

**ANDERSON LUIS DO NASCIMENTO**

**Análise do óleo volátil e avaliação de atividades biológicas dos  
constituintes fixos e voláteis de *Bidens segetum* Mart. ex Colla  
(Asteraceae)**

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**

**2013**

**ANDERSON LUIS DO NASCIMENTO**

**Análise do óleo volátil e avaliação de atividades biológicas dos  
constituintes fixos e voláteis de *Bidens segetum* Mart. ex Colla  
(Asteraceae)**

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 pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Nascimento, Anderson Luis do  
N244a Análise do óleo volátil e avaliação de atividades biológicas dos constituintes fixos e voláteis de *Bidens segetum* Mart. Ex Colla (Asteraceae) / Anderson Luis do Nascimento -- São Paulo, 2013.  
86 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2013  
Bibliografia.

1. Óleos essenciais. 2. Fenologia. 3. Cerrado. I. Título

CDU: 547.913

*“Ao meu filho querido Pedro Luis Bezerra do Nascimento.  
Que você possa crescer e se tornar um adulto responsável,  
com saúde e, sobretudo feliz, e que possa se orgulhar desse  
pai imperfeito, mas que te ama incondicionalmente.”*

*Dedico.*

## *AGRADECIMENTOS*

*A conclusão deste trabalho representa a realização de um sonho que se iniciou quando ingressei na graduação e marca superação de mais uma etapa de minha formação acadêmica, mas sua concretização só foi possível graças ao apoio de diversos personagens. Muito ou pouco, cada um a sua maneira contribuiu para que esse sonho se tornasse realidade e por isso lhes sou grato. Em especial agradeço a:*

*A vida*

*Por ter colocado essas pessoas no meu caminho;*

*Natureza*

*Pela fonte incessante de aprendizagem e conhecimento;*

*Aos meus pais*

*Walter Luis do Nascimento e Terezinha Rezende do Nascimento, exemplos de honestidade e perseverança, que com grande amor, dedicaram suas vidas a criação de seus filhos e sem os quais minha formação não seria possível.*

*Dra. Maria Cláudia Marx Young*

*Minha orientadora, pela confiança e pela oportunidade de aprendizado e desenvolvimento.*

*Dra. Márcia Braga; Dra. Carmen L. Queiroga e Dra. Maria Luiza Salatino*

*Pelas valiosas sugestões, no exame de qualificação.*

*Mary Monteiro, Ana Alice M. Cardoso, Maria Aparecida Arantes e Pedro B. Wasinger*

*Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, por facilitar a vida de todos no laboratório.*

*Maura Sartori*

*Pela amizade e pelos auxílios com os ensaios biológicos.*

*Dra. Luce Brandão*

*Pelo auxílio com as análises em cromatografia líquida.*

*MSc. Rodrigo Sant'ana Cabral*

*Pelo companheirismo e pela inestimável atenção dispensada em todas as etapas deste trabalho.*

*Dr. Paulo R. H. Moreno*

*Pelas explicações que minimizaram as dificuldades.*

*Dra. Ludmila Raggi*

*Pelos conselhos e ajuda com as técnicas de laboratório.*

*MSc. Cynthia Murakami*

*Pelas literaturas e informações disponibilizadas, mas, principalmente, pela amizade.*

*Dr. Danilo Centeno*

*Que muito se empenhou para que todos pudessem realizar suas análises cromatográficas.*

*Dra. Inês Cordeiro*

*Pela identificação da espécie.*

*Celso M. José e Kássia Fardin*

*Meus amigos de bancada e que muito contribuíram em muitos ensaios.*

*Manuela O. Joaquim; Vanessa Fuentes e Marina Veronesi*

*Por enfrentarem comigo o desafio do mestrado e por não me deixarem perder meus prazos (risos).*

*Dra. Ângela ; Dra. Lilian; Dra. Maria Ângela Carvalho; Dra. Marília Gaspar; Dra. Rita de  
Cássia; Dr. Marco A. Tiné; Dr. Emerson A. Silva; Dr. Marcos P. Aidar; Dr. Edison P. Chu*

*Por terem me acolhido e pelo suporte prestado.*

*Vanessa Oliveira; Fernanda's; Daiane's; Aline's; Juliana's (Zerlin e Iura); Leila; Kelly;  
Eunice; Mari; Thiara; Verena; Flávio; Cláudio; Marcelo; Joãozinho; Athos; Leonardo;*

*Evandro; Enoque; Glauco; Lamarca*

*Amigos de 'Botânico', pelo convívio alegre e divertido.*

*Mazinho, Luis Zanqueta e Renato*

*Motoristas do Instituto de Botânica*

*Marcos M. Pinto; João D. G. Neto; Samuel B.; Elisamara A. S. Guilherme; Adão M. Barbosa*

*Ana Lúcia S. Caetano; Paulo B. Silva; Maura D. Peixoto*

*Funcionários da Fazenda Campininha, sempre dispostos a ajudar.*

*Michelle C. Silva †*

*“Os que passam por nós não nos deixam sós, deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”.*

*Valesca S. Santos*

*Por aparecer na minha vida e me apoiar sempre que precisei.*

*Aline; Dadá; Alisson; Luana; Juliana; Célia; Gustavo; Rafael; Gabriel; Núbia e Nubinha;*

*Valéria; Nathalia; Armandinho; Leônidas e Leozinho; Larissa*

*Amigos e familiares que se preocupam e torcem por mim.*

*Capes*

*Pela bolsa concedida*

*E Enfim, a todos:*

*Que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e que eventualmente eu  
tenha me esquecido de mencionar;*

*Muito Obrigado!*

## Sumário

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	13
2.1. Gerais .....	13
2.2. Específicos .....	13
3. Materiais e métodos .....	14
3.1. Material vegetal e delineamento experimental .....	14
3.1.1. Para o estudo dos componentes voláteis (óleos e aromas).....	14
3.1.2. Obtenção dos óleos voláteis de folhas, ramos caulinares, capítulos e cipselas de <i>B. segetum</i> pelo método de hidrodestilação .....	15
3.1.3. Estudo do aroma das flores de <i>B. segetum</i> pelo método de microextração em fase sólida (HS-SPME) .....	15
3.1.4. Para o estudo dos componentes fixos .....	16
3.1.5. Obtenção do extrato etanólico e frações das diferentes partes de <i>B. segetum</i> .....	17
3.1.6. Derivatização das frações para análise em GC-MS .....	17
3.2. Análises cromatográficas .....	18
3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada Analítica .....	18
3.2.2. Análise por GC-MS dos óleos voláteis e do aroma .....	18
3.2.3. Análise por GC-MS das frações. ....	20
3.2.4. Análise por LC-DAD e LC-MS-MS/ESI+ .....	20
3.3. Atividades biológicas .....	21
3.3.1. Bioautografia com <i>Cladosporium cladosporioides</i> e <i>Cladosporium</i> <i>sphaerospermum</i> para avaliação preliminar da atividade antifúngica .....	21
3.3.2. Ensaio qualitativo da atividade inibidora da acetilcolinesterase .....	22
3.3.3. Ensaio quantitativo em microplaca da atividade inibidora da acetilcolinesterase .....	22
3.3.4. Ensaio qualitativo da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH .....	23
3.3.5. Ensaio quantitativo em microplaca da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH .....	24
4. Resultados e Discussão .....	25
5. Conclusão .....	62
6. Resumo .....	64
7. Abstract .....	66
8. Referências Bibliográficas .....	68

## 1. Introdução

As plantas ocupam os mais diversos ambientes por todo o globo, por serem organismos sésseis, não podem responder ao ambiente pelas mesmas vias possíveis aos animais e lançam mão de uma série de adaptações físicas e químicas para poder se manter nesses ambientes e é justamente essa vasta capacidade biossintética das plantas que lhes conferem um valor incomparável como fonte de compostos terapêuticos, contribuindo para a descoberta de novas drogas (Harborne 1993, Schmidt *et al.* 2008).

No ano de 2000, estimava-se que aproximadamente 15% das 250.000 espécies de plantas existentes no mundo tinham sido estudadas do ponto de vista químico e 6% tinham sido testadas para atividades biológicas (Verpoorte 2000). Por isso, a biodiversidade vegetal pode ser considerada uma fonte inesgotável de produtos naturais.

Considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, estima-se que o Brasil detenha cerca de 10% de toda a biota terrestre (Machado *et al.* 2004) e que o domínio do Cerrado abrigue cerca de um terço da biota brasileira e 5% da fauna e flora mundiais (Almeida *et al.* 2005).

O Cerrado é uma vegetação adaptada às condições climáticas, fisiográficas, edáficas e antrópicas a que está sujeita nas diversas áreas de sua ocorrência e sua adaptação pode ser verificada por características estruturais e funcionais, vegetativas ou reprodutivas e está sempre ligada às características genéticas de cada espécie. (Mantovani & Martins 1993).

As formas de vegetação do Cerrado apresentam grande diversidade quanto a sua estrutura e fisionomia e em lato senso abrangem tanto formações florestais relativamente densas como os cerradões quanto formas campestres bastante abertas (campos limpos) com a ocorrência de formas intermediárias como os campos sujos, os campos cerrados e o cerrado em seu *sensu stricto* (figura 1). Considerada uma “floresta de cabeça para baixo”, a biomassa subterrânea do Cerrado muitas vezes é maior que a aérea, uma vez que o bioma é periodicamente renovado pelo fogo (Rizzini 1997).

De um modo geral, podem ser notadas por toda a extensão do Cerrado duas floras distintas: uma herbáceo-subarbusciva e outra arbustivo-arbórea, que se antagonizam por serem ambas heliófilas, fato que difere o Cerrado das florestas onde o estrato herbáceo é formado por espécies ombrófilas dependentes do estrato lenhoso. A diversidade fisionômica deste bioma é determinada pelo mosaico de manchas de solos menos ou mais férteis e pela irregularidade dos regimes e características das queimadas e de acordo com o principal fator limitante as formações são consideradas pedoclimaxes ou piroclimaxes (Coutinho 2002).

