



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FABIANA CRISTINA MISSAU

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DAS
ESPÉCIES *Polygala paniculata* E *Polygala pulchella*.**

FLORIANÓPOLIS

2008

FABIANA CRISTINA MISSAU

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DAS
ESPÉCIES *Polygala paniculata* E *Polygala pulchella*.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade Federal de
Santa Catarina por Fabiana Cristina Missau, como
requisito parcial para a obtenção do título de Doutora
em Química.

FLORIANÓPOLIS

2008

Fabiana Cristina Missau

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, ESTRUTURAIS E BIOLÓGICAS DAS
ESPÉCIES *Polygala paniculata* E *Polygala pulchella*.**

Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do título de **Doutora em Química**
no **Programa de Pós Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 25 de abril de 2008.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa de Pós Graduação em Química (UFSC)

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti
UFSC (Orientador)

Prof^a. Dr^a. Inês Maria Costa Brighente
UFSC

Prof. Dr. Ademir Farias Morel
UFSM (Relator)

Prof. Dr. Adair R. Soares dos Santos
UFSC

Prof^a. Dr^a. Miriam Inês Marchi
UNIVATES

Prof. Dr. Miguel S. Balparda Caro
UFSC

Ao prof. Dr. Moacir G. Pizzolatti,
meu especial agradecimento pela
orientação, confiança e dedicação
prestadas no decorrer deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre guiou meu caminho, proporcionando-me força e sabedoria para desenvolver este trabalho.

À minha família e a família do Luciano Retzlaff pela compreensão e carinho prestados em todos os momentos.

Ao meu noivo Luciano que muito me ajudou nesta longa caminhada com seu amor, dedicação e compreensão.

Ao professor Dr. Moacir G. Pizzolatti pelo apoio e orientação demonstrados no decorrer deste trabalho.

Aos professores: Dr^a. Inês Maria Costa Brighente (UFSC), Dr. Ademir Farias Morel (UFSM), Dr^a. Miriam Inês Marchi (UNIVATES), Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos (UFSC) e Dr. Miguel Balparda Caro (UFSC) pelo auxílio para a melhoria deste trabalho, como membros da banca examinadora.

Aos meus colegas de laboratório Aline Zacarias, Analice Zuchinalli, Andressa Giglioli, Beatriz Mendes, Cristian Soldi, Henrique Moresco, Heros Horst, Juliana Dalmarco, Luciana Tavares, Michele Magina, Munique Dias, Solomon Amoah e Susana Johann.

Ao Vinicius Ilha pela ajuda com os espectros de RMN.

Aos professores e funcionários da Pós Graduação em Química pelo apoio e colaboração.

Ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - pelo suporte financeiro.

À UFSC pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À todas as pessoas não mencionadas que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas.....	xiv
Abreviaturas.....	xvi
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1 Considerações Gerais sobre o Gênero <i>Polygala</i>	3
2.2 Posição Sistemática de <i>Polygala paniculata</i> L e <i>Polygala pulchella</i>	6
2.3 Xantonas do Gênero <i>Polygala</i>	6
2.3.1 Biossíntese das Xantonas	6
2.4 Cumarinas no Gênero <i>Polygala</i>	14
2.4.1 Biossíntese das cumarinas	14
2.5 Espécie <i>Polygala paniculata</i> L.....	16
2.6 Espécie <i>Polygala pulchella</i> A.....	17
3. Objetivos	18
3.1 Objetivos gerais	18
3.2 Objetivos específicos	18
4. Resultados e Discussão	19
4.1 <i>Polygala paniculata</i>	19
4.1.1 Composição dos constituintes voláteis de <i>P. paniculata</i> por SPME-CG-EM	20
4.1.2 Isolamento e identificação dos constituintes de <i>P. paniculata</i>	23
4.1.2.1 Espinasterol (8).....	23
4.1.2.2 Quercetina 3-rutinosídeo (Rutina) (9)	25
4.1.3 Isolamento de xantonas	27
4.1.3.1 1-hidroxi-5-metóxi -2,3-metilenodioxixantona (10).....	27
4.1.3.2 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11).....	29
4.1.3.3 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (12) (6-desoxijacareubin).....	31
4.1.3.4 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (13)	33
4.1.3.5 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona (14).....	35
4.1.4 Posição das prenil cumarinas no gênero.....	41
4.1.4.1 7-geraniloxicumarina (1) (Aurapteno)	41
4.1.4.2 7-metóxi-8-(1',2'-epóxi-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (2) (febalosina)	43
4.1.4.3 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (15)	45

4.2 Isolamento e identificação dos constituintes de <i>P. pulchella</i>	50
4.2.1 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11).....	50
4.2.2 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16).....	50
4.3 Estudo da Reatividade Química da Febalosina (2).....	56
4.3.1 Reação da febalosina (2) com H ₂ O	58
4.3.2 Reação da febalosina (2) com metanol e metóxido de sódio	59
4.3.3 Reação da febalosina (2) com etanol	60
4.3.4 Acetilação da febalosina (2).....	61
4.3.5 Reação da febalosina com isopropóxido de sódio	62
4.3.6 Reação da febalosina com <i>n</i> -butóxido de sódio	63
4.4 Avaliação da atividade biológica	66
4.4.1 Neurotoxicidade induzida por MeHg (EBEtOH de <i>P. paniculata</i> , Método B)	67
4.4.1.1 Atividade enzimática da glutaciona peroxidase e glutaciona redutase no córtex cerebral e cerebelo de camundongos	67
4.4.2 Atividade antinociceptiva (<i>P. paniculata</i>)	69
4.4.2.1 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) em camundongos	70
4.4.2.2 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina em camundongos.....	70
4.4.2.3 Efeito do EBEtOH e dos compostos isolados, febalosina (2), aurapteno (1) e rutina (9) sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	71
4.4.2.4 Curva tempo-resposta do EBEtOH no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato (10 µmol/pata) em camundongos.....	72
4.4.3 Atividade Antiinflamatória do EBEtOH de <i>P. paniculata</i>	73
4.4.3.1 Efeito do EBEtOH no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos.	73
4.4.4 Atividade gastroprotetora do EBEtOH de <i>P. paniculata</i>	74
4.4.4.1 Efeito do EBEtOH sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% em ratas.	74
4.4.4.2 Efeito do EBEtOH sobre a quantidade de muco na mucosa gástrica após a indução de lesões com etanol 70% em ratas.....	75
4.4.4.3 Avaliação da atividade antifúngica.....	76

4.4.4.4 Avaliação da atividade biológica dos compostos isolados de <i>P. paniculata</i> através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	78
Atividade biológica de <i>Polygala Pulchella</i>	80
4.4.5 Atividade ansiolítica no modelo labirinto em cruz elevado	80
4.4.6 Atividade antidepressiva no teste do nado forçado e Teste da suspensão da cauda	82
4.4.7 Avaliação da atividade antifúngica de <i>P. pulchella</i>	83
4.4.8 Avaliação da atividade biológica dos extratos brutos de <i>P. pulchella</i> através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach.....	84
5. Materiais e Métodos.....	85
5.1 Instrumentação	85
5.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear.....	85
5.1.2 Determinação de Ponto de Fusão	85
5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho	85
5.1.4 CG-EM	85
5.1.5 PROB (EI-MS).....	86
5.1.6 RX.....	86
5.1.7 Materiais e Métodos Cromatográficos	86
5.2 Material vegetal.....	87
5.2.1 Coleta e identificação botânica	87
5.3 Aplicação da técnica de SPME-CG-EM na determinação dos compostos voláteis das flores e raízes de <i>Polygala paniculata</i>	87
5.4 Obtenção dos extratos brutos de <i>Polygala paniculata</i>	88
5.5 Fracionamento e isolamento dos compostos	88
5.5.1 Fracionamento do Método A.....	89
Extrato bruto diclorometano	90
Extrato bruto etanólico	90
5.5.2 Fracionamento do Método B.....	91
Obtenção do extrato hexânico (EH).....	91
Fracionamento do EB _{EtOH}	92
5.6 Fracionamento das flores de <i>Polygala pulchella</i>	93
Obtenção dos extratos brutos	93
5.7 Fracionamento das folhas, caules e raízes de <i>Polygala pulchella</i>	93
Obtenção dos extratos	93
Fracionamento do EB _{DM}	94

5.8 Modificações estruturais	95
5.8.1 Reação da febalosina (2) com H ₂ O	95
5.8.2 Reação da febalosina (2) com metanol em meio ácido	96
5.8.3 Reação da febalosina (2) com metóxido de sódio	96
5.8.4 Reação da febalosina (2) com etanol	97
5.8.5 Acetilação da febalosina (2).....	97
5.8.6 Reação da febalosina (2) com isopropóxido de sódio	98
5.8.7 Reação da febalosina (2) com <i>n</i> -butóxido de sódio.....	98
5.8.8 Reação da febalosina (2) com acetona	99
5.9 Avaliação das atividades biológicas	100
5.9.1 Efeito protetor do EBEtOH de <i>P. paniculata</i> contra neurotoxicidade em camundongos induzida por MeHg	101
5.9.1.1 Animais e tratamento	101
5.9.1.2 Teste do rota-rod.....	101
5.9.1.3 Determinações bioquímicas.....	102
5.9.1.4 Experimentos <i>in vitro</i> para detectar possíveis efeitos quelantes	102
5.9.2 Estudo das propriedades antinociceptivas do EBEtOH do Método B e compostos isolados de <i>P. paniculata</i>	102
5.9.2.1 Vias de administração.....	102
5.9.2.2 Métodos	103
5.9.2.3 Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), em camundongos.	103
5.9.2.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, em camundongos.....	103
5.9.2.5 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, em camundongos.....	104
5.9.3 Estudo da atividade antiinflamatória do EBEtOH de <i>P. paniculata</i>	105
5.9.3.1 Avaliação da atividade antiinflamatória do EBEtOH no modelo do edema de pata, induzido pela carragenina em ratos	105
5.9.4 Estudo da atividade antiúlcero-gênica e anti-secretora ácida do EBEtOH, em ratas.	105
5.9.4.1 Lesões gástricas induzidas por etanol.....	105
5.9.5 Análise Estatística.....	106
5.9.6 Atividade Antifúngica	106
5.9.6.1 Solventes usados na solubilização dos produtos naturais.....	106

5.9.6.2 Reagente usado para a revelação dos testes.....	106
5.9.6.3 Meios de cultura.....	106
5.9.6.4 Origem dos microrganismos	107
5.9.6.5 Preparo do inóculo	107
5.9.6.6 Método de Triagem: bioautografia direta	107
5.9.6.7 Método de Microdiluição para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	108
5.9.7 Avaliação da atividade biológica dos compostos isolados de <i>P. paniculata</i> e análogos estruturais da febalosina através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	109
5.10 Atividades biológicas de <i>P. pulchella</i>	110
5.10.1 Animais e tratamento	110
5.10.2 Atividade ansiolítica no modelo labirinto em cruz elevado	110
5.10.3 Atividade antidepressiva	111
5.10.3.1 Teste do nado forçado	111
5.10.3.2 Teste da suspensão da cauda no modelo do nado forçado	111
6. Conclusões	112
Referências Bibliográficas	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2-1 - Núcleo básico das xantonas.	6
Figura 2-2 - Rota biossintética chiquimato-acetato para a formação de xantonas.....	7
Figura 2-3 - Rota biossintética para a formação de xantonas oxigenadas (substituição em 1,3,5: 1,3,7; 1,3,5,6 e 1,3,6,7).	8
Figura 2-4 - Transformação de benzofenonas em xantonas via intermediários quinonóides. 9	
Figura 2-5 - Transformação de benzofenonas em xantonas via 2,2'-dihidroxibenzofenonas. 9	
Figura 2-6 - Exemplos de xantonas preniladas.	13
Figura 2-7 - Núcleo básico das cumarinas.	14
Figura 2-8 - Origem biossintética de cumarinas.	15
Figura 2-9 – Fotos de <i>Polygala paniculata</i>	17
Figura 2-10 – Foto de <i>Polygala pulchella</i>	17
Figura 4-1 - Etapas num processo analítico visando à análise química por CG.	20
Figura 4-2 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{H-C}$, HMBC da piranoprenilxantona (14) em CD ₃ OD a 400 MHz.	38
Figura 4-3 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{H-C}$, HMBC da piranoprenilxantona (14) em CD ₃ OD a 400 MHz.	39
Figura 4-4 - Espectro expandido de RMN 2D, homonuclear $^1H-^1H$, NOESY da piranoprenilxantona (14) em CD ₃ OD a 400 MHz.	40
Figura 4-5 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{H-C}$, HMBC da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (15) em CDCl ₃ a 400 MHz.	48
Figura 4-6 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{H-C}$, HMBC da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (15) em CDCl ₃ a 400 MHz.	49
Figura 4-7 – Estrutura de Raio-X do composto 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (15).	49
Figura 4-8 – Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear HETCOR da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16) em C ₅ D ₅ N a 100 MHz.	53
Figura 4-9 – Espectro expandido de RMN 2D, homonuclear $^1H-^1H$, COSY da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16) em C ₅ D ₅ N a 400 MHz.	54
Figura 4-10 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{C-H}$ HMBC da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16) em C ₅ D ₅ N a 400 MHz.	55
Figura 4-11 – Modificações estruturais da febalosina usando a abertura do anel epóxido com diferentes nucleófilos.....	57

Figura 4-12 – Efeito de MeHg e EBEtOH de <i>P. Paniculata</i> em níveis de TBARS no córtex cerebral e cerebelo de camundongos.	68
Figura 4-13 – Efeito do EBEtOH sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Cada grupo representa a média de 6-12 animais, e as barras verticais o E.P.M.	70
Figura 4-14 – Efeito do EBEtOH sobre a nocicepção induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.....	71
Figura 4-15 – Efeito do EBEtOH na nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M.....	71
Figura 4-16 - Efeito da febalosina (A), aurapten (B) e rutina (C), em relação à nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média de 6 – 12 animais e as barras verticais o E.P.M.	72
Figura 4-17 - Curva tempo-resposta do EBEtOH no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média \pm erro padrão da média de 6 -12 animais e as barras verticais o E.P.M.	73
Figura 4-18 - Efeito do EBEtOH sobre o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E.P.M.....	74
Figura 4-19 - Efeito do EBEtOH, sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 70% (A e B). Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E.P.M.	75
Figura 4-20 - Efeito do tratamento dos animais com EBEtOH sobre as concentrações de muco da mucosa glandular gástrica de ratas (A e B). Cada grupo representa a média da concentração da Alcian Blue e as barras verticais o E.P.M.	75
Figura 4-21 - Obtenção da dose letal 50% frente ao teste de toxicidade com <i>A. salina</i>	78
Figura 4-22 - Efeito do tratamento dos animais com EBEtOH no modelo labirinto em cruz elevado.....	81
Figura 4-23 - Efeito do tratamento dos animais com EBAcOEt no modelo labirinto em cruz elevado.....	81
Figura 4-24 - Efeito do tratamento dos animais com EBCH ₂ Cl ₂ no modelo labirinto em cruz elevado.....	81
Figura 4-25 – Efeito do tratamento dos animais com EBEtOH, EBAcOEt e EBCH ₂ Cl ₂ na ação antidepressiva no teste do nado forçado.....	82
Figura 4-26 – Efeito do tratamento dos animais com EBEtOH, EBAcOEt e EBCH ₂ Cl ₂ na ação antidepressiva no teste da suspensão da cauda.	83

Figura 5-1 - Fluxograma de isolamento dos compostos de <i>Polygala paniculata</i> pelo Método A.	89
Figura 5-2 - Fluxograma de isolamento de compostos de <i>Polygala paniculata</i> pelo Método B.	91
Figura 5-3 - Fluxograma de isolamento dos compostos do caule, folhas e raízes de <i>Polygala pulchella</i>	94
Figura 5-4 - Monitoramento dos compostos através do bioensaio com <i>Artemia salina</i> L. ...	109

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2-1 – Atividades biológicas e classe dos principais compostos de algumas espécies de <i>Polygala</i>	4
Tabela 4-1 - Fibras de SPME disponíveis comercialmente.....	21
Tabela 4-2 – Componentes voláteis das flores e raízes de <i>P. paniculata</i>	22
Tabela 4-3 – Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) do espinasterol com os valores da literatura (Pinheiro, 1996).	24
Tabela 4-4 - Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) da rutina (9) com os valores da literatura (Markham, 1976).....	26
Tabela 4-5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da xantona (10) em CDCl_3 a 400/100 MHz.....	28
Tabela 4-6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	30
Tabela 4-7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (12) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	32
Tabela 4-8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (13) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	34
Tabela 4-9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC da 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona (14) em CD_3OD	37
Tabela 4-10 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da cumarina aurapteno (1) em CDCl_3	42
Tabela 4-11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da febalosina (2) em CDCl_3 e valore da literatura (Zakaria et al., 1988).	44
Tabela 4-12 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (15) em CDCl_3	47
Tabela 4-13 - Dados de RMN de ^{13}C , ^1H e HMBC da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	52
Tabela 4-14 - Dados de RMN ^1H (CDCl_3 a 400 MHz) da febalosina e seus derivados.....	65
Tabela 4-15 – Efeito do MeHg e EBEOH de <i>P. Paniculata</i> no tratamento da (GPx) e (GR) no córtex cerebral e cerebelo em camundongos.	68
Tabela 4-16 – Efeito do MeHg e do EBEOH de <i>P. paniculata</i> na coordenação motora no teste do rota-rod	69
Tabela 4-17 – Média do halo de inibição em mm da atividade antifúngica pelo Método bioautográfico direto dos extratos de <i>Polygala paniculata</i>	77
Tabela 4-18 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/mL dos extratos e alguns compostos de <i>Polygala paniculata</i> frente a fungos de interesse médico.....	77

Tabela 4-19 - Teste de toxicidade para <i>Artemia salina</i> Leach dos extratos brutos de <i>P. paniculata</i> (TAS < 1000 ppm).....	79
Tabela 4-20 – Teste de toxicidade para <i>Artemia salina</i> Leach dos compostos isolados de <i>P. paniculata</i> (TAS < 100 ppm).....	79
Tabela 4-21 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, µg/mL) dos extratos de <i>Polygala pulchella</i> frente a fungos de interesse médico.	84
Tabela 4-22 - Teste de toxicidade para <i>Artemia salina</i> Leach dos extratos brutos de <i>P. pulchella</i> (TAS < 1000 ppm).....	84

ABREVIATURAS

- δ : Deslocamento químico
- Φ : Diâmetro interno
- BHI: Brain heart infusion (meio de cultura)
- C: Controle
- CC: Cromatografia em coluna
- CCD: Cromatografia em camada delgada
- CGAR-EM: Cromatografia gasosa de alta resolução-espectrometria de massas
- CIM: Concentração Inibitória Mínima
- CL: Controle lesado
- CNL: Controle não lesado
- cm^{-1} : Unidade de número de onda em centímetro recíproco
- COSY: Correlation Spectroscopy (Espectroscopia 2D ^1H - ^1H)
- d: Duplete
- dd: Duplo duplete
- DI_{50} : Dose Inibitória de 50%
- DL_{50} : Dose letal de 50%
- EDM: Extrato bruto diclorometano
- EBEtOH: Extrato bruto etanólico
- EM: Espectrometria de massa
- E.P.M.: Erro padrão da média
- HETCOR: Heteronuclear Correlation (Espectroscopia 2D ^1H - ^{13}C a uma ligação)
- HMBC: Heteronuclear Correlation (Espectroscopia 2D ^1H - ^{13}C a longa distância)
- HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence (Espec. 2D ^1H - ^{13}C a uma ligação)
- ID: Inserção direta
- IK: Índice de Kovats
- IM : Inibição máxima
- i.p.: Intraperitoneal
- i.pt.: Intraplantar
- i.t.: Intratecal
- IV : Infravermelho
- J : Constante de acoplamento (Hz)
- LCE: Labirinto em cruz elevado

m: Multipleteo

min.: Minutos

m/z: Razão massa/carga

MOPS: Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

P : Indicativo de significância

PDMS: Polidimetilsiloxano

Pf.: Ponto de fusão

ppm: Parte por milhão

q: Quarteto

QIM: Quantidade Inibitória Mínima

Rf. : Fator de retenção

RMN ¹H: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ¹³C: Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

RPM: Rotação por minuto

RPMI: Meio de cultivo sintético

RX: raio X

s: Singleto

SPME: Solid-phase microextractions

t : Tripleto

TAS: Toxicidade frente à *Artemia salina*

TI: Tempo de imobilidade

TMS: Tetrametilsilano

TNF: Teste do nado forçado

TPA: Tempo de permanência nos braços abertos

TR: Tempo de retenção

TSC: Teste da suspensão da cauda

v.o: Via oral

RESUMO

As espécies *Polygala paniculata* e *Polygala pulchella* são usadas na medicina popular para o controle e tratamento de várias doenças.

A metodologia de isolamento e caracterização envolveu técnicas de fracionamento cromatográfico, recristalizações, e análises espectroscópicas de Infravermelho, Raio-X, Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC, COSY, NOESY, espectrometria de Massas e comparação com os dados da literatura.

Da *Polygala paniculata* foram identificados os compostos espinasterol (**8**), rutina (**9**), 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (**10**), 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**), 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (**12**), 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**), 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3';1,2)-xantona (**14**) e as cumarinas aurapteno (**1**), febalosina (**2**) e 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**). O composto 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3';1,2)-xantona (**14**) é uma xantona inédita na literatura, e os compostos 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (**12**), e 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**), foram isolados pela primeira vez em *P. paniculata*. A 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) foi considerada como artefato de isolamento.

Por SPME-CG-EM foram caracterizados nas flores de *P. paniculata* 25 compostos representando 98,69% do total dos constituintes voláteis, sendo, acetato de bornila (25,00%), 1,8-cineol (12,45%), pent-2-enal (9,97%) e 1-undeceno (9,48%) os compostos majoritários. Nas raízes foram identificados 13 compostos representando 99,67% do total, onde o salicilato de metila (89,13%) foi o composto majoritário. Esses resultados explicam o uso em aplicações locais do seu extrato alcoólico em torceduras, machucados ou reumatismo das articulações.

Da *Polygala pulchella* foram identificados os compostos 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**), também isolada de *P. paniculata*, porém é o primeiro relato na espécie *P. pulchella* e 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**) inédita na literatura.

Juntamente com o estudo fitoquímico foram realizados ensaios biológicos para as atividades antinociceptiva, antiinflamatória, protetora gástrica, antinociceptiva, antifúngica, neuroprotetora, e toxicidade frente à *Artemia salina*.

Os resultados apresentados neste trabalho mostram a importância de estudos fitoquímicos e atividade biológica de espécies usadas na medicina popular, porém seus efeitos não foram cientificamente comprovados pela ciência. Estes estudos nos permitem verificar através de ensaios biológicos, o potencial terapêutico destas plantas.

ABSTRACT

The *Polygala paniculata* and *Polygala pulchella* species are used in traditional medicine for the control and treatment of several diseases.

The isolation methodology and characterization involved the techniques of chromatographic fractioning, recrystallization, and spectroscopy analysis of Infrared, RX, MNR Spectroscopy of ^1H , ^{13}C , DEPT, HMQC, HMBC, COSY, NOESY, mass-spectrometry and also by comparison with literature data.

The following compounds: spinasterol (**8**), rutin (**9**), 1-hydroxy-5-methoxy-2,3-methylenedioxyxanthone (**10**), 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone (**11**), 1,5-dihydroxy-6',6'-dimethylpyrano-(2',3':3,2)-xanthone (**12**), 1-hydroxy-3,7-dimethoxyxanthone (**13**) 3,5-dihydroxy-6',6'-dimethylpyrano-(2',3':1,2)-xanthone (**14**) and the coumarins Aurapten (**1**), phebalosin (**2**), 7-methoxy-8-(1',2'-acetal-3'-methyl-3'-butenyl)-coumarin (**15**) were identified from *Polygala paniculata*. The compound 3,5-dihydroxy-6',6'-dimethylpyrano (2',3':1,2)-xanthone (**14**) is a new compound and 1,5-dihydroxy-6',6'-dimethylpyrano-(2',3':3,2)-xanthone (**12**) and 1-hydroxy-3,7-dimethoxyxanthone (**13**) were firstly isolated from *Polygala paniculata*. The 7-methoxy-8-(1',2'-acetal-3'-methyl-3'-butenyl)-coumarin (**15**) was considered a coumarinic artifact.

By SPME-CG-MS, 25 compounds were characterized from *P. paniculata* flowers representing 98.69% of the total, which consists, bornyl acetate (25.00%), 1,8-cineole (12.45%), pent-2-enal (9.97%) e 1-undecene (9.48%) the major compounds. From *P. paniculata* roots, 13 compounds were identified representing 99.67% of the total. From this, methylsalicilate was found as the major component (89.13%). These results explain why its alcolic extract is used in local application for sprains, injuries or rheumatism of the joints.

From *Polygala pulchella* the compounds 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone (**11**) also identified from *P. paniculata*, and 1,5-dihydroxy-2,3- methylenedioxyxanthone were identified. However this is the first time of isolation 1,5-dihydroxy-2,3- dimethoxyxanthone (**16**) from *P. pulchella* and the latter is a new compound.

Together with phytochemistry study, biological assays were carried out to investigate antinociceptive, anti-inflammatory, gastroprotective, antinociceptive, antifungal, neurotoxicity, activities as well as toxicity by *Artemia salina*.

The results obtained in this study show the importance of research into species in traditional medicine, which are most often unknown by science. These studies allow us to verify, through the isolated compounds, the chemotaxonomic profiles and, through the biological assays, their potential therapeutical action.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos é intensa a busca de remédios que atuem especificamente nas diversas moléstias já descobertas. Devido aos vários efeitos colaterais apresentados pelos fármacos convencionais, bem como sua ineficácia perante alguns casos, tornou-se necessária a busca de fontes alternativas de medicamentos, encaminhando-se pesquisas sobre novas drogas de origem natural. As fontes abundantes de recursos naturais encontram-se espalhadas principalmente na região Amazônica, contendo uma variedade enorme de compostos orgânicos de origem natural com ação biológica ainda desconhecida pelos cientistas. É com este objetivo que botânicos, biólogos, médicos, químicos, bioquímicos farmacólogos e farmacologistas, entre outros, dedicam-se sob diferentes aspectos ao estudo e aproveitamento de espécies da Flora Brasileira.

Os compostos orgânicos de origem natural formam um grande grupo conhecido como produtos naturais ou metabólitos secundários. Para esclarecer a origem biossintética dos metabólitos secundários faz-se necessário conhecer a origem dos metabólitos primários.

A notável capacidade que os vegetais possuem em produzir durante a fotossíntese os metabólitos primários faz com que os mesmos sejam amplamente distribuídos, podendo encontrá-los em todos os organismos vivos, sendo considerados metabólitos essenciais. Podemos citar como exemplos desta classe de compostos os açúcares, os aminoácidos, os lipídios, etc. (Simões et al., 2000).

Os metabólitos secundários geralmente apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular, marcantes atividades biológicas, e diferentemente dos metabólitos primários, são encontrados em concentrações relativamente baixas e em determinados grupos de plantas, tendo como exemplos alcalóides, flavonóides, cumarinas, xantonas, esteróides entre outros (Simões et al., 2000). Outra característica dos metabólitos secundários é a sua importância na quimiotaxonomia de famílias e gêneros das espécies vegetais.

Deve-se dar atenção especial ao uso popular de plantas medicinais, pela maneira como as informações sobre suas propriedades curativas são transmitidas. Partindo de crenças e tradições seculares, algumas investigações científicas estão sendo realizadas com plantas ainda desconhecidas quimicamente.

São inúmeros os exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos, direta ou indiretamente, de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo dentre outros a morfina. Além disso, cerca de 60% a 75% dos medicamentos para tratamento do câncer e

de doenças infecciosas que estão disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento, são derivados de produtos naturais (Yunes e Calixto, 2001; Newman et al., 2003).

Estes dados justificam o crescente interesse da indústria farmacêutica na produção de agentes terapêuticos de origem natural, inclusive em países de clima tropical, como o Brasil, que apresentam grande biodiversidade. Entre os países da América Latina, somente o Brasil detêm cerca de 20-22% das plantas e microrganismos do planeta (Yunes e Calixto, 2001). Porém, apesar de toda diversidade natural, até por volta do ano 1996, aproximadamente 84% dos fármacos presentes no mercado brasileiro eram importados e 60% de todos os fármacos processados eram consumidos por somente 23% da população, fazendo com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais se mantivessem como a principal fonte de medicamentos para a maioria da população (Elizabetsky e Costa-Campos, 1996).

Para a sociedade dos países em desenvolvimento, a produção e utilização de fitoterápicos padronizados com seus benefícios comprovados e de alta qualidade, podem facilitar o acesso da população a medicamentos seguros e de baixo custo, facilitando ainda o crescimento da fitomedicina nacional e desta forma, apresentando impacto na economia local (Elizabetsky e Costa-Campos, 1996).

Em razão do importante uso na medicina popular, algumas espécies do gênero *Polygala* (Polygalaceae) já foram alvo de estudos químicos e biológicos. Análises químicas de espécies do gênero mostram a forte presença de metabólitos secundários reconhecidamente bioativos com destaque para cumarinas (Cristiano et al., 2003), flavonóides (Rao e Raman, 2004) e xantonas (Dall'Acqua et al., 2002), evidenciando que tais plantas são fontes potenciais de substâncias farmacologicamente ativas.

Neste contexto, realizou-se uma breve revisão dos principais aspectos da família e gênero nas quais as espécies *P. paniculata* e *P. pulchella* pertencem. Por fim, serão discutidos os aspectos químicos e farmacológicos das principais classes de substâncias identificadas nesta espécie, xantonas e cumarinas, que foram os principais alvos deste estudo.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações Gerais sobre o Gênero *Polygala*

O gênero *Polygala* é um dos 13 gêneros da família Polygalaceae e está representado por aproximadamente 600 espécies distribuídas nas regiões temperadas, tropical e subtropical de todos os continentes com exceção de Nova Zelândia e regiões Árticas (Zomlefer, 1994). A maioria é constituída de plantas herbáceas, sendo raras as arbustivas ou trepadeiras.

No estado de Santa Catarina, 19 espécies estão catalogadas na Flora Ilustrada Catarinense (Wurdack et al., 1971) sendo a maioria delas pequenas ervas de aparência delicada, bastante ramificadas, com ramos finos, flores pequenas que variam do branco ao lilás, das quais apenas *P. sabulosa*, *P. cyparissias* e *P. paniculata* possuem algum estudo.

Algumas destas espécies, como *Polygala cyparissias* e *Polygala paniculata* são usadas na medicina tradicional como anestésico de uso tópico devido à alta concentração de salicilato de metila encontrado nas raízes, o qual é o responsável pelo cheiro característico do óleo essencial. Outras espécies de *Polygala* encontradas no norte do Brasil, acima da Bahia, são conhecidas popularmente pelo nome de erva-iodes e usadas com os mesmos fins, especialmente o uso tópico do extrato alcoólico em torceduras, machucados por traumatismo e nas articulações para o alívio das dores reumáticas (Lorenzi e Matos, 2002). Seus usos terapêuticos são descritos na medicina natural de longa data, embora a eficácia e a segurança do uso de suas preparações não tenham sido ainda comprovadas cientificamente, sua utilização popular é notória.

Muitas espécies do gênero *Polygala* são utilizadas na medicina popular, para o controle ou tratamento de várias doenças. O estudo fitoquímico e de bioatividade mostram a ocorrência de várias classes de compostos e diferentes atividades biológicas conforme apresentado na Tabela 2-1. A fitoquímica do gênero *Polygala* está relacionada à presença de xantonas (Dall'Acqua et al., 2004 /2002; Pinheiro et al., 1998), saponinas (Nagai et al., 2001; Jia et al., 2004), flavonóides glicosilados (Rao e Raman, 2004), cumarinas (Hamburger et al., 1985; Pizzolatti et al., 2002) e estilipironas (Pizzolatti et al., 2002), entre outros. Dentre os compostos, destacamos as xantonas devido a sua grande importância quimiotaxonômica para este gênero e também por serem as principais substâncias responsáveis por grande parte da sua bioatividade.

Com relação às atividades biológicas (Tabela 2-1), destacamos *Polygala tenuifolia* com propriedade expectorante, sedativa, tônica (Jiang, 2002), doenças de Alzheimer (Jia et al., 2004) e anti-stress (Kawashima et al., 2004), *Polygala caudata* muito utilizada para o tratamento da tosse, hepatite, assim como agente sedativo e expectorante (Li et al., 1999), *Polygala telephioides* como desintoxicante de narcóticos (Egashira, 2005), *Polygala sabulosa* com propriedade antinociceptiva, anestésica (Pizzolatti et al., 2000), ansiolítica e anticonvulsivante (Duarte et al., 2007), *Polygala cyparissias* com ação antinociceptiva (Campos et al., 1997), anestésica de uso tópico e analgésica (Pinheiro et al., 1998), *Polygala alpestris* com atividade antioxidante (Cervellati et al., 2004) e citotóxica (Dall'Acqua et al., 2004), entre outras.

Tabela 2-1 – Atividades biológicas e classe dos principais compostos de algumas espécies de *Polygala*.

Espécie	Atividade biológica	Compostos	Referência
<i>P. alpestris</i>	Antioxidante Citotóxica	Xantonas e flavonóides Xantonas	Cervellati et al., 2004 Dall'Acqua et al., 2004
<i>P. arenaria</i>	-	Saponinas	Mitaine-Offer et al., 2003
<i>P. caudata</i>	- Tosse, hepatite, agente sedativo e expectorante	Xantonas Xantonas	Mak et al., 2001 Li et al., 1999
<i>P. chinensis</i>	-	Flavonóides	Rao et al., 2004
<i>P. cyparissias</i>	Antinociceptiva Anestésica de uso tópico e analgésica	Xantonas Xantonas	Campos et al., 1997 Pinheiro et al., 1998
<i>P. dalmaisiana</i>	-	Polifenóis glicosilados	Kobayashi et al., 2002
<i>P. fallax</i>	-	Xantonas	Ma et al., 2003
<i>P. myrtifolia</i>	Antifúngica Antibacteriana	- -	Motsei et al., 2003 Lall et al., 1999
<i>P. vulgaris</i>	Citotóxica e antitumoral	Xantonas	Dall'Acqua et al., 2002

Tabela 2-1 (continuação) – Atividades biológicas e classe dos principais compostos de algumas espécies de *Polygala*.

<i>P. japonica</i>	Antiinflamatória Expectorante e antidepressiva	- -	Kou et al., 2006 Zhang et al., 2006
<i>P. paniculata</i>	- Tripanomicida Neuroprotetora Moluscicida	Xantonas, cumari- nas e flavonóides - -	Cristiano et al., 2003 Pizzolatti et al., 2003 Farina et al., 2005 Hamburger et al., 1985
<i>P. radix</i>	Sedativa e antibacteriana Antiinflamatória, antitumoral e anti- hepática	- Saponinas triterpenicas	Lee et al., 2004 Zhang et al., 2002
<i>P. sabulosa</i>	Tripanomicida Antinociceptiva Ansiolítica e anticonvulsivante	- Estirilpironas -	Pizzolatti et al., 2003 Pizzolatti et al., 2000 Duarte et al., 2007
<i>P. senega</i>	Antioxidante Hipoglicemiante	Flavonóides Triterpenos	Amarowicz et al., 2004 Kako et al., 1997
<i>P. spectabilis</i>	Expectorante, diaforética e antidiarréica	Xantonas e espinasterol	Lorenzi et al., 2002
<i>P. tenuifolia</i>	Testes neurológicos Locomotora Alzheimer Anti-stress Protetora Cerebral Expectorante, sedativa e tônica	- - - Ác. 3,4,5- trimetoxicinâmico - Xantonas O- glicosiladas	Chen et al., 2004 Shin et al., 2004 Jia et al., 2004 Kawashima et al., 2004 Ikeya et al., 2004 Jiang et al., 2002

2.2 Posição Sistemática de *Polygala paniculata* L e *Polygala pulchella*

DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUB-CLASSE	Rosidae
ORDEM	Fabales
FAMÍLIA	Polygalaceae
GÊNERO	<i>Polygala</i>
ESPÉCIE	<i>Polygala paniculata</i> / <i>Polygala pulchella</i>

Dados: (wikimedia, 2006)

2.3 Xantonas do Gênero *Polygala*

A dibenzo- γ -pirona (Figura 2-1) corresponde ao núcleo básico de uma classe de produtos naturais denominada xantona. Este termo é proveniente do grego *xanthos* que significa amarelo, fazendo alusão à coloração característica deste produto natural. A numeração dos átomos de carbono no núcleo xantona obedece à conversão biossintética. Os carbonos 1 a 4 são derivados da via metabólica do acetato-malonato e formam o anel A, e os carbonos 5 a 8 são derivados do ácido chiquímico e formam o anel B (Simões et al., 2000).

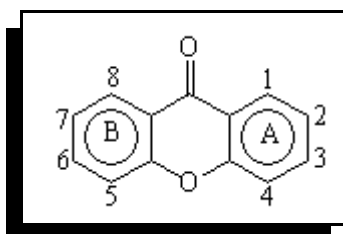


Figura 2-1 - Núcleo básico das xantonas.

2.3.1 Biossíntese das Xantonas

Xantonas de ocorrência natural estão presentes em plantas superiores (Angiospermae) como também em fungos e líquens. Em 1963 sugeriu-se que xantonas provenientes de plantas eram provavelmente derivadas de benzofenonas por acoplamento oxidativo, e que xantonas provenientes de metabólitos de fungos eram produzidas por ciclização intramolecular de benzofenonas 2,2'-dioxigenadas (Gupta e Lewis, 1971).

A rota biossintética mais frequentemente aceita, considera que as xantonas são produzidas a partir de dois precursores biogénicos distintos: Ácido chiquímico e malonil-

CoA. Isso leva a formação de um intermediário comum, a benzofenona, com um núcleo proveniente da rota do ácido chiquímico e outro da rota do malonil-CoA, conforme apresentado na Figura 2-2.

A proposição direta de meta-hidroxilação do benzoato foi sugerida devido a uma pobre incorporação de precursores *para*-substituídos. Um estudo biossintético limitado de xantonas 1,3,7-trioxigenadas indicam a formação dos derivados do acetato (anel A) e da unidade C5-C8 (anel B) que provêm do ácido chiquímico, formando assim a 2,3,4,6-tetrahidroxibenzofenona (Atkinson et al., 1968).

Pelas posições dos substituintes da 2,3,4,6-tetrahidroxibenzofenona, ocorre a formação biossintética das xantonas com quatro modelos diferentes de oxigenação (1,3,5-/1,3,7-/1,3,6,7- e 1,3,5,6), vistos na Figura 2-3.

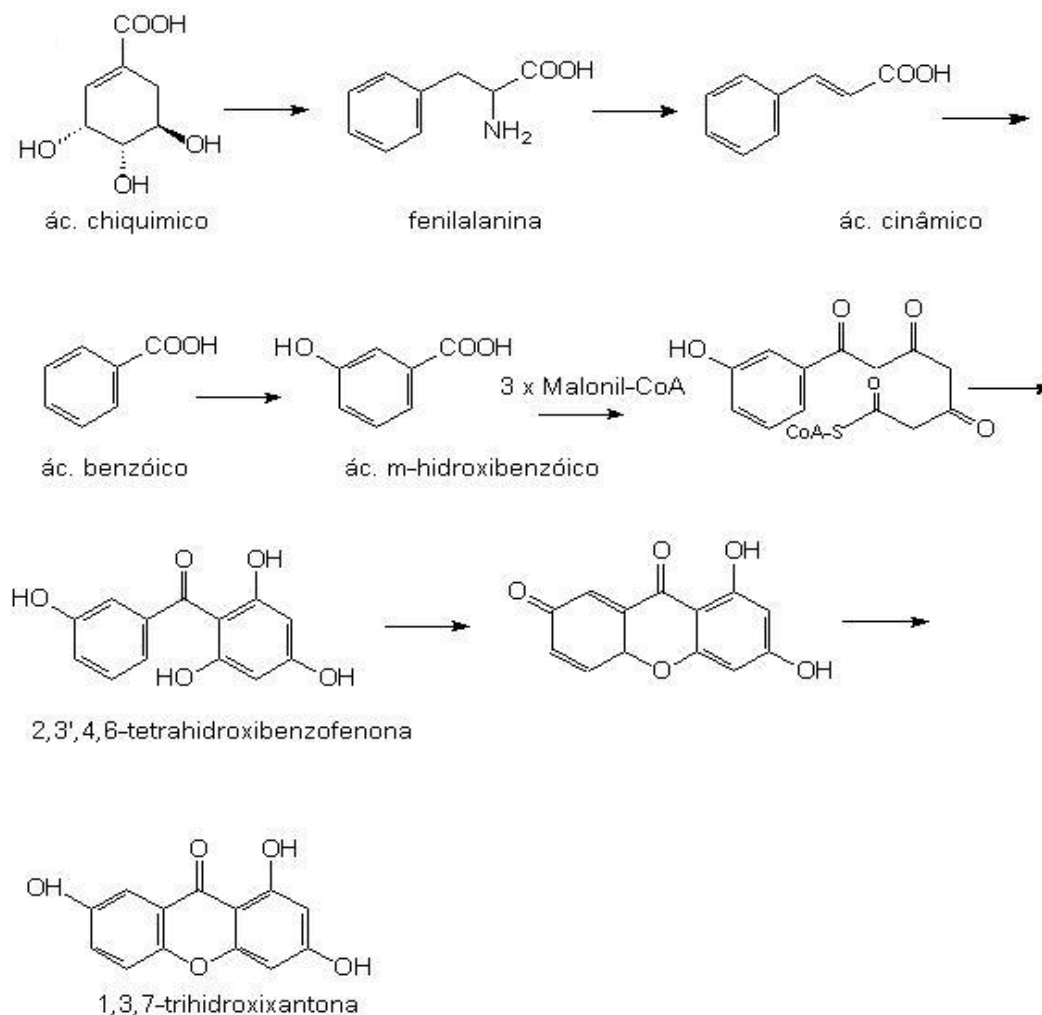
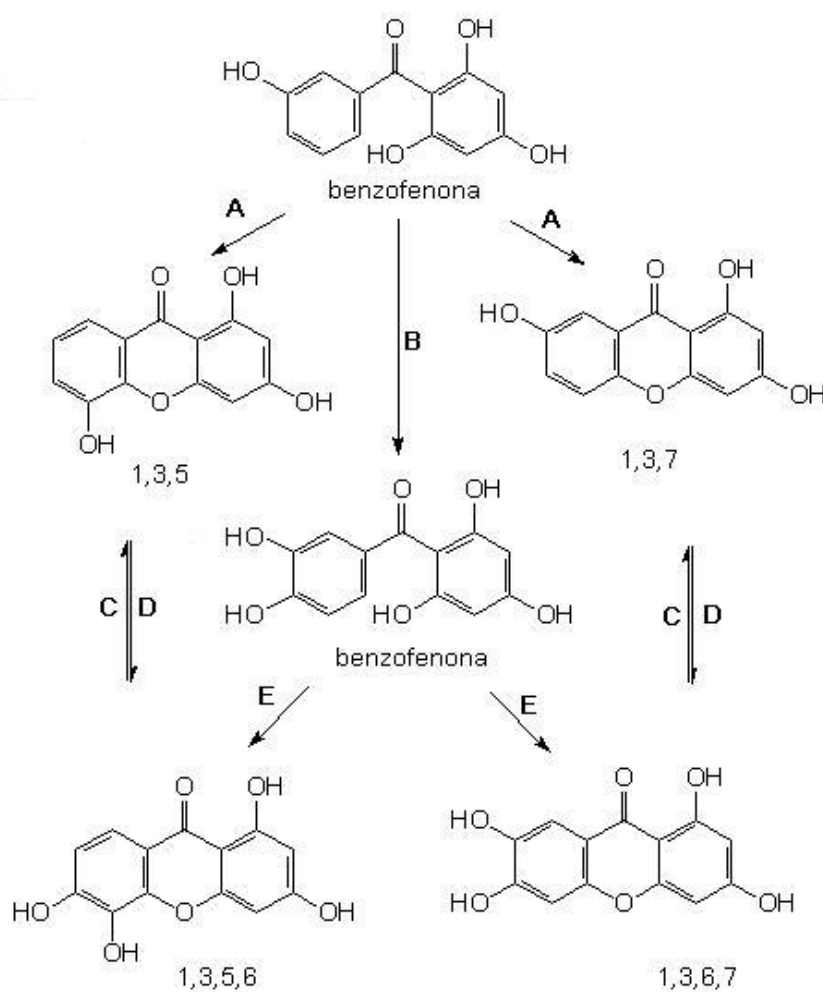


Figura 2-2 - Rota biossintética chiquimato-acetato para a formação de xantonas.



Etapa **A** e **E**: acoplamento oxidativo da benzofenona

Etapa **B**: hidroxilação da posição 4'

Etapa **C**: oxidação da posição 6 da xantona

Etapa **D**: redução da posição 6 da xantona

Figura 2-3 - Rota biossintética para a formação de xantonas oxigenadas (substituição em 1,3,5; 1,3,7; 1,3,5,6 e 1,3,6,7).

Vários mecanismos sugerem a transformação de benzofenonas polioxygenadas em xantonas polioxygenadas. Entre elas citam-se:

- I) Acoplamento oxidativo direto de benzofenonas via radical intermediário (Etapa E da Figura 2-3) (Lewis et al., 1965).
- II) Adição intramolecular de grupos hidroxila em intermediários quinóides (Figura 2-4) (Ellis et al., 1967).
- III) Desidratação entre grupos hidroxila dos derivados acetato e chiquimato via 2,2'-dihidroxibenzofenona (Figura 2-5) (Markham, 1965).

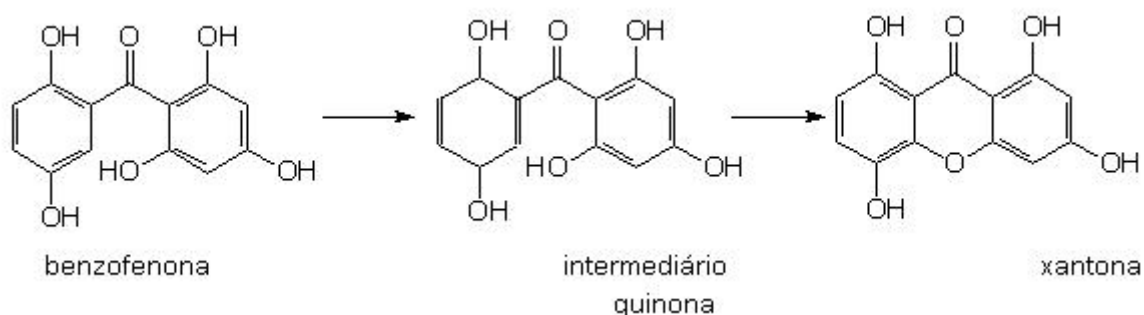


Figura 2-4 - Transformação de benzofenonas em xantonas via intermediários quinonóides.

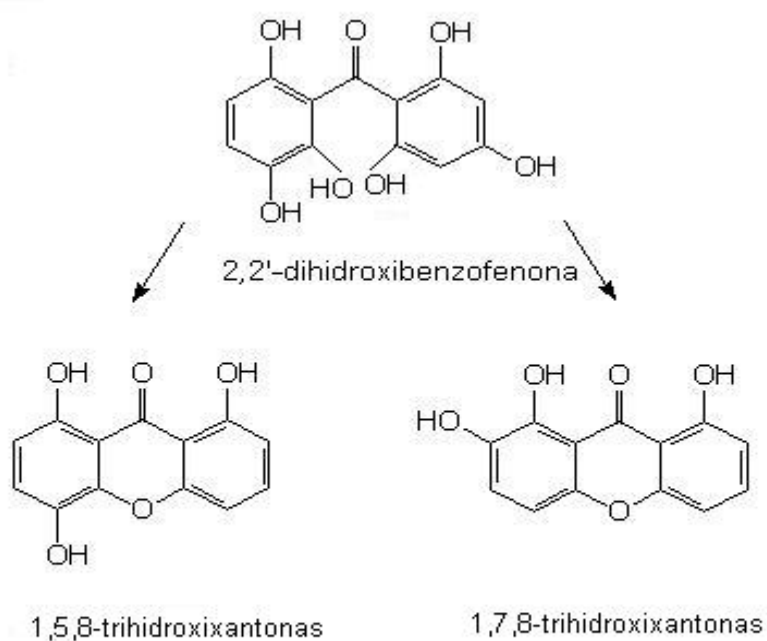


Figura 2-5 - Transformação de benzofenonas em xantonas via 2,2'-dihidroxi-benzofenonas.

Outras transformações associadas à biossíntese de xantonas naturais são a metilação de um ou mais grupos hidroxil levando à xantonas metoxiladas ou com grupos metilendioxí. É comum também a formação de xantonas preniladas e glicosiladas. A prenilação ocorre preferencialmente após a formação do esqueleto da xantona (Ollis et al., 1965) e a glicosilação ocorre preferencialmente no intermediário benzofenona (Fujita et al., 1981).

A Tabela 2- relaciona as xantonas isoladas do gênero *Polygala*, que estão agrupadas conforme seu grau de oxigenação.

Tabela 2-2 – Xantonas isoladas em espécies do gênero *Polygala*.

Xantonas dioxigenadas		
Composto	espécie	Referência
1,7-dihidroxixantona	<i>P. tenuifolia</i> e <i>P. caudata</i>	Ikeya et al., 1991 Naidu et al., 2007
1,7-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1-hidroxi-7-metoxixantona	<i>P. caudata</i>	Li et al., 1999
Xantonas trioxigenadas		
1,3-dihidroxi-7-metoxixantona	<i>P. cyparissias</i>	Pinheiro et al., 1998
1,7-dihidroxi-3-metoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Ikeya et al., 1991
1,7-dihidroxi-4-metoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Ikeya et al., 1991
1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1,3,4-trimetoxixantona	<i>P. arillata</i>	Ikeya et al., 1991
3-hidroxi-2,8-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
2,3,8-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1-hidroxi-2,3-dimetoxixantona	<i>P. arillata</i> e <i>P. triphylla</i>	Ghosal et al., 1981
1,2,3-trimetoxixantona	<i>P. triphylla</i>	Ghosal et al., 1981
1-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. arillata</i>	Ghosal et al., 1981
1-metoxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. macradenia</i> e <i>P. triphylla</i>	Ghosal et al., 1981
1,2,8-trihidroxixantona	<i>P. caudata</i>	Li et al., 1999
Xantonas tetraoxigenadas		
1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona	<i>P. cyparissia</i> , <i>P. tenuifolia</i> <i>P. crotalarioides</i>	Pinheiro et al., 1998 Fujita et al., 1992 Shi-Ming et al., 2006
1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona	<i>P. cyparissias</i>	Pinheiro et al., 1998
7-hidroxi-1,2,3-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
3,8-dihidroxi-1,2-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
3-hidroxi-1,2,7-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1,7-dihidroxi-3,4-dimetoxixantona	<i>P. virgata</i>	Bashir et al., 1992a
1-hidroxi-2,3,4-trimetoxixantona	<i>P. macradenia</i>	Ghosal et al., 1981

Tabela 2-2 (Continuação) – Xantonas isoladas em espécies do gênero *Polygala*.

1,2,3,4- tetrametoxixantona	<i>P. macradenia</i>	Ghosal et al., 1981
1,6-dihidroxi-3,7-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Ikeya et al., 1991
1-hidroxi-3,6,7-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Ikeya et al., 1991
1,3,6,7-tetrametoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona	<i>P. paniculata</i>	Cristiano et al., 2003
1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona	<i>P. paniculata</i>	Cristiano et al., 2003
1,7-dihidroxi-2,3- metilenodioxixantona	<i>P. cyparissias</i>	Pinheiro et al., 1998
1,8-dimetoxi-2,3- metilenodioxixantona	<i>P. nykensis</i>	Marston et al., 1993
1,7-dimetoxi-2,3- metilenodioxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1-hidroxi-5-metoxi-2,3- metilenodioxixantona	<i>P. paniculata</i>	Cristiano et al., 2003
1,4-dihidroxi-6,7- metilenodioxixantona	<i>P. crotalarioides</i>	Shi-Ming et al., 2006
Xantonas pentaoxigenadas		
1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona	<i>P. cyparissias</i> e <i>P. crotalarioides</i>	Pinheiro et al., 1998 Shi-Ming et al., 2006
1,6-dihidroxi-3,5,7-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Ikeya et al., 1991
1,7-dihidroxi-3,5,6-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Ikeya et al., 1991
6,8-dihidroxi-1,2,3-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i> <i>P. crotalarioides</i>	Fujita et al., 1992 Shi-Ming et al., 2006
6,8-dihidroxi-1,2,4-trimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Fujita et al., 1992
1,7-dihidroxi-2,3,4-trimetoxixantona	<i>P. virgata</i>	Bashir et al., 1992a
1,2,3,4,7-pentametoxixantona	<i>P. rollata</i> , <i>P. Macradenia</i> e <i>P. paenea</i>	Ghosal et al., 1981
7-hidroxi-1,2,3,4-tetrametoxixantona	<i>P. macradenia</i>	Ghosal et al., 1981
1-hidroxi-2,3,4,7-tetrametoxixantona	<i>P. paenea</i> e <i>P. macradenia</i>	Ghosal et al., 1981

Tabela 2-2 (Continuação) – Xantonas isoladas em espécies do gênero *Polygala*.

1-metoxi-2,3,6,7-bismetilendioxixantona	<i>P. macradenia</i> e <i>P. triphylla</i>	Ghosal et al., 1981
8-hidroxi-5,7-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. paenea</i>	Ghosal et al., 1981
5,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. paenea</i>	Ghosal et al., 1981
6,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. spectabilis</i> e <i>P. tenuifolia</i>	Ghosal et al., 1981
1,6,7-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. macradenia</i>	Ghosal et al., 1981
1,6,8-trihidroxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. crotalarioides</i>	Shi-Ming et al., 2006
Xantonas hexaoxigenadas		
1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona	<i>P. cyparissias</i>	Pinheiro et al., 1998
Xantonas glicosiladas		
1-glucosiloxi-2-hidroxi-3-metoxixantona	<i>P. triphylla</i>	Ghosal et al., 1981
1-glucosiloxi-2,3-metilenodioxixantona	<i>P. triphylla</i>	Ghosal et al., 1981
6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)- β -D-glucopiranosil]-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Jiang e Tu, 2002
6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1-2)- β -D-glucopiranosil]-1,3dihidroxi-7-metoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Jiang e Tu, 2002
6-O-(β -D-glucopiranosil)-1,2,3,7-tetrametoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Jiang e Tu, 2002
3-O-[α -D-ramnopiranosil-(1-2)- β -D-glucopiranosil]-1,6-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona	<i>P. tenuifolia</i>	Jiang e Tu, 2002
2'-benzoilmangiferina	<i>P. caudata</i>	Li et al., 1999

Xantonas preniladas

A presença de grupos prenil em xantonas é comum e um grande número delas já foi caracterizada em várias espécies.

Uma característica marcante do substituinte prenil é a ciclização oxidativa com um grupo hidroxila em posição *orto* formando um anel cromeno, e estas são denominadas de piranoxantonas.

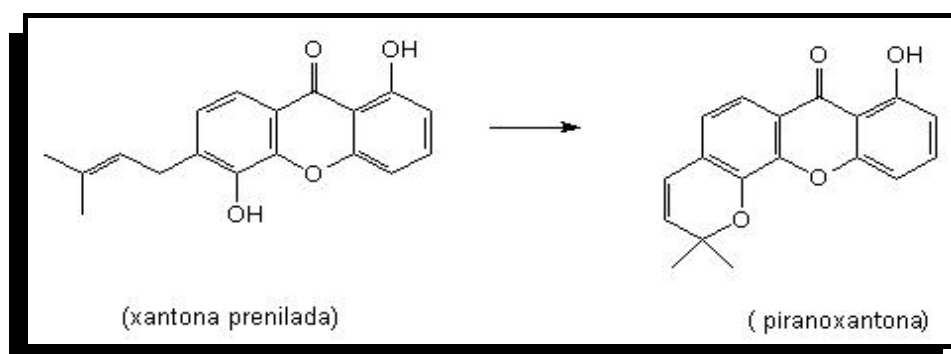


Figura 2-6 - Exemplos de xantonas preniladas.

A ocorrência de xantonas preniladas e piranoxantonas é comumente descrita em espécies das famílias Moraceae (Lee et al., 2005; Fukai et al., 2005) e Clusiaceae (antiga família Guttiferae) (Boonsri et al., 2006; Ngouela et al., 2006; Bayma et al., 1998; Nkengfack et al., 2002; Nguyen et al., 2003; Reyes-Chilpa et al., 2006). Porém até o presente momento não há relato quanto à presença dessa classe de xantonas para a família Polygalaceae.

O estudo de xantonas é interessante não só pela investigação quimiosistemática, mas também devido à sua importância farmacológica (Peres et al., 1997).

