

Marcos Pereira

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Polygala linoides*

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal de Santa Catarina
para a obtenção do Grau de Mestre em
Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Miguel Soriano
Balparda Caro

Coorientador: Prof. Dr. Inês Maria
Costa Brighente

Florianópolis/SC
2017

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

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Marcos Pereira

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Polygala linoides*

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Química

Florianópolis, 17 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Vanderlei Gageiro Machado
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Miguel Soriano Balparda Caro
Orientador

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

Prof.^a Dr.^a Beatriz Garcia Mendes

Dr.^a Dalila Venzke

Este trabalho é dedicado a Deus, meus colegas e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, meus pais, minha família e amigos próximos por todo o apoio e amizade para chegar até a realização deste trabalho.

Especialmente a professora dra. Inês Maria Costa Brighente por abrir as portas do laboratório para mim e ter auxiliado durante todo esse tempo através de longas discussões, dedicando muitas horas suas desde a minha iniciação científica e conclusão do curso, até chegarmos finalmente a orientação deste trabalho com objetivo de obter o título de mestre, contribuindo assim de forma inestimável para esta formação na área da Química de Produtos Naturais.

Ao Professor Dr. Miguel Soriano Balparda Caro pela orientação, discussões e apoio para a conclusão deste trabalho.

Aos companheiros de laboratório Ana Paula Ruani, Tiago Tizziani, Leandro Espíndola, Vanessa Machado, Nicolas Decarli, Gustavo Queiroz e Daiane Fiurenza que estiveram durante esse tempo de mestrado sempre apoiando e auxiliando nas mais diversas atividades para a finalização do trabalho.

Ao professor dr. Rafael Trevisan pela identificação e depósito do material vegetal.

A Professora Sara Baraúna da FURB pela realização do teste antidepressivo.

A professora dra. Susana Johann da UFMG pela realização do ensaio de atividade antifúngica.

A professora dra. Michelle Debiasi da FURB e as alunas Bruna Veiga e Camila Paganelli pela realização do ensaio de atividade antibacteriana.

Ao professor dr. Gustavo Amadeu Micke e a dra. Lizandra Bretanha pela colaboração com as análises de SPME-GC-MS.

A Universidade Federal de Santa Catarina e Departamento de Química, com todos os seus professores e demais funcionários, pela manutenção do local para um ensino público de alta qualidade.

A Capes, CNPQ e a UFSC pelo apoio financeiro.

“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e com muita fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira você chega lá.”

Ayrton Senna -

RESUMO

O gênero *Polygala* é o maior da família Polygalaceae, sendo distribuídas por todo o mundo. Estudos mostraram em espécies de *Polygala*, a presença de xantonas, saponinas triterpênicas, oligossacarídeos esterificados e cumarinas, além de relatos de atividades anti-inflamatória, antipsicótica, antiestresse, antidepressiva e antinociceptiva. O objetivo do trabalho foi realizar o estudo biológico e fitoquímico de *P. linoides* na busca de atividades relacionadas ao extrato e frações da planta. Submeteu-se o extrato bruto a cromatografia em sílica, que levou ao isolamento do α -espinasterol, 13b-hidroxi-(13b-S)-feoforbídeo **a**, além de quatro xantonas, a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona, 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona, 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona, 6-desoxijacareubin, sendo a primeira inédita na literatura. Nos extratos de partes da planta, como raízes, caule com folhas e flores, quantificou-se a xantona inédita, 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona. O composto estava presente quatro vezes mais no extrato das raízes comparado ao extrato do caule com folhas, não sendo observado no extrato das flores. Diferentes partes da planta também foram analisadas quanto ao perfil de voláteis com a análise de SPME-CG-MS, sendo encontrado salicilato de metila nas raízes, além deste composto junto ao 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona nas flores. Nenhum composto foi identificado nas folhas. A filtração do extrato bruto em sílica rendeu as frações hexano, acetato de etila e etanol, avaliadas quanto as atividades biológicas. As amostras apresentaram fraca atividade antioxidante. A fração etanol e acetato de etila possuíram maiores valores de teor de fenólicos e flavonoides, e assim, atividade antioxidante mais pronunciada. No teste de inibição da enzima acetilcolinesterase, a fração acetato de etila apresentou inibição acima de 50%. O extrato bruto e a fração etanol foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana. Não se encontrou atividade com as espécies de bactérias testadas e a fração hexano apresentou inibição de crescimento para o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. O ensaio de toxicidade frente a *A. salina* não apresentou atividade para o extrato e frações, demonstrando o provável perfil não tóxico da planta. Avaliou-se a fração etanol quanto o potencial antidepressivo. Resultados mostraram que a fração reduziu o tempo de imobilidade no teste do nado forçado sem alterar a atividade locomotora no teste do campo aberto nas menores doses testadas, promovendo uma atividade antidepressiva nos roedores.

Palavras-chave: *Polygala*, xantonas, atividade biológica

ABSTRACT

The genus *Polygala* is the largest of the Polygalaceae, been widely distributed in the world. Previous chemical research of *Polygala*'s species demonstrated the presence of xanthenes, triterpenoid saponins, oligosaccharides esters and coumarins, besides to be related the anti-inflammatory, antipsychotic, anti-stress, antidepressant, antinociceptive activities. The aim of this work was to analyze the biological effects and the metabolites of the extract and fraction from *P. linoides*. The chromatographic study of crude extract led to the isolation of α -spinasterol, 13b-hidroxy-(13b-S)-pheophorbide **a**, and four xanthenes, 1,5-dihydroxy-2,3-methylenedioxyxanthone, 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone, 1,5-dihydroxy-3-methoxyxanthone, 6-desoxyjacareubin, where the first is a novel compound, The extracts of parts of the plant, like roots, tale with leaves and flowers, were quantified the novel compound 1,5-dihydroxy-2,3-methylenedioxyxanthone. Xanthone was concentrated four-fold higher in the roots extract compared to tale with leaves, being not found in the flowers extract. Different parts of the plant are analyzed about the volatile profile with the SPME-CG-MS. Methyl salicylate was detected in roots, and the same compound with 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone in the flowers. No compound was identified in the leaves. Crude extract was filtered in silica gel to afford different fractions to analyze with biological assays. Sample tested showed low values in the antioxidant assay. Ethanol and ethyl acetate fractions revealed the highest levels in the flavonoids and phenolics assay, and consequently the higher antioxidant activities. Ethyl acetate fraction was the single fraction showed high inhibition with the acetylcholinesterase assay. Crude extract and ethanol fraction were evaluated about the antimicrobial activity, where no significant activity was observed for the bacterias tested, but hexane fraction showed inhibitory grown against the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. No activity is found in the toxicity assay using *A. salina* when crude extract or fractions are tested, demonstrating the probable nontoxic profile of the specie. Ethanol fraction was evaluated about the antidepressant activity. Results showed decrease in the immobility time in the forced swim test without changing the locomotor activity in the open-field test with the minor tested doses, promoting an antidepressant activity in rodents.

Keywords: *Polygala*, xanthenes, biologic assay

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Habitat da espécie <i>Polygala linoides</i> e detalhe de suas flores.....	69
Figura 2. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto	83
Figura 3. Acoplamento entre hidrogênios do anel B	87
Figura 4. Ampliação do espectro bidimensional de COSY	88
Figura 5. Efeito mesomérico no esqueleto xantona.....	88
Figura 6. Cromatograma obtido em LC-MS do composto 3	91
Figura 7. Ampliação da análise de NOESY mostrando a interação espacial.....	97
Figura 8. Biossíntese das xantonas (NEGI et al., 2013)	99
Figura 9. Fluxograma da separação dos compostos X1, X2 e X3 não identificados	101
Figura 10. Sinais do grupo OH quelado de compostos isolados e não identificados	101
Figura 11. Espectro de UV-VIS em metanol para a clorofila a ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$)	102
Figura 12. Estrutura da feofitína a e b	103
Figura 13. Acoplamento vicinal dos hidrogênios em C-3a e C-3b	104
Figura 14. Compostos e seus tempos de retenção no cromatograma	109
Figura 15. Perfil cromatográfico para cada extrato das partes de <i>P. linoides</i>	109
Figura 16. Curva de calibração para a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona	110
Figura 17. Técnica de SPME através da adsorção em headspace	112
Figura 18. Cromatogramas obtidos para as flores, folhas e raízes da planta.....	112
Figura 19. Compostos obtidos por SPME-GC-MS de <i>P. linoides</i>	113
Figura 20. Fracionamento do extrato bruto de <i>P. linoides</i>	114
Figura 21. Complexo formado entre um flavonoide e o AlCl_3 .	116
Figura 22. Atividade antioxidante da quercetina frente ao radical livre DPPH.	116
Figura 23. Complexo formado entre uma xantona e o AlCl_3	117
Figura 24. Reações presentes no teste de inibição da acetilcolinesterase.....	119

Figura 25. Determinação da CI_{50} da fração acetato de etila de <i>P. linoides</i>	120
Figura 26. Reação com 2,3,5-trifeniltetrazólio promovido pelas bactérias	121
Figura 27. Determinação da DL_{50} para a fração hexano de <i>P. linoides</i>	124
Figura 28. Efeito da administração do extrato no TNF (A) e no TCA (B).....	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Metabólitos encontrados em espécies de Polygala	31
Quadro 2. Xantonas oxigenadas encontradas no gênero Polygala	51
Quadro 3. Xantonas O-glicosiladas encontradas no gênero Polygala.....	54
Quadro 4. Xantonas C-glicosiladas encontradas no gênero Polygala.....	55
Quadro 5. Atividades biológicas encontradas nas espécies de Polygala.....	57
Quadro 6. Divisão dos grupos experimentais	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H para α -espinasterol (Composto 1) em comparação com literatura	84
Tabela 2. Dados de RMN de ^{13}C para o α -espinasterol (composto 1) em comparação com literatura	85
Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C referentes a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (composto 2) em comparação com literatura	89
Tabela 4. Dados obtidos do RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (composto 3) em comparação com literatura.....	92
Tabela 5. Dados obtidos do RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (composto 4) em comparação com literatura	95
Tabela 6. Dados obtidos do RMN uni e bidimensionais da 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona (composto 5).....	98
Tabela 7. Dados obtidos do RMN de ^1H e ^{13}C do feoforbídeo (composto 6) em comparação com a literatura.....	106
Tabela 8. Massas da planta fresca e seca e rendimento dos extratos das partes de <i>P. linoides</i>	108
Tabela 9. Conteúdo de fenólicos e de flavonoide e atividade antioxidante exibida pelo extrato bruto e frações de <i>P. linoides</i>	117
Tabela 10. Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase pelo extrato bruto e frações de <i>P. linoides</i>	119
Tabela 11. Inibição do crescimento fúngico na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs – Absorbância
AChE - Acetilcolinesterase
AcOEt – Acetato de etila
ANOVA - Analysis of variance (análise de variância)
ATCC - American type culture collection
ASD - Ágar Sabouraud Dextrose
CCD - Cromatografia em camada delgada
CDCl₃ – Clorofórmio deuterado
CE50 – Concentração efetiva em 50%
CI50 - Concentração inibitória 50%
CIM - Concentração inibitória mínima
CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute
COSY - Correlation spectroscopy
d – duplete
dd – duplo duplete
DEPT - Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DL50 - Dose letal a 50% da população em teste
DMSO - Dimetilsulfóxido
DPPH - 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico
EB - Extrato Bruto
EtOH - Etanol
FAc - Fração acetato de etila
FEt - Fração etanol
FHe - Fração hexano
GC – Gas chromatography – Cromatografia gasosa
GC-MS – Gas chromatography - mass spectrometer - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas
Hex – Hexano
HETCOR – Heteronuclear correlation
HPLC – High performance liquid chromatography – Cromatografia líquida de alta performance
HR-MS – High Resolution – mass spectrometry – Espectrometria de massas de alta resolução
HSQC - Heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy
IA – Índice aritmético
IV - Infravermelho
g – Grama
hrs – Horas

Hz – Hertz
J – Constante de acoplamento
KBr – Brometo de potássio
m - Multiplete
mg – Miligrama
MHz - Mega hertz
MOPS - Ácido morfolinepropano sulfônico
nm – Nanômetro
ppm - Partes por milhão
Pyr-D5 – Piridina deuterada
Rf – Fator de retenção
RMN de ¹H - Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RMN de ¹³C - Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
s – simpleto
SPME - Solid Phase Micro Extration – Microextração por fase sólida
t – tripletp
TCA – Teste do campo aberto
TMS – Tetrametilsilano
TNF - Teste do nado forçado
UFC – Unidades formadoras de colônia
UV - Luz ultravioleta
UV-Vis - Luz ultravioleta e luz visível
V – Velocidade
v.o. – Via oral
μL – Microlitro
μg – Micrograma
δ - Deslocamento químico

Sumário

1	. INTRODUÇÃO.....	27
2	. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	29
2.1	. FAMÍLIA POLYGALACEAE	29
2.2	. GÊNERO <i>Polygala</i>	29
2.2.1	. Metabólitos secundários encontrados para o gênero <i>Polygala</i>	30
2.2.2	. Atividades biológicas encontradas para o gênero <i>Polygala</i>	56
2.2.3	. <i>Polygala linoides</i>	69
3	. OBJETIVOS.....	70
3.1	. OBJETIVO GERAL	70
3.2	. OBJETIVO ESPECÍFICO	70
4	. METODOLOGIA	71
4.1	. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	71
4.2	. MATERIAL VEGETAL.....	72
4.3	. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO.....	72
4.4	. FRACIONAMENTO SÓLIDO-LÍQUIDO.....	72
4.5	. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA RAIZ, CAULE COM FOLHAS E FLORES	73
4.6	. QUANTIFICAÇÃO DA 1,5-DIHIIDROXI-2,3-METILENODIOXIXANTONA NAS RAÍZES, CAULE COM FOLHAS E FLORES	73
4.7	. MICROEXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS DE <i>P. linoides</i> E ANÁLISE POR GC-MS	73
4.8	. TESTES BIOLÓGICOS	74
4.8.1	. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos.....	74
4.8.2	. Determinação do teor de flavonoides	75
4.8.3	. Determinação do poder redutor.....	75
4.8.4	. Determinação da ação sequestradora do radical DPPH	76

4.8.5	. Ensaio de inibição da acetilcolinesterase	76
4.8.6	. Atividade bacteriana.....	77
4.8.7	. Atividade antifúngica	78
4.8.8	. Ensaio de toxicidade com larvas de <i>Artemia salina</i>	80
4.8.9	. Atividade antidepressiva	80
5	. RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
5.1	. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>P. linoides</i>	82
5.1.1	. Composto 1	82
5.1.2	. Composto 2	86
5.1.3	. Composto 3	90
5.1.4	. Composto 4	93
5.1.5	. Composto 5	96
5.1.6	. Outras possíveis xantonas	99
5.1.7	. Composto 6	102
5.2	. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA RAIZ, FLORES E CAULE COM FOLHAS DA PLANTA	108
5.3	. QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DA 1,5-DIHIÓROXI-2,3-METILENODIOXIXANTONA NOS EXTRATOS DAS RAÍZES, CAULE COM FOLHAS E FLORES	108
5.4	. CONSTITUENTES QUÍMICOS VOLÁTEIS DAS RAÍZES, FOLHAS E FLORES DA PLANTA FRESCA EXTRAÍDAS POR SPME COM POSTERIOR ANÁLISE POR GC-MS	111
5.5	. ENSAIOS BIOLÓGICOS	114
5.5.1	. Determinação de fenólicos e flavonoides e da atividade antioxidante	114
5.5.2	. Inibição da enzima acetilcolinesterase	118
5.5.3	. Atividade antibacteriana	120
5.5.4	. Atividade antifúngica	121
5.5.5	. Ensaio de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	123
5.5.6	. Atividade antidepressiva	124
6	. CONCLUSÃO	127

7	. REFERÊNCIAS	129
Anexo 1.	Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do α -espinaesterol (composto 1).....	160
Anexo 2.	HR-MS, IV e RMN uni e bidimensional do 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (composto 2).....	165
Anexo 3.	HR-MS IV e RMN uni e bidimensional do 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (composto 3).....	173
Anexo 4.	HR-MS, IV e RMN uni e bidimensional da 6-desoxijacareubin (composto 4).....	181
Anexo 5.	HR-MS, IV e RMN uni e bidimensional do 1,3-dihidroxi-5-metoxixantona (composto 5).....	188
Anexo 6.	Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do 13b-hidroxi-(13b-S)-feoforbídeo a (composto 6)	196

1. INTRODUÇÃO

Desde o início da história do homem, a sociedade buscava na fauna e flora remédios para diversas finalidades conhecidas. Os egípcios tinham conhecimento dos opioides e os usavam como anestésicos, os chineses usavam o óleo obtido de sementes de algodão como um contraceptivo masculino e antigas sociedades peruanas mastigavam folhas de coca como estimulantes e também para reduzir a fome. Sendo assim, o estudo dos produtos naturais obtidos de plantas teve papel fundamental na química e medicina, além de grande importância no desenvolvimento da humanidade.

Os produtos naturais presentes em plantas são produzidos a partir do metabolismo primário dos vegetais. Os compostos pertencentes a este metabolismo são indispensáveis para sua sobrevivência e desenvolvimento, e sendo assim, estão presentes em qualquer espécie conhecida, como é o caso de aminoácidos, lipídeos e açúcares. Porém, alguns compostos são encontrados apenas em algumas plantas, pertencendo ao metabolismo secundário destas espécies. Estes compostos possuem grande importância, pois cumprem funções altamente específicas, como atrair insetos para a transferência de pólen, agir como pesticidas naturais de defesa contra herbívoros, proteger contra a luz ultravioleta em casos de longa exposição ao sol, entre outras funções, agindo assim como meio de proteção e sobrevivência para a continuidade da espécie. Compostos que fazem parte do metabolismo secundário de plantas geralmente possuem potencial atividade biológica para seres humanos e alguns são usados amplamente como medicamentos até os dias de hoje. Desse modo, tendo conhecimento químico do grande número de plantas que até hoje não foram estudadas e da potencial atividade biológica existente em produtos naturais, diversos compostos ainda desconhecidos podem ter a sua inserção no mercado atual de fármacos e na indústria química.

Como exemplos da diversidade de metabólitos secundários encontrados em plantas que são usadas nos dias de hoje, podemos citar a quinina, usada como antimalárico, extraída das cascas de espécies de *Cinchona*; a salicina, isolada da planta *Salix alba*, que deu origem a um dos remédios mais vendidos no mundo, a aspirina®, e o paclitaxel, com nome comercial de Taxol®, fármaco usado para tratamento de câncer de pulmão, mamas e ovários, que foi extraído primeiramente das cascas da espécie *Taxus brevifolia*.

O gênero *Polygala* possui mais de 725 espécies espalhadas pelo mundo, onde o acentuado cheiro de salicilato de metila encontrado em

suas raízes atraiu inicialmente a atenção de diversos pesquisadores. Além disso, o uso medicinal de *P. senega* e *P. tenuifolia* fez com que suas espécies fossem ainda mais estudadas, levando a descoberta de diversos metabólitos secundários com aplicações diferentes. Assim, até hoje o gênero é objeto de fascínio, onde novos achados são frequentemente relatados.

Dessa forma, a presente dissertação engloba o estudo biológico e fitoquímico de *Polygala linoides*, que não possui relatos na literatura até o momento. Esta planta pertence ao gênero *Polygala*, de cujas espécies estudadas, foi observada a presença de metabólitos secundários, como xantonas, cumarinas e estilpironas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FAMÍLIA POLYGALACEAE

A família Polygalaceae Hoffman & Link (1809) é representada por 19 gêneros e aproximadamente 1.300 espécies distribuídas por todo o mundo, estando ausentes apenas na nova Zelândia e nas zonas Árticas e antárticas. No Brasil, a família é representada por 240 espécies pertencentes a 6 gêneros, sendo o maior deles o gênero *Polygala*, com cerca de 110 espécies e 30 variedades (PAIVA 1998, MARQUES & PEIXOTO 2007).

O uso terapêutico comprovado do salicilato de metila e de algumas saponinas encontrados em várias espécies da família (HARBONE & BAXTER, 1995) tem despertado o interesse de pesquisadores, justificando a importância de estudos aprofundados sobre a família.

2.2. GÊNERO *Polygala*

Dentre as 110 espécies conhecidas para o gênero *Polygala*, 19 estão catalogadas na Flora Ilustrada Catarinense, sendo que a maioria delas são pequenas ervas, bastante ramificadas, com ramos finos e flores pequenas, as quais variam do branco ao lilás (WURDACK & SMITH, 1971).

O gênero *Polygala* tem origem na palavra grega que significa “muito leite”, o qual se acreditava que as plantas aumentavam a produção de leite em gados (COOMBES, 2012). Esta possível relação despertou o interesse na planta, porém, nenhum estudo confirmou esta propriedade nas espécies. Apesar disso, o gênero apresenta inúmeros trabalhos quanto ao potencial biológico presente nas espécies.

Polygala senega L. foi a primeira a ser investigada quanto a suas atividades biológicas. Ela é uma planta nativa do Canadá e leste dos Estados Unidos, sendo cultivada em grande escala na Europa. A espécie é comprovadamente eficaz contra bronquite crônica e faringite (Resolução nº 89, de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária), além de ser utilizada também pela medicina popular como expectorante, para o tratamento de reumatismo, asma e coqueluche (GRONDONA, 1948; MARQUES 1988, 2003). Além do potencial presente na medicina popular, algumas espécies também têm outros fins, como as espécies africanas *Polygala myrtifolia* L., *Polygala virgata* Thunb. e *Polygala fruticosa* Berg., que são cultivadas para uso ornamental e a espécie *Polygala butyracea* Heckel, a qual é cultivada no

continente africano para fins alimentícios, onde suas sementes são consumidas (PAIVA, 1998).

2.2.1. Metabólitos secundários encontrados para o gênero *Polygala*

As espécies do gênero *Polygala*, são comumente caracterizadas pelo acúmulo de salicilato de metila em suas raízes, sendo este, o principal composto responsável pelas características organolépticas na planta, tal como observado em diversos estudos com as espécies do gênero (PIZZOLATTI et al., 2009, HAYASHI & KAMEOKA, 1995, ROCHA et al., 2012).

Estudos fitoquímicos têm descrito diversas classes de metabólitos secundários nas espécies de *Polygala*, como as saponinas triterpênicas, oligossacarídeos esterificados, esteróis, flavonoides, cumarinas, xantonas e raramente estirilpironas, diidroestirilpironas, benzofenonas e isoflavonas. Os diversos compostos encontrados nas espécies mais estudadas do gênero podem ser encontrados no quadro 1.

Como as xantonas foram os principais fitoconstituintes isolados de *P. linoides*, as estruturas desta classe relatadas em espécies do gênero se encontram nos quadros 2, 3 e 4, onde elas foram divididas em xantonas oxigenadas (X) e xantonas glicosiladas, sendo O-glicosiladas (XO) ou C-glicosiladas (XC).

1,3-dihidroxi-2-metoxixantona (X6)		
7-O- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosil]-1-hidroxixantona (XO1)	Xantona glicosilada	
7-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil]-1-hidroxixantona (XO2)		
4-C- $[\beta$ -D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona (XC1)		
2-C- $[\beta$ -D-glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona (XC2)		
Estigmasterol	Esteroides	LI et al., 1999
Estigmasterol 3-O-D-glucosídeo		
Ácido p-hidroxibenzóico	Ácido benzóico	
7-hidroxi-1-metoxixantona (X7)	Xantona	
1,2,8-trihidroxixantona (8)		
2-C- $[\beta$ -2'-benzoil-glucopiranosil]-1,3,6,7-tetrahidroxixantona (XC3)	Xantona glicosificada	
7-O- $[\alpha$ -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-1-hidroxixantona (XO3)		
2-hidroxi-1,6,7-trimetoxixantona (X9)	Xantona	LIN et al. 2005
1,4-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona (X51)		
7-hidroxi-1,2-dimetoxixantona (X10)		
2,7-dihidroxi-1-metoxixantona (X11)		

	1-metoxi-2,3-metilenodioxixantona (X50)		
	3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona (X3)		CHEN et al., 2005
	2-hidroxi-1,7-dimetoxixantona (X12)		
<i>P. chinensis</i>	Suchilactona	Lignana	GHOSAL et al., 1973
	Chisulactona		
	Helioxantina		
	Chinensina		GHOSAL et al., 1974a
	Chinensinaftol		GHOSAL et al., 1974b
	Chinensinaftol metil eter		
	Arctigenina-4'-glucosídeo	Lignana glicosilada	GHOSAL et al., 1974c
	Arctigenina-4'-gentiobiosídeo		
	Afzelina	Flavonoide glicosilado	
	Miricitrina		
	Rutina		
	Eupalitina-3-O- β -D-galactosídeo		RAO et al., 2003 RAO & RAMAN, 2004
	Ombuina-3- β -rutinosídeo		

<i>P. cyparissias</i>	α -espinasterol 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona (X13) 1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (X14) 1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona (X15) 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (X16) 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7-dimetoxixantona (X17) 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (X52)	Esteroide Xantona	PINHEIRO et al., 1998
<i>P. fallax</i>	Reinosídeo D Senegosídeo G Tenuifoliosídeo C e P Fallaxosídeo A-E 1,3-dihidroxi-2-metoxixantona (X6) 1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (X16) 1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (X52)	Oligossacarídeo esterificado Xantona	ZHANG et al., 1997 MA et al., 2003
<i>P. hongkongensis</i>	Polygalolídeo A-B 8-hidroxi-6-methoxi-3-(4'-hidroxifenil)-isocromanona	Composto fenólico Diidroisocumarina	 WU et al., 2007

	Quercetina	Flavonoide	
	Canferol		
	Isoharmetina		
	Isoquercetina		
	Rutina		
	Canferol-3-O- β -D-glucopiranosídeo		
	Canferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo		
	6-O-[α -L-rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-1,7-dihidroxi-3-metoxixantona (XO4)	Xantona glicosilada	WU et al., 2008
	8-O- β -D-glucopiranosil-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (XO5)		
	2-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona (XC4)		
	2-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona (XC5)		
	Polygalaxantona III (XC6)		
	Polygalaxantona V (XO6)		
<i>P. japonica</i>	Canferol 3-O-[6"-O-(3-hidroxi-3-metilglutaroil)-glucosídeo]	Flavonoide glicosilado	JUNG; DO; SONG; 1993
	Polygalasaponina I-X	Saponina triterpênica	ZHANG et al., 1995a

Bayogenina-3-O- β -D-glucopiranosídeo	
Lobatosídeo B	
Polygalasaponina XI-XIX	ZHANG et al., 1995b
Polygalasaponina XX-XXVII	ZHANG et al., 1996a
Hederagenina 3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo	
Polygalasaponina XXVIII-XXXII	ZHANG et al., 1996b
Tenuifolisídeo C	
3-O- β -D-glucopiranosil ácido medicagenico	
28-O- $\{\beta$ -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 4)- β -D- apiofuranosil (1 \rightarrow 3)]- α -L- ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil }	
ester	WANG et al., 2006
3-O- β -D-glucopiranosil acido 2-oxo-olean- 12-en-23,28-dioico 28-O- $\{\beta$ -D- xilopyranosil(1 \rightarrow 4)- β -D- apiofuranosil(1 \rightarrow 3)]- α -L- ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil }	
ester	
3-O- β -D-glucopiranoside bayogenina 28-O- β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 4)- α -L- ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil ester	

Tenuifolina		
Polygalasaponina E-H		LI et al., 2006b
Polygalasaponina J		
Hederagenina	Triterpeno	FU et al., 2006
Presenegenina		
3-O-(6'-O-palmitoil- β -D-glucopiranosil)- spinasta-7,22-(23)-dieno	Esteroides glicosilado	
3-O- β -D-glucopiranosil-(24-R)-stigmast- 7,22(E)-dien-3a-ol		
3,6-dihidroxi-1,2,7-trimetoxixantona (X18)	Xantona	
3,7-dihidroxi-1,2-dimetoxixantona (X19)		
1,2,7-trihidroxi-3-metoxixantona (X20)		
7-hidroxi-1-metoxi-2,3- metilendioxixantona (X53)		
7-hidroxi-1,3-dimetoxixantona (X21)		
1,3,7-trihidroxixantona (X5)		
1,3-dihidroxi-2,5,6,7-tetrametoxixantona (X22)		XUE et al., 2009a
3-hidroxi-1,2,5,6,7-pentametoxixantona (X23)		
3,8-dihidroxi-1,2,6-trimetoxixantona (X24)		
1,7-dihidroxi-2,3,4-trimetoxixantona (X25)		

1,7-dihidroxi-3,4-dimetoxixantona (X26)		LI et al., 2006a
1,6,8-trihidroxi-2,3-metilenodioxi-5-geranilxantona (X56)		
Canferol-7,4'-dimetil éter	Flavonoide	
Parietina		
Ramnetina	Flavonoide glicosilado	
3,5,7-trihidroxi-4'-metoxiflavona-3-O- β -D-galactopiranosideo		
3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona-3-O- β -D-galactopiranosideo		
3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona-3-O- β -D-galactopiranosideo		
3,5,3',4'-tetrahidroxi-7-metoxiflavona-3-O- β -D-glucopiranosideo		
Polygalina A-C		
1-O- β -D-glucopiranosil-(2 <i>S</i> ,3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,11 <i>E</i>)-2-[(2' <i>R</i>)-2'-hidroxipalmitoilamino]-11-octadeceno-1,3,4-triol	Cerebrosídeo Oligossacarídeo esterificado	ZHANG et al., 2006
Polygalajaponicosideo	Saponina	FU et al., 2008
Polygalasaponina XLVII-L	triterpênica	
Canferol	Flavonoide	KIM et al., 2009

	Crisoeriol		
	Canferol 3-gentiobiosideo		
	Isoramnetina		
	Crisofanol	Antraquinona	
	Emodina		
	Aloe-emodina		
	Emodina 8-O- β -D-glucopiranosideo		
	Trihidroxiantraquinona		
<i>P. macradenia</i>	7-hidroxi-1,2,3,4-tetrametoxixantona (X27)	Xantona	DREYER, 1969
	1,2,3,4,6,7-hexametoxixantona (X28)		
	1-metoxi-2,3,6,7-dimetilenodioxixantona (X57)		
	1,2,3-trimetoxi-6,7-metilenodioxixantona (X58)		
	4'-demetildeoxipodofillotoxina	Lignana	HOFFMANN; WIEDHOPF;COLE; 1977
<i>P. molluginifolia</i>	3',4'-dihidroxi-6'',6''',6'''-tetrametilbis(pirano [2'',3''':5,6::2''',3''':7,8]isoflavona	Isoflavona	VENZKE et al., 2013
	3',4'-dimetoxi-5-hidroxi-6'',6'''-dimetilpirano[2'',3''':7,6]isoflavona		

	3'-metoxi-5,4'-dihidroxi-6'',6''- dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona 5,3',4'-trihidroxi-6'',6''- dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona	Flavonoide glicosilado	
	Rutina	Dissacarídeo	
	Sacarose		
<i>P. paniculata</i>	Aurapteno Febalosina Murrangatina 7-metoxi-8-(1,4-dihidroxi-3-metil-2- butenil)cumarina	Cumarina	HAMBURGER; GUPTA; HOSTETTMANN; 1985
	α -espinasterol	Esteroides	CRISTIANO et al., 2003
	Rutina	Flavonoide	
	1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (X29) 1-hidroxi-5-metoxi-2,3- metilenodioxixantona (X54) 1-hidroxi-2,3,5-trimetoxixantona (X30)	Xantona	

<i>P. sabulosa</i>	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-diidroestiril)-2-pirona	Diidroestirilpirona	PIZZOLATTI; LUCIANO; MONACHE; 2000
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxidiidroestiril)-2-pirona		
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxidiidroestiril)-2-pirona		
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-14-metoxi-estiril)-2-pirona	Estirilpirona	
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxiestiril)-2-pirona		
	4-metoxi-6-(11,12-dimetoxiestiril)-2-pirona		
	6-metoxi-7-preniloxicumarina	Cumarina	
	Protohipericina	Bisantrona	
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxi-10,14-dimetoxiestiril)-2-pirona	Estirilpirona	PIZZOLATTI et al., 2004
	Escopoletina	Cumarina	CAPRA et al., 2010 MARTINS et al., 2009
Quercetina	Flavonoide		
α -espinasterol	Esteroides	BORGES et al., 2014	
<i>P. senega</i>	Senegasaponina a-c	Saponinas triterpênicas	YOSHIKAWA et al., 1996 SHOJI;KAWANISHI; TSUKITANI; 1971
	Senegina I-IV		

	Senegosideo A-E	Oligossacarídeos esterificados	SAITOH;MIYASE; UENO,1993a
	Senegosideo F-I		SAITOH;MIYASE; UENO,1993b
	Senegosideo J-O		SAITOH et al., 1994
<i>P. sibirica</i>	Sibiricosideo A ₁ -A ₆	Oligossacarídeo esterificado	MIYASE;NOGUCHI; CHEN; 1999
	4'-O-[<i>R-L</i> -ramnopiranosil-(1→2)- β - <i>D</i> -glucopiranosil] acetofenona	Acetofenona glicosilada	
	2-C-[β - <i>D</i> -apiofuranosil-(1→6)- β - <i>D</i> -glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona (XC7)	Xantona glicosilada	
	2-C-[β - <i>D</i> -apiofuranosil-(1→2)- β - <i>D</i> -glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxixantona (XC8)		
	4-C-[β - <i>D</i> -apiofuranosil-(1→6)- β - <i>D</i> -glucopiranosil]-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona (XC9)		
	6-O- β - <i>D</i> -glucopiranosil-1,2,3,7-tetrametoxixantona (XO7)		ZHOU et al. 2008
	2-C- β - <i>D</i> -glucopiranosil-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona (XC5)		

2-C-(β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6))- β -D-glucopiranosil)-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona (**XC6**)
 2-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona (**XC4**)
 4-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6-trihidroxi-7-metoxixantona (**XC10**)
 6-O- α -L-ramnopiranosil-1,3-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona (**XO8**)
 6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-ramnopiranosil]-1,3-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona (**XO9**)
 7-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2))- β -D-glucopiranosil]-1-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**XO16**)
 6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-acetil- α -L-ramnopiranosil]-1,3-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona (**XO10**)
 3-O- β -D-glucopiranosil-6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-2-O-acetil- α -L-ramnopiranosil]-1-hidroxi-2,7-dimetoxixantona (**XO12**)

Sibiricasaponinas A-E

Saponina
triterpênica

SONG et al. 2013a

Polygalina H	Flavonoide glicosilado	HUANG et al. 2015
Polygalina I		
Polygalina D-G		SONG et al. 2013b
Polygalina A		
Polygalina C		
Ermanina-2-O- β -D-glicopiranosideo		
Ombuina-3-O- β -D-glicopiranosideo		
Ombuina-3-O- β -D-galactopiranosideo		
Ramnocitrina-3-O- β -D-glicopiranosideo		
Ramnocitrina-3-O- β -D-galactopiranosideo		
Canferol	Flavonoide	
Ramnocitrina		
Ermanina		
Ombuina		
Polygalatenosideo A	Oligossacarídeo esterificado	ZHOU et al. 2014
Polygalatenosideo C		
3'-O-3,4,5-trimetoxicinamoil-6-O-4- metoxibenzoil sacarose		
Tenuifolisideo C		

Sibiricosideo A₇

		Derivado ácido cinâmico	
	Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico		
	6-hidroxi-1,2,3,7-tetrametoxixantona (X31)	Xantona	
	1,3,7-trihidroxi-2-metoxixantona (X15)		
	1,2,3,6,7-pentametoxixantona (X32)		
	1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (X16)		
	4-C- β -D-glucopiranosil-1,3,7- trihidroxixantona (Lancerina) (XC1)	Xantona glicosilada	
	Presegenina	Triterpeno	
	Tenuifolina		
	5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavonol-3-O- β - D-glucopiranosídeo	Flavonoide glicosilado	
	Ramnetina-3-O- β -D-glucopiranosídeo		
	2,4,6,4'-tetrahidroxi-3'-metoxibenzofenona- 6-O- β -D-glucopiranosídeo	Benzofenona glicosilada	
	2,6-dimetoxi-benzofenone-4-O- β -D- apiofuranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosídeo (6 <i>R</i> ,7 <i>E</i> ,9 <i>R</i>)-9,13-dihidroxi-4,7- megastigmadien-3-ona-9-O-[β -D- apiofuranosil(1 \rightarrow 6)- β -D-glucopiranosídeo		ZHOU et al. 2016
<hr/>			
<i>P. tenuifolia</i>	Polygalasaponina I-X	Saponina triterpênica	ZHANG et al., 1995

Polygalasaponina XXXIII-XLI		ZHANG et al. 1996 SAKUMA, SHOJI, 1981
Onjisaponinas A-G		
Onjisaponina H		LI, JIANG, TU, 2006
Onjisaponinas V-Z		LI et al., 2008b
Onjisaponina Vg		
3,6'-disinapoilsacarose (DISS)	Oligossacarídeo esterificado	LING et al., 2013 MIYASE, IWATA, UENO, 1991 MIYASE, IWATA, UENO, 1992
Tenuifoliosideo A-F		CHENG et al., 2006
Tenuifoliosideo G-P		
Polygalatenosideo A-E		
Ácido 3,4,5-trimetoxicinâmico (TMCA)	Derivado ácido cinâmico	ITO et al., 1977
1,2,3,7-tetrametoxixantona (X33)	Xantona	
1,2,3,6,7-pentametoxixantona (X32)		
6-hidroxi-1,2,3,7-tetrametoxixantona (X31)		
Isoharmetina-3-O- β -D-glucopiranosideo	Flavonoide	SHI et al., 2013
Isoharmetina-3-O- β -D-galactopiranosideo		
Quercetina-3-O- β -D-glucopiranosil (1 \rightarrow 2)- β -D-galactopiranosideo		

Linarina

1,7-dihidroxixantona (X4)	Xantona	IKEYA et al., 1991a
1,7-dihidroxi-4-metoxixantona (X34)		
1,7-dimetoxixantona (X35)		FUJITA et al., 1992
1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (X36)		
3-hidroxi-2,8-dimetoxixantona (X37)		
2,3,8-trimetoxixantona (X38)		
1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (X14)		
7-hidroxi-1,2,3-trimetoxixantona (X39)		
3-hidroxi-1,2,7-trimetoxixantona (X40)		
1,3,6,7-tetrametoxixantona (X41)		
1,3,6-trihidroxi-2,7-dimetoxixantona (X16)		
6,8-dihidroxi-1,2,3-trimetoxixantona (X42)		
6,8-dihidroxi-1,2,4-trimetoxixantona (X43)		
1,7-dimetoxi-2,3-metilenodioxixantona (X55)		
1,6-dihidroxi-3,7-dimetoxixantona (X44)		IKEYA et al., 1991b
1-hidroxi-3,6,7-trimetoxixantona (X45)		
1,7-dihidroxi-3,5,6-trimetoxixantona (X46)		
1,6-dihidroxi-3,5,7-trimetoxixantona (X47)		

6-hidroxi-1,2,4-trimetoxixantona (**X48**)
2-C- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-
glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxi-
xantona (**XC7**)

4-C- β -D-glucopiranosil-1,3,7-
trihidroxi-
xantona (**XC1**)

2-C- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-
glucopiranosil]-1,3,6-trihidroxi-7-
metoxixantona (**XC6**)

2-C- $[\beta$ -D-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-
glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxi-6-
metoxixantona (**XC11**)

3-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-
glucopiranosil]-1,7-dihidroxi-
xantona (**XO12**)

6-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-
glucopiranosil]-1,2,3,7-tetrametoxixantona
(**XO13**)

2-C- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-
glucopiranosil]-1,3,7-trihidroxi-
xantona (**XC8**)

2-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6-trihidroxi-7-
metoxixantona (**XC5**)

LING et al., 2013

Xantona
glicosilada

JIANG et al., 2005a

6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-1-hidroxi-3,7-dimetoxixantona (**XO14**)

JIANG et al., 2002

6-O-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-1,3-dihidroxi-7-metoxixantona (**XO6**)

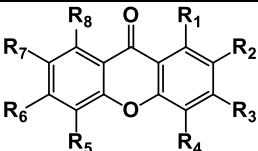
3-O-[α -D-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil]-1,6-dihidroxi-2,7-dimetoxixantona (**XO15**)

Tenuifenona A-D

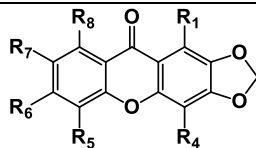
Benzofenona
glicosilada

JIANG, TU, 2005b

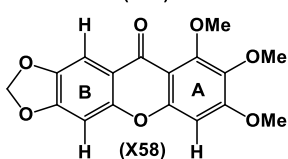
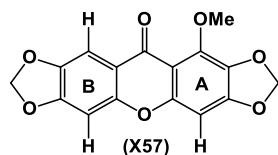
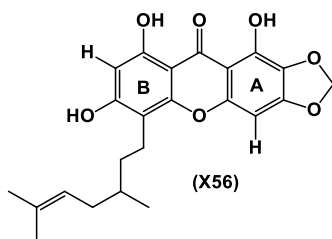
Quadro 2. Xantonas oxigenadas encontradas no gênero *Polygala*

Xantonas Oxigenadas (X)								
								
X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
1	OH	OMe	OMe	H	H	H	H	H
2	OMe	OMe	OMe	H	H	H	H	H
3	OMe	OMe	OH	H	H	H	H	H
4	OH	H	H	H	H	H	OH	H
5	OH	H	OH	H	H	H	OH	H
6	OH	OMe	OH	H	H	H	H	H
7	OMe	H	H	H	H	H	OH	H
8	OH	OH	H	H	H	H	OH	H
9	OMe	OH	H	H	H	OMe	OMe	H
10	OMe	OMe	H	H	H	H	OH	H
11	OMe	OH	H	H	H	H	OH	H
12	OMe	OH	H	H	H	H	OMe	H
13	OH	H	OH	H	H	H	OMe	H
14	OH	OMe	OMe	H	H	H	OH	H
15	OH	OMe	OH	H	H	H	OH	H
16	OH	OMe	OH	H	H	OH	OMe	H
17	OH	OMe	OH	H	H	OH	OMe	OH
18	OMe	OMe	OH	H	H	OH	OMe	H
19	OMe	OMe	OH	H	H	H	OH	H
20	OH	OH	OMe	H	H	H	OH	H
21	OMe	H	OMe	H	H	H	OH	H
22	OH	OMe	OH	H	OMe	OMe	OMe	H

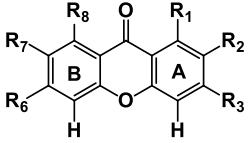
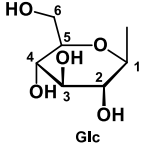
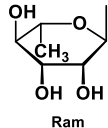
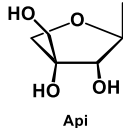
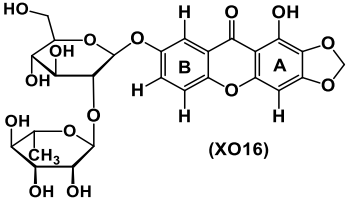
X	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	R₇	R₈
23	OMe	OMe	OH	H	OMe	OMe	OMe	H
24	OMe	OMe	OH	H	H	OMe	H	OH
25	OH	OMe	OMe	OMe	H	H	OH	H
26	OH	H	OMe	OMe	H	H	OH	H
27	OMe	OMe	OMe	OMe	H	H	OH	H
28	OMe	OMe	OMe	OMe	H	OMe	OMe	H
29	OH	OMe	OMe	H	OH	H	H	H
30	OH	OMe	OMe	H	OMe	H	H	H
31	OMe	OMe	OMe	H	H	OH	OMe	H
32	OMe	OMe	OMe	H	H	OMe	OMe	H
33	OH	OH	OH	H	H	H	OH	H
34	OH	H	H	OMe	H	H	OH	H
35	OMe	H	H	H	H	H	OMe	H
36	OH	H	OMe	H	H	H	OMe	H
37	H	OMe	OH	H	H	H	H	OMe
38	H	OMe	OMe	H	H	H	H	OMe
39	OMe	OMe	OMe	H	H	H	OH	H
40	OMe	OMe	OH	H	H	H	OMe	H
41	OMe	H	OMe	H	H	OMe	OMe	H
42	OMe	OMe	OMe	H	H	OH	H	OH
43	OMe	OMe	H	OMe	H	OH	H	OH
44	OH	H	OMe	H	H	OH	OMe	H
45	OH	H	OMe	H	H	OMe	OMe	H
46	OH	H	OMe	H	OMe	OMe	OH	H
47	OH	H	OMe	H	OMe	OH	OMe	H
48	OMe	OMe	H	OMe	H	OH	H	H



X	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
49	OH	-	-	H	H	H	H	H
50	OMe	-	-	H	H	H	H	H
51	OMe	-	-	OMe	H	H	H	H
52	OH	-	-	H	H	H	OH	H
53	OH	-	-	H	H	H	OMe	H
54	OH	-	-	H	OMe	H	H	H
55	OMe	-	-	H	H	H	OMe	H



Quadro 3. Xantonas O-glicosiladas encontradas no gênero *Polygala*

Xantonas Glicosiladas							
Xantonas O-glicosídeos (XO)							
			 Glc	 Ram	 Api		
XO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₆	R ₇	R ₈	
1	OH	H	H	H	Api(1-6)GlcO	H	
2	OH	H	H	H	Glc	H	
3	OH	H	H	H	Ram(1-2)GlcO	H	
4	OH	H	OMe	Ram(1-2)GlcO	OH	H	
5	OH	H	OMe	H	OMe	Gli	
6	OH	H	OH	Ram(1-2)GlcO	OMe	H	
7	OMe	OMe	OMe	GlcO	OMe	H	
8	OH	OMe	OH	RamO	OMe	H	
9	OH	OMe	OH	Ram(1-3)RamO	OMe	H	
10	OH	OMe	OH	Ram(1-3)-2-acetil-RamO	OMe	H	
11	OH	OMe	GliO	Ram(1-3)-2-acetil-RamO	OMe	H	
12	OH	H	Ram(1-2)GlcO	H	OH	H	
13	OMe	OMe	OMe	Ram(1-2)GlcO	OMe	H	
14	OH	H	OMe	Ram(1-2)GlcO	OMe	H	
15	OH	OMe	Ram(1-2)GlcO	OH	OMe	H	
	 (XO16)						

Quadro 4. Xantonas C-glicosiladas encontradas no gênero *Polygala*

Xantonas Glicosiladas				
Xantonas C-glicosídeos (XC)				
XC	R ₂	R ₄	R ₆	R ₇
1	H	Glc	H	OH
2	Glc	H	H	OH
3	2-benzoil-Glc	H	OH	OH
4	Glc	H	OH	OH
5	Glc	H	OH	OMe
6	Api(1-2)Glc	H	OH	OMe
7	Api(1-6)Glc	H	H	OH
8	Api(1-2)Glc	H	H	OH
9	Api(1-6)Glc	H	OH	OMe
10	H	Glc	OH	OMe
11	Ara(1-6)Glc	H	OMe	OH

2.2.2. Atividades biológicas encontradas para o gênero *Polygala*

Entre as espécies estudadas do gênero, *Polygala tenuifolia* W. se destaca quanto ao número de atividades biológicas relatadas, fato este explicado por ela ser conhecida há muito tempo na Medicina Tradicional Chinesa, sendo chamada de Yuan Zhi ou Onji na cultura local. Suas raízes são utilizadas como agente expectorante, tônico e sedativo (FUJITA et al., 1992). As partes aéreas da planta têm função anti-inflamatória (SHI et al., 2013). A tenuigenina, extrato com alta concentração de saponinas obtido da planta, é utilizada na China para o tratamento da doença de Alzheimer (JIA et al., 2004).