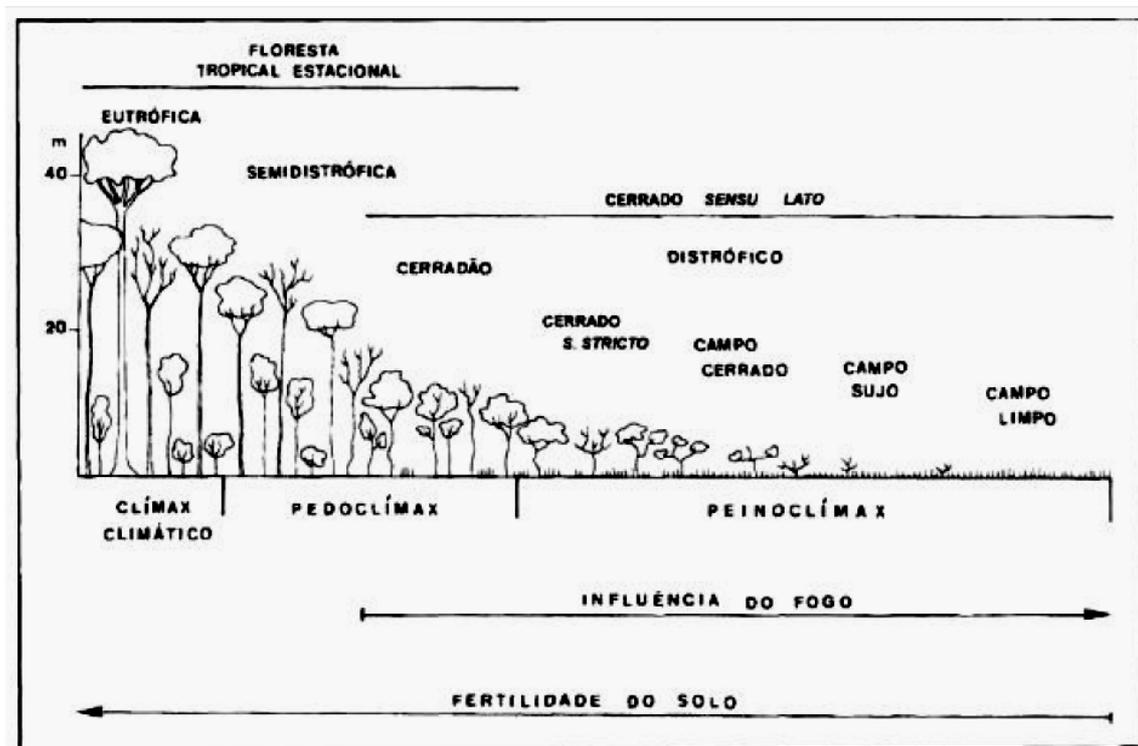


Figura 1. Estrutura fisionômica do domínio do Cerrado (Coutinho 2002).

O domínio do Cerrado é o mais antigo dos ambientes terrestres, com cerca de 35 milhões de anos, por isso já atingiu o seu clímax evolutivo e encontra-se em declínio, dessa forma não tem mais o mesmo potencial de recuperação de uma floresta.

Originalmente, o Cerrado ocupava mais de 2 milhões de km<sup>2</sup> (Felippe & Souza 2006) e correspondia à segunda maior formação vegetal brasileira (Almeida *et al.* 2005), mas devido à intensa devastação antrópica, sua área remanescente é de apenas 20% da área original, classificando-se entre os 25 “hot spots” de biodiversidade do mundo, tanto pelo grau de

endemismo como por espécies em extinção (Myers *et al.* 2000). Estima-se que em 1992 havia cerca de 7% de áreas remanescentes do Cerrado no Estado de São Paulo, com apenas 0,5% dessas áreas protegidas por unidades de conservação (Kronka *et al.* 1998). Assim, a descoberta de novas fontes de drogas a partir de espécies nativas do Cerrado estimula a preservação deste bioma.

A Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, correspondente a uma das áreas de estudo deste trabalho, atua como área de conservação e pesquisa dentro do Estado de SP, e possui área aproximada de 343 ha, clima mesotérmico com inverno seco, temperatura média anual de 27°C e precipitação média anual de 1177 mm (Mantovani & Martins 1993).

O Domínio da Mata Atlântica corresponde a segunda maior floresta pluvial tropical da América, que no passado cobria mais de 1,5 milhões de km<sup>2</sup>, correspondente a 15% do território nacional (Tabarelli *et al.* 2005), e atualmente estima-se que restam apenas aproximadamente 7% de áreas remanescentes, conforme ilustra a Figura 2 (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2008, Myers *et al.* 2000), classificando este bioma na lista mundial denominada “hot spots”, que considera o número de endemismos, a razão entre espécies endêmicas por área tanto para vegetais como para animais, e perda de habitat (Myers *et al.* 2000). É oportuno ressaltar que o termo domínio, segundo Coutinho (2002), refere-se a uma área onde predominam certas características morfoclimáticas e fitogeográficas distintas daquelas predominantes em outras áreas sendo extremamente abrangente e englobando outros ecossistemas sejam eles terrestres, paludosos, lacustres, fluviais, de pequenas ou grandes altitudes, enquanto que o bioma é apenas terrestre.

No Estado de São Paulo, estima-se que restam aproximadamente 13% de áreas remanescentes (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2008), das quais faz parte o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, considerado um remanescente florestal inserido na metrópole, com cerca de 500 ha, clima mesotérmico úmido, temperatura média anual de 19°C e precipitação média anual de 1540 mm (Santos & Funari 2002).

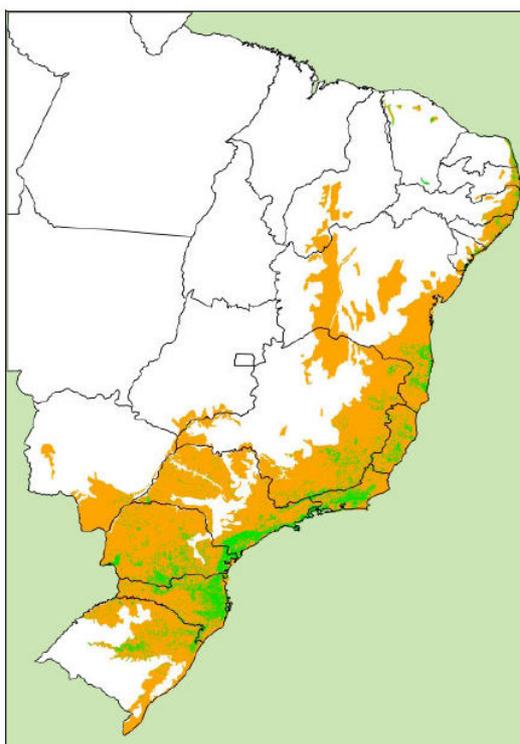


Figura 2. Área original (laranja) e os remanescentes florestais (verde) da Mata Atlântica no Brasil (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2008).

A família Asteraceae, a qual pertence o gênero *Bidens* L., é a segunda mais numerosa dentre as angiospermas, abrigando aproximadamente 23000 espécies distribuídas em mais de 1500 gêneros espalhados por todo o planeta, com exceção da Antártida, representando cerca de 10% da flora mundial (Bremer 1994). O grande sucesso da família, capaz de se adaptar a várias condições ambientais e ecológicas, é justificado por seus caracteres derivados, tais como: predominância de plantas de pequeno porte (cerca de 90%) e raramente árvores (Barroso 1991); flores reunidas em capítulos isolados ou agrupados em inflorescências; frutos secos indeiscentes com apenas uma semente e testa aderida ao endocarpo formando cipselas, cujo cálice é altamente modificado em pápus cerdosos, plumosos ou aristados, diretamente relacionados com a dispersão anemocórica ou epizoocórica (Bremer 1994); indumento foliar variável, desde lâmina foliar

glabra até a presença de tricomas tectores e glandulares; e produção de grande diversidade de substâncias químicas. As plantas dessa família são reconhecidas mundialmente por suas propriedades medicinais e aparecem em um número relativamente grande de citações bibliográficas envolvendo estudos de farmacognosia e fitoquímica.

O gênero *Bidens* L. é composto por cerca de 240 espécies agrupadas em 14 seções distribuídas por todo o mundo, mas concentradas principalmente nas Américas do Norte e do Sul. No Brasil ocorrem aproximadamente 13 espécies, presentes em quase todo o território brasileiro crescendo facilmente em lavouras agrícolas onde são consideradas plantas daninhas (Lorenzi 1994; Nakajima 2000). As espécies deste gênero são amplamente utilizadas pela medicina popular em todo o mundo atraindo também as atenções de pesquisadores e indústrias farmacêuticas com a produção de diversas patentes (Tabela 1). Lorenzi & Matos (2002) ainda destacam o uso popular de plantas desse gênero contra diabetes, disenteria, aftose, hepatite, laringite e para cura de icterícias e outra afecções do fígado.

Tabela 1. Lista de usos populares e atividades cientificamente comprovadas de espécies de *Bidens* L.