Vários trabalhos científicos já foram realizados evidenciando as importantes atividades biológicas apresentadas pelas xantonas. De todas, talvez a mais interessante seja a ação inibitória da enzima monoamino oxidase (MAO), responsável por metabolizar monoaminas como a noradrenalina, dopamina e serotonina, aumentando assim a concentração sináptica destas e condicionando maior excitação dos neurônios que possuem receptores para estes mediadores. Níveis aumentados ou diminuídos de atividade da MAO em indivíduos já foram relacionados a uma série de distúrbios neuropsiquiátricos como fobias, depressão, distúrbio de déficit de atenção, abuso de drogas e comportamento violento. As xantonas apresentam um grande potencial de utilização por terem demonstrado atividade inibitória potente, seletiva e reversível desta enzima (Usdin, 1984; Thulla et al., 1993; Gnerre et al., 2001). Diversos trabalhos têm apresentado as xantonas como potenciais substâncias para o tratamento do câncer (Lin et al., 1996; Asano et al., 1996; Pachuta, 1986; Liou, 1993; Permana et al., 1994). Algumas xantonas (naturais e sintéticas) apresentam ainda, ação antimicrobiana, inclusive contra *Mycobacterium tuberculosis*

(Ghosal et al., 1975; Ghosal et al., 1978), antifúngica (Rocha et al., 1994), citotóxica e antitumoral (Beerhues et al., 1994), antioxidante (Santos et al., 2003), entre outras. Por outro lado, a toxicidade das xantonas é ainda pouco estudada, e esse é um dos passos limitantes ao emprego terapêutico.

2.4 Cumarinas no Gênero *Polygala*

As cumarinas são amplamente distribuídas nos vegetais, mas também podem ser encontradas em fungos e bactérias. Estruturalmente, são lactonas derivadas do ácido *o*-hidroxi-cinâmico (Figura 2-7). O termo cumarina origina-se do caribenho *cumaru*, nome popular de *Dipteryx odorata* Willd da família Fabaceae (Simões et al., 2000). O cumaru, também conhecido por fava-tonka, é encontrado no norte do Brasil e suas sementes contêm grande quantidade de cumarina (1 a 3%). Mais de 1.300 cumarinas já foram isoladas de fontes naturais. Suas propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas dependem de seus padrões de substituição (Simões et al., 2000).

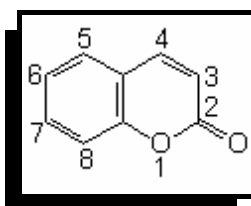


Figura 2-7 - Núcleo básico das cumarinas.

As cumarinas e seus derivados são de considerável interesse devido ao grande número de espécies que contêm esses núcleos heterocíclicos. Elas são de uso comum em alimentos, perfumes, cosméticos, produtos farmacêuticos e na preparação de inseticidas (Maheswara et al., 2006). Vários trabalhos científicos já foram realizados evidenciando as importantes atividades biológicas apresentadas pelas cumarinas, entre elas, atividade antibacteriana (Yasunaka et al., 2005; Maheswara et al., 2006), antitumoral (Ito et al., 1999; Maheswara et al., 2006), antiinflamatória e analgésica (Ghate et al., 2005), anti-HIV (Maheswara et al., 2006; Manolov et al., 2006), asma (Grimm et al., 2006), anticoagulante, espasmolítica e antifúngica (Manolov et al., 2006), no tratamento de doenças gastrintestinais (Reyes-Chilpa et al., 2006), entre outras.

2.4.1 Biossíntese das cumarinas

As cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um dos seus primeiros precursores o ácido *p*-hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico). O derivado *orto*-hidroxilado sofre isomerização enzimática da ligação dupla ($E \rightarrow Z$). O isômero *Z* lactoniza-se

espontaneamente formando a cumarina. A prenilação nas posições C-6 ou C-8 do anel benzênico de uma 7-hidroxi-cumarina conduz à formação de pirano ou furanocumarinas.

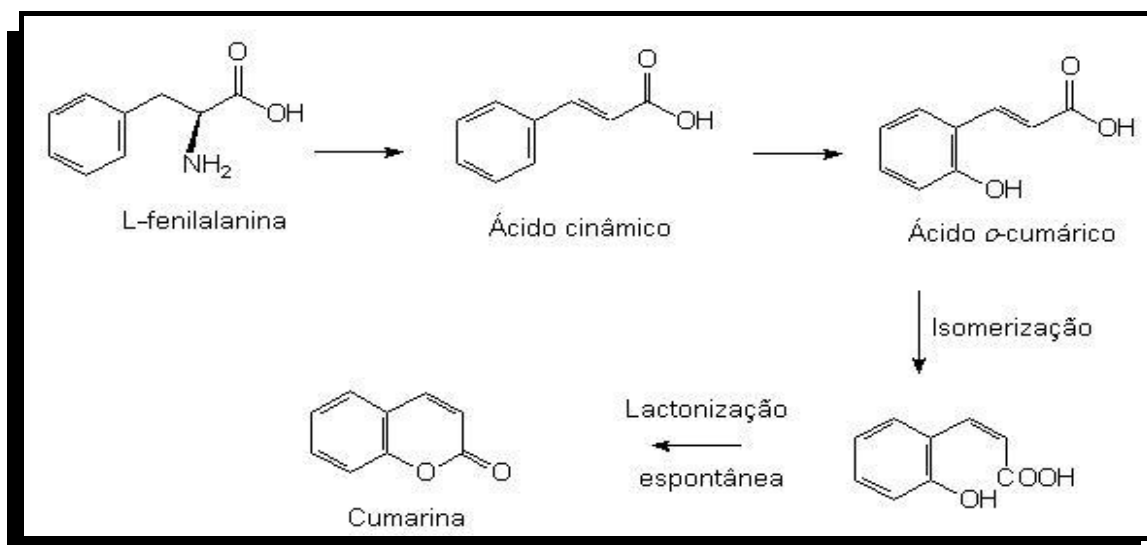
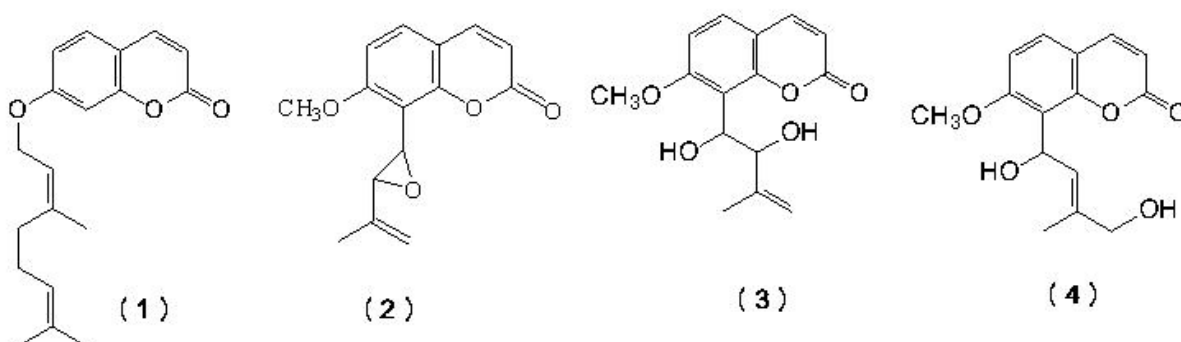
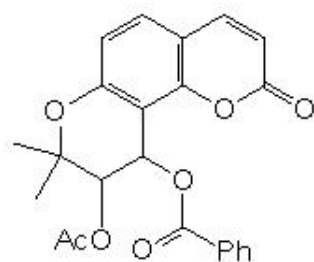


Figura 2-8 - Origem biossintética de cumarinas.

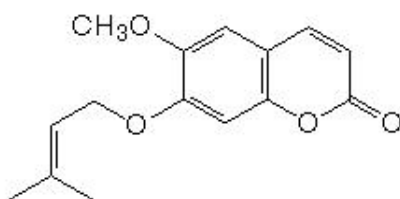
A presença de cumarinas na família Polygalaceae foi pela primeira vez descrita por Hamburger (1984/1985) em *P. paniculata* com o isolamento de cinco cumarinas identificadas como aurapteno **(1)**, febalosina **(2)**, murrangatina **(3)**, 7-metóxi-8-(1,4-dihidroxi-3-metil-2-butenil) cumarina **(4)** e 3'-O-acetil-4'-O-benzoillactona sendo uma pirano cumarina diéster **(5)**.

Até então, *P. paniculata* era a única espécie da família Polygalaceae a apresentar cumarinas. Somente em 2000, foi encontrada cumarina em uma segunda espécie da família, com o isolamento de 6-metoxi-7-preniloxicumarina **(6)** e escopoletina **(7)** em *Polygala sabulosa* (Pizzolatti et al., 2000 e 2006).

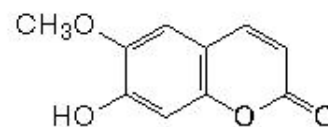




(5)



(6)



(7)

2.5 Espécie *Polygala paniculata* L.

Polygala paniculata L. é conhecida popularmente como Barba-de-São-João, Barba-de-São-Pedro, Bromil, Alecrim-de-Santa-Catarina e Vassourinha. É uma erva ereta, de aparência delicada, bastante ramificada, de 25-40 cm de altura, com ramos finos, distribuída em regiões subtropical e tropical do continente Americano (Hamburger et al., 1985). Possui folhas simples e flores pequenas, de cor branca, reunidas em panículas terminais (Figura 2-9).

Suas raízes, assim como as de outras espécies do mesmo gênero, possuem um aroma característico lembrando o produto “Gelol®” devido aos altos teores de salicilato de metila (Pizzolatti et al., 2000; Pinheiro et al., 1998; Lorenzi e Matos, 2002).

A utilização de *P. paniculata* na medicina popular brasileira vem de longa data principalmente nas regiões costeiras do Sul e Sudeste. São atribuídas as suas folhas as propriedades: antiblenorrágica, vomitiva, purgativa e diurética (Lorenzi e Matos, 2002). Além disso, outros estudos com o extrato desta planta mostraram atividade moluscicida e antifúngica (Hamburger et al., 1985), além da atividade tripanomicida do extrato e frações de *P. paniculata* através de testes *in vitro* contra as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas (Pizzolatti et al., 2003).



Figura 2-9 – Fotos de *Polygala paniculata*.

2.6 Espécie *Polygala pulchella* A.

Polygala pulchella é uma erva ereta, de constituição delicada, com 5,5-30,0 cm de altura. Possui caule folhoso, cilíndrico e ramificado, folhas alternas e eretas, assim como flores pequenas de cor lilás. Esta espécie, assim como outras do mesmo gênero florescem de agosto a março, mais freqüentemente de outubro a dezembro. Ocorre de forma dispersa em campos gramíneos, pedregosos, sujos, graníticos, areníticos, em baixadas úmidas, em capoeira e banhados. Facilmente encontrada na Argentina, Uruguai, Sul e Sudeste do Brasil (Lüdtke, 2004).

Segundo Marques (2003), esta espécie é usada na medicina popular para tratamento de bronquites, asma, coqueluche, reumatismo, assim como antiofídica.

Entretanto, nenhum estudo fitoquímico foi encontrado na literatura com a espécie *P. pulchella*.



Figura 2-10 – Foto de *Polygala pulchella*.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Dar continuidade ao estudo fitoquímico de espécies do gênero *Polygala* (*P. paniculata* e *P. pulchella*) direcionando à avaliação de ações terapêuticas e seus aspectos quimiotaxonômicos.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar os metabólitos secundários das espécies *P. paniculata* e *P. pulchella*, utilizando técnicas cromatográficas e análises espectroscópicas de IV, EM, RMN de ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais.
- Empregar a técnica de microextração em fase sólida seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (SPME-CG-MS) na caracterização dos constituintes voláteis das flores e raízes de *P. paniculata*.
- Estudar a química da febalosina (**2**) com avaliação da reatividade e estabilidade do grupo epóxi através de reações de substituição nucleofílica ($\text{S}_{\text{N}}1$ e $\text{S}_{\text{N}}2$) para abertura do anel epóxido.
- Avaliar as atividades biológicas: neuroprotetora, antinociceptiva, antiinflamatória, protetora gástrica, antifúngica e toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos, compostos isolados e análogos semisintéticos de *P. paniculata* e atividade ansiolítica, antidepressiva, antifúngica e toxicidade frente à *Artemia salina* de *P. pulchella*.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Polygala paniculata*

A espécie *P. paniculata* está grandemente distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do Continente Americano. É uma espécie importante na composição da Flora Catarinense onde o interesse na medicina popular é destacado pelo uso de suas raízes na forma de cataplasmas em contusões, artrites e processos inflamatórios afins. Estas propriedades são primariamente atribuídas à presença de altos teores de salicilato de metila na raiz. Por isso mesmo, esta planta é conhecida popularmente por “Gelol®” ou gelolzinho.

Indivíduos desta espécie coletados no Panamá, foram estudados por Hamburger et al., em 1984/1985 que descreveram a presença das cumarinas aurapteno **(1)**, febalosina **(2)**, murrangatina **(3)**, 7-metóxi-8-(1,4-dihidroxi-3-metil-2-butenil) **(4)** e 3'-O-acetil-4'-O-benzoilactona **(5)**. *P. paniculata* foi a primeira planta da família Polygalaceae que relatou a presença de cumarinas, entretanto, aurapteno, febalosina e murrangatina já haviam sido encontradas em plantas da família Rutaceae. Além disso, a presença de murrangatina **(3)** isolada de *P. paniculata* foi atribuída como um possível artefato da degradação da febalosina **(2)** (Hamburger et al., 1984).

Porém, a ausência de xantonas na espécie *P. paniculata* foi a desencontro com a quimiotaxonomia da família Polygalaceae que é caracterizada pela presença de xantonas. A ocorrência de xantonas na espécie *P. paniculata* era uma incógnita quanto a sua posição quimiotaxonômica. Somente duas décadas após, nosso grupo de pesquisa investigando espécimes de *P. paniculata* coletadas no litoral Catarinense, caracterizou três xantonas 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona **(11)**, 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona e 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenedioxi xantona **(10)**, resgatando assim a sua quimiotaxonomia (Cristiano et al., 2003).

4.1.1 Composição dos constituintes voláteis de *P. paniculata* por SPME-CG-EM

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica analítica relativamente recente, desenvolvida nos anos 90 (Arthur e Pawliszyn, 1990; Arthur et al., 1992; Pawliszyn, 1997), que tem sido empregada como modo de preparo e concentração de amostras a serem aplicadas em instrumentação analítica (Valente e Augusto, 2000), com a vantagem de requerer quantidades muito pequenas de material, além de poder também fazer análise de óleos essenciais *in loco* sem destruição do indivíduo. Esta metodologia associada à CG-EM vem sendo utilizada na análise de constituintes voláteis de plantas.

A SPME apresenta-se como uma técnica de preparo de amostras que dispensa o uso de solventes orgânicos e apresenta duas etapas em seu procedimento. A primeira etapa consiste em expor a fibra revestida diretamente à amostra ou ao seu headspace (HS). Nesta etapa ocorre a partição dos analitos alvo entre a matriz da amostra e o revestimento. Na segunda etapa, a fibra contendo os analitos concentrados é transferida para o instrumento analítico onde ocorre a dessorção, separação e quantificação dos analitos extraídos. A etapa de dessorção dos analitos geralmente é realizada colocando a fibra no injetor aquecido do cromatógrafo (Figura 4-1). No entanto, a quantificação por SPME é dependente da composição da matriz e do tipo de polímero de revestimento da fibra (Tabela 4-1) (Bortoluzzi, 2007).

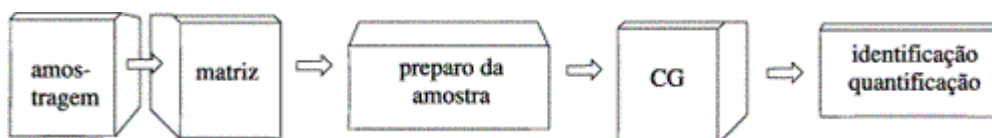


Figura 4-1 - Etapas num processo analítico visando à análise química por CG.

Quando a amostra apresenta uma grande porcentagem de material suspenso, a fibra pode ser prejudicada durante a agitação. Compostos com alta massa molecular também podem adsorver na fibra irreversivelmente, mudando as propriedades da fibra inutilizando-a. A formação de bolhas de ar na superfície da fibra que muitas vezes não é possível evitar afeta a taxa de transferência de massa, sendo, portanto, de interesse o desenvolvimento de formas eficazes de contato amostra-fibra (Bortoluzzi, 2007).

Tabela 4-1 - Fibras de SPME disponíveis comercialmente.

Composição Química do recobrimento	Aplicação sugerida
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Compostos orgânicos pouco polares
Poliacrilato (PA)	Compostos orgânicos polares como triazinas e fenóis
Poli(dimetilsiloxano)-divinilbenzeno PDMS-DVB	Hidrocarbonetos aromáticos e pouco voláteis
Carboxen-poli(dimetilsiloxano) Carboxen-PDMS	Hidrocarbonetos
Carbowax-divinilbenzeno CW-DVB	Compostos orgânicos polares como os álcoois

Neste estudo, flores e raízes da planta fresca foram submetidas à extração por SPME com análise do *headspace* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os componentes voláteis (Tabela 4-2) foram identificados pela análise do padrão de fragmentação de seus respectivos espectros de massas, índices de retenção e comparação com dados da literatura (Adams, 1995).

Nas flores de *P. paniculata* caracterizou-se 25 compostos representando 98,69% do total dos constituintes voláteis. Os principais constituintes voláteis das flores são acetato de bornila (25,00%), seguido de 1,8-cineol (12,45%), pent-2-enal (9,97%), 1-undeceno (9,48%), α -terpineol (6,40%) e α -terpenil acetato (5,35%). Nas raízes identificou-se 13 compostos representando 99,67% do total. Destes, salicilato de metila (89,13%) foi o composto majoritário, seguido de 4-metóxi salicilato de metila (3,6 %), 3-metóxi salicilato de metila (3,03%), acetato de bornila (1,29%) e 1,8-cineol (0,54%). Este é o primeiro relato dos constituintes voláteis de *P. paniculata*, exceto pela descrição prévia de salicilato de metila (Pinheiro et al., 1998; Lorenzi e Matos, 2002). O estudo da composição dos compostos voláteis das raízes de *P. paniculata*, através do uso de SPME-CG-EM, comprovou que o típico aroma das raízes é atribuído a grande quantidade de salicilato de metila numa mistura com seus derivados que aparecem em menor concentração (Missau et al., 2006). Este aroma não é perceptível nas flores o que é explicado pelo baixíssimo teor de salicilato de metila (0,83%). No entanto as flores apresentam um aroma muito peculiar.

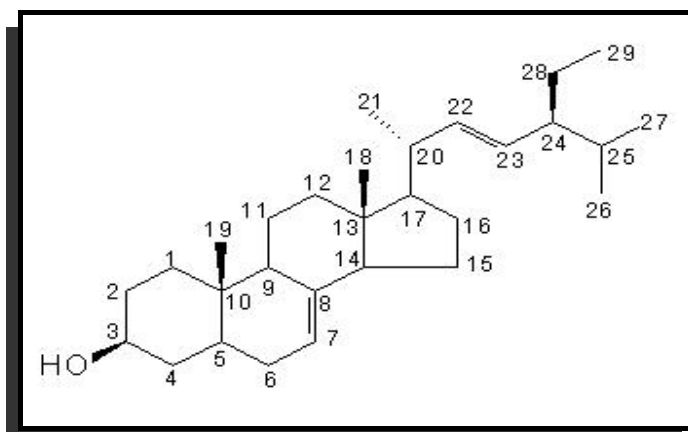
Tabela 4-2 – Componentes voláteis das flores e raízes de *P. paniculata*.

Composto	IK	TR	Flor %	Raiz %
2,4-dimetilhexano	723	5,13	-	0,19
3-hexenilformato	804	6,49	1,12	-
Não identificado	820	6,72	1,69	-
Pent-2-enal	823	6,76	9,97	-
Óxido de linalol	962	8,77	0,55	-
1-octen-2-ol	975	8,94	2,60	-
Octanona-3	984	9,06	2,57	-
2,4-nonadienal	992	9,15	0,69	-
Hexil acetato	1017	9,53	1,73	-
1,8-cineol	1036	9,84	12,45	0,54
1-octanol	1075	10,50	4,23	-
1-undeceno	1093	10,83	9,48	-
Terpinoleno	1101	10,98	1,92	-
Cânfora	1153	11,76	3,00	0,13
Não identificado	1160	11,85	0,65	-
3-thujanol	1166	11,94	1,32	-
Não identificado	1176	12,11	1,45	-
α -terpineol	1196	12,44	6,43	-
Salicilato de metila	1216	12,73	0,83	89,13
Não identificado	1276	13,58	0,52	0,22
Acetato de bornila	1296	13,88	25,00	1,29
4-hidroxi-3-metoxiestireno	1323	14,23	1,30	-
α -terpenil acetato	1357	14,69	5,35	0,35
Eugenol	1368	14,83	2,19	-
C ₁₄ H ₃₀	1400	15,29	0,45	0,12
α -cedreno	1423	15,56	-	0,16
3-metoxi-salicilato de metila	1451	15,91	-	3,03
4-metoxi-salicilato de metila	1455	15,97	-	3,66
γ -patchuleno	1474	16,20	-	0,64
Açor-4-eno (6,11-oxo)	1522	16,80	1,20	0,21
Total identificados			98,69	99,67

4.1.2 Isolamento e identificação dos constituintes de *P. paniculata*

Estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa com a espécie *P. paniculata* detectaram o envolvimento da cumarina febalosina (**2**) na formação de artefatos de isolamento (Pizzolatti et al., 2002). Com o objetivo de isolar a febalosina (**2**) evitando a formação de possíveis artefatos, e para avaliar seu real envolvimento na formação de artefatos, utilizou-se dois métodos distintos de extração: Método A e Método B. O método A consiste na extração com solventes em ordem crescente de polaridade CH₂Cl₂, AcOEt e EtOH separadamente e o Método B consiste na extração da febalosina (**2**) com hexano e posterior extração com EtOH.

4.1.2.1 Espinasterol (**8**)



(8)

Obteve-se o espinasterol na fração 18 eluída com hexano:acetato de etila 95:5 como descrito no Método A (Figura 5.1, p. 89). Deixou-se a fração em repouso para que houvesse a precipitação do espinasterol. Após a precipitação do composto, o sobrenadante foi retirado obtendo-se 55 mg de um sólido branco com Pf. 153-154 °C (Lit. 150 °C; Pinheiro, 1996).

O espectro na região do IV obtido em pastilha de KBr, apresentou absorção em ν 3424 cm⁻¹, correspondendo a banda de vibração da ligação OH. Observou-se também absorção na região ν 2956, 2937 e 2869 cm⁻¹ correspondente a estiramentos C-H alifático.

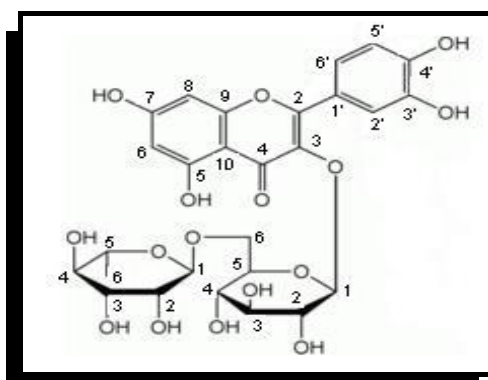
Tabela 4-3 – Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) do espinasterol com os valores da literatura (Pinheiro, 1996).

Carbonos	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Espinasterol (8) CDCl ₃	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Literatura
1	37,37	37,09
2	31,70	31,41
3	71,29	71,03
4	38,22	37,92
5	40,49	40,20
6	29,86	29,59
7	117,68	117,42
8	139,50	139,52
9	49,67	49,38
10	34,45	34,17
11	21,78	21,51
12	39,69	39,41
13	43,51	43,24
14	55,35	55,08
15	23,25	22,99
16	28,73	28,50
17	56,12	55,82
18	12,27	12,03
19	13,27	13,03
20	41,05	40,83
21	21,60	21,36
22	138,39	138,16
23	129,66	129,37
24	51,12	51,21
25	32,10	31,85
26	21,31	21,09
27	19,22	18,96
28	25,62	25,38
29	12,47	12,54

O espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 (Espectro 1, p. 127) confirmou a presença de seis metilas (CH_3); nove metilenos (CH_2); oito carbonos metínicos (CH), sendo um deles (71,29 ppm) ligado ao oxigênio em C-3 e dois carbonos quaternários. Os deslocamentos químicos dos carbonos indicam a presença de duas ligações duplas trissubstituídas definidas pelos sinais 117,68 ppm (CH-7) e 139,78 ppm (C-8), e pelos sinais 138,39 ppm (CH-22) e 129,66 ppm (CH-23). A confirmação destes resultados deu-se através da comparação dos deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C com os dados da literatura (Pinheiro, 1996) e comparação em CCD com amostra padrão (Rf. 0,64; Hexano:acetato de etila 50:50).

4.1.2.2 Quercetina 3-rutinosídeo (Rutina) (9)

A rutina é um flavonóide glicosilado relativamente abundante em várias plantas e com importante atividade biológica. A molécula é constituída pelo núcleo da 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavonol, formada por quercetina (aglicona) e pelo açúcar rutinose (O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)-D-glicopirranose).



(9)

A rutina foi isolada a partir do EB EtOH obtido por ambos os métodos descritos (A e B) (Figura 5.1, p. 89 e Figura 5,2, p. 91). Após purificação por CC e vários procedimentos de purificação apresentou-se na forma de um sólido amarelo com ponto de fusão 188-190 $^{\circ}\text{C}$. A análise do espectro na região do IV obtido em pastilha de KBr mostrou absorção larga e intensa de hidroxila em ν 3415 cm^{-1} , absorções referentes a uma carbonila conjugada (ν 1652 cm^{-1}) e a anéis aromáticos (ν 1595 cm^{-1} e 1496 cm^{-1}). Identificou-se o composto rutina (quercetina-3-rutinosídeo) pelo espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2, p. 128) comparando-se com valores da literatura (Markham, 1976) apresentados na Tabela 4-4 e confirmada por co-CCD (R.f. 0,26; CH_2Cl_2 :MeOH 95:5) com padrão.

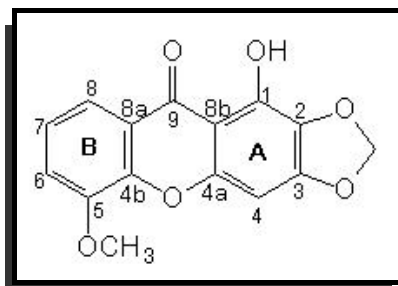
Tabela 4-4 - Comparação entre os deslocamentos químicos δ (ppm) da rutina (**9**) com os valores da literatura (Markham, 1976).

Carbonos	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Rutina (9) em CD ₃ OD	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (Literatura) em DMSO-d ₆
1	-	-
2	157,27	156,40 ^a
3	134,79	133,60
4	178,33	177,40
5	158,04	156,60 ^a
6	97,99	98,80
7	166,21	164,00
8	92,07	93,60
9	167,50	161,20
10	105,37	105,20
1'	122,97	121,60
2'	114,85	115,30 ^b
3'	145,74	144,60
4'	150,56	148,30
5'	116,23	116,50 ^b
6'	122,09	121,60
1G	101,19	100,70
2G	74,52	74,20
3G	76,93	76,80 ^d
4G	70,87	70,40 ^c
5G	76,02	76,10 ^d
6G	67,39	67,10
1R	103,10	101,50
2R	70,26	70,40 ^c
3R	71,05	70,80 ^c
4R	72,66	72,20
5R	68,54	68,20
6R	16,70	17,50

G glicose; R raminose
^{a,b,c,d} valores podem estar trocados.

4.1.3 Isolamento de xantonas

4.1.3.1 1-hidroxi-5-metoxi -2,3-metilenodioxixantona (10)



(10)

A 1-hidroxi-5-metoxi -2,3-metilenodioxixantona foi obtida do EBDM pelo Método A e EBEtOH pelo Método B (Figura 5.1, p. 89 e Figura 5.2, p. 91). Após purificação por sucessivas colunas cromatográficas, apresentou-se como um sólido amarelo com ponto de fusão 205-207 °C (Lit. 205-207 °C; Cristiano et al., 2003) e Rf. 0,36 (Hexano:acetato de etila 80:20).

O espectro na região do IV obtido em pastilha de KBr apresentou absorção larga em ν 3427 cm^{-1} para a hidroxila (OH), absorções em ν 1680 cm^{-1} para a carbonila conjugada (C=O), e absorções em ν 1582 e 1497 cm^{-1} para C=C dos anéis aromáticos.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C em CDCl_3 indica a estrutura de uma xantona trissubstituída no anel A e monossubstituída no anel B.

O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Espectro 3, p. 129), apresentou sete sinais de hidrogênio, com deslocamento químico entre 4,03 – 12,74 ppm, sendo quatro átomos de hidrogênio aromáticos: um singlete em $\delta_{\text{H-4}}$ 6,66 ppm (1H, s) atribuído ao H-4 do anel A e um sistema de spin aromático definido pelos sinais em $\delta_{\text{H-6}}$ 7,23 (1H, dd, $J = 7,98$ e 1,60 Hz); $\delta_{\text{H-7}}$ 7,32 (1H, t, $J = 7,98$ e 7,99 Hz); $\delta_{\text{H-8}}$ 7,82 (1H, dd, $J = 7,99$ e 1,60 Hz) atribuídos o anel B 5-substituído. Adicionalmente foram observados sinais para uma metoxila em 4,03 ppm (3H, s, 5-OCH₃); um grupo metilenodioxo em 6,12 ppm (2H, s, 2-OCH₂O-3) e um sinal em campo baixo 12,74 ppm (1H, s, OH-1) referente à hidroxila quelatogênica.

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 4, p. 130) apresentou 13 sinais de carbono, numa região espectral compreendida entre 56,52 – 181,46 ppm, sendo que dois sinais de carbono quaternários não foram observados (C-2 e C-8b). Observou-se sete carbonos quaternários, sendo um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico a 181,46

ppm, correspondente a uma carbonila e quatro carbonos metínicos que aparecem na região espectral de aromáticos. O sinal em 102,73 ppm foi atribuído ao grupo metilenodioxí e o sinal em 56,52 ppm a uma metoxila.

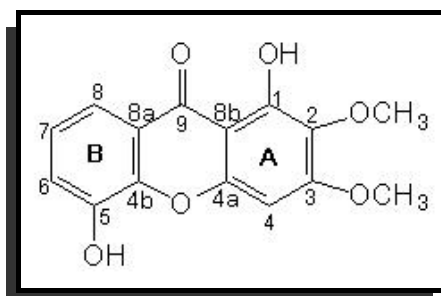
A confirmação destes resultados deu-se através da comparação dos deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^{13}C com os dados da literatura (Cristiano et al., 2003) e por co-CCD com amostra padrão (Rf. 0,46; Hexano:acetato de etila 50:50).

Tabela 4-5 – Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da xantona (**10**) em CDCl_3 a 400/100 MHz.

	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) (Cristiano et al., 2003)
1	-	143,04	143,00
2	-	*	128,40
3	-	153,36	153,40
4	6,66 (s)	89,77	89,70
4a	-	155,22	155,20
4b	-	148,28	148,30
5	-	146,35	146,30
6	7,23 (dd, $J_{6,7} = 7,98$ e $J_{6,8} = 1,6$)	115,42	115,40
7	7,31 (t, $J_{7,6} = 7,98$ e $J_{7,8} = 7,99$)	123,74	123,70
8	7,82 (dd, $J_{8,7} = 7,99$ e $J_{8,6} = 1,6$)	116,55	116,50
8a	-	120,97	120,90
8b	-	*	103,80
9	-	181,46	181,10
OH (quelado)	12,74 (s)	-	-
OCH_2O	6,12 (s)	102,73	102,70
OCH_3	4,03 (s)	56,52	56,40

* Valores não observados

4.1.3.2 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11)



(11)

A 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**) foi obtida do EBDM pelo Método A (Figura 5.1, p. 89). Após purificação por sucessivas colunas cromatográficas, apresentou-se como um sólido amarelo de Pf. 256-258 °C (Lit. 244 °C; Bashir et al., 1992b) e Rf. 0,18 (Hexano:acetato de etila 50:50).

O espectro na região do IV obtido em pastilha de KBr apresentou absorções em ν 3436 cm^{-1} referentes as hidroxilas (O-H), em ν 1652 cm^{-1} para a carbonila conjugada (C=O), e para C=C dos anéis aromáticos em ν 1575 e 1447 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H obtido em piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Espectro 5, p. 131) apresentou sinais referentes a quatro átomos de hidrogênio aromáticos: um singleto em 6,32 ppm (1H, s) atribuído ao H-4 do anel A e um sistema de spin aromático definido pelos sinais: $\delta_{\text{H-6}}$ 7,55 (1H, d, $J_{6,7} = 8,4$ Hz); $\delta_{\text{H-7}}$ 7,31 (1H, t, $J_{7,6} = 8,4$ e $J_{7,8} = 8,4$ Hz) e $\delta_{\text{H-8}}$ 7,97 (1H, d, $J_{8,7} = 8,4$ Hz). Os demais sinais no espectro de hidrogênio foram atribuídos à hidroxila quelada em 13,48 ppm, uma outra hidroxila livre em 5,01 ppm (C5 -OH) e dois sinais referentes a duas metoxilas em 3,98 ppm (3H, s) e 3,73 ppm (3H, s).

A atribuição dos sinais de carbono da estrutura (**11**) (Tabela 4-6) foi possível após a realização do experimento de ^{13}C (Espectro 6, p. 132) e DEPT 135°. Desta maneira, foram observados 15 átomos de carbono numa região espectral entre δ_{C} 56,1 -181,7 ppm. Juntamente com DEPT 135°, observou-se que a estrutura (**11**) é composta por 9 carbonos quaternários, 4 metínicos e 2 metílicos. Os átomos de carbono metílicos aparecem na região espectral de carbono ligado a um oxigênio com absorção em δ_{C} 56,4 e 60,6 ppm. Os demais átomos de carbono aparecem na região espectral de aromáticos, entre δ_{C} 90,9 a 160,7 ppm. Observou-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico à δ_{C} 181,7 ppm, correspondente a uma carbonila.

No espectro de COSY (correlação ^1H - ^1H) (Espectro 7, p. 133) pode-se observar somente as correlações entre os átomos de hidrogênio H-7 com H-6 e H-8. Essas informações estão de acordo com a proposta do anel B substituído em C-5.

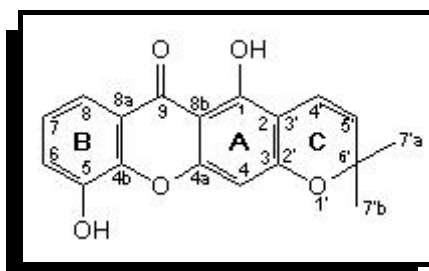
A estrutura (**11**) foi confirmada pela comparação por co-CCD e análise dos espectros de ^1H e ^{13}C com um padrão certificado. Esta xantona já havia sido identificada em uma amostra de *P. Paniculata* (Cristiano et al., 2003).

Tabela 4-6 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

	δ ^1H (J, Hz)	δ ^{13}C ppm ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	δ ^{13}C (ppm) ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Cristiano et al., 2003)
1	-	153,5	153,3
2	-	132,3	132,2
3	-	160,6	160,7
4	6,32 (s)	91,2	90,9
4a	-	154,7	154,5
4b	-	146,4	145,2
5	-	147,9	147,8
6	7,55 (d, $J_{6,7}=8,4$)	121,4	121,2
7	7,31 (tl, $J_{7,6}=8,4$ e $J_{7,8}=8,4$)	124,6	124,0
8	7,97 (d, $J_{8,7}=8,4$)	115,3	115,1
8a	-	*	*
8b	-	104,5	104,3
9	-	181,9	181,7
OH (quelado)	13,48 (s)	-	-
$\text{CH}_3\text{O-C-2}$	3,98 (s)	60,6	60,4
$\text{CH}_3\text{O-C-3}$	3,73 (s)	56,4	56,1

* Valor não observado

4.1.3.3 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (12) (6-desoxijacareubin)



(12)

A 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (**12**) também conhecida como 6-desoxijacareubin foi obtida do EB_{Et}OH pelo Método B (Figura 5.2, p. 91). Após purificação por sucessivas colunas cromatográficas apresentou-se como um sólido amarelo de Pf. 215-217 °C (Lit. 211-213 °C; Burkhardt et al., 1991) e Rf. 0,45 (Hexano:acetato de etila 50:50).

O espectro de massas (EI-MS) deste metabólito apresentou um pico íon molecular m/z 310 $[M]^+$ que juntamente com a análise dos espectros de RMN sugeriu a fórmula molecular $C_{18}H_{14}O_5$.

O espectro de RMN 1H (C_5D_5N) (Espectro 8, p. 134) apresentou um sistema de spin aromático definido pelos sinais: δ_{H-6} 7,53 (1H, dd $J_{6,7} = 7,8$ e $J_{6,8} = 1,4$ Hz); δ_{H-7} 7,28 (1H, t, $J_{7,6} = 7,8$ e $J_{7,8} = 8,1$ Hz); δ_{H-8} 7,96 (1H, dd $J_{8,7} = 8,1$ e $J_{8,6} = 1,4$ Hz), atribuídos ao anel B-5-substituído. A absorção em 6,55 ppm (1H, s) foi atribuída ao H-4 do anel A o que está em acordo com xantonas 1,2,3-trissubstituída (Fujita et al., 1992). Em adição, o espectro de RMN de 1H apresentou um par de dupletos para um sistema olefínico *cis* em $\delta_{H-4'}$ 7,01 (1H, d, $J_{4'-5'} = 10,0$ Hz) e $\delta_{H-5'}$ 5,53 (1H, d, $J_{5'-4'} = 10,0$ Hz) e um singleto em 1,43 ppm com integração de seis átomos de hidrogênio atribuído as metilas geminais C-7'a e C-7'b, o que sugere a presença de um anel piranoprenil fundido ao anel B da xantona. A posição do grupo piranoprenil em O_3-C_2 foi deduzida pela presença de absorção para o hidrogênio quelatogênico em 13,69 ppm e pelo singleto em 6,55 ppm.

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 9, p. 135) apresentou dezoito sinais de carbono numa região espectral compreendida entre δ_C 28,11 – 181,68 ppm. Observou-se que a estrutura (**12**) é composta por 10 átomos de carbono quaternários, 6 metínicos e dois metílicos. Observou-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico δ_C 181-68 ppm, correspondente a uma carbonila. Os átomos de carbono metílicos que fazem parte do anel C da estrutura proposta absorvem a 28,11 ppm.

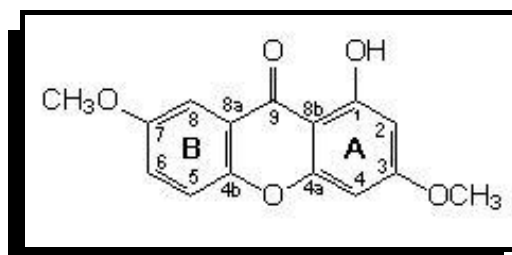
A estrutura foi confirmada por comparação de seus dados espectroscópicos de ^1H com os dados da literatura e os valores estão listados na Tabela 4-7.

Este composto já foi descrito em plantas do gênero *Garcinia* (Nguyen et al., 2003), *Calophyllum* (Jantan et al., 2001; Scheinmann e Sripong, 1971) e *Mourera* (Burkhardt et al., 1992), porém é a primeira vez que se observa sua ocorrência no gênero *Polygala*.

Tabela 4-7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (**12**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz) (CDCl_3) (Burkhardt et al., 1992)
1	161,15	-	
2	99,40	-	
3	163,73	-	
4	95,95	6,55 (s)	6,40 (s)
4a	152,14	-	
4b	146,34	-	
5	147,93	-	
6	121,59	7,53 (dd, $J_{6,7} = 7,8$ e $J_{6,8} = 1,4$)	7,36 (dd, $J = 7,9$ e 1,6)
7	124,64	7,28 (t, $J_{7,6} = 7,8$ e $J_{7,8} = 8,8$)	7,29 (t, $J = 7,9$ e 7,9)
8	115,46	7,96 (dd, $J_{8,7} = 8,1$ e $J_{8,6} = 1,4$)	7,67 (dd, $J = 7,9$ e 1,6)
8a	122,07	-	
8b	101,72	-	
9	181,68	-	
4'	115,54	7,01 (d, $J_{4',5'} = 10,0$)	6,70 (d, $J = 10,0$)
5'	127,24	5,53 (d, $J_{5',4'} = 10,0$)	5,77 (d, $J = 10,0$)
6'	78,61	-	
7'a	28,11	1,43 (s)	1,48 (s)
7'b	28,11	1,43 (s)	1,48 (s)
OH		13,69	13,34
(quelado)			

4.1.3.4 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (13)



(13)

A 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**) foi obtida do EBEtOH no Método B (Figura 5.2 p. 91). Após purificação por sucessivas colunas cromatográficas apresentou-se como um sólido amarelo de Pf. 168-170 °C (Lit. 169-174 °C; Fijita et al., 1992) e Rf. 0,35 (Hexano:acetato de etila 30:70).

O espectro na região do IV obtido em pastilha de KBr apresentou absorções em ν 3445 cm^{-1} referente a hidroxila (O-H), em ν 1657 cm^{-1} para a carbonila conjugada (C=O), e em ν 1587 e 1509 e 1464 cm^{-1} para C=C dos anéis aromáticos.

O espectro de massas (EI-MS) apresentou o íon molecular m/z 272 $[\text{M}]^+$ que juntamente com a análise dos espectros de RMN sugeriu a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

O espectro de RMN de ^1H obtido em piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Espectro 10, p. 136) apresentou sinais referentes a cinco átomos de hidrogênio aromáticos. Um sistema aromático meta correlacionados representado por dois singletos largos encontrados em 6,59 ppm (1H, s) e 6,62 ppm (1H, s) e um sistema de spin aromático definido pelas absorções $\delta_{\text{H-5}}$ 8,16 (1H, d, $J_{5,6} = 8,5$ Hz); $\delta_{\text{H-6}}$ 7,16 (1H, embaixo da $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e $\delta_{\text{H-8}}$ 8,54 (1H, sl), sinais estes atribuídos aos átomos de hidrogênio H-5, H-6 e H-8 respectivamente. Os demais sinais no espectro de hidrogênio foram atribuídos à hidroxila quelada em 13,19 ppm, e dois sinais referentes a duas metoxilas em 3,75 ppm (3H, s) e 3,82 ppm (3H, s).

O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 11, p. 137) apresentou 15 sinais de carbono numa região espectral compreendida entre δ_{C} 56,11 – 177,78 ppm. Juntamente com o espectro de DEPT 135°, observou-se que a estrutura é composta por 8 átomos de carbono quaternários, 5 metínicos e 2 metílicos, em concordância com a estrutura proposta. Os átomos de carbono metílicos aparecem na região espectral de carbono ligado a um oxigênio que absorvem em δ_{C} 56,11 e 56,22 ppm. Observou-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico a 177,78 ppm, correspondente a uma carbonila.

A estrutura foi confirmada por comparação de seus dados espectroscópicos de ^1H com os dados da literatura (Fijita et al., 1992), apresentados na Tabela 4-8.

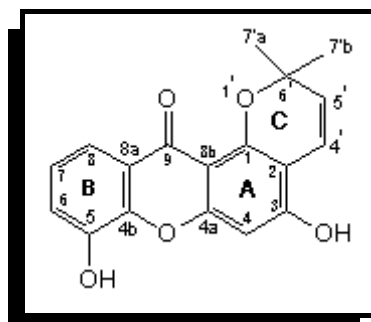
A 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**) foi isolada anteriormente no gênero *Polygala* na espécie *Polygala tenuifolia* (Fijita et al., 1992), porém ainda não havia sido descrita na espécie *P. paniculata*.

Tabela 4-8 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz) (CDCl_3) (Fijita et al., 1992)
1	165,40	-	-
2	98,39	6,62 (s)	6,35 (d, $J = 1,8$)
3	165,95	-	-
4	92,34	6,59 (s)	6,42 (d, $J = 1,8$)
4a	157,38	-	-
4b	148,40	-	-
5	112,35	8,17 (d, $J_{5,6} = 8,5$)	7,44 (d, $J = 9,0$)
6	125,73	7,16 (embaixo $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	7,26 (dd, $J = 9,0$ e $3,0$)
7	162,20	-	-
8	116,72	8,54 (s)	7,60 (d, $J = 3,0$)
8a	120,86	-	-
8b	105,94	-	-
9	177,78	-	-
OH	-	13,19	12,82
(quelado)			
OCH_3	56,22	3,75 (s)	3,91 (s)
OCH_3	56,11	3,82 (s)	3,91 (s)

Valores de ^1H e ^{13}C para $-\text{OCH}_3$ podem estar trocados

4.1.3.5 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona (14)



(14)

A 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona (**14**) foi obtida do EBDM no Método A e EB₂OH no Método B (Figura 5.1, p. 89 e Figura 5.2, p. 91 respectivamente). Após purificação por sucessivas colunas cromatográficas, apresentou-se como um sólido amarelo de Pf. 173-175 °C e Rf. 0,34 (Hexano:acetato de etila 80:20).

O espectro de massas (EI-MS) apresentou o íon molecular a m/z 310 $[M]^+$ que juntamente com a análise dos espectros de RMN sugeriu a fórmula molecular $C_{18}H_{14}O_5$.

Na região do IV (obtido em pastilha de KBr), destacaram-se as absorções para a hidroxila em ν 3401 e 3464 cm^{-1} (OH), para a carbonila conjugada em ν 1650 cm^{-1} (C=O), e para C=C dos anéis aromáticos em ν 1620, 1571 e 1503 cm^{-1} .

O espectro de RMN 1H em metanol deuterado (CD_3OD) (Espectro 12, p. 138) mostrou absorções típicas de um sistema de spin aromático definido pelos sinais: δ_{H-6} 7,29 (1H, dd $J_{6,7} = 7,85$ e $J_{6,8} = 1,7$ Hz); δ_{H-7} 7,23 (1H, t, $J_{7,6} = 7,85$ e $J_{7,8} = 8,0$ Hz); δ_{H-8} 7,63 (1H, dd $J_{8,7} = 8,0$ e $J_{8,6} = 1,7$ Hz), sugerindo um anel B-5-substituído. A absorção em δ_H 6,19 (1H, s) foi atribuída ao H-4 do anel A o que está em acordo com xantonas 1,2,3-trissubstituídas (Fujita et al., 1992). Em adição, o espectro de RMN de 1H apresentou um par de dupletos para um sistema olefínico *cis* em $\delta_{H-4'}$ 7,02 (1H, d, $J_{4'-5'} = 10,0$ Hz) e $\delta_{H-5'}$ 5,72 (1H, d, $J_{H-5'-4'} = 10,0$ Hz) e um singlete em 1,48 ppm com integração de seis átomos de hidrogênio atribuídos as metilas geminais (H-7'a e H-7'b), indicando uma unidade piranoprenil fundida ao anel A da xantona. A posição do grupo piranoprenil em O_1-C_2 foi deduzida pela ausência de absorção para o hidrogênio quelatogênico e pelas correlações heteronucleares mostradas na Tabela 4-9.

A atribuição dos sinais de carbono da estrutura (**14**) foi possível após a realização do experimento de carbono totalmente desacoplados (Espectro 13, p. 139), DEPT e das correlações heteronucleares HMBC (Figura 4-2, p. 38) e HMQC. Desta maneira, foram observados dezoito sinais de carbono, numa região espectral compreendida entre δ_C 27,86

– 181,47 ppm. Observou-se que a estrutura 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona é composta por 10 átomos de carbono quaternários, 6 metínicos e 2 metílicos. Observou-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico a 181,47 ppm, correspondente a uma carbonila. Os átomos de carbono metílicos que fazem parte do anel C absorvem em δ_C 27,86 e 29,70 ppm.

O espectro de RMN de correlação heteronuclear HMBC apresentou correlações ^1H - ^{13}C via acoplamento à longa distância $^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$. Neste espectro observou-se as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre o hidrogênio H-6 (7,29 ppm) e C-4b (145,98 ppm) e C-8 (115,50 ppm); o hidrogênio H-7 (7,23 ppm) e C-5 (146,35 ppm) e C-8a (121,48 ppm); o hidrogênio H-8 (7,66 ppm) e C-4b (146,33 ppm) e C-6 (120,76 ppm), confirmando o padrão de substituição do anel B. Observou-se também as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre o hidrogênio que absorve a 6,19 ppm (H-4) e C-2 (101,68 ppm) e C-8b (103,00 ppm) do anel A. O anel C apresentou as correlações $^3J_{\text{CH}}$ entre o hidrogênio que absorve a 7,02 ppm (H-4') e o carbono que absorve a 78,44 ppm (C-6'), enquanto que o hidrogênio que absorve a 5,72 ppm (H-5') apresentou correlações $^2J_{\text{CH}}$ com C-6' (78,44 ppm) e $^3J_{\text{CH}}$ com C-2 (101,68 ppm) conforme Figura 4-2.

Em adição, observou-se as correlações dos grupos metila em 1,48 ppm dos átomos de hidrogênio 7'a e 7'b com C-5' (127,14 ppm) para a constante de acoplamento $^3J_{\text{CH}}$ e com C-6' (78,44 ppm) para as constantes de acoplamento $^2J_{\text{CH}}$. Observou-se também $^3J_{\text{CH}}$ entre C-7'a (27,86 ppm) e/ou C-7'b (29,70 ppm), confirmando o anel piranoprenil ligado ao anel A (Figura 4-3).

No espectro de NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) pode-se observar somente as correlações entre os átomos de hidrogênio 4' e 5', que está em concordância com a estrutura proposta (Figura 4-4). Estas análises espectroscópicas nos permitiram propor a estrutura **(14)** uma piranoprenilxantona (3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona). Uma vasta busca na literatura (sciencedirect, web of science, SciFinder Scholar, entre outros sites de busca) até a presente data, mostra que a piranoxantona **(14)** trata-se de uma estrutura inédita.

Tabela 4-9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e HMBC da 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona (**14**) em CD_3OD .

	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	HMBC
			$^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$
1	162,83	-	-
2	101,68	-	-
3	161,11	-	-
4	98,97	6,19 (s)	C-2, C-8b
4a	151,90	-	-
4b	145,98	-	-
5	146,35	-	-
6	120,76	7,29 (dd, $J_{6,7}=7,85$ e $J_{6,8}=1,7$)	C-4b, C-8
7	124,08	7,23 (t, $J_{7,6}=7,85$ e $J_{7,8}=8,00$)	C-5, C-8a
8	115,50	7,66 (dd, $J_{8,7}=8,00$ e $J_{8,6}=1,6$)	C-4b, C-6
8a	121,48	-	-
8b	103,00	-	-
9	181,47	-	-
4'	115,12	7,02 (d, $J_{4',5'}=10,0$)	C-6'
5'	127,14	5,72 (d, $J_{5',4'}=10,0$)	C-6', C-2
6'	78,44	-	-
7'a	27,86	1,48 (s)	C-5', C-7'b
7'b	29,70	1,48 (s)	C-5', C-7'a

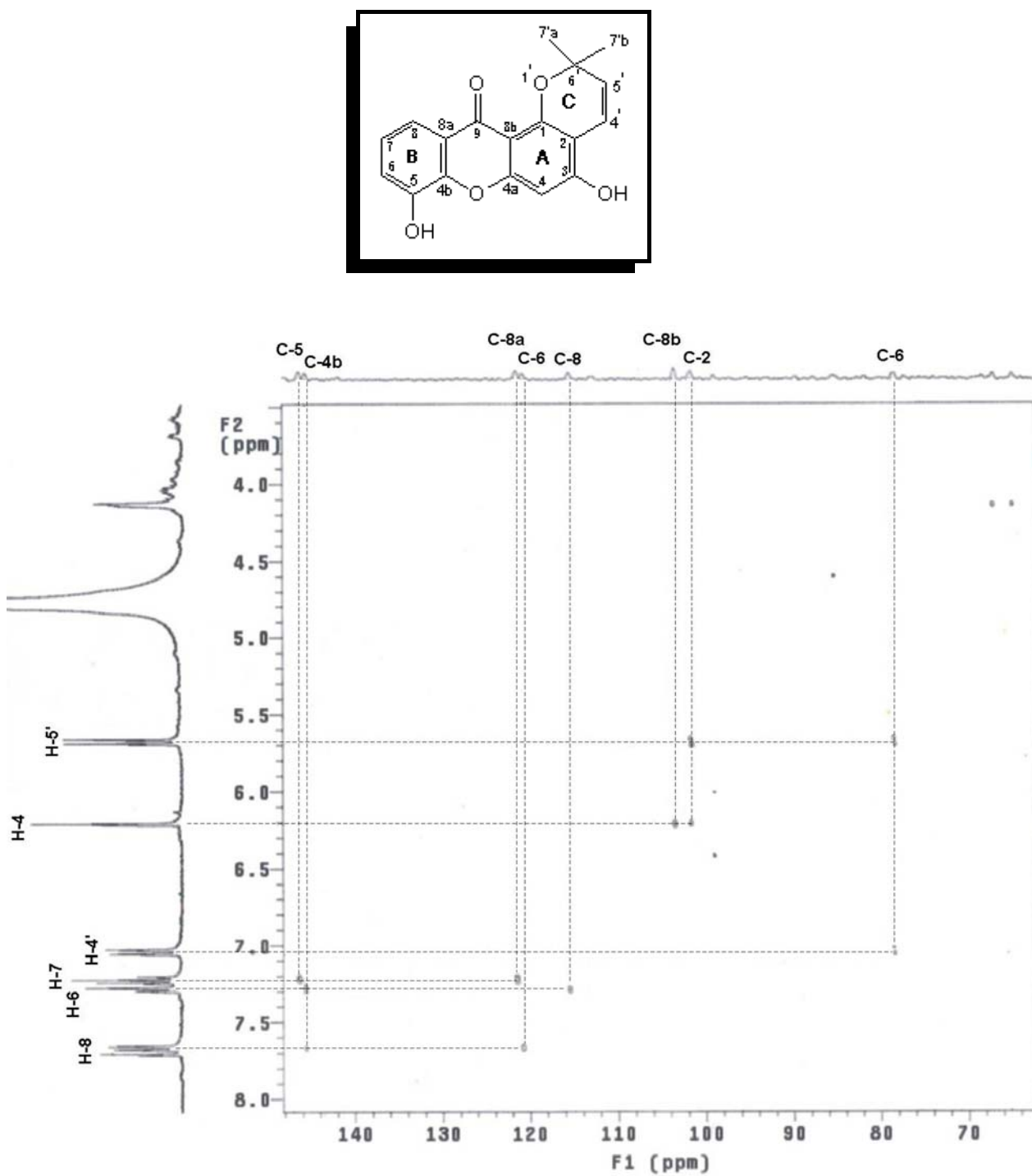


Figura 4-2 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{H-C}$, HMBC da piranoprenilxantona (**14**) em CD_3OD a 400 MHz.

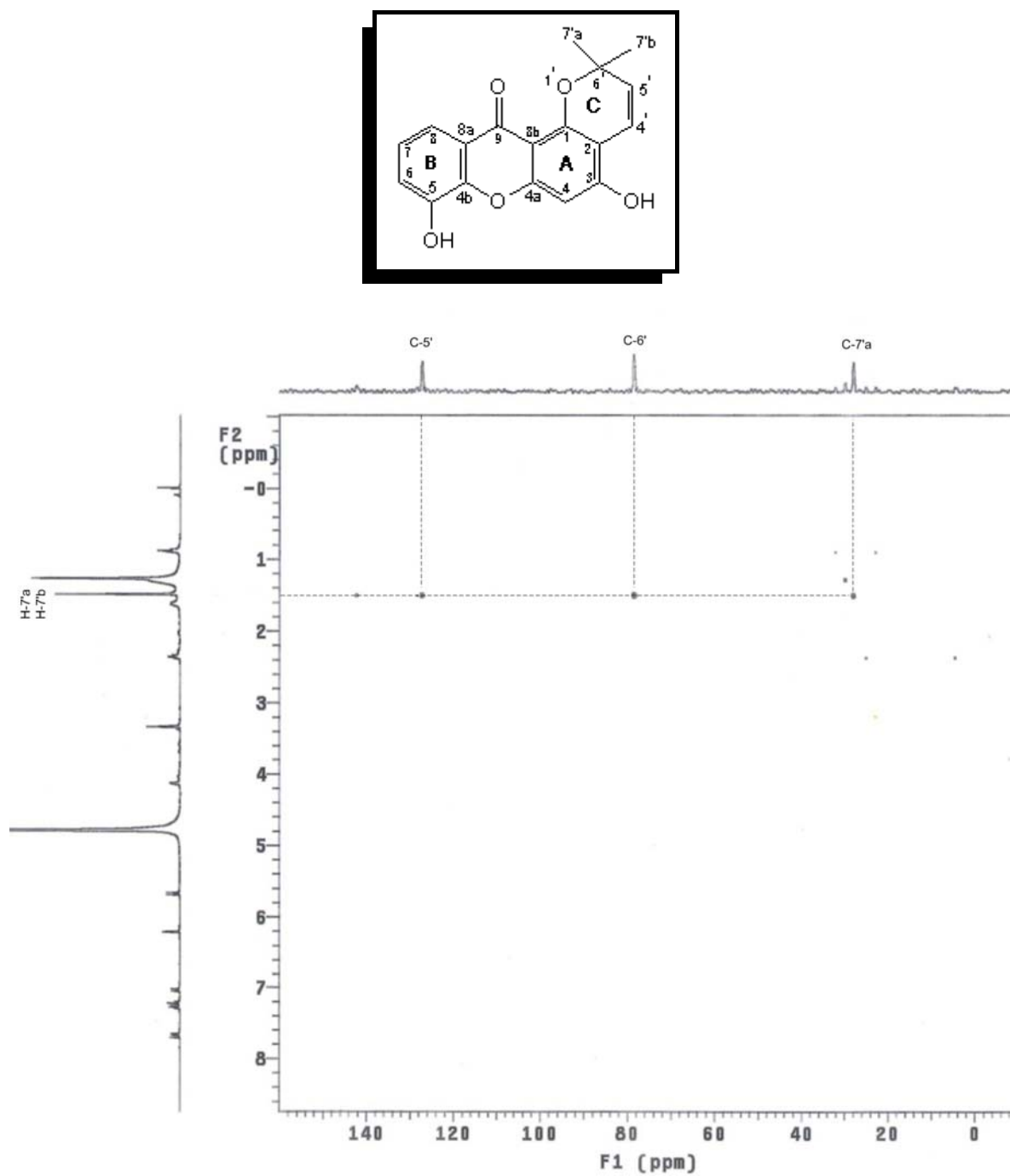


Figura 4-3 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^2\text{-}^3\text{J}_{\text{H-C}}$, HMBC da piranoprenilxantona (**14**) em CD_3OD a 400 MHz.

