

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

Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e
avaliação da atividade antiangiogênica

CAROLINA NÖR

PORTO ALEGRE, 2006.

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

Análise química e taxonômica de espécies de *Hypericum* e
avaliação da atividade antiangiogênica

Dissertação apresentada por **Carolina Nör**
para obtenção do GRAU DE MESTRE em
Ciências Farmacêuticas

Orientador: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31.3.2006, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Miriam Anders Apel
Universidade de Santa Cruz do Sul

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

Profa. Dra. Vera Lúcia Eifler Lima
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

N822a Nor, Carolina
Análise química e taxonômica de espécies de hypericum e avaliação da atividade antiangiogênica – Porto Alegre : UFRGS, 2006. - xix, 166p.: il.

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

1. Hypericum. 2. Floroglucinol. 3. Quimiotaxonomia. 4. Atividade Antiangiogênica. I. Von Poser, Gilsane Lino. II. Título.

CDU: 615.322

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria C. F. Ferreira, CRB10/480

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Produção de Matéria-prima da Faculdade de Farmácia da UFRGS e no laboratório do “Department of Cariology, Restorative Sciences, and Endodontics” – Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, na cidade de Ann Arbor, sob supervisão local do Prof. Dr. Jacques E. Nör. A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES.

Este trabalho foi impresso na Gráfica da UFRGS com auxílio da CAPES.

Só o desejo inquieto, que não passa,
Faz o encanto da coisa desejada...
E terminamos desdenhando a caça
Pela doida aventura da caçada.

DA ETERNA PROCURA – Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

À profa. Gilsane, minha querida orientadora, por todo incentivo, apoio, carinho, paciência e, sobretudo, amizade.

Às minhas amigas e colegas de trabalho, Dani A., Dani F. e Paula, pelo convívio e companheirismo em todos os momentos.

À Kênia, minha querida ajudante, pela dedicação, responsabilidade e carinho com que desempenhou todas as tarefas.

Ao Alexandre, por estar sempre ao lado, ajudando e aconselhando.

Às gurias do laboratório, Juliana, Simone, Bruna e Ana Cristina, por tornarem o ambiente de trabalho tão agradável.

Ao Sérgio, pelas coletas. À Aline, pela disposição e alegria. Ao Júlio por sempre ser tão prestativo.

Ao pessoal do laboratório de farmacologia, pelo estímulo a mais para o estudo da fitoquímica. E, especialmente à Keka, pelas estatísticas.

Ao tio Jacques e tia Silvia, por proporcionarem tantas oportunidades e, principalmente, por todo aprendizado, carinho e acolhida.

Ao Ben, Esther e todos os novos amigos de Michigan, pela paciência, hospitalidade, mas acima de tudo, pelo conhecimento compartilhado.

Ao meu pai, minha mãe, Felipe e Nair por proporcionarem todos os meios para a realização desse sonho.

SUMÁRIO

	Introdução geral	1
	Objetivos gerais	7
	Capítulo 1 – Análise química de espécies de <i>Hypericum</i> nativas do Rio Grande do Sul	11
1.1	Introdução	13
1.2	Objetivos	14
1.3	Revisão da literatura	14
1.3.1	Dados botânicos	14
1.3.2	Dados químicos e biológicos	15
1.3.2.1	Quinonas policíclicas	15
1.3.2.2	Xantonas	16
1.3.2.3	Benzofenonas	16
1.3.2.4	Derivados de floroglucinol	17
1.3.2.5	Flavonóides	18
1.3.2.6	Benzopiranos	19
1.3.2.7	Ácidos fenólicos	19
1.3.2.8	Taninos	20
1.3.2.9	Óleos voláteis	20
1.4	Materiais e Métodos	21
1.4.1	Material vegetal	21
1.4.2	Preparação dos extratos	22
1.4.3	Isolamento e purificação	23
1.4.4	Análise cromatográfica	24
1.4.4.1	Produtos apolares	24
1.4.4.2	Produtos polares	24
1.4.4.3	Extratos das flores	25
1.4.5	Elucidação estrutural	25

1.5	Resultados e Discussão	26
1.5.1	Isolamento de derivados de floroglucinol	26
1.5.1.1	Substância Hp4	27
1.5.1.2	Substância Hc1	30
1.5.1.3	Substância Hc2	32
1.5.2	Isolamento de flavonóides	36
1.5.2.1	Substância HcF1	37
1.5.2.2	Substância HcF15	43
1.5.3	Análise comparativa das flores	48
1.6	Conclusões	49
	Capítulo 2 – Derivados de floroglucinol: significância taxonômica e importância farmacológica.....	51
2.1	Introdução	53
2.2	Objetivos	55
2.3	Revisão da literatura	55
2.3.1	Dados taxonômicos	55
2.3.2	Derivados de floroglucinol	58
2.3.2.1	Biossíntese de derivados de floroglucinol	61
2.3.2.2	Distribuição de derivados de floroglucinol nas diferentes seções do gênero <i>Hypericum</i>	66
2.3.2.3	Atividades biológicas	82
2.3.2.3.1	Atividade antidepressiva	82
2.3.2.3.2	Atividade antimicrobiana	84
2.3.2.3.3	Atividade antiproliferativa	87
2.3.2.3.4	Outras atividades	88
2.3.2.4	Derivados de floroglucinol encontrados em outros gêneros	88
2.4	Materiais e métodos	89
2.5	Resultados e discussão	90
2.6	Conclusões	94
	Capítulo 3 – Estudo preliminar da atividade antiangiogênica de benzopiranos	95

3.1	Introdução	97
3.2	Objetivos	98
3.3	Revisão da literatura	98
3.3.1	Atividade antiproliferativa investigada no gênero <i>Hypericum</i>	98
3.3.1.1	Quinonas policíclicas	98
3.3.1.2	Derivados de floroglucinol	99
3.3.1.3	Benzopiranos	100
3.3.2	Angiogênese	100
3.3.3	Atividade antiangiogênica de produtos em <i>Hypericum</i>	103
3.3.3.1	Hipericina	103
3.3.3.2	Hiperforina	103
3.4	Materiais e métodos	104
3.4.1	Culturas de células	104
3.4.2	Substâncias validadas.....	104
3.4.3	Análise por fotolorimetria de sulfo-rodamina B	105
3.4.4	Análise por citometria de fluxo	106
3.4.5	Análise estatística	106
3.5	Resultados e Discussão	106
3.5.1	Avaliação da citotoxicidade	107
3.5.2	Avaliação da indução de apoptose	112
3.5.3	Avaliação da modificação das fases do ciclo celular	114
3.6	Conclusões	116
	Discussão geral	117
	Conclusões gerais	125
	Referências	129
	Anexos	147

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	Espectros de UV da substância HcF1	41
Figura 1.2	Espectros de UV da substância HcF15	46
Figura 2.1	Diagrama das seções do gênero <i>Hypericum</i>	57
Figura 2.2	Número de espécies contendo derivados de floroglucinol por seção do gênero	91
Figura 2.3	Ocorrência de derivados de floroglucinol monoméricos e diméricos por seção do gênero	92
Figura 3.1	Efeito da exposição a Hp1 , Hp2 e Hp3 no crescimento celular de HDMEC relativo a porcentagem de controle ..	108
Figura 3.2	Efeito de diferentes concentrações Hp1 , Hp2 e Hp3 sobre o crescimento de HDMEC. Com significância estatística	109
Figura 3.3	Efeito da exposição a Hp1 , Hp2 e Hp3 no crescimento celular de HDMEC relativo a porcentagem de controle ..	110
Figura 3.4	Efeito de diferentes concentrações Hp1 , Hp2 e Hp3 sobre o crescimento de HDMEC. Com significância estatística	111
Figura 3.5	Efeito da indução de apoptose de HDMEC pela exposição das compostos Hp2 e Hp3 verificado por Citometria de Fluxo	113
Figura 3.6	Efeito de diferentes concentrações Hp2 e Hp3 sobre as fases do ciclo celular de HDMEC	115

Resumo

A comercialização de fitoterápicos obtidos a partir de extratos de *H. perforatum* para o tratamento de depressão em diversas partes do mundo despertou o interesse de investigadores no estudo de plantas do gênero *Hypericum*, tanto acerca da composição química quanto das propriedades biológicas destas espécies. **Objetivos:** Investigar a constituição química de espécies nativas do gênero *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum*, entre outras); realizar um estudo quimiotaxonômico de derivados de floroglucinol em espécies de *Hypericum*. Avaliar a atividade antiproliferativa de benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* frente a células endoteliais. **Métodos:** Para o isolamento e análise dos compostos foram utilizadas técnicas cromatográficas (CC, CCD e CLAE). A elucidação estrutural foi realizada a partir de métodos espectrofotométrico (UV), espectroscópico (RMN¹H e ¹³C) e espectrométrico. A relevância taxonômica de derivados de floroglucinol foi verificada a partir de revisão da literatura. A avaliação da atividade antiangiogênica foi efetuada pelas técnicas de sulfo-rodamina B e citometria de fluxo. **Resultados e Conclusões:** De *H. caprifoliatum* e *H. polyanthemum* foram isolados três derivados de floroglucinol diméricos. Estes produtos podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos das seções *Brathys* e *Trigynobrathys* do gênero *Hypericum*, as quais incluem todas as espécies nativas do sul do Brasil. Os flavonóides, quercetina e hiperosídeo foram isolados de *H. caprifoliatum*. Os três benzopiranos testados (**Hp1**, **Hp2** e **Hp3**) demonstraram capacidade de inibir o crescimento de células endoteliais de forma dose-dependente. Os compostos **Hp2** e **Hp3** foram capazes de bloquear fases do ciclo celular.

Palavras-chave: *Hypericum*, Floroglucinol, Quimiotaxonomia, Atividade Antiangiogênica

Abstract

Chemical and taxonomic analysis of *Hypericum* species and antiangiogenic activity

The use of St. John's Wort extracts as a phytotherapy to treat depression in several countries around the world has stimulated investigators in order to study the chemical and biological properties of *Hypericum* species. **Purpose:** to investigate the chemical composition of native representatives of *Hypericum* genus (*H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum*, among others), to carry out a chemotaxonomic study about the significance of phloroglucinol derivatives in *Hypericum* species and to evaluate the antiproliferative activity of three benzopyrans isolated from *H. polyanthemum* against endothelial cells. **Methods:** for the isolation and identification of the compounds chromatographic techniques such as TLC, CC and HPLC were employed. The structures were determined through NMR spectroscopy, spectrometry and ultraviolet analyses. In order to study the significance of the phloroglucinol derivatives, data on the occurrence of these compounds was surveyed in the literature. The antiangiogenic activity was performed in both Sulforhodamine B and Flow Cytometry assays. **Results and Conclusions:** From *H. caprifoliatum* and *H. polyanthemum* three phloroglucinol derivatives with a dimeric structure were identified. These group of products could be considered as chemotaxonomic markers from species of the *Hypericum* genus belonging to the *Brathys* and *Trigynobrathys* sections, which include all the native representatives. This work also presents the isolation and structural determination of two well known flavonoids, quercetin and hyperoside, from *H. caprifoliatum*. The three benzopyrans, **Hp1**, **Hp2** and **Hp3**, showed a dose-dependant cytotoxic activity against endothelial cells. The isomers **Hp2** and **Hp3** were able to cause modifications on the normal cell cycle.

Keywords: *Hypericum*, Phloroglucinol, Chemotaxonomy, Antiangiogenic Activity

INTRODUÇÃO GERAL

Produtos naturais vêm sendo utilizados com fins terapêuticos durante toda a história da civilização humana e, por muito tempo, minerais, vegetais e produtos de origem animal representaram os recursos terapêuticos (RATES, 2001). Segundo ROSS & BRAIN (1977), a importância farmacêutica das plantas está na sua capacidade de produzir compostos orgânicos providos de atividade farmacológica ou que podem ser usados como agentes flavorizantes em formulações ou, ainda, como adjuvantes farmacêuticos.

A medicina tradicional, baseada nas propriedades terapêuticas dos vegetais, tem evoluído através dos séculos, de modo que, nos últimos anos, renovou-se o interesse na utilização de plantas ou extratos vegetais (ROUT *et al.*, 2000), provavelmente devido à eficácia demonstrada por um grande número de preparações farmacêuticas obtidas a partir de plantas medicinais (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991).

Entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são de origem exclusivamente vegetal e uma porção significativa é composta por medicamentos sintéticos obtidos a partir de precursores naturais. Contudo, a maioria das moléculas vegetais não é ainda sintetizada, sendo obtida de plantas silvestres ou por meio de cultivos extensivos. Produtos naturais têm originado moléculas protótipo, tornando possível o delineamento e o planejamento racional de novos fármacos, bem como a descoberta de novas atividades terapêuticas (RATES, 2001).

Plantas pertencentes à família Clusiaceae (ou Guttiferae, *nomina conservandum*) são bem conhecidas pela medicina popular apresentando uma ampla variedade de usos tais como anti-inflamatório, anti-hemorragico e antimicrobiano (TADA *et al.*, 1991). Representantes do gênero *Hypericum* têm sido usados tradicionalmente com propósito medicinal em várias partes do mundo e,

conseqüentemente, compostos antifúngicos, antibióticos, antivirais e anticâncer têm sido isolados destas espécies (ISHIGURO *et al.*, 1998). Dentre as cerca de 400 espécies deste gênero, *H. perforatum* L., indicada popularmente para tratar feridas, eczemas, desordens gastrintestinais e psicológicas, é a mais estudada, sendo que seus extratos são os produtos de origem vegetal que apresentam o maior número de estudos clínicos no mundo, podendo ser uma alternativa aos antidepressivos sintéticos. Na Alemanha, seu uso foi aprovado oficialmente em 1988 como medicamento antidepressivo, sendo amplamente prescrito para tratamento de depressão neste país (BLUMENTHAL *et al.*, 2000; PRADO *et al.*, 2002).

O nome "*Hypericum*" é de origem grega e significa "*Hyp*" acima e "*ericum*", imagem, por serem plantas colocadas sobre figuras religiosas a fim de afastar os espíritos malignos (ROBSON, 1977).

Apesar de ser recente o interesse científico neste gênero, os primeiros relatos do uso de *Hypericum* datam do século II a.C., sendo essas plantas utilizadas por Hipócrates e mencionadas por Dioscórides, Galeno e Plínio em suas publicações. Há relatos de que o óleo de *H. perforatum* já era empregado como cicatrizante, anti-inflamatório e anti-séptico desde a Grécia antiga. Além disso, *Hypericum* era comumente usado como anti-helmíntico, cicatrizante em hemorragias secundárias e no tratamento de incontinência urinária infantil (ROBSON, 1977; UPTON, 1997).

Além de *H. perforatum*, outras espécies do gênero são usadas na terapêutica. Nas Ilhas Canárias, infusões preparadas a partir de flores, folhas e frutos de várias espécies de *Hypericum* são usadas popularmente como vermífugo, diurético, cicatrizante, sedativo, entre outras indicações (PRADO *et al.*, 2002). Na medicina popular chinesa emprega-se *H. japonicum* Thunb. ex Murray e *H. patulum* Thunb. ex Murray no tratamento de várias doenças bacterianas, hepatite infecciosa e tumores (ISHIGURO *et al.*, 1999; ISHIGURO *et al.*, 2002). No Nepal, são utilizados *H. uralum* Buch.- Ham. ex D. Don, *H. elodeoides* Choisy e *H.*

cordifolium Choisy como antipirético. As folhas de *H. papuanum* Ridley são usadas em Nova Guiné para tratar feridas, e *H. lalandii* Choisy, em Malawi, como anti-inflamatório. Nas Ilhas Madeira, *H. perforatum* e *H. inodorum* Willd. são empregados como diurético e para doenças renais, bem como *H. humifusum* L. e *H. grandulosum*, usados em distúrbios hepáticos, pela população local (RECIO *et al.*, 1995; RIVERA & OBON, 1995; TAYLOR *et al.*, 1996; HU *et al.*, 2000, WINKELMANN *et al.*, 2000). Na África, *H. roeperanum* G. F. W. Schimper ex A. Rich. é utilizado, isoladamente ou em associações com outras plantas, no tratamento da esterilidade feminina (RATH *et al.*, 1996).

A intensa pesquisa em espécies do gênero *Hypericum*, motivada especialmente pelas atividades atribuídas a *H. perforatum*, tem levado à descoberta de muitas moléculas bioativas, destacando-se as naftodiantronas como hipericina e derivados (AWANG, 1991; TAYLOR *et al.*, 1996), diversos compostos fenólicos, como xantonas (BENNETT & LEE, 1989), flavonóides (ROCHA *et al.*, 1995) e derivados de floroglucinol (JAYASURIYA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996). Estes últimos sendo moléculas com atividades anti-herpética, anti-helmíntica e antibacteriana já determinadas (YAMAKI *et al.*, 1994).

Recentemente, o gênero vem recebendo atenção especial pelo efeito anti-retroviral, atribuído a hipericina. Várias espécies foram ativas frente a bactérias gram-positivas *in vitro* e demonstraram que derivados de floroglucinol e ácido filicínico são os responsáveis por estes efeitos (ROCHA *et al.*, 1995). A atividade antiproliferativa também vem sendo verificada em espécies do gênero, sendo que dentre as substâncias potencialmente responsáveis por este efeito estão os derivados fenólicos de diferentes classes químicas como quinonas policíclicas, derivados de floroglucinol, xantonas, benzopiranos e benzofenonas (FERRAZ, 2004).

OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos deste trabalho foram, primeiramente, a análise química de espécies do gênero *Hypericum* (*H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum*, *H. rigidum*) nativas do Rio Grande do Sul, ou seja, isolamento, purificação e elucidação estrutural de constituintes, bem como a realização de uma análise química comparativa entre as espécies (*H. caprifoliatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum*, *H. rigidum*).

A partir de revisão bibliográfica objetivou-se realizar um estudo visando verificar a significância taxonômica de derivados de floroglucinol em espécies de *Hypericum*.

Além da análise fitoquímica e do estudo taxonômico, pretendeu-se avaliar também a atividade antiproliferativa de produtos isolados de espécies nativas do sul do Brasil, como os derivados benzopirânicos, frente a células de endotélio humano.

Para tanto, esta dissertação está organizada em três capítulos. O primeiro trata da análise química e a elucidação estrutural das substâncias isoladas de espécies de *Hypericum*. O segundo capítulo aborda a significância quimiotaxonômica de derivados de floroglucinol em espécies do gênero. O terceiro apresenta a avaliação da atividade antiproliferativa de derivados benzopirânicos frente a células endoteliais.

Capítulo 1 – Análise química de espécies de
Hypericum nativas do Rio Grande do Sul

1.1. Introdução

A comercialização de fitoterápicos obtidos a partir de extratos de *H. perforatum* para o tratamento de casos de depressão moderada em diversas partes do mundo vem impulsionando a investigação de outras plantas do gênero *Hypericum*, tanto acerca da composição química quanto das propriedades biológicas destas espécies.

De fato, foram encontrados vários trabalhos na literatura abordando o isolamento de compostos, sendo comum a presença de fenólicos em *Hypericum*, tais como xantonas, flavonóides, taninos, naftodiantronas (quinonas policíclicas) e derivados de floroglucinol (KARTNIG *et al.*, 1989; KITANOV & NEDIALKOV, 1998; HU *et al.*, 2000; DALL'AGNOL *et al.*, 2003) e inúmeras atividades biológicas a estes atribuídas.

A partir da existência de relatos da ocorrência de flavonóides para espécies de *Hypericum* e de sua importância farmacológica (BERGHÖFER & HÖLZL, 1987; NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; CROCKETT *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2005), torna-se interessante avaliar a constituição química das frações polares das espécies nativas.

Da mesma forma, os derivados de floroglucinol, estimulados pela ação antidepressiva atribuída a hiperforina presente em *H. perforatum* (VEROTTA *et al.*, 1999; VEROTTA *et al.*, 2000; DE SHAN *et al.*, 2001; VEROTTA, 2002), são amplamente estudados. Assim, evidencia-se o interesse na análise dos extratos apolares de plantas nativas, onde estes compostos são freqüentemente encontrados.

1.2. Objetivos

Isolamento, purificação e elucidação estrutural dos compostos majoritários provenientes do metabolismo secundário, sobretudo derivados fenólicos, presentes nos extratos apolares das espécies *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht., *H. rigidum* St.-Hil. e *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt, bem como nos extratos polares das duas primeiras.

Análise comparativa dos extratos hexânicos obtidos das flores de *Hypericum myrianthum* Cham. & Schldl., *H. polyanthemum* Klotzsch ex Reichardt, *H. caprifoliatum* Cham. & Schlecht., *H. connatum* Lam. e *H. rigidum* St.-Hil.

1.3. Revisão da literatura

1.3.1. Dados botânicos

Em geral, as espécies do gênero *Hypericum* apresentam-se sob forma de arbustos ou ervas, anuais ou perenes, com caules cilíndricos e afilados. As folhas são inteiras, opostas ou verticiladas, sésseis ou curtamente pecioladas, de venação pinada a reticulada. Apresentam inflorescências de pequenas flores, actinomorfas, hermafroditas, com pétalas livres, assimétricas amarelas, vermelhas ou alaranjadas, freqüentemente com estrias vermelhas. Cálice de 4-5 sépalas desiguais, imbricadas ou valvadas e parcialmente unidas, com glândulas amarelas ou pretas. Os estames apresentam-se unidos de diversas formas ou, as vezes, sem a presença do tronco comum. Ovário súpero, 3-5 carpelado; placentação axilar, pseudo-axilar ou parietal. Sementes pequenas, numerosas e não-aladas (JIMÉNES, 1980; ROBSON, 1981).

As espécies se distribuem por regiões temperadas e subtropicais do planeta, desde o nível do mar até altitudes superiores a 4000 m e se adaptam aos mais diversos meios ecológicos (JIMÉNES, 1980).

1.3.2. Dados químicos e biológicos

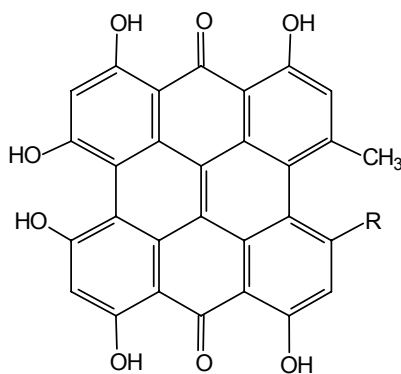
Espécies da família Clusiaceae exibem forte tendência ao acúmulo de substâncias fenólicas, tais como quinonas policíclicas, xantonas, flavonóides, derivados de floroglucinol, benzopiranos, benzofenonas, ácidos fenólicos e taninos, as quais, freqüentemente, são responsáveis pelos efeitos medicinais atribuídos a representantes desta família.

1.3.2.1. Quinonas policíclicas

Dentre as quinonas policíclicas, hipericina (1) e pseudo-hipericina (2) são, sem dúvida, as mais estudadas em *Hypericum*. Estas substâncias estão presentes em pequenas glândulas negras ou pardas encontradas nos órgãos vegetativos e parecem ser restritas a esse gênero (KITANOV, 2001; AGOSTINIS *et al.*, 2002), embora estejam ausentes nas espécies nativas (FERRAZ *et al.*, 2002a). Estudos demonstram diversas propriedades biológicas para estes compostos, como fotodinâmica no tratamento do câncer, antiviral *in vitro* e *in vivo* e inibidora da MAO (EBERMANN *et al.*, 1996; NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; AGOSTINIS *et al.*, 2002; CAVARGA *et al.*, 2005; VIANA *et al.*, 2005).

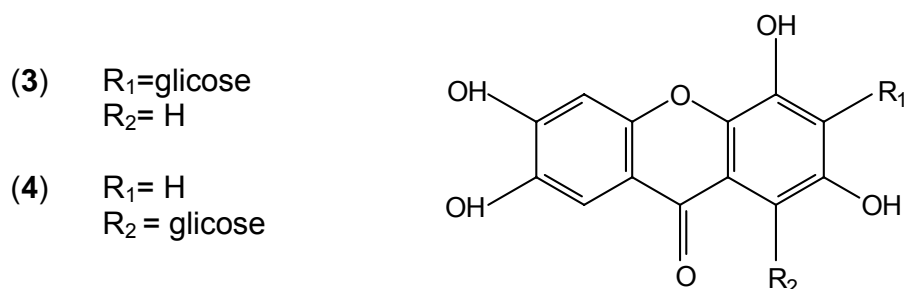
(1) R = CH₃

(2) R = CH₂OH



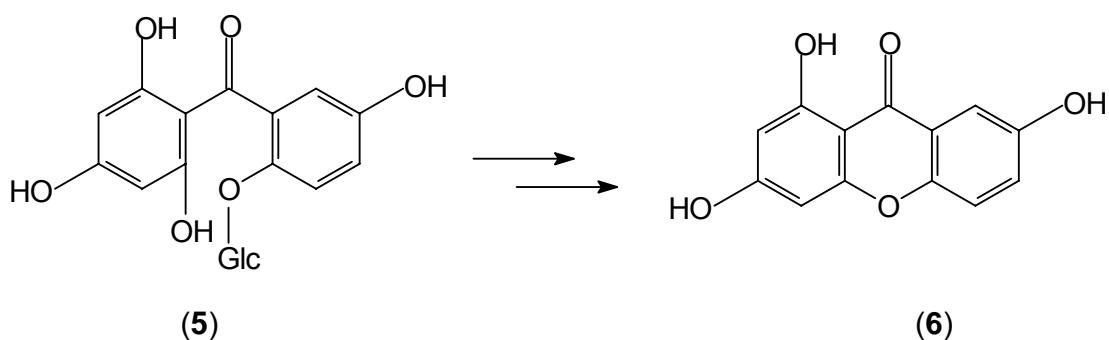
1.3.2.2. Xantonas

Xantonas, constituintes típicos de Clusiaceae, são encontrados em diversas espécies de *Hypericum* (BENNET & LEE, 1989; NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997). Estas estruturas se caracterizam por apresentar fluorescência amarelo-alaranjada sob luz UV, o que possibilita a sua distinção dos demais compostos fenólicos. A presença de xantonas C-glicosiladas parece ter um importante valor taxonômico, uma vez que esta classe de produtos é característica da subfamília Hypericoideae e ausente nas demais subfamílias de Clusiaceae. Como exemplo deste grupo pode-se citar a mangiferina (3) e isomangiferina (4), que foram encontradas em 26 e 33 espécies, respectivamente, dos 36 representantes de *Hypericum* avaliados por KITANOV & NEDIALKOV em 1998.



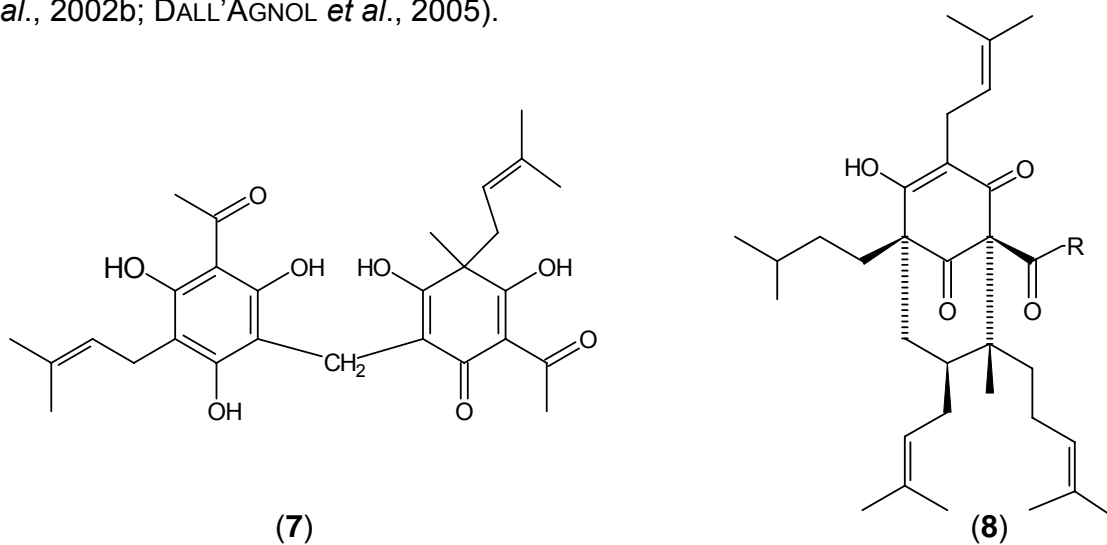
1.3.2.3. Benzofenonas

A ocorrência de benzofenonas não é comum em *Hypericum*, embora seja freqüente na família Clusiaceae (BENNET & LEE, 1989; KITANOV & NEDIALKOV, 2001). Acredita-se que benzofenonas O-glicosiladas (5) participem da biossíntese de xantonas (6) sendo seus precursores biogênicos, como observou-se em *H. annulatum* (KITANOV & NEDIALKOV, 2001). Das espécies nativas, apenas em *H. carinatum* foi verificada a presença de benzofenonas (BERNARDI *et al.*, 2005).



1.3.2.4. Derivados de floroglucinol

De espécies do gênero *Hypericum* muitos derivados de floroglucinol têm sido isolados, compostos estes que, freqüentemente, estão relacionados com as atividades biológicas dessas plantas, como drumondina F (7) de *H. drummondii*, que demonstrou atividade antibiótica (JAYASURIYA *et al.*, 1991), hiperevolutinas de *H. revolutum*, com atividade antiproliferativa (DÉCOSTERD *et al.*, 1989) e hiperforina (8), envolvida na ação antidepressiva de *H. perforatum* (VEROTTA *et al.*, 2000; DE SHAN *et al.*, 2001; ADAM *et al.*, 2002). Algumas das espécies nativas do Rio Grande do Sul foram avaliadas quanto à sua composição química e derivados de floroglucinol foram encontrados nos extratos hexânicos destas plantas (FERRAZ *et al.*, 2002b; DALL'AGNOL *et al.*, 2005).



1.3.2.5. Flavonóides

Os flavonóides são encontrados abundantemente em *Hypericum*, sendo os derivados glicosilados da quercetina, como hiperosídeo (**9**), rutina (**10**), quercitrina (**11**) e isoquercitrina (**12**), os mais comuns. Há, no entanto, uma pequena quantidade de quercetina (**13**) livre, provavelmente, decorrente da hidrólise dos glicosídeos durante a secagem e o processamento do material vegetal. Glicosídeos com agliconas mono ou tri-hidroxiladas no anel B, como canferol e miricetina também estão presentes, assim como a biflavona amentoflavona (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; CROCKETT *et al.*, 2005).

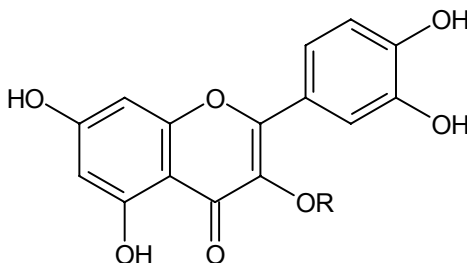
(**9**) R= β -D-galactosil

(**10**) R= α -L-rutinosil

(**11**) R= α -L-ramnosil

(**12**) R= β -D-glicosil

(**13**) R= H



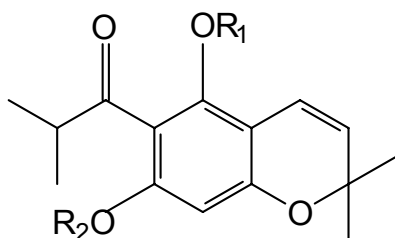
Flavonóides, especialmente flavonas não hidroxiladas na posição 3 são capazes de ligarem-se a receptores benzodiazepínicos e alguns autores acreditam que os flavonóides de *Hypericum* atuem da mesma maneira. Assim, as flavonas diméricas, I3,I18-biapigenina e amentoflavona, presentes em *H. perforatum*, poderiam justificar o efeito sedativo desta planta (BERGHÖFER & HÖLZL, 1987; NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997).

Além disso, acredita-se que flavonóides possam estar envolvidos na ação antidepressiva de *Hypericum perforatum*, devido a sua capacidade de inibição de enzimas como MAO (monoaminoxidase), COMT (catecol-O-metiltransferase) e NOS (óxido nítrico sintase) (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; BUTTERWECK *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2004).

A propriedade antioxidante está relacionada ao conteúdo flavonoídico de diversas espécies, entre elas, *H. triquetrifolium*, *H. androsaemum* e *H. perforatum*, podendo, em parte, justificar os efeitos medicinais atribuídos a essa última, como, os promovidos por radicais livres e a ação antiinflamatória (SILVA *et al.*, 2005).

1.3.2.6. Benzopiranos

A ocorrência de benzopiranos é menos comum em *Hypericum*. Até o momento, estes compostos foram identificados em apenas quatro espécies deste gênero, quais sejam, *H. japonicum* (WU *et al.*, 1998), *H. revolutum* (DÉCOSTERD *et al.*, 1986), *H. annulatum* (NEDIALKOV *et al.*, 2002) e a espécie nativa *H. polyanthemum*, da qual foram isolados três compostos, codificados **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, (14-16) com atividade antiproliferativa e antimicrobiana (FERRAZ *et al.*, 2001; DALL'AGNOL *et al.*, 2005; FERRAZ *et al.*, 2005a).



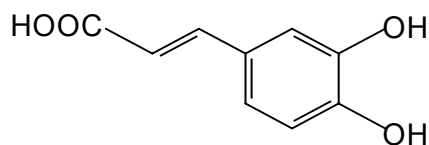
(14) R₁=CH₃ e R₂=CH₃

(15) R₁= CH₃ e R₂=H

(16) R₁=H e R₂= CH₃

1.3.2.7. Ácidos fenólicos

Os representantes deste grupo como ácido cafeico, clorogênico e isoclorogênico têm sido relatados para diversas espécies de *Hypericum*, incluindo algumas das nativas do Rio Grande do Sul. O ácido clorogênico (17), presente em *H. perforatum* e *H. carinatum*, por exemplo, exibe atividade colerética *in vivo* (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; DALL'AGNOL *et al.*, 2003).



(17)

1.3.2.8. Taninos

Em espécies de *Hypericum*, os taninos, moléculas reconhecidamente antimicrobianas, estão presentes em média de 6 a 12%, e os níveis mais altos são observados durante o período de floração. Dentre estes, os taninos condensados, triflavonóides e heptaflavonóides (3 a 7 unidades de flavan-3-ol ou flavan-3,4-diol) são os mais comuns (KARTNIG *et al.*, 1989; NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; DALL'AGNOL *et al.*, 2003). De seis espécies nativas analisadas, *H. ternum* e *H. connatum* apresentaram os maiores teores (DALL'AGNOL *et al.*, 2003).

1.3.2.9. Óleos voláteis

Dentre os constituintes da fração volátil de espécies de *Hypericum*, os mais abundantes são os alcanos, principalmente nonanos e undecanos, embora monoterpenos (α -pineno, β -pineno, mirceno e limoneno) e sesquiterpenos (cariofileno e humuleno) também estejam presentes. Estas substâncias são liberadas de cavidades secretoras encontradas na epiderme de folhas e flores e são responsáveis por diversas ações, tanto para a planta, como defesa frente a microorganismos, quanto para o homem, a partir de diversas atividades já relatadas (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; FERRAZ *et al.*, 2005b).

1.4. Materiais e Métodos

As etapas de preparação do material vegetal, obtenção dos extratos, isolamento e purificação dos produtos foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Os espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C empregados na elucidação das estruturas foram obtidos na Faculté de Pharmacie de Amiens (França) e na Universidade Estadual do Norte Fluminense. A análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e os espectros na região do Ultravioleta (UV) foram realizados na Central Analítica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, em equipamentos cedidos pela prof^a Dra. Teresa Dalla Costa e pelo prof^o Dr. Pedro Ros Petrovick, respectivamente.

Os solventes e reagentes empregados foram de procedência Nuclear[®], Quimex[®], Dinâmica[®], Synth[®] e Merck[®].

1.4.1. Material Vegetal

As partes aéreas de *H. caprifoliatum*, *H. rigidum* e *H. polyanthemum* foram coletadas, em época de floração, no município de Viamão, na região dos Aparados da Serra e em Jaquirana, no Rio Grande do Sul, respectivamente. As espécies foram devidamente identificadas pelo botânico Sérgio Bordignon do Departamento de Botânica da ULBRA e exsiccatas depositadas no herbário ICN (Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul) sob número de registro Bordignon 1400, Bordignon *et al.* 3063 e Bordignon 1429.

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

As flores de *Hypericum myrianthum* (Paraíso do Sul, Bordignon 1402), *H. polyanthemum*, *H. caprifoliatum*, *H. connatum* (Capão do Leão, Bordignon 1527) e *H. rigidum* foram separadas dos ramos, secas em ambiente arejado e ao abrigo da luz e rasuradas.

1.4.2. Preparação dos extratos

Inicialmente, foram preparados os extratos hexano das partes aéreas floridas das espécies (*H. caprifoliatum*, *H. polyanthemum* e *H. rigidum*), uma vez que é na porção mais lipofílica que se encontram os derivados de floroglucinol, compostos de interesse desta etapa do trabalho. Para tanto, cada uma das plantas moída foi submetida à maceração estática utilizando hexano como solvente, por períodos de 24 horas até o esgotamento do material vegetal. A concentração dos extratos foi realizada em evaporador rotatório sob pressão reduzida e temperatura não superior a 55°C (Fisatom®). A seguir, os extratos foram tratados com acetona, filtrados para a remoção de cera e novamente concentrados, para serem então pesados.

Os extratos metanólicos de *H. caprifoliatum* e *H. rigidum* foram obtidos a partir da maceração estática do material vegetal resultante da extração com hexano, até seu esgotamento. O extrato, após concentrado, foi então suspenso em água destilada e filtrado com papel filtro. O filtrado foi particionado em pêra de decantação com acetato de etila (F1) e *n*-butanol (F2). A fração F1 foi levada à secura em evaporador rotatório.

Para a obtenção dos extratos das flores, foram pesados 500 mg de flores de cada uma das espécies (*Hypericum myrianthum*, *H. polyanthemum*, *H. caprifoliatum*, *H. connatum* e *H. rigidum*). O material vegetal foi submetido à maceração estática com 100 ml de hexano até o esgotamento. Posteriormente, os

extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório e redissolvidos em 5 ml de metanol grau CLAE e filtrados (membrana de 0,22 µm, Merck®).

1.4.3. Isolamento e purificação

Nos procedimentos cromatográficos desta etapa do trabalho, foram utilizados conjunto para placas Desaga®, cuba cromatográfica Desaga®, gel de sílica 60 (70-230 mesh) Merck® na confecção das placas cromatográficas preparativas (dimensões: 20X20 cm, espessura: 0,5 mm) e para as colunas cromatográficas foi utilizado gel de sílica GF₂₅₄ Merck®.

Para o isolamento dos compostos de baixa polaridade, obtidos dos extratos hexano, foram realizados sucessivos processos cromatográficos, primeiramente coluna cromatográfica para o fracionamento do extrato, utilizando como eluente misturas de hexano e diclorometano em polaridade crescente. As frações que continham produtos de interesse foram reunidas e submetidas à cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa, para sua purificação.

