

DENISE LOPES RESENDE VIDO

Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. provenientes da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2009

DENISE LOPES RESENDE VIDO

Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. provenientes da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Vido, Denise Lopes Resende

V654c Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica) / Denise Lopes Resende Vido -- São Paulo, 2009.

92 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2009
Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Chloranthaceae. 3. Hedyosmum. I. Título

CDU: 547.913

*Aos meus pais, Joaquina e Ângelo,
ao meu esposo, Danilo, à minha filha Marina
e aos queridos amigos Marta e Domingos
dedico.*

*Imagine all the people living life in peace
You may say I'm a dreamer,
But I'm not the only one
I hope some day you'll join us
And the world will be as one.*

John Lennon

Agradecimentos

Àos meus pais, Joaquina e Ângelo, pelo amor incondicional, pelos valores passados com tanto carinho, pela dedicação em tempo integral e por serem estas pessoas tão lindas, pelas quais tenho muito amor, respeito e admiração.

Ào Danilo, meu eterno companheiro, pelo amor e ajuda incansável, pela compreensão nos momentos de estresse, pelas noites acordado, seja com a Marininha ou me ajudando na formatação, pelo exemplo de dignidade e integridade, pela maravilhosa convivência.

À Marina, que veio radiante e encheu a minha vida de brilho, me dando a oportunidade de sentir a felicidade de ser mãe.

À Dra. Maria Cláudia Marx Young, pela orientação, pela paciência e apoio nos momentos difíceis na iminência de entregar a dissertação, pela compreensão e carinho. Por seu bom humor contagiante, pelas prazerosas idas a campo.

À Pós-Graduação do Instituto de Botânica de São Paulo, por ter dado subsídios para a minha formação e à coordenadora Dra. Solange Mazzoni-Viveiros, por sua competência e por não medir esforços para que o nosso curso se torne cada vez melhor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo pela bolsa concedida e pelo financiamento do projeto temático “Flora aromática da Mata Atlântica no Estado de São Paulo: composição química dos óleos voláteis e análise da atividade biológica”.

À Dra. Elaine Monteiro Cardoso Lopes pelo desenvolvimento e introdução dos ensaios anticolinérgicos no laboratório e pelas sugestões sempre muito bem vindas, inclusive as da qualificação.

À Dra. Maria Luiza Faria Salatino e à Dra. Mitsue Haraguchi pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Ào Dr. Paulo Roberto H. Moreno pelo auxílio na escolha da espécie, pelas companhias bem humoradas nas coltas e pela contribuição intelectual como coordenar do “Biota Cheroso”.

À curadora do Herbário, Dra. Inês Cordeiro, por identificar os indivíduos masculinos e femininos de *Hedyosmum brasiliense*.

À todos os professores da PG-IBt, que nos deram a possibilidade de mergulhar no mundo Ciência e suas vertentes, em especial ao Dr. Sérgio Romaniue Neto, Dr. Marco Aurélio Tiné, Dr. Edson Paulo Chu e Dr. Jefferson Prado.

Às queridas Amanda de Souza, Cynthia Murakami e Ludmila Raggi pela IMENSIF e bem-vinda ajuda, como minhas orientadoras “não-oficiais”, durante esses anos. Pelo carinho, companhia nas baneadas, confiança, e pelos desabafos. Sou infinitamente grata a vocês.

À Anderson Luís do Nascimento, companheiro de coletas, por estar presente em TODAS as coletas em Pindamonhangaba, sempre incansável e disposto a ajudar.

À Suzli Nicolau pela identificação dos indivíduos de Pindamonhangaba, pela companhia nestas coletas, sempre com muito boa vontade e um sorriso estampado no rosto.

À Marcos Yamamoto e ao Márcio Irias, responsáveis pelo Departamento de Meio Ambiente da Votorantim Celulose e Papel pela autorização das coletas e pelo alojamento na Fazenda São Sebastião do Ribirão Grande, Pindamonhangaba.

À Sr. Dorival e Sr. Vitor pela companhia nas coletas de Paranapiacaba, pela atenção e carinho.

À Michelle e à Maura pelos ensaios anticolinérgicos e antifúngicos, pela companhia e pelas risadas, que fizeram do laboratório um local de convivência e de trabalho tão agradável.

À Marcos Enoque Lima pela ajuda na realização dos ensaios antimicrobianos.

Às funcionárias da seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Mary, Ana Alice e Cida por toda ajuda e carinho.

À todos os colegas de laboratório pela convivência durante este período, em especial à Paola e Ju Lura, às quais tenho muito carinho.

Às pessoas que, com muito amor, me ajudaram a cuidar da Marininha nesta reta final: Mara Vido, Adglaid e Joaquina (mamis).

Às minhas irmãs, Juliana e Lillian, por estarem sempre por perto, pelo amor e compreensão e pelo contínuo e mútuo aprendizado. Aos meus avós, Josefa e Federico (*in memoriam*) e ao tio Quinho, pelo carinho, cuidado e amor que sempre me deram durante toda a vida.

Aos amados Domingos e Marta por me despertarem para a Vida e aos Amigos do Compos Sui, de todas as horas, por acreditarem e lutarem, todos os dias, por um Mundo Melhor, sem eles a vida não seria tão rica. E, em especial, ao Dr. Celso Charuri (*in memoriam*).

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Material	19
3.1.1. Material Vegetal	19
3.1.2. Microorganismos	19
3.2. Extração de óleos essenciais	20
3.3. Identificação dos compostos dos óleos essenciais	20
3.4. Ensaio biológicos	21
3.4.1. Atividade antimicrobiana	21
<i>3.4.1.1. Atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica-gel</i>	21
3.4.1.1.1. Preparo das amostras	21
3.4.1.1.2. Obtenção dos microorganismos.....	21
3.4.1.1.3. Ensaio antifúngico	22
<i>3.4.1.2. Atividade antifúngica por diluição em microplaca</i>	22
3.4.1.2.1. Preparo das amostras	22
3.4.1.2.2. Obtenção dos microorganismos	22
3.4.1.2.3. Ensaio antifúngico	22
<i>3.4.1.3. Atividade antibacteriana por diluição em microplaca</i>	23
3.4.1.3.1. Preparo das amostras	23
3.4.1.3.2. Obtenção dos microorganismos	23
3.4.1.3.3. Ensaio antibacteriano	23
3.4.2. Atividade anticolinesterásica	24

3.4.2.1. <i>Ensaio quantitativo em microplaca</i>	24
3.4.2.2. <i>Preparo das amostras</i>	24
3.4.2.3. <i>Ensaio anticolinesterásico</i>	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5. CONCLUSÕES	64
6. RESUMO	65
7. ABSTRACT	67
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
9. ANEXOS	84

1. INTRODUÇÃO

A natureza é a maior produtora de substâncias orgânicas conhecidas. O reino vegetal é responsável pela maior parcela da diversidade química registrada na literatura (Viegas-Jr. *et al.* 2006) e, desde os primórdios das civilizações, tem contribuído significativamente para o fornecimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos.

Ao longo do período evolutivo, os vegetais, sem poder escapar das ameaças de outros organismos por serem sésseis, desenvolveram estratégias químicas a fim de possibilitar sua sobrevivência (McChesney 1996). A variedade e a complexidade das moléculas originadas do metabolismo secundário das plantas teriam sido resultado de milhões de anos de evolução, como forma de proteção e resistência às intempéries do clima, predadores e poluição (Verpoorte 2000, Montanari & Bolzani 2001, Viegas-Jr. *et al.* 2006). Tal variedade e complexidade são inalcançáveis por métodos laboratoriais (Viegas-Jr. *et al.* 2006).

Grande parte da variada gama de compostos produzidos pelas plantas parece não participar diretamente do seu crescimento e desenvolvimento, tais compostos frequentemente são definidos como metabólitos secundários. Em contrapartida, outras substâncias, os chamados metabólitos primários, participam ativamente do metabolismo celular vegetal (Croteau *et al.* 2000).

De acordo com Balandrin *et al.* (1985), metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza e ocorrem, de uma forma ou outra, em todos os organismos. Nos vegetais superiores concentram-se principalmente em sementes e órgãos de armazenamento e são necessários para suprir suas necessidades fisiológicas visto que desempenham papel importante no metabolismo celular.

Por sua vez, metabólitos secundários são compostos derivados de metabólitos primários, possuem uma distribuição mais limitada no reino vegetal, muitas vezes restrita a determinados grupos taxonômicos (famílias, gêneros ou espécies) (Balandrin *et al.* 1985, Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000). Estes compostos aparentemente não possuem função no metabolismo vegetal, mas desempenham importantes papéis ecológicos, dentre eles destacam-se atração de polinizadores, adaptações ao estresse ambiental ou defesa química contra microorganismos, insetos, herbívoros e outras plantas (Balandrin *et al.* 1985, Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000). Verpoorte (2000) enfatiza que os compostos secundários asseguram a sobrevivência do organismo como espécie em seu ecossistema e acrescenta que

“há pouco de ‘secundário’ nos metabólitos secundários”. A tendência atual é utilizar o termo “produtos naturais” para designá-los (Croteau *et al.* 2000, Hartmann 2007).

As pesquisas com produtos naturais tiveram início há 200 anos, com o isolamento da morfina (*principium somniferum*) por Friedrich Wilhelm Sertürner. Por 150 anos esses estudos foram direcionados quase exclusivamente para o isolamento e elucidação de estruturas de novas moléculas empregadas na indústria farmacêutica. Além disso, forneceram as bases químicas para as pesquisas biológicas do metabolismo secundário dos vegetais iniciadas há 50 anos (Hartmann 2007).

Em 1873, Julius Sachs, considerado o “pai da fisiologia vegetal”, definiu esses metabólitos como “co-produtos” originados do metabolismo vegetal, os quais não pareciam contribuir com a formação de novas células e cuja importância para a “economia interna” da planta ainda era desconhecida. Até a década de 80, os aspectos funcionais do metabolismo secundário das plantas foram negligenciados pelos fitoquímicos e fisiologistas. Em 1950, os produtos naturais foram considerados desperdício fisiológico ou produtos de desintoxicação celular (Knobloch *et al.* 1986, Verpoorte 2000, Hartmann 2007). Esta visão só mudou na década de 70 com o incremento do conhecimento da bioquímica do metabolismo vegetal (Gershenzon & Dudareva 2007, Hartmann 2007). Hoje, os “metabólitos secundários” são conhecidos não como desperdício, mas como componentes da dinâmica do metabolismo da planta, alguns autores até o consideram como “playground da evolução bioquímica” (Luckner 1990 *apud* Hartmann 2007). O estudo do metabolismo secundário abrange a fisiologia e a bioquímica vegetal, bem como aspectos ecológicos e evolutivos (Hartmann 2007).

Estes metabólitos acumulam-se em pequenas quantidades nos vegetais, isso se deve em parte ao fato de serem sintetizados em células especializadas e em diferentes estádios de desenvolvimento. Tal fato faz com que frequentemente surjam adversidades na sua extração e purificação (Croteau *et al.* 2000).

Produtos derivados do metabolismo secundário, na maioria das vezes, possuem estrutura química complexa, com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de atividades biológicas. Dessa forma, os metabólitos secundários conhecidos são utilizados comercialmente como compostos bioativos (medicamentos, flavorizantes, fragrâncias, pesticidas).

Compostos bioativos extraídos de vegetais tem papel relevante na economia mundial, atualmente estima-se que no Brasil são movimentados U\$ 500 milhões anuais no mercado de medicamentos à base de plantas medicinais (fitomedicamentos) e alcançam as cifras de U\$

8,5 e 6,3 bilhões na Europa e Estados Unidos, respectivamente (dados obtidos no ano de 2000). Estes valores apontam um mercado com potencial de expansão (Simões & Schenkel 2002).

Uma característica inata do metabolismo secundário é a grande plasticidade genética, que garante adaptações das plantas às demandas da pressão seletiva ambiental (Hartmann 2007). Os produtos naturais podem ser classificados segundo características químicas, origem da planta ou origem biossintética (Verpoorte 2000) e perfazem um número estimado de 200 mil compostos (Hartmann 2007). Segundo Mann (1987), nas plantas existem três vias biossintéticas principais do metabolismo secundário: ácido chiquímico (precursor de compostos aromáticos), acetato (precursor de ácidos graxos, polifenóis, isoprenos, prostaglandinas) e aminoácidos (precursores de alcalóides) (Figura 1).

Dentre os produtos do metabolismo secundário, os terpenóides (também chamados isoprenóides) representam a classe funcional e estruturalmente mais variada (McGarvey & Croteau 1995, Verpoorte 2000, Heinrich *et al.* 2004, Aharoni *et al.* 2006, Rodríguez-Concepción 2006), perfazendo, de acordo com Verpoorte (2000), um terço de todos os metabólitos secundários conhecidos. O termo terpenóide foi dado pelo fato de o primeiro composto desta classe ter sido isolado da terebentina (*terpentin* em alemão) (Chappell 1995, Bramley 1997, Croteau *et al.* 2000)

Alguns terpenóides atuam como metabólitos primários, pois desempenham funções nos processos de respiração (ubiquinona), fotossíntese (carotenóides, clorofilas, plastoquinona) e regulação do crescimento e desenvolvimento (citocininas, brassinosteróides, giberelinas, ácido abscísico), contudo, a grande variedade de compostos dessa classe são metabólitos secundários cujas funções são proteger as plantas contra herbívoros e patógenos, atrair polinizadores e dispersores ou atuar como aleloquímicos (McGarvey & Croteau 1995, Croteau *et al.* 2000, Rodríguez-Concepción 2006). Os terpenóides estão presentes em grandes quantidades nos óleos essenciais, resinas e ceras e são comercialmente importantes devido à sua ampla utilização na indústria como flavorizantes (monoterpenos), fármacos (artemisina, taxol), perfumes, inseticidas e agentes antimicrobianos (McGarvey & Croteau 1995, Aharoni 2006, Rodríguez-Concepción 2006).

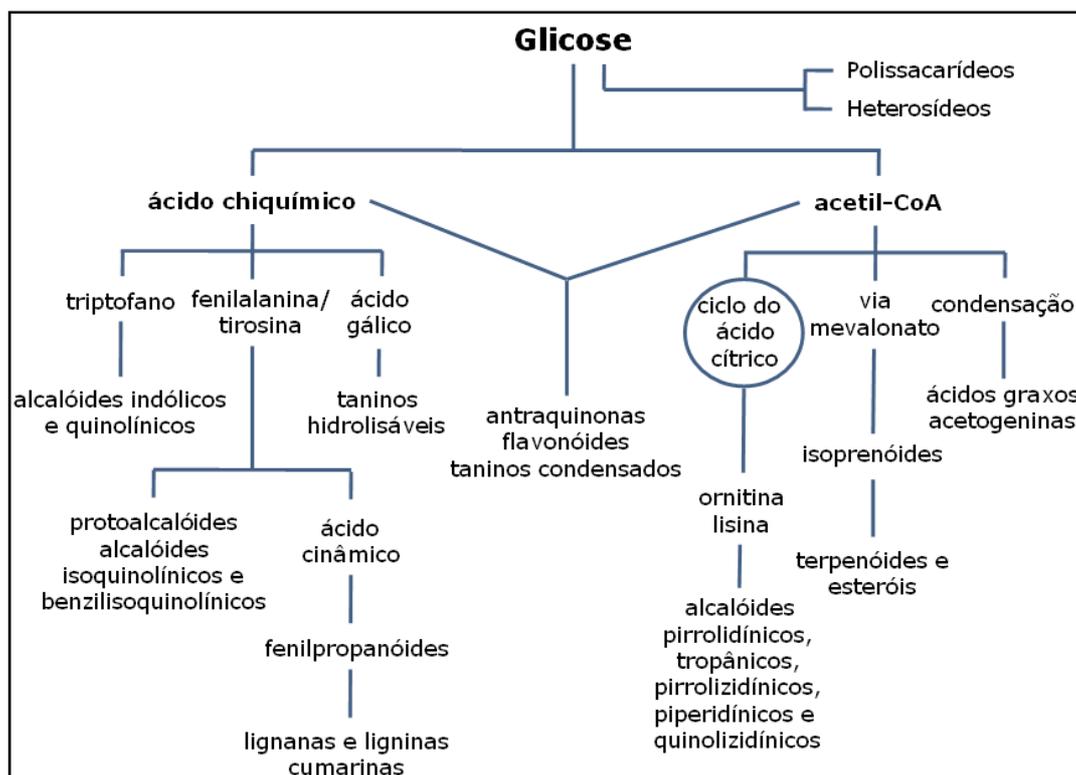


Figura. 1. Rota biossintética do metabolismo secundário (Santos 2004).

As plantas aromáticas são usadas há milhares de anos na cura de doenças e como cosméticos (Tisserand & Balacs 1995). Os óleos essenciais da terebentina já haviam sido descritos desde a Antiguidade, na Grécia e em Roma. A destilação, como método de obtenção destes produtos, foi usada pelos egípcios, indianos e persas, há mais de 2000 anos (Burt 2004) e durante a Idade Média, esse procedimento foi aprimorado pelos árabes (Tisserand & Balacs 1995, Burt 2004, Bakkali *et al.* 2008). Estes óleos, conhecidos por suas propriedades anti-sépticas (bactericida, fungicida e viricida) e por sua fragrância, eram utilizados para embalsamento, para conservar alimentos, como analgésico, anti-inflamatório, sedativo, espasmolítico e anestésico local (Bakkali *et al.* 2008).

O termo óleo essencial deriva do nome *Quinta essentia*, cunhado para esta substância, em meados do século XVI, pelo reformador da medicina Paracelsus Von Hohenheim (Burt 2004, Edris 2007). De modo geral, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, geralmente odoríferas e líquidas (Waterman 1993, Tisserand & Balacs 1995). Sua principal característica é a volatilidade, seguida do aroma, sabor, cor e estabilidade (Waterman 1993). A maioria dos óleos essenciais possui índice de refração específico e são opticamente ativos, propriedades utilizadas na sua identificação e controle de qualidade (Simões & Spitzer 2004). Podem ser obtidos de flores (rosa), folhas (hortelã, louro), frutos

(limão, funcho), sementes (noz-moscada), raízes ou rizomas (gengibre, cálamo), madeira (cedro, pau-rosa), cascas de caule (canela) e bulbos (alho) (Tisserand & Balacs 1995, Simões & Spitzer 2004), estão alocados em estruturas específicas como tricomas glandulares, células parenquimáticas diferenciadas ou canais oleíferos (Simões e Spitzer 2004, Bakkali *et al.* 2008).

Nem todos os vegetais produzem óleos essenciais (Tisserand & Balacs 1995), é raro encontrá-los em Gimnospermas (com exceção das coníferas) e Angiospermas monocotiledôneas, exemplos deste último grupo são representantes da família Poaceae e Zingiberaceae. Em contrapartida, encontram-se em dicotiledôneas inúmeras famílias com espécies que produzem óleos essenciais, com destaque para Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myristicaceae, Myrtaceae, Pinaceae, Rosaceae e Rutaceae (Simões & Spitzer 2004).

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos em duas séries, conforme sua origem biossintética: a aromática, constituída pelos fenilpropanóides, e a série terpênica. Dentre elas, esta última é preponderante (Simões & Spitzer 2004).

O primeiro grupo é constituído por compostos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono derivados de aminoácidos aromáticos, oriundos da via do ácido chiquímico. Nesta via, a partir do ácido chiquímico, é produzido o aminoácido fenilalanina que, por ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) forma o ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico (Santos 2004). A redução da cadeia lateral destes ácidos leva à formação de alilbenzenos e propenilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanóides (Figura 2). Como exemplos desta classe de compostos, podem-se citar o eugenol, presente em grandes quantidades em *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia, empregado em produtos de higiene oral) e o anetol, presente em *Pimpinella anisum* (erva-doce), *Ilicium verum* (anis-estrelado) e *Foeniculum vulgare* (funcho) (Mann 1987, Simões & Spitzer 2004).

Os compostos do grupo dos terpenóides são sintetizados pela condensação de unidades pentacarbonadas, o difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP). A formação do IPP pode ocorrer por duas rotas biossintéticas (Fig. 3): a via clássica ou via do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos e triterpenos, que ocorre preferencialmente no citosol e cujos precursores são piruvato e acetil-coenzima A; e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos, ocorre preferencialmente nos plastídeos e tem como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000, Aharoni

et al. 2006). Por muitos anos acreditou-se que todos os organismos sintetizavam IPP apenas pela via do MVA (Chappell 1995, McGarvey & Croteau 1995), entretanto, há pouco mais de uma década, pesquisas evidenciaram, em bactérias e células vegetais, a existência da via do MEP (Croteau *et al.* 2000, Aharoni *et al.* 2006, Rodríguez-Concepción 2006). Após a síntese do IPP, este é convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), através da enzima IPP isomerase, a partir daí dá-se início à formação dos terpenos (Verpoorte 2000).

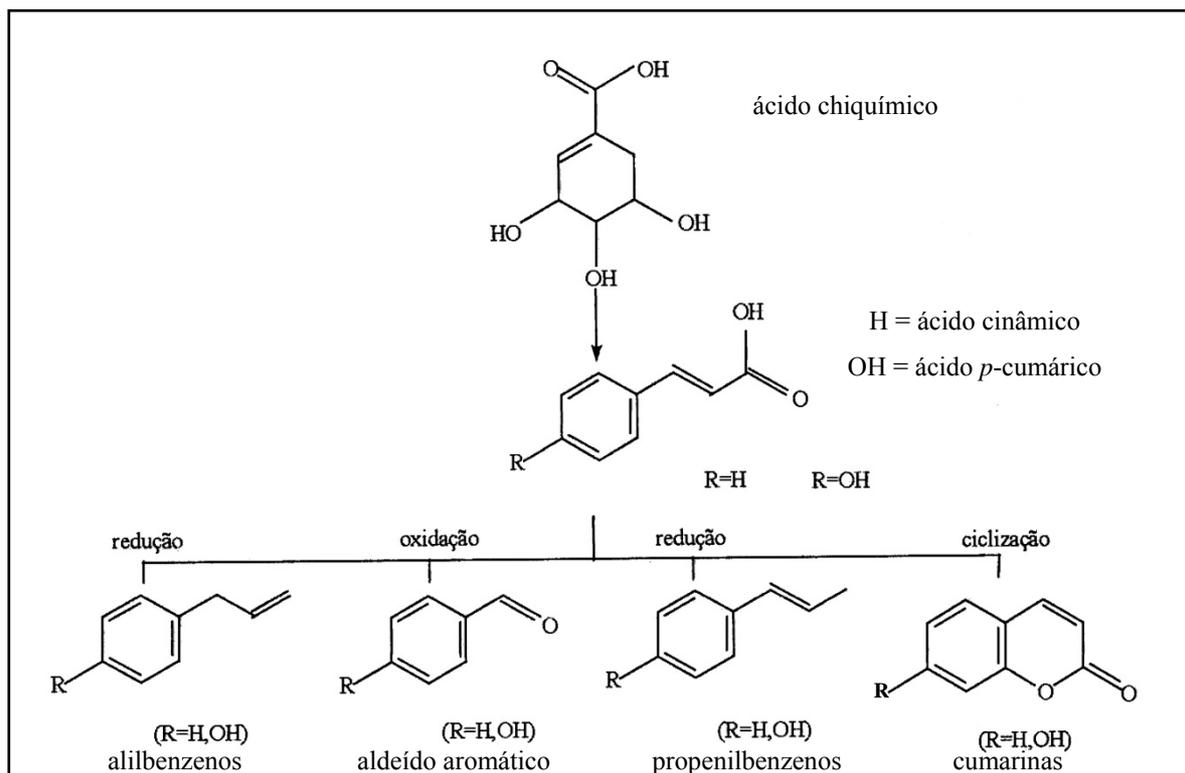


Figura 2. Formação dos compostos fenilpropanoídicos (adaptado de Simões & Spitzer 2004).

A junção de uma molécula de IPP a uma molécula de DMAPP forma o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos (C₁₀). À medida que são adicionadas unidades de IPP, formam-se o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C₁₅) e o difosfato de geranil geranila (GGPP), precursor dos diterpenos (C₂₀) (Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000, Aharoni 2006). Estas estruturas são posteriormente modificadas por enzimas (hidroxilases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil transferases), que juntas geram uma série de compostos diferentes e dão origem aos óleos essenciais, terebentinas e resinas (Bohlmann *et al.* 1998, Aharoni 2006). Os triterpenos (C₃₀) são formados pela junção de duas

unidades FPP e os tetraterpenos (C_{40}) pela junção de duas unidades GGPP (Figura 3) (Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000).

Os monoterpenos são altamente voláteis, podem ser hidrocarbonetos (mirceno, ocimeno, terpineno, α e β -pineno, sabineno) ou compostos oxigenados, com funções álcool (linalol, mentol, α -terpineol), aldeído (geranial, neral, citronelal), cetona (pinocarvona, fenchona, mentona), éter (1,8-cineol, mentofurano) ou éster (α -acetato de terpinila, acetato de linalila, acetato de isobornila). Os sesquiterpenos, por serem cadeias carbônicas maiores, são menos voláteis que os monoterpenos. Assim como estes, podem ser hidrocarbonetos (β -cariofileno, elemenos, β -bisaboleno, farnesenos) ou oxigenados, com funções álcool (bisabolol, β -santalol, viridiflorol), cetona (β -vetivenona, germacrona, turmeronas), epóxido (óxido de cariofileno, epóxidos de humuleno) (Bakkali *et al.* 2008).

Atualmente, são conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, dos quais 300 tem importância comercial para indústrias farmacêutica, alimentícia, de cosméticos e perfumes e para agronomia (Bakkali *et al.* 2008).

Existem diferentes métodos de extração de óleos essenciais. Para a escolha do melhor método, deve-se levar em consideração a localização do óleo na planta ou a finalidade do seu uso (Simões & Spitzer 2004, Bakkali *et al.* 2008). A enfloração ou *enfleurage* é utilizada principalmente pelas indústrias de perfumes (Bakkali *et al.* 2008), para a extração de óleos essenciais de pétalas de flores de baixo rendimento e alto valor comercial. A técnica consiste em depositar as pétalas sobre uma camada de gordura, à temperatura ambiente, durante período suficiente para extrair totalmente o óleo. As pétalas vão sendo trocadas até que a gordura fique saturada e seja, posteriormente, tratada com álcool. Para a retirada do álcool, é feita uma destilação a baixa temperatura (Simões & Spitzer 2004).

Para a indústria, a extração por CO_2 supercrítico é um método muito eficiente (Simões & Spitzer 2004, Bakkali *et al.* 2008). A técnica consiste em liquefazer o CO_2 por compressão, seguido de um aquecimento a 31 °C, desta forma, o CO_2 atinge um estado intermediário, com viscosidade de um gás e capacidade de dissolução elevada, como de um líquido. Terminada a extração, o CO_2 volta à temperatura ambiente, sendo totalmente eliminado do óleo obtido. Nenhum traço de solvente é encontrado no óleo obtido por esse método, além disso, por não utilizar temperatura alta, não há o risco de ocorrer a degradação nem a formação de novos compostos. Por outro lado, apresenta um custo elevado (Simões & Spitzer 2004).

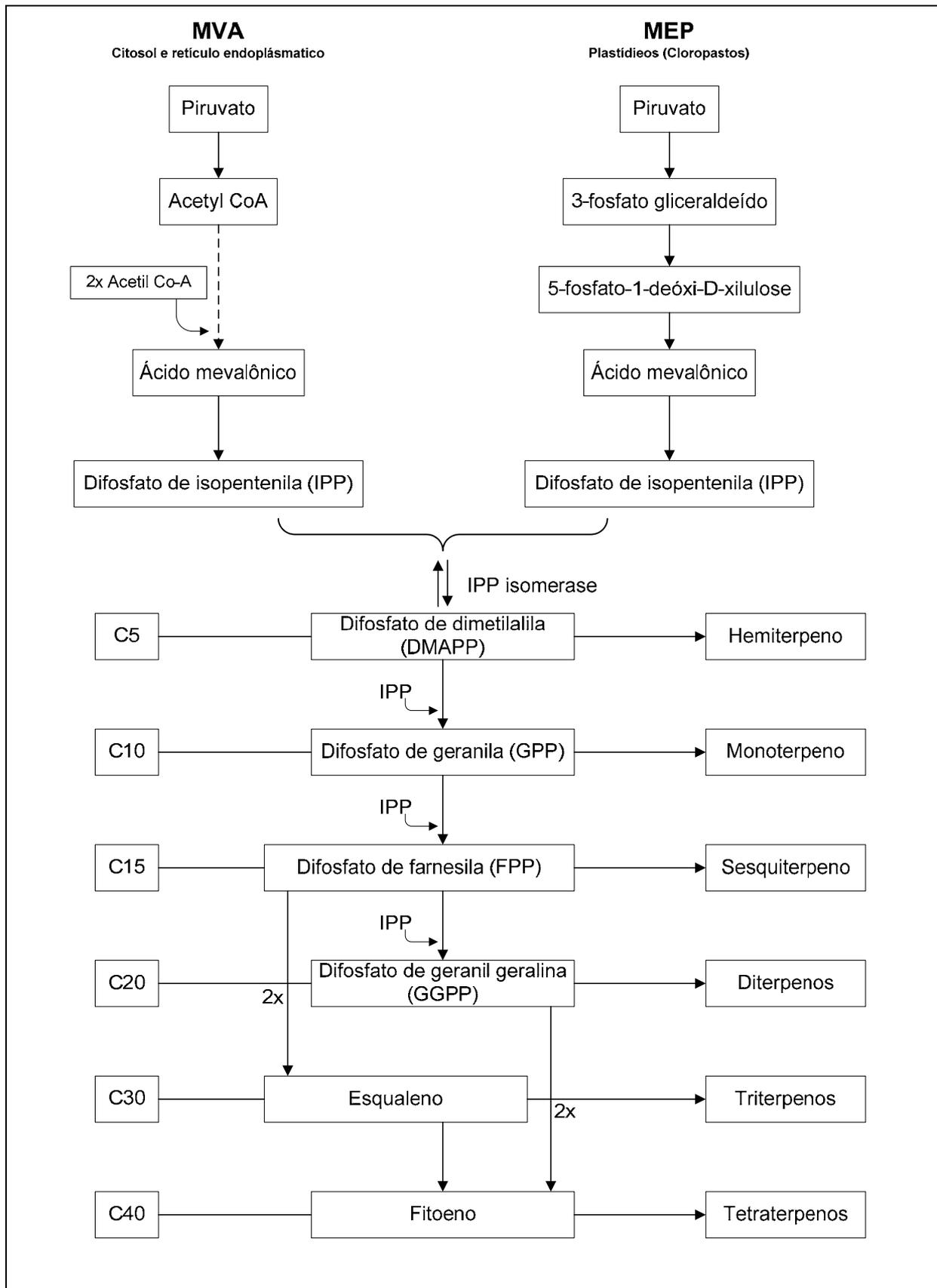


Figura 3. Biossíntese de compostos terpênicos. Via clássica (MVA) e via alternativa (MEP) (adaptado de Owen & Peñuelas, 2005).

Para óleos com propriedades bactericidas e fungicidas, utilizados por indústrias farmacêuticas e alimentícias, Bakkali *et al.* (2008) sugerem que seja feita a extração por vapor de água ou a extração por prensagem. Esta última é utilizada para a extração de óleos presentes no pericarpo de frutos cítricos, após a prensagem destes, o óleo é separado da emulsão formada junto com a água por decantação, centrifugação ou destilação fracionada (Simões & Spitzer 2004). A extração por vapor de água é semelhante à hidrodestilação, ambas retiram óleos essenciais por arraste a vapor, a diferença entre elas é o modo de preparação do material: na primeira, o material não entra em contato com a água; na segunda o material é depositado na água e os óleos essenciais, por possuírem tensão de vapor mais elevada, são arrastados. Esta técnica é realizada frequentemente em laboratório utilizando-se o aparelho Clevenger (Raggi 2008).

A extração com solventes orgânicos retira do material além dos óleos essenciais, outros compostos lipofílicos produzidos pela planta, por este motivo, tem valor comercial baixo (Simões & Spitzer 2004).