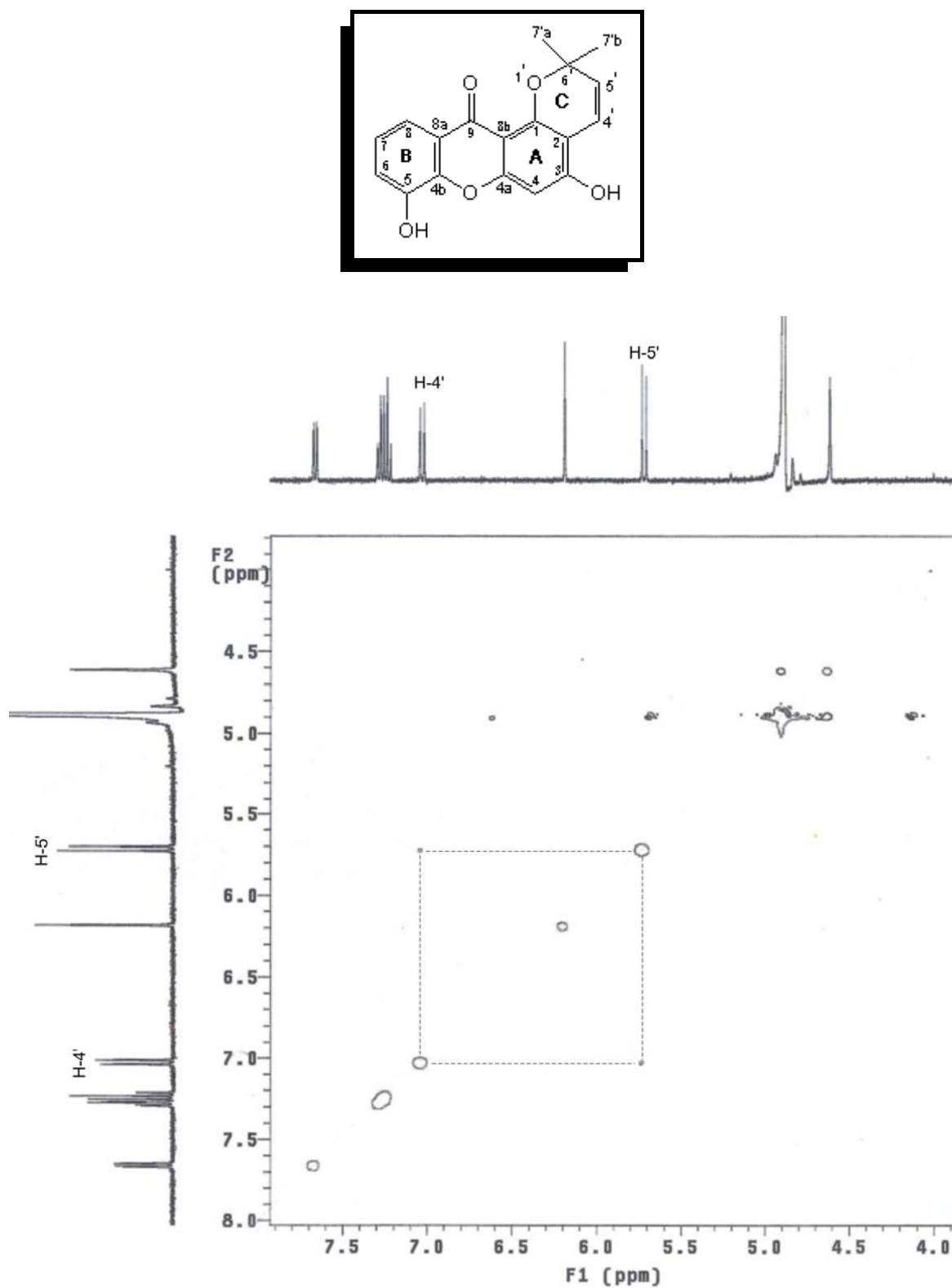


Figura 4-4 - Espectro expandido de RMN 2D, homonuclear ^1H - ^1H , NOESY da piranoprenilxantona (**14**) em CD_3OD a 400 MHz.

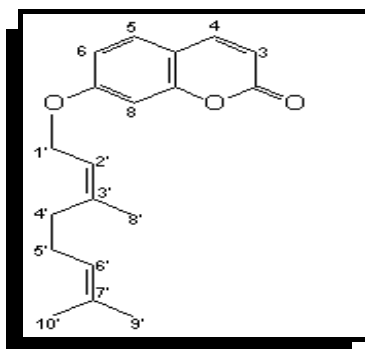
4.1.4 Posição das prenil cumarinas no gênero

As cumarinas representam uma importante e diversificada classe de compostos naturais. A febalosina (**2**) é uma cumarina C-prenilada possuindo um anel epóxido na unidade prenil encontrada em espécies da família Polygalaceae (Hamburger et al., 1985). Artefatos de (**2**), provenientes da abertura do anel epóxido, foram isolados e identificados no gênero *Murraya* (Murray, 1995). Sendo a febalosina (**2**) o composto majoritário em *P. paniculata* (0,05% em relação à planta fresca), nossa intenção foi investigar a distribuição, estabilidade e reatividade das cumarinas no gênero *Polygala*.

Sabendo da possibilidade de abertura do anel epóxi durante o processo de extração, utilizou-se um procedimento diferente de extração (Método B) usando-se primeiramente o solvente hexano (EH) para retirar a febalosina (**2**) e após, usou-se etanol aquoso (80%) para obtenção do extrato bruto etanólico (EBEtOH).

No EBEtOH (Método B) isolou-se também a 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) isolada pela primeira vez na planta. Porém, o composto (**15**) também foi considerado artefato formado durante o processo de isolamento.

4.1.4.1 7-geraniloxicumarina (**1**) (Aurapteno)



(1)

O aurapteno (**1**) foi obtido do EBDM pelo Método A (Figura 5.1, p. 89). Após purificação por coluna cromatográfica, apresentou-se como um sólido branco, de Pf. 65-66 °C e Rf. 0,60 (Hexano:acetato de etila 80:20).

O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou como principais bandas a presença de uma carbonila em 1729 cm^{-1} juntamente com absorção 1592 cm^{-1} de uma δ -lactona α,β -insaturada.

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) (Espectro 14, p. 140) apresentou dois pares de dupletos centrados em $\delta_{\text{H-3}}$ 6,24 (1H, d, $J_{3,4} = 9,5$ Hz); $\delta_{\text{H-4}}$ 7,64 (1H, d, $J_{4,3} = 9,5$ Hz), atribuídos a uma ligação dupla *cis* endocíclica e em $\delta_{\text{H-5}}$ 7,36 (1H, d, $J_{5,6} = 8,2$ Hz) e $\delta_{\text{H-6}}$ 6,85

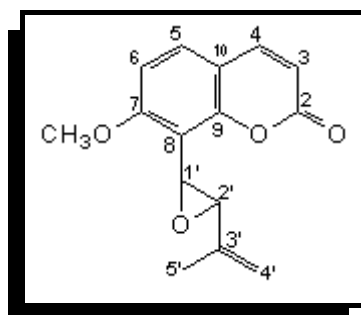
(1H, d, $J_{6,5} = 8,2$ Hz) típico de átomos de hidrogênio aromáticos *orto* relacionados. Apresentou um hidrogênio isolado δ_{H-8} 6,82 (1H, sl) o que indica a presença de um núcleo cumarínico C-7 substituído. A unidade prenilada apresentou sinais em $\delta_{H-9'}$ 1,67 (3H, s) e $\delta_{H-10'}$ 1,58 (3H, s) correspondentes a duas metilas geminais e uma metila em $\delta_{H-8'}$ 1,76 (3H, s). Atribuiu-se o $\delta_{H-1'}$ 4,60 ppm (2H, d) e δ_H 2,11 ppm (integração para quatro átomos de hidrogênio) para H-4' e H-5'. Um singlete largo em $\delta_{H-6'}$ 5,08 ppm (1H) e um tripleto em $\delta_{H-2'}$ 5,47 (1H) foram atribuídos aos átomos de hidrogênio olefínicos adjacentes. Todos os sinais de 1H e $^{13}C/DEPT$ (Espectro 15, p. 141 e espectro 16, p. 142) estão apresentados na Tabela 4-10.

Tabela 4-10 – Dados de RMN de 1H e ^{13}C da cumarina aurapteno (**1**) em $CDCl_3$

	$\delta^{13}C$ ppm	δ^1H (J, Hz)	δ^1H (J, Hz) ($CDCl_3$) (Nakatani et al., 1987)
1	-	-	-
2	126,12	-	-
3	112,94	6,24 (d, $J_{3,4}=9,5$)	6,22 (d, $J=9,6$)
4	143,42	7,64 (d, $J_{4,3}=9,5$)	7,63 (d, $J=9,6$)
5	128,64	7,36 (d, $J_{5,6}=8,2$)	7,36 (d, $J=10,8$)
6	113,21	6,85 (d, $J_{6,5}=8,2$)	6,84(m)
7	161,27	-	-
8	101,57	6,82 (s)	-
9	155,85	-	-
10	112,39	-	-
1'	65,46	4,60 (d, $J_{1',2'}=6,5$)	4,60 (d, $J=7,2$)
2'	118,36	5,47 (t, $J_{2',1'}=6,5$)	5,46 (t, $J=7,2$)
3'	142,34	-	-
4'	39,49	2,11	2,10
5'	26,20	2,11	2,10
6'	123,59	5,08 (sl)	5,09 (sl)
7'	131,94	-	-
8'	16,75	1,76 (s)	1,74 (s)
9'	25,63	1,67 (s)	1,66 (s)
10'	17,69	1,60 (s)	1,60 (s)

A confirmação destes resultados deu-se através da comparação dos deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ^1H com os dados da literatura (Nakatani et al., 1987) e comparação por co-CCD com amostra padrão.

4.1.4.2 7-metóxi-8-(1',2'-epóxi-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (2) (febalosina)



(2)

A febalosina (2) foi obtida através da extração direta com hexano como descrito no Método B (Figura 5.2, p. 91). Apresentou-se como um sólido branco de Pf 124° C (Lit. 121-123 °C; Hamburger et al., 1985) e Rf. 0,39 (Hexano:acetato de etila 60:40); $[\alpha]_D$ 0 (CH_2Cl_2).

O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou as principais bandas em ν 3070 cm^{-1} (C-H aromático), ν 1735 cm^{-1} para a carbonila (C=O), ν 1608 cm^{-1} (C=C).

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) (Espectro 17, p. 143) apresentou dois pares de dupletos centrados em $\delta_{\text{H-3}}$ 6,26 (1H, d, $J_{3,4} = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-4}}$ 7,62 (1H, d, $J_{4,3} = 9,6$ Hz), atribuídos a uma ligação dupla *cis* endocíclica e em $\delta_{\text{H-5}}$ 7,42 (1H, d, $J_{5,6} = 8,8$ Hz) e $\delta_{\text{H-6}}$ 6,87 (1H, d, $J_{6,5}=8,8$ Hz) típicos de átomos de hidrogênio aromáticos *orto* relacionados, o que indica a presença de um núcleo cumarínico C-7, C-8 substituído. Um par de dupletes na região 3,92 - 3,99 ppm com integração de um átomo de hidrogênio cada e $J \cong 2,0$ Hz são atribuídos aos átomos de hidrogênio metínicos adjacentes H-2' e H-1'. Dois singletos na região 5,08 e δ 5,30 ppm com integração de um átomo de hidrogênio cada, são atribuídos a insaturação (H-4'). Um singlete em 1,87 ppm com integração de três átomos de hidrogênio corresponde ao H-5' definindo o grupo prenil. O sinal para os átomos de hidrogênio da MeO- aparecem na região de 3,97 ppm.

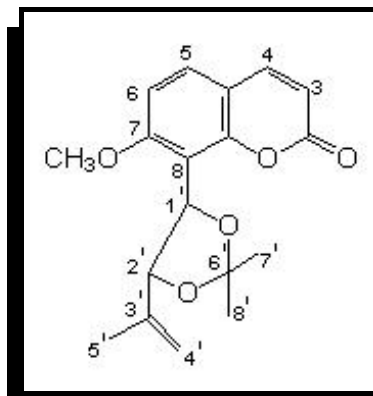
O espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 18, p. 144) e DEPT 135° da febalosina mostrou 14 sinais de carbono numa região espectral compreendida entre δ_{C} 17,68 – 162,18 ppm, sendo 5 sinais de carbono quaternário (C-8 não observado), 6 metínicos, 1 metilênico, e dois metílicos. Dos seis carbonos metínicos, dois aparecem na região espectral de carbono sp^3 em 52,00 e 60,92 ppm de um anel epóxido. A metoxila foi identificada pelo sinal em

56,58 ppm. Observou-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico a 162,18 ppm correspondente a uma carbonila. A atribuição dos valores para os deslocamentos químicos dos átomos de ^1H e ^{13}C foi feita com base nos espectros COSY, HMQC e HMBC. Isto nos permite conferir os dados da literatura para a febalosina, onde os sinais dos átomos de hidrogênio H-1', H-2' e H-4' estão trocados, como apresentados na Tabela 4-11.

Tabela 4-11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da febalosina (**2**) em CDCl_3 e valores da literatura (Zakaria et al., 1988).

	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz) (CDCl_3)	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz) Literatura (CDCl_3)
1	-	-	-
2	162,18	-	-
3	113,05	6,26 (d, $J_{3,4}=9,6$)	6,25 (d, $J=9,5$)
4	141,51	7,62 (d, $J_{4,3}=9,6$)	7,64 (d, $J=9,5$)
5	129,23	7,42 (d, $J_{5,6}=8,8$)	7,38 (d, $J=9,5$)
6	107,81	6,87 (d, $J_{6,5}=8,8$)	6,85(d, $J=9,5$)
7	160,61	-	-
8	^a	-	-
9	154,09	-	-
10	112,76	-	-
1'	52,00	3,99 (d)	5,28 (d, $J=2,1$)
2'	60,92	3,92 (d, $J_{2',1'}=2,0$)	5,06 (d, $J= 2,1$)
3'	113,78	-	-
4'	113,68	5,08 (s)	3,93
4'		5,30 (s)	-
5'	17,68	1,87	1,83
OCH_3	56,58	3,97 (s)	3,93

^a Valor não observado

4.1.4.3 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (15)**(15)**

A 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) foi obtida a partir do EBEtOH pelo Método B (Figura 5.2, p. 91). Apresentou-se na forma de cristais incolores (111 mg) com Pf. 111-112 °C e Rf. 0,58 (Hexano:acetato de etila 50:50); $[\alpha]_D -4,86$. A 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) foi elucidada com base nas análises espectroscópicas de RMN de ^1H , ^{13}C uni- e bidimensionais, e confirmada por cristalografia de Raio-X.

O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou como principais bandas a presença da lactona α, β insaturada ($\text{C}=\text{O}$, ν 1724 cm^{-1}) e ν 1603 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$).

O espectro de RMN de ^1H (CDCl_3) (Espectro 19, p. 145) apresentou dois pares de dupletos centrados: $\delta_{\text{H-3}}$ 6,21 (1H, d, $J_{3,4} = 8,8$ Hz) e $\delta_{\text{H-4}}$ 7,59 (1H, d, $J_{4,3} = 8,8$ Hz); atribuídos a uma ligação dupla *cis* endocíclica; $\delta_{\text{H-5}}$ 7,39 (1H, d, $J_{5,6} = 8,0$ Hz) e $\delta_{\text{H-6}}$ 6,85 (1H, d, $J_{6,5} = 8,0$ Hz) típicos de átomos de hidrogênio aromáticos *orto* relacionados. Estes dados juntamente com os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^{13}C (Espectro 20, p. 146), definem a presença do núcleo cumarínico. O espectro de RMN de ^1H mostra ainda absorção em 3,90 ppm (3H) referente a uma metoxila, um par de dupletos que absorvem em δ_{H} 5,53 e 5,00 ppm com $J = 9,16$ Hz e integração de um átomo de hidrogênio cada, que são atribuídos aos átomos de hidrogênio metínicos adjacentes H-1' e H-2', dois singletos largos que absorvem em δ_{H} 4,82 e 4,93 ppm característico de dois átomos de hidrogênio metilênicos de C sp^2 H-4'. Três singletos que absorvem em 1,51 ppm, 1,67 ppm e 1,71 ppm com integração de três átomos de hidrogênio cada, são atribuídos as metilas H-8', H-7' e H-5' respectivamente.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 18 sinais de carbono, numa região espectral entre 17,46 - 160,24 ppm observando-se que a estrutura é composta por 7 átomos de

carbono quaternários, 6 metínicos, 1 metilênico e 4 metílicos, em concordância com a estrutura proposta. Dos seis átomos de carbono metínicos, dois aparecem na região de carbono sp^3 ligados a oxigênio, os demais aparecem na região espectral de aromáticos. Observa-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico a 160,24 ppm correspondente a uma carbonila.

O espectro de RMN bidimensional HMBC (Figura 4-5, p. 48) apresenta correlações heteronucleares 1H - ^{13}C via acoplamento à longa distância $^{2-3}J_{CH}$. Neste espectro, observou-se correlações entre H-3 que absorve em δ 6,26 ppm com o carbono C-2 (160,24 ppm) e C-10 (112,98 ppm) respectivamente, correlações entre o hidrogênio H-4 que absorve em δ 7,61 ppm e C-2 (160,24 ppm) e C-9 (153,90 ppm). O hidrogênio H-5 que absorve em δ 7,41 ppm do anel aromático apresentou correlações com C-4 (143,54 ppm), C-7 (161,24 ppm) e C-9 (153,90 ppm) e o hidrogênio H-6 que absorve em δ 6,87 ppm apresentou correlação com C-10 (112,98 ppm) confirmando o núcleo cumarínico. O hidrogênio H-1' que absorve em δ 5,57 ppm apresentou correlações com C-7 (161,24 ppm) e C-9 (153,90 ppm) confirmando a substituição em C-8

No espectro expandido HMBC (Figura 4-6, p. 49) observou-se as correlações entre o singlete que absorve em δ 3,93 ppm (CH_3O-) e C-7 (161,24 ppm) confirmando a posição da metoxila. Observou-se correlações entre o hidrogênio H-5' que absorve em 17,46 ppm com C-2' (81,40 ppm); C-3' (141,39 ppm) e C-4' (113,34 ppm) o que a diferencia das metilas geminais H-7' e H-8' do grupo acetal. Os átomos de hidrogênio metílicos H-7' que absorvem em 1,70 ppm correlacionam-se com o carbono C-6' que absorve 111,63 ppm e o carbono C-8' que absorve em δ 27,29 ppm respectivamente, assim como o hidrogênio H-8' que aparece em 1,54 ppm correlaciona-se com C-6' (111,63 ppm) e C-7' (26,90 ppm). Apresentou também correlações entre o hidrogênio H-4' que absorve em 4,96 ppm com o carbono C-2' que aparece em 81,40 ppm, definindo assim, a unidade prenil da cumarina.

Estes dados permitiram propor a estrutura **(15)**, para uma nova cumarina cujas atribuições dos valores dos deslocamentos químicos com base nas análises espectroscópicas de RMN 1H , ^{13}C /DEPT, HMQC e HMBC são listados na Tabela 4-12.

A obtenção de monocristais permitiu a análise cristalográfica definindo sua estrutura de Raio-X e a configuração relativa dos átomos de carbono C-1' e C-2'. Assim a identificação do composto **(15)** foi 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (RR ou SS). O grupo espacial P-1 indica a presença de um centro de inversão na molécula, sendo portanto, o cristal formado por uma mistura racêmica.

Esta nova estrutura foi considerada um artefato gerado por um possível contato da febalosina (**2**) ou murrangatina (**2a**), (p. 58) com acetona no preparo da coluna cromatográfica.

Tabela 4-12 – Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) em CDCl_3 .

	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)	HMBC
			$^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$
1	-	-	-
2	161,24	-	-
3	113,18	6,26 (d, $J_{3,4}=8,8$)	C-2 e C-10
4	143,54	7,61 (d, $J_{4,3}=8,8$)	C-2 e C-9
5	129,25	7,41 (d, $J_{5,6}=8,0$)	C-4, C-7 e C-9
6	107,94	6,87 (d, $J_{6,5}=8,0$)	C-10
7	160,24	-	-
8	111,63	-	-
9	153,90	-	-
10	112,98	-	-
1'	72,53	5,57 (d, $J_{1,2'}=9,6$)	C-7 e C-9
2'	81,40	5,02 (d, $J_{2,1'}=9,6$)	-
3'	141,39	-	-
4'	113,34	4,96 (s) e 4,85 (s)	C-2'
5'	17,46	1,74 (s)	C-2', C-3' e C-4'
6'	109,44	-	-
7'	26,90	1,70 (s)	C-6' e C-8'
8'	27,29	1,54 (s)	C-6' e C-7'
$\text{CH}_3\text{O-C7}$	56,47	3,93 (s)	C-7

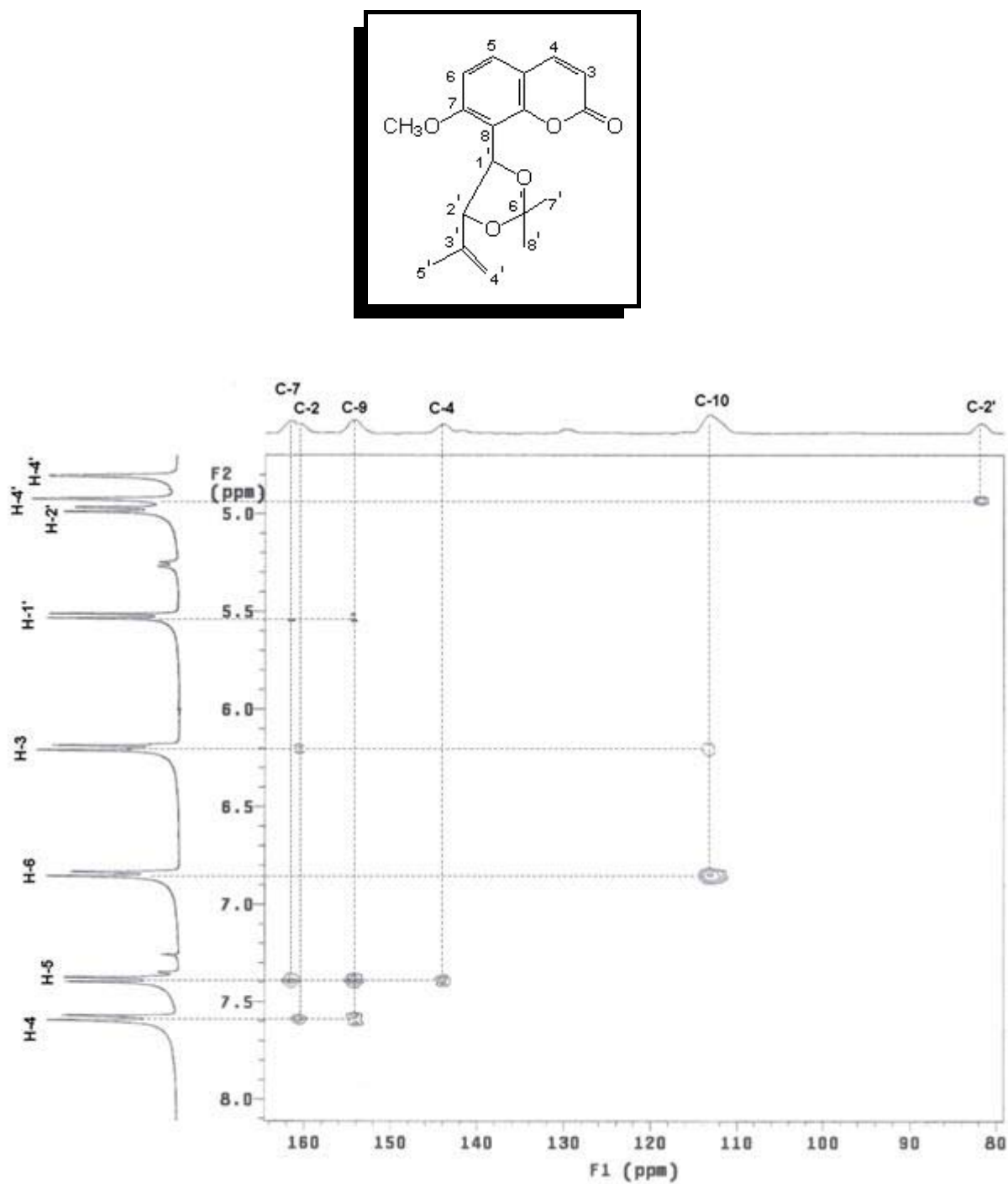


Figura 4-5 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^2\text{-}^3\text{J}_{\text{H-C}}$, HMBC da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) em CDCl_3 a 400 MHz.

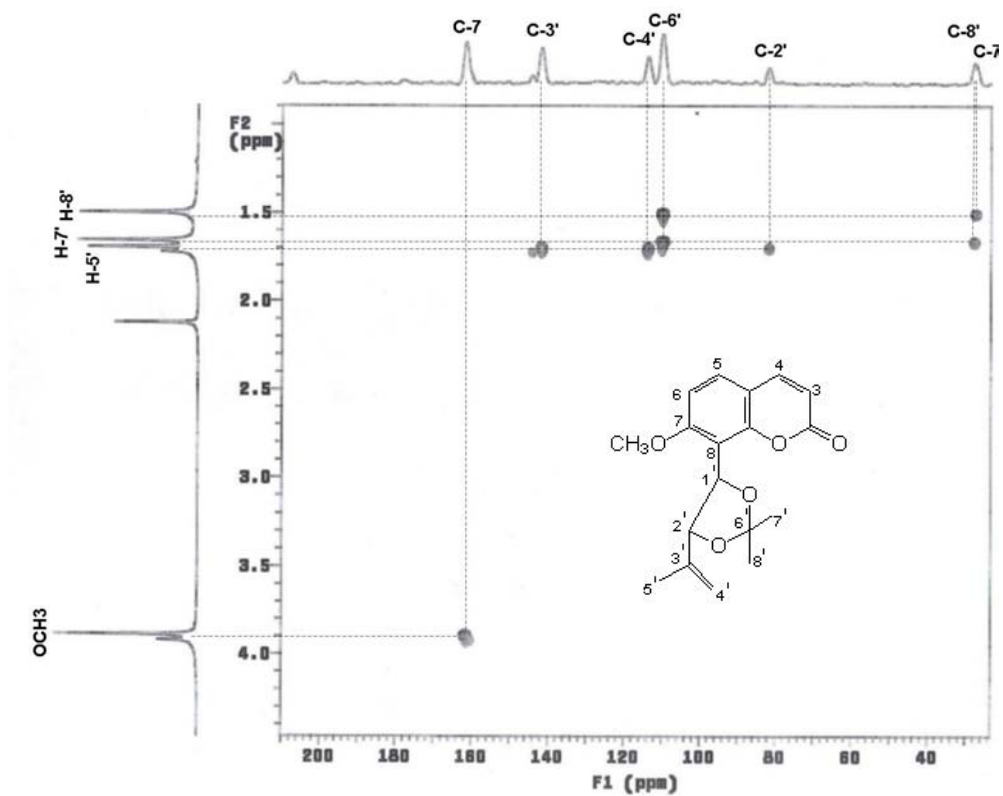


Figura 4-6 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{H-C}$, HMBC da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**) em $CDCl_3$ a 400 MHz.

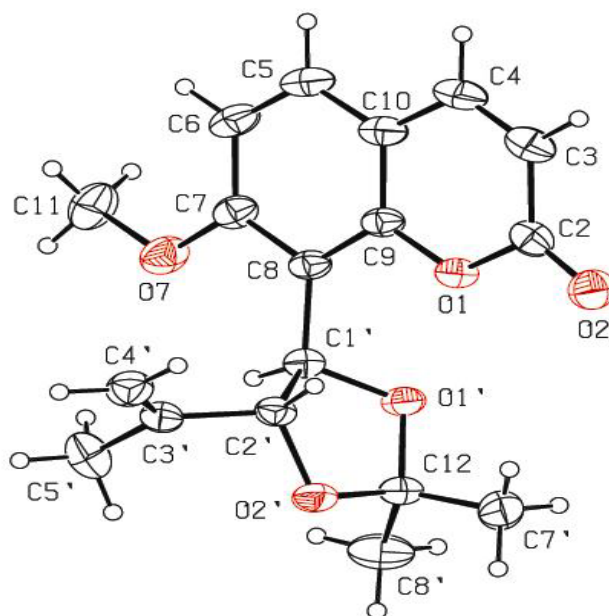
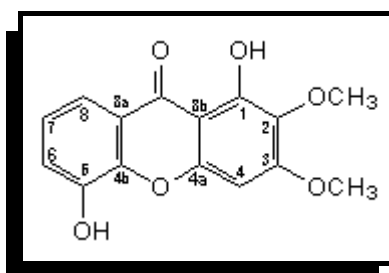


Figura 4-7 – Estrutura de Raio-X do composto 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**).

4.2 Isolamento e identificação dos constituintes de *P. pulchella*

Do EBDM de *Polygala pulchella* (folhas, caules e raízes), isolou-se pela primeira vez duas xantonas, o que insere esta espécie na quimiotaxonomia do gênero.

4.2.1 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11)

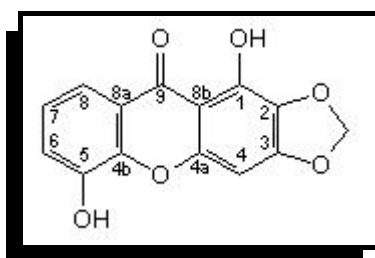


(11)

A 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11) foi obtida do EBDM (Figura 5.3, p. 94). Após purificação por sucessivos fracionamentos em coluna de sílica gel, o composto (11) apresentou-se como um sólido amarelo de Pf. 256-258 °C (Lit. 244 °C; Bashir et al., 1992b) e Rf. 0,18 (Hexano:acetato de etila 50:50).

Sua identificação foi realizada por comparação com dados espectrais de IV e RMN de ^1H e ^{13}C com a xantona (11) isolada anteriormente de *P. paniculata*. No entanto, este é o primeiro relato da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona na espécie *P. pulchella*.

4.2.2 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16)



(16)

A 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona foi obtida do EBDM (Figura 5.3, p. 94). Após purificação por sucessivas colunas cromatográficas, apresentou-se como um sólido amarelo com ponto de fusão 123-125 °C e Rf. 0,30 (Hexano: acetato de etila 80:20).

O espectro de massas (EI-MS) apresentou o íon molecular a m/z 272 $[\text{M}]^+$ que juntamente com a análise dos espectros de RMN sugeriu a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{O}_6$.

O espectro na região do IV obtido em pastilha de KBr apresentou absorção larga em ν 3474 cm^{-1} para a hidroxila (OH), absorções em ν 1684 cm^{-1} para a carbonila conjugada (C=O), ν 1638 e 1472 cm^{-1} para C=C dos anéis aromáticos.

Através da análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , uni- e bidimensionais, homo e heteronucleares, foi possível propor a estrutura da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16).

O espectro de ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, Espectro 21, p.147) apresentou sinais referentes a quatro átomos de hidrogênio aromáticos: um singleto que absorve em $\delta_{\text{H-4}}$ 6,47 (1H, s) atribuído ao H-4 e um sistema de spin aromático definido pelos sinais: $\delta_{\text{H-6}}$ 7,54 (1H, dd, $J = 7,70$ e 1,10 Hz); $\delta_{\text{H-7}}$ 7,30 (1H, t, $J = 7,00$ e 7,00 Hz); $\delta_{\text{H-8}}$ 7,95 (1H, dd, $J = 7,00$ e 1,10 Hz) sugerindo o anel B substituído em C-5. Adicionalmente foram observados sinais para o grupo metilenodioxo em 6,11 ppm (2H, s, 2-OCH₂O-3).

No espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 22, p. 148) observou-se 14 sinais de carbono numa região espectral compreendida entre 89,53 – 182,06 ppm, sendo nove carbonos quaternários, quatro metínicos, e um carbono metilênico. Observou-se um sinal de baixa intensidade com deslocamento químico igual a 182,06 ppm, correspondente a uma carbonila. O carbono metilênico ligado a dois átomos de oxigênio que faz parte do anel A, aparece com deslocamento químico em 103,20 ppm, foi confirmado pelo DEPT 135° (Espectro 23, p. 149).

As correlações ^1H - ^{13}C do tipo HETCOR via $^1J_{\text{CH}}$, (Figura 4-8, p. 53) possibilitou a confirmação dos deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados H-6 (7,54 ppm) com C-6 (121,38 ppm), H-7 (7,30 ppm) com C-7 (124,55 ppm) e H-8 com C-8 (115,42 ppm).

No espectro de COSY (correlação ^1H - ^1H) (Figura 4-9, p. 54) pode-se observar somente as correlações entre os átomos de hidrogênio H-7 com H-6 e H-8. Essas informações confirmando o anel B substituído em C-5.

O espectro bidimensional heteronuclear HMBC (Figura 4-10, p. 55) apresenta correlação ^1H - ^{13}C via acoplamento à longa distância $^{2-3}J_{\text{CH}}$. Neste espectro, observou-se as seguintes correlações: os átomos de hidrogênio do grupo metilenodioxo (O-CH₂-O) que absorve em 6,11 ppm com os átomos de carbono C-3 (155,58 ppm) e C-2 (130,29 ppm); enquanto que o hidrogênio H-4 que absorve em 6,47 ppm correlaciona-se com os átomos de carbono C-2 (130,26 ppm), C-3 (155,58 ppm), C-4a (153,58 ppm) e C-8b (105,80 ppm). Observou-se também correlações do hidrogênio H-6 que absorve em 7,54 ppm com o carbono que aparece em 115,04 ppm (C-8); o hidrogênio H-7 que absorve em 7,30 ppm com os carbonos que aparecem em 147,63 ppm (C-5) e 121,19 ppm (C-6); e o hidrogênio H-8

que absorve em 7,95 ppm apresentou correlação com C-6 (121,19 ppm) e C-4b (146,29 ppm).

Estas análises espectroscópicas nos permitiram propor a estrutura (**16**) como sendo 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona. Uma vasta busca na literatura (sciencedirect, web of science, SciFinder Scholar, entre outros sites de busca) até a presente data, mostra que a xantona (**16**) trata-se de uma estrutura inédita.

A Tabela 4-13 mostra as atribuições para os valores de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ e ^1H com as correlações heteronucleares observadas.

Tabela 4-13 - Dados de RMN de ^{13}C , ^1H e HMBC da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (J, Hz)/HMQC	HMBC
			$^2J_{\text{C-H}}$ e $^3J_{\text{C-H}}$
1	143,45	-	-
2	130,26	-	-
3	155,58	-	-
4	89,53	6,47 (s)	C-2, C-3, C-4a, C-8b
4a	153,58	-	-
4b	146,29	-	-
5	147,63	-	-
6	121,19	7,54 (dd, $J_{6,7} = 7,70$ e $J_{6,8} = 1,10$)	C-8
7	124,55	7,30 (t, $J_{7,6} = 7,70$ e $J_{7,8} = 7,70$)	C-5, C-6
8	115,04	7,95 (dd, $J_{8,7} = 7,70$ e $J_{8,6} = 1,10$)	C-4b, C-6
8a	121,38	-	-
8b	105,80	-	-
9	182,06	-	-
OH	-	a	-
(quelado)			
OCH_2O	103,20	6,11 (s)	C-3, C-2

^a Valor não observado

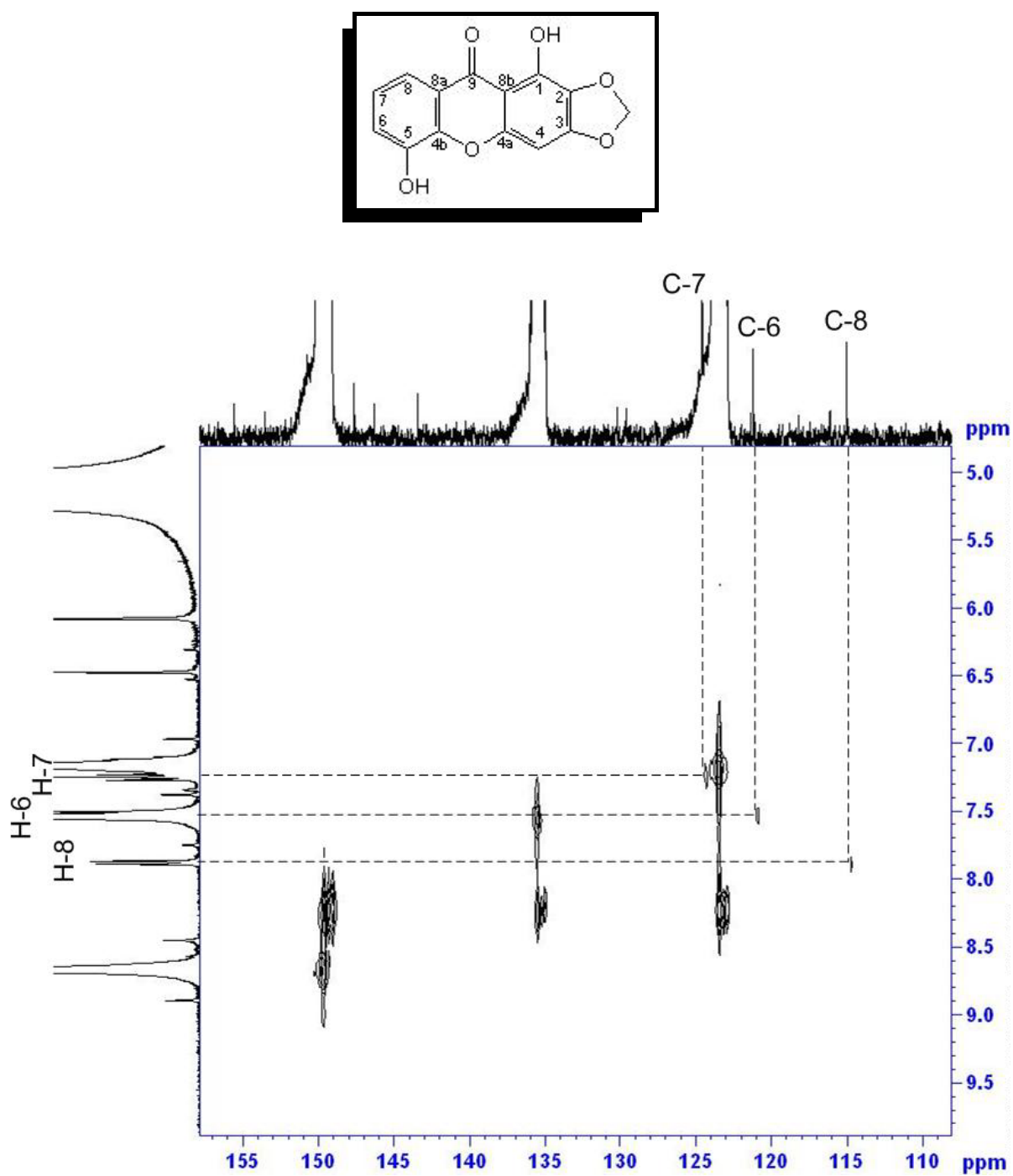


Figura 4-8 – Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear HETCOR da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**) em C_5D_5N a 100 MHz.

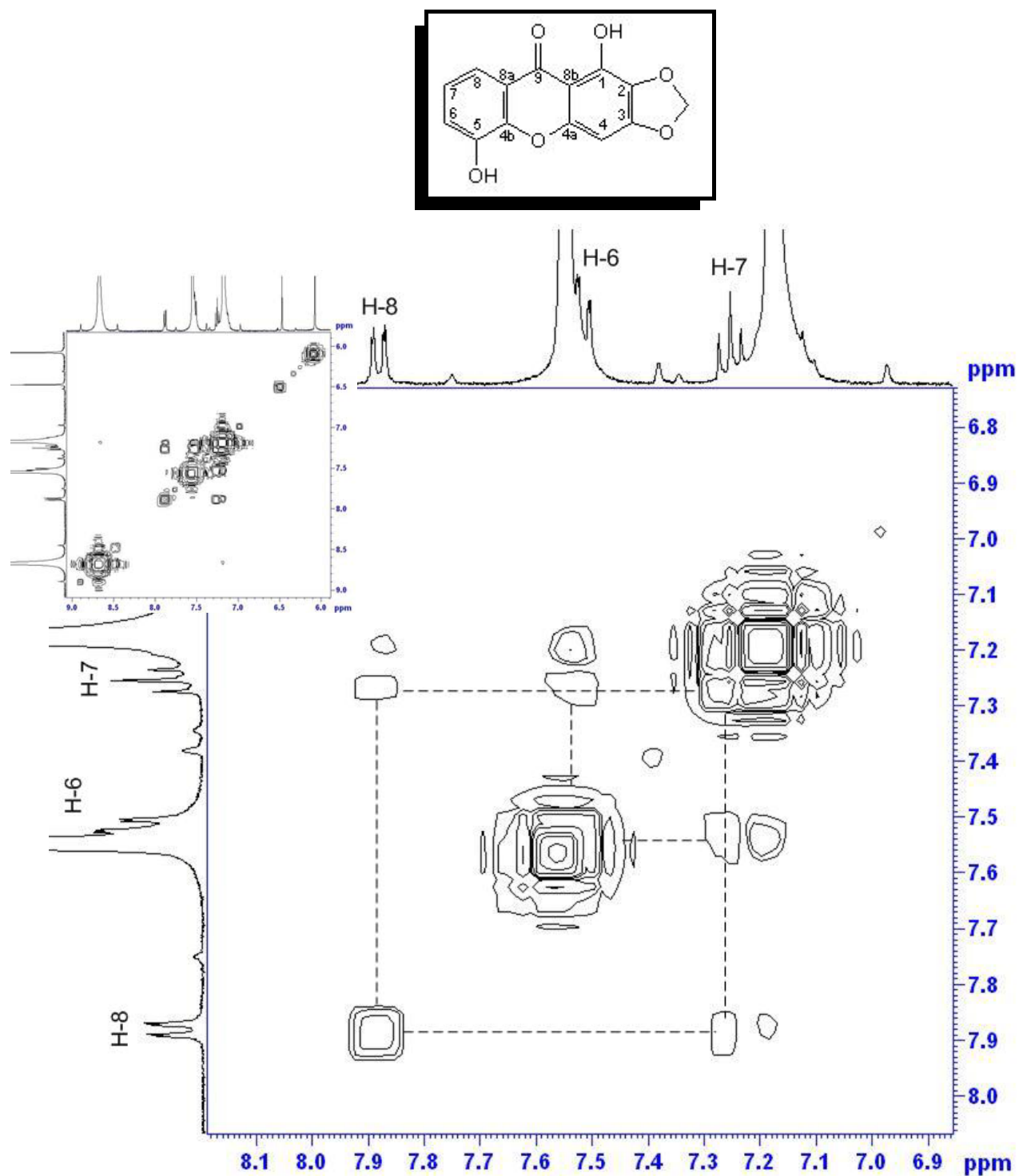


Figura 4-9 – Espectro expandido de RMN 2D, homonuclear ¹H-¹H, COSY da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**) em C₅D₅N a 400 MHz.

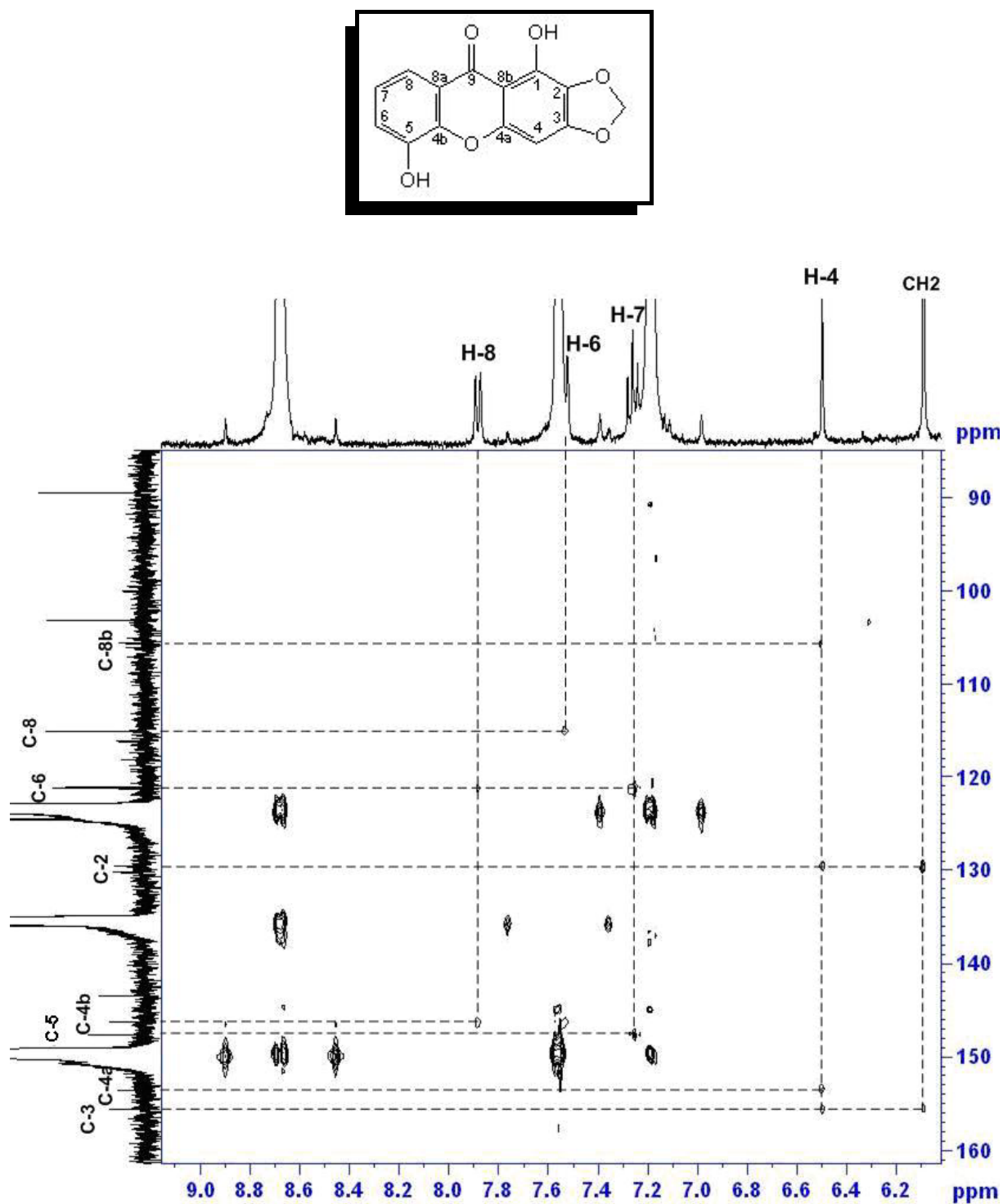


Figura 4-10 - Espectro expandido de RMN 2D, heteronuclear $^{2-3}J_{C-H}$ HMBC da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**) em C_5D_5N a 400 MHz.

4.3 Estudo da Reatividade Química da Febalosina (2)

Os procedimentos utilizados para a obtenção e armazenamento de extratos de plantas, bem como os procedimentos de fracionamento e isolamento de produtos naturais podem favorecer a ocorrência de reações químicas envolvendo metabólitos secundários, resultando na formação dos chamados artefatos de isolamento. Entre os processos responsáveis pela formação de artefatos, destacam-se as reações térmicas e as reações de solvólise (Asfaw et al., 2001). Na suspeita de obtenção de um artefato, o pesquisador deve realizar procedimentos que conduzam à caracterização do mesmo ou a verificação da estabilidade do respectivo produto natural. Assim, reações químicas estratégicas e até mesmo a síntese total devem ser providenciadas (Hussain e Leonard, 1987).

Desta forma, a formação de artefatos de isolamento referentes à febalosina (**2**), uma epóxi prenil cumarina encontrada em espécies da família Polygalaceae, foi avaliada. Na espécie *P. paniculata*, a febalosina é relativamente abundante (0,05% da planta fresca) e facilmente extraída com hexano. Porém quando o extrato bruto for obtido com solventes próticos, tal como, etanol ou metanol, a febalosina não é isolada. Isso provavelmente ocorre devido ao ataque nucleofílico do solvente prótico às posições C-1' e/ou C-2', em presença de sílica, resultando na abertura do anel epóxido durante o processo de isolamento.

Desta forma, planejou-se um estudo da reatividade da febalosina preparando uma série de modificações estruturais envolvendo a abertura do anel epóxido através de reações de substituição nucleofílica utilizando diferentes nucleófilos conforme mostrado no esquema da Figura 4-11.

Recentemente, as cumarinas e seus derivados estão sendo amplamente estudados devido ao interesse por novos heterocíclicos com potentes atividades biológicas as quais se destacam a atividade antiinflamatória e analgésica, além de possuírem baixa toxicidade (Ghate, 2005; Manolov, 2006).

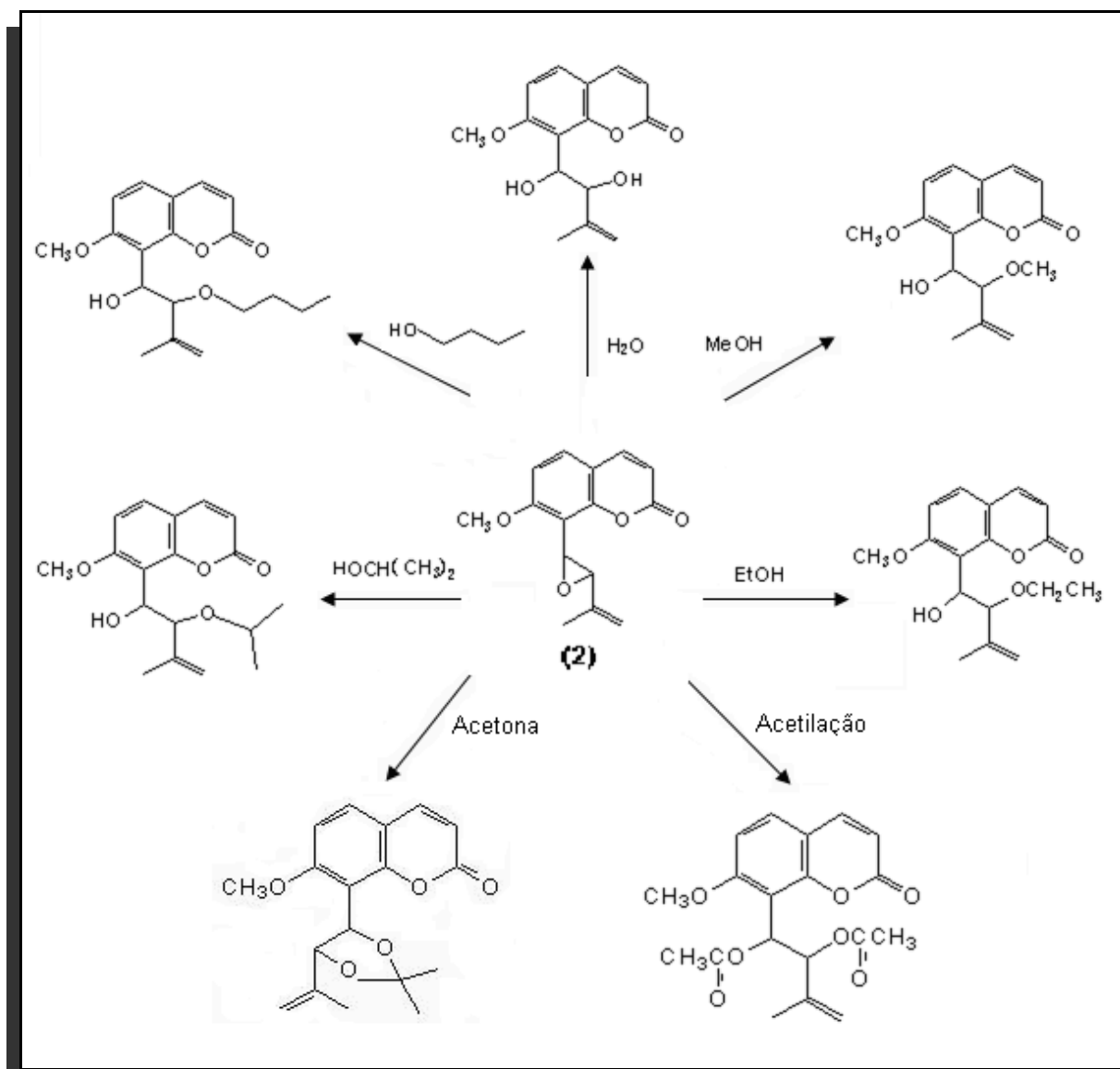
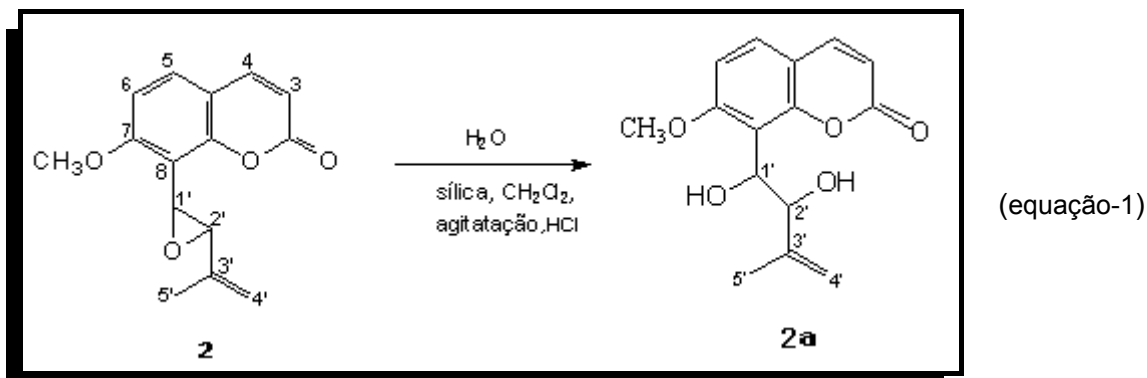


Figura 4-11 – Modificações estruturais da febalosina usando a abertura do anel epóxido com diferentes nucleófilos.

