

Rodrigo Strohmayer Dourado

Isolamento de compostos secundários em
extratos de caules e folhas de *Hypericum*
cordatum (Vell. Conc.) N. Robson
(Clusiaceae)

São Paulo – 2006

Rodrigo Strohmayer Dourado

Isolamento de compostos secundários em
extratos de caules e folhas de *Hypericum*
cordatum (Vell. Conc.) N. Robson
(Clusiaceae)

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica
da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São
Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção
do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE
VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de
Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

Orientadora: Dra. Ângela Maria Ladeira

São Paulo – 2006

Agradecimentos

A meus pais, Antonio Carlos e Thalita, e minha irmã por todo apoio e incentivo.

A Dra. Ângela M. Ladeira, pela orientação e atenção dedicadas na elaboração desse trabalho.

A Dra. Maria Cláudia M. Young e Dra. Luce Maria Brandão Torres pela colaboração e atenção cedidas durante a elaboração desse trabalho.

A Dra. Luciana Retz de Carvalho e à chefia da seção de fisiologia por permitirem a utilização do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência da Dionex.

A meus colegas de laboratório por toda a força que me deram durante esse período.

A minhas grandes amigas Amanda de Souza, Ludmila Raggi, Márcia Débora, Nayara Scalco (minha “segunda melhor estagiária”) e Giovanna Bezerra por toda a paciência que tiveram comigo nos últimos meses.

Ao Dr. João H. G. Lago (IQ-USP) pela realização das análises espectroscópicas.

A toda equipe da seção de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica.

A FAPESP pelos auxílios aos projetos Detecção de substâncias com atividades biológicas em espécies com potencial medicinal: Análise de compostos secundários em *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Gutiferae) Proc. Nº 00/05761-0 e Conservação e uso sustentável da biodiversidade vegetal do Cerrado e da Mata atlântica: Diversidade química e prospecção de fármacos potenciais Proc. Nº 98/05070-0, Programa BIOTA/FAPESP.

Índice

Resumo

Abstract

1.1 Introdução

1.1.1 Considerações gerais sobre plantas medicinais	1
1.1.2 Família Clusiaceae.....	2
1.1.3 Gênero <i>Hypericum</i>	3
1.1.4 <i>Hypericum cordatum</i>	4
1.1.5 Química da família Clusiaceae.....	4
1.1.6 Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Hypericum</i>	14
1.1.7 Estudos realizados com espécies brasileiras de <i>Hypericum</i>	18

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivos Gerais.....	20
1.2.2 Objetivos Específicos.....	20

2. Capítulo 1 – Análise de flavonóides em extratos metanólicos de caules e folhas

2.1 Introdução.....	21
2.2 Material e Métodos	
2.2.1 Material.....	23
2.2.2 Métodos	
2.2.2.1 Preparo do material vegetal.....	24
2.2.2.2 Método de extração.....	24
2.2.2.3 Fracionamento dos extratos metanólicos de folhas e de caules.....	24
2.2.2.4 Análise comparativa das frações obtidas dos extratos de caule e folhas em cromatografia de camada delgada de sílica.....	27
2.2.2.5 Análise de compostos Sulfatados	
2.2.2.5.1 Hidrólise Ácida.....	28
2.2.2.5.2 Eletroforese.....	28

2.2.2.6	Análise das frações solúveis e insolúveis do extrato metanólico de caule e folhas em CLAE	
2.2.2.6.1	Análise em CLAE semipreparativa.....	29
2.2.2.6.2	Análise CLAE analítica.....	30
2.2.2.7	Identificação dos compostos isolados.....	30
2.3	Resultados	
2.3.1	Detecção de flavonóides nos extratos de folha e caule em metanol.....	30
2.3.2	Detecção de flavonóides sulfatados.....	40
2.3.3	Perfil cromatográfico e espectro na região do ultravioleta das frações insolúveis do extrato metanólico 2.3 de folha e 3.2 caule submetidas a CLAE-DAD em escala semi-preparativa.....	40
2.3.4	Perfil cromatográfico das frações insolúveis obtidas de caules e folhas submetidas a CLAE em escala analítica.....	45
2.3.5	Detecção de Flavonóides nas frações 4.1 e 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule.....	58
2.3.6	Avaliação do perfil cromatográfico das frações da fase solúvel 1.3.1 e 2.2.3 do extrato de folha.....	66
2.4	Discussão.....	67

3. Capítulo 2. Análise de compostos secundários em extrato de folhas em clorofórmio

3.1.	Introdução.....	71
3.2.	Material e Métodos	
3.2.1.	Materiais.....	73
3.2.2	Métodos	
3.2.2.1.	Preparo do Material Vegetal.....	73
3.2.2.2.	Método de extração.....	73
3.2.2.3	Fracionamento do extrato de folhas em clorofórmio.....	74
3.2.3	Bioensaio de atividade fungitóxica.....	77
3.3	Resultados.....	78
3.4	Discussão.....	83
4.	Conclusões.....	85
5.	Bibliografia.....	86

Resumo

A utilização de plantas medicinais remonta da antigüidade. Espécies de *Hypericum* vem sendo utilizadas desde a Grécia Antiga. Com o advento da indústria farmacêutica, as plantas medicinais passaram a ser estudadas sob o ponto de vista científico. Este trabalho teve como objetivos realizar o isolamento e identificação de flavonóides de caules e folhas dos extratos de *H. cordatum* e isolamento de compostos com atividade antifúngica em extratos de folhas em clorofórmio. O fracionamento dos extratos foi feito por técnicas cromatográficas em colunas, em camada delgada e CLAE. Os perfis cromatográficos apresentaram poucos compostos comuns aos dois órgãos. Os extratos metanólicos mostraram a presença de um grande um grande número de flavonóides, em especial flavonóis e flavonas. Foram identificados 4 flavonóides, sendo quercitina e quercitrina comuns a caule e folhas, e rutina e canferol até o momento confirmadas apenas em caules. As moléculas foram identificadas pela análise de seus espectros na luz ultravioleta comparados aos espectro de padrões comerciais e por co-cromatografia realizadas com esses padrões. Outros 8 compostos foram isolados em CLAE escala semipreparativa e enviados para análise de ressonância magnética nuclear. Em relação à atividade antifúngica, o extrato de clorofórmio de folhas apresentou 2 compostos com atividade média, os quais tiveram seu perfil cromatográfico analisados e foram enviados para ressonância magnética nuclear, para possível identificação dos compostos.

Abstract

The employ of medicinal plants comes from the distant past. Species of the genus *Hypericum* were used since antiquity in Greece. When the pharmaceutical industry appeared, scientific studies with medicinal plants have been initiated. The aim of this work was the isolation and identification of flavonoids present in the methanolic extracts from stems and leaves of *H. cordatum* and the isolation of fungotoxic compounds in chloroform extracts of leaves. The fraction of this species methanolic extracts was done using column, thin layer and high performance liquid chromatography techniques. The data obtained show that few compounds are common in the plant organs analyzed. A great number of flavonoids were found in the methanolic extracts, specially flavonols and flavones. Four flavonoids were identified: quercetin and quercitrin occurring both in stems and leaves, and rutin and kaempferol occurring only in stems. The identification of these compounds was done by the analyses of the ultraviolet light spectrum obtained in HPLC-DAD and by co-chromatography with standard solutions. Eight compounds were isolated by semipreparative HPLC and were sent to MRN analyses. The fraction of the chloroform extracts of leaf showed two active compounds that were also sent for identification for their chemical structure.

1. INTRODUÇÃO

1.1.1 Considerações gerais sobre as plantas medicinais

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é conhecido desde a mais remota antigüidade, sendo as obras mais antigas sobre medicina e plantas medicinais originárias da China e Egito (ALZUGARAY & ALZUGARAY, 1983). Diversas culturas se valeram das plantas medicinais, sendo esta a principal, ou mesmo a única matéria prima para elaboração de medicamentos (ODY, 1993). No início do século XX, a descoberta e o desenvolvimento de processos de síntese de compostos orgânicos, culminaram no desenvolvimento de diversos medicamentos. Entretanto, efeitos colaterais, causados por eles, somados aos altos valores dos medicamentos sintéticos promoveram a busca por novas drogas, e o interesse por compostos fitoterápicos, uma alternativa de tratamento (VOLAK & STODOLA, 1990).

Em 1915 Sydler propôs o termo Farmacognosia para o estudo de drogas e medicamentos de origem natural, a maioria deles de origem vegetal. Essa área da farmacologia, como ciência, passou a ser subdividida em áreas mais específicas, como por exemplo, a farmacoergasia que estuda as melhores formas de cultivo para cada planta, a farmacokuímica (fitokuímica) que estuda a origem, a síntese e as formas de extração dos compostos. Dessa forma o estudo de plantas medicinais, é uma ciência complexa, dependendo de muitas formas de conhecimento, e conseqüentemente, profissionais especializados em diferentes partes do saber (Di STASI, 1995).

Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos ; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcalóides entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (BALADRIN *et al.*, 1985; Di STASI, 1995).

O uso de espécies medicinais pela população brasileira é grande, e este conhecimento vem sendo transmitido de uma geração para outra, entretanto estudos científicos integrados em diferentes áreas do conhecimento, confirmando o emprego das plantas medicinais, só passaram a ser realizados, a partir, da década de 70.

O número de espécies realmente conhecidas, e utilizadas como medicamentos é pequeno, frente à biodiversidade vegetal e a devastação causada pelo homem, em especial nos séculos XIX e XX (GOTTLIEB & KAPLAN, 1990), surgiu então uma política de preservação do meio ambiente, com receio da perda de espécies raras. Desse modo houve um incentivo às pesquisas de levantamentos florísticos e de triagens químicas das espécies nativas. No Brasil, menos de 1% dessas espécies medicinais nos diferentes ecossistemas foram quimicamente estudadas (VIEIRA, 1993).

Desde 1998 vem sendo realizada no Instituto de Botânica de São Paulo uma triagem de espécies nativas de Mata Atlântica e de Cerrado com metabólitos responsáveis por atividades fungitóxica, antibacteriana, antitumoral e antioxidante. As espécies que mostram algumas dessas atividades são selecionadas para estudos fitoquímicos visando à identificação dos princípios ativos. Entre as espécies analisadas foi selecionada para investigações mais detalhadas *Hypericum cordatum*, pertencente à família Clusiaceae (Guttiferae).

1.1.2 A família Clusiaceae

Essa família compreende quarenta e nove gêneros de ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo com apenas um gênero atingindo as regiões temperadas (JOLY, 1993)

As Clusiaceae são plantas primariamente lenhosas, arbóreas ou arbustivas, lactescente, ou não, com folhas inteiras de disposição alterna, oposta ou verticiladas, sem estípulas, com flores geralmente vistosas isoladas, ou reunidas em inflorescência. Flores cíclicas ou hemicíclicas, geralmente hermafroditas, ou de sexo separado, de simetria radial (JOLY, 1993).

1.1.3 Gênero *Hypericum*

Com cerca de 460 espécies, o gênero *Hypericum* é o maior dentro da família Clusiaceae e o único a penetrar efetivamente regiões temperadas. Aparentemente é um gênero monofilético, podendo tornar-se, com plantas da família Podostemaceae um grupo parafilético, em função de estudos realizados em biologia molecular que mostram que essas plantas têm muita relação com as do gênero *Hypericum*. Possui plantas bastante utilizadas na horticultura devido à coloração das flores (ROBSON, 2006), sendo mais de 25% das espécies cultivadas (ROBSON, 1995).

O hipérico era empregado no âmbito religioso, decorando imagens, o que levou ao nome popular *hyper* (do grego, sobre) *eikon* (do grego, imagem). O cristianismo também deu sua contribuição, sendo o outro nome popular do hipérico “Erva de São João” associado à época de floração da planta que ocorre em junho (ROBSON, 2001).

Em relação à atividade medicinal, a utilização do hipérico remonta a Grécia antiga. Na medicina ocidental, foi utilizado como medicamento de uso externo durante muitos anos, e só recentemente seu emprego em cápsulas para serem ingeridas vem sendo estudadas, especialmente nos tratamentos de crises depressivas, e como agente antitumoral (ROBSON, 2001).

Em relação à morfologia, apresentam hábito bastante variado, desde porte arbóreo com espécies atingindo 12 metros de altura até herbáceo com plantas de pequeno porte, com folhas reduzidas a escamas. O porte arbóreo é raro, as espécies lenhosas apresentam caule principal ereto e ramos laterais. Dentre as herbáceas, as plantas podem apresentar desenvolvimento paralelo ao solo, ou crescimento vertical pequeno, podendo apresentar rizomas. Duas espécies podem desenvolver ramos vegetativos a partir das raízes (*H. perforatum* e *Hypericum pulchrum*) o que pode explicar um pouco a abundância dessas espécies na Europa oriental (ROBSON, 1977).

1.1.4 *Hypericum cordatum*

Hypericum cordatum ocorre no Brasil em Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul (ROBSON, 1981).

Caracteriza-se por apresentar de vinte centímetros a um metro de altura, possui caule ereto, ramificado na base e, às vezes acima. Quando jovens apresentam coloração marrom avermelhada. Possui folhas sésseis, isomórficas, eretas ovato-oblongas ou elípticas. Suas flores medem de 15 a 25 milímetros possuindo cor amarelo alaranjado (ROBSON, 1981)

1.1.5 Química da família Clusiaceae

A família Clusiaceae, especialmente em gêneros como *Clusia* e *Garcinia*, apresentam em sua constituição química compostos como benzofenonas e floroglucinóis, que podem ser encontrados em folhas, raízes, ramos e frutos. Esses compostos são formados por síntese mista a partir das vias do ácido chiquímico e do acetato, apresentando geralmente o anel trihidroxi prenilado, cuja alquilação forma uma complexa ligação com compostos bicíclicos ou tricíclicos (CUESTA-RUBIO *et al.*, 1999; GROSSMAN & JACOBS, 2000; CUESTA-RUBIO *et al.*, 2001^a; CUESTA-RUBIO *et al.*, 2001^b). Das raízes de *Clusia paralicola* foi isolado um composto de atividade neurotrófica, a clusilparalicolina A, que é um biaril, no qual um grupo prenil e geranil estão agrupados (TAKAOKA *et al.*, 2002). OLIVEIRA *et al.*, (1999) isolaram duas benzofenonas (nemorosona-II e 6-epi-nemorosona) e uma xantona em espécies de *Clusia nemorosa*, *C. roseae*, *C. grandiflora*, *C. insignis* e *C. renggerioides*. LOKVAN *et al.* (2000) isolaram benzofenonas poliisopreniladas (chamones I e II) e nemorosona II do látex do tronco de *Clusia grandiflora* e da resina do nectário. Esses compostos são bastante semelhantes, variando apenas o grau de prenilação. Nemorosona é o principal constituinte da resina floral de *Clusia roseae* (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2001^a). TEIXEIRA & CRUZ, (2005) e CRUZ & TEIXEIRA, (2004) isolaram do extrato hexânico de *Clusia obdeltifolia* benzofenonas com ciclização complexas dos substituintes isopentenil e lavandulil, benzofenonas poliisopreniladas, além de benzofenonas polipreniladas

(Sampsoniona B e Sampsoniona G) compostos que apresentam esqueleto tipo triciclo undecano.

Outro grupo de compostos presentes na família Clusiaceae são as cumarinas. CRUZ *et al.* (1997) isolaram duas cumarinas preniladas e duas fenil-cumarinas preniladas do extrato hexânico de caules de *Kielmeyera argentea*. GRAMACHO *et al.* (1999) isolaram uma 4-fenil-cumarina (friedelina), uma furanocumarina e mameigina do extrato hexânico de caule *Kielmeyera alata*.

Xantonas também são bastante comuns dentro da família Clusiaceae. Kielcorina foi encontrada em extrato de *Kielmeyera coriacea*, *Kielmeyera corymbosa*, *Kielmeyera speciosa*, *Kielmeyera ferruginosa* e *Kielmeyera rubriflora* (CASTELÃO, *et al.*, 1976). No extrato metanólico de *Kielmeyera variabilis* foram isoladas xantonas como assiguxanthona B, kielcorina e 1,3,5,6-tetrahidroxi-2-prenilxantona, além do ácido 2,5-diidroxibenzóico, que mostraram atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (CORTEZ *et al.*, 1998). PINHEIRO *et al.* (2003) descreveram que compostos das frações do extrato de caule de *Kielmeyera variabilis* apresentaram assiguxantona, kielcorina, ácido 2,5-diidroxibenzóico e uma mistura de xantonas, as quais apresentaram atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Xantonas polipreniladas, garcibracteanona, neoisobractaina A e B (atividade citotóxica) e xerofenona C, 5-O-metil-xantona, bracteataxantona, nemorosol e outras xantonas simples foram identificadas em *Garcinia bracteata* em extratos de folhas e casca (THOISON *et al.*, 2005).

REYES *et al.*, (2004) em estudos realizados com extratos hexânicos de *Calophyllum brasiliense* verificaram atividade contra a replicação viral indicando essa espécie como uma fonte potencial de compostos anti-HIV. Também com atividade anti-HIV, os tautômeros, clusianona e 7-epi-clusianona foram isolados de frutos de *Clusia torresii*. Todos os compostos apresentaram inibição da infecção, porém clusianona inibiu infecção ligando-se a proteína viral gp 120 e impedindo a interação dessa com o receptor no linfócito CD-4 (PICCINELLI *et al.*, 2005).

AUDI *et al.* (2002) verificaram que extratos etanólicos de folhas de *Kielmeyra coriaceae* apresentam efeito ansiolítico, mas não antidepressivo.

LOPEZ *et al.*, (1977) descreveram atividade contra a infecção de cercárias de *Schistosoma mansoni* quando o extrato de *Kielmeyra coriaceae* é aplicado na pele de animais em experimento, sendo o princípio ativo uma xantona (osjaxantona). PINHEIRO *et al.*, (1996) verificaram atividade moluscicida em *Clusia verticilata* e *Clusia ionophyllum*.

Nas espécies de Hipérico destacam-se como princípios ativos antraquinonas e os compostos fenólicos, tais como flavonóides, xantonas, floroglucínóis (BARNES, 2001).

Antraquinonas

Quinonas são compostos orgânicos que podem ser considerados como produtos da oxidação de fenóis, e da mesma forma a redução de quinonas pode originar os correspondentes fenóis. Sua principal característica é a presença de dois grupos carbonílicos que formam um sistema conjugado com pelo menos duas duplas ligações C-C. Apenas algumas nafto-, antra- e fenantraquinonas podem ser caracterizados com caráter aromático. As *o*- e *p*- quinonas são 1,2- e 1,4 dicetonas cíclicas conjugadas e as *m*- ou 1,3 quinonas não existem (FALKENBERG, 2001).

Em função do tipo de ciclo no qual o sistema de duplas e cetonas conjugadas está inserido, tem-se o grupo das principais quinonas, conhecidos usualmente como nafto-, benzo- e antraquinonas. Também são encontrados na natureza quinonas terpênicas de estrutura policíclica mais complexa, como as diterpenoquinonas com esqueleto do tipo abietano, e os pigmentos policíclicos relacionados com a hipericina encontrados em Clusiaceae. Nesta última, a função quinona se encontra em sua forma estendida com duas carbonilas em anéis diferentes e unidas por ligação dupla conjugada (FALKENBERG, 2001).

Quinonas se apresentam como estruturas cristalinas de coloração amarela a vermelha, ocasionalmente podendo apresentar coloração azul, verde ou mesmo negra. Sua contribuição para a coloração dos organismos que as contém é pequena se comparada com as antocianinas

e carotenóides. As antronas e antronóis têm coloração amarela enquanto as antraquinonas propriamente ditas tem coloração laranja ou amarela e as nafto-diantronas coloração violeta-avermelhado (FALKENBERG, 2001).

A estrutura quinóide condiciona uma alta reatividade química e as quinonas são agentes fortemente oxidantes (FALKENBERG, 2001).

Até o momento são conhecidos na natureza mais de 1500 quinonas, encontradas em bactérias, líquenes, gimnospermas e angiospermas. Na Figura 1 estão dois exemplos de antraquinonas presentes em espécies de *Hypericum* (FALKENBERG, 2001).

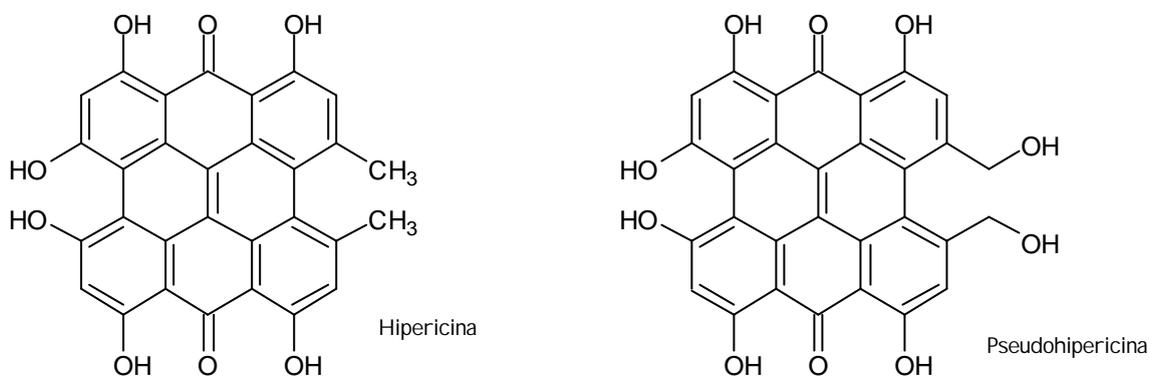


Figura 1: Estrutura de antraquinonas (Hipericina e pseudo-hipericina) presentes em espécies de *Hypericum*.

Compostos Fenólicos

O termo composto fenólico abrange um amplo grupo de moléculas que possuem em comum um anel aromático portando uma ou mais hidroxilas. Compostos fenólicos tendem a ser solúveis em água, podem estar ligados a açúcares. São compostos instáveis facilmente oxidáveis em pH alcalino. Do ponto de vista farmacológico possuem atividade anti-séptica, antiinflamatória e podem inibir atividade enzimática (BRUNETON, 1985; HARBORNE, 1984). Na Figura 2 tem-se alguns exemplo de compostos fenólicos

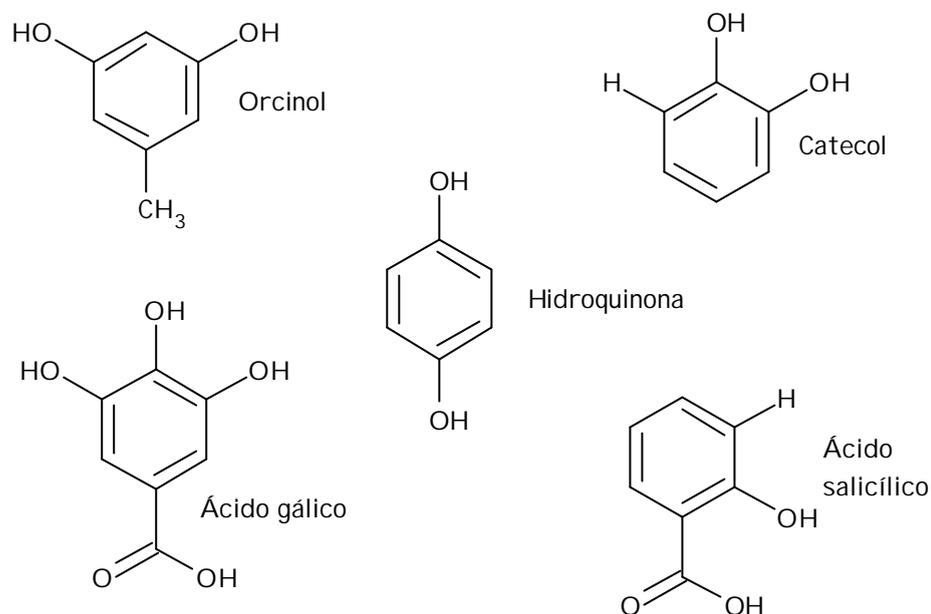


Figura 2: Diferentes compostos fenólicos.

Fenilpropanóides

Compostos fenólicos formados por um anel aromático ao qual uma cadeia lateral de 3 carbonos se encontra ligada, formando uma estrutura (C₆C₃). Algumas estruturas são bastante comuns na natureza, por exemplo o ácido cinâmico e o ácido p-cumárico. Os fenilpropanóides derivados do ácido cinâmico apresentam isomerização das moléculas quando o extrato aquoso é exposto à radiação UV (BRUNETON, 1995; HARBORNE, 1984). A Figura 3 apresenta estrutura de fenilpropanóides.

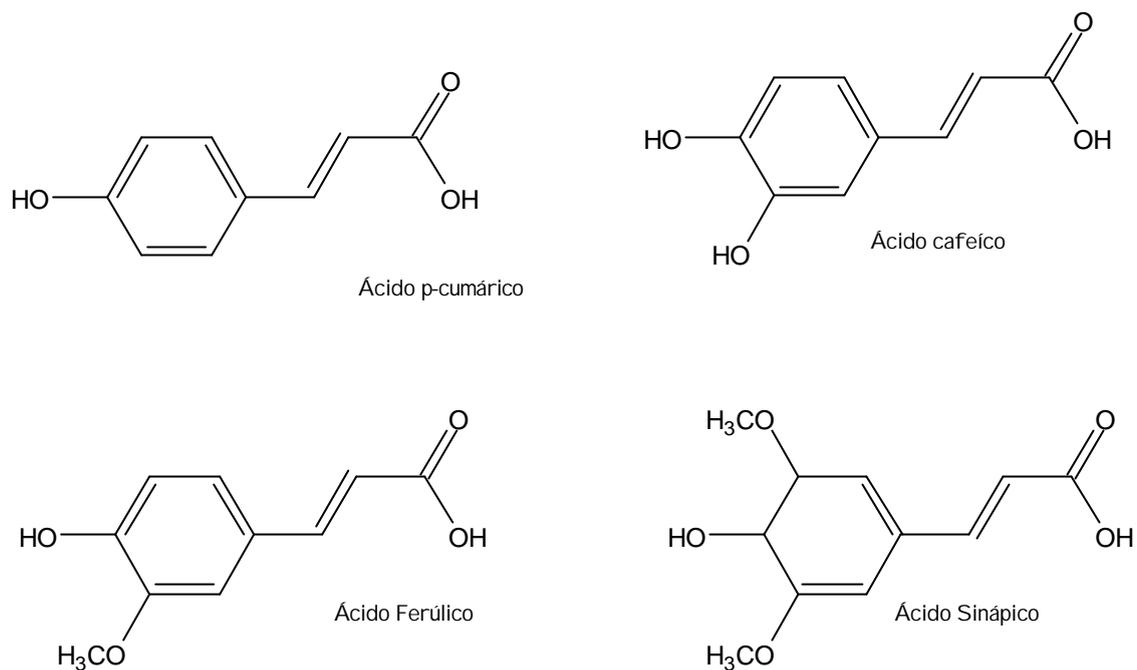


Figura 3: Moléculas de fenilpropanóides.

Floroglucinóis

São compostos fenólicos simples que se destacam por apresentar atividade antibacteriana (BARNES, 2001; HARBORNE, 1984). Derivados da via do ácido chiquímico-acetato, os floroglucinóis são benzenóis derivados do ácido cinâmico. São compostos extraídos de algumas coníferas e também bastante comuns nas espécies de *Hypericum* (ROWE, 1989; BRUNETON *et al.*, 1995). A Figura 4 apresenta floroglucinóis presentes em espécies de *Hypericum*.

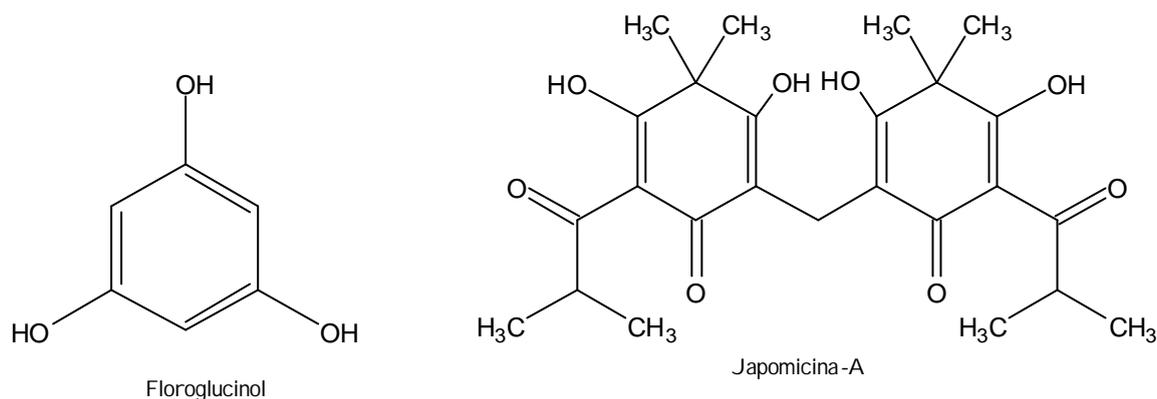


Figura 4: Estrutura do floroglucinol e da Japomicina-A, presente em espécies de *Hypericum*.

Flavonóides

São compostos caracterizados por apresentarem dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos, também derivados da via do ácido chiquímico-acetato. São bastante comuns na natureza atuando na atração de polinizadores, e como co-pigmentos das antocianidinas (BRUNETON *et al.*, 1995). Apresentam atividades antiinflamatórias, antimicrobianas, antitumorais e antidiabéticas (BARNES, 2001), o que torna essa classe de compostos de interesse para a indústria farmacêutica. Apresentam espectro com absorção máxima na luz UV em 254 e 350nm (HARBORNE, 1984).

Esses compostos têm origem biossintética mista, com parte da molécula proveniente da rota do ácido chiquímico e parte do ácido mevalônico, com estrutura química baseada no esqueleto 2-fenilcromano (BRUNETON, 1995). São compostos solúveis em água, podendo ser extraídos com etanol 70% permanecendo na fase aquosa após partição com éter de petróleo. Apresentam alteração de coloração quando tratados com amônio ou bases. Apresentam ligações conjugadas, que garante intensa absorção na luz UV, ou mesmo na luz visível. Podem ser encontrados na forma livre ou conjugados a açúcares, podendo uma mesma aglicona estar ligada a diferentes açúcares na mesma planta. Por apresentarem uma variada constituição, foram divididos em diferentes classes, tais como flavonóis, flavonas, isoflavonas, chalconas, auronas, e flavanonas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

Os flavonóis são encontrados como co-pigmentos das antocianidinas nas pétalas e folhas de plantas superiores. Caracterizam-se por apresentar uma hidroxila ligada na posição 3. Embora seja uma classe de flavonóides bastante rica, 3 agliconas são as mais comuns (canferol, quercetina e miricetina), sendo a maioria dos flavonóis existentes variações dessas três estruturas. Alguns flavonóis podem apresentar glicosídeos ligados a sua estrutura, sendo o mais comum a quercetina-3-rutinosídeo, mais conhecido como rutina (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As flavonas diferem dos flavonóis por não apresentarem hidroxila ligada à posição 3, o que altera o espectro na região do ultravioleta, mobilidade cromatográfica e reações colorimétricas. Podem apresentar glicosídeos ligados a molécula. As flavonas mais comuns são luteolina e apigenina. Um grupo especial de flavonas são os biflavonis que são compostos diméricos (formado por 2 flavonas) ligados através de ligação carbono-carbono ou ligação carbono-oxigênio. Ocorrem especialmente nas Gimnospermas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As isoflavonas são isômeros das flavonas, porém de ocorrência muito mais restrita (subfamília Papilonoidea – Fabaceae), em relação à atividade fisiológica, são subdivididas em três grupos, compostos que mimetizam atividade estrogênica, compostos com atividade inseticida e fitoalexinas (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As chalconas e auronas são grupos pequenos de metabólitos que ocorrem especialmente na Família Asteraceae. Possuem coloração amarelada, a qual se torna vermelha quando exposta a vapores alcalinos. Chalconas não apresentam anel central (anel C), enquanto que nas auronas há um, formado por 5 membros (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

As flavanonas são isômeros das chalconas, podendo as moléculas apresentar interconversão em estudos *in vitro*. São flavonóides comuns nos frutos de *Citrus*, porém sem a ocorrência da chalcona análoga (HARBORNE, 1984; HAHLBROCK, 1981).