Outras espécies do gênero também foram estudadas do ponto de vista biológico. Dentre as atividades destacaram-se as atividades anti-inflamatória, antioxidante e hipoglicemiante, propriedades neuritogênica e neuroprotetora, efeitos mnemônicos, atividades antipsicótica, anticonvulsionante, antidepressiva e antiestresse. As diversas atividades encontradas em extratos e frações de espécies de *Polygala* provavelmente estão relacionadas à presença dos diversos compostos isolados, como cumarinas, flavonoides, xantonas, diidroestirilpironas e estilpironas, já que há estudos que relacionam alguns desses compostos com estas atividades. Estudos sobre atividades biológicas relatadas para plantas do gênero e relações com compostos isolados podem ser observados na Quadro 5.

Quadro 5. Atividades biológicas encontradas nas espécies de *Polygala*

Espécie	Extrato/Composto	Atividade	Referência	
<i>P. auerocauda</i>	Reinosideo C	Hipolipemiante	LI et al., 2008a	
<i>P. caudata</i>	1,7-dihidroxixantona	Estimulante de crescimento neuronal	NAIDU et al., 2007	
		Neuritogênica	HA et al., 2006	
		Neuritogênica	MAK et al., 2001	
	2,7-dihidroxi-1-metoxixantona	Antitumoral	MAK et al., 1999	
		Antioxidante	LIN et al., 2005	
		1,3,7-trihidroxixantona		
		2,7-dihidroxi-1-metoxixantona	Vasodilatadora	
1-metoxi-2,3-metilenodioxixantona				
7-hidroxi-1-metoxixantona				
<i>P. cyparissias</i>	Extrato	1,7-dihidroxixantona		
		1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona	Antinoniceptivo	DE CAMPOS et al., 1997
	Extrato	1,7-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona	Anti-inflamatório	EL SAYAH et al., 1999
		Fração acetona	Antiúlcero gênico	KLEIN et al., 2010

	α -espinasterol 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona 1,7-dihidroxi-2,3- metilenodioxixantona Fração Metanol	Antihiperalgésica	KLEIN-JUNIOR et al., 2012
	α -espinasterol 1,3-dihidroxi-7-metoxixantona 1,7-dihidroxi-2,3- metilenodioxixantona 1,3,6,8-tetrahidroxi-2,7- dimetoxixantona Fração Metanol e fração acetona	Antiúlcero gênico	KLEIN-JUNIOR et al., 2013
<i>P. fallax</i>	Reinosideo C	Atenua a produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) Atenua a regulação crescente de lipoproteína de baixa densidade oxidada	ZHANG et al., 2008a BAI et al., 2009

		Inibidor da proliferação de células vasculares musculares lisas	HONG et al., 2014
<i>P. japonica</i>	3-O-b-D-glucopiranoside bayogenin 28-O- β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil ester	Anti-inflamatório	WANG et al., 2006
	Polygalasaponina V		
	Bayogenina-3-O- β -D-glucopiranosideo		
	Tenuifolina		
	1,6,8-trihidroxi-2,3-metilenodioxi-5-geranil xantona	Antitumoral	LI et al., 2006a
	Polygalasaponina E, H	Antidepressivo	LI et al., 2006b
	Extrato aquoso	Anti-inflamatório	JUNPING et al., 2006
	3-O- β -D-glucopiranosideo bayogenina 28-O- β -D-xilopiranosil(1 \rightarrow 4)- α -L-ramnopiranosil(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil ester	Anti-inflamatório	WANG et al., 2008
Polygalasaponina V			
Bayogenina-3-O-b-D-glucopiranosideo			

	Polygalasaponina G	Promove o crescimento neuronal	XU et al., 2009
	Chrysophanol	Inibidor da produção de óxido nítrico	KIM et al., 2009
	Emodina		
	Aloe-emodina		
	Emodina 8-O-β-D-glucopiranosídeo		
	Canferol		
	Crisoeriol		
	Polygalasaponina F	Melhora na transmissão sináptica	SUN et al. 2012
		Anti-inflamatório	WEN-FEN et al., 2015
<i>P. macradenia</i>	Fração clorofórmio	Antitumoral	HOFFMANN;WIEDHOPF; COLE; 1977
	4'-demetildeoxipodofillotoxina		
	3',4'-dihidroxi-6'',6'',6'''-		
	tetrametilbis(pirano	Inibidor da enzima acetilcolinesterase	
<i>P. molluginifolia</i>	[2'',3'':5,6::2''',3''':7,8]isoflavona	Antioxidante	VENZKE et al., 2013
	5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-	Inibidor da enzima acetilcolinesterase	
	dimetilpirano [2'',3'':7,6]isoflavona	Antioxidante	

		Alta permeabilidade através de membrana artificial	
	Rutina	Antioxidante	
	3'-metoxi-5,4'-dihidroxi-6'',6''-dimetilpirano[2'',3'':7,6]isoflavona	Alta permeabilidade através de membrana artificial	
	Extrato	Anti-inflamatório	ARRUDA-SILVA et al., 2014
	5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'':7,6]isoflavona		
	Rutina		
	Extrato	Antinociceptivo	NUCCI-MARTINS et al., 2016
	5,3',4'-trihidroxi-6'',6''-dimetilpirano [2'',3'':7,6]isoflavona		
	3',4'-dihidroxi-6'',6'',6''',6'''-tetrametilbis(pirano [2'',3'':5,6::2''',3''':7,8]isoflavona	Anti-hiperglicêmico	ALTENHOFEN et al., 2017
<i>P. paniculata</i>	Febalosina	Antifúngica	HAMBURGER;GUPTA; HOSTETTMANN;1985 MONTANHER;PIZZOLATTI; BRIGHENTE; 2002
	Extrato	Citotóxica	
	Extrato, fração diclorometano, fração hexano	Tripanocida	PIZZOLATTI et al., 2003
	Extrato	Neuroprotetora	FARINA et al., 2005
	Extrato	Gastroprotetora	LAPA et al., 2007

	Extrato, rutina	Antinociceptiva	LAPA et al., 2009
	Extrato, rutina	Hipotensiva	LAPA et al., 2011
	Extrato, rutina	Vasorelaxante	
	Extrato	Antidepressiva	BETTIO et al., 2011
	Extrato hexênico, rutina	Antifúngica	JOHANN et al., 2011
	Febalosina	Antifúngica	MISSAU et al., 2014
<i>P. sabulosa</i>	Extrato, fração hexano, fração diclorometano	Citotóxica	MONTANHER;PIZZOLATTI; BRIGHENTE; 2002
	Fração clorofórmio, fração hexano	Tripanocida	PIZZOLATTI et al., 2003
	Extrato, frações aquosa, butanol, acetato de etila, diclorometano, hexano	Antinociceptiva	MEOTTI et al., 2006
	Escopoletina, acetilescopoletina, benzoilescopoletina		
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidiidroestiril)-2-pirona		
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidiidroestiril)-2-pirona		
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidiidroestiril)-2-pirona		
	4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidiidroestiril)-2-pirona		

<p>Fração hexano, fração acetato de etila 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxidiidroestiril)-2-pirona 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxido,14-dimetoxidiidroestiril)-2-pirona 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxiestiril)-2-pirona 4-metoxi-6-(11,12-dimetoxiestiril)-2-pirona</p>	<p>Ansiolítica, hipnosedativa e anticonvulsionante</p>	<p>DUARTE et al., 2008</p>
<p>Quercetina</p>	<p>Neuroprotetora</p>	<p>FRANCO et al., 2007</p>
<p>6-metoxi-7-preniloxicumarina 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxido,14-metoxidiidroestiril)-2-pirona</p>	<p>Tripanocida</p>	<p>PIZZOLATTI et al., 2008</p>
<p>Extrato, escopoletina, α-espinasterol 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxido,14-metoxidiidroestiril)-2-pirona 4-metoxi-6-(11,12-metilenodioxido,10,14-dimetoxidiidroestiril)-2-pirona</p>	<p>Antinociceptiva</p>	<p>RIBAS et al., 2008</p>
<p>Escopoletina</p>	<p>Antidepressiva</p>	<p>CAPRA et al., 2010</p>
<p>Fração acetato de etila, aurapteno</p>	<p>Antifúngica</p>	<p>JOHANN et al., 2011</p>

	α -espinasterol Extrato bruto, Fração diclorometano	Anti-inflamatória	BORGES et al., 2014
	α -spinasterol 6-metoxi-7-preniloxicumarina	Anti-inflamatória	NASCIMENTO et al. 2015
<i>P. senega</i>	Senegasaponina a-b	Hipoglicemiante Inibidor de absorção de etanol	YOSHIKAWA et al., 1995
	Senegenina II	Hipoglicemiante	KAKO et al., 1995
	Extrato das raízes Senegasaponina c, Senegenina II- IV	Hipoglicemiante	KAKO et al., 1996
	Senegenina II	Hipoglicemiante Inibidor de absorção de etanol	YOSHIKAWA et al., 1996
	Senegina II e III	Hipoglicemiante	KAKO et al., 1997
	Frações ricas em saponinas	Adjuvante imunológico	ESTRADA et al. 2000
	Extrato Saponinas triterpênicas PS1, PS2 e PS3	Antioxidante	AMAROWICZ et al., 2004
	Extrato	Adjuvante imunológico	KATSELIS et al., 2007
	Extrato das raízes	Antiinflamatória Quimioprotetivo para câncer de pulmão	VAN et al., 2009 PAUL et al., 2010

	Senegina I, II e IV Senegasaponina a-b	Antiangiogênico	ARAI et al., 2011
	Extrato das raízes	Quimioterapêutico para câncer de pulmão	PAUL et al., 2011a
	Extrato das raízes		PAUL et al. 2011b
<i>P. tenuifolia</i>	Extrato	Larvicida	RHEE et al., 1981
	Extrato	Anti-inflamatória	KIM et al., 1998
	Extrato	Hepatoprotetora	KOO et al., 2000
	Onjisaponina A, E, F e H	Adjuvante imunológico	NAGAI, SUZUKI, 2001
	Fração rica em saponinas	Antipsicótica	CHUNG et al., 2002
	Extrato das raízes	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem	PARK et al., 2002
	Fração rica em saponinas	Neuroprotetora	YABE et al., 2003
	Onjisaponina A, B, E, F e G		
	Extrato, fração rica em saponinas triterpênicas	Neuroprotetora	IKEYA et al., 2004
	Tenuifolideo B, 3,6'- disinapoisacarose		
	Tenuigenin	Diminuição de secreção de proteínas β -amilóide	JIA et al., 2004
	Ácido trimetoxicinâmico	Anti-estresse	KAWASHIMA et al., 2004
	Extrato	Antipsicótica	SCHIN et al., 2004

Extrato	Efeito mnemônico	CHEN et al., 2004
Polygalatenosídeo A, B	Antidepressiva	CHENG et al., 2006
Extrato	Neuroprotetora	NAITO; TOHDA, 2006
Extrato	Antiisquêmica	PARK et al., 2006
Extrato rico em saponinas triterpênicas	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem	SUN et al., 2007
Ácido sinapínico		
Onjisaponina V-Z	Neuroprotetora	LI et al., 2008b
Onjisaponina Vg		
Extrato das raízes	Proliferação das células tronco neurais	PARK et al., 2008
Tenuifolina	Melhora de aprendizado e memória	ZHANG et al., 2008b
Extrato das raízes	Melhora de memória em humanos	LEE et al., 2009
Tenuigenina	Inibição de beta secretase	LV et al., 2009
Extrato das raízes	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem	SHIN et al., 2009a
	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem em humanos com doença de Alzheimer	SHIN et al. 2009b
Extrato das raízes	Antidepressivo	HU et al., 2009
3,6'-disinapóil-sacarose		

Polygalasaponina XXXII	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem	XUE et al., 2009b
3,6'-disinapoilsacarose	Antidepressivo	HU et al., 2010
Fração rica em oligossacarídeos esterificados	Antidepressiva	LIU et al., 2010
3,6'-disinapoilsacarose, Tenuifolisideo A		
Extrato das raízes	Neuroprotetora	CHOI et al., 2011
Tenuigenina	Antioxidante	LIANG et al., 2011
	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem	
Extrato de saponinas hidrolisadas	Proliferação das células tronco neurais	XU et al., 2011
Tenuigenina		CHEN et al., 2012
Tenuigenina	Anti-inflamatório	YUAN et al., 2012
	Atenuação de déficit de memória e aprendizagem	
Tenuigenina	Melhora de aprendizado e memória	CAI et al., 2013
Tenuigenina		HUANG et al., 2013
Tenuifolisideo A	Anti-inflamatória	KIM et al., 2013
Ácido trimetoxicinâmico	Hipnótico	LEE et al., 2013
	Baixa toxicidade em ratos e cães	
Extrato das raízes		SHIN et al. 2014
Ácido trimetoxicinâmico	Antidepressivo	LEEM, OH, 2015

Tenuifolina	Neuroprotetora	LIU et al. 2015
Tenuigenina	Antiinflamatório	LV et al., 2015
3,6'-disinapoilsacarose	Antioxidante	SHI et al., 2015
Extrato das raízes	Baixa genotoxicidade	SHIN et al., 2015
	Aumento da transmissão sináptica	
Tenuigenina	Inibidor da formação de osteoclasto	WEI et al., 2015
Tenuigenina		YANG et al. 2015
Tenuifolina	Hipnótico	CAO et al., 2016
Tenuigenina	Antiinflamatório	FU et al., 2016
Ácido trimetoxicinâmico	Anticonvulsivo	CHEN, WEN, CHEN, 2016
Extrato de saponinas hidrolisadas	Neuroprotetora	GUO et al., 2016

2.2.3. *Polygala linoides*

A espécie é encontrada no Paraguai, Uruguai, Argentina e Brasil, sendo que neste último ela está presente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A planta tem como habitat locais úmidos, e é encontrada em banhados e turfeiras de campos de altitude, campos limpos gramíneos que rodeiam os banhados, beiras de estrada e beira de matas. Ela tem como características ser uma erva ereta, possuir altura entre 13,5 cm e 46,5 cm, ter o caule esparsamente folioso e flores geralmente rosadas, lilases ou roxas, sendo raramente azuis ou brancas. (LÜDTKE, 2008, LÜDTKE et al., 2013). As imagens referentes a planta podem ser encontradas na Figura 1.

Figura 1. Habitat da espécie *Polygala linoides* e detalhe de suas flores



O objetivo do trabalho é enriquecer o conhecimento do gênero *Polygala*, uma vez que a espécie *P. linoides* não possui nenhum estudo fitoquímico ou biológico relatado na literatura, dando continuidade assim aos estudos de novas espécies além das pesquisadas anteriormente pelo nosso grupo.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é o estudo biológico e fitoquímico de *Polygala linoides* na busca de atividades biológicas relacionadas ao extrato e frações da planta.

3.2. OBJETIVO ESPECÍFICO

3.2.1. Obter o extrato bruto da espécie *Polygala linoides*;

3.2.2. Submeter o fracionamento do extrato bruto à cromatografia em coluna de sílica gel visando o isolamento dos compostos majoritários;

3.2.3. Estudar as análises espectroscópicas de IV e de RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT) e bidimensionais (COSY, NOESY, HMQC e HMBC) e de espectrometria de massas a fim de elucidar as estruturas dos compostos isolados;

3.2.4. Obter os extratos hidroalcoólicos da raiz, flores e caule com folhas da planta;

3.2.5. Investigar quantitativamente por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) a presença de 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona nos extratos das raízes, caule com folhas e flores.

3.2.6. Obter os constituintes químicos voláteis nas raízes, caule com folhas e flores da planta fresca extraídas por micro extração em fase sólida (SPME) com posterior análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS);

3.2.7. Efetuar o fracionamento sólido-líquido do extrato bruto a fim de obter as frações hexano, acetato de etila e etanol;

3.2.8. Aplicar ensaios antioxidantes através do teste que avalia o poder redutor e a captura de radicais livres pelo DPPH ao extrato bruto e diferentes frações e comparar com a avaliação do teor de flavonoides e de fenólicos;

3.2.9. Aplicar o ensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase ao extrato bruto e diferentes frações;

3.2.10. Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica no extrato bruto e frações;

3.2.11. Aplicar o ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* ao extrato bruto e frações;

3.2.12. Avaliar a atividade antidepressiva in vivo na fração etanólica.

4. METODOLOGIA

4.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os solventes utilizados foram álcool etílico, álcool metílico, acetona, hexano, acetato de etila, diclorometano, clorofórmio, ácido acético, acetonitrila (HPLC) e álcool 96%, obtidos comercialmente. Os testes antioxidantes utilizaram ferricianeto de potássio, DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil), reagente Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio, quercetina, ácido gálico e ácido ascórbico. Todos os reagentes usados foram de pureza analítica e utilizados sem tratamento prévio, sendo obtidos de diferentes fontes comerciais.

Na realização deste trabalho foram utilizados estufa, rota evaporador, balança analítica, leitor de microplacas Synergy 2 Multi-Mode Reader (Biotek), espectrofotômetro UV-VIS PERKIN ELMER Lambda2S e um aparelho digital Microquímica MQA PF – 301 para medir o ponto de fusão. Os espectros de IV foram analisados através de um espectrômetro ABB FTLA 2000 e as análises de RMN unidimensionais e bidimensionais foram realizadas nos equipamentos VARIAN NMR AS 400 (400 MHz) e BRUKER AC200 (200 MHz). Para as análises quantitativas foi utilizada um HPLC Agilent 1200series equipado com bomba quaternária, degaseificador, detector DAD (Detector de arranjo de diodos - Diode Array Detector) com injetor manual. A aquisição dos dados foi obtida pelo software Agilent Chemstation®.

Para a cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 0,063-0,2 mm (70-230 mesh), sendo as frações monitoradas em cromatografia em camada delgada (CCD) usando cromatoplasmas de alumínio cobertas com sílica gel 60 mesh em uma camada de 0,2 mm de espessura (Merck). Como revelador foi utilizada câmara de luz UV, anisaldeído sulfúrico (0,5 % p-anisaldeído em solução ácido acético:metanol:ácido sulfúrico 15:85:5 v/v/v) e vanilina sulfúrica (0,5 % de vanilina em solução ácido sulfúrico 4:1 etanol v/v).

A realização do ensaio de inibição da acetilcolinesterase utilizou as seguintes soluções tampões: Tampão A – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0; Tampão B – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0 acrescido de 0,1 % de soro albumina bovina; Tampão C – solução de Tris-HCl 50 mM pH = 8,0 acrescido de NaCl 0,1 M e MgCl₂.6H₂O 0,02 mol/L. Foram utilizados também soluções de iodeto de acetiltocolina, reagente de Ellman (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico-DTNB) e a enzima

acetilcolinesterase liofilizada (Tipo VI-S obtida de *Electroparius electricus*). Todos estes reagentes foram obtidos da Aldrich.

Para o teste de toxicidade com *Artemia salina* foram utilizados um oxigenador de aquário, placas de 24 poços com capacidade para 1 mL em cada poço, solução de Tween 80, sal marinho e ovos de *Artemia salina* obtidos de fontes comerciais.

4.2. MATERIAL VEGETAL

A espécie *P. linoides* foi coletada em outubro de 2015 no alto do morro das antenas, em Rancho Queimado, Santa Catarina, e identificada pelo botânico taxonomista, professor Dr. Rafael Trevisan do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina. Um exemplar da espécie foi depositado no herbário FLOR (UFSC) sob o número de identificação FLOR059919. O material vegetal recolhido foi seco por 2 dias em estufa com ventilação a 50°C, onde a planta inteira foi moída e macerada em etanol 96% por três vezes seguidas com intervalos de 7 dias. Após a evaporação do solvente, foi obtido o extrato bruto (EB) da planta. O EB foi fracionado por cromatografia em coluna.

4.3. FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO

Com o objetivo de isolar compostos majoritários, o EB foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel, usando-se eluentes de diferentes polaridades, os quais foram aplicados de modo gradiente. Analisaram-se as frações obtidas através de cromatografia em camada delgada, onde foram juntas aquelas que apresentaram perfil semelhante. A partir dessas frações foram utilizadas técnicas de recristalização visando a purificação dos compostos. Conforme necessário, foi repetido o fracionamento cromatográfico em coluna de sílica gel com solventes diferentes para a obtenção de novas frações.

Por fim, os compostos isolados foram submetidos a análises por espectroscopia de IV, análise com RMN unidimensionais (^1H , ^{13}C e DEPT) e bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC) e espectrometria de massas, conforme a necessidade.

4.4. FRACIONAMENTO SÓLIDO-LÍQUIDO

Uma parte do extrato bruto foi particionado através de coluna cromatográfica. O extrato foi misturado com sílica e colocado na coluna

sobre uma quantidade de sílica gel na proporção de aproximadamente 1:1, sendo então eluídos os solventes hexano, acetato de etila, etanol e água, todos em grandes quantidades, de forma a obter-se as frações hexano (FHe), acetato de etila (FAc) e etanol (FET). O EB e as frações obtidas foram submetidas à ensaios para determinar as diferentes atividades biológicas.

4.5. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DA RAIZ, CAULE COM FOLHAS E FLORES

O material vegetal foi coletado e dividido em três partes: raiz, caule com as folhas e flores. As partes foram secas por dois dias em estufa a 50°C, moídas e maceradas em etanol 96% por três vezes seguidas com intervalos de 7 dias. Após a rotaevaporação do solvente, foi obtido o extrato da raiz, caules com as folhas e flores. Os extratos obtidos das partes da planta foram submetidos à análise por HPLC para a quantificação de compostos.

4.6. QUANTIFICAÇÃO DA 1,5-DIHIIDROXI-2,3-METILENODIOXIXANTONA NAS RAÍZES, CAULE COM FOLHAS E FLORES

Para as análises foi utilizada um HPLC Agilent, como descrito anteriormente, equipado com uma coluna C18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm). Os sistemas eluentes utilizados foram água mili-Q com 0,2% ácido fórmico (eluente B) e acetonitrila com 0,2% de ácido fórmico (eluente C) com a seguinte programação de tempo: em t = 0 min eluente B(90%), 1 min eluente B(90%), 3 min eluente B(70%), 10 min B(60%), 30 min eluente B(53%), 32 min eluente B(0%). O fluxo foi de 1 mL/min e a detecção utilizada foi em 254 nm.

A 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona obtida como composto inédito do fracionamento cromatográfico do extrato bruto foi utilizada nas concentrações de 5 a 50 ppm para a curva de calibração e as amostras vegetais nas concentrações de 1000 ppm. As amostras foram analisadas em duplicata.

4.7. MICROEXTRAÇÃO DE VOLÁTEIS DE *P. linoides* E ANÁLISE POR GC-MS

Para a microextração dos voláteis utilizou-se amostras de partes do vegetal fresco. A microextração dos componentes voláteis e análise por

GC-MS foi realizada no Laboratório de Eletroforese Capilar sob a supervisão do Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke.

Para realizar a microextração foi utilizado um bquer 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 (salt-out), 30 mg da parte da planta fresca separadamente (folhas com caule, flores e raízes) e a fibra de microextração. Mergulhou-se esse recipiente no bquer com água aquecida e agitação por aproximadamente 40 minutos para promover a saturação da fibra com os componentes voláteis. Em seguida, a dessorção dos componentes voláteis presentes na fibra de microextração foi feita por 10 minutos no GC-MS.

Após a dessorção dos componentes foi feita a análise para a determinação dos componentes voláteis. 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. Foi injetada uma série de n-alcanos para identificação dos compostos através do cálculo de índice aritmético (IA) dos componentes voláteis (ADAMS, 2007) e comparação com a biblioteca NIST.

4.8. TESTES BIOLÓGICOS

O extrato bruto e as frações obtidas foram submetidos a diferentes ensaios biológicos. Foram realizados testes avaliando o efeito antioxidante, como os ensaios para determinação do teor de de fenólicos e de flavonoides, assim como os ensaios do poder redutor e captura de radicais livres utilizando DPPH; e diferentes testes preliminares, sendo *in vitro*, como o da inibição da enzima acetilcolinesterase; ou *in vivo*, como o antibacteriano, antifúngico, mortalidade frente a *Artemia salina* e o teste antidepressivo utilizando roedores.

4.8.1. Determinação do conteúdo de compostos fenólicos

O teor de fenólicos foi determinado usando o reativo de Folin-Ciocalteu, de acordo com o método descrito por Moresco et al. (2014). A 0,5 mL de solução de amostra vegetal diluída em etanol (1000 ppm),

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 absorbâncias das soluções foram determinadas em espectrofotômetro a 725 nm. O aparecimento de coloração azul-escura indicou a presença de fenólicos no extrato bruto ou na fração testada. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de ácido gálico nas concentrações de 25 a 400 ppm, diluído em etanol, para comparação. Os testes foram realizados em triplicata. O teor de fenólicos foi determinado em equivalentes de ácido gálico, sendo o resultado dado em mg de ácido gálico/g de extrato.

4.8.2. Determinação do teor de flavonoides

A determinação do teor de flavonoides foi realizada com leitora de microplacas de 96 poços conforme método descrito por Moresco et al. (2014). A 50 μL de solução de amostra vegetal diluída em etanol (1000 ppm), foram adicionados 200 μL de etanol e 50 μL de uma solução de AlCl_3 2%. Após 1 hora, as absorbâncias foram determinadas em espectrofotômetro a 415 nm. Como branco foi utilizado etanol. O deslocamento batocrômico, com aparecimento de coloração verde-fluorescente foi indicativo da presença de flavonoides. Foi construída uma curva de calibração com soluções padrão de quercetina nas concentrações de 10 a 250 ppm, diluídas em etanol, para comparação. Todos os testes foram realizados em triplicata. O teor de compostos flavonoídicos foi determinado em equivalentes de quercetina, sendo o resultado dado em mg de quercetina/g de amostra.

4.8.3. Determinação do poder redutor

Para a análise da atividade antioxidante através da determinação do poder redutor foi utilizada a leitora de microplacas conforme o método descrito por Moresco et al. (2012). Foram preparadas as misturas reacionais em triplicata, cada uma contendo 100 μL de solução de amostra vegetal diluídas em etanol (1000 ppm), 195 μL de água deionizada e 50 μL de solução de FeCl_3 0,1 mol/L em HCl 0,1 M. Após três minutos, adicionou-se 50 μL de uma solução de ferricianeto de potássio 0,008 mol/L. Após 15 minutos, foi feita a leitura da absorbância das misturas em espectrofotômetro a 720 nm. O aparecimento da cor azul da Prússia é indicativo de potencial redutor. A análise dos dados foi feita construindo-se uma curva de calibração utilizando solução de ácido ascórbico para

comparação. O potencial redutor das amostras é expresso em equivalente de ácido ascórbico (mg ácido ascórbico/g de extrato ou fração).

4.8.4. Determinação da ação sequestradora do radical DPPH

A avaliação da ação sequestradora de radicais livres usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) foi realizado com leitora de microplacas baseando-se no método descrito por Moresco et al. (2012). Adicionou-se uma alíquota de 100 μL de solução de DPPH em etanol (0,004%) a 60 μL de solução de amostra vegetal diluídas nas concentrações de 200 a 5 ppm. A mistura em seguida foi agitada e deixada repousar por 30 minutos. A absorbância do DPPH nas soluções foi determinada em um espectrofotômetro a 517 nm. Como branco ($\text{Abs}_{\text{branco}}$) foi utilizada 240 μL de etanol com 60 μl de amostras vegetais. Como controle ($\text{Abs}_{\text{controle}}$) foram utilizadas soluções com 100 μL DPPH e 200 μL de etanol. A análise foi feita em triplicata. A absorbância de cada solução com a amostra ($\text{Abs}_{\text{amostra}}$) foi convertida em porcentagem da atividade antioxidante usando a fórmula 1.

$$\text{AA\%} = 100 - [(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100] / \text{Abs}_{\text{controle}} \quad (1)$$

As análises foram feitas em triplicata, sendo então determinadas as concentrações necessária para diminuir em 50% a absorbância do DPPH, ou seja, a concentração efetiva 50% (CE_{50}) através de um gráfico, plotando-se a porcentagem de DPPH que desaparece em função da concentração das amostras.

4.8.5. Ensaio de inibição da acetilcolinesterase

O bioensaio de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado conforme método descrito Magina et al., 2012 com modificações. Foram colocados 90 μL tampão Tris-HCl 50 mM pH = 8, 30 μL da amostra vegetal diluída em metanol (0,1 mg mL^{-1}), e 15 μL da enzima acetilcolinesterase (0,25 U. mL^{-1}). Após 15 min de incubação em 28°C, foram adicionados, 20 μL do iodeto de acetiltiocolina e 140 μL do reagente de Ellman. Para determinar a velocidade da reação enzimática de cada amostra (V_{amostra}) foram feitas dez leituras em 405 nm a cada três minutos sob a mesma temperatura. Como controle positivo utilizou-se galantamina (0,01 mg mL^{-1}) e como controle negativo (V_{controle}) utilizou-se apenas o solvente no qual a amostra foi dissolvida, onde a atividade

enzimática foi considerada 100%. A porcentagem de inibição foi calculada através da equação 2.

$$\text{Inibição \%} = 1 - [(V_{\text{amostra}} / V_{\text{controle}}) \times 100] \quad (2)$$

Para as amostras que apresentaram valores superiores a 50% de inibição neste teste, determinou-se a concentração para diminuir em 50% a inibição da enzima (CI₅₀). O cálculo foi feito através do gráfico plotando-se a porcentagem de inibição enzimática em função do logaritmo das diferentes doses da amostra aplicadas. As análises foram feitas em triplicata.

4.8.6. Atividade bacteriana

Este ensaio foi realizado no departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Regional de Blumenau (FURB) sob a supervisão da professora Dra. Michele Debiasi Alberton.

Para a determinação da atividade antibacteriana do extrato bruto e frações de *P. linooides* foram utilizadas as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), através da técnica de microdiluição em caldo, em placas contendo 96 poços, conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012).

As amostras foram diluídas a 2 mg mL⁻¹ em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e colocadas nos primeiros poços da microplaca, em seguida transferidas para os micropoços adjacentes, os quais já continham caldo Müller-Hinton (MH), com o objetivo de se obter diluição seriada de ordem dois, com concentrações de amostra variando de 1000 µg mL⁻¹ até 7,81 µg mL⁻¹. Para viabilizar o crescimento das espécies, os microorganismos foram adicionados ao caldo BHI (Brain Heart Infusion) durante 24h a 37°C, e posteriormente semeados em ágar sangue (24 h a 37 °C), para a reativação das cepas bacterianas. O inóculo bacteriano, foi preparado na escala 0,5 de McFarland (5 x 10⁵ UFC mL⁻¹) e adicionado (5 µL) a cada micropoço. Alguns poços de cada microplaca foram reservados para a realização do controle negativo (caldo (MH) + H₂O/DMSO 10% + bactéria em estudo) e para o controle de esterilidade do meio de cultura (caldo MH). Como controle positivo, as bactérias em estudo foram incubadas com o antibiótico gentamicina, em concentrações variando de 40 a 0,31 µg mL⁻¹. Todo o procedimento foi realizado em triplicata e em capela de fluxo laminar.

As microplacas foram incubadas aerobicamente a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 24 horas. Após a incubação, o crescimento bacteriano foi verificado adicionando-se 10 μL de uma solução metanólica de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (5 mg mL^{-1}) em cada micropoço. Após duas horas foi observada a mudança de coloração do meio de cultura. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a última concentração da amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano.

4.8.7. 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 Dra. Susana Johann.

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

O meio de Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e o meio de extrato de levedura, peptona e dextrose (YPD) 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.

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

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 ASD e mantidas a 35°C . O inóculo foi feito de acordo com o documento NCCLS M27-A2 (2002). 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 ressuspendidos, 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 solução 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 520 nm 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).

Para o teste de triagem da atividade antifúngica, as amostras testadas foram diluídas a $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 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 ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

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 amostras nos poços ficou em $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

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^{-1}), o conteúdo foi 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 Dodecil sulfato de sódio (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 VERSAmx (Molecular Devices) pelo programa Softmax® Pro 5 (Molecular Devices), com a absorvância de 570 nm. A absorvância dos poços testes foi comparada com a absorvância do poço controle contendo apenas o microrganismo, sendo a porcentagem de inibição (PI) calculada com a fórmula 3.

$$\text{PI} = \frac{(\text{DO do poço controle} - \text{DO do poço tratado}) \times 100}{\text{DO do poço controle}} \quad (3)$$

DO = densidade óptica

4.8.8. Ensaio de toxicidade com larvas de *Artemia salina*

O bioensaio de letalidade frente a *A. salina* utilizou o método descrito na literatura (MORESCO et al., 2012). O extrato bruto e frações foram diluídos em H₂O/DMSO 10%, a fim de obter uma concentração final de 10.000 µg.mL⁻¹. O meio para o cultivo das larvas de *A. salina* foi solução marinha (35 g de sal marinho/L de água destilada), onde estas foram mantidas sob oxigenação e luz constante. As larvas eclodidas até 24 horas foram separadas e utilizadas nos ensaios após completar 48h do início do cultivo. Para o teste, foram transferidas entre 7 e 10 larvas para cada cavidade de uma placa de 24 poços, contendo 1 mL de solução marinha com 1% de tween 80 (v/v) e os respectivos extratos e frações em diferentes concentrações (100 a 1000 µg.mL⁻¹). A contagem das larvas mortas e vivas foi realizada após 24 h de exposição a temperatura ambiente. A dose necessária para matar 50% das larvas (DL₅₀) foi obtida através do gráfico da porcentagem de larvas mortas em função do logaritmo da dose testada. Como controle positivo foi utilizada solução de K₂Cr₂O₇ cuja DL₅₀ é de 20 a 40 µg mL⁻¹ e como controle negativo foi empregado apenas o solvente utilizado para a preparação das soluções testes. Os testes foram realizados em triplicata.

4.8.9. Atividade antidepressiva

4.8.9.1. Animais e tratamento

Para verificar o eventual efeito tipo-antidepressivo do extrato foram utilizados 35 camundongos machos da linhagem *Swiss* com peso médio de 30g, provenientes do Biotério da Universidade Regional de Blumenau – FURB. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, à temperatura de 22-27°C com água e comida *ad libitum*, em ciclo claro/escuro 12:12hrs. O Biotério setorial da FURB é equipado com sistema de exaustor e controle de umidade.

Os camundongos foram divididos em 5 grupos com 7 animais em cada como descrito no quadro 6.

O grupo controle recebeu apenas veículo por via oral (v.o.). Os grupos seguintes receberam o extrato nas doses de 50 mg/Kg, 125 mg/Kg, 200 mg/Kg ou 250 mg/Kg, 54 minutos antes da realização do Teste do Campo Aberto (TCA). Após este procedimento, os animais foram submetidos ao Teste do Nado Forçado (TNF).

Os testes comportamentais foram escolhidos de acordo com os modelos específicos para triagem de drogas antidepressivas.

Quadro 6. Divisão dos grupos experimentais

Grupo	Tratamento
Controle	Veículo (água destilada)
G1	Extrato 50mg/kg (v.o.)
G2	Extrato 125mg/kg (v.o.)
G3	Extrato 200mg/kg (v.o.)
G4	Extrato 250mg/kg (v.o.)

4.8.9.2. Teste do campo aberto (TCA)

O TCA foi realizado conforme descrito por Rodrigues et al. (1996). O teste foi feito em uma caixa de madeira com 40 x 60 cm e 50 cm de altura. O chão da caixa é dividido em 12 quadrados de igual tamanho. Foi feito o registro do número de quadrados que cada camundongo cruza com as quatro patas durante seis minutos.

4.8.9.3. Teste do nado forçado (TNF)

O TNF foi criado por Porsolt et al. (1977) para facilitar o desenvolvimento de pesquisas com drogas antidepressivas.

O teste foi realizado em uma sessão com duração de 6 minutos. Foi usado um cilindro plástico com 24 cm de altura, 10 cm de diâmetro e com um nível de 19 cm de água a 25°C. O tempo de imobilidade foi cronometrado e registrado (ECKELI et al., 2000; ZOMKOWSKI et al., 2004). Sabe-se que os antidepressivos geram uma ação que reduz o tempo de imobilidade no teste do nado forçado, ou seja, mantém os camundongos sob agitação por um tempo maior que os camundongos controle ou não tratados com a amostra (PORSOLT et al., 1977).

4.8.9.4. Análise estatística

Os resultados para o teste do nado forçado (TNF) e para o teste do campo aberto (TCA) foram avaliados através de ANOVA, seguida do teste de Newman-Keuls, quando necessário. Os resultados foram considerados significativos quando um valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *P. linoides*

A partir do fracionamento do extrato bruto hidroalcoólico da planta inteira de *P. linoides* foram isolados e identificados um fitoesterol, quatro xantonas e um derivado da clorofila.

Após a coleta do material vegetal fresco (136,75 g), este foi seco em estufa, havendo uma perda de água de 53,82%, para fornecer 73,6 g de planta seca. Obteve-se 11,93 g de extrato bruto, originando um rendimento de 16,20% a partir do material vegetal seco.

O extrato bruto (6,33 g) foi cromatografado em sílica gel com os solventes hexano, acetato de etila e etanol de forma gradiente, sendo obtidas 72 frações. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada e reunidas conforme suas semelhanças nos seus perfis cromatográficos. As frações que apresentaram forma de sólidos foram ressuspendidas em um solvente apropriado e recristalizadas.

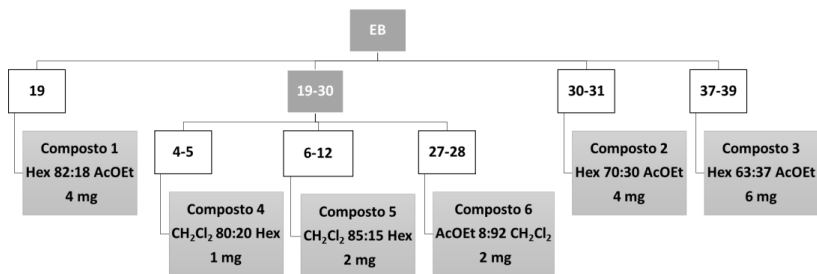
A Figura 2 apresenta um fluxograma mostrando os compostos isolados a partir do fracionamento em coluna do extrato bruto de *P. linoides*. A fração 19 obtida desta coluna (Hex 82:18 AcOEt) apresentou-se na forma de sólido transparente em forma de agulhas, sendo recristalizada em AcOEt, rendendo o composto **1** (4 mg). As frações 30-31 (Hex 7:3 AcOEt), e 37-39 (Hex 63:37 AcOEt) foram reunidas e purificadas com AcOEt para render respectivamente, como sólidos amarelos, os compostos **2** (4 mg) e **3** (6 mg).