4.3.1 Reação da febalosina (2) com H₂O

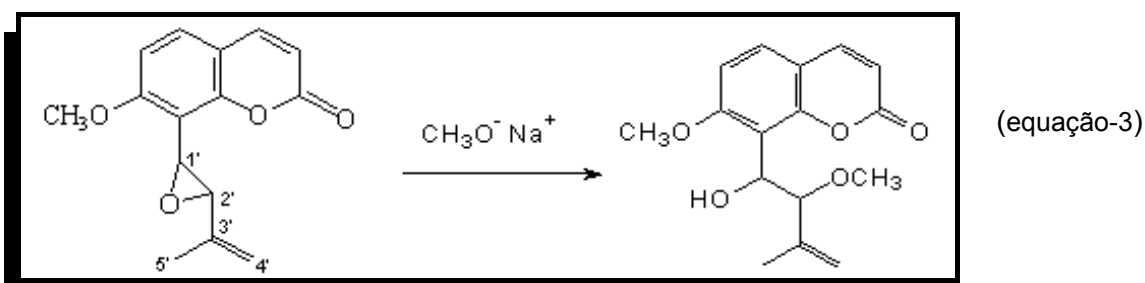
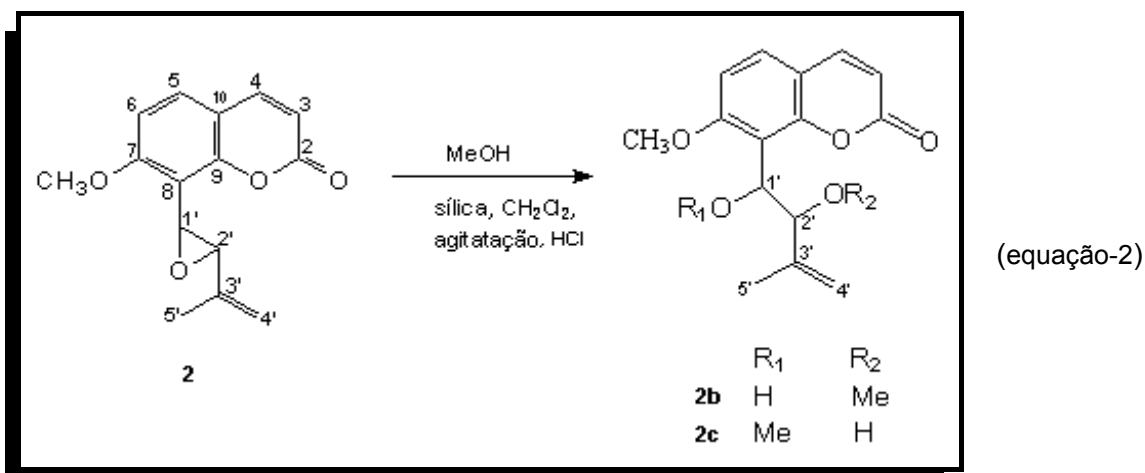


A febalosina (**2**) foi tratada com água e sílica gel sob agitação sendo parcialmente (19%) convertida no dihidroxiderivado **2a**, que apresentou-se na forma de um sólido branco com Pf. 135-136 °C (Lit. 135-136 °C; Hamburger, 1985); Rf. 0,38 (CCD, ACOEt 100%); $[\alpha]_D +16,11$ (CH₂Cl₂).

O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou o aparecimento de absorção intensa de hidroxila em ν 3384 cm⁻¹, evidenciando a abertura do anel epóxido, mantendo as demais absorções características da cumarina.

O espectro de RMN ¹H (Espectro 24, p. 150) do produto da reação (equação-1) manteve as absorções características do núcleo cumarínico: δ_{H-3} 6,26 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); δ_{H-4} 7,63 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); δ_{H-5} 7,40 (1H, d, $J = 8,8$ Hz); δ_{H-6} 6,88 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), juntamente com um singlete em 3,97 ppm do grupo metoxila (C7-OCH₃). Na metade prenil, observou-se o deslocamento dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2' de 3,92 ppm e 3,99 ppm (epóxido) para 5,31 ppm (1H, d) e 4,53 ppm (1H, d, $J = 8,4$ Hz) respectivamente, devido à formação do diol derivado. As absorções dos átomos de hidrogênio H-4' e H-5' foram observadas em 4,59 ppm (1H, s); 4,65 ppm (1H, s) e 1,77 ppm (3H, s) respectivamente. Todos os sinais dos átomos de hidrogênio da estrutura **2a** são encontrados na Tabela 4-14 (p. 65).

4.3.2 Reação da febalosina (2) com metanol e metóxido de sódio



A cumarina febalosina é uma cumarina C-prenilada possuindo um anel epóxido. A abertura deste anel juntamente com adição de um substituinte através de reações de substituição nucleofílica pode ocorrer de duas maneiras distintas, S_N1 e S_N2. Isso é observado quando se submete a reação da febalosina sob duas condições reacionais distintas:

1. Quando a febalosina é dissolvida em CH₂Cl₂ e submetida à reação com MeOH, utilizando-se sílica, agitação magnética e gotas de HCl, a reação é lenta e ocorre a formação de uma mistura estereoisomérica como mostrado na equação-2. Isso só é explicado através da formação de um intermediário carbocátion estável alílico, típico de reações que se processa via mecanismo S_N1.
2. Quando se utiliza MeO⁻ Na⁺ (equação-3), a reação é rápida e ocorre a formação de apenas um produto, indicando que a reação se processa via S_N2. Neste caso, o nucleófilo MeO⁻ se liga regioseletivamente ao C-2' devido provavelmente ao maior impedimento estérico do núcleo cumarínico sobre o C-1'.

A febalosina (**2**) foi tratada com metanol e sílica gel (equação-2) sob agitação sendo parcialmente (25%) convertida nos metoxiderivados **2b/2c**.

Porém, quando a febalosina foi tratada com $\text{MeO}^- \text{Na}^+$ (equação-3), a reação é rápida e o rendimento melhorou consideravelmente (71%). Neste caso, o nucleófilo MeO^- se liga regioseletivamente ao C-2' devido provavelmente ao maior impedimento estérico do núcleo cumarínico sobre o C-1'.

O composto **2b** apresentou-se na forma de sólido branco, com Pf. 140-142 °C, e Rf. 0,24 (CCD, hexano:acetato de etila 50:50); $[\alpha]_D -18,69$ (CH_2Cl_2) (equação-3).

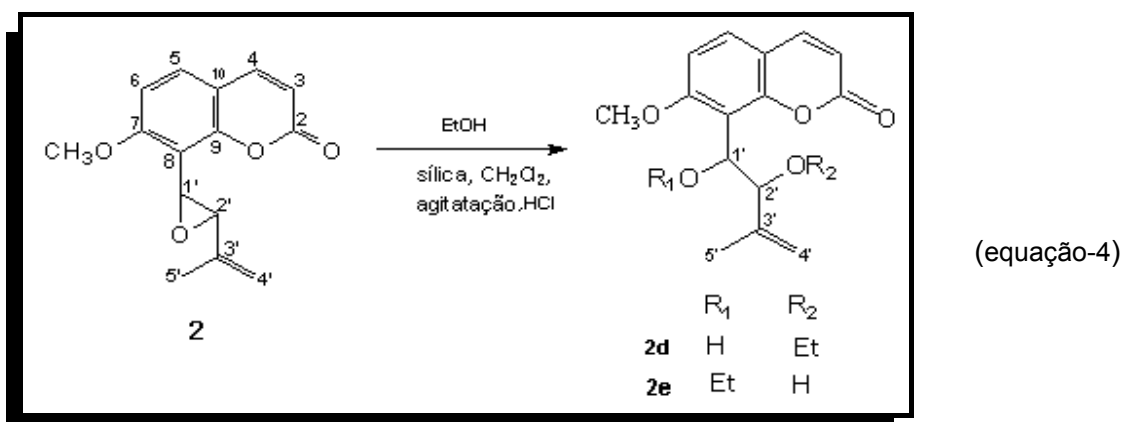
O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou o aparecimento de absorção intensa de hidroxila em ν 3476 cm^{-1} , evidenciando a abertura do anel epóxido, mantendo as demais absorções características da cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 25, p. 151) do produto da reação **2b** (equação-3) manteve as absorções características do núcleo cumarínico: $\delta_{\text{H-3}}$ 6,24 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-4}}$ 7,87 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-5}}$ 7,57 (1H, d, $J = 8,8$ Hz); $\delta_{\text{H-6}}$ 7,05 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), juntamente com a metoxila em 3,93 ppm (C7-OCH₃).

Na metade prenil, observou-se o deslocamento dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2' de 3,92 e 3,99 ppm (epóxido) para 4,65 ppm (1H, d, $J = 2,0$ Hz) e 4,51 ppm (1H, d, $J = 2,0$ Hz) respectivamente, devido à formação do metoxiderivado.

As absorções dos átomos de hidrogênio H-4' e H-5' foram observadas em 4,87 ppm (1H, s); 5,02 ppm (1H, s) e 1,59 ppm (3H, s) respectivamente. A metoxila do grupo prenil foi caracterizada pela absorção em 3,25 ppm (3H, s). Todos os sinais dos átomos de hidrogênio da estrutura **2b/2c** são encontrados na Tabela 4-14 (p. 65).

4.3.3 Reação da febalosina (**2**) com etanol



A febalosina foi tratada com etanol e sílica gel sob agitação sendo parcialmente (26%) convertida nos etoxiderivados **2d/2e**, que apresentou-se na forma de sólido branco, com Pf. 130-131 °C, com Rf. 0,32 (CCD, Hexano:acetato de etila 50:50).

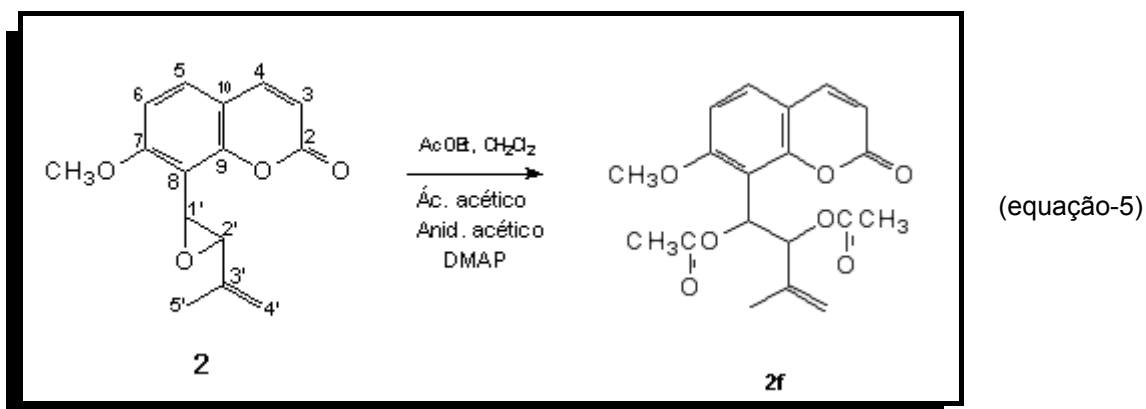
O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou o aparecimento de absorção intensa de hidroxila em ν 3473 cm^{-1} , evidenciando a abertura do anel epóxido, mantendo as demais absorções características da cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 26, p. 152) do produto da reação (equação-4) manteve as absorções características do núcleo cumarínico: $\delta_{\text{H-3}}$ 6,26 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-4}}$ 7,62 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-5}}$ 7,40 (1H, d); $\delta_{\text{H-6}}$ 6,86 (1H, d, $J = 7,0$ Hz), juntamente com um singlete em 3,92 ppm do grupo metoxila (C7-OCH₃).

Na metade prenil, observou-se o deslocamento dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2' de 3,92 e 3,99 ppm (epóxido) para 5,14 ppm (1H, d, $J = 7,2$ Hz) e 4,91 ppm (1H, d) respectivamente, devido à formação do etóxi derivado.

As absorções dos átomos de hidrogênio H-4' e H-5' foram observadas em 4,63 ppm (1H, s); 4,69 ppm (1H, s) e 1,69 ppm (3H, s) respectivamente. Também se observou o aparecimento dos sinais 1,18 ppm (3H, t) e em 3,44 ppm (2H, m) do grupo etóxido (-OCH₂CH₃). Todos os sinais dos átomos de hidrogênio da estrutura **2d/2e** são encontrados na Tabela 4-14 (p. 65).

4.3.4 Acetilação da febalosina (2)



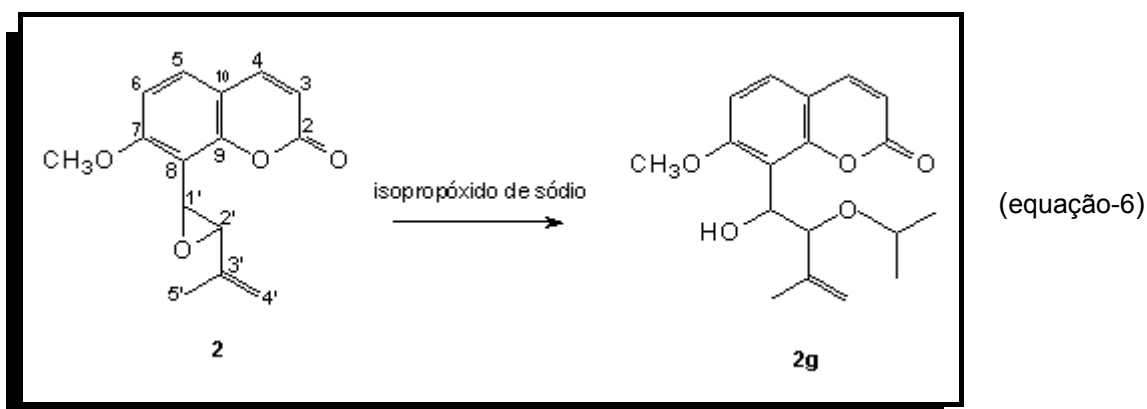
A febalosina foi tratada com ácido acético e anidrido acético sob agitação sendo parcialmente (65%) convertida no diacetil derivado **2f**, que se apresentou na forma de sólido branco, com Pf. 120-121 °C, com Rf. 0,40 (CCD, Hexano:acetato de etila 50:50).

O espectro na região do IV em pastilha de KBr não apresentou absorção de hidroxila, e manteve as demais absorções características da cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 27, p. 153) do produto da reação (equação-5) manteve as absorções características do núcleo cumarínico: $\delta_{\text{H-3}}$ 6,57 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); $\delta_{\text{H-4}}$ 7,54 (1H, d, $J = 8,0$ Hz); $\delta_{\text{H-5}}$ 7,33 p (1H, d, $J = 8,0$ Hz); $\delta_{\text{H-6}}$ 6,74 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), juntamente com a metoxila em 3,82 ppm (C7-OCH₃).

Na metade prenil, observou-se o deslocamento dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2' de 3,92 e 3,99 ppm (epóxido) para 6,08 ppm (1H, d, $J = 12,0$ Hz) e 5,99 ppm (1H, d, $J = 12,0$) respectivamente, devido à formação do diacetil derivado. As absorções dos átomos de hidrogênio H-4' e H-5' foram observadas em 4,57 ppm (1H, s); 4,76 ppm (1H, s) e 1,48 ppm (3H, s) respectivamente. A diacetilação é confirmada pela presença dos sinais em 1,87 ppm (3H, s) e em 1,92 ppm (3H, s) referente aos grupos acetil, e pela desproteção dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2'.

4.3.5 Reação da febalosina com isopropóxido de sódio



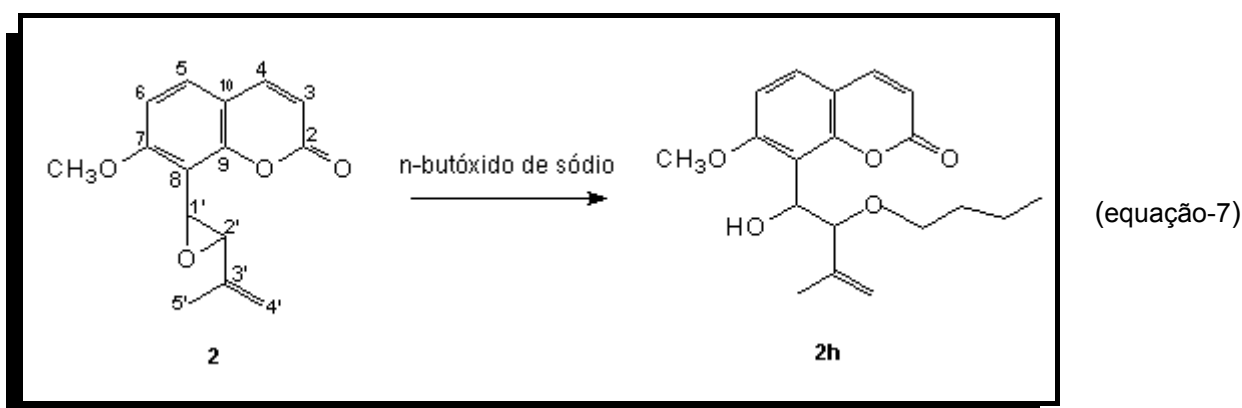
Neste caso, primeiramente preparou-se a reação da febalosina dissolvida em CH₂Cl₂ com isopropanol, sílica e agitação magnética e aquecimento controlado (45 °C) por sete dias, sendo que não ocorreu a reação nestas condições. Isso se deve provavelmente a baixa reatividade do isopropanol como nucleófilo, aliado ao impedimento estérico dos reagentes. Preparou-se então o isopropóxido de sódio, onde a reação ocorreu rapidamente resultando em 44% de conversão no respectivo derivado isopropóxi **2g** que se apresentou na forma de um sólido amarelo claro, com Pf. 101-103 °C, com Rf. 0,48 (CCD, Hexano:acetato de etila 50:50).

O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou o aparecimento de absorção de hidroxila em ν 3557 cm⁻¹, evidenciando a abertura do anel epóxido, mantendo as demais absorções características da cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 28, p. 154) do produto da reação (equação-6) manteve as absorções características do núcleo cumarínico: $\delta_{\text{H-3}}$ 6,26 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-4}}$ 7,62 (1H, d, $J = 9,6$ Hz); $\delta_{\text{H-5}}$ 7,39 (1H, d, $J = 8,8$ Hz); $\delta_{\text{H-6}}$ 6,86 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), juntamente com a metoxila em 3,93 ppm (C7-OCH₃).

Na metade prenil, observou-se o deslocamento dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2' de 3,92 e 3,99 ppm (epóxido) para 4,83 ppm (1H, d, $J = 8,4$ Hz) e 4,65 ppm (1H, d, $J = 8,4$ Hz) respectivamente, devido à abertura do anel. As absorções dos átomos de hidrogênio H-4' e H-5' foram observadas em 3,86 ppm (1H, s); 3,97 ppm (1H, s) e 1,70 ppm (3H, s) respectivamente. A inserção do grupo isopropóxi ficou evidenciada pelo aparecimento do grupo de sinais em 1,01 ppm (3H, d), 1,24 ppm (3H, d) e em 3,54 ppm (1H, m). Todos os sinais dos átomos de hidrogênio da estrutura **2g** são encontrados na Tabela 4-14 (p. 65).

4.3.6 Reação da febalosina com *n*-butóxido de sódio



Esta reação foi primeiramente realizada, dissolvendo-se a febalosina em CH₂Cl₂, *n*-butanol, sílica e agitação magnética e aquecimento controlado (45 °C) por sete dias, sendo que não ocorreu a reação nestas condições. No entanto, o tratamento da febalosina com *n*-butóxido de sódio resultou rapidamente no 2'-*n*-butóxido **2h** que se apresentou na forma de um sólido amarelo claro (38%), com Pf. 97-99 °C, com Rf. 0,52 (CCD, Hexano:acetato de etila 50:50).

O espectro na região do IV em pastilha de KBr apresentou o aparecimento de absorção de hidroxila em ν 3435 cm⁻¹, evidenciando a abertura do anel epóxido, mantendo as demais absorções características da cumarina.

O espectro de RMN ^1H (Espectro 29, p. 155) do produto da reação (equação-7) manteve as absorções características do núcleo cumarínico: $\delta_{\text{H-3}}$ 6,26 (1H, d, $J = 9,2$ Hz);

$\delta_{\text{H-4}}$ 7,67 (1H, d, $J = 9,2$ Hz); $\delta_{\text{H-5}}$ 7,45 (1H, d, $J = 8,8$ Hz); $\delta_{\text{H-6}}$ 6,99 (1H, d, $J = 8,8$ Hz), juntamente com a metoxila em 3,93 ppm (C7-OCH₃).

Na metade prenil, observou-se o deslocamento dos átomos de hidrogênio H-1' e H-2' de 3,92 e 3,99 ppm (epóxido) para 5,14 ppm (1H, d, $J = 8,8$ Hz) e 4,92 ppm (1H, d, $J = 8,8$ Hz) respectivamente. As absorções dos átomos de hidrogênio H-4' e H-5' foram observadas em 4,62 ppm (1H, s); 4,69 ppm (1H, s) e 1,71 ppm (3H, s) respectivamente. Também se observou o aparecimento dos sinais 0,82 ppm (3H, t), 1,31 ppm (2H, m), 1,53 ppm (2H, m) e 3,33 ppm (2H, t) do grupo *n*-butóxido (-OCH₂CH₂CH₂CH₃). Todos os sinais dos átomos de hidrogênio da estrutura **2h** são encontrados na Tabela 4-14 (p. 65).

Tabela 4-14 - Dados de RMN ^1H (CDCl_3 a 400 MHz) da febalosina e seus derivados.

^1H	2	2a	2b	2d	2g	2h
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	6,26 (d, $J=9,6$ Hz)	6,26 (d, $J=9,6$ Hz)	6,24 (d, $J=9,6$ Hz)	6,26 (d, $J=9,6$ Hz)	6,26 (d, $J=9,6$ Hz)	6,26 (d, $J=9,2$ Hz)
4	7,62 (d, $J=9,6$ Hz)	7,63 (d, $J=9,6$ Hz)	7,87 (d, $J=9,6$ Hz)	7,62 (d, $J=9,6$ Hz)	7,62 (d, $J=9,6$ Hz)	7,67 (d, $J=9,2$ Hz)
5	7,42 (d, $J=8,8$ Hz)	7,40 (d, $J=8,8$ Hz)	7,57 (d, $J=8,8$ Hz)	7,40	7,39 (d, $J=8,8$ Hz)	7,45 (d, $J=8,8$ Hz)
6	6,87 (d, $J=8,8$ Hz)	6,88 (d, $J=8,8$ Hz)	7,05 (d, $J=8,8$ Hz)	6,86 (d, $J=7,0$ Hz)	6,86 (d, $J=8,8$ Hz)	6,99 (d, $J=8,8$ Hz)
C-7-OCH ₃	3,97(s)	3,97 (s)	3,93 (s)	3,92 (s)	3,93 (s)	3,93 (s)
8	-	-	-	-	-	-
1'	3,99 (d)	5,31 (d)	4,65 (d, $J=2,0$ Hz)	5,14 (d, $J=7,2$ Hz)	4,83 (d, $J=8,4$ Hz)	5,14 (d, $J=8,8$ Hz)
2'	3,92 (d, $J=2,0$ Hz)	4,53 (d, $J=8,4$ Hz)	4,51 (d, $J=2,0$ Hz)	4,91 (d)	4,65 (d, $J=8,4$ Hz)	4,92 (d, $J=8,8$ Hz)
3'	-	-	-	-	-	-
4'	5,08 (s)	4,59 (s)	4,87 (s)	4,63 (s)	3,86 (s)	4,62 (s)
4'	5,30 (s)	4,65 (s)	5,02 (s)	4,69 (s)	3,97 (s)	4,69 (s)
5'	1,87 (s)	1,77 (s)	1,59 (s)	1,69 (s)	1,70 (s)	1,71 (s)
OCH ₃	-	-	3,25 (s)	-	-	-
OCH ₂ CH ₃	-	-	-	1,18 (3H,t) 3,44 (2H,m)	-	-
OCH(CH ₃) ₂	-	-	-	-	1,01(3H,d) 1,24(3H,d) 3,54(1H,m)	-
O(CH ₂) ₃ CH ₃	-	-	-	-	-	0,82(3H,t) 1,31(2H,m) 1,53(2H,m) 3,33(2H,t)

4.4 Avaliação da atividade biológica

Polygala paniculata

- Neuroproteção no modelo de neurotoxicidade induzida pelo metilmercúrio (MeHg).
- Atividade antinociceptiva nos modelos:
 - a) Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético.
 - b) Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina.
 - c) Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato.
- Atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata induzido pela carragenina.
- Atividade gastroprotetora no modelo de:
Lesão gástrica aguda induzida pelo etanol.
- Atividade antifúngica.
- Toxicidade frente à *Artemia salina*.

Polygala pulchella

- Atividade ansiolítica no modelo de labirinto em cruz elevado.
- Atividade antidepressiva nos modelos:
 - a) Teste do nado forçado.
 - b) Teste da suspensão da cauda.
- Atividade antifúngica.
- Toxicidade frente à *Artemia salina*.

Polygala paniculata

4.4.1 Neurotoxicidade induzida por MeHg (EBEtOH de *P. paniculata*, Método B)

Metilmercúrio (MeHg) é um poluente ambiental muito perigoso. Devido a sua alta lipofilicidade é altamente neurotóxico, conduzindo a deficiências neurológicas em seres humanos e animais (Clarkson et al., 2003). Apesar da neurotoxicidade causada pelo envenenamento por MeHg ser amplamente relatada, ainda não se conhece um tratamento efetivo no combate ao seu efeito tóxico. O tratamento clássico de desintoxicação é feito com agentes quelantes que auxiliam na eliminação do mercúrio dos tecidos. Entretanto, esses fármacos são de uso limitado devido aos efeitos adversos, como, distúrbios hematopoiéticos e desequilíbrio no metabolismo celular (Tchounwou et al., 2003).

A busca de tratamentos mais eficazes para o envenenamento causado por MeHg e os possíveis efeitos benéficos relatados com plantas do gênero *Polygala* em condições neuropatológicas (Park et al., 2002; Lee et al., 2004; Lin et al., 2005), contribuíram para a realização deste estudo.

A atividade das enzimas antioxidantes glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona redutase (GR), bem como conteúdo de tióis não-protéicos (NPSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram avaliados no córtex cerebral e cerebelo, em camundongos. O desempenho dos animais no teste do rota-rod foi determinado para detectar possíveis deficiências motoras induzidas pela exposição ao MeHg.

4.4.1.1 Atividade enzimática da glutaciona peroxidase e glutaciona redutase no córtex cerebral e cerebelo de camundongos

A exposição ao MeHg diminuiu a atividade da glutaciona peroxidase (GPx) no córtex cerebral em 40% e no cerebelo em 30%. Este fenômeno foi prevenido pela administração do EBEtOH (100 mg/Kg) de *P. paniculata*. Além disso, a exposição ao MeHg aumentou a atividade da glutaciona redutase (GR) no córtex cerebral em 20% e no cerebelo em 34%. Entretanto, o extrato de *P. paniculata* reduziu o efeito somente no cerebelo (Tabela 4-15).

Neurotoxicidade: É a qualidade de produzir um efeito venenoso ou letal sobre o tecido nervoso. (http://www.tudosobreela.com.br/oqueeela/sistemanervoso_04.shtml?sessao=osistema).

Tabela 4-15 – Efeito do MeHg e EBEtOH de *P. Paniculata* no tratamento da (GPx) e (GR) no córtex cerebral e cerebelo em camundongos.

Atividade enzimática	Controle	MeHg	EBEtOH	MeHg + EBEtOH
Glutationa peroxidase (GPx)				
Córtex cerebral	23,5 ± 1,3 ^a	14,9 ± 0,7 ^b	24,7 ± 2,2 ^a	22,6 ± 0,9 ^a
Cerebelo	31,0 ± 2,6 ^a	21,4 ± 1,9 ^b	27,8 ± 3,9 ^{a,b}	27,3 ± 2,5 ^{a,b}
Glutationa redutase (GR)				
Córtex cerebral	33,5 ± 1,4 ^a	41,5 ± 1,4 ^{b,c}	38,9 ± 3,5 ^{a,b}	46,0 ± 1,9 ^c
Cerebelo	72,3 ± 1,6 ^a	99,8 ± 9,8 ^b	83,1 ± 4,1 ^a	77,1 ± 2,4 ^a

Os dados são representados por mU/mg.

A exposição ao Metilmercúrio (MeHg) também aumentou o nível de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 4-12) em ambas estruturas encefálicas (41% para córtex cerebral (A) e 48% para cerebelo (B)). Observou-se que as membranas foram protegidas da peroxidação lipídica induzida pelo MeHg no grupo que foi tratado com EBEtOH de *P. Paniculata* (100 mg/Kg).

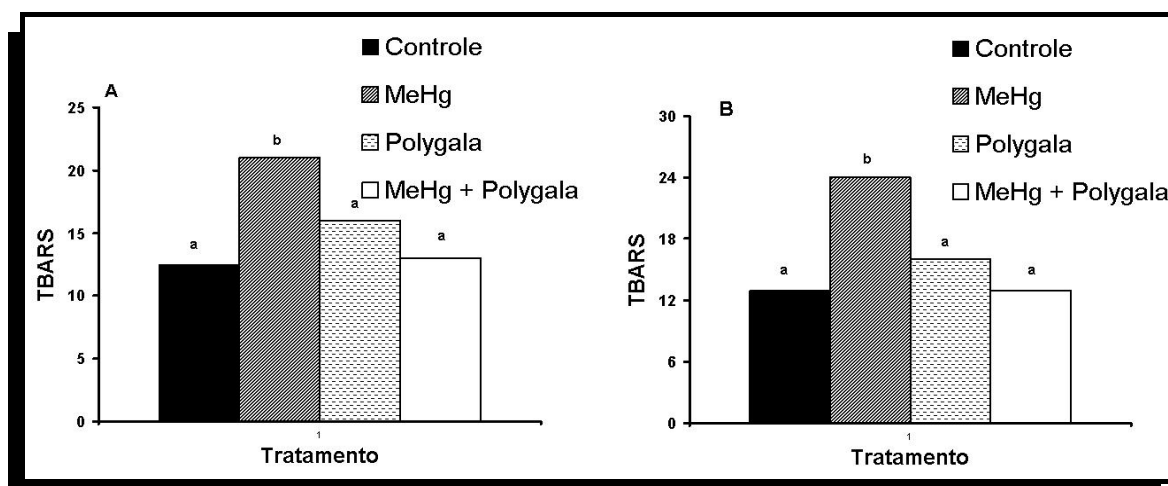


Figura 4-12 – Efeito de MeHg e EBEtOH de *P. Paniculata* em níveis de TBARS no córtex cerebral e cerebelo de camundongos.

A Tabela 4-16 descreve o desempenho dos camundongos no teste do rota-rod antes e depois de 2 semanas de tratamento. A deficiência na coordenação motora foi observada pela exposição dos animais ao MeHg. No entanto, o tratamento com o EBEOH (100 mg/Kg) foi capaz de reverter completamente a deficiência na coordenação motora induzida pelo MeHg.

Tabela 4-16 – Efeito do MeHg e do EBEOH de *P. paniculata* na coordenação motora no teste do rota-rod

Teste	Controle	MeHg	EBEOH	MeHg + EBEOH
Fase 1	51,1 ± 5,4	60,0 ± 0	55,8 ± 4,1	53,4 ± 4,3
Fase2	60,0 ± 0	32,3 ± 8,0	60,0 ± 0	50,0 ± 6,7

Fase 1 e fase 2 representam o tempo que os animais permanecem no teste do rota-rod antes e depois do período de tratamento, respectivamente, em segundos.

Vários estudos mostram que a exposição ao metilmercúrio assim como aos vapores de mercúrio causam efeitos neurotóxicos nocivos a homens e animais (Clarkson et al., 2003). Os resultados apresentados mostram o efeito neuroprotetor do EBEOH de *P. paniculata* contra neurotoxicidade induzida pelo MeHg em camundongos. Em adição, alguns estudos têm relatado importantes efeitos farmacológicos de extratos ou compostos isolados de plantas do gênero *Polygala* (Park et al., 2002; Lee et al., 2004; Lin et al., 2005), porém evidências sobre seus possíveis efeitos adversos são raros.

4.4.2 Atividade antinociceptiva (*P. paniculata*)

A dor é um sintoma de muitas desordens clínicas e afeta grande parte da população. Ela é uma característica cardinal dos mecanismos protetores fisiológicos normais e uma das suas funções é preservar o organismo, evitando o dano tecidual (Dray, 1997). Além de envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva, incluindo componentes afetivos e emocionais, que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (Almeida et al., 2004).

Neste sentido, o termo nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas, que é o conjunto das percepções de dor que somos capazes de distinguir, gerada por estímulos nocivos (calor, pressão, corte), ou ainda, quando uma doença provoca dano no tecido; geralmente é associada com inflamação do tecido danificado (Russo e Brose, 1998).

4.4.2.1 Nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%) em camundongos

A Figura 4-13 mostra que o EBEtOH quando administrado por via oral, foi capaz de reduzir, de forma dose dependente, as contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético em camundongos. O valor médio da DI_{50} foi de 24,8 (18,3 – 33,5) mg/kg, com uma inibição de $90 \pm 4\%$ na dose de 200 mg/kg.

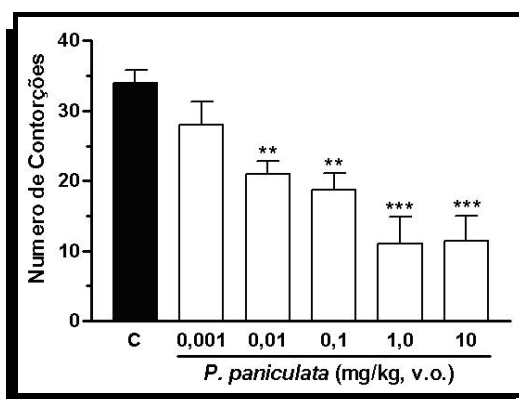


Figura 4-13 – Efeito do EBtOH sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Cada grupo representa a média de 6-12 animais, e as barras verticais o E.P.M (Erro padrão da média). As barras abertas representam o EBtOH e a barra fechada (C) representa o veículo. Na análise estatística, foi considerado significativo $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.4.2.2 Nocicepção induzida pela administração intraplantar de capsaicina em camundongos.

O resultado apresentado na Figura 4-14 mostra que o EBtOH (0,01-10 mg/kg), quando administrado por via oral, foi capaz de inibir de forma significativa a nocicepção de origem neurogênica causada pela capsaicina, somente na dose de 1,0 mg/kg com inibição de $50 \pm 3\%$.

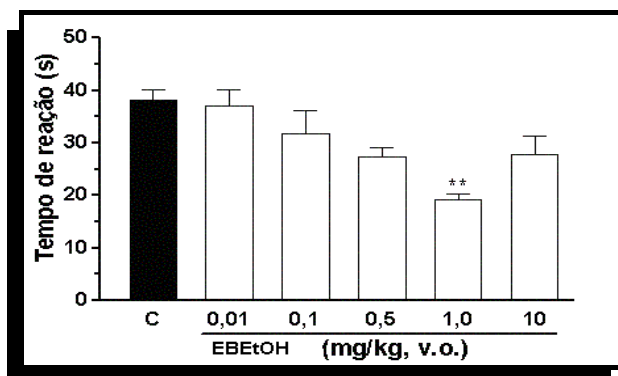


Figura 4-14 – Efeito do EBEOH sobre a nociceção induzida pela capsaicina. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M (Erro padrão da média). As barras abertas representam o EBEOH e a barra fechada (C) representa o veículo. Na análise estatística foi considerado não significativo $P > 0,05$ e significativo $**P < 0,01$ quando comparado ao grupo controle (C).

4.4.2.3 Efeito do EBEOH e dos compostos isolados, febalosina (2), aurapteno (1) e rutina (9) sobre a nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

Os resultados apresentados na Figura 4-15 mostram que o EBEOH, quando administrado por via oral, causou uma inibição de forma dose dependente, da nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos, porém sem interferir com o edema produzido pela mesma. O valor médio da DI_{50} foi de 0,0084 (0,0077 – 0,0092) mg/kg, apresentando IM de $72 \pm 3\%$ para a dose de 1,0 mg/kg.

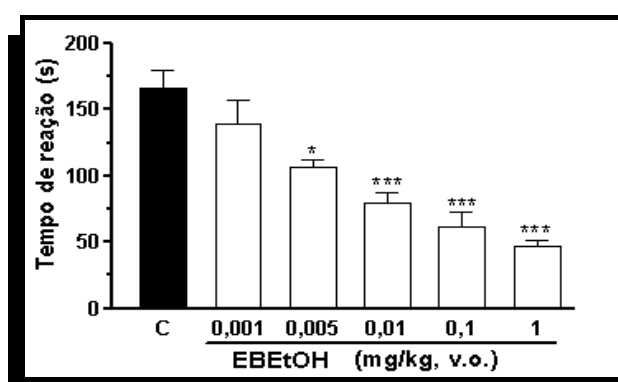


Figura 4-15 – Efeito do EBEOH na nociceção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média de 6 - 12 animais e as barras verticais o E.P.M. As barras abertas representam o EBEOH e a barra fechada (C) representa o veículo. Na análise estatística foi considerado não significativo $P > 0,05$ e $*P < 0,05$, $***P < 0,001$, significativo quando comparado ao grupo controle (C).

A Figura 4-16 mostra que, dos compostos isolados de *P. paniculata* que foram testados na nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, somente a rutina (C) apresentou atividade antinociceptiva de forma dose dependente, com uma DI_{50} de 10,98 (7,80-15,45) e inibição máxima de $82 \pm 7\%$ para a dose de 100 mg/kg. No entanto, a febalosina (A) apresentou atividade antinociceptiva somente na dose de 10 mg/kg, i.p., com inibição de $64 \pm 12\%$. O mesmo ocorreu com a cumarina aurapteno (B), que apresentou efeito inibitório somente na dose de 100 mg/kg, com inibição de $71 \pm 7\%$.

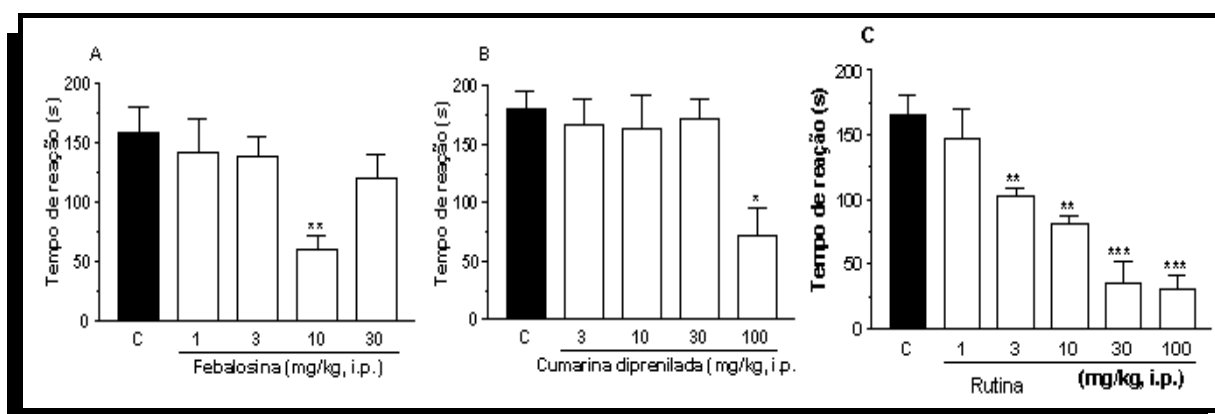


Figura 4-16 - Efeito da febalosina (A), aurapteno (B) e rutina (C), em relação à nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média de 6 – 12 animais e as barras verticais o E.P.M. As barras abertas representam os compostos e a barra fechada (C) representa o veículo. Na análise estatística foi considerado não significativo $P > 0,05$ e $*P < 0,05$; $**P < 0,01$, $***P < 0,001$, significativo quando comparado ao grupo controle (C).

4.4.2.4 Curva tempo-resposta do EBEtOH no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato (10 μ mol/pata) em camundongos.

A Figura 4-17 mostra que o EBEtOH, quando administrado na dose de 0,1 mg/kg, por via oral, 1 hora antes, foi capaz de inibir de forma significativa a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato. Os resultados demonstram que a atividade antinociceptiva do extrato foi mantida até a oitava hora, sendo mais pronunciada da primeira a quarta hora.

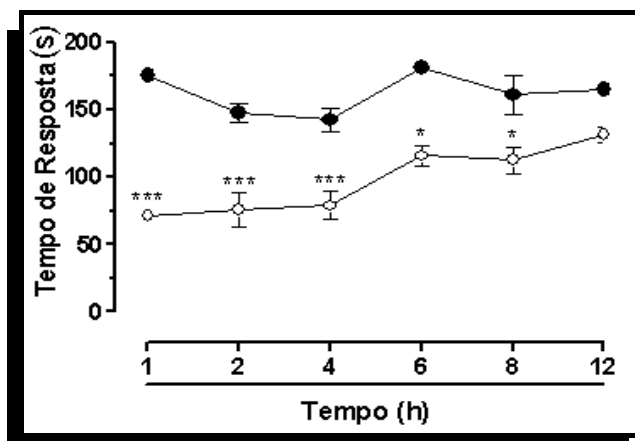


Figura 4-17 - Curva tempo-resposta do EBEOH no modelo de nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato. Cada grupo representa a média \pm erro padrão da média de 6 -12 animais e as barras verticais o E.P.M. Os círculos abertos representam o EBEOH e os círculos fechados representam o veículo. Na análise estatística foi considerado não significativo $P > 0,05$ e $*P < 0,05$; $***P < 0,001$, significativo quando comparado ao grupo controle (C).

4.4.3 Atividade Antiinflamatória do EBEOH de *P. paniculata*

A inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo multimediado. Ela é uma resposta desencadeada por traumas, lesões teciduais e invasão por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microrganismos ou outros agentes irritantes e potenciar o reparo tecidual (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).

4.4.3.1 Efeito do EBEOH no edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos.

A Figura 4-18 mostra que o EBEOH quando administrado por via oral foi capaz de reduzir o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina (300 μ g/sítio), na segunda hora após a injeção do agente flogístico, somente nas doses de 30 e 300 mg/kg com inibição máxima de $43 \pm 12\%$ e $58 \pm 13\%$, respectivamente para as doses de 30 e 300 mg/kg.

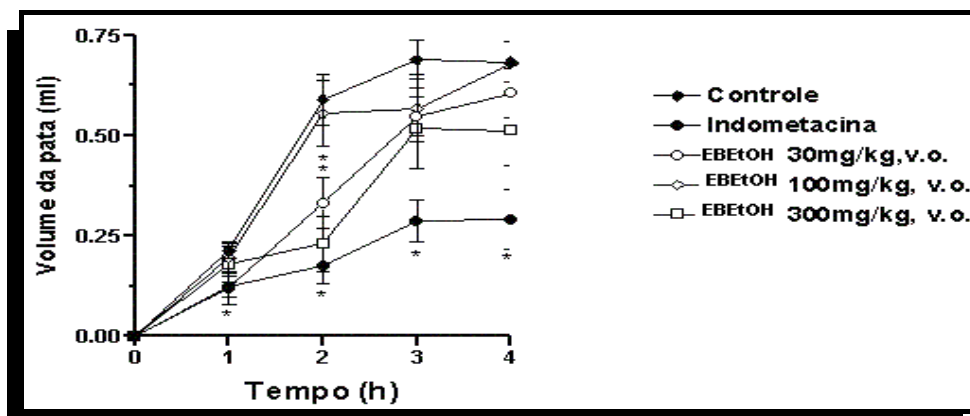


Figura 4-18 - Efeito do EBEtOH sobre o edema de pata causado pela administração intraplantar de carragenina. Os pontos representam a média de 8 animais e as barras verticais o E.P.M (erro padrão da média). Na análise estatística $P > 0,05$ foi considerado não significante e $*P < 0,05$ significante, quando comparado ao grupo controle carragenina.

4.4.4 Atividade gastroprotetora do EBEtOH de *P. paniculata*

A úlcera é formada quando ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressivos luminiais (ácido clorídrico e pepsina) e fatores de defesa da mucosa (secreção de muco e bicarbonato, prostaglandinas, fluxo sangüíneo e migração de granulócitos), ocasionando irritação, ulceração da mucosa e sangramento (Wallace, 2001).

4.4.4.1 Efeito do EBEtOH sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol 70% em ratas.

A Figura 4-19 mostra a atividade gastroprotetora do EBEtOH, quando administrado por via oral nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (A), e por via intraperitoneal (B) nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg. Quando administrado por via oral, o EBEtOH, foi capaz de reduzir o índice de úlceras apresentando DI_{50} de 101,6 (78,8-130,8) mg/kg com inibição máxima de $97 \pm 1\%$. Quando administrado por via intraperitoneal, o EBEtOH reduziu o índice de úlceras induzidas pelo etanol apresentando DI_{50} de 13,03 (7,8 - 21,81) e IM de $74 \pm 3\%$.

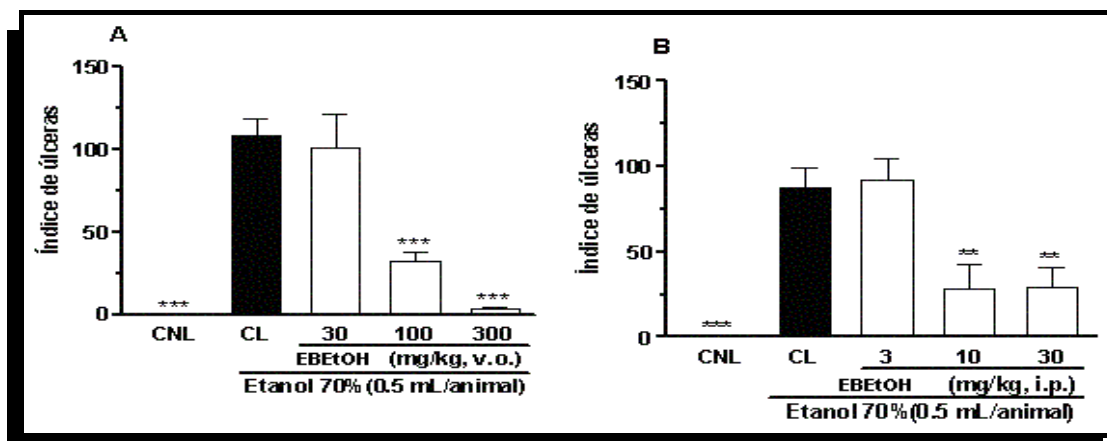


Figura 4-19 - Efeito do EBEtOH, sobre as lesões gástricas induzidas por etanol 70% (A e B). Cada grupo representa a média de 6 animais e as barras verticais o E.P.M. A barra hachurada corresponde ao grupo controle não lesado (CNL) tratado somente com água, a barra fechada, ao grupo controle lesado (CL) tratado com o etanol (0,5 mL/animal, v.o.) e as barras abertas correspondem aos grupos tratados com etanol e extrato. Na análise estatística, foi considerado não significativo $P > 0,05$ e $***P < 0,001$, significativo quando comparado ao grupo controle (C).

4.4.4.2 Efeito do EBEtOH sobre a quantidade de muco na mucosa gástrica após a indução de lesões com etanol 70% em ratas.

A figura 4-20 (A e B) mostra o efeito do EBEtOH, administrado pela via oral ou por via intraperitoneal, na proteção da mucosa gástrica contra o estímulo lesivo do etanol. O EBEtOH, administrado por via oral, foi capaz de promover um aumento da secreção de muco gástrico, quando comparado ao grupo controle lesado (CL), que foi somente tratado com etanol. Nestas mesmas doses, a quantidade de muco gástrico foi restabelecida ao nível da mucosa não lesada (CNL).

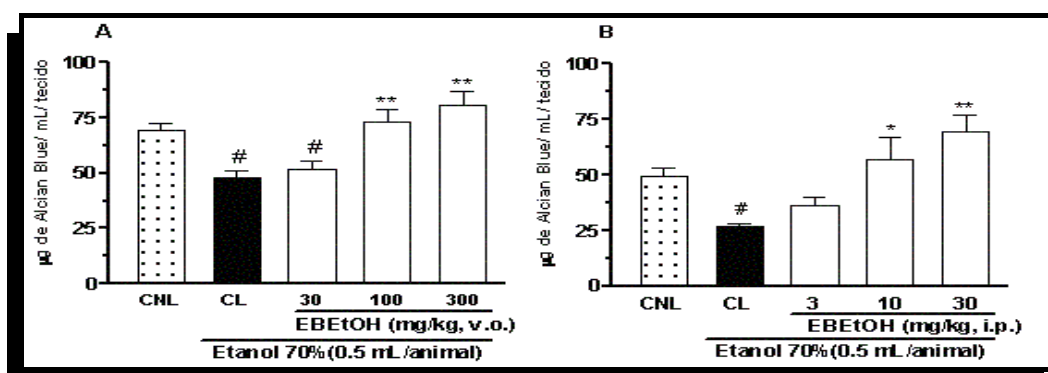


Figura 4-20 - Efeito do tratamento dos animais com EBEtOH sobre as concentrações de muco da mucosa glandular gástrica de ratas (A e B). Cada grupo representa a média da concentração da Alcian Blue e as barras verticais o E.P.M. As barras abertas correspondem ao EBEtOH ou veículo (CNL, barra hachurada) e a barra fechada, ao grupo controle lesado (CL). Na

análise estatística, $P > 0,05$ foi considerado não significativo, $*P < 0,05$, $**P < 0,01$ significativo quando comparado ao grupo controle lesado (CL) e $\#P < 0,01$ significativo quando comparado ao grupo controle não lesado (CNL).

4.4.4.3 Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica dos extratos brutos de *P. paniculata* juntamente com alguns compostos isolados e os derivados da febalosina (**2**) foi avaliada através do método da concentração inibitória mínima (CIM) frente aos microrganismos *Candida albicans* (Ca) ATCC 18804, *Candida krusei* (Ck) ATCC 20298, *Candida tropicalis* (Ct) ATCC 750, *Candida parapsilosis* (Cp) ATCC 22019, *Candida glabrata* (Cg) ATCC 2001, *Sporothrix schenckii* (Ss) ATCC 20679 e *Cryptococcus neoformans* (Cn) ATCC 32588. Como referência foram aplicados 20 μ L de anfotericina-B a 5 μ g/mL.

Os extratos foram testados em 8 concentrações que variaram de 1000 a 7,8 mg/mL. A CIM foi definida como a última concentração do extrato capaz de inibir a presença de turbidez no micropoço.

O extrato hexânico (EH, Método B) de *P. paniculata* apresentou resultados significativos frente à quase todos os fungos testados, podendo-se destacar a CIM de 60 mg/mL para *C. tropicalis* e de 125 mg/mL para *C. neoformans*. (Tabela 4-18). Além disso, no método bioautográfico o EH apresentou halos de inibição para *Candida glabrata*, para *Sporothrix schenckii*, para *Candida tropicalis*, e *Cryptococcus neoformans* conforme apresentado na Tabela 4-17.

O extrato bruto etanólico (EBEtOH, Método B) de *P. paniculata* também apresentou melhor atividade para *C. tropicalis*. Já os compostos isolados, o espinasterol foi o mais promissor apresentando uma CIM de 60 mg/mL para *Candida tropicalis* e *Sporothrix schenckii*, e a rutina apresentou boa atividade para *Cryptococcus neoformans* com uma CIM de 60 mg/mL conforme apresentado na Tabela 4-17.

Os derivados estruturais da febalosina (**2**) também foram testados frente aos mesmos microrganismos, porém não apresentaram atividade antifúngica.

Tabela 4-17 – Média do halo de inibição em mm da atividade antifúngica pelo Método bioautográfico direto dos extratos de *Polygala paniculata*.

	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Sporothrix schenkii</i>
EH	-	-	-	+	+	+	+
EBEtOH	-	-	-	+	+	-	-

Tabela 4-18 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) em mg/mL dos extratos e alguns compostos de *Polygala paniculata* frente a fungos de interesse médico.

	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Sporothrix schenkii</i>
EBDM (Método A)	>1	>1	>1	>1	60	500	>1
EBAcOEt (Método A)	-	-	-	1	1	1	>1
EBEtOH (Método A)	-	-	>1	>1	>1	60	>1
EH (Método B)	-	>1	250	250	60	125	>1
EBEtOH (Método B)	-	-	-	1	250	-	1
Febalosina	>1	>1	>1	>1	>1	>1	>1
Rutina	500	>1	>1	>1	>1	60	>1
Espinasterol	500	500	500	500	60	500	60
Aurapteno	>1	>1	>1	>1	>1	250	>1
7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina	500	500	500	500	-	-	-

>1: não inibiu em quantidade menor que 1000 mg /mL.

4.4.4.4 Avaliação da atividade biológica dos compostos isolados de *P. paniculata* através do bioensaio com *Artemia salina* Leach

A *Artemia salina* é um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas (Siqueira et al., 1998). A simplicidade, rapidez, baixo custo e por não exigir técnicas assépticas, o bioensaio TAS (toxicidade frente à *Artemia salina*) permite sua utilização rotineira no próprio laboratório de fitoquímica. Além disso, diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, antitumoral, entre outras (Siqueira et al., 1998).

A obtenção da dose letal 50% das larvas após o tempo de exposição, foi determinada através de um gráfico de mortalidade (%) em função do logaritmo da dose.

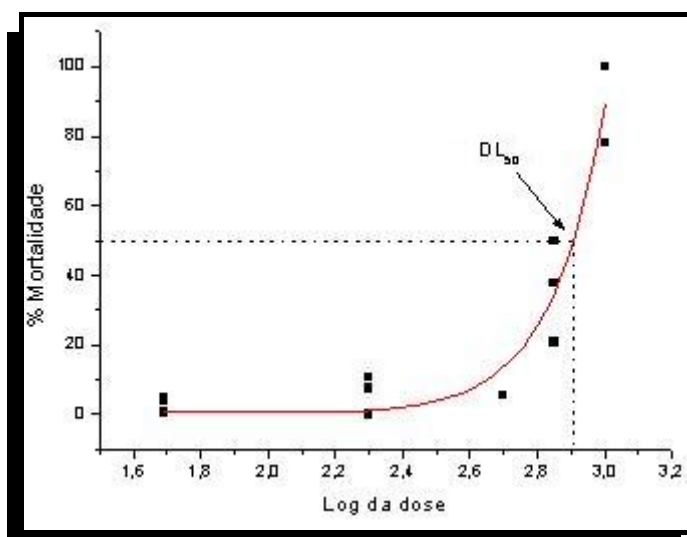


Figura 4-21 - Obtenção da dose letal 50% frente ao teste de toxicidade com *A. salina*.

Avaliou-se os extratos brutos e compostos isolados pelo teste de toxicidade frente à *A. salina* baseado na metodologia de Meyer et al., (1982) com modificações. Submeteu-se ao bioensaio com *A. salina* os extratos brutos de *P. paniculata* (TAS < 1000 ppm), alguns compostos isolados e os derivados da febalosina.

Dos extratos brutos submetidos ao bioensaio, no Método A, o EBDM apresentou melhor resultado com uma DL_{50} de 776,25 ppm seguido do EB $EtOH$ (DL_{50} de 954,65 ppm) e EB $AcOEt$ 975,25 ppm. Tanto o EH (extrato hexânico, DL_{50} 741,31 ppm) quanto o EB $EtOH$ (DL_{50} 776,24 ppm) obtidos pelo Método B, apresentaram atividade moderada (Tabela 4-19).

Dos compostos isolados de *P. paniculata* submetidos ao bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS) considerou-se todos os compostos ativos sendo o composto

de maior atividade a 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**) com uma DL₅₀ de 86,93 ppm, seguido da febalosina (**2**) com uma DL₅₀ de 88,49 ppm (Tabela 4-20). No entanto, houve uma diminuição significativa da atividade nos análogos estruturais da febalosina (**2**) quando comparados com o produto de partida. Correlacionando-se a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividade antifúngica, observa-se que em ambos os testes houve uma diminuição da atividade frente aos análogos estruturais.

Tabela 4-19 - Teste de toxicidade para *Artemia salina* Leach dos extratos brutos de *P. paniculata* (TAS < 1000 ppm).

Extratos	DL ₅₀ (ppm)
EBDM (Método A)	776,25
EBAcOEt (Método A)	975,25
EBEtOH (Método A)	954,65
EH (Método B)	741,31
EBEtOH (Método B)	776,24

Tabela 4-20 – Teste de toxicidade para *Artemia salina* Leach dos compostos isolados de *P. paniculata* (TAS < 100 ppm).

Compostos	DL ₅₀ (ppm)
Febalosina	88,49
Aurapteno	93,17
Espinasterol	89,16
Rutina	95,41
1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona	86,93
1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona	93,32
3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano (2',3':1,2) xantona	95,50

Atividade biológica de *Polygala Pulchella*

4.4.5 Atividade ansiolítica no modelo labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um modelo animal clássico no estudo da ansiedade. Parte do princípio de que o comportamento natural dos camundongos se caracteriza por sua preferência a ambientes escuros e pela tendência em permanecer nos cantos. Quando colocados num LCE, os camundongos tendem a permanecer nos braços fechados com uma exploração espontânea bastante reduzida aos braços abertos. Substâncias de ação ansiolítica fazem com que os camundongos percam o “medo” e passam a explorar e a permanecer por mais tempo nos braços abertos do LCE.

O tratamento com extrato bruto etanólico (EBEtOH) e extrato bruto acetato de etila (EBAcOEt) na dose de 25 mg/kg aumentou de modo significativo a porcentagem de entradas (EA%) e o tempo de permanência (TPA%) nos braços abertos. Nas doses de 50 e 100 mg/kg do extrato bruto etanólico (EBEtOH) e do extrato bruto acetato de etila (EBAcOEt) não se observou nenhuma alteração significativa na porcentagem de entradas (EA%) e no tempo de permanência nos braços abertos (TPA%) do LCE conforme apresentado na Figura 4-22 e Figura 4-23. O tratamento com o extrato bruto diclorometano (EBCH₂Cl₂) nas diferentes doses não alterou de forma significativa a EA% e TPA% no LCE quando comparado ao grupo controle. Não houve alteração na atividade locomotora dos animais quando testados no campo aberto (Figura 4-23). Em todos os experimentos o Diazepam (DIZ) (3 mg/kg i.p.) foi utilizado como controle positivo. Esses resultados sugerem que o extrato bruto etanólico e o EBAcOEt de etila da *Polygala Pulchella* possuem uma potencial ação ansiolítica.