As frações F1 de cada espécie, obtidas dos extratos metanólicos foram submetidas à cromatografia em coluna, a qual foi eluída com um sistema gradiente composto por diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente. As frações de composição semelhante foram reunidas e cromatografadas novamente por CCD preparativa, para a purificação dos compostos, usando sistemas eluente adequados para cada fração (acetato de etila/diclorometano 50:50; acetato de etila; acetato de etila/metanol/água 100:13,5:10).

1.4.4. Análise cromatográfica

Para a análise cromatográfica dos extratos e produtos foram utilizadas cromatofolhas de alumínio de gel de sílica GF₂₅₄ Merck®. Os cromatogramas foram visualizados sob luz Ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de 254 e 366 nm e revelados através de nebulização com reagentes cromogênicos, tais como anisaldeído sulfúrico, com posterior aquecimento a 100°C, até o desenvolvimento máximo de coloração, e reagente natural (preparados no laboratório).

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada dispendo de bomba Waters 600 e detector de absorvância em 2 comprimentos de onda (Waters 2487) com sensibilidade de 1,0 Aups; coluna Waters Nova-Pack C₁₈ (4 µm, 3,9 x 150 mm) acoplada a uma pré-coluna Waters Nova-Pack C₁₈ 60 A (3,9 x 20 mm).

1.4.4.1. Produtos apolares

Os extratos hexano, bem como suas frações e os produtos isolados foram analisados por CCD, utilizando como eluente hexano/diclorometano (3:2) e como revelador anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

1.4.4.2. Produtos polares

A análise dos extratos metanólicos e frações obtidas destes foi efetuada por CCD sendo empregados diferentes sistemas eluente (acetato de etila/diclorometano 50:50; acetato de etila; acetato de etila/metanol/água 100:13,5:10). Reagente natural foi empregado como revelador.

1.4.4.3. Extratos das flores

A análise dos extratos hexano das flores por CLAE foi realizada por comparação com substâncias padrão previamente isoladas de outras espécies do gênero *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul e cedidas (Dr. Alexandre Ferraz, ULBRA - Canoas, RS e doutoranda Ana Paula Machado Bernardi, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS) para a realização desta etapa do trabalho. Ambos os derivados de floroglucinol uliginosina B e japonicina A foram obtidos de *H. myrianthum* e hiperbrasilol B foi isolado de *H. connatum*. Os benzopiranos, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, foram isolados de *H. polyanthemum*.

Na análise para a verificação da presença de derivados de floroglucinol, eluiu-se a amostra com um sistema isocrático composto de acetonitrila/água 95:5 e 0,01% de TFA (trifluoroacetato), o fluxo de eluição foi de 0,6 ml/min e a detecção foi efetuada a partir da absorvância nos comprimentos de onda em 220 e 270 nm. O tempo de eluição foi de 30 min.

A análise das amostras quanto à presença de benzopiranos foi realizada a partir da eluição com um sistema isocrático de acetonitrila/água 60:40, fluxo de 1 ml/min, tempo de eluição de 25 min, sendo a leitura efetuada em comprimento de onda de 270 nm.

O volume de injeção de cada uma das amostras, bem como das substâncias padrão, foi de 20 µl.

1.4.5. Elucidação estrutural

A elucidação das estruturas foi realizada com base em análises físico-químicas e espectroscópicas de ultravioleta (UV), ressonância magnética nuclear

de hidrogênio (RMN¹H) e de carbono (RMN¹³C), bem como análise espectrométrica.

Os espectros na região do ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro de ultravioleta Hewlett Packard® UV-VIS, modelo HP 8452-A, com varredura de diodos em série entre 100 e 900 nm.

Os espectros de RMN¹H (400 ou 500 MHz) e de RMN¹³C (100 ou 125 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.

Os espectros de massas também 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 utilizados na elucidação estrutural dos compostos estão apresentados em anexo (**Anexos**).

1.5. Resultados e discussão

1.5.1. Isolamento de derivados de floroglucinol

No extrato hexano de *H. polyanthemum* ocorrem quatro produtos majoritários, três benzopiranos, previamente isolados por FERRAZ e colaboradores (2001), e uma substância de comportamento cromatográfico similar a derivados de floroglucinol, a qual foi isolada e denominada de **Hp4**.

Das espécies nativas de *Hypericum* testadas em *screening* para a atividade antidepressiva, apenas o extrato apolar de *H. caprifoliatum* apresentou indícios de atividade (Daudt *et al.*, 2000). A partir da análise do extrato apolar desta espécie por CCD, verificou-se a presença de dois compostos de comportamento cromatográfico característico de derivados de floroglucinol, de cor alaranjada após revelação com anisaldeído sulfúrico. Estas substâncias foram codificadas de **Hc1** e **Hc2**, sendo que a primeira é o componente majoritário e, portanto, possível responsável pela atividade antidepressiva demonstrada pelo extrato desta espécie.

A espécie *H. rigidum* também foi analisada quanto à presença de substâncias apolares. Para tanto, o extrato hexano foi fracionado, primeiramente, através de cromatografia em coluna Flash, sendo recolhidas cinco frações. A fração que pareceu ser a mais rica em compostos foi, então, novamente submetida à cromatografia em coluna. Entretanto, não foi possível o isolamento de nenhum composto, devido a ausência de um produto majoritário.

As três substâncias isoladas, **Hp4** de *H. polyanthemum* e **Hc1** e **Hc2** de *H. caprifoliatum*, foram submetidas à análise por técnicas espectroscópicas (RMN¹H e RMN¹³C), espectrofotométrica (UV) e espectrométrica e identificadas como sendo derivados de floroglucinol diméricos.

1.5.1.1. Substância Hp4

O espectro no ultravioleta de **Hp4** apresentou bandas de absorção máximas em λ de 357, 287 e 226 nm, as quais são características de substâncias diméricas formadas por uma unidade de ácido acil-filicínico e uma unidade de floroglucinol unidas por uma ponte metilênica, já previamente relatadas em *Hypericum* (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996). No espectro de massas pôde-

se verificar o pico do íon molecular $m/z=498 [M]^+$ de 55% de intensidade, o pico base $m/z=247$ e os principais fragmentos m/z 219 (53), 229 (33), 262 (41), 275 (20), 484 (30).

Analisando os espectros de RMN de ^1H do composto **Hp4** (Tabela 1.1) observam-se quatro grupos de sinais. O primeiro ocorre em campo alto onde dois sinais (δ_{H} 1,20 e 1,49 ppm) estão duplicados, referindo-se aos hidrogênios das metilas ligadas a C9 e C4, respectivamente. O segundo grupo, é composto por três sinais com deslocamento químico de δ_{H} 3,50, referente aos hidrogênios da ponte metilênica; 3,91 e 4,20 ppm correspondentes às metilas ligadas a C12' e C9. A presença de um grupo vinílico é suposta pela ocorrência de sinais em δ_{H} 5,45 e 6,70 ppm. No quarto grupo de sinais do espectro nota-se o deslocamento de quatro sinais intensos em campo baixo (δ_{H} 10,00; 11,49; 16,22 e 18,80 ppm) que se referem às hidroxilas.

O sinal encontrado em campo muito baixo (δ_{H} 18,80 ppm) no espectro de RMN de ^1H , refere-se ao sistema enolizável formado pela hidroxila de C5 e a carbonila em C8, e é característico de floroglucínóis ligados a unidades de ácido acilfilicínico (JAYASURIYA *et al.*, 1989, ISHIGURO *et al.*, 1994; YAMAKI *et al.*, 1994; ROCHA *et al.*, 1995).

A presença do anel dimetilbenzopirano na estrutura é indicada, no espectro de RMN de ^1H , por um par de dubletos em δ_{H} 5,45 e 6,70 ppm com $J=10$ Hz (atribuídos aos hidrogênios vînicos) e um singleto referente a duas metilas em C2' (δ_{H} 1,49 ppm), o qual acopla com o hidrogênio vînico ligado a C3'. (JAYASURIYA *et al.*, 1989; ROCHA *et al.*, 1996).

No espectro de RMN de ^{13}C (Tabela 1.2) constata-se um total de 22 sinais, dos quais seis estão representando dois átomos de carbono cada [δ_{C} 111,2 (C₂ e C₆), 103,5 (C₈' e C₁₀'), 27,7 (2 Me-C₂'), 24,3 (2 Me-C₄'), 19,1 (2 Me-C₁₂'), 19,1 (2

Me-C₉) ppm]. A partir de valores de deslocamento característicos, observa-se a presença de dois grupos de carbonos aromáticos oxigenados (δ_C 155,4; 159,3 e 162,1 ppm) e (δ_C 171,7; 187,3 e 199,4 ppm), referentes aos núcleos floroglucinol e ácido filicínico respectivamente. O sinal característico do núcleo dimetilbenzopirano é verificado em δ_C 78,1 ppm e refere-se ao carbono quaternário do anel pirano ligado a um grupo dimetila.

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

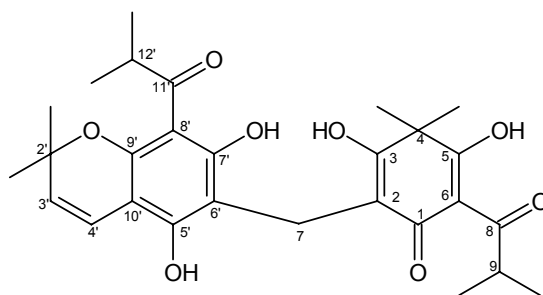
De acordo com estruturas similares relatadas na literatura, pode-se supor que o sinal em δ_C 16,9 ppm, refere-se ao C7 da ponte metilênica ligando o ácido filicínico ao grupo benzopirano (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996).

O espectro de DEPT para **Hp4** revela a presença de 8 sinais referentes a carbonos primários, 1 sinal de carbono secundário, 4 de terciários e 15 de quaternários sendo três de deslocamento químico característico de carbono de carbonila (δ_C 199,4; 211,0 e 210,8 ppm), referentes a C1, C8 e C11', nesta ordem.

O espectro bidimensional de ¹H-¹H COSY mostra as correlações dos hidrogênios das metilas com o hidrogênio de C12' (δ_H/δ_C 1,20-3,91 e 1,11-4,12). Além destas, destacam-se as correlações entre o dubleto do hidrogênio vinílico (δ_H 5,45 ppm) com seu hidrogênio vizinho (δ_H 6,70 ppm) e com um multiplete (δ_H 1,49 ppm), compatível com a presença de um radical dimetil vinílico ou um anel dimetilpirano.

Através da análise do espectro de correlação carbono-hidrogênio HMQC observa-se os seguintes acoplamentos $\delta_H\delta_C$ 1,20-19,3 e 19,1; 1,49-27,9; 3,50-16,9; 3,91-39,0; 4,20-36,6; 5,45-124,6 e 6,70-117,3 ppm. Entretanto, para definir quais carbonos estão ligados às hidroxilas, foram utilizados os dados das correlações do espectro de HMBC, no qual encontra-se: $\delta_H\delta_C$ 10,00-171,7; 11,49-159,3; 16,22-162,1 e 18,80-187,3 ppm.

Assim, com base na análise dos espectros de **Hp4** e em dados obtidos da literatura (**Tabelas 1.1 e 1.2**) o produto em questão foi identificado como uliginosina B (**18**), previamente isolado de *H. uliginosum* HBK por TAYLOR & BROOKER em 1969.



uliginosina B (**18**)

1.5.1.2. Substância Hc1

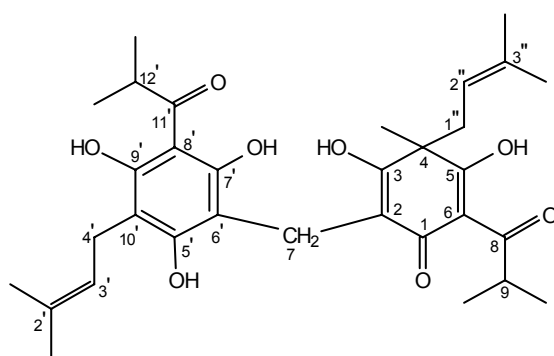
Inúmeras tentativas de isolamento e purificação de **Hc1** foram realizadas, no entanto, até o momento, não foi possível obter o produto completamente puro. Uma fração enriquecida de **Hc1** foi submetida à análise espectroscópica de RMN¹H e ¹³C, o que permitiu a identificação de um derivado de floroglucinol dimérico, formado por uma unidade de floroglucinol e uma de ácido filicínico, unidas por uma ponte metilênica e substituído por prenilas.

Os sinais mais importantes para a caracterização da molécula, encontrados no espectro de RMN¹H (**Tabela 1.1**) são os correspondentes às hidroxilas em δ 18,60; 16,10; 11,32, 10,10 e 6,0 ppm. Além desses, verifica-se a presença de um singleto referente aos prótons da ponte metilênica (δ 3,55 ppm) que liga as unidades do dímero.

No espectro de ¹³C (**Tabela 1.2**) pode-se determinar a natureza do substituinte em C4 (ROCHA *et al.*, 1995 e 1996). Quando nessa posição ocorrem duas metilas o sinal referente a C4 aparece em 44,8 ppm, no entanto, este mesmo sinal, no espectro de **Hc1**, aparece em campo mais baixo (δ 48,9 ppm) indicando que nesta posição ocorre um grupamento prenila.

A partir dos dados dispostos nas tabelas **1.1** e **1.2** pode-se verificar que os sinais de **Hc1** compartilham da maioria dos sinais de hiperbrasilot B (**Tabela 1.3**), com exceção dada ao anel pirano, presente em hiperbrasilot B, que não está ciclizado em **Hc1** e sim na forma de prenila.

Sendo assim, com base nestes dados preliminares, foi proposta para **Hc1** (**19**) uma estrutura que seria inédita.



(19)

1.5.1.3. Substância Hc2

Os dados espectroscópicos de **Hc2** se mostraram muito semelhantes aos encontrados para **Hp4** e **Hc1**, sugerindo que o composto pertença ao grupo dos derivados de floroglucinol diméricos.

As diferenças entre **Hp4** e **Hc2** são evidenciadas no espectro de RMN, tanto de ^1H quanto de ^{13}C , com a presença de alguns sinais adicionais, correspondentes à cadeia lateral prenilada, bem como no espectro de massas.

Porém a espectrometria mostrou a maior diferença, sendo o pico do íon molecular $m/z = 552$ $[\text{M}]^+$. O pico base, $m/z = 275$, corresponde ao fragmento benzopirânico da molécula e os principais fragmentos são: m/z 167 (23), 247 (35), 259 (48) e 465 (36). Basicamente, dois padrões de fragmentação podem ser evidenciados para derivados de floroglucinol, a quebra da ponte metilênica em ambos os lados de C-7 e a perda da cadeia lateral $[\text{O}=\text{C}=\text{CH}(\text{CH}_3)]$ (WOLLENWEBER *et al.*, 1998).

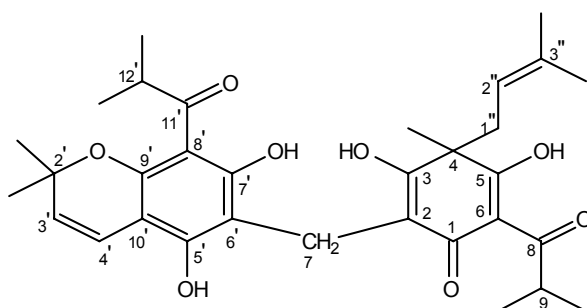
Os espectros de RMN do composto **Hc2**, quando comparado com os espectros da uliginosina B (**Hp4**), mostram a presença de sinais adicionais, correspondentes à cadeia lateral prenilada, e apenas um grupamento metila em C-4 (δ_{H} 1,48; δ_{C} 22,7). Estas características também estão presentes em hiperbrasilol B (**Tabelas 1.1 e 1.2**) (ROCHA *et al.*, 1996).

Este fato é evidenciado no espectro de RMN de ^{13}C de **Hc2**, assim como em **Hc1** (**Tabela 1.2**), no qual o valor de deslocamento químico de C-4 (δ 49,0) está cerca de 5 ppm deslocado para campo mais baixo, em relação a drumondina A (**Tabela 1.2**) (δ 44,3), no entanto, está próximo do valor relatado para hiperbrasilol B (δ 49,8). Isto ocorre porque em **Hc2** um grupamento prenila,

juntamente com uma metila, estão ligados ao C-4, enquanto que o C-4 de drumondina A é substituído por duas metilas (JAYASURIYA *et al.*, 1991; ROCHA *et al.*, 1996).

No espectro de RMN de ^1H do composto **Hc2**, um par de dubletos ($J=10$) em δ 5,43 e δ 6,69, respectivamente, revelam a presença de núcleo 2,2-dimetil cromeno. A existência do anel pirano foi inferida por comparação direta dos sinais das hidroxilas, principalmente, 7'-OH (δ 16,35) e 5'-OH (δ 11,40), com aqueles relatados para drumondina A e hiperbrasílo B (**Tabela 1.1**). As hidroxilas em campo baixo, características de substâncias diméricas, ocorrem em δ 9,85; 11,40; 16,35 e 18,61. A ponte metilênica é evidenciada no espectro de ^1H - ^1H NOESY a partir da correlação existente em δ 3,52 - 9,85 - 11,40.

Assim, com base na análise dos espectros da substância em questão e nas evidências encontradas na literatura, sugere-se que o composto **Hc2** seja o derivado de floroglucinol dimérico hiperbrasílo B (**20**).



(**20**) hiperbrasílo B

Tabela 1.1: Dados de RMN de ^1H dos compostos isolados **Hp4**, **Hc1** e **Hc2** e de substâncias estruturalmente relacionadas, encontrados na literatura (J: constantes de acoplamento em Hz).

H	Hp4 (1) δ_{H} (ppm)	Hc1 (2) δ_{H} (ppm)	Hc2 (3) δ_{H} (ppm)	drumondi na A (4) δ_{H} (ppm)	drumondi na C (5) δ_{H} (ppm)	hiperbrasil ol B (6) δ_{H} (ppm)	sarotraleno B (7) δ_{H} (ppm)
4-Me	1,49 (br s)*		1,48 (s)	1,49 (br s)	1,49 (br s)	1,51 (s)	1,43 (s)
7	3,50 (br s)	3,57 (br s)	3,52 (s)	3,53 (br s)	3,52 (br s)	3,55 (s)	3,53 (s)
9	4,20 (m)	4,21 (m)	4,20 (sep, J=6,7)	3,25 (q, J=7,5)	-	4,19 (sep, J=7)	3,90 (m)
9-Me	1,20 (d J=6,3)*	1,17* (nr)	1,17 (d, J=6,7)	-	2,74 (s)	1,16 (d, J=7)	1,17 (d)
10-Me	-	-	-	1,18 (t, J=7,5)	-	-	-
2'-Me	1,49 (s)*	1,16* (nr)	1,57 (s)	1,49 (br s)	1,49 (br s)	1,53 (s)	1,66 (s)
3'	5,45 (d, J=10)	5,38 (br t)	5,43 (d, J=10)	5,44 (d, J=9,9)	5,44 (d, J=9,9)	5,59 (d, J=10)	5,42 (d, J=10,3)
4'	6,70 (d, J=10)	2,85	6,69 (d, J=10)	6,69 (d, J=9,9)	6,68 (d, J=9,9)	6,66 (d, J=10)	6,76 (d, J=10,3)
12'	3,91 (m)	3,95 (m)	3,90 (sep, J=6,7)	3,12 (q, J=7,5)	-	4,00 (sep, J=7)	4,19 (m)
12'-Me	1,20 (d, J=6,3)*	1,18*	1,21 (d, J=6,7)	-	2,69 (s)	1,20 (d, J=7)	1,20 (d)
13'-Me	-	-	-	1,20 (t, J=7,5)	-	-	-
3-OH	10,00 (s)	10,10 (s)	9,85 (s)	9,95 (s)	9,94 (s)	9,90 (s)	10,01 (s)
5-OH	18,80 (s)	18,55 (s)	18,61 (s)	18,49 (s)	18,42 (s)	18,80 (s)	18,75 (s)
5'-OH	11,49 (s)	11,32 (s)	11,40 (s)	11,44 (s)	11,47	11,40 (s)	11,49 (s)
7'-OH	16,22 (s)	16,10 (s)	16,35 (s)	16,01 (s)	15,88 (s)	16,35 (s)	16,44 (s)
9'-OH	-	6,0 (s)	-	-	-	-	-
13'	-	-	-	-	-	-	2,09 (m)
14'	-	-	-	-	-	-	1,82 (m)
15'	-	-	-	-	-	-	5,09 (m)
16'	-	-	-	-	-	-	1,57 (s)
1''	-	2,33	2,8-2,4 (m)	-	-	2,8-2,5 (m)	-
2''	-	5,12 (br d)	4,70 (br t)	-	-	4,60 (br t)	-
3''-Me	-	1,7* (nr)	1,25 (s)	-	-	1,31 (s)	-
	-	1,6* (nr)	1,25 (s)	-	-	1,34 (s)	-

1-Dados experimentais de **Hp4** medidos a 400 MHz em CDCl_3

2-Dados experimentais de **Hc1** medidos a 400 MHz em CDCl_3

3-Dados experimentais de **Hc2** medidos a 500 MHz em CDCl_3

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

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

6-Dados medidos a 200 MHz em CDCl_3 (ROCHA *et al.*, 1996).

7-Dados medidos a 200 MHz em CDCl_3 (ISHIGURO *et al.*, 1986).

* Os valores dos sinais podem estar trocados entre si.

Nr: sinal não resolvido

Tabela 1.2: Dados de RMN de ^{13}C dos compostos isolados **Hp4**, **Hc1** e **Hc2** e de substâncias estruturalmente relacionadas, encontrados na literatura.

C	Hp4 (1) δ_{C} (ppm)	Hc1 (2) δ_{C} (ppm)	Hc2 (3) δ_{C} (ppm)	drumondina A (4) δ_{C} (ppm)	drumondina C (5) δ_{C} (ppm)	hiperbrasilol B (6) δ_{C} (ppm)	sarotraleno B (7) δ_{C} (ppm)
1	199,4	198,0	198,5	198,0	198,7	199,2	199,4
2	111,2*	110,9	110,0	108,0	108,5	109,8	106,1
3	171,7	172,8	169,8	171,6	171,8	170,7	171,1
4	44,3	48,9	49,0	44,3	44,4	49,8	44,4
4-Me	24,3 25,4	22,7	22,7	24,8	24,8	22,8	25,6
5	187,3	187,6	187,6	187,3	187,3	188,5	187,3
6	111,2*	113,4	113,2	111,2	111,2	114,2	111,3
7	16,9	16,9	16,0	16,8	16,8	16,9	16,9
8	211,0*	211,2	211,1	207,1	207,1	211,9	210,9
9	36,6	36,6	36,5	34,8	29,3	37,2	36,6
10	-	-	-	8,6	-	-	-
9-Me	19,3 19,1	19,0 18,8	19,3 19,5	-	-	19,4 19,5	17,5
2'	78,1	131,9	78,1	78,2	78,2	79,2	81,0
2'-Me	27,9 27,7	-	27,8 27,9	28,1	28,2	27,8 27,9	26,8
3'	124,6	122,3	124,7	124,6	124,7	126,1	123,1
4'	117,3	-	117,3	117,3	117,2	117,5	123,7
5'	159,3	160,5	159,3	159,1	159,4	160,0	162,2
6'	107,1	107,1	106,4	106,1	106,0	107,2	103,3
7'	162,1	160,5	161,9	161,4	161,2	162,7	159,4
8'	103,7*	106,5	103,5	104,4	104,8	104,3	108,2
9'	155,4	160,5	155,2	155,7	155,9	156,1	155,7
10'	103,5*	107,0	103,5	103,6	103,6	104,2	103,6
11'	210,8	210,1	210,9	206,9	203,5	210,8	210,7
12'	39,0	39,1	39,7	37,1	32,2	39,7	38,9
12'-Me	19,3 19,1	19,4 19,2	18,9 19,1	-	-	18,9 19,8	19,3 -
13'	-	-	-	8,9	-	-	41,8
14'	-	-	-	-	-	-	23,2
15'	-	-	-	-	-	-	118,0
16'	-	-	-	-	-	-	132,0
16 - Me	-	-	-	-	-	-	19,6
1''	-	39,0	39,7	-	-	39,3	-
2''	-	117,4	117,0	-	-	118,2	-
3''	-	135,8	134,9	-	-	136,5	-
3''Me	-	17,9	17,8	-	-	17,5	-
	-	25,5	25,7	-	-	25,6	-

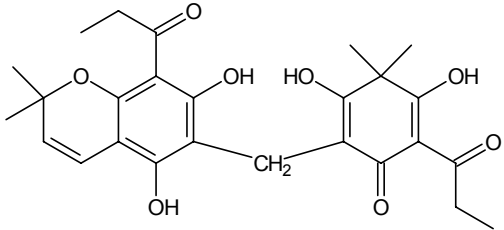
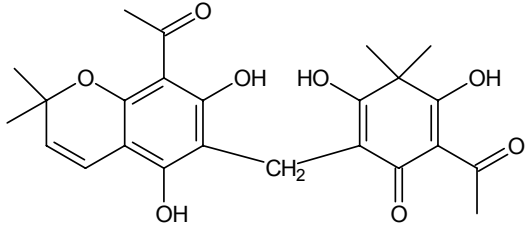
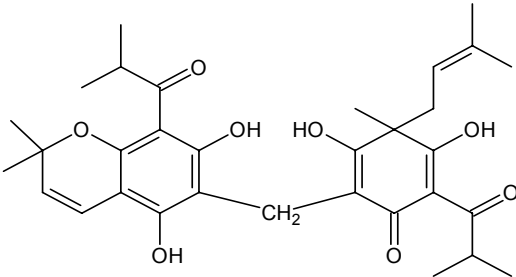
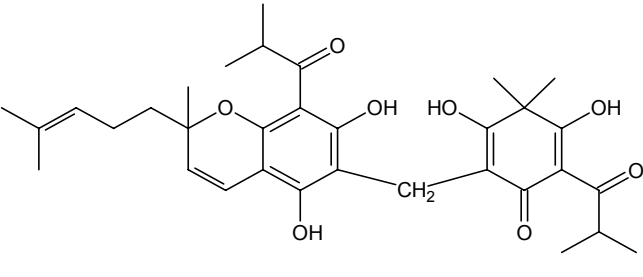
1-Dados experimentais de **Hp4** medidos a 100 MHz em CDCl_3

2-Dados experimentais de **Hc1** medidos a 100 MHz em CDCl_3 .

(continua)

- 3-Dados experimentais de **Hc2** medidos a 125 MHz em CDCl₃.
4-Dados medidos a 75 MHz em CDCl₃ (JAYASURIYA *et al.*, 1989).
5-Dados medidos a 75 MHz em CDCl₃ (JAYASURIYA *et al.*, 1989).
6-Dados medidos a 50 MHz em CDCl₃ ((ROCHA *et al.*, 1996).
7-Dados medidos a 25,2 MHz em CDCl₃ (ISHIGURO *et al.*, 1986).
* Os valores dos sinais podem estar trocados entre si.

Tabela 1.3: Estruturas de dímeros derivados de floroglucinol descritos na literatura.

	
drumondina A	drumondina C
	
hiperbrasilol B	sarotraleno B

1.5.2. Isolamento de flavonóides

As espécies *H. caprifoliatum* e *H. rigidum* foram analisadas quanto à presença de substâncias polares em sua composição. Para tanto, os extratos metanólicos dessas duas plantas foram particionados até obter F1 (vide item 1.4.2. Materiais e Métodos) e submetidos a sucessivos processos cromatográficos.

Das espécies *H. caprifoliatum* e *H. rigidum* foram isolados sete flavonóides, porém apenas dois (**HcF1** e **HcF15**) tiveram suas estruturas elucidadas, uma vez

que os demais se tratam de flavonóis glicosilados e não foi possível a realização de espectros de RMN desses compostos para a determinação da estrutura.

1.5.2.1. Substância HcF1

A fração F1 de *H. caprifoliatum* ao ser ressuspensa em acetato de etila a fim de ser submetida à cromatografia em coluna para fracionamento, apresentou um precipitado abundante. Para a sua purificação, a fração foi filtrada em funil de Büchner com papel filtro e lavada com metanol. O precipitado recolhido foi, então, ressuspensa em metanol e novamente precipitado em temperatura de 4°C. O produto puro codificado de **HcF1**, de cor amarelada, foi analisado por CCD frente a diferentes padrões e detectou-se um perfil cromatográfico semelhante ao do hiperosídeo.

Para a confirmação da estrutura de **HcF1**, foram obtidos espectros de RMN¹H e ¹³C e UV.

A interpretação dos espectros no UV da substância **HcF1** (**Figura 1.1** e **Tabela 1.4**) sugere a estrutura de um flavonol hidroxilado nas posições C5 e C7 do anel A, e C3' e C4' do anel B, bem como a substituição da hidroxila em C3.

Flavonóis contendo um grupamento 3-OH metilado ou glicosilado apresentam um deslocamento hipsocrômico de 12 a 17 nm da banda I, no espectro UV em metanol, em relação à mesma banda do flavonol correspondente não metilado, como a quercetina ($\lambda_{\text{máx. MeOH}}=370$), sendo a banda II não afetada significativamente (MABRY *et al.*, 1970).

O padrão de hidroxilação do anel A, em C5 e C7, é sugerido pela presença de uma nova banda entre 320 e 335, no espectro NaOH, e o deslocamento batocrômico de 42 nm no espectro medido após a adição de ácido à solução

contendo AlCl_3 , ambos relativos ao espectro medido em MeOH. Estas evidências indicam, respectivamente, a presença de uma hidroxila livre em C7 e outra em C5. Esta última é comprovada devido ao complexo formado entre AlCl_3 e as funções 4-ceto e 5-OH ser estável na presença de ácido (MABRY *et al.*, 1970; MARKHAM, 1982).

Por sua vez, a di-hidroxilação típica do anel B, em C3' e C4', pode ser confirmada pelo deslocamento batocrômico da banda I de 14 nm, verificado após a adição de ácido bórico à solução contendo acetato de sódio, em relação ao espectro medido em solução metanólica, bem como, pelo desvio hipsocrômico da mesma banda, após adição de HCl, relativo ao espectro AlCl_3 , resultante da decomposição do complexo ácido-lábil de cloreto de alumínio formado com o grupo *o*-di-OH. A análise do espectro metanólico também indica que o anel B do flavonóide é tipicamente di-hidroxilado nas posições C3' e C4', uma vez que a Banda II apresenta um máximo de absorção entre 250 e 265 nm (Banda II b), seguida de um ombro entre 265-270 nm (Banda II a) (MARKHAM, 1982; VOIRIN, 1983).

A partir da análise dos espectros de RMN¹H e ¹³C (**Tabela 1.5 e Anexos**) pôde-se constatar que o substituinte da hidroxila em C3 é um açúcar. Isto é evidenciado, no espectro de ¹³C, pela presença de 6 sinais referentes à hexose, além dos 15 sinais que representam os átomos de C do núcleo básico de um flavonóide.

Os dados de RMN¹³C são de grande valia na determinação da estrutura de um flavonóide glicosilado, pois a partir destes é possível estabelecer o número de açúcares ligados ao núcleo flavonoídico, assim como a natureza, a posição, a configuração e a conformação da ose (HARBORNE & WILLIAMS, 1982; AGRAWAL & BANSAL, 1989).

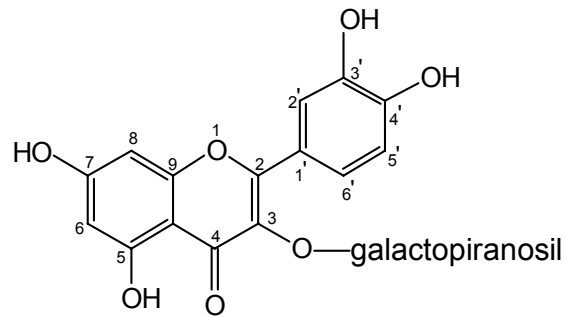
Através de comparação com os dados da literatura (MARKHAM & MOHAN CHARI, 1982; MARKHAM, 1982; AGRAWAL & BANSAL, 1989) verifica-se que o açúcar ligado ao C3 do flavonol é a galactose na sua forma piranosídeo.

No espectro de RMN¹³C verifica-se a presença de grupos distintos de sinais. Os carbonos aromáticos não oxigenados aparecem agrupados em 93-131 ppm (ver **Tabela 1.5** - 93,3; 98,7; 105,8; 114,5; 116,3; 121,3 e 121,5 ppm), enquanto os aromáticos oxigenados aparecem todos entre 156-164 ppm (135,6; 148,5; 157,1; 157,4; 161,6 e 164,6 ppm). A carbonila de C4 é facilmente identificada por estar em campo bem baixo (178,2 ppm). Os carbonos do açúcar estão localizados na faixa de 61 a 77 ppm, com exceção do C1, que aparece em campo mais baixo (104,2 ppm).

A partir da análise do espectro de RMN¹H (**Tabela 1.5**) verifica-se que os hidrogênios do anel B (6,7 - 7,9 ppm) aparecem em campo mais baixo que os do anel A e que todos os sinais relativos ao açúcar encontram-se em 3,5-4 ppm. Além disso, observam-se os dois sinais referentes a C6 (6,22 ppm) e C8 (6,42 ppm), os quais ocorrem tipicamente entre 6,0-6,5 ppm em flavonóis 5,7 di-hidroxilados (MABRY *et al.*, 1970).

Através dos dados de RMN¹H e da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico H1' (5,18 ppm; J= 7,4 Hz) foi possível determinar a natureza da ligação da ose ao núcleo flavonoídico, que se trata do β-D-galactopiranosídeo (MARKHAM *et al.*, 1989).

Desta forma, com base nos espectros de **HcF1** e dos dados da literatura, confirma-se a hipótese inicial de que o composto isolado de *H. caprifoliatum* trata-se do flavonóide glicosilado hiperosídeo (**21**).



(21) hiperosídeo

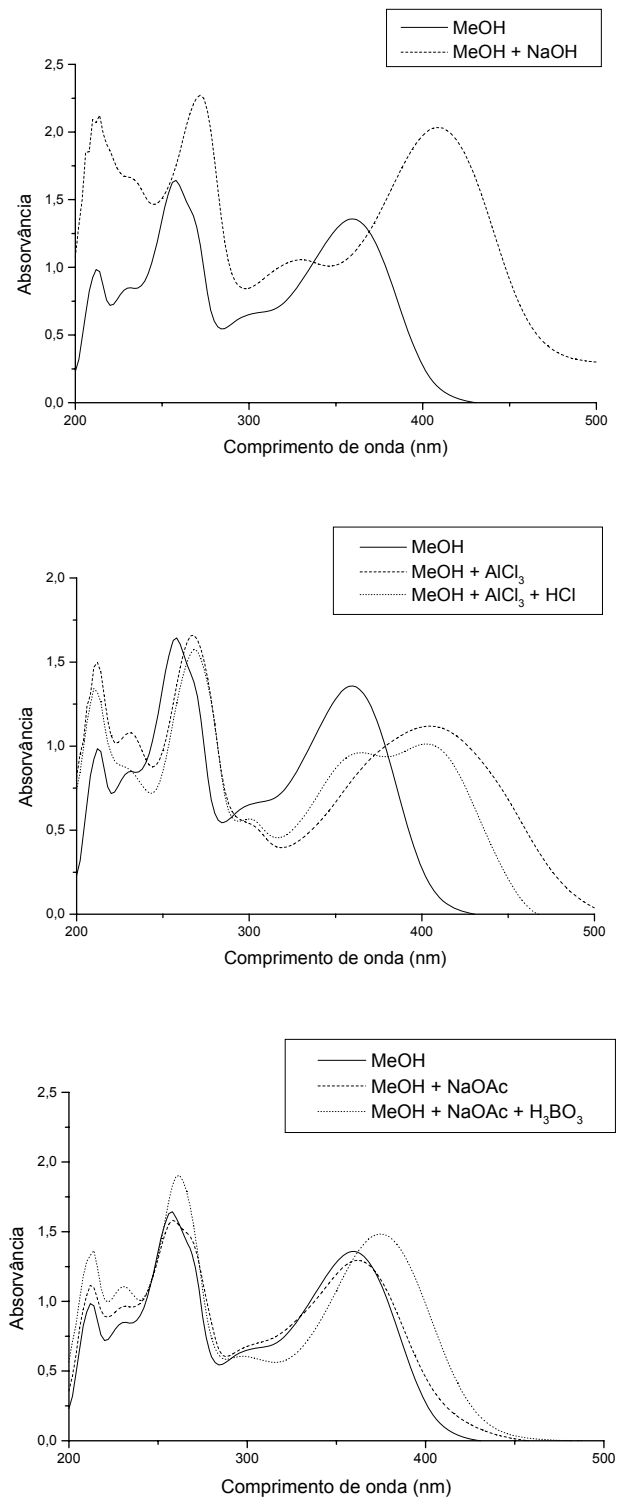


Figura 1.1: Espectros de UV da substância HcF1

Tabela 1.4: Valores máximos de absorção no UV da substância HcF1

Solventes mais reativos	Máximos (nm)		Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I	Banda II	Banda I	Banda II	
MeOH	Ia Ib 360, 296 sh	Ila I Ib 264 sh, 258	-	-	BI 330-360 e BII 250-280: flavonol com hidroxila em C3 substituída BII a e b: substituição orto-di-OH no anel B (C3' e C4')
MeOH + NaOH	408 330 (nova banda)	272	+48	+14	Aparecimento de uma nova banda ou ombro entre 320-335 nm, indica a presença de hidroxila livre em C-7. BI: deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre e ausência de 3-OH livre
MeOH + AlCl ₃	404, 298sh	268	+44	+10	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	402, 366, 300 sh	268	-2 (em relação ao espectro AlCl ₃) +42 (em relação ao espectro MeOH)	+10	BI: deslocamento hipsocrômico em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroilação em orto no anel B. BI: deslocamento batocrômico na ordem de 35-55 nm da Banda I para Banda Ia, em relação ao espectro metanol, indica 5-OH livre e confirma substituição em 3-OH.
MeOH + NaOAc	362, 296 sh	264 sh, 258	-	-	-
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	374	262	+14 (em relação ao espectro MeOH)	+4	BI: Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm, em relação ao espectro metanol, confirma a presença de orto-di-OH no anel B em 3', 4'.

Tabela 1.5: Dados de RMN de ^1H (500 MHz) e RMN de ^{13}C (125 MHz) do composto **HcF1** isolado de *H. caprifoliatum*

	HcF1 δ_{H} (ppm)	HcF1 δ_{C} (ppm)
2		157,1
3		135,6
4		178,2
5		161,6
6	6,22 (s)	98,7
7		164,6
8	6,42 (s)	93,3
9		157,4
10		105,8
1'		121,5
2'	7,86 (s)	114,5
3'		145,8
4'		148,5
5'	6,89 (d, J=8,2)	116,3
6'	7,60 (d, J=8,1)	121,3
1''	5,18 (d, J=7,4)	104,2
2''	3,85 (m)	71,8
3''	3,66 (bd)	73,7
4''	3,58 (bs)	68,6
5''	3,50 (bs)	75,8
6''a	3,58 (bs)	60,6
6''b	3,66 (bd)	

1.5.2.2. Substância HcF15

Das primeiras frações da coluna cromatográfica realizada com a fração acetato de etila de *H. caprifoliatum*, isolou-se um produto amarelo, o qual foi denominado de **HcF15**. A análise por CCD frente a diferentes padrões de flavonóides indica um perfil cromatográfico semelhante ao da quercetina, ou seja, um flavonóide de menor polaridade, na forma de aglicona livre.