Na biossíntese dos flavonóides, a primeira substância formada é uma chalcona, que está em equilíbrio enzimático com sua flavanona correspondente. O par chalcona/flavanona é precursor das subclasses dos flavonóides (Figura 5). Diretamente dele, derivam as flavonas, os

isoflavonóides e os dihidroflavonóides. Estes últimos são intermediários da síntese de catequinas, antocianidinas e flavonóis. As auronas derivam diretamente das chalconas (HAHLBROCK, 1981). Os últimos passos na biossíntese dos flavonóides estão associados aos processos de O- e C- glicosilações, acilação dos açúcares e alquilações (SALEH, 1979). Estudos têm demonstrado a influência de alguns fatores ambientais na regulação gênica de flavonóides (FUGLEVAND *et al.*, 1996). A Figura 5 apresenta as fórmulas das principais classes de flavonóides.

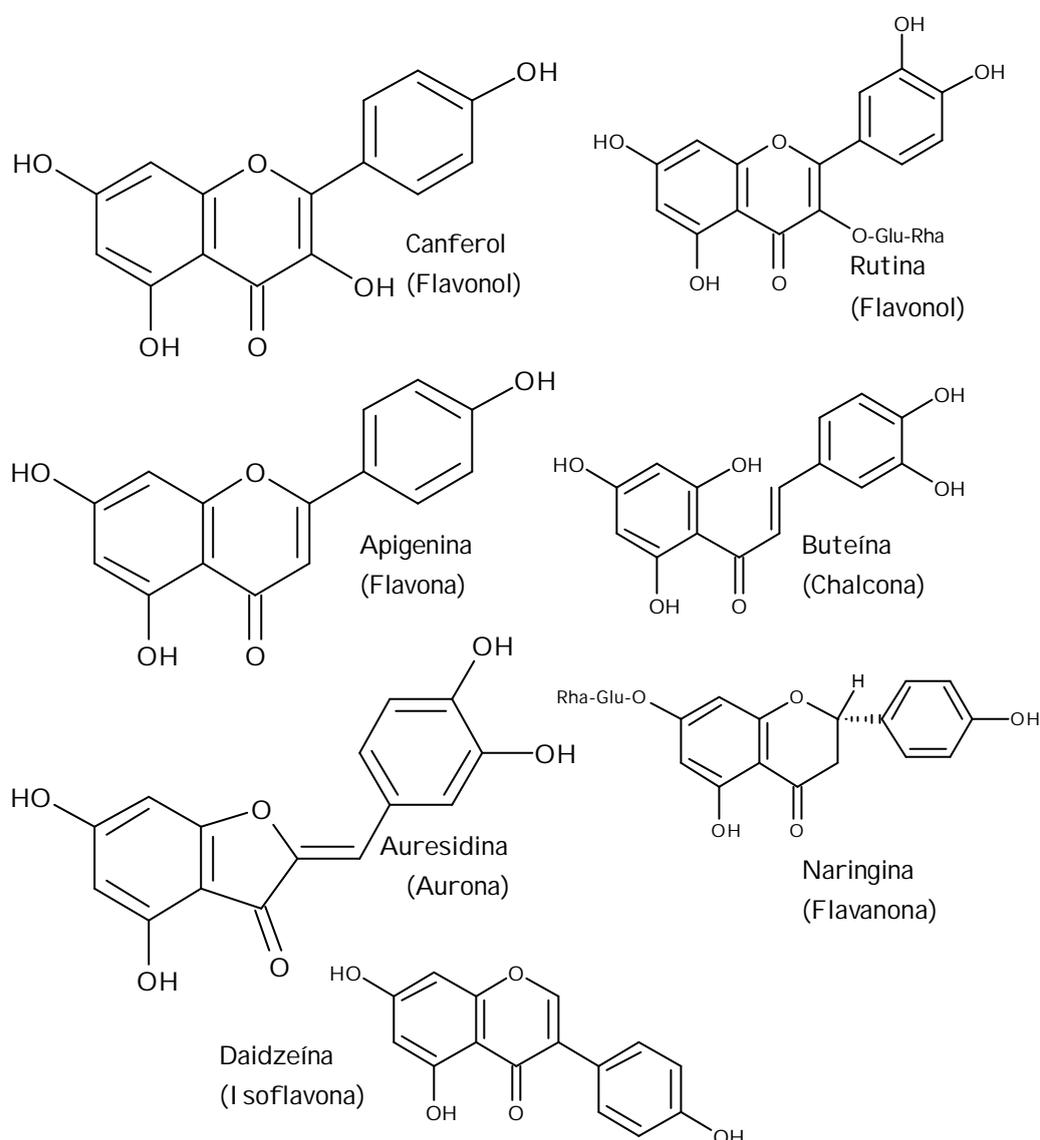


Figura 5: Principais classes de flavonóides.

Xantonas

São compostos fenólicos amarelados presentes apenas em 8 famílias de vegetais, Clusiaceae, Gentianaceae, Polygalaceae, Leguminosae, Lythraceae, Moraceae, Loganiaceae e Rhamnaceae. São largamente distribuídas entre as angiospermas, fungos e samambaias como C-glicosídeos, nas Gentianaceae e Polyganaceae como O-glicosídeos. Estudos mais detalhados têm sido feitos nas Gentianaceae e Clusiaceae (Guttiferae) (HOSTETTMANN & HOSTETTMANN, 1989).

Semelhantes a flavonóides em reação colorimétrica e mobilidade em cromatografia. Apresentam espectro na luz UV bastante característico, com absorção máxima entre 230-245nm, 250-265nm, 305-330nm e 340-400nm (HARBORNE, 1984; HOSTETTMMANN & HOSTETTMMANN, 1989).

São compostos de síntese mista, derivados da via do ácido chiquímico-acetato, apresentando a benzofenona como um dos intermediários de sua síntese.

São responsáveis por várias atividades farmacológicas. Xantonas lipofílicas de *Pserosporum febrifugum* apresentam atividade citotóxica e antitumoral (KUPCHAN *et al.*, 1980). Xantonas de *Hypericum brasiliense* são responsáveis pela atividade antifúngica. SUZUKI *et al.* (1978) descobriram xantonas com tri-substituição, que mostraram forte inibição da enzima MAO, indicando o emprego de xantonas como antidepressivo. Alguns derivados de xantonas mostram atividade mutagênica, que é perdida quando há glicosilação das moléculas. Há também citação de que algumas xantonas têm atividade antiinflamatória e contra tuberculose. A Figura 6 apresenta um núcleo de xantona e uma molécula de xantona presente em *Hypericum*.

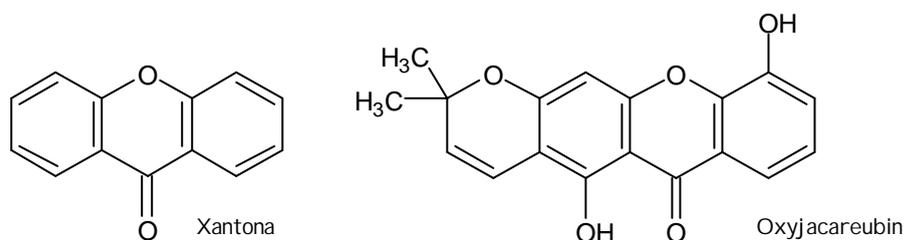


Figura 6: Núcleo de xantona e xantona presente em espécies de *Hypericum*.

1.1.6 Atividades Biológicas do gênero *Hypericum*

Neste gênero destaca-se *Hypericum perforatum*, espécie europeia empregada na medicina popular. É uma planta de hábito herbáceo, perene, nativa da Europa e Ásia, tendo sido introduzida nos Estados Unidos, onde se adaptou muito bem (BARNES *et al.*, 2001).

O hipérico apresenta diversificada atividade biológica. Na medicina popular, destacam-se as atividades sedativa, adstringente, neuralgia, excitabilidade, fibrose, problemas no ciático (BARNES *et al.*, 2001), uso tópico em ferimentos (MUKHERJHEE *et al.*, 2000). As atividades biológicas parecem estar ligadas a moléculas como hipericina e hiperforina (DUKE, 1985) e suas atividades biológicas no sistema nervoso central (OZTURK, 1996; MULLER, 1997). Além das moléculas descritas, outras classes de compostos destacam-se, como as xantonas (ISHIGURO, 1990; ROCHA *et al.*, 1995; HU *et al.* 1999^a; BARNES *et al.*, 2001), flavonóides (SEABRA & ALVES, 1991; BARNES *et al.*, 2001), floroglucínóis (ROCHA *et al.*, 1996; HU *et al.* 1999^b) e antraquinonas (BARNES *et al.*, 2001).

Os estudos farmacológicos têm confirmado diversas utilizações da planta na medicina popular, especialmente a antidepressiva, antimicrobiana, antitumoral e antifúngica (DUKE 1985; VOLAK & STODOLA, 1990). Além das atividades biológicas, o hipérico é utilizado na culinária como flavorizante natural (categoria 5) com limites para teores de hipericina e de xantonas (BARNES *et al.*, 2001).

Estudos realizados com extratos da planta destacam a eficiência desta em relação aos placebos no tratamento de depressão média a moderada. Entretanto ainda são necessários estudos comparativos do extrato da planta em relação às novas drogas com atividade antidepressiva que agem na tomada de serotonina e do efeito da planta no tratamento de longa duração (BARNES *et al.*, 2001).

A atividade antidepressiva foi inicialmente atribuída à presença de hipericina (antraquinona), porém, estudos clínicos e experimentais apontam a hiperforina como composto com atividade antidepressiva. Na realidade até hoje, investigações têm comprovado o efeito desses dois compostos, e há referência de um sinergismo deles com moléculas da

classe dos flavonóides (BARNES *et al.*, 2001). Além disso, xantonas e flavonóides têm grande importância do ponto de vista farmacológico (VIANA *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos vem sendo realizados para esclarecer o mecanismo de ação da hipericina, hiperforina e de compostos da classe dos flavonóides.

SUZUKI *et al.* (1984) descreveram a hipericina como inibidora da monoamino oxidase (MAO), porém estudos posteriores mostraram que a hipericina tratava-se de um inibidor fraco, ou não inibidor de MAO. Além disso, existem indicações de que as concentrações necessárias de hipericina para obtenção de atividade biológica dificilmente seriam atingidas após administração oral de preparados de *Hypericum perforatum* (BARNES *et al.*, 2001).

KHALIFA (2005) verificou que o extrato de *Hypericum perforatum* atua em estruturas diferenciadas, aumentando as concentrações de MAO em diferentes áreas cerebrais, a transmissão dopaminérgica no tálamo e a noradrenérgica no hipocampo e no tronco cerebral, e os níveis de 5-hidróxitriptamina (5-HT) no tronco cerebral, tálamo, córtex e hipocampo.

Hipericina e flavonóides nas concentrações de neuro-transmissores aumentam de forma significativa a atividade da 5-HT no córtex cerebral. Além disso, variações na concentração da mistura de flavonóides hipericina promoveu aumento de noradrenalina do diencéfalo e norepinefrina nas áreas relacionadas à depressão (BARNES *et al.*, 2001).

Estudos de atividade antidepressiva em ratos sugerem uma interação entre 0,3% de hipericina e 3,8% de hiperforina, sendo a atividade antidepressiva relacionada à interação de receptores e ao aumento da transmissão serotoninérgica (BARNES *et al.*, 2001).

Hiperforina pura também se mostrou ativa, porém a atividade é provocada pelo aumento de sódio intracelular em função da troca Na^+/H^+ resultante da queda do pH intracelular, o que provoca a absorção de serotonina (BARNES *et al.*, 2001).

HOSSEINZADEH *et al.* (2004) avaliaram a atividade anticonvulsiva dos extratos aquoso e etanólico de parte aérea de *H. perforatum* e verificaram que a atividade é parcialmente mediada pela via do óxido nítrico e que o extrato apresenta baixa toxicidade.

De acordo com XU *et al.* (2005) extratos de parede celular de *Aspergillus niger* induzem a supressão do óxido nítrico e a biossíntese de ácido jasmônico e hipericina em *Hypericum perforatum*.

FRANKLIN *et al.* (1999) verificaram que a administração de dose única do extrato de hipérico promove aumento nos níveis de hormônio do crescimento e decréscimo nos níveis de prolactina. A concentração de cortisol não foi afetada.

Diversos trabalhos têm analisado o efeito de extratos de *H. perforatum* no tratamento do alcoolismo (PERFUMI *et al.*, 1999; REVZANI *et al.*, 1999; PANOCKA *et al.*, 2000; PERFUMI *et al.*, 2001; PERFUMI *et al.*, 2002; PERFUMI *et al.*, 2003; PERFUMI *et al.*, 2005). Esses estudos realizados em ratos mostraram que extratos de *H. perforatum* cultivados em meio de alto CO₂, e portanto enriquecidos com hiperforina, apresentam atividade inibidora na auto-administração de etanol. Houve queda de 37,2% para doses de 31mg/kg, e 81,8% para doses de 125mg/kg. Essa redução na auto-administração de etanol ocorreu durante uma, duas e até 24 horas após os animais terem tido acesso ao etanol. Apenas com as doses de 7mg/kg não houve inibição na auto-administração de etanol. Nenhum dos tratamentos foi eficiente para períodos superiores a 48 horas (PERFUMI *et al.*, 2005).

Embora os extratos de *H. perforatum* sejam muito utilizados na medicina popular o efeito fototóxico da hipericina é bem conhecido, e mesmo que os níveis de hipericina plasmática estejam abaixo da dose mínima capaz de promover a fotossensibilização, ela pode produzir danos ao DNA, e esses efeitos podem demorar anos para se manifestar (TRAYNOR *et al.*, 2005).

Com relação aos efeitos anti-tumorais de *H. perforatum* KAPSOKALIVAS *et al.*, 2005 em estudos realizados *in vitro*, verificaram que a utilização do extrato não substitui a necessidade de transplante de medula óssea no caso de leucemia, porém representam uma alternativa no tratamento de tumores devido a sua fotoestabilidade, baixa toxicidade e aos custos acessíveis.

Em face das diferentes atividades farmacológicas comprovadas para *H. perforatum* outras espécies de hipérico passaram a ser estudadas. Extratos metanólicos, e infusões. da

parte aérea no período da floração de *Hypericum canariense* e *Hypericum glandulosum* apresentaram atividade antidepressiva em ratos tratados com tetrabenazine e submetidos à teste de nado forçado, porém, não provocaram relaxamento muscular significativo, atividade anticolinérgica e anti-sedativa. Foi verificada uma sutil diminuição na atividade motora dos animais, porém apenas as frações butanólicas de *H. canariense* e clorofórmica de *H. glandulosum* provocaram hipotermia (mantida por seis horas após tratamento) aos animais, ao contrário da clorpromazina que provocou sensível diminuição da atividade motora e acentuada hipotermia (mantida por quatro horas após tratamento). A fração clorofórmica do extrato de *H. glandulosum* apresentou antagonismo significativo contra ptóse induzida por tetrabenazine. Após ingestão oral de 500mg/kg das frações butanólicas e clorofórmicas de ambas as espécies a atividade antidepressiva em teste de nado forçado foi observada sendo a fração clorofórmica de *H. glandulosum* a que apresentou resultado mais significativo (SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2005).

Extratos metanólicos e clorofórmicos de *H. canariense* e *H. glandulosum* apresentaram atividade antibacteriana contra cepas Gram-positivas. Atividade antibacteriana também foi produzida pelos extratos butanólicos de *H. glandulosum* (SÁNCHEZ-MATEO *et al.*, 2005).

Extratos de *H. kazdaghensis* apresentaram forte atividade antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosus* sendo a maior atividade para essas bactérias encontradas no extrato clorofórmico. Para *Escherichia coli* e *Salmonella thyphimurium* o extrato metanólico produziu maior taxa de inibição, e para *Staphylococcus aureus* houve maior taxa de inibição com o extrato acetônico (DULGER & GONUZ, 2005).

GIBBONS *et al.*, (2005) isolaram de *H. foliosum* uma nova molécula de acilfloroglucinol (1,3,5trihidroxi-6-[2''-3''-metilepóxi-3''-metil-butil]-2-[2''-metil-butanoil]-4-[3'-metil-2''-butenil]-benzeno), molécula que mostrou atividade contra uma grande variedade de cepas multiresistentes de *Staphylococcus aureus* com concentração inibitória mínima entre 16 e 32 µg/ml .

TANAKA *et al.*, (2005) isolaram, do extrato metanólico de *Hypericum chinense*, o composto biyouyanagin-A, composto por unidades de sesquiterpeno, spirolactona e

ciclobutano. A Biyouyanagin-A apresenta forte atividade contra HIV, além de inibir a síntese de citocina. *Hypericum connatum* apresentou atividade antiviral contra o vírus da imunodeficiência felina (FIV) (SCHMITT *et al.*, 2001).

Ainda devido ao grande interesse no efeito medicinal de *H. perforatum* vários trabalhos vem sendo realizados sobre o desenvolvimento da espécie e a produção dos compostos ativos.

COUCEIRO *et al.*, 2006 analisaram a variação do teor dos metabólitos secundários de plantas de *H. perforatum* desenvolvidas em campo e em casa de vegetação, e nesta sob duas temperaturas diferentes (25 e 30°C). As taxas de hipericina foram mais altas em 30°C, enquanto as de hiperforina foram mais elevadas em 25°C.

GADZOVZKA, *et al.* (2005) estudaram a micropropagação de explantes de *H. perforatum* visando à produção de hipericina e pseudo-hipericina. Desenvolveram calos em meio MS/B₅ na presença de N⁶-benziladenina (0,1 a 5,0mg.L⁻¹). A regeneração dos ramos foi obtida com auxinas ácido indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (AIB) na concentração de 0,05 a 1,0mg.L⁻¹. O trabalho teve ainda como objetivo verificar o efeito de reguladores de crescimento na produção da hipericina e pseudo-hipericina. Hipericina foi produzida em calos, ramos e plântula. A aplicação de benziladenina (0,1 a 2,0mg.L⁻¹) aumentou a produção de hipericina e pseudo-hipericina nos ramos, porém tal efeito não foi observado nos calos. A administração de AIA não afetou a produção das antraquinonas, porém a disponibilização de AIB no meio cultura promoveu queda nas taxas de hipericina e pseudo-hipericina.

1.1.7 Estudos realizados com espécies brasileiras de *Hypericum*

No Brasil uma das primeiras espécies estudadas foi o *H. brasiliense*. ROCHA *et al.*, 1994; 1995; e 1996 isolaram dos extratos da parte aérea da planta em éter de petróleo, floroglucínóis; dos extratos em diclorometano, á-pirona, xantonas e ácido betulínico; e do extrato em metanol 7 flavonóides. Atividades fungitóxicas e antibacterianas foram comprovadas como ações das xantonas e floroglucínóis. ABREU *et al.*, (2004) estudou nessa

espécie a distribuição dos compostos durante o crescimento da planta, verificando alta concentração de compostos fenólicos na floração e de terpenos na frutificação.

O efeito da variação de fatores ambientais como estresse hídrico (alagamento e seca) e de diferentes temperaturas (altas e baixas) foram analisados visando verificar as alterações na produção de metabólitos secundários em *Hypericum brasiliense*. De modo geral o estresse hídrico aumentou os níveis de todos os metabólitos observados, em especial dos flavonóides, enquanto a variação de temperatura afetou de forma diferenciada os grupos de metabólitos estudados (ABREU & MAZZAFERA, 2005).

Em estudos realizados com *H. brasiliense* no desenvolvimento de células da medula óssea de ratos foi analisado o efeito clastogênico de seus extratos, não tendo sido constatado o efeito genotóxico dessa espécie (ESPÓSITO *et al.*, 2005).

A partir de 1998/1999 várias outras espécies de *Hypericum* da região sul e sudeste do Brasil vêm sendo objeto de investigações. GALLINA (1999) detectou atividade antifúngica de extratos obtidos em éter de petróleo e clorofórmico. Extratos metanólicos mostraram a presença de flavonóides, mas não atividade antifúngica.

Atividade antifúngica também foi verificada no óleo essencial obtido de folhas, e a análise da composição do óleo essencial mostrou α -pineno, mirceno e limoneno como os principais componentes podendo estar relacionados com a atividade antifúngica e antibacteriana vista na espécie.

Ácido filicínico e floroglucínóis derivados desse ácido foram identificados e são responsáveis pelas atividades antimicrobianas das sete espécies estudadas (FERRAZ *et al.*, 2004) e delas apenas *Hypericum ternuum* mostrou atividade antifúngica contra várias espécies, em especial contra *Candida albicans* e *Trychophytonh metagrophytes* e *T. rubrum*, responsáveis pela maioria das infecções em pacientes imunodeficientes (FERNNER *et al.*, 2005).

Hypericum polyanthenum, uma espécie nativa da região sul do Brasil, apresentou atividade antitumoral. FERRAZ *et al.*, (2005) verificaram que os compostos que apresentavam atividade inibitória eram benzopiranos (que são moléculas precursoras das xantonas). O estudo

apontou que a atividade está relacionada à alteração no ciclo celular, promovendo o aumento da fase S da mitose .

Hypericum caprifoliatum, espécie nativa da região sul do Brasil, apresentou atividade antidepressiva em testes de nado forçado, porém este dado não está relacionado à atividade inibidora de MAO. Não há hipericina nessa espécie e os compostos com atividade antidepressiva se encontram no extrato apolar (éter de petróleo), estando, portanto, relacionadas a floroglucínóis, os quais reduziram a mobilidade de ratos em teste de nado forçado. O extrato em ciclohexano apresentou um composto que aumentou a atividade hipotérmica da apomorfina, um resultado inesperado, uma vez que hipotermia induzida por altas doses de antidepressivo, sugere atividade do sistema dopaminérgica na atividade antidepressiva dos extratos de *Hypericum caprifoliatum* (VIANA *et al.*, 2005).

O interesse em se estudar *Hypericum cordatum* surgiu do destaque que vinha tendo na literatura o uso de *Hypericum perforatum*, como antiinflamatória, antibacteriana, antidepressiva; além do número de espécies desse gênero em estudo, nas quais atividades antifúngicas vinham sendo identificadas.

1.2.1 Objetivos Gerais:

Comparar a composição química de caules e folhas de *Hypericum cordatum*.

1.2.2 Objetivos Específicos:

Realizar o isolamento e a identificação de flavonóides nos extratos metanólicos e de compostos fungitóxicos em extratos clorofórmicos.

2. CAPÍTULO 1 - Análise de flavonóides em extratos metanólicos de caules e folhas.

2.1. Introdução

Diversos flavonóides vêm sendo identificados em espécies do gênero *Hypericum* (ROCHA *et al.*, 1995; ABREU *et al.* 2004). A importância desses compostos está relacionada a suas atividades biológicas como antibacteriana, antiinflamatórias, antifúngicas (BARNES, 2001).

Flavonóides são compostos fenólicos de ocorrência bastante comum nos vegetais. São substâncias de baixo peso molecular, produzidas praticamente em todos os órgãos das plantas. Embora presente em outros grupos vegetais, ocorrem mais abundantemente nas Angiospermas (HARBORNE, 1973).

Nos tecidos vegetais, os flavonóides ocorrem de forma conjugada, uma vez que as agliconas fenólicas são presumivelmente tóxicas para as células (HARBORNE, 1979). Formas aglicônicas estão presentes no meio celular externo, como no pó farinhoso dos botões florais de Prímula, e na cera foliar epicuticular de várias espécies (WOLLEMWEBER & DIETZ, 1981). Os processos de glicosilação, metilação e hidroxilação são responsáveis pelas variações estruturais dos flavonóides, além de agirem como fatores detoxificadores (MEARS, 1980).

SILVA *et al.*, (2005) verificaram no extrato etanólico de *H.perforatum* a existência de atividade antioxidante significativa. O fracionamento desses extratos apontou que a fração de flavonóides e, ou ácido cafeoilquínico eram as que apresentavam maior atividade antioxidante, enquanto hipericina e hiperforina não apresentaram atividade antioxidante relevante.

ZOU *et al.*, (2004) estudaram a atividade anticolesterolêmica de frações ricas em flavonóides de *H. perforatum* em ratos Wistar e verificaram diminuição das taxas de colesterol total, triglicérides e lipoproteína da baixa densidade e diminuição da peroxidação de lipídeos e aumento da atividade da enzima antioxidante.

Segundo BARNES *et al.*, (2001) o efeito antidepressivo de *H. perforatum* está relacionado ao sinergismo, ou a alguma relação entre a hipericina, hiperforina e a fração de flavonóides que ocorrem na espécie.

Entretanto, até o momento os estudos químicos e farmacológicos estão ainda voltados para produção e atividade de antraquinonas e do floroglucinol, havendo apenas poucas informações sobre a presença dos flavonóides (CALIE *et al.*, 1983; ROCHA *et al.*, 1996; BARNES *et al.*, 2001).

Os flavonóides tem sido empregados na quimiotaxonomia e já foram identificados em *H. perforatum* e *H. brasiliense*, mas nada foi estudado em *H. cordatum*, espécie nativa do cerrado.

O conhecimento da química de espécies nativas é um aspecto importante em face da biodiversidade do nosso país. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi realizar a análise dos flavonóides dessa espécie.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Materiais:

2.2.1.1. Material vegetal - *Hypericum cordatum* Cordeiro (1702) SP

Hypericum cordatum



(fotos por Mary Esther)

Local das coletas - as plantas foram coletadas em Ibiúna (São Paulo) em campo aberto, na beira da estrada, nas proximidades da Rodovia SP-250, Km 63, às margens da Rua Caieiras.

2.2.1.2. Extratos metanólicos de caules, preparados de materiais coletados em 1999 e 2000.

2.2.1.3. Extratos de folhas, preparados de exemplares coletados em 2004 .

2.2.2 Métodos:

2.2.2.1 Preparo do Material Vegetal

Após coleta, o material foi seco a sombra , à temperatura ambiente, sendo as folhas separadas dos caules, e posteriormente pulverizadas, ficando disponíveis para a extração.

2.2.2.2 Método de extração

Foi feita a extração sequencial de 157g do pó de folhas (ROCHA *et al.*,1994) com éter de petróleo, clorofórmio e metanol. A extração foi realizada em temperatura ambiente, protegida da iluminação.

Após as extrações, os materiais foram filtrados e submetidos à concentração em rota-evaporador.

2.2.2.3 Fracionamento do Extrato Metanólico de folhas e de caules

Os extratos metanólicos de folha e de caule de *Hypericum cordatum*, coleta de 2004 e 1999 e 2000 respectivamente foram submetidos a técnicas de fracionamento utilizadas por ROCHA *et al.* (1994) Figuras 1 e 2.

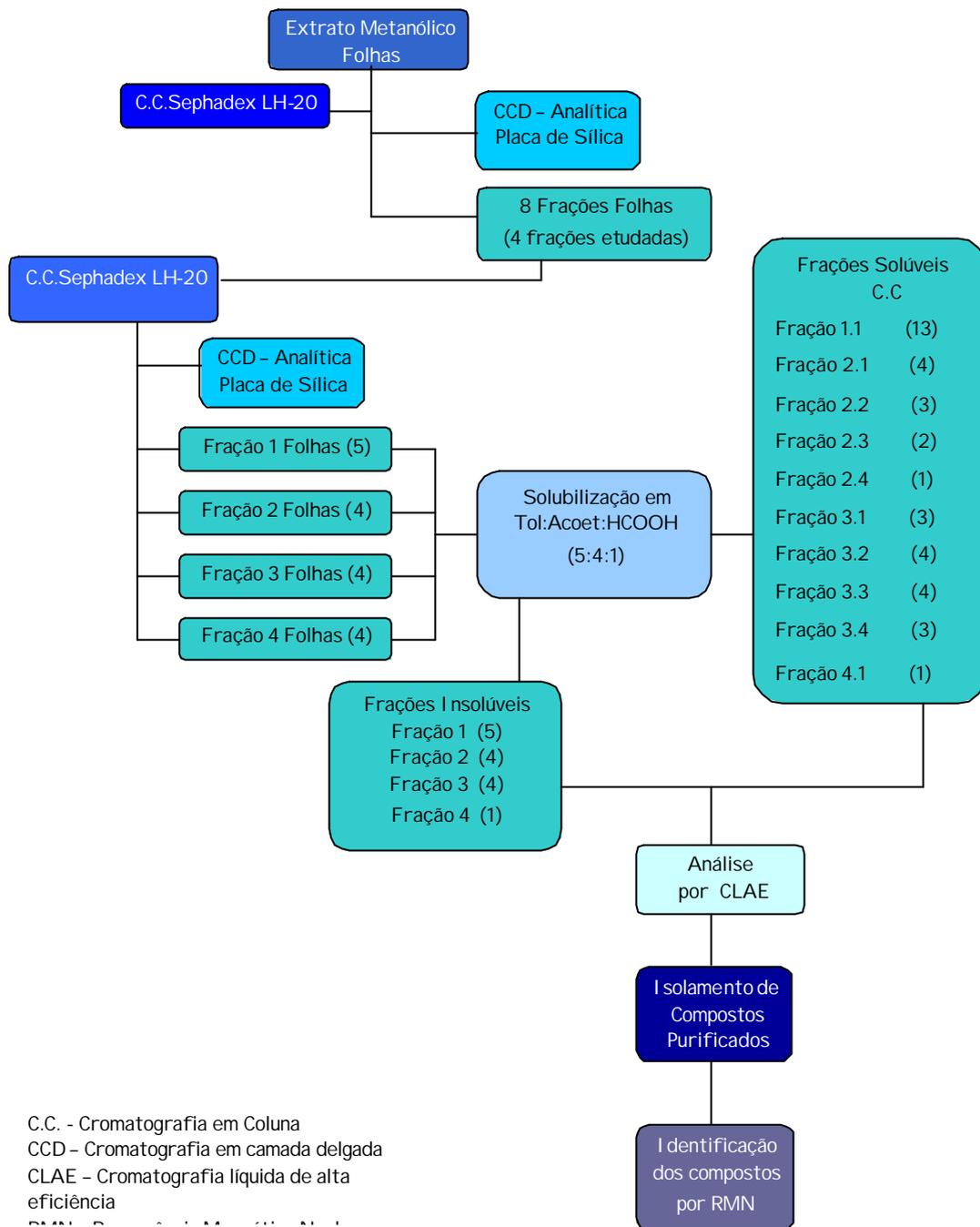


Figura 1: Organograma das técnicas de fracionamento do extrato metanólico de folhas.

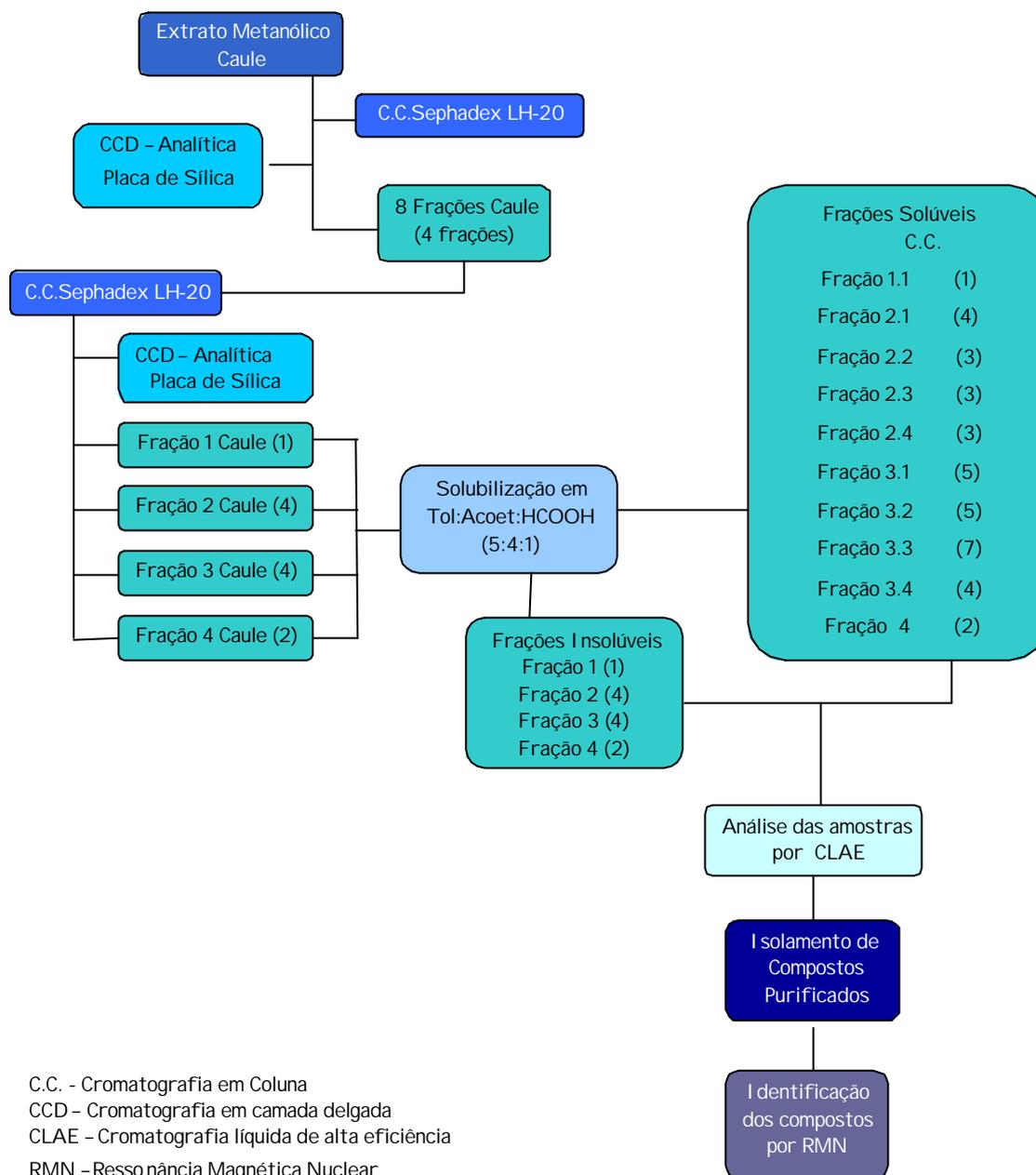


Figura 2: Organograma das técnicas de fracionamento do extrato metanólico de caules.