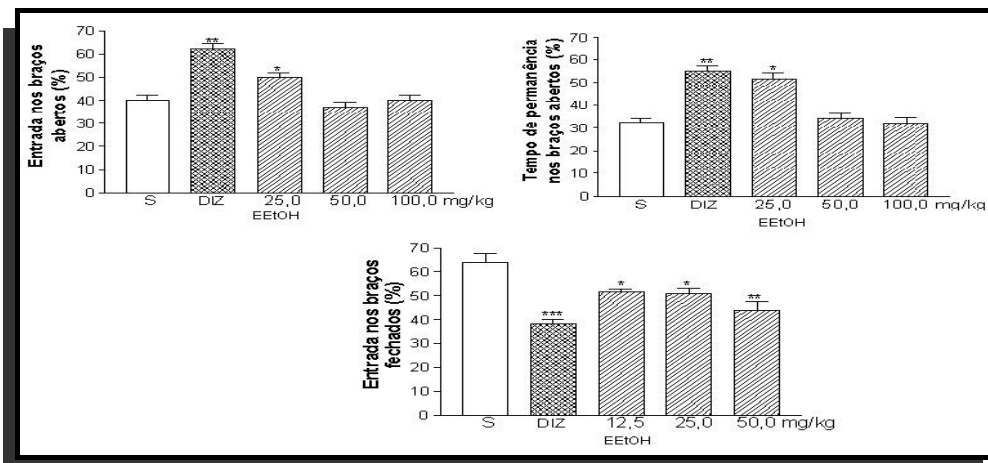


Figura 4-22 - Efeito do tratamento dos animais com EB EtOH no modelo labirinto em cruz elevado.

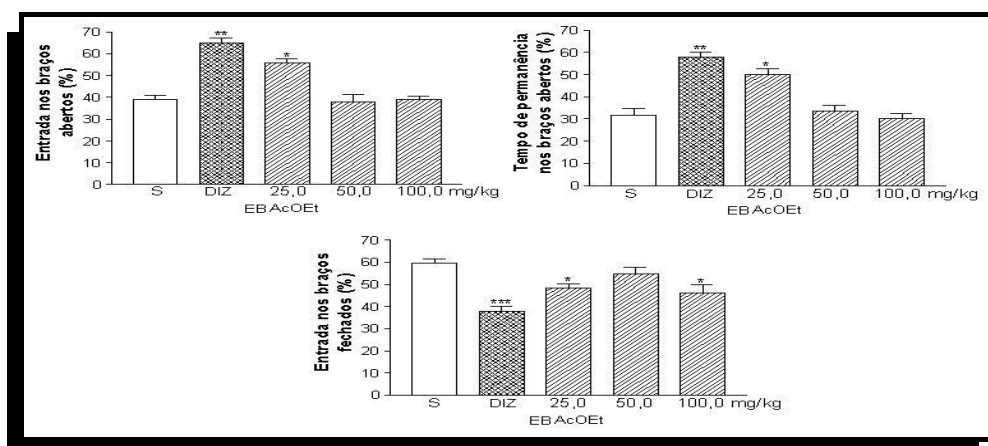


Figura 4-23 - Efeito do tratamento dos animais com EB AcOEt no modelo labirinto em cruz elevado.

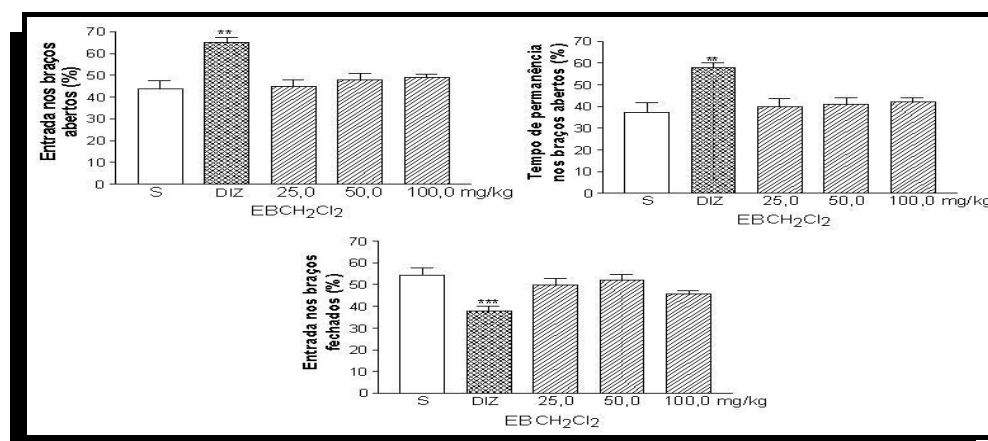


Figura 4-24 - Efeito do tratamento dos animais com EB CH₂Cl₂ no modelo labirinto em cruz elevado.

4.4.6 Atividade antidepressiva no teste do nado forçado e Teste da suspensão da cauda

O modelo experimental do nado forçado é um teste comportamental que avalia a atividade antidepressiva em camundongos, que se baseia no tempo de imobilidade do animal. Um camundongo quando submetido ao nado forçado ele logo parece “desistir” ficando imóvel, no entanto sob efeito de um agente antidepressivo ele é estimulado a continuar nadando.

Observou-se que o tratamento com EBEtOH apresentou uma redução do tempo de imobilidade (TI) de 40% e 69% nas doses de 50 e 100 mg/kg, respectivamente. Com o EBCH₂Cl₂ a redução do TI foi de 51,4% na dose de 50 mg/kg. No Teste da suspensão da cauda (TSC) o EBEtOH e o EBCH₂Cl₂ apresentaram redução do TI de 36,3% e 36,0% nas doses de 100 e 50 mg/kg, respectivamente. O EBACoEt não alterou o TI no teste do nado forçado (TNF) e no teste da suspensão da cauda (TSC). A Imipramina (15 mg/kg i.p.) foi utilizada como controle positivo. Estes resultados sugerem que o EBEtOH e o EBCH₂Cl₂ de *P. Pulchella* possuem ação antidepressiva.

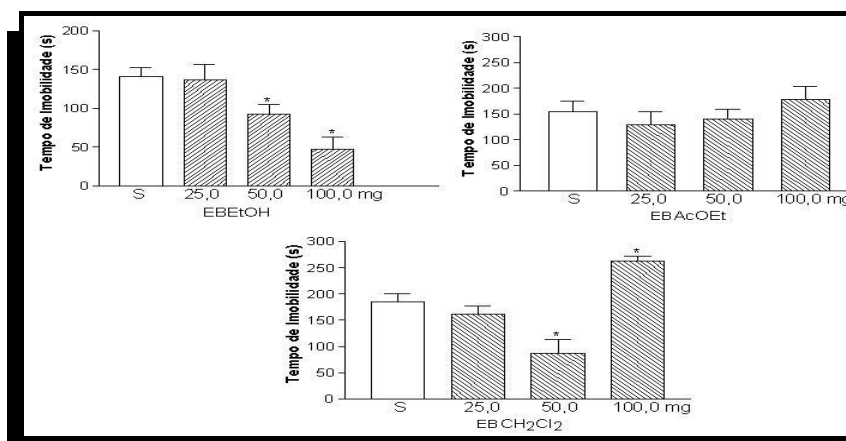


Figura 4-25 – Efeito do tratamento dos animais com EB EtOH, EB AcOEt e EB CH₂Cl₂ na ação antidepressiva no teste do nado forçado.

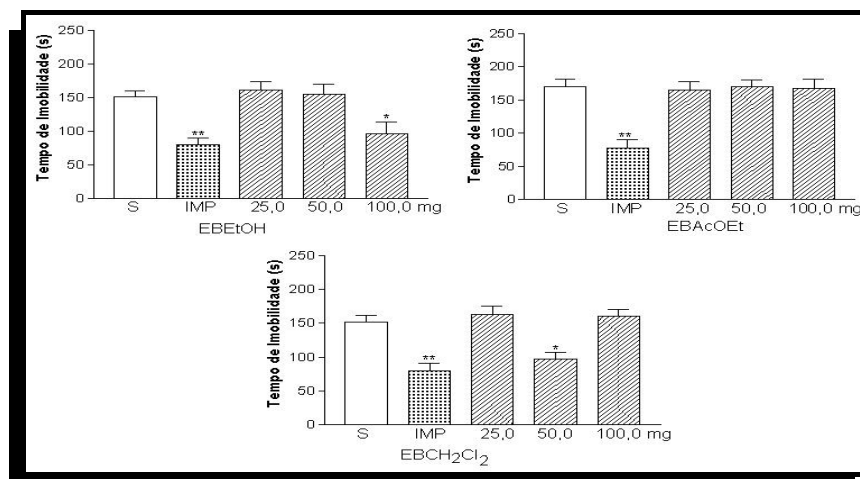


Figura 4-26 – Efeito do tratamento dos animais com EB_{EtOH}, EB_{AcOEt} e EB_{CH₂Cl₂} na ação antidepressiva no teste da suspensão da cauda.

4.4.7 Avaliação da atividade antifúngica de *P. pulchella*

O potencial antifúngico dos extratos brutos e das flores de *P. pulchella* foi avaliado através do método da concentração inibitória mínima (CIM) frente a microrganismos: *Candida albicans* (Ca) ATCC 18804, *Candida krusei* (Ck) ATCC 20298, *Candida tropicalis* (Ct) ATCC 750, *Candida parapsilosis* (Cp) ATCC 22019, *Candida glabrata* (Cg) ATCC 2001, *Sporothrix schenckii* (Ss) ATCC 20679 e *Cryptococcus neoformans* (Cn) ATCC 32588. Como referência foram aplicados 20 µL de anfotericina-B a 5 µg/mL.

Para os extratos de *P. pulchella* não houve inibição significativa frente aos fungos testados. Apenas as flores apresentaram resultados moderados frente ao fungo *S. schenckii* e o extrato bruto diclorometano (EBDM) que apresentou uma CIM de 125 µg/mL para *Cryptococcus neoformans* (Tabela 4-21).

Tabela 4-21 - Concentração Inibitória Mínima (CIM, µg/mL) dos extratos de *Polygala pulchella* frente a fungos de interesse médico.

	<i>Candida krusei</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida parapsilosis</i>	<i>Cândida glabrata</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>
EBDM	>1	-	-	>1	>1	125	>1
EBAcOEt	-	>1	-	-	>1	1	>1
EBEtOH	-	-	-	>1	>1	-	>1
EBDM (flores)	1	1	>1	1	-	-	500
EBEtOH (flores)	-	1	>1	1	-	1	250

>1: não inibiu em quantidade menor que 1000 mg /mL.

4.4.8 Avaliação da atividade biológica dos extratos brutos de *P. pulchella* através do bioensaio com *Artemia salina* Leach

Submeteu-se ao bioensaio com *A. salina* os extratos brutos de *P. pulchella* (TAS < 1000 ppm). O extrato aquoso das flores foi o único ativo com uma DL₅₀ de 371,53 ppm. Os demais extratos foram considerados inativos (TAS > 1000 ppm) conforme Tabela 4-22.

Tabela 4-22 - Teste de toxicidade para *Artemia salina* Leach dos extratos brutos de *P. pulchella* (TAS < 1000 ppm).

Extratos	DL ₅₀ (ppm)
E aquoso (flores)	>1000
EBEtOH (flores)	371,53
EBDM	>1000
EBAcOEt	>1000
EBEtOH	>1000

CAPÍTULO 5

MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Instrumentação

5.1.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C utilizou-se o espectrômetro Varian 400, do departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina, que operou a 400,13 MHz para ^1H e a 100,32 MHz para ^{13}C , em tubos de 5 mm. Para análise das amostras utilizou-se clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD) e piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

Registrou-se os deslocamentos químicos (δ) em partes por milhão (ppm), em relação ao padrão interno TMS ($\delta = 0,00$).

5.1.2 Determinação de Ponto de Fusão

Para obtenção do ponto de fusão de cada substância isolada, utilizou-se o aparelho MQAPF-301 do laboratório de Graduação de Química Orgânica e aparelho MQAPF-302 do laboratório de Química de Produtos Naturais da UFSC.

5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho

Para os espectros de absorção na região de infravermelho, utilizou-se o espectrômetro Perkin-Elmer FT 16PC, na central de Análises do Departamento de Química da UFSC, utilizando pastilha de KBr.

5.1.4 CG-EM

Para as análises utilizou-se um GC – EM modelo Hewlett Packard 5890 Series II, com detector de massas acoplado e injetor “split-splitless”, uma coluna capilar de sílica fundida Agilent HP-5 MS, apolar (5% - fenil)-metilpolisiloxano, com 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno e com fase de recobrimento de 0,25 μm . Programa de temperatura otimizado: temperatura inicial de 35 °C a qual manteve-se por 3 minutos, aqueceu-se usando uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. até alcançar 280 °C. Utilizou-se temperaturas de 250 °C e

280 °C para injetor e detector, respectivamente. Injeção no modo “splitless” durante a dessorção. O gás de arraste utilizado foi hélio, com fluxo constante de 1,0 mL/min.

5.1.5 PROB (EI-MS)

Programa de temperatura otimizado: temperatura inicial ambiente usando uma taxa de aquecimento de 5° C/min. até alcançar 120 °C a qual manteve-se por 5 minutos. Após, usou-se uma taxa de aquecimento de 20° C/min. até alcançar 300 °C a qual manteve-se por 5 minutos. Utilizou-se temperaturas de 150 °C e 280 °C para injetor e interface, respectivamente. Usou-se injeção direta modo ID (inserção direta). O gás de arraste utilizado foi hélio com fluxo constante de 1,0 mL/min.

5.1.6 RX

Para obtenção dos dados de RX utilizou-se o Difratorômetro CAD4 Enraf-Nonius com tubo de molibdênio e dotado com monocromador de grafite.

5.1.7 Materiais e Métodos Cromatográficos

Para o isolamento cromatográfico em coluna (CC), usou-se sílica gel (70-230 e 230-400 mesh) Merck. O diâmetro interno (Φ) e a altura (h) das colunas variam de acordo com a quantidade de material a ser cromatografado. Preparou-se as amostras para as separações cromatográficas nas proporções 1:2 de substrato/sílica. Realizou-se as eluições com solventes orgânicos na forma de gradiente de polaridade conforme cada caso. Após a evaporação do solvente, em evaporador rotatório sob pressão reduzida, reuniu-se as frações coletadas, quando necessário, conforme as semelhanças de R_f e foram analisadas por cromatografia em CCD.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatofolhas de alumínio contendo uma camada de sílica gel (F_{254}) com 0,2 mm de espessura, da Merck.

Revelou-se os cromatogramas sob luz ultravioleta ($\lambda = 254$ e 366 nm), vapores de iodo, imersão em anisaldeído sulfúrico, solução ácida de sulfato cérico, seguidos de aquecimento.

5.2 Material vegetal

5.2.1 Coleta e identificação botânica

Polygala paniculata: Coletou-se a espécie vegetal (planta inteira) nos meses de março de 2004 na baixada do Massiambú no Município de Paulo Lopes (1000 g) e em março de 2005 na praia Daniela (3500 g) em Florianópolis, SC. A espécie foi identificada por comparação com a exsicata depositada sob o registro UPCNB 26027 pelo Professor Olavo Araújo Guimarães do Departamento de Botânica da UFPR.

Polygala pulchella: Coletou-se a espécie vegetal (planta inteira) em outubro de 2004 na serra da Boa Vista, Município de Rancho Queimado, SC. A mesma foi identificada por comparação com a exsicata UPCNB 28555 também pelo Professor Olavo Araújo Guimarães.

5.3 Aplicação da técnica de SPME-CG-EM na determinação dos compostos voláteis das flores e raízes de *Polygala paniculata*

Flores e raízes da planta fresca foram analisadas através da técnica de SPME-CG-EM (microextração em fase sólida seguido de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas). Macerou-se o material vegetal (500 mg), colocou-se em frascos de 16 mL contendo uma barra magnética e adicionou-se 10 mL de água destilada. Primeiramente perfurou-se o septo do frasco com a agulha do sistema de SPME e a fibra de polidimetilasiloxano (PDMS) foi exposta ao headspeace da amostra durante 1 hora para a extração dos analitos, utilizando-se a agitação máxima da amostra. Após esta extração, levou-se imediatamente a fibra para o injetor aquecido do CG-EM para a dessorção térmica dos analitos, onde permaneceu por 10 minutos.

Obeve-se um cromatograma de íons totais (TIC) para cada amostra, e identificou-se os constituintes pela análise dos padrões de fragmentação dos respectivos espectros de massas (EM). Para a confirmação da identidade destes compostos voláteis calculou-se o índice de retenção destes compostos usando uma série homóloga de *n*-alcanos nas mesmas condições operacionais de análises, os quais foram comparados com valores da literatura (Adams, 1995).

5.4 Obtenção dos extratos brutos de *Polygala paniculata*

A obtenção dos extratos brutos de *P. paniculata* foi realizada por duas metodologias distintas.

Método A: A planta inteira (1000 g) foi seca em estufa, e submetida à extração exaustiva por maceração à temperatura ambiente com solventes em ordem crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila e etanol aquoso (80%) em recipiente fechado com três reposições de cada solvente. Posterior a fase de maceração, os extratos foram individualmente filtrados em papel filtro e o solvente foi evaporado à pressão reduzida (50 °C) em evaporador rotativo, obtendo-se assim os respectivos extratos brutos: EBDM (24,2 g), EBAcOEt (6,4 g) e EBEOH (50 g).

Método B: A planta inteira fresca (3500 g) foi extraída primeiramente com hexano, 2 vezes de 24 horas à temperatura ambiente. Com a evaporação do solvente, obteve-se o extrato hexânico (EH). Após, o material vegetal foi macerado exaustivamente com etanol aquoso (80%) durante 15 dias com três reposições do solvente. Após a evaporação do solvente extrator sob pressão reduzida a 50° C, obteve-se o extrato bruto etanólico (EBEOH; 300 g).

5.5 Fracionamento e isolamento dos compostos

Submeteu-se os diferentes extratos obtidos através da maceração (Método A e Método B) ao fracionamento em CC de sílica gel. A eluição realizou-se com misturas de hexano, acetato de etila e etanol na forma de gradiente de polaridade. Reuniu-se as frações coletadas conforme as semelhanças de R_f , observadas por CCD. Submeteu-se, quando necessário, as frações a sucessivas CC e CC flash e os compostos obtidos purificados através de lavagens e recristalização em solventes apropriados conforme apresentado na Figura 5.1 (p. 89) e Figura 5.2 (p. 91).

5.5.1 Fracionamento do Método A

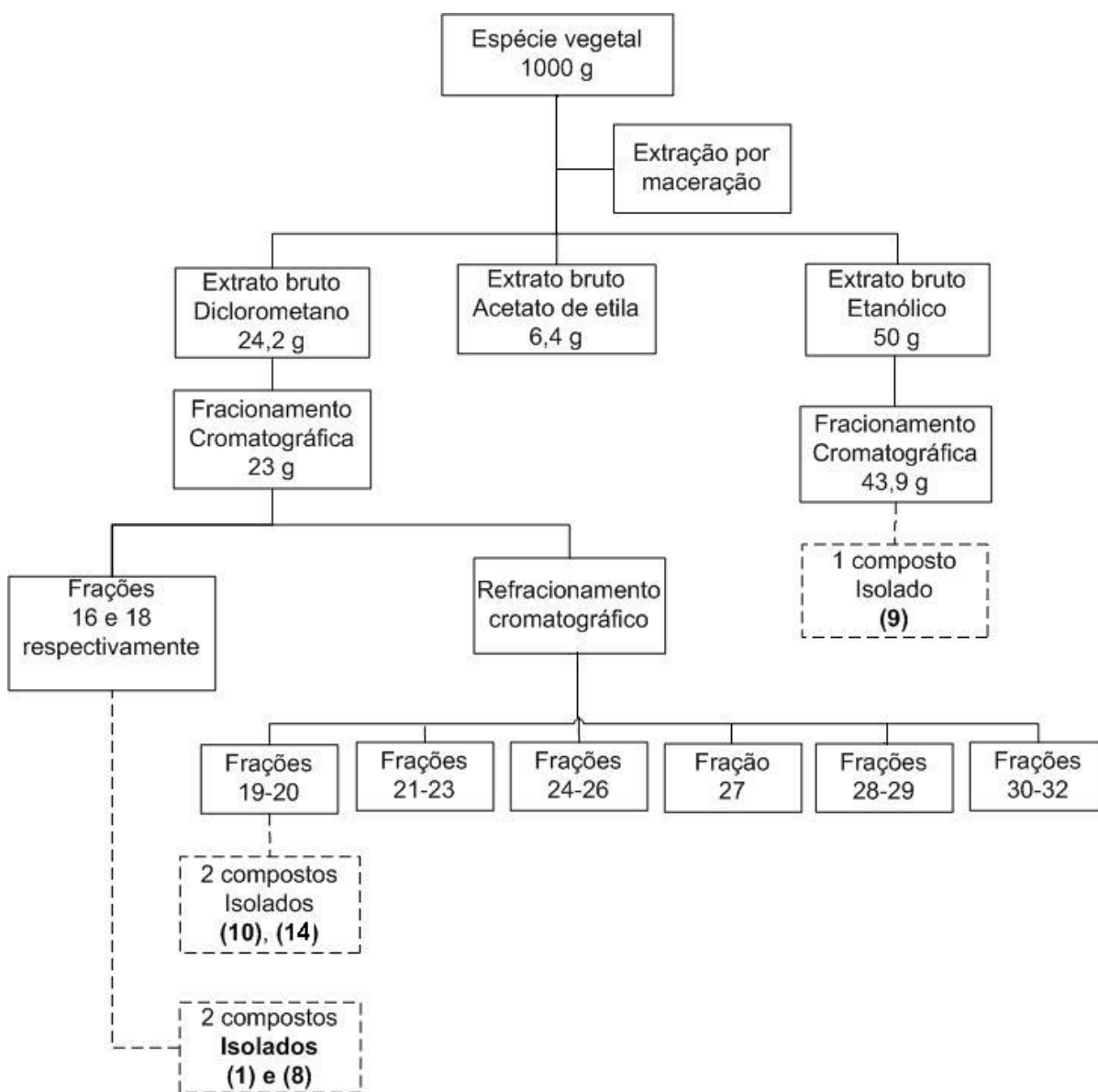


Figura 5-1 - Fluxograma de isolamento dos compostos de *Polygala paniculata* pelo Método A.

Extrato bruto diclorometano

Dissolveu-se o extrato bruto diclorometano (EBDM, 23 g) em acetona e preparou-se uma pastilha a qual submeteu-se ao fracionamento através de uma coluna de 6 cm Φ por 30 cm h, tendo como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh, 10 cm h), utilizando-se como eluente uma mistura de hexano, acetato de etila e etanol, com gradiente de polaridade. Coletou-se 50 frações de 250 mL, monitoradas por CCD e reunidas conforme seu perfil apresentado.

Desta forma, reuniu-se as frações 15-16 e após a retirada do sobrenadante obteve-se o composto **(1)** (87 mg), identificado como aurapteno. Utilizou-se o mesmo procedimento com as frações 17-18, obtendo-se o composto **(8)** (55 mg), identificado como espinasterol (compostos isolados anteriormente pelo grupo nesta espécie).

Recromatografou-se as frações 19-20 (0,82 g) em coluna (Φ 2,5 cm, h 30 cm de sílica gel 70-230 mesh), eluída com hexano, acetato de etila e etanol com gradiente de polaridade coletando-se 15 frações de 150 mL cada. Destas, na fração 3 precipitou um sólido amarelo que após a retirada do sobrenadante resultou em 7 mg do composto **(10)** conhecido como 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona. Também nas frações 4-5 precipitou um sólido amarelo que foi purificado com o mesmo procedimento descrito acima, obtendo-se 12,5 mg do composto **(14)** posteriormente denominado como 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona, descrito pela primeira vez na literatura.

Extrato bruto etanólico

Preparou-se uma pastilha do extrato bruto etanólico (EBEtOH, 43,9 g) a qual foi submetida ao fracionamento através de uma coluna de 6 cm Φ por 30 cm h, tendo como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh, 10 cm h), utilizando como eluente uma mistura de hexano, acetato de etila e etanol, com gradiente de polaridade. Coletou-se 48 frações de 100 mL, monitoradas por CCD e reunidas conforme seu perfil apresentado.

Desta forma, nas frações 36-40 (hexano:acetato de etila 50:50) precipitou um sólido amarelo que após a retirada do sobrenadante obteve-se o composto **(9)** (88 mg), identificado como o flavonóide glicosilado rutina.

5.5.2 Fracionamento do Método B

Obtenção do extrato hexânico (EH)

A espécie vegetal (3500 g de planta fresca) foi extraída primeiramente com hexano à temperatura ambiente por 24 horas (2 vezes) em recipiente fechado, para a obtenção do extrato hexânico (EH). Após filtração, evaporou-se parcialmente o solvente sob pressão reduzida em evaporador rotatório à temperatura controlada, observando-se a precipitação de um sólido branco. Separou-se o sólido do sobrenadante seguido de sucessivas lavagens com hexano, obtendo-se 2 g da epóxi cumarina, febalosina (**2**).

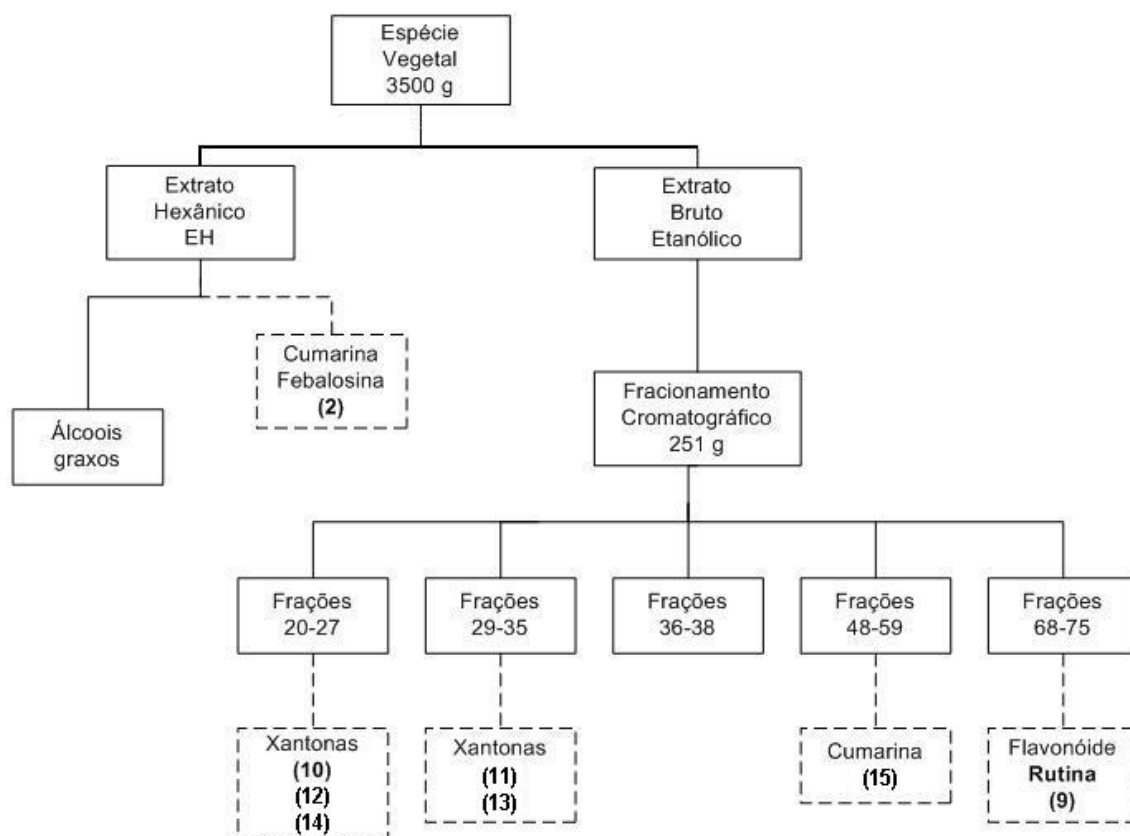


Figura 5-2 - Fluxograma de isolamento de compostos de *Polygala paniculata* pelo Método B.

Fracionamento do EBEOH

Após a extração com hexano, submeteu-se o material vegetal à extração exaustiva, por maceração, em etanol aquoso (80%) à temperatura ambiente durante 15 dias, com três reposições de solvente. Após a eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida (50 °C), obteve-se 300 g do extrato bruto etanólico (EBEOH).

Dissolveu-se 251 g de EBEOH em acetona e preparou-se uma pastilha que foi submetida ao fracionamento através de uma coluna cromatográfica de 7,5 cm Φ por 50 cm h, tendo como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh, 22 cm h). Utilizou-se como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila:etanol, com gradiente de polaridade, resultando na coleta de 110 frações de 100 mL cada. Reuniu-se as frações, quando necessárias, conforme as semelhanças de R_f observadas por CCD para novas colunas cromatográficas (CC).

Reuniu-se as frações 20-27 e submeteu-se a uma nova coluna cromatográfica (Φ 2,5 cm, h 20 cm de sílica gel 70-230 mesh) eluída com hexano:acetato de etila até 100%, onde coletou-se 50 frações de 100 mL. Nesta coluna, obteve-se das frações 5-6 um precipitado amarelo que após a retirada do sobrenadante obteve-se 10 mg do composto 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (**10**) (isolada também no Método A). Nas frações 7-8 precipitou um sólido amarelo que após análise em CCD observou-se tratar de uma mistura de duas xantonas que foram separadas por placa preparativa com o sistema de solvente hexano:acetato de etila (70:30). Após análise espectroscópica identificou-se os compostos como sendo 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1,2)-xantona (**14**) (xantona inédita, também isolada no Método A) e composto 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (**12**).

Reuniu-se as frações 29-35 após CCD, e recromatografou-se em uma coluna (Φ 2,5 cm, h 20 cm de sílica gel 70-230 mesh) eluída em hexano:acetato de etila com gradiente de polaridade, onde obteve-se 50 frações de 100 mL cada. Nas frações 11-12, ocorreu a precipitação de um sólido amarelo que após a retirada do sobrenadante isolou-se 8 mg do composto identificado como 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**). Nas frações 13-22 precipitou um composto amarelo que após retirada do sobrenadante obteve-se 50 mg do composto 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**).

As frações 48-59 foram novamente submetidas à CC (Φ 3 cm, h 21 cm de sílica gel 70-230 mesh), usando-se gradiente de eluição hexano:acetato de etila:etanol, sendo coletadas 20 frações de 100 mL. Na fração 2 houve a formação de cristais incolores posteriormente elucidado como 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**).

Nas frações 68 a 75 precipitou um sólido amarelo, que após várias lavagens com acetona, resultou em 430 mg, posteriormente identificado como quercetina 3-rutinosídeo (rutina) (**9**) também isolada do Método A.

5.6 Fracionamento das flores de *Polygala pulchella*

Obtenção dos extratos brutos

Obteve-se os extratos das flores frescas de *Polygala pulchella* (447 g) através de maceração em temperatura ambiente com diclorometano e posteriormente com etanol aquoso (80%) em recipiente fechado com três reposições de cada solvente. Posterior a fase de maceração, filtrou-se os extratos individualmente em papel filtro e evaporou-se o solvente extrator à pressão reduzida (50 °C), obtendo-se assim os respectivos extratos brutos: EBDM (2,16 g) e EBEtOH (41 g).

5.7 Fracionamento das folhas, caules e raízes de *Polygala pulchella*

Obtenção dos extratos

Obteve-se os extratos das folhas, caules e raízes secas (495 g) de *Polygala pulchella* através de maceração em temperatura ambiente com diclorometano, acetato de etila e etanol aquoso (80%) em recipiente fechado com três reposições de cada solvente. Filtrou-se individualmente os extratos em papel filtro e evaporou-se o solvente extrator à pressão reduzida (50° C) em evaporador rotativo, obtendo-se assim os respectivos extratos brutos: EBDM (6,5 g), EBAcOEt (4,4 g) e EBEtOH (32 g).

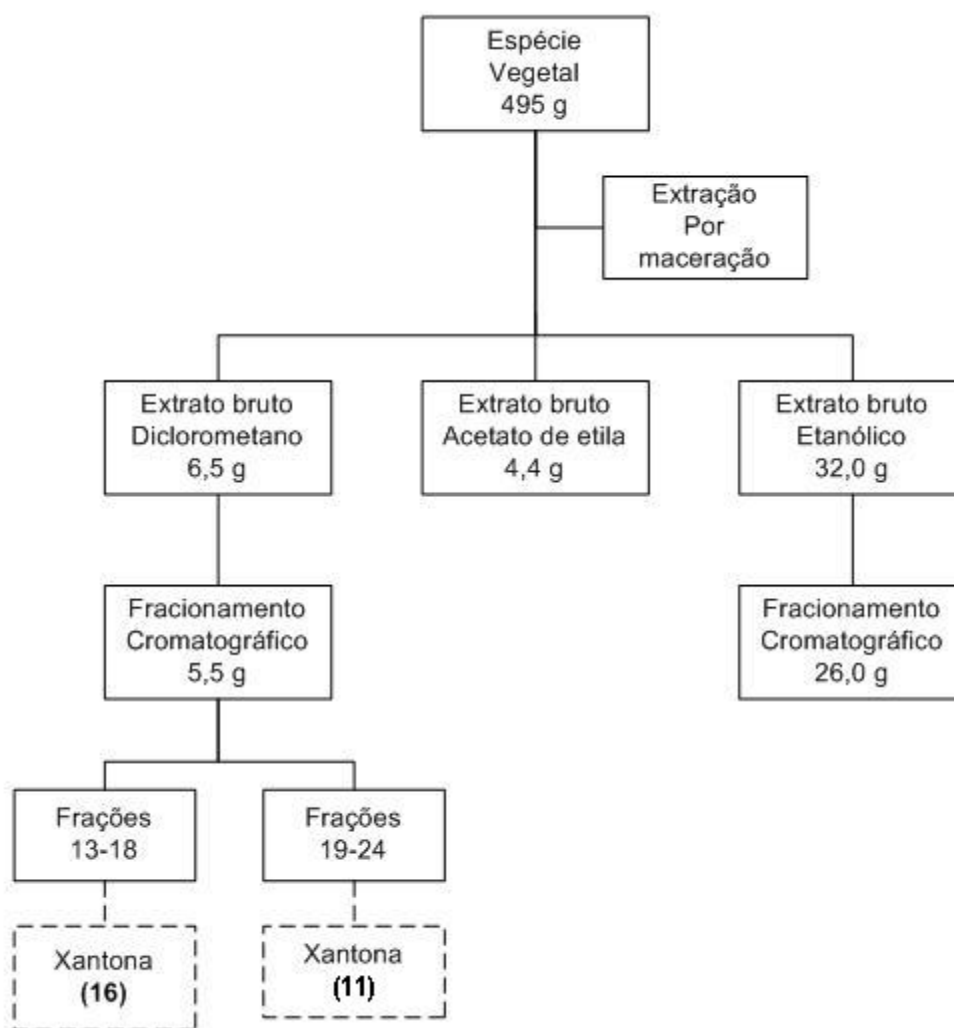


Figura 5-3 - Fluxograma de isolamento dos compostos do caule, folhas e raízes de *Polygala pulchella*.

Fracionamento do EBDM

Preparou-se uma pastilha do EBDM (5,5 g) a qual foi submetida ao fracionamento através de uma coluna de 5,5 cm Φ por 50 cm h, tendo como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh, 18 cm h), utilizando-se como eluente uma mistura de hexano:acetato de etila, com gradiente de polaridade. Coletou-se 45 frações de 100 mL e reuniu-se de acordo com o monitoramento por CCD.

Reuniu-se as frações 13-18 e recromatografou-se em uma coluna de Φ 3,0 cm por 50 cm h de sílica gel (70-230 mesh, 20 cm h) eluída com hexano:acetato de etila até 100%, coletando-se 29 frações de 100 mL. Destas, submeteu-se as frações 4-12 à cromatografia

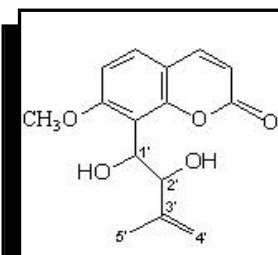
flash (2 cm Φ por 50 cm h, sílica 230-400 mesh, 15 cm h) com hexano:acetato de etila 70:30 como eluente, obtendo-se 24 frações de 15 mL. Nas frações 16-18 precipitou um sólido amarelo 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**).

Reuniu-se as frações 19-24 e submeteu-se ao fracionamento em coluna de sílica Φ 3,0 cm por 50 cm h de sílica gel (70-230 mesh, 18 cm h) usando-se hexano:acetato de etila como eluente, resultando em 26 frações de 100 mL. Destas, submeteu-se as frações 5-7 à cromatografia flash (2 cm Φ por 50 cm h, sílica 230-400 mesh, 15 cm h) usando-se como eluente hexano:acetato de etila 60:40, obtendo-se 17 frações de 15 mL. Nas frações 13-15 precipitou 15 mg do composto (**11**) 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona, isolada anteriormente na *P. paniculata*. Porém é o primeiro relato desta xantona na espécie *P. pulchella*.

5.8 Modificações estruturais

5.8.1 Reação da febalosina (2) com H₂O

Em um balão de fundo redondo de 125 mL dissolveu-se 100 mg de febalosina em 30 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), adicionou-se 10 mL de água destilada, 1 mL de HCl, 5 g de sílica gel e colocou-se em agitação magnética por sete dias com controle de temperatura (50° C durante o dia e T. ambiente à noite), sendo monitorada por CCD. Ao fim da reação, filtrou-se a mistura e extraiu-se (4 vezes) com CH₂Cl₂. Secou-se com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório (50 °C). Após, o resíduo foi purificado em coluna flash (230-400 mesh) com hexano/acetato de etila 1:9 para purificação do produto, rendendo 20 mg de um sólido branco (19%).



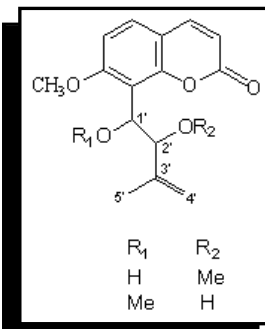
Pf. 135-136 °C.

IV (ν max KBr, cm⁻¹): 3384, 2965, 1715, 1603, 1494, 1255.

RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz): 1,77 (3H, s, CH₃-5'), 3,97 (3H, s, CH₃O-C7), 4,53 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-2'), 4,59 (1H, s, H-4'), 4,65 (1H, s, H-4'), 5,31 (1H, d, H-1'), 6,26 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-3), 6,88 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H-6), 7,40 (1H, d, *J* = 8,8 Hz, H-5), 7,63 (1H, d, *J* = 9,6 Hz, H-4).

5.8.2 Reação da febalosina (2) com metanol em meio ácido

Em um balão de fundo redondo de 125 mL dissolveu-se 100 mg de febalosina em 5 mL de diclorometano seco (CH_2Cl_2). Adicionou-se 50 mL de MeOH, 1 mL de HCl e 5 g de sílica gel. Colocou-se em agitação magnética durante 72 horas (monitorada por CCD), usando-se aquecimento ($50\text{ }^\circ\text{C}$) nas últimas 8 horas. Ao fim da reação filtrou-se a mistura e extraiu-se 4 vezes com CH_2Cl_2 . Secou-se com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida. Aplicou-se o resíduo em coluna flash com hexano/acetato de etila 4:6, obteve-se 28 mg (25%) do composto puro.



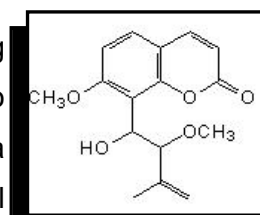
Pf. $140\text{--}142\text{ }^\circ\text{C}$.

IV (ν max KBr, cm^{-1}): 3474, 2929, 1728, 1605, 1489, 1249.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 1,59 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5}'$), 3,25 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C2}'$) 3,93 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 4,51 (1H, d, $J = 2,0\text{ Hz}$, H-2'), 4,65 (1H, s, H-1'), 4,87 (1H, s, H-4'), 5,02 (1H, d, H-4'), 6,24 (1H, d, $J = 9,6\text{ Hz}$, H-3), 7,05 (1H, d, $J = 8,8\text{ Hz}$, H-6), 7,57 (1H, d, $J = 8,8\text{ Hz}$, H-5), 7,87 (1H, d, $J = 9,6\text{ Hz}$, H-4).

5.8.3 Reação da febalosina (2) com metóxido de sódio

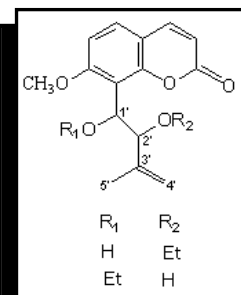
A 15 mL de MeOH seco, adicionou-se aproximadamente 20 mg de sódio metálico sob agitação, para a formação do metóxido de sódio em metanol. A esta solução, adicionou-se 100 mg de febalosina e a reação foi completa após 15 minutos. Acidificou-se o meio reacional com solução MeOH-HCl 1:1 até pH 2-3. Extraíu-se o produto 4 vezes com CHCl_3 , secou-se com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrou-se e evaporou-se o solvente sob pressão reduzida à temperatura controlada ($50\text{ }^\circ\text{C}$), obtendo-se 80 mg do composto (71%).



Dados: Idem ao item 5.8.4.

5.8.4 Reação da febalosina (2) com etanol

Em um balão de fundo redondo de 125 mL dissolveu-se 100 mg de febalosina em 5 mL de diclorometano seco, com posterior adição de 50 mL de etanol, 5 g de sílica gel (catalisador) e 1 mL de HCl. Colocou-se em agitação magnética durante uma semana a temperatura ambiente exceto nos dois últimos dias (total de 10 horas de aquecimento). A reação foi monitorada por CCD. Ao fim da reação, filtrou-se a mistura reacional e extraiu-se (4 vezes) com CH_2Cl_2 . Secou-se com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e evaporou-se o solvente em evaporador rotatório (50 °C). Após, aplicou-se o resíduo em coluna flash para purificação, usando-se como eluente hexano:acetato de etila 4:6. Obteve-se 31 mg de um sólido branco (26%).



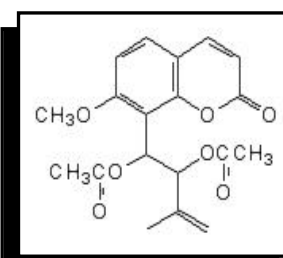
Pf. 130-131 °C.

IV (ν max KBr, cm^{-1}): 3473, 2925, 1728, 1603, 1453, 1251.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 1,18 (3H, t, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{O-C2}'$), 1,69 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5}'$), 3,44 (2H, m, $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-O-C2}'$), 3,92 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 4,63 (1H, s, H-4'), 4,69 (1H, s, H-4'), 4,91 (1H, d, H-2'), 5,14 (1H, d, $J = 7,2$ Hz, H-1'), 6,26 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-3), 6,86 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-6), 7,40 (1H, H-5), 7,87 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4).

5.8.5 Acetilação da febalosina (2)

Em um balão de 50 mL dissolveu-se 100 mg de febalosina (2) em 1 mL de diclorometano seco e adicionou-se 3 mL de acetato de etila, 1 mL de ácido acético e 2 mL de anidrido acético. Colocou-se uma porção catalítica de DMAP (4-dimetil amino piridina). Deixou-se o meio reacional por três dias sob agitação magnética. Ao fim da reação evaporou-se o solvente em dessecador. Purificou-se através de coluna flash usando-se hexano:acetato de etila 50:50 como eluente. Obteve-se 90 mg (65%) de um sólido amarelo claro.



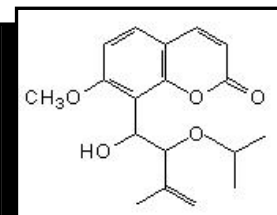
Pf. 120-121 °C.

IV (ν max KBr, cm^{-1}): 2943, 1741, 1606, 1494, 1244.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 1,48 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5}'$), 1,87 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 1,92 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-CO}$), 3,82 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 4,57 (1H, s, H-4'), 4,76 (1H, s, H-4'), 5,98 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-2'), 6,08 (1H, d, $J = 12,0$ Hz, H-1'), 6,57 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3), 6,76 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6), 7,33 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 7,54 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-4).

5.8.6 Reação da febalosina (2) com isopropóxido de sódio

Em um Bécker, adicionou-se 15 mL de isopropanol e aproximadamente 20 mg de sódio metálico para formação do isopropóxido de sódio. Adicionou-se 100 mg de febalosina e após 15 minutos, observou-se através de CCD que a reação havia ocorrido. Acidificou-se a reação com solução isopropanol-HCl 1:1 até pH 2-3. Em funil de separação adicionou-se 20 mL de água destilada e extraiu-se o produto (4 vezes) com clorofórmio (CHCl_3). Secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em dessecador sob vácuo. Purificou-se o produto através de coluna flash usando-se hexano:acetato de etila 50:50 como eluente. Obteve-se 54 mg do composto (44%).



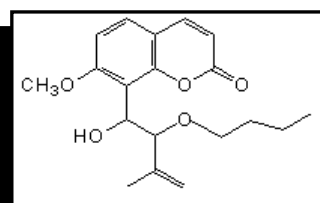
Pf. 101-103 °C.

IV (ν max KBr, cm^{-1}): 3557, 2968, 1728, 1604, 1454, 1368.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 1,01 (3H, d, $\text{C2}'\text{-OCH}(\text{CH}_3)_2$), 1,24 (3H, d, $\text{C2}'\text{-OCH}(\text{CH}_3)_2$), 1,70 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5}'$), 3,54 (1H, m, $\text{C2}'\text{-O-CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,93 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 3,86 (1H, s, H-4'), 3,97 (1H, s, H-4'), 4,65 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-2'), 4,83 (1H, d, $J = 8,4$ Hz, H-1'), 6,26 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-3), 6,86 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-6), 7,39 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 7,62 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-4).

5.8.7 Reação da febalosina (2) com *n*-butóxido de sódio

Em um Bécker, adicionou-se 20 mL de *n*-butanol e pedaços de sódio metálico para formação do *n*-butóxido de sódio. Adicionou-se 100 mg de febalosina e após 15 minutos observou-se através de CCD que a reação havia ocorrido. Acidificou-se a reação com solução isopropanol-HCl 1:1 até pH 2-3. Em funil de separação adicionou-se 20 mL de água destilada e extraiu-se o produto (4 vezes) com clorofórmio (CHCl_3). Secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em dessecador sob vácuo.



Purificou-se o produto através de coluna flash usando-se hexano:acetato de etila 50:50 como eluente. Obteve-se 49 mg do composto puro (38%).

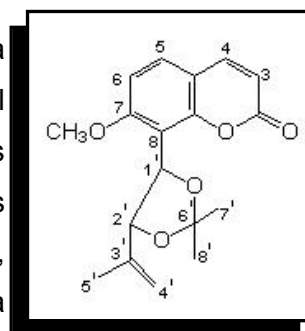
Pf. 97-99 °C.

IV (ν max KBr, cm^{-1}): 3435, 2955, 1723, 1605, 1443, 1250.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 0,83 (3H, t, $\text{C}2'\text{-O}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}_3$), 1,31 e 1,53 (2H cada, m, $\text{C}2'\text{-OCH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{-CH}_3$), 1,71 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5}'$), 3,33 (2H, t, $\text{C}2'\text{-O-CH}_2\text{-(CH}_2)_2\text{CH}_3$), 3,93 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 4,62 (1H, s, H-4'), 4,69 (1H, s, H-4'), 4,92 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-2'), 5,14 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-1'), 6,26 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-3), 6,99 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-6), 7,45 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-5), 7,67 (1H, d, $J = 9,2$ Hz, H-4).

5.8.8 Reação da febalosina (2) com acetona

Em um balão de 50 mL dissolveu-se 20 mg de febalosina (2), em 10 mL de acetona. Adicionou-se 2 g de sílica gel (catalisador) e colocou-se em agitação magnética durante 48 horas (monitorada por CCD), usando-se aquecimento (50 °C) nas últimas 6 horas. Não se observou formação do derivado desejado. Porém, ao limpar o composto de partida (febalosina) em uma pequena coluna utilizando-se o solvente acetona, verificou-se a formação do derivado desejado. Obteve-se 5 mg (20%) de um sólido branco.



Pf. 111-112 °C.

IV (ν max KBr, cm^{-1}): 2980, 1724, 1603, 1488, 1375, 1245.

RMN ^1H (CDCl_3 , 400 MHz): 1,54 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-8}'$), 1,70 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-7}'$), 1,74 (3H, s, $\text{CH}_3\text{-5}'$), 3,93 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C7}$), 4,85 (1H, s, H-4'), 4,96 (1H, s, H-4'), 5,02 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-2'), 5,57 (1H, d, $J = 9,6$ Hz, H-1'), 6,26 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-3), 6,87 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6), 7,41 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 7,61 (1H, d, $J = 8,8$ Hz, H-4).

5.9 Avaliação das atividades biológicas

Os ensaios de avaliação das atividades biológicas foram realizados em colaboração com professores e alunos de outros departamentos:

- Os ensaios referentes à neurotoxicidade foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Farina.

- Efeito protetor do EB_{Et}OH de *P. paniculata* contra neurotoxicidade em camundongos induzida por MeHg.

- Os ensaios referentes à atividade antinociceptiva, antiinflamatória e protetora gástrica foram realizados no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Santa Catarina, pela mestrandia Fernanda Lapa sob orientação do Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

As atividades antinociceptivas foram avaliadas através de diferentes modelos de nocicepção comumente utilizados para triagem desta atividade, dentre eles:

- Contorção abdominal induzida pelo ácido acético: onde se observa a redução no número das contorções abdominais.

- Nocicepção induzida pela capsaicina: observa-se a diminuição na resposta à dor neurogênica.

- Nocicepção induzida pelo glutamato: observa-se a resposta a nocicepção induzida pelo glutamato.

- Atividade antiinflamatória no modelo edema de pata induzido pela carragenina: volume da pata direita e esquerda é avaliado por pletismometria.

- Lesões gástricas induzidas por etanol: observa-se o efeito do EB_{Et}OH sobre as lesões gástricas induzidas por etanol.

- Os ensaios relacionados à atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela doutoranda Susana Johann sob orientação da Profa. Dr^a. Maria Aparecida de Rezende.

- Os ensaios referentes à atividade ansiolítica e antidepressiva foram realizados no Laboratório de Farmacologia da UNIVALI, sob a orientação do Prof^a. Dr^a. Adriana Dias Elpo Barbosa.

- Os ensaios referentes à toxicidade frente à *Artemia salina* foram realizados no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais da UFSC juntamente com o aluno Henrique Moresco sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Inês Maria Costa Brighente.

5.9.1 Efeito protetor do EBEtOH de *P. paniculata* contra neurotoxicidade em camundongos induzida por MeHg

5.9.1.1 Animais e tratamento

Manteve-se os animais (camundongos machos) a 23 °C em um ciclo de 12 horas luz/escuro com livre acesso à comida, sendo separados em quatro grupos experimentais (Controle, MeHg, EBEtOH, MeHg +EBEtOH) com sete animais cada. O grupo controle recebeu água e uma solução de NaCl 150 mM administrado por gavagem (10 mL/Kg), duas vezes ao dia. Diluiu-se o MeHg em água (40 mg/L). O grupo MeHg e MeHg + EBEtOH foram expostos ao cloreto de metilmercurio (II), baseado em estudos anteriores pelo grupo (Fariana et al., 2003). Os grupos EBEtOH e MeHg + EBEtOH receberam uma solução do EBEtOH (100 mg/Kg), diluído em solução NaCl 150 mM por gavagem (10 mL/Kg), duas vezes ao dia. Administrou-se água e solução salina (NaCl 150 mM) como veículo pelos grupos MeHg e EBEtOH, respectivamente. A exposição ocorreu por duas semanas, monitorando-se diariamente a ingestão de líquidos e sólidos.

5.9.1.2 Teste do rota-rod

Submeteu-se os animais ao teste do rota-rod, o qual baseou-se no estudo de Duham e Miya (1957), com pequenas modificações. O aparelho consiste em uma barra (cilindro horizontal giratório) com 2,5 cm de diâmetro, girando a uma velocidade constante de 22 rpm, onde registra-se o número de quedas e o tempo de permanência na barra. Selecionou-se previamente os animais num período de 24 horas, por eliminação dos camundongos que não permaneceram na barra por um período de 60 segundos. Antes de começar o tratamento (fase 1) e após o período de tratamento (fase 2, 2 semanas), submeteu-se os animais selecionados ao teste do rota-rod e cronometrou-se o tempo de permanência no aparelho. Após o teste, os animais foram mortos por decapitação, removeu-se rapidamente o córtex cerebral e o cerebelo e colocou-se sob gelo. Homogeneizou-se o sobrenadante obtido e usou-se para a determinação da atividade enzimática, níveis de tióis não-proteicos (NPSH) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

5.9.1.3 Determinações bioquímicas

Determinou-se a atividade da glutathiona redutase (GR) e glutathiona peroxidase (GPx) baseada em Carlberg e Mannervik (1985) e Wendel (1981), respectivamente. Os níveis de tióis não proteicos (NPSH) foram baseados em Ellman (1959) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) baseadas em Ohkawa et al. (1979) com algumas modificações (Farina et al., 2003). Determinou-se as concentrações proteicas de acordo com Bradford (1976), usando-se albumina sérica (*serum albumin*) como padrão.

5.9.1.4 Experimentos *in vitro* para detectar possíveis efeitos quelantes

Os possíveis efeitos quelantes do EBEOH para MeHg foram desenvolvidos baseados na determinação indireta do MeHg “livre” usando glutathiona reduzida (GSH). Incubou-se diferentes concentrações de MeHg (0, 10, 25, 50, e 100 μM) com GSH (50 μM) na presença ou na ausência do EBEOH (12,5 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C (volume total da reação = 1 mL). Após a incubação por 30 minutos, determinou-se a quantidade de GSH remanecente (Ellman, 1959) usando-se 5,5'-ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico). A quantidade de EBEOH foi equivalente a 50 nmol MeHg por peso:peso base.

5.9.2 Estudo das propriedades antinociceptivas do EBEOH do Método B e compostos isolados de *P. paniculata*

5.9.2.1 Vias de administração

Para avaliar a atividade antinociceptiva do EBEOH, de modo sistêmico, administrou-se o extrato por via oral e os compostos isolados aurapteno (**1**), febalosina (**2**), e rutina (**9**) por via intraperitoneal (i.p.). Tratou-se os animais por via oral (v.o.) e intraperitoneal, com diferentes doses do extrato ou compostos, respectivamente 30 e 60 minutos antes da administração dos agentes indutores da dor, que foram administrados por via intraperitoneal, intraplantar (i.pt.) e via intratecal (i.t.).

Avaliou-se a atividade antiinflamatória do EBEOH através da administração de diferentes doses do extrato por via oral, respectivamente 60 minutos antes da administração dos agentes flogísticos (pró-inflamatório), que foram administrados por intraplantar e intrapleural.

5.9.2.2 Métodos

A metodologia utilizada para verificar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória do EB_{Et}OH, consistiu inicialmente na utilização de modelos de nociceção química, induzida pelo ácido acético (0,6%, 450 µL/animal, i.p.), capsaicina (1,6 µg/pata) e glutamato (10 µmol/pata; 175 nmol/ sítio, i.t.), (Scheidt et al., 2002; Santos et al., 1997; Santos et al., 1999; Beirith et al., 2002).

Com a finalidade de verificar a ação antiinflamatória do EB_{Et}OH, utilizou-se como agente flogístico (pró-inflamatório) a carragenina tanto nos modelos de edema de pata (300 µg/pata) como no modelo de pleurisia (1%, 0,1 mL/sítio).

5.9.2.3 Teste das contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%), em camundongos.

Este modelo consiste na indução da resposta nociceptiva através da administração intraperitoneal de ácido acético (0,6%) diluído em solução salina. A administração de ácido acético por via intraperitoneal provoca irritação da membrana serosa, o que ocasiona movimentos estereotipados, os quais são caracterizados por contração da musculatura abdominal (contorções abdominais) juntamente com a extensão de uma das patas posteriores (Santos et al., 1999; Le Bars et al., 2001).

Tratou-se grupos de animais por via oral com o EB_{Et}OH, nas doses de 5, 10, 50, 100 e 200 mg/kg, 1 h antes da injeção do ácido acético. Os grupos controles receberam o mesmo volume do veículo (10 mL/kg) utilizado para diluir o extrato. Após a administração do ácido acético, colocou-se os animais sob funis de vidro individuais transparentes durante 20 minutos, e quantificou-se o número de contorções abdominais. Obteve-se a atividade antinociceptiva do EB_{Et}OH através da comparação do número de contorções abdominais quantificadas entre os grupos controle (tratado com o veículo) e tratado com o EB_{Et}OH.

5.9.2.4 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, em camundongos.

Esse modelo foi proposto para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz estimulação direta dos neurônios nociceptivos e causa a liberação de vários neuropeptídeos e aminoácidos excitatórios envolvidos na transmissão dolorosa, incluindo principalmente as taquicininas (substância

P, neurocinina A e neurocinina B) e o glutamato, respectivamente (Sakurada et al., 1992; Sakurada et al., 1996).

