

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO I e II

**Avaliação do potencial antinociceptivo de hiperbrasilol B, derivado
floroglucinol isolado de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schtdl.**

Satchie Sakamoto

Porto Alegre, junho de 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO I e II

**Avaliação do potencial antinociceptivo de hiperbrasilol B, derivado
floroglucinol isolado de *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schldl.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
por **Satchie Sakamoto** a Faculdade de Farmácia
da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
como requisito para obtenção de título de
Farmacêutica.

Coordenação: Prof^a Dr^a Gilsane Lino von Poser

Co-orientação: MSc. Eveline Dischkaln Stolz

Porto Alegre, junho de 2012.

À minha família,
que acreditou em mim e no meu potencial.

“Gostar do que se faz e sentir que é importante –

Existe algo mais divertido?”

Katharine Graham

Agradecimentos

À Deus pelas oportunidades e por ter me guiado até aqui. A mim pelo esforço e empenho dedicados a esse trabalho para que saísse o melhor possível.

À Eve pela co-orientação e dedicação durante todo o desenvolvimento desse trabalho. Pela semana de experimentos, inclusive pelo final de semana de sol dentro do laboratório. Agradeço por dividir teus conhecimentos e experiências. Obrigada!

À Gil, que me acolheu no antigo Laboratório 505G, e desde então me dando a oportunidade de ampliar meus conhecimentos e experiências. Pelas conversas, mesmo que breves, mas agradáveis. Pelo companheirismo e atenção. À Jéssica pela ajuda com o CLAE e á Flávia pelo RMN. E aos colegas do laboratório 504 por compartilharem seus conhecimentos em alguns momentos.

À Prof^a Stela Rates pela oportunidade de utilizar o seu laboratório para a realização desse trabalho. E ao restante das gurias do Lab. de Psicofarmacologia Experimental pelo apoio e que de alguma forma contribuíram com esse trabalho.

Aos meus pais, Vera e Toshinobu, que tanto amo. Obrigada por acreditarem em mim, por me ouvirem e me apoiarem em todos os momentos, principalmente os mais difíceis. Por me guiarem e incentivarem a continuar buscando realizar meus sonhos e nunca me deixarem desistir. Obrigada do fundo do meu coração.

A minha irmã Sayuri pelos momentos de alegrias e risadas, conselhos nos momentos de dúvida, “puxões de orelha” quando quis desistir. Pelas horas de estudos que me ajudaram a chegar até aqui. Obrigada!! Te amoo!!

Às minha amigas Adri e Kah, principalmente, obrigada pelos momentos mais que agradáveis, ao ombro amigo e confiança. Vou levá-las no meu coração, sempre. Às amigas que fiz no 505G, Paula, Sita e Gabi. Vocês foram um presente para mim e senti muita falta de vocês esse semestre.

Ao restante dos meus familiares, aos meus colegas e a todos aqueles que de alguma forma acreditaram em mim e tiveram fé que esse dia chegaria. Obrigada!!

Resumo

Espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, tais como *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schlttdl. têm demonstrado atividades do tipo antidepressiva e antinociceptiva em roedores. Nestas espécies são encontrados derivados de floroglucinol diméricos, constituídos por um núcleo floroglucinol e uma porção ácido filicínico como, por exemplo, uliginosina B e hiperbrasilol B. Estudos demonstram que a uliginosina B possui atividade antinociceptiva em roedores. Esse efeito depende da ativação indireta de receptores opioides e dopaminérgicos. Devido à similaridade estrutural entre uliginosina B e hiperbrasilol B, o objetivo desse trabalho foi verificar o potencial antinociceptivo de hiperbrasilol B através do teste de placa aquecida. Para esse teste, os camundongos foram tratados por via oral com quatro doses de hiperbrasilol B ($3,52 \times 10^{-4}$ mol; $1,17 \times 10^{-3}$ mol; $2,35 \times 10^{-3}$ mol; $3,52 \times 10^{-3}$ mol; $n=11$). O tratamento com hiperbrasilol B na dose mais baixa ($3,52 \times 10^{-4}$ mol; v.o.) não apresentou efeito antinociceptivo, enquanto que na dose de $1,17 \times 10^{-3}$ mol apresentou efeito discreto. O platô do efeito antinociceptivo foi alcançado nos tratamentos com hiperbrasilol B nas doses de $2,35 \times 10^{-3}$ e $3,52 \times 10^{-3}$ mol ($p>0,05$). O efeito antinociceptivo observado nos grupos que receberam hiperbrasilol B ocorrem em doses ($2,35 \times 10^{-3}$ mol) que não prejudicam a coordenação motora dos animais. Portanto, esse conjunto de dados, somados a resultados prévios do nosso grupo, permitem sugerir que derivados de floroglucinol, como os encontrados nas espécies nativas de *Hypericum* do sul do Brasil, apresentam um padrão molecular promissor para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos.

Palavras-chaves: hiperbrasilol B, atividade antinociceptiva, *Hypericum caprifoliatum*.

Sumário

1. Introdução	1
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo Geral	7
2.2 Objetivos Específicos.....	8
3. Materiais e Métodos	8
3.1. Obtenção de hiperbrasilot B.....	8
3.1.1 Material vegetal	8
3.1.2 Obtenção do extrato <i>n</i> -hexano	8
3.1.3 Isolamento de hiperbrasilot B	9
3.2. Avaliação comportamental	10
3.2.1 Animais.....	10
3.2.2 Tratamentos	10
3.2.3. Avaliação da atividade antinociceptiva: teste da placa aquecida.....	12
3.2.4. Avaliação da coordenação motora: rota-rod	12
3.2.5. Análise estatística.....	13
3.2.6 Ética.....	14
4. Resultados e Discussão	14
4.1 Isolamento de hiperbrasilot B	14
4.2 Ensaio comportamentais	17
4.2.1 Atividade antinociceptiva: teste de placa aquecida.....	17
4.2.2 Coordenação motora: teste rota-rod.....	20
5. Conclusão	22
6. Referências.....	23

1. Introdução

O uso de plantas no tratamento e cura de doenças é uma das práticas medicinais mais antigas, mas ao longo dos anos esta prática foi substituída por drogas sintéticas. Recentemente, o interesse pelo uso de plantas medicinais no tratamento de doenças vem crescendo (Butler e Keating, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO), 80% da população mundial, principalmente de países em desenvolvimento, confiam em medicamentos derivados de plantas como forma de tratamento médico (Gurib-Fakin, 2006).

Dados mundiais apontam que aproximadamente 25% das prescrições de medicamentos feitos são de formulações contendo substâncias derivadas de plantas, como por exemplo, digoxina de *Digitalis* spp., quinina e quinidina de *Cinchona* spp., morfina e codeína de *Papaver somniferum* e paclitaxel de *Taxus brevifolia* e *Taxus bacata* (Rates, 2001). O uso desse tipo de medicamento é possível graças a políticas mundiais de incentivo ao desenvolvimento de fármacos baseados na medicina tradicional (WHO, 2002).

Em vários países da Europa, a fitoterapia faz parte do cotidiano como forma alternativa de tratamento, seja com o uso de chás ou de fitoterápicos. Um grande número de plantas utilizadas na medicina tradicional europeia vem sendo conhecida devido aos estudos e isolamentos de substâncias ativas que são utilizadas como medicamentos nos dias de hoje (Gurib-Fakin, 2006).

Uma das plantas medicinais europeia mais estudada é *Hypericum perforatum* L.. Pertencente ao gênero *Hypericum* (Guttiferae), popularmente conhecida como *St. John's Wort*, é utilizada devido as suas propriedades medicinais, tais como antibacteriana (Saddiqe et al., 2010), antiproliferativa (Roschetti et al., 2004), antioxidante (Giot et al., 2009), antiviral (Erdelmeier et al., 2000) e no tratamento da depressão leve a moderada (Butler e Keating, 2011).

H. perforatum é amplamente utilizado como antidepressivo na Europa e seu uso vem aumentando significativamente nos Estados Unidos (Larzerele et al., 2010). Na Alemanha, essa espécie vem sendo utilizada no tratamento da depressão desde a década de 1980 (Nahas e Sheikh, 2011). Estudos clínicos demonstram que extratos de *H. perforatum* apresentam atividade antidepressiva no tratamento da depressão leve a moderada (Kasper et al., 2010).