Os extratos metanólicos de caule (59,67 g) e de folhas (63,91g) foram submetidos à cromatografia em coluna de Sephadex LH 20 (122 g), de 48cm de altura por 4,5cm diâmetro, com volume vazio de 180mL. Utilizou-se como eluente Metanol. Foram coletadas frações de 50mL.

As frações obtidas do extrato metanólico foram submetidas a CCD de sílica e revelação com cloreto de alumínio (AlCl₃), para detecção de flavonóides. As frações 1 a 4, que mostraram a presença dessa classe de compostos foram submetidas a uma nova cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 de 40cm de altura por 2.2cm de diâmetro. Utilizou-se como eluente metanol. O fracionamento foi acompanhado por cromatografia em camada delgada de sílica em cromatoplasas da Merck, utilizando-se como eluente tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1) e revelação com AlCl₃.

As frações obtidas foram novamente submetidas à cromatografia em coluna (40cm de altura por 2.2cm de diâmetro) em Sephadex LH-20 utilizando como eluente metanol. O fracionamento foi acompanhado por CCD e revelação com cloreto de alumínio (AlCl₃) para reunião das amostras com perfil cromatográfico semelhante.

Em seguida as frações reunidas foram dissolvidas em metanol e submetidas à partição, com tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1). A fase inferior (material escuro) que foi denominada fase insolúvel, e a fase superior de coloração clara, que foi denominada de fase solúvel.

2.2.2.4 Análise comparativa das frações obtidas dos extratos de caules e folhas por CCD de sílica:

As frações obtidas dos extratos caulinar e foliar foram submetidas a cromatografias em camada delgada de sílica. Utilizou-se como solventes clorofórmio: metanol 98:2; clorofórmio: metanol 9:1; tolueno: acetato de etila: ácido fórmico – 5:4:1 e butanol: ácido acético: água – 3:1:1. Utilizou-se como padrões xantona (Sigma); floroglucinol (Sigma); e os flavonóides rutina, quercitrina, quercetina, canferol (Sigma) e quercetina-3-sulfato (padrão,

identificado por RMN) obtido por VIEL, 2003. Utilizou-se como revelador AIC₃ e NP-PEG (WAGNER & BLADT, 2001)

2.2.2.5 Análise de compostos sulfatados

Tendo em vista que os compostos insolúveis em tolueno: acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1) saíram da origem com o solvente Butanol : Ácido Acético: Água (3:3:1) utilizado por VIEL, (2003) como um eluente para flavonóides sulfatados, procuramos determinar a presença desse composto em nossas amostras. Para isso as frações da fase insolúvel foram submetidas a hidrólises ácidas e à análise em eletroforese.

2.2.2.5.1 Hidrólise ácida

Dez miligramas das frações da fase insolúvel foram solubilizadas em água ácida com TFA 0.1%, e submetidas à hidrólise com HCl 3.0N à temperatura ambiente, por 30 minutos. Foi realizada também a hidrólise total das frações. Para tanto, dez miligramas das frações insolúveis foram submetidos à hidrólise em HCl 3.0N a 100°C por duas horas (SEABRA & ALVES, 1991).

Em seguida foi feita uma partição com acetato de etila e a fração aquosa foi neutralizada com cloreto de bário 1.5g.

2.2.2.5.2 Eletroforese

As frações insolúveis (100 µg) do extrato de hipérico, ressuspendidas em H₂O com ácido trifluoroacético (TFA) a 0.1% foram aplicadas em papel Whatmann 3mm, de 20.0 cm por 35.0 cm. Utilizou-se tampão (buffer) de pH 2.0 com ácido fórmico: ácido acético: água (3.3mL : 14.7mL : 182.0mL), submetidos a uma tensão de 400V por 30, 60 e 90 minutos, em fonte Bio Rad – Power Pac 3000. Após a eletroforese, o papel foi revelado com vapor de amônio (SEABRA *et al.*, 1991) para detecção de flavonóides sulfatados.

2.2.2.6 Análise das amostras solúveis e insolúveis dos extratos metanólicos de caule e de folhas em CLAE

2.2.2.6.1 Análise em CLAE semipreparativa.

Inicialmente foram selecionadas as amostras 2.3 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha e 3.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule, com as quais foram realizados fracionamento em CLAE escala semipreparativa em cromatógrafo Dionex equipado com detector de arranjo de diodo (DAD), essa etapa do trabalho teve como intuito separar compostos com espectro na luz ultravioleta semelhante ao de flavonóides.

Utilizou-se coluna semipreparativa RP-18, fluxo de 2.0mL min⁻¹. Na Tabela-1 está descrito o gradiente utilizado nas análise. Foram injetados 2.0mL das amostras na concentração 2.0 mg mL⁻¹. A detecção foi feita a 250nm.

Tabela-1: Gradiente utilizado para avaliação do perfil cromatográfico das frações de *H. cordatum*.

Tempo (minutos)	Acetonitrila 0,1% Ácido Trifluoracético	Água 0,1% Ácido Trifluoracético	Metanol
0 a 5	5%	95%	-
6 a 10	10%	90%	-
11 a 20	20%	80%	-
21 a 40	60%	40%	-
41 a 43	-	100%	-
44 a 46	-	-	100%

2.2.2.6.2 Análise em CLAE analítica

As análises em escala analítica foram realizadas em cromatógrafo Varian e Dionex. Utilizou-se coluna de sílica RP-18 com fluxo 2.0 mL min⁻¹ (o fluxo foi mantido para comparação dos perfis cromatográficos em escala analítica e semipreparativa). Utilizou-se o gradiente descrito na Tabela 1. Foram injetados 20µL das amostras na concentração de 1.0mg mL⁻¹ e a detecção foi feita em 250nm.

2.2.2.7 Identificação dos compostos isolados

Os compostos isolados nas análises em CLAE semipreparativa foram encaminhados para identificação química por métodos espectrométricos. As análises estão sendo realizadas pelo Dr. João H. G. Lago do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

2.3 Resultados

2.3.1 Detecção de flavonóides nos extratos metanólicos de folha e caule

Os extratos brutos de folhas e caules em metanol produziram oito frações. Destas apenas as frações 1, 2, 3 e 4 dos extratos de caules e de folhas, foram analisadas por cromatografia em placa de sílica e CLAE, devido à grande quantidade de compostos visíveis na luz ultravioleta, e do rendimento obtido para cada uma.

As Figuras 3 a 8 apresentam o resultado das análises em CCD com todas as frações obtidas de caules e folhas. O rendimento das frações, os R_fs dos compostos e a sua coloração na fluorescência na luz ultravioleta após a revelação com NP-PEG estão nas tabelas 2 a 6.

A presença de flavonóides foi observada na maioria das frações obtidas de caule e folhas uma vez que compostos verdes, amarelos ou alaranjados estão presentes. Observou-se compostos de fluorescência azulada, antes e depois da revelação com NP-PEG, que indicam a presença de compostos fenólicos.

A Figura 3 apresenta o perfil cromatográfico das frações das fases solúveis 1.1C e 1.1.1F a 1.4.1F, e a Tabela 2 o rendimento dessas frações, e os Rfs dos compostos obtidos na revelação com NP-PEG e observação na luz UV (250nm).

A comparação de Rf e coloração indicou a presença de quercetina na fração 1.3.1F. Compostos fenólicos foram detectados nos Rfs 0,95 e 0,90 em caules e folhas. Compostos com coloração azul (Rf 0,90) foram detectados em frações de folhas e caule.

A Figura 4 apresenta o perfil cromatográfico das frações 2.1.1F a 2.1.4F da fase solúvel do extrato metanólico de folhas e as frações 2.1.1C a 2.4.3C da fase solúvel do extrato metanólico de caule. Os Rfs de cada um dos compostos, assim como suas colorações na luz ultravioleta (250nm) após revelação com NP-PEG são encontradas na Tabela 3.

A Figura 5 apresenta o perfil cromatográfico das frações das fases solúveis 3.1.1F a 3.2.4F do extrato metanólico de folhas e das frações 3.1.1C a 3.2.7C do extrato metanólico de caule. Os Rfs de cada um dos compostos, assim como sua coloração na luz ultravioleta (250nm) após revelação com NP-PEG são encontrados na Tabela 4.

A Figura 6 apresenta o perfil cromatográfico das frações das fases solúveis 3.3.1F a 3.4.3F do extrato metanólico de folhas, e das frações 3.3.1C a 3.4.4C do extrato metanólico de caule. Os Rfs de cada um dos compostos, assim como sua coloração na luz ultravioleta (250nm) após revelação com NP-PEG é encontrada na Tabela 5.

A Figura 7 apresenta o perfil cromatográfico da fração da fase solúvel 4.1.1F do extrato metanólico de folhas, e das frações 4.1.1C e 4.1.2C do extrato metanólico de caule. Os Rfs de cada um dos compostos, assim como sua coloração no ultravioleta (250nm) após revelação com NP-PEG são encontrados na Tabela 6.

A Figura 8 apresenta o perfil cromatográfico das frações das fases insolúveis 1.1F a fração 4.2F do extrato metanólico de folhas, e das frações 1.1C a 4.2C do extrato metanólico de caule. Utilizou-se como eluente Butanol: Ácido Acético: Água (3:1:1), sendo a placa revelada com NP-PEG.

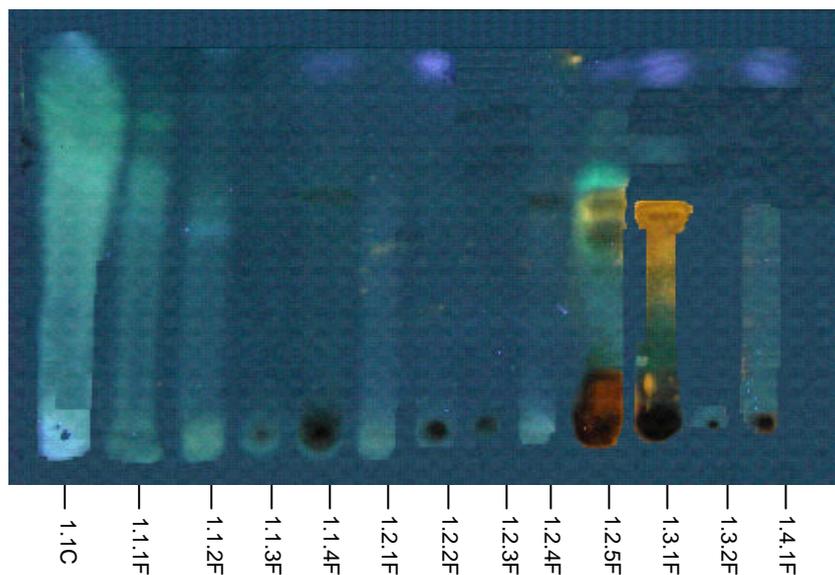


Figura 3: Cromatografia em camada delgada das frações da fase solúvel 1.1C e 1.1.1F a 1.4.2F. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

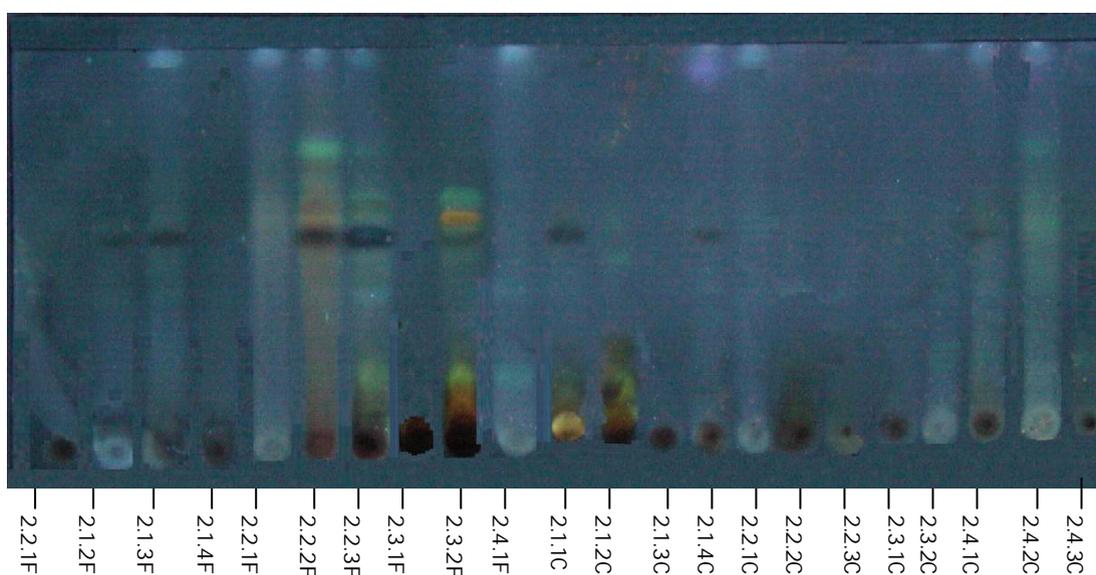


Figura 4 Cromatografia em camada delgada das frações da fase solúvel 2.1.1F a 2.4.1F e 2.1.1C a 2.4.3C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

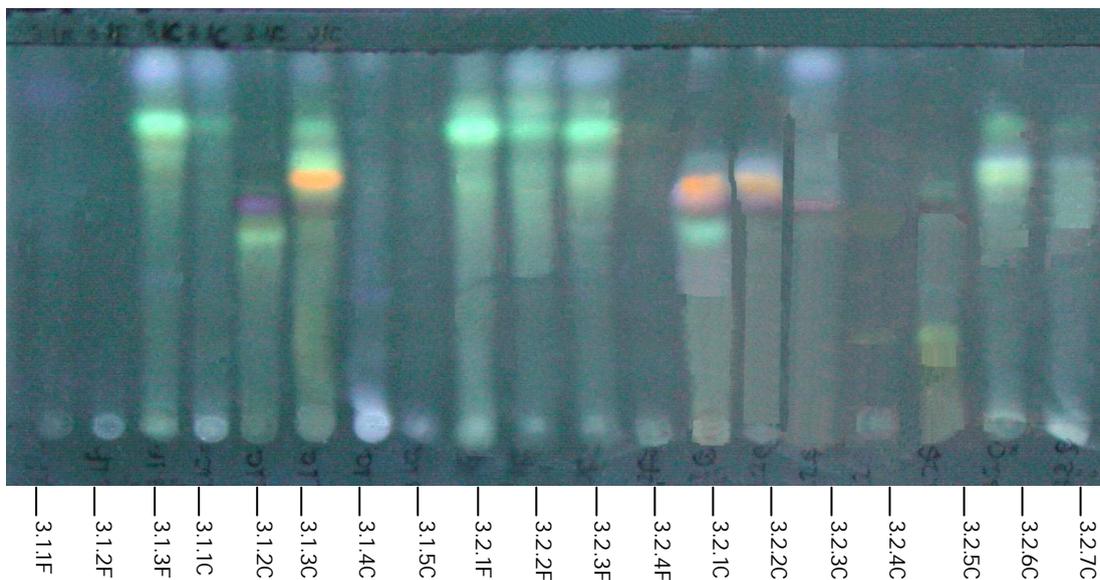


Figura 5: Cromatografia em camada delgada das frações da fase solúvel 3.1.1F a 3.2.4F e 3.1.1C a 3.2.7C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

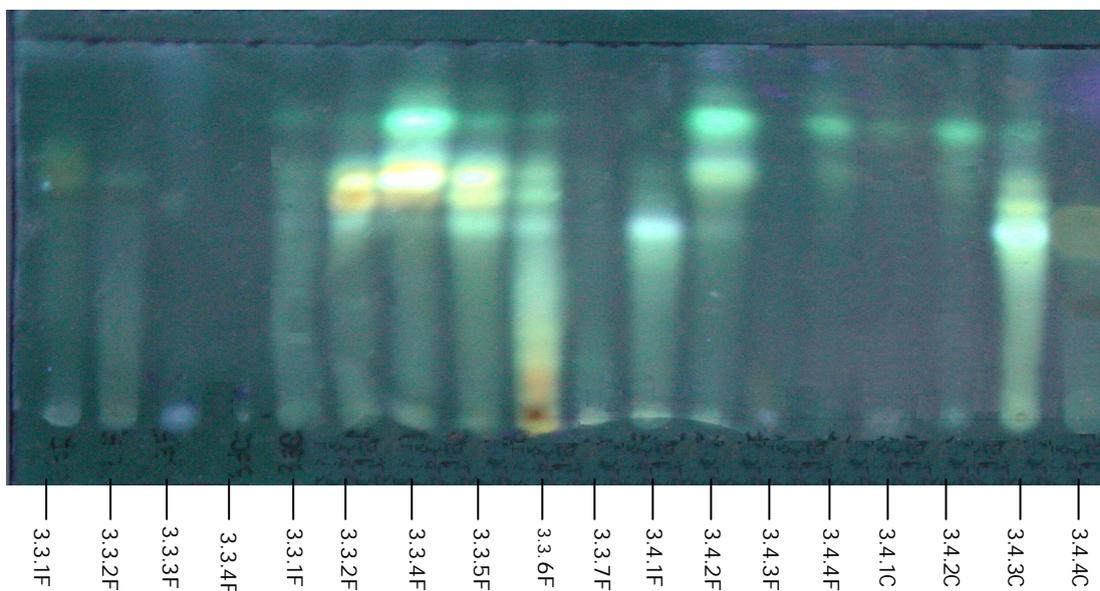


Figura 6: Cromatografia em camada delgada das frações da fase solúvel 3.3.1F a 3.4.3F e 3.3.1C a 3.4.4C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm



Figura 7: Cromatografia em camada delgada das frações da fase solúvel 4.1F e 4.1C e 4.2C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

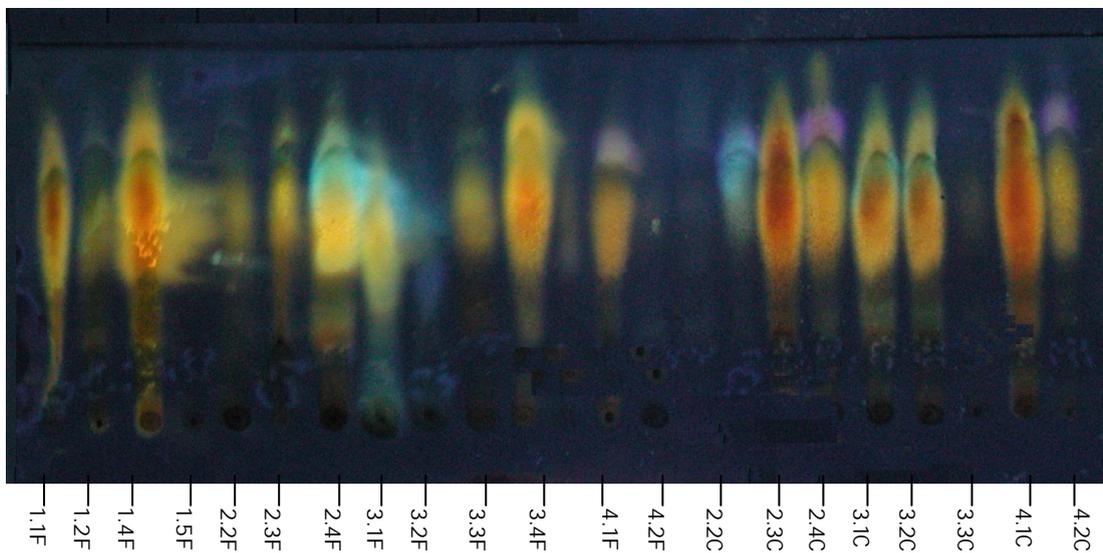


Figura 8: Cromatografia em camada delgada das frações da fase insolúvel 1.1F a 4.2F e 2.2C a 4.2C. Eluente: Butanol: Ácido Acético: Água (3:1:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

Tabela 2: Rfs dos compostos das frações solúveis 1.1.1F a 1.4.1F. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

Amostra	Rendimento (mg)	Revelador NP-PEG UV longo
1.1C	6,0	Rastro esverdeado até Rf 0.90
1.1.1F	28,6	Origem azul; 0.51 (azul); 0.62 (verde); 0.78 (verde)
1.1.2F	53,3	Origem verde; 0.51 (azul); 0.60 (verde)
1.1.3F	88,5	Origem verde
1.1.4F	13,2	Origem escura; 0.71 (escuro); 0.90 (azul)
1.2.1F	89,7	Origem verde; 0.50 (verde)
1.2.2F	12,2	Origem escura; 0.90 (azul)
1.2.3F	20,2	Origem escura; 0.68 (escuro); 0.75 (escuro)
1.2.4F	48,9	Origem verde; 0.57 (verde)
1.2.5F	48,1	Origem escura; 0.11 (marrom-avermelhado); 0.18 (verde); 0.54 (amarelo); 0.61 (verde); 0.90 (azul)
1.3.1F	11,9	Origem escura; 0.11 (escuro); 0.28 (verde); 0.54 (amarelo); 0.90 (azul)
1.3.2F	67,8	Origem verde
1.4.1F	4,1	Origem escura; 0.90 (azul)

Tabela 3: Rfs dos compostos da fase solúvel das frações 2.1.1F a 2.4.1F e 2.1.1C a 2.4.3C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG Observação na luz ultravioleta 250nm

Amostra	Rendimento (mg)	Revelador NP-PEG UV longo
2.1.1F	12,5	Origem escura; 0.21 (escuro)
2.1.2F	13,5	Origem azul; 0.10 (escuro); 0.52 (escuro)
2.1.3F	16,9	Origem escura; 0.10 (escuro); 0.52 (escuro); 0.90 (azul)
2.1.4F	32,4	Origem escura
2.2.1F	5,7	Origem verde; 0.54 (verde); 0.90 (azul)
2.2.2F	80,4	Origem escura; 0.50(escuro); 0.54 (alaranjado); 0.71 (verde); 0.90 (azul)
2.2.3F	19,3	Origem escura; 0.20 (verde); 0.45 (verde); 0.58 (verde); 0.90 (azul)
2.3.1F	34,3	Origem escura
2.3.2F	17,6	Origem escura; 0.11 (marrom-avermelhado); 0.20 (verde) 0.52 (escuro); 0.57 (alaranjado); 0.60 (verde)
2.4.1F	16,8	Origem azul; 0.19 (azul); 0.90 (azul)
2.1.1C	66,5	Origem amarela; 0.14 (verde); 0.50 (escuro)
2.1.2C	124,4	Origem escura; 0.14 (verde); 0.21 (verde); 0.42 (verde)
2.1.3C	35,6	Origem escura
2.1.4C	13,1	Origem escura; 0.50 (escuro); 0.90 (azul)
2.2.1C	21,8	Origem azul; 0.90 (azul)
2.2.2C	3,7	Origem escura; 0.14 (escuro)
2.2.3C	91,2	Origem escura
2.3.1C	3,9	Origem escura; 0.90 (azul)
2.3.2C	115,6	Origem azul; 0.90 (azul)
2.4.1C	9,3	Origem escura; 0.52 (escuro); 0.90 (azul)
2.4.2C	14,8	Origem azul; 0.52 (verde); 0.67 (verde); 0.90 (azul)
2.4.3C	10,4	Origem escura; 0,45 (esverdeado); 0.90 (azul)

Tabela 4: Rfs dos compostos da fase solúvel das frações 3.1.1F a 3.2.4F e 3.1.1C a 3.2.7C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

Amostra	Rendimento (mg)	Revelador NP-PEG UV longo
3.1.1f	2,0	Origem clara; 0.85 (azul)
3.1.2f	23,8	Origem azul
3.1.3f	1.6	Origem azul; 0.37 (azul); 0.54 (verde); 0.74 (verde); 0.90 (azul)
3.1.1c	4.3	Origem azul; 0.74 (verde); 0.90(azul)
3.1.2c	2.3	Origem azul; 0.47 (verde); 0.57 (roxo)
3.1.3c	2.1	Origem verde; 0.57 (roxo); 0.61 (laranja); 0.64 (verde); 0.74 (verde); 0.90 (azul)
3.1.4c	1.1	Origem azul; 0.90 (azul)
3.1.5c	1.8	Origem azul
3.2.1f	0,8	Origem azul; 0.61 (verde); 0.74 (verde); 0.80 (verde); 0.90 (azul)
3.2.2f	1.3	Origem clara; 0.61 (verde); 0.74 (verde); 0.80 (verde); 0.90 (azul)
3.2.3f	0,7	Origem clara; 0.61 (verde); 0.74 (verde); 0.80 (verde); 0.90 (azul)
3.2.4f	1,8	Origem clara
3.2.1c	11.3	Origem clara; 0.40 (claro); 0.50 (verde); 0.57 (roxo); 0.61 (laranja); 0.67 (azul); 0.90 (azul)
3.2.2c	2.8	0.57 (roxo); 0.61 (laranja); 0.67 (azul)
3.2.3c	2.1	0.57 (roxo); 0.80 (azul); 0.90 (azul)
3.2.4c	1.8	Origem clara; 0.25 (verde)
3.2.5c	6.5	Origem verde; 0.25 (verde); 0.57 (escuro)
3.2.6c	3.0	Origem clara; 0.61 (verde); 0.74 (verde)
3.2.7c	2.2	Origem verde; 0.74 (verde)

Tabela-5: Rfs dos compostos das frações solúveis 3.3.1F a 3.4.4F e 3.3.1C a 3.4.4C. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Revelador: NP-PEG. Observação na luz ultravioleta 250nm.

Amostra	Peso (mg)	Revelador NP-PEG UV longo
3.3.1f	1.3	Origem azul; 0.63 (verde)
3.3.2f	2.8	Origem verde; 0.62 (verde)
3.3.3f	0.9	Origem azul; 0.55 (verde)
3.3.4f	1.0	Origem clara
3.3.1c	6.5	Origem verde; 0.25 (verde); 0.42 (verde); 0.52 (verde); 0.64 (verde); 0.78 (verde)
3.3.2c	3.0	Origem verde; 0.42 (verde); 0.52 (verde); 0.57 (amarelo); 0.61 (branco); 0.78 (verde)
3.3.4c	2.2	Origem verde; 0.42 (verde); 0.52 (verde); 0.57 (amarelo); 0.61 (branco); 0.78 (verde)
3.3.5c	0.8	Origem verde; 0.42 (verde); 0.52 (verde); 0.57 (amarelo); 0.61 (branco); 0.78 (verde)
3.3.6c	5.3	Origem amarela; 0.42 (verde); 0.52 (verde); 0.57 (amarelo); 0.61 (branco); 0.78 (verde)
3.3.7c	3.2	Origem verde
3.4.1f	24.9	Origem verde; 0.40 (verde); 0.50 (azul); 0.57 (verde)
3.4.2f	3.0	Origem verde; 0.48 (verde); 0.61 (amarelo esverdeado); 0.74 (verde); 0.90 (azul)
3.4.3f	1.9	Origem azul; 0.90 (azul)
3.4.4f	0,8	0.64 (verde); 0.74 (verde); 0.90 (azul)
3.4.1c	3.6	Origem verde; 0.74 (verde)
3.4.2c	3.2	Origem verde; 0.60 (verde); 0.74 (verde)
3.4.3c	2.5	Origem amarelada; 0.45 (amarelado); 0.50 (azul); 0.57 (azul); 0.74 (verde)
3.4.4c	1.1	Origem verde; 0.52 (verde amarelado); 0.90 (azul)

Tabela 6: Rfs dos compostos das frações solúveis 4.1C, 4.2C e 4.1F, coloração no UV longo após revelação com NP-PEG. Eluente: Tolueno: Acetato de Etila: Ácido Fórmico (5:4:1). Observação na luz UV 250nm.

Amostra	Peso (mg)	Revelador NP-PEG UV longo
4.1c	10.2	Origem laranja; 0.14 (verde); 0.21 (verde); 0.28 (verde); 0.41 (verde); 0.54 (laranja)
4.2c	11.8	Origem laranja; 0.14 (verde); 0.21 (verde); 0.28 (laranja); 0.38 (verde) ; 0.41 (verde); 0.54 (laranja); 0.61 (verde); 0.71 (verde); 0.90 (azul)
4.1f	13.2	Origem verde; 0.50 (azul); 0.54 (verde); 0.61 (verde); 0.71 (verde); 0.77 (verde); 0.90 (azul)

2.3.2 Detecção de flavonóides sulfatados.

As frações obtidas dos extratos de caule e de folhas de *H. cordatum* não mostraram a presença de quercetina, ou de outros compostos sulfatados nas análises realizadas por hidrólise ácida ou eletroforese.

2.3.3 Perfil cromatográfico e espectro na região do ultravioleta das frações insolúveis do extrato metanólico 2.3 de folha e 3.2 caule submetidas a CLAE-DAD em escala semipreparativa.

A fração 2.3 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência em escala semipreparativa em cromatógrafo equipado com detector de arranjo de diodo. A Figura 9 apresenta o perfil cromatográfico da fração. Foram coletados os compostos com TR 8.1 minutos, TR 10.8 minutos, TR 15.6 minutos e TR 18.3 minutos, por apresentarem espectro na luz ultravioleta semelhante ao de flavonóides.

A Figura 10 apresenta o espectro na luz ultravioleta do composto com tempo de retenção 36.4 minutos, presente na fração da fase insolúvel 2.3 do extrato de folha, comparado ao espectro ultravioleta do padrão de quercetina.

A Figura 11 apresenta os espectros na luz ultravioleta de compostos presentes no perfil cromatográfico obtido. Os compostos com tempo de retenção 8.0, 10.8 e 15.6 minutos apresentam espectros na região do ultravioleta característico para compostos fenólicos, enquanto os compostos 18.3, 19.7, 26.6, 32.9, 36.4, 36.7 e 40.7 minutos apresentam espectro característico de flavonóides.

