



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



**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
CITOTÓXICA DE CUMARINAS NATURAIS E SINTÉTICAS**

DAMIANA DA ROCHA VIANNA

PORTO ALEGRE, 2011

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

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
CITOTÓXICA DE CUMARINAS NATURAIS E SINTÉTICAS**

Desenvolvimento de Tese apresentado por
Damiana da Rocha Vianna para obtenção
do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser
Co-Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2011

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 16 de dezembro de 2011 pela Comissão Examinadora constituída por:

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

Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Aloir Antônio Merlo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Miriam Anders Apel
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

da Rocha Vianna, Damiana
Avaliação in vitro da atividade antifúngica e
citotóxica de cumarinas naturais e sintéticas /
Damiana da Rocha Vianna. -- 2011.
146 f.

Orientadora: Gilsane Lino von Poser.
Coorientador : Helder Ferreira Teixeira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-
RS, 2011.

1. cumarina. 2. síntese por micro-ondas. 3.
isolamento a partir de Pterocaulon. 4. atividade
antifúngica contra S. shenckii. 5. atividade
citotóxica frente a linhagens de glioma. I. Lino von
Poser, Gilsane, orient. II. Ferreira Teixeira,
Helder, coorient. III. Título.

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Farmacognosia, no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM) colaboração com a Profa. Dr. Vera Eifler Lima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Laboratório de Produtos Naturais (PILAB, Universidade Federal do Rio de Janeiro) colaboração com Prof. Dr. Ângelo da Cunha Pinto, no Laboratório de Fungos Patogênicos (Instituto de Ciências Básica da Saúde, UFRGS) colaboração com a Profa. Dr. Maria Lúcia Scroferneker e no Laboratório 22 (Departamento de Bioquímica, UFRGS) colaboração com a Profa. Dr. Ana Battastini.

A pesquisa foi financiada pela CAPES, e a autora recebeu bolsa de doutorado deste mesmo órgão financiador.

Ao meu filho amado Vitor

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora professora Dr. Gilsane von Poser pelo incentivo, pela dedicação e pela amizade.

Ao professor Dr. Helder Teixeira, pela co-orientação e pelos conselhos indispensáveis.

À professora Dr. Vera Lima pela colaboração fundamental no desenvolvimento desse trabalho e pela disponibilidade.

Ao professor Dr. Angelo C. Pinto pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança e pelo excelente exemplo de profissional.

Aos colegas do PiLAB em especial as amigas Lidilhone Hamerski, Sabrina Teixeira Martinez, Marluce Oliveira Dias, Márcia e Bárbara Vasconcellos da Silva pela amizade e auxílio fundamental.

As professoras Dr. Maria Lúcia Scroferneker e Dr. Ana Maria Oliveira Batasttini pela colaboração na realização dos ensaios biológicos. As colegas Andressa Bernardi e Cheila Stopiglia pela parceria.

Aos professores Dr. Mauricio Lanznaster e Dr. José Maria Monserrat pela colaboração nos ensaios de propriedades antioxidantes.

A Comissão de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, professores e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

A banca examinadora contituida pelos professores Dr. Alexandre de Barros Falcão Ferraz, Dr. Alexandre Meneghello Fuentesfria, Dr. Aloir Antônio Merlo e Dr. Miriam Anders Apel pela excelente contribuição.

Aos amigos de laboratório, em especial ao doutorando Rômulo Faria Santos Canto pela participação e amizade.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia Gabriela Meirelles, Fernando Torres, Flávia Corvello, Francisco Maikon de Barros, Paula Pinto, Satchie Sakamoto, Sita Lukoki, Luisa Salles e Ismael Sauter pela amizade.

A minha família em especial a minha amada mãe Maria Regina Maia da Rocha pelo apoio fundamental.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito” .

Benjamin Disraeli

RESUMO

Cumarinas são estruturas promissoras e diversas atividades biológicas têm sido atribuídas a esses metabólitos secundários vegetais. Estudos sugerem que o mecanismo antifúngico desses compostos esteja correlacionado com a atividade antioxidante. A reação da tirosinase, que produz radicais livres, está envolvida no processo de melanização do fungo *Sporothrix schenckii*, o causador de micose subcutânea de maior incidência no sul do Brasil. A inibição dessa enzima foi recentemente reportada para extrato de *Pterocaulon* (Asteraceae), planta rica em cumarinas e usada na medicina tradicional do Brasil para tratamento tópico de micoses e na medicina popular da Argentina como anticâncer. O objetivo desse trabalho foi investigar *in vitro* a atividade antifúngica, correlacionando-a com atividade antioxidante, de extratos de espécies de *Pterocaulon* e de 6,7-metilenodioxicumarinas isoladas e também de 4-metilcumarinas obtidas por síntese, bem como a investigação da atividade citotóxica de algumas destas moléculas. As 6,7-metilenodioxicumarinas foram isoladas de *P. balansae* e *P. lorentzii*, enquanto que as 4-metilcumarinas foram sintetizadas via Pechmann por micro-ondas. A atividade antifúngica contra *Sporotrix schenckii* foi realizada conforme manual do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. O estudo das propriedades eletroquímicas foi obtido por voltametria cíclica e a capacidade antioxidante pelo método espectrofotométrico DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e pelo método fluorimétrico ACAP contra radicais peroxil. A análise dessa atividade mostrou que os extratos metanólicos de espécies de *Pterocaulon* (*P. polystachyum*, *P. balansae*, *P. lorentzii*, *P. lanatum* e *P. cordobense*) foram ativos frente às cepas do fungo *S. schenckii*, sendo o extrato de *P. polystachyum* o mais ativo, apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) compreendida entre 156 e 312 µg/mL. O fracionamento dos extratos lipofílicos de *P. balansae* e *P. lorentzii* levou ao isolamento de três metilenodioxicumarinas. Dados cristalográficos da 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina, inéditos, foram depositados no Cambridge Crystallographic Data Centre 779123. As cumarinas sintéticas foram obtidas em rendimentos satisfatórios (98-30%) e em reduzido tempo de reação (5-20 min). O *screening* destas cumarinas frente às cepas do fungo *S. schenckii* revelou que 5-carboxi-6,7-diidroxi-4-metilcumarina, com CIM de 66 µM e Concentração Fungicida Mínima de 246 µM, foi o composto mais ativo. Essa cumarina apresentou sinergismo com a Anfotericina B, sendo sua CIM reduzida para 15 µM. A atividade antifúngica desses

compostos pode estar correlacionada com a atividade antioxidante. O composto 5-carboxi-6,7-diidroxil-4-metilcumarina foi o mais ativo mostrando elevada capacidade antioxidante frente aos radicais DPPH com valores de IC_{50} de 17,49 μ M e elevada atividade frente ao radical peroxil. Além disso, apresentou um potencial de oxidação de 0,4 V sugerindo atividade antioxidante. Baseado nos ensaios antioxidante e antifúngico foi possível observar que a presença de grupamentos hidroxilas no C-7 e C-8 do anel cumarínico, assim como a adição de grupamento polar no C-5 favoreceu ambas as atividades antifúngica e antioxidante. Na segunda etapa desse trabalho foi avaliada a citotoxicidade das cumarinas isoladas e algumas cumarinas simples, disponíveis comercialmente, pelo método Metil Tiazol Tetrazólio (MTT) usando linhagens de glioma humano (U138-MG) e de ratos (C6). Foi observado que as 6,7-metilenodioxycumarinas causaram uma significativa redução na viabilidade celular, sugerindo uma influência positiva do grupamento metilenodioxi sobre essa atividade. O composto 5-metóxi-6,7-metilenodioxycumarina foi o mais promissor (IC_{50} = 34,6 μ M e IC_{50} = 31,6 μ M para C6 e U-138 MG, respectivamente). Como desfecho desse trabalho, pode-se concluir que as cumarinas apresentaram uma atividade inibitória frente ao crescimento celular de linhagens de glioma e um efeito fungicida sobre *S. schenckii*, resultados estes que corroboram com o uso popular dessas plantas.

Palavras-chave: *Pterocaulon*, Asteraceae, cumarina, atividade antifúngica, atividade antioxidante, atividade citotóxica, micro-ondas.

ABSTRACT

***In vitro* antifungal and cytotoxic activities of natural and synthetic coumarins**

Coumarins are promising structures and diverse biological activities have been attributed to these secondary plant metabolites. Studies suggest that the mechanism of antifungal compounds is correlated with antioxidant activity. The reaction of tyrosinase, which produces free radicals, is involved in the process of melanization of the fungus *Sporothrix schenckii*, the agent of subcutaneous mycosis with the highest incidence in southern Brazil. The inhibition of this enzyme has recently been reported to extract *Pterocaulon* (Asteraceae). This plant is rich in coumarins and used in traditional medicine in Brazil for topical treatment of fungal infections and in folk medicine of Argentina as anticancer. The aim of this study was to investigate the *in vitro* antifungal activity and correlation with its antioxidant properties and cytotoxic activities of extracts of some species of *Pterocaulon*, as well as the isolated coumarins, and 4-methylcoumarin analogs obtained by synthesis. The 6,7-methylenedioxy coumarins were isolated from *P. balansae* and *P. lorentzii*, while the 4-methylcoumarins were synthesized via Pechmann reaction using microwave. The antifungal activity against *Sporothrix schenckii* was performed as indicated in the Manual of Clinical and Laboratory Standards Institute. A study of the electrochemical properties of coumarins was performed by cyclic voltammetry, by the method of 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) and against peroxy radicals (ACAP) by fluorometric method. The analysis showed that the antifungal activity of the methanol extracts of *Pterocaulon* species (*P. polystachyum*, *P. balansae*, *P. lorentzii*, *P. lanatum* and *P. cordobense*) were active against the strains of the fungus *S. schenckii*, being the extract of *P. polystachyum* the most active, presenting Minimum Inhibitory Concentration (MIC) compressed between 156 and 312 $\mu\text{g/mL}$. The fractionation of lipophilic extracts of *P. balansae* and *P. lorentzii* led to the isolation of three methylenedioxy coumarins. The crystallographic data of 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin were deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center 779123. The synthetic coumarins were obtained in satisfactory yields (98-30%) and reduced reaction time (5-20 min). The screening of these coumarins against strains of the fungus *S. schenckii* revealed that the 5-carboxy-6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin was the most active compound, presenting MIC of 66 μM and Minimum Fungicidal Concentration of 246 μM . This coumarin showed synergism with Amphotericin B, and its MIC was reduced to 15 μM . The antifungal activity of

phenolic compounds could be related to its antioxidant activities. The compound 5-carboxy-6,7-dihydroxy-4-methylcoumarin was again the most active with IC_{50} value of 17.49 μ M, showing the highest capacity to deplete the radicals DPPH and ACAP, moreover present a oxidation potential of 0.4 V suggesting antioxidant activity. Based on the antioxidant and antifungal tests it was observed that the presence of hydroxyl groups at C-7 and C-8 of the coumarin ring and the addition of polar grouping at C-5 favored both antifungal and antioxidant activities. In the second part of this work, it was evaluated the cytotoxicity of the *Pterocaulon* compounds and some commercially available coumarins, with simple structure. The cytotoxic potential was determined by Methyl Thiazole Tetrazolium (MTT) test using strains of human glioma (U138-MG) and rat (C6). It was observed that the 6,7-methylenedioxy coumarins caused a significant reduction in cell viability, suggesting a positive influence of the methylenedioxy group in this activity. The compound 5-methoxy-6,7-methylenedioxy coumarin was the most promising ($IC_{50} = 34.6 \mu$ M and $IC_{50} = 31.6 \mu$ M for C6 and U-138 MG, respectively). In conclusion, this work it was demonstrated that some coumarins showed an inhibitory activity against the growth of glioma cell lines and a fungicidal effect on the *S. schenckii*. These results corroborate the popular use of these plants.

Keywords: *Pterocaulon*, Asteraceae, coumarin, antifungal activity, antioxidant activity, cytotoxic activity, microwave.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Cumarinas isoladas de diferentes espécies de <i>Pterocaulon</i>	26
Tabela 2: Respostas biológicas de cumarinas.....	101
Tabela 3: Otimização da catálise, temperatura e tempo (aquecimento convencional).....	119
Tabela 4: Comparação entre aquecimento convencional e sob radiação micro-ondas.....	120
Tabela 5: Atividade antifúngica (CIM) de cumarinas comerciais, isoladas e sintéticas e de quercetina contra <i>S. schenckii</i>	122
Tabela 6: Valores de IC ₅₀ e Potencial eletroquímico obtido nos ensaios antioxidantes.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Partes aéreas de <i>P. polystachyum</i>	23
Figura 2: Fungo <i>S. schenckii</i> na forma miceliana (a) e na forma leveduriforme (b).....	41
Figura 3: Estrutura cristalográfica da 5-metóxi-6,7-metilenodioxycumarina (10).....	118
Figura 4: Mecanismo de transformação de energia, polarização dipolar.....	121

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Reação de Perkin na síntese de cumarinas.....	29
Esquema 2: Reação de Knoevenagel na síntese de cumarinas.....	30
Esquema 3: Reação de Wittig na síntese de cumarinas.....	30
Esquema 4: Reação de Reformatsky na síntese de cumarinas.....	31
Esquema 5: Mecanismo de reação proposto para síntese de 4-metilcumarinas.....	31
Esquema 6: Mecanismo de formação da melanina.....	36
Esquema 7: Condensação de Pechmann e derivatização de 4-metilcumarinas.....	118

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: 2,20-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ACAP: Capacidade Antioxidante Contra Radicais Peroxil
A549: Linhagens de câncer pulmonar
BF₃.OEt₂: Trifluoreto de boro dietiléter
CCD: Cromatografia em Camada Delgada
CCDC: Cambridge Crystallographic Data Centre
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CFM: Concentração Fungicida Mínima
CYP3A: Lanosina 14 α -desmetilase
C6: Linhagens celulares de glioma de ratos
DPPH: Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
DU145: Linhagens de carcinoma prostático humano
E_p: Potencial de Oxidação
ERO: Espécies Reativas de Oxigênio
GBM: Glioblastoma Multiforme
HepG2: Linhagens de carcinoma hepatocelular humano
L-DOPA: 3,4-diidroxifenilalanina
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
MW: Micro-ondas
NSCLC-N6: Linhagens de carcinoma brônquico humano
OMS: Organização Mundial de Saúde
SGC-7901: Linhagens de câncer gástrico humano
SIDA: Síndrome da Imunodeficiência Humana
SNC: Sistema Nervoso Central
U138-MG: Linhagens celulares de glioma humano
VC: Voltametria Cíclica

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	OBJETIVOS.....	20
2.1.	Objetivos específicos.....	21
3.	REVISÃO.....	22
3.1.	Gênero <i>Pterocaulon</i>	23
3.1.1	Taxonomia.....	23
3.2	Morfologia do gênero <i>Pterocaulon</i>	23
3.3.	Relatos de uso na medicina tradicional e propriedades biológicas avaliadas em extratos de <i>Pterocaulon</i>	24
3.3.1.	Atividade antifúngica dos extratos de <i>Pterocaulon</i>	25
3.4.	Cumarinas: Compostos químicos majoritários de <i>Pterocaulon</i>	26
3.4.1.	Propriedades químicas das cumarinas.....	29
3.4.2.	Síntese de cumarinas.....	29
3.4.3.	Propriedades biológicas.....	32
3.4.3.1.	Atividade antifúngica.....	33
3.4.3.2.	Propriedade antioxidante.....	35
3.4.3.2.	Atividade citotóxica.....	36
3.4.3.3.	Metabolismo e toxicidade.....	37
4.	PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS	38
	PARTE I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE.....	40
4.1	CAPÍTULO I.....	44
	Antifungal activity of <i>Pterocaulon</i> species (Asteraceae) against <i>Sporothrix schenckii</i> . (2011). <i>Journal de Mycologie Médicale</i> , v. 21, p. 169-172.	
4.2.	CAPÍTULO II.....	59
	Antifungal activity of some natural products from species of <i>Pterocaulon</i> (Asteraceae) against <i>Sporothrix schenckii</i> . Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico <i>Journal of Pharmacy Research</i> .	
4.3.	CAPÍTULO III.....	65
	Microwave-assisted synthesis of 4-methyl-coumarins and their antifungal activity against <i>Sporothrix schenckii</i> . Submetido ao periódico <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters</i> .	
4.4.	CAPÍTULO IV.....	76
	“Evaluation of antioxidant capacity of synthesized coumarins” Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico <i>Biochimie</i>	
	PARTE II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA.....	100
4.5.	CAPÍTULO V.....	104
	Coumarins from <i>Pterocaulon</i> species and their cytotoxic activity against glioma cell lines. Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico <i>Phytochemistry Letters</i> .	
5.	DISCUSSÃO GERAL.....	115
6.	CONCLUSÕES.....	130
7.	REFERÊNCIAS.....	132
8.	ANEXOS.....	144

Plantas e seus metabólitos têm uma longa história de relevância clínica como agentes terapêuticos (SATHIAMOORTHY *et al.*, 2007). O uso é descrito desde 2600 a.C. (GURIB-FAKIM, 2006) e, segundo OLIVEIRA (2008), a utilização de espécies vegetais com fins de tratamento e cura de doenças e sintomas remonta ao início da civilização, desde o momento em que o homem começou manusear, adaptar e modificar os recursos naturais para seu próprio benefício. Estimativas da Organização Mundial de Saúde revelam que cerca de 80% da população mundial recorrem a plantas medicinais para atenção básica em saúde (JUNIOR *et al.*, 2005; WHO, 1997).

Aspectos quimiotaxonômicos, botânico-taxonômicos e informações advindas da medicina tradicional são essenciais para a descoberta de substâncias ativas de origem vegetal (OLIVEIRA, 2008). Em se tratando de plantas medicinais, PEDERSEN e BARUFFATI (1985) defenderam não ser possível separar os usos terapêuticos das plantas do sistema de conhecimento popular da doença, devendo ser primordial aliar experiências científicas ao contexto etnográfico.

Nesse sentido, a partir de um levantamento etnoveterinário realizado por AVANCINI (2002) o qual indicou que plantas conhecidas como “Quitoco” (espécies de *Pterocaulon*, família Asteraceae) são amplamente empregadas no tratamento de doenças da pele, STEIN e colaboradores (2005) avaliaram *in vitro* a atividade antifúngica desses extratos, ricos em cumarinas, frente a cepas de fungos patogênicos demonstrando uma elevada atividade antifúngica. Outros relatos de uso na medicina tradicional da Argentina indicam também a utilização de *P. polystachyum* como antitumoral (MONGELLI *et al.*, 2000; RIVEIRO *et al.*, 2004).

