

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae)
e determinação da atividade antifúngica**

Ana Cristina Stein

Porto Alegre, 2005.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae)
e determinação da atividade antifúngica**

**Dissertação apresentada por Ana Cristina
Stein para obtenção do grau de mestre em
Ciências Farmacêuticas**

**Orientadora: Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser
Porto Alegre, 2005.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 23.06.2005, pela Comissão Examinadora, constituída por:

Prof. Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz
Universidade Luterana do Brasil

Profa. Dra. Raquel Bridi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Renata Pereira Limberguer
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

S819a Stein, Ana Cristina
Análise química de espécies de *Pterocaulon* (Asteraceae) e determinação da atividade antifúngica / Ana Cristina Stein. – Porto Alegre : UFRGS, 2005. - 164 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Pterocaulon. 2. Asteraceae. 3. Cumarinas
4. Quitoco. 5. Atividade antifúngica. I. Poser, Gilsane Lino von. II. Título.

CDU: 615.322:582.998.2

"A mente que se abre a
uma nova idéia jamais
voltará ao seu tamanho
original"
(Albert Einstein)

Agradecimentos

À Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser (a Gil) pela orientação, amizade, carinho, confiança e estímulo para ir além

As minhas queridas colegas Paulinha, Dani Fritz, Carol e Dani Albring pelos momentos inesquecíveis de trabalho, companheirismo e amizade cultivados neste tempo em que passamos juntas

As amigas, bolsistas e futuras farmacêuticas Ju, Kênia, Simone e Bruna pela paciência, empenho e interesse

Ao Prof. Dr. Alexandre Ferraz, pelo incentivo, colaboração, apoio e amizade

Aos colegas e amigos Ana Lúcia, Camila, Marina, Paulinho, Leo, Dudu, Rogério, Tati, Melissa, Nael e Raquel pela parceria e momentos de descontração

Aos professores deste Curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos passados

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro

Ao botânico Prof Dr. Nelson Matzembaker pela coleta e identificação das espécies em estudo

À Profa. Dra. Suzana Zacchino e ao laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas da Universidade Nacional de Rosário (Rosário, Argentina) pelos ensaios de atividade antifúngica realizados

Ao botânico e farmacêutico Luis Fernando Paiva Lima pela coleta e identificação das espécies e colaboração nos estudos taxonômicos do gênero

Ao Prof. Dr. Jan Schripsema da Universidade Estadual do Norte Fluminense (RJ), pela obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Picardie Jules Verne (Amiens, França) pela disponibilização de equipamento para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C

À Simone, ao Caiçara e à Luana pelo carinho, amizade e acolhida

À Nina e ao Artur, que mesmo à distância, sempre me incentivaram

As minhas grandes e inseparáveis amigas Déia, Fran e Márcia que sempre apoiaram e me deram força para chegar até aqui

Ao meu Lucas, pelo carinho e amor, e por ser um constante exemplo de força e determinação para seguir adiante

Aos meus manos Ale, Ange e Renan, por tudo.

Aos meus pais, pela vida, dedicação, amor e apoio incondicionais, e por serem meu admirável exemplo de vida a seguir.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	19
3.1.1 Taxonomia.....	19
3.1.2 Morfologia.....	21
3.1.2.1 Gênero <i>Pterocaulon</i>	21
3.1.2.1.1 <i>Pterocaulon alopecuroides</i>	22
3.1.2.1.2 <i>Pterocaulon polystachyum</i>	24
3.1.2.1.3 <i>Pterocaulon balansae</i>	24
3.2 ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS.....	27
3.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS.....	28
3.3.1 Atividade antimicrobiana.....	28
3.3.2 Atividade antiviral.....	29
3.3.3 Atividades citotóxica e antiproliferativa.....	29
3.3.4 Atividade inseticida.....	31
3.3.5 Outras atividades investigadas.....	31
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DE <i>PTEROCAULON</i>	32
3.5 ASPECTOS QUIMIOTAXONÔMICOS.....	42
3.6 CUMARINAS.....	43
3.6.1 Aspectos químicos.....	43
3.6.2 Propriedades farmacológicas das cumarinas.....	44
3.6.2.1 Atividade antimicrobiana.....	44
3.6.2.2 Atividade antiinflamatória.....	45
3.6.2.3 Atividade antitumoral.....	45
3.6.2.4 Fototoxicidade.....	46
3.6.2.5 Outras atividades.....	47
3.6.2.6 O papel das cumarinas como fitoalexinas.....	48
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
4.1 MATERIAL VEGETAL.....	51
4.2 SOLVENTES E REAGENTES.....	51
4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	52

4.3.1 Extratos para análise do perfil cromatográfico das espécies de <i>Pterocaulon</i>	52
4.3.2 Extratos para análise fitoquímica.....	52
4.3.3 Extratos para análise da atividade antifúngica.....	53
4.3.3.1 Preparação dos extratos brutos.....	53
4.3.3.2 Preparação das frações.....	53
4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	53
4.4.1 Extratos diclorometano de superfície foliar.....	53
4.4.2 Extratos submetidos a avaliação da atividade antifúngica.....	54
4.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS.....	54
4.5.1 Métodos cromatográficos empregados para o isolamento.....	54
4.5.2 Elucidação estrutural.....	54
4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	55
4.6.1 Microorganismos e meios.....	55
4.6.2 Testes de susceptibilidade antifúngica.....	55
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 ANÁLISE QUÍMICA.....	58
5.1.1 Análise e isolamento das substâncias.....	58
5.1.1.1 <i>P. alopecuroides</i>	58
5.1.1.2 <i>P. polystachyum</i>	59
5.1.1.3 <i>P. balansae</i>	59
5.1.2 Identificação das cumarinas.....	59
5.1.2.1 <i>P. alopecuroides</i>	60
5.1.2.1.1 Composto PA1	60
5.1.2.1.2 Composto PA2.....	61
5.1.2.2 <i>P. polystachyum</i>	64
5.1.2.2.1 Composto PP1a.....	65
5.1.2.2.2 Composto PP1b.....	65
5.1.2.2.3 Composto PP2a.....	66
5.1.2.2.4 Composto PP2b.....	67
5.1.3 Análise cromatográfica dos extratos de <i>Pterocaulon</i>	69
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	71

5.2.1 Extratos brutos metanólicos e frações.....	71
5.2.2 Atividade antifúngica dos produtos isolados.....	75
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7. CONCLUSÕES.....	84
8. REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS.....	93
BIOGRAFIA	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Pterocaulon alopecuroides</i>	23
Figura 2: <i>Pterocaulon polystachyum</i>	25
Figura 3: <i>Pterocaulon balansae</i>	26
Figura 4: Estrutura das cumarinas escoparona e ostol.....	48
Figura 5: Estrutura da 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina (PA1).....	61
Figura 6: Estrutura da 7-(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxicumarina (PA2).....	62
Figura 7: Estrutura da iapina (PP1b).....	66
Figura 8: Estrutura da preniletina (PP2a).....	67
Figura 9: Estrutura da preniletina-metil-éter (PP2b).....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das espécies de Asteraceae.....	20
Tabela 2: Estrutura das cumarinas citadas para o gênero <i>Pterocaulon</i>	32
Tabela 3: RMN de ¹ H dos produtos PA1 (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina) e PA2 (7-(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxycumarina) de <i>P. alopecuroides</i>	63
Tabela 4: RMN de ¹³ C dos produtos PA1 (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina) e PA2 (7-(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxycumarina) de <i>P. alopecuroides</i>	64
Tabela 5: RMN de ¹ H dos produtos PP1a (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina) e PP1b (iapina), PP2a (preniletina) e PP2b (preniletina-metil-éter) de <i>P. polystachyum</i>	68
Tabela 6: RMN de ¹³ C dos produtos PP1a (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina) e PP1b (iapina), PP2a (preniletina) e PP2b (preniletina-metil-éter) de <i>P. polystachyum</i>	69
Tabela 7: Determinação da presença /ausência de cumarinas e comparação do perfil cromatográfico dos extratos com os padrões PA1, PA2 (<i>P. alopecuroides</i>), PP1 e PP2 (<i>P. polystachyum</i>).....	70
Tabela 8: Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos extratos de <i>Pterocaulon ssp.</i>	74
Tabela 9: Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i> dos produtos isolados de <i>P. alopecuroides</i> e <i>P. polystachyum</i>	76

Resumo

O gênero *Pterocaulon* (Asteraceae) é formado por 18 espécies, a maioria de ocorrência na América do Sul. Grande parte das espécies deste gênero tem aplicação na medicina popular como digestiva, emenagoga, inseticida e também como agente contra picadas de serpentes. No Sul do Brasil, algumas espécies conhecidas como “Quitoco” são utilizadas como anti-inflamatórios e no tratamento de afecções de pele, tanto de humanos quanto de animais. Neste trabalho foram isolados e identificados cinco diferentes compostos, presentes nos extratos diclorometano das partes aéreas de *P. alopecuroides* e *P. polystachyum*. Os compostos isolados são cumarinas simples e caracteristicamente 6,7-dioxigenadas. Da espécie *P. alopecuroides* foram obtidas 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina (PA1) e 7(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxycumarina (PA2) e da espécie *P. polystachyum* foram isoladas, além da 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina (PP1a), iapina (PP1b), prenilina (PP2a) e prenilina-metil-éter (PP2b). Outras espécies de *Pterocaulon* nativas do Rio Grande do Sul foram analisadas quanto a presença de cumarinas, que podem contribuir para os estudos quimiotaxonômicos do gênero, atuando como marcadores taxonômicos. Os extratos brutos metanólicos e frações hexanólica, diclorometano e metanólica de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* foram testados quanto à atividade antimicrobiana e apresentaram um largo espectro de ação contra um painel de fungos patogênicos oportunistas responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas e dermatológicas, justificando o uso destas plantas no tratamento de doenças de pele de animais popularmente diagnosticadas como micoses. Os compostos isolados, também testados frente a microrganismos patogênicos, não demonstraram atividade relevante, o que leva a crer que os extratos que foram ativos podem conter outros compostos que ainda não foram isolados ou ainda que poderiam agir de forma sinérgica com os produtos isolados. O método de extração utilizado indica que as cumarinas localizam-se em grande maioria na superfície de folhas e caules, onde poderiam estar atuando como fitoalexinas, protegendo a planta especialmente do ataque de fungos.

Palavras-chave: 1. *Pterocaulon*; 2. Asteraceae; 3. Cumarinas 4. Atividade antifúngica; 5. Quitoco.

Abstract

Chemical analysis of *Pterocaulon* species and determination of antifungal activity

The genera *Pterocaulon* is composed by 18 species, most of them growing in South America. Several species of this genera are used in the traditional medicine as digestive, emenagoge, insecticide and, as agent against snake bites. In South Brazil, some species popularly known as "Quitoco" are used as anti-inflammatory agents and in the treatment of skin diseases, both in humans and animals. In this work, five different compounds were isolated from the dichloromethane extract of the aerial parts of *P. alopecuroides* and *P. polystachyum*. The compounds are simple coumarins all of them 6,7-dioxygenated. From *P. alopecuroides* 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (PA1) and 7(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyl-oxo)-6-methoxy coumarin (PA2) were obtained. *P. polystachyum* yielded 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (PP1a), ayapin (PP1b), prenyletin (PP2a) and prenyletin-methyl-ether (PP2b). Other species from the genera were analysed for the presence of coumarins, compounds that could be used in chemotaxonomic studies acting as taxonomic markers. Crude methanolic extracts, and the fractions hexane, dichloromethane and methanol of *P. alopecuroides*, *P. balansae* and *P. polystachyum* were assayed for the antifungal activity and showed a broad spectrum of activity against a panel of opportunistic pathogenic fungi responsible for the most common fungal systemic and dermal infections, justifying the use of these plants in the treatment of skin diseases popularly diagnosed as mycoses. The isolated compounds were also tested but they did not show relevant activity. This fact could indicate that the active extracts contain other compounds not yet isolated and/or the activity is due to a synergism. The extraction method employed indicates that the coumarins are deposited in the surface of the leaves and stems of the plants, where they probably have the function of phytoalexin, protecting the plants specially against fungus.

Keywords: 1. *Pterocaulon*; 2. Asteraceae; 3. Coumarins; 4. Antifungal Activity; 5. Quitoco

1. INTRODUÇÃO

A utilização de vegetais como fonte de medicamentos é tão antiga quanto a civilização humana. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, mantendo em voga a prática do consumo de fitoterápicos e tornando válidas informações que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal: a flora mundial (DE PASQUALE, 1984; PHILLIPSON, 2001; MACIEL *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2002).

Estima-se que exista entre 250.000 a 500.000 espécies de plantas em todo o mundo, mas somente uma pequena parcela tem sido investigada fitoquimicamente, e tampouco suas propriedades farmacológicas foram avaliadas. Nos últimos anos, quase metade das apresentações farmacêuticas dispensadas nos Estados Unidos são fitoterápicos. Esse mercado mundial movimentava cerca de US\$ 22 bilhões de dólares por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Em 2000, o setor faturou US\$ 6,6 bilhões nos EUA e US\$ 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha o maior mercado mundial destes produtos. Ainda que o Brasil exporte cerca de US\$ 7 milhões em extratos vegetais de várias plantas, importa uma quantidade considerável de hormônios esteróides e produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta (COWAN, 1999; PINTO *et al.*, 2002).

Desde o descobrimento dos antibióticos na década de 50, o emprego de derivados de plantas, como antimicrobianos, tem caído em desuso, porém, cresce a necessidade da população mundial por novos e eficazes tratamentos. Com o emprego da quimioterapia moderna, a partir da década de 60 houve o surgimento de microrganismos resistentes aos medicamentos utilizados e, a partir dos anos 80, com o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA),

uma gama de fungos patogênicos oportunistas tem potencializado seu aparecimento no cenário médico (COWAN, 1999; SARDARI *et al.*, 1999).

Os fungos são microrganismos responsáveis por diversas manifestações clínicas como alergias, reações tóxicas e infecções em animais e humanos. Nos últimos anos, tem sido relatado um considerável aumento na incidência de diferentes micoses e doenças imunossupressoras, devido ao uso de quimioterapia agressiva para o tratamento de câncer e largo emprego de antibióticos de amplo espectro. As drogas antifúngicas atualmente utilizadas, como polienos e azóis, sofrem algumas limitações que dificultam suas aplicações terapêuticas, como toxicidade, resistência e interações medicamentosas, o que torna necessário a busca por novos agentes antifúngicos seguros e eficazes (GHAHFAROKHI *et al.*, 2004).

Em virtude das estruturas químicas dos produtos naturais serem diferenciadas, quando comparadas aos antimicrobianos derivados de síntese ou de processos fermentativos, estes compostos obtidos de vegetais podem atuar por mecanismos alternativos, minimizando os problemas decorrentes da resistência desenvolvida por alguns microrganismos (COWAN, 1999).

O gênero *Pterocaulon*, família Asteraceae, possui 18 espécies amplamente distribuídas no noroeste da Argentina, Uruguai, sul do Brasil e Paraguai e diferentes áreas da Austrália. No Brasil são encontradas 11 espécies das quais 10 ocorrem no Rio Grande do Sul. Diversas espécies são empregadas popularmente na forma de infusões e decoctos, tanto para uso interno como externo, com propriedades estomáquicas, anti-sépticas, inseticidas, entre outras. Até o presente mais da metade das espécies deste gênero foi investigada quanto a constituição química (MARTINO *et al.*, 1979; CRONQUIST, 1981; DEBENEDETTI *et al.*, 1987; MAGALHÃES *et al.*, 1989; DEBENEDETTI *et al.*, 1991; DEBENEDETTI *et al.*, 1992; DEBENEDETTI *et al.*, 1994^A; DEBENEDETTI *et al.*, 1994^B; DEBENEDETTI *et al.*, 1997; DEBENEDETTI *et al.*, 1998; DEBENEDETTI *et al.*, 1999; MACLEOD e

RASMUSSEN, 1999; PALACIOS *et al.*, 1999; VERA *et al.*, 2001; KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003).

Um levantamento realizado por AVANCINI (2002) no Rio Grande do Sul, através de entrevista informal com base em dados etnoveterinários, indicou que plantas conhecidas como “Quitoco” (*Pterocaulon* ssp.) eram utilizadas para o tratamento de doenças de pele em animais, popularmente diagnosticadas como sendo micoses. Entretanto, não há relatos na literatura sobre investigações farmacológicas das espécies de *Pterocaulon* quanto à propriedade antifúngica. Além disso, não se sabe exatamente quais espécies são utilizadas popularmente, embora um dos informantes tenha fornecido uma amostra, identificada como *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC.

Com base nestes dados, torna-se interessante a pesquisa das espécies de *Pterocaulon* encontradas no Rio Grande do Sul, principalmente *P. alopecuroides*, *P. polystachyum* DC. e *P. balansae* Chodat., estas últimas de fácil obtenção e também conhecidas como “Quitoco”, visando estabelecer parâmetros fitoquímicos que possibilitem a diferenciação química entre as espécies, bem como realizar estudos quanto a atividade antifúngica dos extratos brutos e frações das diferentes espécies.

2. OBJETIVOS

Considerando os dados anteriormente apresentados, os objetivos desse trabalho são:

Isolar e identificar os compostos majoritários presentes nas espécies *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC., *P. polystachyum* DC. e *P. balansae* Chodat.;

Verificar a ocorrência de cumarinas em outras espécies de *Pterocaulon* nativas do Rio Grande do Sul;

Determinar a atividade antifúngica de extratos, frações e substâncias isoladas de *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC., *P. polystachyum* DC. e *P. balansae* Chodat.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica apresentada a seguir foi realizada nas seguintes bases de dados: MEDLINE/PUBMED (1966-2004), WEB OF SCIENCE-FAPESP/CAPES/Institute for Scientific Information (ISI) (1945-2004), SCIENCE DIRECT (1967-2004), THIEME-CONNECT, FREE MEDICAL JOURNALS, SCIRUS (1973-2004) e MISSOURI BOTANICAL GARDEN (www.mobot.org). Utilizaram-se as seguintes palavras chaves: Asteraceae, Plucheeae, *Pterocaulon*, coumarins, antifungal e phytoalexins. Muitos dos artigos encontrados serviram como fonte para buscas posteriores através de suas referências.

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

3.1.1 Taxonomia

A família Compositae ou Asteraceae compreende cerca de 1.100 gêneros, com aproximadamente 23.000 espécies distribuídas em três subfamílias: *Barnadesioideae*, *Cichorioideae* e *Asteroideae*, com 92, 6.700 e 16.200 espécies, respectivamente (Tabela 1). Estas espécies são de ampla distribuição e bem representadas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (BARROSO, 1991; JOLY, 1991).

Segundo BREMER (1994), a subfamília *Asteroideae*, a qual pertence o gênero em estudo, é a mais numerosa e as espécies estão distribuídas em 10 tribos, 57 subtribos e 1.135 gêneros.

O gênero *Pterocaulon* havia sido classificado anteriormente como pertencente à Tribo Inuleae, composta por 200 gêneros e 2000 espécies. Com as divergências entre alguns autores, a tribo sofreu algumas mudanças. ANDERBERG (1994), baseado em sua análise cladística demonstrou que a tribo era parafilética e

propôs uma nova classificação, na qual a maioria dos gêneros estava acomodada em três tribos: Inuleae (38 gêneros), Gnaphalieae (181 gêneros) e Plucheeae (28 gêneros).

Tabela 1: Distribuição das espécies de *Asteraceae*

Família	Subfamília	Tribo	Subtribo	Gênero	Espécie
Asteraceae			82	1.535	23.000
	Barnadesioideae		-	9	92
		Barnadesieae	-	9	92
	Cichorioideae		25	391	6.700
		Mutisieae	2	76	970
		Cardueae	4	83	2.500
		Lactuceae	11	98	1.550
		Vernonieae	6	98	1.300
		Liabeae	-	14	160
		Arctoteae	2	16	200
	Asteroideae		57	1.135	16.200
		Inuleae	-	38	480
		Plucheeae	5	28	220
		Gnaphalieae	-	181	2.000
		Calenduleae	-	8	110
	Astereae	3	174	2.800	
	Anthemideae	12	109	1.740	
	Senecioneae	3	120	3.200	
	Helenieae	8	110	830	
	Heliantheae	10	189	2.500	
	Eupatorieae	16	170	2.400	

Fonte: BREMER, 1994.

