

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

**Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum*
Lam.**

DANIELA FRITZ

PORTO ALEGRE, 2006.

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

**Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum*
Lam.**

Dissertação apresentada por **Daniela
Fritz** para a obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr^a Gilsane Lino von Poser
Co-orientador: Prof. Dr. Jarbas Alves Montanha

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.03.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Amauri Simonetti
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Edna Sayuri Suyenaga
Centro Universitário FEEVALE

Profa. Dr. Sandra Beatriz Rech
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

F919a	Fritz, Daniela Análise química e avaliação da atividade antiviral de hypericum connatum Lam. / Daniela Fritz – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - xiv, 123p.: il. Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. 1. Hypericum connatum. 2. Guttiferae. 3. Herpesvirus simples tipo 1. 4. Atividade antiviral. 5. Flavonóides. I. Poser, Gilsane Lino von. II. Montanha, Jarbas Alves. III. Título.
-------	--

CDU: 615.322

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da prof^a. Dr^a. Gilsane Lino von Poser e co-orientação do prof. Dr. Jarbas Alves Montanha. Os procedimentos de preparação do material vegetal e obtenção dos extratos vegetais, bem como o isolamento de metabólitos secundários, foram realizados no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Os testes de atividade antiviral foram realizados no Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, da mesma Universidade. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Agradecimentos

Primeiramente a minha mãe, pelo carinho, incentivo e pelo amparo em todos os momentos, principalmente os mais difíceis.

A minha querida Dinda Itie, por ter me acolhido como uma mãe todo o tempo que passei longe de casa e ao tio Duílio que também me acolheu com seu carinho paternal.

Ao Julio, pelo amor, por estar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos e por ter compreendido que a distância era necessária.

Aos meus avós queridos, que sempre confiaram em mim e me incentivaram nessa longa caminhada.

A minha maninha de coração Edi, por ter me consolado nos momentos difíceis e me amparado com palavras sábias, e pela companhia e amizade de todos os dias.

Às bolsistas do laboratório, Kênia, Ju, Bruna e, principalmente a Simone pelo apoio, colaboração e incentivo.

Às bolsistas da virologia, Caroline e Camila pela realização dos experimentos, atenção e ensinamentos nesta área.

Aos meus amigos e colegas de laboratório Ana Cristina, Carol, Dani, Paulinha e Alexandre.

Ao botânico Sérgio Bordignon, pela coleta e identificação da espécie trabalhada.

Ao professor Dr. Jarbas Montanha pelos ensinamentos e atenção.

À professora Dra. Gilsane Lino von Poser - a Gil - pela oportunidade de realizar o mestrado e por ter confiado em mim em todos estes anos de pesquisa.

Enfim, a todos que, de uma forma ou outra me ajudaram a realizar esse trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	xi
Abstract	xiii
1 Introdução geral	1
1.2 Objetivos gerais.....	4
2 Revisão da literatura	5
2.1 Generalidades.....	7
2.2 Aspectos Botânicos.....	8
2.2.1 Taxonomia.....	8
2.2.2 Morfologia.....	11
2.2.3 Aspectos ecológicos.....	12
3 CAPÍTULO I - Análise química de <i>Hypericum connatum</i> Lam.	15
3.1 Introdução.....	17
3.2 Objetivos.....	17
3.3 Revisão da literatura	17
3.3.1 Derivados de floroglucinol.....	18
3.3.2 Flavonóides.....	23
3.3.3 Quinonas policíclicas.....	26
3.3.4 Xantonas.....	27
3.3.5 Taninos.....	28
3.3.6 Ácidos fenólicos.....	28
3.3.7 Óleos voláteis.....	29
3.3.8 Outros constituintes.....	30
3.4 Materiais e Métodos.....	30
3.4.1 Material vegetal.....	30
3.4.2 Preparação do material vegetal.....	30
3.4.3 Extração.....	30
3.4.4 Análise cromatográfica em camada delgada.....	31
3.4.5 Isolamento dos constituintes.....	31
3.4.6 Identificação dos produtos.....	32
3.5 Resultados e Discussão.....	33
3.5.1 Análise cromatográfica qualitativa das frações.....	33
3.5.1.1 Raízes.....	33
3.5.1.2 Partes aéreas.....	33

3.5.2	Isolamento de compostos fenólicos.....	34
3.5.3	Análise estrutural das substâncias isoladas.....	34
3.5.3.1	Substância HCH1.....	34
3.5.3.2	Substância HCN2.....	39
3.5.3.3	Substância HCN3.....	42
3.5.3.4	Substância HCN4.....	45
3.5.3.5	Substância HCN5.....	49
3.6	Conclusões.....	51
4	CAPÍTULO II - Avaliação da atividade antiviral dos extratos e substâncias isoladas de <i>Hypericum connatum</i> Lam.....	53
4.1	Introdução.....	55
4.2	Objetivos.....	56
4.3	Revisão da literatura.....	57
4.3.1	Atividade antiviral de extratos e produtos isolados.....	57
4.3.2	Atividade antiviral de espécies do gênero <i>Hypericum</i>	58
4.3.3	Outras atividades biológicas do gênero <i>Hypericum</i>	60
4.3.3.1	Atividade antidepressiva.....	60
4.3.3.2	Atividade antimicrobiana.....	61
4.3.3.3	Atividade antioxidante.....	63
4.3.3.4	Atividade antiinflamatória.....	64
4.3.3.5	Atividade analgésica.....	64
4.3.3.6	Atividade antiproliferativa.....	64
4.3.3.7	Outras atividades.....	65
4.4	Materiais e Métodos.....	66
4.4.1	Preparo das soluções teste.....	66
4.4.1.1	Preparo do material vegetal.....	66
4.4.1.2	Extração.....	66
4.4.1.3	Preparo das soluções.....	66
4.4.2	Cultura celular.....	67
4.4.2.1	Linhas celulares.....	67
4.4.2.2	Conservação celular.....	67
4.4.3	Preparo das placas de microtitulação.....	68
4.4.3.1	Tripsinização.....	68
4.4.4	Vírus utilizados.....	68
4.4.5	Avaliação da citotoxicidade das substâncias em teste.....	68
4.4.6	Determinação do efeito citopático viral.....	69

4.5	Resultados e Discussão.....	71
4.5.1	Avaliação da citotoxicidade.....	72
4.5.2	Teste da atividade antiviral <i>in vitro</i>	74
4.6	Conclusões.....	78
5	Discussão geral	81
6	Conclusões	89
7	Referências	93
8	Anexos	107
9	Perpectivas futuras	121

Resumo

Análise química e avaliação da atividade antiviral de *Hypericum connatum* Lam.

Plantas da família Guttiferae apresentam diversas atividades biológicas sendo *Hypericum* o gênero mais importante devido às atividades antidepressiva, antibacteriana e antiviral de algumas espécies. *Hypericum connatum*, utilizado no sul do Brasil para o tratamento de feridas de boca, demonstrou atividade contra o lentivírus, responsável pela imunodeficiência felina. **Objetivo:** isolar e identificar as substâncias majoritárias de *H. connatum* e testar a atividade de extratos obtidos das partes aéreas e raízes e das substâncias isoladas frente a duas cepas do herpesvírus simples tipo 1 (HSV-1). **Método:** foram obtidos frações *n*-hexano, diclorometano e metanol e extratos bruto, aquosos a diferentes temperaturas e hidro-etanólico das partes aéreas e raízes. As frações *n*-hexano e metanólica das partes aéreas foram submetidas à coluna cromatográfica para o isolamento de substâncias. Os extratos e substâncias isoladas foram testados frente ao HSV-1, cepas KOS e ATCC-VR733. Determinou-se a concentração máxima não tóxica (CMNT) à célula e a concentração que provoca alteração morfológica em 50% das células (CC₅₀) pela técnica da alteração morfológica celular, utilizando-se células VERO, linhagem ATCC CCL-81. A avaliação da atividade antiviral foi realizada em placas de microtitulação e medida pela inibição do efeito citopático (ECP) provocado pelo vírus. **Resultados e Conclusões:** da fração *n*-hexano foi isolado hiperbrasilol B, da fração metanólica foram isolados amentoflavona, hiperosídeo e guaijaveriana, além de um flavonol de estrutura ainda não definida (HCN3). A fração *n*-hexano e o extrato bruto das raízes inibiram o ECP das cepas KOS e ATCC-VR733. Os demais extratos testados não apresentaram atividade antiviral. Dentre as substâncias analisadas, hiperbrasilol B, amentoflavona e HCN3 foram ativos frente às duas cepas. Os flavonóides hiperosídeo e guaijaverina não apresentaram atividade anti-HSV-1.

Palavras-chaves: *Hypericum connatum* Lam., hiperbrasilol B, hiperosídeo, amentoflavona, guaijaverina, atividade antiviral, herpesvírus simples tipo 1

Abstract

Chemical analysis and evaluation of the antiviral activity of *Hypericum connatum* Lam.

Plants from Guttiferae family present many biological activities being *Hypericum* the most important genus due to the antidepressive, antiinflammatory and antimicrobial activities of some species. *Hypericum connatum*, used in south of Brazil for the treatment of mouth wounds, demonstrated activity against the feline immunodeficiency virus. **Purpose:** to isolate and identify the major compounds from *H. connatum* and to test extracts and compounds obtained from the roots and aerial parts against two strains of the herpes simplex virus type 1. **Method:** *n*-hexane, dichloromethane and methanol fractions and aqueous and hydro-ethanolic from the aerial parts and roots were obtained. The *n*-hexane and methanolic fractions from the aerial parts were submitted to column chromatography. All extracts and isolated compounds were tested against the herpes simplex virus type 1, strains KOS and ATCC-VR733. The determination of The maximum non-toxic concentrations (CMNT) and the concentration that causes morphologic alterations in 50% of the cells (CC₅₀) was carried out by the technique of cellular morphologic alterations, using VERO cells, strain ATCC CCL-81. The assay was performed in 96-well plates and the antiviral activity was evaluated by the inhibition of the measured by the viral cytopathogenic effect assay (ECP). **Results and Conclusions:** hyperbrasilol B was isolated from the *n*-hexane fraction; amentoflavone, hyperoside, guaijaverin, and a flavonol not yet identified (HCN3) were isolated from methanolic fraction. The *n*-hexane fraction and the crude methanolic extracts were active against both strains tested. The other extracts tested did not display antiviral activity. Among the isolated compounds, hyperbrasilol B, amentoflavone and HCN3 were active against both strains. Hyperoside and guaijaverin were not active against HSV-1.

Key words: *Hypericum connatum* Lam., hyperbrasilol B, hyperoside, amentoflavone, guaijaverin, antiviral activity, herpesvirus simplex type 1

1. INTRODUÇÃO GERAL

Plantas da família Guttiferae apresentam vários constituintes com diversas atividades biológicas sendo que seus representantes são encontrados principalmente em regiões tropicais úmidas, exceto aqueles do gênero *Hypericum* que se desenvolvem nas zonas temperadas (BENNETT & LEE, 1989). Recentemente, este gênero tem recebido especial atenção pois algumas de suas espécies exibem atividade antiinflamatória, diurética, anti-helmíntica, antiviral e antibacteriana, além da já conhecida atividade antidepressiva (PABUÇCUOLU *et al.*, 2003). Pode-se também exemplificar a atividade antiviral de hipericina e *pseudo*-hipericina sobre vários retrovírus, *in vitro* e *in vivo*, em particular sobre o vírus da imunodeficiência humana (VIH) (MERUELO *et al.*, 1988; AWANG, 1991; MISKOVSKY, 2002). Além disso, somam-se os resultados promissores em relação à atividade antiviral encontrados por SCHMITT e colaboradores em 2001, sugerindo que algumas plantas do gênero *Hypericum*, em especial *Hypericum connatum*, usada popularmente no tratamento de feridas da boca (JIMÉNEZ, 1980; MENTZ *et al.*, 1997), contêm compostos com potencial atividade antiviral contra o lentivírus, responsável pela imunodeficiência felina.

A atividade antiviral de duas espécies de *Hypericum*, *H. cordifolium* e *H. uralum* foi comprovada frente ao herpesvírus simples tipo 1 (HSV-1), por Taylor e colaboradores em 1996, utilizando o método da inibição do efeito citopático para a análise. Em outro estudo, os extratos metanólicos das partes aéreas de *Hypericum mysorense* e *Hypericum hookerianum* foram analisados e mostraram atividade antiviral frente ao HSV (VIJAYAN *et al.*, 2004).

Infecções causadas por herpesvírus são facilmente encontradas. A maioria das espécies animais, incluindo humanos, é hospedeira de herpesvírus e, em alguns casos de duas ou mais espécies. Todas as herpesviroses são morfológicamente idênticas e têm a importante propriedade de permanecerem

latentes, na forma viável, persistindo por toda a vida. Algumas espécies de herpesvírus reativam-se de tempo em tempo do seu estado latente, produzindo infecção recorrente. São descritas oito espécies de herpesvírus humanos: herpesvírus simples (HSV) 1 e 2, citomegalovírus, herpesvírus zoster (Varicella Zoster), Epstein-Barr, herpesvírus humanos tipos 6, 7 e 8 (HUDSON, 1990; TIMBURY, 1997).

Herpesvírus simples (vírus ADN) são agentes que causam uma variedade de doenças, geralmente na forma de vesículas, que variam em gravidade e, em alguns casos, podem se tornar uma ameaça à vida, especialmente em pacientes com comprometimento imunológico. Depois da primeira infecção, HSV persiste pelo resto da vida. Há dois tipos de herpesvírus simples (HUDSON, 1990):

- tipo 1: mais encontrado, causa lesões oro-faciais;
- tipo 2: causa herpes genital.

Análogos nucleosídeos, como o aciclovir, são usados para o tratamento das infecções por HSV, porém, o uso indiscriminado de medicamentos com base em nucleosídeos têm causado uma emergente seleção de cepas resistentes, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sugerindo a busca de novos agentes antivirais para o tratamento destas infecções virais (VIJAYAN *et al.*, 2004).

1.2 OBJETIVOS GERAIS

Considerando-se a necessidade de busca de novos compostos com atividade antiviral e os promissores resultados citados na literatura em relação a essa atividade em espécies do gênero *Hypericum*, torna-se interessante analisar a constituição química de *Hypericum connatum* Lam. e verificar sua possível atividade contra o herpesvírus simples tipo 1.

2. REVISÃO DA LITERATURA

Muitos estudos têm sido realizados com espécies do *Hypericum* devido à grande variedade de compostos isolados e suas propriedades biológicas.

O levantamento bibliográfico para a realização deste trabalho foi efetuado nas seguintes bases de dados: MEDLINE, PUB MED, SCIENCE DIRECT, WEB OF SCIENCE, SCIELO, SCIRUS, PUBS ACS e THIEME CONNECT. A seguir serão relatados as generalidades, aspectos botânicos e aspectos ecológicos sobre o gênero *Hypericum*. A revisão da literatura sobre constituição química será apresentada no Capítulo I e a avaliação da atividade antiviral no Capítulo II.

2.1 GENERALIDADES

O nome *Hypericum* origina-se de duas palavras gregas, *hyper* = 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 *Hypericum perforatum* L. era conhecida antigamente como uma planta com propriedades sobrenaturais, sendo posteriormente atribuídas à mesma propriedades medicinais (HOBBS, 1990). O nome *perforatum* está fundamentado 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, eram associados ao sangue de São João Baptista (VEROTTA, 2003).

Hypericum perforatum é uma planta medicinal usada tradicionalmente desde a antigüidade, tanto internamente quanto externamente, em toda a Europa para tratamento de diversas patologias e foi chamada por Paracelsus de "arnica dos nervos", porque era usada empiricamente para o tratamento de doenças nervosas (BILIA *et al.*, 2002).

Hypericum connatum é conhecida popularmente como “orelha-de-gato” e “Ka’avotory” pelos índios Guarani, tendo como uso popular o tratamento de feridas de boca, usada como tônica, adstringente, analgésica, considerada “útil” nas anginas, aftas e estomatites, além da flor ser considerada abortiva (JIMÉNEZ, 1980; CORRÊA, 1984; NOELLI, 1996; MENTZ *et al.*, 1997).

2.2 ASPECTOS BOTÂNICOS

2.2.1 Taxonomia

A família Guttiferae é dividida em 6 subfamílias, Kielmeyeroideae, Calophylloideae, Clusioideae, Moronoboideae, Lorostemoneideae e Hypericoideae, compreendendo cerca de 1200 espécies distribuídas em 50 gêneros, porém a maioria dessas pertence somente a três gêneros: *Hypericum*, *Garcinia* e *Clusia*, com 400, 200 e 145 espécies, respectivamente (CRONQUIST, 1981; BENNET & LEE, 1989). Segundo CRONQUIST (1981), a subfamília Hypericoideae é formada por três tribos: Vismiae – gêneros *Vismia*, *Harungana* e *Psorospermum*, Cratoxyleae – gênero *Cratoxylum* e Hypericeae – gênero *Hypericum* (Tabela 2.1).

Tabela 2.1: Divisões e sub-divisões da família Guttiferae (Fonte: BENNET & LEE, 1989)

Sub-família	Tribo	Gênero	Número de espécies
Kielmeyeroideae	Kielmeyereae	<i>Kielmeyera</i>	20
		<i>Mahuera</i>	8
	Caraipeae	<i>Caraipa</i>	20
		<i>Haploclathra</i>	4
	Bonnetiaceae	<i>Bonnetia</i>	18
		<i>Archytaeae</i>	2
Calophytloideae	Calophylleae	<i>Calophyllum</i>	110
		<i>Mesua</i>	40
		<i>Manea</i>	50
Clusioideae	Clusieae	<i>Clusia</i>	145
		<i>Tovomita</i>	60
	Garcinieae	<i>Allanblackia</i>	8
		<i>Garcinia</i>	200
		<i>Pentaphalanium</i>	7
		<i>Rheedia</i>	45
Moronoboideae		<i>Moronobea</i>	7
		<i>Pentadesma</i>	4
		<i>Platonia</i>	1-2
		<i>Symphonia</i>	20
Lorostemonoideae		<i>Lorostemon</i>	3
Hypericoideae	Cratoxyleae	<i>Cratoylum</i>	6
	Hypericaceae	<i>Hypericum</i>	400
	Vismieae	<i>Harungana</i>	1
		<i>Psorospermum</i>	40
		<i>Vismia</i>	35

Hypericum é um gênero com mais de 450 espécies, difundidas através do mundo (ROBSON, 1977; PABUÇCUOLU *et al.*, 2003), e suas espécies estão acomodadas em 30 diferentes seções (Figura 2.1). Esta divisão está baseada em características morfológicas e ecológicas: presença de glândulas negras e/ou pálidas, distribuição geográfica, entre outras (ROBSON, 1981).

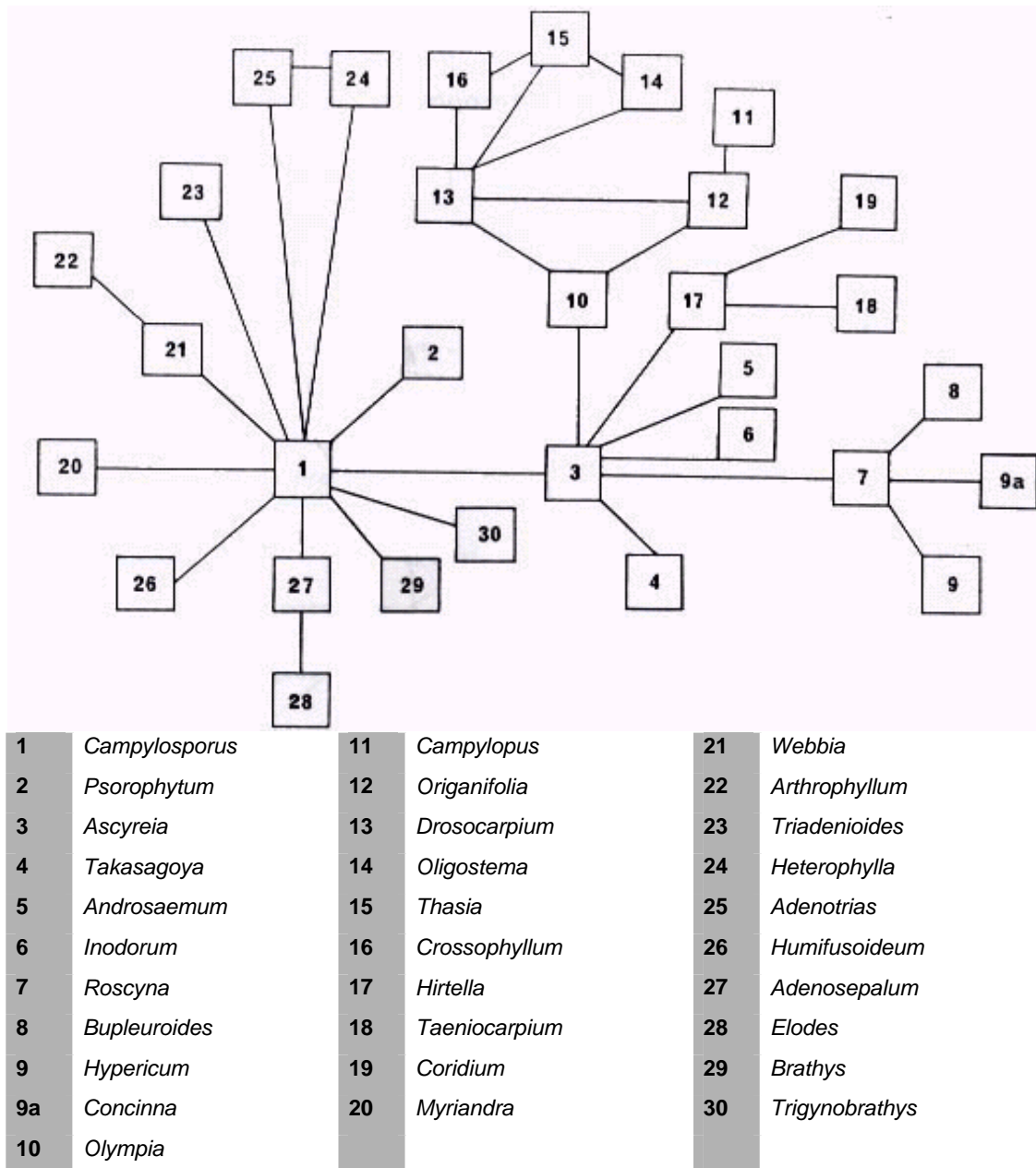


Figura 2.1: Diagrama das seções do gênero *Hypericum* (Fonte: ROBSON, 1981; ROBSON, 1990).

De acordo com CROCKETT e colaboradores (2005), Robson teria acrescentado seis novas seções em seu diagrama, em 2003.

Aproximadamente vinte espécies deste gênero têm ocorrência natural no Brasil, concentrando-se principalmente na região sul do país, sendo que todas estas pertencem a apenas duas seções: *Brathys* e *Trigynobrathys* (2 e 18 representantes nativos, respectivamente). A espécie em estudo, *Hypericum*

connatum está incluída na seção 30 – *Trigynobrathys* (ROBSON, 1981; ROBSON, 1990).

2.2.2 Morfologia

Espécies do gênero *Hypericum* exibem uma grande variedade de tamanhos, desde árvores que chegam a medir mais de 12 m a pequenos caules que não medem mais de 50 cm. Árvores verdadeiras, no entanto, são raras e ocorrem somente entre as espécies mais primitivas. Dentre as ervas perenes, muitas crescem próximas ao solo, antes de se tornarem eretas e ascender, os nós freqüentemente formam raízes, porém, em algumas espécies são encontrados rizomas verdadeiros. Quanto às folhas, podem ser encontradas subpecioladas, pinadas, com venação reticulada, podendo apresentar glândulas negras e/ou pálidas e esta variação de ocorrência tem sido usada como critério de classificação do gênero. Possuem inflorescências com flores pequenas, de pétalas geralmente livres (ROBSON, 1981).

Hypericum connatum, a espécie em estudo neste trabalho, é uma erva ou subarbusto de 0,30 a 1 m, composta por caule simples, avermelhado, cilíndrico na base. Internódios de 1-4,5 cm. Folhas conato-perfoliadas, coriáceas, deltóideas, margens grossas, colenquimatosas (1,5-3 x 2-4 cm). Cimas terminais com 10-30 floras. Brácteas lineares (3-4 mm). Flores com 0,8 a 1,2 cm, pedicelos de 1 a 5 mm, sépalos coriáceos, lanceolados (mais ou menos 6 x 3,5 mm), acuminados, 5 a 6 nervados. Pétalos obovados (0,9-10 x 3-4 mm) amarelos ou alaranjados, estames em número de 50 a 70, soldados na base, formando uma franja. Ovário 5-carpelado. Estiletos 5, às vezes 4 (mais ou menos 3 mm) e estigmas capitados. Cápsula globosa mais ou menos do mesmo comprimento que o cálice. Sementes oblongas, alveoladas e amarelas. Floresce durante os meses de outubro até fevereiro (JIMÉNEZ, 1980). Pertencente à seção *Trigynobrathys*, assim como outras espécies desse mesmo grupo, é caracterizada pela ausência de glândulas negras (ROBSON, 1990).



FIGURA 2.2: *Hypericum connatum* (Fonte: JIMÉNEZ, 1980).

2.2.3 Aspectos ecológicos

Hypericum connatum é uma erva ou subarbusto, característico da zona dos campos do planalto meridional no estado de Santa Catarina, onde apresenta vasta e expressiva dispersão, ocorrendo desde 500 até 1400 m de altitude. É uma espécie heliófita e seletiva xerófila, bastante freqüente, sobretudo nos campos enxutos como solos rasos ou rochosos, existentes principalmente na borda oriental do planalto. Praticamente não se desenvolve nos campos úmidos ou banhados. Encontra-se no sul e sudeste do Brasil, sul da Bolívia, Paraguai, Argentina e Uruguai (JIMÉNEZ, 1980).

