

Dalila Venzke

**ESTUDO QUIMIOSSISTEMÁTICO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Polygala* E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica.
Orientador: Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti.

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Venzke, Dalila

ESTUDO QUIMIOSSISTEMÁTICO DE ESPÉCIES DO GÊNERO Polygala
E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS. / Dalila Venzke ;
orientador, Moacir Geraldo Pizzolatti - Florianópolis, SC,
2015.

230 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Gênero Polygala. 3. isoflavonas. 4.
atividade biológica. I. Pizzolatti, Moacir Geraldo. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

Dalila Venzke

**ESTUDO QUIMIOSSISTEMÁTICO DE ESPÉCIES DO
GÊNERO *Polygala* E AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES
BIOLÓGICAS.**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 26 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Hugo A. Gallardo Olmedo
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti
(QMC-UFSC)
Orientador

Prof. Dr. Andersson Barison
(DQ-UFPR)
Relator

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
(QMC-UFSC)

Prof. Dr. Cristian Soldi
(UFSC-Curitiba)

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke
(QMC-UFSC)

Prof. ^a Dr. ^a Alessandra Mascarello
(QMC-UFSC)

Prof. ^a Dr. ^a Vera Lucia Azzolin Frescura Bascuñan
(QMC-UFSC)

Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o címbalo que retine. E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. E ainda que distribuísse todos os meus bens para sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, e não tivesse amor, nada disso me aproveitaria. O amor é sofredor, é benigno; o amor não é invejoso; o amor não se vangloria, não se ensoberbece, não se porta inconvenientemente, não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não suspeita mal; não se regozija com a injustiça, mas se regozija com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acaba; mas havendo profecias, serão aniquiladas; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, desaparecerá; porque, em parte conhecemos, e em parte profetizamos; mas, quando vier o que é perfeito, então o que é em parte será aniquilado. Quando eu era menino, pensava como menino; mas, logo que cheguei a ser homem, acabei com as coisas de menino. Porque agora vemos como por espelho, em enigma, mas então veremos face a face; agora conheço em parte, mas então conhecerei plenamente, como também sou plenamente conhecido. Agora, pois, permanecem a fé, a esperança, o amor, estes três; mas o maior destes é o amor.

1 Coríntios Cap.13

Dedico esta tese a minha família, meu bem mais precioso.

AGRADECIMENTOS

-A Deus, autor da minha vida, sabedoria e força.

-Aos meus pais Dario e Ursula que não conseguiram estudar, mas nunca mediram esforços para que eu pudesse concluir os estudos. Ao meu marido Djonatan, pelo seu apoio, carinho e paciência nesta jornada.

- Ao professor Dr. Moacir G. Pizzolatti por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa e por sua dedicação, paciência e conhecimentos transmitidos.

-A professora Dra. Inês Maria da Costa Brighente pelo auxílio em testes de atividade antioxidantes, acetilcolinesterase e na revisão do artigo.

- Aos amigos do LQPN, Ana P. Ruani (Aninha), Francieli K. de Carvalho (Fran), Lizandra C. Bretanha (Liza), Luciana Tavares (Lu), Henrique Moresco, Heros Horst, Aldo Sena de Oliveira, Guilherme Colla, Leandro Espindola (Leco), Gustavo Queiroz (Baiano), Tiago Tizziani (Tizzi), Handriela de Oliveira, Amanda, Hugo, Alechania, Naielly, Marcos, Tiago (santista) e Cristiane pelos bons momentos proporcionados.

- Aos amigos do laboratório vizinho, Patrícia D. Neuenfeldt, Maria Claudia (Marry), Larissa (Larry) e Luiz pelas horas de descontração.

-As amigas Ana P. Ruani, Lizandra C. Bretanha, Francieli K. de Carvalho e Luciana Tavares pela amizade e pelas palavras de motivação em momentos difíceis.

-A professora Rosimeri S. Moro e Tiago Katu Pereira da UEPG e Francieli K. Carvalho pelo auxílio na coleta de material vegetal em Ponta Grossa.

- Aos professores Raquel Ludke (UFPel) e Rafael Trevisan (UFSC) pela identificação e depósito do material vegetal.

- A Lizandra C. Bretanha e professor Gustavo A. Micke pelo auxílio na microextração e análise de CG-EM.

-Aos alunos Guilherme Colla e Aldo Sena de Oliveira pela ajuda nos ensaios de atividade antioxidante e inibição de acetilcolinesterase.

- A Ana Paula Ruani por me ajudar nos experimentos de permeabilidade e cálculo de estatística e ao Leandro e Gustavo Queiroz pela ajuda com análises de RMN. Ao Heros pelas dicas de HMBC e na cromatografia.

-Ao Tiago Tizziani pela realização da análise de IV e pela ajuda na correção do texto.

-As alunas de IC, Alechania e Cristiane pelo auxílio na realização da separação dos compostos.

- Ao professor Eduardo Dalmarco e seu aluno Fabio Arruda-Silva pela realização dos testes de atividade anti-inflamatória.

-A professora Susana Johann pela realização dos testes de atividade antifúngica.

-A aluna Catharina e ao professor Adair Santos pelo auxílio na determinação da atividade antinociceptiva e por terem me recebido prontamente no laboratório para acompanhar os experimentos.

- A professora Fátima R.M. Barreto Silva e aluna Delsi Altenhofen pela determinação de atividade anti-hiperglicêmica.

-Ao professor Mario Steindel pelo auxílio na determinação de atividade tripanocida e leishmanicida.

- Aos professores membros da banca examinadora pela avaliação do presente trabalho.

-Ao CEBIME pela realização de análises de massas de alta resolução.

-Aos funcionários da pós-graduação Jadir e Grace pela ajuda na parte burocrática ao longo dos quatro anos.

-Aos órgãos financiadores CNPq e Capes e a UFSC.

- A todos que contribuíram de alguma forma com o presente trabalho.

Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

No presente trabalho realizou-se o estudo fitoquímico das espécies *P. molluginifolia*, *P. campestris* e *P. longicaulis*. A fração acetato de etila de *P. molluginifolia* foi submetida ao fracionamento cromatográfico levando ao isolamento de quatro isoflavonas (1-4) da coleta 1, e duas isoflavonas (7) e (8) da coleta 2, das quais a isoflavona (1) é inédita na literatura. A fração aquosa de *P. molluginifolia* da coleta 1 forneceu os compostos isolados rutina (5) e sacarose (6). As diidroestirilpironas (9) e (10) foram obtidas do fracionamento da fração acetato de etila de *P. longicaulis* e as xantonas (11) e (12) foram isoladas da fração aquosa de *P. campestris*. A análise de determinação dos componentes voláteis de *P. molluginifolia* mostrou o salicilato de metila como componente majoritário na raiz (37,7%), nas folhas o dodecanoato de etila (2,6%), nos caules o tetradecanoato de etila (9,4%) e nas flores dodecanoato de isoamila (28,1%). Na determinação de atividade antioxidante e inibição da AchE dos extratos, frações e compostos isolados (1-4), o extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB), a fração acetato de etila (PMFA) e as isoflavonas (1) e (4) apresentaram os melhores resultados. A xantona (12) e as diidroestirilpironas (9) e (10) apresentaram as maiores permeabilidades no ensaio PAMPA. PMEB, PMFA e compostos (1) e (4) também apresentaram atividade frente a *T. cruzi* e *Leishmania* spp. As isoflavonas (1), (4) e PMEB exibiram atividade antifúngica frente a cepas de *Pb18*, *C. neoformans*, *C. gattii*. Os testes de atividade anti-inflamatória no modelo de pleurisia mostraram que PMEB, PMFA e compostos isolados (4) e (5) inibiram a migração de leucócitos, neutrófilos e a exsudação. PMEB e isoflavona (4) também mostraram efeitos antinociceptivos e não afetaram a atividade locomotora dos camundongos. Na determinação de atividade anti-hiperglicêmica observou-se que PMFA e isoflavonas (1) e (4) reduziram a glicemia de forma significativa.

Palavras-chave: *Polygala*; isoflavonas; atividade biológica.

ABSTRACT

In the present work, a phytochemical study of the species *P. molluginifolia*, *P. campestris* and *P. longicaulis* was done. The ethyl acetate fraction of *P. molluginifolia* was subjected to silica gel chromatographic column leading to isolation of isoflavones (1-4) (collection 1), and two isoflavones (7) and (8) (collection 2), of which the isoflavone (1) is an unpublished compound. The aqueous fraction of *P. molluginifolia* provided the isolated compounds rutin (5) and sucrose (6). The dihydrostyrylpyrones (9) and (10) were obtained from chromatographic fractionation of ethyl acetate fraction and the xanthenes (11) e (12) were obtained from the aqueous fraction of *P. campestris*. The analyses of volatile components of *P. molluginifolia* showed methyl salicylate as the main constituent in the roots (37,7%), ethyl dodecanoate in the leaves (2,6%), ethyl tetradecanoate (9,4%) in the stems and isoamyl dodecanoate (28,1%) in the flowers. In the determination of antioxidant activity and AchE inhibition of extracts, fractions and isolated compounds (1-4), the crude extract of *P. molluginifolia*, ethyl acetate fraction (PMFA) and isoflavones (1) and (4) showed the best results. The xanthone (12) and dihydrostyrylpyrones (9) e (10) presented the highest permeabilities in the PAMPA assay. PMEB, PMFA and compounds (1) and (4) also showed activities against *T. cruzi* e *Leishmania* spp. The isoflavones (1), (4) and PMEB exhibited antifungal activity against strains of *Pb18*, *C. neoformans*, *C. gattii*. The anti-inflammatory activity evaluation on the model of pleurisy showed that PMEB, PMFA and isolated compounds (4) and rutin (5) of *P. molluginifolia* inhibited the migration of leukocytes, neutrophils and exudation. PMEB and isoflavone (4) also showed antinociceptive effects and did not affect spontaneous locomotor activity of the mice. In the determination of antihyperglycemic activity, PMFA and isoflavones (1) and (4), significantly decreased the glycemia.

Keywords: *Polygala*; isoflavones; biological activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Polygala</i>	34
Figura 2. Diidrostiril-2-pironas [9-11] e estiril-2-pironas [12-15] isoladas da espécie <i>Polygala sabulosa</i>	36
Figura 3. Cumarinas isoladas do gênero <i>Polygala</i>	37
Figura 4. Flavonoides isolados de espécies do gênero <i>Polygala</i>	37
Figura 5. Estrutura de isoflavonas [39-42] isoladas de espécies do gênero <i>Polygala</i>	40
Figura 6. Estrutura das xantonas [43-104] isoladas do gênero <i>Polygala</i>	46
Figura 7. Estrutura das xantonas [105-114] isolados do gênero <i>Polygala</i>	47
Figura 8. <i>Polygala molluginifolia</i> coletada no município de São Lourenço do Sul. Foto do autor.....	52
Figura 9. Espécie <i>Polygala longicaulis</i> coletada no município de Ponta Grossa. Fotografada por Francieli K. De Carvalho.....	53
Figura 10. <i>Polygala campestris</i> coletada em Rancho Queimado. Foto do autor.....	53
Figura 11. Local de coleta das espécies no Abrigo Rio Pitangui em Ponta Grossa. Foto cedida pela professora Rosemeri Moro (UEPG)....	58
Figura 12. Ponto de coleta da espécie <i>P. molluginifolia</i>	58
Figura 13. Ponto de coleta de <i>P. campestris</i> em Rancho Queimado.....	59
Figura 14. Obtenção dos extratos brutos e frações da Coleta 1 de <i>P. molluginifolia</i>	61
Figura 15. Isolamento de compostos da fração acetato de etila da Coleta 1 de <i>P. molluginifolia</i>	62
Figura 16. Isolamento de compostos da fração aquosa de <i>P. molluginifolia</i>	63
Figura 17. Obtenção de extratos brutos e frações de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 2).....	63
Figura 18. Isolamento da fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 2).....	64
Figura 19. Preparo de extratos e frações de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 3)....	65

Figura 20. Isolamento da fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 3).....	66
Figura 21. Preparo dos extratos e frações de <i>P. longicaulis</i>	66
Figura 22. Fracionamento da fração acetato de etila de <i>P. longicaulis</i>	65
Figura 23. Preparo de extratos e frações de <i>P. campestris</i>	68
Figura 24. Fracionamento cromatográfico da fração aquosa de <i>P. campestris</i>	68
Figura 25. Estrutura do composto (1).....	91
Figura 26. Estruturas químicas dos compostos (2-4).....	95
Figura 27. Estrutura química da rutina (5).....	97
Figura 28. Estrutura química da sacarose (6).....	99
Figura 29. Cristais formados nas frações 8 (composto 7) 11 (composto 8).....	101
Figura 30. Estrutura proposta para o composto (7).....	104
Figura 31. Representação de correlações heteronucleares (HMBC) da aurículasina (8).....	105
Figura 32. Estrutura química do composto (9).....	107
Figura 33. Estrutura proposta para o composto (10).....	109
Figura 34. Estrutura da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona isolada da fração aquosa de <i>P. campestris</i>	110
Figura 35. Estrutura química do composto (12).....	113
Figura 36. Complexo formado entre Al ³⁺ e um flavonoide.....	117
Figura 37. Formas radicalar e não radicalar do DPPH.....	112
Figura 38. Efeito do extrato bruto (PMEB) sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	134
Figura 39. Efeito da fração aquosa da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	135
Figura 40. Efeito da fração acetato de etila sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	136
Figura 41. Efeito da fração hexano de <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	136

Figura 42. Efeito do composto (4) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	137
Figura 43. Efeito do composto (5) (Rutina) da <i>Polygala molluginifolia</i> sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).....	138
Figura 44. Avaliação da atividade locomotora do extrato bruto (PMEB) e isoflavona isolada (4) de <i>P. molluginifolia</i>	140
Figura 45. Avaliação do extrato bruto na redução da nocicepção induzida pela formalina.....	141
Figura 46. Avaliação da isoflavona (4) na redução da nocicepção induzida pela formalina.....	142
Figura 47. Avaliação da alodinia mecânica do extrato bruto de <i>P. molluginifolia</i>	143
Figura 48. Avaliação do efeito do extrato bruto sobre a hiperalgesia térmica.....	144
Figura 49. Efeito do extrato bruto (PMEB) sob a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.....	145
Figura 50. Efeito da isoflavona (4) sob a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.....	145
Figura 51. Efeito do extrato bruto (PMEB) sob a nocicepção central induzida por capsaicina e cinamaldeído.....	146
Figura 52. Efeito da isoflavona (4) sob a nocicepção central induzida por capsaicina e cinamaldeído.....	147
Figura 53. Envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo do extrato bruto de <i>P. molluginifolia</i>	148
Figura 54. Efeito agudo de PMFA na curva de tolerância a glicose.....	149
Figura 55. Efeito agudo da fração acetato de etila no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	150
Figura 56. Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridasas intestinais <i>in vitro</i>	150
Figura 57. Efeito agudo da fração acetato de etila na atividade de dissacaridasas intestinais <i>in vivo</i>	151
Figura 58. Efeito da fração acetato de etila na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	152

Figura 59. Efeito agudo da isoflavona (1) na curva de tolerância a glicose.....	153
Figura 60. Efeito do composto (1) na secreção de insulina.....	154
Figura 61. Efeito agudo da isoflavona (1) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	155
Figura 62. Efeito da Isoflavona (1) na atividade de dissacaridasas intestinais <i>in vitro</i>	155
Figura 63. Efeito da Isoflavona (1) na atividade de dissacaridasas intestinais <i>in vivo</i>	156
Figura 64. Efeito da Isoflavona (1) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	157
Figura 65. Efeito da Isoflavona (1) na concentração de LDH.....	157
Figura 67. Efeito da isoflavona (4) na secreção de insulina.....	159
Figura 68. Efeito agudo da isoflavona (4) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	159
Figura 69. Efeito do composto (4) na atividade de dissacaridasas intestinais <i>in vitro</i>	160
Figura 70. Efeito do composto (4) na atividade de dissacaridasas intestinais <i>in vivo</i>	160
Figura 71. Efeito inibitório o composto (4) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	161
Figura 72. Efeito do composto (4) na concentração de LDH.....	162
Figura 73. Espectro de IV (pastilhas de KBr) da isoflavona (1).....	183
Figura 74. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) do composto (1).....	183
Figura 75. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) ampliado do composto (1).....	184
Figura 76. Espectro de RMN de ¹³ C {1H} (100 MHz, CD ₃ OD) do composto (1).....	184
Figura 77. Espectro de RMN de DEPT (100 MHz, CD ₃ OD) do composto (1).....	185
Figura 78. Espectro de HMQC (400 MHz, CD ₃ OD) do composto (1).....	185
Figura 79. Espectro de HMBC (400 MHz, CD ₃ OD) do composto (1).....	186
Figura 80. Espectro de HR-MS do composto (1) (Parte A).....	186

Figura 81. Espectro de HR-MS do composto (1) (Parte B).....	187
Figura 82. Espectro de RMN de IV (Pastilhas KBr) do composto (2).....	187
Figura 83. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).....	188
Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl_3) ampliado do composto (2).....	188
Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).....	189
Figura 86. Espectro de DEPT (100 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).....	189
Figura 87. Espectro de HMQC (400 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).....	190
Figura 88. Espectro de HMQC (400 MHz, CD_3Cl_3) ampliado do composto (2).....	190
Figura 89. Espectro de HMBC (400 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).....	191
Figura 90. Espectro de HMBC (400 MHz, CD_3Cl_3) ampliado do composto (2).....	191
Figura 91. Espectro de HR-MS do composto (2) (Parte A).....	192
Figura 92. Espectro de HR-MS do composto (2) (Parte B).....	192
Figura 93. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (3).....	193
Figura 94. Espectro de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto (3).....	193
Figura 95. Espectro de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (3).....	194
Figura 96. Espectro de ^{13}C {1H} (100 MHz, CDCl_3) do composto (3).....	194
Figura 97. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) do composto (3).....	195
Figura 98. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) do composto (3).....	195
Figura 99. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (3).....	190
Figura 100. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto (3).....	196

Figura 101. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl ₃) ampliado do composto (3).....	197
Figura 102. Espectro de NOE (400 MHz, CDCl ₃) do composto (3) (irradiação de H-2').....	197
Figura 103. Espectro de NOE (400 MHz, CD ₃ Cl ₃) do composto (3) (irradiação OME-3').....	198
Figura 104. HR-MS do composto (3) (Parte A).....	198
Figura 105. HR-MS do composto (3) (Parte B).....	199
Figura 106. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (4).....	199
Figura 107. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₃ D ₆ O) composto (4).....	200
Figura 108. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₃ D ₆ O) ampliado do composto (4).....	200
Figura 109. Espectro de RMN de ¹³ C {1H} (100 MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (4).....	201
Figura 110. Espectro DEPT (100 MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (4).....	201
Figura 111. Espectro HMQC (400 MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (4).....	202
Figura 112. Espectro HMQC (400 MHz, C ₃ D ₆ O) ampliado do composto (4).....	202
Figura 113. Espectro HMBC (400 MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (4).....	203
Figura 114. Espectro HMBC (400 MHz, C ₃ D ₆ O) ampliado do composto (4).....	203
Figura 115. Espectro HR-MS do composto (4) (Parte 1).....	204
Figura 116. Espectro HR-MS do composto (4) (Parte 2).....	204
Figura 117. Espectro de RMN de ¹³ C {1H} (100MHz, C ₅ D ₅ N) da rotina (5).....	205
Figura 118. Espectro de RMN de ¹³ C {1H} (100MHz, C ₅ D ₅ N) da sacarose (6).....	205
Figura 119. Espectro de Infravermelho (Pastilha de KBr) do composto (7).....	206
Figura 120. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto (7).....	200
Figura 121. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) ampliado do composto (7).....	207

Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100 MHz, CDCl_3) do composto (7).....	207
Figura 123. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) do composto (7).....	208
Figura 124. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (7).....	208
Figura 125. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto (7).....	209
Figura 126. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (7).....	209
Figura 127. Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) do composto (7) (irradiação de OMe).....	210
Figura 128. Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) do composto (7) (irradiação de H-5').....	210
Figura 129. HR-MS do composto (7) (Parte 1).....	211
Figura 130. HR-MS do composto (7) (Parte 2).....	211
Figura 131. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (8).....	212
Figura 132. Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do composto (8).....	206
Figura 133. Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) ampliado do composto (8).....	213
Figura 134. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100MHz, CDCl_3) do composto (8).....	213
Figura 135. Espectro de DEPT (100MHz, CDCl_3) do composto (8).....	214
Figura 136. Espectro de HMQC (400MHz, CDCl_3) do composto (8).....	214
Figura 137. Espectro de HMBC (400MHz, CDCl_3) do composto (8).....	215
Figura 138 . Espectro de HR-MS do composto (8) (Parte A).....	215
Figura 139 . Espectro de HR-MS do composto (8) (Parte B).....	216
Figura 140 . Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (9).....	216
Figura 141 . Espectro de RMN de ^1H (400MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (9).....	217
Figura 142 . Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (9).....	217

Figura 143. Espectro DEPT (100MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (9)	218
Figura 144. Espectro HMQC (400MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (9)	218
Figura 145. Espectro HMBC (400MHz, C ₃ D ₆ O) do composto (9)	219
Figura 146. Espectro HR-MS do composto (9) (Parte A).....	219
Figura 147. Espectro HR-MS do composto (9) (Parte B).....	220
Figura 148. Espectro de Infravermelho (Pastilhas de KBr) do composto (10)	220
Figura 149. Espectro de RMN de ¹ H (400MHz, CDCl ₃) do composto (10)	221
Figura 150. Espectro de RMN de ¹³ C {1H} (100MHz, CDCl ₃) do composto (10)	221
Figura 151. Espectro DEPT (100MHz, CDCl ₃) do composto (10)	222
Figura 152. Espectro HMQC (400MHz, CDCl ₃) do composto (10)	222
Figura 153. Espectro HMBC (400MHz, CDCl ₃) do composto (10)	223
Figura 154. Espectro HR-MS do composto (10) (Parte A).....	223
Figura 155. Espectro HR-MS do composto (10) (Parte B).....	224
Figura 156. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (11)	224
Figura 157. Espectro de RMN de ¹ H (200MHz, C ₅ D ₅ N) do composto (11)	225
Figura 158. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, C ₅ D ₅ N) ampliado do composto (11)	225
Figura 159. Espectro de RMN de ¹³ C {1H} (100 MHz, C ₅ D ₅ N) do composto (11)	226
Figura 160. HR-MS do composto (11) (Parte A).....	226
Figura 161. HR-MS do composto (11) (Parte B).....	227
Figura 162. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (12)	227
Figura 163. Espectro de RMN de ¹ H (200 MHz, C ₅ D ₅ N) do composto (12)	228

Figura 164. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ampliado do composto (12).....	228
Figura 165. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ampliado do composto (12).....	229
Figura 166. Espectro de massas de alta resolução do composto (12) (Parte A).....	229
Figura 167. Espectro de massas de alta resolução do composto (12) (Parte B).....	230

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diidroestiril-2-pironas e estiril-2-pironas isoladas do gênero <i>Polygala</i>	35
Tabela 2. Cumarinas isolados do gênero <i>Polygala</i>	36
Tabela 3. Flavonoides isolados de espécies do gênero <i>Polygala</i>	38
Tabela 4. Principais xantonas isoladas do gênero <i>Polygala</i>	41
Tabela 5. Principais atividades biológicas reportadas para o gênero <i>Polygala</i> (continua).....	49
Tabela 6. Dados de RMN (400 MHz) do composto (1) (CD ₃ OD).....	90
Tabela 7. Dados de RMN do composto (2) (400 MHz, CDCl ₃), (3) (400 MHz, CDCl ₃) e (4) (400 MHz, C ₃ D ₆ O).....	93
Tabela 8. Deslocamentos químicos de ¹³ C da rutina (5) em C ₅ D ₅ N e comparação com os dados da literatura.....	98
Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN de ¹³ C da sacarose (6) em C ₅ D ₅ N e comparação com os dados descritos na literatura.....	100
Tabela 10. Dados de RMN dos compostos (7) (CDCl ₃) e (8) (CDCl ₃).....	102
Tabela 11. Dados de RMN do composto (9) (C ₃ D ₆ O).....	107
Tabela 12. Dados espectroscópicos para o composto (10) (CDCl ₃)....	109
Tabela 13. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C do composto (11) em C ₅ D ₅ N.....	111
Tabela 14. Dados de ¹ H, ¹³ C do composto (12) em C ₅ D ₅ N.....	112
Tabela 15. Determinação da atividade antioxidante de extratos brutos e frações de espécies do gênero <i>Polygala</i>	116
Tabela 16. Porcentagem de inibição de extratos brutos e frações frente à enzima acetilcolinesterase.....	121
Tabela 17. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) e efeitos antioxidantes (DDPH) dos compostos isolados (1-4).....	123
Tabela 18. Ensaio de Permeabilidade PAMPA em pH 7,4 e valores de <i>ClogP</i>	125
Tabela 19. Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida com promastigotas de <i>L. brasiliensis</i> e epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	127
Tabela 20. Teste de citotoxicidade com THP1 e Inibição percentual de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	128

Tabela 21. Determinação da porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i>	129
Tabela 22. Determinação de CI_{50} de extratos, frações e compostos isolados frente à atividade contra amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> e <i>L. amazonensis</i>	129
Tabela 23. Porcentagem de inibição dos extratos, frações e compostos isolados frente à atividade antifúngica.....	132
Tabela 24. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em $\mu\text{g/mL}$ de extratos, frações e compostos isolados.....	132

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AGES	Produtos Finais da Glicação Avançada
BSA	Albumina Sérica Bovina
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
Cg	Carragenina
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CIM	Concentração Inibitória Mínima
d	Duplete
DA	Doença de Alzheimer
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
Dex	Dexametasona
DI ₅₀	Dose Inibitória de 50%
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EC ₅₀	Concentração efetiva
E.P.M.	Erro Padrão Médio
HMBC	Heteronuclear multiple-bond correlation
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
Hz	Hertz
i.p.	Intraperitonal
i.pl.	Intraplantar
i.g.	Intragástrico
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LDH	Lactato Desidrogenase
MTT	3-[4,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio
m	Multiplete
PAMPA	Parallel Artificial Membrane Permeability
PCEB	Extrato bruto de <i>Polygala campestris</i>

PCFA	Fração acetato de etila de <i>Polygala</i>
PCFH	Fração hexânica de <i>Polygala campestris</i>
PCFW	Fração aquosa de <i>Polygala campestris</i>
p.f.	Ponto de fusão
PloEB	Extrato bruto de <i>Polygala longicaulis</i>
PloFA	Fração acetato de etila de <i>Polygala longicaulis</i>
PloFH	Fração hexânica de <i>Polygala longicaulis</i>
PloFW	Fração aquosa de <i>Polygala longicaulis</i>
PMEB	Extrato bruto de <i>Polygala molluginifolia</i>
PMFA	Fração acetato de etila de <i>Polygala molluginifolia</i>
PMFH	Fração hexânica de <i>Polygala molluginifolia</i>
PMFW	Fração aquosa de <i>Polygala molluginifolia</i>
ppm	Partes por milhão
R.f.	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
TRPA1	Transient Receptor Potential Ankyrin Receptor
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid Receptor
TMS	Tetrametilsilano
UTM	Unidade Transversa de Mercator
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	31
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 Família Polygalaceae.....	33
2.1.1 Gênero <i>Polygala</i>	33
2.1.1.1 Metabólitos secundários encontrados no gênero <i>Polygala</i>	33
2.1.1.2 Bioatividade do gênero <i>Polygala</i>	47
2.1.1.3 <i>Polygala molluginifolia</i>	51
2.1.1.4 <i>Polygala longicaulis</i>	52
2.1.1.5 <i>Polygala campestris</i>	52
3 OBJETIVOS	55
3.1 Objetivos gerais.....	55
3.1.1 Objetivos específicos.....	55
4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	57
4.1 Materiais e equipamentos utilizados.....	57
4.2 Material vegetal.....	58
4.3 Identificação e depósito das espécies em questão.....	59
4.4 Preparo do material vegetal, secagem e obtenção do extrato bruto.....	60
4.5 Extração sólido-líquido.....	60
4.6 Isolamento e purificação dos compostos.....	60
4.6.1 Fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 1).....	60
4.6.2 Fração aquosa de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 1).....	62
4.6.3 Fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 2).....	63
4.6.4 Fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 3).....	64
4.6.5 Fração acetato de etila de <i>P. longicaulis</i> (Coleta 1).....	66
4.6.6 Fração aquosa de <i>P. campestris</i> (Coleta 1).....	67
4.7 Microextração de voláteis de <i>P. molluginifolia</i> e análise por CG- EM.....	69
4.8 Bioensaios de determinação de atividade antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase.....	69
4.8.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais.....	69
4.8.2 Determinação do teor de flavonoides.....	70
4.8.3 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH.....	70
4.8.4 Determinação do potencial redutor.....	71
4.8.5 Ensaio de Inibição da Acetilcolinesterase.....	71
4.9 Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA).....	72
4.10 Ensaios de atividade leishmanicida e tripanocida.....	73

4.10.1 Infecção de células e tratamento.....	74
4.10.2 Ensaio de toxicidade celular.....	74
4.11 Ensaaios de atividade antifúngica.....	75
4.11.1 Solventes usados.....	73
4.11.2 Meios de cultura.....	75
4.11.3 Fungos.....	75
4.11.4 Inóculo.....	75
4.11.5 Teste de triagem da atividade antifúngica.....	76
4.11.6 Teste da Concentração Inibitória Mínima.....	77
4.12 Atividade anti-inflamatória.....	77
4.12.1. Animais.....	78
4.12.2 Procedimento anestésico.....	78
4.12.3 Eutanásia dos animais.....	78
4.12.4 Pleurisia induzida pela carragenina.....	78
4.12.5 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	79
4.12.6 Coloração dos esfregaços celulares.....	79
4.12.7 Determinação da exsudação.....	80
4.13 Determinação da atividade antinociceptiva.....	80
4.13.1 Animais utilizados para a realização dos testes de atividade antinociceptiva.....	80
4.13.2 Reagentes utilizados.....	81
4.13.3 Avaliação da atividade locomotora.....	81
4.13.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina.....	81
4.13.5 Incisão plantar (dor pós-operatória).....	82
4.13.6 Avaliação da hiperalgesia mecânica.....	82
4.13.7 Medida da hiperalgesia térmica.....	83
4.13.8 Nocicepção induzida por injeção intraplantar de agonistas de TRPV1 e TRPA1 em camundongos.....	83
4.13.9 Nocicepção induzida pela injeção intratecal de agonistas TRPV1 e TRPA1 em camundongos.....	84
4.13.10 Avaliação do envolvimento do sistema opióide no efeito analgésico do extrato bruto e a isoflavona (4).....	85
4.13.11 Análise estatística.....	85
4.14 Avaliações da atividade anti-hiperglicêmica.....	85
4.14.1 Animais.....	85
4.14.2 Determinação da curva de tolerância oral à glicose e insulina.....	86
4.14.2.1 Curva de tolerância oral à glicose.....	86
4.14.2.2 Determinação da insulina sérica.....	86
4.14.3 Determinação do conteúdo de glicogênio.....	87
4.14.4 Determinação da atividade das dissacaridases intestinais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	87

4.14.5	Determinação da atividade anti-glicação.....	87
4.14.6	Análises estatísticas.....	88
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	89
5.1	Análise fitoquímica.....	89
5.1.1	Isolamento de compostos de <i>P. molluginifolia</i>	89
5.1.1.1	Compostos isolados da fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> da coleta 1.....	89
5.1.1.1.1	Composto (1).....	89
5.1.1.1.2	Compostos (2-4).....	92
5.1.1.2	Isolamento de compostos da fração aquosa de <i>P. molluginifolia</i>	97
5.1.1.2.1	Rutina (5).....	97
5.1.1.2.2	Sacarose (6).....	99
5.1.1.3	Isolamento da fração acetato de etila de <i>P. molluginifolia</i> da coleta 2.....	100
5.1.1.3.1	Composto (7).....	100
5.1.1.3.2	Composto (8).....	104
5.1.2	Isolamento dos compostos da fração acetato de etila de <i>P. longicaulis</i>	105
5.1.2.1	Composto (9).....	105
5.1.2.2	Composto (10).....	108
5.1.3	Isolamento de compostos da fração aquosa de <i>Polygala campestris</i>	109
5.1.3.1	Composto (11).....	109
5.1.3.2	Composto (12).....	111
5.1.4	Determinação dos voláteis de <i>P. molluginifolia</i> (Coleta 4) por microextração e análise por CG-EM.....	113
5.2	Atividades biológicas.....	114
5.2.1	Atividade antioxidante in vitro de extratos e frações de espécies do gênero <i>Polygala</i>	114
5.2.2	Ensaio de Inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos e frações de espécies do gênero <i>Polygala</i>	120
5.2.3	Atividade antioxidante (DPPH) e acetilcolinesterase dos compostos isolados (1-4).....	122
5.2.4	Determinação da Permeabilidade dos compostos isolados.....	123
5.2.5	Determinação da atividade tripanocida e leishmanicida.....	126
5.2.6	Determinação de atividade antifúngica.....	130
5.2.7	Atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i>	133
5.2.8	Determinação da atividade Antinociceptiva.....	139
5.2.8.1	Avaliação da atividade locomotora.....	139

5.8.2.2 Avaliação do efeito da administração aguda do extrato bruto ou isoflavona (4) na redução da nocicepção induzida por formalina.....	140
5.8.2.3 Alodinia mecânica.....	142
5.8.2.4 Hiperalgesia térmica.....	143
5.2.8.5 Avaliação do extrato bruto e isoflavona (4) na nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.....	144
5.2.8.6 Efeito do extrato bruto e isoflavona (4) na nocicepção central induzida por capsaicina e cinamaldeído.....	145
5.2.8.7 Envolvimento de receptores opióides na ação antinociceptiva sistemática do extrato bruto (PMEB) e isoflavona (4).....	147
5.2.9 Avaliação da atividade anti-hiperglicêmica.....	148
5.2.9.1 Efeito da fração acetato de etila na curva de tolerância oral à glicose e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	149
5.2.9.2 Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais.....	149
5.2.9.3 Efeito da fração acetato de etila na formação de AGES.....	151
5.2.9.4 Efeito agudo da isoflavona (1) na curva de tolerância oral à glicose.....	152
5.2.9.5 Efeito do composto (1) na secreção de insulina.....	154
5.2.9.6 Efeito agudo da isoflavona (1) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	154
5.2.9.7 Efeito da Isoflavona (1) na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	155
5.2.9.8 Efeito inibitório da Isoflavona (1) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	156
5.2.9.9 Efeito da Isoflavona (1) na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH).....	157
5.2.9.10 Efeito agudo da isoflavona (4) e estradiol na curva de tolerância oral à glicose.....	158
5.2.9.11 Efeito da isoflavona (4) na secreção de insulina.....	158
5.2.9.12 Efeito agudo de isoflavona (4) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.....	159
5.2.9.13 Efeito da isoflavona (4) na atividade de dissacaridases intestinais <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	160
5.2.9.14 Efeito do composto (4) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.....	161
5.2.9.15 Efeito do composto (4) na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH).....	161
5 CONCLUSÕES.....	163
REFERÊNCIAS.....	165
ANEXOS.....	183

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da química orgânica moderna ocorreu de forma conjunta com o estudo de plantas, principalmente a partir século XIX onde foram feitos os primeiros registros envolvendo estudos de plantas sob o ponto de vista científico e que levaram ao isolamento de metabólitos secundários de plantas, já então utilizadas como plantas medicinais (Montanari *et al.*, 2001).

Muitas substâncias isoladas de plantas medicinais desta época como a morfina, quinina, cânfora são empregadas até hoje no tratamento de certas doenças e são ainda consideradas moléculas altamente eficazes (Montanari *et al.*, 2001; Viegas *et al.*, 2006). Os produtos naturais implicam no desenvolvimento de 50% de todos os novos medicamentos produzidos (Newman *et al.*, 2012).

Atualmente, os produtos naturais continuam a contribuir com uma variedade de novas estruturas, seja de maneira direta, servindo como novas fontes de fármacos, ou de maneira indireta por modificações estruturais feitas em suas estruturas obtendo produtos semissintéticos ou ainda servindo como modelos para o desenvolvimento de novas drogas na indústria farmacêutica (Montanari *et al.*, 2001).

A diversidade estrutural de substâncias provenientes do metabolismo das plantas justifica o crescente interesse químico e farmacológico por estes compostos (Cordell, 2000). A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas formaram-se devido a mecanismos de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação. Sendo assim, o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas valiosas farmacologicamente a serem descobertas, fruto de milhões de anos de evolução e adaptação sobre a terra (Montanari *et al.*, 2001).

Em particular, o Brasil devido a sua localização geográfica estratégica apresenta uma rica flora e muitas das espécies vegetais existentes não apresentam nenhum tipo de estudo do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Este fato sugere a enorme importância de realizar estudos fitoquímicos no Brasil e nos coloca em posição de destaque nestes estudos (Montanari *et al.*, 2001).

Algumas plantas da flora catarinense chamaram nossa atenção inicialmente pelo aroma característico de salicilato de metila exalado pelas suas raízes. Assim, iniciaram-se os estudos com as espécies do gênero *Polygala* no nosso grupo de pesquisa.

O gênero *Polygala* pertencente à família Polygalaceae é representado por 98 espécies e 29 variedades no Brasil (Lüdtke *et al.*, 2013). Muitas espécies do gênero *Polygala* são utilizadas na medicina popular como anestésicos locais, expectorantes, sedativos e tratamento de doenças inflamatórias como asma e bronquite, como por exemplo, as espécies *Polygala sabulosa*, *Polygala panicula* e *Polygala cyparissias* (Duarte *et al.*, 2007; Lapa *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 1998).

Estudos farmacológicos mostraram a potencialidade do gênero principalmente em se tratando de atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, ansiolítica, anticonvulsante e antidepressiva (Borges *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2013; Lapa *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013). Estas atividades vêm sendo atribuídas à presença de metabólitos como xantonas, flavonoides, cumarinas, saponinas triterpênicas, oligossacarídeos esterificados, diidroestirilpironas e estilpironas (Lapa *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2014; Miyase *et al.*, 1999; Pinheiro *et al.*, 1998; Pizzolatti *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 1995).

Nosso grupo de pesquisa vem investigando os metabólitos secundários e a farmacologia de algumas espécies do gênero, como as espécies *Polygala paniculata*, *Polygala sabulosa* e *Polygala cyparissias*, e importantes resultados do ponto de vista químico e biológico vêm sendo obtidos (Duarte *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2008; Lapa *et al.*, 2009; Lapa *et al.*, 2011; Pinheiro *et al.*, 1998; Pizzolatti *et al.*, 2000; Pizzolatti *et al.*, 2008).

Em continuidade aos nossos estudos quimiosistemáticos e investigação de atividade biológica do gênero *Polygala*, o presente trabalho vem a contribuir com a quimiotaxonomia e bioatividade do gênero através da investigação de três espécies: *Polygala molluginifolia*, *Polygala longicaulis* e *Polygala campestris*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Polygalaceae

A família Polygalaceae compreende 19 gêneros distribuídos em torno do globo terrestre e são encontradas principalmente em regiões de clima tropical e temperado, com exceção da Nova Zelândia e das zonas árticas e antárticas (Lüdtke *et al.*, 2013).

Os gêneros *Acanthocladus*, *Barnhartia*, *Bredemeyera*, *Diclidanthera*, *Monnina*, *Moutabea*, *Polygala* e *Securidata* representam a família Polygalaceae no Brasil. Na região Sul do Brasil, são encontrados os gêneros *Acanthocladus*, *Bredemeyera*, *Monnina*, *Polygala* e *Securidata* (Lüdtke *et al.*, 2013).

2.1.1 Gênero Polygala

O gênero *Polygala* sendo o mais abundante da família Polygalaceae compreende mais de 725 espécies distribuídas amplamente no planeta (Lüdtke *et al.*, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013)

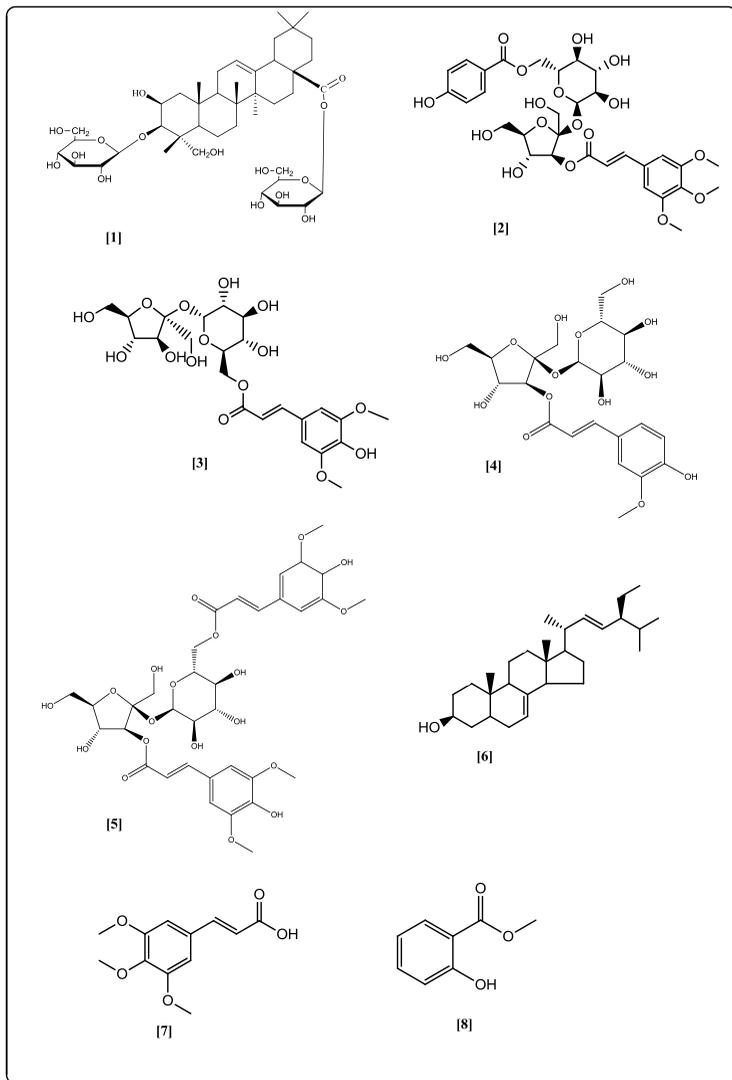
No Brasil, o gênero é representado por aproximadamente 98 espécies e 29 variedades (Lüdtke *et al.*, 2013). A maioria das espécies se apresentam na forma de ervas delicadas e apresentam pequenas flores que variam do branco à púrpura (Montanher *et al.*, 2003)

2.1.1.1 Metabólitos secundários encontrados no gênero

Polygala

Estudos fitoquímicos com o gênero *Polygala* mostram a presença de vários metabólitos secundários tais como saponinas triterpênicas como a polygalasaponina I [1] isolada de *Polygala tenuifolia* (Zhang *et al.*, 1995), oligossacarídeos esterificados como a tenuifolisida A [2], sibiricoses A₁ [3] e A₅ [4] obtidas de *P. sibirica* (Miyase *et al.*, 1999), 3,6'-disinapoilsacarose [5] (Ling *et al.*, 2013) isolada de *P. tenuifolia* e esteróis como o espinasterol [6] encontrado em *P. sabulosa* (Borges *et al.*, 2014) (**Figura 1**). Também são encontrados no gênero *Polygala* derivados do ácido cinâmico como o ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico [7] isolado de *Polygala tenuifolia* (Ito *et al.*, 1977) e o salicilato de metila [8], um dos componentes do Gelol® que é encontrado em muitas espécies do gênero *Polygala*, conferindo um aroma bem característico as raízes destas espécies (Da Rocha *et al.*, 2012) (**Figura 1**).

Figura 1. Metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Polygala*.



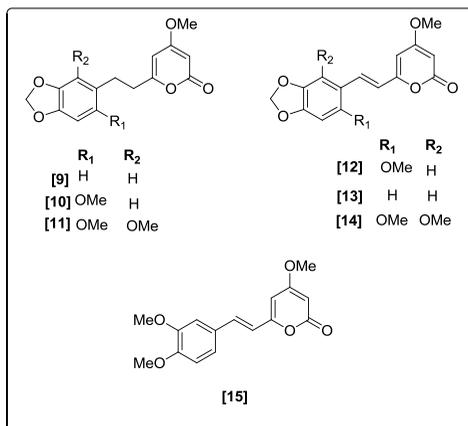
Além destes compostos, o gênero também é caracterizado pela presença de flavonoides, cumarinas, estilpironas, diidroestirilpironas e as xantonas, metabólitos que daremos enfoque na presente revisão, pois estes são os principais metabólitos estudados pelo nosso grupo de pesquisa e também pelo fato de terem sido isolados nas espécies investigadas no presente trabalho.

As **Tabelas 1-4** e **Figuras 2-5** mostram as principais diidroestirilpironas, estilpironas, cumarinas e flavonoides isolados do gênero *Polygala*. A **Tabela 1** mostra as diidroestirilpironas e estilpironas isoladas do gênero *Polygala*. Como pode ser observado na **Tabela 1** o acúmulo destes compostos no gênero foi observado até a presente data somente para a espécie *P. sabulosa*, no entanto o estudo desta espécie não mostrou a presença de xantonas. Segundo *Pizzolatti et al.* (2004), este fenômeno que ocorre na espécie *P. sabulosa* pode ser explicado por um desvio metabólico na biossíntese de xantonas levando a produção de diidroestirilpironas e estilpironas.

Tabela 1. Diidroestiril-2-pironas e estiliril-2-pironas isoladas do gênero *Polygala*.

Espécie	Compostos	Referência
<i>P.sabulosa</i>	4-metoxi-6-(11,12metilenodioxi-diidroestiril)-2-pirona [9]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2000)
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxidiidroestiril)-2-pirona [10]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2000)
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxidiidroestiril)-2-pirona [11]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2000)
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-estiril)-2-pirona [12]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2000)
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxiestiril)-2-pirona [13]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2000)
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxiestiril)-2-pirona [14]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2004)
	4-metoxi-6-(11,12-dimetoxiestiril)-2-pirona [15]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2000)

Figura 2. Diidrostiril-2-pironas [9-11] e estiril-2-pironas [12-15] isoladas da espécie *Polygala sabulosa*.

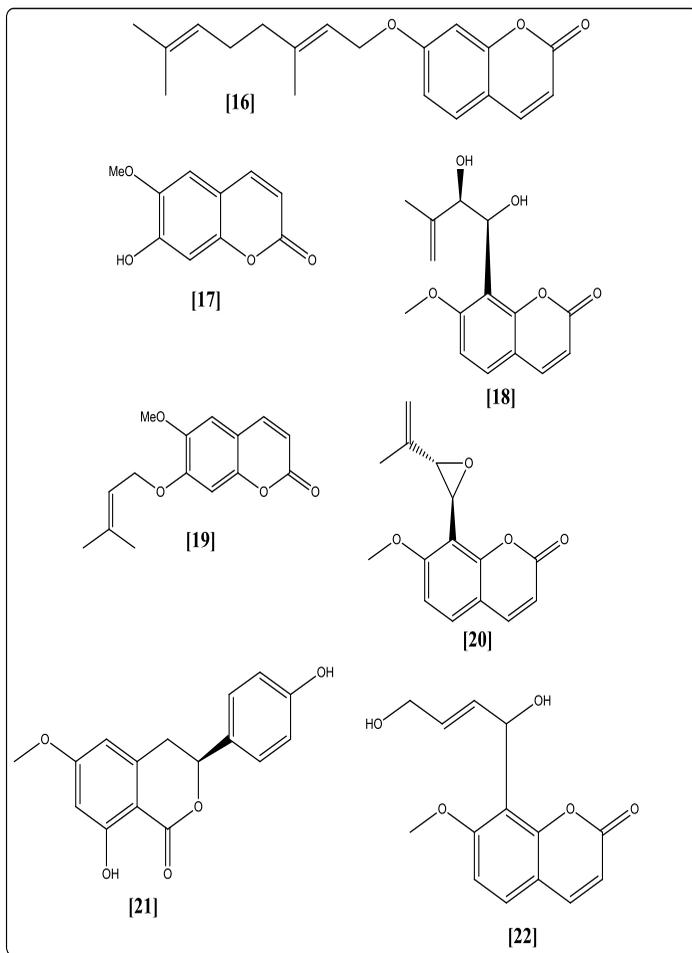


A presença de cumarinas no gênero é mais comum, podendo ocorrer em espécies como *P. paniculata*, *P. sabulosa* e *P. hongkongensis* como mostra a **Tabela 2**.

Tabela 2. Cumarinas isolados do gênero *Polygala*.

Espécie	Compostos	Referências
<i>P. paniculata</i>	Aurapteno [16]	(Hamburger <i>et al.</i> , 1985)
<i>P. sabulosa</i>	Escopoletina [17]	(Capra <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. paniculata</i>	Murrangatina [18]	(Cristiano <i>et al.</i> , 2003) (Hamburger <i>et al.</i> , 1985)
<i>P. sabulosa</i>	6-metoxi-7-preniloxicumarina [19]	(Duarte <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. paniculata</i>	Febalosina [20]	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2002) (Hamburger <i>et al.</i> , 1985)
<i>P. hongkongensis</i>	Hongkongenina [21]	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. paniculata</i>	7-metoxi-8-(1,4-dihidroxi-3-metil-2-butenil)cumarina [22]	(Hamburger <i>et al.</i> , 1985)

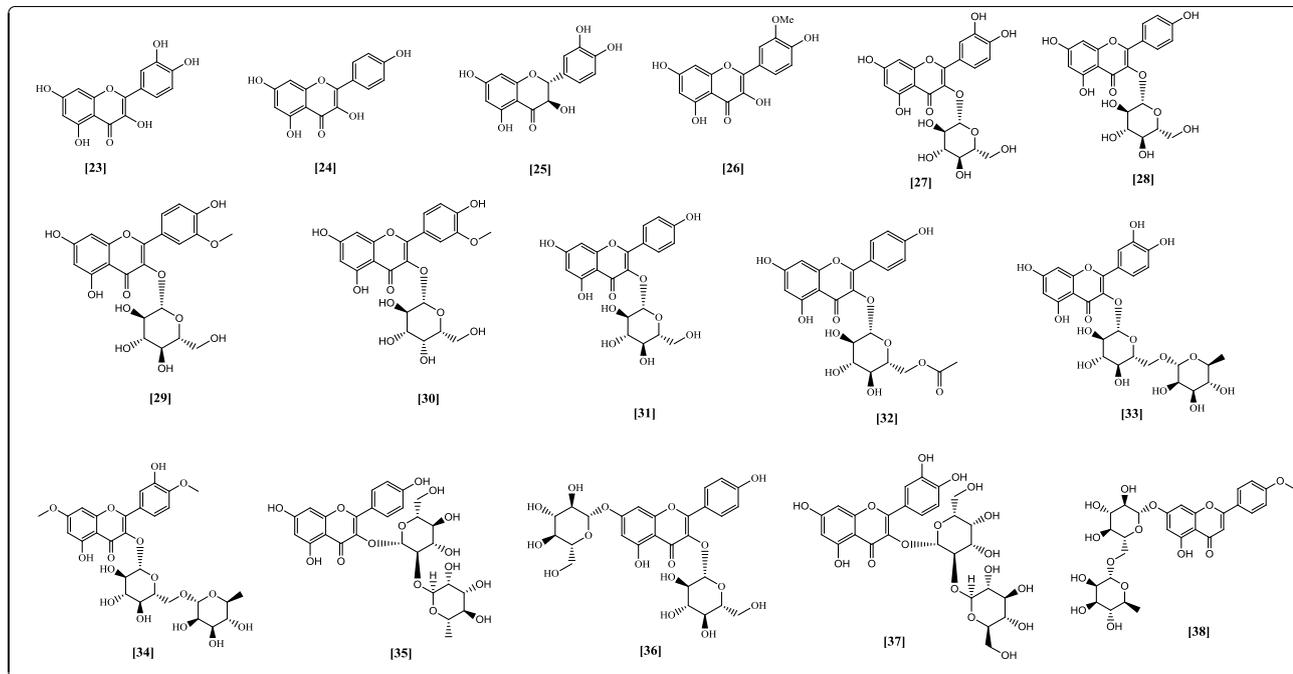
Figura 3. Cumarinas isoladas do gênero *Polygala*.



Outra classe de compostos que pode ser muito encontrada no gênero são os flavonoides. Estes compostos podem ser encontradas na forma livre, como é o caso dos flavonoides [23-26] ou na forma glicosilada [27-38].

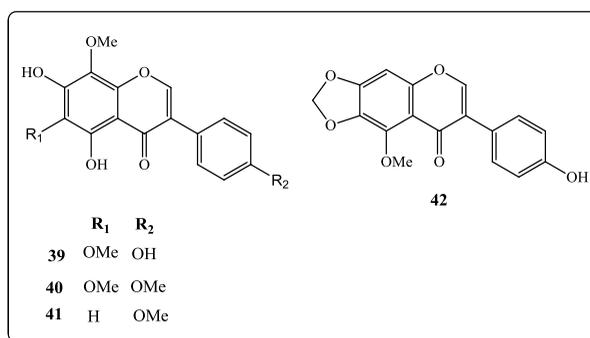
Tabela 3. Flavonoides isolados de espécies do gênero *Polygala*.

Espécie	Compostos	Referências
<i>P. caudata</i>		(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. sabulosa</i>	Quercetina [23]	(Martins <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. hongkongensis</i>		(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. japonica</i>	Kaempferol [24]	(Do <i>et al.</i> , 1992; Wu <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. hongkongensis</i>		
<i>P. caudata</i>	Diidroquercetina [25]	(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. hongkongensis</i>		
<i>P. hongkongensis</i>	Isoharmetina [26]	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. hongkongensis</i>		
<i>P. hongkongensis</i>	Isoquercetina [27]	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. hongkongensis</i>		
<i>P. hongkongensis</i>	Kaempferol 3-O- β -D-glucopiranosideo [28]	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. tenuifolia</i>	Isoharmetina-3-O- β -D-glucopiranosideo [29]	(Shi <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. tenuifolia</i>	Isoharmetina-3-O- β -D-galactopiranosideo [30]	(Shi <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. japonica</i>	Astragalina [31]	(Do <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. japonica</i>		
<i>P. japonica</i>	Kaempferol 3-O-(6"-O-acetil)- β -D-glucopiranosideo [32]	(Do <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. paniculata</i>		(Cristiano <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. hongkongensis</i>	Rutina [33]	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. chinensis</i>		
<i>P. chinensis</i>	Ombuina-3- β -rutinosideo [34]	(Rao <i>et al.</i> , 2004)
<i>P. hongkongensis</i>		
<i>P. hongkongensis</i>	Kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosideo [35]	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
<i>P. japonica</i>		
<i>P. japonica</i>	Kaempferol 3,7-di-O- β -D-glucopiranosideo [36]	(Do <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. tenuifolia</i>		
<i>P. tenuifolia</i>	Quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosideo [37]	(Shi <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. tenuifolia</i>		
<i>P. tenuifolia</i>	Linarina [38]	(Shi <i>et al.</i> , 2013)

Figura 4. Flavonoides isolados de espécies do gênero *Polygala*.

Dentro da classe dos flavonoides podemos encontrar as isoflavonas caracterizadas por apresentarem o anel aromático B ligado ao C₃ na sua estrutura (Simões *et al.*, 2010). Estes metabólitos ocorrem mais raramente em espécies do gênero *Polygala*, sendo que os únicos relatos da presença de isoflavonas no gênero foram feitos para a espécie *Polygala virgata* em que foram isoladas as isoflavonas [39-41] e espécie *Polygala stenopetala* onde foi encontrada a isoflavona [42] (Bashir *et al.*, 1991; Chaudhary *et al.*, 2001).

Figura 5. Estrutura de isoflavonas [39-42] isoladas de espécies do gênero *Polygala*.



Entre todos os metabólitos encontrados para no gênero, as xantonas são os mais frequentes e são considerados os seus marcadores quimiotaxonômicos. Estes compostos caracterizam-se por apresentar um esqueleto base do tipo dibenzo- γ -pirona (Li *et al.*, 2014).

As xantonas deste gênero podem ser encontradas na forma oxigenada variando quanto ao padrão de substituição podendo estar hidroxiladas e/ou metoxiladas [43-82] ou ainda podem ser encontradas na forma de dioximetilenos [105-115]. As xantonas podem também se apresentar na forma glicosilada [83-104] seja como O-glicosídeo ou C-glicosídeos e podem ocorrer mais raramente na forma de xantanolignoides [116-118] (Li *et al.*, 2014).

As principais xantonas presentes no gênero *Polygala* são mostradas na **Tabela 4**:

Tabela 4. Principais xantonas isoladas do gênero *Polygala*.