Segundo ANDERBERG (1991) o táxon Plucheeae é formado por 5 subgrupos monofiléticos: os grupos *Cylindrocline*, *Coleocoma*, *Pterocaulon*, *Laggera* e *Pluchea*. O grupo *Pterocaulon*, diagnosticado através de seus caules alados, é compreendido em três gêneros: *Pterocaulon* (incluindo *Monenteles*), *Noejeffreya* e *Stenachaenium*. *Pterocaulon* e *Stenachaenium* são encontrados no norte e sul da América. Outro grupo de *Pterocaulon*, a seção *Monenteles*, é encontrada na Austrália e leste tropical da Ásia, e *Noejeffreya* ocorre em Madagascar.

A distribuição biogeográfica do grupo *Pterocaulon* é de grande importância, e de acordo com ANDERBERG (1991) a análise cladística das espécies de *Pterocaulon* contribuiria de maneira significativa para os estudos sobre vicariância biogeográfica.

3.1.2 Morfologia

3.1.2.1 Gênero *Pterocaulon*

As espécies apresentam involúcro comprimido, formado por poucas séries de brácteas linear-lanceoladas, sendo as exteriores gradualmente menores, caducas com as flores. Receptáculo pequeno, hirsuto ou glabro. Flores dimorfas: as marginais pluriseriadas, femininas, com corolas filiformes truncadas ou com 2-3 dentes no ápice; as centrais são poucas, hermafroditas ou masculinas por esterilidade do gineceu, com corola tubulosa estreita, pentadenteada no limbo. Folhas alternadas, inteiras ou denteadas, decurrentes resultando em caule alado. Capítulos pequenos, sésseis, dispostos em glomérulos terminais ou em espigas mais ou menos densas (CABRERA, 1974).

3.1.2.1.1 *Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC.

Essa espécie é descrita como uma erva perene de 40 a 80 cm de altura, com xilopódio esférico ou alargado, caule ereto, ramificado na parte superior, com caule alado até a inflorescência. É uma herbácea sem canais de resina. Folhas sésseis e decurrentes, obovado-lanceoladas ou elípticas, agudas dentadas ou serradas, quase glabras, de 50-70 mm de comprimento e 20-30 mm de largura. Capítulo terminal disposto em espigas elipsóides muito compactas, freqüentemente interrompidas na base. Invólucro de aproximadamente 5 mm de altura; brácteas involucrais externas oblongo-lanceoladas formando um glomérulo denso ou espiga. Flores femininas numerosas, masculinas uma ou duas, estilete bifido ramificado e cutícula não muito longa. Aquênios pilosos e glandulosos. Pappus esbranquiçado (Figura 1) (CABRERA, 1974).

3.1.2.1.2 *Pterocaulon polystachyum* DC.

Erva perene de 50-100 cm de altura, com caule ereto, ramosos na parte superior, alado, densamente folhoso até a inflorescência, densamente glanduloso-pubescente. Folhas sésseis e decurrentes, obovado-lanceoladas ou obovado-oblongas, agudas, de 50-80 mm de comprimento x 20-35 mm de largura. Capítulos muito numerosos, dispostos em amplo ramo de espigas. Invólucro comprimido de 4 mm de altura x 2 mm de diâmetro; brácteas involucrais lanceoladas, as exteriores um pouco glandulosas, as interiores caudado-acuminadas. Flores femininas numerosas. Flores hermafroditas 3-6. Aquênios de 1,2- 1-3 mm de comprimento, glandulosos. Pappus branco (Figura 2) (CABRERA, 1974).

3.1.2.1.3 *Pterocaulon balansae* Chodat

Erva perene de 1-1,5 m de altura, com caule ereto, ramoso, alado, densamente tomentoso, folhoso até a inflorescência. Folhas sésseis e decurrentes, elíptico-lanceoladas, agudas, de 80-120 mm de comprimento x 15-40 mm de largura. Capítulos numerosos, dispostos em forma de espiga. Invólucro comprimido de 5 mm de altura por 3-4 mm de diâmetro; brácteas involucrais exteriores lanceoladas, lanosas; as interiores glabras. Flores femininas numerosas, hermafroditas de 3-5. Aquênios glandulosos-pubescentes. Pappus branco (Figura 3) (CABRERA, 1974).

3.2 ASPECTOS ETNOFARMACOLÓGICOS

Muitas espécies do gênero *Pterocaulon* possuem relatos de serem amplamente utilizadas na medicina popular.

Na medicina tradicional da Argentina, o uso de plantas na forma de infusão e decocção é uma prática comum entre as comunidades rurais e tem aumentado significativamente na população urbana. Partes aéreas das espécies *P. virgatum* (Lam.) DC. e *P. purpurascens* Malme, amplamente distribuídas no norte Argentino, são utilizadas por suas propriedades digestivas, inseticidas, e também como agentes contra picadas de serpentes (MARTINO *et al.*, 1979; DEBENEDETTI *et al.*, 1992; DEBENEDETTI *et al.*, 1994^B; DEBENEDETTI *et al.*, 1998; DEBENEDETTI *et al.*, 1999; MONGELLI *et al.*, 2000).

P. redolens (Forst. F) F. Vill, planta indígena encontrada na região central da Tailândia, também tem uso popular como inseticida e agente contra picadas de serpentes (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003).

A espécie *P. polystachyum*, encontrada no sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina possui relatos de usos na forma de infusões ou decocções como repelente de pulgas e moscas (PALACIOS *et al.*, 1999; CICCIA *et al.*, 2000; VERA *et al.*, 2001).

As espécies *P. sphacelatum* (Labill.) Benth. e *P. serrulatum* (Montr.) Guillaumin têm sido usadas na medicina tradicional pelo povo nativo de diferentes partes da Austrália. São indicadas no tratamento de infecções respiratórias, resfriados comuns, febres, dores de cabeça e doenças de pele. *P. sphacelatum*, é utilizado na terapia de infecções respiratórias na forma de inalação ou vapor. Frequentemente, as folhas verdes frescas amassadas ou moídas, são inseridas na cavidade nasal, sendo também empregada a inalação de folhas secas. As folhas e

os brotos de *P. serrulatum* são usados na forma de decocto para lavagens antissépticas de feridas e cortes, tratamento de eczemas e ulcerações (SEMPLE *et al.*, 1998; SEMPLE *et al.*, 1999; MACLEOD e RASMUSSEN, 1999; FLOWER, 2000).

3.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS

3.3.1 Atividade antimicrobiana

A triagem de extratos de plantas e produtos naturais para atividade antimicrobiana tem demonstrado que plantas superiores representam uma fonte potencial de novos agentes antinfeciosos. A terapia tradicional de antibacterianos está se encaminhando para uma crise devido ao rápido desenvolvimento da resistência aos agentes existentes, o que aumenta consideravelmente a procura por novas e eficazes substâncias com atividade antimicrobiana (SCHER *et al.*, 2004).

Através de fracionamento do extrato heptanólico das partes aéreas de *P. serrulatum*, MACLEOD e RASMUSSEN (1999) demonstraram que a fração éter-dietílica apresentou atividade contra os microrganismos *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Deste extrato foi isolado o sesquiterpeno 14-hidroxi- β -cariofileno, considerado a substância ativa dessa fração.

O estudo das propriedades antimicrobianas da espécie *P. balansae* foi realizado utilizando-se o extrato hidroalcoólico das partes aéreas desta planta, porém não apresentou atividade frente as cepas testadas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Staphylococcus aureus* (HEEMANN *et al.*, 2002).

KANLAYAVATTANAKUL e colaboradores (2003) avaliaram o extrato etanólico das partes aéreas de *P. redolens* quanto à atividade antituberculose, dentre outras. Os produtos isolados foram testados contra o *Mycobacterium*

tuberculosis, onde seis cumarinas e um flavonóide demonstraram ser ativos frente ao microrganismo.

3.3.2 Atividade antiviral

Em 1998, SEMPLE e colaboradores determinaram a atividade antiviral dos extratos de 40 diferentes espécies de plantas utilizadas na medicina tradicional da Austrália, dentre as quais, *P. sphacelatum*, que foi testado contra três tipos de vírus: citomegalovírus humano, Ross River vírus (RRV) e polivírus. Este vegetal é utilizado na Austrália para resfriados, congestão nasal, infecções respiratórias e de pele, e infecções ou inflamações de olhos. O extrato etanólico das partes aéreas de *P. sphacelatum* inibiu mais de 75% a produção do polivírus que ocorreu em uma concentração de 52 µg/mL, considerada não-citotóxica.

Em 1999, SEMPLE e colaboradores realizaram um fracionamento bioquímico do extrato etanólico de *P. sphacelatum*, o que resultou no isolamento do flavonóide crisosplenol C responsável pela atividade antiviral. Este composto demonstrou ser ativo contra um tipo de polivírus utilizado no estudo, em concentração de 0,27 µg/mL, sendo 3,91 µg/mL a concentração máxima não-citotóxica. Crisosplenol C pertence a uma classe de compostos conhecida como 4'-hidroxi-3-metoxiflavonas, considerados potentes e específicos inibidores da replicação picornaviral, incluindo a replicação do rinovírus, o mais freqüente causador de resfriados.

3.3.3 Atividades citotóxica e antiproliferativa

Plantas têm demonstrado ser uma fonte viável de compostos clinicamente relevantes para tratamento de doenças como o câncer. Porém, em muitos sistemas etnomédicos, os relatos de usos de plantas especificamente para um tipo de tumor são raramente encontrados, principalmente porque o câncer é uma doença que

envolve um complexo quadro de sintomas (SOUZA BRITO e SOUZA BRITO, 1993).

MONGELLI e colaboradores (2000) detectaram a atividade citotóxica de algumas plantas utilizadas na medicina tradicional da Argentina com relatos etnobotânicos de uso para tratamento de câncer, entre elas, *P. polystachyum*. Através de um *screening* biológico, os resultados obtidos demonstraram que o extrato diclorometano das partes aéreas de *P. polystachyum* apresentou inibição do crescimento frente a células tumorais utilizadas no estudo, indicando a presença de compostos que interagem com DNA.

Muitos agentes utilizados correntemente na terapia do câncer dispõem de significativa toxicidade e não são específicos. Alternativas em potencial para o tratamento dessa doença incluem agentes que induzem a diferenciação celular. Isto está baseado na hipótese de que muitas células neoplásicas exibem defeitos reversíveis no curso de sua diferenciação, as quais, com tratamento apropriado, resultam em um tumor reprogramado e concomitante diminuição da capacidade proliferativa e indução de diferenciação terminal ou apoptose (LESZCZYŃIECKA *et al.*, 2001).

A atividade citotóxica dos constituintes químicos das partes aéreas de *P. redolens* foi determinada utilizando as linhagens de células de câncer de mama e de pulmão utilizando a técnica de SRB (Sulforodamina B), onde o flavonóide isolado apresentou atividade citotóxica moderada, com IC₅₀ 5,52 e 9,25 µg/mL, respectivamente (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003).

RIVEIRO e colaboradores (2004) testaram o efeito de uma série de extratos de *P. polystachyum* e duas cumarinas 5,6,7-trioxigenadas isoladas da mesma planta, quanto à proliferação e diferenciação de uma linhagem de células leucêmicas humanas. O extrato éter de petróleo foi o único que reduziu significativamente a proliferação celular e induziu a diferenciação das mesmas. O tratamento com as substâncias 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina e 5-(3-metil-2-

buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina, presentes como produtos majoritários no extrato éter de petróleo, mostrou uma inibição na proliferação celular, dependente de tempo e concentração, bem como alterações das propriedades de diferenciação celular. Os autores concluem que a caracterização destes mecanismos pode permitir a identificação dos marcadores moleculares chave deste grupo de compostos, facilitando o desenvolvimento de novas ferramentas farmacológicas de potencial terapêutico para a leucemia.

3.3.4 Atividade inseticida

O uso de extratos de plantas no controle de insetos é de grande interesse para o homem, e representa um método alternativo para minimizar os efeitos nocivos de alguns agrotóxicos em outras espécies de insetos e ao meio ambiente (FATOPE *et al.*, 1993).

Aedes aegypti e *Aedes albopictus* são mosquitos vetores de arbovírus responsáveis pela febre amarela e dengue hemorrágica, endêmicas no sudeste Asiático, ilhas do Pacífico, África e Américas, sendo que no Brasil infestam milhares de municípios. Estudos realizados por CICCIA *et al.* (2000), na Argentina, relatam a ação do extrato diclorometano de *P. polystachyum* como inseticida, apresentando atividade contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*, justificando o uso popular desta planta como inseticida (DEBENEDETTI *et al.*, 1994^A; PALACIOS *et al.*, 1999; MONGELLI *et al.*, 2000).

3.3.5 Outras atividades investigadas

MENDES e colaboradores (1999) utilizaram mais de 60 espécies da família *Asteraceae* para testar a atividade moluscicida. O extrato bruto etanólico de *Pterocaulon alopecuroides* não apresentou atividade contra moluscos do gênero

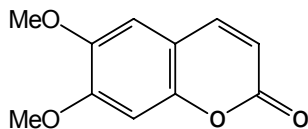
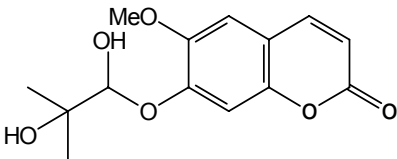
Biomphalaria, hospedeiros intermediários do *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose.

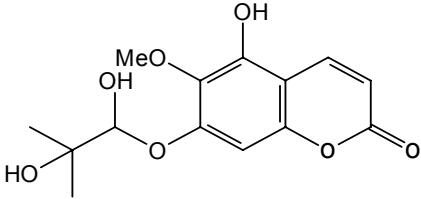
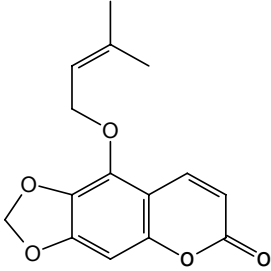
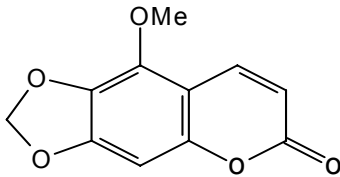
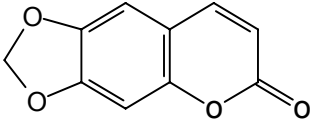
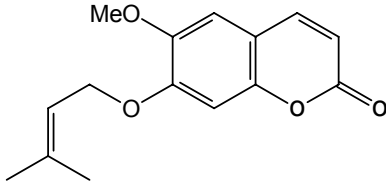
O extrato etanólico das partes aéreas de *P. redolens* foi submetido a testes biológicos para as atividades antimalárica, antifúngica, antivírus herpes simples, antituberculose e citotoxicidade em linhagens de células cancerígenas. Os resultados positivos foram obtidos apenas para os dois últimos testes (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003).

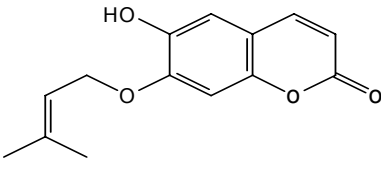
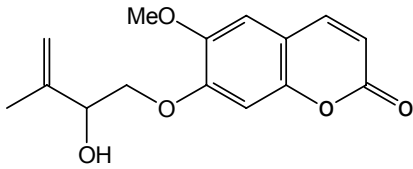
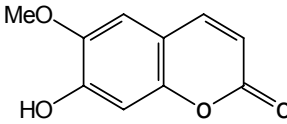
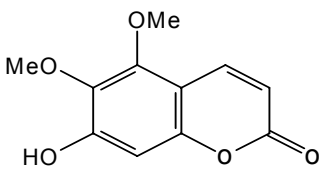
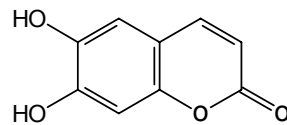
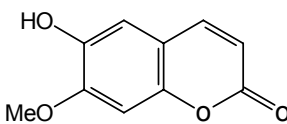
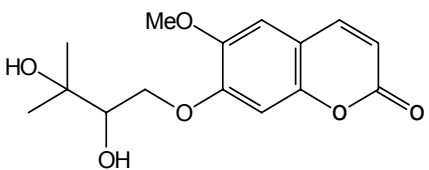
3.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DE *PTEROCAULON*

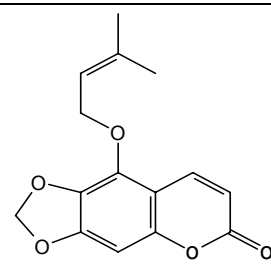
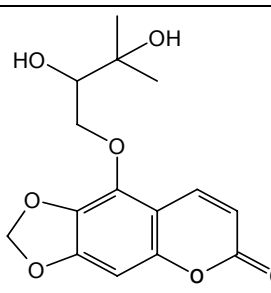
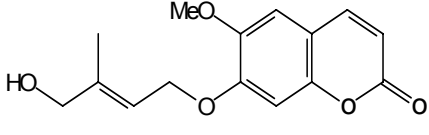
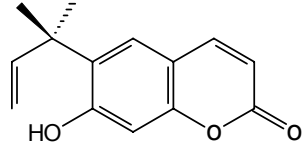
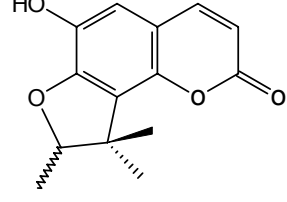
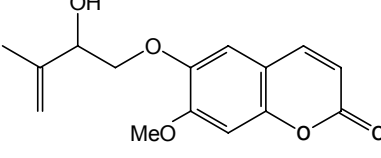
Dentre os compostos encontrados nas espécies do gênero *Pterocaulon*, há relatos de isolamento de monoterpenos, sesquiterpenos, flavonóides, poliacetilenos (VILEGAS *et al.*, 1995), ácido caféico, ácido clorogênico, ácido isoclorogênico e ácido 3,4-dicafeoilquínico (DEBENEDETTI *et al.*, 1999). Entretanto, a ampla maioria dos trabalhos se refere ao isolamento de cumarinas. A tabela a seguir (tabela 2) apresenta as estruturas das cumarinas que já foram encontradas para as espécies deste gênero.

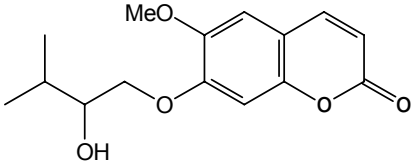
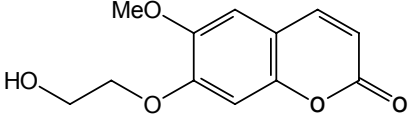
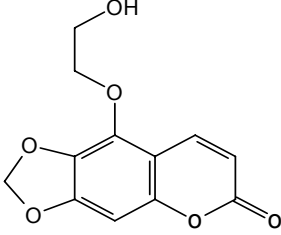
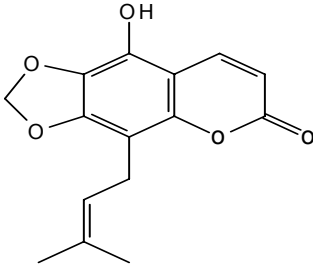
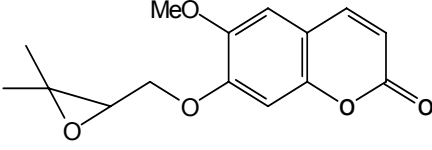
Tabela 2. Estruturas das cumarinas citadas para o gênero *Pterocaulon*.