Um novo fracionamento das frações reunidas 19 a 30, utilizando hexano, diclorometano e acetato de etila de modo gradiente, rendeu nas subfrações 4-5 (Hex 2:8 CH₂Cl₂) um sólido amarelo, correspondente ao composto **4** (1 mg); nas subfrações 6-12 (Hex 15:85 CH₂Cl₂), um sólido branco, denominado de composto **5** (2 mg), recristalizado em CHCl₃, e as subfrações 27-28 (CH₂Cl₂ 92:8 AcOEt), após recristalização em etanol, forneceu um sólido verde escuro, denominado composto **6** (2 mg).

5.1.1. Composto 1

O composto **1** foi obtido como um sólido transparente na forma de agulhas, característico de fitoesteroides. Tendo em vista a presença do esteroide α -espinaesterol em diversas espécies de *Polygala* (PINHEIRO et al., 1998; CRISTIANO et al., 2003; BORGES et al., 2014) determinou-se o ponto de fusão do composto, e obteve-se o valor de 170,1-171,9°C, semelhante ao encontrado na literatura para o α -espinaesterol (171-173°C,

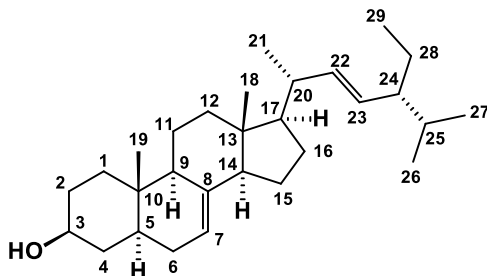
Figura 2. Fluxograma do fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *P. linoides*



LEE et al., 2014). O Rf do composto em estudo obtido em cromatografia em camada delgada foi de 0,55 (CHCl₃ 75:25 AcOEt). Foram feitas análises por RMN de ¹H e ¹³C, a qual foi comparado com os dados da literatura, como descrito nas Tabelas 7 e 8. No espectro de RMN de ¹H é notada a presença de hidrogênios ligados a carbono sp² em campo baixo, onde há um duplo duplete centrado em 5,17 ppm com acoplamento de 15,0 e 8,8 Hz sobreposto a um outro sinal de hidrogênio, além de um duplo duplete em 5,03 ppm com acoplamentos de 15,0 e 8,6 Hz, referentes aos hidrogênios ligados em C-22 e C-23. Em 3,61 ppm nota-se um multiplete referente a um hidrogênio ligado a um carbono com grupo OH, além do duplete em 1,03 ppm referente aos hidrogênios do grupo metila em C-21 e do simpleto em 0,86 ppm referente a metila em C-26. Há também um simpleto de uma metila referente aos hidrogênios de C-18 em 0,56 ppm e de outras metilas na região entre 0,79 e 0,83 ppm, na qual se encontram sobrepostas. Os dados estão resumidos na Tabela 1.

No espectro de RMN de ¹³C nota-se os sinais deslocados em campo baixo em 117,5, 136,6, 138,1, 129,5 ppm referentes aos carbonos sp² C-7, C-8, C-22 e C-23, um sinal em 71,1 ppm referente ao C-3 ligado a uma hidroxila e 6 sinais de carbonos em 12,0, 12,2, 13,0, 19,0, 21,0 e 21,4 ppm referentes as metilas C-18, C-29, C19, C-26, C-27 e C-21 respectivamente. Entre 23,0 e 56,0 ppm os sinais são atribuídos aos outros carbonos alifáticos presentes na molécula. Os dados estão resumidos na Tabela 2.

Com base nos dados obtidos e analisados em comparação com a literatura, a estrutura proposta para o composto **1** foi o esteroide α -spirosterol.

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H para α -espinasterol (Composto 1) em comparação com literatura

C	δ ^1H CDCl_3 , 400 MHz	δ ^1H , CDCl_3 , 500MHz ^a	δ ^1H , Pyr- d_5 , 250MHz ^b
3	3,61 (1H, m)	3,60 (1H, m)	3,84 (1H, m)
7	5,17 (1H, sobreposto)	5,15 (1H, m)	5,14 (1H, t, $J = 4,0$ Hz)
18	0,56 (3H, s)	0,55 (3H, s)	0,59 (3H, s)
19	0,79-0,83 (3H, sobreposto)	0,79 (3H, m, sobreposto)	0,82 (3H, s)
21	1,03 (3H, d, $J = 6,6$ Hz)	1,03 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)	1,06 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
22	5,17 (1H, dd, $J = 8,8$ e 15,0 Hz)	5,15 (1H, m)	5,18 (1H, dd, $J = 8,7$ e 15,0 Hz)
23	5,03 (1H, dd, $J = 8,6$ e 15,0 Hz)	5,02 (1H, dd, $J = 8,0$ e 15,0 Hz)	5,08 (1H, dd, $J = 8,7$ e 15,0 Hz)
26	0,86 (3H, d, $J = 6,4$ Hz)	0,80 (3H, m, sobreposto)	0,87 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
27	0,79-0,83 (3H, sobreposto)	0,85 (3H, d, $J = 6,0$ Hz)	0,85 (3H, d, $J = 6,5$ Hz)
29	0,79-0,83 (3H, sobreposto)	0,81 (3H, m, sobreposto)	0,81 (3H, m, sobreposto)

^a ZHANG et al. 2005c^b LEE et al., 2014

Tabela 2. Dados de RMN de ^{13}C para o α -espinasterol (composto 1) em comparação com literatura

C	δ ^1H CDCl ₃ , 400 MHz	δ ^1H , CDCl ₃ , 500MHz ^a	δ ^1H , Pyr-d ₅ , 250MHz ^b
1	37,2	37,2	37,5
2	31,5	31,5	32,1
3	71,1	71,1	71,0
4	38,1	38,0	38,9
5	40,3	40,2	40,5
6	29,7	29,7	29,5
7	117,5	117,5	117,9
8	139,6	139,6	139,6
9	49,5	49,4	49,7
10	34,2	34,2	34,4
11	21,6	21,5	21,8
12	39,5	39,4	39,6
13	43,3	43,3	43,4
14	55,2	55,1	55,3
15	23,0	23,0	23,3
16	28,5	28,5	28,2
17	56,0	55,9	55,9
18	12,0	12,0	13,2
19	13,0	13,0	12,1
20	40,8	40,8	41,1
21	21,4	21,4	21,2
22	138,1	138,2	138,6
23	129,5	129,4	129,6
24	51,3	51,2	51,3
25	31,9	31,9	37,6
26	19,0	19,0	21,5
27	21,0	21,1	19,1
28	25,4	25,4	25,6
29	12,2	12,2	12,4

^a ZHANG et al. 2005c

^b LEE et al., 2014

5.1.2. Composto 2

O composto **2** foi obtido como um sólido amarelo e analisado em espectrômetro de massas de alta resolução (HR-MS), onde apresentou íon molecular de razão massa carga m/z igual a 271,02369 [M^+-1]. A massa correspondeu a fórmula molecular $C_{14}H_8O_6$ (calculado: 271,02371) e juntamente com as análises de RMN uni e bidimensionais foi deduzido que sua estrutura seria referente a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona.

Este composto apresentou R_f igual a 0,65 ($CHCl_3$ 75:25 AcOEt) e ponto de fusão de 120,5-122,2°C condizente com o encontrado por VENZKE, 2015 (121-122°C), porém nunca publicado na literatura.

Através do espectro infravermelho em pastilhas de KBr do composto foi possível observar uma banda larga referente ao estiramento da ligação O-H em 3444 cm^{-1} , entre 2918 e 2849 cm^{-1} o estiramento em menor intensidade referente a ligação C-H em carbonos sp^3 e sp^2 , em 1682 cm^{-1} o estiramento referente a ligação C=O quelado ao grupo OH, em 1572 e 1470 cm^{-1} os estiramentos da ligação C=C de anel aromático e em 1109 cm^{-1} o da ligação C-O.

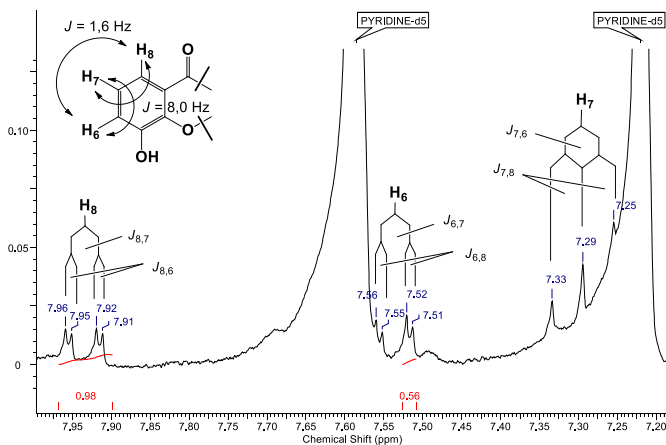
O espectro de RMN de 1H em clorofórmio deuterado (Anexo 2) revelou um sinal em 12,75 ppm, referente a uma hidroxila quelada por uma carbonila. Apesar desse e outros sinais estarem presentes, a solubilidade do composto não foi adequada para obter uma boa integração dos sinais. Assim, o espectro foi analisado em piridina deuterada, onde foi possível perceber todos os cinco conjuntos de sinais de hidrogênio da molécula (Tabela 9). O simplete com deslocamento de 6,11 ppm com integração para 2H, refere-se ao grupo metilenodioxi (O-CH₂-O). Em 6,47 ppm, observa-se outro simplete com integração para 1H, referente ao hidrogênio aromático ligado em C-4. Há mais três grupos de sinais, onde dois deles se encontram sobrepostos aos sinais do solvente. Apesar de não ser possível observar a integração precisa de todos os sinais, supõe-se que estes façam parte de um sistema de acoplamento com três hidrogênios em posições *orto* entre si. Estes três grupos de sinais foram assim designados: o sinal de maior deslocamento químico, é formado por duplo duplete centrado em 7,93 ppm. Ele apresenta integral de 1H e $J = 8,0$ Hz e 1,6 Hz, referente ao hidrogênio ligado ao C-8. O segundo sinal em 7,53 ppm aparenta ser um duplo duplete também, embora parte dele esteja sob o sinal intermediário da piridina. É possível identificar a integração de 0,5 H em uma das partes do duplo duplete, e percebe-se as mesmas constantes de acoplamento anteriores. Este sinal foi designado ao hidrogênio ligado ao C-6. O último sinal é referente a um duplo duplete

colapsado centrado em 7,29 ppm, possuindo $J = 8,0$ Hz e com integração para 1H, designado ao hidrogênio ligado ao C-7 (Figura 3).

A atribuição dos sinais dos H-7, H-6 e H-8 respectivamente, indo de menor até maior deslocamento químico, são justificados de acordo com os efeitos eletrônicos presentes na estrutura molecular. Devido a geometria planar da molécula e devido ao fato do H-8 estar mais próximo da carbonila, este hidrogênio é afetado pela anisotropia magnética promovida pela carbonila, desblindando o hidrogênio (H-8) e levando a valores de deslocamento mais altos. Além disso, o H-6 e H-8 estão sujeitos ao efeito mesomérico negativo da carbonila, justificando os maiores deslocamentos químicos. O H-7 não sofre o mesmo efeito e assim está presente em campo mais alto que os outros hidrogênios (BARRACLOUGH et al., 1970; FERNANDES et al., 1998). O efeito mesomérico pode ser representado através das estruturas de ressonância da Figura 4.

Através da análise bidimensional de COSY é possível notar o acoplamento entre os hidrogênios H-6, H-7 e H-8, certificando a atribuição dada aos mesmos, conforme mostra a Figura 5.

Figura 3. Acoplamento entre hidrogênios do anel B



A quantidade obtida do composto a partir da planta foi insuficiente para que os 14 sinais referentes a cada carbono fossem detectados no espectro de RMN de ^{13}C . Foram encontrados somente 6 sinais de carbono, sendo seus deslocamentos 89,93 ppm, 103,67 ppm, 115,57 ppm, 121,74 ppm, 125,04 ppm e 148,16 ppm. Estes dados foram

Figura 5. Efeito mesomérico no esqueleto xantona

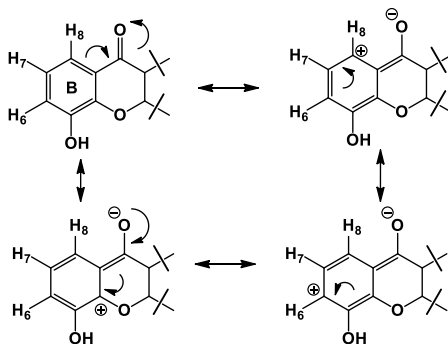
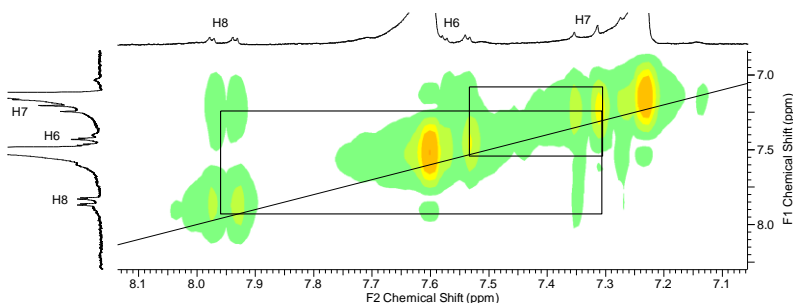


Figura 4. Ampliação do espectro bidimensional de COSY



possíveis de serem designados, devido às análises feitas pelo HETCOR, encontrou-se a correlação entre os núcleos hidrogênio e carbono presentes na molécula. O sinal em 89,93 ppm foi atribuído ao H-4 e o carbono em 103,67 ppm aos hidrogênios do grupo metilenodioxi. Os sinais em 121,7, 125,0 e 115,6 ppm foram atribuídos aos hidrogênios H-6, H-7 e H-8 do anel B, respectivamente. Os resultados das análises de RMN de ^1H e de ^{13}C estão resumidos na Tabela 3 em comparação com os dados da literatura.

Apesar deste composto ser considerado inédito na literatura, há relatos nos estudos de *Polygala campestris* (Venzke, 2015) e *Polygala pulchella* (Missau, 2008) desenvolvidos em nosso grupo de pesquisa. Baseado nos dados espectroscópicos em comparação com a literatura propõe-se que a estrutura para o composto **2** seja a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxi-xantona.

Tabela 3. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C referentes a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (composto 2) em comparação com literatura

C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^1H	δ ^{13}C
	Pyr- d_5 , 200MHz	Pyr- d_5 , 50MHz	Pyr- d_5 , 400MHz ^a	Pyr- d_5 , 100MHz ^a
1				144,1
2				130,3
3				156,4
4	6,47 (1H, s)	89,9	6,49 (1H, s)	90,3
4a				154,3
4b				147,0
5		148,2		148,4
6	7,53 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,6$ Hz)	121,7	7,56 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,6$ Hz)	121,9
7	7,29 (1H, dd, $J = 8,0$ e $8,0$ Hz)	125,0	7,30 (1H, t, $J = 8,2$ Hz)	125,4
8	7,93 (1H, dd $J = 8,0$ Hz e $1,6$ Hz)	115,6	7,93 (1H, dd, $J = 8,2$ e $1,6$ Hz)	115,7
8a				122,1
9				182,8
8b				104,0
OCH ₂ O	6,11 (2H, s)	103,7	6,11 (2H, s)	103,4

^a (VENZKE et al., 2015)

5.1.3. Composto 3

O composto **3** foi obtido como um sólido amarelo e analisado em espectrômetro de massas, onde mostrou íon molecular de razão massa carga m/z 287,0552 [M^+-1]. A massa foi correspondente a fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_6$ (calculado: 287,0552). Assim como o composto **2**, após análise dos dados de RMN uni e bidimensionais, deduziu-se que sua estrutura seria referente a 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona.

Este composto apresentou R_f igual a 0,52 ($CHCl_3$ 75:25 AcOEt) e ponto de fusão de 244,5-246,2°C condizente com a literatura de 246-248°C (YUAN et al., 2006).

Através do espectro infravermelho em pastilhas de KBr do composto foi possível observar uma banda larga referente ao estiramento da ligação O-H em 3440 cm^{-1} , entre 2951 e 2849 cm^{-1} o estiramento em menor intensidade referente a ligação C-H em carbonos sp^3 e sp^2 , em 1659 o estiramento referente a ligação C=O quelado ao grupo OH, em 1570 e 1456 cm^{-1} os estiramentos da ligação C=C de anel aromático e em 1160 cm^{-1} o sinal para a ligação C-O.

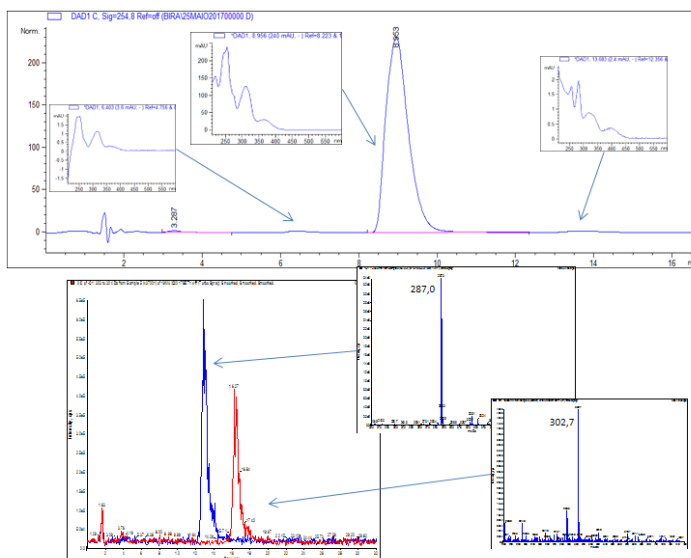
O espectro de RMN de 1H em clorofórmio deuterado (Anexo 3) revelou um sinal em 12,79 ppm referente a um grupo -OH quelado a carbonila. Além disso, é possível perceber um sinal em 5,78 ppm referente a um grupo OH fenólico. O espectro de RMN de 1H em piridina mostrou um -OH quelado em 13,47 ppm, embora este sinal tenha pouca intensidade. O mesmo tipo de acoplamento encontrado no composto **2** anterior, está presente no composto **3**, sendo um simpleto com integração para 1H em 6,29 ppm referente ao hidrogênio ligado ao C-4. Observa-se ainda, um duplo duplete em 7,96 ppm de integração para 1H e $J = 7,8$ e 1,5 Hz; um duplo duplete em 7,57 ppm colapsado em parte com o sinal do solvente, onde atenta-se a um $J = 7,8$ e 1,5 Hz e integração de 0,5H em um dos dupletos; e um duplo duplete colapsado centrado em 7,31 ppm com integração de 1H e $J = 7,8$ Hz. Estes sinais referem-se aos hidrogênios ligados aos C-8, C-6 e C-7, respectivamente. Também se observa dois sinais de grande intensidade com integração para 3H em 3,74 e 3,98 ppm referentes a 2 grupos metoxi.

No espectro de RMN de ^{13}C são encontrados 17 sinais, sendo que apenas 15 sinais deveriam estar representando os carbonos da molécula. Os sinais foram comparados com a literatura, onde 15 dos 17 sinais foram atribuídos para cada carbono da molécula. A análise bidimensional de COSY revelou o mesmo tipo de acoplamento que o composto anterior (composto **2**) e através da análise de HETCOR relacionou-se cada

carbono aos hidrogênios da molécula. Os dados estão descritos em comparação com a literatura na Tabela 4.

Os sinais de carbono não atribuídos no espectro de RMN de ^{13}C foram 130,1 ppm e 116,7 ppm. Como forma de analisar a presença de alguma impureza na amostra foram feitas análises em cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS), onde foram encontrados três picos no cromatograma (Figura 6). O pico intermediário, com a massa do composto **3**, corresponde a mais de 98% da área de integração do cromatograma. Os outros dois sinais possuem área menor que 1%, e apesar da detecção imprecisa, foi possível identificar que um deles possui massa de 302,7 [M^+]. Apesar da pequena quantidade das impurezas em comparação com o composto **3**, acredita-se que os dois sinais presentes no espectro de RMN possam ser atribuídos a algum sinal remanescente destes outros compostos.

Figura 6. Cromatograma obtido em LC-MS do composto **3**



O composto analisado (composto **3**) apresentou o mesmo perfil de fragmentação, quando comparado com o mesmo composto isolado previamente (VENZKE, 2015). Assim, baseado nas análises dos dados obtidos, propõe-se que a estrutura do composto **3** seja a 1,5-dihidroxi-2,3-metoxixantona.

Tabela 4. Dados obtidos do RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (composto 3) em comparação com literatura

C	δ ^1H	δ ^{13}C	δ ^{13}C	δ ^{13}C
	Pyr- D_5 , 400 MHz	Pyr- D_5 , 100 MHz	DMSO- d_6 , 125MHz ^a	Pyr- d_5 , 75MHz ^b
1		155,1	153,0	153,3
2		132,8	131,1	132,2
3		160,9	160,1	160,7
4	6,29 (1H, s)	91,6	91,5	91,0
4a		153,9	152,8	145,2
4b		146,8	145,0	154,5
5		148,2	146,2	147,8
6	7,57 (1H, dd, $J = 7,8$ e $1,5$ Hz)	121,8	120,5	121,2
7	7,31 (1H, dd, $J = 7,8$ e $7,8$ Hz)	124,9	124,3	124,0
8	7,96 (1H, dd, $J = 7,8$ Hz e $1,5$ Hz)	115,7	114,5	115,1
8a		104,9	103,2	104,3
9		182,3	180,8	181,7
8b		122,2	120,6	-
OCH ₃	3,98	61,0	60,1	60,4
OCH ₃	3,74	56,7	56,6	56,1
1-OH	13,47 (s)			

^a YUAN et al., 2006^b GONÇALVES et al., 2005

5.1.4. Composto 4

O composto **4** foi obtido como um sólido amarelo em pouca quantidade (1 mg). Devido a esse fator, as análises foram limitadas ao uso da espectrometria de massas, análise de RMN de ^1H e de RMN bidimensional por HSQC como forma de observar o deslocamento químico para cada carbono ligado a um determinado hidrogênio. Quando analisado em HR-MS, este composto apresentou o valor para o íon molecular de razão massa carga m/z 309,0760 [M^+-1], correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{O}_5$ (Calculado: 309,0757). O composto apresentou Rf igual a 0,68 (CHCl_3 90:10 AcOEt). Baseado nestas análises em conjunto com espectros de RMN uni e bidimensionais, deduziu-se que sua estrutura seria referente a 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona.

Através do espectro infravermelho em pastilhas de KBr do composto foi possível observar uma banda larga referente ao estiramento da ligação O-H em 3441 cm^{-1} , entre 2922 e 2581 cm^{-1} o estiramento em menor intensidade referente a ligação C-H em carbonos sp^3 e sp^2 , em 1650 cm^{-1} o estiramento referente a ligação C=O quelado ao grupo OH, em 1580 e 1458 cm^{-1} os estiramentos da ligação C=C de anel aromático e em 1134 cm^{-1} o sinal da ligação C-O.

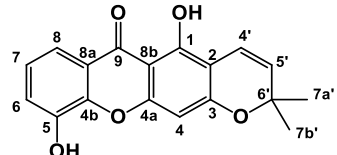
No espectro de RMN de ^1H em clorofórmio deuterado (Anexo 4) observou-se um sinal de OH quelado em 13,17 ppm. A mesma análise em piridina mostrou também um sinal em 13,86 ppm referente ao OH quelado, além do mesmo conjunto de sinais para os 3 hidrogênios do anel B, sendo: um duplo duplete em 7,91 ppm com integração para 1H e $J = 7,8$ e $1,2\text{ Hz}$; um duplo duplete em 7,55 ppm com integração para 1H e $J = 7,8$ e $1,2\text{ Hz}$; e um duplo duplete colapsado centrado em 7,27 ppm com integração para 1H e $J = 7,8\text{ Hz}$, que correspondem aos H-8, H-6 e H-7, respectivamente. Observa-se ainda dois dupletos em 6,88 e 5,64 ppm com integração para 1H e $J = 10,0\text{ Hz}$, acoplamento característico para ligação dupla com estereoquímica cis; um simpleto em 6,43 ppm com integração igual 1H e um simpleto de grande intensidade em 1,39 ppm com integração para 6H, que corresponde a dois grupos metila.

Foi feita a análise bidimensional de HSQC, onde atribuiu-se o sinal de cada carbono acoplado aos hidrogênios da molécula. O simpleto no RMN de ^1H em 6,43 ppm foi atribuído a um carbono em 94,8 ppm, os dupletos em 5,64 e 6,88 atribuídos a carbonos em 127,7 e 115,0 ppm e as metilas em 1,39 ppm a carbonos de mesmo deslocamento em 27,7 ppm. Os hidrogênios pertencentes ao acoplamento do anel B em C-6, C-7 e C-8 foram atribuídos aos carbonos 121,5, 123,5 e 114,5 ppm

respectivamente. Os espectros são encontrados em anexo e resumidos na Tabela 5 em comparação com dados da literatura.

Baseado nos dados os obtidos em comparação com a literatura, propõe-se que a estrutura para o composto 4 seja a 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona, conhecida também como 6-desoxijacareubina

Tabela 5. Dados obtidos do RMN de ^1H e ^{13}C da 1,5-dihidroxi-6',6'-dimetilpirano-(2',3':3,2)-xantona (composto 4) em comparação com literatura



C	δ ^1H Pyr-D ₅ , 400 MHz	δ ^{13}C Pyr-D ₅ , 100 MHz	δ ^1H , DMSO- <i>d</i> ₆ , 200MHz ^a	δ ^{13}C DMSO- <i>d</i> ₆ , 50MHz ^a
1				153,3
2				132,2
3				160,7
4	6,43 (1H, s)	94,8	6,43 (1H, s)	91,0
4a				145,2
4b				154,5
5				147,8
6	7,55 (1H, dd, <i>J</i> = 7,8 e 1,2 Hz)	121,2		121,2
7	7,27(1H, dd, <i>J</i> = 7,8 Hz e 7,8 Hz)	123,5		124,0
8	7,91(1H, dd, <i>J</i> = 7,8 e 1,2 Hz)	114,5		115,1
8a				104,3
9				181,7
8b				-
4'	5,64 (1H, d, <i>J</i> = 10,0 Hz)	127,7		
5'	6,88 (1H, d, <i>J</i> = 10,0 Hz)	115,0		
7a'	1,39 (3H, s)			60,4
7b'	1,39 (3H, s)			56,1
1-OH	13,86 (s)			

^a ROCHA et al., 1994

5.1.5. Composto 5

O composto **5** foi obtido como um sólido branco. Esse composto foi obtido em pouca quantidade (2 mg), o que causou os mesmos problemas com análises que o composto anterior (composto **4**). Assim, este composto foi analisado e deduzido, usando as mesmas técnicas usadas anteriormente. Além disso, esse composto possui R_f de 0,55 (CHCl₃ 90:10 AcOEt), igual ao α -espinasterol, de modo que foram eluídos juntos durante o fracionamento cromatográfico em coluna. Estes compostos foram separados devido a menor solubilidade deste composto (**5**) em clorofórmio comparado ao esteroide. Deste modo, foi possível observar sinais residuais do esteroide no espectro de RMN de ¹H do composto **5**. O composto foi analisado em espectrômetro de massas, que mostrou íon molecular de razão massa carga m/z 257,0445 [M⁺-1], correspondente a fórmula molecular C₁₄H₁₀O₅ (calculado: 257,0444). Baseado nestas análises em conjunto com espectros de RMN uni e bidimensionais, deduziu-se que sua estrutura seria referente a 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona.

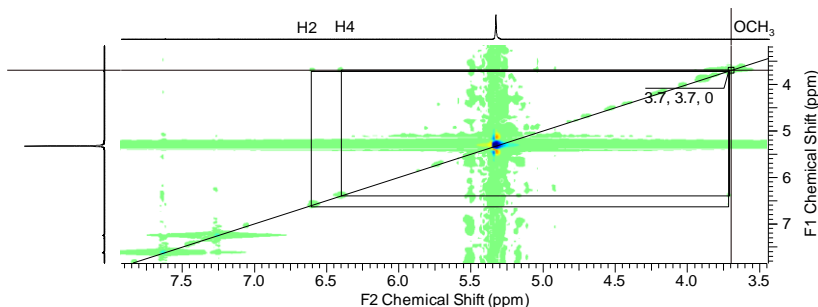
Através do espectro infravermelho em pastilhas de KBr do composto foi possível observar uma banda larga referente ao estiramento da ligação O-H em 3440 cm⁻¹, entre 2916 e 2849 cm⁻¹ o estiramento em menor intensidade referente a ligação C-H em carbonos sp³ e sp², em 1656 cm⁻¹ o estiramento referente a ligação C=O quelado ao grupo OH, em 1572 e 1462 cm⁻¹ os estiramentos da ligação C=C de anel aromático e em 1160 cm⁻¹ o sinal da ligação C-O.

No espectro de RMN de ¹H em clorofórmio (Anexo 5) foi observado um sinal de -OH quelado em 12,89 ppm e um grupo -OH livre em 5,76 ppm. O espectro de RMN de ¹H em piridina mostrou também um sinal em 13,50 ppm referente ao -OH quelado, porém, apesar de este composto aparentar ter o mesmo acoplamento que os compostos anteriores para os 3 hidrogênios do anel B, o hidrogênio que antes era encontrado relativamente sobreposto pelo sinal intermediário do solvente, neste caso é completamente encoberto. É possível observar apenas dois pequenos sinais em 7,57 e 7,56 ppm no ombro do solvente, onde encontra-se um $J = 1,5$ Hz. Os outros dois sinais referentes aos outros dois hidrogênios são um duplo duplete em 7,92 ppm de integração igual 1H e $J = 7,8$ e 1,5 Hz e um duplo duplete colapsado centrado em 7,28 ppm com integração de 1H e $J = 7,8$ Hz, referentes aos H-8 e H-7, respectivamente. Além desses sinais, há dois dupletos em 6,56 e 6,37 ppm, ambos com integração de 1H e $J = 2,2$ Hz, característico de hidrogênios *meta*

correlacionados; observa-se também um simpleto em 3,69 ppm correspondente a um grupo metoxi.

Foi feita a análise bidimensional através de HSQC onde conseguiu-se atribuir o sinal de cada carbono que estava acoplado aos hidrogênios da molécula, obtendo resultados próximos aos do composto anterior, com exceção para o H-7, encoberto pelo solvente. Quanto a posição do grupo metoxi na molécula, este grupo pode estar ligado em C-5 ou C-3, uma vez que a presença do -OH quelado a carbonila confirma a posição da hidroxila no C-1. Foi feita uma análise por NOESY para confirmar em qual sítio este grupo metoxi estaria ligado (Figura 7), onde foi possível identificar a relação espacial do grupo com os hidrogênios em C-2 e C-4 (6,56 e 6,34 ppm), sendo definido a posição da metoxila em C-3 no anel A.

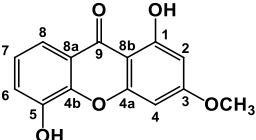
Figura 7. Ampliação da análise de NOESY mostrando a interação espacial



Os espectros relativos ao composto se encontram em anexo e os resultados das análises são resumidos na Tabela 6.

Baseado nos dados obtidos, propõe-se que a estrutura para o composto **5** seja a 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona.

Tabela 6. Dados obtidos do RMN uni e bidimensionais da 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona (composto 5)

			
C	δ ^1H Pyr-D ₅ , 400 MHz	δ ^{13}C Pyr-D ₅ , 100 MHz	NOESY
2	6,56 (1H, d, $J = 2,2$ Hz)	100,6	
4	6,34 (1H, d, $J = 2,2$ Hz)	93,1	
6	7,92 (1H, dd, $J = 7,8$ e 1,5 Hz)	119,2	
7	7,28 (1H, dd, $J = 7,8$ Hz e 7,8 Hz)	125,6	
8	7,58 (1H, dd, $J = 7,8$ e 1,5 Hz)	-	
3- OCH ₃	3,69 (3H, s)	55,0	H2 e H4
1-OH	13,50 (s)		

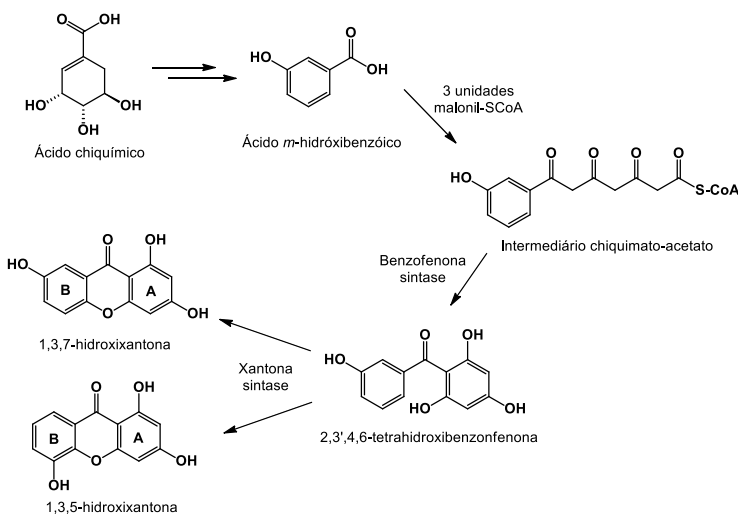
5.1.6. Outras possíveis xantonas

O gênero *Polygala* é caracterizado pela biossíntese de saponinas triterpênicas, oligossacarídeos esterificados, esteróis, flavonoides, cumarinas, estilpironas, diidroestirilpironas e as xantonas.

Segundo os dados espectroscópicos obtidos para as xantonas isoladas, é possível perceber que todas possuem uma estrutura básica semelhante, explicada pela sua biossíntese.

As xantonas são biossintetizadas devido ao encontro de duas vias metabólicas, sendo a primeira, a via do ácido chiquímico, responsável pela formação do anel B; e a segunda, a via do acetato-malonato, responsável pelo anel A (Figura 13). Em seguida, através da catálise enzimática (benzofenona sintase) ocorre a formação de uma benzofenona, seguida pela formação das xantonas com diferentes padrões de substituição, catalisada pela xantona sintase. Neste ponto ocorre a formação do anel central (anel C) que pode acontecer de duas formas. Na primeira, o acoplamento oxidativo ocorre na posição *para* em relação a hidroxila do anel B, levando a formação da xantona 1,3,7-substituída; e na segunda, o acoplamento ocorre na posição *orto* em relação a hidroxila do anel B, levando a xantona 1,3,5-substituída (NEGI et al., 2013). O esquema é representado na Figura 8.

Figura 8. Biossíntese das xantonas (NEGI et al., 2013)



É possível encontrar no gênero *Polygala* esses dois padrões de substituições para as xantonas, onde a substituição 1,3,7 encontra-se em *P. caudata* (LI et al., 1998), *P. cyparissias* (PINHEIRO et al., 1998), *P. fallax* (MA et al., 2003), *P. japonica* (FU et al., 2006), *P. sibirica* (MIYASE, NOGUCHI, CHEN, 1999), enquanto o padrão 1,3,5 se encontra em outras espécies como *P. pulchella* (MISSAU, 2008), *P. campestris* (VENZKE, 2015) e *P. paniculata* (CRISTIANO et al., 2003).

Nos compostos identificados em *P. linoides*, composto **2** a **5**, observa-se o padrão de substituição 1,3,5. Esse padrão reflete a especificidade da enzima xantona sintase presente em cada planta, levando as moléculas a um único padrão de substituição.

Outra consequência da especificidade da biossíntese em *P. linoides* é que todas as 4 xantonas identificadas possuem um sinal referente ao -OH quelado ao oxigênio do grupo carbonílico. Devido aos efeitos eletrônicos dos ligantes em cada molécula, foi possível perceber que este sinal possuía um deslocamento específico para cada composto, que se repetiu nas análises de RMN de ^1H e serviu como método para identificar os compostos presentes na mistura.

Através da análise do espectro de RMN de ^1H de outras amostras foi possível identificar valores para o grupo OH quelado diferentes dos encontrados experimentalmente para as 4 xantonas. Assim, pode haver outras xantonas que não foram identificadas pelos métodos tradicionais de análise orgânica, uma vez que a quantidade pequena e a retenção em sílica gel próxima a outros compostos não permitiu o isolamento em quantidades consideráveis. Por exemplo, foram encontradas três outras xantonas, durante o fracionamento do extrato bruto, correspondente às frações 19-30 (Hex 82:18 AcOEt), 36 (Hex 67:33 AcOEt) e 38-53 (Hex 63:37 AcOEt), sendo que a primeira e última fração foram recromatografadas, obtendo-se os compostos X1 (Hex 15:85 CH_2Cl_2) juntamente com 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona (**4**) e 6-desoxijacareubin (**5**), X2 juntamente com o 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**3**) e X3 (CHCl_3 95:5 AcOEt). O fluxograma para a separação de cada composto está representado na Figura 9.

Os sinais dos grupos OH quelado das três xantonas não identificadas foram 13,24 ppm (X1), 13,12 ppm (X2) e 13,29 ppm (X3), conforme os espectros de ^1H em clorofórmio deuterado apresentados na Figura 10.

Figura 9. Fluxograma da separação dos compostos X1, X2 e X3 não identificados

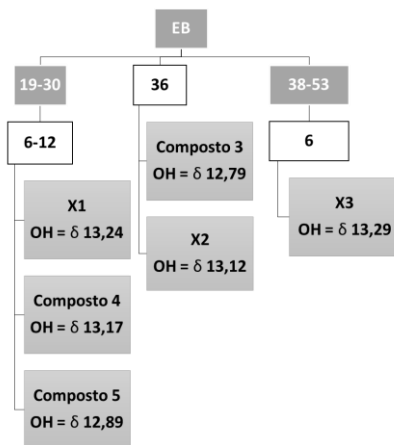
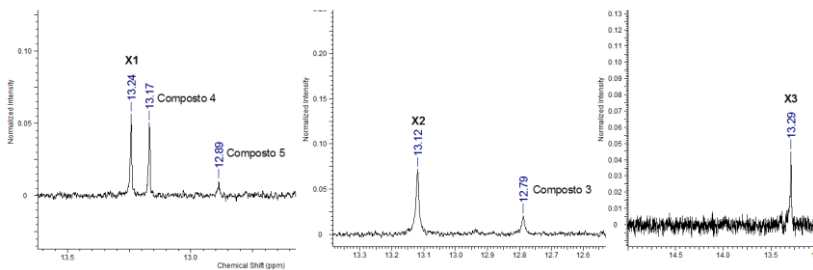


Figura 10. Sinais do grupo OH quelado de compostos isolados e não identificados

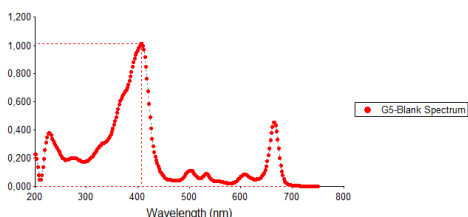


5.1.7. Composto 6

Finalmente, o composto **6** foi eluído na cromatografia em coluna, como uma banda de cor verde escura (CH_2Cl_2 92:8 AcOEt). Após ser ressuspendido com etanol foi obtido um sólido verde solúvel em clorofórmio.

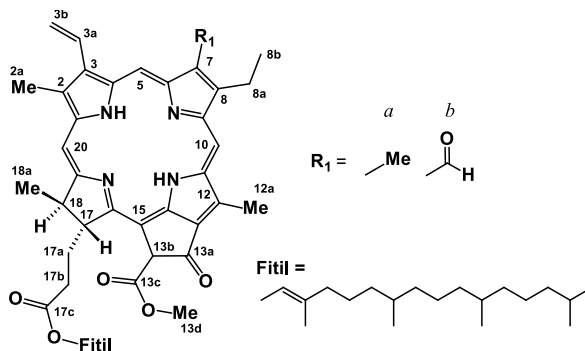
Devido a sua cor característica, foi feita uma análise em UV-VIS para investigar se o composto seria a clorofila, conhecida na maioria das plantas em duas diferentes formas: **a** e **b**, sendo a primeira encontrada em plantas maiores geralmente na proporção de 3:1 (GROSS, 1991). O resultado da análise pode ser visto na Figura 11, onde encontra-se os $\lambda_{\text{máx}}$ de 406 e 664 nm

Figura 11. Espectro de UV-VIS em metanol para a clorofila a ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)



As duas formas de clorofila encontradas em plantas apresentam dois principais sinais de absorção, a banda de Soret, na faixa de 380 a 500 nm e a banda Q, em 500 a 750 nm; sinais característicos em sistemas porfirínicos. Pode ser percebida uma diferença no $\lambda_{\text{máx}}$ nessas duas bandas, onde a clorofila **a** possui valores relatados para elas de 432 e 665 nm e a clorofila **b** de 469 e 652 nm (KOBAYASHI, 2013). Apesar deste composto ter alguma semelhança com a clorofila **a** devido a semelhança nos valores de $\lambda_{\text{máx}}$ para as duas bandas, os dados espectroscópicos não foram suficientes para uma identificação precisa.

As clorofilas são moléculas sensíveis, sendo facilmente degradadas frente a luz, na presença de solventes, sob altas temperaturas ou sob ação de ácidos e bases. A desmetalização do átomo de magnésio central leva a formação das feofitinas, as quais tem valores de absorção em UV-VIS deslocados comparados aos da clorofila com o metal. Além dessa modificação, elas podem perder o grupo fitol, formando os feoforbídeos e o grupo carboximetoxi em C-13b, formando os pirofeoforbídeos (ROCA, CHEN, PÉREZ-GÁLVEZ, 2016). Estas estruturas podem ser melhor compreendidas na Figura 12.

Figura 12. Estrutura da feofitína *a* e *b*

A feofitína *a* possui comprimento de onda máximo de absorção em 409 e 665 nm, enquanto que a feofitína *b* possui valores de 436 e 654 nm (KOBAYASHI, 2013), desta forma o composto isolado apresentou valores similares a feofitina *a*.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C também foi usada como forma de identificar a molécula. Apesar da pouca quantidade, foi possível detectar sinais característicos deste composto. Normalmente, a presença de um sinal em deslocamentos maiores de 10 ppm no RMN de ^1H evidencia a presença de um grupo aldeído em C-7 da forma *b* da molécula, porém esse sinal não está presente no espectro, confirmando a estrutura *a*, conforme apresentado na Figura 18.

Devido a aromaticidade presente nos anéis porfirínicos, é possível perceber que alguns sinais de hidrogênio têm seus valores deslocados como consequência. Os hidrogênios olefínicos em C-5, C-10 e C-20 estão desblindados e deslocados para campo baixo, apresentando simpletos de integral 1H nos valores respectivos de 9,49, 9,63 e 8,65 ppm. Além disso, as metilas em C-2a, C-7a, e C-12a também são influenciados pela aromaticidade, apresentando os respectivos valores de 3,44; 3,27 e 3,75 ppm. Os hidrogênios ligados aos nitrogênios do anel central são blindados a valores de -1,81 ppm, comprovando a aromaticidade e a desmetalização da molécula.