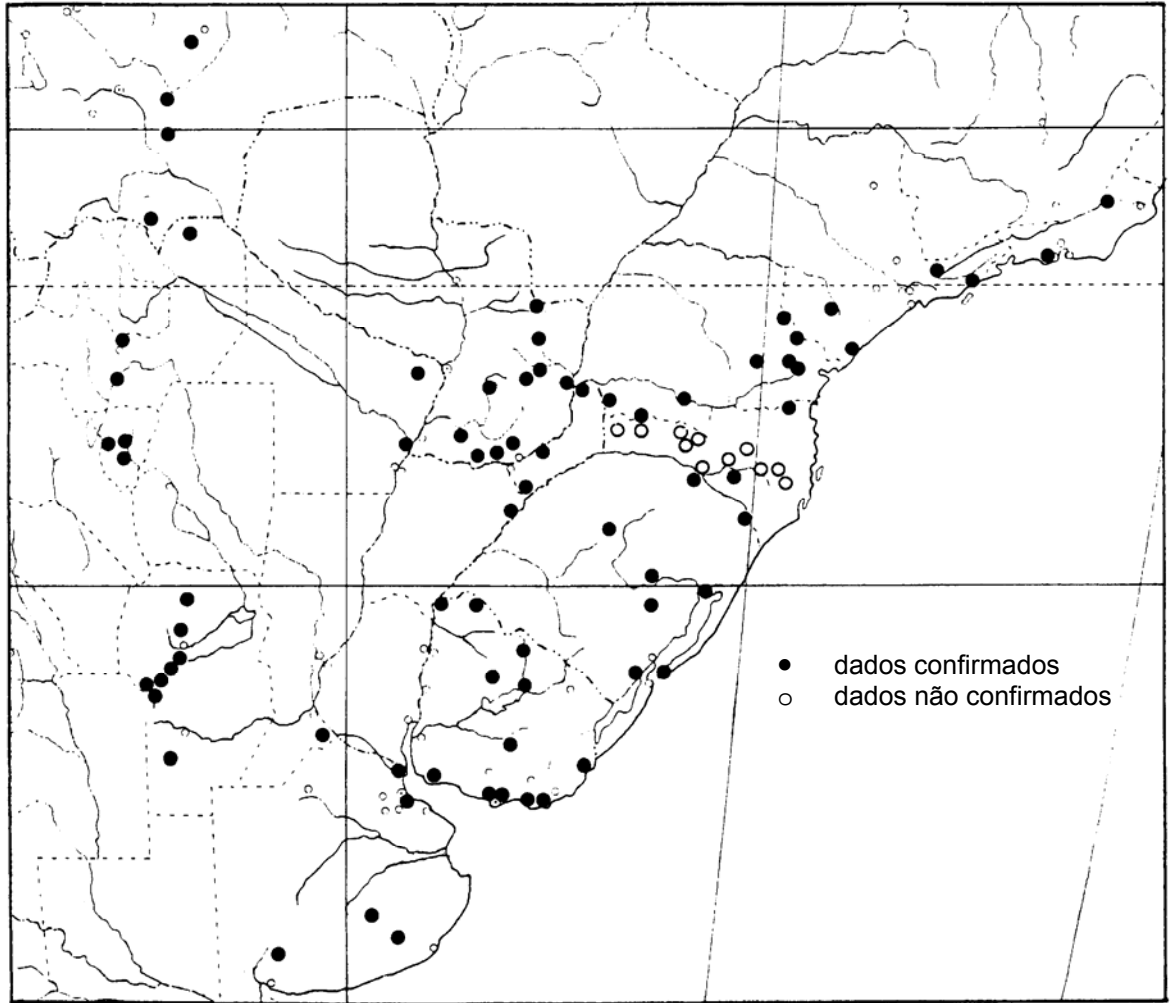


Figura 2.3: Distribuição geográfica de *Hypericum connatum* (Fonte: ROBSON, 1990).

**3. CAPÍTULO I - ANÁLISE QUÍMICA DE *Hypericum
connatum* Lam.**

3.1 INTRODUÇÃO

O gênero mais estudado da família Guttiferae é o *Hypericum* do qual muitas espécies são usadas tradicionalmente na medicina popular. Estas plantas têm uma forte tendência em acumular compostos fenólicos com padrão de substituição floroglucinol. Do gênero *Hypericum*, muitos derivados de floroglucinol têm sido isolados, dos quais alguns são bem conhecidos como a hiperforina de *H. perforatum*, enquanto outros se apresentam conjugados com uma molécula de ácido filicínico. Outras substâncias presentes no gênero incluem flavonóides, xantonas, benzopiranos entre outras (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

3.2 OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste capítulo foram:

- realizar uma análise química preliminar de *Hypericum connatum* Lam.;
- isolar e identificar as substâncias majoritárias.

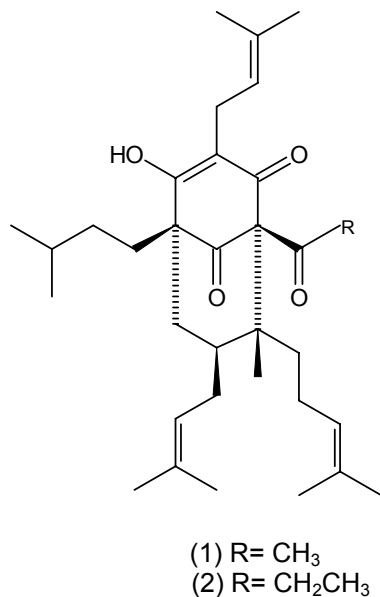
3.3 REVISÃO DA LITERATURA

Estudos químicos com espécies do gênero *Hypericum* têm sido realizados e dentre os compostos obtidos de espécies brasileiras estão flavonóides, xantonas e derivados de floroglucinol isolados das folhas e flores de *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1994, 1995, 1996), benzopiranos das partes aéreas de *H. polyanthemum* (FERRAZ *et al.*, 2001), e um derivado de floroglucinol, uliginosina B de *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002a).

Nesta revisão foi dada ênfase nas classes de compostos isolados, sendo assim, flavonóides e derivados de floroglucinol foram os mais discutidos.

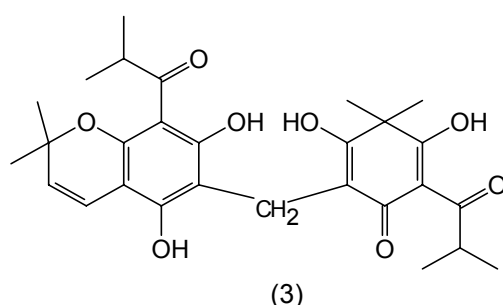
3.3.1 Derivados de floroglucinol

Muitos derivados de floroglucinol foram isolados de espécies de *Hypericum*, dos quais alguns são poliisoprenilados como hiperforina (1), obtida como uma mistura de tautômeros, e *ad*-hiperforina (2) isolados de *Hypericum perforatum*, enquanto outros se apresentam como dímeros (BARREIRO & FRAGA, 2001). Hiperforina vem a ser o constituinte majoritário das folhas e flores de *H. perforatum*, acumulando-se em quantidades superiores a 5% do peso seco das mesmas (ADAM *et al.*, 2002). Análogos mais oxidados da hiperforina também foram isolados da espécie, sendo eles, oxepa-hiperforina, 33-desoxi-33-hidroperoxifuro-hiperforina e 8-hidróxi-hiperforina-8,1-hemiacetal (DE SHAN *et al.*, 2001). A análise das partes aéreas da espécie coletada na China revelou um novo metabólito, perforatumona 1, a qual é caracterizada por um esqueleto carbônico único, sendo essa estrutura determinada por análises espectroscópicas (WU *et al.*, 2004).

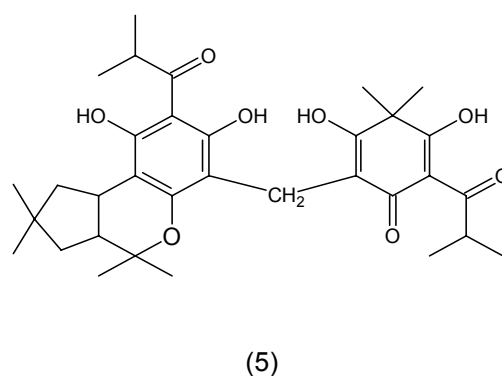
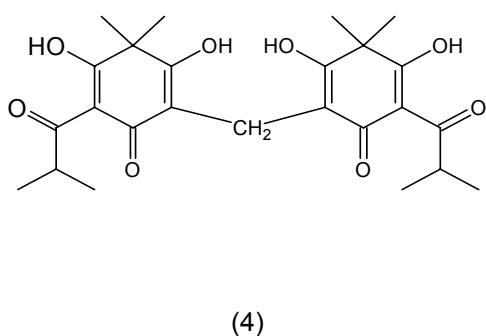


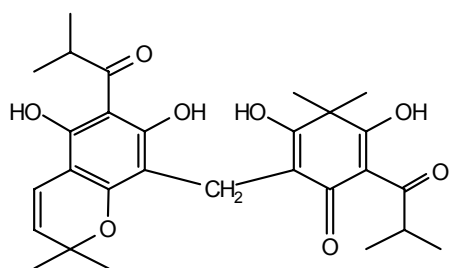
Das espécies nativas do Rio Grande do Sul, foi isolado o composto uliginosina B (3), um dímero composto por uma unidade floroglucinol e uma unidade de ácido filicínico, de *H. myrianthum* e *H. carinatum* (FERRAZ *et al.*, 2002a; BERNARDI *et al.*, 2005). Este mesmo composto foi encontrado também

em *H. uliginosum* (TAYLOR *et al.*, 1969). Outro composto dimérico também foi isolado de *H. caprifoliatum* (VIANA, 2002).

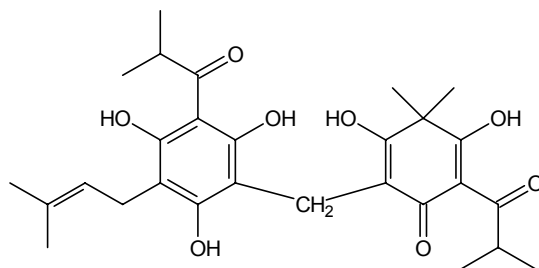


Do extrato éter de petróleo das folhas e flores da espécie *H. brasiliense*, encontrada no sudeste do Brasil, foram isolados 4 floroglucinosíis: japonicina A (4), hiperbrasílo A (5), iso-uliginosina B (6) e uliginosina A (7), esta última também isolada de *H. uliginosum* (ROCHA *et al.*, 1995; ABREU *et al.*, 2004a). Em 1996, ROCHA e colaboradores também isolaram os compostos hiperbrasílo B (8), iso-hiperbrasílo B (9) e hiperbrasílo C (10), sendo todos derivados de floroglucinol diméricos unidos por uma ponte metilênica. Hiperbrasílo B também foi isolado de *H. connatum* e *H. caprifoliatum* por NÖR e colaboradores (2004). O composto japonicina A é constituído de duas unidades de ácido filicínico, os demais são formados por uma unidade floroglucinol e uma de ácido filicínico.

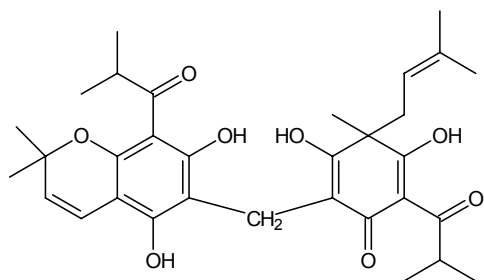




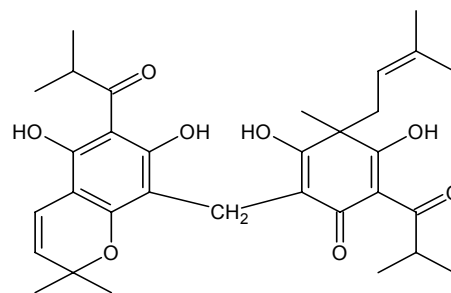
(6)



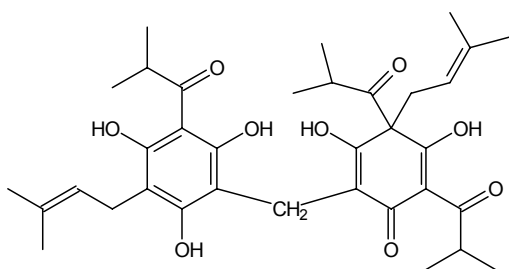
(7)



(8)



(9)



(10)

A espécie *H. japonicum*, usada popularmente na medicina chinesa para o tratamento de várias doenças, foi estudada resultando no isolamento de diversos derivados de floroglucinol, sarotraleno A, sarotraleno B (ISHIGURO *et al.*, 1986; HU *et al.*, 2000), saroaspídina A, B e C (ISHIGURO *et al.*, 1987), japonicina A e sarotraleno C e D (ISHIGURO *et al.*, 1994), sendo todos formados por uma unidade floroglucinol e uma unidade ácido filicínico ligadas por uma ponte metilênica, com exceção da japonicina A, que contém duas unidades de ácido filicínico unidas por uma ponte metilênica formando sua molécula.

Do extrato etéreo de *Hypericum erectum* foram isolados dois derivados de floroglucinol denominados erectonas A e B de estrutura tetracíclica provavelmente formadas por cicloadição e ciclizações complexas envolvendo grupos prenilados

(AN *et al.*, 2002a). No mesmo ano, foram identificadas as substâncias erectoquionas A, B e C (AN *et al.*, 2002b). Anteriormente, da mesma espécie, TADA e colaboradores, em 1991, isolaram outros dois compostos denominados otogirina e otogirona.

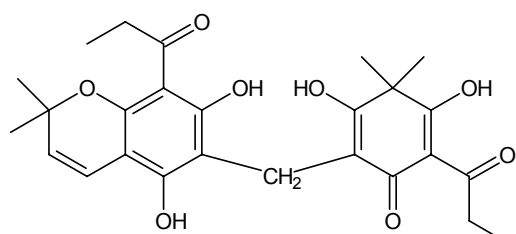
De *H. sampsonii* foram isolados derivados benzoilfloroglucínóis poliprenilados, denominados sampsonianas A a M, sendo que a maioria dos derivados poliprenilados obtidos de espécies de *Hypericum* contém um grupamento acil e é interessante perceber que *H. sampsonii* é a primeira espécie que contém derivados tão complexos com um grupo aroil, o qual é mais característico de metabólitos obtidos de outros gêneros da família Guttiferae como *Garcinia* e *Clusia* (HU *et al.*, 2000).

Em 2003, BENKIKI e colaboradores isolaram das partes aéreas de *H. perforiatum*, um novo floroglucinol poliisoprenilado ao qual denominaram hiperfoliatina. No ano seguinte, foram isolados dois novos derivados de floroglucinol por ATHANASAS e colaboradores (2004), do extrato diclorometano de *Hypericum jovis*, uma planta considerada endêmica na Grécia, denominados hiperjovinols A e B.

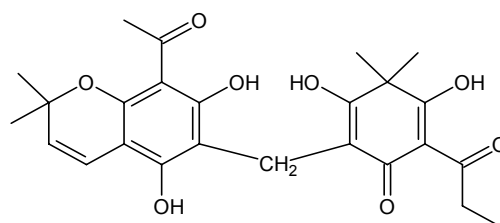
O extrato éter de petróleo das folhas de *H. papuanum*, foi submetido a fracionamento bioguiado, levando ao isolamento de 5 novos derivados tricíclicos de floroglucinol, nomeados ialibionas A-E e seus tautômeros (ialibionas Aa-Ee) correspondentes (WINKELMANN *et al.*, 2000). Um ano mais tarde, foram isolados, também do extrato etéreo, cinco derivados prenilados de acil-floroglucinol tricíclicos e três bicíclicos, a partir de fracionamento bioguiado visando determinar a atividade antibacteriana. Os compostos tricíclicos foram chamados de papuaforinas A-E e os de estrutura bicíclica foram isolados juntamente com seus tautômeros correspondentes e denominados de hiperguionas A e B e hiperpapuanona (WINKELMANN *et al.*, 2001).

JAYASURIYA e colaboradores (1989; 1991), obtiveram extratos hexano das raízes e partes aéreas de *H. drummondii* para a avaliação da atividade antimicrobiana. Das raízes obtiveram as substâncias drummondinas A (11), B (12), C(13), e F (14), juntamente com albaspidinas A-A e P-P e das partes aéreas,

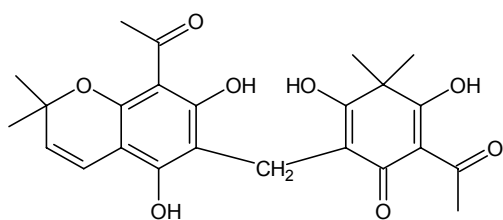
drumondina D (15), isodrumondina D (16), drumondina E (17) e drumondina F (14). As substâncias foram caracterizadas por métodos espectroscópicos sendo que o espectro de RMN ^1H destes compostos sugere a presença de um sistema enolizável β -trietona.



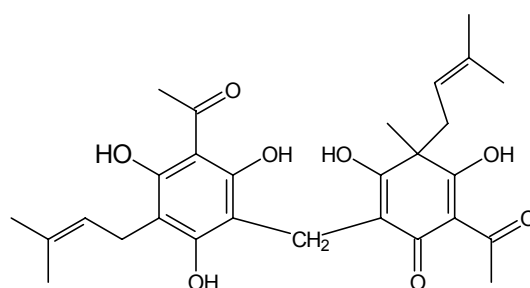
(11)



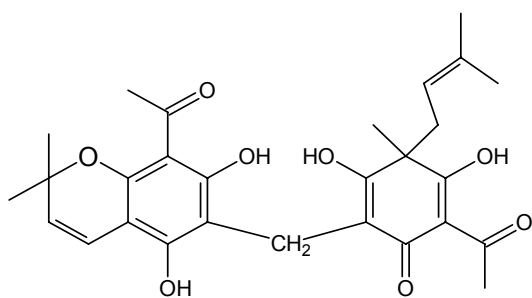
(12)



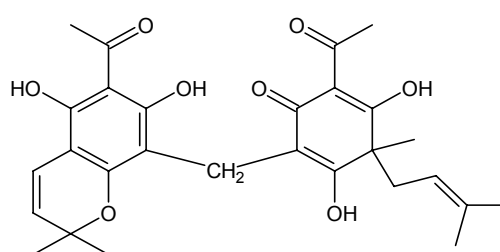
(13)



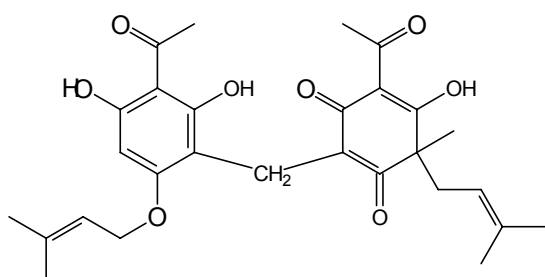
(14)



(15)



(16)



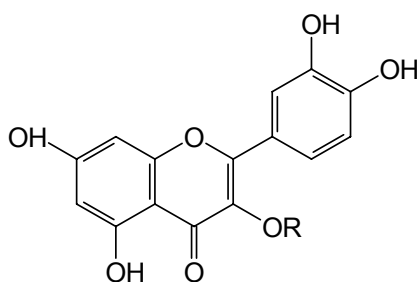
(17)

Em muitas outras espécies de *Hypericum* foram identificados derivados de floroglucinol: de *H. patulum* foi isolado paglucinol (ISHIGURO *et al.*, 1998), de *H. chinense*, chinesina I e II (TADA *et al.*, 1991), da espécie *H. scabrum* foram isolados nove benzoilfloroglucinóis poliprenilados: hiperibonas A a I (MATSUHISA *et al.*, 2002) e de *H. japonicum* foi isolado o composto sarotraleno B (HU *et al.*, 2000). Das partes aéreas do extrato lipofílico de *H. atomarium* foi encontrado o composto denominado hiperatomarina com alta percentagem (representando 3,1% do peso da planta seca), ocorrendo em duas formas tautoméricas (FODULOVIC *et al.*, 2003).

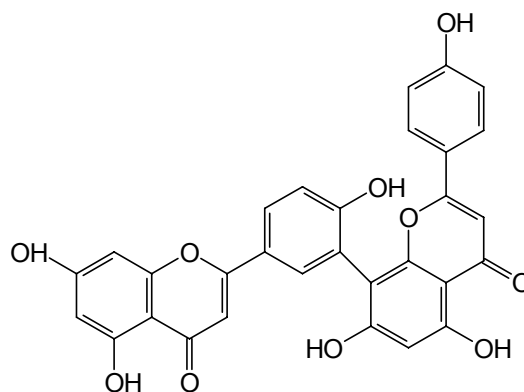
De acordo com FERRAZ e colaboradores (2002a), as seções *Brathys* e *Triginobrathys* são fontes de derivados de floroglucinol com estrutura dimérica, de onde foram isolados todos os floroglucinóis diméricos até então, sugerindo essa classe de substâncias como marcadores taxonômicos dessas duas seções.

3.3.2 Flavonóides

Flavonóides constituem um grupo de compostos polifenólicos de estrutura química e características diversas encontrados em praticamente todas as plantas (COOK & SAMMAN, 1996). São freqüentes no gênero *Hypericum* e entre os mais encontrados estão rutina (18), quercetina (19) e seus derivados, hiperosídeo (quercetina-3-O- β -D-galactosídeo) (20), isoquercitrina (quercetina-3-O-glicosídeo) (21), e quercitrina (quercetina-3-O-ramnosídeo) (22) (CROKETT *et al.*, 2005). Biflavonóides como amentoflavona (23) e biapigenina também estão presentes em diversas espécies (BERGHÖFER & HÖLZL, 1986; KARTNIG *et al.*, 1996; BILIA *et al.*, 2002; JÜRGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002; CROKETT *et al.*, 2005).



- (18) R= α -L-rutinosil
- (19) R= H
- (20) R= β -D-galactosil
- (21) R= β -D-glicosil
- (22) R= α -L-ramnosil



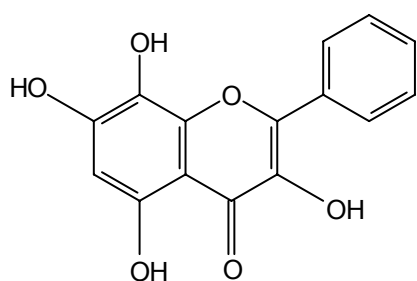
(23)

Em um estudo recente, CROCKETT e colaboradores (2005) analisaram o extrato metanólico de setenta e quatro espécies de *Hypericum*, entre estas, *H. perforatum*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificar a presença de flavonóides (rutina, hiperosídeo, isoquercitrina, quercitrina, quercetina e amentoflavona), através da comparação com padrões comerciais e determinaram que, entre as espécies analisadas, o flavonóide mais freqüentemente encontrado foi hiperosídeo, seguido de isoquercitrina, quercitrina, rutina, quercetina e amentoflavona, encontrados 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.

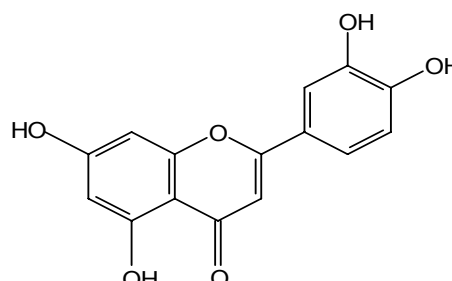
O biflavonóide amentoflavona foi encontrado nas flores de *H. olympicum*, *H. hirsutum*, *H. patulum*, *H. perforatum*, porém não está presente nas folhas de *H. perforatum* (BAUREITHEL *et al.*, 1997). Na espécie *H. perforatum* também estão presentes os flavonóides canferol (24), luteolina (25) (BERGHÖFER & HÖLZL, 1986), canferol-3-rutinosídeo (SILVA *et al.*, 2005) e avicularina (WU *et al.*, 2002).

O flavonóide quercetina foi isolado de *H. japonicum* (WU *et al.*, 1998), *H. hyssopifolium* (CAKIR *et al.*, 2003), *H. monogynum* (WANG *et al.*, 2002), *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995; ABREU *et al.*, 2004a), *H. ericoides* (CARDONA & SEOAN, 1982), *H. perforatum* (WU *et al.*, 2002) e *H. triquetrifolium* (COULADIS *et al.*, 2002). Rutina está presente em *H. brasiliense* (ABREU *et al.*, 2004a), *H. monogynum* (WANG *et al.*, 2002), *H. perforatum* (WU *et al.*, 2002) e *H. triquetrifolium* (COULADIS *et al.*, 2002;), porém está presente em pequenas concentrações ou não aparece em *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

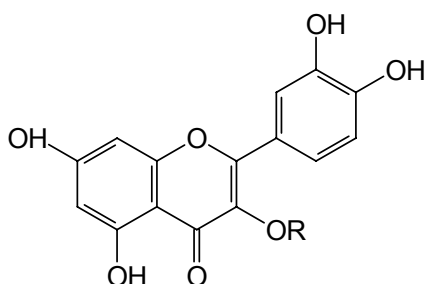
A presença de hiperosídeo também foi detectada em *H. ericoides* (CARDONA & SEOAN, 1982), *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* (SCHMITT *et al.*, 2001), em *H. hyssopifolium* (CAKIR *et al.*, 2003), *H. triquetrifolium* (CONFORTI *et al.*, 2002), *H. monogynum* (WANG *et al.*, 2002), *H. maculatum* (SMELCEROVIC, *et al.*, 2006), *H. sampsonii* (HONG *et al.*, 2004) e em *H. brasiliense*, da qual também foram isolados luteolina, quercitrina, isoquercitrina e guaijaverina (26) (ROCHA *et al.*, 1995). Já o flavonóide canferol foi isolado de *H. japonicum* (WU *et al.*, 1998) e *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995).



(24)



(25)



(26) R= α -L-arabinopiranosil

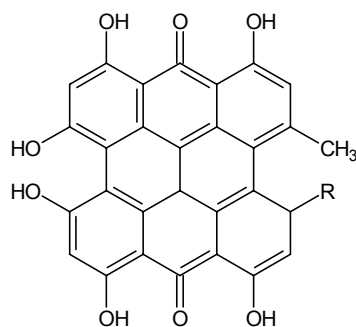
Dos extratos de *Hypericum hyssopifolium* foram isolados outros flavonóides: 3-8"-biapigenina, quercetina-3-O- α -L-arabinofuranosídeo, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo-7-O- β -D-glucopiranosídeo (CAKIR *et al.*, 2003), o flavonóide 3-8"-biapigenina, também foi isolado das partes aéreas de *H. triquetrifolium* (COULADIS *et al.*, 2002), da qual também foram isolados, canferol-3-O-glicosídeo e tereína (CONFORTI *et al.*, 2002). Da espécie *H. japonicum* foram isolados os seguintes flavonóides: vincetoxicosídeo B (quercetina-7-O-ramnosídeo), (2R,3R)-taxifolina-7-ramnosídeo (ISHIGURO *et al.*, 1991), sarotranol (ISHIGURO *et al.*, 1993), 7,8-(2",2"-dimetilpirano)-5,3',4'-triidróxi-3-metoxiflavona e (2R, 3R) diidroquercetina-3,7- α -L-diramnosídeo além de canferol, já citado (WU *et al.*, 1998).

Das espécies analisadas por DALL'AGNOL e colaboradores (2003), *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*, através de cromatografia em camada delgada, concluiu-se que estas apresentam certa homogeneidade em sua composição quanto à presença de flavonóides. Todas apresentaram quercitrina, hiperosídeo (com exceção de *H. connatum*) e isoquercitrina. Quercitrina está presente também em *H. japonicum* (ISHIGURO *et al.*, 1991).