Em um estudo clínico randomizado, realizado por Behnke e colaboradores (2002), o efeito do extrato padronizado de *H. perforatum* (Calmigen®) na dose de 150 mg foi comparado com o fármaco fluoxetina (Prozac®) na dose de 20 mg. Participaram do estudo 70 pacientes (divididos igualmente em dois grupos). Tanto os pacientes que tomaram o extrato padronizado de *H. perforatum* (38%) quanto àqueles que ingeriram fluoxetina (45%) sentiram-se muito satisfeitos após as seis semanas de tratamento. Estes dados apontam que ambos os tratamentos apresentam eficácia semelhante no alívio de sintomas da depressão moderada.

Outro estudo randomizado comparou o efeito do extrato padronizado WS 5570 de *H. perforatum* com o efeito da paroxetina, um inibidor seletivo da recaptação de serotonina. O estudo avaliou 251 pacientes tratados agudamente para depressão moderada a severa. Szagedi e colaboradores (2005) concluíram que o extrato WS 5570 é tão efetivo quanto a paroxetina para tratar os sintomas da depressão moderada a severa.

Kasper e colaboradores (2010) relatam que a heterogeneidade de resultados encontrados em diferentes estudos clínicos realizados com *H. perforatum* se deve ao uso de diferentes preparações de extratos. No entanto, relatam também que muitas revisões sistemáticas e meta-análises de ensaios com extratos de *H. perforatum* comparando com placebo ou com antidepressivos mais utilizados, fornecem uma visão abrangente dos estudos clínicos realizados. Esses resultados

evidenciam o uso desta espécie no tratamento da depressão leve a moderada, oferecendo uma alternativa eficaz na substituição de antidepressivos tricíclicos ou inibidores da recaptação de serotonina.

A atividade antinociceptiva também foi relatada para *H. perforatum* por Galeotti e colaboradores (2010). O extrato clorofórmico rico em hiperforina, um derivado floroglucinol, apresentou ação antinociceptiva em roedores quando administrado na dose correspondente a 30 mg/kg de hiperforina no extrato seco padronizado. Esse extrato diminuiu a hiperalgesia de ratos testados no modelo de constrição no nervo ciático e de administração crônica de oxaliplatina. Na investigação do mecanismo de ação foi administrando previamente o antagonista opioide naloxona nos animais. O aumento do limiar da dor induzida pela administração do extrato clorofórmico foi completamente antagonizado pela naloxona, inferindo que a ação antinociceptiva é mediada pelo sistema opioide.

Outras espécies de *Hypericum* também apresentam ação antinociceptiva em roedores como *H. reflexum* L. fil, espécie nativa das Ilhas Canárias (Sanchés-Mateo et al., 2006) e *H. grandifolium* Choisy, nativa da Macaronésia (Bonkanka et al., 2011).

Perazzo e colaboradores (2008) testaram um extrato padronizado em flavonóides e derivados de xantonas da espécie brasileira *Hypericum brasiliense* Willd, encontrada no Rio de Janeiro. O tratamento com esse extrato demonstrou atividade anti-inflamatória nos testes de edema em pata de rato induzido por carregénina e por dextrina, bem como ação antinociceptiva no teste de placa aquecida.

Já para espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul, como por exemplo, *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl. (Figura 1), foi demonstrado

atividades do tipo antidepressiva em roedores (Viana et al., 2006), antiproliferativa (Ferraz et al., 2005) e antiviral (Schmitt et al., 2001).



Figura 1: Espécie *in natura*: *H. caprifoliatum* (imagem: von Poser)

A atividade antinociceptiva de *H. caprifoliatum* também foi avaliada por Viana e colaboradores (2003). O extrato ciclo-hexano foi testado na dose de 90 mg/kg em camundongos no teste da placa aquecida. Este tratamento apresentou atividade antinociceptiva mais pronunciada quando administrado por via oral do que quando administrado pela via intraperitoneal. Também foi investigado o mecanismo de ação através da administração de naloxona. O pré-tratamento com naloxona preveniu o efeito antinociceptivo do extrato, indicando que o mecanismo de ação depende da ativação de receptores opioides. Os principais componentes do extrato apolar de *H. caprifoliatum* são os derivados floroglucínóis, como uliginosina B, hiperbrasilol B e HC1 (Nör, 2006).

Derivados de floroglucinol são comumente encontrados em espécies de *Hypericum*. O composto hiperforina – derivado floroglucinol poli-isoprenilado isolado de *H. perforatum*, apresenta atividades antibacteriana e antitumoral *in vitro*, ação do tipo antidepressiva (Beerhues, 2006) e antinociceptiva em roedores (Galeotti et al., 2010).

Nas espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil também são encontrados derivados de floroglucinol. Essas substâncias se diferem da hiperforina por serem diméricas. Os compostos encontrados nas espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil, além do núcleo floroglucinol, apresentam uma porção ácido filicínico (von Poser, 2006), como por exemplo, uliginosina B e hiperbrasilotol B apresentadas na Figura 2.

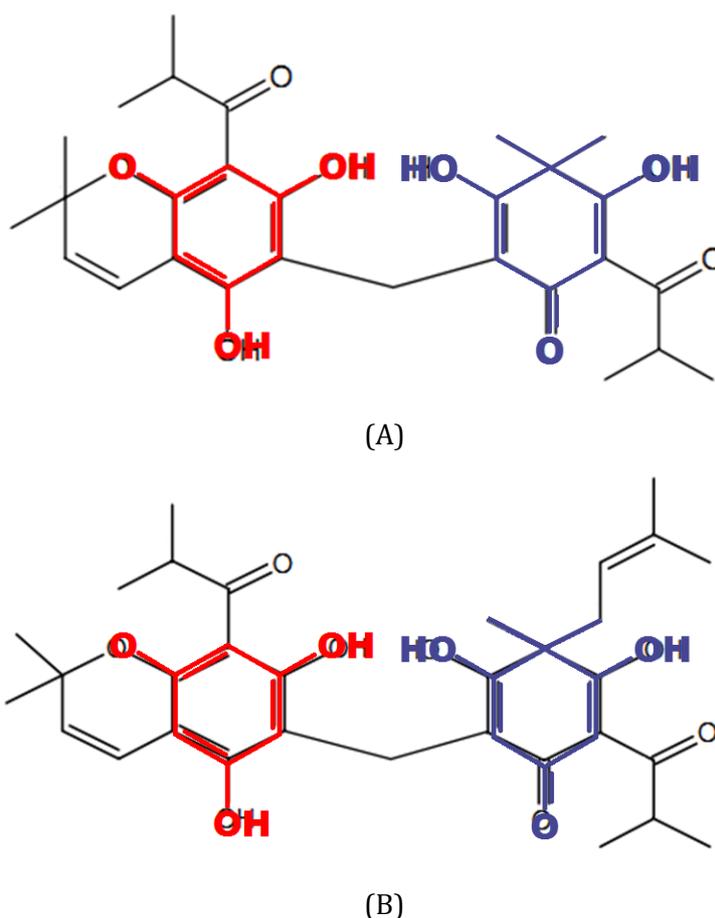


Figura 2: Estruturas químicas: (A) uliginosina B, (B) hiperbrasilotol B, destacando em vermelho o núcleo floroglucinol e em azul o núcleo ácido filicínico.

A ação no Sistema Nervoso Central de derivados floroglucinol isolados de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil vem sendo estudada pelo nosso grupo (Viana et al., 2005, 2006; Viana, 2007; Stein et al., 2012; Stolz et al., 2010a, 2011, 2012). Viana e colaboradores (2005, 2006) demonstraram que uma fração enriquecida em derivados floroglucinol obtidos de *H. caprifoliatum* apresentou efeito do tipo antidepressivo em camundongos, dependente da ativação da neurotransmissão monoaminérgica.