Colocou-se os animais sob funis de vidro transparentes individuais, para um período de adaptação de 20 minutos. Após esse período, cada animal recebeu por via intraplantar 20 μ L de solução de capsaicina (1,6 μ g/pata) na pata posterior direita. Cronometrou-se o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com capsaicina por um período de 5 minutos. Tratou-se grupos de animais com o EBEtOH, nas doses de 0,01; 0,1; 0,5; 1,0 e 10 mg/kg por via oral 1 h antes da injeção da capsaicina. Os animais controles receberam igual volume dos veículos utilizados (10 mL/kg, v.o.) para diluir o extrato.

5.9.2.5 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de glutamato, em camundongos.

Para testar a hipótese do envolvimento dos aminoácidos excitatórios (AAE) no efeito antinociceptivo do EBEtOH, administrou-se o extrato por via oral e 1 hora após, analisou-se sua atividade no modelo de nociceção induzida pelo glutamato (Santos e Calixto, 1997; Beirith et al., 2002).

Também neste modelo, avaliou-se a atividade antinociceptiva dos três compostos isolados a partir do EBEtOH, administrando-se todos via intraperitoneal. Administrou-se a febalosina (**2**) nas doses de 1, 3, 10, 30 mg/kg; o aurapteno (**1**) nas doses de 3, 10, 30, 100 mg/kg e a rutina (**9**) nas doses de 1, 3, 10, 30, 100 mg/kg, 30 minutos antes da injeção de glutamato.

Após os tratamentos com o extrato e compostos isolados, os animais receberam 20 μ L de solução de glutamato (10 μ mol/pata) dissolvido em salina por via intraplantar na pata traseira direita. Após, colocou-se os animais individualmente sob funis de vidro transparentes, e cronometrou-se durante 15 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. Ao fim do experimento os animais foram mortos por deslocamento cervical. Cortou-se a pata na altura da articulação e pesou-se em balança analítica. A diferença entre a pata que recebeu o agente nociceptivo e a pata que não o recebeu, correspondeu ao edema, em mg (Ferreira et al., 1999 e Beirith et al., 2002).

Administrou-se igual volume de veículos utilizados para diluir o extrato e compostos para os animais controle.

5.9.3 Estudo da atividade antiinflamatória do EBEtOH de *P. paniculata*

5.9.3.1 Avaliação da atividade antiinflamatória do EBEtOH no modelo do edema de pata, induzido pela carragenina em ratos

Realizou-se o modelo de edema em pata de rato de acordo com Winter et al., 1962. Avaliou-se por pletismometria o volume da pata direita e esquerda dos animais. Em seguida, tratou-se os animais com EBEtOH, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.), indometacina (4 mg/kg, i.p.) (antiinflamatório) ou os respectivos veículos (10 mL/Kg) e após 30 e 60 minutos, respectivamente, receberam uma injeção intraplantar de carragenina (300 µg/pata) na pata posterior direita e salina na pata posterior esquerda no volume de 50 µL. Avaliou-se novamente por pletismometria os volumes das patas traseiras direita e esquerda após 1, 2, 3 e 4 horas. Expressou-se os resultados como a diferença entre o volume da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi), representados pela fórmula Vf-Vi.

5.9.4 Estudo da atividade antiúlcero-gênica e anti-secretora ácida do EBEtOH, em ratas.

5.9.4.1 Lesões gástricas induzidas por etanol

Administrou-se o EBEtOH em ratas Wistar adultas, por via oral, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, e por via intraperitoneal nas doses de 3, 10, 30 mg/kg. Uma hora depois da administração do etanol (0,5 mL de etanol a 70%), os animais foram mortos. Expôs-se a parede abdominal, localizou-se e removeu-se o estômago.

Após a remoção do estômago, manteve-se o mesmo em placa de Petri, lavou-se e abriu-se ao longo da curvatura menor. Desprezou-se, o conteúdo gástrico e lavou-se a mucosa delicadamente com água destilada. Após, determinou-se o índice de úlceras através de "leitura cega" de acordo com Mesia-Vela (1998), por contagem direta das lesões menores ou iguais a 1 mm (1 ponto). Mediu-se e quantificou-se o comprimento de cada lesão na mucosa glandular considerando 1,5 pontos x mm. No caso de úlceras perfuradas, cada mm de lesão é multiplicado por 5 pontos (5 pontos x mm).

5.9.5 Análise Estatística

Apresentou-se os resultados como a média \pm erro padrão da média, exceto as DI_{50} s (dose ou concentração dos fármacos ou compostos que reduziram a resposta em 50% em relação ao grupo controle), que são apresentadas como médias geométricas acompanhadas de seus respectivos limites de confiança, em nível de 95%. Realizou-se as análises estatísticas dos resultados por meio de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método de Newman Keuls, quando apropriado. Considerou-se valores de $P < 0,05$ como indicativos de significância. Estimou-se as DI_{50} s a partir de experimentos individuais utilizando-se o método de regressão linear através do programa "Graph Pad" ou "Instat".

5.9.6 Atividade Antifúngica

5.9.6.1 Solventes usados na solubilização dos produtos naturais

Para dissolver e diluir os extratos utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) nos testes em que o solvente manteve contato com o microrganismo-teste (Microdiluição) por ser menos tóxico. Nos testes de bioautografia, onde o solvente é evaporado antes do contato do produto natural com o microrganismo, usou-se hexano (para o extrato hexânico - EH) e DMSO para as demais amostras.

5.9.6.2 Reagente usado para a revelação dos testes

Para a revelação dos testes de bioautografia direta usou-se uma suspensão a 0,5 mg/mL do sal de *p*-iodonitrotetrazolium Violet (INT) (Sigma), em etanol a 70%.

5.9.6.3 Meios de cultura

Utilizou-se o meio de Ágar Sabouraud para a manutenção das culturas fúngicas, o caldo Sabouraud para os testes de bioautografia, o Ágar Batata Dextrose para as curvas de crescimento dos fungos e o meio de RPMI 1640 (Sigma) tamponado com ácido sulfônico morfolinepropano (MOPS) (Sigma) para os testes de microdiluição.

5.9.6.4 Origem dos microrganismos

Avaliou-se a atividade antifúngica dos extratos brutos de *P. paniculata* e *P. pulchella* juntamente com alguns compostos isolados frente a vários microrganismos. Avaliou-se o potencial antifúngico dos extratos através do método da concentração inibitória mínima (CIM) frente a microrganismos padrões como *Candida albicans* (Ca) ATCC 18804, *Candida krusei* (Ck) ATCC 20298, *Candida tropicalis* (Ct) ATCC 750, *Candida parapsilosis* (Cp) ATCC 22019, *Candida glabrata* (Cg) ATCC 2001, *Sporothrix schenckii* (Ss) ATCC 20679 e *Criptococcus neoformans* (Cn) ATCC 32588. Aplicou-se 20 µL de anfotericina-B a 5 µg/mL como referência.

5.9.6.5 Preparo do inóculo

Repicou-se em estrias as amostras para as espécies de *Cândida*, 24 horas antes da realização dos testes e para *C. neoformans*, 48 horas em Ágar Saboraud mantidas à 35°C.

Para se obter as células na fase leveduriforme, cultivou-se o fungo *S. schenckii* em BHI a 37°C por um período de 4 a 6 dias.

Para o teste de microdiluição ressuspendeu-se as amostras com o auxílio de uma alça de Henle em solução fisiológica esterilizada, homogeneizada em vórtex e ajustadas à turbidez de 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. A partir deste inóculo fez-se diluições 1:50 e 1:20, correspondendo a um inóculo de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL para as amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*. Para o *S. schenckii* fez-se apenas a diluição 1:50, correspondendo a $1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ UFC/mL.

Para os testes de bioautografia preparou-se a suspensão fúngica em caldo Saboraud de modo a se obter $0,2-1 \times 10^5$ UFC/mL.

5.9.6.6 Método de Triagem: bioautografia direta

Dissolveu-se os extratos (100 µg/mL) em DMSO ou hexano, e aplicou-se alíquotas de 20 µL em placas de cromatografia de camada delgada (CCD) (placas de gel de sílica 60F₂₅₄; Merck). Entre os pontos de aplicação das substâncias e/ou da margem da placa de CCD manteve-se distância mínima de 2,5 cm. Como referência aplicou-se 20 µL de anfotericina-B a 5 µg/mL (Gomes e Resende, 1992). Para o teste de toxidez, aplicou-se somente o solvente utilizado (20 µL). Após a aplicação dos produtos a serem testados, mergulhou-se as placas de CCD por 5 segundos duas vezes consecutivas no inóculo fúngico, preparado conforme descrito anteriormente. Colocou-se as placas de CCD dentro de placas de Petri

estéreis. Acondicionou-se os sistemas assim montados em caixas plásticas contendo um Bécker com algodão embebido em água destilada. Vedou-se hermeticamente as caixas e levou-se à estufa a uma temperatura de aproximadamente 35° C por 48 h para as espécies de *Candida* e *C. neoformans*, e 72 h para *S. schenckii*. Para a leitura, após a incubação, borrifou-se as placas de CCD com solução de INT (sal de *p*-iodonitrotetrazolium Violet) e incubou-se novamente por 4 h a 36± °C. Conduziu-se os experimentos em duplicata. Mediu-se o diâmetro dos halos de inibição e expressou-se os resultados como média de duas repetições, em milímetros (Nostro et al., 2000).

5.9.6.7 Método de Microdiluição para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Dissolveu-se os extratos e substâncias puras em 200 µL do solvente específico para cada caso, sendo após, adicionados a 1800 µL de RPMI (meio de cultivo sintético). Posteriormente, fez-se diluições seriadas dos produtos naturais usando como diluente o próprio RPMI, e manteve-se o volume constante de 1000 µL em cada tubo. Assim, testou-se as substâncias em oito concentrações que variaram de 1000 a 7,8 µg/mL. De cada diluição, distribuiu-se alíquotas de 100 µL em orifícios da placa de microdiluição. Como controle de crescimento e de esterilidade usou-se somente o RPMI sem a adição do extrato e solvente. Como controle de toxidez do solvente usou-se o meio de cultura juntamente com o solvente. Como controle positivo usou-se o RPMI adicionado de anfotericina-B. As concentrações usadas do antifúngico de referência variaram, desta forma, de 0,12 a 64,0 µg/mL. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento receberam 100 µL do inóculo microbiano. Incubou-se as placas e leu-se após 48 horas para as amostras de *Candida* spp. e 72 horas para *C. neoformans* e *S. schenckii*, a temperatura de a 35 °C (Johann, 2003).

Considerou-se as CIMs como a menor concentração do produto natural ou antifúngico que inibiu o crescimento do microrganismo, em relação ao controle de crescimento, após a incubação, expressou-se em µg/mL.

5.9.7 Avaliação da atividade biológica dos compostos isolados de *P. paniculata* e análogos estruturais da febalosina através do bioensaio com *Artemia salina* Leach

Testou-se os extratos brutos e os compostos isolados de *Polygala paniculata* assim como os derivados da febalosina (**2**) segundo o teste de toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS).

Mediu-se a toxicidade dos extratos brutos e compostos em solução de água marinha com 1% de tween 80 (v/v). Transferiu-se aproximadamente 6-10 larvas de *Artemia salina* para cada cavidade de uma placa de 24 poças contendo solução salina e o respectivo composto a ser testado em diferentes concentrações (20 a 200 µg/mL) para os compostos e 100 a 1000 µg/mL para os extratos brutos conforme apresentado na Figura 5-4. Após 24 horas de contato, contou-se os animais mortos. Obteve-se a DL₅₀ através do gráfico da % de animais mortos em função do logaritmo da dose testada. Como controle negativo utilizou-se o solvente onde diluiu-se os compostos (H₂O), e como controle positivo utilizou-se K₂Cr₂O₇ cuja DL₅₀ ~ 20-40 µg/mL. Fez-se o teste em triplicata e considerou-se tóxicas, as amostras que apresentaram DL₅₀ < 1000 µg/mL.

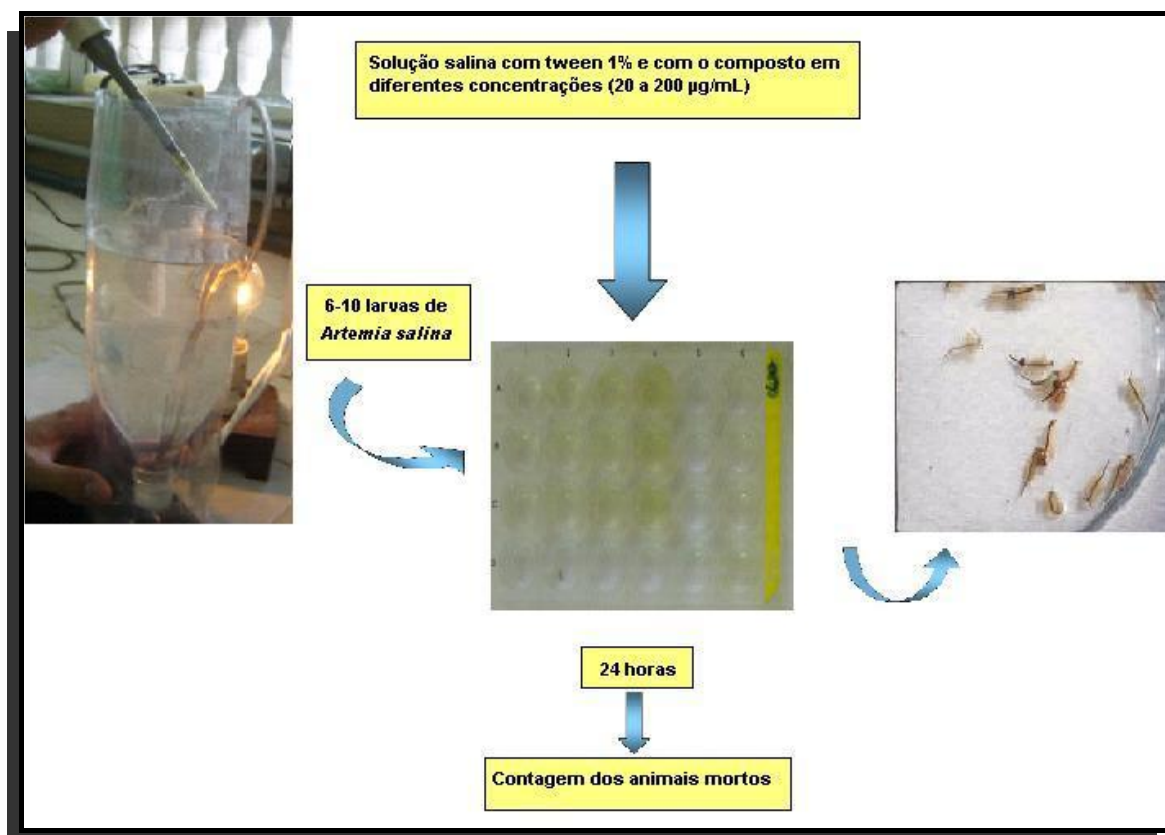


Figura 5-4 - Monitoramento dos compostos através do bioensaio com *Artemia salina* L.

Polygala pulchella

5.10 Atividades biológicas de *P. pulchella*

5.10.1 Animais e tratamento

Utilizou-se camundongos Suíços, machos, provenientes do biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí, com 3 a 3,5 meses de idade e peso entre 35 - 40 g, mantidos em ambiente com temperatura de 23 ± 1 °C, com ciclo de luz, claro/escuro, de 12 h (luz ligada às 6 h), tendo livre acesso à água e comida. Aclimatizou-se os animais no Laboratório de Farmacologia por pelo menos 1 hora antes do teste.

5.10.2 Atividade ansiolítica no modelo labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado (LCE) é um aparelho feito de madeira, elevado 56 cm do chão, constituído por dois braços abertos (30 x 5 cm) e dois braços fechados (30x5x30cm), opostos entre si com uma proteção de acrílico com 0,5 cm de altura ao redor dos braços abertos, para minimizar a queda dos animais. Manteve-se o aparelho em uma sala parcialmente escura, iluminada com luz vermelha da intensidade de 44 lux. Colocou-se os animais em uma arena de madeira antes de ir para o LCE, em forma de um campo aberto quadrado (40 x 40cm) por cinco minutos para se habituarem com o ambiente do teste. Colocou-se os animais no LCE (no centro do aparelho voltado para um dos braços fechados) durante 5 minutos para o registro das medidas comportamentais que consiste em verificar a frequência de entrada nos braços abertos (FEA) e fechados (FEF) e o tempo de permanência nos braços abertos (TPA) e fechados (TPF). Calculou-se as porcentagens das frequências de entradas nos braços abertos (%FEA) e o tempo de permanência nos braços abertos (%TPA).

Tratou-se cada grupo de 10 animais, com extrato bruto etanólico (EBEtOH; 25,0; 50,0 ou 100,0 mg/kg intraperitoneal) (i.p.), extrato bruto acetato de etila (EBAcOEt; 25,0; 50,0 ou 100,0 mg/kg i.p.) e extrato bruto diclorometano (EBCH₂Cl₂; 25,0; 50,0 ou 100,0 mg/kg i.p.) de *Polygala Pulchella* e o grupo controle com a solução de NaCl 0,9% (salina). Trinta minutos após as injeções, manteve-se os animais na arena de madeira por cinco minutos. Em seguida, testou-se todos os animais durante 5 minutos no labirinto em cruz

elevado (LCE). Mediu-se a porcentagem das freqüências de entradas (%FEA) e a porcentagem do tempo de permanência (%TPA) no lado aberto do LCE. Utilizou-se o Diazepam (DIZ; 3,0 mg/kg i.p.) como controle positivo para todos os experimentos.

5.10.3 Atividade antidepressiva

5.10.3.1 Teste do nado forçado

Para a avaliação do efeito antidepressivo do EB_{EtOH}, EB_{AcOEt}, e EB_{CH₂Cl₂} de *Polygala Pulchella*, administrou-se via intraperitoneal (i.p.) o extrato ou a solução de NaCl 0,9% (salina). Trinta minutos após as injeções, avaliou-se o tempo de imobilidade dos camundongos durante um período de 6 minutos, em um cilindro plástico de 10 cm de diâmetro e 24 cm de altura contendo 19 cm de altura de água a temperatura de 25 °C ± 1 °C de acordo com o método descrito por Porsolt et al., 1977.

5.10.3.2 Teste da suspensão da cauda no modelo do nado forçado

Para a avaliação do efeito antidepressivo do EB_{EtOH}, EB_{AcOEt}, e EB_{CH₂Cl₂} de *Polygala Pulchella*, administrou-se via intraperitoneal (i.p.) o extrato ou a solução de NaCl 0,9% (salina) e trinta minutos após as injeções, isolou-se acústica e visualmente os camundongos. Fixou-se os animais com fita adesiva na extremidade da cauda pelo menos 50 cm acima do chão. Avaliou-se o tempo de imobilidade durante um período de 6 minutos de acordo com o método descrito por Steru et al., 1985.

Tratou-se os animais (grupos de 10) com extrato bruto etanólico EB_{EtOH} (25,0; 50,0 ou 100,0 mg/kg i.p.), EB_{AcOEt} (25,0; 50,0 ou 100,0 mg/kg i.p.) e EB_{CH₂Cl₂} (25,0; 50,0 ou 100,0 mg/kg i.p.) de *Polygala Pulchella* e o grupo controle com salina (S). Trinta minutos após as injeções, testou-se todos os animais durante 6 minutos no teste do nado forçado (TNF) ou teste da suspensão da cauda (TSC) e mediu-se o tempo de imobilidade. A imipramina (IMP; 15,0 mg/kg i.p.) foi utilizado como controle positivo para todos os experimentos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Como resultado do estudo fitoquímico e das propriedades biológicas realizadas com extratos, compostos isolados e análogos sintéticos das espécies *P. paniculata* e *P. pulchella* pode-se concluir que:

1) De *P. paniculata* isolou-se e identificou-se 10 compostos: aurapteno (**1**), febalosina (**2**), espinasterol (**8**), rutina (**9**), 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (**10**) e 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**), já descritos na espécie. Os compostos 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3',3,2)-xantona (**12**), 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**) e 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**), foram isolados e identificados pela primeira vez na espécie *P. paniculata*. O composto 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3',1,2)-xantona (**14**) é uma estrutura nova na literatura. Os resultados estão de acordo com os estudos quimiotaxonômicos do gênero *Polygala* que é caracterizado pela biossíntese de xantonas.

2) Os constituintes voláteis das flores e raízes *P. paniculata*, extraídos individualmente por SPME e analisados por CG-EM e índice de retenção, tiveram a seguinte distribuição: nas flores caracterizou-se 25 compostos representando 98,69% do total dos constituintes voláteis sendo, portanto, acetato de bornila (25,00%), 1,8-cineol (12,45%), pent-2-enal (9,97%), 1-undeceno (9,48%), α -terpineol (6,40%) e α -terpenil acetato (5,35%) os compostos mais abundantes. Nas raízes identificou-se 13 compostos representando 99,67% do total, sendo o salicilato de metila o composto majoritário (89,13%), seguido de 4-metóxi salicilato de metila (3,66%), 3-metóxi salicilato de metila (3,03%), acetato de bornila (1,29%) e 1,8-cineol (0,54%). Esses resultados explicam o uso em aplicações locais do seu extrato alcoólico em torceduras, machucados ou reumatismo das articulações, cujo efeito se explica pela presença do salicilato de metila e seus derivados como ativador da circulação no local da aplicação. Esses compostos foram identificados pela primeira vez na espécie com exceção do salicilato de metila.

3) De *P. pulchella*, foi isolada a xantona 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**) uma estrutura inédita na literatura e a xantona 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**) já descrita no gênero *Polygala*, porém é a primeira vez identificada na espécie *P. pulchella*.

4) O EBEtOH de *P. paniculata* apresentou uma atividade neuroprotetora *in-vivo* contra intoxicação induzida por MeHg. Portanto, os testes *in vitro* não apresentaram possíveis efeitos quelantes do extrato. Esses resultados reforçam a idéia de que o efeito protetor de *P. paniculata* esta relacionado com as propriedades antioxidantes dos compostos presentes no EBEtOH, sobretudo as xantonas.

5) O EBEtOH de *P. paniculata* apresentou atividade antinociceptiva nos modelos de nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético, nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina e nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Avaliando a atividade antinociceptiva dos compostos isolados febalosina (**2**), aurapteno (**1**) e rutina (**9**) foram obtidos importantes resultados. A rutina administrada i.p. foi capaz de reverter a nocicepção induzida pelo glutamato significativamente e de forma dose-dependente, caracterizando-se pelo composto que apresentou a melhor atividade. Além disso, o EBEtOH apresentou atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina.

6) O EBEtOH apresentou atividade gastroprotetora, reduzindo o índice de úlceras na mucosa causado pela administração oral de etanol 70%. O extrato foi administrado pelas vias oral e intraperitoneal, sendo que a proteção está relacionada ao aumento da produção de muco gástrico, um fator de proteção da mucosa gástrica, e não da inibição de um fator agressor como a produção de ácido gástrico, sendo este, o mecanismo comum aos medicamentos mais empregados para o tratamento de úlceras gástricas atualmente.

7) A ação antifúngica no modelo da concentração inibitória mínima (CIM) do extrato hexânico (EH) de *P. paniculata* apresentou resultados significativos frente à quase todos os fungos testados (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Sporothrix schenckii* e *Cryptococcus neoformans*), podendo-se destacar a CIM de 60 mg/mL para *C. tropicalis* e de 125 mg/mL para *C. neoformans*. Já os compostos isolados, o espinasterol (**8**) foi o mais promissor apresentando uma CIM de 60 mg/mL para *Candida tropicalis* e *Sporothrix schenckii*, seguido da rutina (**9**) que apresentou boa atividade para *Cryptococcus neoformans* com uma CIM de 60 mg/mL.

8) Dos extratos brutos de *P. paniculata* submetidos ao bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina* (TAS), o EBDM apresentou melhor resultado com uma DL₅₀ de 776,25 ppm seguido do EBEtOH (DL₅₀ de 954,65 ppm) e EBAcOEt 975,25 ppm, no método A. Tanto o EH (extrato hexânico, DL₅₀ 741,31 ppm) quanto o EBEtOH (DL₅₀ 776,24 ppm) obtidos pelo método B, apresentaram atividade moderada. Dos compostos isolados considerou-se todos os compostos ativos, sendo o composto de maior atividade a 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**) com uma DL₅₀ de 86,93 ppm, seguido da febalosina (**2**) com uma DL₅₀ de 88,49 ppm. No entanto, houve uma diminuição da atividade nos análogos estruturais da febalosina (**2**).

9) A espécie *P. pulchella* apresentou uma provável ação ansiolítica para o EBEtOH e EBAcOEt no modelo do labirinto em cruz elevado. Apresentou também ação antidepressiva para o EBEtOH e EBDM nos modelos do teste do nado forçado e suspensão da cauda.

10) A ação antifúngica no modelo da concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos de *P. pulchella* não houve inibição significativa frente aos fungos testados (*Candida albicans*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Sporothrix schenckii* e *Criptococcus neoformans*). Apenas as flores apresentaram resultados moderados frente ao fungo *S. schenckii* e o extrato bruto diclorometano (EBDM) que apresentou uma CIM de 125 µg/mL para *Criptococcus neoformans*.

11) Dos extratos brutos de *P. pulchella* submetidos ao bioensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, o extrato aquoso das flores foi o único ativo com uma DL₅₀ de 371,53 ppm. Os demais extratos foram considerados inativos por possuírem TAS > 1000 ppm.

Os resultados deste trabalho em conjunto com os dados descritos na literatura, mostram nitidamente que as plantas medicinais são fontes de uma variedade de compostos com potencial atividade biológica que poderão dar origem ou servir de protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos e/ou fitofármacos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R. **Identification of essential oil components by gas chromatographic / mass Spectroscopy**. Allured Publishing, 1995.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. **Afferent pain pathways: a neuroanatomical review**. *Brain Res.*, 1000, 2004, p. 40-56.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. **Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies**. *Food Chemistry*, 84, 4, 2004, p. 551-562.
- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. **"Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers"**, *Anal. Chem.*, 62, 1990, p. 2145-2148.
- ARTHUR, C.L. et al., **"Solid-Phase Microextraction: An Attractive Alternative"**, *Environmental Lab.*, 11, 1992, p. 10-15.
- ASANO, J. et al., **Citotoxic xanthenes from *Garcinia hamburyi***. *Phytochemistry*, 41, 1996, p. 815-820.
- ASFAW, N. et al., **Coexistence of chrysanthenone, filifolone and (Z)-isogeranic acid in hydrodistillates. Artifacts**. *Phytochemistry*, 58, 2001, p. 489-492.
- ATKINSON, J.E.; GUPTA, P.; LEWIS, J.R. **Benzophenone participation in xanthone biosynthesis**. *Chem. Commun.*, 1968, 1386p.
- BAYMA, J.C.; ARRUDA, M.S.P.; NETO, M.S. **A prenylated xanthone from the bark of *symphonia globulifera***. *Phytochemistry*, 49, 4, 1998, p. 1159-1160.
- BASHIR, A. et al., **Isoflavones and xanthenes from *Polygala virgata***. *Phytochemistry*, 31, 1, 1992a, p. 309-311.
- BASHIR, A. et al., **Biphenyls and a xanthone from *Monnina sylvatica***. *Phytochemistry*, 31, 9, 1992b, p. 3203-3205.
- BEERHUES, L.; BERGER, U. **Xanthenes in cell suspension cultures of two centaury species**. *Phytochemistry*, 35, 5, 1994, p. 1227-1231.
- BEIRITH, A. et al., **Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action**. *Eur. J. Pharmacol.*, 345, 3, 1998, p. 233-245.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. **Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw**. *Brain Res.*, 924, 2002, p. 219-228.
- BOONSRI, S. et al., **Antibacterial and cytotoxic xanthenes from the roots of *Cratoxylum formosum***. *Phytochemistry*, 67, 2006, p. 723-727.

BORTOLUZZI, J.H. **Aplicação da técnica de SPME-GC-MS na determinação dos produtos voláteis gerados na degradação térmica de polímeros.** 155 p. Tese (doutorado em química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

BRADFORD, M.M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem., 72, 1976, p. 248-254.

BURKHARDT, W. et al., **Biphenyls and xanthenes from the Podostemaceae.** Phytochemistry, 31, 2, 1992, p. 543-548.

CAMPOS, O.P. et al., **Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae).** Life Sciences, 59, 16, 1997, p. 1599-1630.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. **Glutathione reductase.** Methods Enzymol, 113, 1985, p. 484-490.

CERVELLATI, R. et al., **Polyphenols from *Polygala* spp. And their Antioxidant Activity.** Chemistry & Biodiversity, 1, 3, 2004, p. 415-425.

CHEN, Y.J. et al., **Effect of *Polygala tenuifolia* root on behavioral disorders by lesioning nucleus basalis magnocellularis in rat.** Journal of Ethnopharmacology, 95, 1, 2004, p. 47-55.

CLARKSON, T.W.; STRAIN, J.J. **Nutritional factors may modify the toxic action of methyl mercury in fish-eating populations.** J. Nutri., 133, 2003, p. 1539s-1543s.

CORNE, S.J.; MORRISEY, S.M.; WOODS, R.J. **A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus.** Journal of Physiology, 224, 1974, p. 116-117.

COUTAUX, A. et al., **Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms.** Joint Bone Spine, 72, 2005, p. 359-371.

CRISTIANO, R. et al., **Two xanthenes from *Polygala paniculata* and Confirmation of the 1-Hidroxy-2,3,5-trimetoxy-xanthone at Trace Level by HRGC-MS.** Zeitschrift fur Naturforsch, 58c, 2003, p. 490-494.

CYONG, J.C. et al., **Clinical and pharmacological studies on liver diseases treated with *Kampo* herbal medicine.** American Journal of Chinese Medicine, 28, 3-4, 2000, p. 351-358.

CUNHA F.Q.; FERREIRA, S.H. **Peripheral hyperalgesic cytokines.** Adv. Exp. Méd. Biol., 521, 2003, p. 22-39.

DAVIS, A.J.; PERKINS, M.N. **The involvement of bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms in cytokine-induced mechanical hyperalgesia in the rat.** Br. J. Pharmacol., 113, 1994, p. 63-68.

DJAHANGUIRI, B. **The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat.** Scandinavian Journal of Gastroenterology, 4, 1969, p. 265.

DALL'ACQUA, S. et al., **Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*.** Chiminal & Pharmaceutical Bulletin, 50, 11, 2002, p. 1499-1501.

- DALL'ACQUA, S. et al., **Xanthenes from *Polygala alpestris* (Rchb)**. Zeitschrift für Naturforsch C-A Journal of biosciences, 59, 5-6, 2004, p. 335-338.
- DALMARCO, E.M.; FRODE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. **Effects of methotrexate upon inflammatory parameters induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy**. Mediators Inflamm, 11, 2002, p. 151-157.
- DRAY, A. **Peripheral mediators of pain**. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. The pharmacology of pain. Berlin: Springer-Verlag, 130, 1997, p. 21-41.
- DUARTE, F.S. et al., **Participation of dihydrostyryl-2-pyrone and styryl-2-pyrone in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic**. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 86, 2007, p. 150-161.
- DUHAM, N.W.; MIYA, T.S. **A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice**. J. Am. Pharm. Assoc., 46, 1957, p. 208-209.
- EGASHIRA, N. et al., **Antagonistic effects of methanolic extract of *Polygala telephioides* on morphine responses in mice**. Journal of Ethno-Pharmacology, 2005.
- ELIZABETISKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. **Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian perspective**. J. Ethnopharmacol., 51, 1996, p. 111-120.
- ELLIS, R.C.; WHALLEY, W.B.; BALL, K. **Biogenetic-type syntheses of xanthenes**. Chem. Commun., 16, 1967, p. 803-804.
- ELLMAN, G.L. **Tissue sulphhydryl groups**. Arch. Biochem. Biophys., 82, 1959, p. 70-77.
- FARINA, M. et al., **Ebselen protects against methylmercury-induced inhibition of glutamate uptake by cortical slices from adult mice**. Toxicol. Lett, 144, 2003, p. 351-357.
- FARINA, M. et al., **Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice**. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 57, 2005, p. 1-6.
- FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. **A role for a systemic, spinal and supraspinal L-arginine – nitric oxide – cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice**. Neuropharmacol., 38, 1999, p. 835-842.
- FRANKE, R. et al., **Theoretical drug design methods**. Pharmacochimistry, Elsevier, 7, 1984, 412 p.
- FUJITA, M.; INOUE, T. **Further studies on the biosynthesis of mangiferin in *Anemarrhena asphodeloides*: hydroxylation of the shikimate-derived ring**. Phytochemistry, 20, 1981, p. 2183-2185.
- FUJITA, T. et al., **Xanthenes from *Polygala tenuifolia***. Phytochemistry, 31, 11, 1992, p. 3997-4000.
- FUKAI, T. et al., **Antimicrobial activity of isoprenoid-substituted xanthenes from *Cudrania cochinchinensis* against vancomycin-resistant enterococci**. Phytomedicine, 12, 2005, p. 510-513.

- GHOSAL, S.; CHAUDHURI, R.K. **Chemical constituents of Gentianaceae. Antitubercular activity of xanthones of *Canscora decussate* Schult.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 64, 1975, p. 888-889.
- GHOSAL, S.; BISWAS, K.; CHAUDHURI, R.K. **Anti Mycobacterium tuberculosis activity of naturally occurring xanthones and synthetic analogs.** Journal of Pharmaceutical Sciences, 67, 1978, 1978p.
- GHOSAL, S. et al., **1,2,3-trioxygenated glucosyloxyxanthones from *Polygala triphylla*.** Phytochemistry, 20, 3, 1981, p. 489-492.
- GHATE, M. et al., **Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivatives.** European Journal of Medicinal chemistry, 40, 2005, p. 882-887.
- GNERRE, C. et al., **Natural and synthetic xanthones as monoamine oxidase inhibitors: biological assay and 3D-DSAR.** Helvetica Chimica Acta, 84, 2001, p. 552-570.
- GOMES, M.H.R.; RESENDE, M.A. **Fonsecae pedrosoi: lipid composition and determination of susceptibility to amphotericin B.** Canadian journal of microbiology, 38, 1992, p. 209-214.
- GONZALEZ, A.M. **Morfologia de plantas vasculares.** Disponível através do site: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema13/13-3paredepid.htm>. Acesso em: 27 Setembro 2007.
- GRIMM, E.L. et al., **Substituted coumarins as potent 5-lipoxygenase inhibitors.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 16, 2006, p. 2528-2531.
- GUPTA, P.; LEWIS, J.R. **Biogenesis of xanthones in *Gentiana lutea*.** J. Chem. Soc C, 1971, p. 629-631
- HADDAD, M. et al., **New acylated saponins from *Polygala myrtifolia*.** Helvetica Chimica acta, 86, 9, 2003, p. 3055-3065.
- HAMBURGER et al., **A new pyranocoumarin diester from *Polygala paniculata* L.** Helvetica Chimica Acta, 1984, 67, 7, p. 1729-1733.
- HAMBURGER, M.; Gupta, M.; Hostettmann, K. **Coumarins from *Polygala paniculata*.** Planta Médica, 1985, p. 215-217.
- HERBERT, R.B. **The biosynthesis of secondary metabolites.** 2° ed., 1989, 2p.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. **The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.** Pain, 30, 1987, p. 103-114.
- HUSSAIN, N.; LEONARD, J. **Total synthesis of specionin – natural product or artifact?** Tetrahedron Letters, 42, 1987, p. 4871-4874.
- ITO, C. et al., **Anti-tumor-promoting effects of 8-substituted 7-methoxycoumarins on Epstein-Barr virus activation assay.** 138, 1-2, 1999, p. 87-92.

- JANTAN, I.; JURİYATI, J.; WARIF, N.A. **Inhibitory effects of xanthenes on platelet activating factor receptor binding *in vitro***. Journal of ethnopharmacology, 75, 2001, p. 287-290.
- JIA, H.X. et al., **Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid beta-protein in cultured cells**. Neuroscience Letters, 367, 1, 2004, p. 123-128.
- JIANG, Y.; TU, P-F. **Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia***. Phytochemistry, 58, 2002, p. 813-816.
- JIANG, D. et al., **Relationship between protective effect of xanthone on endothelial cells and endogenous nitric oxide synthase inhibitors**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11, 2003, p. 5171-5177.
- JOHANN, S. **Atividade antimicrobiana de flavonoides polimetoxilados isolados de frutos cítricos**. Dissertação de Mestrado, UFSC, 2003, 97p.
- KAKO, M. et al., **Hipoglycemic activity of some triterpenoid glycosides**. Journal of Natural Products, 60, 6, 1997, p. 604-605.
- KAWASHIMIRA, K. et al., **Anti-stress effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia***. Biological & Pharmaceutical bulletin, 27, 8, 2004, p. 1317-1319.
- KOBAYASHI, S.; MIYASE, T.; NOGUCHI, H. **Polyphenolic glycosides and ligosaccharide multiesters from the roots of *Polygala dalmatiana***. Journal of Natural Products, 65, 3, 2002, p. 319-328.
- KOU, J. et al., **Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract**. Fitoterapia, 77, 2006, p. 411-415.
- LALL, N.; MEYER, J.J. **In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants**. Journal of Ethnopharmacology, 66, 3, 1999, p. 347-354.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. **Animals models of nociception**. Pharmacol., Rev., 53, 4, 2001, p. 597-652.
- LEE, B.W. et al., **Antioxidant and cytotoxic activities of xanthenes from *Cudrania tricuspidata***. Bioorganic & Medicinal Chem. Letters, 15, 2005, p. 5548-5552.
- LEE, H.J. et al., ***Polygala radix* extract protects cultured rat granule cells against damage induced by NMDA**. American Journal of Chinese Medicine, 32, 4, 2004, p. 599-610.
- LEWIS, J.R. **Biogenetic type syntheses of the xanthone nuclear**. Proc. Chem. Soc., 1965, 373p.
- LI, W. et al., **Xanthenes from *Polygala caudata***. Phytochemistry, 51, 7, 1999, p. 953-958.
- LIN, C.N. et al., **Xanthone derivatives as potential anti-cancer drugs**. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 48, 5, 1996, p. 539-544.

- LIN, L.L. et al., **Xanthones from the roots of *Polygala caudate* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro**. *Planta Médica*, 71, 2005, p. 372-375.
- LIU, Y. et al., **Synthesis and pharmacological activities of xanthone derivatives as α -glucosidase inhibitors**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2006.
- LIOU, S.S. et al., **Gamma pyrone compones as potencial anti-cancer drugs**. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 45, 9, 1993, p. 191-194.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil**. São Paulo, 2002, 386p.
- LÜDTKE, R. **O Gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. Dissertação de mestrado, 2004, 101p.
- MA, W.Z. et al., **New phenolic from *Polygala fallax***. *Journal of Natural Products*, 66, 3, 2003, p. 441-443.
- MAHESWARA, M. et al., **A solvent-free sintesis of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalist**. *Journal of Molecular Catalysis*, 255, 2006, p. 49-52.
- MAIA, F. et al., **The binding of xanthone derivatives to transthyretin**. *Biochemical Pharmacology*, 70, 2005, p. 1861-1869.
- MAK, N.K. et al., **Expression of protein Kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells**. *Planta Medica*, 67, 95, 2001, p. 400-405.
- MANOLOV, I. et al., **Sintesis, structure, toxicological and pharmacological investigations of 4-hydroxycoumarin derivatives**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2006.
- MARKHAM, K.R. **Gentian pigments-III penta-oxygenated xanthones from *Gentiana bellidifolia***. *Tetrahedron*, 21, 12, 1965, p. 3687-3695.
- MARKHAM, K.R. **^{13}C NMR of Flavonoids-II. Flavonoids other flavone and flavonol aglycones**. *Tetrahedron*, 32, 1976, p. 2607-2612.
- MARQUES, M.C.M. **Estudo taxonômico do gênero *Polygala* L. Subgênero *Ligustrina* Paiva (Polygalaceae)**. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, UFRJ, 2003, 139p.
- MARSTON, A. et al., **Xanthones from *Polygala nykensis***. *Phytochemistry*, 33, 4, 1993, p. 809-812.
- MEOTTI, F.C. et al., **Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-1-2pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice**. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 58, 1, 2006, p. 107-112.
- MESIA-VELA, S. **Mecanismos das ações anti-secretora ácida e antiúlcera gástrica de princípios isolados do gervão-roxo (*Starchytarpheta cayennensis* Vahl)**. Tese de Doutorado em Farmacologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), 1998.

- MEYER, B.N. et al., **Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents.** *Planta Medica*, 1982, 45, p. 31-36.
- MITAINE-OFFER, A.C. et al., **New acylated triterpene saponins from *Polygala arenaria*.** *Helvetica Chimica Acta*, 86, 7, 2003, p. 2404-2413.
- MOTSEI, M.L. et al., **Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*.** *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 2-3, 2003, p. 235-241.
- MURRAY, R.D.H. **Coumarins.** *Natural Products Reports*, 5, 1995, p. 477-505.
- MISSAU, F.C. et al., **Compostos voláteis das flores e raízes de *Polygala paniculata* por SPME.** XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Salvador, Bahia, setembro de 2006.
- NAIDU, M. et al., **Analysis of the action of euxanthone, a plant-derived compound that stimulates neurite outgrowth.** *Neuroscience*, 148, 2007, p. 915-924.
- NGUYEN, L. et al., **Xanthones from the bark of *Garcinia merguensis*.** *Phytochemistry*, 63, 4, 2003, p. 467-470.
- NAKATANI, N.; YAMADA, Y.; FUWA, H. **7-Geranyloxy coumarin from juice oil of Hassaku (*Citrus hassaku*) and antimicrobial effects of Related Coumarins.** *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2, 1987, p. 419-423.
- NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. **Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002.** *J. Nat. Prod.*, 66, 2003, p. 1022-1037.
- NGOUELA, S. et al., **Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f.** *Phytochemistry*, 67, 2006, p. 302-306.
- NGUYEN, L.D. et al., **Xanthones from the bark of *Garcinia merguensis*.** *Phytochemistry*, 63, 2003, p. 467-470.
- NKENGFACK, A.E. et al., **A prenylated xanthone from *Allanblackia floribunda*.** *Phytochemistry*, 60, 2002, p. 381-384.
- NOSTRO, A.G.M.P. et al., **Extraction methods and bioautography of medicinal plant antimicrobial activity.** *Letters in Applied Microbiology*, 30, 5, 2000, p. 379-84.
- OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Ana. Biochem.*, 95, 1979, p. 351-358.
- OLLIS, W. D. et al., **Constitution of gambogic acid.** *Tetrahedron*, 21, 6, 1965, 1453p.
- PACHUTA, R.R. et al., **Antineoplastic agents from higher plants: application of tander mass spectroscopy to xanthones from *Psorospermum febrifugum*.** *Journal of Natural Products*, 49, 3, 1986, p. 412-423.
- PARK, C.H. et al., **Novel cognitive improving and neuroprotective activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11.** *J. Neurosci. Res.* 70, 2002, p. 484-492.

- PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction: Theory and Practice**; Wiley; New York 1997, p. 46.
- PERES, V.; NAGEN, T.J. **Naturally occurring pentaoxygenated, hexaoxygenated and dimeric xanthenes: a literature survey**. *Química Nova*, 20, 4, 1997, p. 388-397.
- PERMANA, P.A. et al., **Mechanism of action of the antileukemic xanthone psorospermim: DNA strand breaks, abasic sites, and protein-DNA cross-links**. *Cancer Res.*, 54, 12, 1994, p. 3191-3195.
- PINHEIRO, T.R. **Isolamento, identificação e avaliação do potencial farmacológico dos constituintes de *Polygala cyparissias* ST. Hill & Moq.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, 1996.
- PINHEIRO, T.R. et al., **Three xanthenes from *Polygala cyparissias***. *Phytochemistry*, 48, 4, 1998, p. 725-728.
- PIZZOLATTI, M.G.; LUCIANO, C.; MONACHE, F.D. **Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa***. *Phytochemistry*, 55, 2000, p. 819-822.
- PIZZOLATTI, M.G. et al., **Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae)**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12, 1, 2002, p. 21-26.
- PIZZOLATTI, M.G. et al., **Tripanocidal activity of extract from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species**. *Phytomedicine*, 10, 5, 2003, p. 422-426.
- PIZZOLATTI, M.G. et al., **A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae)**. *Biochemical Systematics and ecology*, 32, 2004, p. 583-586.
- PORSOLT, R.D., BERTIN, A., JALFRE, M. **Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants**. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 229, 1977, p. 327-336.
- RAO, M.S.; RAMAN, N.V. **A novel flavonoid from *Polygala Chinensis***. *Biochemical Systematics and ecology*, 32, 4, 2004, p. 447-448.
- REYES-CHILPA, R. et al., **Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants**. *Journal of Ethnopharmacology*, 105, 2006, p. 167-172.
- ROBERT, A. et al., **Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury**. *Gastroenterology*, 77, 1979, p. 433-443.
- ROCHA, L. et al., **An antifungal gamma-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense***. *Phytochemistry*, 36, 1994, p. 1381-1385.
- RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. **Chronic pain**. *Annu. Rev. Med.*, 49, 1998, p. 123-133.
- SALEH T. S.F., CALIXTO, J.B. , MEDEIROS, Y.S. **Proinflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy**. *Eur. J. Pharmacol.*, 331, 1997, p. 43-52.

SAKURADA, T. et al., **The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord.** Neuropharmacology, 31, 1992, p. 1279-1285.

SAKURADA, T. et al., **Involvement of nitric-oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioral responses in the mouse.** Neurochem. Int., 29, 3, 1996, p. 271-278.

SANOFI-AVENTIS, **Tudo sobre ELA (Esclerose lateral amiotrófica).** Disponível através do site: http://www.tudosobreela.com.br/oqueeela/sistemanervoso_04.shtml?sessao=osistema. Acesso em: 07 de outubro de 2007.

SANTOS A.R.S., CALIXTO, J.B. **Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice.** Neurosc. Lett., 235, 1997, p. 73-76.

SANTOS A.R.S. et al., **Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-di-N-propillobelidiol hidrocloreto dihidrato isolado de *Siphocampylus vercillatus*: Evidence for the mechanism of action.** J. Pharmacol. Exp. Therap., 289, 1, 1999, p. 417-426.

SANTOS, A.S. et al., **Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório.** Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento, 2004, p. 1-6, Disponível através do site: <http://www.cpatu.embrapa.br/online/comunicado/com.tec.99.pdf>. Acesso em: 29 de setembro de 2007.

SANTOS, L.C. et al., **Atividade antioxidante de xantonas isoladas de espécies de *Leiothrix* (Eriocaulaceae).** Revista Brasileira de farmacognosia, 13, 2, 2003, p. 67-74.

SCHEIDT, C. et al., **Evidence for the involvement of glutamatergic receptors in the antinociception caused in mice by sesquiterpene drimaniol.** Neur. Pharmacol., 43, 2002, p. 340-347.

SCHEINMANN, F.; SRIPONG, N. **Xanthones from the heartwood of *Calophyllum neobudicum*: comments, on the taxonomic value of jacareubin in *Calophyllum* species.** Phytochemistry, 10, 3, 1971, p. 603-606.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of the inflammation response.** Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol., 18, 3, 2004, p. 385-405.

SHI-MING, D. et al., **New xanthones from *Polygala crotalarioides*.** Chem. Res. Chinese U., 22, 3, 2006, p. 400-402.

SHIN, E.J. et al., **Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference by *Polygala tenuifolia* root extract.** Life sciences, 75, 23, 2004, p. 2751-2764.

SIMÕES, C.M. et al., **Farmacognosia da planta ao medicamento.** 2.ed. Florianópolis/Porto Alegre: 2000, 12p.

SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G. **Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach.** Química Nova, 21, 5, 1998, p. 557-559.

- SKALISZ, L.L.; BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. **Effect of Hypericum perforatum on marble-burying by mice.** Phytot. Res., 18, 5, 2004, p. 399-402.
- STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERY, B.; SIMON, P. **The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice.** Psychopharmacology, 85, 1985, p. 367-370.
- TCHOUNWOU, P.B. et al., **Environmental exposure to mercury and its toxicopathologic implications for public health.** Environ. Toxicol., 18, 2003, p. 149-175.
- THULLA, U. et al., **Substituted xanthenes as selective and reversible monoamine oxidase A inhibitors.** Pharmacological Research, 10, 8, 1993, p.1187-1190.
- USDIN, E. **Monoamine oxidase, basic and clinical frontiers.** Proc Symp. Hakone Japan, Excerpta Medica, 1984, p. 315-354.
- VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. **Microextração por fase sólida.** Química Nova, 23, 2000, p. 523-530.
- WALLACE, J.L. **Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research.** Amer. J. Med., 110, 2001, p.19-23.
- WENDEL, A. **Glutathione peroxidase.** Methods Enzymol. 77, 1981, p. 325-333.
- WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. **Carrageenan-induced edema in hind paw of a rat as an assay for anti-inflammatory drugs.** Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine III. 1962, 544p.
- WIKIMEDIA, **Wikispecies free species directory.** 2006. Disponível em: http://species.wikimedia.org/wiki/Polygala_paniculata. Acesso em: 29 de outubro de 2007.
- WURDACK, J.J.; SMITH, L.B. **Polygalaceae in: REITZ, P.R.** Flora Illustrada Catarinense, 1971, p. 3-70.
- YABE, T. et al., **Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of Kampo (Japanese herbal) medicine, Ninjin-Yoei-To.** Phytomedicine, 10, 2-3, 2003, p. 106-114.
- YASUNAKA, K. et al., **Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes.** Journal of Ethnopharmacology, 97, 2005, p. 293-299.
- IKEYA, Y. et al., **Two xanthenes from *Polygala tenuifolia*.** Phytochemistry, 30, 6, 1991, p. 2059-2065.
- IKEYA, Y. et al., **Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*.** Biological & Pharmaceutical Bulletin, 27, 7, 2004, p. 1081-1085.
- YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Brasileira.** Chapecó: Argos, 2001, p. 13-14; 59-60.

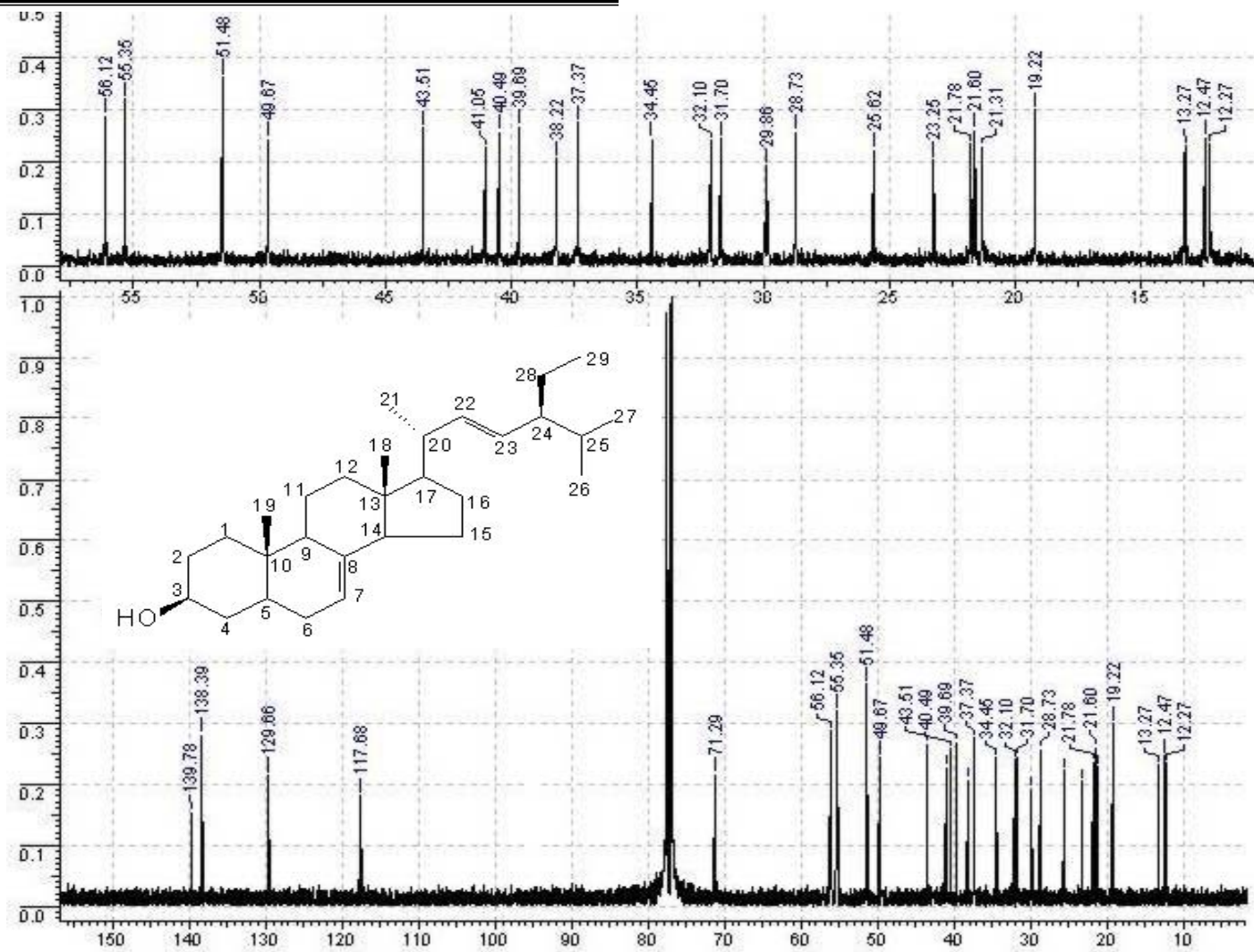
ZAKARIA, M.B.; SAITO, I.; MATSUURA, T. **Coumarins of *Merrillia caloxylon***. *Phytochemistry*, 28, 1988, p. 657-659.

ZHANG, D.M. et al., **Identification of metabolites of reinoside C, a triterpene saponin from the roots of *Polygala fallax***. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese*, 23, 1, 2002, p. 63-67.

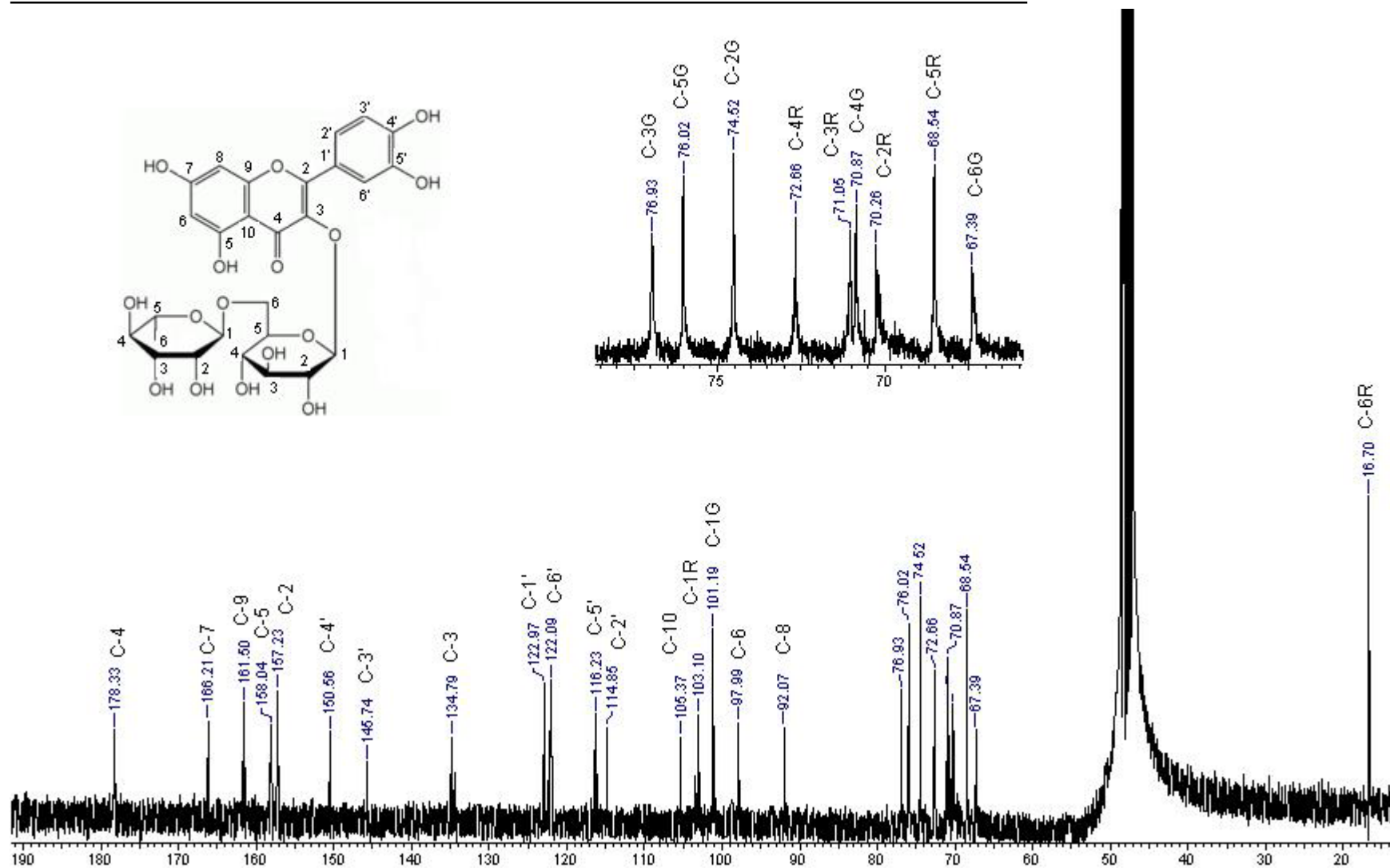
ZHANG, w. et al., **A new cerebroside from *Polygala japonica***. *Phytochemical communication*, 77, 2006, p. 336-337.