3.3.3 Quinonas policíclicas

As naftodiantronas hipericina (27) e *pseudo*-hipericina (28) são os principais constituintes de espécies de *Hypericum* e parecem estar restritas a este gênero (KITANOV, 2001). Estudos fitoquímicos revelaram a presença de hipericina em extratos alcoólicos de *H. perforatum*, *H. barbatum*, *H. hirsutum*, *H. elodes*, *H. humifusum*, *H. maculatum*, *H. montanum*, *H. tetrapterum*, *H. bithynicum*, *H. glandulosum* e *H. tomentosum*, *H. olympicum* (KARTNIG *et al.*, 1989; KARTNIG & GÖBEL, 1992; KARTNIG *et al.*, 1996; BAUREITHEL *et al.*, 1997; BARREIRO & FRAGA, 2001; KITANOV, 2001; PIOVAN *et al.*, 2004; SMELCEROVIC *et al.*, 2006). Porém, FERRAZ e colaboradores (2002b), evidenciaram a ausência em espécies nativas do sul do Brasil. *H. caprifoliatum*, *H.*

brasiliense, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, *H. connatum*, *H. piriai*, *H. carinatum* e *H. cordatum*.



(27) R=CH₃

(28) R= CH₂OH

3.3.4 Xantonas

Xantonas estão presentes principalmente na família Guttiferae, sendo que mais de 200 delas já foram isoladas da família, incluindo xantonas simples oxigenadas, preniladas, xantolignóides e benzofenonas. Normalmente encontram-se na forma livre e mais da metade das agliconas isoladas de plantas dessa família são substituídas por isoprenóides ou geranóides, que podem estar ciclizados ou não (WU *et al.*, 1998; KUSTER & ROCHA, 2003).

As xantonas glicosiladas mangiferina e isomangiferina foram, respectivamente, encontradas em 26 e 33 de 36 espécies investigadas de *Hypericum*, pertencentes a 17 seções do gênero, sugerindo uma pequena significância taxonômica para a classificação seccional do gênero. São exemplos de fontes de mangiferina *H. rochelli*, *H. perforiatum*, *H. aucheri*, *H. montanum* e *H. sampsonii* (KITANOV & NEDIALKOV, 1998; HONG *et al.*, 2004).

No trabalho realizado por WU e colaboradores, em 1998, foram isoladas cinco xantonas de *H. henryi* e sete xantonas de *H. japonicum*, das quais, 1,5-diidroxixantona-6-O-β-D-glicosídeo, glicosilada, e bijaponicaxantona, uma xantona dimérica, descritas pela primeira vez.

Da espécie *Hypericum ascyron* foram isoladas as xantonas 2-metoxixantona, euxantona, 1-hidróxi-7-metoxixantona, 7-metóxi-1,5,6-triidroxixantona, toxiloxantona B, 1,3,6,7-tetraidróxi-8-(3-metilbut-2-enil) xantona, friedelina, 3,6-diidróxi-1,7-dimetoxixantona e 5-cloro-1,6-3-metóxi-8-metilxantona, a primeira cloroxantona isolada de vegetais superiores (LI *et al.*, 1999).

De *Hypericum brasiliense* foi isolada 1,5-diidroxixantona, encontrada em todas as partes da planta, com maior concentração na época de frutificação (ABREU *et al.*, 2004a). Em *H. canariensis* foram encontradas as xantonas 1,7-diidroxixantona, 2-diidroxixantona, 2-hidróxi-5-metoxixantona e 2,5-diidroxixantona, 3-hidróxi-2,4-dimetoxixantona, 1,6-diidróxi-5-7-dimetoxixantona e a piranoxantona hipericanarina (CARDONA *et al.*, 1986).

HONG e colaboradores (2004) isolaram as xantonas sulfonadas 1,3-diidroxixantona-5-metoxixantona-4-sulfonada e 1,3-dihidroxixantona-5-O-β-D-glicopiranosilxantona-4-sulfonada de *H. sampsonii*, até então desconhecidas.

3.3.5 Taninos

Taninos são freqüentemente encontrados em espécies de *Hypericum*, podendo-se verificar elevados teores que variam de 5 a 16% em espécies nativas do Rio Grande do Sul, sendo encontrados em maiores percentuais em *H. ternum* e *H. connatum*, 16,7% e 11,5%, respectivamente (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

3.3.6 Ácidos fenólicos

A presença de ácido clorogênico foi verificada com freqüência, através de cromatografia em camada delgada, em espécies do gênero *Hypericum*, como em *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2003) e *H. triquetrifolium* (COULADIS *et al.*, 2002). Ácido caféico e ácido isoclorogênico também foram detectados em *H. ternum* por cromatografia em camada delgada, por DALL'AGNOL e colaboradores, em 2003.

3.3.7 Óleos voláteis

Os óleos voláteis de espécies de *Hypericum* de diferentes regiões têm sido extensivamente estudados por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CAKIR *et al.*, 2005). Porém, sabe-se pouco sobre as espécies nativas do Rio Grande do Sul. O estudo de FERRAZ e colaboradores (2005a) revelou que o óleo volátil de *H. connatum* representa 0,1%, quando a planta é submetida a processos de hidrodestilação, tendo como principal constituinte óxido de cariofileno (40%). Outras espécies nativas também foram analisadas por esses mesmos autores: *H. caprifoliatum* (0,2%), *H. carinatum* (0,2%), *H. myrianthum* (0,5%), *H. polyanthemum* (0,2%) e *H. ternum* (0,1%); tendo como principais constituintes: nonano, β -cariofileno, undecano, benzopirano HP1 (6-isobutiril-5,7-dimetóxi-2,2-dimetil-benzopirano) e β -cariofileno, respectivamente.

Em *Hypericum perforatum*, há maior abundância de monoterpenos, sendo que 2-metil-octano e α -pineno são os principais (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; SCHWOB *et al.*, 2004). Verificou-se, porém, que em plantas coletadas em diferentes regiões da França, o óleo volátil é principalmente constituído por hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SCHWOB *et al.*, 2004). Pode-se, ainda, encontrar no óleo os seguintes constituintes: óxido de cariofileno, β -cariofileno, espatulenol, 1-tetradecanol, 1-dodecanol e γ -muroleno (GUDZIC *et al.*, 2001; SCHWOB *et al.*, 2004). A substância β -cariofileno também está presente, como principal constituinte, em *H. brasiliense*, cujo óleo volátil é constituído em sua maioria por sesquiterpenos (ABREU *et al.*, 2004b) e em *H. maculatum*, que apresentou, ainda, a presença de β -farneseno, n-undecano, δ -cadineno e γ -muroleno (GUDZIC *et al.*, 2002).

Outras espécies de *Hypericum* também foram estudadas, entre estas *Hypericum rumeliacum*, verificando-se a presença de α -pineno, como principal constituinte, β -pineno, de-hidro-aromadendreno e α -copaeno (COULADIS *et al.*, 2003). *H. olympicum*, que contém (E)-anetol e β -farneseno (GUDZIC *et al.*, 2001), *H. coris* contendo principalmente α -curcumeno (SCHWOB *et al.*, 2002), *H.*

linarioides composto principalmente por δ -cadineno (CAKIR *et al.*, 2005) e o composto óxido de cariofileno foi encontrado como majoritário em *H. hyssopifolium* e *H. lysimachioides* por TOKER e colaboradores em 2006.

3.3.8 Outros constituintes

Outras substâncias também foram isoladas de espécies do gênero *Hypericum*, como chalconas de *H. geminiflorum* (CHUNG *et al.*, 1999) e benzopiranos de *H. polyanthemum* (FERRAZ *et al.*, 2001). Recentemente foram isoladas duas novas benzofenonas das partes aéreas de *H. carinatum*, denominadas carifenona A e carifenona B por BERNARDI e colaboradores (2005).

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS

3.4.1 Material vegetal

As partes aéreas (ramas e flores) do vegetal utilizado no desenvolvimento deste trabalho foram coletadas na região de São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, no mês de novembro de 2005. Foram preparadas exsiccatas para identificação e registro do material vegetal no herbário ICN (Herbário do Departamento de Botânica - Instituto de Biociências-UFRGS), sob número Bordignon 1527.

3.4.2 Preparação do material vegetal

O material, imediatamente após a coleta, foi selecionado, seco em ambiente arejado, ao abrigo da luz direta e triturado em moinho de facas.

3.4.3 Extração

Para a extração dos constituintes químicos das partes aéreas da espécie em estudo, o material vegetal foi submetido à extração por maceração estática a frio utilizando-se solventes em polaridade crescente (*n*-hexano, diclorometano e

metanol), denominados frações *n*-hexano, diclorometano e metanol. Foram também obtidos, pelo mesmo processo, frações *n*-hexano, diclorometano e metanólico das raízes, para análise cromatográfica.

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes solventes: hexano, diclorometano, metanol e acetato de etila, todos grau p.a., de procedência Grupo Química[®], Reagen[®] e Merck[®], além de água destilada.

3.4.4 Análise cromatográfica em camada delgada

Extratos obtidos com as raízes e partes aéreas da planta foram previamente analisadas quanto à constituição química através de cromatografia em camada delgada (CCD) analítica, utilizando-se cromatofolhas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄, de procedência Merck[®] e como sistemas eluentes, misturas de diclorometano:hexano (3:2) (V:V) e acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10) (V:V:V).

3.4.5 Isolamento dos constituintes

Os diferentes extratos foram submetidos à cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, utilizando-se diversos sistemas eluentes.

Fracionamentos em coluna cromatográfica foram realizados sob gel de sílica 60 procedência Merck[®], com tamanho de partícula entre 35-70 mesh-ASTM e 70-230 mesh-ASTM.

Para cromatografias em camada delgada preparativas, visando o isolamento de substâncias, foram utilizadas placas de vidro 20 x 20 cm, preparadas no laboratório com auxílio de conjunto Desaga[®], tendo como adsorvente gel de sílica GF₂₅₄, de procedência Merck[®], em espessura de 0,5 mm. Cromatografias em camada delgada analíticas foram realizadas utilizando-se

cromatofolhas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄, de procedência Merck®, para acompanhamento durante o processo de purificação.

A visualização e análises dos cromatogramas foram efetuadas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm) e revelação através da nebulização com reagentes cromogênicos, tais como anisaldeído sulfúrico, com posterior aquecimento a 100°C até o desenvolvimento máximo de coloração e reagente natural a 10% em metanol.

A eliminação do solvente utilizado para extração e concentração dos extratos foi realizada sob pressão reduzida, em aparelho de evaporação rotatório, utilizando-se temperatura não superior a 55°C.

3.4.6 Identificação dos produtos

Os produtos foram identificados através de espectrometria de massas, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C. Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) (400 MHz) e de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono (RMN¹³C) (100 MHz) foram obtidos em espectrômetro Jeol® Eclipse 400, através da colaboração com o professor Prof. Dr. Dominique Guillaume da Faculté de Pharmacie de Amiens (França) e Prof. Dr. Jan Schripsema da Universidade Estadual do Norte Fluminense, RJ.

Os espectros de massas foram realizados na Universidade Estadual do Norte Fluminense em aparelho de GC-MS-QP 5000 (Shimadzu, Japão) utilizando coluna DB-1 com temperatura programada de 100 a 270°C sob aumento de 4°C/min e temperatura de 250°C e 230°C no injetor e linha de transferência, respectivamente.

Os espectros na região do ultravioleta (UV) foram obtidos em espectrofotômetro de ultravioleta Hewlett Packard® UV-VIS, modelo HP 8452-A, com varredura de diodos em série entre 100 e 900 nm, da Central Analítica, gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Pedro Ros Petrovick, e espectrofotômetro

Shimadzu UV/VIS 2201 no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os espectros utilizados na elucidação estrutural dos compostos estão apresentados em anexo.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Análise cromatográfica qualitativa das frações

3.5.1.1 Raízes

O cromatograma da fração *n*-hexano apresentou a presença de diversos compostos fenólicos, sem o predomínio de componentes majoritários, que desenvolveram coloração similar quando revelados com o agente cromogênico anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. No cromatograma da fração metanólica verificou-se a presença de substâncias fenólicas, principalmente derivados de ácidos fenólicos como ácido clorogênico e isoclorogênico, evidenciados pelo comportamento cromatográfico, principalmente pela coloração esverdeada formada pela reação com reagente natural e exposição à luz ultravioleta.

3.5.1.2 Partes aéreas

No cromatograma da fração *n*-hexano foi possível verificar a presença de uma substância majoritária, além de outras minoritárias. Mesmo com a eliminação do material ceroso presente nessas frações, através de processamento com acetona (ROCHA *et al.*, 1995), pode-se observar 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 cromatograma da fração metanólica mostrou um predomínio de compostos fenólicos. A análise cromatográfica desta fração revelou a presença de

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.

3.5.2 Isolamento de compostos fenólicos

A partir de processos cromatográficos, da fração *n*-hexano das partes aéreas foram isolados quatro compostos majoritários sendo denominados HCH1, HCH2, HCH3 e HCH4 e da fração metanólica, foram isoladas cinco substâncias, sendo codificadas como HCN1, HCN2 HCN3, HCN4, e HCN5.

3.5.3 Análise estrutural das substâncias isoladas

Através de dados espectroscópicos e espectrométricos, comparados com os disponíveis na literatura, foi possível a identificação das estruturas de HCH1, HCN2, HCN3, HCN4 e HCN5 descritas a seguir. As outras substâncias isoladas não puderam ser identificadas devido a problemas na obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C . Os dados obtidos a partir dos espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C estão apresentados nas Tabelas 3.1 e 3.2 para a substância HCH1 e os dados obtidos a partir dos espectros de UV estão representados nas Tabelas 3.3, 3.4, 3.5 e 3.6 para as substâncias HCN2, HCN3, HCN4 e HCN5, respectivamente, das quais também não foi possível obter os espectros de ressonância magnética nuclear.

3.5.3.1 Substância HCH1

A partir da fração *n*-hexano das partes aéreas uma substância majoritária codificada como HCH1 foi isolada através de técnicas cromatográficas e submetida a análises espectroscópicas.

O produto foi obtido como um sólido oleoso de coloração amarela. O espectro de massas determinou $[M]^+$ de 552 m/z , a fórmula molecular foi então deduzida como sendo $C_{32}H_{40}O_8$.

O espectro de RMN de 1H de HCN1 mostrou os seguintes sinais δ 1,18 (*d* $J=6,7$ Hz); 1,21 (*d* $J=6,7$ Hz); 1,29 (s) 1,48 (s); 1,51(s); 2,82-2,53 (*m*); 3,55 (s); 3,90 (*sep* $J=6,7$ Hz); 4,20 (*sep* $J=6,7$ Hz); 4,80 (*br t*); 5,45 (*d* $J=10$ Hz); 6,70 (*d* $J=10$ Hz); 9,85 (s); 11,45 (s); 16,16 (s) e 18,61 (s) ppm, apresentados na Tabela 3.1. No espectro de RMN ^{13}C foram encontrados trinta e um sinais que estão apresentados, juntamente com sua atribuição, na Tabela 3.2.

Os espectros deste composto revelaram uma estrutura dimérica constituída por uma unidade ácido filicínico e uma de floroglucinol ligados por uma ponte metilênica. O espectro RMN 1H realizado a 400 MHz mostrou ressonância de hidroxilas em δ 18,61, 16,16, 11,45 e 9,85 ppm. A ocorrência de duas cadeias isobutiril foi detectada pela presença de septetos no espectro de RMN 1H em δ 4,20 e 3,90 ppm com constante de acoplamento de $J = 6,7$ Hz com dubletos em δ 1,18 e 1,21 ppm, respectivamente.

O sinal em campo muito baixo (18,61 ppm) no espectro de RMN 1H indicou a presença de um sistema enolizável de uma β -triketona. Esta observação, juntamente com o sinal do grupamento metila em 1,48 ppm neste mesmo espectro é um forte indicativo da presença de um ácido filicínico nesta molécula.

No espectro de RMN 1H um par de dubletos ($J=10$ Hz) em δ 5,45 e 6,70 ppm, respectivamente, revelaram a presença de um 2',2'-dimetilcromeno. A fusão do anel pirano foi inferida com a comparação direta das ressonâncias de hidroxila, em particular 7'-OH e 5'-OH com aquelas observadas no composto de estrutura similar, drumondina C. A presença do grupamento isoprenila é indicada pelos sinais adicionais que não ocorrem no composto drumondina C.

Os carbonos quaternários e secundários, e terciários e primários, foram confirmados no espectro de APT (*Attached Proton Test*). Os espectros bidimensionais de correlação curta e longa revelaram detalhes estruturais da molécula. Através do espectro de HMQC (*Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) foi possível inferir os carbonos e hidrogênios diretamente ligados, como por exemplo a correlação entre os carbonos em 124,61 (3') e 117,31 (4') com os dubletos de hidrogênios em 5,45 e 6,70 ppm, respectivamente. O espectro de HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*) de correlação longa mostrou a que os sinais de ^{13}C de 78,08 ppm com os hidrogênios de 6,70 e 5,45 ppm eram correlacionados. O espectro obtido por NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) revelou correlações entre os hidrogênios 5-OH e 3'-Me, 7'-OH e 4-Me, 7 com 5'-OH e 3-OH, entre outros.

O espectro de massas determinou como principais fragmentos, as massas de 552 (41), 465 (36), 275 (100), 259 (48), 247 (35) e 167 (23). A fragmentação segue um padrão característico de derivados de floroglucinol; o pico base (pico de 275) corresponde à unidade floroglucinol juntamente com a ponte metilênica, enquanto a fragmentação perdida (de 552 a 275) corresponde ao ácido filicínico com seus radicais (WOLLENWEBER *et al.*, 1998).

O composto foi então identificado como sendo hiperbrasilot B.

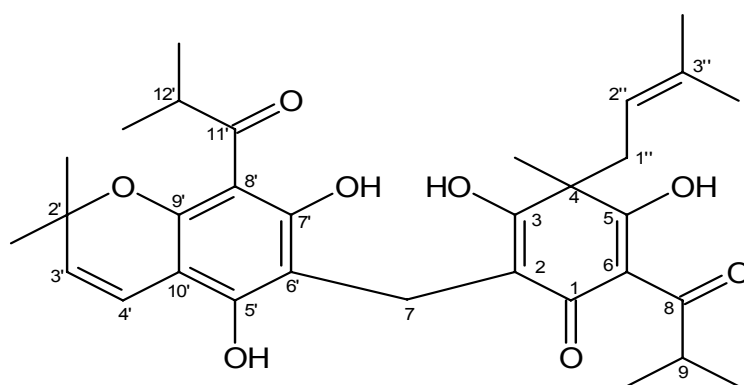


Tabela 3.1: Dados de RMN ¹H do composto HCH1, drumondina C e hiperbrasilot B

H	HCH1*	drumondina C**	hiperbrasilot B***
4-Me	1,48 (s)	1,49 (br s)	1,51 (s)
7	3,55 (s)	3,52 (br s)	3,55 (br s)
9	4,20 (sep, J=-6,7)	-	4,19 (sep, J=-7)
9-Me	1,18 (d, J=6,7)	2,74 (s)	1,16/1,17 (d, J=7)
2'-Me	1,51 (s)	1,49 (br s)	1,53 (s)
3'	5,45 (d, J=10)	5,44 (d, J=9,9)	5,59 (d, J=10)
4'	6,70 (d, J=10)	6,68 (d, J=9,9)	6,66 (d, J=10)
12'	3,90 (sep, J=6,7)	-	4,00 (sep, J=7)
12'-Me	1,21 (d, J=6,7)	2,69 (s)	1,20/1,21 (d, J=6,7)
3-OH	9,85 (s)	9,94 (s)	9,90 (s)
5-OH	18,61 (s)	18,42 (s)	18,80 (s)
5'-OH	11,45 (s)	11,47 (s)	11,40 (s)
7'-OH	16,16 (s)	15,88 (s)	16,35 (s)
1''	2,82-2,53 (m)	-	2,8-2,5 (m)
2''	4,80 (br t)	-	4,60 (br t)
3''-Me	1,29 (s)	-	1,34 (s)

*Dados experimentais (400 MHz; CDCl₃)

**Realizado em 300 MHz em CDCl₃ (Fonte: Jayasuriya *et al.*, 1989).

*** Realizado em 200 MHz em acetona-d₆ (Fonte: Rocha *et al.*, 1996).

Todos os dados foram comparados com aqueles citados por ROCHA e colaboradores (1996) que haviam isolado essa substância de *H. brasiliensis*. Hiperbrasilot B também havia sido relatado anteriormente para *H. caprifoliatum* e para *H. connatum* por NÖR e colaboradores em 2004.

Tabela 3.2: Dados de RMN ^{13}C do composto HCH1, drumondina C e hiperbrasilot B

C	HCN1*	drumondina C**	hiperbrasilot B***
1	198,00	198,7	199,2
2	110,04	108,5	109,8
3	170,00	171,8	170,7
4	49,00	44,4	49,8
4-Me	22,67	24,8	22,8
5	187,65	187,3	188,5
6	113,31	111,2	114,2
7	16,56	16,8	17,9
8	211,16	207,1	211,9
9	36,56	29,3	37,2
9-Me	19,26	-	19,4
	19,07	-	19,5
2'	78,08	78,2	79,2
2'-Me	27,96	28,2	27,8
	27,78		27,9
3'	124,61	124,7	124,1
4'	117,31	117,2	117,5
5'	159,28	159,4	160,0
6'	106,29	106,0	107,2
7'	161,95	161,2	162,7
8'	103,82	104,8	104,3
9'	155,45	155,9	156,1
10'	103,53	103,6	104,2
11'	210,93	203,5	210,8
12'	38,93	32,2	39,7
12'-Me	18,88	-	18,9
	19,47	-	19,8
1''	39,73	-	39,3
2''	116,99	-	118,2
3''	134,92	-	136,5
3''-Me	25,67	-	25,6
	16,01		17,5

*Dados experimentais (100 MHz; CDCl_3)

**Realizado em 75 MHz in CDCl_3 (Fonte: Jayasuriya *et al.*, 1989).

*** Realizado em 50 MHz em acetona- d_6 (Fonte: Rocha *et al.*, 1996).

3.5.3.2 Substância HCN2

A análise cromatográfica revelou uma substância com características de flavonóides, especificamente uma aglicona devido a sua polaridade, de coloração amarelo-esverdeada quando revelada com reagente natural e exposição à luz ultravioleta (MARKHAM *et al.*, 1975).

A análise do espectro de UV realizado em metanol, da substância codificada como HCN2, revelou duas absorções máximas, estando em 270 e em 340 nm. Estes máximos de absorção indicam que a substância trata-se de uma flavona ou um flavonol 3-substituído (MABRY *et al.*, 1970).

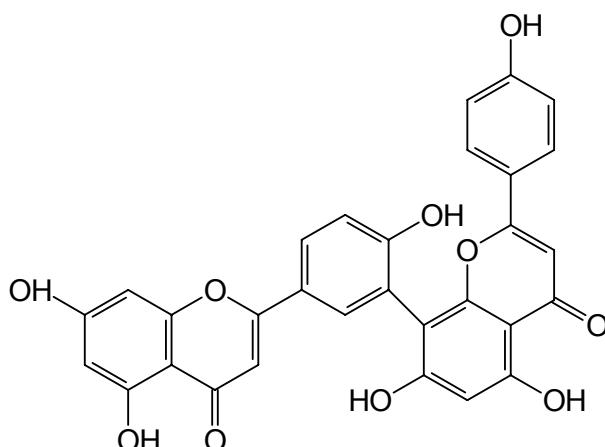
Adicionando-se hidróxido de sódio houve um deslocamento batocrômico de 55 nm na banda I, indicando uma possível substituição 4'-OH neste flavonóide. O espectro de metanol adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico proporciona um deslocamento batocrômico de 20 nm em relação ao espectro de metanol na banda I, indicando substituição em 5-OH e uma oxigenação em 6 (MABRY *et al.*, 1970).

Com a adição de acetato de sódio em relação ao espectro de metanol, ocorreu um deslocamento batocrômico de 16 nm na banda II em relação ao espectro de metanol. Um deslocamento na ordem de 5-20 nm na banda II é indício de uma hidroxila na posição 7. Já, com a adição de ácido bórico houve um deslocamento batocrômico na ordem de 20 nm em relação ao espectro de metanol na banda I, indicando uma substituição di-O-OH, confirmado pelo deslocamento hipsocômico da banda I, no espectro metanólico adicionado de cloreto de alumínio e ácido clorídrico em relação ao espectro metanólico com cloreto de alumínio (MABRY *et al.*, 1970).

Como a análise dos espectros de UV não foi totalmente conclusiva, procurou-se como alternativa a comparação com padrões de substâncias freqüentemente isoladas do gênero *Hypericum*, através de cromatografia em camada delgada. O fato do composto se apresentar como aglicona e a coloração esverdeada no cromatograma quando revelado com reagente natural e exposição

à luz ultravioleta, indicando ser uma flavona, levaram à hipótese de que poderia se tratar do biflavonóide amentoflavona, que tem sido frequentemente isolado de espécies do gênero (CROKETT *et al.*, 2005).

A análise cromatográfica foi realizada aplicando-se a substância HCN2 e padrões de alguns flavonóides, entre estes amentoflavona (padrão gentilmente cedido pelo prof. Dr. Valdir Cechinel Filho da Universidade do Vale do Itajaí, SC), num sistema de eluição com acetato de etila 100%, eluente adequado para flavonóides na forma de aglicona livre. Através da revelação com reagente natural e exposição à luz ultravioleta pôde-se constatar que a substância em questão apresentava perfil cromatográfico do biflavonóide amentoflavona por apresentar o mesmo fator de retenção e a mesma coloração depois de revelada.



Biflavonóides já foram isolados de diversas espécies do gênero *Hypericum* (BERGHÖFER & HÖLZL, 1986; KARTNIG *et al.*, 1996; BILIA *et al.*, 2002; JÜRGENLIEMK & NAHRSTEDT, 2002; CROKETT *et al.*, 2005). O biflavonóide amentoflavona é encontrado em um grande número de plantas com propriedades medicinais, incluindo *Hypericum perforatum* e *Ginkgo biloba* (HANRAHAN *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2005).

Tabela 3.3: Valores máximos de absorção no UV da substância HCN2

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I	Banda II	Banda I	Banda II	
MeOH	340	270	-	-	BI: flavonol com hidroxila em C3 substituída ou flavona
MeOH + NaOH	395	270	+55	0	Deslocamento batocrômico da ordem de 40-65 nm da Banda I, sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH.
MeOH + AlCl ₃	420, 350sh	280	+80	+10	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	375sh, 345	285	-60 (em relação ao espectro AlCl ₃) +20 (em relação ao espectro MeOH)	+5	Deslocamento hipsocrômico da Banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em orto no anel B. Deslocamento batocrômico na ordem de 17-20 nm da Banda I, em relação ao espectro metanol, é indicativo de 5-OH livre com oxigenação em 6
MeOH + NaOAc	380, 324 sh	274	+20	+16	Deslocamento batocrômico da Banda II, na ordem de 5-20 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 orto-di-OH no anel B

3.5.3.3 Substância HCN3

A substância HCN3 foi obtida como um sólido de cor caramelo. A análise cromatográfica revelou ser um flavonóide na forma de aglicona livre devido à polaridade e indicou tratar-se de um flavonol tendo-se em vista a coloração quando revelada com reagente natural após exposição à luz ultravioleta (MARKHAM *et al.*, 1975).