Recentemente, Stein e colaboradores (2012) demonstraram que o tratamento com a uliginosina B (10 e 15 mg/kg, v.o.) apresenta atividade do tipo antidepressiva no teste de nado forçado em camundongos, reduzindo o tempo de imobilidade sem alterar a atividade locomotora dos animais, no teste do campo aberto. Experimentos *in vivo* demonstraram que o efeito do tipo antidepressivo depende da ativação da neurotransmissão monoaminérgica. A uliginosina B também é capaz de inibir a recaptação sinaptossomal de dopamina, serotonina e noradrenalina. Contudo, a uliginosina B atua através de um mecanismo distinto dos antidepressivos convencionais, pois não se liga aos transportadores monoaminérgicos.

Dados preliminares (não publicados) do nosso grupo demonstraram que a japonicina A (16 mg/kg = $3,52 \times 10^{-3}$ mol; v.o.) (Figura 3) e o hiperbrasilotol B (10 e 15 mg/kg, v.o.) também apresentaram atividade do tipo antidepressiva, no teste do nado forçado em roedores.

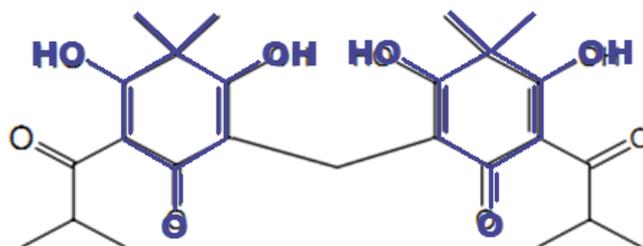


Figura 3: Estrutura química da japonicina A, destacando em azul o núcleo ácido filicínico.

A atividade antinociceptiva também tem sido relatada para derivados de floroglucinol. Resultados prévios (não publicados) apontaram que a japonicina A (16 mg/kg = $3,52 \times 10^{-3}$ mol; v.o.) possui atividade antinociceptiva no teste da placa aquecida.

Stolz e colaboradores (2012) demonstraram que o derivado floroglucinol uliginosina B apresenta atividade antinociceptiva no teste da placa aquecida (10 – 90 mg/kg, i.p. e 15 e 90 mg/kg, v.o.) e também no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (15 e 90 mg/kg, v.o.), em doses que não comprometem a coordenação motora dos camundongos. Esse efeito depende da ativação de receptores opióides e dopaminérgicos da família D₂. Entretanto, a ativação destes receptores parece ser indireta, uma vez que em ensaios de radioligação a uliginosina B não foi capaz de estimular a ligação [S³⁵]-GTP_γS nem de deslocar a ligação de [³H]-naloxona, [³H]-SCH23390 e [³H]-sulpirida a receptores opióides e dopaminérgicos, respectivamente. Com esses dados, pode-se supor que o efeito antinociceptivo observado para uliginosina B está associado à sua capacidade de inibir a recaptação de monoaminas com consequente ativação de receptores dopaminérgicos e estimulação indireta do sistema opióide.

Esse conjunto de dados permite afirmar que derivados de floroglucinol apresentam um padrão molecular promissor para o desenvolvimento de antidepressivos e analgésicos (Viana et al., 2005; Viana, 2007; Stein et al., 2012; Stolz et al., 2012).

Contudo, o estudo dessas substâncias precisa ser aprofundado. Neste contexto é relevante continuar a investigação da ação antinociceptiva para o composto hiperbrasilol B, em especial, devido à similaridade estrutural com uliginosina B.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antinociceptiva de hiperbrasilol B.

2.2 Objetivos Específicos

Isolar o composto hiperbrasilol B a partir de um extrato *n*-hexano de *Hypericum caprifoliatum*.

Avaliar o efeito da administração via oral de hiperbrasilol B nos testes da placa aquecida e rota-rod.

3. Materiais e Métodos

3.1. Obtenção de hiperbrasilol B

3.1.1 Material vegetal

Partes aéreas da espécie *Hypericum caprifoliatum* foram coletadas no período de floração no mês de outubro de 2009, no município de Caçapava do Sul, Rio Grande do Sul - Brasil.

A coleta da espécie foi autorizada pelo CGEM/IBAMA: 003/2008 P 02000.001717/2008-60 e as exsiccatas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências dessa universidade, sob o número de registro Bordignon 1400.

3.1.2 Obtenção do extrato *n*-hexano

Após a coleta, as partes aéreas (folhas, caules e flores) foram submetidas à secagem na sombra, sendo posteriormente moídas em moinho de facas.

Cerca de 200 g do pó obtido da moagem foram submetidos à extração por maceração estática com solvente *n*-hexano. Diariamente o macerado foi filtrado sobre papel filtro e o extrato concentrado em evaporador rotatório. Esse procedimento foi repetido com o pó até o esgotamento da planta, ou seja, até a coloração do extrato ficar próximo ao incolor e deixar de produzir massa de extrato.

O extrato *n*-hexano obtido foi solubilizado em acetona e filtrado sobre papel filtro para a retirada de ceras epicuticulares. Esse novo extrato foi concentrado em evaporador rotatório e armazenado em geladeira até o uso.

3.1.3 Isolamento de hiperbrasilol B

O extrato *n*-hexano sem cera foi submetido a diversas colunas cromatográficas para a obtenção de frações enriquecidas de hiperbrasilol B. Essas frações foram reunidas e submetidas a uma nova coluna cromatográfica para o isolamento de hiperbrasilol B. Ambas as colunas tiveram como fase estacionária sílica gel Acrôs organics (0,060 – 0,200 mm 60Å) e como fase móvel gradiente hexano:diclorometano em polaridade crescente.

A fração contendo hiperbrasilol B isolado foi submetida à cromatografia de camada delgada preparativa, visando sua purificação. A fase móvel constituiu-se de mistura de *n*-hexano:diclorometano, na proporção 1:1, e como fase estacionária, sílica gel 60 GF₂₅₄ Merk.

A pureza de hiperbrasilol B isolado foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE (Nunes et al., 2009) e ressonância magnética nuclear de prótons - RMN de H¹ (Rocha et al., 1996), e comparados com padrões existentes no laboratório.

3.2. Avaliação comportamental

3.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos, CF1 machos (25-35 g) provenientes da colônia da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS-RS). Antes dos experimentos, os animais foram adaptados por, no mínimo, 05 dias no biotério de manutenção da Faculdade de Farmácia – UFRGS.

Os animais foram mantidos em caixas plásticas de 17x28x13 cm, com no máximo cinco camundongos, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (luzes acesas das 07 às 19 horas), temperatura constante ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), sob sistema de exaustão (estantes ventiladas Alesco®) e umidade monitorada, com acesso livre a água e alimento (Nuvital®)

Os experimentos foram realizados no período das 10 às 16 horas, ocorrendo adaptação dos animais de 1 hora na sala de experimentação. Antes da administração por via oral os animais passaram por um período de 2 horas de jejum, para evitar uma possível interação composto/alimento, uma vez que não existem estudos farmacocinéticos para o hiperbrasilol B.

3.2.2 Tratamentos

Os camundongos foram tratados com volumes de 1 mL/kg pela via oral (gavagem), conforme protocolo específico de cada experimento. A solubilização das drogas e ressuspensão de hiperbrasilol B foram realizadas em solução salina com auxílio de ultrassom e, quando necessário, com polissorbato 80, não excedendo 5% do volume final. As doses testadas de hiperbrasilol B foram

escolhidas com base nos estudos anteriores do grupo (Viana, 2007; Stolz et al., 2010b, 2011, 2012; Stein et al., 2012). Optou-se por realizar este estudo com doses de hiperbrasilol B equimolares as doses de uliginosina B já testadas, iniciando por $3,52 \times 10^{-3}$ mol, o que permite comparar o efeito entre as duas moléculas.

O número de animais por grupo experimental foi de nove a onze (9-11). O tamanho amostral foi definido a partir de trabalhos anteriores publicados pelo grupo (Viana, 2007; Haas et al., 2010; Stolz et al., 2012; Stein et al., 2012), através do programa Sigma Stat versão 2.03 (Jandel Scientific Corporation®), considerando um valor de alfa de 0,01, poder do teste de 0,9 e o correspondente teste estatístico para cada experimento.