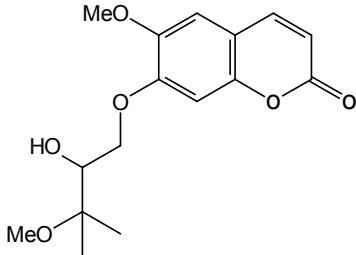
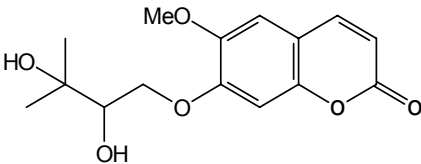
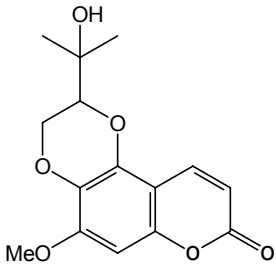
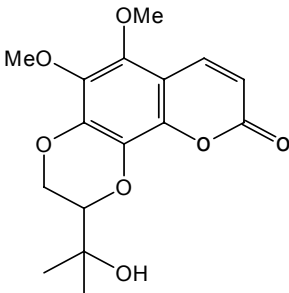
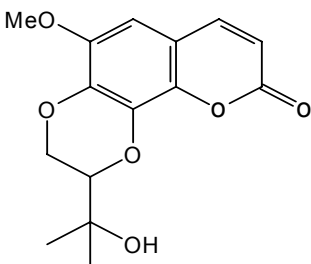
Substâncias	Estruturas	Fontes	Referências
Escoparona		<i>P. sphacelatum</i>	Johns <i>et al.</i> , 1968
7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina		<i>P. alopecuroides</i>	Vilegas <i>et al.</i> , 1995
		<i>P. balansae</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
		<i>P. lanatum</i> KUNTZE	Magalhães <i>et al.</i> , 1981

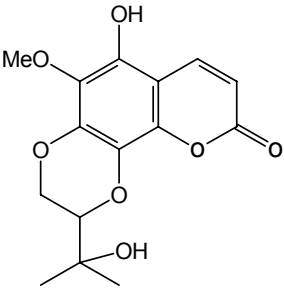
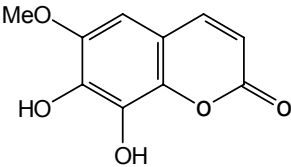
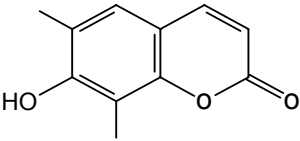
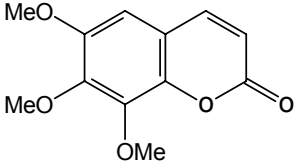
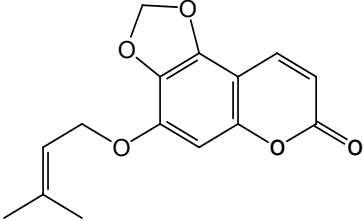
<p>7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxicumarina</p>		<p><i>P. alopecuroides</i></p>	<p>Vilegas <i>et al.</i>, 1995</p>
<p>5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Palacios <i>et al.</i>, 1999 Riveiro <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Palacios <i>et al.</i>, 1999 Vera <i>et al.</i>, 2001 Riveiro <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>lapina</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Palacios <i>et al.</i>, 1999 Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>7-(3-metil-2-buteniloxi)-6-metoxicumarina (preniletina-metil-éter)</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Palacios <i>et al.</i>, 1999 Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
		<p><i>P. virgatum</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1998</p>

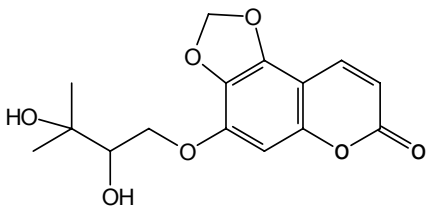
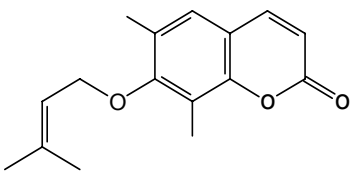
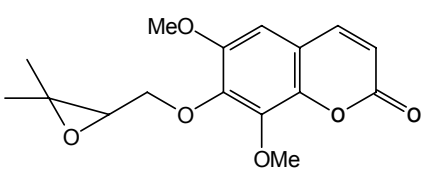
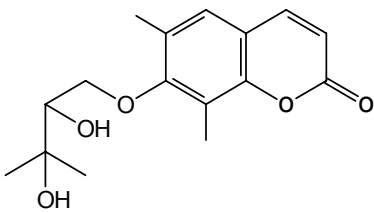
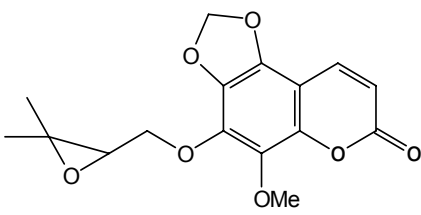
Preniletina		<i>P. polystachyum</i>	Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001
Virgatenol		<i>P. polystachyum</i>	Palacios <i>et al.</i> , 1999 Vera <i>et al.</i> , 2001
		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1998 Demyttenaere <i>et al.</i> , 2004
Escopoletina		<i>P. polystachyum</i>	Palacios <i>et al.</i> , 1999
		<i>P. virgatum</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1998 Demyttenaere <i>et al.</i> , 2004
5-metoxiescopoletina		<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanakul <i>et al.</i> , 2003
Esculetina		<i>P. polystachyum</i>	Palacios <i>et al.</i> , 1999
Isoescopoletina		<i>P. polystachyum</i>	Vera <i>et al.</i> , 2001
Obtusinina		<i>P. polystachyum</i>	Vera <i>et al.</i> , 2001

<p>5-(3,3-dimetilaliloxi)-6,7-metilenodioxicumarina</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>5-(2',3'-diidroxil-3-metilbutanoxi)-6,7-metilenodioxicumarina</p>		<p><i>P. virgatum</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1997</p>
		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
		<p><i>P. redolens</i></p>	<p>Kanlayavattanakul <i>et al.</i>, 2003</p>
<p>Metil eter haplopinol</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxicumarina</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>Desmetilniexoutina</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Vera <i>et al.</i>, 2001</p>
<p>Isovirgatenol</p>		<p><i>P. polystachyum</i></p>	<p>Vera <i>et al.</i>, 2001</p>

3'-desoxiobtusina		<i>P. polystachyum</i>	Vera <i>et al.</i> , 2001
6-metoxi-7-(2'-hidroxietoxi)-cumarina		<i>P. polystachyum</i>	Vera <i>et al.</i> , 2001
5-(2'-hidroxietoxi)-6,7-metilenodioxicumarina		<i>P. polystachyum</i>	Vera <i>et al.</i> , 2001
5-hidroxi-6,7-metilenodioxi-8-(3,3-dimetilalil) cumarina		<i>P. polystachyum</i>	Vera <i>et al.</i> , 2001
7-(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxicumarina		<i>P. virgatum</i>	Bohlmann <i>et al.</i> , 1981 Demyttenaere <i>et al.</i> , 2004
	<i>P. balansae</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981	

<p>Virgatol</p>		<p><i>P. virgatum</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1998 Demyttenaere <i>et al.</i>, 2004</p>
<p>7-(2,3-diidroxi-3-metilbutoxi)-6-metoxicumarina</p>		<p><i>P. virgatum</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1999</p>
		<p><i>P. lanatum</i></p>	<p>Magalhães <i>et al.</i>, 1981</p>
		<p><i>P. balansae</i></p>	
<p>Isopurpurasol</p>		<p><i>P. virgatum</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1999</p>
<p>Purpurenol</p>		<p><i>P. purpurascens</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1991</p>
<p>Purpurasol</p>		<p><i>P. purpurascens</i></p>	<p>Debenedetti <i>et al.</i>, 1992</p>

Purpurazolol		<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1996
Fraxetina		<i>P. purpurascens</i>	Debenedetti <i>et al.</i> , 1996
Isofraxidina		<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanakul <i>et al.</i> , 2003
6,7,8-trimetoxicumarina		<i>P. serrulatum</i>	Macleod e Rasmussen, 1999
	<i>P. sphacelatum</i>	Semple <i>et al.</i> , 1999	
7-(3-metil-2-buteniloxi)-5,6-metilenodioxicumarina		<i>P. balansae</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981

7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)5,6-metilenodioximarina		<i>P. balansae</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
		<i>P. lanatum</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
Puberulina		<i>P. balansae</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
		<i>P. lanatum</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
		<i>P. redolens</i>	Kanlayamattanukul <i>et al.</i> , 2003
2',3'-epoxipuberulina		<i>P. lanatum</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
2',3'-diidroxipuberulina		<i>P. redolens</i>	Kanlayavattanukul <i>et al.</i> , 2003
7-(3-metil-2,3-epoxibutiloxi)-5,6-metilenodioximarina		<i>P. balansae</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981
		<i>P. lanatum</i>	Magalhães <i>et al.</i> , 1981

Observa-se que as cumarinas encontradas nas espécies deste gênero são classificadas como cumarinas simples, a maioria 6-7 dioxigenadas, e muitas destas relatadas como novos produtos naturais. *Pterocaulon* é o único gênero pertencente à tribo Plucheeae que apresenta cumarinas em sua composição. Já foram isoladas cumarinas de 9 espécies, totalizando 40 diferentes compostos.

VERA e colaboradores (2001) descreveram que as partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum*, coletadas na Província de Chaco, Argentina, forneceram 17 cumarinas, sendo que duas delas são citadas como novos produtos naturais: 6-(1,1-dimetil-2-propenil)-7-hidroxycumarina e desmetilniesoutina. Os autores ainda relataram o isolamento de cinco novas cumarinas para a espécie *P. polystachyum*: isovirgatenol, 3-desoxiobtusina, 6-metoxi-7-(2-hidroxietoxi)-cumarina, 5-(2-hidroxietoxi)-6,7-metilenodioxycumarina e uma substância, para a qual foi proposta a estrutura da 5-hidroxi-6,7-metileno-dioxi-8-(3,3-dimetilalil)-cumarina.

A partir do extrato aquoso-metanólico das partes aéreas de *Pterocaulon virgatum*, há relatos de isolamento do ácido 3,4-dicafeoilquínico (MARTINO *et al.*, 1979) e do extrato éter de petróleo, duas cumarinas já conhecidas foram isoladas (DEBENEDETTI *et al.*, 1994^B). DEBENEDETTI e colaboradores (1998), relataram duas novas cumarinas denominadas virgatenol e virgatol dos extratos éter de petróleo e clorofórmio de *P. virgatum*, bem como outras quatro cumarinas conhecidas. Isopurpurasol, uma nova cumarina 5,6,7-trioxigenada foi encontrada no extrato clorofórmico desta espécie, sendo este produto um novo isômero de purpurasol, isolado de *P. purpurascens* (DEBENEDETTI *et al.*, 1999).

Para a espécie *Pterocaulon purpurascens*, há relatos do isolamento de seis flavonóides do extrato diclorometano os quais foram identificados como quercetina, isoramnetina e derivados de quercetageninas: quercetagenina-3,7,4'-trimetil éter, quercetagenina-3,7-dimetil éter, quercetagenina-3,3'-dimetil éter e quercetagenina-3,7-dimetil éter (DEBENEDETTI *et al.*, 1987). Ainda para a espécie *P.*

purpurascens, ácido cafeoilquínico (DEBENEDETTI *et al.*, 1987), duas novas cumarinas tetraoxigenadas denominadas purpurenol (DEBENEDETTI *et al.*, 1991) e purpurasol (DEBENEDETTI *et al.*, 1992) e uma nova cumarina tetraoxigenada denominada purpurasolol (DEBENEDETTI *et al.*, 1996). BOEYKENS e col. (1994), relatam que a determinação da estrutura do purpurasol foi baseada na similaridade dos dados espectroscópicos da substância purpurenol, estabelecida inequivocadamente por análise de difração de raios-X. Através de análise de dados espectroscópicos e espectrométricos, os autores determinaram que obtusivol, cumarina isolada de *Haplophyllum obtusifolium* é um composto idêntico ao purpurasol.

VILEGAS e colaboradores (1995) isolaram das partes aéreas de *P. alopecuroides*, duas cumarinas oxipreniladas, e um flavonol 3,5,3',4'-tetra-hidroxi-7-(2,3-em-3-metilbutiloxi)-2,3-diidroflavonol. Neste trabalho, os autores isolaram e identificaram também monoterpenos, sesquiterpenos e poliacetilenos, já relatados para outras espécies: *P. sphacelatum*, *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. virgatum* e *P. rugosum* (Vahl) Malme.

SEMPLE e colaboradores (1999) isolaram e identificaram, juntamente com a cumarina 6,7,8-trimetoxicumarina que nunca havia sido relatada para a espécie, o flavonóide crisosplenol C (3, 7, 3' trimetoxi, 5, 6, 4' triidroxiflavona), pertencente ao grupo das 4'-hidroxi-3-metoxiflavonas, obtido do fracionamento do extrato etanólico de *P. sphacelatum*. Os compostos pertencentes a este grupo apresentam atividade inibitória potente e específica sobre a replicação do polivírus, e também do rinovírus, sendo o último o mais freqüente causador dos resfriados comuns. Os autores também detectaram a presença da cumarina 6,7-dimetoxicumarina, e quantidades majoritárias de limoneno e cariofileno no óleo volátil da espécie.

MACLEOD e RASMUSSEN (1999) realizaram um estudo com *Pterocaulon serrulatum*, uma espécie utilizada na medicina tradicional da Austrália. Os compostos isolados e identificados desta espécie foram: um novo derivado de β -

cariofileno, o 4,5-epoxi-1,3-hidroxi- β -cariofileno, o 14-hidroxi- β -cariofileno, e a 5,7-diidroxiflavanona, isolados da mesma fonte.

Os extratos obtidos com éter dietílico e éter de petróleo das partes aéreas de *P. balansae* e *P. lanatum*, forneceram além de outras cumarinas conhecidas, quatro novas cumarinas: 7-(3-metil-2-buteniloxi)-5,6-metilenodioxicumarina, 7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-5,6-metilenodioxicumarina, 2',3'-epoxipuberulina e 2',3'-diidroxipuberulina (MAGALHÃES *et al.*, 1981).

Estudo feito com os constituintes químicos de *P. redolens* resultou no isolamento de dez compostos, entre estes sete cumarinas e três flavonóides. Foi o primeiro relato do isolamento como produto natural da cumarina denominada 2',3'-diidroxipuberulina, somente obtida anteriormente através de síntese (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003).

3.5 ASPECTOS QUIMIOTAXONÔMICOS

A presença de certos compostos em determinados grupos de plantas é de grande importância nos estudos sobre evolução. A existência de metabólitos secundários indica que as espécies que os sintetizam possuem uma rota biossintética específica e um gene ou um conjunto de genes específicos controlando essa rota. Assim, a existência de um padrão comum no metabolismo secundário pode prover evidências mais corretas de parentesco do que certas similaridades morfológicas (VON POSER e MENTZ, 2003).

FRITZ e colaboradores (2003) realizaram recente estudo sobre a ocorrência das cumarinas em Asteraceae. Para as espécies pertencentes a esta família, foram encontrados relatos da ocorrência de aproximadamente 150 produtos desta classe de substâncias, com predomínio de cumarinas simples. *Pterocaulon*, pertencente à tribo *Plucheeae*, foi o único gênero desta tribo que apresentou este tipo de compostos.

3.6 CUMARINAS

Dentre os constituintes químicos presentes nas espécies de *Pterocaulon*, as cumarinas parecem ser os compostos majoritários encontrados para o gênero, isolados das partes aéreas dessas plantas. Assim, torna-se interessante destacar alguns aspectos sobre as características químicas e biológicas dessas substâncias.

3.6.1 Aspectos químicos

Mais de 1.300 cumarinas já foram identificadas em fontes naturais como fungos, bactérias e plantas, principalmente em espécies das famílias Asteraceae, Apiaceae, Moraceae e Rutaceae. Compreendem o grande grupo de compostos conhecidos como benzopironas, que consiste no anel benzeno unido ao anel pirano, sendo o representante mais simples e o mais encontrado, a cumarina, também conhecida como 1,2-benzopirona. As propriedades farmacológicas, bioquímicas e aplicações terapêuticas das cumarinas dependem de seus padrões de substituição (HOULT e PAYÁ, 1996).

Cumarinas podem ser encontradas naturalmente em combinação com açúcares, como glicosídeos. São classificadas como “simples” – que são as hidroxiladas, alcoxiladas e alquiladas, derivadas da cumarina, juntamente com seus glicosídeos; “furanocumarinas” - compostos constituídos por um anel furano ligado ao núcleo cumarínico, dividido em tipos angulares e lineares com substituintes em uma ou ambas as posições benzênicas restantes; “piranocumarinas” - análogos a furanocumarinas, porém contendo anel de seis membros e cumarinas substituídas no anel pirano (MURRAY *et al.*, 1982).

Como outros fenilpropanóides, as cumarinas são derivadas do metabolismo da fenilalanina, sendo um de seus primeiros precursores o ácido *p*-hidroxi-cinâmico (ácido *p*-cumarínico). O processo inicia com a hidroxilação na posição C-2' (*orto*-

hidroxilação), isomerização fotocatalizada e em seguida a lactonização espontânea. Em alguns raros casos, ocorre a glicosilação do ácido *p*-hidroxi-cinâmico, excluindo a lactonização. Nestes casos, as cumarinas somente são formadas sob injúria tecidual e hidrólise enzimática. A formação das cumarinas di- e trihidroxiladas e de seus éter-derivados envolve a hidroxilação da umbeliferona (7-hidroxi-cumarina). Estes grupos hidroxilas podem ser metilados, glicosilados, ou até mesmo prenilados. A prenilação do anel benzênico pelo grupamento dimetilalil pirofosfato nas posições C-6 do derivado 7-hidroxi-cumarina conduz à formação de pirano ou furanocumarinas lineares, e na posição C-8 são formados os homólogos angulares. (OJALA, 2001; KUSTER e ROCHA, 2003).

3.6.2 Propriedades farmacológicas das cumarinas

As cumarinas possuem uma extensa variedade de efeitos farmacológicos incluindo anticoagulante, estrogênico, fotossensibilizante, antimicrobiano, anti-helmíntico, vasodilatador, moluscicida, sedativo, hipnótico, analgésico e hipotérmico e os humanos estão diariamente expostos a estas substâncias, presentes em frutas ou plantas (HOULT e PAYÁ, 1996; OJALA, 2001).

3.6.2.1 Atividade antimicrobiana

Diversas cumarinas simples, furanocumarinas e produtos derivados de síntese foram testados quanto a atividade antifúngica. Angelicina, bem como seus derivados sintéticos, demonstraram satisfatória atividade antifúngica, e os autores concluíram que as modificações estruturais feitas nas moléculas direcionaram para uma maior atividade antifúngica ou antibacteriana (SARDARI *et al.*, 1999). Extratos e cumarinas obtidos de *Mitracarpus scaber* mostraram atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como contra fungos (BISIGNANO *et al.*, 2000).

3.6.2.2 Atividade antiinflamatória

HOULT e colaboradores (1994) descrevem que as cumarinas fraxetina, esculetina, 4-metilesculetina, dafnetina e 4-metildafnetina inibem a geração do leucotrieno B₄, um dos precursores da síntese das prostaglandinas, que fazem parte dos mediadores da inflamação. Em outro experimento, LINO *et al.* (1997) testaram a cumarina (1,2-benzopirona) e a umbeliferona (7-hidroxicumarina) frente à inflamação induzida por carragenina, as quais demonstraram possuir mecanismo de ação similar aos antiinflamatórios não esteróides (AINES).

Cumarinas também demonstraram ter eficácia frente a edema de pata de ratos, induzido por dextrano. Ostol, isolado de *Angelica archangelica*, *A. pubescens* e *Atractyloides lancea*, demonstrou ser inibidor seletivo *in vitro* da 5-lipoxigenase, que catalisa a peroxidação do ácido araquidônico, bloqueando a síntese das prostaglandinas (RESCH *et al.*, 1998).

Columbianadina, acetato de columbianetina, bergapteno e umbeliferona isolados de *Angelica pubescens* demonstraram atividade antiinflamatória e analgésica em ratos (CHEN *et al.*, 1995). GARCIA-ARGAEZ e colaboradores (2000) relatam atividade antiinflamatória para ostol e xantotoxina, e para isoimperatorina apenas a analgésica. Os autores concluíram ainda que cumarinas podem exercer efeito pró-inflamatório, pois baixas doses de psoraleno e imperatorina demonstraram atividade antiinflamatória, porém altas doses das substâncias promoveram a inflamação.

3.6.2.3 Atividade antitumoral

Estudos recentes demonstraram que extratos de plantas contendo cumarinas apresentaram atividade inibitória sobre o crescimento de um número significativo de células malignas *in vitro*. Em tumores sensíveis, cumarinas e seus

derivados causam mudanças significativas na regulação da resposta imune, crescimento e diferenciação celular. Recentemente, diversas cumarinas têm sido relatadas como anti-tumorais e sinérgicas com os ácidos *trans* retinóicos, usados no tratamento de pacientes com leucemia promielocítica aguda, na diferenciação de células leucêmicas humanas (RIVEIRO *et al.*, 2004).