Para a confirmação da estrutura de **HcF15**, foram obtidos espectros no UV (Figura 1.2 e Tabela 1.6).

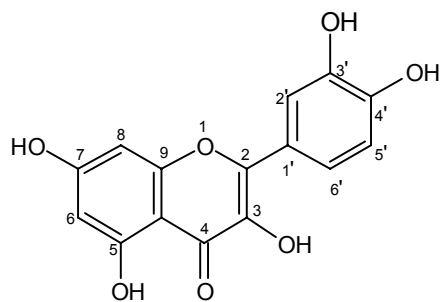
O espectro de **HcF15** em metanol exibiu dois picos de absorção majoritários na região de 240-400 nm, os quais se referem à Banda I em 356 nm e a Banda II em 254 nm, respectivamente, típicas de flavonóis (MABRY, 1970; MARKHAM, 1982).

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

O desvio batocrômico de 44 nm da Banda I após a adição de NaOH em relação ao espectro MeOH, sem decréscimo de intensidade é diagnóstico da presença de hidroxila livre em C4', bem como em C3 (MABRY, 1970).

Presença de 4 bandas, no espectro $AlCl_3$ após a adição de HCl, todas apresentando desvio batocrômico relativo ao espectro em MeOH, indica que a molécula é hidroxilada em C3 e C5. A hidroxila livre em C3 também pode ser comprovada pelo desvio batocrômico de 50-60 nm da Banda I, típico de 3-hidróxi-flavonas. Além disso, o surgimento de uma nova banda (324 nm) no espectro NaOH significa que C7 é substituído por uma hidroxila.

Assim, a partir da análise dos espectros de **HcF15**, das semelhanças destes com os espectros da quercetina padrão e sabendo-se que derivados da quercetina são comuns no gênero *Hypericum*, sugere-se que o composto em questão seja a quercetina (**22**) (NAHRSTEDT & BUTTERWECK, 1997; CROCKETT *et al.*, 2005).



(22) quercetina

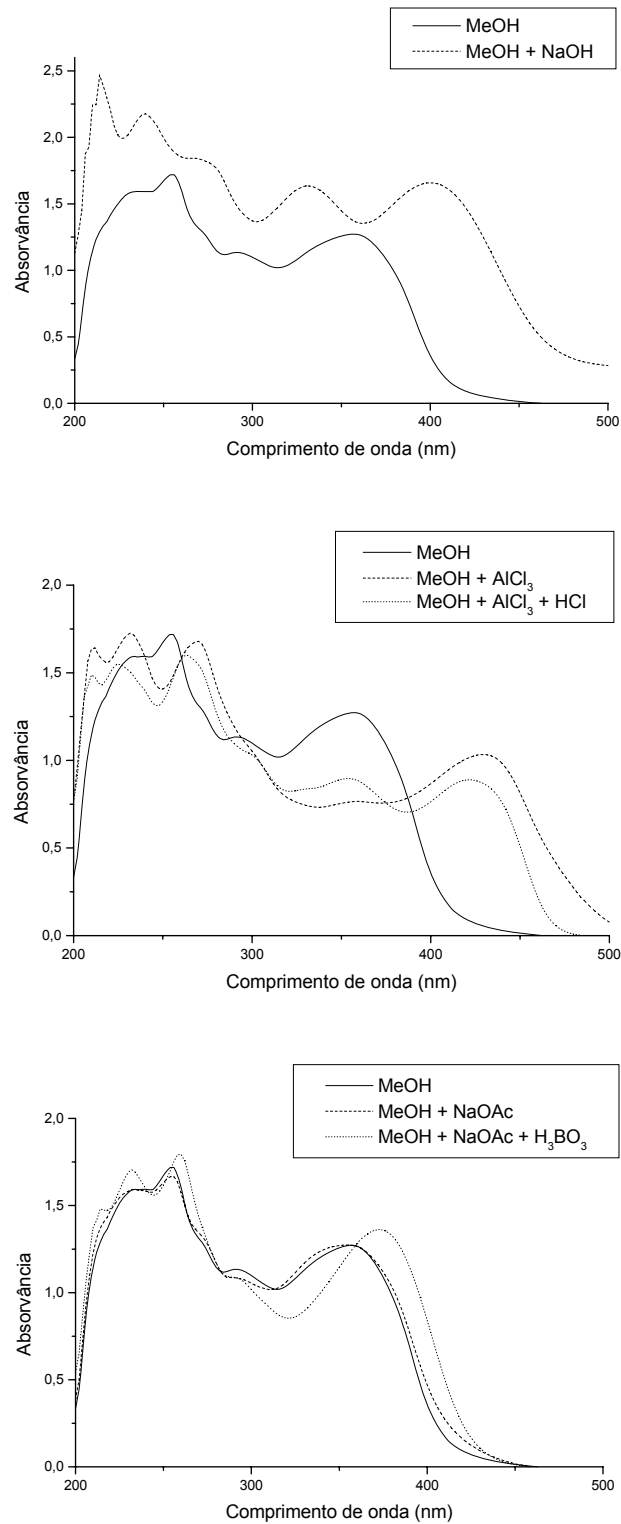


Figura 1.2: Espectros de UV da substância HcF15

Tabela 1.6: Valores máximos de absorção no UV da substância HcF15

Solventes mais reativos	Máximos (nm)				Desvios (nm)		Conclusões
	Banda I		Banda II		Banda I	Banda II	
MeOH	Ia 356	Ib 292 sh	IIa 270 sh	IIb 248	-	-	BI 352-385 e BII 250-280: flavonol com hidroxila livre em C3. BII a e b: substituição orto-di-OH no anel B (C3' e C4').
MeOH + NaOH	400 324 (nova banda)		266		+44	+12	Aparecimento de uma nova banda ou ombro entre 320-335 nm, indica a presença de hidroxila livre em C-7. BI: deslocamento batocrômico na ordem de 40-65 nm sem diminuição na intensidade da absorção confirma a presença de 4'-OH livre.
MeOH + AlCl ₃	430	356 302 sh	270		+74	+16	-
MeOH + AlCl ₃ + HCl	422	354	304 sh	264	-8 (em relação ao espectro AlCl ₃) +66 (em relação ao espectro MeOH)	+10	BI: deslocamento hipsocrômico em relação ao espectro AlCl ₃ , indica a presença de di-hidroxilação em orto no anel B. BI: desvio batocrômico na ordem de 50-60 relativo a MeOH indica 3,5-di-OH
MeOH + NaOAc	354	330 sh	272 sh	254	-2	-	-
MeOH + NaOAc + H ₃ BO ₃	374	290 sh	260		+16 (em relação ao espectro MeOH)	+6	BI: Deslocamento batocrômico na ordem de 12-30 nm, em relação ao espectro metanol, confirma a presença de orto-di-OH no anel B em 3', 4'.

1.5.3. Análise química comparativa das flores

Considerando que em *H. polyanthemum* os benzopiranos **Hp1 (14)**, **Hp2 (15)** e **Hp3 (16)** estão em concentrações mais elevadas nas flores e que há uma diferenciação no conteúdo desses nas diferentes partes da planta (Prof. Dra. Sandra Rech, Faculdade de Farmácia UFRGS, comunicação pessoal), procurou-se analisar as flores de outras plantas nativas quanto à presença desses compostos.

Os produtos em questão estavam ausentes em todas as espécies analisadas (*Hypericum myrianthum*, *H. caprifoliatum*, *H. connatum* e *H. rigidum*) exceto nas flores de *H. polyanthemum*. A ocorrência destes benzopiranos já havia sido detectada nos extratos lipofílicos das partes aéreas (FERRAZ *et al.*, 2001) e no óleo volátil (FERRAZ *et al.*, 2005b) desta espécie, bem como no óleo obtido das partes aéreas floridas de *H. ternum* (FERRAZ *et al.*, 2005b).

Paralelamente, verificou-se a presença de derivados de floroglucinol nas flores das espécies mencionadas, a partir de comparação do tempo de retenção das substâncias padrão uliginosina B, hiperbrasilol B e japonicina A. Foi detectada a presença de uliginosina B nas flores de *H. polyanthemum*, como observado nas partes aéreas desta espécie (item 1.5.1.1 deste capítulo); *H. myrianthum*, da qual já havia sido isolada por FERRAZ e colaboradores (2002) e *H. caprifoliatum*.

O derivado de floroglucinol hiperbrasilol B foi verificado nas flores de *H. caprifoliatum* e *H. connatum*, isolado previamente das partes aéreas de ambas espécies (NÖR *et al.*, 2004). Japonicina A foi detectada em *H. myrianthum* e *H. connatum*, embora a presença nesta última ainda não tenha sido relatada.

Observa-se ainda nos cromatogramas obtidos a partir da eluição de extratos das flores de *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum* com o sistema próprio para detecção de derivados de floroglucinol, diversos picos não identificados que

poderiam corresponder a produtos desta classe de compostos ainda não isolados das espécies em estudo.

1.6. Conclusões

Da fração apolar das partes aéreas de *H. polyanthemum* obteve-se o floroglucinol uliginosina B. Este composto já havia sido isolado de *H. uliginosum* (PARKER & JOHNSON, 1968; TAYLOR & BROOKER, 1969) e de espécies nativas *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002b) e *H. carinatum* (NÖR *et al.*, 2004).

De *H. caprifoliatum* foram isolados dois derivados de floroglucinol de estrutura dimérica, hiperbrasilol B, encontrado também em *H. brasiliense* e *H. connatum*, e outro de estrutura inédita, porém não completamente elucidado até o momento, codificado como **Hc1**.

Também de *H. caprifoliatum*, porém da fração metanólica, foram isolados dois flavonóides, a aglicona livre, quercetina e o hiperosídeo (também conhecido por hiperina), ambos comumente encontrados em espécies de *Hypericum*.

A partir da análise das flores de espécies nativas, verificou-se a presença de benzopiranos apenas em *H. polyanthemum* e de derivados de floroglucinol diméricos em *H. caprifoliatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum*.

A discussão acerca da importância taxonômica dos derivados de floroglucinol isolados encontra-se detalhada no **capítulo 2**.

Capítulo 2 – Derivados de floroglucinol: significância
taxonômica e importância farmacológica

2.1. Introdução

Desde a antiguidade, o maior incentivo para a investigação química de plantas foi a importante utilidade dos produtos naturais como recursos terapêuticos para a humanidade. Aliado a isso, observa-se um crescente interesse nas relações evolutivas e na tentativa de auxiliar os taxonomistas na busca de uma classificação mais natural, como estímulo adicional para a pesquisa fitoquímica (HEGNAUER, 1986; KAPLAN & GOTTLIEB, 1987).

A taxonomia vegetal (ou botânica sistemática) é a ciência que delimita, descreve e denomina um grupo de plantas que representa uma unidade distinta dita “unidade taxonômica” ou “táxon” e classifica estes táxons em sistemas. Além disso, a taxonomia engloba o estudo das relações entre os táxons e a dinâmica da evolução dos caracteres (HEGNAUER, 1986).

A filogenia dos táxons é construída a partir da observação de caracteres presentes nas plantas vivas, os quais decorrem de processos evolutivos dependentes da combinação de fatores como mutação, recombinação gênica e seleção. O conhecimento da constituição química pode ser de grande valia no estabelecimento de sistemas de classificação de plantas, uma vez que a produção de certos metabólitos secundários indica claramente que as espécies que os sintetizam possuem uma rota biossintética específica em comum, a qual está associada a um gene ou conjuntos deles (HEGNAUER, 1986).

A observação de que os metabólitos secundários são restritos a determinados grupos de plantas abriu um amplo campo de estudos, denominado de quimiotaxonomia. Os primeiros relatos de estudos nesta área ocorreram já no final do século XVII, quando alguns autores relacionaram certos grupos de plantas com os respectivos usos terapêuticos. No início do século XIX, DE CANDOLLE fez

uma importante contribuição considerando a composição química como caráter taxonômico ao observar que “plantas diferentes nascidas em solos idênticos continham produtos diferentes enquanto que plantas análogas nascidas em solos completamente diferentes formavam produtos análogos” (GIBBS, 1963).

Segundo alguns autores, a existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode prover evidências mais corretas de parentesco do que similaridades morfológicas, que podem tanto ser atribuídas a ancestrais comuns quanto à evolução convergente (ERDTMAN, 1963)

A Quimiosistemática Micromolecular, então, consiste da aplicação de dados químicos, ocorrência de micromoléculas, em sistemas de classificação botânica já existentes, concordando os parâmetros de avanço evolutivo químicos com os parâmetros de avanço evolutivo morfológicos, a fim de elaborar um sistema mais natural (GOTTLIEB, 1982 e 1989).

Segundo HEGNAUER (1986), a quimiotaxonomia tem muito a oferecer a fitoquímicos, farmacêuticos, botânicos, os quais freqüentemente procuram novas fontes de produtos naturais com atividades biológicas ou mesmo classes de substâncias de interesse. O estudo fitoquímico comparado, associado com a correta classificação botânica do táxon pode representar uma ferramenta interessante e contribuir significativamente para uma obtenção mais racional de novas moléculas ativas.

No entanto, para que dados químicos possam ser utilizados em taxonomia, precisamos considerar que, mesmo que o número de trabalhos de pesquisa venha aumentando, apenas uma pequena proporção das plantas foi estudada quanto a química e, conseqüentemente, as informações disponíveis nem sempre são suficientes. Além disso, variações geográficas e ecológicas, decorrentes da plasticidade do genótipo individual ou mesmo da heterogeneidade genética de um

táxon, podem ser fatores capazes de interferir na composição química de indivíduos vegetais de um mesmo táxon.

2.2. Objetivos

Sendo assim, os objetivos desta etapa do trabalho são realizar um levantamento bibliográfico sobre a ocorrência dos derivados de floroglucinol nas espécies do gênero *Hypericum*, verificar a variabilidade química dessas substâncias e as atividades biológicas relacionadas. A partir destes dados, elaborar um estudo quimiotaxonômico acerca da relevância da ocorrência de derivados de floroglucinol como marcadores químicos de espécies de *Hypericum*, comparando com o sistema evolutivo proposto por ROBSON (1981), que considera apenas fatores morfo-ecológicos. Ou seja, o propósito deste estudo se concentra em verificar se há concordância entre os dados químicos e os dados morfológicos e ecológicos que se tem conhecimento das espécies do gênero em questão.

2.3. Revisão da literatura

2.3.1. Dados taxonômicos

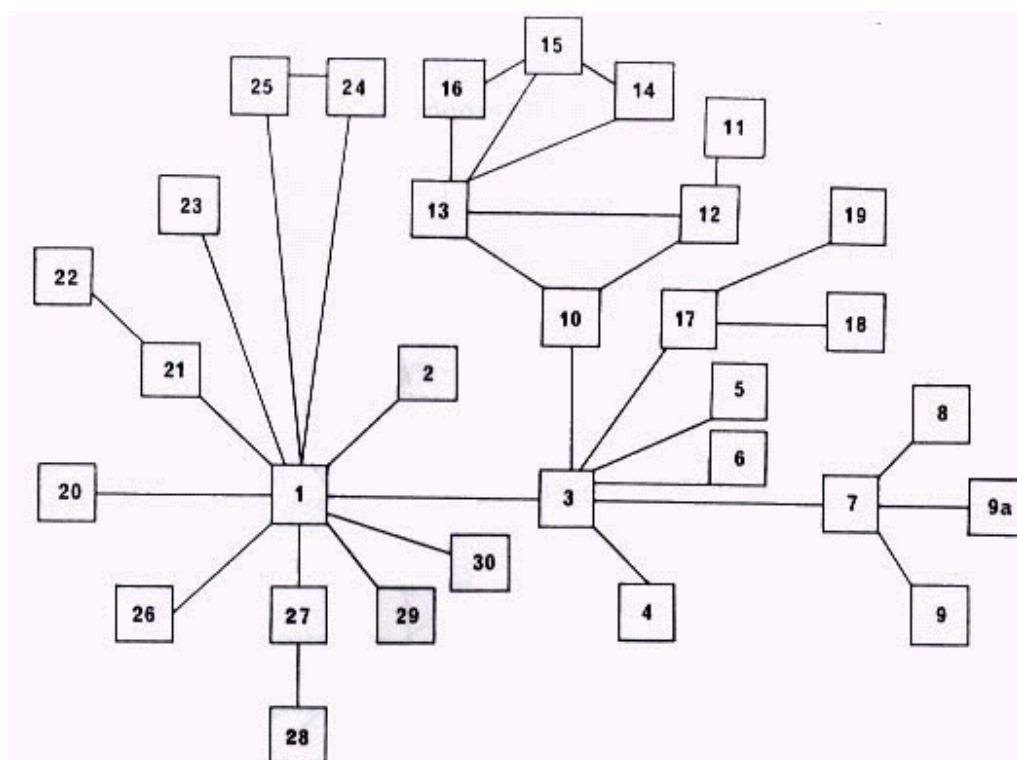
A família Clusiaceae é dividida em 6 subfamílias (Kielmeyeroideae, Calophylloideae, Clusioideae, Moronoboideae, Lorostemoneideae, Hypericoideae) e compreende cerca de 1200 espécies, distribuídas em 50 gêneros. A maioria das espécies pertence a apenas três gêneros, *Hypericum*, *Clusia* e *Garcinia* (CRONQUIST, 1981; BENNETT & LEE, 1989).

A subfamília Hypericoideae é formada por três tribos: Vismiae (gêneros *Vismia*, *Harungana* e *Psorospermum*), Cratoxyleae (gênero *Cratoxylum*) e Hypericeae (gênero *Hypericum*) (CRONQUIST, 1981).

As subfamílias Clusioideae e Hypericoideae são tratadas por alguns autores como famílias distintas, devido ao considerável grau de diversidade morfológica que possuem, sendo que *Hypericum* apresenta características tão distintas de sua subfamília que, por vezes, é considerado como uma família independente, denominada Hypericaceae. No entanto, a presença de xantonas simples relaciona Hypericoideae às demais subfamílias, permitindo assim, a inclusão desta em Clusiaceae (CRONQUIST, 1981; ROBSON, 1981; GUNATILAKA *et al.*, 198; BENNETT & LEE, 1989).

O gênero *Hypericum* L. compreende cerca de 450 espécies amplamente distribuídas no mundo, embora a maioria das espécies tenha origem em regiões temperadas e montanhosas tropicais (BENKIKI *et al.*, 2003; SAVIKIN-FODULOVIC *et al.*, 2003; CROCKETT *et al.*, 2005).

As espécies desse gênero foram distribuídas por ROBSON (1981) em 31 diferentes seções (**Figura 2.1**), organizadas num sistema filogenético baseado em características morfológicas e ecológicas: presença de glândulas negras e/ou pálidas, distribuição geográfica, mecanismo de polinização, entre outras.



- | | | | | | |
|----|---------------------|----|----------------------|----|-----------------------|
| 1 | <i>Campyloporus</i> | 11 | <i>Campylopus</i> | 21 | <i>Webbia</i> |
| 2 | <i>Psorophytum</i> | 12 | <i>Origanifolia</i> | 22 | <i>Arthrophyllum</i> |
| 3 | <i>Ascyreia</i> | 13 | <i>Drosocarpium</i> | 23 | <i>Triadenioides</i> |
| 4 | <i>Takasagoya</i> | 14 | <i>Oligostema</i> | 24 | <i>Heterophylla</i> |
| 5 | <i>Androsaemum</i> | 15 | <i>Thassia</i> | 25 | <i>Adenotrias</i> |
| 6 | <i>Inodora</i> | 16 | <i>Crossophyllum</i> | 26 | <i>Humifusoideum</i> |
| 7 | <i>Roscyne</i> | 17 | <i>Hirtella</i> | 27 | <i>Adenosepalum</i> |
| 8 | <i>Bupleuroides</i> | 18 | <i>Taeniocarpium</i> | 28 | <i>Elodes</i> |
| 9 | <i>Hypericum</i> | 19 | <i>Coridium</i> | 29 | <i>Brathys</i> |
| 9a | <i>Concinna</i> | 20 | <i>Myriandra</i> | 30 | <i>Trigynobrathys</i> |
| 10 | <i>Olympia</i> | | | | |

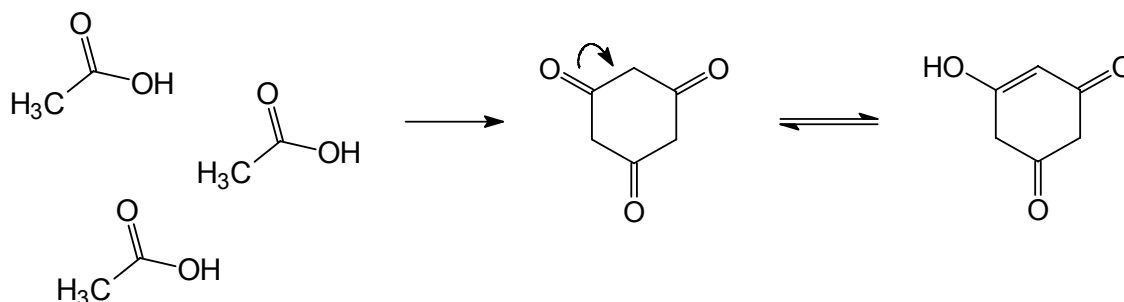
Figura 2.1: Diagrama das seções do gênero *Hypericum* (Fonte: ROBSON, 1981)

Na Região Sul do Brasil, ocorrem cerca de 20 espécies do gênero, sendo que todas pertencem a apenas duas seções, *Brathys* e *Trigynobrathys* (2 e 18 representantes nativos, respectivamente) (ROBSON, 1981; ROBSON, 1990).

2.3.2. Derivados de floroglucinol

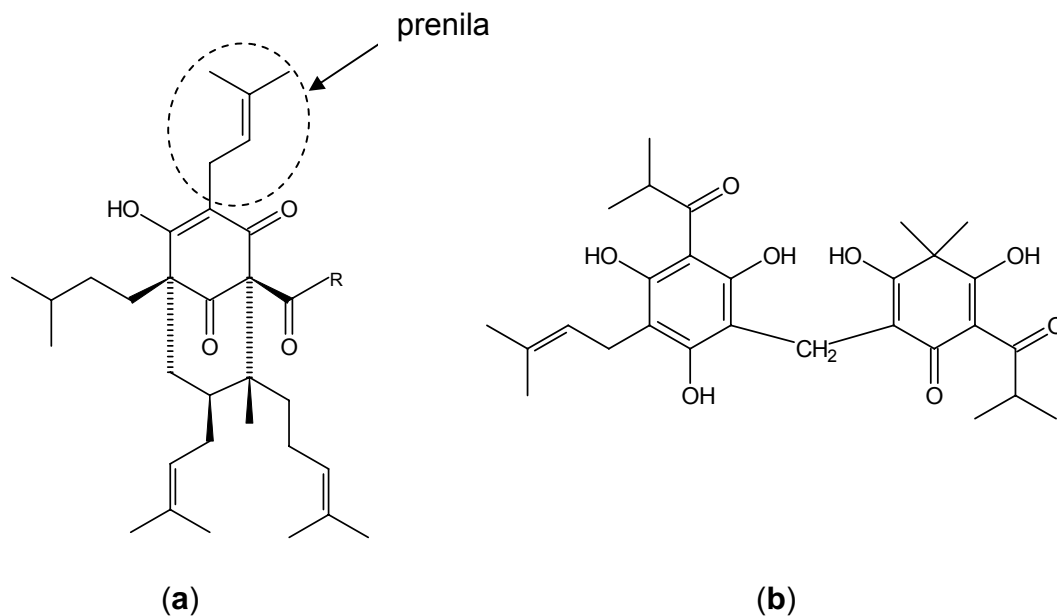
Numerosas espécies de *Hypericum* são usadas como plantas medicinais. Algumas têm sido extensivamente estudadas, tanto química quanto farmacologicamente, sendo que, de uma maneira geral, observa-se que estas espécies exibem uma forte tendência ao acúmulo de compostos fenólicos e que dentre estes, os derivados de floroglucinol estão freqüentemente relacionados com as atividades biológicas. De fato, várias espécies usadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças bacterianas, incluindo *H. uliginosum*, *H. brasiliense*, *H. japonicum* e *H. papuanum* levaram ao isolamento de derivados de floroglucinol com atividade antibiótica. Da mesma forma, os floroglucinóis hiperforina e *ad*-hiperforina são atualmente considerados os constituintes responsáveis pela atividade antidepressiva da erva-de-são-joão européia, *H. perforatum* (WINKELMANN *et al.*, 2000; BENKIKI *et al.*, 2003; SAVIKIN-FODULOVIC *et al.*, 2003).

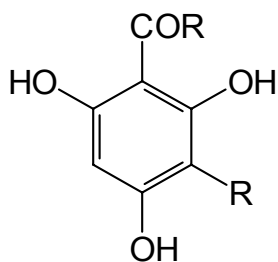
Uma variedade de produtos naturais apresenta o núcleo floroglucinol em sua estrutura. O núcleo básico, uma tricetona tautomérica, pode ser considerado como derivado de três unidades de acetato (**Esquema 2.1**) e diversas reações envolvendo este núcleo são entendidas com base na estrutura cetônica (IKAN, 1991). Em muitos casos o anel aromático encontra-se reduzido ou ainda na sua forma ceto-enólica, também pode estar substituído por prenilas (unidades com 5 átomos de carbono) e/ou farnesilas (unidades com 15 átomos de carbono) (GIBBONS *et al.*, 2005).



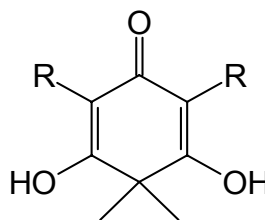
Esquema 2.1: Núcleo floroglucinol formado a partir de três unidades de acetato.

Os derivados de floroglucinol podem ser divididos em dois grupos estruturais, os poliprenilados semelhantes à hiperforina e *ad*-hiperforina (**a**) presentes em *H. perforatum* (WINKELMANN *et al.*, 2000) e os dímeros, como uliginosina A (**b**), compostos de uma porção de floroglucinol (**c**) e uma de ácido filicínico (**d**) unidas por uma ponte metilênica, encontrados em espécies nativas do Brasil (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996; FERRAZ *et al.*, 2002b).



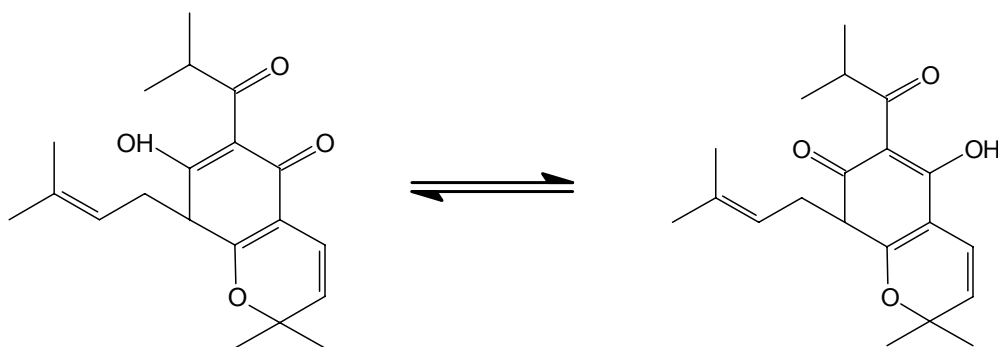


(c)



(d)

De um modo geral, acilfloroglucínóis são constituídos de misturas tautoméricas (e), ou seja, estabelece-se uma isomeria dinâmica, na qual os isômeros interconvertem-se entre si coexistindo em equilíbrio dinâmico como moléculas distintas e não meramente formas ressonantes, dificultando seu isolamento e purificação. Em solução, os derivados de floroglucinol permanecem na forma de um tautômero majoritário, embora a composição tautomérica possa variar em função de vários fatores, como a superfície da vidraria de laboratório, capaz de catalisar a interconversão estabelecendo o equilíbrio, e condições ambientais como solvente, traços de ácidos e bases, temperatura e concentração. O processo de metilação torna os isômeros estáveis, contudo pode dificultar a separação além de destruir os compostos originais. Derivados de floroglucinol são compostos lábeis, sensíveis à luz, oxigênio e calor (VEROTTA, 2002; SOLOMOS, 2005).



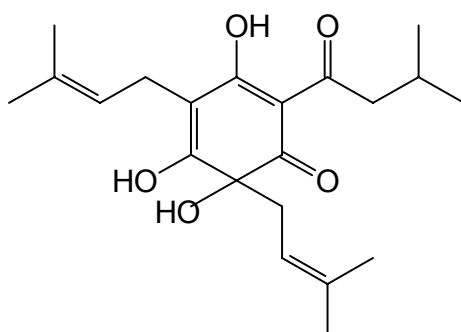
(e)

2.3.2.1. Biossíntese de derivados de floroglucinol

Acredita-se que a formação dos derivados de floroglucinol tenha como origem biossintética o metabolismo de aminoácidos, seguindo, predominantemente, a rota da desoxixilulose fosfato (ADAM *et al.*, 2002; VEROTTA, 2002).

O núcleo floroglucinol é gerado por um mecanismo policetídico, no qual o principal elemento de construção é o acetato na forma de acetil coenzima A, normalmente convertido em malonil coenzima A, via reação de carboxilação (GEISSMAN, 1967; ADAM *et al.*, 2002; VEROTTA, 2002).

O primeiro passo da biossíntese é a formação do anel aromático, que posteriormente é substituído por prenilas. O substrato iniciador pode variar de acordo com o derivado de floroglucinol a ser formado, por exemplo, o isobutiril-CoA serve de substrato tanto para a hiperforina, quanto para a co-humulona, isolada de *Humulus lupulus*, enquanto que o isovaleril-Coa forma a humulona (**23**), encontrada na mesma espécie; a *ad*-hiperforina se origina de 2-metilbutiril-CoA (ZUURBIER *et al.*, 1995; KLINGAUF *et al.*, 2005).

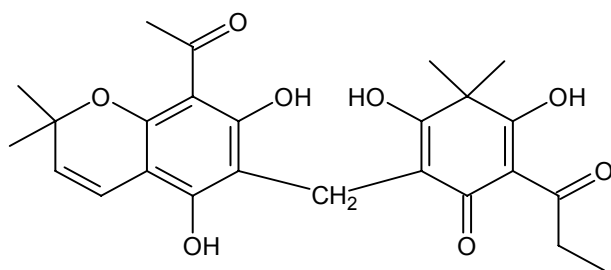


(**23**) humulona

O substrato iniciador é subsequenteamente alongado com três unidades de malonil-CoA por ação enzimática da policetídeo sintase. A posterior ciclização do precursor linear, catalisada por uma enzima chamada policetídeo ciclase, conduz à formação da acilfloroglucina, o núcleo floroglucinol (**Esquema 2.2 – Parte I**) (GEISSMAN, 1967; ZUURBIER *et al.*, 1995, ZUURBIER *et al.*, 1998; ADAM *et al.*, 2002; VEROTTA, 2002; KLINGAUF *et al.*, 2005).

A segunda etapa da biossíntese é a adição de prenilas ao núcleo aromático. As reações de prenilação contribuem consideravelmente para a diversidade dos produtos. A prenilação do núcleo floroglucinol é verificada, normalmente, em posição *orto* a uma hidroxila, uma vez que os grupamentos hidroxila aumentam a densidade eletrônica favorecendo energeticamente as reações enzimáticas de substituição eletrofílica com pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). A dimetilaliltransferase, ou preniltransferase aromática, catalisa a formação da ligação entre um anel aromático e o grupo prenila (**Esquema 2.2 – Parte II**) (ROCHA *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1999; ADAM *et al.*, 2002; BOUBAKIR *et al.*, 2005).

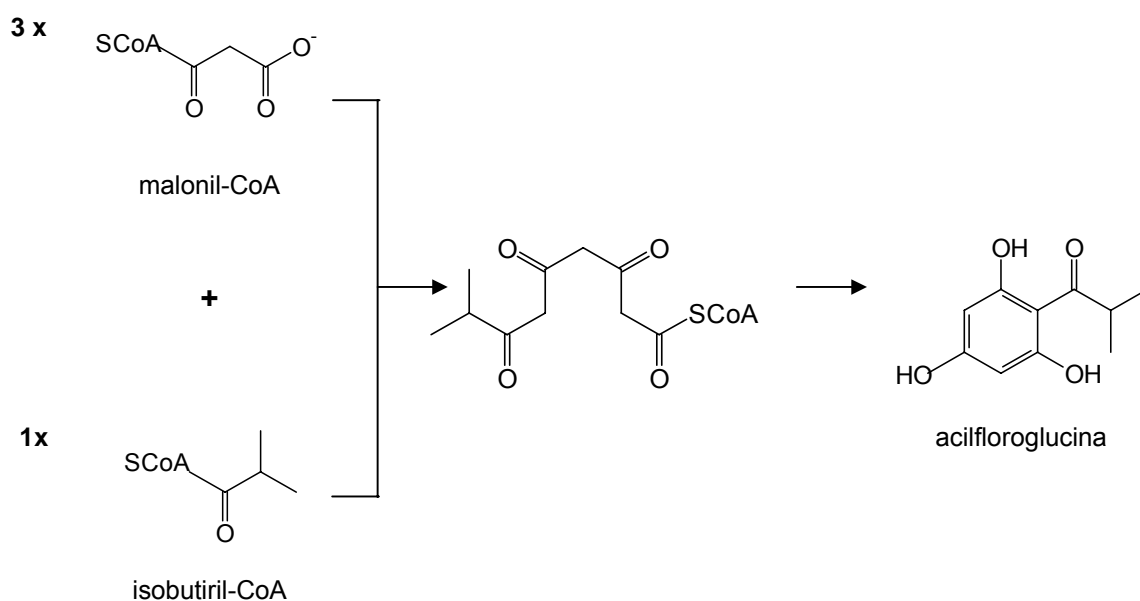
O grupo prenila pode ser capaz de ciclizar com um grupo hidroxila adjacente levando a formação de heterociclos de 5 membros, anel furano, ou 6 membros, anel pirano, característico de derivados dimetilbenzopirânicos como drumondina B (**24**) (ROCHA *et al.*, 1995; SANTOS *et al.*, 1999; BOUBAKIR *et al.*, 2005)



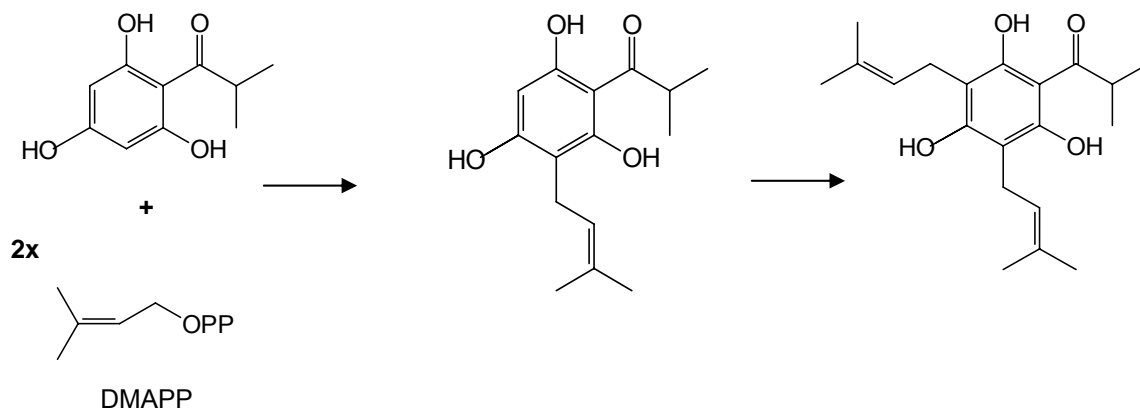
(**24**) drumondina B

No caso específico da hiperforina, além do precursor acilfloroglucinol não-substituído sofrer uma tripla substituição eletrofílica do núcleo aromático envolvendo um geranyl pirofosfato e duas unidades de DMAPP, ocorre um ataque nucleofílico de um terceiro DMAPP na dupla ligação 2'/3' da cadeia geranyl pré implantada, a fim de desencadear o fechamento do segundo anel (**Esquema 2.2 – Parte III**) (ADAM *et al.*, 2002; BOUBAKIR *et al.*, 2005).

Parte I

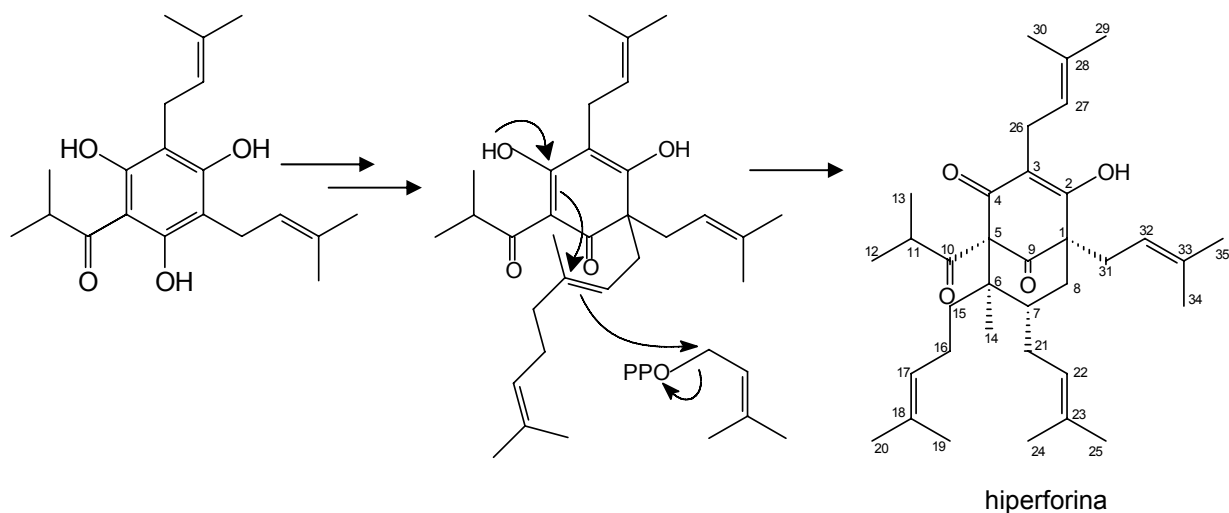


Parte II



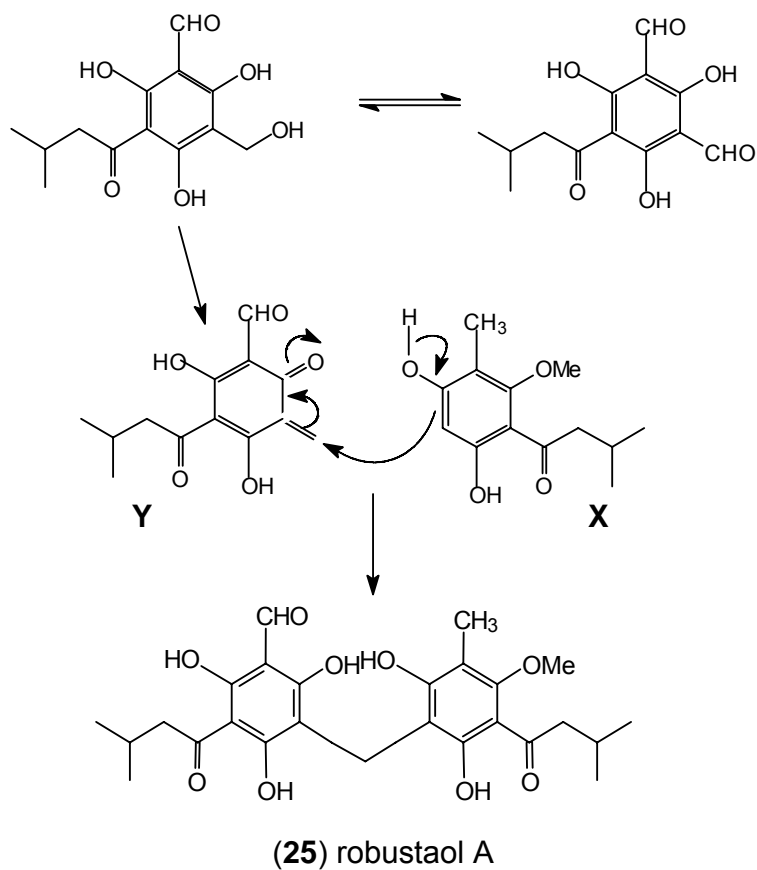
(continua)

Parte III



Esquema 2.2: Proposta de biossíntese de derivados de floroglucinol monomérico, seguindo o mecanismo policetídeo. Parte I: formação do núcleo de floroglucinol. Parte II: Adição de prenils ao núcleo básico de floroglucinol. Parte III: Mecanismo hipotético da biossíntese da hiperforina.