Embora seja determinada geneticamente, sendo em geral específica para determinado órgão e determinado estágio de desenvolvimento, a composição química dos óleos essenciais pode variar em função de fatores ambientais como a umidade do ar, disponibilidade hídrica, condições de solo, intensidade luminosa, temperatura, período de coleta e herbivoria (Waterman 1993, Tisserand & Balacs 1995).

Fatores endógenos como idade da planta e estágio fenológico, bem como a existência de quimiotipos também podem acarretar mudanças na composição e no rendimento dos voláteis (Tisserand & Balacs 1995). Quimiotipos são frequentes em plantas ricas em óleos essenciais (Simões & Spitzer 2004). *Siparuna guianenses*, por exemplo, apresenta três quimiotipos amazônicos: quimiotipo A, rico em *epi*-bisabolol e espatulenol; quimiotipo B, rico em selin-11-en-4-ol e espatulenol e quimiotipo C rico em germacrona e atractilona (Andrade *et al.* 2004). Outro exemplo é tomilho (*Thymus vulgaris*), que apresenta uma série de quimiotipos (Kaloustian *et al.* 2005), oito foram identificados na Europa: sete na França, cujos componentes majoritários são timol, carvacrol, geraniol, linalol, α -terpineol, (*E*)-4-tuyanol e (*Z*)-8-mircenol e um na Espanha, rico em cineol. As diferenças intra-específicas na composição química podem interferir nas atividades biológicas, os quimiotipos timol e carvacrol de *T. vulgaris* possuem atividade antimicrobiana mais forte em relação aos demais, e por serem majoritariamente constituídos por compostos fenólicos são potentes antioxidantes e atuam na inibição da agregação plaquetária (Thompson *et al.* 2003).

Propriedades anti-sépticas dos óleos essenciais são mencionadas na Bíblia (Apel *et al.* 2006); os egípcios usavam-nos em procedimentos de mumificação, para evitar a degradação por bactérias e fungos (Apel *et al.* 2006, Edris 2007).

A literatura relata uma gama de voláteis ativos contra bactérias (Nagy & Tengerdy 1968, Toama *et al.* 1974, Akpata & Akinrimisi 1977, Himejima *et al.* 1992, Ahmed *et al.* 1993, Mendoza *et al.* 1997, Amaral *et al.* 1998, Carson *et al.* 2002), fungos (Harrigan *et al.* 1993, Ayafor *et al.* 1994, Rana *et al.* 1997, Hammer *et al.* 2000, Passos *et al.* 2002, Jaham *et al.* 2005) e vírus (Amoros *et al.* 1992, Allahverdiyev *et al.* 2004) dentre eles o HIV (Pengsuparp *et al.* 1995). Segundo Cowan (1999), até 1977 foi relatado que 60% dos óleos essenciais estudados eram ativos contra fungos e 30% contra bactérias.

Considerando o grande número de constituintes, pouco se sabe sobre o modo de ação molecular dos óleos essenciais (Cowan 1999, Gershenzon & Dudareva 2007). Por se tratarem de compostos lipofílicos, especula-se que seu mecanismo de ação envolva o rompimento de membranas celulares e sua toxicidade seja causada pela perda do controle quimiosmótico (Cowan 1999, Gershenzon & Dudareva 2007, Bakkali *et al.* 2008), o que acarretaria na perda de íons e redução do potencial de membrana, com o colapso das bombas de prótons e depleção dos níveis de ATP (Gershenzon & Dudareva 2007, Bakkali *et al.* 2008).

A complexidade química dos óleos essenciais dificulta a análise dos seus componentes bioativos. Em muitos casos registrados na literatura, o constituinte majoritário é responsável pela atividade biológica. No entanto, esta pode ser atribuída à ação sinérgica ou antagônica de vários componentes (Burt 2004, Bakkali *et al.* 2008).

Compostos fenólicos como timol, carvacrol e eugenol possuem atividades contra uma ampla gama de bactérias e são empregados na indústria para a produção de cremes dentais e enxaguantes bucais. Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* inibem o crescimento de microorganismos multi-resistentes a drogas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, *Klebsiellae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, sua ação bactericida é atribuída ao terpinen-4-ol (Edris 2007). A ação antibacteriana de monoterpenos como linalol, 1-8-cineol e limoneno também foram comprovadas, os dois últimos contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Sonboli *et al.* 2005, Sonboli *et al.* 2006) e o primeiro contra *Candida albicans*, *E. coli* e *Staphylococcus aureus* (Peana *et al.* 1999, Sonboli *et al.* 2005)

Estudos antimicrobianos são de grande relevância, pois, atualmente, um dos desafios para a área médica é a busca de agentes antimicrobianos mais eficazes no tratamento de

infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (Cowan 1999, Lima *et al.* 2006a) como portadores de leucemia, linfoma, diabetes mellitus, síndrome da imunodeficiência adquirida (Lima *et al.* 2006b), indivíduos que sofreram transplantes ou quimioterapia (Lima *et al.* 2006a). Dentre as infecções micóticas, a candidíase é a mais comum, seu agente etiológico mais frequente é *Candida albicans*, além de outras 17 espécies do mesmo gênero (Hazen 1995).

Além das atividades antimicrobianas, óleos essenciais apresentam propriedades analgésica, antiinflamatória, antimalárica, anticarcinogênica, anticonvulsante, antioxidante, gastro-protetora (Lahlou 2004) e anticolinesterásica (Trevisan *et al.* 2003). Esta última propriedade é de grande interesse no controle da doença de Alzheimer, patologia neurodegenerativa progressiva, que afeta principalmente a população idosa, responsável por 50-60% dos casos de demência em pessoas acima de 65 anos (Howes & Houghton 2003, Barbosa-Filho *et al.* 2006). O principal sintoma é a perda de memória, à medida que a doença progride aparecem características como déficit na linguagem, depressão, alterações de humor, agitação e psicose. Um dos tratamentos mais promissores para a doença é o aumento do nível do neurotransmissor acetilcolina por meio da inibição da enzima acetilcolinesterase (Barbosa-Filho *et al.* 2006). Óleos essenciais de *Salvia lavandulaefolia* inibiram a enzima em questão tanto em testes *in vitro* como *in vivo* (Perry *et al.* 2002). Alguns monoterpenos isolados como α - e β -pineno, fenchol e fenchona também mostraram-se eficientes na inibição da acetilcolinesterase (Miyazawa & Yamafuji, 2005).

Muitos autores, como Balandrin *et al.* (1985), Chechin Filho & Yunes (1998), Gottlieb & Borin (2000), Verpoorte (2000) ressaltam a importância de intensificarem-se os estudos de compostos do metabolismo secundário pelo fato de muitos deles terem aplicação como drogas ou servirem de modelos moleculares para a síntese de novos fármacos.

De acordo com os dados apresentados por Chechin Filho & Yunes (1998), das 250-500 mil espécies de plantas existentes no planeta, somente 5% foram estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem ainda menor foi avaliada quanto às atividades biológicas. O número de constituintes químicos ativos das espécies tropicais é de três a quatro vezes maior que nas plantas que habitam climas temperados (Rodriguez & West 1995), provavelmente devido ao intenso número de interações verificado nas florestas tropicais.

O Brasil possui aproximadamente 55 mil espécies de angiospermas, ocupando o primeiro lugar no ranking mundial. Estes dados demonstram que nosso país possui uma flora riquíssima, considerada uma fonte inesgotável de metabólitos secundários. Infelizmente, com

relação ao número de artigos publicados em estudos de componentes químicos de plantas, ele ocupa o 17º lugar no mundo (Gottlieb & Borin, 2000).

Dentre os biomas mais ameaçados do mundo, encontra-se a Mata Atlântica. Myers *et al.* (2000) listaram-na entre as 25 áreas prioritárias de conservação mundiais, denominadas “hotspots”. De acordo com estes autores, são considerados “hotspots” os biomas que possuem um número elevado de espécies endêmicas agregado a uma acelerada perda de área. O Cerrado brasileiro também está incluso nesta lista.

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que originalmente estendia-se de forma contínua ao longo da costa brasileira até o leste do Paraguai e nordeste da Argentina (Tabarelli 2005, SOS Mata Atlântica & INPE 2008). Seus limites originais abrangiam 17 estados (PI, CE, RN, PB, PE, SE, AL, BA, ES, MG, GO, RJ, MS, SP, PR, SC e RS), perfazendo 15% do território brasileiro (SOS Mata Atlântica & INPE 2008). Dos 1,5 milhão de km² inicialmente ocupados, hoje restam menos de 100 mil km² (cerca de 7%) da sua área, distribuídos em fragmentos dispersos no território brasileiro (Tabarelli 2005, SOS Mata Atlântica & INPE 2008). Apesar da intensa degradação sofrida por este bioma ao longo dos anos, sua riqueza em biodiversidade é tão significativa, que o recorde mundial de diversidade de plantas lenhosas foi registrado lá, com 454 espécies em apenas um hectare no sul da Bahia. Além disso, a Mata Atlântica abriga cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, dentre as quais 6 mil estão restritas ao bioma (SOS Mata Atlântica & INPE 2008).

A diversidade de formações florestais da Mata Atlântica é conseqüência de sua grande variação latitudinal, altitudinal e geomorfológica, tais características proporcionaram a formação de diferentes habitats capazes de abrigar plantas e animais com diferentes adaptações e preferências de ambiente (Pivello & Peccinini 2002).

Apesar da riqueza da flora nas zonas tropicais e da importância de seu uso medicinal pela população, menos de 1% deste potencial já foi quimicamente estudado (Plotkin, 1991). Assim, considerando o potencial taxonômico disponível e a velocidade de extinção de espécies pela destruição dos ecossistemas, é provável que nem 5% dessas plantas sejam adicionadas ao conhecimento disponível antes que sejam extintas (Gottlieb & Kaplan 1990). De acordo com a literatura revisada, uma família botânica muito utilizada na medicina popular, logo com grandes possibilidades de possuir potencial farmacológico, porém relativamente pouco investigada, é Chloranthaceae.

Chloranthaceae é uma família pantropical, constituída por quatro gêneros e aproximadamente 75 espécies (Todzia 1988, Balthazar & Endress 1999, Kong 2001, Eklund *et al.* 2004). Evidências no registro fóssil, morfologia comparada e análises moleculares filogenéticas indicam que esta família está entre as linhagens mais antigas das angiospermas (Kong 2001, Zhang & Renner 2003), além disso, os representantes deste grupo possuem o registro fóssil mais antigo e extenso, datado do início do período cretáceo (Todzia 1988, Todzia & Keating 1991, Balthazar & Endress 1999, Doyle *et al.* 2003), o que faz com que muitos estudiosos como Endress (2001) a considerem como uma família basal. Em decorrência disso, a maioria dos estudos acerca dessa família está restrito à filogenia ou à paleobotânica.

As clorantáceas são plantas arbustivas, herbáceas ou arbóreas, com folhas opostas simples, pinadas e com margens serradas, pecioladas, com estípulas livres no ápice e soldadas na base entre si e com o pecíolo, formando uma bainha amplexicaule (Reitz 1965). A família tem uma curiosa distribuição geográfica, compreendendo grandes áreas descontínuas – Américas, ilhas da Oceania e da Ásia oriental e tropical (Occhioni 1954).

Os quatro gêneros da família dividem-se em dois grupos. Pelo caráter bissexual de suas flores, os gêneros *Sarcandra* e *Chloranthus*, ambos confinados no leste asiático e na região indo-malasiana, tem maior proximidade filogenética. Por outro lado, os gêneros *Ascarina* e *Hedyosmum* se distinguem por possuírem flores unissexuadas e hábito arbóreo ou arbustivo (Todzia 1988, Todzia & Keating 1991, Doyle *et al.* 2003, Eklund *et al.* 2004). As principais diferenças entre os quatro gêneros encontram-se na tabela 1.

O gênero *Hedyosmum* Sw. compreende 40 espécies de árvores e arbustos, predominantemente montanos e neotropicais. Distribui-se desde o México, percorrendo toda América Central até a Bolívia, leste das Guianas e Antilhas. *Hedyosmum brasiliense* ocorre no Paraguai e do centro até o sul do Brasil, a espécie *Hedyosmum orientale* é disjunta (a única que ocorre fora da América), de ocorrência no sudeste asiático. O centro de diversificação do gênero é o norte dos Andes, onde se encontram mais de 50% das espécies (Todzia, 1988).

O nome do gênero *Hedyosmum* (do grego *hedy*, agradável; *osmum*, odor, fragrância) faz alusão a uma das características mais notáveis destas plantas: o cheiro agradável que emana de todas as suas partes (Reitz 1965, Todzia 1988). A maioria das espécies do gênero são árvores ou arvoretas de 2 a 30 m de altura, poucas espécies são arbustivas (*H. brenesii*, *H. nutans* e *H. scabrum*) e apenas uma é herbácea (*H. orientale*) (Todzia 1988).

Tabela 1. Comparação das principais diferenças entre os gêneros da família Chloranthaceae (adaptado de Todzia 1988).

Característica	<i>Sarcandra</i>	<i>Chloranthus</i>	<i>Ascarina</i>	<i>Hedyosmum</i>
Nº de espécies	3	aprox. 20	11	40
Distribuição	Malásia, China, Indochina, Japão, Índia e Ceilão	Japão, China, extremo leste da ex-URSS até a Índia, Ceilão e leste da Malásia até Nova Guiné	Ilhas do Pacífico até Nova Zelândia, Ilhas Marquesas até Bornéu, Madagascar	América Central e do Sul, 1 sp. no sudeste asiático
Hábito	arbustivo	herbáceo ou arbustivo	arbustivo ou arbóreo	arbustivo, arbóreo ou herbáceo
Flores	bissexuais	bissexuais	unissexuais	unissexuais
Estigmas	pequenos, com perfume e úmidos	pequenos, com perfume e úmidos	grandes, inodoros e secos	grandes, inodoros e secos
Nº de cromossomos	n = 15	n = 14, 15	n = 14	n = 8

Os representantes do gênero ocorrem principalmente em ambientes úmidos, de floresta montana entre 600 e 3000 m de altura. Poucas espécies ocorrem fora destes ambientes, podendo aparecer em altitudes maiores ou menores. Todas as espécies são perenes, alguns autores afirmam que a polinização é anemófila (Leroy 1983 *apud* Todzia 1988), pelo fato de suas flores femininas possuírem estigmas irregulares e secos e suas inflorescências não portarem nenhuma estrutura que presumivelmente atraia polinizadores, sejam insetos ou mamíferos. Além disso, flores masculinas produzem pólen em abundância que, anatomicamente, parecem flutuar com o vento (Todzia 1988). De acordo com Todzia (1988), os frutos são carnosos, aromáticos e de cor clara, todas as espécies do gênero tem pássaros como dispersores.

Por toda América Central e do Sul, as folhas aromáticas das várias espécies de *Hedyosmum* são usadas principalmente como chás para o alívio de uma variedade de enfermidades. Em sua monografia sobre o gênero, Todzia (1988) faz menção sobre os usos de algumas espécies na medicina popular: *H. scabrum* e *H. scaberrimum* são usados para aliviar dores de estômago e, ainda a primeira espécie é usada para estimular a concepção; com as folhas de *H. sprucei* se faz cataplasma para mordidas de cobra; o chá de *H. cumbalense* tem efeito estimulante; a infusão de folhas de *H. racemosum* é usada para dores nas articulações.

A autora ainda complementa, de uma maneira mais genérica, que espécies do gênero são empregadas para eliminar dores de cabeça, cólicas, febre e resfriado.

Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. pode ser considerado um arbusto ou arvoreta que varia de 2,9 a 7 m de altura, apresenta-se distribuído por toda região central e sul do Brasil, podendo ser encontrado também no leste do Paraguai. No planalto central do Brasil, ocorre em matas de galeria e certas regiões de altitudes que variam de 900 a 1550 m. Na Serra do Mar, pode ser encontrado em vegetação de restinga, perto do nível do mar até altitudes superiores a 1200 m, em floresta montana (Todzia 1988). Todzia (1988) menciona que a espécie apresenta grande variação morfológica, maior do que todas as outras espécies do gênero, especialmente no que se refere ao tamanho da folha e densidade de tricomas no caule, e acrescenta que tais variações parecem ser resultado de diferentes graus de exposição à luz e disponibilidade de água.

Segundo a descrição de Occhioni (1954), as plantas desta espécie são dióicas, aromáticas, resiníferas, com os ramos opostos, folhas peninérveas, oblongas ou ovais oblongas, base atenuada, ápice acuminado, margens serreadas, pecioladas, com estípulas livres só no ápice e soldadas com o pecíolo em uma bainha muito grande, em forma de ócrea. Apresentam inflorescências com flores femininas (Figura 5A) pequenas, esverdeadas, inodoras, sésseis com brácteas carnosas e unidas entre si; e inflorescências masculinas (Figura 5B) do tipo espigas ovais ou cilíndricas, dispostas em panículas axilares, com flores também esverdeadas com brácteas lineares ou triangulares lanceoladas. Os frutos são pequenas drupas subcarnosas circundadas por brácteas persistentes e soldadas entre si, durante a maturação são de coloração branco-lácteo.

Popularmente, *H. brasiliense* é conhecido por sinonímias vulgares que variam de acordo com a região: âmbar vegetal, canela cânfora (DF); chá-de-índio (SP); chá-de-bugre (DF, RJ, e MG); chá-de-soldado (DF e RJ); cidreira (PR e SC); erva almíscar e erva-de-bugre (RJ); erva cidreira (SC); erva-de-soldado (DF, SP e MG); hortelã-do-brejo (RJ e MG) e hortelã silvestre (RJ). Seu consumo na medicina popular se deve às suas características aromáticas, analépticas e febrífugas, sendo utilizado no tratamento de enxaqueca, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, dores de estômago, como diurético, e na forma de vinho é considerado como tônico e afrodisíaco (Reitz 1965, Todzia 1988). Contudo, apenas as atividades analgésica (Trentin *et al.* 1999) e anticoagulante (Guedes 1997 *apud* Machado *et al.* 2003) foram confirmadas.



Figura 5. Detalhe das inflorescências femininas (A) e masculinas (B) de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. Miq.

Existem poucos registros na literatura sobre a composição química de espécies do gênero *Hedyosmum*. Podem ser destacados trabalhos de identificação de lactonas sesquiterpênicas de *H. arborescens* (Bercion *et al.* 2005). Tais estruturas moleculares, de acordo com os autores, são incomuns na família Chloranthaceae e frequentes em várias espécies da família Asteraceae, dentre outras famílias, e em espécies de origem marinha.

Lorenzo *et al.* (2003) compararam a composição de óleos essenciais de folhas frescas de *H. angustifolium* e *H. scabrum*, e verificaram que muitos dos componentes estavam presentes nas duas espécies, porém em quantidades diferentes. Ambos apresentaram hidrocarbonetos monoterpênicos como constituintes majoritários, entretanto, o óleo de *H. angustifolium* apresentou alta percentagem de monoterpênicos oxigenados, enquanto hidrocarbonetos sesquiterpênicos tiveram papel de destaque no óleo de *H. scabrum*. Uma das principais diferenças entre os óleos das duas espécies corresponde à distribuição de enantiômeros do linalol, indicando respostas metabólicas diferentes em cada espécie, o que os autores apontam como possíveis marcadores quimiotaxonômicos.

Mundina *et al.* (2000) fizeram comparações entre a composição de óleos essenciais de folhas e frutos de três espécies de *Hedyosmum* provenientes da Costa Rica, e detectaram a presença majoritária de hidrocarbonetos monoterpênicos nos óleos de *H. bonplandianum* e *H. mexicanum*, sendo, nas duas amostras, sabineno o constituinte majoritário e hidrocarbonetos sesquiterpênicos em *H. costaricense*, com alto teor de germacreno-D.

Mais escassos ainda são os estudos que tem como objetivo identificar os princípios ativos responsáveis por atividades farmacológicas, como é o caso da atividade analgésica de lactonas sesquiterpênicas de *H. brasiliense* (Trentin *et al.* 1999) e de flavonóides glicosídicos de *H. bonplandianum* (Cárdenas *et al.* 1993). Segundo Trentin *et al.* (1999), o extrato hidroalcolico de *H. brasiliense* e a lactona sesquiterpênica isolada 13-HDS (13-hidroxi-8,9-dehidroshizukanolida) produziram pronunciado efeito analgésico dose-dependente em ensaios de constrição abdominal induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético em ratos, sendo esta última mais efetiva que aspirina, acetaminofeno e dipirona, porém menos efetiva que a morfina.

Estudos recentes revelaram que óleos essenciais de folhas de *Hedyosmum arborecens* (espécie nativa do Caribe) possuem atividade antitumoral frente a linhagens de células humanas de carcinoma hepático e de adenocarcinoma do cólon nas concentrações de 158 µg/mL e 178 µg/mL (DL₅₀), respectivamente, o que caracteriza uma atividade moderada (Sylvestre *et al.* 2007).

Esses trabalhos são sumamente importantes e servem como instrumento para direcionar a identificação de princípios ativos dessas espécies, frequentemente utilizadas na medicina popular, porém, sem comprovação científica de sua atividade farmacológica.

Os estudos com plantas medicinais no Brasil são relativamente recentes e o número de pesquisadores que se dedicam a essa área ainda é reduzido, se comparado ao grande número de espécies a serem investigadas (Gottlieb & Borin 1997). Devido a essa escassez, faz-se necessária a ampliação de pesquisas nessa área tanto em termos fitoquímicos, na busca de novos modelos moleculares que possam levar à descoberta de novos medicamentos para a cura ou controle de doenças, como em termos fisiológicos e ecológicos, que ampliarão o conhecimento sobre o desenvolvimento dessas plantas, sua propagação e as relações entre as espécies.

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- comparar a composição química dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* coletadas em duas áreas de Mata Atlântica: Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, no município de Santo André (Serra do Mar) e Fazenda Ribeirão Grande, propriedade particular da Votorantim Celulose e Papel, no município de Pindamonhangaba (Serra da Mantiqueira), ambas no estado de São Paulo, nas quatro estações do ano;
- verificar o potencial antifúngico, anticolinesterásico e antimicrobiano dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* provenientes das duas áreas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material Vegetal

Foram coletadas folhas de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq., originárias de dois locais diferentes de Mata Atlântica: Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba (23° 46' 00''S e 46° 18' 20''W), localizada na Serra do Mar, município de Santo André e Fazenda São Sebastião do Ribeirão Grande (22° 47' 08''S e 45° 28' 17''W), propriedade particular da Votorantim Celulose e Papel localizada na Serra da Mantiqueira, município de Pindamonhangaba, ambas no estado de São Paulo.

Em cada localidade, foram demarcados quatro indivíduos. As coletas foram realizadas pela manhã, no meio de cada estação, no período de novembro de 2007 a setembro de 2008, conforme dados da Tabela 2.

Tabela 2. Datas das coletas do material utilizado para a extração de óleos essenciais no período de novembro de 2007 a setembro de 2008.

Estação do ano	Data da coleta	
	Pindamonhangaba	Paranapiacaba
Primavera	22/11/2007	28/11/2007
Verão	22/02/2008	27/02/2008
Outono	20/05/2008	29/05/2008
Inverno	05/09/2008	09/09/2008

Em todas as coletas, parte do material fresco foi submetida à extração de óleos essenciais e o restante do material foi colocado em casa de vegetação para secar a sombra, em temperatura ambiente até a obtenção de massa constante.

3.1.2. Microorganismos

Os microorganismos utilizados para os testes antimicrobianos foram: os fungos *Cladosporium cladosporioides* (SPC - Micoteca do Instituto de Botânica 491) e

Cladosporium sphaerospermum (SPC 140) para as análises por bioautografia e *Candida albicans* (ATCC, American Type Culture Collection, 10231) para os ensaios em microplaca, e a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538) e as Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Todas as bactérias foram ensaiadas em microplaca, em condições semelhantes a *Candida albicans*.

3.2. Extração dos óleos essenciais

O material fresco e seco de cada coleta foi submetido à extração do óleo essencial por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, por um período 3 h e 30 minutos, conforme normas adaptadas da Farmacopéia Brasileira (Farmacopéia 2001, OMS 1992).

Após a extração foi recolhido o óleo do frasco florentino do aparelho de Clevenger, ao qual adicionou-se pentano e sulfato de sódio anidro, para remover possíveis resíduos de água. Em seguida, o pentano foi removido em evaporador rotatório. Os óleos foram acondicionados em frascos e armazenados em freezer a -22°C até o momento das análises. Os rendimentos foram calculados com base na massa dos óleos e nas massas do material fresco ou seco utilizado na extração.

3.3. Identificação dos compostos dos óleos essenciais

Amostras de 10 µL dos óleos essenciais, diluídas em acetona na proporção de 1:100, foram analisadas por cromatografia a gás, em aparelho Hewlett-Packard acoplado a espectrômetro de massas. A coluna capilar utilizada foi HP 5-MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura), cujas temperaturas inicial e final foram de 40°C e 240°C, respectivamente, com aquecimento gradativo de 3°C min⁻¹ (tempo total de análise: 78 min). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste (1 mL min⁻¹) a uma pressão de 80 kPa. O nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares na razão de 1:1:10, respectivamente. O índice de retenção de Kováts (IK) (Collins & Braga 1988) foi calculado com base numa série homóloga de *n*-alcanos (C₅ – C₃₀), submetida às mesmas condições da análise cromatográfica, conforme fórmula abaixo:

$$I = \frac{100z + 100(\log t'RX - \log t'RZ)}{(\log t'R(Z+1) - \log t'RZ)}$$

Em que:

Z = número de átomos de carbono com menor massa molecular

t'_{RX} = tempo de retenção do composto x , sendo que t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$

t'_{RZ} e $t'_{R(Z+1)}$ = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

Os cromatogramas foram reintegrados com área de pico inicial de 0,50% para os compostos. A identificação destes foi feita por comparação de seus índices de Kováts (IK) e de seus espectros de massas com a biblioteca do sistema Willey 275 e a literatura especializada (Adams 2007).

3.4. Ensaio biológico

3.4.1. Atividade antimicrobiana

Os ensaios de atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica gel foram realizados no Instituto de Botânica de São Paulo - Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Os ensaios de atividade antibacteriana e antifúngica por diluição em microplaca foram realizados no laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.4.1.1. Atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica-gel

3.4.1.1.1. Preparo das amostras

Amostras de 5 μL de cada óleo essencial foram pesadas e diluídas em acetona, ajustadas na concentração de 200 μg 10 μL^{-1} .

3.4.1.1.2. Obtenção dos microorganismos

Cepas dos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides* obtidos da micoteca do Instituto de Botânica de São Paulo foram incubadas em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar - Difco) a 25°C por 14 dias. Após esse período foi feita a extração dos

esporos com solução de sais e glicose (6:1). A suspensão foi filtrada e armazenada a -18°C para posterior nebulização nas cromatofolhas.

3.4.1.1.3. Ensaio antifúngico

As amostras de óleos e o controle positivo Nistatina (1 µg) diluídos foram aplicados em cromatofolhas (placas prontas de sílica gel suportadas em alumínio F₂₅₄ Merk®). As cromatofolhas foram nebulizadas com uma suspensão de esporos dos fungos (> 2x10⁶ esporos mL⁻¹) em solução de glicose e sais (6:1) e incubadas em câmara úmida a 27°C por 48 h, no escuro (Homans & Fuchs 1970, Rahalison *et al.* 1994).

Após o tempo de incubação, zonas claras corresponderam à área de inibição dos fungos pela ação dos óleos essenciais.

3.4.1.2. Atividade antifúngica por diluição em microplaca

3.4.1.2.1. Preparo das amostras

Amostras de 50 µL dos óleos essenciais foram diluídas em 150 µL de DMSO(Dimetilsufóxido)/Metanol (1:1), até obter-se uma proporção final de 3,125 µL de óleo mL⁻¹.

3.4.1.2.2. Obtenção dos microorganismos

Para cada ensaio, cepas da levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) foram incubadas em tubos inclinados contendo o meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA, Difco) a 25°C por 24 h. Após este período, os microrganismos foram ressuspensos com solução salina (0,85 %) e submetidos à padronização através de diluição seriada. As diluições 10⁴, 10⁵ e 10⁶ foram plaqueadas em duplicata, utilizando-se meio SDA, em seguida incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C (Tortora *et al.* 2000).

3.4.1.2.3. Ensaio antifúngico

As suspensões microbianas padronizadas foram diluídas em solução salina e inoculadas no meio de cultura líquido SDB (Sabouraud Dextrose Broth), obtendo-se uma concentração final de microrganismos em cada cavidade da microplaca de 200 a 400 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) em 200 µL.

A distribuição das substâncias nas microplacas, com 96 cavidades, obedeceu a um padrão pré-estabelecido com a presença de controle do meio (200 μL de meio SDB sem microrganismos), controle de crescimento (200 μL de meio SDB com microrganismos), controle negativo (190 μL de meio SDB inoculado com microrganismos acrescido de 10 μL de DMSO:MeOH - 1:1) e controle positivo (190 μL de meio SDB inoculado com microrganismos e 10 μL de antibiótico), em quatro repetições. O antibiótico utilizado foi a Nistatina na concentração de 1mg mL^{-1} . Amostras dos óleos essenciais (10 μL) já diluídas em DMSO:MeOH (1:1) foram adicionadas nas cavidades contendo 190 μL de meio SDB com microrganismos, em duplicata. Para a obtenção de um controle do número de colônias por cavidade, 200 μL do meio inoculado foram plaqueados em duplicata. As placas e microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C . Após o período de incubação, foram feitas a contagem do número de colônias nas placas e a leitura das microplacas em leitor (SLT Spectra) em $\lambda = 630\text{nm}$ (Salie *et al.* 1996, Willinger *et al.* 2000, Devienne & Raddi 2002).

3.4.1.3. Atividade antibacteriana por diluição em microplaca

3.4.1.3.1. Preparo das amostras

Amostras de 50 μL dos óleos essenciais foram diluídas em 150 μL de DMSO(Dimetilsufóxido)/Metanol (1:1), até obter-se uma proporção final de 3,125 μL de óleo mL^{-1} .

3.4.1.3.2. Obtenção dos microorganismos

Para cada ensaio, os microorganismos *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538) foram incubados em tubos inclinados contendo o meio Tryptose Soya Agar (TSA, Difco) a 37°C por 24 h. Após este período, os microrganismos foram ressuspendidos com solução salina (0,85 %) e submetidos à padronização através de diluição seriada. As diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 foram plaqueadas em duplicata, utilizando meio TSA, em seguida incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C (Tortora *et al.* 2000).

3.4.1.3.3. Ensaio antibacteriano

As soluções microbianas padronizadas foram diluídas em solução salina e inoculadas no meio de cultura líquido TSB (Tryptose Soya Broth), obtendo-se uma concentração final de microrganismos em cada cavidade da microplaca de 200 a 400 UFC em 200 μL .

A distribuição das substâncias nas microplacas, com 96 cavidades, obedeceu a um padrão pré-estabelecido com controle do meio (200 μL de meio TSB sem microrganismos), controle de crescimento (200 μL de meio TSB com microrganismos), controle negativo (190 μL de meio TSB inoculado com microrganismos acrescido de 10 μL de DMSO:MeOH - 1:1) e controle positivo (190 μL de meio TSB inoculado com microrganismos e 10 μL de antibiótico), em quatro repetições. Os antibióticos utilizados foram o Cloramfenicol, na concentração de 1mg mL^{-1} , para *E. coli* e *S. aureus* e Amicacina, na mesma concentração, para *P. aeruginosa*. Amostras dos óleos essenciais (10 μL) já diluídas em DMSO:MeOH (1:1) foram adicionadas nas cavidades contendo 190 μL de meio TSB com microrganismos, em duplicata. Para a obtenção de um controle do número de colônias por cavidade, 200 μL do meio inoculado foram plaqueados em duplicata. As placas e microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 24h na temperatura de 35°C. Após o período de incubação, foi feita a contagem do número de colônias nas placas e a leitura das microplacas em leitor (SLT Spectra) em $\lambda = 630\text{nm}$ (Salie *et al.* 1996, Willinger *et al.* 2000, Devienne & Raddi 2002).