Cumarinas, lactonas do ácido *o*-hidroxicinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas), são compostos abundantes encontrados em *Pterocaulon* (HEEMANN *et al.*, 2004). Esses metabólitos secundários estão amplamente distribuídos nos vegetais e podem ser encontrados em todas as partes das plantas (SIMÕES *et al.*, 2003). Além disso, diversas rotas sintéticas também têm sido descritas como fonte de obtenção dessas estruturas de interesse farmacológico.

Dessa forma, a investigação das atividades biológicas descritas pela medicina tradicional, como, (i) atividade antifúngica e (ii) atividade citotóxica, de extratos de *Pterocaulon*, cumarinas isoladas ou obtidas por síntese foi o objetivo geral desse trabalho.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral analisar fitoquimicamente os extratos de *Pterocaulon*, isolamento e síntese de cumarinas para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica, antioxidante e citotóxica.

2.1. Objetivos específicos

- Isolar e identificar as cumarinas dos extratos de *Pterocaulon*;
- Sintetizar 4-metilcumarinas através da reação de Pechmann;
- Avaliar *in vitro* da atividade antifúngica dos extratos, das cumarinas obtidas por isolamento e por síntese;
- Estudar *in vitro* da atividade antioxidante das cumarinas obtidas por síntese;
- Determinar a atividade citotóxica *in vitro* das cumarinas isoladas de espécies de *Pterocaulon*.

3.1. Gênero *Pterocaulon*

3.1.1. Taxonomia

O gênero *Pterocaulon* pertence à família *Asteraceae* a qual compreende cerca de 1.100 gêneros, com aproximadamente 23.000 espécies distribuídas em três subfamílias: *Barnadesioideae*, *Chichorioideae* e *Asteroideae*. A subfamília *Asteroideae*, a qual pertence o gênero das espécies em estudo, é a mais numerosa e as espécies estão distribuídas em 10 tribos, 57 subtribos e 1.135 gêneros (BARROSO, 1991; JOLY, 1991; BREMER, 1994).

3.2. Morfologia do gênero *Pterocaulon*

As características morfológicas do gênero *Pterocaulon* incluem involúcro comprido, formado por poucas séries de brácteas linear-lanceoladas, sendo as exteriores gradualmente menores, caduca 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). A **Figura 1** abaixo, de *Pterocaulon polystachyum*, ilustra a disposição alternada das suas folhas.



Figura 1: Partes aéreas de *P. polystachyum*

3.3. Relatos de uso na medicina tradicional e propriedades biológicas avaliadas em extratos de *Pterocaulon*

O gênero *Pterocaulon* é amplamente distribuído no sul e no norte da América e da Austrália. Dentre as 18 espécies do gênero, 12 apresentam relatos de propriedades medicinais (CABRERA e RAGONESE, 1978). Geralmente, o uso desses vegetais é restrito a partes aéreas, sendo as formas de infusão e decocção as mais comuns. Na medicina tradicional da Argentina as espécies *P. virgatum* e *P. purpurascens* são utilizadas por suas propriedades digestivas e inseticidas. Além disso, também são empregadas em casos de acidentes com serpentes (MARTINO *et al.*, 1979; DEBENEDETTI *et al.*, 1992; DEBENEDETTI *et al.*, 1994; DEBENEDETTI *et al.*, 1999; MONGELLI *et al.*, 2000). Esse último uso também é descrito pelos nativos da Tailândia (KANLAYAVATTANAKUL *et al.*, 2003). Para as propriedades digestivas, inseticidas e antiofídica ainda não foram encontrados relatos na literatura.

Relatos etnobotânicos também citam o uso de *P. polystachyum* como agente antitumoral na medicina tradicional da Argentina. MONGELLI e colaboradores (2000) demonstraram que o extrato diclorometano foi capaz de inibir o crescimento celular, indicando a presença de compostos capazes de interagir com o DNA. Posteriormente, RIVEIRO e colaboradores (2004) demonstraram ação inibitória de proliferação celular dependente de tempo e de concentração, bem como alteração das propriedades de diferenciação celular do extrato éter de petróleo dessa mesma espécie.

Outras espécies de *Pterocaulon*, *P. sphacelatum* e *P. serrulatum* têm sido usadas na Austrália com o propósito de tratamento de infecções respiratórias na forma de inalação de seus vapores e também como função antisséptica (SEMPLE *et al.*, 1998; SEMPLE *et al.*, 1999; FLOWER, 2000). As propaladas atividades referentes a estes usos populares ainda não foram investigadas cientificamente.

Já na medicina popular no sul do Brasil, essas espécies vegetais são conhecidas popularmente como “Quitoco” e são usadas para tratamento de “micoses” em animais e em humanos (AVANCINNI, 2002). Extratos de algumas

espécies do gênero apresentaram um largo espectro de ação contra cepas de fungos patogênicos oportunistas (STEIN *et al.*, 2006).

3.3.1. Atividade antifúngica dos extratos de *Pterocaulon*

Extratos metanólicos brutos e frações hexano, diclorometano e metanol de três espécies do gênero *Pterocaulon* (*P. alopecuroides*, *P. balansae* e *P. polystachyum*) foram avaliadas *in vitro* quanto à atividade antifúngica frente a fungos patogênicos, incluindo dermatófitos, verificando-se que todas as plantas foram ativas (STEIN *et al.*, 2005).

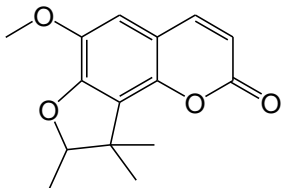
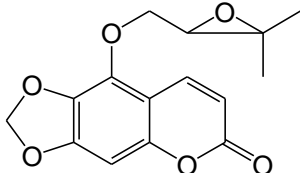
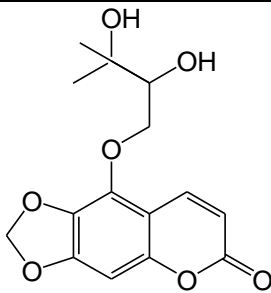
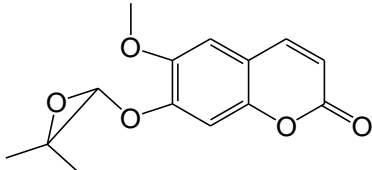
Entre as amostras testadas, a maior atividade foi verificada para o extrato hexano de *P. balansae*, o qual demonstrou um largo espectro de ação, sendo capaz de inibir todos os fungos testados. A CIM foi definida como sendo a Concentração Inibitória Mínima, com os seguintes resultados para esse extrato: *Candida albicans* CIM=100 µg/mL, *Candida tropicalis* CIM=50 µg/mL, *Saccharomyces cerevisiae* CIM=50 µg/mL, *Cryptococcus neoformans* CIM=50 µg/mL, *Aspergillus flavus* CIM=400 µg/mL, *Aspergillus niger* CIM=200 µg/mL, *Aspergillus fumigatus* CIM=400 µg/mL, *Microsporum gypseum* CIM=25 µg/mL, *Trichophyton rubrum* CIM=12,5 µg/mL, *Trichophyton mentagrophytes* CIM=12,5 µg/mL (STEIN *et al.*, 2005).

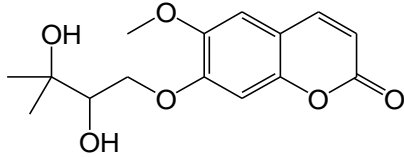
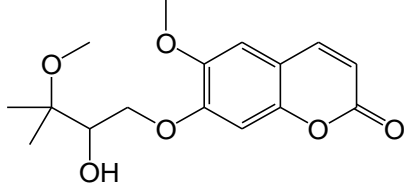
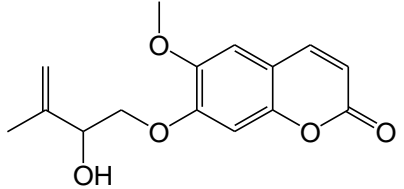
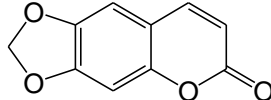
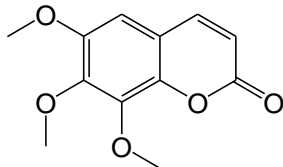
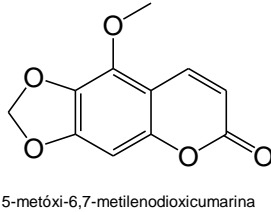
Recentemente, foi demonstrada a atividade antifúngica de extrato metanólico de *P. alopecuroides* contra alguns agentes causadores da cromoblastomicose (*Fonsecaea pedrosoi* e *Fonsecaea compacta*), uma infecção fúngica crônica do tecido cutâneo e subcutâneo causada pela inoculação traumática do agente etiológico. Esse extrato foi ativo contra todas as cepas testadas apresentando CIM entre 625 e 2500 µg/mL (DABOIT *et al.*, 2010).

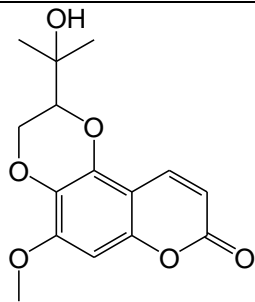
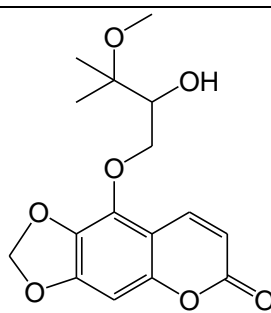
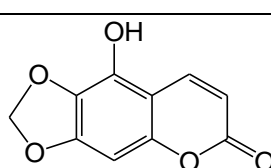
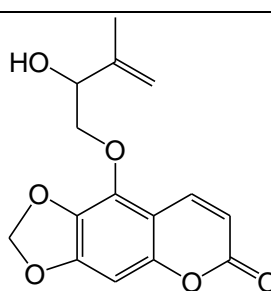
3.4. Cumarinas: Compostos majoritários de *Pterocaulon*

Dentre os constituintes químicos presentes nas espécies de *Pterocaulon* encontram-se o ácido cafeoilquínico (MARTINO *et al.*, 1979), poliacetilenos (BOHLMANN *et al.*, 1981; MAGALHÃES *et al.*, 1989) e flavonoides (DEBENEDETTI *et al.*, 1987; SEMPLE *et al.*, 1999). As cumarinas são os compostos majoritários encontrados no gênero, sendo que a maioria apresenta em sua estrutura química o grupamento 6,7-metilenodioxí. Na **Tabela 1** estão demonstradas cumarinas isoladas de diferentes espécies de *Pterocaulon*, o critério usado para seleção dessas referências foi prioritariamente o primeiro isolamento.

Tabela 1: Cumarinas isoladas de diferentes espécies de *Pterocaulon*

Composto	Estrutura	Fontes	Referência
(1)	 <p>8,9-dihidro-6-metoxi-8,9,9-trimetilcumarina</p>	<i>Pterocaulon polystachyum</i>	VERA <i>et al.</i> , 2001
(2)	 <p>5-(2',3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxícumarina</p>	<i>Pterocaulon balansae</i>	BARROS,1981
(3)	 <p>5-(2',3'-diidroxí-3'-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxícumarina</p>	<i>Pterocaulon balansae</i>	BARROS,1981
(4)	 <p>6-metoxi-7-(2',3'-epoxi-3'-metilbutiloxi)cumarina</p>	<i>Pterocaulon balansae</i>	BARROS,1981

(5)		<i>Pterocaulon balansae</i>	BARROS,1981
(6)		<i>Pterocaulon virgatum</i>	DEBENEDETTI <i>et al.</i> , 1998
(7)		<i>Pterocaulon virgatum</i>	DEBENEDETTI <i>et al.</i> , 1998
(8)		<i>Pterocaulon serrulatum</i>	MACLEOD e RASMUSSEN, 1999
(9)		<i>Pterocaulon serrulatum</i>	MACLEOD e RASMUSSEN, 1999
(10)		<i>Pterocaulon serrulatum</i>	MACLEOD e RASMUSSEN, 1999
		<i>Pterocaulon polystachyum</i>	RIVEIRO <i>et al.</i> , 2004
		<i>Pterocaulon balansae</i>	HEEMANN <i>et al.</i> , 2004

(11)	 <p>Isopurpurasol</p>	<i>Pterocaulon virgatum</i>	DEBENEDETTI <i>et al.</i> , 1999
(12)	 <p>5-(2-hidroxi-3-metoxi-3-metilbutoxi)-6,7-metilenodioxycumarina</p>	<i>Pterocaulon virgatum</i>	MAES <i>et al.</i> , 2006
(13)	 <p>5-hidroxi-6,7-metilenodioxycumarina</p>	<i>Pterocaulon virgatum</i>	MAES <i>et al.</i> , 2006
(14)	 <p>5-(2-hidroxi-3-metil-3-buteniloxi)-cumarina</p>	<i>Pterocaulon virgatum</i>	MAES <i>et al.</i> , 2006

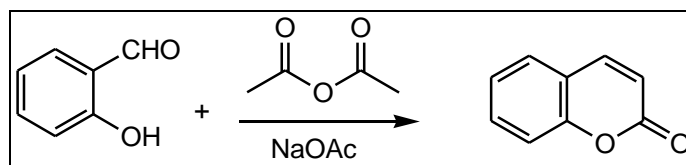
3.4.1. Propriedades químicas das cumarinas

Cumarinas ocorrem como cumarinas-simples, furanocumarinas, piranocumarinas, lignocumarinas, cumarinas diméricas e triméricas. São lactonas do ácido *o*-hidróxi-cinâmico (2H-1-benzopiran-2-onas) que apresentam um espectro ultravioleta (UV) característico, o qual é fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes. Desse modo, são facilmente visualizadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD). As manchas do cromatograma, sob ação da luz UV, aparecem em cores diversas, como azul, amarela e roxa, as quais podem ser realçadas após exposição ao vapor amônia (SIMÕES *et al.*, 2003).

3.4.2. Síntese de cumarinas

Vários métodos de síntese de cumarinas têm sido empregados e a escolha dentre eles depende do padrão de substituição desejado. Algumas metodologias são baseadas nas reações de Perkin (JOHNSON, 1942), Reformatsky (SHRINER, 1942), Knoevenagel (KADIN, 1996), Wittig (YAVARI *et al.*, 1998) e Pechmann (PECHMANN, 1884).

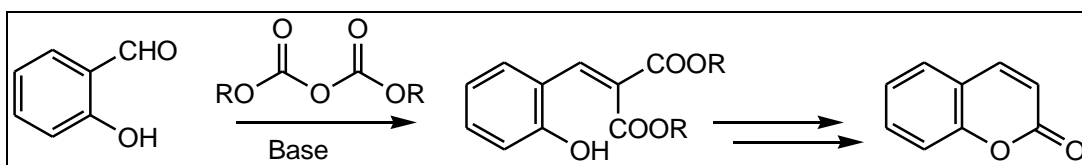
A reação de Perkin consiste na formação de cumarinas por condensação aldólica, de orto-hidroxibenzaldeído aromáticos e anidridos ácidos, na presença de um sal alcalino do ácido (**Esquema 1**). Vários relatos sobre a síntese de cumarinas através deste método já foram publicados (TRKOVNIK *et al.*, 2000).



Esquema 1: Reação de Perkin na síntese de cumarinas

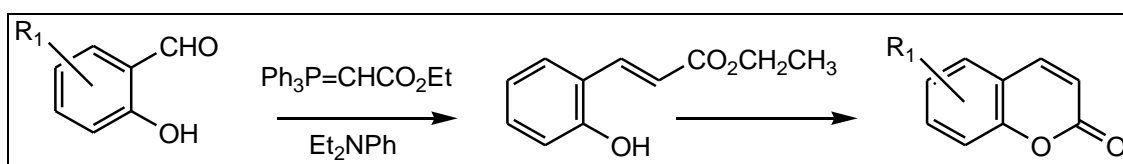
A Reação de Knoevenagel consiste na condensação de aldeídos com grupamentos metileno ativo, na presença de amônia ou aminas. Normalmente, a reação é catalisada por bases fracas ou por combinações adequadas de aminas e ácidos carboxílicos ou ácidos de Lewis. Além disso, quando o ácido malônico e piridina são utilizados, a reação é chamada de Doebner (**Esquema 2**). Diversas

cumarinas foram sintetizadas usando este método, por exemplo, derivados 3-ácidos carboxílicos, amino-e alquilamino, 3-acetil, 3-éteres benzoil cumarinas (MOHAREB *et al.*, 2001).



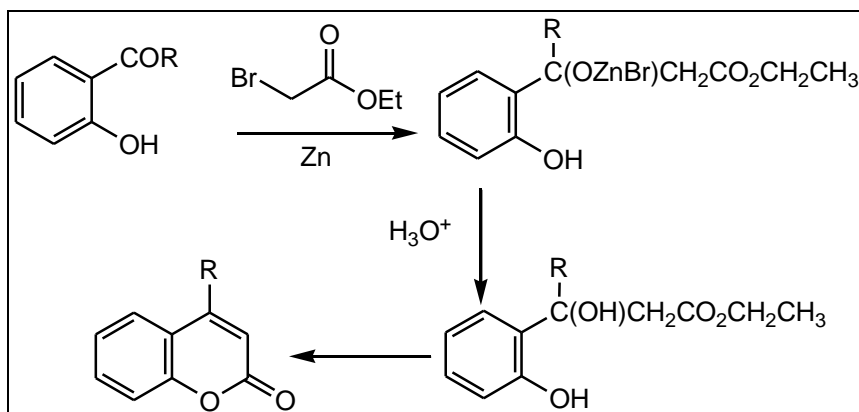
Esquema 2: Reação de Knoevenagel na síntese de cumarinas

Na reação de Wittig, a formação ocorre a partir de compostos alceno carbonílicos e sal fosfônio (**Esquema 3**). Quando o sal é substituído por um carbânion fosfonato, a reação é chamada de Horner-Emmons-Wadsworth. Este tipo de olefinação de compostos aromáticos orto-hidroxicarbonil, seguido por lactonização é um método conhecido para a síntese de cumarinas preniladas (TAKEUCHI *et al.*, 2003).