<b>Espécie</b>	<b>Uso popular</b>	<b>Atividade comprovada - composto bioativo</b>	<b>Referência</b>
<i>B. bipinnata</i>	inflamações, reumatismo, hipertensão e diabetes	hepatoprotetora - flavonoides; antimicrobiana, anti-inflamatória e antileucêmica - poliacetilenos e flavonas	Yuan <i>et al.</i> (2008)
<i>B. cernua</i>	doenças de pele, feridas, neoplasmas, como diurético e sudorífico	atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas, fungos dermatófitos e várias cepas de leveduras patogênicas humanas - cernuol e fenilheptatrieno isolados do óleo volátil	Rybalchenko <i>et al.</i> (2010)
<i>B. ferulaefolia</i>		antimalárica - extrato etanólico	Brandão <i>et al.</i> (1997)
<i>B. odorata</i>	desordens gastrointestinais	antidiarréica - extratos aquoso e etanólico	Astudillo-Vázquez <i>et al.</i> (2008)
<i>B. pilosa</i>	malária, diabetes, reumatismo, inflamações, como antiséptico, antibiótico, diurético e hepatoprotetor	antidiabética - extrato metanólico e poliacetilenos isolados; anti-hiperglicêmica - extrato aquoso; antimalárica - extrato etanólico e frações clorofórmica e butanólica; antioxidante - óleos voláteis de folhas e flores; antimicrobiano - óleos voláteis e extratos	Chien <i>et al.</i> (2009); Hsu <i>et al.</i> (2009); Deba <i>et al.</i> (2008); Brandão <i>et al.</i> (1997)
<i>B. tripartita</i>	malária, inflamações, febre, doenças de pele, sudorífica, como diurético e estimulante do sistema imunológico	antimalárica - extrato etanólico; antioxidante - flavonóides	Brandão <i>et al.</i> (1997); Wolniak <i>et al.</i> (2007)

Segundo Barroso (1991), este gênero pode ser facilmente reconhecido por seu papilho formado por aristas barbeladas, retosas, enquanto que quase todos os gêneros próximos ou semelhantes possuem aristas barbeladas, antrosas. As folhas e capítulos em *Bidens* possuem grandes variações morfológicas tradicionalmente utilizadas para o reconhecimento específico ou de grupos de espécies (Nakajima 2000).

Assim como as outras espécies deste gênero o *Bidens segetum* Mart ex Colla (Figura 3) é conhecido popularmente como “picão” ou “carrapicho” devido ao seu mecanismo de dispersão. Apesar de ser uma espécie bastante polimórfica, pode ser caracterizado por seu hábito escandente por apoio, folhas membranáceas, acuminadas, geralmente 3-partida, raro 5-partida, e cipselas lateralmente setosas (Nakajima 2000). Sherff (1937) distinguiu duas variedades: *Bidens segetum* var. *segetum* com folhas pinatissectas, raramente inteiras e, neste caso estreitamente lanceoladas; e o *Bidens segetum* var. *patula* com todas as folhas inteiras, oval-lanceoladas.

Esta espécie se desenvolve em lugares úmidos, beira de estradas e matas, campos de altitude, afloramentos rochosos e bordas de capão (Magenta 1998). Foi encontrada em um levantamento florístico realizado no Parque Nacional da Serra da Canastra e habita o Peru, Bolívia e no Brasil ocorre em regiões de Cerrado dos estados de Goiás, Minas Gerais, Paraná, São Paulo (Nakajima 2000, Romanuic Neto *et al.* 2012).



Figura 3. Populações de *Bidens segetum* Mart ex Colla. A= Reserva Biológica e Estação Experimental, Mogi Guaçu (RBEE); B= Parque Estadual Fontes do Ipiranga, São Paulo (PEFI); C= Detalhe de seus capítulos (inflorescências).

Há poucos estudos desenvolvidos com *B. segetum* até o momento. Lelis (2008) descreveu a sua biologia reprodutiva, abordando a dinâmica de floração e polinização, formação dos frutos e dispersão das sementes. Nos extratos e frações de seus capítulos e folhas foram relatadas atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante (Silveira *et al.* 2009, Fabri *et al.* 2011).

Vários levantamentos etnobotânicos registram o uso tradicional de plantas medicinais por comunidades locais nos biomas brasileiros (Agra *et al.* 2007, Di Stasi *et al.* 2002, Rodrigues & Carvalho 2001), servindo como ponto de partida para a busca de novos fitofármacos.

A partir das plantas medicinais, podem-se produzir tanto os fármacos, que consistem de compostos puros isolados de plantas, como os fitoterápicos, que são extratos complexos obtidos de plantas para serem usados no tratamento de doenças (Schmidt *et al.* 2008). As abordagens quimioterápica e fitoterápica têm sido utilizadas simultaneamente pela maioria das sociedades, uma complementando a outra, com a aplicação de fármacos para o tratamento de condições agudas e os fitoterápicos sobre doenças crônicas, reduzindo sintomas e melhorando a qualidade de vida de maneira econômica (Gurib-Fakim 2006).

Segundo a OMS (2003) mais de 80% da população do continente africano utilizam da medicina tradicional para os cuidados básicos de saúde; cerca de 30 a 50% do consumo de medicamentos na China consistem de preparações tradicionais de ervas e mais da metade da população da Europa e América do Norte já utilizaram medicina complementar ou alternativa, sendo que a Alemanha é responsável por consumir metade dos extratos vegetais comercializados na Europa (Veiga Junior *et al.* 2005). Seguindo essa tendência mundial, a fabricação dos fitoterápicos foi regulamentada em 2004, exigindo as mesmas condições regulatórias estritas de produção, segurança e eficácia dos fármacos (Schmidt *et al.* 2008). No Brasil, o governo federal implantou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que estabeleceu linhas de ações prioritárias para o uso desses medicamentos de forma segura e racional, ampliando as opções terapêuticas da população dentro da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS e garantindo também a sustentabilidade da biodiversidade.

De um modo geral, é possível atribuir atividades biológicas a determinados grupos químicos de metabólitos secundários. A capacidade de sequestrar radicais livres e o potencial antioxidante dos compostos fenólicos depende do arranjo dos grupos funcionais sobre a estrutura nuclear, assim, tanto o número como a configuração dos grupos hidroxílicos doadores de hidrogênio são as características principais que influenciam a capacidade antioxidante desses compostos (Soobrattee *et al.* 2005). Os alcaloides são responsáveis por uma série de atividades farmacológicas, tais como estimulante (caféina), analgésica (morfina), anestésica (cocaína), antitumoral (vincristina e vimblastina), antibacteriana (berberina) e antimalárica (quinina), entre outras (Simões & Spitzer 2004).

Os principais fatores que afetam a produção natural dos metabólitos secundários nas plantas são: localização geográfica (Schwob *et al.* 2004), temperatura, disponibilidade hídrica, nutrição, sazonalidade, ciclo circadiano, fenologia, herbívora e ataque de patógenos (Gobbo-Neto & Lopes 2007), biotipo (Tellez *et al.* 1999) e quimiotipo (Lahlou 2004). Enquanto algumas espécies de plantas reduziram a sua capacidade de produzir determinados compostos secundários ao serem domesticadas, outros compostos bioativos têm sido fortuitamente reforçados ao longo do cultivo de alimentos e seleção de plantas medicinais, como os teores de flavonoides de uva (*Vitis* spp.), que atuam no combate de doenças cardiovasculares, os teores de mentol com ação descongestionante da hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*), e o licopeno produzido pelo tomate (*Lycopersicum esculentum*), que combate o câncer de próstata (Schmidt *et al.* 2008).

Os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água são chamados de óleos essenciais ou óleos voláteis. Os óleos voláteis são constituídos por uma mistura complexa de substâncias voláteis de viscosidade semelhante a dos óleos, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Sua composição varia desde hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos contendo enxofre. (Simões & Spitzer 2004).

A grande maioria dos constituintes químicos dos óleos essenciais é derivada de fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo que o segundo grupo com maior relevância. Os fenilpropanoides são compostos fenólicos que se caracterizam por apresentarem uma cadeia lateral de três átomos de carbono derivados de aminoácidos aromáticos, que se originam a partir do ácido chiquímico. Os terpenoides, por sua vez, são substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do difosfato de isopentenila (IPP), que se origina a partir do ácido mevalônico, ou, através de uma rota alternativa, a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato (Adam & Zapp 1998). Os principais terpenoides encontrados nos óleos voláteis podem ser divididos em monoterpenos e sesquiterpenos. Os monoterpenos constituem uma classe de terpenos cujo esqueleto contém 10 carbonos, composto por duas unidades isopreno. Já os sesquiterpenos possuem 15 carbonos em seu esqueleto, o qual pode ser reduzido em três unidades de isopreno, sendo em geral menos voláteis (Simões & Spitzer 2004). O ciclo biossintético geral dos metabólitos secundários é demonstrado na Figura 4.

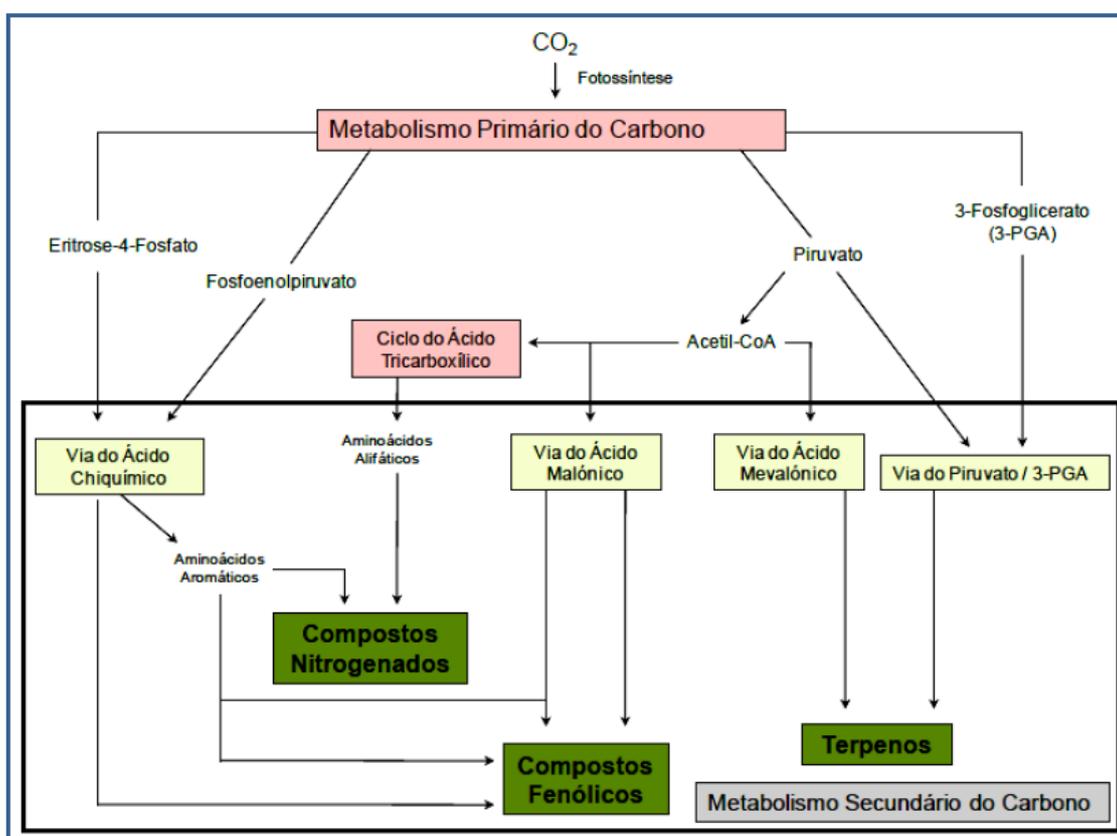


Figura 4: Rota de biossíntese das principais classes de metabólitos secundários (Taiz & Zeiger 2006).

