

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

***Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estirilpironas e
cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades
biológicas**

Beatriz Garcia Mendes

**Florianópolis
2008**

Beatriz Garcia Mendes

***Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estirilpironas e
cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades
biológicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2008**

Beatriz Garcia Mendes

***Polygala sabulosa* A. W. Bennett: obtenção de estirilpironas e
cumarinas, preparo de análogos e ensaios de atividades
biológicas**

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
Orientador

Prof. Dr Antônio Euzébio G. Sant'Ana
(IQB/UFAL)

Prof. Dra. Maique W. Biavatti
(CCS/UNIVALI)

Prof. Dra. Miriam de B. Falkenberg
(CIF/UFSC)

Prof. Dr. Ricardo José Nunes
(QMC/UFSC)

Prof. Dra. Inês M. Costa Brighente
(QMC/UFSC)

*A ciência pode classificar e nomear
os órgãos de um sabiá
mas não pode medir seus encantos.*

*A ciência não pode calcular quantos cavalos de força
existem nos encantos de um sabiá*

*Quem acumula muita informação perde o condão de advinhar:
divinare.*

Os sabiás divinam.

(Manoel de Barros)

Ao Julían, meu grande amor

*Aquí ou noutro lugar
que pode ser feio ou bonito
Se nós estivermos juntos
haverá um céu azul*

(Djavan)

Agradecimentos

Mais difícil que a realização de um trabalho de doutorado é agradecer de forma adequada todas as pessoas especiais que fizeram parte dele e que também fazem parte da minha vida e sem as quais eu não teria chegado até aqui.

Agradeço primeiramente a Deus por criar esse mundo maravilhoso e nos dar a capacidade de poder ajudar a melhorar suas criações.

Ao Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti, mais que um orientador um amigo, sempre presente nestes anos de aprendizado. Muito obrigado pela oportunidade concedida e confiança em mim depositada, contribuindo para meu crescimento pessoal e científico.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Química pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Carlos e Graça, por se dedicarem incondicionalmente a nós, muitas vezes abdicando de seus sonhos, para que os nossos se tornassem realidade. Ao meu irmão Alberto, pelo amor e carinho sempre presentes.

Ao meu marido Julian, que esteve ao meu lado em cada momento, confortando, ajudando, aconselhando e compartilhando uma vida juntos. Obrigada por seu meu grande amor!

Aos amigos e colegas de laboratório: Analice, Andressa, Aline, Alexandra, Fabiana, Fernanda, Henrique, Heros, Luciana, Monique, Solomon, Verdi (*in memoriam*) e, principalmente, ao Cristian, pelo incentivo, companheirismo, idéias, risadas e por me fazerem acreditar que sempre é possível. À Prof. Dra. Inês, por tornar mais divertida a convivência no laboratório.

A minha querida Michele, por ser uma grande amiga, uma pessoa maravilhosa que eu admiro muito e que me alegrou todos os dias que passamos juntas deste a época de iniciação científica. Ao querido Wanderson, por amar tanto minha amiga e por ser também um grande amigo.

A minha querida amiga Silvânia, uma pessoa muito especial em minha vida, presente em minha vida desde o mestrado e que acabou optando por outro caminho, mas participou de cada etapa deste trabalho. Ao seu marido Luís Felipe, um grande amigo.

Ao casal Juliana e Eduardo (FURB), pela amizade e pela valiosa colaboração na realização dos ensaios de atividade antibacteriana.

À Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima (Farmacologia/UFSC) pela confiança na possibilidade de transformar o trabalho com *P. sabulosa* na tese de doutorado do Filipe. Meu agradecimento especial ao Filipe, que de um colaborador passou a ser um amigo, pela realização de todo trabalho de atividade central, pelas longas conversas, trocas de experiências, idéias e angústias. A colaboração de vocês foi essencial para a concretização deste trabalho.

À Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle (Farmacologia/UFSC) e seus alunos, Jarbas e Andreza, pela colaboração na realização dos ensaios de viabilidade celular.

Ao Prof. Dr. Carlos Leomar Zani (CPqRR/FIOCRUZ/MG), Prof. Dra. Maria Aparecida Rezende (Microbiologia/UFMG) e à aluna Susana, pela colaboração nos ensaios de atividade antiproliferativa e antifúngica.

Ao Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke (QMC/UFSC) e sua aluna Melina pelo auxílio nas análises por eletroforese capilar.

A todos os professores do curso de farmácia e de química da UFSC pela colaboração na minha formação e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos funcionários da Central de Análises na obtenção dos espectros.

Aos funcionários da secretaria de Pós-graduação, Grace e Jadir, pela colaboração, paciência e momentos de descontração.

Ao Vladimir (CAPES/UFSC) pelo auxílio e informações na obtenção da bolsa de doutorado sanduíche.

A toda a família do Julian, por ter me acolhido como uma verdadeira SILVA! Obrigada por todo carinho.

A toda a minha família, que apesar de não entender exatamente o que eu faço, apoiou-me em toda minha vida.

A todos os amigos de Sombrio, especialmente aos “cumpadres”, Andréia e Marcelo, e ao Pedro, por serem muito importantes em nossas vidas.

Adesso, vorrei fare un ringraziamento a alcune persone che sono state molto speciali in una tappa importante di questo lavoro di dottorato e della mia vita.

Al Prof. Dr. Massimo Curini, che gentilmente mi ha ospitato nel suo laboratorio all'Università degli Studi di Perugia. Non ho parole per ringraziarlo.

Al Prof. Dr. Ornelio Rosati, che mi ha accompagnato ogni giorno, insegnandomi e seguendo il mio lavoro in laboratorio. Mille grazie.

Alla Profssa Maria Carla Marcottulio, una persona molto speciale, che dal primo giorno mi ha trattato come una figlia. Alla sua carina figlia Giorgia, una bambina bellissima, que praticamente mi ha addotato come sua sorella più grande.

Al Fausto, che all'inizio manteneva la porta chiusa, ma che ad ogni giorno lasciava aprirsi un po'. Grazie dei suggerimenti.

Alla mia carina amica Claudia, che mi ha contrattato come sua avvocata. Mi manchi...

Agli amici Salvatore, Gildas, Serena, Caroline e Fabio che hanno reso i miei giorni in laboratorio più felice e pure alla signora Grazia!

Alle mie eterne amiche Maria Assunta, Serena e Serafina, che mi hanno accolta generosamente alla loro casa, mi hanno regalato un amore così grande, perciò hanno permesso che la mancanza del Brasile fosse meno intensa. Voi sarete sempre nel mio cuore.

Alla mia amica brasiliana, giapponese, italiana, filippina Mayura, per la amicizia e per i momenti di svago.

A tutti gli altri amici che ho lasciato in Italia.

Ai miei professori di italiano in Brasile, Neusa Locatelli e Luciano de Oliveira, che mi hanno fatto imparare e amare la lingua italiana, e ai miei colleghi, specialmente Carmen Lucia.

Grazie a tutti

Obrigada a todos

Beatriz

RESUMO

No presente estudo, realizou-se uma reinvestigação fitoquímica da espécie *Polygala sabulosa* para a obtenção dos principais metabólitos secundários, o preparo de moléculas análogas e, paralelamente, a realização de ensaios de atividades biológicas. A análise dos componentes do óleo volátil das raízes mostrou o salicilato de metila como componente majoritário (83,8%), e para as partes aéreas a 6-pentil-4-metoxi-pirona (47,0%) e o salicilato de metila (31,5%) são os principais componentes. A avaliação da atividade antibacteriana do óleo das partes aéreas revelou uma importante ação contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas com CIM= 0,15 µL/mL. Através do fracionamento dos extratos de flores, folhas e caules, seis estirilpironas foram isoladas: DST 1, DST 2, DST 3, STY 4, STY 5 e STY 6. A análise por CG da mistura de estirilpironas revelou a presença de outras duas estirilpironas, a STY [51] e a 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-13-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona [52], inédita na espécie. Além disso, a xantona 1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona [54] foi identificada nesta mistura, sendo um importante resultado do ponto de vista quimiotaxonômico. A avaliação da ação central, o EBH e a FAE promoveram um efeito do tipo ansiolítico, anticonvulsivante e hipno-sedativo, sendo as ações mais evidentes para a FAE. Os experimentos *in vitro* mostraram que as diidro- e estirilpironas apresentam afinidade pelo sítio BDZ do receptor GABA_A. Os estudos preliminares de toxicologia aguda e sub-crônica revelaram que a administração oral da FAE em camundongos mostrou boa tolerabilidade e baixa toxicidade. Os estudos das variações dos teores de estirilpironas revelaram que existem diferenças sazonais no conteúdo, sendo que a DST 1 e STY 4 apresentaram o maior valor médio nas coletas. A escopoletina [8], isolada em pouca quantidade no EBH, foi obtida com sucesso a partir da 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7], isolada em grande quantidade na espécie estudada. A partir da escopoletina, obtiveram-se 11 derivados: seis ésteres benzoílicos e cinco ésteres alquílicos. Vinte e duas cumarinas foram obtidas através da reação de von Pechmann e outras sete através da reação de Knoevenagel. A avaliação da atividade citotóxica contra as diferentes células tumorais mostrou bons resultados, destacando-se as cumarinas sintéticas com o clorometileno ligado ao C-4. A atividade antibacteriana das cumarinas foi observada principalmente para os ésteres benzoílicos derivados da escopoletina, sendo mais importante contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma CIM= 0,43 µmol/mL para o *p*-bromo benzoilato de escopoletina [11]. As cumarinas não apresentaram atividade antifúngica significativa. Extratos e frações de *P. sabulosa* apresentaram uma atividade antioxidante regular nos ensaios do DPPH e do potencial redutor. A análise dos componentes fenólicos por eletroforese capilar mostrou a presença de três heterosídeos da quercetina.

ABSTRACT

In this study, a phytochemical re-investigation of the *Polygala sabulosa* specie was done to obtain the main secondary metabolites, the preparation of similar molecules and the evaluation of biological activities. The analysis of the volatile oil showed methyl salicylate (83.8%) as the main constituent in the roots and the 6-pentyl-4-methoxypyronone (47.0%) and methyl salicylate (31.5%) as the main components for the aerial parts. The assessment of the antibacterial activity of the oil from the aerial parts showed a major action against bacteria *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, both with CIM 0.15 μ L/mL. By the successive silica gel column chromatography of the flowers, leaves or stems extracts, six styrylpyrones were isolated: three dihydrostyryl-2-pyrones (DST **1**, DST **2**, DST **3**) and three styryl-2-pyrones (STY **4**, STY **5** and STY **6**). The analysis of the styrylpyrones mixture by GC revealed the presence of two other styrylpyrones, the STY [51] and 4-methoxy-6-(11,12-methylenedioxy-13-methoxystyryl)-2-pyrone [52], new in this specie. Moreover, the xanthone 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone [53] was identified in this mixture, an important result from a chemotaxonomic view point. The evaluation of the central effects showed that the crude extract (EBH) and the ethyl acetate fraction (FAE) promoted an anticonvulsant, hypno-sedative and anxiolytic-like effects and that these effects were more evident for FAE. The in-vitro experiments showed that the dihydro- and styrylpyrones exhibited high affinity with benzodiazepine binding sites of the GABA_A. The preliminary analysis of acute and sub-chronic toxicity revealed that oral administration of the FAE in mice showed good tolerability and low toxicity. The studies of changes in the levels of styrylpyrones revealed that there were seasonal differences in content, and the DST **1** and STY **4** presented the highest average in the collection. The scopoletin [8], isolated in low quantities in EBH, was successfully obtained from the 6-methoxy-7-preniloxycoumarin [7], isolated in high quantity in this specie. From the scopoletin, eleven derivatives were prepared: six benzoic esters and five alkyl esters. Twenty-two coumarins were obtained by the von Pechmann reaction and seven others by the Knoevenagel reaction. The cytotoxic activity evaluation against different tumor cells showed good results, where the most active compounds were synthetic coumarins with methylene Chloride linked to the C-4. The antibacterial activity of coumarins was observed principally in the benzoic esters derived from scopoletin, with the scopoletin p-bromo benzoylate [11] being more important against the bacterium *P. aeruginosa*, with a MIC = 0.43. The coumarins showed no significant antifungal activity. Extracts and fractions of *P. sabulosa* had an antioxidant activity in the regular testing of DPPH and reducing potential. The analysis of phenolic components by capillary electrophoresis showed the presence of three quercetin heterosides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estruturas das principais classes de compostos já isolados do gênero <i>Polygala</i>	11
Figura 2: Estrutura de algumas xantonas isoladas de espécies de <i>Polygala</i>	12
Figura 3: <i>Polygala sabulosa</i> no seu habitat natural	13
Figura 4: Proposta para biossíntese de estilipironas na espécie <i>P. sabulosa</i>	16
Figura 5: Algumas estilil-lactonas isoladas de espécies do gênero <i>Goniothalamus</i>	16
Figura 6: Proposta da rota biossintética de cumarinas em vegetais superiores	21
Figura 7: Origem biossintética de derivados cumarínicos	22
Figura 8: Fluxograma de isolamento dos constituintes químicos do extrato diclorometânico das flores de <i>P. sabulosa</i> - Coluna 1	30
Figura 9: Fluxograma de isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico dos caules (coleta março/2004)- Coluna 2	31
Figura 10: Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico das folhas (coleta março/2004)- Coluna 3	32
Figura 11: Estrutura proposta para o componente majoritário do óleo volátil das partes aéreas de <i>P. sabulosa</i> 6-pentil-4-metoxi-2-pirona [49] e esquema de fragmentações proposta para a mesma.....	64
Figura 12: Espectros de massas dos compostos 6-pentil-4-metoxi-2-pirona [49] (A) e do seu derivado 6-heptil-4-metoxi-2-pirona [50] (B) presentes no óleo volátil das partes aéreas de <i>P. sabulosa</i>	65
Figura 13: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da diidroestirilpirona [1] (DST 1)	70
Figura 14: Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) da estilipirona [5] (STY 5)	71
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da estilipirona [6] (STY 6)	72
Figura 16: Cromatograma de íons totais dos componentes presentes na mistura de estilipironas.....	73
Figura 17: Esquema de formação do íon tropílio (m/z 135 u.m.a.) a partir da diidroestirilpirona [1] (DST 1) e seu respectivo espectro de massas ..	74
Figura 18: Espectro de massas da diidroestirilpirona [2] (DST 2)	74

Figura 19: A- Esquema de formação dos íons m/z 274, 259 e 231 a partir da estirilpirona [5] (STY 5) e B- seu respectivo espectro de massas.....	75
Figura 20: Espectro de massas da 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-10,14-dimetoxi-estiril)-2-pirona [51] (STY 51).....	76
Figura 21: Espectro de massas referente à sobreposição da estirilpirona [4] + diidroestirilpirona [3]	77
Figura 22: Espectro de massas da estirilpirona [6] (STY 6)	78
Figura 23: Espectro de massas para a estrutura proposta como 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-13-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona [52]	79
Figura 24: Espectro de massas do composto com tr= 30,91 min (Pico H)	80
Figura 25: Cromatograma dos íons totais da A)- Mistura de estirilpironas, B)- 1,5-diidroxido-2,3-dimetoxixantona [54], C)- Co-injeção da mistura de estirilpironas + 1,5-diidroxido-2,3-dimetoxixantona [54]	82
Figura 26: Efeito do tratamento oral com o EBH (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) de <i>P. sabulosa</i> no comportamento de camundongos avaliados no LCE	85
Figura 27: Efeito do tratamento oral com o EBH (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) no sono induzido pelo pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.).....	85
Figura 28: Efeito do tratamento oral com o EBH (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) na convulsão induzida pelo PTZ.	86
Figura 29: Efeito da 6-metoxi-7-preniloxicumarina (6-MC), fração aquosa (FA), fração hexano (HEX) (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) e a fração acetato de etila (FAE) (125 – 1.000 mg/kg, v.o.) na latência para indução (A) e na duração do sono induzido pelo éter etílico (B)	87
Figura 30: Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila (FAE) (250 – 1.000 mg/kg, p.o.) no comportamento de camundongos avaliados no LCE	88
Figura 31: Cromatograma de íons totais da FAE de <i>P. sabulosa</i> utilizada nos ensaios de ação sob o sistema nervoso central	89
Figura 32: Efeito da DST 1 (0,2 – 25 pmol), DST 3 (0,3 fmol – 25 pmol), STY 4 (1 - 25 pmol) e STY 6 (8 fmol – 25 pmol) no modelo do LCE no parâmetro “Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos”	90
Figura 33: Curvas de competição entre a DST 1, 2, 3 e STY 4, 5, 6 (0,1 - 600 µM) e o [³ H]-flunitrazepam (0,42 nM) em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos	92

Figura 34: Conteúdo relativo de estirilpironas nos diferentes meses de coleta: setembro (2002), fevereiro (2003), novembro (2003) e março (2004)	95
Figura 35: Variação do conteúdo individual das diidro- e estirilpironas nas diferentes coletas	95
Figura 36: Estrutura da 6-metoxi-7-preniloxicumarina obtida através do fracionamento do EBH de <i>P. sabulosa</i> [7]	103
Figura 37: Estrutura da 6-metoxi-7-hidroxycumarina (escopoletina) [8] obtida através do fracionamento do extrato do caule de <i>P. sabulosa</i>	103
Figura 38: Obtenção de escopoletina [8] a partir da 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7]	105
Figura 39: Modificações estruturais propostas para a escopoletina	108
Figura 40: Reação geral para a síntese dos ésteres benzoílicos derivados da escopoletina	107
Figura 41: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do <i>p</i> -clorobenzoilato de escopoletina [10]	108
Figura 42: Reação geral para obtenção dos ésteres alquílicos derivados da escopoletina.....	109
Figura 43: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do butanoato de escopoletina [17]	110
Figura 44: Esquema geral da obtenção de cumarinas através da condensação de Pechmann utilizando o α -ZrP-SO ₃ H como catalisador ácido em condições livres de solventes	113
Figura 45: Estrutura do catalisador ácido α -Zr(CH ₃ PO ₃) _{1.2} (O ₃ PC ₆ H ₄ SO ₃ H) _{0.8}	118
Figura 46: Esquema geral da obtenção de cumarinas através da reação de Knoevenagel utilizando o α -Zr(KPO ₄) ₂ como catalisador básico em condições livres de solventes	120
Figura 47: Estrutura tridimensional do catalisador básico α -Zr(KPO ₄) ₂	122
Figura 48: Principais cumarinas com atividade citotóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	126
Figura 49: Efeito das cumarinas [28], [30], [32] e [34] (10 – 50 μ M) sobre a viabilidade celular de células de melanoma murino (B16F10) pelo teste de redução do MTT	130
Figura 50: Principais cumarinas com atividade antiproliferativa frente a linhagem de células de carcinoma mamário MCF-7.....	133

- Figura 51: Eletroferograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. sabulosa* e espectro de UV dos três compostos detectados no extrato (1A, 1B e 1C).....144
- Figura 52: Eletroferograma dos extratos hidroalcoólicos das folhas, flores e caules de *P. sabulosa*.....145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade biológica de extratos e compostos isolados de espécies do gênero <i>Polygala</i>	6
Tabela 2: Kavalactonas presentes nos rizomas de kava-kava.....	19
Tabela 3: Estrutura das diidroestirilpironas [1], [2], [3] e estirilpironas [4], [5] e [6]	69
Tabela 4: Fragmentações do composto em análise e das duas xantonas selecionadas	81
Tabela 5: Comparação entre os valores das atividades <i>in vivo</i> (LCE) e <i>in vitro</i> (<i>binding</i>) e as quantidades individuais de cada estirilpirona nas respectivas coletas	96
Tabela 6: Efeito do tratamento sub-crônico (32 dias) com a fração acetato de etila (FAE) de <i>Polygala sabulosa</i> nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos machos e fêmeas	101
Tabela 7: Síntese de cumarinas a partir de fenóis com diferentes β -ceto ésteres catalisada pelo α -Zr-PSO ₃ H.....	114
Tabela 8: Comparação de algumas reações entre o resorcinol (A) e o acetoacetato de etila (B) empregando diferentes catalisadores	117
Tabela 9: Obtenção de cumarinas a partir de <i>o</i> -hidroxibenzaldeídos com dietilmalonato catalisada pelo α -Zr(KPO ₄) ₂	121
Tabela 10: Dose letal (DL ₅₀) das diferentes cumarinas frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	125
Tabela 11: Efeito das cumarinas (50 μ M) sobre a viabilidade celular de células de melanoma murino (B16F10) pelo teste de redução do MTT.....	128
Tabela 12: Atividade antiproliferativa das cumarinas (20 μ g/mL) frente a linhagem celular de câncer de mama (MCF-7).....	132
Tabela 13: Atividade antiproliferativa das cumarinas (20 μ g/mL) frente a linhagem celular de câncer de rim (TK10).....	134
Tabela 14: Atividade antibacteriana das cumarinas expressa como CIM (μ mol/mL)	136
Tabela 15: Teor de fenóis totais, flavonóides totais, capacidade seqüestrante do radical livre DPPH e potencial redutor do EBH e frações de <i>P. sabulosa</i>	143

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[³H]-FNZ: [³H]-flunitrazepam
6-MC: 6-metoxi-7-preniloxicumarina
ATCC: Coleção de Cultura Tipo Americana (*American Type Culture Collection*)
B16F10: linhagem celular representativa de melanoma murino
BDZ: benzodiazepínico (s)
CC: cromatografia em coluna
CCD: cromatografia em camada delgada
CCf: cromatografia em coluna flash
CG: cromatografia gasosa
CG-EM: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM: Concentração Inibitória Mínima
d: dubleto
DL₅₀: dose letal 50%
DMSO: dimetilsulfoxido
DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazilaa
DST: Diidroestirilpirona (s)
DZP: diazepam
EBH: extrato bruto hidroalcoólico
EC: eletroforese capilar
E.P.M: erro padrão médio
FA: fração aquosa
FAE: fração acetato de etila
GABA: ácido γ -aminobutírico
HEX: fração hexano
Hz: hertz
i.c.v.: intracerebroventricular
i.p.: intraperitonal
i.v.: intravenosa
IC_{95%}: intervalo de confiança 95%
IV: infravermelho
J: constante de acoplamento
Ki: constante de inibição ou constante de afinidade
LCE: labirinto em cruz elevado

m: multiplete
MCF-7: linhagem celular representativa de carcinoma de glândula mamária
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina
MTT: 3-[4,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
pf: ponto de fusão
PTZ: pentilenotetrazol
Py: piridina
q: quarteto
Rf: fator de retenção
RMN ¹³C: ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹H: ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s: singleto
sl: singleto largo
SNC: sistema nervoso central
Sp1: ponto 1 - margens da Rodovia 282
Sp2: ponto 2 - topo do Morro da Antena
STY: Estirilpirona
t: tripleto
TA: temperatura ambiente
THF: tetraidrofurano
TK10: linhagem celular de tumor de rins
u.m.a: unidades de massa atômica
UFC: Unidades Formadoras de Colônias
v.o.: via oral

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1- Considerações gerais sobre a família Polygalaceae	5
2.1.1- Gênero <i>Polygala</i>	5
2.1.2- <i>Polygala sabulosa</i>	13
2.2- Estirilpironas	15
2.3- Cumarinas	20
3- OBJETIVOS	24
3.1- Objetivos gerais	25
3.2- Objetivos específicos	25
4- PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	26
4.1- Materiais	27
4.1.1- Equipamentos utilizados	27
4.2- Material vegetal	28
4.3- Obtenção dos extratos	28
4.4- Fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico	29
4.5- Isolamento e identificação dos compostos.....	29
4.5.1- Isolamento dos constituintes químicos do extrato diclorometânico das flores- Coluna 1	30
4.5.2- Isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico dos caules (coleta março/2004)- Coluna 2	31
4.5.3- Isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico das folhas (coleta março/2004)- Coluna 3	31
4.6- Análise dos componentes voláteis	34
4.6.1- Extração e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)	34
4.6.2- Atividade antibacteriana do óleo volátil	35

4.7- Estirilpironas	36
4.7.1- Análise por CG-EM das estirilpironas	36
4.7.2- Avaliação do teor de diidro- e estirilpironas em diferentes coletas ...	36
4.7.3- Atividade no sistema nervoso central (SNC)	37
4.8- Cumarinas	41
4.8.1- Procedimento padrão para obtenção de escopoletina a partir da preniloxicumarina	41
4.8.2- Procedimento geral para benzoilação/acilação da escopoletina com cloretos de ácido- obtenção de ésteres benzoílicos e alquílicos.....	41
4.8.3- Procedimento geral para obtenção de cumarinas através da reação de von Pechmann	45
4.8.4- Procedimento geral para obtenção de cumarinas através da reação de Knoevenagel	51
4.8.5- Atividade citotóxica	53
4.8.5.1- Atividade tóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i>	53
4.8.5.2- Ensaio de viabilidade de células tumorais	54
4.8.5.3- Ensaio de atividade antiproliferativa de células tumorais	55
4.8.6- Atividade antimicrobiana	56
4.8.6.1- Atividade antibacteriana	56
4.8.6.2- Atividade antifúngica	56
4.9- Avaliação do potencial antioxidante e análise dos constituintes fenólicos em extratos e frações	57
4.9.1- Determinação do teor de compostos fenólicos totais	57
4.9.2- Determinação do teor de flavonóides totais	58
4.9.3- Ação seqüestradora do radical livre DPPH	58
4.9.4- Determinação do potencial redutor	58
4.9.5- Análise dos compostos fenólicos por eletroforese capilar (EC).....	59
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1- Análise dos componentes voláteis	61

5.1.1- Análise do óleo volátil	61
5.1.2- Atividade antibacteriana do óleo volátil	66
5.2- Estirilpironas	67
5.2.1- Identificação das estirilpironas isoladas	68
5.2.2- Análise da fração estirilpironas por CG-EM	72
5.2.3- Estudo da ação no sistema nervoso central (SNC)	83
5.2.3.1- Efeito do tratamento com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de <i>Polygala sabulosa</i>	84
5.2.3.2- Efeito do tratamento com a fração acetato de etila de <i>Polygala sabulosa</i>	87
5.2.3.3- Efeito das estirilpironas isoladas de <i>Polygala sabulosa</i>	89
5.2.3.4- Ensaio de <i>binding</i>	91
5.2.4- Avaliação do teor de diidro- e estirilpironas em diferentes coletas de <i>P. sabulosa</i>	93
5.2.5- Ensaio de toxicidade	97
5.3- Cumarinas	102
5.3.1- Identificação das cumarinas isoladas	102
5.3.2- Obtenção de escopoletina a partir da preniloxicumarina	104
5.3.3- Modificações estruturais na escopoletina	105
5.3.3.1- Obtenção de ésteres benzoílicos derivados da escopoletina ...	107
5.3.3.2- Obtenção de ésteres alquílicos derivados da escopoletina	109
5.3.4- Síntese de cumarinas	110
5.3.4.1- Obtenção de cumarinas através da reação de von Pechmann.....	111
5.3.4.2- Obtenção de cumarinas através da reação de Knoevenagel ...	119
5.3.5- Atividade citotóxica	123
5.3.5.1- Atividade tóxica frente a larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	124
5.3.5.2- Ensaio de viabilidade de células tumorais	127
5.3.5.3- Ensaio de atividade antiproliferativa de células tumorais	131

5.3.6- Atividade antimicrobiana	135
5.3.6.1- Atividade antibacteriana	135
5.3.6.2- Atividade antifúngica	138
5.4- Avaliação do potencial antioxidante do extrato e frações de <i>P. sabulosa</i> e análise dos constituintes fenólicos	139
5.4.1- Determinação do teor de compostos fenólicos totais	140
5.4.2- Determinação de flavonóides totais	140
5.4.3- Ação seqüestradora do radical livre DPPH	141
5.4.4- Determinação do potencial redutor	142
5.4.5- Análise por eletroforese capilar do conteúdo fenólico em extratos hidroalcoólicos de diferentes partes de <i>P. sabulosa</i>	143
6- CONCLUSÕES	147
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150

1 - Introdução

Os metabólitos secundários produzidos por plantas tiveram um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna. Historicamente, o desenvolvimento da química orgânica ocorreu paralelamente ao estudo de plantas, principalmente a partir do século XIX, quando foram registrados os primeiros estudos sobre plantas com embasamento científico. Desses estudos foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como princípios ativos eficazes, e que até hoje ainda são muito empregados no tratamento de certas doenças (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

Assim, até meados do século XX, os medicamentos de origem vegetal constituíam a base da terapia medicamentosa, porém com o desenvolvimento da síntese química, novos fármacos sintéticos foram rapidamente introduzidas na terapêutica. Atualmente cerca de 50% dos fármacos utilizados são de origem sintética e 25% originários de plantas, isolados diretamente ou por semi-síntese a partir de um precursor vegetal (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002). Nos últimos anos, o interesse pelos medicamentos de origem vegetal voltou a crescer, acompanhado de um aumento significativo nos investimentos em pesquisa (TOPLISS et al., 2002).

A natureza, de um modo geral, é a responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas, entretanto, é o reino vegetal que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de substâncias úteis na terapêutica (MONTANARI; BOLZANI, 2001). A variedade e a complexidade dos metabólitos secundários de plantas e organismos marinhos ainda é inalcançável por métodos laboratoriais. Isto seria a consequência direta de milhões de anos de evolução, atingindo um refinamento elevado de formas de proteção e resistência às intempéries do clima, poluição e predadores (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; VERPOORTE, 1998).

A química medicinal em suas inúmeras vertentes engloba o planejamento racional de novas substâncias, envolvendo a síntese ou a modificação molecular, o isolamento a partir de fontes naturais, identificação, elucidação estrutural e a compreensão a nível molecular dos processos bioquímicos, farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos. E então, a proposição e validação de modelos matemáticos que permitam estudos de relação entre a estrutura química e a atividade farmacológica e ou toxicológica (AMARAL; MONTANARI, 2002).

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando com o isolamento de produtos naturais, modificações estruturais e síntese de compostos análogos a estes, com o intuito de obter moléculas potencialmente ativas contra diversas patologias.

A quimiosistemática do gênero *Polygala* está relacionada principalmente a biossíntese de xantonas. No entanto, detectou-se na espécie *Polygala sabulosa* A.W. Bennett um desvio da rota metabólica das xantonas levando a biossíntese de estilipironas, que possuem uma similaridade estrutural às kavalactonas. Utilizando o princípio da similaridade, podemos ver a espécie *P. sabulosa* como uma planta de potencial atividade no sistema nervoso central e uma possível aplicação no tratamento de distúrbios de ansiedade.

Além das estilipironas, a espécie em estudo apresenta outras classes de metabólitos secundários de interesse, como cumarinas, flavonóides, esteróis e salicilato de metila, responsável pelo odor característico de suas raízes.

Assim, dando continuidade ao estudo com a espécie *P. sabulosa* como o foco na obtenção de entidades químicas promissoras do ponto de vista terapêutico, nosso interesse neste estudo foi a obtenção de estilipironas para avaliação das suas atividades centrais, isolamento das cumarinas, obtenção de análogos por síntese e semi-síntese para avaliação das atividades citotóxicas e antimicrobianas, bem como o estudo da composição do óleo volátil e avaliação de sua atividade antibacteriana, e finalmente, o estudo da atividade antioxidante do extrato e frações.

2 - Revisão Bibliográfica

2.1- Considerações gerais sobre a família Polygalaceae

O número real de representantes da família Polygalaceae é controverso, mas se acredita que seja constituído por mais de 1000 espécies reunidas em 16 a 18 gêneros (FURNESS; STAFFORD, 1995). Os gêneros *Polygala* e *Monnina* são os maiores representantes, incluindo aproximadamente 600 e 150 espécies respectivamente. As espécies pertencentes a esta família estão dispersas em todo mundo, com exceção da Nova Zelândia e das zonas árticas e antárticas, sendo abundantes nos trópicos (LÜDTKE, 2004).

Espécies pertencentes à família Polygalaceae são conhecidas por serem uma importante fonte de xantonas (LANNANG et al., 2006). Embora os estudos fitoquímicos tenham sido direcionados aos gêneros *Polygala* e *Bredemeyera*, muitas xantonas já foram isoladas de outros gêneros desta família (OLIVEIRA; SILVEIRA, 2000).

2.1.1- Gênero *Polygala*

Espécies pertencentes ao gênero *Polygala* são ervas, subarbustos e raras vezes árvores com folhas normalmente alternas e ocasionalmente opostas e verticiladas, possuem flores brancas, esverdeadas, roxas ou rosas, hermafroditas e zigomorfas, frutos capsulares, drupáceos ou samaróides e sementes com corpo glabro, pubérulo e globoso (WURDACK; SMITH, 1971).

O gênero *Polygala* é o maior representante da família Polygalaceae, incluindo aproximadamente 600 espécies de ampla distribuição geográfica. WURDACK e SMITH (1971) descreveram a ocorrência de 19 espécies no estado de Santa Catarina, dentre elas *P. sabulosa*, *P. cyparissias* e *P. paniculata* que estão sendo estudadas pelo nosso grupo de pesquisa.

Apesar do grande número de representantes, poucas espécies do gênero *Polygala* foram estudadas do ponto de vista químico e biológico, destacando-se as atividades antiinflamatória, antioxidante e hipoglicemiante. A tabela 1 sumariza os estudos de atividades biológicas já realizados com plantas deste gênero. Quanto às ações no sistema nervoso central, a revisão identificou alguns trabalhos pré-clínicos realizados, destacando as propriedades neuritogênica e neuroprotetora, a redução dos sinais de abstinência induzida pela retirada abrupta de opióides, os efeitos mnemônicos e atividades antipsicótica, antidepressiva e antiestresse.

Tabela 1: Atividade biológica de extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Polygala*.

Espécie	Compostos/Extratos	Atividade biológica	Referência
<i>Polygala alpestris</i>	Polifenóis	Antioxidante	CERVELLATI et al., 2004
<i>P. amarella</i>	Saponinas	Imunoestimulante	DESBENE et al., 1999
<i>P. arillata</i>	Xantonas	Inib. aldose redutase	MAO et al., 1997
<i>P. aureocauda</i>	Saponinas	Hipolipêmica	LI et al., 2007
	Saponinas	Hepatoprotetora	GUO et al., 2006
	Polissacarídeos	Imunoestimulante	QIN; XIA; LI, 1998
<i>P. arvensis</i>	Extrato	Hepatoprotetora	DHANABAL et al., 2006
<i>P. caudata</i>	Euxantona	Estimulante de cresc. neuronal	NAIDU et al., 2007
	Xantonas	Neuritogênica	HA et al., 2006
	Xantonas	Antioxidante e vasodilatadora	LINN et al., 2005
	Xantonas	Neuritogênica	MAK et al., 2001
	Xantonas	Antitumoral	MAK et al., 1999
<i>P. cyparissias</i>	Xantonas	Antiinflamatória	EL SAYAH et al., 1999
	Extrato/xantona	Antinociceptiva	CAMPOS et al., 1997
<i>P. fallax</i>	Saponinas	Hipolipêmica	XU et al., 2006
	Xantonas	Antioxidante	LIN et al., 2005
	Extrato	Antiinflamatória	KOU et al., 2003
<i>P. hongkongensis</i>	Cumarina e flavonóides	Antioxidante	WU et al., 2007
<i>P. japonica</i>	Saponinas triterpênicas	Antiinflamatória	WANG et al., 2008
	Extrato	Antiinflamatória	KOU et al., 2006
	Saponinas	Antidepressiva	LI et al., 2006
<i>P. macradenia</i>	Fração	Antitumoral	HOFFMANN; WIEDHOPF; COLE, 1977
<i>P. myrtifolia</i>	Extrato	Antifúngica	MOTSEI et al., 2003
	Extrato	Antibacteriana	LALL; MEYER, 1999
<i>P. paniculata</i>	Extrato	Gastroprotetora	LAPA et al., 2007
	Xantona	Neuroprotetora	FRANCO et al., 2007
	Extrato	Neuroprotetora	FARINA et al., 2005
	Extrato e frações	Tripanocida	PIZZOLATTI et al., 2003
	Extrato	Citotóxica	MONTANHER et al., 2002

Continuação da tabela 1

<i>P. sabulosa</i>	Extrato, cumarinas, esterol e estirilpironas	Antinociceptiva	RIBAS et al., 2008
	Cumarinas, estirilpironas, flavonóides e esteróis	Tripanocida	PIZZOLATTI et al., 2008a
	Extratos, frações, estirilpironas	Anticonvulsivante e ansiolítica	DUARTE et al., 2008
	Cumarina e quercetina	Neuroprotetora	FRANCO et al., 2007
	Extratos, frações, estirilpironas	Ansiolítica	DUARTE et al., 2007
	Extratos, frações, cumarinas, esterol e estirilpironas	Antinociceptiva	MEOTTI et al., 2006
<i>P. senega</i>	Extrato	Tripanocida	PIZZOLATTI et al., 2003
	Extrato e frações	Citotóxica	MONTANHER et al., 2002
	Saponina	Imunoestimulante	KATSELIS et al., 2007
	Extrato	Antioxidante	AMAROWICZ et al., 2004
	Triterpenos	Hipoglicemiante	KAKO et al., 1997
	Extrato e triterpenos	Hipoglicemiante	KAKO et al., 1996
<i>P. tenuifolia</i>	Saponinas e glicosídeos	Hipoglicemiante e inibidor absorção EtOH	YOSHIKAWA et al., 1996
	Saponinas	Inibidor absorção EtOH	YOSHIKAWA et al., 1995
	Senegina II	Hipoglicemiante	KAKO et al., 1995
	Saponinas	Neuroprotetora	LI et al., 2008
	Extratos e derivados ác. cinâmico	Efeito mnemônico	SUN et al., 2007
	Poligalatenosídeos (oligossacarídeos)	Antidepressiva	CHENG et al., 2006
<i>P. tenuifolia</i>	Extrato	Neuroprotetora	NAITO; TOHDA, 2006
	Extrato	Antiisquêmica	PARK et al., 2006
	Extrato	Contração musc. uterina	XU; WANG; QIN, 2005
	Extrato	Antipsicótica	SCHIN et al., 2004
	Extrato	Efeito mnemônico	CHEN et al., 2004
	Saponinas, Tenuigenina 3,4,5- trimetoxicinâmico	Doença de Alzheimer Anti-estresse	JIA et al., 2004 KAWASHIMA et al., 2004

Continuação da tabela 1

	Oligossacarídeo acilado	Neuroprotetora	IKEYA et al., 2004
	Saponinas	Neuroprotetora	YABE et al., 2003
	Saponinas	Antipsicótica	CHUNG et al., 2002
	Extrato	Hepatoprotetora	KOO et al., 2000
	Extrato	Antiinflamatória	KIM et al., 1998
	Extrato	Larvicida	RHEE et al., 1981
<i>P. telephioides</i>	Extrato	↓ abstinência causada por opióides	EGASHIRA et al., 2006
	Polifenóis	Antioxidante	CERVELLATI et al., 2004
<i>P. vulgaris</i>	Extratos, frações, xantona, aucuparina	Antitumoral	DALL'ACQUA et al., 2002

As espécies mais pesquisadas do ponto de vista químico e farmacológico são *Polygala senega* e *Polygala tenuifolia*. Além disso, tradicionalmente, são as espécies que mais se destacam dentro do gênero pelo elevado valor sócio-econômico.

Polygala senega L., originária da América do Norte, é utilizada popularmente neste continente para o tratamento de tosse e de picadas de cobra. O extrato seco ou fluído das raízes é utilizado como antitussígeno, expectorante, no tratamento de bronquite crônica e faringite. Estas propriedades estão relacionadas principalmente ao efeito irritante na membrana mucosa do trato respiratório causado pelas saponinas triterpênicas. Quimicamente, a espécie contém até 12% destes compostos, consistindo de 6-10 diferentes saponinas, sendo a senegina II, III, IV e senega-saponinas *a*, *b* e *c* as mais importantes (ESTRADA et al., 2000). No Brasil, a utilização de extratos e tinturas das raízes de *Polygala senega* está regulamentada pela Resolução Nº 89 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)¹. (<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10241&word=89>).

Polygala tenuifolia W. é uma espécie bem conhecida na Medicina Tradicional Chinesa sendo utilizada tradicionalmente como expectorante e antipsicótica (PARK et al., 2005). Estudos farmacológicos em roedores sugerem importantes ações no tratamento e prevenção da demência (doença de Alzheimer) (CHEN et al., 2004), como antipsicótico, sedativo, neuroprotetor, no melhoramento cognitivo, de memória e inteligência, além do efeito antiinflamatório (SCHIN et al., 2004). Atualmente, a tenuigenina, extrato obtido a partir de *P. tenuifolia* cuja composição é na maior parte de onjisaponinas, vem sendo utilizada na China para o tratamento da doença de Alzheimer (JIA et al., 2004). Várias xantonas (JIANG; TU, 2002; FUJITA et al., 1992; IKEYA et al., 1991), saponinas (NAGAI et al., 2001; JIA et al., 2004), derivados do ácido cinâmico (KAWASHIMA et al., 2004; ITO et al., 1977) e ésteres de oligossacarídeos (IKEYA et al., 2004; JIANG; TU, 2002) já foram isolados desta espécie.

¹ As indicações/ações terapêuticas do uso de extratos e tinturas de *Polygala senega* são relacionadas a bronquite crônica e faringite sendo a dose diária de 18 - 33 mg de saponinas triterpênicas e sua dispensação não necessita de prescrição médica. (<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10241&word=89>).

Segundo Marques (1996), muitas espécies do gênero *Polygala* são caracterizadas pelo acúmulo de salicilato de metila em suas raízes, sendo o principal composto responsável pelas características organolépticas deste órgão nestas plantas, tal como observado nas espécies *P. cyparissias*, *P. paniculata* (PIZZOLATTI et al., 2008b) e *P. senega* (HAYASHI; KAMEOKA, 1995).

Estudos fitoquímicos têm mostrado a presença de diversos metabólitos secundários no gênero *Polygala* tais como: saponinas, como a onjisaponina E isolada de *Polygala tenuifolia* (NAGAI et al., 2001); oligossacarídeos esterificados como reiniose D, isolada das raízes de *Polygala fallax* (ZHANG et al., 1997); flavonóides livres e heterosídicos como a ombuína- β -rutenosídeo isolada de *Polygala chinensis* (RAO; RAMAN, 2004); derivados livres e esterificados do ácido cinâmico, como o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico, obtido a partir da espécie *Polygala tenuifolia* (KAWASHIMA et al., 2004); cumarinas como a febalosina, isolada de *Polygala paniculata* (PIZZOLATTI et al., 2002); esteróis como α -espinasterol, isolado da espécie *Polygala cyparissias* (PINHEIRO et al., 1998), entre outros (Figura 1).

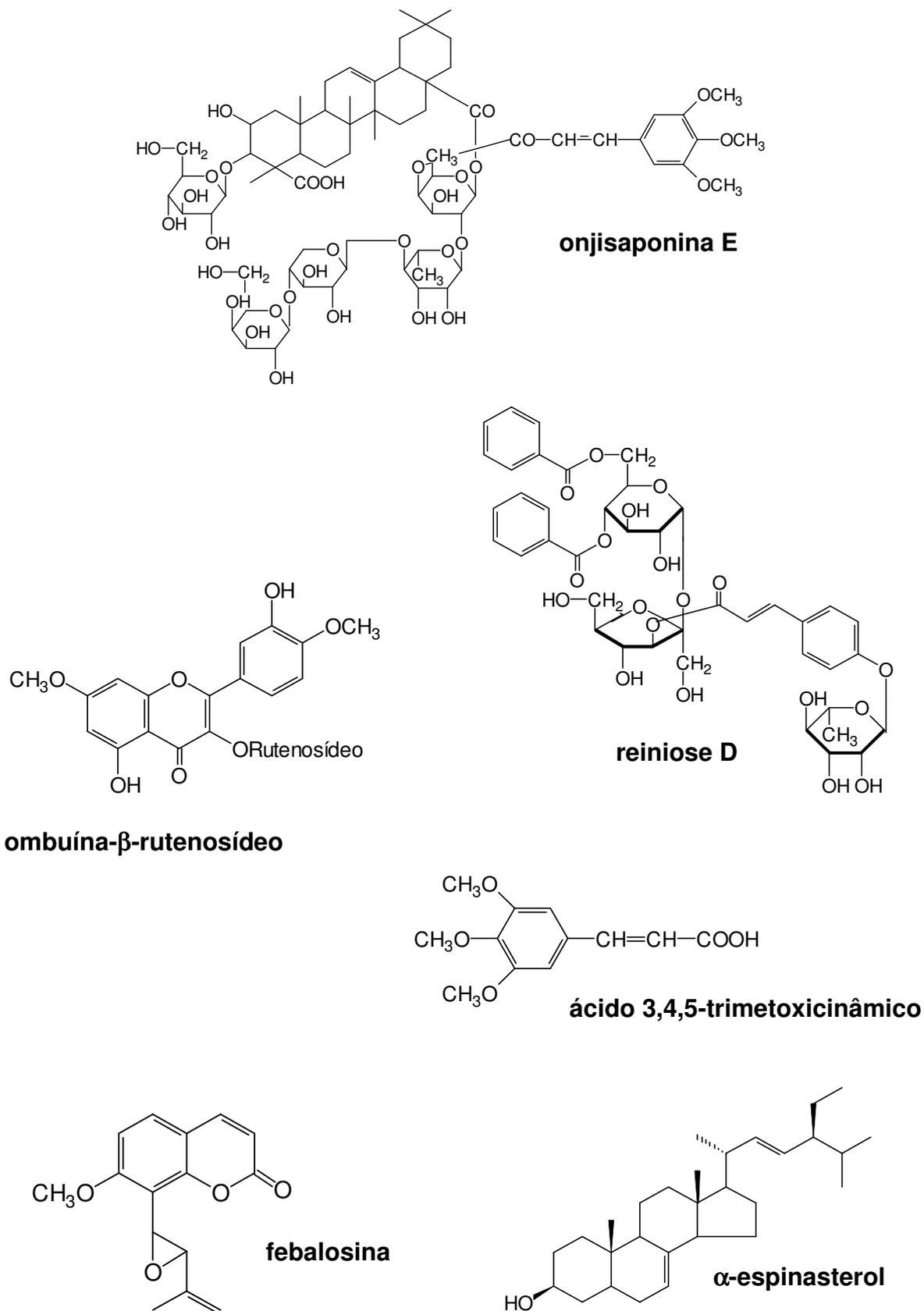
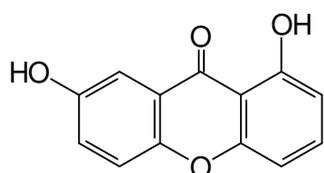
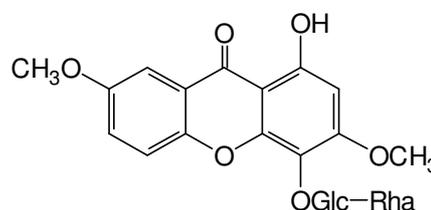


Figura 1: Estruturas de representantes das principais classes de compostos já isolados do gênero *Polygala*.

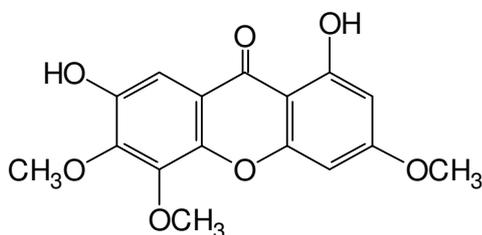
No entanto, as xantonas são os compostos mais freqüentemente encontrados, sendo considerados bons marcadores quimiotaxômicos do gênero. As xantonas isoladas caracterizam-se pela variação no padrão de *O*-substituição, onde o(s) grupo(s) fenólico(s) pode(m) apresentar-se livres (1,7-diidroxixantona) (MAK et al., 1999), *O*-glicosilados 4-*O*-Glc-Rha-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona) (JIANG; TU, 2002), metoxiladas (1,7-diidroxixantona) (MARSTON et al., 1993) e como grupos metilenodioxi (1,7-diidroxixantona) (PINHEIRO et al., 1998). Raramente as xantonas são *C*-glicosiladas (4-*C*-Glc-1,3,6-triidroxixantona) (WANG et al., 2003) (Figura 2).



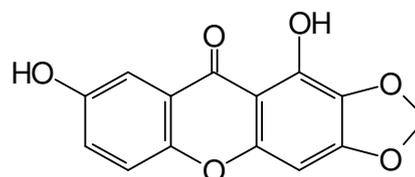
1,7-diidroxixantona



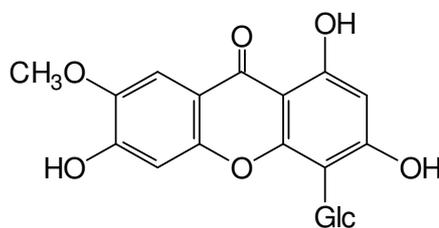
4-*O*-Glc-Rha-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona



1,7-diidroxixantona



1,7-diidroxixantona



4-*C*-Glc-1,3,6-triidroxixantona

Figura 2: Estrutura de algumas xantonas isoladas de espécies do gênero *Polygala*.

2.1.2- *Polygala sabulosa*

Polygala sabulosa A. W. Bennett é conhecida popularmente como timutupinheirinho. É uma espécie higrófita e heliófita, característica da “zona de campos” do planalto meridional catarinense, onde apresenta vasta e expressiva dispersão preferencialmente nos campos úmidos e nas beiras de banhados junto à vegetação graminácea alta ou à vegetação arbustiva (WURDACK; SMITH, 1971). É encontrada desde o sudeste, nos estados de Minas Gerais e São Paulo, até os estados da região sul (LÜDTKE, 2004).

Apresenta-se como uma erva glabra, lenhosa na base, com ramos compridos, folhas sésseis, alternas, opostas, numerosas e laminares, flores rosadas ou lilases presentes de outubro a março, frutos capsulares e sementes elipsóides (WURDACK; SMITH, 1971; LÜDTKE, 2004) (Figura 3).



Figura 3: *Polygala sabulosa* no seu habitat natural – Morro da Antena, município de Rancho Queimado. Foto do autor.

Quimicamente esta espécie é definida pela presença de duas cumarinas, 6-metoxi-7-preniloxicumarina e 7-hidroxi-6-metoxicumarina; do esterol α -espinasterol; da bis-antrona proto-hipericina; de três flavonóides: quercetina, apigenina e 3-O- β -D-glicopiranosil-quercetina. Porém, o acúmulo de derivados de estiril-lactonas com suposta ausência de xantonas, chama atenção quanto a sua posição quimiotaxonômica no gênero *Polygala*. Em trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa, descreveu-se a identificação de três diidroestiril-2-pironas e quatro estiril-2-pironas (PIZZOLATTI et al., 2004; 2000).

A atividade tripanocida do extrato etanólico e frações de *P. sabulosa* foi avaliada através de testes *in vitro* contra as formas epimastigota e tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. O extrato bruto hidroalcoólico revelou ser ativo contra a forma epimastigota ($DL_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$). A fração hexânica apresentou importante atividade frente às formas epimastigotas com $DL_{50} = 1 \mu\text{g/mL}$, sendo mais ativa em relação às frações diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt) ($DL_{50} = 5 \mu\text{g/mL}$ e $DL_{50} = 10 \mu\text{g/mL}$ respectivamente). A fração CH_2Cl_2 nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g/mL}$ reduziu em 100% o número de tripomastigotas sanguíneas (PIZZOLATTI et al., 2003). Dentre os compostos testados, a cumarina prenilada foi o composto mais ativo contra ambas as formas epimastigota e tripomastigota, com DL_{50} 10,5 e 88,2 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Além disso, 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-14-metoxidihidroestiril)-2-pirona e 7-preniloxi-6-metoxicumarina reduziram em quatro vezes a infecção em ratos por células Vero nas concentrações de 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (PIZZOLATTI et al., 2008).

A ação antinociceptiva do extrato hidroalcoólico, frações e compostos isolados foi avaliada através do teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético. Animais tratados com injeção intraperitoneal (i.p.) do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) e frações (CH_2Cl_2 , AcOEt, n-butanólica e aquosa) nas doses de 1 - 100 mg/kg apresentaram uma significativa inibição dose-dependente na resposta a nocicepção visceral. As frações CH_2Cl_2 , AcOEt e n-butanólica foram mais potentes que o EBH e a fração aquosa. Dentre os compostos testados, α -espinasterol e escopoletina foram os mais potentes e eficazes neste modelo ($DL_{50} = 0,07$ e $0,06$ mg/kg respectivamente). Dois derivados preparados a partir da escopoletina (benzoato de escopoletina e acetato de escopoletina) causaram significativa inibição na resposta à dor, sendo o primeiro mais potente que a escopoletina. Ao contrário, o acetato de escopoletina apresentou atividade relativamente menor quando comparado à cumarina original (MEOTTI et al., 2006). Recentes estudos a respeito do mecanismo de ação antinociceptiva demonstraram que os efeitos do EBH estão associados com a inibição da transmissão glutamatérgica (RIBAS et al., 2008).

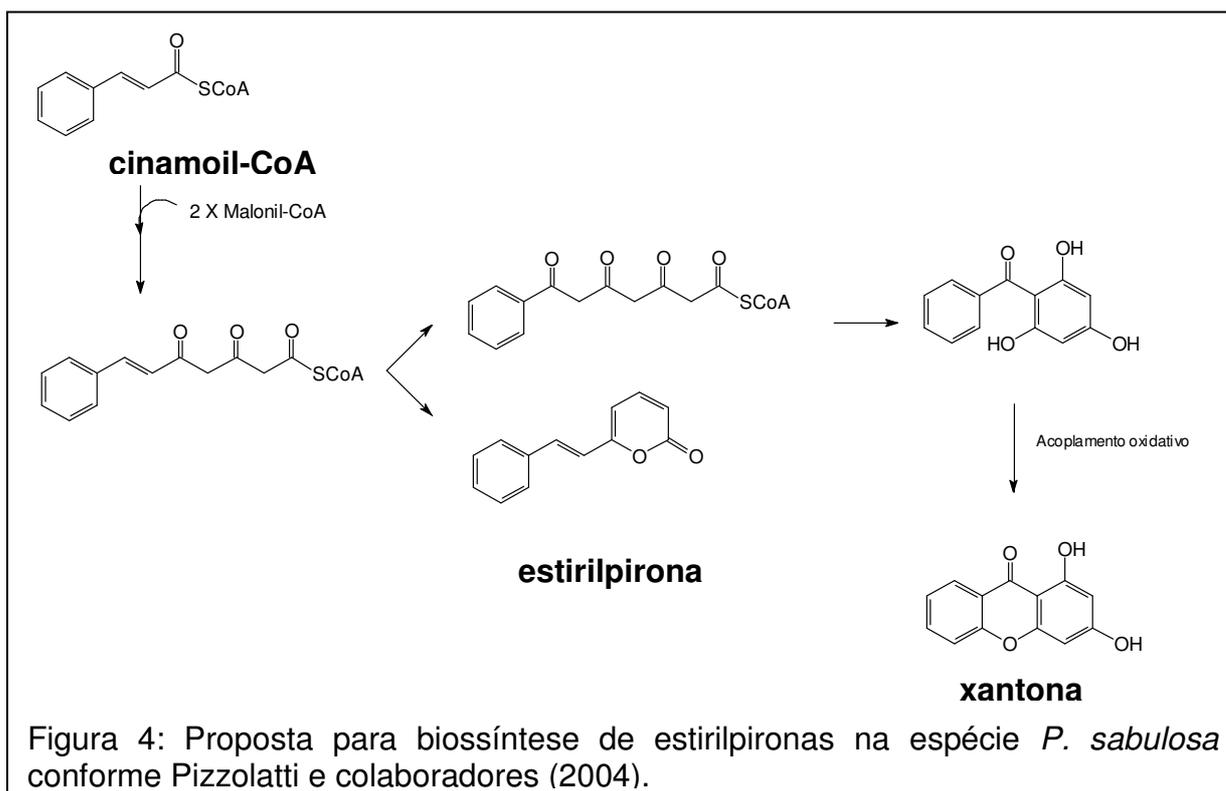
2.2- Estirilpironas

As estirilpironas ou estiril-lactonas são consideradas um grupo relativamente incomum de produtos naturais, apresentando estruturas moleculares contendo um anel γ , δ -lactona conectado a um fragmento estiril ou diidroestiril.