A interpretação dos espectros de ultravioleta da substância HCN3 propõe dois máximos de absorção em 280 e 350 nm, com um ombro em 394 nm, caracterizando uma flavona ou flavonol 3-OH podendo estar ou não substituído (MABRY *et al.*, 1970).

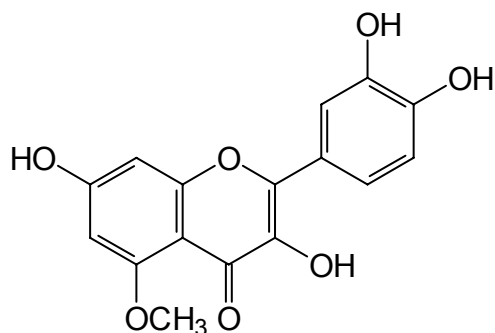
Com a adição de hidróxido de sódio, houve um deslocamento batocrômico de 74 nm e o aparecimento de um ombro em 330 nm em relação ao espectro metanólico. Este dado dá um indício de que haja uma hidroxila livre na posição 7 da molécula e uma hidroxila na posição 4', porém esta hidroxila na posição 7 não é confirmada, uma vez que apenas o deslocamento batocrômico de 8-20 nm na banda II no espectro metanol-acetato de sódio em relação ao espectro metanólico confirma a hidroxila livre na posição 7 (MABRY *et al.*, 1970).

Adicionando-se cloreto de alumínio e ácido clorídrico houve um aumento em 25 nm na banda I em relação ao espectro metanólico. O deslocamento hipsocrômico da banda I, em relação ao espectro metanol-cloreto de alumínio, indica a presença de diidroxilação em orto no anel B, confirmado pelo espectro metanólico com acetato de sódio e ácido bórico (MABRY *et al.*, 1970).

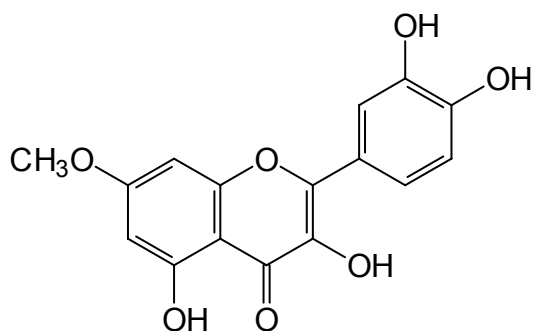
Esta substância foi comparada através de cromatografia em camada delgada, com padrões como quercetina, 3-O-metil-quercetina e 3,7-O-dimetil-quercetina, não se assemelhando a nenhum destes. Assim sendo, tendo em vista que muitos derivados da quercetina foram isolados previamente de espécies de *Hypericum* (CROKETT *et al.*, 2005) e este flavonóide não se assemelha aos

padrões empregados, propõe-se três estruturas para o composto isolado, que deverão ser confirmadas através de técnicas espectroscópicas.

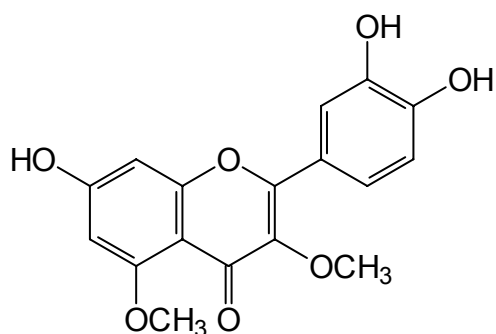
A primeira estrutura trata-se do composto 5-O-metil-quercetina, também conhecido por azaelatina, o segundo, 7-O-metil-quercetina (ramnetina) e a estrutura do terceiro composto trata-se do flavonóide 3,5-O-dimetil-quercetina, conhecido também como cariatina.



5-O-metil-quercetina



7-O-metil-quercetina



3,5-O-dimetil-quercetina

Tabela 3.4: Valores máximos de absorção no UV da substância HCN3

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I	Banda II	Banda I	Banda II	
MeOH	la lb 394sh, 350	280	-	-	BI: flavona ou flavonol com hidroxila em C3 substituída ou não.
MeOH + NaOH	424, 330sh	290	+74	+10	O aparecimento de uma nova banda ou ombro, entre 320-335 nm é indicativo da presença de 7-OH livre e uma OH na posição 4'.
MeOH + AlCl ₃	414	294sh, 282	+64	+2	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	392sh, 375	280	-39 (em relação ao espectro AlCl ₃) +25 (em relação ao espectro MeOH)	+2	Deslocamento hipsocrômico da Banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em orto no anel B.
MeOH + NaOAc	390sh, 346	280	-4	-	
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	368	286	+18 (em relação ao espectro MeOH)	+6	Deslocamento batocrômico de 12-30 nm na Banda I indica a presença de di-hidroxilação em orto no anel B

3.5.3.4 Substância HCN4

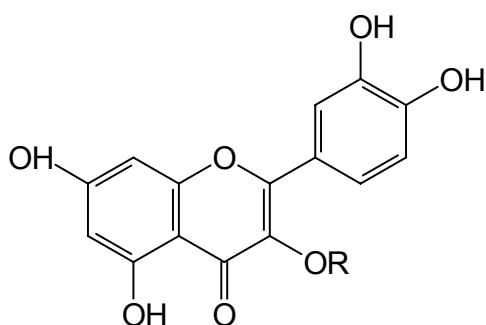
Através da análise cromatográfica da substância HCN4, pôde-se constatar de que a mesma era um flavonóide glicosilado tendo em vista o seu perfil cromatográfico (MARKHAM *et al.*, 1975).

Por intermédio da análise dos dados espectrais de ultravioleta da substância HCN4, verificou-se que a mesma possui máximos de absorção em 354 nm, um ombro em 286 nm, um ombro em 266 e 258 nm, indicando se tratar de um flavonol substituído na posição 3. Verificou-se ainda a presença de uma hidroxila livre em C7; isso foi evidenciado pelo deslocamento batocrômico de 17 nm da banda II, bem como pela ausência de um ombro no lado de comprimento de onda mais longo da banda I, após a adição de NaOAc na solução metanólica em análise (MABRY *et al.*, 1970).

O deslocamento batocrômico de 46 nm no espectro metanólico com cloreto de alumínio e ácido clorídrico na banda I em relação ao espectro metanólico, indicou a presença de uma hidroxila livre na posição 5 e confirmou-se a substituição em 3-OH. Por outro lado, o deslocamento hipsocrômico de 25 nm observado na banda I em relação ao espectro metanólico adicionado de cloreto de alumínio indicou a presença de diidroxilação em orto no anel B que é confirmada pelo deslocamento batocrômico de 21 nm no espectro metanólico com acetato de sódio e ácido bórico em relação ao espectro metanólico (MABRY *et al.*, 1970).

A interpretação dos espectros de HCN4 conduziu à estrutura de um flavonóide derivado da quercetina substituído na posição 3 por um açúcar.

A partir das conclusões obtidas pelos espectros de UV, foram realizadas análises cromatográficas, comparando-se o composto com padrões e pôde-se constatar que a substância HCN4 apresentou perfil cromatográfico do flavonóide derivado da quercetina, quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, também conhecido como hiperosídeo ou hiperina.



R= β -D-galactosil

Hiperosídeo é um flavonóide que vem sendo isolado com freqüência de espécies do gênero *Hypericum*. Em um estudo recente realizado por CROCKETT e colaboradores (2005) foi analisado o extrato metanólico de setenta e quatro espécies de *Hypericum*, através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para verificar a presença de flavonóides. Através da comparação com padrões comerciais, foi determinado que, entre espécies analisadas, o flavonóide mais freqüentemente encontrado foi o hiperosídeo, estando presente em cinquenta e duas espécies. Este flavonóide também foi caracterizado através de cromatografia em camada delgada em algumas espécies nativas do Rio Grande do Sul, como *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (SCHMITT *et al.*, 2001; DALL'AGNOL *et al.*, 2003). Porém, DALL'AGNOL e colaboradores (2003) não encontraram hiperosídeo em *H. connatum*. Esta diferença pode ser devido à técnica utilizada, à pequena quantidade dessa substância na planta analisada ou devido a variações edafoclimáticas, já que o meio ambiente, a hora do dia e a época do ano em que a coleta foi realizada exercem grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos vegetais (FALKENBERG *et al.*, 2003).

Hiperosídeo vem sendo isolado também de plantas de famílias como Compositae (FARNSWORTH *et al.*, 1968), Lauraceae (TIMMERMANN, *et al.*, 1995), Euphorbiaceae, (MANGA *et al.*, 2004), Ebenaceae (PRETORIUS *et al.*, 2004), entre outras.

Tabela 3.5: Valores máximos de absorção no UV da substância HCN4

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I	Banda II	Banda I	Banda II	
MeOH	la lb 354, 286sh	Ila I Ib 266 sh, 258	-	-	BI: flavonol com hidroxila em C3 substituída BII a e b: substituição orto-di-OH no anel B (C3' e C4')
MeOH + NaOH	360	266sh, 259	+4	+1	
MeOH + AlCl ₃	425	270	+71	+12	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	400, 365	275	-25 (em relação ao espectro AlCl ₃) +46 (em relação ao espectro MeOH)	+17	Deslocamento hipsocrômico da Banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em orto 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	360	275	+6	+17	Deslocamento batocrômico da Banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	375	260, 295sh	+21 (em relação ao espectro MeOH)	+2	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da Banda I confirma a presença de orto-di-OH no anel B

A presença deste flavonóide também é relatada para a família Rosaceae, principalmente em algumas espécies do gênero *Crataegus* (Rosaceae), conhecidas como “hawthorn”. Essas plantas são utilizadas para doenças do coração, destacando-se a espécie *C. oxyacantha*, utilizada desde o século XIX, que contém uma variedade de flavonóides que parecem ser os principais constituintes responsáveis pela atividade farmacológica de fitoterápicos à base de *Crataegus* (WAGNER, 1999; FONG & BAUMAN, 2002; LY, 2005).

Muitos estudos já foram realizados a fim de investigar a ação destes flavonóides como cardiotônicos e resultados promissores foram encontrados. O flavonóide hiperosídeo, em estudo realizado por SCHUSSLER e colaboradores (1995) que investigavam a influência dos flavonóides de espécies de *Crataegus* no fluxo coronariano, taxa e pressão do ventrículo esquerdo do coração bem como a velocidade de contração e relaxamento utilizando coração de porco, exibiu um acréscimo do fluxo coronário de 66%. Estudos clínicos realizados com extratos padronizados vêm apresentando eficácia como adjuvantes no tratamento de disfunções ventriculares esquerdas. Outros estudos demonstraram uma melhora na tolerância aos exercícios e sintomas da falência cardíaca leve a moderada (FONG & BAUMAN, 2002).

Porém, há resultados divergentes entre autores, pois alguns relatam que, embora extratos obtidos das espécies *C. oxyacantha* e *C. monogyna* relaxem o tônus muscular, os flavonóides presentes nos extratos não o afetariam (KIM *et al.*, 2000). Esses flavonóides, entre eles o hiperosídeo, atuam como antioxidantes, inibidores da ciclooxigenase e 5-lipoxigenase e da enzima elastase de neutrófilos; assim, efeitos adicionais como antiinflamatório e inibição da agregação plaquetária seriam esperados e não efeitos propriamente sobre o coração (WAGNER, 1999; MELZIG *et al.*, 2001; MANGA *et al.*, 2004).

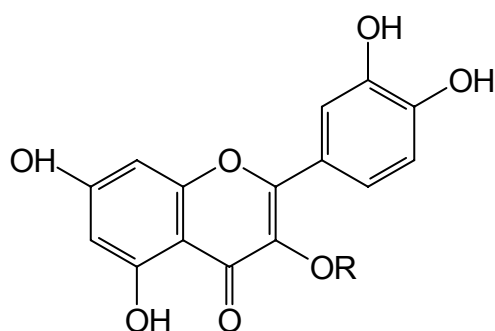
Mesmo com divergências entre autores sobre a(s) substância(s) responsável(is) pela ação cardiotônica de espécies do gênero *Crataegus*, é possível fazer uma analogia entre estas espécies e *H. connatum*, que é usada popularmente para o tratamento de angina no Rio Grande do Sul e pelos índios Guaranis (NOELLI, 1996; MENTZ *et al.*, 1997; RUSSO & SANCHEZ, 2001). Além

disso, esta espécie também é amplamente utilizada na medicina popular da América Latina, principalmente na Argentina, para o tratamento de doenças do coração, sendo indicado como tônico cardíaco e comercializado na forma macerada em solução hidroetanólica com o nome “Esencia Herbal N°17 Cabotoril” (RUSSO & SANCHEZ, 2001, ARCANODELSOL, 2006; SEPTIVALE, 2006) pois ambas espécies são utilizadas para tratamento de doenças do coração e possuem o flavonóide hiperosídeo.

3.5.3.5 Substância HCN5

Através da análise dos dados espectrais de ultravioleta da substância HCN5, verificou-se que esta possui o mesmo comportamento da substância HCN4 quando submetida ao tratamento com os reagentes de deslocamento, apresentando, portanto, o mesmo padrão de substituição. A substância, que apresentou máximos de absorção de 352 e 258 nm, com um ombro em 295 nm no espectro metanólico, trata-se também de um derivado da quercetina.

Por intermédio de cromatografia em camada delgada, comparando-se a substância HCN5 com padrões de flavonóides glicosilados derivados da quercetina, concluiu-se que a mesma apresenta padrão cromatográfico da substância guajaverina.



R= α -L-arabinopiranosil

Tabela 3.6: Valores máximos de absorção no UV da substância HCN5

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I	Banda II	Banda I	Banda II	
MeOH	352	Ila I Ib 295 sh, 258	-	-	BI: flavonol com hidroxila em C3 substituída BII a e b: substituição orto-di-OH no anel B (C3' e C4')
MeOH + NaOH	362	260	+10	+2	
MeOH + AlCl ₃	430	275	+78	+17	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	400, 360sh	270	-30 (em relação ao espectro AlCl ₃) +48 (em relação ao espectro MeOH)	+12	Deslocamento hipsocrômico da Banda I, em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em orto 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, 320 sh	270	+28	+12	Deslocamento batocrômico da Banda II, na ordem de 8-20 nm indica hidroxila livre em C7.
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	375	260	+23 (em relação ao espectro MeOH)	+2	Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm da Banda I confirma a presença de orto-di-OH no anel B

Este flavonóide havia sido isolado previamente por ROCHA e colaboradores (1995) de *H. brasiliense*.

3.6 CONCLUSÕES

A análise cromatográfica da fração *n*-hexano das raízes revelou a presença de diversos compostos fenólicos sem predomínio de componentes majoritários, com desenvolvimento de coloração similar entre eles, quando revelados com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. O perfil cromatográfico da fração metanólica indica a presença de substâncias fenólicas, principalmente derivados de ácidos fenólicos, evidenciados pela coloração esverdeada formada pela reação com reagente natural e expostos à luz ultravioleta.

Nas frações *n*-hexano e diclorometano das partes aéreas foi possível verificar a presença de uma substância majoritária, além de outras minoritárias através da análise cromatográfica. Esta substância majoritária foi isolada e identificada como hiperbrasilol B. Algumas das substâncias minoritárias também foram isoladas, mas ainda não foi possível elucidar suas estruturas.

Na fração metanólica das partes aéreas evidenciou-se a presença de substâncias majoritárias com características de flavonóides. Deste extrato foram isolados flavonóides com perfil cromatográfico de amentoflavona (HCN2), hiperosídeo (HCN4) e guaijaverina (HCN5), além de um flavonol com sua estrutura não totalmente definida (HCN3).

**4. CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL
DE *H. connatum* Lam.**

4.1 INTRODUÇÃO

Plantas têm sido usadas como recurso terapêutico popular e a literatura etnobotânica tem descrito, por séculos, o uso de extratos de plantas, infusões e pós para doenças de origem viral (VIJAYAN *et al.*, 2004).

Dentre os diversos tipos de infecções virais, aquelas causadas por herpesvírus são freqüentemente encontradas. A maioria das espécies animais, incluindo humanos, é hospedeira de herpesvírus e, em alguns casos, de duas ou mais espécies. Todas as infecções por herpesvirus possuem a importante propriedade de permanecerem latentes, na forma viável, persistindo por toda a vida. Algumas espécies de herpesvírus reativam de tempo em tempo do seu estado latente, podendo produzir infecção recorrente. São descritas na literatura oito espécies de herpesvírus humanos: herpesvírus simples (HSV)-1 e -2, citomegalovírus, herpesvírus zoster (Varicella Zoster), Epstein-Barr, herpesvírus humanos tipos 6, 7 e 8 (HUDSON, 1990; TIMBURY, 1997).

Herpesvírus simples (vírus ADN) causam uma variedade de doenças, geralmente na forma de vesículas, que varia em gravidade e, em alguns casos, podem se tornar uma ameaça à vida, especialmente em pacientes imunodeprimidos. Depois da primeira infecção, HSV persiste no hospedeiro pelo restante da vida. Há dois tipos de herpesvírus simples (HUDSON, 1990): tipo 1: mais encontrado em lesões oro-faciais e tipo 2 que causa principalmente lesões genitais.

Após o período de latência, HSV pode ser reativado causando freqüentemente infecções recorrentes em alguns pacientes, enquanto na maioria das pessoas as recorrências não são freqüentes. As infecções causadas pelo HSV-1 são muito comuns e a maioria afeta pessoas adultas. Este vírus está envolvido em diversas doenças oculares e pode causar queratite herpética em doenças imunopatológicas, que são associadas com cegueira (KHAN *et al.*, 2005).

Em relação ao tratamento, estão disponíveis substâncias como aciclovir, ganciclovir, valaciclovir e penciclovir, entre outros. Dentre estas, o aciclovir é o

mais freqüentemente utilizado. No entanto, o uso indiscriminado de medicamentos com base em nucleosídeos tem levado à seleção de cepas resistentes, especialmente em pacientes imunocomprometidos, sugerindo a busca de novos agentes antivirais para o tratamento destas infecções (VIJAYAN *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 2005).

Isto demonstra a grande necessidade de descoberta de novos compostos com atividade antiviral. Desta forma, a pesquisa de novos agentes tem se desenvolvido através de testes com numerosas plantas e produtos de origem natural frente a diferentes tipos de vírus e resultados promissores têm sido encontrados (ALARCON *et al.*, 1984; MONTANHA *et al.*, 1995; SIMONI *et al.*, 1996; BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999; BOURNE *et al.*, 1999; SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999; VIJAYAN *et al.*, 2004). A atividade antiviral de espécies do gênero *Hypericum* também tem sido estudada demonstrando resultados relevantes (TADA, 1991; TAYLOR *et al.*, 1996; SCHMITT *et al.*, 2001; VIJAYAN *et al.*, 2004).

4.2 OBJETIVOS

Os objetivos desta etapa do trabalho foram:

- testar a atividade antiviral dos extratos de partes aéreas e raízes de *Hypericum connatum* frente ao HSV-1;
- testar a atividade antiviral dos produtos isolados de *Hypericum connatum* frente ao HSV-1.

Os objetivos específicos foram:

- testar a atividade antiviral dos extratos aquosos, bruto e frações hexano, diclorometano e metanol das partes aéreas de *Hypericum connatum* frente ao herpesvírus simples tipo 1;

- testar a atividade antiviral dos extratos aquosos, bruto e frações hexano, diclorometano e metanol das raízes de *Hypericum connatum* frente ao herpesvírus simples tipo 1;
- testar a atividade antiviral de substâncias isoladas de *Hypericum connatum* frente ao herpesvírus simples tipo 1.

4.3 REVISÃO DA LITERATURA

Esta revisão tem como objetivo fornecer uma visão geral de estudos realizados com produtos naturais frente aos herpesvírus, bem como com plantas da família Guttiferae, em especial aquelas do gênero *Hypericum*, já que não há muitos relatos em relação à espécie estudada.

4.3.1 Atividade antiviral de extratos e produtos isolados

Com exceção do gênero *Hypericum* (que será abordado na seção 4.3.2), não foram encontrados relatos de estudos em relação ao herpesvírus em plantas da família Guttiferae, porém, estudos com espécies de outras famílias revelaram resultados promissores, em especial, quando testados os compostos fenólicos, como por exemplo, flavonóides (AMARAL *et al.*, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2001; DU *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2005).

O extrato aquoso das partes aéreas de *Geranium sanguineum* L. (Geraniaceae), planta usada popularmente para o tratamento de lesões de pele, inibiu significativamente a replicação do vírus herpes simples tipo 1, cepa Kupka, na concentração de 200 µg/ml, quando avaliado pelo método da inibição do efeito citopático viral (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999).

Os extratos metanólicos das partes aéreas de *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride (Lythraceae) e *Tillandsia usneoides* (L.) L. (Bromeliaceae), conhecidas popularmente como sete-sangrias e barba-de-velho, foram testados frente ao HSV-1 cepa KOS, pelo método de inibição do efeito citopático, demonstrando atividade anti-herpética promissora, com índices de seletividade de

90 e 65, quando comparadas ao controle aciclovir (SI>200). Já os extratos butanólico de *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown (Verbenaceae), diclorometano, acetato de etila e *n*-butanólico de *T. usneoides*, assim como etanólico e *n*-butanólico de *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Cucurbitaceae) inibiram a cepa 29R/aciclovir resistente do HSV-1 sugerindo que compostos presentes nestes extratos atuem por um mecanismo diferente do aciclovir (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005).

As frações acetato de etila e uma mistura de quercetina-3-O-glicosídeo (isoquercitrina) e quercetina-3-O-galactosídeo (hiperosídeo) de *Chamaesyce thymifolia* Millsp. (Euphorbiaceae) mostraram atividade antiviral frente ao HSV-1, cepa aciclovir resistente, nas concentrações de 6 µg/ml (inibição de 43,8%) e 17 µg/ml (inibição de 58,3%), respectivamente (AMARAL *et al.*, 1999).

Extratos e frações ricas em flavonóides de frutos e folhas de *Vitex polygama* Cham. (Verbenaceae) foram testados contra o herpesvírus simples tipo 1 aciclovir resistente (ACV^R-HSV-1). Ambos extratos acetato de etila, de frutos e flores, exibiram atividade antiviral dose dependente. Na concentração máxima não tóxica às células, 50 µg/ml e 25 µg/ml, inibiram em 85,2% e 73,7% a atividade do vírus, respectivamente, pelo método da redução do título viral (GONÇALVES *et al.*, 2001).

O flavonóide leachianona G isolado de *Morus alba* L. (Moraceae), mostrou potente atividade antiviral contra o HSV-1 (15577) em células VERO na concentração de 1,6 µg/ml inibindo em 50% a multiplicação do vírus, quando utilizado o método da inibição do efeito citopático viral (DU *et al.*, 2003).

4.3.2 Atividade antiviral de espécies do gênero *Hypericum*

Algumas espécies do gênero *Hypericum* são usadas popularmente para o tratamento de infecções virais, como é o caso da espécie *Hypericum perforatum* que é utilizada popularmente na Grécia contra herpes zoster. Suas flores juntamente com óleo de oliva são expostas ao sol pelo período de uma semana,

obtendo-se uma solução de coloração alaranjada, que é aplicada na área afetada (MALAMAS & MARSELOS, 1992).

No estudo realizado por TAYLOR e colaboradores (1996), a atividade antiviral dos extratos metanólicos de três espécies de *Hypericum* foi testada utilizando o método da inibição do efeito citopático para a análise. *H. uralum* mostrou-se parcialmente ativo contra os três tipos de vírus testados: herpesvírus simples tipo 1 (HSV-1), Sindbis (SINV) e poliovírus 1, nas concentrações de 200, 100 e 200 µg/ml respectivamente; *H. cordifolium* mostrou atividade somente contra os vírus envelopados HSV-1 e SINV, nas concentrações de 100 e 50 µg/ml, respectivamente; e *H. cordifolium* não mostrou atividade antiviral frente a esses vírus.

Em 2004, VIJAYAN e colaboradores testaram os extratos metanólicos das partes aéreas de *Hypericum mysorense* e *H. hookerianum*, plantas usadas tradicionalmente no tratamento da ansiedade e inflamações, quanto à atividade antiviral; essas mostraram atividade frente ao HSV-1 em concentração inibitória 50% (CC₅₀) de 100 e 50 µg/ml, respectivamente, determinadas pela inibição do efeito citopático viral. Estes resultados sugerem que esses extratos possuem substâncias com atividade antiviral, mas estas estão presentes em quantidades insuficientes para inativar todas as partículas virais infectantes. É possível que a elucidação estrutural dos constituintes ativos destas plantas seja uma forma de encontrar novos e efetivos agentes antivirais.

No estudo realizado por SCHMITT e colaboradores (2001), três espécies de *Hypericum* (*H. connatum*, *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum*) nativas do sul do Brasil foram testadas quanto a sua atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência felina (FIV), um vírus envelopado de ARN que causa o decréscimo de células CD4⁺. Extratos aquoso, aquoso com baixa concentração de taninos e metanólico foram testados, sendo que o extrato aquoso das três espécies foi tóxico em todas as concentrações. Neste trabalho, o extrato aquoso com baixa concentração de taninos não causou inibição do FIV. No entanto, um pequeno número de partículas virais foi observado no sobrenadante quando

células infectadas com FIV foram tratadas com o extrato metanólico de *H. connatum*. Estes resultados sugerem que as espécies investigadas do gênero *Hypericum* contêm compostos com potencial atividade antiviral contra lentivírus, em especial, a espécie *Hypericum connatum*.

Hipericina e *pseudo*-hipericina, produtos isolados de *H. perforatum*, possuem potente atividade anti-retroviral, sendo ambas efetivas na prevenção das manifestações virais tanto *in vitro* quanto *in vivo* quando administradas em ratos, nas quantidades de 10 a 50 µg por animal, após a infecção pelo vírus leucemia *friend* (FV), impedindo a esplenomegalia induzida por esse vírus (MERUELO *et al.*, 1988).

4.3.3 Outras atividades biológicas do gênero *Hypericum*

4.3.3.1 Atividade antidepressiva

Os extratos de *Hypericum perforatum* têm se mostrado efetivos no tratamento da depressão leve a moderada, porém seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido. Seus extratos empregados no tratamento sub-crônico reduzem os níveis elevados de corticosterona e cortisol cerebrais associados à depressão (FRANKLIN *et al.*, 2004). Seu efeito antidepressivo deve-se provavelmente à hiperforina, um derivado de floroglucinol (ZANOLI *et al.*, 2002). Sua eficácia e tolerabilidade são inquestionáveis e nos estudos clínicos em que a atividade é comparada com outros antidepressivos, seus menores efeitos colaterais fazem da mesma uma planta medicinal segura. Os extratos de *H. perforatum* têm sido utilizados como antidepressivo sem efeitos colaterais específicos, porém, recentemente tem-se discutido sobre o potencial de interação desta planta com outros fármacos, pois a mesma potencializa certas enzimas do citocromo P450, causando diminuição na concentração sérica de substâncias como a varfarina, digoxina e teofilina, por exemplo (CHATTERJEE *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 2001; BILIA *et al.*, 2002; TRAUTMANN-SPONSEL & DIENEL, 2004).