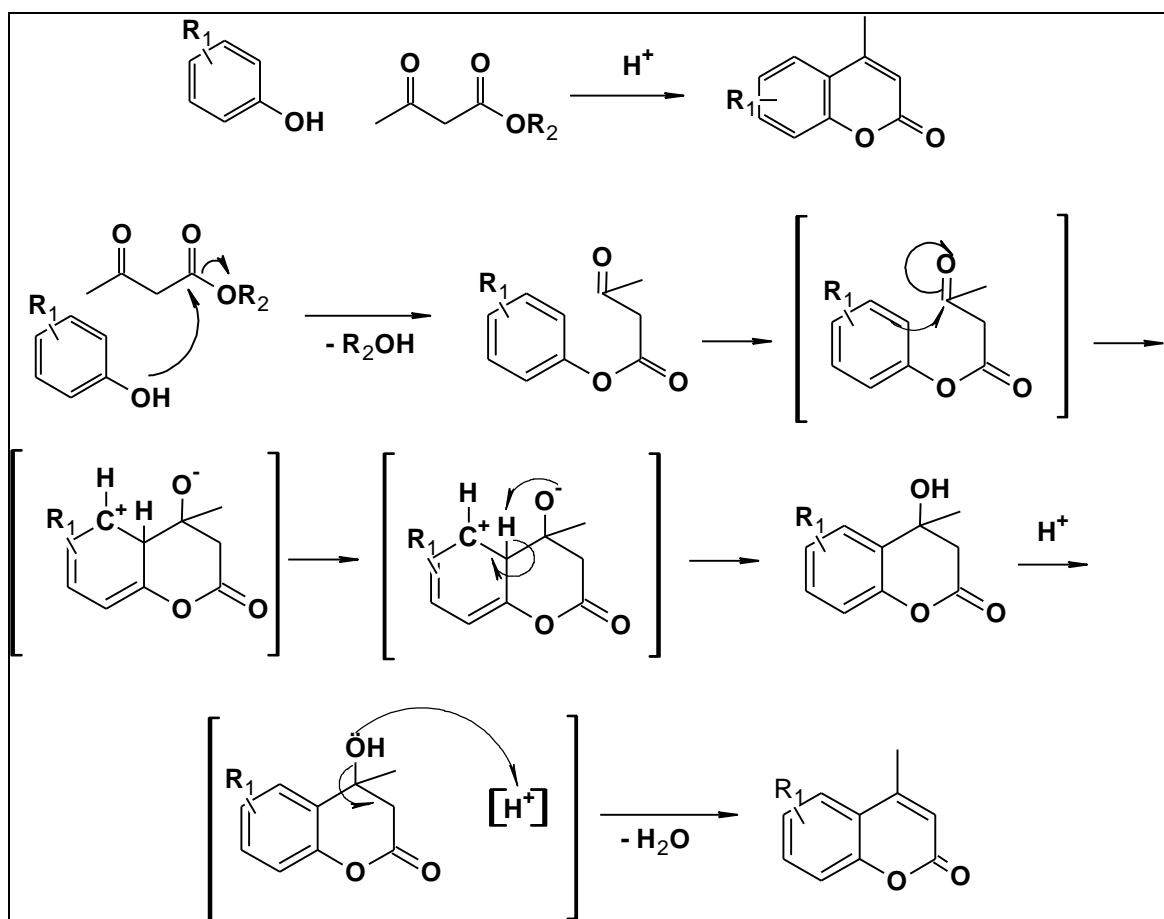
Esquema 3: Reação de Wittig na síntese de cumarinas

A condensação de aldeídos ou cetonas com derivados de ésteres para produzir β-hidroxiésteres é conhecida como reação de Reformatsky (**Esquema 4**). Em condições apropriadas, ocorre a lactonização com a formação de cumarinas como, por exemplo, a 4-ciclo-hexil-hidroxicumarinas (BORGES *et al.*, 2005).



Esquema 4: Reação de Reformatsky na síntese de cumarinas

Dentre essas metodologias apresentadas para a síntese de cumarinas, a condensação de Pechmann é um método acessível de síntese que se baseia na reação entre um β-cetoéster e um composto fenólico, na presença de ácido de Brønsted ou ácido de Lewis, conforme apresentado no **Esquema 5**. Através de um mecanismo de transesterificação seguida de alquilação aromática e desidratação ocorre a formação do produto (PECHMANN, 1884).



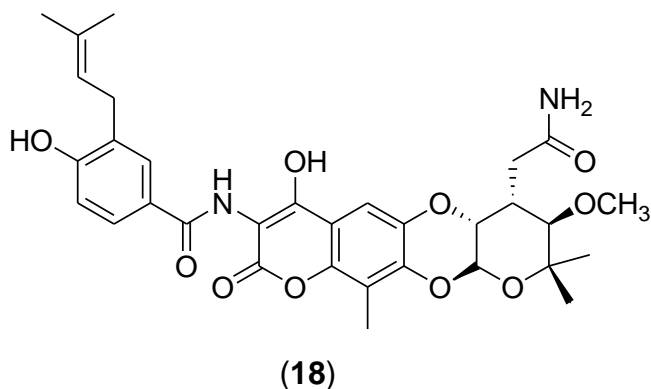
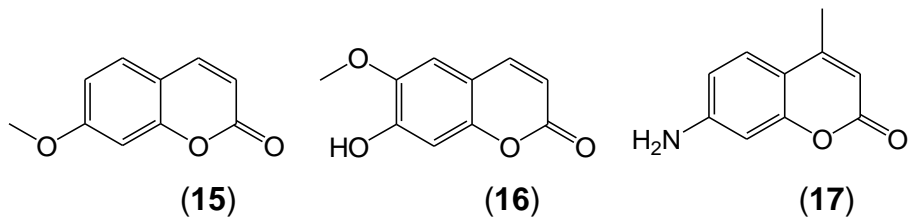
Esquema 5: Mecanismo de reação proposto para síntese de 4-metilcumarinas

O uso de radiação de micro-ondas (MW) tem sido reportado como uma excelente ferramenta na síntese de cumarinas com substituição no C-4 e diidroxycumarinas (SINGH *et al.*, 2005). A aplicação de MW na síntese orgânica oferece inúmeras vantagens sobre a síntese de aquecimento convencional como formação de produtos com elevado teor de pureza, aumento do rendimento e diminuição do tempo reacional (STRAUSS e VARMA, 2006).

3.4.3. Propriedades biológicas

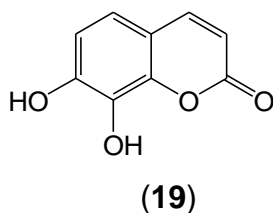
As cumarinas possuem uma extensa variedade de efeitos biológicos incluindo anticoagulante, estrogênico, fotossensibilizante, anti-helmíntico, vasodilatador, moluscicida, sedativo, hipnótico, analgésico, hipotérmico (HOULT e PAYÁ, 1996; OJALA *et al.*, 2000), antioxidante (RAJ *et al.*, 1998; MORABITO *et al.*, 2010) e antitumoral (DEXEUS *et al.*, 1990; NOGUCHI *et al.*, 1995; JIMENEZ-OROZCO *et al.*, 1999; CHIMICHI *et al.*, 2002; YANG, 2010).

Atividades antiviral (ZEMBOWER *et al.*, 1997; PATIL *et al.*, 2010), antibacteriana (MAXWELL, 1993; CHIMENTI *et al.*, 2010) e antifúngica (STEIN *et al.*, 2006; THATI *et al.*, 2007; SINGH *et al.*, 2010) têm sido amplamente investigadas. Exemplos de cumarinas com atividade antimicrobiana são herniarina (**15**), escopoletina (**16**), 7-amino-4-metil-cumarina (**17**), além de um antibiótico introduzido no mercado, a novobiocina (**18**), que atua ligando-se à topoisomerase II bloqueando a atividade da adenosina trifosfatase (LIU *et al.*, 2008):



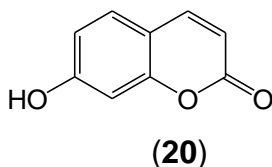
3.4.3.1. Atividade antifúngica

Extratos diclorometano e metanol de *Bazzania trilobata* apresentaram atividade antifúngica contra fungos fitopatogênicos; os compostos antifúngicos isolados incluem, além de sesquiterpenos, a 7,8-diidroxicumarina (19) (SCHER *et al.*, 2004). Extratos de *Toona ciliata* e *Amoora rohituka* apresentaram atividade antifúngica e essa foi atribuída às cumarinas (RASHEDUZZAMAN *et al.*, 2003). Outras cumarinas obtidas de *Mitracarpus scaber* também mostraram essa atividade (BISIGNANO *et al.*, 2000).

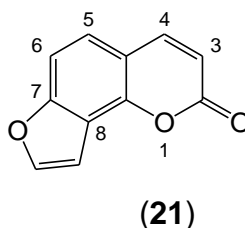


Estudos realizados com a planta *Conium maculatum* têm mostrado que furanocumarinas são os compostos antifúngicos predominantes, além da umbeliferona (20) (FATMA *et al.*, 2004). A atividade antifúngica da escopoletina (16), proveniente de *Ulmus pumila* e *Ulmus campestris*, também foi verificada (VALLE *et al.*, 1997). Flavonoides e cumarinas têm sido isolados das partes aéreas de

Tordylium apulum, dentre elas pode se destacar as diidrofuranocumarinas com atividade antifúngica (KOFINAS *et al.*, 1998).



Em um trabalho publicado por Sardari diversas cumarinas estruturalmente simples, furanocumarinas e cumarinas de origem sintéticas foram testadas quanto à atividade antifúngica frente a leveduras. Angelicina (21) uma furanocumarina isolada de *Diplotaenia damavandica*, bem como seus derivados, demonstraram satisfatória atividade antifúngica. Esse trabalho concluiu que o grupamento OH livre no C-6 é essencial para a atividade frente ao fungo testado e que o grupamento benzil no C-5 diminui a atividade (SARDARI *et al.*, 1999).



Outro estudo avaliou a atividade antifúngica de cumarinas comerciais, obtidas por síntese e isoladas da planta mexicana *Tagetes lucida* contra fungos filamentosos. A triagem dessas cumarinas indicou que a presença de grupamento metóxi na posição C-7 é fundamental para a atividade e que os grupamentos dimetóxi nas posições C-6 e C-7 favorecem essa atividade (CÉSPEDES *et al.*, 2006). Por sua vez, substituições em C-3 reduzem a atividade antifúngica assim como a introdução de cadeias longas em C-7 (AHMED *et al.*, 2005; TELES *et al.*, 2006; IRANSHAHI *et al.*, 2008).

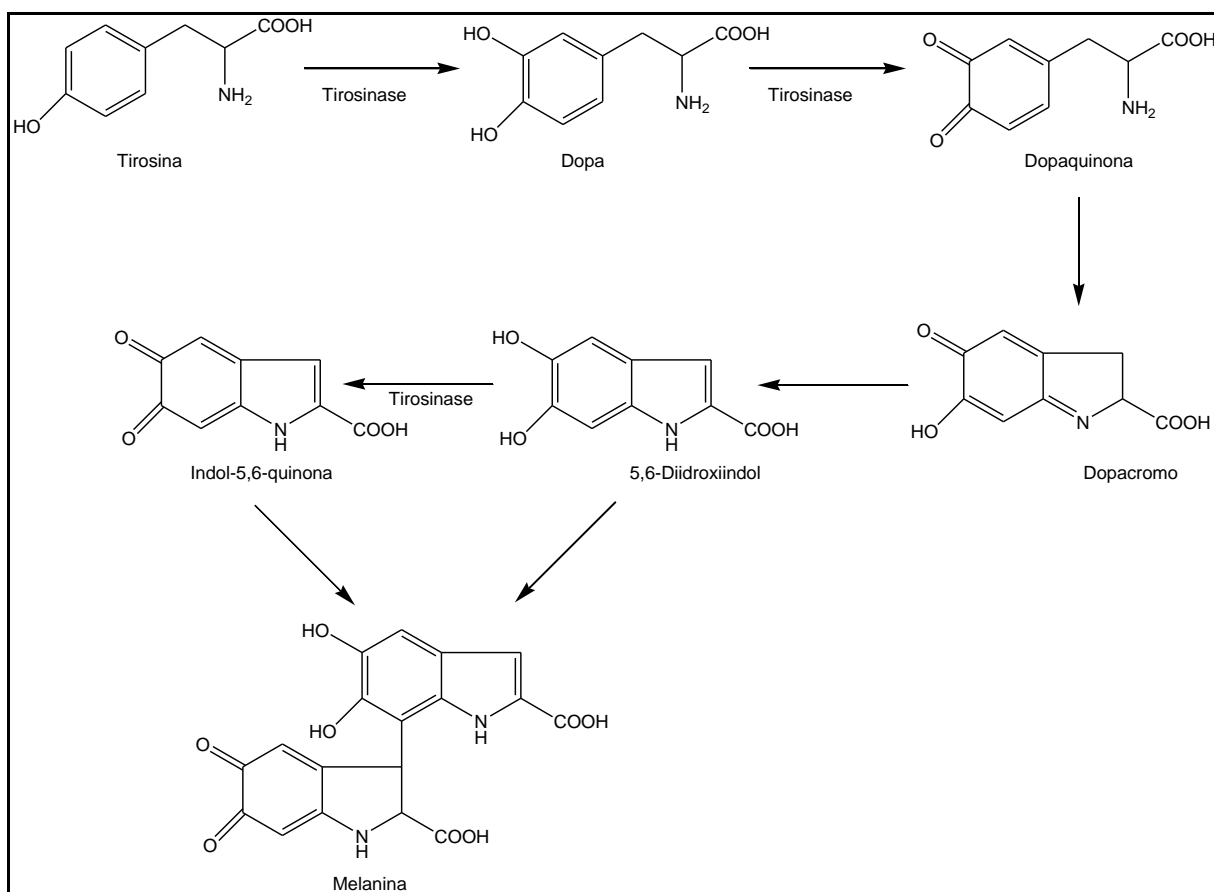
Diversos trabalhos de síntese de cumarinas têm mostrado elevada atividade antifúngica de cumarinas complexadas a cobre, prata e manganês (CREAVEN *et al.*, 2007; THATI *et al.*, 2007). A adição do grupamento 1,10-fenantrolina a esses complexos mostrou elevar a atividade antifúngica sendo capaz de inibir todos os

fungos testados, devido a uma possível redução do conteúdo de ergosterol e extravasamento de aminoácidos pela membrana fúngica (CREAVEN *et al.*, 2007).

3.4.3.1.2. Propriedade antioxidante

Diversos autores correlacionam a atividade antifúngica de alguns compostos com sua atividade antioxidante. Muitos compostos antifúngicos podem atuar como inibidores da produção de micotoxinas, por agirem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e consequentemente o estresse oxidativo, que está relacionado à biossíntese de aflatoxinas (JAYASHREE *et al.*, 2000; RASOOLI *et al.*, 2004).

Além disso, a inibição da formação de radicais livres pode afetar outras reações fúngicas importantes, como por exemplo, as reações envolvidas na síntese de melanina, conforme o **Esquema 6**. Essa reação é mediada pela enzima tirosinase, cuja inibição foi recentemente evidenciada por extratos de *Pterocaulon alopecuroides* (CHIARI *et al.*, 2010). Essa proteína também é conhecida como polifenoloxidase e catalisa a hidroxilação de L-tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e consequentemente a oxidação de L-DOPA a dopaquinona (SCHALLREUTER *et al.*, 2008). Essa enzima é amplamente distribuída nos vertebrados, invertebrados, plantas e micro-organismos (CHEN e KUBO, 2002) A melanização do fungo *S. schenckii* reduz o processo de fagocitose, sendo assim um mecanismo de defesa. Sem a produção de radicais livres as reações que conduzem a formação da melanina, ficam impedidas e assim o fungo se torna mais suscetível ao ataque do organismo e mais permeável ao fármaco (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000).



Esquema 6: Mecanismo de formação da melanina. Adaptado de YAMAGUCHI *et al.*, 2010.

3.4.3.2. Atividade citotóxica

Cumarinas e seus derivados causam mudanças significativas na regulação da resposta imune, crescimento e diferenciação celular. Diferentes mecanismos têm sido propostos como inibição da proteína quinase (YANG *et al.*, 1999), fosfodiesterase (WU *et al.*, 2002) e regulação negativa da expressão de oncogenes (CHU *et al.*, 2001). HOFMANOVA e colaboradores (1998) demonstraram *in vitro* associação sinérgica da esculetina e ácido *trans*-retinóico na diferenciação células leucêmicas humanas HL-60.

Estudos têm demonstrado que as cumarinas inibem o crescimento de vários tipos celulares em cultura, incluindo linhagens de carcinoma brônquico humano (NSCLC-N6) (KOFINAS *et al.*, 1998), câncer pulmonar (A549) (ROSSELLI *et al.*, 2009), carcinoma hepatocelular humano (HepG2) (YU *et al.*, 2009), câncer gástrico humano (SGC-7901) (ZHANG *et al.*, 2009) e carcinoma prostático humano (DU145) (KANG *et al.*, 2009).

3.4.3.3. Metabolismo e toxicidade

As cumarinas foram avaliadas no tratamento de diversas condições clínicas resultando no emprego de variados regimes de dose. As doses recomendadas variam de 8 mg/dia para tratamento de constrição venosa até 7.000 mg/dia para terapia antineoplásica (MARSHALL *et al.*, 1994). Essa última dose terapêutica é de aproximadamente 2.000 vezes maior que a estimada de 3,5 mg/dia considerando as cumarinas contidas em fragrâncias e na dieta.

A cumarina é rapidamente absorvida sofrendo metabolismo hepático CYP2A6 a 7-hidroxicumarina, que é excretada na urina, na forma de conjugados glicurônicos e sulfatados. Enquanto a principal via de metabolismo das cumarinas em primatas é por hidroxilação, essa é uma via minoritária para outras espécies. A principal via de metabolização nos ratos é através da epoxidação nas posições do C-3 e do C-4, com posterior abertura do anel e formação de metabólitos como HPAA (ácido orto-hidroxifenilpropionico). Deficiência na via de hidroxilação foi observada em indivíduos com polimorfismo genético na CYP2A6, sugerindo que a metabolização de cumarinas nesses indivíduos deficientes seja por 3,4-epoxidação (PEARCE *et al.*, 1992).

Alterações funcionais no fígado têm sido relatadas em uma pequena proporção de pacientes que tende a reverter à normalidade quando o tratamento é suspenso. A hepatotoxicidade foi observada em ratos e em camundongos, mas não em humanos e esse fato está provavelmente associado à predominância da via de detoxificação através da 7-hidroxilação. Em ratos e camundongos as principais alterações observadas foram nos rins e pulmões. Os dados disponíveis sugerem que as cumarinas não são agentes genotóxicos, nenhuma evidência de cumarina indutora de genotoxicidade foi observada em estudo *in vivo* em ratos e *Drosophila melanogaster* (LAKE *et al.*, 1999).

4. PARTE EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Visando ordenar os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados na forma de manuscritos divididos em duas partes:

PARTE I: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE

- 4.1. “Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*.”
- 4.2. “Antifungal activity of some natural products from species of *Pterocaulon* (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*.”
- 4.3. “Microwave-assisted synthesis of 4-methylcoumarins and antifungal activity against *Sporothrix schenckii*.”
- 4.4. “Evaluation of antioxidant capacity of synthesized coumarins.”