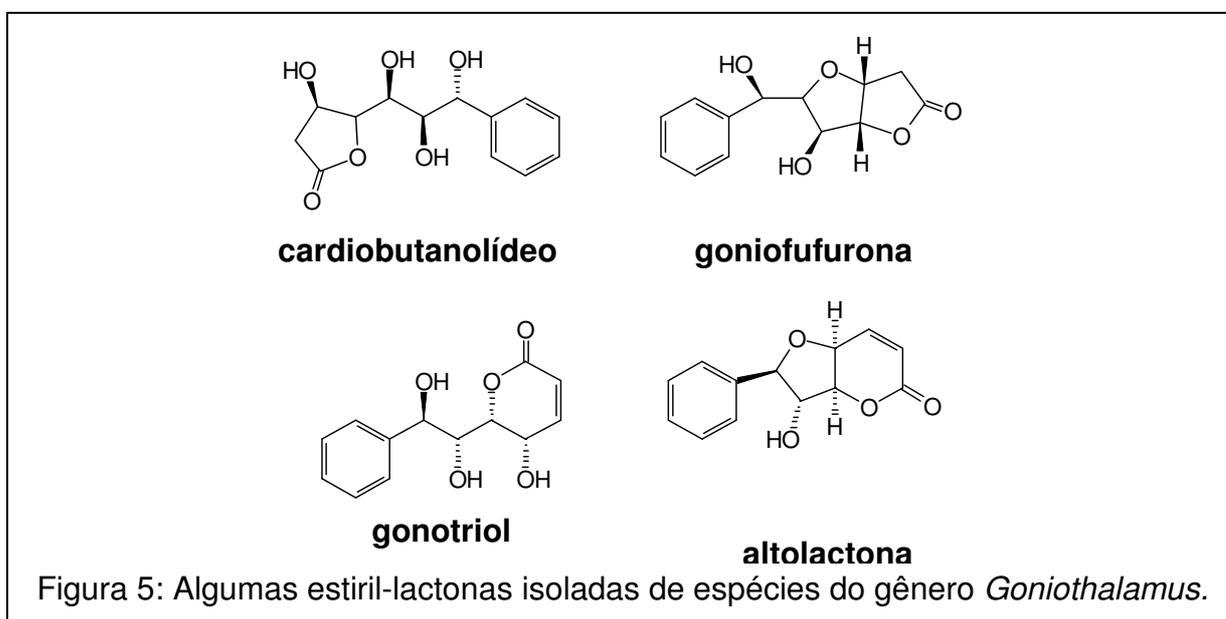
Acredita-se que a biossíntese desta classe de metabólitos secundários seja através da rota do ácido chiquímico. Segundo Herderich e colaboradores (1997), o ácido cinâmico em sua forma ativa (cinamoil-CoA) e sob ação da enzima estirilpirona-sintase, incorpora duas unidades de malonil-CoA e, subseqüentemente, o derivado policetídio sofre lactonização para resultar na correspondente estirilpirona.

A despeito do gênero *Polygala* ser caracterizado pelo acúmulo de xantonas, estudos com a espécie *P. sabulosa* constataram a ausência destes compostos. Por outro lado, o acúmulo de diidro- e estiril-2-pironas coloca esta espécie em uma posição especial dentro do gênero por ser a única estudada até o momento a produzir estes metabólitos. A presença de estirilpironas nesta espécie, aparentemente no lugar das xantonas poderia ser interpretada como um desvio metabólico na biossíntese das xantonas.

A rota biossintética para produção de xantonas em plantas envolve a condensação de derivados do ácido benzóico (C_6-C_1) com três equivalentes de malonil-CoA. Entretanto, a condensação do precursor C_6-C_3 (derivados do ácido cinâmico) com duas unidades de acetato também conduz à produção de xantonas, consistindo em uma rota alternativa de síntese. Considerando que a formação de diidro- e estiril-2-pironas também ocorre pela condensação de um precursor C_6-C_3 com fragmentos C_2 adicionais, similar à rota alternativa descrita anteriormente para xantonas, é possível postular que estirilpironas e xantonas do gênero *Polygala* derivam de um policetídio comum como intermediário-chave (PIZZOLATTI et al., 2004), conforme mostrado na figura 4.



Árvores do gênero *Goniothalamus* (Annonaceae) têm despertado grande interesse do ponto de vista farmacológico como fonte de estilil-lactonas biologicamente ativas (FÁTIMA et al., 2005). Recentes estudos têm demonstrado que esses compostos apresentam propriedades citotóxicas, antitumorais e indutoras de apoptose em células tumorais (TIAN et al., 2006; HUSSAIN et al., 2002). As estilil-lactonas isoladas deste gênero possuem o anel lactônico com 5 membros, tais como o cardiobutanólídeo e a goniofufurona, e com 6 membros como o goniotriol e altolactona (MATSUURA; TAKABE; YODA, 2006) (Figura 5).



As estiril-lactonas que vêm tendo destaque ao longo dos anos são aquelas isoladas da kava-kava, sendo conhecidas como kavalactonas ou kavapironas. O nome kava-kava é utilizado tanto para designar o arbusto característico da planta *Piper methysticum* Forst. (Piperaceae) como a bebida feita com os seus rizomas (SCHULTZ; HÄNSEL; TYLER, 2002).

Nativos das ilhas Pacífico Sul utilizam a bebida a base de kava-kava há milhares de anos em eventos sociais, recreacionais e cerimoniais devido aos efeitos narcótico e soporífero, pela redução da fadiga e ansiedade, e por gerar uma sensação de bem-estar (CARLINI, 2003; DHARMARATNE; NANAYAKKARA; KHAN, 2002).

Além disso, a kava-kava é considerada um bom remédio para o tratamento da gonorréia, dores menstruais, tuberculose, tratamento de infecções respiratórias, insônia, dores relacionadas à gota e artrite reumatóide. Outros efeitos benéficos incluem efeitos analgésicos e diuréticos, relaxamento da tensão muscular e alívio da ansiedade (SINGH, 1992; 1983). Seu extrato é também utilizado pelos nativos na forma de bochechos (SINGH; BLUMENTHAL, 1997).

Devido aos seus efeitos benéficos à saúde, *P. methysticum* ganhou popularidade em países ocidentais como uma alternativa para o tratamento de distúrbios de ansiedade (SINGH; BLUMENTHAL, 1997). Diversos países Europeus, como Alemanha, Suíça e Áustria, aprovaram o uso de preparações à base de kava no tratamento da ansiedade com base em estudos farmacológicos e clínicos. Nos Estados Unidos a espécie é comercializada como suplemento alimentar (PEREZ; HOLMES, 2005), podendo ser comprada em lojas de produtos naturais e até mesmo pela internet (AVDEEF et al., 2001).

Em 2002, produtos contendo kava foram retirados do mercado alemão devido a um suposto risco de hepatotoxicidade. Alguns estudos contrariaram os dados relatados de hepatotoxicidade, apresentando evidências que a maioria dos pacientes afetados já apresentava danos na função hepática (BLUMENTHAL, 2002). Unger e colaboradores (2002) demonstraram que extratos de kava-kava inibem a isoenzima 3A4 do complexo citocromo P450, responsável pela metabolização de um grande número de fármacos.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução nº 356 de 28 de fevereiro de 2002, promulgou uma medida de

interesse sanitário de apreensão dos produtos à base de kava-kava que não possuam tarja vermelha contendo os dizeres "Venda sob prescrição médica", bem como os que não possuíam registro na ANVISA, restringindo, dessa forma, o uso indiscriminado deste fitoterápico em nosso país (<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=4444&word=>)

Estudos clínicos duplo-cego mostraram que extratos de kava são tão efetivos quanto a terapia benzodiazepínica utilizada para o tratamento da ansiedade, apresentando menos efeitos tóxicos e mostrando pouca dependência física e psicológica (PITTLER; ERNST, 2000; VOLZ; KIESER, 1997). Estudos em animais também comprovaram o potencial ansiolítico (REX; MORGENSTERN; FINK, 2002).

Na verdade, as propriedades ansiolíticas da kava-kava ainda não foram totalmente elucidadas quanto ao seu mecanismo farmacológico de ação, além disso, a maioria dos estudos pré-clínicos e clínicos foi realizada com extratos padronizados e não com cada substância isoladamente (REX; MORGENSTERN; FINK, 2002; JUSSOFIE; SCHMIZ; HIEMKE, 1994). Porém, acredita-se que os mecanismos envolvidos incluam: bloqueio voltagem-dependente de canais de Na^+ , aumento da ligação aos receptores do ácido γ -amino butírico tipo A (GABA_A^2), diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios devido a um bloqueio de canais de Ca^{2+} reduzindo a recaptção neuronal da noradrenalina, inibição reversível da monoamina oxidase B (MAO B) e supressão da síntese de tromboxana A^2 , a qual antagoniza a função do receptor GABA_A (BOONEN; HABERLEIN, 1998; JUSSOFIE; SCHMIZ; HIEMKE, 1994).

Os constituintes responsáveis pelas atividades centrais da kava são as kavalactonas (ou kavapironas), uma mistura de lactonas lipofílicas relacionadas estruturalmente com o esqueleto α -pirona, tipicamente 4-metoxi-2-pironas, com um substituinte estiril aromático ou um feniletil ligado ao C-6. Mais de 20 kavalactonas já foram isoladas e identificadas, porém a metisticina, diidrometisticina, kavaína, diidro-kavaína, desidro-kavaína e yangonina são os

² GABA_A : São receptores de ocorrência principalmente pós-sináptica, diretamente acoplados aos canais de cloreto, cuja abertura reduz a excitabilidade da membrana. Drogas que interagem com os receptores GABA_A e os canais incluem a) - tranqüilizantes benzodiazepínicos, que atuam em um local de ligação acessório para facilitar a ação do GABA e b) - anticonvulsivantes como a picrotoxina, que bloqueiam o canal de ânions (RANG; DALE; RITTER, 1997).

compostos mais abundantes, correspondendo a 96% do extrato lipídico (BILIA et al., 2002). Suas estruturas são mostradas na tabela 2. Constituintes minoritários incluem outras kavalactonas, três chalconas e um alcalóide (BILIA et al., 2004).

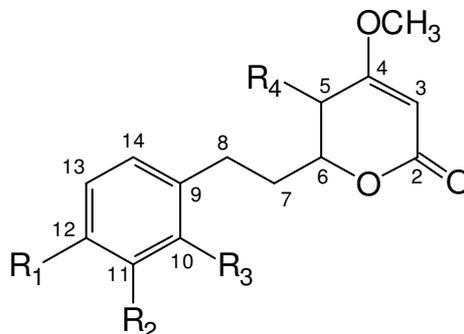


Tabela 2: Kavalactonas presentes nos rizomas de kava-kava.

Kavalactonas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	C5-C6	C7-C8
11-hidroxi-12-metoxidiidro-kavaína	OCH ₃	OH				
7,8-diidro-5-hidroxi-kavaína				β-OH		
11,12-dimetoxidiidro-kavaína	OCH ₃	OCH ₃				
Metisticina*	OCH ₂ O					=
Diidrometisticina*	OCH ₂ O					=
Kavaína*						=
7,8-diidro-kavaína*						=
5,6-deidrometisticina	OCH ₂ O				=	=
5,6-deidro-kavaína*					=	=
Yangonina*	OCH ₃				=	=
5,6,7,8-tetraidroyangonina	OCH ₃					
5,6-diidroyangonina	OCH ₃					=
7,8-diidroyangonina	OCH ₃				=	
10-metoxiyangonina	OCH ₃		OCH ₃		=	=
11-metoxiyangonina	OCH ₃	OCH ₃			=	=
11-hidroxiyangonina	OCH ₃	OH			=	=
Hidroxi-kavaína				OH		=
11-metoxi-12-hidroxideidro-kavaína	OH	OCH ₃			=	=

*Kavalactonas majoritárias

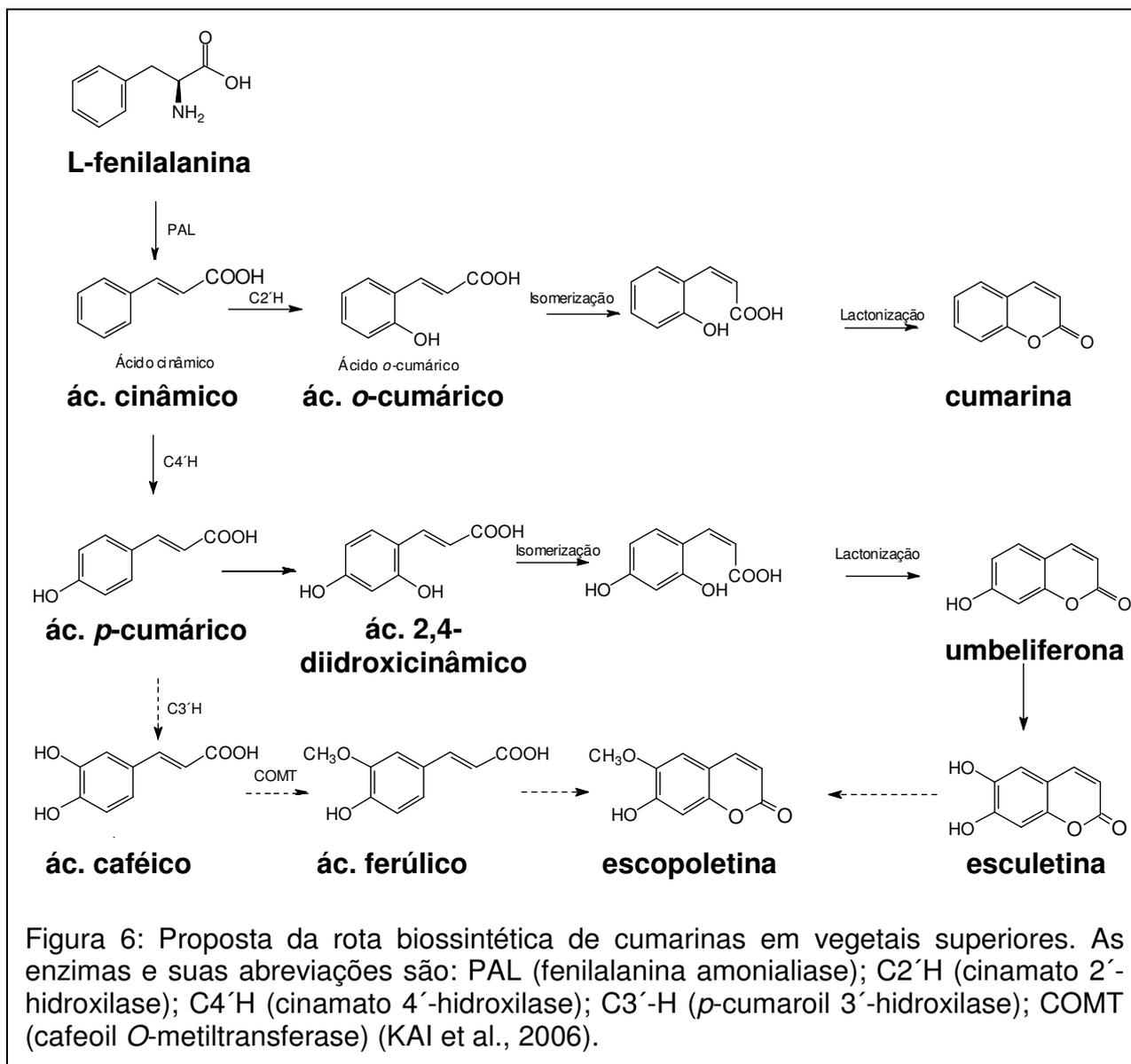
A composição dos metabólitos secundários na espécie *P. methysticum* é variável nos diferentes órgãos e de acordo com a idade da planta, bem como com a localização geográfica do cultivo. O conteúdo de kavalactonas diminui progressivamente a partir das raízes às folhas. Kavaína e metisticina são os

principais componentes nas raízes e rizomas, enquanto os diidroderivados constituem os maiores componentes das folhas (FOLMER et al., 2006).

2.3- Cumarinas

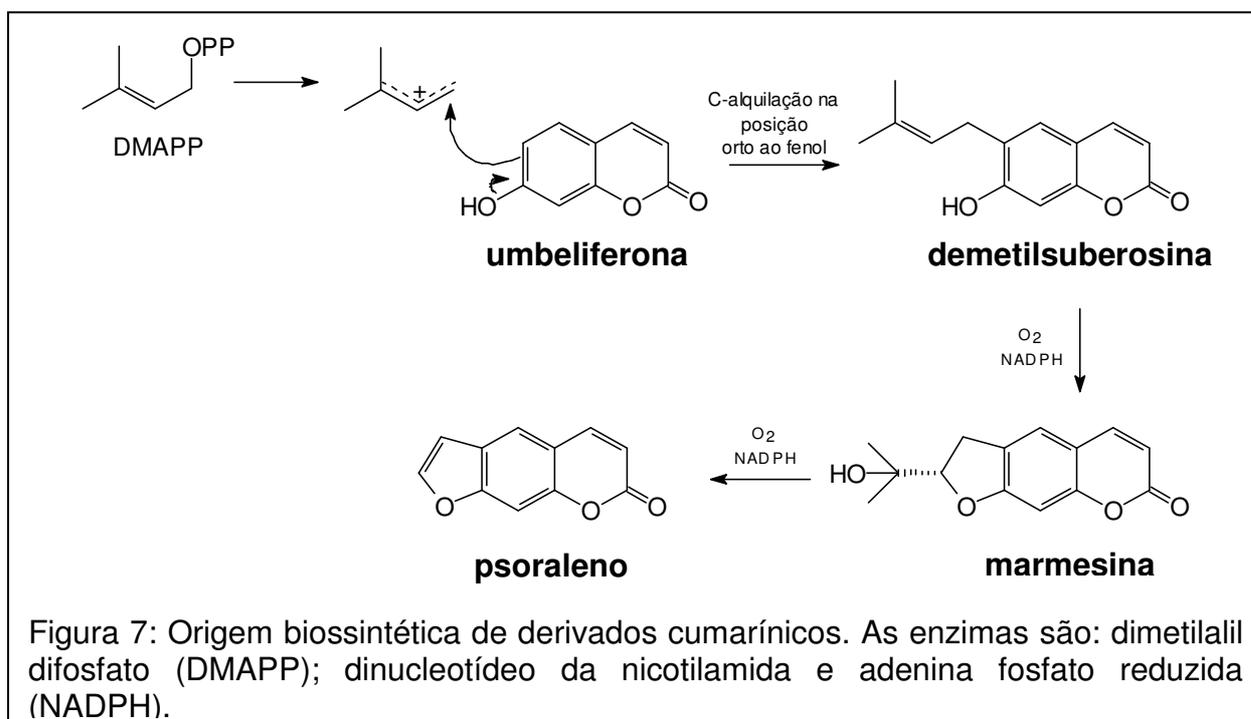
O termo cumarina origina-se do caribenho *cumaru*, nome popular de *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd (Fabaceae). O cumaru, também conhecido como fava-tonka, contém em suas sementes grande quantidade de cumarina (1 a 3%) (KUSTER; ROCHA, 2004).

As cumarinas são biossintetizadas através da rota do ácido chiquímico, derivadas do metabolismo da fenilalanina. A enzima fenilalanina amonialiase (PAL) é o *link* entre o metabolismo primário e o secundário por catalisar a desaminação da L-fenilalanina (metabólito primário) produzindo o ácido *trans*-cinâmico (SHARAN et al., 1998). O ácido *trans*-cinâmico é *p*-hidroxilado através da ação da enzima cinamato 4'-hidroxilase resultando no ácido *p*-cumárico (HURTADO et al., 1998; DOUGLAS, 1996). Ao contrário do que geralmente ocorre, a hidroxilação do ácido cinâmico ou do ácido *p*-cumárico pode ocorrer *orto* a cadeia lateral originando o ácido *o*-cumárico e o ácido 2,4-diidroxicumárico respectivamente (DEWICK, 1997). Após, os ácidos hidroxicinâmicos sofrem isomerização da forma *trans* para *cis* (WATERMAN; MOLE, 1994). Na natureza, as isomerizações *trans/cis* e a lactonização são mediadas por enzimas. O ácido *o*-cumárico e o ácido *p*-cumárico originam a cumarina *per se* e umbeliferona respectivamente (DEWICK, 1997). As etapas seguintes são dependentes das características gênicas da planta, podendo estar envolvidas duas ou mais rotas específicas na biogênese das cumarinas. Por exemplo, a escopoletina pode ser biossintetizada a partir da umbeliferona - esculetina, como na espécie *Nicotiana tabacum* (tabaco) ou via ácido ferúlico, como em *Arabidopsis thaliana* (KAI et al., 2006) (Figura 6).



Muitas outras cumarinas naturais têm estruturas mais complexas, onde a incorporação extra de átomos de carbono pode ser a partir do ácido mevalônico. Assim, o anel aromático da umbeliferona pode ser ativado na posição *orto* ao grupo hidroxila sendo alquilado pelo agente alquilante apropriado, neste caso o dimetilalil difosfato (DMAPP). O composto obtido com o grupo dimetilalil (ou prenil), a demetilsuberossina, pode então ciclizar com o grupo fenol, originando a marmesina. Essa transformação é catalisada pelo citocromo P450 dependente de mono-oxigenase, requerendo cofatores NADPH e oxigênio molecular. Uma segunda isoenzima do complexo citocromo P450 dependente de mono-oxigenase cliva o fragmento hidroxiisopropila da marmesina, originando o psoraleno, uma furanocumarina linear. Furanocumarinas angulares podem ser formadas pela

mesma seqüência reacional, porém envolvem uma alquilação na outra posição *orto* ao fenol (Figura 7) (DEWICK, 2002).



A biogênese das cumarinas pode ser induzida como resposta a situações estresse biótico e abiótico, como deficiência nutricional, sinalizadores químicos tais como hormônios vegetais e metabólitos, bem como xenobióticos (HURTADO et al., 1998). A cumarina escopoletina, por exemplo, tem sido descrita como uma fitoalexina³ nas espécies *Nicotiana tabacum* (tabaco) e *Helianthus annuus* (girassol), onde seu acúmulo está relacionado à resistência contra patógenos, ao ataque de insetos e inoculação de fungos, após sofrer injúria mecânica e ao tratamento com elicitores abióticos como a sucrose ou CuCl₂ (HURTADO et al., 1998; EDWARDS et al., 1997). Além disso, observou-se que variedades de girassol com elevados níveis de escopoletina e aiapina (6,7-

³ Fitoalexina: do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele. São produtos naturais, ausentes na planta sadia, acumulados temporariamente no local e nos arredores da infecção. Possuem atividade inibidora sobre bactérias, fungos, nematóides e efeito tóxico para animais e para as próprias plantas. Podem ser acumulados em resposta a vários microorganismos, mas também como consequência de fatores que causam estresse na planta, como ferimentos e exposição a substâncias tóxicas (SOYLU, 2006).

metilenodioxycumarina) são mais resistentes ao ataque de insetos (GUTIÉRREZ et al., 1995).

As cumarinas podem ser obtidas sinteticamente através de vários métodos, dentre eles a condensação de Perkin, Reformatsky, Wittig (DONG et al., 2008), Pechmann (MANHAS et al., 2006; GHATE; KUSANUR; KULKARNI, 2005; CURINI et al., 2004) e de Knoevenagel (REDDY et al., 2004; BYLOV; VASYLYEV; BILOKIN, 1999). Essas reações conduzem à obtenção de cumarinas com substituições no C-4 e C-3. A obtenção de diidro-cumarinas (ausência da dupla entre o C-3 e C-4) pode ser realizada através da reação de hidroarilação entre fenóis e derivados do ácido cinâmico em meio ácido (AOKI et al., 2005).

Dentre as atividades já atribuídas às cumarinas, pode-se destacar: atividade hepatoprotetora (KANG et al., 1998), antioxidante (BEILLEROT et al., 2008; SHAW et al., 2003), antiinflamatória (KIM et al., 2004; KANG et al., 1999; HOFFMANOVA et al., 1998), ação espasmolítica (OLIVEIRA et al., 2001), ação antitrombótica e vasodilatadora (MONTI et al., 2007; HOULT; PAYÁ, 1996), propriedade antimutagênica (PILLAI et al., 1999), inibição da proliferação celular (KIM et al., 2005; LIU et al., 2001; OROZCO et al., 2001), antineoplásica (STANCHEV et al., 2008), antibacteriana e antifúngica (STEIN et al., 2006; LAURIN et al., 1999), atividade antinociceptiva (MEOTTI et al., 2006), dentre muitas outras.

3 - Objetivos

3.1- Objetivos gerais

- Dar continuidade a investigação fitoquímica da espécie *Polygala sabulosa* com o isolamento e caracterização estrutural de seus principais constituintes ativos e síntese de moléculas análogas para estudos de suas atividades biológicas.

3.2- Objetivos específicos

- Caracterizar a composição química do óleo volátil das raízes e partes aéreas de *P. sabulosa* usando CG-EM e avaliar sua atividade antibacteriana;
- Isolar e caracterizar as estiril- e diidroestirilpironas de *P. sabulosa* para realizar ensaios farmacológicos, *in vivo* e *in vitro*, de atividade no sistema nervoso central;
- Avaliar as variações sazonais do teor de estirilpironas usando cromatografia gasosa;
- Isolar e caracterizar cumarinas de *P. sabulosa* e utilizar estes compostos no preparo de moléculas análogas através da reação de benzoílação e acilação;
- Sintetizar cumarinas através da reação de Pechmann e Knoevenagel utilizando catalisadores heterogêneos e avaliar a atividade antitumoral e antimicrobiana de todas as cumarinas obtidas;
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos e frações de *P. sabulosa* e analisar os constituintes fenólicos por eletroforese capilar.

4 - Procedimentos Experimentais

4.1- Materiais

Os solventes utilizados para maceração, partição líquido-líquido, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada foram de grau PA. Para as reações, os solventes passaram por processos de secagem quando necessário. Todos os solventes de extratos, frações e de reações foram evaporados em rotaevaporador à pressão reduzida e temperatura controlada.

Os extratos obtidos através das macerações foram submetidos aos procedimentos de fracionamento por cromatografia em coluna (CC) utilizando-se como fase estacionária sílica gel 0,063 - 0,2 *mesh* para CC normal e 0,04 - 0,063 *mesh* para CC flash (CCf), sendo que o diâmetro interno (ϕ) e a altura (h) variaram de acordo com a quantidade de material a ser fracionado. Solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade foram utilizados como eluentes, sendo geralmente, misturas de hexano:AcOEt e AcOEt:EtOH. Após a evaporação dos solventes, as frações obtidas foram avaliadas através de cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando-se placas de alumínio recobertas por sílica gel 60 GF254 de 200 μm de espessura (Merck®).

As cumarinas sintetizadas foram identificadas através do ponto de fusão (pf), análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e, quando necessário, de carbono (^{13}C). Estas análises foram realizadas no “Dipartimento di Sintese e Tecnologia del Fármaco”, na Università degli Studi di Perugia (Unipg), Perugia, Itália.

4.1.1- Equipamentos utilizados

- Pontos de fusão (pf): aparelho MQAPF-302 Microquímica Equipamentos Ltda;
- Ultravioleta (UV): Espectrômetro Perkin-Elmer UV/VIS Spectrometer Lambda 2S;
- Infravermelho (IV): FT-16PC sendo as amostras sólidas preparadas em pastilha comprimida de KBr;
- Ressonância Magnética Nuclear (RMN): Ressonância magnética nuclear de ^1H (200 e 400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) foi obtida em aparelho Bruker AC-200F e Varian Oxford AS-400 respectivamente, utilizando tetrametilsilano

(TMS) como padrão de referência interna. As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado apropriado;

- Cromatografia Gasosa (CG): Cromatógrafo Shimadzu GC-14B, equipado com detector de ionização em chama (FID), coluna capilar DB-1 e injetor split/splitless com proporção 1:20;
- Cromatografia Gasosa (CG) *on column*: Cromatógrafo Shimadzu GC-14B, equipado com detector de ionização em chama (FID), coluna capilar DB-1 e injetor *on column*;
- Eletroforese capilar (EC): Shimadzu CLASS LC, equipado com detector SPD 10AVP DAD (*Diode Array Detector*), coluna C18 Supelco 5 μM (25 cm X 4,6 mm ϕ);
- Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (Unipg): Cromatógrafo HP 6890 series, equipado com detector de massas HP 5973, coluna capilar HP-5MS e injetor splitless;
- RMN (Unipg): Ressonância magnética nuclear de ^1H (200 MHz) e ^{13}C (50 MHz) foi obtida em instrumento Bruker DPX, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado apropriado.

4.2- Material vegetal

O material vegetal utilizado foi coletado na serra da Boa Vista, município de Rancho Queimado, planalto meridional catarinense, em dois locais distintos denominados Sp1 (ponto 1: margens da rodovia 282) e Sp2 (ponto 2: topo do Morro da Antena) e em diferentes datas:

- Setembro de 2002 – Sp1
Setembro de 2002 – Sp2
- Fevereiro de 2003 – Sp1
Fevereiro de 2003 – Sp2
- Novembro de 2003 – Sp1
Novembro de 2003 – Sp2
- Março de 2004 – Sp1
Março de 2004 – Sp2
- Novembro de 2007 – Sp2

A espécie vegetal foi identificada pelo Prof. Dr. Olavo de Araújo Guimarães e uma exsiccata depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Paraná, sob o número 19640.

As plantas foram separadas de possíveis contaminantes e submetidas à secagem em estufa de ar circulante com temperatura em torno de 50°C. Este procedimento não foi adotado para a última coleta (Novembro/2007), sendo utilizado o material fresco.

4.3- Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos através da maceração exaustiva em temperatura ambiente com etanol 96% com todas as amostras previamente trituradas (rendimento médio 30,3%). Para as duas últimas coletas (março/2004 e novembro/2007), o extrato foi preparado com cada órgão isoladamente: caule, folhas e flores. A amostra de flores (coleta de março/2004, Sp1 + Sp2) foi primeiramente extraída com diclorometano (2 X 24 h) (5,7 g, 1,7%) e então com etanol 96% (2 X 24 h) (31,7 g, 9,4%). Todos os extratos obtidos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida em temperatura inferior a 50°C fornecendo os respectivos extratos brutos hidroalcoólicos (EBH).

4.4- Fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico

Uma alíquota de cada extrato bruto foi utilizada para o preparo de uma suspensão aquosa que foi submetida à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: hexano (3 X) e acetato de etila (3 X). O solvente de cada fase orgânica foi evaporado sob vácuo a 50°C para obtenção das respectivas frações solúveis: fração hexano (HEX) (8,3%), fração acetato de etila (FAE) (20,9%) e a fração aquosa (FA) (70,8%).

4.5- Isolamento e identificação dos compostos

Os diferentes extratos obtidos através da maceração foram submetidos ao fracionamento em CC de gel de sílica. A eluição foi realizada com misturas de hexano:AcOEt e AcOEt:EtOH na forma de gradiente de polaridade. A reunião das frações foram realizadas conforme os perfis cromatográficos demonstrados, levando-se em consideração os valores do fator de retenção (Rf), fluorescência

e/ou extinção após a exposição em radiação ultravioleta nos comprimentos de 254 e 365 nm, e coloração após pulverização com reveladores como anisaldeído sulfúrico, vapores de iodo e cloreto férrico. As frações reunidas foram então submetidas a sucessivas CC e CCf e os compostos obtidos purificados através de lavagens e recristalização em solventes apropriados.

Os compostos obtidos foram caracterizados através de suas propriedades físicas, químicas e espectroscópicas tais como ponto de fusão (pf), tempos e índices de retenção em cromatografia gasosa (CG), infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C). As análises espectroscópicas foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

4.5.1- Isolamento dos constituintes químicos do extrato diclorometânico das flores (coleta de março/2004, Sp1 + Sp2) - Coluna 1

O extrato obtido através da maceração das flores em diclorometano (5,3 g) foi submetido a sucessivas cromatografias em coluna (CC e CCf) de acordo com o representado no esquema mostrado na figura 8.

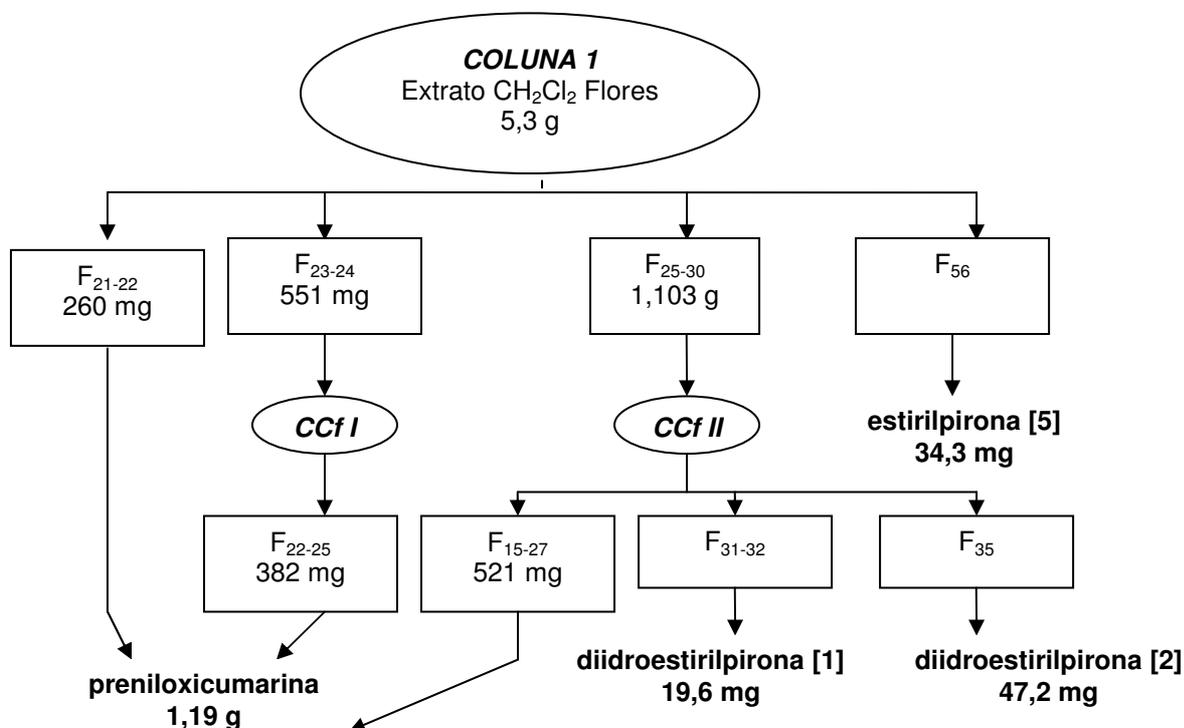


Figura 8: Fluxograma de isolamento dos constituintes químicos do extrato diclorometânico das flores de *P. sabulosa* - Coluna 1

4.5.2- Isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico dos caules (coleta março/2004, Sp2)- Coluna 2

O extrato bruto hidroalcoólico (542,8 g) foi cromatografado em coluna de sílica gel, de acordo com o representado no esquema da figura 9.

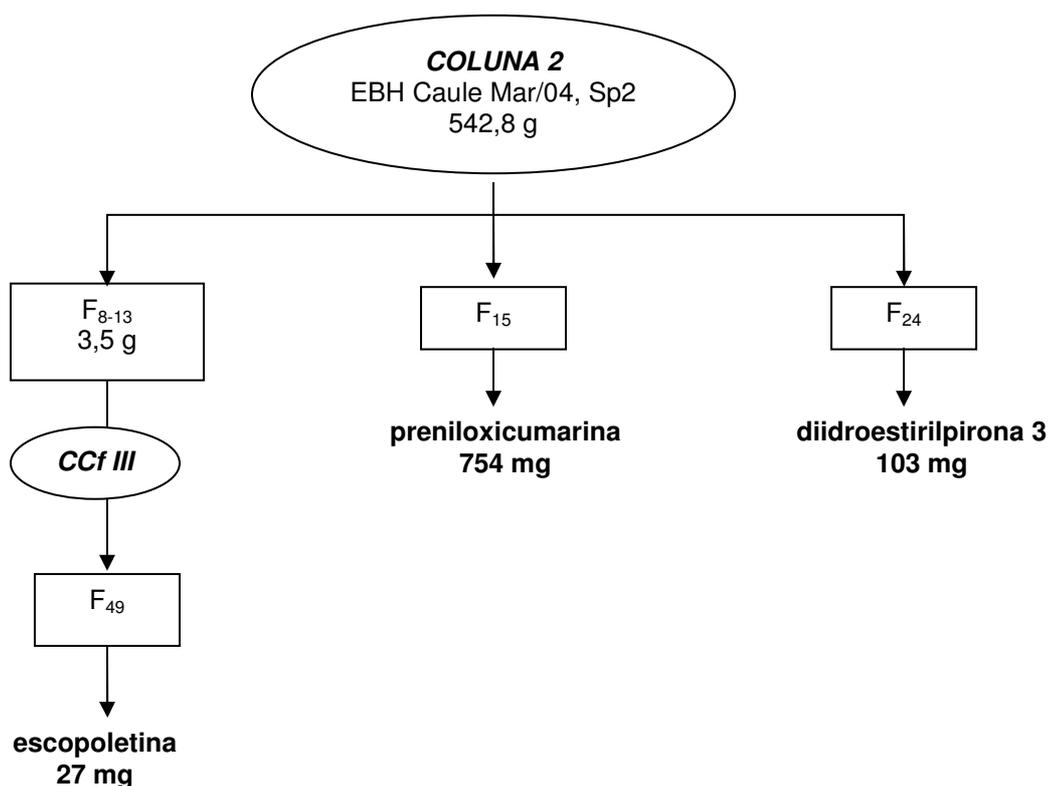


Figura 9: Fluxograma de isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico dos caules (coleta março/2004, Sp2)- Coluna 2.

4.5.3- Isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico das folhas (coleta março/2004, Sp2)- Coluna 3

O extrato bruto hidroalcoólico das folhas (456,1 g) foi submetido a sucessivas CC de acordo com o fluxograma apresentado na figura 10:

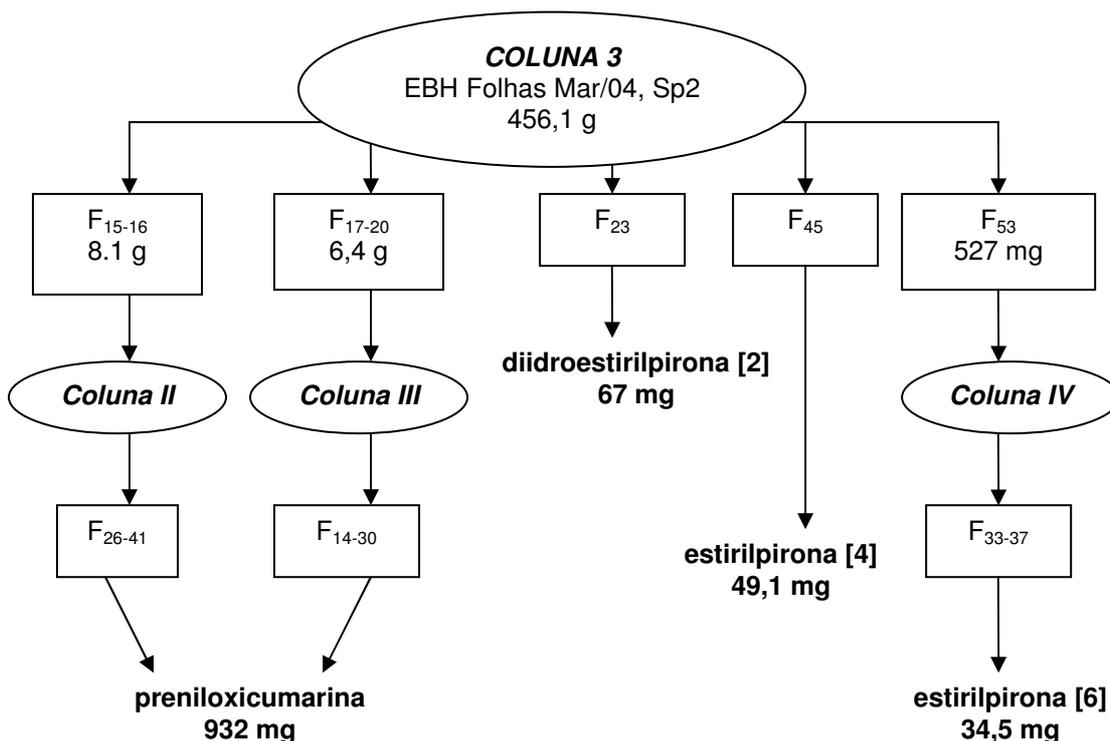
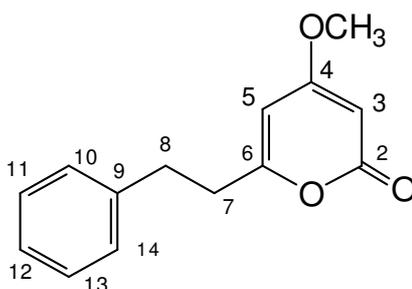


Figura 10: Fluxograma do isolamento dos constituintes químicos do extrato bruto hidroalcoólico das folhas (coleta março/2004, Sp2)- Coluna 3.

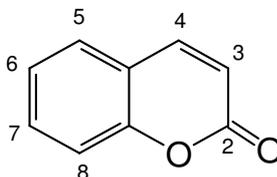
A seguir, serão apresentados os dados espectroscópicos dos compostos isolados:



- **Diidroestirilpirona [1] → 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-diidroestiril)-2H-piran-2-ona:** Pf: 137 - 140°C; IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3104, 2924, 1710, 1646, 1567, 1489, 1457, 1410, 1242, 1030, 925, 821. RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 6,72 (d, 1H, $J=7,2$ Hz, H-13), 6,65 (d, 1H, $J=1,8$ Hz, H-10), 6,60 (dd, 1H, $J=7,2$ Hz, 1,8 Hz, H-14), 5,92 (s, 2H, OCH_2O em C-11 e C-12), 5,70 (sl, 1H, H-5), 5,40 (sl, 1H, H-3), 3,77 (s, 3H, 4- OCH_3), 2,87 (t, 2H, H-8), 2,70 (t, 2H, H-7). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 171,3 (C-2), 165,1 (C-4), 164,4 (C-6), 147,9 (C-11), 146,3 (C-12), 133,8 (C-9), 121,4 (C-

- 14), 108,9 (C-10), 108,5 (C-13), 101,1 (OCH₂O), 100,5 (C-5), 87,9 (C-3), 56,0 (4-OCH₃), 35,9 (C-7), 32,8 (C-8).
- **Diidroestirilpirona [2] → 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-diidroestiril)-2H-piran-2-ona:** Pf: 148 - 151°C; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,59 (s, 1H, H-10), 6,49 (s, 1H, H-13), 5,88 (s, 2H, OCH₂O em C-11 e C-12), 5,71 (sl, 1H, H-5), 5,40 (sl, 1H, H-3), 3,77 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,74 (s, 3H, 14-OCH₃), 2,85 (t, 2H, H-8), 2,65 (t, 2H, H-7). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 171,1 (C-2), 164,9 (C-4), 164,1 (C-6), 152,2 (C-14), 146,5 (C-12), 140,6 (C-11), 120,1 (C-9), 109,5 (C-10), 100,9 (OCH₂O), 99,5 (C-5), 94,5 (C-13), 87,5 (C-3), 56,1 (14-OCH₃), 55,7 (4-OCH₃), 34,0 (C-8), 27,6 (C-7).
 - **Diidroestirilpirona [3] → 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxi-diidroestiril)-2H-piran-2-ona:** Pf: 165 - 167°C; IV v_{max} (KBr) cm⁻¹: 3089, 2951, 2849, 1727, 1646, 1572, 1508, 1474; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,23 (s, 1H, H-13), 5,86 (s, 2H, OCH₂O em C-11 e C-12), 5,71 (sl, 1H, H-5), 5,40 (sl, 1H, H-3), 3,96 (s, 3H, 10-OCH₃), 3,78 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,71 (s, 3H, 14-OCH₃), 2,90 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-8), 2,58 (t, 2H, J=7,6 Hz, H-7).
 - **Estirilpirona [4] → 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-estiril)-2H-piran-2-ona:** Pf: 199 - 202°C; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,45 (d, 1H, J=16 Hz, H-8), 7,03 (s, 1H, H-10), 6,88 (s, 1H, H-14), 6,81 (s, 1H, H-13), 6,45 (d, 1H, J=16 Hz, H-7), 5,92 (s, 2H, OCH₂O em C-11 e C-12), 5,70 (sl, 1H, H-5), 5,48 (sl, 1H, H-3), 3,89 (s, 3H, 4-OCH₃).
 - **Estirilpirona [5] → 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona:** Pf: 190 - 191°C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,77 (d, 1H, J=16 Hz, H-8), 6,96 (s, 1H, H-10), 6,52 (s, 1H, H-13), 6,46 (d, 1H, J=16 Hz, H-7), 5,95 (s, 2H, OCH₂O em C-11 e C-12), 5,84 (sl, 1H, H-5), 5,40 (sl, 1H, H-3), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 3,72 (s, 3H, OCH₃).
 - **Estirilpirona [6] → 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxi-estiril)-2H-piran-2-ona:** Pf: 147 - 149 °C; IV v_{max} (KBr) cm⁻¹: 3076, 2942, 2838, 1702, 1638, 1594, 1552, 1516, 1450; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,45 (d, 1H, J= 16 Hz, H-8), 7,09 (d, 1H, J= 8 Hz, H-14), 7,03 (sl, 1H, H-10), 6,87 (d, 1H, J=8,0

Hz, H-13), 6,45 (d, 1H, $J=16$ Hz, H-7), 5,92 (sl, 1H, H-5), 5,48 (sl, 1H, H-3), 3,93 (s, 3H, 4-OCH₃), 3,91 (s, 3H, 11-OCH₃), 3,83 (s, 3H, 12-OCH₃).



- **Preniloxicumarina [7] → 6-metoxi-7-preniloxicumarina:** Pf: 79 - 81°C; IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 1713, 1612, 1561, 1513, 1381, 1280, 1248, 1140, 971, 812. RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,63 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-4), 6,86 (s, 1H, H-8), 6,82 (s, 1H, H-5), 6,26 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-3), 5,49 (t, 1H, [CH₃]₂-C=CH-CH₂), 4,66 (d, 2H, [CH₃]₂-C=CH-CH₂), 3,90 (s, 3H, 6-OCH₃), 1,79 (s, 6H, [CH₃]₂-C=CH-CH₂). RMN ¹³C (50 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 161,7 (C=O), 152,0 (C-7), 149,8 (C-10), 146,6 (C-6), 143,3 (C-4), 138,9 (C-3'), 118,6 (C-2'), 113,2 (C-3), 111,2 (C-9), 108,0 (C-5), 101,0 (C-8), 66,2 (C-1'), 56,3 (6-OCH₃), 25,7 (C-4'), 18,3 (C-5').
- **Escopoletina [8] → 7-hidroxi-6-metoxicumarina:** Pf: 203 - 204°C; IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3340, 1709, 1267. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,60 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 6,91 (s, 1H, H-8), 6,85 (s, 1H, H-5), 6,27 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 6,22 (s, 1H, OH), 3,95 (s, 3H, 6-OCH₃). ¹³C RMN (CDCl₃) δ (ppm): 161,8 (C=O), 150,4 (C-9), 149,9 (C-7), 144,0 (C-6), 143,5 (C-4), 113,6 (C-3), 111,7 (C-10), 107,7 (C-5), 103,4 (C-8), 56,6 (OCH₃).

4.6- ANÁLISE DOS COMPONENTES VOLÁTEIS

4.6.1- Extração e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Os óleos voláteis foram obtidos por hidrodestilação durante 2 horas a partir das partes aéreas e raízes frescas, separadamente, utilizando um aparelho tipo-Clevenger modificado, de acordo com o preconizado pela FARMACOPÉIA Brasileira IV (1988). O rendimento do óleo volátil foi calculado em função do volume de óleo obtido e do peso de material vegetal fresco. Para análise, os óleos voláteis foram diluídos em éter etílico.

Os óleos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) utilizando espectrômetro com ionização por impacto de elétrons com voltagem de 70 eV. A separação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo Shimadzu GC 14A, utilizando coluna DB1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Utilizou-se temperatura programada de 40°C a 310°C, à taxa de 10°C/min, seguida de uma isoterma a 310°C por 20 minutos. A temperatura usada para o injetor e detector foram 290 e 300°C, respectivamente. Hélio (He) foi utilizado como gás de arraste, com um fluxo de 1,0 mL/min.

A identificação dos componentes dos óleos foi realizada por comparação de seus espectros de massas com dados da espectroteca NIST 98 (*National Institute of Standards and Technology*) e com dados espectrais da literatura (ADAMS, 1995).

4.6.2- Atividade antibacteriana do óleo volátil

Avaliação da atividade antibacteriana foi realizada no Laboratório de Microbiologia Clínica, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau (FURB) pelo grupo do Prof. Msc. Eduardo Monguillhott Dalmarco.

Os testes foram realizados através do método de microdiluição, determinando-se a CIM (Concentração Inibitória Mínima) contra as seguintes bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Todos os testes foram realizados de acordo com o preconizado pela *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (CLSI, 2005). Os testes foram realizados em microplacas estéreis de 96 poços. O óleo obtido das partes aéreas foi previamente preparado e transferido para cada poço na ordem de obter uma diluição do composto original (de 1:2 a 1:256 a partir de uma alíquota de 50 µL do óleo). Gentamicina foi usada como o antibiótico padrão.

O inóculo (100 µL) contendo 5×10^5 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) de cada microorganismo foi adicionado aos poços. Em cada placa, poços foram utilizados para o controle estéril (sem inóculo), para a viabilidade do inóculo (sem amostra) e o efeito inibitório do etanol (utilizado para diluir a amostra). As placas foram incubadas aerobicamente a 35°C. Após a incubação

por 18 - 24 h, o crescimento bacteriano foi avaliado pela adição de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em metanol (5 mg/mL), o qual foi utilizado para detectar o crescimento bacteriano pela mudança de coloração para vermelho. A CIM foi definida como a menor concentração dos compostos em que não houve aparecimento da cor vermelha.

4.7- ESTIRILPIRONAS

4.7.1- Análise por CG-EM da mistura de estirilpironas

A análise por CG-EM foi realizada no laboratório do Prof. Dr. Faruk Nome pelo aluno Jacques Priebe, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Durante o isolamento e a purificação das estirilpironas, várias frações contendo misturas foram obtidas. Algumas frações foram então reunidas, obtendo-se assim uma mistura de estirilpironas. Essa mistura foi submetida à análise por CG-EM utilizando espectrômetro com ionização por impacto de elétrons com voltagem de 70 eV. A separação foi conduzida no equipamento CGMS-QP 5050 A Shimadzu 17A utilizando coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm). A programação da temperatura foi de 80 a 300°C a uma taxa de 10°C/min. A temperatura usada para o injetor e detector foram 300 e 310°C, respectivamente. Hélio (He) foi usado como gás de arraste a uma taxa de 1,0 mL/min.

4.7.2- Avaliação do teor de diidro- e estirilpironas em diferentes coletas

Para a realização deste estudo, utilizaram-se as amostras de *P. sabulosa* coletadas às margens da rodovia 282 (Sp1), serra da Boa Vista, município de Rancho Queimado, em quatro diferentes datas: setembro/2002, fevereiro/2003, novembro/2003 e março/2004. Os extratos brutos hidroalcoólicos (EBH) foram preparados conforme item 4.3 (p. 28) e a fração acetato de etila (FAE) conforme item 4.4 (p. 29). A FAE foi dissolvida em CHCl₃:MeOH (5:1) a fim de se obter soluções com concentrações finais de 40 µg/µL. Para a quantificação das estirilpironas presentes nesta fração, injetaram-se volumes conhecidos das soluções preparadas (1 µL). As análises foram realizadas por cromatografia gasosa, utilizando injetor *on column* e coluna DB-1 (30 m X 0,25 mm X 0,25 µm)

na seguinte programação: para a coluna, a temperatura inicial foi de 80°C com aumento até 265°C a 10°C/min, já para o injetor utilizou-se gradiente de temperatura de 200 - 280°C a 10°C/min. A temperatura do detector foi 300°C. Padrões previamente isolados e identificados de cada estirilpirona foram utilizados para identificação individual na FAE. Para análise quantitativa, a integração dos sinais cromatográficos foi realizada através do programa do equipamento, possibilitando o cálculo da área de cada pico individualmente. As análises foram realizadas em duplicata.

4.7.3- Atividade no sistema nervoso central (SNC)

Os testes para verificação das ações centrais do extrato, frações e compostos isolados foram desenvolvidos no Laboratório de Neurofarmacologia, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pelo doutorando Filipe Silveira Duarte, orientado pela Prof. Dra. Thereza Christina Monteiro de Lima.

Para avaliação da atividade central, investigaram-se as ações *in vivo*, em camundongos, do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), fração hexânica (HEX), fração acetato de etila (FAE), fração aquosa (FA), preparadas de acordo com o item 4.3 e 4.4 (p. 28 e 29), 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7] (6-MC) e as estirilpironas [1], [2], [3], [4], [5] e [6] isoladas de *Polygala sabulosa* (item 4.5, p. 29) em testes considerados como preditores de ação central. As estirilpironas isoladas também foram submetidas à avaliação *in vitro* através dos ensaios de *binding*.

Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com os padrões internacionais de bem-estar dos animais recomendados pela Sociedade Brasileira de Neurociência e Comportamento (SBNeC), sendo os protocolos comportamentais aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animal (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (processos números 315/CEUA e 23080.027554/2004-49/UFSC).