Outros estudos demonstraram a inibição do crescimento de várias linhagens de células tumorais malignas *in vitro*, pelo extrato da raiz de *Angelica japonica*, o qual continha escopoletina, bergapteno, japoangelona e xantotoxina (FUJIOKA *et al.*, 1999) e do extrato metanólico de *Tordylium apulum*, o qual continha umbeliferona, isoimperatorina e derivado de angelicina. Esses produtos demonstraram atividade frente às linhagens de células KB (câncer rinofaríngeo humano) e NSCLC-N6 (carcinoma humano brônquico epidermal) (KOFINAS *et al.*, 1998).

3.6.2.4 Fototoxicidade

As furanocumarinas, como a maioria das cumarinas, são substâncias altamente reativas sob a incidência da luz, sendo utilizadas desde épocas remotas para o tratamento de doenças de pele, tais como psoríase, hanseníase, vitiligo, leucoderma, micoses, dermatite e eczemas. A xantotoxina, isolada de *Ammi majus*, foi a primeira a ser introduzida no tratamento do vitiligo, a mais de 50 anos. A terapia de uso tópico ou oral destas cumarinas (ex. metoxsaleno, trioxisaleno), seguida de exposição controlada a radiação ultravioleta para tratamento de diversas dermatoses é bastante empregada na atualidade (DIAWARA e TRUMBLE, 1997).

Furanocumarinas absorvem fortemente energia na região do ultravioleta (UV) e por isso, são altamente reativas sob a incidência da luz. Após absorção da luz, formam moléculas que se ligam às bases pirimídicas do DNA causando mutações citoplasmáticas. Essa capacidade das furanocumarinas reagirem quando

fotoativadas com os blocos construtores do organismo vivo constitui a base para a compreensão de sua toxicidade para mamíferos, insetos, vírus, bactérias, fungos e até mesmo para outras plantas (HOULT e PAYÁ, 1996).

A utilização das furanocumarinas necessita de uma avaliação do risco-benefício, uma vez que o uso terapêutico dessas substâncias está relacionado à incidência crescente de câncer de pele, conferindo-lhes toxicidade (DIAWARA e TRUMBLE, 1997).

3.6.2.5 Outras atividades

Os derivados da 4-hidroxi-cumarina destacam-se na área de medicamentos. A Varfarina®, importante fármaco que deriva do núcleo básico das 4-hidroxi-cumarinas, clinicamente utilizado como anticoagulante e largamente empregado como rodenticida, teve sua descoberta durante a investigação de uma doença hemorrágica no gado alimentado com o trevo-de-cheiro-amarelo fermentado (*Melilotus officinalis*), devido à ação anticoagulante do dicumarol, composto do qual deriva (HOULT e PAYÁ, 1996). Esse foi o primeiro fármaco com essa ação por via oral e constituiu o modelo para o desenvolvimento de uma classe de anticoagulantes com o núcleo básico da 4-hidroxi-cumarina (HARDMANN e LIMBIRD, 1996).

A escoparona (6,7-dimetoxi-cumarina) (Figura 4), isolada da planta chinesa *Artemisia scoparia* (Asteraceae), demonstrou atividades imunossupressora, relaxante vascular, hipolipidêmica e hipotensora. Ostol (7-metoxi-8-[3-metilpent-2-enil]cumarina), também utilizado na medicina chinesa, causa hipotensão *in vivo*, inibe a agregação plaquetária, e possui atividade relaxante da musculatura lisa e cardíaca, o que pode ser atribuído a sua interferência no influxo de cálcio e inibição das enzimas cAMP e cGMP-fosfodiesterases (HOULT e PAYÁ, 1996).

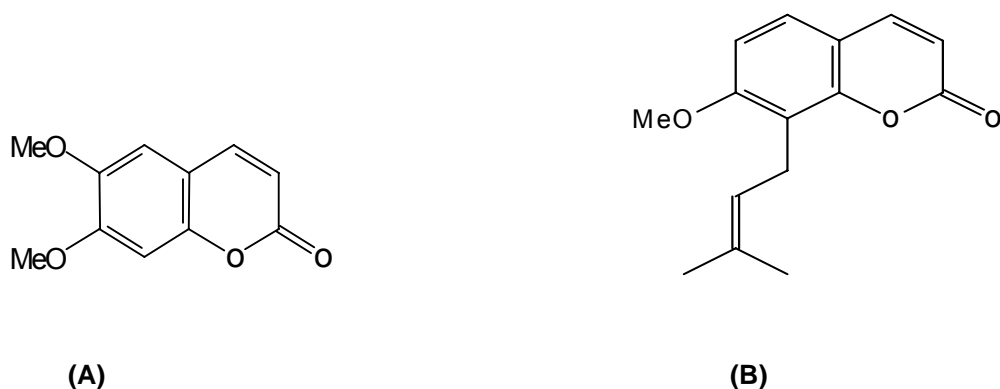


Figura 4. Estruturas das cumarinas escoparona (A) e ostol (B)

A aplicação de cumarinas e derivados tem demonstrado vantagens em várias análises, como estimativas de atividade enzimática, marcadores de proteínas, anticorpos, DNA e lipídios, marcadores químicos, entre outros devido à característica fluorescência destas substâncias (OJALA, 2001).

3.6.3 O papel das cumarinas como fitoalexinas

Os vegetais possuem suas próprias defesas que os protegem de outras plantas, insetos fitófagos e herbívoros predadores de uma maneira geral. As fitoalexinas são substâncias com propriedades antimicrobianas produzidas pelas plantas quando estas são infectadas por microrganismos fitopatogênicos como vírus, bactérias e fungos, ou quando as plantas estão sob condições de estresse, como seca, frio, ação de luz ultravioleta, etc. As fitoalexinas aparecem, geralmente, em altas concentrações em resposta à infecção, desempenhando nas plantas um papel semelhante ao dos anticorpos nos animais (PINTO *et al.*, 2002).

Em trabalho realizado por ZEID (2002), foram relatadas cinco cumarinas, produzidas como fitoalexinas através de estresse metabólico das folhas de *Corchorus olitorius*, L. (Tiliaceae), em resposta à inoculação de uma suspensão de

esporos do fungo *Helminthosporium turcicum* e dos agentes químicos cloridrato de mercúrio e cloridrato de chumbo em suspensão. Os compostos foram isolados, purificados e identificados como escopoletina, fraxinol, isopimpinelina, xantotoxol e peucedanol, e testados quanto a atividade antimicrobiana. Todas as cumarinas apresentaram boa atividade frente aos microrganismos utilizados no estudo, o que demonstrou que estes resultados estão em concordância com os relatos de que muitas cumarinas são produzidas nas plantas como fitoalexinas, em resposta a uma infecção ou estresse.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas das espécies de *Pterocaulon* foram coletadas no município de Guaíba/RS em março de 2003 com o auxílio do botânico Dr. Nelson Matzembacker (Programa de Pós-graduação em Botânica-Universidade Federal do Rio Grande do Sul). O material testemunho está depositado no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN): *P. alopecuroides* (Lam.) DC. (136583); *P. angustifolium* DC. (136587); *P. balansae* Chodat (136589); *P. cordobense* OK. (136588); *P. lorentzii* Malme (136586) *P. polypterum* (D.C.) Cabrera (136585); *P. polystachyum* D.C. (136584) e *P. rugosum* (Vahl) Malme (136590).

Em virtude da dificuldade de se obter quantidade suficiente de todas as espécies de *Pterocaulon* nativas do Rio Grande do Sul, além de *P. alopecuroides*, planta indicada no estudo etnoveterinário, optou-se por coletar quantidades maiores das espécies *P. balansae* e *P. polystachyum*, encontradas com facilidade nas áreas em que foram coletadas. Das outras espécies, coletou-se material suficiente para avaliar o perfil cromatográfico. O material vegetal, após a coleta, foi selecionado, seco em ambiente arejado e ao abrigo da luz direta. Parte das amostras vegetais foi triturada em moinho de facas. Este material foi utilizado para análise fitoquímica e para a avaliação da atividade antifúngica.

4.2 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes empregados no desenvolvimento do trabalho foram de procedência Merck[®], Reagen[®], Roth[®] e Grupo Química[®].

Os fracionamentos em coluna cromatográfica foram realizados empregando-se gel de sílica 60, de procedência Merck[®], com tamanho de partícula entre 35-75 mesh-ATSM.

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) preparativas foram utilizadas placas de vidro (20x20 cm), preparadas no laboratório com auxílio de conjunto Desaga[®], tendo como adsorvente gel de sílica GF₂₅₄, de procedência Merck[®].

Para as cromatografias em camada delgada analíticas foram usadas cromatofolhas de alumínio em gel de sílica 60 F₂₅₄ (20 x 20 cm) de procedência Merck[®].

4.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

4.3.1 Extratos para análise do perfil cromatográfico das espécies de *Pterocaulon*

O perfil cromatográfico das espécies de *Pterocaulon*, nativas do Rio Grande do Sul, foi avaliado em extratos obtidos com aproximadamente 10 g das partes aéreas de cada amostra, submetidos à maceração estática durante três dias em diclorometano, com uma relação droga/solvente 1:10.

4.3.2 Extratos para análise fitoquímica

Para a análise fitoquímica foram obtidos dois tipos de extratos: um deles, preparado com a planta rasurada, forneceu extratos com grande quantidade de clorofila optando-se, então, por utilizar o método de imersão do material intacto em solventes orgânicos para obtenção dos produtos da superfície foliar. Para tanto, 100 g das partes aéreas inteiras e secas das espécies em estudo foram submetidas à imersão em 1000 mL de diclorometano por duas vezes consecutivas, durante aproximadamente 15 segundos. Esta técnica permite a extração dos produtos da

superfície de folhas e ramos, com a mínima interferência de outros compostos como a clorofila.

4.3.3 Extratos para análise da atividade antifúngica

4.3.3.1 Preparação dos extratos brutos

Inicialmente, o material vegetal seco e moído das espécies *Pterocaulon alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* foi submetido, por três períodos de 24 horas, a extração com metanol, por maceração estática (relação droga/solvente 1:10), para obtenção dos extratos brutos metanólicos, os quais foram evaporados à secura, em evaporador rotatório, sob pressão reduzida.

4.3.3.2 Preparação das frações

As frações foram obtidas extraíndo sucessivamente o material vegetal (aproximadamente 50 g) com hexano, diclorometano e metanol, em aparelho de Soxhlet por 12h. Os extratos foram evaporados até secura total, sob pressão reduzida, com rendimento de 3,5 – 4,5% (extrato hexânico), 3,5–4,0% (extrato diclorometano) e 4,5 – 6,0% (extrato metanólico), respectivamente.

4.4 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

4.4.1 Extratos diclorometano de superfície foliar

Através de cromatografias analíticas em camada delgada foram analisados os perfis cromatográficos dos extratos diclorometano das partes aéreas de todas as espécies de *Pterocaulon* utilizadas no estudo e os sistemas eluentes foram diclorometano (100%), diclorometano:metanol (99:1; 98:2; 97:3 e 95:5 v/v). Como

agentes reveladores foram utilizadas lâmpada de luz ultravioleta (UV) (254 e 366 nm) e anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento.

4.4.2 Extratos submetidos a avaliação da atividade antifúngica

Os extratos metanólicos brutos e as frações hexanólica, diclorometano e metanólica foram analisadas utilizando-se os sistemas cromatográficos apresentados no item anterior.

4.5 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS

4.5.1 Métodos cromatográficos empregados para o isolamento

Para o isolamento das substâncias dos extratos diclorometano obtidos da superfície das partes aéreas, foram empregados métodos cromatográficos tais como cromatografia em coluna de gel de sílica, usando como eluente diclorometano e metanol, em mistura de polaridade crescente. As frações obtidas foram monitoradas através de CCD analítica e a purificação foi feita através de CCD preparativa.

4.5.2 Elucidação estrutural

Para a elucidação estrutural foram utilizados métodos espectroscópicos. Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C), das substâncias (PA1 e PA2) de *P. alopecuroides*, foram obtidos na Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, Amiens, França. Os espectros dos produtos obtidos de *P. polystachyum* (PP1 e PP2) foram obtidos no Setor de Química de Produtos Naturais, LCQUI/CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes (RJ).

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

4.6.1 Microrganismos e meios

Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos brutos, frações e produtos isolados, foram usadas cepas da American Type Culture Collection, Rockville, MD, EUA (ATCC) e do CEREMIC (C), Centro de Referência Micológica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacêuticas, Rosário, Argentina: *Candida albicans* ATCC10231, *C. tropicalis* C131, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763, *Cryptococcus neoformans* ATCC32264, *Aspergillus flavus* ATCC9170, *A. fumigatus* ATCC26934, *A. niger* ATCC9029, *Trichophyton rubrum* C110, *T. mentagrophytes* ATCC9972, e *Microsporum gypseum* C115. Os microorganismos foram crescidos em ágar inclinado de Sabouraud-cloranfenicol, por 48h a 30°C.

4.6.2 Testes de susceptibilidade antifúngica

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para cada extrato e produto isolado foi determinada usando a técnica de microdiluição do caldo em microplacas de 96 poços como descrito pelo Comitê Nacional para Padrões de Laboratórios Clínicos para leveduras (M27-A2) (NCCLS, 2002^A) e para fungos filamentosos (M 38 A) (NCCLS, 2002^B). Os valores de CIMs foram determinados em meio de cultura apropriado - RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, EUA), tamponado (pH 7,0) com MOPS (ácido morfopropileno sulfônico). A inoculação inicial foi de aproximadamente 1×10^3 a 5×10^3 UFC/mL (UFC= unidades formadoras de colônias). As placas foram mantidas em câmara escura a 35°C para o desenvolvimento de leveduras e hialofitomicetos, e a 28-30°C para dermatófitos. A CIM foi definida como concentração inibitória mínima da amostra a qual resultou na total inibição do crescimento dos fungos, após um período de 48 h de incubação. A susceptibilidade das drogas utilizadas como padrões cetoconazol, terbinafina e anfotericina B foi

definida como a concentração mais baixa do fármaco a qual resulta na total inibição do crescimento do fungo.

Para os ensaios, as amostras dos extratos e dos compostos isolados foram solubilizadas em DMSO (concentração final de 1%) e submetidas a uma série de duas diluições com RPMI 1640, obtendo-se concentrações entre 800-0,98 $\mu\text{g/mL}$, com volume final de 100 μL . Este volume (100 μL) foi adicionado a cada halo, com exceção do controle, onde a água esterilizada foi adicionada ao poço. A CIM foi definida como a concentração inibitória mínima do extrato e do produto que resultou em total inibição do crescimento do fungo.

Para a realização da avaliação antifúngica com os ensaios de microdiluição em caldo, as concentrações dos extratos até 1000 $\mu\text{g/mL}$ foram incorporados aos meios de crescimento seguindo as diretrizes do NCCLS (2002^A; 2002^B). A concentração inibitória mínima considerada ativa para os extratos com foi CIM \leq 800 e para os produtos isolados, CIM \leq 200 $\mu\text{g/mL}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE QUÍMICA

A análise cromatográfica dos extratos obtidos com as plantas trituradas demonstrou que esse método fornece extratos com ampla variedade de substâncias e grande quantidade de clorofila, optando-se, assim, por trabalhar com extratos obtidos da superfície foliar.

Através de análises cromatográficas preliminares das frações apolares das espécies em estudo detectou-se a presença de substâncias com perfil cromatográfico de cumarinas, o que vem de encontro a dados da literatura uma vez que esses são os compostos mais citados para as espécies de *Pterocaulon*.

5.1.1 Análise e isolamento das substâncias

5.1.1.1 *P. alopecuroides*

Dentre as espécies estudadas, o extrato diclorometano de *P. alopecuroides* foi submetido a fracionamento por meio de coluna cromatográfica, utilizando-se uma mistura de diclorometano e metanol com gradiente de concentração variável em polaridade crescente, iniciando com diclorometano 100% até o gradiente de 50:50 (diclorometano: metanol), obtendo-se 260 frações. O monitoramento das frações obtidas foi realizado através de CCD analítica e demonstrou a presença de substâncias com adequado grau de pureza entre as frações 49 a 66 (gradiente de eluição 99:1), e 101 a 108 (gradiente de eluição 98:2). As frações 49 a 66 foram reunidas resultando numa substância pura codificada como PA1. As frações 101 a 108, também reunidas, foram novamente submetidas a um fracionamento em coluna cromatográfica com o mesmo gradiente de eluição que resultou em uma substância pura, codificada como PA2. As duas substâncias foram submetidas a análise espectroscópica.

5.1.1.2 *P. polystachyum*

O extrato diclorometano das partes aéreas intactas de *P. polystachyum* foi fracionado através de coluna cromatográfica com diclorometano e metanol em gradiente de eluição, iniciando-se como diclorometano 100%. Desta coluna foram obtidas 300 frações que foram monitoradas através de CCD analítica demonstrando a presença de frações com perfil cromatográfico semelhante. As frações 29 a 73 (gradiente de eluição 99:1) e 95 a 145 (gradiente de eluição 98:2) foram reunidas e os produtos majoritários, codificados como PP1 e PP2, foram isolados através de CCD preparativa e enviados para análise espectroscópica.

5.1.1.3 *P. balansae*

Através de coluna cromatográfica com gradiente de eluição variável (diclorometano:metanol), do extrato diclorometano das partes aéreas de *P. balansae*, obteve-se 230 frações. Da mesma forma como a coluna anterior, foi realizado um monitoramento através de CCD analítica para a observação das frações com perfil cromatográfico semelhante. As frações 24 a 70 (gradiente 99:1) foram reunidas. Essa fração de *P. balansae* continha uma substância majoritária que foi purificada através de sucessivas lavagens com metanol. Após purificação, a substância apresentou um perfil cromatográfico idêntico ao da substância PA1, isolada de *P. alopecuroides*.

5.1.2 Identificação das cumarinas

O isolamento e identificação das cumarinas presentes na superfície foliar de *P. alopecuroides* e *P. polystachyum* estão descritos em trabalho submetido ao periódico *Plant Systematics and Evolution* apresentado no anexo 1.

5.1.2.1 *P. alopecuroides*

Do extrato diclorometano das partes aéreas inteiras de *Pterocaulon alopecuroides* isolou-se os compostos PA1 e PA2. Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no Anexo 3.

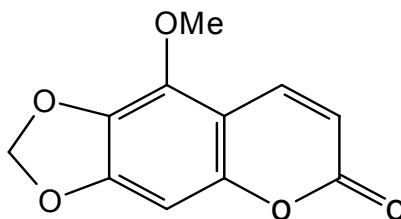
5.1.2.1.1 Composto PA1

O espectro de RMN de ^1H (Tabela 3) mostrou um par de dubletos em δ 6,22 (d , $J= 9,7$ Hz) e δ 7,95 (d , $J= 9,7$ Hz), referentes a hidrogênios vinílicos em H-3 e H-4, respectivamente. O deslocamento do sinal do último hidrogênio para campo mais baixo sugere a presença de uma função oxigênio na posição C-5. O singlete em 6,54 é atribuído ao H-8. A redução da intensidade do sinal do dubleto de H-4, que correlaciona com H-3, é evidência de um acoplamento à longa distância sobre cinco ligações do sistema aromático bicíclico. Os singletos em δ 6,02 (2H) e em δ 4,15 (3H) são atribuídos aos hidrogênios metilênicos do grupo O-CH₂-O e da metoxila, respectivamente.

Com auxílio do espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado e dos subespectros DEPT (anexos) tornou-se possível caracterizar cada carbono da molécula da substância PA1 como sendo: uma metoxila (-OCH₃-) em δ 59,91, um grupamento metilenodioxo (-OCH₂O-) em δ 101,79, três grupamentos metino (-CH-) em δ 111,67, δ 138,80 e δ 92,31 e seis carbonos quaternários em δ 161,28, δ 138,00, δ 131,71, δ 151,51, δ 152,62 e δ 106,57.