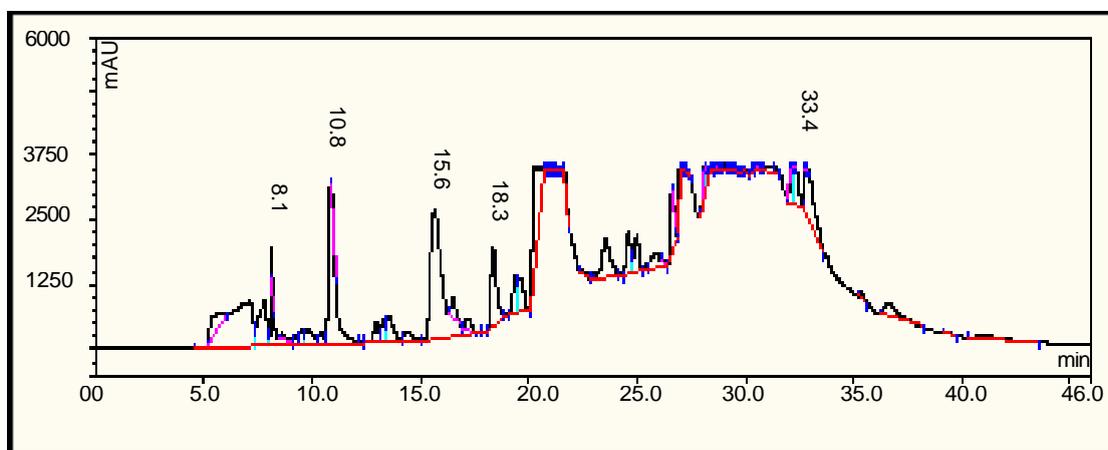


Figura 9: Perfil cromatográfico da fração da fase solúvel 2.3 do extrato de folhas no cromatógrafo Dionex equipado com detector de arranjo de diodo (DAD), com coluna semipreparativa.

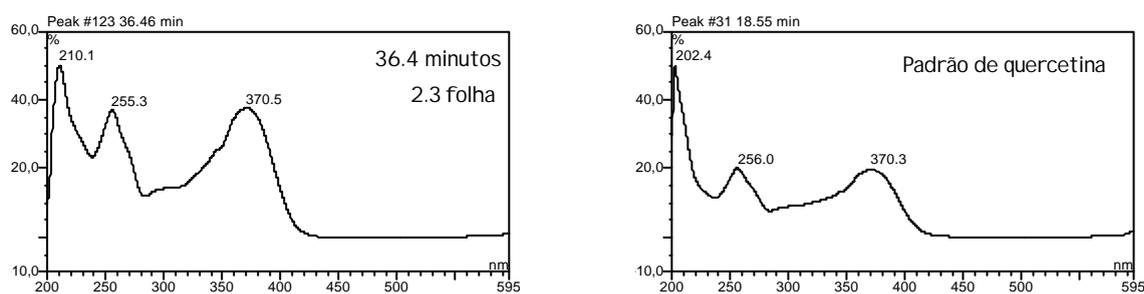


Figura 10: Comparação do espectro do composto 36.4 minutos da fração da fase insolúvel 2.3 do extrato metanólico de folha (CLAE-DAD em coluna semipreparativa) com o espectro do padrão de quercetina (CLAE-DAD em coluna analítica).

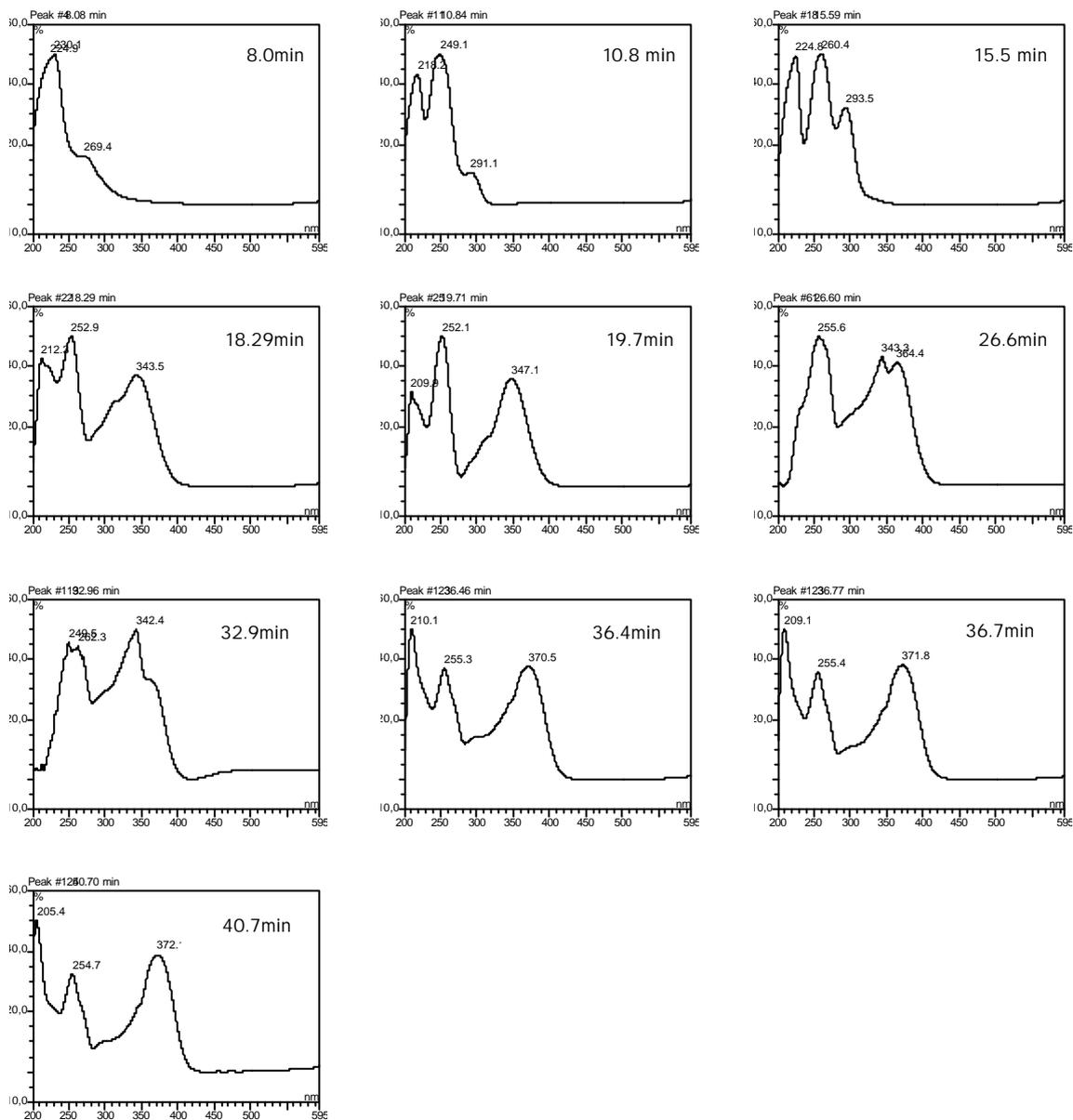


Figura 11: Espectro na luz ultravioleta de alguns dos compostos da fração da fase solúvel 2.3 do extrato de folhas.

A Figura 12 apresenta o perfil cromatográfico em escala semipreparativa da fração 3.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Destacam-se os compostos com tempo de retenção 10.3 minutos, 17.3 minutos, 22.3 minutos, 29.1 minutos, 29.6 minutos, 33.5 minutos e 34.1 minutos, os quais foram coletados e enviados para análise por ressonância magnética nuclear.

A Figura 13 apresenta a comparação dos espectros na região do ultravioleta dos composto de tempo de retenção 33.5 minutos e do padrão de quercitrina obtidos por CLAE-DAD.

A Figura 14 mostra os espectros na luz ultravioleta obtidos nas análises realizadas com a fração 3.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Os compostos com tempo de retenção 5.7, 10.2, 17.1 e 26.9 minutos apresentam espectro na região do ultravioleta semelhante ao espectro de compostos fenólicos, e os compostos com tempo de retenção 28.2, 29.0, 30.3, 32.9, 33.5, 34.2 e 34.4 minutos apresentam espectro na região do ultravioleta característico de flavonóides.

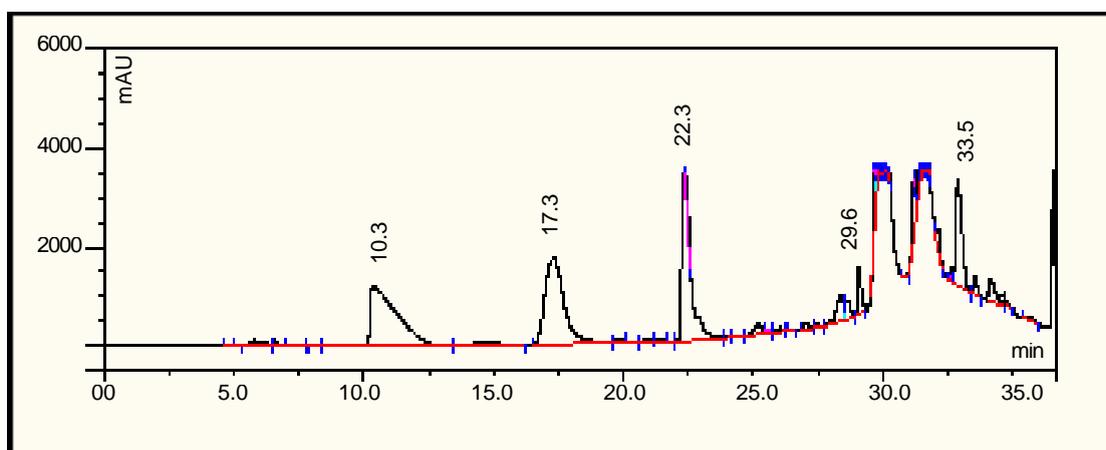


Figura 12: Perfil cromatográfico da fase insolúvel da fração 3.2 do extrato de caule em cromatografia líquida de alta eficiência em cromatógrafo Dionex com coluna semipreparativa, equipado com detector de arranjo de diodo (DAD).

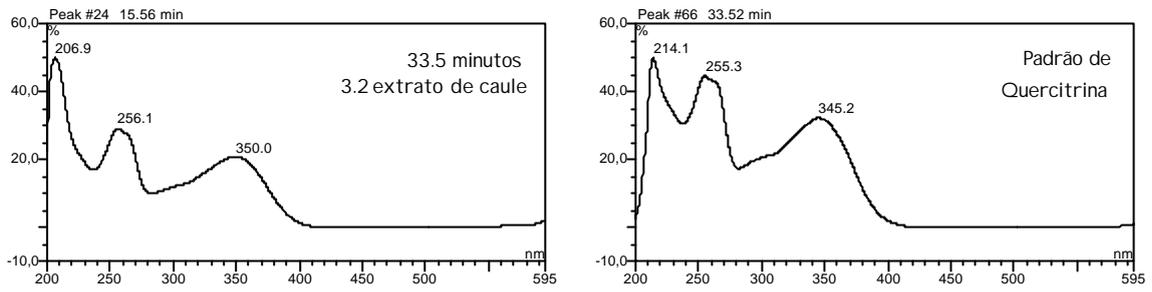


Figura 13: Comparação do espectro do composto 33.5 minutos da fração da fase insolúvel 3.2 do extrato metanólico de caule (CLAE-DAD em coluna semipreparativa) com o espectro na região do ultravioleta de quercitrina (CLAE-DAD em coluna analítica).

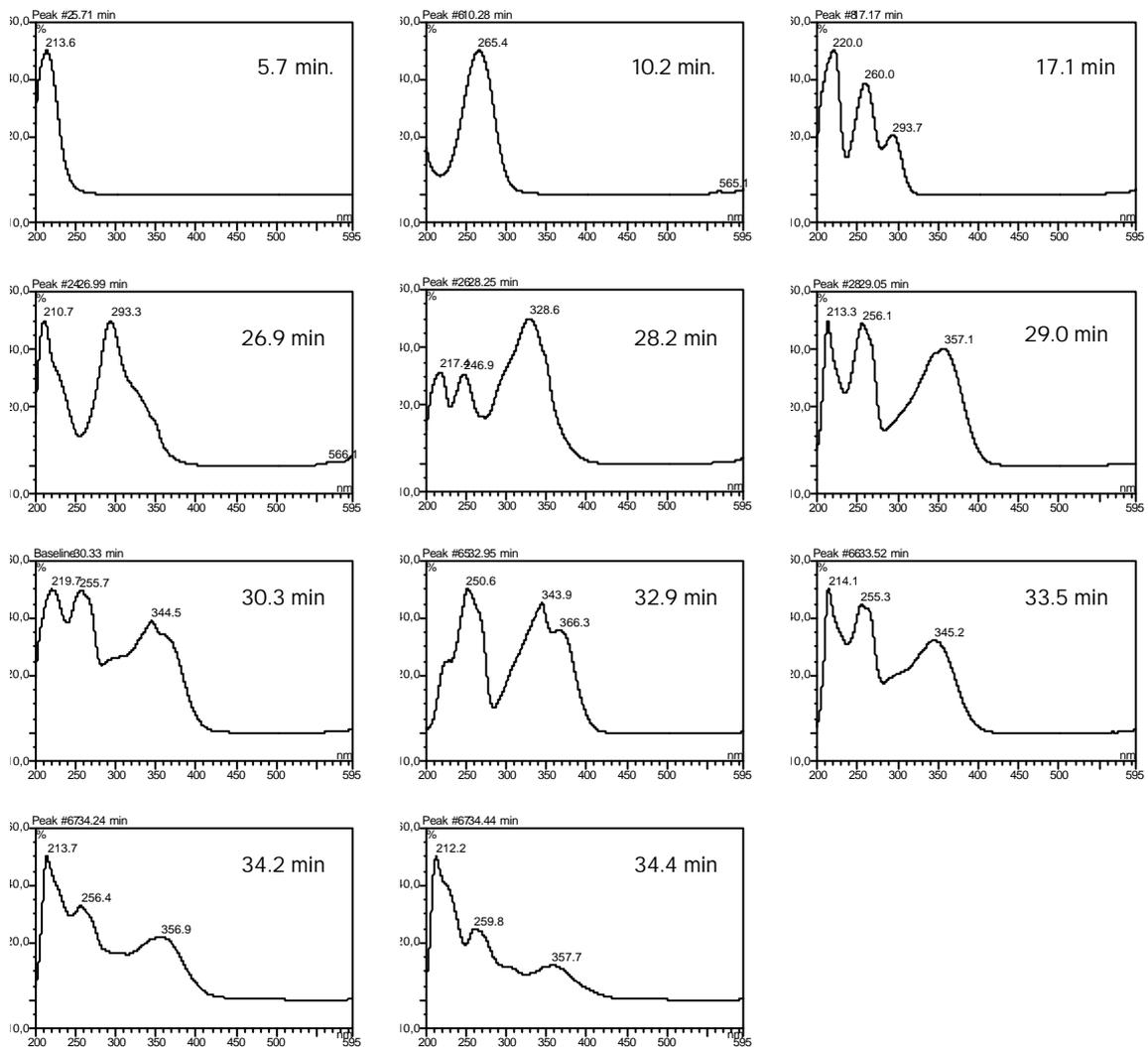


Figura 14: Espectro UV de alguns compostos presentes na fração 3.2 do extrato de caule da fase insolúvel.

2.3.4 Perfil cromatográfico das frações insolúveis do extrato metanólico de caules e folhas submetidas a CLAE em escala analítica.

As Figuras 15 a 18 apresentam os perfis cromatográficos das frações da fase insolúvel do extrato metanólico de caule por CLAE em escala analítica. A Tabela 7 a porcentagem dos compostos presentes nas diferentes frações.

A figura 15 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 2.3 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Nessa fração destacam-se os picos com tempos de retenção 3.6, 5.7 e 8.9 minutos.

A figura 15 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 2.4 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Nessa fração destacam-se dois picos de maior porcentagem nos tempos de retenção 3.5 e 15.8 minutos.

A Figura 16 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Nessa fração destaca-se o pico com tempo de retenção 3.9 minutos.

A Figura 16 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Nessa fração, destacam-se dois picos com tempos de retenção 4.0 e 9.8 minutos.

A Figura 17 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.3 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Destacam-se os compostos com tempo de retenção 14.1 e 14.5 minutos.

A Figura 17 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Destacam-se os compostos com tempo de retenção 3.7, 14.5 e 17.4 minutos.

Na Figura 18 B observa-se o perfil cromatográfico da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Nessa fração destacam-se três picos, com tempo de retenção 4.4, 14.6 e 17.3 minutos.

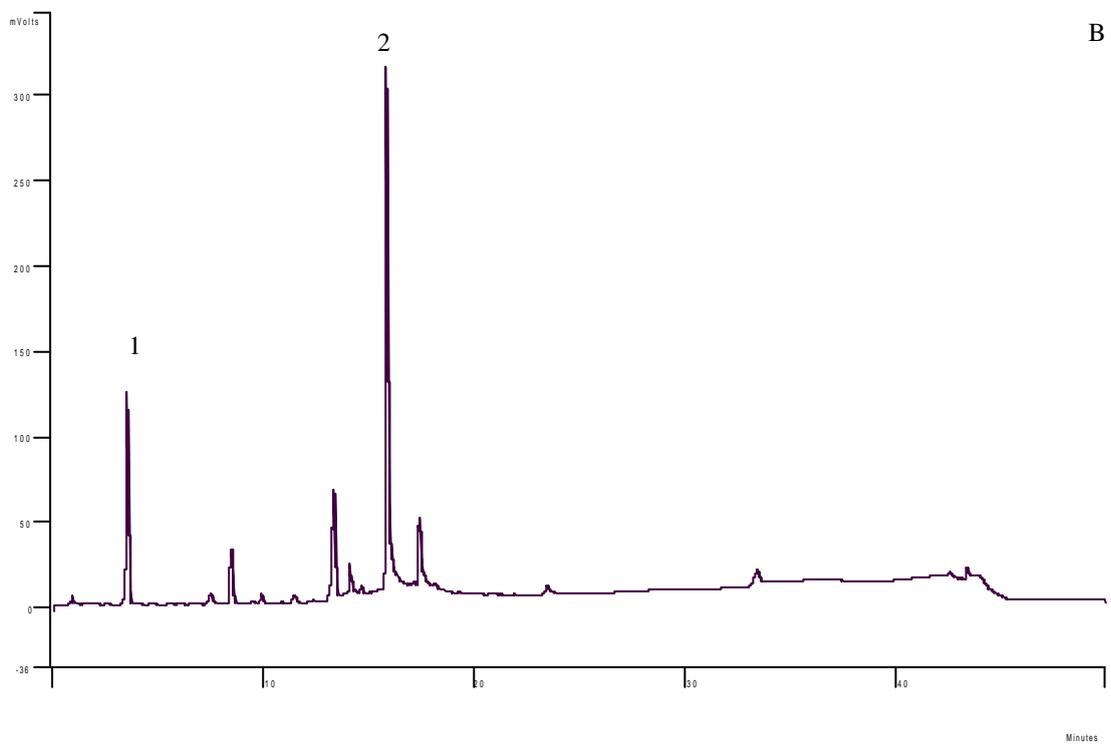
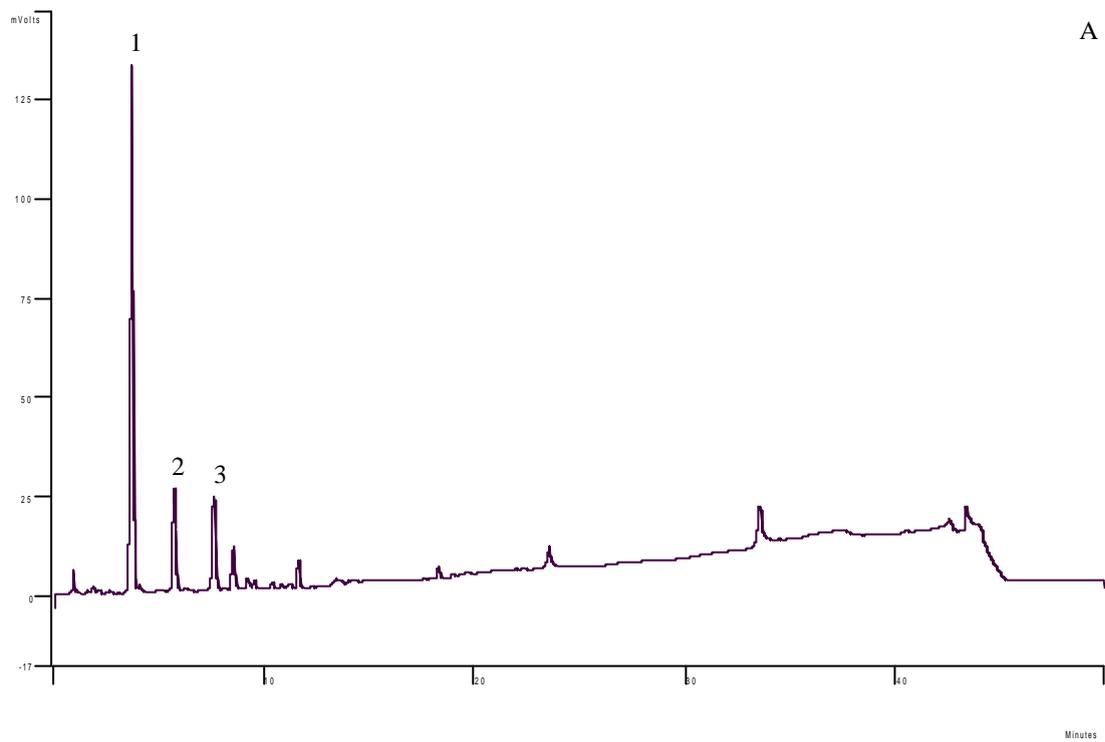


Figura 15: Perfil cromatográfico das frações 2.3 (A) e 2.4 (B) da fase insolúvel do extrato metanólico de caule por CLAE escala analítica no comprimento de onda 250nm.

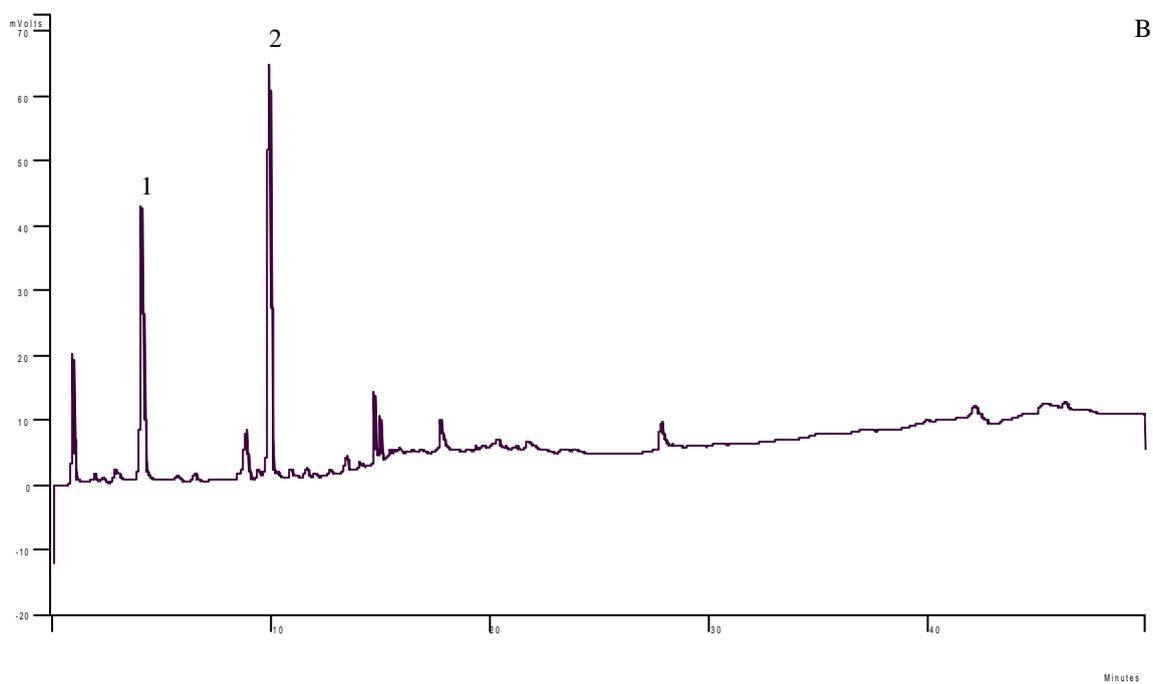
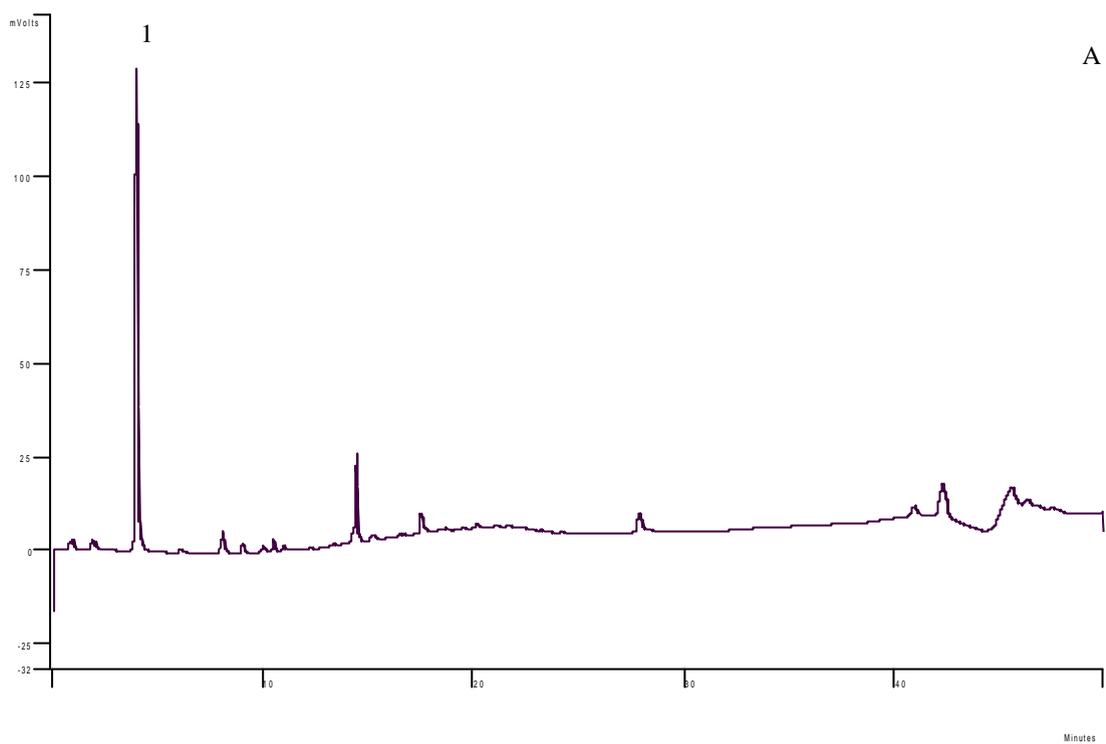


Figura 16: Perfil cromatográfico das frações 3.1 (A) e 3.2 (B) da fase insolúvel do extrato metanólico de caule por CLAE escala analítica no comprimento de onda 250nm.

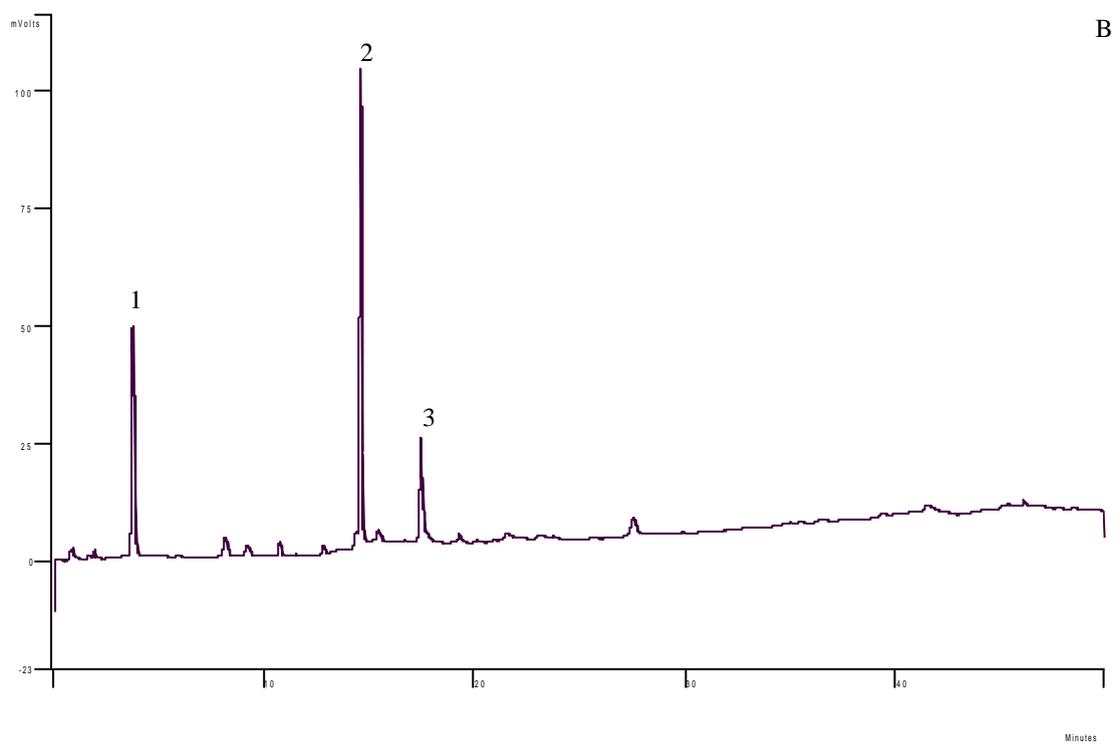
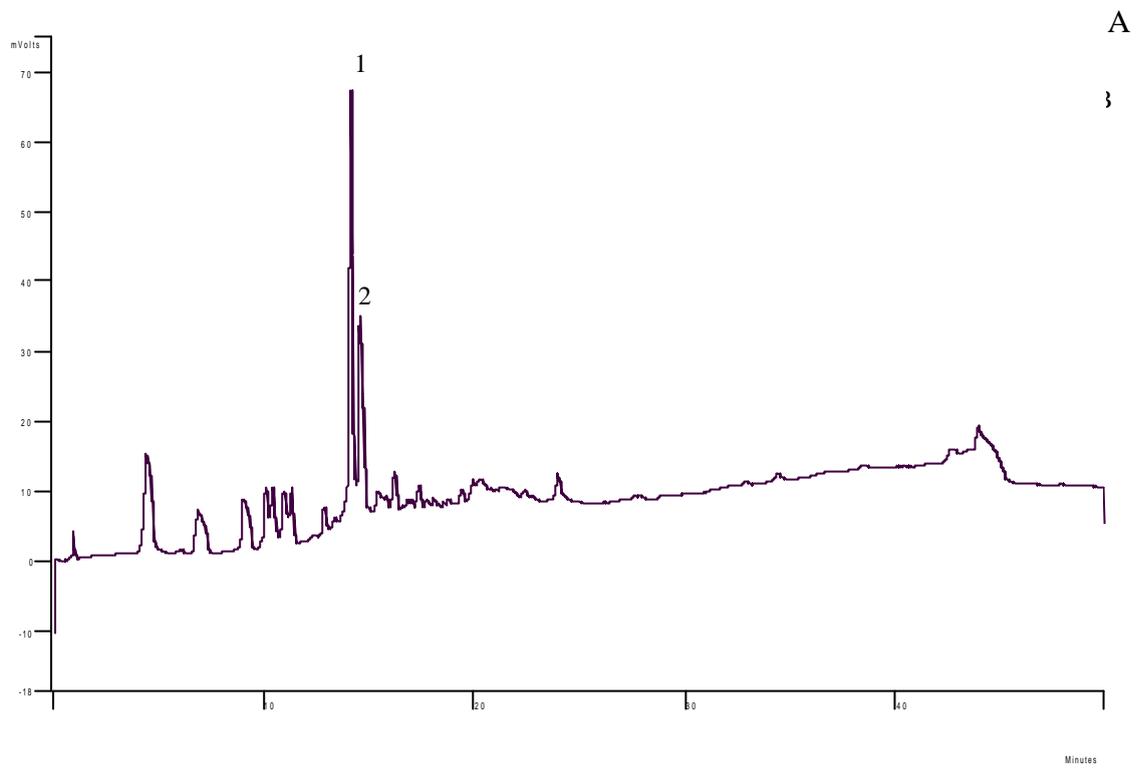


Figura 17: Perfil cromatográfico das frações 3.3 (A) e 4.1(B) da fase insolúvel do extrato metanólico de caule por CLAE escala analítica no comprimento de onda 250nm.