PARTE II: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

- 4.5. “Coumarins from *Pterocaulon* species and their cytotoxic activity against glioma cell lines.”

PARTE I

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E
PROPRIEDADE ANTIOXIDANTE**

Introdução

Tendo como base o uso tradicional de *Pterocaulon* para tratamento de infecções na pele e a atividade antifúngica apresentada pelos seus diferentes extratos, a presente tese teve como um dos propósitos investigar a atividade antifúngica de plantas deste gênero frente ao fungo *Sporothrix schenckii* causador da esporotricose, micose subcutânea de maior incidência no estado do Rio Grande do Sul (DA ROSA *et al.*, 2005).

A esporotricose é uma dermatozoonose causada por fungo dimórfico e produtor de melanina, *S. schenckii*. Esse fungo se apresenta na forma miceliana no meio ambiente, ou seja, quando exposto a temperatura entre 25 °C e 30 °C. Já em temperaturas de aproximadamente 37 °C se apresenta sob a forma leveduriforme, que é a maneira encontrada nos organismos dos hospedeiros, ou seja, a forma encontrada no parasitismo (DIXON *et al.*, 1991), conforme ilustra a **Figura 2**.

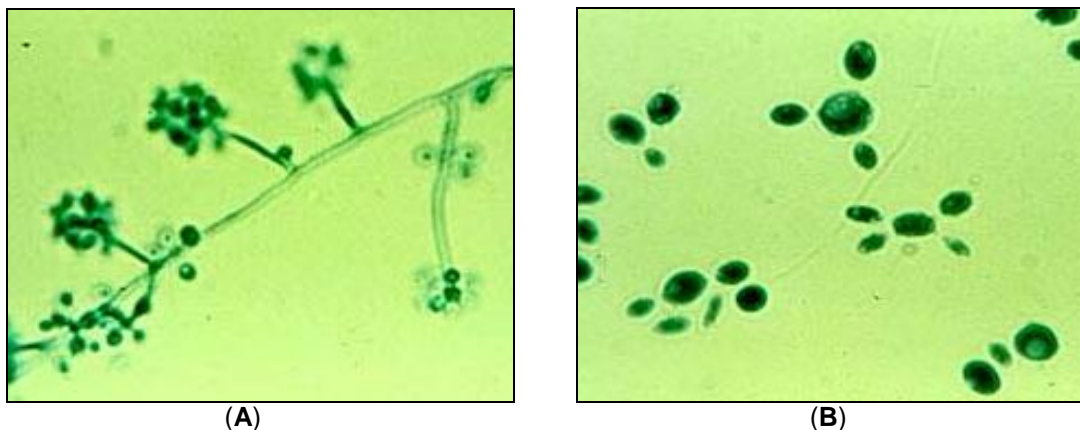


Figura 2: Fungo *S. schenckii* na forma miceliana (A) e na forma leveduriforme (B).
Adaptado de ZAITZ *et al.*, 2004.

A esporotricose é uma infecção fúngica cosmopolita predominante em zonas tropicais e temperadas sendo considerada endêmica no Japão, Índia, sul da África, México, Peru, Uruguai e Brasil (KUSUHARA *et al.*, 1988; CONTI DIAZ, 1989; KNOW-CHUNG e BENETT, 1992; PAPPAS *et al.*, 2000). A transmissão é feita pela inoculação através de ferimentos com material contaminado. Na natureza, o fungo é encontrado em material vegetal em putrefação, sendo comum esse tipo de infecção em trabalhadores que apresentam contato direto com o solo, caracterizando uma

doença ocupacional. A transmissão zoonótica, principalmente a realizada por felinos, tem sido relatada (SCHUBACH *et al.*, 2008).

Os humanos podem apresentar várias formas clínicas da doença, sendo mais comum a cutâneo-linfática, na qual se inicia com um nódulo no local da inoculação e após ocorre ulceração. Com a evolução, formam-se novos nódulos que seguem o trajeto linfático, caracterizando a linfangite nodular ascendente (RAMOS e SILVA *et al.*, 2007). Embora, a esporotricose disseminada seja comum em indivíduos imunocomprometidos, a meningite causada por esse fungo ainda é rara (HARDMAN *et al.*, 2004).

Dentre as classes de antifúngico mais comumente usadas para o tratamento encontram-se azóis (itraconazol) e os polienos (anfotericina B), que atuam em nível da membrana plasmática, agindo sobre o ergosterol, esterol predominante das membranas das células dos fungos, análogo ao colesterol das membranas das células animais. Os polienos formam complexos com o ergosterol formando poros ou canais, o que leva ao aumento da permeabilidade da membrana, liberando o conteúdo intracelular e conduzindo a morte da célula. Já os azóis são capazes de inibir a biossíntese do ergosterol, pois inativam a enzima fúngica (CYP3A) do citocromo P-450, a lanosina 14 α -desmetilase, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol, inibindo, assim, a replicação e o crescimento dos fungos (ANDRIOLE, 1999).

O tratamento com o antifúngico itraconazol, por 36 meses, é a terapia de escolha para esporotricose na forma cutânea e linfocutânea. Porém, números cada vez maiores de cepas fúngicas estão se tornando resistentes ao tratamento com azóis (SCHMOURLO *et al.*, 2005). Por sua vez, a anfotericina B está indicada como terapia de primeira linha nas formas pulmonar, meníngea e disseminada, contudo, mesmo com o tratamento, estes pacientes possuem um prognóstico reservado. Pacientes portadores da Síndrome da Imunodeficiência Humana (SIDA) e esporotricose necessitam de tratamento contínuo (por toda a vida) com o supressor itraconazol, uma vez que o fármaco exerce um efeito fungistático. O número de casos relatados de esporotricose bem como a manifestação dessas formas atípicas da patologia vem crescendo, principalmente nas populações afetadas pela SIDA. As

infecções fúngicas nesses indivíduos imunocomprometidos é a maior responsável pela mortalidade e morbidade da doença (DURDEN e ELEWSKI, 1997).

Sendo assim, além da resistência, os antifúngicos vêm apresentando uso limitado devido a diversos fatores, destacando-se a baixa potência, a baixa solubilidade e a elevada toxicidade. Assim, embora a maioria dos antimicrobianos de uso clínico tenha sido obtida de micro-organismos, o interesse em antimicrobianos derivados de vegetais tem aumentado (PORTILLO *et al.*, 2001). Em virtude das estruturas químicas dos produtos naturais serem diferenciadas, quando comparadas aos antimicrobianos convencionais, como os derivados de processos fermentativos, estes compostos obtidos de vegetais podem atuar por mecanismos alternativos, minimizando os problemas decorrentes da resistência desenvolvida por alguns micro-organismos (COWAN, 1999).

Considerando o aumento dos casos das formas graves da esporotricose associado à ausência de terapia fungicida e a resistência apresentada aos fármacos antifúngicos, os extratos de cinco espécies de *Pterocaulon*, as cumarinas isoladas assim como as 4-metilcumarinas obtidas por síntese foram avaliadas frente ao fungo causador da micose subcutânea de maior incidência no Rio Grande do Sul. Os resultados estão apresentados na forma de três manuscritos anexados a seguir.

4.1. CAPÍTULO I

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *PTEROCAULON* SPECIES (ASTERACEAE) AGAINST *SPOROTHRIX SCHENCKII*.

Publicado no periódico
Journal de Mycologie Médicale, v. 21, p. 169-172, 2011.

As páginas 45 a 58 referem-se ao artigo publicado “Antifungal activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*” na revista *Journal de Mycologie Médicale*, v. 21, p. 169-172, 2011.

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia^a, Damiana da Rocha Vianna^b, Gabriela de Carvalho Meirelles^b, Helder Teixeira^b, Gilsane Lino von Poser^b, Maria Lúcia Scroferneker^{a,c}

^a Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos nº 2400, 2º andar, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil.

^b Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga nº 2752, 1º andar, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite nº 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence: Maria Lúcia Scroferneker, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite nº 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil. Telefone: +55 51 3308 3934 Fax: +55 51 3308 3121

E-mail: scrofern@ufrgs.br/ gilsane@farmacia.ufrgs.br

RESUMO

Plantas do gênero *Pterocaulon* (Asteraceae) são popularmente utilizadas no tratamento de doenças de pele causadas por fungos e bactérias. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade *in vitro* dos extratos metanólico bruto obtido das partes aéreas de *Pterocaulon polystachyum*, *P. balansae*, *P. lorentzii*, *P. lanatum* e *P. cordobense* contra 24 isolados clínicos de *Sporothrix schenckii* e determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Mínima Fungicida (MFC). MIC foram realizadas pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes recomendadas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute para fungos filamentosos e MFC foram determinados por transferência de alíquotas do poço, que mostrou 100% de inibição do crescimento em tubos com meio de cultura. O extrato de *P. polystachyum* foi a amostra mais ativa, apresentando ampla MIC de 156 e 312 µg/mL. O uso popular destas plantas corrobora a importância das investigações etnofarmacológicas e abre a possibilidade de encontrar novos agentes antifúngicos clinicamente eficazes.

4.2. CAPÍTULO II

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF SOME NATURAL PRODUCTS FROM SPECIES OF *PTEROCAULON* (ASTERACEAE) AGAINST *SPOROTHRIX SCHENCKII*.

Manuscrito em preparação

As páginas 60 a 64 referem-se ao artigo “Antifungal activity of some natural products from species of *Pterocaulon* (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*” em preparação.

Damiana R. Vianna^a, Cheila Stopiglia^b, Angelo C. Pinto^c, Helder Ferreira Teixeira^a,

Gilsane Lino von Poser^{a*}, Maria Lúcia Scroferneker^{b*}

RESUMO

Plantas do gênero *Pterocaulon* (Asteraceae) são popularmente utilizadas no tratamento de doenças de pele causadas por fungos e bactérias. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade *in vitro* de produtos naturais: 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina (**1**) e 3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**2**) isolados de *P. balansae* Chodat; 5-(2,3-diidroxil-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**3**), obtido a partir de *P. lorentzii* Malme e o flavonoides quercetina (**4**) isoladas de *P. polystachyum* DC. contra *Sporothrix schenckii* e determinar a Concentração Inibitória Mínima (MIC). MIC foi realizada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com as diretrizes recomendadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* para fungos filamentosos. A triagem dos metabólitos secundários de *Pterocaulon* com o fungo *S. schenckii* revelou que o composto (**2**), mais lipofílico log P 2,71, apresentou o MIC mais promissor de 450 µM.

4.3. CAPÍTULO III

MICROWAVE-ASSISTED SYNTHESIS OF 4-METHYLCOUMARINS AND ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *SPOROTHRIX SCHENCKII*.

Submetido para publicação no periódico
Bioorganic & Medicinal Chemistry

As páginas 66 a 75 referem-se ao artigo “Microwave-assisted synthesis of 4-methylcoumarins and their antifungal activity against *Sporothrix schenckii*”.

D. R. Vianna^a, R. F. S. Canto^a, C. D. O. Stopiglia^b, F. Corvello^a, A. R. Crestani^a, M. L. Scroferneker^c, H. F. Teixeira^a, G. L. von Poser^{a*} and V. L. Eifler-Lima^{a†}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/UFRGS, Faculdade de Farmácia. Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, 90610-000, Brazil.

^b Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas, UFRGS, Faculdade de Medicina. Rua Ramiro Barcelos 2400, Porto Alegre, 90035-003, Brazil.

^c Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS. Rua Sarmiento Leite 50, Porto Alegre, 90050-170, Brazil.

RESUMO

Uma série de 4-metil-cumarinas foram sintetizadas e avaliadas *in vitro* para sua atividade antifúngica contra *Sporothrix schenckii*. A síntese assistida por micro-ondas, de cumarinas através de uma condensação Pechmann com modificações na posição C-7 foram realizados, com excelentes rendimentos (74-100%). 7,8-dihidroxi-4-metil-2-oxo-2H-cromeno-5-carboxílico teve excelente atividade fungicida e demonstrou efeito sinérgico quando testado com Anfotericina B. Estes resultados promissores abrem perspectiva para síntese de novos compostos químicos eficazes como agente antifúngico.

*Corresponding author. Tel.: +55-051-3308-5456; fax: +55-051-3308-5610; e-mail: gilsane@farmacia.ufrgs.br

†Corresponding author. Tel.: +55-051-3308-5517; fax: +55-051-3308-5610; e-mail: veraeifler@ufrgs.br

4.4. CAPÍTULO IV

“EVALUATION OF ANTIOXIDANT CAPACITY OF SYTHETIZED COUMARINS”

Manuscrito em preparação para ser submetido ao periódico *Biochimie*

As páginas 77 a 99 referem-se ao artigo “Evaluation of antioxidant capacity of synthesized coumarins”.

Damiana R. Vianna^a, Gabriela Meirelles^a, Guilherme Borges Bubols^a,
Maurício Lanznaster^c, Alessandra Martins da Rocha^d, Helder
Teixeira^a, José Maria Monserrat^d, Solange Cristina Garcia^a, Vera Lúcia
Eiffler Lima^a, Gilsane von Poser^{a*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
UFRGS. Av. Ipiranga, 2752, 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil.

^c Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense. Outeiro
de São João Batista, s/n. Campus do Valonguinho Centro, Niterói
24020-150, RJ, Brazil.

^d Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia
Animal Comparada. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade
Federal do Rio Grande, FURG. Av Itália km 8 s/n, 96201-900. Rio
Grande, RS, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed.

Phone +55 51 33085456, Fax +55 51 33085610

RESUMO

Cumarinas são metabólitos secundários que são amplamente distribuídos no reino vegetal, algumas das quais têm sido estudada por suas propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante de cumarinas analisadas no presente estudo, foi medida pelo 1,1-difenil-2-picril-hidrazil (DPPH ●) e método de voltametria cíclica contra os radicais peroxila (ACAP). O 7,8-dihidroxi-4-metilcumarina (LaSom 78), 5-carboxi-7,8-diidroxi-4-metilcumarina (LaSom 79) e 6,7-dihidroxicoumarin (Esculetina) compostos demonstraram ser os mais ativos, mostrando a maior capacidade para neutralizar os radicais DPPH, a maior capacidade antioxidante contra os radicais peroxila, e os menores valores de potencial oxidantes.

PARTE II

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA

Introdução

Estudos têm demonstrado que as cumarinas inibem o crescimento de vários tipos celulares em cultura, incluindo linhagens de carcinoma brônquico humano, câncer pulmonar, carcinoma hepatocelular humano e câncer gástrico humano. (ROSSELLI *et al.*, 2009; KOFINAS *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2009). Diferentes mecanismos têm sido propostos para a atividade citotóxica das cumarinas, conforme demonstra a **Tabela 2**.

Tabela 2. Respostas biológicas de cumarinas. Onde HC significa hidroxicumarina. Adaptada de Wu *et al.*, 2009.

Compostos	Respostas Biológicas e Mecanismos
4-HC	Diminuição da fosforilação da tirosina
6-NO ₂ -7-HC	Ativação da p38, SAPK e MAPK; bloqueio na fase G1
7-HC	Inibição da cadeia leve da miosina quinase; bloqueio da formação dos microtúbulos do fuso mitótico e da fase G1
Aurapteno	Elevação da fase II das enzimas GST e QR; supressão da expressão da MMP-7, -2, -9
Dafnetino	Inibição da atividade de proteínas quinases, incluindo o EGF receptor tirosina quinase, a PKA e PKC; <i>upregulation</i> da p38MAPK; bloqueio na fase S em baixa concentração, e na fase G1 e S um bloqueio precoce em maior concentração.
Decursino	<i>Downregulation</i> da PKC α e β II
Dicumarol	Mediação da ligação da tubulina e estabilização da dinâmica dos microtúbulos do fuso; inibição da liberação de MMPs e do fator tecidual VIIa
Esculetina	Indução de p21, diminuição da atividade de CDKs; inibição da fosforilação de pRb e ativação de caspase-3
Imperatório	Inibição da CYP1A1/1B1 e indução da GSTs hepática bloqueando a formação de adutos de DNA
Escopoletina	Ativação de NF- κ B e caspase-3

Dentre os diversos tipos neoplasias, o glioma maligno é o tumor primário mais comum do Sistema Nervoso Central (SNC), contabilizando cerca de 78% dos tumores nessa região. O termo glioma refere-se a todas as neoplasias originadas de células gliais ou precursores gliais, incluindo tumores constituídos de células com

características de astrócitos (astrocitomas), oligodendrócitos (oligodendromas), células ependimais (ependimomas) e misturas de vários tipos de glias (oligoastrocitoma) (HOLLAND, 2001). Os fatores de risco mais relacionados a estes tumores são radiação ionizante, mutações genéticas e histórico familiar. Uma das características mais marcantes é o seu elevado grau de proliferação e invasividade. Como consequência, pacientes com esse tipo de tumor apresentam um grande comprometimento do tecido periférico ao tumor com o desenvolvimento de sintomas que incluem cefaleia, mudanças cognitivas, papiloedema, disfagia e hemiparesia progressiva (GIROLAMI, 2000).

Segundo a OMS, os gliomas são classificados em quatro níveis de acordo com sua histopatologia. O Glioblastoma Multiforme (GBM) é classificado no quarto nível, o grau mais maligno, sendo que a taxa média de sobrevivência dos pacientes com essa neoplasia é de apenas 9-12 meses (SATHORNSUMETEE *et al.*, 2007). Esse reservado prognóstico do GBM é resultado da alta capacidade proliferativa, da variabilidade histopatológica e também devido a alta capacidade de infiltração em regiões cerebrais ainda não afetadas, o que ocasiona um alto índice de recidivas bem como gera resistência a radiação e aos quimioterápicos (LACROIX *et al.*, 2001; OHGAKI e KLEIHUES, 2007; WEN e KESARI, 2008).

Apesar dos avanços em neurocirurgia, neuroradiologia, radioterapia e quimioterapia, a sobrevida média dos pacientes com GBM pouco se alterou nos últimos 30 anos. A cirurgia representa o tratamento de primeira escolha para pacientes com glioma, entretanto a ressecção completa do tumor é limitada pela alta invasividade das células tumorais nos tecidos normais circundantes (BEHIN *et al.*, 2003). Portanto, a maioria dos pacientes é tratada com radioterapia e/ou quimioterapia pós-operatória. No tratamento quimioterápico a temozolomida, um antineoplásico da classe dos alquilantes, é atualmente o fármaco de escolha para o tratamento do GBM (MACDONALD *et al.*, 2011). Sua eficácia é limitada pela ausência de especificidade terapêutica, bem como pela quimiorresistência intrínseca, além disso, a barreira hematoencefálica é um fator limitante na entrada dos quimioterápicos, de modo que apenas fármacos altamente lipofílicos como a

temozolomida e as nitrosuréias podem ser utilizados (MOUSSEAU *et al.*, 1993). O principal objetivo do tratamento com temozolomida é o aumento da sobrevida dos pacientes (BONDY *et al.*, 2008).