Os dados de RMN de ^1H aliados aos dados de RMN ^{13}C (Tabela 4) sugerem para PA1 a estrutura da 5-metoxi-6,7-metilenodioxocumarina (Figura 5), isolada pela primeira vez de *Simsia cronquistii* (Asteraceae) (MALDONADO *et al.*, 1992). A descrição desta cumarina para o gênero ocorreu em 1994, quando foi encontrada

em *P. virgatum* (DEBENEDETTI *et al.*, 1994^B) e posteriormente para as espécies *P. serrulatum* (MACLEOD e RASMUSSEN, 1999), *P. polystachyum* (PALACIOS *et al.*, 1999) e *P. redolens* (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003). Para a espécie *P. alopecuroides* esta é a primeira vez que esta substância é relatada.



(5)

5.1.2.1.2 Composto PA2

O composto PA2 apresentou um espectro de RMN de ^1H (Tabela 3) com um típico par de dubletos em δ 6,27 e δ 7,62 (1H cada, $J=9,4$ Hz) atribuído aos hidrogênios vinílicos H-3 e H-4, respectivamente. Dois hidrogênios aromáticos desacoplados em δ 6,90 e δ 6,87 (1H cada), característicos de H-5 e H-8, são uma clara indicação de um padrão de 6,7-dioxigenação no núcleo aromático. O singlete em δ 3,90 (3H) foi atribuído à metoxila aromática. Os duplos dubletos restantes em δ 4,12 ($J=11,6$ Hz), δ 4,34 ($J=11,4$ Hz) e 3,19 ($J=6,4$ Hz) são atribuídos aos grupamentos metileno e metino da cadeia lateral, respectivamente (1H cada, AMX, $J_{AM}=11$; $J_{AX}=4$, $J_{MX}=6$). Os singletos em δ 1,38 e δ 1,39 (3H cada) indicam a presença de grupamento dimetila geminal.

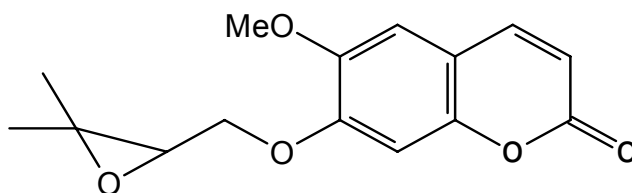
No espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado (anexos), observou-se a presença dos sinais intensos e característicos de cumarinas em δ 113,79 e δ 143,17 atribuídos aos carbonos C-3 e C-4 respectivamente. Os sinais de

deslocamento dos grupamentos –CH em δ 108,65 e δ 101,89 correspondem aos carbonos C-5 e C-8, e o sinal em δ 60,83 é referente ao C-2' da cadeia lateral.

Com o auxílio do subespectro DEPT (anexos) foi possível atribuir o deslocamento químico do grupo metileno da cadeia lateral. Os carbonos quaternários não aparecem neste espectro, porém, comparando-se este com o espectro de RMN de ^{13}C totalmente desacoplado, os sinais são δ 161,22, δ 146,67, δ 151,82, δ 149,77, δ 111,97, δ 58,25 referentes aos carbonos, C-2, C-6, C-7, C-9, C-10 e C-3'.

Os sinais referentes às metoxilas aparecem em campo mais alto, em δ 56,44, δ 24,53 e δ 19,07 .

Os dados espectrais do composto sugerem para PA2 a estrutura da 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (Figura 6) e estão em concordância com os dados da literatura do primeiro relato desta cumarina, isolada de *Conyza obscura* (Asteraceae) (BOHLMAN e JAKUPOVIC, 1979). Os relatos desta cumarina dentro do gênero *Pterocaulon* foram para as espécies *P. virgatum* (BOHLMAN *et al.*, 1981) e para *P. balansae* (MAGALHÃES *et al.*, 1981). Para a espécie *P. alopecuroides*, não havia sido encontrada até o presente momento.



(6)

Tabela 3. RMN de ¹H dos produtos PA1 (5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina) e PA2 (7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina) isolados de *Pterocaulon alopecuroides* (500 MHz; CDCl₃)

	PA1	PA2
H-3	6,22 (d, J=9,7)	6,27 (d, J= 9,4)
H-4	7,95 (d, J=9,7)	7,62 (d, J= 9,4)
H-5	-	6,90 (s)
H-8	6,54 (s)	6,87 (s)
5-OMe	4,15 (s)	-
6-7-OCH ₂ O-	6,02 (s)	-
6-OH	-	-
6-OMe	-	3,90 (s)
H-1'a	-	4,12 (dd, J= 11,4; 6,0)
H-1'b	-	4,34 (dd, J= 11,4; 4,0)
H-2'	-	3,19 (dd, J= 6,0; 4,0)
H-4'	-	1,39 (s)*
H-5'	-	1,38 (s)*

* Sinais intercambiáveis

Tabela 4. RMN de ^{13}C dos produtos PA1 (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina) e PA2 (7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxycumarina) isolados de *Pterocaulon alopecuroides* (125 MHz; CDCl_3)

	PA1	PA2
C-2	161,28	161,22
C-3	111,67	113,79
C-4	138,80	143,17
C-5	138,00	108,65
C-6	131,71	146,67
C-7	151,51	151,82
C-8	92,31	101,89
C-9	152,62	149,77
C-10	106,57	111,97
5-O <u>C</u> H ₃	59,91	-
6-7- O <u>C</u> H ₂ O-	101,79	-
6-O <u>C</u> H ₃	-	56,44
C-1'	-	68,51
C-2'	-	60,83
C-3'	-	58,25
C-4'	-	24,53
C-5'	-	19,07

5.1.2.2 *Pterocaulon polystachyum*

A partir do extrato diclorometano das partes aéreas inteiras de *Pterocaulon polystachyum*, obteve-se através de cromatografia em coluna seguida de purificação em camada delgada, dois compostos, codificados como PP1 (frações 29 a 73) e PP2 (frações 95 a 145). Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C estão apresentados no Anexo 3.

Após análise dos dados dos espectros de RMN verificou-se claramente que o “composto” PP1 tratava-se de uma mistura de duas substâncias sendo, no entanto, possível fazer inequivocamente a atribuição dos sinais para PP1a e PP1b. O mesmo ocorreu com o “composto” PP2, que tratava-se de mistura de PP2a e PP2b. A amostra PP1 (15,4 mg) apresentou proporções de 55% de PP1a e 45% de PP1b enquanto que a amostra PP2 (15,15 mg), apresentou as proporções de 30% para PP2a e 70% para PP2b.

5.1.2.2.1 Composto PP1a

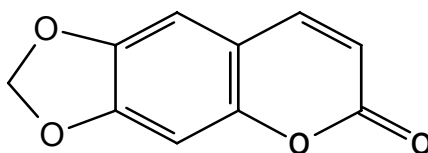
A análise dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H referentes a substância PP1a permite concluir que este é o mesmo produto encontrado na espécie *P. alopecuroides* (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina). Os dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C (Tabelas 5 e 6 respectivamente) são muito semelhantes aos do composto PA1, apresentando pequenas diferenças de deslocamento em função das diferentes condições experimentais. O relato de isolamento desta cumarina para a espécie *P. polystachyum* foi descrita por PALACIOS *et al.* (1999).

Como descrito anteriormente, esta cumarina primeiramente encontrada em *P. virgatum* (DEBENEDETTI *et al.*, 1994), também foi relatada para a espécie *P. serrulatum* (MACLEOD e RASSMUSSEN *et al.*, 1999).

5.1.2.2.2 Composto PP1b

Os sinais referentes ao composto PP1b são bastante similares aqueles obtidos para o composto PP1a, diferindo apenas no substituinte ligado ao carbono 5, o singlete em δ 6,82 (1H), enquanto o composto PP1a possui uma metila ligada a este carbono. O sinal em δ 6,83 (1H, s) corresponde ao hidrogênio ligado ao

carbono 8, e o sinal em δ 6,07 (2H) foi atribuído aos hidrogênios do grupamento metilenodioxí. Os dados de RMN de ^1H e de ^{13}C deste composto (Tabelas 5 e 6) estão em concordância com os dados previamente relatados e sugerem a estrutura da cumarina denominada iapina (7). Seu primeiro relato foi para a espécie *P. virgatum* (DEBENEDETTI *et al.*, 1998), e posteriormente para *P. serrulatum* (MACLEOD e RASMUSSEN *et al.*, 1999), *P. polystachyum* (PALACIOS *et al.*, 1999) e para *P. redolens* (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003), onde a estrutura foi revisada pelos autores.



(7)

5.1.2.2.3 Composto PP2a

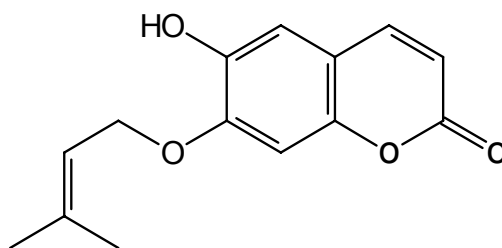
O espectro do composto PP2a mostrou um típico par de dubletos ($J= 9,4$ Hz) para H-3 (δ 6,20) e H-4 (δ 7,83), e dois hidrogênios aromáticos desacoplados em δ 7,07 (H-5) e 6,89 (H-8), os quais são característicos de cumarinas 6,7-dissubstituídas. Dois singletos em δ 1,76 e 1,78 correspondem aos grupamentos metila unidos à cadeia lateral isopentenil. O dubleto em δ 4,62 ($J= 6,7$ Hz) dos hidrogênios metilênicos indica que houve substituição em 3,3-dimetilaliloxi, e singlete em δ 5,50 indica a presença de grupamento hidroxila (OH).

O subespectro de ATP (anexos) permitiu observar a presença de 14 sinais, referentes aos carbonos da molécula de PP2a. Em δ 67,20 o sinal intenso refere-se

ao grupamento CH₂ da cadeia lateral prenilada. Os demais sinais em δ 163,82, δ 139,97, δ 150,15, δ 148,36, δ 112,98 e 139,76 pertencem aos carbonos quaternários da molécula. Os sinais em δ 112,89 e δ 145,87 correspondem aos carbonos C-3 e C-4 respectivamente, característicos de cumarinas. As metoxilas em δ 25,84 e δ 18,28 são referentes à cadeia lateral.

Os dados espectrais de RMN de ¹H e ¹³C (Tabelas 5 e 6 respectivamente) sugerem a estrutura 8 para o composto, denominado como a cumarina prenilletina.

O primeiro relato desta cumarina foi para a espécie *Carduus tenuiflorus* (Asteraceae) (CARDONA *et al.*, 1992), e para o gênero em estudo, o primeiro relato foi para a espécie *P. polystachyum* (PALACIOS *et al.*, 1999) não tendo sido encontrada em outra espécie deste gênero.

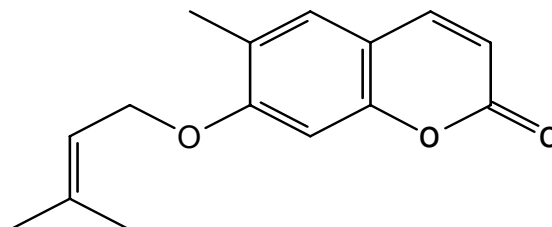


(8)

5.1.2.2.4 Composto PP2b

Os dados de RMN de ¹H referentes ao composto PP2b são muito semelhantes àqueles referentes ao composto PP2a. A única diferença corresponde ao singlete em δ 3,82 atribuído ao grupamento metoxila na posição C-6. Os sinais de RMN de ¹³C para os compostos PP2a e PP2b foram atribuídos através dos espectros de APT (Tabela 6). Os valores encontrados para os espectros propõem a estrutura 9 para o composto que é denominado prenilletina-metil-éter e são idênticos aos publicados anteriormente para este composto (CARDONA *et al.*, 1992).

O primeiro relato desta cumarina dentro do gênero foi para a espécie *P. virgatum* (DEBENEDETTI *et al.*, 1998), e para *P. polystachyum*, o primeiro relato foi realizado por PALACIOS e colaboradores, em 1999.



(9)

Tabela 5: RMN de ^1H dos compostos **PP1a** (5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina), **PP1b** (lapina), **PP2a** (preniletina) e **PP2b** (preniletina-metil-eter) isolados de *P. polystachyum* (400 MHz; CDCl_3)

	PP1a	PP1b	PP2a	PP2b
H-3	6,20 (d, $J=9,7$)	6,27 (d, $J=9,5$)	6,20 (d, $J=9,4$)	6,22 (d, $J=9,4$)
H-4	7,94 (d, $J=9,7$)	7,58 (d, $J=9,5$)	7,83 (d, $J=9,4$)	7,77 (d, $J=9,4$)
H-5	-	6,82 (s)	7,07 (s)	6,93 (s)
H-8	6,52 (s)	6,83 (s)	6,89 (s)	6,88 (s)
5-OMe	4,13 (s)	-	-	-
6-7-OCH₂O-	6,00 (s)	6,07 (s)	-	-
6-OH	-	-	5,50 (t)	-
6-OMe	-	-	-	3,82 (s)
H-1'a	-	-	4,62 (d, $J=6,7$)	4,67 (d, $J=6,4$)
H-1'b	-	-	4,62 (d, $J=6,7$)	4,67 (d, $J=6,4$)
H-2'	-	-	5,46 (t)	5,51 (t)
H-4'	-	-	1,76 (s)*	1,78 (s)*
H-5'	-	-	1,78 (s)*	1,78 (s)*

* Sinais intercambiáveis

Tabela 6: RMN de ^{13}C dos compostos **PP1a** (5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina), **PP1b** (lapina), **PP2a** (preniletina) e **PP2b** (preniletina-metil eter) isolados de *P. polystachyum* (100 MHz; CDCl_3)

	PP1a	PP1b	PP2a	PP2b
C-2	161,27	161,13	163,82	164,00
C-3	111,72	113,36	112,89	113,40
C-4	138,76	143,40	145,87	145,80
C-5	138,04	105,05	110,05	108,15
C-6	131,74	144,89	139,97	145,50
C-7	152,65	151,25	150,15	152,47
C-8	92,36	98,35	102,11	101,75
C-9	151,51	151,25	148,36	148,36
C-10	106,60	112,67	112,98	112,98
5-OCH₃	59,91	-	-	-
6-7- OCH₂O-	101,80	102,32	-	-
6-OCH₃	-	-	-	56,83
C-1'	-	-	67,20	67,20
C-2'	-	-	120,11	120,27
C-3'	-	-	139,76	139,76
C-4'	-	-	25,84	25,84
C-5'	-	-	18,28	18,28

5.1.3 Análise cromatográfica dos extratos de *Pterocaulon*

A presença de cumarinas nas espécies nativas de *Pterocaulon* foi determinada através da análise cromatográfica dos extratos diclorometano. Os cromatogramas, eluídos em diclorometano: metanol (99:1 v/v), utilizando revelador KOH 10%, foram analisados sob ação da luz UV (254 e 366 nm).

A tabela 7 apresenta os resultados das análises cromatográficas realizadas com as espécies neste estudo. Os extratos diclorometano das partes aéreas foram analisados quanto à presença ou ausência de cumarinas através da fluorescência na luz UV. As amostras também foram submetidas a comparação com os padrões de cumarinas previamente isoladas de *P. alopecuroides* (PA1 e PA2) e *P. polystachyum* (PP1 e PP2).

Tabela 7. Presença ou ausência de cumarinas e comparação do perfil cromatográfico dos extratos diclorometano com os padrões PA1, PA2 (*P. alopecuroides*), PP1 e PP2 (*P. polystachyum*).

Espécie	Presença de cumarina (sim/não)	Perfil cromatográfico comparativo dos extratos das espécies do gênero <i>Pterocaulon</i> com os produtos isolados (presente/ausente)			
		PA1	PA2	PP1	PP2
<i>P. alopecuroides</i>	sim	presente	presente	presente	presente
<i>P. angustifolium</i>	sim	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>P. balansae</i>	sim	presente	presente	ausente	presente
<i>P. cordobense</i>	sim	presente	presente	ausente	ausente
<i>P. lorentzii</i>	sim	ausente	ausente	ausente	ausente
<i>P. polypterum</i>	sim	ausente	ausente	ausente	presente
<i>P. polystachyum</i>	sim	presente	ausente	presente	presente
<i>P. rugosum</i>	sim	presente	ausente	ausente	ausente

Através das cromatografias analíticas em camada delgada, observou-se que todas as espécies apresentam substâncias com intensa fluorescência sob luz UV, intensificada pela adição de solução de KOH, indicando a presença de cumarinas nos extratos destas espécies.

Quanto ao perfil de substâncias encontradas nos extratos comparado às substâncias já isoladas, a substância PA1, presente na espécie *P. alopecuroides* e

P. polystachyum, parece estar presente em *P. balansae*, *P. cordobense* e *P. rugosum*. Esta última, juntamente com *P. balansae* mostrou a presença de substância com perfil cromatográfico de PA2 isolada de *P. alopecuroides*. As espécies *P. polypterum* e *P. balansae* apresentaram substância com perfil cromatográfico de PP2, isolada de *P. polystachyum*. A substância PA1 foi mais frequentemente encontrada nas espécies em estudo.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados da avaliação da atividade antifúngica dos extratos das espécies de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* estão descritos em trabalho publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology*, apresentado no anexo 2.

5.2.1 Extratos brutos metanólicos e frações

Os extratos que apresentaram CIM (Concentração Inibitória Mínima) menor ou igual a 800 µg/mL foram considerados ativos.

Os resultados mostraram (Tabela 8) que todos os fungos testados foram inibidos pelos diferentes extratos das espécies de *Pterocaulon* ssp. (valores de CIMs entre 12,5-800 µg/mL) sendo *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* as espécies mais suscetíveis. Dos 12 extratos testados, 8 inibiram o crescimento de *Candida* ssp., e dentre estes, 7 apresentaram valores menores ou iguais a 200 µg/mL. São resultados relevantes, tendo-se em conta de que *Candida albicans* é o principal agente causador de infecções superficiais e freqüente disseminador de infecções fatais em pacientes imunocomprometidos e *Candida tropicalis* é um dos fungos que está emergindo em infecções fúngicas (POWDERLY *et al.*, 1999). Existe, até o presente momento, um renovado interesse em novos inibidores destes microrganismos, pois a resistência às drogas utilizadas

atualmente está se tornando um dos principais problemas para a população imunocomprometida (WHITE *et al.*, 1998; GHAFAROKHI *et al.*, 2004).

Considerando o extrato metanólico bruto, é interessante observar que o de *P. alopecuroides* mostrou a melhor atividade contra *Cryptococcus neoformans* (CIM=25 µg/mL) o qual é a causa mais comum de meningites em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) (MICHAELS *et al.*, 1999). Este fungo, sensível a alguns antifúngicos correntemente utilizados na clínica, algumas vezes adquire resistência durante o curso de uma terapia sendo necessários novos agentes mais potentes (POWDERLY *et al.*, 1990).

Entre as frações de *Pterocaulon*, o extrato hexânico de *P. balansae* demonstrou um largo espectro de ação inibindo todos os fungos testados, incluindo *Candida ssp.*, e exibiu forte atividade antifúngica contra *Trichophyton ssp.* com CIM=12,5 µg/mL. *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* são os maiores causadores de “pé de atleta” e onicomicoses em humanos, sendo que o primeiro é o mais prevalente em infecções superficiais no mundo desenvolvido (EVANS, 1997) e o segundo, causador de infecções que atingem de 2-13% da população mundial e até 30% dos grupos de alto risco como os idosos e pessoas com diabetes (LEVY, 1997; GUPTA *et al.*, 1998).

O extrato hexanólico de *P. polystachyum* apresentou boa potência frente aos microrganismos *Aspergillus flavus* (CIM = 200 µg/mL), *A. niger* (CIM = 200 µg/mL) e *A. fumigatus* (CIM = 100 µg/mL). Estes fungos são responsáveis por desenvolver sinusite alérgica, asma e quadros de sinusite com destruição óssea, abscesso cerebral, e, eventualmente, infecção do trato digestivo, urinário e até do coração em pacientes neutropênicos (leucêmicos e pacientes submetidos a transplantes de medula óssea) (COLOMBO *et al.*, 2001).

O fato de a melhor propriedade antifúngica das espécies de *Pterocaulon* testadas ter sido a dos extratos hexânico e diclorometano sugere que a atividade pode ser atribuída as cumarinas, constituintes característicos das partes aéreas

destas plantas, as quais estão presentes no extrato lipofílico e são um grupo de produtos naturais com atividade antimicrobiana reconhecida (VERA *et al.*, 2001).