A biossíntese dos derivados diméricos foi encontrada apenas no trabalho de GHISALBERTI (1996), onde consta um estudo acerca de produtos deste grupo presentes em espécies de *Eucalyptus*. O mecanismo da reação descrita consistiria de uma Adição de Michael do composto **X** à **Y**, levando à formação de uma ponte metilênica entre estes dois anéis (**Esquema 2.3**), resultando em robustaol A (**25**), um derivado de floroglucinol dimérico isolado das folhas de *Eucalyptus robusta* Smith.



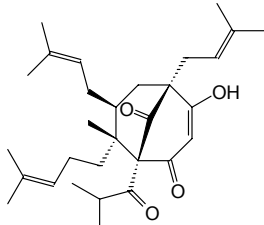
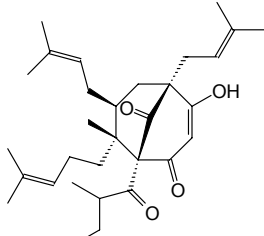
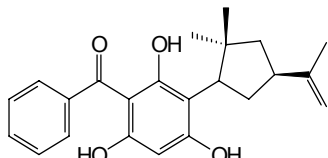
Esquema 2.3: Mecanismo provável de formação de robustal A (GHISALBERTI, 1996).

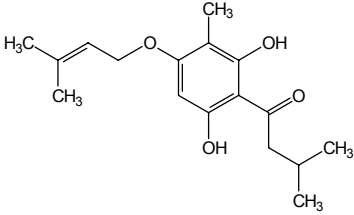
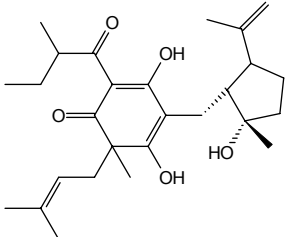
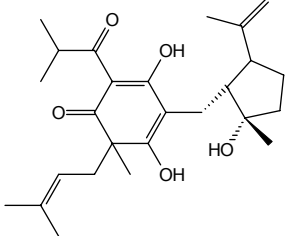
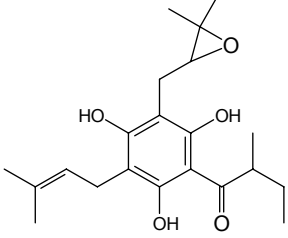
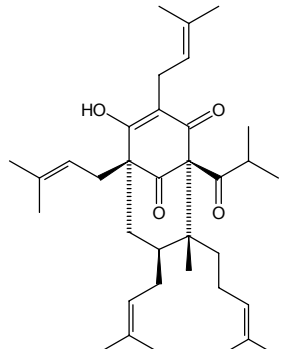
2.3.2.2. Distribuição de derivados de floroglucinol nas diferentes seções do gênero *Hypericum*

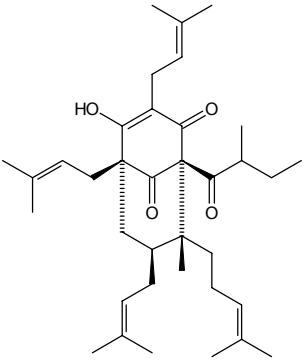
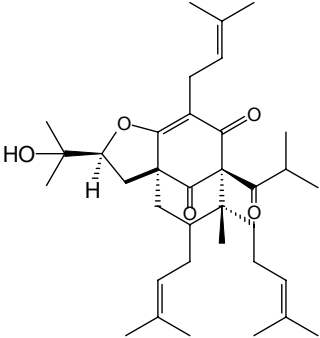
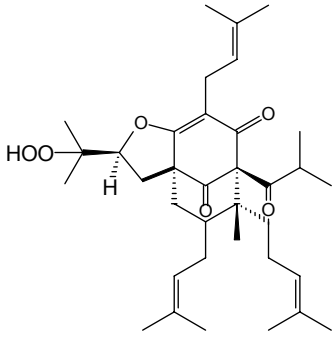
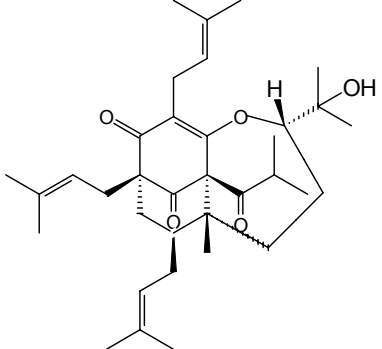
O quadro que segue (**Quadro 2.1**) apresenta um levantamento bibliográfico da ocorrência de derivados de floroglucinol em espécies de *Hypericum* por seção do gênero.

Os artigos utilizados no embasamento deste tópico foram localizados através do acesso aos bancos de dados *Science direct*, *Web of science*, *Pubmed*, *Scirus*, *Thieme-connect* e *Pubs acs*. As palavras-chave utilizadas foram *phloroglucinol* e *Hypericum*.

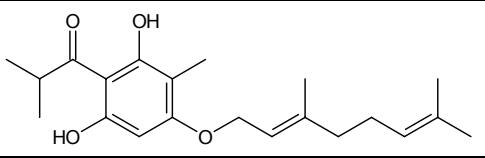
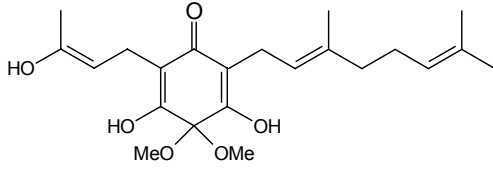
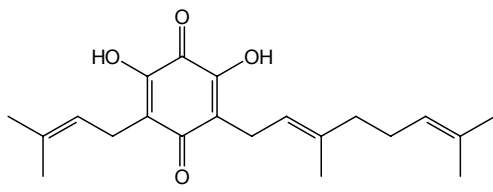
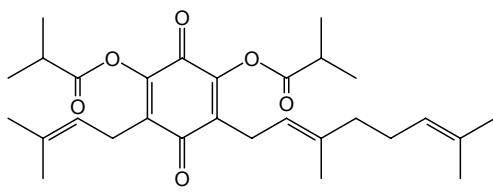
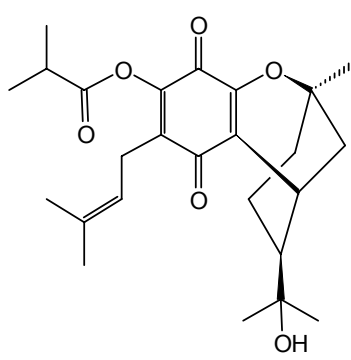
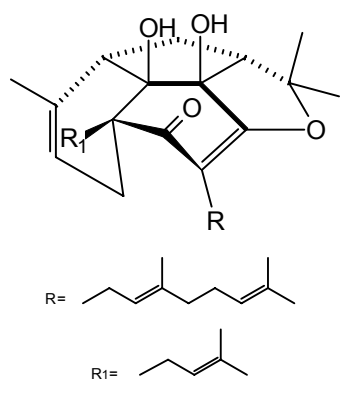
Quadro 2.1: Derivados de floroglucinol encontrados em espécies de *Hypericum*.

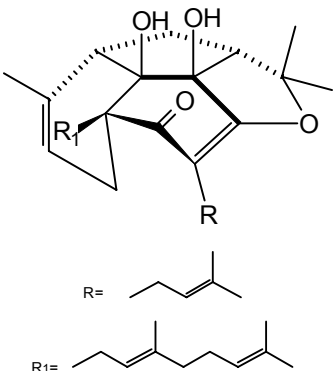
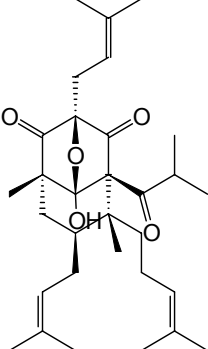
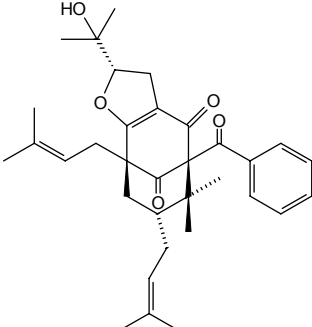
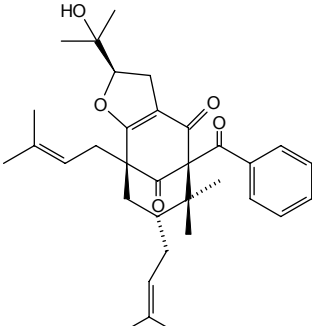
Seção	Espécie	Nome do derivado de Floroglucinol	Estrutura química	Referência
Seção 1 - <i>Campylosporus</i>	<i>Hypericum revolutum</i> VAHL	hiperevoluti na A (1)		DÉCOSTER D <i>et al.</i> , 1989.
		hiperevoluti na B (2)		
Seção 3 - <i>Ascyreia</i>	<i>Hypericum patulum</i> (si. <i>H. uralum</i>)	paglucinol (3)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1998.

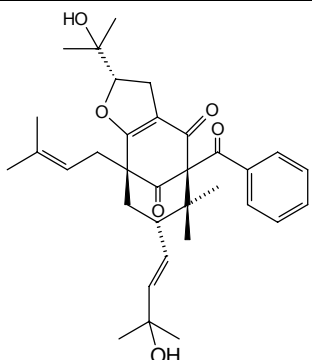
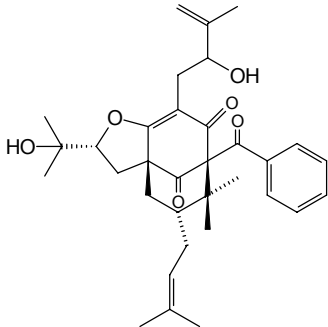
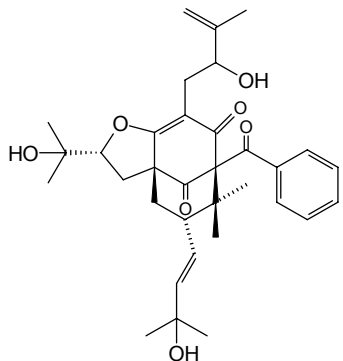
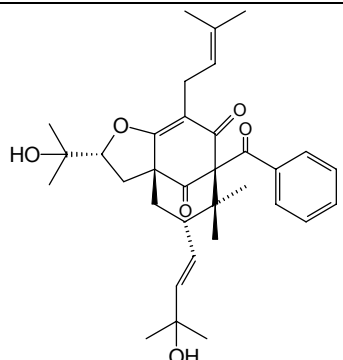
	<i>H. calycinum</i> L	(4)		DÉCOSTER D <i>et al.</i> , 1991.
	<i>Hypericum chinense</i> Osb	chinesina I (5)		TADA <i>et al.</i> , 1991.
		chinesina II (6)		TADA <i>et al.</i> , 1991.
Seção 5 - <i>Androsaemum</i>	<i>H. foliosum</i> Aiton	(7)		GIBBONS <i>et al.</i> , 2005.
Seção 9 - <i>Hypericum</i>	<i>H. perforatum</i> L.	Hiperforina (8)		ADAM <i>et al.</i> , 2002.

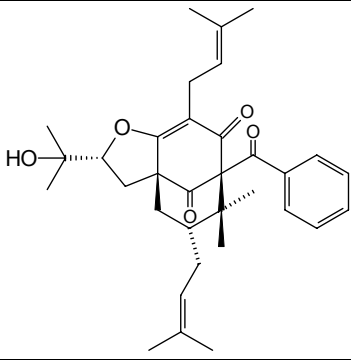
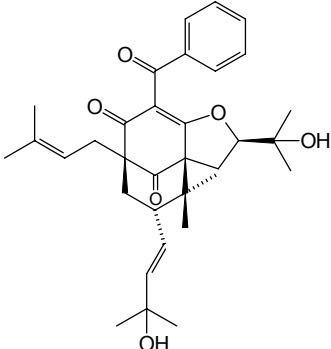
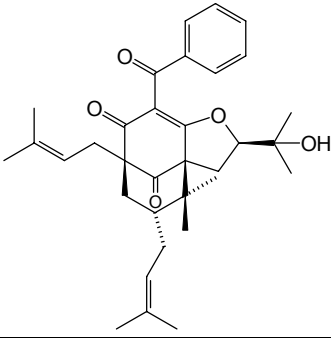
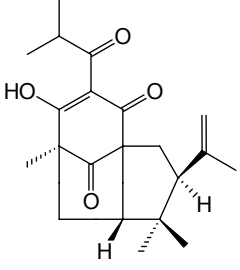
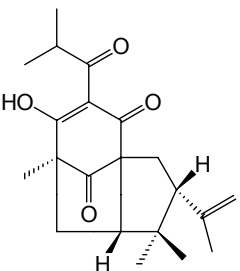
		<p><i>ad</i>-hiperforina (9)</p> 	<p>VEROTTA <i>et al.</i>, 1999 e 2000; DE SHAN <i>et al.</i>, 2001.</p>
		<p>furo-hiperforina (10)</p> 	<p>VEROTTA <i>et al.</i>, 1999.</p>
		<p>análogo oxidado da hiperforina (11)</p> 	<p>VEROTTA <i>et al.</i>, 2000.</p>
		<p>análogo oxidado da hiperforina (12)</p> 	<p>VEROTTA <i>et al.</i>, 2000.</p>

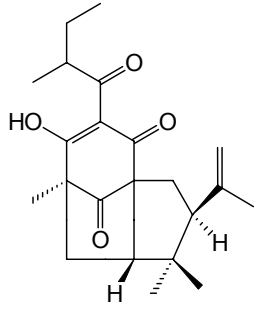
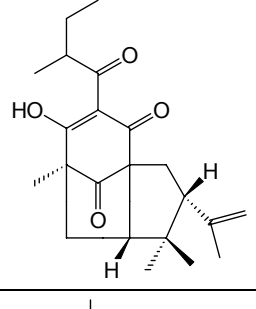
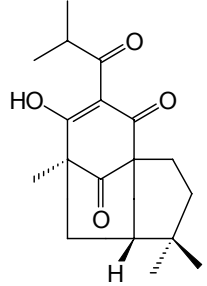
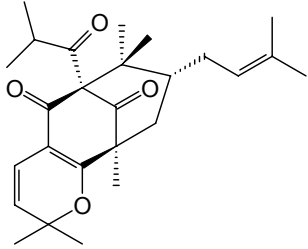
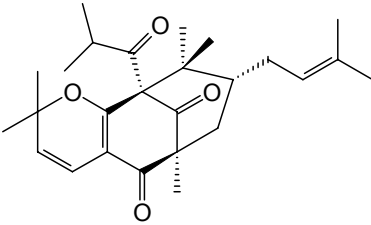
		análogo oxidado da hiperforina (13)		VEROTTA <i>et al.</i> , 2000.
		oxepa-hiperforina (14)		DE SHAN <i>et al.</i> , 2001.
		33-desoxi-33-hidroperoxifuro-hiperforina (15)		DE SHAN <i>et al.</i> , 2001.
		8-hidroxi-hiperforina-8,1-hemiacetal (16)		DE SHAN <i>et al.</i> , 2001.
		perforatuma (17)		Wu <i>et al.</i> , 2004.

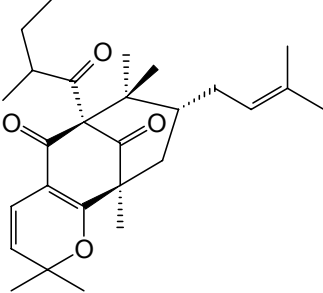
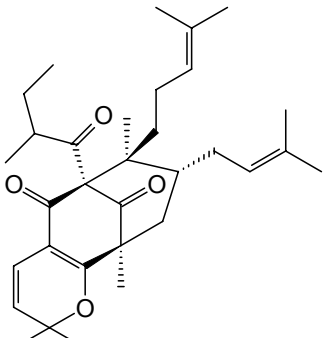
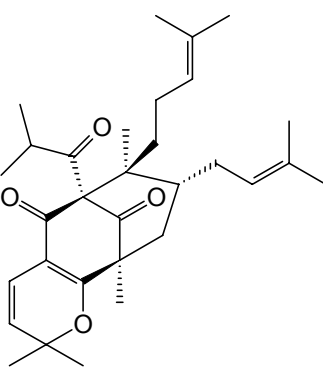
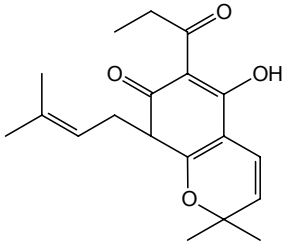
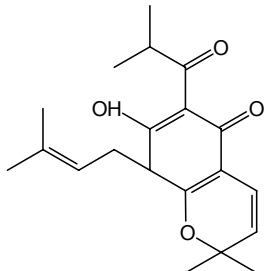
<i>Hypericum erectum</i> Thunb. ex Murray	otogirina (18)		TADA <i>et al.</i> , 1991.
	otogirona (19)		TADA <i>et al.</i> , 1991.
	erectoquion a A (20)		AN <i>et al.</i> , 2002b.
	erectoquion a B (21)		AN <i>et al.</i> , 2002b.
	erectoquion a C (22)		AN <i>et al.</i> , 2002b.
	erectona A (23)		AN <i>et al.</i> , 2002a.

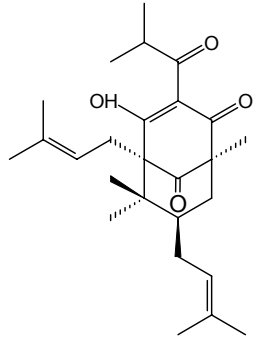
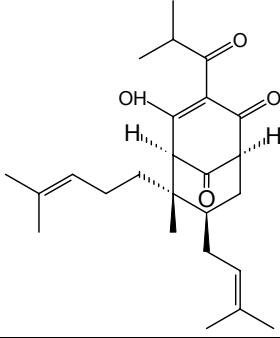
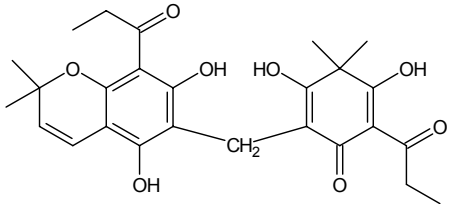
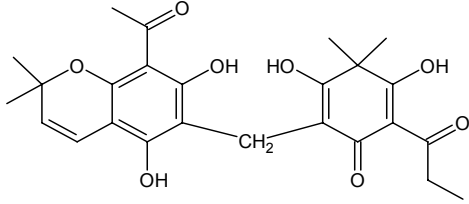
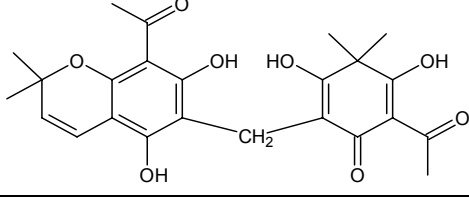
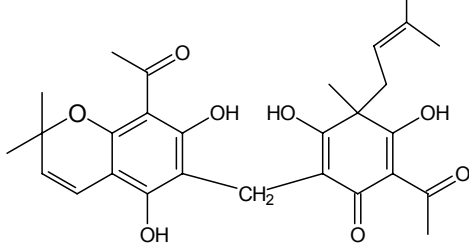
		erectona B (24)		AN <i>et al.</i> , 2002a.
Seção 13 - <i>Drosocarpium</i>	<i>Hypericum perforatum</i> L.	hiperfoliatina (25)		BENKIKI <i>et al.</i> , 2003.
Seção 17 - <i>Hirtella</i>	<i>Hypericum scabrum</i> L.	hiperibona A (26)		MATSUHI A <i>et al.</i> , 2002.
		hiperibona B (27)		

		hiperibona C (28)		
		hiperibona D (29)		
		hiperibona E (30)		
		hiperibona F (31)		

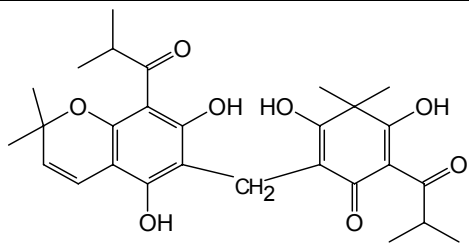
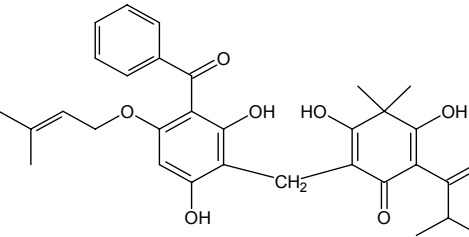
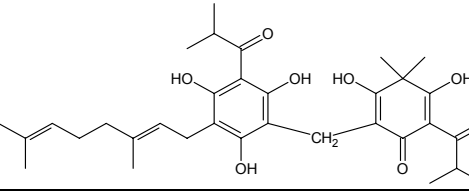
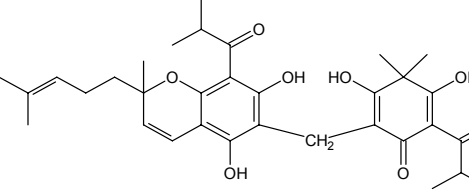
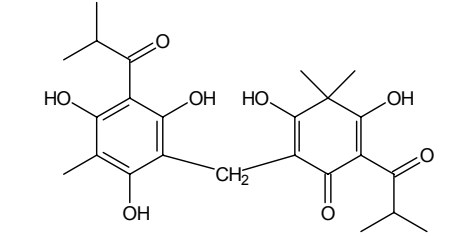
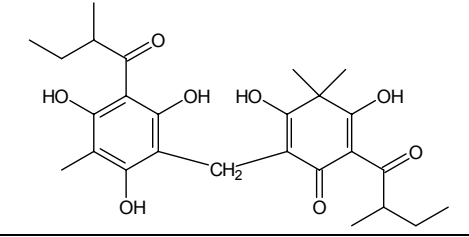
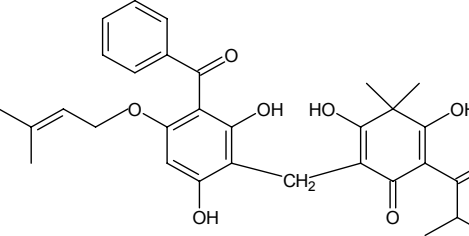
		<p>hiperibona G (32)</p> 	
		<p>hiperibona H (33)</p> 	
		<p>hiperibona I (34)</p> 	
Seção 26 - <i>Humifusoide</i> <i>um</i>	<i>H.</i> <i>papuanum</i> Ridley	<p>ialibinona A (35)</p> 	WINKELMA NN <i>et al.</i> , 2000.
		<p>ialibinona B (36)</p> 	

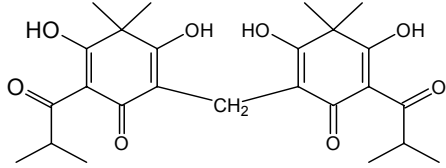
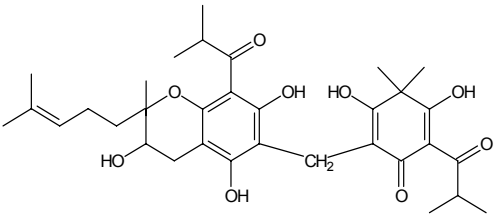
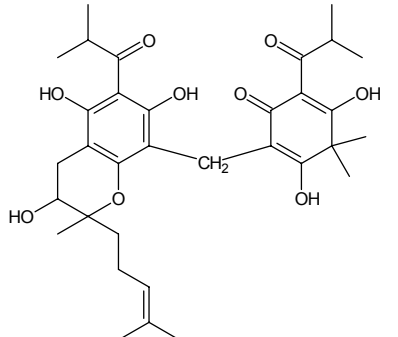
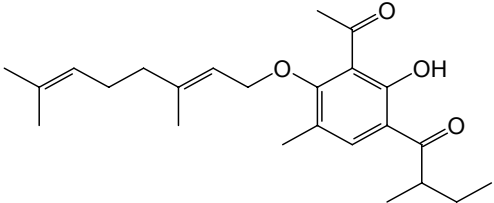
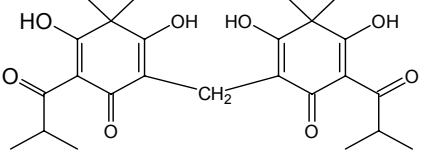
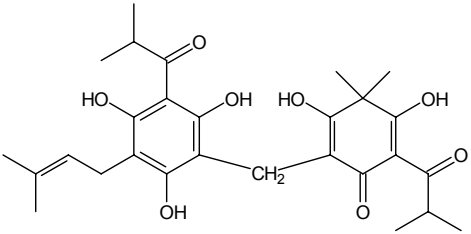
		ialibinona C (36)		
		ialibinona D (37)		
		ialibinona E (38)		
		papuaforina A (39)		
		papuaforina B (40)		

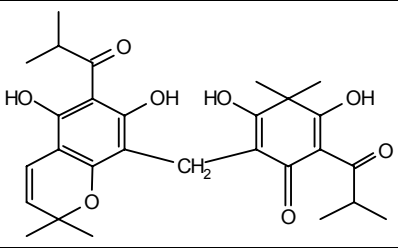
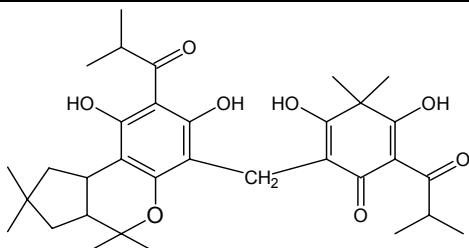
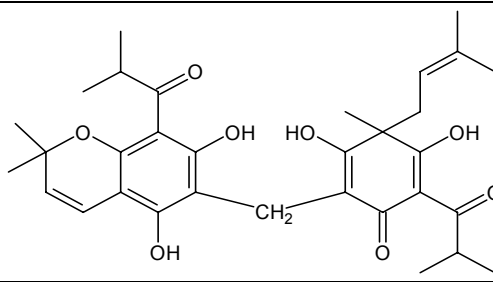
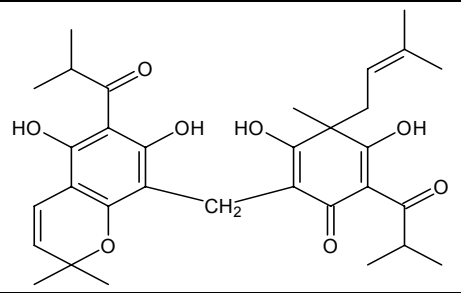
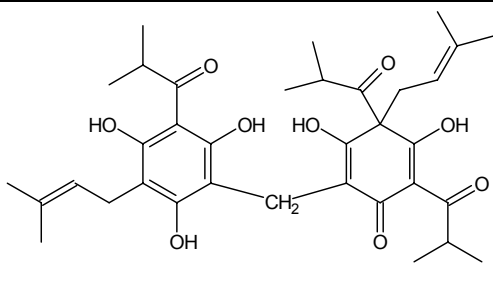
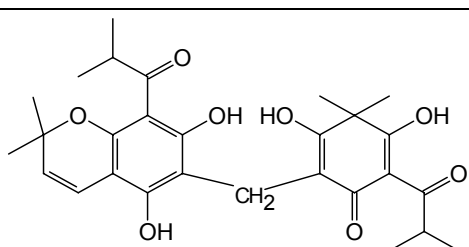
		<p>papuaforina C (41)</p> 	
		<p>papuaforina D (42)</p> 	
		<p>papuaforina E (43)</p> 	<p>WINKELMA NN <i>et al.</i>, 2001.</p>
		<p>hiperguinon a A (44)</p> 	<p>WINKELMA NN <i>et al.</i>, 2001.</p>
		<p>hiperguinon a B (45)</p> 	<p>WINKELMA NN <i>et al.</i>, 2001.</p>

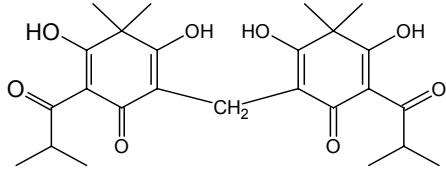
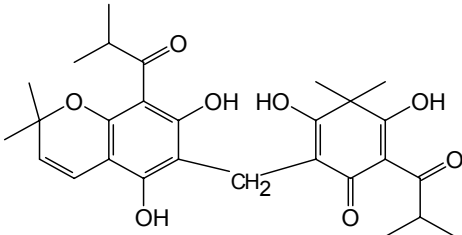
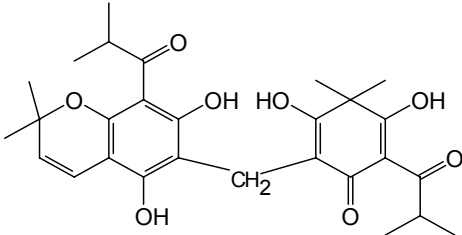
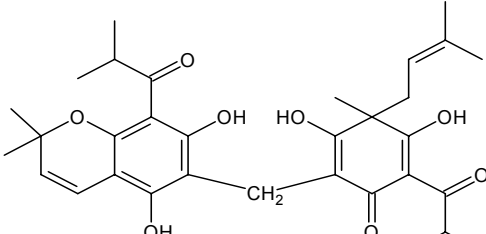
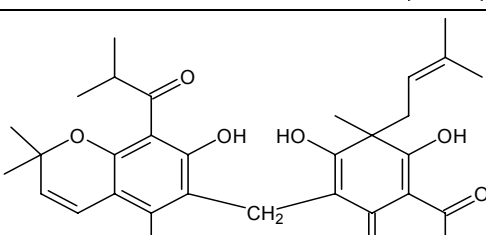
		hiperpapuanona (46)		WINKELMANN et al., 2001.
Seção 27 - <i>Adenosepalum</i>	<i>H. atomarium</i> Boiss. Ssp. <i>Degenii</i> (Bornm) Hayek, (sin. <i>H. annulatum</i> Moris)	Hiperatomarina (47)		SAVIKIN-FODULOVIC et al., 2003.
Seção 29 - <i>Brathys</i>	<i>H. drummondii</i> (Grev. & Hook.) Torrey & Gray	drumondina A (48)		JAYASURIYA et al., 1989.
		drumondina B (49)		JAYASURIYA et al., 1989.
		drumondina C (50)		JAYASURIYA et al., 1989.
		drumondina D (51)		JAYASURIYA et al., 1991.

		albaspidina A-A (52)		JAYASURIY A <i>et al.</i> , 1991.
		albaspidina P-P (53)		JAYASURIY A <i>et al.</i> , 1991.
		drumondina F (54)		JAYASURIY A <i>et al.</i> , 1989.
		isodrumondi na D (55)		JAYASURIY A <i>et al.</i> , 1991.
		drumondina E (56)		JAYASURIY A <i>et al.</i> , 1991.
	<i>H. stypheoide</i> s A. Rich.	3-geranil-1-(3- metilbutanoi l) floroglucinol (57)		GAMIOTEA -TURRO <i>et al.</i> , 2004.
Seção 30 - <i>Trigynobrat</i> <i>hys</i>	<i>Hypericum</i> <i>uliginosum</i> HBK	uliginosina A (58)		TAYLOR <i>et al.</i> , 1969.

		uliginosina B (59)		TAYLOR <i>et al.</i> , 1969.
<i>H. japonicum</i> Thunb. ex Murray		sarotralino (60)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1986.
		sarotraleno A (61)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1986.
		sarotraleno B (62)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1986; HU <i>et al.</i> , 2000.
		saroaspidin a A (63)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1987.
		saroaspidin a B (64)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1987.
		saroaspidin a C (65)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1987.

		japonicina A (66)		YAMAKI <i>et al.</i> , 1994.
		sarotraleno C (67)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1994.
		sarotraleno D (68)		ISHIGURO <i>et al.</i> , 1994.
		(69)		HU <i>et al.</i> , 2000.
<i>Hypericum brasiliense</i> Choisy		japonicina A (70)		ROCHA <i>et al.</i> , 1995.
		uliginosina A (58)		ROCHA <i>et al.</i> , 1995.

		iso- uliginosina B (71)		ROCHA <i>et al.</i> , 1995.
		hiperbrasilol A (72)		ROCHA <i>et al.</i> , 1995.
		hiperbrasilol B (73)		ROCHA <i>et al.</i> , 1996.
		iso- hiperbrasilol B (74)		ROCHA <i>et al.</i> , 1996.
		hiperbrasilol C (75)		ROCHA <i>et al.</i> , 1996.
	<i>H. myrianthum</i> Cham. & Schlecht	uliginosina B (59)		FERRAZ <i>et al.</i> , 2002b.

		japonicina A (70)		DALL'AGNOL <i>et al.</i> , 2005.
	<i>H. polyanthemum</i> Klotzsch ex Reichardt	uliginosina B (59)		NÖR <i>et al.</i> , 2004.
	<i>H. carinatum</i> Griseb.	uliginosina B (59)		NÖR <i>et al.</i> , 2004.
	<i>H. caprifoliatum</i> Cham. & Schlecht.	hiperbrasilol B (73)		NÖR <i>et al.</i> , 2004.
	<i>H. connatum</i> Lam.	hiperbrasilol B (73)		NÖR <i>et al.</i> , 2004.

2.3.2.3. Atividades biológicas

2.3.2.3.1. Atividade antidepressiva

Fitoterápicos contendo extratos de *H. perforatum* são amplamente usados na Alemanha para o tratamento de depressão leve a moderada. Recentemente seu uso com essa indicação tem se estendido a outros países europeus e para os Estados Unidos (JENSEN *et al.*, 2001) sendo que a monografia do vegetal consta na ESCOP (European Scientific Cooperative on Phytoterapy, 1997) e na Comissão E (BLUMENTHAL, 2000).

Esta atividade tem despertado grande interesse na química e bioquímica de seus constituintes. Diversos ensaios clínicos têm apoiado o uso de extratos desse vegetal no tratamento de depressão leve a moderada e alterações de humor e têm evidenciado que a erva-de-são-joão é tão efetiva quanto antidepressivos sintéticos. Resultados *in vivo* demonstram que *H. perforatum* possui atividade comparável ao antidepressivo tricíclico desipramina e o inibidor da recaptação de serotonina sertralina (VEROTTA *et al.*, 1999; DAUDT *et al.*, 2000; VEROTTA *et al.*, 2000; DE SHAN *et al.*, 2001; JENSEN *et al.*, 2001).

Inicialmente a atividade antidepressiva de *H. perforatum* era associada à hipericina, uma naftodiantrona polar, dotada de uma moderada atividade inibidora da monoamina oxidase A (MAO-A)¹. Contudo, sua relevância para esta atividade dos extratos de “St. John’s Wort” (*H. perforatum*) foi questionada com base em

estudos que demonstram que a retirada da hiperforina diminui consideravelmente a atividade do extrato inferindo assim que o derivado de floroglucinol é a molécula responsável pela atividade antidepressiva de *H. perforatum* (VEROTTA *et al.*, 1999; VEROTTA *et al.*, 2000; DE SHAN *et al.*, 2001; VEROTTA, 2002). Sabe-se que tanto a hiperforina quanto a *ad*-hiperforina são potentes inibidores da recaptação de dopamina, serotonina e noradrenalina (ADAM *et al.*, 2002).

Todavia, este composto é instável e sua propensão à degradação oxidativa é um sério problema para a padronização e pode afetar dramaticamente a atividade farmacológica dos extratos. Quando testados em ensaio de inibição da recaptação de serotonina nos sinaptossomos corticais de cérebro de rato, os três análogos oxigenados da hiperforina (11), (12) e (13) e a furo-hiperforina mostram um decréscimo da atividade maior que dez vezes, se comparado com a hiperforina, sugerindo que a oxidação que resulta na ausência de equilíbrio tautomérico é desfavorável para a atividade. A labilidade da hiperforina por oxidação e o decréscimo da atividade de seus derivados oxidados salientam a importância do desenvolvimento de preparações de *H. perforatum* que se mantenham estáveis e padronizadas em seus princípios ativos (VEROTTA *et al.*, 1999; VEROTTA *et al.*, 2000).

Não está claro se as formas oxidadas da hiperforina e *ad*-hiperforina são constituintes genuínos da planta ou são artefatos formados a partir da rota de degradação dos produtos naturais. Neste último caso, seriam bons modelos ou marcadores da degradação da hiperforina em extratos da planta. O sistema β -dicarbonil ionizável é o responsável pela instabilidade da hiperforina, uma vez que

¹MAO: enzima envolvida na degradação metabólica de dopamina e noradrenalina, e que auxilia no controle da reserva liberável dessas catecolaminas na fenda sináptica. MAO-A: uma das isoenzimas de MAO. Depressão: A teoria da monoamina, atualmente aceita, sugere que a depressão resulta da transmissão funcionalmente deficiente de noradrenalina e/ou serotonina no Sistema Nervoso Central (SNC) (RANG, 2001; GOODMAN & GILMAN'S, 2001).

análogos sem este núcleo são estáveis. Modificações nesta parte da molécula seriam essenciais para a obtenção de derivados passíveis de desenvolvimento farmacêutico (VEROTTA, 2002).