Os testes foram divididos em três modalidades: atividade comportamental, ensaios de *binding* e estudos da toxicidade. Apresentaremos a seguir de maneira sucinta as metodologias empregadas para tais avaliações:

- ***Sono barbitúrico/etéreo***

Para avaliar o potencial hipnótico, camundongos foram tratados com o EBH, HEX, FA, 6-MC (250, 500 e 1.000 mg/kg i.g.) e FAE (125, 250, 350, 500, 750 e 1.000 mg/kg i.g.). Após 1 h, os animais foram colocados em ambiente saturado com éter etílico (5 mL) ou receberam intraperitonealmente (i.p.) pentobarbital sódico (50 mg/kg). A latência até a perda do reflexo postural e a duração do sono foi marcada em segundos e minutos, respectivamente. O tempo de sono foi mensurado a partir da perda do reflexo postural, sendo a recuperação deste reflexo considerado o ponto final da hipnose (CARLINI et al., 1986). Diazepam (DZP) (0,75 e 1 mg/kg i.p.) foi usado como fármaco hipno-sedativo padrão.

- ***Teste do labirinto de cruz elevado (LCE)***

O efeito tipo ansiolítico do EBH, frações e estirilpironas isoladas de *P. sabulosa* foi avaliado usando o teste do labirinto de cruz elevado (LCE), conforme adaptado para ratos por Lister (1987). Os animais foram submetidos a diversos tratamentos e após 1 h (DZP 30 min), cada animal foi colocado no centro da plataforma, de frente a um dos braços fechados, sendo observado por um período de 5 min. Os parâmetros comportamentais avaliados neste teste foram: a frequência de entradas nos braços abertos e fechados, o tempo gasto em cada braço, o número de imersões de cabeça, número de estiramentos corporais e número de vezes em que o animal chegou até o fim do braço aberto (RODGERS, 1997).

- ***Convulsão induzida por Pentilenotetrazol (PTZ)***

A ação anticonvulsivante foi avaliada através da administração do PTZ (80 mg/kg) aos grupos de animais tratados previamente (60 min) com água, EBH e FAE. A latência até o primeiro episódio convulsivo bem como a duração foram contadas em segundos. A severidade das convulsões foi registrada até 30 min.

- ***Ensaio de binding***

Os ensaios de ligação foram utilizados para avaliar a possível interação das estirilpironas isoladas de *P. sabulosa* com o sítio de ligação BDZ do complexo

receptor GABA_A, em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratas. Os compostos estudados foram as DST [1], [2] e [3] e STY [4], [5] e [6].

As membranas sinaptossomais foram preparadas de acordo com Marder e colaboradores (2003). As membranas foram diluídas 10 vezes com tampão Tris-HCl 25 mM pH 7,4. Nos ensaios de competição, a mistura de incubação foi preparada em um volume final de 1 mL agregando-se as amostras já dissolvidas em 10 µL de etanol absoluto, a suspensão de membranas contendo 0,2 - 0,4 mg de proteína e, finalmente, 10 µL de uma solução de [³H]-Flunitrazepam ([³H]-FNZ) (84,5 Ci/mmol) de tal maneira que a concentração final do mesmo foi de 0,42 nM. A incubação realizou-se a 4°C durante 1 h. A reação foi então finalizada pela adição de 3 mL de tampão e a solução resultante foi rapidamente filtrada a vácuo. Os filtros secos foram ressuspensos em 1,5 mL de líquido de cintilação. O conteúdo de radioatividade foi mensurado 24 h após em um contador Wallac Rackbeta 1214.

- **Ensaio de toxicidade**

A avaliação preliminar da toxicidade aguda da FAE de *P. sabulosa* foi realizada utilizando doses entre 1.000 e 5.000 mg/kg pela via oral e entre 500 e 2.500 mg/kg pela via intraperitoneal. Camundongos machos foram tratados com veículo (controle) ou FAE, pela respectiva via de administração, e observados em diferentes tempos durante 3 h consecutivas e após 24 e 48 h. Os parâmetros de observação neste teste foram: a presença ou ausência de contorções abdominais, ptose palpebral, nistagmo, lacrimejamento, hiperemia, cianose, sialorréia, frequência respiratória, piloereção, micção, diarreia, movimentação circular, atividade locomotora, comportamento agressivo, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, resposta à pressão da cauda, paralisia de membros e cabeça, convulsão, sinal de *Straub* e mortes (BRITO, 1994; CARLINI, 1972).

Grupos de 10 camundongos machos e 10 fêmeas foram tratados com dose única, por via oral, com veículo ou FAE (1.000, 2.500, 3.500 ou 5.000 mg/kg), sendo avaliados diariamente quanto à evolução do peso corporal durante os quinze dias subsequentes. A incidência de mortalidade foi anotada e a dose letal oral (DL₅₀) determinada (LITCHFIELD; WILCOXON, 1949). Calculou-se a DL₅₀

somente para a via oral, pois esta é a via mais utilizada por humanos no uso popular de plantas medicinais, geralmente na forma de chás.

A toxicidade sub-crônica foi estudada para obter informações a respeito da toxicidade da FAE de *P. sabulosa* em camundongos quando administrada repetidamente, por um período de 32 dias, de acordo com o protocolo preconizado pela ANVISA (Resolução n° 90, de 16 de março de 2004). De acordo com este protocolo, as doses utilizadas na etapa de toxicologia sub-crônica devem ser pelo menos em número de 3, de forma que a dose mínima seja a menor dose que tenha o efeito terapêutico, a maior dose deve produzir um efeito adverso detectável e a dose intermediária pode ser obtida através da média geométrica entre a dose maior e menor. Assim, as doses de FAE selecionadas para este ensaio foram 250, 500 e 1.000 mg/kg. Os animais foram tratados por via oral com o veículo ou FAE uma vez ao dia, durante 32 dias, sendo pesados semanalmente. Após o período de tratamento, os animais foram anestesiados e submetidos às análises biológicas.

O sangue foi coletado a partir da veia cava inferior sendo obtido aproximadamente 800 - 900 μ L. A primeira alíquota de 300 μ L foi transferida a um tubo Eppendorf contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,1%, sendo manualmente homogeneizado e, em seguida, conduzido às análises hematológicas. O sangue remanescente foi transferido a outro tubo sem anticoagulante e, após 30 min, centrifugado a 3.000 rpm durante 15 min. Após a centrifugação, o soro foi imediatamente separado do coagulado e armazenado por um dia a 4 °C antes de ser encaminhado às análises bioquímicas.

Os parâmetros bioquímicos creatinina, uréia, fosfatase alcalina, γ -glutamil transferase (γ -GT), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), proteínas totais, albumina e globulina foram determinados no soro dos animais. As análises foram realizadas no aparelho automatizado Mira Cobas (Roche) do Hospital Universitário/UFSC pelas professoras Dra. Alcibia Maia Cardoso e Dra. Claudia Regina dos Santos (Departamento de Patologia/UFSC).

O sangue com anticoagulante foi utilizado para avaliar os seguintes parâmetros hematológicos: contagem de eritrócitos, leucócitos, linfócitos, plaquetas, hemoglobina e volume corpuscular médio (VCM), bem como a determinação do hematócrito (através da utilização da centrífuga de micro-

hematócrito). A diferenciação das células sangüíneas (neutrófilos, eosinófilos, monócitos e linfócitos) foi realizada através da confecção de esfregaço sangüíneo e coloração pelo método de May Grünward-Giemsa sob microscopia óptica (Microscópio Olympus, BX41).

4.8- CUMARINAS

4.8.1- Procedimento padrão para obtenção de escopoletina a partir da 6-metoxi-7-preniloxicumarina

A 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7] utilizada neste estudo foi previamente isolada de acordo com o descrito no ítem 4.5 (p. 29).

A 1,0 g (3,84 mmol) de preniloxicumarina em etanol adicionou-se 3 mL de água e sob vigorosa agitação 2 mL de H₂SO₄ (0,037 mmol) concentrado. O sistema foi mantido em agitação até que todo substrato fosse consumido. O precipitado formado na reação foi purificado através de filtração a vácuo, obtendo-se o composto de interesse no resíduo sólido. Para otimizar o rendimento, o filtrado foi ainda extraído 3 X com clorofórmio. A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro, evaporada, e então reunida ao resíduo sólido, sendo o produto recristalizado em acetona (75 - 80 % rendimento).

4.8.2- Procedimento geral para benzoilação/acilação da escopoletina com cloretos de ácido- obtenção de ésteres benzoílicos e alquílicos

O material de partida, escopoletina (1 mmol) [8], foi dissolvido em piridina e tratado com excesso do respectivo cloreto de benzoíla/acila (1,2 mmol). O sistema reacional foi mantido sob refluxo até que todo substrato fosse consumido. A formação do produto foi monitorada por CCD utilizando a mistura de hexano:AcOEt (9:1 v:v). Ao final, adicionou-se 40 mL de CHCl₃ ao sistema e, em funil de separação, extraiu-se o excesso de piridina com uma solução aquosa pH ± 2 com HCl (4 X 25 mL). A fase orgânica foi lavada com uma solução de NaHCO₃ a 10% (4 X 25 mL), seca sob Na₂SO₄ anidro, evaporada e então purificada usando coluna de sílica gel eluída com misturas de hexano:AcOEt.

Aril derivados

- **Benzoato de escopoletina [9]:** composto [9] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) com o cloreto de benzoíla (0,10 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido amarelo claro (83,2% rendimento). Pf: 157 - 159°C; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,21 (d, 2H, *J*=7,8 Hz, H-2',6'), 7,69 (d, 1H, *J*=9,7 Hz, H-4), 7,68 (m, 1H, *J*=7,8 Hz, 2,6 Hz, H-4'), 7,52 (d, 2H, *J*=7,8 Hz, H-3',5'), 7,22 (s, 1H, H-8), 7,02 (s, 1H, H-5), 6,43 (d, 1H, *J*=9,7 Hz, H-3), 3,86 (s, 3H, 6-OCH₃).
- ***p*-clorobenzoato de escopoletina [10]:** composto [10] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de *p*-clorobenzoíla (0,12 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de cor branca (86,9% rendimento). Pf: 149 - 153,4°C; IV ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3066, 1739, 1572, 1507, 1266, 880, 750; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,13 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-2',6'), 7,68 (d, 1H, *J*=9,6 Hz, H-4), 7,49 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-3',5'), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-5), 6,43 (d, 1H, *J*=9,6 Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃).
- ***p*-bromobenzoato de escopoletina [11]:** composto [11] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,149 g, 0,77 mmol) e cloreto de *p*-bromobenzoíla (0,205 g, 0,93 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de cor branca (17,2% rendimento). Pf: 216 - 219°C; IV ν_{\max} (KBr) cm⁻¹: 3066, 1739, 1572, 1507, 1266, 880, 750; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,06 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-2',6'), 7,68 (d, 1H, *J*=9,2 Hz, H-4), 7,68 (d, 2H, *J*=8,4 Hz, H-3',5'), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,01 (s, 1H, H-5), 6,43 (d, 1H, *J*=9,2 Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃).
- ***p*-nitrobenzoato de escopoletina [12]:** Preparação do reagente cloreto de *p*-nitrobenzoíla: A 0,2 mL de SOCl₂ (cloreto de tionila) (2,9 mmol) adicionou-se lentamente uma solução contendo 0,5 g de ácido *p*-nitrobenzóico (2,9 mmol) dissolvido em CH₂Cl₂ (diclorometano) anidro e THF (tetraidrofurano). O sistema foi mantido em refluxo por 30 minutos e então purificado através de recristalização, obtendo-se o cloreto de *p*-nitrobenzoíla. Composto [12] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2,

usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de *p*-nitrobenzoíla (0,170 g, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como cristais amarelos (30,1% rendimento). Pf: 220 - 223°C; IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3072, 1734, 1524, 1266, 855, 708; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,16 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-2',6'), 7,69 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-4), 7,68 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-3',5'), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,00 (s, 1H, H-5), 6,43 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-3), 3,88 (s, 3H, 6-OCH₃).

- ***p*-aminoacetilbenzoato de escopoletina [13]:** Preparação do reagente cloreto de *p*-aminoacetilbenzoíla: A 0,4 mL de SOCl_2 (5,6 mmol) adicionou-se lentamente uma solução contendo 1,0 g do ácido *p*-aminoacetilbenzóico (5,6 mmol) dissolvido em CH_2Cl_2 seco e THF. A reação foi mantida em refluxo por 30 minutos e o produto obtido purificado através de recristalização. Composto [13] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,149 g, 0,77 mmol) e cloreto de *p*-aminoacetilbenzoíla (0,180 g, 0,93 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de cor amarelo claro (36,8% rendimento). Pf: 224 - 227°C; IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3313, 1741, 1698, 1535, 1265, 1135; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,17 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-2',6'), 7,70 (d, 1H, $J=9,2$ Hz, H-4), 7,68 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-3',5'), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,00 (s, 1H, H-5), 6,43 (d, 1H, $J=9,2$ Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,24 (s, 3H, CH₃).
- ***p*-metoxibenzoato de escopoletina [14]:** composto [14] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de *p*-metoxibenzoíla (0,1 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de cor branca (27,5% rendimento). Pf: 150 - 153°C; IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 3066, 1739, 1572, 1507, 1266, 880, 750; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,15 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-2',6'), 7,68 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,20 (s, 1H, H-8), 7,00 (d, 2H, $J=8,4$ Hz, H-3',5'), 6,98 (s, 1H, H-5), 6,42 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 3,90 (s, 3H, 4'-OCH₃) e 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃).

Alquil derivados

- **Acetato de escopoletina [15]:** Anidrido acético (4,5 mL) e uma quantidade catalítica de dimetilaminopiridina (DMAP) foram adicionados a 0,120 g de escopoletina (0,625 mmol) dissolvida em 15 mL de acetato de etila. A reação foi mantida sob agitação em temperatura ambiente por 1 hora, sendo então evaporada e extraída com CHCl_3 em funil de separação. O composto purificado [15] foi obtido como cristais de coloração amarelo-clara (94,0%). Pf: 177 - 179°C; IV ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3066, 1739, 1572, 1507, 1266, 880, 750; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,65 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-4), 7,08 (s, 1H, H-8), 6,96 (s, 1H, H-5), 6,40 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-3), 3,87 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,34 (s, 3H, CH₃).
- **Propanoato de escopoletina [16]:** composto [16] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de propanoíla (0,09 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom (80,5% rendimento). Pf: 103 – 105°C; IV ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2934, 1718, 1567, 1137; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,65 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,06 (s, 1H, H-8), 6,96 (s, 1H, H-5), 6,39 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,64 (q, 2H, H-1'), 1,27 (t, 3H, H-2').
- **Butanoato de escopoletina [17]:** composto [17] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de butanoíla (0,1 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom (71,9% rendimento). Pf: 105 - 107°C; IV ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2969, 1730, 1569, 1502, 1133; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,64 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-4), 7,05 (s, 1H, H-8), 6,95 (s, 1H, H-5), 6,39 (d, 1H, $J=9,6$ Hz, H-3), 3,85 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,58 (t, 2H, H-1'), 1,79 (m, 2H, H-2'), 1,04 (t, 3H, H-3').
- **Hexanoato de escopoletina [18]:** composto [18] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de hexanoíla (0,12 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom claro (70,1% rendimento). Pf: 110 - 112°C; IV ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 2969, 1730, 1569, 1502, 1133; RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 7,65 (d, 1H, $J=9,4$

Hz, H-4), 7,01 (s, 1H, H-8), 6,93 (s, 1H, H-5), 6,40 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-3), 3,86 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,60 (t, 2H, H-1'), 1,78 (m, 2H, H-2'), 1,40 (m, 4H, H-3',4'), 0,94 (t, 3H, H-5').

- **Decanoato de escopoletina [19]:** Composto [19] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.2, usando uma solução de escopoletina (0,150 g, 0,78 mmol) e cloreto de decanoíla (0,19 mL, 0,94 mmol). O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom claro (18,0% rendimento). IV ν_{\max} (KBr) cm^{-1} : 2969, 1730, 1569, 1502, 1133; RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,65 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-4), 7,07 (s, 1H, H-8), 6,96 (s, 1H, H-5), 6,41 (d, 1H, $J=9,4$ Hz, H-3), 3,86 (s, 3H, 6-OCH₃), 2,6 (t, 2H, H-1'), 1,8 (m, 10H, H-2',3',4',5',6'), 1,4 (m, 4H, H-7',8'), 0,8 (t, 3H, H-9').

Síntese de cumarinas

Este trabalho fez parte da etapa de Doutorado sanduíche, realizada no “Dipartimento di Chimica e Tecnologia del Fármaco”, na Università degli Studi di Perugia, Itália, sob orientação do Prof. Dr. Massimo Curini e co-orientação do Prof. Dr. Ornelio Rosati.

4.8.3- Procedimento geral para obtenção de cumarinas através da reação de von Pechmann

À mistura do fenol (1 mmol) e acetoacetato de etila (2 mmol) ou 4-Cl-acetoacetato de etila (1 mmol) ou 2-carboximetil-cicloexanona (1 mmol) adicionou-se 50 mg/mol do catalisador α -Zr-PSO₃H. A mistura reacional foi mantida sob agitação em temperatura de 80°C em banho de óleo sendo monitorada por CCD. Após completa, adicionou-se uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (1:1), sendo imediatamente filtrada. O solvente foi evaporado e o resíduo obtido lavado com éter etílico e recristalizado em etanol quando possível, obtendo-se assim as respectivas cumarinas.

- **7-hidroxi-4-metilcumarina [20]:** composto [20] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de resorcinol (0,20 g, 1,80 mmol), acetoacetato de etila (0,47 mL, 3,60 mmol) e 90 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um

- sólido de coloração branca (88,3% rendimento). Pf: 185 - 187°C; RMN ¹H (200 MHz, DMSO + CDCl₃) δ (ppm): 9,81 (s, 1H, OH), 7,37 (d, 1H, *J*=6,3 Hz, H-5), 6,81 (dd, 1H, *J*=6,3 Hz, 2,4 Hz, H-6), 6,76 (d, 1H, *J*=2,4 Hz, H-8), 5,99 (s, 1H, H-3), 2,31 (s, 3H, 4-CH₃).
- **5,7-diidroxí-4-metilcumarina [21]:** composto [21] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de floroglucinol (0,20 g, 1,23 mmol), acetoacetato de etila (0,31 mL, 2,46 mmol) e 61 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração bege (99,0% rendimento). Pf: 280 - 283°C; RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,46 (s, 1H, OH), 10,2 (s, 1H, OH), 6,13 (d, 1H, *J*=2,2 Hz, H-8), 6,04 (d, 1H, *J*=2,2 Hz, H-6), 5,73 (s, 1H, H-3), 2,38 (s, 3H, 4-CH₃).
 - **7,8-diidroxí-4-metilcumarina [22]:** composto [22] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de pirogalol (0,20 g, 1,58 mmol), acetoacetato de etila (0,40 mL, 3,16 mmol) e 79 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração cinza (81,4% rendimento). Pf: 237 - 239°C; RMN ¹H (200 MHz, DMSO + CDCl₃) δ (ppm): 9,4 (1H, OH), 6,97 (d, 1H, *J*=8,6 Hz, H-6), 6,77 (d, 1H, *J*=8,6 Hz, H-5), 5,98 (s, 1H, H-3), 2,33 (s, 3H, 4-CH₃).
 - **7-hidroxí-6-etil-4-metilcumarina [23]:** composto [23] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de 4-etilresorcinol (0,20 g, 1,45 mmol), acetoacetato de etila (0,36 mg, 2,90 mmol) e 72 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração bege (75,5% rendimento). Pf: 217 - 219°C; RMN ¹H (200 MHz, DMSO + CDCl₃) δ (ppm): 7,40 (s, 1H, H-8), 6,89 (s, 1H, H-5), 6,08 (s, 1H, H-3), 2,72 (q, CH₂CH₃), 2,48 (s, 4-CH₃), 1,30 (t, CH₂CH₃).
 - **7-hidroxí-8-metil-4-metilcumarina [24]:** composto [24] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de 2-metilresorcinol (0,20 g, 1,61 mmol), acetoacetato de etila (0,41 mL, 3,22 mmol) e 82 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração bege (70,0% rendimento). EM: 190

- [M⁺], 162 (100%); Pf: 242 - 245°C; RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,35 (s, 1H, OH), 7,33 (d, 1H, *J*=8,6 Hz, H-5), 6,74 (d, 1H, *J*=8,6 Hz, H-6), 6,00 (s, 1H, H-3), 2,23 (s, 3H, 4-CH₃), 2,02 (s, 3H, 8-CH₃).
- **7-metoxi-4-metilcumarina [25]:** composto [25] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de 3-metoxifenol (0,20 g, 1,56 mmol), acetoacetato de etila (0,42 mL, 3,12 mmol) e 78 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração bege (90,2% rendimento). Pf: 153 - 154°C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,54 (d, 1H, *J*= 8,6 Hz, H-5), 6,93 (dd, 1H, *J*= 8,6 Hz, 2,5 Hz, H-6), 6,86 (s, 1H, *J*= 2,5 Hz, H-8), 6,18 (s, 1H, H-3), 3,91 (s, 3H, OCH₃), 2,44 (s, 3H, 4-CH₃).
 - **7,8-dimetoxi-4-metilcumarina [26]:** composto [26] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de 2,3-dimetoxifenol (0,20 g, 1,29 mmol), acetoacetato de etila (0,33 mL, 2,58 mmol) e 64,5 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração cinza (10,4% rendimento). Pf: 209 - 210°C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,20 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, H-6), 6,80 (d, 1H, *J*= 8,7 Hz, H-5), 6,04 (s, 1H, H-3), 3,87 (s, 3H, OCH₃), 3,85 (s, 3H, OCH₃), 2,29 (s, 3H, 4-CH₃).
 - **7,8-benzo-4-metilcumarina [27]:** composto [27] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de α-naftol (0,20 g, 1,38 mmol), acetoacetato de etila (0,35 mL, 2,76 mmol) e 69,3 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração branca (19,9% rendimento). EM: 210 [M⁺] (100%); Pf: 155 - 158°C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,47 (m, 1H, H-10), 7,77 (m, 1H), 7,53 (m, 4H), 6,28 (s, 1H, H-3), 2,43 (s, 4-CH₃).
 - **7-hidroxi-4-clorometilenocumarina [28]:** composto [28] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura de resorcinol (0,20 g, 1,80 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila (0,23 mL, 1,60 mmol) e 80,5 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração creme (35,0% rendimento). Pf: 180 - 182°C; EM: 210 [M⁺], 147 (100%); RMN ¹H (200

MHz, CDCl₃) δ (ppm): 9,95 (s, 1H, OH), 7,29 (d, 1H, *J*= 6,7 Hz, H-5), 6,80 (dd, 1H, *J*= 6,7 Hz, 2,2 Hz, H-6), 6,79 (d, 1H, *J*= 2,2 Hz, H-8), 6,21 (s, 1H, H-3), 4,83 (s, 2H, 4-CH₂Cl).

- **5,7-diidroxi-4-clorometilenocumarina [29]:** composto [29] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de floroglucinol (0,20 mg, 1,58 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila (0,21 mL, 1,58 mmol) e 79,2 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração amarela escura (68,5% rendimento). Pf: 242 - 244°C; EM: 222 [M⁺], 162 (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,79 (s, 1H, OH), 10,32 (s, 1H, OH), 6,20 (s, 1H, H-6), 6,18 (s, 1H, H-8), 6,10 (s, 1H, H-3), 4,91 (s, 2H, 4-CH₂Cl).
- **7-hidroxi-6-etil-4-clorometilenocumarina [30]:** composto [30] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de 4-etilresorcinol (0,20 mg, 1,45 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila (0,19 mL, 1,45 mmol) e 72,0 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração branca (31,3% rendimento). Pf: 214 - 216°C; EM: 238 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,53 (s, 1H, OH), 7,52 (s, 1H, H-8), 6,65 (s, 1H, H-5), 6,27 (s, 1H, H-3), 4,85 (s, 2H, 4-CH₂Cl), 2,40 (q, 2H, CH₂CH₃), 1,02 (t, 3H, CH₂CH₃).
- **7-hidroxi-8-metil-4-clorometilenocumarina [31]:** composto [31] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de 2-metilresorcinol (0,20 mg, 1,61 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila (0,21 mL, 1,61 mmol) e 78,0 mg do catalisador α-Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom (28,0% rendimento). Pf: 284 - 286°C; EM: 224 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,44 (s, 1H, OH), 7,42 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, H-5), 6,77 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, H-6), 6,30 (s, 1H, H-3), 4,83 (s, 2H, 4-CH₂Cl), 2,04 (s, 3H, CH₃).
- **7-metoxi-4-clorometilenocumarina [32]:** composto [32] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de 3-metoxifenol (0,18 mL, 1,60 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila

- (0,22 mL, 1,60 mmol) e 80,5 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom (35,0% rendimento). Pf: 194 - 195°C; EM: 224 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,46 (s, 1H, $J=8,6$ Hz, H-5), 6,80 (dd, 1H, $J= 8,5$ Hz, 2,5 Hz, H-6), 6,75 (d, 1H, $J= 2,5$, H-8), 6,30 (s, 1H, H-3), 4,52 (s, 2H, 4-CH₂Cl), 3,60 (s, 3H, OCH₃).
- **7,8-dimetoxi-4-clorometilenocumarina [33]:** composto [33] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de 2,3-dimetoxifenol (0,20 mg, 1,29 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila (0,17 mL, 1,29 mmol) e 65,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom clara (7,6% rendimento). Pf: 149 - 151°C; EM: 254 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,27 (d, 1H, $J=8,9$ Hz, H-5), 6,82 (d, 1H, $J=8,9$ Hz, H-6), 6,32 (s, 1H, H-3), 4,52 (s, 2H, 4-CH₂Cl), 3,88 (s, 3H, OCH₃), 3,86 (s, 3H, OCH₃).
 - **7,8-benzo-4-clorometilenocumarina [34]:** composto [34] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de α -naftol (0,20 mg, 1,38 mmol), 4-cloro acetoacetato de etila (0,18 mL, 1,38 mmol) e 69,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração bege (49,6% rendimento). Pf: 176 - 178°C; EM: 244 [M⁺], 181 (100%); RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,48 (m, 1H), 7,78 (m, 1H), 7,55 (m, 4H), 6,55 (s, 1H, H-3), 4,66 (s, 2H, 4-CH₂Cl).
 - **7-hidroxi-3,4-cicloexenocumarina [35]:** composto [35] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura de resorcinol (0,20 mg, 1,81 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,28 mL, 1,81 mmol) e 90,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração bege (85,8% rendimento). Pf: 245 - 246°C; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 7,34 (d, 1H, $J=8,6$ Hz, H-5), 6,80 (d, 1H, $J= 2,4$ Hz, H-8), 6,71 (dd, 1H, $J=8,6$ Hz, 2,4 Hz, H-6), 2,65 (m, 2H), 2,43 (m, 2H), 1,72 (m, 4H).
 - **5,7-diidroxi-3,4-cicloexenocumarina [36]:** composto [36] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma

- mistura de pirogalol (0,20 mg, 1,58 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,22 mL, 1,58 mmol) e 79,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração bege (59,5% rendimento). Pf: 251 - 253°C; EM: 230 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,25 (s, OH), 10,00 (s, OH), 6,12 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, H-6), 6,02 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, H-8), 2,91 (m, 2H), 2,22 (m, 2H), 1,52 (m, 4H).
- **7,8-diidroxi-3,4-cicloexenocumarina [37]**: composto [37] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura floroglucinol (0,20 mg, 1,23 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,17 mL, 1,23 mmol) e 61,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração cinza (80,0% rendimento). Pf: 256 - 259°C; RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 9,76 (s, 1H, OH), 9,11 (s, 1H, OH), 6,90 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, H-5), 6,60 (d, 1H, $J=8,5$ Hz, H-6), 2,59 (m, 2H), 2,26 (m, 2H), 1,60 (m, 4H).
 - **7-hidroxi-6-etil-3,4-cicloexenocumarina [38]**: composto [38] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura 4-etilresorcinol (0,20 mg, 1,56 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,23 mL, 1,56 mmol) e 78,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom (69,3% rendimento). Pf: 218 - 220°C; EM: 244 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,22 (s, OH), 7,26 (s, 1H, H-5), 6,59 (s, 1H, H-8), 2,61 (m, 2H), 2,38 (m, 2H), 2,3 (m, 2H, CH₂CH₃), 1,59 (m, 2H), 1,05 (t, 3H, CH₂CH₃).
 - **7-hidroxi-8-metil-3,4-cicloexenocumarina [39]**: composto [39] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma mistura 2-metilresorcinol (0,20 mg, 1,56 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,23 mL, 1,56 mmol) e 78,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom (69,3% rendimento). Pf: 242-245°C; EM: 230 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 10,11 (s, OH), 7,26 (d, 1H, $J=8,7$ Hz, H-6), 6,71 (d, 1H, $J=8,7$ Hz, H-5), 2,60 (m, 2H), 2,26 (m, 2H), 2,02 (s, 3H, CH₃), 1,61 (m, 4H).
 - **7-metoxi-3,4-cicloexenocumarina [40]**: composto [40] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.3, usando uma

mistura de 3-metoxifenol (0,18 mL, 1,56 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,22 mL, 1,56 mmol) e 78,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração branca (80,5% rendimento). Pf: 117 - 119°C; EM: 230 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 7,50 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, 1,8 Hz, H-6), 6,81 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H-5), 6,78 (d, 1H, $J=1,8$ Hz H-8), 3,71 (s, 3H, OCH₃), 2,63 (m, 2H), 2,27 (m, 2H), 1,62 (m, 4H).

- **7,8-benzo-3,4-cicloexenocumarina [41]:** composto [41] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.3, usando uma mistura α -naftol (0,20 mg, 1,38 mmol), 2-carboximetil-cicloexanona (0,20 mL, 1,38 mmol) e 69,0 mg do catalisador α -Zr-PSO₃H. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração laranja claro (2,9% rendimento). Pf: 187-189°C; EM: 250 [M⁺] (100%); RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,46 (m, 1H), 7,74 (m, 1H), 7,49 (m, 4H), 2,77 (m, 2H), 2,55 (m, 2H), 1,77 (m, 4H).

4.8.4- Procedimento geral para obtenção de cumarinas através da reação de Knoevenagel

A uma mistura do respectivo salicilaldeído (1 mmol) e dietilmalonato (1 mmol) adicionou-se 50 mg/mol do catalisador básico α -Zr(KPO₄)₂. A reação foi mantida em agitação e temperatura de 120°C em banho de óleo, sendo monitorada por CCD utilizando como sistema de eluente éter de petróleo:AcOEt (8:2, v:v). A mistura foi refluxada até que todo substrato fosse consumido. Então, adicionou-se à reação uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v:v), sendo filtrada e evaporada em rotaevaporador. O produto bruto obtido foi lavado com éter etílico, sendo seco com auxílio do vácuo, para obter as respectivas cumarinas.

- **3-carboxietilcumarina [42]:** composto [42] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.4, usando uma mistura de salicilaldeído (0,40 g, 3,28 mmol), dietilmalonato (0,50 mL, 3,28 mmol) e 164 mg do catalisador α -Zr(KPO₄)₂. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração branca (42,2% rendimento). Pf: 93 - 94°C; RMN ¹H

- (200 MHz, DMSO) δ (ppm): 8,82 (s, 1H, H-4), 8,01 (m), 7,78 (m), 7,43 (m), 4,31 (q, 2H, OCH₂CH₃), 1,48 (t, 3H, OCH₂CH₃).
- **6-metil-3-carboxietilcumarina [43]:** composto [43] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.4, usando uma mistura de 5-metilsalicilaldeído (0,40 g, 2,93 mmol), dietilmalonato (0,45 mL, 2,93 mmol) e 146 mg do catalisador α -Zr(KPO₄)₂. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração branca (32,7% rendimento). Pf: 96 - 98°C; EM: 232 [M⁺], 160 (100%); RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,4 (s, 1H, H-4), 7,3 (dd, *J*=8,2 Hz, 2,0 Hz, H-7), 7,2 (d, 1H, *J*=2,0 Hz, H-5), 7,1 (d, 1H, *J*=8,2 Hz, H-8) 4,3 (q, 2H, OCH₂CH₃), 2,3 (s, 3H, CH₃), 1,3 (t, 3H, OCH₂CH₃).
 - **7-metoxi-3-carboxietilcumarina [44]:** composto [44] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.4, usando uma mistura de 4-metoxisalicilaldeído (0,40 g, 2,62 mmol), dietilmalonato (0,20 mL, 2,62 mmol) e 131 mg do catalisador α -Zr(KPO₄)₂. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração branca (35,5% rendimento). Pf: 117-119°C; EM: 248 [M⁺], 203 100%; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,4 (s, 1H, H-4), 7,5 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, H-5), 6,8 (d, 1H, *J*=8,7 Hz, H-6), 6,7 (s, 1H, H-8), 4,3 (q, 2H, OCH₂CH₃), 3,8 (s, 3H, OCH₃), 1,3 (t, 3H, OCH₂CH₃).
 - **5,7-dimetoxi-3-carboxietilcumarina [45]:** composto [45] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.4, usando uma mistura de 4,6-dimetoxisalicilaldeído (0,40 g, 2,20 mmol), dietilmalonato (0,33 mL, 2,20 mmol) e 110 mg do catalisador α -Zr(KPO₄)₂. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração branca (21,0% rendimento). Pf: 159 - 162°C; EM: 278 [M⁺]; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,4 (s, 1H, H-4), 6,78 (sl, 1H, H-6), 6,65 (s, 1H, H-8), 4,32 (q, 2H, OCH₂CH₃), 3,83 (s, 3H, OCH₃), 3,77 (s, 3H, OCH₃), 1,35 (t, 3H, OCH₂CH₃).
 - **6-bromo-3-carboxietilcumarina [46]:** composto [46] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no ítem 4.8.4, usando uma mistura de 5-bromosalicilaldeído (0,40 g, 1,98 mmol), dietilmalonato (0,60 mL, 1,98 mmol) e 99 mg do catalisador α -Zr(KPO₄)₂. O produto purificado foi obtido como cristais de coloração amarela clara (69,5% rendimento). Pf: 165 -166°C; EM: 297 [M⁺]; RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,42 (s, 1H,

H-4), 7,73 (dd, 1H, $J=7,9$ Hz, 1,9 Hz, H-7), 7,69 (d, 1H, $J=1,9$ Hz, H-5), 7,23 (d, 1H, $J=7,9$ Hz, H-8), 4,45 (q, 2H, OCH_2CH_3), 1,39 (t, 3H, OCH_2CH_3).

- **6-bromo-8-metoxi-3-carboxietilcumarina [47]:** composto [47] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.4, usando uma mistura de 5-bromo-3-metoxisalicilaldeído (0,40 g, 1,73 mmol), dietilmalonato (0,26 mL, 1,73 mmol) e 86 mg do catalisador $\alpha\text{-Zr}(\text{KPO}_4)_2$. O produto purificado foi obtido como um sólido de coloração marrom claro (65,7% rendimento). Pf: 157 - 159°C; EM: 297 [M^+]; RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,39 (s, 1H, H-4), 7,89 (sl, 1H, H-7), 7,69 (sl, 1H, H-5), 4,36 (q, 2H, OCH_2CH_3), 3,87 (s, 3H, OCH_3), 1,33 (t, 3H, OCH_2CH_3).
- **6-cloro-3-carboxietilcumarina [48]:** composto [48] foi preparado de acordo com o procedimento geral descrito no item 4.8.4, usando uma mistura de 5-clorosalicilaldeído (0,40 g, 2,56 mmol), dietilmalonato (0,39 mL, 2,56 mmol) e 128 mg do catalisador $\alpha\text{-Zr}(\text{KPO}_4)_2$. O produto purificado foi obtido como um sólido amorfo de coloração branca (64,8% rendimento). Pf: 150 - 153°C; EM: [M^+]; RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 8,72 (s, 1H, H-4), 8,05 (d, 1H, $J=2,2$ Hz, H-5), 7,78 (dd, 1H, $J=8,1$ Hz, 2,2 Hz, H-7), 7,45 (d, 1H, $J=8,1$ Hz, H-8), 4,32 (q, 2H, OCH_2CH_3), 1,37 (t, 3H, OCH_2CH_3).

4.8.5- Atividade citotóxica

4.8.5.1- Atividade tóxica frente a larvas de *Artemia salina*

Para testar a toxicidade das cumarinas, utilizou-se a metodologia de Meyer e colaboradores (1982) com pequenas modificações. Cistos de *Artemia salina* foram incubados em água salgada artificial (3,8 g de sal marinho/L de água) em temperatura de 27°C por 48 horas para a eclosão. Decorrido este tempo, de 5 a 10 larvas foram transferidas para poços individuais em uma placa com 24 poços contendo água salgada e as substâncias a serem testadas em quatro diferentes concentrações (25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$). Os testes foram realizados em triplicata e a contagem das larvas vivas e mortas realizada após 24 horas. Dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, $\text{DL}_{50} \cong 20 - 40 \mu\text{g/mL}$) e o solvente utilizado para fazer as soluções dos compostos (etanol) foram usados como controle positivo e negativo respectivamente. A dose letal para ocorrer mortalidade de 50% (DL_{50}) após 24 horas de exposição foi obtida através do gráfico da % de animais mortos em

função do logaritmo da dose testada. Valores de DL_{50} maior que 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram considerados inativos. Os resultados foram analisados estatisticamente através do método de probitos.

4.8.5.2- Ensaio de viabilidade de células tumorais

A avaliação da viabilidade celular foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, pela aluna Andreza Campos coordenado pelo Pós-doc Jarbas Motta Siqueira Junior e pela Prof. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle.

O ensaio foi baseado na redução do brometo 3-[4,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) pela desidrogenase presente na mitocôndria de células vivas, formando um composto violeta insolúvel, o formasana. Para isto, células de melanoma murino B16F10 em meio de cultura DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, L-glutamina (2 mM), glicose (4,5 g/L), bicarbonato de sódio (1,5 g/L), penicilina/estreptomicina, foram plaqueadas numa placa de 96 poços (2,5 x 10³ células/poço). A placa foi então incubada por 24 horas a 37°C. Decorrido o período, removeu-se o meio (células ficam aderidas no fundo da placa) e adicionou-se 100 μL de uma solução contendo a cumarina (50 μM) em DMEM. Após incubar as placas a 37°C por 48 horas, o meio foi removido e, então, adicionou-se 100 μL do MTT 0,5 mg/mL em DMEM. Novamente as placas foram incubadas a 37°C por 2 horas e 30 min. e, em seguida, o MTT foi removido e 200 μL de DMSO adicionados para dissolver os cristais de formasana produzidos. As placas foram então avaliadas por meio de leitor ELISA, em 40 nm, para estabelecer a relação linear do número médio de células por poço (adaptado de MOSMANN, 1983).

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média \pm erro padrão da média das porcentagens em relação ao grupo controle. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$ representam diferenças significativas em relação ao controle (ANOVA/Dunnet).

4.8.5.3- Ensaio de atividade antiproliferativa de células tumorais

Os ensaios de atividade antiproliferativa foram realizados no Centro de Pesquisas René Rachou/CPqRR - FIOCRUZ em Minas Gerais pela Pós-doc Susana Johann sob orientação do Prof. Dr. Carlos Leomar Zani.

O efeito das cumarinas sobre a proliferação celular foi avaliado utilizando as linhagens tumorais MCF-7 (glândula mamária) e TK10 (renal) (MONKS et al., 1991). De forma geral, as suspensões celulares foram diluídas de acordo com a linhagem de modo que em 100 µL, adicionados em cada poço de uma placa de 96 poços, contenha: 10.000 células MCF-7 e 15.000 células TK10. Os inóculos foram incubados por 24 horas a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂ para estabilização. Em cada poço foi adicionado a respectiva cumarina de modo a atingir a concentração final de 20 µg/mL. As células foram incubadas na presença dos compostos por 48 horas, a 37°C, em atmosfera de 5% CO₂. A multiplicação celular foi medida pelo método colorimétrico, empregando-se a sulforrodamina B. Este corante liga-se aos aminoácidos básicos das proteínas celulares e pode ser utilizado para quantificar a proliferação celular. A leitura espectrofotométrica da absorvância foi realizada em 560 nm em leitor de microplacas. Os testes foram realizados em triplicata utilizando como controles positivos fármacos citotóxicos colchicina e etoposídeo.

Os resultados foram analisados da seguinte maneira: calcularam-se as médias das absorvâncias descontadas de seus respectivos brancos e, através das fórmulas descritas a seguir, determinou-se a inibição de crescimento (IG) de cada amostra testada (MONKS et al., 1991).

- $T > C$ a substância estimulou o crescimento (não apresenta IG);
- Se $T \geq T_0$ mas $< C$, a substância foi citostática e a fórmula utilizada é $100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$;
- Se $T < T_0$ a substância é citocida e a fórmula utilizada é $100 \times [(T-T_0)/(C)]$, sendo T a média da absorvância da célula tratada, C a absorvância controle de célula e T₀ a absorvância das células no dia da adição da substância teste. O resultado obtido foi subtraído de 100% obtendo-se então a porcentagem de inibição de crescimento.

4.8.6- Atividade antimicrobiana

4.8.6.1- Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi realizada conforme a metodologia descrita no item 4.6.2 (p. 35) para óleos voláteis, utilizando-se além das bactérias citadas (*P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus*), cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, conhecida como MRSA.

4.8.6.2- Atividade antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela doutoranda Susana Johann sob orientação da Prof. Dra. Maria Aparecida de Rezende.

Os microrganismos utilizados foram: *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. glabrata* (ATCC 2001), *C. krusei* (ATCC 200298), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. tropicalis* (ATCC 22019). O inóculo foi preparado de acordo com o documento NCCLS M27-A (1995). Para o teste de microdiluição, as amostras foram ressuspensas em solução fisiológica esterilizada e homogeneizadas em vórtex, ajustando-se a turbidez de 0,5 da escala de McFarland, equivalente a $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL. A partir deste inóculo foram feitas diluições 1:50 e 1:20, correspondendo a um inóculo de $1 \times 10^3 - 5 \times 10^3$ UFC/mL.

As substâncias foram dissolvidas em 200 µL de dimetilsulfoxido (DMSO) sendo adicionadas a 1800 µL do meio RPMI. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas usando como diluente o próprio RPMI, mantendo-se o volume constante de 1000 µL em cada tubo. Assim, as substâncias foram testadas em 3 concentrações: 500, 250 e 125 µg/mL. De cada diluição, alíquotas de 100 µL foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento recebeu 100 µL do inóculo microbiano. As placas foram incubadas por 48 horas a temperatura de 35°C, sendo realizada a leitura após este período.

A CIM foi considerada como a menor concentração do composto que inibiu totalmente o crescimento do microrganismo, em relação ao controle de crescimento, sendo expressas em µg/mL. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o RPMI sem a adição do composto e solvente. Como controle de toxicidade do DMSO foi usado o meio de cultura juntamente

com o mesmo. Como controle positivo utilizou-se o RPMI adicionado de anfotericina B. Os testes foram realizados em triplicata.

4.9- Avaliação do potencial antioxidante e análise dos constituintes fenólicos em extratos e frações

4.9.1- Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais no extrato bruto hidroalcoólico (EBH) e nas frações hexano (HEX), acetato de etila (FAE) e aquosa (FA) foi realizado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (WU et al., 2005; KUJALA et al., 2000). A 0,5 mL de cada amostra (solução com concentração de 1000 ppm) foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos, acrescentou-se 1,0 mL de uma solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3). Decorrido 1 hora de incubação em temperatura ambiente, a absorvância foi mensurada em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco, utilizou-se uma solução preparada conforme descrita acima, porém adicionando 0,5 mL de metanol no lugar da amostra. Ácido gálico (25 a 50 mg/mL), dissolvido em água destilada, foi usado para elaboração da curva de concentração padrão, sendo os valores de fenólicos totais expressos como mg de ácido gálico/g de extrato ou fração seca. Os testes foram realizados em triplicata.

4.9.2- Determinação do teor de flavonóides totais

A concentração de flavonóides totais presentes no EBH, HEX, FAE e FA foi avaliada de acordo com o método descrito por Woisky e Salatino (1998). A uma solução de 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de cloreto de alumínio (AlCl_3) 2% (em metanol) foram adicionados 0,5 mL das soluções testes (diluídas em metanol com concentração de 1000 ppm). Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 1 hora e decorrido este tempo, a absorvância foi determinada a 415 nm. Utilizou-se etanol como branco. Foi construída uma curva de calibração com uma solução padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 400 $\mu\text{g/mL}$ (em metanol). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de flavonóides totais foi expresso em mg de quercetina/g de extrato ou fração seca.

4.9.3- Ação seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade seqüestrante de radicais DPPH foi determinada de acordo com o método de Cavin e colaboradores (1998), com algumas modificações.

Uma solução de DPPH 0,004% foi adicionada às soluções testes nas concentrações de 5 a 200 ppm. Após 30 minutos, mediu-se a absorvância em 517 nm da solução de DPPH (2 mL de solução 0,004%), acrescentado de 1 mL de MeOH, obtendo-se assim a absorvância no tempo inicial (A_0). A cada uma das concentrações da amostra em análise (1 mL), adicionou-se 2 mL da solução de DPPH, obtendo-se a absorvância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorvância de uma solução da amostra (1 mL) em metanol (2 mL) foi subtraída da absorvância das amostras analisadas, a fim de minimizar a possível interferência da cor ou turbidez presente no extrato ou frações. Os valores obtidos foram plotados na forma de % de decréscimo da absorvância de DPPH em função da concentração da amostra teste, determinando-se a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50% (IC_{50}). As análises foram feitas em triplicata.

4.9.4- Determinação do potencial redutor

A metodologia utilizada na determinação do potencial redutor foi baseada no método proposto por Waterman e Mole (1994), com adaptações.

A 100 μ L das amostras (EBH e frações na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. Adicionou-se, então, 1,0 mL da solução de cloreto férrico ($FeCl_3$) 0,1 M, e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 M. Após 15 minutos, realizou-se a leitura da absorvância da solução a 720 nm. Como branco, utilizou-se uma solução preparada conforme o procedimento descrito acima, sem a adição da amostra. Realizou-se uma curva de calibração utilizando soluções padrões de ácido ascórbico. O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico/g de extrato ou fração seca. As análises foram feitas em triplicata.

4.9.5- Análise dos compostos fenólicos por eletroforese capilar (EC).

A análise por EC foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar, pela aluna de mestrado Melina Heller, sob responsabilidade do Prof. Dr. Gustavo de Amadeu Micke do Departamento de Química (UFSC). Utilizaram-se os EBH obtidos dos galhos, folhas e flores separadamente com a amostra coletada em novembro/2007, conforme descrito no ítem 4.3 (p. 28). As soluções dos extratos foram preparadas na concentração de 1000 ppm.

As condições utilizadas foram: injeção hidrodinâmica (50 mbar, 4s), a tensão aplicada foi de 25 kV e a temperatura de 25°C, com detecção direta em 390 nm. O capilar utilizado apresentava diâmetro interno de 50 µm, com comprimento total 48,5 cm, sendo que o comprimento até o detector foi de 40 cm. Utilizou-se um eletrólito composto por 20 mmol/L de tetraborato de sódio (TBS) em água e metanol (10%), com valor final de pH 9,3.

Na seqüência, uma alíquota de cada extrato foi submetida à hidrólise ácida para avaliação da possível presença de compostos heterosídicos. Assim, colocou-se 300 µL de cada amostra em tubos de ensaio com tampas, adicionando-se 60 µL de HCl 6,0 mol/L. Os tubos de ensaio foram fechados e aquecidos a 95°C por uma hora. A mistura foi seca sob fluxo de N₂ e em seguida ressuspensa em 300 µL de etanol e novamente analisada.

A análise qualitativa foi realizada através da comparação dos tempos de migração dos padrões conhecidos, presentes na base de dados do próprio equipamento, com os tempos de migração das substâncias presentes na amostra e através dos respectivos espectros de UV/Vis (detector por arranjo de diodos).

5 - Resultados e Discussão

O escopo deste trabalho foi a obtenção dos principais constituintes de *P. sabulosa*, o preparo de moléculas análogas e ensaios de atividades biológicas. Assim, o trabalho foi dividido em: análise dos óleos voláteis de partes aéreas e raízes com avaliação da atividade antibacteriana; isolamento e caracterização das estirilpironas, avaliação das propriedades no sistema nervoso central e análise do conteúdo destes compostos em diferentes coletas; isolamento e caracterização de cumarinas e obtenção de moléculas análogas através de síntese e semi-síntese com avaliação das atividades citotóxica e antimicrobiana; e finalmente, avaliação do potencial antioxidante e do teor de componentes fenólicos em extratos e frações de *P. sabulosa*.

5.1- Análise dos componentes voláteis

Óleos voláteis são, em sua maioria, misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, obtidas principalmente a partir de plantas aromáticas (SIMÕES; SPITZER, 1999). A composição química destes óleos é diferente em cada espécie ou subespécie e é sempre característica na espécie em questão. A identificação dos componentes individuais presentes nos óleos voláteis requer o uso de diferentes técnicas. Um dos métodos mais populares para este estudo é a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), que permite a identificação dos componentes individuais encontrados na mistura através da comparação de seus respectivos índices de retenção e espectros de massas com bancos de dados e literatura (YAYLI et al., 2006).

Neste trabalho, o óleo volátil obtido das raízes e partes aéreas frescas de *P. sabulosa* foi analisado por CG-EM, sendo posteriormente submetido ao teste de atividade antimicrobiana.

5.1.1- Análise do óleo volátil

O óleo volátil das partes aéreas e raízes de *P. sabulosa*, obtido por hidrodestilação, apresentou rendimento de 0,3 mL e < 0,1 mL por 100 g do material fresco utilizado, respectivamente.

Através da análise por CG-EM do óleo volátil das raízes de *P. sabulosa*, pôde-se identificar 9 compostos que representaram 89,2% do total. Os principais

componentes voláteis caracterizados foram: salicilato de metila (83,8%), linalol (2,5%), 4-metoxi-salicilato de metila (1,5%), *m*-hidroxi-benzoato de metila (0,9%), 2-hidroxi-benzoato de etila (0,4%), *p*-hidroxi-benzoato de metila (0,2%). No óleo volátil das partes aéreas, 11 compostos foram identificados, representando 89,0% do total. Os componentes majoritários foram uma δ -pentil lactona (47,0%) e salicilato de metila (31,5%), além de outros componentes minoritários como 2,6-ditercbutil *p*-cresol (3,8%), geraniol (2,5%), 4-metoxi-salicilato de metila (2,4%), eugenol (0,8%), aromadendreno (0,5%) e salicilato de benzila (0,5%).

O típico aroma das raízes da espécie em estudo pode ser atribuído à significativa quantidade de salicilato de metila e, em menor extensão, de seus derivados. Salicilato de metila é um éster aromático formado na via do chiquimato, sendo derivado do ácido salicílico (DEWICK, 1997). É um importante sinalizador molecular que induz a defesa das plantas contra insetos herbívoros e outros patógenos (BI et al., 2007), apresentando propriedades antifúngica e antibacteriana (PAPANDREOU et al., 2002). É utilizado em linimentos, pomadas, pastas de dente, e amplamente empregado na indústria devido ao seu sabor e aroma (CLARK, 1999).

A ocorrência de salicilato de metila foi previamente reportada nas raízes de alguns gêneros pertencentes à família Polygalaceae, tais como *Polygala* e *Securidaca*, diferindo das espécies pertencentes ao gênero *Carpolobia*, que não contêm este composto no córtex de suas raízes (DELAUDE, 1975).

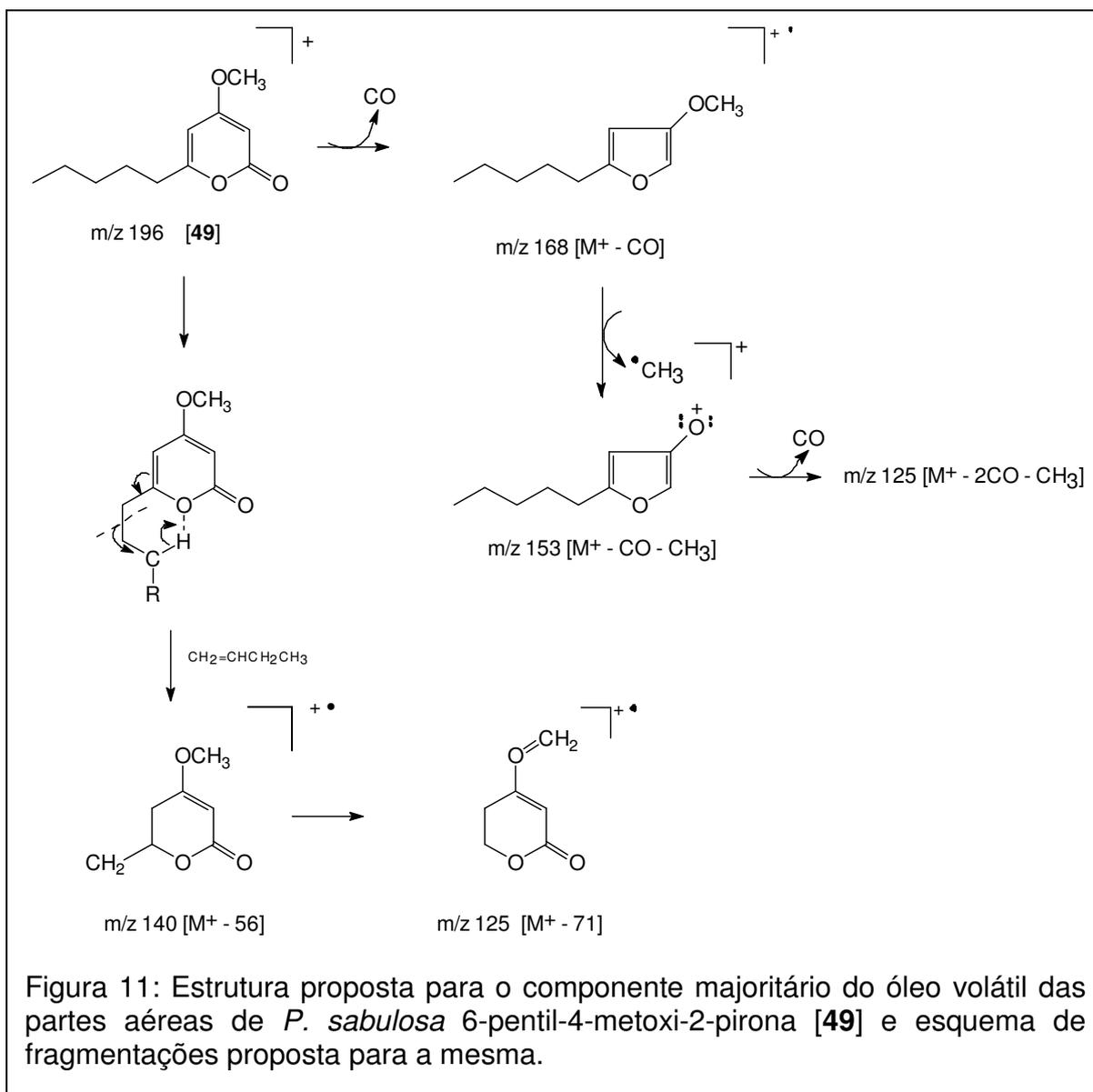
Securidaca longepedunculata Fres. é uma espécie do gênero *Securidaca*, pertencente a família Polygalaceae, comum em muitos países do Oeste da África e amplamente usada na medicina popular (AJALI; CHUKWURAH, 2004). Nébié e colaboradores (2004) relataram que o salicilato de metila compreende mais de 90,0% da fração volátil das raízes de *S. longepedunculata*, juntamente com outros componentes minoritários. Este é o principal composto responsável pelas propriedades repelente, tóxica e fumegante desta planta contra algumas espécies de insetos que contaminam grãos estocados, tais como *Rhyzopertha dominica*, *Sitophilus zeamais* e *Prostephanus truncatus* (JAYASEKARA et al., 2005; BELMAIN et al., 2001).