Cumarinas são freqüentemente encontradas nas frações lipofílicas de plantas que pertencem a diversas famílias e tem demonstrado atividade antibacteriana contra microorganismos como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis* e *Nocardia gardenen*. A presença destas pode justificar o uso popular de algumas espécies de *Pterocaulon* como agente no tratamento de algumas doenças infecciosas (AVANCINI, 2002).

Os extratos de *Pterocaulon* apresentaram um largo espectro de ação contra um painel de fungos patogênicos oportunistas, responsáveis pela maioria das infecções sistêmicas, dermatológicas e em mucosas, as quais são geralmente muito difíceis de combater. Estes extratos abrem uma possibilidade de se encontrar novos compostos antifúngicos com efetividade clínica e fornecem dados positivos considerando que estes são utilizados para infecções fúngicas em animais e humanos.

Tabela 8. Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos extratos de *Pterocaulon* ssp. utilizando métodos de caldo de microdiluição M27A2 e M38A recomendado por NCCLS (valores de CIM dados em µg/mL)

Planta	Tipo de extrato	<i>C. a</i>	<i>C. t</i>	<i>S. c</i>	<i>Cr. n</i>	<i>A. fl</i>	<i>A. n</i>	<i>A. fu</i>	<i>M. g</i>	<i>T. r</i>	<i>T. m</i>
<i>P. alopecuroides</i>	EMBT	100	100	50	25	400	400	400	50	50	50
	HEX	200	100	200	100	>800	>800	>800	50	25	25
	DCM	200	200	100	100	>800	>800	>800	50	25	25
	MET	400	400	400	250	400	400	400	200	200	100
<i>P. balansae</i>	EMBT	>800	>800	>800	400	>800	>800	>800	200	200	200
	HEX	100	50	50	50	400	200	400	25	12,5	12,5
	DCM	200	200	100	100	400	400	400	100	50	50
	MET	>800	>800	500	250	>800	>800	>800	200	200	100
<i>P. polystachyum</i>	EMBT	200	200	100	100	>800	>800	>800	50	50	50
	HEX	200	100	200	100	200	200	100	50	50	25
	DCM	>800	>800	500	100	>800	>800	>800	200	100	100
	MET	>800	>800	>800	>800	>800	>800	>800	250	250	250
<i>Anfotericina B</i>		1	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,5	0,125	0,075	0,075
<i>Cetoconazol</i>		0,5	0,125	0,5	0,25	0,125	0,5	0,25	0,05	0,025	0,025
<i>Terbinafina</i>									0,04	0,01	0,04

EMBT – Extrato Metanólico Bruto Total; HEX - extrato hexano; DCM –extrato diclorometano; MET-extrato metanólico; *C.a.*: *Candida albicans* ATCC 10231; *C.t.* *Candida tropicalis* C 131; *S c*: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763; *Cr.n*: *Cryptococcus neoformans* ATCC 32264; *A. fl.*: *Aspergillus flavus* ATCC 9170; *A. n.*: *Aspergillus niger* ATCC 9029; *A. fu.*: *Aspergillus fumigatus* ATCC 26934; *M. g.*: *Microsporium gypseum* C 115; *T. r.*: *Trichophyton rubrum* C 113; *T. m.*: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9972

5.2.2 Atividade antifúngica dos produtos isolados

Através da análise da atividade antifúngica dos produtos isolados do extrato diclorometano de *P. alopecuroides* e *P. polystachyum* (Tabela 9), observou-se que apenas o composto PP2, a qual continha a mistura das cumarinas prenilatina e prenilatina-metil-éter, apresentou relevante capacidade de inibição do crescimento frente aos fungos *Cryptococcus neoformans* (CIM 125 µg/ml), *Microsporum gypseum* (CIM 31,25 µg/mL), *Trichophyton rubrum* (CIM 62,5 µg/ml) e *Trichophyton mentagrophytes* (CIM 31,25 µg/ml).

SARDARI e colaboradores (1999), realizaram um estudo para avaliar a atividade antifúngica de algumas classes de cumarinas e também de seus derivados modificados através de síntese. Em análise comparativa entre os compostos que apresentaram atividade antifúngica, concluíram que a hidroxila livre na posição C-6 é importante para a atividade destes compostos. Levando-se em conta as estruturas químicas das duas cumarinas pertencentes à PP2, o composto prenilatina possui a hidroxila livre na posição C-6, e este fato pode justificar a inibição do crescimento dos fungos.

Os três principais grupos de antifúngicos de uso clínico são: os antibióticos polienos (anfotericina B), os derivados azólicos (cetoconazol) e as alilaminas/tiocarbamatos (terbinafina). O mecanismo de ação destes agentes é baseado na interação ou inibição do ergosterol, principal esterol da membrana plasmática da maioria dos fungos (ODDS *et al.*, 2003). Apesar da identificação de várias espécies de plantas com propriedades antifúngicas, bem como de alguns de seus componentes ativos, poucos dados documentados foram apresentados sobre seus mecanismos de ação (GHAHFAROKHI *et al.*, 2004).

Tabela 9: Avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos produtos isolados de *P. alopecuroides* e *P. polystachyum*

	PA1	PA2	PP1	PP2
<i>Candida albicans</i>	>250	>250	>250	>250
<i>Candida tropicalis</i>	>250	>250	>250	>250
<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	>250	>250	>250	>250
<i>Cryptococcus neoformans</i>	>250	>250	>250	125
<i>Aspergillus fumigatus</i>	>250	>250	>250	250
<i>Aspergillus flavus</i>	>250	>250	>250	250
<i>Aspergillus niger</i>	>250	>250	>250	>250
<i>Microsporum gypseum</i>	>250	>250	>250	31,25
<i>Tricopyton rubrum</i>	>250	>250	>250	62,5
<i>Tricopyton mentagrophytes</i>	>250	>250	>250	31,25

PA1: 5-metoxi-6,7-metilenodioximarina (*P. alopecuroides*)

PA2: 7-(2,3-epoxi-3-metil-3-butiloxi)-6-metoxicumarina (*P. alopecuroides*)

PP1: 5-metoxi-6,7-metilenodioximarina e iapina (*P. polystachyum*)

PP2: preniletina e preniletina-metil-éter (*P. polystachyum*)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A motivação para a realização do presente trabalho partiu de um estudo realizado por AVANCINI (2002) que, através de relatos etnoveterinários, obteve a informação que espécies do gênero *Pterocaulon* são utilizadas para o tratamento de doenças de pele de animais, popularmente diagnosticadas como micoses. Contudo, a grande semelhança morfológica e a denominação comum (Quitoco) levam a população utilizar diferentes espécies com a mesma finalidade.

Com a possibilidade de estabelecer parâmetros de diferenciação entre as espécies de *Pterocaulon*, no presente trabalho foram isolados e identificados cinco compostos majoritários dos extratos diclorometano das partes aéreas de *P. alopecuroides* e *P. polystachyum*, espécies encontradas com bastante frequência durante a realização deste estudo. Os produtos isolados, identificados como cumarinas, estão em concordância com os dados da literatura que relatam esta classe de compostos como a mais encontrada para o gênero.

Os métodos de extração utilizando a planta rasurada e através de imersão do material intacto em solvente orgânico, foram comparados através de cromatografia em camada delgada. Observou-se a presença dos mesmos compostos majoritários nos extratos, optou-se assim pelo segundo método, que proporcionou a mínima interferência de outros compostos como a clorofila.

Para *Pterocaulon alopecuroides*, as cumarinas majoritárias encontradas foram a 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, codificada como PA1 e 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina, codificada como PA2. Estes não foram os mesmos compostos previamente isolados desta planta. O primeiro e único estudo fitoquímico encontrado na literatura sobre *P. alopecuroides*, realizado por VILEGAS e colaboradores (1995), descreve o isolamento de um flavonóide e de duas cumarinas do extrato diclorometano das partes aéreas desta espécie. Os compostos foram identificados como 7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-5-hidroxi-6-metoxicumarina, de estrutura inédita, e 7-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6-

metoxicumarina, esta já relatada para outras espécies de *Pterocaulon*: *P. balansae*, *P. lanatum*, *P. virgatum* e *P. rugosum*.

A justificativa para as divergências entre os compostos isolados para a mesma espécie pode estar nos métodos de extração utilizados serem diferentes, ou até mesmo, regiões e épocas distintas de coleta, fatores que podem influenciar diretamente na quantidade e qualidade de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais.

De *P. polystachyum* foram isolados duas substâncias, codificados como PP1 e PP2, os quais através da análise dos espectros de RMN, observou-se que ambos tratavam-se de misturas de cumarinas. O composto PP1 apresentou a 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, anteriormente isolada de *P. alopecuroides*, codificada como PP1a, e iapina, como PP1b. O composto PP2 também apresentou duas cumarinas, prenilatina, codificada como PP2a, e prenilatina-metil-éter, codificada como PP2b.

Ainda que tenha sido empregando um método de extração diferente daquele citado na literatura, as cumarinas isoladas de *P. polystachyum*, foram as mesmas relatadas em trabalhos anteriores (PALACIOS *et al.*, 1999; VERA *et al.*, 2001).

De *P. balansae*, foi isolado e identificado, através de cromatografia em camada delgada, a cumarina 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, confirmada através da comparação do perfil cromatográfico do composto previamente isolado de *P. alopecuroides* PA1.

As cumarinas possuem um espectro ultravioleta (UV) característico, fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes, sendo facilmente visualizadas por cromatografia em camada delgada. Para reforçar a afirmação de que estes compostos são caracteristicamente encontrados nas espécies de *Pterocaulon*, realizou-se a análise do perfil cromatográfico de *P.*

angustifolium, *P. balansae*, *P. cordobense*, *P. lorentzii*, *P. polypterum* e *P. rugosum*, nativas do Rio Grande do Sul. Com isso verificou-se a presença de cumarinas em todas as espécies. Este fato pode sugerir que esta classe de compostos sirva como marcador taxonômico para o gênero.

Na comparação cromatográfica entre *P. alopecuroides* e *P. polystachyum* e outras seis espécies do gênero, submetidas ao mesmo processo de extração, foi possível observar que quatro destas apresentaram perfil cromatográfico idêntico ao dos produtos isolados das duas espécies anteriormente citadas.

A espécie *P. balansae* foi a que apresentou perfil de maior número de substâncias isoladas (PA1, PA2 e PP2) seguido de *P. cordobense* (PA1 e PA2), *P. polypterum* (PP2) e *P. rugosum* (PA1).

As espécies *P. angustifolium* e *P. lorentzii* apesar de demonstrar a presença de substâncias com perfil cromatográfico de cumarinas, quando comparadas aos produtos isolados, não se observou a presença destes nestas espécies.

O método de extração utilizado indica que estas substâncias localizam-se, em grande maioria, na superfície das partes aéreas onde poderiam estar atuando como fitoalexinas. Algumas cumarinas como iapina obtida de várias espécies do gênero *Pterocaulon*, são descritas como fitoalexinas, defendendo a planta de microrganismos, especialmente fungos. Este tipo de composto é formado em resposta a um trauma que ocorre com a planta, seja por uma doença ou por processo de secamento, e se acumulam na superfície das folhas, frutos e sementes, inibindo o crescimento e esporulação de fungos patógenos e agem como repelentes de abelhas e outros invertebrados terrestres (OJALA, 2001).

A avaliação da atividade antifúngica de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* demonstrou ótimos resultados, pois os diferentes extratos foram ativos contra todos os fungos testados. Levando-se em consideração os valores das concentrações inibitórias do crescimento, que chegaram até a 12,5 µg/mL,

estes extratos possuem ótima atividade, pois um extrato bruto que demonstra ser ativo a 100 µg/mL, é considerado um extrato de boa potência (RIOS *et al.*, 1988).

As espécies *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* foram as mais suscetíveis, com valores de concentração inibitória mínima (CIMs) menores ou iguais a 250 µg/mL. A fração hexânica de *P. balansae* demonstrou a melhor atividade antifúngica, com CIMs de 12,5 µg/mL frente as duas espécies de fungos. Estes microorganismos são os maiores causadores de “pé de atleta” e onicomicoses em humanos, sendo os mais prevalentes em infecções superficiais.

A espécie *Candida albicans*, principal agente causador de infecções superficiais e disseminador de infecções fatais em pacientes imunocomprometidos, teve seu crescimento inibido por mais da metade dos extratos, com valores de CIMs menores ou iguais a 200 µg/mL.

O extrato metanólico bruto de *P. alopecuroides* demonstrou a melhor atividade (CIM= 25 µg/mL) contra *Cryptococcus neoformans*, micorganismo que é a causa mais freqüente de meningites em pacientes com SIDA.

Os dados promissores obtidos para atividade antifúngica podem justificar o uso popular de algumas espécies de *Pterocaulon* para o tratamento de doenças infecciosas de pele, tanto de humanos quanto de animais.

Os resultados positivos dos testes antifúngicos realizados com os extratos brutos e frações das espécies *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum*, foram atribuídos às cumarinas, compostos majoritários isolados destes extratos e com atividade antimicrobiana reconhecida (VERA *et al.*, 2001). Porém, os resultados obtidos no teste para a atividade antifúngica dos produtos isolados não foi relevante. Mas é preciso considerar que os extratos utilizados nos testes antifúngicos apresentavam muitas cumarinas, além destas majoritárias isoladas, que poderiam ser os responsáveis pela atividade.

A provável presença de outros compostos como flavonóides e óleos voláteis, além das cumarinas, indica que estes também poderiam ter sido os responsáveis pela atividade dos extratos. Este dado é suportado pela fraca atividade demonstrada pelas cumarinas puras, embora estudos anteriores sobre efeitos inibitórios destas substâncias foram relatados para xantotoxina, herniarina, umbeliferona, escopoletina, cumarina (OJALA *et al.*, 2000), fraxinol, isopimpinellina, xantotoxol e peucedanol (ZEID, 2002).

Dentre os produtos isolados testados quanto à atividade antifúngica, apenas PP2 apresentou poder de inibição frente ao crescimento das cepas. Esta fração contém uma mistura das cumarinas preniletina-metil-éter e preniletina, e a atividade pode ser atribuída à estrutura química desta última, que possui uma hidroxila livre na posição C-6, substituinte que, segundo SARDARI *et al.* (1999), leva a um aumento da atividade antifúngica.

RIOS e colaboradores (1988) relataram que se um extrato bruto é ativo a 100 µg/mL, significa que ele possui uma boa potência, porém, se uma substância pura não é ativa a 100 µg/mL, provavelmente não será de importância clínica. Acredita-se que esta atividade poderia ter sido mais pronunciada se a substância estivesse pura ou em maior concentração, pois a proporção entre os dois compostos era de 70% de preniletina-metil-éter e 30% para preniletina.

O mecanismo de ação deste composto associado ao substituinte hidroxila na posição C-6 ainda não está esclarecido. Apesar da identificação de várias espécies de plantas com propriedades antifúngicas e alguns de seus componentes ativos, poucos dados de relatos de mecanismo de ação foram encontrados na literatura (GHAHFAROKHI *et al.*, 2004).

A continuidade dos estudos químicos e biológicos com as espécies *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* é de grande importância, considerando-se a possibilidade de testar as demais substâncias presentes nos

extratos destas espécies e se chegar a um ou mais compostos responsáveis pela atividade antifúngica.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a etnofarmacologia e dados ecológicos aliados aos estudos fitoquímicos podem levar a detecção de substâncias com relevantes atividades biológicas.

7. CONCLUSÕES

O método de extração dos produtos de superfície, utilizando a planta íntegra, mostrou ser eficaz para a obtenção dos produtos majoritários das folhas e galhos, com a interferência mínima de outros compostos indesejáveis como a clorofila.

Os compostos majoritários encontrados para as espécies de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* são cumarinas 6,7-dissubstituídas.

As cumarinas isoladas foram: 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina (PA1) e 7-(2,3-epoxi-3-metilbutiloxi)-6-metoxicumarina (PA2) de *P. alopecuroides*, 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina (PP1a), iapina (PP1b), preniletina (PP2a) e preniletina-metil-éter (PP2b) de *P. polystachyum* e 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina, de *P. balansae*.

As demais espécies nativas do Rio Grande do Sul utilizadas no estudo, *P. angustifolium*, *P. cordobense*, *P. lorentzii*, *P. polypterum* e *P. rugosum*, também demonstraram a presença de cumarinas.

Os extratos brutos metanólicos e frações hexânica, diclorometano e metanólica de *P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum* apresentaram atividade antifúngica bastante pronunciada, e os microrganismos mais suscetíveis foram *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*, com valores de CIMs de até 12,5 µg/mL.

Mais da metade dos extratos testados inibiu o crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* com valores de CIMs menores ou iguais a 200 µg/mL.

O extrato bruto metanólico de *P. alopecuroides* apresentou melhor atividade contra *Cryptococcus neoformans* (CIM=25 µg/mL) e o extrato hexânico

de *P. balansae* exibiu a melhor atividade contra *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (CIM=12,5 µg/mL).

Dos produtos isolados, apenas a mistura de preniletina e preniletina-metil-éter, demonstrou atividade inibitória contra *Trichophyton mentagrophytes* (CIM=31,25 µg/mL), *Trichophyton rubrum* (CIM=62,5 µg/mL) e *Microsporum gypseum* (CIM=31,25 µg/mL).

8. REFERÊNCIAS

- ANDERBERG, A. A. Taxonomy and phylogeny of the tribe Inuleae (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution*, v. 176, p. 75-123, 1991.
- ANDERBERG, A. A. Tribe Plucheeae. In: BREMER, K. *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press: Portland, p. 292-303, 1994.
- AVANCINI, C. A. M. Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas do sul do Brasil. *Tese de Doutorado*, Programa de Pós-graduação em Agronomia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 2002.
- BARROSO, G. M.. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*, v. 3, Viçosa: Imprensa Universitária, 1991.
- BISIGNANO, G.; SANOGO, R.; MARINO, A.; AQUINO, R.; D'ANGELO, V.; GERMANÒ, M.P.; DE PASQUALE, R.; PIZZA, C. Antimicrobial activity of *Mitracarpus scaber* extract and isolated constituents. *Letters Applied Microbiology*, v. 30, p. 105-108, 2000.
- BOEYKENS, M.; KIMPE, N. D.; DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; GOMEZ, M. A.; COUSSIO, J. D.; ABYSHEV, A. Z.; GINDIN, V. A. Revision of the structure of obtusivol. *Phytochemistry*, v.36, n.6, p. 1559-1560, 1994.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J. 8-oxo- α -selinen und scopoletin-derivate aus *Conyza*-arten. *Phytochemistry*, v. 18, p. 1367-1370, 1979.
- BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W.; KINGS, R. M.; ROBINSONS, H.; Thiophene acetylenes and flavanols from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v. 20, n.4, p. 825- 827, 1981.
- BREMER, K. *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Portland: Timber Press Inc., 1994.
- CABRERA, A.L. Compositae. in BURKART, A. *Flora Illustrada de Entre Ríos* (Argentina), Parte 6. Colección Científica del I.N.T.A. p. 106- 554, Buenos Aires, 1974.
- CARDONA, L.; GARCÍA, B.; PEDRO, J. R.; PÉREZ, J. 6-prenyloxy-7-methoxycoumarin, a coumarin-hemiterpene ether from *Carduus tenuiflorus*. *Phytochemistry*, v.31, n. 11, p. 3989-3991, 1992.
- CHEN, Y. F.; TSAI, H. Y.; WU, T. S. Anti-inflammatory and analgesic activities from the roots of *Angelica pubescens*. *Planta Medica*, v. 61, p. 2-8, 1995.
- CICCIA, G.; COUSSIO, J.; MONGELLI, E. Insecticidal activity against *Aedes aegypti* larvae of some medicinal South American plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 185-189, 2000.
- COLOMBO, A. L.; PINHEIRO, B. V.; JARDIM, J. R. Micoses pulmonares, *Pneumo Atual*, (ISSN1519-521), 2001.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, p. 564-582, 1999.