Além disso, estudos recentes têm identificado alguns riscos associados ao uso popular de *H. perforatum* como erva medicinal, devido ao fato de que hiperforina e outros compostos da planta podem diminuir os níveis sanguíneos de fármacos como ciclosporina, inibidores de protease do vírus da imunodeficiência humana (HIV), compostos citostáticos, anticoagulantes, antidiabéticos orais e anticoncepcionais, os quais sofrem um aumento na degradação metabólica, atribuída a uma maior expressão de enzimas do citocromo P450, envolvidas na detoxificação de compostos orgânicos lipofílicos. Assim, a eficácia desses fármacos poderia ficar comprometida com a terapia auxiliar com o fitoterápico. Este fato foi denominado de “a descoberta do ano 2000” pela Science (ADAM *et al.*, 2002).

No sul do Brasil existem cerca de 20 espécies de *Hypericum*; destas, a primeira a ser estudada quanto à atividade antidepressiva foi *H. brasiliense*, que teve sua atividade inibidora das monoaminoxidases (MAO) citada por ROCHA e colaboradores em 1995. O extrato bruto metanólico de *H. caprifoliatum* também demonstrou esta atividade e, a partir de estudo por fracionamento bioguiado do extrato, acredita-se que o componente majoritário, um derivado de floroglucinol dimérico, seja o responsável pela atividade (DAUDT *et al.*, 2000; GNERRE *et al.*, 2001). Os dados preliminares de isolamento desse composto estão discutidos no **Capítulo 1**.

2.3.2.3.2. Atividade antimicrobiana

O tratamento de doenças infecciosas com agentes antimicrobianos representa, atualmente, um problema de grande importância para a medicina, uma vez que o uso indiscriminado de antibióticos vem provocando o desenvolvimento

de resistência por parte de vários microorganismos. Este fato impulsionou a busca por novas moléculas ativas a partir de plantas usadas tradicionalmente com este propósito. Plantas da subfamília Hypericoideae são freqüentemente usadas na medicina popular como agentes antibióticos, sendo que vários derivados de floroglucinol ativos já foram isolados (MUKHERJEE *et al.*, 2002; DALL'AGNOL *et al.*, 2005).

As chinesinas de *H. chinense* (5 e 6), bem como a hiperforina (8) de *H. perforatum* possuem atividade antibacteriana. Isto poderia justificar o uso tópico desta última no tratamento de feridas (TADA *et al.*, 1991; MAISENBACHER & KOVAR, 1992; VEROTTA *et al.*, 1999; ADAM *et al.*, 2002). As hiperibonas (26-34) de *H. scabrum*, segundo os autores, demonstraram uma leve atividade frente *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (MATSUHISA *et al.*, 2002).

A partir de fracionamento bioguiado, GIBBONS e colaboradores (2005) comprovaram a atividade antibacteriana do derivado de floroglucinol isolado do extrato hexano de *H. foliosum*, o qual mostrou-se levemente mais ativo contra cepas resistentes a tetraciclina e meticilina, quando comparado com cepas de referência de *S. aureus*.

Os derivados de floroglucinol isolados de *H. papuanum* foram testados frente a *Bacillus cereus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*. As ialibionas A-D, de estrutura semelhante à ialibinona E (38), demonstraram atividade antibacteriana (WINKELMANN *et al.*, 2000). Os efeitos antibacterianos dos produtos papuaforinas A, C, D e E, (39-43), hiperquinonas A (44) e B (45) e hiperpapuanona (46) foram considerados um tanto fracos ou mesmo equivalentes ao controle negativo (solvente), exceção dada a hiperpapuanona, a qual se mostrou moderadamente ativa frente às bactérias citadas. Entretanto, os autores acreditam que esta atividade possa justificar o uso tradicional desta espécie no tratamento de feridas em Papua Nova Guiné (WINKELMANN *et al.*, 2001).

Todos os produtos isolados de *H. drummondii* (30-39) apresentaram atividade antibacteriana comparável ou maior que estreptomicina frente às bactérias gram-positivas, *S. aureus*, *B. subtilis* e à bactéria ácido-resistente, *Mycobacterium smegmatis*, exceção dada à drumondina C e às albaspidinas. O floroglucinol apresentando núcleo benzopirano linear (drumondina D - 51) foi tão ativo quanto o derivado angular (isodrumondina D - 55) e ambos compostos, C-prenilado (drumondina F - 54) e O-prenilado (drumondina E - 56), foram ativos (JAYASURYA *et al.*, 1989; JAYASURYA *et al.*, 1991). Os potenciais mecanismos tóxicos sugeridos que poderiam justificar esta atividade são a geração de radicais livres, a quelação de cátions intracelulares e a ligação a várias macromoléculas ou centros nucleofílicos na célula. Contudo, a resposta tóxica não é específica para bactérias (inibição da síntese de parede celular) e não é afetada pela substituição de metila ou etila na cadeia lateral. A estrutura dimérica é requerida para a atividade, e parece também que o sistema conjugado das drumondinas contribui para a atividade biológica, quando comparados às albaspidinas que não foram ativas (JAYASURIYA *et al.*, 1989).

Outras substâncias ainda apresentam atividade inibidora do crescimento de microorganismos como a uliginosina A (58) (*B. subtilis*, *S. aureus*) e uliginosina B (59) (*S. aureus*) (TAYLOR *et al.*, 1969), sarotralenos A (61) e B (62) (*S. aureus*, *B. Cereus* e *Nocardia gardenen*) (ISHIGURO *et al.*, 1986), sarotralenos C (67) e D (68) (*S. aureus*) (ISHIGURO *et al.*, 1994) e os derivados encontrados em *H. brasiliense*, iso-uliginosina B (59), hiperbrasilol A (72), B (73) e C (75), iso-hiperbrasilol B (74) e japonicina A (70) (*B. subtilis*) (ROCHA *et al.*, 1995; ROCHA *et al.*, 1996).

Em ensaio antimicrobiano realizado por DALL'AGNOL e colaboradores (2003) com espécies de *Hypericum* nativas do RS, verificou-se que o extrato bruto metanólico de *H. connatum*, *H. carinatum* Griseb., *H. ternum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthum* contêm substâncias capazes de retardar o crescimento de *Candida albicans*, podendo justificar o uso popular de plantas como o *H. connatum*, no

tratamento de ferimentos na boca, incluindo aftas. Os extratos metanólicos brutos de *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum* foram ativos contra *S. aureus*, enquanto que os extratos de *H. polyanthemum* e *H. ternum* apresentaram atividade contra *B. subtilis* e *M. luteus*.

A análise comparativa de diferentes frações das espécies demonstrou que, o extrato lipofílico das partes aéreas de *H. myrianthum* apresentou a segunda maior atividade frente *S. aureus*. E a análise da fração éter de petróleo de *H. polyanthemum* apresentou atividade antimicrobiana contra *B. subtilis* e *M. luteus* (DALL'AGNOL *et al.*, 2003). Na fração lipofílica há predomínio de derivados de floroglucinol os quais poderiam ser responsáveis pela atividade observada.

Alguns derivados de floroglucinol isolados de representantes de outras famílias botânicas tais como Myrtaceae e Rutaceae têm demonstrado propriedades antiviral e antifúngica (DÉCOSTERD *et al.*, 1991). Na família Clusiaceae, as chinesinas (5 e 6) de *H. chinense* são compostos reconhecidamente antivirais (TADA *et al.*, 1991).

A atividade antifúngica foi verificada em *H. calycinum*, na qual o único derivado de floroglucinol (4) isolado foi ativo contra *Cladosporium cucumerinum*, sendo o primeiro exemplar de um derivado de floroglucinol de estrutura simples com propriedades fungicidas em espécies do gênero (DÉCOSTERD *et al.*, 1991). As uliginosinas A (58) e B (59) de *H. uliginosum* também exibem tal ação, porém contra *Trychophyton mentagrophytes* (ROCHA *et al.*, 1995).

2.3.2.3.3. Atividade Antiproliferativa

A revisão bibliográfica acerca da atividade antiproliferativa de derivados de floroglucinol será abordada no **Capítulo 3**.

2.3.2.3.4. Outras Atividades

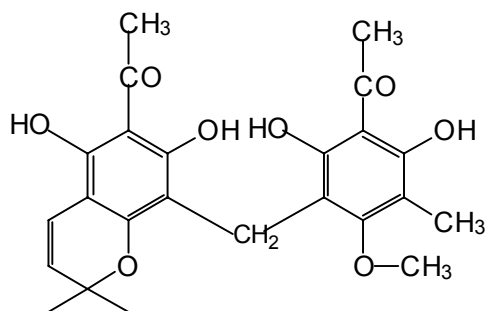
A atividade antimalárica é também mencionada para *Hypericum*. Entre os compostos isolados desse gênero, sarotraleno B (**62**) (também chamado de japonicina B) e o derivado (**4**) presente em *H. calycinum* possuem ação *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* multi-resistente (DÉCOSTERD *et al.*, 1991).

Algumas doenças alérgicas envolvidas com anticorpo IgE são mediadas por substâncias químicas como histamina, leucotrieno D4 e tromboxano A2. Antagonistas destes mediadores químicos poderiam representar um composto antialérgico importante. Os derivados de floroglucinol, otogirina (**18**) e otogirona (**19**), juntamente com os previamente isolados de *H. chinensis*, chinensina I (**5**) e chinensina II (**6**), são os primeiros antagonistas efetivos de ambos (TADA *et al.*, 1991).

A ação antioxidante, ainda que moderada, é verificada para o derivado de floroglucinol (**57**) presente em *H. styphelioides* (GAMIOTEA-TURRO *et al.*, 2004).

2.3.2.4. Derivados de floroglucinol encontrados em outros gêneros

Espécies de outras famílias também apresentam derivados de floroglucinol, de estrutura dimérica semelhante àqueles isolados de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, com atividade antitumoral. *Mallotus japonicus* Muell. Arg. (Euphorbiaceae) é uma árvore cujas cascas são usadas popularmente no tratamento de câncer (ARISAWA *et al.*, 1985). Desta espécie foram isolados vários constituintes do extrato clorofórmico, todos derivados de floroglucinol, a maioria de estrutura dimérica, semelhantes a malotolerina (**76**). Estes compostos foram capazes de inibir promotores de tumor estimulados pela incorporação de ³H-colina em fosfolipídios (ARISAWA *et al.*, 1991) o que pode justificar o uso popular desta planta.



(76)

Exudatos foliares de pteridófitas do gênero *Dryopteris* (*D. villarii* e *D. arguta*) (Dryopteridaceae) também contêm derivados de floroglucinol diméricos, os quais foram previamente isolados dos rizomas dessas espécies (WOLLENWEBER *et al.*, 1998).

Derivados de floroglucinol monoméricos contendo um anel furano são considerados componentes químicos característicos de *Garcinia subelliptica* (Clusiaceae) (FUKUYAMA *et al.*, 1993 e 1998) e são quimicamente relacionados com os derivados poliprenilados encontrados em *Humulus lupulus* (Cannabaceae) (ZUURBIER *et al.*, 1995 e 1998).

Espécies de *Eucalyptus* (Myrtaceae), (item 2.3.2.1, biossíntese de derivados de floroglucinol diméricos) apresentam uma grande variedade de diferentes estruturas dessa classe de compostos, desde simples até complexos derivados de floroglucinol contendo um núcleo terpenóide (GHISALBERTI, 1996).

2.4. Materiais e métodos

Os dados sobre a ocorrência de derivados de floroglucinol em espécies de *Hypericum* foram obtidos a partir de revisão da literatura e isolamentos realizados

no próprio laboratório, a partir do estudo fitoquímico de espécies nativas do Rio Grande do Sul (ver isolamento de derivados de floroglucinol - **1.5.1 Capítulo 1**). Tais informações encontram-se compiladas no **Quadro 2.1** do item **2.3.2.2** da revisão bibliográfica deste trabalho. Os derivados de floroglucinol foram classificados em monomérico, os que continham apenas uma porção floroglucinol e dimérico, os formados por duas unidades de floroglucinol.

2.5. Resultados e discussão

A partir do levantamento bibliográfico realizado acerca da ocorrência de derivados de floroglucinol no gênero *Hypericum*, foram encontradas 76 estruturas diferentes em 22 espécies pertencentes a 10 seções do gênero (**Figura 2.2**), a saber: *Campylosporus*, *Ascyreia*, *Androsaemum*, *Hypericum*, *Drosocarpium*, *Hirtella*, *Humifusoideum*, *Adenosepalum*, *Brathys* e *Trigynobrathys*.

Os produtos relatados pertencem a dois grupos biogenéticos principais, os floroglucinóis monoméricos (aromáticos ou não) e os diméricos (com um ou ambos núcleos não aromáticos).

Dentre as seções que apresentam as moléculas em questão, a mais rica parece ser a de número 30, *Trigynobrathys* (**Figura 2.2**), com relatos de ocorrência de 25 produtos em oito espécies, dos quais apenas um é derivado monomérico. Entretanto, convém salientar que, nesta seção uma mesma substância é encontrada em diferentes espécies, como é o caso de uliginosina A, presente em *H. uliginosum* (TAYLOR *et al.*, 1969) e *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995); uliginosina B isolada primeiramente de *H. uliginosum* (TAYLOR *et al.*, 1969) e encontrada também nas espécies nativas *H. myrianthum* (FERRAZ *et al.*, 2002b), *H. polyanthemum* e *H. carinatum* (NÖR *et al.*, 2004), hiperbrasilol B de *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1996), *H. caprifoliatum* e *H. connatum* (NÖR *et al.*, 2004) e

japonicina A presente em *H. japonicum* (YAMAKI *et al.*, 1994), *H. brasiliense* (ROCHA *et al.*, 1995) e *H. myrianthum* (DALL'AGNOL *et al.*, 2005).

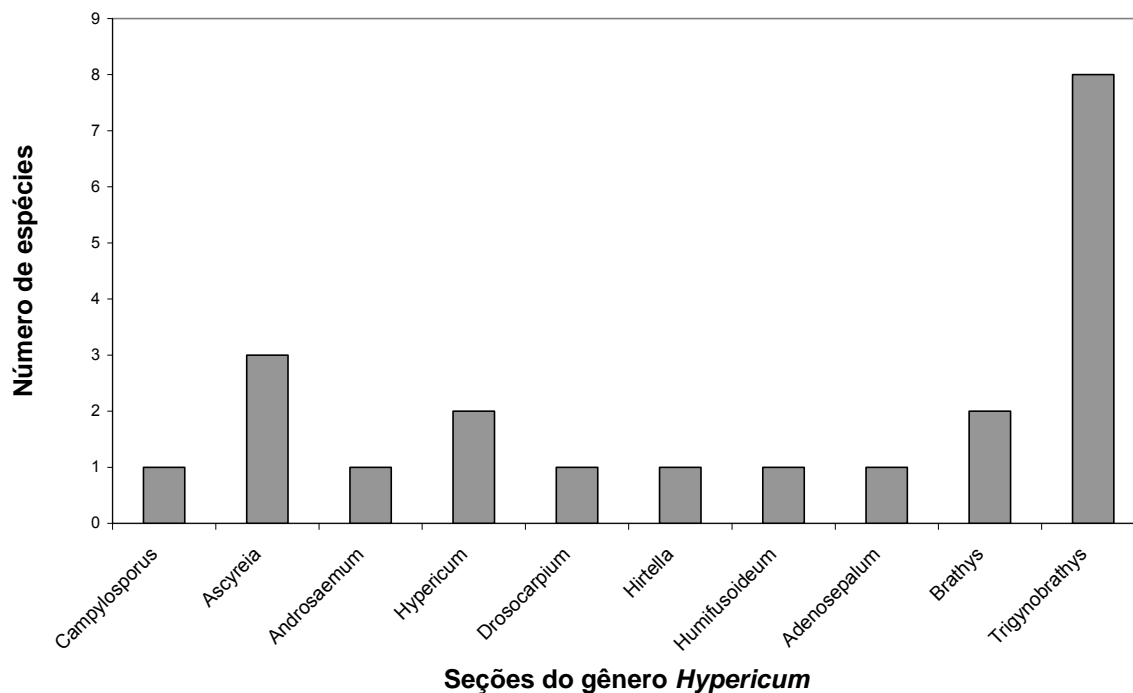


Figura 2.2: Numero de espécies que contém derivados de floroglucinol em sua composição química por seção do gênero.

Enquanto que os derivados monoméricos foram encontrados em todas as seções relacionadas, os derivados diméricos parecem ter uma dispersão restrita no gênero. Estes últimos estão presentes em espécies de apenas duas seções, *Brathys* (29) e *Trigynobrathys* (30), as quais comportam todas as espécies brasileiras. Os derivados monoméricos são raramente encontrados nas seções mencionadas, havendo sido relatado apenas um composto deste tipo em cada uma das seções (**Figura 2.3**). Este fato aponta para a possibilidade de utilização de derivados diméricos como marcadores quimiotaxonômicos das seções 29 e 30.

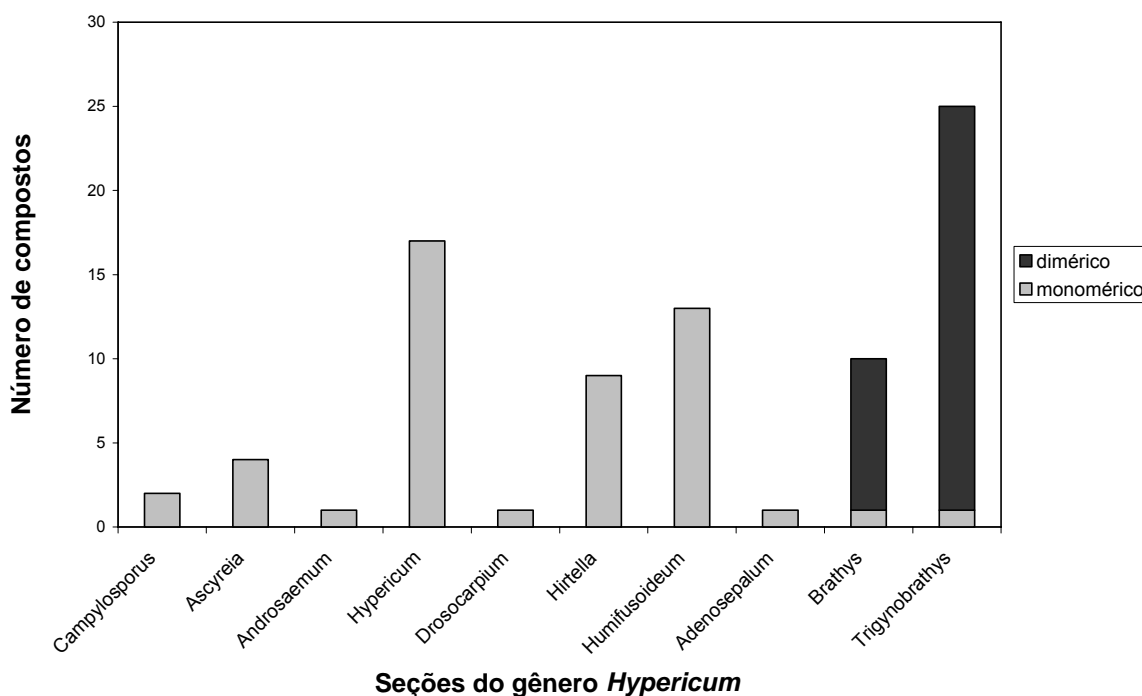


Figura 2.3: Ocorrência de derivados de floroglucinol monoméricos e diméricos por seção do gênero.

A característica química peculiar encontrada nestes dois táxons pode ser explicada a partir de tendências morfológicas e biogeográficas de *Hypericum*, propostas por ROBSON (1981), o qual sugere que o gênero tenha surgido na África tropical e então difundido para a América do Sul, onde se encontram as espécies das seções 29 (*Brathys*) e 30 (*Trigynobrathys*), América do Norte (seção 20, *Myriandra*), norte da África, região Mediterrânea e Socotra (seções 2, *Psorophytum*; 21, *Webbia*; 23, *Triadenioides*; 27, *Adenosepalum*), sul da Índia e Sri Lanka (seção 3, *Ascyreia*) e Papua Nova Guiné (seção 26, *Humifusoideum*), onde chegou, provavelmente, através da Austrália (ROBSON, 1977; ROBSON, 1981).

De maneira geral, acredita-se que a dispersão do gênero tenha ocorrido através de migração terrestre, divergindo a partir da África e chegando aos demais continentes, ainda antes da separação da “Gondwanaland”, exceção dá-se às espécies herbáceas da seção *Trigynobrathys*, cuja evolução é fortemente

sustentada pela hipótese de dispersão a longa distância, possivelmente, devido a aves migratórias aquáticas (ROBSON, 1981).

Portanto, sugere-se que as espécies nativas sul americanas estariam distantes quimicamente das demais, podendo-se inferir também que a proximidade geográfica tenha contribuído para a sua constituição química característica.

Por sua vez, na seção *Hypericum* parece haver a ocorrência de maior variabilidade de produtos em termos de padrão de oxidação. Este fato poderia estar ligado à presença de *H. perforatum* neste táxon, uma vez que esta é a espécie mais estudada do gênero e por isso, sua constituição química estaria melhor estabelecida até o momento.

Entretanto, de acordo com o diagrama, observa-se que a seção 9 (*Hypericum*) encontra-se um tanto distante da seção mais ancestral de número 1 (*Campylosporus*), o que significa que estes táxons apresentam características morfológicas e ecológicas díspares.

Assim, poderia-se sugerir que a seção *Hypericum* é mais evoluída em relação às outras seções que contêm floroglucínóis, por conter derivados mais oxidados. Segundo GOTTLIEB (1982 e 1989) a evolução morfológica das espécies é acompanhada pelo aumento progressivo da oxidação dos metabólitos secundários dentro de uma classe biossintética, podendo-se dizer que a evolução micromolecular é dependente da quantidade de oxigênio atmosférico.

Sabe-se que, no momento, estão sendo realizadas algumas alterações no diagrama (prof. Dr. N. K. B. Robson, Department of Botany The Natural History Museum London, comunicação pessoal), principalmente com o objetivo de subdividir seções como 9 (*Hypericum*) e 27 (*Adenosepalum*), as quais são muito grandes e variáveis, também modificando as seções 10 a 19 para torná-las

subseções de uma mesma seção. Porém, até o fechamento deste trabalho não se teve acesso a essas modificações a fim de avaliar se estão de acordo com as características químicas discutidas aqui.

2.6. Conclusões

A partir dos dados de ocorrência de derivados de floroglucinol encontrados na literatura, sugere-se que estes compostos sejam bons marcadores químicos para *Hypericum*.

De maneira geral, o padrão de ocorrência dessas substâncias, derivados monoméricos e diméricos, é concordante com o arranjo sistemático das seções do gênero.

A seção *Hypericum* apresenta uma grande especialização nos derivados simples e a sua diversidade química está de acordo o *status* evolutivo.

As seções com espécies americanas nativas do Sul do Brasil (*Brathys* e *Trigynobrathys*) demonstram especialização nos derivados diméricos que são restritos a esses táxons, o que pode ser resultante do seu isolamento geográfico. Assim, derivados diméricos poderiam ser considerados marcadores taxonômicos dessas seções.

**Capítulo 3 – Estudo preliminar da atividade
antiangiogênica de benzopiranos**

3.1. Introdução

Plantas têm sido fonte de substâncias de uso terapêutico por milhares de anos, e fitoprodutos representam até hoje um importante papel na medicina. Estima-se que mais de 60% dos fármacos aprovados para o tratamento de câncer são obtidos a partir de recursos naturais, sendo que uma parcela significativa destes têm sua origem nas plantas. Entre eles os mais conhecidos são vimblastina e vincristina isoladas de *Catharanthus roseus*, etoposídeo e teniposídeo obtidos de plantas do gênero *Podophyllum* e paclitaxel presente em *Taxus brevifolia*. Contudo, apenas 5 a 15% de aproximadamente 250.000 espécies de vegetais superiores foram estudadas quanto à presença de compostos ativos até o momento. Sendo assim, evidencia-se o grande potencial das plantas na descoberta de novos agentes terapêuticos, sobretudo antineoplásicos, uma vez que o maior entrave para o sucesso do tratamento dessa doença é o surgimento de resistência a agentes quimioterápicos de uso corrente (CRAGG *et al.*, 1997; ALEXANDROVA *et al.*, 2000; MANS *et al.*, 2000).

Os fármacos usados na terapia anticâncer podem ser divididos em dois grandes grupos, o primeiro, composto por agentes que atuam contra oncogenes específicos, receptores da superfície celular e sistemas de sinalização, como imatinib (Glivec®), trastuzumabe (Herceptin®), rituximab (Rituxan®, Mabthera®), entre outros, enquanto que o segundo atua contra os vasos sanguíneos tumorais ou através do bloqueio de sua formação, através de mecanismo antiangiogênico (GAYA & RUSTIN, 2005).

Sabendo-se que tumores necessitam de um suporte vascular para sua progressão, sobrevivência e disseminação, a terapia direcionada ao bloqueio do sistema vascular do tumor poderia possibilitar a indução de respostas inibitórias

em todos os tipos de tumores e, assim, aumentar a eficácia das terapias antitumorais (EICHHORN *et al.*, 2004; GAYA & RUSTIN, 2005; AUGUSTE *et al.*, 2005).

3.2. Objetivos

Realizar um estudo preliminar da atividade antiangiogênica dos três benzopiranos **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, previamente isolados de *H. polyanthemum* frente a células de endotélio microvascular dérmico humano e verificar sua capacidade de interferir na distribuição do ciclo celular.

3.3. Revisão da literatura

3.3.1. Atividade antiproliferativa no gênero *Hypericum*

A pesquisa bibliográfica foi realizada através de busca nos bancos de dados *Science direct*, *Web of Science* e *Pubmed*. As palavras-chave utilizadas foram *Hypericum* e *proliferation/apoptosis/cancer/tumor*.

3.3.1.1. Quinonas policíclicas

Recentemente, tem sido observado um crescente interesse na hipericina, como potencial agente anticâncer, uma vez que diversos estudos estabeleceram sua eficácia antineoplásica por irradiação tanto *in vitro* quanto *in vivo*. De fato, este composto é considerado um dos mais potentes fotossensibilizantes encontrados na natureza (VANDENBOGAERDE & WITTE, 1995; EBERMANN *et al.*, 1996; AGOSTINIS *et al.*, 2002; CAVARGA *et al.*, 2005).

A terapia fotodinâmica antitumoral consiste da administração sistêmica de um agente fotossensibilizante (substância capaz de gerar radicais superóxido ou

moléculas simples de oxigênio em presença de luz) e da estimulação luminosa específica do tumor, resultando na destruição de suas células, modificações na vasculatura associada e a ocorrência de uma resposta imune pós-tratamento ao tumor (AGOSTINIS *et al.*, 2002; CAVARGA *et al.*, 2005).

Além disso, a hipericina encontra-se em estudos clínicos de sua atividade de inibição do crescimento de glioma maligno, adenoma de pituitária e linfoma cutâneo (MANS *et al.*, 2000; AGOSTINIS *et al.*, 2002).

3.3.1.2. Derivados de floroglucinol

A atividade citotóxica, embora não seletiva, foi verificada para as drumondinas (ver **Quadro 2.1** – item **2.3.2.2**), derivados de floroglucinol isolados de *H. drummondii*, frente a linhagens de células mamárias, de cólon, pulmão e melanoma. Entretanto, a mesma atividade não pôde ser verificada para as albaspidinas, as quais são estruturalmente formadas por duas unidades de ácido filicínico, enquanto que as substâncias ativas possuem uma unidade de floroglucinol (JAYASURIYA *et al.*, 1989). Este fato demonstra que a porção floroglucinol é importante para a atividade.

As hiperevolutinas A e B (ver **Quadro 2.1** – item **2.3.2.2**), isoladas das cascas das raízes de *H. revolutum*, foram considerados os principais constituintes ativos do extrato éter de petróleo, o qual exhibe significativa atividade inibitória do crescimento de células de carcinoma de cólon humano (DÉCOSTERD *et al.*, 1989).

A atividade antineoplásica de *H. perforatum*, observada para diversos tipos de tumores, como de próstata, mama e leucemia, é atribuída à ação sinérgica dos componentes da planta, como a hipericina, por sua propriedade inibidora de proteína-quinase C e a hiperforina, derivado de floroglucinol capaz de estimular as

enzimas caspase 3, 8 e 9 envolvidas no processo de apoptose (AGOSTINIS *et al.*, 2002; VEROTTA, 2002; HOSTANSKA *et al.*, 2003; MARTARELLI *et al.*, 2004).

3.3.1.3. Benzopiranos

FERRAZ e colaboradores (2004) em seu estudo com as espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul avaliaram o efeito antiproliferativo dos extratos metanólicos brutos de seis espécies (*H. caprifoliatum*, *H. carinatum*, *H. connatum*, *H. myrianthum*, *H. polyanthemum* e *H. ternum*) frente a duas linhagens de células (carcinoma de cólon humano e células não pequenas de carcinoma de pulmão). As plantas mais ativas neste ensaio foram *H. caprifoliatum* e *H. myrianthum*. Posteriormente, todas as espécies foram submetidas a fracionamento com solventes de polaridade crescente e reavaliadas quanto à atividade citotóxica frente às células testadas anteriormente além de células de glioma maligno humano. As frações hexano de *H. caprifoliatum*, *H. myrianthum* e *H. polyanthemum* mostraram-se as mais ativas, nesta etapa do trabalho, podendo este fato estar relacionado à presença de compostos fenólicos lipofílicos nesta fração. Em estudo posterior, três benzopiranos, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, isolados do extrato clorofórmico das partes aéreas de *H. polyanthemum* foram avaliados quanto ao seu efeito no crescimento de células de linhagens derivadas de tumores humanos (citadas anteriormente). Todos os benzopiranos testados apresentaram citotoxicidade significativa e mostraram-se capazes de alterar a distribuição do ciclo celular (FERRAZ *et al.*, 2005 a c).

3.3.2. Angiogênese

A pesquisa bibliográfica foi realizada através de busca nos bancos de dados *Science direct*, *Web of Science* e *Pubmed*. As palavras-chave utilizadas foram *angiogenesis*, *angiotherapy*, *endothelial cells* e *cancer*.

O termo angiogênese deriva das palavras gregas “angeion”, que quer dizer vasos, e “genesis”, que significa criação, sendo inicialmente atribuído na descrição da formação de novos vasos sanguíneos de placenta. Entretanto, o conceito mais recente para angiogênese engloba a formação de novos capilares sanguíneos através de um processo de proliferação de vasos pré-existentes, distinguindo-se, portanto, do evento da vasculogênese, que ocorre pela diferenciação de precursores mesodérmicos em células endoteliais, para a formação do plexo capilar primário, no período embrionário (AUERBACH & AUERBACH, 2001; PEPPER *et al.*, 2001; RIBATTI, 2004).

O processo angiogênico inicia-se por ocasião da organogênese, gerando novos vasos sanguíneos a partir das células endoteliais de vasos pré-formados na vasculogênese. Esse processo continua durante toda a vida do indivíduo, desempenhando um importante papel na manutenção da integridade estrutural e funcional do organismo. A angiogênese ocorre em diversas condições, tanto fisiológicas (cicatrização, inflamação e ovulação), quanto patológicas (artrite reumatóide, psoríase, aterosclerose, isquemia tecidual e câncer). Em termos de ativação endotelial, uma importante diferença pode ser observada entre as duas condições mencionadas; enquanto que nas situações fisiológicas a proliferação de células endoteliais é extremamente controlada, a condição patológica caracteriza-se por um desordenado crescimento celular endotelial (AUERBACH & AUERBACH, 2001; PEPPER *et al.*, 2001; RIBATTI, 2004).

Entretanto, atualmente, o grande interesse na angioterapia advém do fato de que tumores, para se desenvolverem, dependem da existência de células endoteliais próximas a eles a fim de que possam formar sua própria microcirculação. Os novos vasos servirão para garantir a alta demanda metabólica necessária para a rápida proliferação das células tumorais. Posteriormente, estes vasos formados atuarão como portas de entrada de células do tumor na circulação

do indivíduo, caracterizando o que denominamos de metástases (FOLKMAN & SHING, 1992; PEPPER *et al.*, 2001).

A relação entre angiogênese e câncer está muito bem estabelecida, uma vez que o crescimento tumoral e as metástases são angiogênese dependentes. Durante a progressão do tumor, duas fases distintas podem ser observadas: a fase pré-vascular e a fase vascular. A fase pré-vascular é caracterizada por um aumento inicial do crescimento tumoral, seguido de um platô, no qual a taxa de proliferação de células é equivalente à morte por apoptose. Esta fase pode persistir por vários anos e normalmente não produz metástases. Já na fase vascular, caracterizada pelo crescimento exponencial, invasão tecidual e propagação sangüínea de células tumorais, o rápido aumento no tamanho do tumor se deve ao decréscimo da taxa de apoptose. A transição entre as duas fases é marcada pela neovascularização, o evento que transforma uma hiperplasia em neoplasia (FOLKMAN & SHING, 1992; PEPPER *et al.*, 2001; SHAWVER *et al.*, 2001).

As células tumorais e inflamatórias são capazes de liberar diversos indutores de angiogênese e sabe-se que ao menos quatro mecanismos de sinalização são responsáveis por desencadear o processo em tumores sólidos, estando envolvidos com a liberação de fatores de crescimento como o derivado de plaquetas (PDGF) (KECK *et al.*, 1989), de endotélio vascular (VEGF) (FERRARA & HENZEL, 1989; FERRARA, 2002; LEUNG *et al.*, 1989), de epiderme e de fibroblasto (bFGF) (RIBATTI, 2004).

A correlação entre a densidade vascular, a severidade da doença e o seu prognóstico, tem sido observada em diversos tipos de tumores como cerebral, de mama, cólon e endométrio (SHAWVER *et al.*, 2001).

A antiangiogênese, como terapia anticâncer, foi proposta há mais de vinte anos e desde então uma variedade de compostos, com esta atividade, vem sendo

relatada. Esta terapia é aplicável a diversos tipos de tumores e em função do baixo potencial mutagênico das células endoteliais, estes não desenvolvem resistência à ação de muitos desses inibidores (RIBATTI, 2004).

3.3.3. Atividade antiangiogênica de produtos em *Hypericum*

A pesquisa bibliográfica foi realizada através de busca nos bancos de dados *Science direct*, *Web of Science* e *Pubmed*. As palavras-chave utilizadas foram *antiangiogenic activity* e *plant products*.

3.3.3.1. Hipericina

Recentemente, hipericina demonstrou a capacidade de inibir várias etapas-chave do processo angiogênico, como a proliferação de células endoteliais, formação de estruturas vasculares, migração e invasão. Assim como na terapia fotodinâmica, a irradiação local da hipericina no tumor leva a uma destruição seletiva não apenas das células, mas também da vasculatura tumoral (MARTÍNEZ-POVEDA *et al.*, 2005). Este fato poderia justificar o uso popular de *H. perforatum* em doenças angiogênese-dependente como processos inflamatórios e tumores.

3.3.3.2. Hiperforina

Além de suprimir a proliferação de células tumorais *in vitro* através da indução de apoptose, hiperforina também atua como agente inibidor de angiogênese *in vitro* e *in vivo*. Hiperforina demonstrou ser capaz de bloquear a formação de microvasos e a proliferação de células endoteliais de modo dose-dependente, não induzindo efeito tóxico nem mesmo apoptótico nessas células (SCHEMPP *et al.*, 2005).

3.4. Materiais e métodos

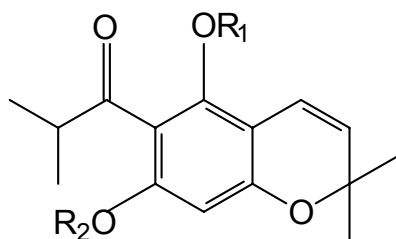
Os experimentos desta etapa do trabalho foram realizados no laboratório do “Department of Cariology, Restorative Sciences, and Endodontics” na Universidade de Michigan – Faculdade de Odontologia, sob supervisão do Prof. Dr. Jacques E. Nör.

3.4.1. Cultura de células

As células HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells - Clonetics Corp., San Diego, CA) foram mantidas em meio de crescimento para células endoteliais (Endothelial cell growth medium EGM2-MV, Clonetics, San Diego, CA) suplementado com 5% de soro fetal bovino, 0,04% hidrocortisona, 0,1% rhVEGF, 0,4% rhbFGF, 1% ácido ascórbico, 0,1% rhEGF, 0,1% fator de crescimento tipo insulina, 0.1% de sulfato de gentamicina e amphotericina-B. Foram inoculadas $2,5 \times 10^3$ células por poço nas placas de 96 poços dos experimentos de Sulfo-rodamina B (SRB). Nos experimentos de Citometria de Fluxo foram inoculadas 5×10^4 células por poço.

3.4.2. Substâncias avaliadas

Os três benzopiranos, **Hp1** ($C_{17}H_{22}O_4$, PM 290,15), **Hp2** ($C_{16}H_{20}O_4$, PM 276,13) e **Hp3** ($C_{16}H_{20}O_4$, PM 276,13), foram previamente isolados de *H. polyanthemum* (FERRAZ *et al.*, 2001). Os compostos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente diluídos em meio de cultura celular.



(Hp1) R₁=CH₃ e R₂=CH₃

(Hp2) R₁= CH₃ e R₂=H

(Hp3) R₁=H e R₂= CH₃

3.4.3. Análise fotocolorimétrica de sulfo-rodamina B (SRB)

O ensaio de SRB foi realizado usando um método modificado do originalmente descrito por SKEHAN (1990), cujo princípio baseia-se na habilidade do corante de proteínas SRB ligar-se eletrostaticamente e pH-dependente a resíduos básicos de aminoácidos de células fixadas com ácido tricloroacético (KIM *et al.*, 1996; LIN *et al.*, 1999).

As células aderidas ao substrato de placas de 96 poços foram fixadas com ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final de 10%. As placas foram incubadas a 4°C por 1h, lavadas com água corrente para remoção de TCA, meio e células mortas, e secas a 37°C por 20 min. A cada poço foram adicionados, então, 100 µl de solução SRB a 0,4%. Após um período de incubação de 30 min a temperatura ambiente, o excesso de corante foi removido a partir de lavagens com ácido acético a 1%. As placas foram novamente secas a temperatura ambiente e o corante ligado a proteína, solubilizado pela adição de Trizma-base.

As densidades ópticas foram lidas em espectrofotômetro de microplacas (GENious, TECAN, Graz, Áustria) em comprimento de onda de 565 nm e os dados processados com auxílio do programa Megalean.

3.4.4. Análise por citometria de fluxo

O ensaio por Citometria de Fluxo foi realizado para verificar a interferência dos compostos **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** na distribuição das células no ciclo celular.

Este método resulta na liberação do núcleo, corado com iodeto de propídeo (PI) para a medida do conteúdo de DNA.