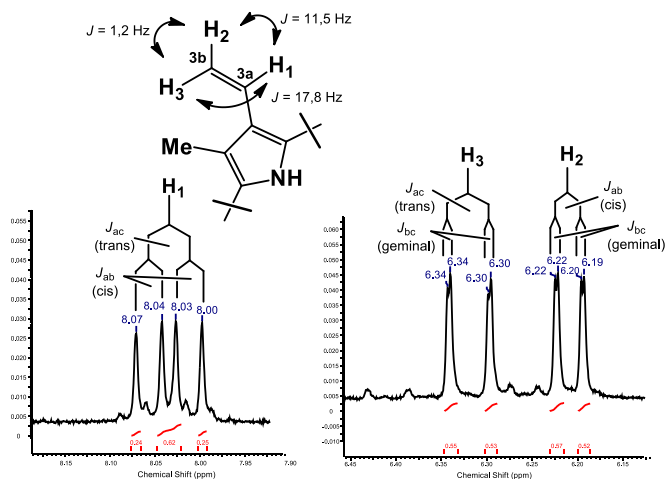
A provável molécula de feofitína *a*, aqui isolada, apresenta normalmente um simpleto em campo baixo referente ao hidrogênio em C-13b, porém é possível perceber apenas um sinal largo em 5,54 ppm, que quando analisado em conjunto com os dados do espectro de RMN de ^{13}C , revela que o referido carbono em 89,0 ppm está mais desblindado que o esperado, sugerindo a presença de um grupo OH em C-13b. A formação do grupo nesta posição da molécula acontece como consequência da exposição a luz visível ou UV tanto *in vitro*, como *in*

vivo, sendo este um mecanismo que não foi completamente elucidado ainda. Entretanto, é conhecido que a inserção do oxigênio, formando o grupo OH em C-13b, é uma das importantes reações iniciais para a degradação da clorofila tanto no escuro, como quanto sob a luz, sendo este fenômeno conhecido por alomerização (PETRÓVIC, ZVEZDANOVIC, MARKOVIC, 2017). Um estudo relata a presença dos dois estereoisômeros isolados com a hidroxila em C-13b, onde o grupo OH possui deslocamento de 5,53 ppm para o estereoisômero *S* e valor de 5,35 ppm para a forma *R* (MATSUO et al., 1996). Através de nossas análises, o valor de deslocamento químico obtido para o grupo OH nesta molécula sugere fortemente que a estereoisomeria do C-13b seja *S*.

É possível também encontrar os sinais referentes aos hidrogênios ligados a carbono sp^2 geminais em C-3b. Estes hidrogênios geram dois duplos dupletos em 6,32 e 6,21 ppm com integração de 1H cada. O acoplamento geminal entre eles é de 1,2 Hz. O hidrogênio em 6,32 ppm possui também um acoplamento trans de 17,8 Hz com o hidrogênio em C-3a e o sinal em 6,21 ppm um acoplamento cis de 11,5 Hz com o mesmo hidrogênio C-3a. O hidrogênio em C-3a tem valor de integral de 1H e forma um duplo duplete, com acoplamentos de 11,5 e 17,6 Hz. A figura 13 representa os sinais referentes aos hidrogênios ligados ao C-3a e C-3b.

Os sinais referentes ao núcleo feoforbídeo presente nos espectros de RMN de 1H e ^{13}C estão resumidos na tabela 7 em comparação com os dados da literatura.

Figura 13. Acoplamento vicinal dos hidrogênios em C-3a e C-3b



Embora seja possível atribuir a maioria dos sinais referentes ao núcleo feoforbídeo, o grupo fitil aparenta não estar na molécula. No RMN de ^1H não há os sinais de hidrogênios metílicos e metilênicos misturados no campo alto do espectro, nem um tripleto referente a um hidrogênio olefínico do grupo fitil em 5,24 ppm. No espectro de RMN de ^{13}C também não é possível localizar os sinais em campo baixo para os carbonos vinílicos do grupo fitil ligado ao éster em C-17c (118,4 e 143,0 ppm), nem o carbono ligado ao oxigênio do éster (61,9 ppm) correspondente a este mesmo grupo.

Porém há 11 sinais sem referência no campo alto como 60,5; 31,9; 29,7; 29,6; 29,4; 29,4; 29,2; 29,1; 22,7; 14,1 e 14,0 ppm. Há também no espectro de RMN de ^1H sinais que não foram atribuídos a nenhum hidrogênio como 4,10 ppm, 2,36 ppm e 1,16 ppm.

Entre os compostos isolados em *P. linooides*, percebe-se que estes estão de acordo com os marcadores taxonômicos encontrados no gênero, seguindo uma rota metabólica preferencial das xantonas e não apresentando o desvio levando a formação de estilipironas relatado para algumas espécies como *P. sabulosa* (PIZZOLATTI et al., 2004) e *P. longicaulis* (VENZKE, 2015).

O fracionamento cromatográfico resultou no isolamento e identificação do α -espinasterol (**1**), na 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**2**) e 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (**3**), 6-desoxijacareubin (**4**), 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona (**5**) e 13b-hidroxi-(13b-S)-feoforbídeo **a** (**6**).

Todos estes compostos são inéditos na espécie estudada, mas já foram biossintetizados em outras espécies do gênero *Polygala*, porém o composto 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona (**2**) é inédito na literatura.

11			137,9	137,8	138,4
12			129,4	129,4	129,4
12a	3,75 (3H, s)	3,77 (3H, s)	12,3	12,3	12,7
13			127,0	127,0	127,7
13a			-	192,0	192,2
13b	5,54 (OH)	5,47 (OH)	89,0	89,0	89,4
13c			172,8	172,8	173,3
13d	3,63 (3H, s)	3,62 (3H, s)	53,4	53,4	53,8
14			149,9	149,8	150,9
15			107,7	107,7	107,1
16			162,5	162,5	164,0
17	4,17 (1H, m)	4,17 (1H, m)	52,0	51,8	52,6
17a	2,27 (m)	2,25 (1H, m)	31,2	31,1	31,6
	2,93 (1H, m)	2,95 (1H, m)			
17b	2,54 (2H, m)	2,55 (2H)	31,7	31,6	32,0
17c			173,5	173,6	173,8
18	4,51 (1H, q)	4,56 (1H, m)	50,4	50,3	50,9
18a	1,61 (3H, d, $J = 7,1$ Hz)	1,63 (3H, d, $J = 7,0$ Hz)	22,7	22,7	22,9
19			172,4	172,4	173,0
20	8,65 (1H, s)	8,76 (1H, s)	93,6	93,6	95,0

^a JERZ et al., 2007

^b MATSUO et al., 1996

5.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA RAIZ, FLORES E CAULE COM FOLHAS DA PLANTA

A planta fresca foi coletada e divididas em três partes: raiz, caule com folhas e flores. As partes da planta foram secas em estufa para posterior extração com etanol 96% a fim de se obter o extrato respectivo de cada parte da planta. As massas da planta fresca e da planta seca, assim como os rendimentos obtidos da extração estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8. Massas da planta fresca e seca e rendimento dos extratos das partes de *P. linoides*.

	Planta fresca	Planta seca	Extrato Bruto	Rendimento
Raiz	1,56 g	1,21 g	0,13 g	10,59%
Caule e folhas	7,72 g	5,73 g	0,58 g	10,12%
Flores	1,53 g	1,05 g	0,28 g	26,74%

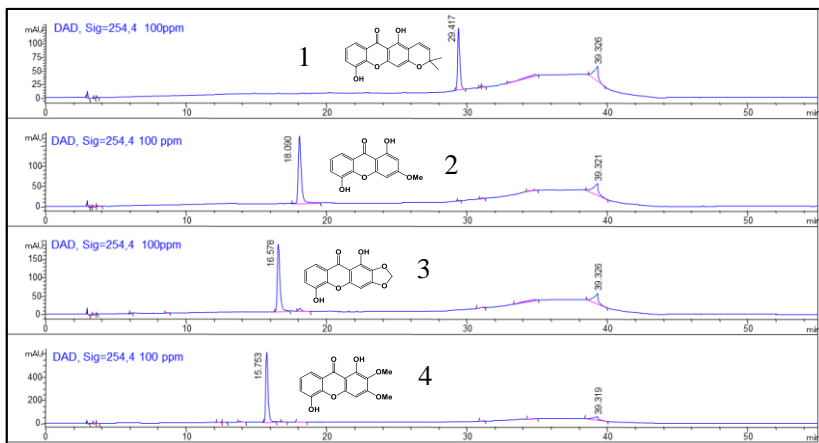
5.3. QUANTIFICAÇÃO POR HPLC DA 1,5-DIHIODROXI-2,3-METILENODIOXIXANTONA NOS EXTRATOS DAS RAÍZES, CAULE COM FOLHAS E FLORES

Polygala tenuifolia é uma espécie presente na China, onde há diversos estudos que relatam atividades biológicas devido a utilização de suas raízes (LEE et al., 2009; SHIN et al. 2009b, CHOI et al., 2011). Encontrou-se uma concentração alta de oligossacarídeos esterificados nesta parte da planta, que estavam relacionadas com suas propriedades farmacológicas (LIU et al., 2010; LIU et al. 2015; WEI et al., 2015). Além disso, é possível encontrar também uma concentração alta de salicilato de metila nas raízes das espécies do gênero, sendo este também relacionado a outras atividades. Assim, as diferentes partes de *P. linoides* foram investigadas com a premissa de que metabólitos secundários poderiam estar acumulados também em suas raízes. As xantonas são consideradas marcadores taxonômicos da espécie e foram usadas para este teste devido ao seu isolamento prévio.

Foi desenvolvido um método para a análise com os eluentes A (Acetonitrila + 0,2% ácido fórmico) e B (Água MilliQ + 0,2% ácido fórmico), onde usou-se a seguinte programação: t = 0 minutos com o sistema de eluentes A (10%) e B (90%), 1 minuto B (90%), 10 minutos eluente B (60%), 25 minutos B (50%) e 30 minutos B (0%). Através desse

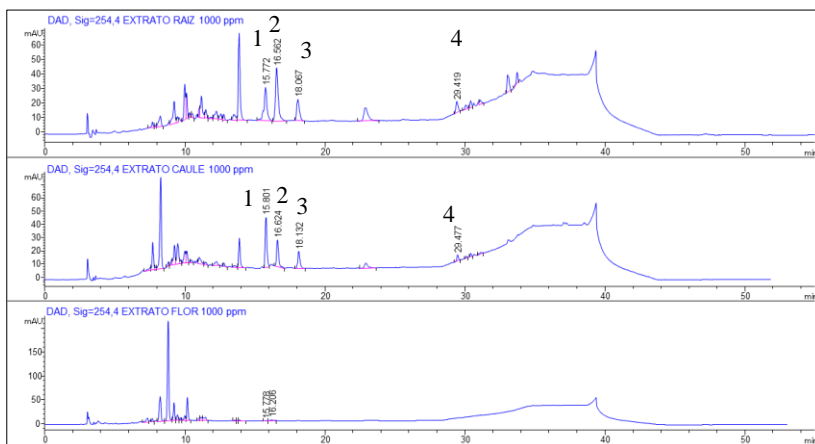
método, as xantonas isoladas foram analisadas e obtidos o espectro de UV e tempo de retenção para cada uma. Os cromatogramas para cada xantona injetada na concentração de $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ estão representados na Figura 14.

Figura 14. Compostos e seus tempos de retenção no cromatograma



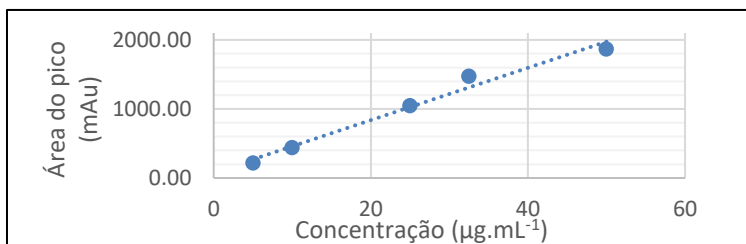
Além disso, foi obtido o perfil para o extrato da raiz, do caule com folhas e das flores na concentração de $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, onde cada extrato está representado nos cromatogramas da Figura 15.

Figura 15. Perfil cromatográfico para cada extrato das partes de *P. linoides*



A 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona foi o composto extraído em maior quantidade da planta, porém após diversas tentativas não foi possível separar o sinal referente ao composto de outros sinais próximos. Assim, o método foi otimizado para quantificar a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona, o qual é um composto inédito obtido da planta. Dessa forma, a programação foi alterada para t = 0 minuto B (90%), 1 minuto B (90%), 10 minutos eluente B (60%), 20 minutos B (53%) e 23 minutos B (0%), de forma a diminuir o tempo de análise que anteriormente era de 52 minutos para 42 minutos. Foi obtida uma curva de calibração com injeções do composto em concentrações entre 5 e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ como forma de realizar a quantificação por método de padrão externo (Figura 16).

Figura 16. Curva de calibração para a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona



A xantona não foi identificada nas flores. Para o extrato das raízes e do caule com folhas foram obtidos respectivamente as concentrações de $14,37\pm 0,24 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $4,00\pm 0,15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. O valor calculado para o limite de detecção (LD) foi $1,87 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e para o limite de quantificação (LQ) foi $2,95 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Sendo assim, os valores apresentados para a análise com a xantona estão de acordo com os dados obtidos.

Segundo os resultados, para cada 1 mg do extrato de caule com folhas, estima-se que haja 4 μg da xantona, enquanto para cada 1 mg do extrato das raízes existe 14,4 μg . Percebe-se que o rendimento quanto a extração dessas duas partes da planta foi semelhante, porém a massa de caule com folhas é maior para a planta toda do que a massa das raízes (Vide tabela 14). Levando isso em consideração, ao analisar os extratos das partes da planta como um todo, para os 0,58 g obtido do extrato de caule com folhas, estima-se que haja aproximadamente 2,3 mg da xantona, enquanto que para os 0,13 g de extrato obtido para as raízes, são estimados uma quantidade aproximada de 1,9 mg do composto.

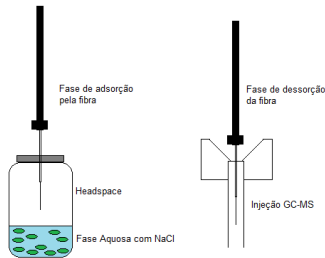
Apesar dos resultados evidenciarem que a 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona se concentra cerca de 4 vezes mais nas raízes em comparação com o resto da planta, propõe-se que é mais vantajoso usar o extrato das raízes em conjunto do caule e folhas como forma de obter maior rendimento para o isolamento do composto.

5.4. CONSTITUINTES QUÍMICOS VOLÁTEIS DAS RAÍZES, FOLHAS E FLORES DA PLANTA FRESCA EXTRAÍDAS POR SPME COM POSTERIOR ANÁLISE POR GC-MS

Diversas técnicas são utilizadas para a extração e identificação de compostos voláteis de uma planta, onde se destacam a destilação por arraste a vapor, a hidrodestilação, extração por fluido supercrítico e a microextração por fase sólida (SPME). A primeira e a segunda técnica estão relacionadas a extração de óleos essenciais de plantas e são as mais usadas pois são técnicas mais antigas e que utilizam equipamentos de fácil obtenção e maneabilidade. Estas técnicas têm como desvantagem obter os voláteis através do tratamento do material sob maiores temperaturas e períodos prolongados, podendo levar a degradação de compostos e modificação dos voláteis extraídos na espécie (CHU-CHIN, 1987; RUBIOLO et al., 2010). A extração por fluido supercrítico e SPME são técnicas mais recentes e com tratamento mais brando quanto a extração dos voláteis. Em especial, SPME é uma técnica que permite seu uso diretamente na amostra, necessitando de menos material, pois não há a necessidade de pré-concentrá-la, além de ser facilmente acoplável a cromatografia líquida e gasosa. Assim, esta técnica foi utilizada neste trabalho para a identificação dos voláteis em *P. linooides*.

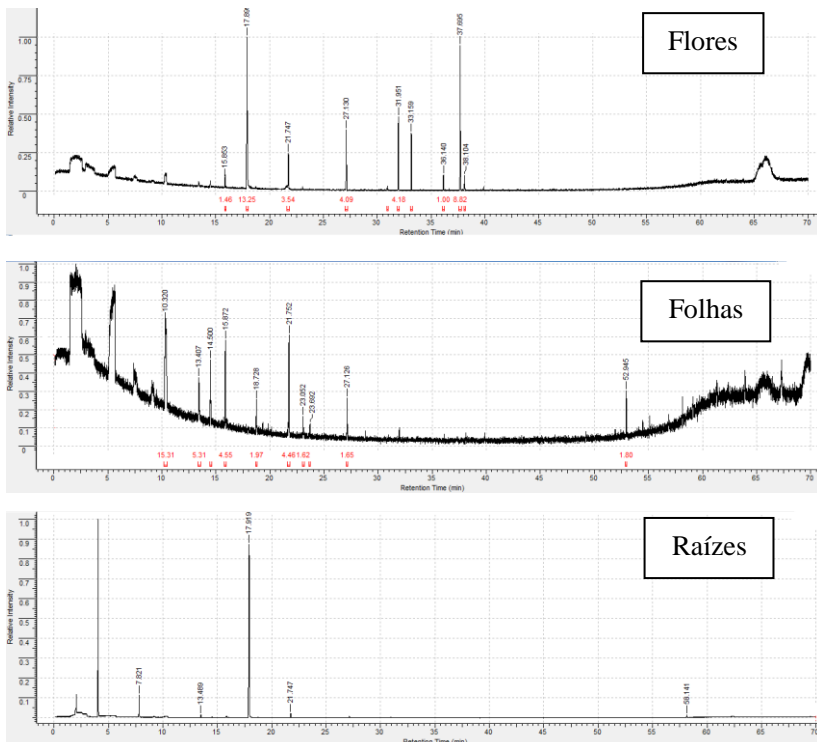
O método de extração consiste na utilização de uma seringa modificada contendo uma fibra de poli(dimetilsiloxano) (PDMS), a qual é exposta diretamente em fase gasosa (*headspace*) para a adsorção dos voláteis. Foram utilizadas para o teste plantas coletadas vivas, que foram diretamente levadas ao laboratório e tiveram suas raízes, folhas e flores separadas antes do início do teste. No primeiro momento as partes foram colocadas em meio saturado com cloreto de sódio, de modo a promover a dispersão dos constituintes voláteis para o *headspace*, saturando assim a fibra exposta no ambiente. Num segundo momento a fibra é retraída através de um dispositivo, e em seguida exposta em GC-MS para dessorção e análise dos compostos (Figura 17). Apesar da necessidade de aquecimento durante a saturação da fibra, o tempo e a temperatura necessária para a extração dos voláteis são menores que outros métodos convencionais, minimizando a chance de degradação dos compostos.

Figura 17. Técnica de SPME através da adsorção em *headspace*



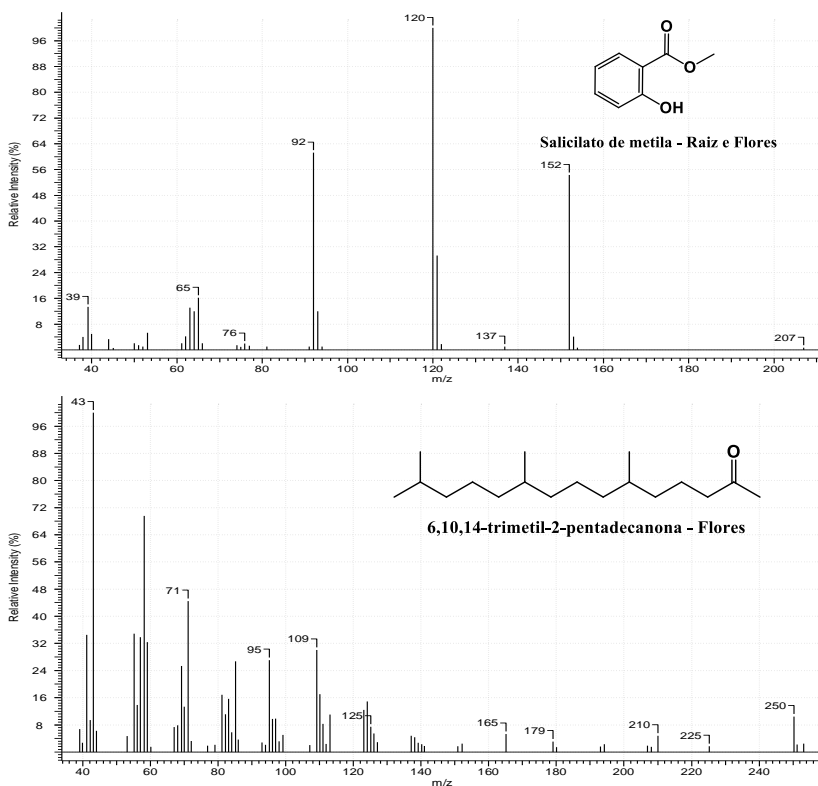
Os resultados obtidos para as flores, folhas e raiz da planta estão representados nos cromatogramas da Figura 18.

Figura 18. Cromatogramas obtidos para as flores, folhas e raízes da planta



Apesar de serem detectados diversos sinais, poucos voláteis foram obtidos na extração. A maioria dos sinais presentes nos cromatogramas possuem prováveis valores para as partículas da fibra utilizada para a extração dos voláteis segundo dados da biblioteca NIST, sendo que supostamente seria preciso maior quantidade de material da planta, ou de um compartimento menor para aumentar a concentração dos voláteis durante a fase de adsorção do teste. Apesar disso, identificou-se a presença do salicilato de metila como um sinal intenso nas raízes e com um sinal menos intenso nas flores, ambos com $IA_{exp} = 1191$ ($IA_{liter} = 1190$). Além deste, nas flores também foi obtido um sinal relativo ao 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona com $IA_{exp} = 1839$ ($IA_{liter} = 1847$). Os espectros de massa dos dois compostos estão representados na Figura 19. Nas folhas da espécie nenhum composto foi identificado.

Figura 19. Compostos obtidos por SPME-GC-MS de *P. linoides*

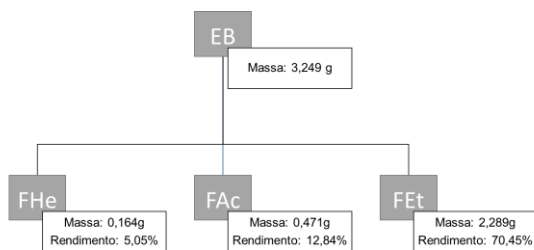


Apesar dos poucos dados obtidos na análise de voláteis, foi possível encontrar o salicilato de metila em grandes quantidades na raiz conforme descrito em outros estudos utilizando a mesma técnica (PIZZOLATTI et al., 2009; VICTORIO, CARRIÇO, LAGE, 2011; YANG et al., 2010). Além disso, não havia sido relatada a presença do salicilato de metila nas flores de espécies do gênero através desta técnica anteriormente (PIZZOLATI et al., 2009).

5.5. ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios biológicos foram realizados com o extrato bruto e frações obtidas a partir do extrato bruto. Sendo assim, uma parte de extrato bruto foi fracionado através de filtração em leito de sílica gel com os solventes hexano, acetato de etila e etanol para render as respectivas frações, segundo o fluxograma apresentado na Figura 20.

Figura 20. Fracionamento do extrato bruto de *P. linoides*



5.5.1. Determinação de fenólicos e flavonoides e da atividade antioxidante

A produção de radicais livres em células é um procedimento normal para a sua manutenção, porém quando há um desequilíbrio entre formação e neutralização desses compostos em algum local do organismo, o excesso de radicais leva a danos em tecidos próximos. Este processo é chamado de estresse oxidativo, sendo relacionado a várias doenças, como osteoclerose, doença renal crônica e diabetes mellitus (YOUNG & WOODSIDE, 2001).

Os radicais responsáveis pelo estresse oxidativo estão divididos em 4 classes: as espécies reativas de oxigênio (ROS), de nitrogênio (RNS), de enxofre (RSS) e as de cloro (RCS) (SOSA et al., 2013). As espécies reativas podem ser geradas por fatores exógenos, como a luz UV, raios

X, raios gama, poluentes atmosféricos; ou em meio intracelular (endógeno), como macrófagos durante o processo inflamatório, ou produtos resultantes do funcionamento da cadeia respiratória da mitocôndria, entre outras (CADENAS, 1989).

A produção de espécies reativas é controlada nos seres vivos por compostos antioxidantes, sendo estes identificados como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação em substratos. Entre os antioxidantes não enzimáticos estão o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C) e flavonoides (BAGCHI & PURI, 1998). Os antioxidantes não enzimáticos podem ser obtidos de fontes naturais, sendo absorvidos pelo organismo e utilizado no combate a formação do estresse oxidativo.

Dessa forma, é importante a pesquisa por novas substâncias antioxidantes de recursos naturais, pois estas podem prevenir o dano a tecidos causado pelo estresse oxidativo, utilizando como mecanismo principal a oxidação das espécies reativas formando radicais estáveis, sendo então excretado no organismo sem causar maiores danos as células do ser vivo.

Como forma de avaliar o poder antioxidante do extrato e frações de *P. linoides*, foram utilizados dois diferentes ensaios, a captura do radical livre DPPH e o ensaio do potencial redutor. Os resultados foram comparados com os valores obtidos para a determinação de compostos fenólicos e flavonoides como forma de relacionar estes compostos com a atividade reportada.

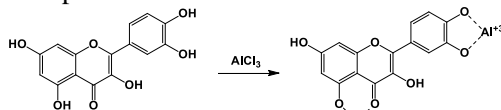
A determinação do teor de fenólicos usa o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste em uma mistura de ácidos fosfomolibdídico ($H_3Mo_{12}PO_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3W_{12}PO_{40}$), onde ambos se encontram no estado de oxidação +6. Em presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais é +5 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras em 725 nm. Desta maneira, quanto maior a intensidade da coloração azul, maior é a concentração de compostos fenólicos na amostra. Na tabela 9, observa-se a quantificação de compostos fenólicos no extrato bruto e frações de *P. linoides*.

A determinação de flavonoides foi feita utilizando a metodologia de complexação com o cloreto de alumínio ($AlCl_3$). Quando em presença de flavonoides que possuem em sua estrutura hidroxilas fenólicas e/ou grupos carbonila, o alumínio pode ser complexado por estes grupos formando anéis de 5 ou 6 membros (Figura 21), e com isto, proporcionando um deslocamento batocrômico nas bandas de

absorbância do espectro de UV-Vis destes compostos. Desta forma, quanto maior é o deslocamento batocrômico, maior é a quantidade de flavonoides na amostra.

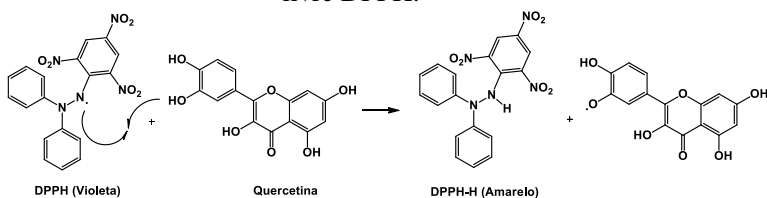
A determinação do teor de flavonoides no extrato bruto e frações de *P. linoides* podem ser observadas na tabela 9.

Figura 21. Complexo formado entre um flavonoide e o $AlCl_3$



A atividade antioxidante foi medida através do ensaio que determina a habilidade do radical livre estável 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) capturar um elétron do agente redutor. O radical DPPH possui uma cor violeta em solução, sendo reduzido a molécula de DPPH de coloração amarelada quando o flavonoide ou composto fenólico é oxidado (Figura 22). Quanto maior o descoloramento do radical DPPH, maior é a atividade antioxidante da amostra, sendo então menor o valor de CE_{50} para cada amostra.

Figura 22. Atividade antioxidante da quercetina frente ao radical livre DPPH.



Na tabela 9 pode-se observar a atividade antioxidante relacionada ao ensaio com DPPH aplicado ao extrato bruto e frações de *P. linoides*.

A atividade antioxidante também foi observada através do ensaio do poder redutor. Este ensaio é baseado na reação de redução de íons férricos (Fe^{+3}) a íons ferrosos (Fe^{+2}) pelo substrato, devido a presença de compostos doadores de elétrons. Dessa forma, os íons ferricianeto são reduzidos a ferrocianeto que, por sua vez, formam um complexo com os íons ferro III, $(Fe_4[Fe(CN)_6]_3)$ de coloração azul intensa (azul da Prússia), apresentando absorção em 720 nm. Assim, quanto maior a intensidade da coloração azul, maior é a atividade antioxidante da amostra. Na tabela 9 encontram-se os resultados para a atividade antioxidante relacionada ao ensaio do poder redutor aplicado ao extrato bruto e frações de *P. linoides*.

Tabela 9. Conteúdo de fenólicos e de flavonoide e atividade antioxidante exibida pelo extrato bruto e frações de *P. linoides*

Amostras	Fenólicos ^a	Flavonoides ^b	Poder reductor ^c	DPPH CE ₅₀ ug.mL ⁻¹
EB	74,76±4.94	2,26±0,47	113,40±5.08	8,26±1,10
FAC	77,09±4.10	24,59±2.62	487,17±5.48	17,21±3,5
FEt	85,10±4.04	51,01±3.30	337,46±1.37	5,87±0,34

^a mg ac. gálico/g amostra. ^b mg quercetina/g amostra.

^c mg ac ascórbico/g amostra.

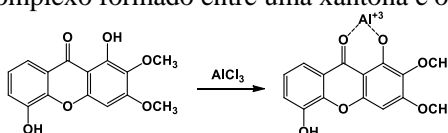
O extrato bruto e as frações solúveis em acetato de etila e etanol apresentaram acentuada atividade antioxidante, tanto quando avaliadas pelo ensaio do poder reductor, como quando avaliadas pelo ensaio do DPPH. Como na fração hexano não se observou a presença nem de fenólicos nem de flavonoide, não foi determinada a sua atividade antioxidante.

O teor de compostos fenólicos foi maior nas frações mais polares, sendo que na fração solúvel em etanol encontrou-se maior expressão destes compostos. Este comportamento teve correspondência na quantificação de compostos flavonoides no extrato bruto e frações.

A fração etanol apresentou a maior atividade antioxidante quando avaliada pelo teste com DPPH, e também foi a fração que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos e de flavonoides. No entanto, a fração acetato de etila apresentou maior atividade antioxidante quando avaliada pelo teste do poder reductor.

Estudos confirmam a acentuada atividade antioxidante encontrada para a classe de xantonas (MARTÍNEZ, FERNANDEZ-MARIN, GALANO, 2012), onde presume-se que estes compostos podem estar influenciando nos resultados antioxidantes presentes na fração acetato de etila. É provável também que as xantonas sejam um falso positivo no teste para determinação de flavonoides, pois apresentam os mesmos grupos –OH e >C=O dos flavonoides, responsáveis por quelação do alumínio (Figura 23).

Figura 23. Complexo formado entre uma xantona e o AlCl₃



Assim, a planta é uma boa fonte de antioxidantes, onde incentiva-se a busca de compostos que sejam responsáveis por essa atividade na fração etanólica e acetato de etila.

5.5.2. Inibição da enzima acetilcolinesterase

A doença de Alzheimer é a causa mais comum de demência em pessoas idosas, sendo esta a faixa etária que mais cresce em quase todo o mundo. Isso acontece, pois, a população mundial tende a atingir cada vez idades mais avançadas devido a evolução da medicina, tornando a doença de Alzheimer um problema de saúde pública cada vez maior futuramente.

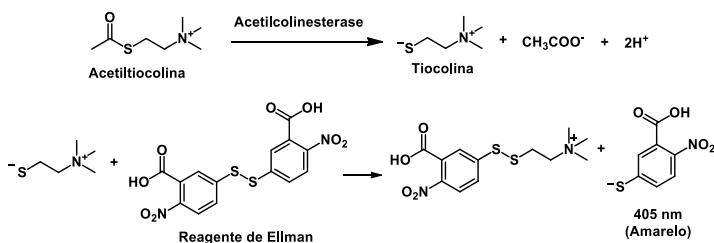
Diferentes hipóteses foram formuladas desde a década de 80 para a causa da doença, onde entre elas se destacam a colinérgica, a glutamatérgica, a amiloide, a metálica e a diabética (FALCO et al., 2016). A hipótese colinérgica relaciona a causa da doença com a diminuição de neurotransmissores no cérebro, entre eles a acetilcolina. A acetilcolina, após ser usada na sinapse nervosa, é hidrolisada pela enzima acetilcolinesterase, transformando-a em colina e um grupo acetil. Assim, trata-se o paciente com um inibidor desta enzima, tendo como objetivo principal aumentar a concentração de acetilcolina na sinapse nervosa, amenizando o déficit cognitivo nos primeiros estágios da doença, retardando dessa forma o avanço da doença e prolongando a vida do paciente (HEINRICH & TEOH, 2004).

Apesar de ser considerada por muitos autores como um tratamento sintomático, até o momento os inibidores da acetilcolinesterase são os únicos medicamentos indicados para as pessoas diagnosticadas com a doença de Alzheimer (COMAN & NEMES, 2017). Um dos remédios mais usados é a galantamina (Reminyl®), um alcaloide extraído da planta *Galanthus woroonwii* e logo após encontrado em outras espécies do gênero (BERKOV et al., 2011). Além deste medicamento existem poucos inibidores da acetilcolinesterase no mercado, sendo mais utilizados os fármacos donepezil (Aricept®) e rivastigmina (Exelon®). Apesar destes apresentarem efeito satisfatório em pacientes, eles são caros e apresentam diversos efeitos colaterais (JUNIOR et al., 2004). Por isso, incentiva-se a busca de produtos naturais que possam substituí-los, tendo-se uma opção de menor custo e com tratamento mais eficiente para a doença.

O extrato bruto e frações de *P. linooides* foram avaliados quanto ao potencial de inibição sobre a enzima acetilcolinesterase. O teste utilizado baseia-se na hidrólise do substrato acetiltiocolina pela enzima, formando o produto tiocolina, que reage com o ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico (reagente de Ellman), produzindo o ânion 2-nitrobenzoato-5-

mercaptotiocolina e o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico, sendo o ânion identificado pela coloração amarela (Figura 24). Deste modo, caso haja compostos na amostra que inibam a ação da enzima, esta não degradará a acetiltiocolina e não formará um cromóforo amarelo. Quanto mais intensa a coloração amarela, maior a hidrólise da acetiltiocolina realizada pela enzima e menor a concentração de compostos vegetais que possuem a propriedade de inibir a enzima.

Figura 24. Reações presentes no teste de inibição da acetilcolinesterase



Dessa forma, analisou-se a velocidade da reação enzimática, onde as amostras vegetais com maior atividade reduziram a velocidade da reação em comparação com o controle negativo, com o tampão fosfato no lugar das amostras. O controle positivo, o fármaco galantamina, inibiu fortemente a enzima como esperado (94%). Na Tabela 10, observa-se que apenas a fração acetato de etila inibiu em mais de 50% a atividade enzimática, prosseguindo dessa forma com a determinação da CI_{50} , para verificar qual é a concentração necessária para inibir em 50% a atividade enzimática. Este valor foi de $68,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 25).

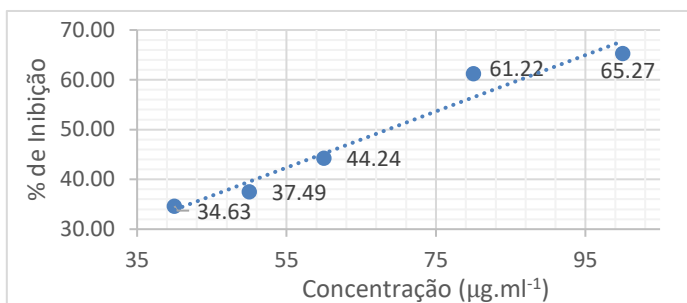
Tabela 10. Avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase pelo extrato bruto e frações de *P. linoides*

Extratos	% Inibição
Extrato Bruto ^a	11,48
Fração Hexano ^a	6,50
Fração Acetato de etila ^a	79,69
Fração Etanol ^a	6,07
Galantamina ^b	94,65

^a 1000 ppm. ^b 100 ppm.

Existem muitos relatos na literatura em relação às propriedades anticolinérgicas presentes nas xantonas (URBAIN et al., 2004; KHAW et al., 2014; TEH et al., 2016), assim incentiva-se a busca de resultados que relacionem esta atividade concentrada na fração acetato de etila com as xantonas de polaridade intermediária obtidas no fracionamento do extrato bruto.

Figura 25. Determinação da CI_{50} da fração acetato de etila de *P. linooides*



5.5.3. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana é definida pela capacidade de um composto matar bactérias ou inibir seu crescimento. Estes compostos são chamados antibióticos, sendo comercializados como forma de tratamento de doenças causadas por esse tipo de agente. O uso indiscriminado de antibióticos nas últimas décadas devido ao baixo custo induzido pelas perdas de proteção de patentes e produção de medicamentos genéricos, levou ao aumento de casos de doenças causadas por estirpes resistentes a múltiplas drogas, como o *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (FERNANDES & MARTENS, 2017). Devido a impossibilidade do tratamento destas superbactérias com os antibióticos atuais, a pesquisa por novos agentes bactericidas continua crescendo. Desta maneira, o uso de fitofármacos ganha destaque, uma vez que a ação sinérgica entre compostos presentes em um extrato pode levar a uma ação “multi-target”, causando a morte de bactérias por mecanismos variados em conjunto e dificultando a resistência de uma nova geração para um composto específico (KIM et al., 2011).

O teste antibacteriano usado neste estudo baseia-se na aplicação do extrato e frações em placa de 96 poços com caldo Muller-Hinton (ágar com nutrientes) para o desenvolvimento das bactérias, onde em seguida

infecções, pois diferentemente das bactérias, os fungos são formados por células eucarióticas, fazendo com que diversos alvos farmacológicos sejam tóxicos também para células humanas (CAMPOY & ADRIO, 2017). Devido a estes fatores, incentiva-se a busca por novos fármacos que possuam atividade antifúngica.

Há diversos relatos quanto a atividade antifúngica no gênero *Polygala*, onde destacam-se as espécies *P. myrtifolia* (MOTSEI et al., 2003), *P. gazensis* (BERGERON et al., 1997), *P. nyikensis* (MARSTON et al., 1993), *P. paniculata*, *P. campestris*, *P. sabulosa*, *P. pulchella* e *P. cyparissias* (JOHANN et al., 2011). Em *P. nyikensis* foi encontrado xantonas, onde duas delas apresentaram atividade frente a *Cladosporium cucumerinum* (MARSTON et al., 1993); os extratos hexânico e etanólico de *P. paniculata* apresentaram atividade antifúngica para *Candida tropicalis*, e o extrato hexânico ainda apresentou atividade para *Candida glabrata*, *Candida parapsolis* e *Criptococcus gattii*; o extrato diclorometano de *P. campestris* apresentou atividade para *Sporothrix schenckii* (JOHANN et al., 2011). Assim, baseado nos resultados obtidos para outras espécies, avaliou-se o potencial antifúngico em *P. linoides*.

Para o teste antifúngico foram usados o extrato e frações, sendo estes diluídos em meio de cultura apropriado para o desenvolvimento de fungos e posteriormente adicionados em poços de uma placa de 96 poços. Os fungos foram repicados nas condições favoráveis para cada um, onde após atingida a concentração necessária para o teste, foram então adicionadas nos poços com as amostras. Foi conduzido também o controle negativo e o controle positivo com itraconazol. Após incubação nas condições e tempo necessários para cada espécie, foi adicionado a cada poço o reagente brometo tiazolil azul de tetrazólio (MTT) e levado novamente a incubação por mais quatro horas. As células vivas do fungo são responsáveis pela metabolização do MTT de forma semelhante a relatada para o teste antibacteriano, sendo que neste caso há a mudança da coloração amarela do reagente para a coloração púrpura do derivado formazan. Após adição de detergente para o rompimento da membrana celular e liberação dos compostos em solução, é feita a determinação da inibição do crescimento fúngico para cada amostra, sendo que quanto menor a intensidade da coloração púrpura apresentada, maior a inibição sobre a espécie fúngica. Os resultados obtidos para a inibição do crescimento fúngico podem ser observados na tabela 11. Os extratos ou frações foram considerados ativos quando inibiram o crescimento fúngico em valor igual ou maior que 70% (JOHANN et al., 2011).

A maioria das amostras testadas foram inativas quanto a inibição do crescimento fúngico, exceto para a fração hexano, a qual apresentou

valor acima de 70% para a espécie *P. brasiliensis*. Os resultados negativos apresentados são referentes a um maior crescimento dos fungos quando comparados ao controle.

Dessa forma a fração hexano apresentou atividade para um dos fungos, onde incentiva-se a aplicação do teste para determinar a concentração inibitória mínima e determinar que compostos seriam responsáveis por essa atividade.

Tabela 11. Inibição do crescimento fúngico na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

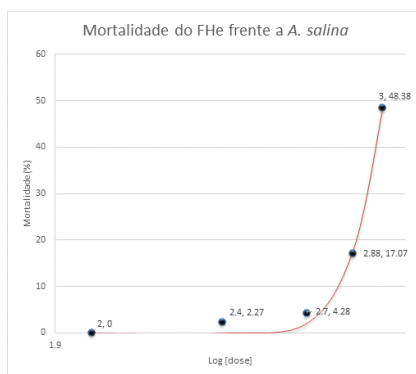
Amostra	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
EB	-22,2%	34,2%	-2,5%
FHe	27,4%	55,3%	-6,8%
FAc	-13,4%	42,6%	-6,0%
FEt	-17,1%	-3,9%	-32,8%
Amostra	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Paracoccidioides brasiliensis Pb18</i>
EB	8,0%	14,7%	0,5%
FHe	23,6%	-5,6%	81,6%
FAc	41,1%	54,0%	61,9%
FEt	5,3%	8,1%	0%

5.5.5. Ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina*

A. salina é um microcrustáceo que tem como habitat natural águas salgadas. Os testes com a espécie têm como vantagem o baixo custo, fácil manuseio em bancada e por não haver necessidade de alimentá-los (HAMIDI, JOVANOVA, PANOVSKA, 2014). Este teste pode avaliar as propriedades biológicas de uma amostra, pois parte-se da premissa que se ela apresentar toxicidade para o microcrustáceo, pode também possuir uma atividade biológica atrelada aos compostos presentes nesta amostra. Por outro lado, a não toxicidade frente a *A. salina*, podem evidenciar a baixa toxicidade destas mesmas. Estudos anteriores relatam que existe uma correlação entre a toxicidade de amostras para *A. salina* e a toxicidade em ratos (HAMIDI, JOVANOVA, PANOVSKA, 2014). Assim, este é um teste simples que serve para prever uma possível toxicidade de amostras em animais superiores.

São consideradas tóxicas as amostras que apresentam valores da DL_{50} menores que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MEYER et al., 1982). Para o extrato bruto e todas as frações testadas de *P. linoides* foram encontrados valores maiores que $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Este resultado indica a provável baixa toxicidade do extrato bruto e frações de *P. linoides*. A única fração que apresentou resultado próximo a concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a fração hexano, como está representado na Figura 27. Apesar desta fração não alcançar 50% de toxicidade na concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, teve seu valor de DL_{50} estimado em $1015,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 27. Determinação da DL_{50} para a fração hexano de *P. linoides*



A não-toxicidade presente nas amostras de *P. linoides* frente a *A. salina* reflete os resultados obtidos para os testes antimicrobianos, uma vez que estes também evidenciaram a não toxicidade das amostras em espécies de fungos e bactérias.