Várias espécies de *Polygala*, tais como *Polygala chamaebuxus*, *P. nambalensis*, *P. usafuensis*, *P. macrostigma*, *P. persicariaefolia*, *P. pygmaea*, *P.*

exelliana, *P. paniculata* e *P. cyparissias* também apresentam grande concentração deste composto em suas raízes (WHERRY, 1927; PIZZOLATTI et al., 2008). Para *P. senega* L. var. *latifolia*, os principais componentes encontrados no óleo essencial das raízes foram ácido hexanóico (33,6%), salicilato de metila (26,5%), hexanal (5,3%) e *o*-cresol (3,5%) (HAYASHI; KAMEOKA, 1995). Estudos por CCD demonstraram que no óleo volátil das raízes de *Polygala microphylla* não foi detectado salicilato de metila, podendo ser uma exceção nas espécies de *Polygala* (ACCAME; GARCIA, 1984).

Neste estudo, apesar de ter sido encontrado uma concentração de 31,5% de salicilato de metila nas partes aéreas de *P. sabulosa*, suas características organolépticas são distintas daquelas observadas nas raízes que possuem 83,8% do mesmo. Essa diferença pode ser atribuída à δ -pentil lactona identificada no óleo volátil das partes aéreas em uma concentração de 47,0% e tempo de retenção de 31,9 min.

A proposta estrutural para este constituinte volátil foi baseada no estudo da fragmentação de seu espectro de massas e comparação de dados da literatura, sendo observado que seu padrão de fragmentação é muito similar ao da 4-metoxi-6-metil-pirona. No espectro de massas $[M]^+$ [(m/z) 196 (25%), 168 (8%), 153 (5%), 140 (25%), 125 (100%), 112 (23%), 98 (27%), 69 (53%)], o íon m/z 140 indicou que a fragmentação do íon molecular foi acompanhada de um rearranjo de hidrogênio. Analisando estas fragmentações juntamente com a hipótese de que este composto tenha uma metade estrutural da 4-metoxi-6-metil-pirona, propusemos que o mesmo possui uma cadeia lateral linear de 5 átomos de carbono, ligada ao C-6. Assim a proposta estrutural para o composto majoritário do óleo volátil das partes aéreas de *P. sabulosa* foi a 6-pentil-4-metoxi-2-pirona [49]. A figura 11 apresenta um esquema de fragmentação proposto para este composto.



Analisando as fragmentações dos outros componentes não identificados do óleo essencial das partes aéreas, observou-se que o composto com tempo de retenção de 35,5 min (0,3%). apresentou o padrão de fragmentação semelhante à 6-pentil-4-metoxi-2-pirona [49] (Figura 12A), porém com íon molecular contendo 28 u.m.a a mais: $[M]^+$ m/z 224 u.m.a (14%), 168 (8%), 153 (32%), 140 (31%), 125 (100%), 112 (17%), 98 (33%), 69 (60%) (Figura 9B). Essa diferença de 28 u.m.a foi atribuída à presença de uma unidade etilênica adicional a cadeia lateral, o que nos permitiu propor a estrutura da 6-heptil-4-metoxi-2-pirona [50] para este constituinte do óleo volátil das partes aéreas de *P. sabulosa*.

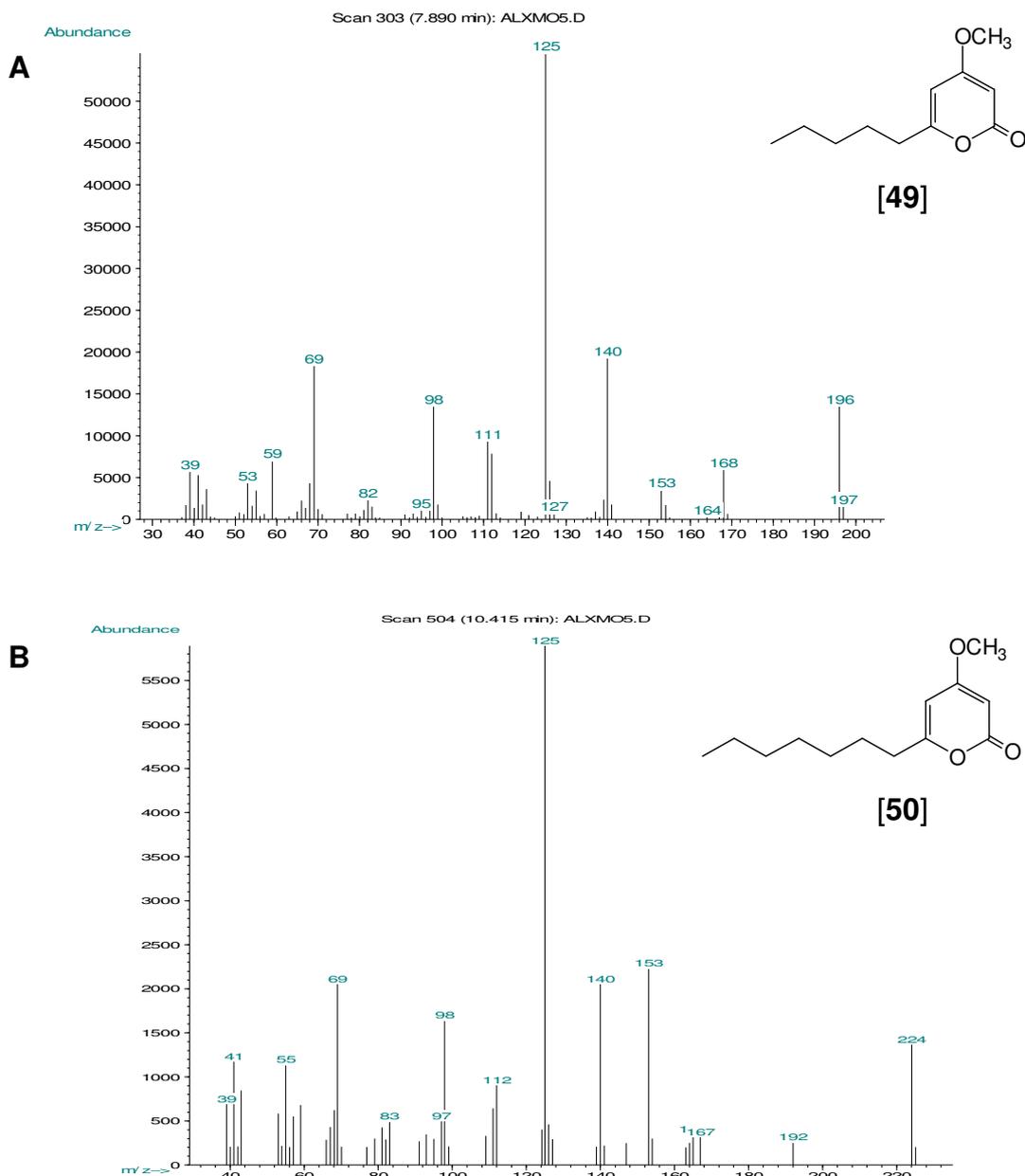


Figura 12: Espectros de massas dos compostos 6-pentil-4-metoxi-2-pirona **[49]** (A) e da 6-heptil-4-metoxi-2-pirona **[50]** (B) presentes no óleo volátil das partes aéreas de *P. sabulosa*.

Adicionalmente, a análise por CG-EM da fração acetato de etila (FAE) de *P. sabulosa*, revelou a presença de 6-pentil-4-metoxi-2-pirona **[49]** (m/z 196 u.m.a) e de 6-heptil-4-metoxi-2-pirona (m/z 224 u.m.a.) **[50]** em quantidades apreciáveis.

A 6-pentil-4-metoxi-2-pirona **[49]** foi anteriormente isolada da espécie de fungo *Galiella rufa* (Sarcosomataceae, Ascomycota) (KOPCKE et al., 2002) e do ascomiceto A111-95 (JOHANSSON et al., 2002).

5.1.2- Atividade antibacteriana do óleo volátil

Vários estudos têm apontado importantes propriedades terapêuticas relacionadas aos óleos voláteis, destacando-se as atividades antiviral, antiespasmódica, analgésica, antibacteriana, antifúngica, expectorante, relaxante, anti-séptica das vias respiratórias, antioxidante, antiinflamatória dentre outras (OYEDJI; AFOLAYAN, 2006; SOUZA et al., 2007; HALCON; MILKUS, 2004). Além do uso na medicina tradicional, os óleos voláteis possuem uso bastante difundido na indústria farmacêutica, de alimentos e fragrâncias (DEBA et al., 2008).

Seguindo este interesse da indústria por óleos voláteis, em 2005, o laboratório Aché lançou o Acheflan[®]. Este fitofármaco, produzido a partir do óleo volátil da espécie *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) (erva-baleeira), tem como princípios ativos o alfa-humuleno e o transcariofileno. A estes compostos foram atribuídas às propriedades antiinflamatórias apresentadas pelo medicamento, sendo seu uso indicado no tratamento da tendinite crônica e dores miofasciais (musculares) (Fernandes et al., 2007) (http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero6.pdf).

O óleo volátil de *P. sabulosa* obtido através da hidrodestilação das partes aéreas foi testado contra as espécies *Staphylococcus aureus*, um coco Gram positivo, e as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A classificação para a atividade antimicrobiana foi baseada nos valores de CIM: forte inibição – CIM até 0,5 µL/mL; moderada inibição – CIM entre 0,6 – 1,5 µL/mL; fraca inibição – CIM maior que 1,6 µL/mL (ALIGIANNIS et al., 2001).

O óleo volátil mostrou uma forte inibição contra a bactéria Gram positiva *S. aureus*, com valores de CIM de 0,15 µL/mL. *Staphylococcus aureus* é um microrganismo patogênico clássico, reconhecido como agente etiológico de infecções comunitárias e hospitalares apresentando a capacidade de colonizar diferentes tecidos e órgãos, causando uma grande variedade de patologias, desde as leves/moderadas – como as superficiais, de pele/partes moles – até aquelas envolvendo elevada morbidade e mortalidade, como a infecção de corrente sangüínea e a pneumonia (LOPES, 2005).

Para a bactéria Gram negativa *E. coli* a inibição foi moderada, com um valor de CIM= 0,63 µL/mL. Porém, uma forte inibição foi observado para *P. aeruginosa*

(CIM= 0,15 $\mu\text{L}/\text{mL}$), outra espécie de bactéria Gram negativa. Este achado é interessante, pois a grande maioria de extratos de plantas, em geral, é mais ativa contra bactérias Gram positivas. A maior resistência de bactérias Gram negativas a extratos foi previamente relatada por Salvador e colaboradores (2004). Esta resistência pode estar relacionada ao fato de que a parede celular de bactérias gram negativas apresenta-se como uma barreira para muitas substâncias. Além disso, o espaço periplasmático contém enzimas que são úteis na quebra de moléculas estranhas ao organismo. Adicionalmente, bactérias Gram negativas possuem bombas de efluxo que reduzem o nível intracelular de antibióticos (PALOMBO; SEMPLE, 2001).

A atividade antibacteriana do salicilato de metila isoladamente foi anteriormente descrita, apresentando moderada atividade contra diferentes bactérias, com CIMs variando de 141 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 562 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O maior efeito inibitório foi observado contra *S. aureus* e a espécie *P. aeruginosa* foi a bactéria que apresentou maior resistência a este composto (RADULOVIC et al., 2007).

Como a 6-pentil-4-metoxi-2-pirona não apresenta atividade antibacteriana descrita na literatura, é difícil inferir que este composto seja o principal responsável pela atividade observada para o óleo das partes aéreas de *P. sabulosa*. Além disso, a atividade observada para o óleo pode ser atribuída ao efeito sinérgico dos dois compostos majoritários, 6-pentil-4-metoxi-2-pirona + salicilato de metila, ou mesmo, aos componentes minoritários presentes no mesmo.

5.2- Estirilpironas

As estirilpironas ou estiril-lactonas são consideradas um grupo de metabólitos relativamente incomum em produtos naturais. No entanto, as estiril-lactonas que ganharam bastante destaque no meio científico e vêm sendo estudadas intensamente ao longo dos anos são aquelas isoladas da kava-kava, como abordado anteriormente.

A espécie *P. sabulosa* foi selecionada a partir de estudos fitoquímicos prévios realizados em nosso laboratório, nos quais revelaram a presença de substâncias com estrutura química similar às kavalactonas presentes na kava-kava, motivo pelo qual investimos no estudo das ações no sistema nervoso central de roedores.

5.2.1- Identificação das estirilpironas isoladas

As estirilpironas foram identificadas por comparação dos seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura (PIZZOLATTI et al., 2000), pelos índices de retenção em CG e fragmentação de seus respectivos espectros de massas.

A distinção espectroscópica entre as estiril e diidroestirilpironas é prontamente realizada pelos deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para os átomos de hidrogênio e carbono da ponte etilênica (C-7 e C-8). Nas diidroestirilpironas observa-se a presença de um par de tripletos na região de δ 2,60 - 2,90 ppm ($J= 7,6$ Hz) (no espectro de ^1H) e de dois CH_2 na região de δ 20 - 35 ppm (no espectro de ^{13}C), referentes aos átomos de hidrogênios da ponte etilênica (7- CH_2 e 8- CH_2 respectivamente). Para as estirilpironas, os correspondentes ^1H e ^{13}C são observados na forma de um par de dupletos na região de δ 6,40 - 7,80 ppm ($J= 16$ Hz) para os hidrogênios *trans* (no ^1H) e dois sinais de CH sp^2 na região de δ 115 - 136 ppm (no ^{13}C). Ambas as classes apresentam o mesmo perfil para o anel pirona, dado pelos dois singletos largos entre δ 5,4 - 6,0 ppm referentes aos hidrogênios H-3 e H-5. As demais diferenças entre cada composto ficam por conta do padrão de substituição do anel aromático da unidade estiril, ou seja, dos átomos de hidrogênio aromáticos, dos sinais das metoxilas ligadas ao C-10 e C-14 e do metilenodioxí ligado ao C-11 e C-12.

Desta forma, através das análises dos espectros de ^1H e ^{13}C e da comparação com os tempos de retenção (CG), pode-se identificar a 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxí-diidroestiril)-2-pirona [1], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxí-14-metoxi-diidroestiril)-2-pirona [2], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxí-10,14-dimetoxi-diidroestiril)-2-pirona [3], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxí-estiril)-2-pirona [4], 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxí-14-metoxi-estiril)-2-pirona [5], 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxi-estiril)-2-pirona [6] (Tabela 3).

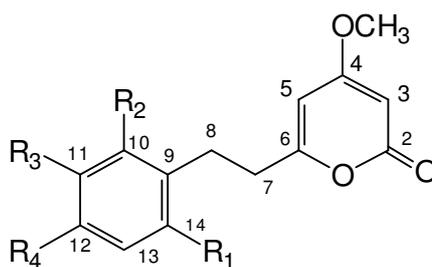


Tabela 3: Estrutura das diidroestirilpironas [1], [2], [3] e das estirilpironas [4], [5] e [6].

Estirilpironas	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	C ₇ -C ₈
Diidroestirilpirona [1] - DST 1			OCH ₂ O		
Diidroestirilpirona [2] - DST 2	OCH ₃		OCH ₂ O		
Diidroestirilpirona [3] - DST 3	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₂ O		
Estirilpirona [4] - STY 4			OCH ₂ O		=
Estirilpirona [5] - STY 5	OCH ₃		OCH ₂ O		=
Estirilpirona [6] - STY 6			OCH ₃	OCH ₃	=

A seguir, será descrita a elucidação estrutural para uma diidroestirilpirona, DST 1, e duas estirilpironas, STY 5 e 6.

O espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) (Figura 13) da diidroestirilpirona [1] apresentou além dos sinais referentes ao anel pirona, H-5 (δ 5,70 ppm, sl, 1H) e H-3 (δ 5,40 ppm, sl, 1H), δ 3,77 ppm (s, 3H) referente a metoxila ligada ao C-4, e sinais da ponte etilênica, H-8 (δ 2,87 ppm, t, 2H, *J* = 7,6 Hz) e H-7 (δ 2,70 ppm, t, *J* = 7,6 Hz), sinais de átomos de hidrogênios *orto*, *meta* relacionados referente ao anel aromático tri-substituído, definido pelo sistema de *spins* compostos por dois dupletos em δ 6,72 ppm (1H, *J* = 7,2 Hz, H-13), δ 6,65 ppm (1H, *J* = 1,8 Hz, H-10), e um duplo duplete em δ 6,60 ppm (1H, *J* = 7,2 Hz, 1,8 Hz, H-14). O singlete em δ 5,90 ppm, com integração para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído ao grupo metilenodioxo ligado ao C-11 e C-12 da porção aromática.

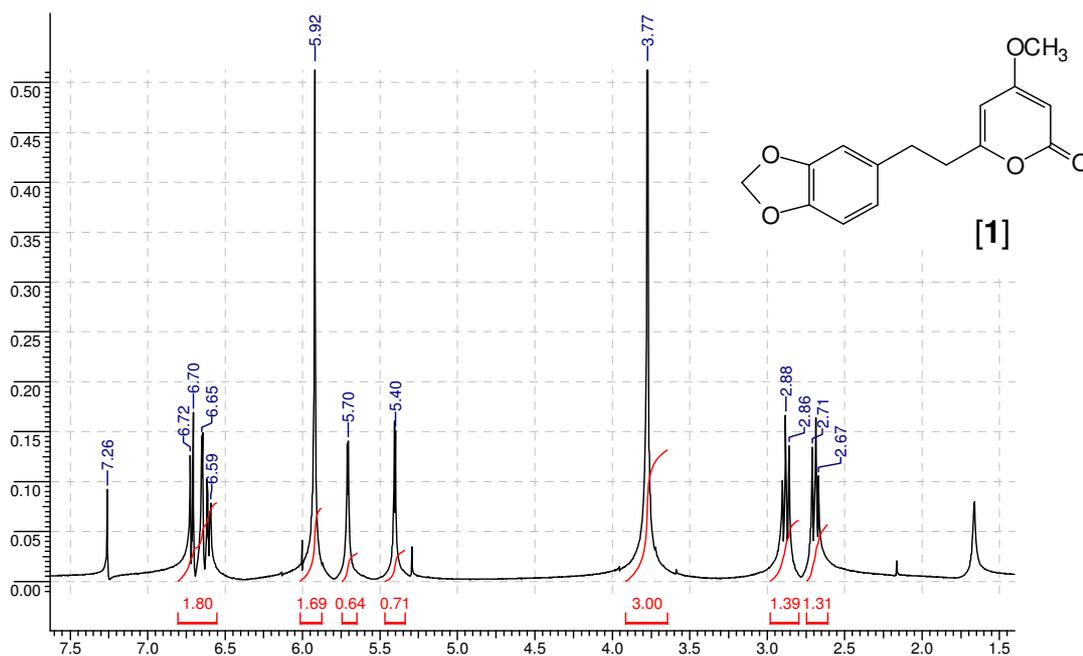


Figura 13: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da diidroestirilpirona [1] (DST 1).

Para a estirilpirona [5], o espectro de ¹H (200 MHz, CDCl₃) (Figura 14) apresentou um par de dupletos centrados em δ 7,70 e 6,40 ppm com $J = 16$ Hz indicando a presença de dois átomos de hidrogênio olefínicos com configuração *trans* sendo atribuídos aos H-8 e H-7 respectivamente. O padrão dos sinais restantes diferiu daqueles observados para o composto [1] somente na região dos hidrogênios aromáticos e nos sinais referentes às metoxilas. Observou-se para o composto [5] a presença de dois singletos em δ 6,90 e 6,50 ppm atribuídos aos átomos de hidrogênio H-10 e H-13. Além disso, na região entre δ 3,80 e 3,70 ppm observaram-se dois singletos onde a integração indicou a presença de seis átomos de hidrogênio, dois grupos metoxila ligados ao C-4 e C-14 respectivamente.

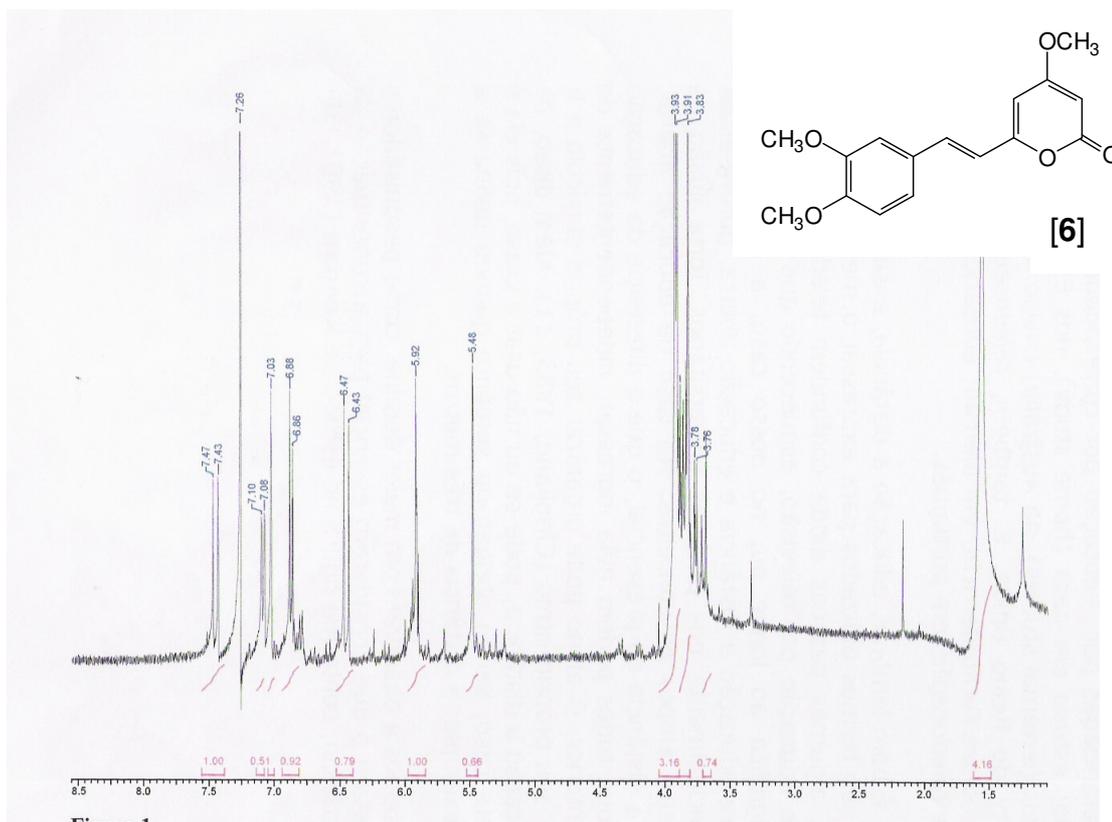


Figura 15: Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) da estirilpirona [6] (STY 6).

5.2.2- Análise mistura de estirilpironas por CG-EM

A obtenção das estirilpironas na forma pura através dos tradicionais métodos cromatográficos em gel de sílica é um trabalho árduo que requer sucessivas purificações por CC e recristalização. A dificuldade no isolamento destas diidro- e estirilpironas reside na sua baixíssima resolução ($\Delta R_f < 0,1$) devido às suas semelhanças estruturais. Desta forma, a análise das frações muitas vezes foi conduzida por CG e a identificação das estirilpironas presentes nas misturas realizada pela comparação dos respectivos tempos de retenção com o de padrões (estirilpironas já isoladas e identificadas).

Os cromatogramas destas frações obtidos por CG revelaram a presença de componentes minoritários com tempo de retenção muito próximo daqueles observados para as estirilpironas até então conhecidas.

A figura 16 apresenta o cromatograma de íons totais da mistura em análise, onde se observou cinco compostos majoritários juntamente com quatro minoritários com tempos de retenção entre 30 – 35 min. Os compostos conhecidos

foram identificados basicamente por seus respectivos íons moleculares e fragmentações características.

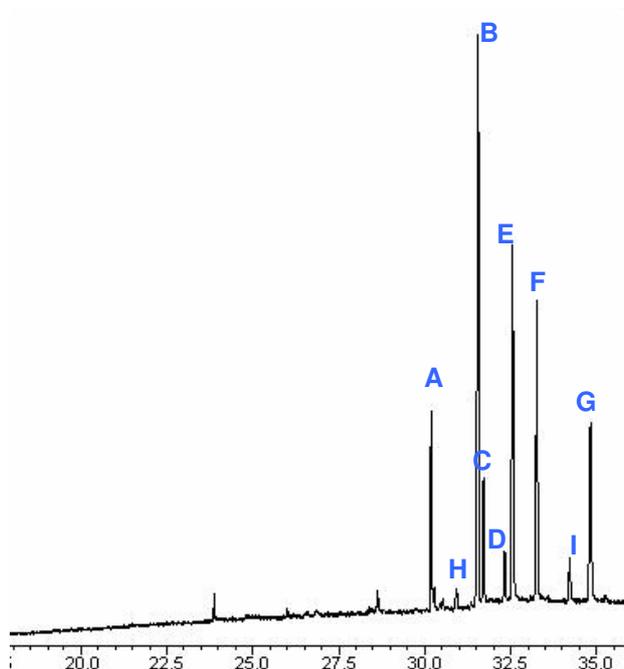


Figura 16: Cromatograma de íons totais dos componentes presentes na mistura de estirilpironas. Equipamento CGMS-QP 5050 A Shimadzu 17A utilizando coluna DB-5 (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m). A taxa de aquecimento foi de 80 - 300°C (10°C/min). A temperatura do injetor e detector foram 300 e 310°C, respectivamente sendo Hélio (He) usado como gás de arraste (1,0 mL/min).

Dos nove picos selecionados a partir do cromatograma, foi possível propor a estrutura para oito deles, baseado nas seguintes análises:

- **Pico A (tr = 30,27 min.):** o espectro de massas (Figura 17) apresentou o íon molecular $[M]^+$ a m/z 274 u.m.a (9%). O pico base m/z 135 u.m.a (100%) $[M - C_7H_7O_3]^+$ atribuiu-se ao íon tropílio proveniente da clivagem da ligação C-C entre os dois grupos metilenos que constituem a ponte etilênica que é uma característica das diidroestirilpironas, conforme esquema mostrado a seguir. Assim, este composto foi identificado como a diidroestirilpirona [1] (DST 1);

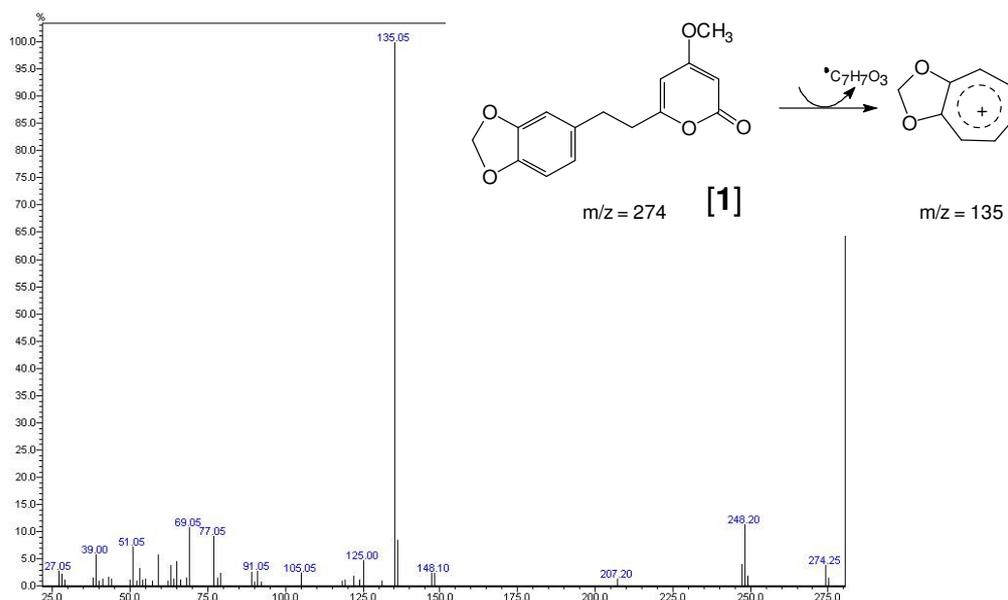


Figura 17: Esquema de formação do íon tropílio (m/z 135 u.m.a.) a partir da diidroestirilpirona [1] (DST 1) e seu respectivo espectro de massas.

- **Pico B (tr = 30,91 min.):** o composto apresentou íon molecular $[M]^+$ a m/z 304 u.m.a (9%) e pico base a m/z 165 u.m.a (100%), referente ao íon tropílio característico das diidroestirilpironas, sendo o padrão de fragmentação muito semelhante a DST 1, com a perda de $[M - C_7H_7O_3]^+$. Com este incremento de 30 u.m.a tanto no íon molecular como no pico base, pode-se identificar este composto como a diidroestirilpirona [2] (DST 2) (Figura 18);

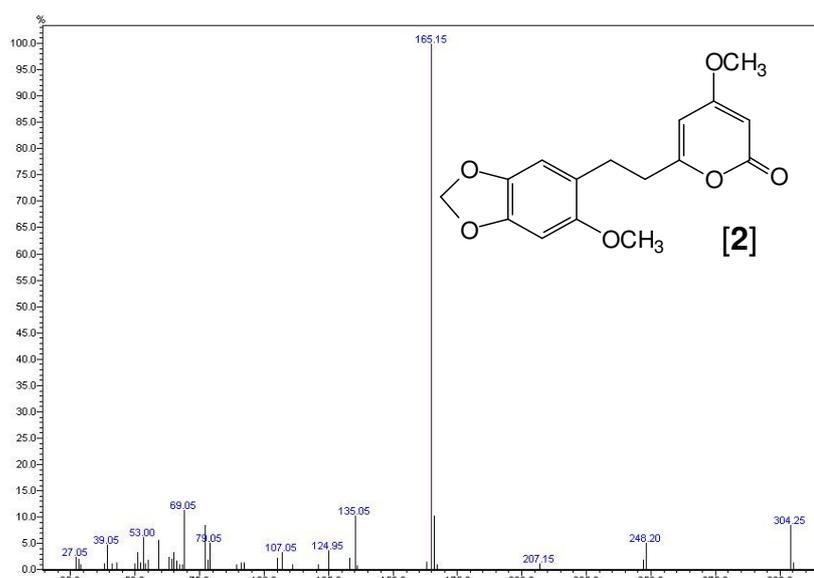


Figura 18: Espectro de massas da diidroestirilpirona [2] (DST 2).

- Pico C (tr = 31,72 min.):** este composto apresentou o íon molecular altamente estável a $[M]^+$ m/z 302 u.m.a (100%) e um padrão de fragmentação característico de estililpironas (Cunha Junior, 2002). O íon molecular perde uma molécula de CO, m/z 274 (5%) $[M - CO]^+$, o fragmento iônico resultante perde um $\cdot\text{CH}_3$, m/z 259 (15%) $[M - CO - \text{CH}_3]^+$ e na seqüência mais uma molécula de CO m/z 231 (26%) $[M - 2\text{CO} - \text{CH}_3]^+$ (Figura 19A e 19B). Assim, o composto foi identificado como sendo a estililpirona [5] (STY 5).

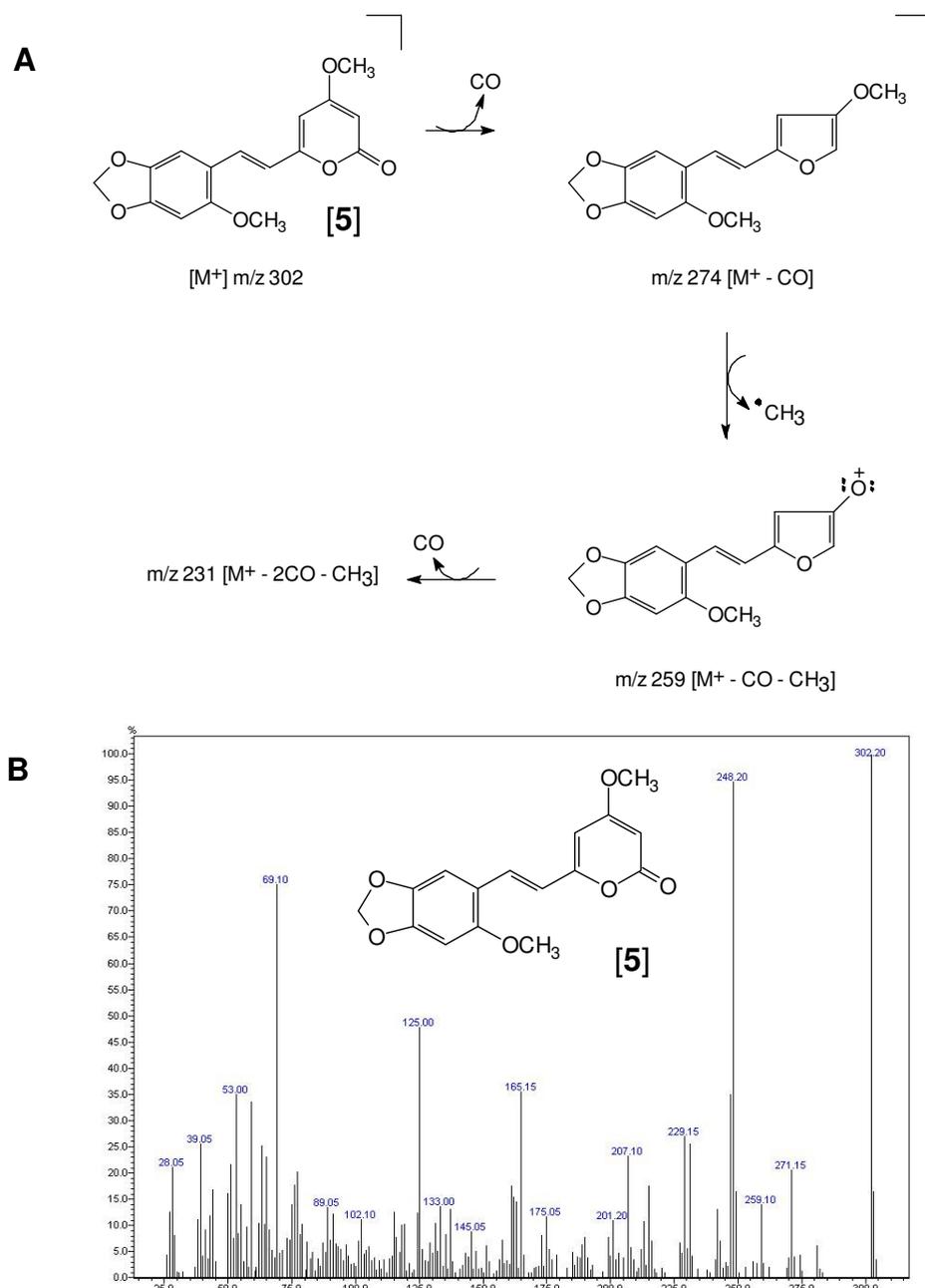


Figura 19: A- Esquema de formação dos íons m/z 274, 259 e 231 a partir da estililpirona [5] (STY 5) e B- seu respectivo espectro de massas.

- Pico D (tr = 32,32 min.):** o espectro de massas apresentou um padrão de fragmentação semelhante ao da estirilpirona [5], tendo o íon molecular bastante estável em $[M]^+$ m/z 332 u.m.a (100%)⁴. Em seguida, o composto sofreu perdas sucessivas de CO, CH₃ radicalar e novamente CO para dar origem respectivamente aos fragmentos iônicos m/z 304 (14%), 289 (9%), 261 (18%) (Figura 20). Com este conjunto de dados e principalmente o aumento de 30 u.m.a., que confirma a presença de uma metoxila adicional, o composto pode ser identificado como a 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxi-estiril)-2-pirona [51]. Esta estirilpirona foi identificada anteriormente na espécie em estudo (Pizzolatti et al., 2003), porém neste trabalho não foi possível obtê-la isoladamente devido a baixa concentração na planta.

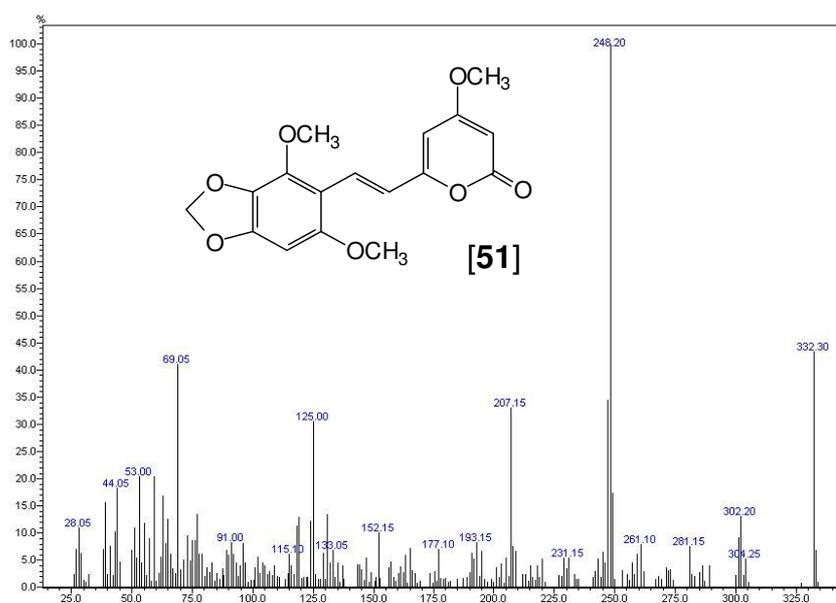


Figura 20: Espectro de massas da 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-10,14-dimetoxi-estiril)-2-pirona [51] (STY 51).

- Pico E (tr = 32,55 min.):** com base no conhecimento dos padrões de fragmentação características de diidroestirilpironas e estirilpironas, uma análise mais acurada do espectro de massas revelou a sobreposição de duas pironas (uma diidro e outra estiril) (Figura 21).

⁴ O íon m/z 248 que aparece como íon molecular neste espectro foi atribuído a um artefato oriundo da coluna, detectado em todos os espectros de massas com maior ou menor intensidade.

O primeiro íon molecular, $[M]^+$ $m/z = 334$ u.m.a (4%), está relacionado com uma estrutura do tipo diidroestiril devido a sua baixa estabilidade e a perda do fragmento $C_7H_7O_3$ dando origem ao fragmento a $m/z 195$ (73%) atribuído ao respectivo íon tropílio. O aumento de 60 u.m.a em relação a DST [1] equivale a duas metoxilas adicionais. Estes dados de fragmentação, juntamente com o respectivo tempo de retenção comparado aos demais membros da série nos permitiram propor a identificação deste composto como a diidroestirilpirona [3] (DST 3).

O íon molecular em $[M]^+$ $m/z 272$ u.m.a., equivalente a 100%, está relacionado com moléculas do tipo estirilpironas, em que a insaturação confere a este íon uma maior estabilidade. Como o padrão de fragmentação ($[M]^+$ $m/z 272$ (100%), 244 (18%) $[M-CO]^+$, 229 (15%) $[M - COCH_3]^+$, 201 (58%) $[M - 2CO - CH_3]$) foi muito semelhante a STY 5 ($m/z 302$ u.m.a.), com apenas 30 u.m.a. a menos (ausência de uma metoxila), a estrutura proposta foi da estirilpirona [4] (STY 4).

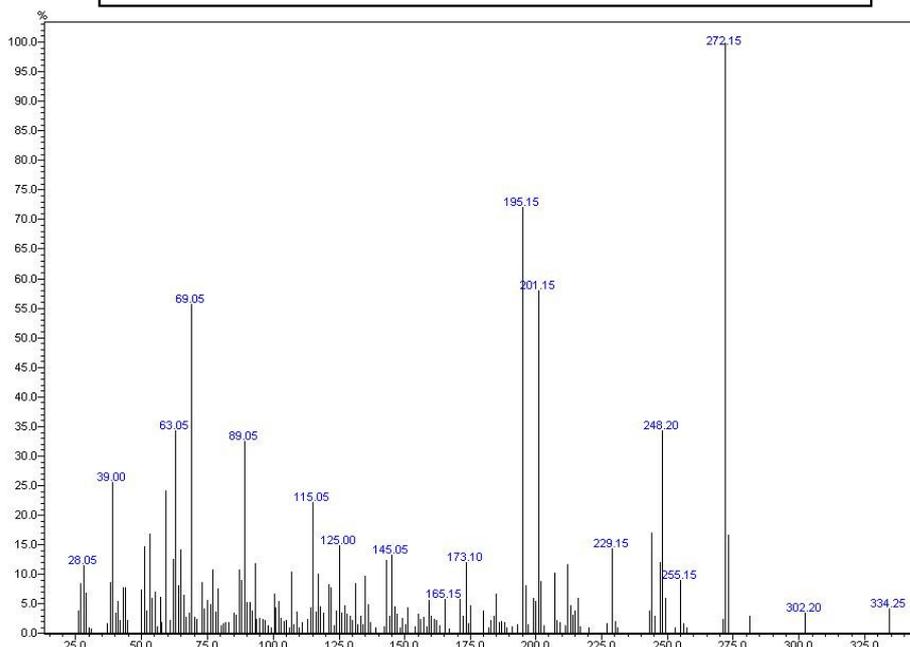
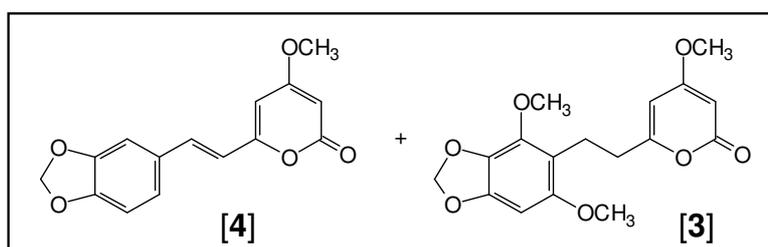


Figura 21: Espectro de massas referente à sobreposição da estirilpirona [4] + diidroestirilpirona [3].

- **Pico F (tr = 33,25 min.):** o composto apresentou íon molecular bem estável a $[M]^+$ m/z 288 u.m.a. (100%), seguido das fragmentações m/z 260 (13%) $[M - CO]^+$, m/z 245 (19%) $[M - CO - CH_3]^+$, m/z 217 (42%) $[M - 2CO - CH_3]^+$ (Figura 22), típicas para compostos da classe das estirilpironas. Desta maneira, atribuiu-se a este composto a estrutura da estirilpirona [6] (STY 6).

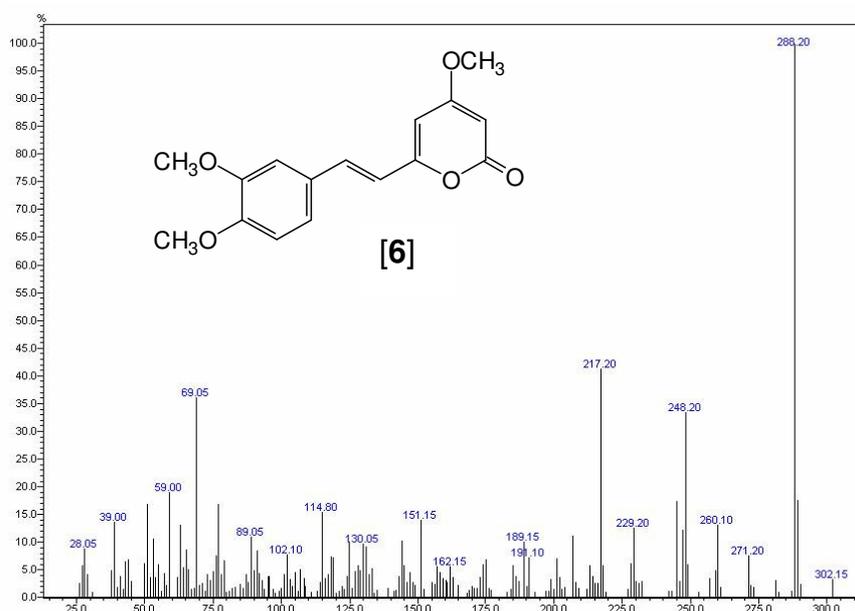


Figura 22: Espectro de massas da estirilpirona [6] (STY 6).

- **Pico G (tr = 34,81 min.):** o EM deste composto apresentou o mesmo íon molecular $[M]^+$ m/z 302 u.m.a (100%) e o mesmo padrão de fragmentação da estirilpirona [5], que possui duas metoxilas ligadas ao C-4 e ao C-14, sugerindo assim, tratar-se de uma estrutura isomérica. Considerando que todas as estirilpironas já identificadas na espécie *P. sabulosa* apresentam uma metoxila no anel pirona ligada ao C-4 e que o grupo metilenodioxi da metade estiril está ligado aos átomos de carbono C-11 e C-12, é razoável inferir que a segunda metoxila desta estrutura isomérica esteja em C-10 ou C-13 da metade estiril. De acordo com o padrão de substituição no anel aromático das estirilpironas já identificadas, a metoxila pode estar ligada de duas maneiras distintas: somente ao C-14 (como na STY 5) e ao C-14 e C-10 (como na STY 51). Baseado nisto, supõe-se que uma metoxila ligada ao

C-13 seria menos provável por não manter os padrões verificados. Porém, uma considerável diferença nos tempos de retenção entre a STY 5 ($t_r = 31,72$ min) e este composto ($t_r = 34,81$ min) nos orientou a propor que a estrutura isomérica possui a metoxila ligada ao C-13, o que deixaria a ligação dupla livre para interagir com a fase estacionária da coluna utilizada. Assim, uma metoxila em C-14, como na STY 5, aumentaria o impedimento estérico próximo à ligação dupla, diminuindo sua interação com a fase estacionária. Portanto, explicamos a maior retenção deste composto como sendo um efeito do aumento da interação da dupla ligação com a fase estacionária decorrente na posição da metoxila em C-13 não causar impedimento estérico. Baseados nesta análise propusemos a estrutura 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-13-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona [52] para uma nova estirilpirona de *P. sabulosa* (Figura 23).

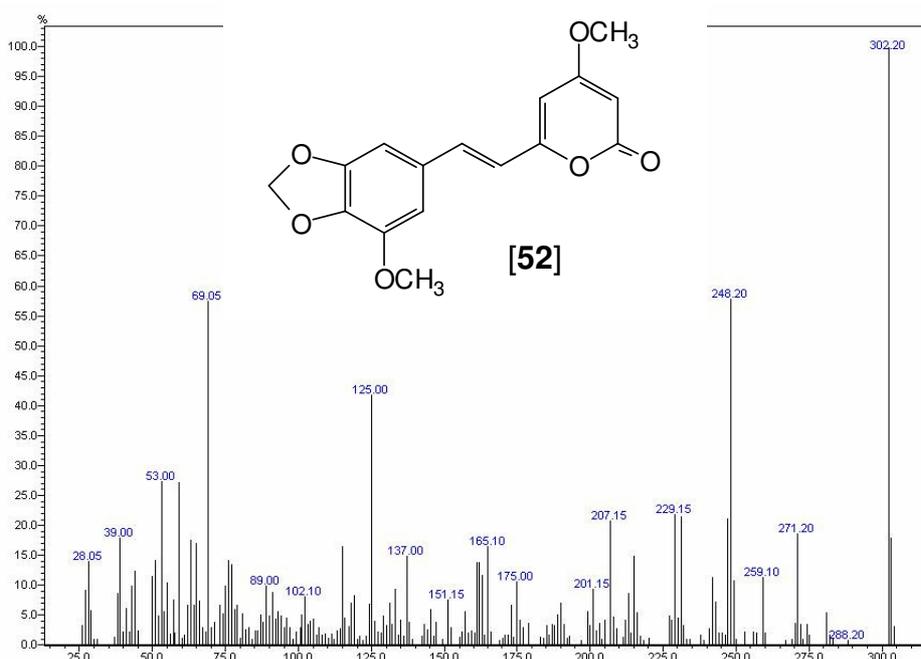


Figura 23: Espectro de massas para a estrutura proposta → 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxo-13-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona [52]

- **Pico H ($t_r = 30,91$ min):** o EM deste composto mostrou o pico correspondente ao íon molecular a $[M]^+$ m/z 288 (100%). A presença dos picos m/z 273 (79%) e m/z 258 (42%) pode ser relacionada a fragmentos iônicos resultante da perda de um $[M^+ - CH_3]$ e dois radicais metilas $[M^+ -$

2CH₃] respectivamente, como pode ser observado no espectro de massas (Figura 24).

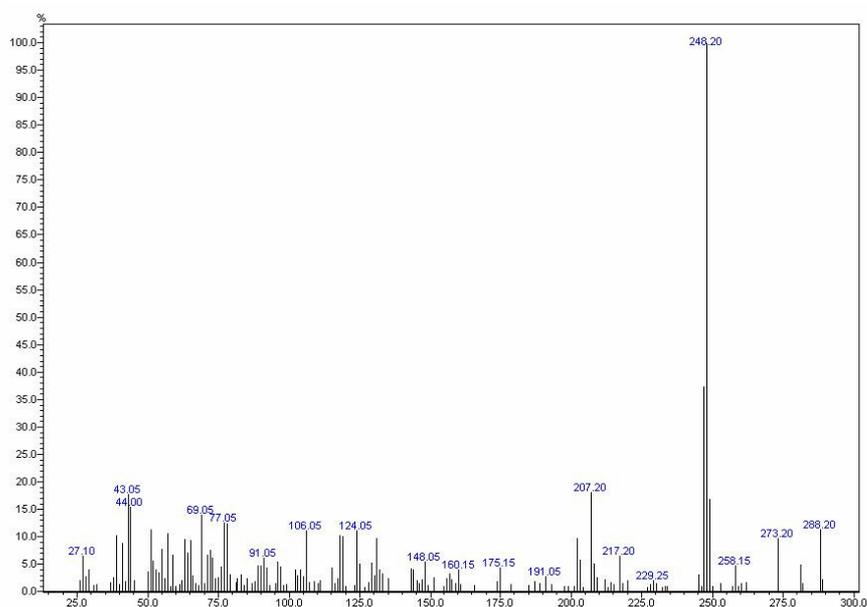
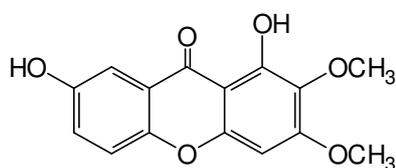
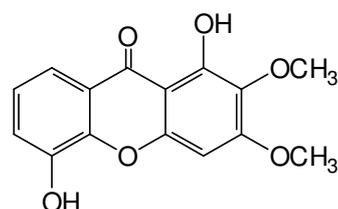


Figura 24: Espectro de massas do composto com tempo de retenção 30,91 min (Pico H).

O padrão de fragmentação observado para este composto é distinto daqueles observados para diidro- e estilpironas. Uma busca em trabalhos com espécies do gênero *Polygala* revelou que o padrão de fragmentação deste composto é muito semelhante ao de algumas xantonas. A fragmentação de xantonas metoxiladas é caracterizada pela presença do fragmento $[M - 15]^+$ referente à perda de um radical metila (BASHIR et al., 1992; FUJITA et al., 1992; IKEYA et al., 1991), tal como foi observado no EM deste composto. Esta busca na literatura mostrou que o íon molecular m/z 288 u.m.a pode ser atribuído a uma xantona diidroxilada e dimetoxilada, sendo que o seu EM possui grande semelhança ao EM das xantonas 1,7-diidroxil-2,3-dimetoxixantona e 1,5-diidroxil-2,3-dimetoxixantona, isoladas de *P. cyparissias* (PINHEIRO et al., 1998) e *P. paniculata* (CRISTIANO et al., 2003) respectivamente (Tabela 4).



1,7-diidroxi-2,3-dimetoxixantona
P. cyparissias



1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona
P. paniculata

Tabela 4: Fragmentações do composto em análise e das duas xantonas selecionadas

Composto	1,7-diidroxi-2,3-dimetoxixantona	1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona
288 (100%) [M] ⁺	288 (100%) [M] ⁺	288 (90%) [M] ⁺
273 (79%) [M - CH ₃] ⁺	273 (100%) [M - CH ₃] ⁺	273 (100%) [M - CH ₃] ⁺
258 (42%) [M - 2CH ₃] ⁺	259 (15%) [M - 29] ⁺	nd
245 (25%) [M - CH ₃ - CO] ⁺	245 (65%) [M - CH ₃ - CO] ⁺	245 (70%) [M - CH ₃ - CO] ⁺
229 (20%) [M - CO - COH] ⁺	nd	229 (80%) [M - CO - COH] ⁺
202 (72%)	202 (23%)	nd
174 (17%)	174 (20%)	nd
no	136 (18%)	nd

no: não observado; nd: não descrito na literatura

Para confirmação da proposta estrutural como sendo uma xantona, uma análise por CG foi realizada, mostrando que a amostra padrão da 1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona apresentou o mesmo tempo de retenção do composto em análise. Assim, procedeu-se a co-injeção em CG da fração estirilpironas com a xantona 1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona [53], observando-se a co-eluição de ambos (Figura 25), indicando a presença da referida xantona na mistura de estirilpironas.