Como parâmetros para as diferenças e desvios padrão esperados foram utilizados as referências bibliográficas citadas em cada experimento proposto. O número total de animais utilizados para o desenvolvimento do projeto foram 111 camundongos, demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1: Relação entre experimento e número de animais a ser utilizado.

Experimento	Tratamento	Nº de animais	
Teste da placa aquecida	Controle negativo - veículo	11	
	Controle positivo - morfina $3,50 \times 10^{-3}$ mol	11	
	Controle grupo - uliginosina B $3,52 \times 10^{-3}$ mol	9	
	Dose $3,52 \times 10^{-3}$ mol de hiperbrasilol B	11	
	Dose $2,35 \times 10^{-3}$ mol de hiperbrasilol B	11	
	Dose $1,17 \times 10^{-3}$ mol de hiperbrasilol B	11	
	Dose $3,52 \times 10^{-4}$ mol de hiperbrasilol B	11	
Teste do rota-rod	Controle negativo - veículo	9	
	Dose $2,35 \times 10^{-3}$ mol de hiperbrasilol B	9	
	Controle positivo	codeína $3,34 \times 10^{-3}$ mol	9
		haloperidol $1,06 \times 10^{-3}$ mol	9

3.2.3. Avaliação da atividade antinociceptiva: teste da placa aquecida

A placa aquecida consiste numa chapa, de dimensão 25x25 cm, com temperatura controlável. Um cilindro acrílico, com diâmetro 20 cm e altura 18 cm, é posto sobre a placa delimitando o espaço do animal.

Antes do início do teste, os camundongos foram habituados na placa (Ugo Basile®) ainda fria, por 60 segundos. Em seguida, a placa foi aquecida ($55 \pm 1^\circ\text{C}$) e os animais recolocados sobre a mesma, para verificar o tempo de latência basal (denominado L1). Contou-se o tempo de latência para o camundongo lambe uma das patas posteriores ou pular e, imediatamente após, o animal foi retirado da placa. Os camundongos que não responderem em até 20 segundos foram excluídos.

Os animais selecionados foram tratados com hiperbrasilol B v.o. nas doses de $3,52 \times 10^{-3}$ mol (19,4 mg/kg); $2,35 \times 10^{-3}$ mol (13 mg/kg); $1,17 \times 10^{-3}$ mol (6,5 mg/kg) e $3,52 \times 10^{-4}$ mol (1,4 mg/kg), tendo como base experimentos anteriores realizados pelo grupo (Stolz et al., 2012). Os controles positivo e negativo receberam morfina $3,50 \times 10^{-3}$ mol v.o. (10 mg/kg) ou uliginosina B $3,52 \times 10^{-3}$ mol v.o. (15 mg/kg) e veículo v.o., respectivamente. Passados 60 minutos os camundongos foram recolocados na placa, seguindo-se o procedimento anterior, para verificar o tempo de latência após o tratamento (denominado L2). Nesta etapa o tempo máximo de permanência foi de 40 segundos, para evitar dano tecidual (Viana et al., 2003).

3.2.4. Avaliação da coordenação motora: rota-rod

Ensaios de coordenação motora como o rota-rod são utilizados principalmente para descartar algum efeito na junção neuromuscular e como

indicativo de efeito neurotóxico agudo. Esse teste é útil para detectar falsos positivos no teste da placa aquecida (Adzu et al., 2002).

Esse ensaio foi realizado conforme descrito por Neves e colaboradores (2010). Foi utilizado aparelho de rota-rod com 3 cm de diâmetro, com uma taxa de 5 rotações por minuto (rpm). Inicialmente, os camundongos foram habituados ao aparato durante um tempo total de 5 minutos, incluindo as quedas. Vinte e quatro horas após, os animais foram submetidos a duas exposições de 5 minutos ao aparelho, denominadas pré-seleção (T0) e sessão teste (T60).

Na pré-seleção (T0), apenas os animais que apresentaram um tempo de permanência contínuo mínimo de 90 segundos foram considerados aptos a continuar o teste. Imediatamente após os camundongos foram tratados com hiperbrasilol B $2,53 \times 10^{-3}$ mol (13 mg/kg v.o.), haloperidol $1,06 \times 10^{-3}$ mol (4 mg/kg v.o.), $3,34 \times 10^{-3}$ mol (codeína 10 mg/kg v.o.) ou veículo v.o., passados 60 minutos os animais foram expostos a sessão teste (T60). Foi avaliado o desempenho dos animais no rota-rod na pré-seleção e na sessão teste através dos parâmetros: maior tempo de permanência (em segundos) e número de quedas, dentro do período de observação.

3.2.5. Análise estatística

Foi utilizado o programa estatístico Sigma Stat 2.0 (Jandel Scientific Corporation). Os resultados foram analisados através do teste ANOVA de dois fatores com medidas repetidas seguida do teste de Comparações Múltiplas Student-Newman-Keuls. Foi aceito o nível de significância $p < 0,05$.

3.2.6 Ética

A manipulação dos animais foi realizada de acordo com os princípios éticos relatados nas normas do *Council for International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS), na Resolução nº 714 (2002) do Conselho Federal de Medicina Veterinária e na Lei Brasileira nº 11794 (2008).

Imediatamente após os experimentos, os animais foram submetidos, isoladamente, a eutanásia, em câmara de CO₂ (40%) e as carcaças acondicionadas em embalagem apropriada e armazenadas em freezer a - 20°C até o recolhimento (semanal) pela Aborgama do Brasil.

Os protocolos experimentais foram apreciados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFRGS, sob número 22329/2012.

Os resíduos químicos foram identificados e acondicionados em frascos apropriados para o recolhimento mensal da Comissão de Saúde e Ambiente de Trabalho (COSAT).

4. Resultados e Discussão

4.1 Isolamento de hiperbrasilol B

O extrato de *H. caprifoliatum* obtido por maceração com solvente *n*-hexano apresentou um rendimento de 2,29 %, antes do tratamento com acetona, e de 2,04 %, após a retirada de ceras epicuticulares. Foram realizadas 11 colunas cromatográficas com, aproximadamente, 1 g de extrato sem cera cada (Figura 4A). O rendimento de fração rica em hiperbrasilol B foi em torno de 2 %. Dessa fração, foram isolados 51,1 mg de hiperbrasilol B através de cromatografia em camada

delgada preparativa (Figura 4B). A identificação da substância isolada foi realizada através de RMN de H^1 e CLAE.

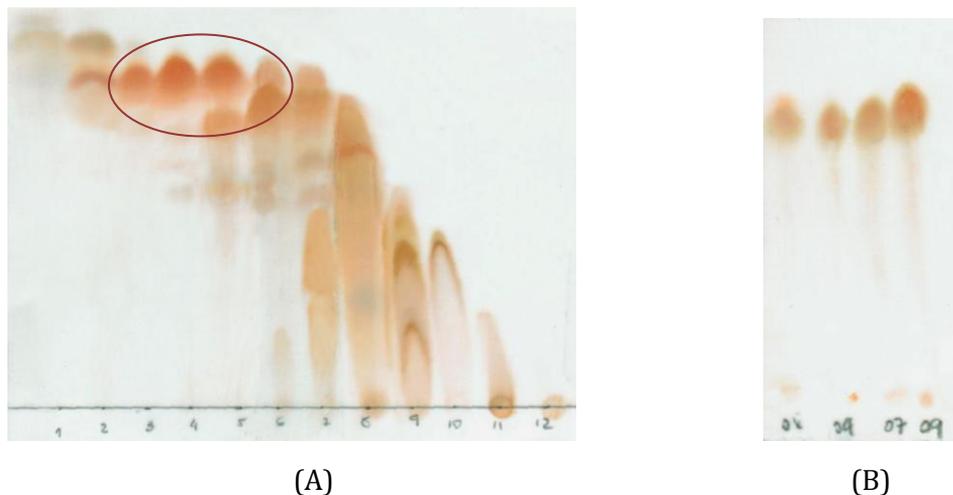


Figura 4: Perfil cromatográfico: frações obtidas através de (A) isolamento por coluna destacando as frações ricas em hiperbrasilol; (B) isolamento por placa preparativa. Sistema eluente: diclorometano:*n*-hexano (1:1); revelador anisaldeído sulfúrico.