As células HDMEC foram semeadas em placas de seis poços e incubadas por 18 h. Após o tratamento com os produtos-teste, as células foram recolhidas por adição de 0,5 ml de tripsina e centrifugadas por 5 min/1000 rpm/4°C; lavadas e ressuspensas em PBS gelado. Às amostras foi adicionada 300 µl de solução de lise hipotônica (1 ml de citrato de sódio a 1%, 100 µl de triton a 10%, 1 ml de RNase 1 mg/ml). As células foram coradas com 500 µl de PI a 1 mg/ml (Sigma, St Louis, MO).

As amostras foram mantidas em temperatura de 4°C por 30 min antes da análise por citofotômetro de fluxo (Epics XL, Coulter Corp., Hialeah, FL). Os dados foram obtidos de triplicatas de 3 amostras por tratamento.

3.4.5. Análise estatística

A significância estatística dos resultados foi determinada por análise de variância One-Way (ANOVA).

3.5. Resultados e discussão

3.5.1. Avaliação da citotoxicidade

Três benzopiranos isolados de *H. polyanthemum* já haviam demonstrado ação inibidora frente a células tumorais, verificada por FERRAZ e colaboradores (2005). Nesta etapa do trabalho avaliou-se a atividade frente a células de endotélio vascular, envolvidas no processo de angiogênese.

Substâncias consideradas agentes inibidores de angiogênese, podem atuar de diferentes maneiras, ao bloquear componentes do processo angiogênico como migração, proliferação de células endoteliais, e formação de novos vasos capilares. Assim, quando um fator é capaz de inibir um ou mais eventos *in vitro*, este pode ser considerado um candidato para a inibição deste processo *in vivo* (MOSES & LANGER, 1991).

De fato, diversos compostos caracterizados como agentes antiangiogênicos foram inicialmente selecionados por sua capacidade de interferir no crescimento de células endoteliais como o análogo sintético da fumagilina, TNP-470 (INGBER *et al.*, 1990), e muitos produtos naturais (MARTÍNEZ-POVEDA *et al.*, 2005).

A citotoxicidade *in vitro* tem sido considerada como a primeira ferramenta na busca de novos agentes anticâncer. Assim, o ensaio de sulfo-rodamina B (SRB)¹ foi escolhido para avaliar a citotoxicidade dos compostos isolados frente às células de endotélio humano; de forma que, a absorvância resultante da medida fotolorimétrica de SRB possui uma relação linear e diretamente proporcional à quantidade de proteína celular medida e, por conseguinte, com o número de células viáveis existentes (SKEHAN *et al.*, 1990; VOIGT, 2005).

¹SRB: método colorimétrico que quantifica células viáveis através da coloração de seu conteúdo protéico, amplamente empregado na avaliação da citotoxicidade e proliferação celular, por ser um método prático, sensível, não destrutivo e indefinidamente estável, sendo o método de rotina adotado pelo "The National Cancer Institute" (NCI) em *screenings* de larga-escala.

Primeiramente, as substâncias foram avaliadas em concentrações de 0,02-50 μM e tempo de exposição de 72 h. Células não tratadas (apenas em meio de cultura) e células incubadas na presença do veículo (DMSO) foram usadas como controle. Na **Figura 3.1** verifica-se um indicativo de diminuição do número de células nos tratamentos com **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**.

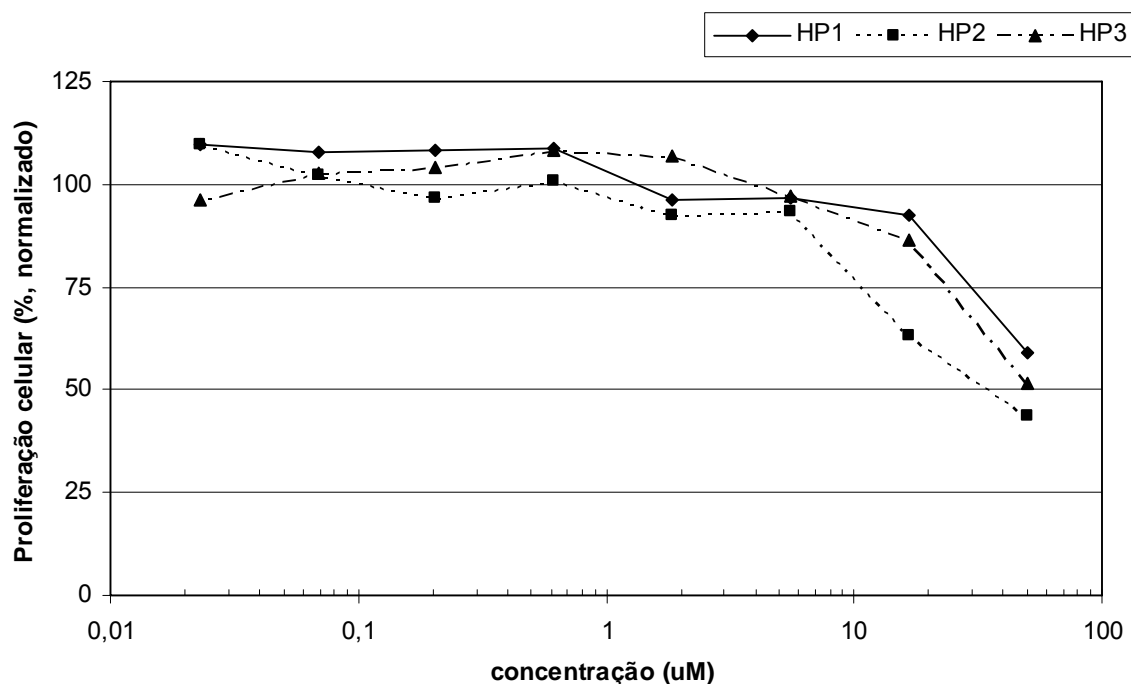


Figura 3.1: Efeito da exposição a **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** na proliferação celular de HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) relativo a porcentagem de controle, após 72 h do tratamento.

O efeito inibitório do crescimento dos compostos foi significativo, relativo ao controle, apenas nas duas maiores concentrações (50 e 16,6 μM) para **Hp3** e, principalmente, para **Hp2**. No entanto, apenas a concentração mais alta (50 μM) de **Hp1** foi considerada significativamente ativa pelo teste estatístico aplicado (**Figura 3.2**).

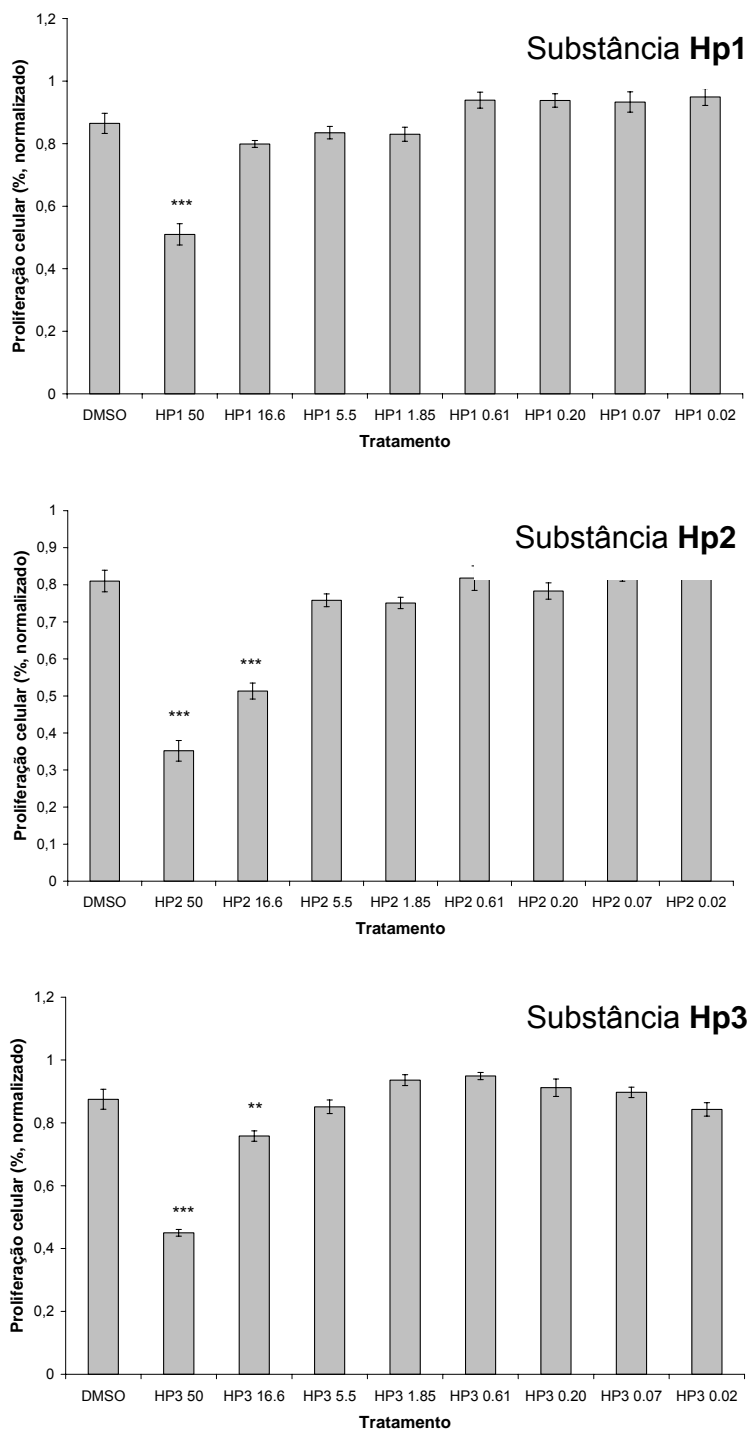


Figura 3.2: Efeito de diferentes concentrações **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** sobre o crescimento de HDMEC, após 72 h do tratamento. Resultados expressos em média +/- erro padrão (***) diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,001$; ** diferença significativa em relação a DMSO, $p = 0,01$). ANOVA: fator tratamento $F_{8,53} = 27,685$ (**Hp1**); $F_{8,53} = 53,337$ (**Hp2**); $F_{8,53} = 56,007$ (**Hp3**).

No intuito de confirmar a atividade citotóxica verificada no experimento anterior e avaliar a existência de uma relação dose-dependente das substâncias, realizou-se um segundo experimento com concentrações maiores, que variaram de 11,7 a 200 μM (**Figura 3.3**).

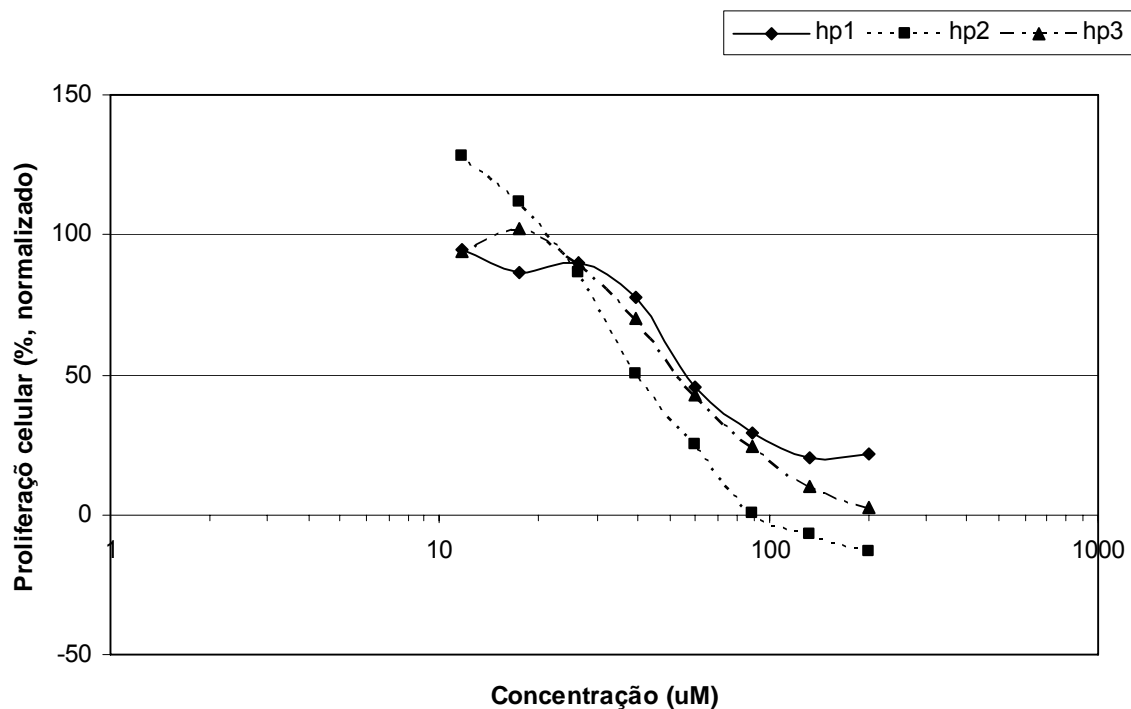


Figura 3.3: Efeito da exposição a **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** na proliferação celular de HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) relativo a porcentagem de controle, após 72 h do tratamento.

A partir desses dados pôde-se calcular os valores de IC_{50} (concentração que inibe em 50% o crescimento celular quando comparado ao grupo não tratado) de **Hp1** (62,80 μM), **Hp2** (46,53 μM) e **Hp3** (54,05 μM) (**Figura 3.4**).

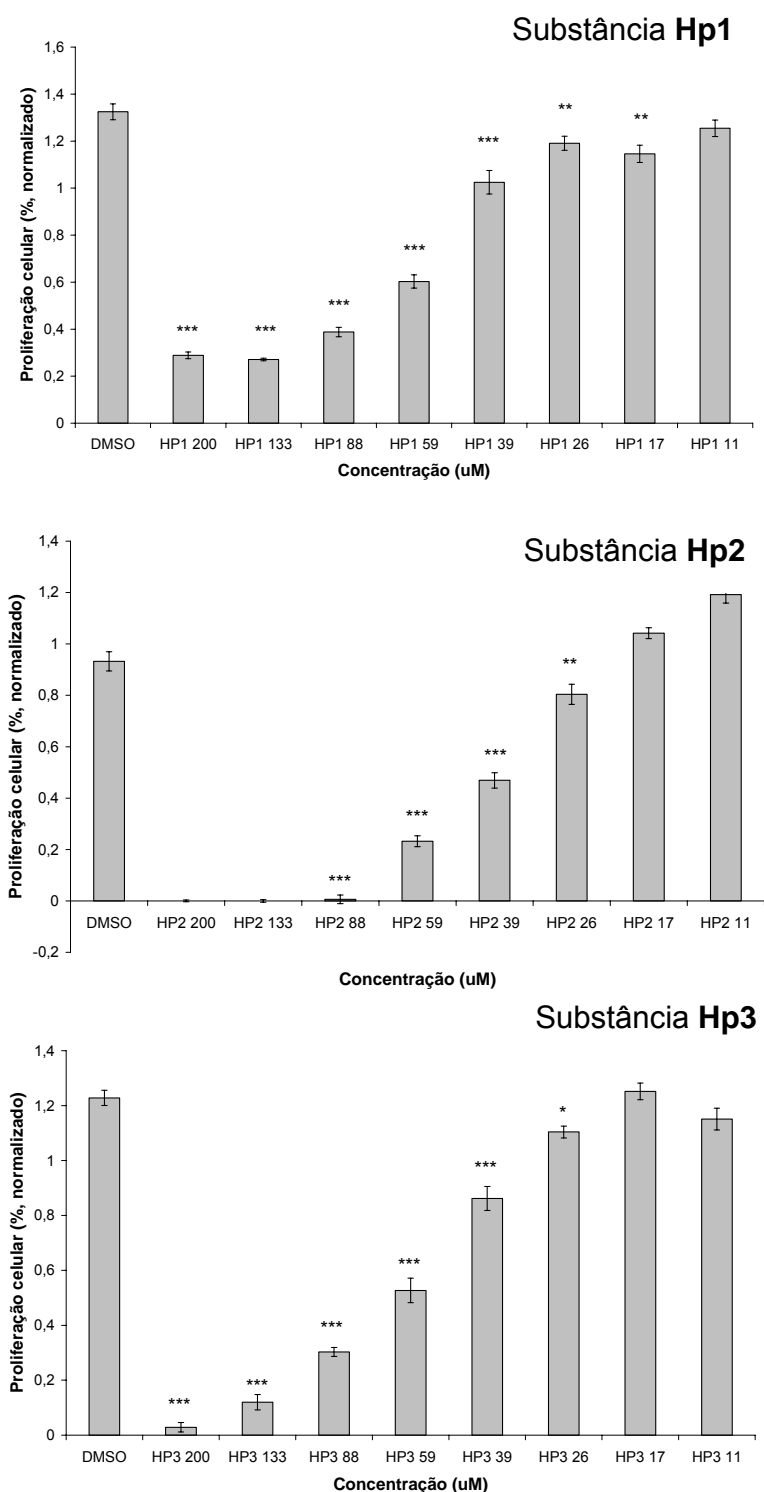


Figura 3.4: Efeito de diferentes concentrações **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** sobre o crescimento de HDMEC, após 72 h do tratamento. Resultados expressos em média +/- erro padrão (***) diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,001$; ** diferença significativa em relação a DMSO, $p = 0,01$; * diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,05$). ANOVA: fator tratamento $F_{8,53} = 202,762$ (**Hp1**); $F_{8,53} = 384,094$ (**Hp2**); $F_{8,53} = 244,602$ (**Hp3**).

Analisando o gráfico, verifica-se citotoxicidade significativa, relativo ao controle, para a maioria das concentrações avaliadas dos três compostos. Pode-se observar também que estes resultados sugerem uma relação dose-dependente para os compostos.

3.5.2. Avaliação da indução de apoptose

Baseando-se nos dados de citotoxicidade obtidos anteriormente e dos valores de IC_{50} , os isômeros **Hp2** e **Hp3**, foram escolhidos para seguir com as investigações acerca do potencial antiproliferativo.

As células que estiverem em processo de apoptose, perdem parte do seu DNA devido à fragmentação que ocorre neste evento e são detectadas como população “sub- G_1 ” no experimento de Citometria de Fluxo.

Assim, nesta etapa do estudo verifica-se que a citotoxicidade causada pelos compostos (**Hp2** e **Hp3** 150 μ M – **Figura 3.5**) está relacionada com a indução de apoptose, ou seja, morte celular programada, a qual difere morfológica e bioquimicamente da morte celular por simples necrose; sugerindo que as substâncias testadas sejam capazes de provocar de alguma maneira que o estímulo pró-apoptótico seja acionado.

Contudo a análise do gráfico revela que a substância **Hp2** apresentou maior capacidade de indução de apoptose, cerca de 30 vezes, se comparado com seu isômero **Hp3**, o qual parece induzir apoptose em cerca de 2 vezes, em relação ao controle.

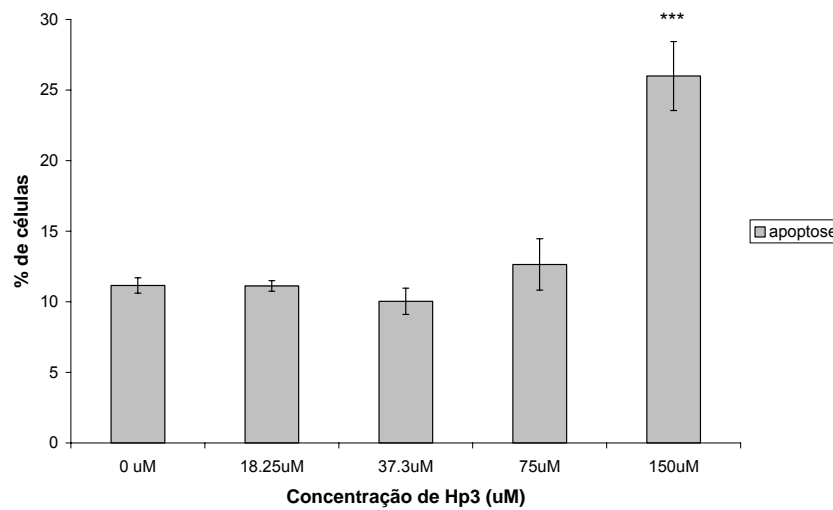
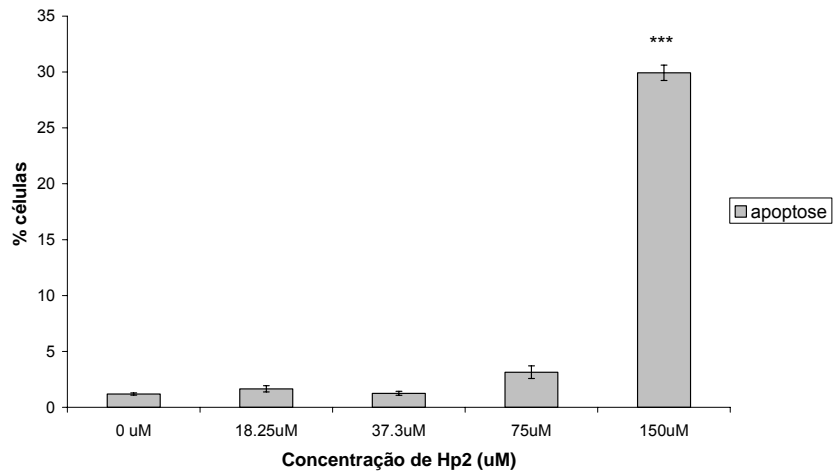


Figura 3.5: Efeito da indução de apoptose de HDMEC (human dermal microvascular endothelial cells) pela exposição dos compostos **Hp2** e **Hp3** verificado por Citometria de Fluxo 72 h após tratamento. Resultados expressos em média +/- erro padrão (***) diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,001$). ANOVA: fator tratamento $F_{4,14} = 864,986$ (**Hp2**); $F_{4,14} = 19,081$ (**Hp3**).

3.5.3. Avaliação da modificação das fases do ciclo celular

A avaliação da capacidade do composto de interferir no ciclo celular foi realizada a partir do método de citofotometria¹, no qual a quantidade de DNA de células individuais é medida, em uma população celular.

O acúmulo de células nas fases S e G2 indica que as mesmas não seguiram o fluxo do ciclo celular normal até a fase de mitose para a sua divisão, caracterizando, desta maneira, inibição do crescimento celular.

A partir dos resultados desse estudo, verificou-se que os dois compostos testados interferem no fluxo do ciclo de células de endotélio nas fases S e G2. A substância **Hp2** demonstrou bloqueio significativo ($p < 0,001$) da fase G2 nas concentrações de 75 e 150 μM e bloqueio da fase S na maior concentração (**Figura 3.6**). No entanto, o maior bloqueio da fase G2 (33%) ocorre com o tratamento de 75 μM , enquanto que, o maior acúmulo de células em fase S (39%) é observado na concentração de 150 μM de **Hp2**.

O efeito de **Hp3** nas fases do ciclo pode ser considerado menor que o verificado para **Hp2** (**Figura 3.6**), tanto no bloqueio da fase G2 (21%) na concentração de 75 μM , quanto da fase S (13%) no tratamento de 150 μM .

Ao comparar estes resultados com aqueles obtidos por FERRAZ em 2004, observa-se que os benzopiranos, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, quando testados frente a células H-460 (carcinoma de células não pequenas de pulmão) bloqueiam o ciclo celular apenas durante a fase S, não manifestando qualquer efeito sobre a fase G2.

¹Citofotometria: Análise feita através de um citofotômetro ou microfluorometria de fluxo, onde a fluorescência detectada ou a intensidade de luz transmitida pelos núcleos é proporcional ao conteúdo de DNA, sendo as frequências de células com conteúdo de DNA duplicado, não-duplicado e intermediário, correspondente aos períodos G₂, G₁ e S, respectivamente.

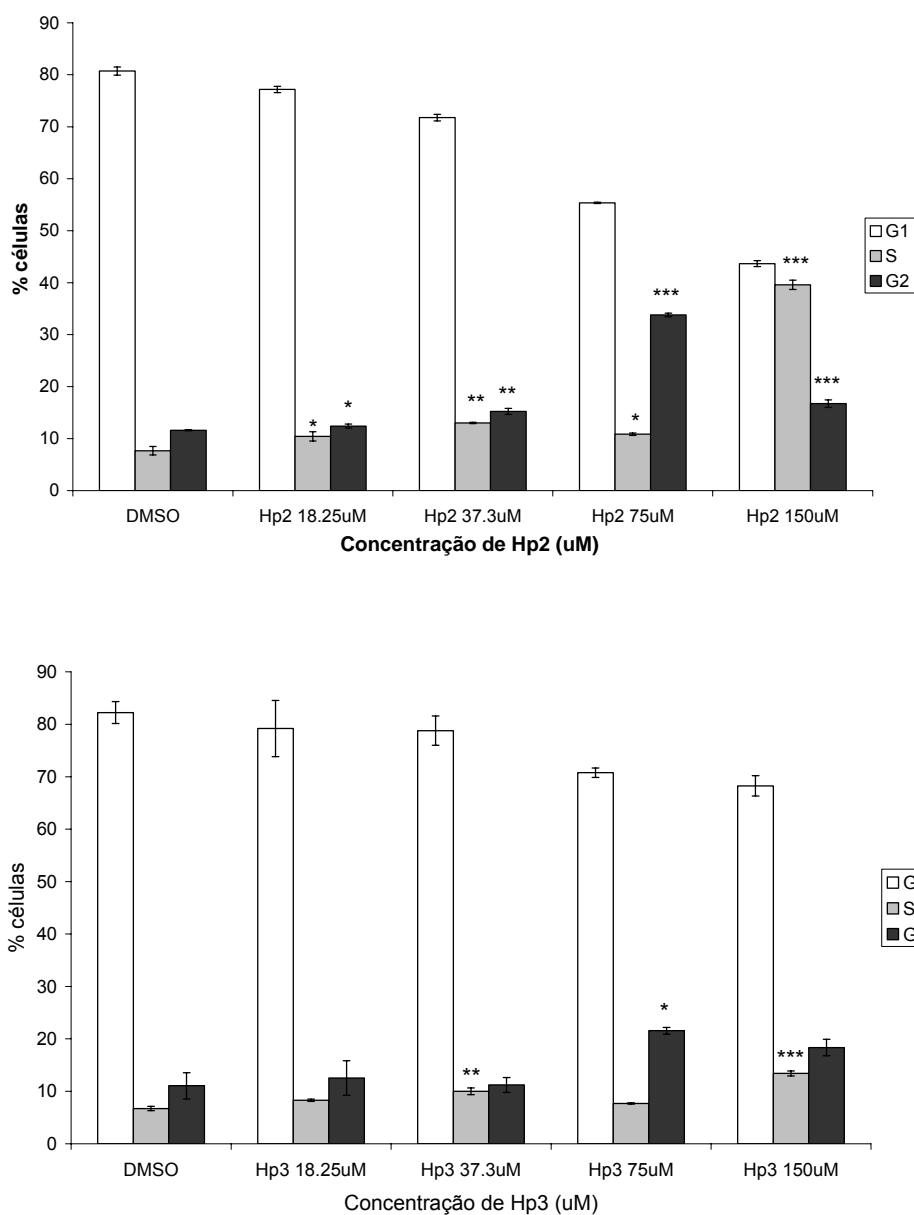


Figura 3.6: Efeito de diferentes concentrações **Hp2** e **Hp3** sobre as fases do ciclo celular de HDMEC, após 72 h do tratamento. Resultados expressos em média +/- erro padrão (***) diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,001$; ** diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,01$; * diferença significativa em relação a DMSO, $p < 0,05$). ANOVA: fator tratamento, **Hp2**: $F_{4,14} = 714,4; 372,4; 355,8$ (G1; S; G2); **Hp3**: $F_{4,14} = 9,98; 40,4; 5,16$ (G1; S; G2).

3.6. Conclusões

Os três compostos testados, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, demonstraram efeito citotóxico dose-dependente frente a células de endotélio vascular.

Os valores de IC₅₀ encontrados foram de 62,80µM para **Hp1**, 46,53µM para **Hp2** e 54,05µM para o composto **Hp3**.

A substância **Hp2** apresentou maior efeito de indução de apoptose (29%), se comparado com o efeito demonstrado por **Hp3** (25%), na concentração de 150 µM.

Modificações no fluxo do ciclo celular normal, como bloqueio de fase S e G2, foram verificadas tanto para **Hp2**, quanto para **Hp3**, mas em maior intensidade para **Hp2**. Sugerindo que os compostos atuem não apenas induzindo morte celular como também inibindo a proliferação das células por um mecanismo citostático.

Sendo assim, a partir da capacidade dos compostos em inibir o crescimento celular em um ou mais eventos diferentes, sugere-se que os compostos sejam submetidos a mais testes a fim de que se possa comprovar a atividade antiangiogênica dos mesmos.

Discussão Geral

Motivado pelas inúmeras evidências acerca da eficácia de fitoterápicos obtidos de *H. perforatum* e da crescente difusão de seu uso ao redor do mundo, este trabalho teve como intenção primordial o estudo de espécies do gênero *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul, em seqüência à investigação prévia realizada por FERRAZ (2004).

O conhecimento das propriedades farmacológicas de *H. perforatum*, sobretudo a atividade antidepressiva, estimulou a análise fitoquímica de diversas espécies do mesmo gênero, levando ao isolamento de inúmeras substâncias novas dotadas de ações as mais variadas, como antibacteriana (MAISENBACHER & KOVAR, 1991), antifúngica (DÉCOSTERD *et al.*, 1991), antialérgica (TADA *et al.*, 1991), antiproliferativa (AGOSTINIS *et al.*, 2002; MARTARELLI *et al.*, 2004), antioxidante (SILVA *et al.*, 2005) e antidepressiva (ADAM *et al.*, 2002; VEROTTA, 2002).

Observa-se na literatura que a grande maioria das substâncias responsáveis pelas atividades mencionadas provém da fração mais lipofílica dessas plantas. Este fato foi observado no *screening* da atividade antidepressiva de espécies nativas de *Hypericum*, no qual apenas a fração lipofílica de *H. caprifoliatum* demonstrou atividade (DAUDT *et al.*, 2000). Estimulado por este resultado, o objetivo inicial deste trabalho foi o isolamento e identificação da molécula ativa deste extrato. Sendo assim, a fração apolar de *H. caprifoliatum* foi submetida à cromatografia em camada delgada (CCD), na qual pôde-se verificar a presença de um produto majoritário de coloração alaranjada, de comportamento cromatográfico semelhante a derivados de floroglucinol. Uma fração enriquecida deste produto foi submetida a sucessivos processos cromatográficos. No entanto, o isolamento total do composto não foi possível. A partir de purificação parcial, o produto, denominado de **Hc1** foi submetido à análise por espectroscopia de RMN¹H e ¹³C, a qual revelou uma estrutura dimérica composta por uma unidade

de floroglucinol e uma unidade de ácido acilfilicínico unidas por uma ponte metilênica. O espectro obtido a 400 MHz revelou a presença de hidroxilas em δ_H 18,6; 16,1; 11,3; 10,1 e 6,0 ppm. A ocorrência de duas cadeias laterais isobutiril foi proposta pela presença de multipletos em δ_H 4,21 e 3,95 que acoplam com dubletos em δ_H 1,17 e 1,15 ppm, respectivamente. Os dados espectrocópicos obtidos, porém, não foram conclusivos para determinar com precisão a estrutura química de **Hc1**, a qual, a partir desta análise preliminar caracterizaria uma substância inédita.

No entanto, observou-se na fração lipofílica de *H. caprifoliatum* a presença de um segundo produto semelhante a floroglucinol, em menor concentração, o qual também poderia estar envolvido na atividade antidepressiva demonstrada pelo extrato. Esta substância foi isolada através de técnicas cromatográficas e submetida à análise espectroscópica e espectrométrica, sendo identificada como hiperbrasilol B, um derivado de floroglucinol, cuja estrutura já havia sido relatada previamente por ROCHA e colaboradores em 1996, em *H. brasiliense*. Além disso, hiperbrasilol B foi detectado tanto nas flores de *H. caprifoliatum* quanto de *H. connatum* através da análise cromatográfica de alta eficiência, por comparação com o tempo de retenção do padrão.

Analisando as estruturas de **Hc1** e **Hc2**, observa-se que as duas substâncias são muito similares. A diferença está apenas na porção floroglucinol, onde a prenila encontra-se aberta em **Hc1** e ciclizada, formando o anel benzopirano, em **Hc2**. Esta evidência poderia sugerir que **Hc1** seja precursor de **Hc2**.

Continuando o estudo das frações lipofílicas de espécies nativas isolou-se a substância uliginosina B das partes aéreas de *H. polyanthemum*. Este produto de cor amarela, aspecto oleoso e características cromatográficas típicas de floroglucinol, foi identificado por espectroscopia como sendo um dímero formado por um núcleo acilfilicínico e um núcleo floroglucinol. A primeira porção da

molécula foi inferida pela presença de um sistema tricetona β -enolizável através de um sinal em campo baixo (δ_H 18,75 ppm) e de metilas em δ_H 1,50 ppm. A presença do núcleo 2',2'-dimetilcromeno foi verificada por comparação com a literatura de sinais específicos como 7'-OH e 5'-OH de moléculas estruturalmente semelhantes como drumondina C (JAYASURIYA *et al.*, 1989) e hiperbrasilol B (ROCHA *et al.*, 1996). Através da análise comparativa das flores, detectou-se a presença dessa substância em *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum*.

Reunindo os dados de isolamento de derivados de floroglucinol discutidos no **Capítulo 1** e os relatos da ocorrência de compostos semelhantes, encontrados na literatura, elaborou-se um estudo acerca da presença de representantes dessa classe de substâncias no gênero *Hypericum*. Este estudo aborda o conjunto de características estruturais de compostos contendo o núcleo floroglucinol, as atividades biológicas a eles atribuídas, bem como propõe a sua rota de biossíntese. Baseando-se na literatura, sugere-se que o núcleo floroglucinol seja gerado através de um mecanismo policetídeo, no qual o principal elemento de construção é a malonil coenzima A. O anel aromático, formado por ação catalítica, é posteriormente substituído por prenilas o que contribui significativamente para a variabilidade estrutural das substâncias encontradas (BOUBAKIR *et al.*, 2005; KLINGAUF *et al.*, 2005).

A partir do levantamento bibliográfico realizado, verificou-se que os derivados de floroglucinol presentes em *Hypericum* pertencem a dois grupos biogénéticos principais, o dos monoméricos e dos diméricos. Sendo que estes últimos poderiam ser considerados marcadores taxonômicos das espécies nativas sul americanas, uma vez que, até o momento, foram identificados exclusivamente nestas espécies, as quais pertencem a apenas duas seções do gênero (*Brathys* e *Trigynobrathys*).

A espécie nativa *H. rigidum* também foi analisada quimicamente neste estudo, porém, não foi observado nenhum composto de estrutura dimérica no

extrato lipofílico. Este fato poderia ser explicado com base nos dados morfológicos desta espécie que incluem as formas mais primitivas na seção 30 (vide Diagrama das Seções - **Figura 2.1**), sendo que suas características aproximam-se muito da espécie africana *H. revolutum* (Seção1) (ROBSON, 1990), da qual, foram isolados dois derivados de floroglucinol monoméricos, semelhantes à hiperforina (DECOSTERD *et al.*, 1989), e da qual não se tem relatos de derivados diméricos. Provavelmente, devido a seu caráter primitivo e muito variável, a espécie *H. rigidum* possua características também químicas um tanto díspares das outras espécies nativas encontradas na mesma seção 30, que apresentam em sua composição derivados diméricos (TAYLOR *et al.*, 1969; ISHIGURO *et al.*, 1986; FERRAZ *et al.*, 2002).

Além de derivados de floroglucinol, outros compostos também podem ser encontrados nas frações lipofílicas de espécies nativas de *Hypericum*. Este é o caso dos benzopiranos, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** detectados nas flores de *H. polyanthemum*, os quais foram previamente isolados das partes aéreas desta espécie por FERRAZ e colaboradores em 2001.

Estes benzopiranos foram testados quanto à atividade antiangiogênica. Sabe-se que tumores necessitam de um suporte vascular para sua progressão, sobrevivência e disseminação e que a proliferação de células endoteliais está envolvida no processo de formação de novos vasos sanguíneos (SHAWVER *et al.*, 2001; RIBATTI, 2004). Sendo assim, as substâncias **Hp1**, **Hp2** e **Hp3** foram submetidas a ensaios de sulfo-rodamina B e citometria de fluxo para a avaliação de sua capacidade de impedir o crescimento e a multiplicação dessas células.

Através do ensaio de SRB observou-se que os três compostos exercem um efeito citotóxico dose-dependente sobre as células de endotélio humano e que esta ação pode estar relacionada com a indução de apoptose. Além disso, a partir dos resultados obtidos no ensaio por citometria de fluxo evidencia-se que tanto

Hp2 quanto **Hp3** são capazes de provocar alterações no ciclo celular normal, impedindo, desta maneira, a proliferação desenfreada dessas células.

Contudo, para que os compostos possam ser considerados bons candidatos a fármacos, passíveis de utilização terapêutica, testes adicionais precisariam ser realizados. Dentre as perspectivas de continuidade do estudo, figuram testes de indução das enzimas caspase, envolvidas no processo apoptótico, bem como a repetição dos ensaios realizados, a fim de verificar se os resultados citados anteriormente se mantêm.

Finalizando a investigação química de espécies nativas de *Hypericum* deste trabalho, isolou-se, do extrato polar obtido de *H. caprifoliatum*, dois flavonóides, quercetina e hiperosídeo, os quais tiveram suas estruturas determinadas através da utilização de um conjunto de técnicas (cromatográfica, espectrofotométrica e espectroscópica). Derivados da quercetina são comumente encontrados em *Hypericum*, podendo estar envolvidos nas atividades biológicas apresentadas por espécies deste gênero, como a ação antidepressiva de *H. perforatum* (BUTTERWECK *et al.*, 2000).

Conclusões Gerais

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir:

O estudo da constituição química das partes aéreas de *H. caprifoliatum* revelou a presença de dois derivados de floroglucinol, hipebrasilol B e outro dímero não completamente identificado até o momento, mas aparentemente de estrutura inédita e de dois flavonóides, quercetina e hiperosídeo.

Em *H. polyanthemum* foi encontrado o derivado dimérico de floroglucinol uliginosina B.

A análise através de cromatografia líquida de alta eficiência aponta para a presença de uliginosina B nas flores de *H. polyanthemum*, *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum*. Enquanto que hiperbrasilol B foi verificado nas flores de *H. caprifoliatum* e *H. connatum*. Japonicina A foi detectada em *H. myrianthum* e *H. connatum*.

Observa-se ainda nos cromatogramas de *H. myrianthum* e *H. caprifoliatum* abundância de picos não identificados que poderiam corresponder a compostos não identificados.

Os três benzopiranos, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, estão presentes apenas nas flores de *H. polyanthemum*.

A partir dos isolamentos realizados em espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul e revisão da bibliografia, sugere-se que derivados de floroglucinol diméricos possam ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos das seções *Brathys* e *Trigynobrathys*, nas quais estão classificadas todas as espécies sul americanas do gênero.