O reservado prognóstico do GBM, a baixa responsividade desse tumor frente à quimioterapia, bem como o sucesso limitado da cirurgia e da radioterapia pós-operatória, estimulam a busca de novas moléculas que possam servir de modelo para fármacos antitumorais. Assim, as cumarinas isoladas de espécies de *Pterocaulon* foram avaliadas quanto à atividade citotóxica frente a linhagens celulares de glioma humano (U138-MG) e de ratos (C6). Os resultados estão apresentados em um artigo científico anexado a seguir.

4.5. CAPÍTULO V

“COUMARINS FROM *PTEROCAULON* SPECIES AND THEIR CYTOTOXIC ACTIVITY AGAINST GLIOMA CELL LINES”

Manuscrito submetido ao periódico

Phytochemistry Letters

As páginas 104 a 114 referem-se ao artigo “Coumarins from *Pterocaulon* species and their cytotoxic activity against glioma cell lines”.

Damiana R. Vianna^a, Andressa Bernardi^a, Ana Maria Oliveira Battastini^b, Helder Ferreira Teixeira^a, Gilsane Lino von Poser^a, Lorenzo do Canto Visentin^c, Lidilhone Hamerski^c, Angelo C. Pinto^c

^a Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Av. Ipiranga 2752, CEP 90610-000 Porto Alegre/RS, Brazil.

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Ramiro Barcelos 2600-anexo, CEP 90035-003, Porto Alegre/RS, Brazil.

^c Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Centro de Tecnologia, Av. Athos da Silveira Ramos, 149 Bloco A 7º andar, CEP: 21941-909, Rio de Janeiro/RJ, Brazil.

RESUMO

O presente trabalho trata do isolamento de três cumarinas que são 5-metoxi-6,7-methylenedioxicumarina (**1**) 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**2**), ambos de *P. balansae* Chodat e 5-(2,3-diidroxil-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**3**) de *P. lorentzii* Malme. O composto (**1**) foi submetido a estudos de cristalografia (difração de raios X). Os compostos isolados e quatro cumarinas comerciais foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica. Os resultados indicam que as cumarinas isoladas foram significativamente citotóxica contra células de glioma, sugerindo uma influência positiva do grupo metilenodioxil na atividade uma vez que este substituinte não estava presente na cumarinas comercialmente disponíveis, que foram inativas. Composto (**1**) apresentou valores IC₅₀ de 34,6 µM e 31,6 µM, que demonstrou ser de pelo menos duas vezes mais citotóxico do que compostos (**2**) e (**3**), tanto para humanos (U138-MG) e células de rato (C6) glioma, respectivamente.

5. DISCUSSÃO GERAL

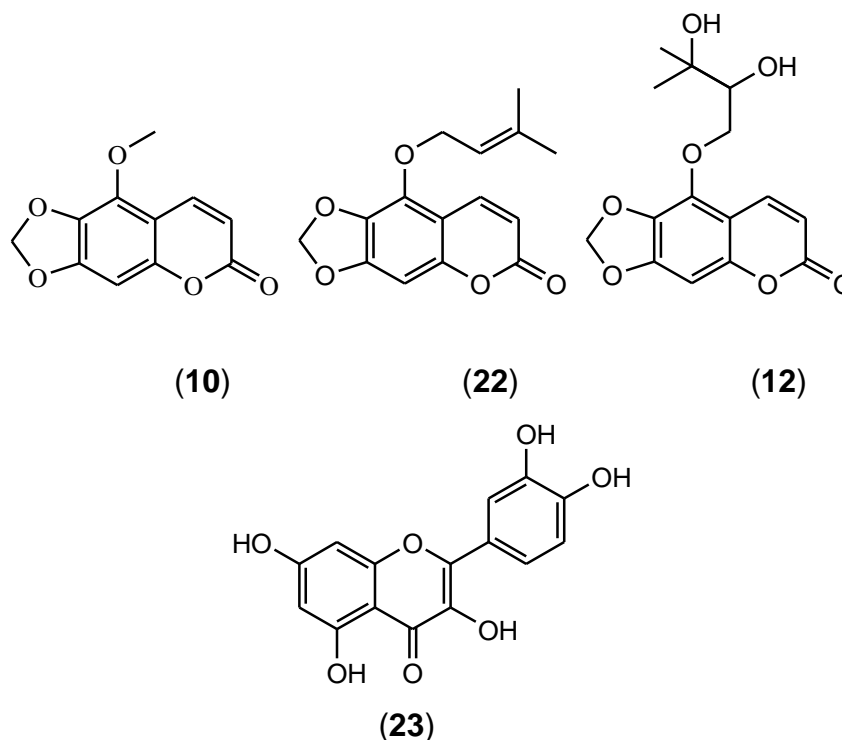
Estima-se que cerca de 40% dos medicamentos comercializados são produtos naturais ou seus derivados, constituindo 80% dos antimicrobianos e dos antitumorais (NEWMANN e CRAGG, 2007). Sabe-se que a probabilidade de detectar atividades biológicas em plantas é mais elevada quando existem relatos de usos etnofarmacológicos (SVETAZ *et al.*, 2010). O aumento de pesquisas investigando a atividade *in vitro* de plantas do gênero *Pterocaulon* ilustra essa estratégia (STEIN *et al.*, 2005; 2006; RÓDIO *et al.*, 2008; DABOIT *et al.*, 2010; SAUTER *et al.*, 2011).

Na primeira etapa deste trabalho, os extratos metanólicos de cinco espécies de *Pterocaulon* (*P. polystachyum*, *P. balansae*, *P. lorentzii*, *P. lanatum* e *P. cordobense*) foram investigados frente a 24 cepas do fungo *Sporothrix schenckii*. A fim de classificar os extratos quanto ao potencial antifúngico, foi utilizado o critério proposto por ALIGIANNIS e colaboradores (2001), que sugeriu faixas de CIM para materiais vegetais relacionadas com a sua capacidade inibitória. Segundo essa classificação, CIM de até 500 µg/mL foi definida como sendo uma forte inibição, CIM entre 600 e 1500 µg/mL uma moderada inibição, e por fim, CIM acima de 1600 µg/mL, uma fraca inibição.

Através deste estudo, observou-se que o extrato mais ativo foi o de *P. polystachyum* (CIM entre 156 e 312 µg/mL). Conforme os resultados apresentados no Capítulo I, todas as amostras foram capazes de inibir o crescimento fúngico (CIM entre 156 e 1250 µg/mL). Além disso, todos os extratos apresentaram atividade fungicida nas concentrações analisadas, sugerindo um potencial uso no tratamento de infecções em pacientes imunodeprimidos. Essa atividade fungicida se torna importante uma vez que até o momento a terapia disponível é apenas fungistática, o que exige uma terapia contínua.

Em continuidade, foi realizada a análise química dos extratos de *Pterocaulon* a fim de identificar os compostos responsáveis por essa atividade, conforme apresentado no Capítulo II. Foram obtidos os compostos 5-metóxi-6,7-metilenodioxycumarina (**10**) e 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**22**)

ambos de *P. balansae*; 5-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxycumarina (**12**) de *P. lorentzii*; e o flavonoide quercetina (**23**) de *P. polystachyum*. Os espectros de RMN de Hidrogênio-1 e de Carbono-13 encontram-se em **Anexo** e estão de acordo com os resultados prévios publicados na literatura.



A elucidação cristalográfica do composto **10** foi depositada na base CCDC Cambridge Crystallographic Data Centre (www.ccdc.cam.ac.uk/data_request/cif) sob o número 779123. Esse estudo demonstrou o comportamento das ligações de hidrogênio, medição de distâncias interatômicas, ângulos de ligação e ângulos de torção. Essa estrutura é formada por três anéis condensados planares. A elucidação da estrutura cristalográfica mostrou apenas uma ponte de hidrogênio intramolecular não clássica entre os átomos C12-H12A...O4 essa ligação impede a livre rotação entre os átomos O3-C5 e O3-C12. Esse fenômeno é o responsável pela conformação planar adotada pela molécula, conforme **Figura 3**.

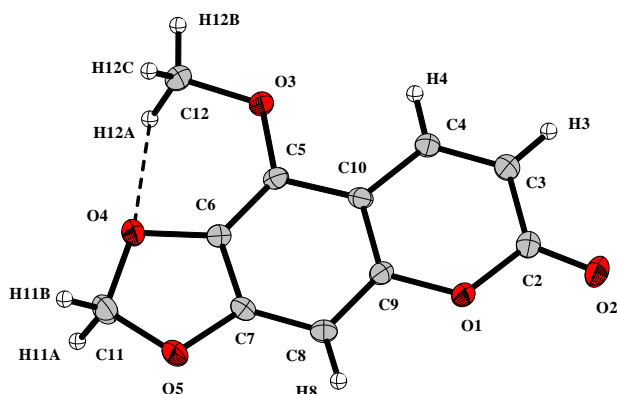
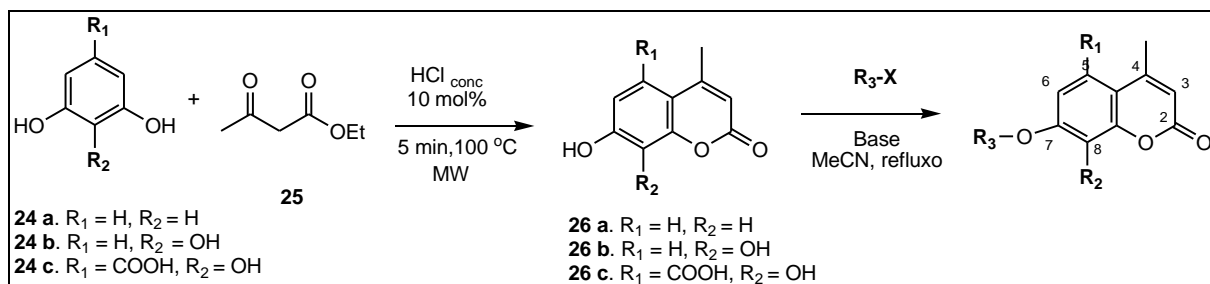


Figura 3: Estrutura cristalográfica da 5-metóxi-6,7-metilenodioxicumarina (10)

Após a etapa de isolamento de cumarinas, se iniciaram os estudos sobre a síntese destes compostos. Para tanto foi realizada a condensação de Pechmann entre compostos fenólicos e acetoacetato etila e posterior derivatização de 4-metilcumarina, conforme apresentado no **Esquema 7**. Preliminarmente, a fim de otimizar as reações, estas foram realizadas com o método convencional de aquecimento. Uma vez definidos os parâmetros, a síntese foi realizada em micro-ondas, com vantagens, como demonstrado na sequência.



Onde, R_3-X está representado na **Tabela 4**

Esquema 7: Condensação de Pechmann e derivatização de 4-metilcumarinas

Inicialmente foram avaliados diferentes ácidos de Lewis bem como HCl e H_2SO_4 para otimização da catálise ácida. De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 3**, o ácido sulfúrico mostrou ser um pobre agente catalítico (entrada 4), assim como os HCl demais ácidos de Lewis testados (entradas 5-8). Trifluoreto de boro dietiléter ($BF_3 \cdot OEt_2$) (entradas 11 e 12) demonstrou ser um bom sistema catalítico, porém o tempo de reação foi elevado (>1000 e 480 minutos para as reações conduzidas a temperatura ambiente e a $100^\circ C$, respectivamente). Dessa forma, o ácido clorídrico, 10 mol% (entrada 3), devido ao elevado rendimento (96%),

ao reduzido tempo (30 min) e também por ser um catalisador de fácil manuseio e acessível, foi o sistema catalítico empregado nas demais reações realizadas, tanto com aquecimento convencional quanto em micro-ondas.

Tabela 3: Otimização da catálise, temperatura e tempo (aquecimento convencional)

Entrada	R ₁	R ₂	Catálise	Temp. (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)
1	H	H	HCl	t.a**	120	56
2	H	H	HCl	50	120	76
3	H	H	HCl	100	30	96
4	H	H	H ₂ SO ₄	100	30	42
13	H	OH	HCl	100	30	72
14	COOH	OH	HCl	100	30	73
5	H	H	MnCl ₂	100	90	80
6	H	H	InCl ₃	100	50	84
7	H	H	CoCl ₂	100	90	32
8	H	H	SnCl ₂ .2H ₂ O	100	60	30
9	H	H	BaCl ₂ .2H ₂ O	100	30	-
10	H	H	CuSO ₄ .5H ₂ O	100	30	-
11	H	H	BF ₃ .OEt ₂	100	480	93
12	H	H	BF ₃ .OEt ₂	t.a**	>1000	69

* R₁ e R₂ representados no **Esquema 7**



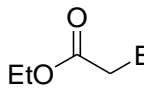
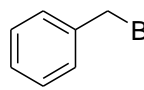
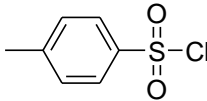
** t.a: Temperatura ambiente.

Nas reações realizadas sob aquecimento convencional, **26a** foi sintetizado com excelentes rendimentos (97%) em 2 horas, **26b** e **26c**, com bons rendimentos (72 e 73%, respectivamente), em 30 minutos (dados não publicados). Entretanto, quando essas reações foram realizadas sob radiação de micro-ondas, o tempo de reação foi drasticamente reduzido para 5 minutos, com rendimentos de 99%, 80% e 76%, respectivamente, conforme apresentado no Capítulo III.

A fim de explorar a influência do grupo hidroxila livre na posição C-7 do anel cumarínico o composto **26a** foi submetido à reação com uma variedade de agentes eletrofílicos originando compostos 7-O-substituídos **27-31**, conforme **Tabela 4**. As reações foram realizadas com aquecimento convencional (dados não publicados) e

sob radiação micro-ondas, estas últimas, conduzidas em um curto intervalo de tempo, entre 15 a 20 minutos, gerando compostos puros com rendimentos entre 74 e 99%.

Tabela 4: Comparação entre aquecimento convencional e sob radiação micro-ondas

Composto	R ₃ -X	Aquecimento Convencional			MW		
		Temp. (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)	Temp. (°C)	Tempo (min)	Rendimento (%)
27		70	120	98	70	20	74
28		70	120	84	70	15	81
29		70	180	72	70	15	85
30		70	30	29	100	20	99
31		70	60	49	100	20	93

Esses resultados mostraram que as radiações MW, de um modo geral, elevaram os rendimentos das reações e reduziram o tempo, além de gerarem produtos com elevado grau de pureza, livres de produtos secundários. Essas diferenças observadas entre os dois tipos de aquecimentos empregados podem ser explicadas pelo fenômeno de transferência de energia; no MW essa transmissão é realizada por via dielétrica, enquanto no aquecimento convencional por condução (BOUGRIN *et al.*, 2005).

O aquecimento por micro-ondas é também chamado de aquecimento dielétrico, e existem dois mecanismos principais para a transformação de energia eletromagnética em calor. O primeiro, chamado rotação de dipolo, relaciona-se com o alinhamento das moléculas, que apresentam dipolos permanentes ou induzidos, com o campo elétrico aplicado. Quando esse campo é removido essas moléculas retornam a um estado desordenado, e a energia absorvida para orientação destes dipolos é dissipada na forma de calor (**Figura 4**). O segundo mecanismo é chamado de condução iônica, e o calor é gerado através de perdas por fricção, através da

migração de íons dissolvidos sob a ação de um campo eletromagnético (DA SILVA *et al.*, 2009).

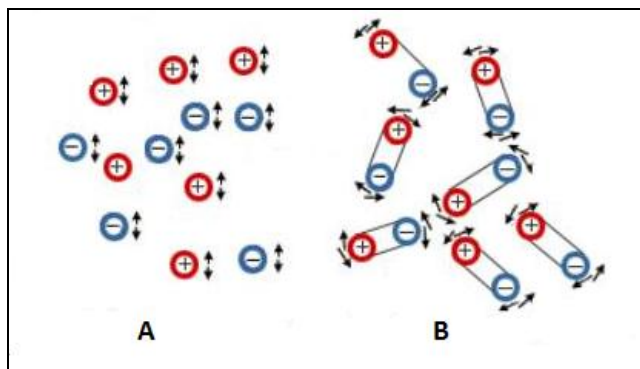
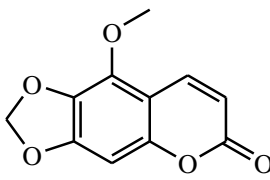
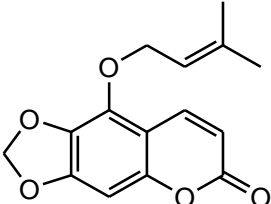
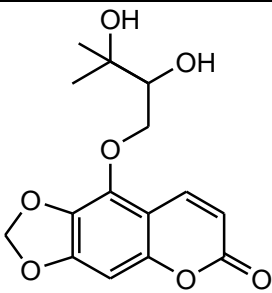
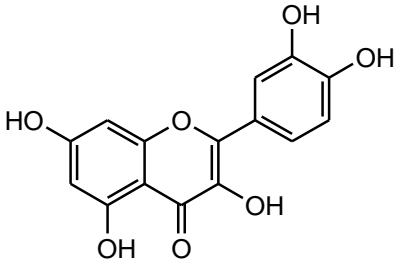
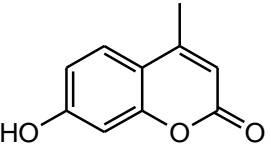
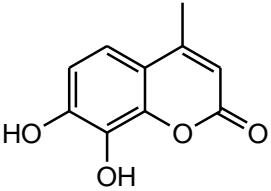
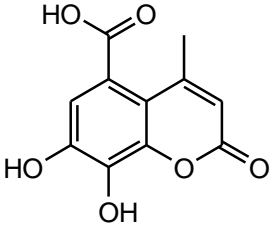
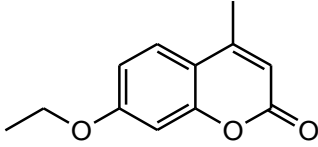
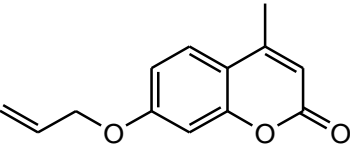
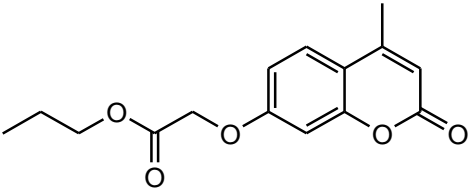
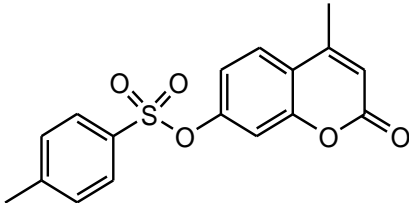
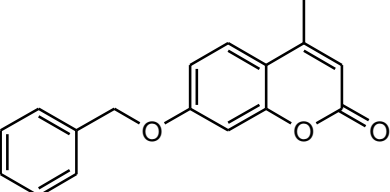
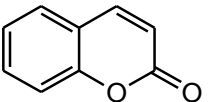
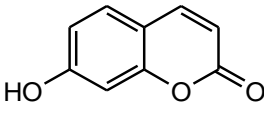
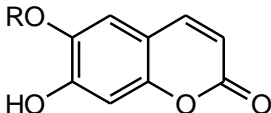


Figura 4: Mecanismo de transformação de energia. Onde **A** representa a polarização das cargas e **B** a orientação após alternância do campo elétrico. Adaptado de DA SILVA *et al.*, 2009.

