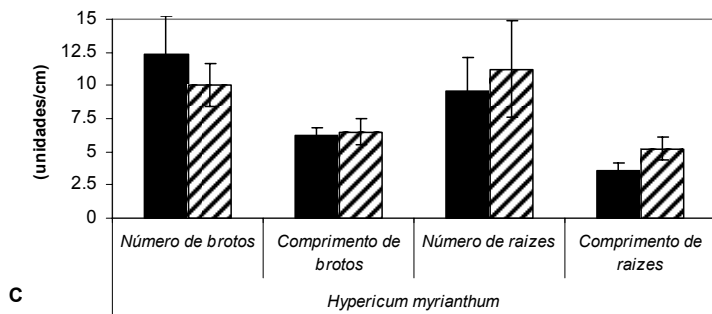
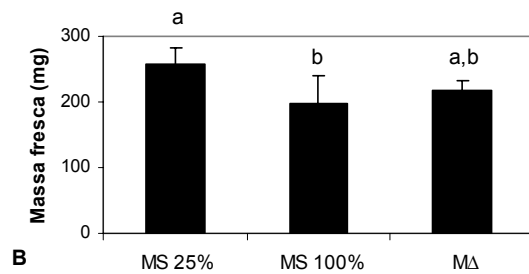
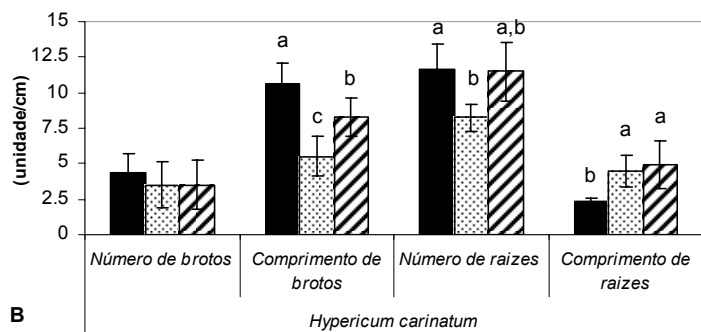
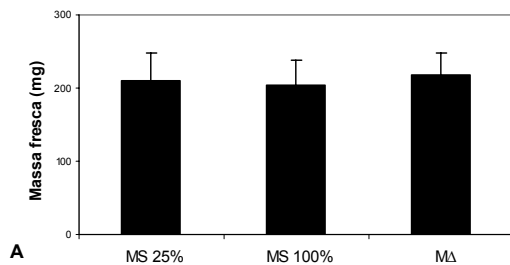
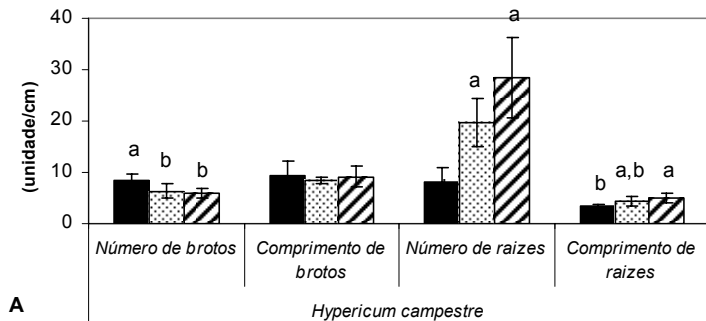
4.5.2 Avaliação da concentração de sais do meio de cultivo no desenvolvimento *in vitro* de espécies de *Hypericum*

Visando avaliar a influência da concentração de sais do meio de cultivo, após a

regeneração das plântulas de *H. campestre*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum* mantidas a ciclos de 45 dias em meio M Δ sólido, estas foram transferidas para este mesmo meio M Δ , para o meio MS com sua concentração íntegra de sais, bem como para meio contendo 25% da concentração de sais do MS.

A variação da concentração de sais no meio de cultura influenciou o desenvolvimento *in vitro* de *H. myrianthum* não sendo observado desenvolvimento de plântulas em meio MS 100%. Os parâmetros analisados em plântulas cultivadas em meio MS 25% e em meio M Δ não variaram significativamente (figura 3.5 C). Plântulas de *H. campestre* demonstraram desenvolvimento nos três meios estudados, sendo o maior número de brotos ($8,5 \pm 1,29$) observado no cultivo em meio MS 25%, enquanto o maior número de raízes ($28,5 \pm 7,76$) e raízes mais compridas ($4,9 \pm 0,945$) foram verificados no cultivo em meio M Δ . Os demais parâmetros analisados não variaram significativamente (figura 3.5 A). Plântulas de *H. carinatum* demonstraram desenvolvimento nos três meios estudados, sendo a maior massa fresca observada no cultivo em meio MS 25% ($258,02 \pm 23,92$), seguido do meio M Δ ($216,7 \pm 16,83$) e do meio MS 100% ($198,62 \pm 42,43$). Brotos mais compridos ($10,6 \pm 1,53$) e o maior número de raízes ($11,67 \pm 1,75$) foram observados no cultivo em meio MS 25%, enquanto raízes mais compridas ($4,9 \pm 1,65$) foram verificadas no cultivo em meio M Δ (figura 3.5 B). Plântulas de *H. ternum* demonstraram desenvolvimento nos três meios estudados, sendo que em meio MS 25% apresentaram brotos de maior comprimento ($9 \pm 1,22$ cm), enquanto as cultivadas em meio MS 100% apresentaram raízes mais longas ($5,8 \pm 2,6$ cm). Os demais parâmetros analisados não variaram significativamente (figura 3.5 E). Plântulas de *H. polyanthemum* demonstraram desenvolvimento nos três meios estudados, sendo a maior massa seca observada no cultivo em meio MS 25% ($37,19 \pm 2,09$), seguido do meio M Δ ($34,16 \pm 5,41$) e do meio MS 100% ($22,30 \pm 3,51$). Além disso, não ocorreram diferenças significativas na produção de biomassa das partes aéreas. O maior número de raízes ($11,00 \pm 1,79$) foi observado no cultivo em meio M Δ , enquanto raízes mais compridas ($3,56 \pm 0,38$) foram verificadas no cultivo em meio MS 100% (figura 3.5 D). O teor de benzopiranos em plântulas de 45 dias cultivadas nos três meios foi também avaliado, sendo descrito no

capítulo 4.



Continuação da figura 3.5

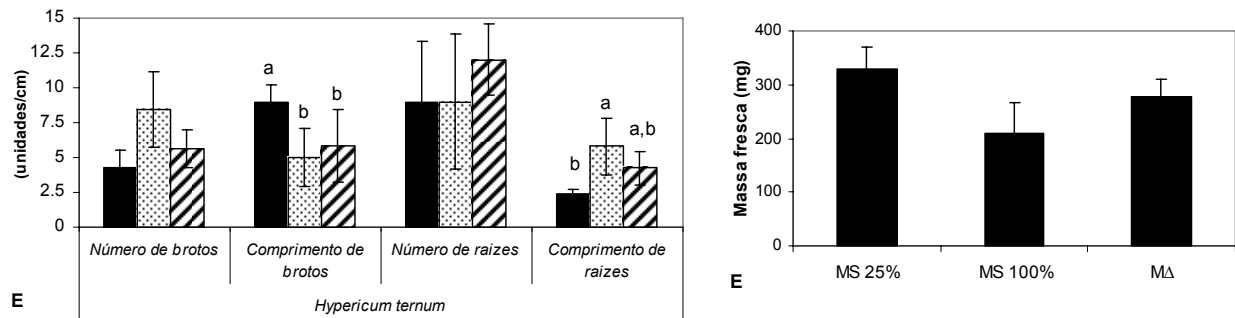


Figura 3.5: Análise de crescimento de *H. campestre* (A), *H. carinatum* (B), *H. myrianthum* (C), *H. polyanthum* (D) e *H. ternum* (E) micropropagadas em meios : ■ MS 25%; ▨ MS 100%; ▩ M Δ , representado através dos parâmetros número e comprimento dos brotos, número e comprimento de raízes e massa. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b} Considerando a mesma variável, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).

Pode-se observar que o meio M Δ estimulou a formação de raízes de modo significativo em *H. polyanthum*. Apesar de isso não ser evidenciado de modo significativo nas outras espécies, é possível observar uma tendência ao melhor enraizamento neste meio de cultivo. Como já discutido anteriormente, isso pode ser explicado pela concentração aumentada de meso-inositol (0,15 g/L) no meio M Δ , em relação ao meio MS (0,1 g/L), uma vez que este participa na homeostasia de auxinas (LJUNG *et al.*, 2002), importantes na indução de raízes.

Durante o desenvolvimento de um protocolo de multiplicação *in vitro* para *H. foliosum*, MOURA (1998) avaliou diferentes meios de cultura, verificando os melhores resultados para o meio composto por sais de MURASHIGE & SKOOG diluídos em 2/5 da formulação original. Segundo a autora e outros trabalhos referenciados, a performance desse meio poderia ser explicada pela diluição dos nutrientes, uma vez que concentrações iônicas altas podem apresentar um efeito inibitório no crescimento de algumas espécies. Utilizando o meio MS/2, PASQUA e colaboradores (2004) demonstraram que a utilização de meio MS diluído 50 % foi adequado para a indução de calos, estabelecimento de cultura de células em suspensão e regeneração de plântulas de *H. perforatum*. Em condições salinas, o potencial osmótico do meio é um dos fatores que mais influencia a absorção de água pelas plantas através do sistema radicular. Portanto, uma alta concentração de sais solúveis pode afetar negativamente o

desenvolvimento das plantas, podendo causar a perda de água, devido ao potencial hídrico do meio ser mais negativo que o do suco celular, levando à desidratação e até à morte das plantas. Para as espécies de *Hypericum* avaliadas neste trabalho, observa-se que a concentração salina do meio de cultivo influenciou apenas no desenvolvimento de *H. myrianthum* e de *H. carinatum*.

4.5.3 Estudo da cinética de crescimento *in vitro* de *Hypericum polyanthemum*

O desenvolvimento *in vitro* de *H. polyanthemum* cultivada em meio M Δ , foi monitorado durante o período de 6 a 14 semanas, em relação aos parâmetros de crescimento massa fresca, massa seca e massa seca das partes aéreas.

Foi evidenciado que as plântulas apresentaram crescimento máximo ($1,56 \pm 0,35$ g de massa fresca) após 12 semanas de cultivo (figura 3.6), desacelerando o desenvolvimento na semana subsequente. Cabe ressaltar que foi observada alteração na coloração das raízes das plântulas cultivadas *in vitro* após esse período, conforme descrito em 4.5.1 (figura 3.4). Entretanto, não houve diferença significativa entre a massa seca de plântulas cultivadas *in vitro* por 12 e 14 semanas.

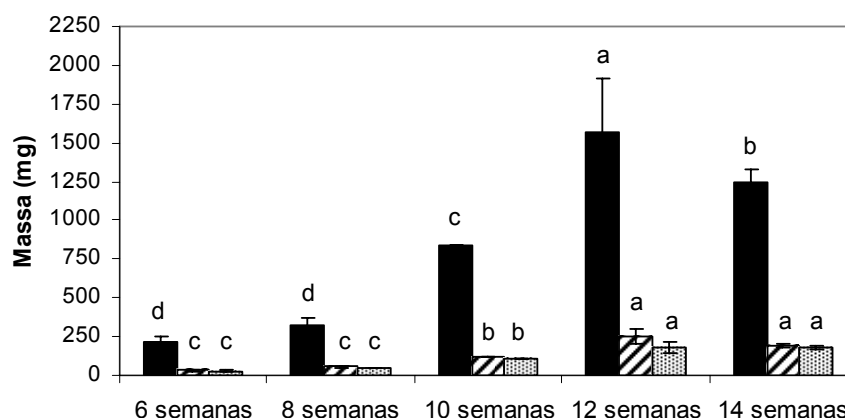


Figura 3.6: Análise de crescimento de *H. polyanthemum* micropropagada em meio M Δ , durante o período de 6 a 14 semanas, representado através da massa fresca, massa seca e massa seca das partes aéreas. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c,d} Considerando a mesma variável avaliada, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$). (■ massa fresca; ▨ massa seca; ▩ massa seca das partes aéreas).

O teor de benzopiranos produzidos por estas plântulas foi avaliado, para verificar uma possível correlação entre o crescimento desta espécie e a produção de metabólitos secundários, sendo este estudo descrito no capítulo 4.

4.5.4 Aclimatização das plântulas

A aclimatização de plântulas regeneradas foi iniciada após um ano de cultivo *in vitro*, com o transplântio das mesmas, cultivadas por 6 semanas em meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento, para substrato contendo uma mistura de vermiculita expandida:solo não fertilizado. Após o endurecimento por 30 dias em sala climatizada, essas foram transferidas para terra vegetal de jardim e cultivadas a campo. Para a espécie *H. polyanthemum* foi realizado o transplântio de plântulas cultivadas *in vitro* por 6, 8, 12 e 14 semanas.

Na fase de aclimatização, um dos grandes problemas na produção de mudas pelo cultivo *in vitro* é a dificuldade de readaptação das plantas ao ambiente *ex vitro*. Quando se trabalha em grande escala, mesmo com um percentual relativamente pequeno de morte dessas plantas, isso pode significar um prejuízo econômico considerável devido ao alto investimento e emprego de mão-de-obra nessa técnica. Na fase de aclimatização, é imprescindível a manutenção da umidade e temperaturas amenas. Dentre os fatores que podem influenciar as respostas das plantas na fase de aclimatização, destaca-se o substrato, através de suas características físicas, químicas e biológicas. Outro fator que assume grande influência durante a fase de aclimatização da maioria das espécies é a concentração da solução nutritiva usada na irrigação (CARVALHO & AMÂNCIO, 2002; NETO *et al.*, 2004; WALTERS, 2005).

A aclimatização das espécies foi realizada com sucesso, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 95 a 97 % para as espécies *H. ternum* (figura 3.7), *H. carinatum* (figura 3.8), *H. campestre* (figura 3.9), *H. caprifoliatum* (figura 3.10) e *H. myrianthum* (figura 3.11). Para a espécie *H. polyanthemum* (figura 3.12), o percentual de sobrevivência foi influenciado pelo tempo de manutenção das plântulas sob cultivo *in*

vitro, antes da transferência *ex-vitro*. As plantas cultivadas a campo mostraram-se vigorosas e não foram atacadas por fungos e/ou pragas.



Figura 3.7: *H. ternum* aclimatizada, após 6 semanas de crescimento em sala climatizada.



Figura 3.8: *H. carinatum* aclimatizada, após 8 semanas de cultivo a campo.



Figura 3.9: *H. campestre* aclimatizada, após 8 semanas de cultivo a campo.



Figura 3.10: *H. caprifoliatum* aclimatizada, após 6 semanas de crescimento em sala climatizada.

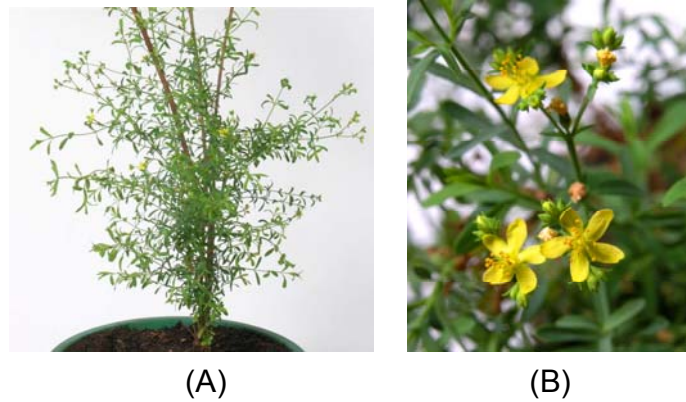


Figura 3.11: *H. myrianthum* aclimatizada, após um ano de transferência *ex-vitro* (A). Detalhe da flor de *H. myrianthum* aclimatizada (B).

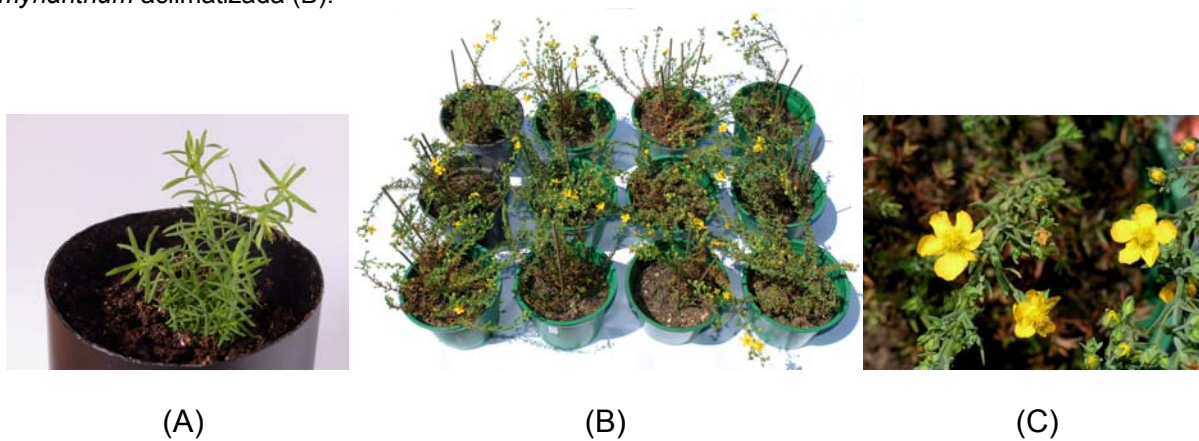


Figura 3.12: *H. polyanthemum* aclimatizada, após 6 semanas de crescimento em sala climatizada (A); aclimatizada após 16 semanas de cultivo em campo (B). Detalhe da flor de *H. polyanthemum* aclimatizada (C).

O cultivo *in vitro* das plântulas de *H. polyanthemum* no mesmo meio de cultura por até 12 semanas garantiu a sobrevivência quando da transferência *ex vitro*. Após este período, as plantas mantiveram-se viáveis na etapa de transferência para substrato em ambiente climatizado, mas não resistiram às condições de cultivo a campo. Plântulas cultivadas *in vitro* por 8 semanas, produziram $10,27 \pm 2,39$ g de biomassa após 18 semanas de cultivo a campo, enquanto as cultivadas *in vitro* por 12 semanas geraram $20,49 \pm 6,22$ g (figura 3.13). O acréscimo de 4 semanas no tempo de cultivo *in vitro* das plântulas garantiu o dobro da biomassa, oferecendo diretrizes para futuros experimentos.

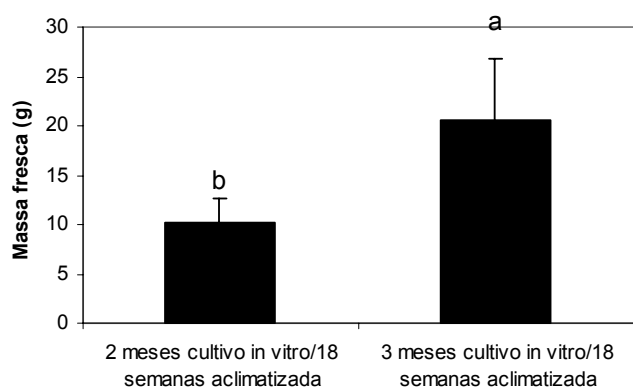


Figura 3.13: Análise da produção de biomassa de *H. polyanthemum* acclimatizada durante o período de 18 semanas, considerando o tempo de manutenção das plântulas *in vitro*, antes da transferência para condição *ex vitro*. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b} Diferentes letras são significativamente diferentes entre si (Teste t-student; $p < 0,05$).

Dentre as espécies aqui trabalhadas este é o primeiro relato de cultivo através da aclimatização das espécies de *Hypericum* nativas. No entanto, devido ao potencial terapêutico de *H. caprifoliatum*, uma dissertação de mestrado foi desenvolvida com o objetivo de cultivo sustentado com sementes, para a conservação desta espécie. Sementes desta planta foram caracterizadas, sendo avaliadas a germinação e a propagação sexuada. Os resultados indicaram necessidade de luz, superação de dormência e temperatura inferior a 25°C para germinação de *H. caprifoliatum*, sendo possível sua propagação sexuada (KREIMEIER, 2005).

4.5.4.1 Estudo da ontogenia de *Hypericum polyanthemum* aclimatizada

Para este estudo, foi realizada a análise da biomassa de diferentes partes de *H. polyanthemum* cultivada *in vitro* por 8 semanas e, posteriormente, cultivada a campo, no período de agosto/06 a janeiro/07, com avaliações quinzenais durante o período de 14 a 22 semanas (figura 3.14). Ao longo deste período foi observado uma diminuição progressiva na proporção das partes vegetativas, e um aumento das partes reprodutivas da planta.

Os primeiros botões florais foram visíveis após 14 semanas de transferência *ex-vitro*. Da mesma maneira, plantas de *H. perforatum*, aclimatizadas em um sistema hidropônico, após 14 a 16 semanas produziram flores (MURCH *et al.*, 2002).

Foram verificados diferentes estágios de ontogênese floral, que foram classificados como botões florais fechados (completamente verdes) e abertos (com as primeiras pétalas amarelas visíveis), flores abertas, flores senescentes e frutos (figura 3.15) (massa fresca e massa seca de cada órgão individual apresentadas na figura 3.16). Para avaliar a relação entre a produção dos compostos bioativos com o desenvolvimento do vegetal, foi realizada a quantificação dos benzopiranos nas partes vegetativas e nos diferentes estágios reprodutivos de *H. polyanthemum* aclimatizada. Esses resultados estão apresentados no capítulo 4.

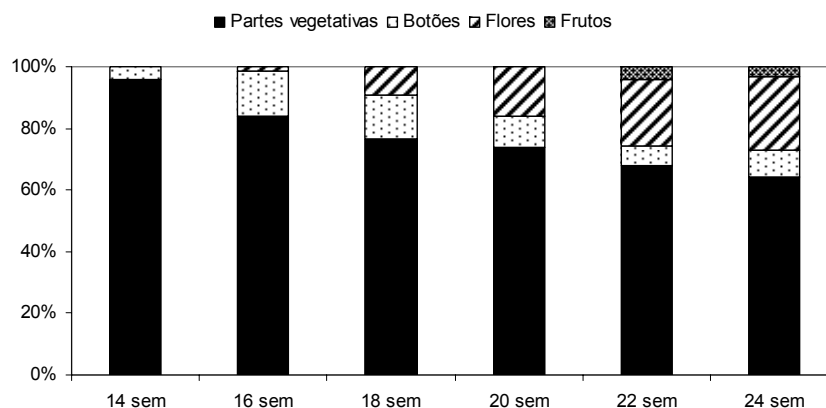


Figura 3.14: Proporção de partes vegetativas, botões florais, flores e frutos em *H. polyanthemum* aclimatizada, durante o período de 14 a 22 semanas.

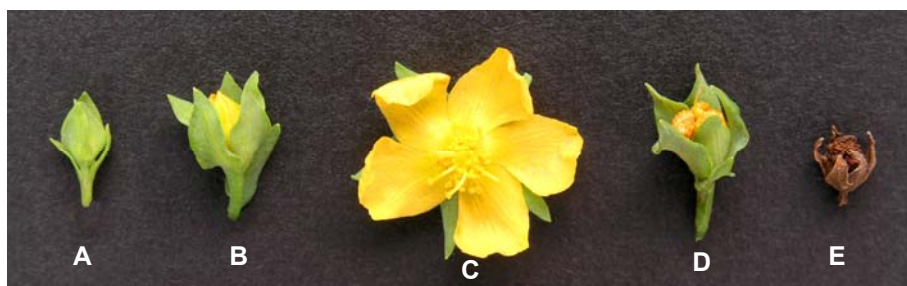


Figura 3.15: Diferentes estágios de ontogênese floral de *H. polyanthemum* acimatizada: botões florais fechados (A), botões florais abertos (B), flores (C), flores senescentes (D) e frutos (E).

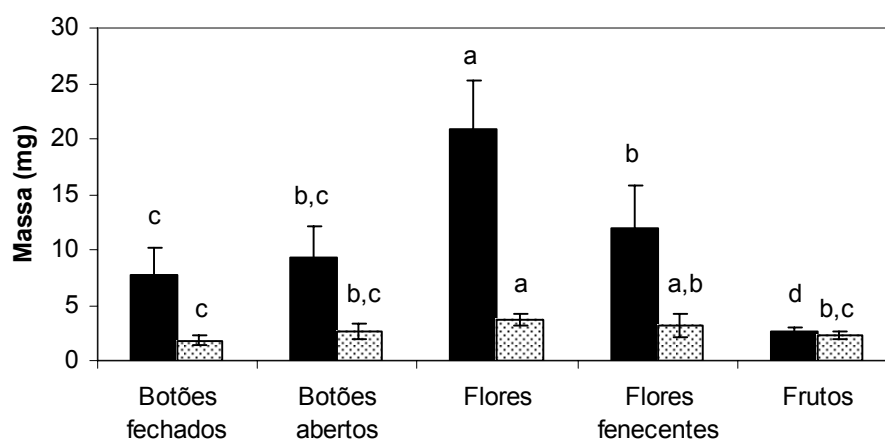


Figura 3.16: Análise do peso fresco e peso seco das diferentes partes reprodutivas de *H. polyanthemum* acimatizada. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c} Considerando a mesma variável, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$). (■ Massa fresca; ▨ Massa seca).

A análise da biomassa de *H. polyanthemum* cultivada *in vitro* por 12 semanas e, posteriormente, cultivada a campo, no período de setembro/06 a janeiro/07, com avaliação realizada após 18 semanas de cultivo a campo, demonstrou que as plantas apresentaram 94,5 % de partes vegetativas e 5,4 % de inflorescências, proporção distinta da verificada nas plantas cultivadas *in vitro* por 8 semanas no mesmo período de cultivo a campo (78 % de partes vegetativas e 22% de inflorescências). Pode-se inferir que a variação da massa de inflorescências ocorre em função das temperaturas mais elevadas verificadas durante o período de cultivo a campo das plantas mantidas *in vitro* por 12 semanas (mínimas de 18 ± 4 °C e máximas de 28 ± 8 °C) em comparação

com as temperaturas de cultivo a campo das plantas mantidas *in vitro* por 8 semanas (mínimas de 14 ± 4 °C e máximas de 24 ± 5 °C).

A temperatura é caracterizada como um dos principais fatores ambientais que influencia o processo fisiológico, especialmente fotossíntese e crescimento, das plantas (ZOBAYED *et al.*, 2005). Estudos realizados com *H. perforatum* relatam a influência da temperatura na germinação das sementes e desenvolvimento da planta, demonstrando melhores resultados em temperaturas mais amenas (SOUTHWELL & BURKE, 2001; ZOBAYED *et al.*, 2005; COUCEIRO *et al.*, 2006).

A quantificação dos benzopiranos nas partes vegetativas e flores totais de *H. polyanthemum* aclimatizada durante o período de 18 semanas, considerando o tempo de manutenção *in vitro* foi também realizada. Esses resultados estão apresentados no capítulo 4.

4.5.5 Indução e estabelecimento das culturas de calos

A otimização da proliferação celular *in vitro* é o primeiro passo para o estabelecimento de culturas em larga escala e produção de metabólitos secundários. Com esse objetivo, culturas de calos de *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum* foram estabelecidas.

Discos foliares de *H. myrianthum in natura*, foram inoculados em meio M Δ suplementado com 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de cinetina; 1 mg/mL de 2,4-D, 0,2 mg/mL de cinetina e 0,2 mg/mL de ANA ou com 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de BAP resultando na indução de calos, independentemente da condição de luminosidade. A análise de crescimento dos calos desta espécie evidenciou um maior índice de crescimento quando estes foram cultivados em meio suplementado com 2,4-D/CIN (figura 3.17).

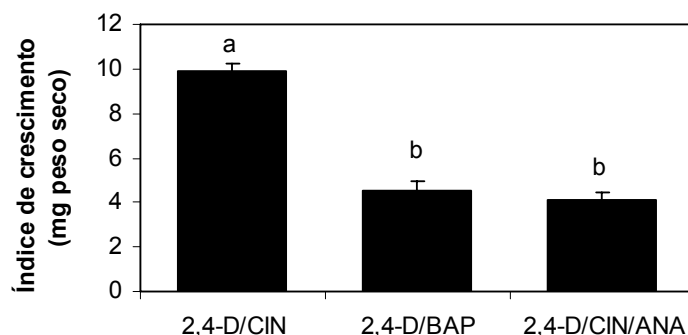


Figura 3.17: Análise de crescimento dos calos de *H. myrianthum* em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN (1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de cinetina); 2,4-D/BAP (1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de BAP); 2,4-D/CIN/ANA (1 mg/mL de 2,4-D, 0,2 mg/mL de cinetina e 0,2 mg/mL de ANA), representado através do índice de crescimento. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b} Diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).

Os calos obtidos constituem-se em uma massa de células indiferenciadas, apresentando coloração inicial amarelo-claro passando a amarelo-marrom. Quando mantidos no mesmo frasco de cultivo por períodos longos, os calos adquirem uma coloração rósea.

Segmentos caulinares e foliares provenientes de plântulas de *H. polyanthemum* micropropagadas foram inoculados em meio M Δ com diferentes combinações de reguladores de crescimento. Após 30 dias do início da cultura, observou-se que seis tratamentos demonstraram calogênese (tabela 3.5). O melhor desenvolvimento foi obtido na presença de 1,0 mg/L de 2,4-D, 0,2 mg/L de CIN e 0,2 mg/L de ANA (figura 3.18), verificando-se que a combinação de duas auxinas e uma citocinina induziu a proliferação celular, como anteriormente relatado em culturas de calos de *H. perforatum* (PASQUA *et al.*, 2004). Entre os tratamentos avaliados no cultivo de calos de *H. polyanthemum*, verificou-se maior produção de biomassa com a utilização de folhas como explante, mantidas sob fotoperíodo de 16 horas e diferenças no aspecto dos mesmos em relação à condição de luminosidade e aos reguladores de crescimento utilizados (figuras 3.18 e 3.19). Isso também foi observado para *H. perforatum*, onde

calos induzidos no escuro apresentaram-se friáveis e amarelos, e quando na presença de luz, verdes e compactos (PRETTO & SANTARÉM, 2000).

Tabela 3.5: Análise da calogênese de *H. polyanthemum*

Combinação de reguladores de crescimento	Concentração (mg/L)	Explantos	Frequência da formação de calos (%)		Aparência do calo	
			Luz	Escuro	Luz	Escuro
2,4-D/CIN	1,0/0,2	Folhas	100	86	Marron esverdeados	Amarelo claro
		Entre-nós	100	100	Marron esverdeados	Amarelo claro com pontos marrons
2,4-D/ BAP	1,0/0,2	Folhas	90	88	Verdes	Amarelo claro
		Entre-nós	100	-	Verdes	-
2,4-D/CIN/ANA	1,0/0,2/0,2	Folhas	80	100	Amarelo com pontos marrons	Amarelo claro com pontos marrons
		Entre-nós	100	100	Amarelo com pontos marrons	Amarelo claro com pontos marrons

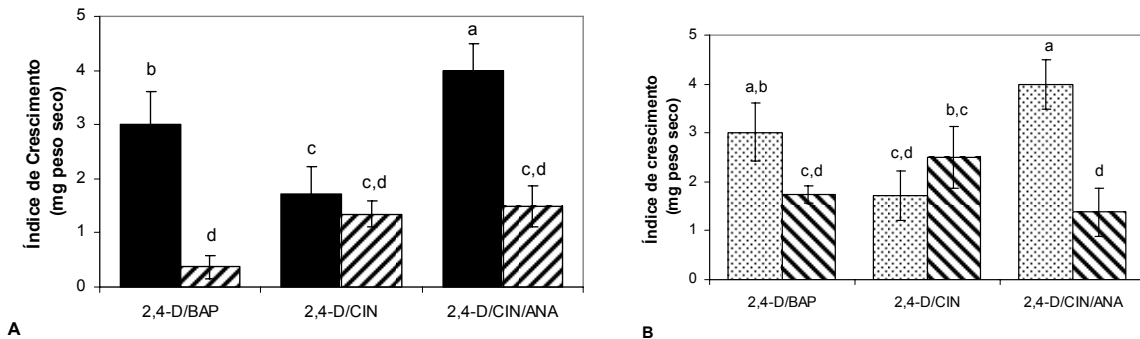


Figura 3.18: Análise de crescimento dos calos de *H. polyanthemum* em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN (1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de cinetina); 2,4-D/BAP (1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de BAP); 2,4-D/CIN/ANA (1 mg/mL de 2,4-D, 0,2 mg/mL de cinetina e 0,2 mg/mL de ANA), representado através do índice de crescimento. (A) Indução de calogênese a partir de folhas (■ Claro; ▨ Escuro). (B) Indução de calogênese no claro a partir de folhas ou segmentos nodais (▤ Folhas; ▨ Segmentos nodais). Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b} Diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).



Figura 3.19: Aspecto dos calos de *H. polyanthemum* cultivados em meio M Δ suplementado com A) 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de cinetina; B) 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de BAP e C) 1 mg/mL de 2,4-D, 0,2 mg/mL de cinetina e 0,2 mg/mL de ANA), sob fotoperíodo de 16 h.

Culturas de calos de *H. ternum* foram estabelecidas a partir de folhas apicais de plântulas micropropagadas em meio M Δ , sem a adição de reguladores de crescimento mantidas *in vitro* por 12 meses. Os explantes foliares, inoculados em meio M Δ suplementado com 6 combinações de concentrações da auxina 2,4-D (1,0 e 2,0 mg/L) e da citocinina cinetina (0,0; 0,2 e 0,5 mg/L), demonstraram calogênese em todos os tratamentos com adição de reguladores de crescimento, após 30 dias do início da cultura. Entretanto, nem todos os tratamentos mantiveram o crescimento de calos. Desse modo, após oito meses do início de cultura, somente no tratamento com a adição de 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de cinetina, independente da intensidade luminosa, houve um contínuo crescimento de células. Os calos obtidos constituem-se em uma massa de células indiferenciadas, com aspecto pulverulento e de coloração inicial amarelo-claro passando a amarelo-marrom (figura 3.20).



Figura 3.20: Aspecto dos calos de *H. ternum* cultivados em meio M Δ suplementado com 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de cinetina.

Algumas espécies do gênero *Hypericum* têm sido utilizadas para obtenção de

culturas de calos. Os trabalhos visam não apenas os calos propriamente ditos, mas também a obtenção de culturas de células em suspensão, que são normalmente iniciadas com a transferência de calos friáveis para um meio nutritivo líquido.

O cultivo de células vegetais tem se apresentado como uma alternativa viável aos métodos convencionais de produção de biomassa para extração de metabólitos secundários bioativos. Além disso, culturas *in vitro* podem ser estabelecidas objetivando-se o estudo da biossíntese dessas substâncias (BOURGAUD *et al.*, 2001). Essas duas abordagens têm sido relatadas para o estabelecimento de culturas celulares das espécies de *Hypericum*.

Em *H. patulum*, culturas de calos foram estabelecidas a partir de flores cultivadas no escuro na presença de 2,4-D e cinetina (ISHIGURO *et al.*, 1993; ISHIGURO *et al.*, 1995; ISHIGURO *et al.*, 1997; ISHIGURO *et al.*, 1998). Yasaki e Okuda (1990) obtiveram calos de *H. erectum* em meio Linsmaier-Skoog suplementado com AIA e BA. Utilizando segmentos nodais de *H. brasiliense* como explantes, a combinação de citocininas e auxinas não promoveu o crescimento de calos, obtidos apenas na presença de 2,4-D ou de ANA, isoladamente, sob um fotoperíodo de 16 horas (CARDOSO & DE OLIVEIRA, 1996). No entanto, para *H. perforatum*, o cultivo de folhas na presença de 2,4-D como único regulador de crescimento não resultou na formação de calos dessa espécie (PRETTO & SANTARÉM, 2000), sendo induzida calogênese apenas com a combinação de 2,4-D com BA ou cinetina (PRETTO & SANTARÉM, 2000; DIAS *et al.*, 2001; BAIS *et al.*, 2002). Ainda em *H. perforatum*, calos foram estabelecidos com a suplementação combinada de BA e ANA (KARTNIG *et al.*, 1996, KIRAKOSYAN *et al.*, 2000a), cinetina e ANA (DIAS *et al.*, 1998), TDZ e ANA (SANTARÉM & ASTARITA, 2003) e também BAP e AIA (MCCOY & CAMPER, 2002).

Culturas de calos de *H. androsaemum* foram induzidas e mantidas a partir de segmentos caulinares, inoculados em meio MS suplementado com diferentes combinações de auxina e citocininas (ANA/CIN; ANA/BA; 2,4-D/CIN; 2,4-D/BA e 2,4-D/BA/CIN), sendo a produção de biomassa estimulada pelo aumento na concentração

de ANA, na presença de CIN (DIAS *et al.*, 2000). Outras espécies do gênero também foram avaliadas, *H. bithynicum*, *H. glandulosum*, *H. balearicum*, *H. olympicum* e *H. maculatum*, demonstrando-se indução e manutenção de culturas celulares dessas espécies em meio MS suplementado com BAP e ANA (KARTNIG *et al.*, 1996).

Com isso mostra-se, então, que a resposta a diferentes reguladores de crescimento pode ser variável entre plantas de um mesmo gênero, o que explica os diferentes comportamentos das culturas de tecidos e células das espécies de *Hypericum* avaliadas nesse trabalho. Além disso, cabe ressaltar que a variabilidade fisiológica e química existente entre as plantas também afeta o comportamento das mesmas em cultura.

Nesse trabalho, demonstrou-se o estabelecimento de protocolos de micropropagação de *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. polyanthemum*, *H. myrianthum* e *H. ternum*, e a indução de calos das últimas três espécies, possibilitando, assim, a manutenção do germoplasma dessas espécies, bem como a investigação da produção *in vitro* dos metabólitos de interesse farmacológico.

4.5.6 Análise fitoquímica do material vegetal obtido por cultivo *in vitro*

Sistemas de cultivo *in vitro* têm sido empregados como uma ferramenta efetiva para a obtenção de vegetais geneticamente uniformes, que podem ser utilizados como fonte de matéria-prima para obtenção de metabólitos secundários de plantas (FERREIRA *et al.*, 1998; ROUT *et al.*, 2000; FRANÇA, 2003). Esse método torna-se de grande importância para a obtenção de produtos de interesse cujas concentrações na planta são baixas, sem que haja a necessidade de uma grande quantidade de matéria-prima vegetal, ou até mesmo quando a fonte vegetal do metabólito alvo apresenta limitações e/ou dificuldades no cultivo a campo, ou seu período de desenvolvimento é longo. Essa tecnologia ainda permite a obtenção de substâncias sob condições controláveis e reprodutíveis, independentemente de variações sazonais ou localização geográfica, uma vez que o cultivo de tecidos vegetais *in vitro* pode minimizar os efeitos de

alterações ambientais, conseguindo-se um maior controle sobre as condições de temperatura, luz e nutrientes (STAFFORD & WARREN, 1991; ROUT *et al.*, 2000; BOTTA *et al.*, 2001; FRANÇA, 2003).

Como demonstrado na revisão bibliográfica, em muitas espécies de *Hypericum* esse recurso tem sido utilizado. Considerando as atividades biológicas que vem sendo demonstradas para as substâncias isoladas das espécies nativas do Rio Grande do Sul, foi realizada uma avaliação comparativa da produtividade das espécies de *Hypericum* desenvolvidas através do cultivo *in vitro* neste trabalho.

4.5.6.1 Análise cromatográfica e caracterização de substâncias tanantes

A avaliação química do material vegetal obtido por cultivo *in vitro* foi realizada mediante comparação cromatográfica com as plantas desenvolvidas em campo.

Na análise qualitativa das frações *n*-hexânica das plântulas micropropagadas observou-se a produção de compostos apolares com comportamento cromatográfico de terpenos e derivados de floroglucinol. Assim como na planta desenvolvida em campo, as plântulas de *H. ternum* apresentaram produção apenas de substâncias com características de terpenóides. No entanto, as plântulas de *H. myrianthum* e *H. campestre* apresentaram produção de derivados de floroglucinol.

Na análise cromatográfica da fração *n*-hexânica de *H. myrianthum* micropropagada pode-se verificar a presença de substâncias com comportamento cromatográfico semelhante ao dos floroglucinóis uliginosina B e japonicina A, evidenciado pelo mesmo valor de R_f, bem como desenvolvimento de mesma coloração após revelação com anisaldeído sulfúrico quando comparado com amostras autênticas desses derivados de floroglucinóis. No entanto, na fração *n*-hexânica das raízes das plântulas desta espécie verifica-se apenas a presença de traços de japonicina A.

H. campestre in natura apresentou a produção de substâncias com esse

mesmo comportamento cromatográfico, sendo uliginosina B produzida por plântulas micropropagadas desta espécie.

Na análise da fração *n*-hexânica o de *H. carinatum* micropropagada evidenciou-se a presença de apenas traços de substâncias com comportamento cromatográfico das benzofenonas carifenona A e carifenona B.

Em plântulas de *H. polyanthemum* verificou-se a presença de substâncias com comportamento cromatográfico dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3, substâncias majoritárias da fração *n*-hexânica da planta desenvolvida *in natura*.

Nas frações metanólicas, verificou-se produção similar de compostos fenólicos presentes nas plantas desenvolvidas em campo, tais como flavonóides e ácidos fenólicos.

Todas as plântulas micropropagadas apresentaram traços de taninos nos seus extratos aquosos, indicado por turvação do extrato após adição de algumas gotas de solução de gelatina 1%. Os taninos produzidos foram caracterizados como condensados devido ao desenvolvimento de coloração esverdeada após reação com cloreto férrico 1%. A caracterização e o conteúdo de taninos das plantas desenvolvidas em campo foi determinado previamente por DALL'AGNOL e colaboradores (2003), sendo evidenciado um acúmulo de taninos condensados nessas espécies, e o menor conteúdo verificado para *H. myrianthum* (5,1%) e o maior para *H. ternum* (16,7%).

As espécies micropropagadas demonstraram perfis qualitativos similares aos apresentados pelas plantas desenvolvidas no campo. Nesse sentido, o cultivo *in vitro* das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul apresenta-se como uma alternativa interessante aos métodos convencionais de produção de biomassa para extração de metabólitos secundários bioativos.

4.5.6.2 Análise das raízes de *Hypericum campestre* e *Hypericum polyanthemum* micropropagadas

Antocianinas são pigmentos hidrossolúveis, na forma de glicosídeos de antocianidinas, a forma aglicona dessa classe de substâncias. A cor de pigmentos vegetais está associada à sua estrutura química, e a sua coloração em meio ácido ou básico depende justamente das modificações ocorridas na molécula, quando a mesma é submetida a diferentes valores de pH (STRACK & WRAY, 1989).

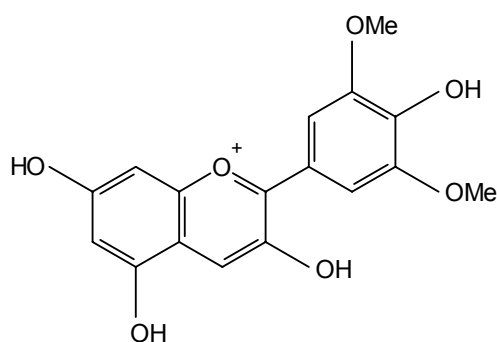
Verificando-se a influência do pH, mediante o tratamento da solução metanólica do extrato das raízes de *H. campestre* e *H. polyanthemum* micropropagadas com solução de HCl e NH₃ concentrados, foi possível evidenciar a presença de antocianinas nos extratos, devido à alteração na coloração da solução. Em pH ácido, verificou-se a formação de uma coloração vermelha intensa, enquanto na presença de pH alcalino, observou-se a formação de uma coloração esverdeada.

Considerando a possibilidade de estas substâncias estarem presentes nas partes aéreas das culturas cujas raízes apresentaram coloração vermelha, e também de estas serem liberadas para o meio de cultura, foi avaliada a influência do pH nestas amostras. Foi verificada ausência de antocianinas nas mesmas, uma vez que não houve alteração na coloração das soluções com o tratamento ácido e básico. Da mesma forma, foram analisadas partes aéreas e raízes das plantas cultivadas em campo, verificando-se ausência destas substâncias.

Em diferentes pH as antocianinas se encontram em diferentes formas e apresentam cores diversas. Em meio ácido as antocianinas se encontram na forma de sais de oxônio e são geralmente de cor vermelha brilhante. Com o aumento do pH das soluções, as antocianinas passam a ter uma estrutura quinoidal, púrpura, e em meio alcalino a cor muda para azul (STRACK & WRAY, 1989).

As cromatografias com os eluentes BAW e Forestal mostraram a presença de

uma única banda rósea no cromatograma. Utilizando-se como eluente água:HCl (99:1) não ocorreu eluição das amostras, que permaneceram muito próximas ao ponto de aplicação, evidenciando a possibilidade de tratar-se de antocianidina. De acordo com STRACK & WRAY (1989) seis estruturas de antocianidinas são encontradas mais comumente na natureza: pelargonidina, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina. Os valores de R_f da banda nos eluentes BAW e Forestal foram comparados com dados de R_f da literatura (HARBORNE, 1998). Após o tratamento dos cromatogramas com vapor de amônia, a coloração rósea da banda tornou-se azul esverdeada. Os valores de R_f encontrados foram 0,59 em BAW e 0,60 em Forestal. Estes valores de R_f e a coloração desenvolvida após o tratamento dos cromatogramas com vapor de amônia sugerem a presença da antocianidina malvidina (34) nos extratos das raízes em análise.



(34)

Para analisar esta hipótese foram realizadas análises espectroscópicas na região do ultravioleta-visível. O pico máximo de absorção observado foi em $\lambda=530$ nm (MeOH:HCl 0,1%), para o extrato das raízes de *H. polyanthemum* (figura 3.21 A) e em $\lambda=528$ nm (MeOH:HCl 0,1%), para a amostra purificada (extraída do papel após eluição cromatográfica) (figura 3.21 B). Após a adição de AlCl₃, a coloração de ambas as soluções permaneceu a mesma, não ocorrendo deslocamento batocrômico do espectro de absorção. Com isso evidenciou-se a ausência de hidroxilas vicinais na estrutura da substância em análise, reforçando a possibilidade de tratar-se da antocianidina malvidina.

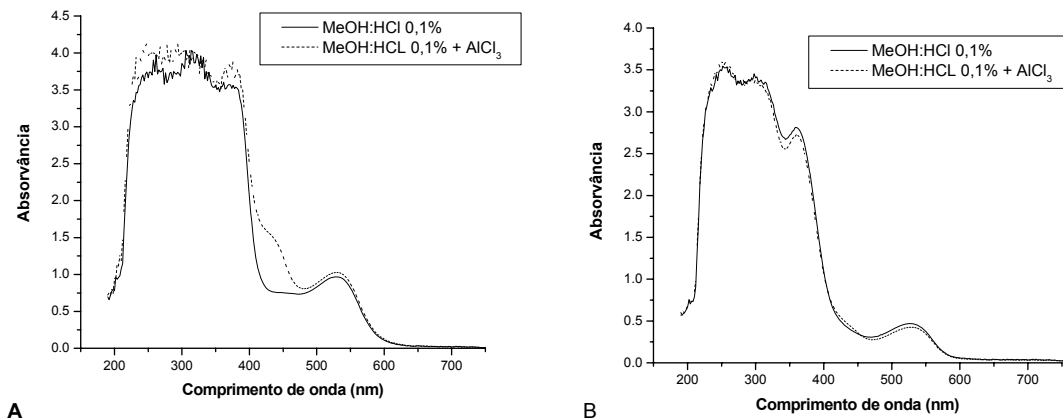


Figura 3.21: Espectro de absorção na região do UV-VIS do extrato das raízes de *H. polyanthemum* (A) e da amostra purificada (B).

A presença de antocianinas em culturas de micropropagação não é relatada para espécies de *Hypericum*. Neste trabalho, não evidenciou-se a produção destes compostos em plantas desenvolvidas a campo, de modo que a presença destas substâncias nas raízes de *H. polyanthemum* e *H. campestre* e nos calos de *H. myrianthum* pode ser um indicativo de estresse no ambiente de cultivo, promovido pelo esgotamento e secamento do meio de cultura, uma vez que o aparecimento das mesmas é observado em material cultivado *in vitro* por um período de três meses, sem a realização de subcultura.

Muitas espécies vegetais, aciânicas quando crescem em condições normais, produzem antocianinas na presença de altos teores de açúcar, ou quando deficientes em certos metais, bem como em resposta a ataques por patógenos. Sabe-se ainda que a deficiência de importantes minerais, tais como fósforo e nitrogênio, também resulta em um aumento no teor de antocianinas ou produção por plantas que naturalmente não acumulam esses pigmentos (HRAZDINA, 1982).

Fazendo uma comparação através de observação visual das raízes de *H. campestre*, verificou-se que raízes mantidas em meio MS 25% apresentaram uma maior produção de antocianinas, em relação às raízes mantidas em meio M Δ . Isso pode ser devido à composição de nitrogênio presente no meio de cultura. Acredita-se que a

produção de antocianinas é melhorada quando o nitrogênio total ($\text{NH}_4^+/\text{NO}_3^-$) é um fator limitante ao crescimento (SATO *et al.*, 1996).

4.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo descrito neste capítulo 3 permitem concluir que:

√ A regeneração *in vitro* das espécies *H. campestre*, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum* foi induzida a partir de apices caulinares em meio M Δ .

√ A indução dos novos brotos em *H. ternum* foi verificada em meio M Δ sem a adição de reguladores de crescimento e promovida com a adição de 0,04 mg/L BAP. A regeneração em plântulas completas ocorreu em ambos os meios, com melhor taxa de proliferação dos brotos no meio suplementado com BAP e enraizamento favorecido no meio M Δ livre de reguladores de crescimento.

√ A diferenciação e a proliferação dos brotos nas culturas *in vitro* de *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* deu-se de modo mais eficiente em meio M Δ suplementado com 0,4 mg/mL de BAP. Brotos das três espécies foram transferidos para meio M Δ sem adição de reguladores de crescimento, onde desenvolveram raízes, sendo regeneradas em plântulas completas.

√ A diferenciação e a proliferação dos brotos nas culturas *in vitro* de *H. caprifoliatum* ocorreu em meio M Δ suplementado com 0,4 mg/L BAP e 0,2 mg/L ANA. O enraizamento e regeneração em plântulas completas deu-se com a transferência desses brotos para meio M Δ , sem adição de reguladores de crescimento. Após quatro subculturas não houve sobrevivência das plântulas mantidas *in vitro*.