Também foi demonstrada atividade antidepressiva das infusões das partes aéreas de *Hypericum canariense*, *H. landulosum*, *H. reflexum* e *H. grandifolium* em ratos, porém, sem indução de relaxamento muscular, propriedades anticolinérgicas e sedativas (PRADO *et al.*, 2002).

ROCHA e colaboradores, em 1995, observaram que extratos de *Hypericum brasiliense* coletado no sudeste do Brasil inibiram a atividade das monoaminooxidasas, enzimas importantes na regulação de aminas fisiológicas, podendo contribuir no controle da depressão.

Para avaliar a atividade inibitória das monoaminooxidasas (MAO) A e B, extratos metanólicos e de éter de petróleo, clorofórmio, e frações metanólicas de *Hypericum caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. cordatum*, *H. myrianthum*, *H. piriái*, *H. polyanthemum* e *H. brasiliense*, nativas do sul do Brasil, foram testados em cérebros de ratos em diferentes concentrações. O benzopirano HP3 (5-hidroxi-6-isobutiril-7-metóxi-2,2dimetilbenzopirano) isolado de *H. polyanthemum* também foi testado mostrando significativa atividade. Os extratos lipofílicos de *H. polyanthemum*, *H. caprifoliatum* e *H. piriái* mostraram atividade inibitória da MAO A maior que 50% (GNERRE *et al.*, 2001).

Em outro estudo, VIANA e colaboradores (2005), testaram extratos de *H. caprifoliatum* quanto à atividade antidepressiva utilizando o teste do nado forçado em ratos e camundongos; os extratos brutos e fração enriquecida com HC1 (um derivado de floroglucinol) reduziram o tempo de imobilidade, sugerindo um resultado promissor.

4.3.3.2 Atividade antimicrobiana

Espécies do gênero *Hypericum* têm revelado importante atividade antimicrobiana. Como exemplos podem-se citar *Hypericum mysoreense*, *H. patulum* e *H. hookerianum*, quando seus extratos de éter de petróleo, acetona, clorofórmio e metanol foram testados (MUKHERJEE *et al.*, 2001; MUKHERJEE *et al.*, 2002); o óleo volátil da espécie *H. remeliacum* que mostrou moderada atividade contra seis bactérias gram-positivas e gram-negativas (COULADIS *et*

al., 2003); o derivado de floroglucinol chinensina, isolado das flores de *H. chinense* que possui atividade antibacteriana (TADA, 1991) e de *H. perforatum* e hiperforina que também apresenta essa atividade (VEROTTA *et al.*, 1999; ADAM *et al.*, 2002). O óleo volátil de *Hypericum hyssopifolium* na concentração de 60 µg/ml teve atividade praticamente igual ao controle frente a *Candida albicans*, quando utilizado o método de difusão em disco (TOKER *et al.*, 2006).

Os extratos metanólico, acetônico e clorofórmico das partes aéreas de *Hypericum kazdaghensis* mostraram forte atividade antimicrobiana contra várias bactérias, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* quando comparados ao controle gentamicina (DULGER & GONUZ, 2005).

O óleo volátil de *Hypericum maculatum* mostrou forte atividade antimicrobiana *in vitro* contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (GUDZIC *et al.*, 2002). Já o óleo volátil de *H. coris* inibiu totalmente o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* na concentração de 100 µg/ml e parcial de *Staphylococcus aureus* e *S. cerevisiae* nas concentrações de 100 e 25 µg/ml, respectivamente, pelo método de difusão (SCHWOB *et al.*, 2002).

Diversos extratos de *Hypericum canariense*, *H. glandulosum* e *H. grandifolium* foram investigados quanto a sua atividade antimicrobiana utilizando o método de microdiluição e difusão em disco. Os extratos metanólico e clorofórmico de *H. canariense*, bem como o extrato metanólico, butanólico e clorofórmico de *H. glandulosum* e *H. granifolium* exibiram atividade antibacteriana contra quatro tipos de bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus* var. *mycoides*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e a gram-negativa *Bordetella bronchiseptica* (RABANAL *et al.*, 2002).

No estudo realizado por DALL`AGNOLL e colaboradores (2003), o extrato bruto metanólico de seis espécies de *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*) nativas do sul do

Brasil foi analisado quanto à atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos (bactérias e fungos), testando-se concentrações de 100 µg/ml e 200 µg/ml utilizando-se o método de difusão em ágar. O extrato que se mostrou mais ativo foi de *H. caprifoliatum* que mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus* na concentração de 100 µg/ml. Somente *H. polyanthemum* e *H. ternum* foram ativos contra *Bacillus subtilis*, o primeiro nas duas concentrações testadas e o segundo somente na concentração de 200 µg/ml. Neste mesmo ensaio microbiológico, verificou-se que o extrato bruto metanólico de todas as espécies retardou o crescimento de *Candida albicans*.

O estudo de JAYASURIYA e colaboradores, realizado em 1989, revelou que o extrato hexano das raízes e partes aéreas de *H. drummondii* apresentou atividade importante contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e a bactéria ácido-resistente *Mycobacterium smegmatis*, em ensaio de difusão em ágar.

4.3.3.3 Atividade antioxidante

O estudo realizado por SILVA e colaboradores (2005), avaliou a atividade antioxidante do extrato etanólico de *Hypericum perforatum* e suas frações. De acordo com os autores, a fração contendo flavonóides e/ou ácidos fenólicos contribui para a atividade anti-radicais livres. A peroxidação lipídica induzida com ascorbato/Fe²⁺ foi significativamente reduzida na presença do extrato e das frações contendo flavonóides e/ou ácidos fenólicos. A fração contendo agliconas de flavonóides foi descrita como a responsável pela maior parte da proteção contra a peroxidação lipídica.

O tratamento com infusão de *Hypericum androsaemum* em hepatócitos isolados de ratos induzidos com peróxido de *tert*-butila mostrou que esta, nas concentrações 16, 62 e 250 µg/ml, previne o extravasamento da lactato desidrogenase e peroxidação lipídica causados pelo tratamento com peróxido de *tert*-butila por 30 minutos. No entanto, ocorreram alterações na homeostasia como depleção total nos níveis de glutathiona, indicando que os derivados desta planta

não podem ser considerados como um meio seguro para o tratamento antioxidativo (VALENTÃO *et al.*, 2004).

4.3.3.4 Atividade antiinflamatória

A espécie *Hypericum triquetrifolium* demonstrou atividade antiinflamatória quando o modelo de edema de pata foi utilizado em ratos machos, tratados intraperitonealmente com o extrato nas concentrações 25, 50, 60 mg/kg, em comparação ao grupo controle (OZTURK *et al.*, 2002).

4.3.3.5 Atividade analgésica

O estudo realizado por VIANA e colaboradores (2003) com as espécies *Hypericum caprifoliatum* e *H. polyanthemum* para avaliação da atividade antinociceptiva mostrou que os extratos cicloexânicos das duas espécies de *Hypericum*, administrados pelas vias intra-peritonal e oral em roedores, quando avaliados no teste da placa quente, apresentam atividade. O pré-tratamento com naloxona, um antagonista opióide, aboliu completamente este efeito, indicando que a analgesia é mediada por mecanismos opióides. No entanto, apesar do extrato metanólico de *H. caprifoliatum* também apresentar ação analgésica, este efeito é apenas parcialmente relacionado a este sistema, uma vez que o bloqueio causado por naloxona foi apenas parcial para via intra-peritonal e não afetou a analgesia do extrato administrado por via oral.

A ação analgésica parece estar também relacionada com o extrato hidroetanólico de *Hypericum cordatum*, uma vez que este promoveu um aumento no tempo de resposta a estímulos térmicos quando administrado em roedores nas doses de 50 mg/kg (via intraperitoneal) e 500 mg/kg (via oral) (MENDES *et al.*, 2002).

4.3.3.6 Atividade antiproliferativa

Devido ao efeito antiproliferativo dos inibidores da recaptção de serotonina demonstrado em tumores de próstata e, sendo *Hypericum perforatum*

um representante dessa classe, o efeito do tratamento com o extrato metanólico de *H. perforatum* em células tumorais de próstata de humanos *in vitro* e *in vivo* foi analisado. Este estudo demonstrou uma significativa redução do crescimento do tumor e do número de metástases sugerindo que este extrato pode ter potencial para o tratamento do câncer de próstata (MARTARELLI *et al.*, 2004).

A fim de avaliar a atividade antiproliferativa de seis espécies de *Hypericum* nativas da região sul do Brasil, seus extratos brutos e frações (hexano, clorofórmio e metanol) foram testados. Os extratos brutos metanólicos de *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. connatum* frente a HT-29 (células de carcinoma de cólon humano) e *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* frente a H-460 (células de carcinoma de pulmão), foram considerados antiproliferativos pois inibiram de 75% o crescimento celular na concentração de 100 µg/ml. Foram consideradas ativas as frações hexânicas de *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, *H. ternum* em HT-29, a fração hexânica de *H. caprifoliatum* em H-460, e a fração clorofórmica de *H. polyanthemum* em U-373 (FERRAZ *et al.*, 2005b).

4.3.3.7 Outras atividades

A erva-de-São-João (*H. perforatum*) inibiu a transmissão excitatória da bexiga urinária de ratos e a contratilidade da musculatura lisa e seu uso deve ser avaliado em pacientes deprimidos com incontinência urinária (CAPASSO *et al.*, 2004).

A espécie *Hypericum ulinosum* é amplamente distribuída no México e América Central. No México, o chá preparado a partir dos caules, folhas e flores era usado pelos nativos para o tratamento da diarreia (TAYLOR *et al.*, 1969).

Uma das plantas medicinais de uso popular no Uzbequistão é *Hypericum scabrum*, sendo utilizada para o tratamento de várias desordens como hepática e intestinal, reumatismo e cistite (MATSUHISA *et al.*, 2002).

4.4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.4.1 Preparo das soluções teste

4.4.1.1 Preparo do material vegetal

O material vegetal, imediatamente após a coleta, foi selecionado, seco em ambiente arejado, ao abrigo da luz direta e triturado em moinho de facas.

4.4.1.2 Extração

Para obtenção dos extratos a serem testados, o material vegetal foi submetido à maceração estática a frio utilizando-se como solventes: metanol (para a preparação do extrato bruto) e, em polaridade crescente, *n*-hexano, diclorometano e metanol, respectivamente, obtendo-se suas frações, além de etanol e uma mistura hidro-etanólica (1:1, V:V). Os extratos aquosos das raízes e partes aéreas denominados “a frio” foram preparados por maceração estática; os demais extratos aquosos foram preparados a partir da decocção por 15 minutos em temperaturas de 50°C e 100°C, utilizando-se água destilada como solvente.

No desenvolvimento deste trabalho foram utilizados os seguintes solventes: *n*-hexano, diclorometano, metanol e etanol, todos grau p.a., de procedência Grupo Química[®], Reagen[®] e Merck[®], além de água destilada.

A eliminação do solvente utilizado para extração e concentração dos extratos foi realizada sob pressão reduzida, em aparelho de evaporação rotatório, utilizando-se temperatura não superior a 55°C.

4.4.1.3 Preparo das soluções

Para os testes de citotoxicidade e atividade antiviral as amostras dos extratos vegetais foram preparadas a uma concentração inicial de 40 mg/ml. Para os extratos vegetais aquosos foi utilizada água bidestilada estéril como solvente e

para os demais, foi acrescentado dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração máxima de 0,019%.

Os produtos HCH1, isolado da fração *n*-hexano das partes aéreas, e HCN2, HCN3, HCN4 e HCN5 isolados da fração metanólica também das partes aéreas do vegetal, foram solubilizados em DMSO e água bidestilada estéril na concentração inicial de 10 mg/ml. Devido à ausência de dados de citotoxicidade em células VERO e de atividade antiviral dos compostos isolados, estes produtos foram testados em uma ampla faixa de concentração (partindo de 2,5 mg/ml a 0,039 mg/ml). Foi acrescentado dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração máxima de 0,019%.

4.4.2 Cultura celular

4.4.2.1 Linhas celulares

Foram utilizadas células VERO, cultura contínua de fibroblastos isolados de rins de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), linhagem ATCC CCL-81, cultivadas em meio de cultura mínimo essencial de Eagle (MEM) com 10% de soro fetal bovino, antimicrobiano enrofloxacino (10 mg/ml de MEM) e o antifúngico anfotericina B (2 mg/ml de MEM).

Esta linhagem celular foi escolhida em função de sua sensibilidade aos vírus selecionados para os estudos. O efeito citopático provocado pelos vírus é claro, reprodutível e fácil de observar ao microscópio invertido.

4.4.2.2 Conservação celular

As células foram cultivadas em frascos de 75 cm², estéreis, para cultura celular e em meio de cultura e soro bovino fetal, a 37°C, atmosfera úmida, em uma mistura de ar/CO₂ (95%/5%).

4.4.3 Preparo das placas de microtitulação

4.4.3.1 Tripsinização

Após descarte do meio de cultura de células, o tapete celular foi lavado com tampão PBS estéril; a seguir foi adicionada tripsina; o excesso foi descartado e o frasco de cultura foi incubado a 37°C até dissociação completa do tapete celular. As células foram, então, ressuspensas em MEM com soro bovino fetal e separadas por aspiração. Esta suspensão celular foi submetida à contagem celular em câmara de Fuchs-Rosenthal, para a preparação de uma suspensão celular com aproximadamente 400.000 células/ml. Foram colocados 100 µl desta suspensão em cada poço da placa de 96 poços, ou seja, aproximadamente 40.000 células por poço. As placas foram incubadas em estufa com 5% de CO₂ e atmosfera úmida por 24 horas. Os poços das bordas das placas não foram utilizados, sendo preenchidos apenas com 200 µl de PBS.

4.4.4 Vírus utilizados

Os estoques do vírus herpes simples tipo 1 cepas KOS, provenientes da Université de Rennes, França e ATCC-VR733, foram preparados a partir da infecção de culturas de células VERO, incubadas por 1 a 2 dias, congeladas a –70°C, descongeladas e centrifugadas. O sobrenadante foi dividido em criotubos de 1 ml e mantidos em nitrogênio líquido até o momento do uso.

4.4.5 Avaliação da citotoxicidade das substâncias em teste

A determinação da concentração máxima não tóxica (CMNT) e da concentração que provoca alteração morfológica em aproximadamente 50% do tapete celular (CC₅₀) foi realizada pela técnica da alteração morfológica (MONTANHA *et al.*, 2004)

Todos os extratos, separadamente, foram exatamente pesados (40 mg) e colocados em tubos eppendorf; cada extrato foi separadamente dissolvido, sendo os extratos aquosos em 1 ml de água bidestilada e os demais, em 0,150 ml de DMSO e 0,850 ml de água bidestilada, fornecendo assim concentrações de 40 mg/ml. Foi, então, realizada a adição de diferentes diluições (partindo-se de 20 mg/ml até a diluição de 0,039 mg/ml) dos extratos à cultura celular. Para as substâncias HCH1, HCN2, HCN3, HCN4 e HCN5, foram pesados 10 mg de cada em tubos eppendorf e adicionado 0,150 ml de DMSO e 0,850 ml de água bidestilada, perfazendo uma concentração de 10 mg/ml. Posteriormente foram adicionadas diluições ao meio dessas soluções partindo-se da concentração de 2,5 mg/ml até a concentração de 0,156 mg/ml à cultura celular. O efeito citotóxico (caracterizado pelo aspecto desorganizado, arredondado e granular das células) foi verificado em relação ao controle, após 72 horas de incubação a 37°C, através da observação do aspecto do tapete celular ao microscópio invertido (MONTANHA *et al.*, 1995).

4.4.6 Determinação do efeito citopático viral

O efeito citopático (ECP) observado para o vírus da herpes compreende alterações que se caracterizam pelo arredondamento celular, desorganização do tapete, formando, algumas vezes, focos de aglomerados celulares arredondados ou mesmo destruindo completamente o tapete celular.

Esta atividade foi realizada em placas de microtitulação e medida pela inibição do efeito citopático provocado pelo vírus. Os extratos vegetais e substâncias isoladas foram adicionados sobre o tapete celular pré-formado em placas preparadas com 24 horas de antecedência (conforme descrito no item 4.4.3) em diferentes concentrações - na CMNT (determinada anteriormente) e mais três diluições inferiores a CMNT (CMNT/2, CMNT/4 e CMNT/8) e o vírus (cepas KOS e ATCC-VR733) foi inoculado a 100 doses infectantes. Após 72 horas de incubação a 37°C, as placas foram analisadas em microscópio invertido para determinação da inibição do efeito citopático viral (MONTANHA *et al.*, 2004).

O ensaio para a determinação do efeito citopático viral foi realizado em triplicata. Cada análise foi realizada concomitantemente com o controle celular, o controle viral e o controle positivo. Como controle positivo de inibição foi utilizado aciclovir (Sigma) na concentração de 10 µg/ml. Também foram realizados controles virais para confirmar o efeito citopático a 100 doses infectantes (DI) e controle celular para confirmar a integridade do tapete celular, este último na ausência de vírus e amostra teste.

Ao mesmo tempo em que era realizado o estudo da atividade antiviral, controlou-se a toxicidade dos extratos, repetindo-se o teste de citotoxicidade na mesma placa. Um desenho esquemático do ensaio de determinação do efeito citopático viral é apresentado na Figura 4.1.

O efeito citopático causado pelo vírus foi estimado de acordo com uma escala que varia de 1 a 5, conforme o grau de destruição do tapete celular (ANDRIGHETTI-FRÖHNER, 2003):

- 1= de 0 a 20% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 2= de 21 a 40% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 3= de 41 a 60% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 4= de 61 a 80% aproximadamente do tapete celular infectado;
- 5= de 81 a 100% aproximadamente do tapete celular infectado.

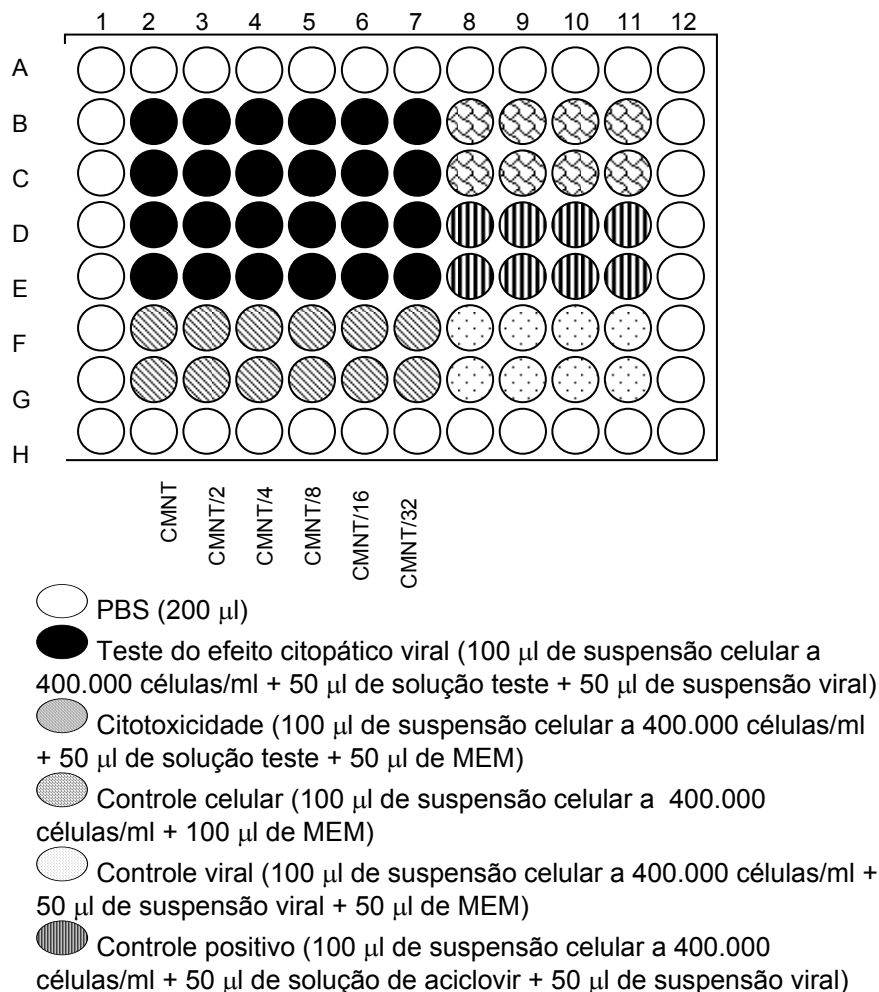


Figura 4.1: Esquema da disposição da placa de microtitulação utilizada para o ensaio de determinação do efeito citopático viral

4.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A espécie *Hypericum connatum* é usada popularmente na região sul do Brasil para o tratamento de feridas de boca (JIMÉNEZ, 1980; MENTZ *et al.*, 1997). Levando-se em consideração que estas feridas poderiam ter origem viral e não sendo mencionado qual é a parte da planta utilizada, foram testados tanto as raízes quanto as partes aéreas frente ao herpesvírus tipo 1.

4.5.1 Avaliação da citotoxicidade

Quando a amostra (extratos e substâncias) submetida ao teste de atividade antiviral é citotóxica (e como o vírus é um parasita absoluto), esta citotoxicidade pode ser confundida com uma falsa atividade antiviral, pois ambas levam à morte celular. Portanto, tornou-se necessário um estudo prévio para avaliar a influência destas amostras sobre a cultura celular, permitindo assim que o teste de atividade antiviral seja realizado em concentrações subtóxicas.

As Tabelas 4.1 e 4.2 apresentam as concentrações que provocaram alteração morfológica em aproximadamente 50% do tapete celular (CC_{50}) e as concentrações máximas não tóxicas (CMNT) para cada um dos diferentes extratos e compostos testados obtidas pelo ensaio de citotoxicidade.

Observa-se, em geral, que entre os extratos analisados, aqueles preparados com solventes orgânicos apresentam uma CMNT inferior aos preparados com água bidestilada. Isto indica que substâncias mais apolares extraídas por estes solventes tendem a ser mais tóxicas que substâncias polares extraídas pela água.

Os extratos aquosos tanto das raízes quanto das partes aéreas preparados a 100°C, apresentaram CMNT superior aos extratos aquosos preparados a 50°C, sugerindo uma degradação de substâncias que possuam algum efeito tóxico quando estas são expostas a elevadas temperaturas, embora o extrato aquoso a frio das partes aéreas tenha sido o menos tóxico.

Dentre os extratos das partes aéreas, a fração metanólica foi a mais tóxica (CMNT=0,039 mg/ml) e o extrato aquoso preparado a frio foi o menos tóxico (CMNT=0,312 mg/ml). Em relação aos extratos preparados com as raízes, o hidroetanólico e a fração metanólica, também na concentração de 0,039 mg/ml foram os mais tóxicos à célula. O extrato com maior CMNT foi o aquoso preparado a 100°C (CMNT=0,156 mg/ml), sendo o menos tóxico dos extratos obtidos das raízes frente às células VERO ATCC CCL-81.

Entre os compostos isolados, a substância HCH1 (CMNT=0,039 mg/ml) apresentou-se como sendo a mais tóxica, e a HCN4 (CMNT=2,5 mg/ml) como a menos tóxica para as células, como descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.1: Resultados do ensaio de citotoxicidade para os extratos testados

Parte do vegetal utilizada	Tipo de extrato	CC ₅₀ (mg/ml)	CMNT (mg/ml)
Partes aéreas	Fração hexano	0,156	0,078
	Fração diclorometano	0,156	0,078
	Fração metanol	0,078	0,039
	Bruto	0,156	0,078
	Aquoso a frio	0,625	0,312
	Aquoso a 50° C	0,156	0,078
	Aquoso a 100° C	0,312	0,156
	Hidroetanólico	0,156	0,078
	Etanólico	0,156	0,078
Raízes	Fração hexano	0,156	0,078
	Fração diclorometano	0,156	0,078
	Fração metanol	0,078	0,039
	Bruto	0,156	0,078
	Aquoso a frio	0,156	0,078
	Aquoso a 50° C	0,156	0,078
	Aquoso a 100° C	0,312	0,156
	Hidroetanólico	0,078	0,039
	Etanólico	0,156	0,078

CC₅₀ = concentração que provoca alteração morfológica em aproximadamente 50% do tapete celular

CMNT = concentração máxima não tóxica

Tabela 4.2: Resultados do ensaio de citotoxicidade para os produtos isolados

Produto	CC ₅₀ (mg/ml)	CMNT (mg/ml)
HCH1	0,078	0,039
HCN2	0,156	0,078
HCN3	1,25	0,625
HCN4	ND	2,5
HCN5	1,25	0,625

ND = não determinado

4.5.2 Teste da atividade antiviral *in vitro*

A atividade antiviral de muitos extratos vegetais tem sido demonstrada nos últimos anos (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999; GONÇALVES *et al.*, 2001; DU *et al.*, 2003, ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005). Assim, os extratos obtidos da espécie *H. connatum* foram avaliados quanto a sua atividade anti-HSV-1 cepas KOS e ATCC-VR733 pelo método da inibição do efeito citopático viral, estimado de acordo com a escala proposta no item 4.4.6, levando-se em consideração o grau de destruição do tapete celular. Os resultados dos ensaios para os extratos e substâncias isoladas que apresentaram atividade anti-HSV-1, cepas KOS e ATCC-VR733, estão representados nas Figuras 4.2 e 4.3, respectivamente.

A fração *n*-hexano das raízes foi a mais ativa entre os extratos testados, inibindo em mais de 80% o efeito citopático do HSV-1 cepa KOS na concentração de 0,078 mg/ml. Na concentração de 0,039 mg/ml, a inibição foi de aproximadamente 50% para a mesma cepa viral. Para a cepa ATCC-VR733, a inibição ocorreu em proporções menores - a concentração de 0,078 mg/ml da fração hexano inibiu em torno de 40 a 60% a ação do vírus e a concentração 0,039 mg/ml inibiu em menos de 20% o efeito citopático da cepa ATCC-VR733.

O extrato bruto das raízes, na concentração de 0,078 mg/ml, inibiu o efeito citopático da cepa KOS em torno de 40 a 60%; já para a cepa ATCC-VR733, a ação foi menor, com inibição da ação viral menor que 20%. Tal fato propõe que,

levando-se em consideração os extratos testados, a cepa KOS seria mais resistente que a cepa ATCC-VR733.

Devido à dificuldade na solubilização e por conseqüência a influência na reprodutibilidade dos resultados para a fração diclorometano das raízes, extrato bruto e hidroetanólico das partes aéreas não foi possível apresentar o resultado da atividade anti-HSV-1 desses extratos frente as duas cepas testadas. As demais amostras testadas (frações *n*-hexano, diclorometano e metanol, extratos aquoso preparado a frio, aquoso preparado a 50°C, aquoso preparado a 100°C e etanólico das partes aéreas e fração metanol, extratos aquoso preparado a frio, aquoso preparado a 50°C, aquoso preparado a 100°C, hidroetanólico e etanólico das raízes), não apresentaram atividade antiviral.