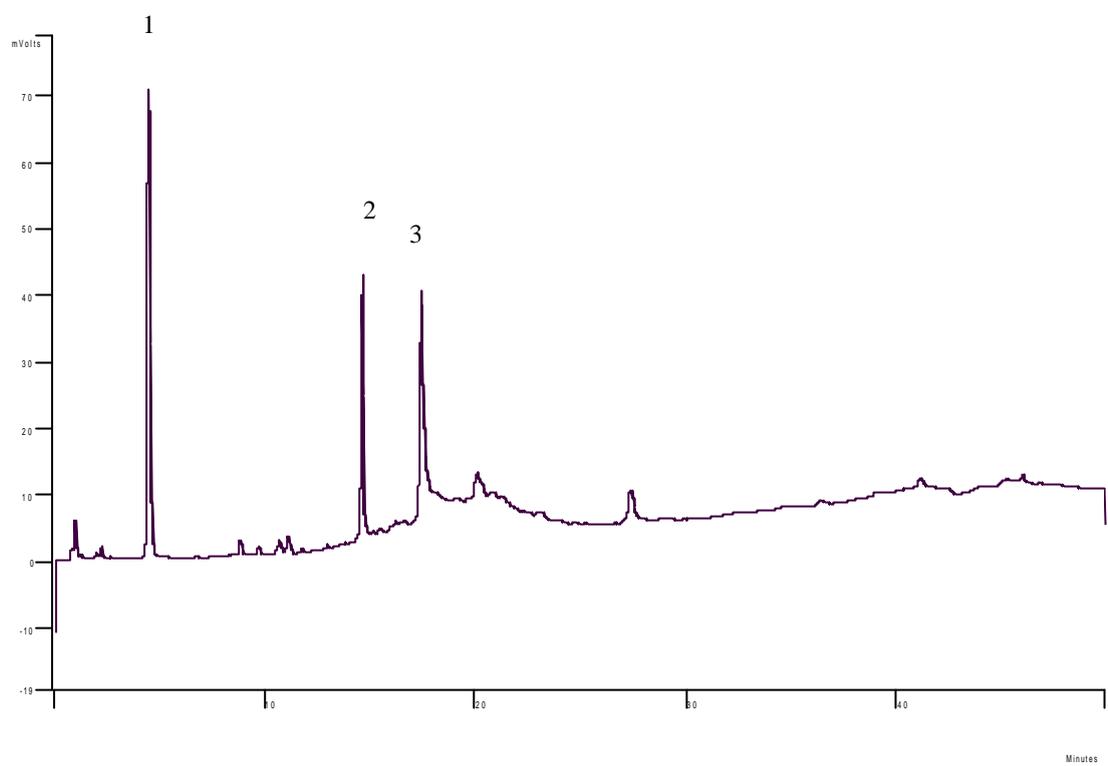


Figura 18: Perfil cromatográfico da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule por CLAE escala analítica no comprimento de onda 250nm.

Tabela 7: Tempo de retenção e porcentagem dos compostos das frações da fase insolúvel do extrato metanólico de caule.

Fração	Pico	Tempo de Retenção (min)	Porcentagem (%)
2.3	1	3.6	7.36
2.3	2	5.7	2.40
2.3	3	8.9	2.09
2.4	1	3.5	6.69
2.4	2	8.4	2.06
2.4	3	13.3	4.70
2.4	4	15.8	20.79
2.4	5	17.3	3.02
3.1	1	3.9	11.80
3.1	2	14.4	2.50
3.2	1	4.0	10.35
3.2	2	9.8	14.43
3.3	1	14.1	7.95
3.3	2	14.5	5.02
4.1	1	3.7	14.85
4.1	2	14.5	28.34
4.1	3	17.4	10.13
4.2	1	4.4	12.99
4.2	2	14.6	11.02
4.2	3	17.3	13.17

As Figuras 19 a 23 apresentam o perfil cromatográfico das frações da fase insolúvel do extrato metanólico de folha por CLAE em escala analítica. A Tabela 8 apresenta a porcentagem dos compostos de cada fração.

A Figura 19 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 1.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de folhas. Nessa fração destacam-se dois picos, com tempos de retenção 13.6 e 16.2 minutos.

A Figura 19 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 1.4 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração destaca-se o composto com tempo de retenção de 3.2 minutos.

A Figura 20 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 2.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração destacam-se os compostos com tempo de retenção 0.8 e 42.6 minutos.

A Figura 20 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 2.3 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração destacam-se os compostos com tempo de retenção 13.6 e 42.6 minutos.

A Figura 21 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 2.4 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração cinco picos com tempos de retenção 9.2, 13.5, 13.7, 14.4 e 42.6 minutos.

A Figura 21 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração destacam-se o composto com tempo de retenção 33.9 minutos.

A Figura 22 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Nessa fração destacam-se os compostos com tempo de retenção 0.8 e 42.6 minutos.

A Figura 22 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.3 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração destacam-se os compostos com tempo de retenção 3.5, 13.1, 16.1 e 42.6 minutos.

A Figura 23 A apresenta o perfil cromatográfico da fração 3.4 da fase insolúvel do extrato metanólico de folha. Nessa fração destacam-se os picos com tempo de retenção 13.8 e 14.3 minutos.

A Figura 23 B apresenta o perfil cromatográfico da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de folhas. Nessa fração destacam-se três compostos, com tempos de retenção 4.2, 13.7 e 42.6 minutos.

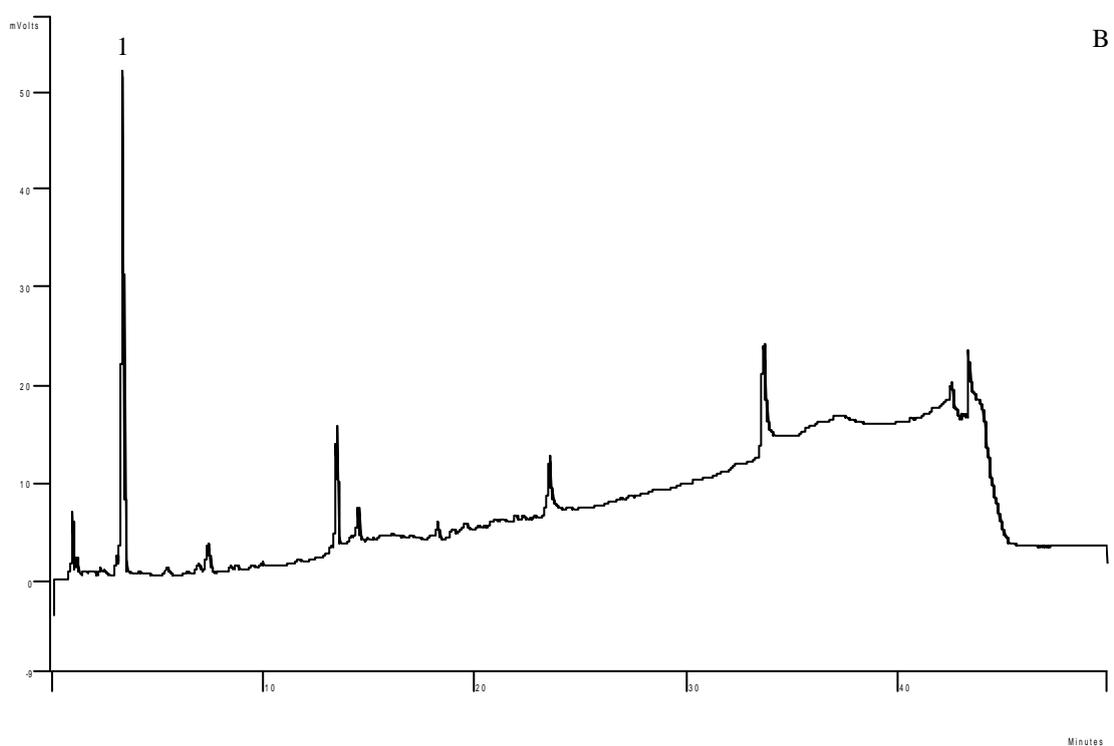
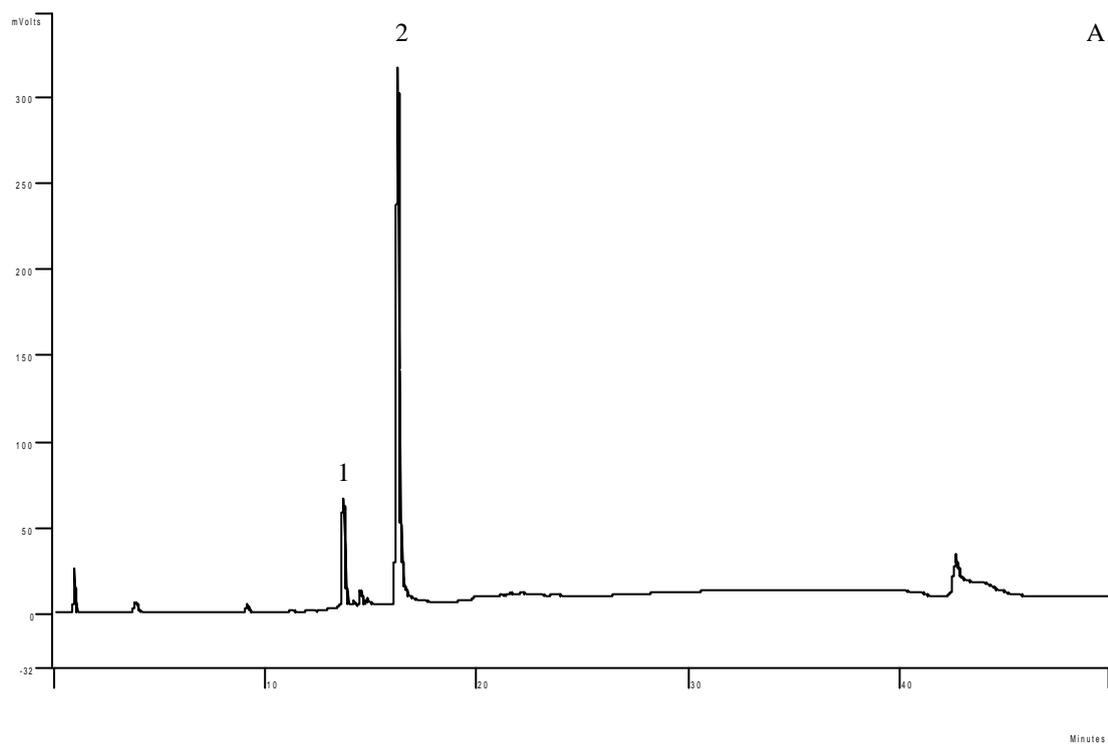


Figura 19: Perfis cromatográficos das frações 1.1 (A) e 1.4 (B) das frações insolúveis do extrato metanólico de folha.

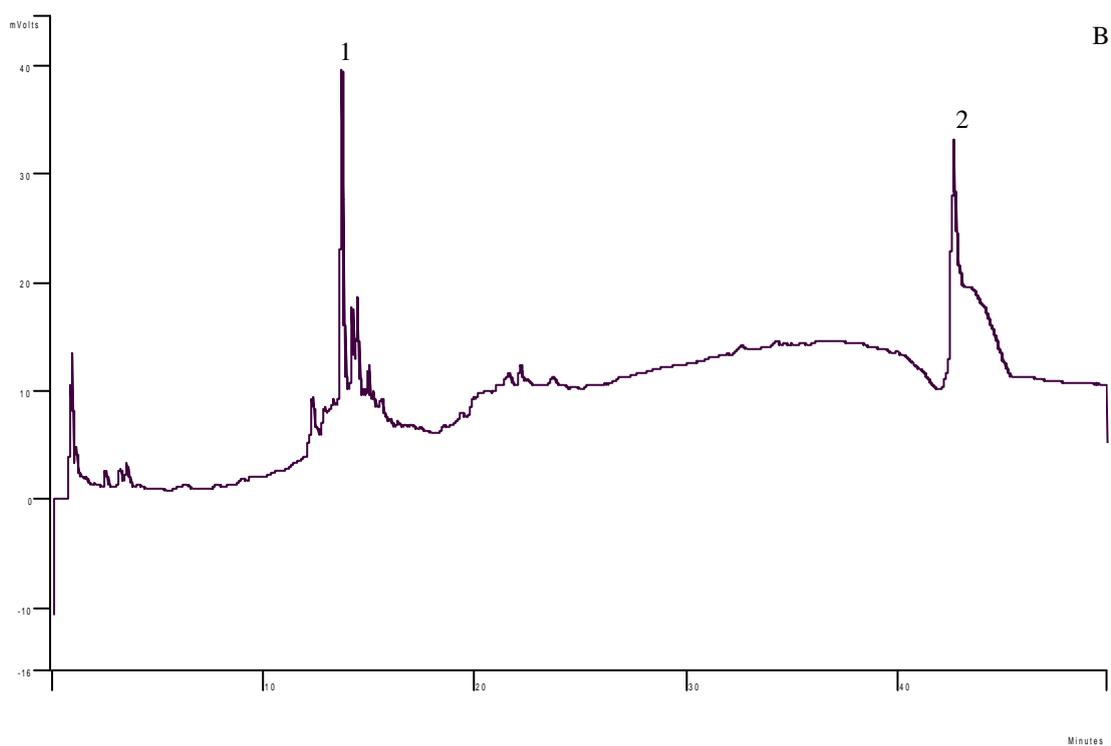
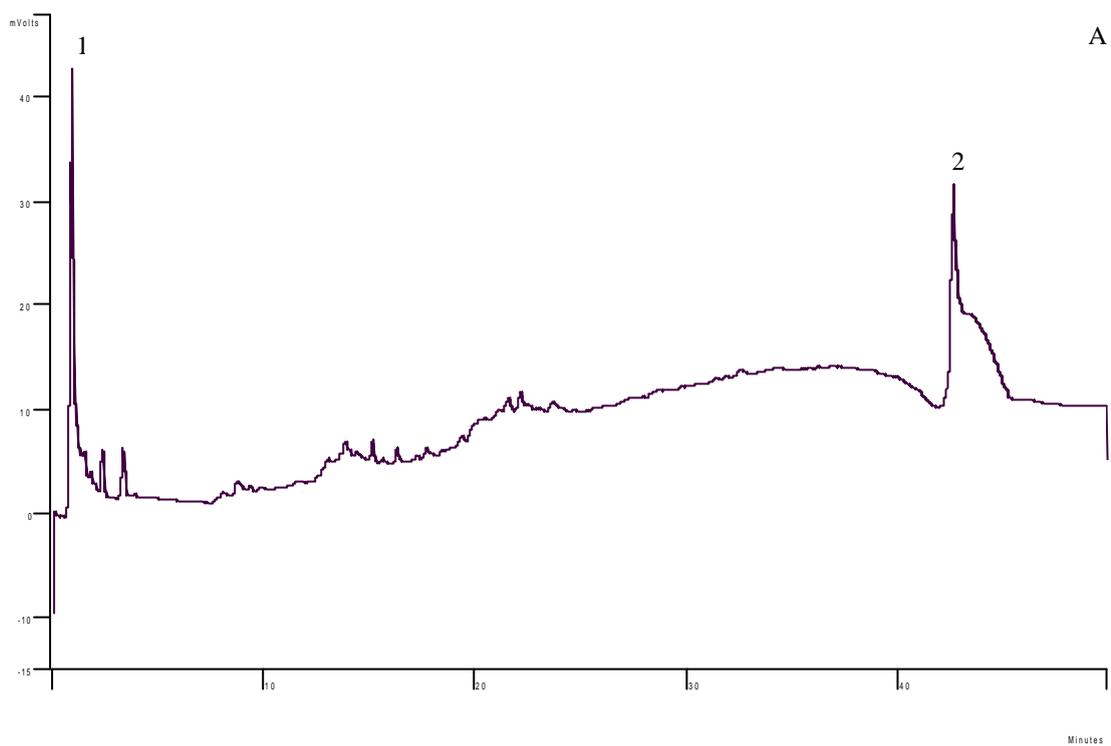


Figura 20: Perfis cromatográficos das frações 2.2 (A) e 2.3 (B) das frações insolúveis do extrato metanólico de folha.

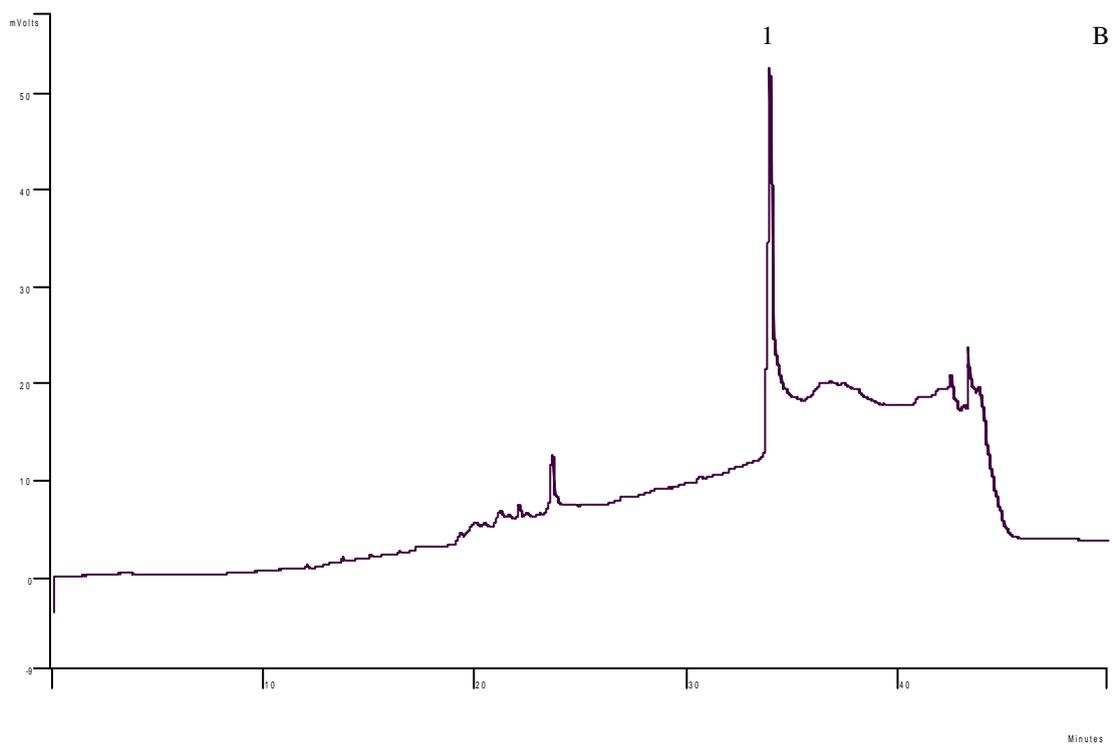
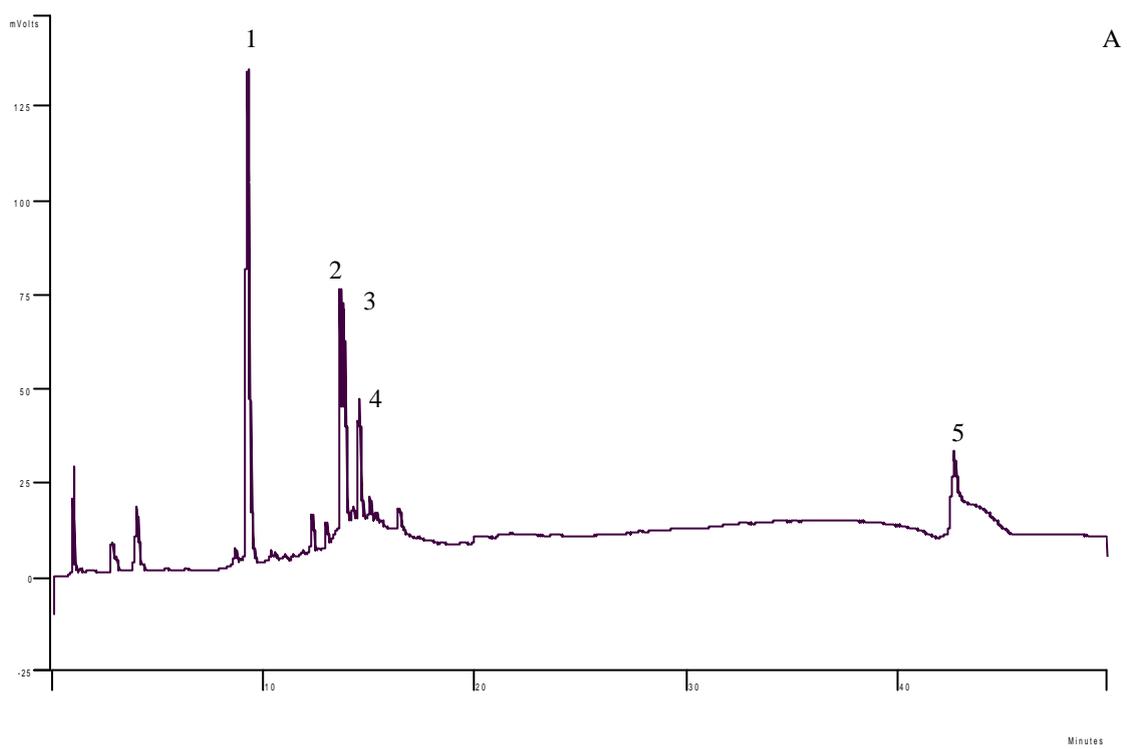


Figura 21: Perfis cromatográficos das frações 2.4 (A) e 3.1 (B) das frações insolúveis do extrato metanólico de folha.

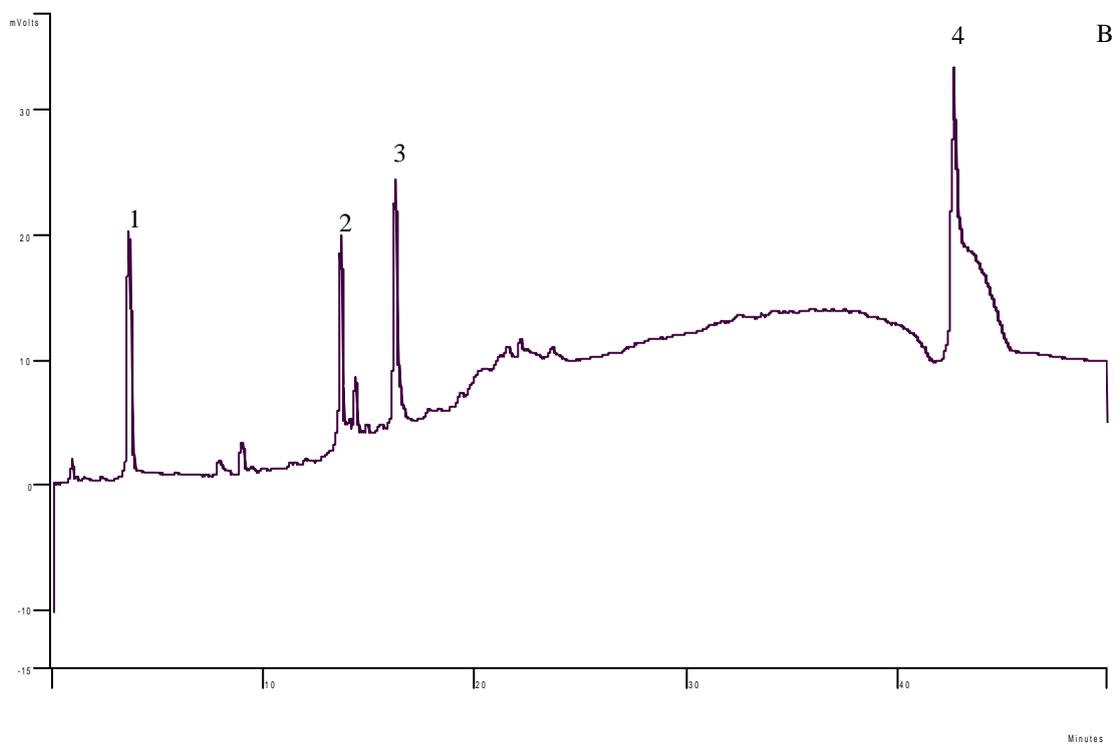
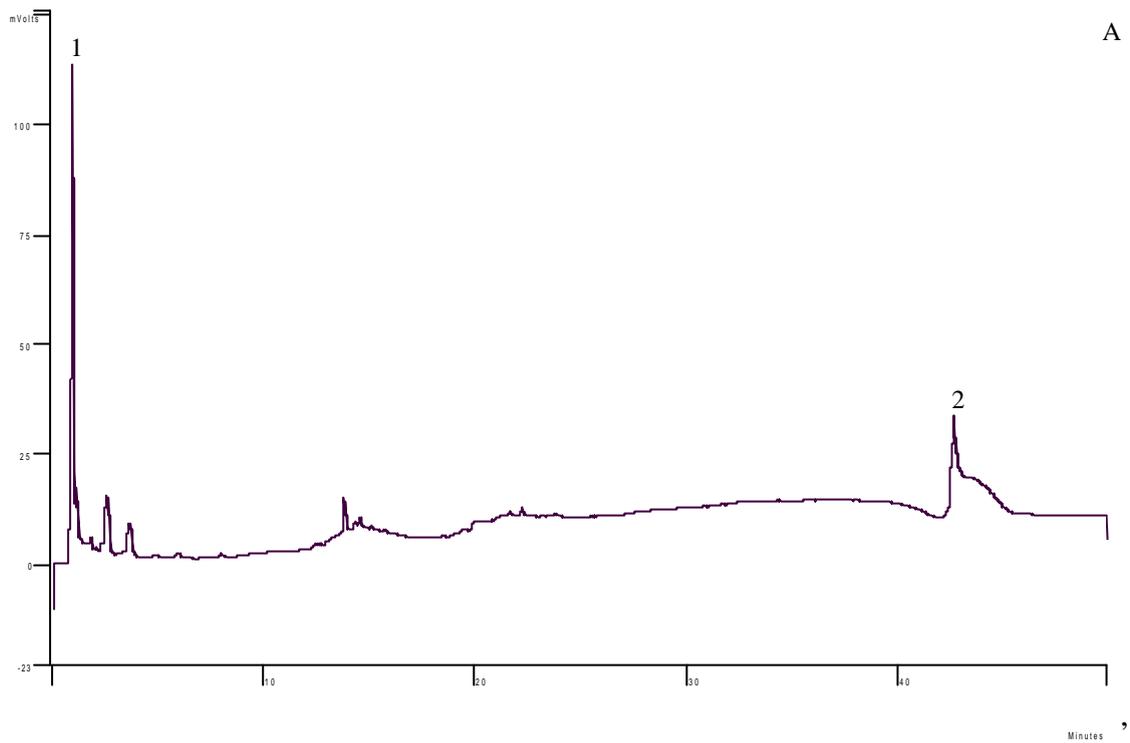


Figura 22: Perfis cromatográficos das frações 3.2 (A) e 3.3 (B) das frações insolúveis do extrato metanólico de folha.

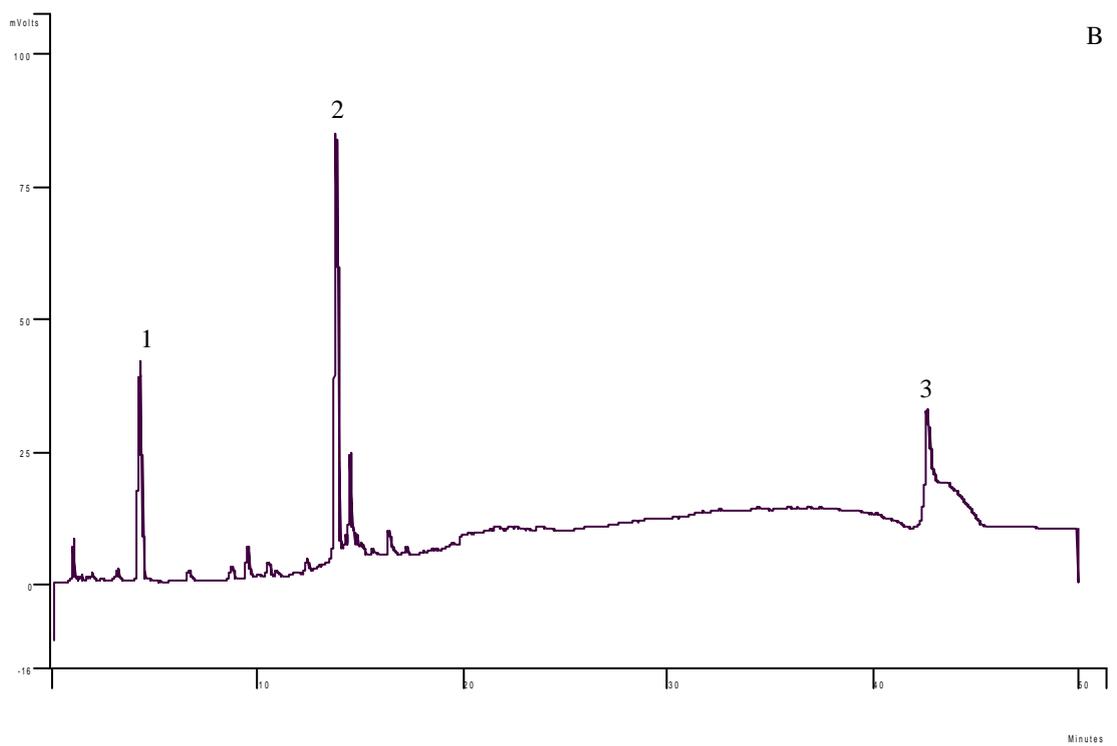
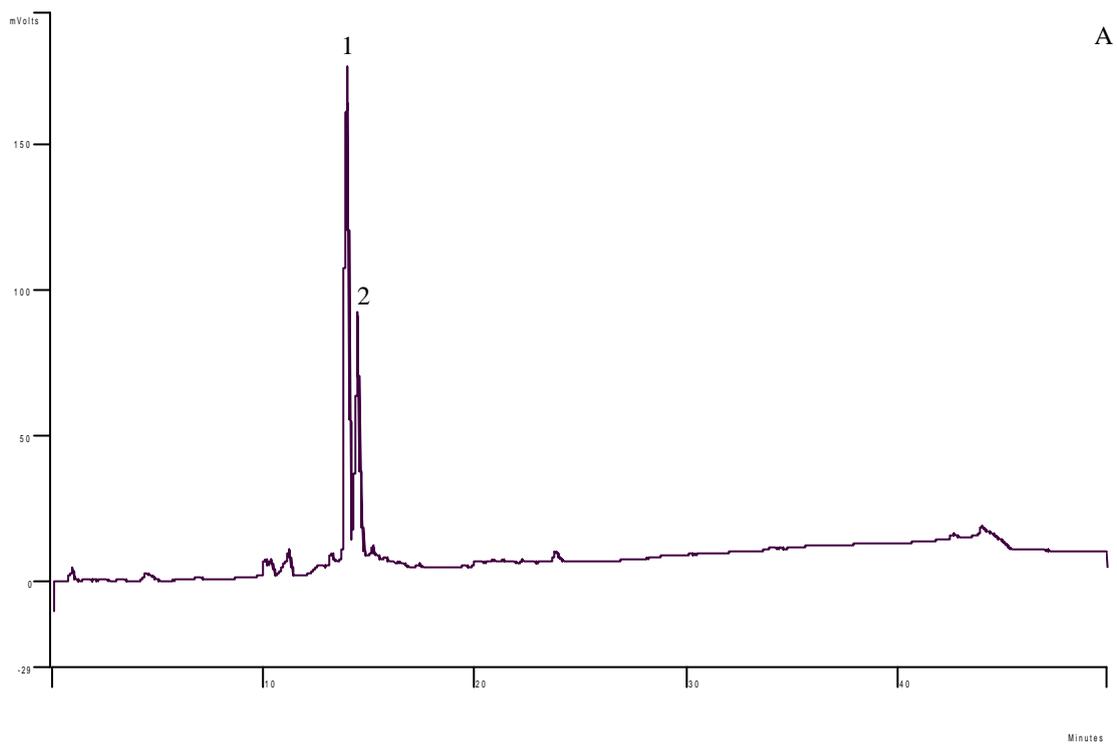


Figura 23: Perfis cromatográficos das frações 3.4 (A) e 4.1 (B) das frações insolúveis do extrato metanólico de folha.

Tabela 8: Tempo de retenção e porcentagem dos compostos das frações da fase insolúvel do extrato metanólico de folha.