√ A indução de brotos a partir de segmentos apicais de *H. campestre* foi

verificada apenas em meio M Δ , suplementado com 0,2 mg/L de BAP e 1,0 mg/L de 2,4-D, com formação de calos. Os brotos induzidos nesse tratamento, foram transferidos para meio M Δ , na ausência de reguladores de crescimento, proporcionando o enraizamento e formação de plântulas completas.

√ Para todas as espécies avaliadas, a suplementação do meio M Δ com 1 mg/L de BAP resultou na formação de brotos incompletos, apresentando um aspecto de calos esverdeados, inadequados para regeneração *in vitro* dessas plantas.

√ A manutenção de plântulas de *H. campestre* e de *H. polyanthemum*, sem subcultura no mesmo meio M Δ durante um período superior a três meses, induziu a um quadro de estresse, evidenciado pela coloração vermelha intensa das raízes das plântulas e caracterização da produção de antocianinas. A análise cromatográfica e espectrofotométrica sugere a presença da antocianidina malvidina nos extratos das raízes em análise.

√ A concentração de sais do meio de cultivo (MS 25%, MS 100% e M Δ) promoveu diferentes respostas, entre as espécies, nos parâmetros de crescimento *in vitro* avaliados. Com exceção de *H. myrianthum*, que não se desenvolveu no meio MS 100%, as plântulas adaptaram-se à nova condição de cultivo. Em relação ao parâmetro de massa fresca, apenas para a espécie *H. carinatum* ocorreu diferença significativa, evidenciando-se o maior aumento de biomassa no meio MS 25%. O meio M Δ estimulou a formação de raízes de modo significativo em *H. polyanthemum*, observando-se, ainda, nesse meio uma tendência ao melhor enraizamento nas outras espécies.

√ Plântulas de *H. polyanthemum* cultivada em meio M Δ apresentaram crescimento máximo após 12 semanas de cultivo *in vitro*.

√ A aclimatização das espécies foi realizada com sucesso, obtendo-se uma taxa de sobrevivência de 95 a 97 % para as espécies *H. ternum*, *H. carinatum*, *H.*

campestre, *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum*. Para a espécie *H. polyanthemum*, o percentual de sobrevivência foi influenciado pelo tempo de manutenção das plântulas sob cultivo *in vitro*, antes da transferência *ex-vitro*.

√ A análise da biomassa de diferentes partes de *H. polyanthemum* aclimatizada durante o período de 14 a 22 semanas revelou uma diminuição progressiva na proporção das partes vegetativas, e um aumento das partes reprodutivas da planta.

√ Os primeiros botões florais de *H. polyanthemum* aclimatizada foram visíveis após 14 semanas de transferência *ex-vitro*. Diferentes estágios de ontogênese floral foram verificados, classificados como botões florais fechados (completamente verdes) e abertos (com as primeiras pétalas amarelas visíveis), flores abertas, flores senescentes e frutos.

√ O período de manutenção de plântulas de *H. polyanthemum*, sob cultivo *in vitro*, influencia na biomassa e proporção de partes aéreas e flores de plantas aclimatizadas durante 18 semanas. Entretanto, avaliações em diferentes épocas do ano são necessárias para a confirmação dos resultados obtidos.

√ Calos de *H. myrianthum* foram induzidos a partir de discos foliares em meio M Δ suplementado com 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de cinetina; 1 mg/mL de 2,4-D, 0,2 mg/mL de cinetina e 0,2 mg/mL de ANA ou com 1 mg/mL de 2,4-D e 0,2 mg/mL de BAP, independentemente da condição de luminosidade, com maior índice de crescimento em meio M Δ suplementado com 2,4-D/CIN.

√ Calos de *H. polyanthemum* foram induzidos a partir de segmentos caulinares e foliares provenientes de plântulas micropropagadas. O melhor desenvolvimento foi obtido em meio M Δ , na presença de 1,0 mg/L de 2,4-D, 0,2 mg/L de CIN e 0,2 mg/L de ANA, com maior produção de biomassa utilizando folhas como explante, mantidas sob fotoperíodo de 16 horas.

√ Calos de *H. ternum* foram induzidos a partir de folhas apicais de plântulas micropropagadas em todos os tratamentos avaliados, com manutenção do crescimento celular apenas na presença de 1,0 mg/L de 2,4-D e 0,2 mg/L de cinetina, independente da intensidade luminosa.

√ A resposta a diferentes reguladores de crescimento apresenta variações entre espécies do gênero *Hypericum*, cuja variabilidade química existente entre as plantas influencia no comportamento das mesmas sob cultivo *in vitro*.

√ As espécies micropropagadas demonstraram padrões de produtividade similares aos apresentados pelas plantas desenvolvidas a campo.

√ O cultivo *in vitro* das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul apresenta-se como uma alternativa interessante aos métodos convencionais de produção de biomassa para extração de metabólitos secundários bioativos.

5. CAPÍTULO 4

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA
QUANTIFICAÇÃO DE BENZOPIRANOS EM EXTRATO *N*-HEXÂNICO
DE *HYPERICUM POLYANTHEMUM***

5.1 INTRODUÇÃO

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI, 2004).

Como já apresentado no decorrer deste trabalho, *Hypericum polyanthemum* é uma espécie nativa que vêm despertando interesse pelo nosso grupo de pesquisa devido ao seu potencial terapêutico. Desta forma, é importante o desenvolvimento de métodos que permitam a padronização do material vegetal proveniente desta planta.

Nesse sentido, o cultivo de modo controlado, bem como a avaliação da produção de metabólitos secundários, mostram-se de grande importância para obtenção de matéria-prima de alto padrão de qualidade e uniformidade. Os produtos mais abundantes isolados desta planta e aos quais vêm sendo atribuídas diversas atividades biológicas são derivados benzopirânicos, presentes no extrato lipofílico da espécie (FERRAZ *et al.*, 2001; GNERRE *et al.*, 2001; VIANA *et al.*, 2003; DALL'AGNOL *et al.*, 2005; FERRAZ *et al.*, 2005b,c; NÖR, 2006).

5.2 OBJETIVOS

Estabelecimento e otimização de um sistema de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum*.

Validação de metodologia para a quantificação dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum*.

Análise química comparativa entre *H. polyanthemum* de desenvolvimento *in natura*, micropropagada e aclimatizada.

5.3 REVISÃO

5.3.1 Validação de metodologia analítica

A validação de métodos analíticos é o processo que confirma o emprego de um procedimento analítico para um teste específico, visando comprovar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (SHABIR, 2003).

Os métodos cromatográficos, em especial a técnica de CLAE, vêm sendo selecionados para utilização de análises de extratos vegetais, por apresentarem a capacidade de realizar separações que permitem a análise qualitativa e quantitativa de substâncias. Esta técnica apresenta uma variedade de parâmetros passíveis de modificações pelo operador, para otimizar o procedimento de separação dos constituintes de uma amostra complexa. Entre os principais fatores encontram-se o eluente que compõe a fase móvel, o tamanho e preenchimento das colunas cromatográficas, a disponibilidades de diferentes tipos de detectores, entre outros.

Aliados ao desenvolvimento de metodologias analíticas quantitativas utilizando CLAE estão os procedimentos de validação, onde órgãos regulamentadores, como o ICH (INTERNATIONAL HARMONIZATION CONFERENCE, 1996), Farmacopéia Americana (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2005) e ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA; BRASIL, 2003) estabelecem normas para sua a realização, garantindo assim a confiabilidade nos resultados obtidos.

Os principais parâmetros de performance analítica que devem ser avaliados na validação de um método para preparações de origem vegetal são exatidão, precisão, seletividade/especificidade, linearidade, robustez e estabilidade da substância a ser quantificada (ICH, 1996; BRASIL, 2003; THE UNITED, 2005).

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos e o valor verdadeiro ou mais provável. Frequentemente é expressa como percentual de

recuperação.

A precisão representa o grau de concordância entre uma série de análises, resultantes da aplicação repetida do método a amostras homogêneas. Pode ser avaliada através do coeficiente de variação (CV %), que corresponde ao desvio padrão relativo. A precisão pode ser avaliada pelo grau de repetibilidade, precisão intermediária ou reprodutibilidade. A repetibilidade é avaliada em função dos valores encontrados após a análise de uma única amostra em um laboratório por um único analista, no mesmo equipamento. A precisão intermediária é medida através dos resultados obtidos de uma amostra analisada em diferentes dias, diferentes operadores ou em diferentes equipamentos. A reprodutibilidade é avaliada pela análise em diferentes laboratórios.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, a substância em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa. O mesmo significado tem sido freqüentemente utilizado para o termo especificidade (RIBANI, 2004). Apesar do termo mais adequado para o parâmetro seja seletividade, o ICH (1996) e a Farmacopéia Americana (THE UNITED, 2005) consideram especificidade como o termo correto. Este parâmetro pode ser expresso como desvio percentual em relação a uma quantidade conhecida de substância incorporada na amostra (ICH, 1996).

A linearidade representa a capacidade do método em produzir resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação, que deve possuir no mínimo cinco concentrações no intervalo de 80-120%. O comportamento dos resultados obtidos deve ser descrito por uma equação linear e avaliado por métodos estatísticos apropriados, como por exemplo, o cálculo de regressão pelos métodos dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

Robustez é a capacidade intrínseca do método de fornecer resultados

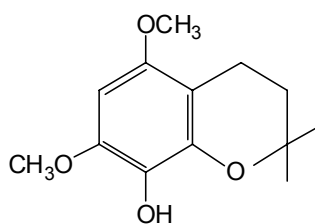
reprodutíveis quando submetido a pequenas modificações das condições experimentais.

5.3.2 Benzopiranos

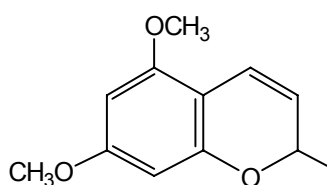
Devido ao desenvolvimento de metodologia para quantificação de benzopiranos presentes no extrato lipofílico de *H. polyanthemum*, foi realizada uma breve revisão sobre essa classe de compostos.

Através da revisão realizada, foi possível perceber que a ocorrência de benzopiranos em Guttiferae não é freqüente como na família Asteraceae. Entretanto, a produção destas substâncias é esperada, pois para a biossíntese dos mesmos é necessária a ciclização de um radical prenila vicinal a uma hidroxila aromática. No gênero *Hypericum*, tanto o radical prenila, quanto derivados de floroglucinol (fonte de hidroxilas aromáticas) são abundantes.

Benzopiranos têm sua estrutura caracterizada pela presença de um anel aromático ligado a um núcleo pirano o qual pode ser formado por duas vias distintas. Os produtos presentes no gênero *Hypericum* pertencem à rota biossintética clássica, na qual a prenila é fundamental para a ciclização formando um núcleo benzopirânico (35). A outra via foi relatada para cromenos de Myrtaceae que estruturalmente se diferenciam dos demais pela ausência da dimetila geminal em α ao oxigênio do heterociclo (36). Neste caso, segundo propõem os autores, sua formação biossintética é originada a partir de eugenol ou floro-acetofenona e não de floroglucínóis prenilados, como ocorre na via clássica (MENUT *et al.*, 2000).

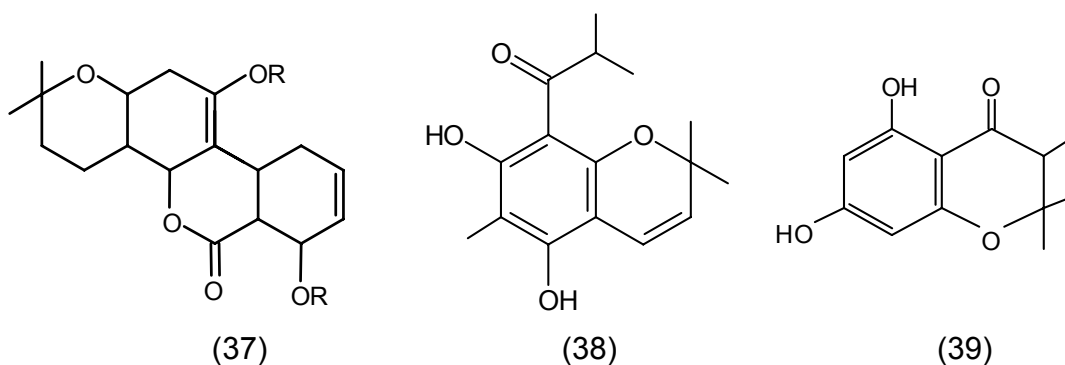


(35)



(36)

Os derivados dimetil-benzopirânicos relatados para espécies de *Hypericum* são sarolactona (37), isolada de *H. japonicum* (ISHIGURO *et al.*, 1990) 8-isobutiril-5,7-di-hidroxi-6-metil-2,2-dimetilcromeno (38), isolado de *H. revolutum* (DÉCOSTERD *et al.*, 1986) e 5,7-di-hidroxi-3-metilcromona (39) isolado de *H. annulatum* (NEDIALKOV & KITANOV, 2002) bem como os objetos de estudo deste capítulo, HP1, HP2 e HP3, isolados de *H. polyanthemum*, cujas estruturas já foram apresentadas no decorrer do trabalho.



Estas três substâncias vêm despertando a atenção do nosso grupo de pesquisa devido às propriedades biológicas demonstradas, nos diferentes ensaios realizados.

Inicialmente, caracterizou-se o efeito inibitório de HP3 sobre as enzimas monoamino oxidase A e B em preparações de mitocôndrias de cérebro de ratos (GNERRE *et al.*, 2001). Dando continuidade aos estudos com esses produtos, evidenciou-se o efeito antimicrobiano promissor de HP1 e HP3 (DALL'AGNOL *et al.*, 2005).

Além disso, foi demonstrado que HP1, HP2 e HP3 apresentam ação antiproliferativa frente a HT-29 (células de carcinoma de cólon humano), H-460 (células de carcinoma de pulmão) e U-373 (glioma maligno humano) (FERRAZ *et al.*, 2005b,c). Estas substâncias apresentam citotoxicidade significativa e mostram-se capazes de alterar a distribuição do ciclo celular (FERRAZ *et al.*, 2005c). Mais recentemente, foi evidenciado que os benzopiranos de *H. polyanthemum* apresentam efeito citotóxico

dose-dependente frente a células de endotélio vascular, envolvidas no processo de angiogênese. HP2 e HP3 apresentam ainda efeito de indução de apoptose e modificação no fluxo do ciclo celular (NÖR, 2006).

5.4 MATERIAIS E MÉTODOS

A validação de metodologia analítica para a quantificação de benzopiranos em extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum* foi realizada na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em equipamento CLAE, gentilmente cedido pela Profa. Dr. Teresa Dalla Costa.

Para um melhor entendimento, um esquema da metodologia está apresentado como anexo (Anexo VIII, página 321).

5.4.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado para o desenvolvimento desta etapa do trabalho foi constituído de partes aéreas (folhas, ramos e flores) e raízes da espécie *H. polyanthemum* coletada nas Guaritas, município de Caçapava do Sul (Rio Grande do Sul), entre os meses de outubro a novembro. As exsicatas para a devida identificação e registro do material vegetal foram depositadas no herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Bordignon 1429).

Para a avaliação do teor de benzopiranos no material obtido por cultivo *in vitro* foram utilizadas plântulas de *H. polyanthemum*, desenvolvidas nas condições descritas no capítulo 3. Da mesma maneira, foi utilizado o material vegetal em vários estágios de desenvolvimento, obtido através da aclimatização desta espécie.

5.4.2 Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de benzopiranos em extrato *n*-hexânico de *Hypericum polyanthemum*

Devido às propriedades biológicas atribuídas aos benzopiranos presentes na fração apolar de *H. polyanthemum*, tornou-se interessante avaliar a produção *in vitro* destes compostos. Nesse sentido, foi desenvolvido um procedimento para quantificação dessas substâncias no extrato *n*-hexânico desta espécie.

5.4.2.1 Preparação da solução extrativa

Para obtenção dos extratos, o material vegetal em análise foi liofilizado, sendo posteriormente triturado com o auxílio de gral e pistilo. Cada amostra de 50 mg foi submetida a quinze extrações sucessivas de 20 minutos, com 5 mL de *n*-hexano cada, em banho de ultrasonicador. Os extratos de cada amostra foram reunidos e evaporados até *secura* sob pressão reduzida. O resíduo seco obtido foi redissolvido em 5 ml de metanol grau CLAE em balão volumétrico. Essa solução resultante foi filtrada (filtro com poros de 0,22 µm, Merck®), sendo posteriormente analisada em cromatógrafo líquido.

5.4.2.2 Condições cromatográficas

A análise cromatográfica de benzopiranos foi realizada utilizando cromatógrafo a líquido de alta eficiência Waters® gerenciado por software Millennium® (versão 32,2), empregando-se uma bomba Waters® 600, injetor automático Waters® 717 e detector de absorvância dual λ Waters® 2487. A análise foi realizada utilizando-se coluna Waters Nova-Pack® C18 (3,9 x 150 mm) com partículas de 4 µm de diâmetro nominal, adaptada a uma pré-coluna Waters Nova-Pack® C18 60A (3,9 x 20 mm).

Visando encontrar um sistema simples e eficaz na separação e quantificação dos benzopiranos nas amostras de *H. polyanthemum* foram testados diferentes sistemas eluentes. O sistema mais adequado para a análise foi constituído de uma mistura de acetonitrila (grau analítico para CLAE) e água ultrapura (Milli-Q) (60:40),

com um regime de eluição isocrático. A fase móvel utilizada foi previamente filtrada em membrana hidrofóbica (Millipore®) de 0,45 µm de diâmetro nominal de poro e 13 mm de diâmetro, e desgaseificada por 15 minutos em banho de ultrasom. O sistema foi mantido com purga de gás hélio durante as análises. O fluxo de eluição utilizado foi de 1 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. A sensibilidade do detector foi de 0,05 AUFS e a detecção foi realizada em $\lambda=270$ nm, em temperatura ambiente.

5.4.2.3 Validação do método de doseamento de benzopiranos por CLAE

A metodologia para quantificação de benzopiranos no extrato *n*-hexânico das flores de *H. polyanthemum in natura* foi validada segundo normas do ICH (1996), da Farmacopéia Americana (THE UNITED, 2005) e da RE 899 (BRASIL, 2003). Os parâmetros de performance analítica avaliados na validação do método foram linearidade, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação.

5.4.2.3.1 Avaliação da linearidade

A linearidade do método foi avaliada empregando-se análise de regressão aos resultados das curvas padrão obtidas para os benzopiranos HP1, HP2 e HP3. Os parâmetros considerados foram o coeficiente de determinação (R^2), a equação da reta obtida pelo método dos mínimos quadrados, os limites de confiança do intercepto e do coeficiente angular, bem como a análise de variância (ANOVA) da regressão linear.

5.4.2.3.1.1 Curva padrão dos benzopiranos

Os benzopiranos HP1, HP2 e HP3 utilizados como substâncias de referência foram isolados e purificados do extrato *n*-hexânico das partes aéreas de *H. polyanthemum*, conforme metodologia descrita por FERRAZ e colaboradores (2001). Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com substâncias autênticas, seguida de confirmação por ressonância magnética nuclear de hidrogênio

(RMN de ^1H) e de carbono (RMN de ^{13}C).

Para confecção das curvas padrão foram preparadas soluções metanólicas de cada um dos benzopiranos, utilizando-se diferentes concentrações (1,95; 3,91; 7,81; 15,63; 31,25; 62,5; 125,0; 250,0; 500,0 $\mu\text{g/mL}$). Cada solução foi filtrada (filtro com poros de 0,22 μm , Merck[®]), sendo posteriormente injetada em triplicata, utilizando-se os parâmetros cromatográficos descritos no item 5.4.4.2.2. O experimento foi realizado em três dias consecutivos.

A média das injeções foi obtida após integração dos picos correspondentes a cada benzopirano, que foram utilizadas para a construção de um gráfico de área versus concentração, obtendo três curvas respostas. Foram considerados o desvio padrão e coeficiente de variação percentual para cada uma das soluções.

5.4.2.3.2 Determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram determinados a partir das curvas padrão dos benzopiranos e calculados segundo as equações (4.1 e 4.2).

$$(4.1) \text{ LD} = 3,3 \times \text{dp/lc}$$

$$(4.2) \text{ LQ} = 10 \times \text{dp/lc}$$

Onde, dp representa o desvio padrão médio do intercepto de três curvas padrão, e lc corresponde à média da inclinação das três curvas.

5.4.2.3.3 Teste de Repetibilidade

A resposta à repetibilidade foi avaliada em relação aos picos correspondentes aos benzopiranos no extrato *n*-hexânico das flores de *H. polyanthemum in natura*, partindo-se de 6 alíquotas a 100 % da solução extrativa preparadas conforme item

5.4.4.2.1. As injeções ocorreram em triplicata, em um mesmo dia, seguindo os parâmetros cromatográficos descritos no item 5.4.4.2.2. Os resultados foram expressos em coeficiente de variação percentual.

5.4.2.3.4 Teste de Precisão intermediária

A avaliação da precisão intermediária foi realizada através da repetição do experimento descrito no item 5.4.4.2.3.2.1, utilizando-se três alíquotas da solução extrativa, injetadas em triplicata durante cinco dias consecutivos. A partir dos resultados foi possível avaliar a precisão intra-dia e entre-dias, através do coeficiente de variação percentual.

5.4.2.3.5 Teste de recuperação

Para realização do teste de recuperação foram adicionadas alíquotas de 50, 75 e 100 μL de cada benzopirano (solução 125 $\mu\text{g/mL}$) à solução extrativa em análise. Cada solução extrativa adicionada foi preparada em triplicata, e injetada no cromatógrafo seguindo os parâmetros do item 5.4.4.2.2. O percentual de recuperação foi determinado através da equação (4.3):

$$(4.3) R\% = [C_{ad} - C_{nad}] / C_p \cdot 100$$

Onde,

C_{ad} : Concentração do benzopirano de interesse na solução extrativa adicionada;

C_{nad} : Concentração do benzopirano de interesse na solução extrativa controle;

C_p : Concentração da solução padrão adicionada à amostra.

5.4.3 Quantificação de benzopiranos em diferentes órgãos de *Hypericum polyanthemum in natura*, micropropagada e aclimatizada

O processamento do material vegetal utilizado para a quantificação, bem como a preparação dos extratos e condições cromatográficas utilizadas estão descritos nos itens 5.4.2.1 e 5.4.2.2.

5.4.4 Análise estatística dos resultados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão. A significância estatística dos resultados foi determinada por análise de variância One-Way (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, utilizando o software para cálculos estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 12.0[®]. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.5.1 Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de benzopiranos em extrato *n*-hexânico de *Hypericum polyanthemum*

A cromatografia líquida de alta eficiência tornou-se uma das metodologias analíticas mais amplamente utilizadas na análise quantitativa, devido à possibilidade de separar os constituintes de uma amostra complexa e quantificá-los, com simplicidade e confiabilidade (SWARTZ & KRULL, 1997).

Para a validação de métodos analíticos, tanto o ICH (1996) quanto a Farmacopéia Americana (THE UNITED, 2005) reconhecem que não há a necessidade de avaliar todos os parâmetros de performance analítica. O tipo de método e seu respectivo uso determinam quais os parâmetros relevantes para o desempenho do processo analítico (SWARTZ & KRULL, 1997). Para este estudo, tratando-se de uma matriz biológica complexa, como é o caso de soluções extrativas vegetais, foram

realizados os testes de linearidade e faixa de variação, seletividade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e limites de detecção e quantificação.

Entre os sistemas cromatográficos testados para a análise por CLAE, foi selecionado o sistema isocrático constituído de acetonitrila e água (60:40) como fase móvel, com fluxo de 1 mL/min, coluna em fase reversa C₁₈ como fase estacionária e detecção em $\lambda=270$ nm. A identificação dos benzopiranos no extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum* foi realizada através de comparação entre os tempos de retenção obtidos para as amostras autênticas. Nessas condições cromatográficas, os benzopiranos apresentaram tempos de retenção de 9,1 min (HP₁), 12,9 min (HP₂) e 21,6 min (HP₃). As análises realizadas no mesmo dia apresentaram tempos de retenção que tiveram um CV% entre 0,2 e 1,4 % (HP₁); 0,2 e 1,1 (HP₂); 0,2 e 1,8 % (HP₃) e nas verificações realizadas em diferentes dias apresentaram CV% de 1,5 a 2,5% (HP₁); 1,7 a 2,5 % (HP₂); 1,5 a 3,2 (HP₃). Este sistema permitiu uma separação adequada para a análise dos benzopiranos, em tempo relativamente curto (tempo de análise de 25 min).

O perfil cromatográfico do extrato *n*-hexânico das flores de *H. polyanthemum in natura*, bem como de cada benzopirano isoladamente, analisados conforme descrito na metodologia pode ser visualizado na figura 4.1, em sobreposição.

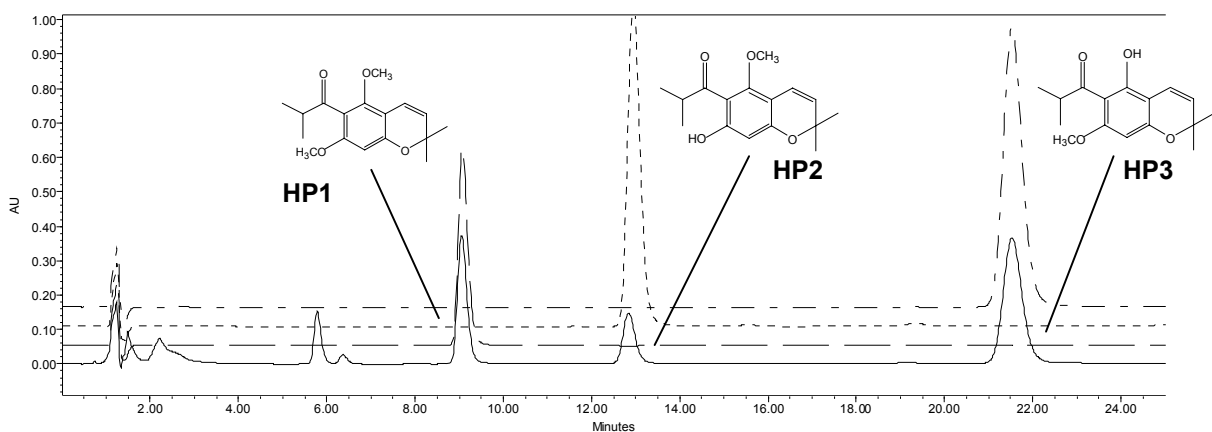


Figura 4.1: Perfil cromatográfico obtido por CLAE do extrato *n*-hexânico das flores de *H. polyanthemum in natura* e dos benzopiranos HP1, HP2 e HP3. Condições cromatográficas: fase móvel acetonitrila:água (60:40); fluxo de 1 mL/min, volume de injeção 20 μ L e detecção em $\lambda=270$ nm.

A avaliação da linearidade constitui um dos principais requisitos para a validação de uma metodologia analítica. Segundo as normas do ICH (1996), os ensaios de linearidade podem ser realizados pela diluição de uma solução padrão estoque em ao menos cinco diferentes concentrações.

A linearidade do método foi avaliada para os benzopiranos HP1, HP2 e HP3, através do desenvolvimento de curvas padrão. Para a obtenção da curva padrão de HP1 foram utilizadas soluções de concentração variando entre 15,6 a 250,0 $\mu\text{g/mL}$, e para obtenção da curva padrão de HP2 e HP3 foram utilizadas soluções de concentração variando entre 3,9 a 62,5 $\mu\text{g/mL}$. As tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 apresentam as áreas dos picos referentes aos benzopiranos, nas diferentes concentrações, bem como os coeficientes de variação percentual (CV %) para ponto da curva.

Tabela 4.1: Áreas dos picos de HP1 nas soluções padrão analisadas por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico ($\text{mVs}^{-1} \pm \text{dp}, n = 3$)	CV %
15,6	531090 \pm 6320,5	1,19
31,3	1061595 \pm 13198,9	1,24
62,5	2134320 \pm 6492,4	0,30
125,0	4304419 \pm 18091,6	0,42
250,0	8270829 \pm 22966,8	0,28

Tabela 4.2: Áreas dos picos de HP2 nas soluções padrão analisadas por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico ($\text{mVs}^{-1} \pm \text{dp}, n = 3$)	CV %
3,9	493504,7 \pm 11723,7	2,38
7,8	1001647 \pm 4140,9	0,41
15,6	1997628 \pm 12872,5	0,64
31,3	4021604 \pm 107525,3	2,67
62,5	8012257 \pm 437192	5,46

Tabela 4.3: Áreas dos picos de HP3 nas soluções padrão analisadas por CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área do pico ($\text{mVs}^{-1} \pm \text{dp}, n = 3$)	CV %
3,9	517596 \pm 23829,6	4,60
7,8	913641,3 \pm 12969	1,42
15,6	1932220 \pm 21942,2	1,14
31,3	3499042 \pm 35340,8	1,01
62,5	7164405 \pm 217313,5	3,03

As equações da reta obtida foram:

$$\text{HP1: } y = 33070x + 56790 \text{ (n=3, } R^2 = 0,9995\text{)}$$

$$\text{HP2: } y = 128333x - 2900,5 \text{ (n=3, } R^2 = 1\text{)}$$

$$\text{HP3: } y = 113088x + 66398 \text{ (n=3, } R^2 = 0,9992\text{)}$$

Onde, y representa a área do pico (mVs^{-1}) e x representa a concentração dos respectivos benzopiranos ($\mu\text{g/mL}$).

A representação gráfica das curvas padrão obtidas com os dados das tabelas 4.1, 4.2 e 4.3 pode ser visualizada na figura 4.2.

Na avaliação dos resultados da análise de regressão linear, o coeficiente de determinação (R^2), que representa o grau de associação entre a variável independente (x) e a variável dependente (y), deve ser o mais próximo possível de 1, o que significa que existe forte correlação entre as variáveis. Os coeficientes de determinação (R^2) 0,9995 (obtido para HP1), 1 (obtido para HP2) e 0,9992 (obtido para HP3) demonstram a forte relação verificada entre a concentração do respectivo benzopirano e a resposta do equipamento (área do pico).

Os erros sistemáticos constantes foram descartados pela inclusão do zero entre os limites de confiança (LC) do intercepto (b) das curvas padrão de HP1 ($\text{LC}_{\text{inferior}} = -21815,9$ e $\text{LC}_{\text{superior}} = 135395,8$); HP2 ($\text{LC}_{\text{inferior}} = -211219,1$ e $\text{LC}_{\text{superior}} = 205418,1$) e HP3 ($\text{LC}_{\text{inferior}} = -66653,3$ e $\text{LC}_{\text{superior}} = 199450,3$).

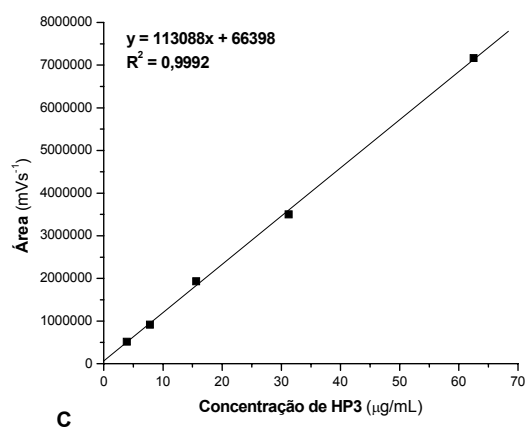
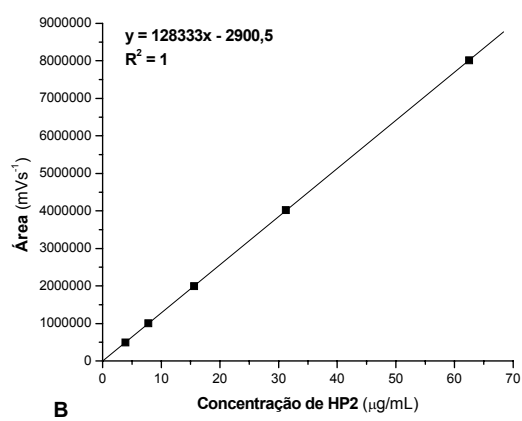
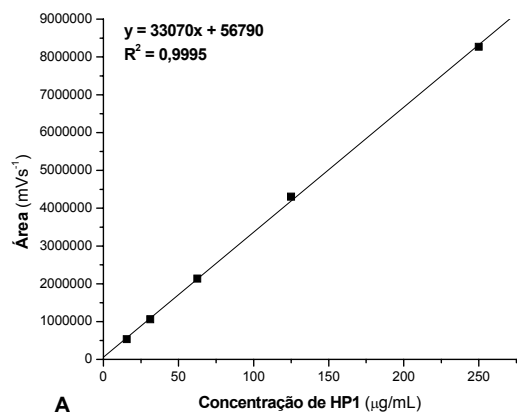


Figura 4.2: Curvas padrão de HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C), obtidas por CLAE.

Através do valor de p , proveniente do teste “t”, para a inclinação (HP1: $6,3 \times 10^{-23}$; HP2: $2,9 \times 10^{-17}$ e HP3: $4,5 \times 10^{-19}$) rejeitou-se a hipótese nula, que sugere a inclinação sendo constante ou igual a zero. Nesse sentido, incrementos na concentração de cada benzopirano provocaram um aumento linear da resposta, expressa como áreas do pico. Esta hipótese também foi avaliada na ANOVA da regressão linear, onde verificou-se valores de F significativos para $\alpha=0,01$ (HP1: 536333,3; HP2: 2762,6; HP3: 8764,6), comprovando existir uma relação linear entre as variáveis.

Os resultados descritos para a linearidade da curva padrão de HP1, HP2 e HP3 foram adequados, podendo-se afirmar que o método proposto possui linearidade na faixa de concentração de trabalho utilizada para cada benzopirano.

O limite de detecção (LD) é dado como a menor concentração de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada nas condições experimentais. Já o limite de quantificação (LQ) é dado como a menor concentração do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 1996).

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados com base nas equações 4.1 e 4.2, apresentadas na metodologia. Os valores encontrados para estes parâmetros nas condições experimentais utilizadas estão demonstrados na tabela 4.4.

Tabela 4.4: Valores de limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) obtidos para os benzopiranos HP1, HP2 e HP3

Benzopirano	LD = $3,3 \times dp/lc$ ($\mu\text{g/mL}$)	LQ = $10 \times dp/lc$ ($\mu\text{g/mL}$)
HP1	0,17	0,52
HP2	0,74	2,26
HP3	1,44	4,36

Os reduzidos valores obtidos para LD e LQ de HP1 e HP2 demonstram a sensibilidade do método analítico para essas substâncias. Apesar de o valor de LQ ser mais elevado para HP3, este ainda se revela adequado para a aplicação do método a

extratos vegetais.

A seletividade do método proposto foi avaliada pela análise dos cromatogramas da solução extrativa das flores da planta desenvolvida em campo. Como demonstrado na figura 35, os picos de HP1, HP2 e HP3 apresentam-se com resolução satisfatória em relação aos demais constituintes do extrato, indicando que a seletividade é adequada.

Com a finalidade de avaliar a precisão do método de quantificação dos benzopiranos por CLAE foram realizados os testes de repetibilidade e precisão intermediária (intra e inter-dias) para a solução extrativa. As tabelas 4.5, 4.6 e 4.7 apresentam os resultados obtidos nessa análise.

Tabela 4.5: Teores de HP1, em solução extrativa de *H. polyanthemum*, analisadas por CLAE, nos testes para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

	HP1 (g% ± dp)	CV %
Repetibilidade*	1,68 ± 0,006	0,37
Precisão intra-dia		
Dia 1	1,70 ± 0,058	3,39
Dia 2	1,75 ± 0,034	1,97
Dia 3	1,70 ± 0,036	2,12
Dia 4	1,77 ± 0,041	2,31
Dia 5	1,71 ± 0,045	2,64
Precisão inter-dias	1,73 ± 0,032	1,87

* Resultados da média de seis alíquotas, cada uma injetada em triplicata.

Tabela 4.6: Teores de HP2, em solução extrativa de *H. polyanthemum*, analisadas por CLAE, nos testes para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

	HP2 (g% ± dp)	CV %
Repetibilidade*	0,22 ± 0,002	0,78
Precisão intra-dia		
Dia 1	0,22 ± 0,006	2,58
Dia 2	0,23 ± 0,005	2,13
Dia 3	0,22 ± 0,004	1,99
Dia 4	0,23 ± 0,006	2,63
Dia 5	0,23 ± 0,006	2,88
Precisão inter-dias	0,23 ± 0,004	1,85

* Resultados da média de seis alíquotas, cada uma injetada em triplicata.

Tabela 4.7: Teores de HP3, em solução extrativa de *H. polyanthemum*, analisadas por CLAE, nos testes para avaliação da repetibilidade e precisão intermediária.

	HP3 (g% ± dp)	CV %
Repetibilidade*	0,96 ± 0,005	0,56
Precisão intra-dia		
Dia 1	0,98 ± 0,026	2,62
Dia 2	0,99 ± 0,024	2,46
Dia 3	0,97 ± 0,020	2,08
Dia 4	1,00 ± 0,020	2,02
Dia 5	0,98 ± 0,021	2,11
Precisão inter-dias	0,98 ± 0,013	1,33

* Resultados da média de seis alíquotas, cada uma injetada em triplicata.

As variações encontradas entre os resultados obtidos, podem ser consideradas satisfatórias visto que os valores de coeficiente de variação percentual estão abaixo do limite estabelecido de 5% aceito para matrizes complexas, como é o caso de soluções extrativas vegetais (Brasil, 2003), constatando-se que o método demonstra elevada precisão.

A exatidão do método foi determinada através do teste de recuperação, onde uma faixa de concentração específica foi estabelecida e quantidades conhecidas dos padrões HP1, HP2 e HP3 foram adicionados na solução extrativa. Estes valores estão especificados na tabela 4.8, que mostra ainda o teor de benzopirano recuperado, que foi calculado com a utilização da equação 4.3.

Tabela 4.8: Valores dos percentuais de recuperação de HP1, HP2 e HP3, em solução extrativa de *H. polyanthemum*.

Benzopirano	Concentração (µg/mL)		Taxa de recuperação (%)	Média (% ± dp)	CV %
	Adicionada	Recuperada			
HP1	0,0125	0,0128	102,68	102,61(0,94	0,92
	0,0188	0,0194	103,50		
	0,0250	0,0254	101,63		
HP2	0,0125	0,0126	101,06	101,03 ±1,14	1,13
	0,0188	0,0187	99,88		
	0,0250	0,0255	102,17		
HP3	0,0125	0,0127	101,85	102,02 ±1,04	1,02
	0,0188	0,0193	103,13		
	0,0250	0,0253	101,08		

O método proposto demonstrou boa exatidão para os três benzopiranos avaliados, visto que os resultados de recuperação situam-se entre os limites de 95 e 105% preconizados pelo ICH (1996). Além disso, os coeficientes de variação percentual demonstram a precisão nos resultados, considerados de grande relevância, em se tratando de uma matriz complexa, como é o caso de um extrato vegetal.

Os parâmetros de performance analítica avaliados demonstraram resultados coerentes com os exigidos pela legislação vigente, de modo que considera-se validado o método para a quantificação de HP1, HP2 e HP3 no extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum*, através de CLAE. Com isso, torna-se possível garantir a confiabilidade dos resultados obtidos e ressalta-se a aplicabilidade para a determinação dessas substâncias em material proveniente do cultivo *in vitro* desta espécie.

5.5.2 Quantificação de benzopiranos em diferentes órgãos de *Hypericum polyanthemum in natura*, micropropagada e aclimatizada

A investigação da presença e determinação dos teores de HP1, HP2 e HP3 presentes em diferentes órgãos de plantas cultivadas a campo, micropropagadas e aclimatizadas foi realizada através de CLAE, segundo metodologia analítica descrita anteriormente.

As curvas padrão de cada benzopirano foram utilizadas para a obtenção da concentração individual destas substâncias nos extratos *n*-hexânicos provenientes de diferentes órgãos de *H. polyanthemum*, bem como de diferentes estágios de desenvolvimento desta planta. O método possibilitou a quantificação simultânea de HP1, HP2 e HP3, que apresentaram separação satisfatória, tendo a comprovação da sua identidade realizada através da coincidência dos tempos de retenção após co-injeção da solução padrão dos benzopiranos juntamente com o extrato vegetal.

A análise revelou que os três benzopiranos acumulam-se nas partes aéreas da planta, sendo os teores de HP1, HP2 e HP3 variáveis em função do estágio de

desenvolvimento do vegetal.

Visando uma organização na apresentação dos resultados, estes foram divididos conforme a origem do material vegetal: *H. polyanthemum in natura*, micropropagada e aclimatizada.

5.5.2.1 *Hypericum polyanthemum in natura*

A avaliação do teor de benzopiranos na planta *in natura* foi realizada com material vegetal obtido de coletas a campo realizadas em novembro de 2004 e em outubro de 2006. Visando verificar diferenças na produção de HP1, HP2 e HP3 em relação às diferentes partes do vegetal, a planta coletada em novembro de 2004 foi dividida em folhas, ramos, flores e raízes. Porém, para a planta coletada em outubro de 2006, foram avaliadas as partes vegetativas como um todo, uma vez que normalmente não há subdivisão em folhas e ramos para a preparação dos extratos, e as flores, devido ao maior teor de benzopiranos totais encontrado neste órgão.

Como é possível evidenciar na figura 4.3, os três benzopiranos se acumulam nas partes vegetativas e flores. Nas raízes, foi verificado apenas a presença de HP3, de modo que não foram coletadas raízes para análise em 2006. Observa-se ainda uma forte variação no teor de HP1, HP2 e HP3, considerando apenas as flores. Enquanto nas flores coletadas em novembro de 2004, a maior concentração foi verificada para HP3 ($1,43 \pm 0,07$ g %), seguida de HP2 ($1,12 \pm 0,11$ g %) e HP1 ($0,37 \pm 0,03$ g %), na coleta de 2006, os maiores teores foram encontrados para HP1 ($1,67 \pm 0,04$ g %), seguido de HP3 ($0,95 \pm 0,03$ g %) e de HP2 ($0,22 \pm 0,007$ g %). Em um trabalho semi-quantitativo, verificando a presença dessas substâncias nas flores de diferentes espécies de *Hypericum*, NÖR e colaboradores (2007) evidenciaram este mesmo padrão de produção, onde HP1 acumula-se em maior proporção, seguido por HP3 e HP2.

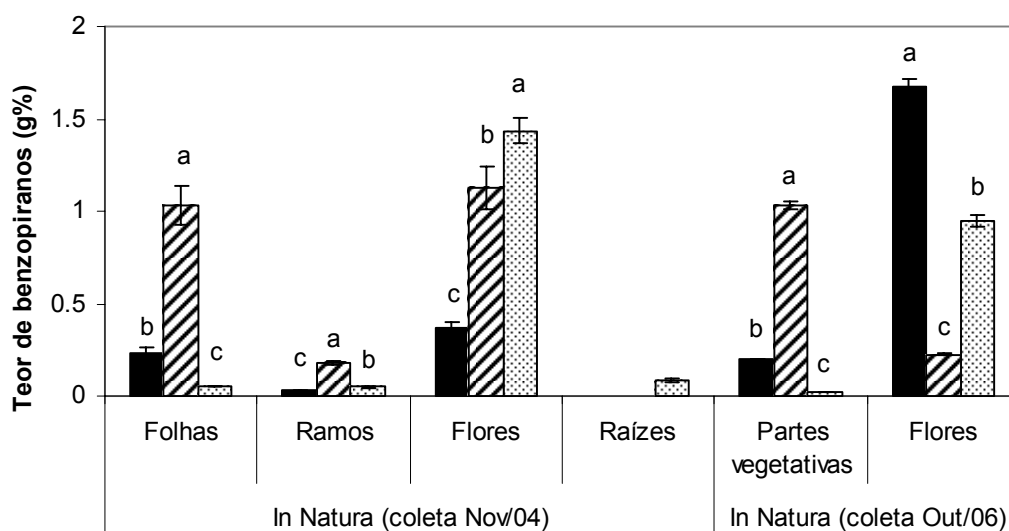


Figura 4.3: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de diferentes órgãos de *H. polyanthum in natura*, em diferentes épocas de coleta. Os dados representam a média \pm dp.
^{a,b,c} Considerando o mesmo órgão avaliado, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).
 (■ HP1; ▨ HP2; ▩ HP3).

Muitos trabalhos, não apenas dentro do gênero *Hypericum*, demonstram a variabilidade na composição de compostos bioativos, em função da localização geográfica, condições de cultivo e estágio de desenvolvimento do vegetal. LEE e colaboradores (2007) verificaram variação na concentração de alcalóides produzidos por *Lupinus leucophyllus* desenvolvido a campo, quantificados em plantas coletadas durante três anos consecutivos.

Espécies de *Hypericum* coletadas em diferentes regiões, épocas ou horários de coleta comumente apresentam variações no teor de metabólitos secundários (BÜTER *et al.*, 1998; ÇIRAK *et al.*, 2006; COUCEIRO *et al.*, 2006), de modo que a variabilidade na concentração de benzopiranos podem ser explicados devido a estes fatores. Em relação às partes vegetativas, a proporção entre estas substâncias permaneceram similares.

5.5.2.2 *Hypericum polyanthemum* micropropagada

Plântulas de *H. polyanthemum* micropropagadas em meio M Δ por 45 dias foram subdivididas em folhas, ramos e raízes, com o objetivo de verificar o padrão de produção destes compostos nos diferentes órgãos cultivados *in vitro*. Foi verificado que todos os três metabólitos acumulam-se nas folhas das plântulas. No entanto, apenas HP1 e HP3 foram acumulados em teores quantificáveis nos ramos, enquanto nas raízes há produção de apenas HP3 (tabela 4.9).

Tabela 4.9: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de plântulas de *H. polyanthemum* micropropagada subdivididas em folhas, ramos e raízes.

	HP1 (g % \pm dp)	HP2 (g % \pm dp)	HP3 (g % \pm dp)
Folhas	0,09 \pm 0,002 ^a	0,0025 \pm 0,0002 ^e	0,02 \pm 0,0002 ^b
Ramos	0,007 \pm 0,001 ^d	-	0,015 \pm 0,0002 ^c
Raízes	-	-	0,008 \pm 0,003 ^d

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,01$).

Considerando as partes aéreas como um todo, os maiores teores verificados foram de HP1, seguido de HP3 e de HP2. Nesta avaliação, as plântulas foram coletadas após 45 dias de cultivo *in vitro*. No entanto, no estudo da cinética de produção de benzopiranos *in vitro* (item 5.5.2.2.2), as plântulas mantidas por um período de 45 dias apresentaram nas partes aéreas teores consideravelmente superiores aos aqui verificados, porém mantendo esse mesmo padrão de produção (HP1>HP3>HP2). Cabe ressaltar que as plântulas avaliadas nas diferentes análises foram obtidas de explantes provenientes de diferentes coletas a campo, caracterizando a influência do germoplasma na produção dos metabólitos secundários. Recentemente a influência genética na produção de compostos bioativos de duas linhagens de *H. perforatum* micropropagada foi avaliada. A análise química das mesmas demonstrou teores de hipericina e de pseudo-hipericina 6 e 14 vezes superiores, respectivamente, em uma das linhagens, principalmente devido a variações anatômicas e morfológicas verificadas entre elas (KORNFELD *et al.*, 2007).

5.5.2.2.1 Avaliação da influência da concentração de sais do meio de cultivo na produção de benzopiranos

Como apresentado no capítulo 3, o desenvolvimento *in vitro* de plântulas de *H. polyanthemum* foi avaliado em meio M Δ sólido e em meio MS com a concentração íntegra de sais ou a 25 %.

As plântulas de *H. polyanthemum* se desenvolveram e produziram benzopiranos nos três meios de cultura avaliados. No entanto, houve variação no acúmulo de HP1, HP2 e HP3, como é possível evidenciar na figura 4.4. Em todos os meios avaliados a produção de HP1 foi superior, seguida de HP3 e HP2. Não houve diferença significativa na produção de HP1 e de HP3 quando as plântulas foram cultivadas nos meio M Δ e MS 25%. Apenas para a substância HP2, verificou-se maior produção no meio MS 25%, em relação ao meio M Δ . A produção dessas substâncias foi afetada consideravelmente com o cultivo em meio MS 100%, onde houve uma redução no teor dos três benzopiranos. Nesta análise, a produção de benzopiranos foi avaliada nas partes aéreas como um todo.

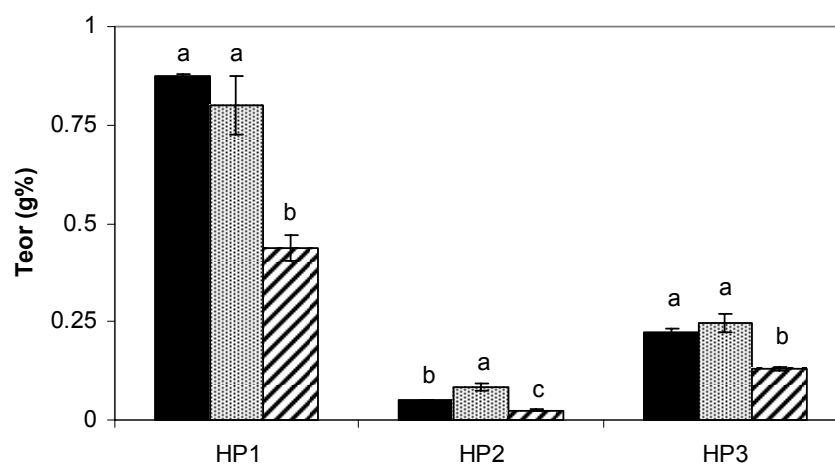


Figura 4.4: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de plântulas de *H. polyanthemum* micropropagado em diferentes meios de cultura. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c} Considerando o mesmo benzopirano, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).
 (■ M Δ ; ▨ MS 25%; ▩ MS 100%)

O efeito exercido na produção de benzopiranos por plântulas mantidas sob cultivo no meio MS 100% provavelmente pode ser devido à ação de fosfato inorgânico, cuja concentração neste meio é superior à presente nos meios M Δ e MS 25%. Concentrações aumentadas deste ânion exercem uma influência negativa na biossíntese de muitos metabólitos secundários em culturas vegetais *in vitro* (BONDAREV *et al.*, 2003).

