

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

Derivados de floroglucinol de espécies de *Hypericum* L. sul brasileiras e determinação de suas atividades biológicas

HENRIQUE BRIDI

PORTO ALEGRE, 2018

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

Derivados de floroglucinol de espécies de *Hypericum* L. sul brasileiras e determinação de suas atividades biológicas

Tese apresentada por
Henrique Bridi para obtenção do título de DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

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

PORTO ALEGRE, 2018

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, nível de Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em 18.10.2018 e aprovada pela banca examinadora constituída por:

Profº Drº Alexandre de Barros Falcão Ferraz

Universidade Luterana do Brasil

Profª Drª Amélia Teresinha Henriques

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª Drª Maique Weber Biavatti

Universidade Federal de Santa Catarina

Bridi, Henrique
Derivados de floriglucinol de espécies de
Hypericum L. sul brasileiras e determinação de suas
atividades biológicas / Henrique Bridi. -- 2018.
325 f.
Orientadora: Gilsane Lino von Poser.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2018.

1. Derivados de floriglucinol. 2. Hypericum. 3.
Antinociceptivo. 4. Antividade proliferativa. 5.
espécies sul brasileiras. I. Lino von Poser,
Gilsane, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Farmacognosia, Laboratório de Psicofarmacologia Experimental, no Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas e no Laboratório de Hematologia e Células-Tronco da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no Laboratório Regional de Nanociências e Nanotecnologia – LRNANO da UFRGS, com financiamento realizado pela CAPES, CNPq e FAPERGS. O autor recebeu bolsa CAPES.

**Ao meu irmão Roberto,
seu exemplo mostra que com carinho e muita dedicação
nenhum objetivo é impossível de ser alcançado**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida e por tantas oportunidades.

À Prof^a Dr^a Gilsane Lino von Poser, muito obrigado pela confiança ao longo destes seis anos. Seu carinho, generosidade, incentivo nos momentos mais difíceis, e a sua ímpar capacidade de transmitir o conhecimento, tornaram a caminhada mais leve.

À Prof^a Dr^a Stela Rates, por todos os ensinamentos e cooperação nos ensaios de nocicepção.

Ao Prof^o Dr^o Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, por sua dedicação em coletar o material vegetal utilizado nesta tese. Por todo o conhecimento transmitido nas saídas a campo.

À CAPES, pela bolsa de estudos durante a realização do doutorado.

À todos que fazem parte da Faculdade de Farmácia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pelo empenho em proporcionar a melhor infraestrutura para o desenvolvimento dos estudos e em manter a excelência no ensino.

Aos todos os colegas do Laboratório de Farmacognosia (Lab 504) que tive a oportunidade de conviver ao longo dessa jornada. Muito obrigado pela amizade, pela disposição em ajudar, pelos conhecimentos passados e pelas risadas dadas ao longo do dia-a-dia. Em especial aos colegas Gari Vidal e Gabriela Meirelles e Eveline Dischkaln Stolz.

À IC Bianca Elingson, pela amizade, dedicação, atenção e cuidado que sempre teve em todos os experimentos.

À Aline Beckenkamp e Natasha Maurmann, pela parceria nos experimentos de proliferação celular.

À toda a minha família, tanto de sangue, quanto de coração, muito obrigado por todo o apoio.

À minha namorada Leticia, muito obrigado por ser essa pessoa tão carinhosa, generosa e amável. Seu amor e carinho nos momentos de dificuldades foram indispensáveis nessa caminhada.

Finalmente, aos meus pais Carlos e Marlene, por seu apoio incondicional, pela confiança e por sempre se orgulharem tanto das minhas conquistas. Ao meu irmão Roberto, muito obrigado por fazer parte da minha vida, seu exemplo de vida me torna uma pessoa mais forte e me dá força a buscar cada vez mais.

RESUMO

O gênero *Hypericum* (Hypericaceae) se distribui em todo o mundo e seus representantes estão subdivididos em 36 seções taxonômicas. Ao longo das últimas décadas essas plantas passaram a receber maior atenção, principalmente após a indicação de uso de *H. perforatum* para o tratamento de casos de depressão leve a moderada. Esses vegetais se caracterizam pelo acúmulo de compostos fenólicos, principalmente de derivados de floroglucinol, tendo sido relatados mais de 400 diferentes compostos em cerca de 60 espécies. Os compostos de maior ocorrência são os floroglucinóis prenilados e os acilfloroglucinóis policíclicos poliprenilados. No sul do Brasil há relatos da ocorrência de 21 espécies nativas, distribuídas nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys*. Quimicamente estas espécies apresentam tendência em acumular floroglucinóis diméricos e, menos frequentemente, benzopiranos e benzofenonas. Estes compostos exibem uma variedade de atividades biológicas e farmacológicas, destacando-se atividades do tipo antidepressiva e antinociceptiva. Dessa forma, estudos conduzidos com o extrato *n*-hexano de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. denudatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* levaram ao isolamento de 13 derivados de floroglucinol conhecidos (uliginosina A, uliginosina B, isouliginosina B, hiperbrasilol B, isohiperbrasilol B, hiperbrasilol A, japonicina A, carifenona A, carifenona B, selancina A, HP1, HP2, HP3) e de outros dois floroglucinóis diméricos de estrutura inédita, denudatina A e japonicina E. Dentre os compostos isolados, sete foram testados quanto ao potencial antinociceptivo utilizando o teste da placa aquecida. Todos os derivados testados exibiram efeitos antinociceptivos, sem provocar prejuízo motor. Esses estudos desenvolvidos com espécies de *Hypericum* sul brasileiras vêm se mostrando de grande importância na ampliação do conhecimento sobre composição química destas espécies e demonstram a preservação das rotas biossintéticas nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys*. Tradicionalmente, preparações obtidas com as partes aéreas de *Hypericum* são utilizadas no tratamento de feridas e queimaduras. Assim, as frações enriquecidas em floroglucinol foram testadas, sendo capazes de aumentar a proliferação de queratinócitos *in vitro*. Visando a determinação dos compostos ativos destas frações, diversos derivados de floroglucinol também foram testados neste mesmo tipo celular. Os resultados demonstraram que japonicina A, HP2 e carifenona B aumentaram a proliferação celular, com destaque para carifenona B que promoveu um aumento na proliferação de 22.3%, na concentração de 0,01 μ M. Adicionalmente, três derivados de floroglucinol foram testados frente a fibroblastos e células troncos mesnquimais. Nestes experimentos, apenas uliginosina

têm de acumular derivados de floroglucinol com padrão molecular capaz de reduzir a percepção da dor. Além disso, estes resultados, ainda que preliminares, indicam esses compostos como possíveis alvos na investigação de agentes cicatrizantes.

Palavras-chave: *Hypericum*; atividade antinociceptiva; derivados de floroglucinol; atividade proliferativa; espécies sul brasileiras.

ABSTRACT

The genus *Hypericum* (Hypericaceae) is distributed throughout the world and its representatives are subdivided into 36 taxonomic sections. Over the last decades these plants have received more attention, especially due to the use of *H. perforatum* for the treatment of cases of mild to moderate depression. These plants are characterized by the accumulation of phenolic compounds, mainly of phloroglucinol derivatives, with more than 400 different compounds found in about 60 species. The most frequently occurring compounds are prenylated phloroglucinols and polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. In southern Brazil there are reports of the occurrence of 21 native species distributed in the *Brathys* and *Trigynobrathys* sections. Chemically these species tend to accumulate dimeric acylphloroglucinols and, less frequently, benzopyrans and benzophenones. These compounds exhibit a variety of biological and pharmacological activities, especially antidepressant-like and antinociceptive. Thus, studies conducted with the *n*-hexane extract of *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. denudatum*, *H. myrianthum* and *H. polyanthemum* have led to the isolation of 13 known phloroglucinol derivatives (uliginosin A, uliginosin B, isouliginosin B, hyperbrasilol B, isohyperbrasilol B, hyperbrasilol A, japonicine A, cariphenone A, cariphenone B, selancin A, HP1, HP2, HP3) and two novel dimeric phloroglucinols, trivially named denudatin A and japonicine E. Among the isolated compounds, seven were tested for antinociceptive potential in the hot plate test. All the derivatives tested showed antinociceptive effects, without causing motor impairment. These studies, developed with southern Brazilian *Hypericum* species, have been of great importance in the expansion of the knowledge about the chemical composition of these species and demonstrate the preservation of the biosynthetic routes in the *Brathys* and *Trigynobrathys* sections. Traditionally, preparations obtained with the aerial parts of *Hypericum* are used in the treatment of wounds and burns. Thus, the phloroglucinol enriched fractions were tested being able to increase the proliferation of keratinocytes *in vitro*. Aiming to determine the active compounds of these fractions, several phloroglucinol derivatives have also been tested in the same cell line. The results demonstrated that the japonicine A, HP2 and cariphenone B increased cell proliferation, especially cariphenone B which promoted a proliferation increase of 22.3% at the concentration of 0.01 μ M. Additionally, three phloroglucinol derivatives were tested against fibroblasts and mesenchymal stem cells. In these experiments, only uliginosin B showed activity. The results of this study reinforce the potential that Brazilian southern *Hypericum* species have in accumulating phloroglucinol derivatives with molecular pattern

capable of reducing the perception of pain. In addition, the results showing the effect in the cell proliferation, although preliminary, indicate these composites as possible targets in the investigation of healing agents.