ZOMLEFER, W,B. **The University of North Carolina Press**. *Guide to Flowering Plants Families*, 5^a ed., 1994, p. 143-145.

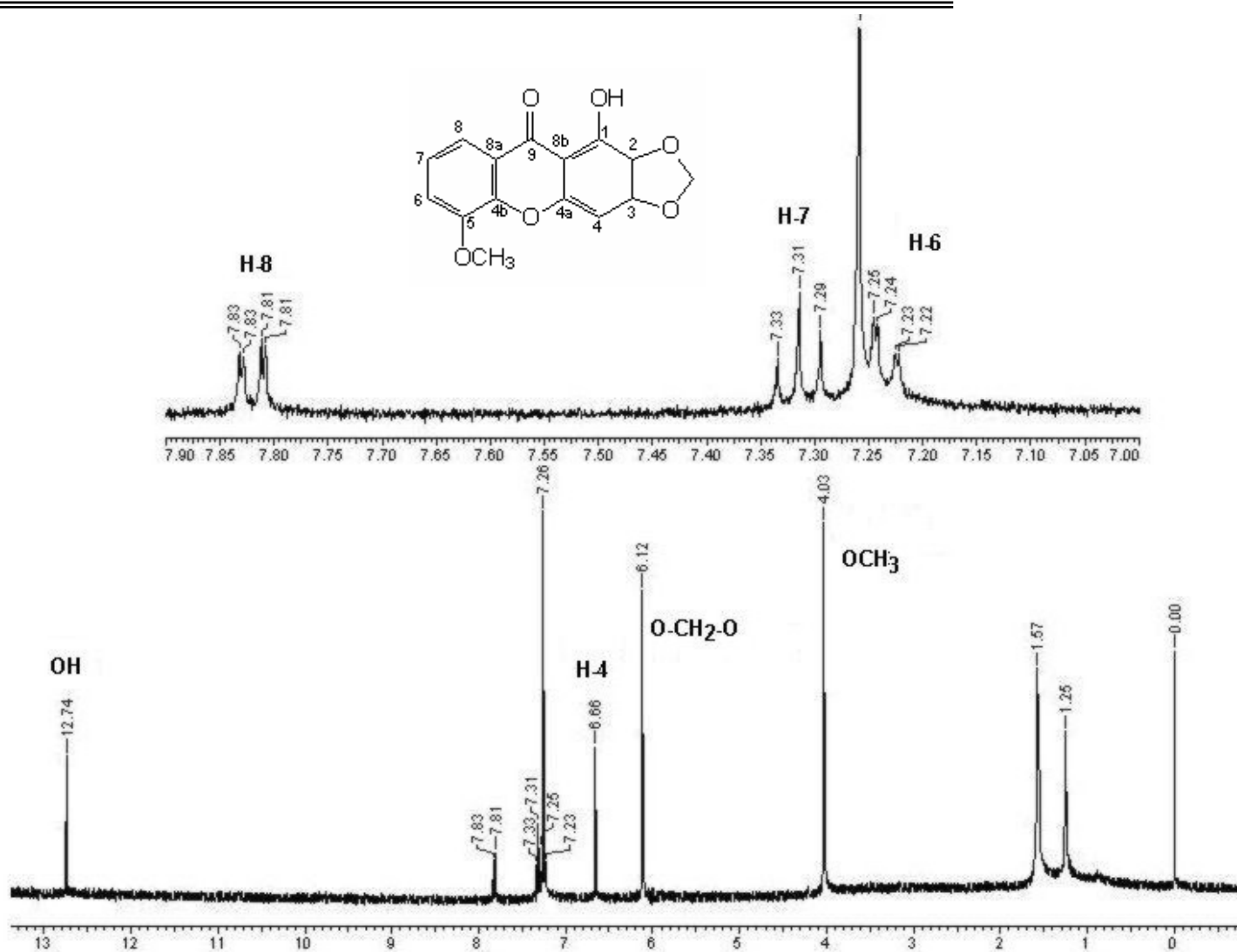
APÊNDICES



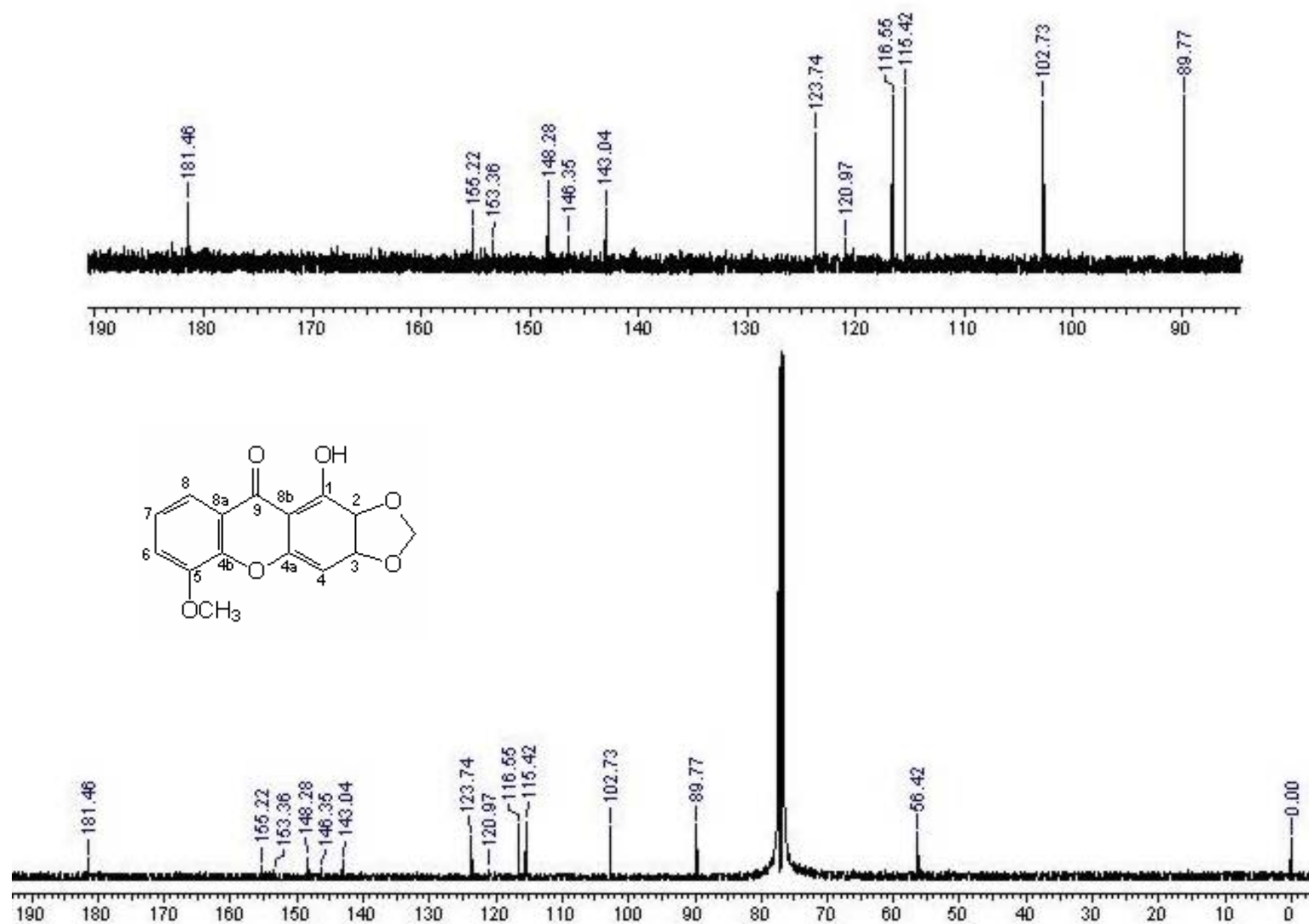
Espectro 1 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do espirosterol (8).



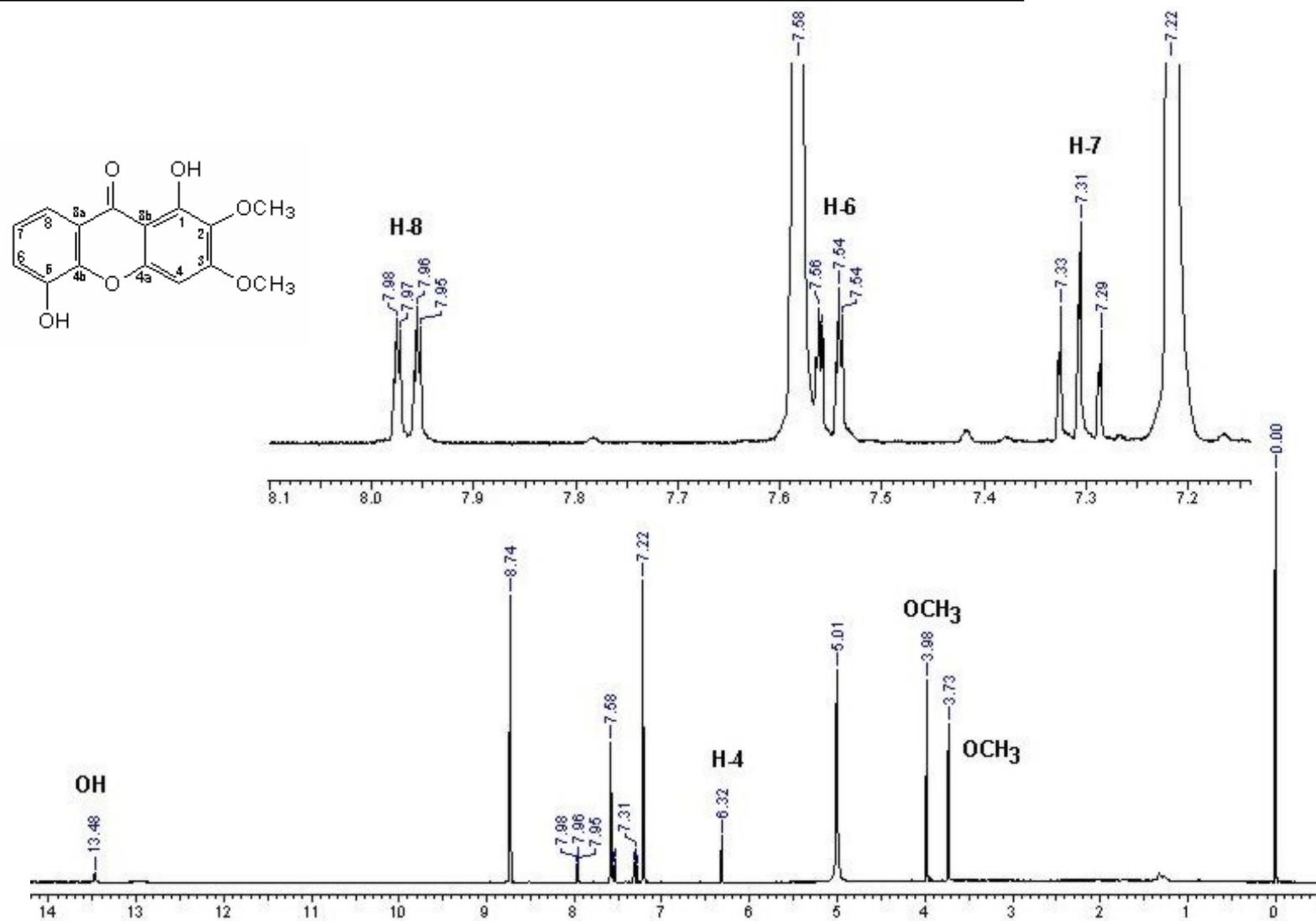
Espectro 2 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) da rutina (9).



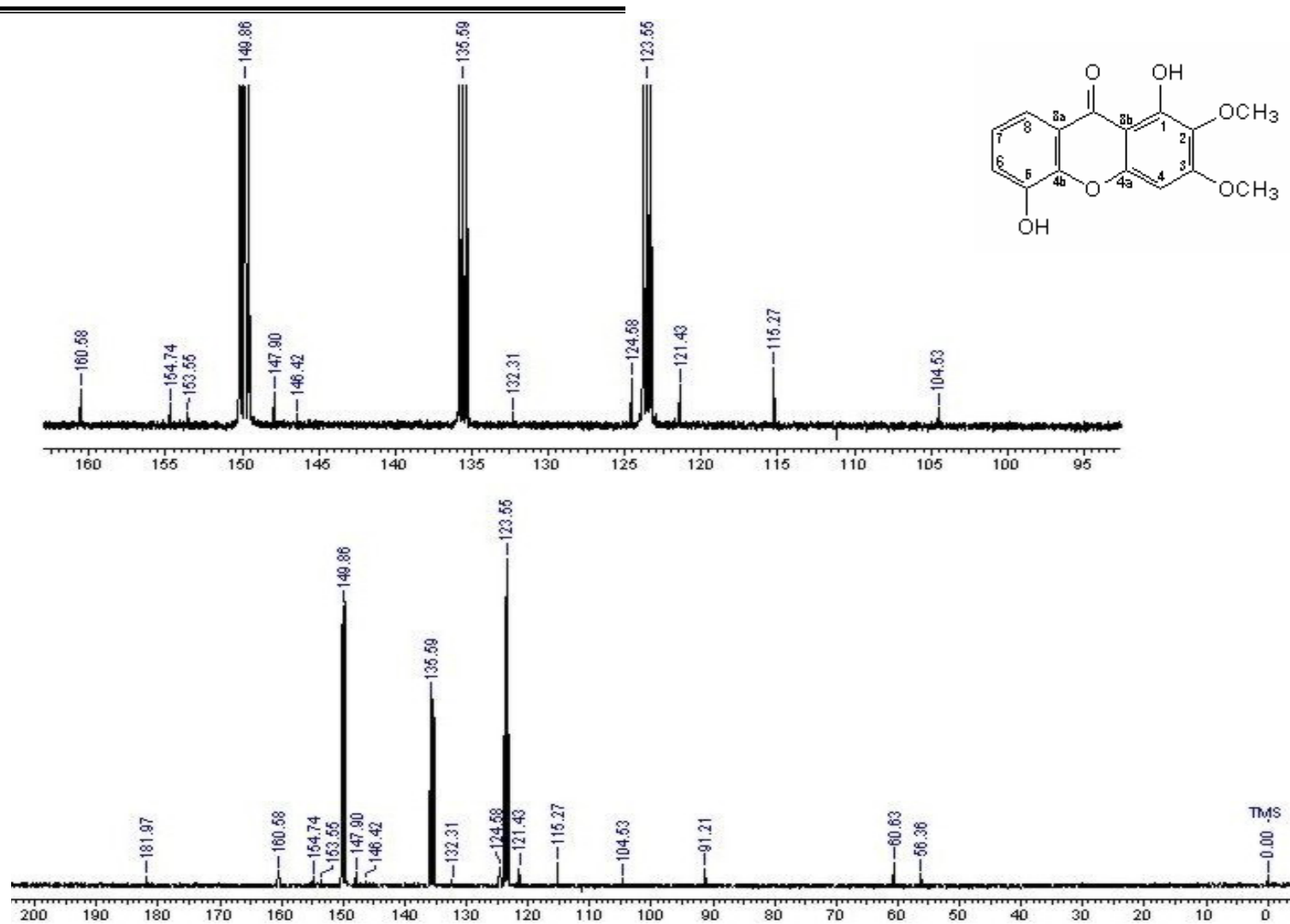
Espectro 3 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (**10**).



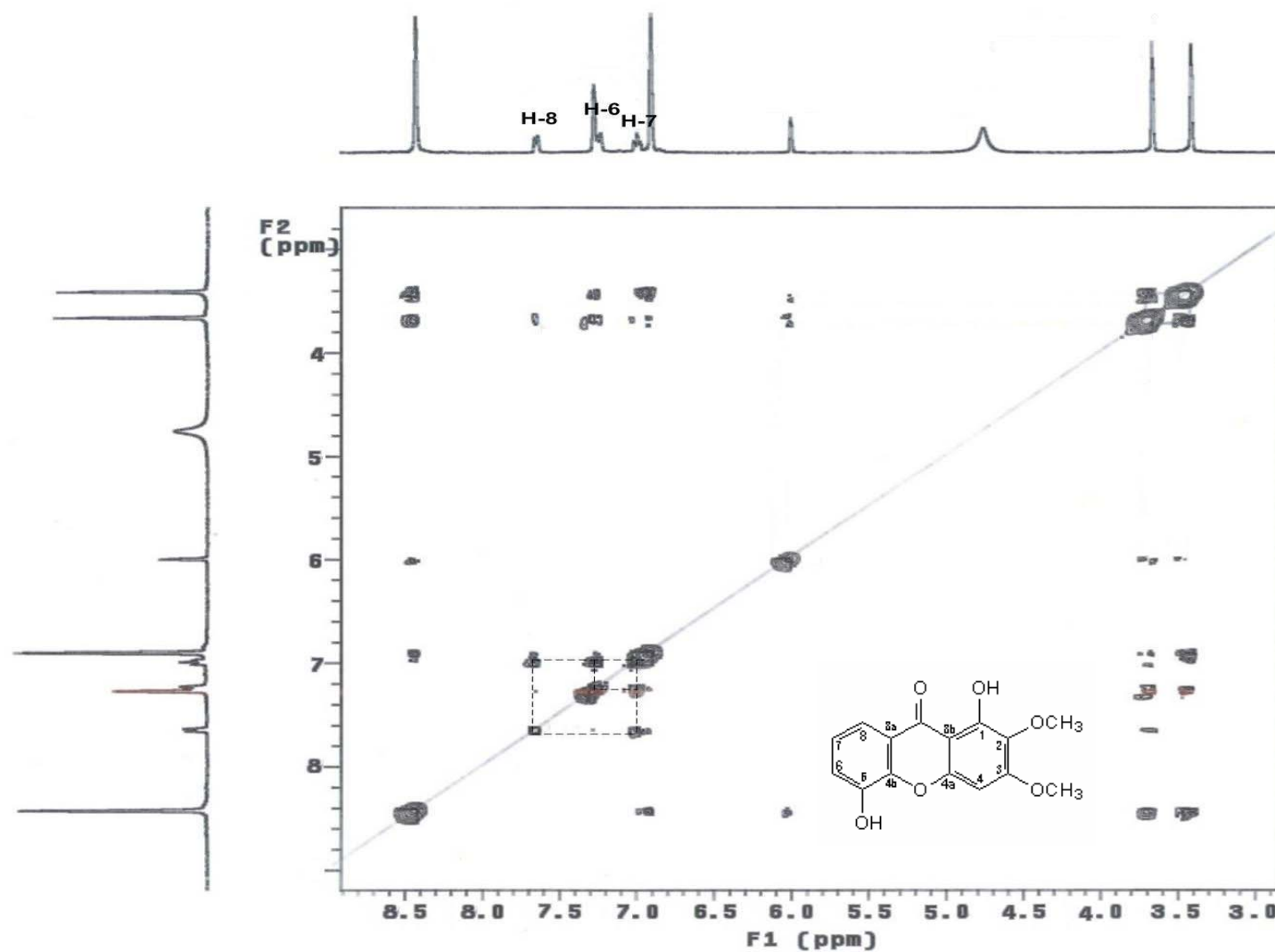
Espectro 4 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) da 1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (**10**).



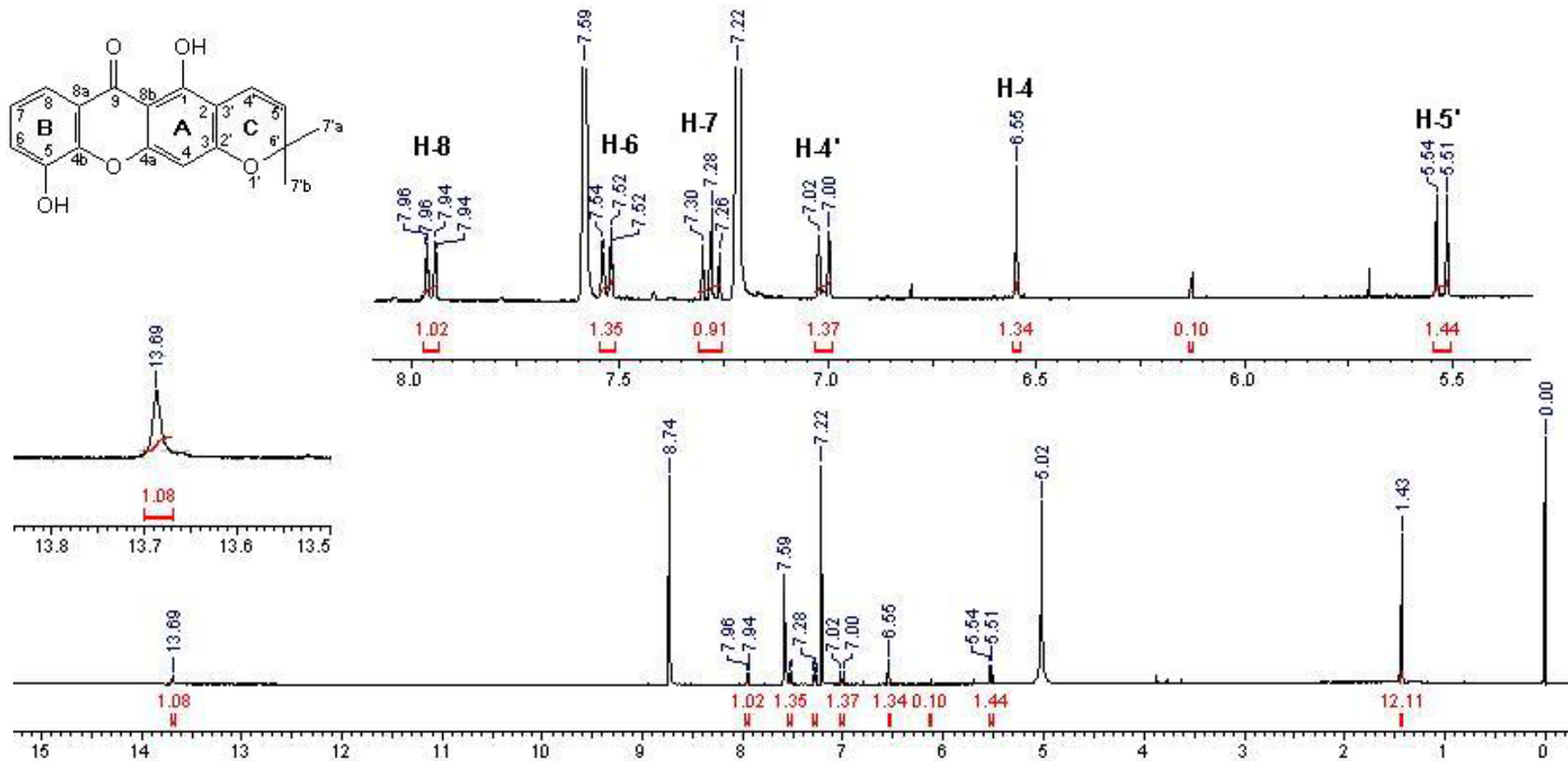
Espectro 5 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, C₅D₅N) da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**).



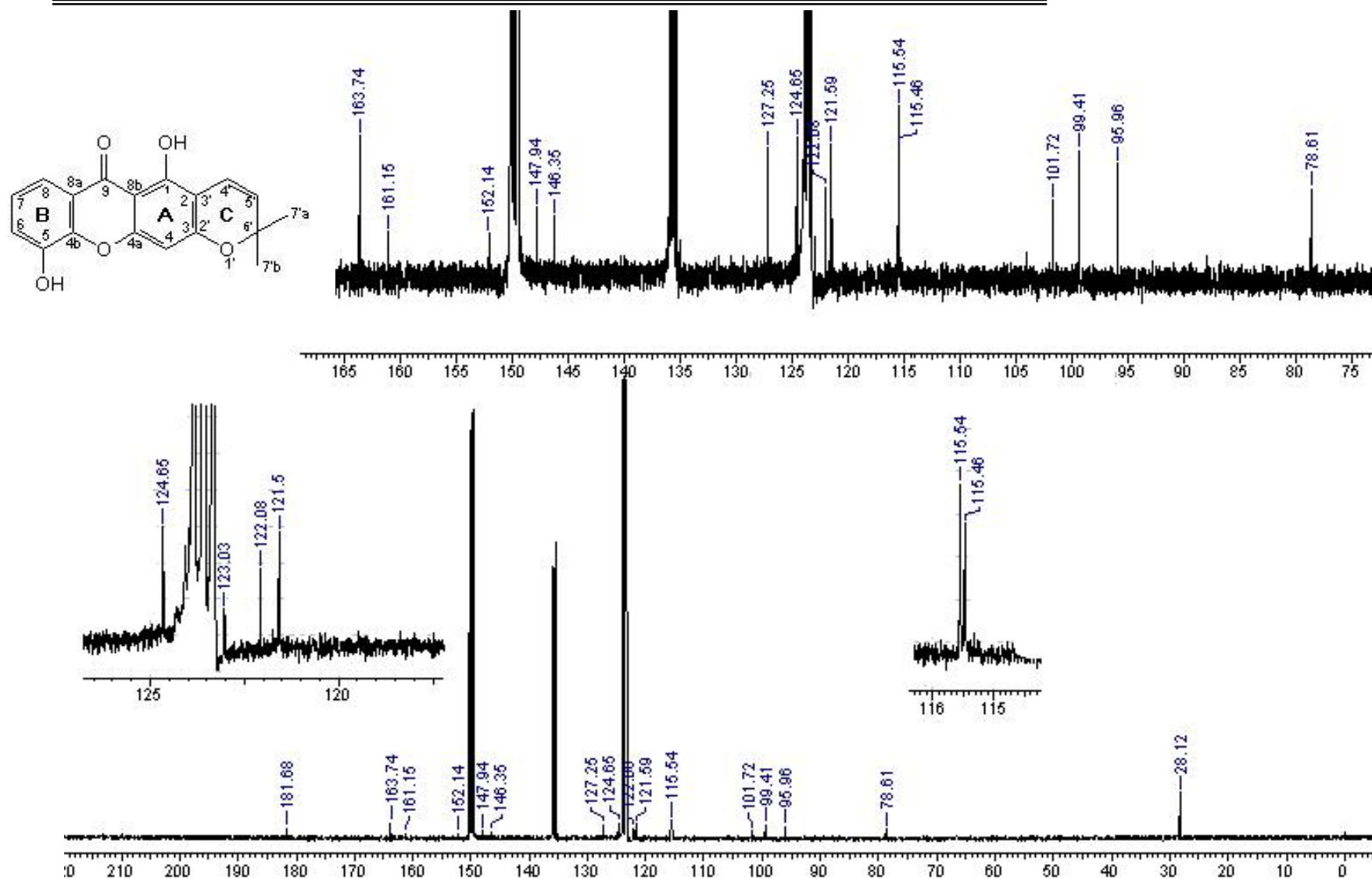
Espectro 6 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (11).



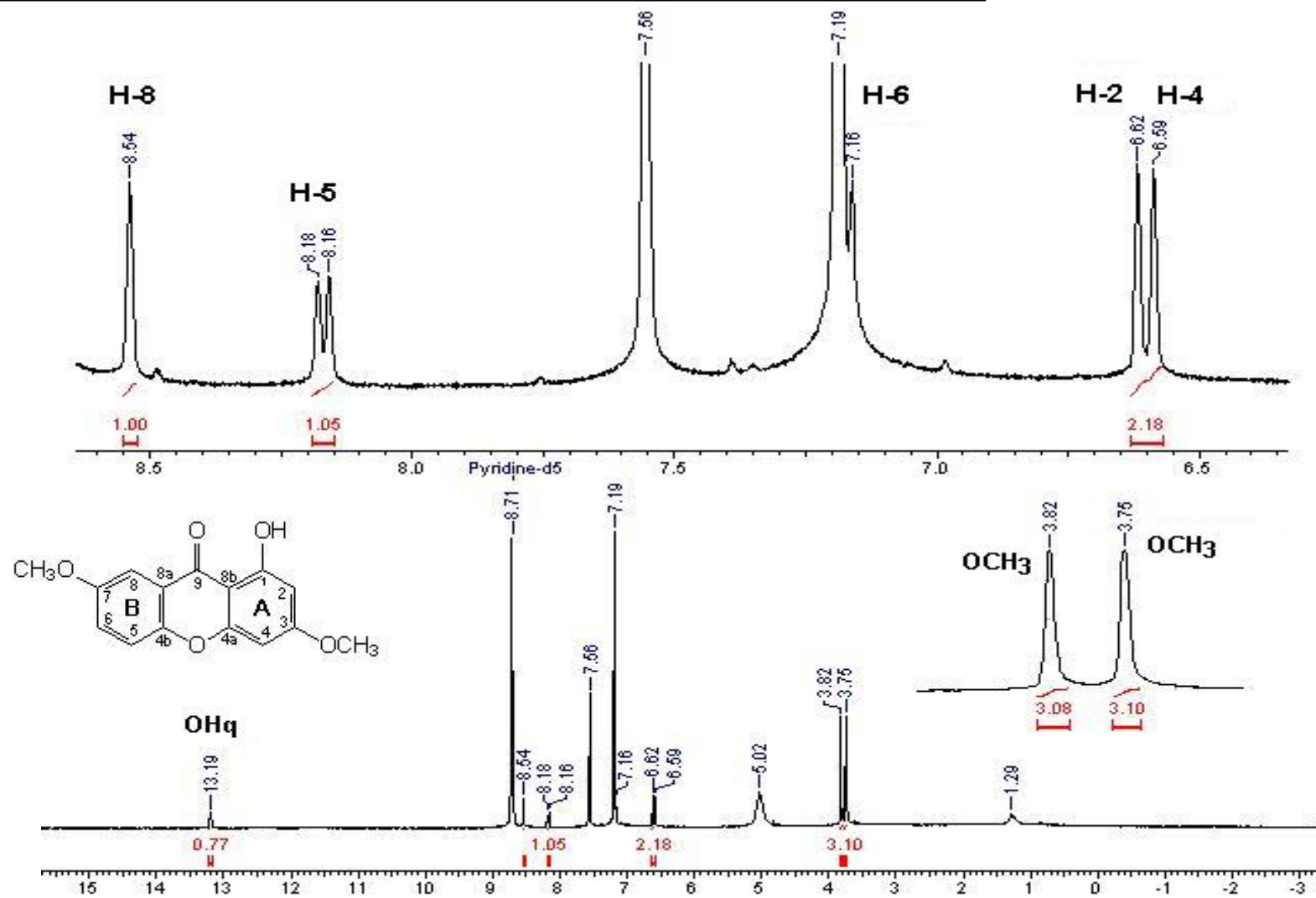
Espectro 7 – Espectro de RMN ¹H-¹H COSY (C₅D₅N) da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**11**).



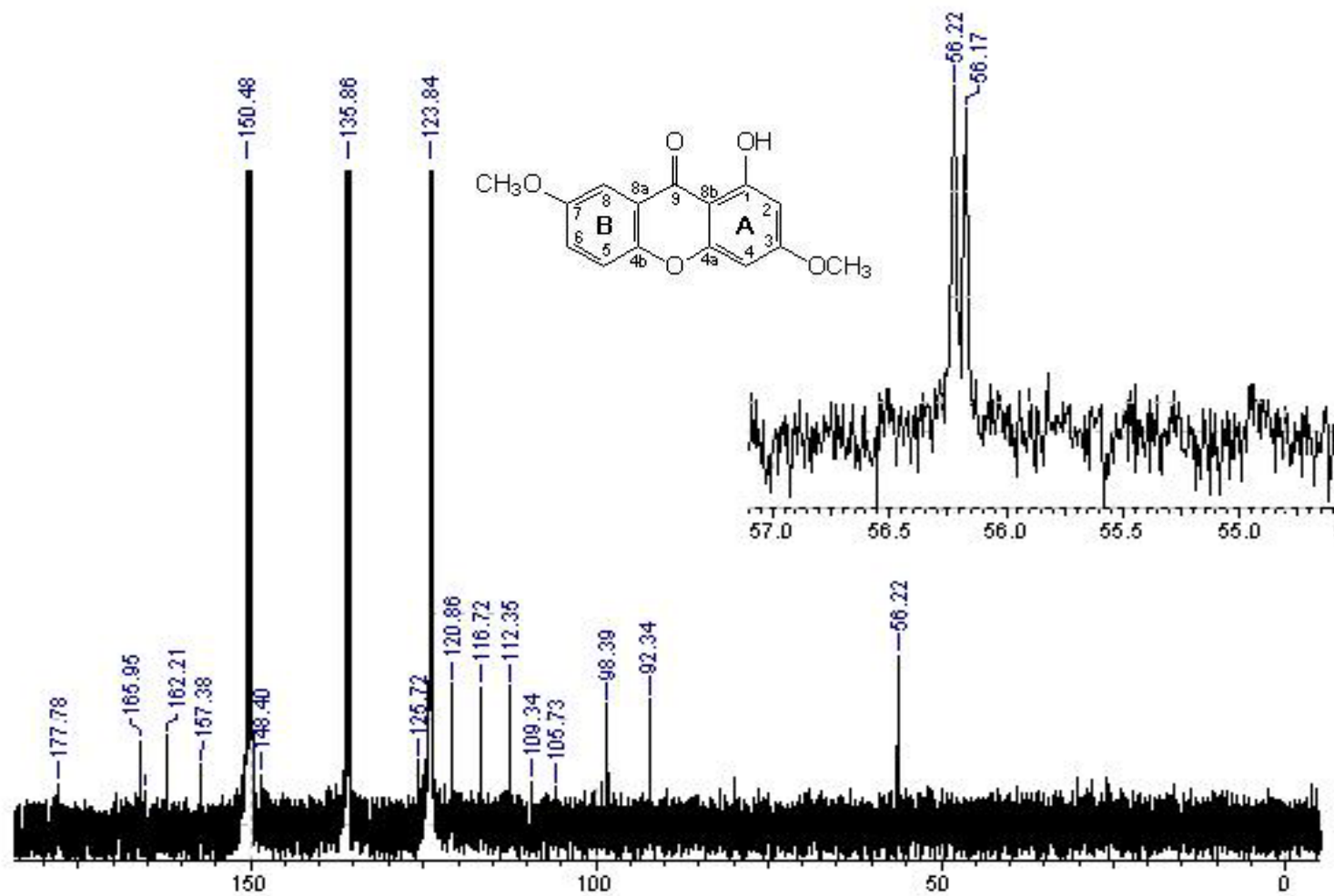
Espectro 8 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, C₅D₅N) 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (12).



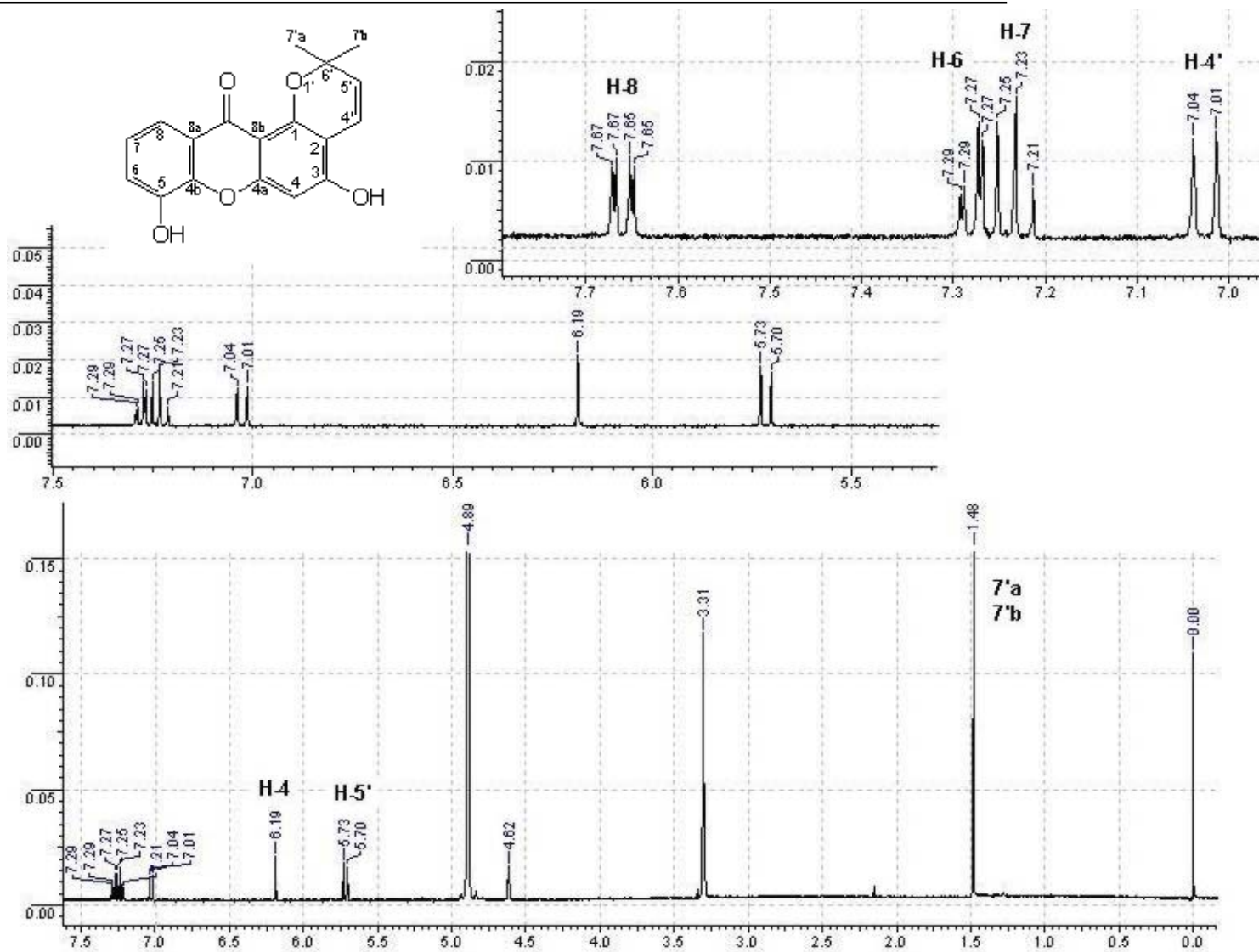
Espectro 9 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (12).



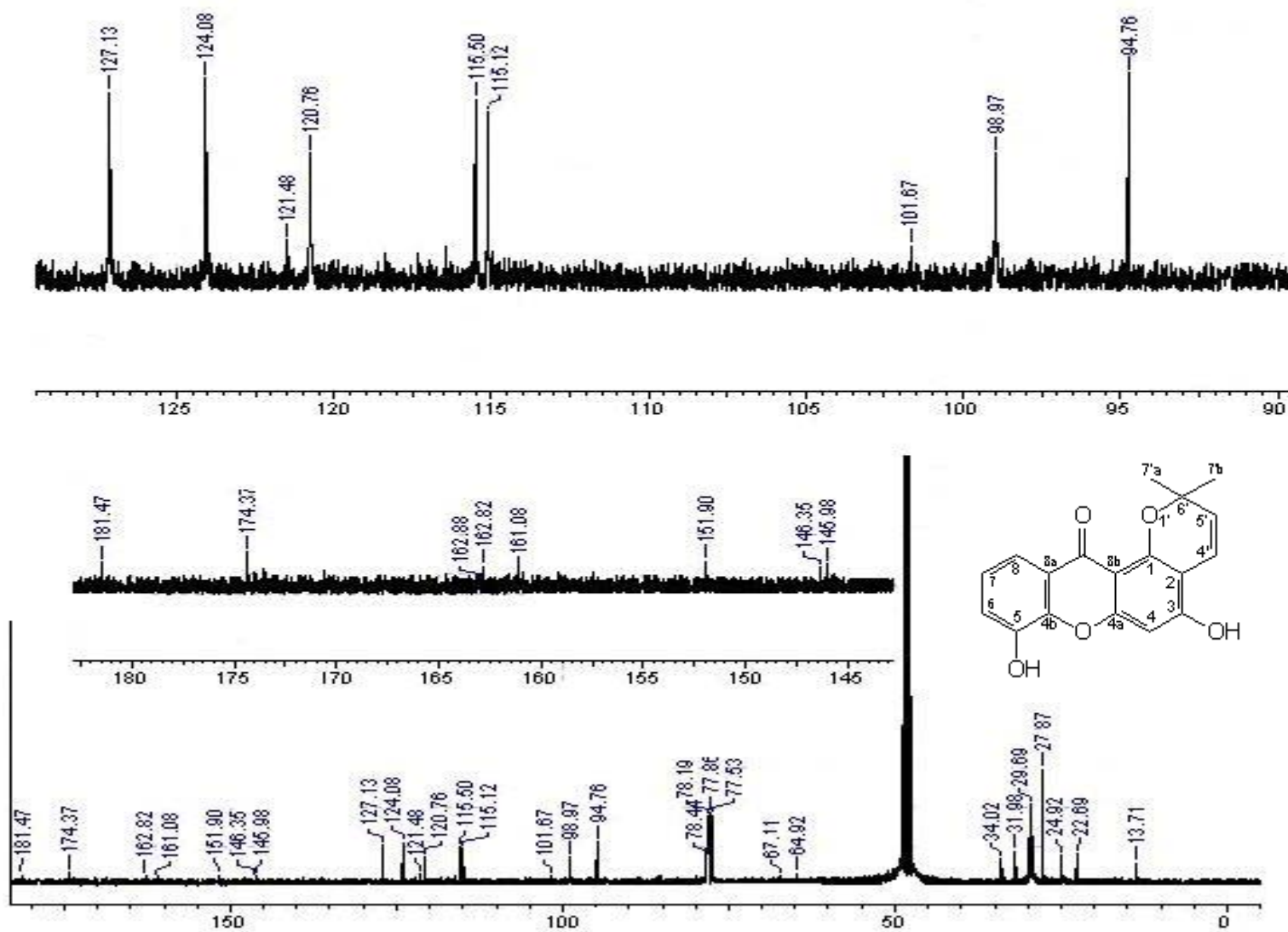
Espectro 10 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, C₅D₅N) da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (13).



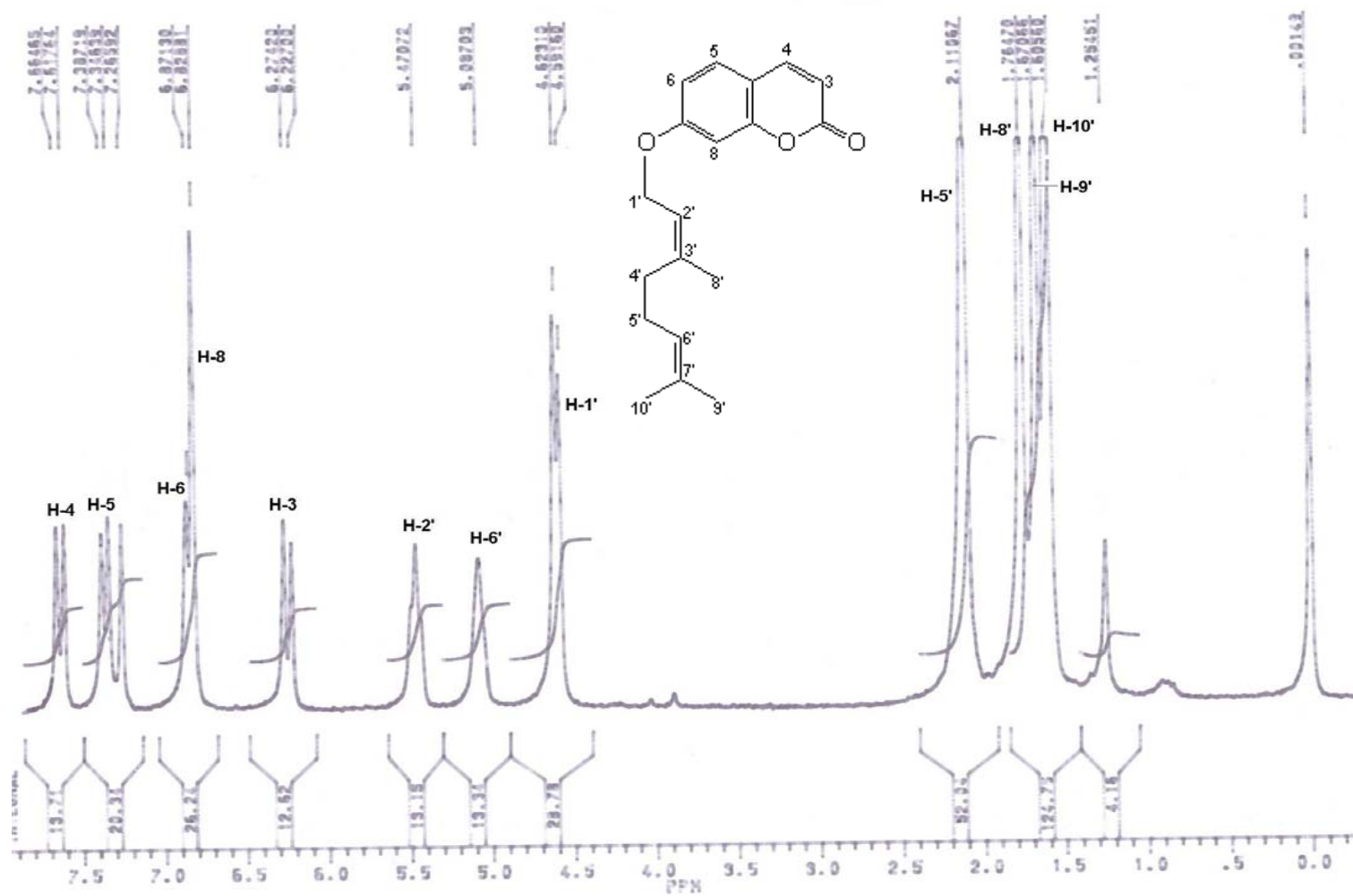
Espectro 11 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**13**).



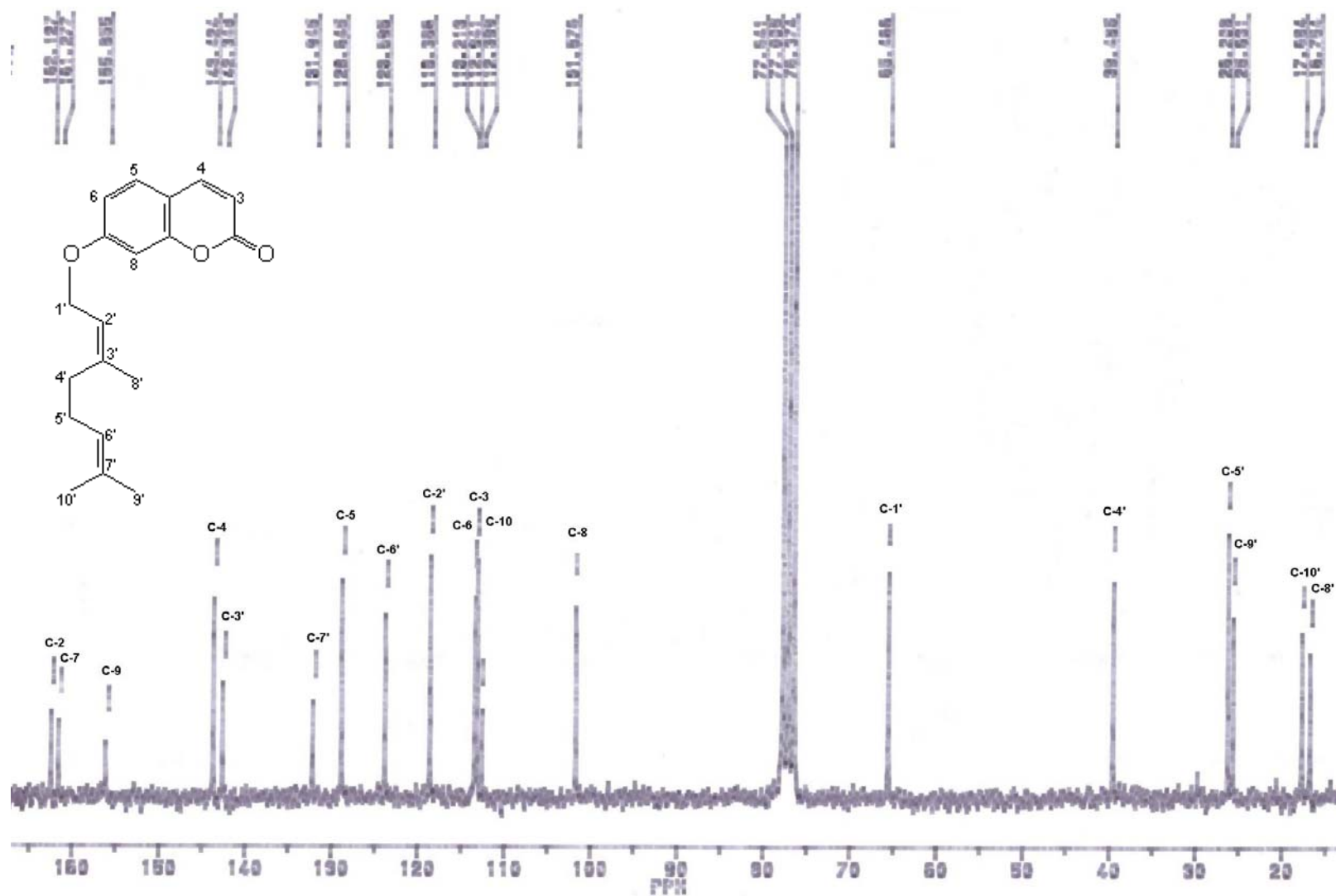
Espectro 12 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) da 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1',2')-xantona (14).



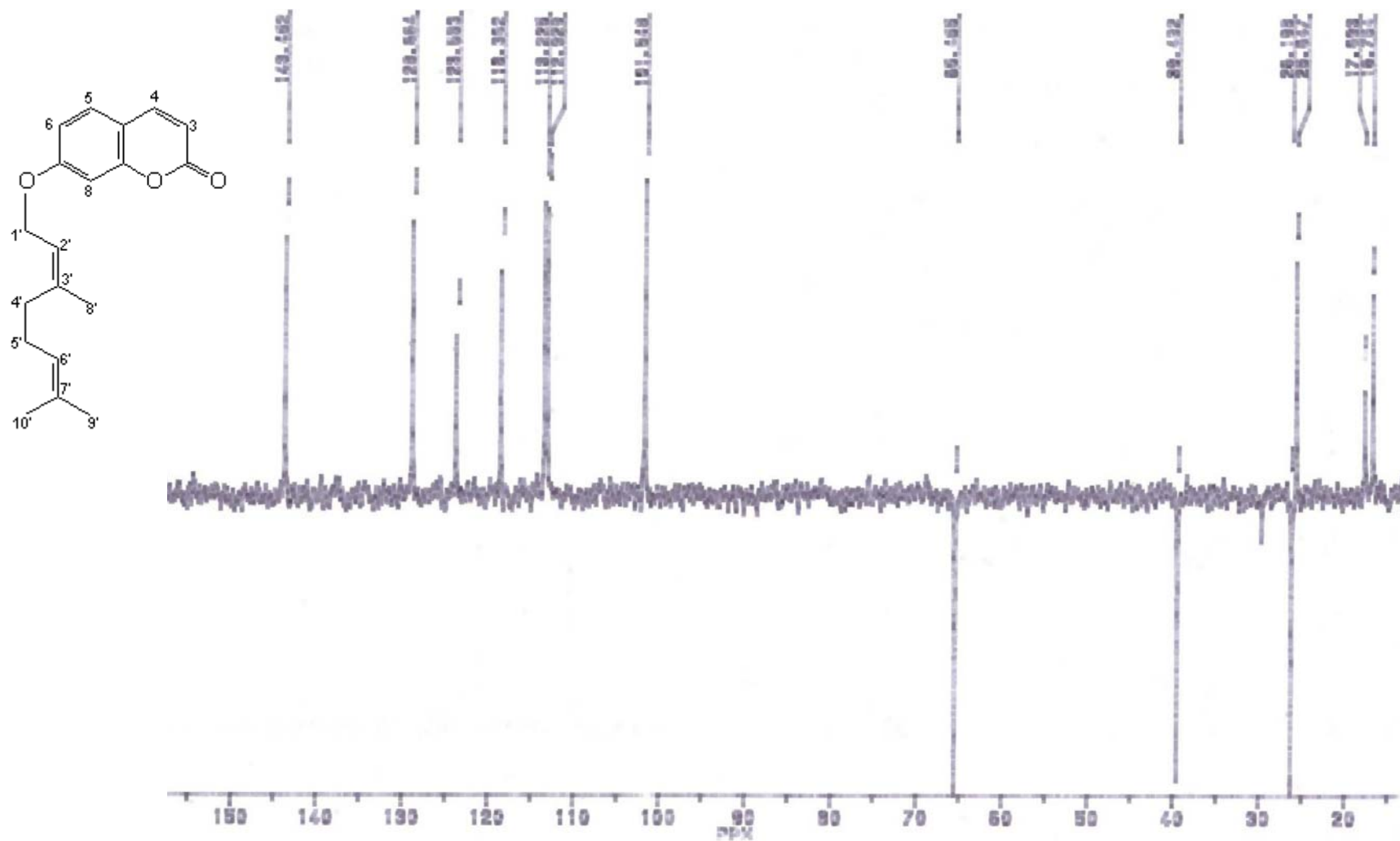
Espectro 13 – Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de 3,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':1',2')-xantona (**14**).



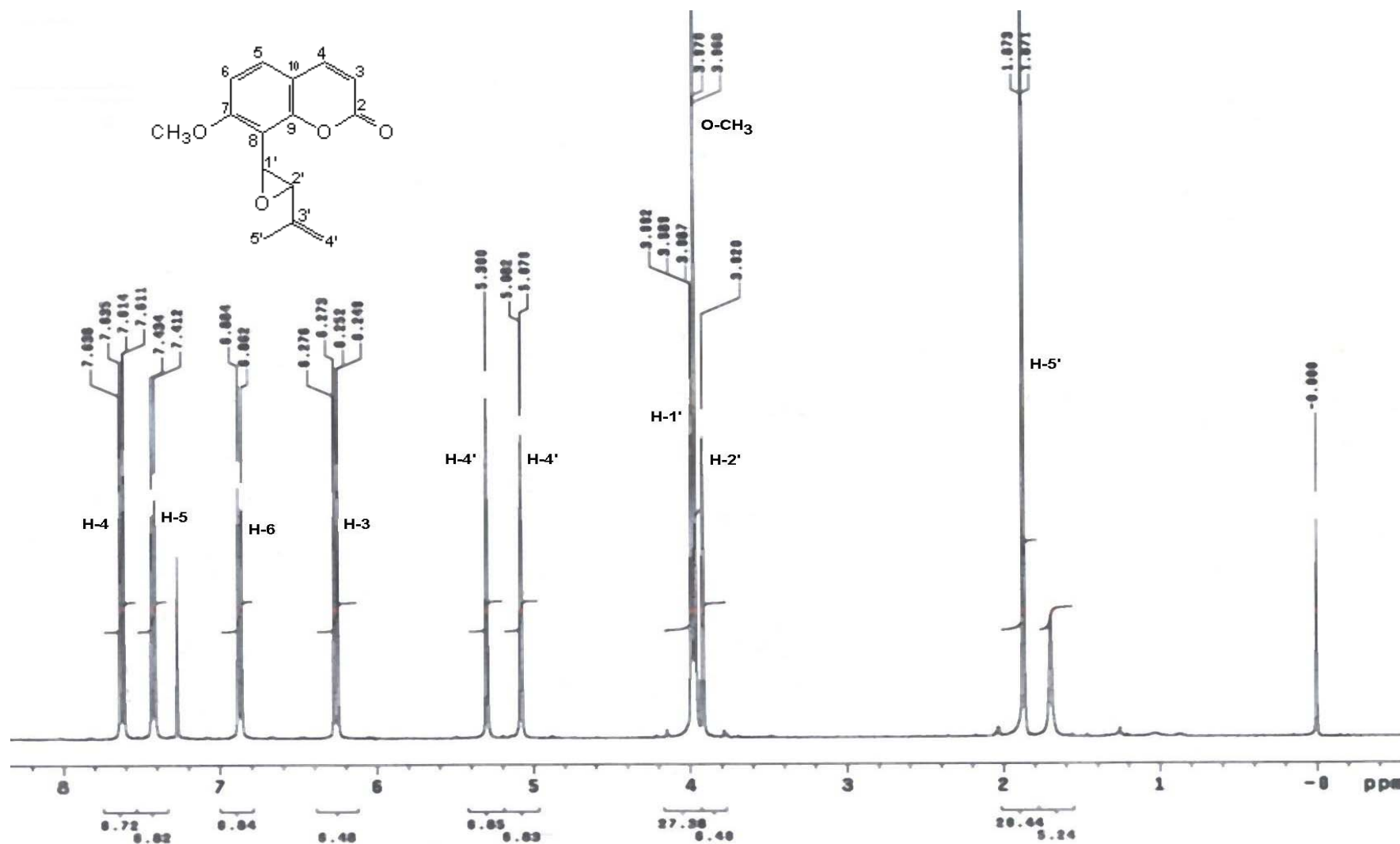
Espectro 14 – Espectro de RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) da cumarina aurapteno (1).