Considerando o meio M Δ utilizado neste trabalho, o aumento na concentração dos micronutrientes I, Mo, Cu e Co foi baseada na ausência de efeitos desses componentes no crescimento de calos de tabaco, avaliados em várias concentrações no estudo original de MURASHIGE & SKOOG (1962), sendo estes importantes para modular o metabolismo sem afetar o crescimento. Como evidenciado no capítulo 3 (item 4.5.2), o crescimento das plântulas de *H. polyanthemum* não foi significativamente afetado pelo maior conteúdo destes micronutrientes no meio M Δ .

5.5.2.2 Estudo da cinética de produção de benzopiranos *in vitro*

Plântulas de *H. polyanthemum* cultivadas em meio M Δ em diferentes estágios de desenvolvimento foram avaliadas quinzenalmente, durante o período de 6 a 14 semanas, em relação ao aumento de biomassa, descrito no capítulo 3, e em relação à produção de benzopiranos.

Verificou-se que a maior produção de HP1, HP2 e de HP3 ocorreu nas plântulas cultivadas *in vitro* por 12 semanas (figura 4.5), associada ao maior pico de produção de biomassa observada neste mesmo período (capítulo 3, item 4.5.3, figura 3.6). A manutenção das plântulas por 14 semanas promoveu uma diminuição na produção de benzopiranos.

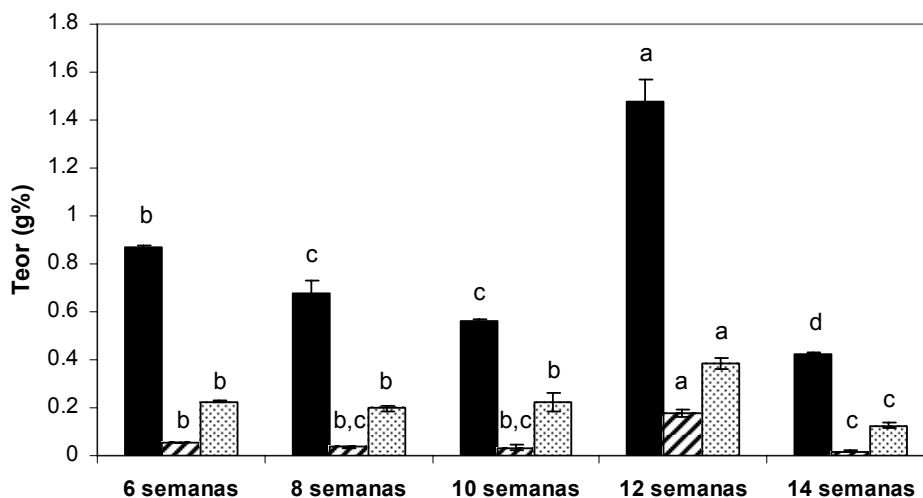


Figura 4.5: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de plântulas de *H. polyanthemum* cultivadas em meio M Δ , em diferentes estágios de desenvolvimento. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c,d} Considerando o mesmo benzopirano avaliado, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$). (■ HP1; ▨ HP2; ▩ HP3).

5.5.2.3 *Hypericum polyanthemum* aclimatizada

Plantas de *H. polyanthemum* aclimatizadas por 8 semanas na primavera foram subdivididas em folhas, ramos e raízes, com o objetivo de verificar o padrão de produção destes compostos nos diferentes órgãos após transferência para cultivo *ex-vitro*. Nesta avaliação, as plantas aclimatizadas não apresentavam flores, de modo que um estudo detalhado das partes reprodutivas foi realizado em um segundo momento. Foi verificado que todos os três metabólitos acumulam-se nas folhas e ramos do vegetal e apenas HP3 é acumulado nas raízes (tabela 4.10).

Enquanto nas folhas o benzopirano HP1 mostrou-se em maior concentração ($0,71 \pm 0,001$ g %), nos ramos a maior produção foi evidenciada para HP3 ($0,096 \pm 0,012$ g %). Considerando as partes vegetativas como um todo, os maiores teores verificados foram de HP1, seguido de HP3 e de HP2.

Tabela 4.10: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum* aclimatizada subdivididas em folhas, ramos e raízes.

	HP1 (g % ± dp)	HP2 (g % ± dp)	HP3 (g % ± dp)
Folhas	0,71 ± 0,001 ^a	0,073 ± 0,001 ^d	0,14 ± 0,002 ^b
Ramos	0,015 ± 0,006 ^f	0,037 ± 0,001 ^e	0,096 ± 0,012 ^c
Raízes	-	-	0,15 ± 0,007 ^b

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,01$).

5.5.2.3.1 Estudo da ontogenia de *Hypericum polyanthemum* aclimatizada

Visando verificar uma possível relação entre a produção dos compostos bioativos com o desenvolvimento do vegetal, plantas aclimatizadas foram avaliadas quinzenalmente durante o período de 14 a 22 semanas quanto à produção dos benzopiranos durante o curso de desenvolvimento vegetativo e reprodutivo.

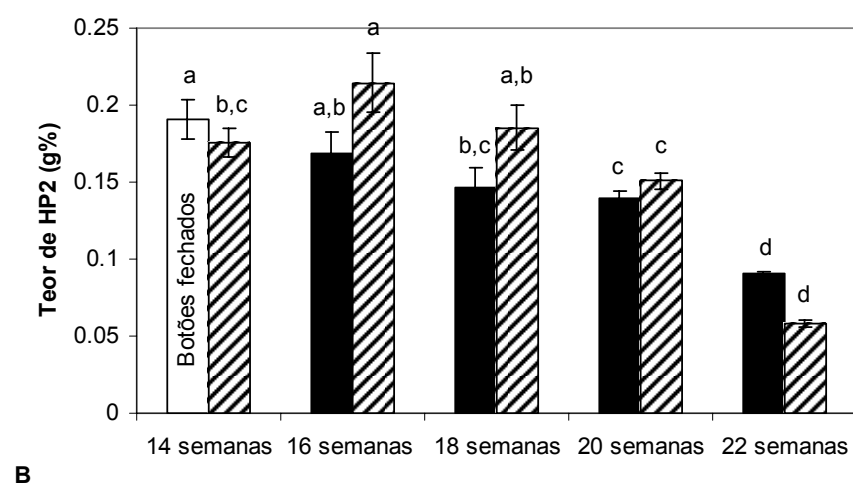
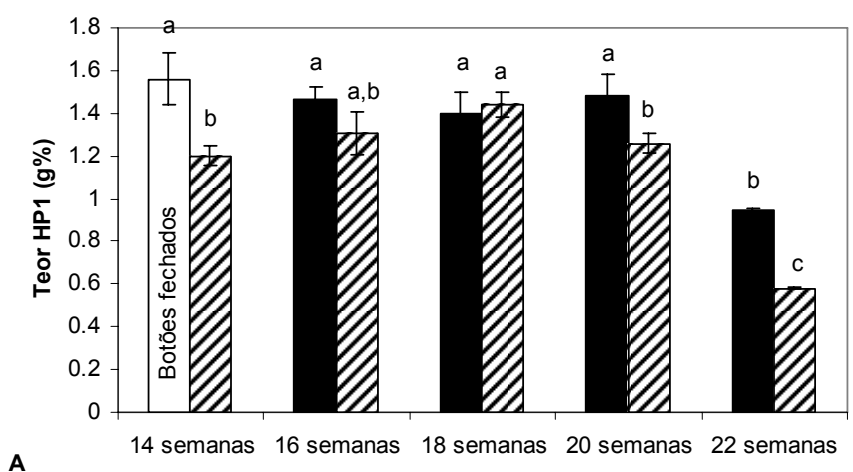
O acúmulo de benzopiranos ao longo do desenvolvimento do vegetal apresentou um padrão diferenciado para HP1, HP2 e HP3 (figura 4.6). Na etapa de 14 semanas não havia flores abertas, de modo que utilizou-se os botões florais fechados para medidas de comparação.

Como é possível ser observado na figura 4.6 A, não houve diferença significativa na produção de HP1, avaliada em flores totais, durante o período de 14 ($1,56 \pm 0,11$ g %) a 20 ($1,48 \pm 0,10$ g %) semanas. No entanto, evidenciou-se um decaimento no teor desta substância na vigésima segunda semana ($0,95 \pm 0,007$ g %). Considerando as partes vegetativas, observou-se um pico de produção de HP1 ($1,44 \pm 0,06$ g%) na décima oitava semana de aclimatização.

Considerando as flores totais, o período de aclimatização de 14 semanas foi favorável ao acúmulo de HP2 (figura 4.6 B), provavelmente devido ao maior conteúdo dessa substância nos botões florais fechados (figura 4.9). Ao longo do período de aclimatização avaliado, observou-se um declínio na produção dessa substância, o que pode ser explicado pelo aumento na proporção de botões florais abertos e flores

(capítulo 3, item 4.5.4.1, figura 3.14), que apresentam menores teores de HP2. A maior produção desse benzopirano nas partes vegetativas ($0,21 \pm 0,02$ g%) ocorreu após 16 semanas de aclimatização.

O benzopirano HP3 apresentou a maior diferença observada na produção em flores totais e partes vegetativas (figura 4.6 C). O acúmulo dessa substância foi consideravelmente superior nas flores totais, em relação às partes vegetativas. No entanto, considerando o período de aclimatização avaliado, a maior produção de HP3 foi verificada entre a décima oitava e vigésima semana, tanto nas flores ($0,96 \pm 0,04$ g % e $0,99 \pm 0,02$ g %, respectivamente) quanto nas partes vegetativas ($0,30 \pm 0,01$ g % e $0,2916 \pm 0,004$ g %, respectivamente).



Continuação da figura 4.6

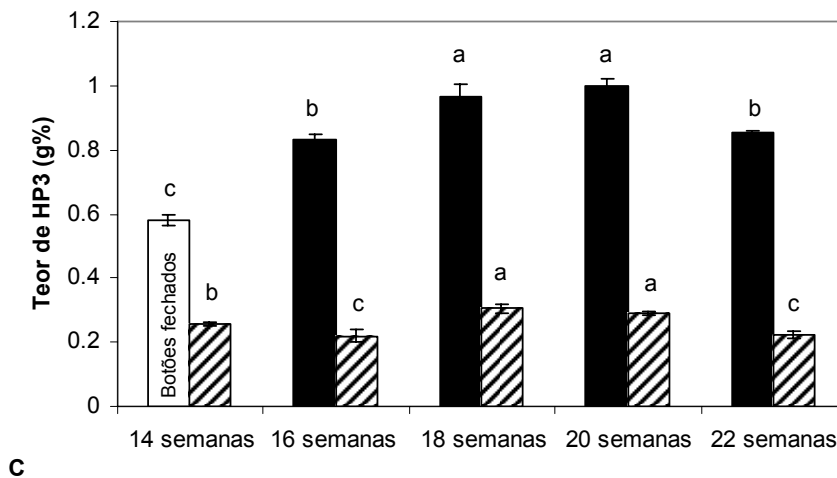


Figura 4.6: Teor de benzopiranos HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C) em extrato *n*-hexânico de flores totais e partes vegetativas de *H. polyanthemum* aclimatizada em diferentes épocas de desenvolvimento. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c,d} Considerando a mesma porção do vegetal, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).
 □ Botões fechados; ■ Flores totais; ▨ Partes vegetativas

Avaliando-se o teor de benzopiranos totais no extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum* aclimatizada verificou-se uma produção crescente desses compostos ao longo de 18 e 20 semanas de aclimatização, nas partes vegetativas e reprodutivas do vegetal, respectivamente, ocorrendo uma diminuição dos teores dos metabólitos tanto nas partes vegetativas quanto nas partes reprodutivas do vegetal na semana subsequente (figura 4.7).

H. perforatum produz os metabólitos secundários de interesse farmacêutico em maior concentração nas flores do que nas folhas (SOUTHWELL & CAMPBELL, 1991; SOUTHWELL & BOURKE, 2001; ÇIRAK *et al.*, 2006), da mesma maneira que em *H. polyanthemum*, onde verificou-se que após 18 semanas de cultivo a campo as plantas produziram teores totais de 1,93 g % e 2,51 g % de benzopiranos nas partes vegetativas e reprodutivas do vegetal, respectivamente.

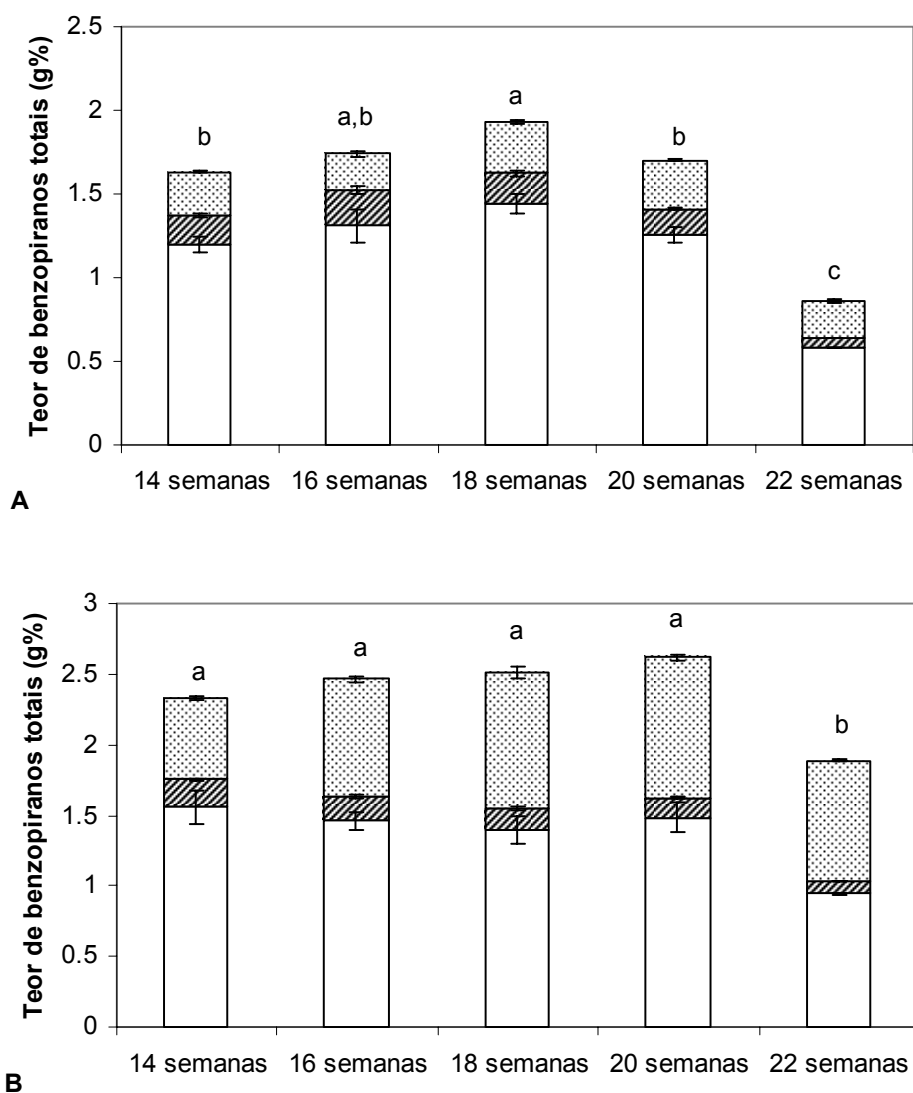


Figura 4.7: Teor de benzopiranos totais em extrato *n*-hexânico de partes vegetativas (A) e flores totais (B) de *H. polyanthemum* aclimatizada em diferentes épocas de desenvolvimento. Os dados representam a média \pm dp. Considerando a mesma variável, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$). (□HP1; ▨HP2; ▩HP3).

A acumulação dos três benzopiranos durante o curso de desenvolvimento floral mostrou um padrão diferenciado (figura 4.8). Enquanto os maiores teores de HP1 e de HP2 foram evidenciados nos botões florais fechados, para HP3 a maior concentração foi apresentada durante o fenecimento floral.

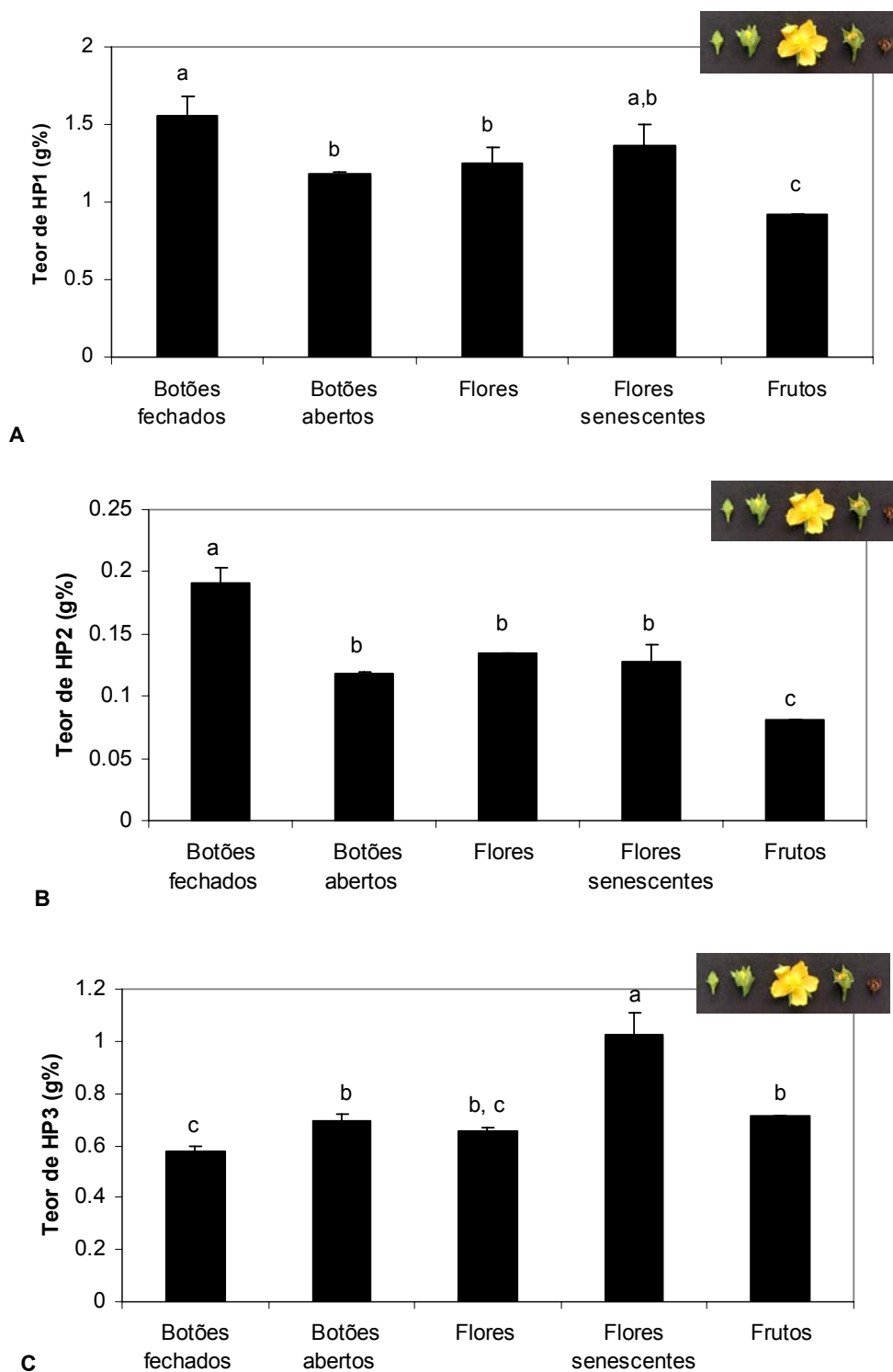


Figura 4.8: Teor de benzopiranos HP1 (A), HP2 (B) e HP3 (C) em extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum* aclimatizada em diferentes estágios de desenvolvimento reprodutivo. Os dados representam a média \pm dp. Considerando a mesma variável, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).

Considerando o conteúdo total dos três benzopiranos nos diferentes estágios reprodutivos de *H. polyanthemum*, verifica-se que a maior produção destas substâncias é evidenciada durante os botões florais fechados (com maior acúmulo de HP1) e flores senescentes (com maior acúmulo de HP3) (figura 4.9). HP1 caracteriza-se por ser o único benzopirano, dentre os três produzidos por *H. polyanthemum*, de coloração branca, enquanto HP3 apresenta uma coloração amarela intensa. O maior acúmulo de HP3 nas flores senescentes poderia, então, contribuir para a coloração destas, uma vez que de todos os estágios florais avaliados, estas são as que apresentam a maior intensidade de cor amarela observada. Acredita-se, ainda, que esses compostos, juntamente com derivados de floroglucinol, atuem como guias marcadoras para a polinização por insetos (NÖR *et al.*, 2007).

O menor conteúdo de benzopiranos totais foi verificado durante o estágio de frutificação, assim como previamente relatado para o conteúdo de hipericina em *H. aviculariifolium*, *H. maculatum*, *H. perforatum* e *H. pruinatum* (KIREEVA & SHARANOV, 1999; ÇIRAK *et al.*, 2006).

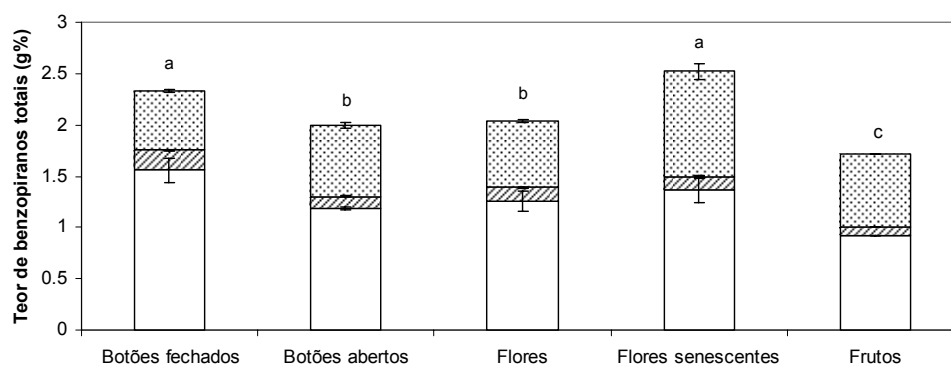


Figura 4.9: Teor de benzopiranos totais em extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum* aclimatizada em diferentes estágios reprodutivos. Os dados representam a média \pm dp. Considerando a mesma variável, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).
 □ HP1; ▨ HP2 e ▩ HP3

Alguns trabalhos vem sendo desenvolvidos com espécies de *Hypericum* com o intuito de relacionar a produção de metabólitos secundários com diferentes estágios

ontogênicos de desenvolvimento das plantas (BUTER *et al.*, 1998; KIREEVA & SHARANOV, 1999; TEKEL'OVÁ *et al.*, 2000; ABREU *et al.* 2004; ÇIRAK *et al.*, 2006).

Estudos com *H. brasiliense* avaliaram a produção de metabólitos secundários em diferentes estágios de desenvolvimentos vegetativo, florescimento e frutificação desta planta, bem como em diferentes partes do vegetal. Os autores demonstraram que ocorreu uma acumulação preferencial de substâncias, dependendo do estágio de desenvolvimento. Enquanto a maior concentração de compostos fenólicos (1,5-dihidroxi-xantona, isouliginosina B, rutina e quercetina) foi encontrada durante o estágio de florescimento, a de terpenóides (ácido betulínico) foi durante a frutificação (ABREU *et al.* 2004).

Considerando o conteúdo de hipericinas em diferentes estágios de desenvolvimento ontogênicos, verifica-se um aumento gradual em correlação com o desenvolvimento e florescimento, nas espécies *H. aviculariifolium*, *H. maculatum*, *H. perforatum* e *H. pruinatum* (KIREEVA & SHARANOV, 1999 TEKEL'OVÁ *et al.*, 2000; ÇIRAK *et al.*, 2006).

O máximo conteúdo de taninos em *H. perforatum* foi observado durante o estágio vegetativo, declinando com o florescimento. No entanto, em *H. maculatum* o teor de taninos aumentou com o progresso da fase vegetativa à fase de florescimento (KIREEVA & SHARANOV, 1999). Segundo TEKEL'OVÁ e colaboradores (2000), em *H. perforatum*, foi demonstrada maior concentração de hiperforina nos frutos imaturos. Considerando os flavonóides, foi demonstrado um aumento nos teores dessas substâncias desde botões florais pequenos até flores abertas.

Considerando o peso seco de cada órgão individual (capítulo 3, item 4.5.4.1, figura 3.16) a maior massa é evidenciada para as flores abertas, cujo peso seco médio é de $3,68 \pm 0,5$ mg, seguida de flores senescentes ($3,14 \pm 0,8$ mg). O menor peso seco observado foi para botões fechados ($1,84 \pm 0,5$ mg). Nesse sentido, cabe ressaltar que embora os botões fechados apresentem maiores teores de HP1 e de HP2, esses são

os que apresentam menor massa individual, de modo que, visando a obtenção de benzopiranos, acredita-se que a melhor época para a coleta destas plantas seja aquela onde a maior proporção de flores (abertas ou senescentes) esteja presente. No entanto, estudos para avaliar a produção de outros metabólitos de interesse, tal como o derivado de floroglucinol uliginosina B, são necessários para avaliar o período ideal para coleta de *H. polyanthemum*. A proporção de diferentes tecidos vegetais pode afetar a eficácia de preparações de *H. perforatum*, como o percentual de flores e frutos presentes em produtos comerciais, onde é possível variações que abrangem 0 a 50 % destas partes reprodutivas, dentro de diferentes etapas de desenvolvimento do vegetal (MURCH *et al.*, 2002).

O teor dos benzopiranos nas partes vegetativas e flores totais de *H. polyathemum* aclimatizada durante o período de 18 semanas, considerando o tempo de manutenção *in vitro* (8 ou 12 semanas) apresentou diferenças significativas (figura 4.10). A produção de HP1, HP2 e de HP3 foi consideravelmente superior nas partes vegetativas e flores totais de plantas transferidas para condição *ex vitro* após 2 meses de manutenção *in vitro*. Embora tenha sido observado que plântulas mantidas no mesmo meio de cultura por 3 meses apresentaram a maior produção de benzopiranos, os resultados aqui apresentados indicam a influência da manutenção de um mês extra sob cultivo *in vitro* nas plantas aclimatizadas. Entretanto, deve-se considerar a maior biomassa obtida nas plantas que foram mantidas *in vitro* por 3 meses (capítulo 3, item 4.5.4, figura 3.13) e salientar que foi observada uma variação de temperatura durante o período de cultivo a campo. Enquanto para plantas mantidas *in vitro* por 12 semanas verificou-se mínimas de 18 ± 4 °C e máximas de 28 ± 8 °C, para plantas mantidas *in vitro* por 8 semanas foi registrado mínimas de 14 ± 4 °C e máximas de 24 ± 5 °C. Nesse sentido, estudos posteriores com avaliações em diferentes épocas do ano são necessários para a conclusão desses resultados.

A subcultura de material micropropagado para meio nutriente fresco é uma prática importante para a manutenção das culturas, uma vez que, com o passar do tempo, os nutrientes do meio são gradualmente consumidos e, ao mesmo tempo,

ocorre uma diminuição da umidade relativa no ambiente de cultivo, levando à perda de água no meio de cultura (ROUT *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que as plântulas mantidas sob 3 meses *in vitro* apresentaram evidências de uma condição estressante, demonstrada pela produção de antocianinas, que, apesar de não interferir na produção de benzopiranos na planta micropropagada, parece influenciar a produção desses após a transferência para condição *ex vitro*. Além disso, foi observado, ainda, que plantas mantidas *in vitro* por um período superior a 12 semanas mantiveram-se viáveis na etapa de transferência para substrato em ambiente climatizado, mas não resistiram às condições de cultivo a campo.

Além disso, o estágio de desenvolvimento das plantas e as condições de crescimento podem influenciar de modo significativo nos fatores que determinam a qualidade da matéria-prima vegetal, tais como o teor de substâncias de interesse e acúmulo de biomassa. O metabolismo primário e secundário competem na sua biossíntese por precursores comuns, de modo que a concentração de metabólitos secundários pode ser alterado em resposta à estimulação ou restrição do metabolismo primário. Todas as classes de metabólitos secundários podem ser influenciadas por fatores bióticos e abióticos, tais como luz, fertilização, fenologia e estresse hídrico (GRAY *et al.*, 2003)

Estudos avaliando o efeito do estresse hídrico e de temperatura no conteúdo de constituintes ativos de *H. brasiliense* demonstraram que o estresse hídrico aumentou os níveis de todos os compostos analisados, particularmente compostos fenólicos. Por outro lado, a resposta a diferentes temperaturas variou de acordo com o produto avaliado e as plantas mantidas em câmeras de crescimento indicaram que uma baixa intensidade luminosa pode influenciar na produção dessas substâncias (ABREU & MAZZAFERA, 2005).

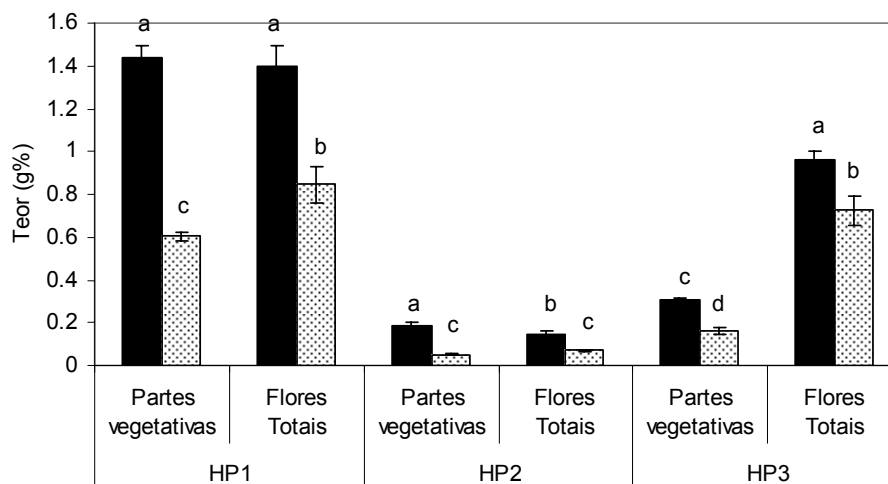


Figura 4.10: Teor de benzopiranos HP1, HP2 e HP3 em extrato *n*-hexânico de flores totais e partes vegetativas de *H. polyanthemum* com 18 semanas de aclimatização, considerando o período de cultivo *in vitro*. Os dados representam a média \pm dp. ^{a,b,c,d} Considerando o mesmo benzopirano, diferentes letras são significativamente diferentes entre si (ANOVA seguida do teste de Tukey; $p < 0,05$).
 (■ 2 meses de cultivo *in vitro* antes do transplântio; ▨ 3 meses de cultivo *in vitro* antes do transplântio)

Essas variações encontradas na produção de metabólitos secundários por *H. polyanthemum* micropropagada, aclimatizada e desenvolvida a campo pode ser explicada por muitos fatores, que vão desde a regulação endógena de processos fisiológicos até características ambientais de cultivo (ABREU *et al.* 2004; ÇIRAK *et al.*, 2006).

BUTER e colaboradores (1998) avaliando parâmetros bioquímicos e agrônômicos de sete linhagens de *H. perforatum* cultivadas em três diferentes localidades, por dois anos consecutivos, observaram uma influência significativa do ambiente e de fatores genéticos na época de florescimento, comprimento das plantas e produção de biomassa. Além disso foram observadas variações no teor de metabólitos secundários (hiperforina, hipericina, *pseudo*-hipericina, quercetina, hiperosídeo, rutina, amentoflavona e biapigenina) em flores. Segundo os autores, as condições climáticas, os diferentes estágios fisiológicos das plantas avaliadas, bem como a influência genética, poderiam contribuir para as variações encontradas na produção de metabólitos secundários.

Estudos avaliando a produção *in vitro* de *H. perforatum* demonstraram que plântulas derivadas de material proveniente de cultivo a campo ou de cultivo controlado em casa de vegetação são boas fontes para obtenção desses metabólitos secundários. No entanto, enquanto a produção de hipericinas foi seis vezes superior em plântulas mantidas *in vitro*, os teores de hiperforina foram inferiores aos daqueles encontrados em plantas cultivadas a campo ou em casa de vegetação (KIRAKOSYAN *et al.*, 2003; KIRAKOSYAN *et al.*, 2004).

Da mesma maneira, este trabalho demonstra que o material proveniente de cultivo *in vitro* e aclimatização de *H. polyanthemum* apresenta-se como uma fonte sustentada para a obtenção de HP1, HP2 e HP3. Parte dos resultados aqui apresentados estão publicados no periódico *Acta Physiologiae Plantarum*, em artigo intitulado “Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*” (Anexo IX, página 325).

5.6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no estudo descrito neste capítulo 4 permitem concluir que:

√ Os parâmetros de performance analítica avaliados para a quantificação de HP1, HP2 e HP3 no extrato *n*-hexânico de *H. polyanthemum*, através de CLAE, demonstraram resultados coerentes com os exigidos pela legislação vigente, considerando a técnica validada.

√ HP1, HP2 e HP3 acumulam-se nas partes vegetativas e flores de *H. polyanthemum*, sendo os teores variáveis em função do estágio de desenvolvimento do vegetal

√ Nas raízes de *H. polyanthemum*, ocorre produção apenas de HP3, independente do estágio de desenvolvimento da planta.

√ O teor de benzopiranos em plantas cultivadas a campo é influenciado por fatores geográficos e ambientais, bem como estágio de desenvolvimento apresentado na época de coleta.

√ Plântulas de *H. polyanthemum* produziram benzopiranos nos meios de cultura MS 25 %, MS 100 % e M Δ , apresentando variações no acúmulo de HP1, HP2 e HP3, sob a influência da concentração de sais do meio de cultivo. A produção dessas substâncias foi afetada consideravelmente com o cultivo em meio MS 100%, onde houve uma redução no teor dos três benzopiranos.

√ No estudo da cinética de produção de benzopiranos *in vitro*, verificou-se que a maior produção de HP1, HP2 e de HP3 ocorreu nas plântulas cultivadas *in vitro* por 12 semanas associada ao pico de produção de biomassa observada neste mesmo período.

√ O acúmulo de benzopiranos em *H. polyanthemum* aclimatizada apresentou um padrão diferenciado para HP1, HP2 e HP3 durante o período de 14 a 22 semanas sob condição *ex-vitro*. Considerando as flores totais, a produção de HP1 deu-se de modo constante no período de 14 a 20, observando-se um decaimento no teor desta substância na vigésima segunda semana. O período de aclimatização de 14 semanas foi favorável ao acúmulo de HP2 nas flores totais, ocorrendo um declínio no teor desse benzopirano nas semanas subseqüentes. O acúmulo de HP3 foi superior no período de aclimatização de 18 a 20 semanas, tanto nas flores quanto nas partes vegetativas. Para HP1 e HP2, observou-se maior produção na décima oitava semana e décima sexta semanas de aclimatização, respectivamente.

√ Uma produção crescente no teor de benzopiranos totais foi observada ao longo de 18 e 20 semanas de aclimatização de *H. polyanthemum*, nas partes vegetativas e reprodutivas do vegetal, respectivamente, ocorrendo uma diminuição nos teores dos metabólitos na semana subseqüente.

√ A acumulação dos três benzopiranos durante o curso de desenvolvimento floral mostrou um padrão diferenciado, onde os maiores teores de HP1 e de HP2 foram evidenciados nos botões florais fechados, e para HP3, durante o fenecimento floral. O menor conteúdo de benzopiranos totais foi verificado durante a frutificação.

√ Visando a obtenção de benzopiranos, acredita-se que a melhor época para a coleta de *H. polyanthemum*, seja aquela onde a maior proporção de flores (abertas ou senescentes) esteja presente.

√ As variações encontradas na produção de metabólitos secundários por *H. polyanthemum* micropropagada, aclimatizada e desenvolvida a campo pode ser explicada por fatores como a regulação endógena de processos fisiológicos e características ambientais de cultivo.

√ O material proveniente de cultivo *in vitro* e aclimatização de *H. polyanthemum* apresenta-se como uma fonte sustentada para a obtenção de HP1, HP2 e HP3.

6. DISCUSSÃO GERAL

Motivados pelas evidências a respeito da eficácia de fitoterápicos obtidos de *H. perforatum* e da crescente difusão de seu uso, muitos trabalhos têm sido desenvolvidos visando a análise fitoquímica e biológica de diversas espécies desse gênero.

Desta forma, este trabalho vem complementar o estudo das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul, iniciados nesta Faculdade no ano 2000. Durante este período, muitos trabalhos foram publicados, decorrentes de duas teses de doutorado e seis dissertações de mestrado.

Como já bastante discutido durante o desenvolvimento deste trabalho, a fitoquímica das espécies de *Hypericum* é marcada pela ocorrência de compostos fenólicos, incluindo desde substâncias apolares (como benzopiranos, benzofenonas, xantonas e floroglucínóis) até compostos polares (como ácidos fenólicos, flavonóides e taninos) (ROCHA *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995; FERRAZ *et al.*, 2001; FERRAZ *et al.*, 2002a; DALL'AGNOL *et al.*, 2003; NÖR *et al.*, 2004; BERNARDI *et al.*, 2005).

De fato, o trabalho aqui apresentado confirma a forte tendência ao acúmulo de substâncias fenólicas no gênero *Hypericum*. Das espécies avaliadas, *H. ternum* e *H. myrianthum*, foram isolados das frações apolares os derivados de floroglucinol uliginosina B e japonicina A, bem como os flavonóides quercetina, 3,7-dimetil-quercetina, 3-metil-quercetina, guaijaverina, isoquercitrina e hiperosídeo, o biflavonóide 13,118-biapigenina e o ácido fenólico ácido 5-O-cafeoil-1-metoxi-quínico, todos provenientes das frações polares.

Derivados de floroglucinol são substâncias muito comuns nesse gênero. No entanto, dentre as espécies de *Hypericum* nativas do estado não se verifica derivados poliprenilados semelhantes a hiperforina e *ad*-hiperforina. Dentre essas, é comum a ocorrência de derivados diméricos contendo uma unidade floroglucinol conjugada ao ácido filicínico. Esse grupo de substâncias apresenta uma pequena dispersão no gênero, sendo relatado apenas para espécies pertencentes às seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, das quais fazem parte as espécies de *Hypericum* nativas do Brasil,

podendo-se inferir uma significância taxonômica para esses produtos (NÖR, 2006).

Da mesma maneira, observa-se uma preponderância de flavonóis em *Hypericum*, principalmente de derivados da quercetina (CALIE *et al.*, 1983), sendo hiperosídeo encontrado com grande frequência (CROCKETT *et al.*, 2005). No entanto, apesar da ocorrência destes compostos entre as espécies do gênero, essa característica parece não ter relevância quimiotaxonômica, quando consideradas evidências morfológicas e moleculares (CROCKETT *et al.*, 2005).

Flavonóides, assim como compostos polifenólicos em geral, são caracterizados por apresentarem potencial antioxidante (ZHENG & WANG, 2001; PAREJO *et al.*, 2003; CAI *et al.*, 2004; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; ŠKERGET *et al.*, 2004; KATALINIC *et al.*, 2006), o que motivou a avaliação de extratos, frações e substâncias isoladas de quatro espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul quanto à capacidade de neutralizar radicais livres. Foi observado que as espécies apresentam elevados teores de fenólicos totais, principalmente nos extratos brutos e frações metanólicas, onde compostos polifenólicos como taninos, flavonóides e ácidos fenólicos apresentam-se como os componentes majoritários (DALL'AGNOL *et al.*, 2003). De fato, em relação às frações *n*-hexânicas avaliadas, extratos brutos e frações metanólicas, caracterizadas por uma grande proporção de compostos fenólicos polares, apresentaram a maior capacidade em neutralizar radicais DPPH*. Da mesma maneira, foi demonstrada maior atividade antioxidante neste ensaio para os flavonóides avaliados.

O estudo da atividade antioxidante de espécies de *Hypericum* nativas do estado apresentadas neste trabalho, caracteriza-se por uma avaliação preliminar do potencial destas espécies na neutralização de radicais livres. Devido à complexidade dos processos de oxidação e de antioxição, são necessários métodos complementares que expressem o perfil antioxidante de uma amostra de forma mais completa (ZOU *et al.*, 2004).

Considerando os promissores resultados biológicos revelados para extratos e

substâncias isoladas das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul evidencia-se a necessidade de aprofundar os estudos iniciados, nas diferentes atividades biológicas avaliadas. No entanto, estudos sobre o potencial medicinal de uma espécie demanda o contínuo suprimento de material botânico.

Em observações de campo, verifica-se que as espécies de *Hypericum* aqui estudadas ocorrem predominantemente em beiras de estrada, como planta ruderal, onde há a presença de luz. Este habitat é muito vulnerável à eliminação das plantas por roçadas constantes. Por outro lado, quando colhidos extrativamente, há o risco de comprometimento da qualidade, em função da deposição de poeira e de resíduos tóxicos, oriundos dos pneus e do escapamento de veículos que transitam nas estradas, ou de agroquímicos aplicados em lavoura, que acabam atingindo estas plantas.

A diversidade genética que estas espécies, por serem plantas silvestres, apresentam, bem como as potencialidades terapêuticas as caracterizam como espécies promissoras na indústria de fitoterápicos, de modo que o cultivo de modo controlado é de grande importância para obtenção de matéria-prima de alto padrão de qualidade e uniformidade.

Nesse sentido, o desenvolvimento de protocolos para micropropagação e cultivo de modo controlado apresentado para as espécies avaliadas nesse trabalho torna-se de grande importância para investigações futuras. O uso de plantas propagadas através do cultivo *in vitro* e aclimatização como fonte de matéria-prima para estudos fitoquímicos e farmacológicos vêm aumentando consideravelmente (ROUT *et al.*, 2000).

Esta técnica apresenta vantagens, quando comparada aos métodos convencionais de propagação, incluindo a produção de um grande número de plantas em um curto período de tempo e em espaço reduzido, além de permitir a produção contínua durante o ano sem a influência de variações sazonais. Estas plantas constituem-se então como fontes renováveis permitindo o suprimento sem a

necessidade de reaccessar a fonte de material vegetal em seu *habitat* natural (ROUT *et al.*, 2000).

Dentre as espécies de *Hypericum* nativas do Estado, *H. polyanthemum* se destaca devido ao potencial terapêutico, demonstrado por extratos apolares e por substâncias isoladas desta planta. Em função da necessidade de padronizar o material vegetal proveniente desta espécie foi realizada uma avaliação mais detalhada sobre o cultivo *in vitro* e aclimatização desta espécie, bem como sobre a produção de benzopiranos HP1, HP2 e HP3.

Verificou-se a influência de muitos fatores sobre o acúmulo de benzopiranos nos diferentes estágios de desenvolvimento avaliados em *H. polyanthemum*. Considerando a produção de metabólitos secundários em espécies de *Hypericum*, muitos trabalhos demonstram variações no acúmulo de compostos bioativos, decorrentes de coletas em diferentes regiões, épocas ou horários (BÜTER *et al.*, 1998; ÇIRAK *et al.*, 2006; COUCEIRO *et al.*, 2006), de diferentes germoplasmas (KOSUTH *et al.*, 2003; KORNFELD *et al.*, 2007), de diferentes estágios de desenvolvimento ontogenético (BUTER *et al.*, 1998; KIREEVA & SHARANOV, 1999; TEKEL'OVÁ *et al.*, 2000; ABREU *et al.*, 2004; ÇIRAK *et al.*, 2006), bem como de diferentes parâmetros físicos e químicos impostos às condições de cultivo (BRISKIN *et al.*, 2000; SCHMIDT *et al.*, 2000; MURCH *et al.*, 2003; ZOBAYED *et al.*, 2003; ABREU & MAZZAFERA, 2005; TIRILLINI *et al.*, 2006).

7. CONCLUSÕES GERAIS

No decorrer deste trabalho, verificou-se que as espécies de *Hypericum* avaliadas apresentam um acúmulo de compostos fenólicos de diferentes polaridades, evidenciado tanto pelas substâncias isoladas de *H. ternum* e *H. myrianthum*, quanto pela quantificação de fenólicos totais presentes nas frações de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*. A presença desses compostos fenólicos contribui para a atividade antioxidante demonstrada por extratos e frações purificadas destas quatro espécies.

Considerando a manutenção sustentada das espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul, o cultivo *in vitro* e aclimatização apresentam-se como uma alternativa interessante aos métodos convencionais de produção de biomassa para extração de metabólitos secundários bioativos.

Além disso, fatores genéticos e sazonais afetam a produção de biomassa, bem como a produção de metabólitos secundários em *H. polyanthemum*. Em função disso, acredita-se que a disponibilidade de material genético superior, juntamente com métodos agrotecnológicos de melhoramento, tornam-se um fator importante para uma futura produção a campo bem-sucedida.

8. REFERÊNCIAS

- ABREU I. N.; PORTO, A. L. M.; MARSAIOLI, A. J.; MAZZAFERA, P. Distribution of bioactive substances from *Hypericum brasiliense* during plant growth. **Plant Science**, v. 167, p. 949-954, 2004.
- ABREU I. N.; MAZZAFERA, P. Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 241-248, 2005.
- AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEM, A.; MERLEVEDE, W.; DE WITTE, P. A. M. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 221-241, 2002.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. Other Flavonoids. In: AGRAWAL, P. K. (Ed.). **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V., 1989a. Cap. 5. p. 236-282.
- AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. Flavonoid Glycosides. In: AGRAWAL, P. K. (Ed.). **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. The Netherlands: Elsevier Science Publisher B. V., 1989b. Cap. 6. p. 283-294.
- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S.; BANSAL, M. C. Flavonoids. In: Agrawal, P. K. (Ed.). **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V., 1989. Cap. 3. p. 95-182.
- AKOWUAH, G. A.; ZHARI, I.; NORHAYATI, I.; SADIKUN, A.; KHAMSAH, S.M. Sinensetin, eupatorin, 30-hydroxy-5, 6, 7, 40-tetramethoxyflavone and rosmarinic acid contents and antioxidative effect of *Orthosiphon stamineus* from Malaysia. **Food Chemistry**, v. 87, p. 559-566, 2004.
- AMIC, D.; DAVIDOVIC-AMIC, D.; BESLO, D.; TRINAJSTIC, N. Structure radical scavenging activity relationships of flavonoids. **Croatica Chemica Acta**, v. 76, n. 1, p. 55-61, 2003.
- ARREDONDO, M. F.; BLASINA, F.; ECHEVERRY, C.; MORQUIO, A.; FERREIRA, M.; ABIN-CARRIQUIRY, J. A.; LAFON, L.; DAJAS, F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 13-20, 2004.
- ATHANASAS, K.; MAGIATIS, P.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D. Hyperjovinols A and B: Two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 6, p. 973-977, 2004.
- AXARLIS, S.; MENTIS, A.; DEMETZOS, C.; MITAKU, S.; SKALTSOUNIS, A. L.; MARCELOS, M.; MALAMAS, M. Antiviral *in vitro* activity of *Hypericum perforatum* L. extract on the human cytomegalovirus (HCMV). **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 507-511, 1998.
- BAIS, H. P.; WALKER, T. S.; MACGREW, J. J.; VIVANCO, J. M. Factors affecting the growth of

cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort) and production of hypericin. **In Vitro Growth & Development - Plant**, v. 38, p. 1-9, 2002.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **The Journal of Pharmacy & Pharmacology**, v. 53, n. 5, p. 583-600, 2001.

BARRUETO CID, L. P. A propagação *in vitro* de plantas. O que é isso? Cultura de tecidos vegetais - uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano III, n. 19, p. 16-21, 2001.

BARUAH, A.; SARMA, D.; SAUD, J. SINGH, R. S. In vitro regeneration of *Hypericum patulum* Thunb. – a medicinal plant. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 39, n. 9, p. 947-949, 2001.

BEAL M. F. Oxidatively modified proteins in aging and disease. **Free Radical Biology & Medicine** v. 32, n. 9, p., 797-803, 2002.

BENEDÍ J.; ARROYO, R.; ROMERO, C.; MARTÍN-ARAGÓN, S.; VILLAR, A. M. Antioxidant properties and protective effects of a standardized extract of *Hypericum perforatum* on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in PC12 cells. **Life Sciences**, v. 75, n. 10, p. 1263-1276, 2004.

BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthonenes from Guttiferae. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 967-998, 1989.

BERGHÖFER, R.; HÖLZL, J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*: Part 1. Isolation of 13,118-biapigenin. **Planta Medica**, v. 53, p. 216-217, 1987.

BERNARDI, A. P. M.; 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. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 784-786, 2005.

BHOJWANI, S. S.; RAZDAN, M. K. **Plant tissue culture: theory and practice**. 6th ed. The Netherlands: Elsevier Science Publishers B. V., 1992.

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

BILICI, M.; EFE, H.; KOROGLU, M. A.; UYDU, H. A.; BEKAROGLU, M.; DEGER, O. Antioxidative enzyme activities and lipid peroxidation in major depression: alterations by antidepressant treatments. **Journal of Affective Disorders**, v. 64, n. 1, p. 43-51, 2001.

BLAKESLEY, D.; CONSTANTINE, D. Uptake and metabolism of 6-benzyladenine in shoot

cultures of a range of species. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 28, p. 183-186, 1992.

BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P. *Hypericum perforatum*. **Fitoterapia**, v. 66, p. 43-68, 1995.

BONDAREV, N.; RESHETNYAK, O.; NOSOV, A. Effects of nutrient medium composition on development of *Stevia rebaudiana* shoots cultivated in the roller bioreactor and their production of steviol glycosides. **Plant Science**, v. 165, n. 4, p. 845-850, 2003.

BOTTA, B.; SILVESTRINI, A.; VITALI, A.; DELLE MONACHE, G. Cultura de células vegetais: doze anos de experiência. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). **Plantas Mediciniais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó:Argos, 2001. Cap. 10. p. 353-379.

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.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v. 161, p. 839-851, 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. D.O.U. 02 junho 2003.

BRISKIN, D. P.; LEROY, A.; GAWIENOWSKI, M. C. Influence of nitrogen on the production of hypericins by St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 413-420, 2000.

BRISKIN, D. P.; GAWIENOWSKI, M. C. Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39, p. 1075-1081, 2001.

BROLIS, M.; GABETTA, B.; FUZZATI, N.; PACE, R.; PANZERI, F.; PETERLONGO, F. Identification by high-performance liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and quantification by high-performance liquid chromatography-UV absorbance detection of active constituents of *Hypericum perforatum*. **Journal of Chromatography A**, v. 825, n. 1, p. 9-16, 1998.