5.5.6. Atividade antidepressiva

Mundialmente foram registrados aproximadamente 322 milhões de casos de depressão no ano de 2015, segundo relatório da Organização Mundial de Saúde (2017), representando um aumento de 18,4% em 10 anos. A maioria dos medicamentos antidepressivos usados tem como função regular a concentração dos neurotransmissores serotonina, noradrenalina e dopamina, onde muitos apresentam vários efeitos colaterais. Sob esta perspectiva, algumas espécies de *Polygala* foram estudadas quanto ao seu potencial antidepressivo. Pode-se citar *P. pulchella*, cujo extrato bruto apresentou atividade (BETTIO et al., 2011),

P. japonica, sendo sua atividade antidepressiva relacionada às saponinas triterpênicas (LI et al., 2006b), *P. sabulosa*, com a atividade atribuída a escopoletina, uma cumarina (CAPRA et al., 2010) e *P. tenuifolia*, onde vários compostos isolados apresentaram atividade antidepressiva, como o 3,6'-disinapoilsacarose (HU et al., 2010), os oligossacarídeos esterificados (LIU et al., 2010) e o ácido trimetoxicinâmico (LEEM, OH, 2015). Desta forma, a fração etanólica de *P. linooides* foi avaliada quanto a atividade antidepressiva.

Os testes comportamentais escolhidos, como o teste do nado forçado (TNF) e o teste do campo aberto (TCA), foram aplicados a camundongos seguindo modelos específicos para triagem de drogas antidepressivas.

No teste de nado forçado (TNF) busca-se reproduzir em modelo animal um comportamento que se assemelhe à depressão. Além disso, o TNF é sensível a drogas clinicamente efetivas utilizadas no tratamento desta doença. O teste se baseia na observação de camundongos, que sendo forçados ao nado em uma situação da qual eles não possam escapar, passam por um período de agitação que é seguida por uma postura de imobilidade. Considera-se imóvel o animal que flutua ou faz apenas os movimentos necessários para que sua cabeça se mantenha acima da água. Amostras que aumentem o tempo de imobilidade do animal podem ter potencial ação antidepressiva.

O teste de campo aberto (TCA) tem por objetivo eliminar a possibilidade de que ocorra uma redução da imobilidade no teste do nado forçado devido a um aumento na atividade locomotora, mas que não represente efeito antidepressivo. Este teste foi realizado anteriormente ao TNF, afim de verificar o nível de agitação de cada camundongo.

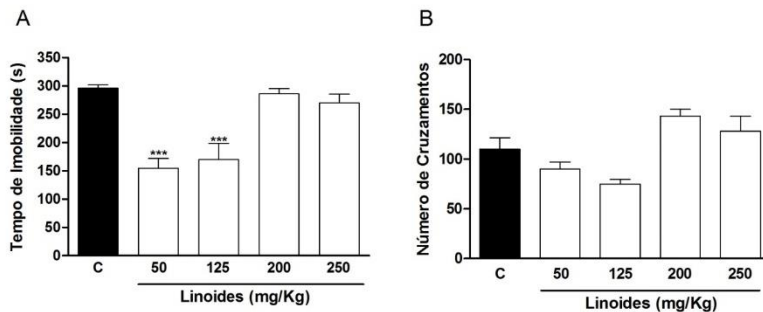
Os resultados para os testes do nado forçado e do campo aberto são observados na Figura 28.

Podemos observar na Figura 37 (A), que apenas os animais tratados com as doses de 50 mg/kg e 125 mg/kg da amostra apresentaram uma diminuição no tempo de imobilidade no TNF, comparado ao grupo controle, indicando assim uma atividade tipo-antidepressiva para a fração etanólica nestas concentrações de amostra. No TCA, não houve alterações significativas no número de cruzamentos dos animais tratados comparado com o grupo controle, indicando que os animais estavam em um nível de agitação normal e não interferindo assim no menor tempo de imobilidade relatada na amostra testada. (Figura 37 (B)).

Desta forma, encontrou-se atividade antidepressiva nas doses menores de 50 e 125 mg/Kg da fração etanólica desta planta. Apesar de

nenhum composto ser isolado desta fração, incentiva-se a busca por compostos que sejam responsáveis por esta atividade.

Figura 28. Efeito da administração do extrato no TNF (A) e no TCA (B)



O extrato foi administrado v.o. (gavagem) 54 minutos antes dos testes (n=7). Os resultados apresentam a média dos experimentos \pm erro padrão, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (C).

6. CONCLUSÃO

A partir das técnicas de isolamento cromatográfico do extrato bruto hidroalcoólico da planta foram obtidos 6 compostos, sendo estes o α -espinasterol, 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona, 1,5-dihidroxi-3-metoxixantona, 6-desoxijacareubin e o 13b-hidroxi-(13b-S)-feoforbídeo **a**, todos inéditos para a espécie, além da xantona 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona, inédita na literatura. Os compostos obtidos nesta espécie estão de acordo com os marcadores taxonômicos encontrados previamente no gênero.

A quantificação da 1,5-dihidroxi-2.3-metilenodioxixantona por HPLC nas partes da planta mostrou que o composto se concentra no extrato das raízes (14,4 mg/g de extrato), sendo que nas flores ele não foi detectado. Porém, há uma quantidade considerável da xantona no extrato do caule com folhas apesar da menor concentração encontrada (4 mg/g de extrato), pois, a quantidade do material vegetal para esta parte da planta é maior em comparação ao material das raízes.

A investigação de compostos voláteis por SPME permitiu identificar o salicilato de metila como um sinal de grande intensidade nas raízes, além deste mesmo composto ser encontrado em conjunto com o 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona nas flores, mostrando que o salicilato não está presente apenas nas raízes da espécie.

A análise quanto ao conteúdo de fenólicos e flavonoides revelou que o teor desta classe de compostos concentra-se na fração etanol e acetato de etila, sendo que, referente a atividade antioxidante, a fração etanol possuiu maior atividade usando o ensaio com DPPH, e a fração acetato de etila, maior atividade usando o teste do poder redutor. Na fração hexano não foi encontrada resultados relevantes para estes testes.

Para o ensaio de inibição as enzima acetilcolinesterase, a fração acetato de etila foi a única que apresentou inibição, incentivando-se a busca de compostos que sejam responsáveis por esta atividade na fração.

Os testes antimicrobianos aplicados aos extratos e frações da espécie revelaram a baixa toxicidade das amostras para as bactérias e fungos testados. Apenas a fração hexano teve atividade considerável quanto a inibição do crescimento da espécie de fungo *Paracoccidioides brasiliensis*.

Foi realizado o teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, onde todas as amostras foram inativas, mostrando a baixa toxicidade do extrato e frações, o que vem a corroborar com os resultados encontrados para os testes antimicrobianos.

O teste antidepressivo evidenciou a potencial atividade da fração etanólica nas concentrações de 50 mg/Kg e 125 mg/Kg para os roedores, o que incentiva a busca de compostos responsáveis pela atividade nesta amostra.

Os resultados obtidos para este trabalho confirmam a importância da continuidade do estudo da espécie, tanto para a fração acetato de etila com sua inibição da enzima acetilcolinesterase, quanto para a fração etanólica com sua ação antidepressiva. É interessante também obter os compostos isolados nestas frações através de diferentes métodos cromatográficos como forma de justificar o princípio ativo para as atividades relatadas.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy**, 4th Edition. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007, 804p.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chem.**, vol. 84, n.1 551-562, 2004

ARAI M.; HAYASHI A.; SOBOU, M.; ISHIDA, S.; KAWACHI, T.; KOTOKU, M.; KOBAYASHI, M. Anti-angiogenic effect of triterpenoidal saponins from *Polygala senega*. **Journal of Natural Medicines**, vol. 65, n. 1, p. 149-156, 2011

ARRUDA-SILVA, F.; NASCIMENTO, M.V.P.S.; LUZ, A.B.G.; FRODE, T.S.; VENZKE, D.; QUEIROZ, G.S.; PIZZOLATTI, M.G.; DALMARCO, E.M. *Polygala molluginifolia* A. St.-Hil. and Moq. prevent inflammation in the mouse pleurisy model by inhibiting NF- κ B activation. **International Immunopharmacology**, vol. 19, n. 2, p. 334-341, 2014

BAGCHI K.; PURI S. Free radical and antioxidants in health and disease. **Eastern Mediterranean Health Journal**, vol. 4, p. 350–360. 1998

BAI Y.P.; HU C.P.; CHEN M.F.; XU K.P.; TAN G.S.; SHI R.Z.; Li Y.J.; ZHANG G.G. Inhibitory effect of reinoside C on monocyte-endothelial cell adhesion induced by oxidized low-density lipoprotein via inhibiting NADPH oxidase/ROS/NF-kappaB pathway. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** vol. 380, p. 399–406, 2009

BARRACLOUGH, D.; LOCKSLEY, H.D.; SCHEINMANN, F.; MAGALHÃES, M.T.; GOTTLIEB, O.R. Applications of proton magnetic resonance spectroscopy in the structural investigation of xanthenes. **Journal of the Chemical Society B: Physical Organic**, p. 603-612. 1970

BETTIO, L.E.B.; MACHADO D.G.; CUNHA, M.P.; CAPRA J.C.; MISSAU, F.C.; SANTOS, A.R.; PIZZOLATTI, M.G.;

RODRIGUES A.L. Antidepressant-like effect of extract from *Polygala paniculata*: Involvement of the monoaminergic systems. **Pharm. Biol.** (London, U. K.), vol. 49, n.12, p. 1277-1285, 2011

BERGERON, C.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J.L.; MAVI, S.; ROGER, C.; HOSTETTMANN, K. Isolation of polyphenols from *Polygala gazensis* and liquid chromatography–mass spectrometry of related African *Polygala* species. **Phytochem. Anal.** Vol. 8, p. 32-36. 1997

BERKOV, S.; BASTIDA, J.; SIDJIMOVA, B.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. **Chem Biodivers.** Vol. 8, n. 1, p. 115-30. 2011

BORGES, F. R. M.; SILVA M.D.; CÓRDOVA, M.M.; SCHAMBACH, T.R.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 151, p. 144-150, 2014.

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicity. **Ann Rev Biochem.** Vol. 58, p. 79–110. 1989

CAI, Z.-L.; WANG, C.Y.; GU, X.Y.; WANG, N.J.; WANG J.J.; LIU W.X.; XIAO, P. LI C.H. Tenuigenin ameliorates learning and memory impairments induced by ovariectomy. **Physiol. Behav.**, vol. 118, p.112-117, 2013

CAMPOY, S.; ADRIO, J.L. Antifungals. **Biochemical Pharmacology**, Vol. 133, n. 1, p. 86-96. 2017

CAO, Q.; JIANG, Y.; CUI, S.; TU, P.; CHEN, Y.; MA, X.; CUI, X.; HUANG, Y.; DING, H.; SONG, J.; YU, B.; SHENG, Z.; WANG, Z.; XU, Y.; YANG, G.; YE, H.; HU, X.; ZHANG, T. Tenuifolin, a saponin derived from Radix Polygalae, exhibits sleep-enhancing effects in mice, **Phytomedicine**, vol. 23, n. 14, p. 1797-1805, 2016

CAPRA, J.C.; CUNHA, M.P.; MACHADO, D.G.; ZOMKOWSKI, A.D.; MENDES B.G.; SANTOS A.R.; PIZZOLATTI, M.G.; RODRIGUES, A.L. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice:

Evidence for the involvement of monoaminergic systems. **Eur. J. Pharmacol.**, vol. 643, n. 2-3, p. 232-238, 2010

CHEN, Y.L.; HSIEH, C.L.; WU, P.H.; LIN, J.G. Effect of *Polygala tenuifolia* root on behavioral disorders by lesioning nucleus basalis magnocellularis in rat. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 95, p. 47-55, 2004

CHEN, S.; LIN, L.; CHEN, S.; YANG, D., YANG, J.; XIAO, P. Quantitative Determination of Nine Xanthenes in *Polygala caudata* and Fingerprinting of *Polygala* L. by HPLC, **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies** Vol. 28, n. 18, p. 2953-2963, 2005

CHEN, Y.; HUANG, X.; CHEN, W.; WANG, N.; LI L. Tenuigenun promotes proliferation and differentiation of hippocampal neural stem cells. **Neurochem. Res.**, vol. 37, p. 771-777, 2012

CHEN, C.; WEI, X.; CHEN, C. 3,4,5-Trimethoxycinnamic acid, one of the constituents of *Polygalae Radix* exerts anti-seizure effects by modulating GABAergic systems in mice, **Journal of Pharmacological Sciences**, vol. 131, n. 1, p. 1-5, 2016

CHENG, M.C.; LI, C.Y.; KO, H.C.; KO, F.N.; LIN, Y.L.; WU, T.S. Antidepressant principles of the roots of *Polygala tenuifolia*. **J. Nat. Prod.**, vol. 69, n. 9, p. 1305-1309, 2006

CHOI, J.; KIM, H.; KIM M.; YANG, W.; HUH, Y., KIM, S., OH, M. *Polygalae radix* inhibits toxin-induced neuronal death in the Parkinson's disease models. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 134, p. 414-421, 2011

CHU-CHIN, C. Gas chromatographic analysis of thermal degradation products of gingerol compounds in steam-distilled oil from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Journal of Chromatography A**, vol. 387, p. 499-504. 1987

CHUNG, I.W.; MOORE, N.A.; OH, W.K.; O'NEILL, M.F.; AHN, J.S.; PARK, J.B.; KANG, U.G.; KIM, Y.S. Behavioural pharmacology of polygalasaponins indicates potential antipsychotic efficacy. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, vol. 71, n.1-2, p.191-195, 2002

CLARKE, G.; TING, K.N.; WIART, C.; FRY, J. High Correlation of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging, Ferric Reducing Activity Potential and Total Phenolics Content Indicates Redundancy in Use of All Three Assays to Screen for Antioxidant Activity of Extracts of Plants from the Malaysian Rainforest. **Antioxidants**, vol. 2, n. 1, p. 1–10. 2013

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Second Informational Supplement; [... provides updated tables for ... M02-A11 and M07-A9]. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2012.

COMAN, H.; NEMES, B.; New Therapeutic Targets in Alzheimer's Disease. **International Journal of Gerontology**, vol. 11, n. 1, p. 2-6. 2017

COOMBES, A. J. (2012). **The A to Z of Plant Names**. USA: Timber Press. p.312. ISBN 9781604691962.

CRISTIANO, R.; PIZZOLATTI M.G.; DELLE MONACHE F.; REZENDE C.M.; BRANCO A. 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

DE CAMPOS, R.O.P.; SANTOS, A.R.S.; VAZ, Z.R.; PINHEIRO, T.R.; PIZZOLATTI, M.G.; CECHINEL FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.V.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and preliminary study of a xanthone isolated from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae), **Life Sciences**, vol. 61, n. 16, p. 1619-1630, 1997

DREYER, D.L. Extractives of *Polygala macradenia*. **Tetrahedron**, vol. 25, n. 18, p. 4415-20. 1969

DUARTE, F.S.; MARDER M.; HOELLER A.A.; DUZZIONI M.; MENDES B.G.; PIZZOLATTI M.G.; DE LIMA T.C. Anticonvulsant and anxiolytic-like effects of compounds isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae): in vitro and in vivo interactions with benzodiazepine binding sites. **Psychopharmacology**, vol. 197, n. 3, p. 351-360, 2008

ECKELI, A.L.; DACH, F.; RODRIGUES, A.L.S. Acute treatments with GMP produce antidepressant-like effect in mice. **Neuroreport**, v. 11, p. 839–843. 2000.

EL SAYAH, M.; CECHINEL-FILHO, V.; PINHEIRO, T.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. In vitro effect of the extract and the 1,7-dihydroxy-2,3-dimethoxy xanthone from *Polygala cyparissias* on the contractions induced by inflammatory mediators and ovalbumin in normal and actively sensitized trachea from guinea pig. **Inflammation Research**, vol. 48, n. 4, p. 218-223, 1999

ESTRADA, A.; KATSELIS, G.S.; LAARVELD, B.; BARL, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L., **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, vol. 23, n. 1, p. 27-43, 2000

FALCO, A.D.; CUKIERMAN, D.S.; HAUSER-DAVIS, R.A.; REY, N.A. Doença de Alzheimer: Hipóteses etiológicas e perspectivas de tratamento. **Química Nova**, vol. 39, n. 1, p. 63-80. 2016

FARINA, M.; FRANCO J.L.; RIBAS C.M.; MEOTTI F.C.; MISSAU F.C.; PIZZOLATTI M.G.; DAFRE A.L.; SANTOS A.R. Protective effects of *Polygala paniculata* extract against methylmercury-induced neurotoxicity in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, vol. 57, p. 1503-1508, 2005

FERNANDES, E.G.R.; SILVA, A.M.S.; CAVALEIRO, J.A.S.; SILVA, F.M.; FERNANDA M.; BORGES M.; PINTO M.M.M. ¹H and ¹³C NMR Spectroscopy of mono-, di-, tri- and tetrasubstituted xanthenes. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 36, 4, p. 305–309. 1998

FERNANDES, P.; MARTENS, E. Antibiotics in late clinical development, **Biochemical Pharmacology**, vol. 133, p. 152-163. 2017

FRANCO, J.L.; BRAGA H.C.; STRINGARI J.; MISSAU F.C.; POSSER T.; MENDES B.G.; LEAL R.B.; SANTOS A.R.; DAFRE A.L.; PIZZOLATTI M.G.; FARINA M. Mercurial-induced hydrogen peroxid generation in mouse brain mitochondria: protective effects of quercetin. **Chem. Res. Toxicol.**, vol. 20, p. 1919-1926, 2007

FU, J.; ZHANG, D.; CHEN, R. Three new xanthenes from the roots of *Polygala japonica* Houtt. **Journal of Asian natural products research**, vol. 8, n. 1-2, p. 41-6. 2006

FU, J.; ZUO, L.; YANG, J.; CHEN, R.; ZHANG, D.; Oligosaccharide polyester and triterpenoid saponins from the roots of *Polygala japonica*, **Phytochemistry**, vol. 69, n. 7, p. 1617-1624, 2008

FU, H.; HU, Z.; DI, X.; ZHANG, Q.; ZHOU, R.; DU, H. Tenuigenin exhibits protective effects against LPS-induced acute kidney injury via inhibiting TLR4/NF- κ B signaling pathway, **European Journal of Pharmacology**, vol. 791, p. 229-234, 2016

FUJITA, T.; DA-YOU, L.; UEDA, S.; TAKEDA, Y. Xanthenes from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, vol. 31, n. 11, p. 3997-4000, 1992

GHOSAL, S.; KUMARSWAMY, C.; CHAUHAN, R.B.S.; SRIVASTAVA, R.S. Lactonic lignans of *Polygala chinensis*. **Phytochemistry**, vol. 12, n. 10, p. 2550-1, 1973

GHOSAL, S.; CHAUHAN, R.P.S.; SRIVASTAVA, R.S. Chemical constituents of the Polygalaceae. II. Structure of chinensin, a new lignan lactone from *Polygala chinensis*. **Phytochemistry**, vol. 13, n. 10, p. 2281-4, 1974a

GHOSAL, S.; CHAUHAN, R.P.S.; SRIVASTAVA, R.S. Chemical constituents of the Polygalaceae. III. Two new aryl naphthalide lignans from *Polygala chinensis*. **Phytochemistry**, vol. 13, n. 9, p. 1933-6. 1974b

GHOSAL, S.; CHAUHAN, R.P.S.; SRIVASTAVA, R.S. Extractives of the Polygala. IV. Lignan and flavonol glycosides of *Polygala chinensis*. **Plant Biochemical Journal**, vol. 1, n. 2, p. 64-72, 1974c

GHOSAL, S.; BANERJEE, S.; CHAUHAN, R.B.P.S.; SRIVASTAVA, R.S. Extractives of *Polygala*. Part 5. New trioxxygenated xanthenes of *P. arillata*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry** (1972-1999) vol. 7, p. 740-3, 1977

GIACOMAZZI, J.; BAETHGEN, L.; CARNEIRO, L.C.; MILLINGTON, M.A.; DENNING, D.W.; COLOMBO, A.L.; PASQUALOTTO, A.C. and in association with the LIFE program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses**, vol. 59, n. 3, p. 145-50. 2016.

GIOVANNETTI, R. The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins, In: UDDIN J. **Macro To Nano Spectroscopy**, InTech, 2012. cap. 6, p. 88-108

GONÇALVES, N.S.; CRISTIANO, R.; PIZZOLATI, M.G.; MIRANDA F.S. Vibrational analysis and NMR properties based on ab initio and DFT calculations of two naturally occurring xanthones: 1,5-dihydroxy-2,3-dimethoxyxanthone and 1-hydroxy-5-methoxy-2,3-methylenedioxyxanthone. **Journal of Molecular Structure**, vol. 733, p. 53–61. 2005

GRONDONA, E.M. Las especies argentinas del género *Polygala*; in: **Darviniana**, v.8, n.2-3, p.279-405. 1948

GROSS, J. **Pigments in vegetables, chlorophylls and carotenoids**. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 3. 1991

GUO C.; SHEN J.; MENG Z.; YANG X.; LI F., Neuroprotective effects of polygalacic acid on scopolamine-induced memory deficits in mice, **Phytomedicine**, vol. 23, n. 2, p. 149-155, 2016

HA, W.Y.; WU, P.K.; KOK, T.W.; LEUNG, K.W.; MAK, N.K.; YUE, P.Y.K.; NGAI, S.M.; TSAI, S.N.; WONG, R.N.S. Involvement of protein kinase C and E2F-5 in euxanthone-induced neurite differentiation of neuroblastoma. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, vol. 38, p. 1393-1401, 2006

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, 2000

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

HAMIDI, M.R.; JOVANOVA, B.; PANOVSKA, T.K. Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (*Artemia salina* L.) model. **Macedonian pharmaceutical bulletin**, vol. 60, n. 1, p. 9 – 18. 2014

HARBONE, J.B. & BAXTER, H. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. Taylor & GFrancis, London, 1995

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

HEINRICH, M.; TEOH, H.L. Galanthamine from snowdrop-the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 92, p. 147–162. 2004

HOFFMANN, J.J.; WIEDHOPF, R.M.; COLE, J.R. Cytotoxic and tumor inhibitory agent from *Polygala macradenia* Gray (Polygalaceae): 4'-demethyldeoxypodophyllotoxin. **Journal of pharmaceutical sciences**, vol. 66, n. 4, p. 586-7, 1977

HOFFMANNSEGG, J.C. von & Link, J.H.F. **Flora de Portugal**, p:1-62, 1809

HONG, D.; BAI, Y.-P.; SHI, R.-Z.; TAN, G.-S.; HU, C.-P.; ZHANG, G.-G. Inhibitory effect of reinoside C on vascular smooth muscle cells proliferation induced by angiotensin II via inhibiting NADPH oxidase-ROS-ERK1/2-NF-κB-AP-1 pathway. **Pharmazie**, vol. 69, n. 9, p. 698-703, 2014

HU, Y.; LIAO, H.B.; LIU, P.; GUO, D.H.; RAHMAN, K. A bioactive compound from *Polygala tenuifolia* regulates efficiency of chronic stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Pharmazie**, vol. 64, p. 605–608, 2009

HU, Y.; LIAO, H.B.; DAI, H.G.; LIU, P.; WANG, Y.Y.; RAHMAN, K. Antidepressant-like effects of 3,6-disinapoyl sucrose on hippocampal neuronal plasticity and neurotrophic signal pathway in chronically mild stressed rats. **Neurochem. Int.**, vol. 56, p. 461-466, 2010

HUANG, J.N.; WANG, C.Y.; WANG, X.L.; WU, B.Z.; GU, X.Y.; LIU, W.X.; GONG, L.W.; XIAO, P.; LI, CH. Tenuigenin treatment improves behavioral Y-maze learning by enhancing synaptic plasticity in mice. **Behav. Brain Res.**, vol. 246, p. 111-115, 2013

HUANG, Y.; ZHOU, L.; WANG, J.; LI, Q.; GENG, Y.; LIU, H.; HUA, Y. Two New Flavonol Glycosides from *Polygala sibirica* L. var megalopha Fr. **Molecules**, vol. 20, n. 12, p. 21494-21500, 2015

IKEYA, Y.; SUGAMA, K.; OKADA, M.; MITSUHASHI, H. Two xanthones from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, vol. 30, n. 6, p. 2061-5, 1991a

IKEYA, Y.; SUGAMA, K.; OKADA, M.; MITSUHASHI, H. Four new phenolic glycosides from *Polygala tenuifolia*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 39, n. 10, p. 2600-5, 1991b

IKEYA, Y.; TAKEDA, S.; TUNAKAWA, M.; KARAKIDA, H.; TODA, K.; YAMAGUCHI, T.; ABURADA, M. Cognitive improving and cerebral protective effects of acylated oligosaccharides in *Polygala tenuifolia*. **Biol. Pharm. Bull.** v.27 n.7, p. 1081-1085, 2004

ITO, H.; TANIGUCHO, H.; KITA, T.; MATSUKI, Y.; TACHIKAWA, E.; FUJITA, T. Xanthones and a cinnamic acid derivatives from *Polygala tenuifolia*. **Phytochemistry**, vol. 16, n. 10, p. 1614-16, 1977

JAHANI, S.; SAEIDI, S.; JAVADIAN, F.; AKBARIZADEH, Z.; SOBHANIZADE, A. Investigating the Antibacterial Effects of Plant Extracts on *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **International Journal of Infection**, Vol. 3, n. 2, e34081. 2016

JERZ, G.; ARREY, T.N.; WRAY, V.; DU, Q.; WINTERHALTER, P. Structural characterization of 13²-hydroxy-(13²-*S*)-phaeophytin-a from leaves and stems of *Amaranthus tricolor* isolated by high-speed countercurrent chromatography. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, vol. 8, p. 413-418. 2007

JIA, H.; JIANG, Y.; RUAN, Y.; ZHANG, Y.; MA, X.; ZHANG, J.; BEYREUTHER, K.; TU, P.; ZHANG, D.; Tenuigenin treatment

decreases secretion of the Alzheimer's disease amyloid β -protein in cultured cells. **Neurosci. Lett.**, vol. 367, n. 1, p. 123-128, 2004

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

JIANG, Y.; ZHANG W.; TU P.; XU X. Xanthone Glycosides from *Polygala tenuifolia* and Their Conformational Analyses. **J. Nat. Prod.**, v. 68, n. 6, p. 875-879, 2005a

JIANG, Y.; TU, P. Four New Phenones from the Cortexes of *Polygala tenuifolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Volume 53, n. 9, p. 1164-1166, 2005b

JOHANN, S., MENDES B.G.; MISSAU F.C.; RESENDEI M.A.; PIZZOLATTI M.G. Antifungal activity of five species of *Polygala*. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 42, n. 3, p. 1065-1075, 2011

JUNG, K.Y.; DO, J.C.; SON, K.H. Kaempferol 3-O-[6"-O-(3-hydroxy-3-methylglutaroyl)-glucoside] from leaves of *Polygala japonica* **Phytochemistry**, vol. 34, n. 4, p. 1196-7, 1993

JUNIOR, C.V.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Quím. Nova**, vol. 27, n. 4, p. 655-660. 2004

JUNPING, K.; MINDA, S.; GUOFEI, D.; YUWEN, L.; DANNI, Z. Antiinflammatory activity of *Polygala japonica* extract. **Fitoterapia**, vol. 77, n. 6, p. 411-5, 2006

KAKO, M.; MIURA T.; USAMI M.; NISHIYAMA Y.; ICHIMARU M.; MORIYASU M.; KATO A. Effect of senegin-II on blood glucose in normal and NIDDM mice. **Biol. Pharm. Bull.**, v.18, n.8, p.1159-1161, 1995

KAKO, M.; MIURA T.; NISHIYAMA Y.; ICHIMARU M.; MORIYASU M.; KATO A. Hypoglycemic effect of the rhizomes of *Polygala senega* in normal and diabetic mice and its main component, the triterpenoid glycoside senegin-II. **Planta Med.**, v.62, n.5, p. 440-443, 1996

KAKO, M.; MIURA T.; NISHIYAMA Y.; ICHIMARU M.; MORIYASU M.; KATO A. Hypoglycemic activity of some triterpenoid glycosides. **J. Nat. Prod.**, vol. 60, n. 6, p.604-605, 1997

KATSELIS, G.S.; ESTRADA A.; GORECKI D.K.; BARL B. Adjuvant activities of saponins from the root of *Polygala senega* L. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, vol. 85, n. 11, p.1184-1194, 2007

KAWASHIMA, K.; MIYAKO D.; ISHINO Y.; MAKINO T.; SAITO K.; KANO Y. Anti-stress effects of 3,4,5-trimethoxycinnamic acid, an active constituent of roots of *Polygala tenuifolia* (Onji). **Biol. Pharm. Bull.** vol. 27, n. 8, p. 1317-1379, 2004

KHAW, K.Y.; CHOI, S.B.; TAN, S.C.; WAHAB, H.A.; CHAN, K.L.; MURUGAIYAH, V. Prenylated xanthenes from mangosteen as promising cholinesterase inhibitors and their molecular docking studies. **Phytomedicine.** Vol. 21, n. 11, p. 1303-9. 2014

KIM, H.M.; LEE E.H.; NA H.J.; LEE S.B.; SHIN T.Y.; LYU Y.S.; KIM N.S.; NOMURA S. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on the tumor necrosis factor-alpha secretion from mouse astrocytes. **J. Ethnopharmacol.**, vol. 61, n.3, p. 201-208, 1998

KIM, S.H.; JANG, S.; LEE, K.Y.; SUNG, S.H.; KIM, Y.C. Chemical constituents isolated from *Polygala japonica* leaves and their inhibitory effect on nitric oxide production in vitro. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, vol. 24, n. 1, p. 230-3, 2009

KIM, K.S.; YANG, H.J.; CHOI, EK.; PARK, Y.J.; CHO, D.K.; AHN, K.S.; LEE, J.H.; LEE, S.G.; UM, J.Y.; JUNG, H.J.; JUNG, S.K.; JANG, H.J. The multi-target antibiotic efficacy of *Angelica dahurica* Bentham et Hooker extract exposed to the *Escherichia coli* O157:H7. **BioChip Journal**, vol. 5, n. 4, p. 333. 2011

KIM, KS.; LEE, D.S.; BAE, G.S.; PARK, S.J.; KANG, D.G.; LEE, H.S.; OH, H.; KIM, Y.C. 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.**, vol. 721, n. (1-3), p. 267-76, 2013

KLEIN, L.C.J.; GANDOLFI, R.B.; SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; CECHINEL FILHO, V., DE ANDRADE, S.F. Antilcerogenic activity of extract, fractions, and some compounds obtained from *Polygala cyparissias* St. Hillaire & Moquin (Polygalaceae). **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, vol. 381, n. 2, p. 121-6, 2010

KLEIN-JUNIOR, L.C.; MEIRA, N.A.; BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL-FILHO, V.; QUINTAO, N.L.M. Antihyperalgesic activity of the methanol extract and some constituents obtained from *Polygala cyparissias* (Polygalaceae). **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, vol. 111, n. 3, p. 141-53, 2012

KLEIN-JUNIOR, L.C.; SANTIN, J.R.; LEMOS, M.; SILVEIRA, A.C. DE O.; ROCHA, J.A.R.; BEBER, A.P.; WAGNER, T.M.; BRESOLIN, T.M.B.; BELLA-CRUZ, A.; CECHINEL-FILHO, V.; FALONI DE ANDRADE, S. Role of gastric mucus secretion, oxinitrenergic system and sulfhydryl groups on the gastroprotection elicited by *Polygala cyparissias* (Polygalaceae) in mice; **The Journal of pharmacy and pharmacology**, vol. 65, n. 5, p. 767-76, 2013

KOBAYASHI, M., AKUTSU, S., FUJINUMA D.; FURUKAWA, H.; KOMATSU, H.; HOTOTA, Y.; KATO, Y.; KUROIWA, Y.; WATANABE, T.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; ONO, H.; OHKUBO, S.; MIYASHITA, H. Physicochemical Properties of Chlorophylls in Oxygenic Photosynthesis - Succession of Co-Factors from Anoxygenic to Oxygenic Photosynthesis, In: DUBINSKY Z. **Photosynthesis**, InTech, 2013. cap. 3, p. 48-90

KOBAYASHI, W.; MIYASE, T.; SUZUKI, S.; NOGUCHI, H.; CHEN, X.M. Oligosaccharide esters from the roots of *Polygala arillata*. **J Nat Prod**. Vol. 63, n. 8, p. 1066-9. 2000

KOO, H.N.; JEONG H.J.; KIM K.R.; KIM J.C.; KIM K.S.; KANG B.K.; KIM H.M.; KIM J.J. Inhibitory effect of interleukin-1-a-induced apoptosis by *Polygala tenuifolia* in Hep G2 cells. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, vol. 22, n. 3, p. 531-544, 2000.

LAPA, F.D.R.; FREITAS C.S.; BAGGIO C.H.; MISSAU F.C.; PIZZOLATTI M.G.; SANTOS A.R.; MARQUES M.C. Gastroprotective

activity of the hydroalcoholic extract obtained from *Polygala paniculata* L. in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, vol. 59, n. 10, p. 1413-1419, 2007

LAPA, F. D. R.; GADOTTI V.M.; MISSAU, F.C.; PIZZOLATTI, M.G.; MARQUES, M.C.; DAFRÉ, A.L.; FARINA, M.; RODRIGUES, A.L.; SANTOS, A.R. Antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract and the flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. in mice. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, vol. 104, n. 4, p. 306-315, 2009.

LAPA, F.D.R.; SOARES K.C.; RATTMANN Y.D.; CRESTANI S.; MISSAU F.C.; PIZZOLATTI M.G.; MARQUES M.C.; RIECK L.; SANTOS A.R. Vasorelaxant and hypotensive effects of the extract and the isolated flavonoid rutin obtained from *Polygala paniculata* L. **J Pharm Pharmacol**, vol. 63, n. 6, p. 875-81, 2011

LEE, J.Y.; KIM, K.Y.; SHIN K.Y.; WON, B.Y.; JUNG, H.Y.; SUH, Y.H. Effects of BT-11 on memory in healthy humans. **Neurosci. Lett.**, vol. 454, p. 111–114, 2009

LEE, C.I.; HAN, J.Y.; HONG, J.T.; OH, K.W. 3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA), one of the constituents of *Polygalae Radix* enhances pentobarbital-induced sleeping behaviors via GABAergic systems in mice. **Arch Pharm Res.**, vol. 36, p. 1244–1251, 2013

LEE, M.Y.; SHIN I.S.; KYOUNG, H.; SEO, C.S.; SON J.K.; SHIN, H.K. α -spinasterol from *Melandrium irinum* attenuates benign prostatic hyperplasia in a rat model. **Molecular medicine reports**, vol. 9, p. 2362-2366. 2014

LEEM Y.; OH S. 3,4,5-Trimethoxycinnamin acid ameliorates restraint stress-induced anxiety and depression, **Neuroscience Letters**, vol. 585, p. 54-59, 2015

LI, W.; CHAN, C.; LEUNG, H.; YEUNG, H.; XIAO, P. Xanthones and flavonoids of *Polygala caudata*. **Pharmacy and Pharmacology Communications**, vol. 4, n. 8, p. 415-417, 1998

LI, W.; CHAN, C.; LEUNG, H.; YEUNG, H.; XIAO, P., Xanthones from *Polygala caudata*. **Phytochemistry**, vol. 51, n. 7, p. 953-958, 1999

LI, T.; ZHANG, W.; YANG, G.; LIU, W.; LIU, R.; ZHANG, C.; CHEN, H. New flavonol glycosides and new xanthone from *Polygala japonica*. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol. 8, n. 5, p. 401-409, 2006a

LI, T.; ZHANG, W.; YANG, G.; LIU, W.; CHEN, H.; SHEN, Y. Saponins from *Polygala japonica* and Their Effects on a Forced Swimming Test in Mice. **Journal of Natural Products**, vol. 69, n. 4, p. 591-594. 2006b

LI J., JIANG Y., TU, P.F. New acylated triterpene saponins from *Polygala tenuifolia* willd. **J Asian Nat Prod Res**. Vol. 8, n. 6, p. 499-503. 2006

LI, H.; WANG, Q.J.; ZHU, D.N.; YANG, Y. Reinoside C, a triterpene saponin of *Polygala aureocauda* Dunn, exerts hypolipidemic effect on hyperlipidemic mice. **Phytother Res** vol. 22, p. 159–164. 2008a

LI, C.; YANG, J.; YU, S.; CHEN, N.; XUE, W.; HU, J.; ZHANG, D., Triterpenoid saponins with neuroprotective effects from the roots of *Polygala tenuifolia*. **Planta Medica**, vol. 74, n. 2, p. 133-141. 2008b

LIANG, Z.; SHI F.; WANG Y.; LU L.; ZHANG Z.; WANG X.; WANG X. Neuroprotective effects of tenuigenin in a SH-SY5Y cell model with 6-OHDA-induced injury. **Neurosci. Lett.**, vol. 497, p.104-109, 2011

LIN, L.L.; HUANG, F.; CHEN, S.B.; YANG, D.J.; CHEN, S.L.; YANG, J.S.; XIAO, P.G. Xanthenes from the roots of *Polygala caudata* and their antioxidation and vasodilatation activities in vitro. **Planta Med.** Vol. 71, n. 4, p. 372-5, 2005

LING, Y.; LI Z.; CHEN M.; SUN Z.; FAN M.; HUANG C. 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.**, vol. 85, p. 1-13, 2013

LIU, P.; HU Y.; GUO, D.H.; WANG, D.X.; TU, H.H.; MA, L.; XIE, T.T.; KONG, L.Y. Potential antidepressant properties of Radix Polygalae (Yuan Zhi). **Phytomedicine**, vol.17, p.794-799, 2010

LIU, Y; LI, Z.; HU, H.; XU, S.; CHANG, Q.; LIAO, Y.; PAN, R.; LIU, X. Tenuifolin, a secondary saponin from hydrolysates of polygalasaponins, counteracts the neurotoxicity induced by A β 25–35 peptides in vitro and in vivo, **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, vol. 128, p. 14-22, 2015

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.; 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.

LV, J.; JIA H.; JIANG Y.; RUAN Y.; LIU Z.; YUE W.; BEYREUTHER K.; TU P.; ZHANG D. Tenuifolin, an extract derived from tenuigenin, inhibits amyloid- β secretion in vitro. **Acta Physiol.**, vol.196, p. 419-425, 2009

LV, H.; ZHU, C.; LIAO, Y.; GAO, Y.; LU, G.; ZHONG, W.; ZHENG, Y.; CHEN, W.; CI, X.; Tenuigenin ameliorates acute lung injury by inhibiting NF- κ B and MAPK signalling pathways, **Respiratory Physiology & Neurobiology**, vol. 216, p. 43-51, 2015

MA, W.; WEI X.; LING T.; XIE H.; ZHOU W. New phenolics from *Polygala fallax*. **J. Nat. Prod.**, vol. 66, n. 3, p. 441-443, 2003

MAK, N.K.; LI W.K.; ZHANG M.; WONG R.N.; TAI L.S.; YUNG K.K.; LEUNG H.W. Effects of euxanthone on neuronal differentiation. **Life Sci.**, vol. 66, n.4, p. 347-354, 1999

MAGINA, M. D. A.; Dalmarco EM; Dalmarco JB; Colla G.; Pizzolatti MG.; Brighente IMC. Bioactive triterpenes and phenolics of leaves of *Eugenia brasiliensis*. **Quim. Nova**, vol. 35, n. 6, p. 1184-1188, 2012.

MAK, N.K.; LUNG, H.L.; WONG, R.N.; LEUNG, H.W.; TSANG, H.Y.; LEUNG, K.N. Expression of protein kinase C isoforms in

euxanthone-induced differentiation of neuroblastoma cells. **Planta Med.**, vol. 67, n. 5, p. 400-405, 2001

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

MARQUES, M.C.M. Polígalas do Brasil – V. Seção *Polygala* (Polygalaceae) **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, 29: 1-114. 1988

MARQUES, M.C.M. **Estudo taxônomico do gênero *Polygala* L. Subgêner *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae)**. Tese de Doutorado em ciências Biológicas (Botânica) – UFRJ. Rio de Janeiro. 139p. 2003

MARQUES, M.C.M. & PEIXOTO, A.L. Estudos taxonômicos de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). **Rodriguésia**, vol. 58, n. 1, p. 95-146. 2007

MARSTON, A.; HAMBURGER, M.; SORDAT-DISERENS, I.; MSONTHI, J.D.; HOSTETTMANN, K.; Xanthones from *Polygala nyikensis*. **Phytochemistry**, vol. 33, n. 4, p. 809-812. 1993

MARTÍNEZ, A.; HERNÁNDEZ-MARIN, E.; GALANO, A. Xanthones as antioxidants: A theoretical study on the thermodynamics and kinetics of the single electron transfer mechanism. **Food Funct.**, vol. 3, p. 442. 2012

MARTINS, R.P. BRAGA, H.C.; DA SILVA, A.P.; DALMARCO, J.B.; DE BEM, A.F.; DOS SANTOS, A.R.; DAFRE, A.L.; PIZZOLATTI, M.G.; LATINI, A.; ASCHNER, M.; FARINA, M. Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice. **Food Chem Toxicol**, v. 47, n. 3, p. 645-9, 2009

MATSUO, A.; ONO, K.; HAMASAKI, K.; NOZAKI, H. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*. **Phytochemistry**, Vol. 42, N. 2, p. 427-430. 1996

MEOTTI, F.C.; ARDENGHI, J.V.; PRETTO, J.B.; SOUZA, M.M.; D' AVILA MOURA, J; JUNIOR, A.C.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS A.R. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrone from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. **J. Pharm. Pharmacol.**, vol. 58, p. 1-6, 2006

MEYER, B.N.; FERRIGNI N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN J.L. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

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.

MISSAU, F.C.; JOHANN, S.; PEREIRA DE SA, N.; CISALPINO, P.S.; ROSA, C.A.; FERREIRA, B.A.; PIZZOLATTI, M.G. Phebalosin and its structural modifications are active against the pathogenic fungal causing paracoccidioidomycosis. **Medicinal Chemistry**, vol. 4, n. 8, p. 581-587, 2014

MIYASE, T.; IWATA, Y.; UENO A. Tenuifolioses A–F, oligosaccharide multi-esters from the roots of *Polygala tenuifolia* Willd. **Chem Pharm Bull**, vol. 39, p. 3082–3084, 1991

MIYASE T.; IWATA Y.; UENO A. Tenufolioses G–P, oligosaccharide multi-esters from the roots of *Polygala tenuifolia* Willd. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol. 40, p. 2741–2748, 1992

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

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

MORESCO, H.H.; QUEIROZ, G.S.; PIZZOLATTI, M.G.; BRIGHENTE, I.M.C. Chemical constituents and avaluation of the toxic

and antioxidant activities of *Averrhoa carambola* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 22, n. 2, p. 319-324. 2012

MORESCO, H.H.; PEREIRA, M.; BRETANHA, L.C.; MICKE, G.A.; PIZZOLATTI M.G.; BRIGHENTE I.M.C. Myricitrin as the main constituent of two species of *Myrcia*. **Journal Applied Pharmaceutical Science**, vol. 4, n. 2, p. 1-7. 2014

MOTSEI, M.L.; LINDSEY, K.L.; VON STADEN, J.; JÄGER, A.K. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.86, p. 235-241. 2003

NAGAI, T.; SUZUKI, Y. Onjisaponins, from the root of *Polygala tenuifolia* Willdenow, as effective adjuvants for nasal influenza and diphtheria–pertussis–tetanus vaccines. **Vaccine**, vol. 19, p. 4824–4834, 2001

NAIDU, M.; KUAN C.Y.; LO W.L.; RAZA M.; TOLKOVSKY A.; MAK N.K.; WONG R.N.; KEYNES R. Analysis of the action of euxanthone, a plant-derived compound that stimulates neurite outgrowth. **Neuroscience**, vol. 148, n. 4, p. 915-924, 2007

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

NASCIMENTO, M.V.P.S.; ARRUDA-SILVA, F.; LUZ, A.B.G.; VENZKE, D.; QUEIROZ, G.S.; MENDES, B.G.; FERNANDES-RIBEIRO, E.R.; FRODE, T.S.; PIZZOLATTI, M.G.; DALMARCO, E.M. 7-prenyloxi-6-methoxycoumarin from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett Regulates p38 MAPK and NF-kB Pathways Inhibiting the Inflammation Induced by Carrageenan in the Mouse Model of Pleurisy. **Inflammation & Allergy: Drug Targets**, vol. 14, n. 1, p. 37-46, 2015

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved Standard. Second edition, document M27- A2. **National Committee for Clinical Laboratory Standards: Wayne, Pa**, 2002.