3.4.2. Atividade anticolinesterásica

3.4.2.1. Ensaio quantitativo em microplaca

Os ensaios de atividade anticolinesterásica foram realizados no Instituto de Botânica de São Paulo - Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Para determinar a inibição da enzima acetilcolinesterase, foi utilizado o ensaio quantitativo na microplaca (Rhee *et al.* 2001, Trevisan *et al.* 2003).

3.4.2.2. Preparo das amostras

Amostras dos óleos (5 μL) foram pesadas e diluídas em metanol até a obtenção de 200 μg de óleo em 5 μL de metanol.

3.4.2.3. Ensaio anticolinesterásico

Para a realização do ensaio, foram preparadas previamente as seguintes soluções tampões: solução (A): Tris/HCl 50 mM, pH=8; solução (B): Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1% de albumina sérica bovina fração V e solução (C): Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂.6H₂O.

Para cada cavidade da placa foram adicionados 25µL de iodeto de acetiltiocolina 15 mM, 125µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM na solução (C), 50 µL da solução (B) e 25µL da amostra do óleo diluída 10 vezes na solução (A). Após esse preparo, foi medida a absorbância a 405 nm em leitor KC4-Biotek a cada 30 segundos por três vezes. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U mL⁻¹) e a absorbância medida novamente a cada 10 minutos por duas vezes (Ellman et al. 1961, Rhee et al. 2001).

Os resultados foram representados como médias das três repetições ± erro padrão das médias. A velocidade das reações foi calculada utilizando-se o software Microplate Manager version 4.0 (Bio-Rad Laboratories). Calculou-se a porcentagem de inibição pela comparação das velocidades das amostras em relação ao branco (10% de MeOH no tampão A).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram demarcados quatro indivíduos em cada local. Durante a primavera, foi possível encontrá-los em floração, como as plantas de *Hedyosmum brasiliense* são dióicas, detectou-se que os indivíduos 1 e 3 de Paranapiacaba eram femininos e os indivíduos 2 e 4, masculinos. Em Pindamonhangaba, os indivíduos 1 e 2 eram masculinos e os indivíduos 3 e 4, femininos.

Uma característica observada durante as coletas é que as folhas dos indivíduos de Pindamonhangaba, especialmente as do indivíduo 1, eram mais espessas do que as dos indivíduos de Paranapiacaba. Essa característica é condizente com os estudos de *H. brasiliense* realizados por Todzia (1988), em que a autora menciona que há grande variação morfológica na espécie conforme ocorrem variações ambientais e sugere que os fatores preponderantes seriam a exposição à luz e a disponibilidade de água.

Neste trabalho, fatores ligados ao ambiente ou à genética e fisiologia vegetal serão sempre relacionados com óleos de folhas frescas.

Ao longo das coletas, os indivíduos foram encontrados tanto em fase vegetativa como em fase reprodutiva (floração e frutificação), conforme especificado nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Estádio fenológico dos indivíduos de *Hedyosmum brasiliense* ao longo das estações do ano na RBAS de Paranapiacaba.

	Hb1 (♀)	Hb2 (♂)	Hb3 (♀)	Hb4 (♂)
Primavera	Auge da floração	Final da floração	Auge da floração	Final da floração
Verão	Início da frutificação	estéril	Auge da frutificação	estéril
Outono	estéril	estéril	estéril	estéril
Inverno	Início da floração	Auge da floração	Início da floração	Auge da floração

Tabela 4. Estádio fenológico dos indivíduos de *Hedyosmum brasiliense* ao longo das estações do ano na FSRG em Pindamonhangaba.

	Hb1 (♂)	Hb2 (♂)	Hb3 (♀)	Hb4 (♀)
Primavera	Final da floração	Estéril	Auge da floração	Auge da floração
Verão	Estéril	Estéril	Início da frutificação	Auge da frutificação
Outono	Estéril	Estéril	Final da frutificação	Estéril
Inverno	Auge da floração	Auge da floração	Início da Floração	Início da Floração

De acordo com os dados mostrados nas tabelas referidas acima, foi observado um sincronismo no estágio fenológico entre as arvoretas de Paranapiacaba, tal sincronismo não ocorreu entre os indivíduos de Pindamonhangaba. Spina *et al.* (2001) observaram que a época de floração de *H. brasiliense* se dá entre os meses de agosto a dezembro, este período coincide com o verificado para os indivíduos demarcados em ambos os locais (primavera e inverno).

As tabelas 5 e 6 mostram os valores dos rendimentos dos óleos essenciais de folhas frescas e secas coletadas em todas as estações, em Paranapiacaba e Pindamonhangaba, respectivamente.

Tabela 5. Rendimento (%) dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) e secas (FS) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente na RBAS de Paranapiacaba.

Coletas	Hb1		Hb2		Hb3		Hb4	
	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS
Primavera	0,16	0,64	0,31	0,84	0,19	0,72	0,12	0,50
Verão	0,21	0,64	0,45	1,05	0,20	0,70	0,24	0,64
Outono	0,21	0,80	0,43	0,85	0,35	0,93	0,21	0,80
Inverno	0,28	0,56	0,53	0,58	0,29	0,64	0,23	0,65

Tabela 6. Rendimento (%) dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) e secas (FS) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente na FSRG em Pindamonhangaba.

Coletas	Hb1		Hb2		Hb3		Hb4	
	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS
Primavera	0,07	0,15	0,14	0,29	0,07	0,47	0,09	0,30
Verão	0,12	0,27	0,10	0,43	0,16	0,35	0,14	0,29
Outono	0,13	0,16	0,06	0,35	0,16	0,39	0,15	0,29
Inverno	0,12	0,19	0,27	0,59	0,33	0,56	0,13	0,22

De acordo com os resultados demonstrados nas tabelas, para cada local de coleta, os rendimentos dos óleos essenciais extraídos foram sempre superiores nas amostras de óleos obtidos de folhas secas em relação aos obtidos de folhas frescas.

Ao comparar o rendimento dos óleos essenciais de folhas coletadas nas diferentes regiões, foi possível detectar variações: óleos obtidos de folhas de Paranapiacaba atingiram valores maiores em relação aos de Pindamonhangaba, tanto para folhas frescas como para folhas secas.

As médias dos rendimentos dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* coletadas em ambos os locais são mostradas na Figura 6.

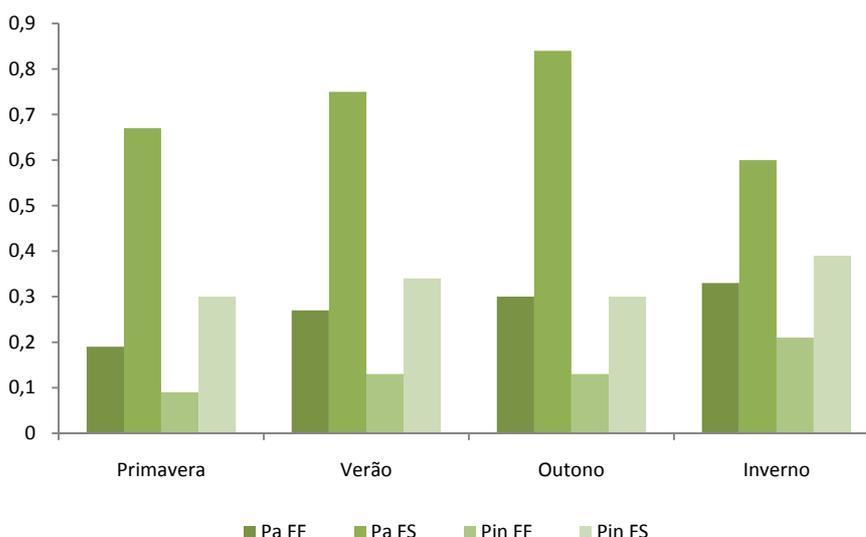


Figura 6. Médias dos rendimentos (%) dos óleos essenciais de folhas frescas (FF) e secas (FS) de *Hedyosmum brasiliense*, coletadas sazonalmente em Paranapiacaba (Pa) e Pindamonhangaba (Pin).

Parece não haver grandes flutuações no rendimento em resposta à sazonalidade. Em média, os maiores rendimentos foram obtidos no inverno, exceto para os óleos extraídos de folhas secas dos indivíduos de Paranapiacaba.

Muitos estudos apontam a sazonalidade como fator determinante na flutuação do rendimento dos voláteis. Os maiores rendimentos de óleos essenciais de *Santolina etrusca* foram detectados durante o verão, época associada ao período que antecede a fase reprodutiva (Flamini & Cioni 2007). O rendimento dos óleos de *Lippia alba* foram maiores na estação seca do que na estação chuvosa, no Cerrado. Tal fato foi atribuído à diminuição da temperatura e da luminosidade durante a estação seca (Santos & Inecco 2003). De maneira diferente, *Elyonorus muticos*, gramínea comum em regiões do Pantanal, apresentou maior rendimento de seus óleos essenciais durante a primavera (Hess *et al.* 2007), época em que foi detectada maior inibição desses contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Em contrapartida, o rendimento dos óleos essenciais de *Trilichia catigua* (catuaba) e *Siparuna guaianensis* (negramina) não variou conforme a época da coleta (Castellani *et al.* 2006). Isso demonstra que as plantas respondem de forma diferente às condições ambientais, variando conforme a espécie ou até mesmo dentro de uma mesma espécie. Não foram encontrados estudos com outras espécies do gênero *Hedyosmum* que analisassem a variação do rendimento quanto a aspectos sazonais ou fenológicos ou processos de secagem.

Os rendimentos de óleos essenciais obtidos de folhas frescas de *Hedyosmum bonplandianum* e *H. costaricensis*, coletadas na Costa Rica, foram de 0,06% e 0,10%, respectivamente (Mundina *et al.* 2000). Rendimentos maiores foram observados para os óleos de folhas frescas de *H. angustifolium* (0,30%) e *H. scabrum* (0,39%) coletados na Bolívia (Lorenzo *et al.* 2003).

Óleos essenciais de folhas frescas de *Hedyosmum brasiliense* possuem valores de rendimentos intermediários em relação às espécies citadas, com médias de 0,28% e 0,14% para indivíduos de Paranapiacaba e Pindamonhangaba, respectivamente (Figura 6). Em um estudo anterior de óleos essenciais de folhas frescas desta espécie coletadas na Serra do Mar, no estado do Paraná, foram obtidos rendimentos maiores, em média de 0,33% (Gabriel *et al.* 1998). Apesar dos indivíduos pertencerem à mesma espécie, nota-se que há variação no rendimento conforme a localização geográfica.

Os rendimentos dos óleos essenciais de folhas secas de *Hedyosmum mexicanum* e *H. arborecens* foram de 0,40% e 0,24%, respectivamente (Mundina *et al.* 2000, Sylvestre *et al.* 2007). Em *H. brasiliense*, a média do rendimento de óleos essenciais de folhas secas

coletadas em Paranapiacaba (0,72%) foi superior em relação às espécies de *Hedyosmum* citadas acima, bem como em relação aos óleos obtidos de folhas secas de Pindamonhangaba (0,33%).

Nas coletas realizadas em campo, observou-se que as arvoretas de *H. brasiliense* de Pindamonhangaba apresentavam mais sinais de herbivoria do que as arvoretas de Paranapiacaba. Esta situação pode ter influenciado não só a variação dos rendimentos como também a composição dos óleos entre os dois locais.

As plantas são submetidas a condições ambientais que influenciam seu desenvolvimento e crescimento, isso sugere a existência de alterações metabólicas como respostas à pressão seletiva do meio. Os fatores ambientais podem ser de caráter biótico ou abiótico. Fatores bióticos estão relacionados com as interações planta-herbívoro, planta-microorganismo ou planta-planta. Os mecanismos de respostas a estas interações variam de acordo com as relações ecológicas locais e imediatas, e podem resultar em diversas alterações na síntese de metabólitos (Andrade & Casali 1999). Dentre os fatores abióticos estão as condições de clima e solo. De acordo com Bell (1981), a intensidade luminosa pode alterar a ação de enzimas fotossensíveis envolvidas na rota biossintética, de forma a alterar a composição de óleos essenciais. Em outras palavras, condições ambientais que interferem no metabolismo primário, influenciam indiretamente o metabolismo secundário, visto que há uma relação intrínseca entre eles.

A composição química das amostras de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense*, coletadas durante as estações do ano, em Paranapiacaba e Pindamonhangaba, pode ser visualizada nas tabelas 7 e 8, respectivamente. O número de compostos variou de 17 a 33 em amostras de folhas frescas e de 26 a 40 em amostras de folhas secas de Paranapiacaba. Em Pindamonhangaba, o número de compostos variou de 19 a 37 e de 28 a 42, nas amostras de óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas, respectivamente.

Óleos essenciais extraídos de folhas coletadas em Paranapiacaba apresentaram 71 compostos e de folhas coletadas em Pindamonhangaba, 73. Foram encontrados 57 compostos em comum nos óleos essenciais extraídos de folhas coletadas nos dois locais.

Os constituintes encontrados somente nos óleos essenciais de folhas de *H. brasiliense* de Paranapiacaba foram: canfeno, δ -2-careno, metil chavicol, metil eugenol, α -santaleno, α -guaieno, β -santaleno, curzereno, sesquicineol e atractilona. Com exceção do metil eugenol e curzereno, todos se apresentaram em pequenas quantidades. Os constituintes exclusivos dos óleos de folhas de Pindamonhangaba foram: α -canfonelal, 2, *allo*-ocimeno, acetato de timila,

(*E*)-cariofileno, α -humuleno, *allo*-aromadendreno, β -selineno, δ -selineno, α -muuroleno e 10-*epi*- γ -eudesmol, todos eles encontrados em porcentagens reduzidas e, em alguns casos, apenas em uma amostra.

As estruturas químicas dos compostos majoritários (áreas de pico $\geq 9,00\%$) caracterizados em folhas frescas e secas de ambos os locais são mostradas na Figura 7.

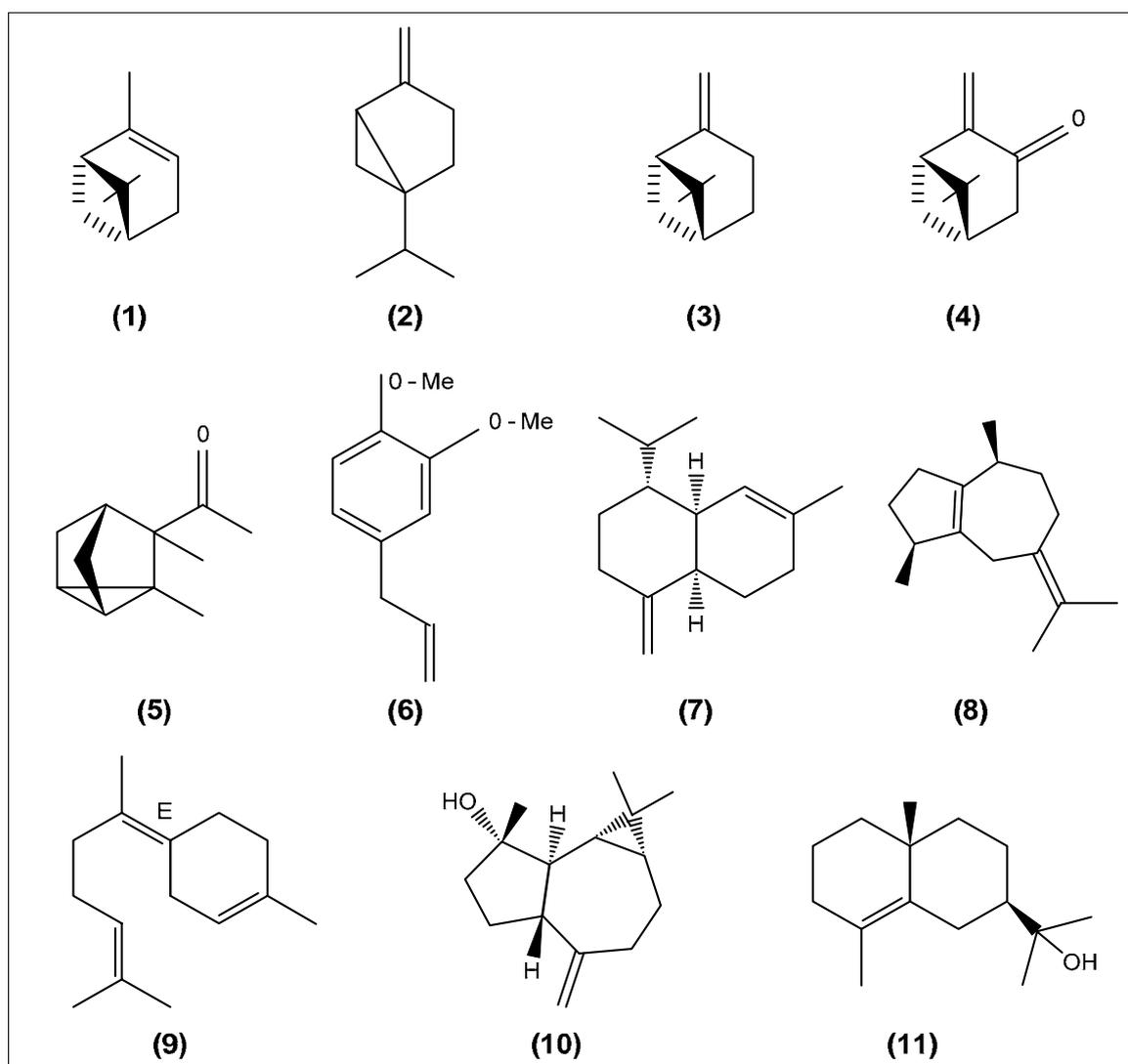


Figura 7. Estrutura química dos compostos majoritários dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq coletadas na RBAS de Paranapiacaba e na FSRG em Pindamonhangaba. (1) α -pineno; (2) sabineno; (3) β -pineno; (4) pinocarvona; (5) santalona; (6) metil eugenol; (7) γ -muuroleno; (8) (*Z*)- β -guaieno; (9) (*E*)- γ -bisaboleno; (10) espatuleno e (11) γ -eudesmol.

Tabela 7. Composição química (%) dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de quatro indivíduos de *Hedysmum brasiliense* coletadas sazonalmente (novembro de 2007 a setembro de 2008) em Paranapiacaba.

Composto	IK	Hb1								Hb2								Hb3								Hb4								
		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		
		FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS			
α -tujeno	924		3,40		4,11		2,56		4,31		3,55		3,79		1,93		4,00		3,27		3,13		1,99		2,09		2,71		2,66		2,02		3,83	
α -pineno	930	1,41	2,92	1,49	3,73	0,73	3,62	1,19	2,99	1,41	3,77	1,22	4,19	1,32	3,84	2,02	4,11	1,83	3,96	1,47	3,73	2,71	4,21	2,82	2,68	1,90	2,73	0,88	2,58	1,40	3,48	1,20	2,92	
canfeno	945						0,52																											
sabineno	970	22,95	4,91	17,52	8,29	19,79	16,69	23,74	7,15	21,51	3,56	17,93	4,30	20,42	7,97	28,68	3,19	25,66	9,52	23,65	9,96	32,86	13,55	39,35	2,67	23,48	6,60	15,19	7,39	25,09	12,63	26,50	6,27	
β -pineno	972	2,84	5,76	2,63	6,52	2,46	5,63	2,44	5,74	2,61	6,61	2,75	7,21	2,63	6,24	3,98	7,14	3,28	6,26	3,05	6,26	3,90	6,28	5,13	4,60	2,93	4,82	2,31	4,24	2,40	5,34	3,45	5,07	
mirreno	989	0,58		0,61				0,66		0,61		0,52		0,55		0,67		0,83		0,76		0,90	0,53	0,97					0,49					
δ -2-careno	998																								2,72		2,50		3,01		3,14			
α -terpineno	1013	1,25	2,43	1,57	2,77	0,59	3,43	1,05	2,79	0,77	2,11	0,91	2,56	0,55	1,96	0,90	2,43	1,26	2,04	1,29	2,21	0,79	3,10	0,95	1,55	1,44	2,17	0,89	2,24	0,61	3,29	1,23	2,64	
<i>p</i> -cimeno	1021		5,15		4,71		1,45		5,17		5,35		4,63		0,97	5,69		5,69		4,88		1,21		3,67	0,60	5,05		3,97		2,31		5,47		
limoneno	1024	0,94	1,39	0,92	1,52	0,69	1,85	0,98	1,54	0,70	1,29	0,64	1,44	0,69	1,19	0,76	1,22	1,12	1,60	1,18	1,56	1,09	1,57	1,22	0,89	1,54	1,49	0,94	1,39	1,32	1,89	1,50	1,63	
1,8-cineol	1026	1,18	1,78	0,99	2,25	0,96	2,28	1,13	2,15	0,98	1,92	0,79	2,02	0,76		1,08	1,85	1,30	1,69	0,98	1,81	1,30	1,40	1,39	1,20	1,23	1,63	0,83	1,52	0,96	1,49	1,10	1,49	
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1050																								0,52							0,70		
γ -terpineno	1057	2,89	5,94	2,83	5,63	1,66	6,39	2,45	6,00	1,66	4,54	2,04	5,13	1,40	4,30	2,04	4,72	2,75	4,43	3,12	4,53	1,78	6,01	2,17	3,45	2,85	4,58	2,12	4,46	1,37	6,09	2,91	5,40	
n.i. 1	1064				0,65		1,02				0,50								0,65		0,95		0,55			0,56		0,86						
terpinoleno	1084		0,90		0,64		0,89		0,86		0,67		0,68		0,54		0,68		0,68		0,55		0,87			0,58		0,56		0,76		0,64		
<i>p</i> -cimeneno	1093				0,69		1,06		0,54		0,53				0,47				0,68		0,91					0,70		0,80						
linalol	1097	6,73	5,98	5,11	5,36	6,90	7,29	7,44	7,80	4,53	3,88	2,82	3,04	3,17	1,34	3,78	2,74	4,83	3,19	3,75	3,29	3,72	2,78	3,68	1,81	1,58	1,12	1,11	1,15	1,25	1,31	1,66	1,00	
dehidro-sabina cetona	1116						0,46																											
crisantenona	1127		0,60		0,60		0,84		0,94		0,88		0,91			1,42		2,36		2,08		0,88		2,23										
pinocarvona	1159	8,86	6,49	7,45	6,38	9,03	8,31	9,89	8,31	6,39	3,46	4,81	3,17	5,76	1,95	5,80	3,08	9,44	4,97	7,66	4,61	8,43	4,62	9,28	2,92	7,14	4,95	5,51	4,38	6,84	5,23	8,21	5,16	
virideno	1160	1,12	0,87	1,02	0,86	0,89	0,57	0,51	0,48																			0,84	0,64	0,84	0,73		0,60	
n.i. 4	1168															0,54																		
santalona	1174	6,99	14,11	6,15	11,00	4,32	10,72	5,26	12,19	3,91	9,85	4,84	9,64	2,87	6,35	4,03	9,99	6,64	10,82	6,01	9,85	3,14	9,87	4,27	9,60	6,61	10,75	5,26	8,34	2,70	10,16	6,07	10,03	
α -terpineol	1185				0,53		0,50		0,52		0,53		0,58		0,51				0,52		0,65									0,55				
mirtenol	1189															0,52																		
metil chavicol acetato de (<i>Z</i>)-crisantemila	1193																	1,19		0,82		0,64		0,78										
acetato de (<i>Z</i>)-pinocarvila	1258	0,76	1,42	0,66	1,02	0,87	1,29	0,64	1,17	0,73	1,45	0,51	1,03	0,62	0,79		1,27	0,52	0,85	0,77	0,91	0,51	0,78		0,72	2,27	3,33	1,49	2,52	1,86	2,56	2,09	2,46	
δ -elemeno	1307	1,43	2,30	1,05	1,80	1,50	2,05	1,23	1,99	1,37	2,63	0,98	1,87	1,06	1,30	0,88	2,40									1,07	1,70	0,90	1,47	1,12	1,48	1,20	1,85	
acetato de α -terpinila	1334	0,54		0,53		0,88																				1,27		1,48		1,32		0,86		
α -copaeno	1349	0,75	1,14	0,59	0,94	0,87	1,15	0,61	1,04		0,75		0,64		0,63		0,63	0,73	1,10	0,85	0,97	0,43	0,74		1,27	0,68	0,81		0,52		0,54		0,54	
β -elemeno	1375																																	
β -elemeno	1393	0,85		0,90		1,12		0,63		0,42			0,51					0,43		0,65		0,51				0,95		1,14		1,12		0,71		
metil eugenol	1408	2,67	1,43	2,18	1,04	1,75	1,89	2,49	1,57	24,70	26,47	29,66	25,48	25,23	31,65	22,60	26,50	2,57	2,05	1,77	1,23	1,50	1,23	1,04	1,87	1,19	1,04	0,85	1,40	0,91	0,98	0,99		
α -santaleno	1420								0,55										0,61		0,58				1,10			0,70				0,61		
γ -elemeno	1434																								0,68	0,46		0,48						
α -guaiano	1442																								0,82									
sesquissabineno	1457	0,93		0,88				0,81										1,01	1,13	0,99	1,13	0,88	0,98							0,64				
β -santaleno	1459		0,59		0,65			0,67																1,52	0,72		0,81	0,91	0,85				0,80	
γ -muuroloeno	1476	1,67		1,73		1,95		1,32		2,89		1,96		2,97		1,40		0,95		1,30		1,08			1,97		2,01		2,94		1,44			

Tabela 7. (Continuação)

Composto	IK	Hb1								Hb2								Hb3								Hb4							
		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno	
		FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS		
(Z)- β -guaieno	1490	11,26		17,41		17,88		11,00		5,86		7,55		8,58		3,81		3,59		4,59		4,64		2,53		19,73	0,86	31,38	0,64	25,80	0,87	22,80	
curzereno	1499									7,53		5,85		6,38		5,22																	
β -bisaboleno	1502	0,86	0,60	0,77	0,69	0,78		0,83	0,81	0,59	0,87	0,62	1,01	0,69	1,12		1,20	1,47	2,81	1,46	2,93	1,40	2,15	0,99									
γ -cadineno	1506																																
sesquicineol	1507																	0,52		0,58		0,50											
δ -cadineno	1516																	0,51		0,65													
(E)- γ -bisaboleno	1539	14,54	5,50	16,46	6,31	17,05	4,42	15,86	5,86	9,49	5,24	12,17	8,29	12,43	13,23	10,40	5,54	23,58	16,54	23,98	18,05	24,36	23,17	22,37	18,04								
elemol	1543																											0,54		0,56			
germacreno B	1549	0,97		1,47		1,27		0,80		0,71		0,75		0,86				0,81		1,27		0,92			1,10		1,59		1,55		1,16		
β -vetiveneno	1556																			0,59				0,77									
(E)-nerolidol	1559	1,62	1,23	1,89	1,22	1,87	0,84	1,43	0,91									1,14	1,14	1,72	1,18	0,99	1,05		1,57	1,90	1,28	2,64	1,74	2,09	1,36	2,03	1,09
espatulenol	1570	1,78	14,36	1,94	13,57	2,40	8,63	2,05	11,36	0,63	6,57	0,70	6,21	0,57	6,86	7,10		2,06	7,23	3,09	7,39	1,04	5,87	1,06	12,19	2,67	23,61	1,78	23,82	1,68	17,70	1,91	21,96
n.i. 5	1575	1,04	1,29	1,23	1,16	1,21	0,71	0,98	0,86		0,67		0,51		0,63	0,61			0,75	0,65	0,82		0,56		1,19	1,84	1,93	2,90	1,90	1,68	1,76	2,01	1,50
viridiflorol	1582	0,60		0,64		0,57		0,55																	1,09		2,99		1,10		1,31		
n.i. 7	1593																								0,72		1,15		0,73	0,60	0,84	0,52	
β -atlantol	1602																							1,74		1,29		1,31		1,09		1,17	
1- <i>epi</i> -cubenol	1621																							0,92		0,78		0,81				0,69	
muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1631		1,76		1,56		1,35		1,23		0,64			0,98					0,84	0,90	0,67		0,95	0,93	0,73	3,55	0,62	3,78	0,56	3,94		2,99	
n.i. 9	1635		0,53		0,53																0,68					0,94	0,63	0,94		0,77		0,88	
n.i. 10	1639		0,60											0,54					0,55			0,87		1,12									
γ -eudesmol	1642		1,03		1,00		0,98				1,08		1,00		1,42				0,62		0,79		1,44	1,91	3,34	7,21	4,12	5,80	3,45	5,62		5,40	
α -cadinol	1646			0,89																					1,22		1,71	0,99	1,26			1,11	
(Z)- α -santalol	1653		0,75		0,69				0,57		0,60		0,60		0,78		0,61		0,85		1,02		0,77					0,56				0,50	
n.i. 11	1662		1,42	0,49		0,56		0,77											0,60	0,48					0,80	0,54	1,70	2,06	0,66	2,00		1,94	
n.i. 12	1668																																
atractilona	1683																															2,98	
n.i. 14	1690																																
n.i. 15	1709																																
n.i. 16	1712							0,64																				0,99					0,86
n.i. 17	1725																							0,69									
n.i. 18	1731		0,74																							0,77							
Hidrocarbonetos monoterpênicos		33,98	33,67	28,59	39,47	26,81	44,66	33,02	35,10	29,27	31,98	26,01	33,93	27,56	29,41	39,05	33,18	36,73	38,13	34,52	37,72	44,03	39,32	52,61	21,60	37,98	31,43	25,67	30,93	36,53	38,54	40,63	34,47
Monoterpenos oxigenados		26,70	33,82	22,00	29,88	24,45	34,89	26,20	35,59	17,91	25,35	14,75	22,90	14,24	12,87	15,57	23,90	23,46	25,50	20,02	24,17	17,53	21,07	18,62	19,75	20,58	24,29	15,10	19,90	14,73	23,32	20,33	22,53
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		31,62	6,69	40,15	7,65	40,93	4,42	31,25	7,89	19,96	6,11	23,05	9,30	26,04	14,35	15,62	6,74	32,35	21,09	35,48	22,69	33,79	26,30	25,89	30,25	26,20	0,86	38,41	2,73	33,58	1,51	26,97	1,41
Sesquiterpenos oxigenados		4,00	19,13	5,36	18,04	4,84	11,80	4,03	14,07	8,16	8,89	6,65	7,81	6,95	10,04	5,22	7,71	3,72	10,68	6,29	11,05	2,53	10,08	1,06	20,94	10,95	37,72	14,40	38,81	10,68	29,71	8,23	34,91
Fenilpropanóides		2,67	1,43	2,18	1,04	1,75	1,89	2,49	1,57	24,70	26,47	29,66	25,48	25,23	31,65	22,60	26,50	3,76	2,05	2,59	1,23	2,14	1,23	1,82	1,87	1,19		1,04	0,85	1,40	0,91	0,98	0,99
Total identificado		98,97	94,74	98,28	96,08	98,78	97,66	96,99	94,22	100,00	98,80	100,00	99,42	100,00	98,32	98,06	98,03	100,00	95,64	98,90	96,86	100,00	98,00	100,00	94,41	96,90	94,3	94,62	93,22	96,92	93,99	97,14	94,31

IK: índice de retenção de Kováts; n.i.: composto não identificado

Tabela 8. Composição química (%) dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de quatro indivíduos de *Hedysmum brasiliense* coletadas sazonalmente (novembro de 2007 a setembro de 2008) em Pindamonhangaba.

Composto	IK	Hb1								Hb2								Hb3								Hb4								
		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		
		FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS			
α -tujeno	924				0,55					0,71		2,95		2,80		4,63		1,86		2,12		2,81		4,39		1,62		1,85		2,21		2,24		
α -pineno	930				0,95			0,83	4,63	2,66	2,09	8,72	0,60	9,39	6,69	12,51	3,94	6,60	6,65	8,85	4,78	13,06	10,10	14,17	1,65	3,03	1,08	3,40	1,91	5,44	2,41	3,63		
sabineno	970	7,62		4,44	1,74	3,99	1,07	8,32	1,04	24,34	1,13	10,81		9,20		31,29		19,80	4,27	30,30		23,68	12,20	37,50		15,15	4,65	12,73	6,28	17,73	12,21	17,58	3,86	
β -pineno	972	0,82	0,79							7,14	6,28	3,48	19,29	3,29	20,15	8,73	22,36	6,30	12,67	8,31	20,43	8,00	19,26	11,35	28,80	2,85	4,99	2,83	5,44	3,77	7,91	4,33	6,32	
mirceno	989	0,97					0,90			0,59						0,77			0,72		0,63		0,87						0,52					
α -terpineno	1013		0,71		0,49			0,84		1,03		1,38		2,34	0,87	2,60		1,57		0,92	0,55	1,96	0,83	2,40		1,23		0,91		1,29		1,76		
<i>p</i> -cimeno	1021		3,19		3,60		2,95		6,20	0,49	3,47		4,84		5,20		7,50		2,75		2,57		2,71		4,15		3,51		3,00		3,88		4,35	
limoneno	1024								0,84	0,81	0,75	1,25	0,57	1,48	1,06	1,50	0,67	1,00	0,95	0,85	0,91	1,36	0,97	1,38	0,62	0,89	0,53	0,81	0,66	1,24	0,69	1,08		
1,8-cineol	1026	0,72	1,52		2,70		2,37		3,08	1,12	1,75		2,85	0,76	3,49	1,45	3,70	1,04	2,06	1,52	2,24	1,15	3,08	1,74	3,17	0,70	1,90	1,00	2,00	1,15	3,20	0,83	2,24	
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1050	2,43		1,38		1,74		2,90		2,19		1,67		1,66		2,83		1,11		1,64		1,20		1,50		2,57		2,23		2,01		3,06		
γ -terpineno	1057	0,71	1,53		1,36	0,61	0,91	1,08	2,01	0,83	2,55	1,02	3,60	1,03	4,92	2,03	5,05	0,87	3,15	1,22	2,48	1,41	4,05	1,77	4,85	0,75	2,24	0,88	2,26	0,88	2,88	1,36	4,03	
n.i. 1	1064						0,81				2,02		1,04		0,95		1,20		2,00		1,13		2,41		1,05		1,94		0,71		3,23		0,65	
terpinoleno	1084										0,57		0,57		0,69		0,83								0,56		0,66							
<i>p</i> -cimeneno	1093				0,61		0,97				2,58		1,19		1,18		1,39		2,52		1,15		2,29		1,33		2,17		0,68		2,93		0,85	
linalol	1097	4,82	4,36	1,49	4,76	3,17	2,86	4,11	3,36	2,77	3,34	0,88	3,89	3,32	3,86	2,60	3,04	2,30	2,78	2,69	3,13	2,43	2,87	2,40	2,18	0,89	1,36		0,92	0,66	1,14	0,61	1,21	
dehidro-sabina cetona	1116												0,77																					
α -canfolenal	1122						0,56		0,54		1,51			1,16		0,97		0,83				0,83		0,53					0,74					
crisantenona	1127																					1,00		0,90		1,49								
n.i. 2	1133										0,79			0,60		0,78							0,60											
allo-ocimeno	1141		0,53				0,63				0,91			0,51		0,58										0,54				0,91				
n.i. 3	1153															0,51														0,52				
pinocarvona	1159	5,11	3,04	2,61	2,63	4,10	2,38	5,37	3,44	1,34	2,11	0,49	1,13	1,47	1,80	1,38	1,38								3,51	2,48	3,80	2,19	3,88	2,50	4,41	2,21		
virideno	1160																																	
santalona	1174	2,78	6,53	0,78	4,29	1,71	4,46	2,25	6,01	2,06	9,24	1,99	7,11	2,31	10,59	2,91	8,72	1,72	7,57	1,70	4,69	1,86	6,65	2,52	8,42	1,60	6,44	1,81	4,68	1,30	5,28	2,15	8,24	
α -terpineol	1185		0,53								1,20		0,69		0,89		0,85		0,79						0,69									
mirtenol	1189						0,58				2,00		0,64		1,30		1,62		1,29		0,55		1,32		0,66		0,92			1,33		0,68		
acetato de (<i>Z</i>)-crisantemila	1258	1,16	2,91	0,74	1,58	0,72	1,54	1,02	2,12		0,60																1,27		0,52		0,66		0,72	
acetato de (<i>Z</i>)-pinocarvila	1307		1,17		0,63		0,83		1,13		0,51														0,62	1,40		0,53		0,88		0,98		
δ -elemeno	1334	1,35		2,86		5,09		2,07		0,84		2,10		1,84		0,67		0,73		0,52		0,62				1,62		1,50		1,34		1,09		
acetato de α -terpinila	1349	0,91	0,98		0,67					0,91		0,51	0,70	0,50				0,78	1,31	0,70	1,12	0,66	0,92		0,58	0,73	1,28		0,97	0,56	0,98		0,94	
acetato de timila	1355																		0,85								0,73							
α -copaeno	1375	0,52	0,74		0,56	0,64		0,81		1,36						0,53		0,59	1,89			0,64		0,86	1,20	1,79	0,52	0,94	0,54	1,15	0,98	2,49		
β -elemeno	1393	3,05		4,77		4,47		3,24		1,12		3,45		3,30		1,02		1,88		1,26		1,44		0,60		2,15		1,87		1,70		1,38		
(<i>E</i>)-cariofileno	1418	0,49		0,53		0,66				0,60		1,03		0,78				0,53								0,74								
γ -elemeno	1434	0,61		1,34		2,29		0,75		0,92		2,13		1,50												1,33		1,21		1,03		0,82		
α -humuleno	1450											0,54																						
sesquissabineno	1457																0,93					0,57												
allo-aromadendreno	1457	0,58		0,79		0,88					0,79	0,70		0,56					1,74							0,58								
γ -muuroleno	1476	8,15		6,49		7,68		8,48		15,03		20,33		17,05		12,93		10,23		5,93		6,52		5,21		13,17		7,94		10,19		10,91		

Tabela 8. (Continuação)

Composto	IK	Hb1								Hb2								Hb3								Hb4									
		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno		Primavera		Verão		Outono		Inverno			
		FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS																		
β-selineno	1481		0,63		0,54		0,62																												
δ-selineno	1488				0,70		0,55																			0,70		1,42							
(Z)-β-guaieno	1490	23,57		37,87		30,97		28,68		19,42		28,25		26,96		14,94		15,15		12,63		13,82		7,56		30,39		38,12		32,89		30,97			
α-muuroleno	1493	0,67												0,53																					
β-bisaboleno	1502																1,39	1,61	0,64	1,05	1,14	0,91	0,55	0,63											
γ-cadineno	1506	0,99		1,04		0,81	0,62	0,93									0,49								0,60	0,69									
δ-cadineno	1516	2,22	1,67	2,18	1,85	2,36	1,43	2,42	1,72	1,20	0,92	1,56	0,53	1,46		1,16		1,40	1,06	0,80	0,73	1,03		0,76		1,83	1,09	1,63	1,36	1,53		2,27	1,11		
(E)-γ-bisaboleno	1539																20,53	10,12	14,55	10,43	20,91	3,86	12,32	3,90	0,74										
elemol	1543	0,92		1,22		0,93		0,91																	0,57		0,70		0,59						
germacreno B	1549	1,98		3,26		1,77		2,31		3,11		3,70		3,93		1,85		1,27		1,08		1,28		0,45		3,37		4,09	0,70	3,67		3,42			
β-vetiveneno	1556	1,13	1,09	1,08	1,16	1,00	0,85	1,28	0,94			0,57					0,61	0,67		0,79								0,56							
(E)-nerolidol	1559	0,73	1,16	0,95	1,10	0,90	0,90	0,77	0,96																										
espatulenol	1570	5,24	26,01	3,66	26,53	4,08	26,68	3,65	24,64	3,07	25,30	3,69	19,35	5,22	14,19	1,32	11,39	2,39	15,02	2,97	18,36	3,04	10,40	0,98	9,03	2,27	25,78	2,67	31,40	1,93	21,12	1,47	23,41		
n.i. 5	1575	2,10	4,53	2,47	4,25	2,54	3,96	2,17	3,66	1,18	3,92	1,65	2,94	2,13	2,44	0,85	1,83	0,79	2,37	0,91	2,65	1,06	1,67		1,49	0,90	2,66	1,50	2,52	1,12	2,31	1,00	2,61		
viridiflorol	1582	0,94	1,38	1,41	1,12	1,65	1,22	1,51	1,45	0,60	0,69	1,15	0,76	1,01				0,58		0,50	0,73				0,59	0,99	0,98	0,64	0,73	0,50	0,70	0,88			
n.i. 6	1589				0,77		0,78		0,84																										
n.i. 7	1593	0,68	1,67	0,85	1,34	0,82	1,62	0,75	1,48		1,13	0,64		0,78				0,53			0,52							0,72	0,54	0,61		0,51	0,66		
β-atlantol	1602		2,53		2,41		3,39		2,10		2,41		1,32		0,90		0,79		1,38		1,05		0,63			2,34		1,49		1,39			1,49		
n.i. 8	1603										1,06		0,59								0,69												0,57		
10- <i>epi</i> -γ-eudesmol	1610				0,68		0,77		0,71																										
1- <i>epi</i> -cubenol	1621	0,66	2,83	0,79	2,50	0,86	2,94	0,55	2,78		1,43		0,85		0,81				1,07		0,73						1,37		1,31		0,97		1,44		
β-ol	1631	2,05	3,43	1,70	3,95	1,73	3,04	1,73	2,45	0,78	2,92	1,30	2,66	1,71	1,50		0,74	0,59	1,55	0,69	1,92	0,45	0,53		0,54	0,63	3,20	0,75	4,32		1,54		2,34		
n.i. 9	1635	1,18	1,97	0,95	1,88	1,03	1,94	1,12	1,88	0,79	1,45	1,00	1,50	1,25	0,85	0,72	0,68				0,91					0,65	1,18	0,81	1,23	0,74	0,73	0,85	1,23		
n.i. 10	1639	1,45											0,92		0,57				0,79		0,90														
γ-eudesmol	1642	8,72	15,22	10,08	14,61	8,40	16,66	8,59	14,68		2,11			0,53	2,54						1,33		0,56		0,79	3,38	7,15	5,17	7,56	4,20	6,35	3,56	7,76		
α-cadinol	1646	1,47	2,34	1,63	2,37	1,83	2,21	1,58	2,10	2,00	1,57	2,34	3,39	2,66	1,37	1,95	0,55	0,84		1,12	1,27	0,85		0,63	1,10	1,47	1,81	1,88	1,52	1,01	1,55	1,75			
(Z)-α-santalol	1653		1,00		0,95		1,23		1,05										1,13		0,86		0,84		0,65		0,57		0,66				0,72		
n.i. 11	1662	0,63	2,14	0,63	2,72	0,58	3,19	0,55	1,95		1,43		1,62		0,82		0,80		1,18		1,19		0,59		0,67		1,25		2,51		0,87				
n.i. 12	1668		0,91		0,56		1,22		1,96																									0,74	
n.i. 13	1678						0,59				0,98	0,69	0,91	0,76		0,52		0,85		1,00				0,58				0,53					0,75		
n.i. 16	1712		0,98		0,90		1,25		0,66		1,06		1,04	0,51							0,65						1,25		1,27		0,71			1,15	
n.i. 19	1756												0,61													0,55		0,62		0,65		0,52			
Hidrocarbonetos monoterpênicos		12,55	6,75	5,82	9,30	6,34	6,53	13,20	10,92	41,05	22,70	19,82	43,79	16,35	48,66	54,27	58,95	32,69	36,59	49,79	39,37	41,16	59,70	64,89	62,03	23,59	25,53	20,28	24,63	27,48	40,90	29,43	28,12		
Monoterpenos oxigenados		15,50	21,04	5,62	17,26	9,70	15,00	12,75	20,26	7,29	23,94	3,36	16,82	8,56	23,59	8,34	19,48	5,84	18,33	6,61	11,73	6,10	16,67	6,66	17,13	8,05	19,27	6,61	11,81	7,55	16,71	8,00	17,22		
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		45,31	4,13	62,21	4,81	58,62	4,07	50,16	3,47	42,24	3,07	64,36	0,53	57,91		32,57	0,53	55,73	17,09	37,41	13,00	47,33	5,41	27,45	5,39	57,72	4,27	56,88	4,98	52,98	1,15	51,84	3,60		
Sesquiterpenos oxigenados		20,73	55,90	20,22	55,62	20,38	59,04	19,29	52,92	6,45	36,43	8,48	28,33	11,13	19,94	3,27	13,47	4,40	21,69	5,28	26,25	4,34	12,96	0,98	11,64	8,55	42,87	12,08	49,26	8,97	32,88	7,28	39,79		
Fenilpropanóides																																			
Total identificado		94,09	87,82	93,87	86,99	95,04	84,64	95,40	87,57	97,03	86,14	96,02	89,47	93,95	92,19	98,45	92,43	98,66	93,7	99,09	90,35	98,93	94,74	99,98	96,19	97,91	91,94	95,85	90,68	96,98	91,64	96,55	88,73		

IK: índice de retenção de Kováts; n.i.: composto não identificado

Os compostos majoritários dos óleos extraídos de folhas frescas de Paranapiacaba foram o hidrocarboneto monoterpênico sabineno, cujos teores variaram entre 15,19% (Hb4 - verão) e 39,35% (Hb3 - inverno), os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (*E*)- γ -bisaboleno (de 0, Hb4, a 24,36%, Hb3 - outono) e (*Z*)- β -guaiano (de 2,53%, Hb3 - inverno, a 31,38%, Hb4 - verão) e o monoterpene oxigenado pinocarvona (de 4,81%, Hb2 - verão, a 9,89%, Hb1 - inverno). As concentrações destes compostos variaram entre os indivíduos. Em geral, o sabineno foi o composto encontrado em quantidades maiores em todos os indivíduos, o (*E*)- γ -bisaboleno foi encontrado no indivíduo 3 (até 24,36%, outono) em quantidades superiores aos indivíduos 1 (até 17,05%, outono) e 2 (até 12,43%, outono) e esteve completamente ausente no indivíduo 4, o (*Z*)- β -guaiano foi encontrado em grandes quantidades nos indivíduos 4 (até 31,38%, verão) e 1 (até 17,88%, outono). Óleos essenciais do indivíduo 2 apresentaram como composto majoritário o metil eugenol (até 29,66%, verão), encontrado em quantidades muito menores nos voláteis dos demais indivíduos.

Já nas amostras de óleos de folhas frescas oriundas de Pindamonhangaba, a pinocarvona não se apresentou em grandes quantidades e um dos majoritários encontrados em todos os indivíduos foi o hidrocarboneto sesquiterpênico γ -muuroleno, cujos teores variaram de 5,21% (Hb3 - inverno) a 20,33% (Hb2 - verão). Os teores de sabineno variaram entre 3,99% (Hb1 - outono) a 37,50% (Hb3 - inverno). Nos óleos essenciais do indivíduo 1 foi observado alto teor de γ -eudesmol (até 10,08%, Hb1 - verão) e os óleos essenciais do indivíduo 3 apresentaram como um dos majoritários o (*E*)- γ -bisaboleno (até 20,91%, Hb3 - outono), composto não encontrado nos indivíduos 1 e 2, e em pequena quantidade em uma amostra do indivíduo 4 (0,74%, primavera). O hidrocarboneto monoterpênico β -pineno apareceu em maiores quantidades nas amostras de óleos dos indivíduos 3 em todas as estações (6,30% a 11,35%) e 2 nas folhas coletadas na primavera e no inverno (7,14% e 8,73%).

Dentre as amostras de óleos de folhas frescas dos indivíduos de Paranapiacaba há algumas divergências a serem ressaltadas. O óleos do indivíduo 1 apresentaram maiores percentagens de linalol (até 7,44%, inverno) do que os demais. Este composto foi encontrado em quantidades semelhantes em óleos essenciais de folhas de *Hedyosmum angustifolium* (6,10%) (Lorenzo *et al.* 2003). O sesquiterpene oxigenado curzereno presente nas amostras do indivíduo 2 (até 7,53%, primavera), não foi detectado nas outras amostras, este e outros constituintes da classe dos furanosesquiterpenos foram encontrados em quantidades elevadas nos óleos essenciais de *Hedyosmum mexicanum* e é comum em outros gêneros de Chloranthaceae (Mundina *et.al* 2000).

Destaca-se o fato de que nenhuma das amostras de óleos de folhas provenientes de Pindamonhangaba apresentou em sua composição fenilpropanóides, tais como o metilchavicol e o metil-eugenol, presentes em amostras de Paranapiacaba. Como citado anteriormente, este último composto foi o majoritário nos óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas do indivíduo 2 de Paranapiacaba. A maioria das espécies do gênero *Hedyosmum* que tiveram seus óleos essenciais identificados não apresentaram teores tão elevados de fenilpropanóides, ao contrário, na maioria delas, esta classe esteve ausente. Foram encontrados apenas traços de acetato de (*E*)-isoeugenol (0,20%) em folhas de *H. arborescens* (Sylvestre *et al.* 2007). Os elevados teores de metil eugenol dos óleos essenciais de folhas do indivíduo 2 da RBAS de Paranapiacaba está possivelmente mais relacionado à genética do que a fatores climáticos ou edáficos, pois os indivíduos ali demarcados encontravam-se bem próximos uns dos outros.

Foram detectadas variações qualitativas e quantitativas entre os indivíduos de um mesmo local, entretanto, estas diferenças parecem ser maiores entre os indivíduos de cada localidade. Segundo Oliveira (2007), a adaptação a condições ambientais diferentes apresenta desafios evolutivos e as plantas que ocorrem ao longo dos gradientes ambientais variam também quanto à sua constituição genética e atividade fisiológica, condicionadas pelo processo de seleção natural; embora pertencendo à mesma espécie, podem responder de modo muito diferente a determinado grau de tensão ambiental.

Diferenças na composição química em função da localização geográfica foram relatadas para diversas espécies. Karousou *et al.* (2005) analisaram os óleos essenciais de duas espécies de Lamiaceae, *Satureja thymbra* e *Corydthymus capitatus*, em 26 locais na ilha de Creta. De acordo com resultados obtidos, inferiram que a composição química das duas espécies varia quantitativamente conforme a região e definiram três grupos: teores elevados de carvacrol foram associados a regiões secas, de baixa altitude e de vegetação herbáceo-arbustiva (Grupo A); grandes quantidades de timol e carvacrol foram encontradas em regiões de vegetação de garrigues (Grupo B) e maiores teores de timol estão relacionados a regiões de altitudes superiores (Grupo C). Óleos essenciais de raízes de *Angelica glauca*, utilizada na medicina oriental, coletadas em Kashmir (Índia) apresentaram maiores teores de α -pineno, β -pineno, limoneno, β -felandreno e acetato de citronenila comparados com voláteis de raízes coletadas em Himachel (Índia) (Thappa *et al.* 2005). Lima *et al.* (2006a) observaram que os óleos essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae) também apresentaram variações conforme a localização geográfica: folhas coletadas na Ilha do Cardoso (Mata Atlântica) apresentaram em seus voláteis o eugenol como composto majoritário (71,9%) e

folhas coletadas em Paranapiacaba (Mata Atlântica) apresentaram maiores teores de 4-metil eugenol (94,6%).

As condições edafoclimáticas, a altitude e as interações intra-específicas diferem entre regiões geográficas distintas, além deste, outro aspecto da variação geográfica é a restrição ou interrupção do fluxo gênico por barreiras geográficas. A Serra do Mar e a Serra da Mantiqueira são fragmentos de Mata Atlântica separados pelo Vale do Paraíba. Essa barreira espacial entre regiões pode contribuir com o isolamento ecológico, pré-requisito para variabilidade genética e química entre populações (Zucchi *et al.* 2003). Curado *et al.* (2006) detectaram variações no perfil dos óleos essenciais de duas populações de *Lychnophora ericoides* no Cerrado e atribuíram-na em maior proporção a fatores genéticos, apesar de haver divergências edáficas e climáticas entre os dois ambientes.

É difícil determinar, em estudos de variabilidade intra-específica relacionada à variação geográfica, o grau de interferência dos componentes ambientais e genéticos, uma vez que estes estão intrinsecamente relacionados, pois são condições ambientais (bióticas e abióticas) que proporcionam a pressão seletiva em detrimento de um ou outro genótipo (Souza 2009).

Os óleos de folhas secas de indivíduos de Paranapiacaba e de Pindamonhangaba apresentaram dois compostos majoritários em comum: sesquiterpeno oxigenado espatulenol e o monoterpene oxigenado santalona. O primeiro composto atingiu valores de até 23,82% (Hb4 - verão) em Paranapiacaba e de até 31,40% (Hb4 - verão) em Pindamonhangaba e o segundo, de até 14,11% (Hb1 - primavera) em Paranapiacaba e de até 10,59% (Hb2 - outono) em Pindamonhangaba. As divergências encontradas entre as amostras de Pindamonhangaba foram: alto teor de α -pineno e β -pineno nos óleos dos indivíduos 2 e 3; grande quantidade de γ -eudesmol presente nos óleos dos indivíduos 1 e 4 e de (*E*)- γ -bisaboleno nos óleos do indivíduo 3 (até 10,43%, verão), sendo que este composto não foi encontrado em nenhuma amostra de óleos de folhas secas dos demais indivíduos deste local. As diferenças destacadas entre os óleos extraídos de folhas secas de Paranapiacaba são os altos teores de (*E*)- γ -bisaboleno nos óleos do indivíduo 3 (até 23,17%, outono) e, à semelhança dos óleos de folhas frescas, os elevados teores de metil eugenol no indivíduo 2 em todas as estações.

As diferenças qualitativas e quantitativas na composição dos óleos obtidos de folhas frescas e de folhas secas entre indivíduos de um mesmo local foram expressivas. As amostras de óleos de ambos os locais demonstraram que a secagem ocasiona a redução de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (tal diminuição refletiu no aumento percentual de

sesquiterpenos oxigenados, o que não significa que, necessariamente, a quantidade absoluta destes compostos tenha aumentado). Exemplos de compostos que praticamente desapareceram são os hidrocarbonetos sesquiterpênicos (*Z*)- β -guaiano e γ -muuroleno. Por outro lado, ocorreu um aumento considerável do sesquiterpeno oxigenado espatulenol, cujo teor em amostra de folha fresca foi 2,67% e após a secagem atingiu proporções de 31,40% (Hb4 - verão, Pindamonhangaba). As demais amostras seguiram padrão semelhante.

A produção de óleo essencial resulta de complexas interações entre biossíntese, transporte, manuseio, estocagem e degradação (Pääkkönen *et al.* 1990, Wink, 1990). Uma metodologia frequentemente empregada na extração de óleos essenciais, bem como na de extratos vegetais direcionados ao uso medicinal, é a secagem do material vegetal, a fim de permitir maior período de comercialização (Silva e Casali 2000). Os processos de secagem podem causar mudanças na composição química do produto extraído, isso ocorre em razão de algumas enzimas continuarem ativas. As enzimas responsáveis pela variação da composição podem ser oxidases (causam a oxidação de compostos fenólicos ou ácidos graxos insaturados), peroxidases (causam a oxidação de terpenos e terpinenos), hidrolases (rompem ligações ésteres e glicosídicas) e isomerases (isomerizam certas classes de alcalóides e compostos opticamente ativos) (Fennel *et al.* 2004). O grau de interferência na composição depende das condições de temperatura, luminosidade e umidade do ar às quais o material é submetido (Fennel *et al.* 2004, Silva 2005).

Silva (2005), em seus experimentos com diversos processos de secagem de plantas de calêndula e carqueja, alerta que há variações na composição dos óleos essenciais ao variar o processo de secagem. Isto demonstra que não só a própria secagem como também o tipo empregado influencia na composição e no teor dos óleos essenciais e dos princípios ativos (se a planta estudada for utilizada para fins medicinais), podendo eventualmente alterar sua eficácia no tratamento de enfermidades.

As figuras 8 e 9 representam os teores de hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos, de mono- e sesquiterpenos oxigenados e de fenilpropanóides de voláteis de folhas coletadas em Paranapiacaba e em Pindamonhangaba, respectivamente. Tanto nas amostras obtidas de folhas frescas como nas de folhas secas provenientes de Paranapiacaba, a quantidade de monoterpenos (totais) foi sempre superior à de sesquiterpenos (totais) e esta diferença é maior nos óleos de folhas frescas. Os óleos essenciais de folhas coletadas em Pindamonhangaba apresentaram mais sesquiterpenos (totais) do que monoterpenos (totais) tanto em óleos extraídos de folhas frescas como de folhas secas, com exceção do indivíduo 3 (outono e inverno).

Com relação aos monoterpenos, foi encontrado maior teor de hidrocarbonetos do que de oxigenados nas amostras de óleos essenciais de ambos os locais, com exceção de duas amostras do indivíduo 1 de Pindamonhangaba. Os óleos de todos os indivíduos apresentaram um aumento no teor de monoterpenos oxigenados com a secagem das folhas, que não necessariamente coincidiu com a diminuição de hidrocarbonetos monoterpênicos. Já dentre os sesquiterpenos, todos os indivíduos obedeceram a um mesmo padrão: com a secagem houve expressiva diminuição das quantidades dos hidrocarbonetos e aumento dos compostos oxigenados. Os altos teores de fenilpropanóides encontrados no indivíduo 2 de Paranapiacaba se devem quase que exclusivamente a um único composto, o metil eugenol, que não sofreu influência da secagem nem da época de coleta.

Em linhas gerais, os óleos de folhas frescas dos indivíduos de Paranapiacaba apresentaram uma relação entre hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos mais igualitária ao passo que, os óleos de folhas frescas de Pindamonhangaba apresentaram maiores teores de hidrocarbonetos sesquiterpênicos.

Para a maioria das amostras de ambos os locais, observou-se que a secagem das folhas acarreta no aumento de compostos oxigenados (tanto monoterpenos como sesquiterpenos). Além disso, foi verificado que, com raras exceções, amostras de óleos de folhas secas tem um número maior de compostos que amostras de óleos extraídos de folhas frescas. Esses números evidenciam que, durante a secagem ou a estocagem, pode ter ocorrido a formação de artefatos.

Njoroge *et al.* (2003) estudaram a composição química de óleos essenciais de *Citrus aurantium* durante a estocagem em três temperaturas (-21° C, 5° C e 20° C) e em períodos crescentes (3, 6 e 12 meses). O total de artefatos formados foi 0,4% na temperatura de -21° C, 5,7% a 5° C e 17,0% a 20° C. Os autores afirmam que artefatos também podem ser formados no manuseio do material vegetal (como a secagem) e sugerem que monoterpenos como o linalol possam ser produto da oxidação do mircenol e que o α -terpineol seja formado pela oxidação do limoneno. Dentre os sesquiterpenos, o germacreno D pode ser convertido em cadinenos, muurolenos e elemenos; o biciclogermacreno pode sofrer ciclizações e dar origem a aromadendreno, *allo*-aromadendreno e viridifloreno; o espatulenol, viridiflorol e globulol podem ser produtos da oxidação do biciclogermacreno, *allo*-aromadendreno e aromadendreno, respectivamente. Entretanto, os autores alertam que estes compostos podem ser constituintes naturais de voláteis de outras espécies.

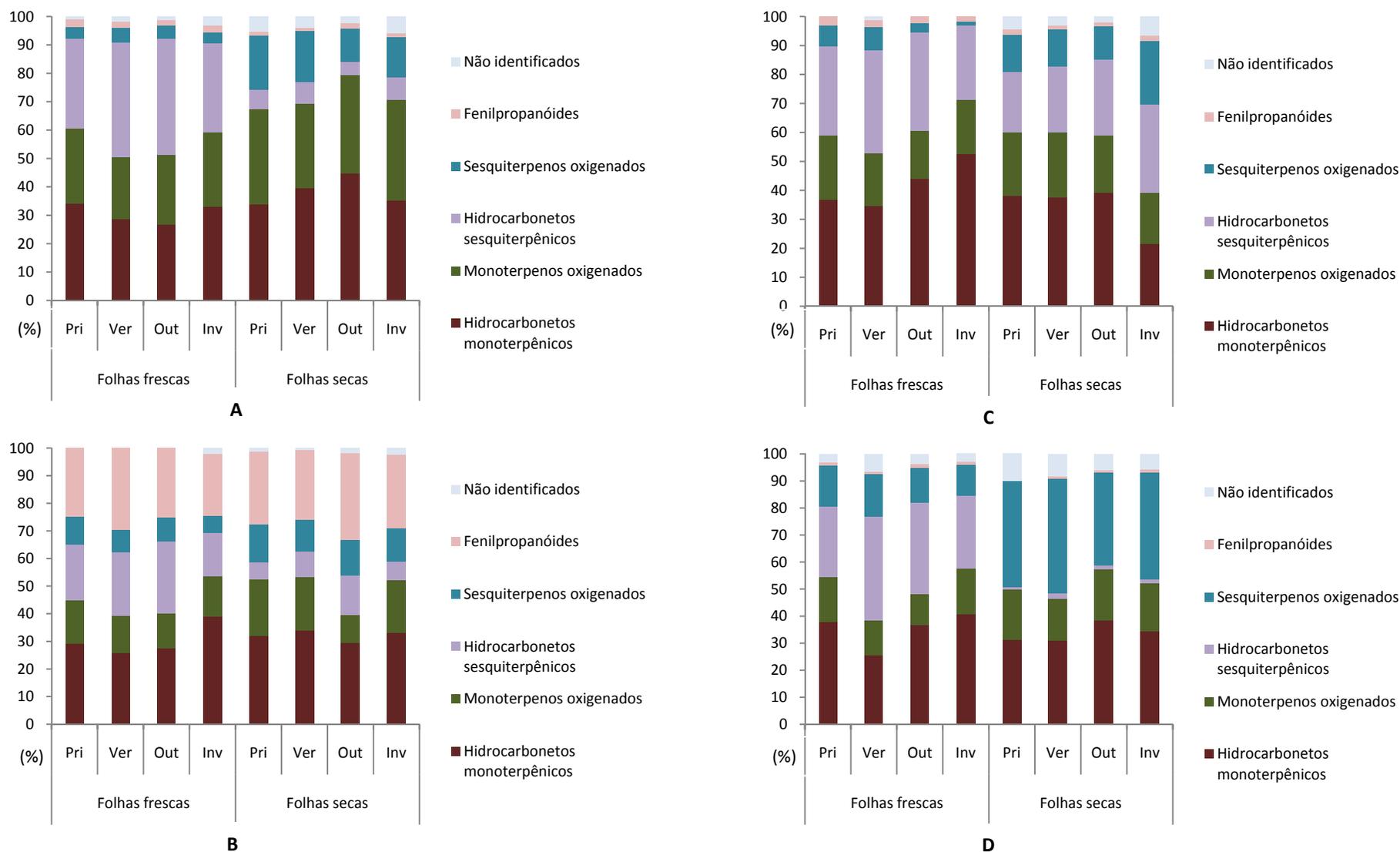


Figura 8. Teores de hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos, mono- e sesquiterpenos oxigenados e fenilpropanóides presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas dos indivíduos Hb1(A), Hb2 (B), Hb3(C) e Hb4 (D) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba.

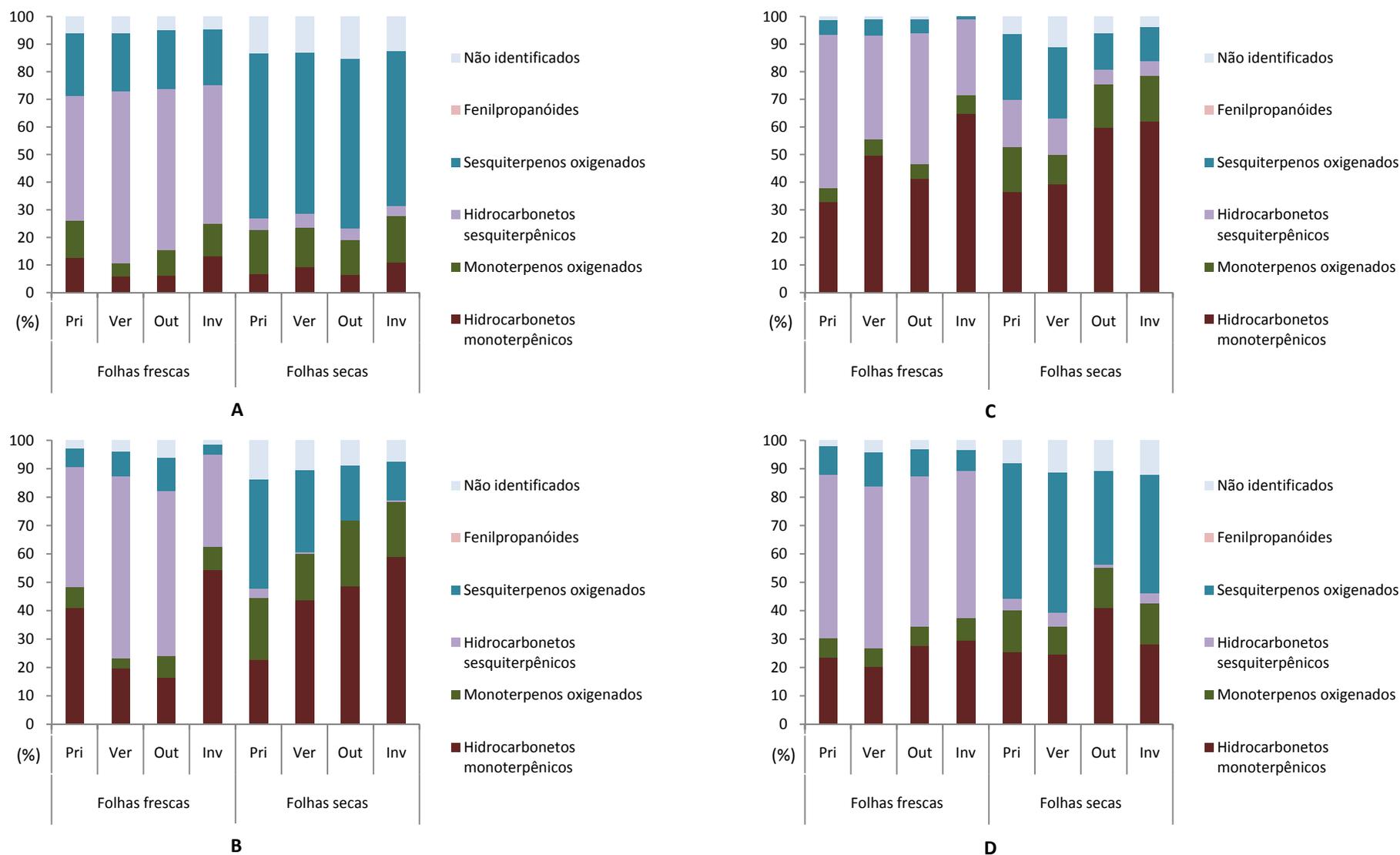


Figura 9. Teores de hidrocarbonetos mono- e sesquiterpênicos, mono- e sesquiterpenos oxigenados e fenilpropanóides presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas dos indivíduos Hb1(A), Hb2 (B), Hb3(C) e Hb4 (D) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Pindamonhangaba.

Não foi observado um padrão bem definido de variação das classes de terpenóides em relação à variação sazonal.

Em *Quercus ilex*, árvore de clima mediterrâneo, que domina também áreas de clima temperado na Europa, as emissões de monoterpenos são reguladas positivamente pela disponibilidade de luz e temperatura (Staudt & Bertin 2002). Segundo os autores, a dependência da luz na emissão dos voláteis existe em decorrência da necessidade de produtos fotossintéticos para a biossíntese de isopreno, ao passo que a dependência da temperatura está relacionada à temperatura ideal para a ação da isopreno sintase, enzima do cloroplasto que sintetiza isoprenos a partir de DMAPP.

Aparentemente a variação da composição foi mais proeminente em relação à secagem que em relação às épocas do ano, provavelmente pelo fato da sazonalidade não ser tão marcante em florestas tropicais.

Ao comparar a composição química com o estágio fenológico das plantas de Paranapiacaba, observou-se que durante a floração, que coincidiu com as coletas da primavera e do inverno nos dois locais, há um aumento nos teores de hidrocarbonetos monoterpênicos e monoterpenos oxigenados e uma diminuição dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos. Em Pindamonhangaba, fato semelhante ocorreu com os indivíduos 1 e 2.

À semelhança dos óleos essenciais dos indivíduos de Paranapiacaba, hidrocarbonetos monoterpênicos foram a classe preponderante de óleos de folhas de *Hedyosmum mexicanum*, *H. bonplandianum* (Mundina *et al.* 2000), *H. arborescens* (Sylvestre *et al.* 2007), *H. angustifolium* e *H. scabrum* (Lorenzo *et al.* 2003). Com exceção da última espécie, todas também apresentaram teores elevados de sabineno (28%, 15%, 9,7% e 6,4%, respectivamente). Em contrapartida, a classe dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos foi a mais representativa em óleos essenciais de folhas de *H. costaricensis*, cujo majoritário foi germacreno D (32%) (Mundina *et al.* 2000).

Os compostos de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* com área de pico acima de 5%, coletadas ao longo das estações do ano em Paranapiacaba e em Pindamonhangaba são mostrados nas figuras 10 a 13. São eles: sabineno, β -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, linalol, pinocarvona, santalona, metil eugenol, (*Z*)- β -guaieno, curzereno, β -bisaboleno, (*E*)- γ -bisaboleno, espatulenol e γ -eudesmol para óleos de folhas de Paranapiacaba e α -pineno, sabineno, β -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, pinocarvona, santalona, δ -elemeno, γ -muuroleno, (*Z*)- β -guaieno, (*E*)- γ -bisaboleno, espatulenol e γ -eudesmol para óleos de folhas de Pindamonhangaba.

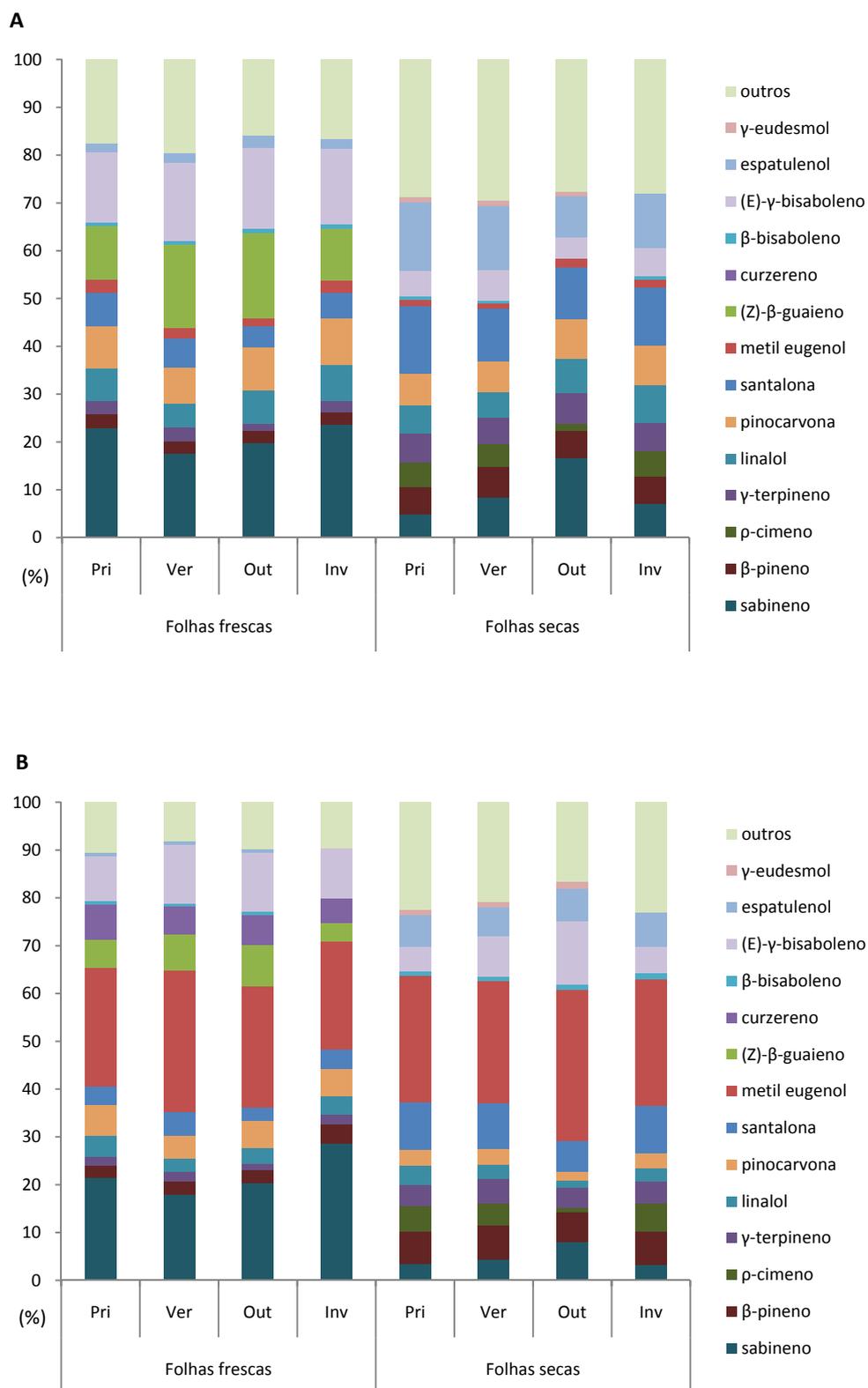


Figura 10. Compostos com áreas de pico acima de 5% presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas dos indivíduos Hb1 (A) e Hb2 (B) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba.

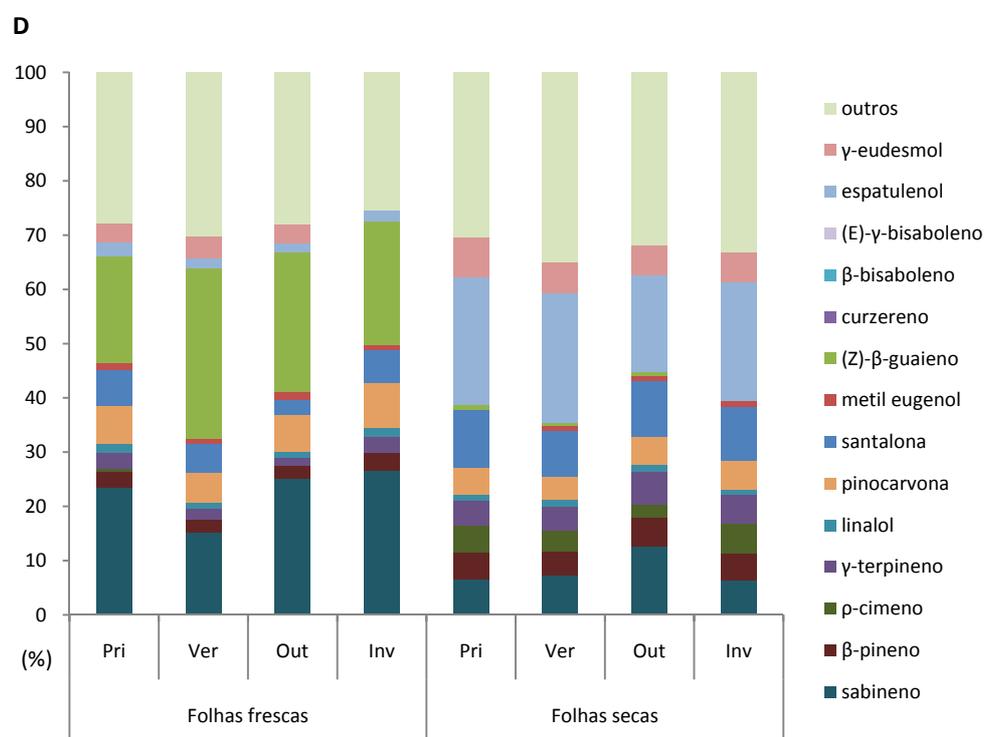
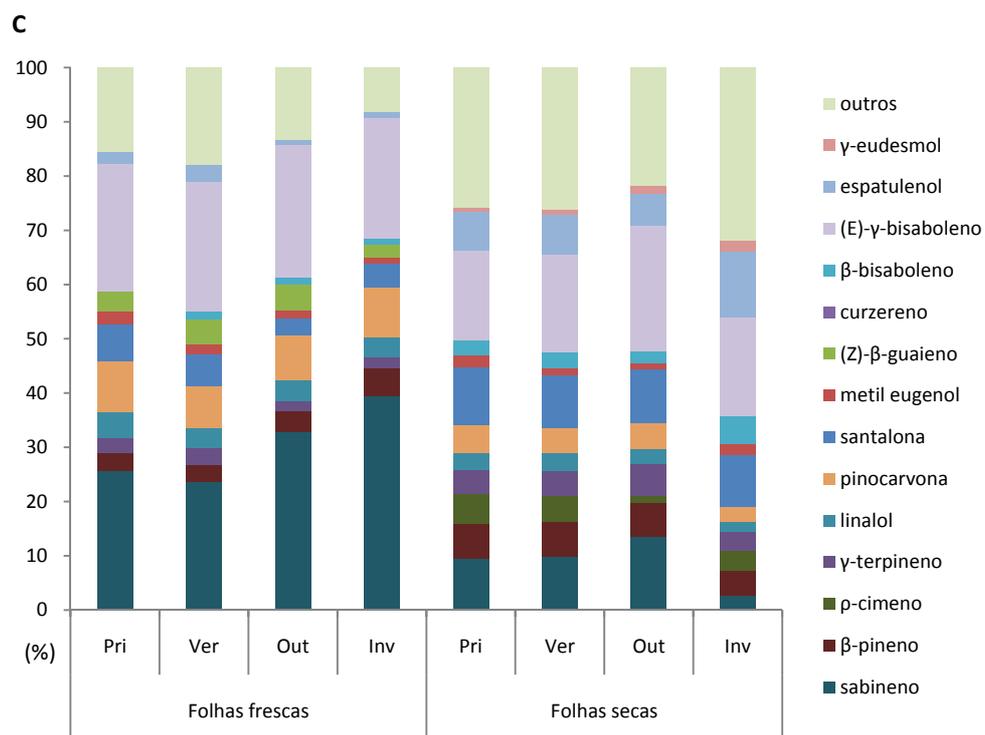


Figura 11. Compostos com áreas de pico acima de 5% presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas dos indivíduos Hb3 (C) e Hb4 (D) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba.

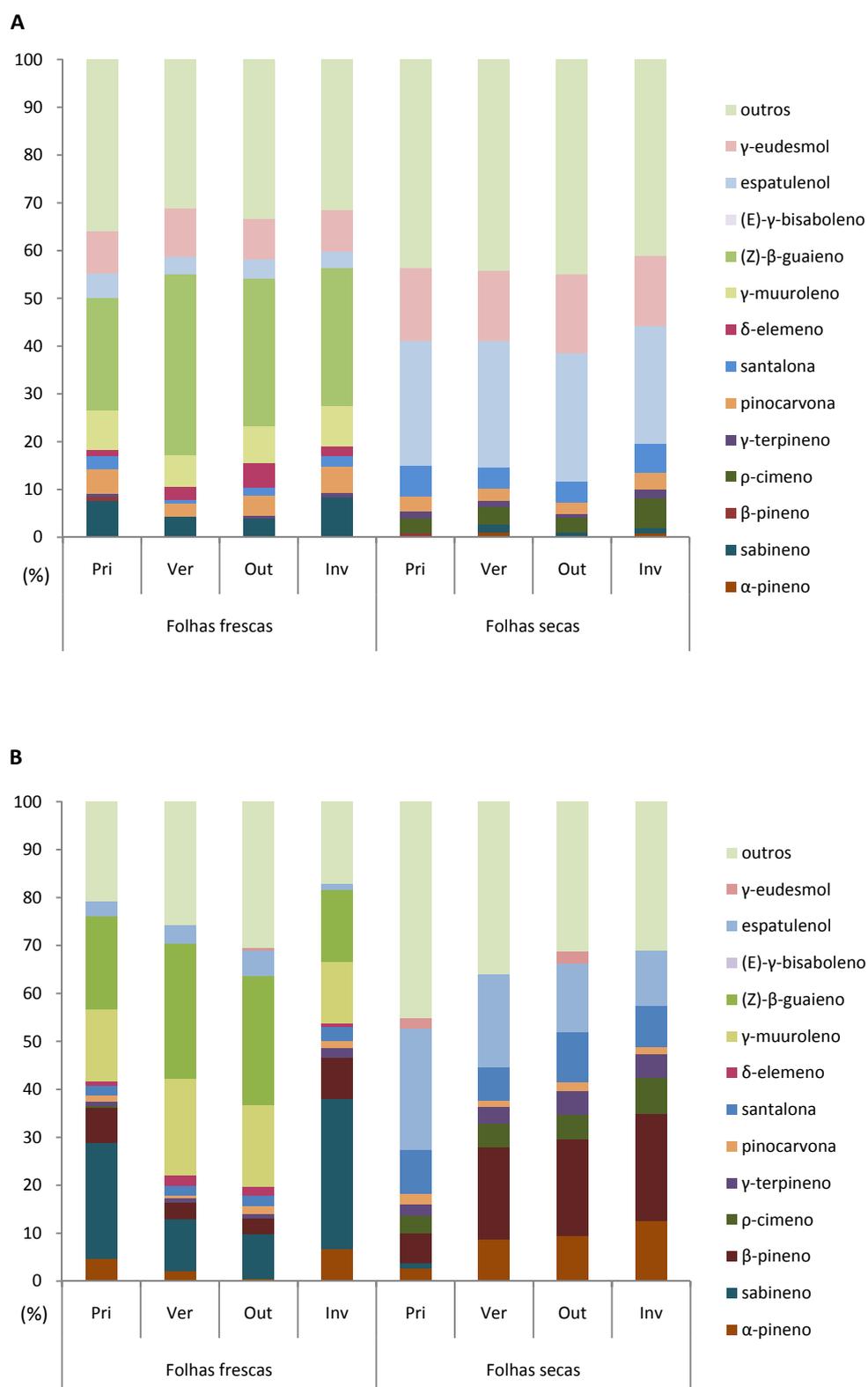


Figura 12. Compostos com áreas de pico acima de 5% presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas dos indivíduos Hb1 (A) e Hb2 (B) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Pindamonhangaba.

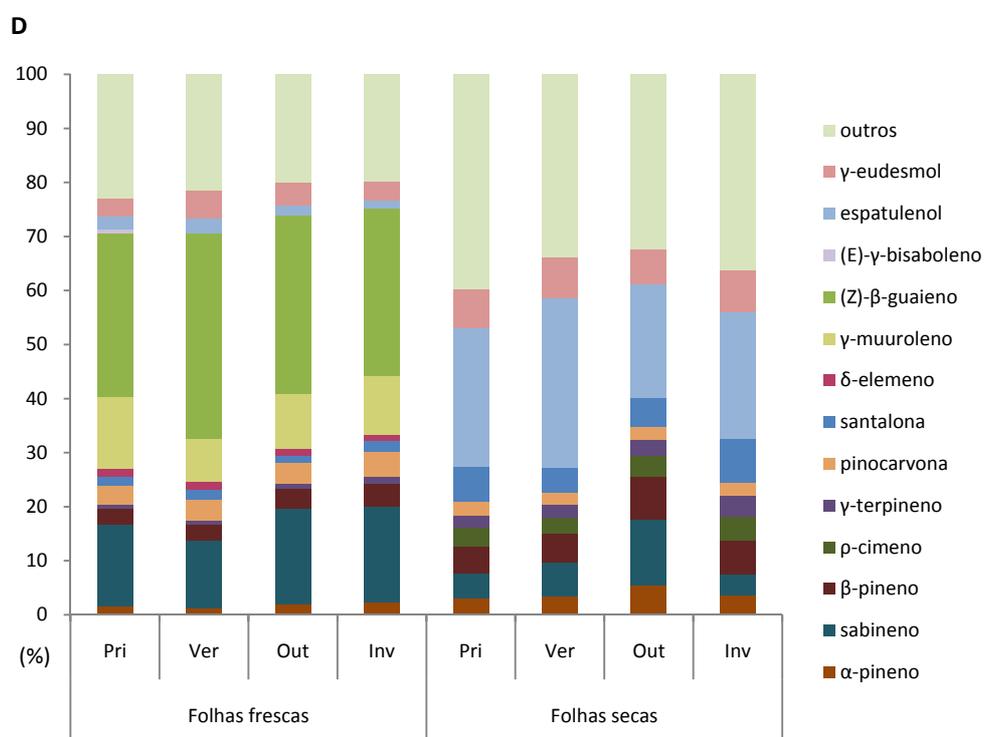
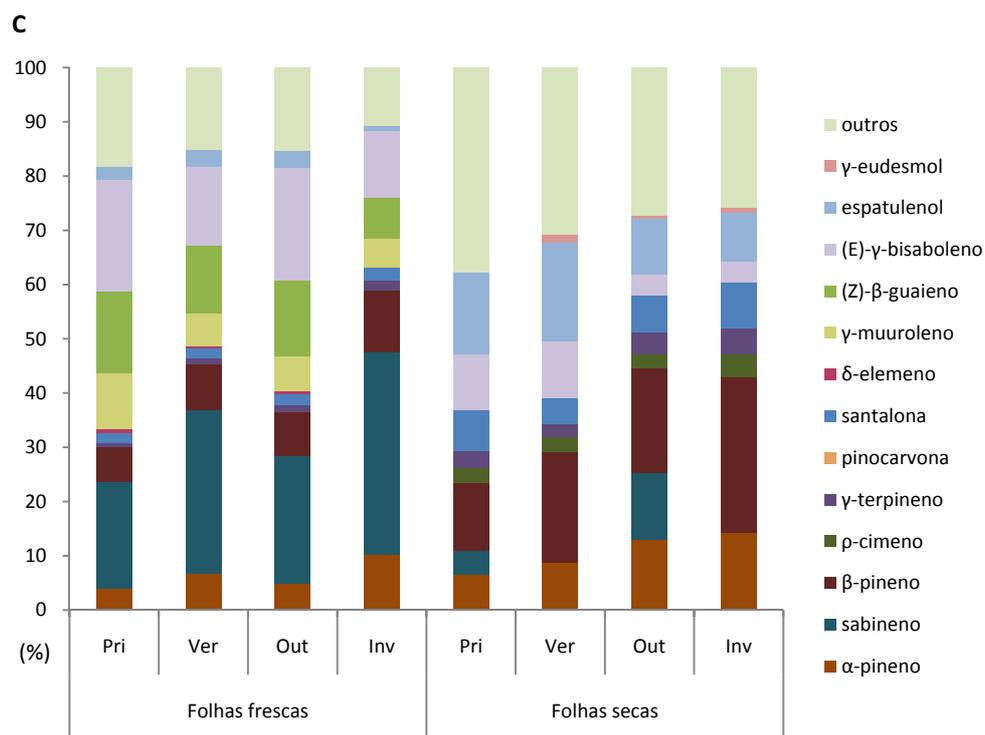


Figura 13. Compostos com áreas de pico acima de 5% presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas dos indivíduos Hb3 (C) e Hb4 (D) de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Pindamonhangaba.

Aparentemente os teores dos compostos com áreas de pico acima de 5%, são semelhantes durante as estações do ano para cada indivíduo. Porém diferenças são observadas na composição química entre os indivíduos. Isso sugere que o componente genético é preponderante à variação sazonal.

Entre os óleos de folhas frescas e secas de um mesmo indivíduo, observa-se variação qualitativa e quantitativa consideravelmente maior do que variações sazonais de óleos obtidos do mesmo tipo de material. Com a secagem das folhas, alguns compostos tiveram seu teor diminuído ou desapareceram, são compostos termolábeis como sabineno, pinocarvona, γ -muuroleno, (*Z*)- β -guaieno, curzereno e (*E*)- γ -bisaboleno. Compostos que revelaram aumento no teor ou surgiram com a secagem (possíveis artefatos) foram α -pineno, β -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, santalona, β -bisaboleno, espatulenol e γ -eudesmol. Compostos como o metil eugenol e o linalol não sofreram variações significativas com a secagem.

As figuras 14 a 18 mostram tendências relacionadas à sazonalidade nos compostos majoritários dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* provenientes de Paranapiacaba e Pindamonhangaba.

O sabineno, no geral, apresentou comportamento semelhante nas duas localidades, com aumento de seu teor no inverno. Diferenças quantitativas não foram detectadas nos teores de sabineno entre os indivíduos de Paranapiacaba. A variação no teor desse composto é maior entre os indivíduos de Pindamonhangaba. Os óleos de folhas secas apresentaram menores quantidades de sabineno que os de folhas frescas, apesar de ainda ser um dos constituintes majoritários naqueles.

Os teores de β -pineno dos óleos de folhas de Pindamonhangaba foram superiores aos de Paranapiacaba, sendo naquele lugar um dos compostos majoritários. Suas quantidades foram aumentadas com a secagem do material, assim como os teores de α -pineno. Na natureza, estes dois compostos tem função de deter o ataque de herbívoros e é agressivo para a maioria dos artrópodes (Harborne 2003), isso pode explicar o fato de estarem presentes em maiores quantidades nos óleos de folhas dos indivíduos de Pindamonhangaba (com exceção do indivíduo 1), especialmente nos indivíduos 2 e 3, cujas folhas foram encontradas intensamente predadas.

Compostos como o γ -muuroleno e (*Z*)- β -guaieno apresentaram-se extremamente vulneráveis à secagem. Eles estiveram praticamente ausentes em óleos de folhas secas provenientes de ambos os locais. Em contrapartida, os teores de espatulenol e santalona

aumentaram consideravelmente em óleos de folhas secas. Estes últimos compostos não apresentaram alterações ao longo das coletas.

As quantidades de (Z)- β -guaieno nos óleos de ambos os locais mostraram a mesma tendência, com um aumento de seus teores (em maior ou menor grau) durante o verão. Esse composto e o sabineno parecem sofrer pequenas variações sazonais em sua produção. Porém não se pode afirmar que tais alterações sejam devidas exclusivamente a esse fator.

O (E)- γ -bisaboleno foi majoritário somente nas amostras de óleos essenciais do indivíduo 3 de Pindamonhangaba, nas demais, esteve ausente. Ao passo que, todas as amostras de óleos de Paranapiacaba apresentaram esse composto, com exceção do indivíduo 4. O composto em questão também mostra certa instabilidade com a secagem.

É muito difícil relatar o que ocorre no metabolismo vegetal em condições de campo, visto que não podemos controlar as inúmeras interações entre um organismo e seu ambiente. Além disso, a própria técnica de extração para esses metabólitos pode originar artefatos, em virtude da sua temperatura. Ao cortar o material vegetal para realizar a extração e posterior análise, já não se obtém óleos com composição igual à da planta em seu ambiente natural, visto que injúrias mecânicas também podem interferir na produção dos voláteis, como descrevem Barnola *et al.* (1997) para os óleos essenciais de *Pinus caribaea*. Porém, alguns óleos essenciais podem apresentar atividades biológicas justamente por haver mudanças no teor de seus compostos.

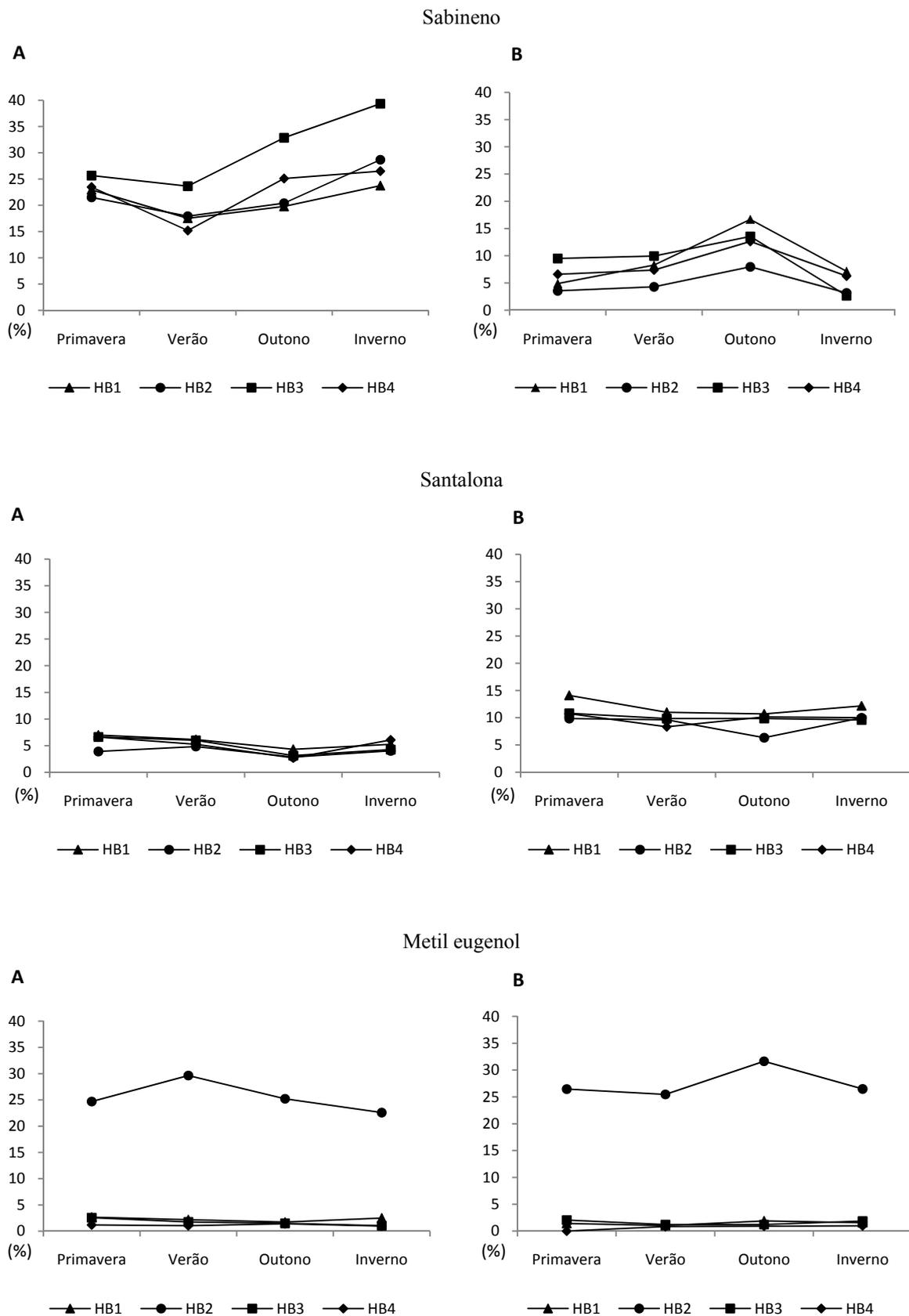


Figura 14. Tendências sazonais dos compostos majoritários (sabineno, santalona e metil eugenol) de óleos essenciais de folhas frescas (A) e secas (B) coletadas em Paranapiacaba.

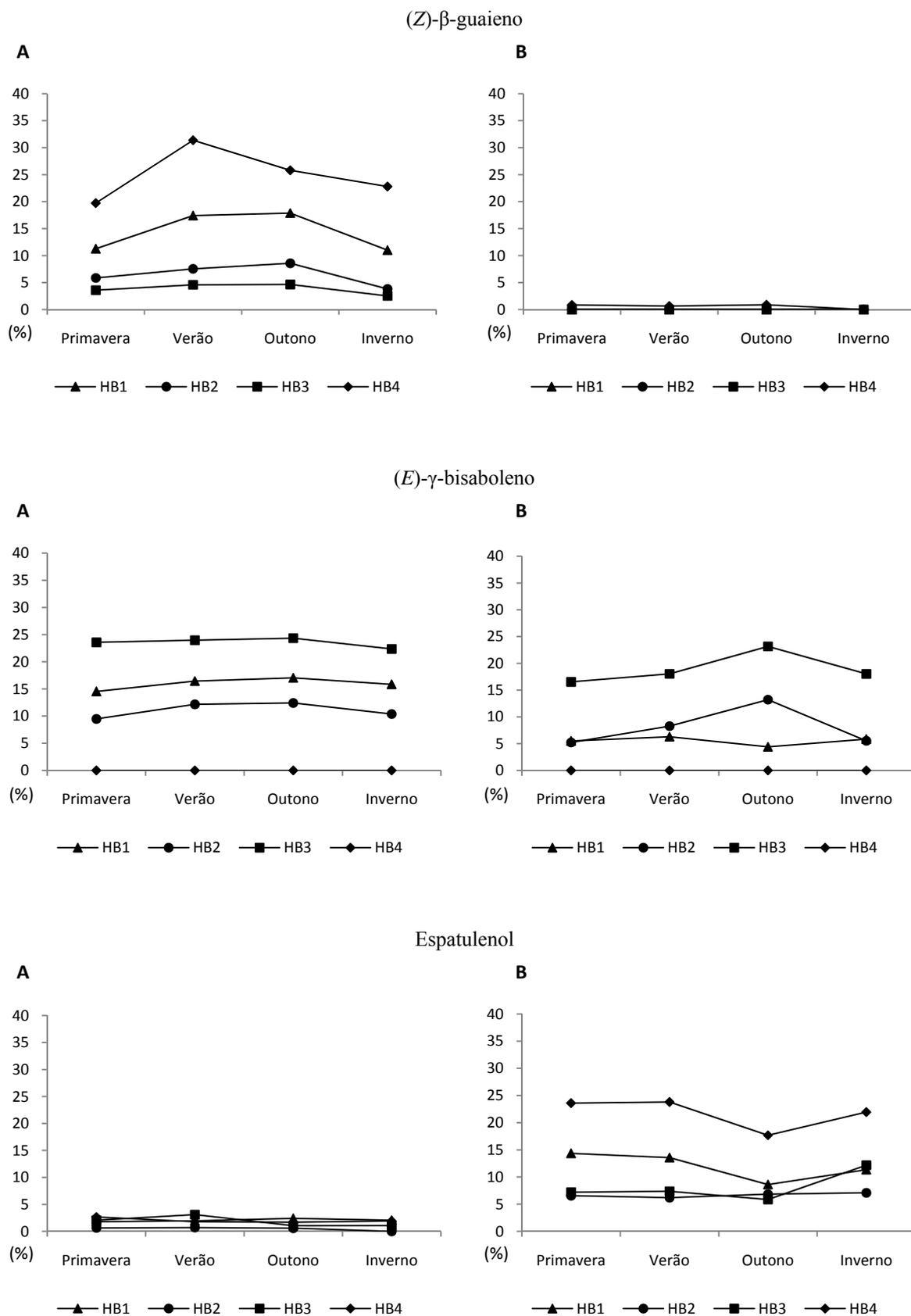


Figura 15. Tendências sazonais dos compostos majoritários ((Z)- β -guaïeno, (E)- γ -bisaboleno e espatulenol) de óleos essenciais de folhas frescas (A) e secas (B) coletadas em Paranapiacaba.

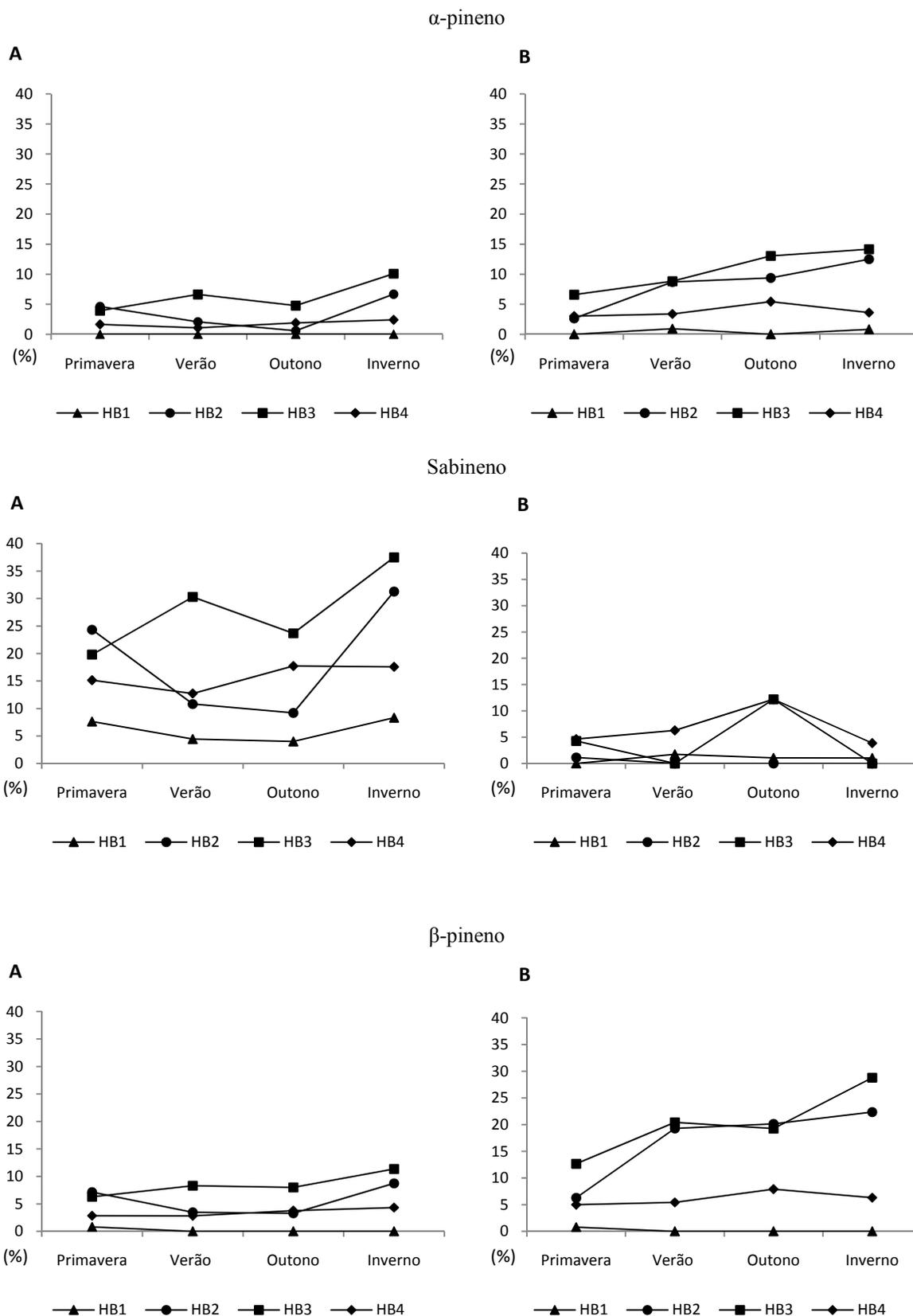


Figura 16. Tendências sazonais dos compostos majoritários (α -pineno, sabineno e β -pineno) de óleos essenciais de folhas frescas (A) e secas (B) coletadas em Pindamonhangaba.

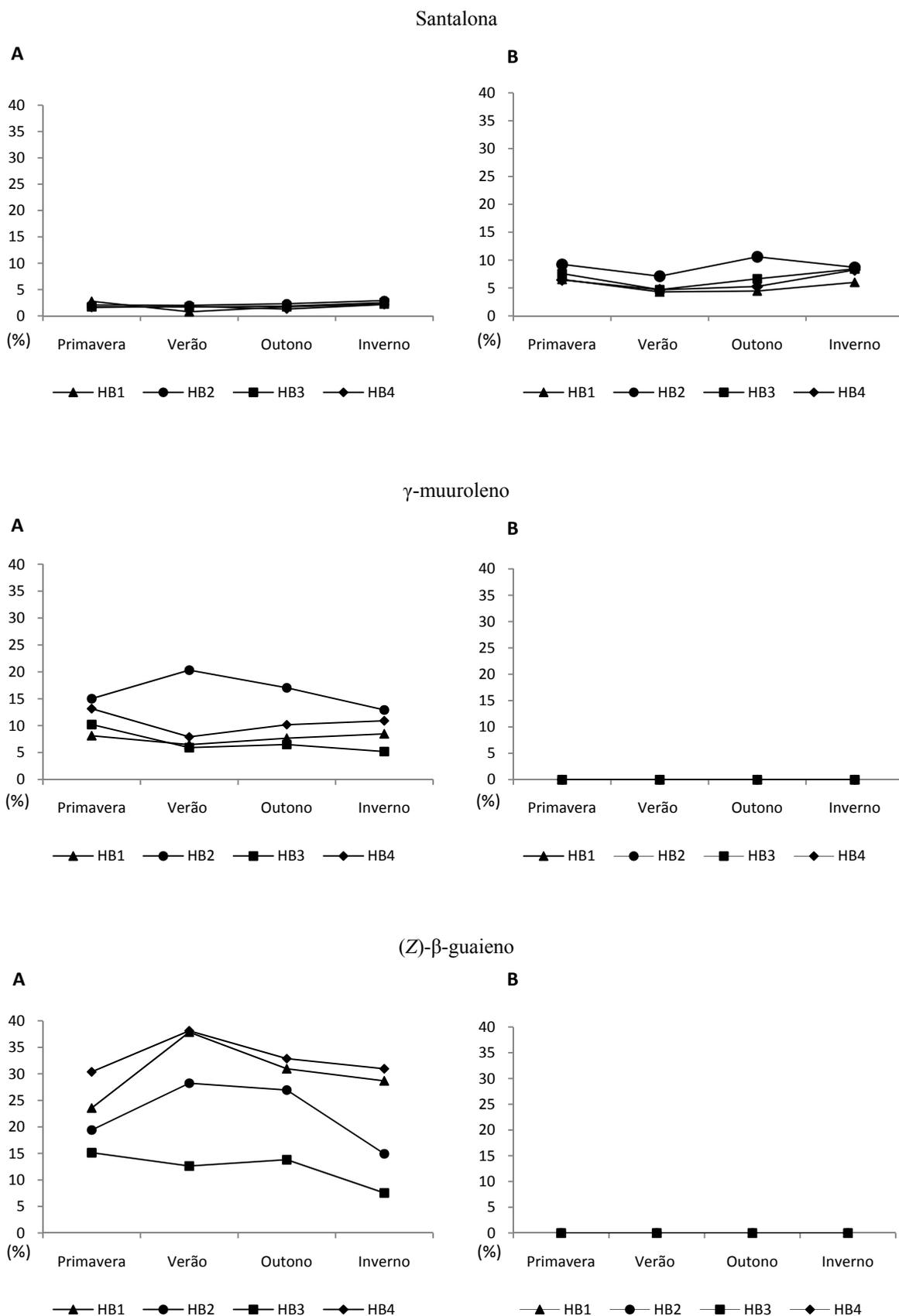


Figura 17. Tendências sazonais dos compostos majoritários (santalona, γ -muuroleno e (Z)- β -guaieno) de óleos essenciais de folhas frescas (A) e secas (B) coletadas em Pindamonhangaba.

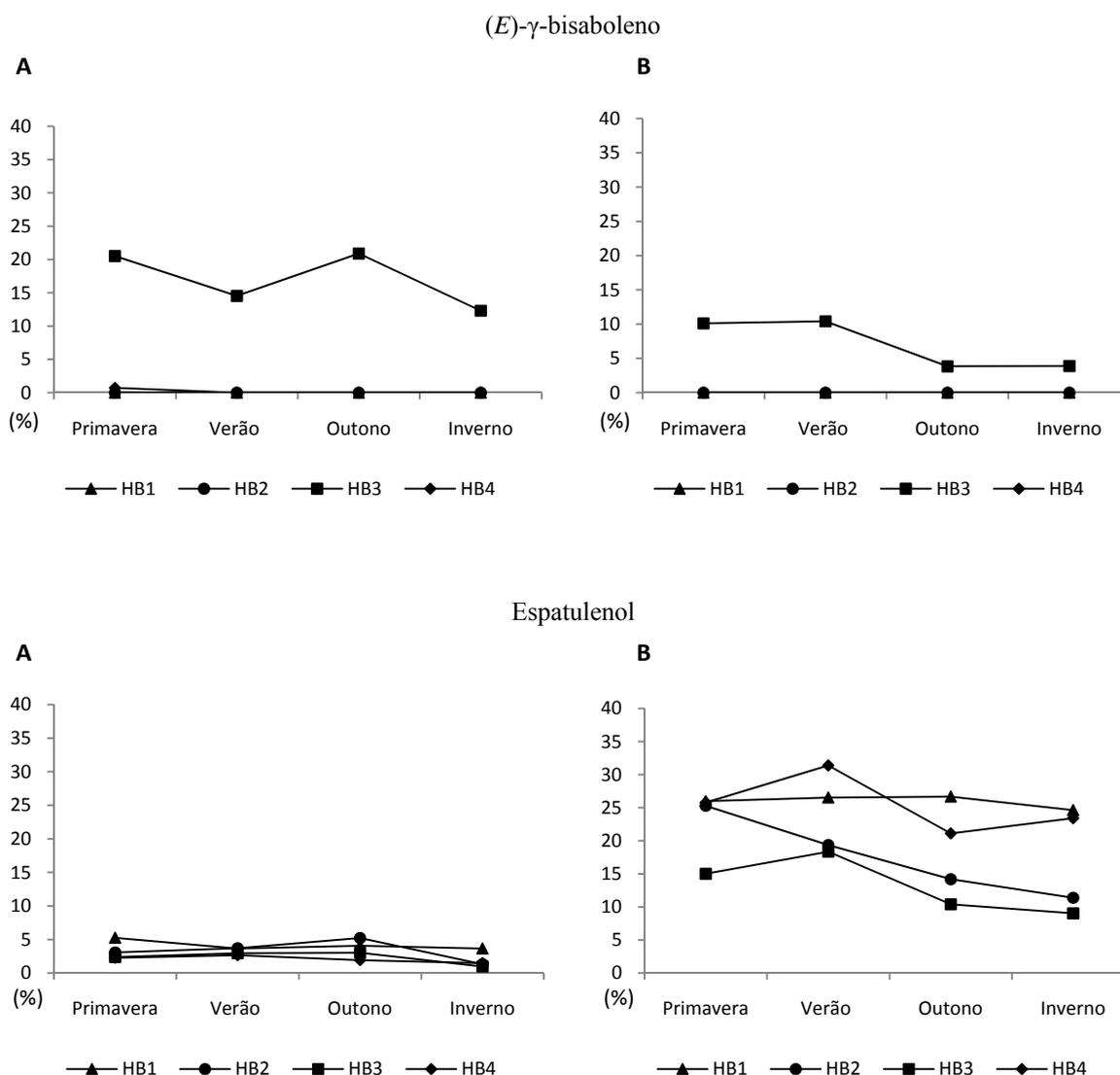


Figura 18. Tendências sazonais dos compostos majoritários ((*E*)- γ -bisaboleno e espatulenol) de óleos essenciais de folhas frescas (A) e secas (B) coletadas em Pindamonhangaba.

As tabelas 9 e 10 apresentam as porcentagens de inibição dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* oriundas de Paranapiacaba e Pindamonhangaba, respectivamente, frente à levedura *Candida albicans* e às bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* e Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.

Em linhas gerais, os óleos essenciais de folhas de *H. brasiliense* de ambos os locais tiveram respostas antimicrobianas excelentes, com a maioria das inibições acima de 90%.

Tabela 9. Porcentagem de inibição das atividades antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba.

Estação	Indivíduo	<i>Candida albicans</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS
Primavera	Hb1	95,7	93,6	18,5	100,0	30,3	71,1	95,2	92,9
	Hb2	87,7	73,2	28,9	99,7	22,0	39,0	84,9	66,8
	Hb3	62,9	89,6	35,4	100,0	11,7	100,0	55,0	97,9
	Hb4	100,0	100,0	52,0	59,3	31,5	93,0	100,0	94,5
Verão	Hb1	100,0	100,0	93,0	91,3	66,0	83,6	100,0	92,9
	Hb2	98,0	94,5	79,6	93,2	65,9	81,6	100,0	91,6
	Hb3	100,0	96,1	69,2	94,6	70,1	85,2	100,0	91,1
	Hb4	100,0	95,6	63,6	91,9	60,5	81,0	100,0	88,8
Outono	Hb1	97,8	87,6	65,3	80,2	59,1	35,1	97,0	51,9
	Hb2	100,0	62,8	39,6	60,3	15,6	28,3	100,0	47,8
	Hb3	100,0	82,5	50,6	98,0	10,3	56,4	100,0	92,6
	Hb4	92,2	97,5	41,5	94,1	3,6	50,2	78,8	94,9
Inverno	Hb1	100,0	99,0	52,9	95,6	31,8	55,5	100,0	99,9
	Hb2	100,0	89,9	51,5	92,1	16,3	47	100,0	99,8
	Hb3	100,0	97,1	49,4	95,7	11,6	62,3	100,0	98,1
	Hb4	99,2	98,7	52,8	55,7	6,3	41,6	100,0	94,4
Controle		92,1 (Nistatina)		100,0		100,0 (Cloramfenicol)		100,0	

FF: óleos de folhas frescas; FS: óleos de folhas secas.

Óleos essenciais de folhas frescas e secas de Pindamonhangaba apresentaram forte atividade frente à levedura *Candida albicans*, a maioria das amostras chegou a 100% de inibição. Grande parte das amostras de óleos de folhas frescas de Paranapiacaba também apresentou resultados semelhantes, os óleos de folhas secas conferiram inibições ligeiramente menores, porém com a maioria das porcentagens de inibições acima de 90%. Segundo Lima *et al.* (2006b), a candidíase é a principal infecção micótica em ambiente hospitalar.

Considerando sua resistência frente a antifúngicos comercializados atualmente, essas infecções são com frequência de difícil tratamento. Os óleos obtidos de *H. brasiliense* mostraram resultados interessantes para investigações posteriores, apresentando inibição maior do que a da nistatina, utilizada como controle (92%).

Compostos fenólicos como eugenol, timol, cinamaldeído, carvacrol e isoeugenol se mostraram fortemente ativos contra uma ampla gama de fungos patogênicos (Pauli & Knobloch 1987). Porém estes compostos não foram encontrados nos óleos de *H. brasiliense*.

Tabela 10. Porcentagem de inibição das atividades antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Pindamonhangaba.

Estação	Indivíduo	<i>Candida albicans</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
		FF	FS	FF	FS	FF	FS	FF	FS
Primavera	Hb1	95,5	98,4	52,6	61,9	53,8	67,5	100,0	99,9
	Hb2	85,6	100,0	60,0	100,0	56,2	83,3	85,5	100,0
	Hb3	100,0	100,0	41,6	99,1	44,2	81,5	100,0	100,0
	Hb4	64,3	100,0	28,6	100,0	21,5	78,1	62,6	100,0
Verão	Hb1	100,0	100,0	42,8	66,1	20,5	78,3	100,0	100,0
	Hb2	99,6	100,0	37,0	97,8	41,0	77,5	100,0	97,9
	Hb3	100,0	100,0	53,1	75,7	51,2	76,3	100,0	100,0
	Hb4	100,0	100,0	52,9	96,3	49,8	80,5	100,0	97,3
Outono	Hb1	100,0	100,0	61,5	65,4	53,6	58,7	100,0	100,0
	Hb2	*	100,0	*	95,0	*	85,6	*	92,4
	Hb3	100,0	96,0	57,8	98,1	49,9	86,9	100,0	98,3
	Hb4	100,0	100,0	47,2	98,9	28,6	88,4	100,0	97,9
Inverno	Hb1	100,0	100,0	53,9	97,2	57,3	74,9	100,0	98,4
	Hb2	100,0	99,3	59,2	97,5	66,0	84,0	100,0	97,0
	Hb3	100,0	99,3	57,6	95,2	67,3	78,9	100,0	94,0
	Hb4	100,0	100,0	51,3	66,0	60,6	72,4	98,9	98,8
Controle		92,1		100,0		100,0		100,0	
		(Nistatina)				(Cloramfenicol)			

FF: óleos de folhas frescas; FS: óleos de folhas secas; * teste não realizado

Em relação às atividades antibacterianas, os óleos essenciais foram mais eficazes contra a bactéria Gram-positiva do que contra as Gram-negativas, resultados semelhantes à maioria das investigações do potencial antimicrobiano de voláteis. De acordo com Vaara (1992), as bactérias Gram-negativas são resistentes a um grande número de antibióticos devido à presença de uma membrana externa envolvendo a parede celular, que dificulta a passagem de compostos hidrofóbicos. Contudo, nem todos os estudos com óleos essenciais revelam que as Gram-positivas sejam sempre mais susceptíveis, óleos essenciais de *Achillea clavенаe* revelaram forte atividade contra as bactérias Gram-negativas *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* ao passo que a Gram-positiva *Streptococcus pyogenes* se mostrou mais resistente (Edris 2007).

Contra *Staphylococcus aureus*, a maioria das inibições de óleos de folhas coletadas em nos dois locais foi de 100%. As inibições por parte dos óleos de folhas frescas foram mais pronunciadas do que as dos óleos de folhas secas, porém estes últimos também apresentaram, na sua maioria, valores maiores que 90% e em alguns casos de 100% (Pindamonhangaba).

Óleos essenciais de folhas de *Piper regnellii*, cujos componentes majoritários foram mirceno e linalol, e de *Piper cernuum*, com biciclogermacreno e β -cariofileno como majoritários, apresentaram atividade frente a *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus*, os autores atribuíram tal atividade aos compostos majoritários (Constantin *et al.* 2001). Diante disso, pode-se inferir que tanto monoterpenos como sesquiterpenos podem apresentar atividade antifúngica.

Óleos essenciais de folhas secas oriundas dos dois locais foram mais efetivos contra *Escherichia coli* do que os óleos de folhas frescas. Nos primeiros a porcentagem de inibição chegou a 100% na primavera (com a maioria das respostas acima de 90%). Os óleos de folhas frescas de Paranapiacaba apresentaram uma heterogeneidade nas respostas inibitórias conferida pela mudança de estação: na primavera foram observados valores mais baixos (de 18,5 a 52%), aumentando gradativamente no inverno (49 a 52,9%) e outono (39,6 a 65,3%), atingindo valores altos no verão (63,6 a 93%). Nos óleos de Pindamonhangaba não foram detectadas variações tão expressivas das atividades em relação às estações.

Pseudomonas aeruginosa foi o microorganismo que se mostrou menos vulnerável frente aos óleos essenciais de *H. brasiliense*. Entretanto, as inibições destes óleos também foram satisfatórias. Esta bactéria é tida na literatura como a menos susceptível aos óleos essenciais (Cosentino *et al.* 1999, Burt 2004, Demo *et al.* 2005). Os óleos de folhas secas de ambos os locais foram mais efetivos que os de folhas frescas. Óleos essenciais de folhas secas

provenientes de Paranapiacaba mostraram maior poder inibidor na primavera (até 100%) e verão (até 85,2%), atingindo médias maiores que de Pindamonhangaba. Os óleos de folhas secas dos indivíduos de Pindamonhangaba não apresentaram variações sazonais em sua atividade, e atingiram valores de até 88,4% de inibição.

Aparentemente, algumas das atividades biológicas não se relacionam apenas com os majoritários, como é descrito, por vezes, na literatura (Burt 2004, Bakkali *et al.* 2008). Tomemos como exemplo os óleos de folhas frescas do indivíduo 1 de Pindamonhangaba frente a *Escherichia coli*: na primavera, verão e outono, seus óleos apresentaram inibições de 61,9%, 66,1% e 65,4%, respectivamente, em contrapartida, no inverno seu potencial inibidor foi de 97,2%. Ao confrontar estes dados com os da Figura 12A, verifica-se que há semelhanças entre as proporções dos majoritários e dos compostos que se encontram em quantidades acima de 5%. Comparando-se os dados dessas mesmas amostras de voláteis com as atividades frente à *Pseudomonas aeruginosa*, observam-se inibições de 65,7%, 78,3%, 58,7% e 74,9% (primavera, verão, outono e inverno, respectivamente). Estes resultados também não coincidem com a proporção dos constituintes principais.

Apesar de, na maioria dos casos, a literatura relatar que compostos fenólicos como timol, carvacrol, eugenol, anetol, entre outros (Cosentino *et al.* 1999, Burt 2004, Bakkali *et al.* 2008) possuem atividade mais efetiva contra microorganismos, os óleos essenciais de *H. brasiliense* não são ricos nesses compostos, com exceção dos voláteis do indivíduo 2 de Paranapiacaba. O metil eugenol, presente em óleos de folhas deste indivíduo, aparentemente não é o responsável pelas atividades biológicas visto que além de constituir uma fração pequena nos demais indivíduos de Paranapiacaba está completamente ausente nos óleos essenciais de folhas de Pindamonhangaba.

Assim, não é possível inferir que estas atividades se devam somente aos majoritários, mas podem ser atribuídas a uma ação sinérgica destes ou é provável que a atividade dos componentes majoritários seja controlada pelos minoritários (Bakkali *et al.* 2008).

Óleos essenciais de duas espécies de *Thymus* provenientes da Sardenia inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e em menor grau de *Escherichia coli*, porém não apresentaram bioatividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Seus constituintes majoritários, timol, carvacrol, α -pineno, *p*-cimeno, γ -terpineno, linalol e α -terpineol, também foram testados e, as maiores inibições, atribuídas aos dois primeiros, contudo a mistura do óleo essencial foi mais efetiva que os compostos isolados (Cosentino *et al.* 1999). Isso demonstra que os demais constituintes possivelmente atuam de forma

sinérgica na inibição desses microorganismos. Com exceção do timol e carvacrol, os outros compostos foram encontrados nos óleos essenciais de folhas de *Hedyosmum brasiliense*, estes compostos podem ter contribuído em algum grau para a atividade antimicrobiana.

Em uma visão mais ecológica, Gershenzon & Dudareva (2007) argumentam o motivo de óleos essenciais constituírem-se de misturas complexas em lugar de um ou dois componentes. Uma das justificativas é que para organismos que possuem muitos inimigos, uma combinação diversificada de componentes, pode protegê-lo simultaneamente de predadores, parasitas e competidores. O grande número de compostos presentes nos óleos essenciais de *H. brasiliense* possibilita várias formas de interações sinérgicas e antagônicas, isso pode explicar a sua ação antimicrobiana frente a organismos cujos mecanismos de defesa são diferentes.

Os resultados da atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba e Pindamonhangaba estão mostrados na tabela 11.

Todas as amostras de óleos obtidos de folhas secas coletadas na primavera apresentaram índices de inibição acima de 40%, o que é considerado atividade positiva. As maiores inibições foram dos óleos dos indivíduos 4 e 2 de Pindamonhangaba (65,65% e 59,29%, respectivamente) seguidas dos indivíduos 1 e 3 de Paranapiacaba (58,25% e 54,36%, respectivamente). Dos óleos obtidos de folhas frescas desta mesma estação, apenas o do indivíduo 1 de Pindamonhangaba apresentou inibição maior que 40%.

Todas as amostras de folhas secas tem em comum altas percentagens de espatulenol (até 23,82% em Paranapiacaba e até 31,4% em Pindamonhangaba) e santalona (até 14,11% em Paranapiacaba e até 10,59% em Pindamonhangaba) na sua constituição. Porém, estes dados não explicam a inibição maior por parte dos óleos de folhas coletadas na primavera nem nas diferenças encontradas entre os indivíduos desta estação. Além disso, Raggi (2008) estudou os óleos essenciais de folhas secas de duas espécies de *Ocotea*, da família Lauraceae, cujo composto majoritário foi o espatulenol: nenhuma delas apresentou atividade positiva de inibição da acetilcolinesterase. Isso sugere que a inibição desta enzima por óleos de folhas secas pode estar relacionada não aos compostos majoritários, mas à interação sinérgica de compostos que se apresentam em menores quantidades.

Tabela 11. Atividade anticolinesterásica (média da % de inibição \pm erro padrão) dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba e Pindamonhangaba.

Estação	Indivíduo	Paranapiacaba		Pindamonhangaba	
		FF	FS	FF	FS
Primavera	Hb1	19,81% \pm 2,93%	58,25% \pm 1,62%	44,15% \pm 2,14%	44,53% \pm 1,79%
	Hb2	25,35% \pm 1,90%	42,59% \pm 1,78%	35,30% \pm 2,69%	59,29% \pm 0,90%
	Hb3	22,90% \pm 2,19%	54,36% \pm 2,30%	24,47% \pm 3,77%	53,36% \pm 0,55%
	Hb4	24,68% \pm 0,33%	43,84% \pm 0,54%	24,61% \pm 5,18%	65,65% \pm 0,66%
Verão	Hb1	12,29% \pm 0,89%	28,72% \pm 0,29%	19,25% \pm 1,07%	25,63% \pm 0,97%
	Hb2	14,10% \pm 1,46%	31,13% \pm 0,71%	24,60% \pm 1,20%	34,55% \pm 0,56%
	Hb3	13,32% \pm 1,23%	36,93% \pm 0,91%	13,68% \pm 2,06%	25,51% \pm 0,24%
	Hb4	11,40% \pm 0,43%	28,92% \pm 0,60%	14,41% \pm 1,58%	34,82% \pm 0,82%
Outono	Hb1	12,79% \pm 0,26%	27,32% \pm 0,26%	19,25% \pm 1,07%	35,26% \pm 0,60%
	Hb2	12,97% \pm 1,07%	26,59% \pm 0,81%	24,6% \pm 1,20%	41,16% \pm 0,36%
	Hb3	14,17% \pm 1,09%	30,19% \pm 1,18%	13,68% \pm 2,06%	36,89% \pm 1,19%
	Hb4	15,69% \pm 0,12%	29,94% \pm 0,89%	14,41% \pm 1,58%	29,28% \pm 0,35%
Inverno	Hb1	15,18% \pm 1,44%	30,42% \pm 0,35%	5,50% \pm 0,76%	30,47% \pm 1,33%
	Hb2	16,04% \pm 0,43%	28,14% \pm 0,37%	12,37% \pm 0,84%	27,54% \pm 0,62%
	Hb3	16,13% \pm 3,00%	30,96% \pm 0,94%	13,53% \pm 0,75%	26,51% \pm 1,15%
	Hb4	21,67% \pm 0,84%	30,00% \pm 0,86%	13,34% \pm 1,78%	35,21% \pm 0,75%
Controle (Galantamina)		75,58 \pm 0,48			

*Valores acima de 40% são considerados atividades positivas.

Perry *et al.* (2002) sugerem que o óleo essencial de *Salvia lavandulaefolia* pode ser relevante no tratamento da doença de Alzheimer, após estudos *in vitro* da inibição da enzima acetilcolinesterase. Os autores propõem que a atividade anticolinesterásica se deve à ação sinérgica dos seus componentes. Em estudo posterior, Savelev *et al.* (2003) testam o óleo essencial desta espécie e seus constituintes separadamente, são eles 1,8-cineol, cânfora, α -pineno, β -pineno, borneol, óxido de cariofileno, linalol e bornil acetato, e detecta que a inibição da mistura do óleo foi mais efetiva que a dos constituintes isolados, com exceção da ação inibidora de constituinte majoritário 1,8-cineol, que foi semelhante. Picollo *et al.* (2008), testaram a ação anticolinesterásica de 20 monoterpenos isolados, dentre eles alguns presentes

nos óleos de *H. brasiliense* como 1,8-cineol, linalol, α -pineno, β -pineno, limoneno, terpineno e mirceno, o primeiro composto também se mostrou mais efetivo que os demais.

Muitos destes compostos constituem o óleo essencial de *H. brasiliense*, porém a inibição da enzima acetilcolinesterase somente por parte dos óleos obtidos de folhas coletadas na primavera não está relacionada aos teores destes constituintes. Com base nos relatos dos estudos anteriores, é reforçada a hipótese de que a inibição da enzima em maior ou menor grau esteja relacionada à ação sinérgica ou antagônica entre os constituintes dos óleos.

Os óleos de folhas frescas, coletadas nos dois locais, não foram efetivos na inibição da acetilcolinesterase (com exceção da amostra de óleo do indivíduo 1 de Pindamonhangaba, na primavera).

Os resultados da atividade dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas de *H. brasiliense*, coletadas sazonalmente em Paranapiacaba e Pindamonhangaba contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, estão apresentados nas tabelas 12 e 13.

De maneira geral, *C. cladosporioides* foi mais sensível do que *C. sphaerospermum* à ação dos óleos essenciais de *H. brasiliense*. Óleos de folhas secas dos dois locais de coleta apresentaram maior atividade contra ambos os fungos.

Os melhores resultados para esta atividade foram dos óleos de folhas oriundas de Paranapiacaba. Em relação ao fungo *C. cladosporioides*, foram detectadas inibições fortes dos óleos essenciais de folhas secas e frescas coletadas na primavera e de folhas secas coletadas no inverno nesse local. Os óleos de folhas frescas e secas das outras duas estações apresentaram, no geral, atividade antifúngica fraca e média, respectivamente.

Óleos de folhas frescas coletadas em Pindamonhangaba foram inativos frente a *C. cladosporioides*, com exceção de óleos de folhas coletadas na primavera, cuja inibição foi fraca. A maioria destas amostras mostrou-se também inativas contra *C. sphaerospermum*. Óleos essenciais de folhas secas coletadas na primavera e no outono em Pindamonhangaba apresentaram atividade inibidora média frente a *C. sphaerospermum*, os primeiros, apresentaram resultados semelhantes frente a *C. cladosporioides*.

Apesar das respostas antifúngicas variarem com as diferentes estações do ano, não houve grandes diferenças quanto à composição química dos óleos essenciais, principalmente entre os constituintes majoritários, como discutido anteriormente.

Tabela 12. Atividade antifúngica (*Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*), por bioautografia, de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Paranapiacaba.

Estação	Indivíduo	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
		FF	FS	FF	FS
Primavera	Hb1	**	***	*	**
	Hb2	***	***	*	**
	Hb3	**	***	*	**
	Hb4	***	***	**	**
Verão	Hb1	**	**	*	*
	Hb2	*	**	-	*
	Hb3	*	*	-	*
	Hb4	**	**	*	*
Outono	Hb1	*	*	**	**
	Hb2	*	**	*	**
	Hb3	*	*	*	**
	Hb4	*	**	**	**
Inverno	Hb1	*	***	*	*
	Hb2	*	***	*	*
	Hb3	-	**	-	*
	Hb4	**	***	*	*
Controle (Nistatina)		***			

*** atividade forte; ** atividade média; * atividade fraca; - sem atividade

Tabela 13. Atividade antifúngica (*Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*), por bioautografia, de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas sazonalmente em Pindamonhangaba.

Estação	Indivíduo	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	
		FF	FS	FF	FS
Primavera	Hb1	*	**	*	**
	Hb2	*	**	*	**
	Hb3	*	**	*	**
	Hb4	*	**	*	**
Verão	Hb1	-	*	*	**
	Hb2	-	*	*	*
	Hb3	-	*	-	*
	Hb4	-	*	-	*
Outono	Hb1	-	*	*	**
	Hb2	-	*	*	**
	Hb3	-	*	-	**
	Hb4	-	*	*	**
Inverno	Hb1	-	*	-	*
	Hb2	-	*	-	*
	Hb3	-	*	-	*
	Hb4	-	*	-	*
Controle (Nistatina)		***			

*** atividade forte; ** atividade média; * atividade fraca; - sem atividade

Os resultados são promissores para o seguimento das investigações dos óleos essenciais desta espécie frente aos microorganismos testados a fim de determinar a concentração inibitória mínima e realizar testes pré-clínicos e clínicos. Posteriormente, podem ser realizados experimentos para a compreensão do mecanismo de ação dos seus constituintes. Há um consenso entre estudiosos da área que substâncias que possuem atividade antimicrobiana tem grandes possibilidades de apresentar outras atividades farmacológicas (Lima *et al.* 2006a). Assim, essa espécie, com potencial farmacológico, pode ainda revelar resultados esperançosos para a cura de outras enfermidades mais graves.

5. CONCLUSÕES

- O rendimento dos óleos essenciais extraídos do material vegetal seco de *Hedyosmum brasiliense* sempre foi superior ao obtido de material vegetal fresco.
- Óleos essenciais obtidos de folhas de Paranapiacaba apresentaram maior rendimento que óleos extraídos de folhas de Pindamonhangaba, tanto para folhas frescas como para folhas secas.
- Nos óleos essenciais de folhas de Paranapiacaba, houve predomínio de compostos monoterpênicos, ao passo que óleos de folhas coletadas em Pindamonhangaba apresentaram maior teor de sesquiterpenos.
- Os resultados indicam que o componente genético se sobrepõe à sazonalidade em relação à variabilidade química encontrada, visto que há grande variação intra-específica e pequena alteração sazonal no teor dos compostos.
- O indivíduo 2 de Paranapiacaba apresentou teores elevados de fenilpropanóides, devido quase que exclusivamente ao metil eugenol e, além disso, apresentou o sesquiterpeno oxigenado curzereno, composto não detectado em nenhuma outra amostra. Nenhuma amostra de Pindamonhangaba apresentou fenilpropanóides em sua composição.
- A secagem do material acarretou em uma diminuição de hidrocarbonetos sesquiterpênicos, mudando radicalmente o perfil do óleo essencial e sua atividade biológica de forma positiva para as bactérias Gram-negativas.
- A localização geográfica influenciou na composição química dos óleos essenciais de *H. brasiliense*.
- Os óleos essenciais de folhas de *Hedyosmum brasiliense* apresentaram respostas antimicrobianas excelentes frente a *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estes resultados, agregados ao bom rendimento, justificam a continuidade das investigações dos óleos essenciais desta espécie para fins farmacêuticos.

6. RESUMO

As plantas, em especial as plantas medicinais e aromáticas, podem apresentar alterações bioquímicas e fisiológicas, capazes de afetar a síntese dos princípios ativos, tanto quantitativa como qualitativamente. Os óleos essenciais são compostos provenientes do metabolismo secundário e apresentam diferentes funções. Fatores endógenos ou exógenos, como variabilidade genética entre os indivíduos, o estágio fenológico, a interação com outras espécies, a época de colheita, o tempo de secagem entre outros, podem alterar a sua composição e o seu teor. *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. é um arbusto ou arvoreta que varia de 2,9 a 7 m de altura, distribuído por toda região central e sul do Brasil, e também no leste do Paraguai. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para enxaqueca, dores de estômago, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, como tônico e afrodisíaco, porém, somente as propriedades analgésicas e anticoagulantes foram comprovadas. Considerando o extrativismo e a possível extinção de espécies da flora tropical em condições naturais, o objetivo deste trabalho foi ampliar o conhecimento sobre a composição química e o teor dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense*, provenientes de duas formações distintas de Mata Atlântica (Serra do Mar e da Mantiqueira), em diferentes épocas do ano e avaliar suas atividades antifúngica, antibacteriana e anticolinesterásica. Os óleos de folhas frescas e secas dos quatro indivíduos demarcados em cada local foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG/EM. A atividade antifúngica foi realizada pelo método de bioautografia direta com os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. A avaliação da atividade contra os microorganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada pelo método da microdiluição. A atividade anticolinesterásica foi avaliada por ensaio colorimétrico em microplaca. Os rendimentos de óleos de folhas secas foram sempre superiores aos de folhas frescas, e em relação aos diferentes locais, óleos de folhas de Paranapiacaba tiveram maior rendimento que os de folhas de Pindamonhangaba. Dentre os óleos dos indivíduos de Paranapiacaba houve predominância de compostos monoterpênicos, em contrapartida, óleos provenientes de folhas dos indivíduos de Pindamonhangaba apresentaram maiores teores de sesquiterpenos. A secagem das folhas alterou o teor dos compostos majoritários. Em Paranapiacaba, os óleos obtidos de folhas frescas apresentaram como constituintes majoritários: sabineno, (*Z*)- β -guaieno, (*E*)- γ -bisaboleno, pinocarvona e metil eugenol (este último apenas para o indivíduo 2). Em Pindamonhangaba, os óleos extraídos de folhas frescas apresentaram os mesmos constituintes majoritários, com exceção de metil eugenol e do (*E*)- γ -bisaboleno (presente apenas no indivíduo 3), além do γ -muuroleno. Os óleos de folhas secas

apresentaram componentes majoritários semelhantes em ambos os locais: espatulenol, santalona e sabineno. Os óleos obtidos de folhas frescas e secas de ambos os locais apresentaram atividade de fraca a forte contra os fungos filamentosos. Óleos de folhas secas de ambos os locais apresentaram atividade antimicrobiana forte: com inibição de até 100% para *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os óleos de folhas frescas foram mais efetivos contra os dois primeiros microorganismos. Com relação à atividade anticolinesterásica, os melhores resultados foram obtidos para os óleos extraídos de folhas secas coletadas em Pindamonhangaba durante a primavera. Os resultados permitem concluir que a secagem, a genética e a localização geográfica dos indivíduos foram os fatores que tiveram maior influência na variação do teor e composição dos óleos essenciais de *Hedyosmum brasiliense*.

7. ABSTRACT

Plants, in special medicinal and aromatic, may present biologic and physiologic changes, capable to affect the synthesis of active compounds, even quantitative and qualitatively. Essentials oils are compounds originated from the secondary metabolism and present different functions. Endogens or hexogen factors, like genetic variability between individuals, phenologic stage, interaction with other species, harvest time, drying time and others, may modify their composition and contents. *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. is a shrub or a small tree, varying from 2,9 to 7 meters high, distributed in the center and south of Brazil, and also in the east of Paraguay. Their leaves are used in folk medicine for migraines, stomach pains, ovary dysfunctions, athlete's foot, rheumatism, invigorating and aphrodisiac, however only analgesic and anticoagulant properties were proved. Considering the constant use of the natural resources and the potential extinction of the tropical flora, the aim of this work was to increase the knowledge of chemical compounds and the contents of essentials oils from *H. brasiliense* fresh and dried leaves, from populations occurring in two distinct formation of the Atlantic Rainforest (Serra do Mar and Mantiqueira), in different seasons and evaluate their antifungal, antibacterial, and acetylcholinesterase inhibition properties. Oils from fresh and dried leaves of four individuals from each place were obtained by hydrodistillation and evaluated by GC/MS. The activity against filamentous fungi *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum* were evaluated by the method of direct bioautograph in silica gel thin-layer. The activity against microorganisms *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* was carried out by the dilution method. The anticholinesterasic activity was evaluated by a spectrophotometric method. The oil yields from dried leaves were always superior compared with those from fresh leaves, and regarding the different places, Paranapiacaba leaves oils had a better yield than Pindamonhangaba leaves. Among the Paranapiacaba oils from individuals there were a predominance of monoterpenic compounds, on the other hand, leaf oils from individuals from Pindamonhangaba had a predominance of sesquiterpenic compounds. Drying leaves changed the content of major compounds. In Paranapiacaba, oils acquired from fresh leaves presented as major compounds: sabinene, (*Z*)- β -guaiene, (*E*)- γ -bisabolene, pinocarvone and methyl eugenol (this last only for individual 2). In Pindamonhangaba, oils extracted from fresh leaves presented the same major compounds, with exception of methyl eugenol and (*E*)- γ -bisabolene (presented only in individual 3), besides γ -muurolene. Oils from fresh leaves presented similar major compounds in both places: spathulenol, santalone and sabinene. The oils acquired from fresh and dried leaves of both places presented weak to strong activity against

filamentous fungi. For both locations, oils obtained from dried leaves presented strong antimicrobial activity: with inhibition until 100% for *S. aureus*, *C. albicans*, *E. coli* and *P. aeruginosa*. Oils from fresh leaves were more effective against the two former microorganisms. Regarding the anticholinesterasic activity, the best results were obtained for oils extracted from dried leaves collected in Pindamonhangama during spring. The results allow to conclude that the drying process, the genetic and the geographic location of individuals were the factors that had major influence in the variability of content and composition from essential oils from leaves of *Hedyosmum brasiliense*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, K. & Zapp, J.** 1998. Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpens. *Phytochemistry* 48: 953-959.
- Adams, R. P.** 2007. Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry. Academic Press, New York.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.Y., Ri, M.B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. & Bouwmeester, W.A.** 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews*. 5: 49-58.
- Ahmed, A.A., Mahmoud, A.A., Williams, H.J., Scott, A.I., Reibenspies, J.H. & Mabry, T.J.** 1993. New sesquiterpene α -methylene lactones from the Egyptian plant *Jasonia candicans*. *Journal of Natural Products*. 56: 1276-1280.
- Akpata, E.S. & Akinrimisi, E.O.** 1977. Antibacterial activity of extracts from some African chewing sticks. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 44: 717-722.
- Allahverdiyev, A., Duran, N., Ozguven, M. & Koltas, S.** 2004. Antiviral activity of the volatile oils of *Melissa officinalis* L. against *Herpes simplex* virus type-2. *Phytomedicine*. 11: 657-661.
- Amaral, J.A., Ekins, A., Richards, S.R. & Knowles, R.** 1998. Effect of selected monoterpenes on methane oxidation, denitrification, and aerobic metabolism by bacteria in pure culture. *Applied and Environment Microbiology*. 64: 520-525.
- Amoros, M., Sauvager, F., Girre, L. & Cormier, M.** 1992. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie*. 23: 231-240.
- Andrade, F.M.C. & Casali, V.W.D.** 1999. Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. UFV - Departamento de Fitotecnia, Viçosa, 139 p.

- Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B. & Machado, L.B.** 2004. Seasonal variation in germacrone and atractilone in the essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. 6(3): 62-64.
- Ayafor, J.F., Tchuendem, M.H.K., Nyasse, B., Tillequin, F. & Anke, H.** 1994. Novel active diterpenoids from *Aframomum aulacocarpus*. *Journal of Natural Products*. 57: 917-923.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, B. & Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446-475.
- Balandrin, M.F., Klocke, J.A., Wurtele, E.S. & Bollinger, W.H.** 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science*. 228: 1154-1160.
- Balthazar, M. & Endress, P.K.** 1999. Floral bract function, flowering process and breeding systems of *Sarcandra* and *Chloranthus* (Chloranthaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 218: 161-178.
- Barbosa-Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S. & Quintans-Júnior, L.J.** 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16(2): 258-285.
- Barnola, L.F., Cedeño, A. & Hasegawa, M.** 1997. Intraindividual variations of volatile terpene contents in *Pinus caribaea* needles and its possible relationship to *Atta laevigata* herbivore. *Biochemical Systematics and ecology*. 25(8): 707-716.
- Bell, E.A.** 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. *In*: Conn, E.E. (ed.) *The Biochemistry of Plants*. v. 7. Academic Press, New York, p. 1-19.
- Bercion, S., Martin, M.A.C.K., Baltaze, J.P. & Bourgeois, P.** 2005. A new α -methylene γ -lactone from *Hedyosmum arborecens*. *Fitoterapia*. 76: 620-624.

- Bohlmann, J., Meyer-Gauen, G. & Croteau, R.** 1998. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. (95): 4126-4133.
- Bramley, P.M.** 1997. Isoprenoid metabolism. *In: Dey, P.M. & Harborne, J.B. (eds.) Plant Biochemistry*. Academic Press, San Diego, p. 417-437.
- Burt, S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*. 94: 223-253.
- Cao, C.M., Peng, Y., Shi, Q.W. & Xiao, P.G.** 2008. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity*. 5: 219-238.
- Cárdenas, L.C., Rodríguez, J., Villaverde, M.C., Riguera, R., Cadena, R. & Otero, J.A.** 1993. The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Medica*. 59(1): 26-27.
- Carson, C.F., Mee, B.J. & Riley, T.V.** 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46: 1914-1920.
- Castellani, D.C., Casali, V.W.D., Souza, A.L., Cecon, P.R., Cardoso, C.A. & Marques, V.B.** 2006. Produção de óleo essencial de catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de coleta. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8: 62-65.
- Castro, H.G., Oliveira, L.O., Barbosa, L.C.A., Ferreira, F.A., Silva, D.J.H., Mosquim, P.R. & Nascimento, E.A.** 2004. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. *Química Nova*. 27: 55-57.
- Chappell, J.** 1995. Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 46: 521-547.

- Chechinell Filho, V. & Yunes, R.** 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*. 21(1): 99-105.
- Collins, C. H. & Braga, G. L.** 1988. Introdução a Métodos Cromatográficos. 3 ed. Editora da UNICAMP, Campinas.
- Constantin, M.B., Sartorelli, P., Limberger, R., Henriques, A.T., Steppe, M., Ferreira, M.J., Ohara, M.T., Emerenciano, V.P. & Kato, M.J.** 2001. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta Medica*. 67(8):771-773.
- Cosentino, S., Tuberoso, S.I.G., Pisano, B., Satta, M., Mascia, V., Arzedi, E. & Palmas, F.** 1999. *In vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. *Letters in Applied Microbiology*. 29: 130-135.
- Cowan, M.M.** 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). *In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (eds.). Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp.1250-1318.
- Curado, M.A., Oliveira, C.B.A., Jesus, J.G., Santos, S.C., Seraphin, J.C. & Ferri, P.H.** 2006. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*. 67: 2363-2369.
- Demo, M., Oliva, M. de las M., López, M.L., Zunino, M.P. & Zygadlo, J.A.** 2005. Antimicrobial activity of essential oils obtained from aromatic plants of Argentina. *Pharmaceutical Biology*. 43(2): 129-134.
- Devienne, K.F. & Raddi, M.S.G.** 2002. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33(2): 166-168.

- Doyle, J.A., Eklund, H. & Herendeen, P.S.** 2003. Floral evolution in Chloranthaceae: implications of a morphological phylogenetic analysis. *International Journal of Plant Sciences*. 164 (5 suppl.): S365-S382.
- Edris, A.E.** 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy Research*. 21: 308-323.
- Eklund, H.; Doyle, J.A. & Herendeen, P.S.** 2004. Morphological phylogenetic analysis of living and fossil Chloranthaceae. *International Journal of Plant Sciences*. 165: 107-151.
- Endress, P.K.** 2001. The flowers in extant basal angiosperms and inferences on ancestral flowers. *International Journal of Plant Sciences*. 162(5): 1111-1140.
- Farmacopéia Brasileira.** 2001. 4 ed. Parte II. Fascículo 2. *In*: Diário Oficial, Suplemento ao nº 1 de 10/01/2001.
- Fennel, C.W., Light, M.E., Sparg, S.G., Stafford, G.I. & van Staden, J.** 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal of Ethnopharmacology*. 95: 113-121.
- Fundação SOS Mata Atlântica & INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais).** 2008. Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – período de 2000 a 2005. Fundação SOS Mata Atlântica e INPE, São Paulo, 472p.
- Gabriel, M.M., Moreira, E.A., Miguel, O.G., Nakashima, T. & Lopes, M.** 1998. Estudo fitoquímico de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. Chloranthaceae. *Revista Brasileira de Farmácia*. 79: 65-68.
- Gershenzon, J. & Dudareva, N.** 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*. 3(7): 408-414.
- Gottlieb, O.R. & Borin, M.R.M.** 1997. Natural products research in Brazil. *Ciência e Cultura*. 49: 315-320.

- Gottlieb, O.R. & Borin, M.R.M.** 2000. Medicinal products: regulation of biosynthesis in space and time. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95(1): 115-120.
- Gottlieb, O.R. & Kaplan, M.A.C.** 1990. Amazônia: tesouro químico a preservar. *Ciência Hoje*. 11: 17-20.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. & Riley, T.V.** 2000. In vitro activities of ketoconazole, econazole, miconazole, and *Melaleuca alternifolia* (Tea tree) oil against *Malassezia* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 44: 467-469.
- Harborne, J. B.** 2003. *Introduction to Ecological Biochemistry*. 4 ed. Academic Press, London.
- Harrigan, G.G., Ahmad, A., Baj, N., Glass, T.E., Gunatilaka, A.L. & Kingston, D.G.I.** 1993. Bioactive and other sesquiterpenoids from *Porella cordeana*. *Journal of Natural Products*. 56: 921-925.
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to echochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2831-2846.
- Hazen, K.C.** 1995. New and emerging yeast pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. 8(4): 462-478.
- Hess, S.C., Peres, M.T.L.P., Batista, A. L., Rodrigues, J.P., Tiviroli, S.C., Oliveira, L.G.L., Santos, C.W.C. & Fedel, L.E.S.** 2007. Evaluation of seasonal changes in chemical composition and antibacterial activity of *Elyonorus muticus* (Sprengel) Kuntze (Gramineae). *Química Nova*. 30: 370-373.
- Himejima, M., Hobson, K.R., Otsuka, T., Wood, D.L. & Kubo, I.** 1992. Antimicrobial terpenes of oleoresin of ponderosa pine tree *Pinus ponderosa*: a defense mechanism of microbial invasion. *Journal of Chemical Ecology*. 18: 1809-1818.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography*. 51: 327-329.

- Howes, M.J.R. & Houghton, P.J.** 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 75: 513-527.
- Jham, G.N., Dhingra, O.D., Jardim, C.M. & Valente, V.M.M.** 2005. Identification of the major fungitoxic component of cinnamon bark oil. *Fitopatologia Brasileira*. 30(4): 404-408.
- Kaloustian, J., Abou, L., Mikail, C., Amiot, M.J. & Portugal, H.** 2005. Southern French thyme oils: chromatographic study of chemotypes. *Journal of the Science Food and Agriculture*. 85:2437-2444.
- Karousou, R., Koureas, D.N. & Kokkini, S.** 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry*. 66: 2668-2673.
- Kong, H.Z.** 2001. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 136: 279-294.
- Knobloch, K., Weigand, H., Weis, N., Schwarm, M. & Vigneschow, H.** 1986. Action of terpenoids on energy metabolism. *In: Brunke, E.J. (ed.)*. Progress in essential oil research. Gruyter, Berlin.
- Lahlou, M.** 2004. Methods to study the Phytochemistry and Bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18:435-448.
- Lino, C.S., Gomes, P.B., Lucetti, D.L., Diógenes, J.P., Sousa, F.C., Silva, M.G. & Viana, G.S.** 2005. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil (EO) of *Ocimum micranthum* Willd. from Northeastern Brazil. *Phytotherapy Research*. 19(8): 708-712.
- Lima, M.E.L., Cordeiro, I., Young, M.C.M., Sobral, M.E.G. & Moreno, P.R.H.** 2006a. Antimicrobial activity of essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) R. L. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State – Brazil. *Pharmacology on line*. 3:589:593.

- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Farias, N.M.P., Souza, E.L.** 2006b. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 16(2):197-201.
- Lorenzo, D., Loayza, I. & Dellacassa, E.** 2003. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. Flavour and Fragrance Journal. 18(1): 32-35.
- Machado, A.V.; Santos, M., Paulilo, M.T.S., Fermino-Jr., P.C.P.** 2003. Changes in root anatomy of *Hedyosmum brasiliense* Mart. drought-induced young plants. Acta Microscopica. 12b: 25-26.
- Mahmoud, S.S. & Croteau, R.B.** 2001. Metabolic engineering of essential oil yield and composition in mint by altering expression of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase and menthofuran synthase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 98: 8915-8920.
- Manhães, M.A.** 2003. Dieta de traupíneos (Passeriformes, Emberizidae) no Parque Estadual de Ibitipoca, Minas Gerais, Brasil. Iheringia. 93(1): 59-73.
- Mann, J.** 1987. Secondary metabolism. 2 ed. Oxford: Claredon. 357 p.
- McChesney, J.D.** 1996. Biological diversity, chemical diversity, and the search for new pharmaceuticals. In: Balick, M.J., Elisabetsky, E. & Laird, S.A. Medicinal resources of the tropical forest: biodiversity and its importance to human health. Columbia University Press, New York, p.11-18.
- McGayver, D.J. & Croteau, R.** 1995. Terpenoid metabolism. The Plant Cell. 7: 1015-1026.
- Mendoza, L.; Wilkens, M. & Urzua, A.** 1997. Antimicrobial study of resinous exudates and of diterpenoids and flavonoids isolated from Chilean *Pseudognaphalium* (Asteraceae). Journal of Ethnopharmacology. 58(2): 85-88.
- Miyazawa, M. & Yamafuji, C.** 2005. Inhibition of acetylcholinesterasic activity by bicliclic monoterpenoids. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 53: 1765-1768.

- Montanari, C.A. & Bolzani, V.S.** 2001. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. *Química Nova*. 24(1): 105-111.
- Mundina, M., Vila, R., Felix, T., Ciccío, J.F., Ibañez, C., Adzet, T., Casanova, J. & Cañigüeral, S.** 2000. Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal*. 15(3): 201-205.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*. 430: 853-858.
- Nagy, J.G. & Tengerdy, R.P.** 1968. Antibacterial action of essential oils of *Artemisia* as an ecological factor. *Applied Microbiology*. 16(3): 441-444.
- Njoroge, S.M., Ukeda, H. & Sawamura, M.** 2003. Changes of volatile profile and artifact formation in dadai (*Citrus aurantium*) cold-pressed peel oil on storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4029-4035.
- Occhioni, P.** 1954. Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw. Tese (Doutorado - Professor Catedrático de Botânica Aplicada à Farmácia) - Faculdade Nacional de Farmácia, Rio de Janeiro, 176 p.
- Oliveira, J.E.Z.** 1997. Variabilidade isozimática e do teor de óleo essencial em acessos de *Bidens pilosa* L. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). UFV, Viçosa, 72 p.
- OMS - Organisation Mondiale De La Sante.** 1992. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. Genebra, (Série de Informes Técnicos).
- Owen, S.M. & Peñuelas, J.** 2005. Opportunistic emissions of volatiles isoprenoids. *Trends in Plant Science*. 10(9): 420-426.
- Pääkönen, K., Malmsten, T., Hyvönen, L.** 1990. Drying, packaging and storage effects on quality of basil, marjoram and wild marjoram. *Journal of Food Sciences*. 55: 1373-1382.

- Passos, X.S.; Santos, S.C.; Ferri, P.H.; Fernandes, O.F.L.; Paula, T.F.; Garcia, A.C.F. & Silva, M.R.R.** 2002. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 35(6): 623-627.
- Pauli, A. & Knobloch, K.** 1987. Inhibitory effects of essential oils components on growth of food-contaminating fungi. Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und-Forschung A. 185(1): 10-13.
- Peana, A.T., Moretti, M.D. & Juliano, C.** 1999. Chemical composition and antimicrobial action of the essential oils of *Salvia desoleana* and *Salvia sclarea*. Planta Medica. 65(8): 752-754.
- Pengsuparp, T., Cai, L., Constant, H., Fong, H.H.S., Lin, L.Z., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., Cordell, G.A., Ingolfssdottir, K & Wagner, H.** 1995. Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 revertase transcriptase. Journal of Natural Products. 58(7): 1024-1031.
- Perry, N.S.L., Houghton, P., Jenner, A. Keith, A. & Perry, E.K.** 2002. *Salvia lavandulaefolia* essential oils inhibit cholinesterase *in vivo*. Phytomedicine. 9: 48-51.
- Picollo, M.I., Toloza, A.C., MOugabure-Cueto, G., Zygadlo, J. & Zerba, E.** 2008. Anticholinesterase and peculicidal activities of monoterpenoids. Fitoterapia. 79:271-278.
- Pivello, V.R. & Peccinini, A.A.** 2002. A vegetação do PEFI In: Bicudo, D.C.; Forti, M.C.; Bicudo, C.E.M. (eds.) Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI): unidade de conservação que resiste a urbanização de São Paulo. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo. São Paulo. pp. 75-92.
- Plotkin, M.J.** 1991. Traditional knowledge of medicinal plants: the search for new jungle medicines. In: Akerele, O., Heywood, V. & Syngé, H. Conservation of medicinal plants. Cambridge University Press, Cambridge, p. 53-63.
- Raggi, L.** 2008. Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano. Dissertação (Mestrado em

Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Secretaria do Meio Ambiente - Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 67 p.

Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E. & Hostettmann, K. 1994. Antifungal tests in phytochemical investigations: comparison of bioautographic methods using phytopathogenic and human pathogenic fungi. *Planta Medica*. 60:41-44.

Rana, B.K., Singh, U.P. & Taneja, V. 1997. Antifungal activity and kinetics of inhibition by essential oil isolated from leaves of *Aegle marmelos*. *Journal of Ethnopharmacology*. 57(1): 29-34.

Reis, M.S. 1996. Manejo sustentado de plantas medicinais em ecossistemas tropicais. *In: Di Stasi, L.C. (org.) Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo Interdisciplinar.* Editora UNESP, São Paulo.

Reitz, R. 1965. Clorantáceas. *In: Reitz, R. et al. Flora catarinense.* Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 10p.

Rhee, I. K., Van De Meent, M., Ingkaninan, K. & Verpoorte, R. 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel Thin-Layer Chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography*. 915(1-2): 217-223.

Rodríguez-Concepción, M. 2006. Early steps in isoprenoids biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. *Phytochemistry Reviews*. 5: 1-15.

Salie, F., Eagles, P.F.K. & Leng, H.M.J. 1996. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology*. 52:27-33.

Santos, M.R.A. & Innecco, R. 2003. Influência de períodos de secagem de folhas no óleo essencial de erva-cidreira (quimiotipo limoneno-carvona). *Revista Ciência Agronômica*. 34: 5-11.

Santos, R.I. 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. *In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.P.C; Mentz, L.A. & Petrovik, P.R.*

- (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Porto Alegre, pp. 403-434.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. & Perry, E.K.** 2003. Synergistic and antagonistic interactions of acetylcholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 75: 661-668.
- Silva, F.** 2005. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola). UNICAMP, Campinas, 152 p.
- Silva, F. & Casali, V.W.D.** 2000. Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais. Departamento de Fitotecnia, UFV, Viçosa, 153 p.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V.** 2004. Óleos Voláteis. *In*: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.P.C; Mentz, L.A. & Petrovik, P.R. (orgs.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Editora da UFSC, Porto Alegre, pp. 467-495.
- Simões, C.M.O. & Schenkel, E.P.** 2002. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 12(1): 35-40.
- Sonboli, A., Eftekhari, F., Yousefzadi, M., Kanani, M.R.** 2005. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. From Iran. *Zeitschrift für Naturforschung*. 60: 30-34.
- Sonboli, A., Babakhani, B. & Mehrabian, A.R.** 2006. Antimicrobial activity and composition of six constituents of essential oil from *Salvia*. *Zeitschrift für Naturforschung*. 61: 160-164.
- Souza, A.** 2009. Variabilidade dos óleos voláteis de espécies de Myrtaceae nativas da Mata Atlântica. Tese (Doutorado em Ciências, na área de Botânica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 351 p.