BÜTER, B.; ORLACCHIO, C.; SOLDATI, A.; BERGER, K. Significance of genetic and environmental aspects in the field cultivation of *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 431-437, 1998.

BUTTERWECK, V.; PETEREIT, F.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A. Solubilized hypericin and pseudo-hypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v. 64, p. 291-294, 1998.

BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v. 66, n. 1, p. 3-6, 2000.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.

CAKIR, A.; MAVI, A.; YILDIRIM, A.; DURU, M. E.; HARMANDAR, M.; KAZAZ, C. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from the aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity-guided fractionation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 73-83, 2003.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª ed. Brasília: Embrapa- SPI /Embrapa- CNPH, 1998. Vol. 1, p. 87-132.

CALIE, P. J.; SCHILLING, E. E.; WEBB, D. H. Flavonoid chemistry of the generic segregates *Ascyrum* and *Crookea* of *Hypericum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 11, n. 2, p. 107-109, 1983.

CAO, G.; ALESSIO, H.; CUTLER, R. Oxygen radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 303, 1993.

CARDONA, M. L.; FERNANDEZ, I.; PEDRO, J. R.; SERRANO, A. Xanthenes from *Hypericum reflexum*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 9, p. 3003-3006, 1990.

CARDOSO, M. A.; DE OLIVEIRA, D. E. Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 44, p. 91-94, 1996.

CARVALHO, L.; AMÂNCIO, S. Effect of *ex vitro* conditions on growth and acquisition of autotrophic behavior during the acclimatization of chestnut regenerated *in vitro*. **Scientia Horticulturae**, v. 95, p. 151-164, 2002.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, 2003. Cap. 20. p. 519-535.

CELLÁROVÁ, E.; KIMÁKOVÁ, K.; BRUTOVSKÁ, R. Multiple shoot formation and phenotypic changes of R₀ regenerants in *Hypericum* L. **Acta biotechnologica**, v. 12, p. 445-452,

1992.

CELLÁROVÁ, E.; DAXNEROVÁ, Z.; KIMÁKOVÁ, K.; HALUSKOVÁ, J. The variability of the hypericin content in the regenerants of *Hypericum perforatum*. **Acta biotechnologica**, v. 14, p. 267-274, 1994.

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.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. An introduction to free radical biochemistry. **British Medical Bulletins**, v. 49, p. 481-493, 1993.

CICCARELLI, D.; ANDREUCCI, A. C.; PAGNI, A. M. Translucent glands and secretory canals in *Hypericum perforatum* L. (Hypericaceae): morphological, anatomical and histochemical studies during the course of ontogenesis. **Annals of Botany**, v. 88, p. 637-644, 2001.

ÇIRAK C.; SAGLAM, B.; AYAN, A. K.; KEVSEROGLU, K. Morphogenetic and diurnal variation of hypericin in some *Hypericum* species from Turkey during the course of ontogenesis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 1-13, 2006.

CONCEIÇÃO, L. F. R.; FERRERES, F.; TAVARES, R. M.; DIAS, A. C. P. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. **Phytochemistry**, v. 67, p. 149-155, 2006.

CONFORTI, F.; STATTI, G. A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v. 73, p. 479-483, 2002.

COOK, N. C.; SAMMAN, S. Flavonoids - Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 66-74, 1996.

COUCEIRO, M. A.; AFREEN, F. D. E.; ZOBAYED, S. M. A.; KOZAI, T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of St. John's wort: Effects of harvesting time, temperature and germoplasm. **Plant Science**, v. 170, p. 128-134, 2006.

COULADIS, M.; BAZIOU, P.; VERYKOKIDOU, E.; LOUKIS, A. Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 769-770, 2002a.

COULADIS, M.; BADISA, R. B.; BAZIOU, P.; CHAUDHURI, S. K.; PILARINO, E.; VERYKOKIDOU, E.; HARVALA, C. Antioxidant and cytotoxic activities of *Hypericum* sp. on brine shrimps and human cancer cell lines. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 719-722, 2002b.

CROCKETT, S. L.; SCHANEBERG, B.; KHAN I. A. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 479-485,

2005.

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.; 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, n. 4, p. 291-293, 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.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; BARANIAK, B. The antioxidant properties of alcoholic extracts from *Sambucus nigra* L. (antioxidant properties of extracts) **LWT – Food Science and Technology**, v. 39, n. 3, p. 308-315, 2006.

DE RIJK, M. C.; BRETILER, M. M. B.; DEN BREEIJEN, J. H.; LAUNER, L. J.; GROBBEE, D. E.; VAN DER MECHÉ, F. G. A.; HOFMAN, A. Dietary antioxidants and Parkinson's disease. The Rotterdam study. **Archives in Neurology**, v. 54, p. 762-765, 1997.

DÉCOSTERD, L. A.; STOECKLI-EVANS, H.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. A new antifungal chromene and a related dichromene from *Hypericum revolutum*. **Planta Medica**, v. 55, p. 429, 1986.

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

DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CICCIA, G. Total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of medicinal plants used in Southwest Amazonia (Bolivia and Peru). **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, p. 288-296, 1997.

DESMARCHELIER, C.; LISBOA ROMANO, R.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the 'Caatinga' region in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 69-77, 1999.

DESMARCHELIER, C.; CICCIA, G.; COUSSIO, J. Recent advances in the search for antioxidant activity in South American plants. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 22, p. 343-367, 2000.

- 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.
- DIAS, A. C. P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; FERRERES, F.; FERREIRA, M. F. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. **Plant Science**, v. 150, p. 93-101, 2000.
- DIAS, A. C. P.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B.; FERRERES, F.; FERREIRA, M. F. Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 7, p. 821-827, 2001.
- DINI, I.; TENORE, G. C.; DINI, A. Phenolic constituents of *Kancolla* seeds. **Food Chemistry**, v. 84, p.163-168, 2004.
- EL-SHERBINY, D. A.; KHALIFA, A. E.; ATTIA, A. S.; ELDESHARY, E. E. S. *Hypericum perforatum* extract demonstrates antioxidant properties against elevated rat brain oxidative status induced by amnesic dose of scopolamine. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 76, p. 525-533, 2003.
- ESPÍN, J. C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H. J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetables oils and oil fractions using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 648-656, 2000.
- EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E. A. Evaluation of total reactive antioxidant potential (trap) of tissue homogenates and their cytosols. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 388, p. 261-266, 2001.
- FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S. M. K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; NOR, C.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; SCHAPOVAL, E.; VON POSER, G. L.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 12, p. 236-240, 2005.
- FERRAZ, A. B. F., BORDIGNON, S. A. L., STAATS, C., SCHRIPSEMA, J., VON POSER, G. L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1227-1230, 2001.
- FERRAZ, A. B. F.; SCHRIPSEMA, J.; POHLMANN, A. R.; VON POSER, G. L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 989-991, 2002a.
- FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D. R. A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A. P.; VON POSER, G. L. Screening for the presence of hypericins in Southern Brazilian species of *Hypericum* (Guttiferae). **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 4, p. 294-297, 2002b.
- FERRAZ, A. B. F.; LIMBERGER, R. P.; BORDIGNON, S. A. L.; VON POSER, G. L.; HENRIQUES, A. T. Essential oil in composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. **Flavour**

and **Fragrance Journal**, v. 20, p. 335-339, 2005a.

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

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**, v. 76, n. 2, p. 210-215, 2005c.

FERREIRA, M. E.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da Cultura de Tecidos no Melhoramento Genético de Plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1ª ed. Brasília: Embrapa-SPI /Embrapa- CNPH, 1998. Vol. 1. p. 21-43.

FLICK, C. E.; EVANS, D. A.; SHARP, W. R. Organogenesis. In:EVANS, D. A.; SHARP, W. R.; AMMIRATO, P. V.; YAMADA, Y. (Eds.). **Handbook of Plant Cell Culture. Techniques for Propagation and Breeding**. New York:Macmillan, 1983. p. 13-81.

FRAISSE, D. ; HEITZ, A. ; CARNAT, A. ; CARNAT, A. P. ; LAMAISON, J. L. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 463-464, 2000.

FRANÇA, S. C. Abordagens biotecnológicas para a obtenção de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, 2003. Cap. 7. p. 123-146.

FRANKEL, E. N.; WATERHOUSE, A. L.; TEISSEDE, P. L. Principal phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 890-894, 1995.

FRITZ, D. Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum* Lam. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre: UFRGS, 2006.

GADZOVSKA, S.; MAURY, S.; OUNNAR, S.; RIGHEZZA, M.; KASCAKOVA, S.; REFREGIERS, M.; SPASENOSKI, M.; JOSEPH, C.; HAGÈGE, D. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* cultures. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 591-601, 2005.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspensions cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**, v. 50, p. 151-158, 1968.

GAMIOTEA-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.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1: The technology**. 2nd ed. Edington: Exegetics, 1993.

GEORGE, E. F.; SHERRINGTON, P. D. **Plant propagation by tissue culture: handbook and directory of commercial laboratories**. Eversley: Exegetics, 1984.

GNERRE, C.; VON POSER, G. L.; FERRAZ, A.; VIANA, V.; TESTA, B.; RATES, S. M. K. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. MICROPROPAGAÇÃO. IN: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. (Eds.). **Cultura de Tecidos e Transformação Genética de Plantas**. 1^a ed. Brasília: Embrapa- SPI /Embrapa- CNPH, 1998. v. 1., p. 183-260.

GRAY, D. E.; PALLARDY, S. G.; GARRETT, H. E.; ROTTINGHAUS, G. E. Acute drought stress and plant age effects on alkalamide and phenolic acid content in purple coneflower roots. **Planta Medica**, v. 69, p. 50-55, 2003.

GRONQUIST, M.; BEZZERIDES, A.; ATTYGALLE, A.; MEINWALD, J.; EISNER, M.; EISNER, T. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 98, n. 24, p.13745-13750, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Eds.). **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press: Oxford, 2001. 888p.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. Nature Publishing Group, 2001. p. 1-7.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 386-3874, 1991.

HANSEN, S. H.; JENSEN, A. G.; CORNETT, C.; BJORNSDOTTIR, I.; TAYLOR, S.; WRIGHT, B.; WILSON, I. D. High-Performance Liquid Chromatography On-Line Coupled to High-Field NMR and Mass Spectrometry for Structure Elucidation of Constituents of *Hypericum perforatum* L. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 22, p. 5235-5241, 1999.

HARBORNE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). **Methods in plant biochemistry (v.1) Plant Phenolics**. London: Academic Press Limited, 1989. Cap. 1. p. 1-27.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Flavone and flavonol glycosides. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. (Eds.). **The flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982. Cap. 5. p. 261-311.

HARBORNE, J. B. New naturally occurring plant polyphenols. In: **Polyphenolic phenomena**. Paris: Scalbert, INRA, 1993.

HARBORNE, J. B. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. 3^a ed. London: Chapman & Hall, 1998. 302p.

HEILMANN, J.; WINKELMANN, K.; STICHER, O. Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 202-206, 2003.

HEINONEN, I. M.; LEHTONEN, P. J.; HOPIA, A. Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n.1, p. 25-31, 1998.

HOBBS, A. St. John's wort-ancient herbal protector. **Pharmacy History**, v. 32, n. 4, p. 166, 1990.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. B. Absorption, metabolism, and health effects of dietary flavonoids in man. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 51, p. 305-310, 1997.

HRAZDINA, G. Anthocyanins. In: Harborne, J. B.; Mabry, T. J. (Eds). **The Flavonoids: Advances in Research**, Chapman & Hall, London, p. 135-189, 1982.

HU, L. H.; KHOO, C. W.; VITTAL, J. J.; SIM, K. Y. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 705-709, 2000.

HUNT, E. J.; LESTER, C. E.; LESTER E. A.; TACKETT, R. L. Effect of St. John's wort on free radical production. **Life Sciences**, v. 69, p. 181-190, 2001.

ICH. International Conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. Topic Q2B, 1996. ICH Steering Committee, 1996.

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.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S.; ISOI, K. A chromene from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1010-1011, 1990.

ISHIGURO, K.; FUKUMOTO, H.; NAKAJIMA, M.; ISOI, K. Xanthenes in cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 4, p. 839-840, 1993.

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; FUKUMOTO, H.; YAMAKI, M.; ISOI, K. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 469-471, 1994.

ISHIGURO, K.; NAKAJIMA, M.; FUKUMOTO, H.; ISOI, K. Co-occurrence of prenylated xanthenes and their cyclization products in cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 867-869, 1995.

ISHIGURO, K.; NAGAREYA, N.; SUITANI, A.; FUKUMOTO, H. A prenylated xanthone from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 6, p. 1065-1066, 1997.

ISHIGURO, K.; NAGAREYA, N.; FUKUMOTO, H. A phloroglucinol derivative from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1041-1043, 1998.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 145-150, 2005.

JANG, M.; LEE, T.; SHIN, M.; BAHN, G.; KIM, J.; SHIN, D.; KIM, E.; KIM, C. Protective effect of *Hypericum perforatum* Linn (St. John's wort) against hydrogen peroxide-induced apoptosis on human neuroblastoma cells. **Neuroscience Letters**, v. 329, p. 177-180, 2002.

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, n. 5, p. 1324-1320, 1991.

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**. Florianópolis: Editora IOESC, 1980.

JONE, W. P.; CHIN, Y. W.; KINGHORN, A. D. The Role of Pharmacognosy in Modern Medicine and Pharmacy. **Current Drug Target**, v. 7, n. 3, p. 247-264, 2006.

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

KHANZODE, S. D.; DAKHALE, G. N.; KHANZODE, S. S.; SAOJI, A.; PALASODKAR, R. Oxidative

damage and major depression: the potential antioxidant action of selective serotonin re-uptake inhibitors. **Redox Report**, v. 8, n.6, p. 365-370, 2003.

KARTNIG, T.; BRANTNER, A. Secondary constituents in cell cultures of *Hypericum perforatum* and *Hypericum maculatum*. **Planta Medica**, v. 56, p. 634, 1990.

KARTNIG, T.; GÖBEL, I. Hypericin and pseudohypericin in cell cultures of various *Hypericum* species and chemotypes. **Planta Medica**, v. 58, n. 1, p. A579, 1992.

KARTNIG, T.; GÖBEL, I.; HEIDEL, 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.

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

KASPER, S. *Hypericum perforatum* - a review of clinical studies. **Pharmacopsychiatry**, v. 34, n. 1, p. S51-S55, 2001.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; KULISIC, T.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, v. 94, p. 550-557, 2006.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 62, p. 229-237, 2003.

KIRAKOSYAN, A. B.; VARDAPETYAN, R. R.; CHARCHOGLYAN, A. G. The content of hypericin and pseudohypericin in cell cultures of *Hypericum perforatum*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 47, n. 2, p. 270-273, 2000a.

KIRAKOSYAN, A.; HAYASHI, H.; INOUE, K.; CHARCHOGLYAN, A.; VARDAPETYAN, H. Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. **Phytochemistry**, v. 53, p. 345-348, 2000b.

KIRAKOSYAN, A.; GIBSON, D. M.; SIRVENT, T. A comparative study of *Hypericum perforatum* plants as sources of hypericins and hyperforins. **Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants**, v. 10, p. 73-88, 2003.

KIRAKOSYAN, A.; SIRVENT, T. M.; GIBSON, D. M.; KAUFMAN, P. B. The production of hypericins and hyperforin by *in vitro* cultures of *Hypericum perforatum*, **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, p. 71-81, 2004.

KIREEVA, T. B.; SHARANOV, U. L.; LETCHAMO, W. Biochemical and eco-physiological studies on *Hypericum* spp. Perspectives on new crops and new uses. 1999. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA. p. 467-468.

KITANOV, G. M. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 171-178, 2001.

KITANOV, G. M.; NEDIALKOV, P. T. Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 647-653, 1998.

KITANOV, M. G.; 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.

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

KORNFELD, A.; KAUFMAN, P. B.; LU, C. R.; GIBSON, D. M.; S. F., BOLLING; WARBER, S. L.; CHANG, S. C.; KIRAKOSYAN, A. The production of hypericins in two selected *Hypericum perforatum* shoot cultures is related to differences in black gland structure. **Plant Physiology et Biochemistry**, *in press*.

KOSUTH, J.; KOPERDAKOVA, J.; TOLONEN, A.; HOHTOLA, A.; CELLAROVÁ, E. The content of hypericins and phloroglucinols in *Hypericum perforatum* L. seedlings at early stage of development. **Plant Science**, v. 165, p. 515-521, 2003.

KREIMEIER, R. D. **Caracterização das sementes e propagação sexuada da espécie *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlecht (Clusiaceae), nativa do sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Fitotecnia, Porto Alegre: UFRGS, 2005.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (EDS.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da universidade, 2003. Cap. 21. p. 461-479.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LAWVERE, S.; MAHONEY, M. C. St. John's Wort. **American Family Physician**, v. 72, n. 11, 2005.

LEE, S. T.; RALPHS, M. H.; PANTER, K. E.; COOK, D.; GARDNER, D. R. Alkaloid profiles, concentration, and pools in Velvet Lupine (*Lupinus leucophyllus*) over the growing season. **Journal of Chemical Ecology**, v. 33, p. 75-84, 2007.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M.; Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, p. 299-311, 1992.

LIU, Z.; TAO, X.; ZHANG, C.; LU Y.; WEI, D. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-O-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and *tert*-butyl hydroperoxide. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 59, p. 481-490, 2005.

LJUNG, K.; HULL, A. K.; KOWALCZYK, M.; MARCHANT, A.; CELENZA, J.; COHEN, J. D.; SANDBERG, G. Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 249-272, 2002.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; LISSI, E. A novel and simple ORAC methodology based on the interaction of pyrogallol red with peroxy radicals. **Free Radical Research**, v. 40, n.9, p. 979-985, 2006.

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

MAILLARD, M.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of Barley and Malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1789-1793, 1995.

MANCUSO, C.; BONSIGNORE, A.; DI STASIO, E.; MORDENTE, A.; MOTTERLINI, R. Bilirubin and S-nitrosothiols interaction: evidence for a possible role of bilirubin as a scavenger of nitric oxide. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, 2355-2363, 2003.

MARIANI, E.; POLIDORI, M.C.; CHERUBINI, A.; MECOCCHI P. OXIDATIVE stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: An overview. **Journal of Chromatography B**, v. 827, p. 65-75, 2005.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification (Biological techniques series)**. London: Academic Press, 1982.

MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. (Eds.). **Methods in plant biochemistry (v.1) Plant Phenolics**. London: Academic Press Limited, 1989. Cap. 6. p. 197-235.

MARKHAM, K. R.; MOHAN CHARI, V. Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. (Eds.). **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman & Hall, 1982. Cap. 2. p. 19-134.

MARTINEZ-POVEDA B, Quesada AR and Medina MA: Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis *in vitro*. **European Journal of Pharmacology** v. 516, p. 97-103, 2005.

MASUDA, T.; INABA, Y.; MAEKAWA, T.; TAKEDA, Y.; YAMAGUSHI, H.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; NISHIZATO, S.; NONAKA, A. Simple detection method of powerful antiradical compounds in the raw extract of plants and its application for the identification of antiradical plant constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1831-1838, 2003.

MAURMANN, N. **Valeriana glechomifolia: Crescimento e produção de valepotriatos em diferentes meios nutritivos e avaliação preliminar de atividade**

neurofarmacológica. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre: UFRGS, 2006

MCCOY, J. A.; CAMPER, N. D. Development of a micropropagation protocol for St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). **Hort Science**, v. 37, n. 6, p. 978-980, 2002.

MEDEROS, M. S. *In vitro* growth and multiplication of *Hypericum canariense* L. **Acta Horticulturae**, v. 289, p. 133-135, 1991.

MEDEROS, S.; SAN ANDRES, L.; LUIS, J. G. Rosmanol controls explants browning of *Hypericum canariense* L. during *in vitro* establishment of shoots. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 66, p. 347-349, 1997.

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.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MENTZ, L. A.; LUTZEMBERGER, L. C.; SCHENKEL, E. P. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra literária de D'Ávila. **Caderno de Farmácia**, v. 13, p. 25-47, 1997.

MENUT, C.; BESSIERE, J.M.; NTALANI, H.; VERIN, P.; HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R. Two chromene derivatives from *Calyptanthus tricona*. **Phytochemistry**, v. 53 p. 975-979, 2000.

MERUELO, D.; LAVIE, G.; LAVIE, D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, p. 5230- 5234, 1988.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.

MOURA, M. Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic Azorean species, by micropropagation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, v. 34, n. 3, p. 244-248, 1998.

MÜLLER, W. E.; SINGER, M.; WONNEMANN, M. Hyperforin - antidepressant activity by a novel mechanism of action. **Pharmacopsychiatry**, v. 34, n. 1, p. S98-S102, 2001.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with

tabacco tissue cultures. **Physiology Plant**, v. 15, p. 473-497, 1962.

MURCH, S. J.; CHOFFE, K. L.; VICTOR, J. M. R.; SLIMMON, T. Y.; KRISHNARAJ, S.; SAXENA, P. K. Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of St. John's wort (*Hypericum perforatum* cv 'Anthos'). **Plant Cell Reports**, v. 19, p. 576-581, 2000.

MURCH, S. J.; RUPASINGHE, H. P. V.; SAXENA, P. K. An *in vitro* and hydroponic growing system for hypericin, pseudohypericin, and hyperforin production of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* CV New Stem). **Planta Medica**, v. 68, p. 1108-1112, 2002.

MURCH, S. J.; HAQ, K.; RUPASINGHE, H. P. V.; SAXENA, P. K. Nickel contamination affects growth and secondary metabolite composition of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, p. 251-257, 2003.

NAHRSTEDT, A.; BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. **Pharmacopsychiatry**, v. 30, p. 129-134, 1997.

NAIR, A. G. R.; RAMESH, P.; SUBRAMANIAN, S. S.; JOSHI, B. S. Rare methylated flavonols from *Angelonia grandiflora*. **Phytochemistry**, v. 7, n. 3, p. 591-592, 1978.

NEDIALKOV, P. T.; KITANOV, G. M. Two benzophenones O-arabinosides and a chromone from *Hypericum annulatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 867-871, 2002.

NETO, C. P. C. T.; HERNANDEZ, F. F. F.; BEZERRA, F. C.; DE SOUSA, R. F.; CAVALCANTI, M. L. F. Efeito da concentração salina da solução nutritiva na aclimação de plantas micropropagadas de Violeta Africana (*Saintpaulia ionantha* Wendl). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 4, n. 2, 2004.

NG, T. B.; LIU, F.; WANG, Z. T. Antioxidative activity of natural products from plants. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 709-723, 2000.

NIELSEN, H.; ARENDS, P. Xanthone constituents of *Hypericum androsaemum*. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 3, p. 301-304, 1979.

NÖLDNER, M.; SCHÖTZ, K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. **Planta Medica**, v. 68, p. 577-580, 2002.

NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A. B. F.; SCHRIPSEMA, J.; PIRES, V.; SONNET, P.; GUILLAUME, D.; VON POSER, G. L. Phloroglucinol derivatives from four *Hypericum* species belonging to the *Trigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 517-519, 2004.

NÖR, C. **Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e avaliação da atividade antiangiogênica**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre: UFRGS, 2006.

NÖR, C.; BERNARDI, A. P. M.; SCHRIPSEMA, J.; VON POSER, G.L. Phenolic compounds in *Hypericum* flowers. **Biochemical Systematics and Ecology**, *in press*.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-Biological Interactions**, v. 159, p. 1-17, 2006.

OZEN, T.; AYAN, A. K.; CIRAK, C.; KEVSEROGLU, K. Total phenol content of some *Hypericum* species growing in Turkey. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n. 2, 2005

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMERO, A.; SAAVEDRA, G.; MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; CODINA, C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences**, v. 73, p. 1667-1681, 2003.

PARKER, W. L.; JOHNSON, F. The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. **Journal of American Chemical Society**, v. 90, p. 4716-4723, 1968.

PASQUA, G.; AVATO, P.; MONACELLI, B.; SANTAMARIA, A. R.; ARGENTIERI, M. P. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. **Plant Science**, v. 165, n. 5, p. 977-982, 2003.

PAULI, G. F.; POETSCH, F.; NAHRSTEDT, A. Structure assignment of natural quinic acid derivatives using proton nuclear magnetic resonance techniques. **Phytochemical analysis**, v. 9, p. 177-185, 1998.

PETERS, S.; SCHMIDT, W.; BEERHUES, L. Regioselective oxidative phenol couplings of 2,3',4,6-tetrahydroxybenzophenone in cell cultures of *Centaurium erythraea* RAFN and *Hypericum androsaemum* L. **Planta**, v. 204, p. 64-69, 1998.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PRETTO, F. R.; SANTAREM, E. R. Callus formation and plant regeneration from *Hypericum perforatum* leaves. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 62, n. 2, p. 107-113, 2000.

RAMACHANDRA RAO, S.; RAVISHANKAR, G. A. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v. 20, p. 101-153, 2002.

RATH, G.; POTTERAT, O.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Xanthones from *Hypericum roeperanum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 513-520, 1996

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 2^a ed., Rio de Janeiro:Guanabara Dois, 1985. 724p.

REINERT, J.; YEOMAN, M. M. **Plant cell and tissue culture - A Laboratory Manual**. Berlin: Springer- Verlag, 1982.

RIBANI, M. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

ROBERTS, S. C.; SHULER, M. L. Large-scale plant cell culture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 8, n. 2, p. 154-159, 1997.

ROBSON, N. K. B. Studies in the genus *Hypericum* L. (*Guttiferae*) 1. Infrageneric classification. **Bulletin of the British Museum (Natural History). Botany Series**, v. 5, n. 6, 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.

ROBSON, N. K. B. *Hypericum* botany. In: KRESS, J. M.; ERNST, E. (Ed.). **Hypericum: the Genus Hypericum**, New York:Taylor & Francis, 2003. Cap. 1. p. 1-22.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI- EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, 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, n. 5, p. 1447-1452, 1995.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; HOSTETTMANN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 185-188, 1996.

RODRIGUEZ, G. I. R.; ALEJO, J. L.; NOA, L. M.; PAIBA, M. E. P.; REYES, O. M. Actividad hepatoprotectora de las tinturas de 2 especies vegetales del género *Hypericum*.

Revista Cubana de Medicina Militar, v. 30, n. 4, p. 241-244, 2001.

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 91-120, 2000.

SADHU, S. K.; OKUYAMA, E.; FUJIMOTO, H.; ISHIBASHI, M.; YESILADA, E. Prostaglandin inhibitory and antioxidant components of *Cistus laurifolius*, a Turkish medicinal plant. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 3, p. 371-378, 2006.

SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI J. A., SAURA-CALIXTO F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 76, p. 270-276, 1998.

SANTARÉM, E. R.; ASTARITA, L. V. Multiple shoot formation in *Hypericum perforatum* L. and hypericin production. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v. 15, n. 1, p. 43-47, 2003.

SATO, K.; NAKAYAMA, M.; SHIGETA, J. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cell cultures of strawberry. **Plant Science**, v. 113, p. 91-98, 1996.

SCHMIDT, W.; ABD EL-MAWLA, A. M. A.; WOLFENDER, J.; HOSTETTMANN, K.; BEERHUES, L. Xanthenes in cell culture of *Hypericum androsaemum*. **Planta Medica**, v. 66, p. 380-381, 2000.

SCHMIDT, W.; BEERHUES, L. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. **Federation of European Biochemical Societies**, v. 420, p. 143-146, 1997.

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, n. 2, p. 239-245, 2001.

SEABRA, R. M.; ALVES, A.C. Mangiferin and chlorogenic acid from *Hypericum* species. **Planta Medica**, v. 55, p. 404, 1989.

SHABIR, G. A. Validation of HPLC methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US FDA, the US Pharmacopeia and the ICH. **Journal of Chromatography A**, v. 987, p. 57-66, 2003.

SIES, H. What is oxidative stress? In: KEANEY, J. F. (Ed.). **Oxidative Stress and Vascular Diseases**, Boston:Kluwer Academic Publishers, 2000. p. 1-8.

SILVA, B. A.; FERRERES, F.; MALVA, J. O.; DIAS, A. C. P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 157-167, 2005a.

SILVA, C. G.; HERDEIRO, R. S.; MATHIAS, C. J.; PANEK, A. D.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; RENNÓ, M. N.; FALCÃO, D. Q.; CERQUEIRA, D. M.; MINTO A. B. M.; NOGUEIRA, F. L. P.; QUARESMA, C. H.; SILVA, J. F. M.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 229-233, 2005b.

SINGH, A.; NAIDU, P. S.; GUPTA, S.; KULKARNI, S. K. Effect of natural and synthetic antioxidants in a mouse model of chronic fatigue syndrome. **Journal of Medicinal Food**, v. 5, p. 211-220, 2002.

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

SIRVENT, T.; GIBSON, D. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 60, p. 311-320, 2002.

ŠKERGET M.; KOTNIK, P.; HADOLIN, M.; RIŽNER-HRAŠ, A.; SIMONIČ, M.; KNEZ, Z. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 89, n. 2, p. 191-198, 2005.

SLOLEY, B. D.; URICHUK, L. J.; LING, L.; GU, L. D.; COUTTS, R. T.; PANG, P. K.; SHAN, J. J. Chemical and pharmacological evaluation of *Hypericum perforatum* extracts. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 21, p. 1145-1152, 2000.

SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 468-472, 2002.

SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SOUTHWELL, I. A.; BOURKE, C. A. Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**, v. 56, p. 437-441, 2001.

SOUTHWELL, I. A.; CAMPBELL, M. H. Hypericin content variation in *Hypericum perforatum* in Australia. **Phytochemistry**, v. 30, p. 475-478, 1991.

STAFFORD, A.; WARREN, G. (Eds.). **Plant Cell and Tissue Culture**. London: Open University Press, 1991.

STRACK, D.; WRAY, V. Anthocyanins. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry (v. 1) Plant Phenolics**. London: Academic Press Limited, 1989. Cap. X. p. 326-352.

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

SUZUKI, T. Nitrosation of uric acid induced by nitric oxide under aerobic conditions. **Nitric Oxide**, v. 16, p. 266-273, 2007.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Method Validation. In: *Analytical Method Development and Validation*. New York: Marcel Dekker, 1997.

TANAKA, N.; TAKAISHI, Y.; SHIKISHIMA, Y.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K.; LEE, K.-H.; HONDA, G.; ITO, M.; TAKEDA, Y.; KODZHIMATOV, O. K.; ASHURMETOV, O. Prenylated benzophenones and xanthenes from *Hypericum scabrum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1870-1875, 2004.

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

TEKEL'OVÁ, D.; REPCÁK, M.; ZEMKOVÁ, E.; TÓTH, J. Quantitative changes of dianthrones, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. **Planta Medica**, v. 66, p. 778-780, 2000.

THE UNITED STATE PHARMACOPEIA. NF 23. 28 ed. Rockville: United State Pharmacopeia Convention, 2005.

THIEDE, H. -M.; WALPER, A. Inhibition of MAO and COMT by *Hypericum* extracts and hypericin. **Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology**, v. 7, n. 1, 1994.

TIRILLINI, B.; RICCI, A.; PINTORE, G.; CHESSA, M.; SIGHINOLFI, S. Induction of hypericins in *Hypericum perforatum* in response to chromium. **Fitoterapia**, v. 77, p. 164-170, 2006.

TSIMOGIANNIS, D. I.; OREOPOULOU, V. The contribution of flavonoid C-ring on the DPPH free radical scavenging efficiency. A kinetic approach for the 3',4'-hydroxy substituted members. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 140-146, 2006.

UMEK, A.; KREFT, S.; KARTNIG, T.; HEYDEL, B. Quantitative phytochemical analyses of six *Hypericum* species growing in Slovenia. **Planta Medica**, v. 65, p. 388-390, 1999.

VALENTÃO, P.; CARVALHO, M.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Protective activity of *Hypericum androsaemum* infusion against tert-butyl hydroperoxide-induced oxidative damage in isolated rat hepatocytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 79-84, 2004.

VALENTÃO, P.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F.; ANDRADE, P. B.; SEABRA, R. M.; BASTOS, M. L. Antioxidant activity of *Hypericum androsaemum* infusion: scavenging activity against superoxide radical, hydroxyl radical and hypochlorous acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 10, p. 1320-1323, 2002.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1-40, 2006.

VANDEBOGAERDE, A.; DE WITTE, P. Antineoplastic properties of photosensitized hypericin. **Anticancer Research**, v. 15, n. 5A, p.1757- 1758, 1995.

VELÁZQUEZ, E.; TOURNIER, H. A.; MORDUJOVICH DE BUSCHIAZZO P.; SAAVEDRA, G.; SCHINELLA, G. R. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, p. 91-97, 2003.

VELIOGLU, Y. S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VEROTTA, L. *Hypericum perforatum*, a source of neuroactive lead structures. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 187-201, 2003.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Development Today**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 253-262, 2000.

VIANA, A. F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 5, p. 631-634, 2003.

VIANA, A.; DO REGO, J. -C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A. P.; COSTENTIN, J.; RATES, S. M. K. The antidepressant-like effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test results from an inhibition of neuronal monoamine uptake. **Neuropharmacology**, v. 49, p. 1042-1052, 2005.

VOIRIN, B. UV spectral differentiation of 5-hydroxy- and 5-hydroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') e tri-(3',4',5')- substituted B rings. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2107-2145, 1983.

VON POSER, G. L.; RECH, S. B.; RATES, S. M. K. Chemical and Pharmacological Aspects of Southern Brazilian *Hypericum* Species. In: TEIXEIRA DA SILVA, J. A. (Ed.). **Floriculture and Ornamental Plant Biotechnology. Advances and Tropical Issues**, London:Global Science Book, 2006.

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

WALKER, T. S.; BAIS, H. P.; VIVANCO, J. M. Jasmonic acid-induced hypericin production in cell suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). **Phytochemistry**,

v. 60, p. 289-293, 2002.

WALTERS, R. G. Towards an understanding of photosynthetic acclimation. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 435-447, 2005.

WARREN, G. The regeneration of plants from cultured cells and tissues. In: STAFFORD, A.; WARREN, G. **Plant Cell and Tissue Culture**. London: Open University Press, 1991. Cap. 4. p. 82-100.

WHO monographs on selected medicinal plants - Herba Hiperici. **World Health Organization**. Geneva, 2002. Vol. 2, p. 149-171.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, p. 275-295, 2004.

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

WOOD, S. G. HUFFMAN, J.; WEBER, N. D.; ANDERSEN, D.; NORTH, J. A.; MURRAY, B. K. SIDWELL, R.; HUGHES, B. Antiviral activity of naturally occurring anthraquinones and anthraquinone derivatives. **Planta Medica**, v. 56, p. 651-652, 1990.

YAMAGUCHI, F.; SAITO, M.; ARIGA, T.; YOSHIMURA, Y.; NAKAZAWA, H. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2320-2325, 2000.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

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.

YANIK, M.; EREL, O.; KATI, M. The relationship between potency of oxidative stress and severity of depression. **Acta Neuropsychiatrica**, v.16, n.4, p. 200-203, 2004.

YAZAKI, K.; OKUDA, T. Procyanidins in callus and multiple shoot cultures of *Hypericum erectum*. **Planta Medica**, v. 56, p. 490-491, 1990.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; LIU, Z. W.; SHIMIZU, M. Antioxidative activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v.11, p. 446-449, 1997.

YOU DIM, K. A.; SPENCER, J. P.; SCHROETER, H.; RICE-EVANS, C. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. **Biological Chemistry**, v. 383, p. 503-519, 2002.

ZDUNEK, K.; ALFERMANN, A. W. Initiation of shoot organ cultures of *Hypericum perforatum*

and formation of hypericin derivatives. **Planta Medica**, v. 58, n. 1, p. A621-A622, 1992.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

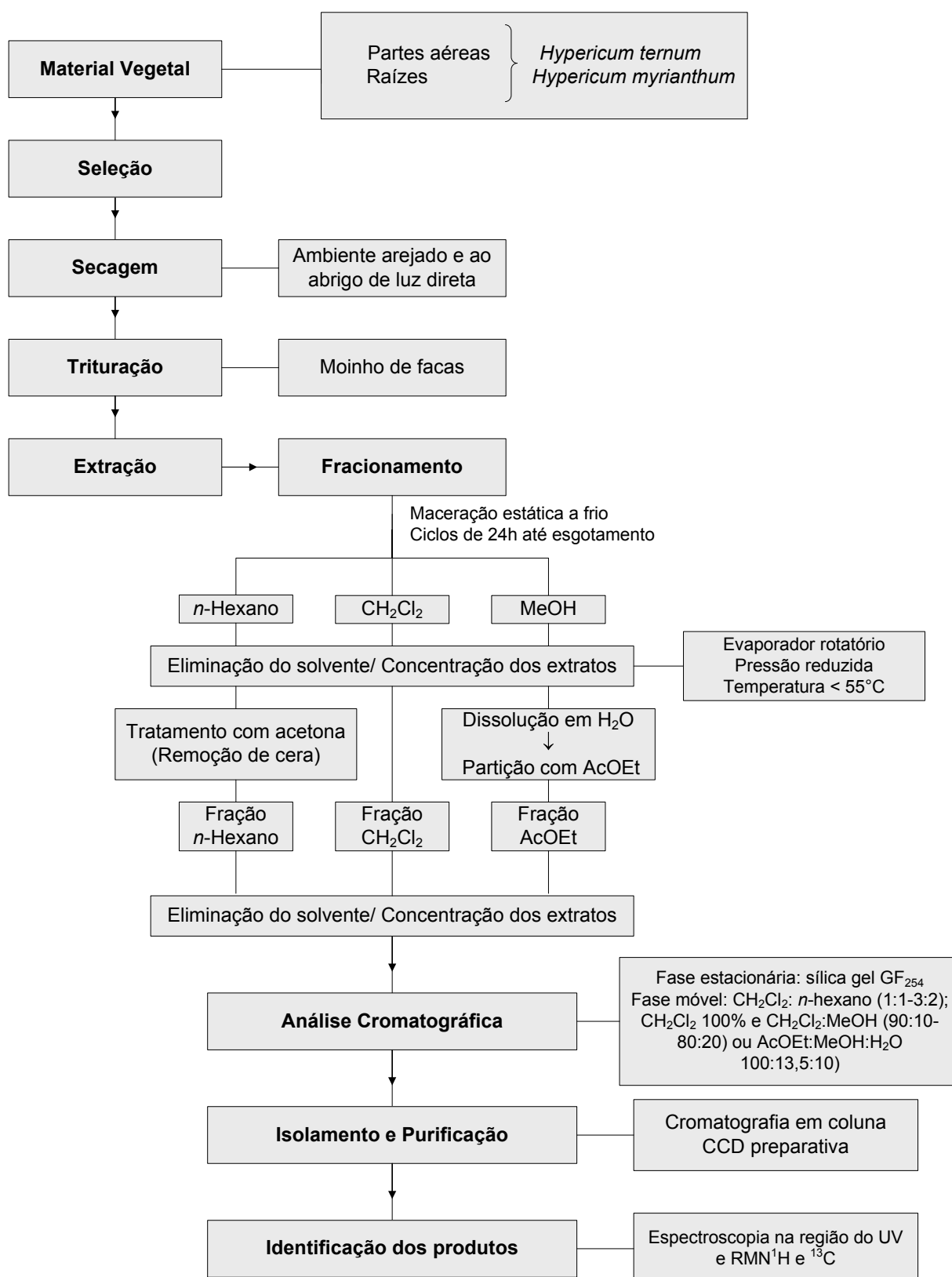
ZOBAYED, S. M. A.; SAXENA, P. K. In vitro-grown roots: a superior explant for prolific shoot regeneration of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv 'New Stem') in a temporary immersion bioreactor. **Plant Science**, v. 165, n. 3, p. 463-470, 2003.

ZOBAYED, S. M. A.; MURCH, S. J.; RUPASINGHE, H. P. V.; SAXENA, P. K. Elevated carbon supply altered hypericin and hyperforin contents of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) grown in bioreactors. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, v. 75, p. 143-149, 2003.

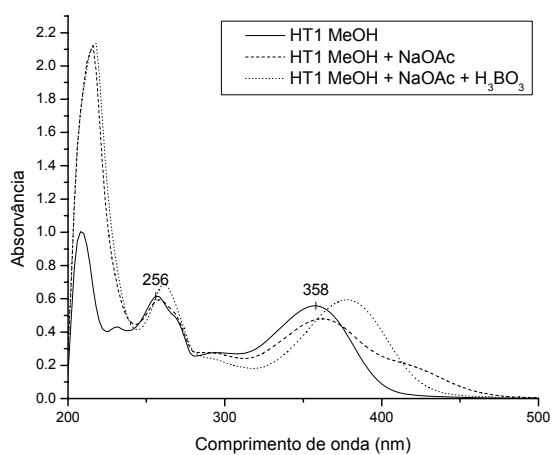
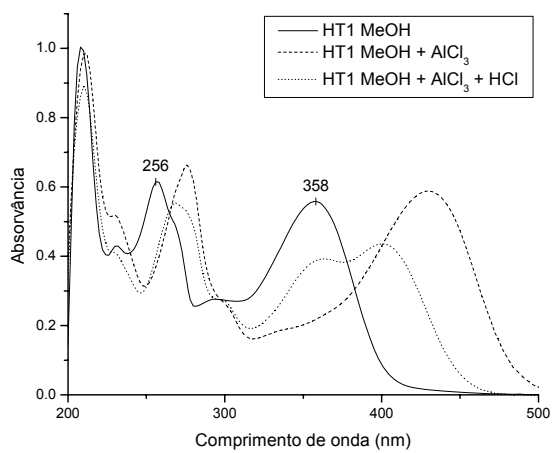
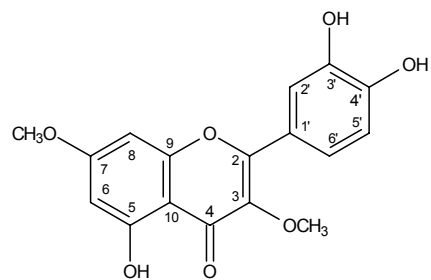
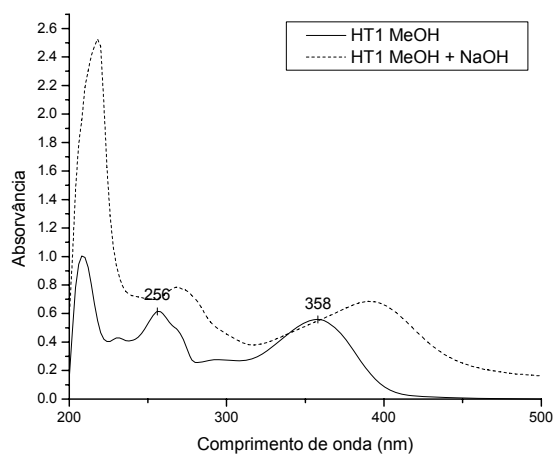
ZOBAYED, S. M. A.; MURCH, S. J.; RUPASINGHE, H. P. V.; SAXENA, P. K. *In vitro* production and chemical characterization of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv New Stem). **Plant Science**, v. 166, p. 333-340, 2004.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F., KOZAI, T. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43, p. 977-984, 2005.