Espécie	Composto isolado	Referência
<i>P. caudata</i>	7-hidroxi-1-metoxixantona [43]	(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. caudata</i> <i>P. tenuifolia</i>	1,7-dihidroxixantona [44]	(Naidu <i>et al.</i> , 2007) (Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	1,7-dimetoxixantona [45]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. caudata</i>	1-hidroxi-7-metoxixantona [46]	(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. cyparissias</i>	1,3-dihidroxi-7-metoxixantona [47]	(Pinheiro <i>et al.</i> , 1998) (Klein <i>et al.</i> , 2010)
<i>P. caudata</i>	1,2,8-trihidroxixantona [48]	(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. fallax</i> <i>P. caudata</i>	1,3-dihidroxi-2-metoxixantona [49]	(Ma <i>et al.</i> , 2003) (Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. tenuifolia</i>	1,7-dihidroxi-3-metoxixantona [50]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	1,7-dihidroxi-4-metoxixantona [51]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. arillata</i>	1,3,4-trimetoxixantona [52]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona [53]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. tenuifolia</i>	3-hidroxi-2,8-dimetoxixantona [54]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. tenuifolia</i>	2,3,8-trimetoxixantona [55]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. arillata e</i> <i>P. triphylla</i>	1-hidroxi-2,3-dimetoxixantona [56]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. arillata</i>	3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona [57]	(Xiong <i>et al.</i> , 2011)
<i>P. triphylla</i>	1,2,3-trimetoxixantona [58]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. paniculata</i>	1,5-dihidroxi-2,3- dimetoxixantona [59]	(Cristiano <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. tenuifolia</i> <i>P. cyparissias</i>	1,7-dihidroxi-2,3- dimetoxixantona [60]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992) (Pinheiro <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. cyparissias</i>	1,3,7-trihidroxi-2- metoxixantona [61]	(Pinheiro <i>et al.</i> , 1998)

Tabela 4. Principais xantonas isoladas do gênero <i>Polygala</i> (continuação).		
<i>P. tenuifolia</i>	1,6-dihidroxi-3,7-dimetoxixantona [62]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	1-hidroxi-3,6,7-trimetoxixantona [63]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	7-hidroxi-1,2,3-trimetoxixantona [64]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. tenuifolia</i>	3-hidroxi-1,2,7-trimetoxixantona [65]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. virgata</i>	1,7-dihidroxi-3,4-dimetoxixantona [66]	(Bashir <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. macradenia</i>	1-hidroxi-2,3,4-trimetoxixantona [67]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. macradenia</i>	1,2,3,4-tetrametoxixantona [68]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. tenuifolia</i>	1,3,6,7-tetrametoxixantona [69]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. vulgaris</i>	7-cloro-1,2,3-trihidroxi-6-metoxixantona [70]	(Dall'acqua <i>et al.</i> , 2002)
<i>P.tenuifolia</i> <i>P.cyparissias</i> <i>P.fallax</i>	1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona [71]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992) (Pinheiro <i>et al.</i> , 1998) (Ma <i>et al.</i> , 2003)
<i>P.tenuifolia</i>	6-hidroxi-1,2,4-trimetoxixantona [72]	Ling <i>et al.</i> , 2013)
<i>P.tenuifolia</i>	1,6-dihidroxi-3,5,7-trimetoxixantona [73]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	1,7-dihidroxi-3,5,6-trimetoxixantona [74]	(Ikeya <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. paenea</i> <i>P. macradenia</i>	1-hidroxi-2,3,4,7-tetrametoxixantona [75]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. macradenia</i>	7-hidroxi-1,2,3,4-tetrametoxixantona [76]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. rollata</i> <i>P.macradenia</i> <i>P.paenea</i>	1,2,3,4,7-pentametoxixantona [77]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. virgata</i>	1,7-dihidroxi-2,3,4-trimetoxixantona [78]	(Bashir <i>et al.</i> , 1991)
<i>P. tenuifolia</i>	6,8-dihidroxi-1,2,4-trimetoxixantona [79]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. tenuifolia</i>	6,8-dihidroxi-1,2,3-trimetoxixantona [80]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. vulgaris</i>	1,3-dihidroxi-2,4,7-trimetoxixantona [81]	(Dall'acqua <i>et al.</i> , 2002)

Tabela 4. Principais xantonas isoladas do gênero <i>Polygala</i> (continuação).		
<i>P. cyparissias</i>	1,3,6,8-tetrahidroxi- 2,7-dimetoxixantona [82]	(Pinheiro <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. tricornis</i>	2- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - α -L- ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosil-3,4- dimetoxixantona [83]	(Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tricornis</i>	3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - β -D- apiofuranosil)-(1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosil-1- hidroxixantona [84]	(Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tricornis</i>	3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - α -L- ramnopiranosil)-(1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosil-1- hidroxixantona [85]	(Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tricornis</i>	5- <i>O</i> - β -D- glucopiranosil- 1,6-dihidroxi - 7-metoxixantona [86]	(Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tricornis</i>	7- <i>O</i> -(6- <i>O</i> - α -L- arabinopiranosil)-(1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosil-1- hidroxixantona [87]	(Li <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tenuifolia</i>	2-C-[β -D-arabinopiranosil- (1 \rightarrow 6)- β -D- glucopiranosil]- 1,3,7-trihidroxi-6- metoxixantona [88]	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tenuifolia</i>	3- <i>O</i> -[α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 2) - β -D-glucopiranosil]- 1,7-dihidroxixantona [89]	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tenuifolia</i>	6- <i>O</i> -[α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil] - 1,2,3,7-tetrametoxixantona [90]	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tenuifolia</i>	2-C-[β -D- apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D- glucopiranosil]-1,3,7- trihidroxixantona [91]	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)
<i>P. tenuifolia</i>	7- <i>O</i> -metilmangiferina [92]	(Jiang <i>et al.</i> , 2005)

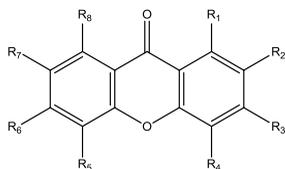
Tabela 4. Principais xantonas isoladas do gênero *Polygala* (continuação).

<i>P. caudata</i> <i>P. sibirica</i>	4-C-[β-D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona [93]	(Jiang <i>et al.</i> , 2005) (Li <i>et al.</i> , 1999) (Miyase <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. caudata</i>	2-C-[β-D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona [94]	(Li <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. tenuifolia</i>	6-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil]-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona [95]	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. tenuifolia</i>	6-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil]-1,3-dihidroxi-7-metoxixantona [96]	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. tenuifolia</i>	6-O-(β-D-glucopiranosil)-1,2,3,7-tetrametoxixantona [97]	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. tenuifolia</i>	3-O-[α-D-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil]-1,6-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona [98]	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. sibirica</i>	2-C-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona [99]	(Miyase <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. sibirica</i>	2-C-[β-D-apiofuranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona [100]	(Miyase <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. sibirica</i>	4-C-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona [101]	(Miyase <i>et al.</i> , 1999)
<i>P. tenuifolia</i>	2-C-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona [102]	(Ling <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. tenuifolia</i>	4-C-[β-D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona [103]	(Ling <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. tenuifolia</i>	2-C-[β-D-apiofuranosil-(1→6)-β-D-glucopiranosil]-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona [104]	(Ling <i>et al.</i> , 2013)

Tabela 4. Principais xantonas isoladas do gênero *Polygala* (conclusão).

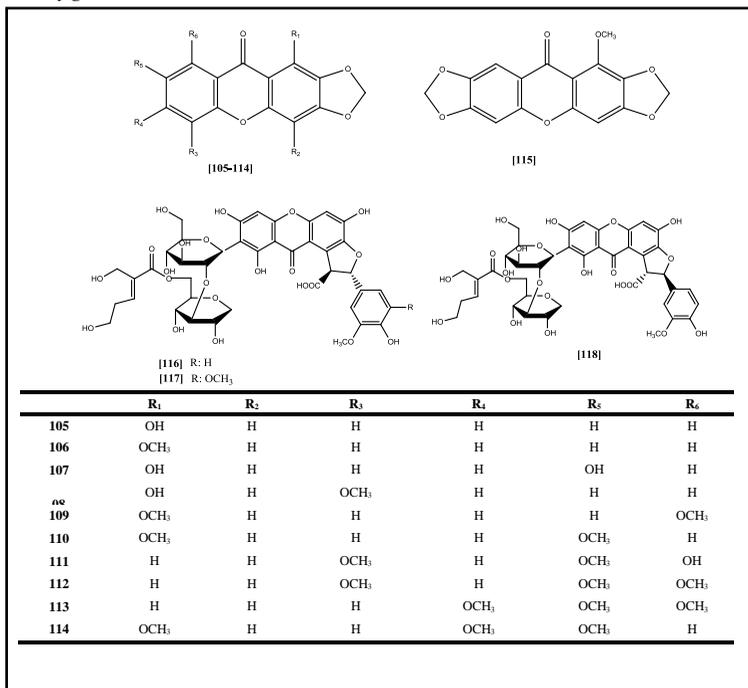
<i>P. arrilata</i>	1-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona [105]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. macradenia</i> <i>P. triphylla</i>	1-metoxi-2,3-metilenodioxixantona [106]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. cyparissias</i> <i>P. fallax</i>	1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona [107]	(Pinheiro <i>et al.</i> , 1998) (Ma <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. paniculata</i>	1-hidroxi-5-metoxi-2,3-metilenodioxixantona [108]	(Cristiano <i>et al.</i> , 2003)
<i>P. nykensis</i>	1,8-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona [109]	(Marston <i>et al.</i> , 1993)
<i>P. tenuifolia</i>	1,7-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona [110]	(Fujita <i>et al.</i> , 1992)
<i>P. paenea</i>	8-hidroxi-5,7-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona [111]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. paenea</i>	5,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona [112]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. spectabilis</i> <i>P. tenuifolia</i>	6,7,8-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona [113]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. macradenia</i>	1,6,7-trimetoxi-2,3-metilenodioxixantona [114]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. macradenia</i> <i>P. triphylla</i>	1-metoxi-2,3,6,7-bismetilenodioxixantona [115]	(Ghosal <i>et al.</i> , 1981)
<i>P. glomerata</i>	Glomexantona A [116]	(Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. glomerata</i>	Glomexantona C [117]	(Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. glomerata</i>	Glomexantona B [118]	(Li <i>et al.</i> , 2014)

Figura 6. Estrutura das xantonas [43-104] isoladas do gênero *Polygala*.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
43	OCH ₃	H	H	H	H	H	OH	H
44	OH	H	H	H	H	H	OH	H
45	OCH ₃	H	H	H	H	H	OCH ₃	H
46	OH	H	H	H	H	H	OCH ₃	H
47	OH	H	OH	H	H	H	OCH ₃	H
48	OH	OH	H	H	H	H	H	OH
49	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H
50	OH	H	OCH ₃	H	H	H	OH	H
51	OH	H	H	OCH ₃	H	H	OH	H
52	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
53	OH	H	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H
54	H	OCH ₃	OH	H	H	H	H	OCH ₃
55	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	OCH ₃
56	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	H
57	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H
58	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	H
59	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	H	H	H
60	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OH	H
61	OH	OCH ₃	OH	H	H	H	OH	H
62	OH	H	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H
63	OH	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
64	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OH	H
65	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₃	H
66	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H
67	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
68	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
69	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
70	OH	OH	OH	H	H	OCH ₃	Cl	H
71	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH	OCH ₃	H
72	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	H
73	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
74	OH	H	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
75	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
76	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H
77	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
78	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H
79	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H	OH
80	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	H	OH
81	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H
82	OH	OCH ₃	OH	H	H	OH	OCH ₃	OH
83	H	Ra (1→6) GlcO	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
84	OH	H	Api (1→6) GlcO	H	H	H	H	H
85	OH	H	Ra (1→6) GlcO	H	H	H	H	H
86	OH	H	H	H	GlcO	OH	OCH ₃	H
87	OH	H	H	H	H	H	Ara (1→6) GlcO	H
88	OH	Ara (1→6) Glc	OH	H	H	H	OH	H
89	OH	H	Ra (1→2) GlcO	H	H	H	OH	H
90	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	Ra(1→2) GlcO	OCH ₃	H
91	OH	Api(1→2)Glc	OH	H	H	H	OH	H
92	OH	Glc	OH	H	H	OH	OCH ₃	H
93	OH	H	OH	Glc	H	H	OH	H
94	OH	Glc	OH	H	H	H	OH	H
95	OH	H	OCH ₃	H	H	Ra (1→2)GlcO	OCH ₃	H
96	OH	H	OH	H	H	Ra (1→2)GlcO	OCH ₃	H
97	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	GlcO	OCH ₃	H
98	OH	OCH ₃	Ra (1→2) GlcO	H	H	OH	OCH ₃	H
99	OH	Api (1→6) Glc	OH	H	H	H	OH	H
100	OH	Api (1→2) Glc	OH	H	H	H	OH	H
101	OH	H	OH	Api(1→6) Glc	H	OH	OCH ₃	H
102	OH	Api(1→6) Glc	OH	H	H	H	OH	H
103	OH	H	OH	Glc	H	H	OH	H
104	OH	Api(1→6) Glc	OH	H	H	OH	OCH ₃	H

Figura 7. Estrutura das xantonas [105-114] isolados do gênero *Polygala*.



2.1.1.2 Bioatividade do gênero *Polygala*

Muitas espécies do gênero *Polygala* apresentam importantes aplicações na medicina popular. As raízes de *Polygala tenuifolia* (Yuanzhi) têm sido usadas na medicina tradicional chinesa como agente expectorante, tônico e sedativo (Fujita et al., 1992). Além disso, Yuanzhi é utilizado no tratamento de insônia, amnésia, depressão, palpitações com ansiedade, desorientação e prevenção de demência e deficiência de memória (Jin et al., 2014). As partes aéreas da planta, chamadas tradicionalmente por “Xiaocao”, também são usadas na medicina popular como anti-inflamatório (Shi et al., 2013).

A espécie *Polygala fallax* é utilizada no sul da China como agente tônico e no tratamento da hepatite (Zhang et al., 1996). *Polygala japonica* é utilizada como expectorante, anti-inflamatório, agente antibacteriano e no tratamento da faringite (Zhang et al., 1995).

Outra espécie muito utilizada é a espécie *Polygala cyparissias* também conhecida como “pinheirinho da praia”, encontrada abundantemente na costa atlântica do Brasil e tem sido usada na medicina tradicional no tratamento de várias doenças como distúrbios do intestino e rins (De Campos *et al.*, 1997). Esta espécie também é utilizada como anestésico tópico, devido a abundante presença de salicilato de metila em suas raízes o que justifica seu uso para esta finalidade (Da Rocha *et al.*, 2012).

Polygala paniculata conhecida popularmente como “barba de São João”, “vassourinha branca” ou “mimosa” é usada na medicina tradicional no tratamento da asma, bronquite, artrite, dores de estômago e desordens nos rins (Lapa *et al.*, 2009) e *Polygala sabulosa* ou “timutu-pinheirinho” é utilizada para dores em geral e doenças parasíticas (Pizzolatti *et al.*, 2008).

Devido as importantes utilizações destas espécies no gênero, algumas espécies já foram estudadas do ponto de vista farmacológico. Entre as atividades farmacológicas apresentadas pelo gênero destacam-se a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antidepressiva, gastroprotetora, antioxidante e aumento de memória e aprendizagem, como mostra a **Tabela 5**.

A espécie *Polygala tenuifolia*, encontrada no sul da China, tem sido amplamente estudada e os resultados mostram o potencial desta planta principalmente como agente antidepressivo, anti-inflamatório e no aumento da memória e aprendizagem (Cai *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2013).

Além desta espécie, as espécies *P. sabulosa* e *P. paniculata*, encontradas em Santa Catarina, também tem mostrado um grande potencial farmacológico como atividades antidepressiva, anti-inflamatória, antinociceptiva, tripanocida, neuroprotetora, ansiolítica e anticonvulsivante (**Tabela 5**) e estas atividades estão possivelmente relacionadas à presença de compostos como cumarinas, flavonoides, xantonas e diidroestirilprionas e estirilpironas.

Tabela 5. Principais atividades biológicas reportadas para o gênero *Polygala* (continua).

Espécie	Atividade biológica	Composto/ Extrato/ Fração	Referência
<i>P. tenuifolia</i>	Atenuação dos efeitos de déficit de memória e aprendizagem	Tenuigenina	(Cai <i>et al.</i> , 2013)
	Antidepressiva e aumento da memória	Oligossacarídeos esterificados	(Sun <i>et al.</i> , 2013)
	Anti-inflamatória	Oligossacarídeos esterificados	(Kim <i>et al.</i> , 2013)
	Inibição da enzima acetilcolinesteras	Tenuigenina	(Huang <i>et al.</i> , 2013)
	Antioxidante	Tenuigenina	(Liang <i>et al.</i> , 2011)
	Antidepressiva	Fração enriquecida com oligossacarídeos esterificados	(Liu <i>et al.</i> , 2010)
	Aumento da memória e aprendizagem	Saponinas triterpênicas	(Xu <i>et al.</i> , 2009)
	Inibição da beta secretase	Tenuigenina	(Lv <i>et al.</i> , 2009)
<i>P. glomerata</i>	Neuroprotetora	Xantonas	(Li <i>et al.</i> , 2014)
<i>P. javana</i>	Antitumoral	Extrato etanólico	(Alagammal <i>et al.</i> , 2013)
<i>P. japonica</i>	Neuroprotetora	Saponinas triterpênicas	(Li <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. karensium</i>	Inibição de cepas virais resistentes da Influenza A	Xantonas	(Dao <i>et al.</i> , 2012)

Tabela 5. Principais atividades biológicas reportadas para o gênero *Polygala* (continua).

<i>P. sabulosa</i>	Antifúngica	Cumarina	(Johann <i>et al.</i> , 2011)
	Anti-inflamatória	Extrato bruto, Fração diclorometano Espinasterol	(Borges <i>et al.</i> , 2014)
	Antidepressiva	Cumarina	(Capra <i>et al.</i> , 2010)
	Ansiolítica	Diidro e estilpironas	(Duarte <i>et al.</i> , 2008)
	Anticonvulsivante	Diidro e estilpironas	(Duarte <i>et al.</i> , 2008)
	Neuroprotetora	Quercetina	(Franco <i>et al.</i> , 2007)
	Tripanocida	Frações diclorometano e acetato de etila Cumarina Diidroestirilpirona	(Pizzolatti <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. sabulosa</i>	Antinociceptiva	Extrato hidroalcoólico Espinasterol Escopoletina	(Ribas <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. paniculata</i>	Antifúngica	Extrato hexânico Flavonóides	(Johann <i>et al.</i> , 2011)
	Antinociceptiva	Flavonoide	(Lapa <i>et al.</i> , 2011)
	Antidepressiva	Extrato hidroalcoólico	(Bettio <i>et al.</i> , 2011)
	Vasorelaxante	Extrato hidroalcoólico	(Lapa <i>et al.</i> , 2011)
	Hipotensiva	Extrato hidroalcoólico	(Lapa <i>et al.</i> , 2011)
	Neuroprotetora	Extrato hidroalcoólico	(Farina <i>et al.</i> , 2005)

Tabela 5. Principais atividades biológicas reportadas para o gênero *Polygala* (conclusão).

<i>P. paniculata</i>	Gastroprotetora	Extrato hidroalcoólico	(Lapa <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. cyparissias</i>	Antiulcerogênica	Fração metanólico e Fração solúvel em acetona	(Klein <i>et al.</i> , 2010)
	Antinociceptiva	Extrato hidroalcoólico Xantona	(De Campos <i>et al.</i> , 1997)
	Antihiperálgica	Extrato metanólico Espinasterol Xantonas	(Klein <i>et al.</i> , 2012)
<i>P. vulgaris</i>	Citotóxica	Xantonas	(Dall'acqua <i>et al.</i> , 2002)
<i>P. hongkongensis</i>	Neuroprotetiva	Flavonoides	(Zhan <i>et al.</i> , 2013)
	Antioxidante	Xantona	(Wu <i>et al.</i> , 2008)
<i>P. fallax</i>	Antioxidante	Xantonas	(Lin <i>et al.</i> , 2005b)
<i>P. caudata</i>	Estimula o crescimento de neurônios	Xantona	(Naidu <i>et al.</i> , 2007)
	Antioxidante	Xantonas	(Lin <i>et al.</i> , 2005a)

2.1.1.3 *Polygala molluginifolia*

Polygala molluginifolia A. St. –Hil & Moq. é uma espécie pertencente ao gênero *Polygala* conhecida popularmente como “cânfora” (**Figura 8**). Esta espécie é encontrada em beiras de estradas alteradas por queimadas, em baixadas úmidas, campos limpos e sujos, em solos secos e úmidos, campos pastejados secos e terrenos

pedregosos. Floresce e frutifica durante todos os meses do ano (Lüdtke, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013).

Ocorre no Uruguai, Argentina e no Brasil nos estados de São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. Apresenta folhas verticiladas sésseis e presença de glândulas nas estruturas vegetativas e reprodutivas. As brácteas e bractéolas são decíduas e as flores rosadas a magenta (Lüdtke, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013).

Figura 8. *Polygala molluginifolia* coletada no município de São Lourenço do Sul. Foto do autor.



2.1.1.4 *Polygala longicaulis*

A espécie *Polygala longicaulis* Kunth. (**Figura 9**) também conhecida como “cânfora” ocorre preferencialmente em campos úmidos e limpos, em banhados e solos pedregosos, sendo que floresce e frutifica de setembro a junho (Lüdtke, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013).

Esta espécie pode ser encontrada no México, Paraguai, Argentina, Colômbia e Brasil, sendo que nesse último pode ser encontrada nos estados de Roraima, Amapá, Rio Grande do Norte, Paraíba, Piauí, Bahia, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Lüdtke *et al.*, 2013).

De forma geral apresenta inflorescências inicialmente cilíndricas, mas com a queda das flores mais velhas se tornam capitadas, restando cicatrizes evidentes dos pedicelos. Outra característica da espécie é que se caracteriza pelas sementes sem apêndices, geralmente de forma cônica e com tricomas longos, seríceos e prateados (Lüdtke, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013).

Figura 9. Espécie *Polygala longicaulis* coletada no município de Ponta Grossa. Fotografada por Francieli K. De Carvalho.



2.1.1.5 *Polygala campestris*

A espécie *Polygala campestris* Gardner (**Figura 10**) pode ser encontrada preferencialmente em campos de altitude, nas bordas e interior da matinha nebulosa e nos aparados da Serra. Encontrada em menor frequência em solos úmidos e rochosos. Floresce e frutifica todos os meses do ano. Ocorre nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Lüdtke, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013).

Esta espécie apresenta folhas numerosas, brácteas florais com margem ciliada e pela carena, geralmente dividida em um número maior de lobos (Lüdtke, 2008; Lüdtke *et al.*, 2013).

Figura 10. *Polygala campestris* coletada em Rancho Queimado. Foto do autor.



3 OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Realizar estudos quimiosistemáticos e avaliar as propriedades biológicas e físico-químicas de três espécies do gênero *Polygala* incluindo as espécies *Polygala longicaulis*, *Polygala campestris* e *Polygala molluginifolia*.

3.1.1 Objetivos específicos

1- Coletar e realizar a identificação botânica de três espécies do gênero *Polygala* em colaboração com a Professora Dra. Raquel Lüdke (UFPEL) e Professor Dr. Rafael Trevisan (UFSC).

2- Obtenção dos extratos brutos por meio de maceração em etanol e fracionamento líquido-sólido dos extratos brutos para render as frações hexano, acetato de etila e aquosa.

3- Caracterizar os constituintes químicos voláteis das flores, folhas, caules e raízes de *P. molluginifolia* por meio da técnica de microextração.

4- Isolar os metabólitos secundários das frações das três espécies em estudo por meio de técnicas cromatográficas.

5- Realizar a caracterização dos compostos isolados por meio de técnicas de IV, HR-MS, RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, NOESY, HMQC e HMBC.

6- Estudar as propriedades físico-químicas dos compostos isolados, como a permeabilidade por meio do ensaio PAMPA relacionada ao processo de ADME.

7- Avaliar os parâmetros relacionados com a atividade antioxidante, como conteúdo de fenólicos, flavonoides, poder redutor e DPPH dos extratos e frações das três espécies em estudo.

8- Realizar ensaios de atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase e atividade antioxidante DPPH dos compostos isolados.

9- Submeter os extratos, frações e compostos isolados a testes de atividade tripanocida, leishmanicida e antifúngica.

10- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* dos extratos, frações e compostos isolados de *P. molluginifolia*.

11- Realizar a avaliação de atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato bruto e isoflavona isolada de *P. molluginifolia*.

12- Submeter às frações e isoflavonas isoladas de *P.molluginifolia* a testes de atividade anti-hiperglicêmica *in vitro* e *in vivo*.

4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1 Materiais e equipamentos utilizados

Os reagentes e solventes utilizados no desenvolvimento deste trabalho foram de grau analítico PA. Para a realização da separação cromatográfica dos compostos nas frações foi utilizado sílica gel 0,063-0,2mm (70-230 mesh) para a cromatografia em coluna normal (CC) e sílica gel 0,04-0,063 mm (230-400 mesh) para a cromatografia em coluna flash no modo isocrático.

As frações e compostos obtidos da separação cromatográfica foram monitorados por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de alumínio recobertas com sílica gel 60 (5-40 μm) da Merck, com 0,25 mm de espessura. Os compostos separados nas placas foram revelados sob visualização em lâmpada UV 254 e 365 nm, vapores de iodo e com o reagente anisaldeído-sulfúrico seguido de aquecimento a 110°C.

Para os bioensaios os reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), Folin-Ciocalteu, Tween 80, iodeto de acetilcolina, a enzima acetilcolinesterase obtida em pó do peixe elétrico VI-S. Para o ensaio PAMPA foram utilizados a fosfatidilcolina obtida da Sigma Aldrich e as placas de 96 poços fornecidas pela Millipore.

Para a determinação do ponto de fusão foi utilizado um aparelho da Microquímica APF-302. Para a obtenção dos espectros de infravermelho foram utilizados os equipamentos Perkin-Elmer FT 16PC e Varian 3100 FT-IR, utilizando pastilhas de KBr.

A determinação dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H (400 e 200 MHz) e ^{13}C (100 MHz) foram obtidas em aparelho Bruker-AC 200-F e Varian Oxford AS-400, utilizando TMS como padrão interno e os solventes adequados para solubilizar cada amostra.

As análises de ESI-Q-TOFMS foram realizadas em um espectrômetro de massas da micrOTOF Q-II (Bruker Daltonics). A leitura dos bioensaios foi realizada em um espectrofotômetro da Perkin Elmer Lambda S.

Para o bioensaio PAMPA foi utilizado um equipamento Shimadzu HPLC equipado com uma coluna LC-10AT e detector de UV. As análises foram realizadas em uma coluna Phenomenex C_{18} (150 \times 4.6 mm; 5 μm), e as eluições foram feitas em modo isocrático [25% H_2O (v/v) 75% acetonitrila (v/v)] e fluxo de 1 mL min^{-1} , com detecção a 280 nm.

4.2 Material vegetal

As espécies *Polygala molluginifolia*, *Polygala longicaulis* e *Polygala campestris* foram coletadas nos seguintes locais e períodos:

Polygala molluginifolia

Coleta 1: Coleta feita em Dezembro de 2010, em uma região próxima ao Rio Pitanguí, com coordenadas UTM 593095 e 7231847 na região dos Campos Gerais, Ponta Grossa-PR-Brasil em parceria com a professora Rosemeri S. Moro da Universidade Estadual de Ponta Grossa (**Figura 11**).

Figura 11. Local de coleta das espécies no Abrigo Rio Pitanguí em Ponta Grossa. Foto cedida pela professora Rosemeri Moro (UEPG).



Coleta 2: Coleta feita em janeiro de 2013, no município de São Lourenço do Sul, na estrada de acesso secundária ao município, próximo a BR-116 (31°22'29"S, 52°4'23"W) em janeiro de 2013, RS (**Figura 12**).

Figura 12. Ponto de coleta da espécie *P. molluginifolia*.



Fonte: <http://www.verdejave.com.br/coordenadas/>

Coleta 3: Coleta feita no município de São Lourenço do Sul, RS, em janeiro de 2014 (**Figura 12**).

Coleta 4: Coleta feita no município em maio de 2014 em São Lourenço do Sul, RS. (**Figura 12**).

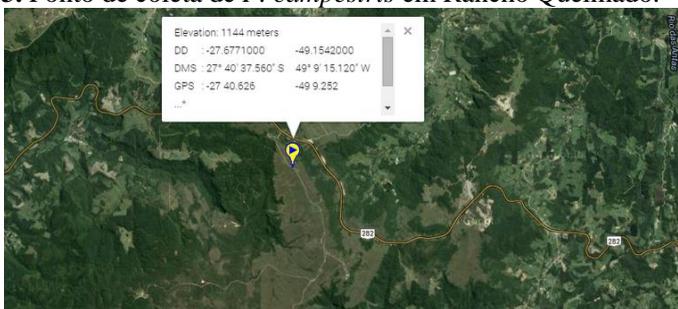
Polygala longicaulis

Coleta 1: Coleta feita no município de Ponta Grossa, PR, em dezembro de 2010 (**Figura 11**).

Polygala campestris

Coleta 1: Coleta feita em janeiro de 2012 no topo do Morro da Antena município de Rancho Queimado, SC, em janeiro de 2012 (**Figura 13**).

Figura 13. Ponto de coleta de *P. campestris* em Rancho Queimado.



Fonte: http://www.sunearthtools.com/dp/tools/pos_earth.php?lang=pt

4.3 Identificação e depósito das espécies em questão

A identificação das espécies foi feita pela Professora Dra. Raquel Lüdke (UFPel) e o depósito foi feito no herbário FLOR (UFSC) pelo Professor Dr. Rafael Trevisan recebendo os seguintes números de depósito:

Polygala molluginifolia:

Coleta 1: FLOR 39551

Coleta 2: FLOR-48690

Polygala longicaulis: FLOR-38271

Polygala campestris: FLOR-39195

4.4 Preparo do material vegetal, secagem e obtenção do extrato bruto

O material vegetal foi separado de possíveis contaminantes e logo após foi seco por meio de estufa de circulação de ar a uma temperatura de 50°C. Depois de seco, o material vegetal foi triturado e submetido à maceração exaustiva com álcool etílico 96% a temperatura ambiente. Os extratos foram combinados, filtrados e concentrados sob pressão reduzida a 50°C resultando nos respectivos extratos brutos.

4.5 Extração sólido-líquido

Os extratos brutos hidroalcoólicos das respectivas espécies foram submetidos à extração sólido-líquido utilizando os solventes hexano e o acetato de etila. Os extratos foram lavados inicialmente com hexano até a extração exaustiva e o solvente foi removido sobre vácuo, obtendo-se então as respectivas frações hexânicas. Logo após, os resíduos dos extratos foram lavados com acetato de etila até a extração exaustiva obtendo-se então as frações solúveis em acetato de etila. O restante dos extratos que não solubilizaram nos solventes hexano e acetato de etila foram consideradas como frações aquosas.

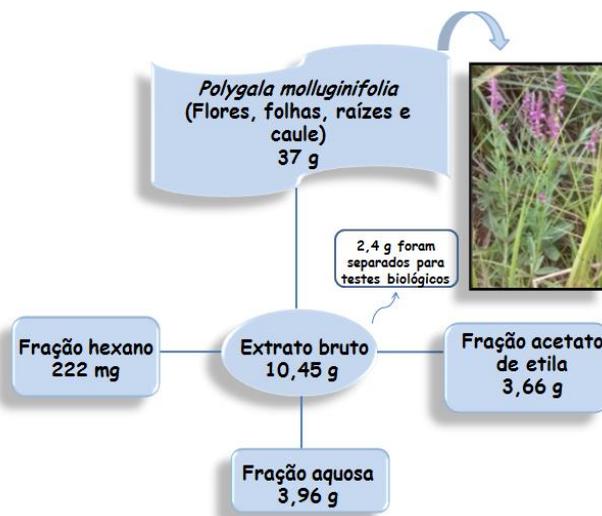
4.6 Isolamento e purificação dos compostos

Após a obtenção das frações das três espécies em estudo foi realizada a separação dos compostos por meio de cromatografia em coluna (CC). Para isso, algumas frações foram selecionadas de acordo com a quantidade de fração e necessidade de composto para testes de atividade biológica. As frações submetidas para a realização de cromatografia em coluna foram as seguintes:

4.6.1 Fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (Coleta 1)

Na coleta 1 de *P. molluginifolia* foram obtidos 37,0 g de planta seca e após maceração obteve-se 10,45 g de extrato bruto. Parte do extrato foi separada para testes biológicos e parte foi submetida à extração sólido-líquido, o que resultou nas frações hexânica, acetato de etila e aquosa (**Figura 14**).

Figura 14. Obtenção dos extratos brutos e frações da Coleta 1 de *P.molluginifolia*.

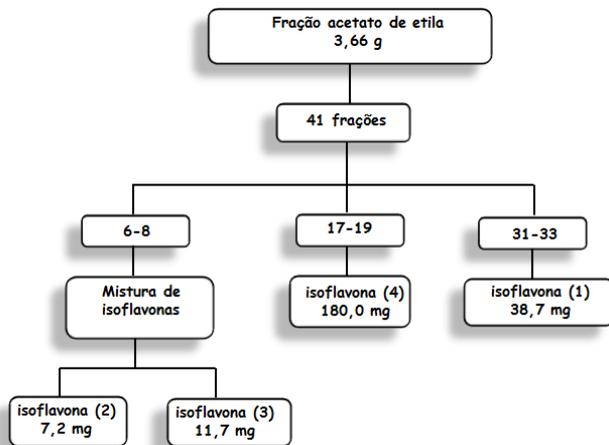


A fração acetato de etila (3,66 g) foi submetida à separação cromatográfica em coluna de sílica gel normal eluída com um gradiente crescente de acetato de etila em hexano, seguido de gradiente crescente de etanol em acetato de etila, processo que resultou em 41 frações. Estas frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e as frações que apresentaram o mesmo perfil foram reunidas (**Figura 15**).

As frações 6-8 (1:9 EtOAc-hexano) foram reunidas e recromatografadas através de coluna flash e eluídas no modo isocrático (hexano:acetona 8:2) resultando no isolamento dos compostos **2** (7,2 mg) e **3** (11,7 mg).

As frações 17-19 (3:7 EtOAc-hexano) e 31-33 (EtOAc) foram purificadas através de lavagens sucessivas com MeOH para render os compostos **4** (180 mg) e **1** (38,7 mg) (**Figura 15**).

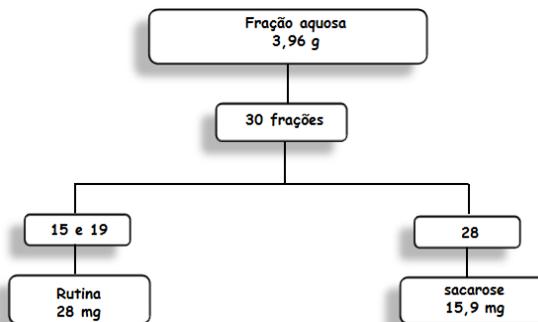
Figura 15. Isolamento de compostos da fração acetato de etila da Coleta 1 de *P. molluginifolia*.



4.6.2 Fração aquosa de *P. molluginifolia* (Coleta 1)

Os compostos da fração aquosa (3,96 g) de *P. molluginifolia* foram separados por meio de cromatografia em coluna de sílica gel utilizando como eluentes: 7:3 hexano:EtOAc; 5:14:1 hexano:EtOAc:MeOH; 1:19:13 hexano:EtOAc:EtOH e finalmente MeOH, rendendo 30 frações. As frações 15 e 19 (1:19:13, hexano:EtOAc:EtOH) foram combinadas e após purificação resultou no composto (5). A fração 28 (metanol) foi purificada através de lavagens sucessivas com MeOH, resultando no composto (6) (Figura 16).

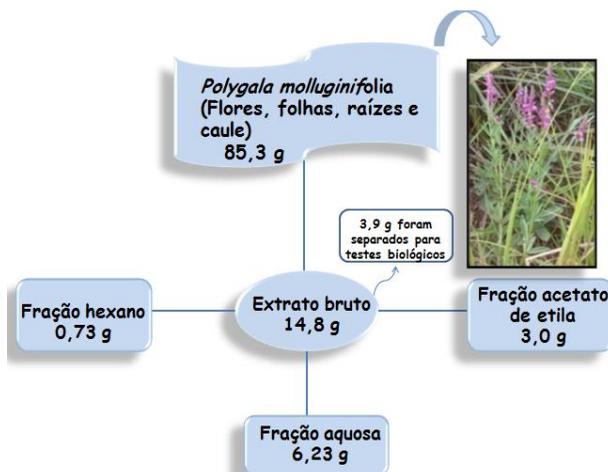
Figura 16. Isolamento de compostos da fração aquosa de *P.molluginifolia*.



4.6.3 Fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (Coleta 2)

A partir da coleta 2 de *P. molluginifolia* foram obtidos 85,3 g de planta seca. Após maceração com etanol foram obtidos 14,8 g de extrato bruto. Deste extrato bruto parte foi separada para testes biológicos e parte (10,9 g) foi submetido ao fracionamento líquido-sólido para obter as respectivas frações hexânica, acetato de etila e aquosa (**Figura 17**).

Figura 17. Obtenção de extratos brutos e frações de *P. molluginifolia* (Coleta 2)

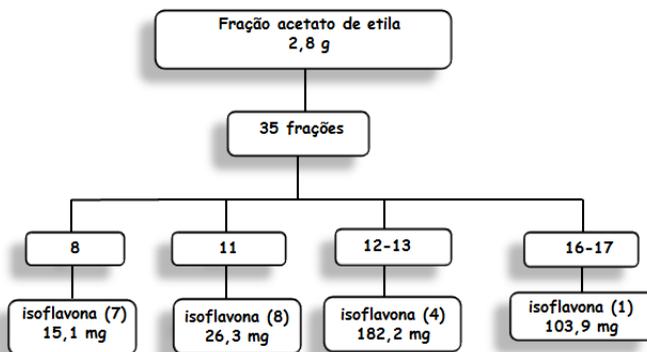


A fração acetato de etila (2,8 mg) foi submetida a cromatografia em coluna de sílica, eluída no modo gradiente crescente de polaridade utilizando misturas de acetato de etila-hexano. Este procedimento

resultou 35 frações que foram monitoradas por CCD e as frações similares foram reunidas. Observou-se a presença de cristais nas frações 8 e 11, das quais foi removido os respectivos sobrenadantes para render os compostos **7** (15,1 mg) e **8** (26,3 mg). Além disso, as frações 12 e 13 (hexano: acetato de etila 74:26) foram reunidas e purificadas por lavagens sucessivas com metanol para render o composto **4** (182,2 mg), isolado também anteriormente na coleta 1.

Além disso, também foi isolado o composto **1** (103,9 mg) (hexano: acetato de etila 60:40), obtido anteriormente também na coleta 1. Este composto foi obtido das frações 16 e 17 que foram reunidas e purificadas com metanol.

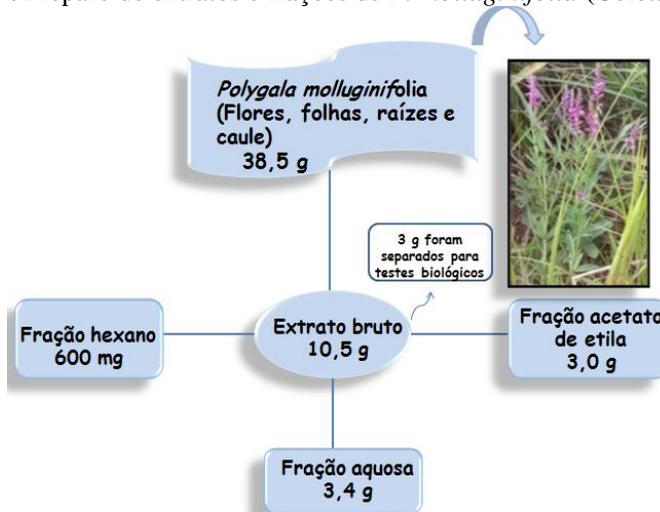
Figura 18. Isolamento da fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (Coleta 2).



4.6.4 Fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (Coleta 3)

Na coleta 3 foram obtidos 38,5 g de planta seca, os quais renderam 10,5 g de extrato bruto após o procedimento de maceração. Parte do extrato bruto obtido foi separado para testes biológicos e parte foi utilizado para o preparo das frações como mostra a **Figura 19**.

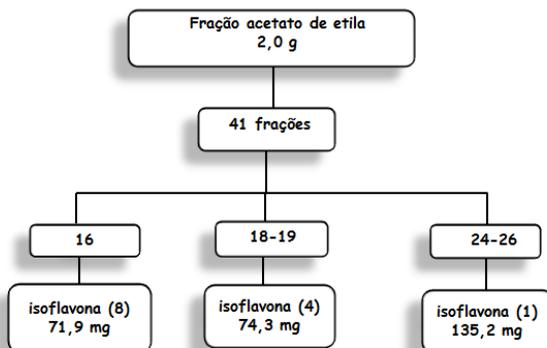
Figura 19. Preparo de extratos e frações de *P. molluginifolia* (Coleta 3).



A fração acetato de etila (2,0 g) foi submetida ao fracionamento em coluna de sílica gel eluída no modo gradiente de polaridade utilizando misturas de acetato de etila-hexano e metanol-acetato de etila como eluentes. As 41 frações obtidas com este procedimento foram analisadas por CCD e as frações similares reunidas. A fração 16 (hexano: acetato de etila 70:30) foi purificada com lavagens sucessivas de metanol resultando no composto **8** (71,9 mg), previamente isolado na coleta 3.

As frações 18-19 (hexano: acetato de etila 70:30) após purificação em metanol resultou em 74,3 mg da isoflavona (**4**). As frações 24-26 (hexano:acetato 40:60) após purificação em metanol rendeu o composto (**1**) (135,2 mg) (**Figura 20**).

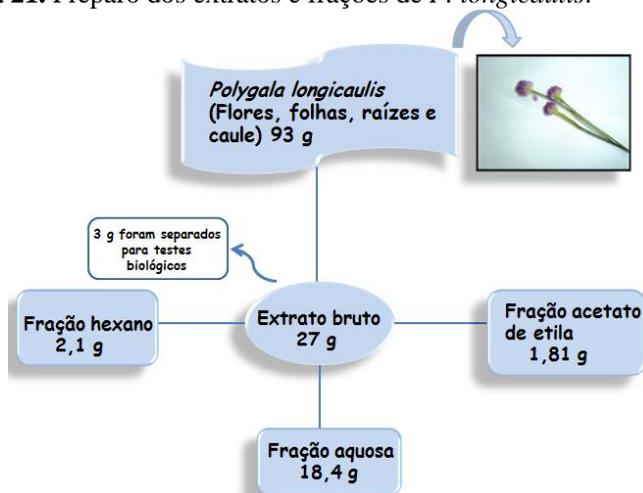
Figura 20. Isolamento da fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (Coleta 3).



4.6.5 Fração acetato de etila de *P. longicaulis* (Coleta 1)

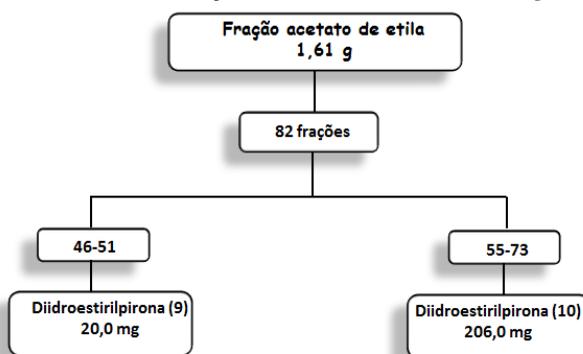
Na coleta de *P. longicaulis* foram obtidos 93,0 g de planta seca. A maceração deste material resultou em 27,0 g de extrato bruto, do qual foram utilizadas 24 g para a realização da partição líquido-sólido, processo que resultou nas frações hexânica, acetato de etila e aquosa (Figura 21).

Figura 21. Preparo dos extratos e frações de *P. longicaulis*.



A fração acetato de etila (1,61 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel e eluída com gradiente de polaridade crescente utilizando acetato de etila-hexano, seguido de metanol-acetato de etila. Foram coletadas 82 frações, monitoradas por CCD. As frações 46-51 (hexano:acetato de etila 80:20) e 55-73 (hexano:acetato de etila 70:30) após purificação com metanol resultaram nos compostos **9** (20,0 mg) e **10** (206,0 mg), repectivamente (**Figura 22**).

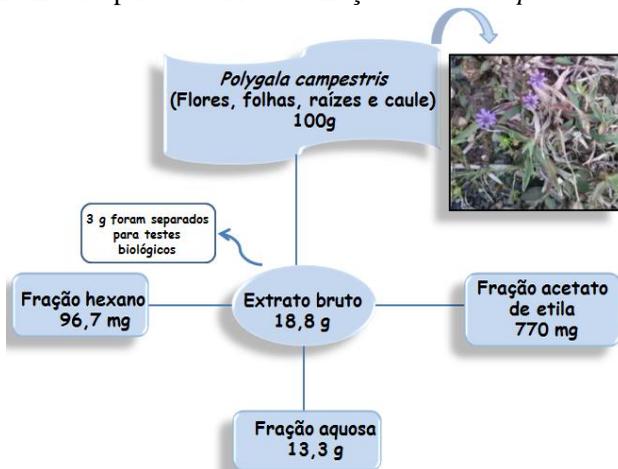
Figura 22. Fracionamento da fração acetato de etila de *P. longicaulis*.



4.6.6 Fração aquosa de *P. campestris* (Coleta 1)

De 100 g de planta seca de *P. campestris* obteve-se 18,8 g de extrato bruto. Desta quantidade obtida, 15,8 g foram utilizadas para realizar o particionamento líquido-sólido, pelo qual foram obtidos 770 mg da fração acetato de etila, 97,6 mg da fração hexânica e 13,3 g da fração aquosa (**Figura 23**).

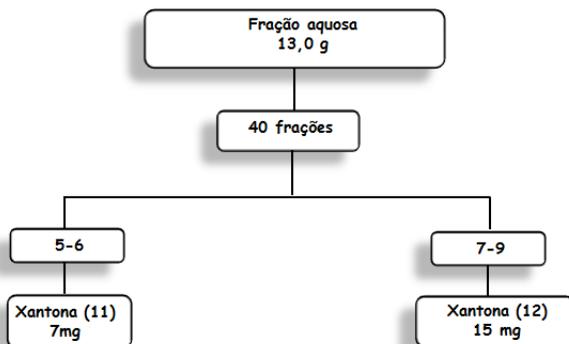
Figura 23. Preparo de extratos e frações de *P. campestris*.



A fração aquosa (13,0 g) foi submetida em cromatografia de sílica eluída no modo crescente de polaridade utilizando um eluente crescente de acetato de etila-hexano seguido de metanol-acetato de etila, resultando em 40 frações que foram reunidas de acordo com o perfil em CCD.

As frações 5 e 6 após purificação por recristalização em acetato de etila, resultou no composto (**11**) (7,0 mg) (hexano:acetato de etila 60:40). As frações 7-9 (hexano:acetato de etila 60:40), após purificação com acetato de etila renderam 15 mg do composto (**12**) (**Figura 24**).

Figura 24. Fracionamento cromatográfico da fração aquosa de *P. campestris*.



4.7 Microextração de voláteis de *P. molluginifolia* e análise por CG-EM

A microextração dos componentes voláteis e análise por CG-EM foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar sob supervisão do Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke.

Para realizar a microextração foi utilizado um béquer com água destilada que foi aquecido a 60°C com agitação lenta. Em outro recipiente colocou-se aproximadamente 10 mL de solução de NaCl saturada (para promover o *salt-out*), 234 mg da parte da planta fresca separadamente (folha, flor, caule e raiz) e a fibra de microextração. Mergulhou-se esse recipiente no béquer com água já aquecida com agitação por aproximadamente 1 hora para promover a saturação da fibra com os componentes voláteis de *P. molluginifolia*. Depois deste período foi feita a dessorção dos componentes voláteis presentes na fibra de microextração por 10 minutos no CG-EM.

Após a dessorção dos componentes foi realizada a análise de determinação dos componentes voláteis. Para isso foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 5975 Series MSD, com ionização por elétrons de 70 eV e temperatura de fonte de íons de 170 °C, equipado com coluna DB-5MS (25 m × 250 µm × 0,25 µm). Como gás de arraste foi utilizado o hélio com vazão de 1 mL min⁻¹, estando o injetor a 250 °C. A injeção da amostra de 1 µL foi conduzida no modo splitless, empregando-se a seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial de 35 °C/0 min, seguido de aquecimento a uma taxa de 10 °C/min até 280 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min. Para identificação dos compostos também foi injetada uma série de *n*-alcanos para fazer o cálculo de índices de retenção (IR) dos componentes voláteis.

4.8 Bioensaios de determinação de atividade antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase

Os bioensaios de atividade antioxidante e determinação da inibição da enzima acetilcolinesterase foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais sob orientação da Professora Dr^a. Inês Maria da Costa Brighente.

4.8.1 Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito na literatura

(Anagnostopoulou *et al.*, 2006). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm, diluídos em metanol), foram adicionados 5,0 mL de água destilada e 0,25 mL do reativo de Folin-Ciocalteu. Após três minutos foi adicionada 1,0 mL da solução saturada de Na_2CO_3 , agitou-se e a solução ficou em repouso por 1 hora. As absorvâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme descrito acima, porém, sem a solução da amostra. Um aparecimento de coloração azul-escuro indicou a presença de fenólicos no extrato ou fração testada. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluído em metanol, para comparação ($y= 5,64x+ 7,79$; $r^2=0,999$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos fenólicos totais foi determinado em mg de ácido gálico/g de amostra.

4.8.2 Determinação do teor de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides foi realizada conforme método descrito por Woisky e colaboradores (Cavin *et al.*, 1998; Woisky *et al.*, 1998). A 0,5 mL de uma solução da amostra (extrato bruto e frações na concentração de 1000 ppm diluídos em metanol), foram adicionados 2,5 mL de etanol e 0,5 mL de uma solução de AlCl_3 2%. Após 1 hora, as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco foi utilizado metanol. O aparecimento de coloração verde-fluorescente foi indicativo da presença de flavonóides. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluídas em metanol, para comparação ($y=10,36x-9,63$; $r^2=0,999$). Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos flavonoídicos foi determinado em mg de quercetina/g de extrato ou fração.

4.8.3 Determinação da ação sequestradora do radical livre DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-picril-hidrazil) baseia-se no método descrito na literatura (Cavin *et al.*, 1998), com algumas modificações. Uma solução de DPPH 0,004 % foi adicionada à solução teste nas concentrações de 5 a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A absorvância das soluções foi determinada em espectrofotômetro UV-VIS (517nm) após 30 minutos. Por meio da leitura da absorvância de uma solução de DPPH (2 mL de solução 0,004 %), acrescentado de 1 mL de MeOH, obteve-se a

absorbância no tempo inicial (A_0). A cada uma das concentrações da solução teste em análise (1 mL) foram adicionados 2 mL de solução de DPPH, obtendo-se a absorbância de cada amostra nas diferentes concentrações. A absorbância de uma solução teste (1 mL) em metanol (2 mL) foi subtraída da absorbância das amostras analisadas, a fim de descontar a possível interferência da amostra nesse comprimento de onda. A análise foi realizada em triplicata. Para os compostos isolados, os valores obtidos para as absorbâncias das diferentes soluções testes foram plotados em gráficos na forma de % de decréscimo da absorbância de DPPH em função da concentração da solução teste, onde foi determinada a concentração necessária para diminuir a concentração do DPPH em 50 % (EC_{50}) nas soluções testadas.

4.8.4 Determinação do potencial redutor

O ensaio para a análise da atividade antioxidante através da determinação do potencial redutor baseia-se no método da literatura (Waterman *et al.*, 1994), com adaptações. A 100 μ L das soluções teste (amostras, diluídas em metanol, na concentração de 1000 ppm) foram adicionados 8,5 mL de água deionizada. A esta solução foi adicionado 1,0 mL da solução de $FeCl_3$ 0,1 M, e após 3 minutos, 1,0 mL da solução de ferrocianeto de potássio 0,08 M, e misturou-se. Após 15 minutos, foi realizada a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia foi indicativo de potencial redutor. A análise foi realizada em triplicata. Como branco, foi utilizada uma solução preparada conforme o procedimento acima, sem a adição da amostra. Uma curva de calibração foi construída utilizando soluções padrões de ácido ascórbico nas concentrações de 0 a 1000 ppm ($y=2,43x+1,94$; $r^2=0,999$). O potencial redutor das amostras foi expresso em mg de ácido ascórbico/ g de amostra.

4.8.5 Ensaio de Inibição da Acetilcolinesterase

O bioensaio de inibição da acetilcolinesterase foi realizado conforme método descrito na literatura (Mata *et al.*, 2007) com modificações. Em uma cubeta foram colocados o tampão Tris-HCl 50 mM pH=8, a amostra testada (0,1 mg mL⁻¹), e a enzima acetilcolinesterase (do peixe elétrico tipo VI-S, pó liofilizado, Sigma). Após 15 min a temperatura ambiente, foram adicionados nesta cubeta, o iodeto de acetilcolina e o reagente de Ellman. Depois de trinta minutos foi feita a leitura em espectrofotômetro UV-VIS a 405 nm. Como controle positivo utilizou-se a galantamina (0,01 mg mL⁻¹) e como controle negativo utilizou-se o mesmo solvente em que foi

dissolvida a amostra, onde a atividade enzimática foi considerada 100%. Na referência (ou branco) foram utilizados todos os reagentes exceto a enzima.

Os resultados dos ensaios de inibição frente à enzima acetilcolinesterase e antioxidante foram submetidos à análise de variância e teste de Fisher com múltiplas comparações fixando $p < 0,05$ para indicar diferença significativa.

4.9 Ensaio de Permeabilidade em Membrana Artificial Paralela (PAMPA)

Os ensaios de permeabilidade foram realizados no Laboratório de Química de Produtos Naturais. Os testes foram realizados de acordo com a metodologia descrita por *Wonsland et al.* (2001) com modificações.

No dia anterior a realização dos testes de permeabilidade foram preparadas as soluções doadoras pela diluição das soluções estoque das amostras em DMSO (1000 ppm) em tampão fosfato 50% (v/v) e agitação overnight. Após agitação, as soluções doadoras foram filtradas.

Em seguida, os filtros de uma placa sanduíche de 96 poços foram revestidos com uma solução de 10 μL de solução de 1% (m/v) do lipídio fosfatidilcolina em dodecano para simular a absorção gastrointestinal. Depois, 150 μL das soluções foram adicionadas aos poços doadores e 300 μL da solução acceptora (50% DMSO em tampão fosfato) foram adicionados aos poços da placa acceptora. A placa doadora foi acoplada sobre a placa acceptora e incubada no escuro por um período de 5 horas, a temperatura ambiente, sob agitação a cada 20 min. Logo após, em frascos separados foram adicionados 150 μL da solução doadora em 300 μL da solução acceptora rendendo as respectivas soluções de equilíbrio. Os experimentos foram realizados em quadruplicata. Depois da incubação, a placa doadora e a placa acceptora foram separadas, e os poços e as soluções de equilíbrio foram analisados diretamente por HPLC a fim de determinar as respectivas áreas. A permeabilidade PAMPA foi calculada utilizando a seguinte equação (*Wohnsland et al.*, 2001):

$$P_{app} = \frac{V_D V_A}{(V_D + V_A) A t} (-\ln(1 - r))$$

Onde V_D é o volume do poço doador; V_A é o volume do poço acceptor; A é área do filtro; t é o tempo em segundos e r é a razão entre a

área dos picos dos poços aceptores e área das soluções de equilíbrio obtidos por HPLC.

4.10 Ensaios de atividade leishmanicida e tripanocida

O estudo de ensaios de atividade leishmanicida e tripanocida foram realizados no laboratório de Protozoologia da UFSC sob supervisão do professor Mario Steindel.

Neste estudo foram feitos ensaios utilizando formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*, formas amastigotas de *L. amazonensis* e formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*.

Formas promastigotas de *Leishmania* foram mantidos a 26°C no meio Schneider's pH 7,4, suplementado com SBF (soro bovino fetal inativado por calor) e 2% de urina humana. Antes da infecção dos macrófagos, os promastigotas de *L. amazonensis* foram diferenciados em formas amastigotas em pH 6,0 e temperatura de 32°C. Os meios foram suplementados com 10 unidades/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina. Os tripomastigotas de *T. cruzi* foram obtidos do sobrenadante de uma cultura de células Vero infectadas em meio *eagle* modificado por Dulbecco's (DMEM) e 2,5% de SBF. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram obtidas na fase exponencial de crescimento em meio LIT e foram lavados 3 vezes em tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 a temperatura ambiente e suspensos em meio LIT suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF). O número de parasitas foi determinado em câmara de Neubauer e a concentração ajustada para 2×10^6 células/mL e os parasitas mantidos a 4°C até o seu uso.