Fração	Pico	Tempo de Retenção (min)	Porcentagem (%)
1.1	1	13.6	5.01
1.1	2	16.2	46.04
1.4	1	3.2	27.89
2.2	1	0.8	4.30
2.2	2	42.6	6.65
2.3	1	13.6	24.90
2.3	2	42.6	19.14
2.4	1	9.2	20.45
2.4	2	13.5	6.52
2.4	3	13.7	9.57
2.4	4	14.4	6.13
2.4	5	42.6	14.87
3.1	1	33.9	33.19
3.2	1	0.8	5.21
3.2	2	42.6	5.92
3.3	1	3.5	19.18
3.3	2	13.1	16.31
3.3	3	16.1	20.06
3.3	4	42.6	28.94
3.4	1	13.8	21.04
3.4	2	14.3	11.86
4.1	1	4.2	12.99
4.1	2	13.7	6.85
4.1	3	42.6	13.17

2.3.5 Detecção de Flavonóides nas frações 4.1 e 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule.

As frações 4.1 e 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule foram selecionadas para comprovação da presença de flavonóides, porque nas análises em CLAE analítica mostraram compostos com tempo de retenção igual aos padrões quercetina, quercitrina rutina e canferol.

A Figura 24 apresenta o perfil cromatográfico da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule, o perfil cromatográfico do padrão de canferol e o perfil da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule com o padrão de canferol. A presença de canferol foi confirmada para a fração 4.1.

Visando confirmação da identificação do composto observado a fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule, foi submetida a CLAE –DAD em escala analítica em cromatógrafo Dionex, para obtenção dos espectros na região do ultravioleta dos compostos presentes.

A Figura 25 apresenta o perfil cromatográfico em escala analítica da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Para essa amostra destacam-se os compostos com tempo de retenção 8.2, 14.7, 15.3 e 18.2 minutos.

A Figura 26 apresenta os espectros na região do ultravioleta dos compostos com tempo de retenção 8.2, 18.5 e 23.9 minutos que indicam que eles são compostos fenólicos. A Figura 27 apresenta os espectros na região do ultravioleta dos compostos com tempo de retenção 14.7, 15.3, 18.2, 20.2, 20.9, 23.5, 24.2, 29.7 e 32.1 minutos que indicam que esses compostos são flavonóides.

Os compostos com tempos de retenção 15.3 e 18.2 minutos apresentam espectro na região do ultravioleta semelhantes aos padrões de quercitrina e canferol, respectivamente (Figura 28).

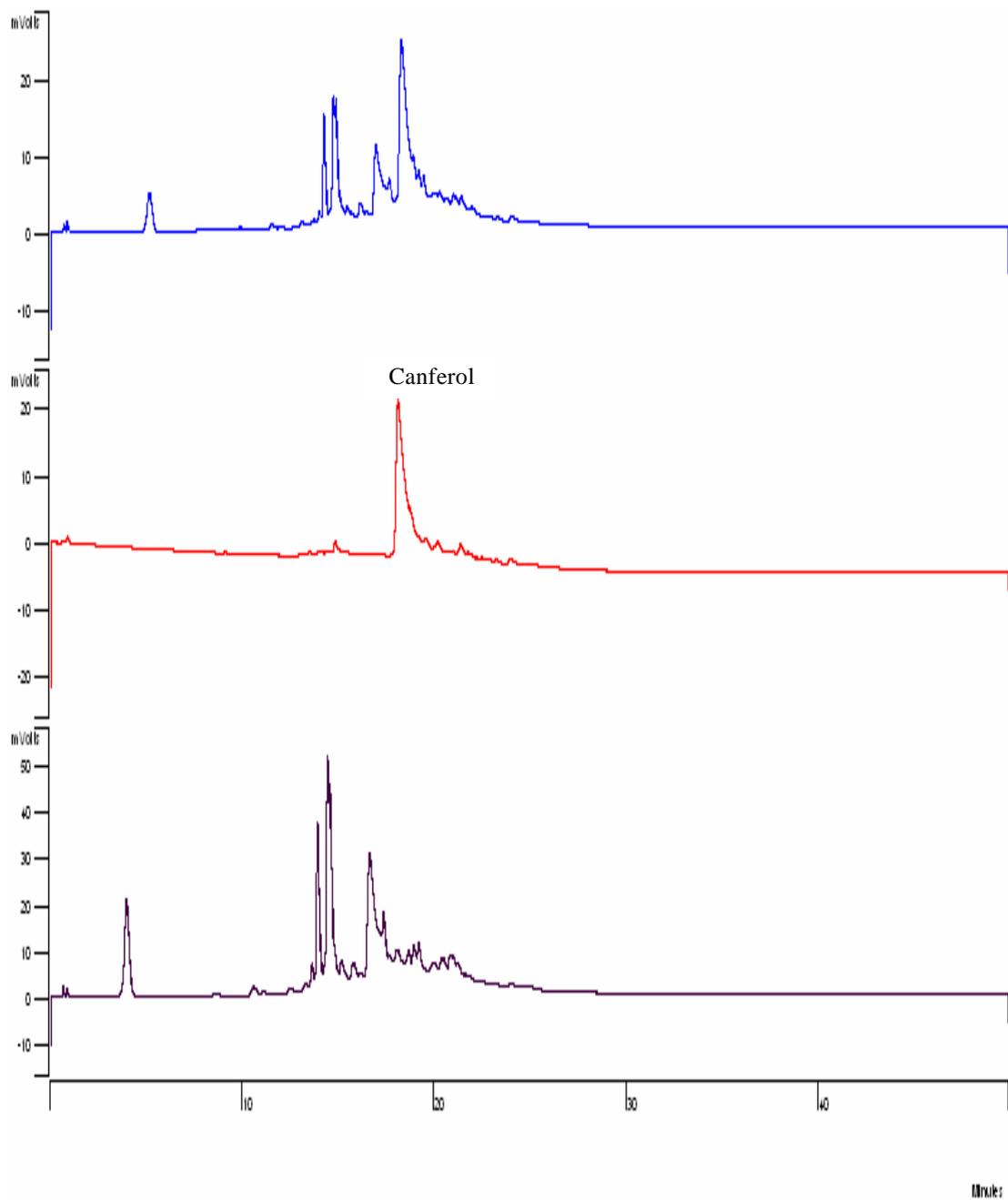


Figura 24: Perfil cromatográfico da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato de caule (■), do padrão de canferol (■) e da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule com o padrão de canferol (■).

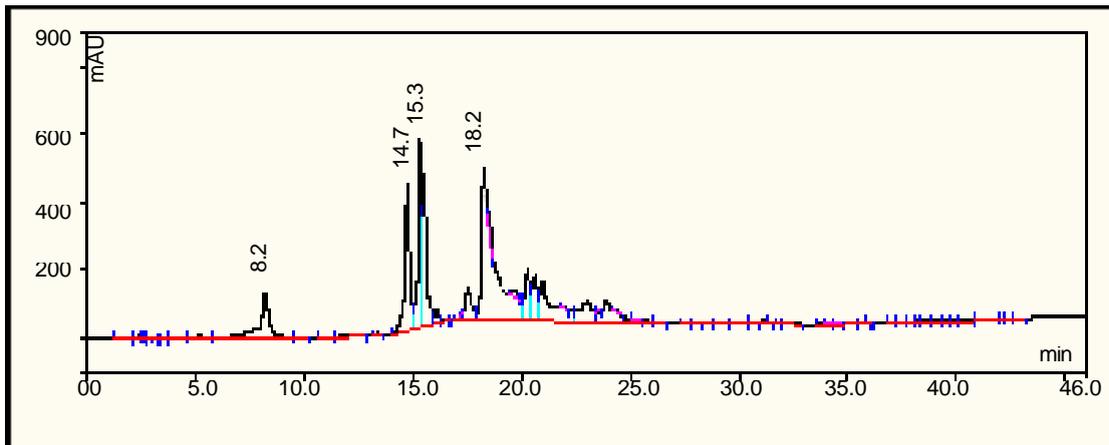


Figura 25: Perfil cromatográfico em escala analítica da fração 4.1 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule.

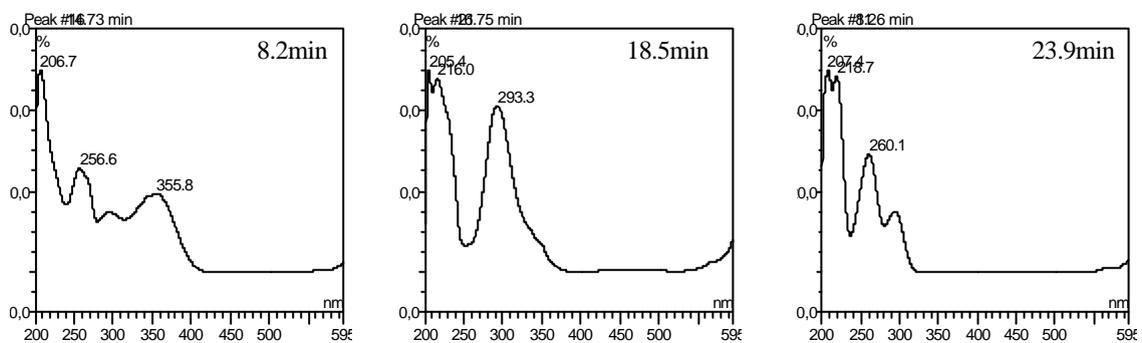


Figura 26: Compostos com espectro de compostos fenólicos na região do ultravioleta.

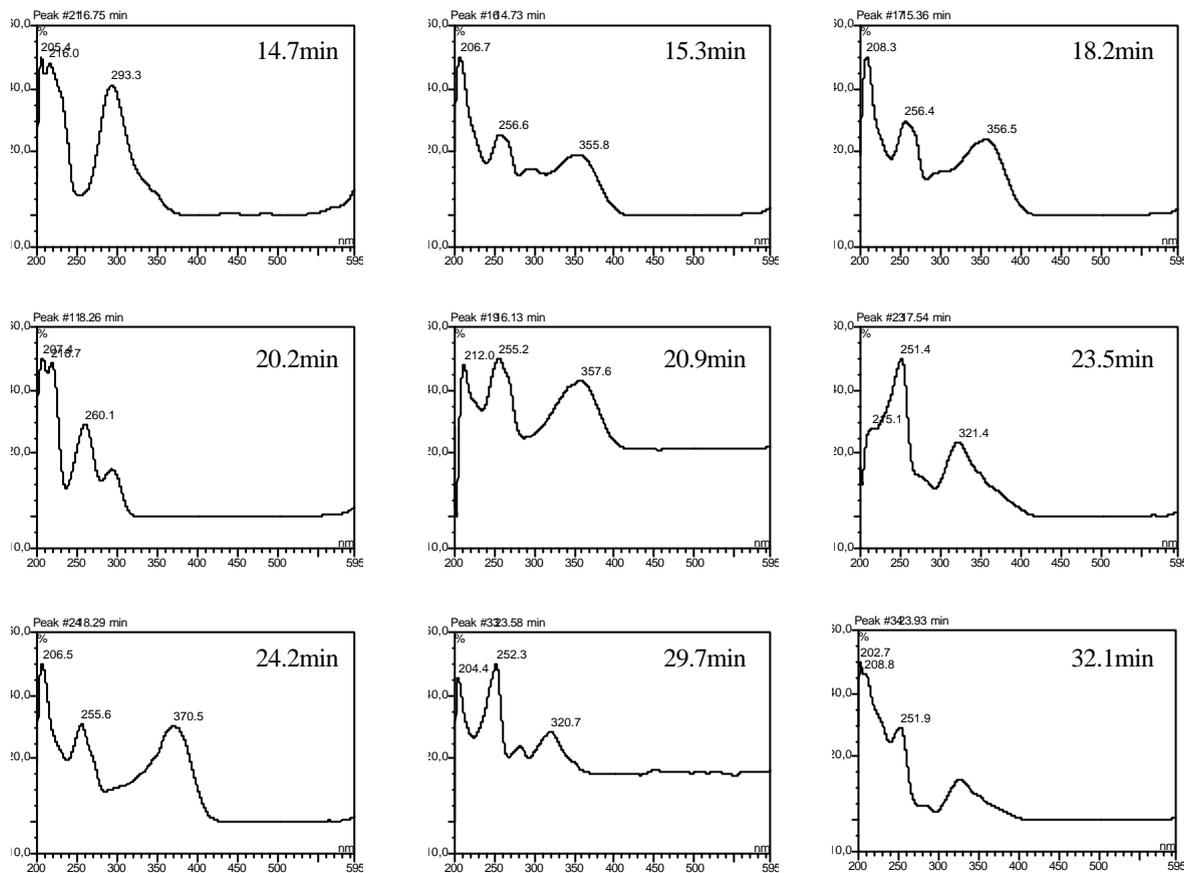


Figura 27: Compostos com espectro de flavonóides na região do ultravioleta.

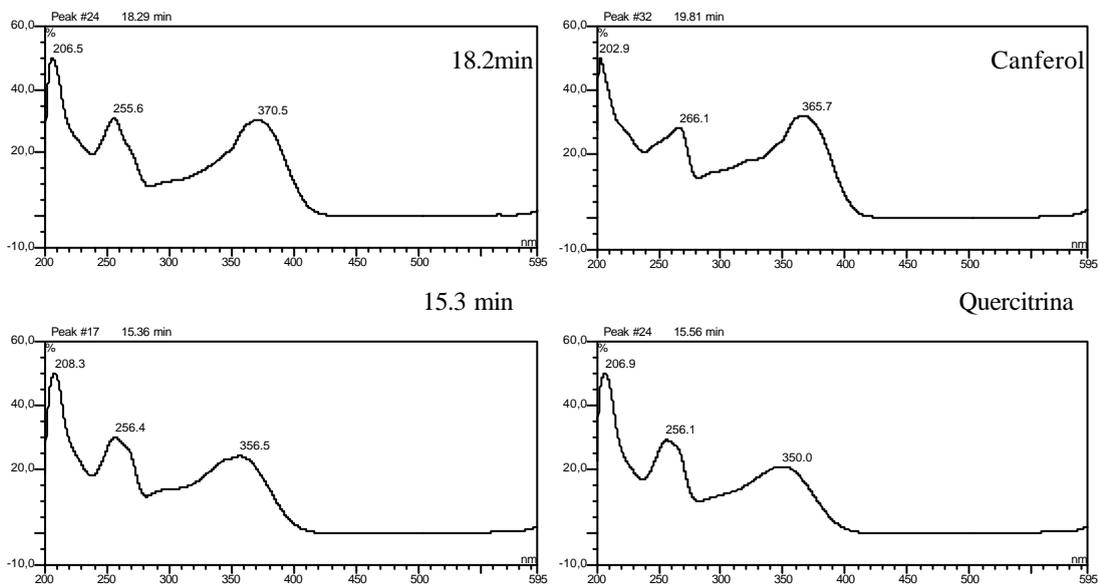


Figura 28: Comparação do espectro na região do ultravioleta dos compostos com tempo de retenção 15.3 e 18.2 minutos com os padrões de quercitrina e canferol respectivamente.

A Figura 29 apresenta os perfis cromatográficos da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule, da mistura de padrões de flavonóides (rutina, quercitrina, quercetina e canferol) e da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule com a mistura de padrões de flavonóides. Verificou-se a presença de rutina quercitrina e quercetina.

Visando, então a obtenção dos espectros na região do ultravioleta desses compostos presentes na fração 4.2, ela foi submetida a CLAE –DAD em escala analítica em cromatógrafo Dionex.

A Figura 30 apresenta o perfil cromatográfico em escala analítica da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule. Destacaram-se os compostos com tempo de retenção 14.7, 15.4 e 18.3 minutos.

A Figura 31 apresenta o espectro na região do ultravioleta dos compostos da fração 4.2 da fase insolúvel de caule. O composto com tempo de retenção 8.2 minutos tem espectro na região do ultravioleta característico de composto fenólico, enquanto os compostos com tempo de retenção 11.0, 14.7, 15.4 e 18.5 minutos mostram espectros na região do ultravioleta característico de flavonóides.

Os compostos com tempos de retenção 14.7, 15.4 e 18.5 minutos apresentam espectros na região do ultravioleta iguais aos espectros dos padrões de rutina, quercitrina e quercetina respectivamente (Figura 32).

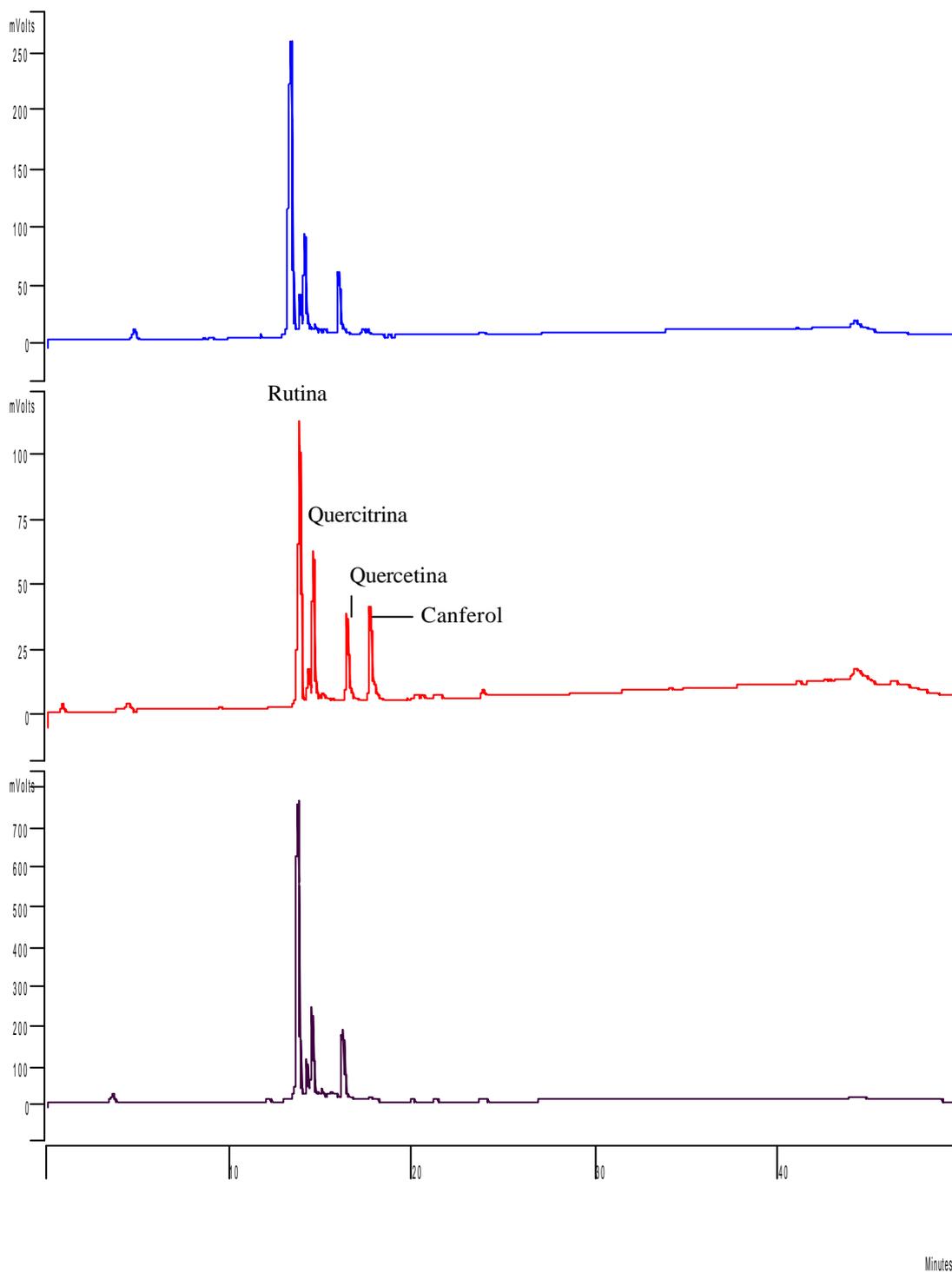


Figura 29: Perfil cromatográfico da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato de caule (■), da mistura de padrão de flavonóides (■) da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule com a mistura de flavonóides (■).

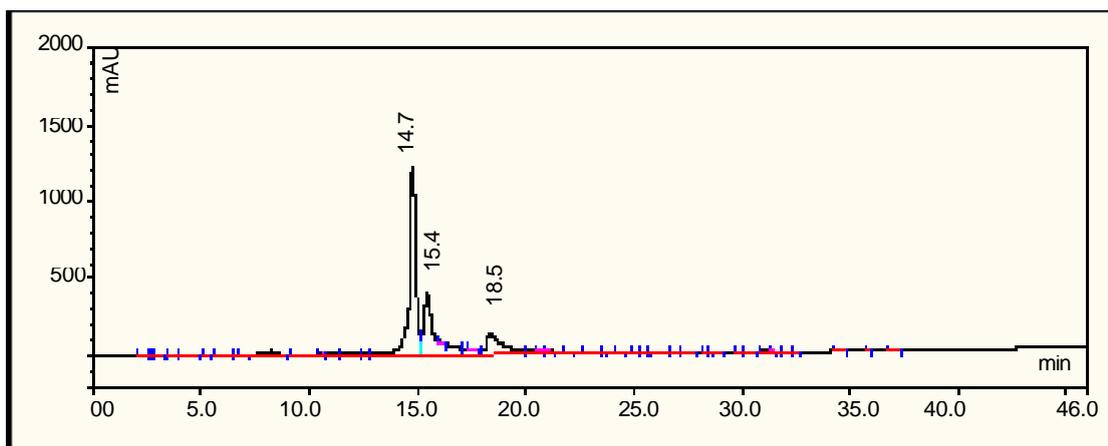


Figura 30: Perfil cromatográfico em escala analítica da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule.

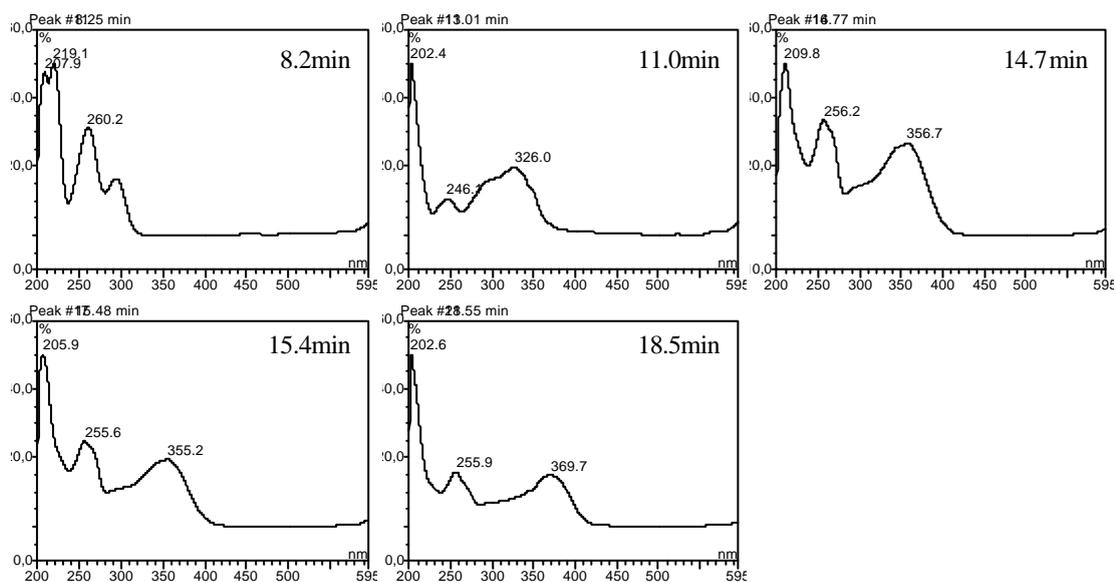


Figura 31: Espectro na região do ultravioleta de compostos presentes na fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule.

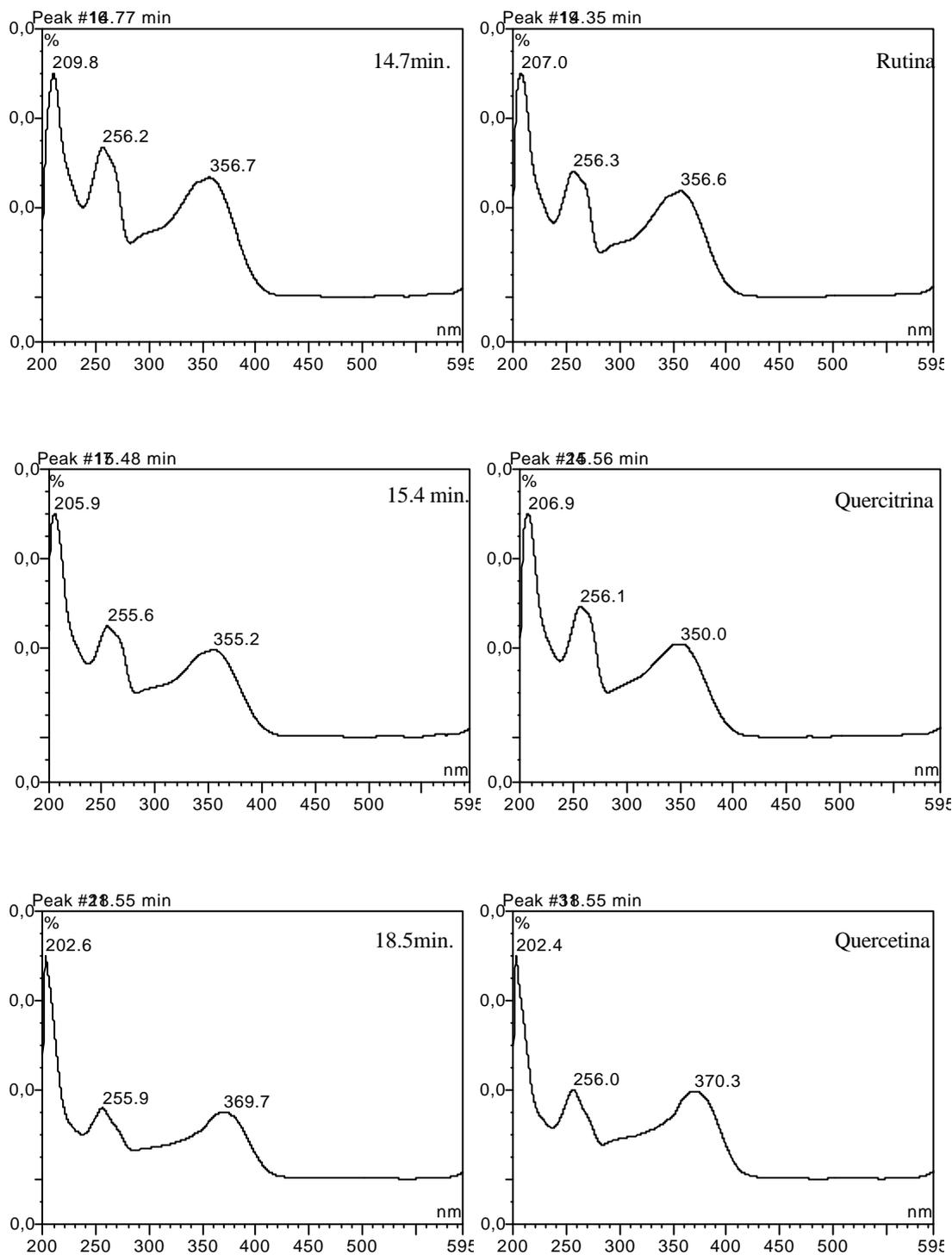


Figura 32: Comparação do espectro na região do ultravioleta dos compostos com tempo de retenção 14.7, 15.4 e 18.5 da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato metanólico de caule com o espectro na região do ultravioleta de padrões de rutina, quercitrina e quercetina.

2.3.6 Avaliação do perfil cromatográfico das frações da fase solúvel 1.3.1 e 2.2.3 do extrato de folha.

As frações da fase solúvel 1.3.1 e 2.2.3 também foram selecionadas para análise em CLAE devido à presença de compostos com Rfs que coincidiam com os padrões de quercetina e quercitrina, respectivamente, nas cromatografias em camada delgada de sílica.

A Figura 40 apresenta o perfil cromatográfico das frações da fase solúvel 1.3.1 e 2.2.3 do extrato de folhas. Comparando-se o perfil cromatográfico das amostras, ao perfil cromatográfico da mistura de padrões de flavonóides (rutina, quercitrina, quercetina e canferol), podem ser observados compostos que coincidem com os padrões de quercetina e quercitrina também na fase solúvel.

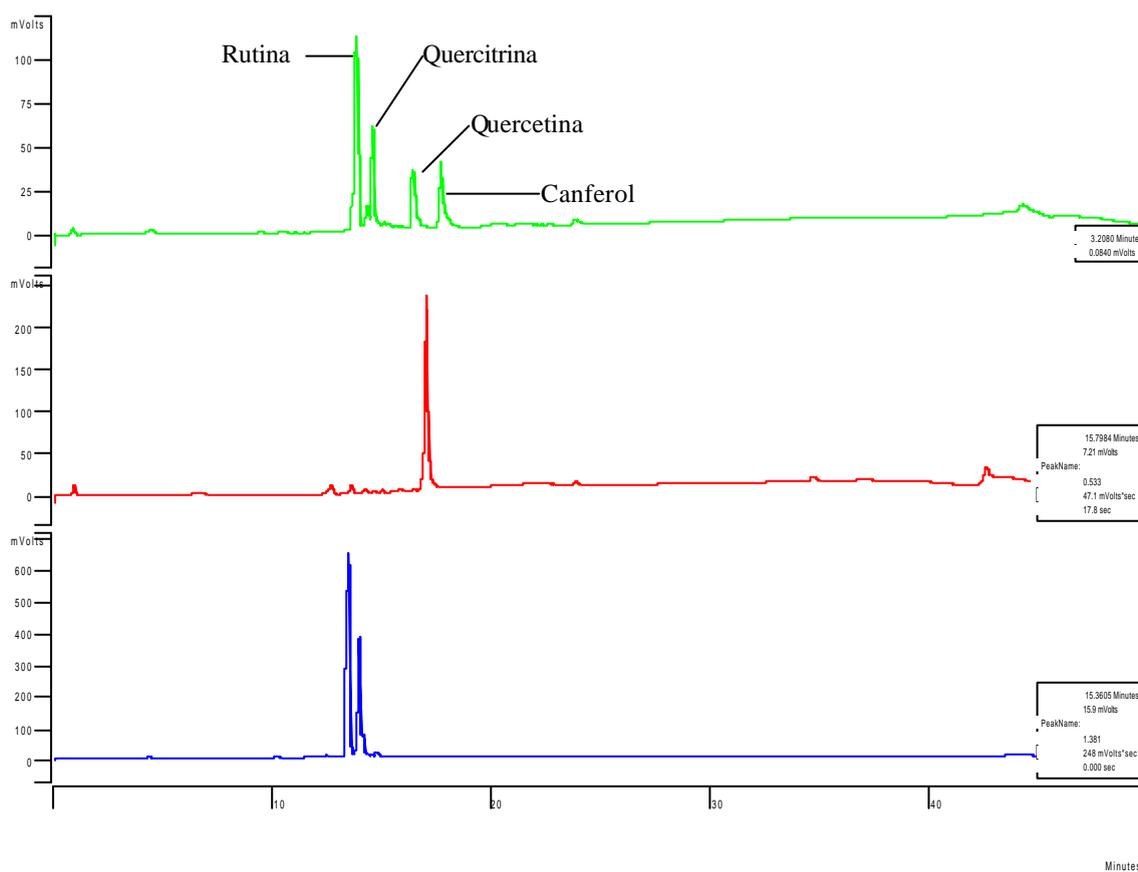


Figura 40: Perfil cromatográfico das frações 1.3.1 da fase solúvel do extrato de folhas (-) e 2.2.3 da fase solúvel do extrato de folhas (-) e mistura de padrões de flavonóides (-).

2.4 Discussão:

Os dados obtidos nesse trabalho mostram a presença de vários flavonóides em *Hypericum cordatum*.

CALIE *et al.*, (1983) estudando a composição química de várias espécies de hipérico, destacaram a grande riqueza de flavonóides presentes no gênero entre as 33 populações de hipérico estudadas. Foram identificados 12 tipos diferentes de flavonóides. Todos os *taxa* apresentaram quercetina glicosilada, entretanto, flavonas estavam presentes apenas em quatro espécies (*Hypericum suffruticosum*, *Hypericum stragalum*, *Hypericum hypericoides*, *Hypericum edisonianum*), a maior complexidade química foi observada em *Hypericum tetrapetalum* que apresentou flavonol e flavonas, além de flavonas C-glicosiladas e flavonas O-glicosiladas.