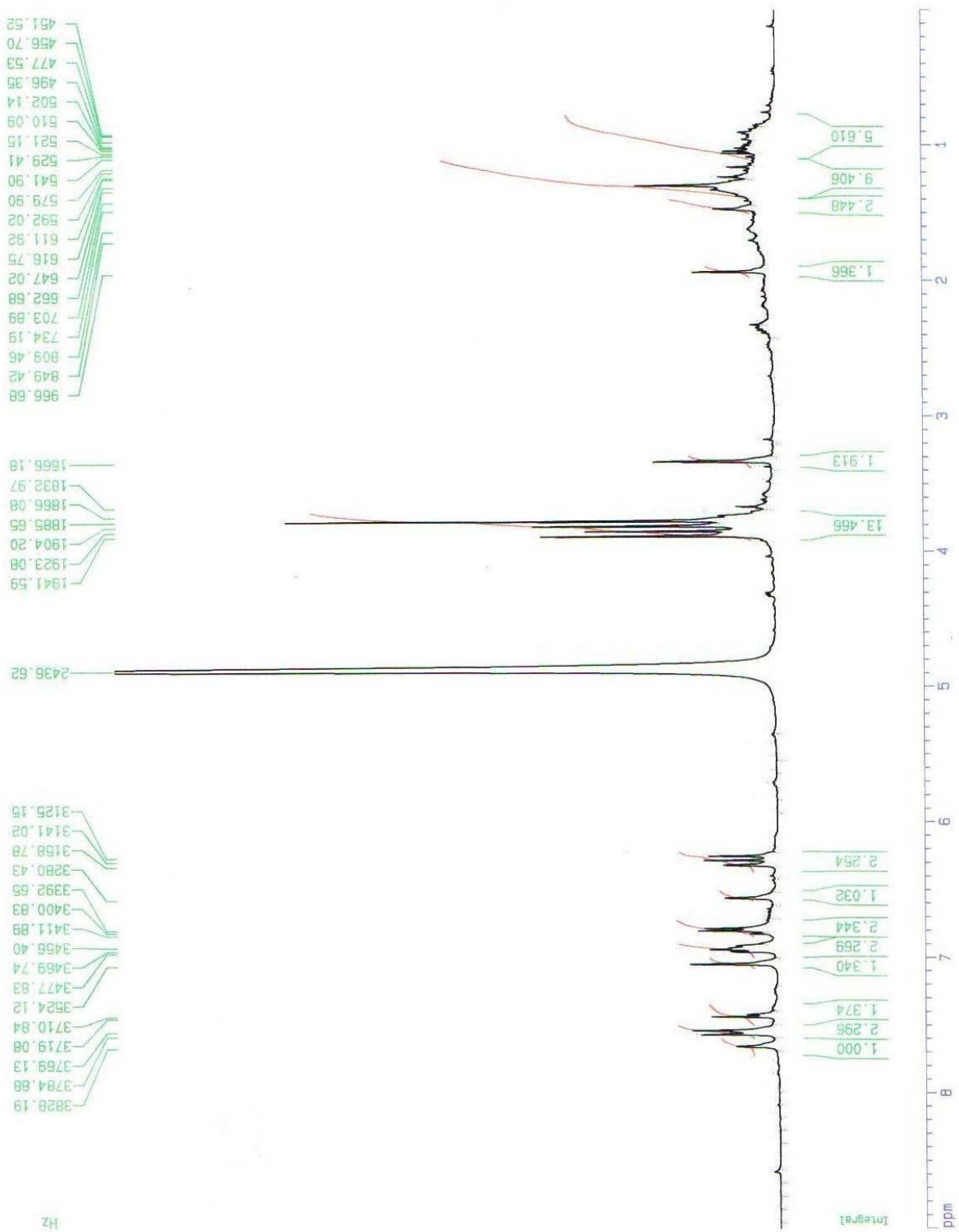
ANEXO I – Esquema da Metodologia descrita no Capítulo 1



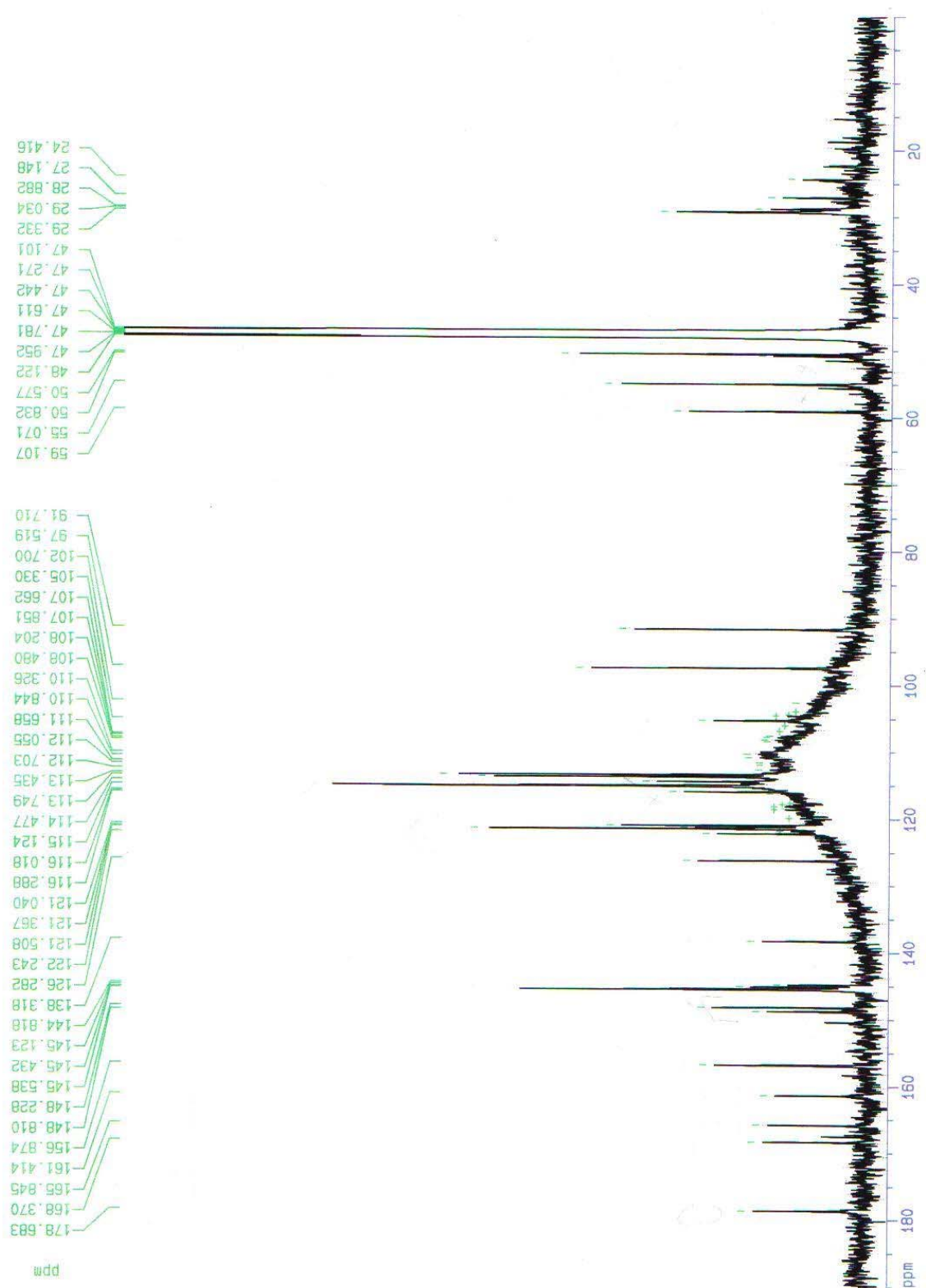
***ANEXO II – Espectros de UV e de RMN¹-H e RMN¹³-C utilizados
para a elucidação das substâncias isoladas***



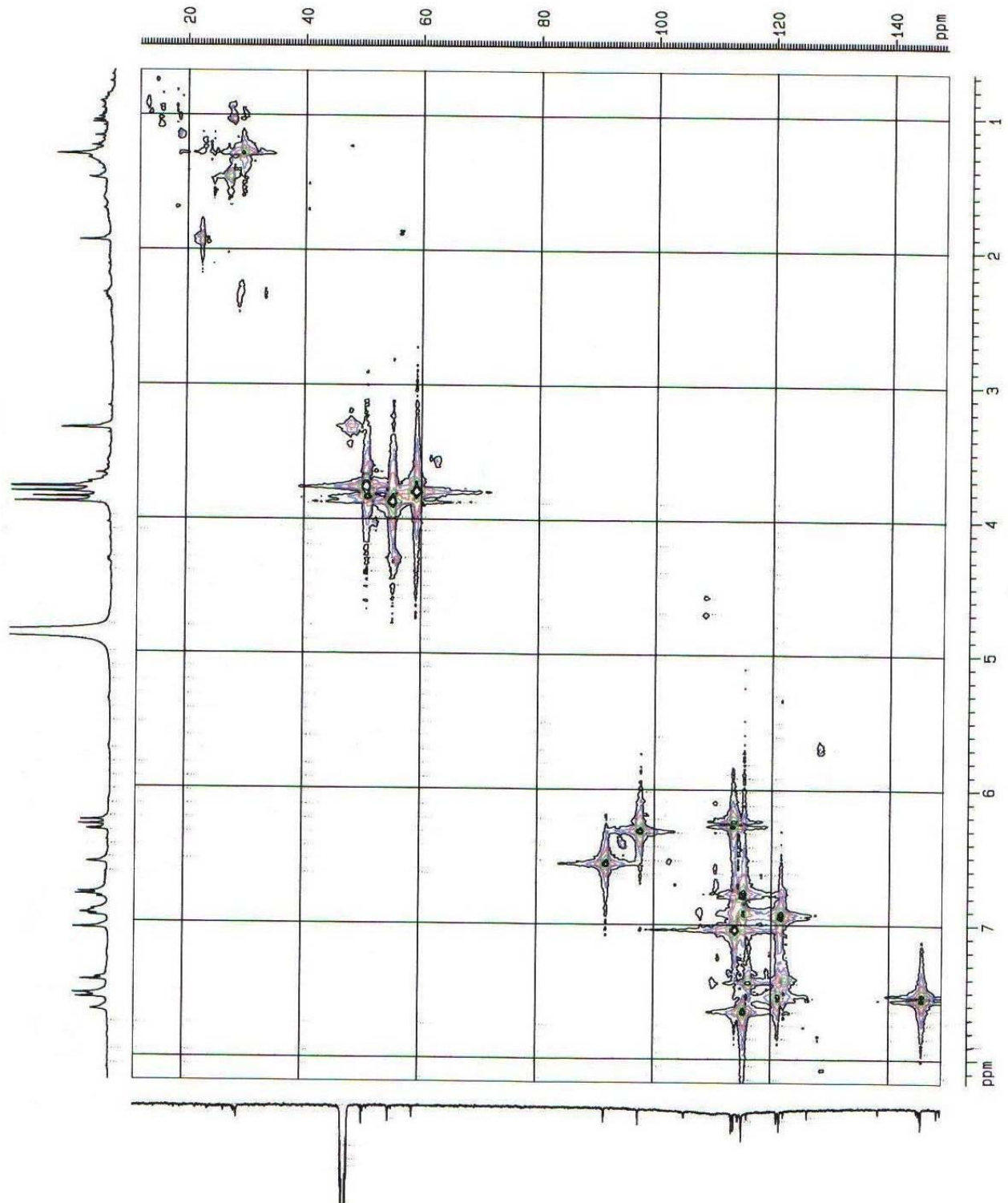
Espectros de UV da substância HT1



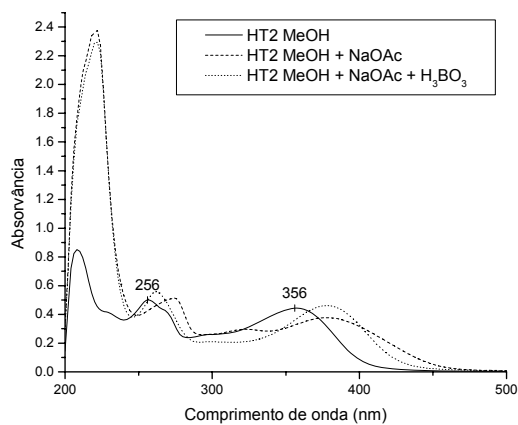
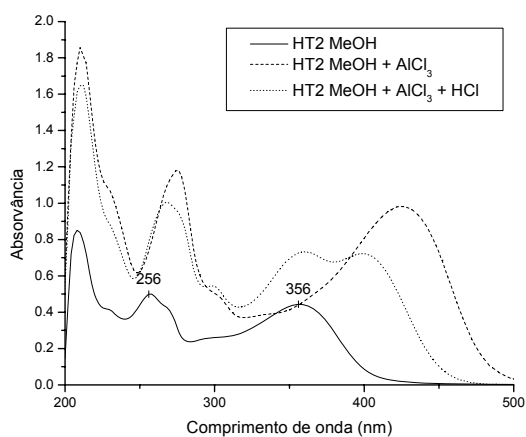
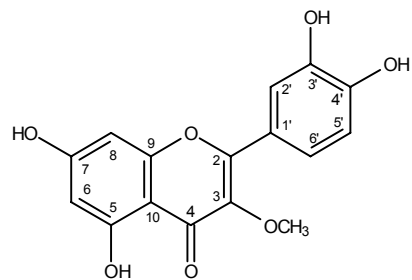
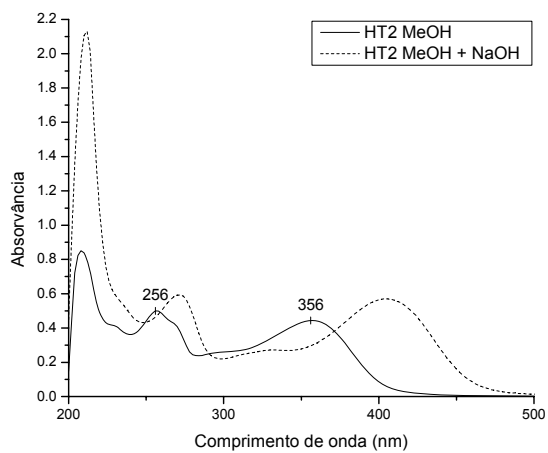
Espectro de RMN- H^1 de HT1 em MeOD a 500 MHz



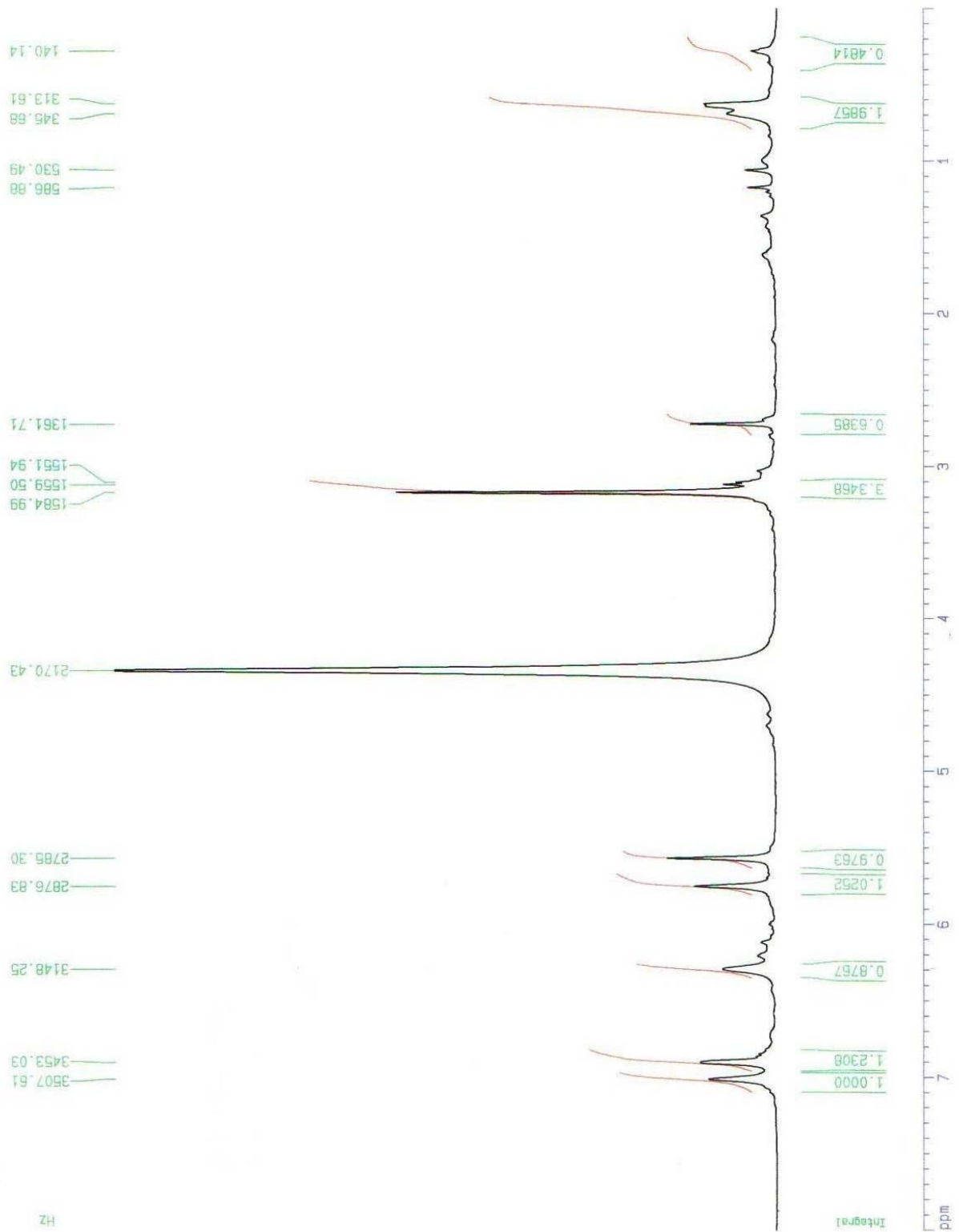
Espectro de RMN- ^{13}C de HT1 em MeOD a 125 MHz



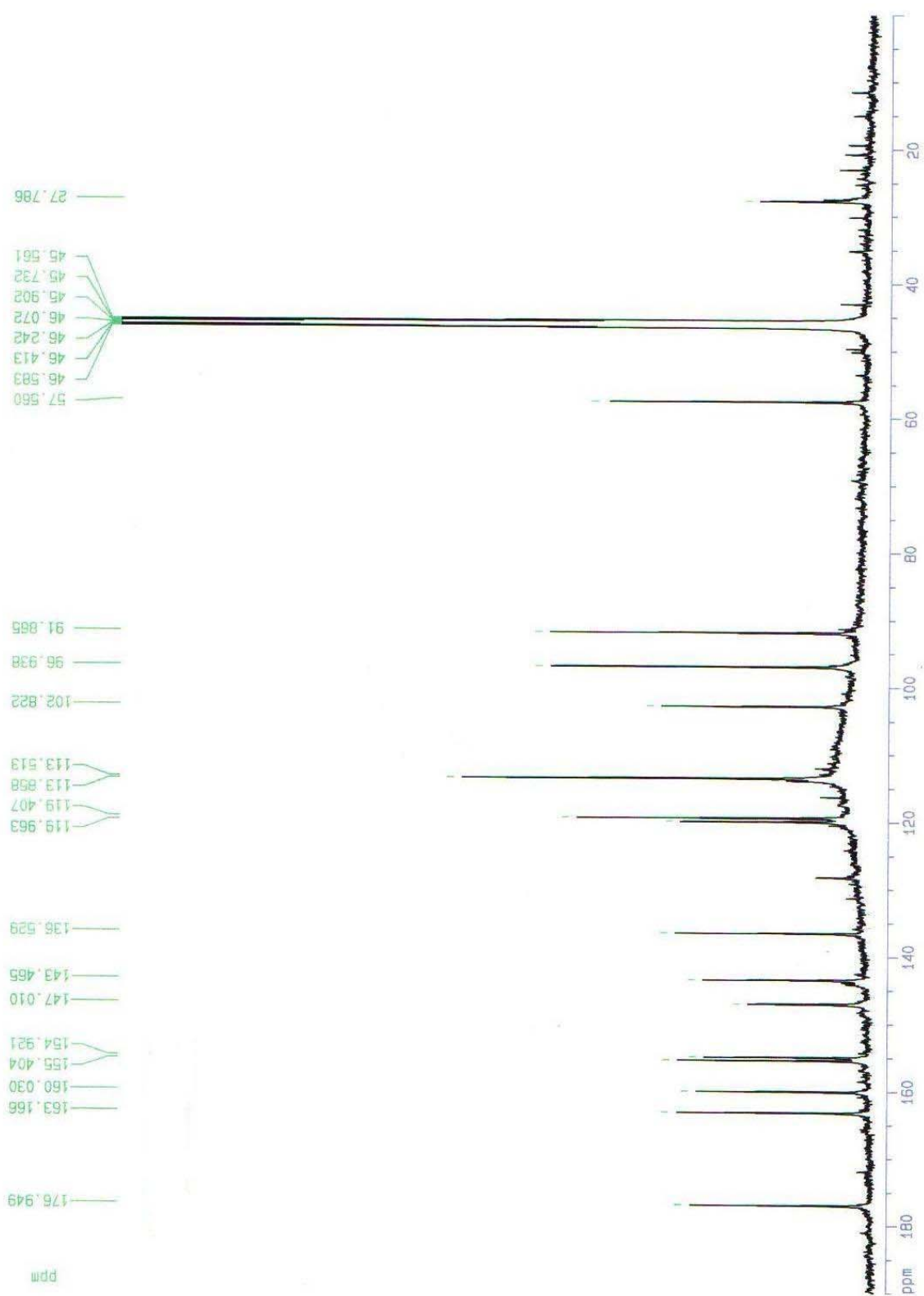
Espectro de correlação HMQC de HT1 em MeOD a 500/125 MHz



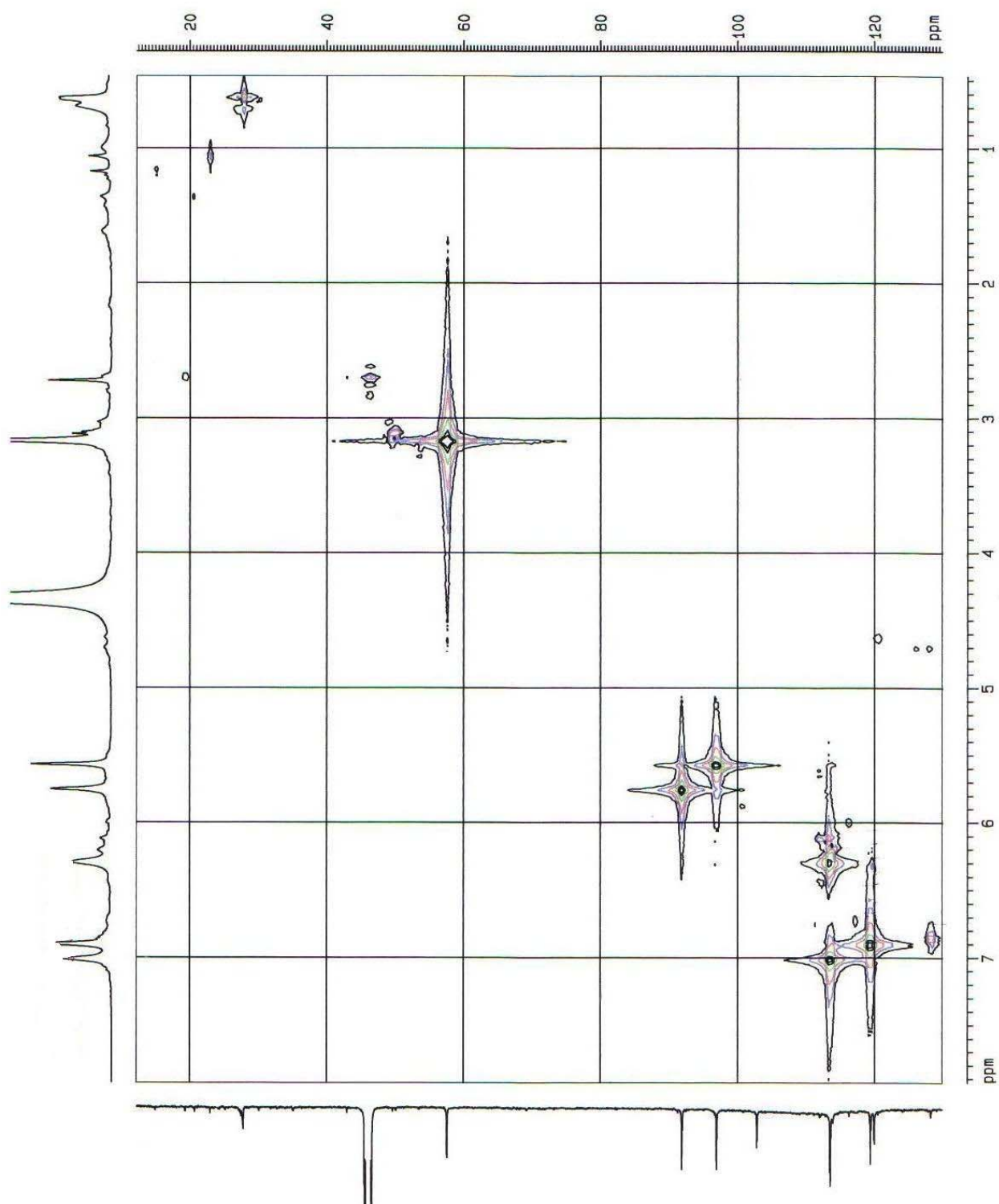
Espectros de UV da substância HT2



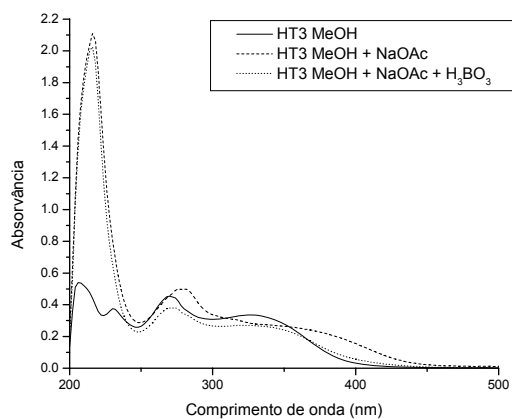
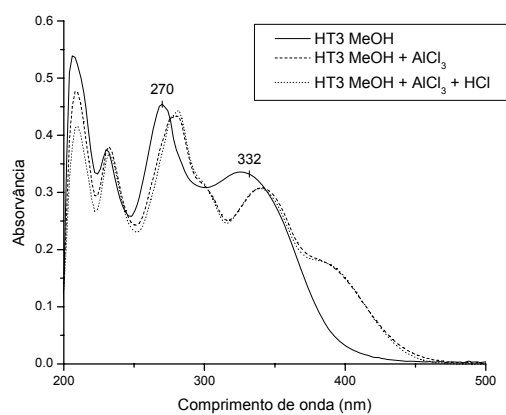
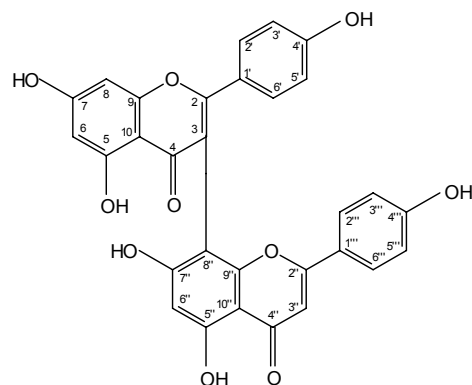
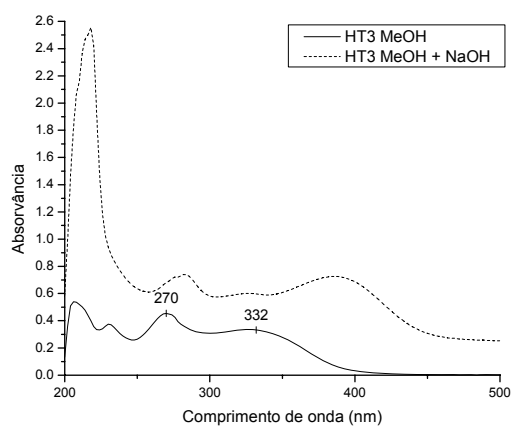
Espectro de RMN-¹H de HT2 em MeOD a 500 MHz



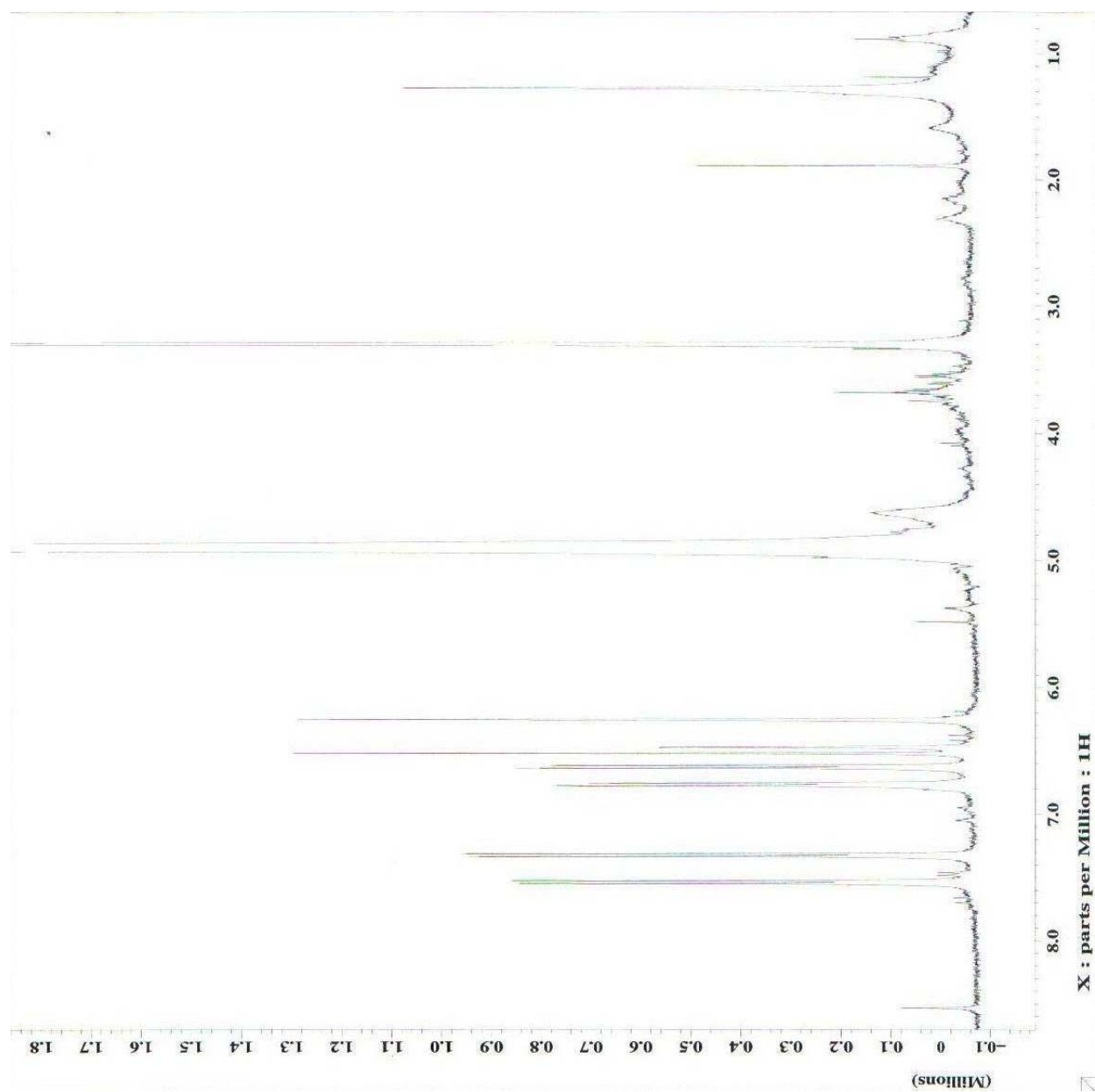
Espectro de RMN- ^{13}C de HT2 em MeOD a 125 MHz



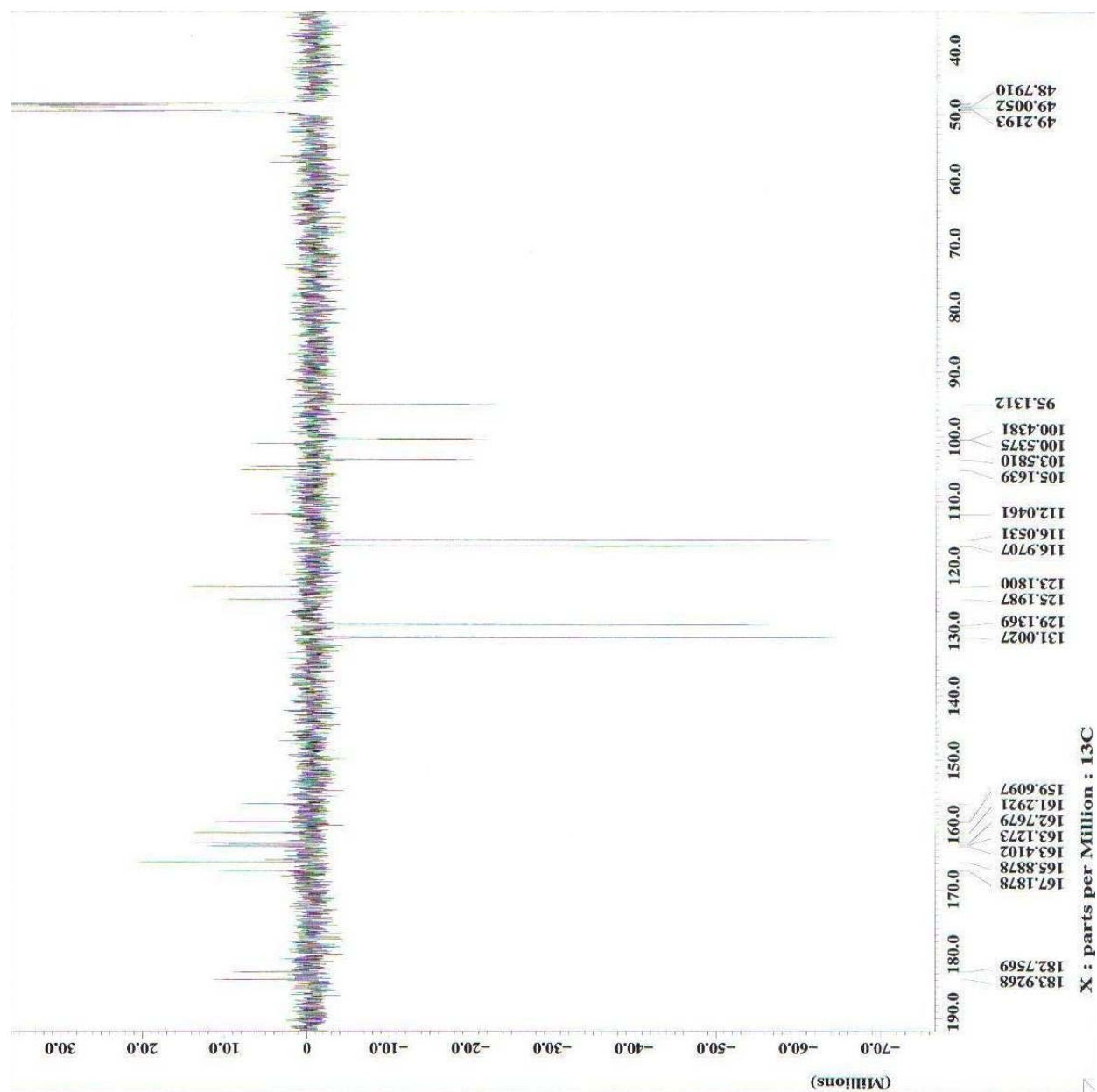
Espectro de correlação HMQC de HT2 em MeOD a 500/125 MHz



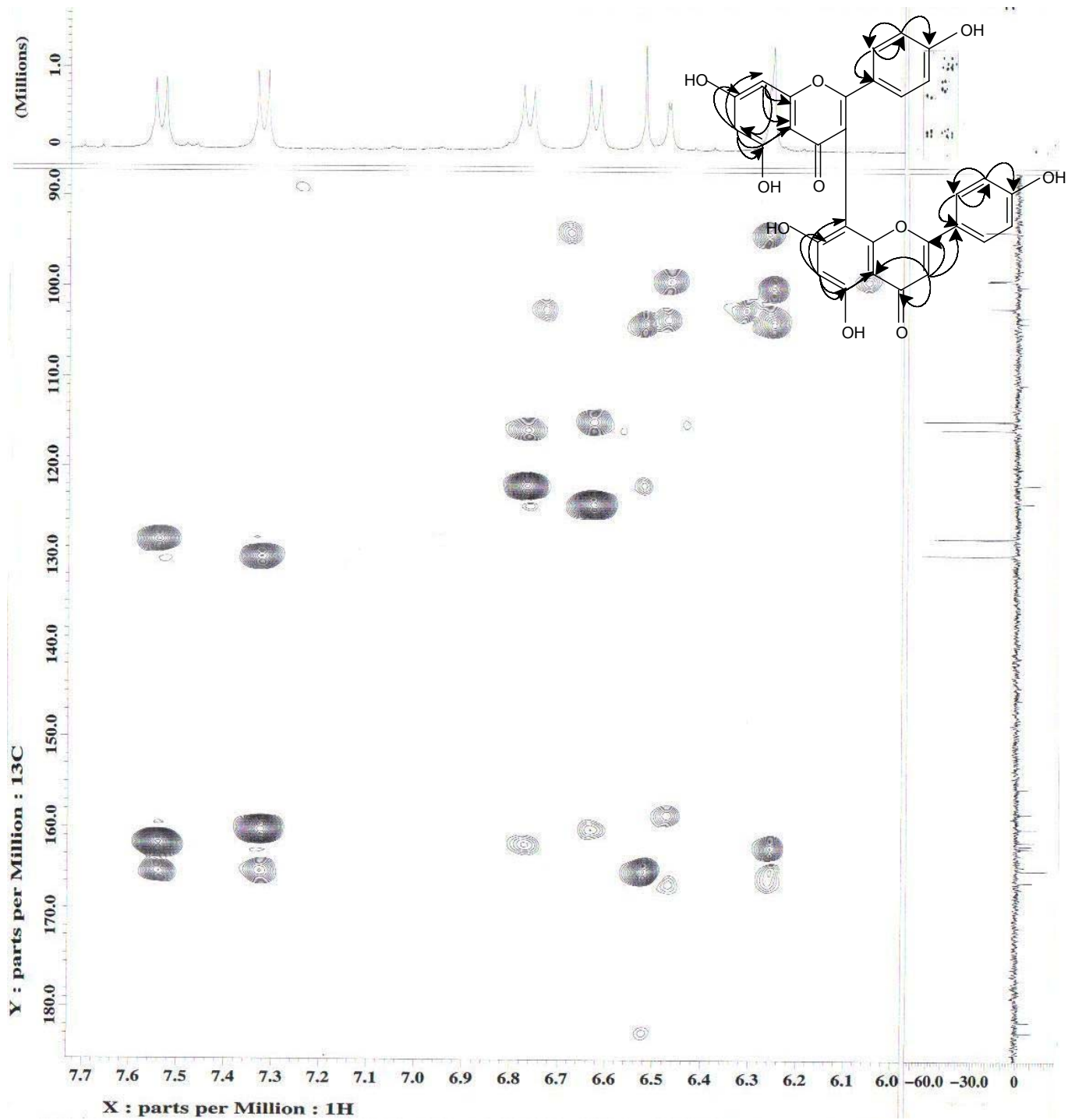
Espectros de UV da substância HT3



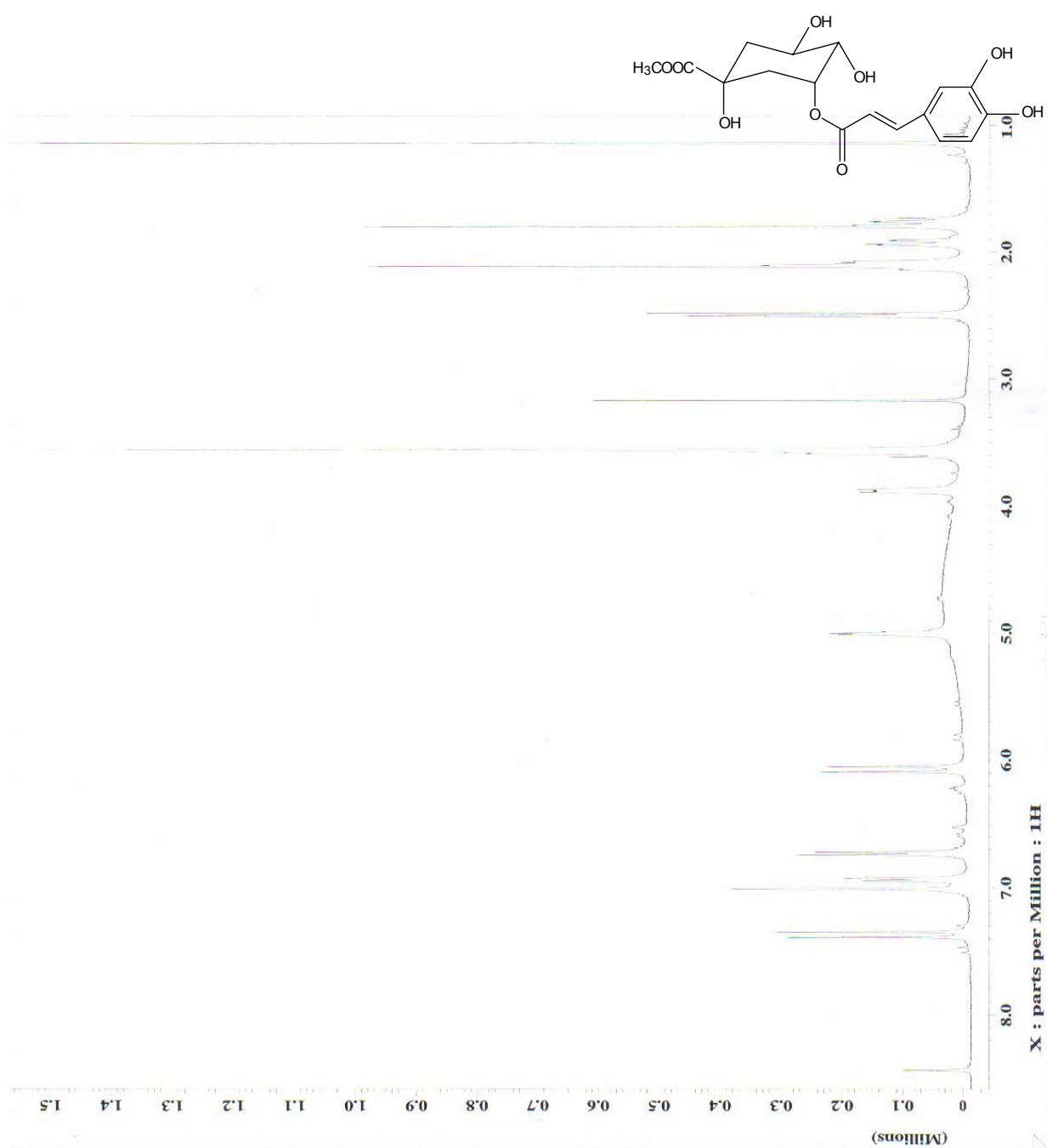
Espectro de RMN- ^1H de HT3 em MeOD a 400 MHz



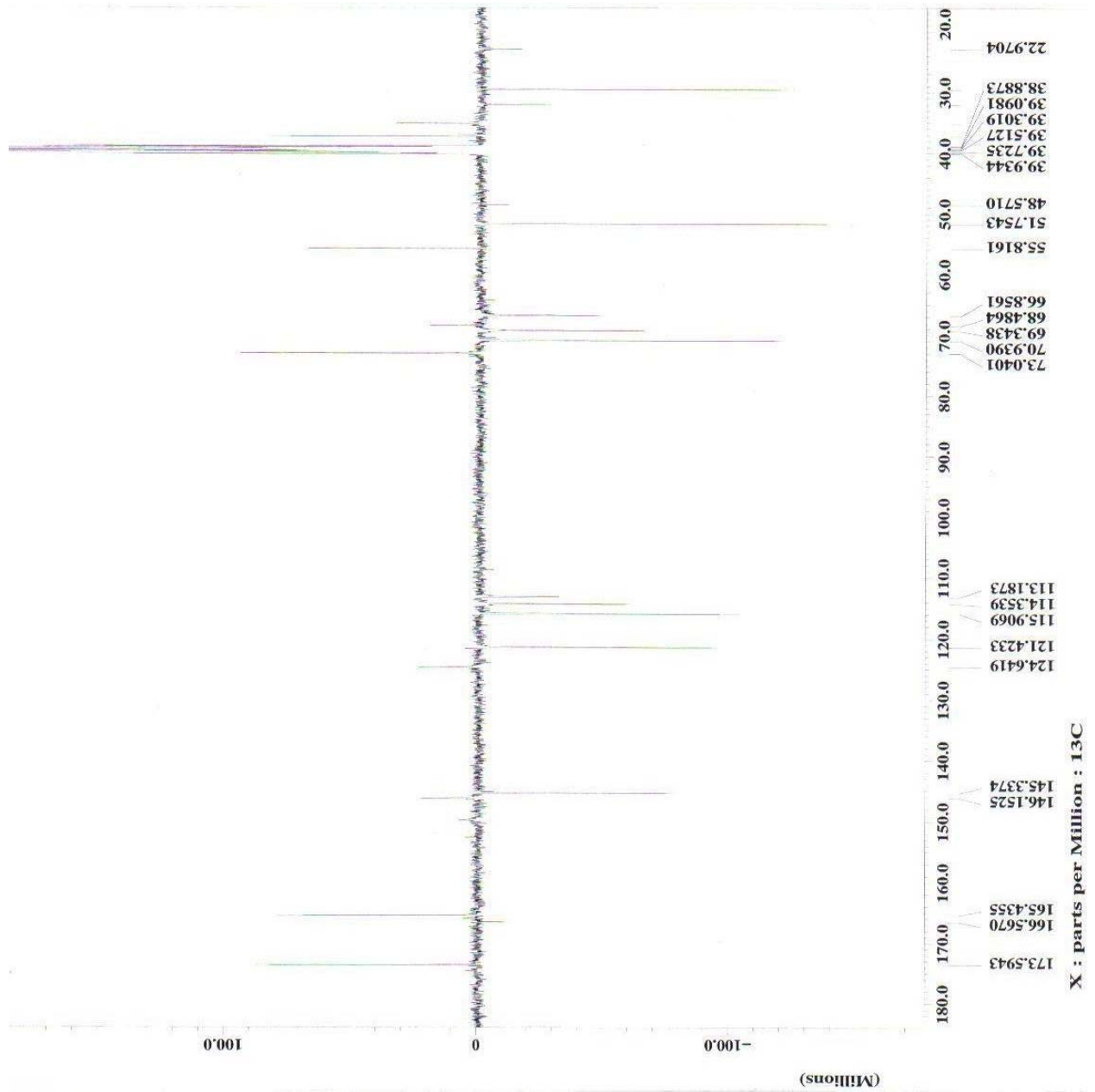
Espectro de RMN- ^{13}C (APT) de HT3 em MeOD a 100 MHz



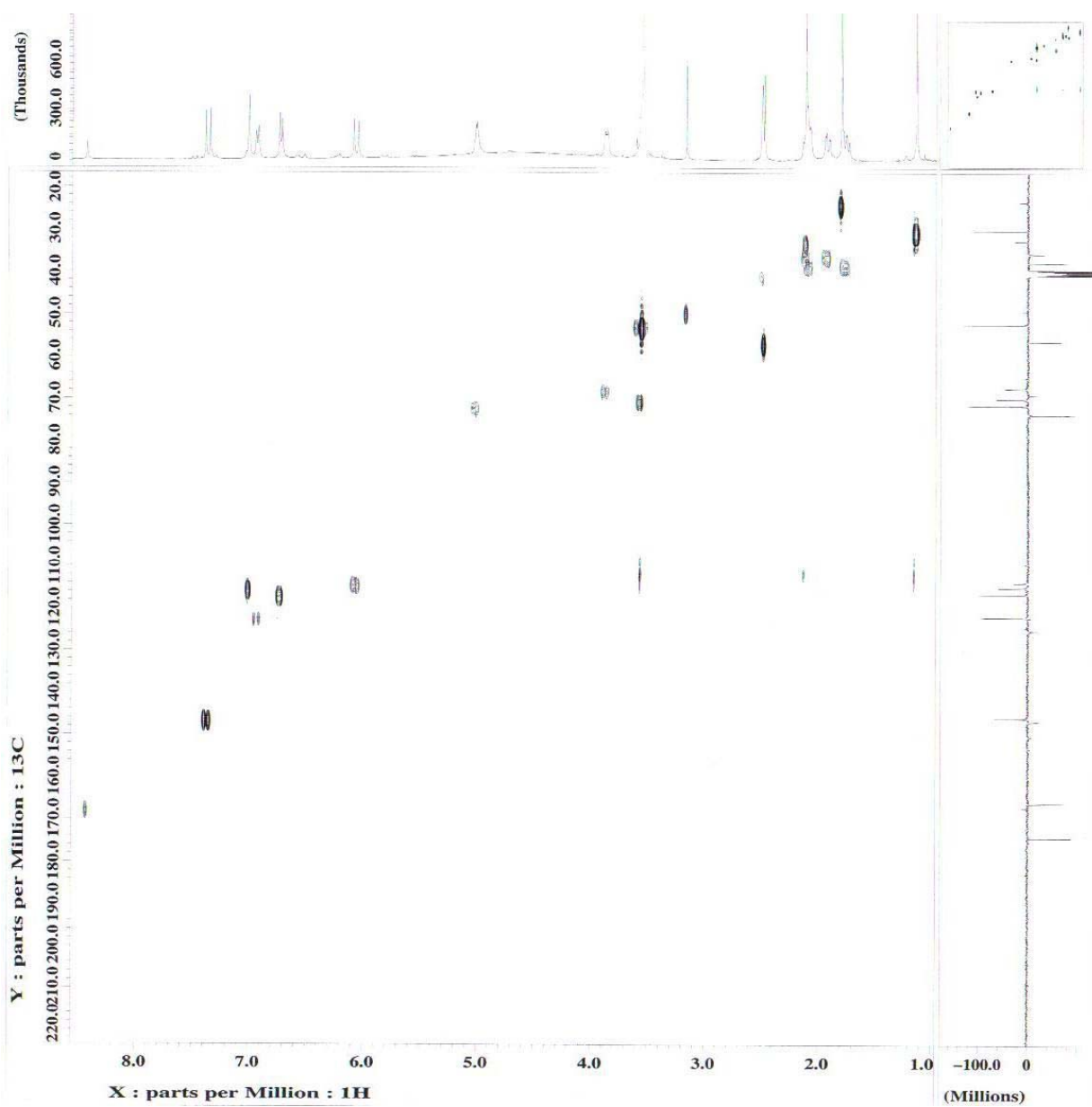
Espectro de correlação HMBC de HT3 em MeOD a 400/100 MHz



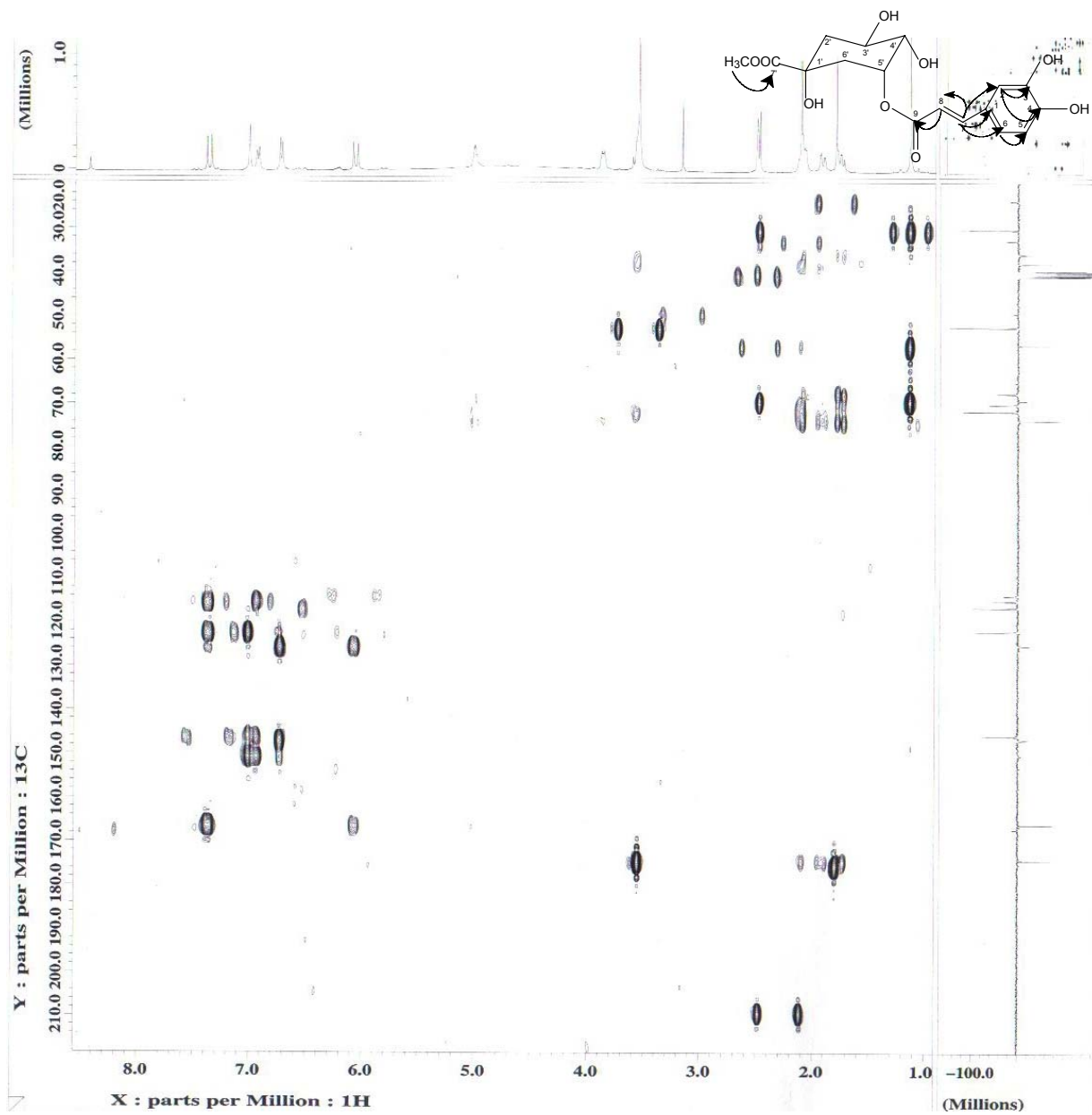
Espectro de RMN-¹H de HT4 em DMSO-d₆ a 400 MHz



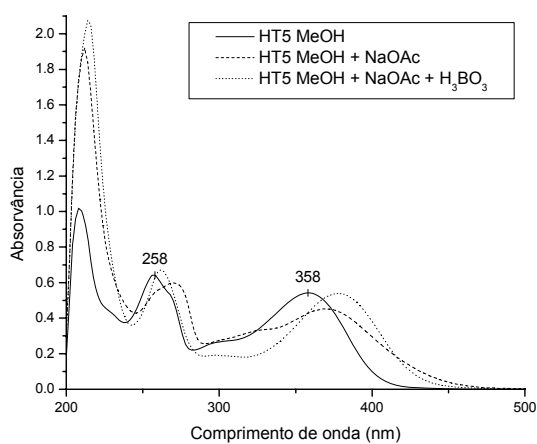
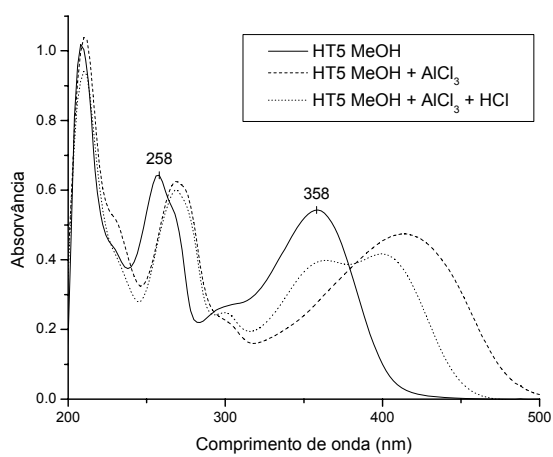
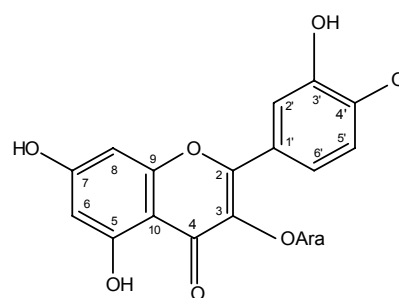
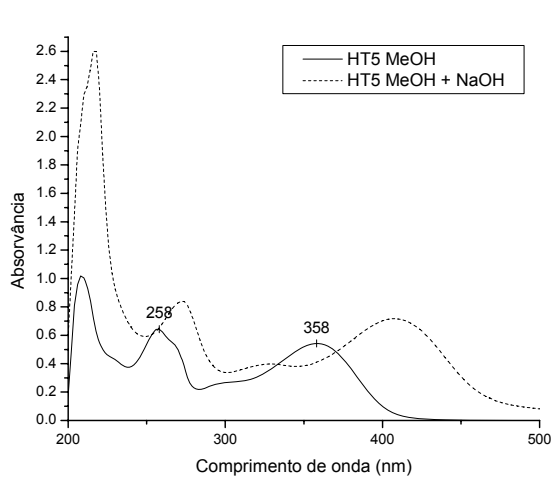
Espectro de RMN- ^{13}C (APT) de HT4 em DMSO-d6 a 100 MHz