CRONQUIST, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press, 1981.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; GOMEZ, M. A.; COUSSIO, J. D. Polyphenols isolated from *Pterocaulon purpurascens*, I. 6-hydroxyflavonoids. *Journal of Natural Products*, v. 50, n. 3, p. 512 – 513, 1987.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, DUPONT, J. F.; DECLERC, J. P. Purpureanol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 30, n.8, p. 2757- 2758, 1991.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; GOMEZ, M. A.; COUSSIO, J. D., DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M. Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 31, n.9, p. 3284-3285, 1992.

DEBENEDETTI, S. L.; PALACIOS, P. S.; WILSON, E. G.; COUSSIO, J. D. Polyphenols of *Pterocaulon polystachyum*. *Fitoterapia*, v. 65, n. 2, p. 188-189, 1994^A.

DEBENEDETTI, S. L.; PALACIOS, P. S.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D. 5-(3-methylenedioxy)coumarin, a 5,6,7-trioxygenated coumarin from *Pterocaulon virgatum*. *Journal of Natural Products*, v. 57, n. 11, p. 1539-1542, 1994^B.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; GOMEZ, M. A.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M. Purpurasolol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*. *Phytochemistry*, v. 42, n. 2, p. 563-564, 1996.

DEBENEDETTI, S. L.; DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M.; COUSSIO, J. D.; KESTELEYN, B. Structural revision of four coumarins from *Pterocaulon* species. *Phytochemistry*, v. 45, n. 7, p. 1515-1517, 1997.

DEBENEDETTI, S. L.; NADINIC, E. L.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; BOEYKENS, M. Two 6,7-dioxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v. 48, p. 707-710, 1998.

DEBENEDETTI, S. L.; TEHRANI, K. A.; PUYVELDE, L. V.; DE KIMPE, N. Isopurpurasol, a coumarin from *Pterocaulon virgatum*. *Phytochemistry*, v.51, p. 701-703, 1999.

DEMYTTENAERE, J.; VERVISCH, S.; DEBENEDETTI, S.; COUSSIO, J.; MAES, D.; DE KIMPE, N. Synthesis of Virgatol and Virgatenol, two naturally occurring coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC, and 7-(2,3-epoxy-3-methylbutoxy)-6-methoxycoumarin, isolated from *Conyza obscura* DC. *Synthesis*, n.11, p. 1844-1848, 2004.

DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. *Journal of Ethnopharmacology*, v.11, p. 1-6, 1984.

DIAWARA, M. M.; TRUMBLE, J. T. Linear furanocoumarins. In: FELIX D'MELLO, J. P. *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Boca Raton: CRC, 1997.

EVANS, E.G. Tinea pedis: clinical experience and efficacy of short treatment. *Dermatology*, v.1, p. 3-6, 1997.

FATOPE, M.O.; IBRAHIM, H.; TAKEDA, Y. Screening of higher plants reputed as pesticides using the brine shrimp lethality assay. *International Journal of Pharmacognosy*, v. 31, p. 250-254, 1993.

FLOWER, R. Characterization of antiviral compounds in Australian bush medicines. *Rural Industries Research and Development Corporation*, 2000.

FRITZ, D.; STEIN, A. C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Distribuição de cumarinas nas tribos de Asteraceae. *12º Edição do Farmapolis*, 2003.

FUJIOKA, T.; FURUMI, K.; OKABE, H.; MIHASHI, K.; NAKANO, Y.; MATSUNAGA, H.; KATANO, M. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants. V. A new furanocoumarin and faltarindiol furanocoumarin ethers from the roots of *Angelica japonica*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 47, p. 96-100, 1999.

GHAHFAROKHI, M. S.; GOODARZI, M.; ABYANEH, M. R.; AL-TIRAIHI, T.; SEYEDIPOUR, G. Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, v. 75, p. 645-655, 2004.

GARCIA-ARGAEZ, A. N.; APAN, T. O. R.; DELGADO, H. P.; VELAZQUEZ, G.; MARTINEZ-VAZQUEZ, M. Anti-inflammatory activity of coumarins from *Decatropis bicolor* on TPA ear mice model. *Planta Medica*, v. 66, p. 279-281, 2000.

GUPTA, A.K.; KONNOKOV, N.; MACDONALD, P.; RICH, P.; RODGER, N.V.V.; EDMONS, M.W. Prevalence and epidemiology of toenail onychomycosis in diabetic subjects: a multicenter survey. *British Journal of Dermatology*, v.139, p. 665-671, 1998.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. Goodman e Gilman's. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9. ed. New York: McGraw Hill, 1996.

HEEMANN, A. C. W. Estudo fitoquímico, botânico e das propriedades antimicrobianas de *Pterocaulon interruptum* DC. (Asteraceae). *Dissertação de Mestrado*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

HEEMANN, A. C. W.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Revisão do Gênero *Pterocaulon*: aspectos fitoquímicos e atividades biológicas. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 53-60, 2004.

HOULT, J. R. S.; FORDER, R. A.; HERAS, B.; LOBO, I. B.; PAYÁ, M. Inibitory activity of a series of coumarins on leukocyte eicosanoid generation. *Agents Actions*, v. 42, p. 44-49, 1994.

HOULT, J. R. S.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potencial. *General Pharmacology*, v. 27, p. 713-722, 1996.

JOLY, A. B. *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*, v. 10, editora São Paulo: Nacional, 1991.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J.A.; PRICE, J. R.; SIOUMIS, A. Identification of coumarins isolated from *Lepiniopsis ternatensis* (Apocynaceae) *Pterocaulon sphacelatum* (Compositae) and *Melicope melanophloia* (Rutaceae). *Australian Journal of Chemistry*, v. 21, p. 3079, 1968.

KANLAYAVATTANAKUL, M.; RUANGRUNGSI, N.; WATANABE, T.; ISHIKAWA, T. Chemical constituents of *Pterocaulon redolens*. *Heterocycles*, v. 61, p. 183-187, 2003.

KOFINAS, C.; CHINOU, I.; HARVALA, C.; ROUSSAKIS, C.; MAILLARD, M.; HOSTETTMANN, K. Cytotoxic coumarins from the aerial parts of *Tordylium apulum* and their effects on a non-small-cell bronchial carcinoma cell line. *Planta Medica*, v. 64, p. 174-176, 1998.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. p. 537-556. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, Editora da UFSC, 2003.

LESZCZYNIĘCKA, M.; ROBERTS, T.; DENT, P., GRANT, S.; FISHER, P. B. Differentiation therapy of human cancer: basic science and clinical applications. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 90, 105-156, 2001.

LEVY, L.A. Epidemiology of onychomycosis in special risk populations. *Journal of the American Pediatric Medical Association*, v. 87, p. 546-550, 1997.

LINO, C. S.; TAVEIRA, M. L.; VIANA, G. S. B.; MATOS, F. J. A. Analgesic and antiinflammatory activities of *Justicia pectoralis* Jacq and its main constituents: coumarin and umbelliferone. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 211-215, 1997.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA, V. F. Jr.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n.3, p. 429-438, 2002.

MACLEOD, J.K.; RASMUSSEN, H.B.; A hydroxy- β -caryophyllene from *Pterocaulon serrulatum*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 105-108, 1999.

MAGALHAES A. F.; MAGALHAES E. G.; LEITAO FILHO, H. F.; FRIGHETTO, R. T. S.; BARROS, S. M. G. Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 6, p. 1369-1371, 1981.

MAGALHAES, A. F.; MAGALHAES, E. G.; VILARDES, N. J.; LEITAO FILHO, H. F. Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. *Phytochemistry*, v. 28, n.9, p. 2497-2499, 1989.

MALDONADO, E.; HERNANDEZ, E.; ORTEGA, A. Amides, coumarins and other constituents from *Simsia cronquistii*. *Phytochemistry*, v. 31, p. 1413-1414, 1992.

MARTINO, V. S.; DEBENEDETTI, S. L.; COUSSIO, J. D. Caffeoylequinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*. *Phytochemistry*, v. 18, p. 2052, 1979.

MENDES, N. M.; QUEIROZ, R. O.; GRANDI, T. S. M.; ANJOS, A.M.G.; OLIVEIRA, A. B.; ZANI, C. L. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for molluscicidal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 94, n.3, p.411-412, 1999.

MICHAELS, S.H.; CLARK, R.; KISSINGER, P. Incidence and spectrum of AIDS defining illnesses among persons treated with antiretroviral drugs. *Clinical Infectious Diseases*, v.29, p. 468-469, 1999.

MONGELLI, E.; PAMPURO, S.; COUSSIO, J.; SALOMON, H.; CICCIA, G. Cytotoxic and DNA interaction activities of extracts from medicinal plants used in Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p.145-151, 2000.

MURRAY, R.D.H.; MÉNDEZ, J.; BROWN, S.A. *The Natural Coumarins - Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 1982.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard, Second Edition, Wayne, Pa, v. 22, n. 15, p. 1-29, 2002^A.

NCCLS, National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi*. Approved Standard, Second Edition, Wayne, Pa, v. 22, n. 16, p. 1-27, 2002^B.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, v. 11, p. 272-279, 2003.

OJALA, T.; REMES, S.; HAANSUU, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R.; HAAHTELA, K.; VUORELA, P. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 73, p. 299-305, 2000.

OJALA, T. Biological Screening of Plant Coumarins. *Academic Dissertation*, Helsinki: University of Helsinki, 62p. 2001.

PALACIOS, P.S.; ROJO, A. A.; COUSSIO, J. D.; DE KIMPE, N.; DEBENEDETTI, S. L. 6,7-dioxygenated and 5,6,7-trioxygenated coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Medica*, v. 65, p. 294-295, 1999.

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 237-243, 2001.

PINTO, A. C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, n.1, p. 45-61, 2002.

POWDERLY, W.G.; KEATH, E.J.; SOKOL-ANDERSON, M. Amphotericin B-resistant *Cryptococcus neoformans* in a patient with AIDS. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, v.1, p.314-316, 1990.

POWDERLY, W.G.; MAYER, K.H.; PERFECT, J.R. Diagnosis and treatment of oropharyngeal candidiasis in patients infected with HIV: a critical reassessment. *AIDS Research and Human Retroviruses*, v. 15, p. 1405-1412, 1999.

RESCH, M.; STEIGEL, A.; CHEN, Z. L.; BAUER, R. 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-1 inhibitory active compounds from *Atractylodes lancea*. *Journal of Natural Products*, v. 61, n.3, p. 347-350, 1998.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: A review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 23, p. 127-149, 1988.

RIVEIRO, M. E.; SHAYO, C.; MONEZOR, F.; FERNÁNDEZ, N.; BALDI, A.; DE KIMPE, N.; ROSSI, J.; DEBENEDETTI, S.; DAVIO, C. Induction of cell differentiation in human

leukemia U-937 cells by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Cancer Letters*, v. 210, p. 179-188, 2004.

SARDARI, S.; MORI, Y.; HORITA, K.; MICETICH, R. G.; NISHIBE, S.; DANESHTALAB, M. Synthesis and antifungal activity of coumarins and angular furanocoumarins. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 1933-1940, 1999.

SCHER, J. M.; SPEAKMAN, J. B.; ZAPP, J.; BECKER, H. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S.F. Gray. *Phytochemistry*, v. 65, p. 2583-2588, 2004.

SEMPLE, S.J.; REYNOLDS, G.D.; O'LEARY, M.C.; FLOWER, R.L.P. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 60, p.163-172, 1998.

SEMPLE, S. J.; NOBBS, S.F.; PYKE, S.M.; REYNOLDS, G.D.; FLOWER, R.L.P. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 68, p. 283-288, 1999.

SOUZA BRITO, A. R. M.; SOUZA BRITO, A. A. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 39, p. 53-67, 1993.

VERA, N.; BARDÓN, A.; CATALAN, C.A.N.; GEDRIS, T.E.; HERZ, W. New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Medica*, v.67, p. 674-677, 2001.

VILEGAS, W.; BORALLE, N.; CABRERA, A.; BERNARDI, A. C.; POZETTI, G. L.; ARANTES, S. F. Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. *Phytochemistry*, v.38, p.1017-1019, 1995.

VON POSER, G. L., MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação, p. 75-89. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade, Editora da UFSC, 2003.

WHYTE, T.C.; MARR, K.A.; BOWDEN, R.A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v.11, p.382-402, 1998.

ZEID, A. H. S. A. Stress metabolites from *Corchorus olitorius* L. leaves in response to certain stress agents. *Food Chemistry*, v.76, p.187-195, 2002.

ANEXOS

ANEXO 1

Artigo submetido para o periódico ***Plant Systematics and Evolution***, junho de 2005.

Coumarins in Asteraceae: their distribution in the tribe Plucheeae, genus *Pterocaulon*

Ana Cristina Stein¹; Daniela Fritz¹; Luis Fernando Paiva Lima²; Nelson Ivo Matzenbacher²;
Jan Schripsema³; Viviane Pires⁴, Pascal Sonnet⁴; Gilsane von Poser^{1*}

¹PPG-Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS,
Brazil. Phone (051) 33165258, Fax (051) 33165610

²PPG-Botânica, ICBS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Sala 209, 91509-900 Porto
Alegre, RS, Brazil. Phone (051) 33167686, Fax (051) 33167670

³Grupo Metabolômica, LCQUI/CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av.
Alberto Lamego, 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes - RJ, Brazil.

⁴Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, 1 Rue des Louvels, 80037
Amiens, France

*Corresponding author.

E-mail address: gilsane@farmacia.ufrgs.br (G. von Poser).

Abstract. The most characteristic compounds found in Asteraceae are sesquiterpene lactones but other secondary metabolites can have predictive value. The distribution of coumarins in Asteraceae has been subjected to a investigation and an interesting distribution was found. In the controversial tribe Plucheeae these substance are abundant only in one taxon: the genus *Pterocaulon* in which all the coumarins are 6-7-oxygenated and could be considered a taxonomic marker of the genus. Seven species belonging to the genus *Pterocaulon* native from south Brazil were studied for their exudate coumarin composition. Some compounds were isolated and from *P. alopecuroides*. Two coumarins (5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin and 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxycoumarin) not previously reported for this species were obtained.

Key Words. *Pterocaulon*; Asteraceae; exudate coumarins; tribe Plucheeae; substitution trends; chemosystematics.

Running title: **Coumarins in Asteraceae**

Introduction

Asteraceae comprises 1535 genera and more than 23.000 species distributed into three subfamilies (Barnadesioideae, Cichorioideae and Asteroideae) and 17 tribes. From the chemical point of view, the family presents a tendency to produce sesquiterpene lactones although other classes of natural products such as coumarins have been found.

The genus *Pterocaulon* was formerly included in Inuleae, composed by 200 genera and 2000 species. In spite of the splitting attempts of some authors, the tribe survived without considerable change. Based on cladistic analysis Anderberg (1994a, b, c) demonstrated that the

tribe was paraphyletic and proposed a new classification in which the majority of the genus was accommodated into three tribes: Inulae (38 genera), Gnaphalieae (181 genera) and Plucheeae (28 genera).

According to Anderberg (1991) the taxa of Plucheeae form five monophyletic subgroups: the clades *Cylindrocline*, *Coleocoma*, *Pterocaulon*, *Laggera* and *Pluchea*. The *Pterocaulon* clade, diagnosed by its winged stems, comprises three genera: *Pterocaulon* (including *Monenteles*) *Neojeffreya*, and *Stenachaenium*. *Pterocaulon* and *Stenachaenium* are found in North and South America. Another group of *Pterocaulon*, section *Monenteles*, is found in Australia and in east tropical Asia, and *Neojeffreya* occurs in Madagascar. The biogeographic distribution of the clade *Pterocaulon* is interesting and, according to Anderberg (1991), a cladistic analysis of *Pterocaulon* at the species level, would be helpful in studies about vicariance biogeography. In this way, chemical data could be used as a character.

About half of the *Pterocaulon* species have been analyzed previously and many compounds have been isolated: caffeoylquinic acids from *P. virgatum* (Martino et al., 1979); thiophene acetylenes and flavanols from *P. virgatum* (Bohlmann et al., 1981); polyacetylenes from *P. alopecuroides*, *P. balansae*, *P. lanatum* and *P. rugosum* (Magalhães et al., 1989); hydroxy- β -caryophyllene from *P. serrulatum* (Macleod and Rasmussen, 1999); flavonoids from *P. sphacelatum* (Semple et al., 1999), *P. purpurascens* (Debenedetti et al., 1987) and *P. alopecuroides* (Vilegas et al., 1995); and coumarins from *P. balansae*, *P. lanatum* (Magalhães et al., 1981), *P. purpurascens* (Debenedetti et al., 1991, 1992 and 1996), *P. redolens* (Kanlayavattanakul et al., 2003), *P. virgatum* (Debenedetti et al., 1994, 1998 and 1999), *P. polystachyum* (Vera et al., 2001) and *P. alopecuroides* (Vilegas et al., 1995). Several species of

the genus are used in folk medicine as insecticides and agents against snake bites (Debenedetti et al., 1999).

The aim of this work is to study the exudate coumarin composition of some *Pterocaulon* species native to Brazil, to scrutinize the distribution of coumarins in Asteraceae and to assess the usefulness of these compounds as taxonomic marker in the family at the tribal level and at the sections of *Pterocaulon*.

Materials and Methods

Survey of coumarins in Asteraceae: The distribution of coumarins in Asteraceae was obtained in Murray et al. (1982), a review which covers the literature up to 1980. The reports of occurrence of these compounds in the subsequent years were compiled in literature.

Plant material: Aerial parts of the plants were collected in the Rio Grande do Sul state, in March, 2003. The species were identified by N.I. Matzenbacher (Programa de Pós-graduação em Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil). The voucher specimens are deposited in the herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN)(*Pterocaulon alopecuroides* (Lam.) DC. (136583); *P. angustifolium* DC. (136587); *P. balansae* Chodat (136589); *P. cordobense* O.K. (136588); *P. lorentzii* Malme (136586); *P. polypterum* (DC.) Cabrera (136585); *P. polystachyum* DC. (136584) and *P. rugosum* (Vahl) Malme (136590).

Chemical methods: whole leaves and branches of the plants (ca. 50 g) were carefully dried and extracted twice by immersion in dichloromethane for 15 s. This short extraction period proved sufficient for obtaining the compounds that coated the twigs and leaves without

extracting other components such as chlorophyll from those parts of the plant. The extracts were evaporated to dryness under reduced pressure and analyzed by TLC on silicagel using elution with CH₂Cl₂ 100% up to CH₂Cl₂:MeOH (95:5). From *P. alopecuroides* and *P. polystachyum*, the main products in each case were isolated by column chromatography on silica gel using a chloroform/methanol gradient system followed by preparative TLC on silica gel with chloroform: methanol (98:2), to afford 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (**1**) and 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxycoumarin (**2**) from *P. alopecuroides*. From *P. polystachyum*, besides compound **1**, ayapin (**3**), prenyletin (**4**) and prenyletinmethyl-ether (**5**) were isolated. The products were identified by ¹H NMR and ¹³C NMR spectroscopy (Tables 1 and 2) and comparison with literature data (**1**: Maldonado et al., 1992; **2**: Bohlmann and Jakupovic, 1979; **3**: Debenedetti et al., 1998; **4** and **5**: Cardona et al., 1992)(Fig. 1).