Após a etapa de isolamento e de síntese, todas as cumarinas obtidas, juntamente com quatro cumarinas comerciais, cumarina (**32**), umbeliferona (**20**), esculetina (**33**) e esculina (**34**), foram testadas quanto à atividade antifúngica contra *S. schenckii*. No teste foi também incluída a quercetina (**23**) isolada de *P. polystachyum*. Os valores da CIM estão apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5: Atividade antifúngica (CIM) de cumarinas e de quercetina contra *S. schenckii*

			
(10)	(22)	(12)	(23)
CIM: 567 μM (125 $\mu\text{g/mL}$)	455 μM (125 $\mu\text{g/mL}$)	650 μM (125 $\mu\text{g/mL}$)	>3000 μM (> 2000 $\mu\text{g/mL}$)
			
(26a)	(26b)	(26c)	(27)
CIM: 1420 μM (250 $\mu\text{g/mL}$)	650 μM (125 $\mu\text{g/mL}$)	66 μM (15,6 $\mu\text{g/mL}$)	612 μM (125 $\mu\text{g/mL}$)
			
(28)	(29)	(31)	
CIM: 289 μM (62,5 $\mu\text{g/mL}$)	>3000 μM (>1000 $\mu\text{g/mL}$)	378 μM (125 $\mu\text{g/mL}$)	
			
(30)	(32)	(20)	(33) R=H
CIM: >3000 μM (>1000 $\mu\text{g/mL}$)	>3000 μM (>1000 $\mu\text{g/mL}$)	1542 (250 $\mu\text{g/mL}$)	2808 μM (500 $\mu\text{g/mL}$) (34) R= glucose 734 μM (250 $\mu\text{g/mL}$)

Os resultados obtidos no teste de atividade antifúngica dos produtos isolados (**10**, **12**, **22** e **23**) revelaram uma moderada atividade com CIM de aproximadamente 500 μM para as 6,7-metilenodioxycumarinas. Foi possível observar uma influência dos substituintes na posição do C-5, sendo que grupamento prenilado nessa posição favoreceu a atividade antifúngica (**22**). Por outro lado, o flavonoide não foi ativo frente ao fungo (CIM > 3000 μM).

Por sua vez, as cumarinas obtidas por síntese apresentaram moderada a fraca atividade antifúngica com CIM entre 289 até >3000 μM . No entanto, o composto **26c** apresentou atividade fungicida com excelente valor de CIM (66 μM). As cumarinas mostraram valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) na faixa de 1300 - >3000 μM , sendo que **26c** foi o mais promissor, com valor de 246 μM .

Relações estrutura atividade para cumarinas com atividade antifúngica têm sido reportadas por diversos autores. Trabalhos mostraram um aumento da atividade em cumarinas 7-O-substituídas quando comparadas a 7-OH-cumarinas (DINI *et al.*, 1992; CÉSPEDES *et al.*, 2006). Por sua vez, outros autores não detectaram tal elevação na atividade antimicrobiana de cumarinas 7-O-substituídas (IRANSHAHI *et al.*, 2008). Neste trabalho, as cumarinas alquiladas na posição 7-OH com os grupamentos etila, alila e tosila (**27**, **28**, e **31**, CIM de 612, 289 e 378 μM , respectivamente) foram aproximadamente cinco vezes mais ativas que a correspondente cumarina não alquilada (**26a**) (CIM = 1420 μM) contra *S. schenckii*. Por outro lado, os grupamentos acetato de etila e benzila na posição 7-O-substituinte (**29** e **30**, com CIM de > 3000 μM para ambos os compostos) foram prejudiciais para a atividade contra esse fungo.

Comparando os compostos **20** e **32** (CIM 1542 e >3000 μM , respectivamente), a adição do grupamento hidroxila na posição C-7 do anel cumarínico aumentou a atividade, sendo similar comportamento observado por OJALA e colaboradores (2000) para o fungo *Fusarium culmorum*. Ao analisar os compostos **26a** e **20** (CIM de 1420 e 1542 μM , respectivamente), cuja única

diferença é o grupamento metila na posição C-4, pode-se observar que a atividade não apresentou diferença significativa, demonstrando que 4-metil substituinte provavelmente não desempenhe um papel importante nessa atividade. Alguns autores corroboram com essa hipótese ao relatarem comportamento semelhante para cumarinas que diferem apenas na ausência ou presença do substituinte CH₃ no C-4 do anel cumarínico. Este é o caso das cumarinas 6,7-dimetoxicumarina e 6,7-dimetoxi-4-metilcumarina que demonstraram comparável atividade anticândida (CÉSPEDES *et al.*, 2006).

A cumarina (**32**), a mais simples da classe, que não apresenta qualquer substituição no anel, foi inefetiva contra *S. schenckii* (CIM = > 3000 µM). A esculetina (**33**) que possui um grupamento hidroxila livre na posição C-6 mostrou reduzida atividade antifúngica (CIM = 2808 µM). Esse resultado, ao contrário do proposto por SARDARI (1999), mostrou que a presença de OH na posição C-6 não é essencial para a atividade das cumarinas contra *S. schenckii*. Em concordância com os resultados obtidos neste trabalho, JURD *et al.* (1971) também não observaram inibição do crescimento fúngico com a esculetina. A cumarina mais polar, a esculina (**34**), glicosilada em C-6, foi três vezes mais ativa que seu análogo C-6 hidroxilado, esculetina **33** (CIM de 734 µM e 2808 µM, respectivamente).

Apesar de o grupamento hidroxila adicional na posição C-6 ser deletério para a atividade (comparação entre **20** e **33**, CIM de 1542 e 2808 µM, respectivamente), a presença de um grupamento hidroxila adicional na posição C-8 conduz a uma elevação de duas vezes na atividade. Esse fato pode ser observado ao comparar os compostos **26a** (um único grupamento hidroxila em C-7, CIM de 1420 µM) com o composto **26b** (dois grupamentos hidroxilas nas posições C-7 e C-8, CIM de 650 µM). A presença adicional de um grupamento carboxila na posição C-5 gerou um aumento intenso na atividade: o composto **26c**, que apresenta dois grupamentos hidroxilas nas posições C-7 e C-8 e também um grupamento carboxila em C-5 foi o composto mais ativo (CIM = 66 µM). Comparando esse composto ao seu análogo não carboxilado **26b** (CIM = 650 µM), a adição do grupamento polar na posição C-5 elevou dez vezes a atividade contra *S. schenckii*. Esses resultados corroboram a

hipótese de KAWASE e colaboradores (2001) que demonstraram ser importante para a atividade antimicrobiana a presença de grupamentos hidroxila e ácido carboxílico.

O composto mais ativo **26c** foi testado em conjunto com os dois fármacos usados no tratamento da esporotricose, anfotericina B e itraconazol, a fim de investigar uma possível interação. Essa interação ocorreu apenas com a anfotericina B, observando-se um efeito sinérgico que resultou em CIM de 15 μM para **26c** e CIM de 0,54 μM para a anfotericina B. Similar relação sinérgica foi demonstrada entre antioxidantes fenólicos e esse fármaco (ANDREWS *et al.*, 1979).

A redução da concentração do antifúngico anfotericina B, usado para tratamento da esporotricose nas formas mais graves a disseminada e a meníngea, se torna importante uma vez que esse fármaco é reconhecido por sua toxicidade renal. Essa nefrotoxicidade é dependente da dose e gera lesões histológicas permanentes nos túbulos renais mesmo durante cursos de terapia de curta duração (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Na etapa subsequente ao estudo da atividade antifúngica, as cumarinas comerciais e também as obtidas por síntese foram submetidas à avaliação da atividade antioxidante, através de três ensaios: método espectrofotométrico com DPPH, método eletroquímico por voltametria cíclica e método fluorimétrico ACAP. Após um *screening*¹ inicial realizado em cromatoplasmas com solução de DPPH 0,2%, foi verificado que os compostos **26b**, **26c** e **33** apresentaram capacidade de *scavenger*² de radicais DPPH, tal fato foi observado através da mudança de coloração das amostras. Então, esses três compostos foram avaliados quantitativamente pelo método espectrofotométrico frente ao radical DPPH. O perfil cinético, apresentado no Capítulo IV, revelou que esses compostos foram capazes de sequestrar esse radical de maneira concentração dependente. Ou seja, quanto maior a concentração da cumarina testada maior foi consumo desse radical.

¹ Screening: Varredura amostral

² Scavenger: Capacidade de sequestro

Analisando os valores de IC₅₀ dessas cumarinas (composto **26b** IC₅₀ = 33.46 µM, composto **26c** IC₅₀ = 17.49 µM e composto **33** IC₅₀ = 25.18 µM) foi possível concluir que o composto **26c** apresentou maior capacidade antioxidante frente ao radical.

Além disso, a análise desse perfil cinético também revelou um decaimento bifásico, sendo que nos primeiros segundos foi observado um rápido declínio das absorvâncias seguido de um platô. Esse perfil, segundo ESPÍN e colaboradores (2000), é indicativo de estruturas que apresentam mais de um centro de reatividade.

Analisando os valores de Potencial *Scavenger* do radical DPPH (IC₅₀) apresentados na **Tabela 6** juntamente com a análise das estruturas química dos compostos, inferiu-se que os compostos mais polares foram os mais ativos. Dessa forma, conclui-se que o número de hidroxilas ligadas ao anel benzeno da cumarina está relacionado à atividade de supressão de ERO. Similar correlação foi reportada para derivados de fenilpropanoides (CHANG *et al.*, 2007).

Adicionalmente, foi determinada a capacidade antioxidante frente aos radicais peroxil. Essa metodologia confirmou a elevada capacidade antioxidante das cumarinas **26b**, **26c** e **33**.

Tabela 6: Valores de IC₅₀ e Potencial eletroquímico obtido nos ensaios antioxidantes

Compostos	log P*	IC₅₀ (µM)	Ep_a (V)
26c	0.78	17.49	0.44
26b	1.22	33.46	0.49
33	1.05	25.18	0.48
23	0.35	29.41	0.22
26a	1.61	-	0.85
28	2.57	-	0.76
20	1.44	-	0.83
27	2.21	-	0.72
31	3.57	-	0.70

* log P calculado usando o programa ChemDraw Ultra

Posteriormente a esse ensaio, foi realizada a análise das propriedades eletroquímicas dessas cumarinas por voltametria cíclica. Os resultados revelaram

que as cumarinas **26b**, **26c** e **33** exibiram um Potencial de Oxidação (E_{p_a}) irreversível em aproximadamente 0,7 V, o que correspondente à oxidação do grupamento fenol (DEMPSEY *et al.*, 1993). Também foi possível observar um segundo pico de oxidação irreversível apenas para o composto **26c** o que pode representar o centro de reatividade referente ao grupamento carboxílico.

Comparando os ensaios DPPH e VC, relações entre os valores de IC_{50} e E_{p_a} foi estabelecido que a ausência de grupamento hidroxila (compostos **27** - **31**) ou a presença de apenas um grupamento hidroxila (**26a**) eleva o potencial de oxidação dos compostos, dificultando sua atividade antioxidante. Por sua vez, a presença de dois grupamentos hidroxila (compostos **26b**, **26c** e **33**) reduz o potencial de oxidação, o que proporciona uma boa atividade de sequestro radicalar. Dessa forma, os resultados indicaram que os compostos com valores de E_{p_a} até 0,5 V são promissores frente à atividade antioxidante, enquanto valores de E_{p_a} maiores que 0,5 V sugerem inatividade antioxidante.

O tipo de substituinte presente no anel benzeno da cumarina interfere na atividade antioxidante. Os resultados sugerem uma reduzida influencia do grupamento metila, enquanto os grupamentos hidroxilas exercem uma influencia positiva sobre a atividade. Adicionalmente, a presença do grupamento carboxila no anel benzeno eleva consideravelmente a capacidade antioxidante.

Comparando as atividades antioxidante com a antifúngica das cumarinas foi possível observar que a presença de duas hidroxilas nas posições C-7 e C-8 do anel cumarínico favoreceram ambas as atividades; assim como a adição de um grupamento carboxila em C-5. Embora esse estudo não tenha estabelecido uma correlação direta entre as atividades antifúngica e antioxidante, a estrutura mais promissora em ambos os ensaios foi a **26c**, que apresentou uma elevada atividade fungicida frente a *S. schenckii* e também uma excelente atividade antioxidante. Tal fato pode indicar que o mecanismo antifúngico dessa cumarina seja possivelmente através da inibição da formação de ERO envolvidas na síntese de melanina fúngica.

A melanização do fungo *S. schenckii* reduz o processo de fagocitose, sendo assim um mecanismo de defesa. Sem a produção de radicais livres, as reações que conduzem à formação da melanina ficam impedidas e, dessa forma, o fungo se torna mais suscetível ao ataque do organismo e também mais permeável ao fármaco antifúngico (ROMERO-MARTINEZ *et al.*, 2000).

Outro mecanismo de ação possível está relacionado aquele proposto por THATI e colaboradores (2007); segundo os autores a ação antifúngica das cumarinas ocorre através da interrupção da cadeia respiratória, que leva a depleção do ergosterol, ocorrendo um aumento da permeabilidade da membrana, ocasionando a indução de apoptose.

Embora ainda não esteja elucidado o mecanismo de ação antifúngico dessas cumarinas contra *S. schenckii*, esses resultados promissores explicam o uso dessas plantas na medicina tradicional do sul do Brasil para tratamento tópico de infecções fúngicas. Após a investigação da atividade antifúngica frente a *S. schenckii* realizada com as cumarinas se obteve um composto promissor **26c** com excelente atividade fungicida o que sugere um potencial *hit*³ para investigação no tratamento da esporotricose em pacientes imunodeprimidos.

Depois de avaliada a atividade antifúngica dos extratos de *Pterocaulon* e cumarinas, pode-se inferir que o uso popular desses extratos realizado em propriedades rurais no Rio Grande do Sul para tratamento tópico de micoses é justificado, uma vez que foram observadas as propriedades fungicidas esperadas nos extratos dessas plantas. Embora as cumarinas isoladas tenham apresentado moderada atividade, algumas sintéticas foram ativas.

A segunda parte deste trabalho foi conduzida visando à investigação de outro uso tradicional da medicina popular. Como citado anteriormente, *P. polystachyum* é utilizado na Argentina como antitumoral. Desta forma, as cumarinas isoladas e também as comerciais foram analisadas quanto ao potencial citotóxico utilizando

³ Hit: Estrutura química de interesse farmacológico

linhagens de glioma humano e de ratos, através do método MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium].

A análise revelou que as cumarinas isoladas (**10**, **12** e **22**), quando comparadas à cultura controle de células, causaram uma significativa redução na viabilidade celular (Capítulo II). Os resultados também demonstraram que estes compostos foram significativamente mais citotóxicos contra linhagens celulares de glioma C6 e U138-MG que as cumarinas comerciais (**20**, **32** - **34**). Comparando as estruturas químicas dos compostos foi possível sugerir uma influência positiva do grupamento metilenodioxí nessa atividade, visto que apenas as cumarinas isoladas, as mais ativas, apresentam esse grupamento.

Os valores de IC₅₀ mostraram que o composto **10** (IC₅₀= 34,6 µM e IC₅₀= 31,6 µM para C6 e U-138 MG, respectivamente) foi pelo menos duas vezes mais citotóxico que os compostos **22** (IC₅₀= 77,5 µM e IC₅₀= 65,4 µM para C6 e U-138 MG, respectivamente) e **12** (IC₅₀= 76,4 µM e IC₅₀= 75,6 µM, para C6 e U-138 MG respectivamente) para ambas as linhagens celulares. Até o momento, as cumarinas isoladas nesse estudo não haviam sido testadas em linhagens de glioma. RIVEIRO e colaboradores em 2004 também reportaram uma atividade antiproliferativa [células leucêmicas humanas (U-937)] mais elevada para o composto **10** ao comparar com o composto **22**. Em concordância com o presente trabalho, VUCKOVIC (2007) demonstrou a atividade citotóxica (para linhagem celular de glioma C6) de outra cumarina contendo grupamento prenila no anel cumarínico, conforme o encontrado na estrutura **22**.

Nas concentrações testadas de 5-100 µM, as cumarinas comerciais (**20**, **32-34**) que não apresentam grupamento metilenodioxí mostraram ser inativas. Por outro lado, a esculina (**34**) estimulou o crescimento celular, provavelmente devido à presença do grupamento glicosídeo, o qual poderia ser usado como substrato no crescimento celular (PORTAIS *et al.*, 1996).

Com base na relevante atividade apresentada pelas 6,7-metilenodioxycumarinas isoladas de *Pterocaulon* é possível sugerir que o propalado uso popular de *P. polystachyum* como antitumoral seja talvez devido à presença de cumarinas.

6. CONCLUSÕES

- Os extratos metanólicos de espécies de *Pterocaulon* (*P. polystachyum*, *P. balansae*, *P. lorentzii*, *P. lanatum*, e *P. cordobense*) foram ativos frente a cepas do fungo *S. schenckii*, sendo o extrato de *P. polystachyum* mais ativo.
- Os métodos cromatográficos empregados foram adequados para o isolamento de metabólitos secundários de *Pterocaulon*. As três cumarinas isoladas apresentaram moderada atividade antifúngica frente a *S. schenckii*.
- A síntese de cumarinas realizada em MW de modo geral apresentou rendimentos superiores e reduzido tempo de reação quando comparada àquela sob aquecimento convencional. Foi possível sintetizar nove cumarinas, sendo que quatro foram sintetizadas pela primeira vez usando MW. A 5-carboxi-6,7-diidroxí-4-metilcumarina **26c** apresentou considerável atividade fungicida frente ao fungo *S. schenckii*, além de apresentar interação sinérgica com a anfotericina B. As demais cumarinas sintetizadas apresentaram fraca a moderada atividade antifúngica.
- As cumarinas sintetizadas e as comerciais mais polares apresentaram maior atividade *scavenger* de radicais livres e reduzidos valores de potencial de oxidação. As cumarinas com atividade antioxidante foram as mais promissoras frente ao fungo *S. schenckii*.
- As cumarinas isoladas apresentaram significativo efeito citotóxico contra linhagens celulares de glioma humano e de ratos, os resultados indicaram uma influência positiva do grupamento metilenodioxí na atividade.
- O conjunto dos elementos obtidos *in vitro* corrobora o uso tradicional de plantas de diferentes espécies de *Pterocaulon* para fins de tratamento de micoses e antitumoral.