Os óleos voláteis apresentam ampla ocorrência entre as angiospermas, sendo abundante entre as espécies das famílias Asteraceae, Lamiaceae e Myrtaceae; todas eudicotiledôneas ou em angiospermas basais como as Lauraceae e relativamente rara entre as monocots e as gimnospermas. Estão presentes em estruturas especializadas, como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), em pêlos glandulares (Lamiaceae), ou canais oleíferos (Apiaceae). E podem também estar estocados em certos órgãos como flores (laranjeira), folhas (louro), cascas do caule (canelas), madeira (pau-rosa), rizomas (gingibre), frutos (anis estrelado) ou sementes (noz-moscada). (Simões & Spitzer 2004).

A produção de óleos essenciais pelas plantas tem uma demanda de energia considerável, representada pelo investimento em DNA, enzimas e fotossintéticos, isto é, os indivíduos que os produzem devem ter alguma vantagem quando comparados com os que não os produzem. Os óleos essenciais presentes nas plantas, assim como os demais metabólitos secundários, desempenham funções fisiológicas e ecológicas específicas, ou seja, estas substâncias são sintetizadas em resposta as necessidades ecológicas e de desenvolvimento da planta (Silva 2005). A figura 5 demonstra hipoteticamente algumas dessas funções.

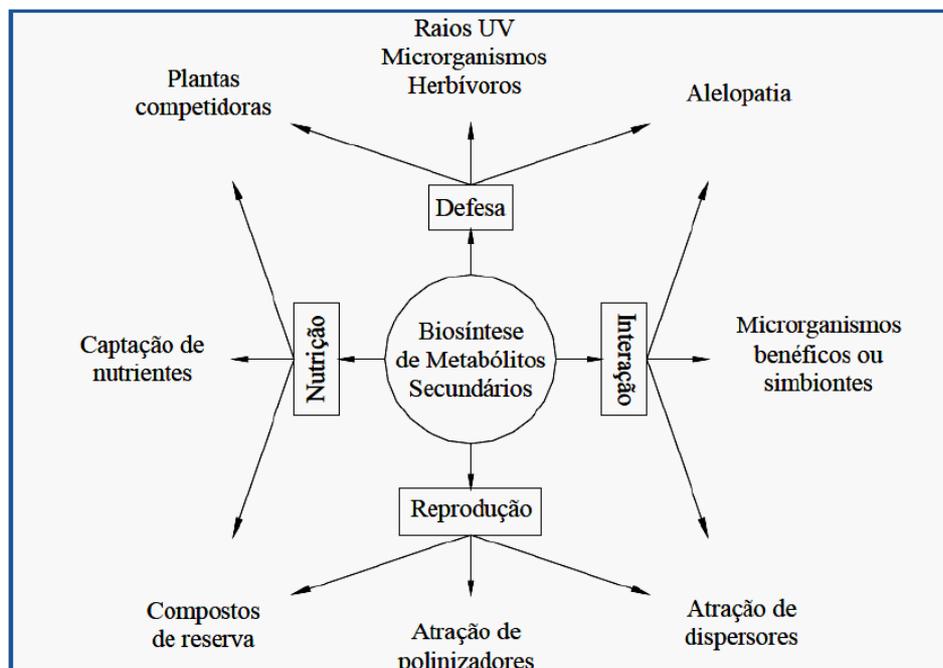


Figura 5. Funções ecológicas, fisiológicas e adaptativas dos metabólitos secundários para o estabelecimento da planta no ambiente (Silva 2005).

A natureza é uma fonte de inestimável riqueza para novos medicamentos e os produtos naturais são considerados como uma das maiores fontes de diversidade química. Nos EUA e Inglaterra, aproximadamente 25% dos compostos ativos, nas prescrições atuais, foram identificados em plantas superiores (Trevisan *et al.* 2003).

Agentes fungitóxicos provenientes de plantas superiores são utilizados tanto na clínica humana quanto na veterinária, e são pesquisados através da detecção do efeito inibitório das substâncias sobre o crescimento de cepas específicas de fungos. Os estudos com fungos fitopatogênicos são de grande interesse agrícola, visto que representam perdas e prejuízos no âmbito econômico, além de problemas ecológicos, em decorrência do uso de pesticidas para o seu controle. O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries, é uma espécie fitopatogênica em *Anacardium occidentale* L. ocorrendo nos Estados da Bahia, Ceará, Piauí e Rondônia, em *Astronium urundeuva* Engl. e *Lycopersicon esculentum* Mill. (Mendes 1998). Enquanto que o fungo *Cladosporium sphaerospermum* Penzig, é uma espécie comum e cosmopolita, ocorrendo como invasor secundário em diversas partes de plantas, como a rizosfera do feijão, e sementes de arroz e milho. Encontrado em ambientes como ar, solo, comidas e tinturas, é sensível a diversas substâncias químicas (Hoog & Garro 1995).

Outro alvo das companhias farmacêuticas é o desenvolvimento de fármacos que aumentem a capacidade cognitiva. Assim, pesquisas sobre a possibilidade de que a elevação no nível da acetilcolina possa melhorar os sinais de deficiência de aprendizagem vem sendo incentivadas e os inibidores da acetilcolinesterase, os quais aumentam a função colinérgica central, utilizados no tratamento da doença de Alzheimer. A doença de Alzheimer é uma doença degenerativa do sistema nervoso central, de causa não totalmente conhecida que acomete cerca de 5% dos indivíduos com idade superior a 65 anos, causando entre outros sintomas deficiências relativas à memória. Ela está associada com “déficits” dos diversos neurotransmissores cerebrais, como a acetilcolina (ACh), a noradrenalina e a serotonina (Francis *et al.* 1999).

Recentemente, tem havido um interesse crescente na pesquisa sobre o papel dos derivados de plantas antioxidantes em alimentos e saúde humana. Antioxidante é uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de prevenir ou retardar, de forma significativa, a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, tais como as gorduras. O processo de envelhecimento e o aparecimento de patologias como o câncer, enfisema, aterosclerose, artrites e outras doenças graves estão relacionadas com a oxidação de componentes biológicos como membranas celulares, proteínas e o DNA. Contudo, outros campos também precisam de antioxidantes, tais como o controle de polimerização no fabrico de borracha, plásticos e tintas, para a proteção de plásticos claros contra a luz ultravioleta, ou na elaboração de melhores combustíveis para automóveis e óleos lubrificantes (Liu 2010; Miguel 2010).

A seleção de espécies vegetais com atividades antifúngica e inibidora da acetilcolinesterase já vinha sendo realizada por nosso grupo, dentro do programa BIOTA/FAPESP, cujos objetivos principais eram a descoberta de fármacos de alto valor comercial e a conservação e o desenvolvimento sustentável dos biomas Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo. Triagens realizadas em regiões de Cerrado indicaram algumas espécies, entre elas *Bidens segetum* Mart. ex Colla, para esse estudo devido ao forte potencial antifúngico e anticolinesterásico detectados no extrato bruto e nos óleos voláteis obtidos dessa espécie (dados não publicados), respectivamente, justificando um estudo aprofundado da composição química e atividades biológicas de seus componentes fixos e voláteis, a fim de ampliar o conhecimento da espécie, permitindo estabelecer mecanismos e estratégias para garantir a conservação e o uso sustentável do Cerrado.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Gerais**

Avaliar as atividades biológicas dos componentes fixos e voláteis de *Bidens segetum* (Asteraceae), de modo a ampliar o conhecimento sobre a espécie.

### **2.2. Específicos**

Analisar a composição química dos óleos voláteis de *B. segetum*, obtidos de diferentes órgãos (folhas, ramos caulinares, flores, frutos e raízes), a partir de material fresco, em dois estádios fenológicos (reprodutivo e vegetativo), de populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (domínio do Cerrado) e cultivado no Instituto de Botânica (domínio da Mata Atlântica);

Testar as atividades biológicas de todos os óleos voláteis obtidos, por ensaios: antifúngico, anticolinesterásico e antioxidante;

Comparar a composição química do óleo volátil e do aroma das flores da população cultivada de *B. segetum*, obtidos por hidrodestilação e microextração em fase sólida (SPME), respectivamente.

Realizar o fracionamento biomonitorado dos extratos etanólicos de folhas, ramos caulinares, flores, frutos e raízes de *B. segetum*, que apresentarem atividades biológicas, direcionados para a obtenção das frações ou compostos responsáveis pelas atividades detectadas.

### **3. Material e Métodos**

O estudo foi realizado no Laboratório de Fitoquímica e de Fisiologia e Bioquímica do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (IBt) da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo (SMA/ SP).