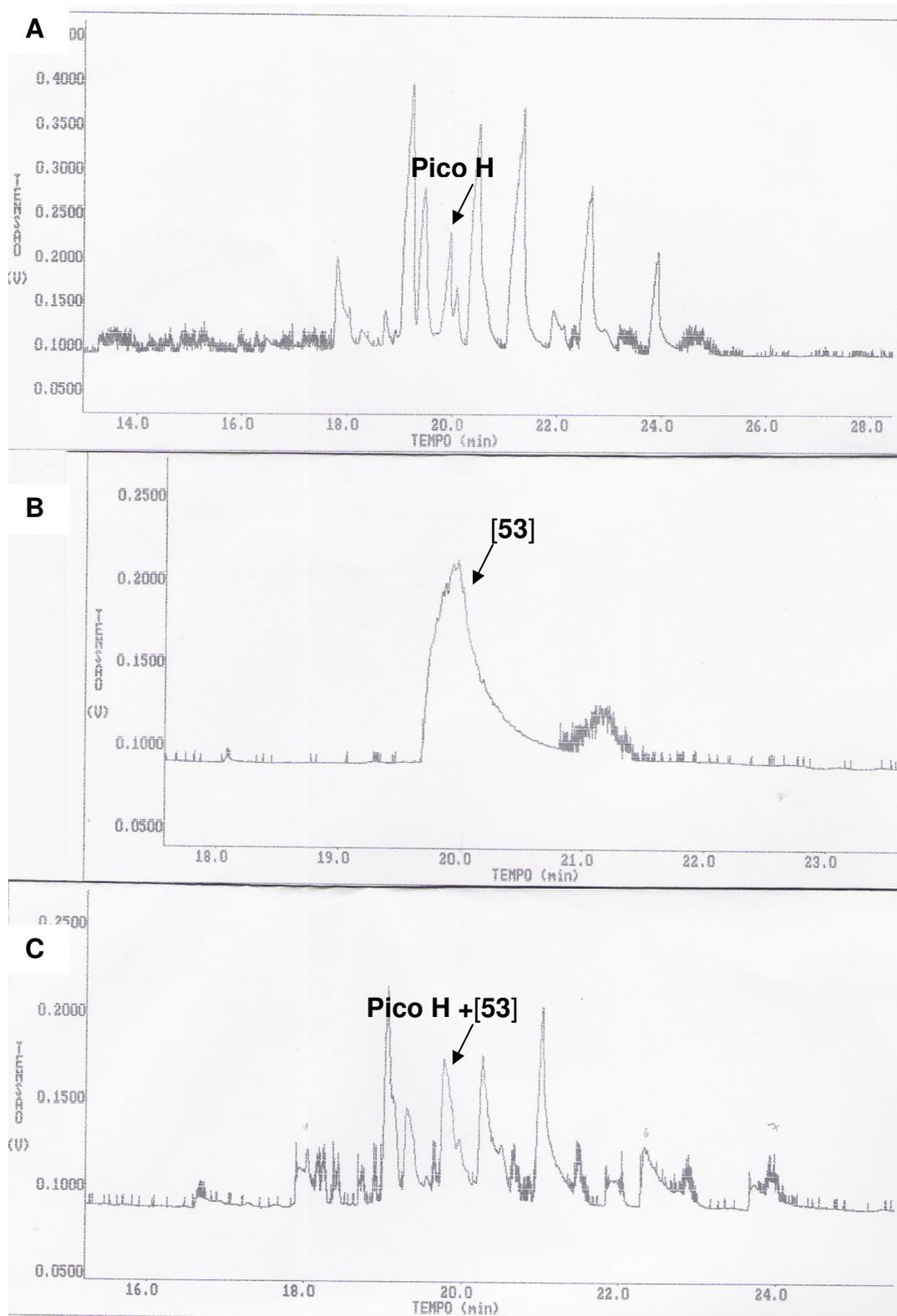


Figura 25: Cromatograma dos íons totais da A)- Mistura de estilipironas, B)- 1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona [53], C)- Co-injeção da mistura de estilipironas + 1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona [53]. A coluna utilizada foi DB-1 (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m) na seguinte programação: para a coluna, a temperatura foi de 80°C - 265°C (10°C/min) e para o injetor (*on column*) utilizou-se gradiente de temperatura de 200 - 280°C (10°C/min). A temperatura do detector foi 300°C.

Em conclusão, a análise por CG-EM da mistura de estirilpironas levou a identificação de uma nova estirilpirona [52] e uma xantona [53] em *P. sabulosa*. Este resultado tem uma alta relevância principalmente do ponto de vista quimiotaxonômico, pois até o momento, postulava-se que *P. sabulosa* era a única espécie do gênero *Polygala* cuja rota bioquímica produzia diidro- e estirilpironas no lugar de xantonas.

5.2.3- Estudo da ação no sistema nervoso central (SNC)

Sandford e colaboradores (2000) descrevem a ansiedade patológica não como um fenômeno unitário, mas sim um grupo de condições clínicas distintas, tais como o transtorno do pânico, da ansiedade generalizada, de estresse pós-traumático e fobia social. Ressalta-se, porém, que todos estes transtornos de ansiedade são tratados com medicações distintas (LEVELEKE et al., 2006; ARGYROPOULOS; SANDFORD; NUTT, 2000).

Os fármacos ansiolíticos estão entre as classes farmacológicas prescritas com maior frequência (RANG; DALE; RITTER, 1997). Estudos realizados em países desenvolvidos mostraram que a proporção da população que utiliza estes fármacos regularmente era de 10% (SHADER; GREENBLATT, 1993). Benzodiazepínicos (BZP) são a classe de medicamentos mais prescritos no tratamento da ansiedade, sendo que, em 1992, Woods e colaboradores estimaram que esta classe seria a responsável por 83% das prescrições mundiais de ansiolíticos. No entanto, a administração crônica de benzodiazepínicos pode resultar em dependência fisiológica, prejuízo cognitivo e síndrome de abstinência após a interrupção do tratamento (MACKINNON; PARKER, 1982).

Assim, o desenvolvimento de novos medicamentos possuindo efeitos ansiolíticos sem as complicações dos benzodiazepínicos é de grande importância para o tratamento de distúrbios de ansiedade. É neste contexto que está inserido o potencial uso de plantas medicinais como ferramenta alternativa na pesquisa de novos medicamentos para o tratamento destas desordens (BEAUBRUN; GRAY, 2000; CARLINI, 2003).

É estimado que 43% dos pacientes que sofrem de ansiedade usam alguma forma de terapia complementar, sendo o uso de plantas medicinais o mais popular (ERNST, 2006). Várias plantas são utilizadas para o tratamento de desordens

psíquicas em diversas partes do mundo. Recentemente, em um trabalho sobre a utilização de fitoterápicos na região da grande Florianópolis, Alexandre (2004) verificou que dentre os fitoterápicos mais utilizados pela população desta região a kava-kava (*Piper methysticum* F.), utilizada como ansiolítico, e o hipérico (*Hypericum perforatum* L.), utilizado como antidepressivo, ocupavam o 2º e o 4º lugar respectivamente.

A semelhança estrutural das estirilpironas da espécie *P. sabulosa* com as kavalactonas da kava-kava sugere ser promissora a investigação das ações desta planta no sistema nervoso central (SNC) de roedores. Assim, esta parte do trabalho objetivou analisar os efeitos no SNC do extrato bruto hidroalcoólico (EBH), frações hexano (HEX), acetato de etila (FAE) e aquosa (FA), bem como das substâncias isoladas 6-metoxi-7-preniloxicumarina (6-MC) [7], DST 1, 2, 3 e STY 4, 5 e 6 em modelos de atividade ansiolítica. Em uma segunda etapa, realizaram-se estudos de *binding* com os compostos DST 1, 2, 3 e STY 4, 5 e 6. Para complementar, avaliou-se a toxicidade da fração acetato de etila em camundongos.

5.2.3.1- Efeito do tratamento com extrato bruto hidroalcoólico (EBH) de *Polygala sabulosa*

- *Labirinto de cruz elevado (LCE)*

Drogas com atividade tipo ansiolítica usualmente aumentam o tempo de permanência e/ou a frequência de entradas nos braços abertos, enquanto o contrário é relacionado a drogas tipo ansiogênicas (RODGERS; DALVI, 1997).

O tratamento oral com o EBH (250, 500 e 1.000 mg/kg) aumentou todos os parâmetros de exploração dos braços abertos do LCE, como a porcentagem de tempo e frequência de entradas nos braços abertos (Figura 26A 26B), imersões desprotegidas de cabeça e uma redução dos estiramentos protegidos corporais. Este conjunto de alterações comportamentais indicou uma elevada atividade exploratória de áreas ditas potencialmente perigosas (COLE; RODGERS, 1993), efeito similar ao observado com diazepam (DZP) (0,75 mg/kg, i.p.), BDZ padrão utilizado como controle positivo, sugerindo uma propriedade do tipo-ansiolítica para a planta em estudo.

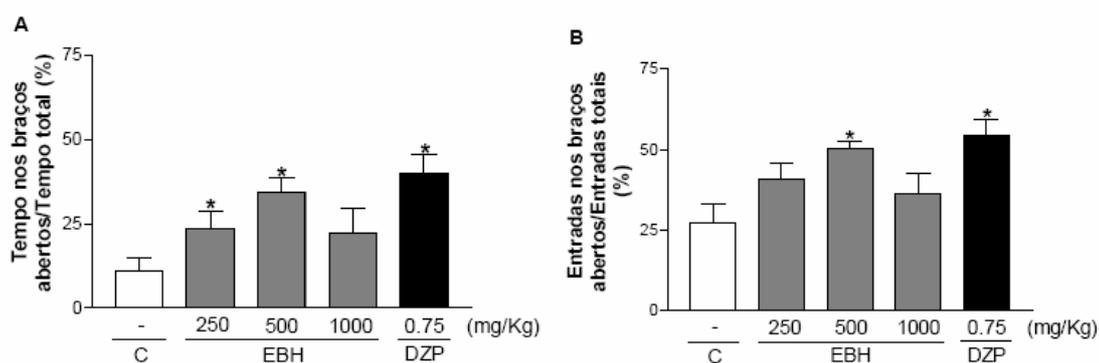


Figura 26: Efeito do tratamento oral com o EBH (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) de *P. sabulosa* no comportamento de camundongos avaliados no LCE. DZP (0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como droga ansiolítica padrão. (A) Porcentagem de tempo de permanência e (B) Frequência de entradas nos braços abertos. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 8 - 9 animais. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

- *Sono barbitúrico*

Complementando a investigação de uma possível atividade tipo-ansiolítica, investigou-se a atividade hipno-sedativa do EBH, utilizando o teste de sono induzido por pentobarbital sódico. Neste estudo, o tratamento oral com EBH (250 – 1.000 mg/kg), 1 h antes da injeção de pentobarbital sódico, não foi capaz de modificar a latência para a indução do sono (Figura 27A). Entretanto, o EBH aumentou significativamente a duração total do sono nas doses de 500 e 1.000 mg/kg (Figura 27B), um efeito hipno-sedativo similar ao do DZP, o BDZ padrão utilizado.

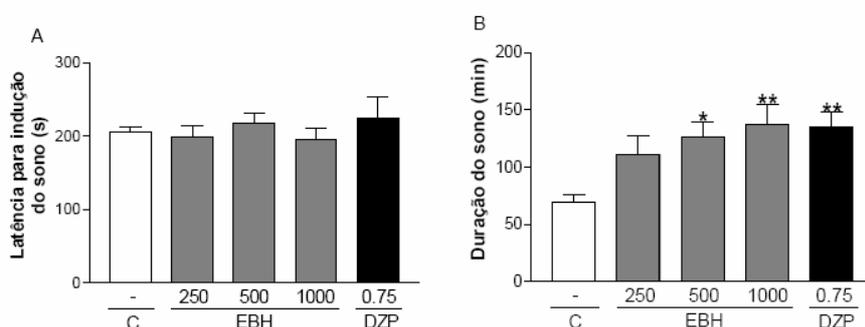


Figura 27: Efeito do tratamento oral com o EBH (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) no sono induzido pelo pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.). (A) latência para indução e (B) duração do sono induzido. DZP (0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 9-10 animais. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

- *Convulsão induzida pelo pentilenotetrazol (PTZ)*

Outro teste também utilizado durante o *screening* pré-clínico de drogas ansiolíticas é o teste de convulsões induzidas por PTZ, embora sua sensibilidade seja focalizada particularmente em drogas com mecanismos BDZ.

Neste trabalho, o pré-tratamento com o EBH não modificou a latência para o primeiro episódio convulsivo (Figura 28A). No entanto, o EBH nas doses de 500 e 1.000 mg/kg reduziu significativamente a duração da primeira convulsão (Figura 28B), sugerindo que, possivelmente, mecanismos GABAérgicos possam estar envolvidos na modulação dos efeitos induzidos pelo EBH.

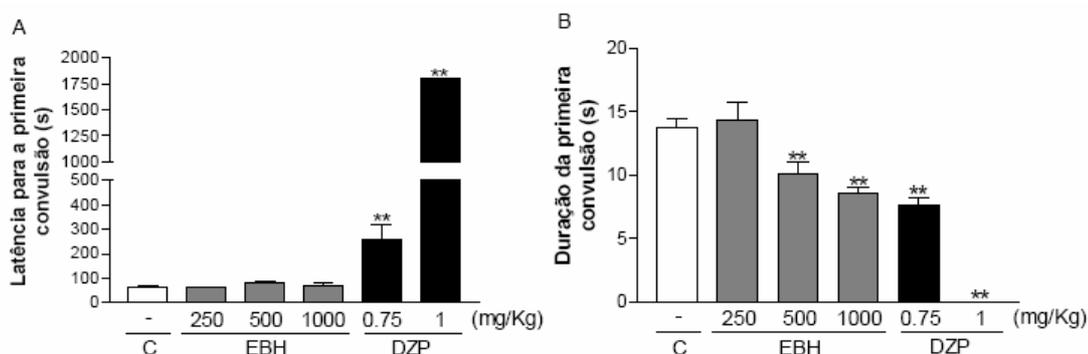


Figura 28: Efeito do tratamento oral com o EBH (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) na convulsão induzida pelo PTZ. (A) latência para o primeiro episódio convulsivo e (B) duração da primeira convulsão. DZP (0,75 - 1 mg/kg, i.p.) foi utilizado como fármaco anticonvulsivante padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-14 animais. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Considerando que extratos de plantas são constituídos por uma grande variedade de substâncias, a etapa seguinte foi identificar qual(is) a(s) fração(s) seria(m) responsável(is) por estas ações centrais observadas com o uso do EBH de *P. sabulosa*. Assim, as frações hexano (HEX), acetato de etila (FAE) e aquosa (FA) foram avaliadas quanto a atividade no SNC através do teste do sono etéreo.

- *Hipnose induzida pelo éter etílico*

No teste do sono etéreo, a dose de 500 mg/kg v.o. do EBH (dose ansiolítica encontrada previamente no LCE) não foi capaz de modificar a latência para indução do sono, mas aumentou significativamente a hipnose induzida pelo éter etílico. Como mostra a figura 29A, nenhuma fração de *P. sabulosa* modificou a latência para indução ou a duração do sono, exceto a FAE (500 – 1.000 mg/kg) que aumentou de modo significativo este último parâmetro (Figura 29B).

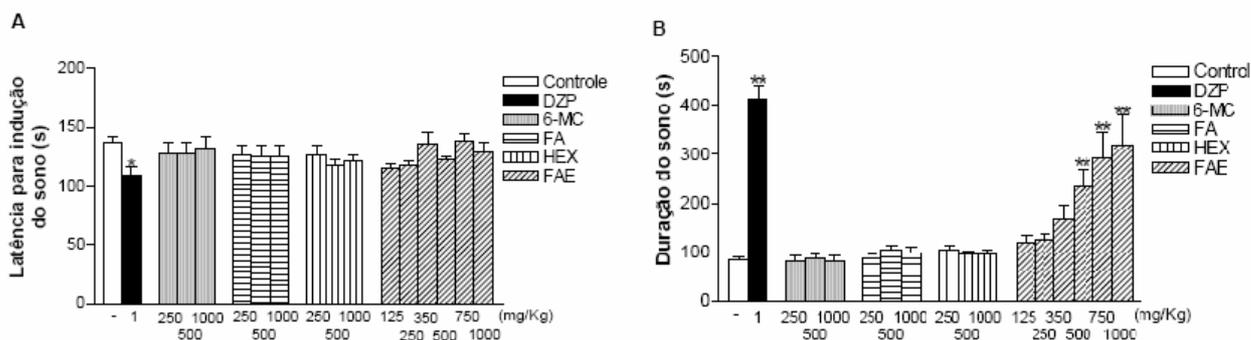


Figura 29: Efeito da 6-metoxi-7-preniloxicumarina (6-MC), fração aquosa (FA), fração hexano (HEX) (250 – 1.000 mg/kg, v.o.) e a fração acetato de etila (FAE) (125 – 1.000 mg/kg, v.o.) no sono etéreo. (A) latência para indução do sono e (B) duração do sono. DZP (0,75 mg/kg, i.p.) foi utilizado como fármaco hipno-sedativo padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-11 animais. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

Estes dados sugerem, primeiramente, uma atividade hipno-sedativa do EBH, confirmando as observações do teste de sono induzido por barbitúrico, uma vez que a influência de interações farmacocinéticas é eliminada com o uso do éter etílico como indutor do sono. Em segundo lugar, este teste também indicou que a(s) substância(s) responsável(is) pelas ações centrais de *P. sabulosa* estão presentes na FAE, direcionando os testes posteriores para esta fração.

5.2.3.2- Efeito do tratamento com a fração acetato de etila de *Polygala sabulosa*

Nesta etapa, as possíveis ações centrais da FAE de *P. sabulosa* foram investigadas nos vários modelos experimentais que avaliam atividades relacionadas a um perfil de ação BDZ: o LCE, o sono barbitúrico e as convulsões induzidas por PTZ.

No teste do LCE, a administração oral da FAE (250, 500 e 1.000 mg/kg) induziu um aumento significativo na porcentagem de tempo e na frequência de entradas nos braços abertos do LCE (Figura 30A e 30B). Além disso, a FAE foi capaz de promover um aumento significativo no número de imersões desprotegidas de cabeça e na atividade exploratória do final dos braços abertos, nas doses de 500 ou 1.000 mg/kg. Este conjunto de alterações comportamentais foi similar àquele promovido pelo DZP (0,75 mg/kg).

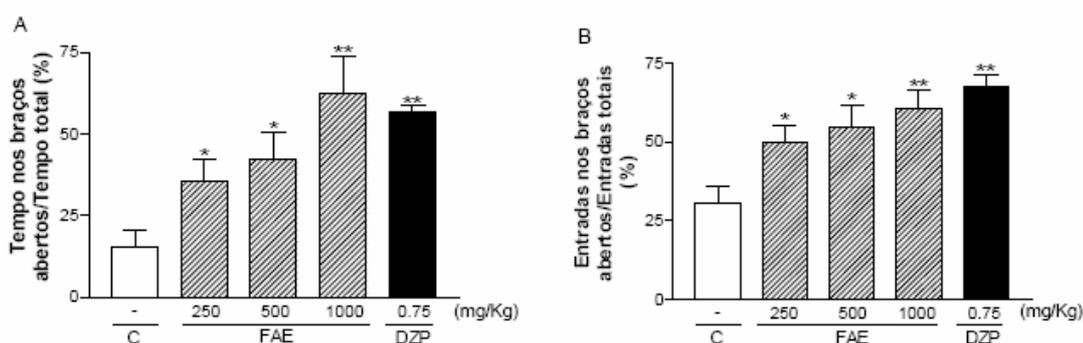


Figura 30: Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila (FAE) (250 - 1.000 mg/kg, v.o.) no comportamento de camundongos avaliados no LCE. (A) porcentagem de tempo de permanência e (B) freqüência de entradas nos braços abertos. DZP (0,75 mg/kg) - BZP padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 6-10 animais. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

No teste da hipnose induzida por pentobarbital, o pré-tratamento (1 h antes) com FAE (1.000 mg/kg) reduziu a latência para indução do sono, enquanto as doses de 500 ou 1.000 mg/kg foram capazes de potencializar a duração total do sono. Nas convulsões induzidas por PTZ, o pré-tratamento com a FAE (500 e 1.000 mg/kg) aumentou a latência para indução do primeiro episódio convulsivo. Ambas as doses também reduziram a duração da primeira convulsão, bem como sua severidade.

Estes resultados mostraram que as propriedades do tipo-ansiolítica, hipnosedativa e anticonvulsiva de *P. sabulosa* apresentaram maior potência para a FAE em relação ao EBH, sugerindo que esta fração contenha os compostos responsáveis pelos efeitos biológicos observados.

No primeiro trabalho realizado com a espécie *P. sabulosa* (PIZZOLATTI et al., 2000), todas as estirilpironas foram isoladas da fração acetato de etila. Neste trabalho, como descrito no ítem 4.5 (p. 29), as seis estirilpironas (DST **1**, **2**, **3** e STY **4**, **5**, **6**) foram obtidas através do fracionamento de diferentes extratos brutos. Desta forma, para comprovar a identidade da FAE utilizada nos ensaios de atividade central, esta fração foi submetida à análise por CG. O perfil cromatográfico da fração bem como a identificação de cada estirilpirona é mostrado na figura 31.

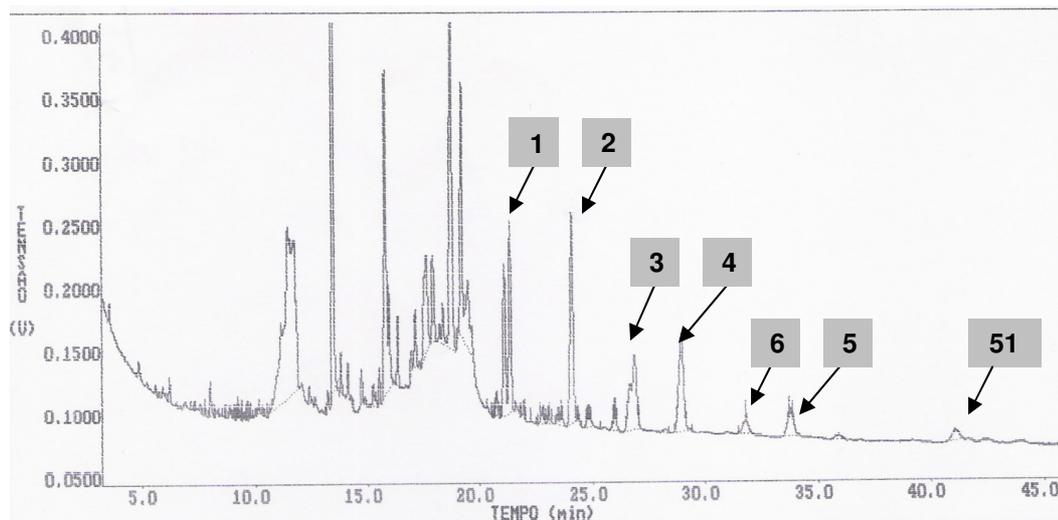


Figura 31: Cromatograma de íons totais da FAE de *P. sabulosa* utilizada nos ensaios de ação sob o sistema nervoso central. As setas indicam as diidroestirilpironas (DST) **1**, **2**, **3** e as estirilpironas (STY) **4**, **5**, **6** e **51**. A coluna utilizada foi DB-1 (30 m X 0,25 mm X 0,25 μ m) na seguinte programação: para a coluna, a temperatura foi de 80°C -265°C (10°C/min) e para o injetor (*on column*) utilizou-se gradiente de temperatura de 200 - 280°C (10°C/min). A temperatura do detector foi 300°C.

5.2.3.3- Efeito das estirilpironas isoladas de *Polygala sabulosa*

Nesta etapa do trabalho, os compostos isolados DST **1**, **2**, **3** e STY **4**, **5**, **6** foram estudados através da administração intracerebroventricular (i.c.v) em camundongos e avaliados no modelo do LCE, com o intuito de correlacionar as possíveis ações centrais destes compostos com aquelas observadas anteriormente para o EBH e a FAE de *P. sabulosa*.

O tratamento i.c.v. com as estirilpironas apresentou diferentes perfis de potência frente aos parâmetros avaliados no teste do LCE. Aqui, selecionou-se apenas um destes parâmetros para analisar os efeitos das estirilpironas, conforme mostrado na figura 32. Através da análise destes dados, observou-se que os tratamentos i.c.v com a DST **1** e a STY **4** promoveu um aumento significativo na porcentagem do tempo gasto nos braços abertos, na concentração de 5 pmol. Para o composto STY **6**, o efeito significativo foi observado na concentração de 0,2 pmol. Já para a DST **3**, o mesmo efeito foi observado nas doses de 0,3 fmol.

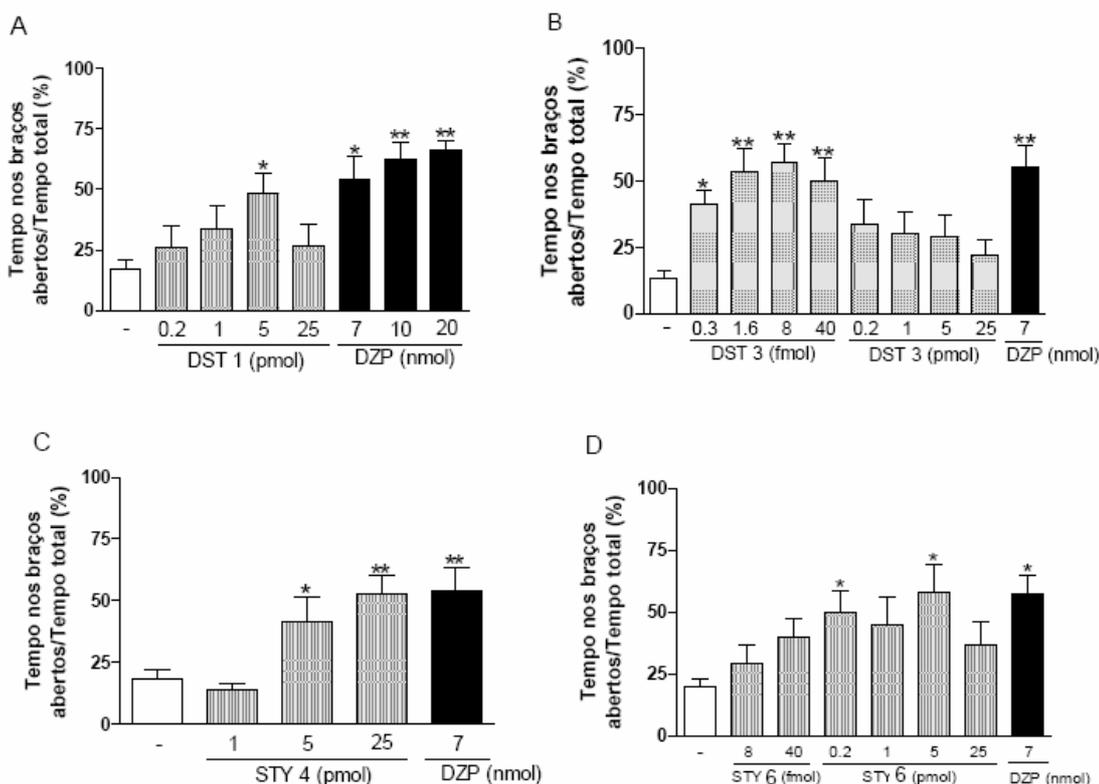


Figura 32: Efeito da DST 1 (0,2 – 25 pmol, i.c.v.), DST 3 (0,3 fmol – 25 pmol, i.c.v.), STY 4 (1 -25 pmol, i.c.v.) e STY 6 (8 fmol – 25 pmol, i.c.v.) no modelo do LCE no parâmetro “Porcentagem do tempo gasto nos braços abertos”. DZP (7 nmol, i.c.v.) – BZP padrão. Cada coluna representa a média dos resultados obtidos e as barras verticais indicam os E.P.M. O número de animais utilizados em cada tratamento variou entre 5-12 animais. * $P \leq 0,05$ e ** $P \leq 0,01$, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett).

De maneira geral, os compostos DST 1, DST 3, STY 4 e STY 6, promoveram um aumento significativo nos parâmetros clássicos espaço-temporais, como porcentagem de tempo despendido e freqüência de entradas nos braços abertos no LCE, caracterizando uma atividade tipo-ansiolítica similar àquela induzida pelo DZP. Em contraste, os compostos DST 2 e STY 5 não foram capazes de modificar nenhum dos parâmetros comportamentais avaliados no LCE nas doses aqui estudadas.

Deve-se considerar que os efeitos induzidos pelo tratamento com extratos de plantas são, muitas vezes, resultantes de uma atividade sinérgica ou aditiva entre os diferentes constituintes químicos que compõem a preparação. Como exemplo podemos citar a ausência de efeito do tipo-antidepressivo das naftodiantronas, constituintes ativos da espécie *Hypericum perforatum*, quando administradas isoladamente, em contraposição às propriedades tipo-

antidepressivas bem caracterizadas para extratos padronizados (BUTTERWECK et al., 1998). Outro exemplo são os efeitos do tipo ansiolíticos caracterizados para extratos padronizados de kava-kava (REX; MORGENSTERN; FINK, 2002; GARRETT et al., 2003), em que grande parte dos constituintes, quando estudados isoladamente, não demonstrou as mesmas propriedades (SMITH et al., 2001). Nos resultados obtidos neste trabalho, dos seis compostos testados isoladamente, quatro deles apresentaram propriedades do tipo-ansiolítica, sugerindo que os efeitos observados para *P. sabulosa* podem ser resultantes de um efeito sinérgico ou aditivo destes constituintes.

A partir destes resultados, tornou-se evidente a participação das estilipironas no efeito tipo-ansiolítico observado para o EBH e FAE de *P. sabulosa*. Assim, a etapa subsequente deste estudo foi realizada a fim de investigar o (s) possível (is) mecanismo (s) de ação (ões) destes compostos.

5.2.3.4- Ensaio de *binding*

Vários metabólitos secundários obtidos de plantas são capazes de se ligarem a receptores GABA_A, tais como a crisina isolada da espécie *Passiflora coerulea* (MEDINA et al., 1990), apigenina de *Matricaria chamomilla* (AVALLONE et al., 2000), 6-metilapigenina e hesperidina de *Valeriana officinalis* (MARDER et al., 2003; WASOWSKI et al., 2002) e hispidulina de *Salvia officinales* (KAVVADIAS et al., 2004).

Entre os diferentes sítios alostéricos presentes neste receptor, um dos mais estudados e que apresenta maior importância clínica é o sítio BDZ. Face ao conjunto de dados comportamentais indicativos de uma ação do tipo BDZ para o EBH e frações obtidos a partir da espécie *P. sabulosa*, e com o intuito de caracterizar o mecanismo de ação das estilipironas isoladas, experimentos de *binding* como a inibição da ligação do [³H]-flunitrazepam (FNZ) por estes compostos foram realizados *in vitro*. Assim, as DST **1**, **2** e **3**, bem como as STY **4**, **5** e **6** foram estudadas em membranas sinaptossomais de córtex de ratos, a fim de testar suas ações como moduladores do sítio BZP do receptor GABA_A.

Concentrações crescentes de cada DST ou STY foram empregadas para realizar as curvas de deslocamento da ligação do [³H]-FNZ em membranas sinaptossomais. Os resultados mostraram que todas as estilipironas foram

capazes de inibir a ligação do [³H]-FNZ ao sítio BDZ, com diferentes potências, confirmando a afinidade destes compostos pelo sítio de ligação BDZ. Entretanto, na maior concentração testada, a DST 1 inibiu a ligação do [³H]-FNZ em apenas 49% (K_i superior a 100 μM), sugerindo baixa afinidade pelo sítio BDZ. Por outro lado, as DST 2 e 3 inibiram a ligação do [³H]-FNZ com valores de K_i (IC_{95%}) de 41,7 μM e 35,8 μM, respectivamente, enquanto que a STY 4, 5 e 6 inibiram a ligação do [³H]-FNZ com K_i (IC_{95%}) de 90,3 μM, 31,0 μM e 70,0 μM, respectivamente, confirmando a atividade do tipo BDZ destes compostos (Figura 33).

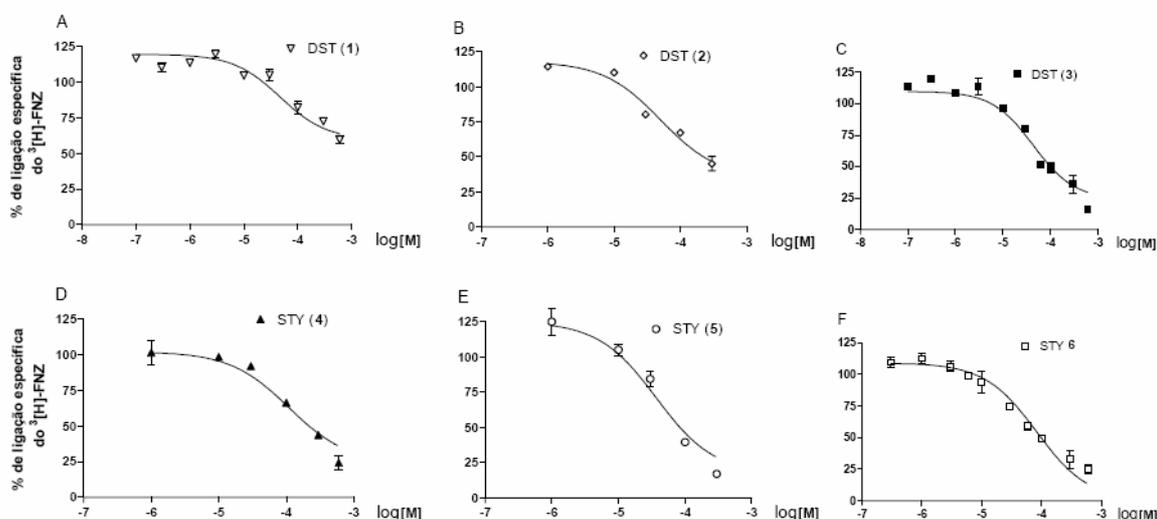


Figura 33: Curvas de competição entre a DST 1, 2, 3 e STY 4, 5, 6 (0,1 - 600 μM) e o [³H]-flunitrazepam (0,42 nM) em membranas sinaptossomais de córtex cerebral de ratos. Os dados representam a média ± E.P.M. de 2 a 5 experimentos independentes realizados em duplicatas.

Os resultados *in vitro* mostraram que as diidro- e estirilpironas isoladas de *P. sabulosa* inibiram a ligação do [³H]-FNZ em sinaptossomas com afinidade em ordem de magnitude de μM. Entretanto, dados da literatura mostram que o DZP inibe o *binding* de radioligantes com afinidade em nM (YASAR et al., 2003). Por outro lado, os resultados obtidos através da injeção i.c.v. das DST e STY mostraram que estes compostos promovem efeitos do tipo ansiolítico, no LCE, na faixa de dose de fmol a pmol, sugerindo maior potência *in vivo* quando comparados ao DZP (nmol). Esta aparente discrepância pode estar relacionada ao fato de que as preparações sinaptossomais utilizadas neste trabalho foram obtidas de córtex de ratos, em que os receptores GABA_A são constituídos por aproximadamente 60% de subunidades α₁ (responsáveis por mediar os efeitos

sedativos) e somente 15 - 20% consistem de subunidades α_2 (responsáveis por mediar as propriedades ansiolíticas) (MÖHLER et al., 2006). Além disso, os resultados *in vitro* não eliminam a possibilidade do envolvimento de outros sistemas de neurotransmissores nos efeitos centrais do extrato, frações e constituintes da espécie *P. sabulosa*.

Através da análise comparativa dos resultados obtidos nos testes *in vivo* e *in vitro* realizados com as diidro- e estirilpironas, detectou-se diferenças significativas, além de uma variação nas potências de atividade dos compostos isolados. Por exemplo, a DST **2** e a STY **5** não apresentaram efeitos ansiolíticos no modelo do LCE (*in vivo*), porém, apresentaram alta afinidade pelos receptores benzodiazepínicos (31,0 e 41,7 μM respectivamente). O contrário foi observado para a STY **6** em que os resultados para a atividade *in vivo* foram mais significativos do que aqueles obtidos no ensaio *in vitro* (ensaio de *binding*). Para a DST **1** e STY **4**, os efeitos não foram muito evidentes em ambos os testes. Entretanto, a DST **3** apresentou tanto efeito *in vivo* (na faixa de 0,3 fmol) quanto *in vitro* (K_i - $\text{IC}_{95\%}$ - 35,8 μM).

É evidente que, apesar da similaridade estrutural entre as diidro- e estirilpironas de *P. sabulosa*, a potência na atividade central está intimamente relacionada à natureza estrutural destes compostos. Deste modo, qualquer variação sazonal no conteúdo de estirilpironas em *P. sabulosa* poderia afetar sobremaneira a atividade de seus extratos e frações. Neste sentido, torna-se de fundamental importância uma análise do conteúdo destes compostos na FAE de *P. sabulosa*.

5.2.4- Avaliação do teor de diidro- e estirilpironas em diferentes coletas de *P. sabulosa*

Para a avaliação do conteúdo total e individual de estirilpironas, quatro coletas foram realizadas em diferentes épocas do ano: setembro (2002), fevereiro (2003), novembro (2003) e março (2004). De cada coleta foram obtidos os extratos brutos hidroalcoólicos (EBH) e destes as respectivas frações solúveis em acetato de etila (FAE) (item 4.3 e 4.4, p. 28 e 29). Soluções (40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) das diferentes FAE foram preparadas e analisadas por cromatografia gasosa. A identificação das

estirilpironas foi realizada através dos tempos de retenção em comparação com os respectivos padrões utilizados (estirilpironas previamente isoladas).

Os dados obtidos com estes cromatogramas foram analisados com ressalvas, pois como foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa, o conteúdo de compostos detectados é restrito aos compostos com maior volatilidade e baixo peso molecular, além da não detecção de compostos mais polares, como flavonóides, por exemplo. Porém, os dados obtidos a partir da análise dos cromatogramas puderam ser comparados entre si, obtendo-se assim os valores relativos do conteúdo de estirilpironas.

Através destas análises, foi possível observar que o conteúdo total de estirilpironas apresentou variação nas diferentes coletas (Figura 34). Os meses que apresentaram maior quantidade relativa destes compostos foram novembro (2003) e março (2004) com 19,6 e 19,4% respectivamente. A amostra que apresentou menor conteúdo relativo de estirilpironas foi obtida no mês de fevereiro de 2003, com apenas 9,4%. Lebot e colaboradores (1999) descreveram que o conteúdo de kavapironas na kava-kava é influenciado por fatores ambientais, sendo demonstrado que os níveis destes compostos aumentam com a irrigação e através da suplementação com nutrientes minerais, e diminuem com o sombreamento. Esses fatores extrínsecos poderiam explicar a diferença no conteúdo relativo de estirilpironas nas coletas em épocas semelhantes como setembro e novembro (primavera) e fevereiro e março (verão). Apesar dos períodos serem muito próximos houve diferenças significativas, onde as duas últimas coletas apresentaram o maior conteúdo total, com o dobro daqueles observados nas duas primeiras coletas (setembro e fevereiro). Para a espécie *Equisetum arvense* L., também produtora de estirilpironas, observou-se que o acúmulo destes compostos depende do estágio de desenvolvimento e de estímulos indutores (HUTZLER et al., 1998). Estes fatores também podem ter influenciado no conteúdo de estirilpironas na espécie *P. sabulosa*.

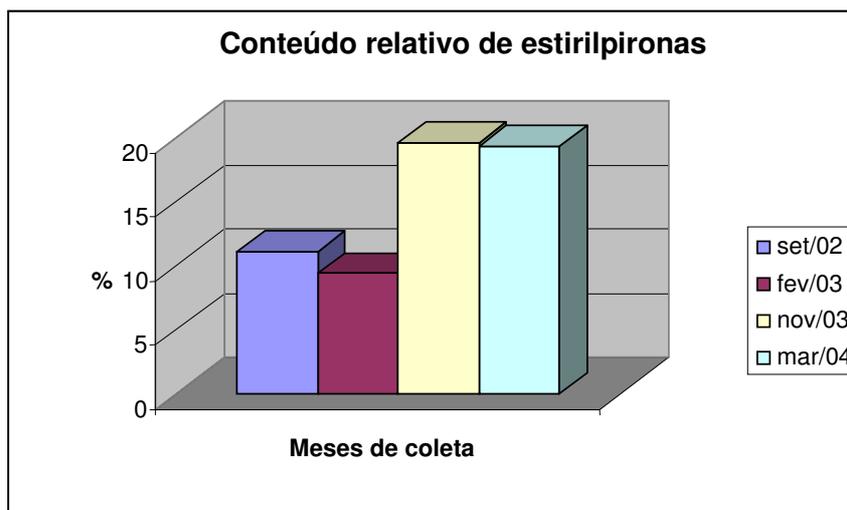


Figura 34: Conteúdo relativo de estirilpironas nos diferentes meses de coleta: setembro (2002), fevereiro (2003), novembro (2003) e março (2004).

Na segunda parte deste estudo, avaliaram-se as variações do conteúdo individual de cada estirilpirona. Analisando a figura 35, pode-se constatar que houve variações neste conteúdo durante as quatro coletas realizadas. Analisando individualmente cada estirilpirona, observou-se que as variações da DST 1 e STY 5, 6, 51 foram muito pequenas, ao contrário da DST 2, 3 e STY 4 em que o perfil variou bastante durante as coletas.

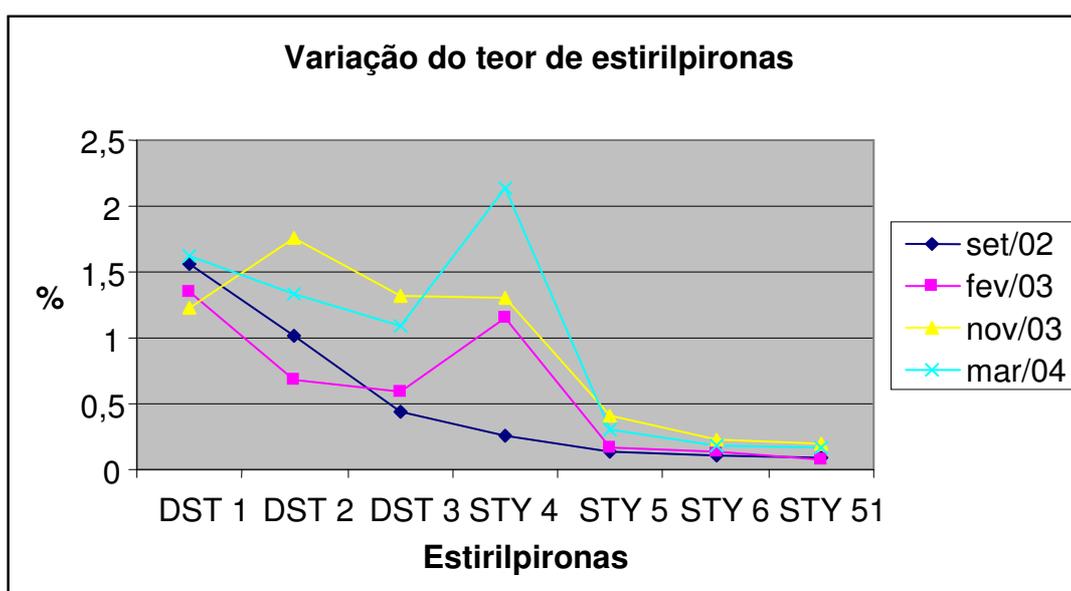


Figura 35: Variação do conteúdo individual das diidro- e estirilpironas nas diferentes coletas.

De uma maneira geral, a presença das diidroestirilpironas (DST **1**, **2** e **3**) foi superior em relação às estirilpironas (STY **4**, **5**, **6** e **51**) em todas as coletas. Apenas para a amostra coletada em março (2004) o conteúdo individual de uma estirilpirona (STY **4**) foi superior àquele das diidro. De acordo com Dewick (2002), as estirilpironas são biossintetizadas através da via do ácido chiquímico, onde o ácido cinâmico, em sua forma ativa (cinamoil-CoA) e sob ação da enzima estirilpirona-sintase, incorpora duas unidades de malonil-CoA e subseqüentemente o derivado policetídeo sofre lactonização para resultar na correspondente estirilpirona (esquema mostrado na figura 4, p. 15). Acredita-se assim, que esta espécie química seja o material de partida para processos secundários que levam a formação das outras formas de estiril-lactonas, tais como as diidroestirilpironas (HERDERICH; BECKERT; VEIT; 1997). Essa informação poderia justificar a baixa quantidade das estirilpironas **5**, **6** e **51**, pois estes compostos poderiam ser os precursores das diidroestirilpironas **1**, **2** e **3** que são encontradas em maior quantidade na espécie.

A tabela 5 correlaciona o conteúdo de cada diidro- e estirilpirona com os resultados obtidos nas atividades *in vivo* (LCE) e *in vitro* (*binding*).

Tabela 5: Relação entre os valores das atividades *in vivo* (LCE) e *in vitro* (*binding*) e as quantidades individuais de cada estirilpirona nas respectivas coletas.

Estirilpirona	Atividades		Coletas			
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	set/02	fev/03	nov/03	mar/04
DST 1	5 pmol	100,0 µM	4,88%	3,67%	3,87%	4,76%
DST 2	na*	41,7 µM	3,28%	1,71%	5,52%	3,83%
DST 3	0,3 fmol	35,8 µM	1,37%	1,60%	4,15%	3,06%
STY 4	5 pmol	90,3 µM	0,81%	2,89%	4,10%	5,17%
STY 5	na	31,0 µM	0,46%	0,42%	1,30%	0,88%
STY 6	0,2 pmol	70,0 µM	0,26%	0,31%	0,69%	0,67%
STY 51	nt**	nt	0,06%	0,23%	0,62%	0,41%

*na: não ativa; **nt: não testada

Como se pode observar, das seis estirilpironas testadas, apenas a DST **3** manteve uma potência significativa em ambos os testes. Fazendo a relação entre

estes resultados e o teor deste composto nas diferentes coletas, a melhor atividade ansiolítica seria obtida da planta coletada nos meses de novembro, com um conteúdo de 4,15% de DST **3**. O segundo composto que apresentou maior atividade nos testes do LCE e de *binding* foi a STY **6** cuja concentração foi baixa em todas as coletas. Apesar disso, as coletas dos meses de novembro (2003) e março (2004) apresentaram mais que o dobro da quantidade em relação às duas primeiras coletas.

Analisando o valor médio da quantidade individual das diidro- e estirilpironas nas diferentes coletas pode-se observar que os compostos presentes em maiores concentrações foram a DST **1** e STY **4** com concentrações relativas médias de 4,29 e 3,24% respectivamente. Ambos os compostos não foram muito ativos no teste do LCE (efeito ansiolítico observado na concentração de 5 pmol) além de apresentarem baixa afinidade pelos sítios de ligação BZD do GABA_A. A DST **3** que apresentou atividade tanto *in vivo* quanto *in vitro* é a terceira estirilpirona presente em maior concentração (valor médio de 2,54%). Para as STY **5**, **6** e **51**, os valores médios ficaram abaixo de 1,0%. A baixa concentração na STY **51** (valor médio de 0,33%) justificou a dificuldade de seu isolamento durante este trabalho.

Outra observação que deve ser realizada é o fato de que todos os ensaios de atividade central foram realizados com o EBH e frações da coleta de fevereiro/2003. Através das análises, foi possível observar que esta amostra apresentou o menor conteúdo de estirilpironas (9,4%), metade da quantidade detectada para o mês de novembro (19,6%). Assim, acredita-se que o perfil de atividade ansiolítica possa ser aumentado quando utilizado o EBH ou FAE obtidos a partir das amostras em que a concentração das estirilpironas foi superior (nov/03 e mar/04). Além disso, deve-se considerar a possibilidade destes compostos apresentarem uma ação sinérgica e/ou aditiva, que poderia ser favorecida com extratos ou frações obtidos a partir destas coletas.

5.2.5- Ensaios de toxicidade

De acordo com Lapa e colaboradores (2003) “plantas medicinais utilizadas como medicamentos são xenobióticos, isto é, são produtos estranhos ao organismo, nele introduzidos com finalidades terapêuticas. Assim, como todo

corpo estranho, os produtos de sua biotransformação podem ser potencialmente tóxicos, devendo ser encarados como tal até que se prove o contrário”. Do ponto de vista toxicológico, é importante considerar que as plantas medicinais ou mesmo os fitoterápicos podem apresentar não apenas efeitos benéficos na sintomatologia de uma determinada patologia, mas principalmente, efeitos que se instalam em longo prazo e, muitas vezes, de forma assintomática, como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos.

Como já descrito, a segurança de produtos a base de kava tem sido questionada devido a efeitos hepatotóxicos, incluindo cirrose, hepatite e insuficiência hepática (STICKEL et al., 2003). Dois possíveis mecanismos para o efeito hepatotóxico da kava são postulados: a inibição do sistema citocromo P450 (ANKE; RAMZAN, 2004; UNGER et al., 2002) e a redução do conteúdo de glutatona hepática (WHITTON et al., 2003).

Porém, questiona-se que a suposta hepatotoxicidade seja decorrente da forma com que o extrato de kava é preparado, ou seja, pelo uso de solventes orgânicos no processo extrativo (ESCHER et al., 2001), somado ao uso das partes aéreas da planta que contém um alcalóide citotóxico (pipermetistina), bem como pela adição de uma mistura racêmica da kavaína sintética (CÔTÉ et al., 2004).

A exemplo da kava-kava, é imperativa a avaliação da toxicidade da FAE de *P. sabulosa*, sobretudo pela presença das estirilpironas. Neste sentido, a FAE foi submetida a avaliação de efeitos tóxicos em camundongos submetidos ao tratamento agudo e subcrônico através, da medição de parâmetros bioquímicos e hematológicos.

Os resultados deste estudo revelaram sinais de toxicidade somente em altas doses, a partir de 2.000 mg/kg para via i.p. e 3.500 mg/kg para v.o. Assim, a triagem farmacológica inicial da FAE identificou os seguintes sinais indicativos de toxicidade aguda: cianose, sialorréia e uma aparente redução da frequência respiratória. No entanto, não foram observados os demais sinais de toxicidade em nenhuma das doses utilizadas, o que reforça a boa tolerabilidade da administração oral da FAE. É importante lembrar, contudo, que estas observações foram qualitativas, servindo apenas para demonstrar um perfil preliminar da FAE e orientar a escolha das doses para o estudo toxicológico subsequente.

Não foi possível obter a DL₅₀ oral da FAE, uma vez que a administração desta fração em camundongos machos induziu de 10 e 30% de mortes nas doses de 3.500 e 5.000 mg/kg, respectivamente, enquanto que em fêmeas, o tratamento oral promoveu 10, 30 e 40% de mortes, nas doses de 2.500, 3.500 e 5.000 mg/kg, respectivamente. Esses resultados indicaram que a DL₅₀ oral da FAE, em camundongos, deve ser superior à maior dose empregada neste estudo (DL₅₀ oral > 5.000 mg/kg).

Os demais sinais observados em altas doses indicativos de toxicidade, tais como ptose palpebral, ataxia, perda do reflexo de endireitamento, bem como resposta diminuída à pressão da cauda, podem ser resultantes de uma atividade do tipo benzodiazepínica, pois estes sinais são comuns a esta classe de medicamentos.

Os resultados obtidos que demonstraram uma baixa toxicidade aguda do tratamento com a FAE de *P. sabulosa* foram semelhantes àqueles encontrados em diversos estudos realizados com kavalactonas isoladamente bem como com extratos de kava, que também mostraram uma baixa toxicidade em testes realizados com animais (SORRENTINO; CAPASSO; SCHMIDT, 2006).

No tratamento subcrônico, as doses selecionadas foram determinadas conforme os resultados obtidos preliminarmente na toxicidade aguda de acordo com o preconizado pela Resolução n° 90 de 16 de março de 2004, na sua publicação: “Guia na realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos”. Nesta etapa experimental, todos os animais tratados (ambos os sexos) por 32 dias sobreviveram e não apresentaram qualquer sinal indicativo de toxicidade. A evolução do peso corporal (em machos e fêmeas) não foi afetada pelo tratamento subcrônico. O peso absoluto e relativo dos órgãos vitais, nas menores doses (250 e 500 mg/kg) não foi modificado pelo tratamento, entretanto, a dose de 1.000 mg/kg promoveu, em camundongos machos, um aumento do peso absoluto e relativo do fígado em 30 e 34%, respectivamente, enquanto que em fêmeas o aumento foi de 14 e 18%, respectivamente. Além disso, a maior dose utilizada (1.000 mg/kg) promoveu um aumento significativo nos níveis séricos da aspartato aminotransferase (AST) em camundongos machos, sem modificação dos demais parâmetros bioquímicos e hematológicos. Em fêmeas, observou-se uma diminuição da creatinina nas doses de 250 e 500 mg/kg e um aumento do

volume corpuscular médio (VCM), bem como de neutrófilos segmentados na menor dose, sem quaisquer alterações nos demais parâmetros bioquímicos e hematológicos (Tabela 6). No entanto, estas alterações não apresentaram um padrão dose ou sexo-dependente, uma vez que ocorreram em caráter esporádico, eventualmente em machos ou em fêmeas. Embora tenham ocorrido diferenças significativas em alguns parâmetros bioquímicos e hematológicos entre animais controle e experimentais, estes valores não excederam os valores normais para camundongos conforme a literatura (BÜRGER et al., 2005). Assim, estes dados sugerem uma boa tolerabilidade e baixa toxicidade da FAE de *P. sabulosa*.

Em um estudo de toxicidade crônica utilizando um extrato comercial padronizado de kavalactonas (Kavasedon[®]), Sorrentino e colaboradores (2006) não observaram diferenças significativas no desenvolvimento do peso corporal, nos parâmetros bioquímicos (glicemia, proteínas totais, AST, ALT- alanina aminotransferase- e colesterol total) e hematológicos (contagem e diferenciação celular), bem como no peso dos órgãos. Para o grupo de ratos machos que receberam 0,1% de kavalactonas, os valores de AST e ALT e colesterol total foram ligeiramente elevados quando comparado ao controle, porém ainda dentro do intervalo de normalidade.

Em linhas gerais, estes resultados sugerem que o tratamento em camundongos com a FAE de *P. sabulosa* em regime agudo e subcrônico não promoveu comprometimento hematológico nem nas funções hepática e renal dos animais, não caracterizando, portanto, toxicidade. Porém, estudos complementares devem ser realizados para garantir a segurança de seu uso em seres humanos.

Tabela 6: Efeito do tratamento sub-crônico (32 dias) com a fração acetato de etila (FAE) de *Polygala sabulosa* nos parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos machos e fêmeas.