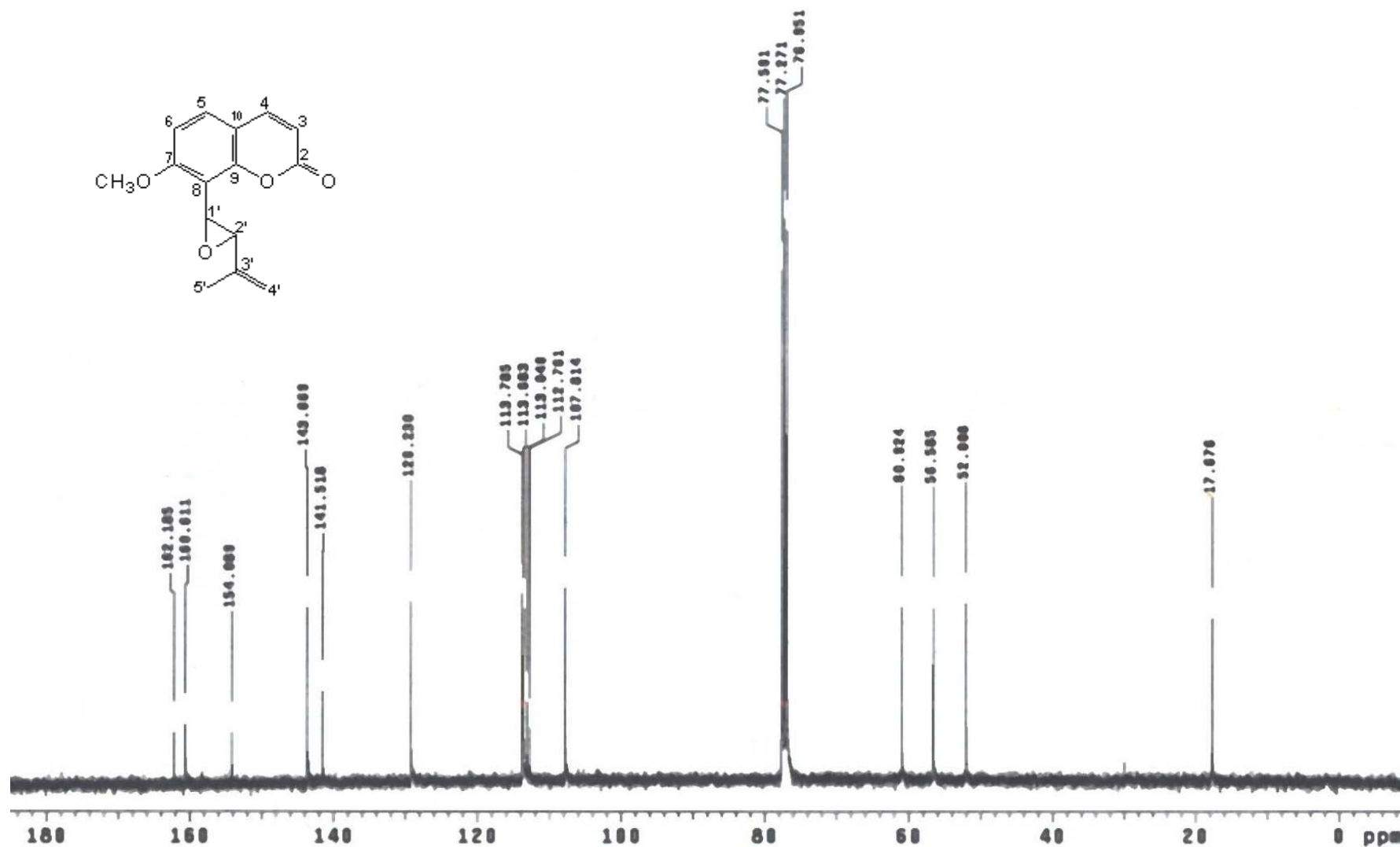
Espectro 15 - Espectro de RMN de ^{13}C (CDCl_3) da cumarina aurapteno (1).



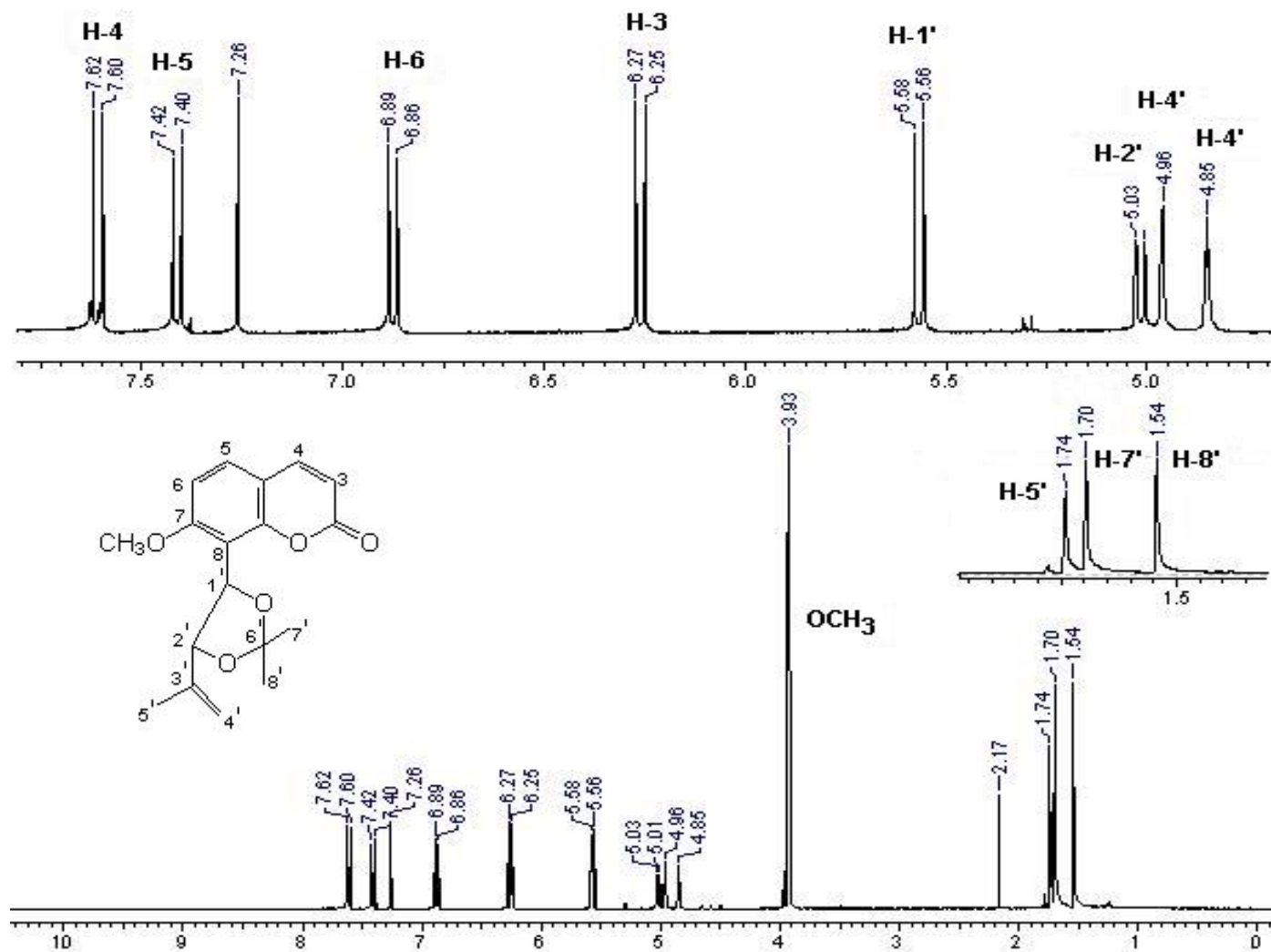
Espectro 16 - Espectro de RMN de ¹³C/DEPT 135 (CDCl₃) da cumarina aurapteno (1).



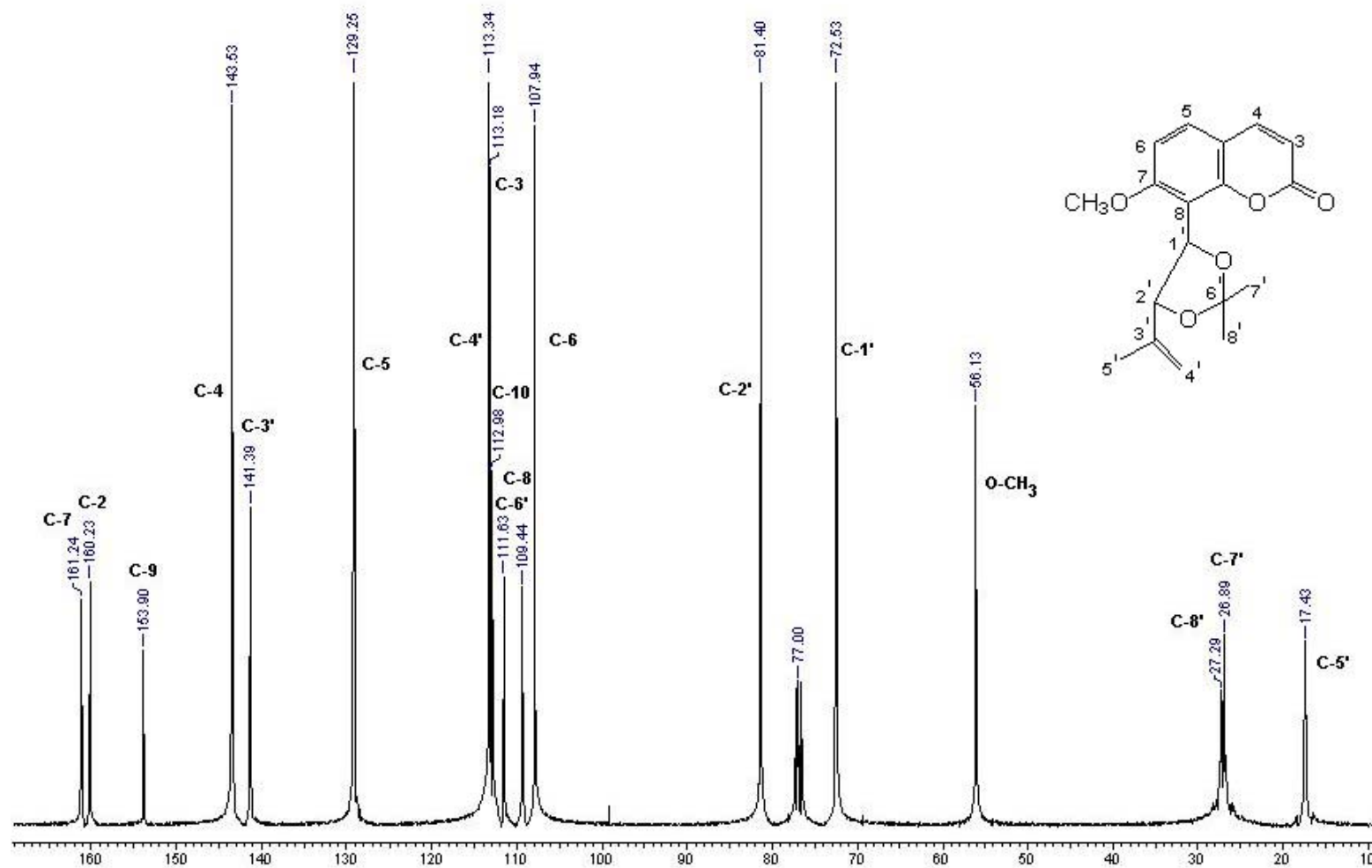
Espectro 17 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da cumarina febralosina (2).



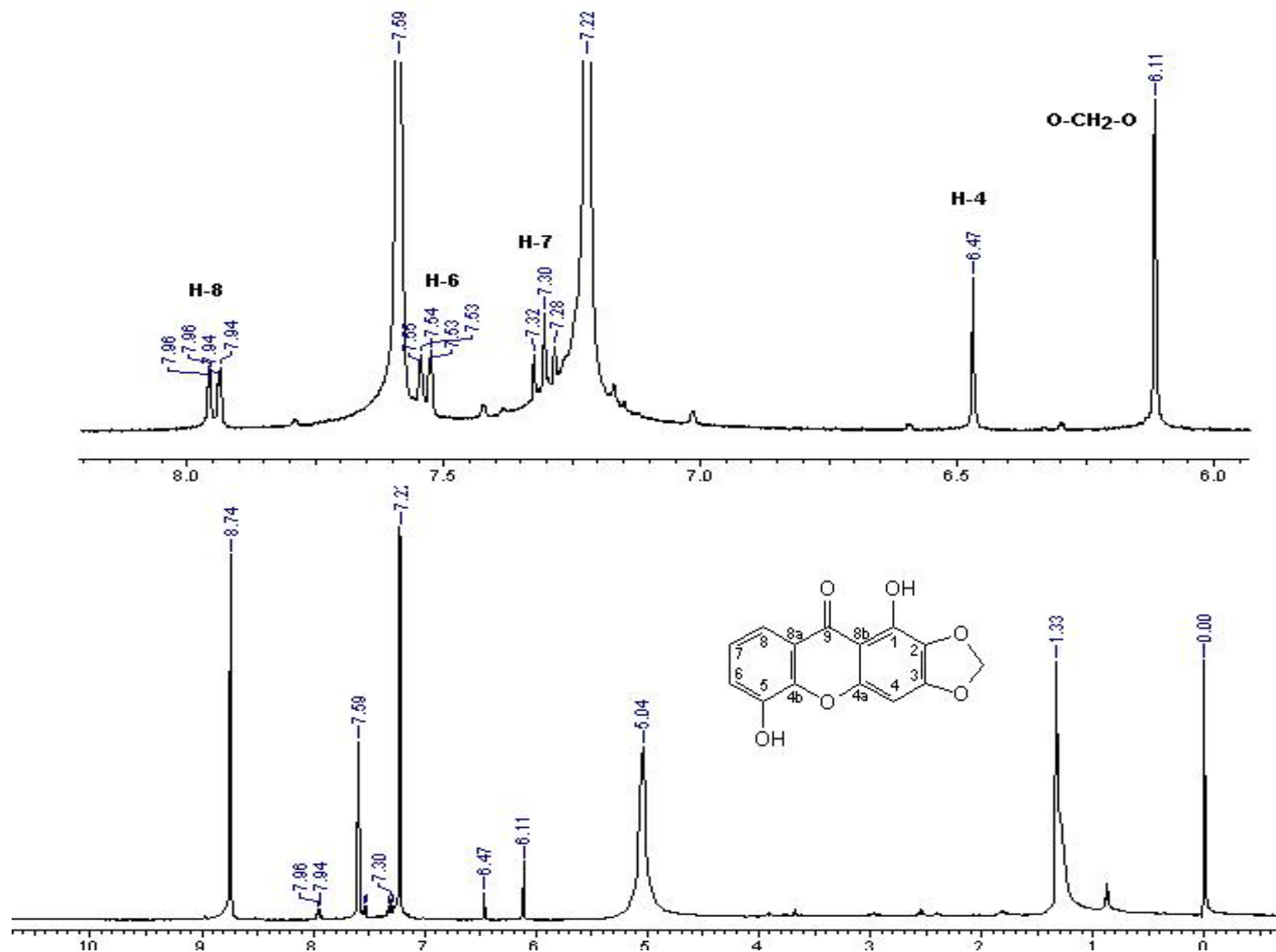
Espectro 18 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da cumarina febalosina (2).



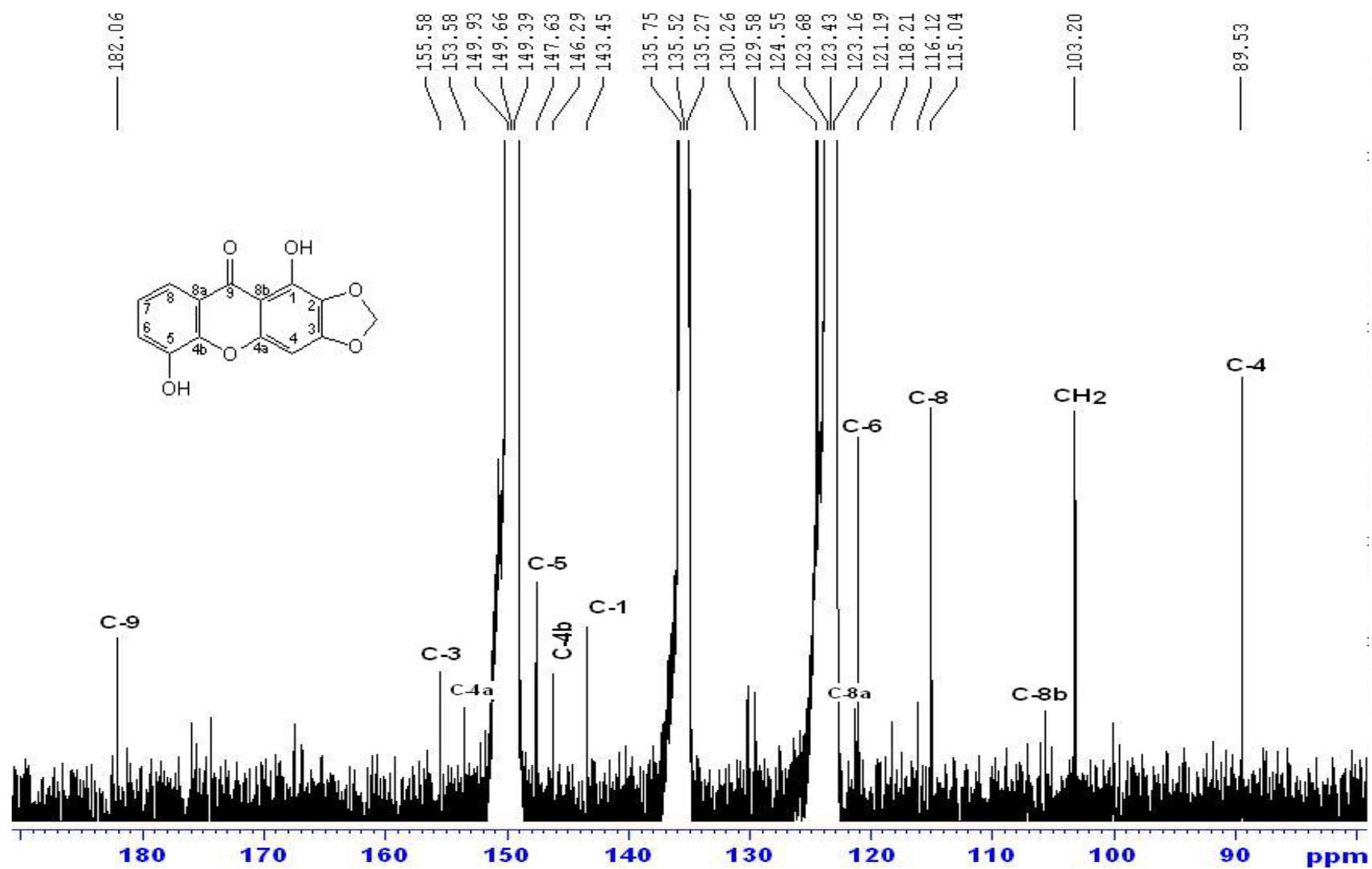
Espectro 19 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**).



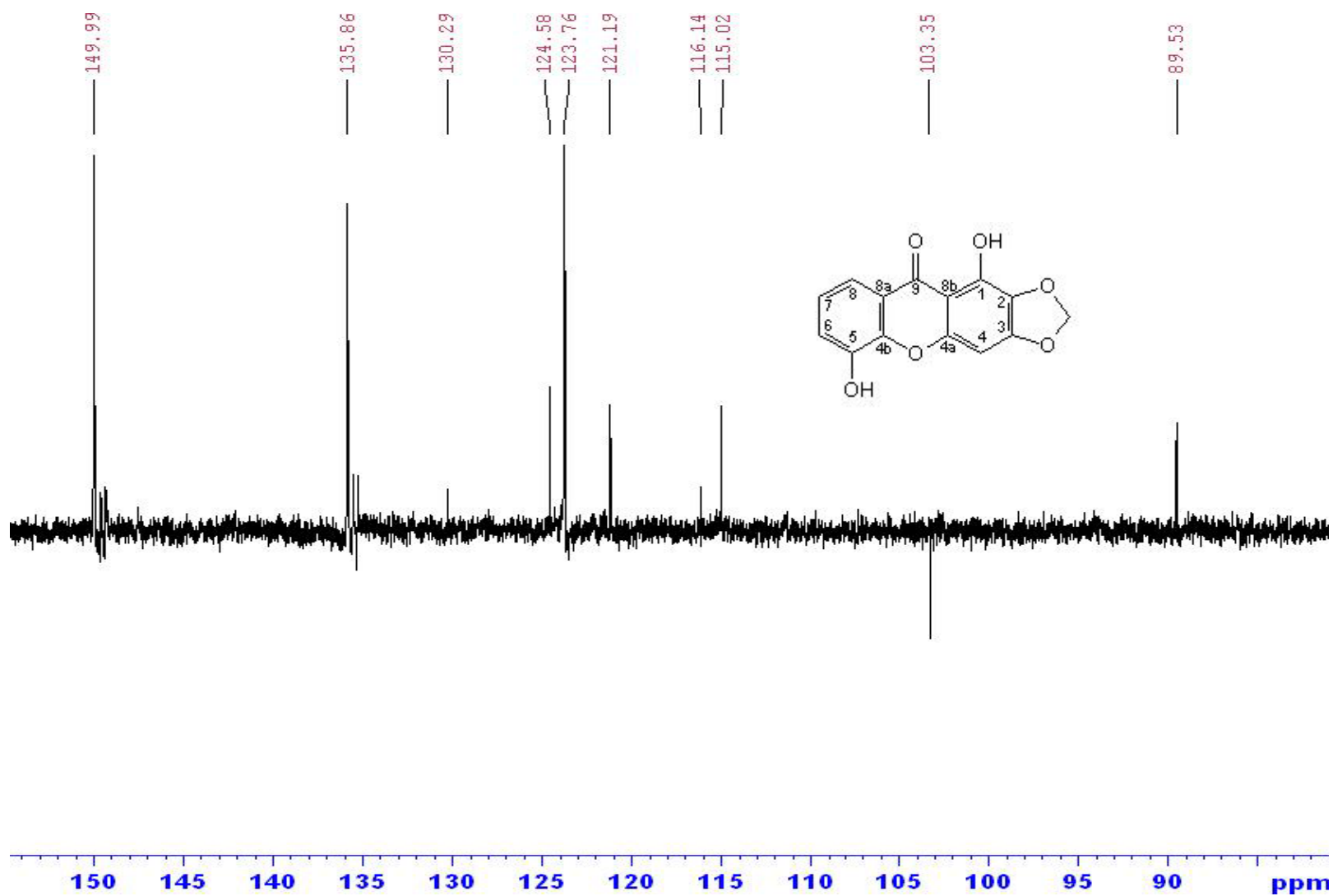
Espectro 20 – Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) da 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**).



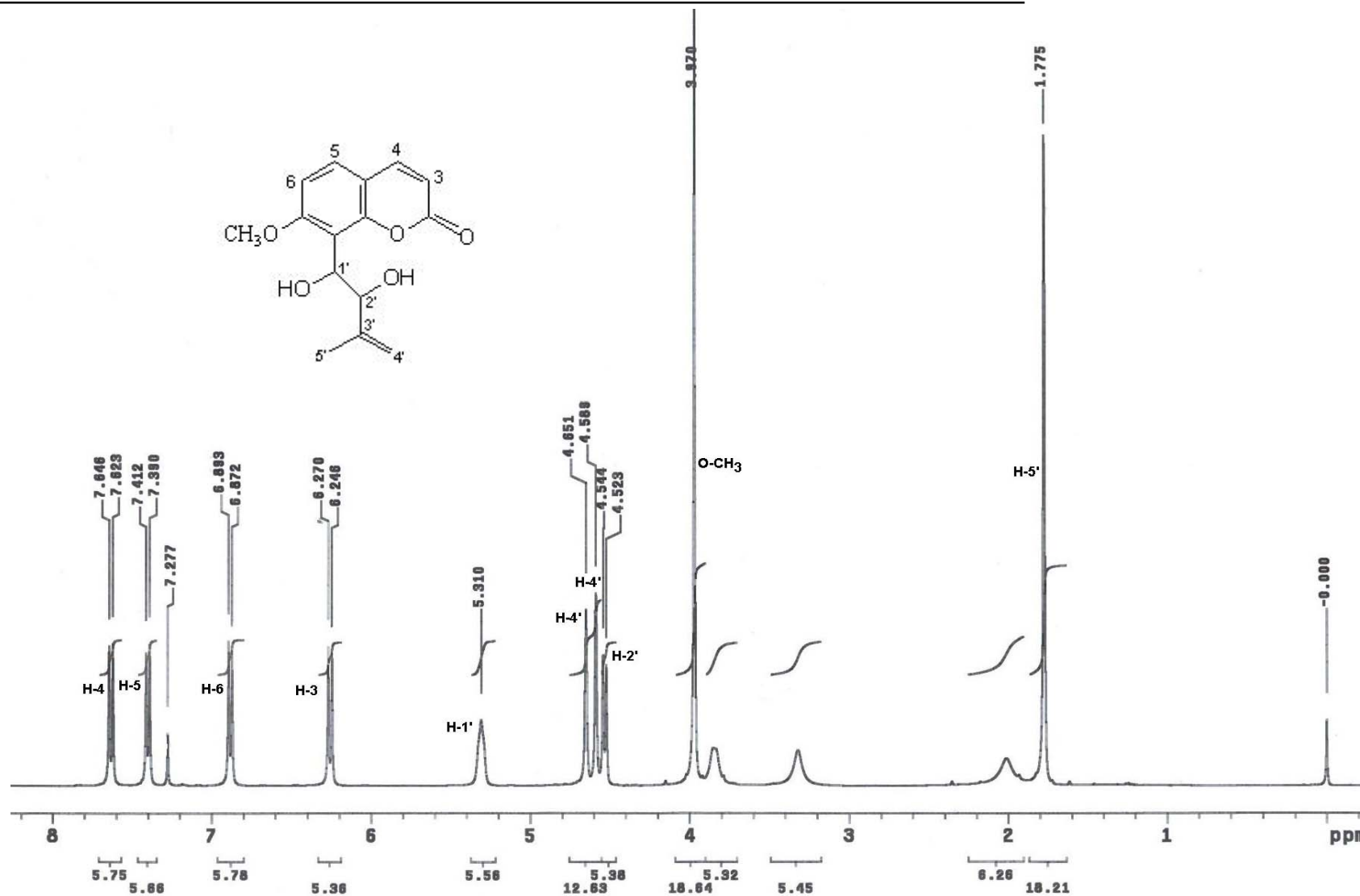
Espectro 21 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**16**)



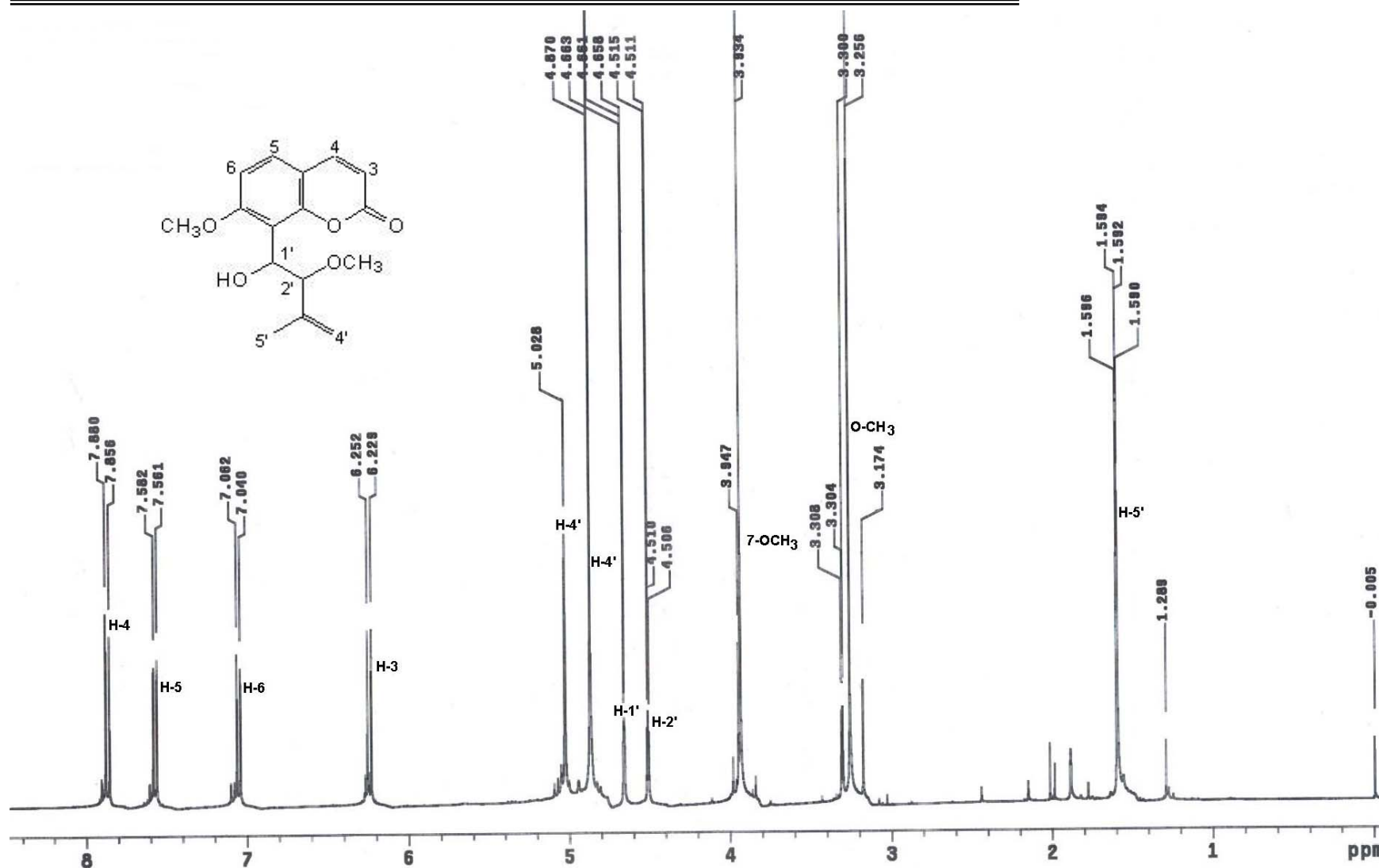
Espectro 22 - Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16).



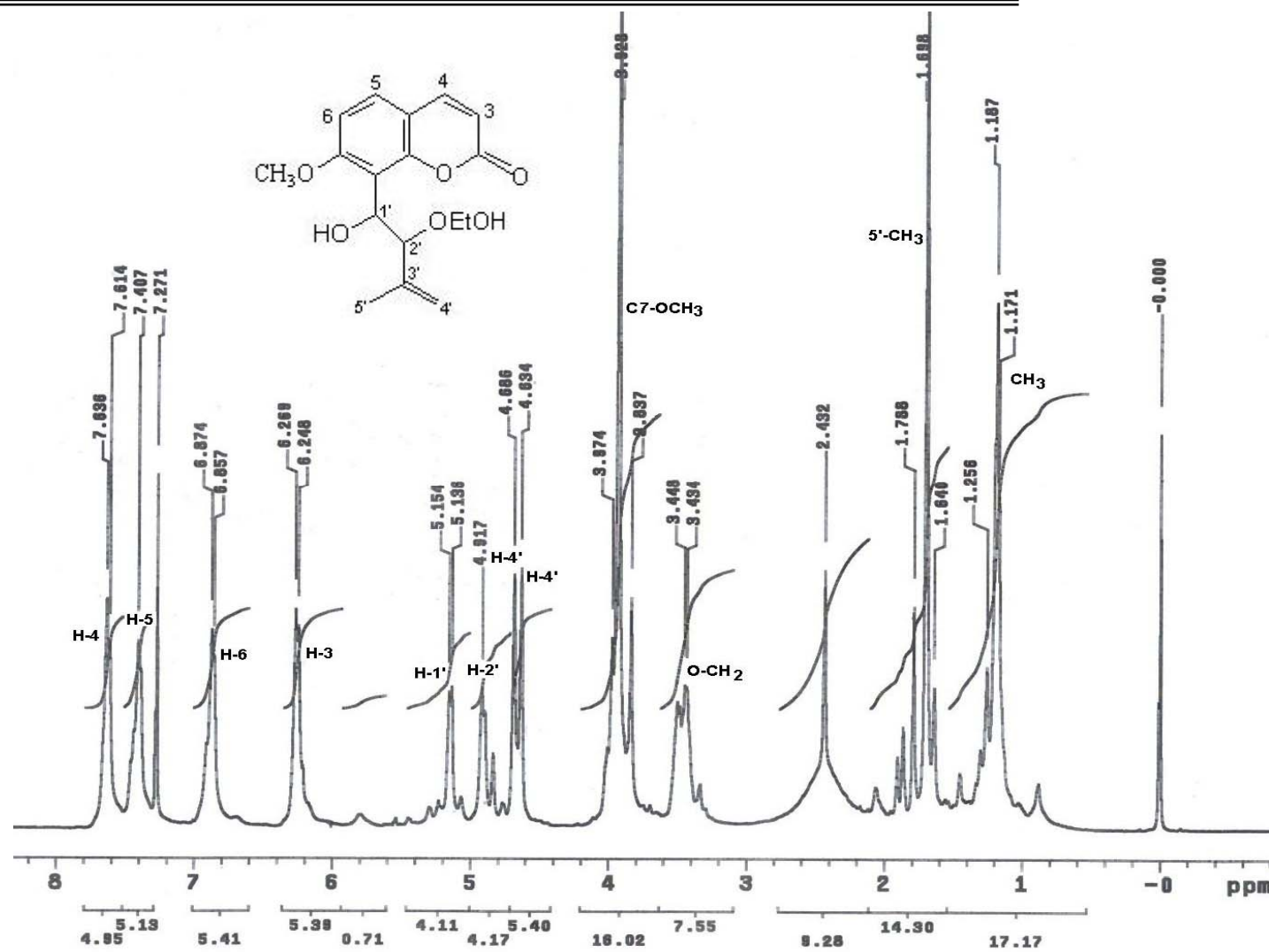
Espectro 23 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT } 135$ ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (16)



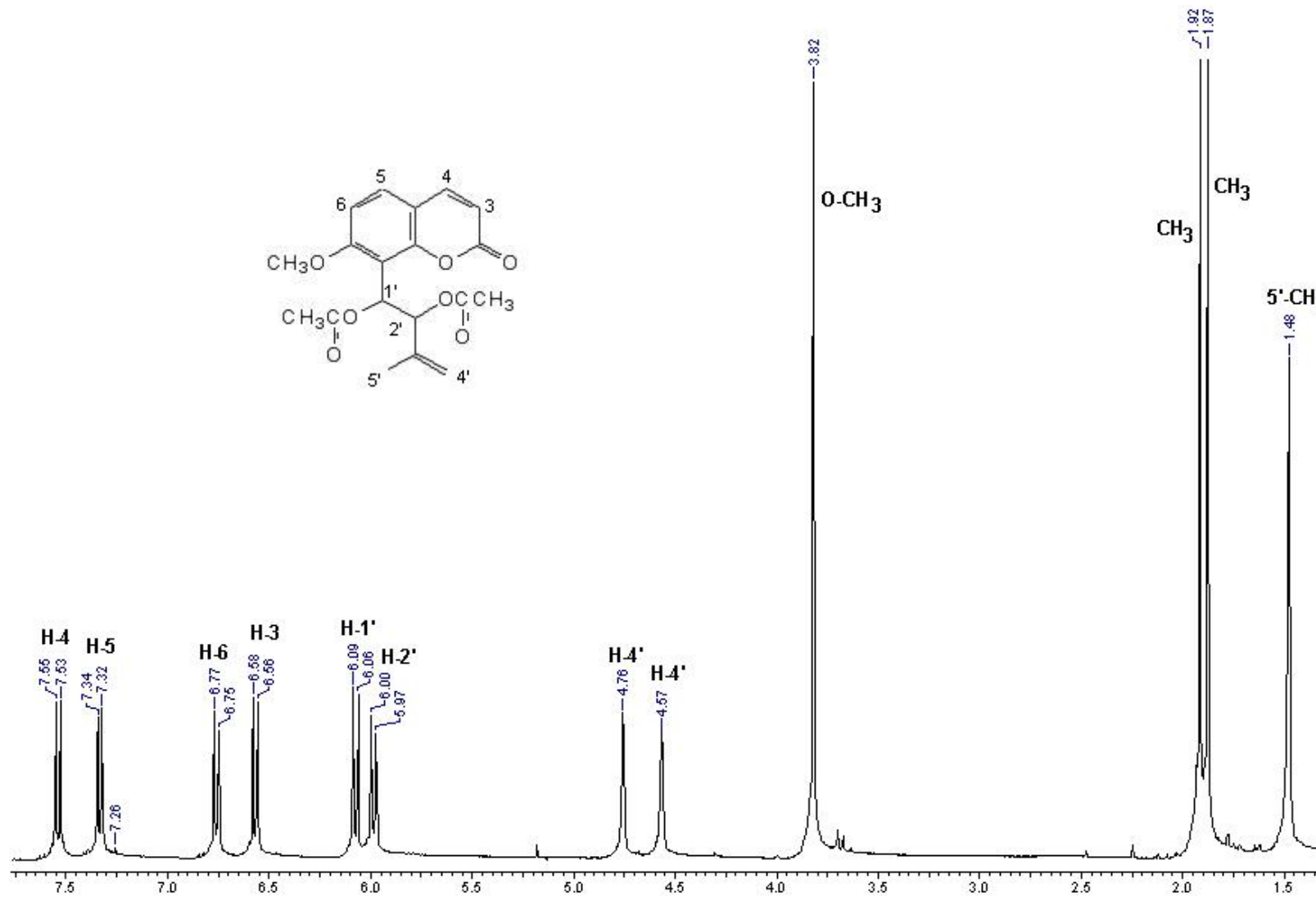
Espectro 24 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da reação da febalosina com H₂O (2a).



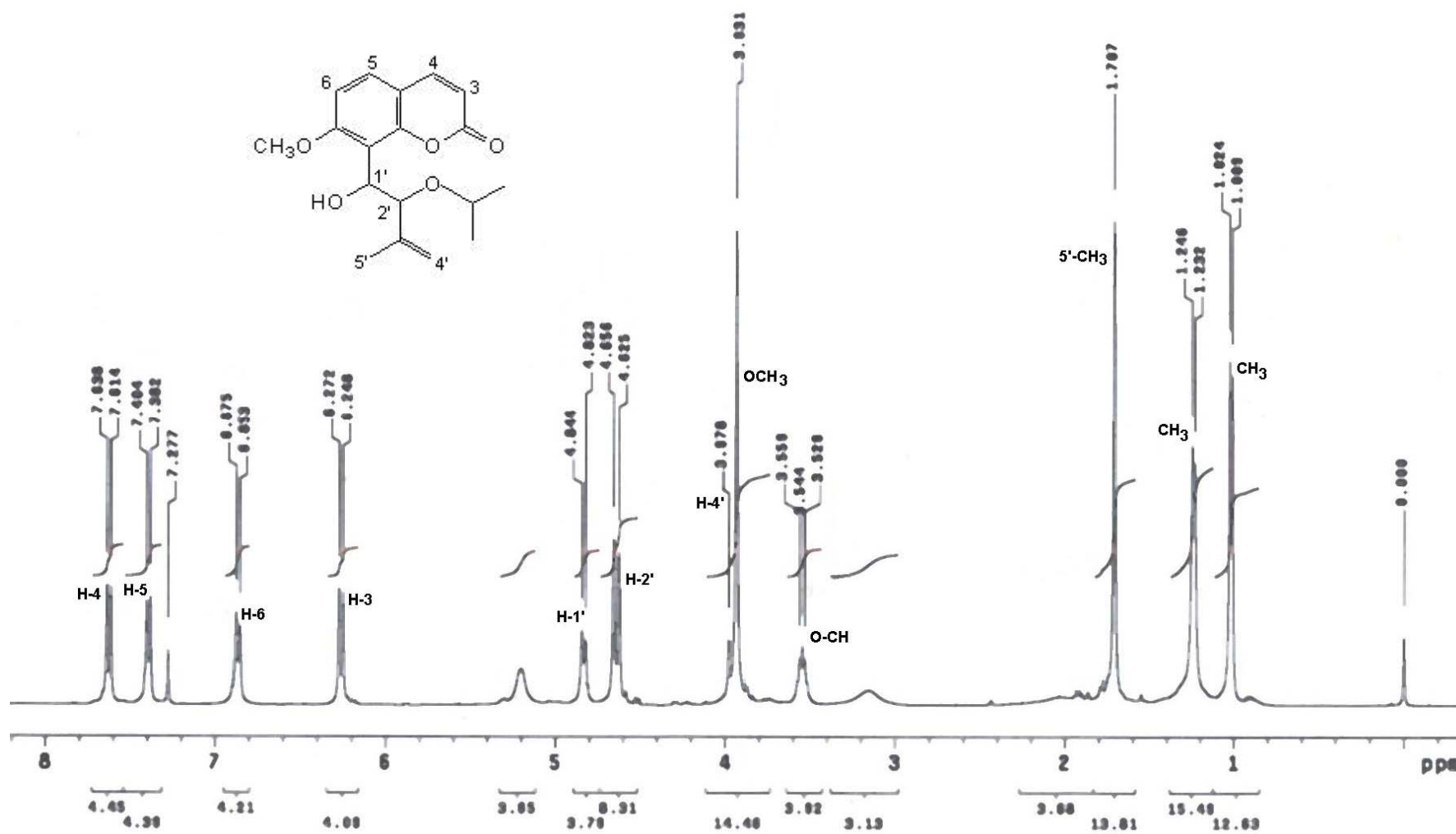
Espectro 25 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da reação da febalosina com metanol (2b).



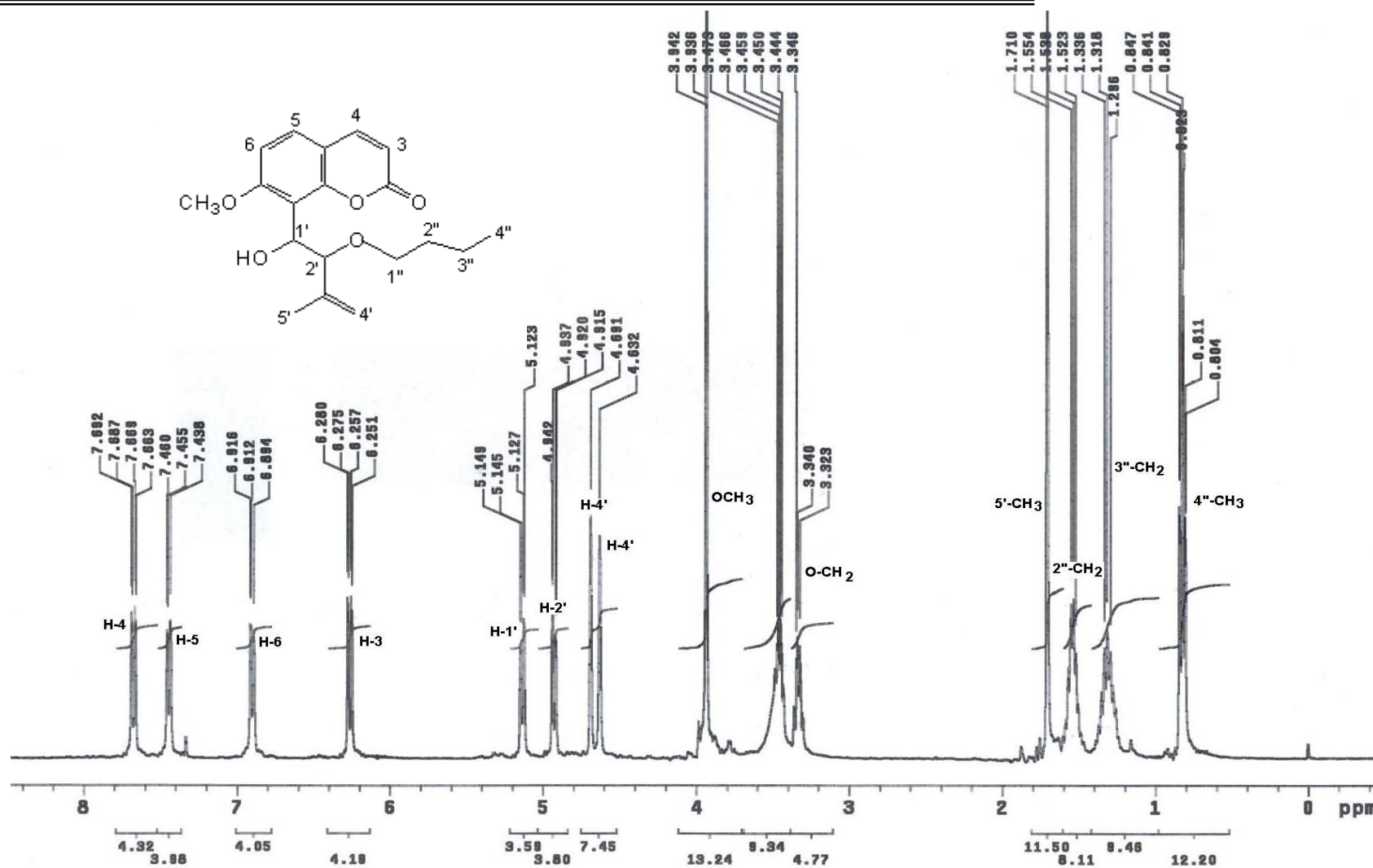
Espectro 26 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da reação da febalosina com etanol (2d/2).



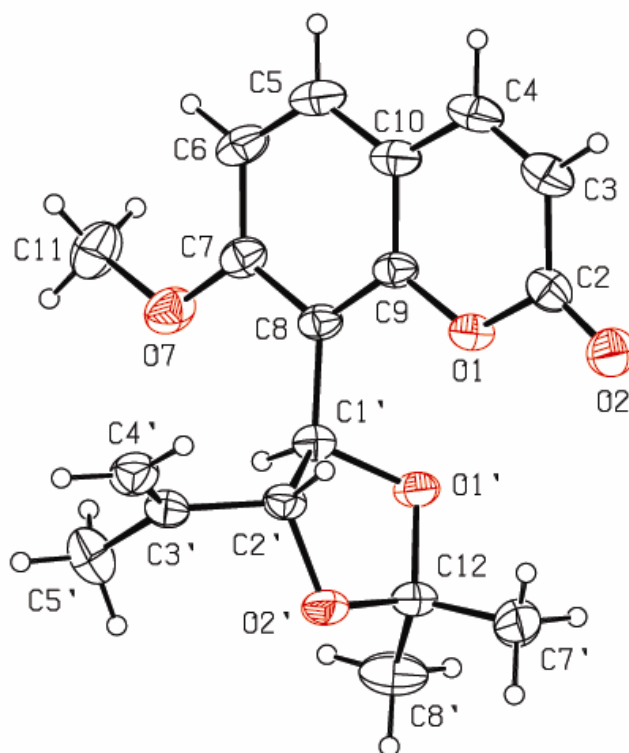
Espectro 27 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da acetilação da febalosina (2f).



Espectro 28 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da reação da febralosina com isopropanol (2g).



Espectro 29 – Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) da reação da febralosina com *n*-butanol (2h).



Dados de raio-X da 7-metoxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil3'-butenil)-cumarina (**15**).

Cadastro **566**

Tabela 1 – Dados de Raio-X da determinação da estrutura for 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil-3'-butenil)-cumarina (**15**).

Empirical formula	C ₁₈ H ₂₀ O ₅	
Formula weight	316.34	
Temperature	293(2) K	
Wavelength	0.71069 Å	
Crystal system	Triclinic	
Space group	P-1	
Unit cell dimensions	a = 8.044(1) Å	α = 84.292(9)°.
	b = 9.581(1) Å	β = 80.842(9)°.
	c = 11.323(1) Å	γ = 72.928(8)°.
Volume	822.29(15) Å ³	
Z	2	
Density (calculated)	1.278 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.093 mm ⁻¹	
F(000)	336	
Crystal size	0.50 x 0.30 x 0.26 mm ³	
Theta range for data collection	1.82 to 25.47°.	
Index ranges	-9 ≤ h ≤ 9, -11 ≤ k ≤ 11, -13 ≤ l ≤ 13	
Reflections collected	6098	
Independent reflections	3053 [R(int) = 0.0150]	
Absorption correction	None	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	3053 / 0 / 212	
Goodness-of-fit on F ²	1.041	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0376, wR2 = 0.0985	
R indices (all data)	R1 = 0.0552, wR2 = 0.1078	
Largest diff. peak and hole	0.184 and -0.196 e. Å ⁻³	

Table 2 - Atomic coordinates ($\times 10^4$) and equivalent isotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil3'-butenil)-cumarina (**15**). U(eq) is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	U(eq)
C(1')	8509(2)	3485(1)	7153(1)	41(1)
C(2)	11121(2)	1157(2)	10035(1)	50(1)
C(2')	7919(2)	2108(1)	7128(1)	43(1)
C(3')	6008(2)	2319(2)	7057(1)	49(1)
C(3)	10687(2)	1724(2)	11219(1)	61(1)
C(4')	5095(2)	1651(2)	7875(2)	61(1)
C(4)	9518(2)	3018(2)	11422(1)	61(1)
C(5')	5217(3)	3292(2)	6046(2)	77(1)
C(5)	7367(2)	5241(2)	10655(1)	61(1)
C(6)	6530(2)	6018(2)	9733(2)	59(1)
C(7')	12051(2)	612(2)	6099(2)	75(1)
C(7)	6938(2)	5452(2)	8593(1)	48(1)
C(8)	8190(2)	4097(1)	8373(1)	41(1)
C(8')	10733(3)	2570(3)	4590(2)	91(1)
C(9)	9010(2)	3346(1)	9342(1)	42(1)
C(10)	8619(2)	3893(2)	10489(1)	51(1)
C(11)	4987(3)	7598(2)	7750(2)	78(1)
C(12)	10540(2)	1908(2)	5855(1)	51(1)
O(1)	10245(1)	2022(1)	9139(1)	45(1)
O(1')	10342(1)	2988(1)	6701(1)	47(1)
O(2')	8953(1)	1488(1)	6055(1)	60(1)
O(2)	12171(2)	21(1)	9748(1)	65(1)
O(7)	6140(2)	6153(1)	7638(1)	63(1)

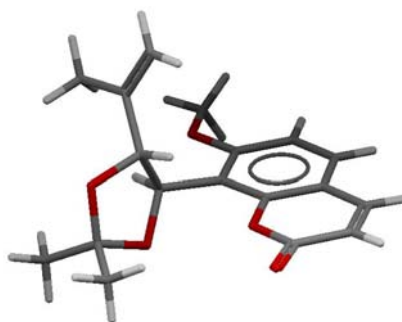


Table 3.- Bond lengths [Å] and angles [°] for 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil3'-butenil)-cumarina (**15**).

C(1')-O(1')	1.4348(16)	C(3')-C(2')-C(1')	117.24(11)
C(1')-C(8)	1.5102(17)	C(4')-C(3')-C(5')	122.70(15)
C(1')-C(2')	1.5319(18)	C(4')-C(3')-C(2')	119.41(14)
C(2)-O(2)	1.2028(18)	C(5')-C(3')-C(2')	117.89(14)
C(2)-O(1)	1.3892(17)	C(4)-C(3)-C(2)	121.10(15)
C(2)-C(3)	1.448(2)	C(3)-C(4)-C(10)	121.66(14)
C(2')-O(2')	1.4326(16)	C(6)-C(5)-C(10)	121.47(13)
C(2')-C(3')	1.504(2)	C(5)-C(6)-C(7)	119.54(15)
C(3')-C(4')	1.322(2)	O(7)-C(7)-C(6)	122.80(13)
C(3')-C(5')	1.502(2)	O(7)-C(7)-C(8)	115.75(12)
C(3)-C(4)	1.334(2)	C(6)-C(7)-C(8)	121.43(14)
C(4)-C(10)	1.432(2)	C(9)-C(8)-C(7)	116.88(12)
C(5)-C(6)	1.368(2)	C(9)-C(8)-C(1')	123.30(12)
C(5)-C(10)	1.393(2)	C(7)-C(8)-C(1')	119.72(12)
C(6)-C(7)	1.404(2)	O(1)-C(9)-C(8)	117.51(11)
C(7')-C(12)	1.499(2)	O(1)-C(9)-C(10)	119.95(13)
C(7)-O(7)	1.3623(18)	C(8)-C(9)-C(10)	122.54(13)
C(7)-C(8)	.4063(19)	C(5)-C(10)-C(9)	118.14(14)
C(8)-C(9)	1.3962(19)	C(5)-C(10)-C(4)	124.07(13)
C(8')-C(12)	1.511(2)	C(9)-C(10)-C(4)	117.79(14)
C(9)-O(1)	1.3767(16)	O(2')-C(12)-O(1')	106.44(10)
C(9)-C(10)	1.4036(18)	O(2')-C(12)-C(7')	109.64(14)
C(11)-O(7)	1.4269(19)	O(1')-C(12)-C(7')	108.92(12)
C(12)-O(2')	1.4271(18)	O(2')-C(12)-C(8')	107.98(13)
C(12)-O(1')	1.4376(16)	O(1')-C(12)-C(8')	110.20(14)
		C(7')-C(12)-C(8')	113.43(15)
O(1')-C(1')-C(8)	112.37(10)	C(9)-O(1)-C(2)	122.94(11)
O(1')-C(1')-C(2')	102.14(10)	C(1')-O(1')-C(12)	107.14(10)
C(8)-C(1')-C(2')	114.52(11)	C(12)-O(2')-C(2')	108.89(10)
O(2)-C(2)-O(1)	116.80(13)	C(7)-O(7)-C(11)	119.26(13)
O(2)-C(2)-C(3)	126.65(14)		
O(1)-C(2)-C(3)	116.54(14)		
O(2')-C(2')-C(3')	109.43(10)		
O(2')-C(2')-C(1')	101.38(10)		

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms

Table 4- Anisotropic displacement parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for 7-metóxi-8-(1',2'-acetal-3'-metil3'-butenil)-cumarina (**15**). The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2 [h^2 a^{*2} U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$.

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
C(1')50(1)	38(1)	36(1)	-5(1)	-4(1)	-13(1)	
C(2)58(1)	55(1)	45(1)	3(1)	-11(1)	-25(1)	
C(2')52(1)	39(1)	41(1)	-9(1)	-9(1)	-12(1)	
C(3')54(1)	46(1)	51(1)	-14(1)	-9(1)	-15(1)	
C(3)78(1)	69(1)	44(1)	1(1)	-17(1)	-31(1)	
C(4')59(1)	61(1)	66(1)	-20(1)	-1(1)	-22(1)	
C(4)85(1)	74(1)	36(1)	-10(1)	-7(1)	-36(1)	
C(5')72(1)	86(1)	79(1)	5(1)	-33(1)	-22(1)	
C(5)77(1)	61(1)	46(1)	-22(1)	9(1)	-26(1)	
C(6)64(1)	47(1)	64(1)	-22(1)	11(1)	-15(1)	
C(7')62(1)	66(1)	97(1)	-35(1)	-19(1)	-3(1)	
C(7)53(1)	40(1)	51(1)	-7(1)	2(1)	-17(1)	
C(8)49(1)	38(1)	40(1)	-9(1)	1(1)	-19(1)	
C(8')125(2)	111(2)	39(1)	-12(1)	0(1)	-37(1)	
C(9)50(1)	41(1)	39(1)	-9(1)	1(1)	-21(1)	
C(10)65(1)	57(1)	40(1)	-13(1)	2(1)	-28(1)	
C(11)71(1)	48(1)	101(2)	-7(1)	-7(1)	4(1)	
C(12)55(1)	58(1)	40(1)	-17(1)	-3(1)	-14(1)	
O(1)56(1)	44(1)	37(1)	-6(1)	-6(1)	-14(1)	
O(1')52(1)	52(1)	40(1)	-14(1)	3(1)	-19(1)	
O(2')55(1)	69(1)	61(1)	-35(1)	-2(1)	-17(1)	
O(2)68(1)	59(1)	60(1)	0(1)	-12(1)	-7(1)	
O(7)70(1)	45(1)	65(1)	-7(1)	-7(1)	-2(1)	