Keywords: *Hypericum*; antinociceptive activity; phloroglucinol derivatives; proliferative activity; southern Brazilian species.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. CAPÍTULO 1 – Metabólitos especiais em espécies de <i>Hypericum</i> e principais atividades biológicas relacionadas.....	23
Manuscrito I – Southern Brazilian <i>Hypericum</i> species, promising sources of bioactive metabolites.....	27
Manuscrito II – Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from <i>Hypericum</i> species.....	53
3. CAPÍTULO 2 – Isolamento de derivados diméricos de floroglucinole avaliação da atividade antinociceptiva	135
Manuscrito III – Denudatin A, a dimeric acylphloroglucinol from <i>Hypericum denudatum</i> presents antinociceptive effect in mice.....	141
Manuscrito IV – Antinociceptive activity of phloroglucinol derivatives isolated from Southern Brazilian <i>Hypericum</i> species.....	189
4. CAPÍTULO 3 – Atividade proliferativa de derivados de floroglucinol de espécies de <i>Hypericum</i> nativas do sul do Brasil.....	227
Manuscrito V – Characterization of phloroglucinol-enriched fractions of Brazilian <i>Hypericum</i> species and evaluation of their effect on human keratinocytes proliferation.....	231
Manuscrito VI – Phloroglucinol derivatives from <i>Hypericum</i> induce <i>in vitro</i> proliferation of cells involved in wound healing process	261
5. DISCUSSÃO GERAL.....	283
6. CONCLUSÕES.....	291
7. REFERÊNCIAS.....	295
8. ANEXOS.....	309

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ao longo do tempo, os seres humanos buscaram na natureza os recursos necessários para a sua sobrevivência, estando nesse rol os remédios capazes de curar as doenças que os acometiam. O reino vegetal é a principal fonte de produtos naturais utilizados na terapêutica e serve de base para a medicina tradicional (BUTLER, 2004; CRAGG & NEWMANN, 2013; HARVEY et al., 2015). Com a descoberta da penicilina (FLEMING, 1929), os esforços de pesquisa se voltaram também aos microrganismos, principalmente na busca por antibióticos.

Com os avanços da química sintética e das técnicas de triagem de alto rendimento, os produtos naturais, além de serem fontes de moléculas bioativas passaram a ser estudados como protótipos para identificação dos grupos farmacofóricos de compostos sintéticos, principalmente devido a sua elevada diversidade estrutural (NEWMANN et al., 2000; NEWMANN & CRAGG, 2012; CRAGG & NEWMANN, 2013). Dados recentes mostram que nos últimos 34 anos foram aprovados 1562 novos fármacos pelo FDA (Food and Drug Administration), sendo que destes, 619 (aproximadamente 40%) são de origem ou derivados de produtos naturais (NEWMANN & CRAGG, 2016).

Dentre as diversas plantas utilizadas para fins terapêuticos, as espécies do gênero *Hypericum* (Hypericaceae), principalmente seu representante mais conhecido, *H. perforatum*, destacam-se por seu uso tradicional como cicatrizante de feridas e queimaduras (LINDBLAD, 2008; WÖLFLE et al., 2010). Estas espécies se distribuem em todos os continentes (com exceção da Antártida), sendo principalmente encontradas em regiões de clima temperado e nos trópicos, em regiões de altitude mais elevada (ROBSON, 1990; ROBSON, 2012). Devido às variações morfológicas e distribuição geográfica, as cerca de 500 espécies representantes estão divididas em 36 seções taxonômicas (ROBSON, 2012). Este gênero passou a receber mais atenção após a comprovação da efetividade do uso de extratos padronizados de *H. perforatum* para o tratamento de casos de depressão (MÜLLER, 2003; LINDE et al., 2005; LINDE et al., 2008; KASPER et al., 2010).

Os componentes majoritários presentes nos extratos de *H. perforatum* são flavonoides (AVATO, 2005; CROCKETT & ROBSON, 2011), derivados de floroglucinol policíclicos poliprenilados (hiperforina e *ad*-hiperforina) (VEROTTA et al., 1999; VEROTTA et al., 2000) e as naftodiantronas (hipericina e *pseudo*-hipericina) (BUTTERWECK & SCHMIDT, 2007).

No sul do Brasil (estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) ocorrem cerca de 20 espécies nativas, que estão distribuídas nas seções *Brathys* e *Trigynobrathys*. Estas espécies são caracterizadas como ervas, arbustos ou subarbustos, com flores amarelas a laranja-escuras (**Figura 1**). A análise fitoquímica de espécies destas seções demonstrou certas particularidades quando comparada a *H. perforatum* (seção *Hypericum*), como a ocorrência de derivados diméricos de floroglucinol (CCANA-CCAPATINTA et al., 2015) e a ausência de hipericina e *pseudo*-hipericina (FERRAZ et al., 2002).



Figura 1. Representantes de espécies de *Hypericum* sul brasileiras. (A) *H. austrobrasiliense*; (B) *H. caprifoliatum*; (C) *H. denudatum*; (D) *H. polyanthemum*; (E) *H. myrianthum*; (F) *H. carinatum*. (Fotos Prof^o Sérgio Bordignon e Prof^a Gilsane Lino von Poser).

Apesar de possuírem constituições químicas distintas de *H. perforatum* e espécies relacionadas, extratos e floroglucinóis obtidos das espécies de *Hypericum* sul brasileiras também apresentam atividades do tipo antidepressiva e antinociceptiva (VIANA et al., 2003; VIANA et al., 2005; HAAS et al., 2010; STEIN et al., 2012; STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2014a; BRIDI et al., 2016; MEIRELLES et al., 2017). O recente relato de isolamento de derivados de floroglucinol inéditos (BRIDI et al., 2016) aliados ao potencial biológico

presente nestes compostos, reforça o interesse em estudar a composição química destes vegetais ainda pouco explorados.

Além das atividades previamente citadas, o uso tradicional de *H. perforatum* para o tratamento de feridas e queimaduras é relatado principalmente na Europa. O *Hyperici oleum* é um macerado de suas partes aéreas com azeite de oliva, com posterior exposição à luz solar, que gera um produto que contém como componente majoritário a hiperforina, ao qual é creditada sua atividade cicatrizante (MAISENBACHER & KOVAR, 1992; ISACCHI et al., 2007; WÖLFLE et al., 2014).

As espécies sul brasileiras têm poucas indicações de uso tradicional, todavia encontram-se relatos da utilização de decoctos de *H. connatum* para o tratamento de aftas e feridas na boca (MENTZ et al., 1997). Adicionalmente, algumas espécies demonstraram atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória (DALL'AGNOL et al., 2003; BARROS et al., 2013; BERNARDI et al., 2005), sendo atividades particularmente importantes no processo de cicatrização (JONES et al., 2004; SADIQQE et al., 2010; ASUYA & TOKURA, 2014). Os estudos pré-clínicos em culturas celulares *in vitro* são importantes, principalmente no processo de seleção de compostos promissores. Em relação aos estudos de compostos cicatrizantes, diversos modelos vêm sendo propostos, entre eles as monoculturas de queratinócitos, fibroblastos e células tronco (VIDMAR et al., 2017).

Considerando a importância do gênero *Hypericum*, como fonte de compostos biologicamente ativos, o presente trabalho tem como objetivo geral o estudo químico de cinco espécies de *Hypericum* sul brasileiras, com ênfase no isolamento e identificação de derivados de floroglucinol, bem como a determinação das atividades antinociceptiva e proliferativa.

Visando um ordenamento dos assuntos abordados, este trabalho está dividido em três capítulos, os quais são na sequência contemplados na discussão geral. O **Capítulo 1** está dividido em duas partes, a primeira apresenta uma revisão da ocorrência de compostos fenólicos bioativos nas espécies de *Hypericum* sul brasileiras. A segunda parte apresenta uma revisão focada na ocorrência de derivados de floroglucinol no gênero *Hypericum*, relacionando a ocorrência com as atividades biológicas (**Manuscritos I e II**).

Os resultados do **Capítulo 2** estão divididos em dois manuscritos (**Manuscritos III e IV**) que descrevem o isolamento e a elucidação estrutural de derivados diméricos de floroglucinol dos extratos lipofílicos (*n*-hexano) de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. denudatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, com a determinação da atividade antinociceptiva dos compostos isolados através do teste da placa aquecida.

O **Capítulo 3** apresenta os resultados obtidos com os ensaios da distribuição do ciclo celular e o ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* (“scratch”) com a fração enriquecida em floroglucinóis de *H. carinatum*. Os resultados obtidos foram reunidos com dados previamente obtidos durante o mestrado e compilados no **Manuscrito V**. O **manuscrito VI** descreve o efeito dos derivados de floroglucinol, isolados de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, na proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células-tronco.

Além dos trabalhos apresentados nos capítulos, no período da Tese o autor se envolveu no desenvolvimento de outro trabalho acerca da atividade antinociceptiva do benzopirano HP1 isolado de *H. polyanthemum*, apresentado no **Anexo 2**.

2. CAPÍTULO 1

Metabólitos especializados em espécies de *Hypericum* e principais atividades biológicas relacionadas.