A análise por CLAE, utilizando método descrito por Nunes e colaboradores (2009) está apresentado na Figura 5. O cromatograma obtido demonstra o pico principal em 12 min., o qual indica que a substância isolada é o hiperbrasilol B.

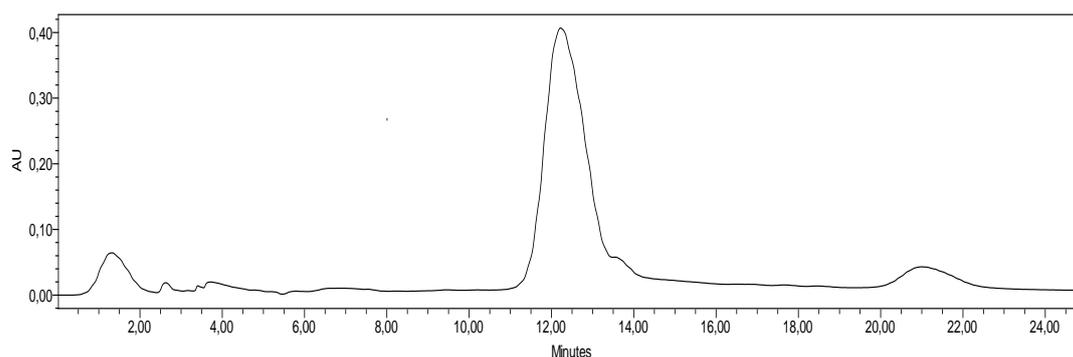


Figura 5: Análise por CLAE demonstrando pico principal em 12 minutos referente ao hiperbrasilol B. Sistema eluente acetonitrila:água (95:5 = 0,01% TFA), com fluxo de 1 ml/min e detector de UV (270 nm).

Os sinais obtidos da análise por RMN de H^1 foram comparados com dados da literatura (Rocha et al., 1996; Nör, 2006), sendo apresentados na Figura 6.

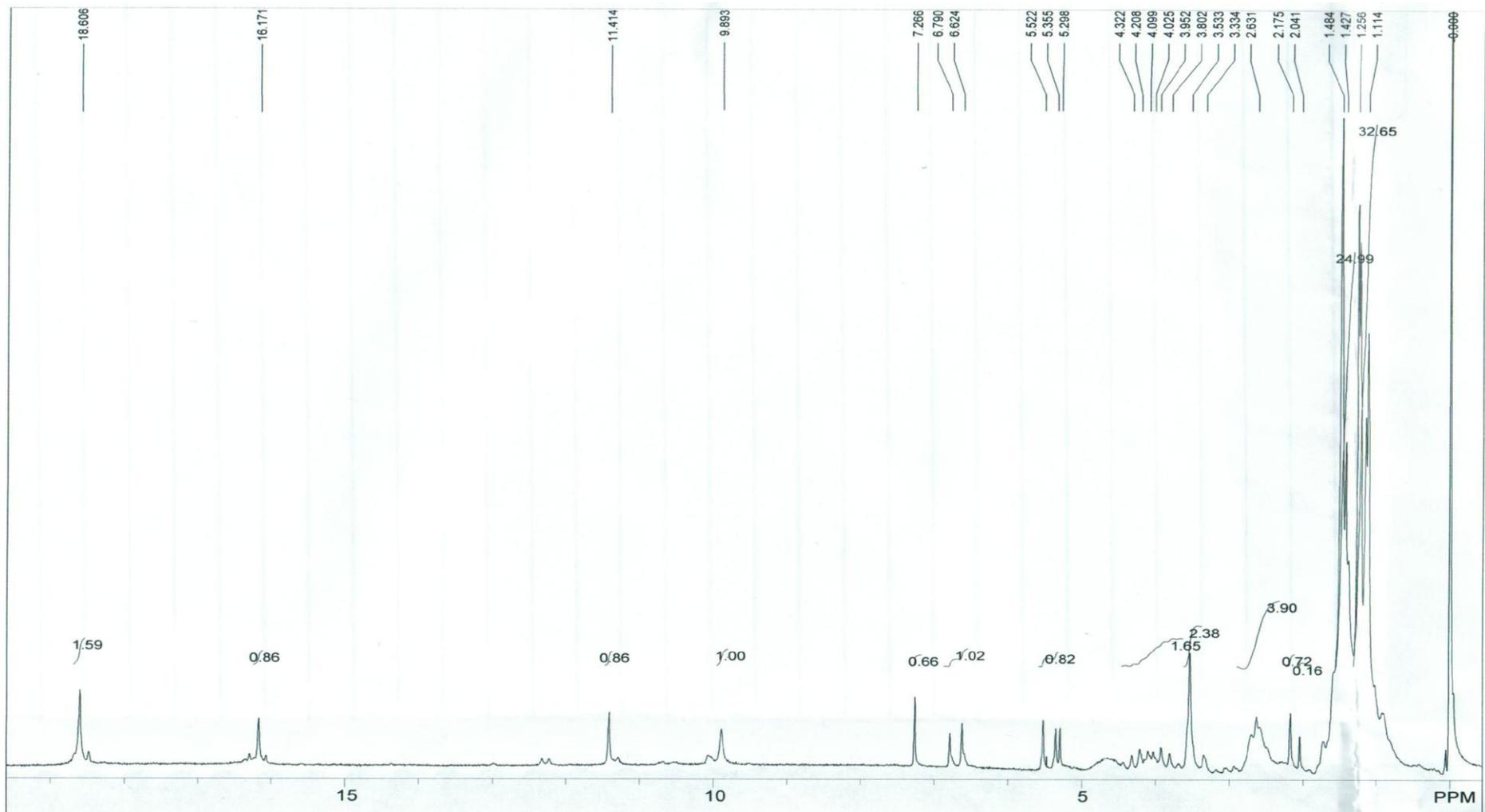


Figura 6: Espectro ^1H RMN do hiperbrasilol B isolado por cromatografia de camada delgada preparativa, retomado em clorofórmio delterado (ANASAZI 60 MHZ).

No espectro de ^1H RMN do hiperbrasilot B obtido, a existência do núcleo floroglucinol foi inferida comparando-se os sinais das hidroxilas (visualizadas na Figura 7) 5'-OH (δ 11,41) e 7'-OH (δ 16,17). O núcleo ácido filicínico foi identificado através dos sinais das hidroxilas 3-OH (δ 9,89), 5-OH (δ 18,61) e o sinal da metila na posição 4 (δ 1,48). A prenila existente no hiperbrasilot B foi identificada pelos sinais das posições 1'' (δ 2,63), 2'' (δ 4,40) e 3''- Me (δ 1,26). O sinal em δ 3,53 caracteriza a metila na posição 7, a qual une os dois núcleos.

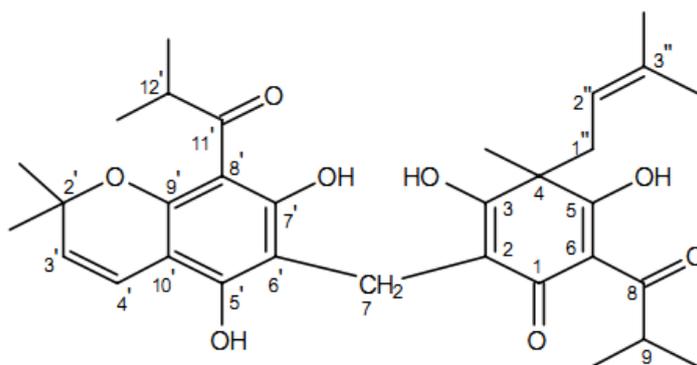


Figura 7: Estrutura química do hiperbrasilot B, indicando a numeração dos carbonos

4.2 Ensaio comportamentais

4.2.1 Atividade antinociceptiva: teste de placa aquecida

Os animais foram tratados com doses equimolares a uliginosina B ($3,52 \times 10^{-3}$ mol), derivado floroglucinol previamente testado pelo nosso grupo (Stolz et al., 2012). Como controles positivo e negativo foram utilizados morfina $3,50 \times 10^{-3}$ mol e veículo, respectivamente.