A espécie foi identificada pela Doutora Inês Cordeiro e uma exsicata (Nascimento 101) foi depositada na coleção do Herbário do Instituto de Botânica (SP).

#### **3.1. Material vegetal e delineamento experimental**

##### **3.1.1. Estudo dos componentes voláteis (óleos e aromas)**

O material vegetal foi coletado, sempre pela manhã, de uma população selvagem de *B. segetum*, localizada na Reserva Biológica e Estação Experimental (RBEE) de Mogi-Guaçu (domínio do Cerrado), e a partir de plantas cultivadas em canteiros no Instituto de Botânica (IBt) de São Paulo (domínio da Mata Atlântica) a partir de sementes provenientes da população selvagem, de acordo com seu estágio fenológico: em abril, para coleta de folhas, ramos caulinares e inflorescências (capítulos), no estágio reprodutivo de floração; em maio, para coleta de infrutescências (cipselas) e de folhas e ramos caulinares, no estágio reprodutivo de frutificação; em dezembro para coleta de folhas e ramos caulinares, no estágio vegetativo, em ambas as populações. Para o estudo do aroma foram utilizados capítulos frescos, recém coletados, da população cultivada (PEFI).

Todo o material vegetal foi triado, para se retirarem das amostras partes vegetais senescentes, muito jovens, com sinais de predação ou doenças e também restos de outras espécies vegetais ou animais.

Antes da extração dos óleos voláteis, o material vegetal proveniente de cada população foi reunido, para estudo de caráter populacional, e dividido em três partes iguais, de modo a permitir o cálculo das médias da triplicata em relação ao rendimento dos óleos de cada material.

O material coletado na RBEE de Mogi-Guaçu foi transportado em sacos plásticos dentro de caixas de isopor com gelo sendo congelado para posterior extração dos óleos voláteis. O material cultivado no IBt também foi congelado após a coleta para posterior extração.

### **3.1.2. Obtenção dos óleos voláteis de folhas, ramos caulinares, capítulos e cipselas de *B. segetum* pelo método de hidrodestilação.**

Após o descongelamento, o material vegetal foi picado manualmente com o auxílio de uma tesoura sendo então pesado em uma balança analítica digital e submetido à hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger, mantida por 3 horas após o início da ebulição. O óleo obtido foi retirado junto com parte do hidrolato, extraído em pentano (Synth) e desidratado com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O pentano foi retirado com o auxílio de evaporador rotatório e o óleo volátil puro pesado para se determinar o rendimento e, posteriormente, armazenado em congelador, à temperatura de -22°C para as análises posteriores (Farmacopeia Brasileira 2001).

O rendimento do óleo volátil foi calculado com base na massa de óleo obtida em relação à massa de material vegetal utilizada. Os valores foram dados em porcentagem.

### **3.1.3. Estudo do aroma das flores de *B. segetum* pelo método de microextração em fase sólida (HS-SPME)**

Os compostos voláteis emitidos pelas flores foram capturados pela técnica de microextração em fase sólida (do inglês – Solid Phase Micro Extraction), utilizando um dispositivo Supelco com fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 µm. Para tanto, dois capítulos, recém-coletados pela manhã; imersos em 20 ml de solução salina saturada (H<sub>2</sub>O + NaCl), previamente preparada; hermeticamente fechados em um vial de 40 ml; foram aquecidos e mantidos a 60°C; sob agitação constante em um agitador magnético (Fisatom). Antes da primeira e após cada análise, para eliminar interferência “de fundo” ou arraste de amostra, a fibra foi mantida exposta no injetor do cromatógrafo a 250°C por no mínimo 10 minutos. Após essa

“purga” a fibra foi retraída para dentro da agulha e inserida no septo que sela o frasco com a amostra. A fibra foi exposta ao espaço vazio (headspace – HS) acima da amostra e passados 30 minutos, foi recolhida novamente para a agulha e a seringa levada imediatamente ao injetor do cromatógrafo a gás, no qual os compostos voláteis foram dessorvidos por 15 minutos, após nova exposição da fibra (Pawliszyn & Arthur 1990, Valente & Augusto 2000, Junqueira *et al.* 2004)

As condições cromatográficas de análise foram às mesmas utilizadas para os óleos voláteis e o ensaio foi repetido três vezes.

#### **3.1.4. Estudo dos componentes fixos**

O material vegetal amostrado para o estudo dos componentes fixos também foi coletado da população selvagem de *B. segetum*, localizada na Reserva Biológica e Estação Experimental (RBEE) de Mogi-Guaçu (domínio do Cerrado), e da cultivada no Instituto de Botânica (IBt) de São Paulo (domínio da Mata Atlântica) de acordo com seu estágio fenológico.

Na população selvagem (RBEE), durante o ano de 2011, foram realizadas coletas de capítulos, folhas e ramos caulinares em abril; de folhas e ramos caulinares em maio e; de folhas e ramos caulinares em dezembro. Além destas, houve a necessidade de outra expedição, em maio de 2012, para a coleta de infrutescências (cipselas) devido à escassez de material no ano anterior.

Na população cultivada (PEFI), durante o ano de 2011, foram realizadas coletas de folhas, ramos caulinares e raízes em abril; de cipselas, folhas, ramos caulinares e raízes em maio e; de folhas, ramos caulinares e raízes em dezembro. Semelhante ao ocorrido para as cipselas provenientes da população da RBEE, os capítulos da população do PEFI, utilizados para este propósito, tiveram de ser coletados em abril de 2012, visto que houve escassez desse material no ano anterior devido à ocorrência de um intenso ataque de insetos herbívoros nos canteiros dessas plantas durante esse período (Figura 6).

Após triagem, os materiais vegetais foram secos à sombra, à temperatura ambiente, em casa de vegetação, por cerca de trinta dias e moídos em moinho de facas para obtenção do pó utilizado para a extração (Moinho de facas TE 625 Tipo Cróton, Marca TECNAL, Mesh 20).



Figura 6. Ataque de insetos herbívoros aos canteiros da população de *Bidens segetum* Mart ex Colla mantidos no Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI).

### 3.1.5. Obtenção dos extratos etanólicos e frações das diferentes partes de *B. segetum*.

As amostras de *B. segetum* pulverizadas foram submetidas à extração com álcool etílico comercial (93°) sob pressão (1500 -1700 psi) e temperatura de 60°C em extrator ASE300 (DIONEX). As soluções etanólicas obtidas foram concentradas em evaporador rotatório (BUCHI) e posteriormente levadas ao banho-maria (40°) para eliminação completa do álcool etílico e obtenção dos extratos etanólicos secos. Os extratos etanólicos das folhas, raízes, capítulos e cipselas das plantas da população do PEFI, selecionados pelas atividades biológicas detectadas, foram submetidos a partições líquido-líquido com MeOH-H<sub>2</sub>O na razão de 1:1 (V/V) e solventes orgânicos de polaridades crescentes (hexano - HEX, diclorometano - DCM e acetato de etila - AcOEt).

### 3.1.6. Derivatização das frações para análise em GC-MS

Em microtubos de 1,5 ml alíquotas de 400 µg das amostras secas foram suspensas em 150 µl de piridina; depois se adicionou 50 µl de cloridrato metoxiamina na concentração de

20mg/ml de piridina (preparados no momento do uso); e então 50 µl de Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% TMCS (trimetilclorossilano); os microtubos foram encubados a 75°C por 1 hora sob agitação constante e; por fim o volume foi transferido para os frascos de vidro, lacrados e encaminhados para a injeção no cromatógrafo a gás (Caccere *et al.* 2013).

## **3.2. Análises Cromatográficas**

### **3.2.1. Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCD)**

Para as análises em cromatografia de camada delgada analítica (CCD) foram utilizadas placas cromatográficas de sílica gel 60 F254 (Merck). Os óleos voláteis foram sempre analisados em espote único, sem desenvolvimento da placa. Já os extratos e suas frações foram submetidos a dois sistemas de eluentes. Sendo o primeiro sistema formado por Hexano-Acetato de etila 9:1 (V/V), para análise dos compostos apolares, e após seu desenvolvimento e secagem, as cromatoplasmas foram ressubmetidas ao segundo sistema constituído por AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O 80:12:8 (V/V), para compostos polares.

Ao término da cromatografia as placas foram observadas sob luz UV nos comprimentos de onda ( $\lambda$ ) de 254 nm e 366 nm, em equipamento CAMAG ReproStar 3 e fotografadas em câmera Epson PhotoPC 3000Z.

### **3.2.2. Análise por CG-EM dos óleos voláteis e do aroma.**

As amostras foram analisadas quali- e quantitativamente em cromatografia a gás, em aparelho Agilent (série 6890) Hewlett-Packard, acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), com energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi HP 5-MS (30m x 0,25mm de diâmetro interno, com 0,25 µm de espessura), nas seguintes condições: injetor (com divisão de fluxo-split/splitless) a 250°C (razão de divisão 1: 20), temperatura de aquecimento da coluna de 40 a 240°C a 3°C/min, 240°C por 10 min (tempo total de análise 78 min) utilizando Hélio como gás de arraste a uma pressão

de 80 kpa e velocidade linear de 1 ml/min. O índice de retenção de Kováts (IK) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de n-alcenos (C<sub>8</sub>-C<sub>40</sub>) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras dos óleos e aroma.

Os óleos voláteis obtidos por hidrodestilação foram diluídos em acetona na razão de 1:100 (V/V). O volume de injeção foi de 1,0 µl e as amostras foram injetadas por um injetor automático Agilent modelo 7683 Series.

A identificação dos componentes dos óleos voláteis e do aroma foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas destes com os das bibliotecas instaladas no equipamento (Wiley 275 e Adams 2007), de amostras autênticas e dados retirados da literatura ou, ainda, por comparação com espectros de massas registrados em banco de dados como NIST 08 (National Institute of Standards and Technology), onde são registrados mais de 65.000 compostos.