PARÂMETROS	Machos				Fêmeas			
	Controle	FAE (mg/kg)			Controle	FAE (mg/kg)		
	0	250	500	1000	0	250	500	1000
Bioquímicos	n=5	n=5	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6	n=6
Creatinina (mg/dL)	0,45±0,02	0,46±0,03	0,39±0,01	0,40±0,04	0,21±0,02	0,15±0,01*	0,13±0,01*	0,17±0,02
Uréia (mg/dL)	47,54±4,17	46,22±2,40	50,13±2,02	53,05±1,90	48,28±2,39	50,28±1,38	45,80±1,11	42,68±2,68
Fosfatase alcalina (U/L)	155,00±15,80	142,00±15,60	148,17±14,50	137,67±21,40	116,50±9,66	112,17±12,63	152,17±15,42	134,83±14,10
γ-GT (U/L)	1,20±0,20	1,40±0,40	1,17±0,17	1,33±0,21	1,17±0,17	1,00±0,00	1,00±0,00	1,00±0,00
AST (U/L)	49,00±3,56	60,4±4,76	58,67±5,11	74,83±10,34	60,17±3,24	54,67±2,89	63,67±2,78	64,83±4,08
ALT (U/L)	36,00±3,73	42,80±3,76	37,17±3,99	51,17±3,28*	43,50±3,35	35,67±1,89	40,33±1,45	45,33±5,29
Proteínas totais(g/dL)	5,70±0,16	5,48±0,08	5,90±0,07	6,08±0,10	5,53±0,08	5,60±0,10	5,78±0,11	5,70±0,16
Albumina (g/dL)	1,70±0,05	1,74±0,04	1,70±0,03	1,68±0,07	1,68±0,03	1,75±0,03	1,78±0,04	1,72±0,07
Globulina (g/dL)	4,06±0,12	4,10±0,08	4,20±0,08	4,40±0,09	3,85±0,06	3,85±0,11	4,00±0,10	3,98±0,11
Hematológicos	n=10	n=10	n=11	n=11	n=11	n=11	n=11	n=10
Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	8,79±0,24	8,31±0,27	8,06±0,12	8,23±0,16	8,28±0,18	8,31±0,12	8,55±0,12	8,10±0,21
Hematócrito (%)	40,97±1,17	42,35±1,63	39,90±0,50	40,67±0,87	38,74±0,99	40,81±0,82	39,90±0,65	38,49±0,71
Hemoglobina (g/dL)	14,00±0,41	13,31±0,41	12,93±0,18	13,24±0,33	13,43±0,30	13,45±0,20	13,81±0,22	13,41±0,23
VCM (μm ³)	46,60±0,54	48,88±1,40	49,54±0,37	49,45±0,80	46,64±0,34	49,00±0,57*	46,64±0,43	47,80±0,68
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	7,57±0,51	5,04±0,68	5,31±0,91	5,56±0,62	5,65±0,56	4,78±0,44	5,42±0,31	6,26±0,55
Neutrófilos segment.(%)	4,60±0,40	4,70±0,58	6,45±1,14	4,09±0,71	3,54±0,37	6,39±0,73*	4,18±0,57	4,60±0,62
Linfócitos (%)	94,00±0,47	91,90±0,89	90,36±1,52	92,54±1,35	94,82±0,57	92,27±8,10	94,27±0,95	94,10±0,71
Monócitos (%)	2,10±0,76	3,40±0,76	2,73±0,36	3,27±1,10	1,45±0,47	2,73±0,66	1,36±0,34	1,20±0,20
Eosinófilos (%)	0,10±0,10	0,00±0,00	0,36±0,20	0,09±0,09	0,00±0,00	0,09±0,09	0,18±0,18	0,10±0,10
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	678,80±65,34	874,30±61,25	855,82±36,80	817,36±60,13	703,64±17,10	702,18±35,00	638,36±27,20	629,60±23,13

Dados são expressos como a média ± E.P.M. dos parâmetros bioquímicos (n= 5 - 6) e hematológicos (n= 10 - 11) de camundongos machos e fêmeas. Dados analisados por ANOVA de uma via seguido pelo teste de Dunnett. **P* < 0,05 ou ***P* < 0,01 quando comparado aos respectivos grupos controle. Abreviações: γ-GT= γ-glutamyl aminotransferase; ALT = Alanina aminotransferase, AST = Aspartato aminotransferase, VCM= Volume Corpuscular Médio.

5.3- Cumarinas

No gênero *Polygala*, pelo menos cinco espécies produzem estes compostos, são elas: *P. senega* (ROOSEMONT, 1957), *P. paniculata* (HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN, 1985), *P. fruticosa* (DI PAOLO et al., 1989), *P. sabulosa* (PIZZOLATTI et al., 2000) e *P. hongkongensis* (WU et al., 2007).

Para dar seguimento ao trabalho com as cumarinas identificadas na espécie *P. sabulosa*, este trabalho foi iniciado com o isolamento da cumarina majoritária a partir de diferentes extratos brutos, seguido pelas reações de modificação estrutural e por último a obtenção de cumarinas sintéticas. Paralelamente a estas etapas, avaliações de atividades biológicas foram realizadas, dentre elas a atividade antitumoral e antimicrobiana.

6.3.1- Identificação das cumarinas isoladas

Estudos realizados anteriormente com *P. sabulosa*, revelaram a ocorrência de duas cumarinas: 6-metoxi-7-preniloxicumarina e escopoletina.

A cumarina 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7] (Figura 36), isolada diversas vezes do extrato bruto ($m_{\text{total}} = 2,87 \text{ g}$), foi caracterizada através do ponto de fusão, análises espectroscópicas e comparação com dados da literatura (PIZZOLATTI et al., 2000; CUNHA JUNIOR, 2002). São características no espectro de IV (KBr) a banda de absorção em $\nu_{\text{máx}} 3050 \text{ cm}^{-1}$ atribuída ao estiramento da ligação C-H aromático, $\nu_{\text{máx}} 2974 \text{ cm}^{-1}$ (C-H alifático) e $\nu_{\text{máx}} 1713 \text{ cm}^{-1}$ (C=O lactona α,β insaturada). No espectro de RMN ^1H , observou-se um par de dupletos centrados em $\delta 7,64$ e $6,25 \text{ ppm}$, ambos com integração para 1 átomo de hidrogênio e $J = 9,3 \text{ Hz}$, típicos de dupla ligação endocíclica, sendo referentes aos átomos de hidrogênio H-4 e H-3 respectivamente (anel lactônico). Os dois singletos em $\delta 6,86$ e $6,82 \text{ ppm}$, com integração para 1 átomo de hidrogênio cada, foram atribuídos aos hidrogênios aromáticos (H-8 e H-5 respectivamente). A metade oxiprenílica foi caracterizada pelo tripleto em $\delta 5,49 \text{ ppm}$ ($J = 6,1 \text{ Hz}$, 1H, H-2') mostrando o hidrogênio olefínico acoplado ao metileno carbinólico em $\delta 4,66 \text{ ppm}$ ($J = 6,1 \text{ Hz}$, 2H, H-1'). O singlete largo em $\delta 1,78 \text{ ppm}$, com integração para 6 átomos de hidrogênio, foi atribuído à presença de duas metilas ligadas ao mesmo carbono

olefínico. Finalmente, a metoxila em C-6 foi identificada pelo singleto em δ 3,90 ppm.

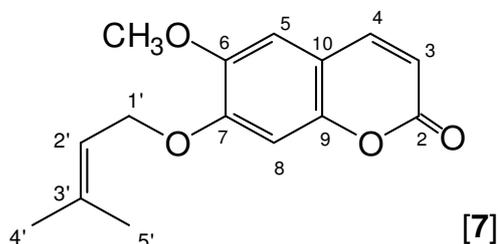


Figura 36: Estrutura da 6-metoxi-7-preniloxicumarina obtida através do fracionamento do EBH de *P. sabulosa* [7].

A outra cumarina obtida, identificada como sendo a escopoletina ($m = 27$ mg) [8] (Figura 37), foi caracterizada através de seu ponto de fusão, IV, espectros de RMN de ¹H e ¹³C além de comparação com dados da literatura (RAZDAN et al., 1987). No espectro de IV (KBr), a banda de absorção em $\nu_{\text{máx}} 3340 \text{ cm}^{-1}$ foi atribuída à ligação O-H, $\nu_{\text{máx}} 2972 \text{ cm}^{-1}$ (C-H alifático) e $\nu_{\text{máx}} 1709 \text{ cm}^{-1}$ (C=O lactona α,β insaturada). Através da análise de seu espectro de ¹H, observou-se um par de dupletos em δ 7,60 ppm (1H, $J = 9,6$ Hz) e δ 6,27 ppm (1H, $J = 9,6$ Hz) relacionados respectivamente aos átomos de hidrogênio H-4 e H-3 da dupla endocíclica. Os dois singletos centrados em δ 6,91 ppm (1H, H-8) e δ 6,85 (1H, H-5) são relacionados aos átomos de hidrogênio aromáticos e o singleto em δ 3,95, com integração para 3 átomos de hidrogênio, referente à metoxila ligada ao C-6.

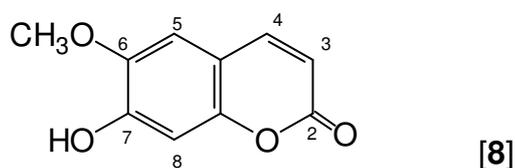


Figura 37: Estrutura da escopoletina (6-metoxi-7-hidroxycumarina) [8] obtida através do fracionamento do extrato do caule de *P. sabulosa*.

Estudos precedentes a este trabalho demonstraram que a escopoletina possui uma potente inibição na dor visceral induzida pelo ácido acético em camundongos. No entanto, este efeito não foi observado com a preniloxicumarina. Além disso, dois derivados obtidos a partir da escopoletina, benzoato de escopoletina e acetato de escopoletina, também foram efetivos na diminuição da

resposta à dor. Observou-se que a adição do grupo benzoil aumentou as propriedades antinociceptivas, sendo mais potente que a escopoletina. No entanto, a adição do grupo acil, como no acetato de escopoletina, diminuiu as propriedades antinociceptivas, sendo menos potente que a cumarina original (MEOTTI et al., 2006).

Embora exista certa similaridade entre estas moléculas, a retirada da cadeia lateral ligada ao C-7 foi suficiente para alterar a resposta biológica no modelo utilizado. Estas pequenas mudanças estruturais podem inibir ou diminuir a eficácia, uma vez que a modificação na estrutura molecular pode alterar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção de um composto (aspectos farmacocinéticos), bem como alterar a especificidade da molécula na ligação em seus alvos biológicos (aspectos farmacodinâmicos) (SOLDI et al, 2008).

Estas observações nos impulsionaram na busca de outros derivados cumarínicos a fim de se iniciar estudos de correlação estrutura *versus* atividade frente a diferentes modelos de atividades biológicas. Devido a presença de uma hidroxila ligada ao C-7, a escopoletina revelou-se como um bom modelo para o preparo de análogos através de simples reações de acilação, permitindo a obtenção de derivados com variações hidrofóbicas, eletrônicas e estéricas, essenciais para estudos de estrutura *versus* atividade. Porém, a pequena quantidade de escopoletina isolada inviabilizaria um trabalho deste tipo. Como a preniloxicumarina é um dos metabólitos secundários majoritário nesta espécie e possui sua cadeia lateral em C-7 oxiprenilada, tomou-se como alternativa obter a escopoletina a partir desta cumarina.

5.3.2- Obtenção de escopoletina a partir da 6-metoxi-7-preniloxicumarina

A ligação C-O do grupo preniloxi ligado ao C-7 da preniloxicumarina [7] foi clivada na presença H_2SO_4 em temperatura ambiente (TA) conforme mostra o esquema da figura 38. A possibilidade de um mecanismo de clivagem via carbocátion possibilitou a regioseletividade da reação devido ao grupo prenil estabilizar o carbocátion formado. Através desta reação, obteve-se a escopoletina [8] com um rendimento entre 75 - 80%.

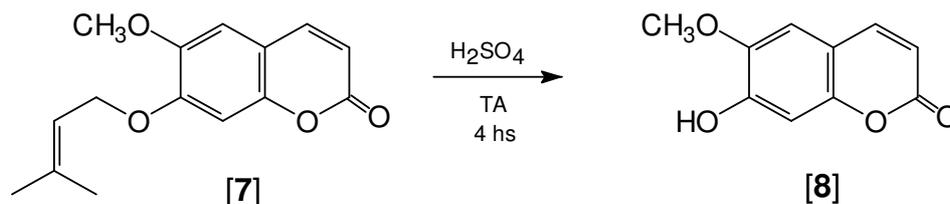


Figura 38: Obtenção de escopoletina [8] a partir da 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7].

A partir da análise de IV (KBr) do produto da reação pode-se observar principalmente o aparecimento de uma banda em $\nu_{\text{máx}} 3340 \text{ cm}^{-1}$, própria do grupo hidroxila. Pelo espectro de RMN ^1H , observou-se uma mudança considerável quando comparado ao espectro da 6-metoxi-7-preniloxicumarina, principalmente pela ausência de sinais na região entre $\delta 4,0$ e $6,0$ ppm, referentes aos átomos de hidrogênio da porção oxiprenílica. Além disso, o desaparecimento do singlete em $\delta 1,78$ ppm referente a duas metilas ligadas ao mesmo carbono sp^2 contribuiu para a evidência de alteração da molécula na posição 7, resultando na escopoletina [8].

5.3.3- Modificações estruturais na escopoletina

A maioria dos fármacos age em um sítio específico, tal como uma enzima ou um receptor. Frequentemente os compostos com estruturas semelhantes tendem a possuir a mesma atividade farmacológica. Porém, geralmente exibem diferenças de potência e de efeitos colaterais e, muitas vezes, atividades distintas. Um estudo de relação estrutura *versus* atividade de um composto-protótipo e de seus análogos pode ser usado para determinar as partes da estrutura do protótipo que são responsáveis por sua atividade biológica (grupo farmacofórico), e também por seus efeitos adversos. Estas alterações estruturais podem ser classificadas como: (1) a dimensão e a conformação do esqueleto carbonado, (2) a natureza e o grau de substituição e (3) a estereoquímica do protótipo (THOMAS, 2003).

Para a proposta de estudos das correlações estrutura X atividade com derivados da escopoletina, elegeu-se duas alterações estruturais relacionadas ao tamanho da cadeia alquílica e a introdução de um anel aromático para avaliar respectivamente os:

- Efeitos hidrofóbicos: aumentando o número de grupamentos metileno numa cadeia, aumenta-se o tamanho e a natureza lipídica da molécula, ou seja, a

lipofilicidade do composto. Inversamente, o aumento do número de grupamentos metileno reduz a solubilidade dos análogos em água. Assim, os efeitos associados com o aumento da cadeia podem assumir várias formas, ou seja, aumento ou diminuição da atividade (THOMAS, 2003);

- Efeitos eletrônicos: a distribuição de elétrons na molécula de um fármaco terá uma influência considerável sobre sua distribuição e a atividade. Com o objetivo de atingir seu alvo, o fármaco normalmente tem que passar por várias membranas biológicas. Como regra geral, os fármacos apolares e os polares na sua forma não-ionizada são transportados mais prontamente através das membranas do que os fármacos polares ou na sua forma ionizada. Além disso, quando o fármaco atinge seu sítio-alvo, a distribuição de elétrons em sua estrutura ditará o tipo de interações que serão formadas com o alvo. As forças que promovem a interação dos ligantes aos alvos biológicos podem ser: ligações covalentes, ligações iônicas e interações dipolo-dipolo de todos os tipos, incluindo pontes de hidrogênio, interações de transferência de carga, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals (THOMAS, 2003);
- Efeitos estéricos: a conformação de uma molécula é um dos fatores mais importantes que afetam a atividade do fármaco. Algumas características estruturais impõem um grau de rigidez considerável à estrutura, ao passo que outros tornam a estrutura mais flexível. Assim, a topologia do farmacóforo do fármaco deve ser complementar àquela do sítio-alvo (THOMAS, 2003).

Assim, para avaliação de tais efeitos foram preparadas duas séries de derivados da escopoletina: uma delas composta de ésteres alquílicos com cadeias lineares de diferentes tamanhos e a outra de ésteres benzoílicos com substituintes retiradores e doadores de elétrons, ambos ligados ao C-7, conforme apresentado no esquema da figura 39.

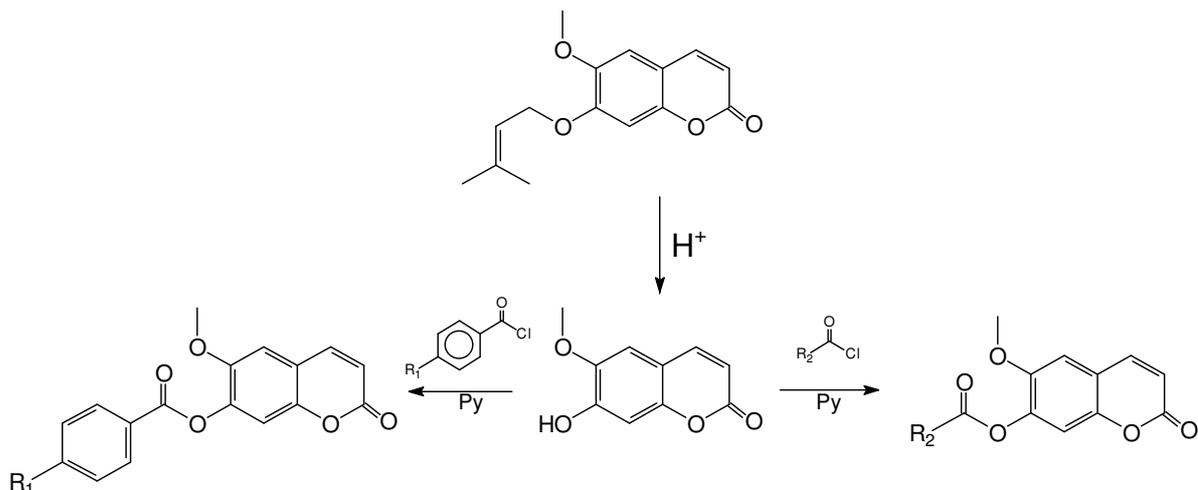
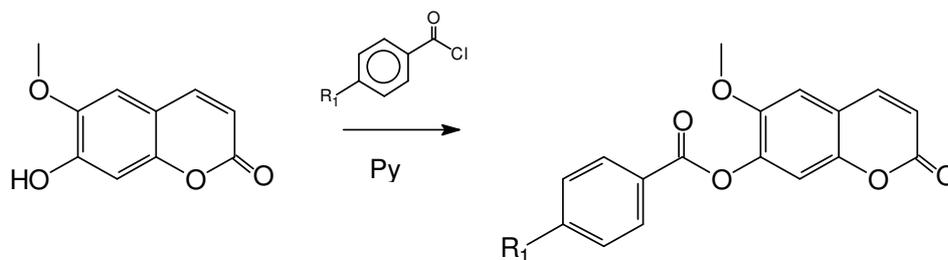


Figura 39: Modificações estruturais propostas para a escopoletina.

5.3.3.1- Obtenção de ésteres benzoílicos derivados da escopoletina

A primeira série de derivados da cumarina escopoletina foi composta por derivados benzoílicos (9 – 14). A esterificação do grupo OH livre no C-7 ocorreu sob agitação e refluxo entre a escopoletina e os respectivos cloretos de benzoílica em piridina. Diferentes cloretos de *p*-benzoílica com substituintes retiradores e doadores de elétrons foram utilizados, seguindo o esquema mostrado na figura 40. Os rendimentos obtidos nestas reações variaram de 17,2 a 86,9%.



- [9]- R₁: H
- [10]- R₁: Cl
- [11]- R₁: Br
- [12]- R₁: NO₂
- [13]- R₁: NHCOCH₃
- [14]- R₁: OCH₃

Figura 40: Reação geral para a síntese dos ésteres benzoílicos derivados da escopoletina.

A identificação dos produtos destas reações foi realizada observando as seguintes mudanças espectroscópicas:

a)- No espectro de IV, o desaparecimento da banda de absorção da hidroxila em $\nu_{\text{máx}}$ 3340 cm^{-1} e o aparecimento de uma banda de absorção para carbonila de éster em $\nu_{\text{máx}}$ 1735 cm^{-1} ;

b)- No espectro de RMN ^1H , o aparecimento de sinais de átomos de hidrogênio na região de aromáticos.

Por exemplo, no espectro de RMN ^1H do composto *p*-clorobenzoílate de escopoletina [10], a porção benzoílica ligada ao C-7 foi caracterizada pela presença de dois pares de dupletos em δ 8,13 e 7,49 ppm, com integração para dois átomos de hidrogênio cada e constantes de acoplamento *orto* relacionadas ($J= 8,4$ Hz), referentes aos átomos de hidrogênio 2',6' e 3',5' respectivamente. Os demais sinais referentes ao esqueleto cumarínico foram observados: o par de dupletos em δ 7,68 ($J= 9,6$ Hz, 1H, H-4) e 6,43 ppm ($J= 9,6$ Hz, 1H, H-3), dois singletos em δ 7,20 (1H) e 7,01 ppm (1H) referentes aos átomos de hidrogênio H-8 e H-5. Finalmente, o singletto em δ 3,85 ppm foi atribuído a metoxila ligada ao C-6 (Figura 41).

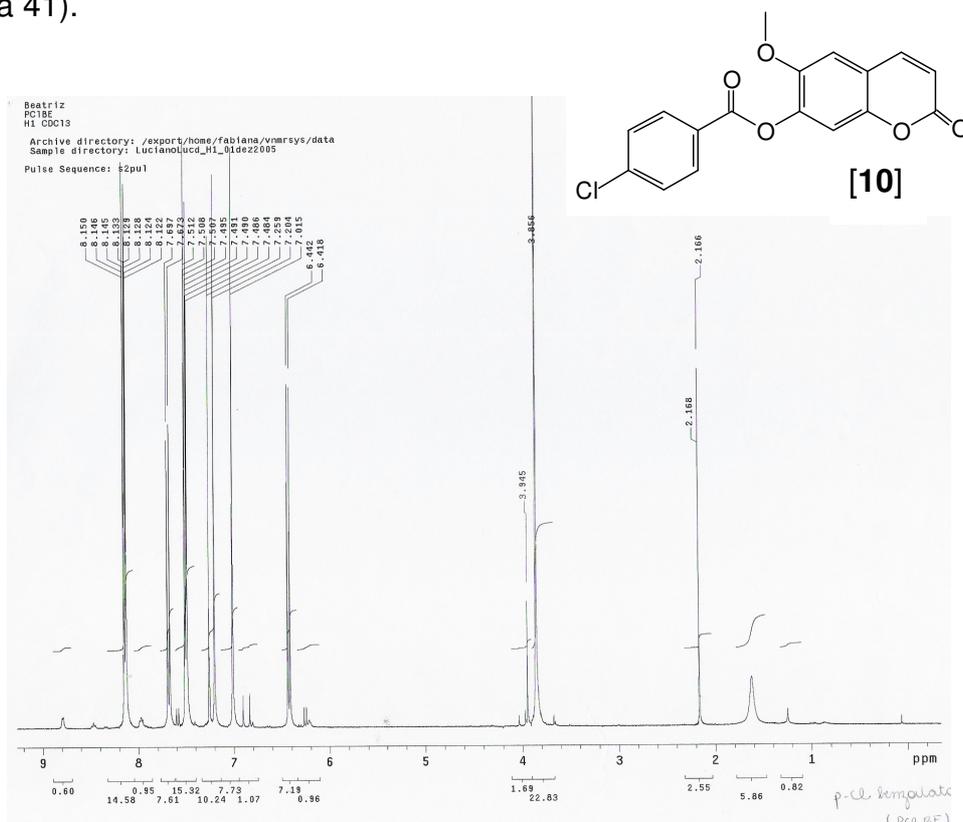


Figura 41: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *p*-clorobenzoílate de escopoletina [10].

Estes derivados foram preparados na tentativa de avaliar as influências eletrônicas e estéricas de grupos inseridos no anel aromático, e correlacionar a atividade biológica com os valores das constantes de Hammett dos substituintes. Essa correlação pode fornecer valiosas informações a respeito das interações do composto com seu alvo biológico (TAVARES, 2004).

5.3.3.2- Obtenção de ésteres alquílicos derivados da escopoletina

O segundo grupo de compostos derivados da escopoletina foi uma série de ésteres de cadeia alquílica linear **15** - **19** (Figura 42). Sob as mesmas condições das reações anteriores, os derivados acilados da escopoletina foram preparados com os respectivos cloretos de acila em piridina. Os rendimentos obtidos nestas reações variaram de 68,0 a 94,0%.

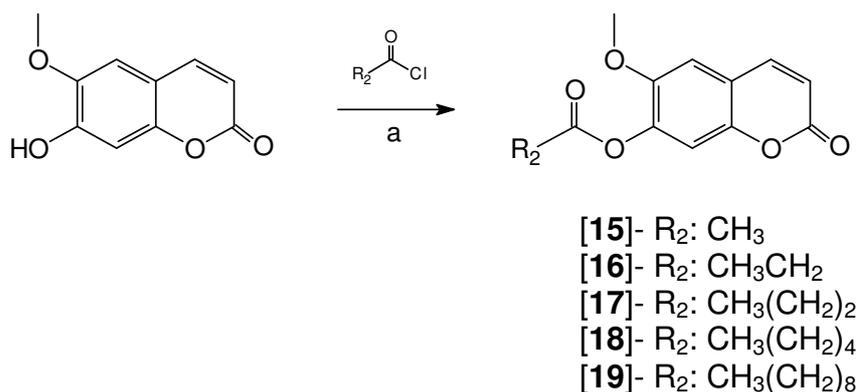


Figura 42: Reação geral para obtenção dos ésteres alquílicos derivados da escopoletina. a) anidrido acético, DMAP, AcOEt para composto [15], e o respectivo cloreto de acila, piridina para o restante dos compostos (16 – 19).

A identificação dos produtos destas reações foi realizada observando as seguintes mudanças espectroscópicas:

a)- No espectro de IV destes derivados, observou-se principalmente o desaparecimento da banda referente a ligação O-H em $\nu_{\text{máx}}$ 3340 cm^{-1} e o aparecimento da banda referente à carbonila de éster em torno de $\nu_{\text{máx}}$ 1735 cm^{-1} ;

b)- No espectro de RMN ¹H, o aparecimento de sinais adicionais abaixo de δ 3,0 ppm referente à cadeia alquílica.

Para o derivado butanoato de escopoletina [17] observaram-se o aparecimento de três sinais na região abaixo de δ 2,70 ppm, característicos dos

átomos de hidrogênio da cadeia alquílica. Assim, o tripleto em δ 2,58 ppm, com integração para dois átomos de hidrogênio, foi atribuído ao metileno vizinho a carbonila (H-1'), o multipletto em δ 1,79 ppm (2H) ao H-2' e o tripleto em δ 1,04 ppm, com integração para três átomos de hidrogênio, referente a metila terminal (H-3'). O restante do espectro foi semelhante ao composto de partida, mostrando o par de dupletos em δ 7,64 (1H, $J=9,6$ Hz, H-4) e 6,39 ppm (1H, $J=9,6$ Hz, H-3), os dois singletos em δ 7,05 (1H, H-8) e 6,95 (1H, H-5) e, finalmente, a metoxila em δ 3,85 ppm (3H) (Figura 43).

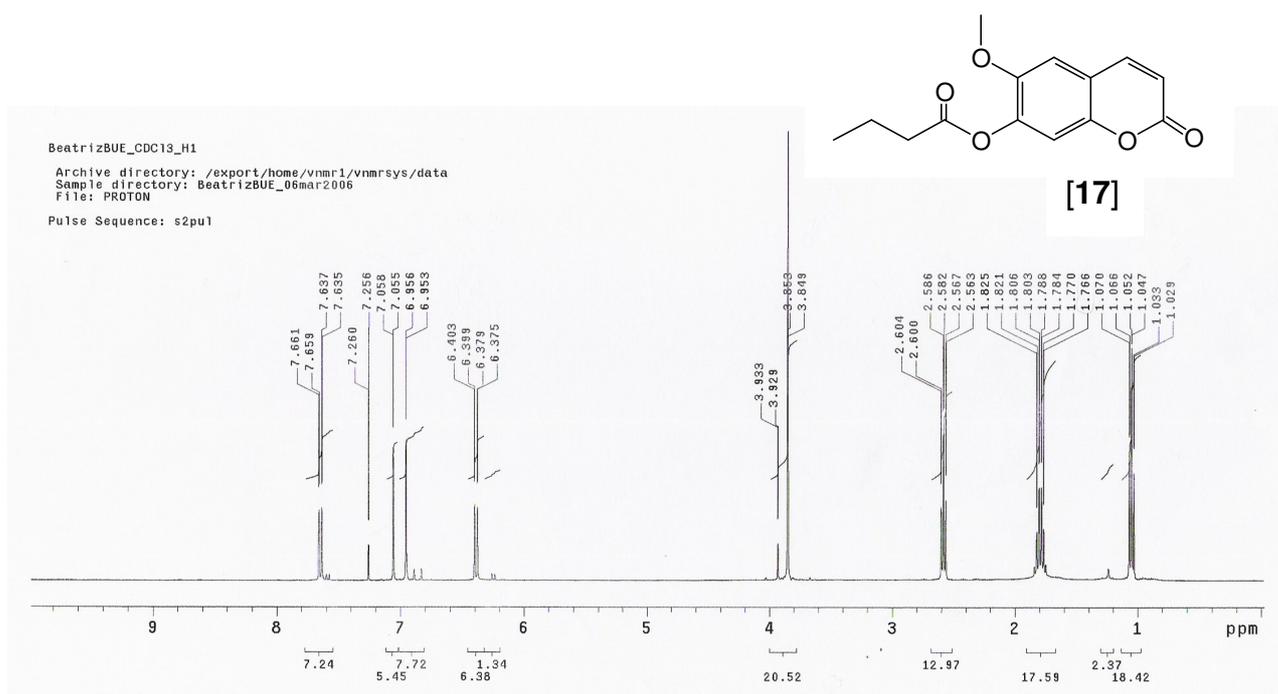


Figura 43: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) do butanoato de escopoletina [17].

Os derivados 7-acil de cadeia linear foram sintetizados para avaliar o parâmetro hidrofóbico sobre as diferentes atividades biológicas.

5.3.4- Síntese de cumarinas

Existem muitas metodologias utilizadas para a síntese de cumarinas, todas elas centradas na possibilidade da construção do anel pirona a partir de derivados benzênicos adequados. No entanto, algumas destas metodologias ganharam significativa importância, dentre elas a reação de Perkin, Pechmann, Pechmann-Duisburg, Knoevenagel, Reformatsky e Wittig (DONG et al., 2008).

O esforço para se obter uma “tecnologia limpa” tem encorajado a aplicação de novos catalisadores bem como em condições livres de solventes em algumas destas reações. A não utilização de solventes tem conduzido, em alguns casos, a uma melhora nos resultados e num procedimento sintético mais “limpo”, causando menores danos ao meio ambiente. Assim, adotando os princípios da “Química Verde”, empregamos condições livres de solventes na síntese de cumarinas.

Os compostos sintetizados neste trabalho são simples do ponto de vista da química orgânica sintética. Porém, há um interesse da indústria farmacêutica em investir na busca de moléculas pequenas e simples, com potencial terapêutico elevado e que possam ser obtidas a partir de processos rápidos, de baixo custo e sem complicações nas etapas de preparação e purificação.

Neste trabalho, duas metodologias distintas foram utilizadas para a obtenção de cumarinas: a condensação de Pechmann e a de Knoevenagel. Em ambas as reações, realizou-se a substituição de seus respectivos catalisadores por dois diferentes catalisadores sólidos em um procedimento livre de solventes.

5.3.4.1- Obtenção de cumarinas através da reação de Pechmann

A reação de Pechmann é amplamente utilizada na síntese de cumarinas, pois seu procedimento envolve materiais de partida simples, obtendo-se bons rendimentos destes compostos e com vários padrões de substituição. Para isso, diferentes fenóis são condensados com β -ceto ésteres na presença de uma grande variedade de catalisadores ácidos para se obter 4-R-cumarinas (POTDAR et al., 2005). Classicamente, a reação de Pechmann emprega H_2SO_4 como agente ciclizante, porém outros catalisadores têm sido usados nesta reação, dentre eles: P_2O_5 , $FeCl_3$, $ZnCl_3$, $POCl_3$, $AlCl_3$, HCl , ácido fosfórico, ácido trifluoracético dentre outros (MAHESWARA et al., 2006). No entanto, estes métodos não são atrativos, pois requerem um excesso de catalisador como, por exemplo, 10 - 12 equivalentes de H_2SO_4 ou 3 - 4 equivalentes de ácido trifluoracético (HEGEDÜS; HELL, 2006); além disso, estes catalisadores não podem ser recuperados e reutilizados. Em alguns casos, diversas horas ou até mesmo dias são necessários para completar a reação, além de temperaturas que podem chegar até $150^\circ C$ e de baixos rendimentos. Produtos não desejados, tais como cromonas, muitas vezes podem ser formados juntamente com as cumarinas (BOSE; RUDRADAS; BABU, 2002).

Por estas razões, várias pesquisas têm sido realizadas no intuito de encontrar uma alternativa “ambientalmente correta” para esta metodologia de síntese. Muitos sistemas de catalisadores alternativos foram empregados neste propósito, tais como: VCl_3 (cloreto de vanádio) (KUMAR et al., 2006), $TiCl_4$ (cloreto de titânio IV) (VALIZADEH; SHOCKRAVI, 2005), $ZnCl_4$ (cloreto de zircônio) (SHARMA et al., 2005), $InCl_3$ (cloreto de índio) (BOSE; RUDRADAS; BABU, 2004), $HClO_4 \cdot SiO_4$ (MAHESWARA et al., 2006), $Sm(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ (BAHEKAR; SHINDE, 2004), $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ (UPADHYAY; MISHRA; KUMAR, 2007), zeolita (HEGEDÜS; HELL, 2006), *Amberlyst* (SABOU et al., 2005), líquidos iônicos (DONG et al., 2008), dentre outros. Adicionalmente, alguns trabalhos foram realizados utilizando irradiação de microondas para acelerar a reação (SINGH et al., 2005).

O grupo de pesquisa coordenado pelo Prof. Dr. Massimo Curini, da Università degli Studi di Perugia, há mais de uma década pesquisa o emprego de catalisadores heterogêneos na síntese orgânica. Muitos trabalhos já foram realizados com esta finalidade, destacando-se aqueles que utilizam o sulfonil fosfonato de zircônio, $Zr(CH_3PO_3)_{1,2}(O_3PC_6H_4SO_3H)_{0,8}$, como catalisador ácido (ROSATI et al., 2007; CURINI et al., 2005; 2003, 2002; 2001a; 2001b; 2000; 1999; 1998; 1997; 1996; CURINI; ROSATI; COSTANTINO, 2004). Assim, dando continuidade a avaliação do emprego deste catalisador na síntese orgânica, realizou-se pela primeira vez a reação de condensação de Pechmann utilizando o $Zr(CH_3PO_3)_{1,2}(O_3PC_6H_4SO_3H)_{0,8}$. Para simplificar, o catalisador será abreviado para α -Zr-PSO₃H.

Para tal propósito, procurou-se verificar quais parâmetros poderiam comportar possíveis economias do tipo energética e de materiais, além de um melhoramento do rendimento, respeitando ao mesmo tempo o conceito já mencionado da “química verde”. Assim, para estabelecer as melhores condições de reação, diferentes concentrações de resorcinol e dos β -ceto ésteres (acetoacetato de etila, 4-cloro-acetoacetato de etila e 2-carboximetilciclohexanona) foram tratadas com diferentes quantidades do catalisador α -Zr-PSO₃H em temperatura de 80 °C, (Figura 44), sendo todas as reações monitoradas por CCD.

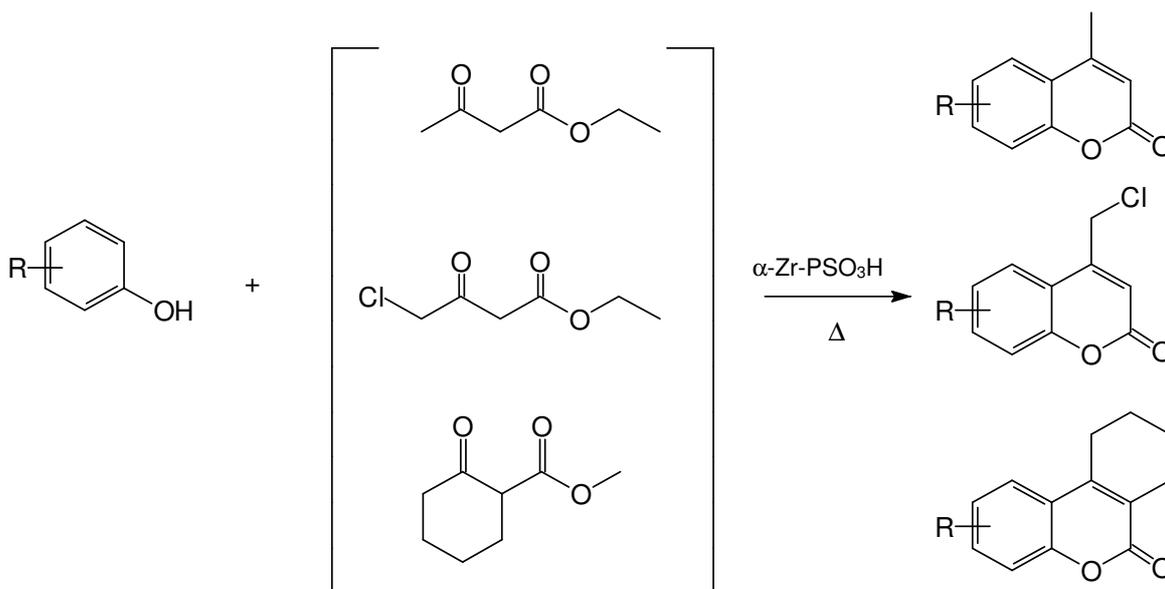


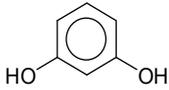
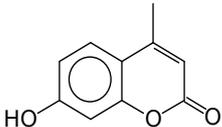
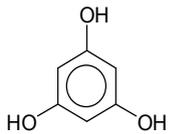
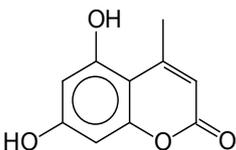
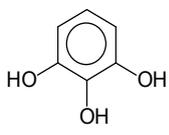
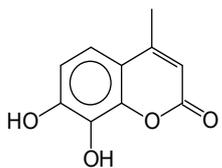
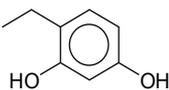
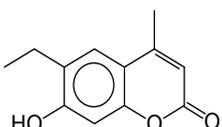
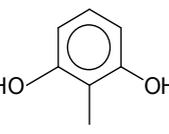
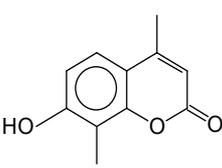
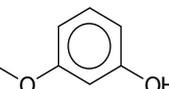
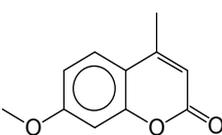
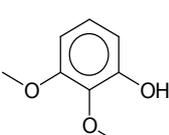
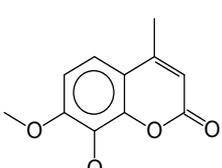
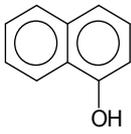
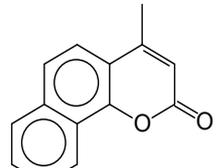
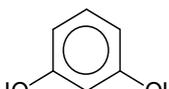
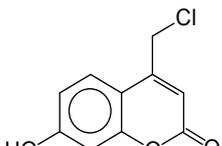
Figura 44: Esquema geral da obtenção de cumarinas através da condensação de Pechmann utilizando o α -Zr-PSO₃H como catalisador ácido em condições livres de solventes.

Através dos resultados preliminares dos testes realizados, pode-se observar que para as reações do resorcinol com 4-cloro-acetoacetato de etila e 2-carboximetilcicloexanona as quantidades foram equimolares, diferente do observado para a reação com acetoacetato de etila, em que os melhores resultados foram aqueles utilizando a proporção de 1 mol de fenol para 2 mol do β-ceto éster. Em relação a quantidade de catalisador, bons resultados foram obtidos usando a proporção de 50 mg/mol do respectivo fenol.

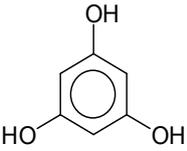
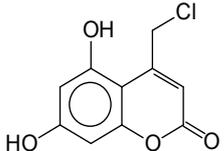
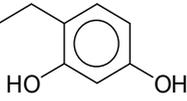
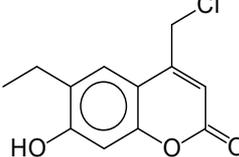
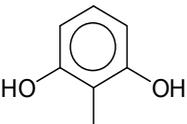
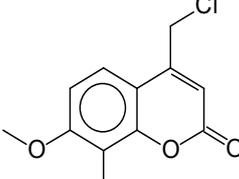
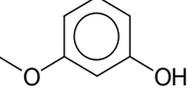
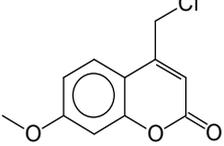
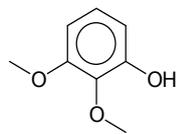
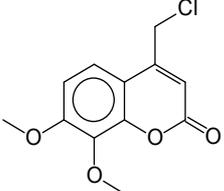
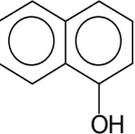
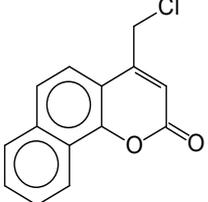
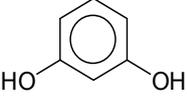
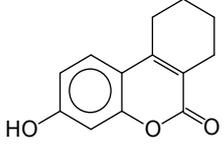
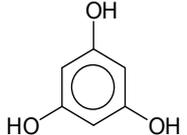
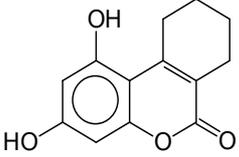
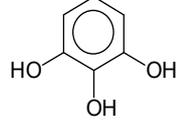
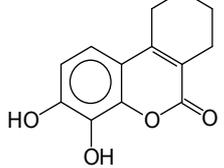
Assim, o protocolo geral para a preparação das cumarinas foi uma mistura de 1 mol do respectivo fenol, 1 mol do β-ceto éster (2 mol no caso do acetoacetato de etila) e 50 mg/mol de α-Zr-PSO₃H. A reação foi em etapa única, sob condições livres de solventes em temperatura de 80 °C. O sistema foi mantido em agitação, monitorando-se por CCD, até que todo o substrato fosse consumido.

Diferentes fenóis foram utilizados, totalizando a síntese de 22 cumarinas (Tabela 7) que foram caracterizadas pelos respectivos pontos de fusão, análises por CG-EM e RMN de ¹H.

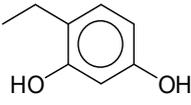
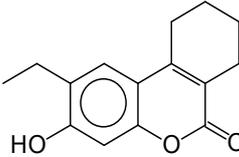
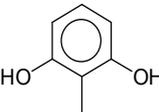
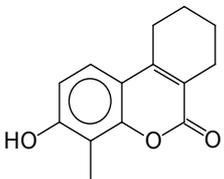
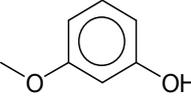
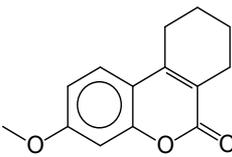
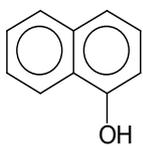
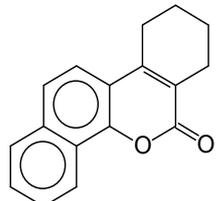
Tabela 7: Síntese de cumarinas a partir de fenóis com diferentes β -ceto ésteres catalisada pelo α -Zr-PSO₃H.

Nº.	Fenol	Produto	Tempo	Rendimento	Pf
[20]			3 h 30 min	88,3 %	185 - 187 °C
[21]			5 h 30 min	99,0 %	280 - 283 °C
[22]			7 h	81,4 %	237 - 239 °C
[23]			6 h	75,5 %	217 - 219 °C
[24]			18 h	70,0 %	242 - 244 °C
[25]			24 h	90,2 %	153 - 154 °C
[26]			30 h	10,4 %	209 - 210 °C
[27]			30 h	19,9 %	155 - 158 °C
[28]			4 h	85,5%	180 - 182 °C

Continuação da Tabela 7

[29]			7 h	88,1 %	242 - 244 °C
[30]			3 h	31,3 %	214 - 216 °C
[31]			30 h	28,0 %	284 - 286 °C
[32]			4 h 30 min	35,0 %	194 - 195 °C
[33]			30 h	7,6 %	149 - 151 °C
[34]			24 h	49,6 %	176 - 178 °C
[35]			3 h 30 min	85,8 %	245 - 246 °C
[36]			6 h	80,5 %	251 - 253 °C
[37]			3 h 30 min	59,5 %	256 - 259 °C

Continuação da Tabela 7

[38]			24 h	69,3 %	215 - 218 °C
[39]			24 h	69,3 %	242 - 245 °C
[40]			22 h	80,5 %	117 - 119 °C
[41]			30 h	2,9 %	187 - 189 °C

Dentre os inúmeros trabalhos já realizados na busca de novos catalisadores para a condensação de Pechmann, a reação clássica adotada em grande maioria é aquela em que se utiliza o resorcinol e o acetoacetato de etila. Em nosso trabalho, empregando-se a proporção de 1:2 (fenol: β -ceto éster) e 50 mg/mol do catalisador, esta reação transcorreu no tempo de 3 horas e 30 minutos, obtendo-se a 7-hidroxi-4-metilcumarina [20] com rendimento de 88,3%. Comparando-se este resultado com outros trabalhos (Tabela 8), pode-se observar que o rendimento obtido esteve dentro da média, que variou de 76 - 98%, porém o tempo da reação foi relativamente superior aos outros trabalhos. Analisando o uso dos catalisadores nestes trabalhos selecionados, pode-se perceber que a maioria deles utilizou a quantidade de 10 mol%. Em nosso trabalho, a concentração de catalisador utilizada foi 50 mg/mol, sendo quase o dobro daquela citada anteriormente. Para a reação utilizando o catalisador heterogêneo $\text{HClO}_4 \cdot \text{SiO}_2$ a quantidade relativa do mesmo foi semelhante àquela utilizada em nossas reações, porém com diferença na temperatura do sistema reacional.

Tabela 8: Comparação de algumas reações entre o resorcinol (A) e o acetoacetato de etila (B) empregando diferentes catalisadores.

[Catalisador]	A:B (mmol)	Tempo	T (°C)	Solvente	%	Ref.
Sm(NO ₃) ₃ .6H ₂ O 10 mol %	1:1	20 min	80	-	98	BAHEKAR; SHINDE, 2004
VCl ₃ 10 mol %	1:1	2 h	50-55	-	92	KUMAR et al., 2006
ZrCl ₄ 10 mol %	1:1	5 min	ta*	-	92	SHARMA et al., 2005
InCl ₃ 10 mol %	1:1	30 min	65	-	98	BOSE; RUDRADAS; BABU, 2004
TiCl ₄ 10 mmol	1:1,5	50 seg	ta*	-	97	VALIZADEH; SHOCKRAVI, 2005
HClO ₄ .SiO ₂ 50 mg	1:1,1	35 min	130	-	95	MAHESWARA et al., 2006
Amberlyst** 500 mg	1:1	2 h	100 - 120	tolueno + acetona	85 - 100	SABOU et al., 2005
Zeolite 500 mg	1:1	3 h	110	tolueno	76	HEGEDÜS; HELL, 2006
α-Zr-PSO₃H 50 mg/mol	1:2	3h 30 min	80	-	88,3	***

* ta: temperatura ambiente; **Foram utilizadas 5 tipos diferentes de Amberlyst (resina de troca iônica); *** dados obtidos neste trabalho.

O catalisador utilizado neste trabalho na obtenção de cumarinas através da condensação de Pechmann faz parte da categoria dos fosfonatos de metais de transição tetravalente (Zr), uma classe de compostos inorgânico-orgânicos muito extensa, no qual as propriedades, estrutura e emprego vem sendo estudada pelo grupo do Prof. Massimo Curini (CURINI; ROSATI; COSTANTINO, 2004). Estes sólidos apresentam uma estrutura lamelar, em que as lamelas são constituídas de um plano de átomos de zircônio ligados a um grupo tetraédrico R-PSO₃ dispostos alternativamente em cima e em baixo do plano da lamela. Uma particular atenção foi reservada aos catalisadores heterogêneos do tipo lamelar, pois se acredita que a superfície de uma lamela possa ser mais eficaz que uma superfície porosa para a atividade catalítica (CURINI et al., 2002).

Este catalisador sólido apresenta-se na forma de um pó microcristalino e satisfaz muitos dos requisitos requeridos para um catalisador heterogêneo do tipo ácido (segundo Brønsted), dentre eles:

Uma grande área superficial ($21 \text{ m}^2/\text{g}$);

Uma acidez superior, ou mesmo equiparável, àquela do ácido sulfúrico;

Grande insolubilidade no meio reacional;

Resistência química e térmica (até 180°C) (CURINI et al., 1997).

A presença do grupo funcional SO_3H , ancorado à superfície das lamelas, justifica a atividade catalítica, aumentada também pelo fato de que os grupos orgânicos, ancorados a matriz inorgânica, tornam o espaço interlamelar também acessível aos reagentes, aumentando assim a superfície catalítica (CURINI; ROSATI; COSTANTINO, 2004). A figura 45 mostra a estrutura tridimensional do sulfofenil fosfonato de zircônio.

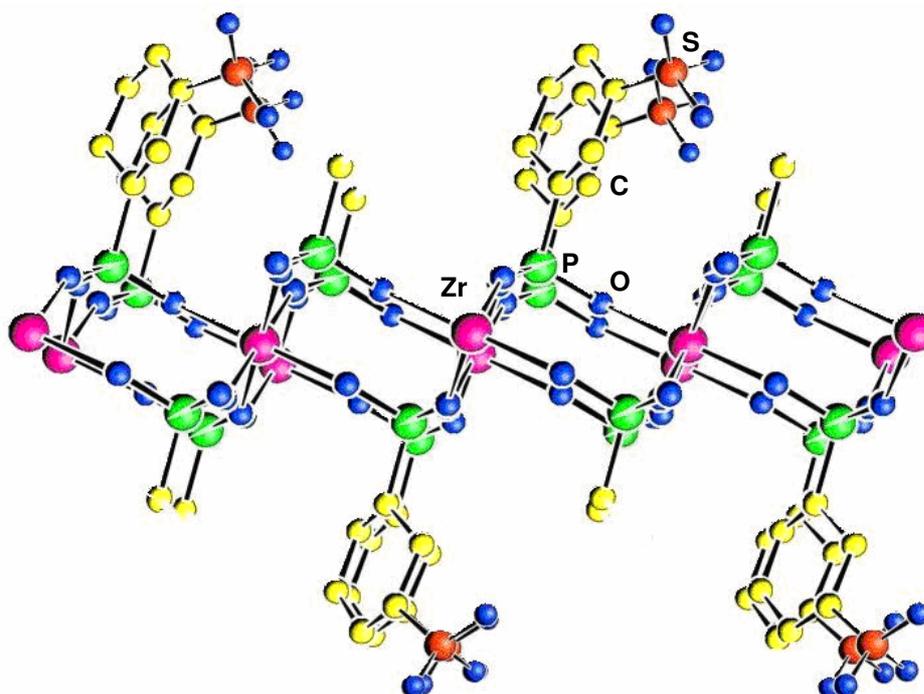


Figura 45: Estrutura do catalisador ácido $\alpha\text{-Zr}(\text{CH}_3\text{PO}_3)_{1.2}(\text{O}_3\text{PC}_6\text{H}_4\text{SO}_3\text{H})_{0.8}$.

Do ponto de vista químico, pode-se dizer que a catálise heterogênea deve algumas de suas peculiaridades, sobretudo ao fato de que as moléculas estão presentes em uma fase diferente (em geral líquida) daquela do catalisador, permitindo uma fácil recuperação dos produtos das reações e a reciclagem dos

catalisadores. Esta vantagem, unida à possibilidade de realizar reações químicas em condições brandas em relação aos métodos tradicionais e, geralmente, com bons rendimentos, boa seletividade e especificidade, rende aos processos do tipo heterogêneo uma ampla versatilidade (CURINI; ROSATII; COSTANTINO, 2004).

O emprego deste catalisador também foi utilizado para avaliar os efeitos dos substituintes na reatividade frente à reação de Pechmann. Para isso, uma grande variedade estrutural de fenóis foi utilizada. Como regra geral, substratos contendo grupos elétron-doadores na posição *para* ao sítio de substituição eletrofílica apresentaram melhores resultados em um tempo relativamente menor quando comparados a substratos com essa posição menos ativada.

Utilizando o acetoacetato de etila como β -ceto éster, obtiveram-se bons rendimentos na obtenção das cumarinas utilizando diferentes fenóis, por exemplo, floroglucinol [21] (99,0%), 3-metoxifenol [25] (90,2%). Porém, efeitos significativos dos substituintes foram observados nas reações, sendo que em muitos casos as cumarinas foram obtidas em baixos rendimentos, como por exemplo, a 7,8-dimetoxi-4-metilcumarina [26] (10,4%). Similarmente, a reação com naftol [27] necessitou um longo tempo de reação e um baixo rendimento (19,9%) devido à presença de uma fenila adicional. Assim, para muitos dos substratos, o tempo de reação foi drasticamente superior nas condições adotadas quando comparado a outros trabalhos.

5.3.4.2- Obtenção de cumarinas através da reação de Knoevenagel

Outra metodologia importante para a síntese de cumarinas é a reação de Knoevenagel, realizada através da condensação do dietilmalonato com *orto*-hidroxiarilaldeídos e catalisada por bases fracas como a piperidina (WATSON; CHRISTIANSEN, 1998). Recentemente, trabalhos relataram o uso de novos catalisadores para esta reação, tais como $ZnCl_2$, $BiCl_3$, CdI_2 , líquidos iônicos, hidrocalcitas Mg-Al (RAMANI et al., 1999) além do uso de microondas para acelerar a reação (SHANMUGASUNDARAM; MANIKANDAN; RAGHUNATHAN, 2002). Em geral, a catálise heterogênea do tipo básica tem recebido menos atenção em relação à catálise ácida (MARTINS; CARDOSO, 2006).

O grupo de pesquisa coordenado pelo grupo do Prof. Dr. Massimo Curini vem estudando o emprego de catalisadores heterogêneo básicos, dentre eles o α -

Zr(KPO₄)₂. Este catalisador já foi utilizado com sucesso na reação de Michael e de Henry (COSTANTINO et al., 1993). Assim, considerando o papel fundamental que muitas reações catalisadas por bases tem na química orgânica e na área farmacêutica, e com o objetivo de ampliar o campo de aplicação, utilizamos o α -Zr(KPO₄)₂ como catalisador básico na obtenção de cumarinas através da condensação de Knoevenagel.

Para a síntese de cumarinas, primeiramente foram avaliadas as melhores condições reacionais. Para estes testes preliminares, utilizaram-se diferentes quantidades do *o*-hidroxibenzaldeído e dietilmalonato, bem como do catalisador α -Zr(KPO₄)₂. A reação foi conduzida em temperatura de 120 °C e em condições livres de solventes, conforme o esquema mostrado na figura 46. Todas as reações foram monitoradas por CCD.