Uma curva dose-resposta do efeito antinociceptivo do hiperbrasilot B ($3,52 \times 10^{-4}$ até $3,52 \times 10^{-3}$ mol, v.o.; n=11) em camundongos foi obtida no teste da placa

aquecida (Figura 8). O tratamento com hiperbrasilol B na dose mais baixa ($3,52 \times 10^{-4}$ mol, v.o.) não apresentou efeito antinociceptivo (L2: $12,4 \pm 5,9$ s; $p > 0,05$). A dose de $1,17 \times 10^{-3}$ mol de hiperbrasilol B apresentou efeito antinociceptivo discreto (L2: $14,5 \pm 4,3$ s), uma vez que o grupo apresentou diferença em relação a sua própria latência basal ($p = 0,001$).

O platô do efeito antinociceptivo foi alcançado no tratamento com hiperbrasilol B na dose de $2,35 \times 10^{-3}$ mol ($19,2 \pm 6,5$ s). Nessa dose o tempo de latência (L2) apresenta diferença em relação à própria latência basal ($p < 0,001$) e às latências após os tratamentos (L2) com veículo ($p < 0,01$), hiperbrasilol B nas doses de $3,52 \times 10^{-4}$ mol ($p < 0,01$) e $1,17 \times 10^{-3}$ mol ($p < 0,05$). No entanto não se difere do tratamento com hiperbrasilol B na maior dose testada, $3,52 \times 10^{-3}$ mol ($p > 0,05$), demonstrado na Figura 8.

O tratamento hiperbrasilol B na dose de $3,52 \times 10^{-3}$ mol apresentou efeito antinociceptivo ($19,3 \pm 4,7$ s) estatisticamente igual ao tratamento com hiperbrasilol B $2,35 \times 10^{-3}$ mol ($p > 0,05$). Nessa dose o tempo de latência (L2) também apresenta diferença em relação à própria latência basal ($p < 0,001$) e as latências após o tratamento (L2) dos grupos que receberam tratamento com veículo ($p < 0,01$), hiperbrasilol B $3,52 \times 10^{-4}$ mol ($p < 0,01$) e hiperbrasilol B $2,35 \times 10^{-3}$ mol ($p < 0,05$).

O derivado floroglucinol hiperbrasilol B pode ser um dos compostos ativos responsáveis pela atividade antinociceptiva descrita para o extrato apolar de *H. caprifoliatum* na placa aquecida (Viana et al., 2003).

Além disso, o efeito antinociceptivo observado no tratamento com hiperbrasilol B $3,52 \times 10^{-3}$ mol ($19,3 \pm 4,7$ s) é semelhante ao efeito previamente descrito para a uliginosina B $3,52 \times 10^{-3}$ mol ($21,8 \pm 2,4$ s) utilizada como controle (Stolz et al., 2012).

No entanto, doses de uliginosina B abaixo do platô do efeito devem ser testadas para que se possa comparar o efeito das substâncias. Neste caso, talvez seja possível identificar a importância da prenila adicional existente na estrutura do hiperbrasilot B, para o efeito antinociceptivo.

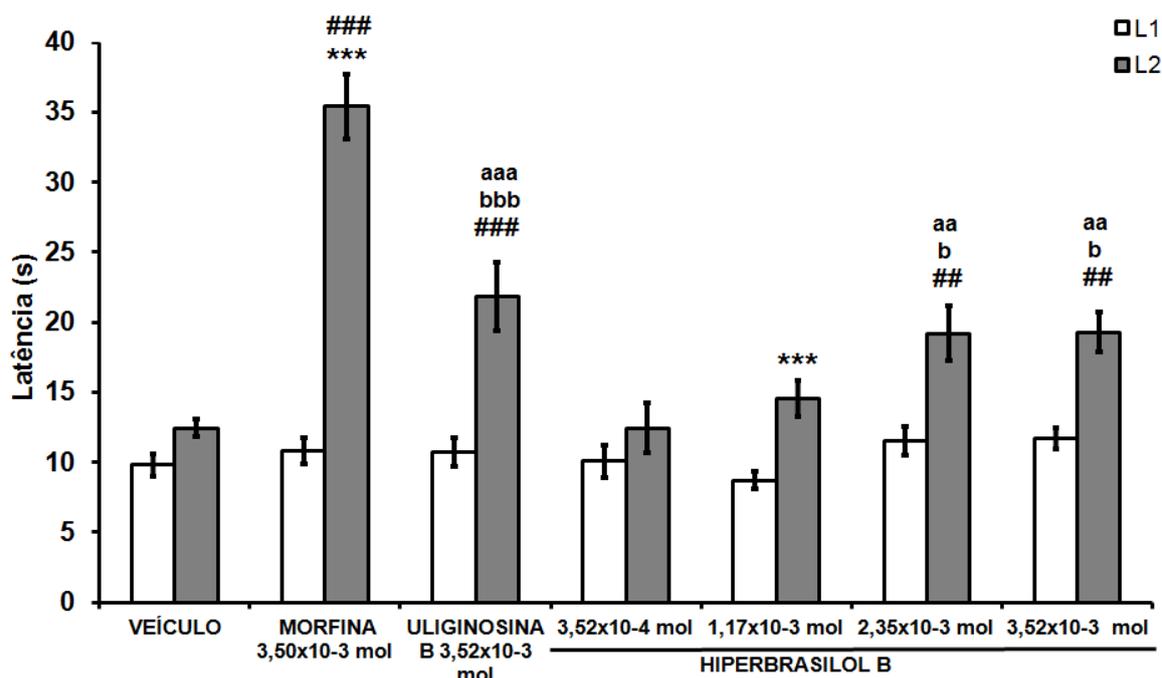


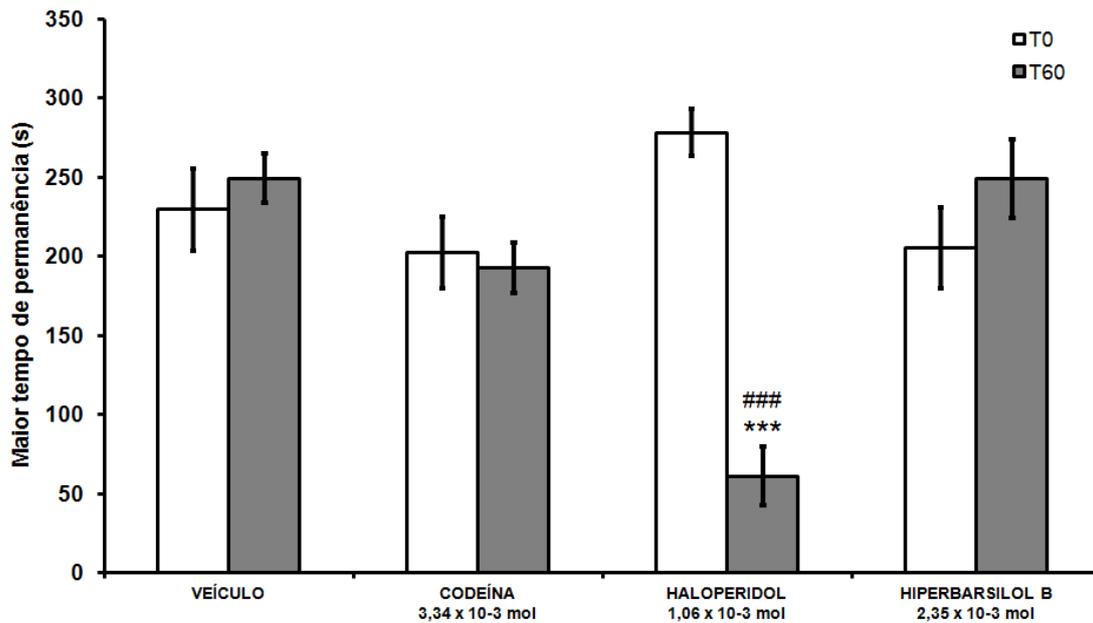
Figura 8: Efeito do hiperbrasilot B (doses de $3,52 \times 10^{-4}$ mol até $3,52 \times 10^{-3}$ mol), uliginosina B ($3,52 \times 10^{-3}$ mol) e morfina $3,50 \times 10^{-3}$ mol (10 mg/kg) no teste da placa aquecida em camundongos. Os dados são apresentados como média \pm erro. (n=9-11 camundongos/grupo). Os valores de significância foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas: $F_{tratamento} (6,149) = 15,394$ $p < 0,001$; $F_{exposição} (1,149) = 177,075$ $p < 0,001$; $F_{interação} (6,149) = 19,359$ $p < 0,001$; Como pós-teste de Student-Newmann-Keuls: *** $p < 0,001$ diferença significativa comparado com a respectiva latência basal (L1). ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ diferença significativa comparado com o grupo veículo (L2). aa $p < 0,01$; a $p < 0,05$ diferença significativa comparado com o grupo hiperbrasilot B $3,52 \times 10^{-4}$ mol v.o. (L2); b $p < 0,05$ diferença significativa comparado com o grupo hiperbrasilot B $2,35 \times 10^{-3}$ mol v.o. (L2).