A fim de permitir uma comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos obtidos com os dados da literatura, amostras autênticas e banco de dados, foi utilizado o índice de retenção de Kováts, que utiliza uma série de carbonos de alcano saturado normal, para evitar erros devidos a variações do tempo de retenção dos compostos, decorrentes de alterações como temperatura, fluxo e operador. O índice de retenção corrigido varia muito pouco e de maneira linear com a temperatura. Os índices de retenção calculados foram, então, comparados com os da literatura ou com amostras autênticas (Sandra & Bichi 1987; Collins & Braga 1988).

O índice de retenção foi obtido através da seguinte equação:

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

Onde: z = número de átomos de carbono com menor peso molecular.

t'<sub>RX</sub> = tempo de retenção do composto x, sendo que t'<sub>RX</sub> é intermediário a t'<sub>RZ</sub> e t'<sub>R(Z+1)</sub>.

t'<sub>RZ</sub> e t'<sub>R(Z+1)</sub> = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

Os cromatogramas foram reitengrados com pico inicial de 0,5% para os compostos.

### **3.2.3. Análise por CG-EM das frações.**

O sistema GC-MS foi composto por um cromatógrafo a gás Agilent 6890 Series, com HP1701 de 30 m com 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura (Supelco, Bellfonte, CA) e um espectrômetro de massas Agilent 5937 NetWork tendo como fonte de ionização impacto eletrônico com analisador de massas do tipo quadrupolo. O sistema utilizou Hélio (He) como gás de arraste.

As amostras foram derivatizadas e preparadas em [10 mg/ml] e analisadas nas seguintes condições: temperatura do injetor em 250 °C, injeção de 0,6  $\mu\text{L}$ , fluxo de hélio em 1 ml/min, ionização em 70 eV e temperatura da fonte de íons de 150 °C. A análise foi desenvolvida sob o seguinte programa: temperatura inicial 70 °C por 5 minutos, aumentando 5 °C por minuto até 280 °C mantida por 1 minutos, com tempo total de 48 minutos. O espectro de massas foi armazenado a uma taxa de 2 varreduras  $\text{s}^{-1}$  na faixa de 50 a 650 m/z.

A identificação dos componentes detectados foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas destes com os da biblioteca NIST 08 instalada no equipamento.

Os cromatogramas foram reitengrados com pico inicial de 0,1% para os compostos.

### **3.2.4. Análise por LC-DAD e LC-MS-MS/ESI(+).**

As análises em LC-DAD e LC-MS-MS/ESI(+) foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP). O sistema utilizado foi composto por um LC da marca Shimadzu, com bomba LC-10AD vp, detector SPD-M10A vp, injetor automático SIL-10AF, coluna C-18 de fase reversa Phenomenex Luna (250 X 4,6mm - 5 $\mu$ ) e um detector de espectrometria de massas modelo Esquire Plus 3000 da marca Bruker, com fonte de íons em eletrospray e analisador do tipo quadrupolar de armadilha de íons (ion trap). Todos os dados foram obtidos no modo positivo ESI(+).

As amostras foram preparadas em concentração de 1mg/ml (MeOH – Merck PA), centrifugadas (5 minutos a 13000 rpm - 20°C) e filtradas (Millex 0,45  $\mu\text{m}$  - Millipore). O perfil cromatográfico foi obtido nas seguintes condições: volume de injeção de 20  $\mu\text{l}$ ; fluxo de 1

ml/min; foi utilizado um gradiente linear com a fase móvel A (acetonitrila – Merck grau HPLC) e fase móvel B (água Mili-Q acidificada com 0,1% de ácido acético glacial - Merck); eluição início (T= 0 minutos) com 90% da fase móvel B e 10% da fase móvel A e finalizando com 10% da fase móvel B e 90% da fase móvel A; tempo total de corrida de 50 minutos. Os perfis foram registrados em ( $\lambda$ ) 254 nm.

### **3.3. Atividades biológicas**

#### **3.3.1. Bioautografia com *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* para avaliação preliminar da atividade antifúngica**

Para a avaliação da atividade antifúngica dos extratos e das frações obtidos de folhas, ramos caulinares, raízes e flores de *B. segetum*, amostras dos extratos brutos (400  $\mu$ g) e das frações (200  $\mu$ g) foram analisadas em CCD, em cromatoplasas de sílica gel F254 (Merck), desenvolvidas conforme descrito no item 3.2.1, e após completa evaporação dos solventes, as placas foram borrifadas com suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides* (Fresen) de Vries (CCIBt 140) ou *C. sphaerospermum* Penzig (CCIBt 491) em meio líquido de sais minerais e glucose (6:1) e incubadas em câmara úmida a 25 °C, no escuro, por 48 horas, segundo método de Homans & Fuchs (1970). Após o período de incubação, zonas claras de inibição do crescimento do(s) fungo(s) se formaram em contraste com um fundo de coloração escura, nas amostras que apresentaram atividade, e o fator de retenção (Rf) dos constituintes ativos foi determinado.

Para a avaliação preliminar da atividade antifúngica dos óleos voláteis de *B. segetum* obtidos por hidrodestilação, 200  $\mu$ g dos óleos diluídos em 10  $\mu$ l de acetona foram aplicados em sobre placas de sílica gel F<sub>254</sub> (Merck), borrifadas com a suspensão de esporos dos fungos *C. cladosporioides* ou *C. sphaerospermum*, e incubadas conforme descrição do ensaio para extratos e frações. Para as amostras de óleos que apresentaram forte atividade foi determinado o limite de detecção utilizando 200, 100, 50, 25, 10 e 5  $\mu$ g dos óleos diluídos em 10  $\mu$ l de acetona,

repetindo-se o ensaio como descrito anteriormente. Nistatina (5 µg) foi utilizada como controle positivo.

### **3.3.2. Ensaio qualitativo da atividade inibidora da acetilcolinesterase**

Amostras dos extratos brutos (200 µg) e das frações (100 µg) foram analisadas em CCD de sílica gel F<sub>254</sub> (Merck). Como controle positivo foi utilizado fisostigmina (0,5 µg).

Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com uma solução de enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%), incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos e, em seguida, borrifada com uma mistura da solução etanólica de acetato de 1-naftila (5 ml; 0,25%) e aquosa do sal Fast Blue B (20 ml; 0,25%) (Marston et al. 2002). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha clara sobre um fundo de coloração roxa indica inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase onde houver substância ativa. Os cromatogramas obtidos foram observados em  $\lambda$  254 nm e 366 nm, e fotografados em câmera fotográfica Epson. E o fator de retenção (Rf) das bandas foi determinado.

### **3.3.3. Ensaio quantitativo em microplaca da atividade inibidora da acetilcolinesterase**

A atividade anticolinesterásica das frações e dos óleos voláteis foi avaliada quantitativamente em microplaca, baseada no método de Ellman (Ellman et al. 1961), utilizando um leitor KC4-Biotek. As frações foram diluídas em metanol e testados nas concentrações de 100 µg/ml. Os óleos voláteis foram dissolvidos em MeOH + Twen 20 na concentração preliminar de 20 mg/ml. As amostras de óleos voláteis que apresentaram atividade (acima de 50% de inibição) foram testadas nas concentrações de 200 – 100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,3 – 3,1 µg/ml para determinação da curva de inibição da enzima acetilcolinesterase e determinação da CE<sub>50</sub>.

Nas 96 cavidades da microplaca, foram adicionados 25 µl de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µl de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução C (3 mM, DTNB ou reagente de Ellman), 50 µl da solução B, 25 µl da amostra de fração ou óleo volátil dissolvida em metanol e diluída 10 vezes na solução A para obter uma concentração final de 0,2 mg/ml (Rhee *et al.* 2001, Trevisan *et al.* 2003). A absorvância foi medida a 405 nm a cada 30 segundos por 2 vezes. Em seguida, foram adicionados 25 µl da enzima acetilcolinesterase (0,22 U/ml) e a absorvância medida novamente após 10 e 20 minutos de incubação da enzima. A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10% de MeOH + Twen 20 na solução A, considerada atividade total da AChE, 100%). Os resultados quantitativos foram representados em um gráfico como médias dos ensaios realizados em triplicata. Soluções - A: Tris/HCl 50 mM, pH=8; B: Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina fração V; C: Tris/HCl 50 mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl<sub>2</sub> .6 H<sub>2</sub>O.

#### **3.3.4. Ensaio qualitativo da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH•**

Alíquotas dos extratos etanólicos brutos (200 µg) e das frações obtidas destes extratos e dos óleos voláteis (100 µg) foram aplicadas em cromatoplasmas de sílica gel F254 (Merck). Quercetina foi utilizada como padrão (5 µg), dissolvida em metanol. A placa cromatográfica foi revelada com uma solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (0,2%, DPPH, Sigma). A coloração roxa aparece em aproximadamente 30 minutos e as manchas brancas ou amarelas são indicativas de atividade antioxidante (Cuendet *et al.* 1997). Os resultados foram observados, fotografados, os valores de R<sub>f</sub> calculados e os cromatogramas registrados em sistema CAMAG.

### **3.3.5. Ensaio quantitativo em microplaca da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH•**

As frações foram testadas nas concentrações de 100 – 50 – 25 – 10 – 5 – 1 µg/ml para determinação da curva de atividade e determinação da CE<sub>50</sub>. Nas 96 cavidades da microplaca, foram adicionados 71,4 µL de solução etanólica de DPPH (0,3 mM) e 178,5 µL da amostra de extrato ou fração em diferentes concentrações, no branco foram pipetados 71,4 µL de solução metanólica e 178,5 µL da amostra teste. Como controle negativo foi utilizado 71,4 µL de solução metanólica de DPPH (0,3 mM) e 178,5 µL de metanol. A microplaca foi mantida a temperatura ambiente, no escuro durante 30 minutos, a absorbância foi medida a 518 nm em aparelho BIOTEK KC4 (Tepe *et al.* 2005).