2.1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são constituídos por uma diversidade de moléculas biossintetizadas, principalmente por vegetais, com o intuito de exercerem diversas atividades tais como atração de polinizadores, defesa, comunicação e proteção contra microrganismos. Interessantemente, muitas classes de produtos naturais são formadas a partir de núcleos mais simples, geralmente oriundas de uma rota metabólica primária (AUSTIN & NOEL, 2003).

As espécies do gênero *Hypericum* são conhecidas produtoras de diversas classes de compostos fenólicos, incluído as naftodiantronas, flavonóis, biflavonoides, xantonas e os derivados de floroglucinol. A distribuição destes metabólitos ao longo das espécies gera considerável interesse, principalmente com relação a possíveis considerações quimiotaxonômicas (AVATO, 2005; CROCKETT ROBSON, 2011).

No reino vegetal, os derivados de floroglucinol ocorrem em diversas famílias botânicas como Asteraceae, Cannabaceae, Dryopteridaceae, Euphorbiaceae, Myrtaceae e especialmente em Clusiaceae e Hypericaceae (SINGH & BHARATE, 2006). O gênero *Hypericum* anteriormente descrito como parte da família Clusiaceae (Guttiferae, *nomina conservanda*), subfamília Hypericoideae (TAKHTAJAN, 1980; CRONQUIST, 1981) foi recentemente removido desta família, juntamente com os gêneros *Cratoxylum* Blume, *Eliaea* Cambessèdes, *Harungana* Lamark, *Hypericum* L., *Psorospermum* Spach, *Santomasia* N. Robson and *Vismia* Vandelli, formando a família Hypericaceae (STEVENS, 2001).

A busca por compostos com atividade antibacteriana levou aos primeiros estudos focados no isolamento de derivados de floroglucinol no gênero *Hypericum*. Nestas pesquisas iniciais, uliginosina A e uliginosina B de *H. thesiifolium* (sin. *H. uliginosum*) (PARKER & JOHNSON, 1968; TAYLOR & BROOKER, 1969) e hiperforina de *H. perforatum* (GUREVICH et al., 1971; BYSTROV et al., 1975), foram obtidos. Com a indicação de uso de *H. perforatum* para o tratamento de casos de depressão leve a moderada, todo o gênero passou a ser mais estudado e com isso o número de derivados de floroglucinol identificados cresceu da mesma forma.

Os primeiros estudos com espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil foram publicados na metade da década de 1990 e a partir do ano 2000 foram aprofundados de forma mais intensa pelo nosso grupo de pesquisa. Desde então, seis espécies (*H. austrobrasiliense*,

H. brasiliense, *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*) foram objetos de estudos fitoquímicos mais detalhados, sendo que destas foi possível descrever o isolamento de 11 floroglucínóis diméricos (ROCHA et al., 1995; ROCHA et al., 1996; FERRAZ et al., 2002; NÖR et al., 2004; BRIDI et al., 2016) e cinco derivados monoméricos, sendo estes, três benzopiranos (FERRAZ et al., 2001) e duas benzofenonas (BERNARDI et al., 2005). Além dos derivados de floroglucínol, são relatados para espécies destas seções, flavonoides (NUNES et al., 2010; BARROS et al., 2013), xantonas (ROCHA et al., 1994), taninos (DALL'AGNOL et al., 2003) e óleos voláteis (FERRAZ et al., 2005).

Nosso grupo de pesquisa também dispendeu esforços na investigação de possíveis atividades biológicas de extratos, frações e derivados de floroglucínol isolados destas espécies de *Hypericum*. Desta forma, foi possível identificar diversas atividades biológicas como inibidores da monoaminoxidase (GNERRE et al., 2001), do tipo antidepressiva (DAUDT et al., 2000; VIANA et al., 2005; STEIN et al., 2012), antinociceptiva (STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2014a,b; STOLZ et al., 2016; BRIDI et al., 2016; MEIRELLES et al., 2017), antimicrobiana (DALL'AGNOL et al., 2003; DALL'AGNOL et al., 2005; FENNER et al., 2005; FRITZ et al., 2007; MEIRELLES et al., 2017), antiparasitária (DAGNINO et al., 2015; MENEZES et al., 2017; DAGNINO et al., 2018) e citotóxica para linhagens de células tumorais (FERRAZ et al., 2005a; FERRAZ et al., 2005b; PINHATTI et al., 2013).

Mesmo com todos os esforços, estima-se que pelo menos 60% de todas as espécies de *Hypericum* não tenham sido minimamente estudadas do ponto de vista fitoquímico, sendo seus componentes secundários ainda desconhecidos (CROCKETT & ROBSON, 2011), incluindo-se nessa consideração as espécies sul brasileiras (com seis espécies estudadas de um total de vinte). Pela importância que os compostos isolados de espécies de *Hypericum* vêm apresentando e pela falta de uma revisão completa da literatura que possa direcionar os esforços na ampliação do conhecimento sobre essas plantas, o presente capítulo está dividido em dois manuscritos. No primeiro são apresentados os resultados obtidos nos estudos com as espécies de *Hypericum* sul brasileiras, investigadas nas últimas duas décadas. O segundo manuscrito apresenta uma compilação de dados relativos a distribuição e atividades biológicas de derivados de floroglucínol isolados no gênero *Hypericum* (Hypericaceae) até o ano de 2016. Adicionalmente, considerações taxonômicas e possíveis áreas de concentração de estudos foram indicadas.

MANUSCRITO I

Southern Brazilian *Hypericum* species, promising sources of bioactive metabolites.

Capítulo publicado no livro *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, v. 59, p. 491-507, 2018.

Southern Brazilian *Hypericum* species, promising sources of bioactive metabolites

Gabriela de Carvalho Meirelles, Henrique Bridi, Stela Maris Kuze Rates, Gilsane Lino von Poser*

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil

O manuscrito I é um capítulo publicado no livro *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, v. 59, p. 491-507, 2018. No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 29-51.

MANUSCRITO II

Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species.

Artigo publicado no periódico *Phytochemistry*, v. 155, p. 203-232, 2018.

Structural diversity and biological activities of phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species

Henrique Bridi ^a, Gabriela de Carvalho Meirelles ^a, Gilsane Lino von Poser ^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Avenida Ipiranga 2752, Porto Alegre/RS 90610-000, Brazil.

O manuscrito II é um artigo publicado no periódico *Phytochemistry*, v. 155, p. 203-232, 2018. No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 55-134.

3. CAPÍTULO 2

Isolamento de derivados diméricos de floroglucinol e avaliação da atividade antinociceptiva

3.1 INTRODUÇÃO

A dor é definida pela Associação Internacional do Estudo da Dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos ou descrita em termos de tais lesões (IASP, 2014). A dor apresenta um complexo sistema de modulação, além disso, fatores como as diferenças genéticas, experiências passadas, ansiedade e expectativa estão relacionados com a sua percepção (MERSKEY & BOGDUK, 1994).

A dor pode ser classificada de três formas principais, transitória, aguda e crônica. Sendo que a dor crônica é forma mais incapacitante, causando impacto nas funções físicas, sociais, ocupacionais e recreacionais dos indivíduos acometidos e até mesmo dos sistemas de saúde (LOESER & MELZACK, 1999; ZALE et al., 2013). Em casos graves, as condições das dores crônicas e os frequentes episódios de dor intermitente podem aumentar os fatores de risco para o suicídio (RACINE, 2017).

Os produtos naturais são uma importante fonte de compostos analgésicos. A morfina de *Papaver somniferum* L. e o ácido salicílico, com o posterior desenvolvimento do ácido acetilsalicílico, de *Salix alba* L, são valiosas opções terapêuticas até os dias atuais (McCURDY & SCULLY, 2005). Atualmente, os produtos naturais de origem marinha também são alvo de interesse, principalmente após o desenvolvimento do peptídeo terapêutico ziconotida (Prialt[®]) a partir do composto ω -conotoxina MVIIA isolado do organismo marinho *Conus magus*. Este peptídeo possui um mecanismo de ação único que envolve o bloqueio seletivo dos canais de cálcio tipo-N, que controlam a neurotransmissão (McGIVERN, 2007; HARVEY, 2014). Dados recentes publicados por Newmann & Cragg (2016) relatam que entre os anos de 1981 até 2014 foram aprovados 17 novos fármacos analgésicos, sendo que seis deles tiveram origem ou foram baseados em produtos naturais.

O gênero *Hypericum*, principalmente representado pela espécie *H. perforatum* é usado popularmente de forma tópica para o tratamento de feridas, queimaduras e inflamação e para o tratamento da ansiedade, depressão e neuralgia (BILIA et al., 2002). Atualmente, os extratos padronizados de *H. perforatum* são indicados para o tratamento de casos de depressão (BILIA et al., 2002; MENNINI & GOBBI, 2004; KASPER et al., 2010). Tendo, nos casos de depressão maior, apresentado efeitos similares aos antidepressivos padrões, com menor

incidência de efeitos adversos (LINDE et al., 2008). Além disso, este fitoterápico apresenta menores custos e incidência de efeitos adversos se comparados aos antidepressivos sintéticos (LINDE & KNÜPPEL, 2005; SOLOMON, 2011).

Por sua importância no tratamento da depressão, *H. perforatum* passou a ser investigado quanto aos seus efeitos antinociceptivos, sendo encontradas evidências de ação no controle da dor aguda, da dor neuropática e da neuropatia diabética. Sendo o derivado de floroglucinol hiperforina e a naftodiantrona hipericina, os possíveis compostos ativos (GALEOTTI et al., 2010a; GALEOTTI et al., 2010b; GALEOTTI et al., 2014). Os estudos pré-clínicos realizados até o momento permitem colocar os extratos de *H. perforatum* como uma alternativa terapêutica para o tratamento da dor (GALEOTTI, 2017).