4.2.2 Coordenação motora: teste rota-rod

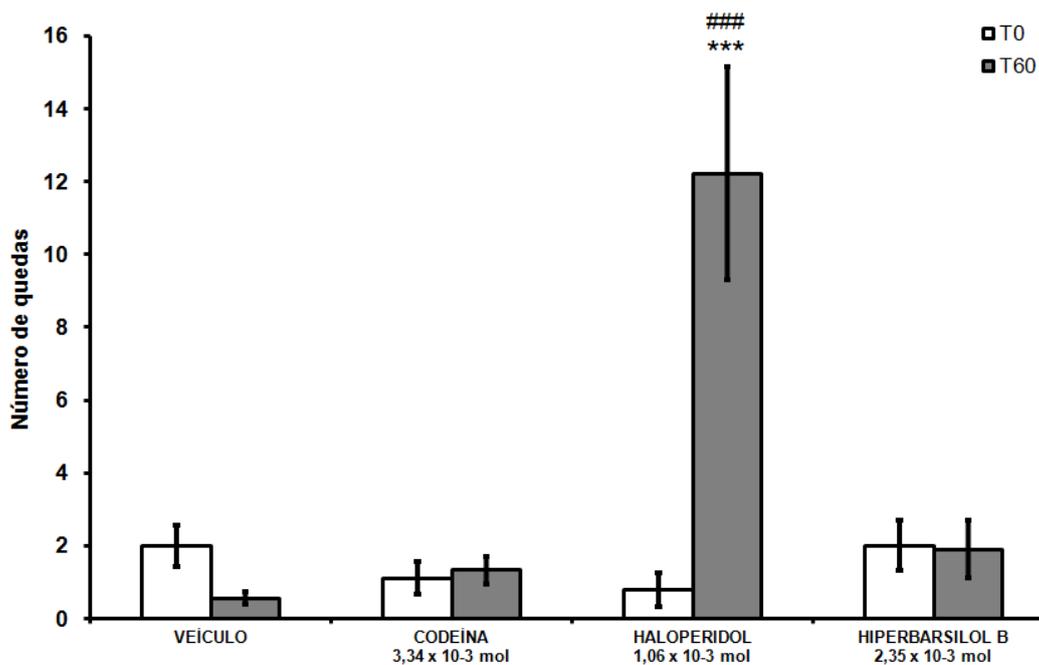
O teste do rota-rod foi realizado com hiperbrasilol B $2,35 \times 10^{-3}$ mol v.o.. Esta dose foi escolhida baseada nos resultados obtidos no teste da placa aquecida. O hiperbrasilol B na dose de $2,35 \times 10^{-3}$ mol apresenta o platô de atividade antinociceptiva. Como controles foram utilizados codeína $3,34 \times 10^{-3}$ mol (10 mg/kg; controle antinociceptivo), haloperidol $1,06 \times 10^{-3}$ mol (4 mg/kg; controle positivo) e veículo (controle negativo).

A Figura 9 apresenta o maior tempo de permanência (A) e o número de quedas (B) dos animais no rota-rod. Observou-se que os grupos hiperbrasilol B $2,35 \times 10^{-3}$ mol, codeína $3,34 \times 10^{-3}$ mol e veículo não apresentaram diferença estatística, ou seja, não alteraram o maior tempo de permanência (Figura 9A) nem no número de quedas (Figura 9B). Estes dados apontam que o efeito antinociceptivo observado para o hiperbrasilol B não se deve a uma alteração motora dos animais. O grupo tratado com haloperidol $1,06 \times 10^{-3}$ mol v.o. apresentou redução no tempo de permanência e aumento no número de quedas no rota-rod.

Os resultados observados para o hiperbrasilol B vão ao encontro dos resultados prévios observados para uliginosina B na dose de $2,11 \times 10^{-2}$ mol (90 mg/kg; v.o.) (Stolz et al., 2012), indicando que derivados floroglucinol diméricos, quando administrados por via oral não afetam a coordenação motora dos animais.



(A)



(B)

Figura 9: Efeito do tratamento com hiperbrasílo B ($2,35 \times 10^{-3}$ mol), codeína ($3,34 \times 10^{-3}$ mol) e haloperidol ($1,06 \times 10^{-3}$ mol) no tempo de permanência (A) e no número de quedas (B) no teste do rota-rod. Os dados são apresentados como média \pm erro ($n=9$ camundongos/grupo). Os valores de significância foram analisados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas: tempo de permanência - $F_{\text{tratamento}}(3,73) = 4,594$ $p < 0,01$; $F_{\text{exposição}}(1,33) = 6,943$ $p < 0,05$; $F_{\text{interação}}(3,73) = 14,719$ $p < 0,001$; número de quedas - $F_{\text{tratamento}}(3,73) = 11,247$ $p < 0,001$; $F_{\text{exposição}}(1,33) = 8,692$ $p < 0,01$; $F_{\text{interação}}(3,73) = 11,156$ $p < 0,001$. Como pós-teste foi adotado Student-Newmann-Keuls: *** $p < 0,001$ diferença significativa comparado com o respectivo grupo basal (T0); ### $p < 0,001$ diferença significativa comparado com o grupo veículo (T60).

5. Conclusão

Os métodos de extração e purificação são adequados para a obtenção de hiperbrasilol B.

O composto hiperbrasilol B possui atividade antinociceptiva frente ao teste da placa aquecida em camundongos.

Das quatro doses testadas para a ação antinociceptiva, a dose mais baixa ativa foi de $1,17 \times 10^{-3}$ mol e a partir da dose de $2,35 \times 10^{-3}$ mol, já obtemos um platô de atividade antinociceptiva.

No teste rota-rod não foi observado nenhuma diferença entre os grupos hiperbrasilol B e veículo, portando a dose de $2,35 \times 10^{-3}$ mol não afeta a atividade motora dos animais.

Deste modo, esses resultados somados aos dados já apresentados pelo nosso grupo demonstram que os derivados de floroglucinol presentes nas espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul são uma classe de estruturas químicas promissoras para o desenvolvimento de fármacos com ação analgésica.

6. Referências

Adzu, B.; Amos, S.; Dzarma, S.; Wambebe, C.; Gamaniel, K.; Effect of *Zizyphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.79, p.13-16, 2002.

Barnes, J.; Anderson, L.A.; Philipson, J.D.; St John's worth (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical proprieties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.583-600, 2001.

Beerhues, L.; Molecules of Interest: Hyperforin. **Phytochemistry**, v.67, p.2201-2207, 2006.

Behnke, K.; Jensen, G.S.; Graubaum, H.J.; Gruenwald, J.; *Hypericum perforatum* versus fluoxetine in the treatment of mind and moderate depression. **Advances in Therapy**, v.19, p.44-52, 2002.

Bonkanka, C.X.; Sánchez-Mateo, C.C.; Rabanal, R.M.; Antinociceptive activity of *Hypericum grandifolium* Choisy in mice. **Journal of Natural Medicine**, v.65, p.122-128, 2011.