## 4. Resultados e Discussão

O clima do Estado de São Paulo se caracteriza por um verão úmido e um período de inverno seco, com temperaturas amenas e precipitação pluviométrica reduzida, fatores que podem influenciar alterações no metabolismo das espécies vegetais (Machado et al. 2002). A Figura 7 mostra os dados de precipitação total, umidade relativa do ar e as temperaturas médias do PEFI e da RBEE de Mogi Guaçu, nos períodos de Janeiro/2011 a Outubro/2012. Os dados foram registrados pelas estações meteorológicas do Departamento de Ciências Atmosféricas do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas (IAG) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no PEFI e da empresa produtora de celulose e papel Chamflora Mogi Guaçu Agroflorestal Ltda., localizada na Rodovia SP 340, km 171 no município de Mogi Guaçu.

Alguns dados correspondem aos já publicados, de acordo com os quais o clima da região do PEFI, caracterizado por Santos & Funari (2002), pela classificação de Köppen, é do tipo Cwb, mesotérmico úmido sem deficiência de água e com excesso no verão, com temperatura média anual de 19 °C, precipitação média anual de 1540 mm e umidade relativa do ar média anual de 81%, semelhante ao observado no período de estudo (Tabela 2). O clima do Cerrado de Mogi Guaçu é classificado como Cwa, de Köppen, mesotérmico de inverno seco, com precipitação média anual de 1177 mm, umidade relativa do ar média anual de 75% e temperatura média anual de 27°C (Mantovani & Martins 1993). Portanto, de um modo geral, a Mata Atlântica é caracterizada por maiores índices de precipitação e umidade e por temperaturas mais baixas que o Cerrado, embora as temperaturas registradas no período tenham se mostrado próximas e a precipitação da RBEE tenha sido elevada para a região.

Souza (2009) observou a existência de duas estações meteorológicas distintas no PEFI, com níveis mais elevados de pluviosidade e temperatura de novembro a março, em oposição a um período de temperaturas mais baixas e menor precipitação de maio a agosto, enquanto que Murakami (2009) obteve uma distribuição de chuva igualmente marcante para o cerrado de Mogi Guaçu caracterizada por verão chuvoso e inverno seco, corroborando com o perfil do clima observado no período de estudo.

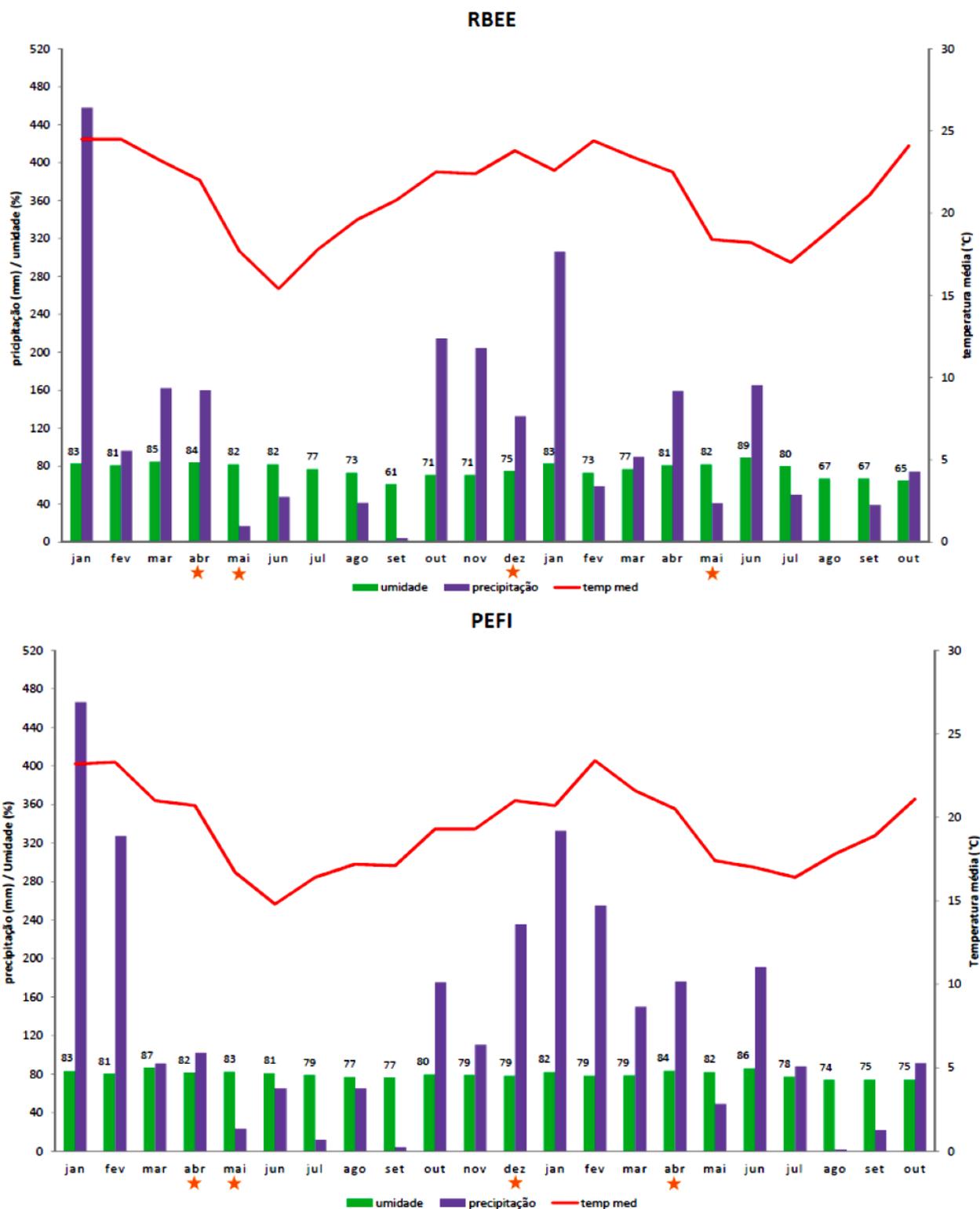


Figura 7. Médias mensais de umidade relativa do ar, precipitação total e de temperaturas registradas para a região do PEFI e da RBEE entre Janeiro/ 2011 e Outubro/2012. As estrelas indicam os meses em que houve coleta de material vegetal para estudo dos componentes voláteis e fixos de *Bidens segetum*.

Tabela 2. Valores médios de precipitação, umidade relativa do ar e temperatura do PEFI (Mata Atlântica) e da RBEE (Cerrado).

Dados	PEFI	RBEE
<b>Precipitação Total (mm)</b>	1719	1431
<b>Umidade Relativa do Ar (%)</b>	80	76
<b>Temperatura (°C)</b>	19	21

O teor de metabólitos secundários pode ser influenciado por vários fatores, dentre eles o local e época de coleta da planta e principalmente a parte da planta utilizada (Falkenberg *et al.* 1999). A Tabela 3 mostra o rendimento dos óleos voláteis extraídos por hidrodestilação de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Bidens segetum*, coletada nas duas populações estudadas em diferentes fases fenológicas. O rendimento do óleo volátil obtido das estruturas vegetativas não apresentou variação significativa entre as fases fenológicas ou local de coleta. Os maiores rendimentos foram observados para as estruturas reprodutivas do material coletado na RBEE, sendo que a principal discrepância nos valores de rendimentos foi observada entre o óleo volátil obtidos dos capítulos da população selvagem da RBEE (0,15%) em relação aos obtidos da população cultivada no PEFI (0,05%). Como a comparação entre a composição química desses dois óleos também foi a mais discrepante, pode-se inferir uma possível resposta fisiológica ao estresse causado pelo ataque de pragas na população cultivada, entre os meses de março e maio, período que abrangeu a primeira e segunda coleta de material vegetal (Figura 6), e/ou aos maiores índices de precipitação total e de temperatura média no período na RBEE. 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-herbívoros, planta-microrganismo 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.

Em estudos anteriores realizados por Nascimento (2008), com material vegetal coletado nas mesmas fases fenológicas, na população da RBEE, os óleos das folhas e capítulos apresentaram rendimento semelhante (0,05 e 0,16 %, respectivamente) enquanto que o das cipselas apresentou rendimento maior (0,16 versus 0,09%). Deba *et al.* (2008) estudando os óleos voláteis de folhas e capítulos de uma população selvagem de *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata* e encontraram rendimento ligeiramente superior para as folhas (0,08 %) e inferior para os capítulos (0,06 %) quando comparados aos obtidos neste estudo.

Tabela 3. Rendimento médio dos óleos voláteis das diferentes partes de *B. segetum* de acordo com a fase fenológica e o local de coleta.

Coleta	Óleos	Fase Fenológica		
		Floração	Frutificação	Vegetativo
RBEE	Folhas	0,05 *	0,05	0,05
	Ramos	0,02	0,01	0,01
	Capítulos	0,15	-	-
	Cipselas	-	0,09	-
PEFI	Folhas	0,07	0,06	0,06
	Ramos	0,01	0,01	0,01
	Capítulos	0,05	-	-
	Cipselas	-	0,10	-

RBEE = Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu; PEFI = Parque Nacional Fontes do Ipiranga; \* valores em porcentagem (%).

A Tabela 3 mostra a composição química dos óleos voláteis de *Bidens segetum* proveniente das populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi Guaçu (RBEE) e mantidas

na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PEFI) nas diferentes fases fenológicas. Ao todo foram detectados 70 componentes com área de pico superior a 0,5%, sendo que: quarenta e um destes foram comuns aos diferentes órgãos de ambas as populações; doze só foram detectados na composição dos óleos provenientes das plantas do RBEE, todos em pequenas quantidades e; dezessete se mostraram exclusivos aos óleos obtidos da população do PEFI, porém alguns se apresentaram como majoritários. Nestes, verificou-se também a ocorrência de silfiperfolenos como o silfiperfol-6-eno, majoritário para as folhas da fase reprodutiva e descrito por Pinto *et al.* (2009) como um dos componentes principais do óleo essencial da pteridófito aromática *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. Estes autores ainda observaram que a presença de sesquiterpenos do tipo silfiperfoleno, pré-silfiperfolanol, pré-silfiperfoleno, isocomeno, nopsano, pré-nopsano e cariofileno em uma mesma espécie, corrobora com a hipótese da relação biossintética dessas estruturas.