Para a triagem de atividade tripanocida e leishmanicida com promastigotas e epimastigotas, 180 µL/poço de uma suspensão contendo 3×10^6 promastigotas (para *L. brasiliensis*) e 5×10^6 epimastigotas (para *T. cruzi*) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com 20 µL das amostras a diferentes concentrações por 48 horas a 26 °C. Como controle positivo foram utilizados a anfotericina B (*L. brasiliensis*) e benzonidazol (para *T. cruzi*) e como controle negativo foi utilizado o DMSO. A atividade antiparasitária foi determinada pela técnica do MTT conforme *Sieuwerts et al.* (1995). Após 48 h de cultivo dos parasitas na presença de compostos, foi feita a adição de 50 µL de solução de MTT (2 mg/mL para *L. brasiliensis* e 10 mg/mL para *T. cruzi*) nos poços e incubação a 26°C por 4 horas para *L. brasiliensis* e 6 horas para *T. cruzi*. Após centrifugação por 10 min, o sobrenadante foi removido e solubilizado com DMSO. A densidade óptica foi medida a 540 nm em

uma leitora de placas TECAN® Infinite M200. Para cada amostra foram realizados três experimentos independentes em triplicata. Os valores de IC₅₀ foram determinados através de três experimentos independentes utilizando regressão linear utilizando software PRISM 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4.10.1 Infecção de células e tratamento

Os macrófagos foram obtidos de fêmeas de camundongos adultos e cultivados por 1 semana em meio DMEM suplementado com 10% de SBF e 30% de sobrenadante de culturas de células L929, conforme descrito por *Bafica et al.* (2005). A cultura de células foi removida e as células tripsinizadas. Depois de lavados, os macrófagos foram semeados em microplacas de 96 poços e cultivados por 24 horas a 37 °C, 5 % CO₂ em DMEM + 10% SBF. As células foram infectadas com *Leishmania* (10:1 parasita:célula) a 34 °C, 5% O₂/2h. Parasitas não internalizados foram removidos por lavagem e as células foram cultivadas em DMEM + 10% SBF por 24 h a 34°C em 5% CO₂. Para ensaios com *T. cruzi*, os macrófagos foram infectados com tripomastigotas (4:1) parasita/célula a 37°C, 5% CO₂ em DMEM por 4 h. Parasitas livres foram removidos por lavagem e as células foram cultivadas em DMEM + 10% SBF por 24 h a 37°C, 5% CO₂. Após um período de cultivo de 24 horas, a cultura celular foi cultivada com diferentes concentrações das amostras a serem analisadas por 48 h. Depois, o meio foi removido e as células foram enxaguadas com tampão fosfato, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares foram determinados por contagem aleatória de 300 células por poços utilizando um microscópio óptico 40 X. A porcentagem de inibição foi determinada como descrito por *Lakshmi et al.* (2007) usando a seguinte fórmula: $PI = 100 - (T/C \times 100)$, onde T representa a média de amastigotas intracelulares totais no macrófago tratado, e C representa a média de amastigotas intracelulares totais no controle não tratado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Anfotericina B e benzonidazol foram utilizados como controles positivos e DMSO 1% como controle negativo. O valor de IC₅₀ foi determinado através de três experimentos independentes utilizando regressão linear utilizando software PRISM 3.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

4.10.2 Ensaio de toxicidade celular

Os macrófagos (2×10^5 células/poço) foram semeados em microplacas de 96 poços e cultivados em meio DMEM + 10 % SBF a 37°C, 5 % CO₂ por 24 h. Para os ensaios de citotoxicidade, amostras a

diferentes concentrações ou DMSO 1% (controle negativo) foram adicionados e as células foram cultivadas a 37°C, 5% CO₂ por 48 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método colorimétrico MTT como descrito por *Siewerts et al.* (1995). A densidade óptica foi medida a 540 nm em uma leitora de placas TECAN® Infinite M200.

4.11 Ensaios de atividade antifúngica

Os ensaios de determinação de atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais sob supervisão da professora Susana Johann.

4.11.1 Solventes usados na solubilização dos produtos naturais

Para dissolver e diluir os extratos e frações das plantas estudadas utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) e a concentração final deste solvente no ensaio foi de 0,002%.

4.11.2 Meios de cultura

O meio de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio YPD (extrato de levedura, peptona e dextrose), foram utilizados para a manutenção das culturas fúngicas e o meio de RPMI 1640 (Sigma) tamponado com ácido morfolinepropano sulfônico (MOPS) (Sigma) foram usados para os testes de microdiluição.

4.11.3 Fungos

Para determinação dos ensaios foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* (ATCC 18804), *C. krusei* (ATCC 200298), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. tropicalis* (ATCC 22019). Utilizou-se também *Cryptococcus gattii* (ATCC 32608) e *C. neoformans* (ATCC) e *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb18) (Coleção de Cultura da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

4.11.4 Inóculo

Para os ensaios com espécies de *Candida* as amostras foram repicadas em estrias, 24 horas antes da realização dos testes e as espécies de *Cryptococcus*, foram repicadas em 48 horas, em SB e mantidas a 35°C. O inóculo foi feito de acordo com o documento M27-A₂.

Para o Pb18 nas formas de levedura este foi repicado em tubos com meio YPD a 37°C. No teste de microdiluição os fungos foram ressuspensos, com o auxílio de uma alça de Henle, em solução

fisiológica esterilizada e homogeneizados em vórtex e ajustados à turbidez de 75-80% em espectrofotômetro a 70% com comprimento de onda de 530 nm, 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 para as amostras de *Candida* spp. e *C. neoformans*. Para o fungo dimórfico *P. brasiliensis* as células leveduriformes em fase exponencial foram coletadas assepticamente com alça de Henle e suspensas em 5 mL de salina estéril (0,85%) (Manocha *et al.*, 1980). O inóculo foi homogeneizado em vortex e deixado em repouso para a decantação e somente após 5 minutos o sobrenadante foi coletado. A transmitância do sobrenadante foi medida com comprimento de onda de 520nm e ajustada para 69-70% (1×10^5 a 5×10^5 células por mL), contando o número de células viáveis em câmara de Neubauer. As suspensões foram então diluídas em RPMI (1:10) para obtenção do inóculo final 1×10^4 a 5×10^4 cel/mL (Hahn *et al.*, 2000).

4.11.5 Teste de triagem da atividade antifúngica

Para o teste de triagem, todas as amostras a serem testadas foram diluídas a 500 µg/ml em RPMI. Posteriormente 100 µL de cada amostra foram adicionadas em um poço de duas placas de 96 poços. Foram feitos também os controles de toxicidade do DMSO na concentração de 0,002%, crescimento fúngico, esterilidade do meio de cultura e suscetibilidade ao itraconazol (0,5 µg/mL).

Posteriormente em cada poço teste e nos poços controles, exceto o controle de esterilidade do meio, foram adicionados 100 µl do inóculo. Desta forma a concentração final das drogas nos poços ficou em 250 µg/mL.

Posteriormente as placas foram incubadas a $\pm 37^\circ\text{C}$. No ensaio utilizando às leveduras do gênero *Candida* as placas ficaram incubadas por 48h, para as espécies de *Cryptococcus* por 72 horas. Para o Pb18 as placas foram incubadas por 10 dias.

Após a incubação, em cada poço foi acrescentado 10 µL de brometo tiazolil azul de tetrazólico (MTT/ AMRESCO - 5 mg/mL), o conteúdo homogeneizado e as placas foram novamente incubadas à mesma temperatura de crescimento dos respectivos inóculos por 4 horas. Nas mitocôndrias das células alvo, o MTT é metabolizado em formazan, revelando a presença de células metabolicamente ativas. Após o metabolismo do MTT, foram adicionados 100 µL/poço de SDS/isopropanol (5%), que rompe a membrana celular dos microrganismos alvos e disponibiliza no meio o formazan.

A leitura foi realizada por meio do método colorimétrico do MTT em um leitor de microplaca VERSAmax (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), com a absorbância de 570 nm. A absorbância dos poços testes foi comparada com a absorbância do poço controle contendo apenas o microrganismo, sendo a porcentagem de inibição calculada pela seguinte fórmula:

$$PI: \frac{\text{Densidade óptica poço controle} - \text{DO poço tratado}}{\text{Densidade óptica do poço controle}} \times 100$$

Os extratos, frações ou compostos isolados foram considerados ativos quando inibiram o crescimento fúngico em valor igual ou maior que 70%.

4.11.6 Teste da Concentração Inibitória Mínima

Este teste foi feito utilizando a metodologia do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM) descrito no documento M27-A2. O teste de CIM para o Pb 18 foi feito conforme descrito por Johann e colaboradores (2010). Primeiramente os extratos, frações e substâncias foram dissolvidos em DMSO e diluídos em caldo RPMI, mantendo o volume constante de 1000 µL em cada tubo. Foram testadas 10 concentrações que variaram de 250-0,45 µg/mL. A partir de cada diluição, alíquotas de 100 µL foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição. Como controle positivo foi utilizada o itraconazol (Sigma) nas concentrações de 8-0,007 µg/mL.

Após a montagem das placas, cada orifício teste e controle de crescimento receberam 100 µL do inóculo microbiano. O tempo e a temperatura de incubação, assim como a leitura das placas foram feitos como descrito acima no teste de triagem.

As CIMs foram consideradas como a menor concentração do produto natural, que inibiu o crescimento do microrganismo em pelo menos 90%, em relação ao controle de crescimento, após a incubação e foram expressas em µg/mL. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e repetidos pelo menos duas vezes.

4.12 Atividade anti-inflamatória

Os ensaios de atividade anti-inflamatória foram realizadas no Laboratório de Imunologia da UFSC sob supervisão do Prof. Dr. Eduardo M. Dalmarco.

4.12.1. Animais

Para os testes de atividade anti-inflamatória foram utilizados camundongos albinos suíços, 1 mês de idade, fêmeas, pesando entre 18 e 25 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Para cada experimento foram utilizados 5 animais por grupo de tratamento. Os animais foram acomodados no biotério setorial (Laboratório de pesquisa em imunologia) em gaiolas plásticas (40 x 32 cm) com serragem, sob temperatura (20 ± 2 °C) e luz controladas. Estes animais receberam alimentação e água a vontade (*ad libitum*) durante todos os experimentos. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC sob protocolo PP00757.

4.12.2 Procedimento anestésico

A anestesia foi induzida com pentobarbital (25 mg/kg) administrados por via intraperitoneal, a fim de possibilitar a administração da solução corante de azul de Evans (25 mg/kg, i.v., intragengival) com o objetivo de avaliarmos de forma indireta a exsudação.

4.12.3 Eutanásia dos animais

Quatro horas após a indução da pleurisia, os animais foram sacrificados com *overdose* de pentobarbital (100 mg/kg), administrado por via intraperitoneal.

4.12.4 Pleurisia induzida pela carragenina

No dia dos experimentos, os animais receberam 0,1 mL de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou do agente flogístico carragenina (Cg, 1%), administrado na cavidade pleural direita, através do espaço intercostal, utilizando-se de uma agulha 13x5 mm e cânula de polietileno. De acordo com o protocolo experimental, 4 h após a administração da carragenina ou da solução salina estéril, os animais foram sacrificados com overdose de pentobarbital. A seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, em declive de 30° a 45°, sendo feita uma incisão transversal na pele e nos músculos abdominais. Posteriormente, o apêndice xifóide foi pinçado e através de duas incisões paralelas ao longo do esterno, a cavidade pleural foi exposta. Imediatamente, a cavidade pleural foi lavada com duas alíquotas de 0,5 mL (totalizando 1 mL) de solução salina tamponada (PBS, pH 7,6, NaCl (130 mmol/L), Na₂HPO₄ (5 mmol/L), KH₂PO₄ (1 mmol/L) e heparina (20 UI/mL). Alíquotas do lavado pleural foram coletadas com auxílio de

pipeta automática para a quantificação dos números total e diferencial de células.

Utilizando este protocolo, diferentes grupos de animais receberam diferentes doses do extrato bruto (50 - 200 mg/kg), fração aquosa (10 - 50 mg/kg), fração acetato de etila (10 - 50 mg/kg), fração hexânica (25 - 100 mg/kg) e compostos isolados isoflavona (4) (1 - 5 mg/kg) e Rutina (5) (2,5 - 10 mg/kg) (i.p.) 30 minutos antes da administração da Cg (i.pl.). Nestes grupos experimentais, 10 minutos antes dos experimentos, os animais foram tratados com solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 mL/animal, i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação na cavidade pleural.

Para todos os experimentos, um dos grupos de animais foi tratado com Dexametasona (0,5 mg/kg) 30 minutos antes da administração da Cg, que foi utilizada como droga de referência anti-inflamatória.

4.12.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

No dia dos experimentos, após sacrifício dos animais e abertura das cavidades, alíquotas do lavado pleural (200 μ L) foram reservadas para a contagem celular total, utilizando-se contador hematológico veterinário automático ajustado para camundongo (MINDRAY, BC-2800 Vet, Nanshan, Shenzhen, China). Os esfregaços celulares foram realizados para a contagem diferencial dos leucócitos. Após o preparo dos esfregaços em citocentrífuga (Wescor-Cytopro, Logan, Utah, EUA), estes foram corados pelo método de May-Grünwald-Giemsa. A contagem celular diferencial foi realizada em microscópio óptico comum, com auxílio de objetiva de imersão (aumento de 1000 vezes), contando-se 100 células por lâmina. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

4.12.6 Coloração dos esfregaços celulares

A metodologia consiste na coloração sucessiva com uma mistura de eosinato de azul-de-metileno (May-Grünwald) e de azul-eosina (Giemsa). As lâminas contendo o sedimento dos lavados pleurais após centrifugação em citocentrífuga foram secas em posição horizontal à temperatura ambiente. Em suporte de coloração apropriado, as lâminas foram cobertas com 1 mL de corante May-Grünwald e mantidas em contato com o sedimento por 2 min. A seguir adicionou-se água deionizada (1 mL) nas lâminas, com auxílio de pipeta automática com capacidade de 1 mL. Após 3 min, o corante foi removido e cobriu-se a lâmina com corante Giemsa (diluído 1:20 em água deionizada) por 15 min. A seguir, as lâminas foram lavadas em água deionizada e secas à

temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em número total de células ($\times 10^6$).

4.12.7 Determinação da exsudação

No dia dos experimentos, uma alíquota (200 μ L) do lavado pleural foi centrifugada e o sobrenadante foi reservado para a determinação da concentração de Azul de Evans em leitor de enzima imunoensaio (ELISA) (Organon-Tecknica, Roseland, New Jersey, EUA), por leitura da densidade ótica, em comprimento de onda 620 nm, de acordo com a metodologia descrita por *Saleh et al.* (1996). Para a quantificação da concentração de azul de Evans, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante (0,01 - 50 μ g/mL) tiveram suas densidades óticas determinadas, e formulou-se uma equação da reta. Os valores das concentrações de azul de Evans nas amostras foram interpolados com base na reta padrão e expressos em μ g/mL.

4.13 Determinação da atividade antinociceptiva

Os ensaios para a determinação da atividade antinociceptiva foram realizados no Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação (LANDI) na Universidade Federal de Santa Catarina sob orientação do Professor Adair R. S. Santos.

4.13.1 Animais utilizados para a realização dos testes de atividade antinociceptiva

Os experimentos de atividade antinociceptiva foram realizados com camundongos suíços machos (25 a 35 g) fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos a 22 ± 2 °C, em um ciclo de 12 horas claro e 12 horas escuro (sendo que as luzes foram acesas as 06:00 horas) e com água e ração *ad libidum*.

Os animais foram mantidos no laboratório para aclimatização por pelo menos 1 hora antes da realização dos experimentos. O número de animais e a intensidade dos estímulos testados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes do extrato bruto e da isoflavona (4) isolada (Zimmermann, 1983).

Todos os procedimentos experimentais empregados estão de acordo com as normas éticas para o estudo com animais em laboratório e foram aprovados de Comissão de Ética no uso de animais da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pelo protocolo PP00745.

4.13.2 Reagentes utilizados

Para a realização dos experimentos foram utilizados os seguintes reagentes: formalina (Merck, Darmstadt, Germany); sulfato de morfina (União Química, Brazil); hidrocloreto de naloxona, cinamaldeído, cânfora (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA); capsaicina (Tocris Bioscience, Ellisville, Missouri, USA) e isoflurano (Cristália, SP, Brazil). Todos os compostos utilizados foram dissolvidas em solução salina isotônica (0.9% NaCl) com exceção do extrato e a isoflavona isolada, que foram dissolvidos com solução salina e Tween 80. A solução final de Tween não excedeu 5%, a fim de não influenciar na atividade exercida pelo extrato e composto isolado. Os grupos controle foram tratados 1 hora antes de cada avaliação com o veículo (5% Tween em solução salina (10 mL/kg, i.g.).

4.13.3 Avaliação da atividade locomotora

A avaliação da atividade locomotora foi realizada através de uma metodologia descrita na literatura (Rodrigues *et al.*, 2002; Tsuda *et al.*, 1996) com a finalidade de averiguar possíveis resultados falso-positivos do extrato bruto da espécie *Polygala molluginifolia* e isoflavona (4) testada. O aparato do teste de campo aberto consiste em uma caixa de madeira medindo 40 × 60 × 50 cm e o assoalho da arena é dividido em 12 quadrados iguais. Foi feita a contagem do número de cruzamentos com todas as patas durante 6 min. Os animais foram tratados com o extrato (10-1000 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 mL/kg, i.g.) 1 hora antes da realização do teste.

4.13.4 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina

A nocicepção induzida por formalina foi medida como descrito previamente (Hunnskaar *et al.*, 1985). Os animais receberam 20 µL de uma solução de formalina 2,5% (0,92% de formaldeído em salina), os quais foram injetados intraplantarmente (i.pl.) na região ventral da pata posterior direita. Este modelo permite evidenciar duas fases de nocicepção: a primeira ocorre entre 0 e 5 minutos e representa a fase neurogênica; a segunda é avaliada entre os tempos de 15 e 30 minutos e representa a fase inflamatória. Após a injeção da formalina os animais foram colocados, individualmente, em um funil de vidro ao lado de um espelho para facilitar sua observação. O tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada com a formalina foi cronometrado, sendo considerado um indicativo da nocicepção. Os animais foram tratados com o extrato bruto de *Polygala molluginifolia*

(10-1000 mg/kg, i.g.) ou isoflavona (4) (10-100 mg/kg, i.g.), 1 hora antes da injeção da formalina na pata posterior direita.

Além disso, foi verificado o edema, temperatura local e sistêmica dos animais antes e depois do tempo de resposta nociceptiva pela injeção intraplantar de formalina. A diferença de espessura (mm) entre a pata direita antes e depois da injeção de formalina foi considerada como um índice de edema, medido na região central da pata, utilizando um micrômetro eletrônico digital 0-25 mm. A diferença de temperatura (°C) entre a superfície ventral da pata direita, antes e depois da injeção da formalina, foi considerada como índice de temperatura local dos animais. A diferença de temperatura (°C) da orelha direita, antes e depois do teste de formalina, foi utilizada como índice de temperatura sistêmica dos animais, verificado pela medida do meato acústico externo da orelha do animal. Para ambas as avaliações, foram utilizadas o termômetro digital Mallory-Pro Thermosensor (10°C - 50°C).

4.13.5 Incisão plantar (dor pós-operatória)

A cirurgia de incisão plantar foi realizada como previamente descrito por *Pogatzki et al.* (2003). Os animais foram anestesiados com 1-2% de isoflurano administrado por meio de uma máscara nasal. Após a preparação estéril da pata traseira direita, foi realizada uma incisão longitudinal de 5 mm através da pele e fáscia da superfície plantar, usando um bisturi com lâmina número 11. A incisão foi iniciada a 2 mm da extremidade próxima do calcanhar em direção aos dedos. O músculo plantar foi elevado com uma pinça, mantendo a origem e inserção do músculo intacto. Em seguida, a pele foi suturada com um fio de sutura de polipropileno 6,0 não absorvível e coberta com solução de 10% de povidine-iodo®.

Os animais do grupo controle foram submetidos a um falso procedimento cirúrgico (grupo Sham), que consiste apenas na aplicação da anestesia sem a realização da incisão. Após os procedimentos, os animais permaneceram em suas gaiolas para recuperação e as suturas foram removidas no segundo dia pós-operatório.

4.13.6 Avaliação da hiperalgesia mecânica

O teste foi aplicado utilizando uma plataforma de (70 x 40 cm), que consiste em uma tela de arame com malha de 6 mm. Para facilitar a aplicação do filamento na superfície ventral da pata posterior direita (operada), os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação feita em acrílico (9 x 7 x 11 cm), sem fundo e coberta com tampa, posicionada sobre a plataforma.

A frequência de retirada da pata foi medida pelo número de vezes que o animal retirou a pata depois que o filamento de von Frey 0,4 g foi aplicado (Bortalanza *et al.*, 2002; Martins *et al.*, 2012). Os resultados foram expressos como porcentagem de frequência de resposta, sendo que foram feitas 10 aplicações do filamento. Os animais foram aclimatizados por no mínimo 1 hora antes do teste. O dia anterior à cirurgia, os animais foram submetidos ao teste para caracterizar a resposta, onde somente os animais que apresentam uma taxa de resposta de 20% foram selecionados.

Para averiguar se o extrato bruto inibe a hiperalgesia mecânica foi investigada a atividade antinociceptiva 24 horas depois de efetuar a cirurgia de incisão plantar, e foi avaliado até 6 horas depois do tratamento com o extrato (30, 100 e 300 mg/kg, i.g.). Animais do grupo controle receberam um volume similar de veículo (10 mL/kg, i.g.), enquanto animais do grupo sham receberam o veículo (10 mL/kg, i.g.) ou extrato (300 mg/kg, i.g.). Para investigar o efeito do tratamento diário do extrato (30 e 300 mg/kg, i.g.), o tratamento foi repetido 6 dias consecutivos depois da incisão plantar.

4.13.7 Medida da hiperalgesia térmica

A avaliação da hiperalgesia térmica a estímulos quentes e frios em camundongos foi utilizada a placa quente/fria conforme descrito por Nucci *et al.* (2012). Os camundongos foram colocados sobre a placa e foram contidos por um cilindro de acrílico. Para analisar a hiperalgesia térmica ao calor, os camundongos foram colocados sobre uma placa quente (48 ± 1 °C) e o tempo de corte para este teste foi de 60 s, a fim de evitar danos teciduais. Para analisar a hiperalgesia térmica ao frio, os camundongos foram colocados sobre placa fria (10 ± 1 °C) e o tempo de corte para este teste foi de 120 s (Nucci *et al.*, 2012).

Os camundongos foram tratados com o extrato (300 mg/kg, i.g.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 1 hora antes. A hiperalgesia foi avaliada pela latência de retirada da pata traseira direita. O comportamento foi avaliado do primeiro ao segundo dia depois da cirurgia de incisão.

4.13.8 Nocicepção induzida por injeção intraplantar de agonistas de TRPV1 e TRPA1 em camundongos

Para avaliar o envolvimento de canais TRPV1 sobre o efeito do extrato bruto e a isoflavona isolada (4), os camundongos foram submetidos ao teste usando a capsaicina, um ativador específico desses canais, como previamente descrito por Santos *et al.* (1997). Foi testado também o envolvimento dos canais TRPA1 na atividade antinociceptiva

do extrato e da isoflavona (4) através do teste usando cinamaldeído, um ativador específico desses canais, como previamente descrito na literatura (Cordova *et al.*, 2011). Os camundongos foram pré-tratados com o extrato bruto (10-300 mg/kg, i.g.), isoflavona (30 e 100 mg/kg, i.g.), cânfora (um antagonista TRPA1 usado como controle positivo, 7,6 mg/kg, s.c.) ou veículo (10 ml/kg, i.g.) 1 hora antes da injeção de 20 µl de capsaicina (ativador TRPV1, 5 nmol/sítio, i.pl.) ou cinamaldeído (ativador TRPA1, 10 nmol/sítio, i.pl.) na superfície da pata traseira direita.

Imediatamente depois da injeção de capsaicina ou cinamaldeído, os animais foram colocados em câmaras de observação (9 x 11 x 13 cm) e a resposta de atividade antinociceptiva foi avaliada como a quantidade de tempo em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada durante 5 minutos.

4.13.9 Nociceção induzida pela injeção intratecal de agonistas TRPV1 e TRPA1 em camundongos

O possível envolvimento dos canais TRPV1 sobre o efeito antinociceptivo do extrato bruto (PMEB) foi avaliado, utilizando o teste da capsaicina, um ativador específico desses canais (Sakurada *et al.*, 1996). Posteriormente, para avaliar o envolvimento dos canais TRPA1 sobre o efeito antinociceptivo, foi criada uma curva dose resposta (3-3000 pmol/sítio, i.t.) para avaliação em camundongos, realizada com base em estudos prévios com ratos (Klafke *et al.*, 2012). De acordo com estes resultados, a melhor dose (30 pmol/sítio, i.t.) e tempo (30 min) foram escolhidos a fim de aumentar o comportamento nociceptivo.

As injeções foram aplicadas a camundongos plenamente conscientes. Os animais foram contidos manualmente e uma agulha de calibre 30 ligada a um tubo de polietileno com uma microseringa de 25 µL (Hamilton, Birmingham, UK) foi inserida através da pele e entre as vértebras L5-L6, no espaço subaracnóide espinal. Cada injeção foi administrada por um período de 5 segundos e o movimento do reflexo da cauda foi considerado como indicativo de sucesso de administração.

A quantidade de tempo (segundos) em que o animal permaneceu mordendo ou lambendo a região caudal foi utilizado como evidência de nociceção e foi avaliada por injeções de um dos seguintes agonistas: capsaicina (ativador TRPV1, 100 pmol/i.t.) (5 min) ou cinamaldeído (ativador TRPA1, 30 pmol/i.t.) (30 min). Os animais receberam o veículo (10 mL/kg, i.g.), extrato bruto (10, 100 ou 300 mg/kg, i.g.) ou isoflavona (4) (30 ou 100 mg/kg, i.g.) 1 hora antes da injeção intratecal de 5 µL de cada droga.

4.13.10 Avaliação do envolvimento do sistema opióide no efeito analgésico do extrato bruto e a isoflavona (4)

O envolvimento do sistema opióide no efeito analgésico do extrato bruto e a isoflavona foi testado (Luiz *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2012). Os camundongos foram submetidos à injeção intraplantar de 20 μ L de cinamaldeído (10 nmol/sítio, i.pl.) e foram pré-tratados com: sistemática (i.p.) injeção de salina (10 mL/kg) ou naloxona (um receptor antagonista opióide não seletivo, 1 mg/kg) 20 min antes do tratamento com o extrato bruto (300 mg/kg, i.g.), isoflavona (4) (100 mg/kg, i.g.) ou morfina (2,5 mg/kg, s.c.). A resposta nociceptiva foi avaliada como o tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata durante 5 minutos, 1 hora antes do tratamento com o extrato bruto ou isoflavona ou 30 minutos depois do tratamento com a morfina.

4.13.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) Os valores de DI_{50} foram determinados a partir dos experimentos usando um software de regressão não linear (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Os testes de formalina, capsaicina, cinamaldeído, naloxona, campo aberto, placas quente/fria foram realizadas pelo método ANOVA de uma via seguido pelo teste de múltipla comparação Student–Newman–Keuls. As análises do teste de dor pós-operatória foram realizadas pelo método de ANOVA de duas vias seguido do teste Bonferroni de múltiplas comparações. Em todas as análises, os valores *P* values foram considerados estatisticamente significativos se forem menores que 0,05 somente. O software estatístico GraphPad Prism[®] v5.01 (San Diego, CA, USA) foi usado para todos os cálculos.

4.14 Avaliações da atividade anti-hiperglicêmica

A avaliação da atividade anti-hiperglicêmica foi realizada no laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais do Departamento de Bioquímica da UFSC sob supervisão da Prof. Dra. Fátima R. M. B. Silva.

4.14.1 Animais

Ratos Wistar machos (180-200 g) foram mantidos em caixas plásticas com temperatura controlada (aproximadamente 21 ± 2 °C) com ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas entre 6 e 18 h). Os animais receberam alimento (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água e *ad libitum*.

Animais em jejum foram privados de alimento por 16 h, sendo permitido acesso livre à água. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo CEUA-UFSC PP00398 e PP00749).

4.14.2 Determinação da curva de tolerância oral à glicose e insulina

4.14.2.1 Curva de tolerância oral à glicose

Para os testes de tolerância oral a glicose usou-se um modelo animal de hiperglicemia amplamente utilizado com sucesso na literatura (Cazarolli *et al.*, 2009; Silva Frederico *et al.*, 2012). Os animais foram divididos em 5 diferentes grupos. A hiperglicemia foi induzida por meio de dose única oral de glicose (4 g/kg; 8,9 M) em todos os grupos, exceto no grupo euglicêmicos, que recebeu apenas o veículo (etanol 1%). Portanto, os animais foram divididos nos seguintes grupos: grupo que recebeu apenas a glicose 4g/kg e veículo (Controle hiperglicêmico). O grupo euglicêmico recebeu apenas o veículo (etanol 1%). Os grupos tratados receberam glipizida (10 mg/kg); fração acetato de etila (PMFA) (10, 25 ou 50 mg/kg) ou as isoflavonas **(1)** e **(4)** (0,1; 1 ou 10 mg/kg). Os tratamentos foram administrados 30 min antes da indução da hiperglicemia (sobrecarga de glicose). A glicemia foi medida antes do início do tratamento (tempo zero). Imediatamente, os ratos receberam o tratamento (veículo, frações, glipizida, isoflavonas **(1)** e **(4)** e, após 30 min a sobrecarga de glicose foi administrada. Todos os tratamentos foram administrados por via intra-esofágica (gavagem). A curva de tolerância à glicose foi iniciada após a administração da glicose e a glicemia foi avaliada aos 15, 30, 60 e 180 min pelo método da glicose oxidase. Os resultados foram expressos em mg de glicose/dL no soro.

4.14.2.2 Determinação da insulina sérica

A detecção da insulina foi realizada através do ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante. O intervalo de valores detectados pelo presente ensaio foi de 0,51 ng/mL a 4,8 ng/mL. Os coeficientes de variação (CV) intra e inter-ensaio para insulina foram 1,33 e 6,71, respectivamente, com uma sensibilidade de 0,1 ng/mL. Todos os níveis de insulina foram estimados por meio de medições colorimétricas em 450 nm com um leitor de placas de ELISA (Organon Teknika, Roseland, NJ, EUA), por interpolação a partir de uma curva padrão. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados foram expressos como ng de insulina no soro mL⁻¹ (Damazio *et al.*, 2010).

4.14.3 Determinação do conteúdo de glicogênio

Para determinação do glicogênio muscular e hepático, músculo sóleo e o fígado foram removidos dos ratos hiperglicêmicos (controles) e de ratos submetidos aos respectivos tratamentos imediatamente após 3 h da sobrecarga de glicose. Os tecidos foram pesados e digeridos com KOH 33% sob fervura a 100 °C por 20 min. Após a fervura, foi adicionado etanol 96% e novamente, as amostras foram submetidas à fervura seguida de banho de gelo para precipitação do glicogênio. As amostras foram então centrifugadas a 1300 r.p.m. durante 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado solubilizado em água. O conteúdo de glicogênio foi determinado pelo tratamento com reagente de iodo e posterior leitura em espectrofotômetro a 460 nm. Os resultados foram expressos em mg de glicogênio/g de tecido (Krisman, 1962).

4.14.4 Determinação da atividade das dissacaridases intestinais *in vivo* e *in vitro*

Os ratos hiperglicêmicos tratados e não tratados *in vivo* foram utilizados para a determinação da atividade de dissacaridases intestinais, após 3 h da sobrecarga de glicose. Para os ensaios *in vitro* o tratamento foi realizado 5 min antes da incubação com substrato maltose, sacarose e lactose. O segmento do duodeno foi removido, lavado em 0,9% de solução de NaCl, secado sobre papel filtro, pesado, cortado, homogeneizado com NaCl a 0,9% (400 mg de duodeno por mL) e centrifugado (18000 r.p.m./8 min). O sobrenadante foi incubado a 37 °C durante 5 min com o substrato (maltose, sacarose e lactose) em tampão maleato (pH 6,0). Atividades da maltase, lactase e sacarase foram determinadas pelo método glicose oxidase de acordo com as recomendações do fabricante (Dahlqvist, 1968; Pereira *et al.*, 2012). A atividade específica foi definida como a atividade da enzima (U) por mg de proteína (corresponde à quantidade de enzima que catalisa uma reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto). A concentração de proteína foi determinada pelo método descrito na literatura (Lowry *et al.*, 1951), utilizando BSA como padrão. Os ensaios foram realizados em duplicata e conduzidos, juntamente com os respectivos controles.

4.14.5 Determinação da atividade anti-glicação

Os AGES (Produtos Finais da Glicação Avançada) foram formados num sistema *in vitro* descrito na literatura com adaptações (Kiho *et al.*, 2004). A glicose (500 mM) ou a frutose (300 mM) foram

incubadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4; azida sódica 0,02%) com BSA (10 mg/ml) na ausência (controle) ou na presença dos tratamentos [(PMFA, Isoflavona (1) e Isoflavona (4)]. A fluorescência formada por AGEs foi medida com o Infinity M200 (TECAN) (excitação = 370 nm e emissão = 440 nm) antes do início da incubação (dia zero). Imediatamente após, a solução foi mantida em estufa com agitação e protegida da luz, a 37°C. A fluorescência foi medida no 7º, 14º e 28º dia (n = 5) (Kiho *et al.*, 2004).

4.14.6 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como a média \pm E.P.M., conforme número de amostras especificadas nas legendas dos gráficos. As comparações estatísticas foram realizadas por análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Bonferroni através do programa INSTAT versão 2.2. a partir de 3 experimentos independentes. Também foi utilizado para avaliação de algumas amostras o teste “t” de Student. As diferenças encontradas foram consideradas estatisticamente significativas para um $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise fitoquímica

Devido ao fato de estudos prévios no nosso grupo de pesquisa com o gênero *Polygala* terem mostrado interessantes resultados do ponto de vista fitoquímico e biológico, decidiu-se escolher esse gênero para o desenvolvimento desta tese. Nesse sentido, fez-se uma investigação de espécies do gênero *Polygala* que não haviam sido pesquisadas do ponto de vista fitoquímico, fazendo um levantamento dos possíveis locais de coleta e a decisão de estudar as espécies: *P. molluginifolia*, *P. longicaulis* e *P. campestris*.

5.1.1 Isolamento de compostos de *P. molluginifolia*

5.1.1.1 Compostos isolados da fração acetato de etila de *P. molluginifolia* da coleta 1

5.1.1.1.1 Composto (1)

Iniciou-se o estudo fitoquímico com a fração acetato de etila de *P. molluginifolia* da coleta 1. O composto (1) foi obtido como um sólido amarelo de p.f. 205-207 °C, R.f. 0,26 (60% hexano: 40% acetato) e coloração azul quando revelado com anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

O espectro de Infravermelho em pastilha de KBr mostrou a presença de uma larga banda de absorção na região de 3214-3546 cm⁻¹ atribuída ao grupo hidroxila. Na região de 2926-3073 cm⁻¹ observaram-se os estiramentos de grupos C-H alifáticos e uma banda característica de grupo carbonila conjugada em 1639 cm⁻¹. Também foram observadas absorções de dupla ligação conjugada em 1607 cm⁻¹ e bandas aromáticas em 1572 e 1525 cm⁻¹.

O espectro de RMN de ¹H do composto (1) (Tabela 6) revelou a presença de um sistema aromático orto-meta: [δ_{H} 6,79 (1H, *d*, H-5', *J*=8,0 Hz), δ_{H} 6,77 (1H, *dd*, H-6', *J*=2,0 Hz e 8,0 Hz) e δ_{H} 6,95 (1H, *d*, H-2', *J*= 2,0 Hz)], quatro metilas [δ_{H} 1,47 (12H, *s*, H-7'', H-8'', H-7''' e H-8''')]; dois pares de hidrogênios olefínicos: [(δ_{H} 6,60 (1H, *d*, H-4'', *J*= 10,0 Hz), (δ_{H} 5,66 (1H, *d*, H-5'', *J*=10,0 Hz), (δ_{H} 6,73 (1H, *d*, H-4''', *J*= 10,0 Hz) e (δ_{H} 5,69 (1H, *d*, H-5''', *J*=10,0 Hz)]; e um simpleto ligado a um carbono sp² em δ_{H} 7,95 (1H, *s*, H-2).

Tabela 6. Dados de RMN (400 MHz) do composto (1) (CD₃OD).

Posição	(1)			
	δ_H (m, J/Hz)	δ_C	HMBC	
			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	7,95 (s)	152,6	-	-
3	-	124,9	H-2	H-2'
4	-	177,7	-	H-2
5	-	155,7	-	H-4''
6	-	108,7	-	H-5''
7	-	154,0	-	H-4'''
8	-	103,5	-	H-5'''
9	-	154,4	-	H-2
10	-	110,2	-	H-8
1'	-	127,1	-	H-5', H-2
2'	6,95 (d, J 2,0)	117,9	-	H-6'
3'	-	146,2	H-2'	H-5'
4'	-	146,7	-	H-2'
5'	6,79(d, J 8,0)	116,3	-	-
6'	6,77 (dd, J 2,0, 8,0)	122,1	-	H-2'
4''	6,60 (d, J 10,0)	116,6	-	-
5''	5,66 (d, J 10,0)	130,0	-	H-7'', H-8''
6''	-	79,7	H-5'', H-7'', H-8''	H-4''
7'', 8''	1,47 (s)	28,5	-	-
4'''	6,73 (d, J 10,0)	116,0	-	-
5'''	5,69 (d, J 10,0)	129,2	-	H7''', H8'''
6'''	-	79,4	H-5''', H-7''', H-8'''	H4'''
7''', 8'''	1,47 (s)	28,1	--	-

Através dos dados espectroscópicos de RMN de ¹³C e DEPT (**Tabela 6**) foram observados 23 carbonos, dos quais: dois carbonos sp³ quaternários, dois sinais referentes a grupos metila, oito carbonos metínicos e 11 carbonos sp² quaternários na estrutura do composto (cinco dos quais são oxigenados e um é carbonílico). A atribuição dos hidrogênios e carbonos diretamente conectados foi estabelecida por meio da análise bidimensional de HMQC (**Tabela 6**). Através das análises de HMBC (**Tabela 6**) observou-se a correlação a longa distância $^2J_{CH}$ do H-2 com o carbono C-3 (δ_C 124,9) e correlações $^3J_{CH}$ com os carbonos C-1' (δ_C 127,1) e C-4 (δ_C 177,7) respectivamente, que são correlações características da estrutura de isoflavonas.

Além disso, observou-se que os hidrogênios olefínicos H-4'' e H-5'' mostraram correlações a longa distância $^3J_{CH}$ com os carbonos C-5 (δ_C 155,7) e C-6 (δ_C 108,7) respectivamente, o que indica que um dos anéis dimetilpirano está conectado aos carbonos C-5 e C-6. O outro anel dimetilpirano está conectado ao anel A através dos carbonos C-7

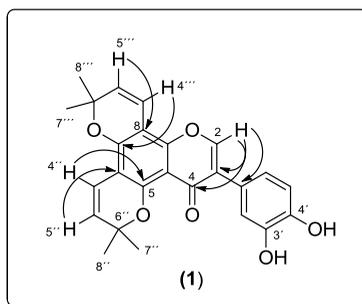
(δ_C 154,0) e C-8 (δ_C 103,5) como demonstrado pelas correlações de HMBC à longa distância $^3J_{CH}$ desses carbonos com os hidrogênios H-4''' e H-5''', respectivamente.

O anel B é dissustituído com dois grupos hidroxila localizados em C-3' e C-4' como indicado pelos dados de HMBC através da correlação a longa distância $^3J_{CH}$ do carbono C-3' (δ_C 146,2) e do hidrogênio em δ_H 6,79 (H-5') e correlação $^2J_{CH}$ com δ_H 6,95 (H-2') e correlações $^3J_{CH}$ do carbono C-4' (δ_C 146,7) com o hidrogênio em δ_H 6,95 (H-2'), respectivamente.

Além destes dados, também foi feita a análise das estruturas biossinteticamente possíveis para o composto (**1**). Com esta análise, observou-se que o composto poderia ter as seguintes possibilidades de estrutura: isoflavona, aurona ou flavona. Porém, identificou-se um simpleto em 7,95 ppm no espectro de RMN de 1H , o que sugere uma estrutura do tipo isoflavona, uma vez que este hidrogênio encontra-se bastante desblindado, o que não seria observado em estruturas do tipo aurona ou flavona.

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 419,1495 correspondente a fórmula molecular $C_{25}H_{22}O_6$ $[M+H]^+$, calculado: 419,1489. Portanto, concluímos a fórmula molecular $C_{25}H_{22}O_6$ para a isoflavona (**1**), confirmando a proposição da estrutura 6''',6'',6''',6'''-Tetrametil-3',4'-dihidroxisobis(pirano[2'',3'':5,6: :2''',3''':7,8]isoflavona (**Figura 25**). Esta isoflavona foi isolada e identificada neste trabalho pela primeira vez sendo portanto um composto natural inédito na literatura.

Figura 25. Estrutura do composto (**1**).



5.1.1.1.2. Compostos (2-4)

O composto (2) foi isolado da fração solúvel em acetato de etila da coleta 1. Este composto foi obtido como um sólido amarelo de p.f. de 136-138 °C [pf. literatura 136°C (Jain *et al.*, 1978)] e R.f. 0,35 (hexano:acetato de etila 60:40).

O espectro de Infravermelho em pastilha de KBr mostrou uma larga banda de absorção em 3434 cm^{-1} atribuída ao grupo hidroxila e uma banda característica de grupo carbonila conjugada em 1665 cm^{-1} . Também foram observadas bandas de absorções em 1622 cm^{-1} referentes à ligação dupla e em 1583 e 1509 cm^{-1} que foram atribuídas às bandas aromáticas.

Os compostos 2 (Jain *et al.*, 1978), 3 (Tsukayama *et al.*, 1992) e 4 (Jain *et al.*, 1978) foram identificados através de dados de RMN (**Tabela 7**) e comparação com os valores descritos na literatura. Devido aos poucos dados de RMN disponíveis na literatura mostrou-se a completa caracterização dos compostos (2-4).

O espectro de RMN de ^1H do composto 2 (**Tabela 7**) revelou a presença de um hidrogênio referente a uma hidroxila quelada em δ_{H} 13,17 (s, 1H, OH-5); duas metilas quaternárias [δ_{H} 1,48 (s, 6H, H-7" e H8")] e dois grupos metoxila [δ_{H} 3,92 (s, 3H, MeO-3') e δ_{H} 3,94 (s, 3H, MeO-4')]. Na região de absorção de hidrogênio ligado a carbono sp^2 , observou-se uma série de sinais assim identificados: um par de dupletos centrados em δ_{H} 6,74 (H-4") e δ_{H} 5,63 (H-5") com constantes de acoplamento de 10 Hz que foram atribuídos aos átomos de hidrogênio da dupla endocíclica do sistema piranoprenil fundido ao anel A da isoflavona.

O simpleto em δ_H 7,86 foi atribuído ao H-2 do anel C e o simpleto em δ_H 6,35 ao H-8 do anel A. Para o anel B da isoflavona, observou-se um sistema aromático orto-meta: δ_H 6,95 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-5'), δ_H 7,04 (dd, 1H, $J = 2,0$ e $8,0$ Hz, H-6') e δ_H 7,10 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-2').

Os dados de RMN de ^{13}C e DEPT (**Tabela 7**) exibiram 21 carbonos, dos quais: dois grupos metoxilas, um carbono sp^3 quaternário, um sinal referente a um grupo metila, sete carbonos metínicos e 10 carbonos quaternários na estrutura do composto (cinco oxigenados e um carbonílico).

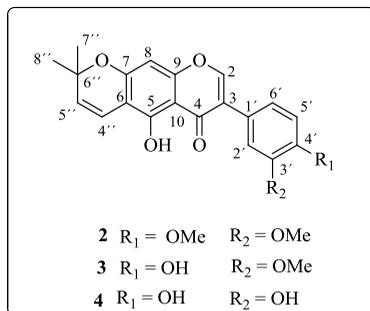
Através da análise de HMQC foi possível estabelecer a correlação de todos os hidrogênios e carbonos diretamente ligados (**Tabela 7**).

O mapa de correlação HMBC da isoflavona (**2**) também exibiu correlações típicas de uma estrutura de isoflavona, mostrando correlações $^2J_{\text{CH}}$ a longa distância entre δ_H 7,86 (H-2) e o carbono C-3 (δ_C 123,6) e correlações com $^3J_{\text{CH}}$ C-1' (δ_C 123,3) e C-4 (δ_C 180,8).

Além disso, o espectro de HMBC também mostrou correlações a longa distância $^3J_{\text{CH}}$ ^1H - ^{13}C entre o carbono C-7 (δ_C 159,7) e o hidrogênio δ_H 6,73 (H-4'') e correlações $^2J_{\text{CH}}$ ^1H - ^{13}C com o hidrogênio H-8, indicando que o anel dimetilpirano está conectado ao anel A nas posições C₆ e C₇.

As correlações $^2J_{\text{CH}}$ ^1H - ^{13}C de hidrogênios dos grupos metoxila em δ_H 3,94 (MeO-3') e δ_H 3,92 (MeO-4') com os carbonos C-3' (δ_C 148,8) e C-4' (δ_C 149,2), respectivamente, indicam que os grupos metoxila estão localizadas nas posições C-3' e C-4' no anel B da isoflavona (**2**) (**Tabela 7**).

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 381,1328 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 381,1333. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_6$ para a isoflavona (**2**), confirmando a estrutura como sendo a 3',4'-dimetoxi-5-hidroxi-6'',6''-dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona (**Figura 26**).

Figura 26. Estruturas químicas dos compostos (2-4).

O composto (**3**), um sólido amarelo, de ponto de fusão de 155-158°C [pf. Literatura 155-156°C (Tsukayama *et al.*, 1992)] e R.f. 0,63 (hexano:acetato de etila 60:40), foi isolado da fração acetato de etila da coleta 1.

O espectro de Infravermelho em pastilha de KBr mostrou a presença de uma larga banda de absorção na região de 3434 cm⁻¹, atribuída ao grupo hidroxila. Observaram-se também a presença de uma banda característica de grupo carbonila conjugada em 1662 cm⁻¹, dupla ligação conjugada em 1624 cm⁻¹ e absorção de anéis aromáticos em 1581 e 1516 cm⁻¹.

Os dados de RMN dos compostos (**2**) e (**3**) são similares ao composto (**1**) previamente descrito, diferindo somente na substituição no anel B do sistema aromático. Os dados de RMN de ¹H do composto (**3**) (**Tabela 7**) exibiram um sistema aromático orto-meta: [δ_{H} 6,96 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,93 (dd, 1H, $J = 2,0$ e 8,0 Hz, H-6') e δ_{H} 7,10 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, H-2')].

Através das análises de HMBC (**Tabela 7**), foi possível observar correlações ²J_{CH} a longa distância entre C-3' (δ_{C} 146,0) e os átomos de hidrogênios do grupo metoxila em δ_{H} 3,92 (s, MeO-3') e o hidrogênio H-2' e correlações ³J_{CH} com o hidrogênio H-5', indicando que a metoxila está na posição C-3'. Além disso, um grupo hidroxila está conectado ao C-4' (δ_{C} 146,4), como demonstrado por correlações ³J_{CH} ¹H-¹³C a longa distância entre este carbono e os hidrogênios H-2' e H-6'. A localização da posição dos grupos metoxila e hidroxila no anel B da isoflavona (**3**) foram confirmadas pelos experimentos de RMN NOE. Assim, a irradiação seletiva dos hidrogênios do grupo metoxila em δ_{H} 3,92 (MeO-3') causaram um aumento do sinal NOE do hidrogênio H-2'. Além disso,

a irradiação seletiva do hidrogênio H-2' causou uma intensificação do sinal do hidrogênio do grupo metoxila em δ_{H} 3,92 (MeO-3'), enquanto que a irradiação seletiva em δ_{H} 6,96 (H-5') não causou um aumento do sinal NOE do grupo metoxila δ_{H} 3,92 (MeO-3').

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 367,1179 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 367,1176. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$ para a isoflavona (**3**), confirmando a proposição da estrutura como 3'-metoxi-5,4'-dihidroxi-6'',6''-dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona (**Figura 26**).

O composto (**4**) foi isolado da fração acetato de etila da coleta 1 como um sólido amarelo com ponto de fusão 165-167 °C [pf. Literatura 166-167°C (Jain *et al.*, 1978)] e R.f. de 0,43 (hexano:acetato de etila 60:40). Através da espectroscopia de IV em pastilhas de KBr, observou-se a presença de uma larga banda de absorção de grupo hidroxila em 3386 cm^{-1} , absorção de carbonila conjugada em 1656 cm^{-1} , dupla conjugada em 1621 cm^{-1} e absorção de bandas de anéis aromáticos em 1573 e 1519 cm^{-1} . O espectro de RMN de ^1H do composto (**4**) (**Tabela 7**) também indicou um sistema aromático orto-meta: δ_{H} 6,87 (d, 1H, $J=8,0$ Hz, H-5'), δ_{H} 6,93 (dd, 1H, $J=2,0, 8,0$ Hz, H-6') e δ_{H} 7,13 (d, 1H, $J=2,0$ Hz, H-2'), porém não foram observados sinais para o grupo metoxila. No espectro de ^{13}C , observou-se a presença de dois átomos de carbonos em 145,8 ppm e 146,5 ppm, indicando a presença de hidroxilas orto no anel B.

A análise de HR-MS do composto (**4**) mostrou uma razão massa carga de m/z 353,1022 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 353,1020. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ para a isoflavona (**4**), confirmando a estrutura do composto como sendo a 5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona (**4**) (**Figura 26**).

Considerando a quimiotaxonomia do gênero *Polygala*, que é caracterizada, sobretudo pela presença de xantonas, a rara ocorrência de isoflavonas abre tema para novas discussões. Relatos prévios da presença de isoflavonas no gênero *Polygala* foram feitos somente para as espécies *P. virgata* e *P. stenopetala* (Bashir *et al.*, 1991; Chaudhary *et al.*, 2001). Sendo assim, os resultados obtidos no presente trabalho contribuem de forma significativa para a quimiotaxonomia do gênero e indicam a necessidade de mais estudos e uma reavaliação de seus marcadores químicos. Além disso, através do estudo com *P. molluginifolia* obteve-se a isoflavona (**1**) uma estrutura não antes

reportada na literatura, o que revela a importância deste estudo fitoquímico.

5.1.1.2. Isolamento de compostos da fração aquosa de *P. molluginifolia*

5.1.1.2.1. Rutina (5)

O composto (5) (**Figura 27**) foi obtido na forma de um sólido amarelo e apresentou p.f. de 189-191°C. Através da espectroscopia de infravermelho em patilha de KBr foi possível observar uma larga absorção em 3408 cm^{-1} atribuída ao grupo hidroxila. Também se verificou a banda característica de carbonila conjugada em 1657 cm^{-1} e bandas aromáticas em 1599 cm^{-1} e 1505 cm^{-1} .

Estes dados aliados às análises de RMN de ^{13}C (**Tabela 8**) e comparação com os dados descritos na literatura permitiram identificar o composto como sendo o flavonóide rutina, um composto encontrado com abundância em plantas e inclusive já reportado no gênero *Polygala* na espécie *P. paniculata* (Lapa *et al.*, 2011).

Figura 27. Estrutura química da rutina (5).

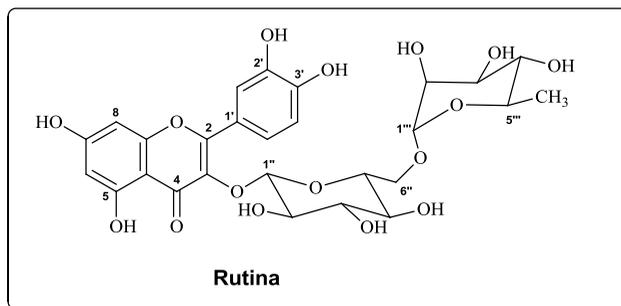


Tabela 8. Deslocamentos químicos de ^{13}C da rotina (5) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ e comparação com os dados da literatura.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (Literatura) (Kazuma <i>et al.</i> , 2003)
2	158,3	158,5
3	135,5	135,6
4	179,2	179,4
5	163,2	162,9
6	100,3	99,5
7	166,5	166,0
8	95,2	94,8
9	158,7	159,3
10	105,7	105,7
1'	122,9	123,1
2'	118,5	117,7
3'	147,3	145,8
4'	147,6	149,8
5'	116,9	116,1
6'	123,5	123,6
1''	105,4	104,7
2''	76,6	75,8
3''	79,3	78,2
4''	73,1	71,4
5''	78,1	77,3
6''	69,1	68,6
1'''	103,2	102,4
2'''	71,8	72,1
3'''	73,1	72,3
4'''	74,6	73,9
5'''	70,2	69,7
6'''	19,1	17,8

5.1.1.2.2. Sacarose (6)

A sacarose (6) (**Figura 28**) foi isolada da fração aquosa de *P. molluginifolia* da coleta 2 após sucessivas purificações com metanol. Este composto foi obtido como um sólido branco com ponto de fusão de 174-176 °C.

O espectro na região de IV em patilhas de KBr mostrou absorções intensas em 3566, 3388 e 3338 cm^{-1} referente a absorções de bandas atribuídas a grupos hidroxila.

Na região entre 2895-3013 cm^{-1} observaram-se bandas referentes aos hidrogênios alifáticos e bandas em 1069 e 991 cm^{-1} , referentes a deformações do grupo C-O-C. A estrutura da sacarose (**Figura 28**) foi identificada por meio dos resultados descritos acima e comparação dos dados espectroscópicos de ^{13}C obtidos (**Tabela 9**) com os dados descritos na literatura (Pfeffer *et al.*, 1979).

Figura 28. Estrutura química da sacarose (6).

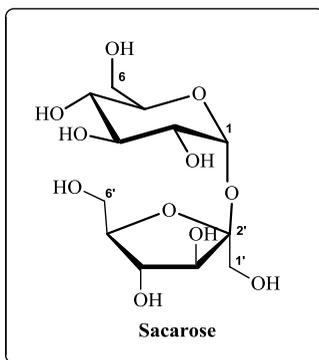


Tabela 9. Deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C da sacarose (6) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ e comparação com os dados descritos na literatura.

Posição	δ_{C} (ppm)	δ_{C} (Literatura) (Pfeffer <i>et al.</i> , 1979)
1	93,4	92,9
2	73,3	72,0
3	75,0	73,6
4	71,7	70,2
5	74,9	73,3
6	62,3	61,1
1'	62,9	63,3
2'	105,8	104,4
3'	79,7	77,4
4'	75,4	74,9
5'	84,3	82,2
6'	64,6	63,4

5.1.1.3. Isolamento da fração acetato de etila de *P. molluginifolia* da coleta 2

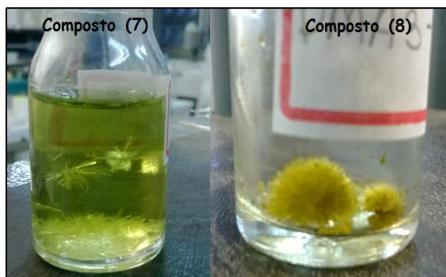
5.1.1.3.1. Composto (7)

Através da realização da coluna cromatográfica em sílica gel da fração acetato de etila da coleta 2 de *Polygala molluginifolia* observou-se a formação de cristais nas frações 8 (composto 7) e 11 (composto 8) como mostra a **Figura 29**. Após purificação dos cristais, estes foram submetidos à CCD visando comparar os compostos isolados desta coluna com os compostos isolados da coleta 1 feita anteriormente. Constatou-se que o composto (8) mostrou um R.f. bem distinto dos demais compostos, sendo desta forma levado as análises de RMN de ^1H e ^{13}C para proceder a sua identificação.

O composto (7) (R.f. 0,60 hexano: acetato de etila 60:40) apresentou uma leve alteração de R.f. em relação ao composto (3) (R.f. 0,63 hexano:acetato de etila 60:40) isolado da coleta 1. Foram feitas análises de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (7), e estes apresentaram o mesmo perfil do composto (3).

Devido a essa similaridade entre os compostos (7) e (3), foi feita uma CCD bidimensional, aplicando a mistura dos dois compostos e eluindo-se inicialmente com a mistura de hexano: acetato de etila 70:30, e depois eluiu-se no outro sentido com a mistura de hexano:acetato de etila 65:35. Com isso, observou-se que se tratava de compostos diferentes.

Figura 29. Cristais formados nas frações 8 (composto 7) 11 (composto 8).



Com estes dados e pela análise de RMN de ^1H e ^{13}C , constatamos que pudesse haver uma pequena diferença estrutural entre eles como uma alteração dos grupos OH e OCH_3 no anel B na estrutura da isoflavona.