As espécies de *Hypericum* do sul do Brasil vêm se notabilizando por serem fontes de compostos capazes de reduzir a percepção da dor. Os extratos lipofílicos de *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum* exibiram atividade antinociceptiva em modelos de placa aquecida e indução de contorção abdominal (VIANA et al., 2003; HAAS et al., 2010). Posteriores estudos fitoquímicos levaram ao isolamento de uma série de compostos com efeitos antinociceptivos como o benzopirano 6-isobutiril-5,7-dimetoxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1) (HAAS et al., 2010; MEIRELLES et al., 2017) e os floroglucinóis diméricos uliginosina B (STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2014a; STOLZ et al., 2014b; STOLZ et al., 2016), austrobrasilol A, austrobrasilol B e isoaustróbrasilol B (BRIDI et al., 2017).

O efeito do benzopirano HP1 é devido, pelo menos em parte, a ativação do sistema opioide (HAAS et al., 2010) e o efeito do floroglucinol dimérico uliginosina B possivelmente é exercido pela sua capacidade de ativar o sistema opioide e os receptores monoaminérgicos, glutamatérgicos e purinérgicos. Entretanto essa parece ser uma ativação indireta, pois o composto não consegue se ligar aos receptores opioides, dopaminérgicos e adenosinérgicos (STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2016). Os resultados obtidos reforçam o potencial biológico que os derivados de floroglucinol obtidos das espécies de *Hypericum* sul brasileiras possuem.

Mesmo com todos os esforços despendidos nas últimas duas décadas, somente uma parte das espécies de *Hypericum* nativas foram amplamente analisadas dos pontos de vista químico e farmacológico. Pela importância de se pesquisar novas fontes de compostos com

atividade antinociceptiva e ampliar os conhecimentos a cerca da ocorrência de derivados de floroglucinol em *Hypericum* no presente capítulo apresenta-se o isolamento e identificação dos derivados de floroglucinol (floroglucinóis monoméricos e floroglucinóis diméricos) presentes nas frações lipofílicas de *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. denudatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*. Além disso, os compostos isolados foram testados em um modelo animal de nocicepção.

Os resultados estão apresentados e discutidos nos Manuscritos III e IV.

MANUSCRITO III

Denudatin A, a dimeric acylphloroglucinol from *Hypericum denudatum* presents antinociceptive effect in mice.

Artigo publicado no periódico *Planta Medica*, v. 83, p. 1329-1334, 2017.

Denudatin A, a dimeric acylphloroglucinol from *Hypericum denudatum* presents antinociceptive effect in mice.

Henrique Bridi ¹, Gabriela de Carvalho Meirelles ¹, Sérgio Augusto de Loreto Bordignon ², Stela Maris Kuze Rates ¹, Gilsane Lino von Poser ¹

Affiliation

¹ Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

² Programa de Pós Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, UNILASALLE, Canoas, Brazil.

O manuscrito III é um artigo publicado no periódico *Planta Medica*, v. 83, p. 1329-1334, 2017. No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 143-187.

MANUSCRITO IV

Antinociceptive activity of phloroglucinol derivatives isolated from Southern Brazilian *Hypericum* species.

Artigo publicado no periódico *Chemistry & Biodiversity*, v. 15, e1800266, 2018 (DOI: 10.1002/cbdv.201800266).

**Antinociceptive Activity of Phloroglucinol Derivatives Isolated from Southern Brazilian
Hypericum Species**

Henrique Bridi,^a Eveline Dischkaln Stolz,^b Francisco Maikon Corrêa de Barros,^a Bianca Elingson da Silva Costa,^a Letícia Guerini,^a Stela Maris Kuze Rates,^b Gilsane Lino von Poser^{*a}

^a Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, e-mail: gilsane@farmacia.ufrgs.br

^b Laboratório de Psicofarmacologia Experimental, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

O manuscrito IV é um artigo publicado no periódico *Chemistry & Biodiversity* v. 15, e1800266, 2018 (DOI: 10.1002/cbdv.201800266). No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 191-225.

4. CAPÍTULO 3

Atividade proliferativa de derivados de floroglucinol de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil

4.1 INTRODUÇÃO

A busca por preparações que pudessem acelerar o processo cicatricial tem um papel histórico importante para os seres humanos, sendo estas necessariamente derivadas de fontes naturais como plantas, produtos animais e minerais. Tratando-se de plantas tradicionalmente utilizadas, o uso por populações europeias de *Hypericum perforatum* para o tratamento de feridas e queimaduras, é conhecido desde a Grécia antiga (SHELTON et al., 2001; LINDBLAD 2008).

Esta preparação é conhecida como *Hyperici oleum*, é oriunda da maceração das flores frescas de *H. perforatum* com azeite de oliva e posterior exposição a luz solar por cerca de seis semanas. O macerado apresenta uma característica cor avermelhada, originada no processo pela degradação da hipericina pela luz solar. Os floroglucínóis poliprenilados hiperforina e seus análogos foram identificados no óleo, sendo a eles creditada a atividade cicatrizante (MAISENBACHER & KOVAR, 1992; ISACHII et al., 2007).

Estudos posteriores com o *Hyperici oleum* e com extratos etanólicos de *H. perforatum* demonstraram sua efetividade em acelerar o processo cicatricial, tanto *in vitro* (culturas celulares de fibroblastos) quanto *in vivo* (modelos animais), reduzindo o tempo de reepitelização em até 40% (ÖZTURK et al., 2007; DIKMEN et al., 2011; PRISĂCARU et al., 2013; WÖLFLE et al., 2014). O derivado de floroglucínol hiperforina também se mostrou capaz de acelerar o processo de fechamento das feridas *in vitro* (TAKADA et al., 2014; TAKADA et al., 2017).

Dentre as cerca de 20 espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, somente *H. connatum* tem a indicação de uso tradicional para o tratamento de aftas e feridas na boca (MENTZ et al., 1997). Entretanto diversas outras espécies demonstram atividades como antimicrobiana (DALL'AGNOL et al., 2003; DALL'AGNOL et al., 2005), antifúngica (BARROS et al., 2013; MEIRELLES et al., 2017) e antiinflamatória (BARROS et al., 2013), sendo estas atividades particularmente importantes no processo cicatricial (SINGER & CLARK, 1999; JONES et al., 2004; SADIQQE et al., 2010; KASUYA & TOKURA, 2014).

Levando em consideração as evidências de que as espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil podem exercer efeitos que acelerar o processo cicatricial, BRIDI e colaboradores

(2017) estudaram os efeitos das frações enriquecidas em floroglucínóis de cinco espécies de *Hypericum* (*H. caprifoliatum*; *H. carinatum*; *H. connatum*; *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*) na proliferação *in vitro* em culturas de queratinócitos imortalizados (HaCaT). Os resultados mais promissores foram obtidos com *H. carinatum* e *H. polyanthemum*, demonstrando que o tratamento por 24 horas promoveu um significativo aumento na proliferação celular.

No decorrer deste trabalho de tese, ensaios adicionais foram realizados com o intuito de compreender melhor a ação que a fração enriquecida em floroglucínóis de *H. carinatum* exercia nas células. Assim foram realizados os testes de distribuição do ciclo celular e o ensaio de cicatrização de feridas *in vitro* (“scratch”). A análise da influência na distribuição do ciclo celular mostrou que a fração foi capaz de aumentar o número de células nas fases S e G2/M, sendo este um indicativo de indução da proliferação. O ensaio de cicatrização *in vitro* demonstrou que a fração exerce efeitos na proliferação celular, entretanto não altera a migração celular (sendo este também um efeito importante no processo cicatricial).

Levando em consideração a importância de se buscar agentes que auxiliem na promoção da cicatrização, é importante aprofundar os resultados previamente obtidos com as frações enriquecidas em floroglucínol de espécies de *Hypericum*, testando os derivados de floroglucínol isolados. Os resultados estão divididos em dois manuscritos (Manuscritos V e VI), sendo que o primeiro contém resultados oriundos dos estudos realizados durante a dissertação e complementados no período da tese do autor. O segundo manuscrito descreve a ação de treze compostos na proliferação *in vitro* de queratinócitos, fibroblastos e células-tronco.

MANUSCRITO V

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

Manuscrito publicado no periódico *Phytotherapy Research*, v. 31, p. 62-68, 2017. (DOI: 10.1002/ptr.5727).

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

Phloroglucinol Fractions of *Hypericum* Promote HaCaT Proliferation

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

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

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

O manuscrito V é um artigo publicado no periódico *Phytotherapy Research*, v. 31, p. 62-68, 2017 (DOI: 10.1002/ptr.5727). No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 233-260.

MANUSCRITO VI

Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* induce *in vitro* proliferation of cells involved in wound healing process

Manuscrito em preparação

Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* induce *in vitro* proliferation of cells involved in wound healing process

Henrique Bridi ^a, Aline Beckenkamp ^b, Natasha Maurmann ^c, Bianca Elingson ^a, Andréia Buffon ^b, Patrícia Pranke ^c, Gilsane Lino von Poser ^{a,*}

^a Laboratório de Farmacognosia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Laboratório de Análises Bioquímicas e Citológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Laboratório de Hematologia e Células Tronco, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

O manuscrito VI é um artigo em preparação. No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 263-281. Neste, consta a descrição do isolamento de derivados de floroglucinol das partes aéreas de espécies de *Hypericum* sul brasileiras. Adicionalmente, os compostos isolados foram avaliados quanto a sua capacidade de induzir a proliferação *in vitro* de queratinócitos, fibroblastos e células tronco mesenquimais.