Os três benzopiranos, **Hp1**, **Hp2** e **Hp3**, avaliados em estudo preliminar de atividade antiangiogênica demonstraram efeito citotóxico dose-dependente frente a células de endotélio vascular, e valores de IC₅₀ de 62,80 µM, 46,53 µM e 54,05 µM respectivamente.

Os isômeros **Hp2** e **Hp3** atuam inibindo a proliferação celular tanto através de indução de mecanismo apoptótico quanto por alteração do fluxo do ciclo celular normal.

Referências

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

AGOSTINIS, P.; VANTIEGHEMA, A.; MERLEVEDE, W.; DE WITTE, P. A.M. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 221-24, 2002.

AGRAWAL, P. K.; BANSAL, M. C. *Flavonoid Glycosides*. In: AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. The Netherlands: Elsevier Science, 1989. Cap. 6. p. 283-264.

ALEXANDROVA, R.; ALEXANDROV, I.; VELCHEVA, M.; VARANDINOVA, T. Phytoproducts and cancer. **Experimental Pathology and Parasitology**, v. 4, p. 15-23, 2000.

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.

ARISAWA, M.; FUJITA, A.; SUZUKI, R.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Studies on cytotoxic constituents in pericarps of *Mallotus japonicus*, part I. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 3, p. 455-459, 1985.

ARISAWA, M.; FUJITA, A.; MORITA, N. Inhibition of tumor-promoter-enhanced ¹H-choline incorporation into cellular phospholipids by phloroglucinol derivatives from *Mallotus japonicus*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 5, p. 1409-1412, 1991.

AUERBACH, R.; AUERBACH, W. Vasculogenesis and Angiogenesis. In: FAN, T.D.; KOHN, E.C. **The New Angiotherapy**. Totowa: Human Press, 2001. Cap. 1. p. 1-6.

AUGUSTE, P.; LEMIERE, S.; LARRIEU-LAHARGUE, F.; BIKFALVI, A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 54, p. 53–61, 2005.

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

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, p. 967-998, 1989.

BERGHÖFER, R.; HÖLZL, J. Biflavonoids in *Hypericum perforatum*: Part 1. Isolation of 13,118-biapigenin. **Planta Medica**, v. 53, p. 216-217, 1987.

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

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine – Expanded Comission E Monographs**. Newton: American Botanical Council, 2000.

BOUBAKIR, Z.; BEUERLE, T.; BENYE, L.; BEERHUES, L. The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 66, p. 51-57, 2005.

BUTTERWECK, V.; JÜRGENLIEMK, G.; NAHRSTEDT, A.; WINTERHOFF, H. Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Medica**, v. 66, p. 3-6, 2000.

CAVARGA, I.; BREZANI, P.; FEDOROCKO, P.; MISKOVSKY, P.; BOBROV, N.; LONGAUER, F.; RYBAROVA, S.; MIROSSAY, L.; STUBNA, J. Photoinduced antitumour effect of hypericin can be enhanced by fractionated dosing. **Phytomedicine**, v. 12, p. 680–683, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; WEISS, R. B. Coral reefs, forests, and thermal vents: The worldwide exploration of nature for novel antitumor agents. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 2, p. 156-163, 1997.

CROCKETT, S.; SCHANEBERG, B.; KHAN, I. A. Phytochemical profiling of new and old world *Hypericum* (St. John's Wort) species. **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 479-485, 2005.

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

DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; VON POSER, G.; SCHAPOVAL, E.E.S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v. 10, p. 6-7, 2003.

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

DAUDT, R.; VON POSER, G.L.; NEVES, G.; RATES, S.M.K. Screening for the anti-depressant activity of some species of *Hypericum* from South Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 14, n. 5, p. 344-346, 2000.

DÉCOSTERD, L.A.; STOECKLI-EVANS, H.; MSONTHI, J. D.; HOSTETTMANN, K. A new antifungal chromene and a related dichromene from *Hypericum revolutum*. **Planta Medica**, v. 55, p. 429, 1986.

DÉCOSTERD, L.A.; STOECKLI-EVANS, H.; CHAPUIS, J-C.; MSONTHI, J. D.; SORDAT, B.; HOSTETTMANN, K. New hyperforin derivatives from *Hypericum revolutum* Vahl with growth-inhibitory activity against human colon carcinoma cell line. **Helvetica chimica acta**, v. 72, p. 464-471, 1989.

DÉCOSTERD, L.A.; HOFFMANN, E.; KYBURZ, R.; BRAY, D.; HOSTETTMANN, K. A new phloroglucinol derivative from *Hypericum calycinum* with antifungal and *in vitro* antimalarial activity. **Planta Medica**, v. 57, n. 6, p. 548-551, 1991.

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.

EBERMANN, R.; ALTH, G.; KREITNER, M.; KUBIN, A. Natural products derived from plants as potential photodynamic destruction of tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, p. 95-97, 1996.

EICHHORN, M. E.; STRIETH, S.; DELLIAN, M. Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives. **Drug Resistance Updates**, v. 7, 125–138, 2004.

ERDTMAN, H. Some aspects of chemotaxonomy. In: SWAIN, T. **Chemical Plant Taxonomy**, London: Academic Press, 1963. Cap. 4. p. 89-126.

ESCOP MONOGRAPHS: The scientific foundation for herbal medicinal products. Exeter: ESCOP, 2003.

FERRARA, N.; HENZEL, W.J. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 161, n. 2, p. 851-858, 1989.

FERRARA, N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nature Reviews/Cancer**, v. 2, n. 10, p.795-803, 2002.

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

FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MANS, D. R. A.; SCHMITT, A.; RAVAZZOLO, A. P.; VON POSER, G. L. Screening for the presence of hypericins in southern brazilian species of *Hypericum*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 4 p. 294-297, 2002a.

FERRAZ, A. B. F.; SCHRIPEMA, J.; POHLMANN, A. R.; VON POSER, G. L. Uliginosin B from *Hypericum myrianthum* Cham. & Schltdl. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 989-991, 2002b.

FERRAZ, A. B. F. Análise química e antiproliferativa de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 2004. 178p.

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

FERRAZ, A. B. F. , LIMBERGER, R. P., BORDIGNON, S. A. L., VON POSER, G. L., HENRIQUES, A. T. Essential oil composition of six *Hypericum* species from southern Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 335 – 339, 2005b.

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

FOLKMAN, J.; SHING, Y. Angiogenesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 16, p. 10931-10934, 1992.

FUKUYAMA Y.; MINAMI, H.; KUWAYAMA. Garsubellins, polyisoprenylated phloroglucinol derivatives from *Garcinia subelliptica*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 483-485, 1993.

FUKUYAMA Y.; KANESHI, A.; TANI, N.; KODAMA, M. Subellione polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Garcinia subelliptica*. **Phytochemistry**, v. 33, p. 853-857, 1998.

GAMIOTEA-TURRO, DAYLIN; CUESTA-RUBIO, O.; PRIETO-GONZÁLES, S.; DE SIMONE, F. Antioxidative constituents from the leaves of *Hypericum styphelioides*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 869-871, 2004.

GAYA, A. M.; RUSTIN, G. J. S. Vascular Disrupting Agents: A New Class of Drug in Cancer Therapy. **Clinical Oncology**, v. 17, p. 277–290, 2005.

GEISSMAN, T. A. The Biosynthesis of Phenolic Plant Products. In: BERNFELD, P. **Biogenesis of Natural Compounds**, 2 ed., Oxford: Pergamon, 1967. Cap. 12. p. 743-799.

GIBBS, R. D. History of chemical taxonomy. In: In: SWAIN, T. **Chemical Plant Taxonomy**, London: Academic Press, 1963. Cap. 3. p. 41-88.

GIBBONS, S; MOSER, E.; HAUSMANN, S.; STAVRI, M.; SMITH, E.; CLENNETT, C. An anti-staphylococcal acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1472-1475, 2005.

GHISALBERTI, E. Bioactive acylphloroglucinol derivatives from *Eucalyptus* species. **Phytochemistry**, v. 41, p. 7-22, 1996.

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

GOODMAN & GILMAN'S. **The pharmacological basis of therapeutics**. New York : McGraw-Hill, Health Professions Division, 2001.

GOTTLIEB, O. R. **Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology. An Essay into a Novel Botanical Discipline**, Berlin: Springer-Verlag, 1982.

GOTTLIEB, O. R. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2545-2558, 1989.

GUNATILAKA, A. A. L.; DE SILVA, A. M. Y. J.; SOTHEESWARAN S. Minor xanthenes of *Hypericum mysorensense*. **Phytochemistry**, v. 21, p.1751-1753, 1982.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMAN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3866-3874, 1991.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Flavone and flavonol glycosides. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. (Eds). **The flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982. Cap. 5. p. 261-311.

HEGNAUER, R. Phytochemistry and plant taxonomy – An essay on the chemotaxonomy of higher plants. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p.1519-1535, 1986.

HOSTANSKA, K.; REICHLING, J.; BOMMER, S.; WEBER, M.; SALLER, R. Hyperforin a constituent of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) extract induces apoptosis by triggering activation of caspases and with hypericin synergistically exerts cytotoxicity towards human malignant cell lines. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 56, p. 121-132, 2003.

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

IKAN, R. **Natural Products: a laboratory guide**. San Diego: Academic Press, 1991.

INGBER, D.; FUJITA, T.; KISHIMOTO, S.; SUDO, K.; KANAMARU, T.; BREM, H.; FOLKMAN, J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. **Nature**, v. 348, p. 555– 557, 1990.

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. Soroaspidin A, B, and C: additional antibiotic compounds from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica**, v. 53 p. 415-417, 1987.

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

ISHIGURO, K.; YAMAMOTO, R.; OKU, H. Parulosides A and B, novel xanthone glycosides from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 6, p. 906-908, 1999.

ISHIGURO, K.; NAGATA, S.; OKU, H.; YAMAKI, M. Bisxanthenes from *Hypericum japonicum*: inhibitors of PAF-induced hypotension. **Planta Medica**, v. 68, p. 258-261, 2002.

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.; CLARK, A. M.; MCCHESENEY, J. D. New antimicrobial filicinic acid derivatives from *Hypericum drummondii*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 5, p. 1314-1320, 1991.

JENSEN, A. G.; HANSEN, S. H.; NIELSEN, E. Adhyperforin as a contributor to the effect of *Hypericum perforatum* L. in biochemical models of antidepressant activity. **Life Sciences**, v. 68, p. 1593-1605, 2001.

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

KAPLAN, M. A. C.; GOTTLIEB, O.R. Alcalóides/neolignanas: toxidez e presença substitutiva como critérios racionais na busca de princípios biodinâmicos em plantas. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 68, p. 8-13, 1987.

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

KECK, P. M.; HAUSER, S. D.; KRIVI, G.; SANZO, K.; WARREN, T.; FEDER, J.; CONNOLLY, D. T. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1309-1312, 1989.

KIM, H. M.; HAN, S. B.; KIM, M. S.; KANG, J. S.; OH, G. T.; HONG, D. H. Efficient fixation procedure of human leukemia cells in sulphorhodamine B cytotoxicity assay. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 36, p. 163-169, 1996.

KITANOV, M. G. Hypericin and pseudohypericin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 171-178, 2001.

KITANOV, M. G.; NEDIALKOV, P. T. Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 647-653, 1998.

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

KLINGAUF, P.; BEUERLE, T.; MELLENTHIN, A.; EL-MOGHAZY, S. A. M.; BOUBAKIR, Z.; BEERHUES, L. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. **Phytochemistry**, v. 66, p. 139-145, 2005.

LEUNG, D.W.; CACHIANES, G.; KUANG, W-J; GOEDEL, D. V.; FERRARA, N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. **Science**, v. 246, n. 4935, p. 1306-1309, 1989.

LIN, Z. X.; HOULT, J. R. S.; RAMAN, A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 141-150, 1999.

LUO, L.; SUN, Q.; MAO, Y. Y.; LU, Y. H.; TAN, R. X. Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 221-225, 2004.

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

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

MANS, D. R. A., ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. Anti-Cancer discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **The Oncologist**, v. 5, p. 185-198, 2000.

MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification (Biological techniques series)**. London: Academic Press, 1982.

MARKHAM, K. R.; MOHAN CHARI, V. Carbon-13 NMR Spectroscopy of Flavonoids. In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982. Cap. 2. p. 19-134.

MARKHAM, K. R. Flavones, flavonols and their glycosides. In: DEY, P. M. & HARBORNE, J. B. **Methods in plant biochemistry (v.1) Plant Phenolics**. London: Academic Press Limited, 1989. Cap. 6. p. 197-235.

MARTARELLI, D.; MARTARELLI, B.; PEDICONI, D.; NABISSI, M. I.; PERFUMI, M.; POMPEI, P. *Hypericum perforatum* extract inhibits growth of human prostatic carcinoma cell line orthotopically implanted in nude mice. **Cancer Letters**, v. 210, p. 27-33, 2004.

MARTÍNEZ-POVEDA, B.; QUESADA, A. R.; MEDINA, M. A. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro, **European Journal of Pharmacology**, v. 516, p. 97-103, 2005.

MATSUHISA, 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.

MOSES, M.A.; LANGER, R. Inhibitors of angiogenesis. **Biotechnology**, v. 9, p. 630-634, 1991.

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.

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

NEDIALKOV, P. T.; KITANOV, G. M. Two benzophenones O-arabnosides and a chromone from *Hypericum annulatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 867-871, 2002.

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.

PARKER, W.L.; JOHNSON, F. The structure determination of antibiotic compounds from *Hypericum uliginosum*. **Journal of American Chemical Society**, v. 90, p. 4716-4723, 1968.

PEPPER, M. S.; MANDRIOTA, S. J.; MONTESANO, R. Angiogenesis-Regulating Cytokines. IN: FAN, T.D.; KOHN, E.C. **The New Angiotherapy**. Totowa: Human, 2001. Cap. 2, p. 8-40,.

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

RANG, H. P. **Farmacologia**. Rio de Janeiro. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 703.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p. 603-613, 2001.

RATH G.; POTTERAT, O.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Xanthones from *Hypericum roeperanum*. **Phytochemistry**, v. 43, n. 2, p. 513-520, 1996.

RECIO, M. C.; GINER, R. M.; MANEZ, S.; RIOS, J. L.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Screening of tropical medicinal plants for antiinflammatory activity. **Phytotherapy Research**, v. 9, n. 8, p. 571-574, 1995.

RIBATTI, D. The crucial role of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in angiogenesis: a historical review. **Journal of Haematology**, v. 128, p. 303-309, 2004.

RIVERA, D.; OBON, C. The ethnopharmacology of Madeira and Porto Santo Islands, a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, p. 7393, 1995.

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

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

ROUT, G. R.; SAMANTARAY, S.; DAS, P. In vitro manipulation and propagation of medicinal plants. **Biotechnology Advances**, v. 13, p. 91-120, 2000.

SANTOS, M.; NAGEM, T. J.; DE OLIVEIRA, T. T.; BRAZ-FILHO, R. 7-epiclusianona, nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardeneriana*. **Química Nova**, v. 22, p. 654-660, 1999.

SAVIKIN-FODULOVIC, K.; 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.

SHAWVER, L.; LIPSON, K. E.; FONG, T. A. T.; MCMAHON, G.; STRAWN, L. M. Receptor Tyrosine Kinases in Angiogenesis. IN: FAN, T.D.; KOHN, E.C. **The New Angiotherapy**. Totowa: Human Press, 2001. Cap. 22. p. 409-452.

SCHEMP, C.M.; KISS, J.; KIRKIN, V.; AVERBECK, M.; SIMON-HAARHAUS, B.; KREMER, B.; TERMEER, C.C.; SLEEMAN, J.; SIMON, J.C. Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Medica*, v. 11, p. 999-1004, 2005.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v.13, p. 1107-1112, 1990.

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. 157-166, 2005.

SOLOMONS, T.W. GRAHAM. **Química orgânica**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

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. L.; MANANDHAR, N. P.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral activities of Nepalese medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, p. 157-163, 1996.

UPTON, R. American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium St. John's Wort Monograph, **American Herbal Pharmacopoeia**, Santa Cruz, p. 3-13, 1997.

VANDEBOGAERDE, A.; DE WITTE, P. Antineoplastic properties of photosensitized hypericin. **Anticancer Research**, v. 15, p. 1757-1758, 1995.

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

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

VEROTTA, L. Are acylphloroglucinols lead structures for the treatment of degenerative diseases? **Phytochemistry Reviews**, v. 1, p. 389-407, 2002.

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.

VOIGT, W. Sulphorhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 39-48, 2005.

VOIRIN, B. UV spectral differentiation of 5-hidroxy- and 5-hidroxy-3-methoxyflavones with mono-(4'), di-(3',4') e tri-(3',4',5')- substituted B rings. **Phytochemistry**, v. 22, n. 10, p. 2107-2145, 1983.

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.; Yang, J.-S.; Xiao, P.-G. Chromone glycosides and flavonoids from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1417-1420, 1998.

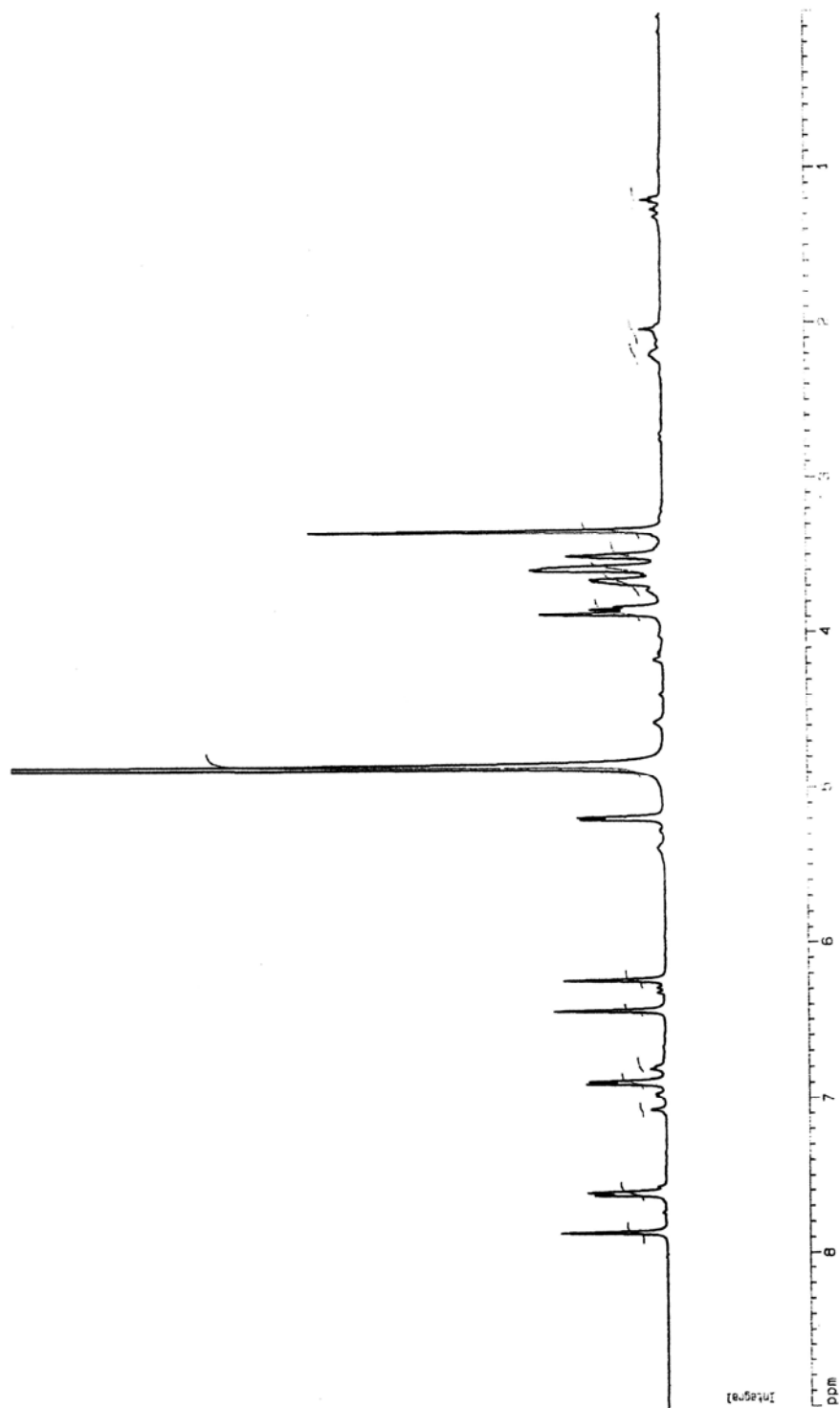
WU, J.; CHENG, X-F.; HARRISON, L. J.; GOH, S-H.; SIM, K-Y. A phloroglucinol derivative with a new carbon skeleton from *Hypericum perforatum* (Guttiferae). **Tetrahedron Letters**, v. 45, p. 9657-9659, 2004.

YAMAKI, M.; MIWA, M.; ISHIGURO, K.; TAKAGI, S. Antimicrobial activity of naturally occurring and synthetic phloroglucinols against *Staphylococcus aureus*. **Phytoterapy Research**, v. 8, p. 112-114, 1994.

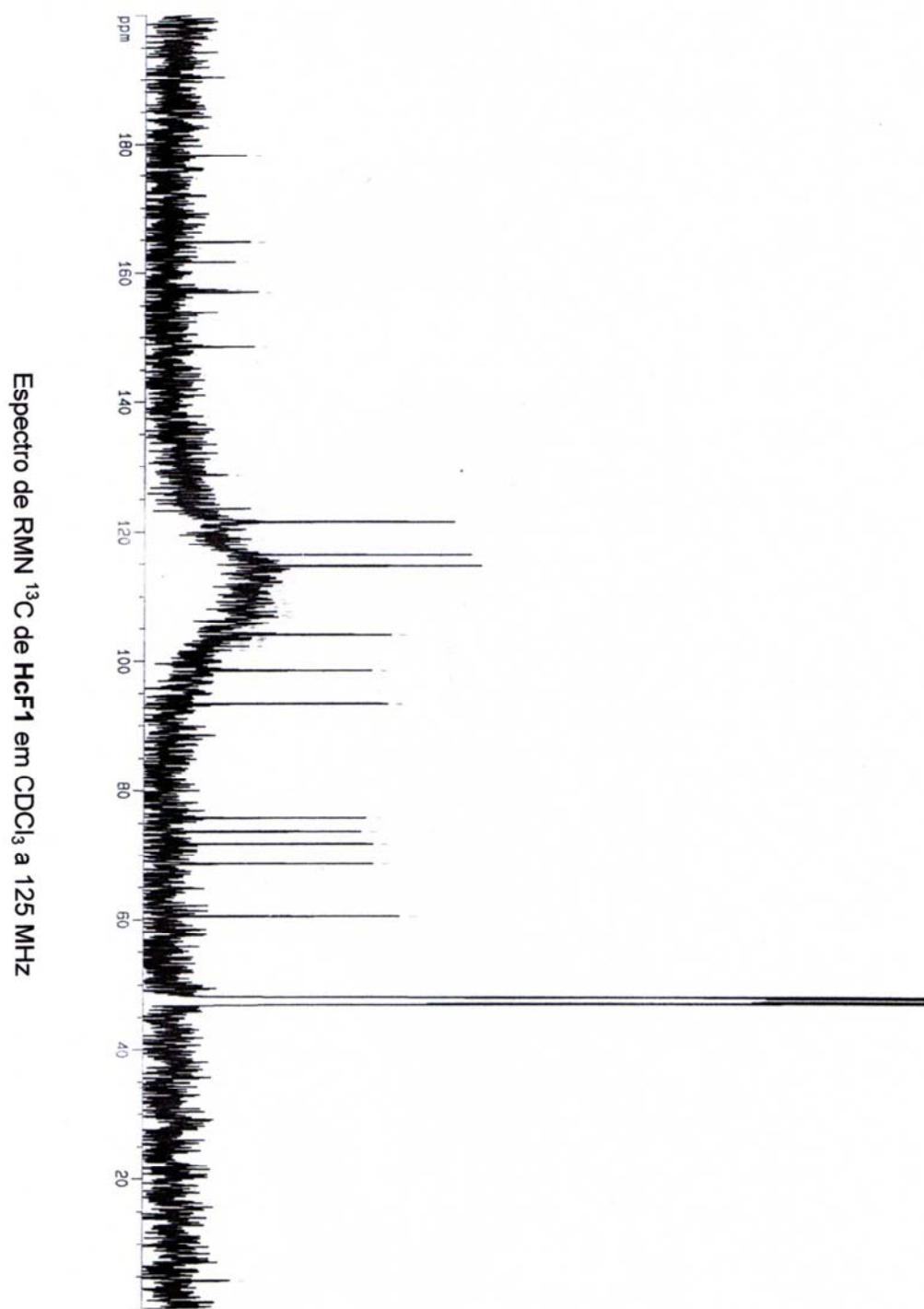
ZUURBIER, K. W. M.; FUNG, S.-Y.; SCHEFFER, J .J. C.; VERPOORTE, R. In-vitro prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 1, p. 77-82, 1995.

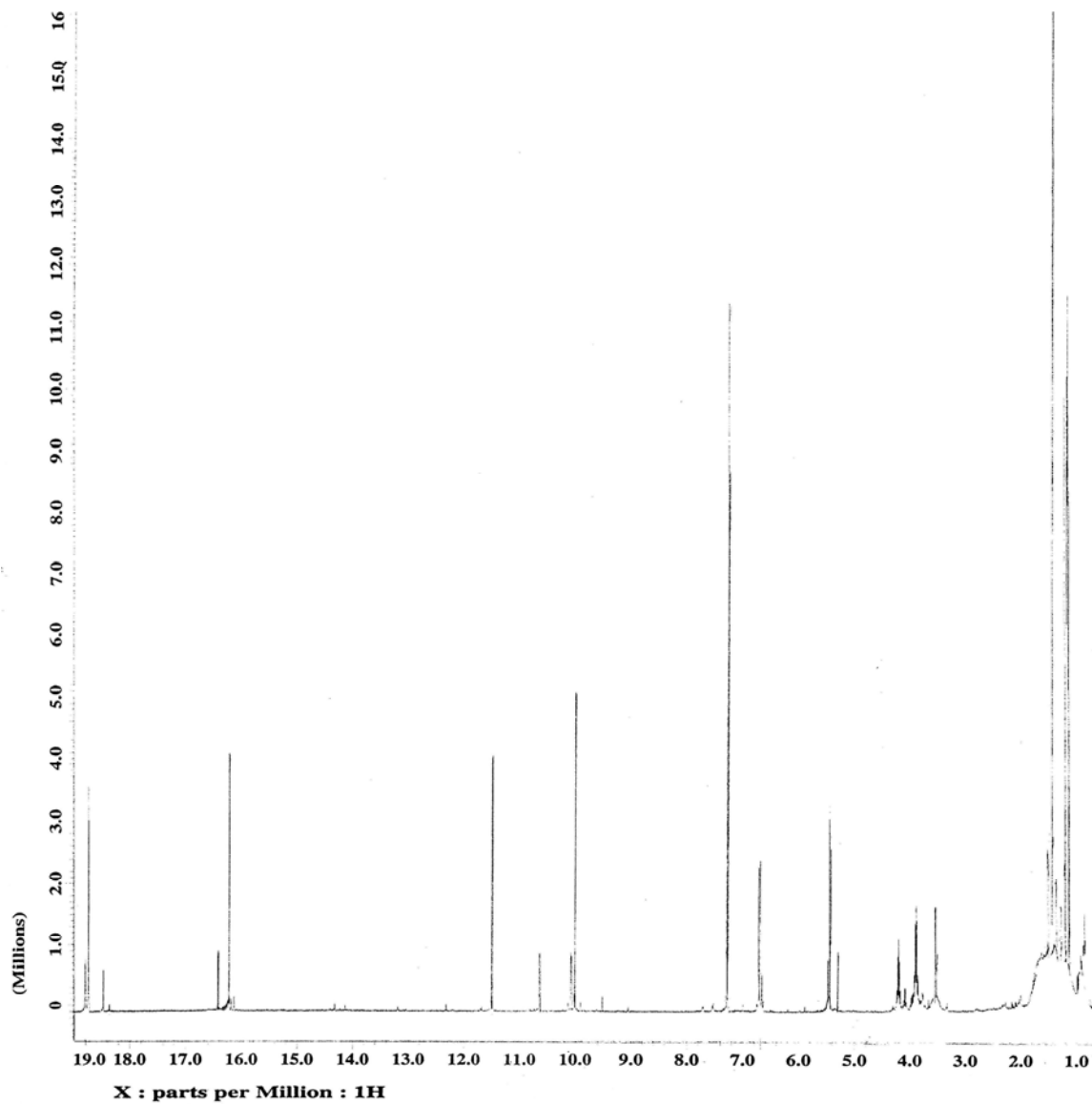
ZUURBIER, K. W. M.; FUNG, S.-Y.; SCHEFFER, J .J. C.; VERPOORTE, R. Formation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 8, p. 2315-2322, 1998.

Anexos



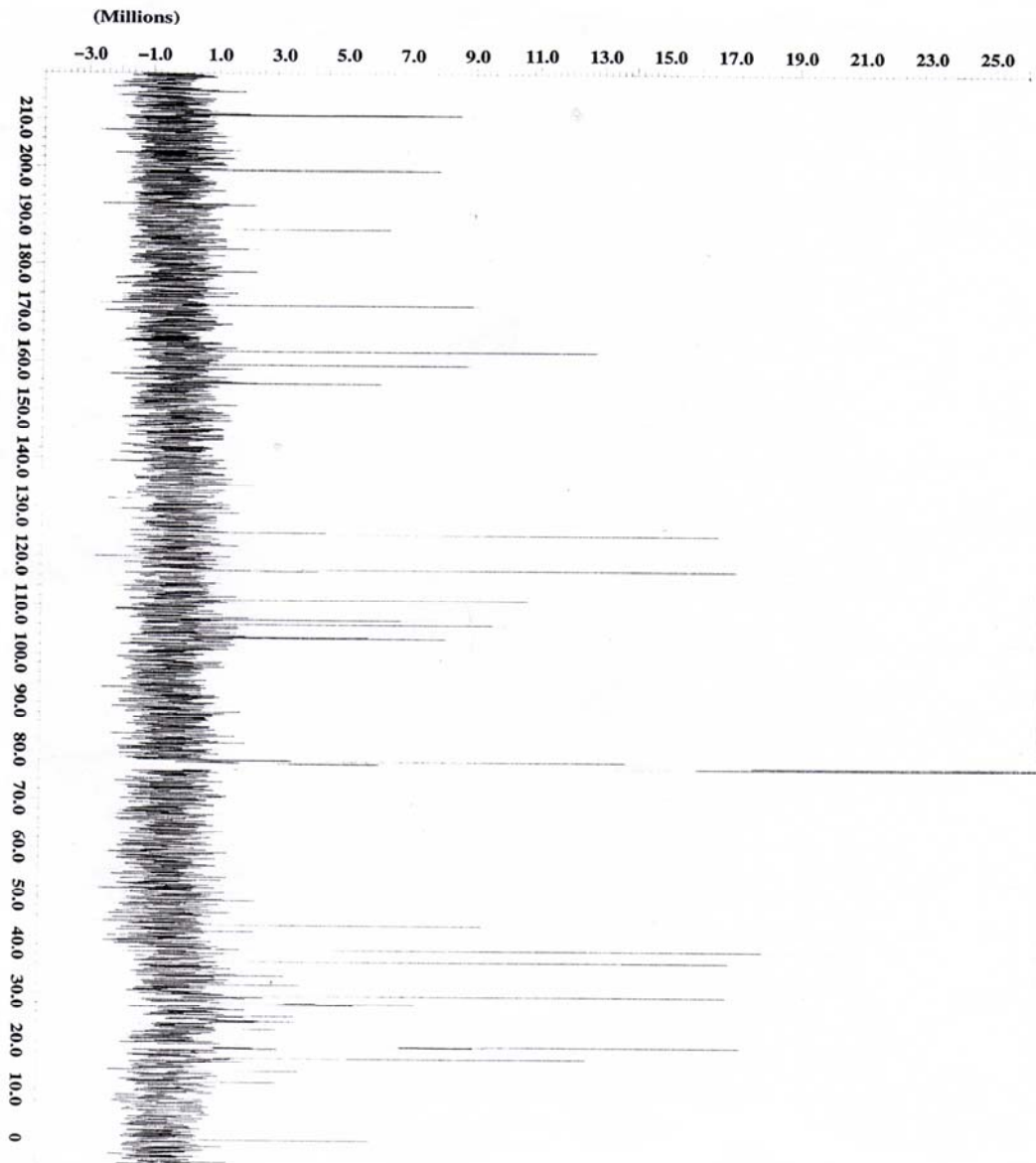
Espectro de RMN ¹H de HcF1 em CDCl₃ a 500 MHz

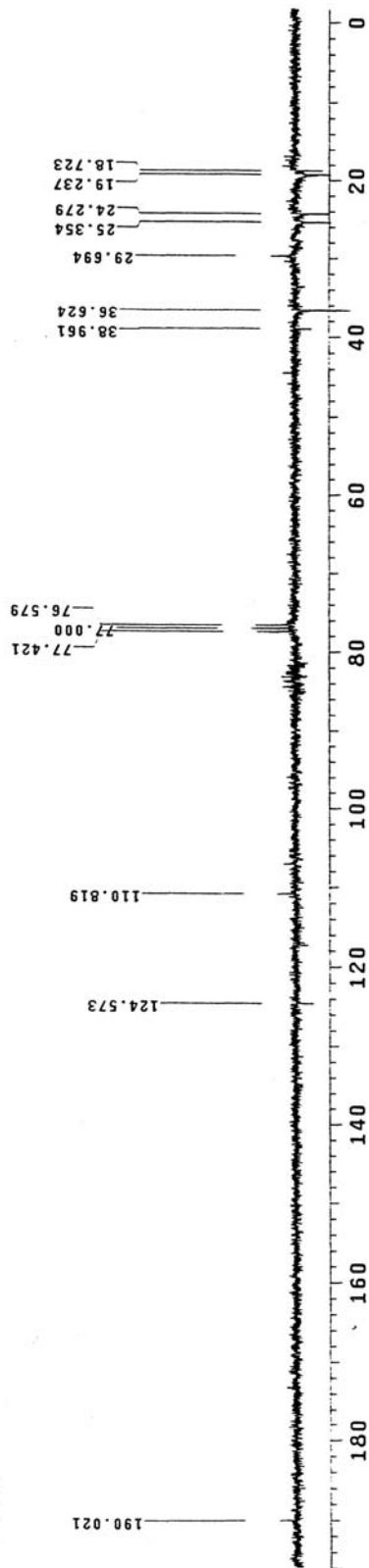




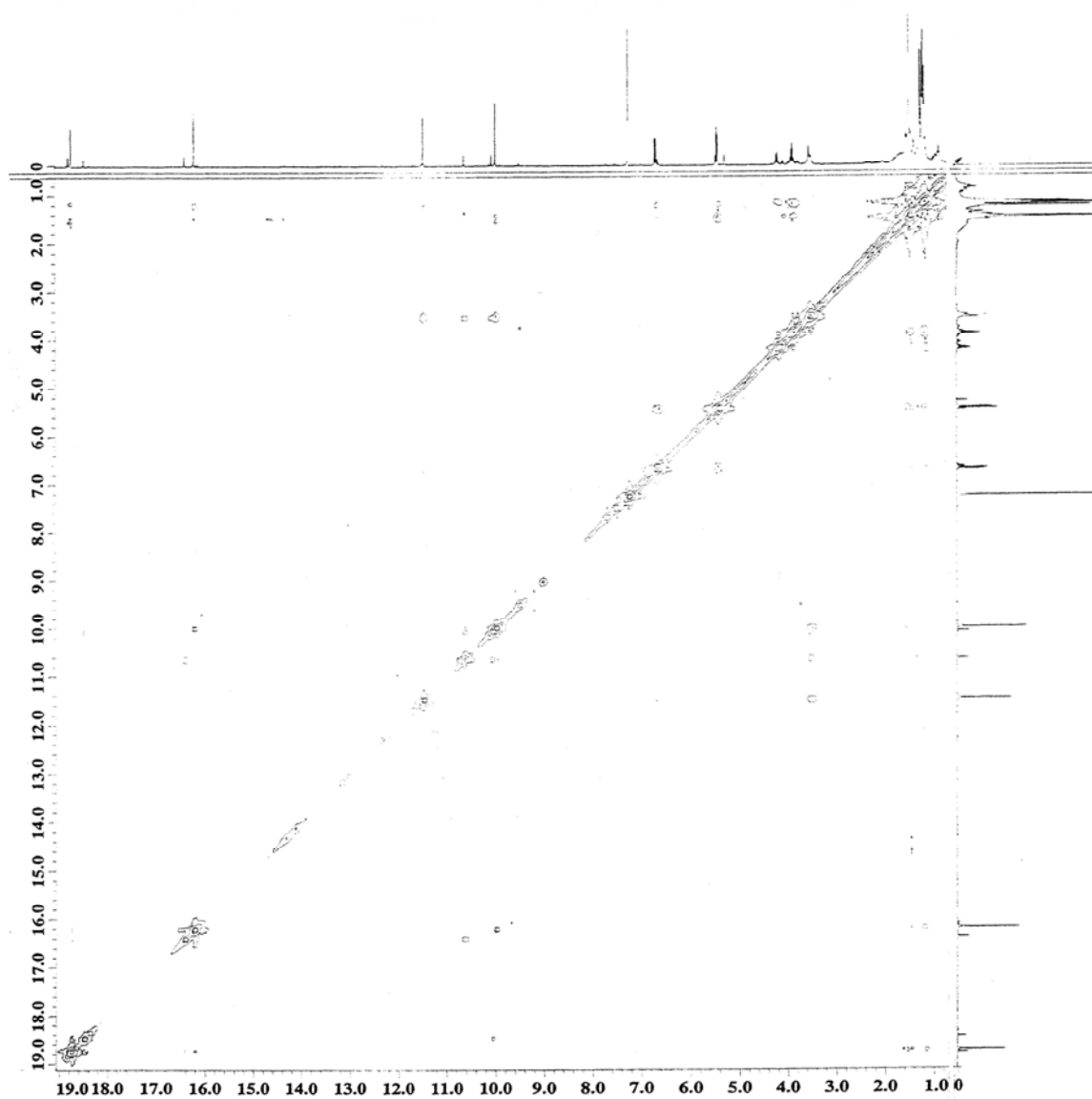
Espectro de RMN¹H de Hp4 em CDCl₃ a 400 MHz