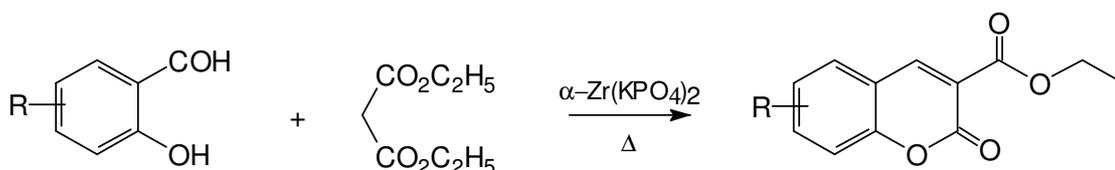
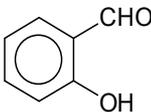
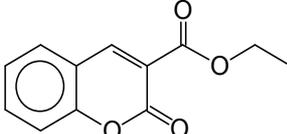
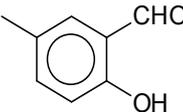
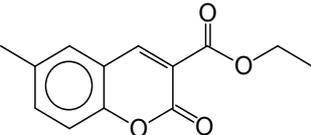
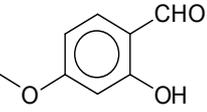
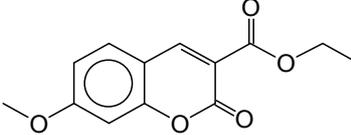
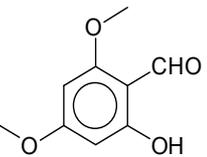
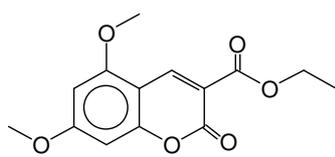
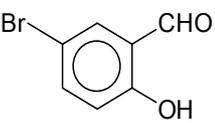
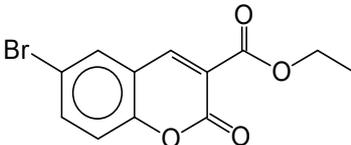
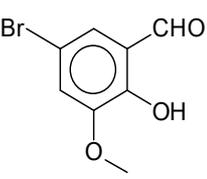
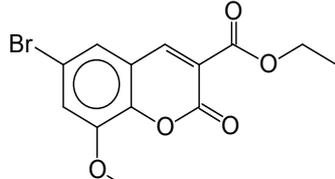
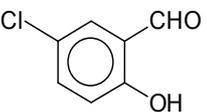
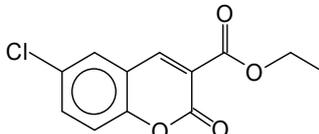


Figura 46: Esquema geral da obtenção de cumarinas através da reação de Knoevenagel utilizando o α -Zr(KPO₄)₂ como catalisador básico em condições livres de solventes.

Nesta etapa preliminar, observou-se que mesmo variando as quantidades dos reagentes bem como do catalisador, os rendimentos não foram bons. De todas as condições testadas, aquela em que se utilizavam quantidades equimolares do *o*-hidroxibenzaldeído e de dietilmalonato foi a que mostrou melhor rendimento. A quantidade de catalisador foi novamente de 50 mg/mol do respectivo salicilaldeído. Diferentes *o*-hidroxibenzaldeídos foram utilizados, somando-se a síntese de 7 cumarinas com padrão de substituição distinto no núcleo aromático (Tabela 9).

Tabela 9: Obtenção de cumarinas a partir de *o*-hidroxibenzaldeídos com dietilmalonato catalisada pelo α -Zr(KPO₄)₂.

N	Salicilaldeído	Produto	Tempo	Rendimento	Pf
[42]			25 h	42,2 %	93 - 94 °C
[43]			30 h	32,7 %	96 - 97 °C
[44]			30 h	35,0 %	117 - 119 °C
[45]			48 h	21,0 %	159 - 162 °C
[46]			24 h	69,5%	165 - 166 °C
[47]			23 h	65,7 %	157 - 159 °C
[48]			24 h	64,8 %	150 - 153 °C

Apesar da reação de Knoevenagel ser uma metodologia tradicional para obtenção de cumarinas, poucos trabalhos foram realizados com intuito de pesquisar o uso de catalisadores heterogêneos básicos. A síntese de 3-carboxietilcumarinas através da reação do dietilmalonato com diferentes *o*-hidroxibenzaldeídos empregando líquidos iônicos como catalisador mostrou

resultados que variaram de 78 – 92% de rendimento (HARJANI; NARA; SALUNKHE, 2001).

Como pode ser observado na tabela 9, os rendimentos obtidos nestas reações foram relativamente baixos (21 – 69,5%) e o tempo de reação também foi prolongado. De uma maneira geral, salicilaldeídos que possuíam grupos elétron-retiradores na posição *para* a hidroxila apresentaram maior rendimento, como pode ser observado para os compostos [46], [47] e [48]. A presença de grupos elétron-doadores nos respectivos salicilaldeídos (44 e 45) diminuiu os rendimentos, como bem como elevou o tempo de reação, fato anteriormente relatado por Harjani e colaboradores (2001).

O catalisador α -Zr(KPO₄)₂ (Figura 47) apresenta as mesmas características do α -Zr-PSO₃H, sendo um sólido lamelar, com elevada insolubilidade e boa estabilidade química e térmica. Quimicamente, este catalisador possui força básica o suficiente para interagir com grupos metileno ativados formando carbânions que irão realizar um ataque nucleofílico à uma carbonila, no caso da reação de Knoevenagel.

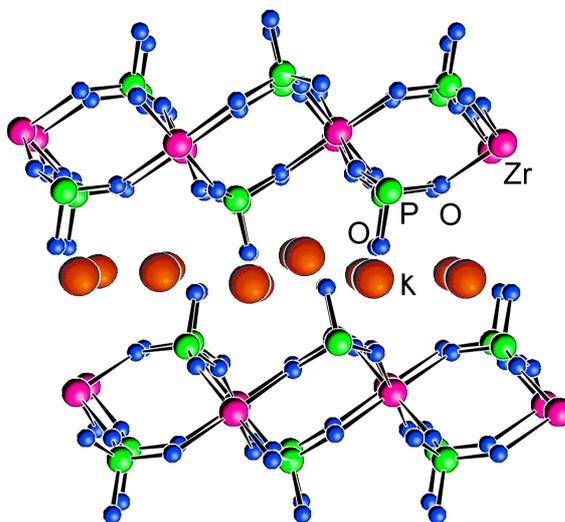


Figura 47: Estrutura tridimensional do catalisador básico α -Zr(KPO₄)₂

Atividades biológicas

Cumarinas compreendem uma grande classe de compostos encontrados em todo reino vegetal. Suas estruturas são extremamente variáveis, devido aos vários padrões de substituição em seu núcleo básico, o qual influencia diretamente

em suas propriedades biológicas. Os efeitos biológicos são diversos conforme já apresentado no item 2.3 (pg. 22).

Como um primeiro *screening* de atividade biológica das cumarinas obtidas neste trabalho, realizou-se a avaliação das atividades citotóxica e antimicrobiana.

5.3.5- Atividade citotóxica

O câncer configura-se como um grande problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. As estatísticas mundiais mostram que no ano 2000, ocorreram 5,3 milhões de novos casos de câncer em homens e 4,7 milhões em mulheres, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo (WHO, 2002). O câncer de pulmão é o mais comum no mundo, somando cerca de 1,2 milhões de novos casos anualmente, seguido pelo câncer de mama feminina, com aproximadamente 1 milhão de novos casos por ano (www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=11).

A despeito do avanço científico e tecnológico para o tratamento dos mais diversos tipos de câncer, a cada dia, novos compostos naturais ou sintéticos farmacologicamente ativos são descritos. Mesmo que a grande maioria destes compostos não se torne um fármaco eles podem ser considerados protótipos de novas entidades moleculares terapêuticamente úteis. Assim, utilizando estes compostos como ponto de partida e por meio de modificações moleculares em suas estruturas químicas, pode-se chegar a novos agentes antitumorais passíveis de utilização na quimioterapia ou quimioprevenção do câncer (LIMA NETO et al., 2006).

Entre as diversas classes de compostos descritas na literatura que apresentam atividade antitumoral, *in vitro* e *in vivo*, encontram-se as cumarinas. Vários trabalhos demonstram que esta classe de compostos, seja natural ou sintético, apresenta atividades antitumoral e antiproliferativa. Por exemplo podemos citar a cumarina *per se* e a 7-hidroxycumarina, que inibem a proliferação de determinadas linhagem celulares de câncer maligno de humanos *in vitro* (KOSTOVA, 2005) e apresentam atividade contra vários tipos de tumores em culturas de células animal (FINN et al., 2002). Estes compostos também foram utilizados em ensaios clínicos, demonstrando atividade contra câncer de próstata,

melanoma maligno e carcinoma metastático de células renais (FINN, CREAVER, EGAN, 2001).

Assim, de acordo com evidências de atividade antitumoral de cumarinas contra diversos tipos de câncer, realizaram-se estudos para avaliar o potencial citotóxico e antiproliferativo das cumarinas obtidas neste trabalho. Primeiramente, realizou-se um *screening* através do teste de letalidade de larvas de *Artemia salina*, e após esta etapa, os compostos foram submetidos à avaliação da atividade antitumoral frente a três linhagens de células tumorais: B16F10 (melanoma murino), TK10 (tumor renal) e MCF-7 (tumor de mama).

5.3.5.1- Atividade tóxica frente a larvas de *Artemia salina* Leach

O *screening* inicial da atividade citotóxica foi realizado através do bioensaio de letalidade de larvas de *Artemia salina* L. Este ensaio caracteriza-se por apresentar baixo custo, ser rápido e não exigir técnicas assépticas. *Artemia salina* é um microcrustáceo componente da fauna aquática salina e de ecossistemas marinhos, utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. (SILVA et al., 2007; PARRA et al., 2001).

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades como antifúngica, viruscida, antibacteriana, parasiticida, tripanocida, entre outras. McLaughlin e colaboradores (1991) utilizam sistematicamente este bioensaio na avaliação prévia de extratos de plantas conhecidas como antitumorais. As frações e substâncias isoladas são posteriormente testadas em diferentes culturas de células tumorais, obtendo-se uma boa correlação. O teste também pode ser utilizado para triagem de atividade antitumoral de substâncias obtidas por síntese orgânica.

As cumarinas obtidas através do isolamento, das modificações estruturais e as sintéticas foram submetidas ao teste em diferentes concentrações (200, 100, 50 e 25 µg/mL). A DL₅₀ foi calculada graficamente pela porcentagem de animais mortos em função do logaritmo da dose testada. Os compostos com DL₅₀ > 200 µg/mL foram considerados inativos e os compostos com DL₅₀ ≤ 200 µg/mL foram considerados ativos. A tabela 10 apresenta os valores de DL₅₀ expressos em µmol/mL.

Tabela 10: Dose letal (DL₅₀) das diferentes cumarinas frente a larvas de *Artemia salina*.

Cumarina	DL ₅₀	Cumarina	DL ₅₀
[7]	0,35 µmol/mL*	[28]	> 200 µg/mL
[8]	> 200 µg/mL**	[29]	> 200 µg/mL
[9]	> 200 µg/mL	[30]	> 200 µg/mL
[10]	0,31 µmol/mL	[31]	0,90 µmol/mL
[11]	> 200 µg/mL	[32]	0,90 µmol/mL
[12]	> 200 µg/mL	[33]	0,70 µmol/mL
[13]	> 200 µg/mL	[34]	> 200 µg/mL
[14]	> 200 µg/mL	[35]	> 200 µg/mL
[15]	> 200 µg/mL	[36]	0,54 µmol/mL
[16]	0,74 µmol/mL	[37]	> 200 µg/mL
[17]	> 200 µg/mL	[38]	> 200 µg/mL
[18]	> 200 µg/mL	[39]	0,51 µmol/mL
[19]	0,35 µmol/mL	[40]	> 200 µg/mL
[20]	1,24 µmol/mL	[41]	nt
[21]	nt***	[42]	> 200 µg/mL
[22]	> 200 µg/mL	[43]	0,58 µmol/mL
[23]	> 200 µg/mL	[44]	0,50 µmol/mL
[24]	> 200 µg/mL	[45]	0,61 µmol/mL
[25]	> 200 µg/mL	[46]	> 200 µg/mL
[26]	0,53 µmol/mL	[47]	> 200 µg/mL
[27]	> 200 µg/mL	[48]	> 200 µg/mL
K₂Cr₂O₇	0,084 µmol/mL		

*para os compostos ativos a DL₅₀ foi expressa em µmol/mL; ** os compostos com DL₅₀ > 200 µg/mL foram considerados inativos; *** nt: não testado.

Das 46 cumarinas testadas, apenas 13 delas exibiram atividade toxica para larvas de *Artemia salina*. A prenilocumarina [7] apresentou atividade citotóxica com uma DL₅₀ de 0,35 µmol/mL, ao contrário da escopoletina [8] que foi considerada inativa (DL₅₀ > 200 µg/mL). Este resultado indica que a presença da cadeia oxiprenílica ligada ao C-7 exerce influência na atividade citotóxica.

Dentre os derivados benzoíladados da escopoletina ([9] a [14]), somente o *p*-clorobenzoíladado de escopoletina [10] apresentou atividade citotóxica com uma DL₅₀= 0,31 µmol/mL. Os demais derivados mostraram-se inativos, sugerindo a importância do átomo de cloro nesta parte da molécula para atividade citotóxica neste modelo experimental.

Para os derivados ésteres alquílicos lineares ([15] a [19]), somente o propanoato de escopoletina [16] (DL₅₀= 0,74 µmol/mL) e o decanoato de

escopoletina [19] ($DL_{50} = 0,35 \mu\text{mol/mL}$) foram ativos e nenhuma correlação direta com a hidrofobicidade foi observada.

Analisando os resultados obtidos com as cumarinas sintéticas, observa-se que os compostos contendo dois grupos metoxi ligados ao C-7 e C-8 como na 7,8-dimetoxi-4-metilcumarina [26] e a 7,8-dimetoxi-4-clorometilencumarina [33] apresentaram DL_{50} significativa de 0,53 e 0,70 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente. A presença da metoxila também influenciou na atividade dos compostos 7-metoxi-3-carboxietilcumarina [44] e 5,7-dimetoxi-3-carboxietilcumarina [45] com DL_{50} de 0,50 e 0,61 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente (Figura 48). De maneira geral, estes compostos demonstraram maior atividade quando comparado àqueles que apresentam hidroxilas ligadas nas mesmas posições, como nas cumarinas [20] ($DL_{50} = 1,24 \mu\text{mol/mL}$), [22] ($DL_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$) e [28] ($DL_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$).

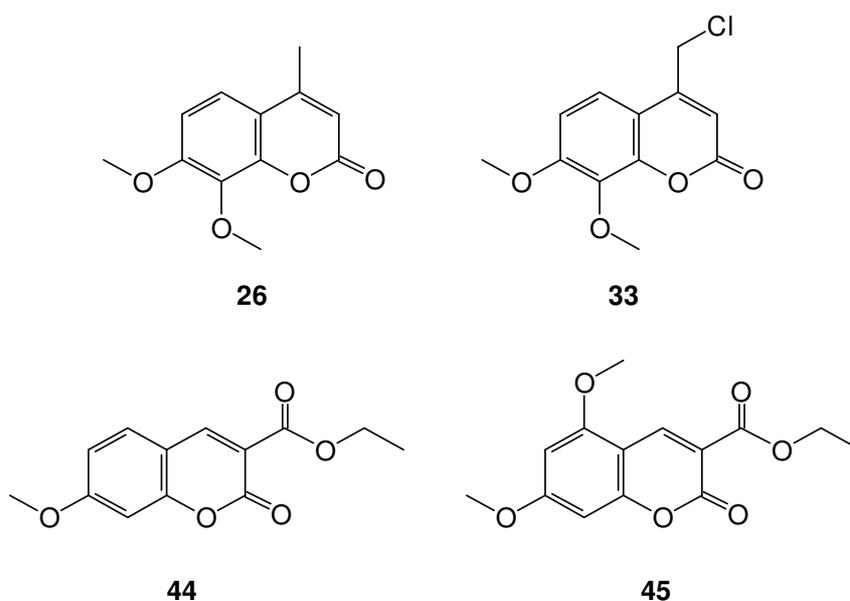


Figura 48: Principais cumarinas com atividade citotóxica frente a larvas de *Artemia salina*.

Analisando os efeitos da 7-hidroxi-8-metil-4-metilcumarina [24], 7-hidroxi-8-metil-4-clorometilencumarina [31] e da 7-hidroxi-8-metil-3,4-cicloexenocumarina [39], pode-se observar que a mudança no substituinte ligado ao C-4 afetou diretamente a atividade citotóxica, com variações na DL_{50} ($> 200 \mu\text{g/mL}$, 0,90 $\mu\text{mol/mL}$, 0,51 $\mu\text{mol/mL}$ respectivamente).

Os dados obtidos no *screening* inicial da atividade citotóxica demonstraram que apesar das cumarinas apresentarem semelhanças estruturais, pequenas modificações exerceram efeitos significativos na atividade estudada.

5.3.5.2- Ensaio de viabilidade de células tumorais

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (Inca), estima-se que, no Brasil, para 2008 são esperados 2.950/100.000 novos casos de melanoma maligno para o sexo masculino e 2.970/100.000 no sexo feminino, sendo que a maior incidência será em Santa Catarina, com uma taxa estimada de 8,61 novos casos para 100.000 homens e 8,08 novos casos para 100.000 mulheres (www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2).

O melanoma maligno origina nos melanócitos, células que produzem a melanina, responsáveis pela coloração da pele, cabelos e olhos. A remoção cirúrgica continua ser a principal forma de tratamento para a doença localizada, já a radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio do câncer. Quando há metástase, o melanoma é incurável na maioria dos casos (SILVA et al., 2003).

A cumarina *per se* foi avaliada clinicamente como um agente capaz de prevenir a recorrência do melanoma maligno. Esta ação foi principalmente relacionada com a habilidade da cumarina em mobilizar o sistema imune (EGAN et al, 1997). Finn e colaboradores (2001) compararam a capacidade antiproliferativa de uma série de cumarinas naturais e sintéticas contra uma linhagem celular de melanócitos malignos, demonstrando que o tratamento com cumarinas nitradas e hidroxiladas, no anel aromático, causou uma significativa redução na viabilidade celular.

Assim, de acordo com as evidências de atividade antitumoral das cumarinas contra o melanoma maligno, avaliou-se o potencial citotóxico *in vitro* de todas as cumarinas obtidas previamente, utilizando uma linhagem celular de melanoma murino (B16F10) através do ensaio de redução do MTT. Este teste está baseado na redução do sal de tetrazólio (solúvel) pelas mitocôndrias de células viáveis. O produto formado, formasana (insolúvel), é então dissolvido em DMSO e mensurado espectrofotometricamente a 570 nm. A quantidade de formasana é proporcional ao número de células viáveis.

Os resultados da atividade citotóxica das cumarinas, avaliadas na concentração de 50 µM, estão apresentados na tabela 11.

Tabela 11: Efeito das cumarinas (50 µM) sobre a viabilidade de células de melanoma murino (B16F10) pelo teste de redução do MTT.

Cumarina	% viabilidade celular	Cumarina	% viabilidade celular
[7]	97,82	[28]	14,46
[8]	103,46	[29]	nt
[9]	nt*	[30]	13,84
[10]	85,86	[31]	nt
[11]	nt	[32]	14,18
[12]	nt	[33]	nt
[13]	70,38	[34]	14,56
[14]	86,05	[35]	nt
[15]	96,28	[36]	nt
[16]	50,45	[37]	31,42
[17]	52,94	[38]	nt
[18]	nt	[39]	68,62
[19]	73,13	[40]	82,73
[20]	98,08	[41]	nt
[21]	64,99	[42]	63,52
[22]	nt	[43]	76,46
[23]	nt	[44]	nt
[24]	90,88	[45]	84,30
[25]	92,17	[46]	78,65
[26]	101,81	[47]	nt
[27]	nt	[48]	71,99
Controle	100%		

nt*: não testado

Os resultados obtidos indicam que de todas as cumarinas testadas, duas delas (**8** e **26**) não apresentaram efeitos citotóxicos frente à linhagem celular de melanoma murino. O restante dos compostos produziu efeitos com variação na taxa de viabilidade celular de 13,84 - 98,08%.

Um dos objetivos principais deste estudo foi, além de avaliar a atividade citotóxica, explorar a possibilidade de existência de uma relação estrutura *versus* citotoxicidade. Assim, os resultados presentes na tabela 11 indicaram que o número, a posição relativa e a natureza dos substituintes no núcleo cumarínico afetaram diretamente a capacidade citotóxica de cada cumarina. Isso é evidente quando comparamos a porcentagem de viabilidade celular obtida com as cumarinas **[25]** (92,17%), **[28]** (14,46%) e **[40]** (82,73%), que possuem como diferença estrutural o substituinte ligado ao C-4, sendo respectivamente o 4-

clorometileno, 3,4-cicloexeno e 4-metil. Da mesma maneira, quando comparamos a atividade de cumarinas com o mesmo substituinte em C-4 (neste caso o 3,4-cicloexeno), mas com um distinto padrão de substituição no anel aromático, como nos compostos [37] (7,8-diidroxi), [39] (7-hidroxi-8-metil) e [40] (7-metoxi), os resultados variaram significativamente, sendo o valor da viabilidade celular respectivamente de 31,42%, 68,62% e 82,73%.

Kolodziej e colaboradores (1997) demonstraram que a citotoxicidade das cumarinas é aumentada quando dois ou mais substituintes polares são posicionados na região aromática do núcleo cumarínico, principalmente quando ligados aos carbonos 6,7 ou 7,8. Em nosso trabalho, observou-se que embora algumas cumarinas cumpram o pré-requisito de possuir substituintes ligados a estes carbonos, a natureza do substituinte é determinante para o potencial citotóxico de cada composto. Por exemplo, a 7-metoxi-4-metilcumarina [25] exibe uma taxa de viabilidade celular de 92,17%; quando o hidrogênio do C-8 é substituído por outro grupamento metoxi, como na 7,8-dimetoxi-4-metilcumarina [26], foi constatado perda total de atividade. Em contrapartida, se compararmos o efeito da 7-hidroxi-4-metilcumarina [20] (98,08%) com a 5,7-diidroxi-4-metilcumarina [21] (64,99%) podemos verificar que com a inserção de uma hidroxila ao C-5 o composto exibe um aumento da potência, observado através da diminuição da viabilidade celular.

Além disso, foi possível observar em nossos resultados que a atividade citotóxica também sofreu efeito pelo padrão de substituição no C-4. Cumarinas com o substituinte 4-clorometileno apresentaram atividade superior quando comparadas com os derivados 4-metil e 3,4-cicloexeno. Isso foi evidente a partir dos valores da porcentagem de viabilidade celular obtidos para a 7-hidroxi-4-clorometilenocumarina [28] (14,46%), 7-hidroxi-6-etil-4-clorometilenocumarina [30] (13,84%), 7-metoxi-4-clorometilenocumarina [32] (14,18%) e 7,8-benzo-4-clorometilenocumarina [34] (14,56%), sendo os compostos mais ativos contra a linhagem celular testada. Para estes compostos determinou-se a IC₅₀, conforme apresentado na figura 49.

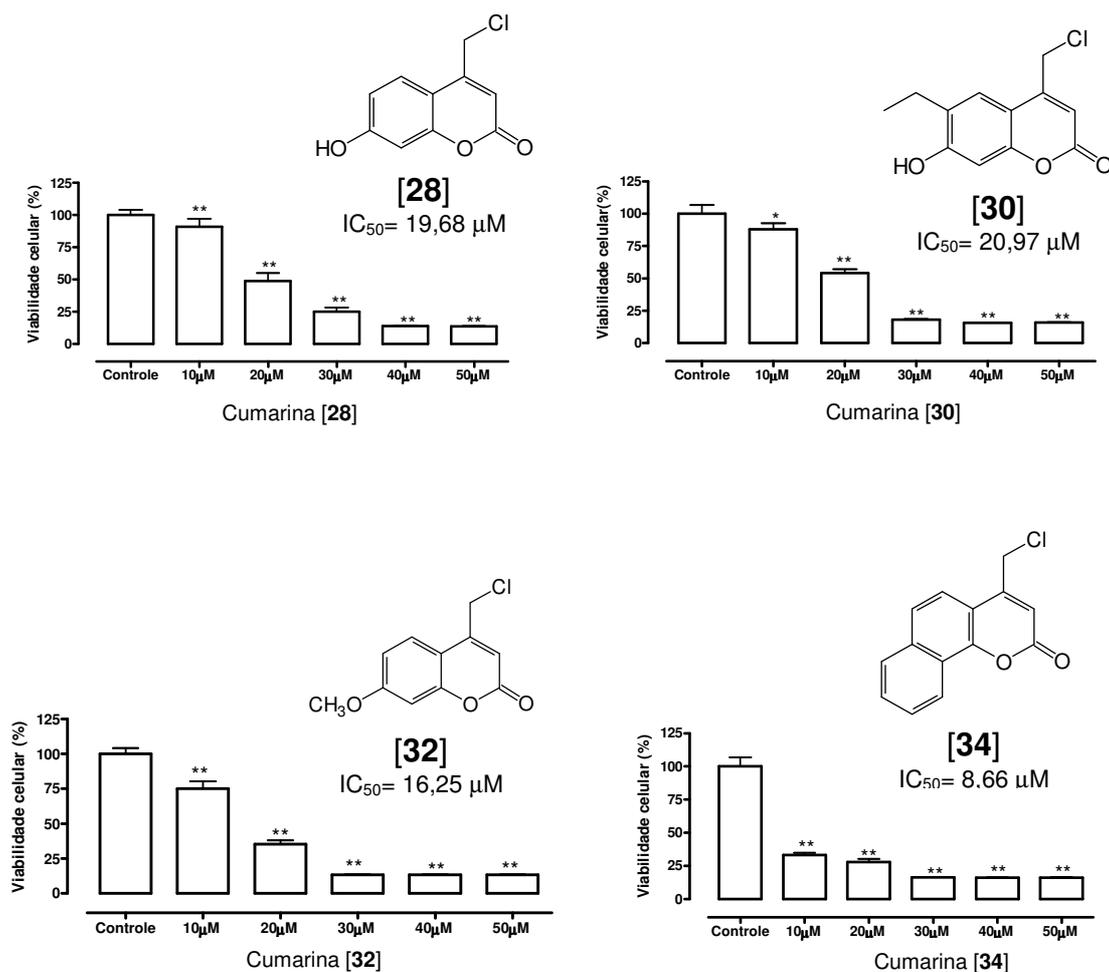


Figura 49: Efeito das cumarinas [28], [30], [32] e [34] (10 – 50 μM) sobre a viabilidade de células de melanoma murino (B16F10) pelo teste de redução do MTT. * $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$.

Observa-se uma aparente tendência de aumento da atividade citotóxica com aumento da hidrofobicidade em C-7. O composto [28], com um grupo OH em C-7, apresentou uma IC_{50} de 19,68 μM , substituindo este grupo por uma OCH_3 (composto 32) verifica-se um aumento na potência citotóxica ($IC_{50} = 16,25 \mu M$). No composto [34], que contém um substituinte 7,8-benzo, observa-se um aumento na atividade contra células de melanoma murino, com IC_{50} de 8,66 μM .

De acordo ainda com a figura 49, o efeito citotóxico para esta série de cumarinas mostrou não ser dose-dependente, não havendo aumento da toxicidade quando as células foram expostas a concentrações maiores que 40 μM .

5.3.5.3- Ensaio de atividade antiproliferativa de células tumorais

- **Células de câncer de mama**

Em virtude de ser uma das mais importantes causas de morte em mulheres, o câncer da mama é uma das neoplasias mais extensivamente estudadas. Ocorre em ambos os sexos, mas com uma prevalência 100 vezes maior nas mulheres sendo que no Brasil é o câncer que mais causa mortes nesta população (<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=mapa.asp&ID=13>).

Recentemente, alguns trabalhos relataram promissoras propriedades de cumarinas sintéticas contra a proliferação de células carcinoma mamário MCF-7 (JACQUOT et al., 2007) e interessante atividade antioxidante e estrogênica, com efeitos em células HepG2 e MCF-7 respectivamente (REFOUVELE et al., 2004; JACQUOT et al., 2001). A psoralidina, um análogo do coumestrol, isolado das sementes de *Psoralea coryfolia* L., também demonstrou importante ação citotóxica contra células MCF-7, com uma IC₅₀ de 0,4 µg/mL (KOSTOVA, 2005).

De acordo com os dados expostos e com a possibilidade das cumarinas apresentarem atividade contra linhagens celulares de câncer de mama, submetemos as cumarinas obtidas neste trabalho a testes de atividade antiproliferativa contra a linhagem de células de tumor de mama MCF-7 através do método da sulforrodamina. Neste teste, o parâmetro utilizado para o cálculo da atividade foi a porcentagem de inibição do crescimento. Uma classificação da atividade foi realizada, onde a inibição < 100% significa que o composto é citostático e quando a inibição é > 100% significa que o composto além de inibir o crescimento é considerado citocida. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50%. Os resultados obtidos neste estudo são mostrados na tabela 12.

Tabela 12: Atividade antiproliferativa das cumarinas (20 µg/mL) frente a linhagem celular de câncer de mama (MCF-7).

Cumarina	Atividade	% inibição	Cumarina	Atividade	% inibição
[7]	nt*	nt	[28]	citostático	31
[8]	citostático	18	[29]	nt	nt
[9]	nt	nt	[30]	citostático	25
[10]	citostático	28	[31]	citocida	101
[11]	nt	nt	[32]	citostático	73
[12]	nt	nt	[33]	nt	nt
[13]	nt	nt	[34]	citostático	78
[14]	citostático	11	[35]	citostático	6
[15]	citostático	29	[36]	citostático	18
[16]	citostático	19	[37]	nt	nt
[17]	citostático	20	[38]	citostático	26
[18]	nt	nt	[39]	citostático	24
[19]	nt	nt	[40]	citostático	28
[20]	citostático	20	[41]	nt	nt
[21]	nt	nt	[42]	citostático	0
[22]	citostático	35	[43]	citostático	15
[23]	citostático	18	[44]	citostático	11
[24]	citostático	10	[45]	citostático	6
[25]	Citostático	24	[46]	citostático	20
[26]	citostático	29	[47]	citostático	12
[27]	nt	nt	[48]	citostático	12
Etoposídeo	citostático	89	DMSO	estimula	0
Colchicina	citostático	81			

nt*: não testado

Avaliando o perfil de atividade foi possível observar que apesar de muitas cumarinas apresentarem inibição da proliferação celular na concentração testada, apenas os compostos [31] (7-hidroxi-8-metil-4-clorometilenocumarina), [32] (7-metoxi-4-clorometilenocumarina) e [34] (7,8-benzo-4-clorometilenocumarina) foram considerados ativos (Figura 50). Aqui também foi observado que a posição, o grau e a natureza da substituição no núcleo cumarínico está diretamente relacionada com a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais, sugerindo a mesma tendência já detectada para a viabilidade celular contra a linhagem celular de melanoma murino (B16F10).

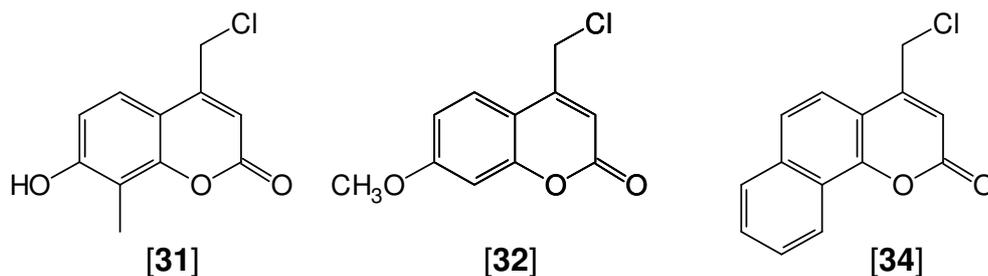


Figura 50: Principais cumarinas com atividade antiproliferativa frente a linhagem de células de carcinoma mamário MCF-7.

Analisando-se o efeito dos compostos [22] (7,8-diidroxi-4-metilcumarina), [26] (7,8-dimetoxi-4-metilcumarina) e [24] (7-hidroxi-8-metil-4-metilcumarina), pode-se observar que o padrão de substituição no anel aromático das cumarinas exerceu significativo efeito na atividade. Para o composto [22], que apresenta dois OH ligados em C-7 e C-8, a atividade inibitória foi de 35%. Substituindo-se essas duas hidroxilas por duas metoxilas, como no composto [26], observou-se uma redução da potência inibitória para 29%. E ainda, com a substituição do OH ligado ao C-8 por um grupamento metila, como no composto [24], ocorreu uma redução ainda maior na atividade para 10%.

A diferença na atividade foi mais evidente quando comparamos as cumarinas com o mesmo padrão de substituição no anel aromático e diferentes substituintes ligados ao C-4. Avaliando-se o perfil de atividades dos compostos [24] (7-hidroxi-8-metil-4-metilcumarina), [31] (7-hidroxi-8-metil-4-clorometilenocumarina) e [39] (7-hidroxi-8-metil-4,3-cicloexenocumarina), pode-se observar que a potência inibitória foi diversa, sendo respectivamente 10%, 101% e 24%. Através destes resultados observou-se que o maior efeito foi para o composto que apresenta o grupo CH_2Cl ligado ao C-4. Porém, este efeito não foi tão evidente para os compostos [28] (7-hidroxi-4-clorometilenocumarina) e [30] (6-etil-7-hidroxi-4-clorometilenocumarina), que apresentaram ação inibitória de 31 e 25% respectivamente.

- **Células de câncer renal**

Desde o final dos anos 1980', alguns estudos *in vivo* investigaram o possível uso da cumarina no tratamento de carcinoma de células renais. Os efeitos *in vitro* no crescimento de linhagens celulares de carcinoma renal

mostraram que a cumarina e a 7-hidroxicumarina são potentes agentes citotóxicos e citostáticos (FINN et al., 2001).

De acordo com estes resultados, avaliou-se a atividade antiproliferativa das cumarinas obtidas previamente utilizando uma linhagem celular de tumor renal (TK10) através do método da sulfodorramina. Neste teste, o parâmetro utilizado para o cálculo da atividade foi a porcentagem de inibição do crescimento, sendo a classificação adotada semelhante à descrita anteriormente para células MCF-7. As amostras foram consideradas ativas quando apresentaram inibição de crescimento maior que 50%. Os resultados obtidos são mostrados na tabela 13.

Tabela 13: Atividade antiproliferativa das cumarinas (20 µg/mL) frente a linhagem celular de câncer de rim (TK10).

Cumarina	Atividade	% inibição	Cumarina	Atividade	% inibição
[7]	nt*	nt	[28]	estimula	0
[8]	estimula	0	[29]	nt	nt
[9]	nt	nt	[30]	estimula	0
[10]	estimula	0	[31]	citostático	1
[11]	nt	nt	[32]	citostático	30
[12]	nt	nt	[33]	nt	nt
[13]	nt	nt	[34]	citostático	11
[14]	estimula	0	[35]	estimula	0
[15]	estimula	0	[36]	estimula	0
[16]	estimula	0	[37]	nt	nt
[17]	estimula	0	[38]	estimula	0
[18]	nt	nt	[39]	estimula	0
[19]	nt	nt	[40]	estimula	0
[20]	estimula	0	[41]	nt	nt
[21]	nt	nt	[42]	estimula	0
[22]	estimula	0	[43]	estimula	0
[23]	estimula	0	[44]	estimula	0
[24]	estimula	0	[45]	estimula	0
[25]	estimula	0	[46]	estimula	0
[26]	estimula	0	[47]	estimula	0
[27]	nt	nt	[48]	estimula	0
Colchicina	citostático	76	DMSO	estimula	0

nt*: não testado

Como pode ser observado na tabela 13, somente o composto [32] (7-metoxi-4-clorometilenocumarina) apresentou atividade citotóxica frente a células de câncer renal, porém abaixo de 50%. Este composto já havia apresentado atividade contra linhagens celulares de melanoma murino e de câncer de mama.

Apesar do composto [32] (7-metoxi-4-clorometilenocumarina) ter apresentado uma atividade citostática contra a linhagem celular de câncer renal, os resultados obtidos até o momento não foram promissores, considerando que a inibição máxima do crescimento foi de apenas 31%. Porém, este dado quando analisado em conjunto com os demais resultados obtidos, torna-se importante devido à evidência de que a presença do grupamento clorometileno em C-4 é de fundamental importância para atividade antineoplásica.

5.3.6- Atividade antimicrobiana

5.3.6.1- Atividade antibacteriana

A resistência bacteriana está se tornando um sério problema de saúde pública, sendo citada para quase todos os antibacterianos disponíveis (SCHAECHTER et al., 2002). A indústria farmacêutica e as companhias de biotecnologia estão respondendo à ameaça da resistência antibiótica com esforços na descoberta de novos antibacterianos. Estratégias em curto prazo estão focadas na bioprospecção de novos agentes ativos contra microrganismos multirresistentes específicos e, em longo prazo, o uso de técnicas de seqüenciamento genômico direcionado para a descoberta de novos agentes ativos (BAX; MULLAN; VERHOEF, 2000).

Neste contexto, esta investigação objetivou avaliar o potencial antibacteriano das cumarinas obtidas no fracionamento, seus derivados estruturais bem como as obtidas por síntese contra as espécies *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA), utilizando o método de microdiluição.

A CIM (Concentração Inibitória Mínima) foi considerada como a menor concentração da substância que inibiu o crescimento bacteriano após incubação. Os compostos em que os valores da CIM ficaram acima de 3,0 µmol/mL foram considerados inativos. Os compostos considerados ativos apresentaram $CIM \leq 3,0$ µmol/mL, sendo os resultados mais promissores aqueles que apresentam $CIM < 1,0$ µmol/mL. A tabela 14 apresenta as CIM obtidas (µmol/mL).

Tabela 14: Atividade antibacteriana das cumarinas expressa com CIM ($\mu\text{mol/mL}$).

Cumarina	Microorganismos CIM ($\mu\text{mol/mL}$)			
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA***
[7]	nt*	7,69	7,69	nt
[8]	5,20	5,20	5,20	nt
[9]	0,93	0,93	1,87	nt
[10]	0,93	0,93	1,87	nt
[11]	0,43	0,43	0,86	nt
[12]	0,96	0,96	1,92	nt
[13]	0,55	0,55	1,11	nt
[14]	1,32	1,32	2,64	nt
[15]	1,27	1,27	2,55	nt
[16]	2,02	2,02	4,04	nt
[17]	1,25	1,25	2,50	nt
[18]	1,27	1,27	2,54	nt
[19]	1,36	1,36	2,72	nt
[20]	3,75	3,75	7,50	7,50
[21]	1,70	1,70	1,70	13,60
[22]	3,17	6,35	12,70	12,70
[23]	3,33	6,66	13,33	13,33
[24]	3,21	25,78	12,89	12,89
[25]	3,68	7,36	14,73	14,73
[26]	na**	na	na	nt
[27]	2,85	5,71	5,71	11,42
[28]	1,49	2,98	1,49	0,74
[29]	na	6,07	12,14	nt
[30]	2,83	15,67	11,35	nt
[31]	2,94	1,42	0,71	0,36
[32]	2,97	5,94	11,89	nt
[33]	na	na	na	nt
[34]	2,66	5,32	10,65	nt
[35]	2,82	5,64	2,82	2,82
[36]	2,84	5,68	5,68	nt
[37]	2,75	2,75	0,68	0,68
[38]	2,70	5,40	10,80	nt
[39]	2,95	5,91	11,82	nt
[40]	5,43	5,43	10,86	nt
[41]	1,56	3,13	6,27	nt
[42]	3,02	6,04	12,08	nt
[43]	2,79	5,58	11,17	nt
[44]	3,36	6,72	13,44	nt
[45]	4,96	4,96	9,92	nt
[46]	2,30	4,60	9,20	nt
[47]	2,39	9,57	19,14	nt
[48]	2,47	9,91	9,91	nt
Gentamicina -	0,27 $\mu\text{g/mL}$	2 $\mu\text{g/mL}$	0,54 $\mu\text{g/mL}$	>0,14 mg/mL

nt*: não testado; na**: não ativo; *** MRSA: *S. aureus* metilicina-resistente.

Entre as 42 cumarinas testadas, os melhores resultados foram obtidos principalmente contra *P. aeruginosa* e MRSA sendo apenas a 7,8-dimetoxi-4-metilcumarina [26] e 7,8-dimetoxi-4-clorometilenocumarina [33] consideradas inativas. A bactéria Gram negativa *P. aeruginosa* foi a espécie mais sensível frente aos compostos testados. Esta observação contraria o comumente descrito na literatura, em que as bactérias Gram positivas apresentam maior sensibilidade devido as suas diferenças morfológicas em relação às Gram negativas. Bactérias Gram negativas possuem do lado externo uma membrana fosfolipídica que carrega lipopolissacarídeos fazendo com que a parede celular seja impermeável a solutos mais lipofílicos (SALVADOR et al., 2004).

Os derivados benzoíladados da escopoletina exibiram importante atividade antibacteriana, principalmente contra as espécies Gram negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*. O derivado *p*-bromobenzoílate de escopoletina [11] foi o composto mais ativo desta série, com uma CIM de 0,43 µmol/mL para as duas bactérias Gram negativas, além da inibição do crescimento da Gram positiva *S. aureus* (CIM= 0,86 µmol/mL). Desta série de compostos, apenas o derivado *p*-metoxibenzoílate de escopoletina [14] apresentou atividade moderada, com CIM entre 1,32 – 2,64 µmol/mL. Estes dados sugerem que a introdução de grupamentos elétron-retiradores na posição *para* da benzoato de escopoletina [9] favorece a atividade antibacteriana quando comparado a substituintes doadores de densidade eletrônica, como no composto [14]. Além disso, a presença de substituintes volumosos na posição *para*, como no *p*-bromobenzoílate de escopoletina [11], parece ter influência na atividade.

Para os ésteres lineares derivados da escopoletina, os melhores resultados foram novamente contra bactérias Gram negativas, sendo observado que o tamanho da cadeia alquílica não influenciou na atividade antibacteriana, pois a CIM para a acetil escopoletina [15] (1,27 µmol/mL) foi muito semelhante aquela observada para o decanoato de escopoletina [19] (1,36 µmol/mL).

Os compostos [20] – [27] (cumarinas com 4-metil) não apresentaram atividade antibacteriana importante tanto para bactérias Gram negativas e Gram positivas.

A introdução de um cloro ligado ao 4-metil do composto [20], como no composto [28] (7-hidroxi-4-clorometilenocumarina), conferiu a molécula um

incremento na atividade antimicrobiana, principalmente contra MRSA (CIM= 0,74 $\mu\text{mol/mL}$). A inclusão de um radical menos polar no C-8 do composto [28], resultando na 7-hidroxi-8-metil-4-clorometilenocumarina [31], confere ao composto um acréscimo na atividade antimicrobiana, com uma CIM de 0,71 e 0,36 $\mu\text{mol/mL}$ para *S. aureus* e MRSA respectivamente.

Na 7,8-diidroxi-3,4-cicloexenocumarina [37], a presença de hidroxilas nas posições C-7 e C-8, pode ter facilitado a passagem da substância através do peptidoglicano, aumentando a atividade (CIM= 0,68 $\mu\text{mol/mL}$) para as bactérias gram positivas (*S. aureus* e MRSA) quando comparados ao composto com apenas uma hidroxila ligada em C-7 (7-diidroxi-3,4-cicloexenocumarina) [35] que apresentou CIM= 2,82 $\mu\text{mol/mL}$ para as mesmas bactérias.

Estes resultados são muito interessantes, pois a bactéria MRSA é uma variação resistente da espécie *S. aureus*, sendo uma das principais espécies causadoras de infecções hospitalares em todo mundo (YASUNAKA et al., 2005).

5.3.6.2- Atividade antifúngica

Recentemente, infecções fúngicas têm emergido como uma das principais causas de doenças e mortalidade principalmente devido ao crescimento da população de imunocomprometidos tais como pacientes com HIV, recebendo quimioterapia, tratados com fármacos imunossupressores, submetidos a tratamento prolongado com corticosteróides e ainda devido ao uso indiscriminado de antibióticos (NAM et al., 2004).

Produtos naturais podem ser uma nova fonte de agentes antimicrobianos, possivelmente com novos mecanismos de ação. Substâncias que podem inibir ou o crescimento dos patógenos ou matá-los tendo pouca ou nenhuma toxicidade às células hospedeiras são considerados bons candidatos ao desenvolvimento de fármacos antifúngicos (MONTHANA; LINDEQUIST, 2005).

Neste trabalho, as cumarinas isoladas da espécie *P. sabulosa*, seus derivados bem como aquelas obtidas por síntese foram avaliadas quanto ao seu potencial antifúngico contra as espécies *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* através do método de microdiluição.

Os resultados obtidos revelaram que apenas quatro cumarinas apresentaram alguma atividade antifúngica com CIM $\leq 125 \mu\text{g/mL}$, são elas: 6-

metoxi-7-preniloxicumarina [7], hexanoato de escopoletina [18], 7,8-dimetoxi-4-clorometilenocumarina [33] e 3-carboxietilcumarina [42].

Em estudo realizado com cumarinas naturais, observou-se que um grupo hidroxila ligado ao anel aromático e/ou um grupo funcional oxigenado extra (éter ou éster) ligado ao C-6 ou C-7 são necessários para a atividade antifúngica (SARDARI et al., 1999). Além disso, derivados alquilados da 7-hidroxycumarina podem mostrar propriedades antifúngicas e antibacterianas (SARDARI et al., 1999). Apesar de muitas cumarinas estudadas neste trabalho apresentarem estes grupos funcionais necessários a atividade, a maioria dos compostos aqui testados apresentaram CIM superior a 500 µg/mL.

5.4- Avaliação do potencial antioxidante do extrato e frações de *P. sabulosa* e análise dos constituintes fenólicos

Os efeitos de espécies oxidantes sobre o organismo tornaram-se alvo de interesse e intensa investigação científica, uma vez que exercem um papel importante em doenças graves, como distúrbios neurodegenerativos, câncer, cirrose hepática, aterosclerose, catarata, inflamação e diabetes (LIU et al., 2008).

Espécies reativas de oxigênio (EROs) na forma de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^{\bullet}) são subprodutos naturais do nosso corpo. Eles são perigosos, pois quando presentes em excesso atacam moléculas biológicas tais como lipídios, proteínas, enzimas, DNA e RNA, conduzindo a injúria celular ou tecidual (AMAROWICZ et al., 2004). Evidências epidemiológicas indicam que o consumo de alimentos que contenham antioxidantes naturais como flavonóides e outros polifenólicos é vantajoso para nossa saúde (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Além disso, muitas das funções biológicas, tais como atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antienvhecimento, dentre outras, são originadas a partir desta propriedade.

Muitas pesquisas vêm sendo realizadas com vistas à caracterização do potencial antioxidante de muitas plantas. No entanto, poucas espécies do gênero *Polygala* tiveram seu potencial avaliado. Assim, a última parte deste trabalho realizado com a espécie *P. sabulosa* refere-se à avaliação do seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante do extrato e frações foi avaliada através de dois métodos distintos: ensaio com o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-

hidrazila) e a medida do potencial redutor. Primeiramente fez-se a avaliação do conteúdo fenólico bem como de flavonóides totais para correlação destes resultados com aqueles da atividade antioxidante.

5.4.1- Determinação do teor de compostos fenólicos totais

A determinação do teor de fenóis totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu (TRUONG et al., 2007). Este método baseia-se na formação de um complexo inorgânico insolúvel, de estrutura ainda não esclarecida, formado quando o íon fenolato é oxidado em condições básicas, reduzindo o complexo fosfotungstico-fosfomolibdico, que proporciona uma coloração azul para a solução (WATERMAN; MOLE, 1994).

A tabela 15 (pg 144) apresenta os resultados obtidos na determinação do teor de compostos fenólicos totais no extrato e frações da espécie *P. sabulosa*.

Como pode ser observado, o conteúdo de fenólicos totais foi baixo tanto para o extrato bruto quanto para as frações. Apesar da pouca quantidade, a fração aquosa apresentou o equivalente a concentração de $1,68 \pm 0,01$ mg de ácido gálico por grama de fração seca. O extrato bruto apresentou a segunda maior concentração de fenólicos totais, com o equivalente a $1,64 \pm 0,01$ mg de ácido gálico por grama de extrato seco.

Estes resultados que demonstram baixa quantidade de compostos fenólicos vem de acordo com a fitoquímica da espécie em estudo que apresenta como componentes majoritários diidro- e estilpironas e uma cumarina do tipo preniloxicumarina. Os compostos que contribuem para a presença de fenólicos no extrato bruto, frações acetato de etila e aquosa são a escopoletina e três flavonóides que são encontrados na espécie como metabólitos minoritários.

5.4.2- Determinação de flavonóides totais

Os efeitos protetores dos flavonóides em sistemas biológicos provêm de sua capacidade de transferir elétrons aos radicais livres, estabilizando-os, além de possuírem ação quelante de íons metálicos, ativarem enzimas antioxidantes, reduzirem radicais livres derivados do tocoferol e de inibir as oxidases (HALLIWELL, 2007; HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002).

Assim, a determinação do conteúdo de flavonóides na espécie *P. sabulosa* foi realizada através do método da complexação com o reagente $AlCl_3$. Este agente complexante forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico nos flavonóides, proporcionando um deslocamento batocrômico das bandas de absorvâncias do espectro de UV/vis (WOISKY; SALATINO, 1998). A tabela 15 (pg 144) mostra os resultados obtidos no teste.

Os resultados mostraram baixa concentração de flavonóides tanto no extrato quanto nas frações. A maior quantidade foi detectada no extrato bruto hidroalcoólico, com conteúdo equivalente a 0,16 mg de quercetina por g do extrato seco. Este conteúdo equivale a aproximadamente 10% daquele encontrado para os fenólicos totais, desta forma, este conteúdo no EBH é decorrente da presença de outros componentes fenólicos. A fração acetato de etila apresentou a segunda maior quantidade, com 0,14 mg de quercetina por g do extrato seco.

Estudos anteriores realizados com a espécie *P. sabulosa* revelaram a presença de pequenas quantidades de três flavonóides: quercetina, apigenina e uma quercetina glicosilada. A presença da quercetina foi descrita anteriormente para outras espécies do gênero *Polygala*, tais como *P. caudata* (LI et al., 1999) e *P. paniculata*. Já a ocorrência dos outros flavonóides isolados em *P. sabulosa* foi descrita pela primeira vez no gênero (PIZZOLATTI et al., 2008). O potencial antioxidante destes compostos já está bem relatado na literatura.

5.4.3- Ação seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

O método de seqüestro do radical livre DPPH pela amostra é utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos e compostos específicos, sendo uma ferramenta útil para avaliar o potencial antioxidante de plantas e vegetais em geral (LEONG; SHUI, 2002).

Assim, o EBH e frações de *P. sabulosa* foram submetidos ao ensaio de atividade seqüestrante do radical livre DPPH sendo os resultados da capacidade apresentados na tabela 15 (pg 144), expressos em IC_{50} ($\mu g/mL$).

De acordo com a tabela, observa-se que o extrato que apresentou a maior capacidade de seqüestro de radicais livres foi o EBH, com $IC_{50} = 63,76 \mu g/mL$, seguida da fração aquosa, com $IC_{50} = 77,78 \mu g/mL$. Os resultados obtidos para o

extrato bruto coincidem em relação aos teores de flavonóides e fenólicos totais, pois o mesmo apresentou a maior quantidade de flavonóides e a segunda maior de compostos fenólicos.

Em estudos com o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* e com a rutina isolada previamente do mesmo extrato, Lapa e colaboradores (2007) demonstraram uma atividade antioxidante com IC₅₀ de 61,2 mg/mL e 4 µg/mL respectivamente. Estes resultados sugerem que o efeito antioxidante pode ser atribuído à presença do flavonóide rutina e que estes efeitos podem estar relacionados ao efeito gastroprotetivo observado para esta espécie. A propriedade antioxidante do extrato também está relacionada ao efeito protetivo contra a neurotoxicidade induzida pelo metil-mercúrio (FARINA et al., 2005).

Apesar do valor de IC₅₀ para o extrato hidroalcoólico de *P. paniculata* ser bastante superior ao encontrado para *P. sabulosa* (IC₅₀= 63,76 µg/mL), importantes efeitos biológicos foram atribuídos ao potencial antioxidante de seus extratos. Desta forma, mesmo que a capacidade seqüestrante do radical livre DPPH pelo extrato e frações de *P. sabulosa* não seja tão elevada, é possível que a atividade observada possa contribuir em importantes efeitos farmacológicos, já que a produção de radicais livres está diretamente envolvida em muitas patologias.

5.4.4- Determinação do potencial redutor

O potencial redutor indica a presença de compostos elétron-doadores que podem reduzir os intermediários oxidativos do processo de peroxidação lipídica (YEN; CHEN, 1995). Neste ensaio, a presença destes redutores causa a redução do complexo Fe³⁺/ferrocianeto à forma ferrosa. Assim, a forma Fe²⁺ pode ser monitorada medindo a formação de um complexo azul (Fe₄[Fe(CN)₆]₃) a 720 nm.

A tabela 15 apresenta os resultados obtidos, sendo os valores expressos em equivalentes de miligramas de ácido ascórbico por grama de extrato ou fração.

Tabela 15: Teor de fenóis totais, flavonóides totais, capacidade seqüestrante do radical livre DPPH e potencial redutor do EBH e frações de *P. sabulosa*.

	Extrato/frações			
	EBH	HEX	FAE	FA
Fenóis totais*	1,64 ± 0,02	1,43 ± 0,001	1,60 ± 0,006	1,68 ± 0,01
Flavonóides totais**	0,16 ± 0,01	0,11 ± 0,007	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,007
DPPH	63,76	> 200	110,50	77,78
Potencial redutor***	148,3	72,0	217,6	146,0

*o teor de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico/g de extrato ou fração seca da planta.

**o teor de flavonóides totais foi expresso em mg de quercetina/g de extrato ou fração seca.

***o potencial redutor foi expresso em equivalentes de mg de ácido ascórbico/ g de extrato ou fração seca da planta.

Através dos resultados obtidos, pode-se observar que a fração acetato de etila apresentou maior capacidade redutora sobre íons férricos, mostrando valores de atividade equivalentes a 217,66 mg de ácido ascórbico/g de extrato. O extrato bruto e a fração aquosa apresentaram capacidade redutora muito proxima de 148,3 mg e 146,0 mg de ácido ascórbico/g de extrato.

Estes dados não correlacionaram diretamente com o conteúdo de fenólicos totais, em que a fração aquosa apresentou o maior conteúdo destes compostos e aqui somente a terceira maior capacidade redutora de íons férricos. O contrário foi observado para a fração acetato de etila, que apresentou o menor conteúdo fenólico e o maior potencial redutor.

Em geral, a atividade antioxidante observada para a espécie *P. sabulosa* foi regular, podendo este fato estar relacionado diretamente com a baixa concentração de componentes fenólicos. Assim, para uma melhor caracterização destes componentes, realizou-se uma análise por eletroforese capilar do EBH.

5.4.5- Análise por eletroforese capilar do conteúdo fenólico em extratos hidroalcoólicos de diferentes partes de *P. sabulosa*

Eletroforese capilar (EC) é utilizada como método alternativo para análise de compostos fenólicos, apresentando boa resolução, sendo um processo mais

simples, eficaz e menos dispendioso quando comparado a outros métodos (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2006).

Para análise dos constituintes fenólicos em *P. sabulosa*, foram utilizados extratos brutos hidroalcoólicos obtidos através da maceração de diferentes órgãos da planta separadamente (caule, folhas e flores) ainda frescos. A figura 51 mostra um típico eletroferograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. sabulosa*. Os picos foram identificados baseados na comparação de seus respectivos espectros de UV com o de padrões presentes no equipamento.