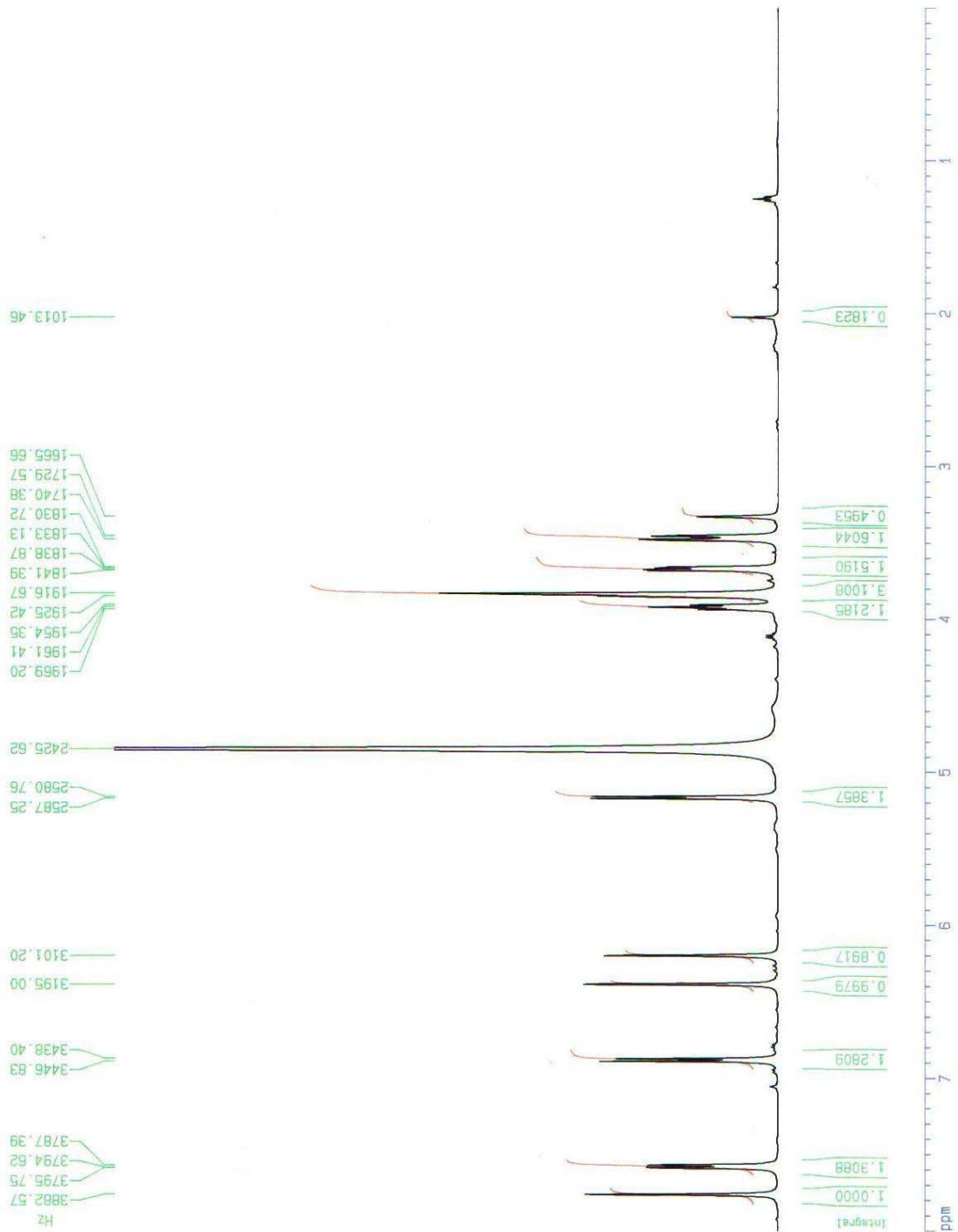
Espectro de correlação HMQC de HT4 em DMSO-d6 a 400/100 MHz



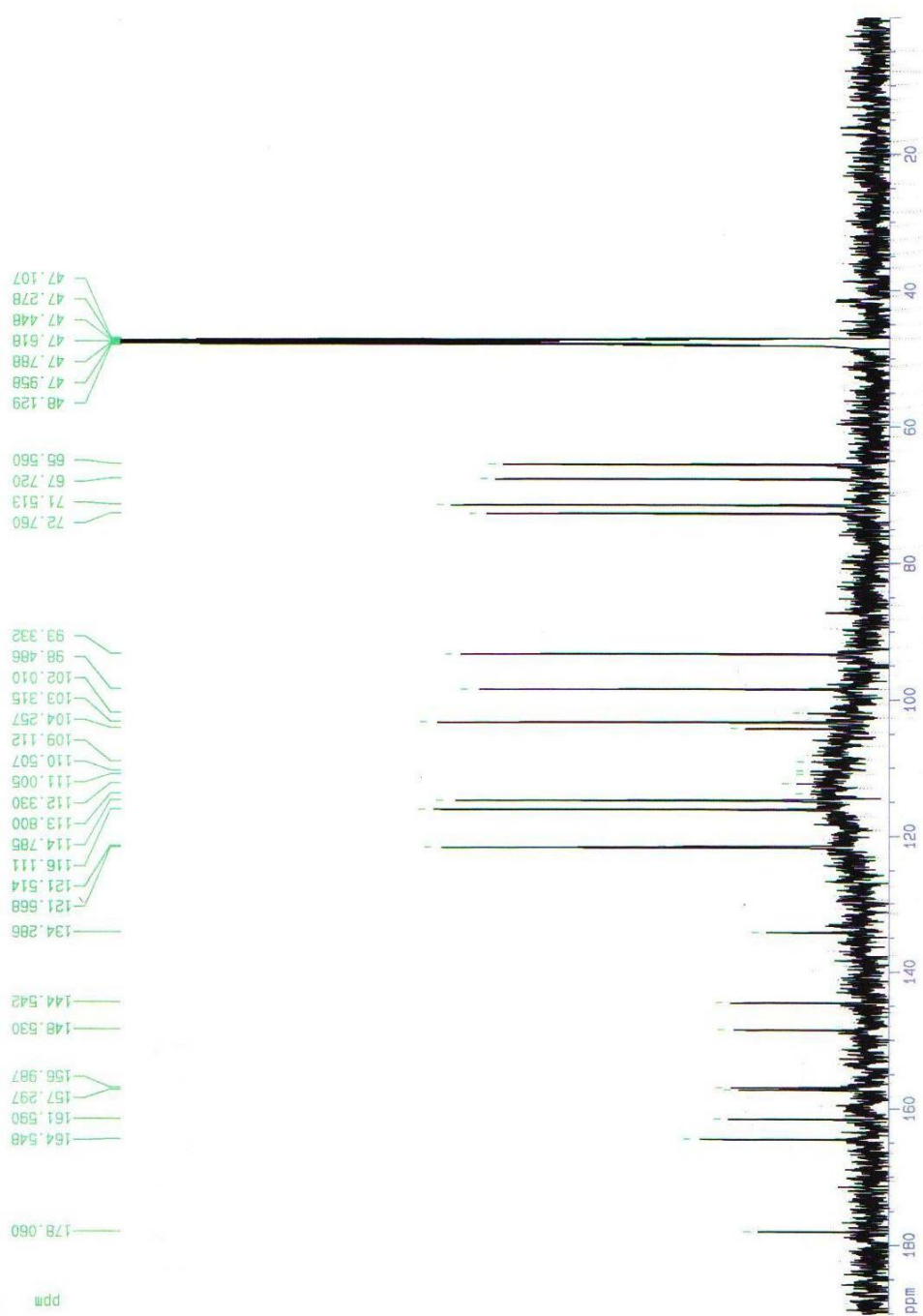
Espectro de correlação HMBC de HT4 em DMSO-d6 a 400/100 MHz



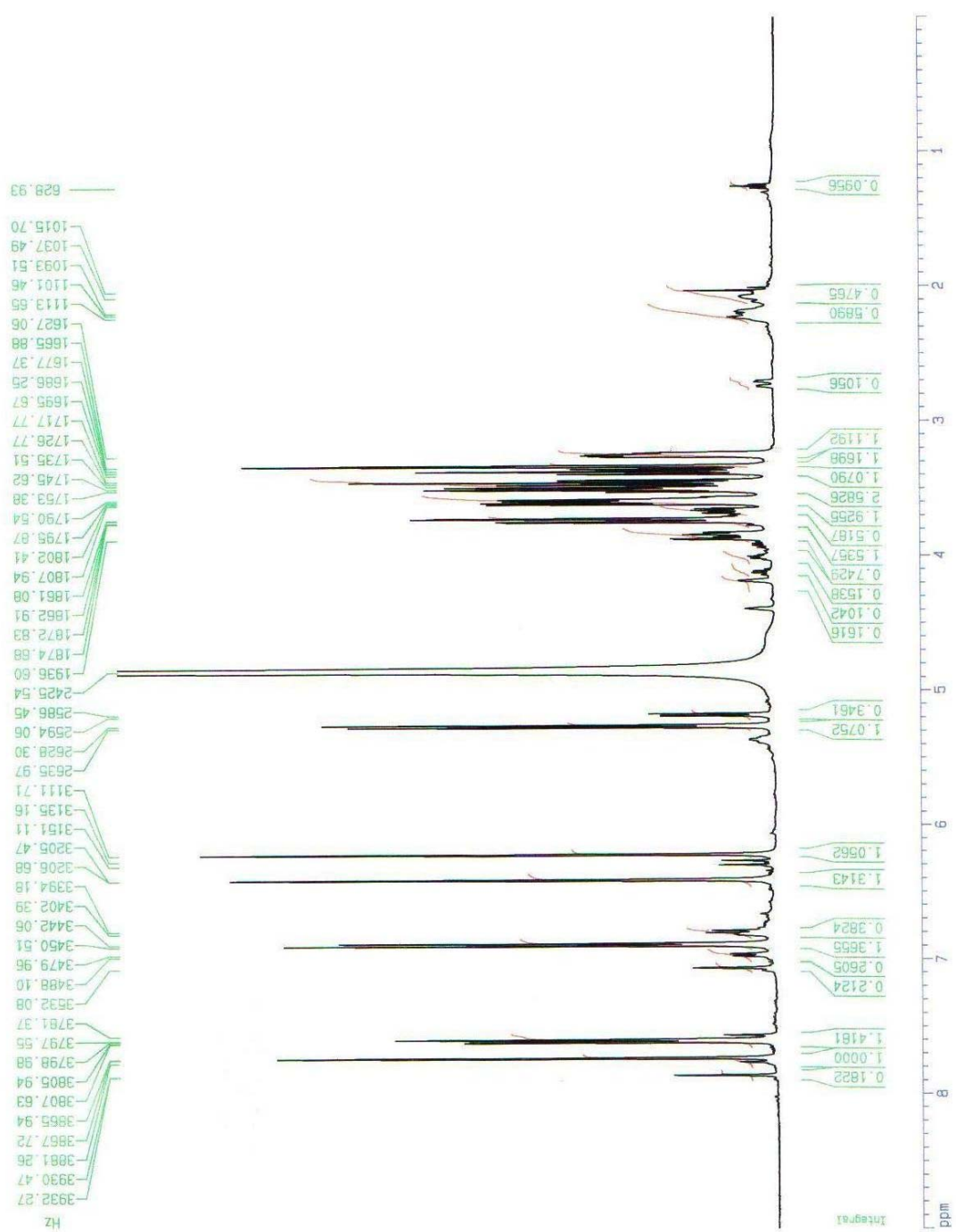
Espectros de UV da substância HT5



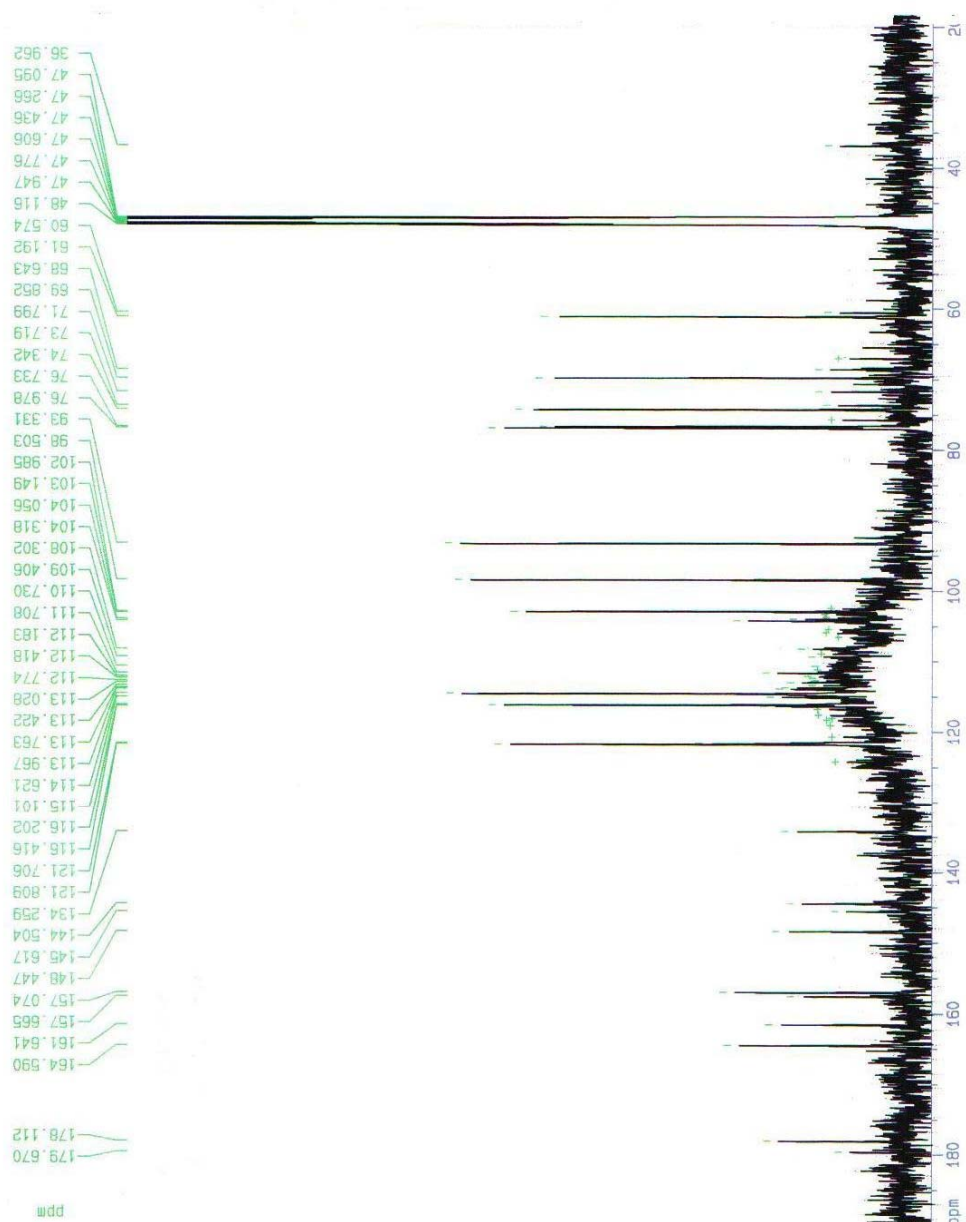
Espectro de RMN-¹H de HT5 em MeOD a 500 MHz



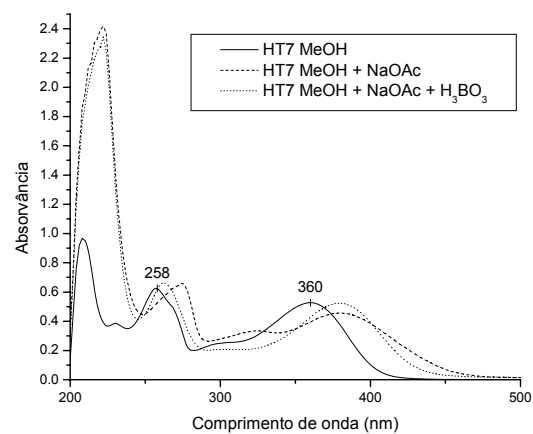
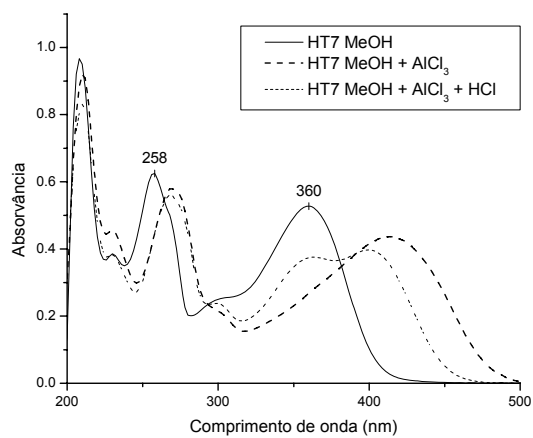
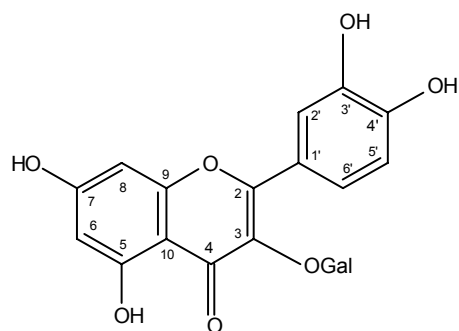
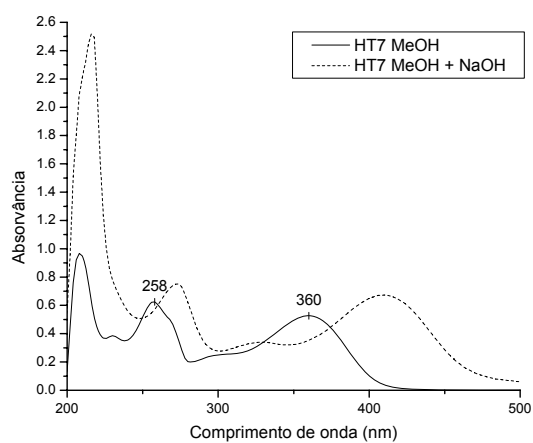
Espectro de RMN- ^{13}C de HT5 em MeOD a 125 MHz



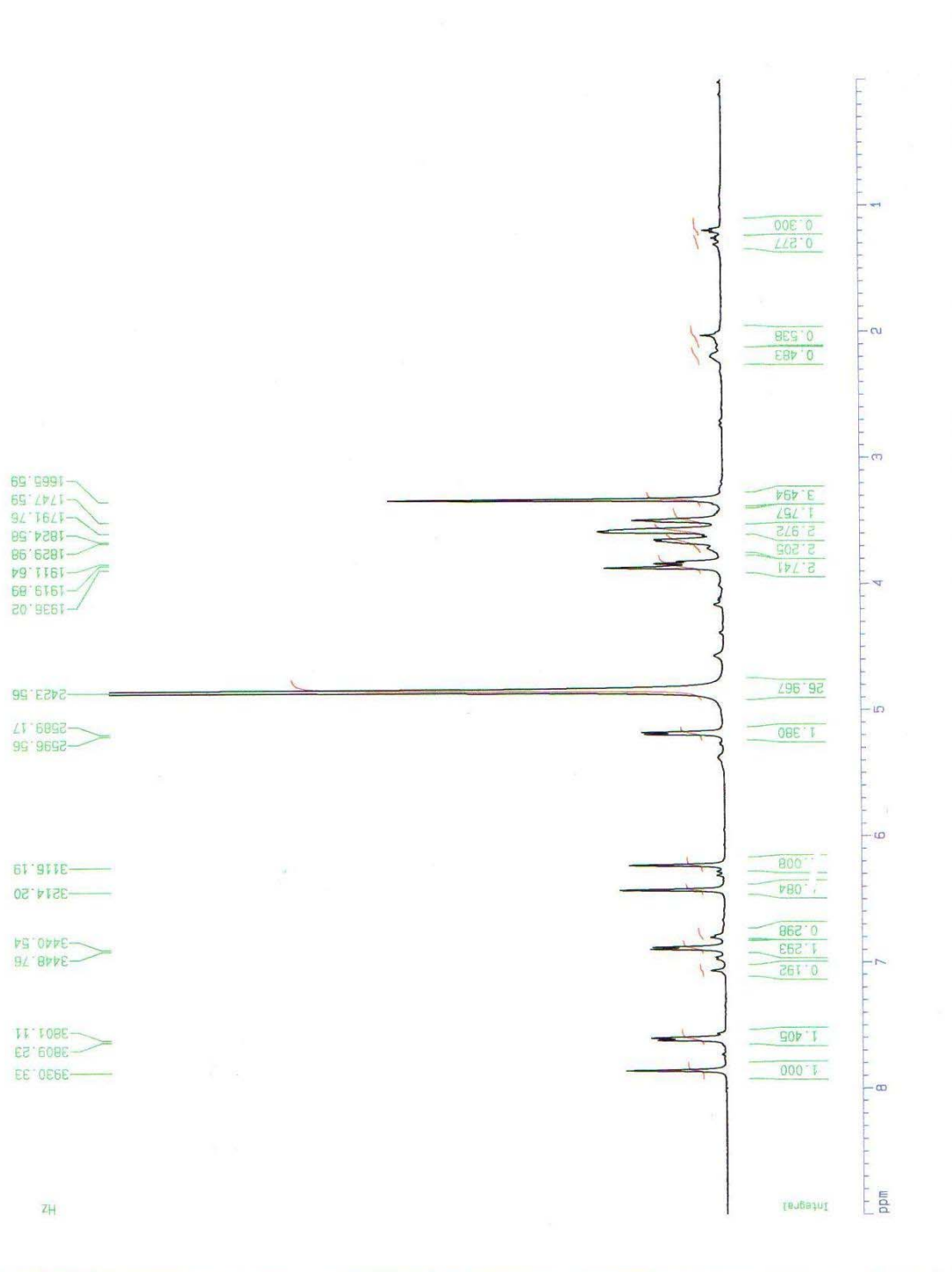
Espectro de RMN-¹H de HT6 em MeOD a 500 MHz



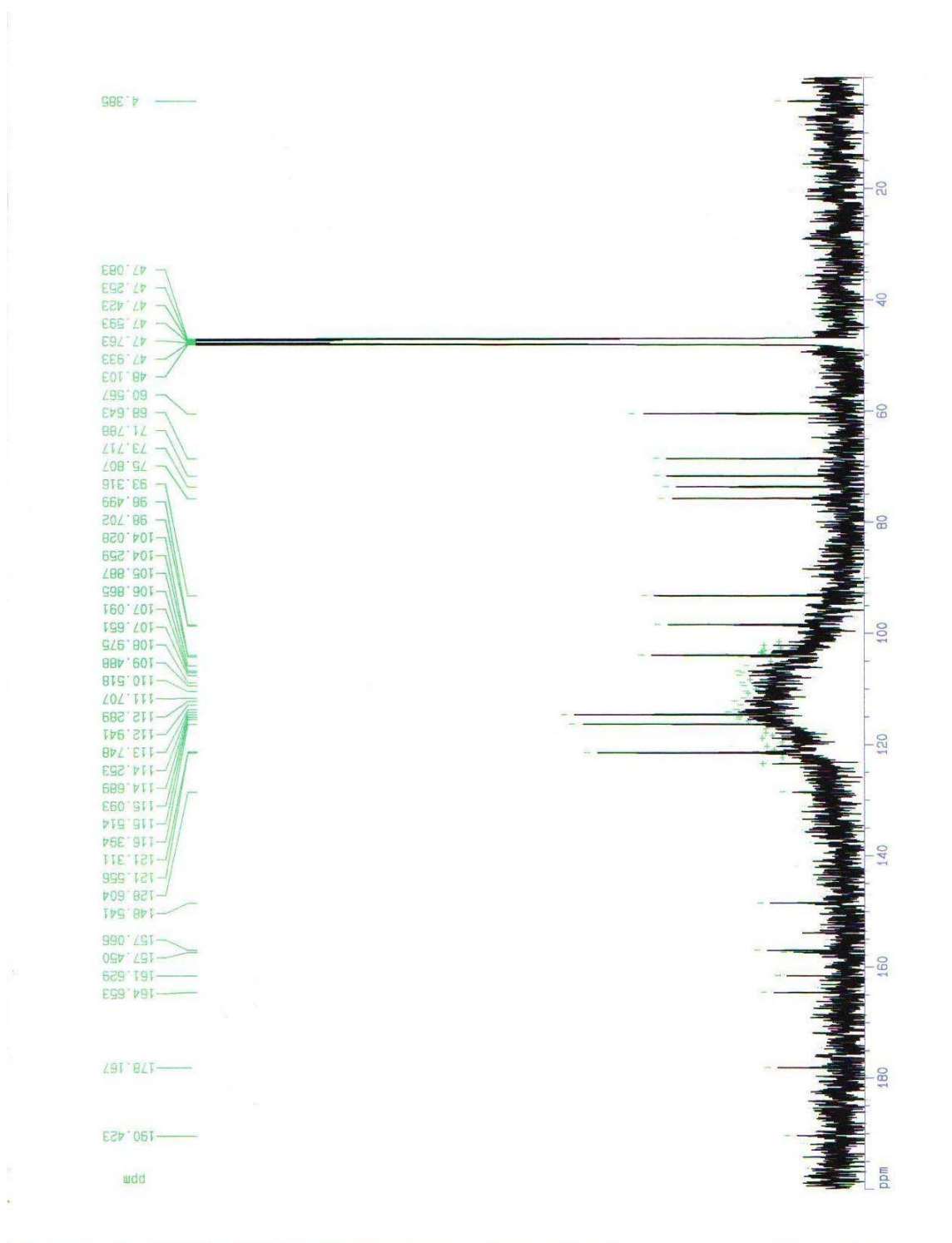
Espectro de RMN- ^{13}C de HT6 em MeOD a 125 MHz



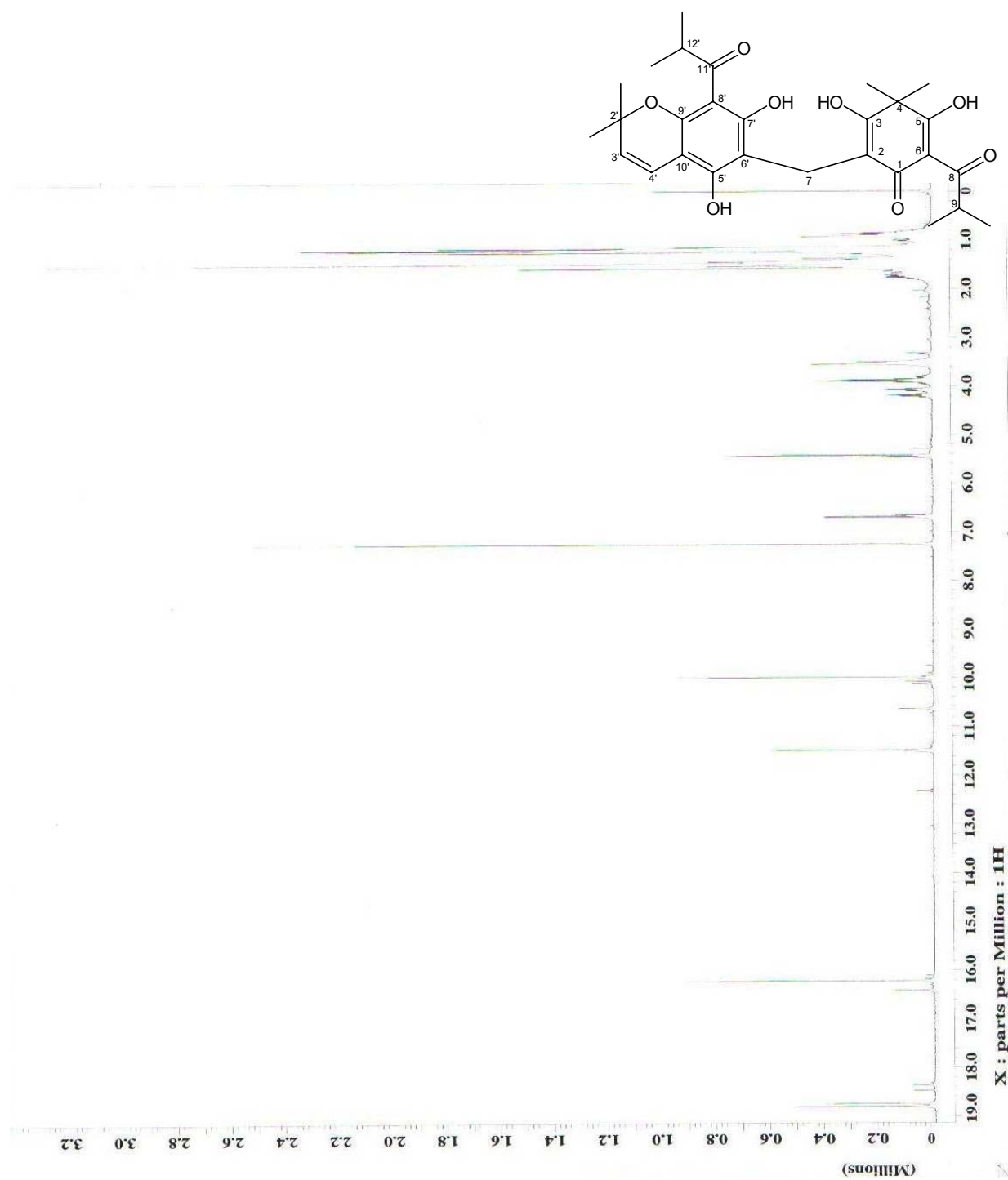
Espetros de UV da substância HT7



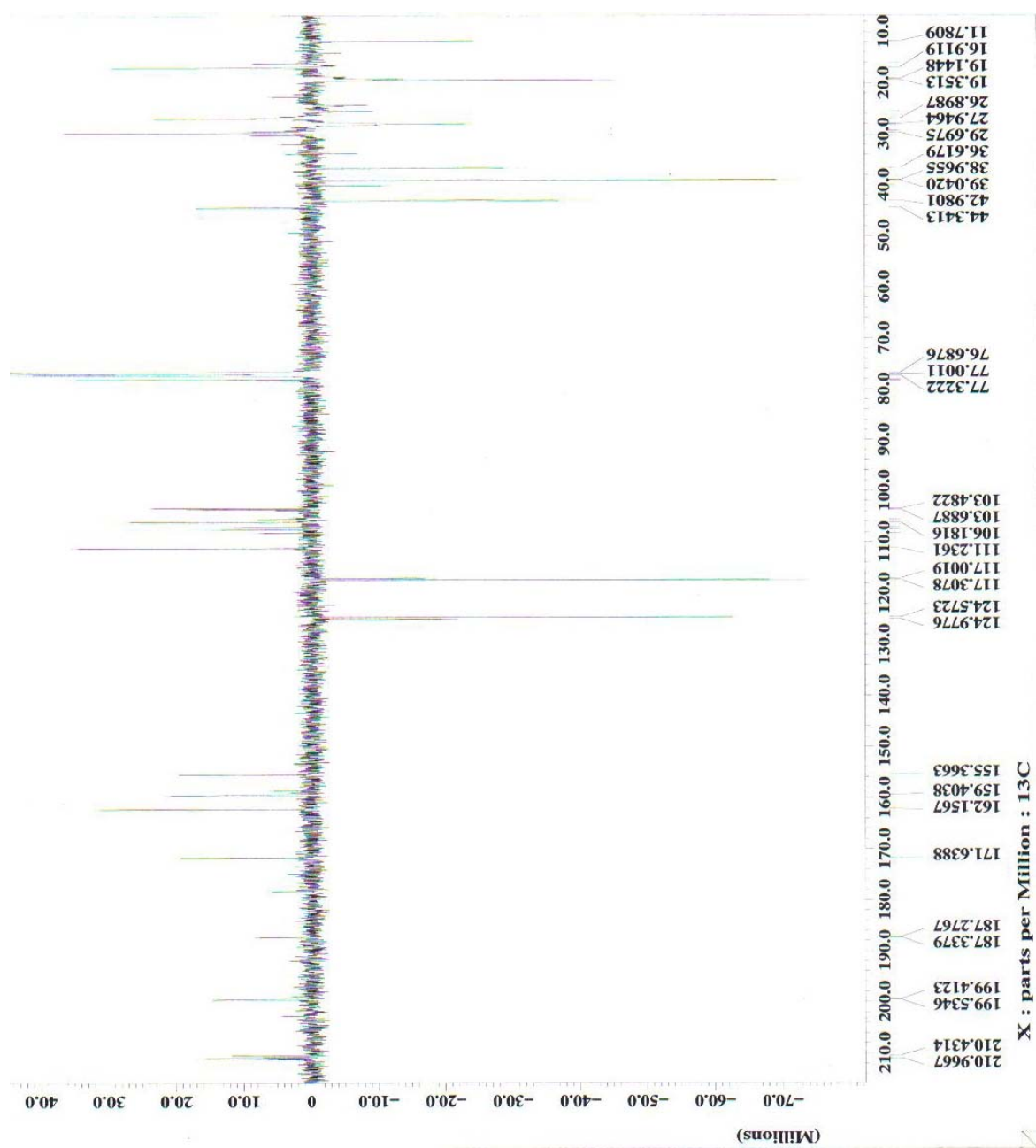
Espectro de RMN-¹H de HT7 em MeOD a 500 MHz



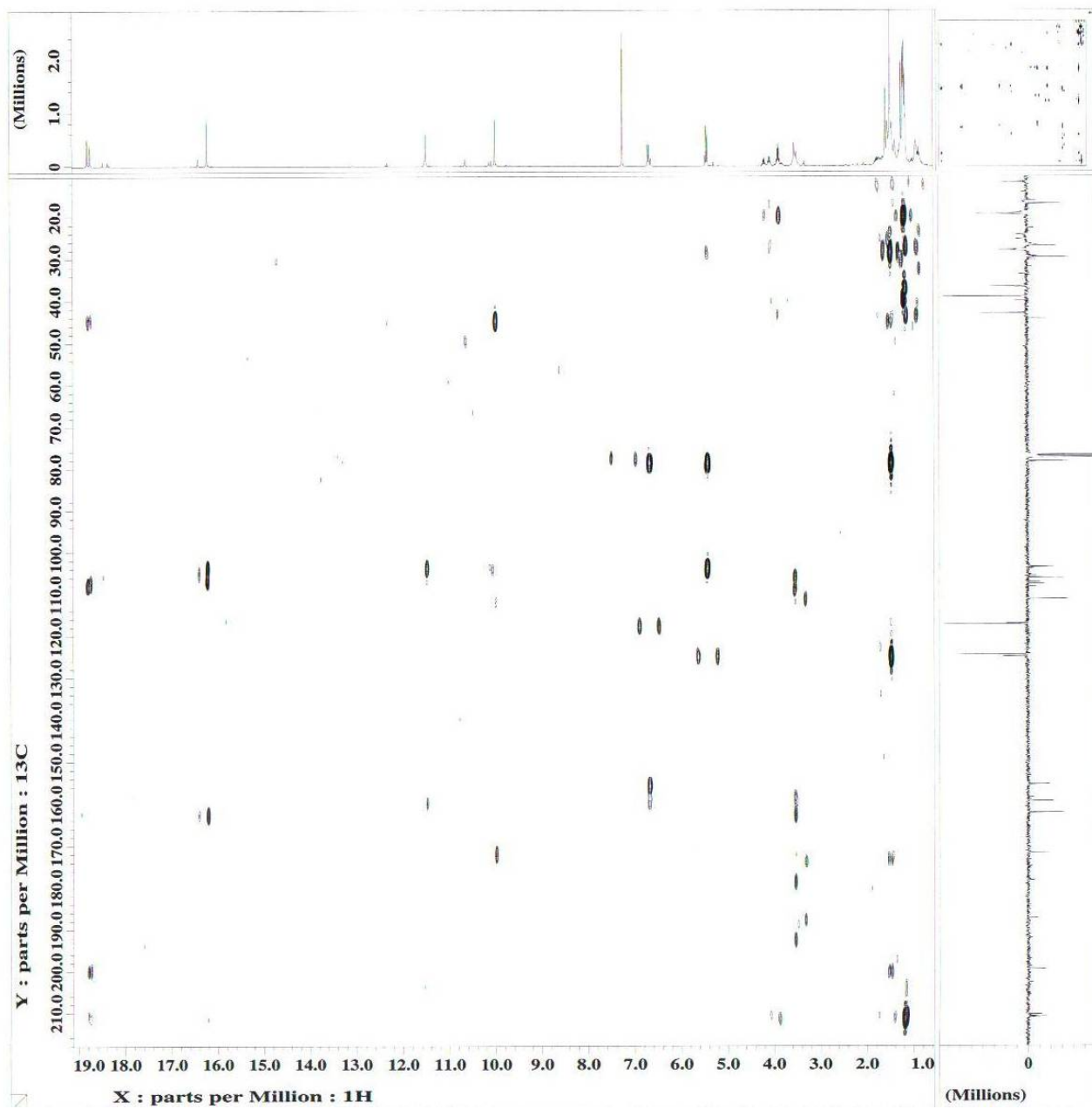
Espectro de RMN-¹³C de HT7 em MeOD a 125 MHz



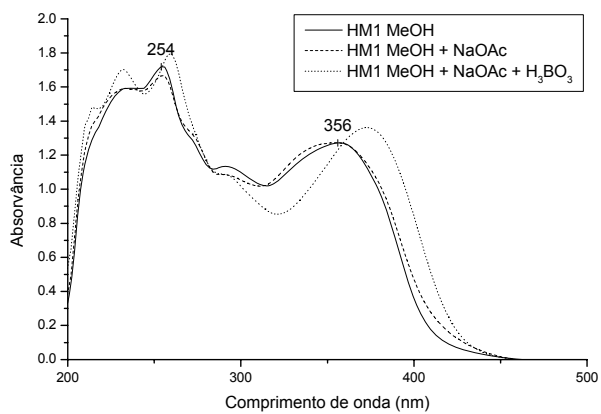
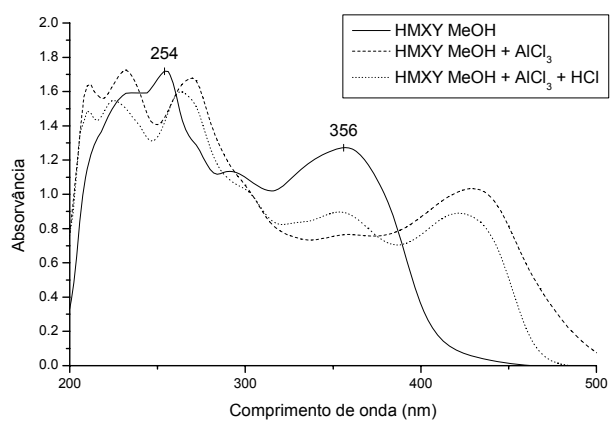
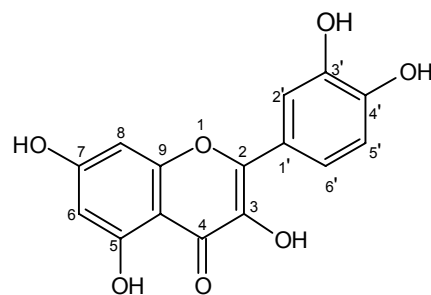
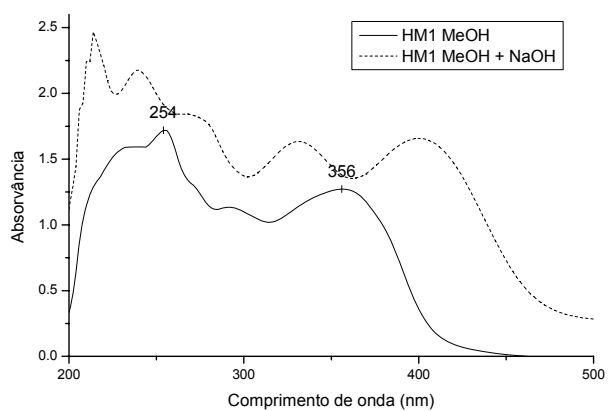
Espectro de RMN- ^1H de HTR1 em CDCl_3 a 400 MHz



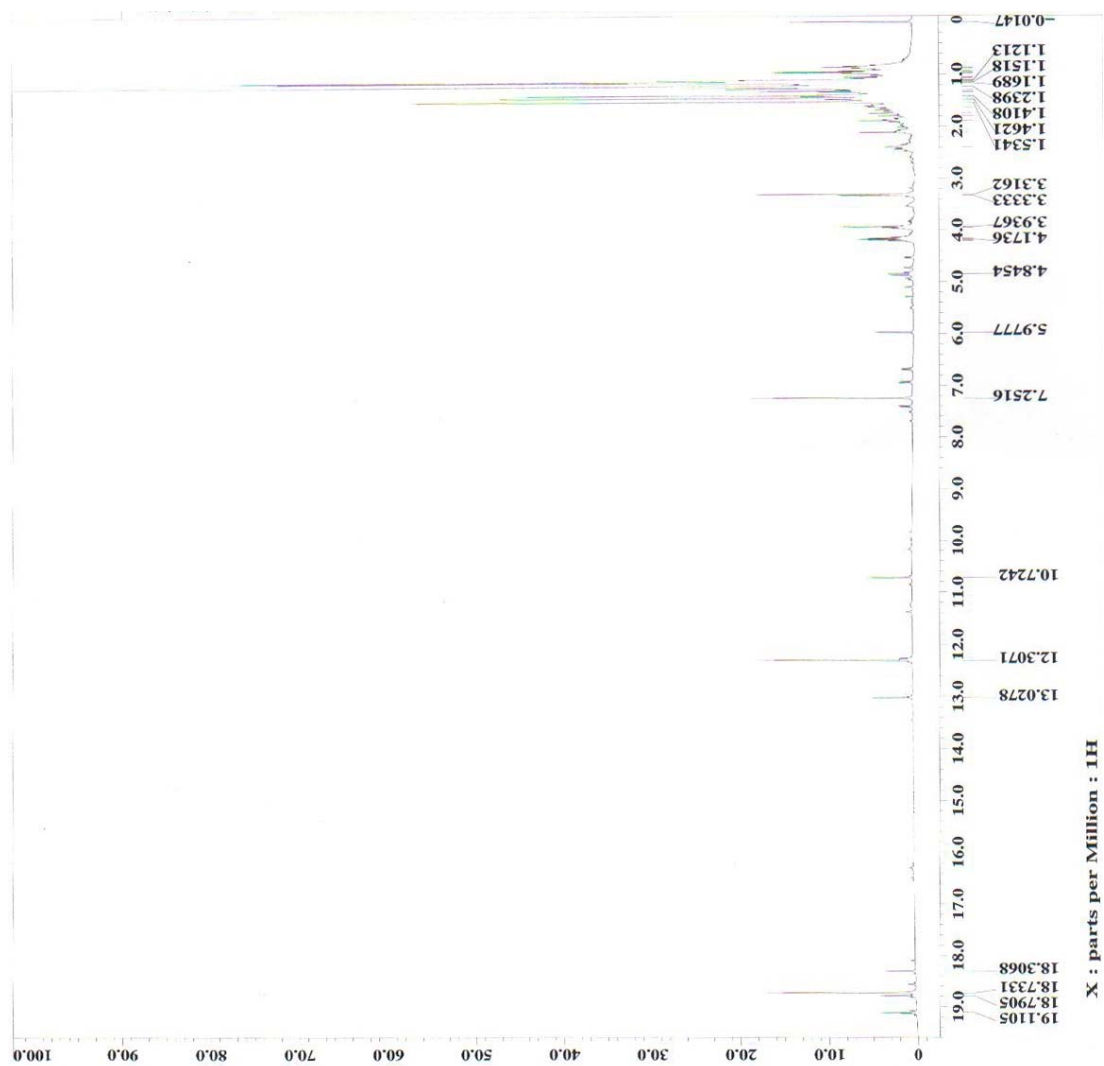
Espectro de RMN-¹³C (APT) de HTR1 em CDCl₃ a 100 MHz



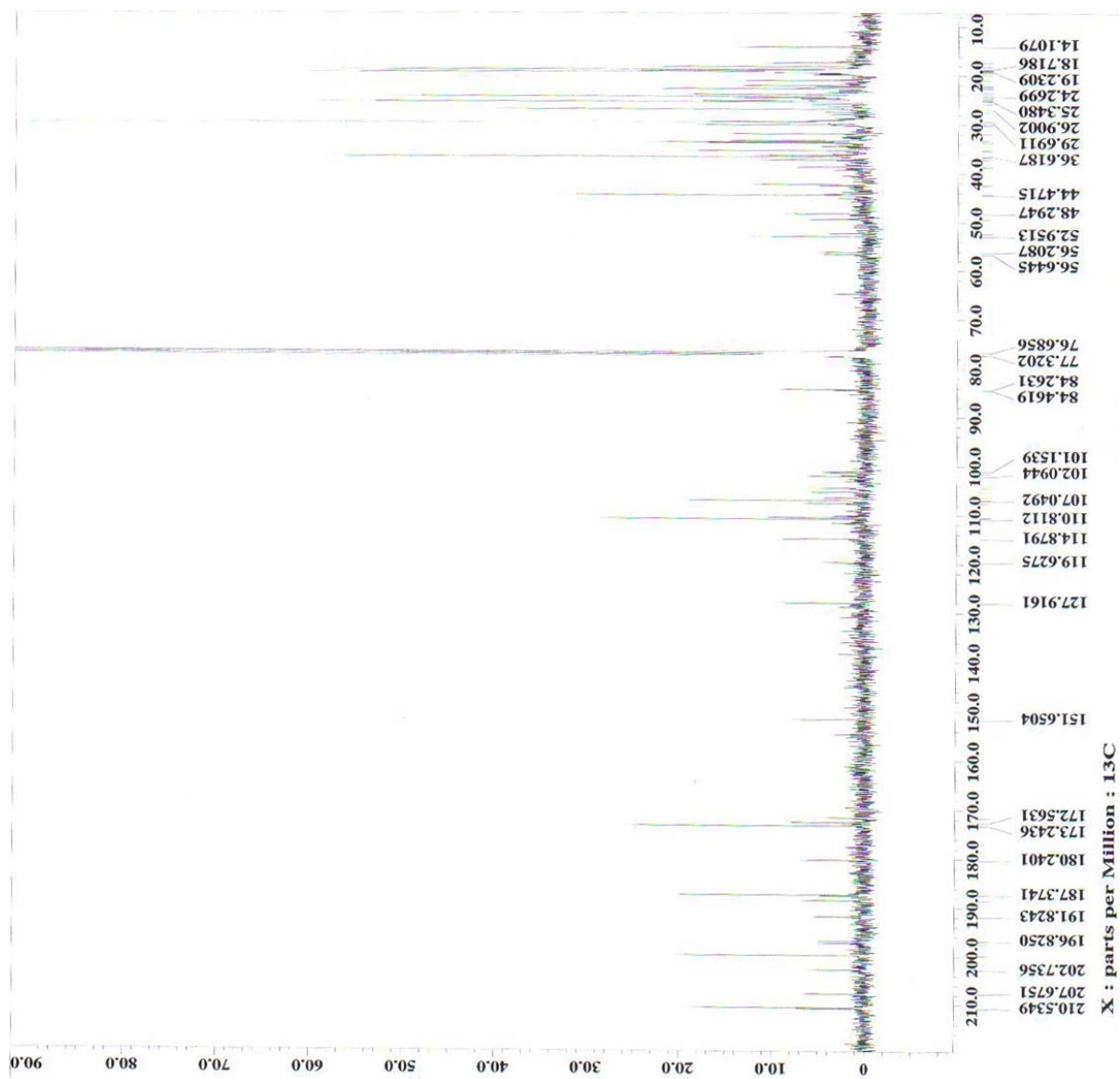
Espectro de correlação de HMBC de HTR1 em CDCl₃ a 400/100 MHz



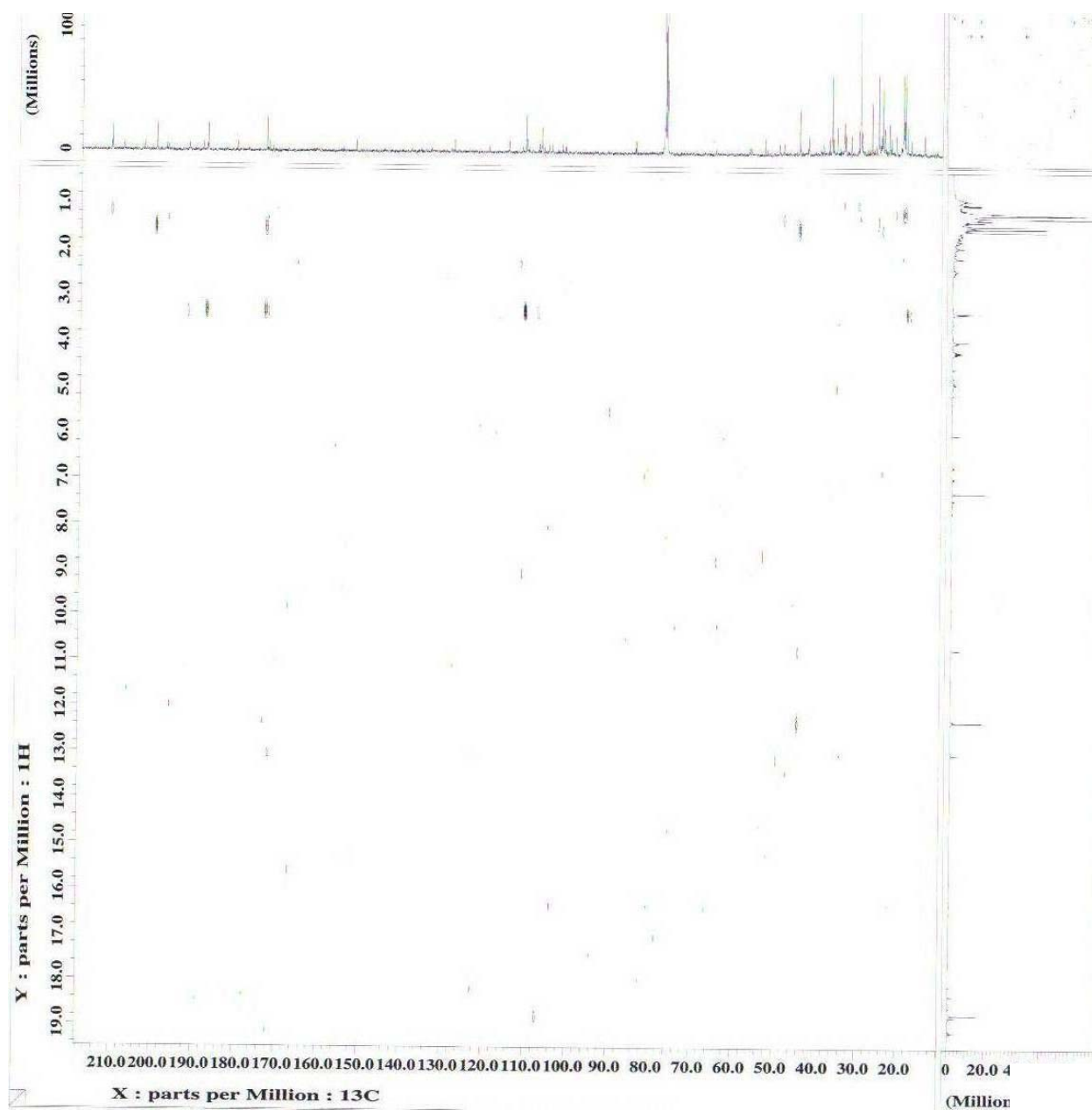
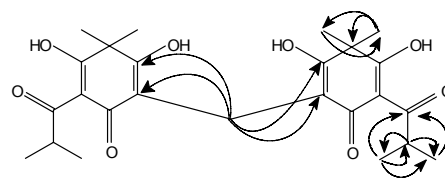
Espectros de UV da substância HM1