Para elucidação estrutural do composto foram feitas análises de ponto de fusão, IV, espectrometria de massas e técnicas de RMN de ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais, juntamente com a técnica de NOE.

O composto (7) apresentou um p.f. de 205-207 °C [pf literatura 202-203°C (Tsukayama *et al.*, 1992)]. Na espectroscopia de Infravermelho em pastilha de KBr observou-se duas bandas atribuídas aos grupos hidroxila, uma referente a hidroxila quelada (3497 cm^{-1}) e a outra referente a hidroxila aromática (3426 cm^{-1}).

Observou-se também bandas de carbonila conjugada (1645 cm^{-1}), dupla conjugada (1617 cm^{-1}) e absorções de anéis aromáticos em 1574 e 1513 cm^{-1} .

Tabela 10. Dados de RMN dos compostos **(7)** (CDCl₃) e **(8)** (CDCl₃).

Posição	(7)				(8)			
	δ_H (m, J/Hz)	δ_C	HMBC		δ_H (m, J/Hz)	δ_C	HMBC	
			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	7,81 (s)	152,9	-	-	7,89 (s)	153,3	-	-
3	-	123,5	H-2	H-6'	-	123,6	H-2	H-2'
4	-	180,8	-	H-2	-	181,8	-	H-2
5	-	157,0	-	H-4''	-	154,6	OH-5	-
6	-	105,6	HO-5	H-5'', H-8,	-	105,6	-	H-5''
7	-	159,5	H-8	H-4''	-	157,3	-	H-4''', H-1'''
8	6,32 (s)	94,9	-	-	-	107,7	H-1'''	-
9	-	157,3	H-8	H-2	-	154,9	-	H-2, H-1'''
10	-	106,1	HO-5	H-8	-	105,8	-	OH-5
1'	-	124,0	-	H-5'	-	122,6	-	H-2, H-5'
2'	7,08 (d, J 2,0)	115,1	-	H-6'	6,96 (d, J 2,0)	116,3	-	-
3'	-	145,7	HO-3'	H-5'	-	143,8	-	H-5'
4'	-	146,8	MeO-4'	H-2'	-	144,5	-	H-2'
5'	6,92 (d, J 8,0)	110,8	-	-	6,81 (d, J 8,0)	115,4	-	-
6'	7,05 (dd, J 2,0, 8,0)	121,0	H-5'	H-2'	6,76 (dd, J 2,0, 8,0)	121,3	-	H-2'
4''	6,72 (d, J 10,0)	115,5	H-5''	-	6,73 (d, J 10,0)	115,7	-	-
5''	5,61 (d, J 10,0)	128,1	-	H-7'', H-8''	5,64 (d, J 10,0)	128,2	-	H-7'', H-8''
6''	-	78,0	H-5'', H-7'', H-8''	H-4''	-	78,9	H-5'', H-7'', H-8''	H-4''
7'', 8''	1,47 (s)	28,3	-	-	1,47 (s)	28,2	-	-
1'''	-	-	-	-	3,40 (d, J 7,0)	21,3	-	-
2'''	-	-	-	-	5,16 (t, J 7,0)	121,8	H-1'''	H-4''', H-5'''
3'''	-	-	-	-	-	131,8	H-4''', H-5'''	H-1'''
4'''	-	-	-	-	1,68 (s)	25,8	-	H-5'''
5'''	-	-	-	-	1,81 (s)	17,9	-	H-4'''
HO-5	13,17 (s)	-	-	-	12,81 (s)	-	-	-
HO-3'	5,63 (s)	-	-	-	5,89 (s)	-	-	-
HO-4'	-	-	-	-	6,57 (s)	-	-	-
MeO-4'	3,92 (s)	56,1	-	-	-	-	-	-

Através das análises de RMN de ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais foi possível verificar que os sinais apresentados seguiram o padrão apresentado para a isoflavona (**3**), como mostra a **Tabela 10**. Através da análise de HMQC foi possível estabelecer a correlação de todos os hidrogênios e carbonos diretamente ligados (**Tabela 10**).

A análise de HMBC mostrou correlações $^2J_{\text{CH}}$ a longa distância entre o carbono C-3' (δ_{C} 145,7) e o hidrogênio 3-OH em δ_{H} 5,63 e correlação $^3J_{\text{CH}}$ com o hidrogênio H-5' em δ_{H} 6,92, o que indica que um grupo hidroxila está localizado na posição C-3'. Foi observado também que um grupo metoxila é conectado ao C-4' (δ_{C} 146,8), como demonstrado pelas correlações $^2J_{\text{CH}}$ deste carbono com os átomos de hidrogênios do grupo metoxila δ_{H} 3,92 (s, MeO-4')] e correlações $^3J_{\text{CH}}$ com o hidrogênio H-2'.

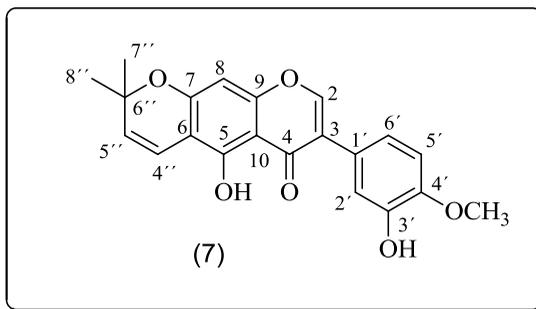
A posição relativa dos grupos hidroxila e metoxila no anel B da isoflavona foram confirmadas através da técnica de NOE. Assim, a irradiação seletiva dos hidrogênios do grupo metoxila em δ_{H} 3,92 (MeO-4') causou um aumento de sinal somente no hidrogênio H-5'.

Além disso, a irradiação seletiva do hidrogênio H-5', provocou um aumento de sinal do grupo MeO-4' enquanto que a irradiação no H-2' não causou alteração do sinal do grupo metoxila. Desta forma foi possível confirmar que o grupo metoxila está localizado no C-4' e o grupo hidroxila está localizado no C-3' como mostrado na **Figura 30**.

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 367,1176 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 367,1176. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_6$ para a isoflavona (**7**).

Através destes dados confirmamos nossa suspeita de que o composto (**7**) difere do anteriormente isolado (**3**) somente na posição da metoxila no anel aromático B da isoflavona, sendo a 4'-metoxi-5,3'-dihidroxi-6'',6''-dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona (**Figura 30**).

Figura 30. Estrutura proposta para o composto (7).



5.1.1.3.2. Composto (8)

O composto (8) foi isolado como um cristal amarelo da fração acetato de etila da coleta 2. Este composto mostrou um R.f. de 0,54 (hexano: acetato de etila 60:40) e p.f. de 179-180°C [pf literatura 176-178°C (Minhaj *et al.*, 1976)].

A espectroscopia de Infravermelho em pastilhas de KBr mostrou absorções de bandas atribuídas a grupos hidroxila em 3438 cm^{-1} e 3238 cm^{-1} , uma banda característica de carbonila conjugada 1652 cm^{-1} , banda atribuída a dupla conjugada em 1615 cm^{-1} e absorções de anéis aromáticos em 1572 e 1531 cm^{-1} .

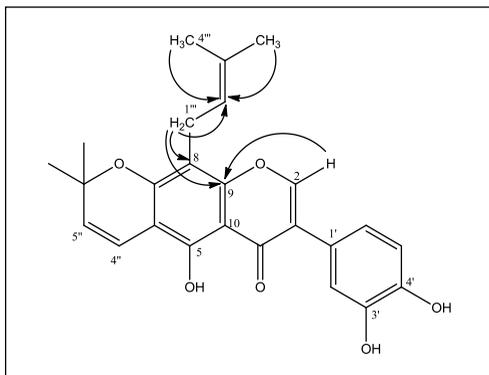
Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais mostraram algumas semelhanças em relação aos dados para a isoflavona (4) previamente descrita (Tabela 10). A diferença observada é a presença de grupo 1,1-dimetilalil conectado ao carbono C-8 (δ_{C} 107,7). A presença deste grupo foi deduzida pelas correlações no HMBC entre C-2''' (δ_{C} 121,8) e hidrogênios δ_{H} 3,40 (H-1'''), δ_{H} 1,68 (H-4'''), δ_{H} 1,81 (H-5''') (Figura 31).

A posição do grupo em C-8 foi fixada através das correlações HMBC entre δ_{H} 3,40 (H-1''') com os carbonos C-8 (δ_{C} 107,7) e C-9 (δ_{C} 154,9). O C-9 foi deduzido pelas correlações HMBC entre o H-2 (δ_{H} 7,89), hidrogênio característico de isoflavona, com o carbono C-9 (δ_{C} 154,9), como mostra a Figura 31.

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 421,1649 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 421,1646. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_6$ para a isoflavona (8).

A análise conjunta dos dados de ponto de fusão, IV, espectrometria de massas e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais e comparação com dados da literatura (Minhaj *et al.*, 1976; Wang *et al.*, 2013) confirmaram a estrutura do composto como sendo a aurículasina (**Figura 31**).

Figura 31. Representação de correlações heteronucleares (HMBC) da aurículasina (**8**).



5.1.2 Isolamento dos compostos da fração acetato de etila de

P. longicaulis

5.1.2.1 Composto (9)

Este composto foi isolado da fração acetato de etila de *P. longicaulis* e mostrou p.f. de 134-136°C [Ponto de fusão literatura 138-140°C (Pizzolatti *et al.*, 2000)] e R.f. de 0,54 (hexano: acetato de etila 70:30).

A espectroscopia de IV em pastilhas de KBr mostrou absorções atribuídas a bandas de carbonila de éster conjugado em 1709 cm^{-1} , dupla conjugada em 1647 cm^{-1} e bandas de absorções de anéis aromáticos em 1568 e 1490 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^1H do composto (**9**) apresentou sinais de um sistema aromático definido pelos sinais: [δ_{H} 6,75 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, H-13), δ_{H} 6,71 (dd, 1H, $J=1,6, 8,2$ Hz, H-14) e δ_{H} 6,80 (d, 1H, $J=1,6$ Hz, H-10)]. Observaram-se também os sinais dos hidrogênios H-5 [δ_{H} 5,89 (dd, 1H, $J=1,6\text{Hz}$)] e H-3 [δ_{H} 5,41 (d, 1H, $J=1,6\text{Hz}$)] e do grupo metoxila em δ_{H} 3,83 (s, 1H) correspondentes a um anel do tipo pirona (**Tabela 11**).

Além disso, o espectro de RMN de ^1H mostrou sinais dos hidrogênios da ponte etilênica características de compostos do tipo

diidroestirilpirona, em δ_{H} 2,74 (t, 2H, $J=7,4$ Hz) e δ_{H} 2,88 (t, 2H, $J=7,4$ Hz). Foi observada também a presença de um grupo metilenodioxí, pois se notou a presença de um simpleto em δ_{H} 5,94 (s, 2H).

O RMN de ^{13}C e DEPT mostrou a presença de 15 carbonos: sendo um grupo metoxila, cinco grupos metínicos, três grupos metilênicos e seis sinais de carbono quaternário (**Tabela 11**).

Através da análise de HMQC foi possível estabelecer a correlação de todos os hidrogênios e carbonos diretamente ligados (**Tabela 11**).

Os sinais de correlações de HMBC (**Tabela 11**) mostraram que o carbono C-11 mostrou correlações $^3J_{\text{CH}}$ com o hidrogênio H-13 em δ_{H} 6,75 e com o hidrogênio do grupo metilenodioxí (OCH_2O) em δ_{H} 5,94 e C-12 mostrou correlações $^3J_{\text{CH}}$ com o hidrogênio H-14 em δ_{H} 6,71, hidrogênio H-10 em δ_{H} 6,80 e o hidrogênio do grupo metilenodioxí (OCH_2O) em δ_{H} 5,94.

Desta forma confirmou-se que o grupo metilenodioxí está conectado ao anel aromático que apresenta um sistema do tipo orto-meta.

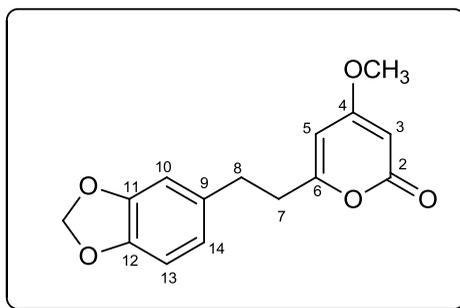
Além disso, o espectro de HMBC também mostrou correlações entre $^3J_{\text{CH}}$ entre o C-5 do anel pirona com os hidrogênios H-7 em δ_{H} 2,74 e H-3 em δ_{H} 5,41 e correlação $^2J_{\text{CH}}$ do carbono C-6 com H-7 em δ_{H} 2,74 e H-5 em δ_{H} 5,89 e correlação $^3J_{\text{CH}}$ com o H-8 em δ_{H} 2,88 (**Tabela 11**).

Foi observado também correlações entre os carbonos C-10 e C-14 do anel aromático com o hidrogênio H-8 em δ_{H} 2,88. Estes sinais de correlação mostram claramente que há uma ponte etilênica que conecta um grupo pirona e um anel trissubstituído. Além disso, os sinais de correlação mostraram que o anel trissubstituído é conectado a um grupo metilenodioxí.

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 275,0919 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 275,0914. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_5$ para o composto (**9**), e propomos a estrutura como sendo a 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxídiidroestiril)-2-pirona (**Figura 32**).

Tabela 11. Dados de RMN do composto (**9**) (C₃D₆O).

Posição	(9)			
	δ_H (m, J/Hz)	δ_C	HMBC	
			$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	-	172,0	-	4-OMe
3	5,41 (d, <i>J</i> 1,6Hz)	88,0	-	-
4	-	164,4	-	-
5	5,89 (d, <i>J</i> 1,6Hz)	100,6	-	H-7, H-3
6	-	165,4	H-7, H-5	H-8
7	2,74 (t, <i>J</i> 7,4 Hz)	36,0	H-8	-
8	2,88 (t, <i>J</i> 7,4 Hz)	33,1	H-7	-
9	-	135,1	H-8	H-13,H-7
10	6,80 (d, <i>J</i> 1,6)	109,6	-	H-8, H-14
11	-	149,1	-	OCH ₂ O, H-13
12	-	148,7	-	OCH ₂ O, H-10 e H-14
13	6,75 (d, <i>J</i> 8,2)	108,9	-	-
14	6,71 (dd, <i>J</i> 8,2 e <i>J</i> 1,6)	122,2	-	H-8, H-10
4-OMe	3,83 (s)	56,6	-	-
OCH₂O	5,94 (s)	101,8	-	-

Figura 32. Estrutura química do composto (**9**).

5.1.2.2 Composto (10)

O composto (10) foi isolado da fração acetato de etila de *P. longicaulis* e apresentou p.f. de 115-118°C [pf. Literatura 117-119°C (Young *et al.*, 1966)] e R.f. 0,46 (Hexano: Acetato de etila 70:30). A espectroscopia de IV em pastilhas de KBr mostrou bandas de absorção atribuída a carbonila de éster conjugada em 1705 cm⁻¹, dupla conjugada em 1621 cm⁻¹ e absorções de anéis aromáticos em 1566 e 1501 cm⁻¹.

Através do espectro de RMN de ¹H, ¹³C e HMBC observou-se que os sinais mostraram-se muito semelhantes ao espectro do composto (9). Porém observou-se uma complexidade maior de sinais, com a presença de um duplo duplete em δ_H (2,29 dd, $J = 16,8$ e $3,5$ Hz), um duplo duplo duplete em δ_H 4,9 (ddd, $J = 16,8$, $11,9$ e $1,6$ Hz) referente ao H-5 e multipletos na região de 4,32-4,39 ppm referente ao H-6 (Tabela 12).

Além disso, observaram-se sinais referentes ao H-7 em δ_H 2,04-2,13 (m) e δ_H 1,83-1,91 (m) e sinais do H-8 em δ_H 2,47-2,91(m). Pelo espectro de RMN de ¹³C e DEPT verificou-se também a presença de 15 carbonos, porém para este composto observou-se a presença de um grupo metoxila, quatro carbonos metilênicos, cinco carbonos metínicos e cinco carbonos quaternários.

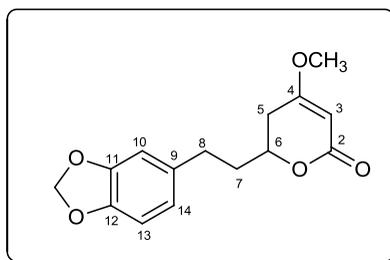
Desta forma, esse composto difere do composto (9) por conter mais um carbono metilênico e não conter um carbono quaternário (Tabela 12). Esse fato levou-nos a pensar que neste composto havia a ausência de uma dupla ligação no anel pirona, o que explica a complexidade de sinais observada no RMN de ¹H.

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 277,1072 correspondente a fórmula molecular C₁₅H₁₆O₅ [M+H]⁺, calculado: 277,1071. Portanto, concluímos a fórmula molecular C₁₅H₁₆O₅ para o composto (10). Diante destes resultados e por comparação de dados descritos na literatura, foi possível propor a estrutura como sendo a diidrometisticina (10) (Shaik *et al.*, 2009) (Figura 33).

Tabela 12. Dados espectroscópicos para o composto (**10**) (CDCl₃).

Posição	(10)			
	δ_{H} (m, J/Hz)	δ_{C}	HMBC	
			$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
2	-	172,4	H-3	OMe
3	5,14 (d, <i>J</i> 1,6)	89,9	-	-
4	-	166,9	-	-
5	2,29 (dd, <i>J</i> 16,8 e 3,5) 4,9 (ddd, <i>J</i> 16,8, 11,9 e 1,6)	32,7	-	H-3
6	4,32-4,39(m)	74,3	-	H-8
7	2,04-2,13 (m) 1,83-1,91 (m)	36,2	H-8	-
8	2,47-2,91(m)	30,3	-	-
9	-	134,2	H-8	H-13
10	6,69 (d, <i>J</i> 1,6)	108,5	-	H-14, H-8
11	-	145,5	H-10	OCH ₂ O
12	-	147,3	H-13	OCH ₂ O, H-14
13	6,73 (d, <i>J</i> 7,8)	107,9	-	-
14	6,65 (dd, <i>J</i> 7,8 e 1,6)	120,9	-	H-10
4-OMe	3,73 (s)	55,7	-	-
OCH₂O	5,92 (s)	-	-	-
		100,5		

Figura 33. Estrutura proposta para o composto (**10**).



5.1.3 Isolamento de compostos da fração aquosa de *Polygala campestris*

5.1.3.1 Composto (**11**)

O composto (**11**) foi obtido da fração aquosa de *P. campestris* e foi purificado através da lavagem com metanol. Este composto é um sólido amarelo amorfo e apresentou p.f. de 121-122°C [p.f. literatura

123-125°C (Missau, 2008)] e R.f. de 0,34 (hexano: acetato de etila 70:30).

O espectro de IV em pastilha de KBr mostrou bandas de absorções atribuídas a grupos hidroxila em 3428 cm^{-1} e uma banda de absorção de grupo de carbonila conjugada em 1684 cm^{-1} .

Através do espectro de RMN de ^1H observou-se sinais de hidrogênios aromáticos, um simpleto em 6,49 ppm e também sinais do seguinte sistema aromático: [δ_{H} 7,30 (1H, *t*, H-7, $J_{7,6}= 8,2\text{ Hz}$ e $J_{7,8}= 8,2\text{ Hz}$), δ_{H} 7,91 (1H, *dd*, H-8, $J=1,6\text{ Hz}$ e $8,2\text{ Hz}$) e δ_{H} 7,56 (1H, *dd*, H-6, $J= 1,6\text{ Hz}$ e $8,2\text{ Hz}$)]. Além disso, observou-se também um sinal de hidrogênio referente ao grupo metilenodioxí δ_{H} 6,11 (2H, *s*) (**Tabela 13**). Pelo espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar 14 sinais na região entre 90,3-182,8 ppm. A atribuição destes sinais foi feita em comparação com valores descritos previamente pelo nosso grupo de pesquisa para a espécie *P. pulchella* (Missau, 2008) (**Tabela 13**).

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 273,0390 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 273,0394. Com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C , juntamente com os resultados de espectrometria de massas e comparação dos dados obtidos com a literatura (Missau, 2008) foi possível caracterizar a estrutura como sendo a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**Figura 34**).

Figura 34. Estrutura da 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona isolada da fração aquosa de *P. campestris*.

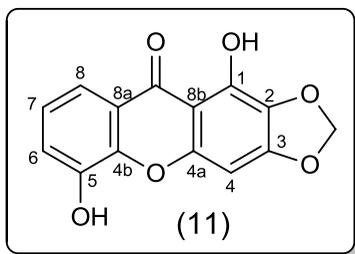


Tabela 13. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C do composto (**11**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Posição	δ_{H} (m, J/Hz)	δ_{C}	δ_{C} ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Missau, 2008)
1	-	144,1	143,4
2	-	130,3	130,3
3	-	156,4	155,6
4	6,49 (1H, s)	90,3	89,5
4a	-	154,3	153,6
4b	-	147,0	146,3
5	-	148,4	147,6
6	7,56 (1H, dd, H-6, J 1,6 e 8,2)	121,9	121,2
7	7,30 (1H, dd, H-7, $J_{7,6}$ 8,2 e $J_{7,8}$ 8,2)	125,4	124,6
8	7,91 (1H, dd, H-8, J =1,6 e 8,2)	115,7	115,0
8a	-	122,1	121,4
8b	-	104,0	105,8
9	-	182,8	182,1
OCH₂O	6,11 (2H, s)	103,4	103,2

5.1.3.2 Composto (12)

O composto (**12**) foi isolado da fração aquosa de *P. campestris* como um sólido amorfo de coloração amarela, mostrando um p.f. de 248-251°C [p.f. literatura 244°C (Bashir *et al.*, 1992)] e R.f. de 0,20 (hexano:acetato de etila 70:30). O espectro de Infravermelho em pastilhas de KBr mostrou bandas de absorções em 3340 cm^{-1} atribuídas

a grupos hidroxila, absorção de banda de carbonila conjugada em 1647 cm^{-1} , e absorções de anéis aromáticos em 1572 e 1456 cm^{-1} .

Através do espectro de RMN de ^1H observou-se dois sinais referentes à metoxilas em $3,73\text{ ppm}$ (3H, *s*) e $3,97\text{ ppm}$ (3H, *s*) (**Tabela 14**). Observou-se também o seguinte sistema aromático: [$\delta_{\text{H}} 7,30$ (1H, *t*, H-7, $J_{7,6} = 8,2\text{ Hz}$ e $J_{7,8} = 8,2\text{ Hz}$), $\delta_{\text{H}} 7,96$ (1H, *dd*, H-8, $J = 1,6\text{ Hz}$ e $8,2\text{ Hz}$) e $\delta_{\text{H}} 7,56$ (1H, *dd*, H-6, $J = 1,6\text{ Hz}$ e $8,2\text{ Hz}$)].

Tabela 14. Dados de ^1H , ^{13}C do composto (**12**) em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

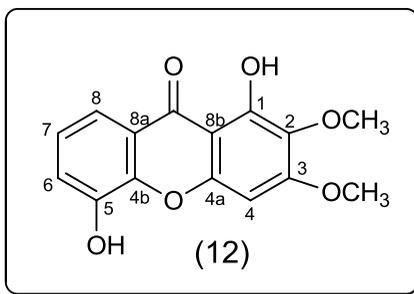
Posição	δ_{H} (m, J/Hz)	δ_{C}	δ_{C} ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) (Cristiano <i>et al.</i> , 2003)
1	-	153,6	153,3
2	-	132,4	132,2
3	-	160,6	160,7
4	6,34 (1H, <i>s</i>)	91,2	90,9
4a	-	154,8	154,5
4b	-	146,5	145,2
5	-	148,0	147,8
6	7,56 (1H, <i>dd</i> , H-6, $J 1,6$ e $8,2$)	121,5	121,2
7	7,30 (1H, <i>dd</i> , H-7, $J_{7,6}$ $8,2$ e $J_{7,8} 8,2\text{ Hz}$)	124,6	124,0
8	7,96 (1H, <i>dd</i> , H-8, $J 1,6$ Hz e $8,2\text{ Hz}$)	115,3	115,1
8a	-	105,0	-
8b	-	104,6	104,3
9	-	182,0	181,7
2-OCH	3,97 (3H, <i>s</i>)	60,7	60,4
3-OCH	3,73 (3H, <i>s</i>)	56,4	56,1

Além disso, o espectro mostrou um sinal de um simpleto aromático em $6,34\text{ ppm}$ (1H, *s*) atribuído ao H-4 (**Tabela 14**). O

espectro de RMN de ^{13}C mostrou a presença de 15 carbonos em uma região entre 56,4-182,0 ppm (**Tabela 14**). A atribuição dos sinais foi feita em comparação com os dados previamente reportados na literatura por *Cristiano et al.* (2003).

A análise de HR-MS mostrou uma razão massa carga de m/z 289,0709 correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado: 289,0707. Portanto, concluímos a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$ para o composto (**12**). Assim, através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C , espectrometria de massas e comparação dos dados obtidos com a literatura (*Cristiano et al.*, 2003), foi possível caracterizar a estrutura como sendo a 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**Figura 35**).

Figura 35. Estrutura química do composto (**12**).



5.1.4 Determinação dos voláteis de *P. molluginifolia* (Coleta 4) por microextração e análise por CG-EM

Os componentes voláteis de *Polygala molluginifolia* foram determinados por uma técnica de microextração. Neste procedimento, foi feita a saturação de uma fibra de microextração com os componentes voláteis da planta e depois foi feita a dessorção dos constituintes e análise por CG-EM.

A determinação de voláteis foi feita utilizando a planta fresca de *P. molluginifolia* (Coleta 4), sendo que o material vegetal foi separado em flores, folhas, caules e raízes.

Para o cálculo dos índices de retenção (IR) dos componentes voláteis foi realizada a injeção de n-alcenos ($\text{C}_5\text{-C}_{30}$) e foi utilizada a equação descrita por *Van Den Dool et al.* (1963). Através da análise conjunta de espectros de massas obtidos (CG-MS) e comparação com seus valores de IR e dados da literatura (*Adams, 1995*) foi possível realizar a identificação dos constituintes voláteis.

A maioria dos componentes identificados nas folhas, flores, caule e raiz eram ésteres. Pela análise das flores foram identificados 14 componentes voláteis, sendo que os compostos majoritários identificados foram o dodecanoato de isoamila (28,1%), decanoato de metila (1,7%) e tetradecanoato de metila (1,6%). Nas folhas foram identificados 11 componentes sendo os constituintes majoritários identificados o dodecanoato de etila (2,6%), hexadecanoato de metila (1,7%), decanoato de metila (1,0%) e dodecanoato de metila (0,6%). Nos caules, foram identificados 10 componentes, entre estes o decanoato de metila (1,7%), dodecanoato de etila (4,6%), tetradecanoato de etila (9,4%), hexadecanoato de etila (3,1%) e hexadecanoato de metila (6,9%), identificados em maior quantidade.

Além disso, nas raízes foram identificados 12 componentes, entre eles os compostos: o dodecanoato de etila (2,4%), tetradecanoato de etila (7,7%), hexadecanoato de etila (14,8%), sendo que composto majoritário encontrado foi o salicilato de metila (37,7%).

O salicilato de metila em algumas espécies do gênero *Polygala* confere um aroma característico as suas raízes. A presença deste componente no gênero foi reportado por alguns autores como *Victório et al.* (2011) e *Pizzolatti et al.* (2009) que descreveram a identificação de salicilato de metila nas espécies *P. paniculata* e *P. cyparissias*. Além do salicilato de metila outros componentes também já foram reportados, como o componente acetato de bornila e 1,8-cineol, que foram encontrados como constituintes majoritários nas flores de *P. paniculata* e *P. cyparissias* (*Pizzolatti et al.*, 2009).

Yang et al. (2010b) descreveram a determinação dos componentes voláteis na espécie *P. furcata* utilizando a técnica de microextração em fase sólida por Headspace e análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Os autores identificaram um total de 52 componentes, sendo que componentes majoritários encontrados foram ésteres e alcanos, o que corrobora com nossos resultados obtidos com *P. molluginifolia*, onde foi identificada uma grande quantidade de ésteres.

5.2 Atividades biológicas

5.2.1 Atividade antioxidante in vitro de extratos e frações de espécies do gênero *Polygala*

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio têm sido alvo de intensa investigação científica, pois estão correlacionados com uma série de doenças neurodegenerativas,

cardiovasculares, doenças hepáticas, aterosclerose, envelhecimento e certos tipos de câncer (Dos Santos *et al.*, 2007; Magina *et al.*, 2010).

Os efeitos ocasionados por estas espécies estão relacionados com a oxidação de componentes celulares como proteínas, DNA, lipídeos e principalmente ácidos graxos poliinsaturados (Dos Santos *et al.*, 2007; Magina *et al.*, 2010). Os radicais livres abstraem átomos de hidrogênio de lipídeos das membranas das células, ricas em ácidos graxos susceptíveis ao processo oxidativo, principalmente o ácido linoleico e araquidônico, o que inicia o processo de peroxidação lípídica, que é um dos principais fatores causadores do stress oxidativo e morte celular (Magina *et al.*, 2010).

Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos danosos dos radicais livres e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Dos Santos *et al.*, 2007). Estes compostos podem ter vários mecanismos de ação, como captação de radicais livres, capacidade de reduzir íons metálicos ou intermediários do processo de peroxidação lípídica através da doação de elétrons (Magina *et al.*, 2010).

Muitas vezes a atividade antioxidante está relacionada à presença de fenólicos. Devido a isso foi avaliado o teor de fenólicos nas espécies estudadas utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Anagnostopoulou *et al.*, 2006), que ao reagir com compostos fenólicos forma um complexo de coloração azul. O reagente de Folin-Ciocalteu pode ser encontrado como uma mistura de ácidos fosfomolibdico e fosfotungstico, em que o molibdênio e tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ . Na presença de agentes redutores como os compostos fenólicos, que são oxidados ao íon fenolato em condições básicas, forma-se o chamado molibdênio azul e tungstênio azul, cujo estado de oxidação se encontra entre 5^+ e 6^+ . Esta coloração permite avaliar a concentração das substâncias redutoras (Chaves *et al.*, 2010; Waterman *et al.*, 1994).

No presente trabalho foi determinado o teor de fenólicos nas seguintes amostras: extrato bruto (PMEB), fração hexânica (PMFH), fração acetato de etila (PMFA), fração aquosa (PMFW) da coleta 1 de *P. molluginifolia*; Extrato bruto (PCEB) e fração hexânica (PCFH), acetato de etila (PCFA) e aquosa (PCFW) de *P. campestris* e extrato bruto (PloEB) e fração hexânica (PloFH), acetato de etila (PloFA) e aquosa (PloFW) de *P. longicaulis*. A quantidade de fenólicos foi determinada por meio de uma curva de calibração feita com soluções padrão de ácido gálico ($y = 5,64x + 7,79$; $r^2 = 0,999$) e os resultados encontrados foram expressos em mg ácido gálico / g de amostra.

Tabela 15. Determinação da atividade antioxidante de extratos brutos e frações de espécies do gênero *Polygala*.

Extrato/ fração	Fenólicos ^(a)	Flavonoides ^(b)	Poder Redutor ^(c)	% Atividade DPPH ^(d)
<i>Polygala molluginifolia</i>				
PMFA	334,26 ± 0,02	10,87 ± 0,01	517,63 ± 0,33	92,60 ± 0,23
PMFH	247,20 ± 0,01	6,60 ± 0,02	162,26 ± 1,21	90,44 ± 0,16
PMFW	107,74 ± 1,12	10,39 ± 0,04	80,72 ± 0,23	80,41 ± 0,21
PMEB	110,86 ± 2,31	74,48 ± 0,12	389,83 ± 1,12	100 ± 0,00
<i>Polygala campestris</i>				
PCFA	217,74 ± 0,45	9,57 ± 0,08	120,76 ± 1,21	0,00* ± 0,00
PCFH	141,13 ± 0,29	30,01 ± 0,28	42,22 ± 0,13	0,00* ± 0,00
PCFW	56,88 ± 0,09	16,15 ± 0,17	134,80 ± 0,89	67,56 ± 0,24
PCEB	64,61 ± 0,01	0,00 ± 0,00	128,66 ± 0,66	50,23 ± 0,06
<i>Polygala longicaulis</i>				
PLoFA	41,09 ± 0,18	0,00 [†] ± 0,00	146,25 ± 1,21	0,00 ± 0,00
PLoFH	8,31 ± 0,26	0,00 [†] ± 0,00	104,02 ± 1,90	24,83 ± 0,23
PLoFW	31,45 ± 0,89	14,64 ± 0,18	122,91 ± 2,16	17,03 ± 0,16
PLoEB	24,34 ± 1,18	0,00 [†] ± 0,00	153,25 ± 1,11	28,34 ± 0,24

^(a) mg ácido gálico / g de amostra.

^(b) mg quercetina/ g de amostra

^(c) mg ácido ascórbico/ g de amostra ^(d) % realizada na concentração de 100 ppm. Os símbolos * † significam que os resultados não mostraram diferença estatística significativa.

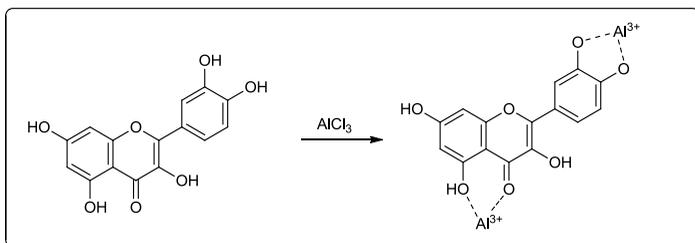
Na **Tabela 15** pode-se observar que entre os extratos brutos das três espécies analisadas, o extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB) apresentou o maior conteúdo de fenólicos (110,86 mg ácido gálico/g de amostra). Além disso, foi observado que entre as frações avaliadas, a fração acetato de etila mostrou maior conteúdo de fenólicos que as frações hexânica e aquosa nas três espécies estudadas, sendo que a fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (PMFA) mostrou o melhor resultado (334,26 mg ácido gálico/g de amostra).

Os resultados obtidos com as frações hexânica e aquosa das três espécies mostraram que nas espécies *P. molluginifolia* e *P. campestris* as frações hexânicas mostraram maior conteúdo de fenólicos que a fração aquosa, enquanto que na espécie *P. longicaulis* observou-se o inverso.

Além do conteúdo de fenólicos também foi avaliado o conteúdo de flavonoides que muitas vezes também está relacionada à atividade antioxidante. A quantidade de flavonoides em um extrato ou fração pode ser determinada por meio da complexação com cloreto de alumínio, que forma um quelato com as hidroxilas fenólicas e com o grupo cetônico

dos flavonoides. A formação deste quelato promove um deslocamento batocrômico das bandas de UV/VIS (Magina *et al.*, 2010) (**Figura 36**). Os resultados foram expressos em mg quercetina/ g de amostra.

Figura 36. Complexo formado entre Al^{3+} e um flavonoide.



De acordo com os resultados obtidos, o extrato bruto de *P. molluginifolia* mostrou maior conteúdo de flavonoides em relação às outras espécies. Quanto às frações de *P. molluginifolia* observou-se a presença de maior teor de flavonoides para a fração acetato de etila, o que possivelmente está correlacionada com a presença de isoflavonas nesta fração (**Tabela 15**).

Além disso, observou-se que a fração aquosa mostrou teor de flavonoides um pouco menor que a fração acetato de etila, mas maior que a fração hexano. O isolamento da fração aquosa de *P. molluginifolia* resultou no isolamento do flavonóide rutina e possivelmente este composto está relacionado, pelo menos em parte, pelo teor de flavonoides encontrado.

Para a espécie *P. campestris* observou-se um comportamento diferente de *P. molluginifolia*, sendo que a fração hexânica apresentou o maior conteúdo de flavonoides (30,01 mg quercetina/g de amostra), seguido da fração aquosa (16,15 mg quercetina/g de amostra) e a fração acetato de etila (9,57 mg quercetina/g de amostra) apresentou o menor teor de flavonoides.

Já para espécie *P. longicaulis* somente foi observado a presença de flavonoides para a fração aquosa (14,64 mg quercetina/g de amostra) (**Tabela 15**).

Diante destes resultados também foi avaliado o poder redutor, um método de determinação de atividade antioxidante para verificar se havia uma relação desta atividade com o conteúdo de fenólicos e flavonoides (**Tabela 15**).

O método do poder redutor baseia-se no fato de quando um íon fenolato presente no extrato ou fração analisada é oxidado, o íon férrico é reduzido a íon ferroso, o qual reage com o reagente ferrocianeto de potássio formando um complexo azul $\text{Fe}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]_2$ (Waterman *et al.*, 1994). Os resultados foram expressos em mg ácido ascórbico/ g de amostra.

Embora não tenha sido observada uma correlação direta entre o poder redutor e o conteúdo de fenólicos e flavonoides, em alguns casos foram observadas algumas relações entre estes fatores. Ao compararmos os resultados de atividade de poder redutor obtido com os extratos das três espécies, foi possível observar que PMEB apresentou melhor atividade antioxidante (389,83 mg ácido ascórbico/ g de amostra) frente ao método testado e também apresentou o maior conteúdo de fenólicos das três espécies avaliadas.

Ao verificar os resultados obtidos com as frações, observou-se que a PMFA mostrou a maior atividade antioxidante (517,63 mg ácido ascórbico/ g de amostra) e novamente observou-se que esta apresentou um maior teor de fenólicos que as demais frações.

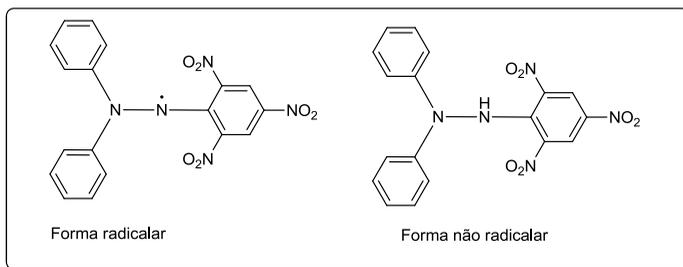
Ainda comparando as frações observou-se que nas espécies *P. longicaulis* e *P. molluginifolia* a fração acetato de etila mostrou maior atividade de poder redutor (maior conteúdo de fenólicos) enquanto na espécie *P. campestris* observou-se maior atividade antioxidante para a fração aquosa (PCFW), sendo que esta não apresentou o maior conteúdo de fenólicos (**Tabela 15**).

Da fração aquosa de *P. campestris* foram isoladas xantonas que contêm hidroxilas fenólicas que possivelmente podem contribuir com a atividade antioxidante observada. Observou-se também que não foi observada correlação entre atividade antioxidante pelo método do poder redutor com o conteúdo de flavonoides.

Os extratos e frações das espécies foram testados quanto a suas atividades antioxidantes pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-1-hidrazil (DPPH) a fim de comparar os resultados com os dados previamente descritos.

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre de coloração violeta e caracterizada pela banda de absorção em etanol em cerca de 520 nm. Este ensaio se baseia na capacidade de uma amostra em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a hidrazina. Quando a amostra age como doador de átomos de hidrogênio é adicionado à solução de DPPH, a hidrazina é obtida como produto e a coloração passa a ser amarelo pálido (Alves *et al.*, 2010).

Figura 37. Formas radicalar e não radicalar do DPPH.



Neste ensaio observou-se que entre os extratos brutos avaliados, somente PMEB apresentou significativa atividade antioxidante (100,0%) o que pode estar relacionado com a maior presença de fenólicos e flavonoides no extrato. Em relação às frações das três espécies, novamente PMFA mostrou a maior atividade antioxidante (92,60%) (**Tabela 15**).

Foi possível verificar ainda que, na espécie *P. molluginifolia* a fração hexânica (PMFH) (90,4%) mostrou maior atividade antioxidante que a fração aquosa (PMFW) (80,4%), e embora a fração aquosa apresente maior conteúdo de flavonoides, a fração hexânica contém o maior conteúdo de fenólicos totais o que pode estar relacionado com a atividade observada (**Tabela 15**).

Na espécie *P. longicaulis* observou-se atividade antioxidante para as frações hexânica (PloFH) e aquosa (PloFW), sendo que a fração hexânica (24,83%) mesmo tendo menor conteúdo de fenólicos e flavonoides apresentou o melhor resultado de atividade antioxidante.

Para as frações da espécie *P. campestris* somente foi observada atividade DPPH (67,56%) para a fração aquosa (PCFW), porém não foi observada relação com o conteúdo de fenólicos e flavonoides (**Tabela 15**).

Através destes dados verifica-se que o extrato bruto e fração acetato de etila da espécie *P. molluginifolia* mostraram os melhores resultados de atividade antioxidante do que as outras duas espécies investigadas. Além disso, observou-se que embora fossem observadas algumas relações, em muitos casos não foi possível obter uma correlação totalmente direta entre o conteúdo de flavonoides e fenólicos com a atividade antioxidante observada.

5.2.2 Ensaio de Inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos e frações de espécies do gênero *Polygala*

A Doença de Alzheimer (DA) tem sido a mais comum síndrome demencial que afeta a população acima de 60 anos e contribuiu com cerca de 70% dos casos. Embora haja um número considerável de estratégias para o tratamento da doença de Alzheimer nenhuma intervenção eficaz foi alcançada.

Um dos tratamentos mais utilizados para a DA é o uso de fármacos inibidores da enzima acetilcolinesterase, que visam aumentar os níveis do neurotransmissor acetilcolina (De Souza *et al.*, 2010; Viegas *et al.*, 2004). No entanto, os fármacos anticolinesterásicos atualmente utilizados têm levado a uma série de efeitos colaterais (Almeida, 1998). Este fato mostra a importância de buscar novos agentes anticolinesterásicos.

Desta forma decidiu-se investigar o potencial anticolinesterásico das espécies *P. molluginifolia*, *P. campestris* e *P. longicaulis* (**Tabela 16**), que até o momento não foram investigadas na literatura em termos de seu potencial anticolinesterásico.

Entre os extratos brutos e frações analisadas, o extrato (PMEB) e frações acetato de etila (PMFA) e hexânica (PMFH) obtidos da coleta 1 de *P. molluginifolia*, mostraram os maiores valores de porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase. A presença de isoflavonas no extrato bruto e fração acetato de etila pode estar relacionada à porcentagem de inibição observada (**Tabela 16**).

Tabela 16. Porcentagem de inibição de extratos brutos e frações frente à enzima acetilcolinesterase.

Extrato/fração	% Inibição da enzima AChE ^(a)
<i>Polygala molluginifolia</i>	
PMFA	100* ± 0,00
PMFH	90,34 ± 0,95
PMFW	2,54 ± 0,66
PMEB	100* ± 0,00
<i>Polygala campestris</i>	
PCFA	82,58 ± 1,41
PCFH	35,89 ± 1,54
PCFW	0,84 ± 0,29
PCEB	6,01 ± 1,81
<i>Polygala longicaulis</i>	
PLoFA	21,14 ± 2,73
PLoFH	6,83 ± 0,69
PLoFW	0,51 [†] ± 1,54
PLoEB	0,00 [†] ± 0,00

(a) % realizada na concentração de 100 ppm. Os símbolos *[†] significam que os resultados não mostraram diferença estatística significativa.

Em se tratando da espécie *P. campestris*, a fração acetato de etila (PCFA) apresentou porcentagem de inibição maior (82,58%) do que as demais frações desta espécie e o extrato bruto (PCEB) (**Tabela 16**). A espécie *P. longicaulis* apresentou os menores valores de inibição da enzima, sendo que a fração acetato de etila (21,14%) foi a que apresentou maior inibição entre as frações analisadas, o que pode estar relacionado em parte à presença de diidroestirilpironas presentes nesta

fração. Desta forma nota-se que novamente a espécie *P. molluginifolia* (Extrato bruto, fração hexânica e acetato de etila) mostrou os melhores resultados de atividade.

5.2.3 Atividade antioxidante (DPPH) e acetilcolinesterase dos compostos isolados (1-4)

Como descrito anteriormente o estudo fitoquímico de *P. molluginifolia* resultou no isolamento de isoflavonas e o flavonoide rutina. As isoflavonas são reportadas na literatura pela sua atividade antioxidante, pela redução do dano neural provocado por radicais livres e por aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e glutatona peroxidase prevenindo a degeneração e apoptose de neurônios (Yang *et al.*, 2010a; Yang *et al.*, 2011).

Além disso, as isoflavonas podem ser usadas para tratar a doença de Alzheimer pela sua habilidade de diminuir a hidrólise da acetilcolina, mantendo a aprendizagem e memória (Yang *et al.*, 2010a; Yang *et al.*, 2011).

Estes dados aliado ao fato de que os extratos e frações de *P. molluginifolia* mostraram os melhores resultados de atividade antioxidante e inibição da enzima acetilcolinesterase levou a investigação dos compostos isolados desta espécie.

Como mostrado na **Tabela 17**, as isoflavonas (1–4) demonstraram efeito inibitório da enzima acetilcolinesterase. Entre estes compostos, as isoflavonas (1) e (4) mostraram os melhores resultados com valores de CI_{50} de 68 e 84 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente comparado ao controle positivo Reminyl. Observou-se que estas isoflavonas apresentam grupos hidroxila nas posições 3' e 4' do anel B, o que sugere que estes grupos podem aumentar a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.

A adição de um segundo anel dimetilpirano conectado ao anel A também aumentou a inibição, como observado para o composto (1) quando comparado ao composto (4). Estes resultados sugerem que ambos os fatores hidrofobicidade e a presença do grupo catecol desempenham um papel importante na habilidade das isoflavonas inibirem a enzima acetilcolinesterase.

Estes resultados seguem a mesma tendência para a atividade antioxidante pelo método DPPH. Compostos com o grupo catecol no anel B, como as isoflavonas (1) e (4), exibiram os melhores resultados, com valores de CE_{50} de 61 e 55 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, comparado com ácido ascórbico (52 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e quercetina (21 $\mu\text{mol L}^{-1}$).

Tabela 17. Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) e efeitos antioxidantes (DDPH) dos compostos isolados (1-4).

Compostos	Inibição da AChE	DPPH
	CI ₅₀ / (μmol L ⁻¹)	CE ₅₀ / (μmol L ⁻¹)
(1)	68	61
(2)	132	838
(3)	126	208
(4)	84	55
Reminyl®	32	-
Ácido Ascórbico	-	52
Quercetina	-	21

5.2.4 Determinação da Permeabilidade dos compostos isolados

A ação de um fármaco ao ser administrado pode ser dividida nas fases farmacocinética e farmacodinâmica. Na fase farmacodinâmica ocorre a interação entre o fármaco e o receptor, ou seja, a produção do efeito desejado. A fase farmacocinética abrange os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) do fármaco no organismo (Pereira, 2007).

A previsão dos processos ADME nos estágios de desenvolvimento de fármacos é muito importante, pois as propriedades físico-químicas são o principal crivo no processo de triagem de candidatos a fármacos (Kansy *et al.*, 1998). A baixa absorção tem sido a principal causa que leva a rejeição de muitos candidatos a fármacos (Pereira, 2007).

A técnica de PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*), introduzida por Kansy *et al.* (1998) consiste em um método que determina a permeabilidade passiva de compostos através de membrana artificial em micropalacas *in vitro* (Kansy *et al.*, 1998; Velicky *et al.*, 2012). O método mostra a habilidade dos compostos de se difundirem

do compartimento doador através de um filtro de membrana pré-tratado para o compartimento receptor (Singh *et al.*, 2011).

O PAMPA é um método rápido, simples e barato comparado às técnicas que utilizam linhagens celulares (Caco-2), as quais são mais caras, complexas e morosas. O principal objetivo do PAMPA é o estudo de permeabilidade passiva (transcelular), que é o principal processo de absorção dos fármacos atuais (Campos, 2013).

Existem vários modelos para o PAMPA, que variam na composição dos lipídeos e pH. Neste trabalho utilizamos um modelo *in vitro* com o lipídeo fosfatidilcolina em pH 7,4 para simular a absorção gastrointestinal *in vivo* das isoflavonas (**1-4**), (**7**) e (**8**) isoladas de *P. molluginifolia*, diidroestirilpironas (**9-10**) obtidas de *P. longicaulis* e xantonas (**11-12**) isoladas de *P. campestris*. Além disso, foi calculado o *ClogP* de todos os compostos a fim de comparar os resultados obtidos (**Tabela 18**). O *ClogP* é um coeficiente de partição comumente estimado em sistema octanol/água e indica a lipofilicidade de um composto. A lipofilicidade está relacionada com muitas outras propriedades como solubilidade, permeabilidade, metabolismo e toxicidade.

Através dos dados obtidos, observou-se que em alguns casos houve uma relação entre o *ClogP* e permeabilidade enquanto outros casos não se observou a mesma relação (**Tabela 18**).

Entre os compostos analisados observou-se que a xantona (**12**) ($41,20 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) e as diidroestirilpironas (**9**) ($13,20 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) e (**10**) ($12,30 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) apresentaram os maiores valores de permeabilidade. Estes compostos apresentaram os menores valores de *ClogP* em relação a todos os compostos analisados, porém observou-se que entre eles o mais permeável apresentou o maior valor de *ClogP* (**Tabela 18**).

Entre as isoflavonas analisadas, observou-se na maioria dos casos que as isoflavonas hidrofóbicas exibiram menor permeabilidade que isoflavonas polares, o que está de acordo com os resultados obtidos por Dreassi *et al.* (2009).

A isoflavona (**8**) apresentou a menor permeabilidade e maior valor de *ClogP* de todos os compostos analisados. A isoflavona (**1**) ($1,50 \times 10^{-6} \text{ cm s}^{-1}$) apresentou a segunda menor permeabilidade e apresentou permeabilidade próxima ao composto (**8**), o que pode ser justificado, pois ambos diferem pouco estruturalmente e o composto (**1**) apresenta valor de *ClogP* um pouco menor que (**8**) (**Tabela 18**).

Em relação às isoflavonas que diferem somente na substituição do anel B, observou-se que a isoflavona (**2**) apresentou a menor

permeabilidade, provavelmente devido a presença de dois grupos metoxila e maior valor de *ClogP*.

Tabela 18. Ensaio de Permeabilidade PAMPA em pH 7,4 e valores de *ClogP*.

Compostos	Coefficiente de Permeabilidade Aparente Papp (cm/s)	<i>ClogP</i> *
(1)	$1,50 \times 10^{-6}$	4,03
(2)	$2,01 \times 10^{-6}$	3,21
(3)	$9,25 \times 10^{-6}$	2,93
(4)	$3,48 \times 10^{-6}$	2,65
(7)	$12,20 \times 10^{-6}$	2,93
(8)	$1,27 \times 10^{-6}$	4,68
(9)	$13,20 \times 10^{-6}$	2,38
(10)	$12,30 \times 10^{-6}$	2,31
(11)	$2,13 \times 10^{-6}$	2,79
(12)	$41,20 \times 10^{-6}$	2,54

* Os valores de *ClogP* foram calculados no site: <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> pelo Programa Osiris.

As isoflavonas (3) e (7) apresentam os mesmos substituintes no anel B, diferindo somente na posição. Observou-se que embora apresentem o mesmo valor de *ClogP*, o composto (7) se mostrou um pouco mais permeável que o composto (3) (Tabela 18).

Além disso, observou-se que mesmo que os compostos (3) e (7) sejam mais hidrofóbicos que o composto (4), estes exibiram maior permeabilidade. Este dado está de acordo com a literatura (Siegel,

1981), onde foi reportado que o aumento até certo ponto do número de grupos hidroxila pode diminuir a permeabilidade.

Embora não tenha sido observada nenhuma correlação direta entre permeabilidade e *ClogP*, pode-se observar algumas tendências como em geral os compostos que apresentaram menor valor de *ClogP* apresentaram as maiores permeabilidades.

5.2.5 Determinação da atividade tripanocida e leishmanicida

Trypanosoma cruzi e *Leishmania* spp. fazem parte do grupo de protozoários parasitas que causam doenças tropicais negligenciáveis que representam a maior causa de mortalidade na América Latina. Apesar disso, o arsenal terapêutico para tratar estas doenças é bastante limitado (Pizzolatti *et al.*, 2008; Yamanaka *et al.*, 2013).

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de buscar novos compostos para o tratamento da Leishmaniose, mas os avanços ainda são muito pequenos. Por outro lado, no tratamento da doença de Chagas, os compostos nifurtimox e benzonidazol são utilizados, porém estes agentes tem eficiência limitada, longo tempo de administração e possuem muitos efeitos colaterais (Yamanaka *et al.*, 2013).

Diante destes dados torna-se clara a necessidade de busca de novos compostos no tratamento destas doenças. Estudos prévios obtidos do nosso grupo de pesquisa com o gênero *Polygala* indicaram que as frações diclorometano e acetato de etila de *P. sabulosa* mostraram potente atividade tripanocida sob as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Além disso, uma cumarina prenilada isolada desta espécie foi ativa sob as formas epimastigota e tripomastigota de *T. cruzi* (Pizzolatti *et al.*, 2008). Desta forma decidiu-se investigar a atividade tripanocida e leishmanicida de extratos, frações e compostos isolados de *P. molluginifolia*, *P. longicaulis* e *P. campestris*.

Os extratos brutos, frações e o composto isolado (**4**) das espécies *P. longicaulis* e *P. molluginifolia* (Coleta 1) foram avaliados quanto a sua inibição percentual frente a atividade leishmanicida e tripanocida sob promastigotas de *L. brasiliensis* e epimastigotas de *T. cruzi* (**Tabela 19**).

Para os extratos, frações e o composto isolado que apresentaram inibição percentual maior que 50% foram obtidos os valores de CI_{50} como mostra a **Tabela 19**. Através dos valores de CI_{50} obtidos, verifica-se que o extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB), fração acetato de etila (PMFA) e composto isolado (**4**) apresentaram os melhores valores de CI_{50} frente à atividade leishmanicida de promastigotas de *L.*

brasiliensis e epimastigotas de *T. cruzi* comparado a anfotericina e benzonidazol usados como controles positivos.

Tabela 19. Avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida com promastigotas de *L. brasiliensis* e epimastigotas de *T. cruzi*.

Composto (50µg/mL)	Inibição Percentual de <i>L. brasiliensis</i>	Inibição percentual de <i>T. cruzi</i>	CI ₅₀ (µM) <i>L. brasiliensis</i>	CI ₅₀ (µM) <i>T. cruzi</i>
PloEB	98,65±1,18	12,28±0,77	44,66±1,22	NA
PloFH	94,80±2,007	33,45±1,36	13,15±5,40*	NA
PloFA	92,41±0,70	30,82±0,01	14,92±5,67*	29,27
PloFW	2,32±2,48	SA	NA	NA
PMEB	96,62±2,76	56,29±1,25	7,52±0,11*	10,09±2,73
PMFH	94,10±3,58	77,00±2,12	NA	NA
PMFA	95,59±4,20	79,11±3,22	3,60±1,00*	12,24±8,90
PMFW	95,48±3,97	7,095±2,02	46,27±8,50	NA
(4)	98,67±1,37	96,05±6,85	5,55±0,90*	4,23±0,05
Anfotericina	95,47±0,73	SA	0,08±0,005	NA
Benzonidazol	NA	86,73±5,70	NA	10,22±2,79

NA= Não avaliado; SA = sem atividade inibitória * Compostos selecionados para os testes de citotoxicidade.

As substâncias mais ativas foram selecionadas para os testes de citotoxicidade (CC₅₀), determinação de inibição percentual de amastigotas de *Leishmania amazonensis* e índice de seletividade (IS) (Tabela 20).

Como mostrado na Tabela 20, às amostras testadas quanto à inibição de amastigotas de *L. amazonensis* não mostraram significativa atividade e sendo assim, os seus respectivos valores de CI₅₀ não foram determinados.

Além disso, observou-se que ao avaliar o índice de seletividade dos compostos que apresentaram melhores valores de CI_{50} frente à promastigotas de *L. brasiliensis* e epimastigotas de *T. cruzi*, PMFA apresentou um índice de seletividade baixo (0,007) (**Tabela 20**) quando comparado ao controle, enquanto que PMEB e o composto (4) mostraram valores de índice de seletividade maiores, de 1,60 para o composto (4) e 1,55 para PMEB. O índice de seletividade indica quantas vezes o composto é mais tóxico para o parasita que para a célula hospedeira.

Tabela 20. Teste de citotoxicidade com THP1 e Inibição percentual de amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Extração/fração ou composto	CC_{50} (μ M) THP1	Inibição percentual de <i>L. amazonensis</i>	Índice de Seletividade (IS)
PloFH	442,5 \pm 2,61	NA	NA
PloFA	30,42 \pm 1,90	>50	>0,60
PMEB	11,76 \pm 3,98	7,55 \pm 1,13	1,55
PMFA	0,03	3,81 \pm 0,26	0,007
PMFH	1881,1	>50	>3,76
(4)	7,01 \pm 0,49	4,37 \pm 0,75	1,60
Anfotericina	>10	0,063 \pm 0,01	>10
Benzonidazol	>500	NA	NA

NA= Não avaliado; IS: CC_{50}/CI_{50}

Posteriormente, também foi avaliada a atividade tripanocida e leishmanicida do extrato bruto (PCEB) e frações acetato de etila (PCFA) e aquosa (PCFW) de *P. campestris* e o extrato bruto e fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (Coleta 2) (**Tabela 21**). Também foram avaliadas as isoflavonas (1) e (8) isoladas da coleta 2 de *P. molluginifolia* e a diidroestirilpirona (10) isolada da fração acetato de etila de *P. longicaulis*. Foram feitos testes frente à atividade de inibição de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Para os compostos com maiores valores de porcentagem de inibição foram determinados os valores de CI_{50} .