5. DISCUSSÃO GERAL

Hypericaceae Juss. é uma extensa família botânica que compreende sete gêneros de plantas, *Cratoxylum*, *Eliaea*, *Harungana*, *Hypericum*, *Psorospermum*, *Santomasia* e *Vismia*. Sendo que, *Hypericum* responde por 80% da diversidade da família (CROCKETT & ROBSON, 2011).

O gênero *Hypericum* compreende cerca de 500 espécies que, segundo as suas características morfológicas e de ocorrência geográfica, são subdivididas em 36 seções taxonômicas (ROBSON, 2012). No Brasil ocorrem de 23 representantes do gênero, especialmente concentrados nos estados da região Sul do país (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná) com relatos de 21 espécies (excluindo-se, *H. pleyostylum* e *H. roraimense*, nativos das regiões Sudeste e Norte, respectivamente) (ELY, 2018). As espécies de *Hypericum* sul brasileiras pertencem às seções *Brathys* (dois representantes) e *Trigynobrathys* (19 representantes). A predominância de espécies da mesma seção se deve uma característica de distribuição destes vegetais. Enquanto os representantes da seção *Brathys* se distribuem principalmente pelo norte da Amazônia, nordeste dos Andes e pelas Antilhas, a seção *Trigynobrathys* tem seu centro na região sul do Brasil (ROBSON, 1990). É importante destacar que recentemente duas novas espécies nativas da região Sul foram descritas, *H. austrobrasiliense* (ELY et al., 2015) e *H. bordignonii* (ELY & BOLDRINI, 2015), provando que este gênero ainda não foi totalmente explorado.

Este grupo de plantas passou a ser mais bem estudado com a disseminação das utilidades terapêuticas de *H. perforatum*, principalmente no tratamento de casos de depressão (KASPER et al., 2010). Nestas espécies, os principais metabólitos secundários encontrados são policetídeos do tipo III, como naftodiantronas, xantonas, flavonoides e derivados de floroglucinol (CROCKETT & ROBSON, 2011). Uma característica marcante destas plantas é a acumulação dos compostos em glândulas, que se distribuem principalmente nas folhas, pétalas e sépalas. Cerca de 2/3 do gênero apresentam glândulas negras que acumulam principalmente naftodiantronas (especialmente hipericina e *pseudo*-hipericina) (ZOBAYED et al., 2006). Os derivados de floroglucinol são estocados nas glândulas pálidas (SOELBERG et al., 2007; CROCKETT & ROBSON, 2011).

O mecanismo biossintético para a produção dos derivados de floroglucinol em *Hypericum* ainda não foi completamente elucidado. Entretanto, os trabalhos focados na biossíntese da hiperforina, provêm os primeiros passos desta rota. A biossíntese inicia com a

condensação de três moléculas de malonil-CoA com uma unidade iniciadora aromática ou alifática (AUSTIN & NOEL, 2003; BEERHUES 2006). Esse policetídeo linear sofrerá ciclização intramolecular formando um intermediário aromático, que posteriormente será substituído por prenilas, contribuindo significativamente para a variedade estrutural destes compostos (BOUBAKIR et al., 2005; KLINGAUF et al., 2005; KARPPINEN et al., 2007). A partir do intermediário aromático prenilado, as cinco classes de derivados de floroglucinol, descritas no **manuscrito II**, são possivelmente biossintetizadas, entretanto os mecanismos e principalmente as enzimas envolvidas nesse processo ainda são pouco conhecidos (**Figura 6; Manuscrito II**).

Conforme os dados demonstrados no **manuscrito II**, aproximadamente 10% do total de espécies do gênero *Hypericum* haviam sido alvo de estudos focados no isolamento e identificação de derivados de floroglucinol. Destas plantas, foram identificados 429 compostos, com a ocorrência majoritária de acilfloroglucinóis policíclicos poliprenilados, que respondem por aproximadamente 50% do total. Além da diversidade estrutural, foram consideradas neste trabalho as atividades biológicas destes compostos. As mais comumente relatadas foram as atividades antimicrobiana, do tipo antidepressiva e antinociceptiva e citotóxica contra linhagens de células tumorais. Um dos fatores limitantes que dificulta um maior aprofundamento dos resultados (principalmente em abordagens de relação estrutura-atividade) é a predominância de ensaios *in vitro*.

Poucas considerações quimiotaxônomicas puderam ser estabelecidas quanto a ocorrência de derivados de floroglucinol. Foi possível observar que as seções *Brathys* e *Trigynobrathys* são as únicas capazes de acumular floroglucinóis diméricos. Essa evidência já havia sido relatada anteriormente por Ccana-Ccapatinta e colaboradores (2015) e reforçada pelos **manuscritos I e II**. Além disso, os floroglucinóis prenilados, cromanos e cromenos e as benzofenonas simples ocorrem em praticamente todas as seções com floroglucinóis descritos, este fato corrobora a proposta de rota biossintética, na qual estes compostos seriam os intermediários.

Além dos floroglucinóis diméricos, outras classes de compostos foram relatadas para as espécies de *Hypericum* sul brasileiras, como xantonas (ROCHA et al., 1994), flavonoides e ácidos fenólicos (NUNES et al., 2010; BARROS et al., 2013) e derivados monoméricos de floroglucinol (benzopiranos e benzofenonas) (FERRAZ et al., 2001; BERNARDI et al., 2005;

BRIDI et al., 2017b). Como esperado, pela ausência aparente de glândulas negras, as naftodiantronas hipericina e *pseudo*-hipericina não foram detectadas nestas espécies (FERRAZ et al., 2002). Os derivados de floroglucinol isolados das espécies sul brasileiras notabilizam-se por exibirem atividades do tipo antidepressiva (STEIN et al., 2012; CENTURIÃO et al., 2014; STEIN et al., 2016) e antinociceptiva (STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2014; STOLZ et al., 2016). Especial destaque foi dado aos estudos voltados à elucidação do mecanismo de ação, principalmente da uliginosina B (STEIN et al., 2012; STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2016) e do benzopirano HP1 (HAAS et al., 2010; MEIRELLES et al., 2017).

Os primeiros derivados de floroglucinol de *Hypericum* foram isolados na década de 1960, no desenvolvimento de estudos focados principalmente na busca por novos antimicrobianos. Desde então, é evidente o aumento no número de publicações e no número de compostos obtidos. Mesmo assim, até o momento, poucas espécies tiveram seu potencial devidamente explorado (~ 10% em nível mundial e ~ 30% no sul do Brasil). Considerando o exposto nos **manuscritos I e II**, torna-se clara a importância e o potencial do gênero *Hypericum* como produtor de moléculas bioativas, com elevada diversidade estrutural. Salienta-se, entretanto, a necessidade de estudos focados nos mecanismos de ação, farmacocinética e perfil toxicológico dos candidatos promissores.

Os estudos fitoquímicos realizados com as espécies sul brasileiras foram, até o momento, capazes de analisar somente uma parte destas espécies. Assim, o **Capítulo 2 (manuscritos III e IV)** apresenta os resultados voltados ao isolamento e identificação estrutural de derivados de floroglucinol de cinco espécies de *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. denudatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*).

O **manuscrito III** descreve os resultados do processo de isolamento da fração *n*-hexano de *H. denudatum*. Nesta espécie foi possível isolar um floroglucinol dimérico inédito (denudatina A) (**Figura 2**) e outros quatro já conhecidos (selancina A; uliginosina B, isouliginosina B e hiperbrasilol A). Cromenos e cromanos são compostos raramente encontrados nas espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*. Até o relato de selancina A em *H. denudatum*, esses compostos haviam sido encontrados somente em *H. japonicum* (ISHIGURO et al., 1990; HU et al., 2000) e em *H. polyanthemum* (FERRAZ et al., 2001).

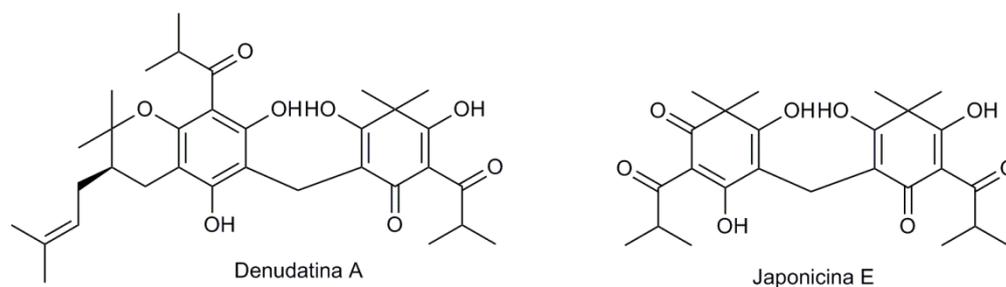


Figura 2. Derivados de floroglucinol inéditos, denudatina A de *H. denudatum* e japonicina E de *H. polyanthemum*.