NEGI, J.S.; BISHT, V. K.; SINGH P.; RAWAT M.S.M.; JOSHI G.P. Naturally Occurring Xanthenes: Chemistry and Biology. **Journal of Applied Chemistry**, vol. 2013, Article ID 621459, 9 pages. 2013

NUCCI-MARTINS, C.; NASCIMENTO, L.F.; VENZKE, D.; BRETHANHA, L.C.; SAKO, A.V.F.; OLIVEIRA, A.S; BRIGHENTE I.M.C.; MICKE, G.A.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.S. Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, vol. 23, n.5, p. 429-40, 2016

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates. Geneva. 2017.

PAIVA, J.A.R. Polygalarum Africanarum ET Madagascariensium prodromos atque gerontogaei generis *Heterosamara* Kuntze, a genere *Polygala* segregati et a nobis denuo recepti, synopsis monographica, **Fontqueria**, vol. 50, n. 1-4, p.1-347, 1998

PAUL, S.; MANDAL, S.K.; BHATTACHARYYA, S.S.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH A.R. In Vitro and In Vivo Studies Demonstrate Anticancer Property of Root Extract of *Polygala senega*, **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**, vol. 3, n. 3, p. 188-196, 2010

PAUL, S.; BHATTACHARYYA S.S.; SAMADDAR, A.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Anticancer potentials of root extract of *Polygala senega* against benzo [α] pyrene-induced lung cancer in mice. **Journal of Chinese Integrative**, vol. 9, n. 3, p. 320-327, 2011a

PAUL, S.; BHATTACHARYYA, S.S.; BOUJEDAINI, N.; KHUDA-BUKHSH, A.R. Anticancer Potentials of Root Extract of *Polygala senega* and Its PLGA Nanoparticles-Encapsulated Form. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, vol. 2011, Article ID 517204, 13 pages, 2011b

PARK, C.H.; CHOI, S.H.; KOO, J.W.; SEO, J.H.; KIM, H.S.; JEONG, S.J.; SUH, Y.H. Novel cognitive improving and neuroprotective

activities of *Polygala tenuifolia* Willdenow extract, BT-11. **J. Neurosci. Res.**, vol. 70, p. 484–492, 2002

PARK, J.H.; KIM J.S.; JANG D.S.; LEE S.M. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on cerebral ischemia and reperfusion. **Am. Journ. Chin. Med.**, vol. 34, n. 1, p. 115-123, 2006

PARK, H.J.; LEE, K.; HE, H.; LEE, M., KIM, J.W.; WHANG, W.W.; KWON, Y.K.; KWON, H. Effects of *Polygala tenuifolia* root extract on proliferation of neural stem cells in the hippocampal CA1 region. **Phytother Res**, vol. 22, p. 1324–1329, 2008

PETROVIC, S.; ZVEZDANOVIC, J.; MARKOVIC, D. Chlorophyll degradation in aqueous mediums induced by light and UV-B irradiation: An UHPLC-ESI-MS study. **Radiation Physics and Chemistry**, vol. 141, p. 8-16. 2017

PINHEIRO, T.R.; CECHINEL FILHO V.; SANTOS A.R.S.; CALIXTO J.B.; DELLE MONACHE F.; PIZZOLATTI M.G., YUNES R.A. Three xanthenes from *Polygala cyparissias*. **Phytochemistry**, vol. 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**, vol. 55, n. 7, p. 819-822, 2000

PIZZOLATTI, M.G.; KOGA, A.H.; GRISARD, E.C.; STEINDEL, M. Trypanocidal activity from Brazilian Atlantic Rain Forest plant species. **Phytomedicine**, vol. 10, n. 5, p. 422-426, 2003

PIZZOLATTI, M.G., CUNHA, A.J.R., PEREIRA, W.S., & MONACHE, F.D. A new styryl-2-pyrone derivative from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae). **Biochemical Systematics and Ecology** vol. 32, p. 603-606, 2004

PIZZOLATTI, M.G.; MENDES, B.G.; CUNHA JR. A.; SOLDI, C.; KOGA, A.H.; EGER, I.; GRISARD, E.C.; & STEINDEL, M. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrone derivatives from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** vol. 18, n. 2, p. 177-182, 2008

PIZZOLATTI, M.G.; MENDES, B.G.; SOLDI, C.; MISSAU, F.C.; BORTOLUZZI, J.H.; CARASEK, E. Analysis of volatile compounds released from flowers and roots of *Polygala cyparissias* and *Polygala paniculata* by headspace/SPME. **The Journal of Essential Oil Research**, vol. 21, n.3, p. 255-8, 2009

PORSOLT, RD.; BERTIN, A.; JALFRE, M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. **Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie**. Vol. 229, n.2, p. 327-36. 1977

RAO, M.S.; RAO, P.S.; KUMAR, J.K.; RAMAN, N.V.; KHALILULLAH, MD. A rare flavonol glycoside from *Polygala chinensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 31, v. 6, p. 635-636, 2003

RAO, M.S.; RAMAN, N.V. A novel flavonoid from *Polygala chinensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol. 32, n. 4, p. 447-448, 2004

RHEE, J.K.; WOO, K.J.; BAEK, B.K.; AHN, B.J. Screening of the wormicidal Chinese raw drugs on *Clonorchis sinensis*. **Am. Journ. Chin. Med.**, vol. 9, n. 4, p. 277-284, 1981

RIBAS, C.M.; MEOTTI, F.C.; NASCIMENTO, F.P.; JACQUES, A.V.; DAFRE, A.L.; RODRIGUES, A.L.; FARINA, M.; SOLDI, C.; MENDES, B.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R.; Antinociceptive effect of the *Polygala sabulosa* hydroalcoholic extract in mice: evidence for the involvement of glutamatergic receptors and cytokine pathways. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, vol. 103, n. 1, p. 43-47, 2008

ROCA, M.; CHEN, K.; PÉREZ-GÁLVEZ, A. Chlorophylls, In: CARLE R.; SCHWEIGGERT R. **Handbook on Natural Pigments in Food and Beverages**, Woodhead Publishing, 2016. Cap. 6, p. 125-158

ROCHA, L.; MARSTOM, A.; KAPLAN, M.A.C.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN, K. An antifungal g-pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1381-1385, 1994

ROCHA, J.L.C. DA; PASTORE, J.F.B.; BRANDÃO, H.N.; AZEREDO, A.; DAVID, J.P., SANTOS, E.O. DOS; DAVID, J.M. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de polygalaceae, por CLAE-DAD. **Química Nova**, vol. 35, n. 11, p. 2263-2266, 2012

RODRIGUES, A.L.; ROCHA, J.B.T.; MELLO, C.F.; SOUZA, D.O. Effect of perinatal lead exposure on rat behaviour in open-field and two-way avoidance tasks. **Pharmacol Toxicol.** vol. 79, p. 150–156, 1996.

RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; LIBERTO, E.; CORDERO, C.; BICCHI, C. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, vol. 25, n. 5, p. 282-290. 2010

SAITOH, H., MIYASE T., UENO A. Senegoses A-E, Oligosaccharide Multi-Esters from *Polygala senega* var. *latifolia* Torr. et Gray. **Chem. Pharm. Bull**, vol. 41, n. 6, p. 1127-1131, 1993a

SAITOH, H., MIYASE T., UENO A. Senegoses F-I, Oligosaccharide Multi-Esters from the roots of *Polygala senega* var. *latifolia* Torr. et Gray. **Chem. Pharm. Bull**, vol 41, n. 12, p. 2125-8, 1993b

SAITOH, H., MIYASE T., UENO A., ATARASHI K., SAIKI Y. Senegoses J-O, Oligosaccharide Multi-Esters from the Roots of *Polygala senega* L. **Chem. Pharm. Bull**, vol. 42, n. 3, p.641-5, 1994

SAKUMA, S.; SHOJI, J. Studies on the Constituents of the Root of *Polygala tenuifolia* WILLDENOW. I. Isolation of Saponins and the Structures of Onjisaponins G and F, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 29, n. 9, p. 2431-2441, 1981

SHI, T.; LI, Y.; JIANG, Y.; TU, P. 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

SHI, Q.; CHEN, J.; ZHOU, Q.; LEI, H.; LUAN, L.; LIU, X.; WU, Y. Indirect identification of antioxidants in Polygalae Radix through their reaction with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl and subsequent HPLC–ESI-Q-TOF-MS/MS, **Talanta**, vol. 144, p. 830-835, 2015

SHIN, E.J.; OH, K.W.; KIM, K.W.; KWON, Y.S.; JHOO, J.H.; JHOO, W.K.; CHA, J.Y.; LIM, Y.K.; KIM, I.S.; KIM, H.C. Attenuation of cocaine-induced conditioned place preference by *Polygala tenuifolia* root extract. **Life Sci.**, vol. 75, n.23, p. 2751-2764, 2004

SHIN, K.Y.; WON, B.Y.; HEO, C.; KIM, H.J., JANG, D.P., PARK, C.H., KIM, S., KIM, H.S.; KIM, Y.B.; LEE, H.G.; LEE, S.H.; CHO, Z.H.; SUH, Y.H. BT-11 improves stress-induced memory impairments through increment of glucose utilization and total neural cell adhesion molecule levels in rat brains. **J. Neurosci. Res.**, vol. 82: p. 260–268, 2009a

SHIN, K.Y.; LEE, J.Y.; WON, B.Y.; JUNG, H.Y.; CHANG, K.A.; KOPPULA, S.; SUH, Y.H. BT-11 is effective for enhancing cognitive functions in the elderly humans. **Neurosci. Lett.**, vol. 465, p. 157–159, 2009b

SHIN, Y.; WON, B.Y.; HA, H.J.; YUN, Y.S.; LEE, H.G. Preclinical safety of the root extract of *Polygala tenuifolia* Willdenow in sprague-dawley rats and beagle dogs. **Evid. Based Compl. Alt.**, ID 570134, 15 páginas, 2014

SHIN, K.Y.; WON, B.Y.; HA, H.J.; YUN, Y.S.; LEE, H.G. Genotoxicity studies on the root extract of *Polygala tenuifolia* Willdenow, **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, vol. 71, n. 3, p. 365-370, 2015

SHOJI, J; KAWANISHI, S; TSUKITANI, Y. Studies on the constituents of senegae radix. I. Isolation and qualitative analysis of the glycosides. **Yakugaku Zasshi**. Vol. 91, n. 2, p. 198-202, 1971

SONG, Y.; ZENG, K., SHI, T.; JIANG, Y.; TU P. Sibiricasaponins A–E, five new triterpenoid saponins from the aerial parts of *Polygala sibirica* L., **Fitoterapia**, vol. 84, p. 295-301, 2013a

SONG, Y.; ZHOU, G.; ZHOU, S.; JIANG, Y.; TU, P. Polygalins D-G, four new flavonol glycosides from the aerial parts of *Polygala sibirica* L. (Polygalaceae). **Natural product research**, vol. 27, n. 13, p. 1220-7, 2013b

SOSA, V.; MOLINÉ, T.; SOMOZA, R.; PACIUCCI, R., KONDOH H., LLEONART M.E. Oxidative stress and cancer: an overview, **Ageing Res. Rev.** vol. 12, n. 1, p. 376–390, 2013

SUN X.L.; ITO H.; MASUOKA T.; KAMEI C.; HATANO T. Effect of *Polygala tenuifolia* root extract on scopolamine-induced impairment of rat spatial cognition in an eight-arm radial maze task. **Biol. Pharm. Bull.**, vol.30, p.1727-1731, 2007

SUN, F.; SUN, J., HAN, N., LI, C.; YUAN, Y.; ZHANG, D.; CHEN, N. Polygalasaponin F induces long-term potentiation in adult rat hippocampus via NMDA receptor activation. **Acta Pharmacologica Sinica**, vol. 33, n. 4, p. 431-437, 2012

TEH, S.S.; EE, G.C.L.; MAH, S.H.; AHMAD, Z. Structure–activity relationship study of secondary metabolites from *Mesua beccariana*, *Mesua ferrea* and *Mesua congestiflora* for anti-cholinesterase activity. **Medicinal Chemistry Research**, Vol. 25, n. 5, p. 819–823. 2016

TENG, R.; WU, Z.; HE, Y.; WANG, D.; YANG, C.. Revised structures of arillatanosides A-C from *Polygala arillata*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, vol. 40, n. 6, p. 424-429, 2002

URBAIN, A.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E.F.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. Xanthones from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors. **Planta Medica**, vol. 70, n. 10, p. 1011-4. 2004

VAN, Q.; NAYAK, B.N.; REIMER, M.; JONES, P.J.H.; FULCHER, R.G.; REMPEL, C.B. Anti-inflammatory effect of *Inonotus obliquus*, *Polygala senega* L., and *Viburnum trilobum* in a cell screening assay, **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 125, n. 3, p. 487-493, 2009

VENZKE, D.; CARVALHO, F.K.; RUANI, A.P.; OLIVEIRA, A.S.; BRIGHENTE, I.M.C.; MICKE, G.A.; BARISON, A.; PIZZOLATTI, M.G. PAMPA permeability, acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of pyranoisoflavones from *Polygala molluginifolia* (polygalaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 24, n. 12, p. 1991-1997, 2013

VENZKE, D. **Estudo quimiosistemático de espécies do gênero *Polygala* e avaliação das propriedades biológicas**. 2015. (Doutorado). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

VICTORIO, C.P.; CARRIÇO, J.B.; LAGE, C.L.S. *Polygala paniculata*: um recurso de salicilato de metila produzido por cultura de tecidos vegetais. **Rev. Ceres**, vol. 58, n. 3, p. 269-272. 2011

WANG, H.; GAO, J.; ZHU, D.; YU, B. Two new triterpenoid saponins isolated from *Polygala japonica*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 54, n. 12, p. 1739-1742. 2006

WANG, H., GAO, J., KOU, J., ZHU, D., YU, B., Anti-inflammatory activities of triterpenoid saponins from *Polygala japonica*, **Phytomedicine**, vol. 15, n. 5, p. 321-326. 2008

WEI, P.J.; YAO, L.H.; DAI, D.; HUANG, J.N.; LIU, W.X.; XIAO, P.; LI, C.H. Tenuigenin enhances hippocampal Schaffer collateral-CA1 synaptic transmission through modulating intracellular calcium. **Phytomedicine**, vol. 22, n. 9, p. 807-12, 2015

WU, J.F. et al. Antioxidants and a new dihydroisocoumarins from *Polygala hongkongensis* H. **Nat. Prod. Res.**, Part B, v. 21, n.7, p. 580-584, 2007

WU, J.F.; CHEN, S.B.; GAO, J.C.; SONG H.L.; WU, L.J.; CHEN, S.L.; T,U P.F. Xanthone glycosides from herbs of *Polygala hongkongensis* Hemsl and their antioxidant activities. **J Asian Nat Prod Res**. Vol. 10, n. 7-8, p. 673-8, 2008

WURDACK, J.J.; SMITH, L.B. **Flora Ilustrada Catarinense**. Polygalaceae. Itajaí: Tipografia e Livraria Blumenauense S.A., p.3-52, 1971

XIONG, H.P.; WU, Z.J.; CHEN, F.T.; CHEN, D.S. 3-Hydroxy-1,2-dimethoxyxanthone. **Acta Crystallographica**, Section E: Structure Reports Online, vol. 67, n. 7, p. 1667, 2011

XU, X.H.; ZHOU, J.F.; LI, T.Z.; ZHANG, Z.H.; SHAN, L.; XIANG, Z.H.; YU, Z.W.; ZHANG, W.D.; HE, C. Polygalasaponin G

promotes neurite outgrowth of cultured neuron on myelin. **Neurosci Lett.**, Vol. 460, n. 1, p. 41-6. 2009

XU, S.P.; YANG, Y.Y.; XUE, D.; LIU, J.X.; LIU, X.M. Cognitive enhancing effects of polygalasaponin hydrolysate in A β 25–35 induced amnesic mice. **Evid. Based Complement. Altern. Med.**, ID 839720, 12 paginas, 2011

XUE, Q.C.; LI, C.J.; ZUO, L.; YANG, J.Z.; ZHANG, D.M. Three new xanthenes from the roots of *Polygala japonica* Houtt. **J Asian Nat Prod Res.** Vol. 11, n. 5, p. 465-9, 2009a

XUE, W.; HU, J.; YUAN, Y.; SUN, J.; LI, B.; ZHANG, D.; LI, C.; CHEN, N. Polygalasaponin XXXII from *Polygala tenuifolia* root improves hippocampal-dependent learning and memory. **Acta Pharmacol Sin.** Vol. 30, n. 9, p. 1211–1219, 2009b

YABE, T.; TUCHIDA H.; KIYOHARA H.; TAKEDA T.; YAMADA H. Induction of NGF synthesis in astrocytes by onjisaponins of *Polygala tenuifolia*, constituents of kampo (Japanese herbal) medicine. **Phytomedicine**, vol. 10, n. 2-3, p.106-114. 2003

YAN, W.; SHAO, Q.; ZHANG, D.; YUAN, Y.; CHEN, N. The molecular mechanism of polygalasaponin F-mediated decreases in TNF α : emphasizing the role of the TLR4-PI3K/AKT-NF- κ B pathway. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol. 17, n. 6, p. 662-670. 2015

YANG, S.; LI, X.; CHENG, L.; WU, H.; ZHANG, C.; LI, K.; Tenuigenin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by down-regulating NF- κ B activation and suppresses bone loss in vivo, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 466, n. 4, p. 615-621, 2015

YANG, Z.; MAO, H.; LONG, C.; SUN C.; GUO, Z. Rapid determination of volatile composition from *Polygala furcata* Royle by MAE–HS–SPME followed by GC–MS. **European Food Research Technology**, vol. 230, n. 5, p. 779-784. 2010

YOSHIKAWA, M.; MURAKAMI, T.; UENO, T.; KADOYA, M.; MATSUDA, H.; YAMAHARA, J.; MURAKAMI N. Bioactive saponins and glycosides. I. *Senegae Radix* (1): E-senegasaponin and Z-

senegasaponin, their inhibitory effect on alcohol absorption and hypoglycemic activity. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 43, n. 12, p. 2115-2122, 1995

YOSHIKAWA, M. MURAKAMI T.; MATSUDA H.; UENO T.; KADOYA M.; YAMAHARA J.; MURAKAMI N. Bioactive saponins and glycosides. II. *Senegae Radix* (2): Chemical structures, hypoglycemic activity, and ethanol absorption-inhibitory effect of E-senegasaponin, Z-senegasaponin and Z-senegins II, III and IV. **Chem. Pharm. Bull.**, v.44, n.7, p. 1305-1313, 1996

YOUNG, I.S.; WOODSIDE, J.V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, vol. 54, p. 176–186. 2001

YUAN H.L.; LI B., XU J.; WANG Y.; HE Y.; ZHENG Y.; WANG X.M. Tenuigenin protects dopaminergic neurons from inflammation-mediated damage induced by the lipopolysaccharide. **CNS Neurosci. Ther.**, vol 18, p. 584–590, 2012

YUAN, W.; ZHANG, L.P.; CHENG, K.D.; ZHU, P.; WANG, Q.; HE, H.X.; ZHU, X. Microbial O-Demethylation, Hydroxylation, Sulfation, and Ribosylation of a Xanthone Derivative from *Halenia elliptica*. **Journal of Natural Products**, vol. 69, p. 811-814. 2006

ZHANG, D.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; UENO, A. 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.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H. Nine New Triterpene Saponins, Polygalasaponins XXXIII-XLI from the Roots of *Polygala fallax* HEMSL. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 44, n. 11 p. 2092-2099, 1996

ZHANG, D.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H. Oligosaccharide polyesters from roots of *Polygala fallax*. **Phytochemistry**, voll. 45, n. 4, p. 733-741, 1997

ZHANG, D.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; UENO, A. Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. I.

Structures of polygalasaponins I-X. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 43, n. 1, p. 115-20. 1995a

ZHANG, D.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; UENO, A. Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. II. Structures of polygalasaponins XI-XIX. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 43, n. 6, p. 966-70, 1995b

ZHANG, D.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; UENO, A. Studies on the constituents of *Polygala japonica* Houtt. III. Structures of polygalasaponins XX-XXVII. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 44n. 1, p. 173-9, 1996a

ZHANG, D.; MIYASE, T.; KUROYANAGI, M.; UMEHARA, K.; UENO, A. Five new triterpene saponins, polygalasaponins XXVI-XXXII from the root of *Polygala japonica* Houtt. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 44, n. 4, p. 810-15. 1996b

ZHANG, W.; LI, T.; LIU, R.; YANG, G.; CHEN, H. A new cerebroside from *Polygala japonica*. **Fitoterapia**, vol. 77, n. 4, p. 336-33, 2006

ZHANG, G.G.; BAI, Y.P.; CHEN, M.F.; SHI, R.Z.; JIANG, D.J.; FU, Q.M.; TAN, G.S.; LI, Y.J. Asymmetric dimethylarginine induces TNF- α production via ROS/NF- κ B dependent pathway in human monocytic cells and the inhibitory effect of reinoside C. **Vascul Pharmacol**, vol. 48, p. 115–121, 2008a

ZHANG, H.; HAN, T.; ZHANG, L.; YU, C.H.; WAN, D.G.; RAHMAN, K.; QIN, L.P.; PENG, C. Effects of tenuifolin extracted from radix polygalae on learning and memory: a behavioral and biochemical study on aged and amnesic mice. **Phytomedicine**, Vol. 15, n. 8, p. 587-94, 2008b

ZHANG, L.J.; YANG, X.D.; XU, L.Z.; ZOU, Z.M.; YANG, S.L. A new sterol glycoside from *Securidaca inappendiculata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, vol. 7:4, p. 649-653. 2005c

ZHOU, Y.; JIANG, Y.; SHI, H.; CHEN, Y.; TU, P. Five new xanthenone O-glycosides from the roots of *Polygala sibirica* L. **Helvetica Chimica Acta**, vol. 9, n. 5, p. 897-903, 2008

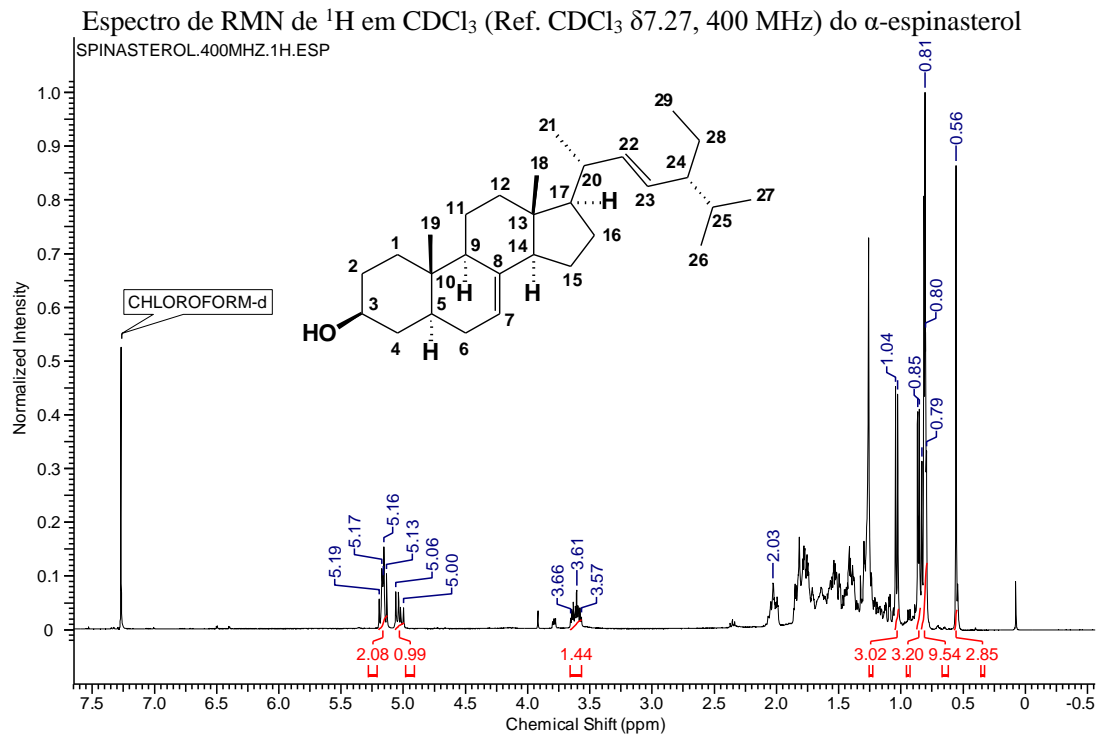
ZHOU, Y.; ZHANG, S.; GUO, Q.; CHAI, X.; JIANG, Y.; TU, P. Chemical investigation of the roots of *Polygala sibirica* L. **Chinese journal of natural medicine**, vol. 12, n. 3, p. 225-8, 2014

ZHOU, L.; WANG, J.; HUANG, Y.; YU, X.; LU, B.; HUA, Y. Two new glycosides isolated from *Polygala sibirica* L. var. megalopha Fr. **Phytochemistry Letters**, vol. 16, p. 174-7, 2016

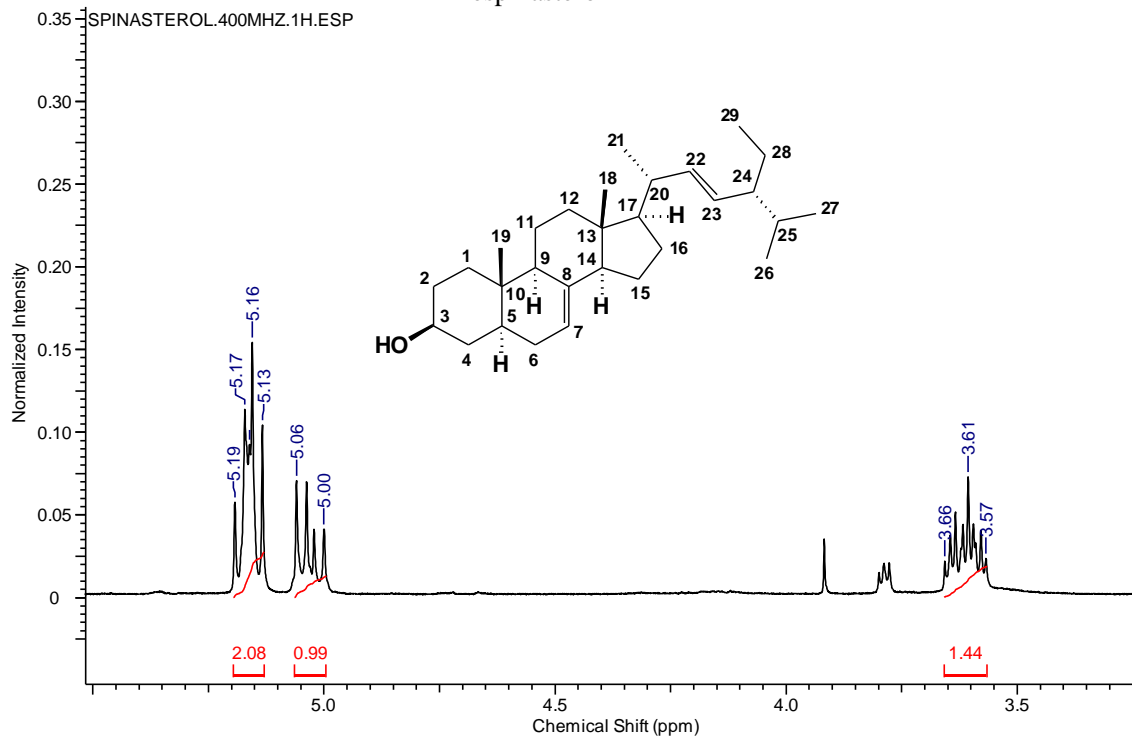
ZOMKOWSKI, A.D.E; ROSA, A.O.; LIN, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B.; RODRIGUES, A.L.S. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant like-effect in the mouse forced swimming test. **Brain Res.** vol. 1023, p. 253– 263. 2004

ANEXO

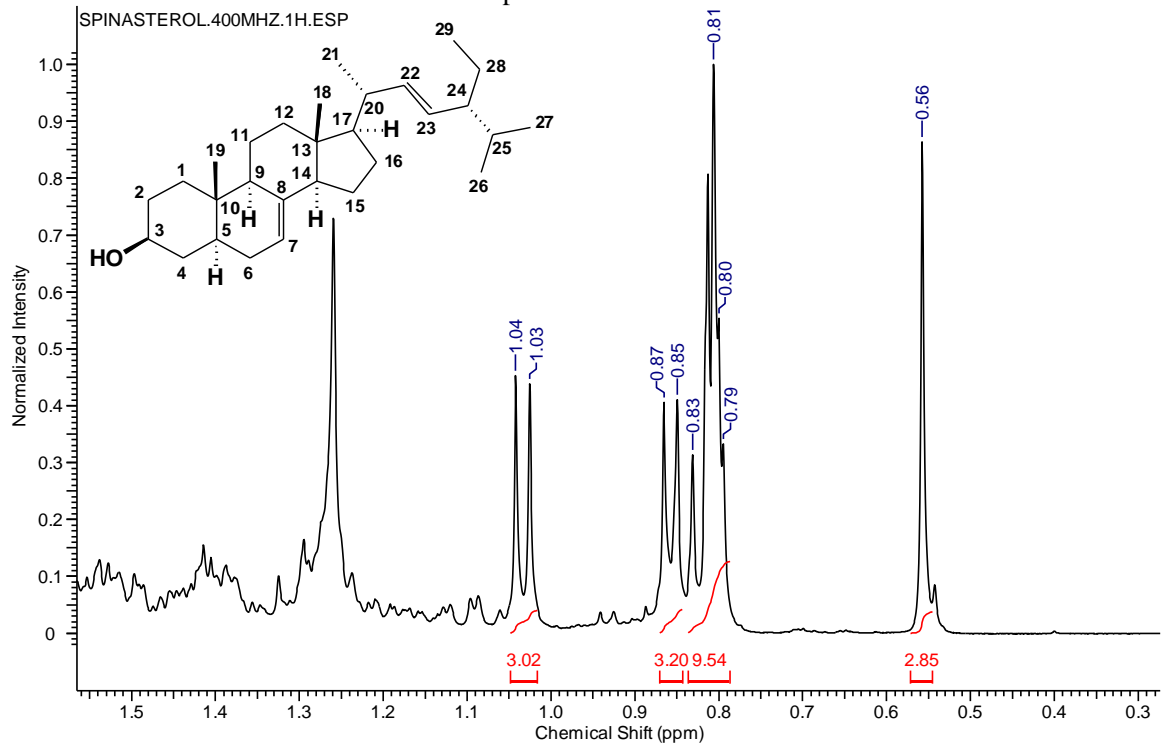
Anexo 1. Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do α -espinasterol (composto 1)

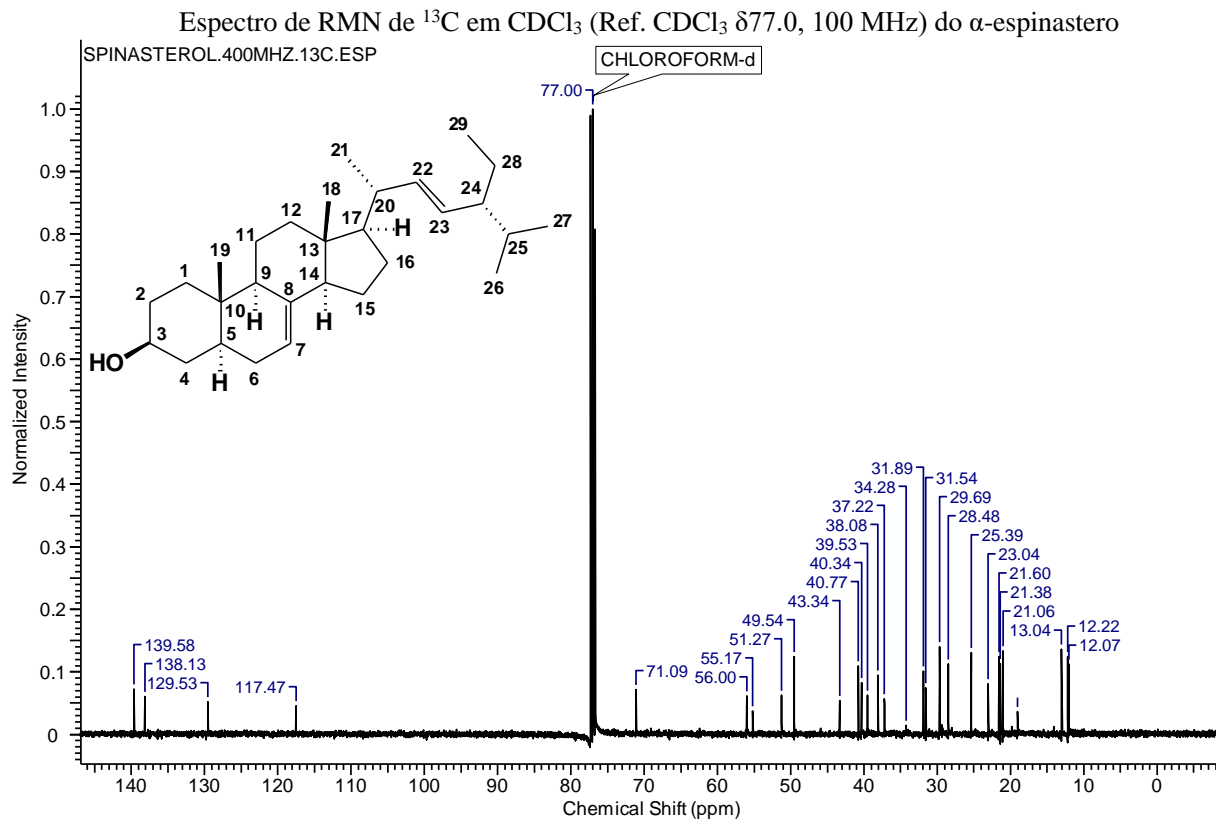


Ampliação do campo baixo espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 $\delta 7.27$, 400 MHz) do α -espinasterol

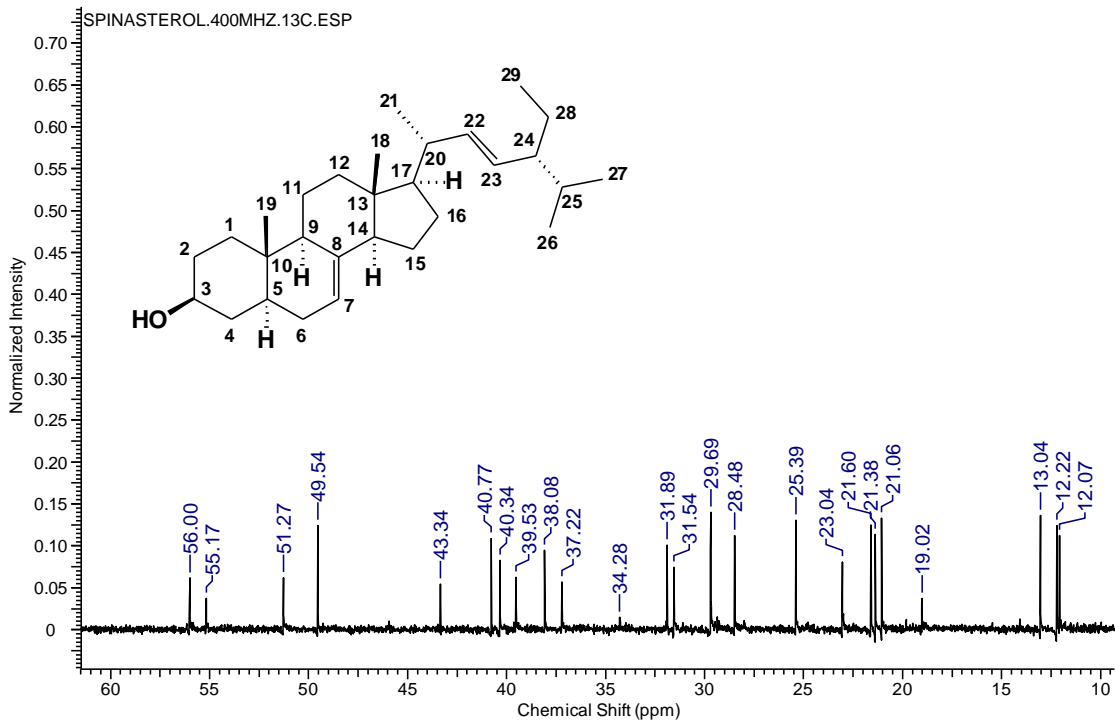


Ampliação do campo alto do espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 δ 7.27, 400 MHz) do α -
espinasterol

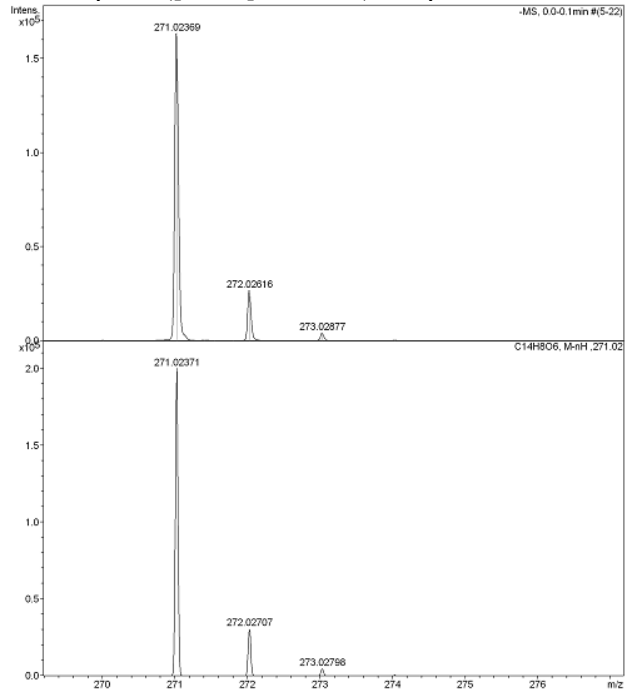




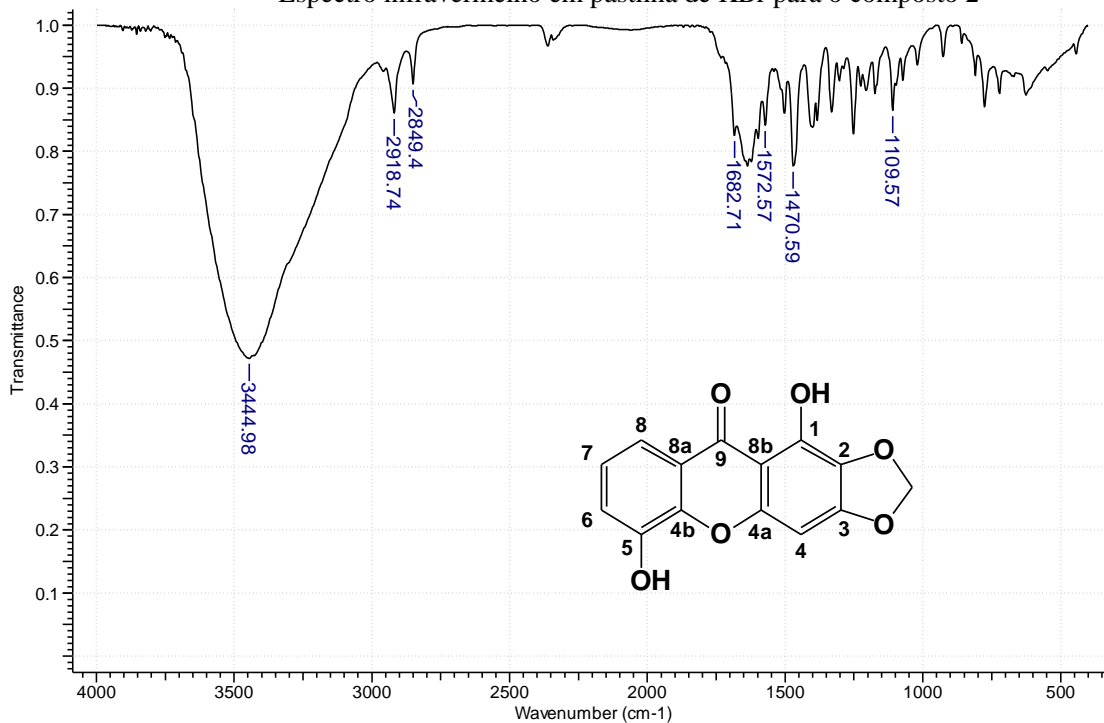
Ampliação na região do espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 $\delta 77.0$, 100 MHz) do α -espinasterol



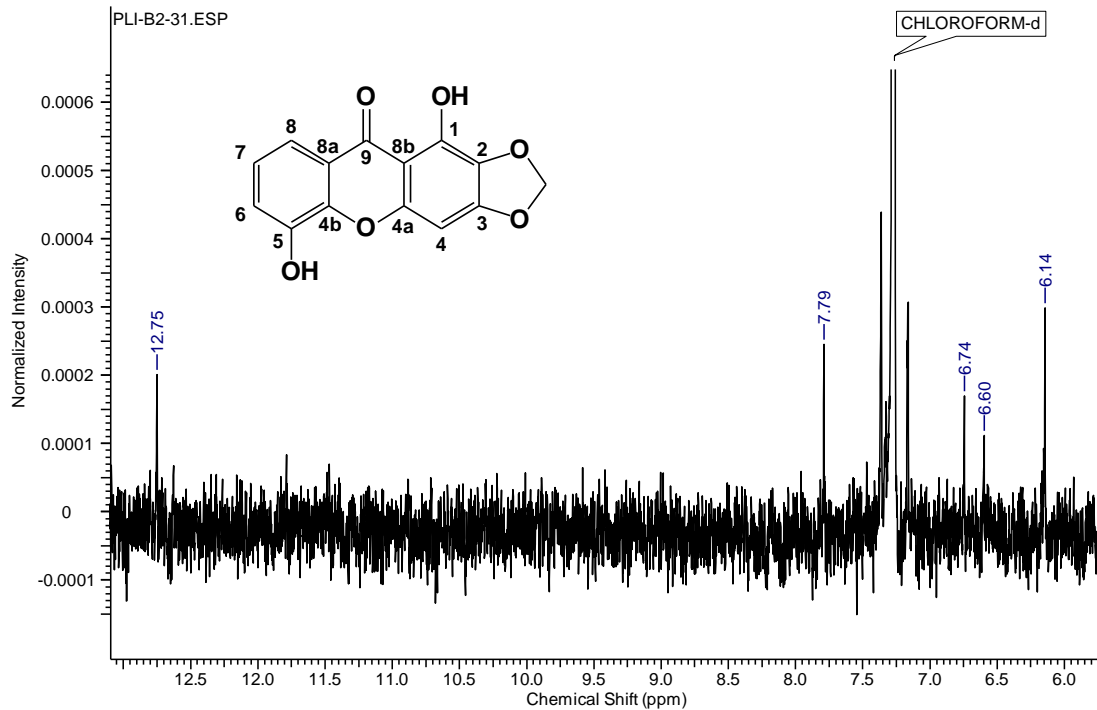
Anexo 2. HR-MS, IV e RMN uni e bidimensional do 1,5-dihidroxi-2,3-metilenodioxi-antona (composto 2)
HR-MS para o composto ($[M^+ - H] = 271,023$) comparado a massa teórica obtida