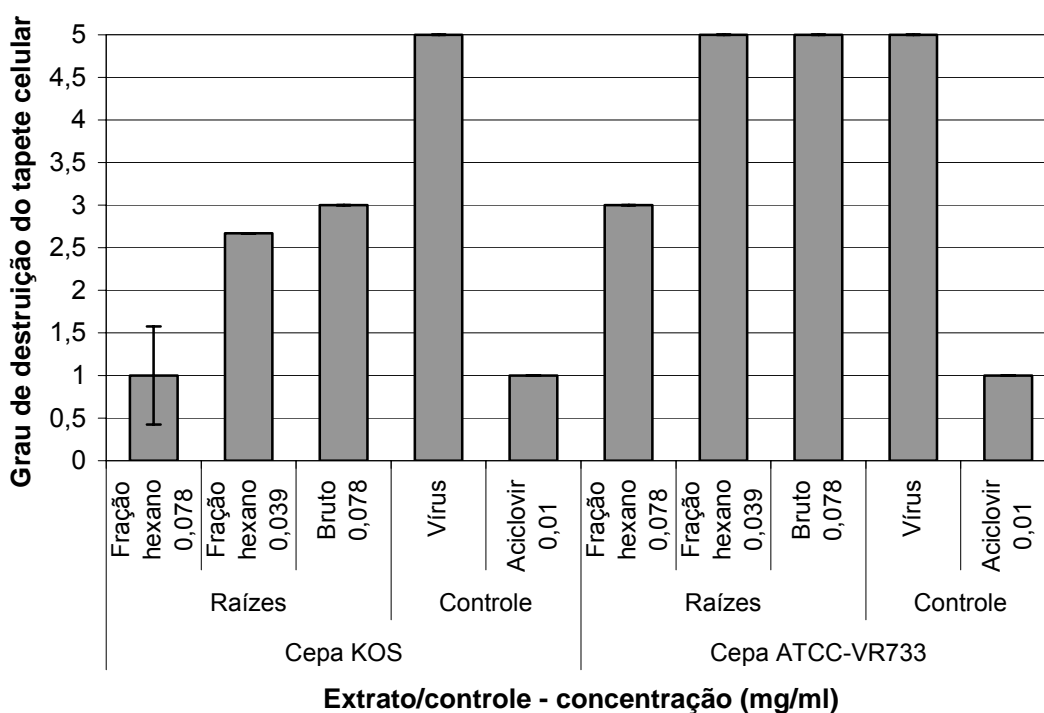


Figura 4.2: Histograma demonstrativo da atividade antiviral dos extratos e controles frente ao HSV-1 cepas KOS e ATCC-VR733 de acordo com a escala do grau de destruição do tapete celular adotada.

A atividade antiviral tem sido demonstrada para extratos de plantas, porém, somente em alguns casos a natureza química dos compostos com essa atividade tem sido caracterizada (SERKEDJIEVA & IVANCHEVA, 1999). Desta forma, a atividade antiviral dos produtos isolados das partes aéreas da fração hexano e

metanólica foi avaliada, embora esses extratos não tenham demonstrado atividade nos testes anteriores. Os resultados obtidos estão representados na Figura 4.3.

As substâncias testadas foram identificadas como o derivado de floroglucinol hiperbrasilol B (HCH1), amentoflavona (HCN2), hiperosídeo (HCN4) e guaijaverina (HCN5), além do flavonol com estrutura não totalmente elucidada, codificado como HCN3.

A amostra mais ativa foi o hiperbrasilol B (HCH1) na concentração de 0,039 mg/ml com aproximadamente 80% de inibição do efeito citopático da cepa ATCC-VR733 e cerca de 60% de inibição da cepa KOS, conforme o escore estabelecido para o teste.

A substância amentoflavona (HCN2), na concentração de 0,078 mg/ml, também apresentou atividade antiviral contra o HSV-1, inibindo em aproximadamente 40 a 60% o efeito citopático viral da cepa ATCC-VR733 e inibindo em mais de 80% o efeito citopático da cepa KOS (Figura 4.3).

HCN3 também foi ativa, na concentração de 0,625 mg/ml inibiu em torno de 70% o ECP da cepa KOS e, na mesma concentração, em torno de 40% o efeito da cepa ATCC-VR733.

Dentre as cinco substâncias testadas, hiperosídeo e guaijaverina não apresentaram atividade antiviral frente às duas cepas virais.

Quando comparadas as duas cepas de HSV-1, em relação às substâncias testadas, pode-se inferir, de acordo com a Figura 4.3, que a cepa ATCC-VR733 tende a ser mais resistente, ao contrário do que aconteceu quando os extratos foram testados.

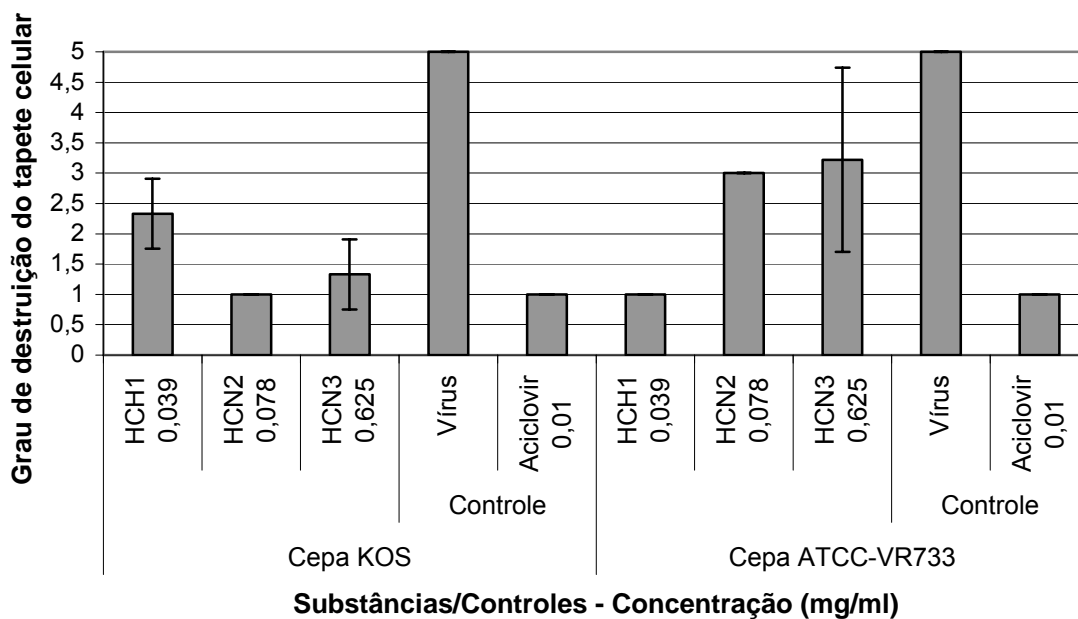


Figura 4.3: Histograma demonstrativo da atividade antiviral das substâncias e controles frente ao HSV-1 cepas KOS e ATCC-VR733 de acordo com a escala do grau de destruição do tapete celular adotada.

Embora não tenham sido encontrados na literatura estudos de avaliação da atividade antiviral hiperbrasilol B (substância HCH1), o trabalho de ROCHA e colaboradores (1996) mostra que este composto possui atividade antimicrobiana inibindo o crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* na concentração de 0,6 µg/ml.

Em relação à atividade antiviral frente ao HSV-1 de flavonóides, alguns trabalhos mostram que extratos contendo estes compostos fenólicos possuem atividade anti-HSV-1, como foi constatado por GONÇALVES e colaboradores, em 2001, quando o extrato acetato de etila das folhas de *Vitex polygama* (Verbenaceae), se mostrou ativo contra a cepa aciclovir resistente (ACV^R-HSV-1) na concentração de 0,025 mg/ml.

A atividade antiviral de flavonóides também foi constatada por DU e colaboradores (2003). O flavonóide leachianona G, isolado de *Morus alba* L. mostrou potente atividade contra HSV-1 (15577), com IC₅₀ (concentração inibitória 50%) de 0,0016 mg/ml.

O flavonóide hiperosídeo não apresentou atividade frente às duas cepas testadas, embora AMARAL e colaboradores (1999) tenham relatado que uma mistura dos flavonóides quercetina-3-O- β -glicosídeo (isoquercitrina) e quercetina-3-O- β -galactosídeo (hiperosídeo), isolados de *Chamaesyce thymifolia* Millsp. (Euphorbiaceae) exibiu atividade antiviral frente ao HSV-1 cepa aciclovir resistente, na concentração de 17 μ g/ml inibindo em 58,3% o efeito do vírus.

Segundo AMOROS e colaboradores (1992), flavonóis foram mais ativos contra o HSV-1 que flavonas, sendo que a atividade decresce com o aumento da substituição por hidroxilas. Galangina, por exemplo, foi mais ativa que canferol, que por sua vez, foi mais ativo que quercetina. Porém, os resultados obtidos neste trabalho indicam que HCN2 (amentoflavona) foi mais ativa que HCN3 que é possivelmente um flavonol. A eficácia contra HSV-1 de combinações binárias de flavonas e flavonóides também foi avaliada sendo constatado um sinergismo entre elas. Isso poderia explicar o fato do flavonóide hiperosídeo não apresentar atividade anti-HSV-1 quando testado isoladamente, e sim quando testado em combinação com isoquercitrina como descrito por AMARAL e colaboradores (1999), embora neste caso tenha sido uma combinação de flavonóis e não flavona-flavonol.

4.6 CONCLUSÕES

O extrato aquoso preparado à temperatura elevada possui uma CMNT superior ao extrato preparado a menor temperatura. Este resultado leva à hipótese de que elevadas temperaturas degradam substâncias tóxicas à célula.

O extrato *n*-hexano das raízes na concentração 0,078 mg/ml inibiu em mais de 80% o efeito citopático viral, comparando-se ao controle aciclovir. Os testes realizados com os diferentes extratos indicam que a espécie em análise possui substâncias com potencial atividade antiviral principalmente as lipofílicas, e concentradas nas raízes.

A substância isolada da fração hexano das partes aéreas, HCH1 (hiperbrasilol B), foi a mais ativa frente ao HSV-1 entre as testadas, inibindo em mais de 80% a cepa ATCC-VR733. Duas das substâncias isoladas da fração metanólica das partes aéreas, HCN2 (amentoflavona) e HCN3, apresentaram atividade antiviral no modelo utilizado embora os extratos, quando testados, não tenham sido ativos.

5. DISCUSSÃO GERAL

Há muito tempo, plantas medicinais têm sido utilizadas na forma de extratos, infusões e pós para o tratamento de muitas doenças infecciosas, sem um suporte científico comprovado (VIJAYAN *et al.*, 2004; KHAN *et al.*, 2005), e o interesse em produtos e extratos de origem vegetal tem aumentado como possíveis fontes de medicamentos (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 1999).

Na família Guttiferae, o gênero mais estudado é o *Hypericum* do qual muitas espécies são usadas tradicionalmente na medicina popular, principalmente *H. perforatum*, de comprovada atividade antidepressiva (CHATTERJEE *et al.*, 1998; MÜLLER *et al.*, 2001; BILIA *et al.*, 2002; FRANKLIN *et al.*, 2004; TRAUTMANN-SPONSEL & DIENEL, 2004), além disso, é utilizado popularmente na Grécia contra herpes zoster (MALAMAS & MARSELOS, 1992). Outras espécies também foram analisadas quanto à atividade antiviral e mostraram resultados promissores, como por exemplo, os extratos metanólicos das espécies *H. uralum*, *H. cordifolium*, *H. myorense* e *H. hookerianum* que foram ativas contra o HSV-1 (TAYLOR *et al.*, 1996; VIJAYAN *et al.*, 2004).

As espécies nativas do Rio Grande do Sul, *H. connatum*, *H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* foram submetidas a testes quanto a sua atividade antiviral frente ao vírus da imunodeficiência felina; os extratos aquoso, aquoso com baixa concentração de taninos e metanólico foram testados. O extrato metanólico de *H. connatum* foi ativo, sugerindo a existência de compostos com potencial atividade antiviral nesta espécie (SCHMIT *et al.*, 2001).

Hypericum connatum é conhecida popularmente como “orelha-de-gato” e “Ka'avotory” pelos índios Guarani, usado para tratar feridas de boca, dores, anginas, aftas e estomatites (JIMÉNEZ, 1980; CORRÊA, 1984; NOELLI, 1996; MENTZ *et al.*, 1997), porém, na maioria dos casos, não se conhecem os processos de preparação e aplicação desta espécie. No caso das feridas de boca, a origem das mesmas também não é conhecida, podendo ser viral. Tal fato serviu como propósito para a investigação da atividade anti-HSV-1 desta espécie, levando-se em consideração a necessidade de busca de novos compostos com atividade antiviral. Para tanto, a análise química das raízes e partes aéreas da espécie também foi relevante.

A análise das raízes revelou que na fração *n*-hexano houve um acúmulo de diversos compostos fenólicos, sem o predomínio de componentes majoritários. No cromatograma da fração metanólica também verificou-se a presença de substâncias fenólicas, principalmente derivados de ácidos fenólicos como ácido clorogênico e isoclorogênico.

No cromatograma da fração *n*-hexano das partes aéreas foi possível verificar a presença de uma substância majoritária com característica de compostos fenólicos. O cromatograma da fração metanólica das partes aéreas mostrou uma predominância de compostos fenólicos. A análise cromatográfica desta fração revelou a presença de substâncias majoritárias com características de flavonóides. Ambos extratos foram submetidos à cromatografia em coluna objetivando o isolamento destas substâncias.

Como não há conhecimento sobre a parte da planta utilizada e o modo de preparo utilizado popularmente, foram preparados diferentes extratos das partes aéreas e raízes para os testes da atividade antiviral.

Para os testes da atividade antiviral, foi necessário primeiramente determinar a citotoxicidade das amostras, pois esta pode ser confundida com uma falsa atividade antiviral, uma vez que ambas levam à morte celular. Isso permitiu que o teste de atividade antiviral fosse realizado em concentrações subtóxicas, determinando-se assim a CC_{50} e a CMNT para cada amostra testada.

Os extratos obtidos da espécie *H. connatum* foram avaliados quanto a sua atividade anti-HSV-1 cepas KOS e ATCC-VR733 levando-se em consideração o grau de destruição do tapete celular.

A fração *n*-hexano das raízes foi a mais ativa entre os extratos testados, inibindo em mais de 80% o efeito citopático do HSV-1 cepa KOS na concentração de 0,078 mg/ml. Para a cepa ATCC-VR733, a inibição ocorreu em proporções menores - a concentração de 0,078 mg/ml da fração hexano inibiu em torno de 40 a 60% a ação do vírus e a concentração 0,039 mg/ml inibiu em menos de 20% o

efeito citopático da cepa ATCC-VR733. O extrato bruto das raízes também foi ativo na concentração de 0,078 mg/ml, inibindo o efeito citopático da cepa KOS em torno de 50%; já para a cepa ATCC-VR733, a ação foi menor, com inibição da ação viral menor que 20%. Das raízes não foram isolados compostos devido à escassez do material vegetal.

As demais amostras testadas (frações *n*-hexano, diclorometano e metanol, extratos bruto, aquoso preparado a frio, aquoso preparado a 50°C, aquoso preparado a 100°C, hidroetanólico e etanólico das partes aéreas e frações diclorometano e metanol, extratos aquoso preparado a frio, aquoso preparado a 50°C, aquoso preparado a 100°C, hidroetanólico e etanólico das raízes) não apresentaram atividade antiviral.

A atividade antiviral dos compostos isolados das partes aéreas da fração hexano e metanólica foi avaliada, embora esses extratos não tenham demonstrado atividade nos testes anteriores.

Da fração *n*-hexano das partes aéreas foi isolado o derivado de floroglucinol hiperbrasilol B (HCH1), obtido na forma de um sólido oleoso, identificado através de métodos espectroscópicos. Seus espectros revelaram uma estrutura dimérica constituída por uma unidade ácido filicínico e uma de floroglucinol ligadas por uma ponte metilênica. Este tipo de composto tem sido encontrado com frequência em espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul (NÖR *et al.*, 2004). Hiperbrasilol B foi isolado previamente de *H. brasiliensis* (ROCHA *et al.*, 1996) e havia sido relatado anteriormente para *H. caprifoliatum* e para *H. connatum* por NÖR e colaboradores em 2004.

Hiperbrasilol B, entre os compostos testados, foi o mais ativo. Na concentração de 0,039 mg/ml inibiu em mais de 80% o efeito citopático da cepa ATCC-VR733 e levou à inibição do efeito citopático da cepa KOS em aproximadamente 60%, conforme o escore estabelecido para o teste. Não foram encontrados dados na literatura sobre o efeito anti-HSV-1 para este composto. Até o momento, o único dado biológico disponível foi o trabalho de ROCHA e

colaboradores (1996) mostrando que o composto possui atividade antimicrobiana inibindo o crescimento da bactéria *Bacillus subtilis* na concentração de 0,6 µg/ml.

Os compostos isolados da fração metanólica: amentoflavona (HCN2), hiperosídeo (HCN4), guajaverina (HCN5) e HCN3, identificados por análise cromatográfica e ultravioleta (exceto HCN3, cuja estrutura não foi definida) das partes aéreas também foram testados.

Amentoflavona (HCN2), um biflavonóide, é encontrado em um grande número de plantas com propriedades medicinais, incluindo *Hypericum perforatum* e *Ginkgo biloba* (HANRAHAN *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2005) e já foi identificado em várias espécies do gênero *Hypericum* (CROCKETT *et al.*, 2005). Este composto também apresentou atividade antiviral contra o HSV-1 inibindo de 40 a 60% o efeito citopático viral da cepa ATCC-VR733 e inibindo em mais de 80% o efeito citopático da cepa KOS.

A substância HCN3 foi obtida como um sólido de cor caramelo. A análise cromatográfica revelou ser um flavonóide na forma de aglicona livre devido à polaridade e indicou tratar-se de um flavonol devido à coloração quando revelada com reagente natural após exposição à luz ultravioleta (MARKHAM *et al.*, 1975). Esta substância foi comparada através de cromatografia em camada delgada, com padrões de quercetina, 3-metil-quercetina e 3,7-dimetil-quercetina e não se assemelhou a nenhum destes. Assim sendo, ainda não foi possível a sua identificação. Mesmo assim, este produto foi submetido ao teste antiviral apresentando inibição do efeito citopático: na concentração de 0,625 mg/ml inibiu em torno de 70% o ECP da cepa KOS e, em torno de 40% o efeito da cepa ATCC-VR733.

A substância HCN4 foi identificada como hiperosídeo (quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo, também conhecido como hiperina), é um flavonóide que vem sendo isolado frequentemente de espécies do gênero *Hypericum* (SCHMITT *et al.*, 2001; DALL'AGNOL *et al.*, 2003; CROCKETT *et al.*, 2005). Foi também foi caracterizado através de cromatografia em camada delgada em algumas espécies nativas do Rio Grande do Sul, como *H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H.*

ternum, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* (SCHMITT *et al.*, 2001; DALL'AGNOL *et al.*, 2003). Porém, não foi encontrado em *H. connatum* por DALL'AGNOL e colaboradores (2003). Os resultados divergentes entre estes estudos podem ser devidos à técnica utilizada, à baixa concentração dessa substância na planta analisada ou a variações edafoclimáticas, uma vez que fatores como a quantidade de água disponível para a planta e a temperatura do ambiente influenciam na concentração de compostos fenólicos, como constatado por ABREU e MAZZAFERA (2005) em *H. brasiliense* e por ZOBAYED e colaboradores (2005) em *H. perforatum*.

Hiperosídeo não apresentou inibição do efeito citopático viral, por outro lado, este flavonóide pode estar relacionado ao uso popular de *H. connatum* no tratamento de angina e outras doenças do coração, uma vez que este composto está presente também em espécies do gênero *Crataegus* (Rosaceae), que são utilizadas para o tratamento de doenças do coração, em especial, *C. oxyacantha* (WAGNER, 1999; FONG & BAUMAN, 2002; LY, 2005). Porém, ainda são necessários estudos em relação aos efeitos deste flavonóide sobre o coração, pois há divergências entre os autores sobre a verdadeira ação do hiperosídeo sobre esse órgão.

A substância HCN5 apresentou perfil cromatográfico do flavonóide glicosilado guaijaverina, derivado da quercetina. Este flavonóide havia sido isolado previamente por ROCHA e colaboradores (1995) de *H. brasiliense*. Quando testado frente ao HSV-1 não apresentou atividade.

Como os flavonóides derivados da quercetina, hiperosídeo e guaijaverina, não mostraram atividade anti-HSV-1, pode-se inferir que a glicosilação na posição 3 diminuiu a atividade antiviral, uma vez que há relatos dessa atividade para a quercetina (CUSHNIE & LAMB, 2005).

6. CONCLUSÕES

Analisando-se a fração *n*-hexano das raízes de *Hypericum connatum*, através de cromatografia em camada delgada, verificou-se a presença de diversos compostos fenólicos sem predomínio de componentes majoritários, com desenvolvimento de coloração similar entre estes, quando revelados com anisaldeído sulfúrico, seguido de aquecimento. O perfil cromatográfico da fração metanólica das raízes indicou a presença de substâncias fenólicas, principalmente derivados de ácidos fenólicos.

Na fração *n*-hexano das partes aéreas foi possível verificar a presença de uma substância majoritária, sendo identificada como hiperbrasilol B.

Na fração metanólica das partes aéreas evidenciou-se a presença de substâncias com características de flavonóides. Deste extrato foram isolados flavonóides caracterizados como amentoflavona (HCN2), hiperosídeo (HCN4) e guajaverina (HCN5), e um flavonóide de estrutura não definida (HCN3).

Nos testes da atividade antiviral, o extrato hexano das raízes foi o mais ativo: na concentração 0,078 mg/ml inibiu em mais de 80% o efeito citopático viral. O extrato bruto das raízes também foi ativo. Os testes realizados com os diferentes extratos indicam que a espécie em análise possui substâncias com potencial atividade antiviral principalmente as lipofílicas, sendo concentradas nas raízes.

Dos compostos isolados, hiperbrasilol B, foi o mais ativo frente ao HSV-1, inibindo em mais de 80% o efeito citopático viral da cepa ATCC-VR733. Duas das substâncias isoladas da fração metanólica das partes aéreas, amentoflavona e HCN3, apresentaram atividade antiviral no modelo utilizado.

7. 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, 2004a.

ABREU, I.N.; REIS, M.G.; MARSAIOLI, A.J.; MAZZAFERA, P. Essential oil composition of *Hypericum brasiliense* Choise. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, p.80-82, 2004b.

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.

ADAM, P.; ARIGONI, D.; BACHER, A.; EISENREICH, W. Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. **Journal of Medicine Chemistry**, v.45, p. 4786-4793, 2002.

ALARCON, B.; LACAL J.C.; FERNANDEZ-SOUSA, J.M.; CARRASCO, L. Screening for new compounds with antiherpes activity. **Antiviral Research**, v.4, p.231-244, 1984.

AMARAL, A.C.F.; KUSTER, R.M.; GONÇALVES, J.L.S.; WIGG, M.D. Antiviral investigation on the flavonoids of *Chamaesyce thymifolia*. **Fitoterapia**, v.70, p.293-295, 1999.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, p.1732-1740, 1992.

AN, T.; HU, L.; CHEN, Z.; SIM, K. Erectones A and B, two dome-shaped polyprenylated phloroglucinol derivatives, from *Hypericum erectum*. **Tetrahedron Letters**, v.43, p.163-165, 2002a.

AN, T.; SHAN, M.; HU, L.; LIU, S.; CHEN, Z. Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum erectum*. **Phytochemistry**, v.59, p.395-398, 2002b.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R. **Avaliação da citotoxicidade, da genotoxicidade e da potencial atividade antiviral da violaceína, produzida pela *Chromobacterium violaceum*** Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Dissertação de Mestrado.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C.R.; SINCERO, T.C.M.; SILVA, A.C.; SAVI, L.A.; GAIDO, C.M.; BETTEGA, J.M.R.; MANCINI, M.; ALMEIDA, M.T.R; BARBOSA, R.A. FARIAS, M.R.; BARARDI, C.R.M.; SIMÕES, C.M.O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. **Fitoterapia**, v.76, p. 374-378, 2005.

ARCANODELSOL. Disponível em:
http://www.arcanodelsol.com.ar/esencias_herbales/N17_cabotoril.htm. Acessado em 25.01.2006.

ATHANASAS, K.; MAGIATIS, P.; FOKIALAKIS, N.; SKALTSOUNIS, A.L.; 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, p.973-977, 2004.

AWANG, D.V. St. John's Wort. **Canadian Pharmaceutical Journal**. v.124, p.33-35, 1991.

BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal – As bases moleculares da ação dos fármacos**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 243p.

BAUREITHEL, K.H.; BÜTER, K.B.; ENGESSER, A.; BURKARD, W.; SCHAFFNER, W. Inhibition of benzodiazepine binding *in vitro* by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v.72, p.153-157, 1997.

BENKIKI, N.; KABOUCHE, Z.; TILLEQUIN, F.; VÉRITÉ, P.; CHOSSON, E.; SEGUIN, E. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae). **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 58 c, p. 655-658, 2003.

BENNETT, G. J.; LEE, H. H. Xanthones 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, 1986.

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

BETANCUR-GALVIS, L.A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J.E. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, p.531-535, 1999.

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.

BOURNE, K.Z.; BOURNE, N.; REISEING, S.F.; STANBERRY, L.R. Plant products as topical microbicide candidates: assessment of *in vitro* and *in vivo* activity against herpes simplex virus type 2. **Antiviral Research**, v.42, p.219-226, 1999.

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.

CAKIR, A.; KORDALI, S.; KILIC, H.; KAYA, E. Antiungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.33, p.245-256, 2005.

CAPASSO, R.; BORRELLI, F.; CAPASSO, F.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A. Inhibitory effect of the antidepressant St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on rat bladder contractility *in vitro*. **Urology**, v.64, p.168-172, 2004.

CARDONA, M.L.; SEOAN, E. Flavonoids and xantholignoids of *Hypericum ericoides*. **Phytochemistry**, v.21, p.2759-2760, 1982.

CARDONA, M.L.; FERNANDEZ, M.I.; PEDRO, J.R.; SEOANE, E.; VIDAL, R. Additional new xanthones and xantholignoids from *Hypericum canariensis*. **Journal of Natural Products**, v.49, p.95-100, 1986.

CHATTERJEE, S., NÖLDNER, M., KOCH, E.; ERDELMEIER, C. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hiperforin: the neglected possibility. **Pharmacopsychiatry**, v.31, s.1, p.7- 15, 1998.

CHUNG, M.I.; WENG, J.R.; LAI, M.H.; YEN, M.H.; LIN, C.N. A new chalcone, xanthones, and a xanthonolignoid from *Hypericum geminiflorum*. **Journal of Natural Products**, v.62, p.1033-1035, 1999.

CONFORTI, F.; STATTI, G.A.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. Antioxidant activity of metanolic 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. **Nutritional Biochemistry**, v.7, p.66-76, 1996.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, 1984.