Os espectros de RMN de hidrogênio (^1H) são especialmente valiosos no processo de identificação dos floroglucinóis diméricos. Inicialmente destacam-se a presença de sinais referentes aos grupos hidroxila quelados, na região de campo baixo (geralmente entre 4-5 singletos na região de δ_{H} 9,00 – 19,00 ppm). O sinal δ_{H} 18,7 ppm é característico da presença de um sistema de β -tricetonas. Além disso, singletos em $\sim 16,0$ ppm e $\sim 14,0$ ppm são característicos das hidroxilas ligadas na porção floroglucinol destes compostos, sendo diagnósticos na diferenciação de isômeros, como a uliginosina B e a isouliginosina B. Singletos ou singletos alargados em δ_{H} 3,50 ppm, são sinais característicos relativos aos hidrogênios metilênicos, indicando assim a presença da ponte metilênica que une os dois monômeros. Outros sinais característicos são observados como um par de dubletos, relativos aos hidrogênios olefínicos (δ_{H} 5,60 ppm e δ_{H} 6,60 ppm) do anel cromano e septetos em $\sim 4,20$ ppm correspondente ao hidrogênio metínico dos grupos isobutirilas. Os espectros de RMN de carbono (^{13}C) também são informativos e apresentam sinais característicos, principalmente relacionados às posições destacadas nos espectros de RMN ^1H . Os espectros de correlação (principalmente ^1H - ^1H COSY, HSQC e HMBC) provêm detalhes que auxiliam a determinar o substituinte e a posição de ligação deste no anel floroglucinol ou acilfilicínico.

Na interpretação dos espectros obtidos com a denudatina A, foi possível verificar a presença dos sinais característicos dos floroglucinóis diméricos (comparável a uliginosina B), contudo não se observava a presença dos sinais característicos do anel cromeno. Entretanto, foi possível visualizar a presença de sinais característicos de um carbono metilênico (δ_{C} 22,9 ppm) e um carbono metínico (δ_{C} 40,8 ppm), indicando a presença de um anel cromano. Adicionalmente, no RMN ^1H foi possível visualizar os sinais característicos da presença de uma prenila (dois singletos em δ_{H} 1,62 ppm e δ_{H} 1,73 ppm; um dubleto alargado em δ_{H} 1,48 ppm e um pseudotripleto em δ_{H} 5,20 ppm). Os espectros de correlação indicaram a ligação

desta prenha no carbono metínico do anel cromeno. A denudatina A possui um centro quiral, que teve sua estereoquímica definida como *R* com o auxílio de espectros de NOESY e de dados previamente publicados (WINKELMANN et al., 2003; HENRY et al., 2006).

Seguindo na mesma linha de estudos, no **manuscrito IV** foi relatado o processo de isolamento em quatro espécies previamente estudadas (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. denudatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*). A análise fitoquímica das raízes de *H. polyanthemum* levou ao isolamento dos cromenos 6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1) e 5-hidróxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP3), e de uma mistura de floroglucínóis diméricos, japonicina A e seu isômero japonicina E (**Figura 2**), composto de estrutura inédita. Salienta-se a ausência, nas raízes, de compostos já isolados nas partes aéreas do cromeno 7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e de isouliginosina B (BRIDI et al., 2018; manuscrito IV). Adicionalmente, uliginosina A, isouliginosina B e isohiperbrasilol B foram relatados pela primeira vez em *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. caprifoliatum*, respectivamente.

Os espectros de RMN uni e bidimensionais da mistura de japonicina A e japonicina E apresentaram sinais duplicados ou sobrepostos, em uma proporção estimada de 3:1. Inicialmente, a presença de japonicina A foi detectada nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , pela ocorrência de sinais duplicados, característicos dessa molécula simétrica. Todavia, sinais adicionais de um segundo composto, puderam ser observados. Durante o processo de identificação foi possível determinar que o segundo composto da mistura era estruturalmente semelhante a japonicina A. A diferença entre os compostos é a posição das carbonilas dos monômeros do ácido acilfilicínico, no caso da japonicina A são visualizados em C-1 e C-1' e na japonicina E ocorrem em C-1 e C-3'. Esta proposta foi baseada principalmente na ocorrência de um sinal mais desblindado em δ_{C} 49,5 (C-4') quando comparado a δ_{C} 44,5 (C-4), indicando a presença da carbonila em C-3' e da correlação de longa distância entre a metila ligada em C-4' e a carbonila. Sendo essa característica já observada em ácidos filicínicos (ÄYRÄS et al. 1981) e no composto hiperjapona A (YANG et al., 2016).

Os dados fitoquímicos reunidos nos dois manuscritos reforçam o potencial que as espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil têm de acumular derivados de floroglucinol e demonstram a preservação das rotas biossintéticas nas diferentes espécies analisadas (mantendo o padrão observado nas espécies das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*). A

ocorrência restrita de cromenos pode ser explicada (pelo menos em parte) pela hipótese postulada por Crispin e colaboradores (2013), na qual os floroglucínóis diméricos seriam biossintetizados a partir da união de dois floroglucínóis monoméricos, mantendo-se assim estoques relativamente baixos dos monômeros.

Ao longo do processo de busca por conhecimento acerca da constituição química das espécies de *Hypericum* sul brasileiras, as possíveis atividades biológicas exercidas pelos compostos isolados tornam-se uma segunda questão a ser respondida. Em estudos anteriores, uliginosina B (STOLZ et al., 2012; STOLZ et al., 2014; STOLZ et al., 2016) e 6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP1) (HAAS et al., 2010; MEIRELLES et al., 2017) demonstraram um perfil promissor de atividade antinociceptiva. Os derivados de floroglucinol identificados nos **manuscritos III e IV** são pertencentes à mesma classe dos compostos com atividade antinociceptiva, entretanto com diferenças estruturais que poderiam ser importantes para a atividade biológica. Assim, objetivou-se testar os novos floroglucínóis, provendo assim um maior saber a cerca das características estruturais importantes para a atividade antinociceptiva.

Assim, nos **manuscritos III e IV** estão relatadas as atividades antinociceptivas, em camundongos, de cinco derivados diméricos (denudatina A, japonicina A + japonicina E, uliginosina A, isouliginosina B e hiperbrasilol B) e dois monoméricos (selancina A e carifenona A). Estes resultados reforçam o potencial dos derivados de floroglucinol isolados nas espécies de *Hypericum* do sul do Brasil como uma fonte de padrões moleculares que podem servir para o desenvolvimento de analgésicos. O estabelecimento de uma relação estrutura-atividade continua sendo um desafio para o futuro.

Além do uso para o tratamento da depressão, tradicionalmente populações europeias utilizam o macerado das partes aéreas floridas de *H. perforatum* para o tratamento de feridas e queimaduras (WÖLFLE et al., 2014). O *Hyperici oleum* possui como principal componente ativo o derivado de floroglucinol hiperforina. Com base nestas evidências, o **Capítulo 3** apresenta os resultados da atividade das frações enriquecidas em floroglucinol de espécies de *Hypericum* na proliferação de queratinócitos, fibroblastos e células-tronco. Como descrito no **manuscrito V**, foi possível verificar que dentre as espécies testadas, *H. carinatum* e *H. polyanthemum* foram as que exibiram os resultados mais potenciais. Estas espécies foram capazes de aumentar a proliferação dos queratinócitos em 138,7% e 120,6%, respectivamente.

A fração enriquecida em floroglucínóis de *H. carinatum* (nas concentrações de 10 e 15 µg/mL) foi capaz de alterar o ciclo celular (aumentando as células nas fases S e G2/M), indicando a indução da proliferação, sem induzir a migração celular.

Os promissores resultados obtidos com as frações enriquecidas em floroglucínóis das espécies de *Hypericum*, motivaram testes com os derivados de floroglucinol. Dessa forma, 13 derivados de floroglucinol (oito floroglucínóis diméricos, três benzopiranos e duas benzofenonas) foram testados, em cinco concentrações, de 0,01 a 10 µM, quanto ao seu potencial de induzir a proliferação de queratinócitos *in vitro*. Destes, japonicina A, 7-hidróxi-6-isobutiril-5-metóxi-2,2-dimetil-benzopirano (HP2) e carifenona B foram capazes de induzir a proliferação. Dentre estes, carifenona B demonstrou os melhores resultados induzindo um aumento na proliferação em 22% (se comparado ao controle) na concentração de 0,01 µM.

A cicatrização é um processo complexo e que envolve uma variedade de tipos celulares, entre eles, os fibroblastos e as células tronco mesenquimais. Visando aprofundar os resultados anteriormente obtidos e considerando os resultados de proliferação de *H. carinatum*, os derivados de floroglucinol uliginosina B, carifenona A e carifenona B foram testados em culturas de fibroblastos (MRC5) e de células tronco mesenquimais. Os resultados demonstraram que a uliginosina B possui a capacidade de induzir a proliferação dos dois tipos celulares, sendo especialmente ativa na linhagem MRC5 (aumento de 52,5% na concentração de 5 µM). As carifenonas A e B não induziram proliferação nestas linhagens celulares. Estes resultados evidenciam que os derivados de floroglucinol podem interagir de maneira diferenciada com cada tipo de célula e que a mistura destes compostos pode atuar de maneira sinérgica, acelerando o processo de cicatrização.