Diversos compostos apresentaram reação positiva para flavonóides após revelação com NP-PEG. Nas frações 1.1C; 1.1.1F; 1.1.2F; 1.2.1F e 1.2.5F, são observados compostos de coloração esverdeada em vários valores de Rfs. A fração 1.3.1F contém um composto alaranjado no Rf 0,54, mesmo valor obtido para quercetina. A presença de quercitrina e rutina também foi observada nas análises em CLAE.

Um composto escuro no Rf 0.57 foi comum a caules e folhas. Nas frações 2.2.2F; 2.2.3F; 2.3.1F; 2.3.2F; 2.1.1C e 2.1.4C são observados alguns compostos de coloração esverdeada nos Rfs 0.20, 0,58 e 0,71. Um composto de Rf 0,54 (da quercetina), também foi observado nas cromatoplasas das frações 2.2.2F e 2.3.2F. E na fração 2.2.3F a presença de quercetina foi confirmada nas análises em CLAE.

Um composto de Rf 0.80 foi observado nas frações 3 de folha e caules; no Rf 0.71 e no Rf 0.64 das três frações de caule. Compostos de coloração alaranjada no Rf 0.61. Nenhum desses compostos apresentaram Rfs equivalentes aos padrões de flavonóides utilizados. Podem ser observados compostos de coloração roxa no Rf 0.61 nas frações 3.1.2C; 3.2.1C; 3.2.2C e 3.2.3C. Não foi possível utilizar xantonas comuns no gênero como padrão, mas a xantona mostra essa coloração na luz ultravioleta.

Compostos com coloração esverdeada estão presentes nos Rfs 0.52; 0.58; 0.61 0.64 e 0.67 em várias frações 3 de caules e de folhas. O composto de Rf 0,76 está presente em 8 frações de caule e em 2 frações de folha, mostrando-se um dos principais componentes da fração 3. Um composto amarelo no Rf 0.12 da fração 3.3.6C e um de fluorescência azulada no Rf 0,52 das frações 3.4.1F e 3.4.3C também são observados.

Compostos de coloração esverdeada são observados no Rf 0,15 da fração 4.1; no Rf 0,23 das frações 4.1C e 4.2C; e no Rf 0,49 das frações 4.1C, 4.2C e 4.1F, e 0.69 nas frações 4.1F e 4.2C. Compostos de coloração alaranjada na origem e nos Rfs 0.15; 0.35 e 0.51 foram observados nas frações de caule.

Destacaram-se, portanto glicosídeos de flavonas (compostos de coloração verde escuro) nas frações da fase solúvel de caules e folhas, embora também tenham sido observados glicosídeos de flavonol (coloração alaranjada ou amarelada) segundo metodologia de WAGNER & BLADT, 2001.

O material da fase insolúvel, saiu da origem apenas com o solvente butanol: ácido acético: água (3:1:1) , não havendo boa separação dos componentes. Os compostos mais representativos das frações insolúveis são flavonóis glicosilados (compostos de coloração alaranjada ou amarelada) segundo WAGNER & BLADT, 2001.

O rendimento das frações solúveis foi muito baixo, ao contrário do obtido nas frações insolúveis. Os compostos que permaneceram na origem no eluente tolueno; acetato de etila: ácido fórmico (5:4:1) embora apresentassem coloração amarela na luz natural não apresentaram mobilidade em eluentes específicos para flavonóides. Todos os compostos saíram da origem apenas no eluente butanol: ácido acético: água (3:1:1). SEABRA & ALVES (1991) e SEABRA *et al* (1991) isolaram quercetina-3-sulfato nas espécies *H. elodes* e *H. undulatum* e VIEL (2003) também isolou esse composto em *Cuphea carthagenensis*. Entretanto análise por eletroforese com extratos de *H. cordatum* não mostraram presença de compostos sulfatados nessa espécie.

Nas análises realizadas em CLAE as frações insolúveis dos extratos de caules e folhas mostraram perfis distintos, porém alguns compostos com tempos de retenção comuns, ou próximos são observados nos extratos das duas partes da planta.

A comparação dos perfis cromatográficos de caule e folhas e a análise dos compostos presentes nas frações obtidas mostrou que a composição de folhas e caules é bem diferente, porém os principais compostos estão presentes em ambos os órgãos. No extrato de caule, as frações 2.4, 3.2, 4.1 e 4.2 contém os componentes mais importantes do extrato. Para os extratos de folha, as principais frações são 1.1, 1.4 e 3.1.

A análise das frações 2.3F e 3.2C apresentaram compostos com espectro na região do ultravioleta característicos de flavonóides e de compostos fenólicos.

A análise da fração 4.2 da fase insolúvel do extrato de caules não apresentou nenhum composto com espectro na luz ultravioleta de compostos fenólicos, e apresentou apenas 5 compostos com espectro de flavonóides. Os compostos com tempo de retenção 14.7 minutos, 15.4 minutos e 18.5 minutos apresentaram espectro na luz ultravioleta semelhante aos espectros da rutina, quercitrina e quercetina, respectivamente.

Em *H. perforatum* existe uma maior quantidade de flavonóis. Entre os flavonóis identificados estão a quercetina, rutina, hiperosídeo, além de derivados da quercetina e derivados do canferol (SILVA, *et al.*, 2005).

CHAUDARY & WILLET (2006) verificaram o potencial antitumoral de flavonóides de *H. perforatum* contra tumores de próstata. As análises indicaram que a rutina não apresentou atividade na inibição do citocromo CYP1A1 (citocromo das células mutantes). Apigenina e amentoflavona funcionam como inibidores do citocromo por competição, quercetina também se mostrou ativa.

LUO (2004) verificou que flavonóides de *H. perforatum* inibiam a oxido nítrico sintase em homogenato de cérebros de cobaias, e que a taxa de inibição da enzima em relação às concentrações de quercetina e hiperosídeo eram dose dependentes, com o hiperosídeo sendo mais potente que a quercetina, provavelmente devido à presença de galactose ligada à molécula.

CONFORTI *et al.* (2002) isolaram flavonóides de *Hypericum triquetrifolium*, e estudos espectrográficos apontaram a presença de biapigenina, quercetina e canferol glicosilados. Foi observada forte atividade antioxidante dos flavonóides, em especial da biapigenina.

ABREU *et al.*, (2004) descreveram quercetina e rutina em extratos caulinares de *H. brasiliense* e verificaram-se que as taxas dos metabólitos eram elevadas na época da frutificação. Na floração, destacava-se a uliginosina (floroglucinol) além da rutina e quercetina.

Em *H. cordatum* os flavonóides identificados não apresentaram atividades antifúngicas quando os extratos brutos foram analisados. Os flavonóides identificados são comuns nas plantas, mas ainda não haviam sido descritos na espécie brasileira. Alguns flavonóides foram isolados e estão sendo identificados, e outros deverão ainda ser obtidos em quantidades suficiente para essa etapa do trabalho.

3. Capítulo 2. Análise de compostos secundários em extratos clorofórmicos de folhas

3.1. Introdução

Várias doenças que ocorrem em animais e humanos são causadas por fungos. Os fungos, direta ou indiretamente estão envolvidos em vários processos infecciosos, e mais recentemente, com o aparecimento da AIDS em micoses sistêmicas oportunistas, associadas com o uso de drogas imunossupressoras. Tais fatos têm acentuado pesquisas sobre novas substâncias de atividade antifúngica de origem natural. Segundo GRAYER & HARBORNE (1994), entre 1982 e 1993 foram isoladas de plantas em torno de 250 substâncias com atividade antifúngica.

Na triagem que vem sendo realizada em plantas de cerrado, já foram isolados e identificados vários compostos com atividade antifúngica.

Os compostos responsáveis por atividade fungitóxica pertencem a diferentes classes químicas, como xantonas, flavonóides, isoprenóides, terpenóides, estilbenos e alcalóides (BALADRIN & KINGHORN, 1993).

TOKER, *et al.* (2006) verificaram que os óleos essenciais de *Hypericum hyssopifolium* e *Hypericum mycrocalycinum* inibiram o crescimento de três diferentes cepas de *Escherichia coli*, cepas de *Baccilus brevis*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e também apresentaram atividade contra *Candida albicans*.

CAKIR *et al.* (2005) verificaram a composição química dos óleos essenciais de *Hypericum linaroides* sendo caracterizados 74 compostos. A atividade antifúngica dos óleos foi determinada contra cepas de fungos patógenos da agricultura. Os óleos apresentaram atividade contra *Fusariumm culmorum*, *Fusariumm equiseti*, *Alternaria solani* e *Rhizoctonia solani*.

SCHIMITT *et al.*, (2001) descreveram a atividade antiviral de extratos aquosos com baixa concentração de taninos e extratos metanólicos de três espécies de hipérico da região sul

do Brasil (*Hypericum caprifoliatum*, *Hypericum connatum* e *Hypericum polyantenum*) contra o vírus da imunodeficiência felina, o qual pertence ao mesmo grupo dos Lentivírus, mesmo grupo ao qual o HIV se encontra inserido.

COS *et al.*, (2002) fizeram uma triagem de plantas com atividades antifúngicas e antiviral, e verificaram que extratos de folha *Hypericum rebotolum* apresentavam atividade antiviral contra o adenovírus HSV, além de atividade antiinflamatória.

Em *Hypericum brasiliense*, xantonas com atividade antifúngica foram isoladas em extratos em diclorometano de parte aérea de plantas (ROCHA *et al.*, 1994; ABREU *et al.*, 2004).

Em *Kielmeyera variabilis* xantonas também foram os compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana (PINHEIRO *et al.*, 2003; CORTEZ *et al.*, 1998).

DALL'AGNOL *et al.*, (2003) verificaram a atividade antimicrobiana de espécies de hipérico (*Hypericum caprifoliatum*, *Hypericum carinatum*, *Hypericum connatum*, *Hypericum ternum*, *Hypericum myrianthum* e *Hypericum polyanthenum*) contra bactérias e fungos.

Diferentes xantonas vêm sendo isoladas de diversas espécies de *Hypericum* (CARDONA *et al.*, 1990; WU *et al.*, 1998; HU *et al.*, 1999).

Tendo em vista a falta de informações sobre a química da espécie nativa do cerrado, *Hypericum cordatum* (Clusiaceae), e a ocorrência de xantonas com atividade antifúngica em outras espécies do gênero, julgamos de interesse realizar o estudo fitoquímico de extratos clorofórmico, visando o isolamento de compostos ativos e a determinação da relação entre a atividade e a presença de xantonas ocorrentes nesse extrato.

3.2. Material e Métodos

3.2.1. Materiais:

3.2.1.1. Material vegetal - *Hypericum cordatum* Cordeiro (1702) SP

Local das coletas - as plantas foram coletadas em Ibiúna (São Paulo) em campo aberto, na beira da estrada, nas proximidades da Rodovia SP-250, Km 63, às margens da Rua Caieiras.

3.2.1.2. Extratos clorofórmico de folhas, preparados de exemplares coletados em 2004.

3.2.3 Métodos:

3.2.2.1. Preparo do Material Vegetal

Após coleta, o material foi seco à sombra , à temperatura ambiente, sendo as folhas separadas dos caules, e posteriormente pulverizadas, ficando disponíveis para a extração.

3.2.2.2. Método de extração

Foi feita a extração exaustiva de 157g do pó de folhas (ROCHA *et al.* ,1994) com éter de petróleo, clorofórmio e metanol.

Após as extrações, os materiais foram filtrados e submetidos à concentração em rota-evaporador.

3.2.2.3 Fracionamento do extrato de folhas em clorofórmio.

O fracionamento do extrato clorofórmico de folhas (5,92g) foi feito em coluna de Sephadex LH-20. Foi utilizada coluna de 48.0 cm de altura, e 4.5 cm de diâmetro, com 138 g de Sephadex LH-20 solução de clorofórmio: metanol (1:1) como eluente (Figura 1).

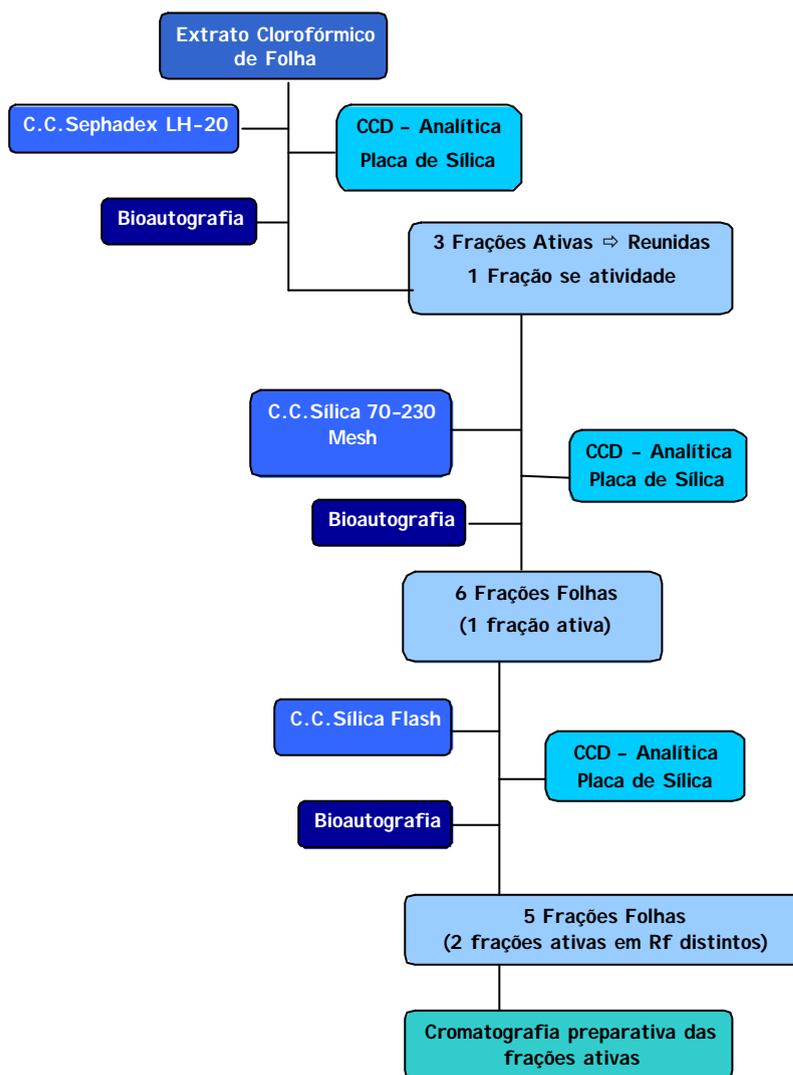


Figura 1: Organograma das atividades do fracionamento por cromatografia do extrato clorofórmico de folhas.

As frações coletadas foram submetidas a CCD em cromatoplaça da Merck, utilizou-se como eluente clorofórmio: metanol (95:5). As frações semelhantes de acordo com a revelação com vanilina sulfúrica foram reunidas e submetidas ao bioensaio de atividade antifúngica conforme técnica descrita por HOMANS & FUCHS (1970).

A amostra com atividade antifúngica (3.3876g) foi submetida a uma nova cromatografia em coluna. Utilizou-se coluna de sílica 70-230 Mesh com 40.0 cm de altura e 2.2 cm de diâmetro. Como eluente utilizou-se um gradiente de clorofórmio: metanol conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1: A figura apresenta o gradiente de Clorofórmio: Metanol utilizado na Cromatografia em Coluna de Sílica 70-230 Mesh.

Concentração de Clorofórmio	Concentração de Metanol	Número de Frações Coletadas (Volume de 5mL por fração)
100	00	04
98	02	04
96	04	04
94	06	04
92	08	04
90	10	20
80	20	20
70	30	20
60	40	20
50	50	20
40	60	20
30	70	20
20	80	20
10	90	20
0	100	20

Novamente, as frações coletadas foram submetidas a CCD em cromatoplaça de sílica da Merck e reveladas com vanilina sulfúrica. Após reunião, as frações foram submetidas a bioautografia de HOMANS & FUCHS (1970).

A fração que apresentava atividade antifúngica foi submetida a uma nova cromatografia em coluna. Foi utilizada uma coluna de 31.0 cm de altura e 1.2 cm de diâmetro. Como fase fixa utilizou-se sílica flash, sendo a fase móvel, Clorofórmio: Metanol (9:1). Foram coletadas frações de 5,0 mL. As frações coletadas foram submetidas à cromatografia em cromatoplaca de sílica da Merck e reveladas com vanilina sulfúrica. Após a reunião, as frações foram submetidas a bioautografia pelo método de HOMANS & FUCHS (1970).

As frações com atividade antifúngica foram submetidas à cromatografia preparativa em cromatoplaca de sílica. Utilizou-se como fase móvel clorofórmio: metanol (95:5), uma pequena faixa da cromatoplaca foi cortada, e submetida a bioautografia pelo método de HOMANS & FUCHS (1970). As zonas de inibição foram marcadas na cromatoplaca e posteriormente raspadas. Os compostos ativos foram eluídos em clorofórmio:metanol (9:1).

Os compostos ativos isolados foram submetidos a CLAE para obtenção do perfil cromatográfico de cada amostra, e encaminhados para identificação química por técnicas espectrométricas.

As análises em cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas em aparelho Varian. Utilizou-se coluna analítica de sílica RP-18 (Varian), com fluxo de $1,0\text{ mL min}^{-1}$ e com gradiente metanol: água (Tabela 2). Para detecção dos compostos utilizou-se radiação ultravioleta no comprimento 250nm. Foram injetados $20\ \mu\text{L}$ dos compostos ativos eluídos na concentração 1 mg mL^{-1} .

Tabela 2: Gradiente utilizado para obtenção do perfil cromatográfico das frações antifúngicas.

Tempo (minutos)	Água (0,1% Ácido trifluoracético)	Metanol
0-5	70	30
6-20	20	80
21-27	0	100
27-32	0	100
32-40	70	30

3.2.3 Bioensaio de atividade fungitóxica.

Foi realizado pelo método de bioautografia de HOMANS & FUCH (1970). As frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada, em solvente adequado, reveladas com suspensões dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* ou *Cladosporium cladosporioides* nebulizados na cromatoplaca. Após a nebulização com os esporos do fungo, as placas permaneceram por 48h incubadas a 25°C. A ocorrência de zonas de inibição do fungo mostraram a existência de compostos de atividade fungitóxica.

Utilizou-se 400µg dos extratos brutos, 200µg das frações e 100µg das frações.

Foi determinado o limite de detecção dos compostos eluídos. Utilizou-se 100µg, 50µg, 20µg e 10µg das frações ativas.

3.3 Resultados

A Tabela 3 mostra o rendimento das frações obtidas na cromatografia em coluna de sephadex LH-20.

Tabela 3: Rendimento das 4 frações obtidas do extrato clorofórmico

Extrato Clorofórmico Bruto (5.92g)	Massa (g)
Fração 1	0.9357
Fração 2	1.7543
Fração 3	0.6976
Fração 4	1.3598
Rendimento Total	4.7474g

Verificou-se que as frações 1, 2 e 3 embora apresentassem perfil cromatográfico diferente para alguns compostos, mostravam zonas de inibição do crescimento dos fungos nas mesmas regiões, sendo por isso, reunidas numa única fração com 3.3876g.

Após cromatografia em coluna de sílica dessa fração ativa, observou-se que apenas a fração 6 possuía atividade. Verificou-se 2 halos de inibição, um no Rf 0,66 para *Cladosporium sphaerospermum* e outro no Rf 0,77 para *Cladosporium cladosporioides* (Figura 2).

Novo fracionamento dessa fração 1.6 em coluna de sílica flash produziu mais cinco frações. As frações 1.6.4 e 1.6.5 apresentaram agora atividade antifúngica, nos Rfs 0,66 e 0,77 em ambos os fungos.

Após a cromatografia preparativa da fração 1.6.4 obteve-se apenas um composto antifúngico (AF), denominado AF-1 (30mg).

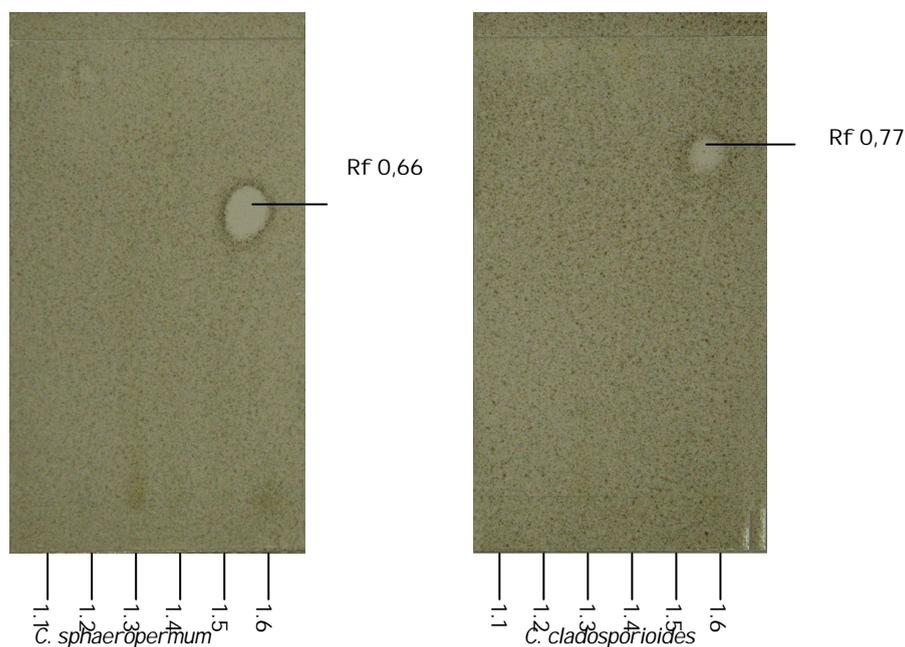
A fração 1.6.5 produziu mais cinco compostos ativos, AF-2 (6.8mg), AF-3 (2.5mg), AF-4 (3.2mg), AF-5 (3.7mg) e AF-6 (1.9mg). Em função da quantidade obtida do composto AF-6 ele não foi submetido a novas análises.

A Figura 3 apresenta o perfil cromatográfico do composto antifúngico 1 e a Tabela 4 os tempos de retenção, porcentagem e absorbância máxima dos compostos da fração ativa 1. A fração está praticamente pura, destacando-se o pico 3 (TR 7.9 minutos) como o principal componente, que foi encaminhado para identificação química.

Os compostos da fração antifúngica-1, com tempo de retenção 7.9 minutos e o da fração antifúngica-2 com tempo de retenção 15.2 minutos são os principais compostos das frações ativas.

A Figura 8 apresenta o limite de detecção para das frações isoladas do extrato clorofórmico de *Hypericum cordatum*.

Verificou-se para AF-1 e AF-2, atividade nas concentrações 100µg e 50µg. As frações AF-3, AF-4 e AF-5 com atividade na placa preparativa não mostram atividade nem com 100µg. A atividade fungitóxica desses compostos pode ser atribuída a uma maior concentração desses compostos na placa preparativa.



Figura

2:

Compostos antifúngicos detectados na bioautografia do extrato clorofórmico de *H. cordatum*.

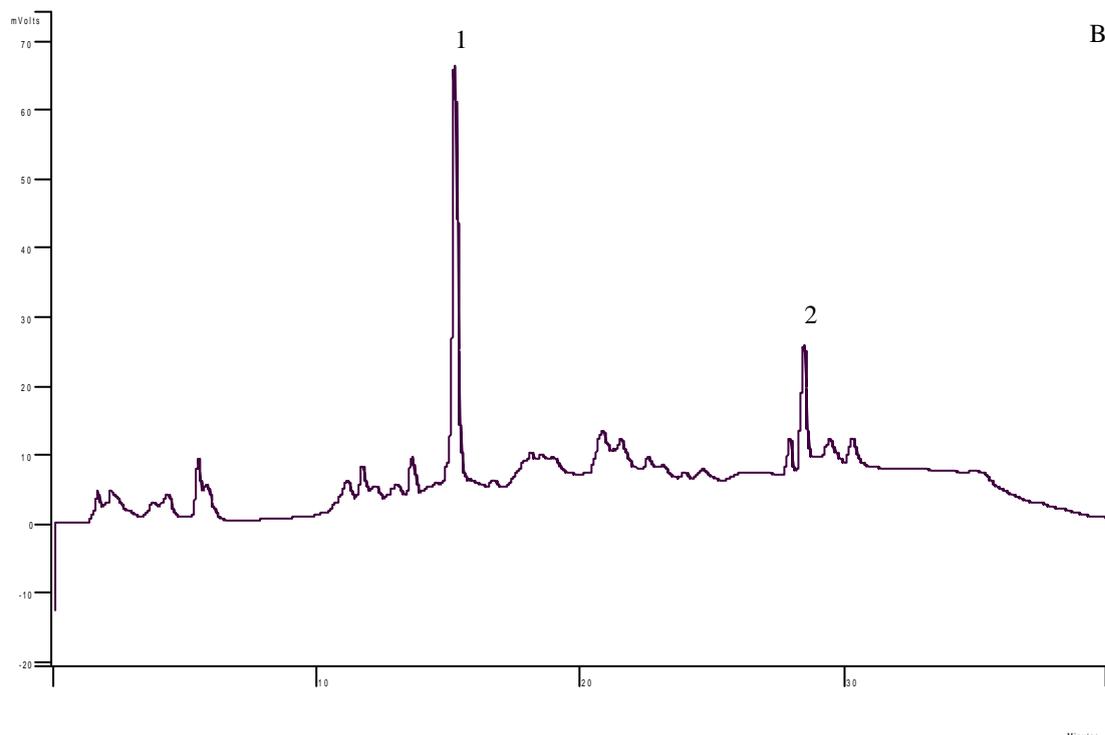
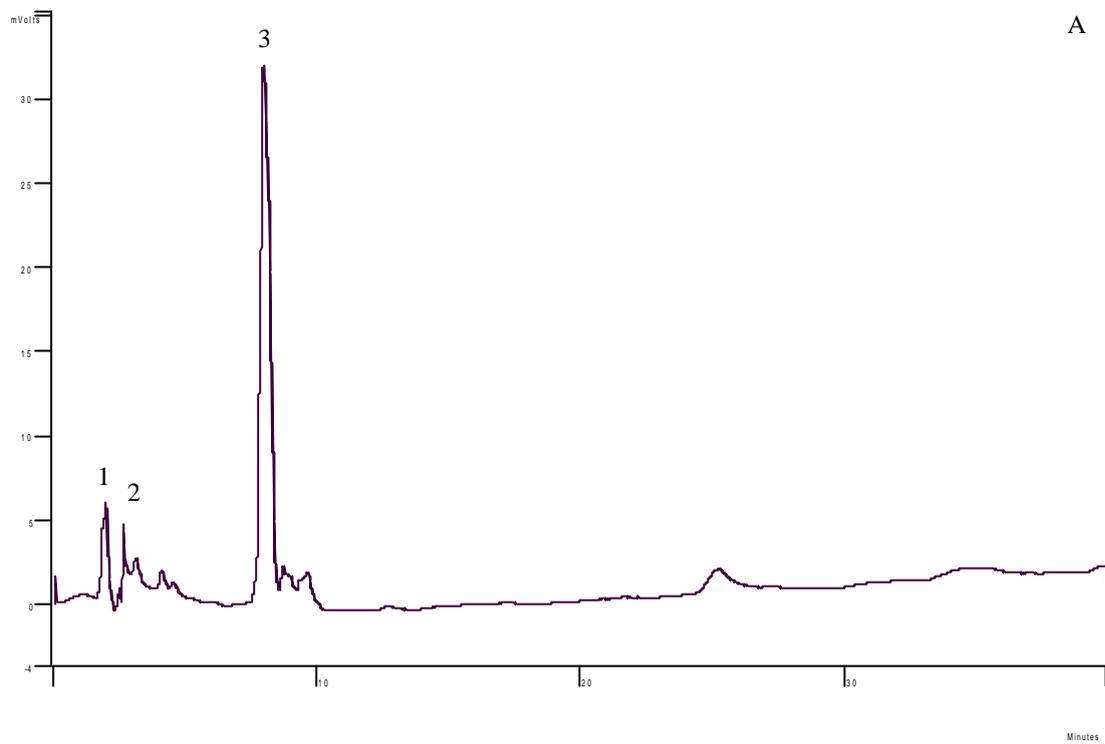


Figura 3: Perfil cromatográfico no comprimento de onda 250nm das frações antifúngica 1 (A) e 2 (B) do extrato clorofórmico de folhas.

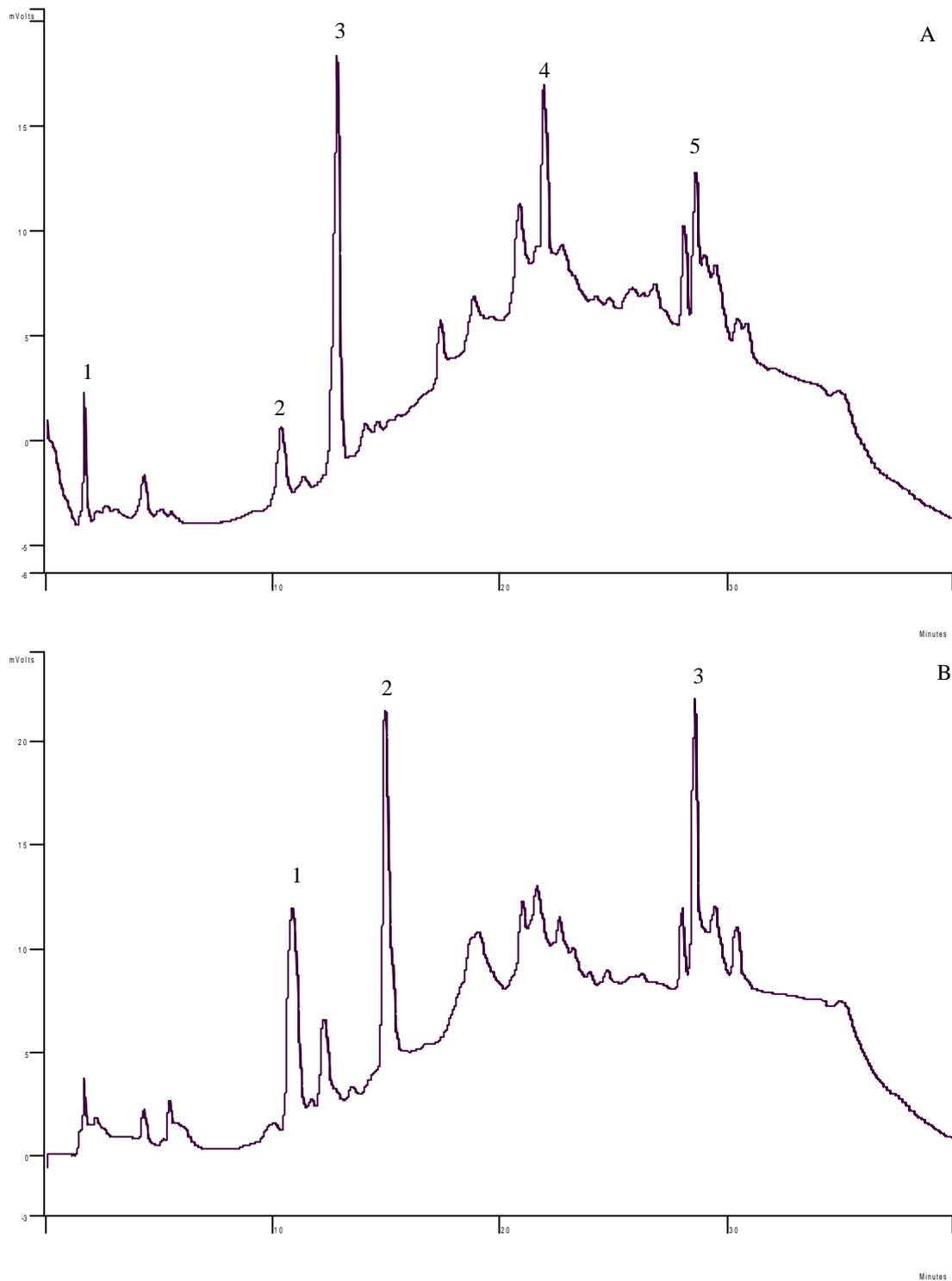


Figura 4: Perfil cromatográfico no comprimento de onda 250nm das frações antifúngica 3 (A) e 4 (B) do extrato clorofórmico de folhas.