7. REFERÊNCIAS

AHMED, A.A.; BISHR, M.; EL-SHANAWANY, M.A.; ATTIA, E.Z.; ROSS, S.A.; PARÉ, P.W. Rare trisubstituted sesquiterpenes daucanes from the wild *Daucus carota*. **Phytochemistry**, v. 66, p. 1680-1684, 2005.

ALIGIANNIS, N.; KALPOTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 4168-4170, 2001.

ANDREWS, F.A.; SAROSI, G.A.; BEGGS, W.H.J. Influence of antioxidants on the bioactivity of amphotericin B. **Antimicrobial Chemotherapy**, v. 5, p. 173-177, 1979.

ANDRIOLE, V.T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 151-162, 1999.

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, 2002.

BARROS, S.M.G. **As cumarinas do *Pterocaulon balansae* Chodat**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1981.

BARROSO, G.M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v. 3, Viçosa: Imprensa Universitária, 1991. 377p.

BEHIN, A.; HOANG-XUAN, K.; CARPENTIER, A.F.; DELATTRE, J.Y. Primary brain tumors in adults. **The Lancet**, v. 361, p. 323-331, 2003.

BISIGNANO, G.; SANOGO, R.; MARINO, A.; AQUINO, R.; D'ANGELO, V.; GERMANO, 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.

BOHLMANN, F.; ABRAHAM, W.R.; KING, R.M.; ROBINSON, H. Thiophene acetylenes and flavonols from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 825-827, 1981.

BONDY, M.L.; SCHEURER, M.E.; MALMER, B.; BARNHOLTZ-SLOAN, J.S.; DAVIS, F.G.; IL'YASOVA, D.; KRUCKO, C.; MCCARTHY, B.J.; RAJARAMAN, P.; SCHWARTZBAUM, J.A.; SADETZI, S.; SCHLEHOFER, B.; TIHAN, T.; WIEMELS, J.L.; BUFFLER, P.A. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. **Cancer**, v. 113, p. 1953-1698, 2008.

BORGES, F.; ROLEIRA, F.; MILHAZES, N.; SANTANA, L.; URIARTE, E. Simple coumarins and analogues in medicinal chemistry: occurrence, synthesis and biological activity. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 887-916, 2005.

BOUGRIN, K.; LOUPY, A.; SOUFIAOUI, M.J. Microwave-assisted solvent-free heterocyclic synthesis. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 6, p. 139-167, 2005.

BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and classification**. Portland: Timber, 1994. 752p.

CABRERA, A.L. Compositae. In: BURKART, A. **Flora ilustrada de Entre Rios** (Argentina), Parte 6. Coleccion Cientifica del I.N.T.A: Buenos Aires, 1974. 554p.

CÉSPEDES, C.L.; ÁVILA, J.G.; MARTÍNEZ, A.; SERRATO, B.; CALDERÓN-MUGICA, J.C.; SALGADO-GARCIGLIA, R. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3521-3527, 2006.

CHANG, Y.C.; LEE, F.W.; CHEN, C.S.; HUANG, S.T.; TSAI, S.H.; HUANG, S.H. Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, p. 1541-1551, 2007.

CHEN, Q.X.; KUBO, I. Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4108-4112, 2002.

CHIARI, M.E.; JORAY, M.B.; RUIZ, G.; PALACIOS, S.M.; CARPINELLA, M.C. Tyrosinase inhibitory activity of native plants from central Argentina: isolation of an active principle from *Lithrea molleoides*. **Food Chemistry**, v. 120, p. 10-14, 2010.

CHIMENTI, F.; BIZZARRI, B.; BOLASCO, A.; SECCI, D.; CHIMENTI, P.; GRANESE, A.; CARRADORI, S.; RIVANERA, D.; ZICARI, A.; SCALTRITO, M.M.; SISTO, F. Synthesis, selective anti-*Helicobacter pylori* activity, and cytotoxicity of novel N-substituted-2-oxo-2H-1-benzopyran-3-carboxamides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 4922-4926, 2010.

CHIMICHI, S.; BOCCALINI, M.; COSIMELLI, B.; VIOLA, G.; VEDALDI, D.; DALL'ACQUA, F. New geiparvarin analogues from 7-(2-oxoethoxy)coumarins as efficient in vitro antitumoral agents. **Tetrahedron Letters**, v. 43, p. 7473-7476, 2002.

CHU, Y.; TSAI, Y.Y.; WANG, C.J.; LIN, W.; TSENG, T.H. Induction of apoptosis by esculetin in human leukemia cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 416, p. 25-32, 2001.

CONTI DIAZ, I.A. Epidemiology of sporotrichosis in Latin America. **Mycopathologia**, v. 108, p. 113-116, 1989.

COWAN, N.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 564-582, 1999.

CREAVEN, B.S.; EGAN, D.A.; KARZ, D.; KAVANAGH, K.; MCCANN, M.; MAHON, M.; NOBLE, A.; THATI, B.; WALSH, M. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper(II) and manganese(II) complexes of coumarin-6,7-dioxyacetic acid (cdoaH2) and 4-methylcoumarin-6,7-dioxyacetic acid (4-MecdoaH2): X-ray crystal structures of [Cu(cdoa)-(phen)2]·8.8H2O and [Cu(4-

Mecdoa)(phen)₂·13H₂O (phen=1,10-phenanthroline). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, p. 1108-1119, 2007.

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 52, p. 451-459, 2005.

DA SILVA, B.N.M. Micro-ondas, a nova macro onda nos laboratórios de química, Novidades na Ciência – **SBQ Rio**, 18 fevereiro 2009. Disponível em: <<http://www.uff.br/sbqrio/>>

DABOIT, T.C.; STOPIGLIA, C.D.O.; VON POSER, G.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal activity of *Pterocaulon alopecuroides* (Asteraceae) against chromoblastomycosis agents. **Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of fungal diseases**, v. 53, p. 246-250, 2010.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; GÓMEZ, M.A.; COUSSIO, J.D. Polyphenols Isolated from *Pterocaulon purpurascens*, I. 6-Hydroxyflavonoids. **Journal of Natural Products**, v. 50, p. 512-513, 1987.

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

DEBENEDETTI, S.L.; PALACIOS, P.S.; NADINIC, E.L.; COUSSIO, J.D. 5-(3-Methyl-2-butenyloxy)-6,7-methylenedioxy coumarin, a 5,6,7-trioxygenated coumarin from *Pterocaulon virgatum*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1539-1542, 1994.

DEBENEDETTI, S.L.; NADINIC, E.L.; COUSSIO, J.D.; DE KIMPE, N.; BOYEKENS, 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. Isopurpurazol, a coumarin from *Pterocaulon virgatum*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 701-703, 1999.

DEMPSEY, E.; O'SULLIVAN, C.; SMYTH, M.R.; EGAN, D.; O'KENNEDY, R.; WANG, J. Development of an Electrochemical Biosensor for 7-hydroxycoumarin. **Analyst** v.118, p. 411-414, 1993.

DEXEUS, F.H.; LOGOTHETIS, C.J.; SELLA, A.; FITZ, K.; AMATO, R.; REUBEN, J.M.; DOZIER, N.J. Phase II study of coumarin and cimetidine in patients with metastatic renal carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, p. 325-329, 1990.

DINI, A.; RAMUNDO, E.; SATURNINO, P.; SCIMONE, A.; STAGNO D'ALCONTRES, I. Isolation, characterization and antimicrobial activity of coumarin derivatives from *Cyperus incompletus*. **Bollettino - Societa Italiana di Biologia Sperimentale**, v. 68, p. 453-461, 1992.

DIXON, D.M.; SALKIN, I.F.; DUNCAN, R.A.; HURD, N.J.; HAINES, J.H.; KEMNA, M.E.; COLES, F.B. Isolation and characterization of *Sporothrix schenckii* from clinical and environmental sources associated with the largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, p. 1106-1113, 1991.

DURDEN, F.M.; ELEWSKI, B. Fungal infections in HIV-infected patients. **Seminars in Cutaneous Medicine Surgery**, v. 16, p. 200-212, 1997.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 648-656, 2000.

FATMA, M.A.B.; ELTAYEB, E.A. Antifungal compounds from induced *Conium maculatum* L. plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 1097-1108, 2004.

FLOWER, R. **Characterization of antiviral compounds in Australian bush medicines**. RIRDC Publications Manager: Kingston, 2000. 82 p.

GIROLAMI, V. O Sistema Nervoso Central In: CONTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, R. **Patologia estrutural e funcional**. Ed. Rio de Janeiro: Koogan, 2000. 1251p.

GOODMAN E GILMAN. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**, 11.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006. 1.821p.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1-93, 2006.

HARDMAN, S.; STEPHENSON, I.; JENKINS, D.R.; WISELKA, M.J.; JOHNSON, E.M. Disseminated *Sporothrix schenckii* in a patient with AIDS. **Journal of Infection**, v. 51, p. 73-77, 2004.

HEEMANN, A.C.W.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Revisão do gênero *Pterocaulon* - Aspectos fitoquímicos e Atividades Biológicas. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 53-60, 2004.

HOFMANOVA, J.; KOZUBIK, A.; DUSEK, L.; PACHERNIK, J. Inhibitors of lipoxygenase metabolism exert synergistic effects with retinoic acid on differentiation of human leukemia HL-60 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 350, p. 273-284, 1998.

HOLLAND, E.C., 2001. Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p. 120-129, 2001.

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.

IRANSHAHI, M.; HOSSEINI, S.T.; SHAHVERDI, A.R.; MOLAZADE, K., KHAN, S.S.; AHMAD, V.U. Diversolidides A-G, guaianolides from the roots of *Ferula diversivittata*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 2753-2757, 2008.

JAYASHREE, T.; SUBRAMANYAM, C. Oxidative stress as a prerequisite for aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Free Radical Biology Medical**, v. 29, p. 981-985, 2000.

JIMENEZ-OROZCO, F.A.; MOLINA-GUARNEROS, J.A.; MENDOZA-PATINO, N.; LEON-CEDENO, F.; FLORES-PEREZ, B.; SANTOS-SANTOS, E. Cytostatic activity of coumarin metabolites and derivatives in the B16-F10 murine melanoma cell line. **Melanoma Research**, v. 9, p. 243-247, 1999.

JOHNSON, J.R. The Perkin reaction and related reactions. **Organic Reactions**, v. 1, p. 210-265, 1942.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 10.ed. São Paulo: Nacional, 1991. 776p.

JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005

JURD, L.; CORSE, J.; KING, A.D. J.R.; BAYNE, H.; MIHARA, K. Antimicrobial properties of umbelliferone derivatives. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2965-2971, 1971.

KADIN, S.B. Reduction of Conjugated Double Bonds with Sodium Borohydride. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 620-622, 1996.

KANG, T.J.; LEE, S.Y.; SINGH, R.P.; AGARWAL, R.; YIM, D.S. Anti-tumor activity of oxypeucedanin from *Ostericum koreanum* against human prostate carcinoma DU145 cells. **Acta Oncologica**, v. 48, p. 895-900, 2009.

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

KAWASE, M.; VARU, B.; SHAH, A.; MOTOHASHI, N.; TANIA, S.; SAITO, S.; DEBNATH, S.; MAHAPATRA, S.; DASTIDAR, S.G.; CHAKRABARTY, A.N. Antimicrobial activity of new coumarin derivatives. **Arzneimittel Forschung**, v. 51, p. 67-71, 2001.

KNOW-CHUNG, K.J.; BENETT, J.E. **Medical Mycology**. Lea & Febiger, Philadelphia. 1992. 866p.

KOFINAS, C.; CHINOUE, I.; LOUKIS, A.; HARVALA, C.; MAILLARD, M. Flavonoids and bioactive coumarins of *Tordylium apulum*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 637-641, 1998.

KUSUHARA, M.; HACHISUKA, H., SASAI, Y. Statistical survey of 150 cases with sporotrichosis. **Mycopathologia**, v. 102, p. 129-133, 1988.

LACROIX, M.; ABI-SAID, D.; FOURNEY, D.R.; GOKASLAN, Z.L.; SHI, W.M.; DE MONTE, F.; LANG, F.F.; MCCUTCHEON, I.E.; HASSENBUSCH, S.J.; HOLLAND, E.; HESS, K.; MICHAEL, C.; MILLER, D.; SAWAYA, R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. **Journal of Neurosurgery**, v. 95, p. 190-198, 2001.

LAKE, B.G. Investigations into the mechanism of coumarins induced-hepatotoxicity in rats. **Food Chemistry Toxicology**, v. 37, p. 423-454, 1999.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; ZHOU, J. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-amino-4-methylcoumarin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 78, p. 241-249, 2008.

MACDONALD, T.J.; AGUILERA, D.; KRAMM, M. Treatment of high-grade glioma in children and adolescents. **Neuro-Oncology Advance**, *in press*, 2011.

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

MAES, D.; DEBENEDETTI, S.; DE KIMPE, N. New coumarins from *Pterocaulon virgatum* (L.) DC. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 165-169, 2006.

MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; JÚNIOR, V.N.; LEITÃO FILHO, H.F. Polyacetylenes from *Pterocaulon* species. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2497-2499, 1989.

MARSHALL, M.E.; MOHLER, J.L.; EDMONDS, K.; WILLIAMS, B.; BUTLER, K.; RYLES, M.; WEISS, L.; URBAN, D.; BUESCHEN, A.; MARKIEWICZ, M.; CLOUD, G. An updated review of the clinical development of coumarin (1,2-benzopyrone) and 7-hydroxycoumarin. **Journal Cancer Research clinical Oncology**, v. 120, p. S39-S42, 1994.

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

MAXWELL, A. The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. **Molecular Microbiology**, v. 9, p. 681-686, 1993.

MOHAREB, R.M.; EL-OMRAN, F.A.; HO, J.Z. Reactions of benzoyl isothiocyanate with active methylene reagents: A novel synthesis of thiophene, thiazoline and thieno[2,3-*d*]pyrimidine derivatives. **Heteroatom Chemistry**, v. 12, p. 168-175, 2001.

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.

MORABITO, G.; TROMBETTA, D.; SINGH, B.K.; PRASAD, A.K.; PARMAR, V.S.; NACCARI, C.; MANCARI, F.; SAIJA, A.; CRISTANI, M.; FIRUZI, O.; SASO, L. Antioxidant properties of 4-methylcoumarins in vitro cell-free systems. **Biochimie**, v. 92, p. 1101-1107, 2010.

MOUSSEAU, M.; CHAUVIN, C.; NISSON, M.F.; CHAFFANET, N.; PLANZ, D.; PASQUIER, D.; SCHAEERER, R.; BENABID, A. A study of expression of four chemoresistance-related genes in human primary and metastatic brain tumors. **European Journal of Cancer**, v. 29A, p. 753-759, 1993.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NOGUCHI, M.; EARASHI, M.; MINAMI, M.; MIYAZAKI, I.; TANAKA, M.; SASAKI, T. Effects of piroxicam and esculetin on the MDA-MB-231 human. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 53, p. 325-329, 1995.

OHGAKI, H.; KLEIHUES P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. **American Journal of Pathology**, v. 170, p. 1445-1453, 2007.

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.

OLIVEIRA, M.B.; BARROS, I.B.I.; AVANCINI, C.A.M.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. **Plantas medicinais e condimentares...enquanto saberes e fazeres quilombolas no Limoeiro do Bacuparí**. 1 ed. Porto Alegre: Evangraf, 2008. p. 216.

PAPPAS, P.G.; TELLEZ, I.; DEEP, A.E.; NOLASCO, D.; HOLGADO, W.; BUSTAMANTE, B. Sporotrichosis in Peru: description of an area of hyperendemicity. **Clinical Infection Diseases**, v. 30, p. 65-70, 2000.

PATIL, V.M.; GUPTA, S.P.; SAMANTA, S. A QSAR study on some series of anti-hepatitis C virus (HCV) agents. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 7, p. 139-145, 2010.

PEARCE, R.; GREENWAY, D.; PARKINSON, A. Species differences and interindividual variation in liver microsomal cytochrome P450 2A enzymes: Effects on coumarin, dicumarol, and testosterone oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 298, p. 211-225, 1992.

PECHMANN, V. "Neue Bildungsweise der Cumarine. Synthese des Daphnetins." **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 17, p. 929-936, 1884.

PEDERSEN, D.; BARUFFATI, V. Health and traditional medicine cultures in Latin America and Caribbean. **Social Science and Medicine**, v. 21, p. 5-12, 1985.

PORTAIS, J.C.; VOISIN, P.; MERLE, M.; CANIONI, P. Glucose and glutamine metabolism in C6 glioma cells studied by carbon 13 NMR. **Biochimie**, v. 78, p. 155-164, 1996.

PORTILLO, A.; VILLA, R.; FREIXA, B.; ADZET, T.; CAÑIGUERAL, S. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 93-98, 2001.

RAJ, H.G.; PARMAR, V.S.; JAIN, S.C.; GOEL, S.; SINGH, A.; GUPTA, A.; ROHIL, V.; TYAGI, Y.K.; JHA, H.N.; OLSEN, C.E.; WENGEL, J. Mechanism of biochemical action of substituted 4-methylbenzopyran-2-ones. Part II: Mechanism-based inhibition of rat liver microsome-mediated aflatoxin B1-DNA binding by the candidate antimutagen 7,8-diacetoxy-4-methylcoumarin. **Bioorganic Medicinal & Chemistry**, v. 6, p. 1895-1904, 1998.

RAMOS E SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 181-187, 2007.

RASHEDUZZAMAN, C.; HASSAN, C.M.; RASHID, M.A. Antimicrobial activity of *Toona ciliata* and *Amoora rohituka*. **Fitoterapia**, v. 74, p. 155-158, 2003.

RASOOLI, I.; ABYANEH, M. R. Inhibitory effects of Thyme oils on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Food Control**, v.15, n.6, p. 479-483, 2004.

RIVEIRO, M.E.; SHAYO, C.; MONCZOR, 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.