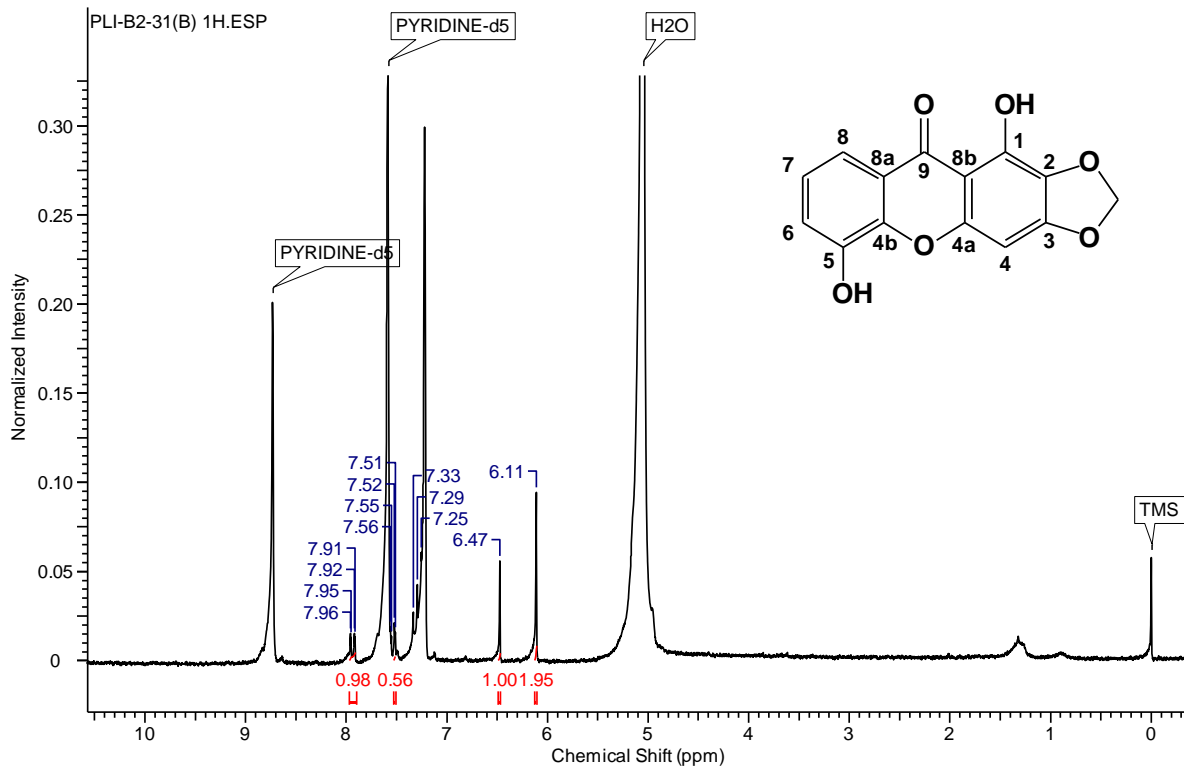
Espectro infravermelho em pastilha de KBr para o composto 2



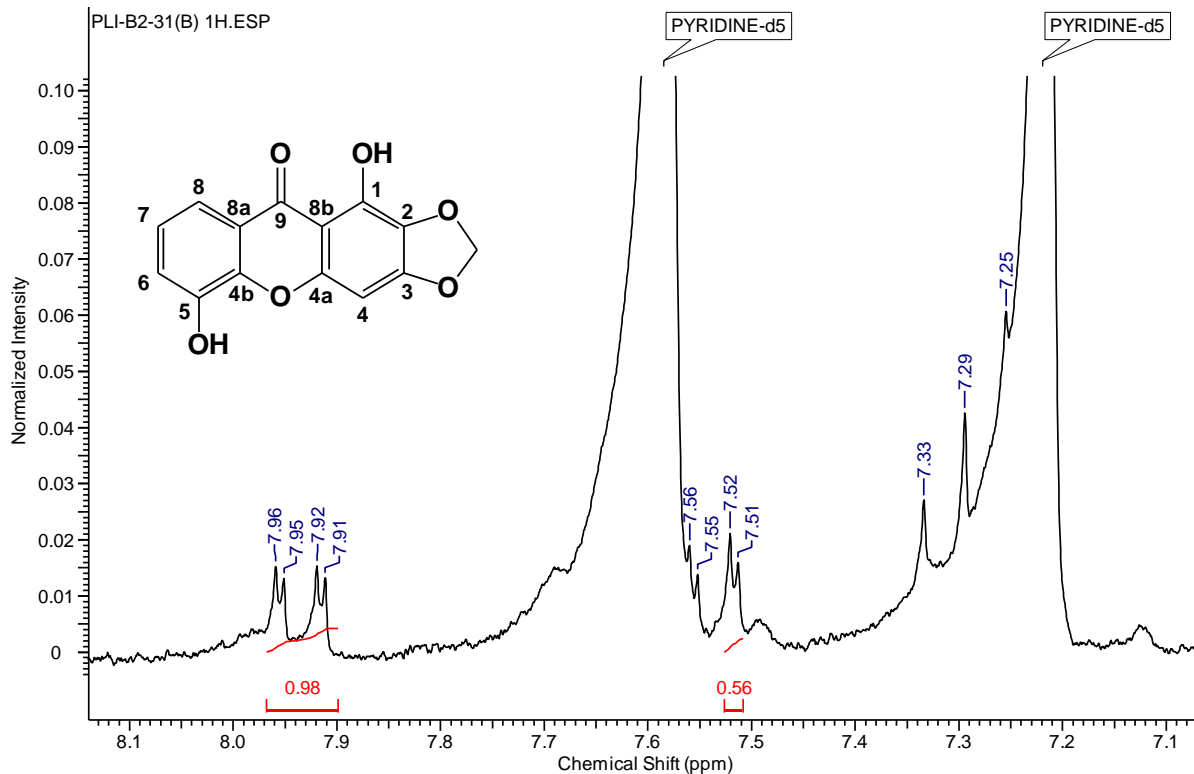
Ampliação do espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 δ 7.27, 200 MHz) do composto 2



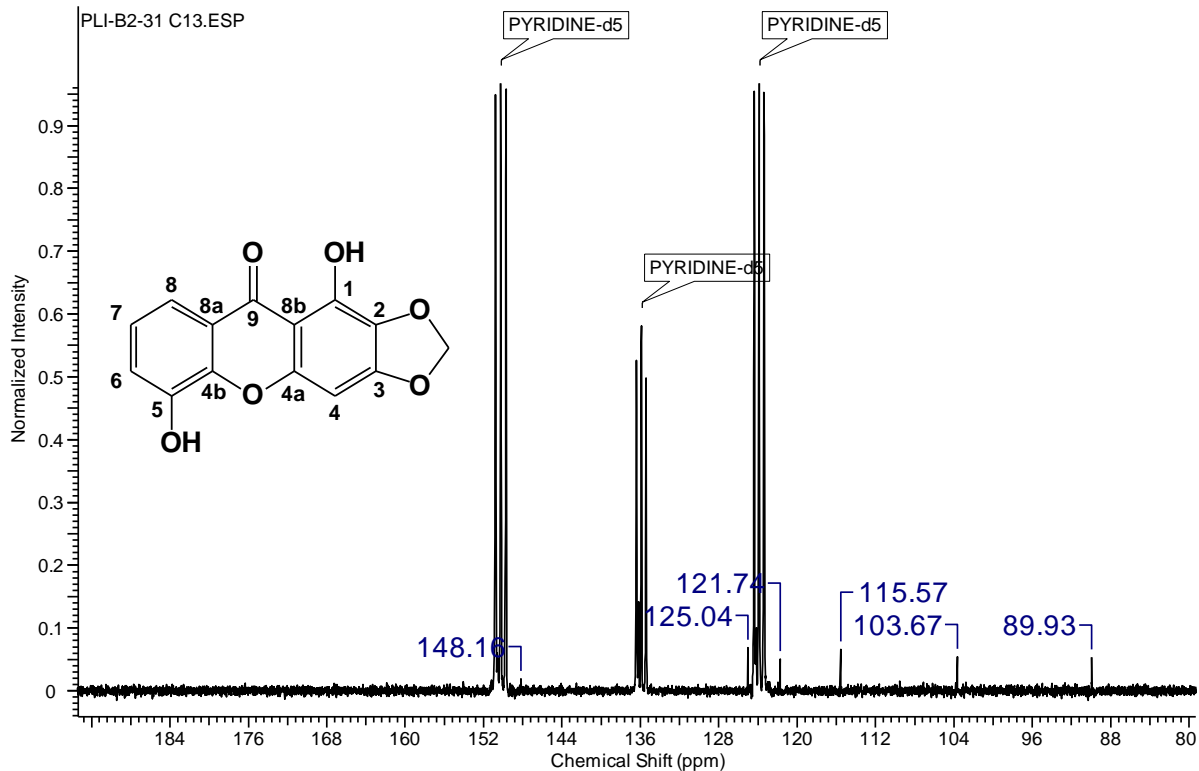
Espectro de RMN de ^1H em Pyr- D_5 (Ref. TMS $\delta 0.00$, 200 MHz) do composto 2



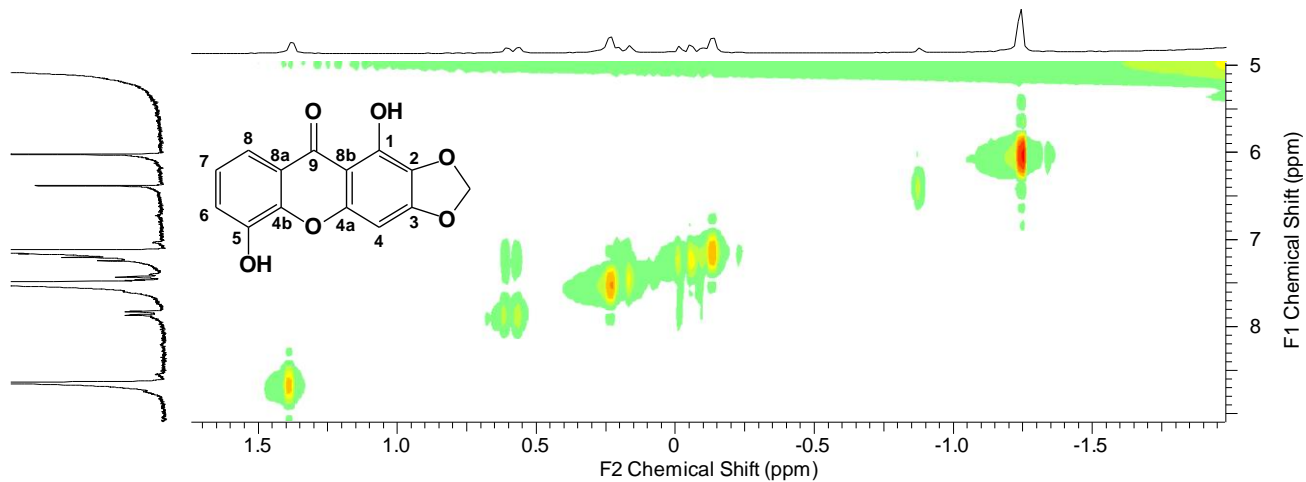
Ampliação do campo baixo do espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. TMS δ 0.00, 200 MHz) do composto 2



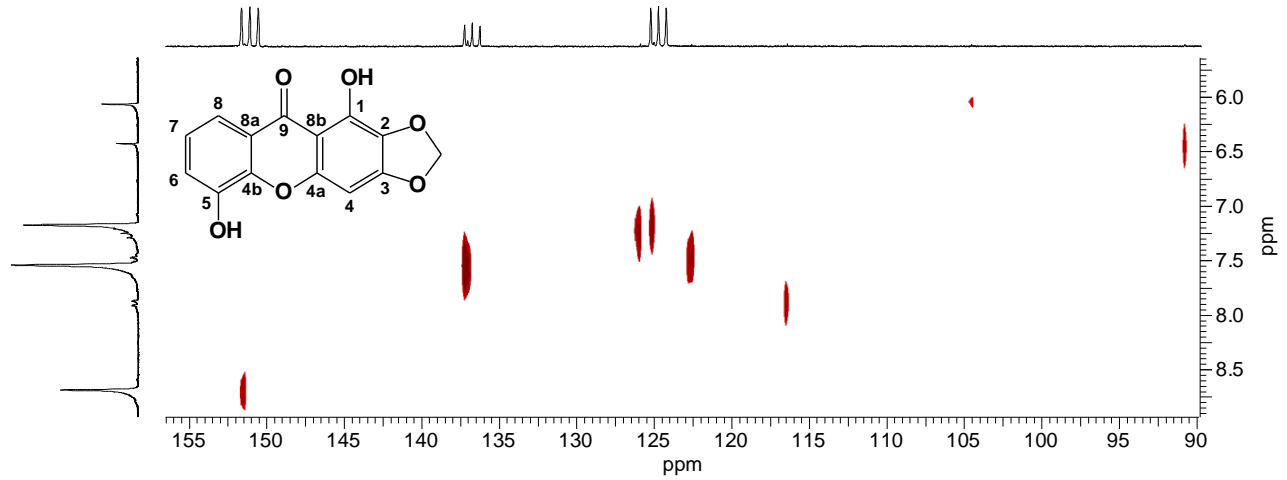
Espectro de RMN de ^{13}C em Pyr-D₅ (Ref. Pyr-D₅ δ 123.87, 50 MHz) do composto 2



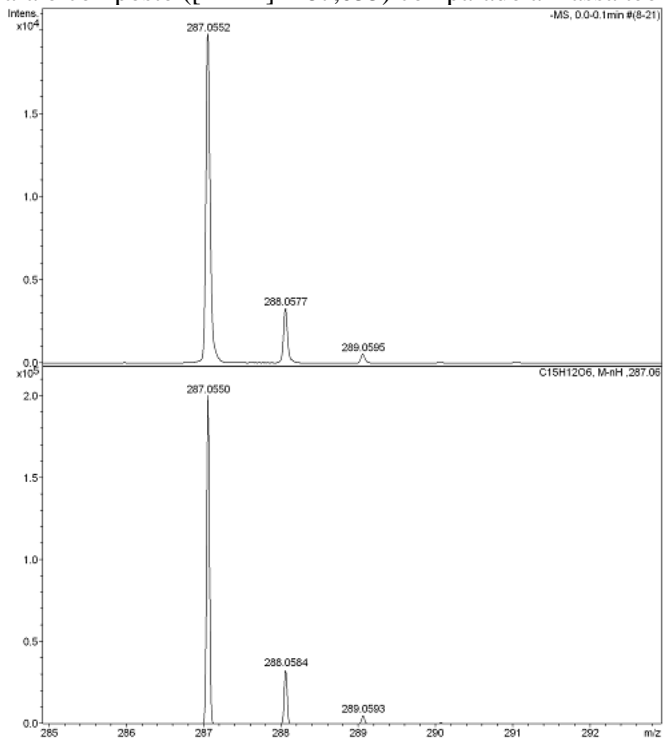
Região do campo baixo do espectro de COSY (Pyr-D₅, 200MHz) do composto 2



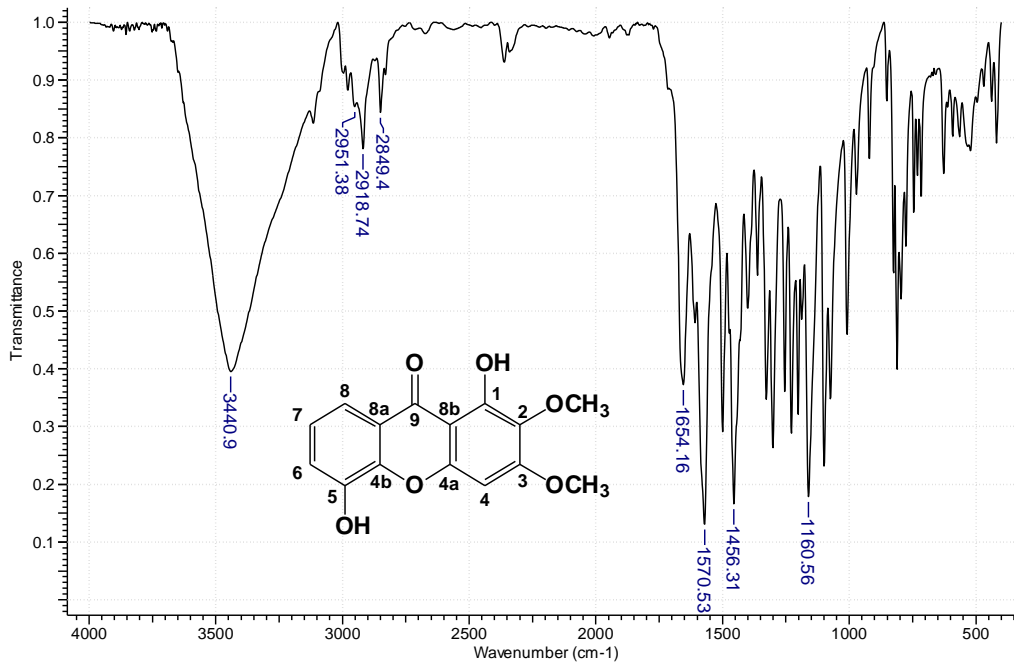
Espectro de HETCOR (Pyr-D₅, 200MHz) do composto 2

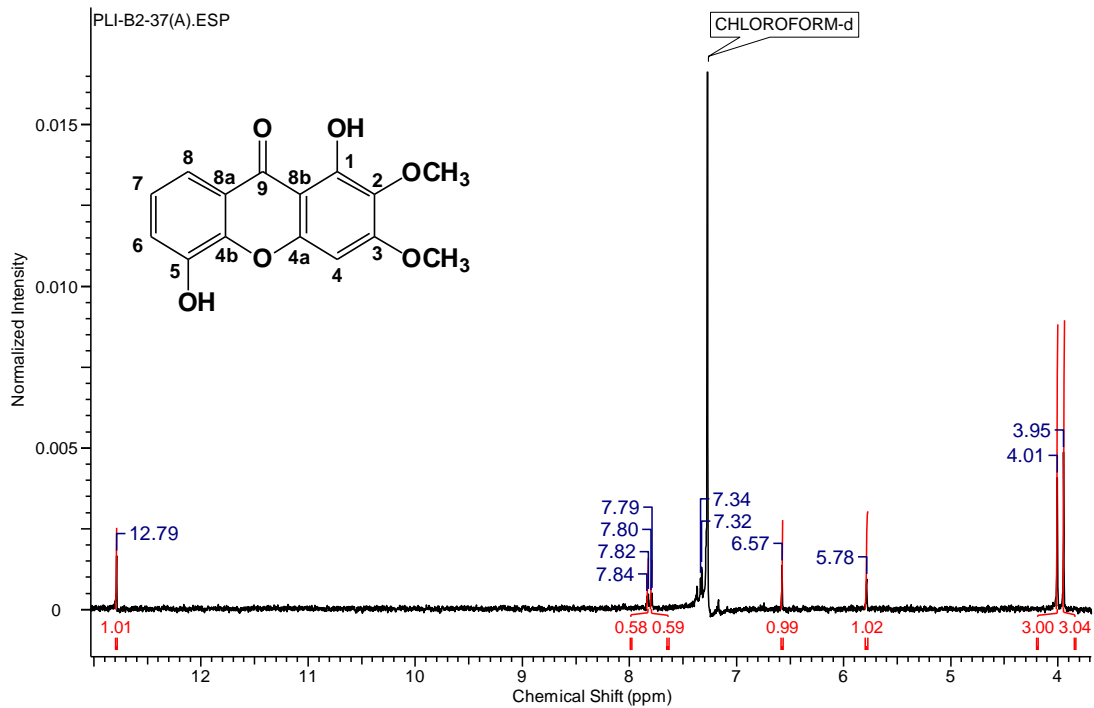


Anexo 3. HR-MS IV e RMN uni e bidimensional do 1,5-dihidroxi-2,3-dimetoxixantona (composto 3)
HR-MS para o composto ($[M^+ - H] = 187,055$) comparado a massa teórica obtida

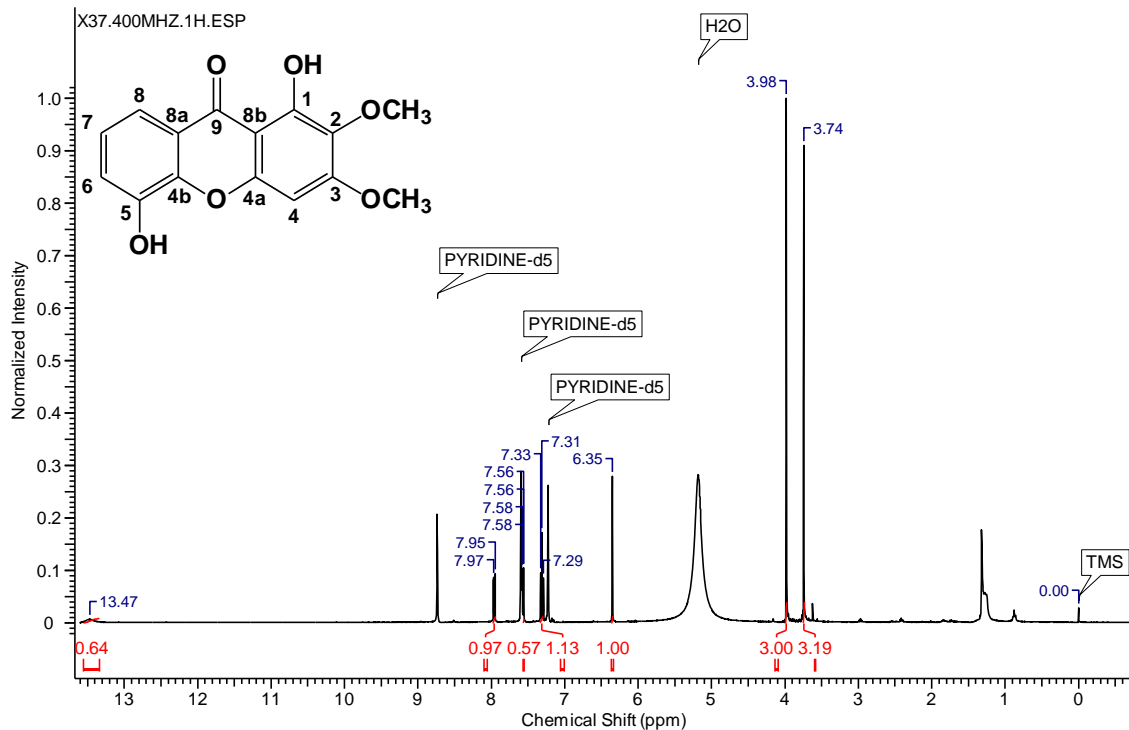


Espectro infravermelho em pastilha de KBr para o composto 3

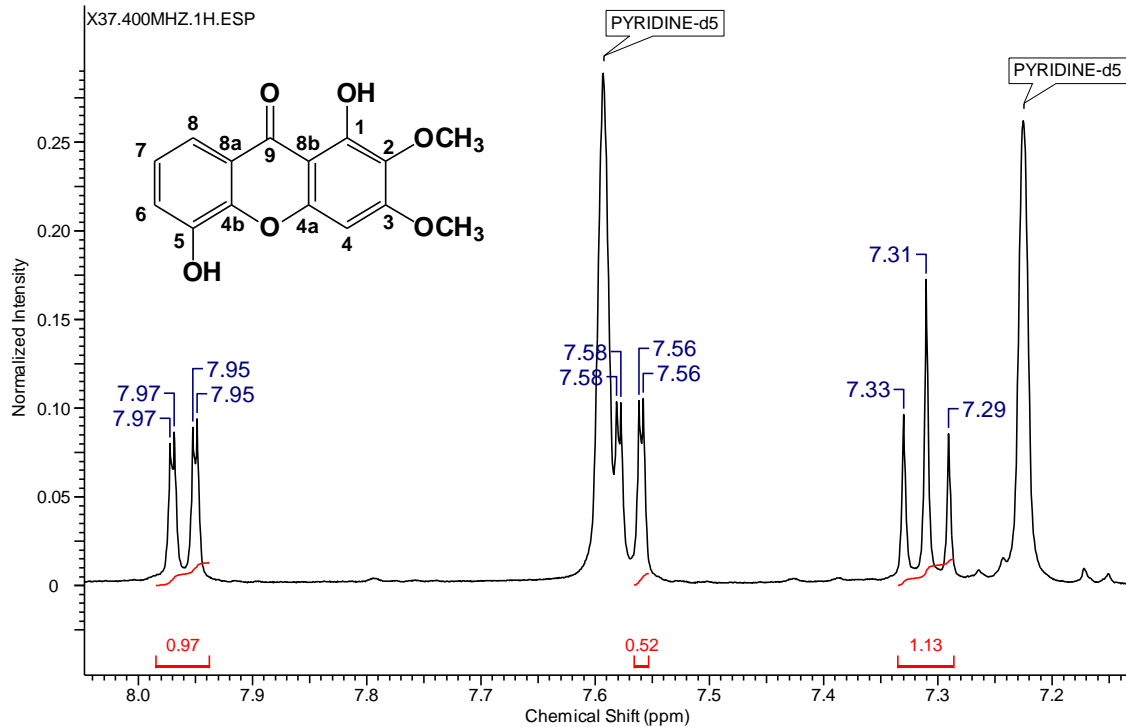


Espectro de RMN de ^1H (Ref. CDCl_3 $\delta 7.27$, 200 MHz) do composto 3

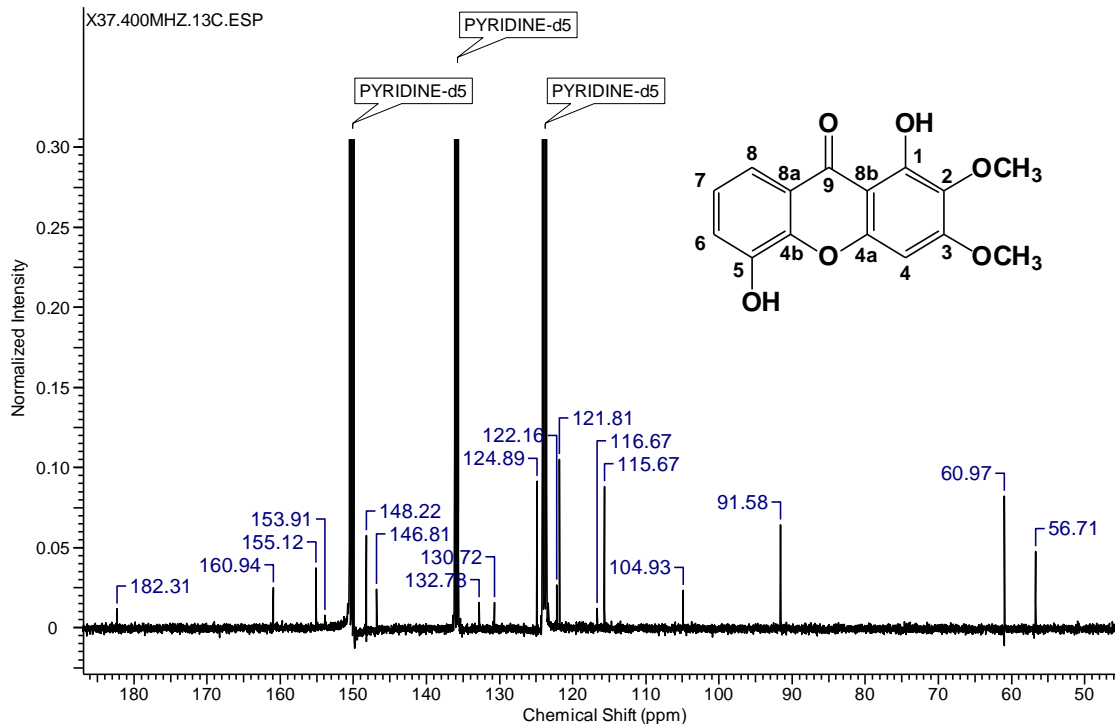
Espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. TMS δ 0.00, 400 MHz) do composto 3

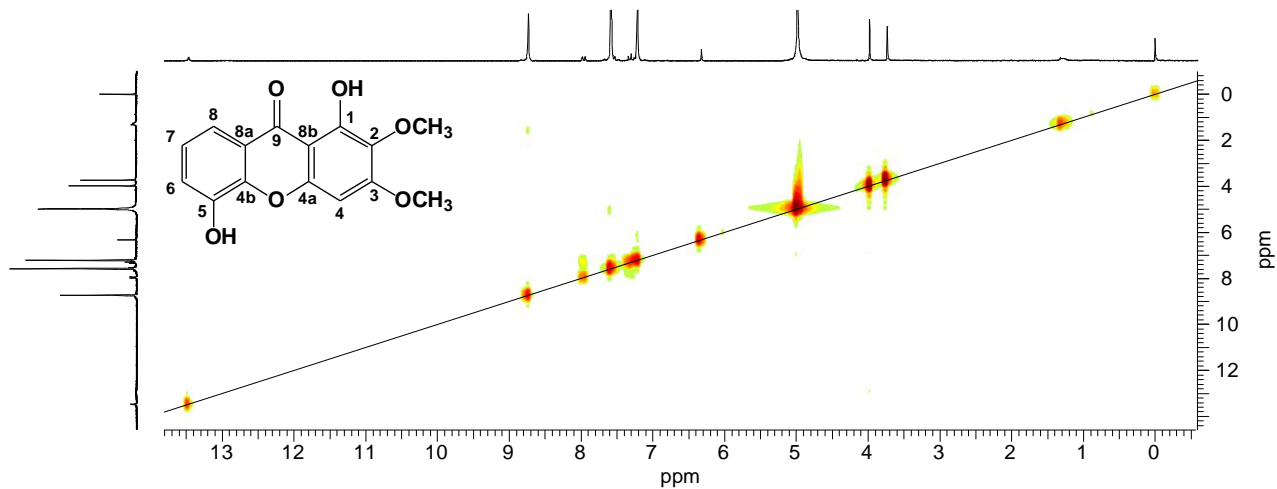


Ampliação do campo baixo do espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. TMS δ 0.00, 400 MHz) do composto 3

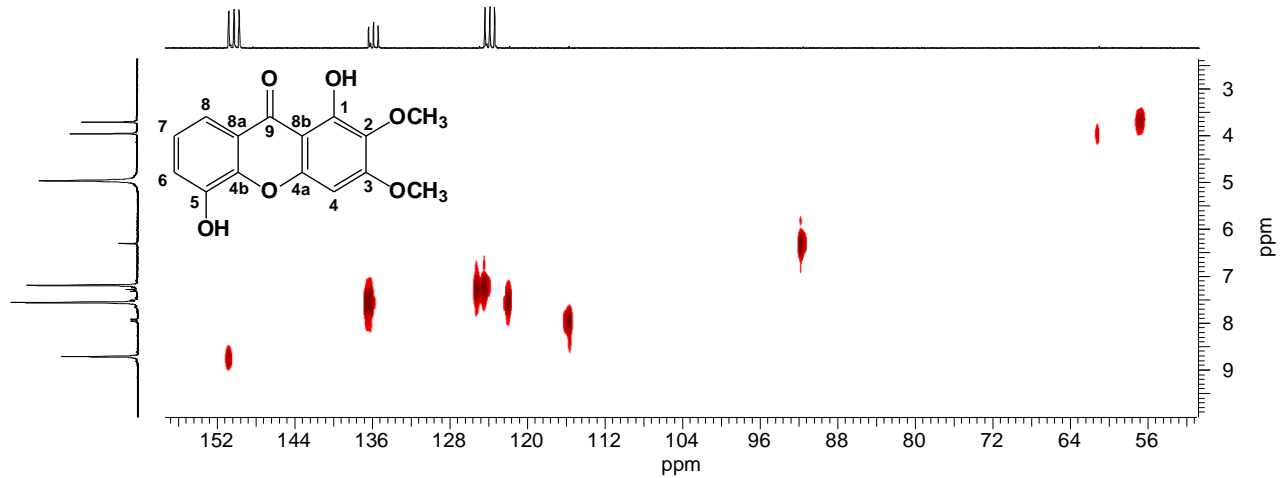


Espectro de RMN de ^{13}C em Pyr-D₅ (Ref. Pyr-D₅ δ 123.87, 100 MHz) do composto 3

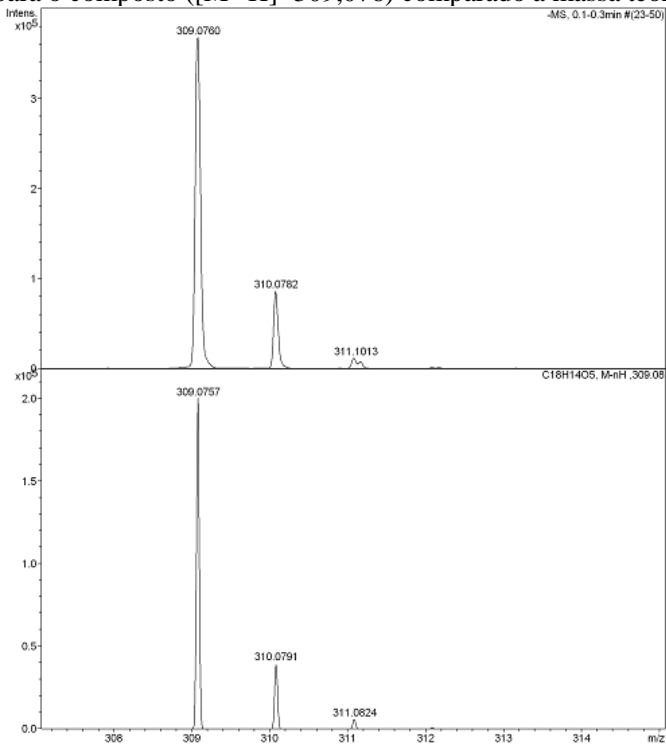


Espectro de COSY (Pyr-D₅, 200MHz) do composto 3

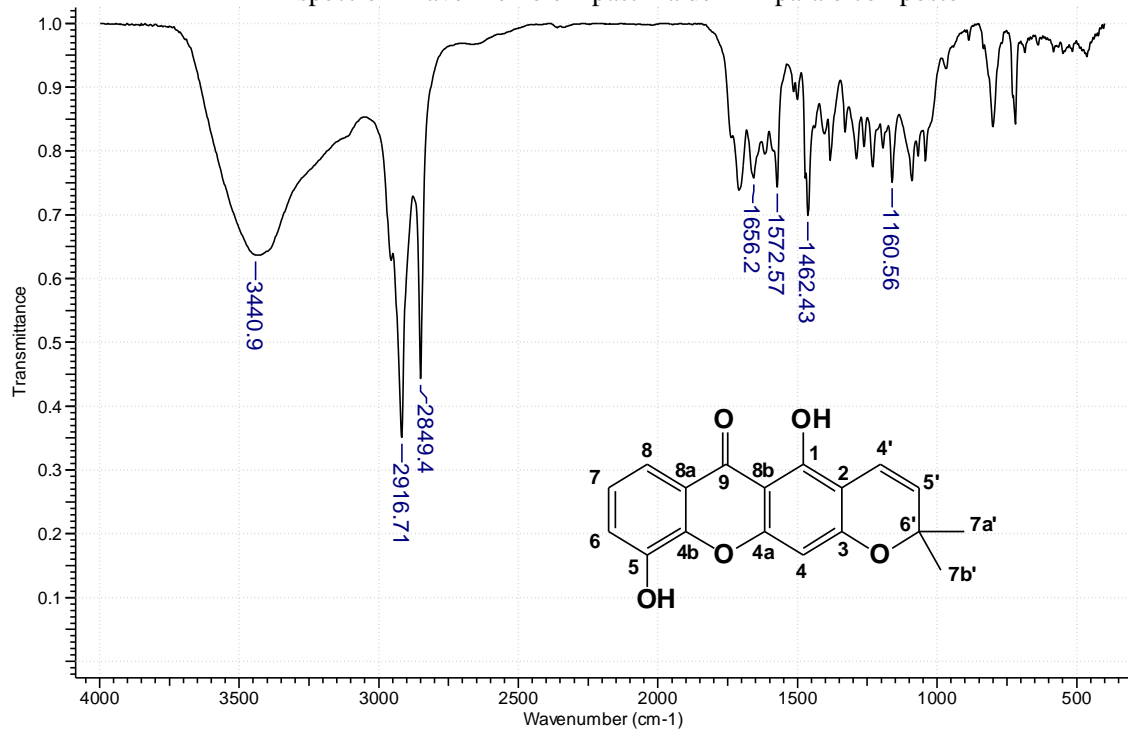
Espectro de HETCOR (Pyr-D₅, 200MHz) do composto

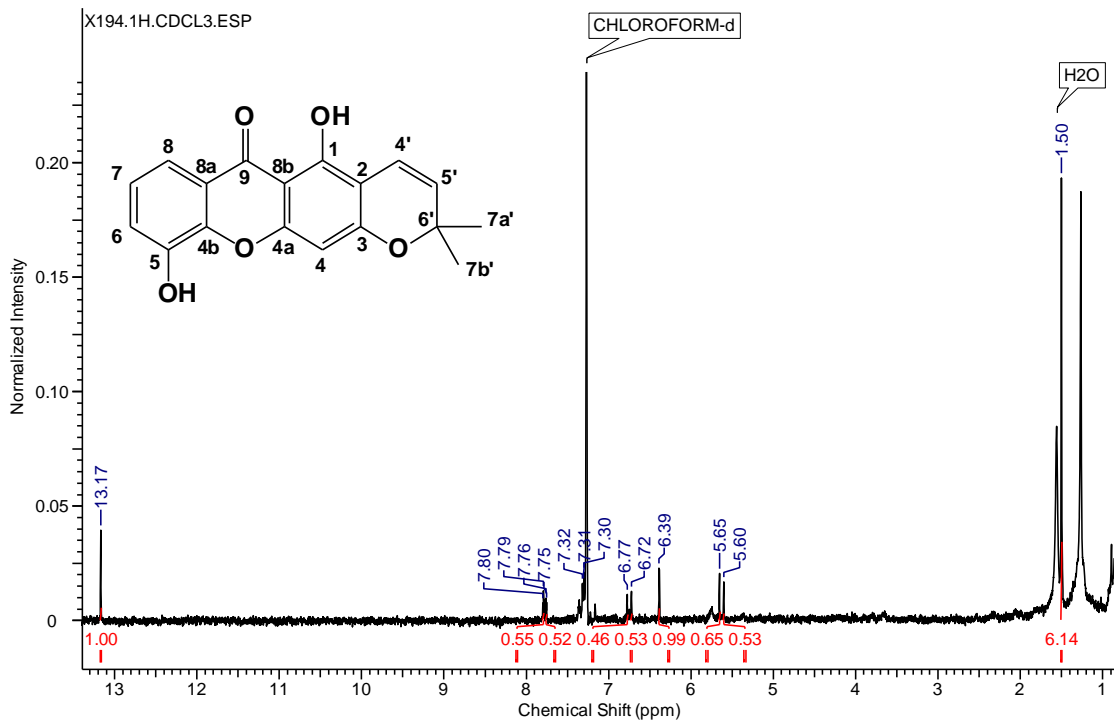


Anexo 4. HR-MS, IV e RMN uni e bidimensional da 6-desoxijacareubin (composto 4)

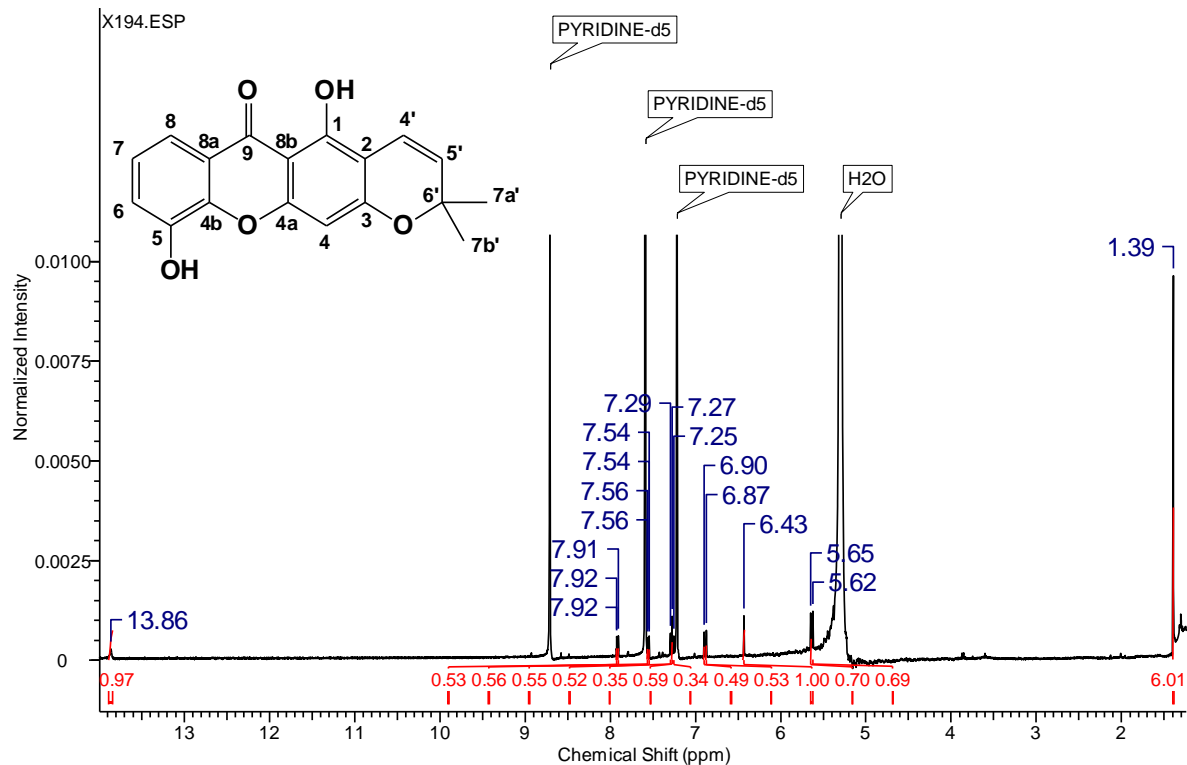
HR-MS para o composto ($[M^+ - H] = 309,076$) comparado a massa teórica obtida