Espectro de RMN ^{13}C de Hp4 em CDCl_3 a 100 MHz

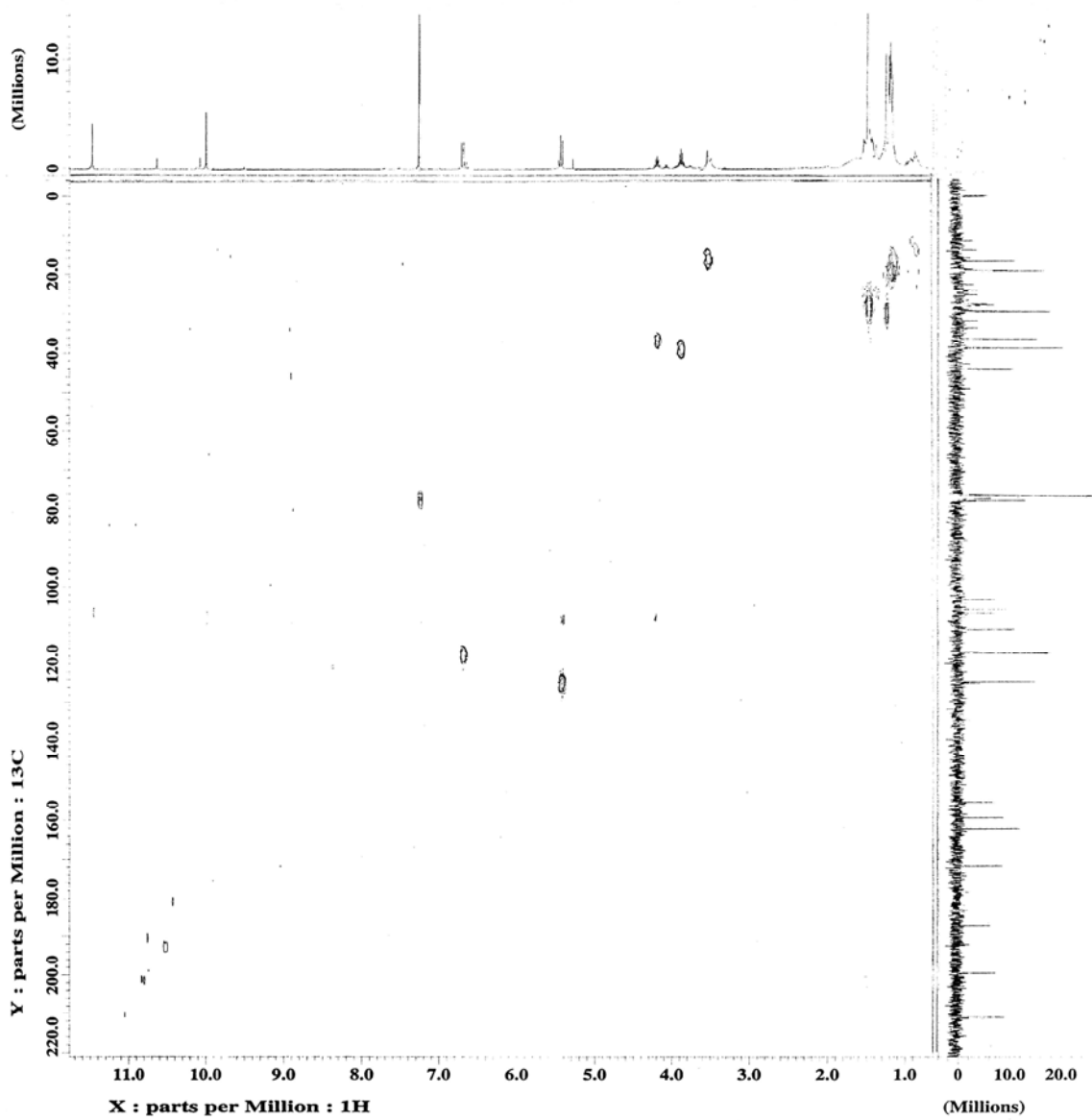




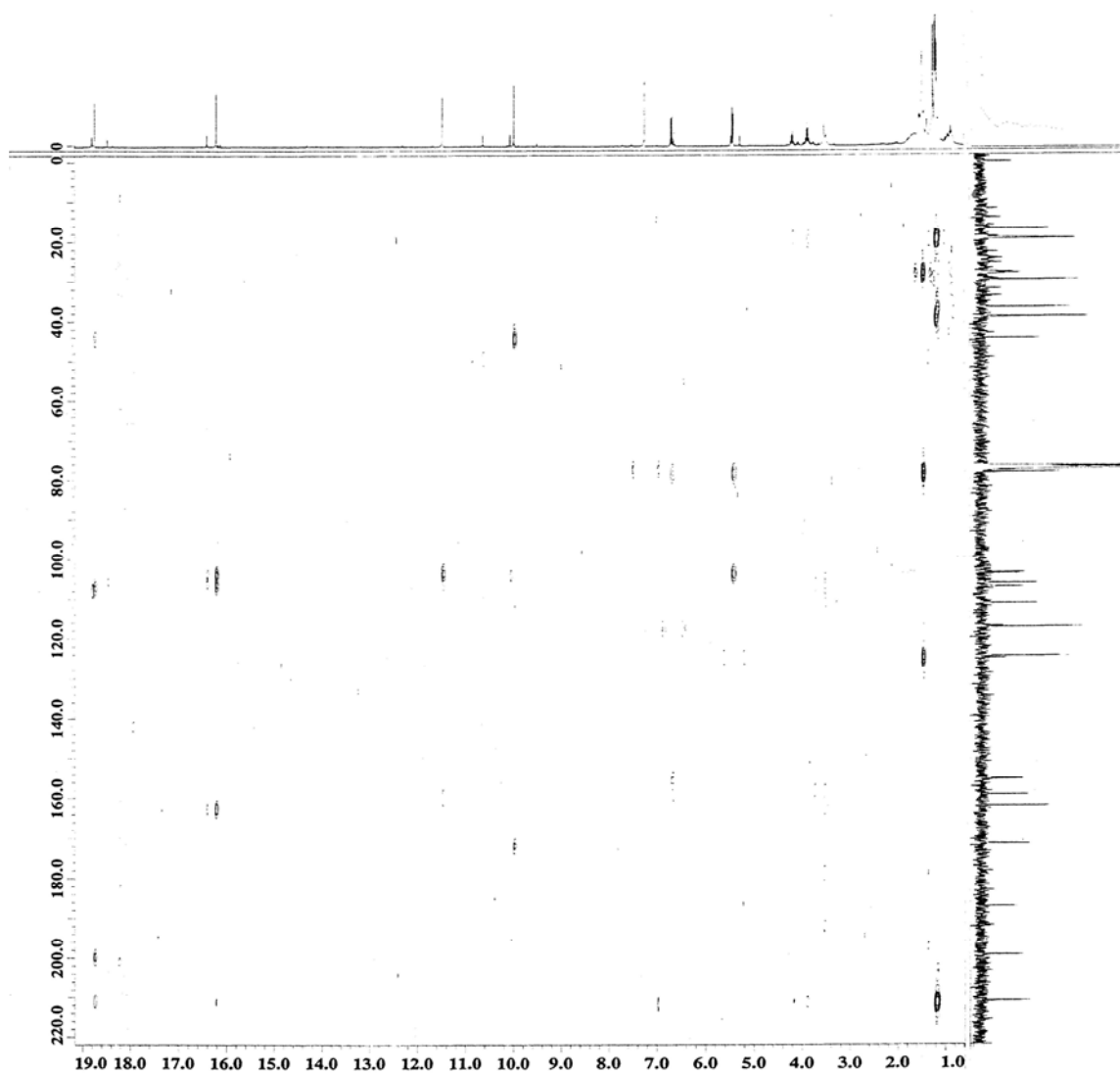
Espectro de RMN¹³C – DEPT de Hp4 em CDCl₃ a 100 MHz



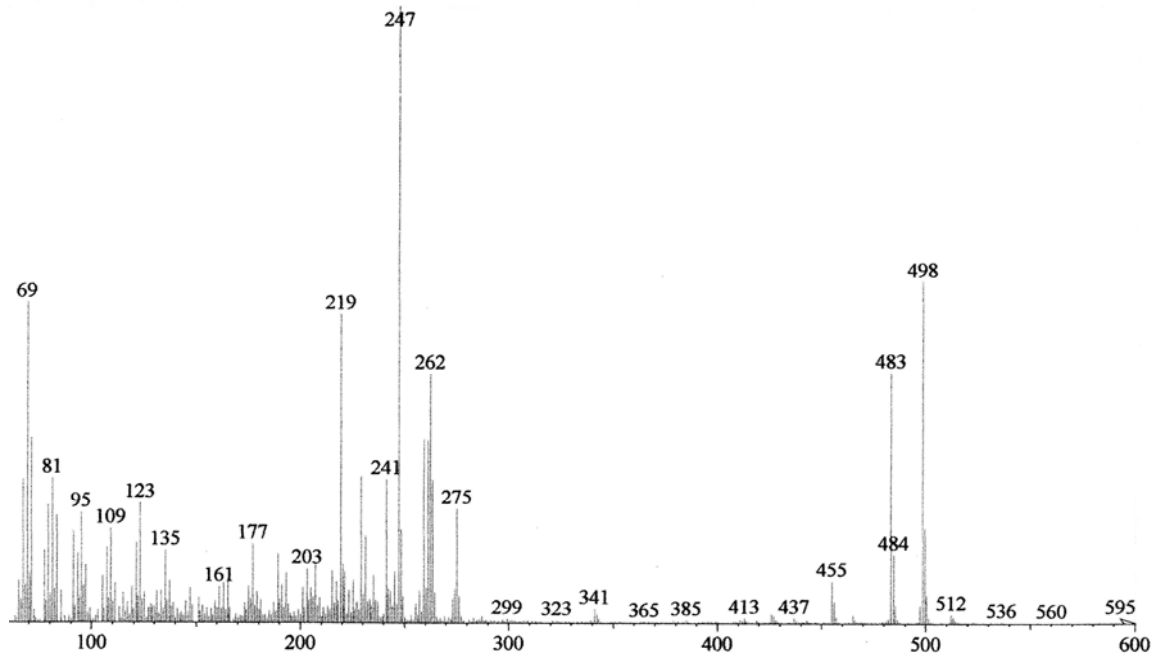
Espectro de correlação HH-COSY de Hp4 em CDCl_3 a 400 MHz



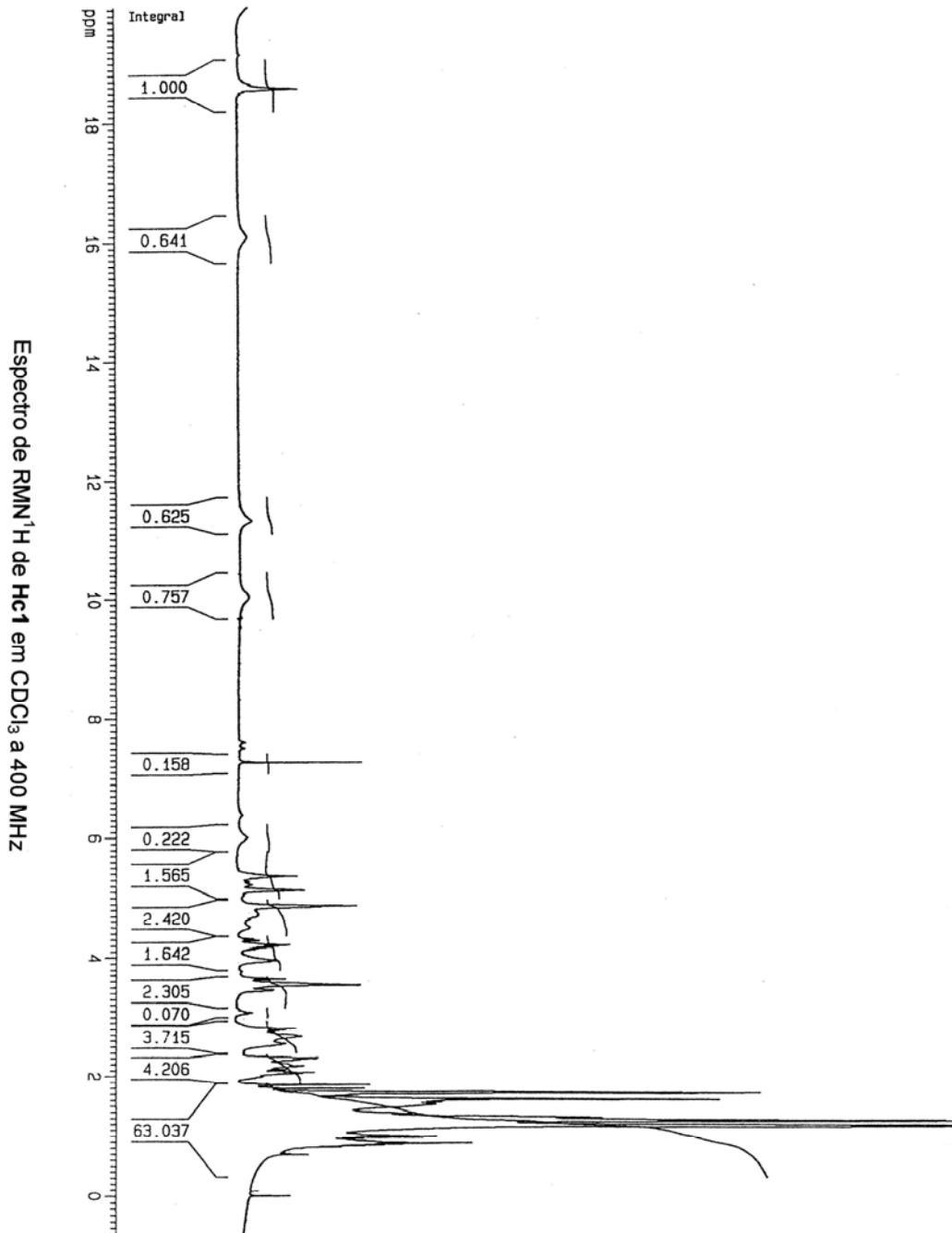
Espectro de correlação HMQC de Hp4 em CDCl₃ a 400/100 MHz

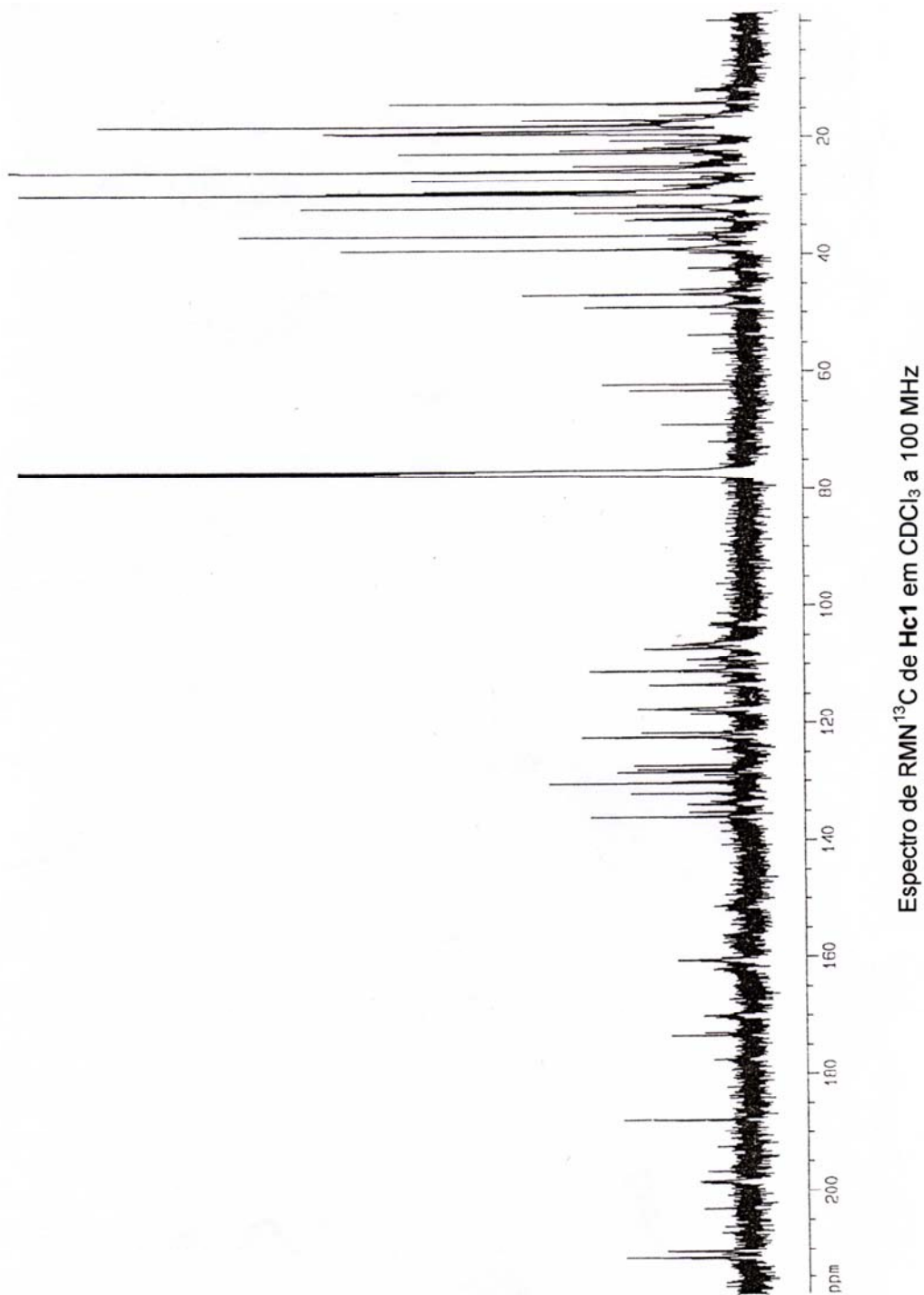


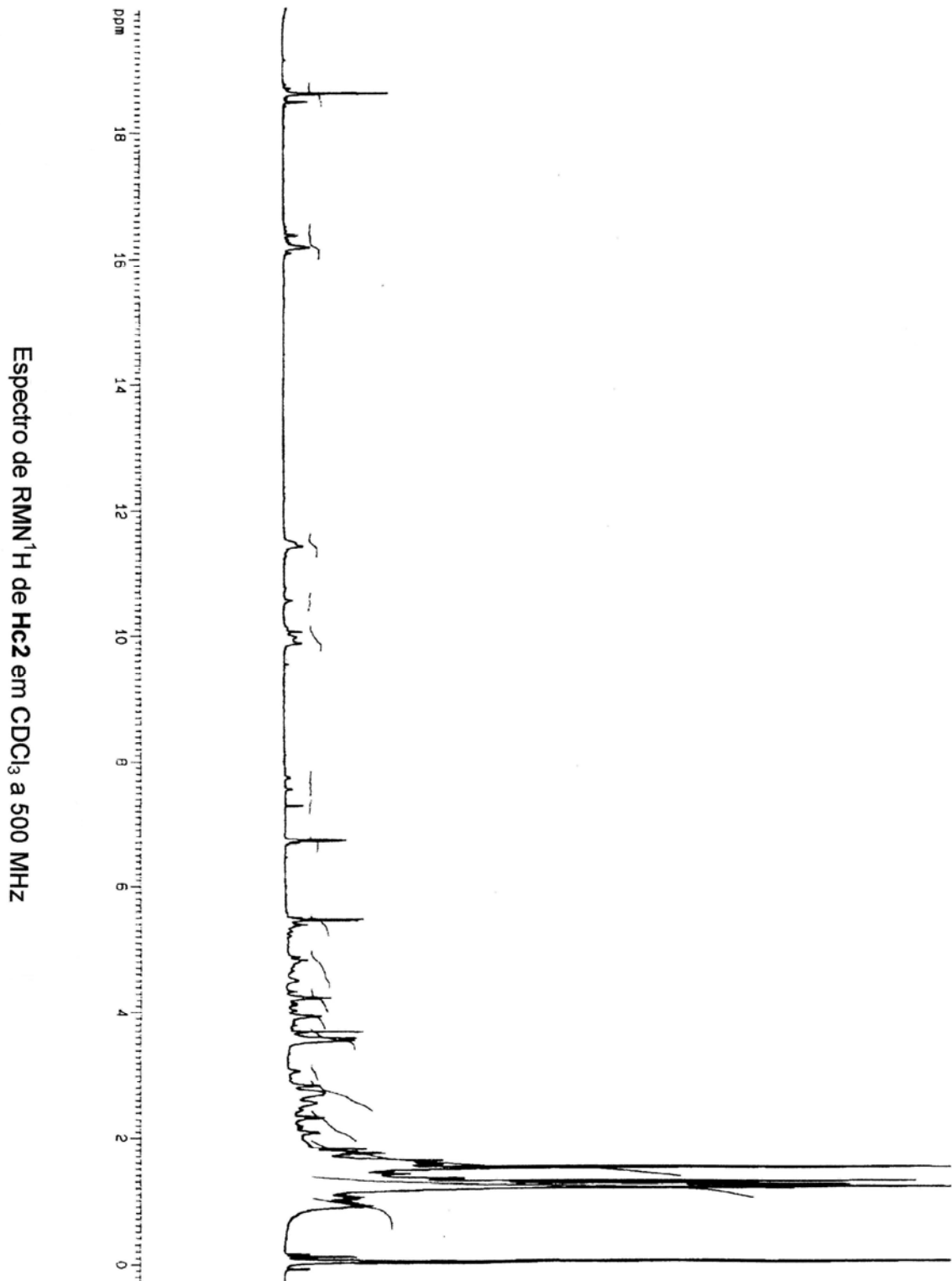
Espectro de correlação HMBC de **Hp4** em CDCl_3 a 400/100 MHz

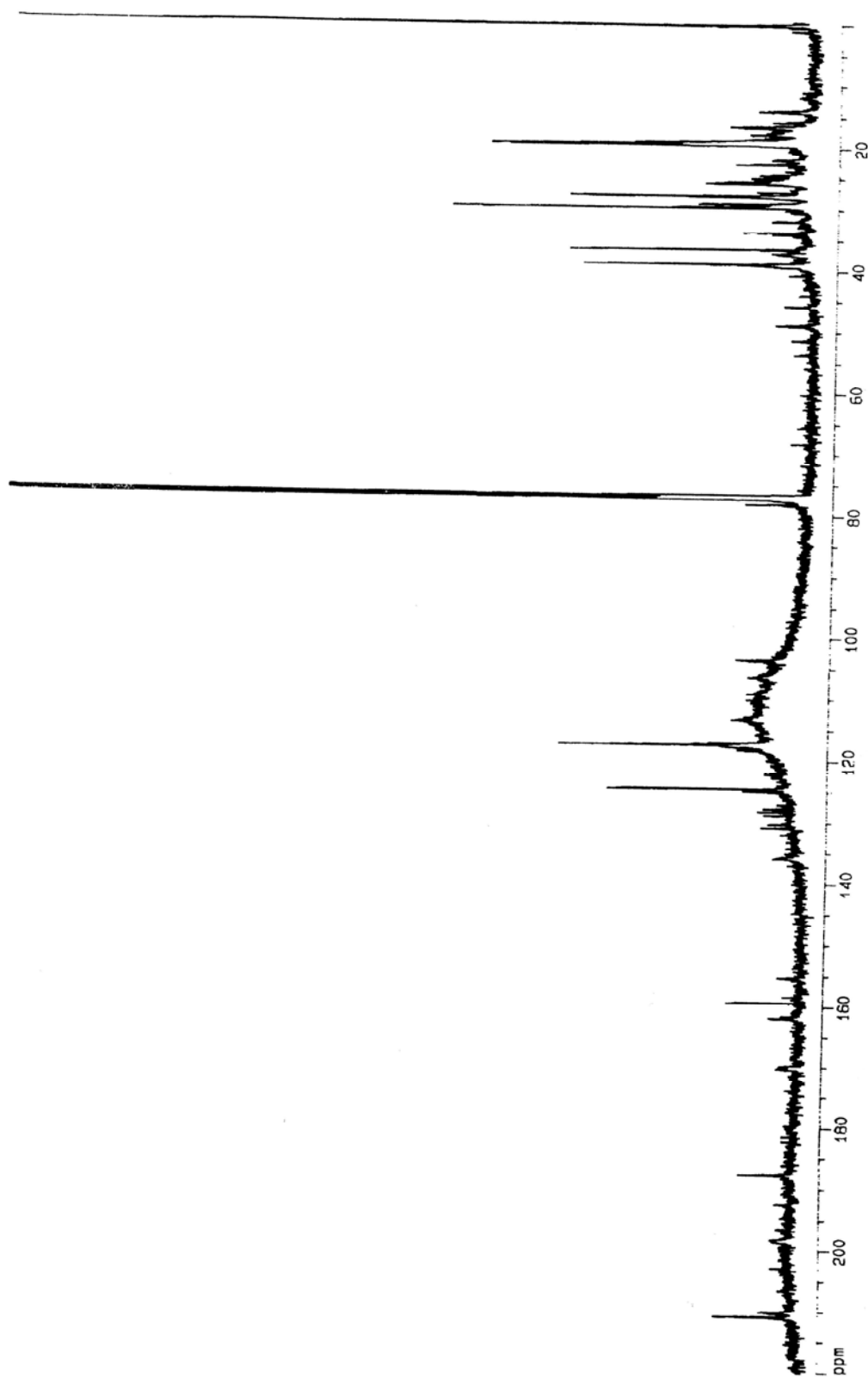


Espectro de massas de Hp4

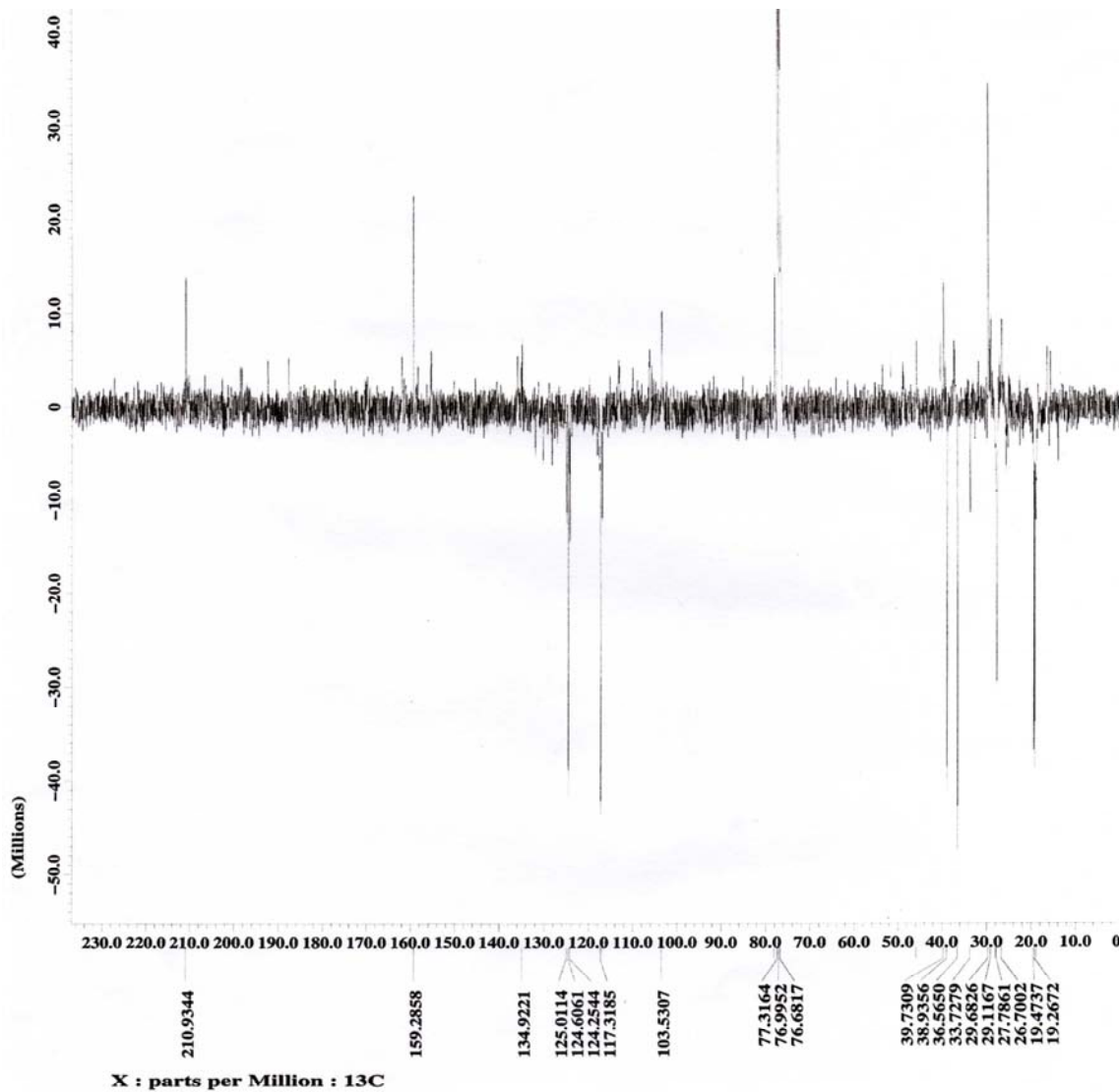




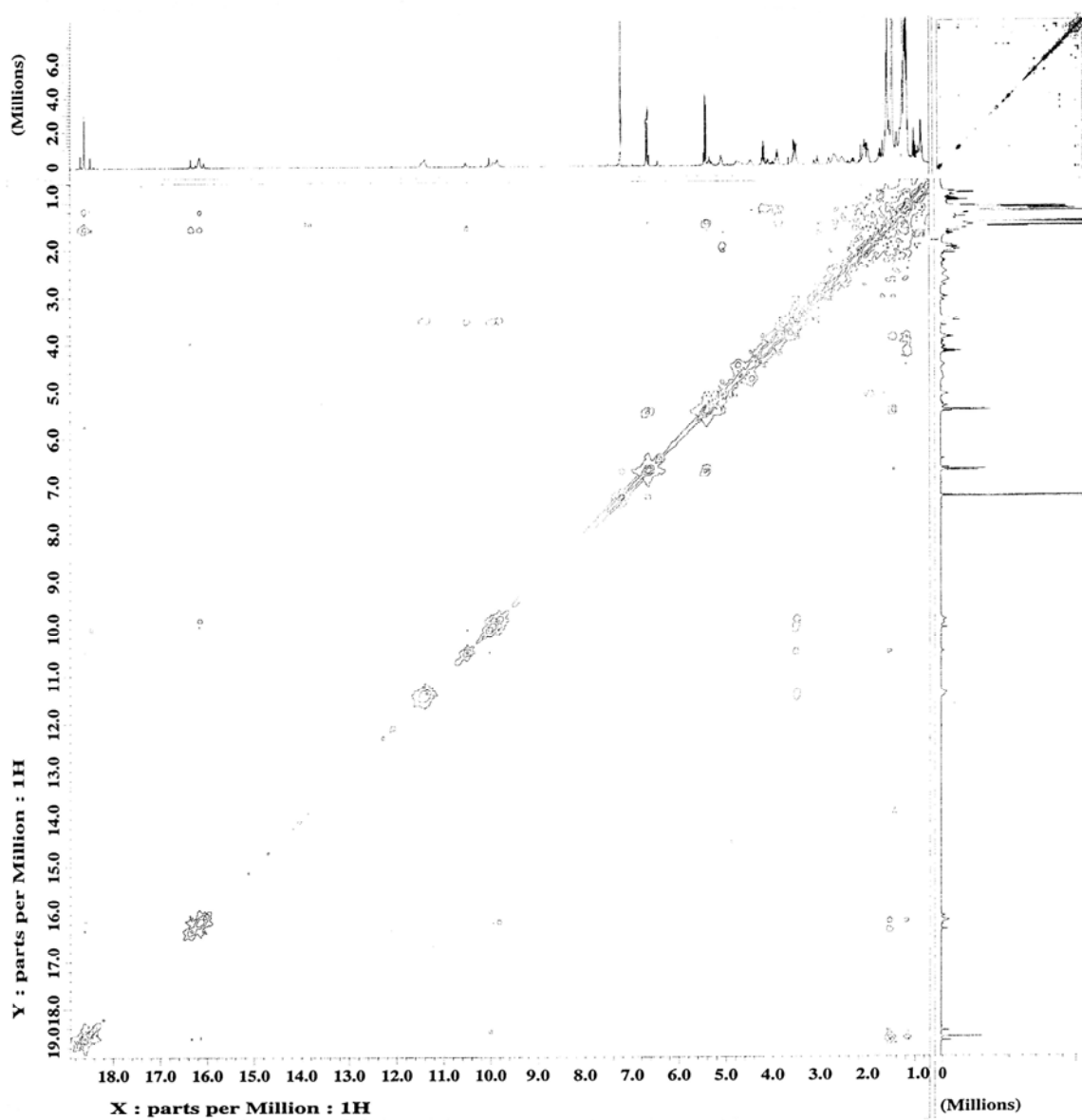




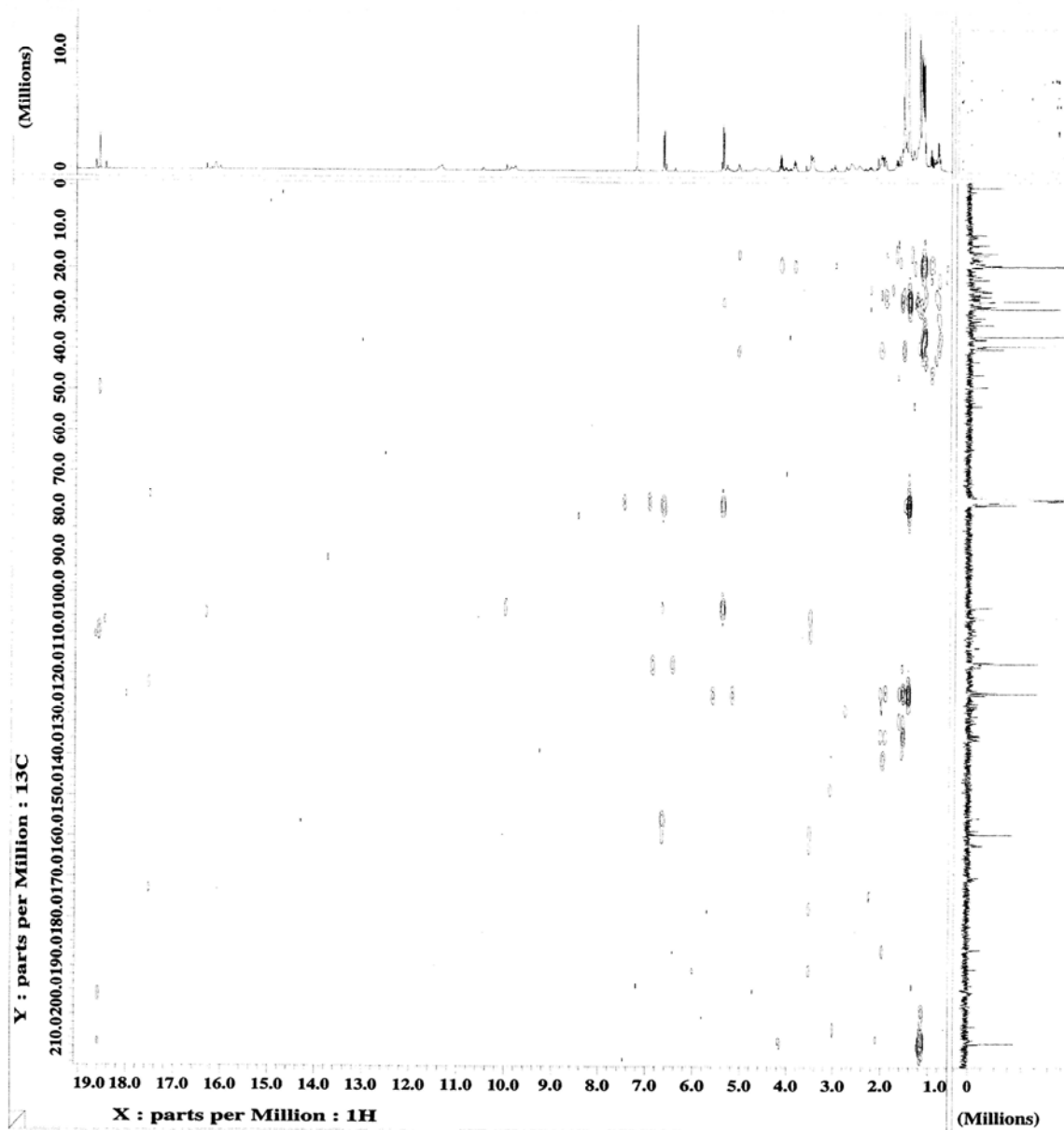
Espectro de RMN¹³C de Hc2 em CDCl₃ a 125 MHz



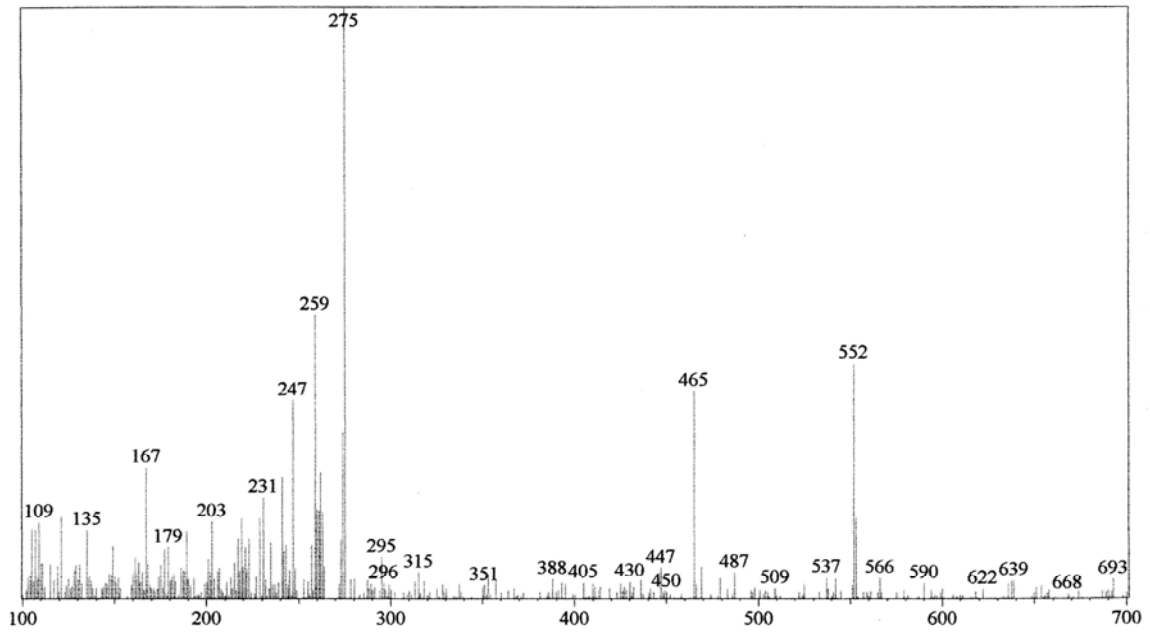
Espectro de RMN¹³C – DEPT de Hc2 em CDCl₃ a 100 MHz



Espectro de correlação HH-NOESY de Hc2 em CDCl_3 a 400 MHz



Espectro de correlação HMBC de Hc2 em CDCl_3 a 400/100 MHz



Espectro de massas de Hc2