Espectro de RMN-¹H de HMR2 em CDCl₃ a 400 MHz



Espectro de RMN-¹³C de HMR2 em CDCl₃ a 100 MHz



Espectro de correlação HMBC de HMR2 em CDCl₃ a 400/100 MHz

ANEXO III – *Tabelas contendo os dados obtidos a partir dos espectros de UV, RMN¹H e de RMN¹³C para as substâncias isoladas*

Tabela 1.1a: Valores máximos de absorção no UV da substância HT1

Solventes mais reativos	Máximos (nm)				Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda II		Banda I	Banda II	
MeOH	Ia	Ib	IIa	IIb	-	-	Banda I: flavonol com hidroxila em C3 substituída Banda II a e b: substituição <i>orto</i> -di-OH no anel B (C3' e C4')
MeOH + NaOH	358,	296 <i>sh</i>	268 <i>sh</i> ,	256	+32	+12	Ausência de 7-OH livre Deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm da banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre e ausência de 3-OH livre
MeOH + AlCl ₃	430,	330 <i>sh</i> ,	276		+72	+20	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	400,	364,	268		-30 (em relação ao espectro AlCl ₃) +42 (em relação ao espectro MeOH)	+12	Deslocamento hipsocrômico da banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Deslocamento batocrômico na ordem de 35-55 nm da banda I para banda Ia, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre e confirma substituição em 3-OH.
MeOH + NaOAc	420 <i>sh</i> ,	362	262		+4	+6	Presença de 7-OH substituída ou ausência de -OH em C7, uma vez que apenas deslocamentos batocrômicos na ordem de 8-20 nm da Banda II confirmam 7-OH livre.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	378,	298 <i>sh</i>	264		+20 (em relação ao espectro MeOH)	+8	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da banda I confirma a presença de <i>orto</i> -di-OH no anel B

Tabela 1.1b: Valores máximos de absorção no UV da substância HT2

Solventes mais reativos	Máximos (nm)				Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda II		Banda I	Banda II	
MeOH	Ia	Ib	IIa	IIb	-	-	Banda I: flavonol com hidroxila em C3 substituída Banda II a e b: substituição <i>orto</i> -di-OH no anel B (C3' e C4')
	356,	294 <i>sh</i>	267 <i>sh</i> ,	256			
MeOH + NaOH	404,	327 <i>sh</i>	272		+48	+16	O aparecimento de uma nova banda ou ombro, entre 320-335 nm, é indicativo da presença de 7-OH livre. Deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm da banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre e ausência de 3-OH livre
MeOH + AlCl ₃	424,	326 <i>sh</i> ,	276		+68	+20	-
	302 <i>sh</i>						
MeOH + AlCl ₃ + HCl	400,	360,	276 <i>sh</i> ,	268	-24 (em relação ao espectro AlCl ₃) +44 (em relação ao espectro MeOH)	+12	Deslocamento hipsocrômico da banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Deslocamento batocrômico na ordem de 35-55 nm da banda I para banda Ia, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre e confirma substituição em 3-OH.
MeOH + NaOAc	378,	324 <i>sh</i>	274		+22	+18	Deslocamento batocrômico da banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	378,	299 <i>sh</i>	264		+22 (em relação ao espectro MeOH)	+8	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da banda I confirma a presença de <i>orto</i> -di-OH no anel B

Tabela 1.1c: Valores máximos de absorção no UV da substância HT3

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I	Banda II	Banda I	Banda II	
MeOH	326	270	-	-	Banda I: flavona Banda II: substituição por apenas uma -OH no anel B (C4')
MeOH + NaOH	386	282	+60	+12	O aparecimento de um ombro, entre 320-335 nm, é indicativo da presença de 7-OH livre. Deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm da banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH .
MeOH + AlCl ₃	340	282	+14	+12	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	la, lb 340, ~390 <i>sh</i>	la, lb 282, ~300 <i>sh</i>	+14	+12	Manutenção do deslocamento batocrômico da banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica ausência de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Deslocamento batocrômico da banda I, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre.
MeOH + NaOAc	~360 <i>sh</i>	276	+34	+8	Deslocamento batocrômico da banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	326	274	-	+4	Manutenção do deslocamento batocrômico da banda I, em relação ao espectro MeOH confirma ausência de <i>orto</i> -di-OH no anel B

Tabela 1.1d: Valores máximos de absorção no UV da substância HT5

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda I	Banda II	
MeOH	la 358, 299 <i>sh</i>	lb 268 <i>sh</i> , 258	-	-	Banda I: flavonol com hidroxila em C3 substituída Banda II a e b: substituição <i>orto</i> -di-OH no anel B (C3' e C4')
MeOH + NaOH	406, 325 <i>sh</i>	272	+48	+14	O aparecimento de uma nova banda ou ombro, entre 320-335 nm, é indicativo da presença de 7-OH livre. Deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm da banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre e ausência de 3-OH livre
MeOH + AlCl ₃	414, 303 <i>sh</i>	268	+56	+10	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	400, 364 301 <i>sh</i>	268	-14 (em relação ao espectro AlCl ₃) +42 (em relação ao espectro MeOH)	+10	Deslocamento hipsocrômico da banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Deslocamento batocrômico na ordem de 35-55 nm da banda I para banda Ia, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre e confirma substituição em 3-OH.
MeOH + NaOAc	370, 325 <i>sh</i>	270, 256 <i>sh</i>	+12	+12	Deslocamento batocrômico da banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	378, 299 <i>sh</i>	264	+20 (em relação ao espectro MeOH)	+6	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da banda I confirma a presença de <i>orto</i> -di-OH no anel B

Tabela 1.1e: Valores máximos de absorção no UV da substância HT6

Solventes mais reativos	Máximos (nm)				Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda II		Banda I	Banda II	
MeOH	la	lb	IIa	IIb	-	-	Banda I: flavonol com hidroxila em C3 substituída Banda II a e b: substituição <i>orto</i> -di-OH no anel B (C3' e C4')
MeOH + NaOH	406, 324 <i>sh</i>		272		+50	+16	O aparecimento de uma nova banda ou ombro, entre 320-335 nm, é indicativo da presença de 7-OH livre. Deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm da banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre e ausência de 3-OH livre
MeOH + AlCl ₃	414, 303 <i>sh</i>		270		+58	+14	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	402, 358 301 <i>sh</i>		268		-12 (em relação ao espectro AlCl ₃) +46 (em relação ao espectro MeOH)	+12	Deslocamento hipsocrômico da banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Deslocamento batocrômico na ordem de 35-55 nm da banda I para banda Ia, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre e confirma substituição em 3-OH.
MeOH + NaOAc	378, 324 <i>sh</i>		274		+22	+18	Deslocamento batocrômico da banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	378, 300 <i>sh</i>		266		+22 (em relação ao espectro MeOH)	+10	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da banda I confirma a presença de <i>orto</i> -di-OH no anel B

Tabela 1.1f: Valores máximos de absorção no UV da substância HT7

Solventes mais reativos	Máximos (nm)				Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda II		Banda I	Banda II	
MeOH	Ia	Ib	IIa	IIb	-	-	Banda I: flavonol com hidroxila em C3 substituída Banda II a e b: substituição <i>orto</i> -di-OH no anel B (C3' e C4')
	360,	299 <i>sh</i>	268 <i>sh</i> ,	258			
MeOH + NaOH	410,	325 <i>sh</i>	274		+50	+16	O aparecimento de uma nova banda ou ombro, entre 320-335 nm, é indicativo da presença de 7-OH livre. Deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm da banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre e ausência de 3-OH livre
MeOH + AlCl ₃	414,	303 <i>sh</i>	268		+54	+10	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	400,	364,	268		-14 (em relação ao espectro AlCl ₃) +40 (em relação ao espectro MeOH)	+10	Deslocamento hipsocrômico da banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Deslocamento batocrômico na ordem de 35-55 nm da banda I para banda Ia, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre e confirma substituição em 3-OH.
MeOH + NaOAc	380,	324 <i>sh</i>	274		+20	+16	Deslocamento batocrômico da banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	380		268		+20 (em relação ao espectro MeOH)	+10	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da banda I confirma a presença de <i>orto</i> -di-OH no anel B

Tabela 1.1g: Valores máximos de absorção no UV da substância HM1

Solventes mais reativos	Máximos (nm)				Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda II		Banda I	Banda II	
MeOH	la	lb	IIa	IIb	-	-	Banda I (352-385) e banda II (250-280): flavonol com hidroxila livre em C3. Banda II a e b: substituição <i>orto</i> -di-OH no anel B (C3' e C4').
	356	292 <i>sh</i>	270 <i>sh</i>	254			
MeOH + NaOH	400	324 <i>sh</i>	266		+44	+12	Aparecimento de uma nova banda ou ombro entre 320-335 nm, indica a presença de hidroxila livre em C-7. Banda I: deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm com diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH e 3-OH livres.
MeOH + AlCl ₃	430	356	270		+74	+16	-
		302 <i>sh</i>					
MeOH + AlCl ₃ + HCl	422	354	304 <i>sh</i>	264	-8 (em relação ao espectro AlCl ₃) +66 (em relação ao espectro MeOH)	+10	Banda I: deslocamento hipsocrômico em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em <i>orto</i> no anel B. Desvio batocrômico na ordem de 50-60 nm, em relação ao espectro metanol, indica a presença de 3,5-di-OH
MeOH + NaOAc	354	330 <i>sh</i>	272 <i>sh</i>	254	-2	-	-
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	374	290 <i>sh</i>	260		+16 (em relação ao espectro MeOH)	+6	Banda I: Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm, em relação ao espectro metanol, confirma a presença de <i>orto</i> -di-OH no anel B.

Tabela 1.2: Dados de RMN de ^{13}C (125 MHz) dos compostos HT1, HT2, HT5, HT6 e HT7, isolados da fração acetato de etila das partes aéreas de *H. ternum*.

C	HT1	HT2	HT5	HT6	HT7
	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (ppm)
C2	158,3	157,8	158,4	158,5	158,5
C3	139,8	139,5	135,7	135,6	135,6
C4	180,1	179,9	179,5	179,5	179,6
C5	167,2	162,9	163,0	163,1	163,0
C6	98,9	99,9	99,9	99,9	99,9
C7	169,8	166,2	165,9	165,9	166,0
C8	93,1	94,8	94,7	94,7	94,7
C9	162,8	158,3	158,7	159,1	158,9
C10	106,7	105,7	105,6	105,7	105,7
C1'	127,7	122,9	123,1	123,2	122,9
C2'	116,5	116,4	116,2	116,0	116,5
C3'	146,8	146,4	145,9	145,9	145,8
C4'	149,6	149,9	149,9	149,8	149,9
C5'	115,9	116,8	117,5	117,6	117,8
C6'	122,9	122,3	122,9	123,1	122,7
3-OCH ₃	60,5	60,5	-	-	-
7-OCH ₃	56,5	-	-	-	-
C1''	-	-	104,7	104,5	105,4
C2''	-	-	74,2	75,7	73,2
C3''	-	-	72,9	78,1	75,1
C4''	-	-	69,1	71,2	70,0
C5''	-	-	66,9	78,4	77,2
C6''	-	-	-	62,6	62,0

* Dados experimentais medidos em MeOD.

Tabela 1.3: Dados de RMN de ^1H (500 MHz) dos compostos HT1, HT2, HT5, HT6 e HT7, isolados da fração acetato de etila das partes aéreas de *H. ternum* (J: constantes de acoplamento em Hz).

H	HT1	HT2	HT5	HT6	HT7
	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)	δ_{H} (ppm)
H6	6,32 (s)	6,38 (s)	6,20 (s)	6,22 (s)	6,22 (s)
H8	6,58 (s)	6,55 (s)	6,39 (s)	6,41 (d, J=1,2)	6,42 (s)
H2'	7,67 (s)	7,90 (s)	7,70 (s)	7,73 (d, J= 1,8)	7,86 (s)
H5'	6,79 (d, J= 8,2)	7,01 (bs)	6,88 (d, J= 8,4)	6,89 (d, J=8,5)	6,88 (d, J= 8,2)
H6'	6,91 (m)	7,70 (bs)	7,58 (dd, J= 1,1; 8,4)	7,61 (dd, J= 1,5; 8,7)	7,60 (d, J= 8,1)
3-OCH ₃	3,82 (s)	3,98 (s)	-	-	-
7-OCH ₃	3,89 (s)	-	-	-	-
H1''	-	-	5,16 (d, J= 6,5)	5,28 (d, J= 7,7)	5,18 (d, J= 7,4)
H2''	-	-	3,92 (m)	3,50 (m)	3,85 (m)
H3''	-	-	3,67 (dd, J= 2,5; 8,3)	3,45 (t, J=8,9)	3,66 (bd)
H4''	-	-	3,84 (bs)	3,37 (t, J= (9,1)	3,58 (bs)
H5''a	-	-	3,84 (bs)	3,24 (m)	3,49 (bs)
H5''b	-	-	3,47 (d, J=10,8)	-	-
H6''a	-	-	-	3,74 (dd; J=1,8; 11,7)	3,58 (bs)
H6''b	-	-	-	3,59 (dd, J= 5,4; 12,0)	3,66 (bd)

* Dados experimentais medidos em MeOD.

Tabela 1.4: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) do composto HT3, isolado da fração acetato de etila das partes aéreas de *H. ternum* (J: constantes de acoplamento em Hz).

Posição	δC (ppm)	δH (ppm)
2	165,9	-
3	112,0	-
4	183,9	-
5	162,8	-
6	100,4	6,26 (s)
7	167,2	-
8	95,1	6,47 (d, J=1,8)
9	159,6	-
10	104,6	-
1'	125,2	-
2', 6'	131,0	6,63 (d, J=8,8)
3', 5'	116,1	7,32 (d, J=8,8)
4'	161,3	-
2''	165,9	-
3''	103,6	6,52 (s)
4''	182,8	-
5''	161,3	-
6''	100,5	6,26 (s)
7''	165,9	-
8''	101,2	-
9''	156,9	-
10''	105,2	-
1'''	123,2	-
2''', 6'''	129,1	6,76 (d, J=8,8)
3''', 5'''	117,0	7,53 (d, J=9,2)
4'''	163,1	-

* Dados experimentais medidos em MeOD.

Tabela 1.5: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) do composto HT4, isolado da fração acetato de etila das partes aéreas de *H. ternum* (J: constantes de acoplamento em Hz).

Posição	δC (ppm)	δH (ppm)
1	124,6	-
2	114,4	7,01 (s)
3	146,2	-
4	149,0	-
5	115,9	6,73 (d, J=8,0)
6	121,4	6,93 (d, J=8,0)
7	145,3	7,37 (d, J=16,1)
8	113,2	6,07 (d, J=15,8)
9	165,4	-
1'	73,0	-
2' ax	37,2	1,73-1,79 (m)
2' eq		2,07-2,11 (m)
3'	66,9	3,88 (m)
4'	69,3	3,61 (m)
5'	70,9	5,01 (m)
6'ax	35,1	1,93 (dd, J= 2,9; 13,6)
6'eq		2,12 (m)
7'	173,6	-
OCH ₃	51,8	3,58 (s)

* Dados experimentais medidos em DMSO-d₆.

Tabela 1.7: Dados de RMN de ^1H do composto HTR1, isolado da fração *n*-hexano das raízes de *H. ternum*, e das substâncias estruturalmente relacionadas isouliginosina B, drummondina C e hiperbrasilol B (J: constantes de acoplamento em Hz).

H	HTR1 (1) δ_{H} (ppm)	Isouliginosina B (2) δ_{H} (ppm)	Drummondina C (3) δ_{H} (ppm)	Hiperbrasilol B (4) δ_{H} (ppm)
4-CH ₃	1,49 (s) 1,48 (s)	1,50 (s)	1,49 (bs)	1,51 (s)
H7	3,51 (bs)	3,52 (bm)	3,52 (bs)	3,55 (s)
H9	4,15-4,26 (m)	4,19 (m)	-	4,19 (m)
9-CH ₃	1,20 (d, J=6,7)*	1,17 (d, J=7)	2,74 (s)	1,17 (d, J=7)
2'-CH ₃	1,48 (s)	1,55 (s)	1,49 (bs)	1,53 (s)
H3'	5,44 (d, J=9,75)	5,46 (d, J=10)	5,44 (d, J=9,9)	5,59 (d, J=10)
H4'	6,70 (d, J=10,35)	6,71 (d, J=10)	6,68 (d, J=9,9)	6,66 (d, J=10)
H12'	3,84-3,95 (m)	4,05 (m)	-	4,00 (m)
12'-CH ₃	1,21 (d, J=6,7)*	1,17 (d, J=7)	2,69 (s)	1,20 (d, J=7)
3-OH	10,01 (s)	9,05 (s)	9,94 (s)	9,90 (s)
5-OH	18,76 (s)	18,80 (s)	18,42 (s)	18,80 (s)
5'-OH	11,50 (s)	-	11,47 (s)	11,40 (s)
7'-OH	16,22 (s)	11,69 (s)	15,88 (s)	16,35 (s)
9'-OH	-	14,14 (s)	-	-
H1''	-	-	-	2,8-2,5 (m)
H2''	-	-	-	4,60 (bt)
H3''	-	-	-	1,31 (s)
3''-CH ₃	-	-	-	1,34 (s)

1-Dados experimentais de HTR1 medidos a 400 MHz em CDCl₃

2-Dados medidos a 200 MHz em CDCl₃ ROCHA *et al.*, 1995.

3-Dados medidos a 300 MHz em CDCl₃ 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 1.8: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) do composto HTR1, isolado da fração *n*-hexano das raízes de *H. ternum*, e das substâncias estruturalmente relacionadas isouliginosina B, drummondina C e hiperbrasilol B.

C	HTR1 (1) δ_{C} (ppm)	Isouliginosina B (2) δ_{C} (ppm)	Drummondina C (3) δ_{C} (ppm)	Hiperbrasilol B (4) δ_{C} (ppm)
C1	199,4	199,1	198,7	199,2
C2	111,2	106,9	108,5	109,8
C3	171,6	170,0	171,8	170,7
C4	44,3	44,1	44,4	49,8
4-CH ₃	24,3	24,5	24,8	22,8
	25,4	25,0	-	-
C5	187,3	187,2	187,3	188,5
C6	107,6	111,3	111,2	114,2
C7	16,1	17,0	16,8	17,9
C8	210,8	211,9	207,1	211,9
C9	36,6	36,8	29,3	37,2
9-CH ₃	19,1	18,9	-	19,4
	19,4	18,9	-	19,5
C2'	78,2	80,5	78,2	79,2
2'-CH ₃	27,9	27,7	28,2	27,8
	27,9	27,7		27,9
C3'	124,6	124,1	124,7	124,1
C4'	117,3	117,1	117,2	117,5
C5'	159,4	154,6	159,4	160,0
C6'	107,1	104,9	106,0	107,2
C7'	162,2	160,1	161,2	162,7
C8'	103,7	105,7	104,8	104,3
C9'	155,4	160,4	155,9	156,1
C10'	103,5	102,1	103,6	104,2
C11'	211,2	210,9	203,5	210,8
C12'	39,0	39,5	32,2	39,7
12'-CH ₃	19,1	19,2	-	18,9
	19,4	19,2	-	19,8
C1''	-	-	-	39,3
C2''	-	-	-	118,2
C3''	-	-	-	136,5
3''-CH ₃	-	-	-	17,5

1-Dados experimentais de HTR1 medidos a 100 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.

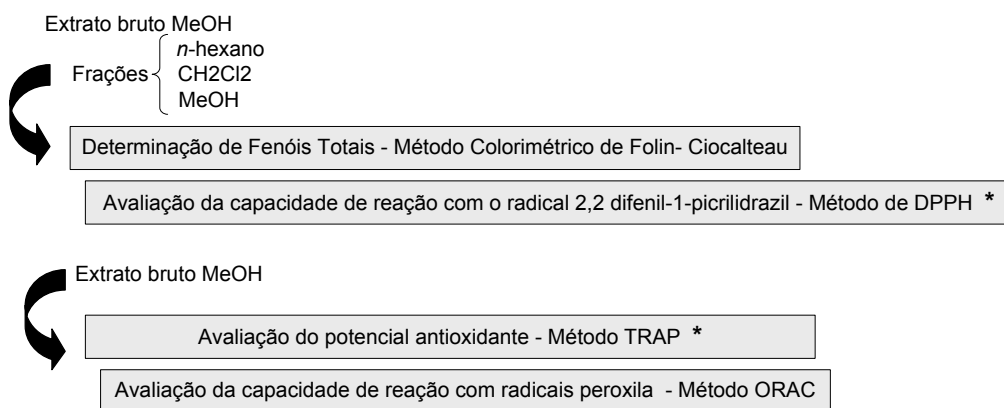
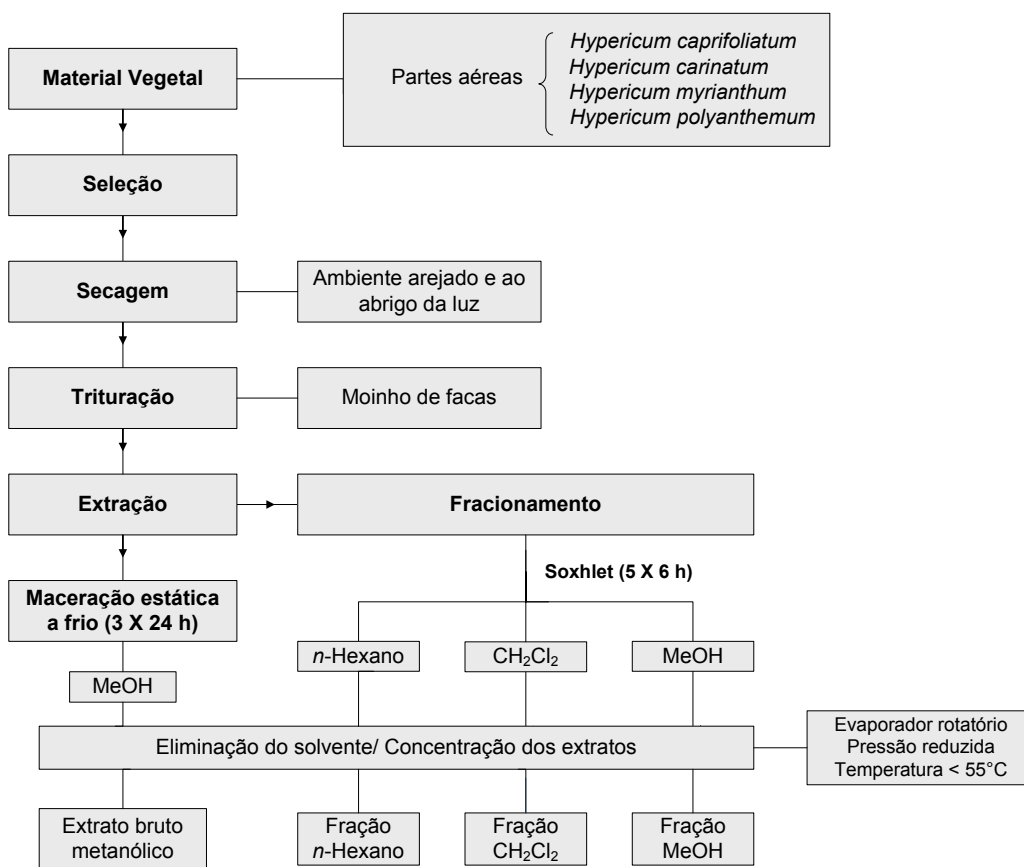
4-Dados medidos a 50 MHz em acetona-*d*₆ ROCHA *et al.*, 1996.

Tabela 1.9: Dados de RMN de ^{13}C (100 MHz) e de ^1H (400 MHz) do composto HMR2, isolado da fração *n*-hexano das raízes de *H. myrianthum* (J: constantes de acoplamento em Hz).

Posição	δC (ppm)	δH (ppm)
1	199,8	-
2	107,0	-
3	173,2	-
3-OH		12,31 (s)
4	44,5	-
4-CH ₃	24,3	1,41 (s)
	25,4	1,46 (s)
5	187,6	
5-OH		18,73 (s)
6	110,8	-
7	18,1	3,32 (bs)
8	210,5	-
9	36,6	4,15 (sept, J=6,8)
9-CH ₃	18,7	1,16 (d, J=6,8)
	19,3	1,16 (d, J=6,8)

* Dados experimentais medidos em CDCl₃.

ANEXO IV – Esquema da Metodologia descrita no Capítulo 2



* Substâncias isoladas das espécies de *Hypericum* foram avaliadas através destas técnicas

ANEXO V – “Benzophenones from *Hypericum carinatum*”

Benzophenones from *Hypericum carinatum*

Ana Paula M. Bernardi,[†] Alexandre B. F. Ferraz,[†] Daniela V. Albring,[†] Sérgio A. L. Bordignon,[†] Jan Schripsema,[‡] Raquel Bridi,[§] Carlos Severo Dutra-Filho,[§] Amélia T. Henriques,[†] and Gilsane Lino von Poser^{*,†}

Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Avenida Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil, Grupo Metabólica, LCQUI/CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Avenida Alberto Lamego, 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil, and Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2600, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil

Received July 6, 2004

Two new benzophenones were isolated from the leaves of *Hypericum carinatum*. Their structures were established on the basis of 2D NMR spectroscopic analyses and mass spectrometry as cariphenone A (6-benzoyl-5,7-dihydroxy-2,2,8-trimethyl-2H-chromene) (**1**) and cariphenone B (8-benzoyl-5,7-dihydroxy-2,2,6-trimethyl-2H-chromene) (**2**). Five known compounds, the phloroglucinol derivative uliginosin B (**3**), 1-icosanol, sitosterol, stigmasterol, and campesterol, were also characterized. Compounds **1–3** were evaluated for their total antioxidant capacity through a total radical-trapping parameter assay. Only compound **1** showed moderate antioxidant activity, exhibiting inhibition of chemiluminescence similar to that of quercetin at the same concentration.

The widespread interest in the antidepressive activity of *Hypericum perforatum* (Guttiferae) has encouraged us to further survey the chemical composition of the *Hypericum* species native to southern Brazil. Recently, in our laboratory some species were investigated, affording benzopyrans and phloroglucinol derivatives.^{1,2} In this paper, we report the structural elucidation of two new benzophenones isolated from the aerial parts of *Hypericum carinatum* Griseb. (Guttiferae), native to southern Brazil.

Guttiferae is a rich source of benzophenones, a group of substances with cytotoxic and anti-HIV^{3,4} activities. This group of compounds has been isolated from genera such as *Allamblackia*, *Clusia*, *Ochrocarpus*, and *Vismia*.^{3–6} The benzophenones found in Guttiferae may be divided into two main groups: prenylated trihydroxybenzophenones and polyisoprenylated benzophenones in which the acetate-derived ring has been modified.⁷

It has been reported that some benzophenones (i.e., garcinol) possess free radical scavenging abilities.^{8,9} In this way, the antioxidant capacity of cariphenones A and B as well as uliginosin B was assessed by total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP) assay, a convenient initial screening method for antioxidative natural products.¹⁰

The *n*-hexane extract of the aerial parts of *H. carinatum* yielded two main compounds, which were separated by chromatographic techniques. Compound **1** was obtained as a yellow oily material and gave a positive reaction to methanolic ferric chloride reagent. Peaks in the mass spectrum at *m/z* 77 [Ph]⁺ and *m/z* 105 [Ph – CO]⁺ indicated a compound with a monosubstituted benzene ring. The NMR spectra of **1** indicated that two aromatic ring systems were present, one fully substituted and the other monosubstituted (Table 1). The wide differences in chemical shifts between the oxygenated and nonoxygenated aromatic carbons, observed in the ¹³C NMR spectrum of **1**, were indicative of a phloroglucinol oxidation pattern in the fully substituted aromatic ring. The carbonyl group (δ 197.2 ppm) showed an IR absorption band at 1630 cm⁻¹, sug-

Table 1. ¹H NMR (δ , in CDCl₃, 400 MHz) and ¹³C NMR (δ , in CDCl₃, 100 MHz) Data for Compounds **1** and **2**^a

	¹ H		¹³ C		
	1	2	1	2	
H-3	5.49 (1H, d, <i>J</i> = 10.0)	5.31 (1H, d, <i>J</i> = 10.0)	C-2	77.8	77.3
H-4	6.59 (1H, d, <i>J</i> = 10.0)	6.49 (1H, d, <i>J</i> = 10.0)	C-3	125.8	125.5
H-11; H-12 (2-Me)	1.46 (6H, s)	0.98 (6H, s)	C-4	116.0	115.8
H-13 (Me)	1.99 (3H, s)	2.10 (3H, s)	C-5	154.5	156.0
5-OH	8.79 (1H, s)	5.38 (1H, s)	C-6	103.9	101.8
7-OH	9.09 (1H, s)	12.70 (1H, s)	C-7	159.6	162.4
2', 6'	7.64 (1H, d)	7.47 (1H, d)	C-8	104.8	105.4
3', 5'	7.54 (1H, t)	7.37 (1H, t)	C-9	159.4	154.1
4'	7.60 (1H, t)	7.44 (1H, t)	C-10	102.2	101.2
			C-11	28.4	27.1
			C-12	28.4	27.1
			C-13	7.1	7.0
			CO	197.2	200.5
			C-1'	139.7	142.8
			C-2'	127.7	127.1
			C-3'	129.4	127.5
			C-4'	132.3	129.9
			C-5'	129.4	127.5
			C-6'	127.7	127.1

^a H, multiplicities, coupling constants in Hz.

gesting hydrogen bonding with a hydroxyl group.¹¹ The IR spectrum of **1** also showed absorptions related to hydrogen-bonded (3250 cm⁻¹), *gem*-dimethyl (1340 and 1320 cm⁻¹), and aromatic groups (1600 and 1470 cm⁻¹).

In the ¹H NMR spectrum of **1** (Table 1) the appearance of a pair of doublets at δ 6.59 and 5.49 ppm (each 1H, *J* = 10.0 Hz) together with a six-proton singlet at δ 1.46 indicated the presence of a dimethylpyran ring system in the molecule.

The presence of two hydroxyls was confirmed by the ¹H NMR spectrum, which exhibited sharp singlets at δ 9.09 and 8.79 ppm. The chemical shifts are characteristic of two hydroxyls associated with a single carbonyl. Due to the alternating hydrogen-bonding, the chemical shifts are intermediate between the chemical shift of a non-hydrogen-bonded hydroxyl (about 6 ppm) and a permanently hydrogen-bonded hydroxyl (about 12 ppm). The observed values

* To whom correspondence should be addressed. Tel: 55-51-3316-5456. Fax: 55-51-3316-5456. E-mail: gilsane@farmacia.ufrgs.br.

[†] Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS.

[‡] Universidade Estadual do Norte Fluminense.

[§] Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

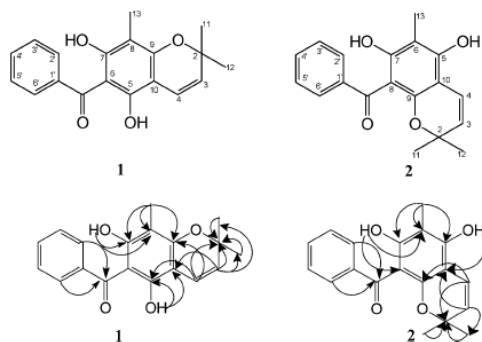


Figure 1. ^1H - ^{13}C long-range correlations by HMBC spectra (optimized for $J = 8$ Hz) of **1** and **2**.

were analogous to those observed for other similar dihydroxybenzophenones.^{11–13}

The structure of **1** was confirmed by HMBC data. Besides the expected cross-peaks for the dimethylbenzopyran moiety, H-4 with C-9, C-5, and C-2; H-8 with C-10, C-2, C-11, and C-12 (2-Me₂), H-11, and H-12 (2-Me₂) with C-2, the following correlations were observed: 7-OH with C-7 and C-8; 5-OH with C-10 and C-5; and H-13 with C-7, C-8, and C-9. The HREIMS data (M^+ , m/z 310.1207) established a molecular formula of C₁₉H₁₈O₄ (calcd 310.1205) for compound **1**, which was named cariphenone A (6-benzoyl-5,7-dihydroxy-2,2,8-trimethyl-2H-chromene).

Compound **2** was isolated as an amorphous yellow powder and shares several ^1H and ^{13}C NMR spectral characteristics (Table 1) with other similar benzophenones.^{7,13} As for compound **1**, the structural analyses were supported by earlier studies.^{14,15} The HREIMS data (M^+ , m/z 310.1209) established a molecular formula of C₁₉H₁₈O₄ (calcd 310.1205) for compound **2**. The IR spectrum of **2** displayed vibration bands due to hydrogen-bonded hydroxyl (3250 cm⁻¹) and carbonyl (1630 cm⁻¹) groups, benzene ring moieties, and other functionalities. Its UV spectrum exhibited maxima at 216, 254, and 294 nm and was similar to that of compound **1**. From the above data, it was inferred that compound **2** could also be a benzophenone. As in compound **1**, the second benzene ring (ring B) has a phloroglucinol oxidation pattern and was fully substituted by two hydroxyl groups, one methyl, and one dimethyl-

benzopyran ring. The HMBC spectrum showed correlations of the hydrogens of the methyl group with C-7, C-6, and C-5. Except for the absence of characteristic signals for a prenyl group at C-6, the spectra are identical to those of isovismiapphenone B.^{7,10,11,13,16–20} In compound **2** the pyran ring is formed by the cyclization of a precursor prenyl side chain with a hydroxyl group at C-9. The presence of two signals at δ_{H} 12.7 and 5.38 ppm indicated that two hydroxyl groups were present, one hydrogen-bonded to the carbonyl group of the benzophenone moiety. As opposed to the 7-OH chemical shift value (δ_{H} 9.09 ppm) in compound **1**, the 7-OH chemical shift in compound **2** is at δ_{H} 12.7 ppm.^{13,21} Thus, two hydroxyl functionalities were assigned to C-7 and C-9 in ring B, and ring C was fused to ring B at C-10 and C-5. Therefore, the structure **2** was assigned to the new compound, cariphenone B (8-benzoyl-5,7-dihydroxy-2,2,6-trimethyl-2H-chromene).

In addition to these two new natural compounds, the fractionation by silica gel column chromatography of the *n*-hexane extracts yielded a mixture of sitosterol (58.9%), stigmasterol (33.4%), and campesterol (3%). Besides this mixture of sterols, 1-eicosanol was also isolated.

The benzophenones and the phloroglucinol derivative were tested for their total antioxidant capacity through the TRAP measurement. This method is based on the fact that free radicals produced from ABAP oxidize luminol, leading to the formation of luminol radicals, which in turn emit light. Antioxidants can inhibit this chemiluminescence, and the time this inhibition lasts, called induction time, is directly proportional to the total antioxidant potential. The induction time of the samples was compared to that from Trolox (a water-soluble α -tocopherol analogue). Figure 2 shows the effect of cariphenone A (**1**) (1.6 and 3.2 mM), Trolox (0.16 mM), and quercetin (3.2 mM) on TRAP measurement. It can be seen in Figure 2 that cariphenone A (**1**) exhibited free radical scavenging activity, as manifested in the reduction of luminescence intensity. This method is most likely due to trapping peroxy radicals.^{10,22} Although Trolox was added at a different concentration than cariphenone A, it can be seen that the curve of Trolox is situated between the curves of both concentrations used of cariphenone A, indicating that this compound may have an antioxidant potential about 10–20 times lower than that of Trolox. Comparing cariphenone A and quercetin, a reference scavenger molecule, at the same concentration

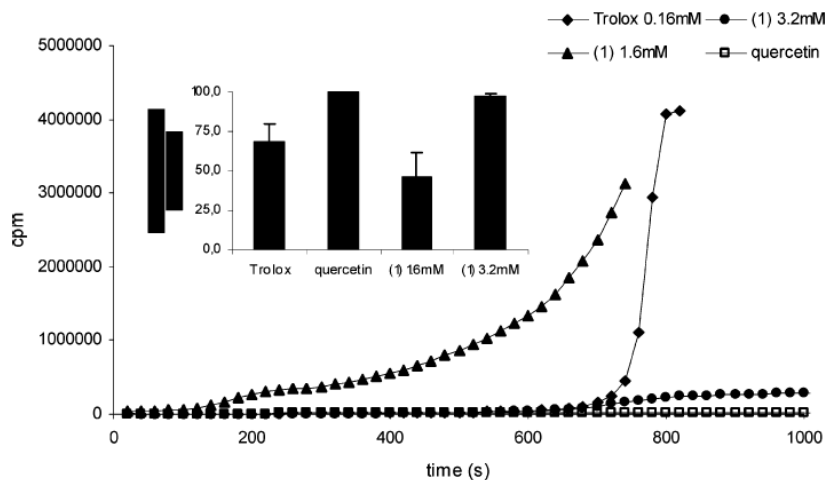


Figure 2. Effect of cariphenone A (**1**) and quercetin on the TRAP measurement. Data are representative for three independent experiments. Data displayed in the bar graphic (inset) were calculated at 700 s and represented by mean \pm SE.

(3.2 mM), the profiles observed in the TRAP assay were similar for both substances, which inhibited the chemiluminescence for a period greater than 900 s. Cariphenone B and uliginosin B showed no antioxidant activity in this assay (results not shown).

Experimental Section

General Experimental Procedures. NMR data (400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C) were measured on a JEOL Eclipse 400 spectrometer in CDCl_3 using the solvent peak as internal standard; for 2D experiments standard pulse sequences from Delta software (version 3.2) were used. The HMQC experiment was optimized for $J = 140$ Hz. The HMBC experiment was optimized for $J = 8$ Hz. HREIMS: 70 eV. Mass spectra were obtained through GC-MS analysis on a Shimadzu QP5050 system: temp program 100–280 °C (15°/min), injector 280 °C, transferline 280 °C, column DB-1, 1 eluted at 7.09 min and 2 at 7.05 min. Preparative TLC: 20 × 20 cm plates coated with 0.5 mm layer of silica gel GF₂₅₄ (Merck); bands were detected under UV light (254 nm).

Plant Material. Plant material of *H. carinatum* Griseb. (aerial parts) was collected in Glorinha, RS, in December 2002. The species was identified by one of us (S.B.), and a voucher specimen was deposited (Bordignon 1520) in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

Extraction and Isolation. Air-dried and powdered plant material (78 g) was extracted in a Soxhlet apparatus with *n*-hexane over 12 h, and then the extract was evaporated to dryness under reduced pressure. The *n*-hexane extract (3.1 g) of *H. carinatum* was submitted to column chromatography (50 × 3 cm) on silica gel using an *n*-hexane/ CHCl_3 gradient system followed by preparative-TLC on silica gel with CHCl_3 /*n*-hexane (1:1). Compounds 1 (31 mg) and 2 (17 mg) were isolated.

Cariphenone A (1): viscous yellow oil; R_f 0.79 (CHCl_3); UV $\lambda_{\text{MeOH}}^{\text{max}}$ nm (log ϵ) 234 (2.81), 282 (2.87), 322 (2.62); IR $\nu_{\text{CHCl}_3}^{\text{max}}$ cm^{-1} 3250, 2900, 2850, 1630, 1600, 1470, 1340, 1320, 1260, 1190, 1160, 1030, 800; EIMS m/z (rel int) [M^+] 310 (23), 295 (100), 257 (19), 255 (10), 217 (49), 179 (12), 105 (7), 84 (25), 77 (11), 49 (9); HREIMS 310.1207 found, calc for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$ 310.1205; ^1H NMR (CDCl_3) and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 1.

Cariphenone B (2): amorphous yellow powder; R_f 0.50 (CHCl_3); UV $\lambda_{\text{MeOH}}^{\text{max}}$ nm (log ϵ) 216 (2.86), 254 (2.50), 294 (2.70); IR $\nu_{\text{CHCl}_3}^{\text{max}}$ cm^{-1} 3250, 2900, 2850, 1630, 1600, 1550, 1470, 1340, 1320, 1280, 1150, 700; EIMS m/z (rel int) [M^+] 310 (20), 295 (100), 217 (58), 147 (14), 105 (23), 83 (10), 77 (48), 43 (23); HREIMS 310.1209 found, calc for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{O}_4$ 310.1205; ^1H NMR (CDCl_3) and ^{13}C NMR (CDCl_3), see Table 1.

TRAP Assay. TRAP, representing the total antioxidant capacity of the compounds, was determined by measuring the chemiluminescence intensity of luminol induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) (ABAP) according to the method of Lissi et al. (1992).²³ Sample solutions (1.0 and 0.5 mg/mL) of cariphenone A, cariphenone B, and uliginosin B were prepared in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6, using Tween 80 (10%). The

solvent alone was analyzed in the experimental procedures, and there was no effect on the measured parameter.

The background chemiluminescence was measured by adding 3 mL of 10 mM ABAP dissolved in 0.1 M glycine buffer, pH 8.6, into a glass scintillation vial. A 10 μL sample of luminol (4 mM) was added to each vial, and the chemiluminescence was measured. This was considered to be the initial value. Trolox (10 μL , 0.16 mM), cariphenone A, and cariphenone B (3.2 and 1.6 mM) or uliginosin B (2.0 and 1.0 mM) were separately added, and the chemiluminescence was measured. The time necessary for the chemiluminescence intensity shows a rapid increase [induction time (IT)]. IT is directly proportional to the antioxidant capacity of the compound, and the IT of each sample was compared with the IT of Trolox.

Acknowledgment. PROPESQ-UFRGS, FAPERGS, and CNPq supported this work.

References and Notes

- Ferraz, A. B. F.; Bordignon, S. A. L.; Staats, C.; Schripsema, J.; von Poser, G. L. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1227–1230.
- Ferraz, A. B. F.; Schripsema, J.; Pohlmann, A. R.; von Poser, G. L. *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 989–991.
- Chaturvedula, V. S. P.; Schilling, J. K.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 965–972.
- Fuller, R. W.; Westergaard, C. K.; Collins, J. W.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 67–69.
- Fuller, R. W.; Blunt, J. W.; Boswell, J. L.; Cardellina, J. H., II; Boyd, M. R. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 130–132.
- Christian, O. E.; Henry, G. E.; Jacobs, H.; McLean, S.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 23–25.
- Olivares, E. M.; Gonzalez, J. G.; Delle Monache, F. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 413–415.
- Sang, S.; Liao, C. H.; Pan, M. H.; Rosen, R. T.; Shiau, S. Y. L.; Linb, J. K.; Ho, C. T. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10095–10102.
- Ito, C.; Itoigawa, M.; Miyamoto, Y.; Onoda, S.; Rao, K. S.; Mukainaka, T.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Hiroshi, F. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 206–209.
- Polydoro, M.; de Souza, K. C. B.; Andrades, M. E.; Da Silva, E. G.; Bonatto, F.; Heydrich, J.; Dal-Pizzol, F.; Schapoval, E. E. S.; Bassani, V. L.; Moreira, J. C. F. *Life Sci.* **2004**, *74*, 2815–2826.
- Mei, L. C.; Mei, H. L.; Ming, H. Y.; Ru, R. W.; Chun, N. L. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 943–947.
- Seo, E. K.; Wall, M. E.; Wani, M. C.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D. *Phytochemistry* **1999**, *52*, 669–674.
- Delle Monache, G.; Gonzalez, G. J.; Delle Monache, F.; Marini Bettolo, G. B. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2025–2028.
- de Oliveira, C. M. A.; Porto, A. M.; Bittrich, V.; Vencato, I.; Marsaioli, A. J. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 6427–6430.
- Delle Monache, F.; Delle Monache, G.; Gacs, B. E. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 2003–2005.
- Bennett, G. J.; Lee, H. H. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 967–998.
- Hu, L. H.; Sim, K. Y. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7999–8002.
- Hu, L. H.; Sim, K. Y. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 759–762.
- Kitanov, G. M.; Nedialkov, P. T. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 1237–1243.
- Nedialkov, P. T.; Kitanov, G. M. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 867–871.
- Seo, E. K.; Wani, M. C.; Wall, M. E.; Navarro, H.; Mukherjee, R.; Farnsworth, N. R.; Kinghorn, A. D. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 35–42.
- Lissi, E.; Salim-Hanna, M.; Pascual, C.; Del Castillo, M. D. *Free Rad. Biol. Med.* **1995**, *18*, 153–158.
- Lissi, E.; Pascual, C.; Del Castillo, M. *Free Rad. Res. Commun.* **1992**, *17*, 299–311.

NP040149E

ANEXO VI – Dados de consumo do radical DPPH*

Quadro 2.2: Dados da cinética de consumo de DPPH* para os extratos brutos metanólicos e frações *n*-hexano e metanólicas das espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, obtidos através da equação de decaimento bi-exponencial $y = y_0 + A_1 \exp^{(-x/T_1)} + A_2 \exp^{(-x/T_2)}$. A₀: absorvância no tempo 0 seg; Abs_{50s}: absorvância no tempo 50 seg; Abs_{600s}: absorvância no tempo 600s.

Amostra (µg/mL)	A0	Y0	A1	T1	A2	T2	A1 + A2	Abs _{50s}	Abs _{600s}	
<i>Hcapri</i> bruto MeOH	20,8	0,7321	0,4054	0,1200	12,48	0,1997	229,33	0,3197	0,5682	0,4199
		0,6739	0,3499	0,1209	15,13	0,2003	264,35	0,3212	0,5204	0,3706
		0,6704	0,3371	0,1213	12,00	0,2025	223,84	0,3238	0,5010	0,3510
	41,7	0,6772	0,1873	0,1908	19,94	0,2912	257,73	0,4820	0,4426	0,2157
		0,6915	0,2031	0,2055	20,83	0,2868	268,53	0,4923	0,4598	0,2333
		0,6889	0,1998	0,1998	20,07	0,2907	273,67	0,4905	0,4585	0,2323
<i>Hcapri</i> <i>n</i> -hexano	20,8	0,7200	0,3875	0,0944	44,90	0,2169	276,10	0,3113	0,5995	0,4122
		0,7433	0,3963	0,0920	42,73	0,2362	268,95	0,3282	0,6209	0,4217
		0,7334	0,3835	0,1089	52,52	0,2258	313,75	0,3347	0,6161	0,4169
	41,7	0,6965	0,2367	0,0841	53,21	0,3671	260,74	0,4512	0,5726	0,2735
		0,7006	0,2398	0,0893	55,33	0,3707	280,32	0,4600	0,5861	0,2834
		0,6889	0,2183	0,0990	57,10	0,3829	315,10	0,4819	0,5863	0,2753
<i>Hcapri</i> MeOH	20,8	0,7156	0,4302	0,1028	8,52	0,1781	189,73	0,2809	0,5673	0,4377
		0,6748	0,3832	0,1023	9,20	0,1929	200,02	0,2952	0,5339	0,3928
		0,6932	0,4114	0,1014	9,95	0,1795	205,71	0,2809	0,5528	0,4211
	41,7	0,6934	0,0677	0,1308	20,93	0,5015	419,79	0,6323	0,5249	0,1878
		0,6863	0,0598	0,1298	18,54	0,4970	435,03	0,6268	0,5116	0,1849
		0,6889	0,0643	0,1315	21,15	0,4907	415,37	0,6222	0,5117	0,1800
<i>Hpoly</i> bruto MeOH	20,8	0,6622	0,4267	0,0788	18,79	0,1545	205,29	0,2333	0,5533	0,4350
		0,6752	0,4200	0,0772	21,64	0,1689	240,87	0,2461	0,5649	0,4340
		0,6863	0,4499	0,0753	19,76	0,1513	199,89	0,2266	0,5737	0,4574
	41,7	0,6752	0,3101	0,0747	18,49	0,2860	230,88	0,3607	0,5454	0,3314
		0,6982	0,2997	0,0946	20,69	0,2973	225,22	0,3919	0,5463	0,3204
		0,6989	0,3169	0,0893	21,33	0,2844	226,08	0,3737	0,5534	0,3369
<i>Hpoly</i> <i>n</i> -hexano	500	0,6502	0,3172	0,0593	30,72	0,2706	298,60	0,3299	0,5577	0,3535
		0,6337	0,3015	0,0566	32,08	0,2733	299,18	0,3299	0,5446	0,3383
		0,6562	0,3034	0,0650	37,01	0,2780	319,98	0,3430	0,5580	0,3460
<i>Hpoly</i> MeOH	41,7	0,6856	0,3393	0,0540	18,97	0,2833	282,53	0,3373	0,5805	0,3732
		0,6907	0,3107	0,0635	23,83	0,3037	272,26	0,3672	0,5712	0,3442
		0,6889	0,3245	0,0655	20,70	0,2887	294,82	0,3542	0,5740	0,3622
<i>Hmyri</i> bruto MeOH	20,8	0,7006	0,4281	0,062	13,50	0,1955	198,47	0,2617	0,5817	0,4376
		0,6898	0,4327	0,0606	14,82	0,1867	175,48	0,2473	0,5752	0,4388
		0,6775	0,4196	0,0633	16,70	0,1932	210,70	0,2565	0,5752	0,4308
	41,7	0,6607	0,2586	0,0759	13,49	0,3079	242,41	0,3838	0,5110	0,2845
		0,6632	0,2622	0,0789	16,66	0,3084	254,38	0,3873	0,5195	0,2914
		0,6762	0,2873	0,0849	18,94	0,2935	236,21	0,3784	0,5309	0,3104
<i>Hmyri</i> <i>n</i> -hexano	41,7	0,7208	0,3816	0,0227	1,27	0,3161	202,07	0,3388	0,6284	0,3978
		0,7347	0,3929	0,1014	43,27	0,2280	273,50	0,3294	0,6147	0,4183
		0,6861	0,3391	0,0212	1,36	0,3269	208,36	0,3481	0,5963	0,3575
<i>Hmyri</i> MeOH	20,8	0,6893	0,3538	0,0638	25,14	0,2650	267,07	0,3288	0,5823	0,3818
		0,6811	0,3544	0,0623	25,26	0,2609	263,13	0,3232	0,5788	0,3811
		0,6860	0,3527	0,0597	20,37	0,2701	252,93	0,3298	0,5795	0,3779
	41,7	0,6936	0,2171	0,0957	34,82	0,3835	322,02	0,4792	0,5682	0,2766
		0,6898	0,2101	0,1043	43,50	0,3799	310,15	0,4842	0,5665	0,2650
		0,6917	0,2137	0,0913	40,14	0,3814	342,75	0,4727	0,5696	0,2799
<i>Hcari</i> bruto MeOH	20,8	0,6896	0,2092	0,1871	15,98	0,2980	170,65	0,4851	0,4397	0,2181
		0,6759	0,1758	0,1737	16,78	0,3182	178,42	0,4919	0,4251	0,1868
		0,6867	0,1738	0,1920	16,16	0,3182	171,13	0,5102	0,4200	0,1834

Continuação do quadro 2.2

Hcari n-hexano	166,7	0,6833	0,3838	0,0674	36,08	0,2390	343,98	0,3064	0,6073	0,4256
		0,7049	0,3876	0,0669	32,45	0,2553	321,29	0,3222	0,6204	0,4270
		0,6944	0,3761	0,0725	37,14	0,2463	346,44	0,3188	0,6082	0,4197
Hcari MeOH	20,8	0,6697	0,2146	0,1140	16,41	0,3365	202,87	0,4505	0,4830	0,2321
		0,7169	0,2567	0,1109	19,30	0,3432	224,05	0,4541	0,5396	0,2803
		0,6731	0,2173	0,1128	17,67	0,3334	215,52	0,4462	0,4883	0,2379
	41,7	0,6992	0,1149	0,1245	19,82	0,4540	199,63	0,5785	0,4783	0,1374
		0,6889	0,1139	0,1153	18,54	0,4494	198,57	0,5647	0,4710	0,1358
		0,6833	0,1089	0,1114	20,05	0,4587	206,73	0,5701	0,4783	0,1341

Quadro 2.3: Parâmetros consumo total (CT), consumo 50 s ($C_{50\text{ s}}$), consumo 600 s ($C_{600\text{ s}}$), percentual de consumo aos 50 s ($\%C_{50\text{ s}}$) e percentual de consumo aos 600 s ($\%C_{600\text{ s}}$), ambos em relação ao consumo total, obtidos com a cinética de consumo de DPPH* para os extratos brutos metanólicos e frações n-hexano e metanólica das espécies *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (dp: desvio padrão). Estão demonstrados apenas os dados que foram utilizados para medidas de comparação entre as substâncias.