COULADIS, M.; BAZIOU, P.; VERYKOKIDOU, E.; LOUKIS, A. Antioxidant activity of polyphenols from *Hypericum triquetrifolium* Turra. **Phytotherapy Research**, v.16, p.769-770, 2002.

COULADIS, M.; CHINO, I.B.; TAZAKOU, O.; PETRAKIS, P.V. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum remeliacum* subsp. Apollinis (Boiss. & Heldr.). **Phytotherapy Research**, v.17, p.152-154, 2003.

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, 1981.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Antimicrobial Agents**, v.26, p.343-356, 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. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v.10, p.511-516, 2003.

DE SHAN, M.; HU, L. H.; CHEN, Z. L. Three new hyperforins analogues from *Hypericum perforatum*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.127-130, 2001

DU, J.; HE, Z.D.; JIANG, R.W.; YE, W.C.; XU, H.X.; BUT, P.P.H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. **Phytochemistry**, v.62, p.1235-1238, 2003.

DULGER, B.; GONUZ, A. Antibacterial activity of the endemic *Hypericum kazdaghensis*. **Fitoterapia**, v.76, p.237-239, 2005.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da Universidade, 2003. Cap.10. p.165-181.

FARNSWORTH, N.R.; WAGNER, H.; HORHAMMER, L.; HORHAMMER, H.P. *Aster pilosus* (Compositae). I. Isolation of hyperoside (quercetin-3-beta-D-mono-galactoside) from the leaves. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.57, p.1059-1061, 1968.

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.

FODULOVIC, K.S.A.; ALJANCIC, I.; VAJS, V.; MENKOVIC, N.; MACURA, S.; GOJGIC, G; MILOSAVLJEVIC, S. Hyperatomarin, an antibacterial prenylated phloroglucinol from *Hypericum atomarium* ssp. *degenii*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1236-1238, 2003.

FONG, H.H.S; BAUMAN, J.L. Hawthorn. **Journal of Cardiovascular Nursing**, v.4, p.1-8, 2002.

FRANKLIN, M.; REED, A.; MURCK, H. Sub-chronic treatment with an extract of *Hypericum perforatum* (St John's wort) significantly reduces cortisol and corticosterone in the rat brain. **European Neuropsychopharmacology**, v.14, p.7-10, 2004.

GONÇALVES, J.L.S.; LEITÃO, S.G.; DELLE MONACHE, F.; MIRANDA, M.M.F.S.; SANTOS, M.G.M.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. In vitro antiviral effect of flavonoid-rich extracts of *Vitex polygama* (Verbenaceae) against acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1. **Phytomedicine**, v.8, p.477-480, 2001.

GNERRE, C.; VON POSER, G.L.; FERRAZ, A.; VIANA, A.; TESTA, B.; RATES, S.M. Monoamine oxidase inhibitory activity of some *Hypericum* species native to South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1273-1279, 2001.

GUDZIC, B.; DORDEVIĆ, S.; PALIĆ, R.; STOJANOVIĆ, G., *Essential oil of Hypericum olimpicum* L. and *Hypericum perforatum* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 201-203, 2001.

GUDZIC, B.; DJOKOVIC, D.; DORDEVIĆ, S.; PALIĆ, R.; VAJS, V.; PALIĆ, R.; STOJANOVIĆ, G. Composition and antimicrobiological activity of the Essential oil of *Hypericum maculatum* Crantz. **Flavour Fragrance Journal**, v. 17, p. 392-394, 2002.

HANRAHAN, J.R.; CHEBIB, M.; DAVUNCHERON, N.L.; HALL, B.J.; JOHNSTON, G.A.; Semisynthetic preparation of amentoflavone: a negative modulator at GABA (A). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v.13, p.2281-2284, 2003.

HOBBS, A. St. John's wort-ancient herbal protector. **Pharmacy History**, v.32, n.4, p.166, 1990.

HONG, D.; YIN, F.; HU, L.H.; LU, P. Sulfonated xanthenes from *Hypericum sampsonii*. **Phytochemistry**, v.65, p.2595-2598, 2004.

HU, L.; KHOO, C. W.; VITTAL, J.J.; SIM, K.Y. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v. 53, p.705-709, 2000.

HUDSON, J.B. **Antiviral Compounds from Plants**. Boca Raton, Florida: CRC. 1990. 200p.

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; KASHIHARA, M.; TAKAGI, S. Sarothralen A and B, new antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**, v.52, n.2, p.288-290, 1986.

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

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; FUKUMOTO, H.; YAMAKI, M.; TAKAGI, S.; ISOI, K. A flavonol rhamnoside from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**. v.30, p.3152-3153, 1991.

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; FUKUMOTO, H.; YAMAKI, M.; ISOI, K.; OYAMA, Y. An isopentenylated flavonol from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v.32, p.1583-1585, 1993.

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; FUKUMOTO, H.; YAMAKI, M.; ISOI, K.; YAMAGATA, Y. A 2-pyrone derivative from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v.37, n.1, p.283-284, 1994.

ISHIGURO, K.; NAGAREYA, N.; FUKUMOTO, H. A phloroglucinol derivative from cell suspension of *Hypericum patulum*. **Phytochemistry**, v.47, n.6, p.1041-1043, 1998.

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, n.2, p.325-331, 1989.

JAYASURIYA, H.; CLARCK, A.M.; MCCHESENEY, J.D. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.1314-1320, 1991.

JIMÉNEZ, C. R. Hipericáceas. **Flora Illustrada Catarinense**. Florianópolis: IOESC, 1980.

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

KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. **Antiviral Research**, v.67, p.107-119, 2005.

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

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.
- KIM, S.H.K.; KANG, K.W.; KIM, K.W.; KIM, N.D. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. **Life Sciences**, v.67, p.121-131, 2000.
- KITANOV, G. M.; NEDIALKOV, P. T. Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p.647- 653, 1998.
- KITANOV, G. M. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, p.171-178, 2001.
- 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.(Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2003. Cap. 21, p.539-540.
- LI, H.H.; SEE, C.Y.; KENG, Y.S. Xanthones from *Hypericum ascyron*. **Phytochemistry**, v.52, p.1371-1373, 1999.
- LY, J. *Crataegus oxyacantha* (aubepine) in the use as herb medicine in France. **Zhongguo Zhong Yao Za Zi**, v.30 p.634-640, 2005. (Resumo)
- MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer, 1970, 354p.
- MALAMAS, M.; MARSELOS; M. The tradition of medicinal plants in Zagori, Epirus (northwestern Greece). **Journal of Ethnopharmacology**, v.37, p.197-203, 1992.
- MANGA, H.M.; BRKIC, D.; MARIE, D.E.P.; QUETIN-LECLERCQ, J. In vivo anti-inflammatory activity of *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg. (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.92, p.209-214, 2004.
- MARKHAM, K.R., MABRY, T.J. Ultraviolet Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. In:HARBORNE, J.B., MABRY, T.J., MABRY, H. **The Flavonoids**. New York: Academic, v.1, p.45-77, 1975.
- MARTARELLI, D.; MARTARELLI, B.; PEDICONI, D.; NABISSI, M. I.; PERFUMI, M.; POMPEI, P. *Hypericum perforatum* methanolic extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. **Cancer Letters**, v.210, p.27-33, 2004.
- MATSUHIRA, M.; SHIKISHIMA, Y.; TAKAISHI, Y.; HONDA, G.; ITO, M.; TAKEDA, Y.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; KODZHIMATOV, O.K.; ASHURMETOV, O. Benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum scabrum*. **Journal of Natural Products**, v.65, p.290-294, 2002.
- MELZIG, M.F.; PERTZ, H.H.; KRENN, L. Anti-inflammatory and spasmolytic of extracts from *Drosereae herba*. **Phytomedicine**, v.8, p.225-229, 2001.
- MENDES, F.L.; MATTEI, R.; CARLINI, E.L.A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v.73, p.462-471, 2002.

MENTZ, L.A.; LUTZEMBERGER, 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, n.1, p.25-47, 1997.

MERUELO, D.; LAVIE, G.; LAVIE, D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: Aromatic polycycle diones hypericin and pseudohypericin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.85, p.5230-5234, 1988.

MISKOVSKY, P. Hypericin – a new antiviral and antitumor photosensitizer: mechanism of action and interaction with biological macromolecules. **Current Drugs Targets**, v.1, p.55-84, 2002.

MONTANHA, J.A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Anti-herpes virus activity of aporphine alkaloids. **Planta Medica**, v.61, p.419-424, 1995.

MONTANHA, J.A.; MOELLERKE, P.; BORDIGNON, S.A.L.; SHENKEL, E.P.; ROEHE, P.M. Antiviral activity of Brazilian plant extracts. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.23, p.183-186, 2004.

MUKHERJEE, P.K.; SARITHA, G.S.; SURESH, B. Antibacterial spectrum of *Hypericum hookerianum*. **Fitoterapia**, v.72, p.558-560, 2001.

MUKHERJEE, P.K.; SARITHA, G.S.; SURESH, B. Antimicrobial potential of two different *Hypericum* species available in India. **Phytotherapy Research**, v.16, p.692-695, 2002.

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.

NAHRSTEDT, A.; BUTTERWECK, V. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. **Pharmacopsychiatry**, v.30, p.129-134, 1997.

NOELLI, F.S. Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas. In: **Simpósio de Etnobiologia e Etnoecologia**. Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. Resumos, 1996.

NÖR, C.; ALBRING, D.; FERRAZ, A.B.F.; SCHRIPEMA, 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.

OZTURK, B.; APAYDIN, S.; GOLDELI, E.; INCE, I.; ZEYBEK, U. *Hypericum triquetrifolium* Turra. extract exhibits anti-inflammatory activity in the rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p.207-209, 2002.

PABUÇCUOLU, A.; KONYALIOLU, S.; BA, M.; MERAL, G.E. The in vitro effects of *Hypericum* species on human leukocyte myeloperoxidase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.87, p.89-92, 2003.

PAN, X.; TAN, N.; ZENG, G.; ZHANG, Y.; JIA, R. Amentoflavone and its derivative as novel natural inhibitors of human Cathepsin B. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p.5819-5825, 2005.

PIOVAN, A.; FILIPPINI, R.; CANIATO, R.; BORSARINI, A.; MALECI, L.B.; CAPPELLETTI, E.M. Detection of hypericins in the "red glands" of *Hypericum elodes* by ESI-MS/MS. **Phytochemistry**, v.65, p.411-414, 2004.

PRADO, B.; RABANAL, R.M.; SANCHES-MATEO, C.C. Evaluation of the central properties of several *Hypericum* species from the Canary Islands. **Phytotherapy Research**, v.16, p.740-744, 2002.

PRETORIUS, J.C.; MAGAMA, S.; ZIETSMAN, P.C. Purification and identification of antibacterial compounds from *Euclea crispa subsp. crispa* (Ebenaceae) leaves. **South African Journal of Botany**, v.69, p.579-586, 2004.

RABANAL, R.M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNADEZ-PEREZ, M.; SANCHEZ-MATEO, C.C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.287-292, 2002.

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.

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.

RUSSO, R.O.; SÁCHEZ, M.S. *Terminalia arjuna* (Combretaceae) y otras especies del género: mitos, realidades y oportunidades en la terapia cardiovascular. **Revista Costarricense de Cardiología**, v.3, n.3, 2001.

SCHMITT, A.C.; RAVAZZOLO, A.P.; VON POSER, G.L. Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.239-245, 2001.

SCHUSSLER, M.; HOLZL, J.; FRICKE, U. Myocardial effects of flavonoids from *Crataegus* species. **Arzneimittelforschung**, v.8, p.842-845, 1995.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J.M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum coris*. **Fitoterapia**, v.73, p.511-513, 2002.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.735-745, 2004.

SEPTIVALE. Disponível em: <http://sepvitale.com.ar/portada/plantas.htm>. Acessado em 25.01.2006.

SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.59-68, 1999.

SILVA, B.A.; FERRERES, F.; MALVA, J.O.; DIAS, A.C.P. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry**, v.90, p.157-167, 2005.

SIMONI, I.C.; MUNFORD, V.; FELICIO, J.D.; LINS, A.P. Antiviral activity of crude extracts of *Guarea guidona*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.647-650, 1996.

SMELCEROVIC, A.; VERMA, V.; SPITELLER, M.; AHMAD, S.M.; PURI, S.C.; QAZI, G.N. Phytochemical analysis and genetic characterization of six *Hypericum* species from Serbia. **Phytochemistry**, v.67, p.171-177, 2006.

TADA, M.; CHIBA, K.; YAMADA, H.; MARUYAMA, H. Phloroglucinol derivatives as competitive inhibitors against thromboxane A₂ and leukotriene D₄ from *Hypericum erectum*. **Phytochemistry**, v. 30, n.8, p. 2559-2562, 1991.

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

TAYLOR, R.S.; MONANDHAR, N.P.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H. Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.52, n.3, p.157-163, 1996.

TIMBURY, M. **Notes on Medical Virology**. 11.ed. New York: Churchill Livingstone, 1997. Cap. 11. p.593-609.

TIMMERMANN, B.N.; VALCIC, S.; LIU, Y.L.; MONTENEGRO, G. Flavonols from *Cryptocarya alba*. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v.50, p.898-899, 1995. (Resumo)

TOKER, Z.; KIZIL, G.; ÖZEN, H.C.; KIZIL, M.; ERTEKIN, S. Composition and antimicrobial activities of the oils of two *Hypericum* species from Turkey. **Fitoterapia**, v.77, p.57-60, 2006.

TRAUTMANN-SPONSEL, R.D.; DIENEL, A. Safety of *Hypericum* extract in mildly to moderately depressed outpatients: A review based on data from three randomized, placebo-controlled trials. **Journal of Affective Disorders**, v.82, p.303-307, 2004.

VALENTÃO, P.; CARVALHO, M.; FERNANDES, E.; CARVALHO, F. 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.

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

VEROTTA, L. *Hypericum perforatum*, a source of neuroactive lead structures. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.3, n.2, p.187-201, 2003.

VIANA, A.F.; **Estudo da atividade psicofarmacológica de espécies nativas do RS e toxicidade aguda de *Hypericum caprifoliatum* Cham. Cheldt.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002. Dissertação de Mestrado.

VIANA, A.F.; HECKLER, A. P.; FENNER, R.; RATES, S. M. K. Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae) Antinociceptive activity of *Hypericum* spp. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.631-634, 2003.

VIANA, A.; DO REGO, J-C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A. P., COSTENTIN, J.; 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.

VIJAYAN, P., RAGHU, C., ASHOK, G., DHANARAJ, S.A., SURESH, B. Antiviral activity of medicinal plants of Nilgiris. **Indian Journal Medical Research**, v.120, p.24-29, 2004.

WAGNER, H. New approaches in phytopharmacological research. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p.1649-1654, 1999.

WANG, J.; PENG, S.L.; WANG, M.K.; CHEN, N.Y., DING, L.S. Chemical constituents of *Hypericum monogynum*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zi**, v.27, p.120-122, 2002. (Resumo)

WINKELMANN, K.; HEILMANN, J.; ZERBE, O.; RALI, T.; STICHER, O. New phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.1, p.104-108, 2000.

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

WOLLENWEBER, E.; STEFENS, J. F.; IVANIC, M.; DEINZER, M. L. Acylphloroglucinols and flavonoid aglycones produced by external glands on the leaves of two *Dryopteris* ferns and *Currantia robertiana*. **Phytochemistry**, v.48, n.6, p.931-939, 1998.

WU, Q.L.; WANG, S.P.; DU, L.J.; ZHANG, S.M.; YABG, J.S.; XIAO, P.G. Chromene glycosides and flavonoids from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v.49, p.1417-1420, 1998.

WU, Y.; ZHOU, S.D.; LI, P. Determination of flavonoids in *Hypericum perforatum* by HPLC analysis. **Yao Xue Xue Bao**, v.37, p.280-282, 2002. (Resumo)

WU, J., CHENG, X.F.; HARRISON, L.J.; GOH, S.H.; SIM, K.Y. A phloroglucinol derivative with a new carbon skeleton from *Hypericum perforatum* (Guttiferae). **Tetrahedron Letters**, v.45, p.9657-9659, 2004.

ZANOLI, P.; RIVASI, M.; BARALDI, C.; BARALDI, M. Pharmacological activity of hyperforin acetate in rats. **Behavioral Pharmacology**, v.13, p.645-651, 2002.

ZOBAYED, S.M.A.; AFREEN, F.; KOZAI, T. Temperature stress can alter the photosynthetic and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.43, p.977-984, 2005.

8. ANEXOS

Meio Mínimo Essencial de Eagle (Meio MEM)

MEM em pó.....	48,09 g
Solução Tris 1 M.....	250 ml
Água desmineralizada.....	5000 ml

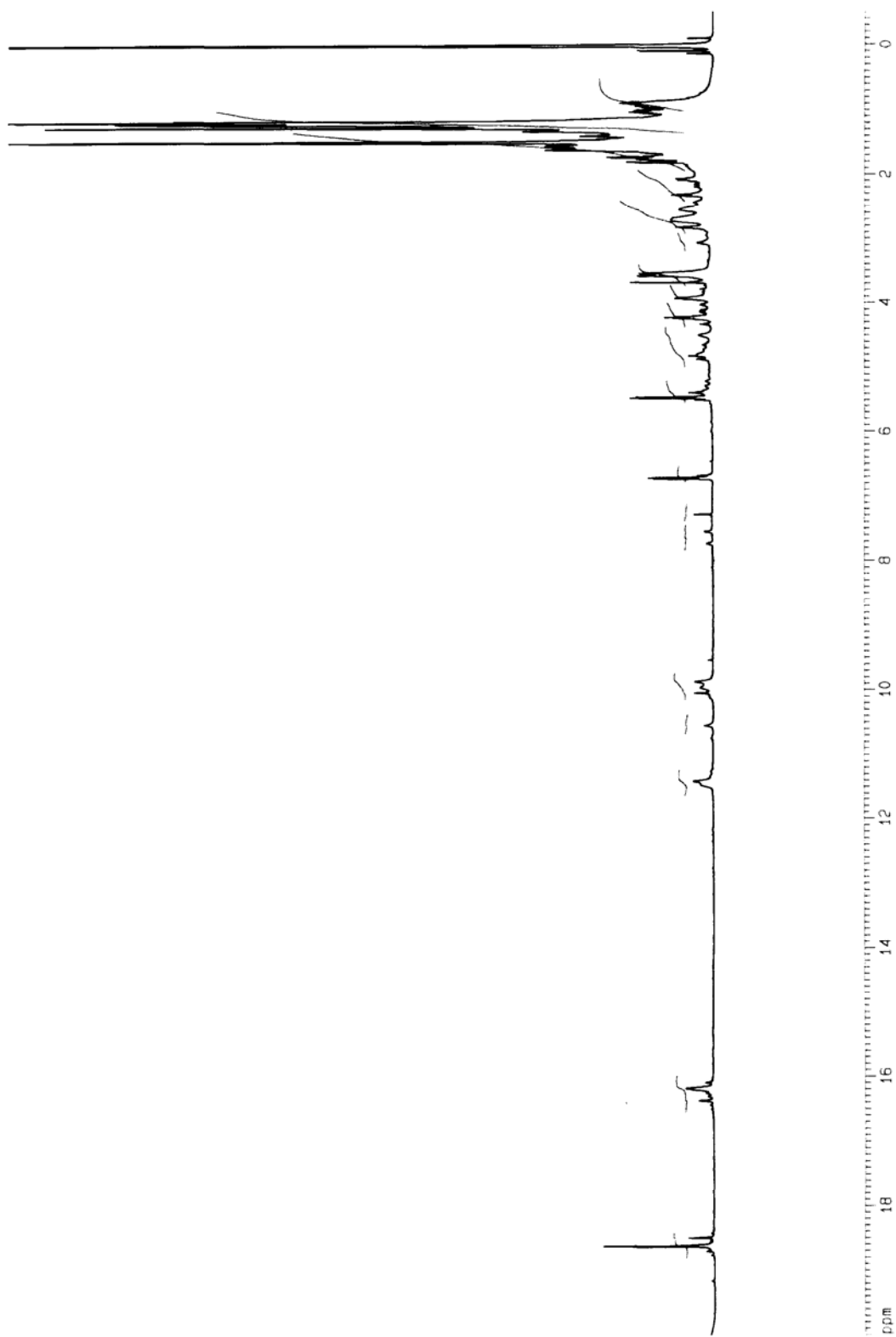
Acerta-se o pH em 7,2 com bicarbonato de sódio.

Tampão Fosfato Salina (PBS)

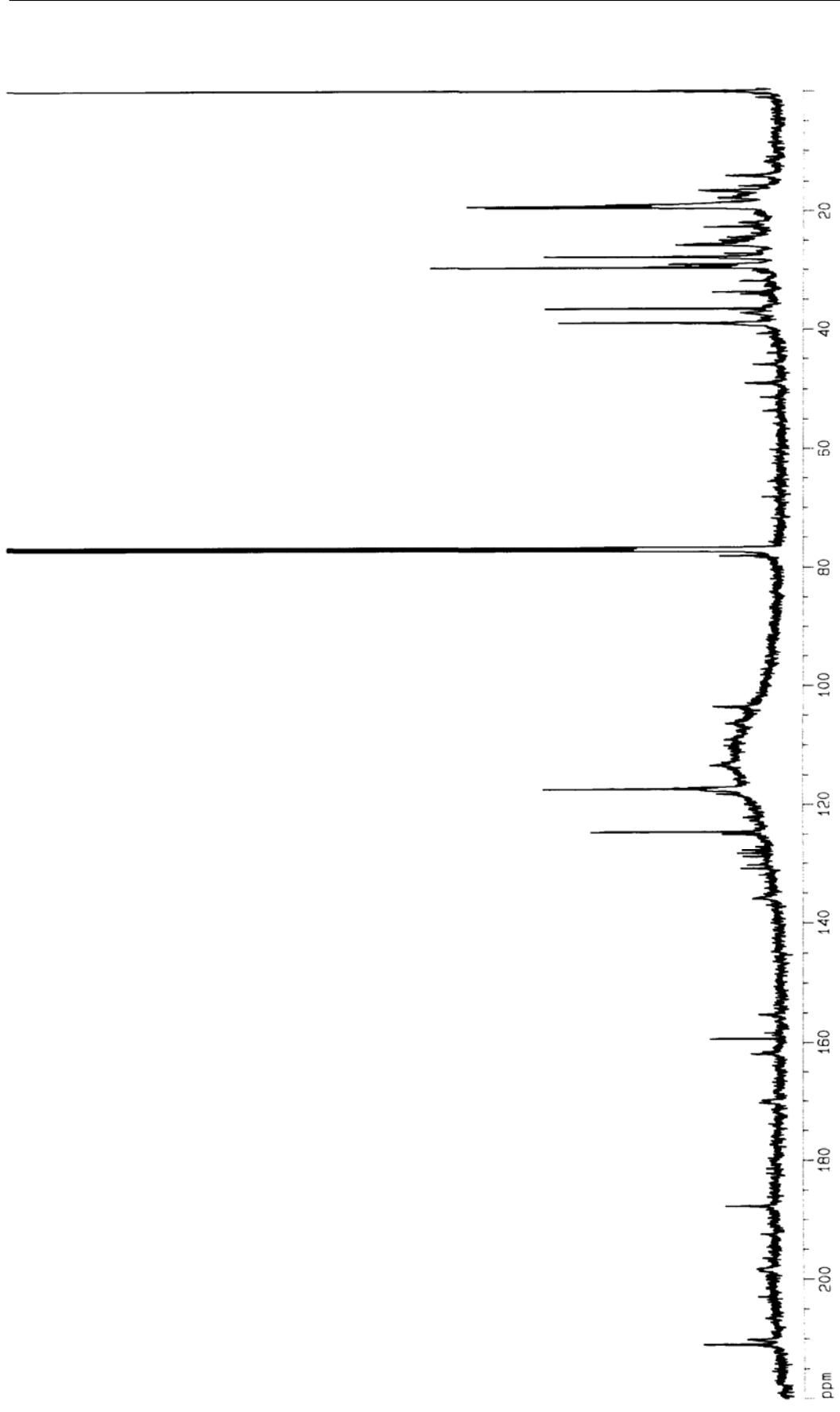
Cloreto de sódio.....	85 g
Fosfato dibásico de sódio.....	15,5 g
Fosfato monobásico de sódio.....	2,3 g
Água q.s.p.....	1000 ml