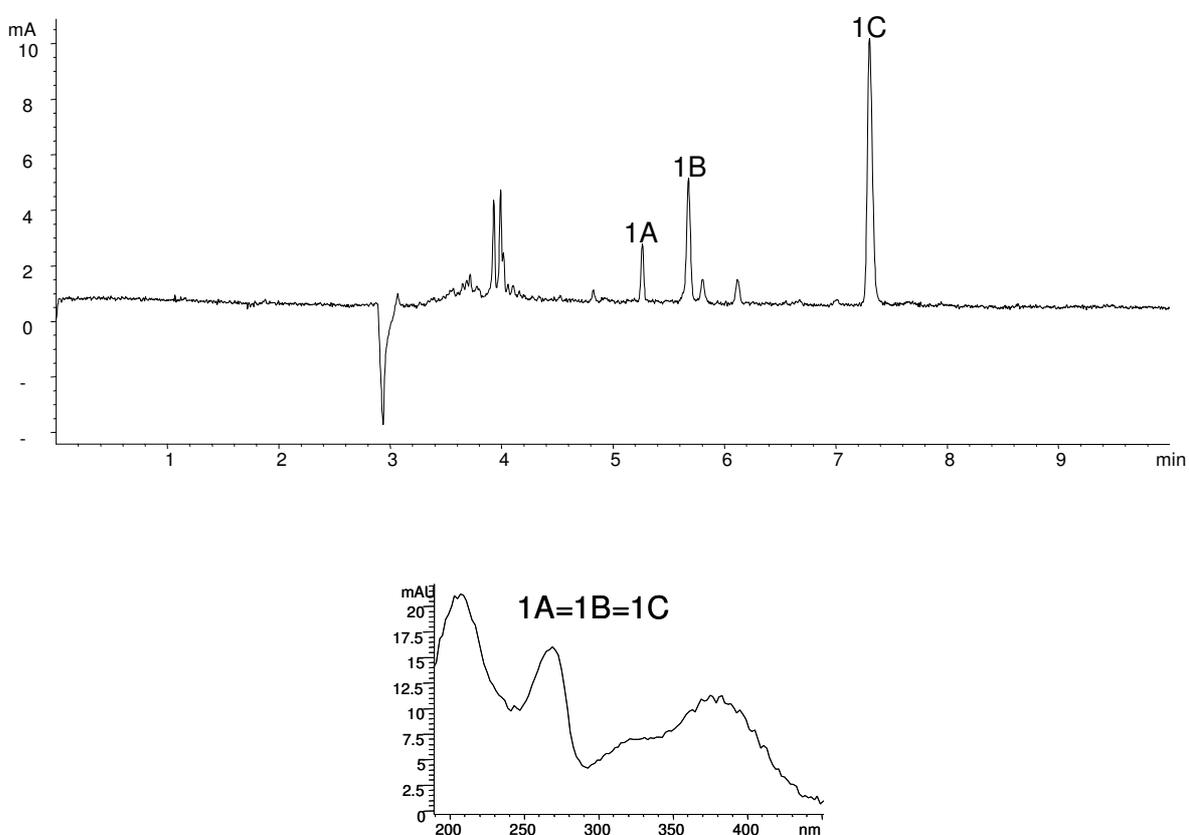


Figura 51: Eletroferograma do extrato hidroalcoólico das folhas de *P. sabulosa* e espectro de UV dos três compostos detectados no extrato (1A, 1B e 1C).

Os eletroferogramas de todos os extratos apresentaram três picos semelhantes na região entre 5 a 8 minutos, semelhantes àqueles observados na figura 51. A análise dos espectros de UV destes três picos (1A, 1B e 1C) mostrou grande similaridade com espectros referentes a flavonóides heterosídeos. Comparando os espectros de UV detectados com o de padrões, foi possível identificar os três compostos como sendo três diferentes flavonóides heterosídeos

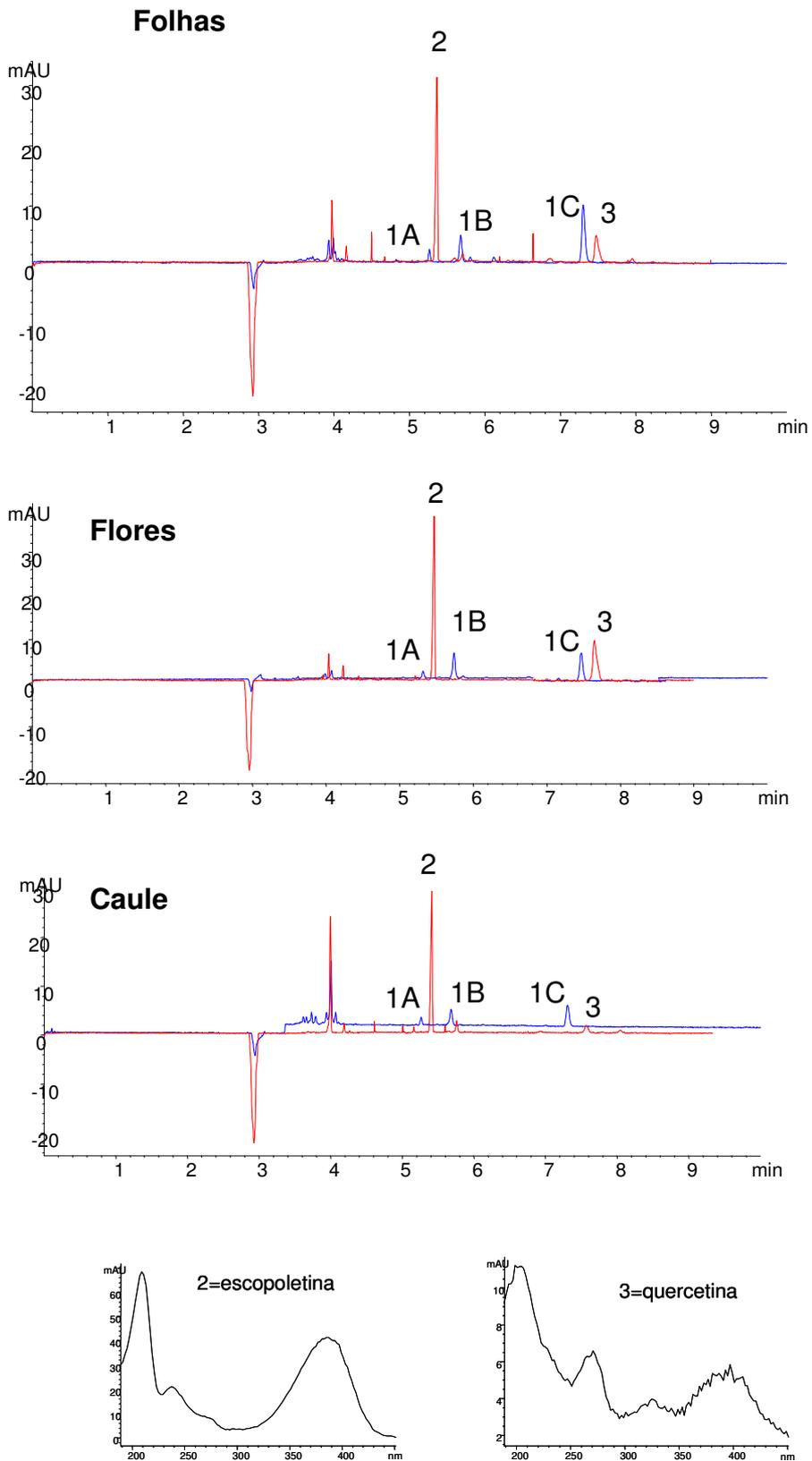


Figura 52: Eletroferograma dos extratos hidroalcoólicos das folhas, flores e caules de *P. sabulosa*. Em azul → pré-hidrólise e em vermelho → pós-hidrólise. Abaixo, espectro de UV dos dois compostos detectados no extrato após hidrólise: 2-escopoletina e 3-quercetina.

tendo a quercetina como aglicona.

Para confirmação, os extratos foram submetidos a uma hidrólise ácida, sendo analisados nas mesmas condições anteriores. Avaliando os eletroferogramas obtidos após a hidrólise (Figura 52), pode-se confirmar a presença de flavonóides livres, todos tendo a quercetina como aglicona. Além disso observou-se o aparecimento de um pico de grande intensidade entre 5 e 6 minutos. Analisando o seu espectro de UV pode-se observar a presença de absorções características que através da comparação com padrões o composto foi identificado como sendo a cumarina escopoletina. Sabe-se que a escopoletina está presente em baixa quantidade na espécie. Assim, o aparecimento deste pico de grande intensidade é decorrente da hidrólise do grupamento éter da cadeia oxiprenílica da 6-metoxi-7-preniloxicumarina, presente em grande quantidade em *P. sabulosa*.

Através da análise dos resultados obtidos, o que mais chama atenção é o fato de que anteriormente três flavonóides haviam sido isolados na espécie *P. sabulosa*: apigenina, quercetina e uma 3-O-glicopiranosilquercetina. Nas análises realizadas por EC, apenas quercetinas heterosídeos foram detectadas nos três extratos, contrariando os dados anteriores.

6 - Conclusões

Óleos voláteis:

- A análise dos componentes do óleo volátil das raízes permitiu identificar o salicilato de metila como principal componente (83,8%). Nas partes aéreas os componentes majoritários foram 6-pentil-4-metoxi-pirona (47,0%), inédita em plantas, e salicilato de metila (31,5%);
- A avaliação da atividade antibacteriana do óleo das partes aéreas revelou uma importante ação, principalmente contra a bactéria gram positiva *Staphylococcus aureus* e a gram negativa *Pseudomonas aeruginosa*, ambas com CIM= 0,15 µL/mL.

Estirilpironas:

- Através do fracionamento dos extratos de flores, folhas e caules, seis estirilpironas foram isoladas: DST 1, DST 2, DST 3, STY 4, STY 5 e STY 6. A análise por CG da mistura de estirilpironas revelou a presença de outras duas estirilpironas, a STY [51] e a 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-13-metoxi-estiril)-2H-piran-2-ona [52], inédita na espécie. Além disso, a xantona 1,5-diidroxi-2,3-dimetoxixantona [54] foi identificada nesta mistura, sendo um importante resultado do ponto de vista quimiotaxonômico;
- O EBH e a FAE promoveram um efeito do tipo ansiolítico, anticonvulsivante e hipno-sedativo, sendo estas ações mais evidentes para a FAE. Os experimentos *in vitro* mostraram que as diidro- e estirilpironas apresentam afinidade pelo sítio benzodiazepínico do receptor GABA_A. Os estudos preliminares de toxicologia aguda e sub-crônica revelaram que a administração oral da FAE em camundongos mostrou boa tolerabilidade e baixa toxicidade;
- Os estudos das variações dos teores de estirilpironas revelaram que existem diferenças sazonais, sendo que as DST 1 e STY 4 apresentaram o maior valor médio nas quatro coletas.

Cumarinas:

- A escopoletina [8] foi obtida com sucesso a partir da hidrólise ácida da 6-metoxi-7-preniloxicumarina [7], isolada em grande quantidade na espécie

estudada. A partir da escopoletina, obtiveram-se seis ésteres benzoílicos e cinco ésteres alquílicos derivados. Vinte e duas cumarinas foram sintetizadas através da reação de Pechmann e outras sete através da reação de Knoevenagel;

- As cumarinas apresentaram bons resultados de atividade citotóxica contra as diferentes células tumorais, sendo a atividade mais evidente obtida com as cumarinas sintéticas que possuem o grupamento 4-clorometileno ligado ao C-4;
- A atividade antibacteriana foi observada principalmente para os ésteres benzoílicos derivados da escopoletina, sendo mais evidente contra a bactéria *P. aeruginosa*, com uma CIM= 0,43 $\mu\text{mol/mL}$ para o *p*-bromo benzoílate de escopoletina [11];
- As cumarinas não apresentaram atividade antifúngica, sendo que apenas quatro cumarinas apresentaram ação contra a espécie *Candida parapsilosis* (CIM \leq 125 $\mu\text{g/mL}$).

Atividade antioxidante

- Extratos e frações de *P. sabulosa* apresentaram atividade antioxidante regular. A análise dos componentes fenólicos por EC mostrou a presença de três quercetinas heterosídeos.

7 - Referências Bibliográficas

ACCAME, M.E.C.; GARCIA, M.P.P. Contribución al estudio de la esencia de la *Polygala microphylla* (L.) (Polygalaceae). **An. Real Acad. Farm.**, v. 50, p. 211-214, 1984.

ADAMS, R. **Identification of essential oil components by gas chromatographic/mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publishing, 1995. 468 p.

AJALI, U.; CHUKWURAH, B. K. Antimicrobial activity of *Securidaca longipedunculata*. **Phytomedicine**, v. 11, n. 7-8, p. 701-703, 2004.

ALEXANDRE, R.F. **Fitoterapia baseada em evidências: exemplos dos medicamentos fitoterápicos mais vendidos em Santa Catarina**. 2004. 404 f Dissertação (Mestrado em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of five taxa of Sideritis from Greece. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 811-815, 2001.

AMARAL, A.T.; MONTANARI, C.A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 1, p. 39-44, 2002.

AMAROWICZ, R. et al. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chem.**, v. 84, 551-562, 2004.

ANKE, J.; RAMZAN, I. Pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interactions with Kava (*Piper methysticum* Forst. f.). **J. Ethnopharmacol.**, v. 93, p. 153-160, 2004.

AOKI, S. et al. A convenient synthesis of dihydrocoumarins from phenol and cinnamic acid derivatives. **Tetrahedron**, v. 61, p. 9291-9297, 2005.

ARGYROPOULOS, S.V.; SANDFORD, J.J.; NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 2: pharmacological treatments of anxiety. **Pharmacol. Ther.**, v. 88, p. 213-227, 2000.

AVALLONE, R. et al. Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 59, n. 11, p. 1387-1394, 2000.

AVDEEF, A. et al. Drug absorption in vitro model: filter-immobilized artificial membranes 2. Studies of the permeability properties of lactones in *Piper methysticum* Forst. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 14, p. 271-280, 2001.

BAHEKAR, S.S.; SHINDE, D.B. Samarium (III) catalyzed one-pot construction of coumarins. **Tetrahedron Lett.**, v. 45, p. 7999-8001, 2004.

BASHIR, A. et al. Isoflavones and xanthenes from *Polygala virgata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, 309-311, 1992.

- BAX, R.; MULLAN, N.; VERHOEF, J. The millennium bugs - The need for and development of new antibacterials. **Int. J. Antimicrob. Agents** , v. 16, p. 51-59, 2000.
- BEAUBRUN, G.; GRAY, G.E. A review of herbal medicines for psychiatric disorders. **Psychiatr. Serv.**, v. 51, p. 1130-1134, 2000.
- BEILLEROT, B. et al. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 18, n. 3, p. 1102-1105, 2008.
- BELMAIN, S.R. et al. Insecticidal and vertebrate toxicity associated with ethnobotanicals used as postharvest protectants in Ghana. **Food Chem. Toxicol.**, v. 39, p. 287-291, 2001.
- BI, H.H. et al. Rice allelopathy induced by methyl jasmonate and methyl salicylate. **J. Chem. Ecol.**, v. 33, p. 1089-1103, 2007.
- BILIA, A.R. et al. Analisis of kavalactones from *Piper methysticum* (kava-kava). **J. Chromatogr. B**, v. 812, p. 203-214, 2004.
- BILIA, A.R.; GALLORI, S.; VINCIERI, F.F. Kava-Kava and anxiety: growing knowledge about the efficacy and safety. **Life Sci.**, v. 70, p. 2581-2597, 2002.
- BLUMENTHAL, M. Kava safety questioned due to case reports of liver toxicity. **Herbalgram**, v. 55, p. 26-32, 2002.
- BOSE, D.S.; RUDRADAS, A.P.; BABU, M.H. The indium (III) chloride-catalyzed von Pechmann reaction: a simple and effective procedure for the synthesis of 4-substituted coumarins. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, p. 9195-9197, 2002.
- BOONEN, G.; HABERLEIN, H. Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA-A binding site. **Planta Med.**, v. 64, p. 504-506, 1998.
- BRITO, A.S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo**. Campinas: Ed. UNICAMP, 1994. 122 p.
- BÜRGER, C. et al. Acute and subacute toxicity of the hydroalcoholic extract from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae) in mice. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v. 8, n. 2, p. 370-373, 2005.
- BUTTERWECK, V. et al. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. **Planta Med.**, v. 64, n. 4, p. 291-294, 1998.
- BYLOV, I.; VASYLYEV, M.V.; BILOKIN, Y.V. Synthesis and anti-inflammatory activity of *N*-substituted 2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxamides and their 2-iminoanalogues. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 34, p. 997-1001, 1999.

CAMPOS, R.O.P. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cypariassias* (Polygalaceae). **Life Sci.**, v. 61, n. 16, p. 1619-1630, 1997.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacol., Biochem. Behav.**, v. 75, p. 501-512, 2003.

CARLINI, E.A. et al. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). 1- Effects of teas prepared from the leaves on laboratory-animals. **J. Ethnopharmacol.**, v. 17, n. 1, p. 37-64, 1986.

CARLINI, E.A. Pharmacological screening of Brazilian plants. **Rev. Bras. Biol.**, v. 32, n. 2, p. 265-274, 1972.

CAVIN, A. et al. Use of on-flow LC/H-1 NMR for the study of an antioxidant fraction from *Orophea enneandra* and isolation of a polyacetylene, lignans, and a tocopherol derivative. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p. 1497-1501, 1998.

CERVELLATI, R. et al. Polyphenols from *Polygala spp.* and their antioxidant activity. **Chemistry & Biodiversity**, v. 1, n. 3, p. 415-425, 2004.

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

CHENG, M.C. et al. Antidepressant principles of the roots of *Polygala tenuifolia*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, n. 9, p. 1305-1309, 2006.

CHUNG, I.W. et al. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 71, n. 1-2, p. 191-195, 2002.

CLARK, G. S. An aroma-chemical profile. Methyl salicylate or oil of wintergreen. **Perfum. Flavor.**, v. 24, p. 5-11, 1999.

CLSI: Clinical and Laboratories Standards Institute (2005) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing fifteenth informational supplement M100-S15. Wayne (PA).

COLE, J.C.; RODGERS, R.J. An ethological analysis of the effects of chlordiazepoxide and bretazenil (Ro 16-6028) in the murine elevated plus-maze. **Behav. Pharmacol.**, v. 4, n. 6, p. 573-580, 1993.

COSTANTINO, U. et al. Metal exchanged layered zirconium hydrogen phosphate as base catalyst of the Michael reaction. **Catal. Lett.**, v. 22, p. 333-336, 1993.

CÔTÉ, C.S. et al. Composition and biological activity of traditional and commercial kava extracts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p. 147-152, 2004.

CRISTIANO, R. et al. Two xanthenes from *Polygala paniculata* and confirmation of the 1-hydroxy-2,3,5-trimethoxy-xanthone at trace level by HRGC-MS. **Z. Naturforsch.**, v. 58, p. 490-494, 2003.

CUNHA JUNIOR, A., **Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae): isolamento e atividade biológica.** 2002. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CURINI, M.; ROSATI, O.; COSTANTINO, U. Heterogeneous catalysis in liquid phase organic synthesis, promoted by layered zirconium phosphates and phosphonates. **Current Organic Chemistry**, v. 8, p. 591-606, 2004.

CURINI, M. et al. Layered zirconium sulfophenyl phosphonate as heterogeneous catalyst in the synthesis of pyrazoles and 4,5,6,7-tetrahydro-1(2)h-indazoles. **Synlett**, v. 19, p. 2927-2930, 2005.

_____ Synthesis and anti-inflammatory activity of natural and semisynthetic geranyloxycoumarins. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v. 14, p. 2241-2243, 2004.

_____ Layered zirconium phosphate and phosphonate as heterogeneous catalyst in the preparation of pyrroles. **Tetrahedron Lett.**, v. 44, n. 20, p. 3923-3925, 2003.

_____ Preparation and deprotection of 1,1-diacetates (acylals) using zirconium sulfophenyl phosphonate as catalyst. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, n. 15, p. 2709-2711, 2002.

_____ Sulfophenyl Phosphonate as heterogeneous catalyst in the preparation of β -amino alcohols from epoxides. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 21, p. 4149-4152, 2001a.

_____ An efficient procedure for preparation of cyclic ketals and thioketals catalyzed by zirconium sulfophenyl phosphonate. **Synlett**, v. 7, p. 1182-1184, 2001b.

_____ Heterogeneous catalysis in acetylation of alcohols and phenols promoted by zirconium sulfophenyl phosphonate. **Synt. Commun.**, v. 30, p. 1319-1329, 2000.

_____ Heterogeneous catalysis in trimethylsilylation of alcohols and phenols by zirconium sulfophenyl phosphonate. **Synt. Commun.**, v. 29, p. 541-546, 1999.

_____ Zirconium sulfophenyl phosphonate as a heterogeneous catalyst in tetrahydropyranlation of alcohols and phenols. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, p. 8159, 1998.

_____ Heterogeneous catalysis in carbonyl regeneration from 1,3-dithiolanes and 1,3-dithianes by zirconium sulfophenyl phosphonate. **Synlett**, v. 7, p. 769-770, 1997.

_____ Heterogeneous catalysis in carbonyl regeneration from oximes, semicarbazones, and tosylhydrazones by zirconium sulphophenyl phosphonate. **Synlett**, v. 4, p. 333-334, 1996.

DALL' ACQUA, S. et al. Cytotoxic compounds from *Polygala vulgaris*. **Chem. Pharm. Bull.** v. 50, n. 11, p. 1499-1501, 2002.

DEBA, F. et al. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* L. var. *Radiata*. **Food Control**, v. 19, n. 4, p. 346-352, 2008.

DELAUDE, C. Chemical study of Polygalaceae saponins. Identification of the saponin extracted from *Carpolobia lutea*. **Bull. Soc. Roy. Sci. Liege**, v. 44, p. 495-496, 1975.

DESBENE, S. et al. Biologically active triterpene saponins from callus tissue of *Polygala amarella*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 6, p. 923-926, 1999.

DEWICK, P.M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. West Sussex: Ed. John Wiley & Sons, 1997. 466 p.

_____ **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2 ed. West Sussex: Ed. John Wiley & Sons, 2002. 507 p.

DHANABAL, S.P. et al. Hepatoprotective activity of the Indian medicinal plant *Polygala arvensis* on D-galactosamine-induced hepatic injury in rats. **Fitoterapia**, v. 77, p. 472-474, 2006.

DHARMARATNE, H.R.W.; NANAYAKKARA, N.P.D.; KHAN, I.A. Kavalactones from *Piper meyhysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. **Phytochemistry**, v. 59, p. 429-433, 2002.

DI PAOLO, E.R. et al. New chromonocoumarin (6H,7H-[1]benzopyrano[4,3-b][1]benzopyran-6,7-dione) derivatives from *Polygala fruticosa* Berg. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, n. 7, p. 1455-62, 1989.

DONG, F. et al. Synthesis of coumarins via Pechmann reaction in water catalyzed by acyclic acidic ionic liquids. **Catal Lett.**, v. 121, n. 3-4, p. 255-259, 2008.

DOUGLAS, C.J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees. **Trends in Plant Sci.s**, v. 1, n. 6, p. 171-178, 1996.

DUARTE, F.S. et al. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae): in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology**, v. 197, n. 3, p. 351-360, 2008.

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**, v. 86, n. 1, p. 150-161, 2007.

EDWARDS, R. et al. Characterization and inducibility of a scopoletin-degrading enzyme from sunflower. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1109-1114, 1997.

EGAN, D. et al. Studies on the cytostatic and cytotoxic effects and mode of action of 8-nitro-7-hydroxycoumarin. **Cancer Letters**, v. 118, n. 2, p. 201-211, 1997.

EGASHIRA, N. et al. Antagonistic effects of methanolic extract of *Polygala telephioides* on morphine responses in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 104, n. 1-2, p. 193-198, 2006.

EL SAYAH, M. et al. In vitro effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and albumin in normal and actively sensitised trachea from guinea pig. **Inflammation Research**, v. 48, n. 4, p. 218-223, 1999.

ERNST, E. Herbal remedies for anxiety – a systematic review of controlled clinical trials. **Phytomedicine**, v. 13, p. 205-208, 2006.

ESCHER, M. Hepatitis associated with kava, a herbal remedy for anxiety. **British Medical Journal**, v. 322, p. 1097-1097, 2001.

ESTRADA, A. et al. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**, v. 23, p. 27-43, 2000.

FARINA, M. et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, p. 1503-1508, 2005.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1988.

FATIMA, A. et al. *R*-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, n. 8, p. 2927-2933, 2005.

FERNANDES, E.S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n.3, p. 228-236, 2007.

FINN, G.J. et al. In vitro cytotoxic potential and mechanism of action of selected coumarins, using human renal cell lines. **Cancer Letters**, v. 183, p. 61-68, 2002.

FINN, G.J., CREAVER, B., EGAN, D.A. Study of the *in vitro* cytotoxic potential of natural and synthetic coumarin derivatives using human normal and neoplastic skin cell lines. **Melanoma Research**, v. 11, p. 461-467, 2001.

FOLMER, F. et al. Inhibition of TNF α -induced activation of nuclear factor κ B by kava (*Piper methysticum*) derivatives. **Biochem. Pharmacol.**, v. 71, p. 1206-1218, 2006.

FRANCO, J.L. et al. Mercurial-induced hydrogen peroxide generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, p. 1919-1926, 2007.

FUJITA, T. et al. Xanthones from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3997-4000, 1992.

FURNESS, S.H.; STAFFORD, P.J., Polygalaceae. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 88, n. 1-4, p. 61-82, 1995.

GARRETT, K. M. et al. Extracts of kava (*Piper methysticum*) induce acute anxiolytic-like behavioral changes in mice. **Psychopharmacology**, v. 170, n. 1, p. 33-41, 2003.

GHATE, M.; KUSANUR, R.A.; KULKARNI, M.V. Synthesis and in vivo analgesic and anti-inflammatory activity of some bi heterocyclic coumarin derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 40, p. 882-887, 2005.

GÓMEZ-CARAVACA, A.M. et al. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 41, p. 1220-1234, 2006.

GUO, J.Y. et al. Studies on the protective effect of saponins from *Polygala aureocauda* on animal models of liver injury. **Zhongguo Tianran Yaowu**, v. 4, n. 4, p. 303-307, 2006.

GUTIÉRREZ, M.C. et al. Abiotic elicitation of coumarin phytoalexins in sunflower. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1185-1191, 1995.

HA, W.Y. et al. Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euxanthone-induced neurite differentiation of neuroblastoma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, p. 1393-1401, 2006.

HALCON, L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **Am J Infect Control**, v. 32, p. 402-408, 2004.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vitro* studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, *In press*, 2008.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins of *Polygala paniculata*. **Planta Med.**, v. 51, p. 215-217, 1985.

HARJANI, J.R.; NARA, S.J.; SALUNKHE, M.M. Lewis acidic ionic liquids for the synthesis of electrophilic alkenes via the Knoevenagel condensation. **Tetrahedron Lett.**, v. 43, n. 6, p. 1127-1130, 2002.

HAYASHI, S.; KAMEOKA, H. Volatile compounds of *Polygala senega* L. var. *latifolia* Torrey et Gray roots. **Flav. Fragr. J.**, v. 10, p. 273-280, 1995.

HEGEDÜS, A.; HELL, Z. Zeolite-catalyzed Pechmann synthesis of coumarins. **Catal. Lett.**, v. 112, n. 1-2, p. 105-108, 2006.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships **J. Nutr. Biochem.**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HERDERICH, M.; BECKERT, C.; VEIT, M. Establishing styrylpyrone synthase activity in cell free extracts obtained from gametophytes of *Equisetum arvense* L. by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Phytochem. Anal.**, v. 8, n. 4, p. 194-197, 1997.

HOFFMANN, J.J.; WIEDHOPF, R.M.; COLE, J.R. Cytotoxic and tumor inhibitory agent from *Polygala macradenia* Gray (Polygalaceae) - 4'-demethyldeoxypodophyllotoxin. **J. Pharm. Sci.**, v. 66, n. 4, p. 586-587, 1977.

HOFFMANOVA, J. et al. Inhibitors of lipoxygenase metabolism exert synergistic effects with retinoic acid on differentiation of human leukaemia HL-60 cells. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 350, p. 273-284, 1998.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. **Phytochem. Rev.**, v. 1, p. 275-285, 2002.

HOULT, J.R.S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 27, n. 4, p. 713-722, 1996.

HURTADO, F.C. et al. Coumarins in *Helianthus tuberosus*: characterization, induced accumulation and biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1029-1036, 1998.

HUSSAIN, S.H.I. et al. Altholactone, a novel styryl-lactone induces apoptosis via oxidative stress in human HL-60 leukemia cells. **Toxicol. Lett.**, v. 131, n. 3, p. 153-159, 2002.

HUTZLER, P. et al. Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. **J. Exp. Bot.**, v. 49, n. 323, p. 953-965, 1998.

IKEYA, Y. et al. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27 n. 7, p. 1081-1085, 2004.

IKEYA, Y. et al. Two xanthenes from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2061-2065, 1991.

ITO, H. et al. Xanthenes and a cinnamic acid derivatives from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 16, n. 10, p. 1614-1616, 1977.

JACQUOT, Y. et al. Synthesis, structure, and estrogenic activity of 4-amino-3-(2-methylbenzyl)coumarins on human breast carcinoma cells. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 2269-2282, 2007.

JACQUOT, Y. et al. Substituted benzopyranobenzothiazinones. Synthesis and estrogenic activity on MCF-7 breast carcinoma cells. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, n. 2, p. 127-136, 2001.

JAYASEKARA, T.K. et al. Effect of volatile constituents from *Securidaca longipedunculata* on stored grain insect pests. **J. Chem. Ecol.**, v. 31, p. 303-313, 2005.

JIA, H. et al. Tenuigenin treatment decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid β -protein in cultured cells. **Neurosci. Lett.**, v. 367, n. 1, p. 123-128, 2004.

JIANG, Y., TU, P.F. Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 813-816, 2002.

JOHANSSON, M. et al. Biologically active secondary metabolites from the ascomycete A111-95: 2. Structure elucidation. **Journal of Antibiotics**, v. 55, n. 1, p. 104-106, 2002.

JUSSOFIE, A.; SCHMIZ, A.; HIEMKE, C. Kavapyrone enriched extract from *Piper methysticum* as modulator of the GABA binding site in different regions of rat brain. **Psychopharmacology**, v. 116, p. 469-474, 1994.

KAI, K. et al. Accumulation of coumarins in *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 379-386, 2006.

KAKO, M. et al. Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. **J. Nat. Prod.**, v. 60, n. 6, p. 604-605, 1997.

_____ Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Polygala senega* in normal and diabetic mice and its main component, the triterpenoid glycoside senegin-II. **Planta Med.**, v. 62, n. 5, p. 440-443, 1996.

_____ Effect of senegin-II on blood glucose in normal and NIDDM mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 18, n. 8, p. 1159-1161, 1995.

KANG, S.Y. et al. Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyratum*, **Arch. Pharmacol. Res.**, v. 21, p. 718-722, 1998.

KANG, T.H. et al. Scopoletin: an inducible nitric oxide synthesis inhibitory active constituent from *Artemisia feddei*, **Planta Med.**, v. 65, p. 400-403, 1999.

KATSELIS, G.S. et al. Adjuvant activities of saponins from the root of *Polygala senega* L. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, v. 85, n. 11, p. 1184-1194, 2007.

KAVVADIAS, D. et al. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. **Br. J. Pharmacol.**, v. 142, n. 5, p. 811-820, 2004.

KAWASHIMA, K. et al. Anti-stress effects of ,3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). **Biol. Pharm. Bull.** v. 27, n. 8, p. 1317-1379, 2004.

- KIM, E.K. et al. Scopoletin induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by activations of nuclear factor κ B and caspase-3. **Life Sci.**, v. 77, p. 824-836, 2005.
- KIM, H.J. et al. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE₂ from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. **Fitoterapia**, v. 75, p. 261-266, 2004.
- KIM, H.M. et al. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor-alpha secretion from mouse astrocytes. **J. Ethnopharmacol.**, v. 61, n. 3, p. 201-208, 1998.
- KOŁODZIEJ, H. et al. Structure-cytotoxicity relationships of a series of natural and semi-synthetic simple coumarins as assessed in two human tumour cell lines. **Z. Naturforsch C.**, v. 52, n. 3-4, p. 240-244, 1997.
- KOO, H.N. et al. Inhibitory effect of interleukin-1- α -induced apoptosis by *Polygala tenuifolia* in Hep G2 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 22, n. 3, p. 531-544, 2000.
- KOPCKE, B. et al. Aliellalactone and its biogenetic precursors as chemotaxonomic markers of the Sarcosomataceae (Ascomycota). **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 709-714, 2002.
- KOSTOVA, I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. **Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents**, v. 5, p. 29-46, 2005.
- KOU, J. et al. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. **Fitoterapia**, v. 77, p. 411-415, 2006.
- KOU, J. et al. Blood-activating and anti-inflammatory actions of *Polygala fallax*. **Zhong Yao Cai**, v. 26, n. 4, p. 268-271, 2003.
- KUJALA, T.S. et al. Phenolics and betacyanins in red beetroot (*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 5338-5342, 2000.
- KUMAR, B.S. et al. Vanadium (III) chloride as an effective catalyst for the Pechmann reaction. **Chem. Heterocycl. Compd.**, v. 42, n. 2, p. 172-175, 2006.
- KUSTER, R.M., ROCHA, L.M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 2004. p. 537-556
- LALL, N.; MEYER, J.J. In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically selected South African plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 66, n. 3, p. 347-354, 1999.
- LANNANG, A.M. et al. Securidacaxanthone A, a hepta-oxygenated xanthone from *Securidaca longepedunculata*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 199-202, 2006.

- LAPA, F.R. et al. Gastroprotective activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 59, n. 10, p. 1413-1419, 2007.
- LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 2003. p. 247-262.
- LAURIN, P. et al. Synthesis and in vitro evaluation of novel highly potent coumarin inhibitors of gyrase B. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v. 9, n. 14, p. 2079-2084, 1999.
- LEBOT, V. et al. Morphological, phytochemical and genetic variation in Hawaiian cultivars of 'awa (Kava, *Piper methysticum*, Piperaceae). **Econ Bot.**, v. 53, p. 407-418, 1999.
- LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chem.**, v. 76, p. 69-75, 2002.
- LEVELEKE, C. et al. Pharmacological evaluation of the stress-induced social avoidance of anxiety. **Brain Res. Bull.**, v. 69, p. 153-160, 2006.
- LI, C. et al. Triterpenoid saponins with neuroprotective effects from the roots of *Polygala tenuifolia*. **Planta Med.**, v. 74, n. 2, p. 133-141, 2008.
- LI, H. et al. Lipid regulatory effects of *Polygala aureocauda* total saponins on Coturnix with hyperlipidemia. **Zhongguo Tianran Yaowu**, v. 5, n. 4, p. 289-292, 2007.
- LI, T.Z. et al. Saponins from *Polygala japonica* and their on a forced swimming test in mice. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 591-594, 2006.
- LI, W. et al. Xanthonenes from *Polygala caudata*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 953-958, 1999.
- LIMA NETO, Q.A. et al. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 2006.
- LIN, L. et al. Chemical constituents in roots of *Polygala fallax* and their anti-oxidation activities in vitro. **Zhongguo Zhongyao Zazhi.**, v. 30, n. 11, p. 827-830, 2005.
- LINN, L.L. et al. Xanthonenes from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro. **Planta Med.**, v. 71, p. 372-375, 2005.
- LISTER, R.G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology**, v. 92, p. 180-185, 1987.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F. Simplified method evaluation dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 96, p. 99-113, 1949.

LIU, X. et al. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthus emblica* L.) from six regions in China. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, 219-228, 2008.

LIU, X.L. et al. Effect of scopoletin on PC3 cell proliferation and apoptosis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 22, n. 10, p. 929-933, 2001.

LOPES, H.V. CA-MRSA: um novo problema para o infectologista. **Rev. Panam. Infectol.**, v. 7, n. 3, p. 34-36, 2005.

LÜDTKE, R. **O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil.** 2004. 164 f. Dissertação (Mestrado em Botânica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MACKINNON, S.; PARKER, R.H. Benzodiazepine withdrawal syndrome- a literature- review and evaluation. **American Journal of Drug and Alcohol Abuse**, v. 9, n. 1, p. 19-33, 1982.

MAHESWARA, M. et al. A solvent-free of coumarins via Pechmann condensation using heterogeneous catalyst. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v. 255, 49-52, 2006.

MAK, N.K. et al. Expression of protein kinase C isoforms in euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. **Planta Med.**, v. 67, n. 5, p. 400-405, 2001.

_____ Effects of euxanthone on neuronal differentiation. **Life Sci.**, v. 66, n. 4, p. 347-354, 1999.

MANHAS, M.S. et al. Microwave initiated reactions: Pechmann coumarin synthesis, Biginelli reaction, and acylation. **Tetrahedron Lett.**, v. 47, p. 2423-2425, 2006.

MAO, S.L. et al. Studies on chemical constituents of *Polygala arillata*. **Yao Xue Xue**, v. 32, n. 5, p. 360-362, 1997.

MARDER, M. et al. 6-methylapigenin and hesperidin: new valeriane flavonoids with activity on the CNS. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 75, n. 3, p. 537-545, 2003.

MARQUES, M. *Securidaca* L. (Polygalaceae) do Brasil. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 34, n. 1, p. 7-44, 1996.

MARSTON, A. et al. Xanthones from *Polygala nykensis*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 4, p. 809-812, 1993.

MARTINS, L.; CARDOSO, D. Aplicação catalítica de peneiras moleculares básicas micro e mesoporosas. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 358-364, 2006.

MATSUURA, D.; TAKABE, K.; YODA, H. Novel and stereocontrolled asymmetric synthesis of a new naturally occurring styryllactone, (+)-cardiobutanolide. **Tetrahedron Lett.**, v. 47, n. 9, p. 1371-1374, 2006.

McLAUGHLIN, J.L.; CHANG, C.J.; SMITH, D.L. "Bench top" bioassay for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A.U. **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier. 1991. v. 9, p. 383-409.

MEDINA, J.H. et al. Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties. **Biochem. Pharmacol.**, v. 40, n. 10, p. 2227-2231, 1990.

MEOTTI, F.C. et al. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 58, p. 1-6, 2006.

MEYER, B. N. et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MÖHLER, H. GABA (A) receptor diversity and pharmacology. **Cell Tissue Res.**, v. 326, n. 2, p. 505-516, 2006.

MONKS, A. et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTANHER, A.B.P.; PIZZOLATTI, M.G.; COSTA-BRIGHENTE, I.M., An application of the brine shrimp bioassay for general screening of Brazilian Medicinal Plants. **Acta Farm. Bonaerense**, v. 21, n. 3, p. 175-178, 2002.

MONTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **J. Ethnopharmacol.**, v. 96, p. 177-181, 2005.

MONTI, M. et al. Characterization of anti-coagulant properties of prenylated coumarin ferulenol. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1770, p. 1437-1440, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTSEI, M.L. et al. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 86, n. 2-3, p. 235-241, 2003.

NAGAI, T. et al. Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as affective adjuvants for nasal influenza and diphtheria-pertussis-tetanus vaccines. **Vaccine**, v. 19, n. 32, p. 4824-4834, 2001.

NAIDU, M. et al. Analysis of the action of euxanthone, a plant-derived compound that stimulates neurite outgrowth. **Neuroscience**, v. 148, n. 4, p. 915-924, 2007.

NAITO, R.; TOHDA, C. Characterization of anti-neurodegenerative effects of *Polygala tenuifolia* in Abeta (25-35)-treated cortical neurons. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, n. 9, p. 1892-1896, 2006.

NAM, N.H. et al. Carboxylic acid and phosphate ester derivatives of fluconazole: synthesis and antifungal activities. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 6255-6269, 2004.

NCCLS M27-A- **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard M27-A. Wayne, Pa, USA, 1995.

NÉBIÉ, R. H. C. et al. Salicylate de méthyle, constituant unique de l'huile essentielle de l'écorce des racines de *Securidaca longepedunculata* du Burkina Faso. **C. R. Chim.**, v. 7, p. 1003-1006, 2004.

OLIVEIRA, E.J. et al. Intracellular calcium mobilization as a target for the spasmolytic action of scopoletin. **Planta Med.**, v. 67, p. 605-608, 2001.

OLIVEIRA, M.C.F.; SILVEIRA, E.R., Pentaoxygenated xanthenes and fatty acids from *Bredemeyera brevifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 847-851, 2000.

OROZCO, F.A.J. et al. Decrease of cyclin D1 in the human lung adenocarcinoma cell line A-427 by 7-hydroxycoumarin. **Lung Cancer**, v. 34, n. 2, p. 185-194, 2001.

OYEDJI, O.A.; AFOLAYAN, A.J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 18, p. 57-59, 2006.

PALOMBO, E.A.; SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 77, n. 2-3, p. 151-157, 2001.

PAPANDREOU, V. et al. Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek *Paeonia taxa*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, p. 101-104, 2002.

PARK, J.H. et al. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on cerebral ischemia and reperfusion. **Am. Journ. Chin. Med.**, v. 34, n. 1, p. 115-123, 2006.

PARK, H.K. et al. Occupational asthma and rhinitis induced by a herbal medicine, Wonji (*Polygala tenuifolia*). **J. Korean Med. Sci.**, v. 20, p. 46-49, 2005.

PARRA, A.L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PEREZ, J.; HOLMES, J.F. Altered mental status and ataxia secondary to acute kava ingestion. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 28, n. 1, p. 49-51, 2005.

PILLAI, S.P. et al. Umbelliferone analogues and their potential to inhibit benzo(a)-pyrene and hydrogen peroxide induced mutations. **J. Nat. Prod.**, v. 62, p. 1358-1362, 1999.

PINHEIRO, T.R. et al. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 725-728, 1998.

PITTLER, M.H.; ERNST, E. Efficacy of kava extract for treating anxiety: systematic review and meta-analysis. **Journal Clinical Psychopharmacology**, v. 20, p. 84-89, 2000.

PIZZOLATTI, M.G. et al. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 177-182, 2008a.

_____ Analysis of volatile compounds released from flowers and roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by headspace/SPME. **The Journal of Essential Oil Research**, *in press*, 2008b.

_____ A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, p. 603-606, 2004.

_____ Trypanocidal activity from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, v. 10, n. 5, p. 422-426, 2003.

_____ Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 12, n. 10, p. 21-26, 2002.

PIZZOLATTI, M.G.; LUCIANO, C.; DELLE MONACHE, F. Styryl- and dihydrostyryl-2-pyrones derivatives from *Polygala sabulosa*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 819-822, 2000.

PODTAR, M.K. et al. Convenient and efficient protocols for coumarin synthesis via Pechmann condensation in neutral ionic liquids. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v. 235, p. 249-252, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

QIN, H.; XIA, X.; LI, Z. Effects of polysaccharide of *Polygala aureocauda* on the immunity functions of normal mouse. **Zhong Yao Cai**, v. 21, n. 9, p. 467-469, 1998.

RADULOVIĆ, N. et al. Antimicrobial synergism and antagonism of salicylaldehyde in *Filipendula vulgaris* essential oil. **Fitoterapia**, v. 78, n. 7-8, p. 565-570, 2007.

RAMANI, A. et al. One-pot synthesis of coumarins: catalysis by the solid base, calcined Mg-Al hydrotalcite. **Green Chemistry**, p. 163-165, 1999.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 692 p.

RAO, M.S.; RAMAN, N.V. A novel flavonoid from *Polygala chinensis*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 4, p. 447-448, 2004.

REDDY, N.S. et al. Synthesis of new coumarin 3-(N-aryl) sulfonamides and their anticancer activity. **Bioorg. Med. Chem. Letters**, v. 14, p. 4093-4097, 2004.

REFOUVELET, B. et al. Synthesis of 4-hydroxycoumarin and 2,4-quinolinediol derivatives and evaluation of their effects on the viability of HepG2 cells and human hepatocytes culture. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 39, n. 11, p. 931-937, 2004.

REX, A.; MORGENSTERN, E.; FINK, H. Anxiolytic-like effects of Kava-kava in the elevated plus maze test a comparison with diazepam. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 26, p. 855-860, 2002.

RHEE, J.K. et al. Screening of the wormicidal Chinese raw drugs on *Clonorchis sinensis*. **Am. Journ. Chin. Med.**, v. 9, n. 4, p. 277-284, 1981.

RIBAS, C.M. et al. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: Evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokines pathways. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, *in press*, 2008.

RODGERS, R.J. Animal models of anxiety: where next? **Behav. Pharmacol.**, v. 8, p. 477-496, 1997.

RODGERS, R.J.; DALVI, A. Anxiety, defence and the elevated plus-maze. **Neurosci. Biobehav. Rev.**, v. 21, n. 6, p. 801-810, 1997.

ROOSEMONT, J. *Polygala senega* and two adulterants: *Glinus oppositifolius* and *Spergularia marginata*. **Pharmaceutisch Tijdschrift voor Belgie**, v. 34, p. 49-57, 1957.

ROSATI, O. et al. Synthesis, docking studies and anti-inflammatory activity of 4,5,6,7-tetrahydro-2H-indazole derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 15, p. 3463-3473, 2007.

SABOU, R. et al. Synthesis of 7-hydroxy-4-methylcoumarin via the Pechmann reaction with Amberlyst ion-exchange resins as catalysts. **J. Catal.**, v. 232, p. 34-37, 2005.

SALVADOR, M.J. et al. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima*. **Pharm. Biol.**, v. 42, n. 2, p. 138-148, 2004.

SANDFORD, J.J.; ARGYROPOULOS, S.V.; NUTT, D.J. The psychobiology of anxiolytic drugs Part 1: Basic neurobiology. **Pharmacol. Ther.**, v. 88, p. 197-212, 2000.

SARDARI, S. et al. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

SCHAECHTER, M. et al. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 664 p.

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

SCHULTZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional – Um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. São Paulo: Manole, 2002. 386 p.

SHADER, R.I.; GREENBLATT, D.J. Use of benzodiazepines in anxiety disorders. **New Engl. J. Med.**, v. 13, p. 1398-1405, 1993.

SHANMUGASUNDARAM, M.; MANIKANDAN, S.; RAGHUNATHAN, R. High chemoselectivity in microwave accelerated intramolecular domino Knoevenagel hetero Diels-Alder reactions- an efficient synthesis of pyrano[3-2c] coumarin frameworks. **Tetrahedron**, v. 58, p. 997-1003, 2002.

SHARAN, M. et al. Effects of methyl jasmonate as elicitor on the activation of phenylalanine ammonia-lyase and the accumulation of scopoletin and scopolin in tobacco cell cultures. **Planta Med.**, v. 132, p. 13-19, 1998.

SHARMA, G.V.M. et al. An efficient ZrCl₄ catalyzed one-pot solvent free protocol for the synthesis of 4-substituted coumarins. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, p. 6119-6121, 2005.

SHAW, C.Y. et al. Antioxidant properties of scopoletin isolated from *Sinomonium acutum*. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 823-825, 2003.

SILVA, T.M.S. et al. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 1, p. 35-38, 2007.

SILVA, A.M. et al. Relevance of micrometastases detected by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for melanoma recurrence: systematic review and meta-analysis. **São Paulo Med. J.**, v. 121, n. 1, p. 24-27, 2003.

SIMÕES, C.M.O., SPITZER, V., Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre-Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 1999. p. 387.

SINGH, V. et al. Microwave accelerated preparation of [bmim][HSO₄] ionic liquid: an acid catalyst for improved synthesis of coumarins. **Catal. Commun.**, v. 6, p. 57-60, 2005.

SINGH, Y.N.; BLUMENTHAL, M. Kava: an overview. Distribution, mythology, culture, chemistry and pharmacology of the South Pacific's most revered herb. **Herbalgram**, v. 39, p. 33-56, 1997.

SINGH, Y.N. Kava: an overview. **J. Ethnopharmacol.**, v. 37, n. 1, p. 13-45, 1992.

SINGH, Y.N. Effects of kava on neuromuscular transmission and muscle contractility. **J. Ethnopharmacol.**, v. 7, n. 3, p. 267-276, 1983.

SMITH, K.K. et al. Anxiolytic effects of kava extracts and kavalactones in the chick social separation - stress paradigm. **Psychopharmacology**, v. 155, p. 86-90, 2001.

SOLDI, C. et al. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 16, n. 6, p. 3377-3386, 2008.

SORRENTINO, L.; CAPASSO, A.; SCHMIDT, M. Safety of ethanolic kava extract: results of a study of chronic toxicity in rats. **Phytomedicine**, v. 13, p. 542-549, 2006.

SOUZA, T.J.T. et al. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.

SOYLU, S. Accumulation of cell-wall bound phenolic compounds and phytoalexin in *Arabidopsis thaliana* leaves following inoculation with pathogens of *Pseudomonas syringae*. **Plant Sci.**, v. 170, p. 942-952, 2006.

STANCHEV, S. et al. Synthesis, computational study and cytotoxic activity of new 4-hydroxycoumarin derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 43, n. 4, p. 694-706, 2008.

STEIN, A.C. et al. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 107, n. 1, p. 95-98, 2006.

STICKEL, F. et al. Hepatitis induced by Kava (*Piper methysticum* rhizoma). **Journal of Hepatology**, v. 39, p. 62-67, 2003.

SUN, X.L. et al. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 1727-1731, 2007.

TAVARES, L.C. QSAR: A abordagem de Hansch. **Quim. Nova**, v. 27, n. 4, p. 631-639, 2004.

THOMAS, G. **Química Medicinal – Uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413p.

TIAN, Z. et al. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 181-186, 2006.

TOPLISS, J.G. et al. Natural and synthetic substances related to human health. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, p. 1957-1985, 2002.

TRUONG, V.D. et al. Phenolic acid content and composition in leaves and roots of common commercial sweetpotato (*Ipomea batatas* L.) cultivars in the United States. **J. Food Sci.**, v. 72, n. 6, p. 343-349, 2007.

UNGER, M. et al. Inhibition of cytochrome P450 3A4 by extracts and kavalactones of *Piper methysticum* (Kava-Kava). **Planta Med.**, v. 68, n. 12, p. 1055-1058, 2002.

UPADHYAY, K.K.; MISHRA, R.K.; KUMAR, A. A convenient synthesis of some coumarin derivatives using SnCl₂ · 2H₂O as Catalyst. **Catal. Lett.**, v. 121, n. 1-2, p. 118-120, 2008.

VALIZADEH, H.; SHOCKRAVI, A. An efficient procedure for the synthesis of coumarin derivatives using TiCl₄ as catalyst under solvent-free conditions. **Tetrahedron Lett.**, v. 46, p. 3501-3503, 2005.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **DDT**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VOLZ, H.P.; KIESER, M. Kava-kava extract WS 1490 versus placebo in anxiety disorders a randomized placebo-controlled 25-week outpatient trial. **Pharmacopsychiatry**, v. 30, p. 1-5, 1997.

WANG, H. et al. Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*. **Phytomedicine**, v. 15, n. 5, p. 321-326, 2008.

WANG, H. et al. Studies on chemical constituents in roots of *Polygala tenuifolia*. **Zhongguo Zhong**, v. 28, n. 9, p. 828-830, 2003.

WASOWSKI, C. et al. Isolation and identification of 6-methylapigenin, a competitive ligand for the brain GABA(A) receptors, from *Valeriana wallichii*. **Planta Med.**, v. 68, n. 10, p. 934-936, 2002.

WATERMAN, P.G.; MOLE, S. **Methods in Ecology- Analysis of phenolic plant metabolites**. London: Ed. Blackwell Scientific Publication, 1994. 238 p.

WATSON, B.T.; CHRISTIANSEN, G.E. Solid phase synthesis of substituted coumarins-3-carboxylic acids via the Knoevenagel condensation. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, p. 6087-6090, 1998.

WHERRY, E. Presence of free methyl salicylate in some American species of *Polygala*, **J. Washington Acad. Sci.**, v. 17, p. 191-194, 1927.

WHITTON, P.A. et al. Kava lactones and the kava-kava controversy. **Phytochemistry**, v. 64, p. 673-679, 2003.

WHO - World Health Organization, policies and managerial guidelines for national cancer control programs. **Rev. Panam. Salud Publica**, v. 12, n. 5, p. 366-370, 2002.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.** v. 37, p. 99-105, 1998.

WOODS, J.H.; KATZ, J.L.; WINGER, G. Benzodiazepines: use, abuse and consequences. **Pharmacology Research**, v. 44, p. 151-338, 1992.

- WU, J.F. et al. Antioxidants and a new dihydroisocoumarins from *Polygala hongkongensis* H. **Nat. Prod. Res., Part B**, v. 21, n. 7, p. 580-584, 2007.
- WU, J.H. et al. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 5917-5921, 2005.
- WURDACK, J.J.; SMITH, L.B. **Flora Illustrada Catarinense. Polygalaceae**. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense S.A., p. 3-52, 1971.
- XU, K. et al. Study on the antihyperlipidemic effective constituents of *Polygala fallax* Hemsl. **Zhongyaocai**, v. 29, n. 1, p. 16-19, 2006.
- XU, J.D.; WANG, W.; QIN, X.M. Different mechanisms mediated the potentiation uterine smooth muscle caused by *Polygala tenuifolia* decoction progesterone in virginal rats. **Zhongguo Zhong**, v. 30, n. 4, p. 295-297, 2005.
- YABE, T. et al. Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine. **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 106-114, 2003.
- YASAR, S. et al. Evaluation of the novel antiepileptic drug, AWD 131-138, for benzodiazepine-like discriminative stimulus and reinforcing effects in squirrelmonkeys. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 465, n. 3, p. 257-265, 2003.
- YASUNAKA, K. et al. Antibacterial activity of crude extracts from Mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes. **J. Ethnopharmacol.**, n. 97, p. 293-299, 2005.
- YAYLI, N. et al. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Minuartia meyeri*. **Turk J. Chem.**, v. 30, p. 71-76, 2006.
- YEN, G.C.; CHEN, H.Y. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 43, p. 27-32, 1995.
- YOSHIKAWA, M. et al. Bioactive saponinas and glycosides. II. Senegae Radix (2): Chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin, Z- senegasaponin and Z-senegins II, III and IV. **Chem. Pharm. Bull**, v. 44, n. 7, p. 1305-1313, 1996.
- YOSHIKAWA, M. et al. Bioactive saponinas and glycosides. I. Senegae Radix (1): E-senegasaponin and Z- senegasaponin, their inhibitory effect on alcohol absorption and hypoglycemic activity. **Chem. Pharm. Bull**, v. 43, n. 12, p. 2115-2122, 1995.
- ZHANG, Z. J. Therapeutic effects of herbal extracts and constituents in animal models of psychiatric disorders. **Life Sci.**, v. 75, n. 14, p. 1659-1699, 2004.
- ZHANG, D. et al. Oligossacharide polyesters from roots of *Polygala fallax*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 733-741, 1997.

www.inca.gov.br/regpop/2003/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=11 (Acesso em 19/02/2008).

www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2 (Acesso em 19/02/2008).

<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/index.asp?link=mapa.asp&ID=13> (Acesso em 19/02/2008).

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=4444&word> (Acesso em: 18/04/2008).

<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=10241&word=89> (Acesso em: 16/04/2008).

http://www.ache.com.br/arquivo/institucional/phytomedica_jornal/numero6.pdf (Acesso em: 10/03/2008)