Table 1: ¹H NMR data of compound **1** (5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin), **2** (7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxycoumarin), **3** (Ayapin), **4** (prenyletin) and **5** (prenyletin-methyl ether) (coupling constants in Hz)

	1 *	2 *	3	4	5
H-3	6.22 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.7)	6.27 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4)	6.27 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.5)	6.20 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.4)	6.22 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.4)
H-4	7.95 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.7)	7.62 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.4)	7.58 (<i>d</i> , <i>J</i> = 9.5)	7.83 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.4)	7.77 (<i>d</i> , <i>J</i> =9.4)
H-5	-	6.90 (<i>s</i>)	6.82 (<i>s</i>)	7.07 (<i>s</i>)	6.93 (<i>s</i>)
H-8	6.54 (<i>s</i>)	6.87 (<i>s</i>)	6.83 (<i>s</i>)	6.89 (<i>s</i>)	6.88 (<i>s</i>)
5-OMe	4.15 (<i>s</i>)	-	-	-	-
6-7-OCH₂O-	6.00 (<i>s</i>)	-	6.07 (<i>s</i>)	-	-
6-OH	-	-	-	5.50 (<i>t</i>)	-
6-OMe	-	3.90 (<i>s</i>)	-	-	3.82 (<i>s</i>)
H-1'a	-	4.12 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11.4; 6.0)	-	4.62 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.7)	4.67 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.4)
H-1'b	-	4.34 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 11.4; 4.0)	-	4.62 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.7)	4.67 (<i>d</i> , <i>J</i> =6.4)
H-2'	-	3.19 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 6.0; 4.0)	-	5.46 (<i>t</i>)	5.51 (<i>t</i>)
H-4'	-	1.39 (<i>s</i>)	-	1.76 (<i>s</i>)	1.78 (<i>s</i>)
H-5'	-	1.38 (<i>s</i>)	-	1.78 (<i>s</i>)	1.78 (<i>s</i>)

Experimental data (400 MHz; CDCl₃)

*Experimental data (500 MHz; CDCl₃)

Table 2: ^{13}C NMR data of compounds **1** (5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin), **2** (7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-coumarin), **3** (Ayapin), **4** (prenyletin) and **5** (Prenyletin-methyl ether)

	1 *	2 *	3	4	5
C-2	161.27	161.22	161.13	163.82	164.00
C-3	111.72	113.79	113.36	112.89	113.40
C-4	138.76	143.17	143.40	145.87	145.80
C-5	138.04	108.65	105.05	110.05	108.15
C-6	131.74	146.67	144.89	139.97	145.50
C-7	152.65	151.82	151.25	150.15	152.47
C-8	92.36	101.89	98.35	102.11	101.75
C-9	151.51	149.77	151.25	148.36	148.36
C-10	106.60	111.97	112.67	112.98	112.98
5-OCH₃	59.92	-	-	-	-
6-7- OCH₂O-	101.80	102.31	-	-	-
6-OCH₃	-	56.44	-	-	56.83
C-1'	-	68.51	-	67.20	67.20
C-2'	-	60.83	-	120.11	120.27
C-3'	-	58.25	-	139.76	139.76
C-4'	-	24.53	-	25.84	25.84
C-5'	-	19.07	-	18.28	18.28

Experimental data (100 MHz; CDCl₃)

*Experimental data (125 MHz; CDCl₃)

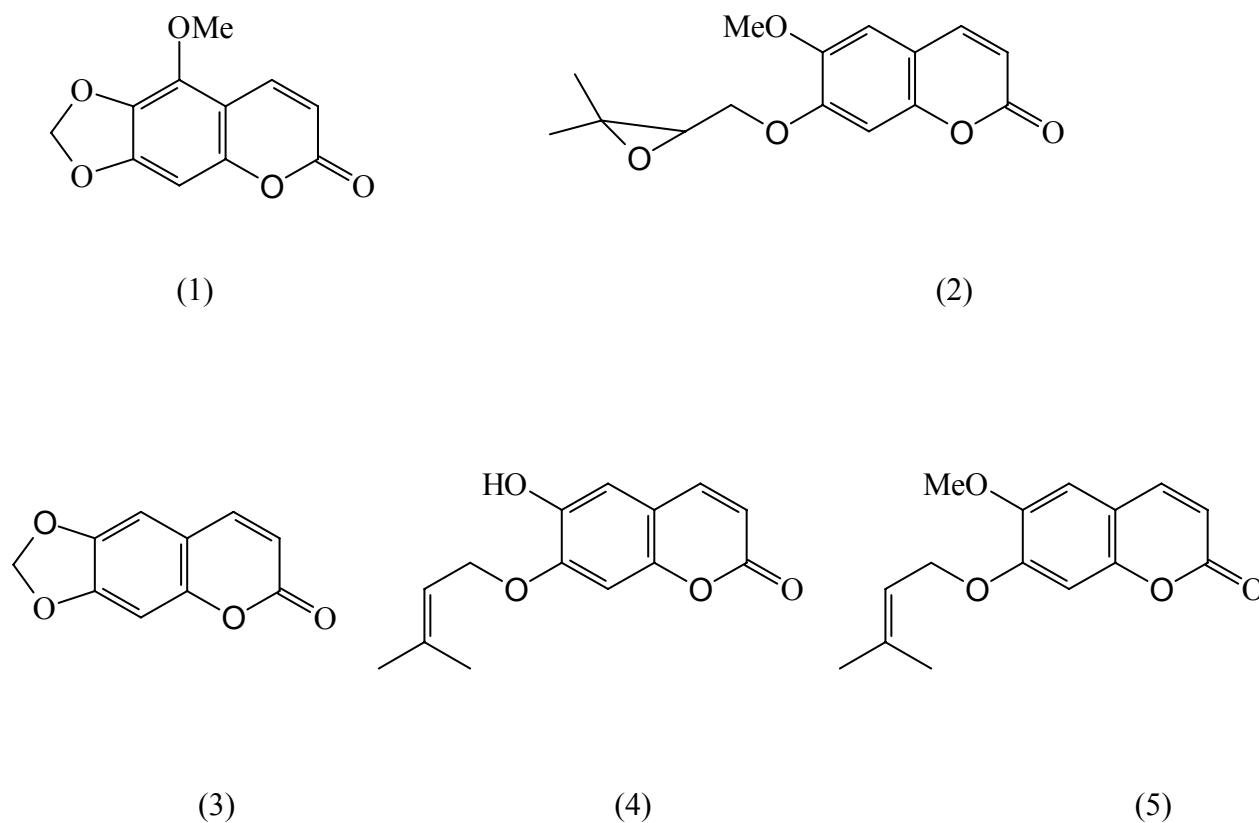


Fig 1. Chemical structures of 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (1), 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-coumarin (2), Ayapin (3), prenyletin (4) and Prenyletin-methyl ether (5)

Results and discussion

The distribution of the coumarins in Asteraceae is shown in Table 3 where the taxa are grouped according to the Bremer (1994) tribal systems.

Table 3: distribution of coumarins in the tribes of Asteraceae

Subfamily	Tribe (number of genus)	Number of genus presenting coumarins	Number of different coumarins (types)
Barnadesioideae	Barnadesieae (9)	NR	-
Cichorioideae	Mutisieae (76)	13	32 (S:21; F:4; P:7)
	Cardueae (83)	3	8 (S:8)

	Lactuceae (98)	8	6 (S:6)
	Vernonieae (98)	4	14 (S:6; P:3)
	Liabeae (14)	NR	-
	Arctoteae (16)	NR	-
Asteroideae	Inuleae (38)	1	2 (S:2)
	Plucheeae (28)	1	40 (S:30)
	Gnaphalieae (181)	3	3 (S:3)
	Calenduleae (8)	NR	-
	Astereae (174)	8	27 (S:27)
	Anthemideae (109)	7	43 (S:42; F:1)
	Senecioneae (120)	4	5 (S:5)
	Helenieae (110)	3	6 (S:6)
	Heliantheae (189)	13	21 (S:21)
	Eupatorieae (170)	7	9 (S:9)

NR= not reported; S= simple coumarins; F= furanocoumarins; P= pyranocoumarins

A number of 146 different coumarins were found in the family occurring in 75 genera distributed in 13 of the 17 tribes. These compounds have not been reported for species from the tribes Barnadesieae (subfamily Barnadesioideae), Liabeae, Arctoteae (subfamily Cichorioideae) and Calenduleae (subfamily Asteroideae). In the subfamily Cichorioideae, the richest taxa are Mutisieae, Lactuceae and Vernonieae. In the subfamily Asteroideae, the richest tribe is Heliantheae.

Considering the chemical structures of the coumarins, it was verified that simple coumarins are the most frequently found in the family. The tribe Mutisieae, subfamily Cichorioideae, with 76 genera presents 13 genera containing coumarins being the richest source of these compounds and the taxa where a great structural variation is found, some species presenting both furanocoumarins and pyranocoumarins. Besides Mutisieae, a report about the occurrence of one furanocoumarin in a species from subfamily

Asteroideae (genus *Artemisia*, tribe Anthemideae) was found (Bretón, 1974). Pyranocoumarins, however, are found only in Cichoroideae, in the tribes Mutisieae and Vernonieae.

It is interesting that in Plucheeae the only genus that presents coumarins is *Pterocaulon* in which a number of 40 different coumarins were previously found in ten species (Table 4). In this work we analysed other five species native to south Brazil and coumarins were found in all of them. These data indicate that these compounds could be considered chemotaxonomic markers for the genus *Pterocaulon*.

Table 4: occurrence of coumarins in *Pterocaulon* species

Species	Origin	Coumarins	Reference
<i>P. alopecuroides</i> (Lam.) DC.	West Indies; S. America	Present	Vilegas et al., 1995; this work
<i>P. angustifolium</i> DC.	S. America	Present	this work
<i>P. balansae</i> Chod.	S. America	Present	Magalhães et al., 1981
<i>P. cordobense</i> O.K.	Argentina, Brazil and Uruguay	Present	this work
<i>P. lanatum</i> O.K.	Bolivia; Paraguay	Present	Magalhães et al., 1981
<i>P. lorentzii</i> Malme	S. America	Present	this work
<i>P. niveum</i> Cabr.	Australia	Absent or not investigated	-
<i>P. polypterum</i> (DC). Cabr.	S. America (Brazil, Uruguay and Argentina)	Present	this work
<i>P. polystachyum</i> DC.	S. America	Present	Palacios et al., 1999; Vera et al., 2001

<i>P. purpurascens</i> Malme	S. America (Argentina,Paraguay)	Present	Debenedetti et al., 1991; 1992; 1996
<i>P. pycnostachyum</i> (Michx.) Ell.	U.S.A.	Absent or not investigated	-
<i>P. redolens</i> (Willd.) F. Villar	Tropical Asia; Australia	Present	Kanlayavattanakul et al., 2003.
<i>P. rugosum</i> (Vahl) Malme	S. America	Present	this work
<i>P. serrulatum</i> (Montr.) Guillemin	Australia; New Caledonia	Present	Macleod e Rasmussen et al., 1999.
<i>P. sphacelatum</i> (Labill.) Benth. et Hook	Australia and surrounded Island to the north	Present	Johns et al., 1968; Semple et al., 1999
<i>P. sphaeranthoides</i> (DC.) Benth. et Hook	Australia	Absent or not investigated	-
<i>P. verbascifolium</i> (Muell.) Benth. et HookK	Java; Sunda Isl.; Australia	Absent or not investigated	-
<i>P. virgatum</i> (L.) DC.	West Indies; EUA(Arizona) S. America	Present	Bohlmann et al., 1981; Debenedetti et al., 1994; 1998; 1999; Demyttenaere et al., 2004

Although the species of *Pterocaulon* present other classes of compounds, coumarins are characteristic of the genus. In *Pterocaulon* coumarins can be di-, tri- or tetraoxygenated and all of them are 6,7 oxygenated.

Pterocaulon alopecuroides and *P. polystachyum* were studied previously but in this work we investigated the exudate instead of the extract of the powdered plant. The exudate of *P. alopecuroides* afforded 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (**1**) and 7-(2,3-epoxy-3-methyl-3-butyloxy)-6-methoxycoumarin (**2**), previously found in *P. virgatum* (Bohlmann et al., 1981; Debenedetti et al., 1994). To our knowledge this is the first report on the occurrence of coumarins **1** and **2** in *Pterocaulon alopecuroides*. From this plant, the compounds 7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-6-methoxycoumarin and 7-(2,3-dihydroxy-3-methylbutyloxy)-5-hydroxy-6-coumarin were previously obtained (Vilegas et al., 1995). This difference could be due to the extraction method employed and to the fact that the plants were collected in different places. Nevertheless, it is worth while to state that the plant exudate presented several coumarins of which only the most abundant were isolated.

The exudate of *P. polystachyum*, besides 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin (**1**), afforded three other coumarins, namely ayapin (**2**), prenyletin (**3**) and prenyletinmethyl-ether (**4**). These compounds were previously isolated from the chloroform extract of the powdered plant material (Palacios et al., 1999; Vera et al., 2001).

The presence of high amounts of coumarins in the exudate of these plants suggests that the compounds are accumulated in the epicuticular wax or in the trichomes or in both. In order to determine the exact localization of the compounds a morpho-anatomical study is being carried out.

The presence of some secondary metabolites can be a useful character in the revision of taxonomic systems. Nevertheless sometimes the available data are not sufficient. As until

now the only chemical character used in cladistic analysis of the tribe Plucheeae was the presence or absence of sesquiterpene cuauhtematl (Cuauhtemon), and its derivatives, the data presented here could be a useful toll.

Some coumarins such as ayapin isolated from several species are described as phytoalexins, protecting the plant against the microorganisms attach, especially fungus. In the case of *Pterocaulon* the method employed for the extraction of the compounds could indicate that the substances, if not all, the majority, are located in the surface of the leaves and branches where they could act as phytoalexins. Interestingly enough, native species of *Pterocaulon* are used in some rural areas in South Brazil to treat animal skin diseases popularly diagnosed as mycoses. In a recent study our group investigated the antifungal activity of crude extracts, fractions and coumarins obtained from *P. alopecuroides*, *P. balansae* and *P. polysthachyum* finding significant results (Stein *et al.*, 2005).

The authors want to thank CNPq and CAPES for the financial support.

References

Anderberg A. A. (1991) Taxonomy and phylogeny of the tribe Plucheeae (Asteraceae). - *Plant Systematics and Evolution* 176: 145-177.

Anderberg A. A. (1994a) Tribe Inuleae. In: Bremer K. (ed.) *Asteraceae - Cladistics and Classification*. Timber Press, Portland, pp. 273-291.

Anderberg A. A. (1994b) Tribe Plucheeae. In: Bremer K. (ed.) Asteraceae - Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, pp. 292-303.

Anderberg A. A. (1994c) Tribe Gnaphalieae. In: Bremer K.(ed.) Asteraceae - Cladistics and Classification. Timber Press, Portland, pp. 304-364.

Bremer K. (1994) Asteraceae - Cladistics and Classification. Timber Press, Portland.

Bohlmann F., Jakupovic J. (1979) 8-oxo- α -selinen und scopoletin-derivate aus *Conyza*-arten. Phytochem. 18: 1367-1370.

Bohlmann F., Abraham W., Kings R. M., Robinsons H.(1981) Thiophene acetylenes and flavanols from *Pterocaulon virgatum*. Phytochem. 20: 825-827.

Bréton J.L. (1974) Lactonas Sesquiterpénicas, Caja General de Ahorros, Santa Cruz de Tenerife.

Cardona L., García B., Pedro J. R., Pérez J. 6-Prenyloxy-7-methoxycoumarin, a coumarin-hemiterpene ether from *Carduus tenuiflorus* (1992) Phytochem. 31: 3989-3991.

Debenedetti S. L., Nadinic E. L., Gomez M. A., Coussio J. D. (1987) Polyphenols isolated from *Pterocaulon purpurascens*, I. 6-hydroxyflavonoids. J Nat Prod 50: 512-513.

Debenedetti S. L., Nadinic E. L., Coussio J. D., De Kimpe N., Dupont, J. F., Declerc J. P., (1991) Purpureanol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*.
Phytochem. 30: 2757-2758.

Debenedetti S. L., Nadinic E. L., Gomez M. A., Coussio J. D., De Kimpe N., Boeykens M. (1992) Purpurasol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*.
Phytochem. 31: 3284-3285.

Debenedetti S. L., Palacios P. S., Nadinic E. L., Coussio J. D. (1994) 5-(3-methylenedioxy)coumarin, a 5,6,7-trioxygenated coumarin from *Pterocaulon virgatum*. J. Nat. Prod. 57: 1539-1542.

Debenedetti S. L., Nadinic E. L., Gomez M. A., Coussio J. D., De Kimpe N., Boeykens, M. (1996) Purpurasolol, a highly oxygenated coumarin from *Pterocaulon purpurascens*.
Phytochem. 42: 563-564.

Debenedetti S. L., Nadinic E. L., Coussio J. D., De Kimpe N., Boeykens M. (1998) Two 6,7-dioxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*. Phytochem. 48: 707-710.

Debenedetti S. L., Tehrani K. A., Puyvelde L. V., De Kimpe N. (1999) Isopurpurasol, a coumarin from *Pterocaulon virgatum*. Phytochem. 51: 701- 703.

Demyttenaere J., Vervisch S., Debenedetti S., Coussio J., Maes D., De Kimpe N. (2004) Synthesis of Virgatol, two naturally occurring coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.)

DC., and 7-(2,3-epoxy-3-methylbutoxy)-6-methoxycoumarin, isolated from *Conyza obscura* DC. Synthesis 11: 1844-1848.

Johns S. R., Lamberton J. A., Price J. R., Sioumis A. (1968) Identification of coumarins isolated from *Lepiniopsis ternatensis* (Apocynaceae), *Pterocaulon sphacelatum* (Compositae) and *Melicope melanophloia* (Rutaceae) Aust. J. Chem. 21: 3079.

Kanlayavattanakul M., Ruangrunsi N., Watanabe T., Ishikawa T. (2003) Chemical constituents of *Pterocaulon redolens*. Heterocycles 61: 183-187.

Macleod J.K., Rasmussen H.B. (1999) A hydroxy- β -caryophyllene from *Pterocaulon serrulatum*. Phytochem. 50: 105-108.

Maldonado E., Hernández E., Ortega A. Amides, coumarins and other constituents from *Simsia cronquistii* (1992) Phytochem. 31: 1413-1414.

Magalhães A. F., Magalhães E. G., Leitão Filho H. F., Frighetto R. T. S., Barros, S. M. G. (1981) Coumarins from *Pterocaulon balansae* and *P. lanatum*. Phytochem. 20: 1369-1371.

Magalhães A. F., Magalhães E. G., Vilarde N. J., Leitão Filho H. F. (1989) Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. Phytochem. 28: 2497-2499.

Martino V. S., Debenedetti S. L., Coussio J. D. (1979) Caffeoylquinic acids from *Pterocaulon virgatum* and *Pluchea sagittalis*. Phytochem. 18: 2052.

Murray R.D.H.; Méndez J.; Brown S.A. (1982) *The Natural Coumarins - Occurrence, Chemistry and Biochemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester.

Palacios R.S., Rojo A.A., Coussio J.D., De Kimpe N., Debenedetti S.L. (1999) 6,7-dioxygenated and 5,6,7-trioxygenated coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Med.* 65: 294-295.

Semple S. J., Nobbs S.F., Pyke S.M., Reynolds G.D., Flower R.L.P. (1999) Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian aboriginal medicine. *J. Ethnopharmacol.* 68: 283-288.

Stein A. C., Sortino M., Avancini C., Zacchino S., von Poser G. (2005) Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). *J. Ethnopharmacol.* 99: 211-214.

Vera N., Bardón A., Catalan C.A.N., Gedris T.E., Herz W. (2001) New coumarins from *Pterocaulon polystachyum*. *Planta Med.* 67: 674-677.

Vilegas W., Boralle N., Cabrera A., Bernardi A. C., Pozetti G. L., Arantes S. F. (1995) Coumarins and a flavonoid from *Pterocaulon alopecuroides*. *Phytochem.* 38: 1017-1019.

Address of the authors: Ana Cristina Stein, Daniela Fritz and Gilsane von Poser, PPG-Ciências Farmacêuticas, UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone (051) 33165258, Fax (051) 33165610. - Luis Fernando Paiva Lima and Nelson Ivo Matzenbacher, PPG-Botânica, ICBS, Av. Bento Gonçalves 9500, Prédio 43433, Sala 209, 91509-900 Porto Alegre, RS, Brazil. Phone (051) 33167686, Fax (051) 33167670. - Jan Schripsema, Grupo Metabolômica, LCQUI/CCT, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Av. Alberto Lamego, 2000, 28015-620 Campos dos Goytacazes - RJ, Brazil. - Viviane Pires and Pascal Sonnet, Faculté de Pharmacie, Université de Picardie Jules Verne, 1 Rue des Louvels, 80037 Amiens, France.

ANEXO 2

Artigo publicado no periódico *Journal of Ethnopharmacology*

ANEXO 3

Espectros de RMN

BIOGRAFIA

DADOS PESSOAIS

Nome: Ana Cristina Stein

Filiação: José Stein e Teresinha Lunkes Stein

Nascimento: 27/09/1979, Campina das Missões, RS, Brasil

1998 – Ingresso na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

2002 – Conclusão do curso de Farmácia

2003 – Ingresso no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), nível de mestrado, sob orientação da Profa. Dra. Gilsane Lino von Poser

2005 – Conclusão do curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS