

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DA
MEDICINA POPULAR DO RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Micaela Rossato Marques

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE
METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DA
MEDICINA POPULAR DO RIO GRANDE DO SUL**

por

Micaela Rossato Marques

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ionara Irion Dalcol

Santa Maria, RS, Brasil

2009

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de
Mestrado

**ISOLAMENTO E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DA MEDICINA POPULAR DO RIO
GRANDE DO SUL**

elaborada por
Micaela Rossato Marques

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em
Farmacologia**

Comissão Examinadora:

Ionara Irion Dalcol, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

Ademir Farias Morel, Dr. (UFSM)

Helmoz Roseniaim Appelt, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, 21 de janeiro de 2009.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conduzir sempre com fé e perseverança, pela oportunidade de crescimento profissional.

Aos meus pais, João e Ires, pelo apoio, amor, carinho, dedicação e principalmente por acreditarem na minha capacidade.

Ao meu irmão, Daniel, pelo carinho e apoio, pela amizade e pelos momentos de descontração.

Ao meu noivo, Luciano, pelo amor, apoio, compreensão e por sempre acreditar no nosso futuro.

Às minhas avós, Célia e Deonilda, pelas orações, torcida e carinho.

À Prof^a. Dr^a. Ionara Dalcol, pelos conhecimentos transmitidos, confiança, amizade e total dedicação.

Ao Prof. Dr. Ademir Morel, pela disponibilidade, amizade e incentivo.

A todos os colegas de laboratório, pela amizade, companheirismo e convívio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realizar este curso.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia
Universidade Federal de Santa Maria

ISOLAMENTO E ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS DA MEDICINA POPULAR DO RIO GRANDE DO SUL

AUTORA: MICAELA ROSSATO MARQUES
ORIENTADORA: IONARA IRION DALCOL

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 21 de janeiro de 2009.

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e a atividade biológica das espécies *Scutellaria racemosa* Pers (Labiatae) e *Pfaffia tuberosa* Spreng (Amaranthaceae). Quatro compostos foram isolados da *S. racemosa* Pers: lupeol (**14**), oroxilina A (**10**), dinatina (**12**) e oroxilosídeo (**11**). A atividade antimicrobiana, citotóxica e a capacidade de inibição das enzimas prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase IV (DPP IV) e acetilcolinesterase (AChE) do extrato bruto (EB), frações e compostos isolados da *S. racemosa* Pers foram avaliadas. As frações *n*-hexano (FH) e acetato de etila (FA) foram as mais ativas contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A avaliação do extrato bruto (EB) e frações através do teste de letalidade frente a *Artemia salina* indicou que esta planta não apresenta toxicidade significativa. Quanto aos testes de inibição enzimática, as frações acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB) de *S. racemosa* Pers e os compostos dinatina (**12**) e oroxilosídeo (**11**) demonstraram significativa capacidade de inibição da POP. A inibição promovida pela dinatina (**12**) (100 µM) correspondeu a 43% e pelo oroxilosídeo (**11**) (100 µM) correspondeu a 34% do total de enzima testada. O extrato bruto (EB) e as respectivas frações da *Pfaffia tuberosa* Spreng também foram avaliadas quanto a atividade antimicrobiana, citotóxica e de inibição enzimática da POP, DPP IV e AChE. Através destes ensaios, verificou-se que o extrato bruto (EB) e as frações da *Pfaffia tuberosa* Spreng não apresentam importante atividade antimicrobiana e citotóxica. Em relação aos testes de atividade inibitória da POP, as frações diclorometano (FD) e acetato de etila (FA) foram as que apresentaram os melhores resultados, com IC₅₀ de 21,4 e 28,5 µg/mL, respectivamente. As frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol (FD, FA e FB) apresentaram baixa capacidade de inibição da DPP IV (< 20%). As frações acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB) apresentaram significativa inibição da AChE, nas quantidades de 6,25 e 25 µg, respectivamente.

Palavras-chave: *Scutellaria racemosa* Pers, Labiatae, *Pfaffia tuberosa* Spreng, Amaranthaceae, atividade antimicrobiana, *Artemia salina*, POP, DPP IV, AChE.

ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree
Post-Graduate Course in Pharmacology
Federal University of Santa Maria

ISOLATION AND PHARMACOLOGIC ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITS OF PLANTS OF THE POPULAR MEDICINE OF THE RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: MICAELA ROSSATO MARQUES
ADVISOR: IONARA IRION DALCOL

Date and place of the defense: Santa Maria, January 21th, 2009.

The present work describes the phytochemistry study and of biological activity of the species *Scutellaria racemosa* Pers (Labiatae) and *Pfaffia tuberosa* Spreng (Amaranthaceae). Four compounds were isolated of the *S. racemosa* Pers: lupeol (**14**), oroxilin A (**10**), dinatin (**12**) and oroxyloside (**11**). The antimicrobial and cytotoxic activities and the capacity of inhibition of enzymes prolyl oligopeptidase (POP), dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and acetylcholinesterase (AChE) of the crude extract (EB), fractions and isolated compounds of the *S. racemosa* Pers were evaluated. The *n*-hexane (FH) and ethyl acetate (FA) fractions were the most active against *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The evaluation of the crude extract and fractions using the Brine Shrimp Lethality Test indicated that this plant does not present toxicity. About the tests of enzymatic inhibition, the ethyl acetate (FA) and *n*-butanol (FB) fractions of *S. racemosa* Pers and the compounds dinatin (**12**) and oroxyloside (**11**) demonstrated significant capacity of inhibition of the POP. The inhibition promoted for the dinatina (**12**) (100 μ M) corresponded 43% and for the oroxyloside (**11**) (100 μ M) corresponded 34% of the total enzyme tested. The crude extract (EB) and the respective fractions of the *Pfaffia tuberosa* Spreng were also evaluated about the antimicrobial and cytotoxic activities and of enzymatic inhibition of the POP, DPP IV and AChE. Through these assays, it was verified that the crude extract (EB) and the fractions of the *Pfaffia tuberosa* Spreng do not present important antimicrobial and cytotoxic activity. In relation to the tests of inhibitory activity of the POP, the dichloromethane (FD) and ethyl acetate (FA) fractions present IC₅₀ of 21.4 and 28.5 μ g/mL against of POP, respectively. Dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol fractions (FD, FA and FB) presented low activity against DPP IV (< 20%). The ethyl acetate (FA) and *n*-butanol (FB) fractions showed significant inhibition of the AChE in the amounts, 6.25 and 25 μ g, respectively.

Keywords: *Scutellaria racemosa* Pers, Labiatae, *Pfaffia tuberosa* Spreng, Amaranthaceae, antimicrobial activity, brine shrimp lethality test, POP, DPP IV, AChE.

LISTA DE TABELAS

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

TABELA 1 – POP and DPP IV inhibition of FA and FB from *Scutellaria racemosa* Pers.....41

TABELA 2 – POP and DPP IV inhibition of compounds **1- 4**.....42

Artigo 2

TABELA 1 - Phytochemical screening of the crude extract and fractions of *Scutellaria racemosa* Pers.....51

TABELA 2 - Bioautography assay (μg) of crude extract (EB), *n*-hexane (FH), dichloromethane (FD), ethyl acetate (FA), *n*-butanol (FB) and aqueous (FAq) fractions of *Scutellaria racemosa* Pers.....51

TABELA 3 - Minimal Concentration Inhibitory (MIC) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) and Minimal Lethal Concentration (MLC) ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of the crude extract (EB), *n*-hexane (FH), dichloromethane (FD), ethyl acetate (FA), *n*-butanol (FB) and aqueous (FAq) fractions and the compound oroxylin A (**1**) of the *Scutellaria racemosa* Pers.....52

Artigo 3

TABELA 1 - Results of DPP IV and AChE inhibitory activity assays of *Pfaffia tuberosa* Spreng.....71

DISCUSSÃO

TABELA 1 – Screening fitoquímico do extrato bruto e frações da *P. tuberosa* Spreng.....79

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1: <i>Scutellaria racemosa</i> Pers (ALABAMAPLANTS, 2008; FLICKR, 2008).....	7
Figura 2: Estruturas de alguns compostos isolados do gênero <i>Scutellaria</i>	10
Figura 3: <i>Pfaffia tuberosa</i> Spreng (TASCHETTO & PAGLIARINI, 2004).....	12
Figura 4: Estruturas de alguns compostos isolados do gênero <i>Pfaffia</i>	14
Figura 5: Núcleo fundamental dos flavonóides.....	15
Figura 6: Estrutura química das principais classes de flavonóides.....	17
Figura 7: Estrutura química de alguns exemplos das diferentes classes de flavonóides.....	18
Figura 8: Núcleo esteroidal e triterpenoidal da saponina.....	19
Figura 9: Estrutura tridimensional da prolil oligopeptidase (POP) de origem suína (imagem cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt – Barcelona. 2008).....	23
Figura 10: Estruturas químicas de inibidores naturais da POP isolados do <i>Ginkgo biloba</i> , <i>Tamarix hispida</i> , <i>Rhizoma coptidis</i> e <i>Scutellaria baicalensis</i>	24
Figura 11: Comparação entre a estrutura da DPP-IV à esquerda e da POP à direita (ROSENBLUM & KOZARICH, 2003).....	24
Figura 12: Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica (VIEGAS et al., 2004).....	26

ARTIGOS CIENTÍFICOS

Artigo 1

Figura 1: Structure of isolated compounds 1-4 from <i>S. racemosa</i> Pers.....	40
---	----

Artigo 2

Figura 1: Structure of oroxylin A (1).....	51
--	----

Artigo 3

Figura 1: POP inhibition by <i>Pfaffia tuberosa</i> Spreng. IC ₅₀ curves for active fractions: (A) dichloromethane fraction (FD, IC ₅₀ = 21.4 µg/mL), (B) ethyl acetate fraction (FA, IC ₅₀ = 28.5 µg/mL) and (C) <i>n</i> -butanol fraction (FB, IC ₅₀ = 74.4 µg/mL).....	70
--	----

DISCUSSÃO

Figura 13: Espectro de RMN ¹ H do Lupeol em CDCl ₃ a 400.13 MHz.....	73
Figura 14: Espectro de RMN ¹³ C do Lupeol em CDCl ₃ a 400.13 MHz.....	73
Figura 15: Espectro de RMN ¹³ C do Lupeol (expansão) em CDCl ₃ a 400.13 MHz.....	74
Figura 16: Espectro de RMN ¹ H da Oroxilina A em DMSO-d ₆ a 400.13 MHz.....	74
Figura 17: Espectro de RMN ¹³ C da Oroxilina A em DMSO-d ₆ a 100.32 MHz.....	75
Figura 18: Espectro de RMN ¹ H da Dinatina em DMSO-d ₆ a 400.13 MHz.....	75
Figura 19: Espectro de RMN ¹³ C da Dinatina em MeOD a 100.32 MHz.....	76
Figura 20: Espectro de RMN ¹ H do Oroxilósídeo em DMSO-d ₆ a 400.13 MHz.....	76
Figura 21: Espectro de RMN ¹³ C do Oroxilósídeo em DMSO-d ₆ a 100.32 MHz.....	77

LISTA DE REDUÇÕES

Å - Ângstron
ACh - Acetilcolina
AChE – Acetilcolinesterase
AcOEt – Acetato de Etila
ATCC – American Type Culture Collection
Atm - Atmosfera
BST – Teste de Letalidade com *Artemia salina*
CL₅₀ – Concentração Letal Média
COX-2 – Ciclooxigenase 2
Da - Dalton
DMSO – Dimetilsulfóxido
DPP I – Dipeptidil Peptidase I
DPP II – Dipeptidil Peptidase II
DPP IV – Dipeptidil Peptidase IV
EB – Extrato bruto
FA – Fração acetato de etila
FAq – Fração aquosa
FB – Fração *n*-butanol
FD – Fração diclorometano
FDA - Food and Drug Administration
FH – Fração *n*-hexano
GLP-1 - Glucagon-like peptide-1
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
MeCN - Acetonitrila
MeOH – Metanol
MBC – Concentração Bactericida Mínima
MFC – Concentração Fungicida Mínima
MLC – Concentração Letal Mínima
MIC – Concentração Inibitória Mínima

NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

POP – Prolil Oligopeptidase

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SNC – Sistema Nervoso Central

t_R – Tempo de Retenção

TRH - thyrotrophin-releasing hormone

TTC – Cloreto de trifenil tetrazóleo

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	4
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1 Plantas Medicinais.....	5
3.1.1 Família Labiatae.....	5
3.1.1.1 Gênero <i>Scutellaria</i>	5
3.1.2 Família Amaranthaceae.....	10
3.1.2.1 Gênero <i>Pfaffia</i>	10
3.2 Principais metabólitos secundários encontrados nos gêneros.....	14
3.2.1 Flavonóides.....	14
3.2.2 Triterpenos.....	18
3.3 Atividades Biológicas.....	19
3.3.1 Atividade Antimicrobiana.....	19
3.3.2 Teste de letalidade com <i>Artemia Salina</i> (BST).....	21
3.3.3 Atividade inibitória enzimática.....	22
3.3.3.1 Prolil Oligopeptidase.....	22
3.3.3.2 Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV).....	24
3.3.3.3 Acetilcolinesterase (AChE).....	25
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	27
4.1 Artigo 1.....	27
4.2 Artigo 2.....	43
4.3 Artigo 3.....	56
5. DISCUSSÃO.....	72
6. CONCLUSÃO.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84

1. INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais pelo homem para os mais diversos propósitos parece ser uma atividade que o acompanha desde os tempos mais remotos. Pode ser observado que, em todas as fases de desenvolvimento das diversas civilizações, sempre prevaleceu uma estreita relação entre o homem e as plantas. Por meio da tentativa e do erro, o homem primitivo teve que adquirir conhecimentos que foram usados para determinar quais plantas eram valiosas como alimento, medicamento, e quais deveriam ser evitadas por serem venenosas ou perigosas. Com o passar do tempo, o poder curativo de certas plantas, mesmo naquelas atividades que foram descobertas por acaso, tornou-se muito importante para ser esquecido; o homem começou então a sistematizar os seus usos. O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais foi realizado em cerca de 2700 a.C. O reconhecimento e seleção de plantas e animais tóxicos, bem como de seus produtos, há milhares de anos, permitiram ao homem a utilização desses materiais na caça, guerra e em execuções.

O termo “planta medicinal” foi oficialmente reconhecido durante a 31ª Assembléia da Organização Mundial de Saúde (maio de 1978), quando foi proposto que “planta medicinal é aquela que, administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica”. Muitos fármacos da atualidade são derivados direta ou indiretamente de substâncias produzidas por plantas superiores. Os conhecimentos etnobotânicos freqüentemente guiam as pesquisas com produtos naturais, e podem contribuir sobremaneira para a descoberta de drogas, porque proporcionam o conhecimento de novas estruturas químicas e/ou mecanismos de ação. Por fim, fármacos derivados de plantas e fitoterápicos têm valor farmacoeconômico, mostrando-se importantes para o desenvolvimento de novos fármacos sintéticos (SILVA, 2006).

A descoberta de um número significativo de compostos de aplicação farmacológica em plantas medicinais ampliou o campo de pesquisas que envolve os processos de isolamento de tais compostos (VEIGA et al., 2005). É extremamente relevante a busca de compostos com atividade antimicrobiana, citotóxica e de inibidores naturais em plantas medicinais, dada a importância e o número muito grande de doenças que acometem o homem. O conhecimento sobre determinada

espécie vegetal com propriedades antimicrobianas tem sido revisto e ampliado, devido aos crescentes problemas associados ao uso de diversos antibióticos. Nos últimos anos destaca-se também a busca de novos inibidores em espécies usadas no tratamento de transtornos mentais, tais como esquizofrenia, ansiedade, amnésia, diferentes estágios da depressão e o transtorno afetivo bipolar (MAES et al., 1995; MAES et al., 1998; BREEN et al., 2004; ROEHRL et al., 2004; VENÄLÄINEN et al., 2004), uma vez que o reconhecimento de determinados compostos por enzimas como a prolil oligopeptidase (POP) afeta diretamente o funcionamento do sistema nervoso central (SNC). Tais compostos metabolizados pelas plantas tornam-se assim alvos terapêuticos de várias proteases do cérebro humano. Nos últimos anos houve um aumento na comercialização de fitoterápicos com indicação para os transtornos mentais. Assim, é importante avaliar cada fitoterápico com uma abordagem semelhante a dos medicamentos sintéticos, ou seja, baseada em evidências científicas sólidas. O reconhecimento de superfícies protéicas é um campo de pesquisa que vem despertando grande interesse (MAES et al., 1995; MAES et al., 1998; DELANO, et al., 2000; PECZUH & HAMILTON, 2000; BREEN et al., 2004; MECCA et al., 2004; ROEHRL et al., 2004; SAKURAI et al., 2004; VENÄLÄINEN et al., 2004). É crescente o número de interações proteína-proteína que estão sendo identificadas com sucesso. Muitos estudos estão sendo desenvolvidos sobre as interações que ocorrem quando proteases, as enzimas proteolíticas que catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, se unem a um substrato. Neste sentido, é importante o surgimento de inibidores enzimáticos com capacidade de modular atividades biológicas tais como a síntese de neuropeptídeos no sistema nervoso central (DECLERCK et al., 2004; TARRAGÓ et al., 2006).

A POP é uma proteína de grande relevância do ponto de vista terapêutico que está relacionada a transtornos mentais como a esquizofrenia, a ansiedade, os diferentes estágios da depressão e o transtorno afetivo bipolar. Em pacientes afetados, observou-se que o nível desta enzima no soro é maior que os níveis encontrados em pacientes não afetados. Assim como a POP, a dipeptidil peptidase IV (DPP IV) também pertencente à família das serina proteases, apresenta um sítio ativo para o reconhecimento enzima-ligantes espacialmente muito similar a POP. Com muita frequência, inibidores ativos da POP também são capazes de inibir a DPP IV, o que não é farmacologicamente desejável já que estas enzimas possuem

mecanismos de ação muito distintos, estando envolvidas em diferentes tipos de patologias. Ao contrário da POP, relacionada com enfermidades neurológicas, a DPP IV está diretamente vinculada a diabetes mellitus (DEACON et al., 2004).

Outra enzima de grande importância em nosso organismo é a acetilcolinesterase (AChE). Esta é a responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), causando uma redução de seus níveis, o que ocasiona diversas doenças, como o Mal de Alzheimer, o glaucoma e a miastenia grave (HOUGHTON et al., 2006).

Estes dados tornam-se significantes na demonstração da importância das plantas medicinais e também serve como estímulo à sua investigação.

2. OBJETIVOS

O estudo realizado com as espécies *Scutellaria racemosa* Pers e *Pfaffia tuberosa* Spreng apresenta como principais objetivos:

- a) O isolamento e purificação de metabólitos secundários presentes na espécie *Scutellaria racemosa* Pers.
- b) A identificação estrutural dos compostos isolados, através de técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (HPLC-MS), técnicas espectroscópicas como a ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e a espectrometria de massa Maldi-Tof.
- c) Realização da análise microbiológica e de toxicidade dos extratos, frações e metabólitos isolados da *Scutellaria racemosa* Pers e *Pfaffia tuberosa* Spreng;
- d) Realização de testes de atividade das frações e dos compostos isolados das espécies acima citadas frente às enzimas prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase IV (DPP IV) e acetilcolinesterase (AChE).

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas medicinais

3.1.1 Família Labiatae

Compreende esta família 200 gêneros com aproximadamente 3200 espécies distribuídas em todo o mundo, estando o maior centro de dispersão localizado na região do Mediterrâneo e no Oriente Próximo. São plantas em geral herbáceas ou arbustivas, com folhas opostas cruzadas e inteiras. Flores pequenas ou grandes, em geral vistosas, reunidas em densas inflorescências (JOLY, 1977).

3.1.1.1 Gênero *Scutellaria*

O gênero *Scutellaria* é formado por aproximadamente 350 espécies. Algumas destas espécies são conhecidas coletivamente por “skullcap”, sendo empregadas como plantas medicinais principalmente na Europa, Estados Unidos e leste da Ásia. As raízes secas de *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Scutellaria radix* na farmacopéia japonesa; nome comum Baikal skullcap) são usadas principalmente na medicina chinesa em países do leste asiático, como a China, Coréia e Japão. As partes aéreas secas da *Scutellaria galericulata* L. e *Scutellaria lateriflora* L. são usadas como skullcap na Europa e Estados Unidos. Entretanto, há dificuldade de diferenciar as partes aéreas secas de duas espécies somente por sua morfologia (HOSOKAWA et al., 2000).

As partes aéreas secas do skullcap são usadas para tratamento da insônia e ansiedade, como sedativo, tônico para os nervos, antiespasmódico (para tratamento de epilepsia) e como substituintes em tratamentos crônicos com barbitúricos e tranqüilizantes (AWAD et al., 2003). No Canadá, o skullcap é usualmente vendido como chá, mas também pode ser usado como tônico ou em combinação com outras plantas medicinais, como a valeriana (*Valeriana officinalis* L.), na indução do sono (HIROTANI et al., 1998; NISHIKAWA et al., 1999).

A *Scutellaria baicalensis*, oficialmente listada na Farmacopéia Chinesa e utilizada popularmente por este povo, possui atividades antiinflamatória, antitumoral, antiviral, antibacteriana, relaxante do músculo liso, hepatoprotetora, redutora dos níveis de colesterol e da pressão sanguínea (LI & CHEN, 2005; OHTA et al., 1997; SHIMIZU et al., 1999; TAIRA et al., 2004), atividades atribuídas principalmente a presença de flavonóides como baicalina (1), baicaleína (2) e wogonina (3). De acordo com ZHANG et al. (2006), a *S. baicalensis* reduz o colesterol total, desintoxica e é antitumoral devido aos flavonóides baicalina (1) e wogonosídeo (4).

A *Scutellaria radix* tem uso comprovado como antibacteriana, antiviral (KIM et al., 1999), antipirética, antitumoral, antiinflamatória e nos casos de úlcera (HORVATH et al., 2005). CHEN et al. (2006) demonstraram que o extrato bruto apresenta atividades antiinflamatória e antipirética, embora ainda precise mais estudos sobre a elucidação de tais efeitos.

A *Scutellaria lateriflora* L. é tradicionalmente usada como sedativo e no tratamento de várias desordens nervosas, como a ansiedade (AWAD et al, 2003). *Scutellaria barbata* é comumente usada no tratamento de tumores, hepatite, cirrose e outras doenças (WANG et al., 1996). *Scutellaria amabilis* foi estudada em 2006, no Japão, onde MIYAICHI et al. isolaram, entre outros, os compostos wogonina (3), scutevulina (5) e alpinetina (6).

A *Scutellaria racemosa* Pers (Figura 1) é uma espécie nativa do continente americano. Há registros de que esta espécie é encontrada no Rio Grande do Sul (GALVANI et al., 1994; GALVANI & BAPTISTA, 2003; SOSINSKI JÚNIOR & PILLAR, 2004). De acordo com estudos realizados com uma amostra coletada na Flórida, esta espécie apresenta-se botanicamente como uma planta diplóide, com 18 cromossomos e núcleo pequeno, semelhante a *Scutellaria baicalensis*. O pequeno genoma que a *Scutellaria racemosa* Pers apresenta indica que esta espécie é uma boa candidata a estudos genômicos (COLE et al., 2008). Há evidências de que povos indígenas colombianos do Vale do Cauca utilizavam a *Scutellaria racemosa* Pers nos seus rituais. BIANCHI (2006) afirma que espécies colombianas de *Scutellaria* (*Scutellaria racemosa* e *S. incarnata*) possuem ação neurológica e que a ação da *Scutellaria racemosa* Pers é provavelmente do tipo canabinóide (em particular o receptor CB1, encontrado em altas concentrações no hipocampo, córtex pré-frontal, cerebelo e gânglios basais, o que estaria relacionado com efeitos na memória e cognição), enquanto que a *Scutellaria incarnata* possui

uma ação mista do tipo canabinóide-serotoninérgico (particularmente receptor 5HT-1c, presente no plexo coróide, atua na ansiedade e na anorexia) (BIANCHI, 2006). A *Scutellaria racemosa* Pers nativa da América do Norte foi estudada por COLE et al. (2008), sendo determinado que possui potente atividade antioxidante. Neste mesmo estudo foi isolada a wogonina (**3**) como flavonóide majoritário e pequenas quantidades de baicalina (**1**), baicaleína (**2**) e scutellarina (**7**). Desta mesma planta também foram isoladas as indolaminas neurotransmissoras melatonina (**8**) e serotonina (**9**) com atividade antioxidante, o que pode explicar a ação neuroprotetora da *Scutellaria racemosa* Pers (COLE et al, 2008).

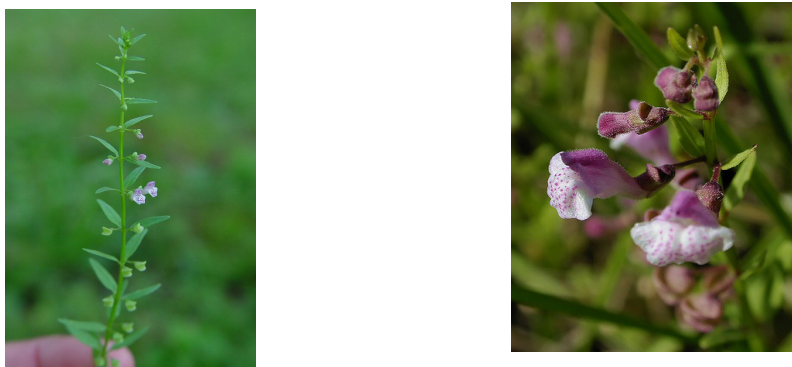


Figura 1: *Scutellaria racemosa* Pers (ALABAMAPLANTS, 2008; FLICKR, 2008)

Muitos compostos já foram isolados do gênero *Scutellaria*. Entre eles, foram isolados óleos essenciais, álcoois orgânicos, sesquiterpenos, diterpenos, cumarinas, taninos e flavonóides (MALIKOV & YULDASHEV, 2002).

A indolamina melatonina (**8**), identificada na *S. racemosa* de origem norte-americana, é substância comum a um grande número de plantas medicinais. Sua função na planta não é bem estabelecida, mas há hipóteses de que tenha função análoga a dos mamíferos, como mensageiro químico do fator claro e escuro e antioxidante (COLE et al., 2008). A serotonina (**9**), também presente na espécie *S. racemosa* nativa da Flórida, é um neurotransmissor que atua regulando a pressão sanguínea e promovendo o peristaltismo intestinal (GUERRIERO et al., 1993). Há várias plantas que afetam o sistema serotoninérgico por efeito direto nos receptores da serotonina ou influenciando sua síntese, armazenamento, recaptação ou liberação, propiciando o desenvolvimento da pesquisa com futuras aplicações terapêuticas (MCKENNA, 1996).

O flavonóide baicalina (baicaleína-7-D-glucuronideo) (**1**) possui atividades antioxidante (GAO et al., 1999), antiinflamatória (SHEN et al., 2003), antiviral (IKEZOE et al., 2001), antitumoral, antialérgica, anti-HIV (LI et al., 2000), sendo também usado como forma de neuroproteção na isquemia (GE et al., 2007). A baicaleína (5,6,7-tri-hidroxi-flavona) (**2**) possui atividades anti-HIV, antitumoral, antioxidante (LI & CHEN, 2005), antialérgica (ZHU et al., 2004) e antibacteriana. Também é usada no tratamento de hepatite, cirrose, leucemia, hiperlipidemia e arterioesclerose (WANG et al., 2004). A oroxilina A (5,7-diidroxi-6-metoxiflavona) (**10**) apresenta atividades antioxidante (JIWAJINDA et al., 2002), antiinflamatória (KIM et al., 2006), sedativa, anticonvulsivante e neuroprotetora (HUEN et al., 2003). Está comprovado que a oroxilina A (**10**) inibe a expressão do gene da COX-2 por suprimir a ativação do fator nuclear kappa B (KIM et al., 2006). Seu derivado glicosilado oroxilosídeo (oroxilina-7-O-glucuronideo) (**11**) é um inibidor da β -glucuronidase. Tais inibidores são capazes de aliviar a diarreia causada por efeito colateral de alguns fármacos (FREE PATENTS ON LINE, 2008). De acordo com o estudo de KINJO et al. (2006), o oroxilosídeo (**11**) não apresenta atividade hepatoprotetora. Apresenta comportamento de inibidor competitivo do NADH (doador de elétrons), tendo uso sugerido como anticoagulante (MILES et al., 1998).

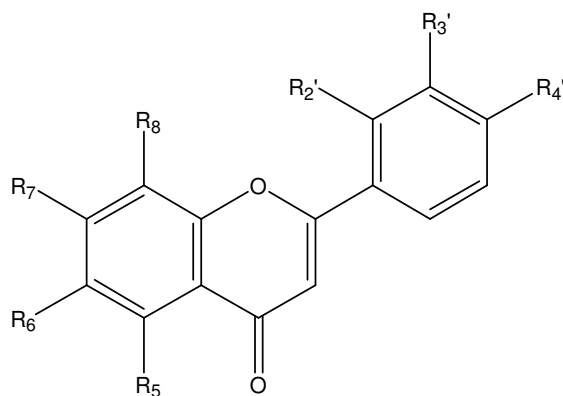
A wogonina (5,7-dihidroxi-8-metoxiflavona) (**3**) possui atividade contra o vírus da hepatite B, é antitumoral, antioxidante (LI & CHEN, 2005) e antiinflamatória. É usada na medicina chinesa oralmente e topicamente para o tratamento de infecções. Wogonina (**3**) e seus análogos baicaleína (**2**) e baicalina (**1**), apresentam atividade antiinflamatória em vários modelos animais de inflamação, porém seu mecanismo de ação não está totalmente esclarecido (KIM et al., 2004). O wogonosídeo (wogonina-7-O-glucuronideo) (**4**) é conhecido por suas propriedades antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e neuroprotetora (DENG et al., 2006).

O flavonóide dinatina (5,6,7-tri-hidroxi-4'-metoxiflavona) (**12**) foi isolado de algumas espécies de *Scutellaria*, como a *S. ovata*, *S. przewalskii*, *S. sevanensis* e *S. ussuriensis* (MALIKOV & YULDASHEV, 2002). Outro flavonóide isolado do gênero *Scutellaria* (MALIKOV & YULDASHEV, 2002) é a hispidulina (5,7,4'-tri-hidroxi-6-metoxiflavona) (**13**), que possui atividades antioxidante e antitumoral (DABAGHI-BARBOSA et al., 2005).

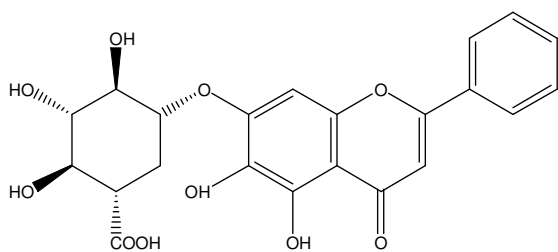
O lupeol (**14**), um triterpeno isolado da *Scutellaria* spp, apresenta propriedades antiinflamatória e citoprotetora, além de possuir efeitos

cardioprotetores os quais beneficiam situações de hipercolesterolemia (SUDHAHAR et al, 2007). O lupeol (**14**) exibe também atividade antiarrítmica, antimutagênica e antimalária (CHATURVEDI et al., 2008).

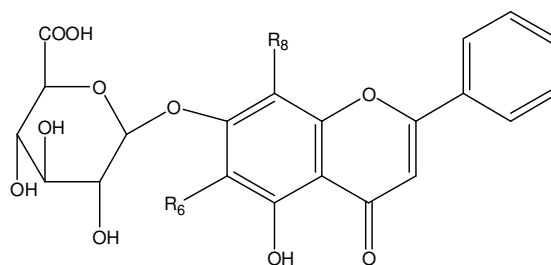
Na Figura 2 encontram-se alguns flavonóides isolados de diferentes espécies de *Scutellaria*.



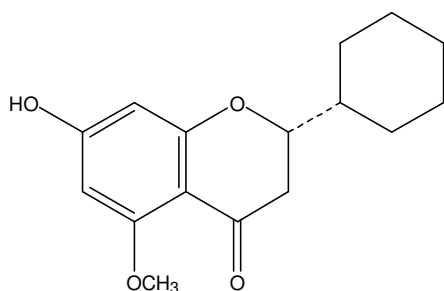
- (2) R₅ = R₆ = R₇ = OH; R₈ = R₂' = R₃' = R₄' = H
 (3) R₅ = R₇ = OH; R₈ = OCH₃; R₂' = R₃' = R₄' = H
 (5) R₅ = R₇ = R₂' = OH; R₈ = OCH₃; R₆ = R₃' = R₄' = H
 (7) R₅ = R₆ = R₇ = R₄' = OH; R₈ = R₂' = R₃' = H
 (10) R₅ = R₇ = OH; R₆ = OCH₃; R₈ = R₂' = R₃' = R₄' = H
 (12) R₅ = R₆ = R₇ = OH; R₈ = R₂' = R₃' = H; R₄' = OCH₃
 (13) R₅ = R₇ = R₄' = OH; R₆ = OCH₃; R₈ = R₂' = R₃' = H



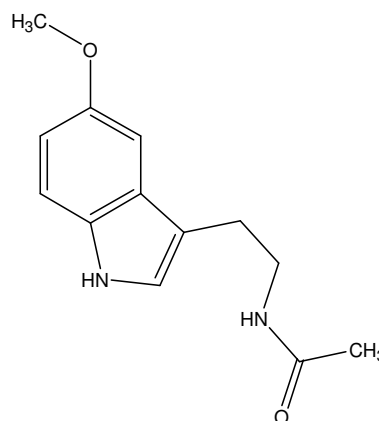
(1)



- (4) R₆ = OH; R₈ = OCH₃
 (11) R₆ = OCH₃; R₈ = H



(6)



(8)

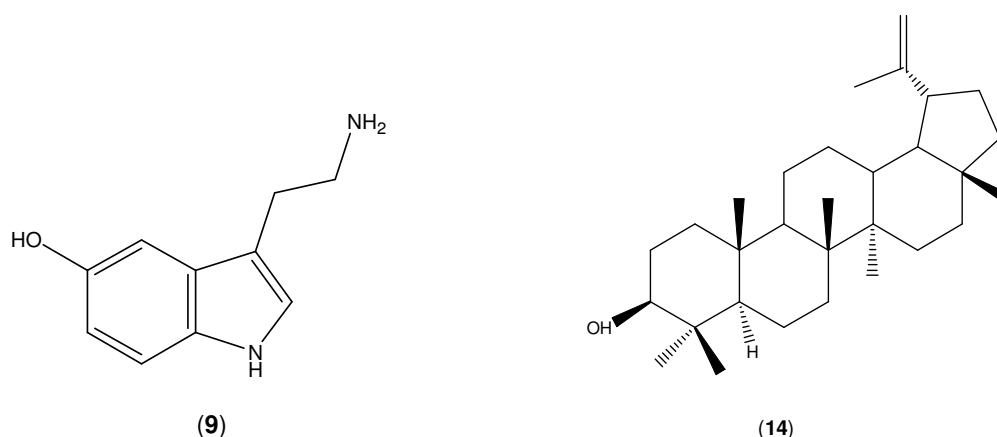


Figura 2: Estruturas de alguns compostos isolados do gênero *Scutellaria*.

3.1.2 Família Amaranthaceae

Incluem-se nesta família aproximadamente 60 gêneros de distribuição em todo o mundo, predominando, entretanto nas zonas tropicais e subtropicais. Compreende representantes predominantemente herbáceos, com folhas inteiras, de disposição espiralada, sem estípulas, flores pequenas não vistosas, em geral secas, reunidas em inflorescências capituliformes, ou em espiga ou cacho, monoclamídeas, geralmente hermafroditas de simetria radial. Tépalas em geral secas, em número de 4 a 5, livres ou com filetes soldados em um tubo coroliforme. Ovário súpero, unicarpelar e unilocular com um único óvulo. Fruto em geral seco (JOLY, 1977).

3.1.2.1 Gênero *Pfaffia*

São aproximadamente 90 espécies de *Pfaffia* conhecidas na América do Sul e Central. No Brasil, 27 espécies são bem descritas (TANIGUCHI et al., 1997), sendo que a diferenciação das espécies não é simples, e muitas vezes, são encontradas no comércio substituições entre as espécies. A espécie *Pfaffia paniculata* referida como substituto do *Panax ginseng* (ginseng coreano), é um vegetal de rara ocorrência no Rio Grande do Sul, sendo nativas as espécies *Pfaffia glomerata* e *Pfaffia tuberosa* (VASCONCELLOS, 1982). A exemplo do ginseng, o uso da *Pfaffia* tornou-se uma panacéia, sendo popularmente denominada

“paratudo”, “suma” ou “corango” (RATES & GOSMANN, 2002). Atualmente, o gênero *Pfaffia* compreende algumas espécies conhecidas como ginseng brasileiro devido ao uso popular de suas raízes como tônico, afrodisíaco, estimulante (MAGALHÃES, 2002) e no tratamento de diabetes (NETO et al., 2005); além do fato de suas raízes serem morfologicamente semelhantes às do ginseng coreano (*Panax ginseng* C.A. Meyer) (NISHIMOTO et al., 1988; SHIOBARA et al., 1993b).

Muitos componentes foram isolados da raiz de *Pfaffia spp*, como stigmasterol (**15**), sitosterol (**16**), alantoína (**17**), ácido páfíco (**18**) e seus glicosídeos (saponinas nortriterpênicas) (NAKAI et al., 1984; NISHIMOTO et al., 1984; SHIOBARA et al., 1993a,b). As saponinas da *Pfaffia spp*. são pouco absorvidas no trato gastrintestinal (HOSTETTMAN & MARSTON et al., 1995).

A *Pfaffia iresinoides* apresenta atividade antiinflamatória (TANIGUCHI et al., 1997) e molusquicida (ALVIM et al., 1999). Foram isolados alguns compostos desta espécie, como a ecdisterona (**19**), pterosterona (**20**), polipodina B (**21**) (NISHIMOTO et al., 1988) e um pigmento amarelo denominado iresinosídeo B (**22**) (SHIOBARA et al., 1992).

A *Pfaffia pulverulenta* apresenta como constituintes nortriterpenos hexacíclicos, ácido páfíco (**18**), ácido pulvérico (**23**), ecdisterona (**19**) e rubrosterona (**24**) (SHIOBARA et al., 1993a).

A partir da *Pfaffia paniculata* Kuntze, foram isolados sitosterol (**16**), stigmasterol (**15**), alantoína (**17**), ácido páfíco (**18**) e seus glicosídeos (fafosídeos A, B, C, D, E, F), que apresentaram atividades antitumorais *in vitro* (NAKAI et al., 1984; NISHIMOTO et al., 1984). O extrato bruto apresenta atividades analgésicas e antiinflamatórias (MAZZANTI & BRAGHIROLI, 1994). A *Pfaffia paniculata* inibe o crescimento de células de melanoma em cultura e possui efeito inibitório de leucemia espontânea (NAKAI et al., 1984). Estudos da fração butanólica da *Pfaffia paniculata*, revelaram atividade antitumoral, devido a presença de saponinas triterpênicas (NISHIMOTO et al., 1984; MATSUZAKI et al., 2006).

O extrato hidroalcoólico da *Pfaffia glomerata* é antiinflamatório e analgésico, similar ao observado em drogas não-esteroidais, como a indometacina. Isto sugere que o mecanismo de ação deste extrato pode estar associado à inibição da síntese de prostaglandinas (NETO et al., 2005). O extrato butanólico da *Pfaffia glomerata* apresenta efeito anti-hiperglicemiante. Todavia, o mecanismo pelo qual este efeito é desencadeado (inibição da degradação do amido solúvel e/ou absorção de glicose,

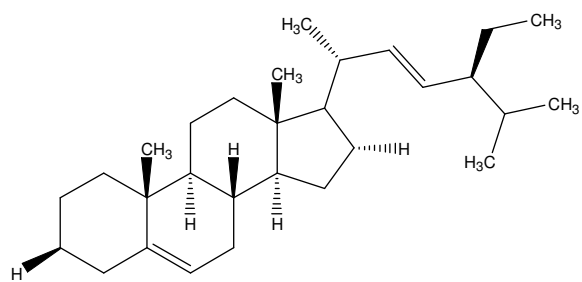
estímulo da secreção de insulina, etc.), necessita uma investigação mais aprofundada (SANCHES et al., 2001). A *Pfaffia glomerata* possui também atividade gastroprotetora, além de apresentar os seguintes compostos: ácido famérico (25), ácido glomérico (26), ácido oleanólico (27), ecdisterona (19) e rubrosterona (24) (SHIOBARA et al., 1993b). *Pfaffia paniculata* e *Pfaffia glomerata* produzem efeitos benéficos na memória de ratos tratados cronicamente com estas plantas (MARQUES et al., 1998).

A *Pfaffia tuberosa* Spreng (Figura 3) é uma espécie medicinal conhecida como corango-de-batata ou ginseng brasileiro, sendo distribuída de forma uniforme desde Goiás até o Rio Grande do Sul. É utilizada popularmente para o tratamento da infertilidade e também como tônico, afrodisíaco e estimulante (FLORES et al., 2007). É utilizada ainda como anti-reumático, antiinflamatório e analgésico, efeitos atribuídos a substâncias como o ácido oleanólico (27), ecdisterona (19), nortriterpenóides, triterpenóides e ecdisteróides que, segundo SHIOBARA et al. (1993b), encontram-se na planta.

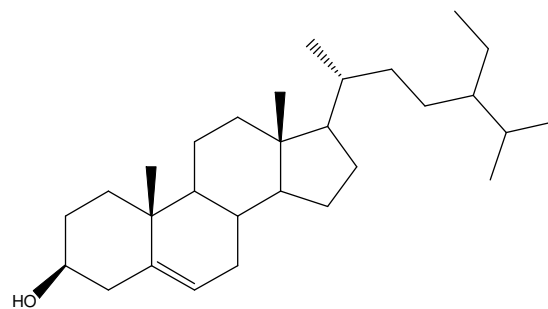


Figura 3: *Pfaffia tuberosa* Spreng (TASCETTO & PAGLIARINI, 2004)

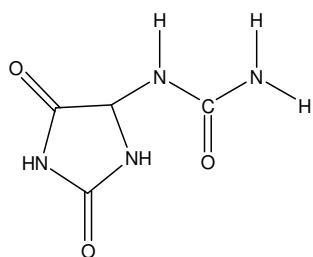
Na Figura 4 estão representadas as estruturas de alguns compostos isolados de diferentes espécies de *Pfaffia*.



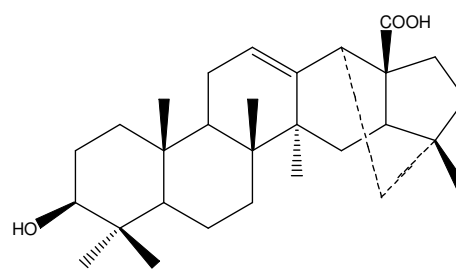
(15)



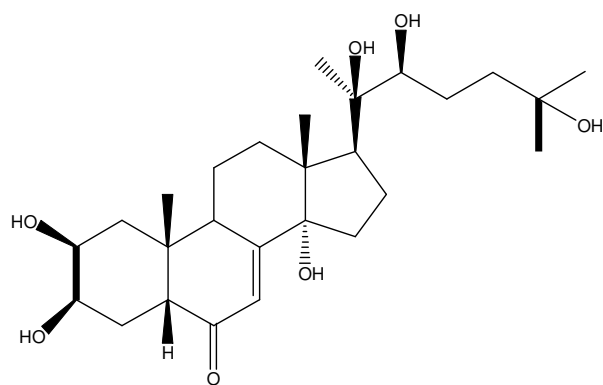
(16)



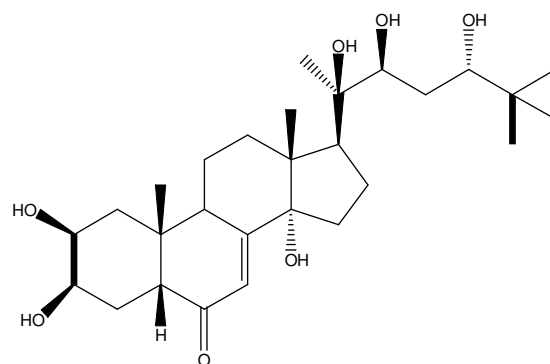
(17)



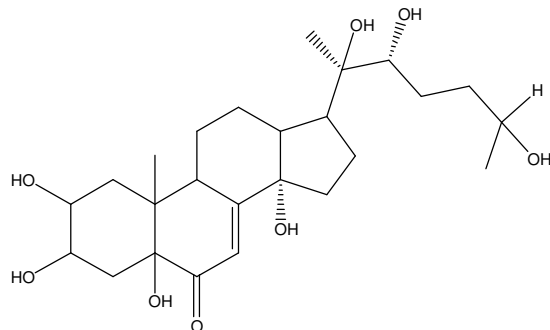
(18)



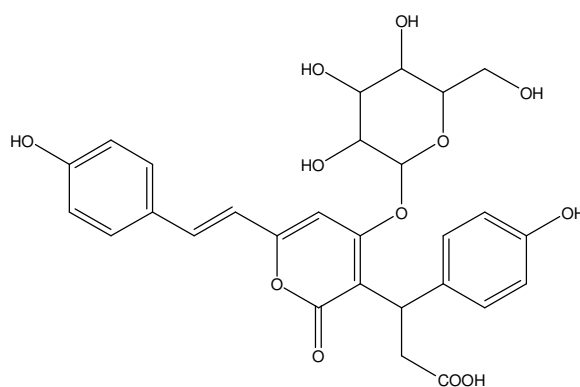
(19)



(20)



(21)



(22)

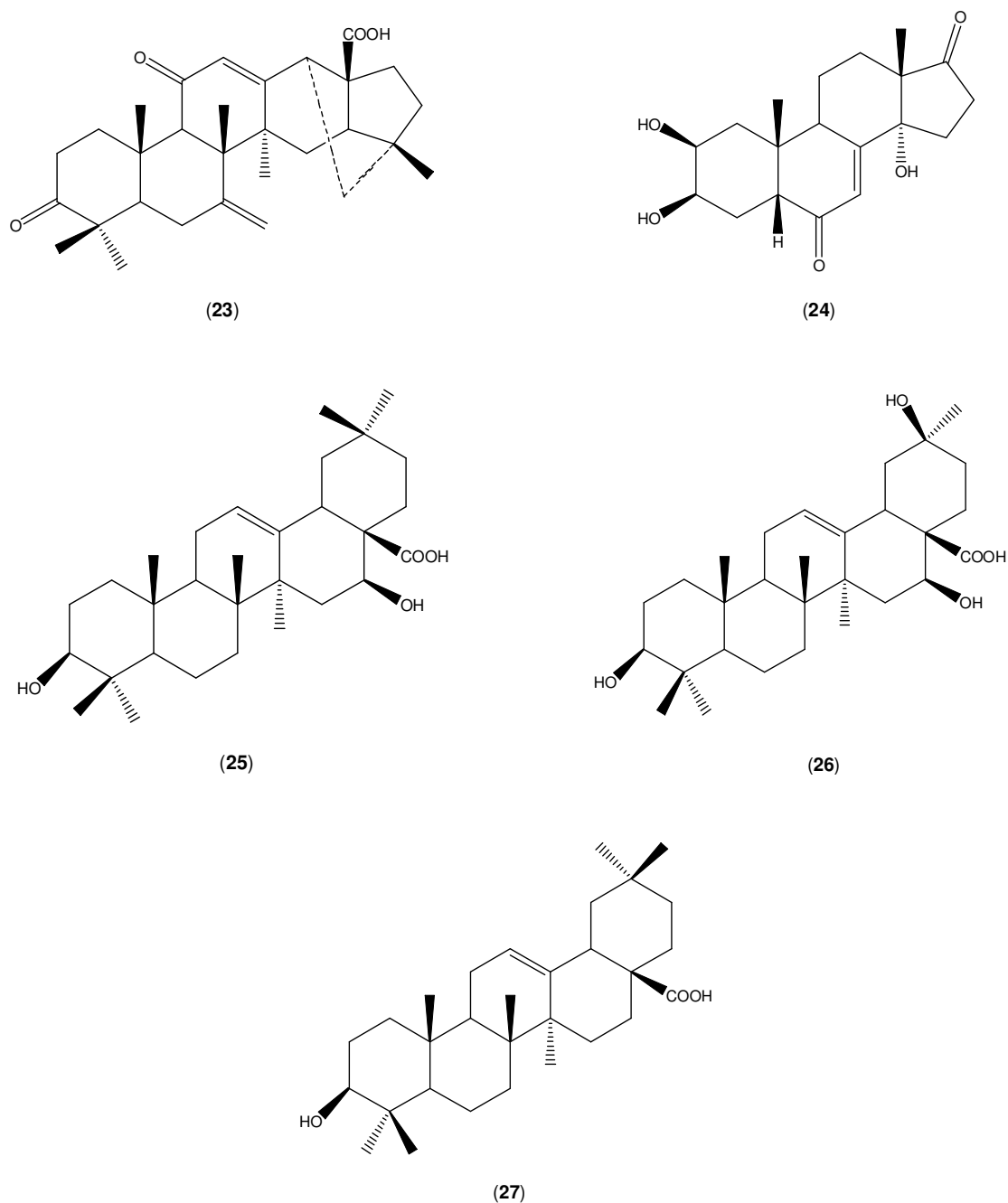


Figura 4: Estruturas de alguns compostos isolados do gênero *Pfaffia*.

3.2 Principais metabólitos secundários encontrados nos gêneros

3.2.1 Flavonóides

Os flavonóides formam um grupo muito extenso, pelo número dos seus constituintes naturais e distribuição ampla no Reino Vegetal. Chamam-lhes também

pigmentos das flores, por participarem na coloração das pétalas, ainda dos frutos e ocasionalmente de outras regiões das plantas, desde as raízes, às sementes, em particular nas plantas vasculares mais evolucionadas (COSTA, 1999). Podem apresentar-se como simples moléculas fenólicas até compostos muito polimerizados com pesos moleculares superiores a 30000 Da.

Os flavonóides são divididos em 13 subclasses de um total de 5000 compostos (TRUEBA et al., 2003). Apresentam como característica dois núcleos fenólicos ligados por uma cadeia de três carbonos (Figura 5). Sob o ponto de vista químico podem-se considerar formados por um núcleo fundamental benzopirano ou cromano ao qual se encontra ligado um anel aromático, isto é, do 2-fenil-benzopirano. Atuam na atração de polinizadores e como co-pigmentos das antocianidinas (COSTA, 1999).

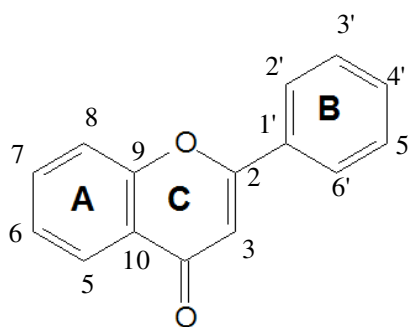
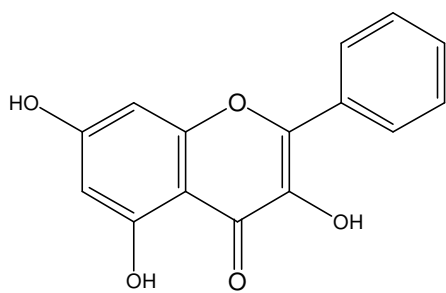


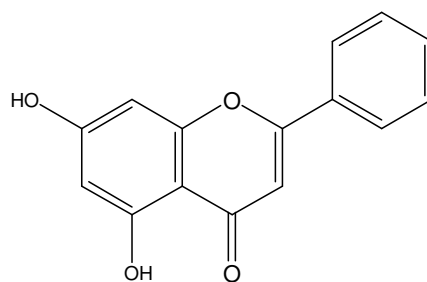
Figura 5: Núcleo fundamental dos flavonóides

São compostos de grande interesse para a indústria farmacêutica, pois apresentam atividades antiinflamatórias, antioxidantes, antimicrobianas, antitumorais, antidiabéticas (BARNES, 2001), antitrombóticas, antialérgicas, antiasmáticas (TRUEBA et al., 2003), vasoprotetoras, antiácidas, diuréticas, antiespasmódicas e corantes (EVANS, 1991).

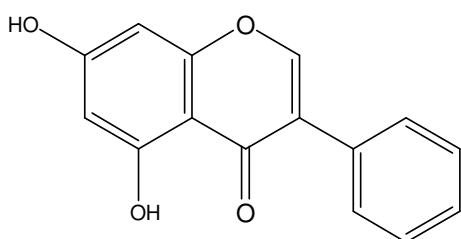
Podem ser encontrados na forma livre ou conjugados a açúcares, podendo uma mesma aglicona estar ligada a diferentes açúcares na mesma planta. Por apresentarem uma variada constituição, foram divididos em diferentes classes, tais como flavonóis, flavonas, isoflavonas, chalconas, auronas e flavanonas (Figura 6).



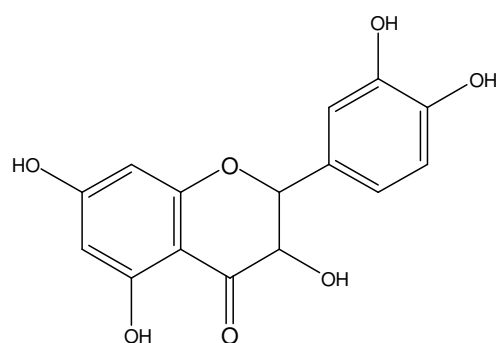
Flavonol



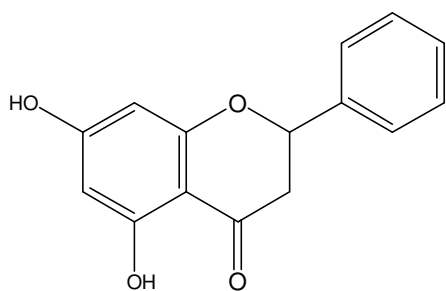
Flavona



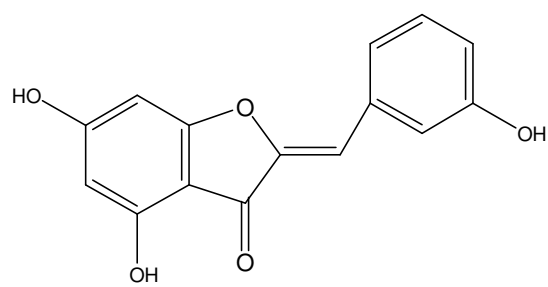
Isoflavona



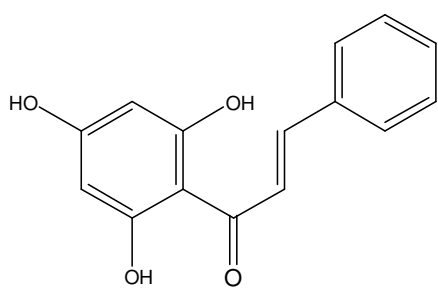
Flavanonol



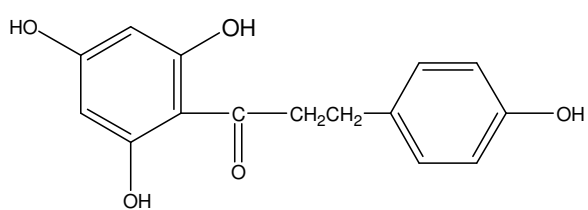
Flavanona



Aurona



Chalcona



Dihydrochalcona

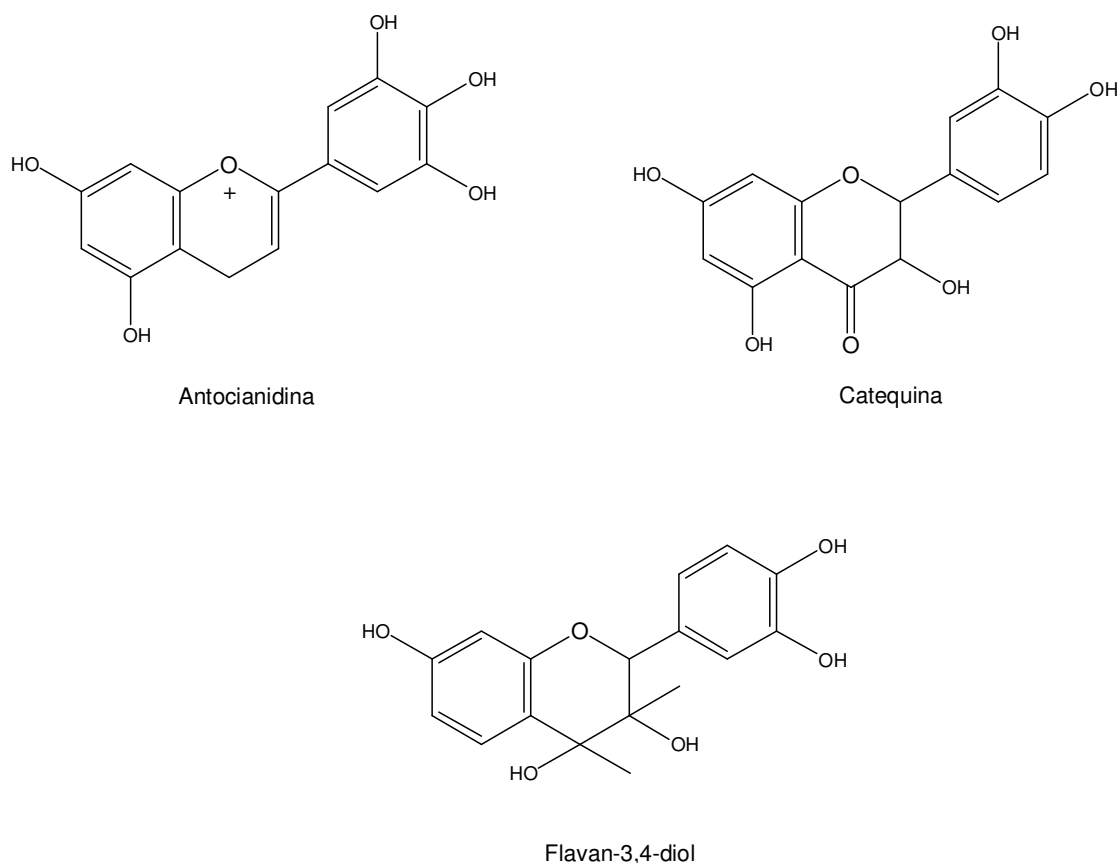
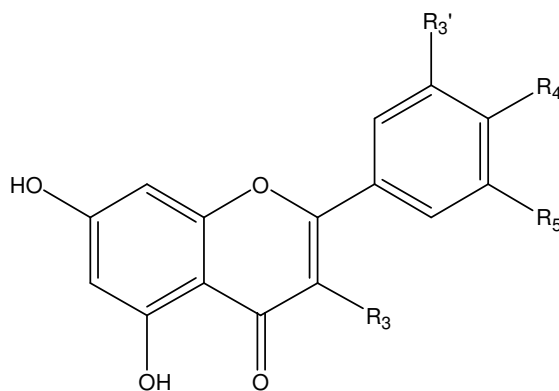


Figura 6: Estrutura química das principais classes de flavonóides.

Os flavonóis são compostos que apresentam uma hidroxila ligada na posição 3. São encontrados na natureza como co-pigmentos das antocianidinas. As agliconas mais comuns são o canferol (**28**), a quercetina (**29**) e a miricetina (**30**). Alguns flavonóis podem apresentar glicosídeos ligados a sua estrutura, sendo o mais comum a quercetina-3-rutinosídeo, mais conhecido como rutina (**31**). As flavonas não apresentam hidroxila ligada à posição 3, o que altera o espectro na região do ultravioleta, mobilidade cromatográfica e reações colorimétricas. Os compostos mais comuns são luteolina (**32**) e apigenina (**33**) (Figura 7). As isoflavonas são isômeros das flavonas, de ocorrência muito restrita (subfamília Papilionoidea – Fabaceae). As chalconas e auronas possuem coloração amarelada, a qual se torna vermelha quando exposta a vapores alcalinos. Ocorrem principalmente na família Asteraceae. As auronas apresentam um anel central de cinco membros, enquanto que as chalconas não o possuem. As flavanonas são isômeros das chalconas, comuns em frutos do gênero *Citrus*. (HAHLBROCK & CONN, 1981; HARBORNE, 1984).



- (28) $R_3 = R_4' = \text{OH}; R_3' = R_5' = \text{H}$
 (29) $R_3 = R_3' = R_4' = \text{OH}; R_5' = \text{H}$
 (30) $R_3 = R_3' = R_4' = R_5' = \text{OH}$
 (31) $R_3 = \text{O-rutinose}; R_3' = R_4' = \text{OH}; R_5' = \text{H}$
 (32) $R_3 = R_3' = \text{H}; R_4' = R_5' = \text{OH}$
 (33) $R_3 = R_3' = R_5' = \text{H}; R_4' = \text{OH}$

Figura 7: Estrutura química de alguns exemplos das diferentes classes de flavonóides.

3.2.2 Triterpenos

Os triterpenos são metabólitos secundários encontrados em plantas, assim como os flavonóides. Constituem um dos grupos de compostos mais antigos já estudados, e hoje representam um grupo altamente diversificado de moléculas pequenas sintetizadas por plantas. Triterpenos são formados por seis unidades de isopreno com 30 carbonos ou por derivados do esqualeno ou de precursores de C30. Na natureza, os triterpenos ocorrem como uma estrutura cíclica complexa chamada “triterpenóides”. Os triterpenóides são compostos presentes em várias plantas da medicina chinesa, como no *Ginseng* (SALMINEN et al., 2008).

Esteróis, esteróides e saponinas são triterpenos com atividade biológica bem caracterizada. A maioria dos triterpenos são 6-6-6-5 tetracíclicos, 6-6-6-6-5 pentacíclicos, ou 6-6-6-6-6 pentacíclicos, mas triterpenos acíclicos, monocíclicos, bicíclicos, tricíclicos e hexacíclicos também foram isolados de fontes naturais (XU et al., 2004).

Os triterpenos pentacíclicos são baseados em um esqueleto de 30 carbonos que compreende cinco anéis seis-membrados (ursanos e lanostanos) ou quatro anéis seis-membrados e um anel cinco-membrado (lupanos e hopanos). Triterpenos pentacíclicos são produzidos pelo arranjo de moléculas do epóxido do esqualeno. Estes compostos geralmente são encontrados nas frutas, nos vegetais e em outras

partes de diversas plantas medicinais. Um exemplo de triterpeno pentacíclico é o lupeol (14), que possui atividades biológicas definidas, como efeitos antiinflamatórios e antitumorais (CHATURVEDI et al., 2008).

As saponinas formam um grupo particular de heterosídeos distribuídos extensamente na natureza. O seu nome provém do fato de formarem espuma quando agitados na água (saponificação), à semelhança do sabão (KENSIL & KAMMER, 1998; COSTA, 1999, WAITE et al., 2001). Possuem uma estrutura característica que contém uma aglicona triterpênica ou esteroidal e uma ou mais moléculas de açúcar. As saponinas esteroidais estão menos amplamente distribuídas na natureza do que as saponinas triterpênicas (Figura 8). As saponinas esteroidais são de grande interesse e importância por sua relação com compostos como os hormônios sexuais, cortisona, esteróides diuréticos, vitamina D e heterosídeos cardiotônicos (EVANS, 1991).

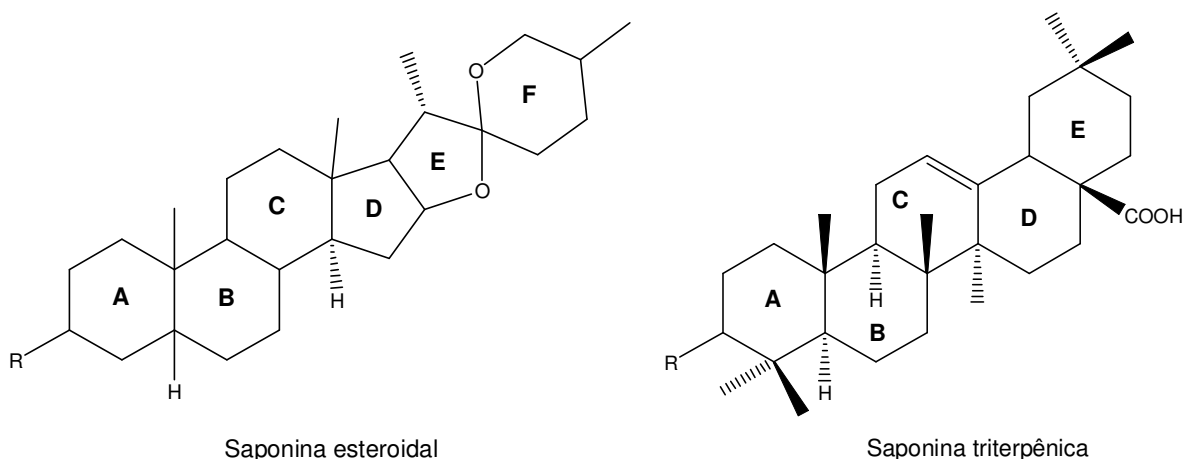


Figura 8: Núcleo esteroidal e triterpenoidal da saponina

3.3 Atividades Biológicas

3.3.1 Atividade Antimicrobiana

Diversos vegetais têm sido utilizados com fins profiláticos e curativos de infecções, sendo que muitos trabalhos vêm sendo realizados em busca de novas plantas com atividade antimicrobiana. Neste trabalho são utilizadas duas metodologias para a avaliação das frações e compostos químicos isolados das

espécies estudadas: bioautografia e concentração inibitória mínima por microdiluição (MIC). O método da bioautografia é considerado um teste qualitativo para detecção de compostos com atividade antimicrobiana. O método da concentração inibitória mínima por microdiluição (MIC) é considerado um ensaio quantitativo usado tanto para avaliação da potência da atividade antimicrobiana de misturas ou substâncias puras. A concentração inibitória mínima (MIC) é a menor concentração do composto que inibe o crescimento de microorganismos (bacteriostático).

Ensaio *in vitro* determinam a menor concentração capaz de causar a morte do microorganismo testado. Assim são utilizados como base para a correlação da dose de um bactericida ou fungicida capaz de trazer a cura de doenças infecciosas *in vivo* (LOEFFLER & STEVENS, 2003). Os microorganismos utilizados neste trabalho estão abaixo especificados:

Staphylococcus aureus é uma das causas mais comuns de infecções que acometem o homem. É muito comum estar presente no quadro infeccioso de pacientes que sofreram cirurgias. Após o sucesso inicial do tratamento das infecções por *S. aureus* com a penicilina, ocorreu o aumento da resistência a esta droga e a busca por novos fármacos capazes de tratar este tipo de infecção (SMITH & DOWNS, 1999).

Staphylococcus epidermidis é um microorganismo patogênico oportunista que acomete endocardites de válvulas cardíacas naturais e protéticas, infecções causadas por cateteres endovenosos e dispositivos ortopédicos. A causa mais aceita para a infecção por *S. epidermidis* instalar-se no organismo humano é a aderência desta bactéria ao corpo (CHRISTENSEN et al., 1982).

Bacillus subtilis vive no solo, proliferando-se para plantas, alimentos e animais sempre que houver condições favoráveis. Somente algumas espécies deste gênero são patogênicas aos humanos, entre elas a mais conhecida é o *B. subtilis* (STEIN, 2005).

Escherichia coli é um anaeróbio facultativo comum na flora intestinal humana. Quando o organismo torna-se debilitado ou imunossuprimido, as barreiras gastrointestinais são violadas e a *E. coli* pode causar infecção, principalmente no aparelho urinário, aparelho digestivo e meninges (NATARO & KAPER, 1998).

Klebsiella pneumoniae é um dos bacilos gram-negativos mais freqüentemente isolados como causa de infecções hospitalares, chegando a ser responsável por até

29% das infecções de um hospital. As infecções causadas por *K. pneumoniae* estão associadas com alta morbimortalidade. A mudança no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de amostras clínicas de *K. pneumoniae* e relatos cada vez mais freqüentes de surtos hospitalares causados por estes agentes justificam a monitoração deste patógeno no ambiente hospitalar (PEREIRA et al., 2003).

Pseudomonas aeruginosa é um dos microorganismos patogênicos oportunistas mais conhecidos atualmente. Encontra-se no solo, em humanos, animais e no ambiente hospitalar. Pode causar infecções em imunodeprimidos, sendo o principal fator de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (ALONSO et al., 1999).

Candida albicans apesar de fazer parte da microbiota normal do trato intestinal, pode constituir-se em patógeno oportunista das regiões mucocutâneas, trato digestivo e genital, além de envolver pele, unhas e trato respiratório com riscos de desencadear fungemias. A candidose como doença primária, é extremamente rara, e via de regra está associada a neoplasias, doenças imunomediadas e ao uso prolongado de corticosteróides, antimicrobianos ou citostáticos. Os estados de imunodeficiências induzidas por infecções podem se constituir em causas predisponentes às infecções fúngicas como a candidose (FERREIRO et al., 2002).

Saccharomyces cerevisiae é comumente utilizado na fermentação alcoólica, apresenta bons níveis de produção de etanol durante a fermentação e pode ser modificado por engenharia genética para a produção de enzimas hidrolíticas necessárias para a conversão de celulose a glicose. Também pode ser utilizado na produção de vários tipos de proteínas, incluindo a vacina contra hepatite B (SIQUEIRA, 2006).

3.3.2 Teste de letalidade com *Artemia Salina* (BST)

Artemia salina Leach (Artemiidae) é um micro crustáceo presente na fauna marinha (PARRA et al., 2001). O teste de toxicidade utilizando larvas de *Artemia salina* Leach é uma prática comum nos laboratórios de pesquisa de produtos naturais. O teste de letalidade empregado foi adaptado do método descrito por COLEGATE & MOLYNEAUX (1993). O procedimento determina os valores da CL₅₀ (concentração capaz de matar 50% da população de *Artemia salina*), em µg/mL, através de regressão linear após 24 horas de análise, o que demonstra boa

correlação com atividade antitumoral e inseticida, ou seja, a atividade antitumoral aumenta a medida que a CL_{50} diminui (MEYER et al., 1982). As amostras são consideradas ativas quando a CL_{50} é menor que 250 $\mu\text{g/mL}$. O critério de classificação dos extratos com base nos níveis da CL_{50} é estabelecida da seguinte forma: $CL_{50} < 80 \mu\text{g/mL}$, altamente tóxicos; CL_{50} entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$, moderadamente tóxicos; e $CL_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$, baixa toxicidade ou não tóxico (PEREIRA & CASTRO, 2007; STÜKER, 2007).

3.3.3 Atividade inibitória enzimática

3.3.3.1 Prolil Oligopeptidase (POP)

As enzimas da classe das prolil oligopeptidases (POPs) são proteínas terapeuticamente de enorme relevância, especialmente a POP do cérebro humano. A POP (Figura 9) pertence à família das serina peptidases sendo que, diferentemente de outras enzimas desta mesma família, caracteriza-se pela capacidade de hidrolisar somente substratos peptídicos relativamente pequenos (menos de 30 resíduos de aminoácidos). Uma propriedade específica da POP é a capacidade de clivar seqüências peptídicas no extremo carboxila de resíduos de prolina (ligações *Pro-Xaa*), por isto é conhecida também como “Post-Proline Cleaving Enzyme” (MAES et al., 1995; MAES et al., 1998; BREEN et al., 2004; ROEHRL et al., 2004; VENÄLÄINEN et al., 2004). O sítio ativo da POP está localizado na cavidade entre os domínios (FÜLÖP et al., 1998).

As pesquisas indicam que a POP do cérebro humano está envolvida em uma variedade de transtornos e patologias do sistema nervoso central (SNC) tais como esquizofrenia, ansiedade, amnésia, diferentes estágios da depressão e o transtorno afetivo bipolar. Em pacientes afetados, observou-se que o nível desta enzima no soro é maior que os níveis encontrados em pacientes não afetados (MAES et al., 1995; MAES et al., 1998; BREEN et al., 2004; ROEHRL et al., 2004; VENÄLÄINEN et al., 2004). Assim, o desenvolvimento de inibidores da POP tornou-se um desafio importante, visto ainda ser premente mais estudos sobre inibidores específicos disponíveis para uso clínico.

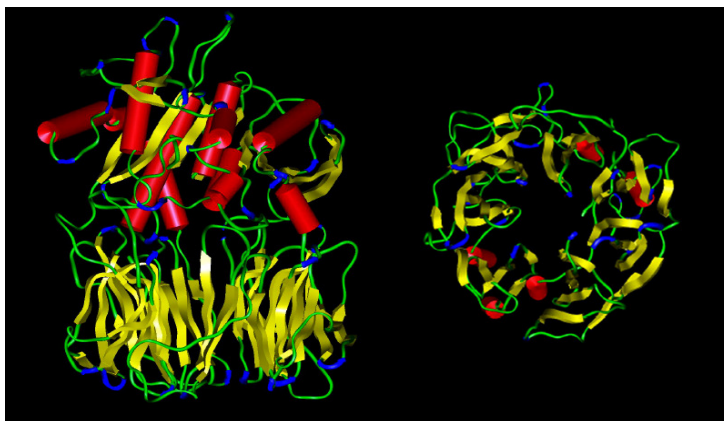
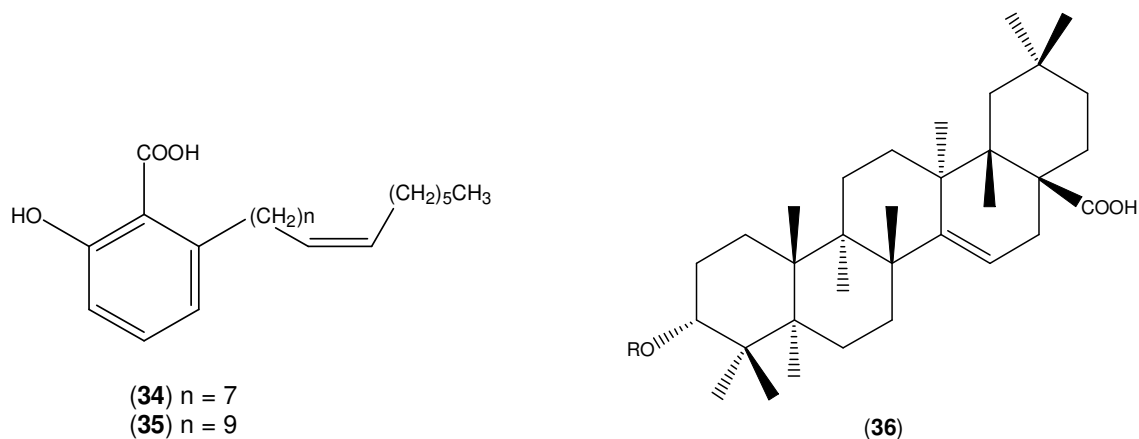


Figura 9: Estrutura tridimensional da prolil oligopeptidase (POP) de origem suína (imagem cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt – Barcelona. 2008)

Nos últimos anos observa-se um crescente interesse no isolamento de inibidores naturais da POP. Assim, tem-se registro de inibidores da POP isolados das folhas de *Ginkgo biloba*, das partes aéreas de *Tamarix hispida* Willd, do extrato de *Rhizoma coptidis* e das raízes da *Scutellaria baicalensis* (Figura 10). Os compostos isolados da fração hexânica do *Ginkgo biloba* foram os ácidos 6-(8'*Z*-pentadecenil)salicílico (**34**) e 6-(10'*Z*-heptadecenil)salicílico (**35**). Um terpenóide pentacíclico foi isolado da *Tamarix hispida*, denominado ácido 3 α -(3",4"-diidroxitrans-cinamoiloxi)-D-friedolean-14-en-28-oico (**36**). Deste foram isolados dois compostos, a rhamnocitrina (**37**) e a isorhamnetina (**38**). Os três compostos isolados da *Tamarix hispida* apresentam atividade inibidora da POP (LEE et al., 2004 e SULTANOVA et al., 2004). Além destes compostos, também apresentam capacidade de inibição da POP a berberina (**39**), alcalóide isolado do extrato de *Rhizoma coptidis* (TARRAGÓ et al., 2007) e a baicaleína (**2**), flavonóide isolado das raízes da *Scutellaria baicalensis* (TARRAGÓ et al., 2008).



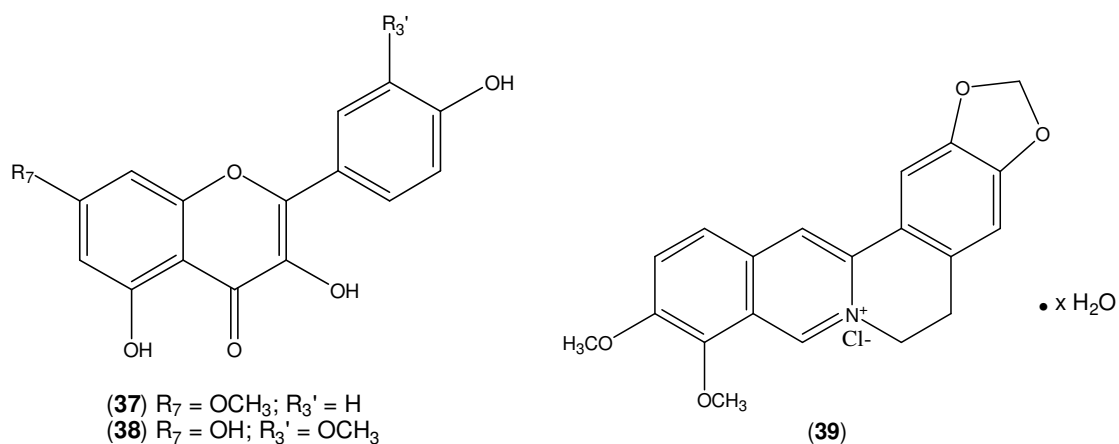


Figura 10: Estruturas químicas de inibidores naturais da POP isolados do *Ginkgo biloba*, *Tamarix hispida* e *Rhizoma coptidis*.

3.3.3.2 Dipeptidil Peptidase IV (DPP IV)

DPP IV (também conhecida como CD 26) é uma glicoproteína com 766 aminoácidos em humanos e 767 aminoácidos em ratos (MISUMI et al., 1992). É uma ectopeptidase pertencente a família da prolil oligopeptidase (Figura 11). Em mamíferos, ela localiza-se na superfície de células endoteliais e epiteliais do intestino, medula óssea e rins. Atua removendo seletivamente dipeptídeos N-terminal de oligopeptídeos com forte preferência por Prolina (Pro) > Alanina (Ala) > Serina (Ser) como penúltimo aminoácido. Também é capaz de clivar dipeptídeos N-terminal com hidroxiprolina, deidroprolina, glicina, valina, treonina ou leucina como penúltimo aminoácido, porém de maneira menos eficiente (LAMBEIR et al., 2003).

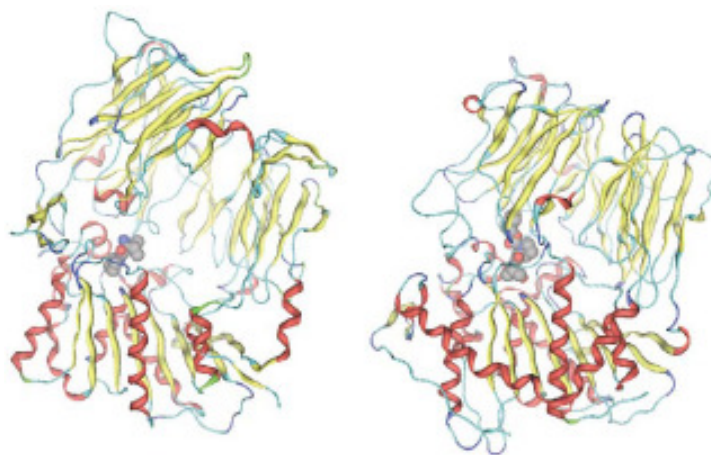


Figura 11: Comparação entre a estrutura da DPP IV à esquerda e da POP à direita (ROSENBLUM & KOZARICH, 2003).

Terapias que aumentam o nível sanguíneo de insulina têm beneficiado o tratamento do diabetes tipo 2. Os inibidores da DPP IV são uma nova promessa para o tratamento do diabetes, pois agem como estimulantes indiretos da secreção de insulina (DEACON et al., 2004). O diabetes mellitus é um distúrbio metabólico crônico que resulta da resistência à insulina e/ou da falha em secretar insulina em resposta a uma dieta rica em carboidratos (disfunção das células β) (GIORGINO et al., 2006). A DPP IV está presente na maioria dos vertebrados, principalmente nos rins, intestino, glândula submaxilar, fígado, placenta, útero, próstata, endotélio capilar e pele. Como a DPP I e a DPP II, em casos de distrofia muscular, os níveis de DPP IV tornam-se elevados (SENTANDREU & TOLDRÁ, 2001).

O hormônio insulínico GLP-1 (glucagon-like peptide-1) é apontado como novo tratamento para o diabetes tipo 2. Este hormônio é metabolizado extremamente rápido pela enzima DPP IV, resultando na formação de um metabólito, o qual deve atuar como antagonista do receptor GLP-1. Este possui muitas ações, as quais incluem estimulação da expressão do gene da insulina, inibição da secreção de glucagon, promoção da saciedade e diminuição da ingestão de comida, assim como retardo no esvaziamento gástrico, tudo isto contribuindo para normalizar os níveis de glucagon aumentados. Assim, a inibição da DPP IV é importante para que aumente os níveis de GLP-1 e reduza os níveis de seu antagonista, sendo útil na terapia do diabetes tipo 2 (HOLST & DEACON, 1998).

O hormônio GLP-1 é rapidamente liberado para a circulação sanguínea a partir das células L do intestino após a ingestão de comida, sendo rapidamente inativado por clivagem do dipeptídeo NH₂-terminal pela DPP IV.

3.3.3.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A redução nos níveis da acetilcolina (ACh) está associada a uma série de doenças. O Mal de Alzheimer é uma desordem neurodegenerativa, de grande impacto sócio-econômico, responsável por 50 a 60% do número total de casos de demência dentre pessoas acima dos 65 anos. Esta patologia afeta cerca de 1,5% da população em idade entre 65-69 anos, 21% entre 85-86 e 39% acima dos 90 anos, acometendo aproximadamente 15 milhões de pessoas em todo o mundo.

Em nível celular, o Mal de Alzheimer está associado à redução das taxas de acetilcolina (ACh) no processo sináptico, diminuindo a neurotransmissão colinérgica

cortical, além de outros neurotransmissores como noradrenalina, dopamina, serotonina, glutamato e substância P em menor extensão. Estudos mais recentes demonstraram ocorrência de redução do número de receptores nicotínicos e muscarínicos (M2) de ACh, muitos dos quais localizados nas terminações colinérgicas pré-sinápticas, havendo preservação dos receptores muscarínicos (M1 e M2) pós-sinápticos (VIEGAS et al., 2004). A redução de ACh no organismo favorece também o surgimento de outras doenças. O glaucoma é uma doença em que ocorre elevação da pressão sanguínea dos vasos sanguíneos dos olhos por uma redução na estimulação colinérgica, pois o nível da ACh está diminuído nestes pacientes. Outro exemplo de doença relacionada à redução dos níveis de ACh é a miastenia grave, onde ocorre paralisia muscular (HOUGHTON et al., 2006).

A atividade e permanência da ACh são reguladas por hidrólise catalisada pela acetilcolinesterase (AChE), que regenera a colina, seu precursor (VIEGAS et al., 2004). O sítio ativo da AChE é composto por uma tríade catalítica (Figura 12) composta por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327). O mecanismo de hidrólise de AChE envolve o ataque nucleofílico da serina ao carbono carbonílico da ACh, gerando um intermediário tetraédrico estabilizado por ligações de hidrogênio, o qual produz colina livre e serina acetilada (VIEGAS et al., 2004).

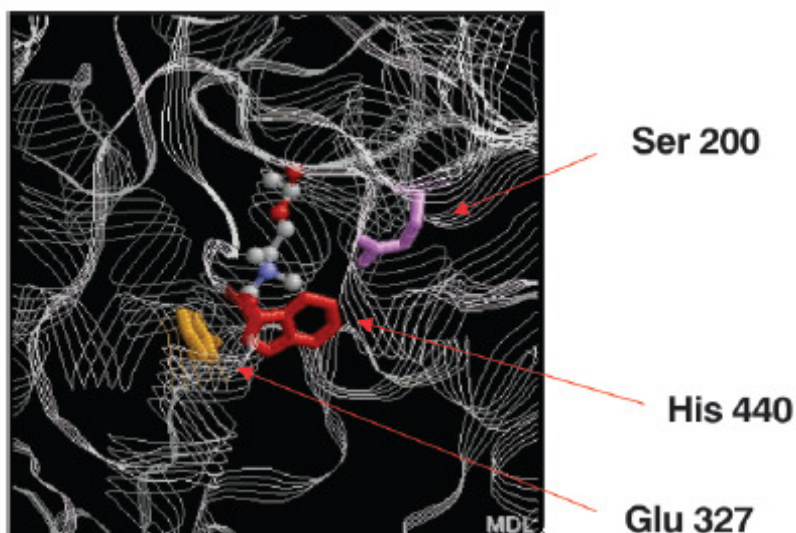


Figura 12: Visão do sítio ativo da AChE e dos resíduos de aminoácidos que constituem a tríade catalítica (VIEGAS et al., 2004).

4. ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 Flavonóides com atividade inibitória da Prolil Oligopeptidase isolados da *Scutellaria racemosa* Pers

Artigo 1

**Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated
from *Scutellaria racemosa* Pers**

Micaela Rossato Marques, Caroline Stüker, Nessim Kichik, Teresa Tarragó, Ernest
Giralt, Ademir Farias Morel, Ionara Irion Dalcol

(Submetido à Phytomedicine)

Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers

M. R. Marques^a, C. Stüker^a, N. Kichik^b, T. Tarragó^b, E. Giralt^b, A. F. Morel^a, I. I. Dalcol^{a,*}

^a Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN), Universidade Federal de Santa Maria, 97045-100. Santa Maria – RS, Brazil

^b Institute for Research in Biomedicine. Barcelona Science Park. E-08028. Barcelona, Spain

*Corresponding author

Universidade Federal de Santa Maria - Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN,
Departamento de Química. Campus Camobi - CEP: 97105-900. Santa Maria, RS - Brazil

Tel.: +55-220-8869; Fax: + 55-220-8031; *e-mail address*: iidalcol@gmail.com

Abstract

Prolyl oligopeptidase (POP) is a serine protease highly expressed in brain that hydrolyses peptide bonds at the carboxyl terminal of prolyl residues. There is evidence that this enzyme participates in several functions of the central nervous system. *Scutellaria racemosa* Pers demonstrated significant and selective POP inhibition. Fractionation of the hydroalcoholic extract resulted in the isolation of four compounds identified for the first time from *S. racemosa* Pers, the triterpenoid lupeol (**1**) and the flavonoids oroxylin A (**2**), dinatin (**3**), and oroxyloside (oroxylin A 7-O-glucuronide, **4**). Inhibitory assays indicated that compounds **3** and **4** at a concentration of 100 μ M inhibit 43 and 34% of total POP activity, respectively.

Keywords: *Scutellaria racemosa* Pers, triterpenoid, flavonoids, POP, DPP IV, AChE

Introduction

The genus *Scutellaria* (Labiatae) is formed by approximately 350 species. Some of these are collectively known as “skullcap”, medicinal plants used popularly in Europe, the United States and eastern Asia. *Scutellaria lateriflora* L. and *Scutellaria galericulata* L. are used as skullcap in Europe and United States while the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Scutellaria radix* in the Japanese pharmacopeia; common name “Baikal skullcap”) is largely administered in folk medicine in the countries of eastern Asia, as China, Korea and Japan (Hosokawa et al., 2000). In general, skullcap is used as a sedative, a tonic for the nerves, an anti-spasmodic agent (for treatment of epilepsy) and to treat sleeplessness, anxiety and as substitute in chronic treatments with barbiturates and tranquilizers (Awad et al., 2003; Hirotsu et al., 1998). Like another medicinal species of the *Scutellaria* genus, *S. racemosa* Pers is used in South America folk medicine for its neurological properties (Bianchi, 2006). To date, only the North American native *S. racemosa* has been studied with regard to its antioxidant potential (Cole et al., 2008).

Prolyl oligopeptidase (POP) and dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) cleave bioactive peptides after proline residues, and are therapeutic targets for several diseases. POP may be involved in the catabolism of the neuropeptides arginine-vasopressin (AVP) and thyrotrophin-releasing hormone (TRH) (Shishido et al., 1999; Bellemère et al., 2005). Research on the features of POP have indicated that this enzyme participates in several aspects of central nervous system (CNS) function. Depression, anxiety and schizophrenia are associated with a significant increase in the serum POP activity (Maes et al., 1995; Maes et al., 1998; Breen et al., 2004; Roehrl et al., 2004; Venäläinen et al., 2004; Männistö et al., 2007). Several potent POP inhibitors, such as Z-Pro-Prolinal and S-17092-1, have been proposed for potential use in the prevention and treatment of neurological diseases (Shishido et al., 1999; Bellemère et al., 2005). However, to date, few studies have addressed POP inhibitors derived from medicinal plants (Lee et al., 2004; Sultanova et al., 2004; Tarragó et al., 2006; Tarragó et al., 2007). Like POP, DPP IV belongs to the same family of serine proteases. Therapeutically, DPP IV is a key target in the treatment of type 2 diabetes mellitus since it inactivates glucagon-like peptide-1, a hormone that stimulates insulin secretion in a glucose-dependent manner. Despite their low amino acid sequence homology, POP and DPP IV share similar three-dimensional structures. Thus, selectivity is highly relevant in the discovery of new inhibitors since these enzymes are involved in

several types of illnesses and show distinct mechanisms of action. Therefore, in the study of new POP inhibitors it is also of interest to evaluate in parallel the capacity of compounds to inhibit DPP IV.

In the course of our continuing search for POP inhibitors of natural origin, *S. racemosa* Pers was selected in the basis of its ethnopharmacological use in South America. Fractionation of hydroalcoholic extract from this plant resulted in the fractions *n*-hexane (HF), dichloromethane (DF), ethyl acetate (AF) and *n*-butanol (BF). AF and BF demonstrated significant POP inhibitory activity. Phytochemical analyses of the extract and fractions afforded four known compounds, the triterpenoid lupeol (**1**) and the flavonoids oroxylin A (5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone), (**2**), dinatin (scutellarein 4'-methyl ether), (**3**), and oroxyloside (oroxylin A-glucuronide), (**4**). Among these compounds, **3** and **4** showed the most significant and selective POP inhibition activity.

Materials and Methods

General

Melting points were determined on an MQAPF-301 Digital (Micro-Química, Florianópolis, Brazil) apparatus and are uncorrected. ^1H and ^{13}C NMR spectra were recorded on a Bruker DPX 400 spectrometer at 400.11/100.6 MHz and a Varian 400 NMR spectrometer operating at 400.12/100.61 MHz using CDCl_3 , CD_3OD or $\text{DMSO}-d_6$ as solvent and TMS as an internal standard. Column chromatography (CC) was carried out on silica gel 60 230-400 mesh (Merck) or reversed-phase C18. Preparative thin layer chromatography (PTLC) was carried out on silica gel PF₂₅₄ (Merck) in glass blades. Thin layer chromatography was performed on a pre-coated TLC plates (Merck, silica 60F-254), and visualized by UV light and by spraying with FeCl_3 1% in EtOH and anisaldehyde in H_2SO_4 . HPLC was performed using a Waters Alliance 2695 (Waters, Massachusetts, USA) chromatography system with a PDA 995 detector, a reverse-phase Symmetry C18 (4.6 x100 mm, 3.5 μm column), and mobile phases of H_2O with TFA (0.045%), and MeCN with TFA (0.036%) at a flow rate of 10 mL min^{-1} . HPLC-MS analysis was carried with Waters 2998 Photodiode Array Detector; Waters 2695 Separations Module; Waters Micromass ZQ ESCi Multi mode ionization Enabled. Mass spectra were recorded on a MALDI Voyager DE RP time-of-flight (TOF) spectrometer (PE Biosystems, Foster City, CA), using an ACH matrix. Fluorescence was measured using a Bio-Tek FL600 fluorescence plate reader (Bio-Tek Instruments, Vermont, USA). POP was obtained by expression in *E. coli* and affinity

purification using a His tail fusion according to a literature procedure.¹⁸ Porcine DPP IV was purchased from Sigma–Aldrich (Deisenhofen, Germany). ZGP-AMC and GP-AMC were obtained from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

Plant material

The material was collected in October 2006 in Santa Maria, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Scutellaria racemosa* Pers (Labiatae) was identified by Dr. Thaís Scotti do Canto-Dorow and deposited in the herbarium (nº. 11461) of the Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria-RS, Brazil.

Extraction and isolation

Dried roots and aerial parts of *Scutellaria racemosa* Pers (170.25 g) were subjected to exhaustive extraction in Soxhlet apparatus with methanol: water (1:2), affording 37.40 g of crude extract (CE). The CE was fractionated with solvent of different degrees of polarity, thereby resulting in *n*-hexane (HF; 5.8%), dichloromethane (DF; 4.7%), ethyl acetate (AF; 5.0%), *n*-butanol (BF; 5.6%) and aqueous (AqF; 21.8%) fractions. HF was subjected to column chromatography (CC) on silica gel, eluting with *n*-hexane, *n*-hexane:CH₂Cl₂ (2:8), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH (8:2), CH₂Cl₂:MeOH (1:1) and MeOH, and separated into six fractions (H1-H6). Fraction H3 was purified by CC using a gradient of *n*-hexane-CH₂Cl₂ to obtain three fractions (H3a-H3c). H3c was further purified by preparative TLC on silica gel (PTLC) using *n*-hexane:CH₂Cl₂ (1:1) as a mobile phase to give **1** (7 mg). Fraction H4 was separated by CC on silica gel with *n*-hexane:CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:AcOEt (5:1), CH₂Cl₂:AcOEt (1:1), AcOEt, MeOH to afford five fractions (H4a-H4e). Fraction H4c was recrystallized in MeOH. The supernatant was rechromatographed on silica gel with CH₂Cl₂: AcOEt (100:0 – 50:50), to give a fraction purified by PTLC with CH₂Cl₂: AcOEt (5:1) to yield **2** (11 mg). AF was separated by CC on silica gel with *n*-hexane: diethyl ether (100:0 – 0:100), diethyl ether: CH₂Cl₂ (75:25 – 0:100), CH₂Cl₂:AcOEt (75:25 – 0:100), AcOEt:MeOH (75:25 – 0:100), to afford nine fractions (A1-A9). Fraction A2 was purified by PTLC with CH₂Cl₂ as a mobile phase to give **2** (10 mg). Fraction A3 was subjected to CC on silica gel using a gradient of *n*-hexane:AcOEt (80:20 – 0:100) to give three fractions (A3a-A3c). Fraction A3b was dissolved in acetone and precipitated with water addition to obtain **2** (10 mg). Fraction A4 was purified by PTLC using *n*-hexane:AcOEt (1:1) to afford two fractions (A4a-A4b).

Fraction A4a was purified by PTLC using CH₂Cl₂: AcOEt (5:3), to give **3** (11 mg). BF was subjected to CC on silica gel, using a gradient of CHCl₃, CHCl₃:MeOH (1:1), MeOH, MeOH:H₂O (1:1) and separated into three fractions (B1-B3). Fraction B1 was purified by PTLC using *n*-hexane:CH₂Cl₂:AcOEt (30:60:5) to afford five fractions (B1a-B1e). Fraction B1a was **2** (10 mg). Fraction B1b was purified by PTLC using *n*-hexane:CH₂Cl₂:AcOEt (30:60:5), to give **3** (3 mg). Fraction B3 was subjected to CC on reversed-phase C18, using a gradient of H₂O:MeOH (100:0 – 0:100), to afford five fractions (B3a-B3e). Fraction B3b is the compound **4** (5 mg). AqF was subjected to CC on C18, using a gradient of H₂O:MeOH (100:0 – 0:100), to afford eleven fractions (Q1-Q11). The Q4 was subjected to HPLC on C18 column, using a gradient of H₂O:MeCN (90:10 – 0:100; 0.05% TFA), to afford ten fractions (Q4a-Q4j). Fraction Q4e was compound **4** (5 mg). The Q5 was subjected to MPLC system on silica gel C18 using a gradient of H₂O: MeCN (80:20 – 0:100; 0.05% TFA), to afford eleven fractions (Q5a-Q5k). Fraction Q5e was compound **4** (5 mg).

Lupeol (1): white solid; mp 158-160 °C; lit. mp 160-162°C (Jácome and Oliveira, 2004). RP-HPLC: *t_R* 7.32 min (linear gradient from 0 to 100% MeCN in 8 min). ¹³C NMR (100.62 MHz, CDCl₃) δ 150.98 (C20), 109.32 (C30), 79.02 (C3), 55.32 (C5), 50.45 (C9), 48.32 (C19), 48.0 (C18), 43.01 (C17), 42.85 (C14), 40.85 (C8), 40.01 (C22), 38.87 (C45), 38.72 (C1), 38.07 (C13), 37.19 (C10), 35.60 (C16), 34.29 (C7), 29.86 (C21), 29.39 (C23), 27.99 (C2), 27.46 (C15), 25.17 (C12), 20.94 (C11), 19.32 (C29), 18.33 (C6), 18.01 (C28), 16.12 (C25), 15.98 (C26), 15.37 (C24), 14.11 (C27).

Oroxilin A (2): yellow solid; mp 202-204 °C; lit. mp 203-204°C (Huang et al., 2003). RP-HPLC: *t_R* 7.34 min (linear gradient from 0 to 100% MeCN in 8 min). ¹H NMR (400.13 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.76 (3H, s, OCH₃), 6.64 (1H, s, H3), 6.95 (1H, s, H8), 7.55-8.07 (5H, m, H2'-H6'), 12.91 (1H, s, 5-OH); ¹³C NMR (100.62 MHz, DMSO-*d*₆) δ 182.17 (C4), 163.12 (C2), 158.06 (C7), 152.69 (C9), 152.90 (C5), 131.96 (C4'), 131.58 (C1'), 130.76 (C8), 129.12 (C3', C5'), 126.36 (C2', C6'), 104.63 (C3), 104.16 (C10), 94.46 (C6), 59.91 (OCH₃).

Dinatin (3): yellow solid; mp 271-273 °C; lit. mp 273-275°C (Malikov and Yuldashev, 2002). RP-HPLC: *t_R* 6.13 min (linear gradient from 0 to 100% MeCN in 8 min). ¹H NMR (400.13 MHz, CD₃OD) δ 7.86-7.84 (2H, d, H2'-6', J=7.34), 6.95-6.93 (2H, d, H3'-5', J=7.34), 6.59 (1H, s, H3), 6.56 (1H, s, H8), 3.90 (3H, s, 4'-OCH₃); ¹³C NMR (100.62 MHz, CD₃OD+(CD₃)₂CO) δ 184.18 (C4), 166.12 (C2), 162.87 (C4'), 159.7 (C7), 154.82 (C9), 154.18 (C5), 133.23 (C6), 130.52 (C2', C6'), 123.51 (C1'), 117.27 (C3', C5'), 105.67 (C10), 103.72 (C3), 95.72 (C8), 61.08 (4'OMe).

Oroxyloside (4): yellow solid; mp 189-192 °C; lit. mp 192-194 °C (Malikov and Yuldashev, 2002). RP-HPLC: t_R 5.291 min (linear gradient from 0 to 100% MeCN in 8 min). ^1H NMR (400.13 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.06-3.46 (sugar H), 3.77 (3H, s, OCH_3) 5.35 (1H, d, $\text{H1}''$), 7.05 (1H, s, H3), 7.11 (1H, s, H8), 7.57-7.63 (3H, m, $\text{H3}'$, 4', 5'), 8.07-8.09 (2H, m, $\text{H2}'$, 6'), 12.82 (1H, s, 5-OH). ^{13}C NMR (100.62 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 182.53 (C4), 170.02 ($\text{C6}''$), 163.78 (C2), 156.24 (C7), 152.59 (C9), 152.30 (C5), 132.65 ($\text{C4}'$), 132.21 ($\text{C1}'$), 130.64 (C6), 129.17 ($\text{C3}'$, $\text{C5}'$), 126.45 ($\text{C2}'$, $\text{C6}'$), 106.15 (C3), 105.01 (C10), 99.43 (C8), 94.13 ($\text{C1}''$), 75.87 ($\text{C5}''$), 75.51 ($\text{C3}''$), 72.83 ($\text{C2}''$), 71.21 ($\text{C4}''$), 60.33 (OCH_3).

Biological assays

POP activity assay using ZGP-AMC

POP activity was determined following the method described by Toide et al. (1995). The reactions were performed in 96-wells microplates, which allowed the simultaneous monitoring of multiple reactions. For each reaction, activity buffer (131 μl , 100 mM of Na/K phosphate buffer, pH 8.0) was pre-incubated for 15 min at 37 °C with POP (7 nM) and with the corresponding sample solution (3 μl). A stock solution of fractions (at 5 mg/mL) or pure compounds (100 mM) was prepared in DMSO and dilutions were prepared from each stock solution with DMSO. A control with the same DMSO concentration was performed. After pre-incubation, ZGP-AMC (10 μl , 3 mM in 40 % of 1,4-dioxane) was added and the reaction was incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped with sodium acetate (150 μl , 1M, pH 4) and the formation of AMC was measured fluorometrically. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC_{50} value was defined as the concentration of inhibitor required to inhibit 50 % of POP activity.

DPP IV activity assay using GP-AMC

DPP IV activity was determined following the method described by Checler et al. (1985). The reactions were performed in a 96-well microplate. For each well, the reaction mixture contained activity buffer (131 μl , 100 mM Na/K phosphate buffer, pH 8.0), 0.7 nM DPP IV, and 3 μl of the corresponding solution (in DMSO). After pre-incubation (15 min at 37 °C), GP-AMC (10 μl , 3 mM in 40 % 1,4-dioxane) was added, and the reaction was incubated for 1 h at 37°C. Finally, the reaction was stopped with sodium acetate (150 μl , 1 M, pH 4) and the formation of AMC was measured fluorimetrically. The

excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC₅₀ value was defined as the concentration of compound required to inhibit 50 % of DPP IV activity.

Results and discussion

The capacity of *S. racemosa* Pers fractions to inhibit POP and DPP IV was evaluated in fluorimetric assays in the presence of ZGP-AMC and GP-AMC as substrates of POP and DPP IV, respectively. Fractions AF and BF showed strong inhibitory effects on POP, with IC₅₀ values of 18.2 and 30.3 µg/mL (Table 1). The assay performed with DPP IV showed inhibitory activity of fractions at 80 µg/mL in the range of 56-38%. After this assessment, AF was fractionated by column chromatography (CC) on silica gel and subsequent preparative thin layer chromatography (PTLC) to afford oroxylin A (**2**) and dinatin (**3**). BF fractionation by CC and PTLC resulted in the isolation of oroxylin A (**2**), dinatin (**3**) and oroxyloside (**4**). Compounds **1** and **2** were also isolated by CC from HF, and **4** was also identified in the aqueous fraction (Figure 1). The compounds were identified comparing their physical and spectroscopic data with those reported previously (Malikov and Yuldashev, 2002; Horie et al., 1998; Kim et al., 2007; Fotie et al., 2006).

From the compounds isolated in this study, lupeol and oroxylin A are the most extensively studied concerning pharmacological activity. Little attention has been devoted to dinatin and the glycosilated flavonoid oroxyloside activities. The triterpene lupeol is a potent anti-malarial agent and shows anti-urolithic effects (Fotie et al., 2006; Sudhahar et al., 2008). This compound also exhibits hepatoprotective, antioxidative, and anti-inflammatory activities (Sunitha et al., 2001; Geetha and Varalakshmi, 1998; Preetha et al., 2006). Oroxylin A ameliorates scopolamine-induced memory impairment. Furthermore, this compound is an anti-oxidative and potential anti-inflammatory agent, by reducing numbers of activated astrocytes and microglial cells and inhibits iNOS (inducible nitric oxide synthase), and exerts a neuroprotective effect on cholinergic transmission (Kim et al., 2007). Oroxylin A reverses the cholinergic dysfunction-induced learning and memory deterioration through central mediation involving the GABA_A receptors (Kim et al., 2008). However, no reports are available on the effects of the isolated compounds **1-4** on POP and DPP IV activity. To establish whether **1-4** are involved in the inhibitory activity against these enzymes, we tested them in the concentration of 10 nM- 100 µM against POP and in the concentration of 0.5 µM- 5 mM against DPP IV (Table 2). Among these compounds, dinatin (**3**) identified in AF, and oroxyloside (**4**), identified in BF, at a concentration

of 100 μM showed the most significant inhibitory effect on POP. Given the neuroprotective and cognition-enhancing effects of POP inhibitors in experimental animals, some of the mentioned effects of compounds **3** and **4** can be attributed to POP inhibition. Therefore, these compounds might be valuable for the treatment of a variety of clinical conditions of the brain, such as the cognitive disturbances present in schizophrenia, bipolar affective disorder and Alzheimer's disease. Neither of these two compounds inhibited DPP IV. Our results indicate that although **3** and **4** are not exceptional inhibitors of POP, they showed selective activity against this enzyme. On the basis of our results, we propose that dinatin (**3**) and oroxyloside (**4**) contribute to the selective POP inhibition of the AF and BF, but that they are not the only compounds present in the fractions responsible for the activity against this enzyme. A possible synergistic effect of the metabolites in these fractions should also be examined. In fact, in previous studies, we reported berberine (Tarragó et al., 2007) and the flavonoid baicalin (Tarragó et al., 2008) as the main POP inhibitory molecules present in extracts of *Coptidis rhizoma* and *Scutellaria baicalensis* respectively, which are both ingredients of the Huang Lian Jie Du Tang formulation (Oren-gedoku-to), a traditional Chinese herbal prescription that protects against neuronal death induced by cerebral ischemia (Kondo et al., 2000). A combination of several POP inhibitors in Huang Lian Jie Du Tang could explain its therapeutic efficacy.

Our results indicate that *S. racemosa* Pers is a medicinal plant of value for the treatment of neurological disorders. Furthermore, the natural products identified here have other advantages, such as water solubility, and possibly the capacity to reach the CNS. Since dinatin (**3**) and oroxyloside (**4**) are natural products with a proven record of safe human administration, they are a highly attractive starting point from which to develop new POP inhibitors with enhanced properties.

Acknowledgment

We thank Prof. Dr^a. T. Canto-Durrow for the technical support. The work was supported by CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Ministério da Educação do Brasil), MECD (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España), MCI-FEDER (BIO2008-00799) and the Generalitat de Catalunya (CeRBa and 2005SGR-00663).

References

- Awad, R., Arnas, J.T., Trudeau, V., Bergeron, C., Budzinski, J.W., Foster, B.C., Merali, Z., 2003. Phytochemical and biological analysis of Skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): A medicinal plant with anxiolytic properties. *Phytomedicine*, 10, 640-649.
- Bellemère, G., Vaudry, H., Morain, P., Jegou, S., 2005. Effect of Prolyl Endopeptidase Inhibition on Arginine-Vasopressin and Thyrotrophin-Releasing Hormone Catabolism in the Rat Brain. *J Neuroendocrinol.*, 17, 306-313.
- Bianchi, A. Annual Meeting for the Instruction of Acupuncture and Reflexology, 2006, Torino.
- Breen, G., Harwood, A.J., Gregory, K., Sinclair, M., Collier, D., Clair, D.S., Williams, R.S.B., 2004. Two peptidase activities decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients. *Bipolar Disord.*, 6, 156-161.
- Checler, F., Vincent, J.P., Kitabgi, P., 1985. Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg⁸-Arg⁹ peptide bond by a metalloendopeptidase. *J Neurosci.*, 45, 1509-1513.
- Cole, I.B., Cao, J., Alan, A.R., Saxena, P.K., Murch, S.J., 2008. Comparisons of *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* and *Scutellaria racemosa*: Genome size, antioxidant potential and phytochemistry. *Planta Med.*, 74, 474-481.
- Fotie, J., Bohle, D., Leimanis, M., Georges, E., Rukunga, G., Nkengfack, A., 2006. Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*. *J. Nat. Prod.*, 69, 62-67.
- Geetha, T., Varalakshmi, P., 1998. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in adjuvant-induced arthritis. *Fitoterapia* 69, 13–19.
- Hirotsu, M., Nagashima, S., Yoshikawa, T., 1998. Baicalin and Baicalein Productions of Cultured *Scutellaria baicalensis* Cells. *Nat Med.*, 52, 440-443.
- Horie, T., Ohtsuru, Y., Shibata, K., Yamashita, K., Tsukayama, M., Kawamuka, Y., 1998. ¹³C NMR spectral assignment of the A-ring of polyoxygenated flavones. *Phytochemistry*, 47, 865-874.
- Hosokawa, K., Minami, M., Kawahara, K., Nakamura, I., Shibata, T., 2000. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. *Planta Med.*, 66, 270-272.
- Huang W., Chien P., Yang C., Lee A., 2003. Novel Synthesis of Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chem Pharm Bull.*, 51, 339-340.
- Jácome, R.L.R.P., Oliveira, A.B., 2004. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC. ("pau-pereira"). *Quim. Nova*, 27, 897-900.

- Kim, D., Jeon, S., Son, K., Jung, J.W., Lee, S., Yoon, B., Lee, J., Cho, J., Cheong, J., Ko, K., Ryu, J., 2007. The ameliorating effect of oroxylin A on scopolamine-induced memory impairment in mice. *Neurobiol Learn Mem.*, 87, 536-546.
- Kim, D., Kim, S., Jeon, S., Son, K., Lee, S., Yoon, B.H., Cheong, J.H., Ko, K., Ryu, J., 2008. The effects of acute and repeated oroxylin A treatments on A β ₂₅₋₃₅-induced memory impairment in mice. *Neuropharmacol.*, 55, 639-647.
- Kondo, Y, Kondo, F., Asanuma, M., Ogawa, N., 2000. Protective Effect of Oren-gedoku-to Against Induction of Neuronal Death by Transient Cerebral Ischemia in the C57BL/6 Mouse. *Neurochem. Res.*, 25, 205- 209.
- Lee, J., Lee, S., Lee, K., Jang, H., Lee, K., Hahn, T., Paik, Y., 2004. Prolyl Endopeptidase Inhibitors from the Leaves of *Ginkgo biloba*. *Planta Med.*, 70, 1228-1230.
- Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., Meltzer, H.Y., 1995. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia: effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic drugs. *Psychiat Res.*, 58, 217-225.
- Maes, M., Goossens, F., Lin, A., Meester, I., Gastel, A.V., Scharpé, S., 1998. Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase iv activity in humans: higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety. *Psychoneuroendocrino*, 23, 485-495.
- Malikov, V.M., Yuldashev, M.P., 2002. Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. genus. Distribution, structure and properties. *Chem Nat Compd.*, 38, 358-406.
- Männistö, P.T., Venäläinen, J., Jalkanen, A., García-Horsman, J.A., 2007. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. *Drug News Perspect*, 20, 293-305.
- Preetha, S.P., Kannian, M., Selvakumar, E., Nagaraj, M., Varalakshmi, P., 2006. Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.*, 143, 333-339.
- Roehrl, M.H.A., Wang, J.Y., Wagner, G., 2004. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein - Protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* 43, 16056-16066.
- Shishido, Y., Furushiro, M., Tanabe, S., Shibata, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., 1999. Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *Eur J Pharmacol.*, 372, 135-142.

- Sudhahar, V., Veena, C.K., Varalakshmi, P., 2008. Antirolithic Effect of Lupeol and Lupeol Linoleate in Experimental Hyperoxaluria. *J. Nat. Prod.*, 71, 1509-1512.
- Sultanova, N., Makhmoo, T., Yasin, A., Abilov, Z.A., Omurkamzinova, V.B., Rahman, A., Choudhary, M.I., 2004. A new antioxidant and Prolyl Endopeptidase-Inhibiting triterpenoid from *Tamarix hispida*. *Planta Med.*, 70, 65-67.
- Sunitha, S., Nagaraj, M., Varalakshmi, P., 2001. Hepatoprotective effect of lupeol and lupeol linoleate on tissue antioxidant defence system in cadmium-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia* 72, 516–523.
- Tarragó, T., Frutos, S., Rodriguez-Mias, R.A., Giralt, E., 2006. Identification by F-19 NMR of traditional chinese medicinal plants possessing prolyl oligopeptidase inhibitory activity *ChemBioChem*, 7, 827-833.
- Tarragó, T., Kichik, N., Segui, J., Giralt, E., 2007. The Natural Product Berberine is a Human Prolyl Oligopeptidase Inhibitor. *ChemMedChem*, 2, 354-359.
- Tarragó, T., Knichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixidó, M., Giralt, E., 2008. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorg Med Chem.* 16, 7516–7524.
- Toide, K., Iwamoto, Y., Fujiwara, H., Abe, H., 1995. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 274, 1370-1378.
- Venäläinen, J.I., Juvonen, R.O., Garcia-Horsman, J.A., Wallén, E.A.A., Christiaans, J.A.M., Jarho, E.M., Gynther, J., Männistö, P.T., 2004. Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site. *Biochem J.*, 382, 1003-1008.

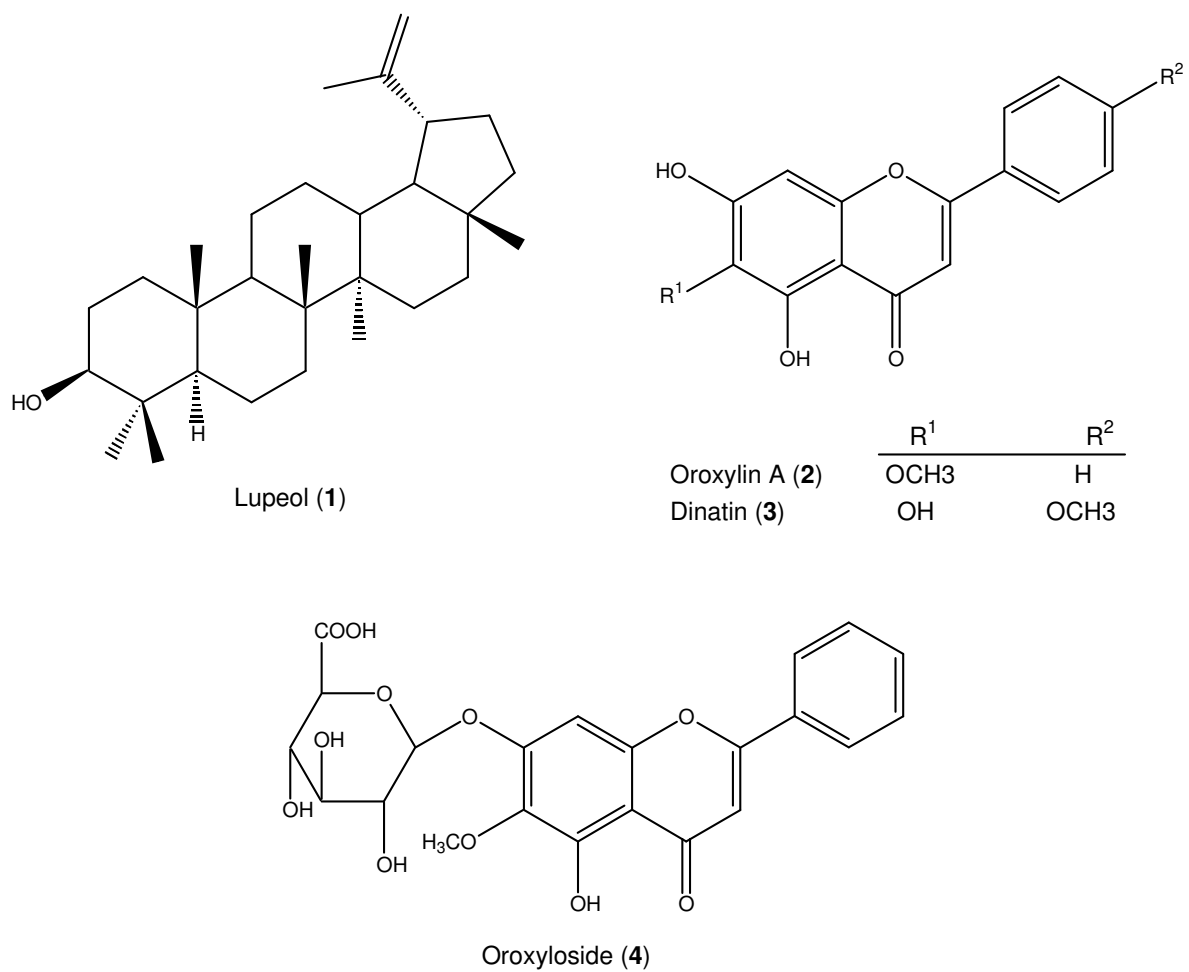


Figure 1. Structure of compounds 1-4 isolated from *S. racemosa* Pers.

Table 1. POP and DPP IV inhibition of ethyl acetate (AF) and *n*-butanol (BF) fractions from *Scutellaria racemosa* Pers

Sample	POP Inhibition IC ₅₀ (µg/mL)	DPP IV Inhibition (%)	
		80 µg/mL	5 µg/mL
AF	18.2	56	28
BF	30.3	38	0

Table 2. POP and DPP IV inhibition of compounds 1-4.

Sample	POP Inhibition (%)			DPP IV Inhibition (%)		
	10 nM	1 μM	100 μM	0,5 μM	50 μM	5 mM
Lupeol (1)	0	0	5	0	0	23
Oroxylin A (2)	0	0	20	0	0	0
Dinatin (3)	2	3	43	0	0	15
Oroxyloside (4)	0	0	34	0	0	12

4.2 Atividade antimicrobiana e avaliação da citotoxicidade da *Scutellaria racemosa* Pers no Brasil.

Artigo 2

Antimicrobial activity and evaluation of citotoxicity of *Scutellaria racemosa* Pers from Brazil

Micaela Rossato Marques, Caroline Stüker, Gabrielle Scapin,
Ademir Morel, Ionara Irion Dalcol

(Submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia)

**Antimicrobial activity and evaluation of citotoxicity of *Scutellaria racemosa*
Pers from Brazil**

Micaela R. Marques^{1,2}, Caroline Stüker², Gabrielle Scapin¹, Ademir Morel^{1,2}, Ionara I.

Dalcol^{1,2,*}

¹Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria. 97105-900. Santa Maria- RS, Brazil.

²Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. 97105-900. Santa Maria- RS, Brazil.

Resumo: “Atividade antimicrobiana e avaliação da citotoxicidade da *Scutellaria racemosa* Pers do Brasil”. A atividade antimicrobiana do extrato bruto, das frações *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa da *Scutellaria racemosa* Pers e do flavonóide isolado oroxilina A foram investigadas contra bactérias Gram (+), Gram (-) e fungos. As frações *n*-hexano e acetato de etila foram as mais ativas contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. A avaliação do extrato bruto e frações frente ao Teste de Letalidade com *Artemia salina* indicou que esta planta apresenta baixa toxicidade.

Unitermos: *Scutellaria racemosa* Pers, Labiatae, Atividade antimicrobiana, Teste de letalidade com *Artemia salina*.

Abstract: The antimicrobial activities of crude extract, *n*-hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol and aqueous fractions from *Scutellaria racemosa* Pers, and the isolated

flavonoid oroxylin A, was investigated against some Gram (+) and Gram (-) bacteria and yeasts. The *n*-hexane and ethyl acetate fractions were the most active fractions against *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The evaluation of the crude extract and fractions using the Brine Shrimp Lethality Test indicated that this plant exhibit low toxicity.

Keywords: *Scutellaria racemosa* Pers, Labiatae, Antimicrobial activity, Brine shrimp test.

*Corresponding author

Universidade Federal de Santa Maria - Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN,
Departamento de Química. Campus Camobi - CEP: 97105-900. Santa Maria, RS - Brazil

Tel.: +55-220-8869; Fax: + 55-220-8031; *e-mail address*: iidalcol@gmail.com

INTRODUCTION

The genus *Scutellaria* (Labiatae) is formed by approximately 350 species. Some of these are collectively known as “skullcap”, medicinal plants used popularly in Europe, the United States and eastern Asia. The roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi (*Scutellaria radix* in the Japanese pharmacopeia; common name “Baikal skullcap”) is used mainly in the traditional medicine in countries of the Asian east, China, Korea and Japan. *Scutellaria galericulata* L. and *Scutellaria lateriflora* L. are used as skullcap in the Europe and United States. However, it has difficulty to differentiate the aerial parts of two species for its morphology (Hosokawa et al., 2000). The aerial parts of skullcap are used as sedative, tonic for the nerves, antispasmodic (for treatment of epilepsy), sleeplessness, anxiety and as substitutes in chronic treatments with barbiturates and tranquillizers (Awad et al., 2003). In

Canada, skullcap is used as tonic or in combination with other medicinal plants, as the valeriana, in the induction of sleep (Hirotani et al., 1998; Nishikawa et al., 1999). *Scutellaria racemosa* is used in the folk medicine in South America as neurologically active plant (Bianchi, 2006). Only the North American native *S. racemosa* has been studied with regard to its antioxidant potential (Cole et al., 2008). In general, flavonoids are the principal class of compounds that has been isolated from several species of *Scutellaria* (Malikov and Yuldashev, 2002). Baicalein, wogonin and oroxylin A were isolated of *Scutellaria baicalensis* (Li and Chen, 2005), while oroxyloside and wogonoside were isolated of *Scutellaria phyllostachya* (Siddikov et al., 2007).

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms

Gram (+) bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Sa), *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 (Se), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Bs); Gram (-) bacteria: *Escherichia coli* ATCC 25792 (Ec), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Pa), *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031 (Kp) and Fungi: *Sacharomyces cerevisiae* ATCC 2601 (Sc), *Candida albicans* ATCC 10231(Ca).

Plant Material

Scutellaria racemosa Pers (Labiatae) was collected from Santa Maria, Rio Grande do Sul (Brazil) in October 2006, and authenticated by Prof. Dr. Thais Scotti do Canto-Dorow, Department of Botany, Universidade Federal de Santa Maria- RS, Brazil, where a specimen sample (n° 11461) is retained.

Extraction and isolation

The plant material (*Scutellaria racemosa* Pers) dried and pulverized was submitted to exhaustive extraction in a Soxhlet apparatus with methanol:water (1:2), affording the crude extract (EB; 21.97% yield). The EB was fractioned with solvents of different degrees of polarity, resulting in the *n*-hexane (FH; 5.81% yield), dichloromethane (FD; 4.75% yield), ethyl acetate (FA; 4.99% yield), *n*-butanol (FB; 5.61% yield) and aqueous (FAq; 21.85% yield) fractions.

The major constituent isolated from *Scutellaria racemosa* Pers was oroxylin A (**1**). Oroxylin A was present in the fractions *n*-hexane, ethyl acetate and *n*-butanol. The FH was subjected to column chromatography (CC) on silica gel, eluting with *n*-hexane, *n*-hexane:CH₂Cl₂ (2:8), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:MeOH (8:2), CH₂Cl₂:MeOH (1:1) and MeOH, and separated into six fractions (H1-H6).

Fraction H4 was chromatographed over silica gel, and eluted with *n*-hexane:CH₂Cl₂ (1:1), CH₂Cl₂, CH₂Cl₂:AcOEt (5:1), CH₂Cl₂:AcOEt (1:1), AcOEt, AcOEt:MeOH (1:1), MeOH to afford five fractions (H4a-H4e). Fraction H4c was recrystallized in MeOH. The supernatant was purified by CC using a solvents gradient of CH₂Cl₂:AcOEt (100:0 – 50:50), to afford a fraction that was purified in preparative TLC on silica gel (PTLC) using CH₂Cl₂:AcOEt (5:1) to give **1** (11 mg).

The FA was chromatographed over silica gel, and eluted with *n*-hexane:diethyl ether (100:0 – 0:100), diethyl ether:CH₂Cl₂ (75:25 – 0:100), CH₂Cl₂:AcOEt (75:25 – 0:100), AcOEt:MeOH (75:25 – 0:100), to afford nine fractions (A1-A9). Fraction A2 was purified by PTLC using CH₂Cl₂ as a mobile phase to give **1** (10 mg). Fraction A3 was subjected to CC on silica gel using a gradient of *n*-hexane:AcOEt (80:20 – 0:100) to afford three fractions (A3a-

A3c). Fraction A3b was dissolved in acetone and precipitated with water addition, obtaining **1** (10 mg).

The FB was subjected to CC on silica gel, using a gradient of CHCl_3 , CHCl_3 :MeOH (1:1), MeOH, MeOH:H₂O (1:1) and separated into three fractions (B1-B3). Fraction B1 was purified by PTLC using *n*-hexane:CH₂Cl₂:AcOEt (30:60:5), affording five fractions (B1a-B1e). Fraction B1a was **1** (10 mg).

Antimicrobial activity

The antimicrobial activity of samples was assayed using the bioautography methods in accordance with Hamburger and Hostettmann (1991). For assay, the samples were applied to plates of adequate paper to the chromatography in concentrations from 200 to 6,25 $\mu\text{g/mL}$. Mueller-Hinton agar medium (MHA-Merck) for bacteria and agar sabouraud medium for fungi was inoculated with microorganisms suspended in saline solution (10^5CFU/mL) and distributed over plates. Bacterium and yeast plates were incubated for 24 hours at 35-37°C and 72 hours at 25-27°C, respectively. Standard antibiotic chloramphenicol and nistatine were used to control the sensitivity of the microbial test. After incubation, the plates were stained with an aqueous solution of 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (TTC, 1mg/mL). The appearance of inhibition zones was used to demonstrate the lesser sample amount that inhibited microorganism growth. Samples were tested in triplicate.

The determination of the MIC by microdilution method, described by NCCLS modified (Hamburger and Fuchs, 1970) was carried out in plates of culture of 96 microwells, where the samples were successively diluted (initiating em 500 $\mu\text{g/mL}$) in liquid medium. The plates were incubated by 24 hours 35-37°C for bacteria and by 48 hours 25-27°C for fungi. After the period of incubation the microbial growth was observed, determining the MIC. The inoculates

on the plates with the cultures without turbation in the MIC were used determine it Minimal Bactericide Concentration (MBC) or Minimal Fungicide Concentration (MFC). The tests were made in triplicate and the control in blank and for the inocule was effectuated to each sample.

Brine Shrimp Lethality Test (BST)

The lethality test was adapted from the method described by Colegate and Molyneaux (1993). Brine shrimp eggs were incubated in a hatching chamber in artificial sea water (3.8 g sea salt per liter of water) at 25- 30 °C and pH 7.0. After 48 h, the shrimp larvae had reached sufficient maturity for experimental bioassays. Ten shrimp larvae were extracted and counted using a Pasteur pipette. They were then placed in 96-well microplates, where soon after the EB and fractions of *S. racemosa* Pers were applied. The samples to be tested were dissolved in DMSO: saline solution 0.8% (1:1) in concentrations from 1440 to 7.5 µg/mL. Immediately after, the microwells were filled with 0.8% saline solution. Survivors were counted after 24 h at room temperature, and the LC₅₀ values were determined by linear regression. The analyses were performed in triplicate. We used 0.8% saline solution and DMSO as a negative control (LC₅₀>1000 µg/mL), while potassium dichromate (LC₅₀= 20 µg/mL) was used as a standard positive control.

Results and Discussion

The crude extract and fractions of *Scutellaria racemosa* Pers were subjected to qualitative chemical screening for the identification of the major classes of chemical constituents (Moreira, 1979; Evans and Trease, 1989; Asongalem et al., 2004; Ayoola et al.,

2008). Table 1 reports the results obtained, being that the flavonoids are the predominant class in this plant.

The antimicrobial activities of *Scutellaria racemosa* Pers crude extract, fractions and compound **1** were evaluated using the bioautography and the minimal concentration inhibitory (MIC) by microdilution (Gressler et al., 2008) against of the Gram (+) bacteria, Gram (-) bacteria and fungi, reported in Table 2 and 3. The *n*-hexane and ethyl acetate fractions were the most active fractions against *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*.

The crude extract and fractions of this plant has been submitted to the lethality test using *Artemia salina* to evaluate the general toxicity (Pereira and Castro, 2007). In accordance with the classification based on LC₅₀ levels used by Pereira and Castro (2007), no toxic effects were observed by the EB (LC₅₀ = 420.08 µg/mL), FH (LC₅₀ = 537.64 µg/mL), FD (LC₅₀ = 296.35 µg/mL), FA (LC₅₀ = 543.12 µg/mL), FB (LC₅₀ = 531.42 µg/mL) and FAq (LC₅₀ = 2398.49 µg/mL). Potassium dichromate (LC₅₀= 15.26 µg/mL) was used as a standard positive control.

Compound **1** was obtained as yellow solid. Mp 202-204°C; lit.mp 203-204°C (Huang et al., 2003). Reverse phase HPLC: linear gradient from 0 to 100% MeCN in 8 min using a Sun Fire C18 column (100 x 4.6 mm, 3.5 µm, Waters). *t*R: 7.33 min (confirmed by HPLC-MS). Mass spectrometry (MALDI-TOF): 285.1 Da. Further identification on the basis by ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, COSY, HMQC spectral data and by comparison of spectral values reported in the literature allowed us to identify **1** as oroxylin A (5,7-dihydroxy-6-methoxyflavone).

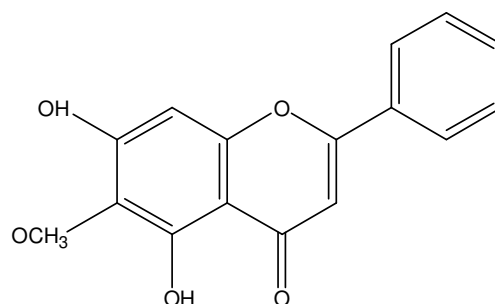
Fig. 1. Structure of **1**.

Table 1. Phytochemical screening of the crude extract and fractions of *Scutellaria racemosa* Pers.

Class of compounds	EB	FH	FD	FA	FB	FAq
Flavonoids	+++	±	+++	+++	+++	+++
Terpenoids/sterols	+	+++	+++	-	-	-
Alkaloids	-	-	-	-	-	-
Aminogroups	-	-	-	-	++	++
Organic acids	-	-	-	+	+	++
Coumarines	++	-	-	++	++	-

+++ = Abundant; ++ = moderately presence; + = present; ± = weakly present; - = absent

Table 2. Bioautography assay (μg) of crude extract (EB), *n*-hexane (FH), dichloromethane (FD), ethyl acetate (FA), *n*-butanol (FB) and aqueous (FAq) fractions of *Scutellaria racemosa* Pers^{a, b}.

Sample	Se	Bs	Ec	Pa	Kp	Sc	Ca
EB	NA	NA	NA	NA	50	NA	NA
FH	50	50	25	50	50	NA	NA

FD	200	200	100	NA	50	NA	NA
FA	50	12.5	12.5	6.25	12.5	50	NA
FB	NA	NA	NA	NA	100	NA	NA
FAq	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Control	0.7	0.8	0.5	0.6	0.5	3.24	2.43

^a NA: not active

^b Standard antibiotic chloramphenicol for bacteria and nistatine for fungi.

Table 3. Minimal Concentration Inhibitory (MIC) ($\mu\text{g/mL}$) and Minimal Lethal Concentration (MLC) ($\mu\text{g/mL}$) of the crude extract (EB), *n*-hexane (FH), dichloromethane (FD), ethyl acetate (FA), *n*-butanol (FB) and aqueous (FAq) fractions and the compound oroxylin A (**1**) of the *Scutellaria racemosa* Pers^{a,b}.

<i>Sample</i>		<i>Sa</i>	<i>Se</i>	<i>Bs</i>	<i>Ec</i>	<i>Pa</i>	<i>Kp</i>	<i>Sc</i>	<i>Ca</i>
EB	MIC	> 500	500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	MLC	NA	> 500	> 500	NA	NA	NA	NA	NA
FH	MIC	> 500	125	250	> 500	500	> 500	> 500	> 500
	MLC	NA	> 500	> 500	NA	> 500	NA	NA	NA
FD	MIC	500	500	500	500	500	> 500	> 500	> 500
	MLC	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	NA	NA	NA
FA	MIC	500	125	250	500	250	> 500	> 500	> 500
	MLC	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	NA	NA	NA
FB	MIC	500	> 500	> 500	> 500	250	500	> 500	> 500
	MLC	> 500	NA	NA	NA	500	500	NA	NA

FAq	MIC	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	MLC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1	MIC	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200
	MLC	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Control	MIC	3.12	1.56	1.56	1.56	3.12	3.12	5.15	5.15

^a NA: not active

^b Standard antibiotic chloramphenicol for bacteria and nistatine for fungi.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by CAPES and FIPE (CCNE- Universidade Federal de Santa Maria).

REFERENCES

- Asongalem EA, Foyet HS, Ekobo S, Dimo T, Kamtchouing P 2004. Antiinflammatory, lack of central analgesia and antipyretic properties of *Acanthus montanus* (Ness) T. Anderson. *J Ethnopharmacol* 95: 63-68.
- Awad R, Arnas JT, Trudeau V, Bergeron C, Budzinski JW, Foster BC, et al. 2003. Phytochemical and biological analysis of Skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): A medicinal plant with anxiolytic properties. *Phytomedicine* 10: 640-649.
- Ayoola GA, Coker HAB, Adesegun SA, Adepoju-Bello AA, Obaweya K, Ezennia EC, Atangbayila TO 2008. Phytochemical Screening and Antioxidant Activities of Some Selected Medicinal Plants Used for Malaria Therapy in Southwestern Nigeria. *Trop J Pharm Res* 7, 1019-1024.

- Bianchi A., 2006. Annual Meeting for the Instruction of Acupuncture and Reflexology, Torino.
- Cole IB, Cao J, Alan AR, Saxena PK, Murch SJ 2008. Comparisons of *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* and *Scutellaria racemosa*: genome size, antioxidant potential and phytochemistry. *Planta Med* 74: 474-481.
- Evans WC, Trease GE 1989. *Pharmacognosy*, 13th ed. Bailliere Tindall, London.
- Gressler V, Stüker CZ, Dias GO, Dalcol II, Burrow RA, Schmidt J, Wessjohann L, Morel AF 2008. Quinolone alkaloids from *Waltheria douradinha*. *Phytochemistry* 69, 994-999.
- Hirotsani M, Nagashima S, Yoshikawa T 1998. Baicalin and Baicalein productions of cultured *Scutellaria baicalensis*. *Nat Med* 52: 440-443.
- Hosokawa K, Minami M, Kawahara K, Nakamura I, Shibata T 2000. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. *Planta Med* 66: 270-272.
- Huang W, Chien P, Yang C, Lee A 2003. Novel Synthesis of Flavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *Chem Pharm Bull* 51: 339-340.
- Li HB, Chen F 2005. Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 1074: 107-110.
- Malikov VM, Yuldashev MP 2002. Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. genus. Distribution, structure and properties. *Chem Nat Compd* 38: 358-406.
- Moreira, EA 1979. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeladii* R.Braga. *Campanulaceae. Trib Farm* 47: 13-34.
- Nishikawa K, Furukawa H, Fujioka T, Fujii H, Mihashi K, Shimomura K, et al 1999. Phenolics in tissue cultures of *Scutellaria*. *Nat Med* 53: 209-213.
- Pereira AC, Castro DL 2007. Prospecção fitoquímica e potencial citotóxico de *Unxia kubitzkii* H. Rob. (Asteraceae – Heliantheae). *Rev Bras Biocienc* 5: 231-233.

Siddikov GU, Yuldashev MP, Abdullaev SV 2007. Flavonoids from *Scutellaria phyllostachya* roots. Chem Nat Compd 43, 324-325.

4.3 Atividade enzimática e citotóxica da *Pfaffia tuberosa* Spreng no Brasil.

Artigo 3

Enzymatic and cytotoxic activities of *Pfaffia tuberosa* Spreng from Brazil

Micaela Rossato Marques, Gabrielle Scapin, Nessim Kichik, Teresa Tarragó, Ernest Giralt, Ademir Morel, Ionara Irion Dalcol

(Submetido à Journal of Ethnopharmacology)

Enzymatic and cytotoxic activities of *Pfaffia tuberosa* Spreng from Brazil

Micaela R. Marques^a, Gabrielle Scapin^a, Nessim Kichik^b, Teresa Tarragó^b, Ernest Giralt^b, Ademir Morel^{a,c}, Ionara I. Dalcol^{a,c,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria. 97105-900. Santa Maria- RS, Brazil

^b Institute for Research in Biomedicine. Barcelona Science Park. E-08028. Barcelona, Spain

^c Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. 97105-900. Santa Maria- RS, Brazil

*Corresponding author

Universidade Federal de Santa Maria - Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN, Departamento de Química. Campus Camobi - CEP: 97105-900. Santa Maria, RS - Brazil

Tel.: +55-220-8869; Fax: + 55-220-8031; e-mail address: iidalcol@gmail.com

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Pfaffia tuberosa* Spreng (Amaranthaceae) is a medicinal plant used in Brazil to increase resistance to stress and to treat infertility. There are no reports on the enzymatic activity of *P. tuberosa* Spreng from Brazil.

Aim of the study: To examine the toxic effects of *Pfaffia tuberosa*, and its inhibitory activity on the enzymes prolyl oligopeptidase (POP), dipeptidyl peptidase-IV (DPP IV) and acetylcholinesterase (AChE).

Material and methods: The following activities of dichloromethane (FD), ethyl acetate (FA), and *n*-butanol (FB) fractions from *Pfaffia tuberosa* Spreng were studied: toxic effect by the brine shrimp lethality test (BST), inhibitory activity of POP, DPP IV and AChE.

Results: The BST indicated that this plant does not present toxic effects. FD and FA showed IC₅₀ against POP of 21.4 and 28.5 µg/mL, respectively, and significant inhibition of AChE at 25- 6.25 µg. FD, FA and FB showed low inhibitory activity against DPP IV.

Conclusions: *P. tuberosa* Spreng, mainly the fractions FD and FA, showed high inhibitory activity against POP, and considerable FA inhibition of AChE. In contrast, the activity against DPP IV was not significant.

Keywords: *Pfaffia tuberosa*, brine shrimp test, prolyl oligopeptidase, dipeptidyl peptidase IV, acetylcholinesterase

1. Introduction

Currently, approximately 90 species of *Pfaffia* (Amaranthaceae) are known in Central and South America. In Brazil, only 27 species are well described (Taniguchi et al., 1997), as differentiation of the species is complex. Various *Pfaffia* species, such as *P. glomerata*, *P. tuberosa*, and *P. paniculata*, are used in folk medicine as stimulants (Magalhães, 2002), aphrodisiacs, anti-rheumatics, anti-inflammatories, analgesics, and in treatment of diabetes (Neto et al., 2005). Previous phytochemical studies on species of this genus have revealed the presence of oleanolic acid, ecdysterone, triterpenoids and nortriterpenoids, and mainly ecdysteroid glycosides (Shiobara et al., 1993). *Pfaffia tuberosa* Spreng is known popularly as “corango-de-batata” and is traditionally used by the local population for the treatment of stress and infertility (Flores et al., 2006). Like several species of the genus, *P. tuberosa* Spreng is also called “Brazilian ginseng”, because its roots are morphologically similar to those of “Korean ginseng”, *Panax ginseng* C.A. Meyer (Nishimoto et al., 1988; Shiobara et al., 1993). *P. ginseng* is widely used in folk medicine to treat type II diabetes and sexual dysfunction, and also as a stimulant and aphrodisiac. A study by Su et al. (2007) showed that the extract of *P. ginseng* roots increases the release of acetylcholine from nerve terminals in rats, thereby stimulating muscarinic M₃ receptor activity located in pancreatic cells for the secretion of insulin, which in turn lowers plasma glucose. These observations suggest that *P. ginseng* has therapeutic value in the treatment of diabetic disorders. This medicinal plant is used also as a cerebral stimulant. In an experiment on rats, Petkov et al. (2003) verified that the extract from ginseng roots in combination with *Ginkgo biloba* improved the retention of learned behaviour and enhanced memory. This observation demonstrates the cognition-enhancing effects of these plants and suggests that *P. ginseng* may also provide a potential treatment for cerebral insufficiency, including Alzheimer’s disease (AD).

AD is characterized by a loss of memory and cognition as well as disturbances in higher cortical functions as a result of the massive loss of cholinergic neurons. Arginine-vasopressin (AVP) and thyrotrophin-releasing hormone (TRH) are neuropeptides that exert potent promnesic effects and promote cholinergic neurotransmission in the rat hippocampus. The treatment of cognitive decline in patients with AD currently consists of increasing cholinergic neurotransmission by inhibiting acetylcholinesterase (AChE) activity. AChE is the peptidase responsible for the hydrolysis of acetylcholine, thereby causing a reduction of its levels (Houghton et al., 2006). Studies on medicinal

plants used to treat amnesia and AD have shown that they exert a potent inhibitory effect on AChE activity (Barbosa et al., 2006).

Another peptidase that may be involved in the catabolism of AVP and TRH is prolyl oligopeptidase (POP), a serine protease highly expressed in brain that hydrolyses peptide bonds at the carboxyl terminal of prolyl residues (Shishido et al., 1996; Bellemère et al., 2005). Studies into the features of POP have indicated that this enzyme participates in several aspects of central nervous system (CNS) function. There is evidence that depression, anxiety and schizophrenia are associated with a significant increase in the serum activity of POP (Maes et al., 1995; Maes et al., 1998; Breen et al., 2004; Roehrl et al., 2004; Venäläinen et al., 2004). Furthermore, like AChE, it has been suggested that POP is involved in the neurodegenerative processes that characterize AD (Männistö et al., 2007). Several potent and selective POP inhibitors, such as Z-Pro-Prolinal and S-17092-1, have been proposed for potential use in the prevention and treatment of neurological diseases (Shishido et al., 1999; Bellemère et al., 2005). However, to date, few studies have addressed POP inhibitors derived from medicinal plants (Lee et al., 2004, Sultanova et al., 2004, Tarragó et al., 2006, Tarragó et al., 2007).

Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) belongs to the same family of serine proteases as POP. Therapeutically, DPP IV is a key target in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) since it inactivates glucagon-like peptide-1 (GLP-1), a hormone that stimulates insulin secretion in a glucose-dependent manner. DPP IV inhibitors have attracted attention as potential drugs for use in the treatment of this disease because they prevent the degradation of GLP-1 and extend its duration of action (McIntosh et al., 2006). Indeed, a large number of DPP IV inhibitors are described in the literature, many of which are shaped like dipeptides, containing a nitrogen and a proline mimic (Fukushima et al., 2004), while others are related to xanthines, including purine, imidazole and pyridine analogs (Kurukulasuriya et al., 2006). Despite their low amino acid sequence homology, POP and DPP IV share similar three-dimensional structures. Thus, selectivity is highly relevant in the discovery of new inhibitors since these enzymes are involved in different types of illnesses and show distinct mechanisms of action.

Given the enzymatic activities of *P. ginseng*, its morphological similarity to *Pfaffia*, and the various popular uses of the “Brazilian ginseng” species, here we evaluated the capacity of the

hydroalcoholic extract of *Pfaffia tuberosa*, a “Brazilian ginseng” used by people in South Brazil to treat diabetes and to stimulate the brain, to inhibit AChE, POP and DPP IV.

2. Materials and Methods

2.1 Plant Material

The material was collected in October 2006 in Santa Maria, state of Rio Grande do Sul, Brazil. *P. tuberosa* Spreng (Amaranthaceae) was identified by Dr. Thais Scotti do Canto-Dorow and deposited in the herbarium (n^o. 11616) of the “*Universidade Federal de Santa Maria*”, Santa Maria-RS, Brazil.

2.2 Extraction and fractionation

Roots of *Pfaffia tuberosa* Spreng were removed from whole plants and dried at 40 °C. The dried material (129 g) was submitted to exhaustive extraction in a Soxhlet apparatus with methanol:water (1:2), affording 30.2 g of crude extract (EB). The EB was fractioned with solvents of different degrees of polarity, thereby resulting in *n*-hexane (discarded for having an amount < 2 mg), dichloromethane (FD; 0.46%), ethyl acetate (FA; 0.38%), *n*-butanol (FB; 1.13%) and aqueous (FAq; 20%) fractions.

2.3 Brine Shrimp Lethality Test (BST)

The lethality test was adapted from the method described by Colegate and Molyneaux (1993). Brine shrimp eggs were incubated in a hatching chamber in artificial sea water (3.8 g sea salt per liter of water) at 25- 30 °C and pH 7.0. After 48 h, the shrimp larvae had reached sufficient maturity for experimental bioassays. Ten shrimp larvae were extracted and counted using a Pasteur pipette. They were then placed in 96-well microplates, where soon after the EB and fractions of *P. tuberosa* Spreng were applied. The samples to be tested were dissolved in DMSO: saline solution 0.8% (1:1) in concentrations from 1440 to 7.5 µg/mL. Immediately after, the microwells were filled with 0.8% saline solution. Survivors were counted after 24 h at room temperature, and the LC₅₀ values were determined by linear regression. The analyses were performed in triplicate. We used 0.8% saline

solution and DMSO as a negative control ($LC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$), while potassium dichromate ($LC_{50} = 20 \mu\text{g/mL}$) was used as a standard positive control.

2.4. POP activity assay using ZGP-AMC

POP activity was determined following the method described by Toide et al. (1995). The reactions were performed in 96-well microplates, which allowed the simultaneous monitoring of multiple reactions. For each reaction, activity buffer (131 μl , 100 mM of Na/K phosphate buffer, pH 8.0) was pre-incubated for 15 min at 37 °C with POP (7 nM) and with the corresponding extract solution (3 μl). Stock solutions of fractions at 5 mg/mL were prepared in DMSO and dilutions were prepared from the each stock with DMSO. A control with the same DMSO concentration was performed. After pre-incubation, ZGP-AMC (10 μl , 3 mM in 40 % of 1,4-dioxane) was added and the reaction was incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped with sodium acetate (150 μl , 1M, pH 4) and the formation of AMC was measured fluorometrically. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC_{50} value was defined as the concentration of fraction required to inhibit 50 % of POP activity.

2.5 DPP IV using GP-AMC

DPP IV activity was determined following the method described by Checler et al. (1985). The reactions were performed in a 96-well microplate. For each well, the reaction mixture contained activity buffer (131 μl , 100 mM Na/K phosphate buffer, pH 8.0), 0.7 nM DPP IV, and 3 μl of the corresponding solution (in DMSO). After pre-incubation (15 min at 37 °C), GP-AMC (10 μl , 3 mM in 40 % 1,4-dioxane) was added, and the reaction was incubated for 1 h at 37°C. Finally, the reaction was stopped with sodium acetate (150 μl , 1 M, pH 4) and the formation of AMC was measured fluorimetrically. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC_{50} value was defined as the concentration of compound required to inhibit 50 % of DPP IV activity.

2.6 AChE bioautography

The bioautography assay in TLC plates was adapted from Marston and Hostettmann (2002). A stock solution of AChE (250 U) dissolved in 37.5 mL of Tris-hydrochloric acid buffer at pH 7.8 with 37.5 mg of bovine serum albumin was kept at 4°C. Before the sample applications, chromatographic plates were eluted with acetone to wash them, and were thoroughly dried before use. The samples were previously dissolved in *n*-hexane, MeOH or MeOH:H₂O (1:1), in function of their solubility. Each sample was applied in concentrations of 50 µg, 25 µg, 12.5 µg, or 6.25 µg. After migration of the samples in an appropriate solvent system, the TLC plates were dried for complete solvent removal, ensuring that temperature did not exceed 40°C. The plates were then sprayed with enzyme stock solution and thoroughly dried again. They were incubated in humid atmosphere for 20 min at 37 °C and revealed with a fresh solution of 12.5 mg of 1-naphthyl acetate in 5 mL of ethanol and 50 mg of Fast Blue B salt in 20 mL of water. After 1- 2 min a purple stain appeared in the plates.

3. Results and discussion

Here we selected the plants for the screening following an ethnopharmacology approach. This led to the selection of the *P. tuberosa* as a result of its use as “Brazilian ginseng” in folk medicine. The EB and fractions of *P. tuberosa* Spreng were submitted to the lethality test using *Artemia salina* to evaluate general toxicity, and presented LC₅₀ = 573.4 µg/mL for the EB, LC₅₀ = 964.5 µg/mL for the FD, LC₅₀ = 584.2 µg/mL for the FA, LC₅₀ = 569.7 µg/mL for the FB and LC₅₀ = 774.7 µg/mL for the FAq. The BST revealed that the plant was not toxic, in accordance with the classification based on LC₅₀ levels used by Pereira and Castro (2007), where LC₅₀ < 250 µg/mL is considered highly toxic, LC₅₀ between 80 and 250 µg/mL is moderately toxic and LC₅₀ > 250 µg/mL presents low toxicity or is not toxic.

The results of the phytochemical screening revealed the predominant presence of anthocyanidins, coumarines, steroids and triterpenoids in the extract and fractions of *P. tuberosa* Spreng. Steroids and triterpenoids were present in the FD, FA, and FB fractions. In addition, FD showed a strong presence of coumarines. In the FA fraction, coumarines and anthocyanidins were also found, while the FB fraction was characterized, beyond steroids and triterpenoids, by anthocyanidins. FD, FA and FB presented relevant results for POP inhibition (Figure 1), but not exceptional activity against DPP IV (Table 1). Among the fractions tested, FD and FA demonstrated

the most potent POP inhibitory activity in a dose-dependent manner, with IC_{50} values of 21.4 and 28.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. To date, few POP inhibitors have been isolated from natural sources, among these berberine, alkaloid from *Rhizoma coptidis* extract (Tarragó et al., 2007), the flavonoid baicalin from *Scutellaria baicalensis* roots, (Tarragó et al., 2008), 6-(8'-Z-pentadecenyl) salicylic acid and 6-(10'-Z-heptadecenyl)-salicylic acid from *Ginkgo biloba* leaves (Lee et al., 2004), the triterpene 3α -(3'',4''-dihydroxy-*trans*-cinnamoyloxy)_D-friedoolean-14-en-28-oic acid and the flavonols rhamnocitrin and isorhamnetin from *Tamarix hispida* Willd (Sultanova et al., 2004). Peptides that inhibit POP have also been isolated from several fish species and cheeses (Sorensen et al., 2004), and the peptides Val-Glu-Ile-Pro-Glu and Tyr-Pro-Ile-Pro-Phe, which inhibit POP, have been isolated from red wine (Yanai et al., 2003). On the basis of our results and the information on natural inhibitors of POP described above, we propose that the compounds oleanolic acid, ecdysterone, triterpenoids and nortriterpenoids, and ecdysteroid glycosides, identified in previous phytochemical studies on several species of the genus *Pfaffia*, play a relevant role in the selective inhibition of the POP. The active fractions of *P. tuberosa* Spreng against POP are currently being separated in our laboratory to determine the compounds with POP inhibitory action.

Given that several natural compounds isolated from medicinal plants inhibit AChE (Barbosa Filho et al., 2006), we also studied the capacity of the EB and FD, FA and FB fractions of *P. tuberosa* Spreng against AChE (Table 1). In the TLC plate area, only FA and FB showed AChE inhibition, until 6.25 and 25 μg , respectively. On analysing the phytochemical screening of these fractions, we deduced that anthocyanidins are most probably the class of compounds responsible for the AChE inhibitory activity of *P. tuberosa* Spreng. The bio-guided fractionation of FA and FB to identify the AChE inhibitors is also underway in our laboratory.

In summary, our results suggest that the medicinal plant *P. tuberosa* Spreng is a promising source of compounds that inhibit POP and AChE. The FD and FA fractions showed high inhibitory activity against POP in a dose-dependent manner. Also, the bioautographic screening assay for AChE inhibitory activity allowed the identification of the fractions with active compounds against this enzyme, thereby allowing an easy bio-guided isolation of the AChE inhibitor components. Inhibition of AChE and POP may be considered a therapeutic approach for neurological disorders such as Alzheimer's disease, schizophrenia and bipolar affective disorder. Further work is under progress to isolate and characterize active compounds against POP and AChE from *P. tuberosa* Spreng extract.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr^a. T. Canto-Durrow for the technical support. This study was supported by *CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Ministério da Educação do Brasil)* and *MECD- Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España*.

References

Barbosa Filho, J., Medeiros, K.C., Diniz, M.F., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., da-Cunha, E.V., Almeida, J., Quintans-Junior, L. 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16, 258-285.

Bellemère, G., Vaudry, H., P. Morain, P., Jegou, S., 2005. Effect of Prolyl Endopeptidase Inhibition on Arginine-Vasopressin and Thyrotrophin-Releasing Hormone Catabolism in the Rat Brain. *Journal of Neuroendocrinology* 17, 306–313.

Breen, G., Harwood, A.J., Gregory, K., Sinclair, M., Collier, D., Clair, D.S., Williams, R.S.B., 2004. Two peptidase activities decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients. *Bipolar Disorders* 6, 156-161.

Checler, F., Vincent, J. P., Kitabgi, P., 1985. Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg⁸-Arg⁹ peptide bond by a metalloendopeptidase. *The Journal of Neuroscience* 45, 1509-1513.

Colegate, S.M., Molyneaux, R.J., 1993. *Bioactive Natural Products: detection, isolation and structural determination*. [S.I.]: CRC Press, pp. 507.

Flores, R., Maldaner, J., Nicoloso, F.T., 2006. Otimização da micropropagação de *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. *Ciência Rural* 36, 845-851.

Fukushima, H., Hiratate, A., Takahashi M., Saito M., Munetomo E., Kitano K., Saito H., Takaoka Y., Yamamoto K., 2004. Synthesis and structure–activity relationships of potent 3- or 4-substituted-2-cyanopyrrolidine dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 12, 6053-6061.

Hamburger, A.L., Fuchs, A., 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* 51, 327-329.

Hamburger, M.O., Hostettmann, K., 1991. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* 30, 3864-3874.

Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology* 86, 985-990.

Houghton, P.J., Ren, Y., Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Products Reports* 23, 181-199.

Kurukulasuriya, R., Rohde J.J., Szczepankiewicz, B.G., Basha, F., Lai, C., Jae, H., Winn, M., Stewart, K.D., Longenecker, K.L., Lubben, T.W., Ballaron, S.J., Sham, H., Von Geldern, T., 2006. Xanthine mimetics as potent dipeptidyl peptidase IV inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 16, 6226-6230.

Lee, J., Lee, S., Lee, K., Jang, H., Lee, K., Hahn, T., Paik, Y., 2004. Prolyl endopeptidase inhibitors from the leaves of *Ginkgo biloba*. *Planta Medica* 70, 1228-1230.

Maes, M., Goossens, F., Scharpé, S., Calabrese, J., Desnyder, R., Meltzer, H.Y., 1995. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia - effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic-drugs. *Psychiatry Research* 58, 217-225.

Maes, M., Goossens, F., Lin, A., Meester, I., Gastel, A.V., Scharpé, S., 1998. Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: Higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety. *Psychoneuroendocrinology* 23, 485-495.

Magalhães, P.M., 2002. *Agrotecnologia para o cultivo da Pfaffia*. Campinas: CPQBA-UNICAMP.

Männistö, P.T., Venäläinen, J., Jalkanen, A., García-Horsman, J.A., 2007. Prolyl Oligopeptidase: A Potential Target for the Treatment of Cognitive Disorders. *Drug News Perspect* 20, 293-305.

Marston, A., Hostettmann, K., 2002. A rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochemical Analysis* 13, 51-54.

McIntosh, C.H., Demuth, H., Kim, S., Pospisilik, J.A., Pederson, R., 2006. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 38, 860-872.

Neto, A.G., Costa, J.M.L.C., Belati, C.C., Vinhólis, A.H.C., Possebom, L.S., Silva, A.A., Cunha, W.R.F., Carvalho, J.C.T., Bastos, J.K., Silva, M.L.A., 2005. Analgesic and anti-inflammatory activity of crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 87–91.

Nishimoto, N., Shiobara, Y., Inoue, S.-S., Fujino, M., Takemoto, T., Yeoh, C.L., Oliveira, F., Akisue, G., Akisue, M.K., Hashimoto, G., 1988. Three ecdysteroid glycosides from *Pffafia iresinoides*. *Phytochemistry* 27, 1665-1668.

Pereira, A.C., Castro, D.L., 2007. Prospecção Fitoquímica e Potencial Citotóxico de *Unxia kubitzkii* H.Rob. (Asteraceae-Heliantheae). *Revista Brasileira de Biociências* 5, 231-233.

Petkov, V.D., Belcheva, S., Petkov, V.V., 2003. Behavioral Effects of *Ginkgo biloba* L., *Panax ginseng* C.A. Mey. and Gincosan. *The American Journal of Chinese Medicine* 31, 841–855.

Roehrl, M.H.A., Wang, J.Y., Wagner, G., 2004. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein - Protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* 43, 16056-16066.

Shiobara, Y., Inoue, S.-S., Kato, K., Nishiguchi, Y., Oishi, Y., Nishimoto, N., Oliveira, F., Akisue, G., Akisue, M.K., Hashimoto, G., 1993. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. *Phytochemistry* 32, 1527–1530.

Shishido, Y., Furushiro, M., Tanabe, S., Shibata, S., Hashimoto, S., Yokokura, T., 1999. Effects of prolyl endopeptidase inhibitors and neuropeptides on delayed neuronal death in rats. *European Journal of Pharmacology* 372, 135-142.

Sorensen, R., Kildal, E., Stepaniak, L., Pripp, H., Sorhaug, T., 2004. Screening for peptides from fish and cheese inhibitory to prolyl endopeptidase. *Nahrung* 48, 53-6.

Su, C., Cheng, J., Liu, I., 2007. Increase of acetylcholine release by *Panax ginseng* root enhances insulin secretion in Wistar rats. *Neuroscience Letters* 412, 101–104.

Sultanova, N., Makhmoo, T., Yasin, A., Abilov, Z.A., Omurkamzinova, V.B., Rahman, A., Choudhary, M.I., 2004. Isotamarixen- A new antioxidant and prolyl endopeptidase-inhibiting triterpenoid from *Tamarix hispida*. *Planta medica* 70, 65-67.

Taniguchi, S.F., Bersani-Amado, C.A., Sudo, L.S., Assef, S.M.C., Oga, S., 1997. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. *Phytotherapy Research* 11, 568–571.

Tarragó, T., Frutos, S., Rodríguez-Mias, R.A., Giralt, E., 2006. Identification by F-19 NMR of traditional chinese medicinal plants possessing prolyl oligopeptidase inhibitory activity. *ChemBioChem* 7, 827-833.

Tarragó, T., Kichik, N., Segui, J., Giralt, E., 2007. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem* 2, 354-359.

Tarragó, T., Knichik, N., Claasen, B., Prades, R., Teixidó, M., Giralt, E., 2008. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 16, 7516–7524.

Toide, K., Iwamoto, Y., Fujiwara, H., Abe, H., 1995. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 274, 1370-1378.

Yanai, T., Suzuki, Y., Sato, M., 2003. Prolyl endopeptidase inhibitory peptides in wine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 67, 380-382.

Yoshimoto, T., Sattar, A.K.M.A., Hirose, W., Tsuru, D., 1988. Studies on Prolyl Endopeptidase from *Shakashimeji (Lyophyllum cinerascens)*: Purification and Enzymatic Properties. *Journal of Biochemistry* 104, 622-627.

Venäläinen, J.I., Juvonen, R.O., Garcia-Horsman, J.A., Wallén, E.A.A., Christiaans, J.A.M., Jarho, E.M., Gynther, J., Männistö, P.T., 2004. Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site. *Biochemical Journal* 382, 1003-1008.

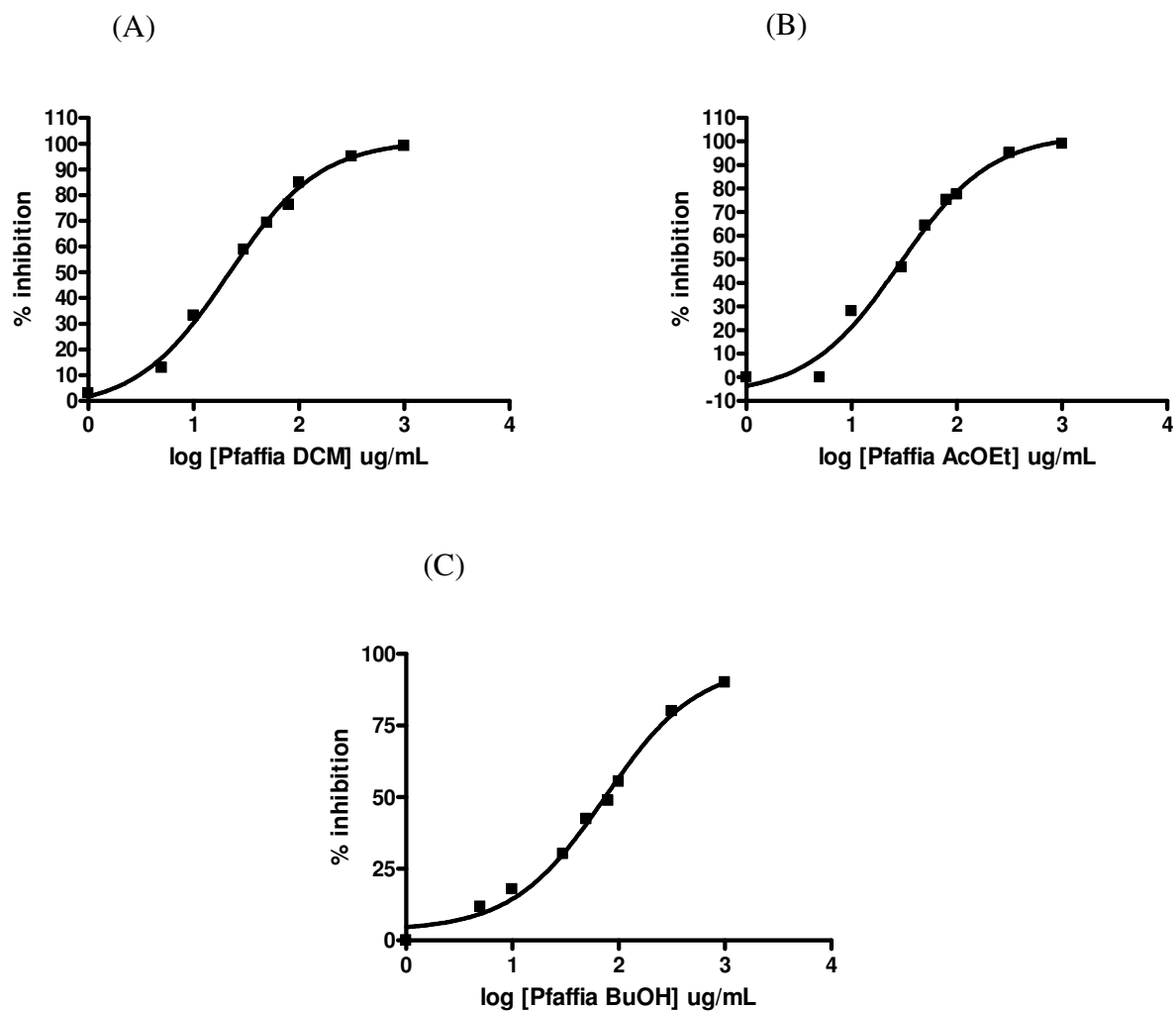


Figure 1. POP inhibition by *Pfaffia tuberosa* Spreng. IC_{50} curves for active fractions: (A) dichloromethane fraction (FD, $IC_{50} = 21.4 \mu\text{g/mL}$), (B) ethyl acetate fraction (FA, $IC_{50} = 28.5 \mu\text{g/mL}$) and (C) *n*-butanol fraction (FB, $IC_{50} = 74.4 \mu\text{g/mL}$).

Table 1: Results of DPP IV and AchE inhibitory activity assays of *Pfaffia tuberosa* Spreng^a

Sample ^b	% Inhibition (DPP IV)		Minimum amount required for inhibition of AchE (μg)
	80 $\mu\text{g/mL}$	5 $\mu\text{g/mL}$	
FD	19	14.5	NA
FA	18	1	6.25
FB	15	0	25

^a NA: not active. ^b FD: dichloromethane fraction; FA: ethyl acetate fraction; FB: *n*-butanol fraction.

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho foram realizados o estudo fitoquímico e a atividade antimicrobiana, citotóxica e de inibição enzimática das espécies *Scutellaria racemosa* Pers e *Pfaffia tuberosa* Spreng.

As raízes e partes aéreas secas da *S. racemosa* Pers foram submetidas à extração exaustiva no aparelho de Soxhlet, obtendo-se o extrato bruto (EB). Este foi fracionado com solventes de diferentes graus de polaridade, resultando as frações *n*-hexano (FH), diclorometano (FD), acetato de etila (FA), *n*-butanol (FB) e aquosa (FAq). Foi realizado o screening fitoquímico qualitativo (Tabela 1 do artigo 2 em anexo) do EB e frações para a identificação das classes de compostos majoritárias, verificando-se que terpenos e favonóides são os compostos que estão presentes em maior quantidade na *S. racemosa* Pers.

As frações obtidas foram estudadas e assim obteve-se o isolamento de quatro de seus metabólitos secundários (Figura 1 do artigo 1 em anexo). A FH foi purificada através de cromatografia em coluna em sílica gel, cromatografia em camada delgada preparativa e técnicas de recristalização, resultando no isolamento do triterpeno lupeol (**14**) e do flavonóide oroxilina A (**10**). As mesmas técnicas de purificação foram usadas para a FA e assim foram isolados os flavonóides oroxilina A (**10**) e dinatina (**12**). Cromatografia em coluna em sílica gel, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia em coluna em fase reversa C18 foram utilizadas para a purificação da FB, resultando no isolamento dos flavonóides oroxilina A (**10**), dinatina (**12**) e oroxilosídeo (**11**). A FAq foi submetida à cromatografia em coluna em fase reversa C18 e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em coluna C18, isolando-se assim o oroxilosídeo (**11**).

Os compostos isolados foram identificados por determinação do ponto de fusão, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (HPLC-MS) e Maldi-Tof (Figuras 13 – 21).

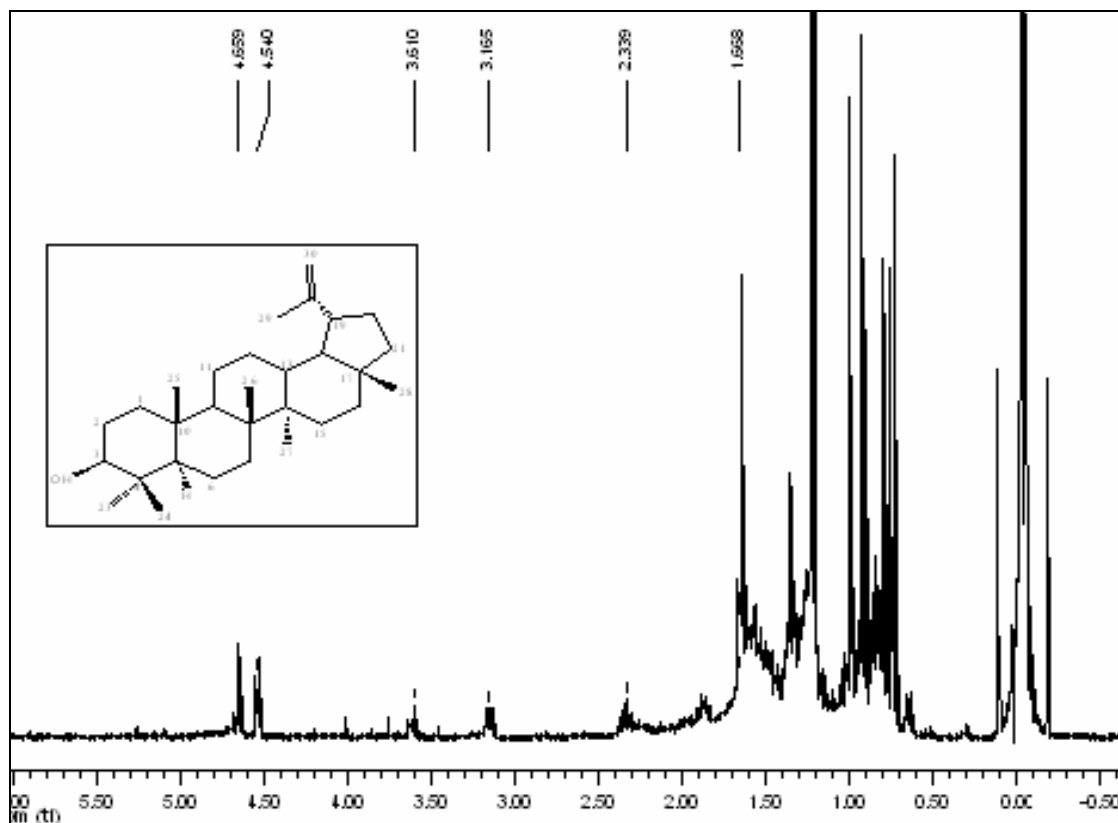


Figura 13: Espectro de RMN ^1H do Lupeol em CDCl_3 a 400.13 MHz.

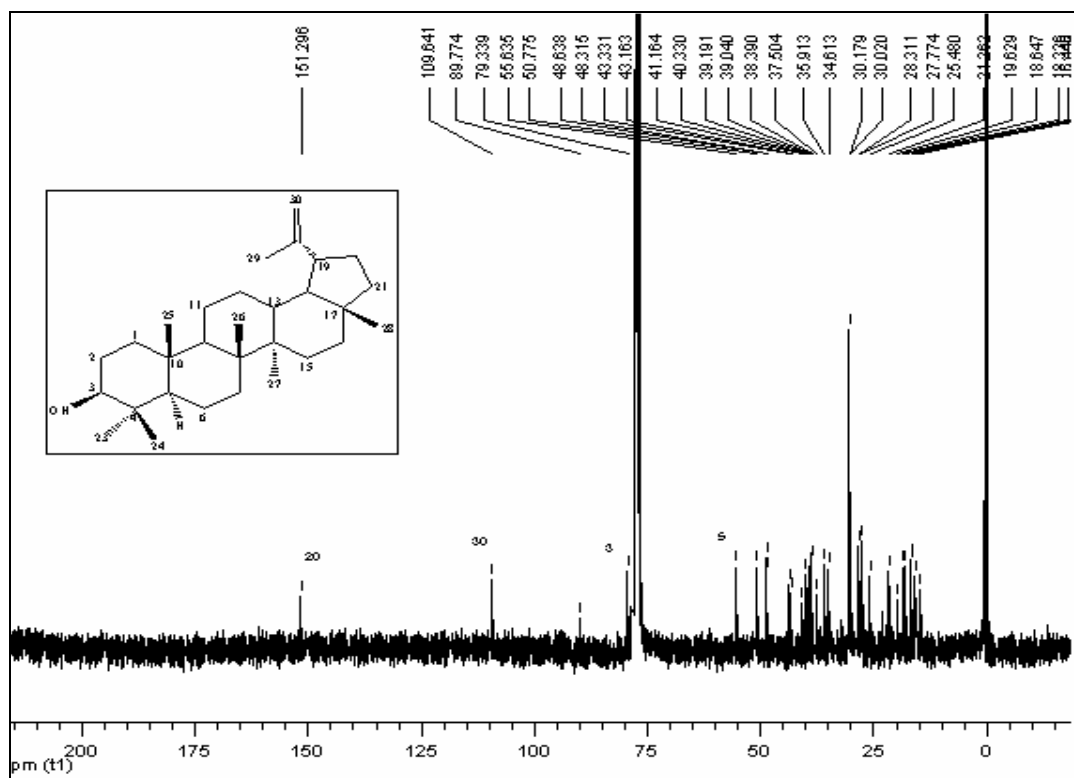


Figura 14: Espectro de RMN ^{13}C do Lupeol em CDCl_3 a 400.13 MHz.

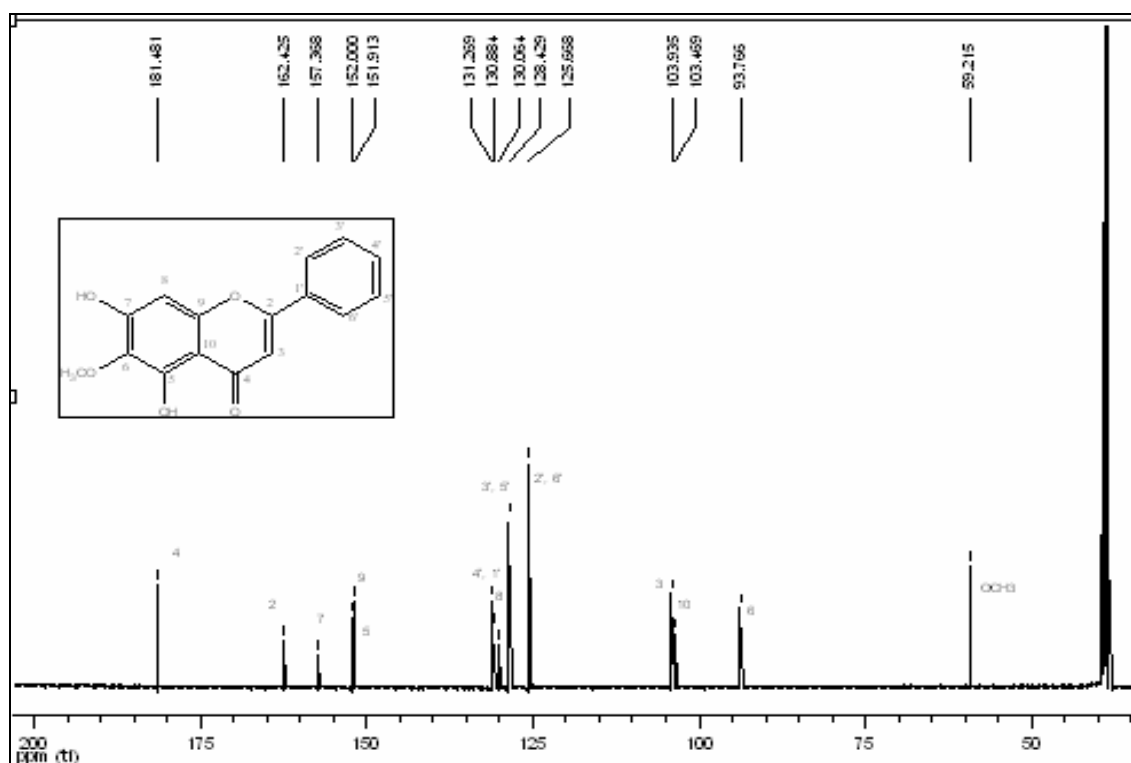


Figura 17: Espectro de RMN ^{13}C da Oroxilina A em DMSO- d_6 a 100.32 MHz.

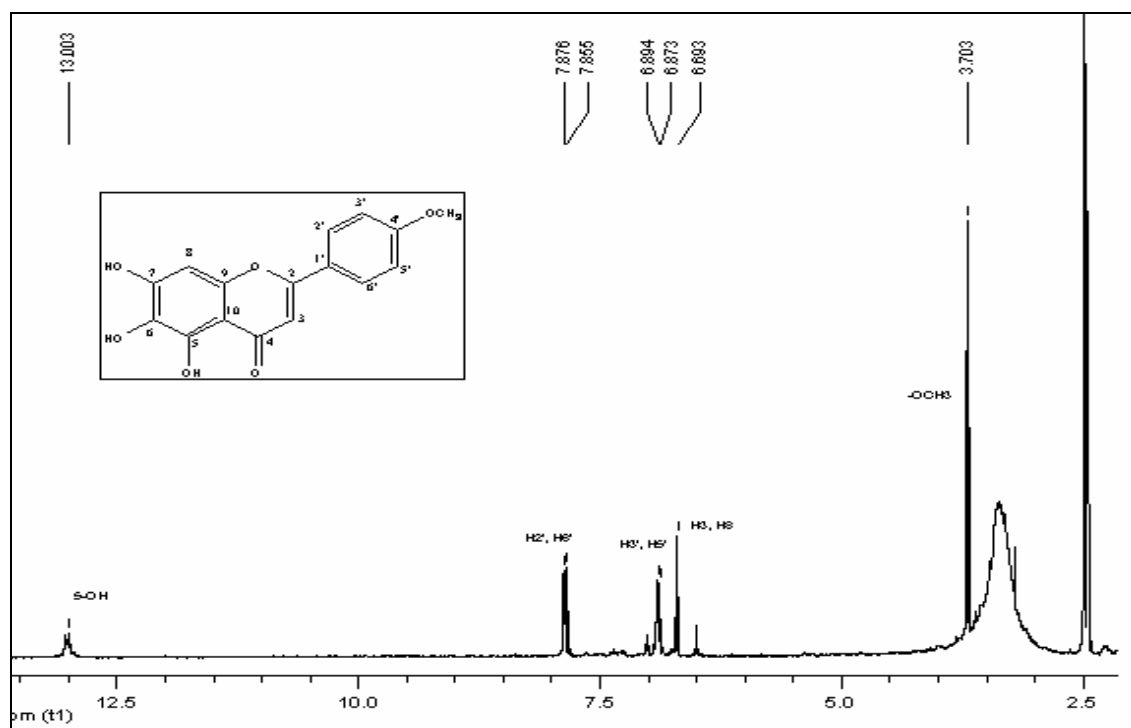


Figura 18: Espectro de RMN ^1H da Dinatina em DMSO- d_6 a 400.13 MHz.

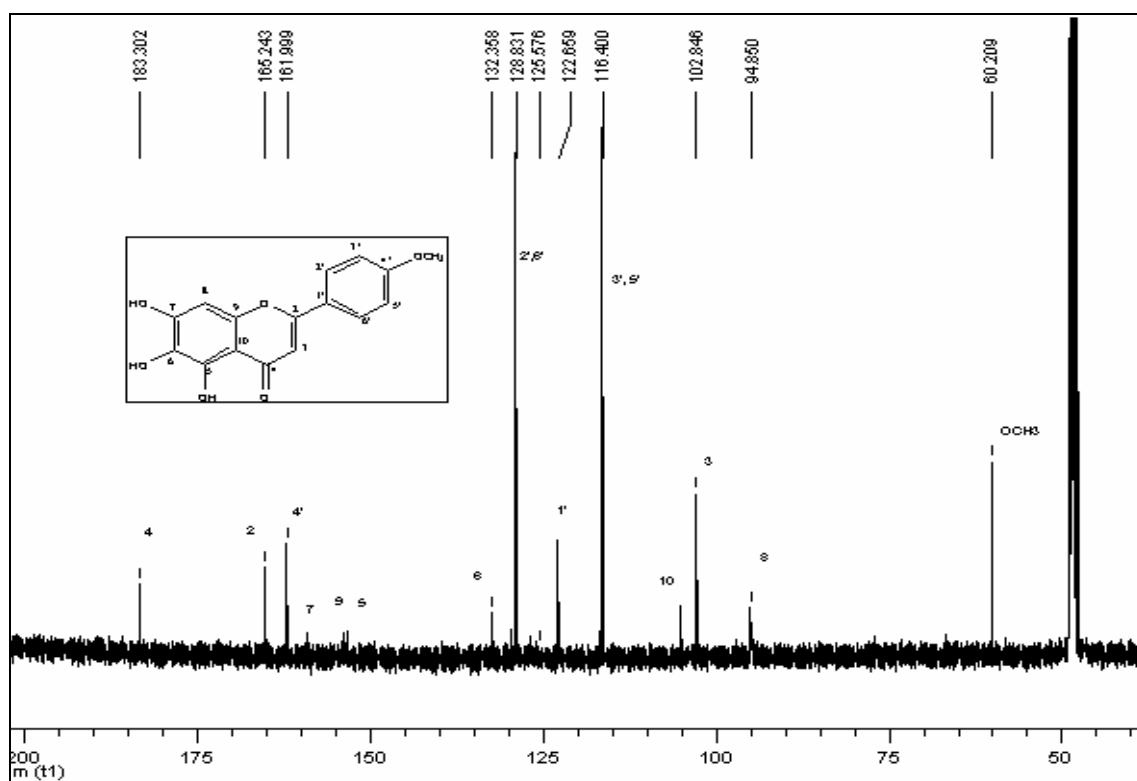


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C da Dinatina em MeOD a 100.32 MHz.

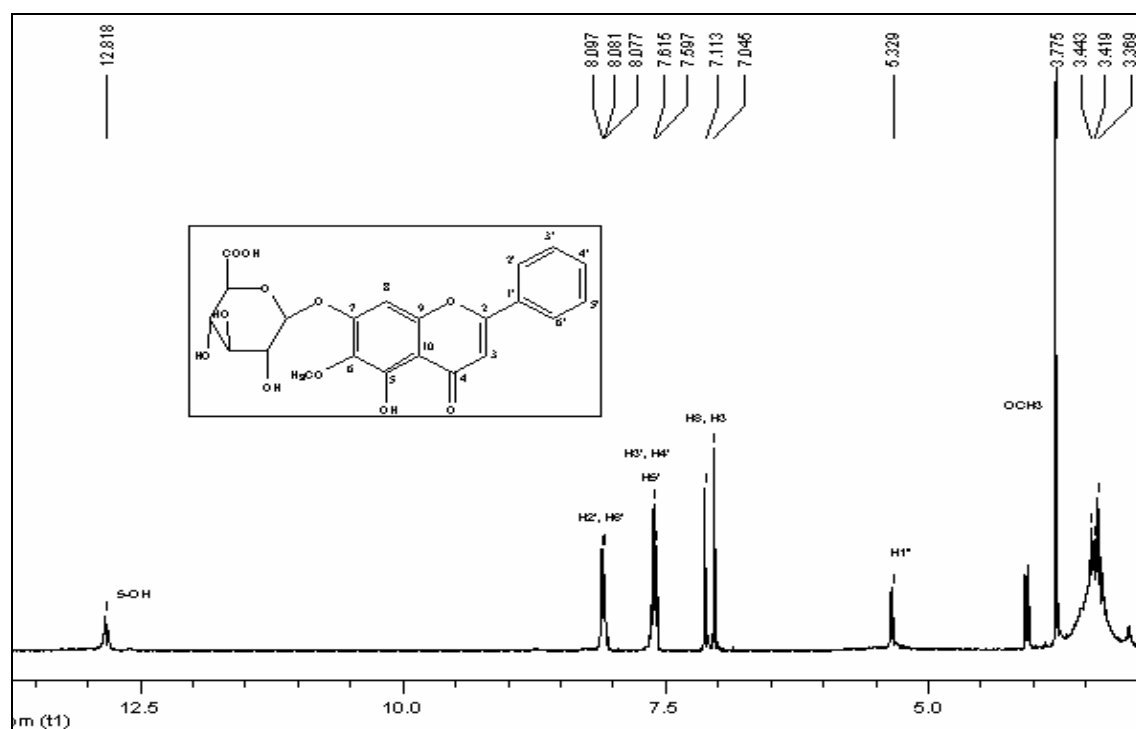


Figura 20: Espectro de RMN ^1H do Oroxilósido em DMSO- d_6 a 400.13 MHz.

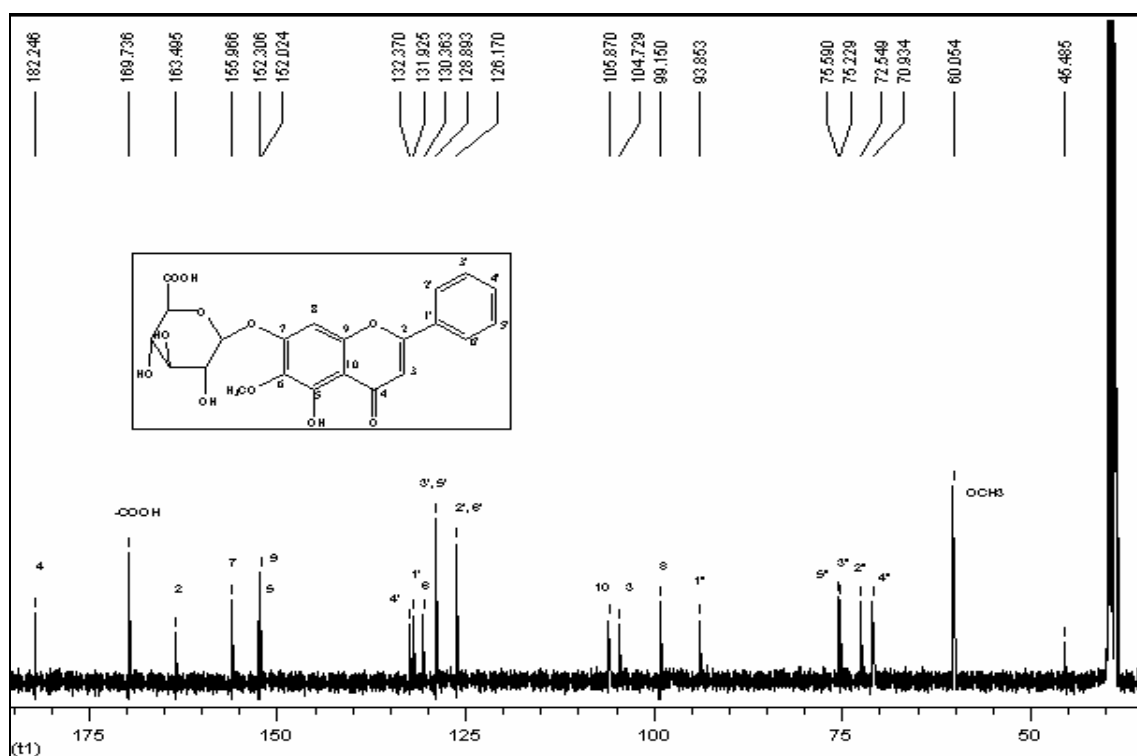


Figura 21: Espectro de RMN ^{13}C do Oroxilosídeo em DMSO-d_6 a 100.32 MHz.

Atualmente muitas enzimas da família da POP são alvos de estudo da indústria farmacêutica, pois degradam vários neuropeptídeos envolvidos em funções neurológicas como aprendizagem e memória (MAES et al., 1995; MAES et al., 1998; BREEN et al., 2004; ROEHRL et al., 2004; VENÄLÄINEN et al., 2004).

A DPP IV é uma ectopeptidase pertencente à família da prolil oligopeptidase, porém mesmo com sítio ativo espacialmente muito similar a POP, elas possuem mecanismos de ação muito distintos. Diferente da POP que atua no SNC, a DPP IV atua diretamente no diabetes mellitus (DEACON et al., 2004).

A capacidade de inibição das frações e compostos isolados da *S. racemosa* Pers foi avaliada em ensaios frente às enzimas POP e DPP IV na presença de ZGP-AMC e GP-AMC, respectivamente. FA e FB foram as frações mais ativas contra a POP, com valores de IC_{50} de 18,2 e 30,32 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1 do artigo 1 em anexo). Dinatina (**12**), isolada da FA e FB, e oroxilosídeo (**11**), isolado da FB e FAq mostraram significativo efeito inibitório da POP na quantidade de 100 μM (Tabela 2 do artigo 1 em anexo). A capacidade de inibição da DPP IV não foi significativa, tanto para as frações como para os compostos isolados. Assim, estes resultados

indicam que a dinatina (**12**) e o oroxilosídeo (**11**) não são excepcionais inibidores da POP, mas são seletivos para esta enzima. Com base nisto, supõe-se que estes compostos contribuam para a seletividade da inibição da POP pela FA e FB, mas é importante ressaltar que não são os únicos compostos presentes nestas frações e que um efeito sinérgico deve ser considerado.

As frações e compostos isolados da *S. racemosa* Pers também foram submetidos aos ensaios de atividade antimicrobiana, através dos métodos de bioautografia (Tabela 2 do artigo 2 em anexo) e concentração inibitória mínima por microdiluição (MIC) (Tabela 3 do artigo 2 em anexo), e ao teste de letalidade com *Artemia salina* (BST).

A atividade antimicrobiana é medida *in vitro* para determinar a potência do agente antimicrobiano em solução, e a concentração nos líquidos ou tecidos corporais conhecidas do fármaco. A determinação destas quantidades pode ser efetuada por dois métodos principais: diluição ou difusão. Ao utilizar um microorganismo padrão apropriado para o teste e uma amostra conhecida do fármaco para comparação, esses métodos podem ser empregados para estimar a potência do antibiótico na amostra ou a sensibilidade do microorganismo.

Os testes de diluição permitem a obtenção de resultados quantitativos, indicando a concentração de determinado fármaco necessário para inibir (ou matar) os microorganismos testados. Os testes de difusão (bioautografia) envolvem o cultivo de papel filtro contendo os antibióticos (BROOKS et al, 2000).

Atualmente o método da concentração inibitória mínima por microdiluição (MIC), desenvolvidas em microplacas, é uma das técnicas de diluição que possibilita o uso de volumes reduzidos de substâncias isoladas de produtos naturais, o que é de grande valia, pois são extraídos em pequenas quantidades. Estas técnicas permitem a análise de vários compostos e de uma ampla variedade de microorganismos ao mesmo tempo, utilizando pequenos volumes de amostra, com baixo custo e apresentando resultados confiáveis e reprodutivos (ELLOF et al., 1998; DEVIENNE et al., 2002).

O ensaio de toxicidade através do uso do microcústáceo *Artemia salina* serve como biomonitoramento dos extratos de plantas. É um método rápido, confiável, simples e de baixo custo que pode ser empregado para a determinação da toxicidade de extratos de plantas e substâncias isoladas, demonstrando uma boa correlação com a atividade antitumoral (SIQUEIRA et al., 2001).

Para a realização dos testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas bactérias Gram(+), Gram(-) e fungos. As frações FH e FA foram as mais ativas contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. De acordo com a classificação baseada nos valores de CL₅₀ seguida por Pereira e Castro (2007), o EB e frações da *S. racemosa* Pers apresentaram baixa toxicidade frente à *Artemia salina*. A atividade inibitória da *S. racemosa* Pers frente à AChE também foi testada, porém o EB, frações e compostos isolados não possuem a capacidade de inibir esta enzima.

As raízes secas da *Pfaffia tuberosa* Spreng foram submetidas à extração exaustiva no aparelho de Soxhlet, obtendo-se o extrato bruto (EB). Este foi fracionado com solventes de diferentes graus de polaridade, resultando nas frações *n*-hexano (FH, descartada por haver pouca quantidade), diclorometano (FD), acetato de etila (FA), *n*-butanol (FB) e aquosa (FAq). As frações foram submetidas a um screening fitoquímico (Tabela 2), onde se observou que as classes de compostos majoritários são esteróides e triterpenos, antocianidinas e cumarinas.

Tabela 1: Screening fitoquímico do extrato bruto e frações da *P. tuberosa* Spreng.

Classe de compostos	EB	FD	FA	FB	FAq
Flavonóides	-	+	-	-	-
Terpenóides/esteróides	-	+++	+++	+++	-
Alcalóides	-	++	-	-	-
Aminogrupos	+++	+	-	-	+++
Ácidos Orgânicos	+	+	+	+	+
Cumarinas	++	+++	+++	+	-
Antocianidinas	-	+	+++	+++	++
Saponinas	+++	-	-	-	+++
Taninos	-	-	++	+	-

+++ = abundante; ++ = moderadamente presente; + = presente; - = ausente

Triterpenos e esteróides estão presentes nas frações FD, FA e FB. Além disso, a FD apresenta forte presença de cumarinas. Na FA, cumarinas e antocianidinas

também estão presentes, enquanto que a FB foi caracterizada por triterpenos e esteróides, além de antocianidinas. As frações e o EB da *P. tuberosa* Spreng foram submetidas a testes de atividade inibitória da POP e DPP IV, utilizando ZGP-AMC e GP-AMC, respectivamente, como substratos. FD e FA apresentaram resultados significativos para a inibição da POP, respectivamente 21,4 µg/mL e 28,5 µg/mL (Figura 1 do artigo 3 em anexo), mas pouca atividade inibitória da DPP IV (menos de 20% de inibição do total de enzima testada).

Os trabalhos encontrados na literatura sobre a POP apresentam poucos inibidores naturais desta enzima. Dentre os compostos previamente isolados que apresentam capacidade de inibição da POP estão a berberina (**39**), alcalóide isolado do extrato de *Rhizoma coptidis* (TARRAGÓ et al., 2007); a baicaleína (**2**), flavonóide isolado das raízes da *Scutellaria baicalensis* (TARRAGÓ et al., 2008); os ácidos 6-(8'Z-pentadecenil) salicílico (**34**) e 6-(10'Z-heptadecenil) salicílico (**35**) isolados das folhas de *Gingko biloba* (LEE et al., 2004); o ácido 3 α -(3'',4''-diidroxitrans-cinnamoiloxi)-D-friedolean-14-em-28-oico (**36**) e os flavonóides ramnocitrina (**37**) e isorhamnetina (**38**), isolados da *Tamarix hispida* Willd (SULTANOVA et al., 2004). Com base nas informações dos inibidores naturais descritos e nos resultados obtidos no presente trabalho, pode-se supor que os compostos característicos do gênero *Pfaffia*, identificados em estudos prévios realizados em várias espécies do gênero, como o ácido oleanólico (**27**), ecdisterona (**19**), ecdisteróides glicosilados, triterpenóides e nortriterpenóides, estejam influenciando ativamente a inibição seletiva da POP que foi observada no presente estudo com as frações de *P. tuberosa* Spreng, assim como a presença de cumarinas, comum às FD e FA, conforme o screening fitoquímico realizado.

A capacidade de inibição da AChE também foi testada com o EB e frações da *P. tuberosa* Spreng. Esta é responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh), causando uma redução de seus níveis, o que ocasiona diversas doenças, como o Mal de Alzheimer, o glaucoma e a miastenia grave, justificando o interesse pela pesquisa de novas substâncias anti-AChE (HOUGHTON et al., 2006). Através de placas cromatográficas de sílica gel, foi possível avaliar que a FA (6,25 µg) e FB (25 µg) apresentaram atividade inibitória da AChE (Tabela 1 do artigo 3 em anexo). Analisando o screening fitoquímico e os resultados obtidos, pode-se sugerir que a

classe das antocianidinas é a mais provável responsável pela atividade inibitória desta enzima.

A atividade antimicrobiana através dos métodos da bioautografia e da concentração inibitória mínima por microdiluição (MIC), assim como o teste de letalidade frente à *Artemia salina* (BST) também foram estudados. As frações da *P. tuberosa* Spreng não apresentaram atividade frente às bactérias Gram(+), Gram(-) e fungos testados, assim como apresentaram baixa toxicidade frente à *Artemia salina*, de acordo com a classificação baseada nos valores de CL₅₀ seguida por Pereira e Castro (2007).

6. CONCLUSÃO

O gênero *Scutellaria*, pertencente à família Labiatae, possui muitas espécies usadas na medicina popular. Em geral, flavonóides são a principal classe de compostos isolados destas espécies. *Scutellaria racemosa* Pers é utilizada na medicina popular da América do Sul para o tratamento de doenças neurológicas, como ansiedade, depressão, esquizofrenia e distúrbio afetivo bipolar. O estudo fitoquímico realizado no presente trabalho com esta planta resultou no isolamento do triterpeno lupeol (**14**) na fração *n*-hexano (FH) e dos flavonóides oroxilina A (**10**) nas frações *n*-hexano (FH), acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB); dinatina (**12**) nas frações acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB); e oroxilosídeo (**11**) na fração *n*-butanol (FB) e aquosa (Faq). As frações acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB) da espécie *Scutellaria racemosa* Pers foram as mais ativas frente a prolil oligopeptidase (POP), apresentando seletividade para esta enzima, uma vez que a inibição da dipeptidil peptidase IV (DPP IV) por estas frações não foi significativa.

Dentre os compostos naturais isolados a partir desta espécie, os mais ativos na inibição da enzima prolil oligopeptidase foram a dinatina (**12**) e o oroxilosídeo (**11**), que foram isolados das frações FA e FB, as quais também apresentaram capacidade de inibição desta enzima. Assim, pode-se concluir que estes compostos contribuem para a ação de inibição da prolil oligopeptidase.

O estudos realizados neste trabalho indicaram que a inibição da POP pelas frações FA e FB de *S. racemosa* Pers e pelos compostos naturais dinatina (**12**) e o oroxilosídeo (**11**) ocorre de forma bastante específica, pois foram negativos os ensaios de inibição realizados com estas frações e compostos frente a outra enzima da mesma família das serina peptidases, a dipeptidil peptidase IV (DPP IV). Porém, não se pode descartar a ocorrência de efeitos sinérgicos, pois estes não são os únicos compostos presentes nas frações.

A atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *Scutellaria racemosa* Pers foi avaliada e observou-se que as frações FH e FA foram as mais ativas contra *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. *S. racemosa* Pers possui baixa toxicidade frente à *Artemia salina*, de acordo com a classificação usada por Pereira e Castro (2007). A atividade inibitória da *S.*

racemosa Pers frente a AChE também foi testada, porém o EB e frações não possuem a capacidade de inibir esta enzima.

O gênero *Pfaffia*, pertencente à família Amaranthaceae, é usado popularmente na América do Sul e Central. Terpenos, esteróides, cumarinas e antocianidinas são classes de compostos presentes neste gênero. *Pfaffia tuberosa* Spreng é conhecida na medicina popular como “corango-de-batata” e utilizada no tratamento do estresse e da infertilidade. Como outras espécies do gênero, *P. tuberosa* Spreng é chamada de “ginseng brasileiro”, dada a similaridade morfológica com o *Panax ginseng* (ginseng coreano). As frações e o extrato bruto da *P. tuberosa* Spreng foram avaliadas frente à prolil oligopeptidase (POP), sendo que as frações diclorometano (FD) e acetato de etila (FA) são as que apresentam maior atividade inibitória. A capacidade de inibição da dipeptidil peptidase IV (DPP IV) também foi testada, mas esta espécie não apresentou atividade significativa, mostrando-se seletiva à inibição da POP.

A atividade inibitória da AChE foi estudada, e as frações acetato de etila (FA) e *n*-butanol (FB) foram as mais ativas na inibição desta enzima. A atividade citotóxica foi testada, porém nenhuma das frações da *P. tuberosa* apresentaram toxicidade e nem possuem atividade antimicrobiana contra os microorganismos testados.

Assim, os resultados indicam que *S. racemosa* Pers e *P. tuberosa* Spreng são plantas medicinais com princípios farmacológicos úteis para o tratamento de distúrbios neurológicos, porém sem atividade antimicrobiana significativa e baixa toxicidade frente à *Artemia salina*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALABAMA PLANTS. Disponível em: <http://www.alabamaplants.com/Pinkopp/Scutellaria_racemosa_page.html>. Acesso em: 2 ago. 2008.

ALONSO, A.; ROJO, F.; MARTÍNEZ, J. L. Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. **Environmental Microbiology**, v. 1, n. 5, p. 421-430, 1999.

ALVIM, N. R. et al. Efeitos biológicos da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e da *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 21, n. 2, p. 349-352, 1999.

AWAD, R. et al. Phytochemical and biological analysis of Skullcap (*Scutellaria lateriflora* L.): A medicinal plant with anxiolytic properties. **Phytomedicine**, v. 10, p. 640-649, 2003.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 53, p. 583-600, 2001.

BIANCHI, A. **Attività antidepressiva di due specie di *Scutellariae* colombiane**. VI Convegno AMIAR Agopuntura e medicina non convenzionale nella terapia dei disturbi d'ansia e nella depressione. Torino, 8 april. 2006.

BREEN, G et al. Two peptidase activities decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients. **Bipolar Disorders**, v. 6, p. 156-161, 2004.

BROOKS, G. R.; BUTEL, J. S.; MORSE, A. S. **Microbiologia Médica**. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

CHECLER, F.; VICENT, J. P.; KITABGI, P. Inactivation of Neurotensin by Rat Brain Synaptic Membranes Partly Occurs Through Cleavage at the Arg⁸-Arg⁹ Peptide Bond by a Metalloendopeptidase. **Journal of Neurochemistry**, v. 45, p. 1509-1513, 1985.

CHEN, C. S. et al. Effects of *Scutellariae Radix* on gene expression in HEK 293 cells using cDNA microarray. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 346-351, 24 may 2006.

CLAESON, P. et al. Fractionation protocol for the isolation of polypeptides from plant biomass. **Journal Natural Products**, v. 61, p. 77-81, 1998.

CHATURVEDI, P. K.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

CHRISTENSEN, G. D. et al. Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 1, p. 318-326, jul. 1982.

COLE, I. B. et al. Comparisons of *Scutellaria baicalensis*, *Scutellaria lateriflora* and *Scutellaria racemosa*: Genoma size, antioxidant potential and phytochemistry. **Planta Medica**, v. 74, p. 474-481, 2008.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEAUX, R. J. **Bioactive Natural Products: detection, isolation and structural determination**. [S.l.]: CRC Press, 1993. p. 507.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5. ed. 2 v. Lisboa: Fundamental Calouste Gulbenkian, 1999. p. 195-201 e 338-356.

DABAGUI-BARBOSA, P. et al. Hispidulin: Antioxidant properties and effect on mitochondrial energy metabolism. **Biochemistry & Molecular Biology**, v. 39, p. 1305-1315, 2005.

DEACON, C. F.; AHRÉN, B.; HOLST, J. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: a novel approach for the prevention and treatment of type 2 diabetes? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 13, p. 1091-1102, 2004.

DECLERCK, Y. A. et al. Proteases, Extracellular Matrix, and Cancer. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 4, apr. 2004.

DELANO W. L. et al. Convergent Solutions to Binding at a Protein-Protein Interface. **Science**, v. 287, p. 1279-1283, 18 feb. 2000.

DENG, Y-X. et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic study of wogonoside in rat serum after oral administration of traditional Chinese medicinal preparation Huang-Lian-Jie-Du decoction. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 1098-1102, 2003.

DEVIENNE, K. F.; RADDI, M. S. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 166-168, 2002.

ELLOF, J. N. et al. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plants extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

EVANS, W. C. **Farmacognosia**. 13. ed. [S.l.]: Nueva Editorial Interamericana S. A. 1991. p. 401-403, 448-451 e 519-533.

FERREIRO, L. et al. Associações entre o isolamento de *Candida Albicans* com a infecção pelo vírus da leucemia felina (FELV), tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 30, n. 3, p. 179- 183, 2002.

FLICKR. Disponível em <<http://flickr.com/photos/ultimorollo/315227304/>>. Acesso em: 2 ago. 2008.

FLORES, R. et al. Embriogênese Somática e Organogênese Indireta em *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 993-995, 2007.

FREE PATENTS ON LINE. Disponível em <<http://www.freepatentsonline.com/5447719.html>>. Acesso em: 8 set. 2008.

FÜLÖP, V.; BÖCSKEI, Z.; POLGÁR, L. Prolyl oligopeptidase: an usual β -propeller domain regulates proteolysis. **Cell**, v. 94, p. 161-170, 1998.

GALVANI, F. R.; BAPTISTA, L. R. M. Flora of the Parque Estadual do Espinilho, Barra do Quaraí/RS. **Revista da FZVA**, v. 10, n. 1, p. 42-62, 2003.

GALVANI, F. R.; FERNANDES, G. M.; FREITAS, M. R. Floristic survey on a native field in the municipality Uruguaiana. **Revista da FZVA**, v. 1, n. 1, p. 15-23, 1994.

GAO Z. et al. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1472, p. 643-650, 1999.

GE, Q. F. et al. Baicalin attenuates oxygen–glucose deprivation-induced injury via inhibiting NMDA receptor-mediated 5-lipoxygenase activation in rat cortical neurons. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 148-157, feb. 2007.

GIACOMELLI, S. **Estudo fitoquímico de três espécies pertencentes à família Rhamnaceae: *Discaria americana*, *Colletia paradoxa* e *Gouania ulmifolia***. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

GIORGINO, F. et al. GLP-1: a new approach for type 2 diabetes therapy. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 74, p. S152-S155, 2006.

GRESSLER, V. **Estudo fitoquímico e da atividade antimicrobiana de *Waltheria douradinha* Saint Hilaire**. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

GUERRIERO, A.; D'AMBROSIO, M.; PIETRA, F. Pteridines, sterols, and indole derivatives from the lithistid sponge *Corallistes undulatus* of the coral sea. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 11, p. 1962-1970, 1993.

HAHLBROCK, J. B.; CONN, E. E. The biochemistry of plants. A comprehensive treatise. **Academic Press**, p. 425-591, 1981.

HAMBURGER, A. L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

HAMBURGER, M. O.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 985-990, 1999.

HARBORNE, J. B. **A guide to modern techniques of plant analysis**. Londres: Phytochemical methods. Chapman and Hall. 1984. p. 288.

HIROTANI, M.; NAGASHIMA, S.; YOSHIKAWA, T. Baicalin and Baicalein productions of cultured *Scutellaria baicalensis*. **Natural Medicines**, v. 52, p. 440-443, 1998.

HOLST, J. J.; DEACON, C. F. Inhibition of the activity of dipeptidyl-peptidase IV as treatment for type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 47, nov. 1998.

HORVATH, C. R.; MARTOS, P. A.; SAXENA, P. K. Identification and quantification of eight flavones in root and shoot tissues of the medicinal plant Huang-qin (*Scutellaria baicalensis* Georgi) using high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, p. 199–207, 2005.

HOSOKAWA, K. et al. Discrimination among three species of medicinal *Scutellaria* plants using RAPD markers. **Planta Medica**, v. 66, p. 270–272, 2000.

HOSTETTMAN, K.; MARSTON, A. **Saponin. Chemistry and Pharmacology of Natural Products**. Cambridge: Cambridge University Press. 1995.

HOUGHTON, P. J.; REN, Y.; HOWES, M. J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. **Natural Products Reports**, v. 23, p. 181-199, 2006.

HUEN, M. S. Y., et al. 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone, a benzodiazepine site ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi, with selective antagonistic properties. **Biochemical Pharmacology**, n. 66, p. 125-132, 2003.

IKEZOE, T. et al. Baicalin is a major component of PC-SPES which inhibits the proliferation of human cancer cells via apoptosis and cell cycle arrest. **Prostate**, v. 49, p. 285–292, 2001.

JIWAJINDA, S. et al. Suppressive effects of edible thai plants on superoxide and nitric oxide generation. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 3, p. 215–223, 2002.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 4. ed. [S.l.]: Companhia Editorial Nacional. 1977. p. 276, 582.

KENSIL C. R.; KAMMER R. QS-21: a water-soluble triterpene glycoside adjuvant. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 7, n. 9, p. 1475-1482, set. 1998.

KIM, H. et al. The nitric oxide-producing activities of *Scutellaria baicalensis*. **Toxicology**, v. 135, p. 109–117, 1999.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KIM, D. H. et al. Effect of the flavonoid, oroxylin A, on transient cerebral hypoperfusion-induced memory impairment in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 85, p. 658-668, 2006.

KINJO, J. et al. Hepatoprotective constituents in plants 15: protective effects of natural-occurring flavonoids and miscellaneous phenolic compounds as determined in an HepG2 cell cytotoxicity assay. **Journal of Natural Medicines**, v. 60, p. 36-41, 2006.

LAMBEIR, A-M. et al. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions and clinical aspects of the enzyme DPP IV. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 40, p. 209-294, 2003.

LEE, J. H. et al. Prolyl Endopeptidase Inhibitors from the Leaves of *Ginkgo biloba*. **Planta Medica**, v. 70, p. 1228-1230, 2004.

LI, B. Q. et al. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 276, p. 534–538, 2000.

LI, H-B.; CHEN, F. Isolation and purification of baicalein, wogonin and oroxylin A from the medicinal plant *Scutellaria baicalensis* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, n. 1074, p. 107-110, 2005.

LOEFFLER, J.; STEVENS, D. A. Antifungal Drug Resistance. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, p. 31-41, 2003.

MAES, M. et al. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia - effects of antidepressants, mood stabilizers, and antipsychotic-drugs. **Psychiatry Research**, v. 58, p. 217-225, 1995.

MAES, M. et al. Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: Higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety. **Psychoneuroendocrinology**, v. 23, p. 485-495, 1998.

MAGALHÃES, P. M. **Agrotecnologia para o cultivo da *Pfaffia***. Campinas: CPQBA-UNICAMP. 2002.

MAGLIERY, T. J. et al. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: Scope and mechanism. **Journal American Chemical Society**, v. 127, p. 146-157, 2005.

MALIKOV, V. M.; YULDASHEV, M. P. Phenolic compounds of plants of the *Scutellaria* L. genus. Distribution, structure and properties. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 38, n. 4, p. 358-406, 2002.

MATHABE, M. C. et al. Antibacterial activities and cytotoxicity of terpenoids isolated from *Spirostachys africana*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 194-197, 2008.

MARQUES, L. C. et al. **Estudo Farmacológico pré-clínico de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pederson-Amaranthaceae**. XV Simpósio de Plantas medicinais do Brasil — Programa e Resumos, p. 68, 1998.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MATSUZAKI, P. et al. Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata*. **Cancer Letters**, v. 238, p. 85-89, 8 jul. 2006.

MAZZANTI G.; BRAGHIROLI L. Analgesic and anti-inflammatory action of *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 413-416, 1994.

MCKENNA, D. J. Plant hallucinogens: springboards for psychotherapeutic drug discovery. **Behavioural Brain Research**, v. 73, p. 109-115, 1996.

MECCA T. et al. Designed calix [8] arene-based ligands for selective tryptase surface recognition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 5057-5062, 2004.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILES, D. H.; NGUYEN, C. L.; MILES, D. H. Utilization of natural products for treatment of blood diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 421-440, 1998.

MIYAICHI, Y. et al. Studies on the Constituents of *Scutellaria* species (XXII). Constituents of the Roots of *Scutellaria amabilis* HARA. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 54, p. 435-441, 2006.

NAKAI S. et al. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1703-1705, 1984.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, jan. 1998.

NETO A. G. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of a crude root extract of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, p. 87–91, 2005.

NISHIKAWA, K. et al. Phenolics in tissue cultures of *Scutellaria*. **Natural Medicines**, v. 53, p. 209-213, 1999.

NISHIMOTO N. et al. Pfaffosides and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 139–142, 1984.

NISHIMOTO, N. et al. Three ecdysteroid glycosides from *Pfaffia iresinoides*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1665-1668, 1988.

OHTA Y. et al. Comparative study of oral and parenteral administration of sho-saiko-to (xiao-chaihu-tang) extract on d-galactosamine-induced liver injury in rats. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 25, p. 333–342, 1997.

PARRA, A. L. et al. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plants extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PECZUH M. W.; HAMILTON A. D. Peptide and Protein Recognition by Designed Molecules. **Chemical Reviews**, v. 100, p. 2479-2494, 2000.

PEREIRA, A. C.; CASTRO, D. L. Prospecção fitoquímica e potencial citotóxico de *Unxia kubitzkii* H. Rob. (Asteraceae – Heliantheae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 231-233, 2007.

PEREIRA, A. S. et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 301-308, 2003.

RATES, S. M. K.; GOSMANN, G. Gênero *Pfaffia*: aspectos químicos, farmacológicos e implicações para o seu emprego terapêutico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 2, p. 85-93, jul. – dez. 2002.

ROEHRL, M. H. A.; WANG J. Y.; WAGNER G. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein - Protein interactions by fluorescence polarization. **Biochemistry**, v. 43, p. 16056-16066, 2004.

ROSENBLUM, J. S.; KOZARICH, J. W. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 496-504, 2003.

SAKURAI K., CHUNG H. S; KAHNE D. Use of a Retroinverso p53 Peptide as an Inhibitor of MDM2. **Journal American Chemical Society**, v. 126, p. 16288-16289, 2004.

SALMINEN, A. et al. Terpenoids: natural inhibitors of NF- κ B signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 2979-2999, 2008.

SANCHES, N. R. et al. Avaliação do potencial anti-hiperglicemiante da *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Amaranthaceae). **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2, p. 613-617, 2001.

SENTANDREU, M. A.; TOLDRÁ, F. Dipeptidyl peptidase IV from porcine skeletal muscle: purification and biochemical properties. **Food Chemistry**, v. 75, p. 159-168, 2001.

SHEN, Y. C. et al. Mechanisms in mediating the anti-inflammatory effects of baicalin and baicalein in human leukocytes. **European Journal of Pharmacology**, v. 465, p. 171–181, 2003.

SHIMIZU, I. et al. Effects of Shao-saiko-to, a Japanese herbal medicine, on hepatic fibrosis in rats. **Hepatology**, v. 29, p. 149-160, 1999.

SHIOBARA, Y. et al. Iresinoside, a yellow pigment from *pfaffia-iresinoides* **Phytochemistry**, v. 31, p. 953, 1992.

SHIOBARA, Y. et al. Pfaffane-type nortriterpenoids from *Pfaffia pulverulenta*. **Phytochemistry**, v. 3, p. 897–899, 1993a.

SHIOBARA, Y. et al. A nortriterpenoid, triterpenoids and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1527–1530, 1993b.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. [S.l.]: Guanabara Koogan. 2006.

SIQUEIRA, J. M. et al. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, S. J. L. **Clonagem do cDNA da endoglicanase 2 de *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sua expressão em *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade de Brasília, Brasília, mar. 2006.

SMITH, L. B.; DOWNS, R. J. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1972.

SMITH, T. L. et al. Emergence of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus Aureus*. **The New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 7, p. 493-501, 18 feb. 1999.

SOSINSKI JÚNIOR, E. E.; PILLAR, V. D. Respostas de tipos funcionais de plantas à intensidade de pastejo em vegetação campestre. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v.39, n.1, p.1-9, 2004.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845–857, 2005.

STÜKER, C. Z. **Estudo dos óleos voláteis de plantas medicinais da família Asteraceae do Rio Grande do Sul: *Baccharidastrum triplinervium*, *Baccharis pentodonta*, *Pluchea sagittalis* e *Eupatorium buniifolium***. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

SUDHAHAR, V. et al. Protective effect of lupeol and its ester on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Pharmacology**, v. 46, p. 412-418, 2007.

SULTANOVA, N. et al. A new antioxidant and Prolyl Endopeptidase-Inhibiting triterpenoid from *Tamarix hispida*. **Planta Medica**, v. 70, p. 65-67, 2004.

TAIRA Z. et al. Effects of Sho-saiko-to extract and its components, baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 803–807, 2004.

TANIGUCHI S. F. et al. Effect of *Pfaffia iresinoides* on the experimental inflammatory process in rats. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 568–571, 1997.

TARRAGÓ, T. et al. Identification by F-19 NMR of traditional chinese medicinal plants possessing prolyl oligopeptidase inhibitory activity. **ChemBioChem**, v. 7, p. 827-833, 2006.

TARRAGÓ, T. et al. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. **ChemMedChem**, v. 2, p. 354-359, 2007.

TARRAGÓ, T. et al. Baicalin, a prodrug able to reach the CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7516–7524, 2008.

TASCETTO, O. M.; PAGLIARINI, M. S. Meiotic behavior in tetraploid populations of *Pfaffia tuberosa* (Amaranthaceae). **Acta Botanica Croatica**, v. 63, p. 17-24, 2004.

TONG, A. H. Y. et al. A combined experimental and computational strategy to define protein interaction networks for peptide recognition modules. **Science**, v. 295, p. 321-324, 2002.

TOIDE, K. et al. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, p. 1370-1378, 1995.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas**, v.22, n.1, ene/mar. 2003.

VASCONCELLOS, J. M. O. **Estudo taxonômico sobre Amaranthaceae no RS, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1982.

VASILESCU, J.; GUO, X.; KAST, J. Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. **Proteomics**, v. 4, p. 3845-3854, 2004.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Medicinal plants: Safe cure? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VENÄLÄINEN, J. et al. Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site. **Biochemical Journal**, v. 382, p. 1003-1008, 2004.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655-660, 2004.

WAITE, D. C. et al. Three double-blind, randomized trials evaluating the safety and tolerance of different formulations of the saponin adjuvant QS-21. **Vaccine**, v. 19, p. 3957–3967, 2001.

WANG, Z. Q. et al. Scutebarbatine A, a new neoclerodane-type diterpenoid alkaloid from *Scutellaria barbata*. **Chinese Chemical Letter**, v. 7, p. 333-334, 1996.

WANG, J. et al. Baicalein induces apoptosis through ROS-mediated mitochondrial dysfunction pathway in HL-60 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 14, p. 627-632, 2004.

WEBER, A. E. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors for the treatment of diabetes. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 17, p. 4135-4141, 2004.

XU, R.; FAZIO, G. C.; MATSUDA, S. P. T. On the origins of triterpenoid skeletal diversity. **Phytochemistry**, v. 65, p. 261–291, 2004.

ZHANG, Y. et al. Protective effect of flavonoids from *Scutellaria baicalensis* Georgi on cerebral ischemia injury. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, p. 355-360, 6 dec. 2006.

ZHU, M. et al. The flavonoid baicalein inhibits fibrillation of α -Synuclein and disaggregates existing fibrils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 26, p. 26846-26857, 2004.