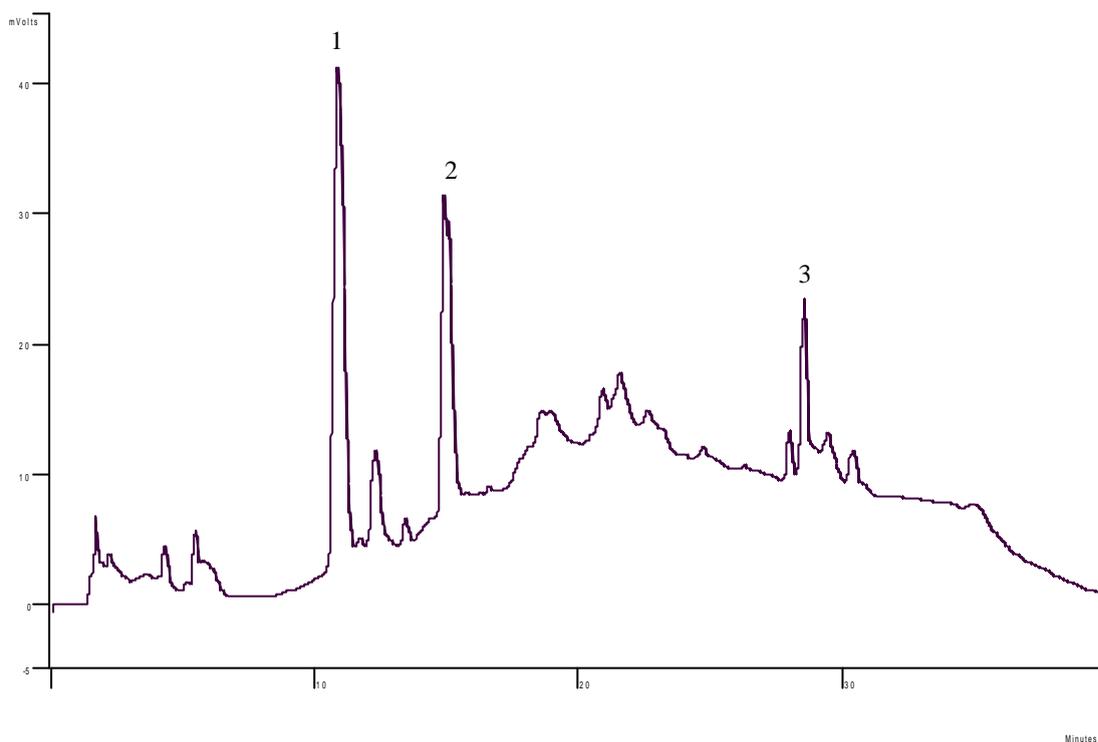


Figura 5: Perfil cromatográfico no comprimento de onda 250nm da fração antifúngica 5 do extrato clorofórmico de folhas.

Tabela 4: Tempos de retenção e porcentagem dos compostos das frações antifúngica 1, 2, 3, 4 e 5.

Fração	Pico	Tempo de Retenção (min)	Porcentagem na Amostra (%)
AF-1	1	1.9	6.25
AF-1	2	2.6	3.78
AF-1	3	7.9	55.45
AF-2	1	15.2	11.35
AF-2	2	28.4	6.04
AF-3	1	1.6	0.42
AF-3	2	10.3	1.40
AF-3	3	12.8	4.43
AF-3	4	21.8	4.45
AF-3	5	28.5	3.19
AF-4	1	10.7	3.30
AF-4	2	14.9	6.53
AF-4	3	28.5	5.72
AF-5	1	10.8	7.55
AF-5	2	14.8	2.95
AF-5	3	28.5	4.54

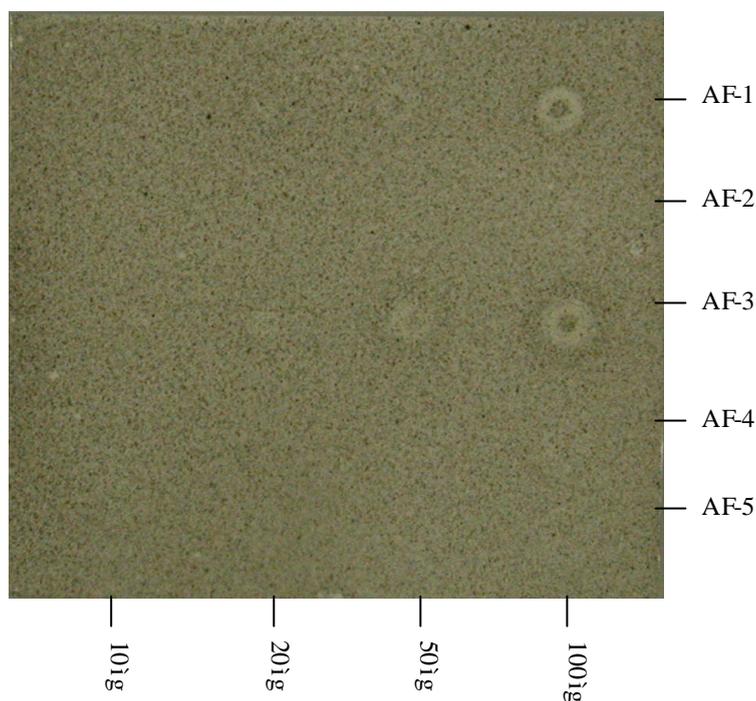


Figura 8: Limite de detecção das frações antifúngicas do extrato clorofórmico de *H. cordatum*.

3.4 Discussão:

Neste trabalho, o extrato de folhas em clorofórmio foi submetido a fracionamento biomonitorado.

Compostos com atividade antifúngica vem sendo descritos em diversas espécies de hipérico (*H. brasiliense*, *H. perforatum*). São descritas diversas classes de compostos com atividade antifúngica, por exemplo, floroglucínóis, óleos essenciais e xantonas.

No presente trabalho, a atividade fungitóxica detectada por GALLINA, (1999) foi comprovada nos extratos de folhas em clorofórmio. A atividade observada é consequência de pelo menos dois compostos um presente na fração AF-1, e o outro na fração AF-2.

Nas análises em CLAE a fração antifúngica 1 apresentou-se quase pura, sendo o composto de tempo de retenção 7.9 minutos, provavelmente o responsável pela atividade antifúngica. A fração antifúngica 2 apresenta composto com tempo de retenção 28.4 minutos

que é observado também nas frações antifúngicas 3, 4 e 5. De qualquer modo nenhum dos compostos dessas frações mostrou porcentagem maior que o composto da fração 1 que foi encaminhado para identificação química.

Os compostos antifúngicos das frações AF-1 e AF-2 apresentaram atividade média nas concentrações 100µg e 50µg, e não apresentaram atividade nas concentrações inferiores a 20µg

DALL'AGNOL *et al.*, (2003) verificaram atividade de diversas espécies de *Hypericum* contra *Candida albicans*. Em estudos posteriores utilizando 36 horas de incubação do meio de cultura com fungos (ao invés das 48 horas do primeiro estudo) verificaram o desenvolvimento de *Candida albicans*, o que indica que os extratos de *Hypericum* retardam o desenvolvimento desse fungo e isto pode justificar o uso popular das espécies de *Hypericum* no combate de outras micoses.

Até o momento, não foi possível caracterizar o composto da fração antifúngica 1 como sendo uma xantona. Outras classes de compostos como terpenóides também tem sido identificadas em outras espécies de *Hypericum* (ABREU *et al.*, 2004).

Assim sendo, podemos concluir que *Hypericum cordatum* apresenta compostos com atividade antifúngicas, embora o composto ativo possa não ser uma xantona.

4. Conclusões

Os extratos de *Hypericum cordatum* se mostraram ricos em flavonóides em especial flavonas e flavonóis o que é pouco comum para o gênero *Hypericum*.

Extratos de caules e folhas apresentaram perfil distinto, embora os principais compostos ocorram em ambos os órgãos.

Foram confirmados em caules e folhas quercetina e quercitrina e nos caules rutina e canferol.

Não foi detectado nenhum flavonóide sulfatado.

Não foi observada atividade antifúngica no extrato metanólico.

Atividade antifúngica foi comprovada para o extrato clorofórmico e é consequência de uma mistura de composto.

A fração AF-1 apresentou-se quase pura, sendo o composto com TR 7.9 minutos o principal componente da fração.

A fração AF-2 trata-se de uma mistura de compostos, sendo o composto com TR 15.2 minutos o principal componente da fração.

Verificou-se que as frações AF-3, AF-4 e AF-5 apresentam perfis cromatográficos semelhantes.

Os compostos ativos mostraram limite de detecção em 50µg.

A atividade antifúngica da mistura de compostos AF-3, 4 e 5 depende de concentrações superiores a 100µg.

5. Bibliografia

- ABREU, I.N. & MAZZAFERA, P. 2005. Effects of water and temperature stress of activity constituent *Hypericum brasiliense* Choisy. **Plant Physiology and Biochemistry** 43: 241-248
- ABREU, I.N.; PORTO, A.L.M.; MARSAIOLI, A.J. & MAZZAFERO, P. 2004. Distribution of bioactive substances in *Hypericum brasiliense* during plant growth. **Plant Science** 167: 949-954
- ALZUGARAY, D. & ALZUGARAY, B, 1983. **As plantas que curam** 2ª edição. Editora Três. São Paulo. 140p
- AUDI, E.A.; OTOBONE, F.; MARTINS, J.V.C. & CORTEZ, D.A.G. 2002. Preliminary evaluation of *Kielmeyra coriaceae* leaves extracts on the central nervous system. **Fitoterapia** 73: 517-519
- BALADRIN, M.F. & KINGHORN, A.D. 1993. Human medicinal agents from plants. **American chemical society** p.534
- BALADRIN, M.F.; KLOKE, J.A.; WURTELE, E.S. & BOLINGE, W.H. 1985. Natural plant chemicals. Source of industrial and medicinal materials. **Science** 228: 1054-1060
- BARNES, J.; ANDERSON, L.A. & PHILLIPSON, J.D. 2001. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology** 53: 583-600
- BRUNETON, J. Phenols and Phenolic acids In BRUNETON, J. 1995. **Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants**. Lavoisier Press. EUA. 211-227.
- CAKIR, A.; MAVI, A.; YILDIRIM, Y.; DURU, M.E.; HARMANDAR, M.; & CAZAZ, E. 2005. Isolation and characterization of antioxidant phenolic compounds from aerial parts of *Hypericum hyssopifolium* L. by activity guided fraction. **Journal of Ethnopharmacology** 87: 73-83

- CALIE, P.J.; SCHLLINGS, E.E. & WEBB, D.H. 1983. Flavonoid of the generic segregates *Ascyrum* and *Crookea* from *Hypericum*. **Biochemical Sistematic and Biology** 2: 107-109.
- CARDONA, M.L.; FERNANDEZ, I.; PEDRO, J.R. & SERRANO, A. 1990. Xanthones from *Hypericum reflexum*. **Phytochemistry** 29: 3003-3006
- CASTELÃO, J.F.; GOTTLIEB, O.R.; de LIMA, A.R.; MESQUITA, A.A.L. 1977. Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species – ¹³C NMR spectroscopy of xanthones. **Phytochemistry** 16: 735-740
- CHAUDARY, A. & WILLET, K.L. 2006. Inhibition of human cytochrome CYP1 enzymes by flavonoids of St. John's wort. **Toxicology** 217: 194-205
- CONFORTI, F. STATTI, A.G.; TUNDIS, R.; MENECHINI, F. & HOUGHTON, P. 2004. Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial parts. **Fitoterapia** 73: 479-483
- CORTEZ, D.A.G.; YOUNG, M.C.M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J.L. & HOSTETTSMANN, K. 1998. Xanthones, triterpenes and biphenil from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry** 47: 1367-1374
- COS, P.; HERMANS, N.; de BRUYNE, T.; APERS, S.; SINDABIWE, J.B.; BERGHE, D.V.; PIETERS, L. & VLIETINCK, A.J. 2002. Further evaluation of Rwanda medicinal plant extract for their antimicrobial and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology** 79: 155-163
- COUCEIRO, M.A.; AFREEN, F.; ZOBAYED, S.M.A. & KOZAI, T. 2006. Variation in major bioactive compounds of St. John's Wort. Effects of harvesting time, temperature and germplasm. **Plant Science** 170: 128-134
- CRUZ, F.G. & TEIXEIRA, J.S.R. 2004. Polyisoprenilated benzophenones with a tricyclo [4.3.1.1] undecane skeleton from *Clusia obdeltifolia*. **Journal of Brazilian Chemical Society** 15: 504-508

- CRUZ, F.G.; SANTOS, N.A.S.; DAVID, J.M.; GUEDES, M.L.S. & CHAVEZ, P.P. 1997. Coumarins from *Kielmeyera argentea*. **Phytochemistry** 48: 703-706
- CUESTA-RUBIO, O.; CASTRO, H.V.; URIBE, B.A.F. & CARDENÁS, J. 2001^a. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. **Phytochemistry** 57: 279-283
- CUESTA-RUBIO, O.; PADRONS, A.; CASTRO, V.H.; PIZZA, C. & RASTRELLI, L. 2001^b. Aristophenones A and B. A new tautomeric pair of polyisoprenilated benzophenones from *Garcinia aristata*. **Journal of Natural Products** 64: 973-975
- CUESTA-RUBIO, O.; CUELLAR, A.C.; ROJAS, N.; CASTRO, H.V.; RASTRELLI, L. & AQUINO, R. 1999. A polyisoprenilated benzophenone from Cuban propolis. **Journal of Natural Products**. 62 (7): 1013-1015
- DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRIG, D.; NÖR, C.; SARMENTO, L.; LAMB, L.; HASS, M.; von POSER, G.; SCAHPOVAL, E.E.S. 2003. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine** 10: 511-514
- Di STASI, L.C. 1995. **Plantas Mediciniais: Arte e Ciência**. UNESP. Brasil. 230p.
- DUKE, J.A. 1985. **Handbook of chemical plants**. CRC press. 667p.
- DULGER, B. & GONUZ, A. 2005. Antibacterial activity of endemic *Hypericum kazdhagensis*. **Fitoterapia** 76: 237-239
- ESPÓSITO, A.V.; PEREIRA, D.M.V.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, J.C.T. & MAISTRO, E.L. 2005. Evaluation of genotoxic potencial of *Hypericum brasiliense* (Gutiferae) in mammalian cell system *in vivo*. **Genetic and Molecular Biology** 28: 152-155
- FALKENBERG, M.B. Quinonas In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOMES, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, A. & PETROVICK, P.R. 2001. **Farmacognosia**. 3^a edição. Editora Universidade do Rio Grande do Sul. 833p.

- FERNNER, R.; SORTINO, M.; KUZE RATES, S.M.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRIG, D.; NÖR, C.; von POSER, G.; SCHAPOVAL, E. & ZACHINNO, S. 2005. Antifungal activity of some Brazilian *Hypericum* species. **Phytomedicine** 5: 213-217
- FERRAZ, A.B.F.; GRIVICICH, I.; von POSER, G.L.; FARIA, D.H.; KAYSER, G.B.; SCHWARTSMANN, G.; HERIQUES, A.T.; ROCHA, A.B. 2005. Antitumour activity of three benzopyrans isolated from *Hypericum polyanthenum*. **Fitoterapia** 216: 210-215
- FERRAZ, E.M.N.; ARAÚJO, E.L. & SILVA, S.I. 2004. Floristic similarities between lowland and montane of Atlantic Coastal Forest in northeastern Brazil. **Plant Ecology** 74: 59-71
- FRANKLIN, M.; CHI, J.; MCGAWAIN, C.; HOCKNEY, R.; REED, A.; CAMPLING, G.; WALE, R.W. & COWAN, P.J. (1999). Neuroendocrine evidence for dopaminergic actions of *Hypericum* extracts (LI 60) in health volunteers. **Biological Psychiatry** 46: 581-584
- FUGLEVAND, G. JACKSON, J.A. & JENKINS, G.I. 1996. UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathway interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. **The Plant Cell** 8: 2347-2357
- GADZOVKA, S.; STÉPHANE, M.; OUNNAR, S.; RIGHEZZA, M.; KASCAKOVA, S.; REFREGIERS, M.; SPASENOSKI, M.; JOSEPH, C. & HAGÈGE, D. 2005. Identification and quantification of hypericin and pseudohypericin in different *Hypericum perforatum* L. *in vitro* culture. **Plant Physiology and Biochemistry** 43: 591-601
- GALLINA, P. 1999. **Análise de compostos secundários de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson, comb. Nov (Gutiferae)**. Monografia apresentada a Univesidade Metodista. 47p.

- GIBBONS, S.; MOSER, E.; HAUSMANN, S.; STRAVI, M; SMITH, E. & CLENET, C. 2005. An anti-staphylococcus acylphloroglucinol from *Hypericum foliosum*. **Phytochemistry** 66: 1472-1475
- GOTTLIEB, O.R. & KAPLAN, M.A.C. 1990. Amazônia: Tesouro químico a preservar. **Ciência hoje** 61: 17-29
- GRAMACHO, R.S.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; QUEIROZ, M.E.L.R.; NEVES, A.A. & SADDI, N. 1999. Phenylcoumarins from *Kielmeyera alata*. **Phytochemistry** 51: 579-581
- GRAYER, R.J. & KOKUBUN, T. 2001. Plant fungal interaction: The search for phytoalexins and other antifungal compounds from higher plant. **Phytochemistry** 37: 19-4
- GROSSMAN, B.R. & Jacobs, b. 2000. On the structures of pluketiones B, D and E and their relationships to other polycyclic polyprenilated acylphloroglucinols. **Tetrahedron Letters** 41: 5165-5169
- HAHLBROCK, J.B. Flavonoids In: CONN, E.E. (1981). **The biochemistry of plants. A comprehensive treatise**. Academic Press. Nova Iorque. 425-591pp
- HARBORNE, J.B. 1973. **Phytochemical Methods**. Chappmann & Hall. Londres. 113p
- HARBORNE, J.B. 1979. Correlations between flavonoid chemistry, anatomy and geography in the Restionaceae. **Phytochemistry** 18: 1323-1327
- HARBORNE, J.B. 1984. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis**. Londres. Chapman and Hall. 288p.
- HOMANS, A.L. & FUCHS, A. 1970. Direct bioautography on thin layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substance. **Journal of chromatography** 51: 327-329
- HOSSEINZADEH, H.; KARIMI, G.R. & RAKSHANIZADEH, M. 2004. Anticonvulsant of *Hypericum perforatum*: role of nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology** 98: 207-208

- HOSTETTMANN, K. HOSTETTMANN, M. 1989. Xanthones In: **Methods in plants Biochemistry**. Vol. 1. Academic Press. p. 493-508
- HU, L.H.; YIP, S.C. & SIM, K.Y. 1999^a. Xanthones from *Hypericum ascyron*. **Phytochemistry** 52: 1371-1373
- HU, L.H.; KHOO, C.W.; VIDAL, J.J. & SIM, K.Y. 1999^b. Phloroglucinols derived from *Hypericum japonicum*. **Phytochemistry** 53: 703-709
- ISHIGURO, K; YAMAKI, M.; TAKAGI, S. & ISOI, K. 1990. Sarothralin G: A new compound from *Hypericum japonicum*. **Planta Medica** 56: 274-276
- JOLY, A.B. 1993. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal** 6^a edição. Editora Nacional. São Paulo. p. 332-334.
- KAPSOKALIVAS, D.; DIMITRIOU, H.; SKALKOS, D.; KONSTANTOUDAKIS, G.; FILIPIDIS, G.; STIAKAKI, E.; PAPAZOGLU, T. & KALMANTI, M. 2005. Does *Hypericum perforatum* L. extract show any specificity as photosensitizer of HL-60 leukemic cells and cord blood hemopoietic progenitors during photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology** 80: 208-216
- KHALIFA, A.E. 2005. Neural monoaminergic mediation of the effect of St. John's wort extract on prepulse inhibition of the acoustic startle response on rats. **Journal of Psychopharmacology** 19: 467-472
- KUPCHAN, S.M., STREELMAN, D.R. & SNEDEN, A.T. 1980. Psorospermim, a new antileukemic xanthone from *Psorospermum febrifugum*. **Journal of Plant Products** 43: 296-391.
- LOKVAN, J.; BRADDOCK, J.F.; REICHARDT, P.B. & CLAUSEN, T.P. 2000. Twopolyisoprenilatedbenzophenone from trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry** 55: 29-34.
- LOPEZ, J.C.L.; LOPEZ, J.C.N.; GILBERT, B. & BONINI, S. 1977. Osaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry** 16: 1001

- LUO, L.; SUN, Q.; MAO, Y.Y. LU, Y.H. & TANH, R.X. 2004. Inhibitory effects of flavonoids from *Hypericum perforatum* on nitric oxide synthase. **Ethnopharmacology** 93: 221-225
- MEARS, J.A. 1980. Flavonoid diversity and geographical endemism *Parthenium*. **Biochemical and Sistematical Evolution**8: 361-370
- MUKHERJHEE, P.K.; SARITHA, J.S.; SURESHI, B. 2001. Antibacterial spectrum of *Hypericum hookerianum*. **Fitoterapia** 72: 558-560
- MULLER, W.E.; ROLLI, M.; SCHAFFER, C.; HAFNER, U. 1997. Effects of *Hypericum* extracts in biochemical model of antidepressant activity. **Pharmacopsychiatry** 30: 102-107
- ODY, P. 1993. **The complete medicinal herbal**. Dorling Kindersley. Nova Iorque. 192p.
- OLIVEIRA, C.M.A.; PORTO, A.L.M.; BITTRISH, V. & MARSAIOLI, A.J. 1999. Two polyisoprenylated benzophenones from floral resins of three *Clusia* species **Phytochemistry** 50: 1073-1079
- OZTURK, Y.; AYDIN, S.; BEIS, R.; BASSER, K.H.C. & BERBEROGLU, H. 1996. Effects of *Hypericum perforatum* and *Hypericum calcinum* L. extracts on central nervous system in mice. **Phytochemistry** 139-146
- PANOCCA, I.; PERFUMI, M.; ANGELLETTI, S.; CICCOCIOPPPO, R. & MASSI, M. 2000. Effects of *Hypericum perforatum* on ethanol intake and on behavioral despair: a search for neurochemical system involved. **Pharmacological and Biochemistry Behavior** 66: 105-111
- PERFUMI, M.; MATTIOLI, L.M.; CUCCUELLI & MASSI, M. 2005. Reduction of ethanol intake by chronic treatment with *Hypericum perforatum*, alone and combined with naltrexone in rats. **Journal of Psychopharmacology** 19: 448-454
- PERFUMI, M.; SANTONI, M; CIPPITELLI, A.; CICCOCIOPPPO, R.; FROLDI, R. & MASSI, M. 2003. *Hypericum perforatum* CO₂ extractand opioid receptor antagonist

- act synergistically to reduced ethanol intake in alcohol preferring rats. **Alcohol Clinical and Experimental Research** 27: 1554-1552
- PERFUMI, M.; SANTONI, M. CICCOCIOPPO, R. & MASSI, M. 2002. Blocked of gamma-aminobutyric acid does not modify the inhibition of ethanol induced intake by *Hypericum perforatum* in rats. **Alcohol and Alcoholism** 37: 540-546
- PERFUMI, M.; PANOCCA, I.; CICCOCIOPPO, R.; VITALI, D.; FROLDI, R. & MASSIM, M. 2001. Effects of methanolic extract and a hiperforin-enriched CO₂ extract of *Hypericum perforatum* on alcohol intake rats. **Alcohol and Alcoholism** 36: 199-206
- PERFUMI M, CICCOCIOPPO R, ANGELETTI S, CUCCULELLI M, MASSI M. 1999. Effects of *Hypericum perforatum* extraction on alcohol intake in Marchigian Sardinian alcohol-preferring rats. **Alcohol and Alcoholism** 34: 690-698
- PICCINELLI, A.L.; CUESTA-RUBIO, O.; CHICA, M.B.; MAHMOOD, N.; PAGANO, B.; PAVONE, M. BARONE, V. & RASTRELLI, L. 2005. Structural revision of clusianone e 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of isoprenylated benzophenones. **Tetrahedron** 61: 8206-8211
- PINHEIRO, L. CORTEZ, D.A.G.; VIDOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M. & FERREIRA, A.G. 2003. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade moluscicida de *Kielmeyera variabilis* MART. **Química Nova** 26: 157-160
- REVZANI, A.H. OVERSTREET, D.H.; YANG, Y. & CLARCK, J.E. 1999. Attenuation of alcohol intake by the extract of *Hypericum perforatum* (St. John's wort) in two different strais of alcohol preferring rats. **Alcohol and Alcoholism** 34: 699-705
- REYES, M.H.; BASUALDO, M.C.; LOZADA, L.; ESTRADA, M.J.; SOLER, C. & CHILPA, R.R. 2004. HIV-1 Inhibition by extracts of Clusiaceae species from Mexico. **Biological and Pharmaceutical Bulletin** 27 (6): 916-920

- ROBSON, N.K.B. 2006. Studies in genus *Hypericum* L. (Clusiaceae). Section 9 *Hypericum sensu lato*(part 3): Subsection 1. *Hypericum* series 2. *Senanensia*, subsection 2. *Erecta* and section 9b. *Graveolentia*. **Systematic and Biodiversity** 4(1): 19-98
- ROBSON, NKB. 2001. Studies in genus *Hypericum* L. (Gutiferae). 4 (1) sections 7 *Roscyna* to 9. *Hypericum sensu lato* (part 1). **Bulletin of the (Natural History Museum), Botany**. Londres. 31: 37-88p
- ROBSON, N.K.B. 1995. *Hypericum* Linnaeus. **In: CULLEN, J. The European garden flora** 4. Cambridge. 44-74pp.
- ROBSON, N.K.B. 1981. Studies in genus *Hypericum* L. (Gutiferae) 2. character of genus. **Bulletin of the British Museum (Natural History), Botany** 8: 55-226
- ROBSON, N.K.B. 1977. Studies in genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 1. Infrageneric classification. **Bulletin of British Museum (Natural History), Botany** 5: 193-355.
- ROCHA, L.; MARTSON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C.; EVANS, H.S. & HOSTETTMANN, K. 1996. More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry** 42: 185-188
- ROCHA, L.; MARTSON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M.A.C. & HOSTETTMANN, K. 1995. Antibacterial phloroglucinol and flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry** 40: 1447-1452
- ROCHA, L.; MARTSON, A.; KAPLAN, M.A.C.; EVANS, H.S.; TULL, U.; TESTA, B. & HOSTETTMANN, K. 1994. An antifungal α -pyrone and xanthenes with monoaminoxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry** 36: 1381-1385
- ROWE, J. Benzenoids Extractives In: ROWE, J. 1989. **Natural products of wood plants I – Chemical extraneous to the lignocellulosic cell wall**. Springer Verlag. EUA. 369-393pp

- SACHEZ-MATEO, C.C.; BONKANKA, C.X.; PRADO, B. & RABANAL, R.M. 2005. Antidepressant activity of *Hypericum canariensis* L. and *Hypericum glandulosum* Ait. extracts in forced swimming test in mice. **Journal of Ethnopharmacology** 97: 541-547
- SALEH, N.A.M. 1979. The biosynthesis of flavonoid glycosides and their importance in chemosystematic. **Biochemical Systematics and Ecology** 7: 37-45.
- SCHIMITT, A.C.; RAVAZOLLO, A.P. & von POSER, G.L. 2001. Investigation of some *Hypericum* species from southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology** 77: 239-245
- SEABRA, R.M. & ALVES, A.C.; 1991. Quercetin-3-sulphate from *Hypericum elodes*. **Phytochemistry** 30: 1344-1345
- SEABRA, R.M.; VASCONCELOS, M.H.; ALVES, A.C. 1991. Flavonoids sulphates from *Hypericum undulatum*. **Revista Portuguesa de Farmacologia** 36: 16-18
- SILVA, B.A.; FERRERES, F. MALVA, J.O. & DIAS, A.C.P. 2005. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. **Food Chemistry** 90: 157-167
- SUZUKY, O.; KATSUMATA, Y.; OYS, M.; BLADT, S. & WGANER, H. 1984. Inhibition of monoaminoxidase by *Hypericum*. **Planta Medica** 50: 272-274.
- SUZUKI, O. KATSUMATA, Y.; OYA, M. & CHARI, U.M.; KLAPFENBERGER, R.; WAGNER, H. & HOSTETTMANN & HOSTETTMANN. 1978. **Biochemical Pharmacology** 27: 2075-2078.
- TAKAOKA, S.; NAKADE, K. & FAKUYAMA, F. 2002. The first total synthesis and neurotrophic activity of Clausiparacoline A, a prenylated, geranylated byaryl from *Clusia paralicola*. **Tetrahedron Lettes** 43: 6919-6923
- TANAKA, N.; OKASAKA, M.; SHIMARU, Y.; TAKANISHI, Y.; SATO, M. OKAMOTO, M. OSHIKAWA, T. AHMED, S.U.; CONSENTINO, L.M. & LEE, K.H. 2005.

- Biyouyanagin A, an anti-HIV agent from *Hypericum chinense* L. var. *salicifolium*. **Organic Letters** 7: 2997-2999
- TEIXEIRA, J.S.R. & CRUZ, F.G. 2005. Polyisoprenilated benzophenones derivatives from *Clusia obdeltifolia*. **Tetrahedron Letters** 46: 2813-2816
- THOISON, O.; CUONG, D.D.; GRAMAIN, A.; CHIARONI, A.; van HUNG, N. & SÉVENET, T. 2005. Further rearranged prenylxanthone and benzophenones from *Garcinia bracteata*. **Tetraheron Letters** 61: 8529-8535
- TOKER, Z.; KVZVL, G.; OZEN, H.Ç.; KVZVL, M. & ERTEKIN, S. 2006. Composition of the essential oils of *Hypericum* species from Turkey. **Fitoterapia** 77: 57-60
- TRAYNOR, N.J.; BEATTIE, P.E.; IBBOTSON, S.H.; MOSELEY, H.; FERGUSON, J. & WOODS, J.A. 2005. Photogenotoxicity of hipericine in HaCaT keratinocyte: Implications for St John's wort supplement and High doses of UVA-1 therapy. **Toxicology Letters** 158: 220-224
- VIANA, A.; REGO, J.C.; von POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J. & RATES S.M.K. 2005. The antidepressant effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Gutiferae) on forced swimming test result from an inhibition of neuronal monoamino uptake. **Neuropharmacology** 49: 1042-1052
- VIEIRA, R.F. 1993. Espécies medicinais prioritárias para conservação – Levantamento preliminar. Brasil. CENARGEN (comunicado técnico). 14p.
- VIEL, T.A. 2003. **Reversão do bloqueio colinérgico por frações isoladas de *Cuphea carthaginensis* (Jacq.) J.F.Mcbr. (sete sangrias). Estudo comparativo em sinapses centrais e periféricas.** Tese apresentada à Universidade Federal do Estado de São Paulo – Escola Paulista de Medicina.
- VOLAK, J. & STODOLA, J. 1990. **Plantas Medicinais**. Ed. Inquérito. 319p.
- WAGNER, H. & BLADT, S. 2001. **Plant drug analysis. Thin Layer chromatography atlas**. 2 edição. Spriger.

- WOLLENWEBER, E.; DIETZ, H. 1981. Scale insect feeding on farinose species of *Pityrogramma*. **American Fern Journal** 71: 10-12
- WU, Q.L.; WANG, S.P.; DU, L.J.YANG, J.S. & XIAO, P.G. 1998. Xanthones from *Hypericum japonicum* and *H. henryi*. **Phytochemistry** 49: 1395-1402
- XU, M.J.; DONG, J.F. & ZHU, M.Y. 2005. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericine production on *Hypericum perforatum* cell suspension culture through a jasmonic acid dependent pathway. **Plant Physiology** 139: 991-998.
- ZOU, Y.; LU, Y. & WEI, D. 2004. Hypocholesterolemic effects of a flavonoid rich extract of *Hypericum perforatum* L. in rats fed a cholesterol rich diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53: 2462-2466