- Spina, A.P., Ferreira, W.M. & Leitão-Filho, H.F.** 2001. Floração, frutificação e síndromes de dispersão de uma comunidade de floresta de brejo na região de Campinas (SP). *Acta Botanica Brasilica*. 15(3): 349-368.
- Staudt, M. & Bertin, N.** 1998. Light and temperature dependence of the emission of cyclic and acyclic monoterpenes from holm oak (*Quercus ilex* L.) leaves. *Plant, Cell and Environment*. 21: 385-395.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Martin, M.A.C.K., Bercion, S.R. & Legault, J.** 2007. Chemical composition of leaf essential oil of *Hedyosmum arborecens* and evaluation of its anticancer activity. *Natural Products Communications*. 2(12): 1269-1272.
- Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M. & Bedê, L.C.** 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*. 1(1): 132-138.
- Thappa, R.K., Kaul, P., Chisti, A.M., Kapahi, B.K, Suri, O.P. & Agarwal, S.G.** 2005. Variability of essential oil of *Angelica glauca* Edgew of different geographical regions. *Journal of Essential Oil Research*. 17: 361-363.
- Thompson, J.D., Chalchat, J.C., Michet, A., Linhart, Y.B. & Ehlers, B.** 2003. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. *Journal of Chemical Ecology*. 29: 859-880.
- Tisserand, R. & Balacs, T.** 1995. *Essential oil safety: a guide for health care professionals*. Bell and Bain Ltd., Glasgow.
- Toama, M.A., El-Afy, T.S. & El-Fatatry, H.M.** 1974. Antimicrobial activity of the volatile oil of *Nigella sativa* Linnaeus seeds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 6(2): 225-226.
- Todzia, C.A.** 1988. *Flora Neotropica*. v. 48. The New York Botanical Garden, New York.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L.** 2000. *Microbiologia*. Artes Médicas Sul, Porto Alegre.

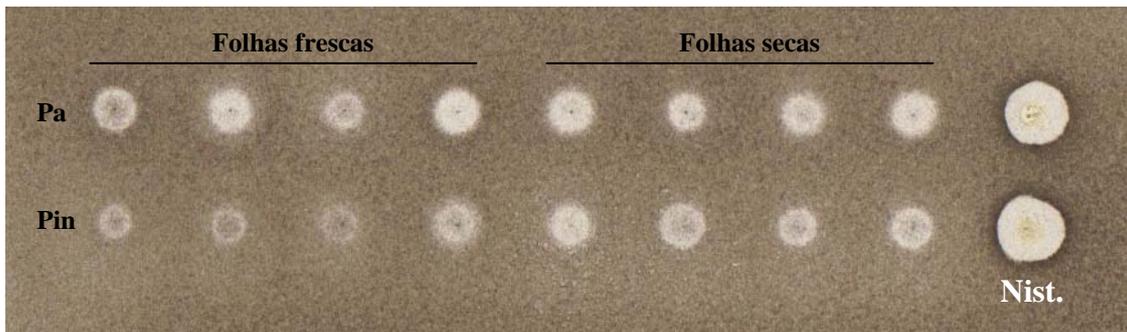
- Trentin, A.P., Santos, A.R., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A. & Calixto, J.B.** 1999. Antinociception caused by extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Medica*. 65(6): 517-521.
- Trevisan, M.T.S., Macedo, F.V.V., Van De Meent, M., Rhee, I.K. & Verpoorte, R.** 2003. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*. 26(3): 301-304.
- Vaara, M.** 1992. Agents that increase the permeability of outer membrane. *Microbiological Reviews*. 56(3): 395-411.
- Verpoorte, R.** 2000. Secondary metabolism. *In: Verpoorte, R. & Alfermann, A.W.* Metabolic engineering of plant secondary metabolism. Kluwer Academic Publishers, London, pp.1-29.
- Viegas-Jr, C., Bolzani, V.S. & Barreiro, E.J.** 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*. 29(2): 326-337.
- Waterman, P.G.** 1993. The chemistry of volatile oils. *In: Hay, R.K.M. & Waterman, P.G.* (eds.). Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production. Avon: Iorigman Group, pp. 47-61.
- Willinger, B., Apfalter, P., Hirschl, A.M., Makristathis, A., Rotter, M. & Seibold, M.** 2000. Susceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitest®. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 38(1): 11-15.
- Wink, M.** 1990. Physiology of secondary product formation in plants. *In: Charlwood, B.V. & Rhodes, M.J.C.* Secondary products from plant tissue culture. Oxford: Clarendon.
- Zhang, L.B. & Renner, S.** 2003. The deepest splits in Chloranthaceae as resolved by chloroplast sequence. *International Journal of Plant Sciences*. 164(5 suppl.): S383-S392.
- Zucchi, M.I., Brondani, R.P.V., Pinheiro, J.B., Chaves, L.J., Coelho, A.S.G., & Vencovsky, R.** 2003. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the

Brazilian Cerrado utilizing SSR makers. *Genetics and Molecular Biology*. 26(4): 449-457.

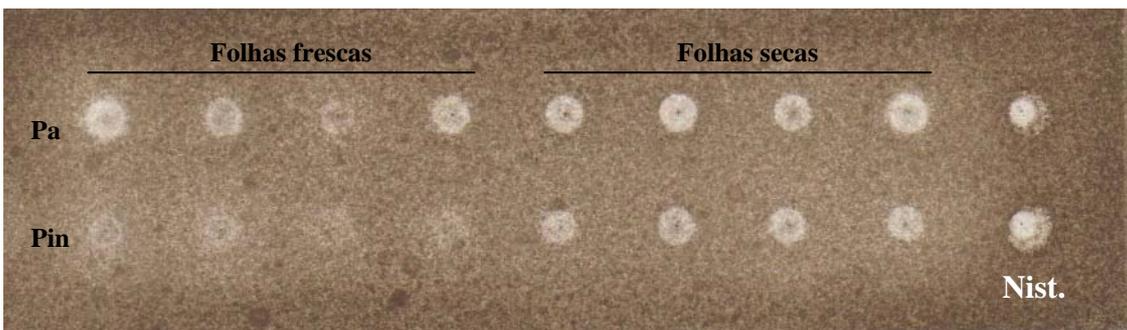
ANEXO I

Atividades antifúngicas (*Cladosporium cladosporioides*) por bioautografia de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas na primavera (A), verão (B), outono (C) e inverno (D), em Paranapiacaba (Pa) e Pindamonhangaba (Pin).

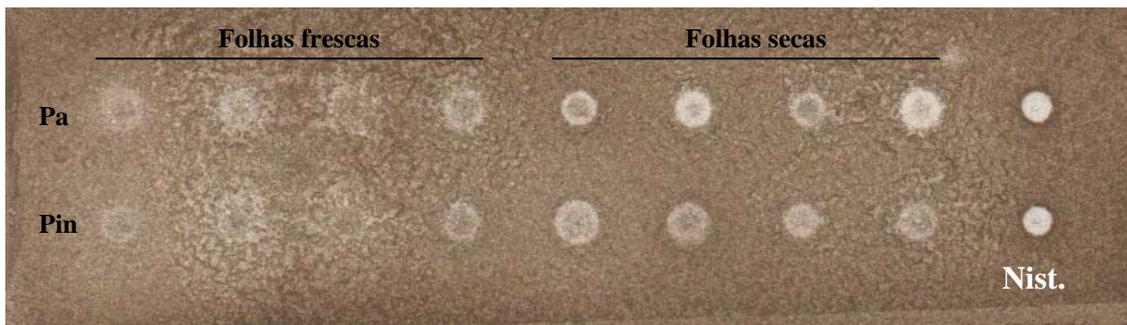
A



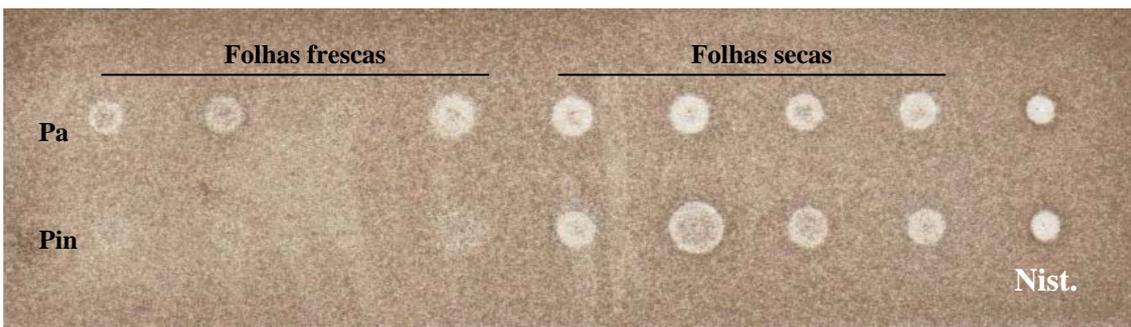
B



C

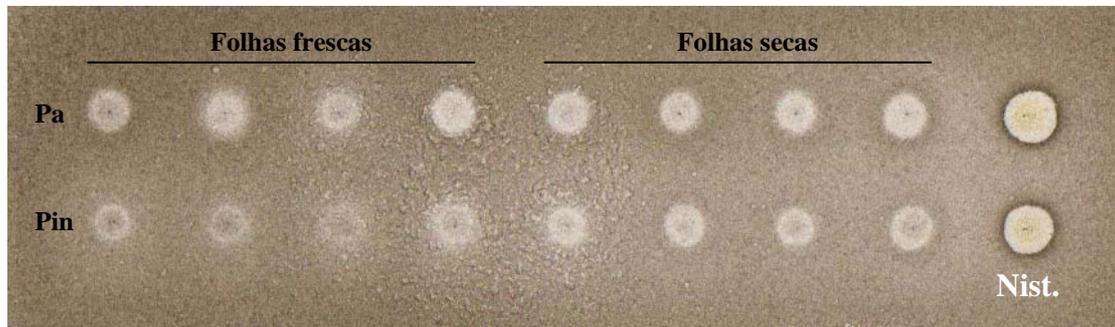


D

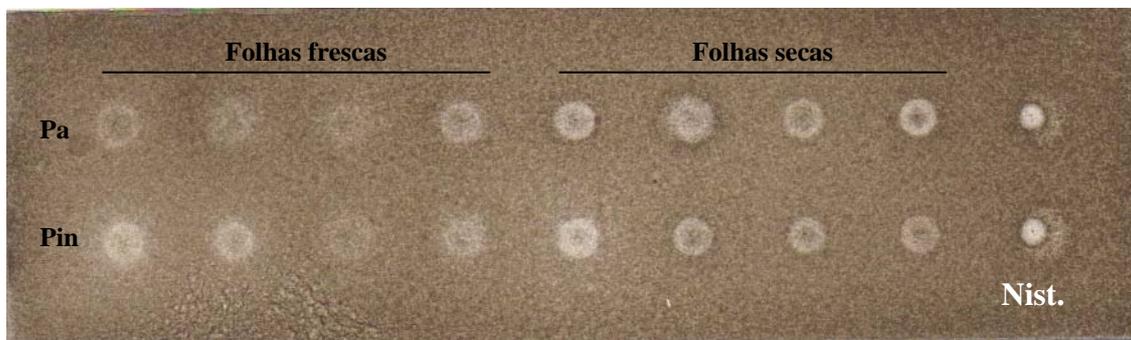


Atividades antifúngicas (*Cladosporium sphaerospermum*) por bioautografia de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas na primavera (A), verão (B), outono (C) e inverno (D), em Paranapiacaba (Pa) e Pindamonhangaba (Pin).

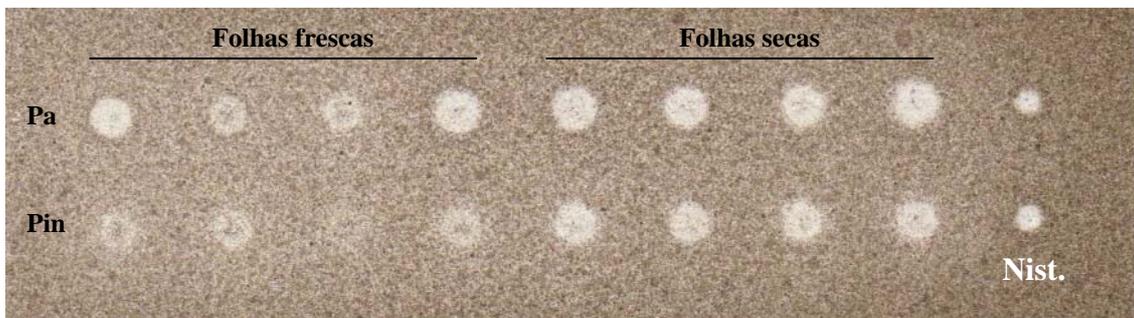
A



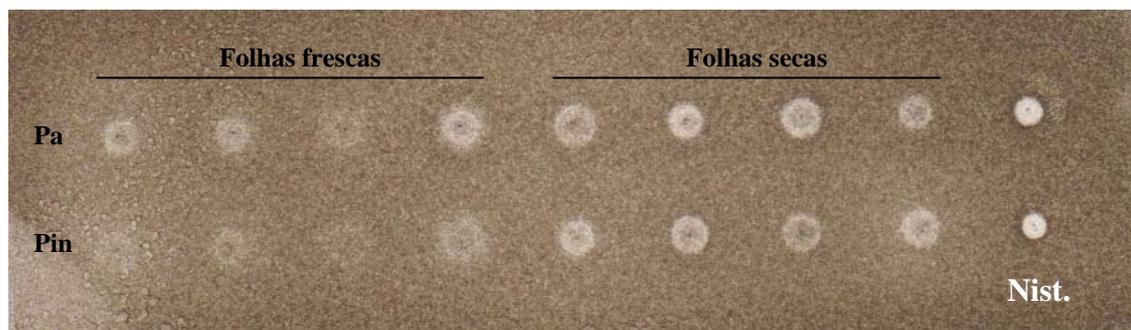
B



C



D



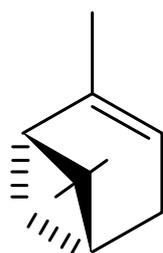
ANEXO II

Estruturas químicas dos compostos encontradas nos óleos essenciais de folhas de *Hedyosmum brasiliense*

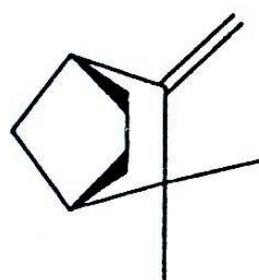
- Hidrocarbonetos monoterpênicos



α -tujeno



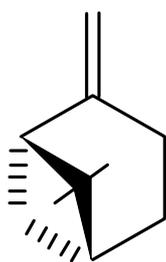
α -pineno



canfeno



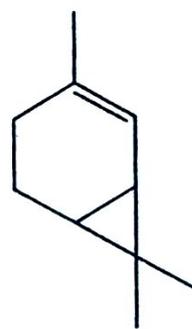
sabineno



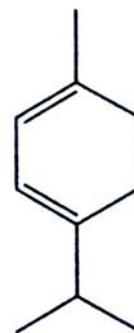
β -pineno



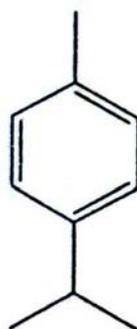
mirceno



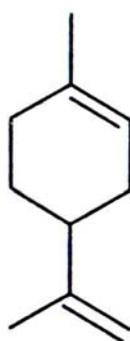
δ -2-careno



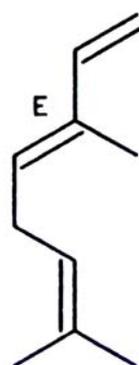
α -terpineno



p-cimeno



limoneno



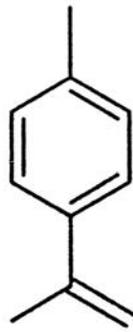
(*E*)- β -ocimeno



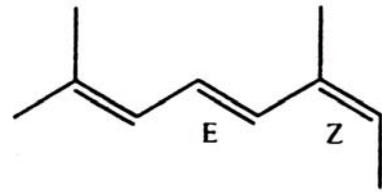
γ -terpineno



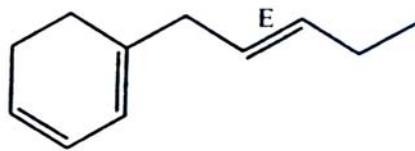
terpinoleno



p-cimeno



allo-cimeno



virideno

- Monoterpenos oxigenados



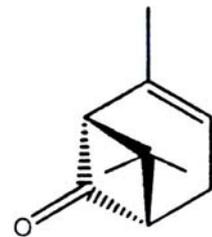
1,8-cineol



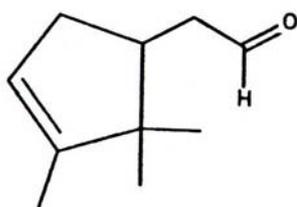
linalol



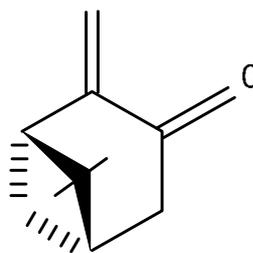
desidro sabina cetona



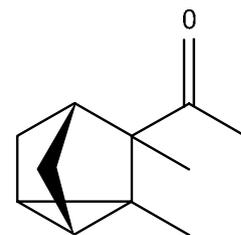
crisantenona



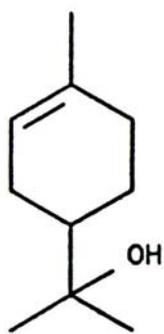
α -canfolenal



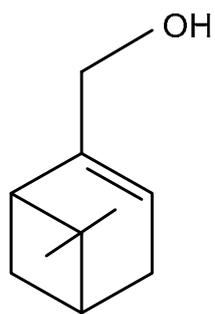
pinocarvona



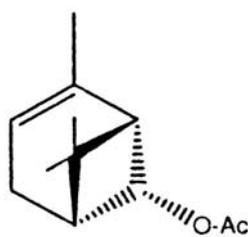
santalona



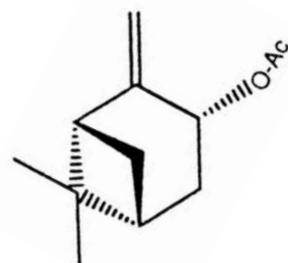
α -terpineol



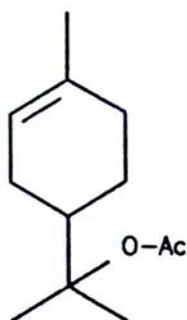
mirtenol



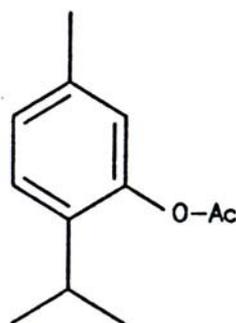
acetato de (*Z*)-
cristantemila



acetato de (*Z*)-
pinocarvila

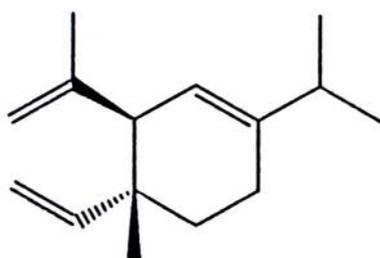


acetato de α -terpinila

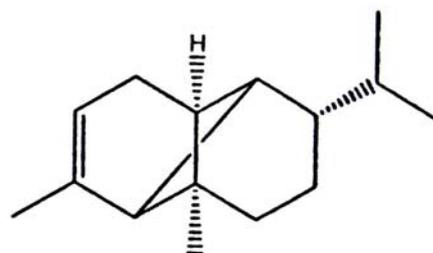


acetato de timila

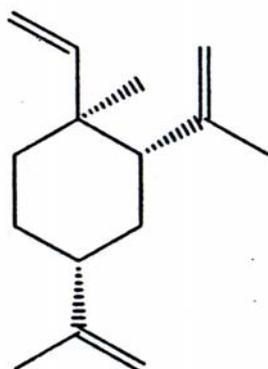
- Hidrocarbonetos sesquiterpênicos



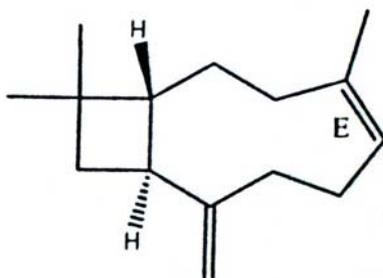
δ -elemeno



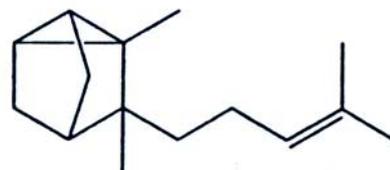
α -copaeno



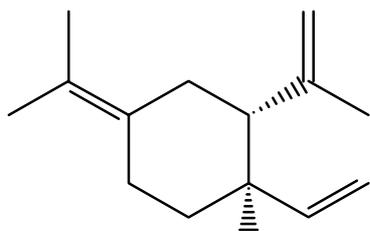
β -elemeno



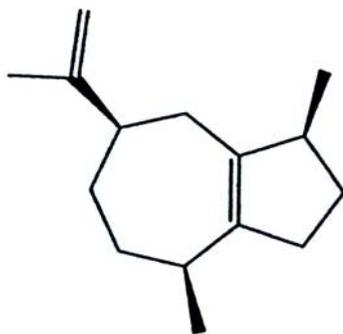
(*E*)-cariofileno



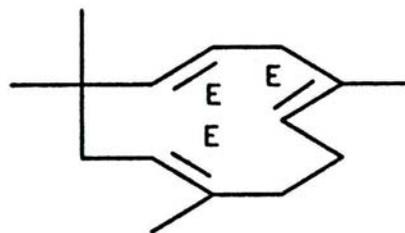
α -santaleno



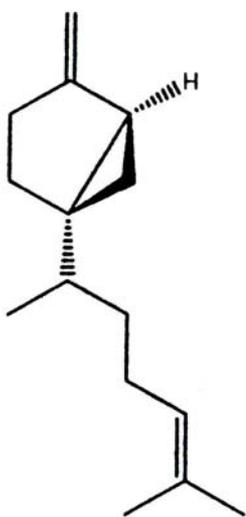
γ -elemeno



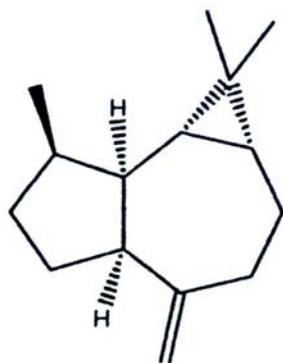
α -guaieno



α -humuleno



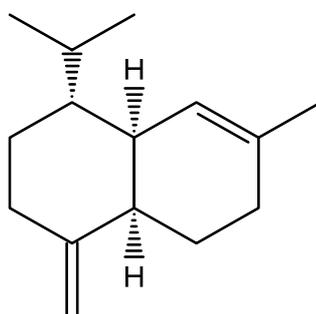
sesquissabineno



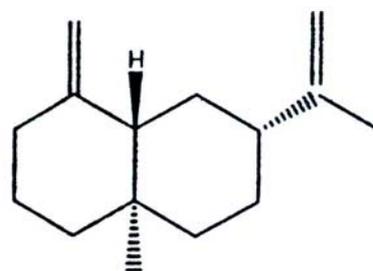
allo-aromadendreno



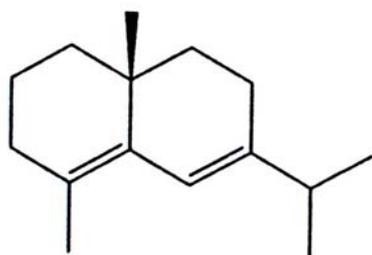
β -santaleno



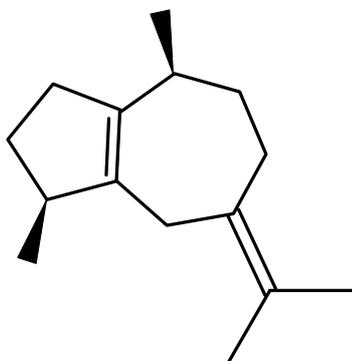
γ -muuroleno



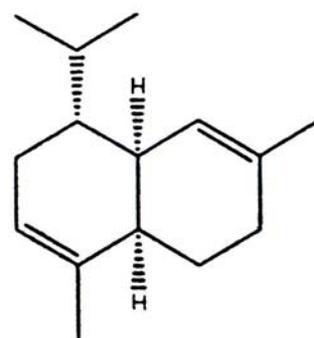
β -selineno



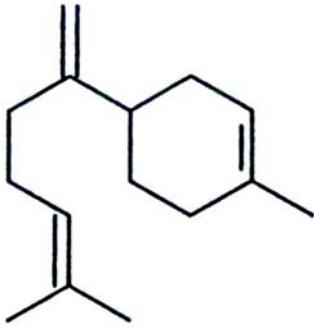
δ -selineno



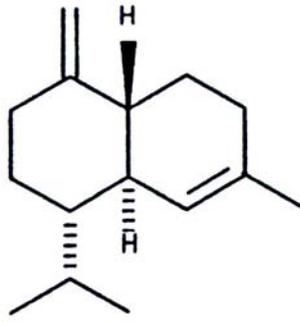
(*Z*)- β -guaieno



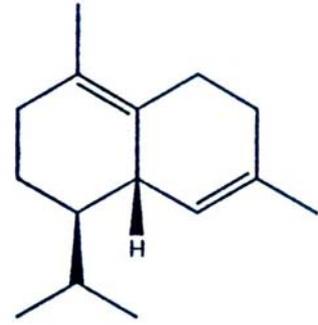
α -muuroleno



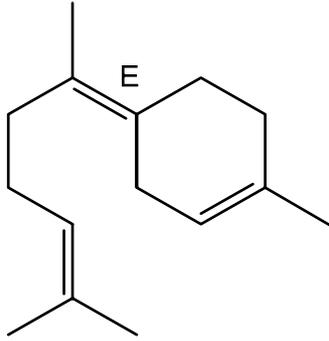
β -bisaboleno



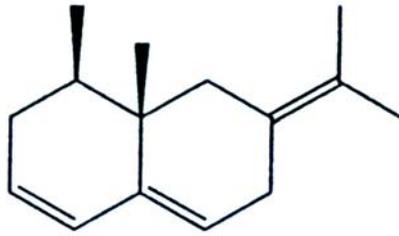
γ -cadineno



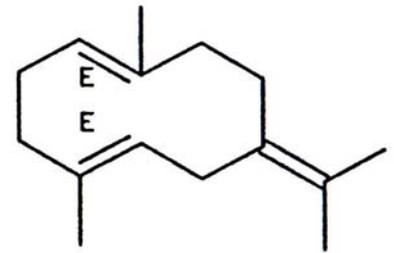
δ -cadineno



(*E*)- γ -bisaboleno

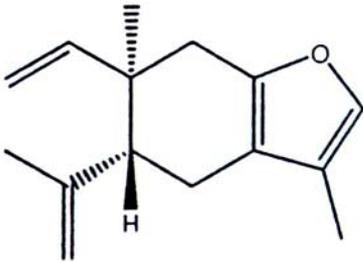


β -vetiveneno

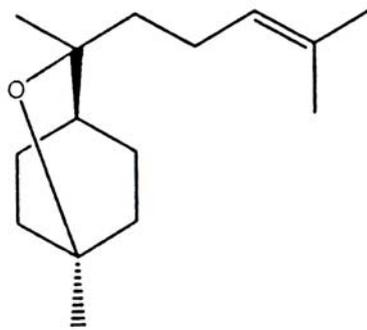


germacreno B

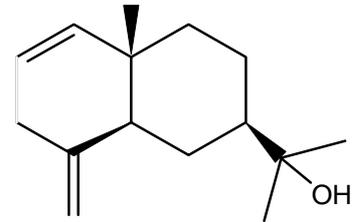
- Sesquiterpenos oxigenados



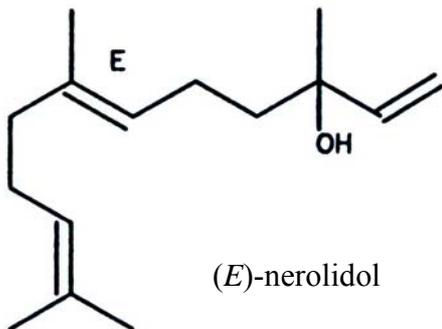
curzereno



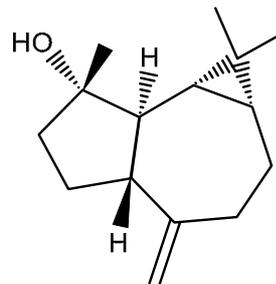
sesquicineol



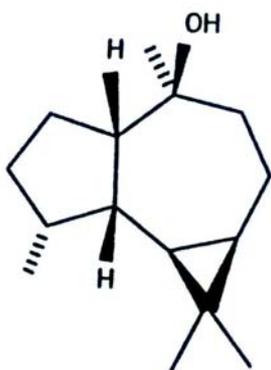
elemol



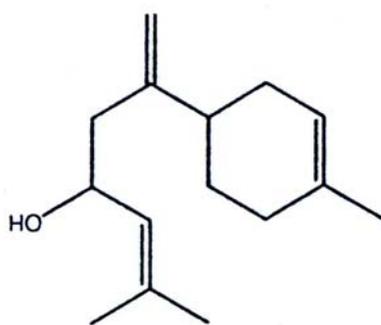
(*E*)-nerolidol



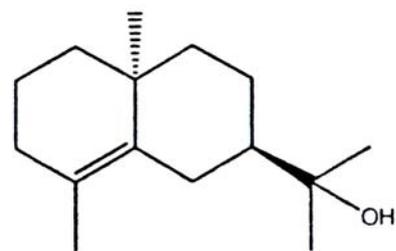
espatulenol



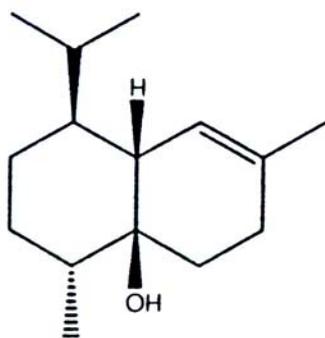
viridiflorol



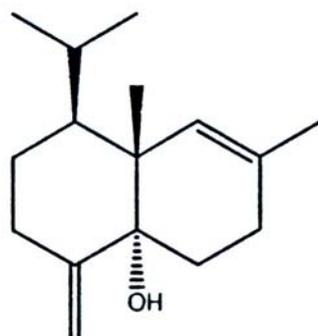
β -atlantol



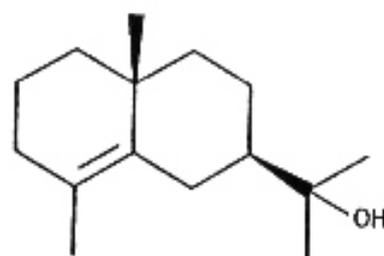
10-*epi*- γ -eudesmol



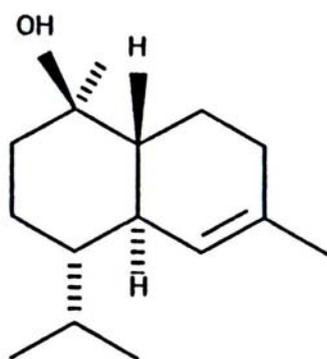
1-*epi*-cubenol



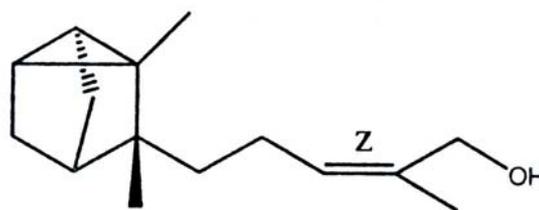
muurolo-4,10(14)-dien-1- β -ol



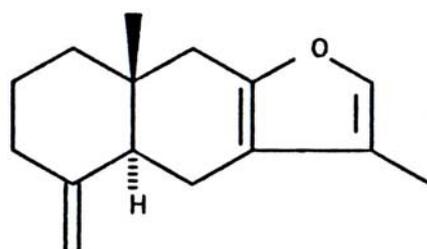
γ -eudesmol



α -cadinol

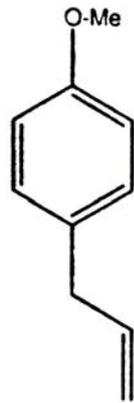


(*Z*)- α -santalol

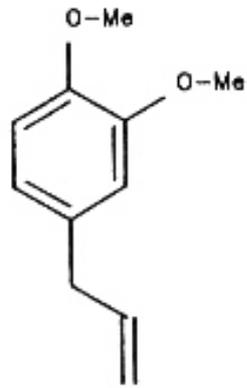


atractilona

- Fenilpropanóides



metil chavicol



metil eugenol