RÓDIO, C.; VIANNA, D.R.; KOWALSKI, K.P.; PANATIERI, L.F.; POSER, G.; ROTT, M.B. *In vitro* evaluation of the amebicidal activity of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. **Parasitology Research**, v. 104, p. 191-194, 2008.

ROMERO-MARTINEZ, R.; WHEELER, M.; GUERRERO-PLATA, A.; RICO, G.; TORRES-GUERRERO, H. Biosynthesis and functions of melanin in *Sporothrix schenckii*. **Infection and Immunity**, v. 68, p. 3696-3703, 2000.

ROSSELLI, S.; MAGGIO, A.M.; FARAONE, N.; SPADARO, V.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H.; BRUNO, M. The cytotoxic properties of natural coumarins isolated from roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of synthetic ester derivatives of aegelinol. **Natural Product Communications**, v. 4, p. 1701-1706, 2009.

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. 1993-1940, 1999.

SATHIAMOORTHY, B.; GUPTA, P.; KUMAR, M.; CHATURVEDI, A.K.; SHUKLA, P.K.; MAURYA, R. New antifungal flavonoid glycoside from *Vitex negundo*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, p. 239-242, 2007.

SATHORNSUMETEE, S.; REARDON, D.A.; DESJARDINS, A.; QUINN, J.A.; VREDENBURGH, J.J.; RICH, J.N. Molecularly targeted therapy for malignant glioma. **American Cancer Society**, v. 110, p. 13-24, 2007.

SAUTER, I.P.; SANTOS, J.C.D.; APEL, M.A.; CIBULSKI, S.P.; ROEHE, P.M.; VON POSER, G.L.; ROTT, M.B. Amoebicidal activity and chemical composition of *Pterocaulon polystachyum* (Asteraceae) essential oil. **Parasitology Research**, v. 4, p. 1-4, 2011.

SCHALLREUTER, K.U.; KOTHARI, S.; CHAVAN, B.; SPENCER, J.D. Regulation of melanogenesis-controversies and new concepts. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 395-404, 2008.

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

SCHMOURLO, G.; MENDONÇA FILHO, R.R.; ALVIANO, C.S.; COSTA, S.S. Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 563-568, 2005.

SCHUBACH, A.; BARROS, M.B.L.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 129-133, 2008.

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.

SHRINER, R.L. The Reformatsky Reaction. **Organic Reactions**, v. 1, p. 15-18, 1942.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis:UFRGS/EDUFSC. 2003. 1102p.

SINGH, V.; KAUR, S.; SAPEHIYIA, V.; SINGH, J.; KAD, G.L. Microwave accelerated preparation of [bmim][HSO₄] ionic liquid: an acid catalyst for improved synthesis of coumarins. **Catalysis Communcations**, v. 6, p. 57-60, 2005.

SINGH, I.; KAUR, H.; KUMAR, S.; KUMAR, A.; LATA, S.; KUMAR, A. Synthesis of new coumarin derivatives as antibacterial agents. **International Journal of ChemTech Research**, v. 2, p. 1745-1752, 2010.

STEIN, A.C.; SORTINO, M.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Ethnoveterinary medicine in the search for antimicrobial agents: antifungal activity of some species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, p. 211-214, 2005.

STEIN, A.C.; ALVAREZ, S.; AVANCINI, C.; ZACCHINO, S.; VON POSER, G. Antifungal activity of some coumarins obtained from species of *Pterocaulon* (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 95-98, 2006.

STRAUSS, C.R.; VARMA, R.S. Microwaves in Green and Sustainable Chemistry. **Topics in Current Chemistry**, v. 266, p. 199-231, 2006.

SVETAZ, L.; ZULJAN, F.; DERITA, M.; PETENATTI, E.; TAMAYO, G.; CÁCERES, A.; CECHINEL FILHO, V.; GIMÉNEZ, A.; PINZÓN, R.; ZACCHINO, S.A.; GUPTA, M. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 137-158, 2010.

TAKEUCHI, Y.; UEDA, N.; UESUGI, K.; ABE, H.; NISHIOKA, H.; HARAYAMA, T. Convenient synthesis of a simple coumarin from salicylaldehyde and wittig reagent. IV: Improved synthetic method of substituted coumarins. **Heterocycles**, v. 59, p. 217-224, 2003.

TELES, H.L.; SORDO, R.; SILVA, G.H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V.S.; PFENNING, L.H.; ABREU, L.M.; COSTA-NETO, C.M.; YOUNG, M.C.M.; ARAÚJO, A.R. Aromatic compounds produced by *Periconia atropurpurea* an endophytic fungus associated with *Xylopiá aromatic*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2686-2690, 2006.

THATI, B.; NOBLE, A.; ROWAN, R.; CREAVEN, B.S.; WALSH, M.; MCCANN, M.; EGAN, D.; KAVANAGH, K. Mechanism of action of coumarin and silver(I)-coumarin complexes against the pathogenic yeast *Candida albicans*. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 801-808, 2007.

TRKOVNIK, M.; IVEZI, Z. Syntheses of some new coumarin-quinolone carboxylic acids. **Journal Heterocyclic Chemistry**, v. 37, p. 137-141, 2000.

VALLE, T.; LÓPEZ, J.L.; HERNÁNDEZ, J.M.; CORCHETE, P. Antifungal activity of scopoletin and its differential accumulation in *Ulmus pumila* and *Ulmus campestris* cell suspension cultures infected with *Ophiostoma ulmi* spores. **Plant Science**, v. 125, p. 97-101, 1997.

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

VUCKOVIC, I.; TRAJKOVIC, V.; MACURA, S.; TESEVIC, V.; JANACKOVIC, P.; MILOSAVLJEVIC, S. A novel cytotoxic lignan from *Seseli annuum* L. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 790-792, 2007.

WEN, P.Y.; KESARI, S. Malignant Gliomas in Adults. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 492-507, 2008.

WHO, 1997. **The World Health Report, Conquering Suffering, Enriching Humanity**. WHO, Genova, p. 1-162.

WU, S.; LO, Y.K.; CHEN, C.C.; LI, H.F.; CHIANG, H.T. Inhibitory effect of the plant-extract osthole on L-type calcium current in NG108-15 neuronal cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 199-206, 2002.

WU, L.; WANG, X.; XU, W.; FARZANEH, F.; XU, R. The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. *Current Medicinal Chemistry*, v. 16, p. 4236-4260, 2009.

YAMAGUCHI, Y.; HEARING, V.J. Maeda, A.; Morita, A. NADPH:Quinone Oxidoreductase-1 as a New Regulatory Enzyme That Increases Melanin Synthesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, p. 645-647, 2010.

YANG, E.B.; ZHAO, Y.N.; ZHANG, K.; MACK, P. Daphnetin, one of coumarin derivatives, is a protein kinase inhibitor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 260, p. 682-685, 1999.

YANG, D.; GU, T.; WANG, T.; TANG, Q.; MA, C. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 74, p. 1424-1430, 2010.

YAVARI, I.; HEKMAT-SHOAR, R.; ZONOUKI, A. A new and efficient route to 4-carboxymethylcoumarins mediated by vinyltriphenylphosphonium salt. **Tetrahedron Letters**, v. 39, p. 2391-2392, 1998.

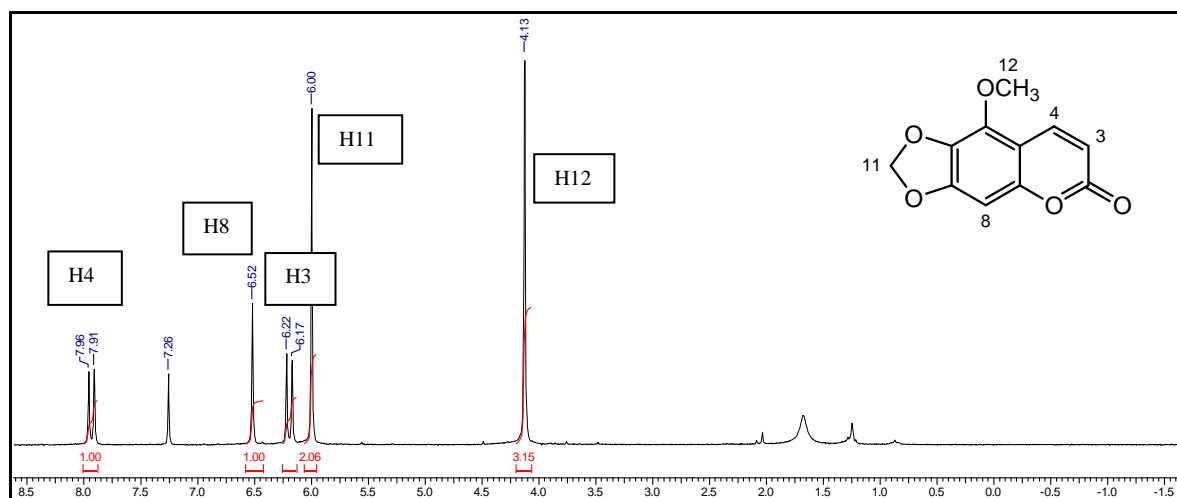
YU, T.; ZHANG, P.; ZHAO, Y.; ZHANG, H.; FAN, D.; DONG, W.; DING, L. Synthesis and Cytotoxic Activity of Coumarin Derivatives Containing Benzotriazole Moieties. **Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements**, v. 184, p. 2655-2663, 2009.

ZAITZ, C.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. **Atlas de Micologia Médica: Diagnóstico Laboratorial**. 2 ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora. 2004. 167p.

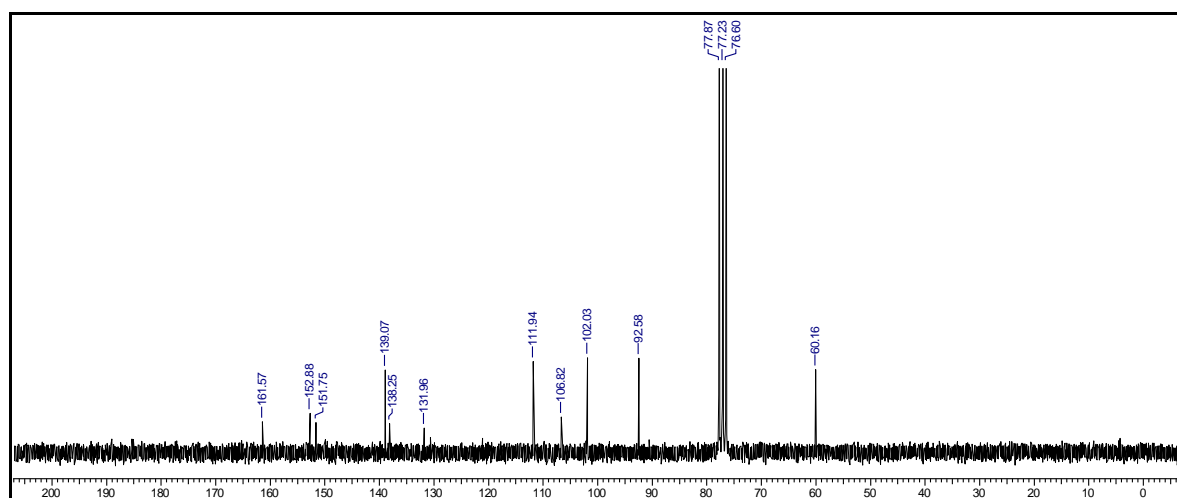
ZEMBOWER, D.E.; LIAO, S.; FLAVIN, M.T.; XU, Z.Q.; STUP, T.L.; BUCKHEIT, R.W. J.R.; KHILEVICH, A.; MAR, A.A.; SHEINKMAN, A.K.J. Structural analogues of the calanolide anti-HIV agents. Modification of the trans-10,11-dimethyldihydropyran-12-ol ring (ring C). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 1005-1017, 1997.

ZHANG, H.; YU, T.; ZHAO, Y.; FAN, D.; DING, L.; ZHANG, S. Cytotoxic activity of some novel dicoumarin derivatives in vitro. **Chemical Research in Chinese Universities**, v. 25, p. 644-647, 2009.

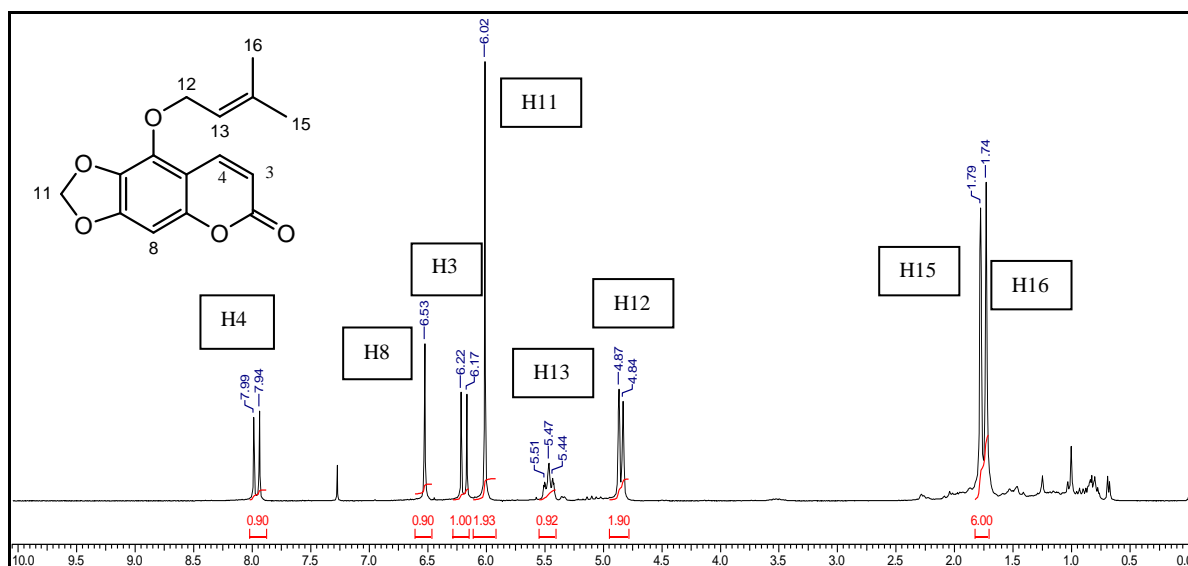
Anexo 1: ^1H RMN representativo do composto 5-metóxi-6,7-metilenodioximarina (Composto **10** referente ao Capítulo II).



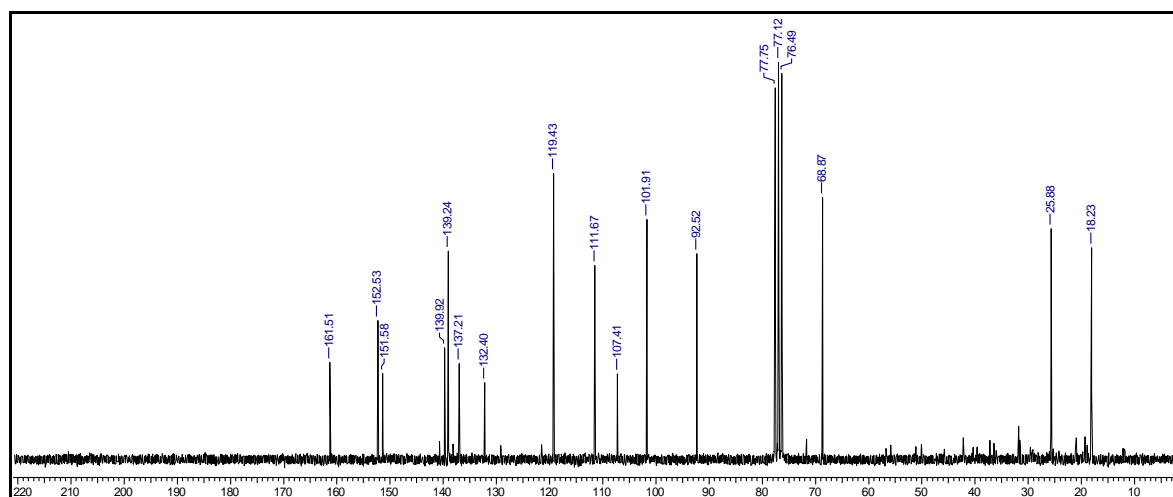
Anexo 2: ^{13}C RMN representativo do composto 5-metóxi-6,7-metilenodioximarina (Composto **10** referente ao Capítulo II).



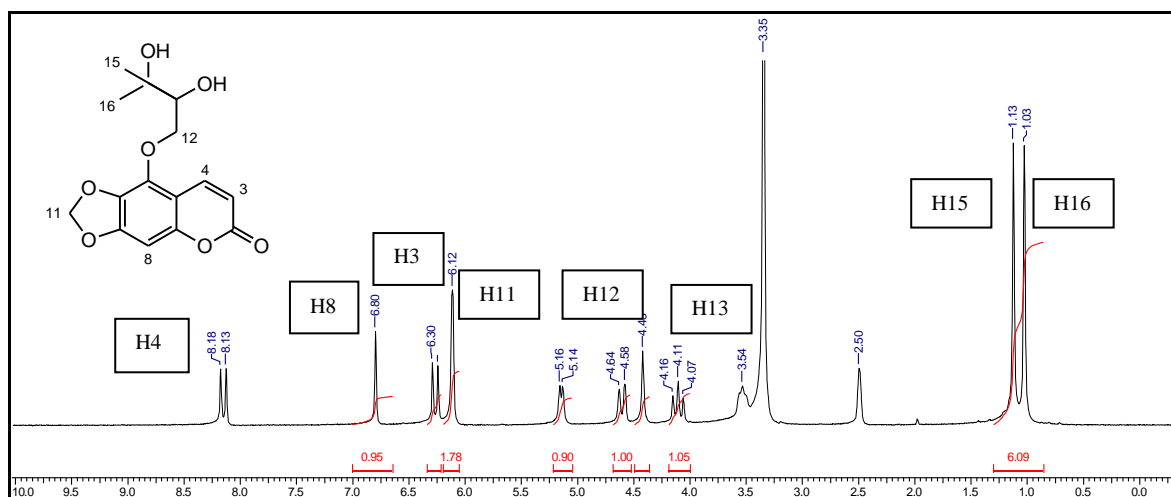
Anexo 3: ^1H RMN representativo do composto 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (Composto **22** referente ao Capítulo II).



Anexo 4: ^{13}C RMN representativo do composto 5-(3-metil-2-buteniloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (Composto **22** referente ao Capítulo II).



Anexo 5: ^1H RMN representativo do composto 5-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (Composto **12** referente ao Capítulo II).



Anexo 6: ^{13}C RMN representativo do composto 5-(2,3-diidroxi-3-metilbutiloxi)-6,7-metilenodioxicumarina (Composto **12** referente ao Capítulo II).