Levando em consideração os dados obtidos nesta tese, podemos concluir que as espécies de *Hypericum* são uma valiosa fonte de metabólitos secundários bioativos, que merece ser mais explorada. Tratando-se das espécies do gênero nativas do sul do Brasil, a descrição de derivados de floroglucinol com estruturas inéditas, reforça a importância destas plantas, reiterando a necessidade de preservação da flora nativa. Os derivados de floroglucinol isolados demonstraram potenciais atividades antinociceptivas e capazes de promover a proliferação celular.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo teve como objetivo central, aprofundar o conhecimento acerca da constituição química de espécies de *Hypericum* sul brasileiras, e avaliar os efeitos antinociceptivos e proliferativos dos derivados de floroglucinol.

No primeiro capítulo podemos concluir que *Hypericum* é um gênero que desperta atenção de vários grupos de pesquisa em todo o mundo. Esse interesse é alicerçado na diversidade de compostos que podem ser isolados, principalmente os derivados de floroglucinol e nas promissoras atividades biológicas que adicionalmente são descritas. Com o mesmo intuito, as espécies nativas do sul do Brasil vêm sendo sistematicamente estudadas nas últimas duas décadas, nos grupos de pesquisa liderados pelas professoras Gilsane Lino von Poser e Stela Maris Kuze Rates. Destes estudos, foi possível a identificação de diversos floroglucinóis diméricos, benzopiranos, benzofenonas e flavonoides. Além disso, estudar com maior detalhamento os mecanismos de ação antinociceptiva e antidepressiva da uliginosina B e de 6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano (benzopirano HP1). Mesmo com todos os esforços, cerca de 90% das espécies de *Hypericum* em nível mundial (e 70% no sul do Brasil) ainda não foram devidamente estudadas, deixando claro que estas plantas permanecem como promissoras fontes de compostos bioativos.

Os dois artigos seguintes da tese (Capítulo 2) reforçam a ainda mais o potencial indicado no primeiro capítulo. Os estudos fitoquímicos realizados com cinco espécies de *Hypericum* resultaram no isolamento de doze floroglucinóis, sendo dois deles inéditos (denudatina A e japonicina E). O uso de novas técnicas de isolamento (cromatografia planar circular), e as facilidades de acesso a diversas técnicas de RMN permitiram que espécies já estudadas fossem revistas, aumentando assim o conhecimento sobre as frações lipofílicas das mesmas. Estes isolados apresentam especificidades estruturais que podem ser importantes para as atividades biológicas, sendo então avaliados quanto a sua capacidade de reduzir a dor termal. Todos os floroglucinóis testados exibiram efeitos antinociceptivos no teste da placa aquecida, sem provocar prejuízo motor nas doses testadas. Os resultados dos testes biológicos reforçam a hipótese que os floroglucinóis isolados de *Hypericum* do sul do Brasil são promissores padrões moleculares para o desenvolvimento de novos analgésicos.

Historicamente muitas plantas despertaram o interesse dos pesquisadores pelo seu uso tradicional. Os poucos relatos de uso tradicional de *Hypericum* no sul do Brasil, citam o uso de uma espécie (*H. connatum*) pro tratamento de feridas na boca. Explorando essa

informação, no terceiro capítulo, observou-se que as frações enriquecidas em floroglucínóis foram capazes de aumentar a proliferação de queratinócitos *in vitro*, com destaque para as espécies *H. carinatum* e *H. polyanthemum*. Na sequência, os floroglucínóis isolados foram testados em queratinócitos, fibroblastos e células-tronco. Os resultados demonstraram que os compostos isolados de *H. carinatum* (carifenona A, carifenona B e uliginosina B) foram capazes de induzir a proliferação destas linhagens celulares, podendo ser úteis no processo de cicatrização de feridas. Estudos *in vivo* e de possíveis mecanismos de ação são perspectivas que surgem destes resultados.

Em conjunto, os dados apresentados nesta tese reafirmam a importância do gênero *Hypericum* como produtor de compostos bioativos e demonstra o potencial ainda inexplorado que pode ser útil no desenvolvimento de fármacos capazes de atuar em doenças cujos tratamentos são deficitários.

7. REFERÊNCIAS

AUSTIN, M.B.; NOEL, J.P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. **Natural Products Reports**, v. 20, p. 79-110, 2003.

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

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

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

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.

BRIDI, H.; BECKENKAMP, A.; CCANA-CCAPATINTA, G.V.; BORDIGNON, S.A.L.; BUFFON, A.; von POSER, G.L. Characterization of phloroglucinol-enriched fractions of Brazilian *Hypericum* species and evaluation of their effect on human keratinocytes proliferation. **Phytotherapy Research**, v. 31, p. 62-68, 2017.

BRIDI, H.; CCANA-CCAPATINTA, G.V.; STOLZ, E.D.; MEIRELLES, G.C.; BORDIGNON, S.A.L.; RATES, S.M.K.; von POSER, G.L. Dimeric acylphloroglucinols from *Hypericum austrobrasiliense* exhibiting antinociceptive activity in mice. **Phytochemistry**, v. 122, p. 178-183, 2016.

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

BUTTERWECK, V.; SCHMIDT, M. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. **Wiener Medizinische Wochenschrift**, v. 157, p. 256-361, 2007.

BYSTROV, N.S.; CHERNOV, B.K.; DOBRYNIN, V.N.; KOLOSOV, M.N. the structure of hyperforin. **Tetrahedron Letters**, v. 32, p. 2791-2794, 1975.

CCANA-CCAPATINTA, G.V.; BARROS, F.M.C.; BRIDI, H.; VON POSER, G.L. Dimeric acylphloroglucinols in *Hypericum* species from *Brathys* and *Trigynobrathys* sections. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 25-50, 2015.

CENTURIÃO, F.B.; SAKAMOTO, S.; STEIN, A.C.; MÜLLER, L.G.; CHAGAS, P.M.; von POSER G.; NOGUEIRA, C.W.; RATES, S.M.K. The antidepressant-like effect of hyperbrasilol B, a natural dimeric phloroglucinol derivative is prevented by veratrine, a sensitive-voltage Na⁺ channel opener. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 4, p. 1268-1281, 2014.

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

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

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1981, 1262 p.

DAGNINO, A.P.; de BARROS, F.M.C. CCANA-CCAPATINTA, G.V.; PROPHIRO, J.S.; von POSER, G.L.; ROMÃO, P.R.T. Leishmanicidal activity of lipophilic extracts of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 22, p. 71-76, 2015.

DAGNINO, A.P.A.; MESQUITA, C.S.; DORNELES, G.P.; TEIXEIRA, V.O.N.; de BARROS, F.M.C.; CCANA-CCAPATINTA, G.V.; FONSECA, S.G.; MONTEIRO, M.C.; RODRIGUES JÚNIOR, L.C.; PERES, A.; von POSER, G.L.; ROMÃO, P.R.T.

Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**, v. 145, p. 1199-1209, 2018.

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SCHAPOVAL, E.E.S; von POSER, G.L. Bioassay-guided isolation of antimicrobial benzopyrans and phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 291-293, 2005.

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

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

DIKMEN, M.; ÖZTÜRK, Y.; SAGRATINI, G.; RICCIUTELLI, M.; VITTORI, S.; MAGGI, F.. Evaluation of the wound healing potentials of two subspecies of *Hypericum perforatum* on cultured NIH3T3 fibroblasts. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 208-214, 2011.

ELY, C.V.; BOLDRINI, I.I.; BORDIGNON, S.A.L. A new species of *Hypericum* (Hypericaceae) from Southern Brazil. **Phytotaxa**, v. 192, p. 290-295, 2015.

ELY, C.V.; BOLDRINI, I.I. A new threatened species of *Hypericum* from the south Brazilian Pampa biome. *Systematic botany*, v. 40, p. 989-994, 2015.

ELY, C.V.; SHIMIZU, G.H.; MARTINS, M.V.; MARINHO, L.C. *Hypericaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB7994>>. Acesso em: 05 Out. 2018.

FENNER, R.; SORTINO, M.; RATES, S.M.K.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; von POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACCHINO, S. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 12, p. 236-240, 2005.

FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D.R.A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A.P.; von POSER, G.L. Screening for the presence of hypericins in Southern Brazilian species of *Hypericum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, p. 294-297, 2002.

FERRAZ, A.B.F.; BORDIGNON, S.A.L.; STAATS, C.; SCHRIPSEMA, J.; VON POSER, G.L. Benzopyrans from *Hypericum polyanthemum*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 1227-1230, 2001.

FERRAZ, A.B.F.; GRIVICICH, I.; von POSER, G.L.; FARIA, D.H.; KAYSER, G.B.; SCHWARTSMANN, G.; HENRIQUES, A.T.; da ROCHA, A.B. Antitumor activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthemum*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 210-215, 2005a.

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

FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPSEMA, J. POHLMANN, A.R.; von POSER, G.L. Uliginosin B from *H. myrianthum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 989-991, 2002.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **The British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226-236, 1929.

FRITZ, D.; VENTURI, C.R.; CARGNIN, S.; SCHRIPSEMA, J.; ROEHE, P.M.; MONTANHA, J.A.; von POSER, G.L. Herpes virus inhibitory substances from *Hypericum connatum* Lam., a plant used in southern Brazil to treat oral lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 517-520, 2007.

GALEOTTI, N. *Hypericum perforatum* (St John's wort) beyond depression: A therapeutic perspective for pain conditions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 136-146, 2017.