Tabela 21. Determinação da porcentagem de inibição de amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. amazonensis*

Composto (50µM) Extrato (50 ug/ml)	Inibição percentual de <i>T. cruzi</i>	Inibição percentual de <i>L. amazonensis</i>
PCFW	SA	SA
PCFA	SA	SA
PCEB	SA	SA
PMFA (Coleta 2)	93,12 (±0,33)	69,61 (±1,33)
(8)	SA	SA
PMEB (Coleta 2)	74,62 (±2,40)	SA
(1)	94,92 (±0,49)	77,99 (±2,31)
(10)	SA	SA
Benzonidazol 20 uM	86,17 (±0,72)	-
Anfotericina 2 uM	-	76,43 (±1,60)

SA = sem atividade inibitória

Entre as amostras analisadas, somente o extrato bruto (PMEB), fração acetato de etila (PMFA) e composto (1) de *P. molluginifolia* tiveram sua IC₅₀ determinada. Entre estes, observa-se que para *T. cruzi* a fração acetato de etila foi mais ativa que as demais amostras. Já para a *L. amazonensis* somente duas amostras tiveram CI₅₀ determinada, composto (1) e PMFA. No entanto, observou-se que o índice de seletividade não foi considerado significativo para estas amostras (Tabela 22).

Tabela 22. Determinação de CI₅₀ de extratos, frações e compostos isolados frente à atividade contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

Composto Extrato	CI ₅₀ (<i>T. cruzi</i>)	CI ₅₀ (<i>L. amazonensis</i>)	CC ₅₀	Índice seletividade
(1)	11,58 (±0,16)	30,90 (±0,96)	>7,80	-
PMFA (Coleta 2)	5,08 (±0,76)	20,40 (±0,28)	>7,80	-
PMEB (Coleta 2)	8,61 (±0,21)	-	>15,60	-

Diante destes resultados observa-se que em geral as isoflavonas (1) e (4) e os extratos brutos e frações acetato de etila de *Polygala molluginifolia* mostraram melhor atividade tripanocida e leishmanicida.

5.2.6. Determinação de atividade antifúngica

As infecções fúngicas estão relacionadas com um grande número de doenças e mortalidade, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Em pacientes afetados pelo HIV, fungos oportunistas como *Candida albicans*, tem contribuído com 60% dos casos clínicos. *Cryptococcus neoformans* causa a meningite em pacientes com HIV e são observados em grande número nos pacientes imunocomprometidos (Johann *et al.*, 2011).

Atualmente existem poucos agentes antifúngicos disponíveis e os que são utilizados apresentam falhas no seu espectro de ação ou são tóxicos. Outro fator a ser considerado é que muitos microorganismos já são resistentes aos agentes antifúngicos utilizados, principalmente ao fluconazol e itraconazol (Lopez-Martinez, 2010). Com base nestes dados torna-se claro a necessidade de investigação de novos agentes antifúngicos.

Em um estudo realizado por Johann *et al.* (2011) foi analisada a atividade antifúngica *in vitro* dos extratos e frações de cinco espécies do gênero *Polygala* e compostos isolados destas espécies. Neste estudo, o extrato hexânico de *P. paniculata* e a fração acetato de etila de *P. sabulosa* apresentaram a melhor atividade antifúngica com valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 60 e 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, contra *C. tropicalis*, *C. gattii* e *S. schenckii*. Entre os compostos isolados de *P. sabulosa*, a preniloxicumarina e 1,2,3,4,5,6-hexanohecol mostraram atividade antifúngica contra *S. schenckii* (com MICs de 125 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) e *C. gattii* (ambos com CIMs de 250 $\mu\text{g/mL}$). Rutina e aurapteno isolados de *P. paniculata* mostraram atividade antifúngica contra *C. gattii* com valores de CIM de 60 e 250 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Além disso, o composto α -espinasterol apresentou ampla faixa de atividade contra as espécies testadas, enquanto a rutina teve a melhor atividade e o valor de CIM mais baixo para os microorganismos testados.

Estes dados nos motivaram a avaliar também os extratos, frações e compostos isolados de *P. campestris*, *P. longicaulis* e *P. molluginifolia* quanto a sua atividade antifúngica frente a cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Também foram utilizadas cepas de *Cryptococcus gattii*, *C. neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensis* (*Pb18*).

A **Tabela 23** mostra a porcentagem de inibição das amostras testadas. Ao avaliar os resultados obtidos com os extratos e frações testadas verificou-se que para a cepa *Pb18*, as amostras PloEB (90,5%), PloFH (74,1%), PloFW (100), PCFA (90,6%) e PCFW (76,8%) mostraram a maior inibição e entre estas PloFW apresentou o melhor resultado de inibição frente a esta cepa. Já em relação à *C. parapsilosis* somente o extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB) mostrou significativa inibição (89,3%) e para *C. krusei* as amostras PMEB (100%) e PCFA (93,5%) foram as que mostraram maior inibição (**Tabela 23**).

Já ao avaliar o efeito das amostras sob *C. albicans*, observou-se que PMEB (72%), PMFH (72%), PloEB (77%) e PloFA (71,1%) se mostraram mais ativas. Para *C. neoformans*, PMEB (95,5%), PloEB (89,1%) e PloFH (80,7%) e para *C.gatti* PMEB (95,9%), PMFH (75,8%), PloEB (98,6%), PloFH (81,2%), PloFA (80%) e PCFA (71,2%) foram mais ativas. Nenhum extrato ou fração mostrou-se ativo na inibição de *C. tropicalis* (**Tabela 23**).

Os resultados obtidos com os compostos isolados mostraram que a isoflavona (**3**) não mostrou inibição sob as cepas avaliadas. Além disso, observou-se que a diidroestirilpirona (**10**) mostrou inibição frente a cepas de *Pb18* (86,6%), *C. parapsilosis* (80,7%) e *C. neoformans* (77,2%).

A isoflavona (**1**) mostrou inibição frente às cepas de *Pb18* (92,9%), *C. parapsilosis* (100,0%) e *C. krusei* (99,8%). No entanto, os melhores resultados foram obtidos com a isoflavona (**4**) que mostrou significativa atividade frente às cepas avaliadas, exceto para a cepa *C. albicans* (**Tabela 23**). Para as amostras que apresentaram porcentagem de inibição igual ou superior a 70% foram determinados os respectivos valores de CIM.

Tabela 23. Porcentagem de inibição dos extratos, frações e compostos isolados frente à atividade antifúngica.

Amostras	Pb18	C. <i>parapsilosis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>albicans</i>	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>neoformans</i>	C. <i>gattii</i>
PMEB	61,1	89,3	100	72	46	95,5	95,9
PMFH	57	0	18	72	51	54,7	75,8
PloEB	90,5	41,6	35	77	18	89,1	98,6
PloFH	74,1	29,3	20	49,7	47,9	80,7	81,2
PloFA	69,1	57	59,8	71,1	57,2	62,4	80
PloFW	100	42,6	45,5	48,1	35,6	0	NA
PCFA	90,6	61,6	93,5	0	33,4	17,8	71,2
PCFH	0	0	0	0	43,9	62,4	42,3
PCFW	76,8	0	21,6	0	66,4	18,1	0
(4)	97,4	98,5	100	69	100	96,5	100
(3)	46,6	4,1	30	13	5	36,2	68,3
(1)	92,9	100	99,8	0	54	63,1	67,1
(10)	86,6	80,7	50,9	9,5	54,7	77,2	52
Itraconazol (0,5 µg/ml)	80	97,9	97,2	80	80	96,3	99,6

NA= Não avaliado;

Entre as amostras que tiveram sua concentração inibitória mínima determinada observou-se que o extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB) da coleta 1 mostrou atividade antifúngica contra *C. neoformans* (CIM= 31,2 µg/mL) e *C. gattii* (CIM= 31,2 µg/mL), *C. parapsilosis* (CIM= 250 µg/mL), *C. krusei* (CIM= 125 µg/mL) e *C. albicans* (CIM= 250 µg/mL). As frações PCFA (CIM= 250 µg/mL) e PCFW (CIM= 250 µg/mL) se mostraram ativas para *Pb18* (**Tabela 24**). Para os compostos isolados verificou-se que a isoflavona (4) mostrou atividade antifúngica frente às cepas de *C. neoformans* (CIM= 7,8 µg/mL), *C. gattii* (CIM= 7,8 µg/mL) e *Pb18* (CIM= 62,5 µg/mL). A isoflavona (1) mostrou-se ativa frente à cepa *Pb18* (CIM= 1,9 µg/mL) e a diidroestirilpirona (10) se mostrou ativa somente para *C. krusei* (CIM= 250 µg/mL) (**Tabela 24**).

Tabela 24. Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL de extratos, frações e compostos isolados.

Amostras	<i>Pb18</i>	C. <i>parapsilosis</i>	C. <i>krusei</i>	C. <i>albicans</i>	C. <i>tropicalis</i>	C. <i>neoformans</i>	C. <i>gattii</i>
PMEB	NA	250	125	250	NA	31,2	31,2
PMFH	-	-	-	-	-	>500	>500
PloEB	NA	500	500	500	NA	>500	500
PloFH	NA	-	-	-	-	≥500	≥500
PloFA	NA	-	-	-	-	-	≥500
PloFW	NA	>500	>500	>500	NA	>500	>500
PCFA	250	-	500	-	-	-	>500
PCFW	250	-	-	-	-	-	-
(4)	62,5	-	-	-	-	7,8	7,8
(1)	1,9	>500	>500	-	-	-	-
(10)	>500	>500	250	-	-	>500	-

NA= Não avaliado;

Diante destes resultados observa-se que as isoflavonas (1), (4) e PMEB mostraram os melhores resultados de atividade antifúngica e podem ser possíveis candidatos como protótipos de fármacos antifúngicos.

5.2.7 Atividade anti-inflamatória *in vivo*

Segundo relatos da literatura algumas espécies do gênero *Polygala* apresentam atividade anti-inflamatória. Segundo *Borges et al.* (2014), a espécie *P. sabulosa* inibiu completamente a infiltração de células inflamatórias e reduziu os níveis de TNF- α e IL-1 β em um modelo de inflamação aguda induzida pela injeção intraperitoneal em ratos de um lipopolissacarídeo, uma endotoxina bacteriana que induz efeitos inflamatórios. Além disso, a espécie *P. tenuifolia* mostrou atividade anti-inflamatória pela inibição da produção de TNF- α em astrócitos murinos (Kim *et al.*, 2013). A inflamação é um processo provocado pelo nosso organismo quando há um agente provocador de lesão (toxina ou microorganismo) e ocorre como uma proteção do organismo a se livrar desse agente bem como das células e tecidos necróticos formados em consequência dessa lesão (Schmid-Schonbein, 2006; Silva, 2014).

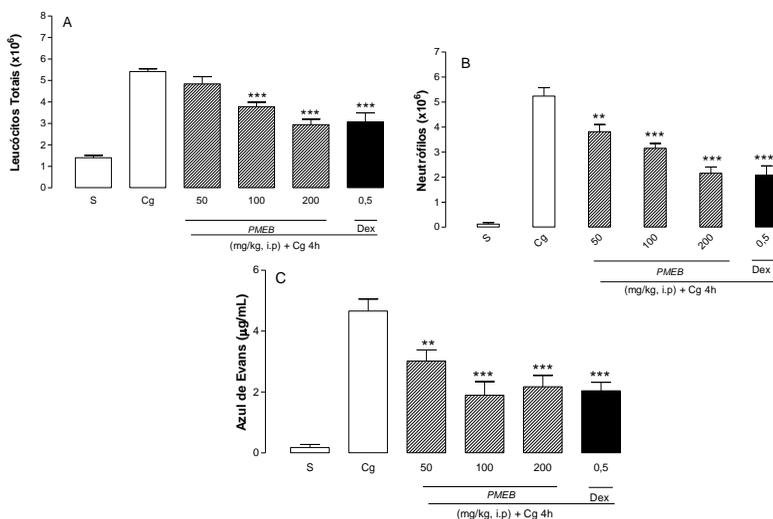
Entre as características do processo inflamatório destaca-se: vasodilatação, aumento de fluxo e permeabilidade vascular, formação de exsudato, migração de leucócitos, formação de espécies reativas, liberação de fatores de crescimento e geração de um novo tecido funcional (Schmid-Schonbein, 2006; Silva, 2014). Neste processo, as células inflamatórias como leucócitos migram para o sítio inflamatório atraído por mediadores. Ocorre também o extravasamento de proteínas plasmáticas dando origem ao edema, resultante do acúmulo de exsudato composto por proteínas, leucócitos e mediadores inflamatórios (Pober *et al.*, 2007; Silva, 2014).

Neste trabalho será investigada a atividade anti-inflamatória do extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB) e frações acetato de etila, hexânica e aquosa da coleta 1 e a isoflavona (4) e a rutina (5) isoladas desta coleta. Os testes foram realizados utilizando um modelo de pleurisia induzida por carragenina, modelo que apresenta uma resposta inflamatória com predomínio de neutrófilos. Inicialmente foi avaliada a primeira fase da resposta inflamatória. Esta fase ocorre após 4 horas depois da administração de carragenina na cavidade pleural e onde é observado o recrutamento de neutrófilos. O extrato bruto reduziu

significativamente a migração de leucócitos nas doses de 100 ($30,2 \pm 3,8$) e 200 mg/kg ($45,7 \pm 4,7$) (**Figura 38A**).

A redução observada se deve a capacidade do extrato em diminuir a redução de neutrófilos observado para as doses de 50, 100 e 200 mg/kg (% inibição: 50 mg/kg: $27,2 \pm 5,4$; 100 mg/kg: $39,8 \pm 3,7$ e 200 mg/kg: $58,9 \pm 4,7$) ($p < 0,001$) (**Figura 38, A e B**). As frações hexânica, acetato de etila e aquosa apresentaram melhores resultados que o extrato bruto, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg. Esta redução deve-se à redução da migração de neutrófilos nas doses testadas (25, 50 e 100 mg/kg) como pode ser observado nas **Figuras 39-41**. Foi determinado também o grau de exsudação, onde o extrato bruto nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente a exsudação na cavidade pleural, comparada com o controle positivo (% de inibição: 50 mg/kg: $35,3 \pm 7,8$; 100 mg/kg: $59,2 \pm 9,5$ e 200 mg/kg: $53,4 \pm 8,0$) ($p < 0,001$) (**Figura 38, C**).

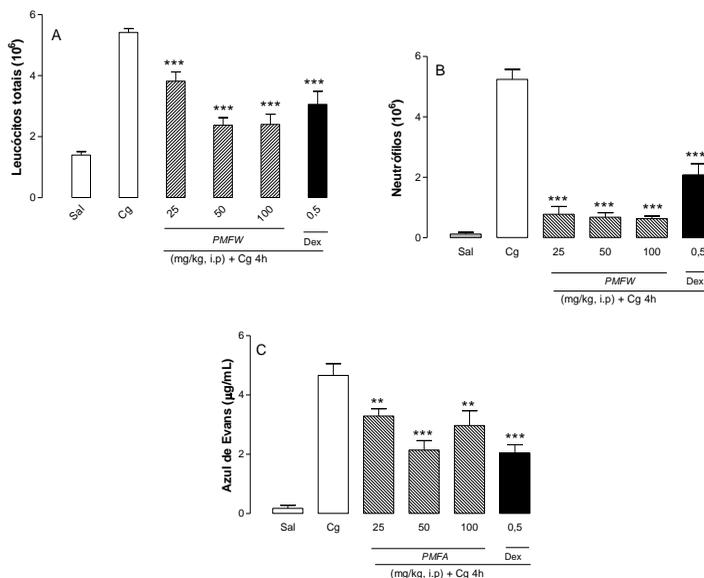
Figura 38. Efeito do extrato bruto (PMEB) sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



Efeito do extrato bruto de *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, $n = 5$ animais. $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

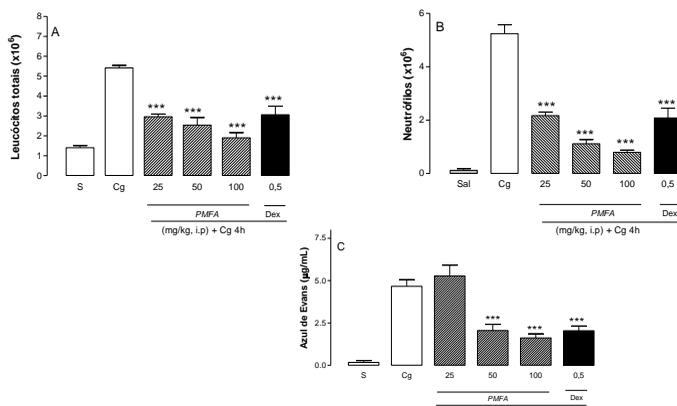
Além disso, a fração aquosa reduziu a exsudação em todas as doses testadas na cavidade pleural (% inibição 25 mg/kg: $32,8 \pm 5,0$; 50 mg/kg: $49,0 \pm 5,2$ e 100 mg/kg: $36,2 \pm 10,6$) ($p < 0,001$) (**Figura 39, C**).

Figura 39. Efeito da fração aquosa da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



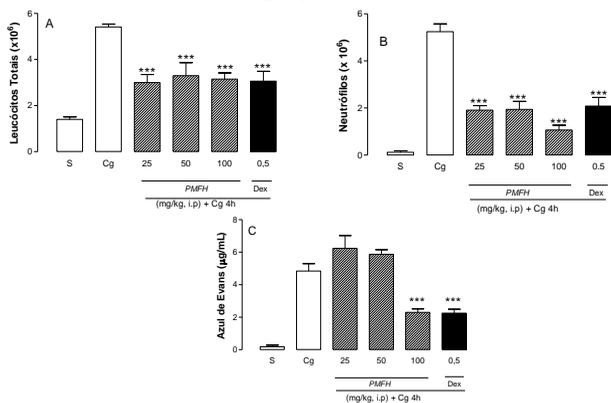
Efeito da fração aquosa da *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 40. Efeito da fração acetato de etila sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



Efeito da fração acetato de etila da *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

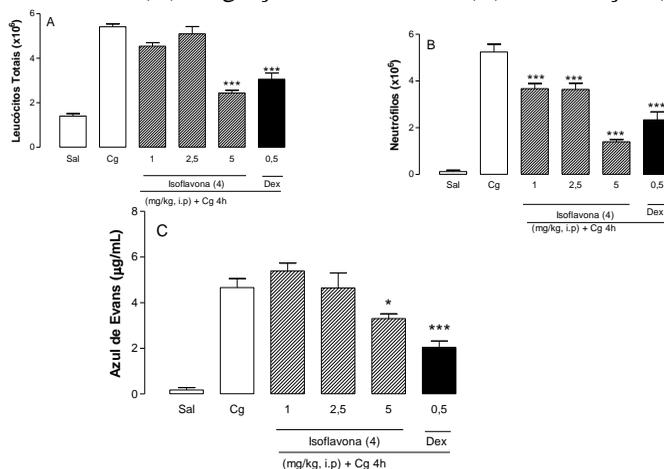
Figura 41. Efeito da fração hexano de *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



Efeito da fração hexano de *Polygala molluginifolia* administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, n = 5 animais. *** $p < 0,001$.

A isoflavona (4) isolada da fração acetato de etila e rutina (5) isolada da fração aquosa também foram avaliadas quanto a sua ação anti-inflamatória, com o objetivo de verificar se estes compostos são responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade do extrato bruto.

Figura 42. Efeito do composto (4) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



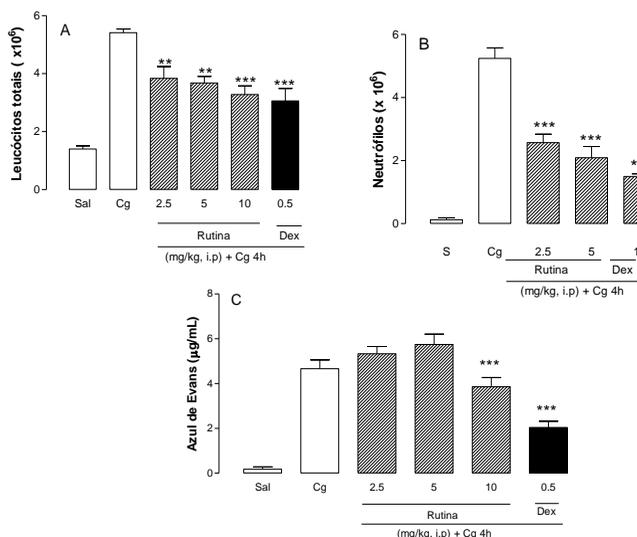
Efeito da Iso administrado 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas encontradas, n = 5 animais. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

O composto (4) reduziu significativamente o influxo de leucócitos para a cavidade pleural na dose de 5 mg/kg (% inibição: $55,0 \pm 2,2$) e curiosamente todas as doses testadas foram capazes de diminuir significativamente a migração de neutrófilos (% de inibição: 1 mg/kg: $29,9 \pm 4,2$; 2,5 mg/kg: $30,6 \pm 5,0$ e 5 mg/kg: $72,3 \pm 1,8$) ($p < 0,001$) (Figura 42, A e B). Já a exsudação na cavidade pleural, também só foi reduzida na dose de 5 mg/kg (% inibição: $29,2 \pm 4,5$) ($p < 0,05$) (Figura 42, C).

O composto (5) (Rutina) reduziu significativamente a migração de leucócitos nas doses de 2,5, 5 e 10 mg/kg (% inibição: 2,5 mg/kg: $29,1 \pm 7,4$; 5 mg/kg: $32,0 \pm 4,1$ e 10 mg/kg: $39,4 \pm 5,5$), redução também devida a inibição da migração de neutrófilos que ocorreu em

todas as doses testadas (2,5 mg/kg: $51,0 \pm 34,7$; 5 mg/kg: $60,1 \pm 6,7$ e 10 mg/kg: $71,5 \pm 1,5$) ($p < 0,001$) (**Figura 43, A e B**). Além disso, verificou-se que o exsudato formado na cavidade pleural diminuiu apenas quando os animais foram pré-tratados na dose de 10 mg/kg (% inibição: 47.3 ± 5.5) ($p < 0,01$) (**Figura 43, C**).

Figura 43. Efeito do composto (5) (Rutina) da *Polygala molluginifolia* sobre o total de leucócitos (A), migração de neutrófilos (B) e exsudação (C).



Efeito da Rutina administrada 0,5 h antes da indução da pleurisia pela carragenina (1 %) em camundongos. S = animais tratados somente com salina estéril (i.p.), Cg = animais tratados somente com carragenina 1% (i.pl.), Dex = animais previamente tratados com dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.; 0,5 h). As colunas verticais representam a média \pm e.p.m e os asteriscos as diferenças estatísticas, n = 5 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Com estes dados observa-se que os melhores resultados de diminuição de migração de neutrófilos, leucócitos e grau de exsudação foram obtidos com as doses do extrato bruto (100 mg/kg), da fração aquosa (50 mg/kg), da fração acetato de etila (50 mg/kg), da fração hexano (100 mg/kg) e dos compostos isolados (4) (5 mg/kg) e Rutina (5) (10 mg/kg).

Além disso, observa-se que os compostos isolados são responsáveis pelo menos em parte pela atividade anti-inflamatória do extrato. Estes dados estão de acordo com relatos da literatura que

sugerem que compostos flavonoidicos são muito estudados em relação a sua atividade anti-inflamatória, pois estes compostos são capazes de inibir a expressão e liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios (Gonzalez-Gallego *et al.*, 2007; Marzocchella *et al.*, 2011).

5.2.8 Determinação da atividade Antinociceptiva

A dor pós-operatória é uma das formas mais comuns de dor aguda. Aproximadamente 70-80% dos pacientes experimentam dor aguda depois de realizar cirurgias, o que afeta significativamente sua qualidade de vida (Apfelbaum *et al.*, 2003). Os opióides e anti-inflamatórios não estereoidais têm sido usados com o intuito de reduzir a dor pós-operatória, no entanto estes agentes tem eficácia limitada e pronunciados efeitos colaterais (Apfelbaum *et al.*, 2003; Kehlet *et al.*, 2003).

As plantas medicinais são ricas fontes de novos compostos bioativos, especialmente no tratamento de dor e inflamação (Sen *et al.*, 2015).

Vários estudos tem mostrado que espécies do gênero *Polygala* tem um significativo valor etnofarmacológico e várias destas espécies mostraram atividade antinociceptiva (De Campos *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 2012; Ribas *et al.*, 2008).

Com base nestes dados e visando complementar os resultados de atividade anti-inflamatória, resolveu-se investigar também a atividade antinociceptiva de *P. molluginifolia*. Para isso foram realizados testes com o extrato bruto de *P. molluginifolia* (PMEB) da coleta 2 e a isoflavona (4) isolada desta coleta.

5.2.8.1 Avaliação da atividade locomotora

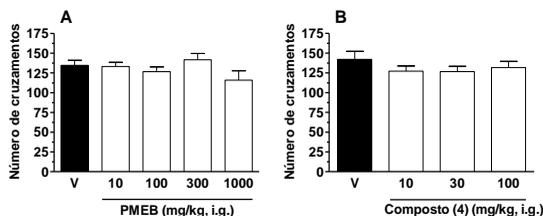
O primeiro teste que foi feito para a avaliação da atividade antinociceptiva foi o teste de campo aberto a fim de verificar um possível resultado falso-positivo na analgesia (Tsuda *et al.*, 1996).

Na avaliação da atividade locomotora do extrato bruto (PMEB) (10-1000 mg/kg) e isoflavona (4) (10-100 mg/kg) pela aplicação intragástrica via gavagem (i.g) não foi verificado alteração na atividade locomotora espontânea, em todas as doses testadas, quando comparadas ao grupo controle (veículo), durante o período de 6 minutos de observação sugerindo que os animais permanecem com as atividades sensoras e motoras normais (Fig. 44, $P > 0,05$).

Esses resultados mostram que o extrato bruto e isoflavona (4) não afetam a atividade locomotora espontânea, excluindo a possibilidade de

efeitos não específicos sobre o efeito antinociceptivo de *P. molluginifolia*, como sedação ou disfunção motora.

Figura 44. Avaliação da atividade locomotora do extrato bruto (PMEB) e isoflavona isolada (4) de *P. molluginifolia*.



5.8.2.2 Avaliação do efeito da administração aguda do extrato bruto ou isoflavona (4) na redução da nociceção induzida por formalina

O teste de formalina é um clássico modelo animal para estudar preliminarmente a ação analgésica e anti-inflamatória (Hunnskaar *et al.*, 1987; Hunnskaar *et al.*, 1985).

A injeção de formalina na pata traseira induz uma resposta de dor bifásica. A primeira fase é neurogênica (F1) e a segunda fase é inflamatória. Assim, a primeira fase pode ser suprimida pela administração de analgésicos com efeito central, como a morfina, enquanto que a segunda fase responde a várias drogas analgésicas clinicamente estabelecidas, como opióides e anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (Hunnskaar *et al.*, 1987).

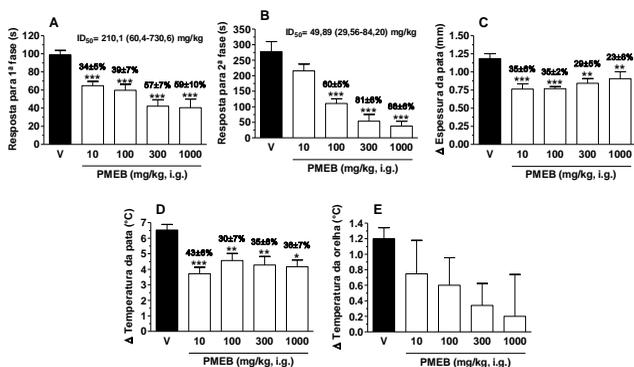
Além disso, estudos mostraram que os antagonistas TRPV1 e TRPA1 também são capazes de inibir a dor induzida pela formalina (Kanai *et al.*, 2006; Macpherson *et al.*, 2007). Em outro estudo (Endres-Becker *et al.*, 2007) foi demonstrado que a ativação do receptor μ -opioide pode inibir a atividade TRPV1 via proteínas $G_{i/o}$ e pela rota cAMP na dor inflamatória.

Os resultados mostrados na **Figura 45A-B** e **Figura 46A-B** revelam que o extrato bruto e a isoflavona isolada (4) administrada intragastricamente causam uma significativa inibição de ambas as fases neurogênica e inflamatória da nociceção induzida por formalina.

Os valores calculados de DI_{50} do extrato bruto para a primeira e segunda fase são 210,1 (60,4-730,6) mg/kg e 49,89 (29,56-84,20) mg/kg, respectivamente. As inibições do extrato bruto observadas para

a primeira fase são $34 \pm 5\%$, $39 \pm 7\%$, $57 \pm 7\%$ e $59 \pm 10\%$ a doses de 10, 100, 300 e 1000 mg/kg, respectivamente (**Figura 45A**) e, para a segunda fase, $60 \pm 5\%$, $81 \pm 8\%$ e $86 \pm 6\%$ a doses de 100, 300 e 1000 mg/kg, respectivamente (**Figura 45B**).

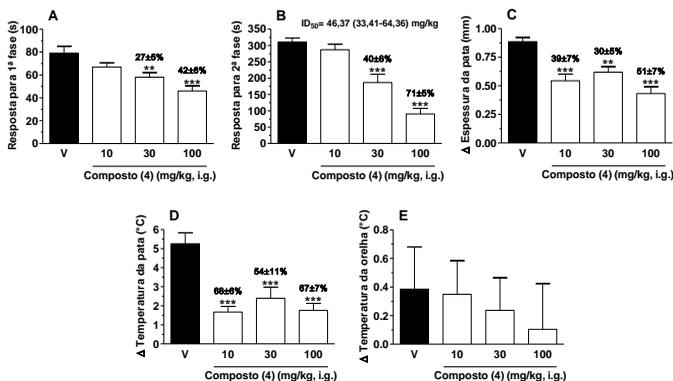
Figura 45. Avaliação do extrato bruto na redução da nocicepção induzida pela formalina.



As inibições para a isoflavona observadas para a primeira fase foram $27 \pm 5\%$ e $42 \pm 6\%$ (**Figura 46A**) e, para a segunda fase, $40 \pm 8\%$ e $71 \pm 5\%$ (**Figura 46B**), ambas as doses de 30 e 100 mg/kg, respectivamente. O valor de DI_{50} da isoflavona para a segunda fase foi de 46,37 (33,41-64,36) mg/kg. Desta forma, os resultados mostram claramente a habilidade do extrato bruto e a isoflavona (**4**) em inibir ambas as fases do teste da formalina, levando-nos a pensar na possibilidade do envolvimento de receptores opióides vaniloide 1 e anquirina 1 no efeito analgésico/anti-inflamatório de *P. molluginifolia*.

Além disso, o extrato bruto e isoflavona também produzem efeito antiedematogênico, em todas as doses testadas, quando comparado ao grupo controle. O extrato bruto (10-1000 mg/kg, i.g.) reduziu o edema da pata causado pela injeção intraplantar de formalina, com inibições de $35 \pm 6\%$, $35 \pm 2\%$, $29 \pm 5\%$ e $23 \pm 8\%$, respectivamente (**Figura 45C**). A isoflavona (10-100 mg/kg, i.g.) reduziu o edema com inibições de $39 \pm 7\%$, $30 \pm 5\%$ e $51 \pm 7\%$, respectivamente (**Figura 46C**).

Figura 46. Avaliação da isoflavona (4) na redução da nocicepção induzida pela formalina.



O extrato bruto e a isoflavona diminuíram o aumento da temperatura causado pela injeção intraplantar de formalina, em todas as doses testadas, quando comparadas ao grupo controle.

O extrato bruto (10-1000 mg/kg, i.g.) reduziu a hiperemia com inibições de $43 \pm 6\%$, $30 \pm 7\%$, $35 \pm 8\%$ e $36 \pm 7\%$, respectivamente (Figura 45D) e a isoflavona (10-100 mg/kg, i.g.) reduziu a hiperemia com inibições de $68 \pm 6\%$, $54 \pm 11\%$ e $67 \pm 7\%$, respectivamente (Figura 46D). No entanto, o extrato bruto e a isoflavona não promoveram mudanças significativas na temperatura corporal, quando comparado ao grupo controle (Figuras 45E e 46E).

5.8.2.3 Alodinia mecânica

No presente trabalho foi utilizado um modelo reportado na literatura (Pogatzki *et al.*, 2003) de dor pós-operatória em humanos que pode ser mimetizado por uma cirurgia de incisão na pata em camundongos, modelo que foi utilizado no presente trabalho a fim de averiguar se o extrato bruto reduz a alodinia mecânica, que é a dor induzida por um estímulo mecânico.

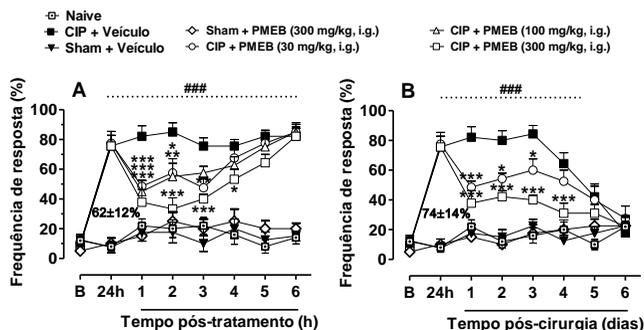
Os resultados da Figura 47 mostram que o extrato bruto (30, 100 e 300 mg/kg, i.g.) causa uma significativa inibição da alodinia induzido por incisão plantar quando comparados ao grupo controle.

O efeito foi mantido por 3 e 4 horas depois do tratamento com doses de 30 e 300 mg/kg, respectivamente. Porém, o efeito da dose de 100 mg/kg foi mantido por 2 h. As inibições observadas para a primeira

hora de tratamento foram de $56 \pm 7\%$, $62 \pm 12\%$ e $74 \pm 14\%$ a doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente (Fig. 47A).

Quando administradas diariamente por 6 dias, o extrato bruto (30 e 300 mg/kg, i.g.) reduziu significativamente a alodinia mecânica causada pela incisão plantar com inibições entre $27 \pm 17\%$ e $56 \pm 7\%$ a dose de 30 mg/kg e $56 \pm 6\%$ a $75 \pm 15\%$ a dose de 300 mg/kg (Fig. 47B).

Figura 47. Avaliação da alodinia mecânica do extrato bruto de *P. molluginifolia*.



Além disso, o efeito antialodínico do extrato bruto de *Polygala molluginifolia* durou até 4 horas após o tratamento agudo e não produziu efeito cumulativo, pois o extrato manteve sua eficiência quando administrado repetidamente.

5.8.2.4 Hiperalgesia térmica

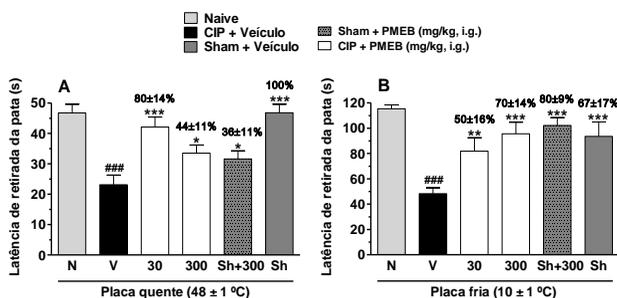
Após realizar a cirurgia de incisão da pata, os camundongos que apresentavam dor foram submetidos a testes usando modelos de placa quente e fria, onde os animais que sentem o estímulo térmico retiram ou lambem a pata. Observou-se que a cirurgia por incisão plantar induziu uma diminuição na latência de retirada da pata durante o estímulo térmico (quente e frio) em comparação aos camundongos que não foram submetidos à cirurgia (Figura 48). O pré-tratamento intragástrico com o extrato bruto (30 e 300 mg/kg) reduziu a hiperalgesia térmica induzida pela incisão, aumentando a latência de retirada da pata de $80 \pm 14\%$ e $44 \pm 11\%$ para as avaliações o calor (Figura 48) e $50 \pm 16\%$ e $70 \pm 14\%$ para o frio (Figura 48), respectivamente.

O modelo de placa quente é um modelo altamente sensível para drogas centralmente ativas, como a morfina e seus derivados (Kayan *et al.*, 1971). Como o extrato bruto de *P. molluginifolia* inibiu a

hiperalgesia térmica neste teste, constata-se uma possível capacidade do extrato em ativar receptores opióides centrais.

Além disso, a literatura mostra que os canais TRPV1 e TRPA1 são sensíveis a temperatura, sendo ativados por calor ($\geq 43\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou frio ($\leq 17\text{ }^{\circ}\text{C}$), respectivamente (Caterina *et al.*, 1997; Story *et al.*, 2003). Desta forma, a inibição de hiperalgesia térmica (48°C e 10°C) observada em nossos resultados de dor pós-operatória, também sugere que o extrato bruto efetivamente inibe os canais TRPV1 e TRPA1. Todos estes dados indicam que *P. molluginifolia* tem um grande potencial terapêutico no tratamento pós-operatório.

Figura 48. Avaliação do efeito do extrato bruto sobre a hiperalgesia térmica.



5.2.8.5 Avaliação do extrato bruto e isoflavona (4) na nociceção induzida por capsaicina e cinamaldeído

Os canais receptores de potencial transitório têm sido alvo de crescentes estudos, pois muitas vezes a hipersensitividade a dor resulta da expressão/ou atividade dos canais TRPV1 ou TRPA1 (Cortright *et al.*, 2007; Julius, 2013). Esses canais podem ser ativados por vários produtos naturais como capsaicina, que ativa o canal TRPV1 (Caterina *et al.*, 2000; Holzer, 1991) e o cinamaldeído, que ativa o canal TRPA1 (Bandell *et al.*, 2004).

Desta forma, no presente estudo foi avaliado também o envolvimento periférico dos receptores de potencial transitório (TRP) na atividade antinociceptiva (Figura 49 e 50) do extrato bruto e isoflavona. O tratamento com o extrato bruto e a isoflavona inibiu a resposta nociceptiva (λ) induzida pela injeção intraplantar de capsaicina e cinamaldeído (ativadores TRPV1 e TRPA1, respectivamente) quando comparado ao grupo controle.

Os valores de inibição para a injeção da pata para o teste de

capsaicina foram de $28 \pm 5\%$, $31 \pm 6\%$ e $39 \pm 7\%$ com pré-tratamento com o extrato nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente (**Figura 49A**) e $36 \pm 7\%$ e $50 \pm 4\%$ com tratamento com a isoflavona a doses de 30 e 100 mg/kg, respectivamente (**Figura 50A**).

Além disso, os valores de inibição para o teste de inibição da pata com injeção de cinamaldeído foram $30 \pm 7\%$, $41 \pm 7\%$ e $48 \pm 4\%$ com pré-tratamento com extrato bruto nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente (**Fig. 49B**) e $45 \pm 3\%$ e $53 \pm 2\%$ com tratamento com a isoflavona a doses de 30 e 100 mg/kg, respectivamente (**Figura 50B**).

Figura 49. Efeito do extrato bruto (PMEB) sob a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.

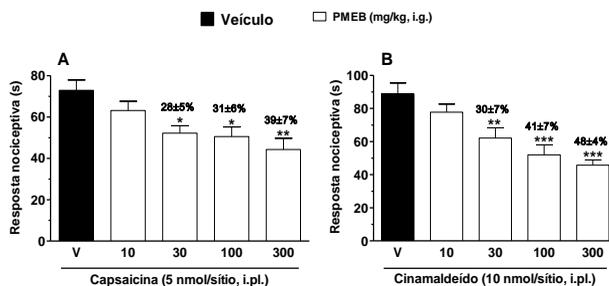
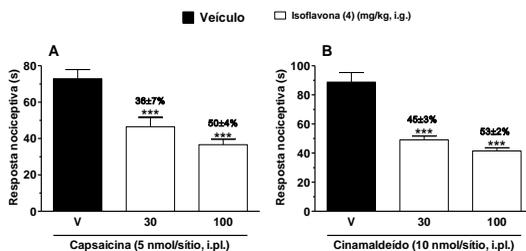


Figura 50. Efeito da isoflavona (4) sob a nocicepção induzida por capsaicina e cinamaldeído.



5.2.8.6 Efeito do extrato bruto e isoflavona (4) na nocicepção central induzida por capsaicina e cinamaldeído

Além do envolvimento periférico como anteriormente descrito foi estudado também o envolvimento central dos receptores de potencial transitório (TRP) na atividade antinociceptiva do extrato bruto e isoflavona isolada (**Figura 51 e 52**).

O tratamento com o extrato bruto e isoflavona (**4**) inibiram a resposta nociceptiva (lambida/mordida) induzido pela injeção intratecal de capsaicina e cinamaldeído (ativadores TRPV1 e TRPA1, respectivamente) quando comparados ao grupo controle. Os valores de inibição para o teste da capsaicina espinal foram de $29 \pm 10\%$ e $36 \pm 5\%$ com pré-tratamento do extrato bruto a doses de 100 e 300 mg/kg, respectivamente (**Figura 51A**) e $32 \pm 11\%$ e $35 \pm 6\%$ com pré-tratamento com a isoflavona com doses de 30 e 100 mg/kg, respectivamente (**Figura 52A**). Além disso, o extrato bruto e a isoflavona foram capazes de inibir completamente a dor causada pela injeção intratecal de cinamaldeído, em todas as doses testadas. Esses resultados mostram o forte envolvimento dos canais no efeito analgésico do extrato bruto e a isoflavona (**Fig. 51B e 52B**, respectivamente). Similarmente, o a cânfora utilizada como controle positivo (7,6 mg/kg, s.c.) produziu uma significativa inibição de $92 \pm 7\%$ e $90 \pm 11\%$ (**Fig. 51B e 52B**, respectivamente).

Assim, de acordo com os resultados obtidos foi observado um importante envolvimento de *P. molluginifolia* a nível central e periférico na inibição dos canais TRPV1 e TRPA1, produzindo analgesia. Também se observa total envolvimento do PMEB e isoflavona (**4**) no canal TRPA1, com inibição de 100%.

Figura 51. Efeito do extrato bruto (PMEB) sob a nocicepção central induzida por capsaicina e cinamaldeído.

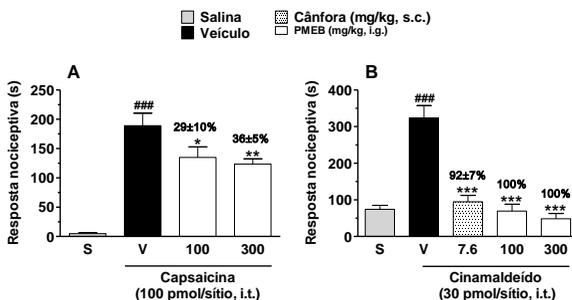
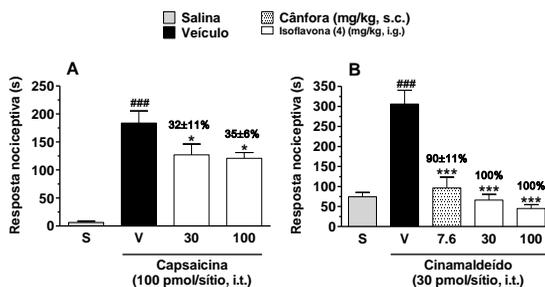


Figura 52. Efeito da isoflavona (4) sob a nocicepção central induzida por capsaicina e cinamaldeído.



5.2.8.7 Envolvimento de receptores opióides na ação antinociceptiva sistemática do extrato bruto (PMEB) e isoflavona (4)

Atualmente os opióides são abundantemente utilizados para tratar a dor moderada e severa. No entanto, o interrompimento abrupto da aplicação prolongada de opióides induz uma síndrome de abstinência, incluindo a hiperalgesia em animais e humanos (Angst *et al.*, 2006). A hipótese opióide foi preliminarmente investigada no intuito de reverter à analgesia depois da administração de naloxona (antagonista opióide) (Hill, 1981).

Neste estudo foi verificado o comportamento dos receptores opióides na ação do extrato bruto e isoflavona (4) e para isso foi utilizada a naloxona (um antagonista não-seletivo de receptores opióides). A antinocicepção induzida por morfina (um receptor opióide não-seletivo, usado como controle positivo) foi revertido com pré-tratamento com naloxona (**Figura 53A**). Similarmente, como mostrado na **Figura 53**, a administração de naloxona (1 mg/kg, i.p.) antagonizou significativamente o efeito antinociceptivo da morfina, do extrato bruto e isoflavona quando comparada ao grupo controle, após a injeção intraplantar de cinamaldeído. Além disso, as inibições observadas no teste de cinamaldeído com morfina (2,5 mg/kg, s.c.), extrato bruto (300 mg/kg, i.g.) e isoflavona (4) (100 mg/kg, i.g.) foram $59 \pm 8\%$, $51 \pm 3\%$ e $47 \pm 4\%$ (**Figura 53A, B e C**, respectivamente).

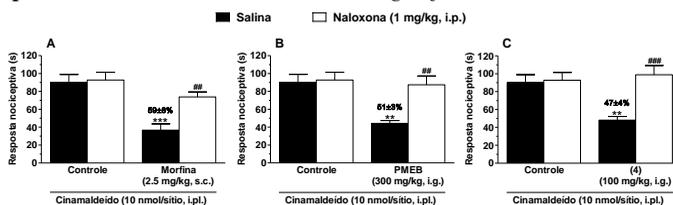
Estes resultados mostram que a pré-administração da naloxona foi capaz de reverter a antinocicepção induzida pelo extrato e isoflavona, demonstrando claramente um importante envolvimento de *P. molluginifolia* na ativação dos receptores opióides endógenos periféricos

a fim de produzir analgesia sem causar efeitos colaterais centrais, que são típicos para agonistas opióides (Benyamin *et al.*, 2008). Além disso, os resultados mostram uma possível interação entre os receptores opióides e o canal TRPA1, pois nos animais pré-tratados com a morfina foi observado que houve inibição da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de cinamaldeído (ativador TRPA1) e o pré-tratamento com naloxona reverte este efeito.

Assim, nós podemos sugerir que a ação de *P. molluginifolia* nas vias central e periférica ou central, é dependente de ativação de um sistema de ativação de um sistema opióide e inibição de canais TRPV1 / TRPA1.

Esses dados sugerem o potencial analgésico de *P. molluginifolia* que pode ser um novo alvo terapêutico no tratamento da dor.

Figura 53. Envolvimento dos receptores opióides no efeito antinociceptivo do extrato bruto de *P. molluginifolia*.



5.2.9 Avaliação da atividade anti-hiperglicêmica

A Diabetes é uma doença caracterizada por uma hiperglicemia resultante de alterações na secreção de insulina, na ação da insulina ou ambos os casos. A hiperglicemia crônica está associada a falhas nos olhos, nervos, coração e vasos sanguíneos. Agentes hipoglicêmicos orais como sulfonil uréias e biguanidas têm sido usados no tratamento desta doença. No entanto, estes compostos podem ser tóxicos ao fígado, promover acidose láctica e diarreia (Harini *et al.*, 2012).

Estudos mostram que as isoflavonas como a genisteína presente na soja mostraram efeitos reguladores da secreção de insulina e alguns casos observou-se que podem aumentar significativamente a produção de insulina. No entanto, os mecanismos pelos quais as isoflavonas exercem estes efeitos ainda não são bem elucidados (Esteves *et al.*, 2001; Jonas *et al.*, 1995).

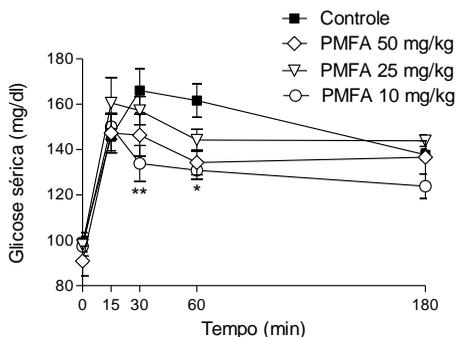
Levando em conta estes fatores foi feita a análise do efeito anti-hiperglicêmico das isoflavonas (1) e (4) e a fração acetato de etila da

coleta 2 de *P. molluginifolia*, fração em que os compostos foram isolados.

5.2.9.1 Efeito da fração acetato de etila na curva de tolerância oral à glicose e no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

Inicialmente foi investigada o efeito da fração acetato de etila (PMFA) da coleta 2 na redução da glicemia. A **Figura 54** apresenta a significativa redução na glicemia (em torno de 20%) obtida com o tratamento de 10 mg/kg da fração acetato de etila nos tempos 30 e 60 min, quando comparado com o controle. Como PMFA mostrou redução da glicemia investigaram-se possíveis mecanismos que podem estar relacionados com a atividade anti-hiperglicêmica desta fração. Para isso foi determinado o conteúdo de glicogênio hepático e muscular e a atividade de dissacaridasas intestinais.

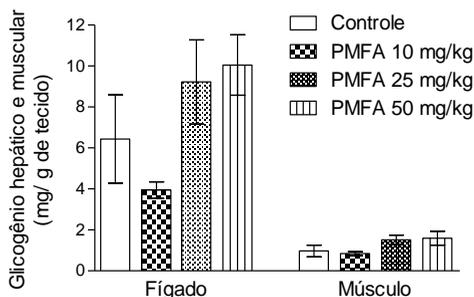
Figura 54. Efeito agudo de PMFA na curva de tolerância a glicose.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento.
* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ comparado ao grupo controle.

O conteúdo de glicogênio hepático e muscular foi avaliado no intuito de verificar se a fração acetato de etila atua na captação de glicose do sangue para estes tecidos. Como observado na **Figura 55**, não ocorreram alterações significativas no conteúdo de glicogênio hepático e muscular nas concentrações e tempos avaliados, quando comparado com o grupo controle.

Figura 55. Efeito agudo da fração acetato de etila no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.

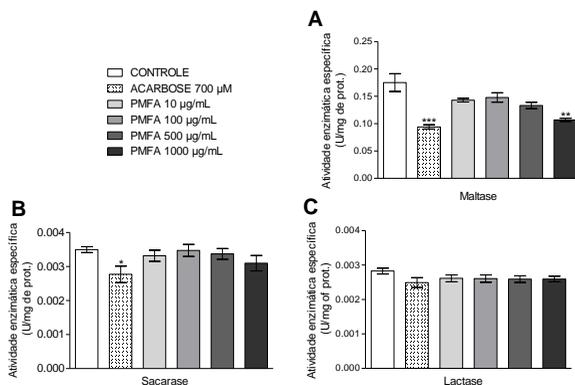


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento.

5.2.9.2 Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridasas intestinais

Outro possível mecanismo que pode estar relacionado à redução de glicose observada é a inibição de dissacaridasas intestinais como a maltase, sacarase e lactase, uma vez que estas enzimas estão localizadas nas células intestinais e hidrolizam dissacarídeos em monossacarídeos. Desta forma, se a fração acetato de etila inibe estas enzimas, ocorre à diminuição da absorção de glicose para o sangue.

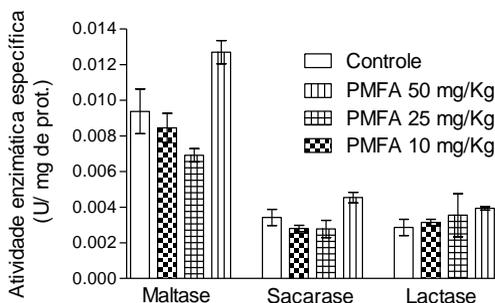
Figura 56. Efeito da fração acetato de etila na atividade de dissacaridasas intestinais *in vitro*.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5. * $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

Os efeitos observados após incubação *in vitro* (Fig. 56) mostraram redução na atividade da maltase (A) quando comparado com o controle. Porém, nenhuma alteração foi observada na atividade da sacarase e lactase nos testes realizados. Contrariamente, não foi observado nenhum efeito após tratamento *in vivo* na atividade de maltase, sacarase e lactase, após 3 h.

Figura 57. Efeito agudo da fração acetato de etila na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo*.

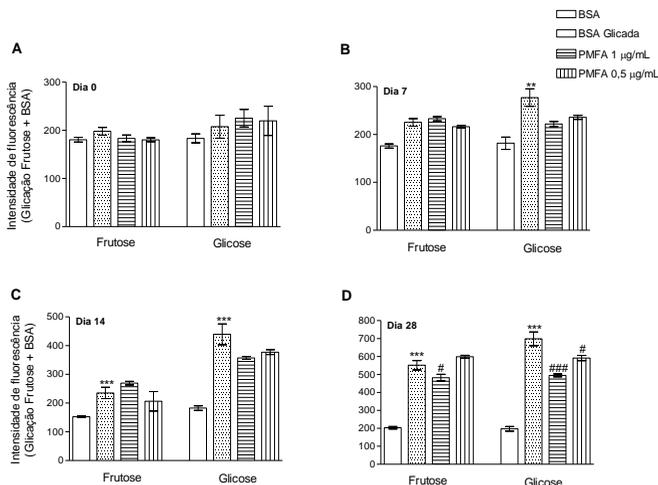


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 em duplicata para o tratamento.

5.2.9.3 Efeito da fração acetato de etila na formação de AGES

Outra importante ação antidiabética, envolve a redução da formação de dos produtos finais de glicação avançada (AGES), também investigada através de ensaio *in vitro* (Figura 58). No momento antecedente à incubação (dia 0), somente se observa a fluorescência intrínseca da albumina, sem diferenças estatísticas entre os grupos (Fig. 58 A). A fração PMFA não apresentou fluorescência intrínseca.

Figura 58. Efeito da fração acetato de etila na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; $n = 6$. *** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle; # $p \leq 0,05$; ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

Como esperado, após 7 dias de incubação da albumina com glicose, se observou o aumento significativo da formação de AGEs, através do aumento da fluorescência (**Fig. 58 B**). Este efeito com a frutose somente foi significativo após 14 dias (**Fig. 58 C**). Os resultados obtidos para o ensaio de glicação apontam que a fração acetato de etila reduziu significativamente a glicação na presença de glicose nas concentrações de 0,5 e 1 $\mu\text{g/mL}$ após 28 dias de incubação. Quando incubada com frutose, apenas a dose de 1 $\mu\text{g/mL}$ reduziu significativamente a fluorescência e portanto, a formação de AGEs (**Fig. 58 D**).

5.2.9.4 Efeito agudo da isoflavona (1) na curva de tolerância oral à glicose

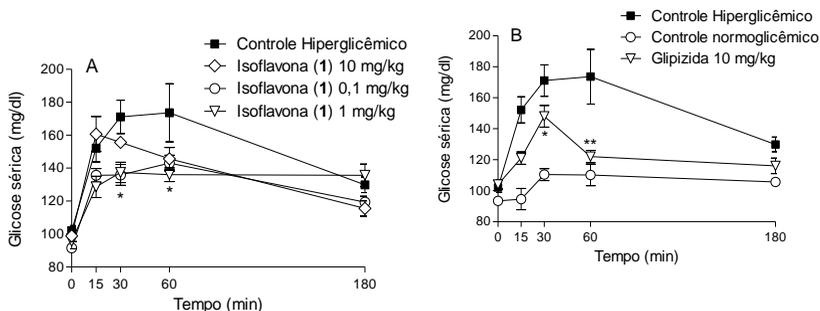
Como esperado, se observou um aumento da glicemia do grupo controle após a sobrecarga de glicose. Quando comparado com o grupo controle, (**Fig 59 A**), a isoflavona (1) apresentou redução significativa de 20% na glicemia com a dose 1 mg/kg.

Este efeito foi observado após 30 min da sobrecarga de glicose e se manteve até os 60 min. Ainda, a dose de 0,1 mg/kg reduziu a glicemia nas mesmas proporções, no tempo 30 min, porém, este efeito não persistiu após este tempo. Contrariamente, a dose de 10 mg/kg não apresentou efeitos significativos na redução da glicemia, quando comparado com o controle.

A **Figura 59 B** apresenta os efeitos da glipizida na redução da glicemia, utilizada como controle positivo. Esta reduziu significativamente a glicemia nos tempos 30 e 60 min. Ainda, o controle normoglicêmico, que recebeu apenas o veículo (etanol 1%), não apresentou alterações no perfil glicêmico durante os tempos avaliados.

Diante dos resultados, a concentração de 1 mg/kg do composto (1) foi escolhida para estudos subsequentes, por apresentar um efeito na redução da glicemia que se manteve dos 30 aos 60 min após sobrecarga de glicose.

Figura 59. Efeito agudo da isoflavona (1) na curva de tolerância a glicose.