Espectro infravermelho em pastilha de KBr para o composto 4

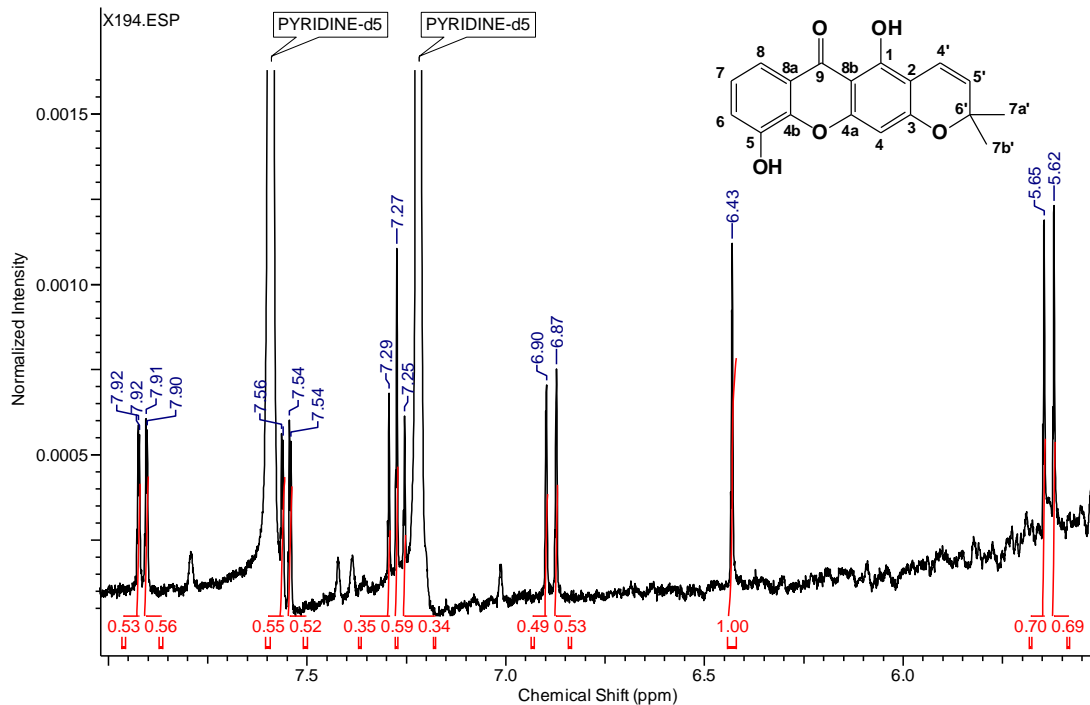


Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 $\delta 7.27$, 200 MHz) do composto 4

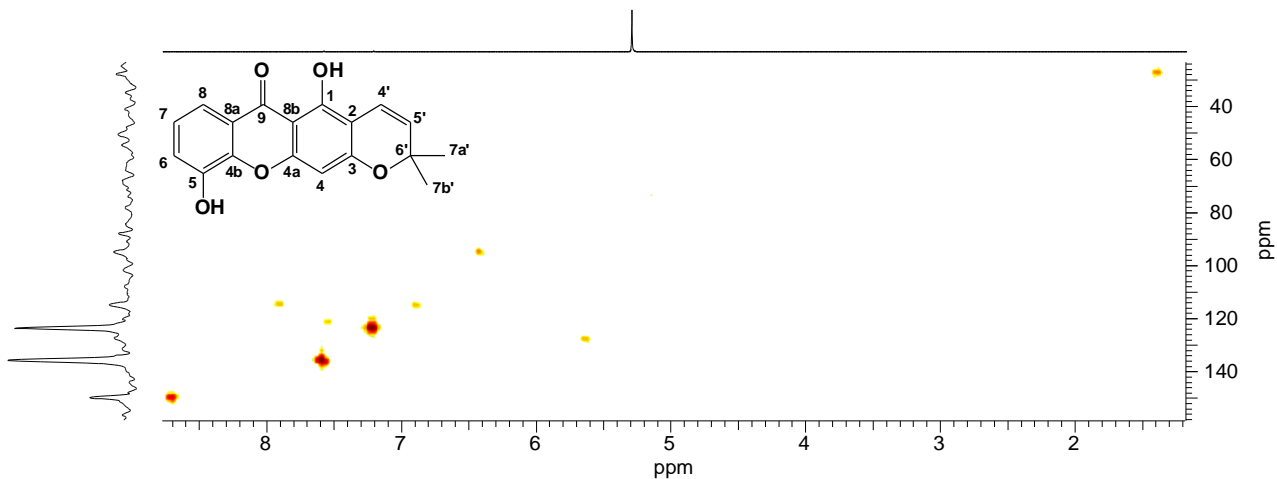
Espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. Pyr-D₅ δ 7.22, 400 MHz) do composto 4



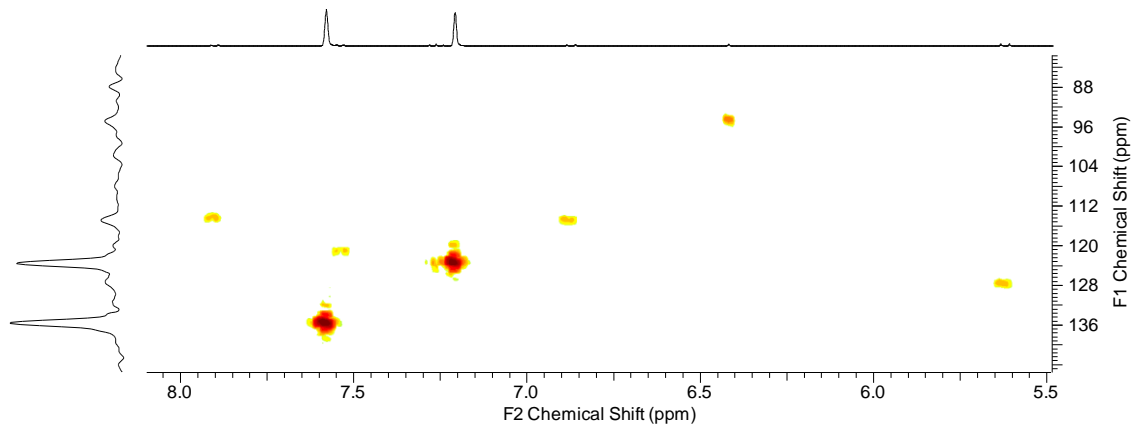
Ampliação do campo baixo do espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. Pyr-D₅ δ 7.22, 400 MHz) do composto 4



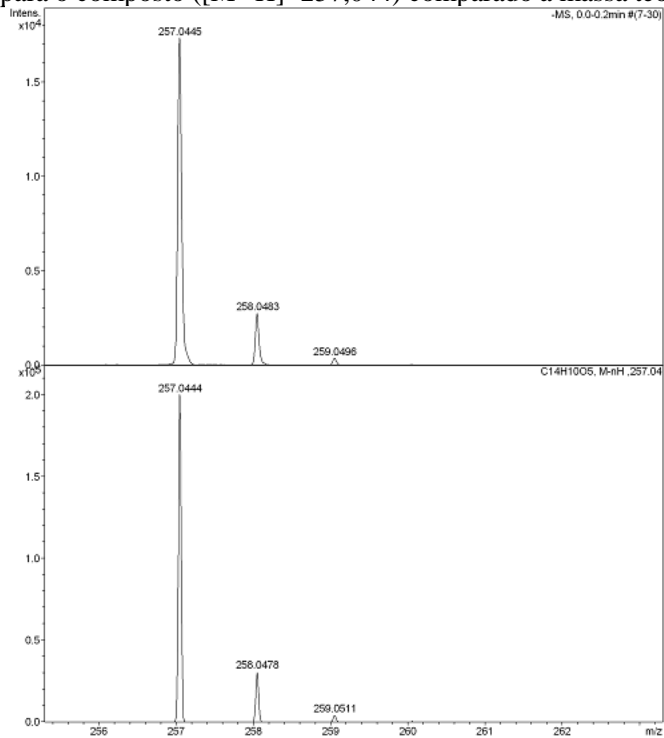
Espectro de HSQC (Pyr-D₅, 400MHz) do composto 4



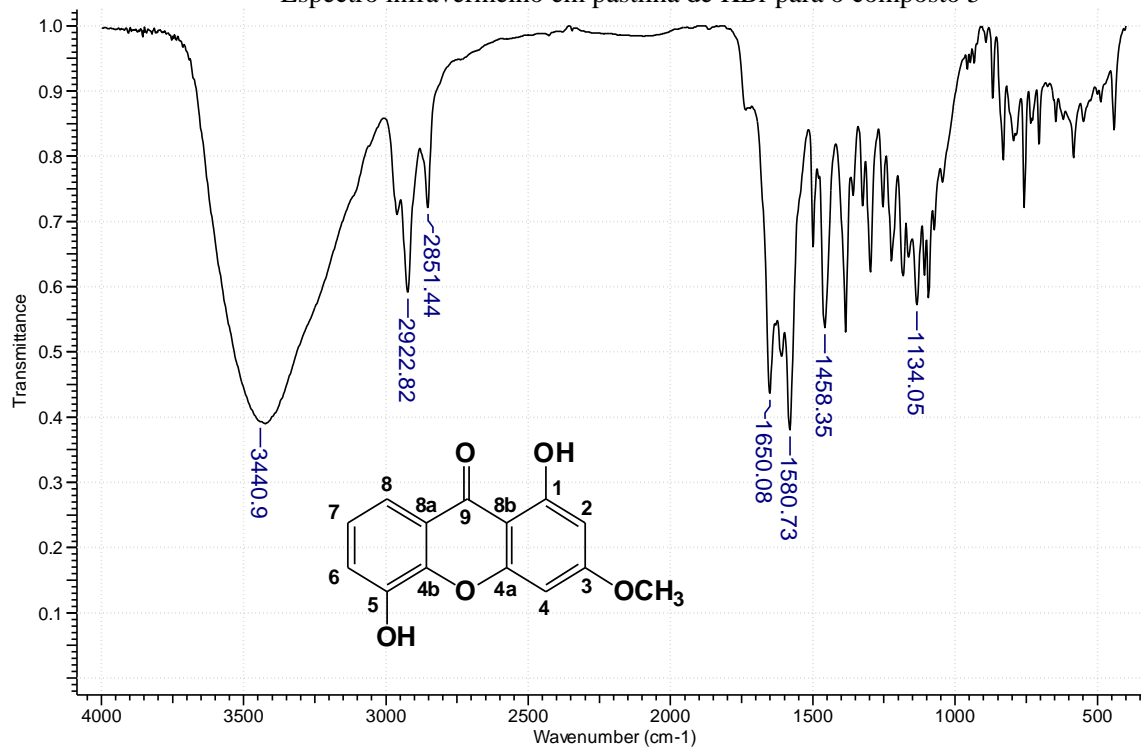
Ampliação do espectro de HSQC (Pyr-D₅, 400MHz) do composto 4



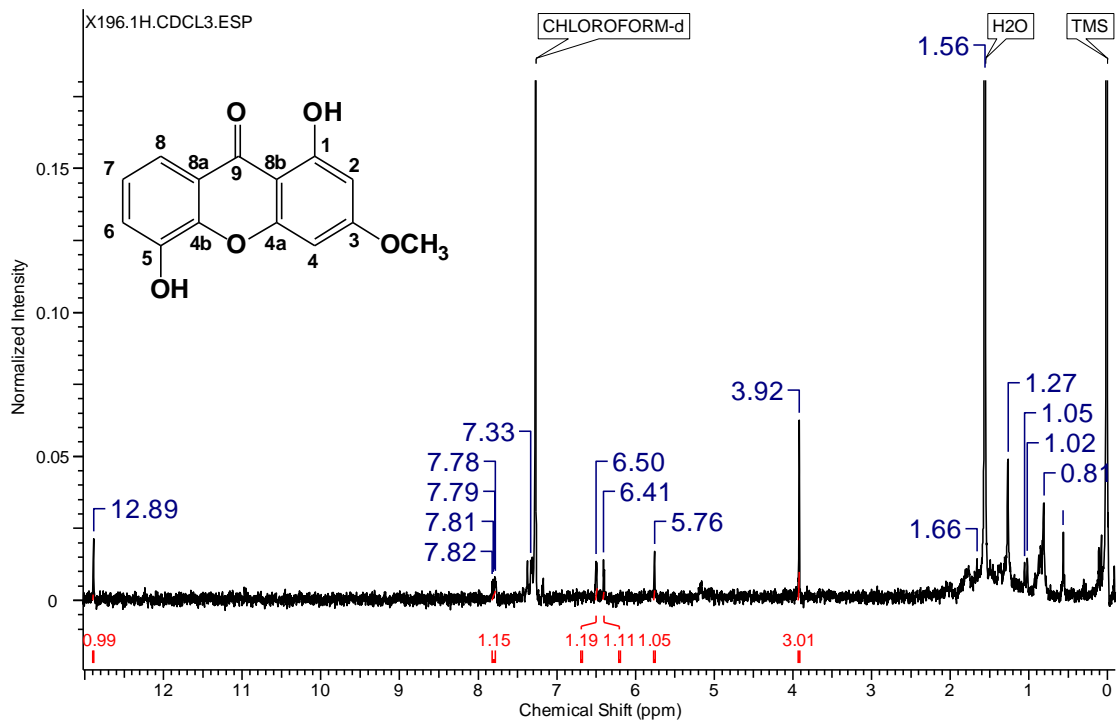
Anexo 5. HR-MS, IV e RMN uni e bidimensional do 1,3-dihidroxi-5-metoxixantona (composto 5)
HR-MS para o composto ($[M^+ - H] = 257,044$) comparado a massa teórica obtida

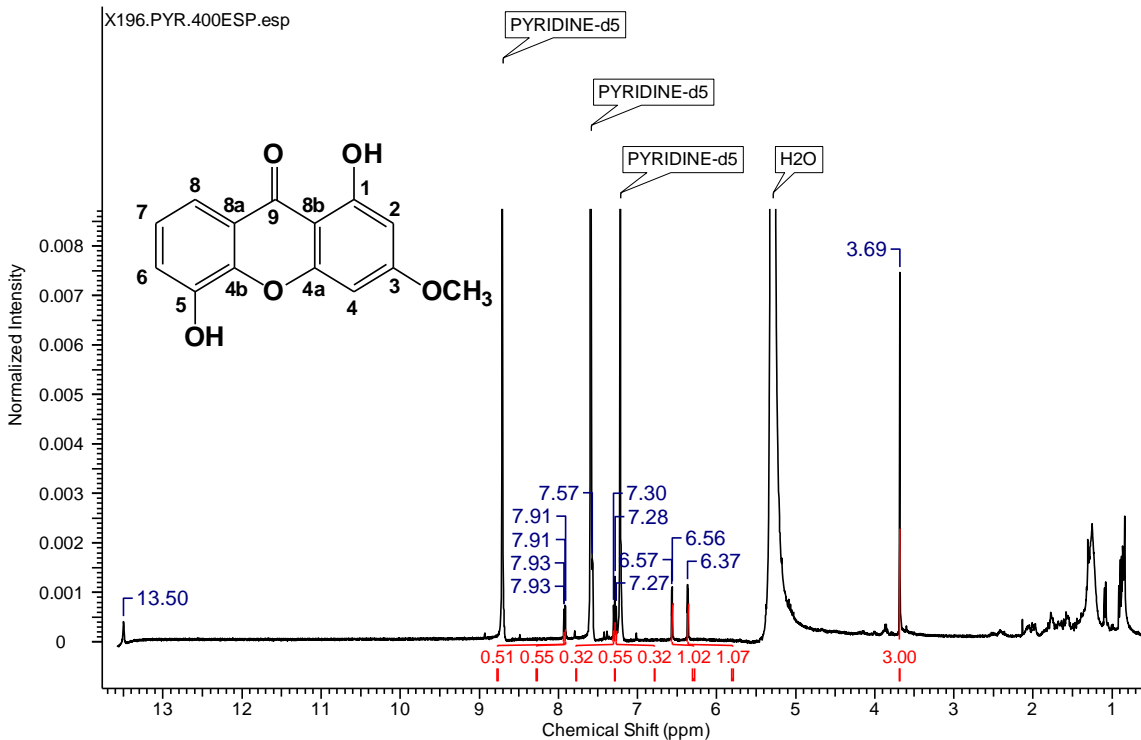


Espectro infravermelho em pastilha de KBr para o composto 5

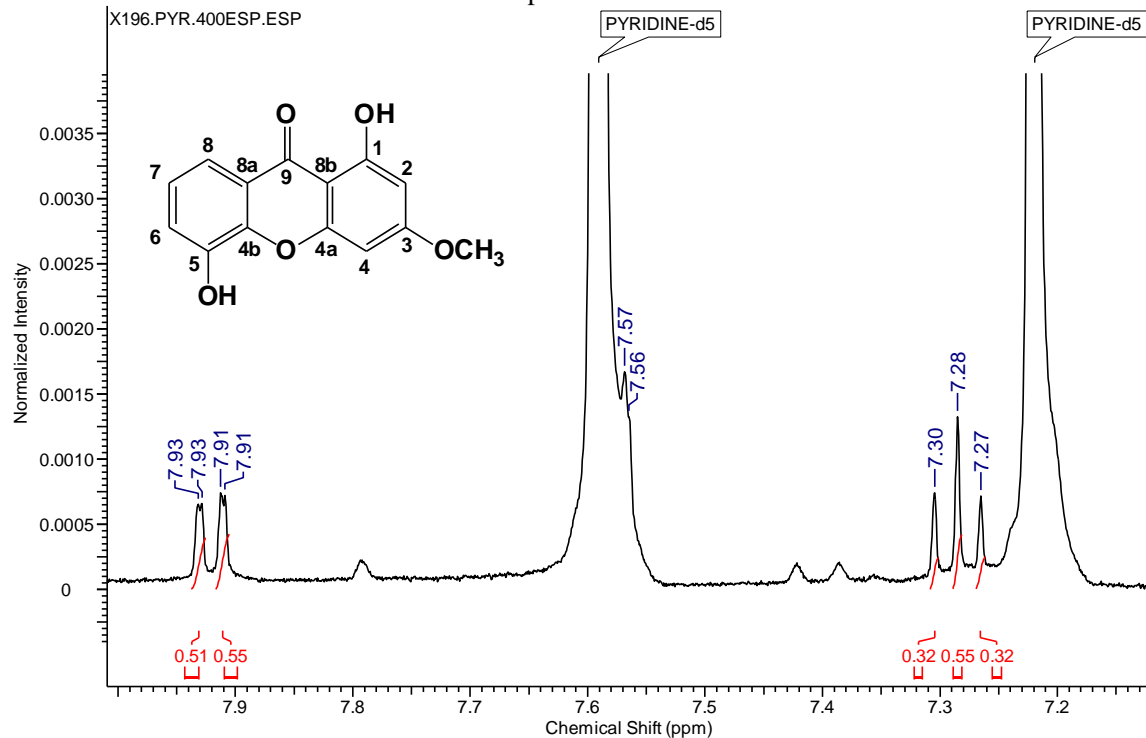


Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 δ 7.27, 200 MHz) do composto 5

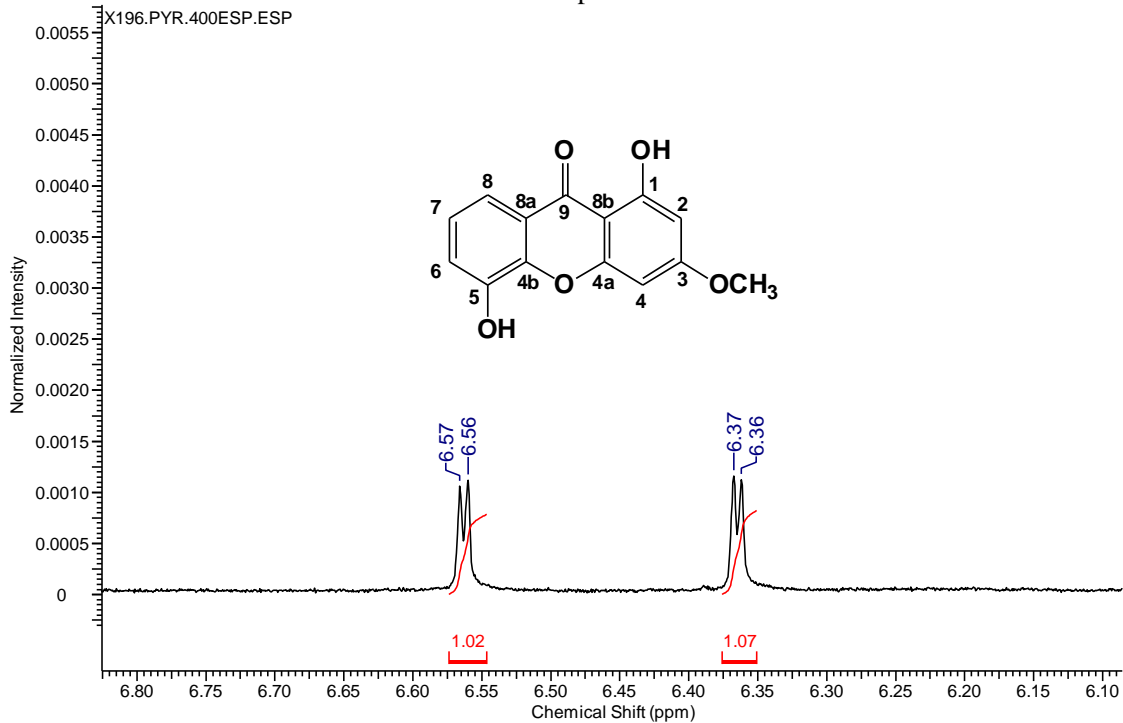


Espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. Pyr-D₅ δ 7.22, 400 MHz) do composto 5

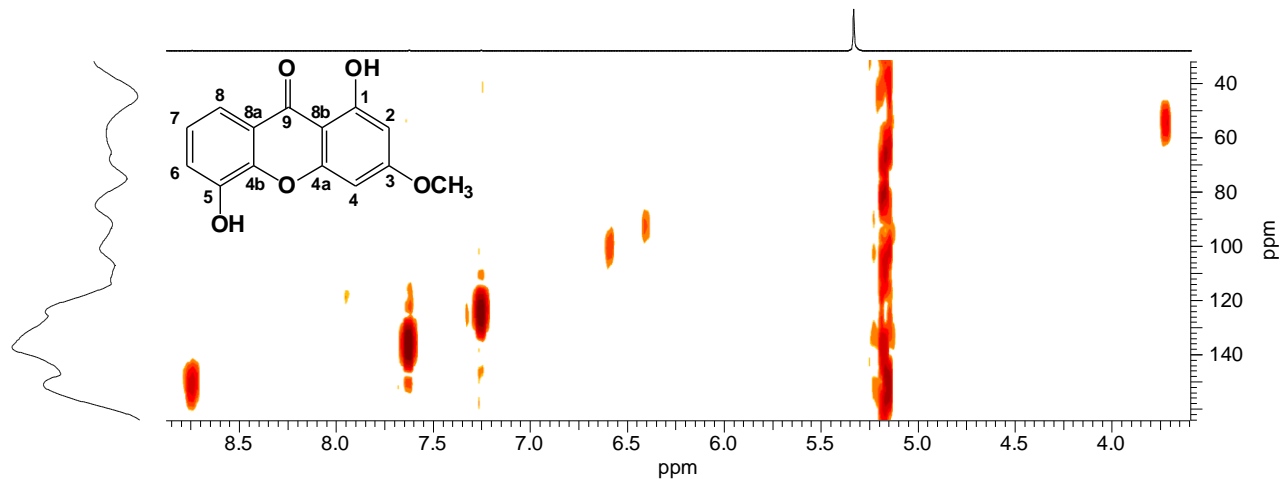
Ampliação do campo baixo do espectro de RMN de ^1H em Pyr-D₅ (Ref. Pyr-D₅ δ 7.22, 400 MHz) do composto5



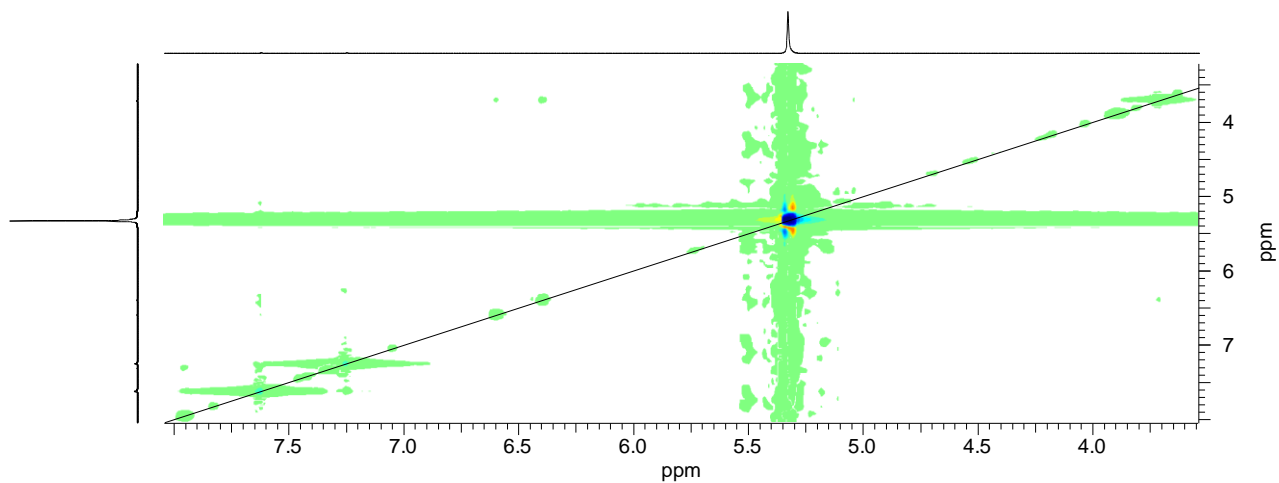
Ampliação do campo baixo do espectro de RMN de ^1H em Pyr- D_5 (Ref. Pyr- D_5 δ 7.22, 400 MHz) do composto5



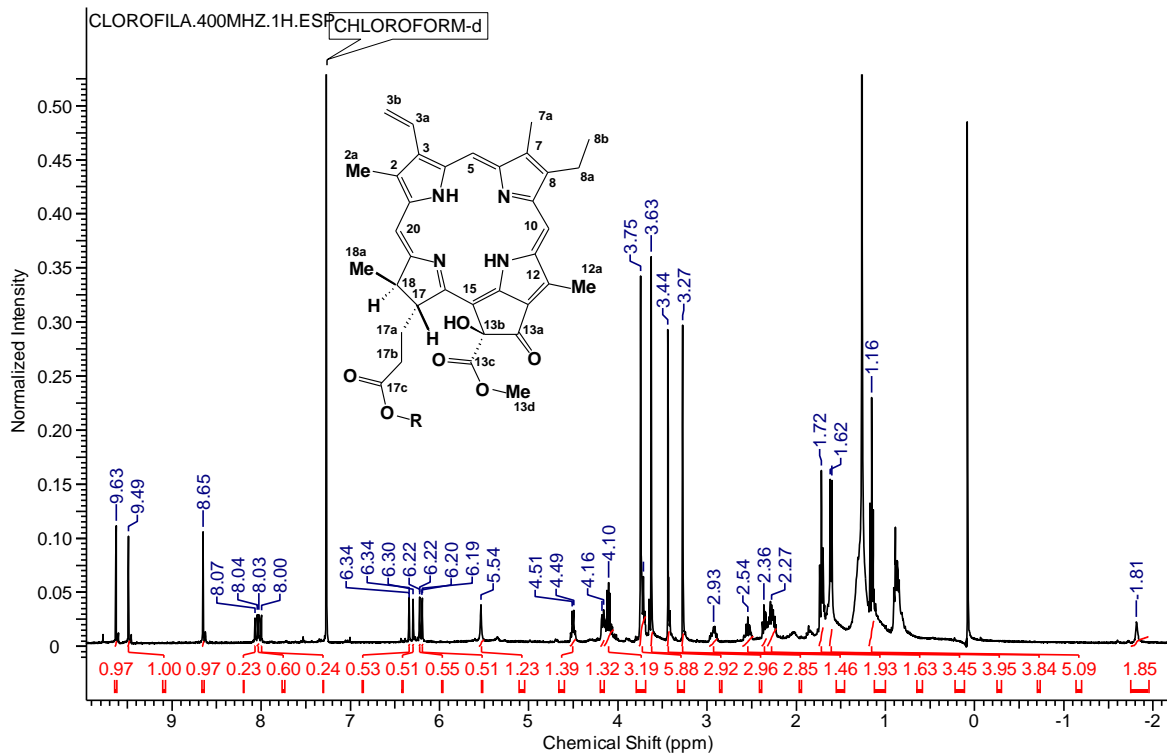
Espectro de HSQC (Pyr-D₅, 400 MHz) para o composto 5

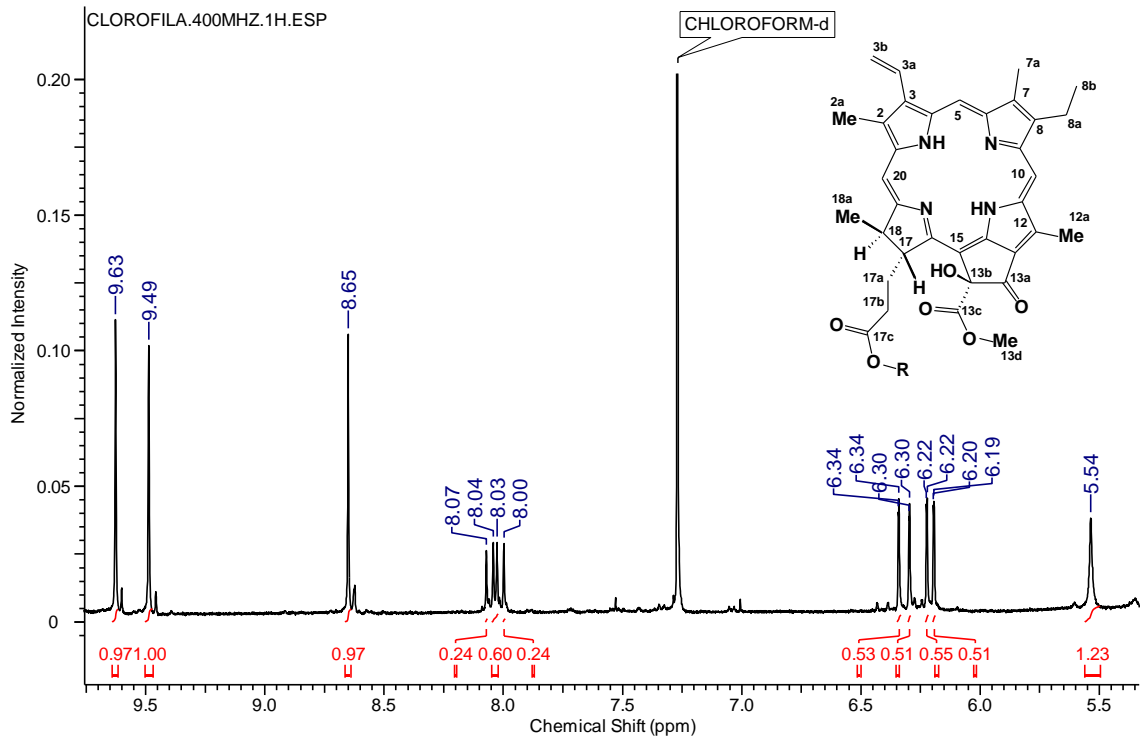


Espectro de NOESY irradiado no grupo metóxi em 3,69 ppm (Pyr-D₅, 400 MHz) para o composto 5

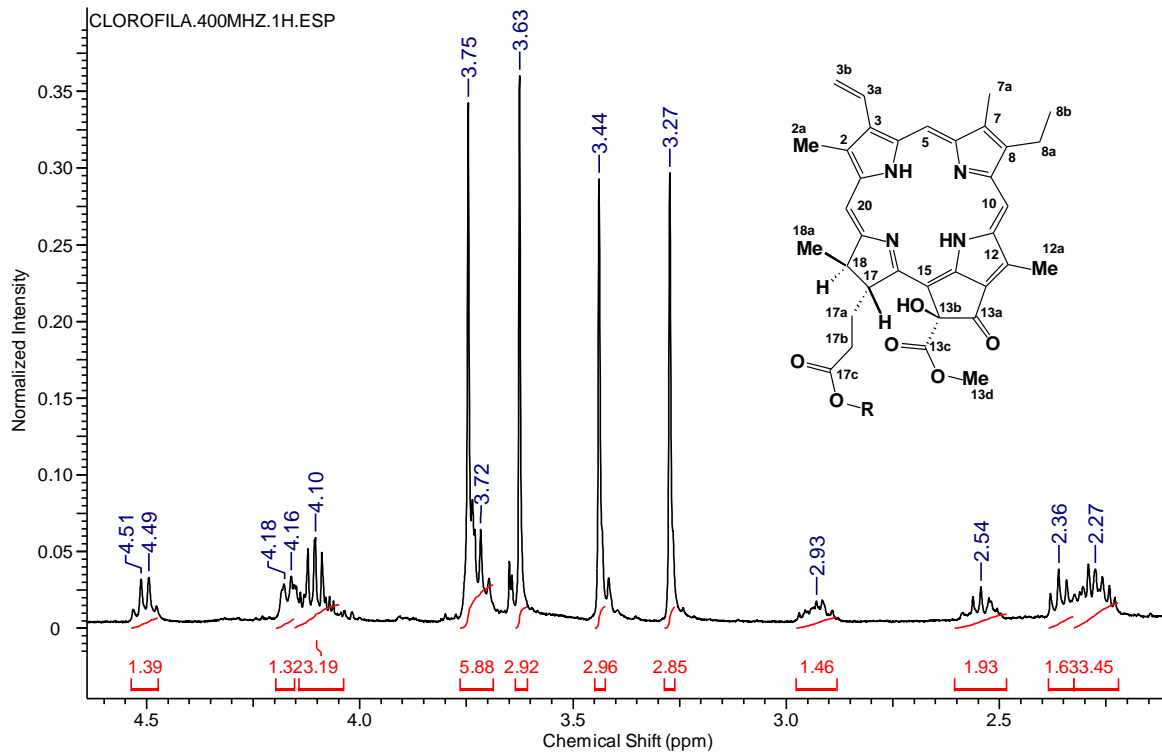


Anexo 6. Espectro de RMN de ^1H e ^{13}C do 13b-hidroxi-(13b-S)-feoforbídeo **a** (composto 6)
Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 δ 7.27, 400 MHz) do composto 6

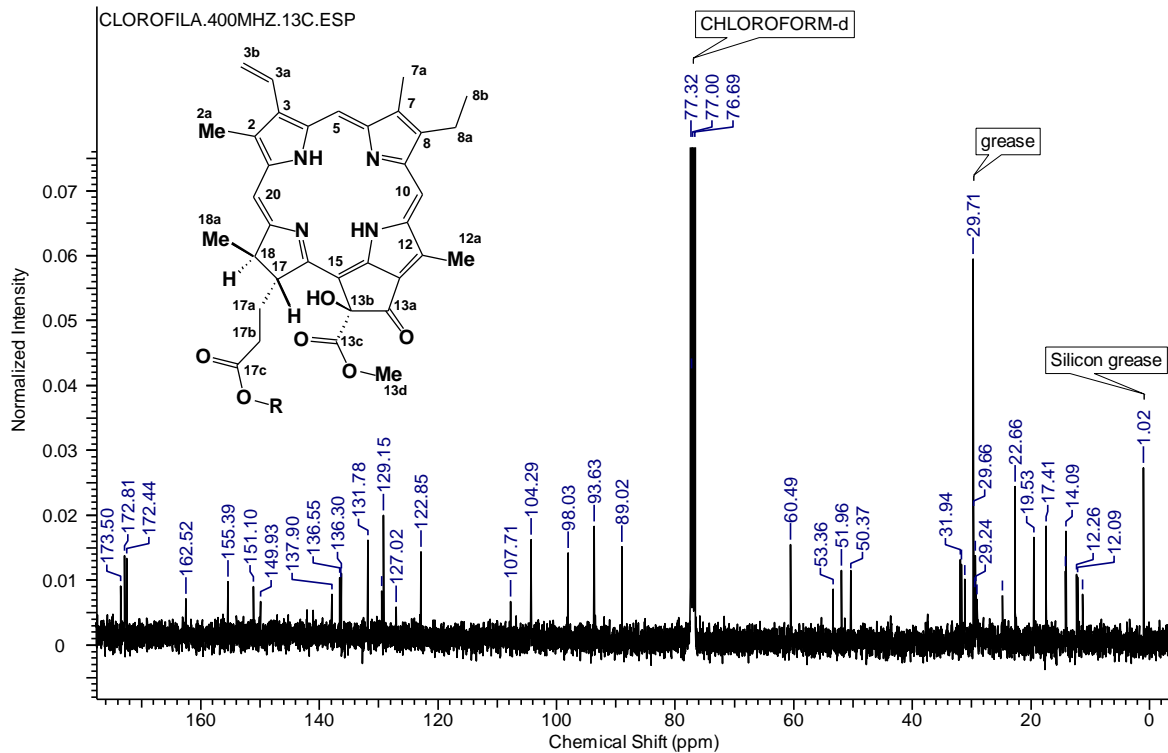




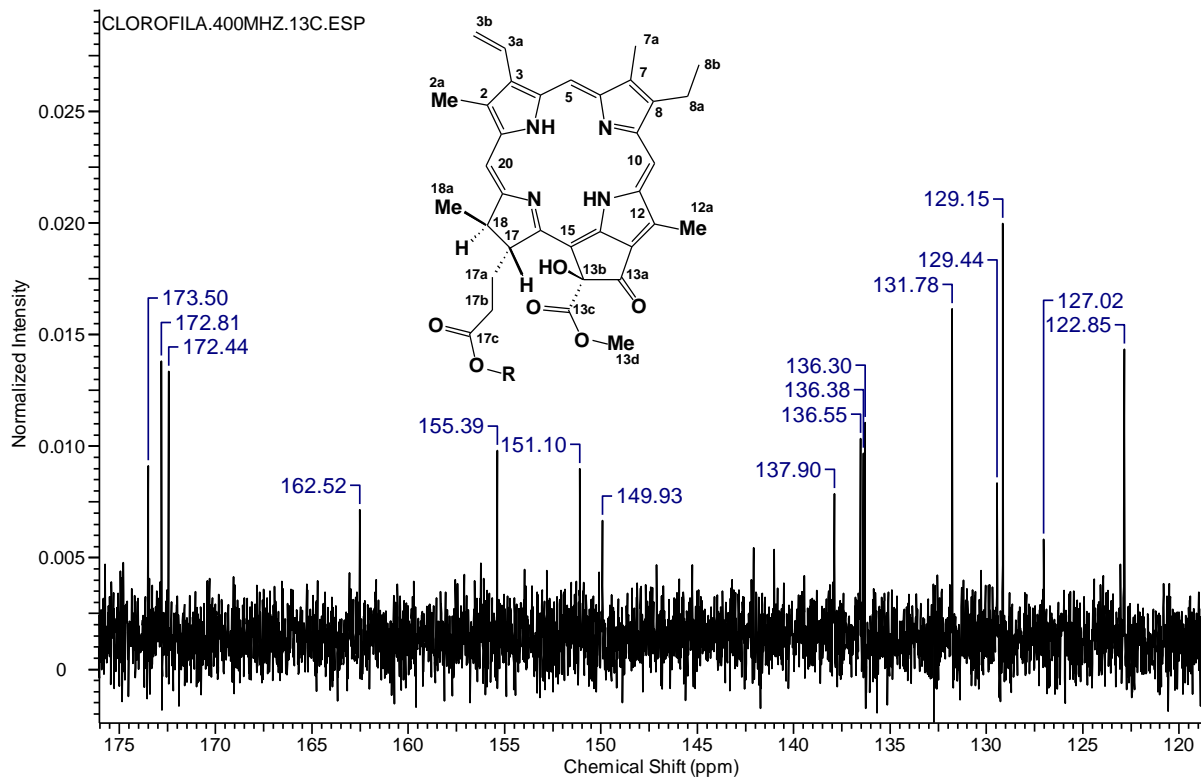
Ampliação do espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 δ 7.27, 400 MHz) do composto 6

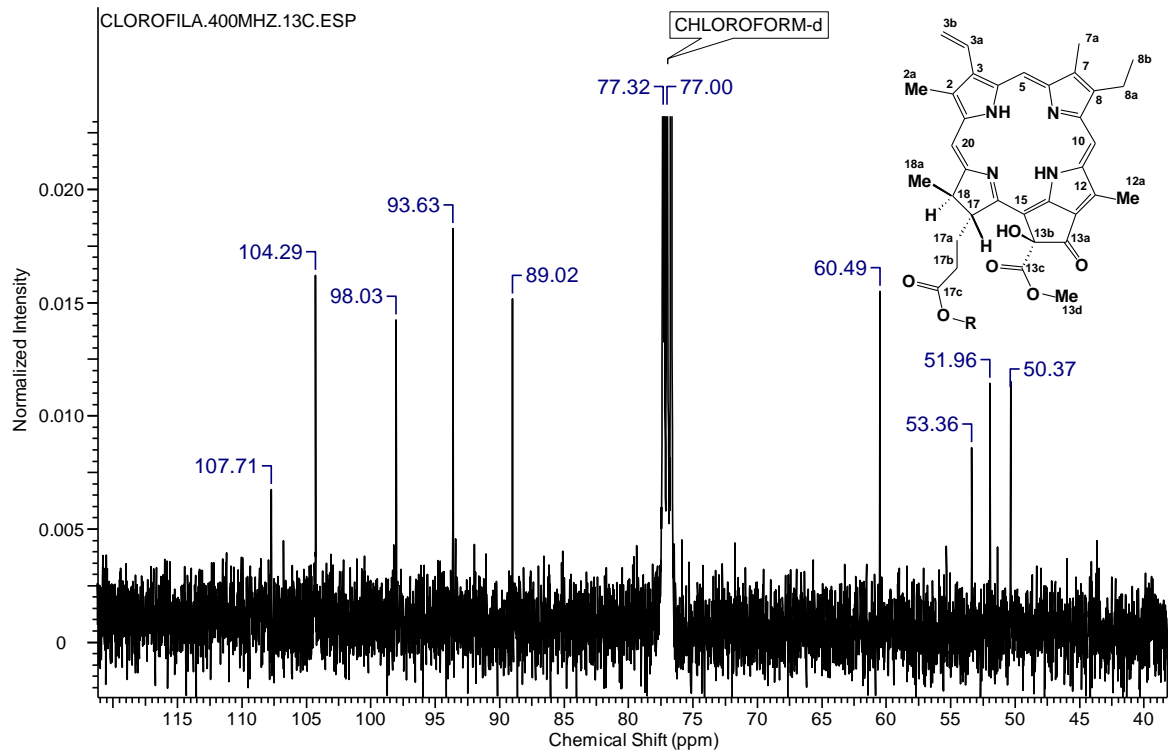


Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 $\delta 77.0$, 100 MHz) do composto 6



Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 δ 77.0, 100 MHz) do composto 6





Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 (Ref. CDCl_3 $\delta 77.0$, 100 MHz) do composto 6