GALEOTTI, N.; MAIDECCHI, A.; MATTOLI, L.; BURICO, M.; GHELARDINI, C.; St. John's Wort seed and feverfew flower extracts relieve painful diabetic neuropathy in a rat model of diabetes. **Fitoterapia**, v. 92, p. 23-33, 2014.

GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A.; BERGONZI, M.; BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C. A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St John's wort in mice. **The Journal of Pain**, v. 11, p. 149-159, 2010a.

GALEOTTI, N.; VIVOLI, E.; BILIA, A.R.; VINCINERI, F.F.; GHELARDINI, C. St. John's Wort reduces neuropathic pain through a hypericin-mediated inhibition of the protein kinase C γ and ϵ activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 1327-1336, 2010b.

GNERRE, C.; von POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, A.; 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.

GUREVICH, A.I.; DOBRYNIN, V.N.; KOLOSOV, M.N.; POPRAVKO, S.A.; RYABOVA, I.D.; CHERNOV, B.K.; DERBENTSEVA, N.A.; AIZENMAN, B.E.; GARGULYA, A.D. Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. **Antibiotiki**, v. 6, p. 510, 1971.

HAAS, J.S.; VIANA, A.F.; HECKLER, A.P.M.; von POSER, G.L.; RATES, S.M.K. The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. **Planta Medica**, v. 76, p. 1419-1423, 2010.

HARVEY, A.L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193-200, 2014.

HARVEY, A.L.; EDRADA-EBEL, R. QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). IASP taxonomy. Disponível em: < <https://www.iasp-pain.org/taxonomy#Pain>>. Atualizada 20 de outubro de 2014. Acesso em 24 de setembro de 2017.

ISACCHI, B.; BERGONZI, M.C.; CARNEVALI, F.; VAN DER ESCH, S.A.; VINCIERI, F.F.; BILIA, A.R. Analysis and stability of the constituents of St. John's wort oils prepared with different methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 45, p. 756-761, 2007.

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

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

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

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

LINDE, K.; KNÜPPEL, L. Large-scale observational studies of *Hypericum* extracts in patients with depressive disorders—a systematic review. **Phytomedicine**, v. 12, p. 148-157, 2005.

LINDE, K.; BERNER, M.M.; KRISTON, L. St John's wort for major depression (Review). **Cochrane Database of Systematic Reviews** 2008, v. 4, Art. No.: CD000448, 2008.

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

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

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

McGIVERN, J.G. Ziconotide: a review of its pharmacology and use in the treatment of pain. **Neuropsychiatric Disease and Treatment**, v. 3, p. 69-85, 2007.

MENEZES, C.B.; RIGO, G.V.; BRIDI, H.; TRENTIN, D.S.; MACEDO, A.J.; von POSER, G.L.; TASCA, T. The anti-Trichomonas vaginalis phloroglucinol derivative isoastrobrasilol B modulates extracellular nucleotide hydrolysis. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 90, p. 811-819, 2017.

MEIRELLES, G.C.; PIPPI, B.; HATWIG, C.; BARROS, F.M.C.; de OLIVEIRA, L.F.S.; von POSER, G.L.; FUENTEFRIA, A.M. Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericum carinatum* and fluconazole. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 118-123, 2017.

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

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

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

MÜLLER, W.E. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. **Pharmacological Research**, v. 47, p. 101-109, 2003.

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

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 – 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

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

NÖR C.; 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.

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

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

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

PARKER, W.L.; JOHNSON, F. The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 14, p. 4716-4723, 1968.

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

RACINE, M. Chronic pain and suicide risk: a comprehensive review. **Progress in Neuropsychopharmacology & Biological Psychiatry**, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.08.020>.

RICHARD, J.A.; POWWER, R.H.; CHEN, D.Y.K. The chemistry of the polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. **Angewandte Reviews**, v. 51, p. 4536-4561, 2012.

ROBSON, N.B.K. *Hypericum* botany. In: Ernst, E. (ed) *Hypericum*. The genus *Hypericum*. Taylor and Francis, New York, 2003, p. 1-22.

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

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

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

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; HOSTETTMANN, K. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 185-188, 1996.

ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial phloroglucinols and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1447-1452, 1995.

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

SHELTON, R.C.; KELLER, M.B.; GELENBERG, A.. DUNNER, D.L.; HIRSCHFELD R.; THASE, M.E.; RUSSELL, J.; LYDIARD, R.B.; CRITS-CRISTOPH, P.; GALLOP, R.; TODD, L. HELLERSTEIN, D.; GOODNICK, P. KEITNER, G.; STAHL, S.M.; HALBREICH, U. Effectiveness of St John's wort in major depression: a randomized controlled trial. **JAMA**, v. 18, p. 1978-1986, 2001.

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

SINGH, I.P.; BHARATE, S.B. Phloroglucinol compounds of natural origin. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 558-591, 2006.

SINGH, I.P.; SIDANA, J.; BHARATE, S.B.; FOLEY, W.J. Phloroglucinol compounds of natural origin: Synthetic aspects. **Natural Products Reports**, v. 27, p. 393-416, 2010.

SOLOMON, D.; FORD, E.; ADAMS, J.; GRAVES, N.; Potential of St John' s Wort for the treatment of depression: the economic perspective. **Australian and New Zealand Journal of Psychiatry**, v. 45, p. 123-130, 2011.

STEIN, A.C.; MÜLLER, L.G.; FERREIRA, A.G.K.; BRAGA, A.; BETTI, A.H.; CENTURIÃO, F.B.; SCHERER, E.B.; KOLLING, J.; von POSER, G.L.; WYSE, A.T.S.; RATES, S.M.K. Uliginosin B, a natural phloroglucinol derivative with antidepressant-like activity, increases Na⁺,K⁺-ATPase activity in mice cerebral cortex. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, p. 611-618, 2016.

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

STEVENS, P.F. Angiosperm Phylogeny Website. Version 14, July 2017. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. 2001. Acesso em 27 de setembro de 2017.

STOLZ, E.D.; da COSTA, P.F.; MEDEIROS, L.F.; SOUZA, A.; BATTASTINI, A.M.O.; von POSER, G.L.; BONAN, C.; TORRES, I.L.S.; RATES, S.M.K. Uliginosin B, a possible new analgesic drug, acts by modulating the adenosinergic system. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, Article ID 5890590, 8 p.

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

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

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

TAKADA, H.; FURUYA, K.; SOKABE, M. Mechanosensitive ATP release from hemichannels and Ca²⁺ influx through TRPC6 accelerate wound closure in keratinocytes. **Journal of Cell Science**, v. 127, p. 4158-4171, 2014.

TAKADA, H.; YONEKAWA, J.; MATSUMOTO, M.; FURUYA, K.; SOKABE, M. Hyperforin/HP-β-Cyclodextrin enhances mechanosensitive Ca²⁺ signaling in HaCaT keratinocytes and in atopic skin *ex vivo* which accelerates wound healing. **BioMed Research International**, v. 2017, Article ID 8701801, 9 p.

TAKHTAJAN, A.L. Outline of classification of flowering plants (Magnoliophyta). **The Botanical Review**, v. 46, p. 1-271, 1980.

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

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; BELLORO, E.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E. Furohyperforin, a Prenylated Phloroglucinol from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Journal of natural Products**, v. 62, p. 770-772, 1999.

VEROTTA, L.; APPENDINO, G.; JAKUPOVIC, J.; BOMBARDELLI, E. Hyperforin Analogues from St. John's Wort (*Hypericum perforatum*). **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 412-415, 2000.

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.

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, p. 631-634, 2003.

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

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

7. ANEXOS

ANEXO 1

Cadastro do projeto “Estudos químicos e biológicos de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul” no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A347956

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A347956**
Usuário: **UFRGS**
CPF/CNPJ: **92.969.856/0001-98**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Hypericum caprifoliatum
Hypericum polyanthemum
Hypericum polyanthemum
Hypericum polyanthemum
Hypericum caprifoliatum
Hypericum carinatum
Hypericum carinatum
Hypericum connatum
Hypericum autrobrasiliense
Hypericum denudatum
Hypericum myrianthum

Título da Atividade: **Estudo químicos e biológicos de espécies de Hypericum nativas do Rio Grande do Sul**

Equipe

Gilsane Lino von Poser

UFRGS

Stela Maris Kuze Rates

UFRGS

Sérgio Augusto de Loreto Bordignon

UNILASALLE

Data do Cadastro:

09/07/2018 15:11:31

Situação do Cadastro:

Concluído



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:51** de **11/07/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**

ANEXO 2

Nanoemulsion improves antinociceptive activity of HP1, a benzopyran from *Hypericum polyanthemum*.

Artigo publicado no periódico *Planta Medica International Open*, v. 4, p. e82-e88, 2017.

Nanoemulsion Improves Antinociceptive Activity of HP1, a Benzopyran from *Hypericum polyanthemum*.

Gabriela Meirelles, Henrique Bridi, Eveline Dischkaln Stolz, Helder Ferreira Teixeira, Gilsane Lino von Poser, Stela Maris Kuze Rates.

Affiliation

Pharmaceutical Sciences Postgraduate Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

O anexo 2 compreende um artigo publicado no periódico *Planta Medica International Open*, v. 4, p. e82-88, 2017 (DOI: 10.1002/ptr.5727). No texto completo da tese defendida, ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 317-325.