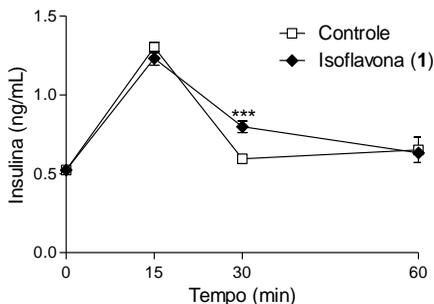


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 5 para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ comparado ao grupo controle hiperglicêmico.

5.2.9.5 Efeito do composto (1) na secreção de insulina

A **Figura 60** apresenta o efeito do composto (1) na concentração sérica de insulina. Como pode ser observado, este composto aumentou a insulina sérica quando comparado com o controle após 30 min da sobrecarga de glicose. No tempo 15 min e após 30 min, a secreção permaneceu igual ao controle.

Figura 60. Efeito do composto (1) na secreção de insulina.

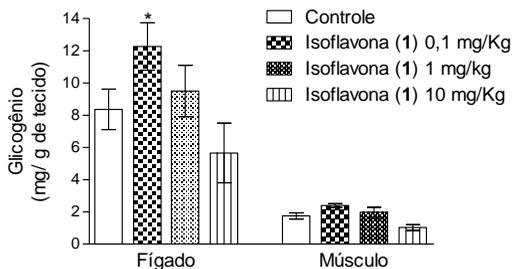


Os valores são expressos como média \pm E.P.M.; n= 3 para cada tratamento.
 *** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle.

5.2.9.6 Efeito agudo da isoflavona (1) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

Pode ser observado na **Figura 61** que a isoflavona (1) aumentou significativamente o conteúdo de glicogênio hepático, após 3,5 h de tratamento, na concentração de 0,1 mg/kg. As concentrações de 1 e 10 mg/kg não produziram efeitos significativos no conteúdo de glicogênio hepático, assim como para o glicogênio muscular em todas as concentrações avaliadas.

Figura 61. Efeito agudo da isoflavona (**1**) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.



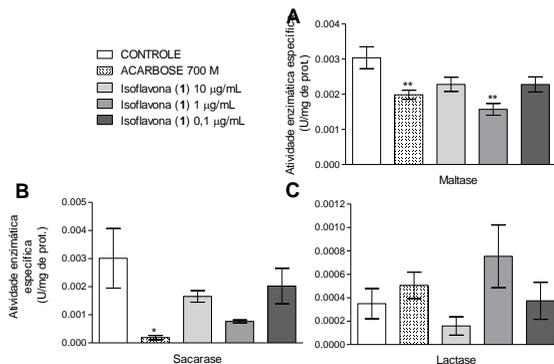
Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n = 5. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

5.2.9.7 Efeito da Isoflavona (**1**) na atividade de dissacaridasas intestinais *in vivo* e *in vitro*

A Isoflavona (**1**) reduziu significativamente a atividade de maltase em modelo experimental *in vitro* (**Figura 62 A**) na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$. Estatisticamente, essa redução foi semelhante à acarbose, representando em valores percentuais 47 e 38%, respectivamente.

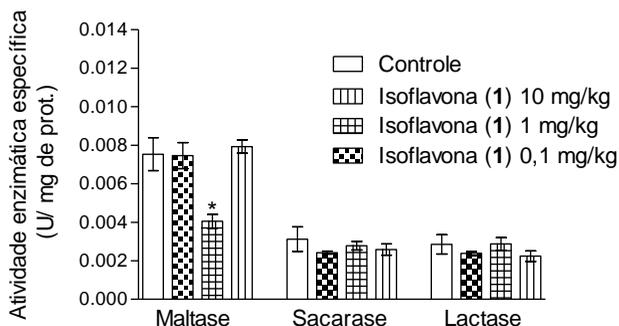
Diferentemente da acarbose, o composto (**1**) não afetou a atividade de sacarase (**Fig. 62 B**). Também não foram observadas alterações na atividade de lactase (**Fig. 62 C**).

Figura 62. Efeito da Isoflavona (**1**) na atividade de dissacaridasas intestinais *in vitro*.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n = 5 para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

Figura 63. Efeito da Isoflavona (1) na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo*.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n=5$ para cada tratamento.
 * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

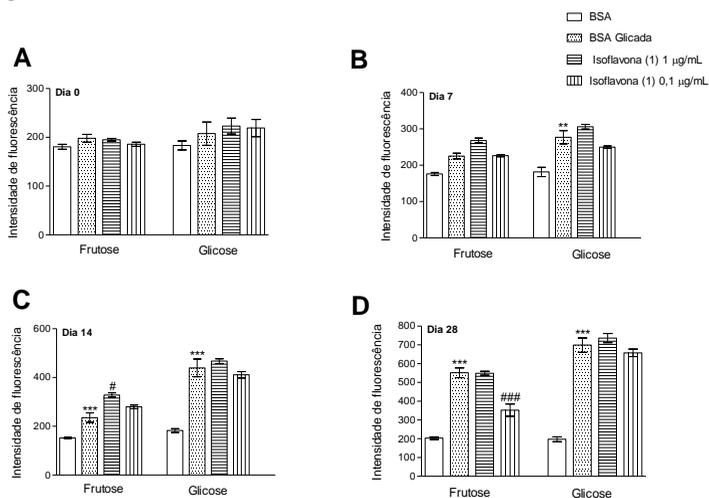
O efeito inibitório de Isoflavona (1) na atividade de maltase foi reproduzido também *in vivo* (Fig. 63). Na concentração de 1 mg/kg, a isoflavona (1) reduziu significativamente (45%) a atividade de maltase quando comparado com o controle. Contrariamente, as demais doses avaliadas não alteraram a atividade das dissacaridases.

5.2.9.8 Efeito inibitório da Isoflavona (1) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose

Como pode ser observado na Figura 64, no dia 0 não há diferença entre os grupos (Figura 64 A), comparado ao grupo BSA. Porém, após 7 dias de incubação, se observa um aumento significativo da fluorescência com glicose, sem alterações para os demais grupos (Figura 64 B).

Após 14 dias, ocorreu aumento tanto de glicose quanto de frutose. Ainda, com 14 dias de incubação a isoflavona (1) 1 $\mu\text{g/mL}$ aumentou a glicação com frutose. Este efeito foi suprimido após 28 dias nesta dose e foi significativamente menor na dose de 0,1 $\mu\text{g/mL}$.

Figura 64. Efeito da Isoflavona (1) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

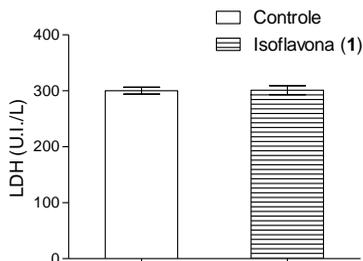


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n = 5$. *** $P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. # $p \leq 0,05$; ### $p \leq 0,001$ comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

5.2.9.9 Efeito da Isoflavona (1) na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH)

A medida do LDH sérico foi utilizada como indicador de toxicidade do composto. Como observado na **Figura 65**, a isoflavona (1) não alterou a atividade de LDH após 3 h de tratamento.

Figura 65. Efeito da Isoflavona (1) na concentração de LDH.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n = 5$.

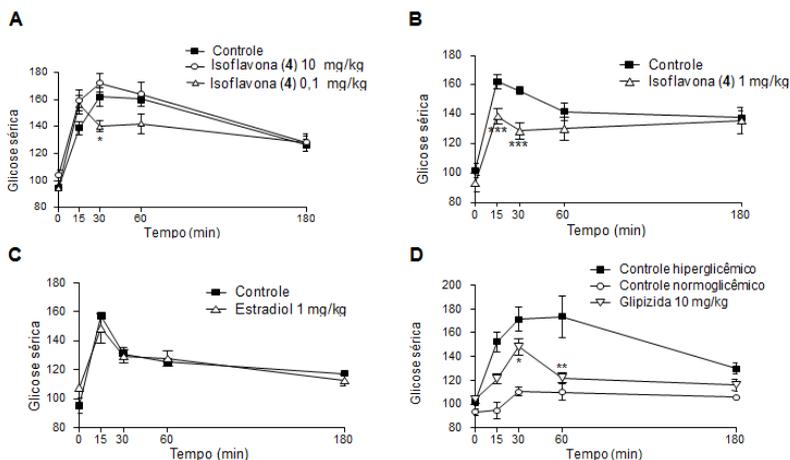
5.2.9.10 Efeito agudo da isoflavona (4) e estradiol na curva de tolerância oral à glicose

A **Figura 66** apresenta a curva de tolerância oral a glicose, com a isoflavona (4) e o estradiol. Como pode ser observado na **Figura 66 A**, a isoflavona (4), na concentração de 0,1 mg/kg reduziu em média 14% da glicemia após 30 min da sobrecarga de glicose. No entanto, quando 10 mg/kg de isoflavona (4) foram utilizados este efeito não foi observado.

Entretanto, a maior eficiência na redução da glicemia foi observada com a dose de 1 mg/kg, que reduziu a glicemia em 17% e manteve este efeito até 30 min da sobrecarga de glicose (**Fig. 66 B**). Devido a maior eficiência e manutenção do efeito, a dose de 1 mg/kg do composto (4) foi utilizada nos estudos subsequentes.

O estradiol não reduziu a glicemia na dose avaliada (**Fig. 66 C**). A glipizida exerceu seu efeito redutor da glicemia nos tempos 30 e 60 min, enquanto que o controle normoglicêmico manteve os níveis normais, sem alterações entre os tempos (**Fig. 66 D**).

Figura 66. Efeito agudo da isoflavona (4) na curva de tolerância a glicose.



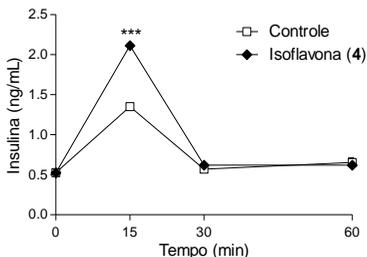
Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 5. * $P \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ comparados ao grupo controle.

5.2.9.11 Efeito da isoflavona (4) na secreção de insulina

A **Figura 67** mostra que a isoflavona (4) aumentou significativamente os níveis de insulina após 15 min da sobrecarga de

glicose quando comparado com o controle. Após este tempo não houve diferença significativa.

Figura 67. Efeito da isoflavona (4) na secreção de insulina.

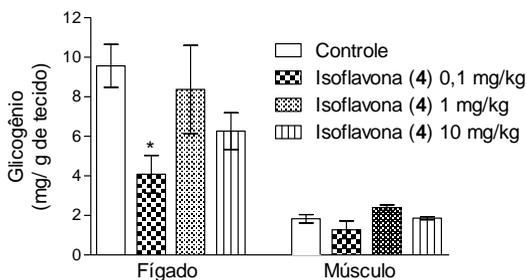


Os valores são expressos como média \pm E.P. M; $n=3$. *** $P \leq 0,001$ comparados ao grupo controle.

5.2.9.12 Efeito agudo de isoflavona (4) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular

A isoflavona (4) não apresentou efeito no conteúdo de glicogênio hepático nas concentrações de 1 e 10 mg/kg. Contrariamente, foi observado uma redução no conteúdo de glicogênio hepático na concentração de 0,1 mg/kg (Fig. 68). Não foram observadas alterações no glicogênio muscular em todas as doses avaliadas.

Figura 68. Efeito agudo da isoflavona (4) no conteúdo de glicogênio hepático e muscular.



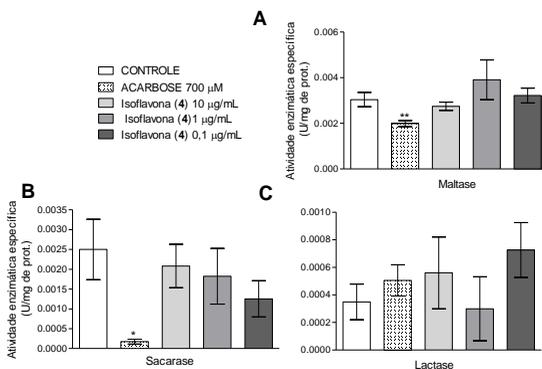
Os valores são expressos como média \pm E.P.M; $n=5$ para cada tratamento. * $P \leq 0,05$; comparado ao grupo controle.

5.2.9.13 Efeito da isoflavona (4) na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo* e *in vitro*

Quando a atividade de dissacaridases foi avaliada *in vitro*, nenhuma das doses do composto (4) inibiu a atividade enzimática quando comparadas ao controle. (Fig. 69). A acarbose, utilizada como controle positivo, apresentou o efeito clássico inibindo atividade de maltase e sacarase, sem efeitos sobre lactase.

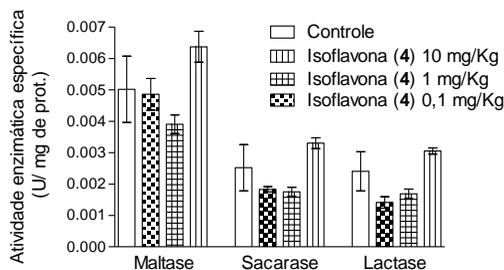
Da mesma forma do composto (4) não apresentou nenhum efeito na atividade de maltase, sacarase e lactase, quando realizado tratamento *in vivo* (Fig. 70).

Figura 69. Efeito do composto (4) na atividade de dissacaridases intestinais *in vitro*.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n = 5. *p < 0,05; **p < 0,01.

Figura 70. Efeito do composto (4) na atividade de dissacaridases intestinais *in vivo*.

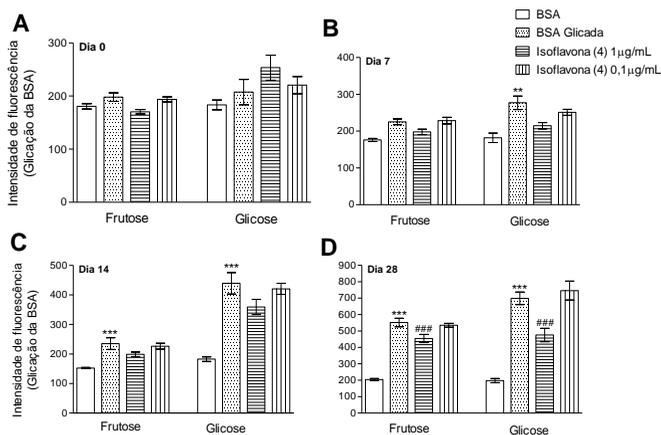


Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n = 5.

5.2.9.14 Efeito do composto (4) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.

A **Figura 71** apresenta os efeitos inibitórios do composto (4) na glicação de albumina (BSA) com glicose e frutose. No dia zero (**Fig. 71 A**), como esperado, não houve diferença entre os grupos. Apenas foi observado o aumento da glicação após 7 dias para a glicose (**Fig. 71B**) e após 14 dias para a frutose (**Fig. 71 C**) quando comparado com o grupo BSA. Decorridos 14 dias de incubação, não se observou nenhum efeito de isoflavona (4) na redução da glicação da albumina. No entanto, após 28 dias o composto (4) reduziu significativamente a glicação quando comparado com o grupo BSA glicada. Esta redução ocorreu com glicose e frutose, na concentração de 1 µg/mL (**Fig. 71 D**).

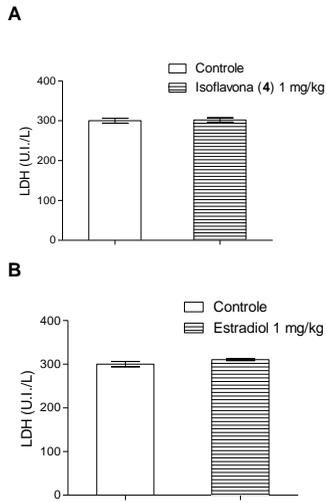
Figura 71. Efeito inibitório o composto (4) na formação de AGEs no modelo BSA/glicose, frutose.



Os valores são expressos como média \pm E.P.M; n= 6. $**P \leq 0,01$; $***P \leq 0,001$ comparado ao grupo controle. $###P \leq 0,001$ comparado ao grupo BSA glicada (com glicose ou frutose).

5.2.9.15 Efeito do composto (4) na concentração sérica de Lactato desidrogenase (LDH)

A medida do LDH sérico foi utilizada como indicador de toxicidade do composto. Como observado na **Figura 72**, composto (4) e o estradiol não alteraram a concentração de LDH sérico após 3h de tratamento.

Figura 72. Efeito do composto (4) na concentração de LDH.

Os valores são expressos como média ± E.P.M; n=5.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico das espécies *Polygala molluginifolia*, *Polygala campestris* e *Polygala longicaulis* e o estudo de atividade biológica do extrato bruto, frações e compostos isolados destas espécies, sendo que as conclusões deste trabalho são:

Quanto ao estudo fitoquímico:

✓ As técnicas de separação cromatográfica e caracterização dos compostos isolados se mostraram muito eficazes, sendo que foram isoladas seis isoflavonas da fração acetato de etila de *P. molluginifolia* (PMFA), das quais a isoflavona (1) é inédita na literatura. A partir da fração aquosa (PMFW) de *P. molluginifolia* foram isolados o flavonóide rutina (5) e a sacarose (6). O fracionamento cromatográfico da fração acetato de etila da espécie *P. longicaulis* resultou no isolamento de duas diidroestirilpironas (9-10) e as xantonas (11) e (12) foram isoladas a partir da fração aquosa de *P. campestris*.

Estes resultados foram de grande relevância do ponto de vista quimiotaxonômico, uma vez que houve uma significativa diferença nos metabólitos encontrados nas três espécies estudadas. É importante ressaltar que o gênero é caracterizado pela presença de xantonas, porém estes metabólitos não foram encontrados nas espécies *P. longicaulis* e *P. molluginifolia*, o que revela a importância desta investigação fitoquímica e a necessidade de uma reavaliação dos marcadores químicos no gênero *Polygala*.

✓ A técnica de microextração dos componentes voláteis de *P. molluginifolia* e análise por CG-EM também se mostrou muito eficaz na identificação dos constituintes na espécie. Foram identificados na sua maioria ésteres, sendo que foram identificados 14 constituintes nas flores, 11 nas folhas, 12 nas raízes e 10 nos caules. Nas flores o componente majoritário encontrado foi o dodecanoato de isoamila (28,1%), nas folhas o dodecanoato de etila (2,6%), nos caules o tetradecanoato de etila (9,4%) e nas raízes, o salicilato de metila (37,7%).

Quanto ao estudo de atividade biológica:

✓ Os resultados de atividade biológica *in vitro*, como atividade antioxidante, anticolinesterásica, antifúngica, tripanocida e leishmanicida mostraram resultados muito significativos, com destaque para a espécie *P. molluginifolia* que mostrou os melhores resultados. A atividade biológica observada para esta espécie pode estar correlacionada com a presença de isoflavonas. Além disso, a hidrofobicidade e a presença do grupo catecol desempenharam um papel muito importante na atividade antioxidante e anticolinesterásica das isoflavonas (1) e (4). Em relação aos ensaios de permeabilidade PAMPA e determinação dos valores de *ClogP*, todos os compostos isolados avaliados mostraram uma permeabilidade significativa, porém a xantona (12) e as diidroestirilpironas (9) e (10) mostraram os maiores valores de permeabilidade e menores valores de *ClogP*. Entre as isoflavonas testadas, as isoflavonas (3) e (7) mostraram os maiores valores de permeabilidade.

✓ Na avaliação de atividade biológica *in vivo* realizada com os extratos, frações e compostos isolados de *P. molluginifolia* verificou-se que esta apresentou um grande potencial biológico, sendo capaz de reduzir de forma significativa o influxo de leucócitos, neutrófilos e o grau de exsudação no modelo de atividade anti-inflamatória e também mostrou significativos efeitos antinociceptivos e não alterou a atividade locomotora dos animais o que é de grande importância, pois muitos fármacos atualmente disponíveis no mercado têm como principais efeitos colaterais a alteração na atividade locomotora. Além disso, *P. molluginifolia* mostrou uma grande redução na glicemia e não mostrou toxicidade ao nível de LDH sérico.

Todos estes dados mostram o potencial fitoquímico e biológico das espécies investigadas, com especial atenção a espécie *P. molluginifolia* que apresentou os melhores resultados e mostrou ser um potencial candidato a fármaco atuando frente a uma série de patologias.

REFERENCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography Mass Spectroscopy**. Carol Stream: Allured Publ Corp., 1995.

ALAGAMMAL, M.; PAULPRIYA, K.; MOHAN, V. R. Anticancer activity of ethanol extract of *Polygala javana* DC whole plant against Dalton Ascites Lymphoma. **Res. J. Recent Sci.**, v. 2, p. 18-22, 2013.

ALMEIDA, O. P. Update on anticholinesterase treatment of Alzheimer's disease. **Arquivos De Neuro-Psiquiatria**, v. 56, n. 3B, p. 688-696, 1998.

ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange-peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.

ANGST, M. S.; CLARK, J. D. Opioid-induced Hyperalgesia: A Qualitative Systematic Review. **Anesthesiology**, v. 104, n. 3, p. 570-587, 2006.

APFELBAUM, J. L. et al. Postoperative pain experience: Results from a national survey suggest postoperative pain continues to be undermanaged. **Anesthesia and Analgesia**, v. 97, n. 2, p. 534-540, 2003.

BAFICA, A. et al. TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 12, p. 1715-1724, 2005.

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**, v. 41, n. 6, p. 849-857, 2004.

BASHIR, A. et al. Isoflavones and xanthenes from *Polygala virgata*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 309-11, 1991.

BASHIR, A. et al. Biphenyls and a xanthone from *Monnina sylvatica*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 9, p. 3203-5, 1992.

BENYAMIN, R. et al. Opioid complications and side effects. **Pain Physician**, v. 11, n. 2 Suppl, p. S105-20, 2008.

BETTIO, L. E. B. et al. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharm. Biol. (London, U. K.)**, v. 49, n. 12, p. 1277-1285, 2011.

BORGES, F. R. M. et al. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinaferol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 151, p. 144-150, 2014.

BORTALANZA, L. B. et al. Anti-allodynic action of the tormentic acid, a triterpene isolated from plant, against neuropathic and inflammatory persistent pain in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 453, n. 2-3, p. 203-208, 2002.

CAI, Z.-L. et al. Tenuigenin ameliorates learning and memory impairments induced by ovariectomy. **Physiol. Behav.**, v. 118, p. 112-117, 2013.

CAMPOS, G. F. R. **Predição in silico da permeabilidade intrínseca determinada pelo ensaio in vitro Double-Sink PAMPA utilizando redes neuronais artificiais**. 2013. (Mestrado). Universidade da Beira Interior, Covilhã.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 643, n. 2-3, p. 232-238, 2010.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816-824, 1997.

- CATERINA, M. J. et al. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 306-313, 2000.
- CAVIN, A. et al. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*. **Planta Medica**, v. 64, n. 5, p. 393-396, 1998.
- CAZAROLLI, L. H. et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2 "-O-alpha-L-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on C-14-glucose uptake. **Chemico-Biological Interactions**, v. 179, n. 2-3, p. 407-412, 2009.
- CHAUDHARY, B. A.; AHMAD, I. Isolation of an isoflavone from *Polygala stenopetala*. **J. Pure Appl. Sci.**, v. 20, n. 1, p. 71-74, 2001.
- CHAVES, M. H. et al. Total phenolics, antioxidant activity and chemical constituents from extracts of *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 106-112, 2010.
- CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 463-480, 2000.
- CORDOVA, M. M. et al. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters**, v. 495, n. 3, p. 173-177, 2011.
- CORTRIGHT, D. N.; KRAUSE, J. E.; BROOM, D. C. TRP channels and pain. **Biochim. Biophys. Acta, Mol. Basis Dis.**, v. 1772, n. 8, p. 978-988, 2007.
- 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. **Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences**, v. 58, n. 7-8, p. 490-494, 2003.
- DA ROCHA, J. L. C. et al. Quantification of methyl salicylate in four genera of the Polygalaceae by HPLC-DAD. **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2263-2266, 2012.

DAHLQVIST, A. Assay of intestinal disaccharidases. **Analytical Biochemistry**, v. 22, n. 1, p. 99-107, 1968.

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

DAMAZIO, R. G. et al. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 4, p. 1332-1337, 2010.

DAO, T. T. et al. Xanthenes from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 22, p. 3688-3692, 2012.

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

DE SOUZA, A. et al. Chemical composition and acetylcholinesterase inhibitory activity of essential oils of *Myrceugenia myrcioides* (Cambess.) O. Berg and *Eugenia riedeliana* O. Berg, Myrtaceae. **Revista Brasileira De Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 175-179, 2010.

DO, J. C. et al. Flavonoids from the leaves of *Polygala japonica*. **Saengyak Hakhoechi**, v. 23, n. 1, p. 9-13, 1992.

DOS SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Quimica Nova**, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.

DREASSI, E. et al. Determination of permeability and lipophilicity of pyrazolo-pyrimidine tyrosine kinase inhibitors and correlation with biological data. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 9, p. 3712-3717, 2009.

DUARTE, F. S. et al. Participation of dihydrostyryl-2-pyrones and styryl-2-pyrones in the central effects of *Polygala sabulosa* (Polygalaceae), a folk medicine topical anesthetic. **Pharmacol., Biochem. Behav.**, v. 86, n. 1, p. 150-161, 2007.

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

ENDRES-BECKER, J. et al. mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain. **Molecular Pharmacology**, v. 71, n. 1, p. 12-18, 2007.

ESTEVEES, E. A.; MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v. 14, p. 43-52, 2001.

FARINA, M. et al. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 57, n. 11, p. 1503-1508, 2005.

FRANCO, J. L. et al. Mercurial-Induced Hydrogen Peroxide Generation in Mouse Brain Mitochondria: Protective Effects of Quercetin. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 20, n. 12, p. 1919-1926, 2007.

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

GHOSAL, S.; BASUMATARI, P. C.; BANERJEE, S. Extractives of *Polygala*. Part 8. 1,2,3-Trioxxygenated glucosyloxyxanthenes from *Polygala triphylla*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 3, p. 489-92, 1981.

GONZALEZ-GALLEGO, J.; SANCHEZ-CAMPOS, S.; TUNON, M. J. Anti-inflammatory properties of dietary flavonoids. **Nutr. Hosp.**, v. 22, n. 3, p. 287-293, 2007.

HAHN, R. C.; HAMDAN, J. S. Effects of amphotericin B and three azole derivatives on the lipids of yeast cells of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1997-2000, Jul 2000.

HAMBURGER, M.; GUPTA, M.; HOSTETTMANN, K. Coumarins from *Polygala paniculata*. **Planta Med.**, n. 3, p. 215-17, 1985.

HARINI, R.; EZHUMALAI, M.; PUGALENDI, K. V. Antihyperglycemic effect of biochanin A, a soy isoflavone, on streptozotocin-diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 676, n. 1-3, p. 89-94, 2012.

HILL, R. G. THE STATUS OF NALOXONE IN THE IDENTIFICATION OF PAIN CONTROL MECHANISMS OPERATED BY ENDOGENOUS OPIOIDS. **Neuroscience Letters**, v. 21, n. 2, p. 217-222, 1981.

HOLZER, P. Capsaicin - cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 143-201, 1991.

HUANG, J.-N. et al. Tenuigenin treatment improves behavioral Y-maze learning by enhancing synaptic plasticity in mice. **Behav. Brain Res.**, v. 246, p. 111-115, 2013.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69-76, 1985.

IKEYA, Y. et al. Two xanthones from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 6, p. 2061-5, 1991.

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

JAIN, A. C.; TULI, D. K.; GUPTA, R. C. Synthesis of pomiferin, auriculasin, and related compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 18, p. 3446-3450, 1978.

JIANG, Y.; TU, P.-F. Xanthone O-glycosides from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, v. 60, n. 8, p. 813-816, 2002.

JIANG, Y. et al. Xanthone Glycosides from *Polygala tenuifolia* and Their Conformational Analyses. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 6, p. 875-879, 2005.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p. 1065-1075, 2011.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 4, p. 388-396, 2010.

JONAS, J. C. et al. Multiple effects and stimulation of insulin-secretion by the tyrosine kinase inhibitor genistein in normal mouse islets. **British Journal of Pharmacology**, v. 114, n. 4, p. 872-880, 1995.

JULIUS, D. TRP channels and pain. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 29, p. 355-84, 2013.

KANAI, Y.; HARA, T.; IMAI, A. Participation of the spinal TRPV1 receptors in formalin-evoked pain transduction: a study using a selective TRPV1 antagonist, iodo-resiniferatoxin. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 4, p. 489-493, 2006.

KANSY, M.; SENNER, F.; GUBERNATOR, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1007-1010, 1998.

KAYAN, S.; WOODS, L. A.; MITCHELL, C. L. Morphine-induced hyperalgesia in rats tested on the hot plate. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 177, n. 3, p. 509-13, 1971.

KAZUMA, K.; NODA, N.; SUZUKI, M. Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea*. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 229-237, 2003.

KEHLET, H.; DAHL, J. B. Anaesthesia, surgery, and challenges in postoperative recovery. **Lancet**, v. 362, n. 9399, p. 1921-1928, 2003.

KIHO, T. et al. Tomato paste fraction inhibiting the formation of advanced glycation end-products. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n. 1, p. 200-205, 2004.

KIM, K.-S. et al. The inhibition of JNK MAPK and NF- κ B signaling by tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 721, p. 267-276, 2013.

KLAFKE, J. Z. et al. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. **Neuroscience**, v. 222, p. 136-146, 2012.

KLEIN, L. C., JR. et al. Antihyperalgesic activity of the methanol extract and some constituents obtained from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 111, n. 3, p. 145-153, 2012.

KLEIN, L. C., JR. et al. Antiulcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). **Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.**, v. 381, n. 2, p. 121-126, 2010.

KRISMAN, C. R. A method for the colorimetric estimation of glycogen with iodine. **Anal. Biochem.**, v. 4, p. 17-23, 1962.

LAKSHMI, V. et al. In vitro and in vivo leishmanicidal activity of *Dysoxylum binectariferum* and its fractions against *Leishmania donovani*. **Phytomedicine**, v. 14, n. 1, p. 36-42, 2007.

LAPA, F. D. 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, 2008.

LAPA, F. D. R. et al. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 104, n. 4, p. 306-315, 2009.

LAPA, F. D. R. et al. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. **J Pharm Pharmacol**, v. 63, n. 6, p. 875-81, 2011.

- LI, C.-J. et al. Glomexanthones A-C, three xanthonolignoid C-glycosides from *Polygala glomerata* Lour. **Fitoterapia**, v. 93, p. 175-181, 2014.
- LI, C. et al. Three triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica* Houtt. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1184-1190, 2012.
- LI, J.; JIANG, Y.; TU, P.-F. Xanthone O-Glycosides and Benzophenone O-Glycosides from the Roots of *Polygala tricornis*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 12, p. 1802-1804, 2005.
- LI, W. et al. Xanthones from *Polygala caudata*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 953-958, // 1999.
- LIANG, Z. et al. Neuroprotective effects of tenuigenin in a SH-SY5Y cell model with 6-OHDA-induced injury. **Neurosci. Lett.**, v. 497, p. 104-109, 2011.
- LIN, L.-L. et al. Xanthones from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro. **Planta Med.**, v. 71, n. 4, p. 372-375, 2005a.
- 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, 2005b.
- LING, Y. et al. Analysis and detection of the chemical constituents of *Radix Polygalae* and their metabolites in rats after oral administration by ultra high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 85, p. 1-13, 2013.
- LIU, P. et al. Potential antidepressant properties of *Radix Polygalae* (Yuan Zhi). **Phytomedicine**, v. 17, p. 794-799, 2010.
- LOPEZ-MARTINEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p. 178-184, 2010.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LÜDTKE, R. **A família Polygalaceae na região Sul do Brasil**. 2008. (Doutorado). Departamento de botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LÜDTKE, R.; AGUIAR, A. C. A. D. Nota sobre a ocorrência de pétalas reduzidas em espécies de *Polygala* L. subgênero *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) da Região Sul do Brasil subgenus *Hebeclada* (Chodat) Blake (Polygalaceae) from southern Brazil. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 1, p. 239-242, 2008.

LÜDTKE, R.; SOUZA-CHIES, T. T. D.; MIOTTO, S. T. S. O gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) na região Sul do Brasil. **Hoehnea**, v. 40, n. 1, p. 1-50, 2013.

LUIZ, A. P. et al. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, n. 3, p. 355-363, 2007.

LV, J. et al. Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid- β secretion in vitro. **Acta Physiol.**, v. 196, p. 419-425, 2009.

MA, W. et al. New phenolics from *Polygala fallax*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 3, p. 441-443, 2003.

MACPHERSON, L. J. et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. **J. Neurosci.**, v. 27, n. 42, p. 11412-11415, 2007.

MAGINA, M. A. et al. Antioxidant Activity of Three Species of *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MANOCHA, M. S.; SANBLAS, G.; CENTENO, S. Lipid-composition of *paracoccidioides-brasiliensis* - possible correlation with virulence of different strains. **Journal of General Microbiology**, v. 117, p. 147-154, 1980.

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

MARTINS, D. F. et al. Ankle Joint Mobilization Decreases Hypersensitivity by Activation of Peripheral Opioid Receptors in a Mouse Model of Postoperative Pain. **Pain Medicine**, v. 13, n. 8, p. 1049-1058, 2012.

MARTINS, R. D. P. et al. Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 3, p. 645-9, 2009.

MARZOCHELLA, L. et al. Dietary flavonoids: molecular mechanisms of action as anti-inflammatory agents. **Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov**, v. 5, n. 3, p. 200-20, 2011.

MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MINHAJ, N. et al. Extractives of *Milletia Auriculata*. **Tetrahedron**, v. 32, n. 6, p. 749-751, 1976.

MISSAU, F. C. **Estudo das propriedades químicas, físicas e biológicas das espécies *Polygala paniculata* e *Polygala pulchella***. 2008. (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MIYASE, T.; NOGUCHI, H.; CHEN, X.-M. Sucrose esters and xanthone C-glycosides from the roots of *Polygala sibirica*. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 7, p. 993-996, 1999.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. D. S. Drug design based on natural products. **Quim. Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

MONTANHER, A. B. P.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Monitoramento dos extratos brutos de espécies de *Polygala* (Polygalaceae) utilizando *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 66-68, 2003.

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.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NUCCI, C. et al. Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pubescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 1, p. 170-178, 2012.

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional Brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**, v. 19, n. 10, p. 868-877, 2012.

PEREIRA, D. G. Importance of metabolism in drug design. **Quim. Nova**, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PFEFFER, P. E.; VALENTINE, K. M.; PARRISH, F. W. DEUTERIUM-INDUCED DIFFERENTIAL ISOTOPE SHIFT C-13 NMR .1. RESONANCE RE-ASSIGNMENTS OF MONOSACCHARIDES AND DISACCHARIDES. **Journal of the American Chemical Society**, v. 101, n. 5, p. 1265-1274, 1979.

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

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

PIZZOLATTI, M. G. et al. Artefatos cumarínicos isolados de *Polygala paniculata* L. (Polygalaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 21-26, 2002.

PIZZOLATTI, M. G. et al. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 6, p. 603-606, 2004.

PIZZOLATTI, M. G. et al. Analysis of Volatile Compounds Released From Flowers and Roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala*

paniculata by Headspace/SPME. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 3, p. 255-258, 2009.

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, 2008.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 7, n. 10, p. 803-815, 2007.

POGATZKI, E. M.; RAJA, S. N. A mouse model of Incisional Pain. **Anesthesiology**, v. 99, p. 1023-1027, 2003.

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

RIBAS, C. M. et al. Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 103, n. 1, p. 43-47, 2008.

RODRIGUES, A. L. S. et al. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 1347-1358, 2002.

SAKURADA, T. et al. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 3, p. 271-278, 1996.

SALEH, T. S.; CALIXTO, J. B.; MEDEIROS, Y. S. Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. **Br J Pharmacol**, v. 118, n. 3, p. 811-9, Jun 1996.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuroscience Letters**, v. 235, n. 1-2, p. 73-76, 1997.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 8, p. 93-151, 2006.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 147, p. 59-110, 2015.

SHAIK, A. A.; HERMANSON, D. L.; XING, C. Identification of methysticin as a potent and non-toxic NF-kappa B inhibitor from kava, potentially responsible for kava's chemopreventive activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 19, p. 5732-5736, 2009.

SHI, T. et al. Isolation of flavonoids from the aerial parts of *Polygala tenuifolia* Willd. and their antioxidant activities. **J. Chin. Pharm. Sci.**, v. 22, n. 1, p. 36-39, 2013.

SIEGEL, I. A. Effect of chemical structure on nonelectrolyte penetration of oral mucosa. **J Invest Dermatol**, v. 76, n. 2, p. 137-40, 1981.

SIEUWERTS, A. M. et al. The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized - How To Use This Assay Reliably To Measure Metabolic-Activity Of Cell-Cultures In-Vitro For The Assessment Of Growth-Characteristics, IC50-Values And Cell-Survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, n. 11, p. 813-823, 1995.

SILVA, F. A. E. **Estudo do efeito anti-inflamatório de *Polygala molluginifolia* St.-Hil.&Moq. no modelo de pleuresia induzida por carragenina em camundongos.** 2014. (Mestrado). Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SILVA FREDERICO, M. J. et al. Acylhydrazones Contribute to Serum Glucose Homeostasis Through Dual Physiological Targets. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 19, p. 2049-2058, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento** Florianópolis/Porto Alegre: Editora da UFSC/URGS, 2010.

SINGH, S. P. et al. PAMPA permeability, plasma protein binding, blood partition, pharmacokinetics and metabolism of formononetin, a methoxylated isoflavone. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 5, p. 1056-1062, 2011.

STORY, G. M. et al. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. **Cell**, v. 112, n. 6, p. 819-829, 2003.

SUN, X.-P. et al. Antidepressant-like effects and memory enhancement of a herbal formula in mice exposed to chronic mild stress. **Neurosci. Bull.**, v. 29, n. 6, p. 737-744, 2013.

TSUDA, M. et al. Involvement of the opioid system in the anxiolytic effect of diazepam in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 307, n. 1, p. 7-14, 1996.

TSUKAYAMA, M.; KAWAMURA, Y.; TAHARA, H. Synthesis Of 4',5-Oxygenated And 3',4',5-Oxygenated Pyranoisoflavones - Alpinumisoflavone and Related-Compounds, and a Revised Structure of Derrone. **Heterocycles**, v. 34, n. 3, p. 505-516, 1992.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 0, p. 463-471, 1963.

VELICKY, M.; TAM, K. Y.; DRYFE, R. A. W. Permeation of a Fully Ionized Species Across a Polarized Supported Liquid Membrane. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 5, p. 2541-2547, 2012.

VICTÓRIO, C. P.; CARRIÇO, J. B.; LAGE, C. L. S. Polygala paniculata: um recurso de salicilato de metila produzido por cultura de tecidos vegetais. **Revista Ceres**, v. 58, n. 3, p. 269-272, 2011.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. D.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIEGAS, C. et al. Natural products as candidates for useful drugs in the treatment of Alzheimer's disease. **Quimica Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

WANG, Y. et al. Bacterial neuraminidase inhibitory effects of prenylated isoflavones from roots of *Flemingia philippinensis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6398-6404, 2013.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. **Analysis of Phenolic Plant Metabolite**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994.

WOHNSLAND, F.; FALLER, B. High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log P with artificial membranes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 923-930, 2001.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WU, J.-F. et al. Antioxidants and a new dihydroisocoumarins from *Polygala hongkongensis* Hemsl. **Nat. Prod. Res.**, v. 21, n. 7, p. 580-584, 2007.

WU, J.-F. et al. Xanthone glycosides from herbs of *Polygala hongkongensis* Hemsl and their antioxidant activities. **J. Asian Nat. Prod. Res.**, v. 10, n. 7, p. 665-670, 2008.

XIONG, H.-P. et al. 3-Hydroxy-1,2-dimethoxyxanthone. **Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online**, v. 67, p. 1667, 2011.

XU, X.-H. et al. Polygalasaponin G promotes neurite outgrowth of cultured neuron on myelin. **Neurosci. Lett.**, v. 460, p. 41-46, 2009.

YAMANAKA, C. N. et al. Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 82, n. 6, p. 697-704, 2013.

YANG, H. et al. Neuro-protective Mechanism of Isoflavones on Senescence-accelerated Mice. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 8, n. 4, p. 280-284, 2010a.

YANG, H. et al. Mechanism of isoflavone aglycone's effect on cognitive performance of senescence-accelerated mice. **Brain and Cognition**, v. 76, n. 1, p. 206-210, 2011.

YANG, Z. B. et al. Rapid determination of volatile composition from *Polygala furcata* Royle by MAE-HS-SPME followed by GC-MS.

European Food Research and Technology, v. 230, n. 5, p. 779-784, 2010b.

YOUNG, R. L. et al. Analysis of kawa pyrones in extracts of *Piper methysticum*. **Phytochemistry (Elsevier)**, v. 5, n. 4, p. 795-8, 1966.

ZHAN, H.-T. et al. Influence of flavonoids from *Polygala hongkongensis* on neuroprotective and the contents of TGF- β and HSP70 in the rats of focal cerebral ischemia. **Foshan Kexue Jishu Xueyuan Xuebao, Ziran Kexueban**, v. 31, n. 3, p. 55-59, 2013.

ZHANG, D. et al. Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. I. Structures of polygalasaponins I-X. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 43, n. 1, p. 115-20, 1995.

ZHANG, D. et al. Nine new triterpene saponins, polygalasaponins XXXIII-XLI from the roots of *Polygala fallax* Hemsl. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 44, n. 11, p. 2092-2099, 1996.

ZIMMERMANN, M. Ethical Guidelines for Investigations of Experimental Pain in Conscious Animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-110, 1983.

ANEXOS

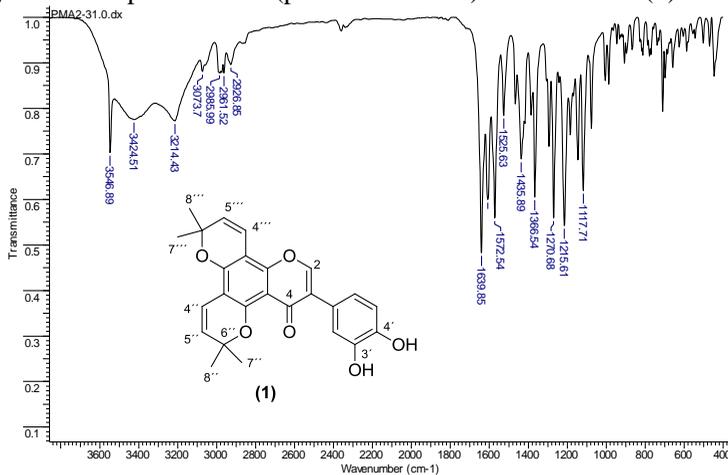
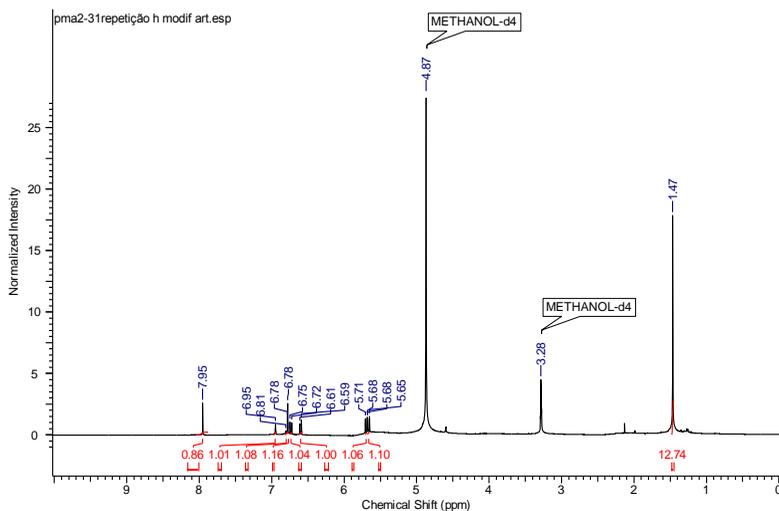
Figura 73. Espectro de IV (pastilhas de KBr) da isoflavona (**1**).**Figura 74.** Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) do composto (**1**).

Figura 75. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) ampliado do composto (1).

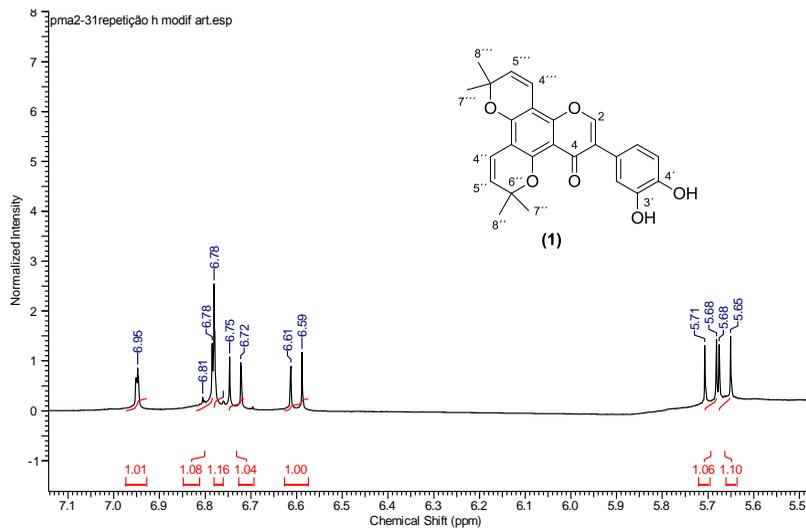


Figura 76. Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (100 MHz, CD_3OD) do composto (1).

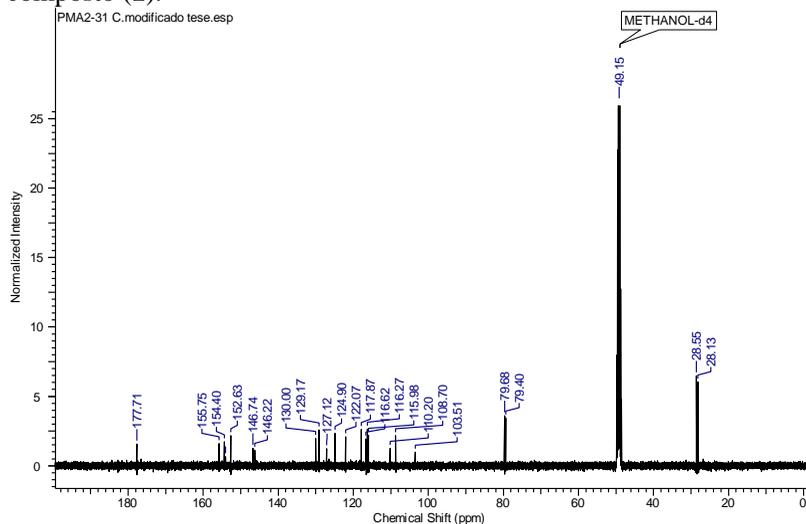


Figura 77. Espectro de RMN de DEPT (100 MHz, CD₃OD) do composto (**1**).

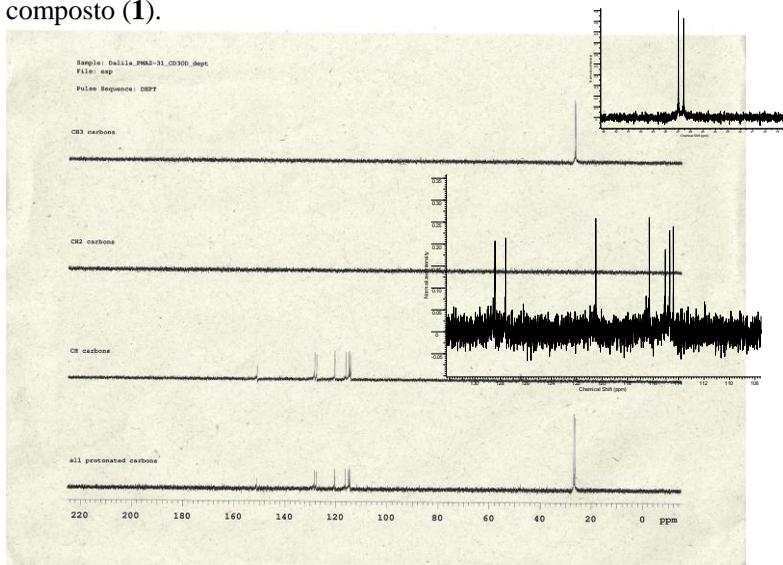


Figura 78. Espectro de HMQC (400 MHz, CD₃OD) do composto (**1**).

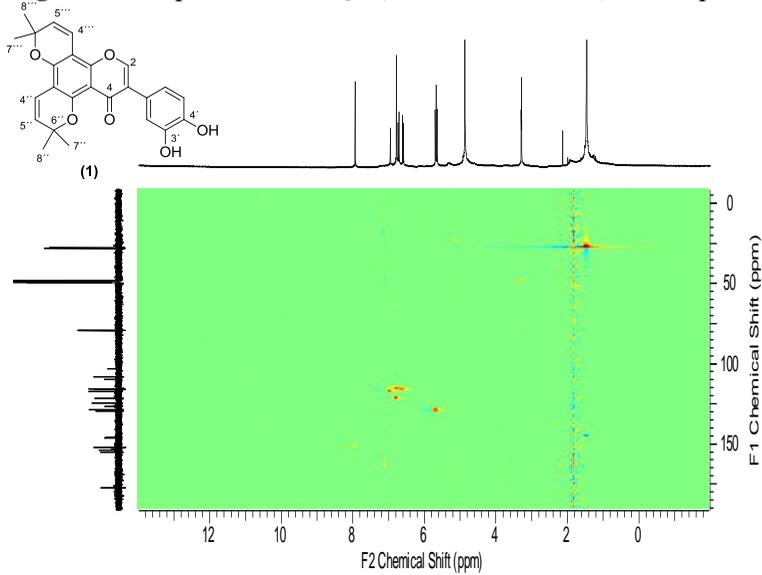


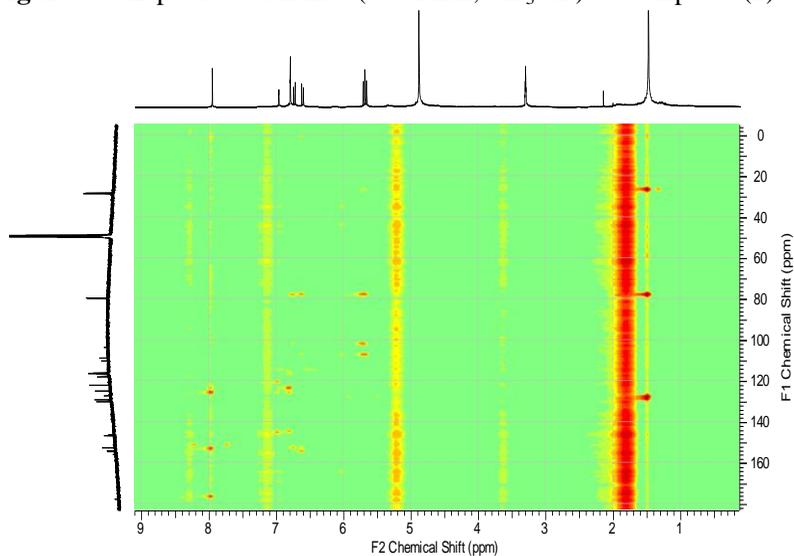
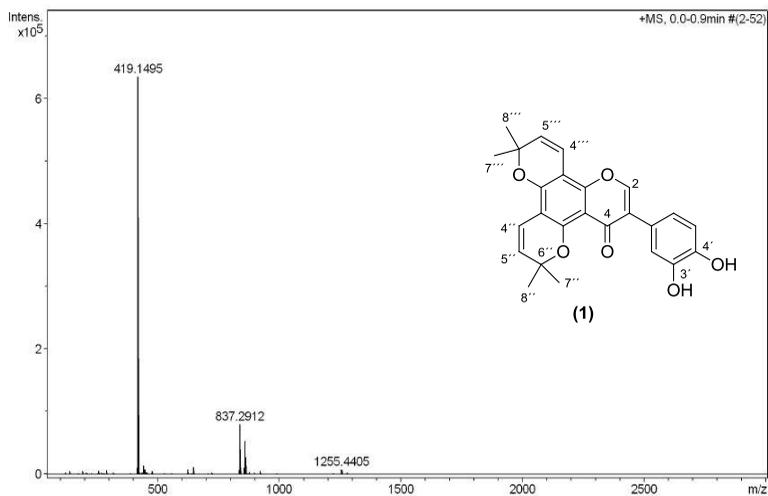
Figura 79. Espectro de HMBC (400 MHz, CD₃OD) do composto **(1)**.**Figura 80.** Espectro de HR-MS do composto **(1)** (Parte A).

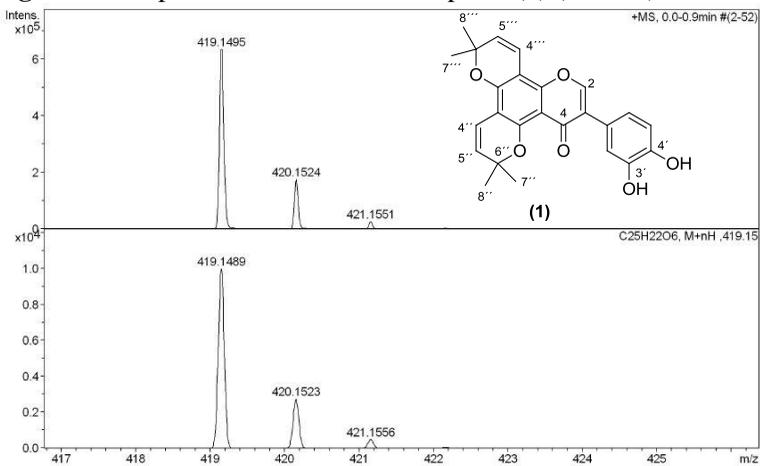
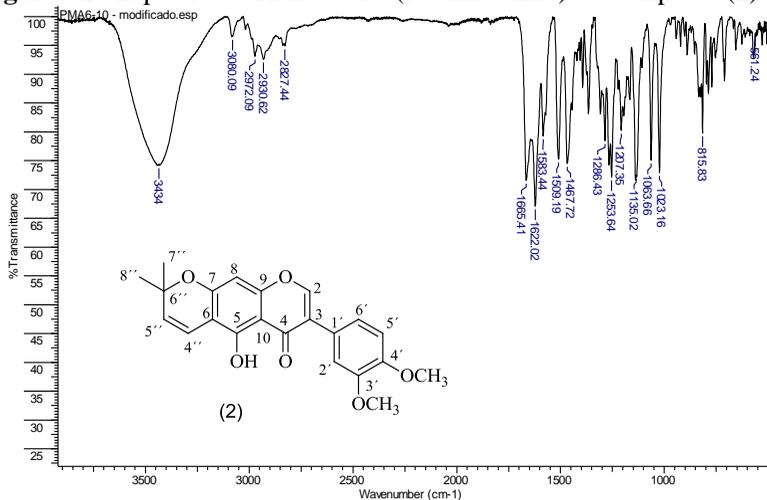
Figura 81. Espectro de HR-MS do composto (1) (Parte B).**Figura 82.** Espectro de RMN de IV (Pastilhas KBr) do composto (2).

Figura 83. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).

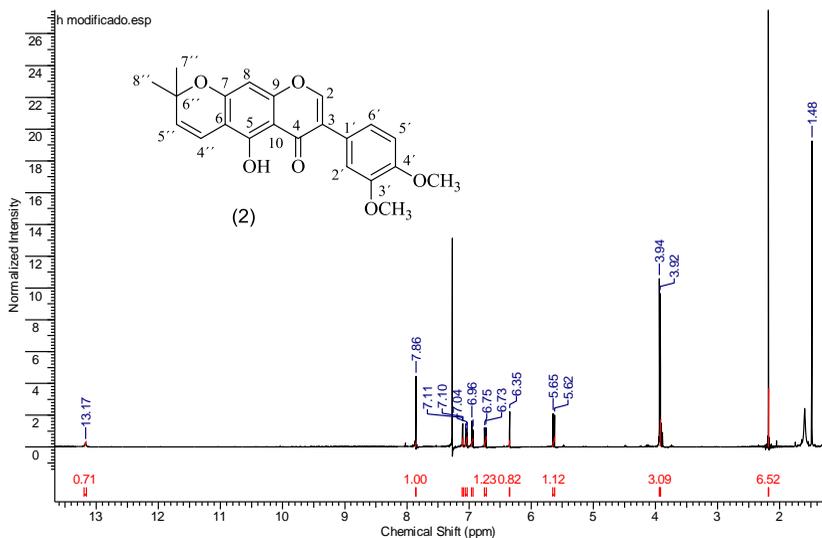


Figura 84. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3Cl_3) ampliado do composto (2).