Amostra ($\mu\text{g/mL}$)		CT ($\mu\text{M} \pm \text{dp}$)	$C_{50\text{ s}}$ ($\mu\text{M} \pm \text{dp}$)	$C_{600\text{ s}}$ ($\mu\text{M} \pm \text{dp}$)	$\%C_{50\text{ s}}$ ($\pm \text{dp}$)	$\%C_{600\text{ s}}$ ($\pm \text{dp}$)
Hcapri bruto MeOH	20,8	28,0 \pm 0,2	14,1 \pm 0,7	27,1 \pm 0,7	50,5 \pm 2,2	97,0 \pm 2,1
	41,7	42,5 \pm 0,5	20,2 \pm 0,2	39,9 \pm 0,2	47,6 \pm 1,0	93,9 \pm 1,5
Hcapri n-hexano	20,8	28,2 \pm 1,0	10,4 \pm 0,2	27,4 \pm 0,6	37,0 \pm 1,8	97,2 \pm 2,4
	41,7	40,4 \pm 1,4	9,9 \pm 1,0	36,4 \pm 0,4	24,6 \pm 3,2	90,2 \pm 0,4
Hcapri MeOH	20,8	24,8 \pm 0,8	12,5 \pm 0,4	24,1 \pm 0,4	50,3 \pm 2,5	97,2 \pm 2,0
	41,7	54,50 \pm 0,5	15,1 \pm 0,4	44,0 \pm 0,4	27,7 \pm 0,9	80,6 \pm 1,1
Hpoly bruto MeOH	20,8	20,5 \pm 0,8	9,8 \pm 0,3	20,2 \pm 0,7	47,7 \pm 1,07	98,9 \pm 1,9
	41,7	32,7 \pm 1,4	12,4 \pm 1,0	31,4 \pm 1,5	38,0 \pm 1,7	96,3 \pm 1,0
Hpoly n-hexano	500	29,1 \pm 0,6	8,1 \pm 0,4	26,2 \pm 0,7	27,9 \pm 0,7	90,0 \pm 0,6
Hpoly MeOH	41,7	30,7 \pm 1,3	9,8 \pm 0,7	28,6 \pm 1,5	32,1 \pm 0,8	93,1 \pm 1,1
Hmyri bruto MeOH	20,8	22,2 \pm 0,7	9,7 \pm 0,7	22,1 \pm 0,7	43,7 \pm 3,3	99,4 \pm 2,6
	41,7	33,3 \pm 0,4	12,7 \pm 0,3	32,3 \pm 0,5	38,1 \pm 0,9	96,8 \pm 1,1
Hmyri n-hexano	41,7	29,5 \pm 0,9	9,1 \pm 1,8	28,1 \pm 0,6	29,7 \pm 5,8	95,3 \pm 0,9
Hmyri MeOH	20,8	28,5 \pm 0,3	9,2 \pm 0,2	26,5 \pm 0,4	32,2 \pm 0,4	93,2 \pm 0,3
	41,7	41,6 \pm 0,5	10,7 \pm 0,2	36,3 \pm 0,6	25,8 \pm 0,4	87,3 \pm 0,3
Hcari bruto MeOH	20,8	43,1 \pm 1,1	22,2 \pm 0,8	42,4 \pm 1,4	51,5 \pm 0,7	98,4 \pm 1,1
Hcari n-hexano	166,7	27,4 \pm 0,7	7,2 \pm 0,5	23,5 \pm 1,0	26,1 \pm 1,2	85,6 \pm 1,2
Hcari MeOH	20,8	39,2 \pm 0,4	15,9 \pm 0,4	38,0 \pm 0,2	40,6 \pm 1,4	96,9 \pm 0,6
	41,7	49,7 \pm 0,6	18,6 \pm 0,7	48,3 \pm 0,6	37,5 \pm 1,4	97,2 \pm 0,8

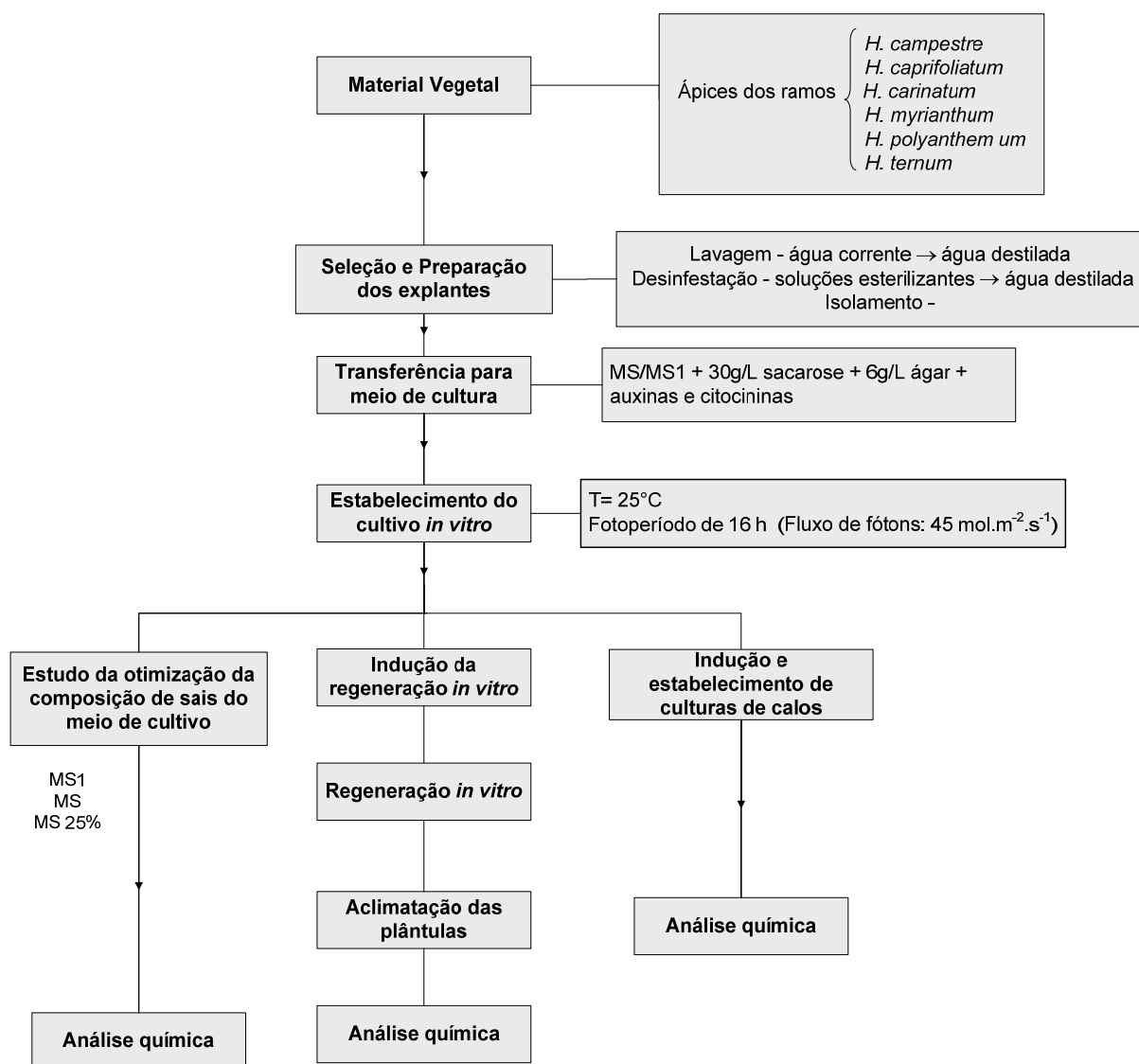
Quadro 2.4: Dados referentes à cinética de consumo de DPPH* para substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do RS, obtidos através da equação de decaimento bi-exponencial $y = y_0 + A_1 \exp^{-x/T_1} + A_2 \exp^{-x/T_2}$. A₀: absorvância no tempo 0 seg; Abs_{50s}: absorvância no tempo 50 seg; Abs_{600s}: absorvância no tempo 600 seg.

Amostra	A0	Y0	A1	T1	A2	T2	A1 + A2	Abs _{50s}	Abs _{600s}
Hiperbrasilol B 100 µM	0,6782	0,3302	0,0567	33,34	0,2772	304,66	0,3339	0,5781	0,3689
	0,6814	0,3362	0,0444	24,98	0,2946	279,65	0,3390	0,5886	0,3707
	0,6902	0,3467	0,0481	28,56	0,2889	298,78	0,3370	0,5994	0,3855
Japonicina A 100 µM	0,6955	0,3019	0,0625	50,22	0,3164	355,37	0,3789	0,5999	0,3604
	0,6731	0,2786	0,0699	52,49	0,3088	362,15	0,3787	0,5745	0,3375
	0,6889	0,2983	0,0628	51,33	0,3178	373,47	0,3806	0,5600	0,3620
Uliginosina B 100 µM	0,7604	0,4673	0,1070	7,8	0,1992	256,9	0,3062	0,6314	0,4866
	0,7409	0,4544	0,0966	13,4	0,1953	277,7	0,2919	0,6198	0,4769
	0,7534	0,4598	0,0997	10,1	0,1989	286,3	0,2986	0,6276	0,4843
Carifenona A 100 µM	0,6673	0,3346	0,1895	11,1	0,1302	104,30	0,3197	0,4173	0,3350
	0,6636	0,3387	0,1937	11,70	0,1283	104,86	0,3220	0,4210	0,3391
	0,6532	0,3299	0,1855	10,50	0,1289	103,90	0,3144	0,4111	0,3303
Carifenona B 100 µM	0,6675	0,5500	0,0359	84,17	0,0821	740,09	0,1180	0,6466	0,5865
	0,6636	0,5304	0,0374	85,73	0,0880	756,30	0,1254	0,6336	0,5702
	0,6687	0,5468	0,0308	83,89	0,0911	773,90	0,1219	0,6492	0,5888
Hiperosídeo 25 µM	0,6546	0,3986	0,1346	18,46	0,1252	630,04	0,2598	0,5232	0,4469
	0,6560	0,3749	0,1445	16,94	0,1333	588,17	0,2778	0,5049	0,4230
	0,6886	0,4066	0,1462	16,33	0,1341	617,74	0,2803	0,5371	0,4574
Isoquercitrina 25 µM	0,6961	0,3821	0,1254	12,18	0,1872	850,61	0,3126	0,5607	0,4746
	0,6658	0,3745	0,0990	9,78	0,1932	1085,06	0,2922	0,5599	0,4856
	0,6889	0,3845	0,1128	11,64	0,1897	970,78	0,3025	0,5662	0,4867
Guajaverina 25 µM	0,6766	0,3687	0,1962	18,17	0,1079	184,13	0,3332	0,4635	0,3728
	0,6831	0,3236	0,2315	14,18	0,1286	356,80	0,3601	0,4422	0,3475
	0,6889	0,3025	0,2549	16,30	0,1315	375,87	0,3864	0,42,95	0,3291
3-metil quercetina 25 µM	0,6960	0,5558	0,0898	11,51	0,0426	557,09	0,1324	0,5959	0,5703
	0,6908	0,5389	0,0946	12,99	0,0561	734,78	0,1507	0,5933	0,5637
	0,6889	0,5367	0,0917	11,87	0,0544	599,62	0,1461	0,5903	0,5567

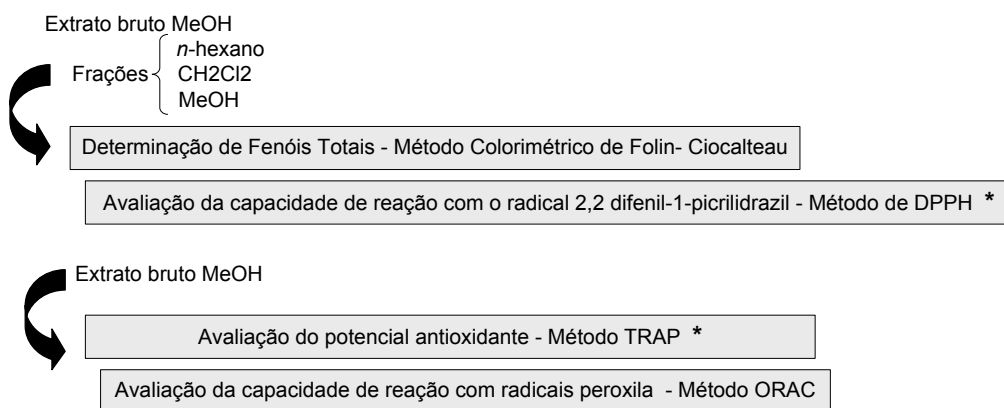
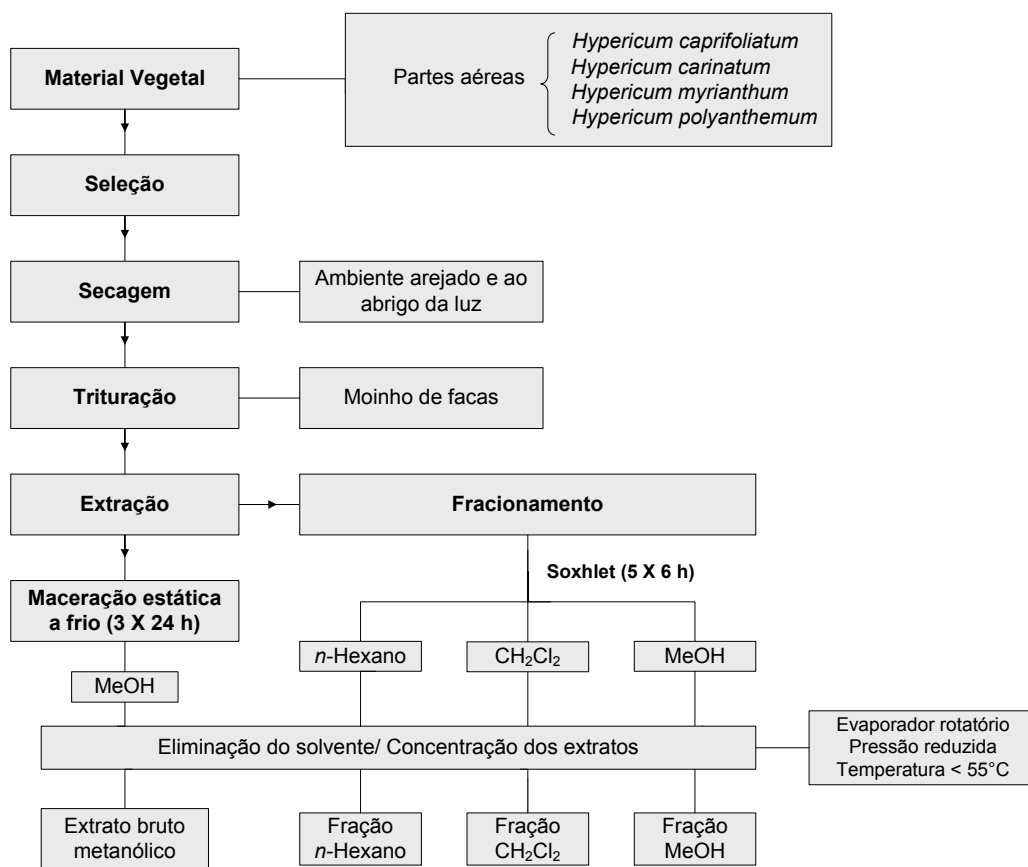
Quadro 2.5: Parâmetros consumo total (CT), consumo 50 s (C_{50 s}), consumo 600 s (C_{600 s}), percentual de consumo aos 50 s (%C_{50 s}) e percentual de consumo aos 600 s (%C_{600 s}), ambos em relação ao consumo total, obtidos com a cinética de consumo de DPPH* para substâncias isoladas de espécies de *Hypericum* nativas do RS (dp: desvio padrão). Estão demonstrados apenas os dados que foram utilizados para medidas de comparação entre as substâncias.

Amostra	CT (µM ± dp)	C _{50 s} (µM ± dp)	C _{600 s} (µM ± dp)	%C _{50 s} (± dp)	%C _{600 s} (± dp)
Hiperbrasilol B 100 µM	29,3 ± 0,3	8,2 ± 0,4	26,8 ± 0,3	28,1 ± 1,6	91,6 ± 1,2
Japonicina A 100 µM	33,0 ± 0,1	9,4 ± 1,6	28,9 ± 0,4	28,3 ± 4,7	87,6 ± 1,5
Uliginosina B 100 µM	26,1 ± 0,9	10,9 ± 0,5	23,4 ± 0,6	41,8 ± 0,5	89,9 ± 0,7
Carifenona A 100 µM	27,7 ± 0,4	21,3 ± 0,3	28,4 ± 0,4	76,9 ± 1,4	102,5 ± 1,6
Carifenona B 100 µM	10,6 ± 0,3	2,0 ± 0,5	7,3 ± 0,7	19,2 ± 4,1	69,3 ± 4,6
Hiperosídeo 25 µM	23,7 ± 1,0	12,6 ± 1,0	19,5 ± 1,2	52,9 ± 2,0	82,1 ± 2,0
Isoquercitrina 25 µM	26,3 ± 0,9	10,6 ± 1,3	17,5 ± 1,8	40,1 ± 3,6	66,6 ± 4,6
Guajaverina 25 µM	31,3 ± 2,3	20,7 ± 2,1	28,9 ± 2,4	66,1 ± 1,9	92,4 ± 1,0
3-metil quercetina 25 µM	12,4 ± 0,8	8,6 ± 0,1	11,2 ± 0,3	69,4 ± 5,6	90,0 ± 5,1

ANEXO VII – Esquema da Metodologia descrita no Capítulo 3



ANEXO IV – Esquema da Metodologia descrita no Capítulo 2



* Substâncias isoladas das espécies de *Hypericum* foram avaliadas através destas técnicas

**ANEXO IX – “Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch
ex Reichardt cultured in vitro”**

Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured in vitro

Ana Paula M. Bernardi · Natasha Maurmann ·
Sandra B. Rech · Gilsane von Poser

Received: 15 March 2006 / Accepted: 16 September 2006
© Franciszek Górski Institute of Plant Physiology, Polish Academy of Sciences, Kraków 2006

Abstract *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt, an endemic species of Southern Brazil, was micropropagated on MS medium supplemented with 1.78 μM BAP. Shoot proliferation and rooting was achieved on hormone-free medium and plantlets survived acclimatization. The bioactive compounds: 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP1), 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP2) and 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP3) were quantified in the leaves, stems and roots of propagated and acclimatized plantlets and compared with the field-grown plants. The HPLC analysis revealed that the three benzopyrans are accumulated in the aerial parts and the concentration varied with the age of the plant whereas the roots were capable of accumulating only HP3. Greatest yield of HP1 (7.12 mg/g DW) was quantified in the leaves of the acclimatized plantlets, whereas the flowers of the plants from natural habitat displayed higher amounts of HP2 (11.04 mg/g DW) and HP3 (13.99 mg/g DW).

Keywords HPLC · Medicinal plant ·
Micropropagation · Phytochemical analysis

Abbreviations

BAP	6-Benzylaminopurine
HP1	6-Isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran
HP2	7-Hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran
HP3	5-Hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran
HPLC	High performance liquid chromatography
IAA	Indole-3-acetic acid
DW	Dry weight
MS	Murashige and Skoog
NAA	α -Naphthalene-acetic acid

Introduction

The flora of Southern Brazil is rich in medicinal plants and the unrestricted collection is resulting in an overexploitation of the natural resources without proper replenishment. From the genus *Hypericum*, widely distributed in temperate regions, approximately 20 species are found and some of them are used in the traditional medicine as anti-inflammatory and wound healing agents (Jiménes 1980; Mentz et al. 1997). In recent years, the pharmaceutical potential increase of *Hypericum perforatum* with antiviral (Diwu 1995), anticancer (Agostinis et al. 2002) and antidepressive (Chatterjee et al. 1998; Singer et al. 1998) activities were demonstrated and other *Hypericum* species have also been found to exert pronounced effects on the central nervous system (Öztürk 1997). Some of the Southern Brazilian species demonstrated antidepressive (Daudt et al. 2000),

Communicated by S. Lewak.

A. P. M. Bernardi · N. Maurmann · S. B. Rech ·
G. von Poser (✉)
Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS),
Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, Brazil
e-mail: gilsane@farmacia.ufrgs.br

antimicrobial (Dall'Agnol et al. 2003) and antiproliferative activities (Ferraz et al. 2005a). Among them, *Hypericum polyanthemum* showed a remarkable analgesic activity (Viana et al. 2003) and three main compounds, 6-isobutyryl-5,7-dimethoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP1), 7-hydroxy-6-isobutyryl-5-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP2) and 5-hydroxy-6-isobutyryl-7-methoxy-2,2-dimethyl-benzopyran (HP3) were isolated from the aerial parts of the plant (Fig. 1) (Ferraz et al. 2001) and the monoamine oxidase and antiproliferative activities evaluated (Gnerre et al. 2001; Ferraz et al. 2005b). Due to the relevant biological properties of *H. polyanthemum* and its highly restricted distribution (Robson 1990), we chose to standardize a protocol for in vitro propagation of the species and to characterize the distribution of the bioactive substances in the leaves, stems and roots of the micropropagated and acclimatized plantlets and compare with the field-grown plants by reversed-phase HPLC.

Materials and methods

Plant material

Plants of *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt were collected in the city of Caçapava do Sul, state of Rio Grande do Sul, Brazil, in the spring of 2003. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN) (*H. polyanthemum*, Bordignon 1429). The aerial parts of the plant were thoroughly washed with tap water, surface sterilized in 70% EtOH for 1 min, rinsed twice with sterile-distilled water, immersed in 1.5% sodium hypochlorite for 10 min, and rinsed four times with sterile-distilled water.

Culture conditions

Shoot tips (0.3–0.5 cm long) were excised and the segments (one per flask) were vertically implanted into 175 ml glass jars with 25 ml of MS medium (Murashige and Skoog 1962) containing 30 g l⁻¹ sucrose supplemented with 0.178, 0.89, 1.78 and 4.45 μM of 6-benzyl-

aminopurine (BAP) alone or in combination with 1.074 μM of α -naphthalene-acetic acid (NAA). The pH of the medium was adjusted to 5.8 prior to the addition of 0.5% agar (extra pure, Merck) and autoclaved for 20 min at 121°C. Medium without plant growth regulators was used as a control. The cultures were maintained at 25 ± 1°C with 16 h light/8 h dark photoperiods (light intensity 45 μmol m⁻² s⁻¹). Each treatment consisted of 12 explants and was replicated five times. The number of shoots/explant and the callus formation was determined after 6 weeks in vitro and the microshoots that grew on medium with 1.78 μM BAP were excised and placed on control medium without growth regulators and supplemented with BAP alone (0.178 and 0.89 μM) or in combination with 1.074 μM of NAA. After 4 weeks of growth regenerated plantlets were transferred to hormone-free medium.

Acclimatization

The regenerated plantlets cultured on hormone-free medium with well developed roots were washed with distilled water to remove adhering culture medium, transferred to pots containing a sterile mixture of non-fertilized commercial top soil and vermiculite (2:1, v/v) and covered with plastic film. Acclimatizing plants were kept under controlled environmental conditions at 25 ± 5°C, under a 16 h photoperiod provided by cool white fluorescent lamps (approximately 70 μmol m⁻² s⁻¹) for 30 days and transferred to a greenhouse (irradiance of 500 μmol m⁻² s⁻¹ at plant level, measured in the middle of sunny days without clouds with a sensor Quantum Li-cor®). The plants were watered as needed.

Benzopyrans determination

Leaves, stems, flowers and roots of field-grown plants, from micropropagated and from acclimatized plantlets were freeze dried and 0.05 g DW of each sample were extracted 15 times × 20 min with 5 ml of *n*-hexane in an ultrasonic bath. The extracts were combined and evaporated to dryness under reduced pressure. The residue was redissolved in 5 ml of HPLC grade methanol and filtered (0.22 μm pore size, Merck). The injection volume was 20 μl.

Liquid chromatographic separations were performed using a Waters 600 pump and a Waters 2487 dual λ absorbance detector. The separations were carried out with an isocratic solvent system (60% CH₃CN, 40% H₂O) using a Waters Nova-Pack C₁₈ column (4 μm, 3.9 × 150 mm) adapted to a guard column Waters Nova-Pack C₁₈ 60A (3.9 × 20 mm). The

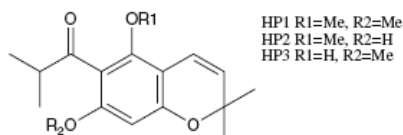


Fig. 1 Benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*

flow rate was 1 ml min^{-1} ; the detector sensitivity 1.0 Afs and the detection was performed at 270 nm at room temperature.

Constituents of the extracts were identified by comparison with retention times of the authentic samples (HP1, HP2 and HP3) isolated from the aerial parts of *H. polyanthemum* in natura as described elsewhere (Ferraz et al. 2001) and the identity and purity of the compounds were confirmed by $^1\text{H NMR}$.

For quantitative analysis, peak areas were used to calculate the amount of the benzopyrans present in different plant material and compared to the standards. The identification was made on the basis of their ultraviolet absorption spectra and retention times. The amount of benzopyrans was calculated by using a calibration curve (absorption at 270 nm vs. mass) measured in $\mu\text{g/ml}$ with: HP1-range of 3.90–250, $R^2 = 0.9994$; HP2-range of 1.95–500, $R^2 = 0.9997$; HP3-range of 0.97–250, $R^2 = 0.9997$. Deviation of repeated estimation of same sample was less than 1%.

The detection limits of the different compounds were 1.69956, 0.01530 and $0.17834 \mu\text{g/ml}$ and the quantification limits were 5.15046, 0.04637 and $0.54043 \mu\text{g/ml}$ for HP1, HP2 and HP3, respectively. Benzopyrans contents were expressed as mg/g of freeze dried weight of the plants.

Statistical analysis

In all of the experiments, the layout was totally randomized. One-way or Two-way Analysis of Variance (ANOVA) was applied with a critical value of $P \leq 0.05$. Data transformation was done as needed to satisfy ANOVA requirements (Sokal and Rohlf 1981).

Results and discussion

Shoot tips of *H. polyanthemum* were cultured on MS medium supplemented with 0.178, 0.89, 1.78 and $4.45 \mu\text{M}$ of BAP alone or in combination with $1.074 \mu\text{M}$ of NAA. Within 6 weeks of inoculation, multiple shoot (approximately 30) and some callus formation was observed on treatment with $1.78 \mu\text{M}$ of BAP (Fig. 2a) whereas the medium with lower concentration of BAP (0.178 and $0.89 \mu\text{M}$) showed three to four shoots per explant and callus formation (data not shown). Interestingly, the increase of BAP concentration promoted multiplication rate up to $1.78 \mu\text{M}$ after which the rate was reduced. Explants cultured on control medium without growth regulators did not respond satisfactorily. Similar effect of BAP on shoot

development in *H. perforatum* and *H. foliosum* has been reported previously (Cellárová et al. 1992; Moura 1998). The absence of rooting in the presence of NAA, as mentioned by the same studies, was also confirmed for *H. polyanthemum*.

Shootlets were further cultured on MS medium with BAP alone and combined with NAA. With $0.178 \mu\text{M}$ BAP, the auxine source did not seem to be necessary for rooting (Table 1), whereas with $0.89 \mu\text{M}$ BAP and $1.074 \mu\text{M}$ NAA no rooting was observed, suggesting the need of a compensatory effect from a higher exogenous auxine source (Tamas 1987).

For culture multiplication, shoots grown with $0.178 \mu\text{M}$ BAP were transferred to a hormone-free medium and regenerated plantlets (Fig. 2b) presented

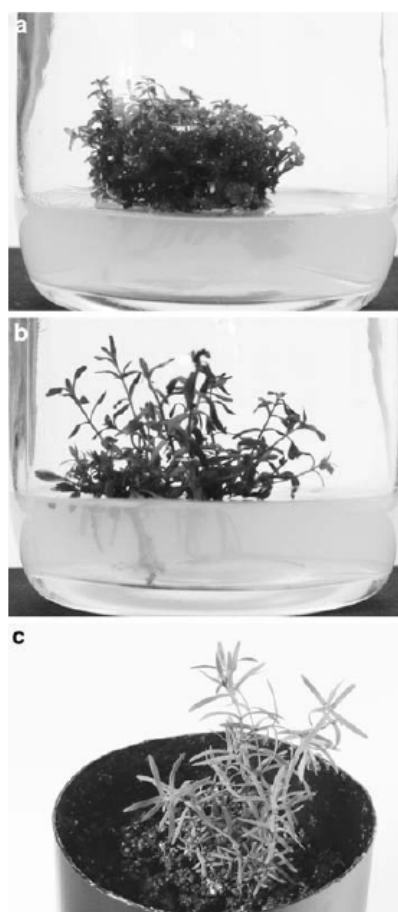


Fig. 2 Stages of micropropagation of *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt: Shoot formation from shoot tips cultivated on $1.78 \mu\text{M}$ BAP (a). Shoots cultured on medium with $0.178 \mu\text{M}$ BAP and transferred to hormone-free medium (b). Acclimatized plantlet after 45 days of growth (c)

Table 1 The effect of growth regulators on growth and rooting of shootlets developed per explant on MS medium with 1.78 μM BAP explants after 4 weeks in culture

Concentration of NAA (μM)	BAP/No. of shoots/ex-plant	No. of roots/ex-plant
00	–	–
0.178	9.5 \pm 1.29 a	7.66 \pm 0.58 a
0.89	4.83 \pm 1.17 b	–
0.178/1.074	8.66 \pm 1.75 a	6.67 \pm 1.37 a
0.89/1.074	5.67 \pm 1.033 b	–

Values are means of three determinations \pm standard deviation
Values on the same column followed by the same letter do not differ statistically at $P \leq 0.05$

7.22 \pm 0.97 shoots and 7.88 \pm 0.99 roots after four weeks of culture, not differing significantly from that on medium with 0.178 μM BAP.

The acclimatization stage was successfully performed by transplanting the plantlets to a potting mixture of soil and vermiculite (2:1) under greenhouse conditions (Fig. 2c). The formation of both shoots and roots on the same medium eliminates one step of medium transfer in the propagation of this species, thus reducing the total time and cost required for plant regeneration. Similar results were reported for *H. perforatum* (Cellárová et al. 1992; McCoy and Camper 2002) and *H. brasiliense* (Cardoso and Oliveira 1996).

Regenerated plantlets of *H. polyanthemum* were evaluated in order to study the production of secondary metabolites. The *n*-hexane extract was analysed by HPLC using a isocratic system composed of acetonitrile and water (60:40% v/v). The assay was shown to be suitable for the characterization of HP1, HP2 and HP3 and a short running time (HP3 20.6 min; HP2 12.4 min; HP1 8.6 min) was achieved. These bioactive substances were quantified in the different parts of the

plants as shown in Table 2. The concentration of the benzopyrans decreased in the in vitro micropropagated plantlets. Nevertheless, in the acclimatized plants the HP1 and HP3 increased approximately threefold in relation to the field-grown plants. HP1 appeared as the main compound in the leaves of the acclimatized plant (Table 2) and surpassed the total amount of the same compound quantified in the field-grown plant at flowering stage, where the main compound quantified was HP3. Similar results were found for the secondary metabolites quantified in regenerated organs of *H. perforatum* (Pasqua et al. 2003). HP1 and HP2 have not been detected in the roots of all analysed plants. These compounds are present, instead in the leaves, stems and flowers, suggesting a role in the chemical defense of the plant against insects and environmental factors which have been found to alter the concentration of secondary metabolites in *Hypericum* species (Briskin and Gawienowski 2001; Abreu and Mazzafera 2005) as have harvest date and season (Southwell and Bourke 2001). On the other hand, HP3 was found in all parts of the plants (Table 2). However, its distribution pattern depends on the developmental stage, with higher concentrations being found in the leaves and roots of the acclimatized plantlets. Moreover, it is necessary that plantlets reach an advanced stage of growth to obtain the biosynthesis of all benzopyrans. Furthermore, the difference in benzopyrans concentration may be due to the light intensity with which plantlets were grown (45 and 500 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for in vitro and acclimatized plantlets, respectively). Thus, the higher contents of the compounds in field-grown plants may be related to the high light intensity (2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) to which the plants were exposed. This effect was previously shown for *H. perforatum* (Briskin and Gawienowski 2001) where a linear

Table 2 Distribution of benzopyrans (mg/g DW) in field-grown, in vitro cultured and acclimatized plantlets of *Hypericum polyanthemum*

	Plant part	HP1	HP2	HP3
Field-grown plant	Leaves	2.30 \pm 0.30 c	10.33 \pm 0.41 a	0.51 \pm 0.03 def
	Stems	0.27 \pm 0.04 e	1.79 \pm 0.09 b	0.49 \pm 0.04 def
	Roots	Nd	Nd	0.81 \pm 0.07 cde
In vitro-grown plantlet	Flowers	3.65 \pm 0.32 b	11.05 \pm 1.17 a	13.98 \pm 0.69 a
	Leaves	0.89 \pm 0.02 d	0.02 \pm 0.003 c	0.21 \pm 0.002 ef
	Stems	0.07 \pm 0.01 e	Nd	0.15 \pm 0.002 f
Acclimatized plantlet	Roots	Nd	Nd	0.08 \pm 0.004 f
	Leaves	7.11 \pm 0.01 a	0.73 \pm 0.02 bc	1.42 \pm 0.02 bc
	Stems	0.15 \pm 0.06 e	0.37 \pm 0.01 c	0.96 \pm 0.12 bcd
	Roots	Nd	Nd	1.47 \pm 0.07 b

Values are means of three different experiments \pm standard deviation

Values on the same column followed by the same letter do not differ statistically by a Tukey test at $P \leq 0.05$

Nd Not detected

relationship was observed between the light intensity and the number of dark glands associated with hypericin contents.

The knowledge of the biosynthesis of HP1, HP2 and HP3 is not available. Nevertheless, an experiment carried out with *Ageratum conyzoides* (Asteraceae), demonstrated that in the benzopyrans precocene I and II, structurally similar to the above mentioned benzopyrans, the aromatic ring arises from the polyketide route and condenses with dimethylallyl pyrophosphate arising from the mevalonic acid; the subsequent hydroxylation followed by methylation of the aromatic ring yielded the precocenes (Vyas and Mulchandani 1980). Considering that this is an usual route for benzopyrans we could infer that the benzopyrans in *H. polyanthemum* are formed by a similar pathway, with HP1 being biosynthesized by the methylation of HP2 and/or HP3 by the action of methyl-transferases.

The higher concentration of benzopyrans was found in the flowers of the field-grown plants except for HP1 which was detected in higher concentration in the leaves of the acclimatized plants. HP2 and HP3 were isolated as yellow crystals, contributing to the intense yellow colour of the flowers, while HP1 was colourless.

Flowers of *Hypericum* have not been extensively investigated, with the presence of flavonoids (quercetin, quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, biapigenin), phloroglucinol derivatives (hyperforin) and hypericin being reported for some species (Takil'ova et al. 2000; Maggi et al. 2004). The report that flowers of in vitro grown plants and field-grown plants of *H. perforatum* have comparable concentrations of medicinal secondary metabolites (Murch et al. 2002) will lead us to investigate the benzopyrans content in different flower ontogenesis phases of in vitro propagated *H. polyanthemum* plants. Furthermore, based on our results, optimal conditions for large biomass yield and production of secondary metabolites from *H. polyanthemum* will be further investigated.

Acknowledgments This study was supported by CNPq, FAPERGS and Propesq-UFRGS. The authors thank CBIM/UFRGS for the HPLC facilities.

References

- Abreu IN, Mazzafera P (2005) Effect of water and temperature stress on the content of active constituents of *Hypericum brasiliense* Choisy. *Plant Physiol Biochem* 43:241–248
- Agostinis PA, Vantieghe A, Merlevede W, de Witte P (2002) Hypericin in cancer treatment: more light on the way. *Int J Biochem Cell Biol* 34:221–241
- Briskin DP, Gawienowski MC (2001) Differential effects of light and nitrogen on production of hypericins and leaf glands in *Hypericum perforatum*. *Plant Physiol Biochem* 39:1075–1081
- Cardoso MA, Oliveira DE (1996) Tissue culture of *Hypericum brasiliense* Choisy: shoot multiplication and callus induction. *Plant Cell Tiss Org Cult* 44:91–94
- Cellárová E, Kimáková K, Brutovská R (1992) Multiple shoot formation and phenotypic changes of R_0 regenerants in *Hypericum perforatum* L. *Acta Biotechnol* 12:445–452
- Chatterjee SS, Nöldner M, Koch E, Erdelmeier E (1998) Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 31:7–15
- Dall'Agnol R, Ferraz A, Bernardi AP, Albring D, Nor C, Sarmiento L, Lamb L, Hass M, von Poser GL, Schapoval EES (2003) Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. *Phytomedicine* 10:141–147
- Daudt R, Poser GLV, Staats C, Neves G, Rates SMK (2000) Screening for the antidepressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. *Phytother Res* 14:344–346
- Diwu Z (1995) Novel therapeutic and diagnostic applications of hypocrellins and hypericins. *Photochem Photobiol* 61:529–539
- Ferraz ABF, Bordignon S, Staats C, Schripsema J, von Poser GL (2001) Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. *Phytochemistry* 57:1227–1230
- Ferraz ABF, Grivicich I, von Poser GL, Faria DH, Kayser GB, Schwartzmann G, Henriques AT, da Rocha AB (2005a) Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. *Fitoterapia* 76:210–215
- Ferraz ABF, Faria DH, Benneti MN, da Rocha AB, Schwartzmann G, Henriques AT, von Poser GL (2005b) Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. *Phytomedicine* 12:112–115
- Gnerre C, von Poser GL, Ferraz AC, Viana A, Testa B, Rates SMK (2001) Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. *J Pharm Pharmacol* 53:1273–1279
- Jiménes CR (1980) Hipericaceae. *Flora Ilustrada Catarinense*. Editora IOESC, Florianópolis, pp 3–32
- Magii F, Ferretti G, Poceschi N, Menghini L, Ricciutelli M (2004) Morphological, histochemical and phytochemical investigation of the genus *Hypericum* of the Central Italy. *Fitoterapia* 75:702–711
- McCoy JA, Camper ND (2002) Development of a micropropagation protocol for St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.). *HortScience* 37:978–980
- Mentz LA, Lutzemberger LC, Schenkel EP (1997) Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra literária de D'Ávila. *Cad Farm* 13:25–47
- Moura M (1998) Conservation of *Hypericum foliosum* Aiton, an endemic Azorean species, by micropropagation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 34:244–248
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15:473–497
- Murch SJ, Rupasinghe HPV, Saxena PK (2002) An in vitro and hydroponic growing system for hypericin, pseudohypericin, and hyperforin production of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. cv New Stem). *Planta Med* 68:1108–1112
- Öztürk Y (1997) Testing the antidepressant effects of *Hypericum* species on animal models. *Pharmacopsychiatry* 40:125–128
- Pasqua G, Avato P, Monacelli B, Santamaria AR, Argentieri MP (2003) Metabolites in cell suspension cultures, calli, and in vitro regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas *Plant Sci* 165:977–982

- Robson NKB. (1990) Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 8. Sections 29. Brathys (part 2) and 30. Trigynobrathys. Bull Br Mus 20:1–151
- Singer AS, Wonnemann M, Muller W (1998) Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na^+ . J Pharmacol Exp Ther 290:1363–1368
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) Biometry. Freeman, San Francisco, p 859
- Southwell IA, Bourke CA (2001) Seasonal variation in hypericin content of *Hypericum perforatum* L. (St. John's wort). Phytochemistry 56:437–441
- Takel'ova D, Repeck M, Zemkova E, Toth J (2000) Quantitative changes in dianthrones, hyperforin and flavonoids in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. Planta Med 66:778–780
- Tamas LA (1987) Hormonal regulation of apical dominance. In: Davies PJ (ed) Plant hormones and their role in plant growth and development. Martinus Nijhoff, Dordrecht, pp 393–410
- Viana AF, Heckler AP, Fenner R, Rates SMK (2003) Analgesic activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). Braz J Med Biol Res 36:631–634
- Vyas AV, Mulchandani NB (1980) Biosynthesis of precocenes –I and –II, anti-juvenile hormones. Phytochemistry 19:2597–2598

ANEXO X – Pareceres dos membros da Comissão Examinadora

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.

Doutoranda: ANA PAULA MACHADO BERNARDI

PARECER

A tese de doutorado apresentada por Ana Paula Machado Bernardi é de mérito científico medicinal. O trabalho, representado por um grande volume de resultados inéditos e de alta qualidade científica, foi dividido em quatro capítulos onde os resultados de cada um deles responde a um objetivo específico. O tema escolhido é original e área de grande repercussão atual. A forma de redação é clara, os métodos principalmente detalhados, o que permite reproduzi-los. Assim, os métodos estão bem delineados e se aplicam aos objetivos propostos. A discussão repercute os objetivos alcançados. O uso de tabelas e figuras é adequado, bem como a bibliografia, clássica e atual. Por outro lado, tem que ser observado a falta de um objetivo geral que compreenda os vários objetivos específicos apresentados neste trabalho, o que poderia ter permitido ressaltar os inúmeros benefícios futuros, como por exemplo o uso de algumas espécies nativas, como novas preparações com atividade antioxidante. Pelo acima descrito, sou de parecer que a Tese de Doutorado deve ser aprovada com o conceito máximo "A".

Prof. Dr. Alexandra Latini

Porto Alegre, 09 de Abril de 2007.

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

Nível: Doutorado

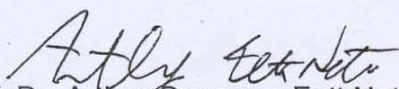
Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

Título: Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.

Doutoranda: ANA PAULA MACHADO BERNARDI

PARECER

A TESE CONSTITUI UM TRABALHO DE VALOR CIENTÍFICO ADEQUADO COMO REQUISITO AO TÍTULO DE DOUTOR. A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ANÁLISE DE PRODUTOS EM DIFERENTES SISTEMAS BIOLÓGICOS, DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANÁLITICA E CULTIVO *IN VITRO* DE DIFERENTES ESPÉCIES NATIVAS DE *Hypericum*, FORAM CONDUZIDOS DE FORMA CORRETA, COM CONTROLES ADEQUADOS E RESULTANDO EM DADOS RELEVANTES PARA A ÁREA DE CONTEÚMENO. DOIS ARTIGOS JÁ FORAM PUBLICADOS EM REVISTAS INTERNACIONAIS E OUTROS ESTÃO EM PREPARAÇÃO, O QUE ATESTA A QUALIDADE DO TRABALHO. PORTANTO, O PARECER É PELA APROVAÇÃO COM CONCEITO A.


 Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

Porto Alegre, 9 de Abril de 2007.

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

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS.

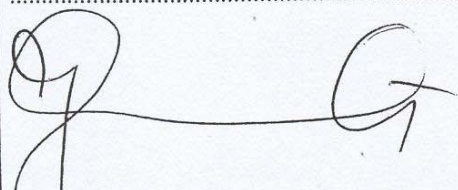
Título: Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul.

Doutoranda: ANA PAULA MACHADO BERNARDI

PARECER

O trabalho está bem apresentado contendo resultados de grande relevância para a área. A alma mater tem a certeza e sua apresentação foi bastante clara, bem como demonstrou excelente conhecimento a respeito do assunto da Tese.

Logo parecer é favorável a obtenção do título.



Porto Alegre, 4 abril 2007.

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

Área de Concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

04/2007

Julgamento da tese "Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul", para obtenção de Título de Doutor em Ciências farmacêuticas por

ANA PAULA MACHADO BERNARDI

A Comissão Examinadora composta dos Professores: Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi desta Faculdade de Farmacia o Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto do Centro de Biotecnologia desta Universidade e a Profa. Dr. Alexandra Latini da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a Presidência da Profa. Dr. Gilsane Lino Von Poser, ao julgar em 9 de abril de 2007 a tese Análise química, avaliação da atividade antioxidante e obtenção de culturas *in vitro* de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas por ANA PAULA MACHADO BERNARDI conferiu os seguintes conceitos:

Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi

A

Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto

A


Profa. Dr. Alexandra Latini

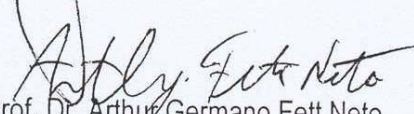
A

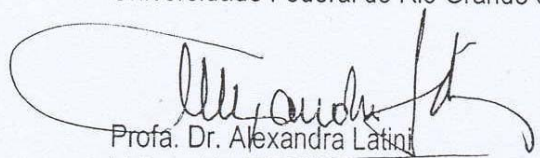
Conceito Final

A

Porto Alegre, 9 de abril de 2007.


 Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul


 Prof. Dr. Arthur Germano Fett Neto
 Universidade Federal do Rio Grande do Sul


 Profa. Dr. Alexandra Latini
 Universidade Federal de Santa Catarina

10. BIOGRAFIA

Dados Pessoais

Nome: Ana Paula Machado Bernardi

Data de nascimento: 05/12/1978

Naturalidade: Entre Ijuís – Rio Grande do Sul

Nacionalidade: Brasileira

Filiação: Mário Paulo Bernardi e Maria Lúcia Machado Bernardi

Dados Acadêmicos

1998/01: Ingresso no curso de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

2000/01 – 2000/02: Monitoria da disciplina FAR01009 (Farmacognosia II) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob orientação da Profa. Dr. Raquel Bridi.

Órgão financiador: PIBIC-UFRGS

2001/01 – 2002/02: Bolsista de Iniciação Científica, vinculada ao projeto “Análise química de espécies do gênero *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul”, sob orientação da Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser e desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Órgão financiador: PIBIC-UFRGS /CNPQ

2002/02: Obtenção do título de Farmacêutico pela Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

2003/01: Ingresso no curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Órgão financiador: Bolsa de Mestrado CAPES

2004/02: Mudança de nível para o curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Órgão financiador: Bolsa de Doutorado CAPES

2004/02: Proficiência em língua estrangeira – Inglês

2006/01: Proficiência em língua estrangeira – Espanhol

PUBLICAÇÕES

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

BERNARDI, A. P. M.; 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. Benzophenones from *Hypericum carinatum*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 784-786, 2005.

FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S. M. K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; NOR, C.; BERNARDI, A. P.; ALBRING, D.; SCHAPOVAL, E.; VON POSER, G. L.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 12, p. 236-240, 2005.

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. **Phytoterapy Research**, v. 19, p. 291-293, 2005.

BERNARDI, A. P. M.; MAURMANN, N.; RECH, S. B.; VON POSER, G. Benzopyrans in *Hypericum polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt cultured *in vitro*. **Acta Physiologiae Plantarum**, disponível on line, 2007.

FRITZ, D.; BERNARDI, A. P.; HAAS, J. S.; ASCOLI, B. M.; BORDIGNON, S. A. L.; VON POSER, G. Germination and growth inhibitory effects of *Hypericum myrianthum* and *H. polyanthemum* extracts on *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, 2007.