ANEXO 2

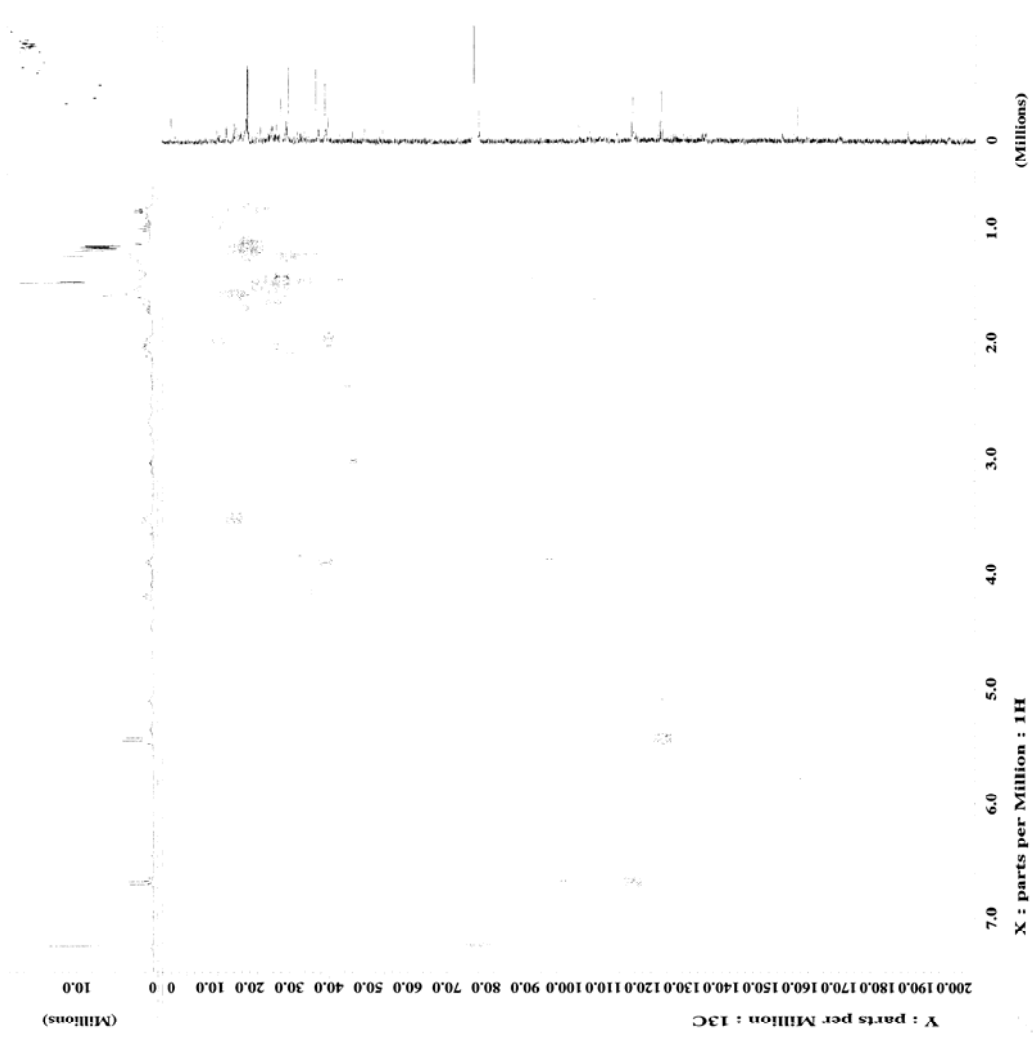
Espectros do composto HCH1



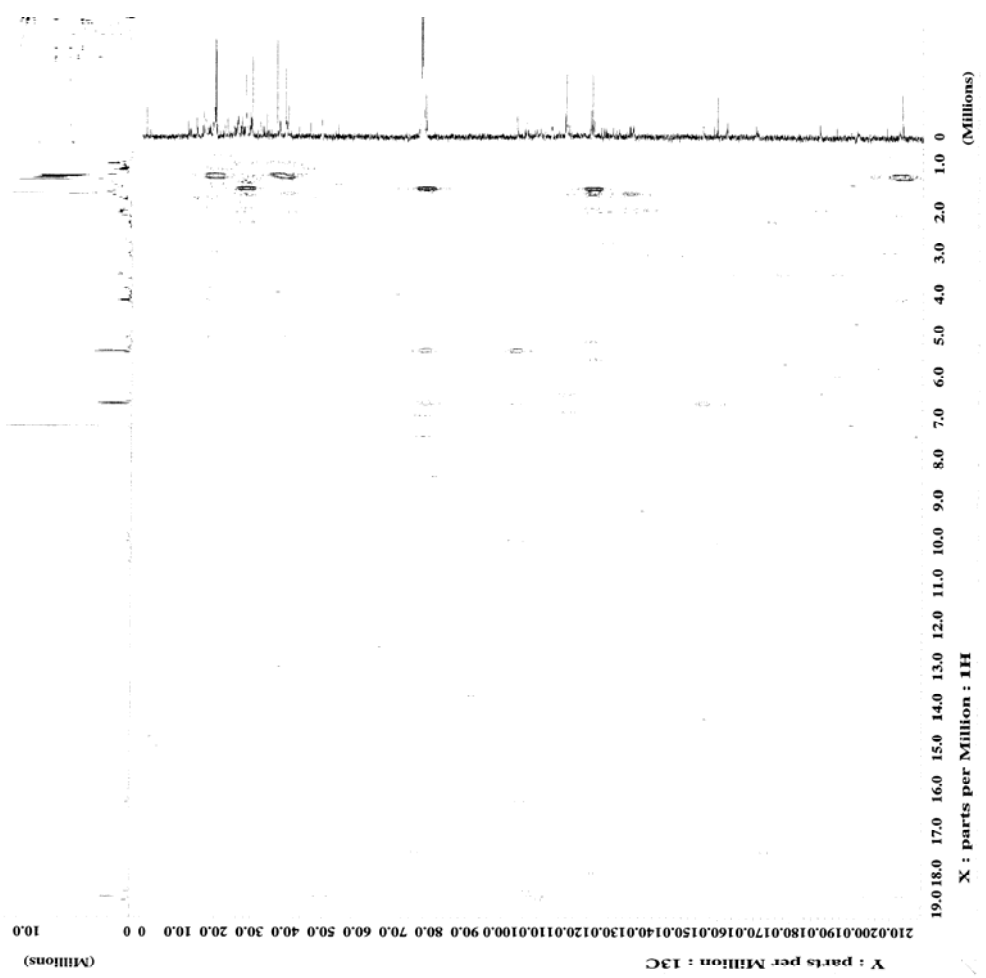
Espectro de RMN H^1 de HCH1 em CDCl_3 a 400 MHz



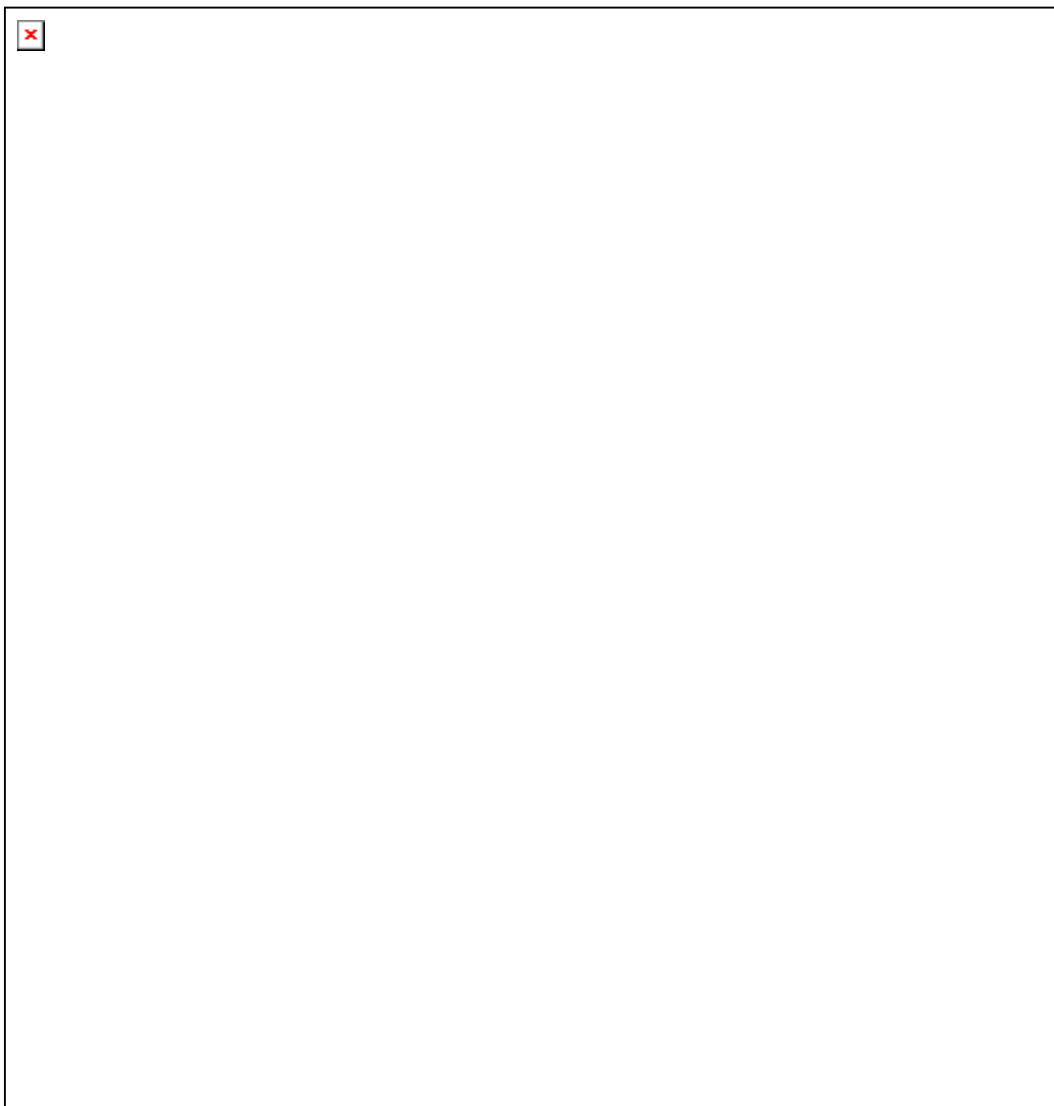
Espectro de RMN C^{13} de HCH1 em CDCl_3 a 100 MHz



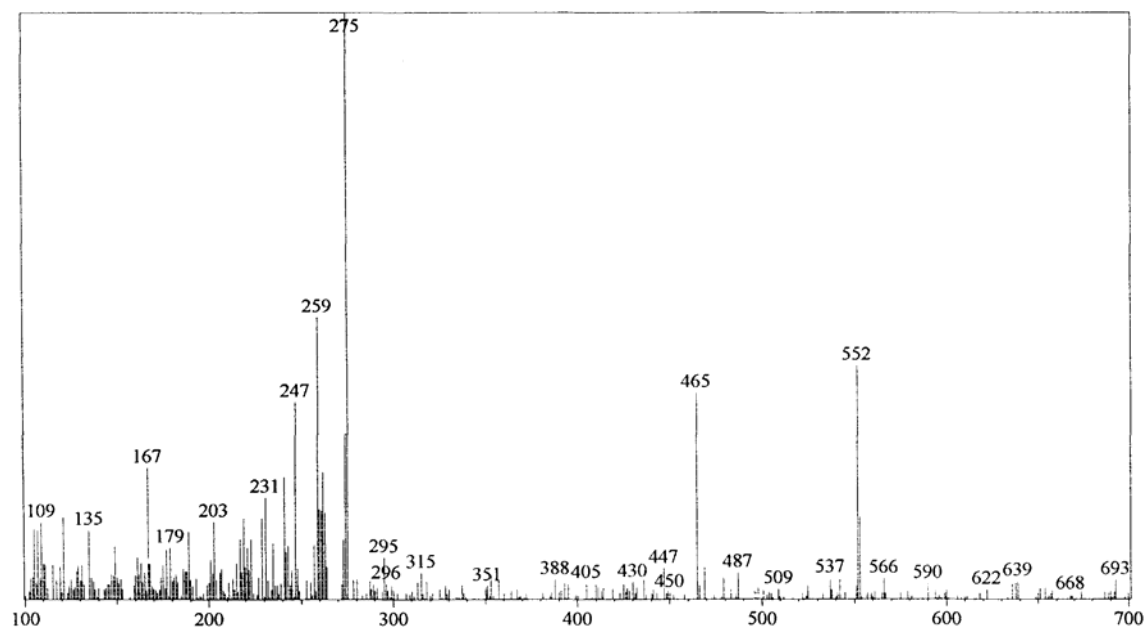
Espectro de correlação de HMQC de HCH1 em CDCl₃ a 400/100 MHz



Espectro de correlação de HMBC de HCH1 em CDCl₃ a 300/75 MHz

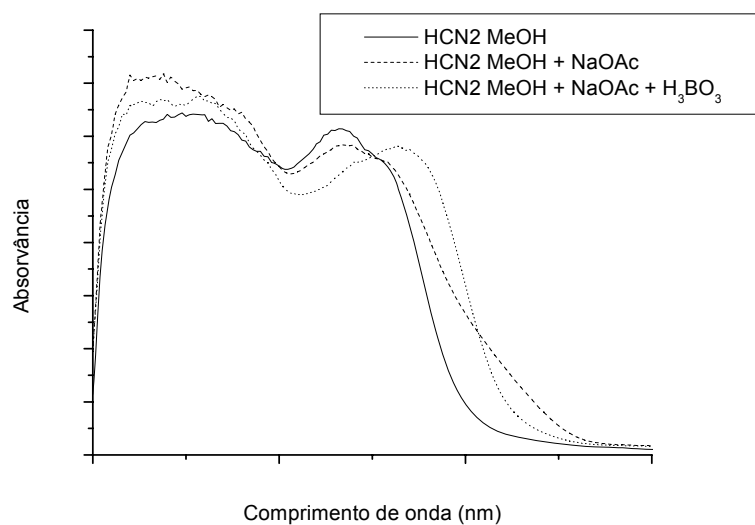
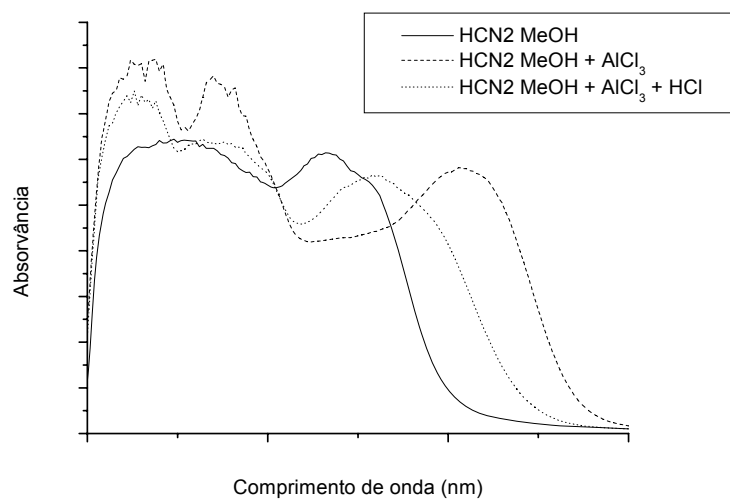
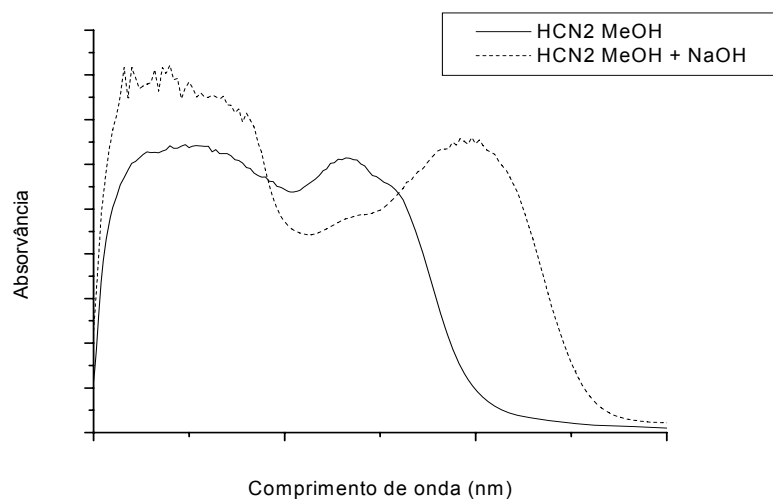


Espectro de correlação NOESY de HCH1 em CDCl₃ a 300/75 MHz



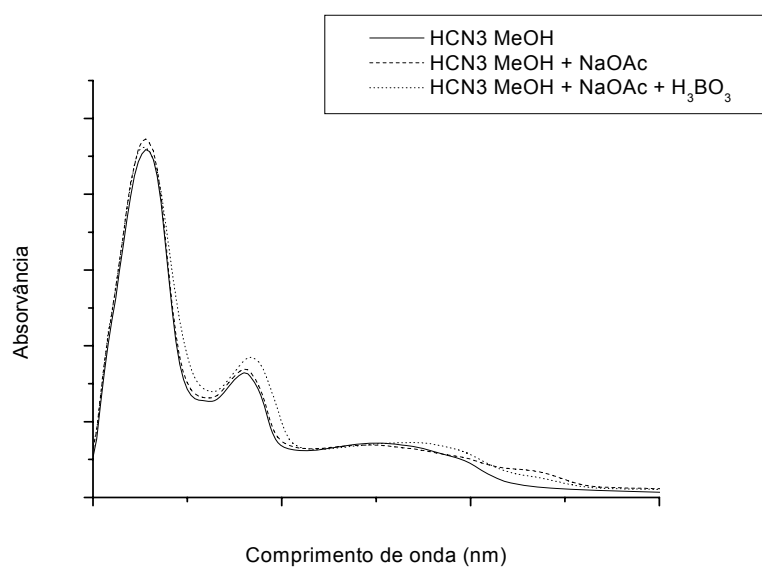
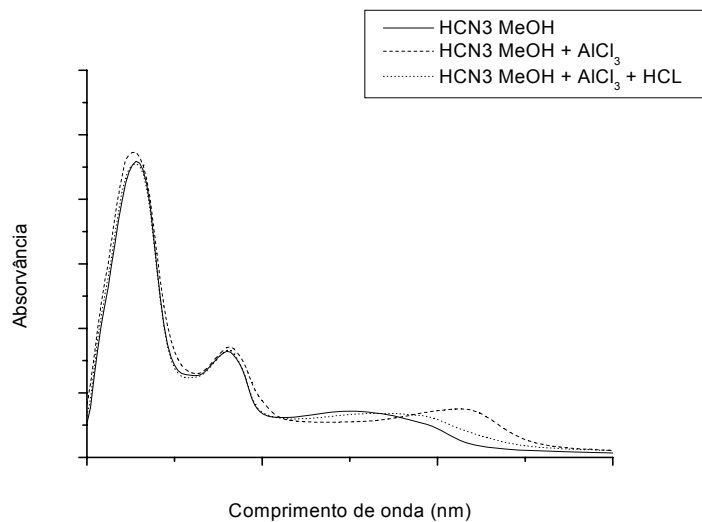
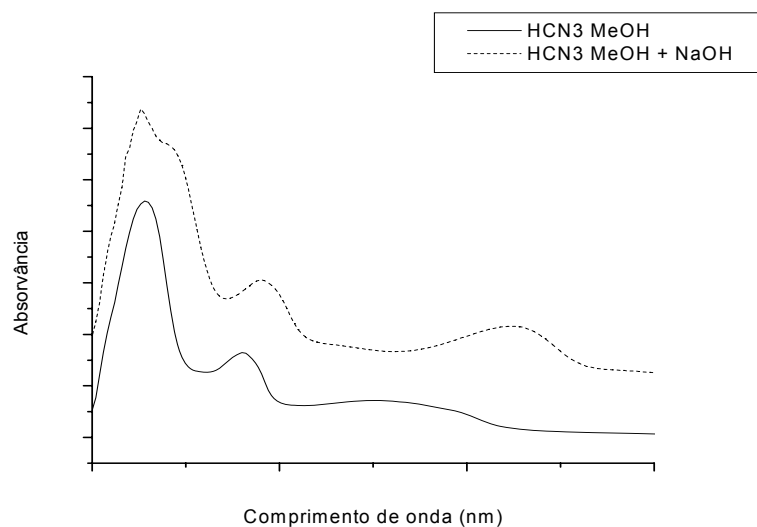
Espectro de massas de HCH1

Espectros do composto HCN2



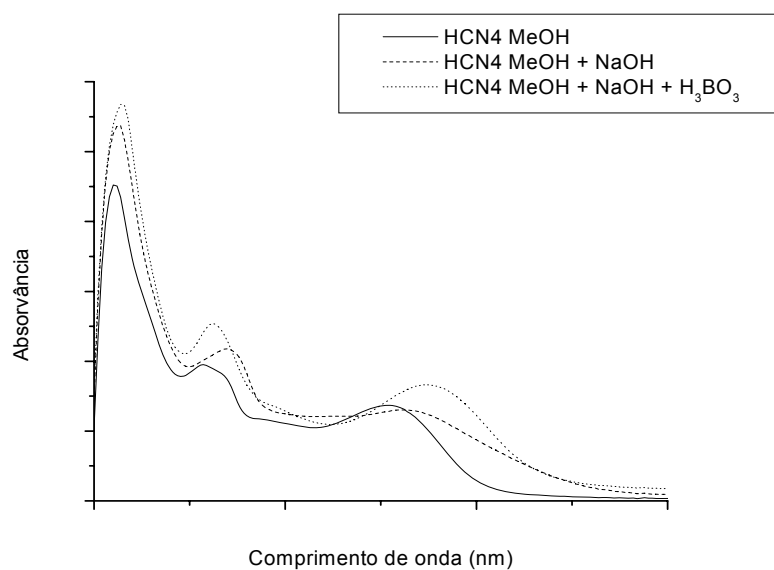
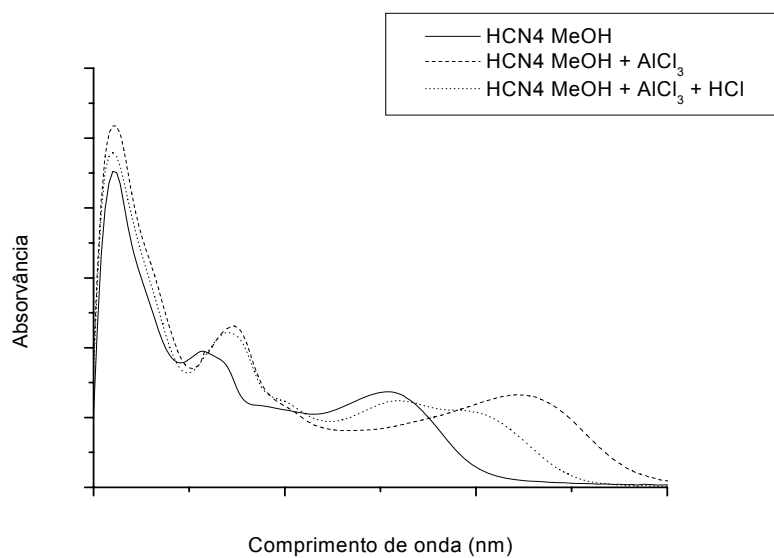
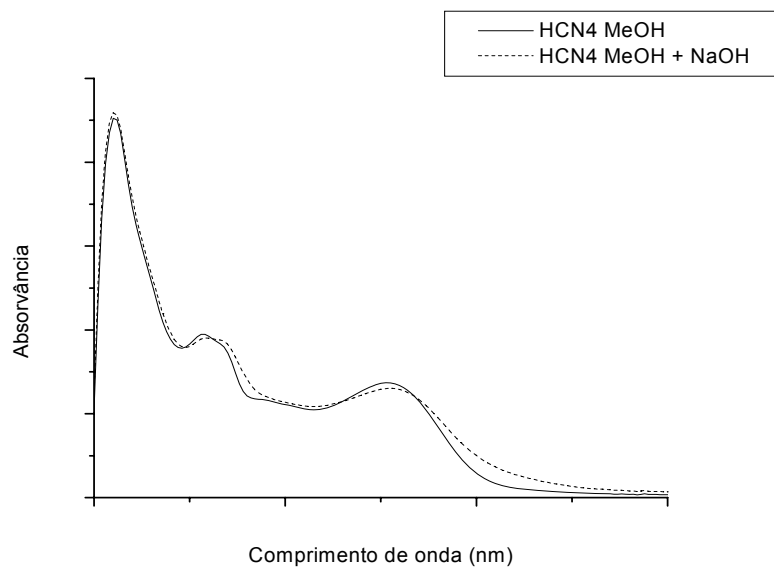
Espectros de UV da substância HCN2

Espectros do composto HCN3



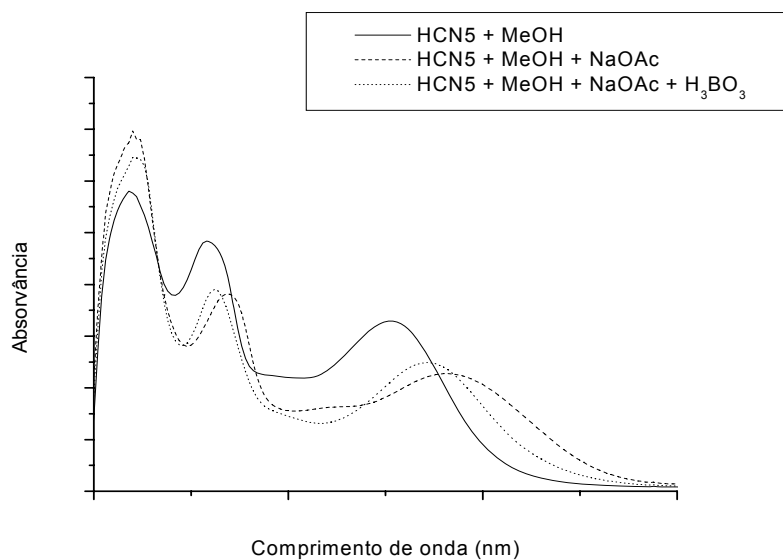
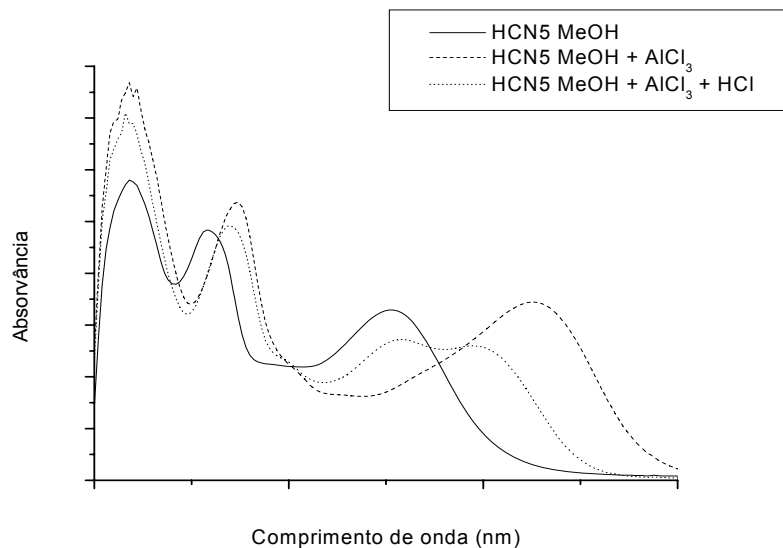
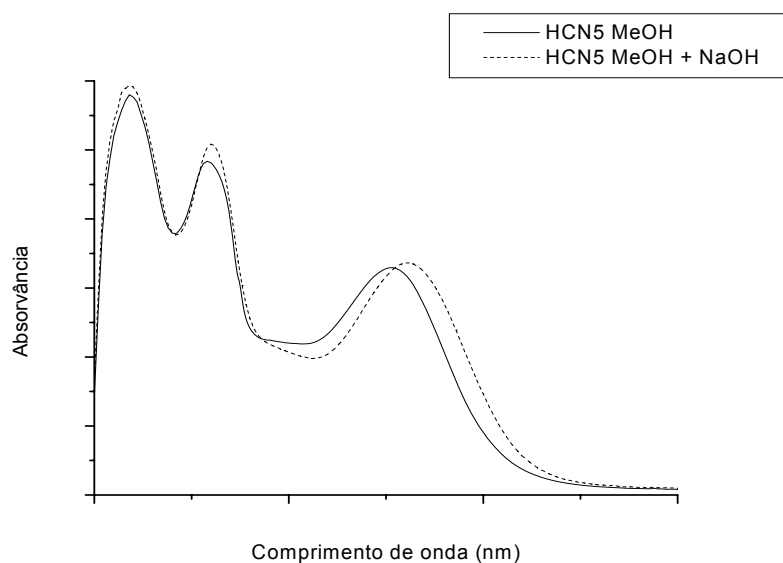
Espectros de UV da substância HCN3

Espectros do composto HCN4



Espectros de UV da substância HCN4

Espectros do composto HCN5



Espectros de UV da substância HCN5

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Identificar a substância HCN3;
- Testar as substâncias hiperbrasilol B, amentoflavona e HCN3 contra HSV-1 cepa aciclovir resistente;
- Revalidar a quantificação da atividade antiviral das amostras hiperbrasilol B, amentoflavona e HCN3 pela técnica da redução do título viral;
- Determinar a ação virucida das amostras hiperbrasilol B, amentoflavona e HCN3 contra o HSV-1.