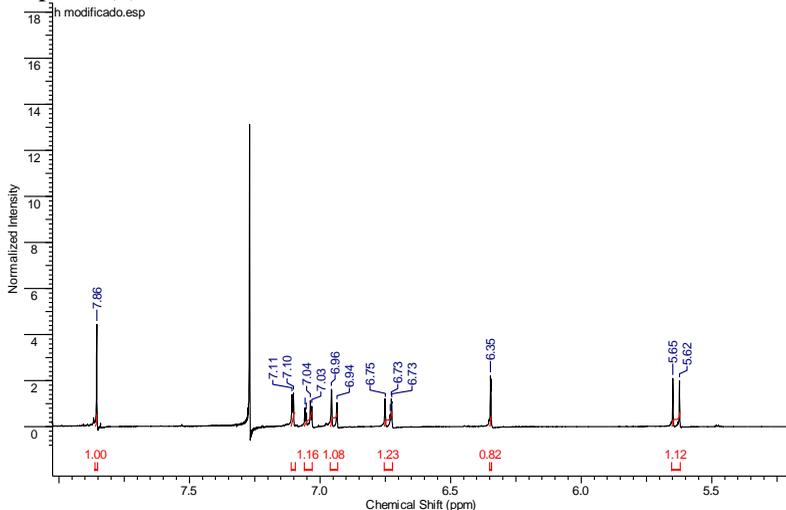


Figura 85. Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (100 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).

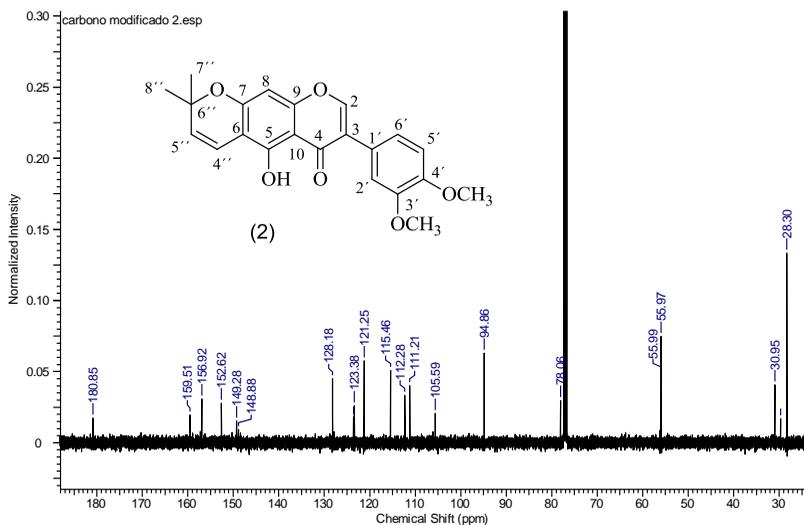


Figura 86. Espectro de DEPT (100 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).

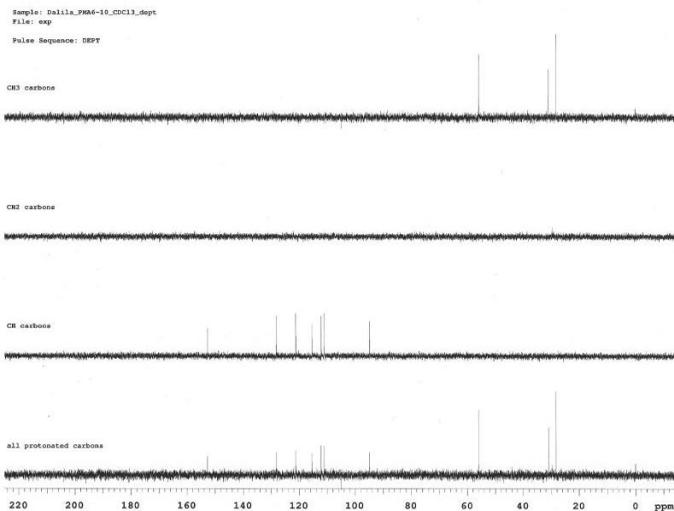


Figura 87. Espectro de HMQC (400 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).

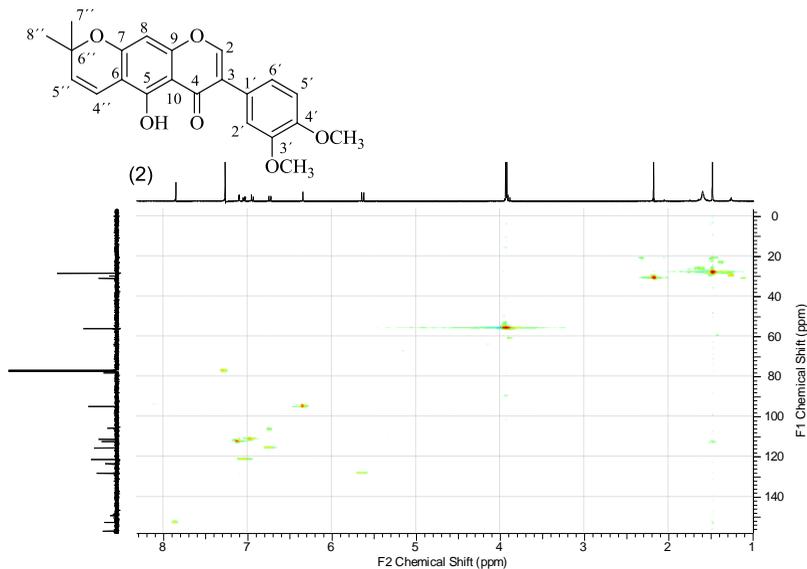


Figura 88. Espectro de HMQC (400 MHz, CD_3Cl_3) ampliado do composto (2).

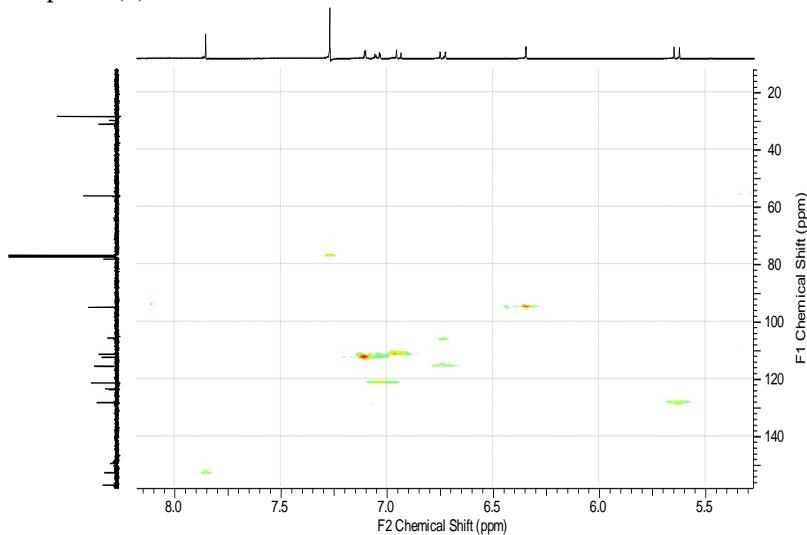


Figura 89. Espectro de HMBC (400 MHz, CD_3Cl_3) do composto (2).

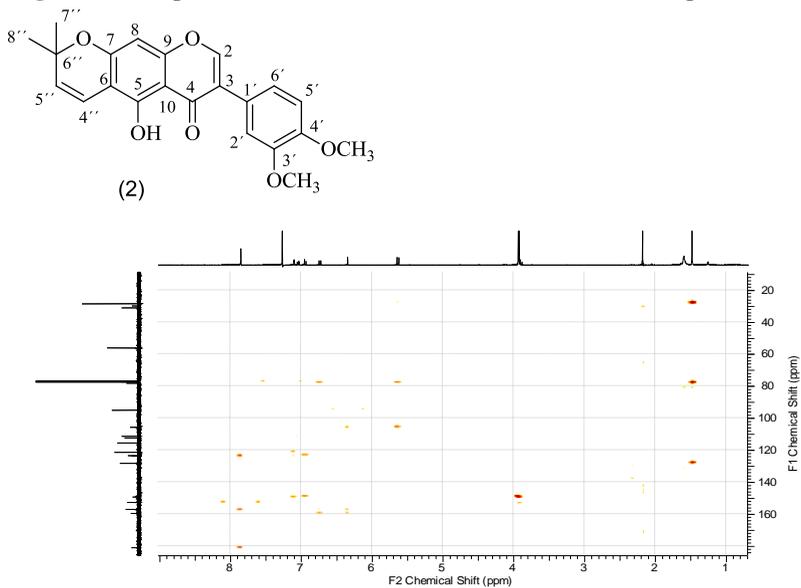


Figura 90. Espectro de HMBC (400 MHz, CD_3Cl_3) ampliado do composto (2).

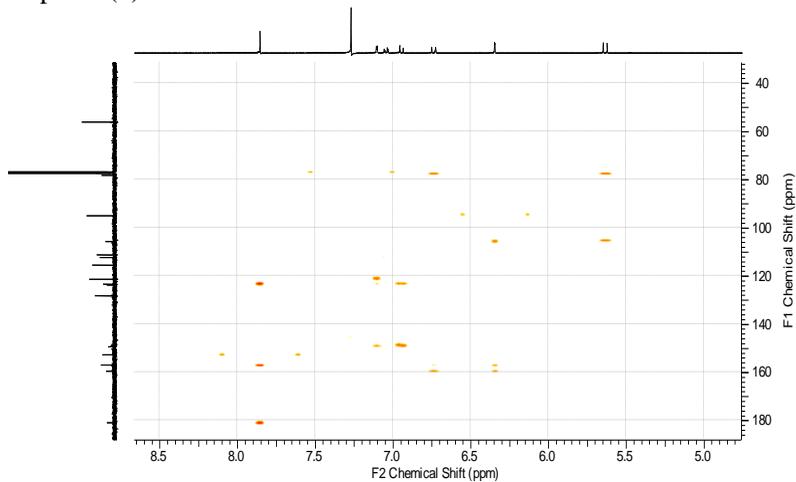


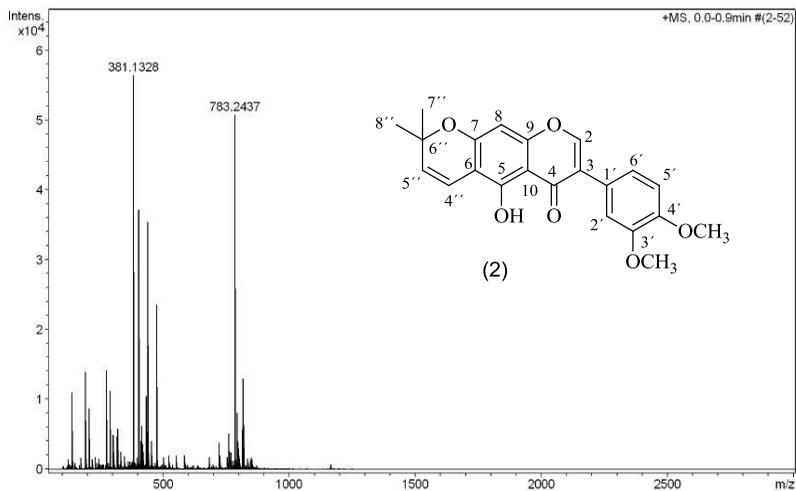
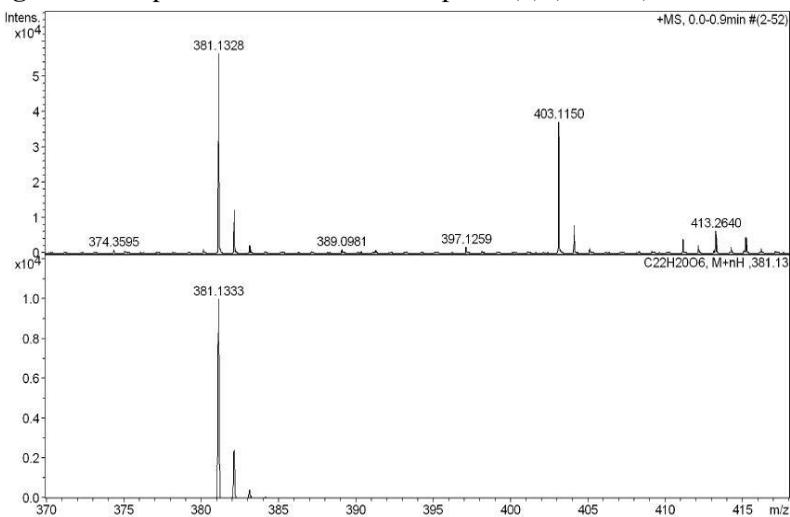
Figura 91. Espectro de HR-MS do composto (2) (Parte A).**Figura 92.** Espectro de HR-MS do composto (2) (Parte B).

Figura 93. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (3).

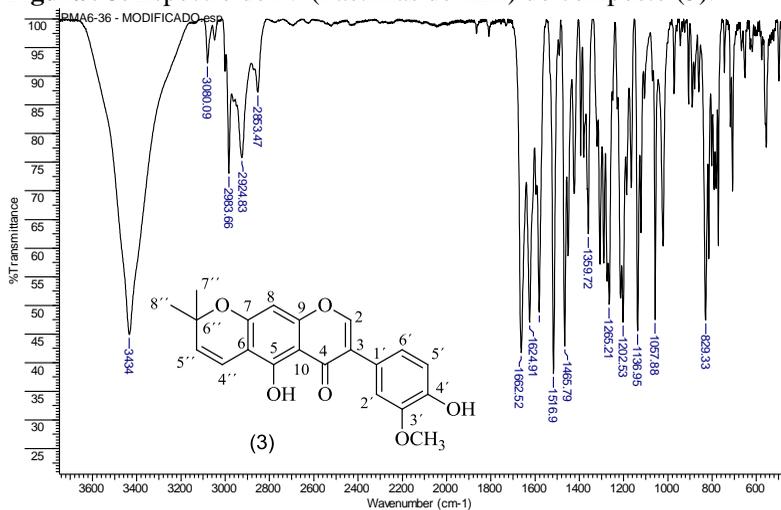


Figura 94. Espectro de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto (3).

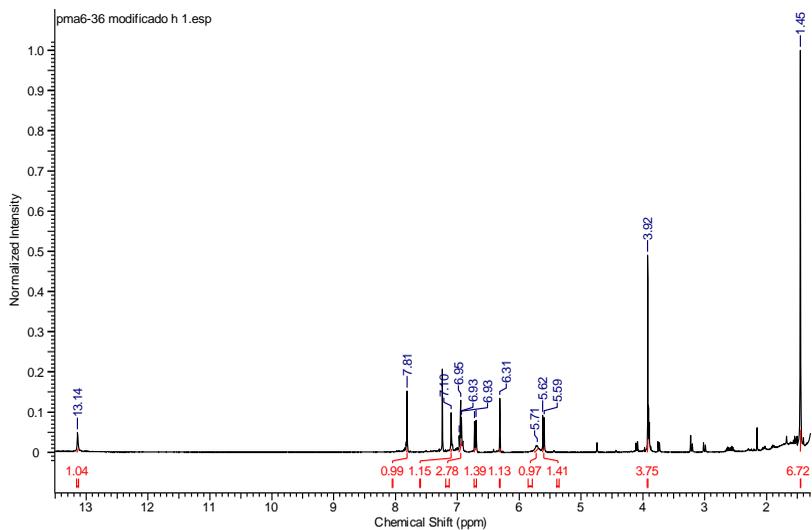


Figura 95. Espectro de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (3).

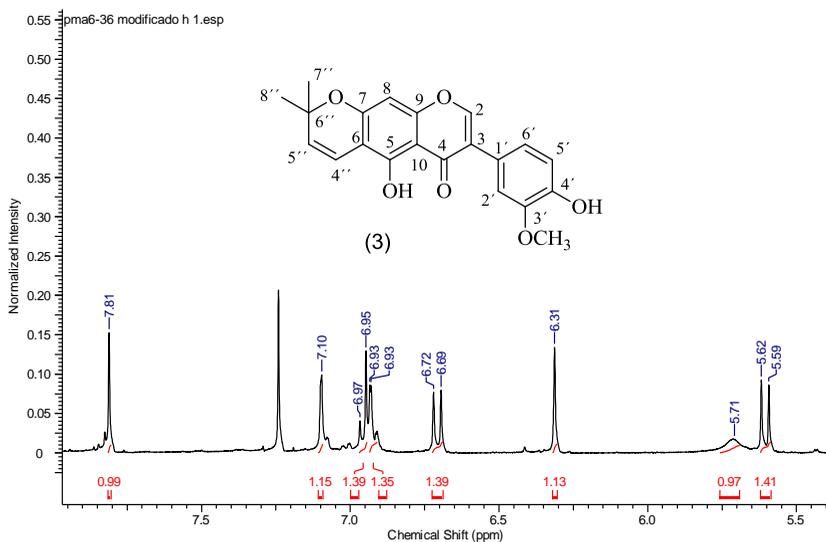


Figura 96. Espectro de ^{13}C { ^1H } (100 MHz, CDCl_3) do composto (3).

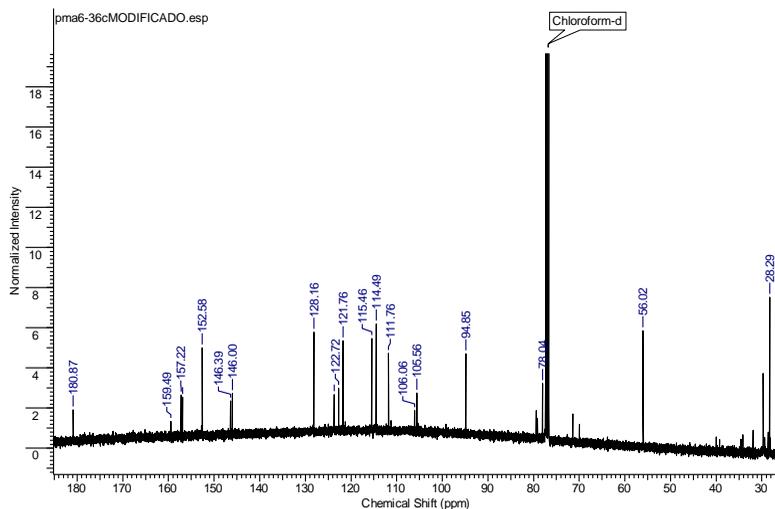


Figura 97. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) do composto (3).

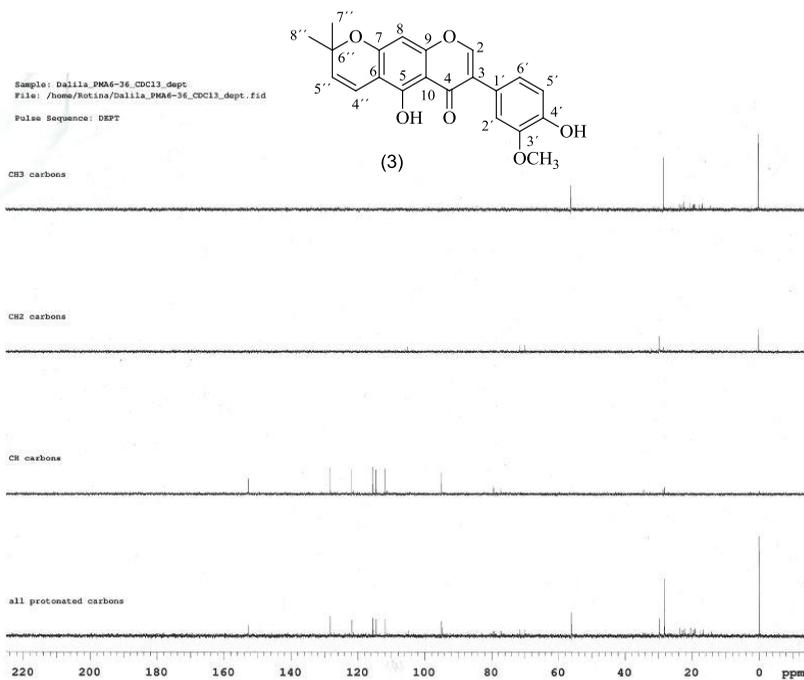


Figura 98. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) do composto (3).

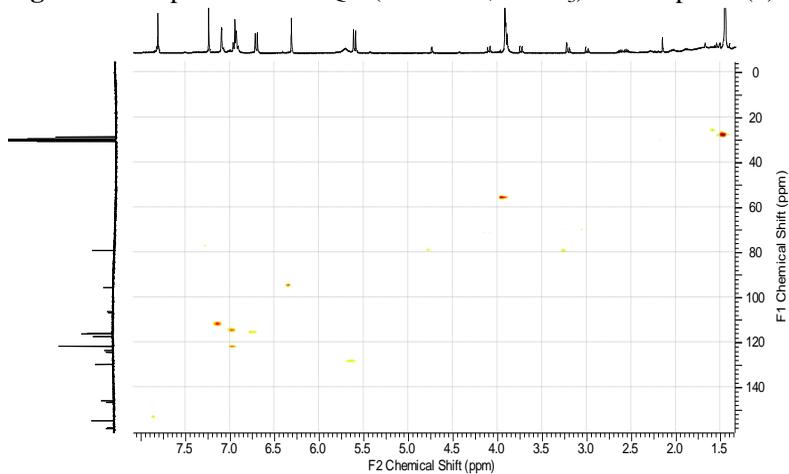


Figura 99. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (3).

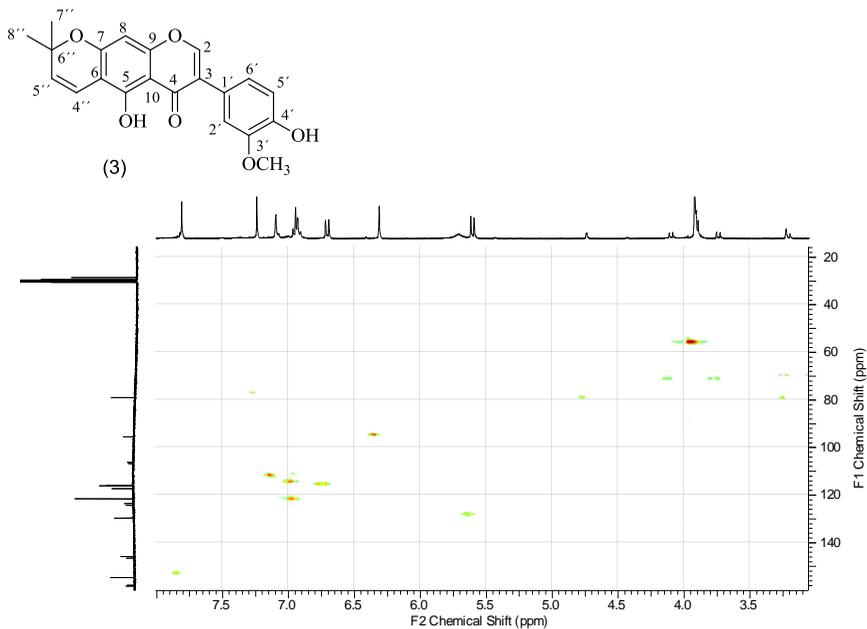


Figura 100. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto (3).

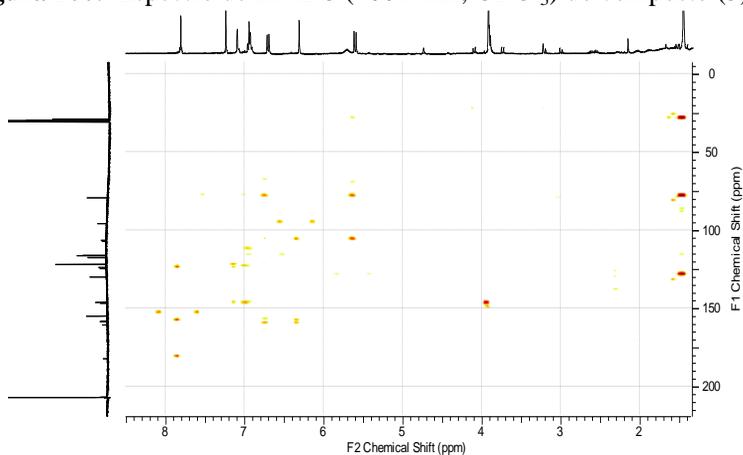


Figura 101. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (3).

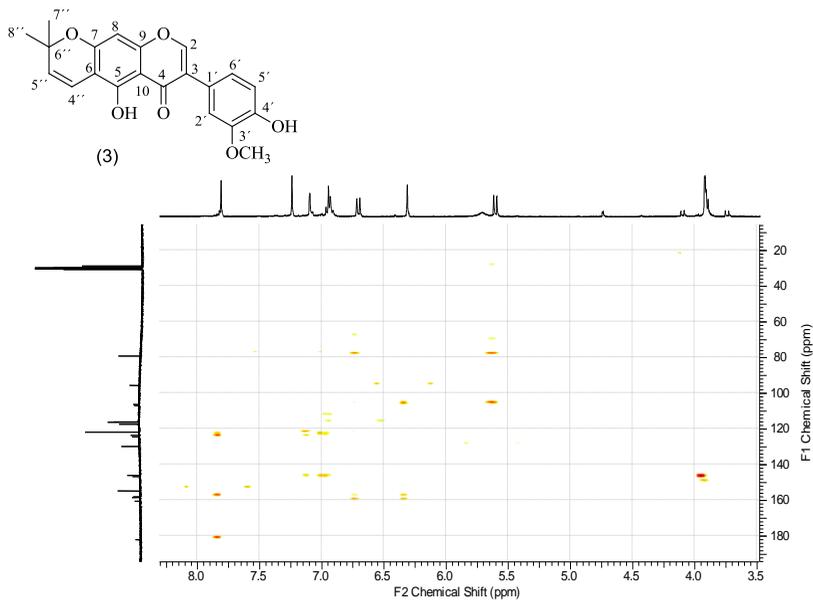


Figura 102. Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) do composto (3) (irradiação de H-2').

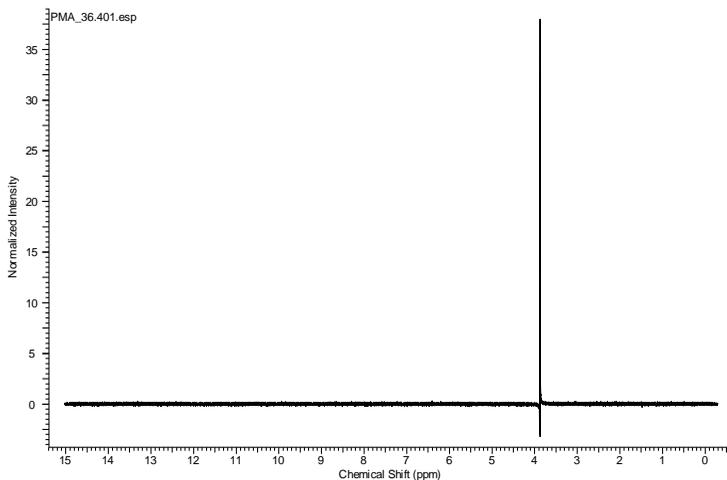


Figura 103. Espectro de NOE (400 MHz, CD₃Cl₃) do composto (3) (irradiação OMe-3').

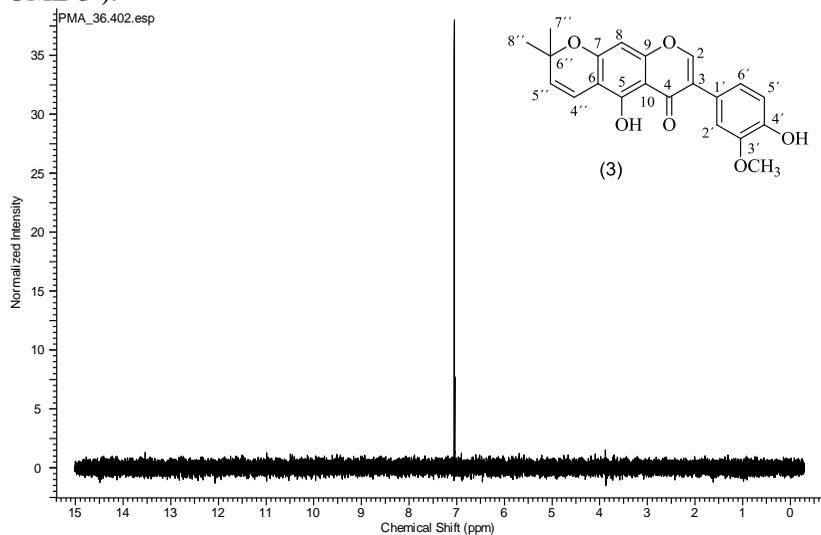


Figura 104. HR-MS do composto (3) (Parte A).

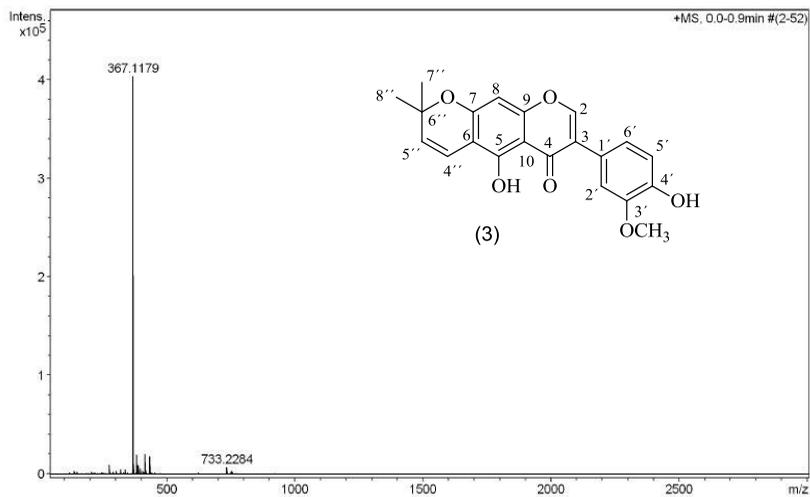


Figura 105. HR-MS do composto (3) (Parte B).

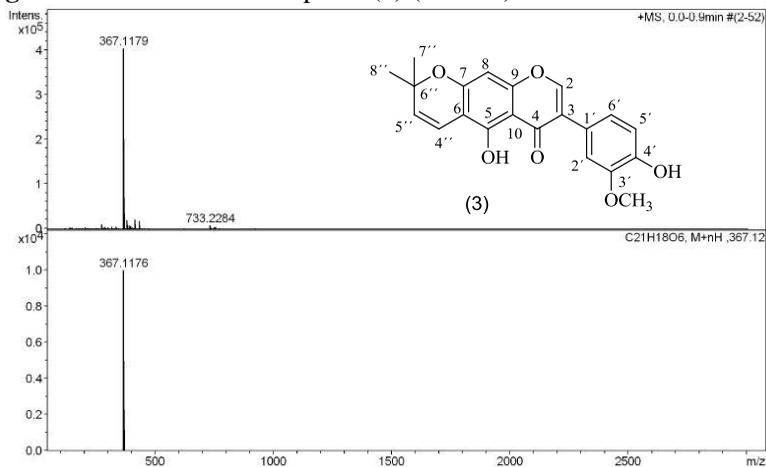


Figura 106. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (4).

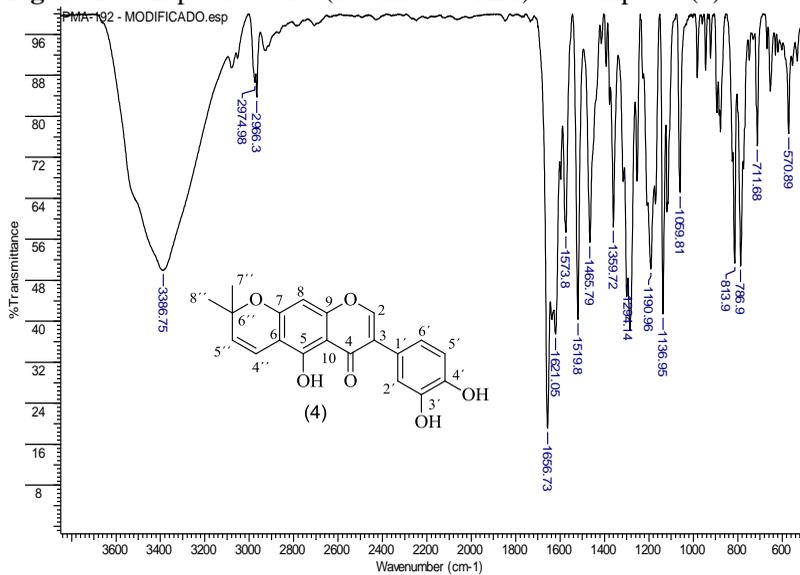


Figura 107. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (4).

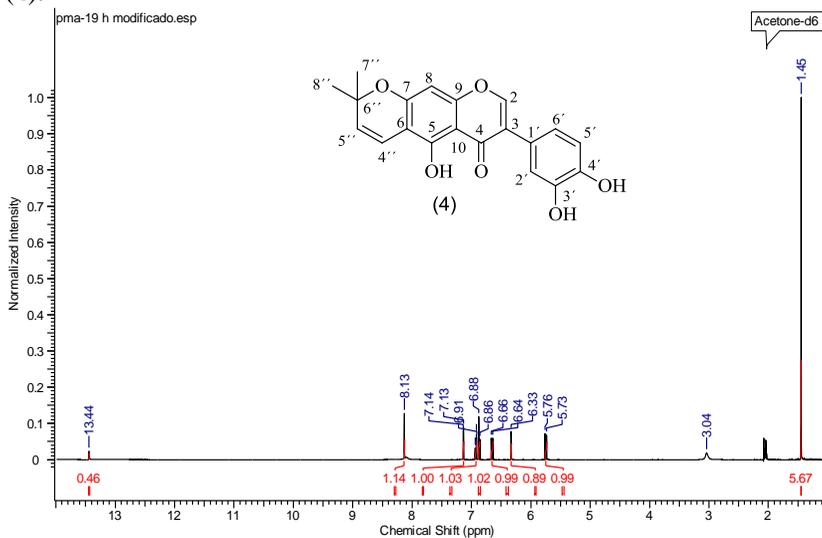


Figura 108. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) ampliado do composto (4).

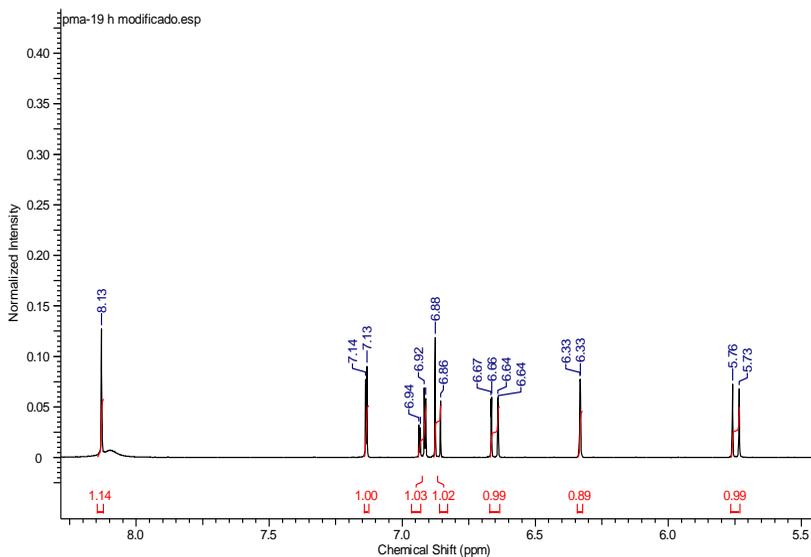


Figura 109. Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (100 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (4).

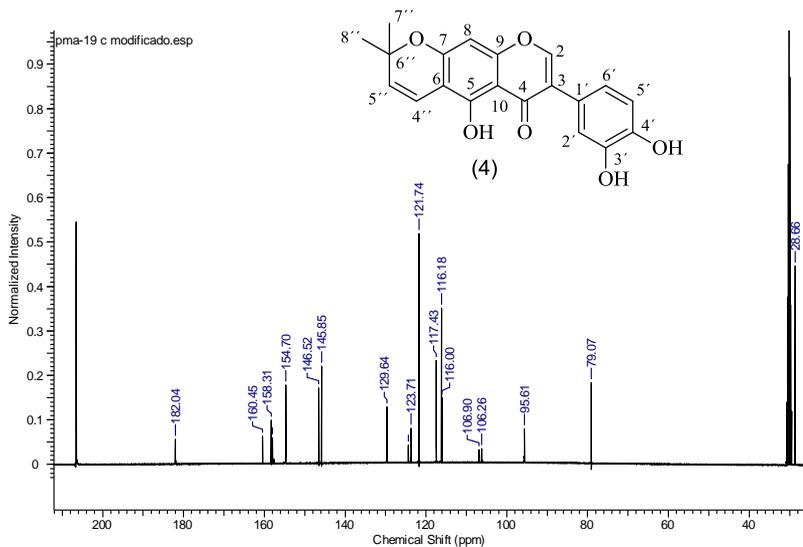


Figura 110. Espectro DEPT (100 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (4).

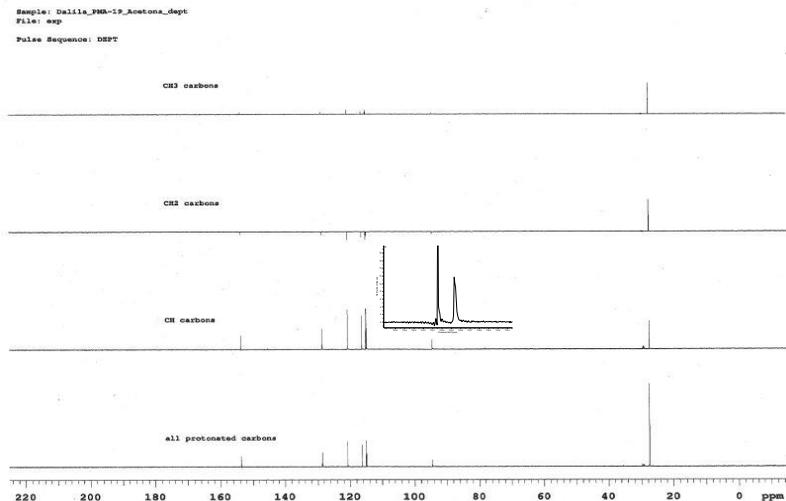


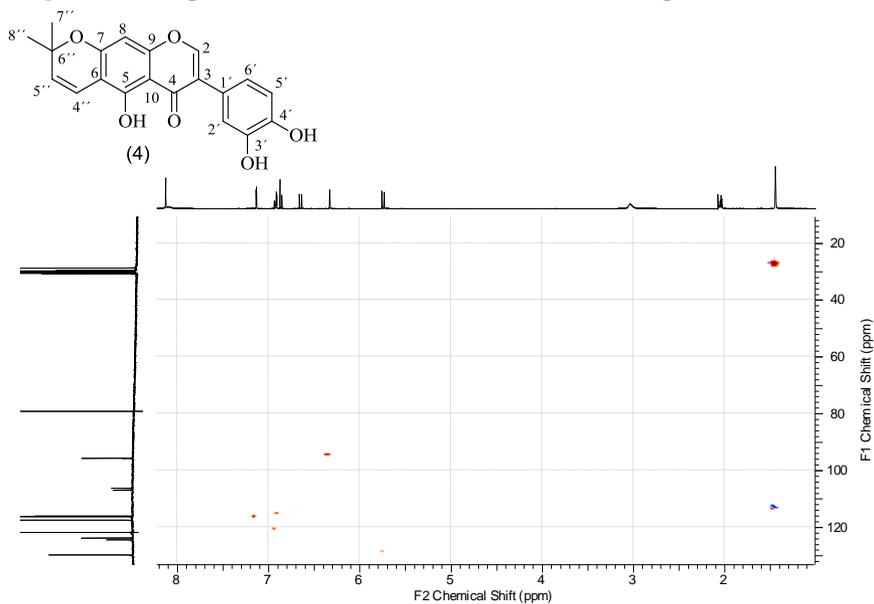
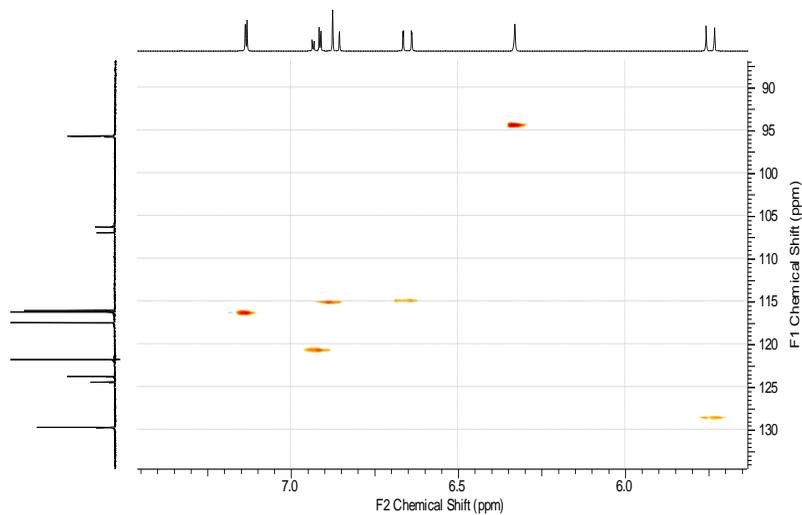
Figura 111. Espectro HMQC (400 MHz, C₃D₆O) do composto (4).**Figura 112.** Espectro HMQC (400 MHz, C₃D₆O) ampliado do composto (4).

Figura 113. Espectro HMBC (400 MHz, C_3D_6O) do composto (4).

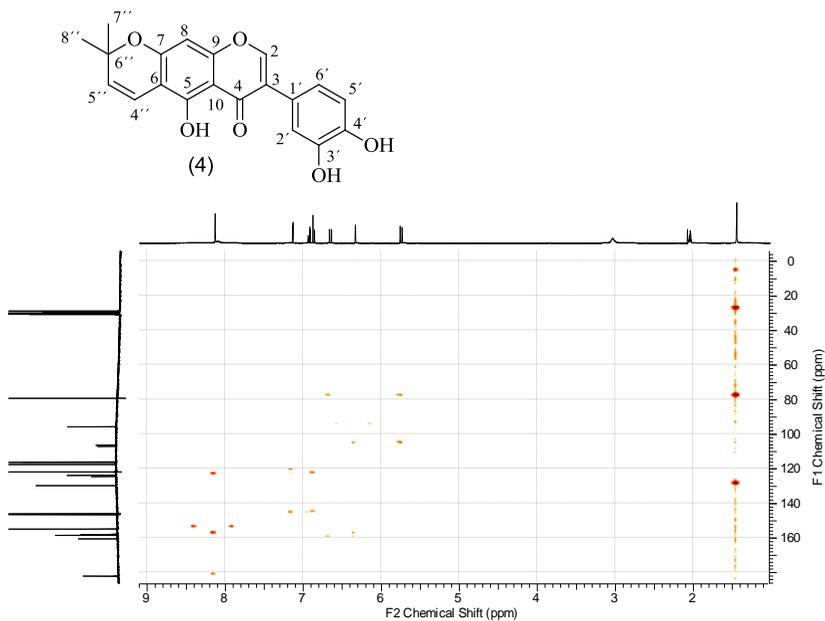


Figura 114. Espectro HMBC (400 MHz, C_3D_6O) ampliado do composto (4).

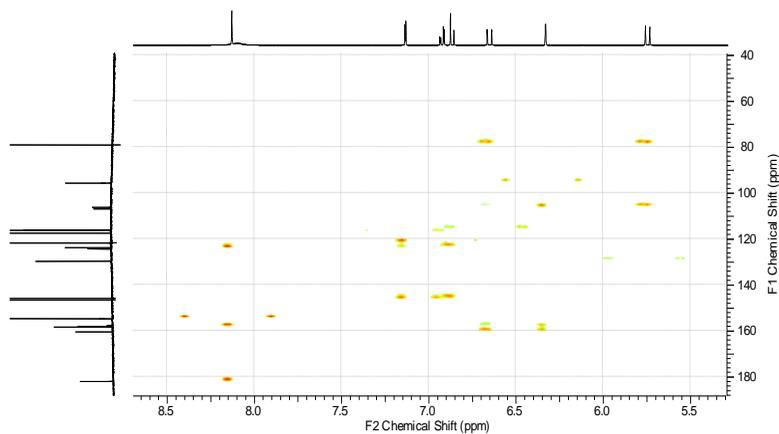


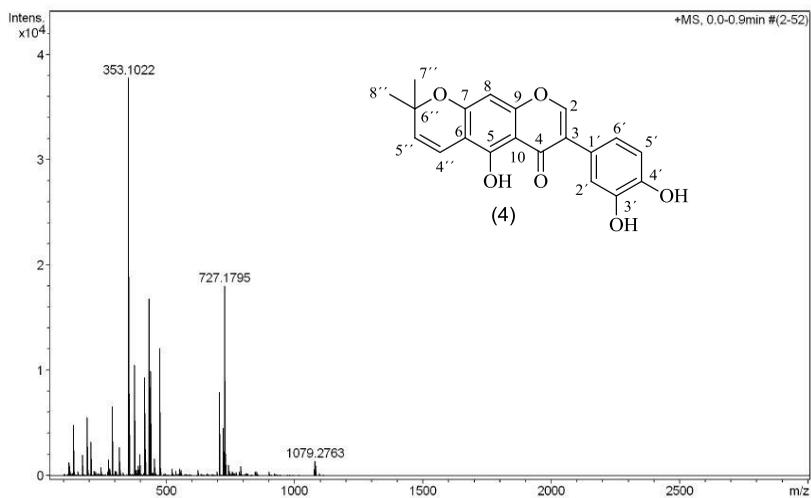
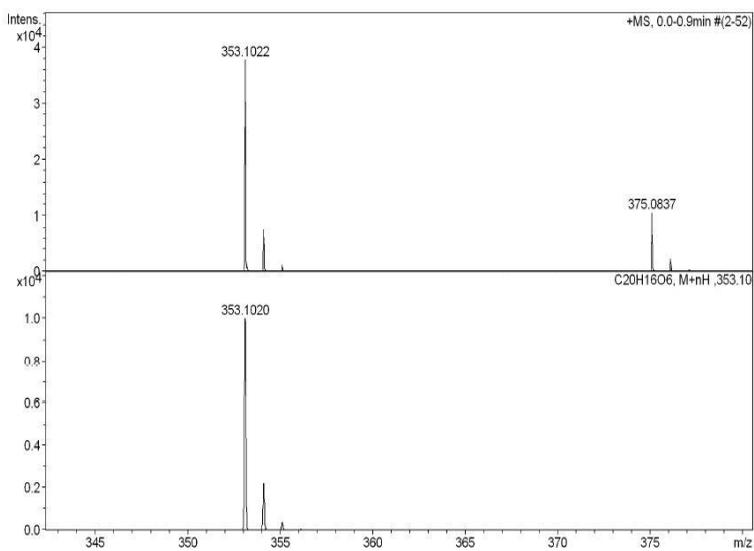
Figura 115. Espectro HR-MS do composto (4) (Parte 1).**Figura 116.** Espectro HR-MS do composto (4) (Parte 2).

Figura 117. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da rutina (5).

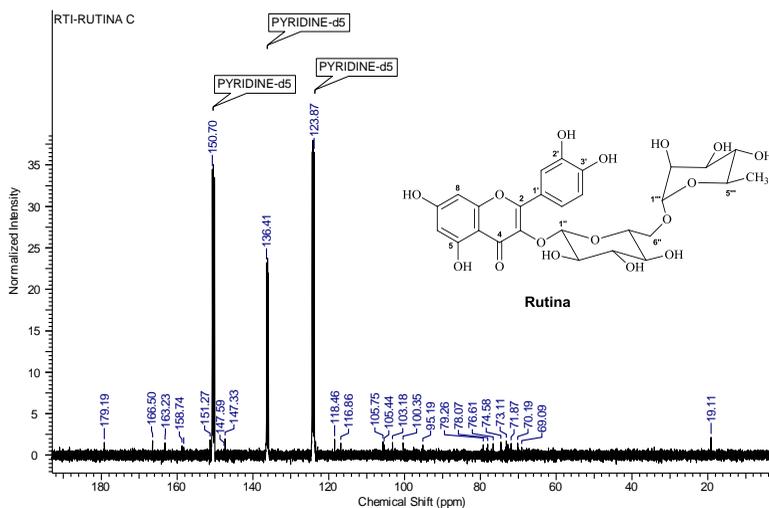


Figura 118. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) da sacarose (6).

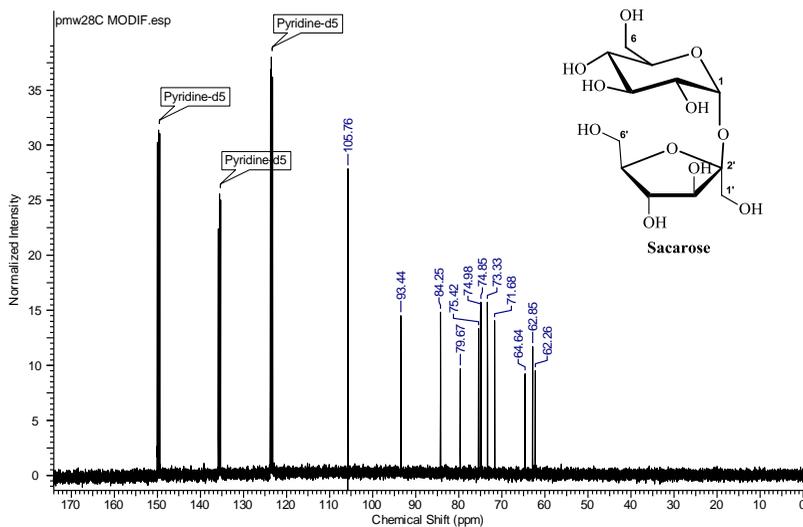


Figura 119. Espectro de Infravermelho (Pastilha de KBr) do composto (7).

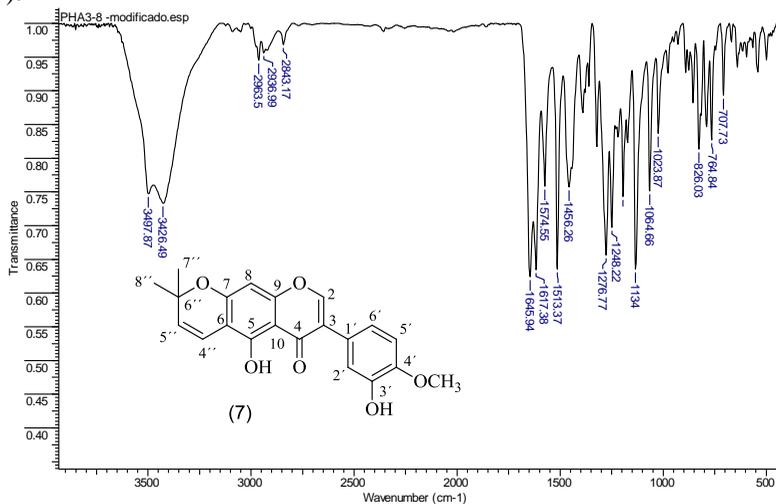


Figura 120. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto (7).

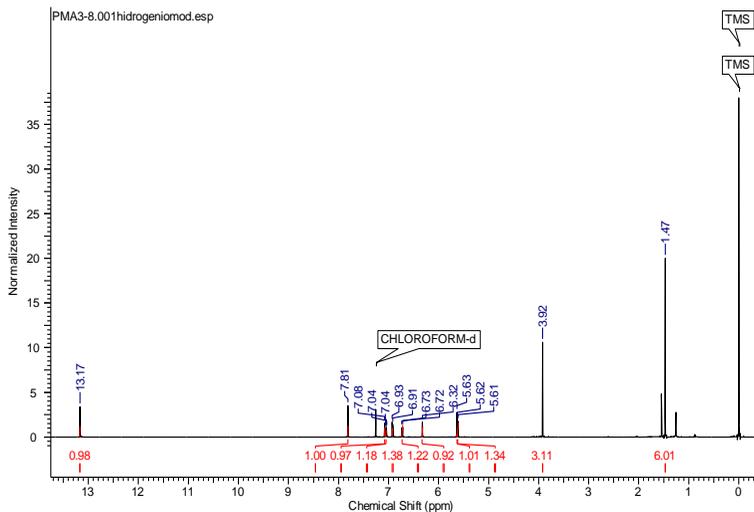


Figura 121. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (7).

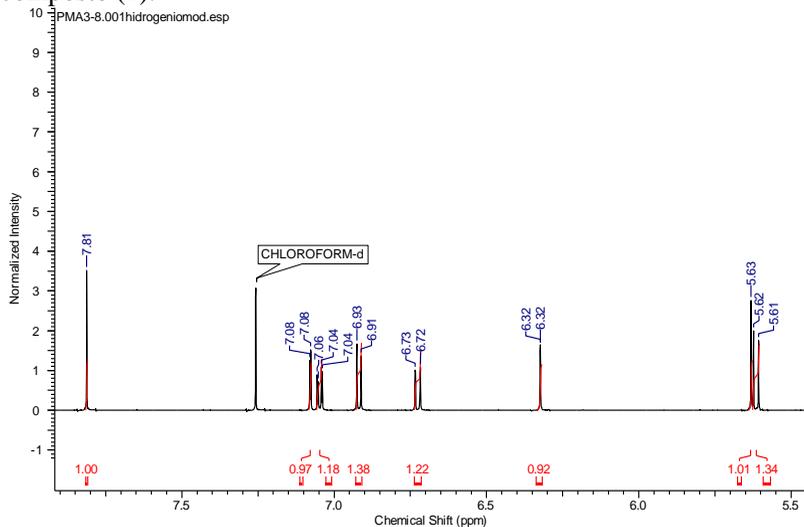


Figura 122. Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (100 MHz, CDCl_3) do composto (7).

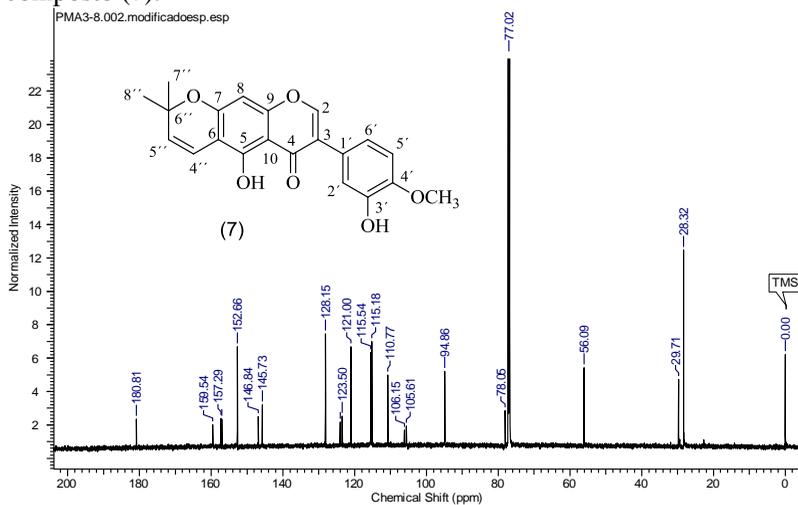


Figura 123. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) do composto (7).

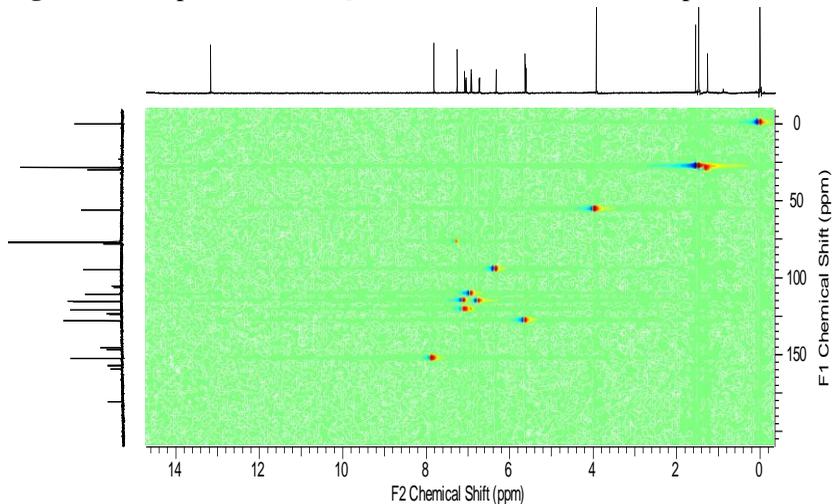


Figura 124. Espectro de HMQC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (7).