Butler, A.; Keating, R.; Old herbal remedies and modern combination therapy. **Scottish Medical Journal**, v.56, p.170-174, 2011.

Erdelmeier, C.A.J.; Kock, E.; Hoerr, R.; *Hypericum perforatum* – St. John's worth, chemical, pharmacological and clinical aspects. **Studies in Natural Products Chemistry**, v.22, p.643-716, 2000.

Ferraz, A.B.F.; Schripsema, J.; Pohmann, A.R.; von Poser, G.L.; Uliginosin B from *Hypericum myrianthum*, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.989-991, 2002.

Ferraz, A.; Faria, D.H.; Benneti, M.N.; Rocha, A.B.; Schwartzmann, G.; Henriques, A.; von Poser, G.L.; Screening for antiproliferative activity of six southern Brazil species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, v.12, p.112-115, 2005.

Galeotti, N.; Vivoli, E.; Bilia, A.R.; Bergonzi, M.C.; Bartolini, A.; Ghelardini, C.; A prolonged protein kinase C-mediated, opioid-related antinociceptive effect of St. John's Worth in mice. **The Journal of Pain**, v.11, n°2, p.149-159, 2010.

Giot, E.M.; Fiamegos, Y.C.; Skalkos, D.C.; Stalinkas, C.D.; Antioxidant activity and bioactive components of the aerial parts of *Hypericum perforatum* L. from Epirus, Greece. **Food Chemistry**, v.117, p.398-404, 2009.

Gurib-Fakin, A.; Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.

Haas, J.S.; Viana, A.F.; Heckler, A.P.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K.; The antinociceptive effect of a benzopyran (HP1) isolated from *Hypericum polyanthemum* in mice hot-plate test is blocked by naloxone. **Planta Médica**, v.76, p.1419-1423, 2010.

Kasper, S.; Caraci, F.; Forti, B.; Drago, F.; Aguglia, E.; Review – Efficacy and tolerability of *Hypericum* extract for the treatment of mild to moderate depression. **European Neuropsychopharmacology**, v.20, p.747-765, 2010.

Larzererele, M.M.; Campbell, J.S.; Robertson, M.; Complementary and alternative medicine usage dor behavioral health indications. **Primary Care: Clinics in Office Prectice**, v.37, p.213-236, 2010.

Nahas, R.; Sheikh, O.; Clinical Review: Complementary and alternative medicine for the treatment of major depressive disorder. **Canadian Family Physician**, V.57, p.659-663, 2011.

Neves, G.; Menegatti, R.; Antonio, C.B.; Graziottin, L.R.; Vieira, R.O.; Rates, S.M.K.; Noel, F.; Barreiro, E.J.; Fraga, C.A.M.; Searching for multi-target antipsychotics: Discovery of orally active heterocyclic N-phenylpiperazine ligands of D2-like and 5-HT1A receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.18, p.1925-1935, 2010.

Nör, C.; Albring, D.; Ferraz, A.B.F.; Schripsema, J.; Pires, V.; Sonet, P.; Guillaume, D.; von Poser, G.L.; Phloroglucinol derivates from four *Hypericum* species belonging to the *Tigynobrathys* section. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.517-519, 2004.

Nör, C. 2006. Avaliação química e taxonômica de species de hypericum e avaliação da atividade antiangiogênica. Dissertação de mestrado. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

Nör, C.; Bernardi, A.P.M.; Haas, J.,S.; Schripsema, J.; Rech, S.B.; von Poser, G.L.; Phenolic constituents of *Hypericum* flowers. **Natural Product Communications**, v.3, p.237-240, 2008.

Nunes, J.M.; Pinhatti, A.V.; von Poser, G.L.; Rech, S.B.; Promotive effects of long-term fertilization on growth of tissue culture-derived *Hypericum polyanthemum* plant during acclimatization. **Industrial Crops and Products**, v.30, p.329-332, 2009.

Perazzo, F.F.; Lima, L.M.; Padilha, M.M.; Rocha, L.M.; Souza, P.J.C.; Carvalho, J.C.T.; Anti-inflammatory and analgesic activities of *Hypericum brasiliense* (Willd) standardized extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.320-325, 2008.

Rates, S.M.K.; Plants as source of drugs. **Toxicon**, v.39, p.603-613, 2001.

Rocha, L.; Marston, A.; Potterat, O.; Kaplan, M.A.C.; Hostettmann, K.; More phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v.42, p.185-188, 1996.

Roscetti, G.; Franzese, O.; Comandini, A.; Bonmassar, E.; Cytotoxic activity of *Hypericum perforatum* L. on K562 erythroleukemic cells: differential effects between methanolic extract and hypericin. **Phytotherapy Research**, v.18, p.66-72, 2004.

Saddiqe, Z.; Naeem, I.; Maimoona, A.; A review of the antibacterial activity of *Hypericum perforatum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.131, p.511-521, 2010.

Sanchés-Mateo. C.C.; Bonkanka, C.X.; Hernández-Pérez, M.; Rabana, R.M.; Evaluation of the analgesic and topical anti-inflammatory effects of *Hypericum reflexum* L. fil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.1-6, 2006.

Schimitt, A.C.; Ravazzolo, A.P.; von Poser, G.L.; Investigation of some *Hypericum* species native to Southern of Brazil for antiviral activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, p.239-245, 2001.

Stein, A.C.; Viana, A.F.; Müller, L.G.; Nunes, J.M.; Stolz, E.D.; Rego, J.C.; Costentin, J.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K.; Uliginosin B, a phloroglucinol derivative from *Hypericum polyanthemum*: A promising new molecular pattern for the development of antidepressant drugs. **Behavioural Brain Research**; v.228, p.66-73, 2012.

Stolz E.D.; Viana, A.F.; Haas, J.S.; Hasse, D.R.; Von Poser, G.L.; Costentin, J.; Do Rego, J.C.; Rates, S.M.K.; Antinociceptive effect of uliginosin B is mediated by the activation of dopaminergic and opioid systems. **Anais 42° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental**, 2010a.

Stolz, E.D.; Cargnin, S.; Centurião, F.B.; Braga, A.; von Poser, G.L.; Rates, S.M.K.; Hyperbrasilol B presents antinociceptive and antidepressant-like effects in mice. **Anais do XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2010b.

Stolz, E.D. 2011. Estudo do efeito antinociceptivo de uliginosina B, um derivado floroglucinol dimérico isolado de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. **Dissertação de mestrado**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Neurociências, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

Stolz, E.D.; Viana, A.F.; Hasse, D.R.; von Poser, G.L.; Rego, J.C.; Rates, S.M.K.; Uliginosin B presents antinociceptive effect mediated by dopaminergic and opioid systems in mice, **Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2012. doi:10.1016/j.pnpbp.2012.05.012

Szegedi, A.; Kohnen, R.; Dienel, A.; Kieser, M.; Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5550 (St John's wort): randomized controlled Double blind non-inferiority trial versus paroxetine, **BMJ**, 2005 – Disponível em <http://www.bmj.com/content/330/7490/503.short> - Acessado em 01/05/2012.

Viana, A.F.; Heckler, A.P.; Fenner, R.; Rates, S.M.K.; Antinociceptive activity of *Hypericum caprifoliatum* and *Hypericum polyanthemum* (Guttiferae). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36, p.631-634, 2003.

Viana, A.F.; Rego, J.C.; Munari, L.; Dourmap, N.; Heckler, A.P.; Costa, T.D.; von Poser, G.L.; Costentin, J.; Rates, S.M.K.; *Hypericum caprifoliatum* Cham. & Schltdl.: a specie native to South Brazil with antidepressant-like activity. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.20, p.507-514, 2006.

Viana, A.F. 2007. Estudo de moléculas potencialmente antidepressivas e analgésicas de espécies de *Hypericum* nativas do Rio Grande do Sul. **Tese de Doutorado**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, UFRGS.

von Poser, G.L.; Rech, S.B.; Rates, S.M.K.; Chemical and pharmacological aspects of Southern Brazilian *Hypericum* species. **Global Science Books**, UK, 510-516, 2006.

WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2005, World Health Organization, Geneva, 2002.