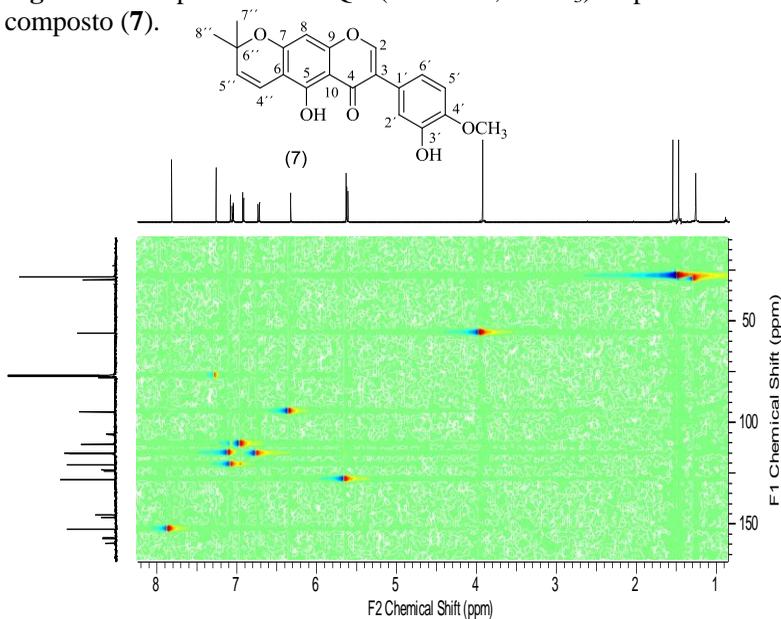


Figura 125. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) do composto (7).

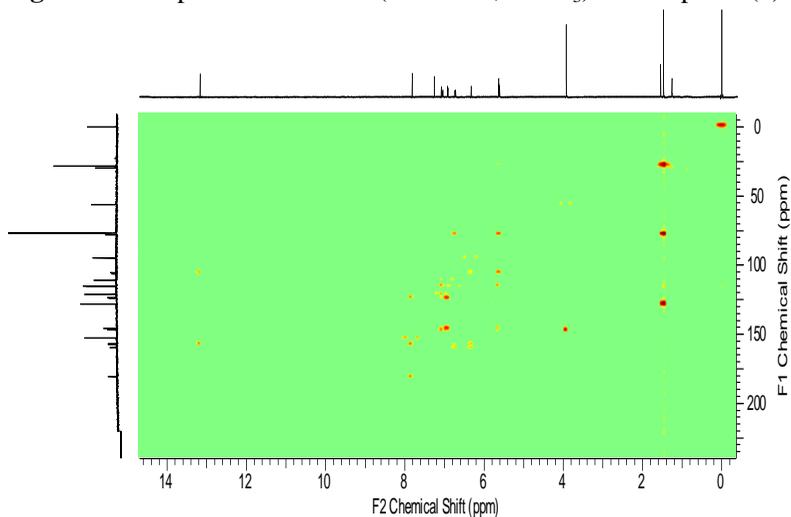


Figura 126. Espectro de HMBC (400 MHz, CDCl_3) ampliado do composto (7).

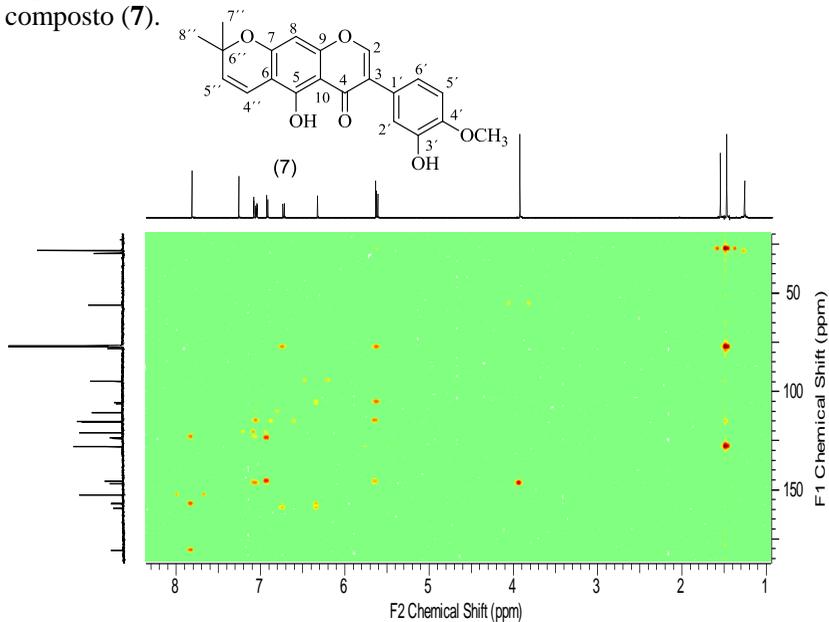


Figura 127. Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) do composto (7) (irradiação de OMe).

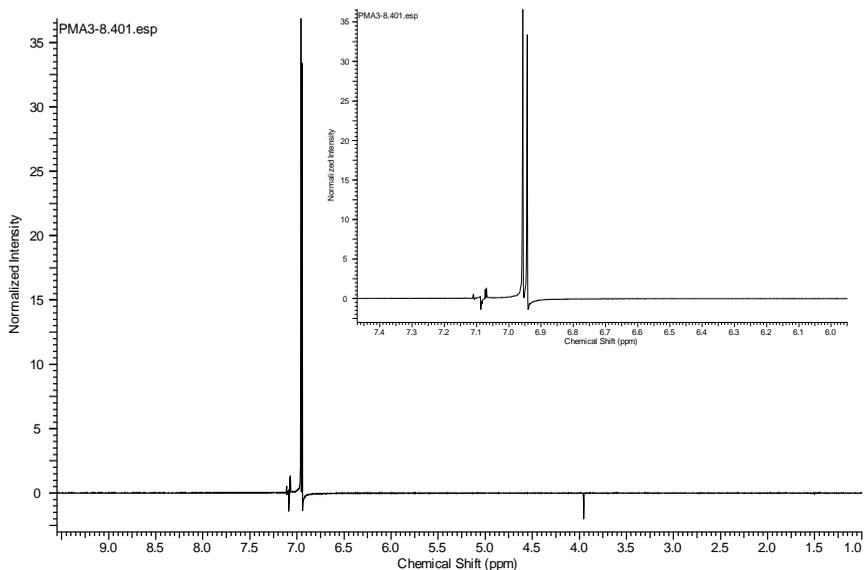


Figura 128. Espectro de NOE (400 MHz, CDCl_3) do composto (7) (irradiação de H-5').

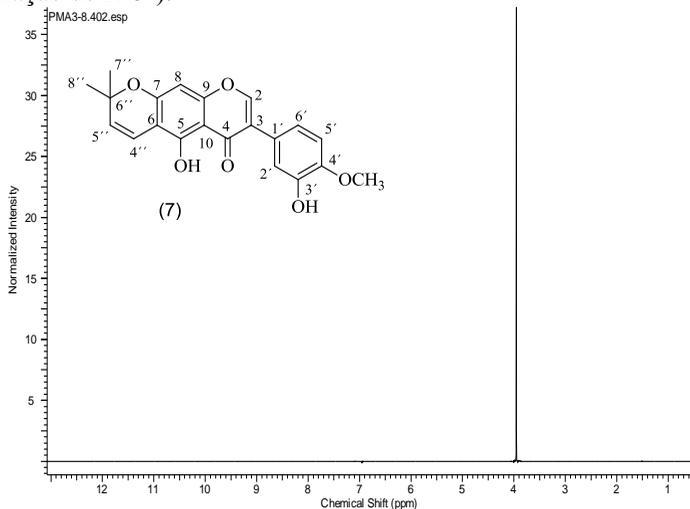


Figura 129. HR-MS do composto (7) (Parte 1).

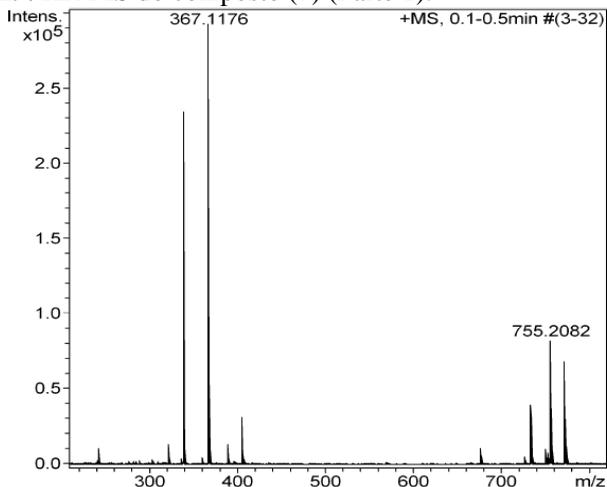


Figura 130. HR-MS do composto (7) (Parte 2).

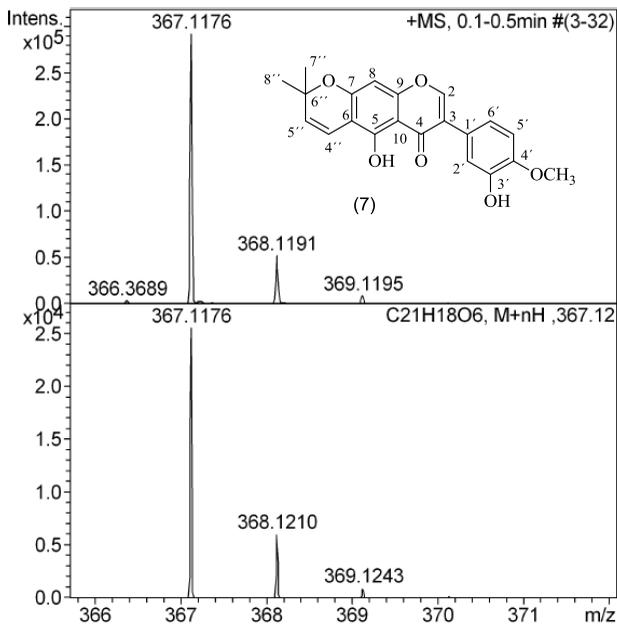


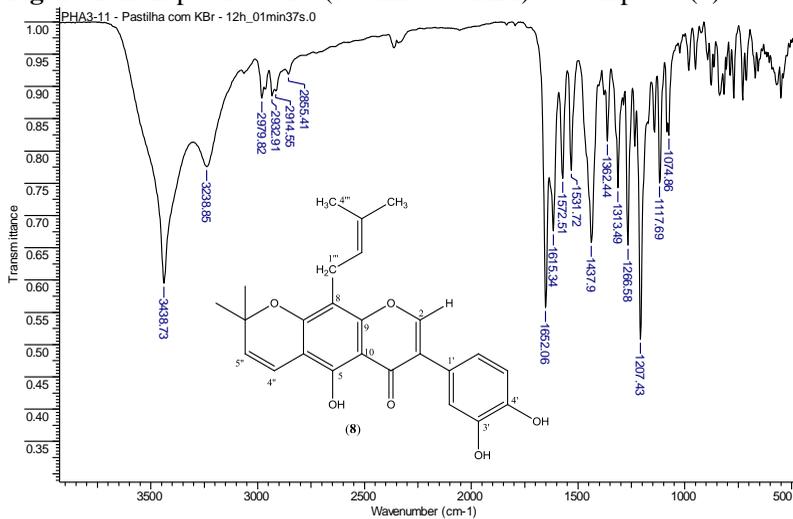
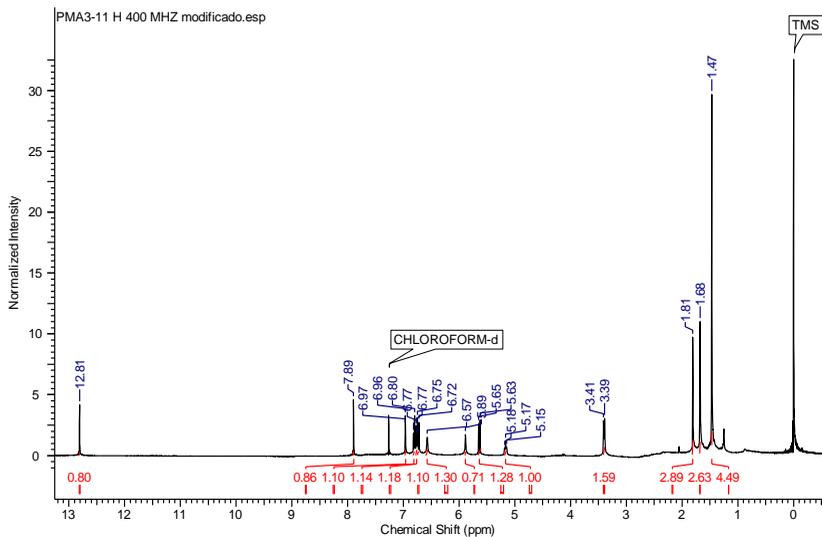
Figura 131. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto **(8)**.**Figura 132.** Espectro de RMN de ¹H (400MHz, CDCl₃) do composto **(8)**.

Figura 133. Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) ampliado do composto (8).

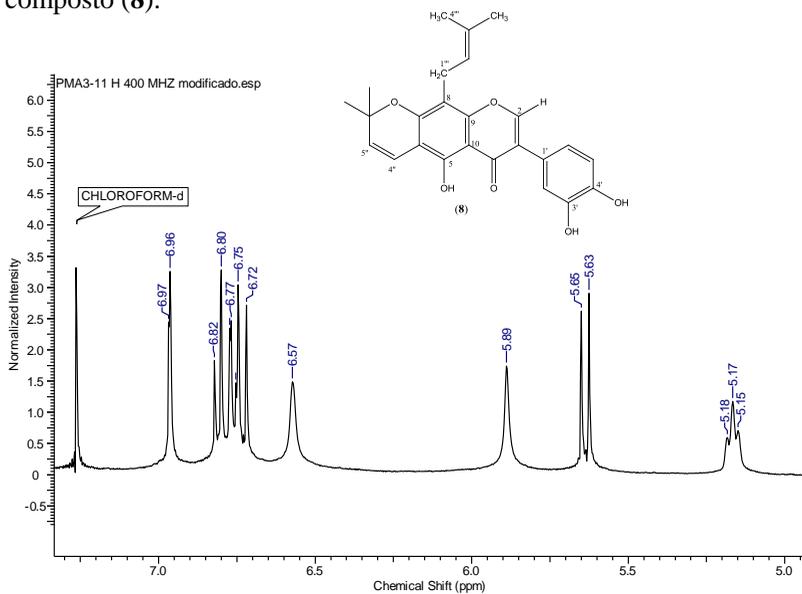


Figura 134. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100MHz, CDCl_3) do composto (8).

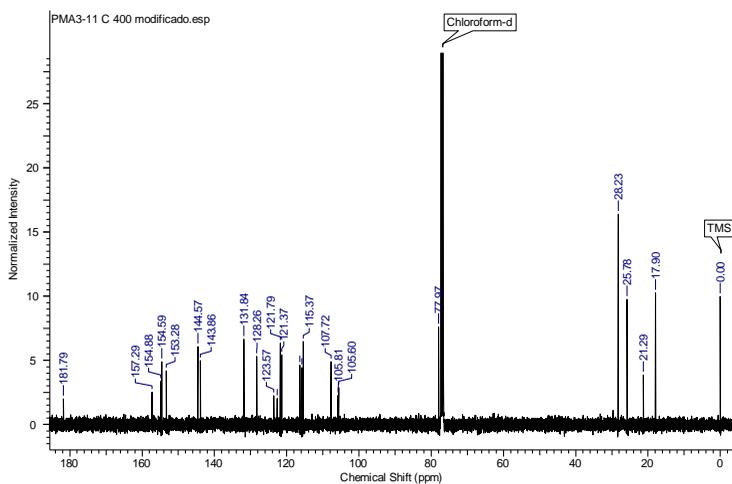


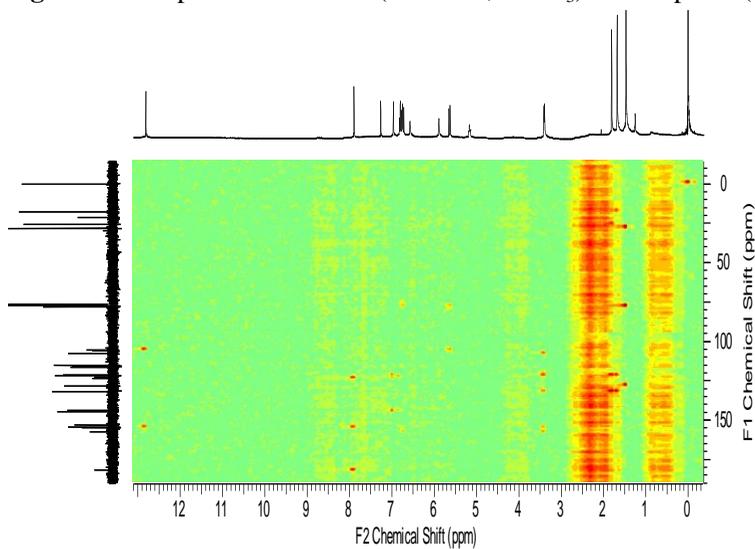
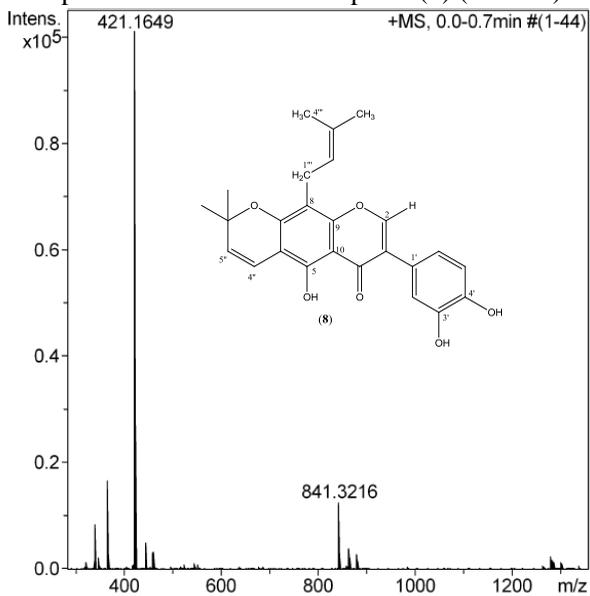
Figura 137. Espectro de HMBC (400MHz, CDCl₃) do composto (**8**).**Figura 138.** Espectro de HR-MS do composto (**8**) (Parte A).

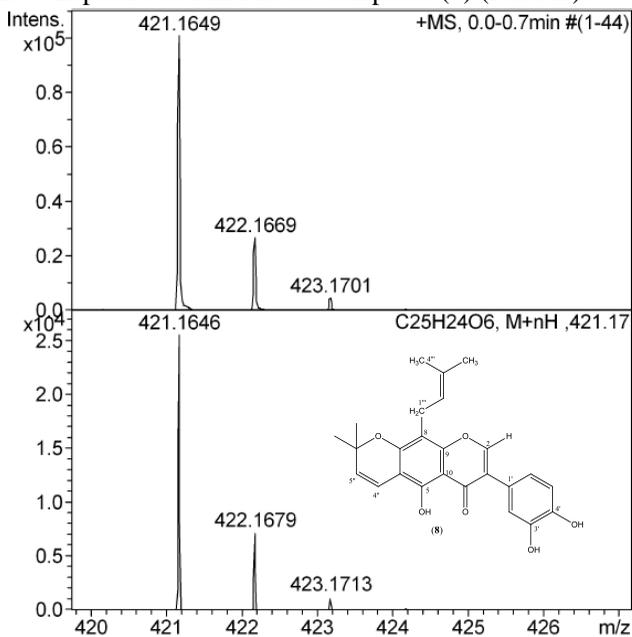
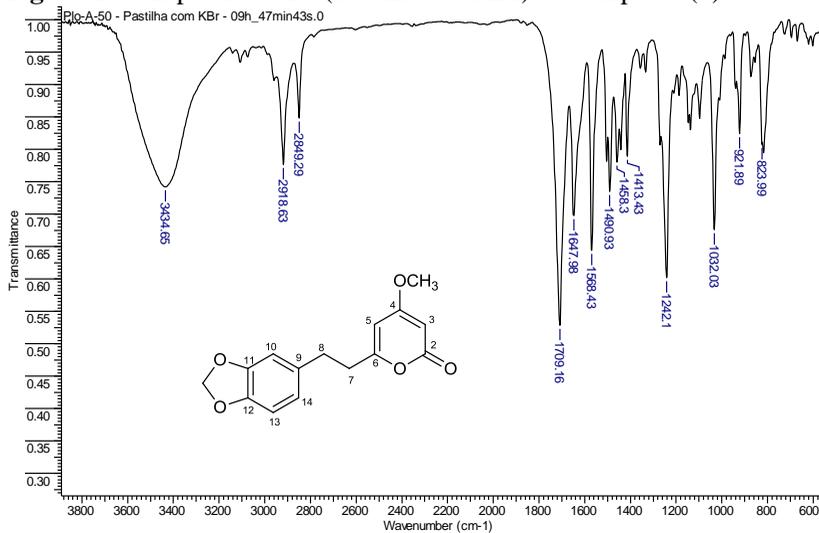
Figura 139. Espectro de HR-MS do composto (8) (Parte B).**Figura 140.** Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (9).

Figura 141. Espectro de RMN de ^1H (400MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (9).

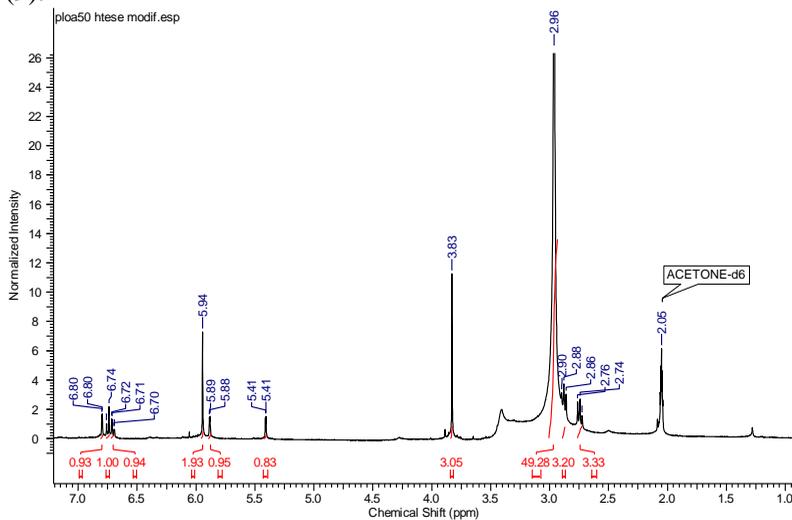


Figura 142. Espectro de RMN de ^{13}C { ^1H } (100MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) do composto (9).

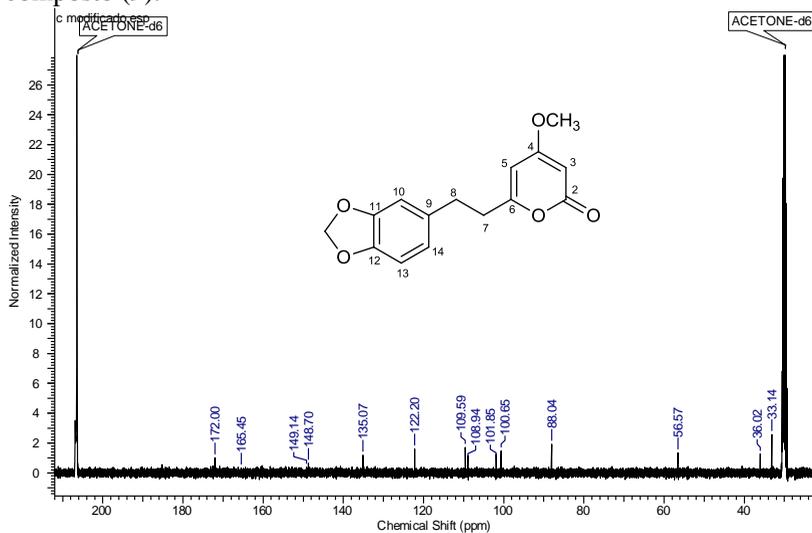


Figura 143. Espectro DEPT (100MHz, C_3D_6O) do composto (9).

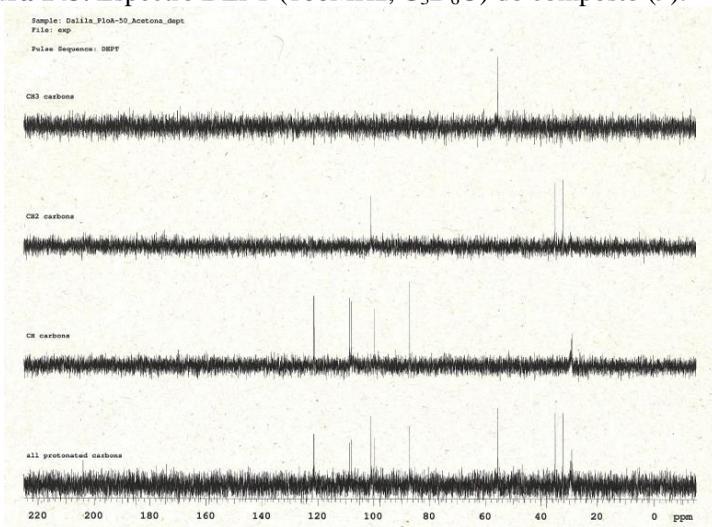


Figura 144. Espectro HMQC (400MHz, C_3D_6O) do composto (9).

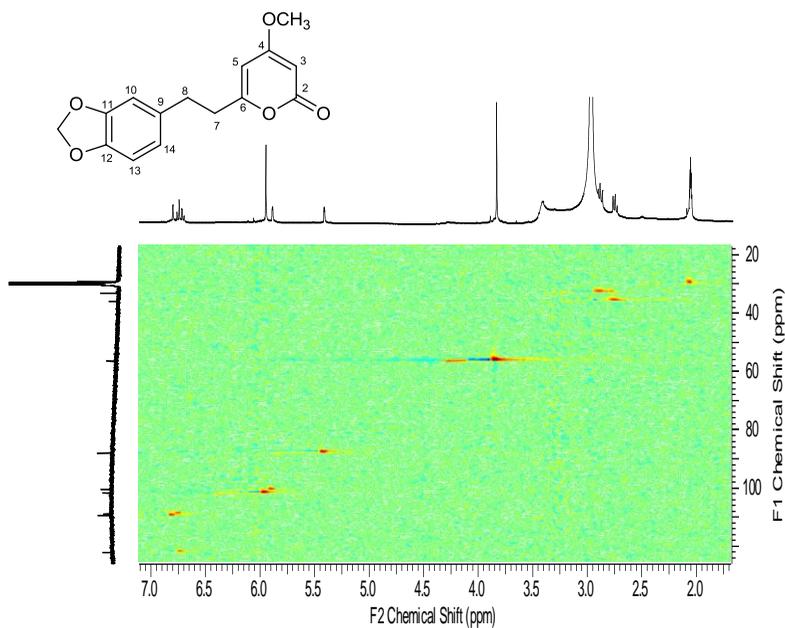


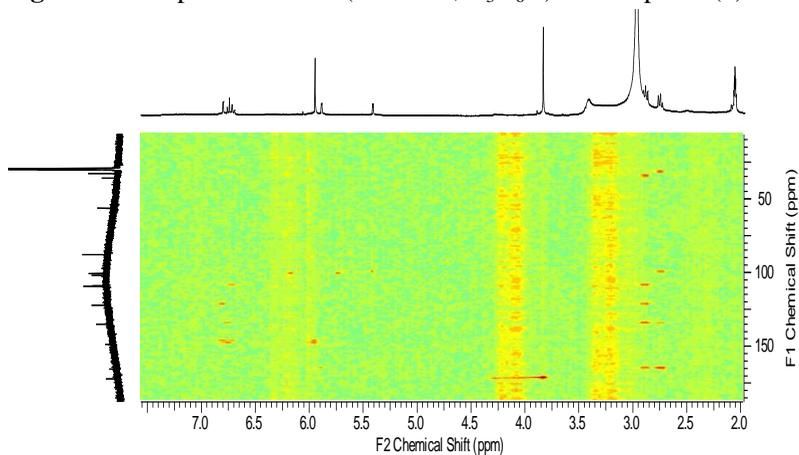
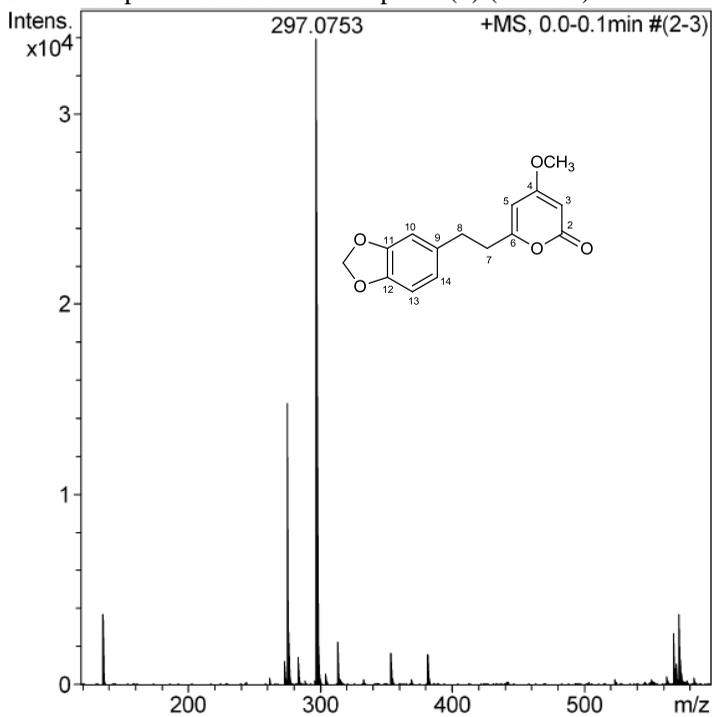
Figura 145. Espectro HMBC (400MHz, C₃D₆O) do composto (9).**Figura 146.** Espectro HR-MS do composto (9) (Parte A).

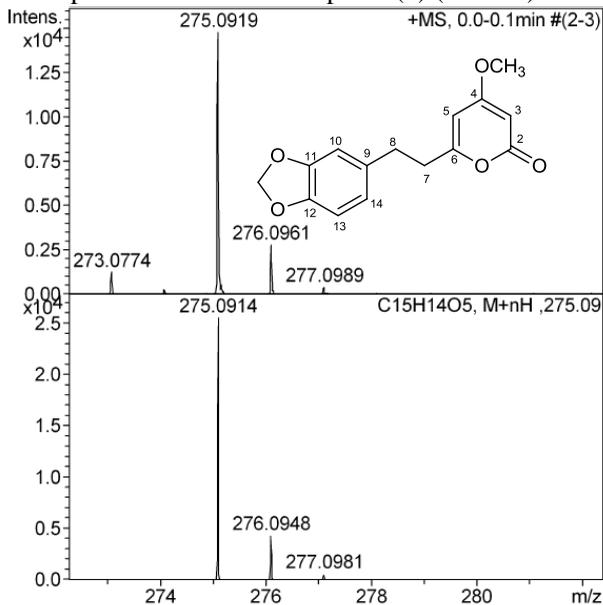
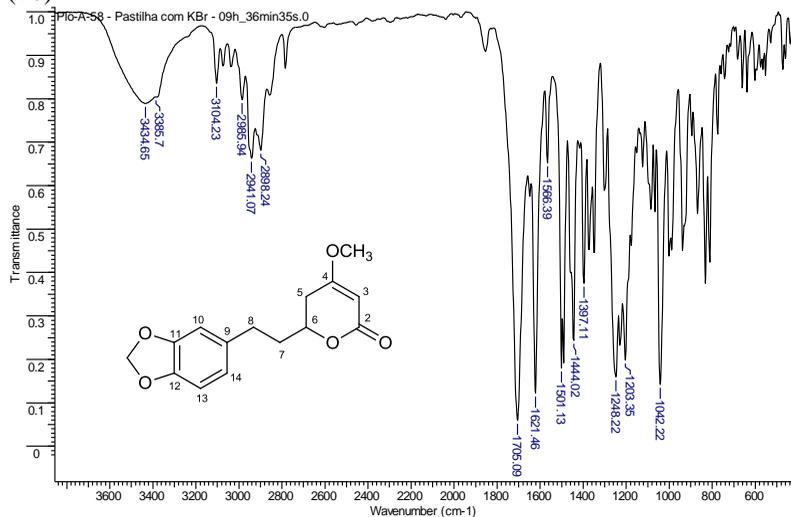
Figura 147. Espectro HR-MS do composto (9) (Parte B).**Figura 148.** Espectro de Infravermelho (Pastilhas de KBr) do composto (10).

Figura 149. Espectro de RMN de ^1H (400MHz, CDCl_3) do composto (10).

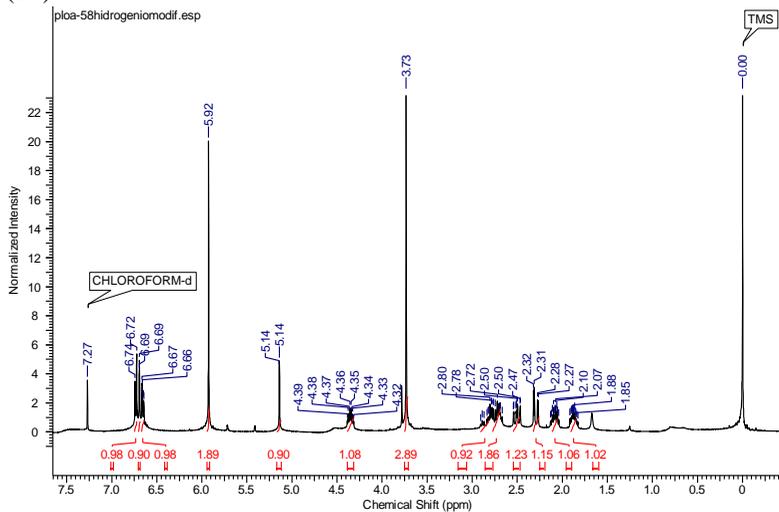


Figura 150. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100MHz, CDCl_3) do composto (10).

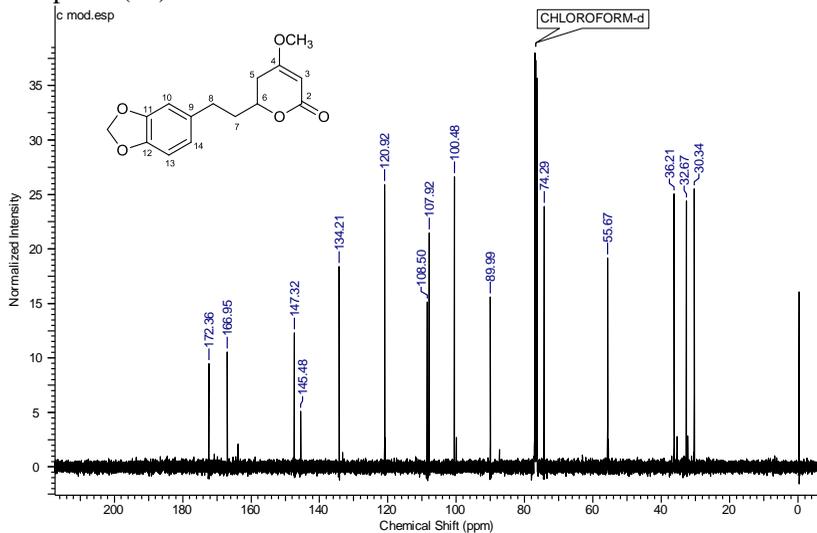


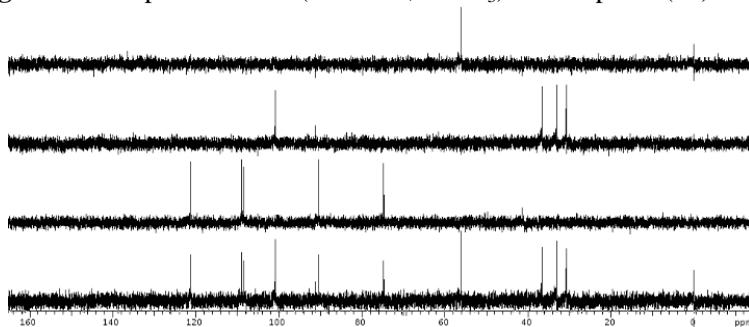
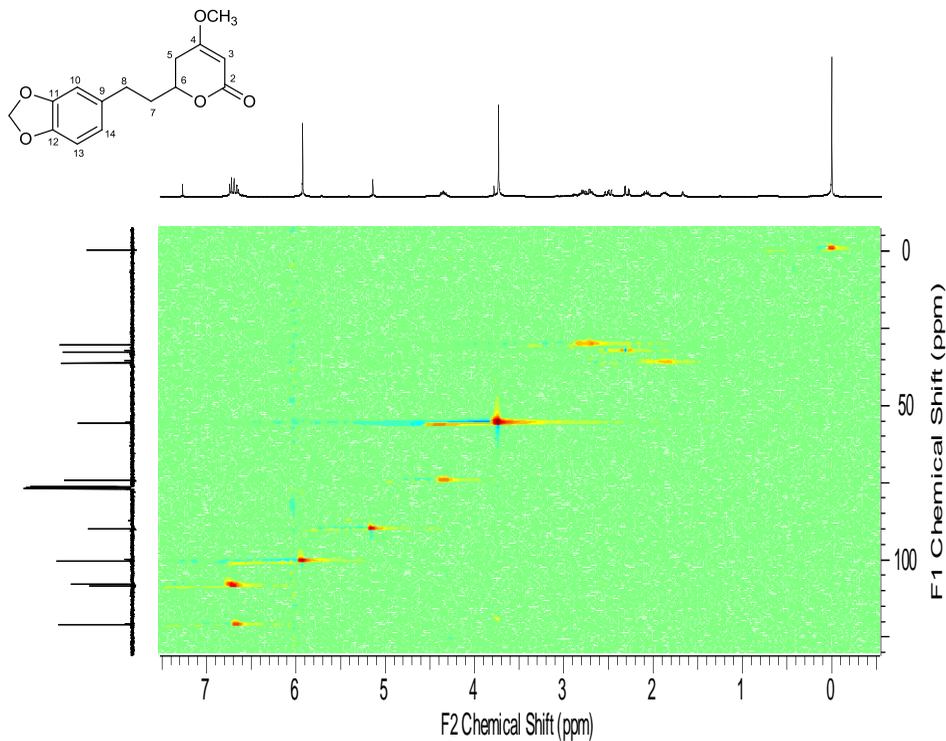
Figura 151. Espectro DEPT (100MHz, CDCl_3) do composto (10).**Figura 152.** Espectro HMQC (400MHz, CDCl_3) do composto (10).

Figura 153. Espectro HMBC (400MHz, CDCl_3) do composto (10).

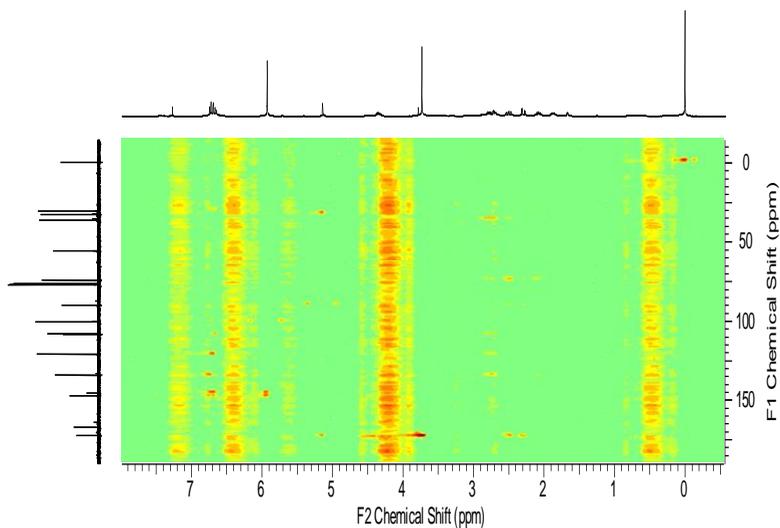


Figura 154. Espectro HR-MS do composto (10) (Parte A).

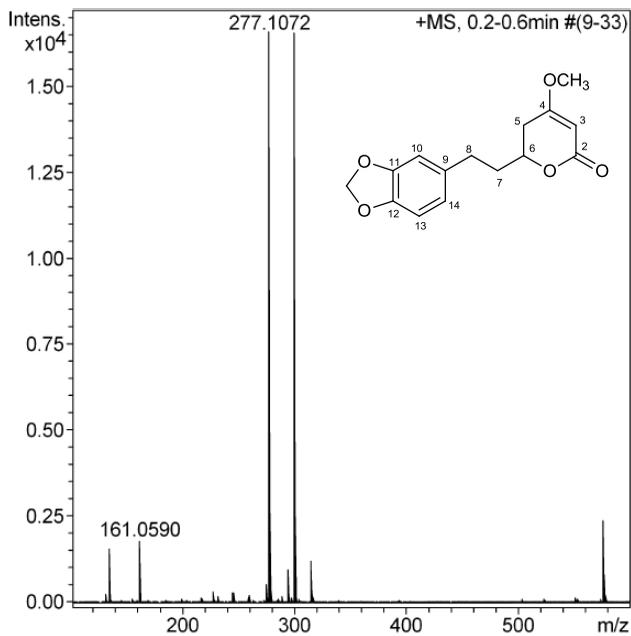


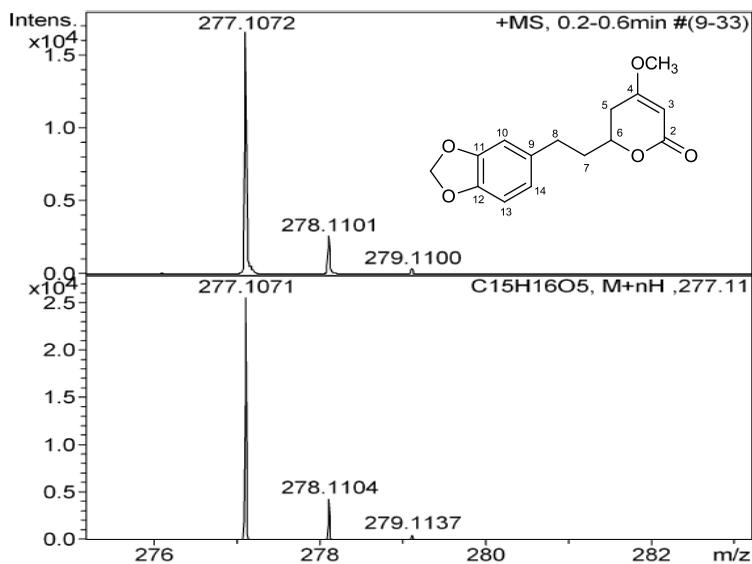
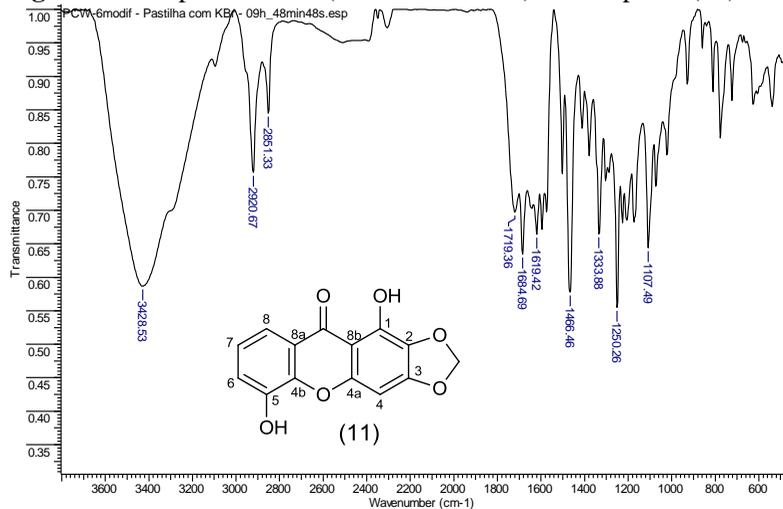
Figura 155. Espectro HR-MS do composto (10) (Parte B).**Figura 156.** Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (11).

Figura 157. Espectro de RMN de ^1H (200MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto (11).

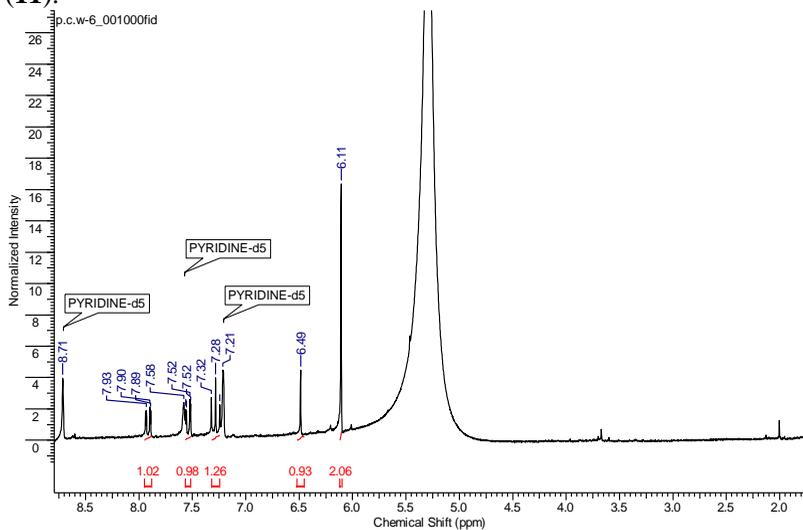


Figura 158. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ampliado do composto (11).

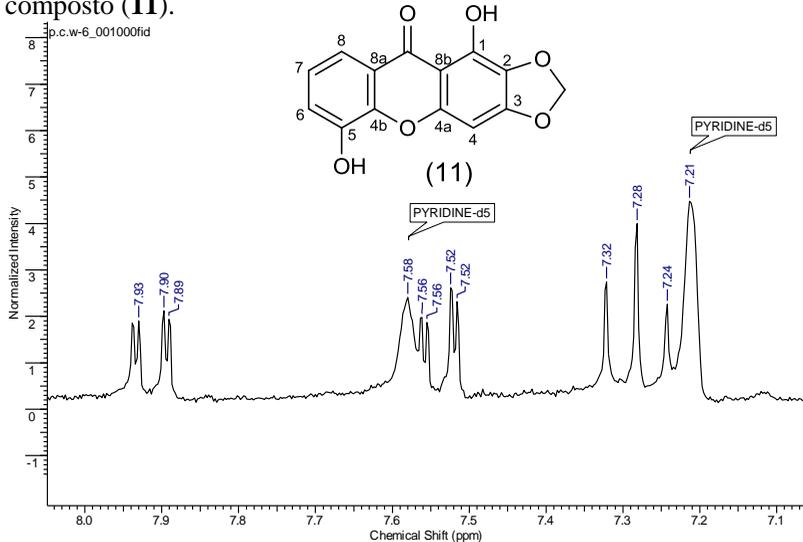


Figura 159. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto (11).

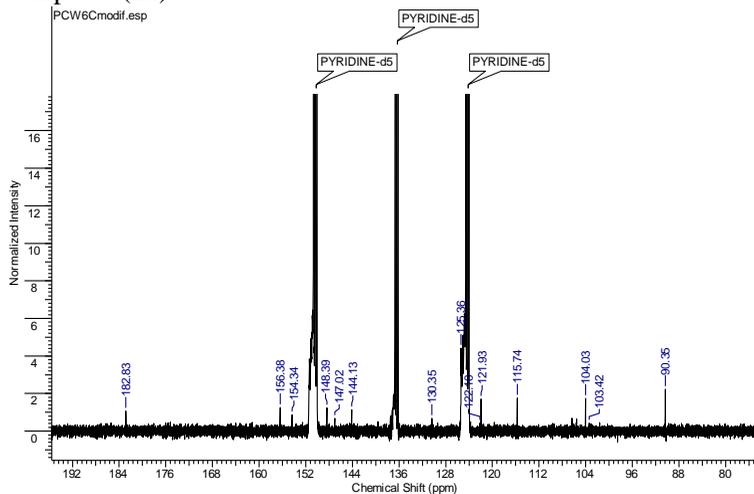


Figura 160. HR-MS do composto (11) (Parte A).

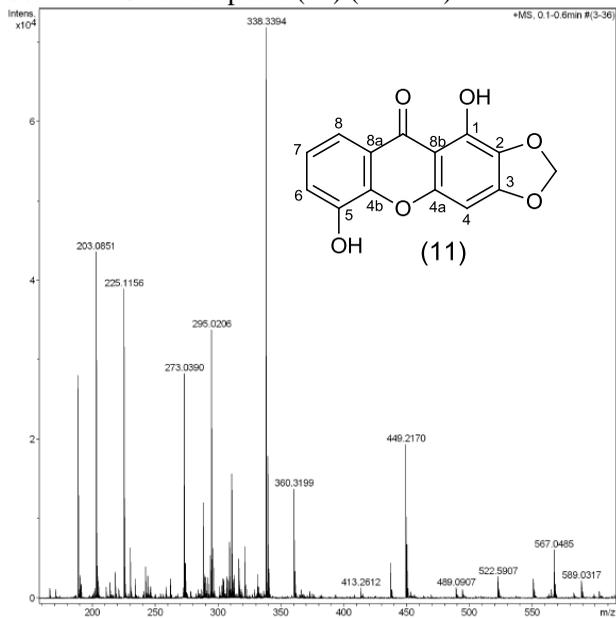


Figura 161. HR-MS do composto (11) (Parte B).

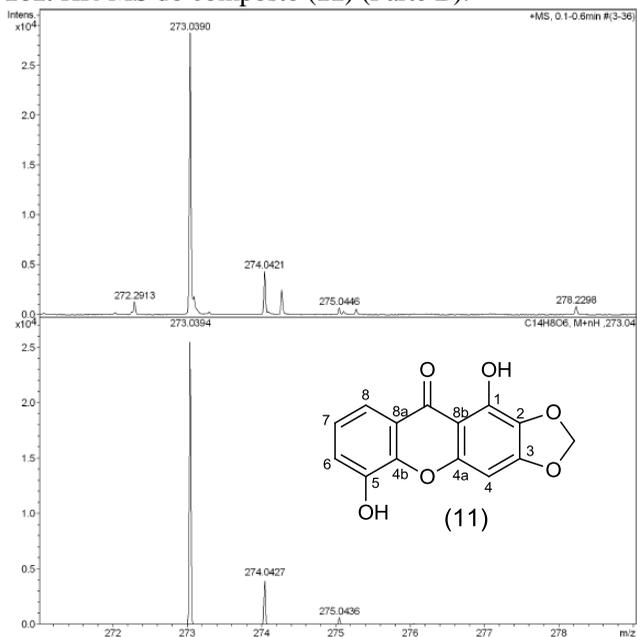


Figura 162. Espectro de IV (Pastilhas de KBr) do composto (12).

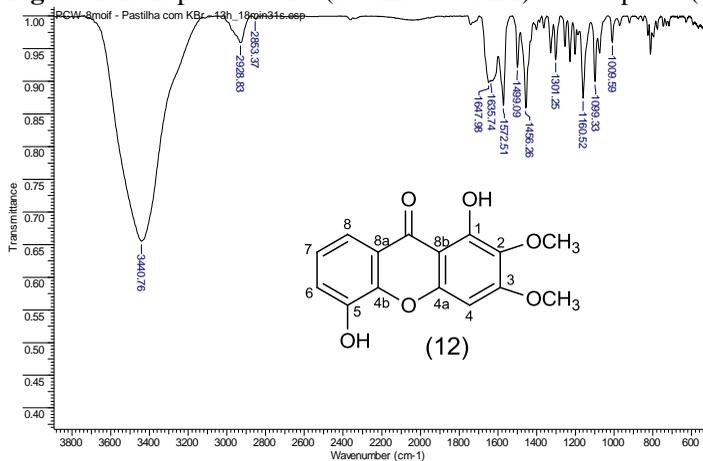


Figura 163. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) do composto (12).

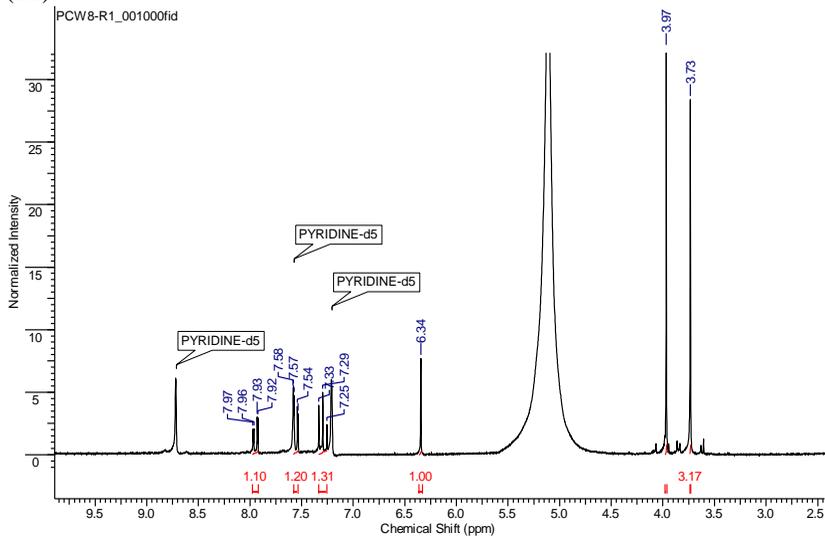


Figura 164. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ampliado do composto (12).

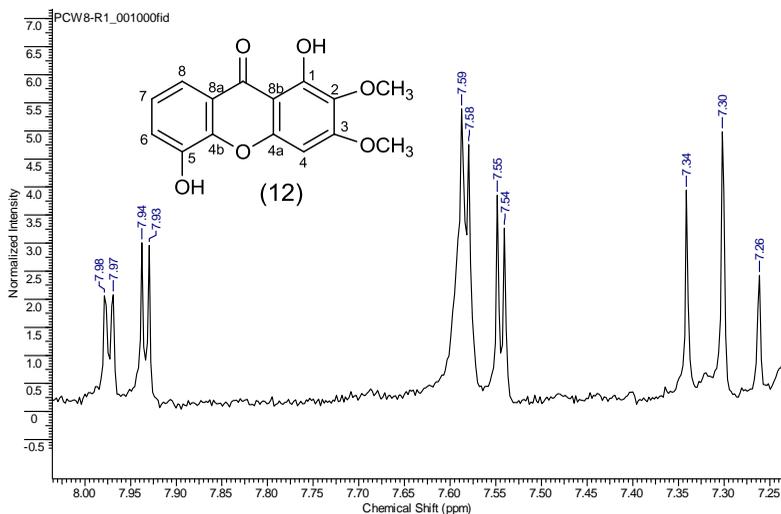


Figura 165. Espectro de RMN de ^{13}C {1H} (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) ampliado do composto (12).

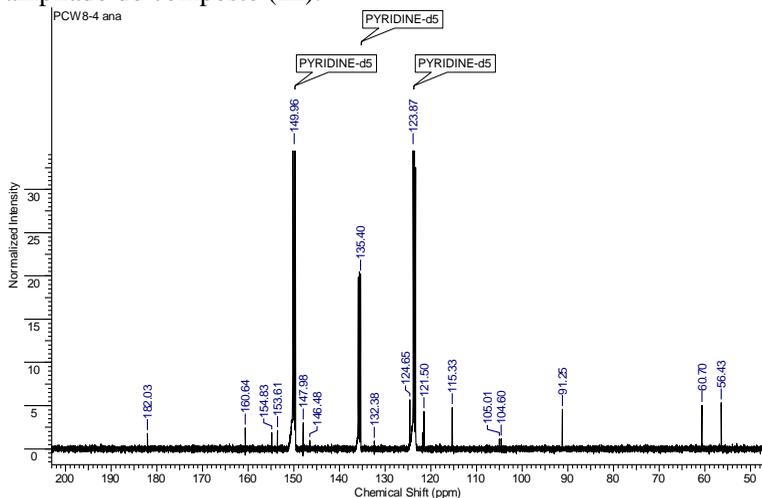


Figura 166. Espectro de massas de alta resolução do composto (12) (Parte A).

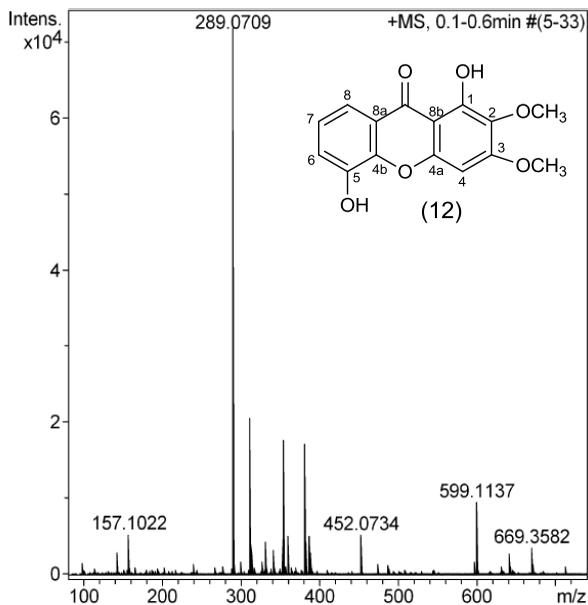


Figura 167. Espectro de massas de alta resolução do composto (**12**) (Parte B).