O óleo volátil obtidos das folhas de *Bidens segetum* de ambas as populações apresentou como principais classes de componentes os hidrocarbonetos sesquiterpênicos, seguidos pelos sesquiterpenos oxigenados e com um percentual bastante inferior de monoterpenos, sendo todos da classe dos hidrocarbonetos (Figura 8). Por outro lado, os óleos dos ramos apresentaram uma proporção mais equilibrada entre hidrocarbonetos monoterpênicos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos, com uma quantidade de sesquiterpenos oxigenados inferior ao das folhas e a ocorrência de um único constituinte da classe dos monoterpenos oxigenados. O 4-terpineol foi o monoterpeno oxigenado comum aos óleos dos ramos e das estruturas reprodutivas, semelhante ao encontrado por Murakami (2008) estudando os óleos dessas estruturas em *Chromolaena laevigata*. Já o óleo volátil dos capítulos e cipselas exibiram quantidade bem inferior de sesquiterpenos, quando comparados aos óleos das estruturas vegetativas e se mostraram ricos em hidrocarbonetos monoterpênicos, devido, principalmente, ao alto teor de  $\beta$ -felandreno nesses óleos (presente em menores teores nas folhas), com exceção daqueles provenientes da população do PEFI que, conforme comentado anteriormente, poder ter sofrido alteração no seu rendimento

e composição devido ao ataque de pragas durante o período de floração ou às diferenças climáticas observadas no período. De fato, essa parece ser a principal alteração apresentada na composição do óleo dessa estrutura, sendo que a redução no teor desse constituinte pode ter refletido no aumento do percentual dos outros componentes, o que não significa, necessariamente, que a quantidade absoluta desses outros compostos tenha aumentado.

Não foi observado um padrão bem definido de variação das classes de terpenoides em relação à variação climática. 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 difosfato de dimetil-alila (DMAPP). Grombone-Guaratini *et al.* (2005) estudando o perfil de sesquiterpenos através da análise do extrato diclorometânico das folhas de populações de *Bidens pilosa*, *Bidens alba* e *Bidens subalternans*, encontrou a recorrência dos sesquiterpenos E-cariofileno,  $\alpha$ -humuleno,  $\alpha$ -muuroleno, biciclogermacreno e germacreno D, comuns também aos óleos de *B. segetum*.

O hidrocarboneto sesquiterpênico Germacreno D foi o componente majoritário comum a todos os óleos de ambas as populações. Além desses, de um modo geral, também se destacam os constituintes com picos acima de 5% de área (Figura 9 e 10), como:  $\alpha$ -pineno, sabineno, mirceno,  $\alpha$ -felandreno,  $\delta$ -3-careno,  $\beta$ -felandreno, silfiperfol-6-eno, para-cimeno, E- $\beta$ -ocimeno,  $\beta$ -elemeno, E-cariofileno, biciclogermacreno e  $\alpha$ -cadinol.

Estudos demonstraram a atuação de sesquiterpenos do tipo germacreno como intermediários biogénéticos para certos grupos de sesquiterpenos do tipo selinenos ou cadinanos, como  $\alpha$ - e  $\gamma$ -amorfeno, cadina-1,4-dieno,  $\alpha$ -copaeno,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -cadineno,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -muuroleno e  $\alpha$ -ylangeno e sugerem que o Germacreno D pode ser convertido em cadinenos, muurolenos e

elemenos; o biciclogermacreno pode sofrer ciclizações e dar origem a aromadendreno, alloaromadendreno e viridifloreño; o espatulenol, viridiflorol, e globulol podem ser produtos da oxidação do biciclogermacreno, allo-aromadendreno e aromadendreno, respectivamente (Bülow & König 2000; Njoroge *et al.* 2003).

Algumas tendências relacionadas às variações fenológicas puderam ser observadas entre alguns dos compostos majoritários identificados nas estruturas vegetativas (Figura 11A e 11B). Embora não tenha sido detectado como componente majoritário em nenhum dos óleos de *B. segetum* o hidrocarboneto sesquiterpênico  $\delta$ -cadineno esteve presente em baixas proporções em todos eles e apresentou variações semelhantes entre ramos e folhas no decorrer das fases fenológicas. Outro sesquiterpeno do tipo cadinano o  $\alpha$ -cadinol, majoritário para as folhas de ambas as populações, apresentou diminuição semelhante em seus teores nos óleos de folhas e variações diferentes entre os ramos das duas populações, embora, nestes, apareça apenas em baixas concentrações. O biciclogermacreno apresentou variações inversas entre as populações para os óleos dos ramos, mas muito semelhante para aqueles obtidos das folhas, diminuindo seus teores na passagem da fase vegetativa para a floração e tornando a aumentar na frutificação. O germacreno D apresentou padrões parecidos para os ramos e folhas da população do PEFI. A diferença básica nas variações deste constituinte em comparação à população da RBEE foi que enquanto seus teores aumentaram da fase de floração para a de frutificação, observou-se uma forte queda no seu teor em ambos os óleos provenientes do PEFI. Esta diminuição pode ter ocorrido, talvez, pela mobilização desse constituinte como intermediário biogénico de outros componente em resposta a predação sofrida por essas plantas e/ou diferenças climáticas do período, como mencionado anteriormente. O E-cariofileno é um dos constituintes principais dos ramos de ambas as populações e mostrou variação análoga nas estruturas vegetativas. Por sua vez, outro constituinte majoritário dos ramos, o hidrocarboneto sesquiterpênico  $\beta$ -elemeno, não apresentou similaridade em seus teores ao longo das fases fenológicas. Entre os hidrocarbonetos monoterpênicos detectados está o E- $\beta$ -ocimeno, que embora não seja um componente majoritário

nos óleos obtidos das estruturas vegetativas, esteve presente na composição dos óleos de todas as estruturas, sendo um dos constituintes principais capítulos e cipselas da população de RBEE. Este pode estar relacionado com a reprodução, pois semelhante ao observado neste estudo, em *Psiadia boivinii* este composto é ausente na fase vegetativa e compõe 10% do óleo volátil das partes aéreas na fase de floração (Gauvin & Smadja 2005) e em *C. laevigata* esteve presente apenas nos óleos dos capítulos e cipselas (Murakami 2009). Por fim, o  $\beta$ -felandreno é um dos componentes principais de todos os óleos analisados com exceção daqueles obtidos das folhas e nos ramos demonstraram variações contrárias de seus teores entre as duas populações estudadas. Porém, pode-se observar, na população de RBEE, que no decorrer das fases fenológicas, seus teores decresceram nos ramos ao mesmo tempo em que se observou uma alta concentração nos capítulos e cipselas, sugerindo que talvez esse constituinte seja produzido por esses ramos e acumulados nos capítulos e cipselas.

De um modo geral, a composição química dos óleos voláteis obtidos de diferentes órgãos de *Bidens segetum*, analisados em relação a sua fenologia e local de ocorrência, mostrou alterações qualitativas e quantitativas significantes. Diferenças na composição química em função da localização geográfica foram relatadas para diversas espécies. As condições edafoclimáticas, a altitude e as interações intra-específicas diferem entre regiões geográficas distintas e é difícil determinar, em estudos de variabilidade intra-específica relacionada à variação geográfica, o grau de interferência dos fatores 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).

Tabela 4. Composição química dos óleos voláteis das diferentes partes de *Bidens segetum* coletadas no Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (RBEE) e na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) em diferentes fases fenológicas.

Composto	IK	Fase vegetativa				Fase de floração						Fase de Frutificação					
		Ramos		Folhas		Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas	
		PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE
$\alpha$ -tujeno	926												0,69				
$\alpha$ -pineno	933	2,10	2,20	0,56	0,69	1,50	1,29		0,94	2,61	7,49	2,16	1,16		0,55	6,78	9,08
canfeno	950								0,64		1,08						0,69
sabinene	973	1,75	1,83			2,25	0,99			6,72	3,05	1,69	1,36			6,75	3,86
$\beta$ -pineno	977									0,95	1,04		0,56			0,66	0,63
mirreno	991	6,48	1,39	0,58		2,37	0,98			1,76	3,87	3,44	1,73			7,32	3,67
p-menta-1(7),8-dieno	1002	0,88	1,35			0,81	0,62			0,89	1,31	1,1				2,92	1,73
$\alpha$ -felandreno	1005	1,5	2,51			3,41	7,94				2,27	4,71	6,29		0,53		2,32
$\delta$ -3-careno	1007	3,9				2,11						5,33					
p-cimeno	1025	3,73	6,44		0,69	2,44	4,65		0,58		1,22	2,39	3,27			1,21	1,66
$\beta$ -felandreno	1032	18,25	27,68	1,24	2,29	18,82	22,79	0,83	2,11	18,36	45,67	23,66	16,56	1,1	1,29	47,87	50,93
Z- $\beta$ -ocimeno	1038										1,27					0,75	1,44
E- $\beta$ -ocimeno	1048	1,6	1,41	3,99	3,67	2,07	1,81	2,28	1,77	2,23	5,07	2,22	1,45	2,42	2,08	3,76	5,21
$\gamma$ -terpineno	1058									0,83							
4-terpineol	1176	0,55					0,78				1,3		0,66				1,22
criptona	1185																1,54
bicicloelemeno	1327	0,72	1,11	0,96	0,56	1,21		1,81	0,53	1,05		1,16	0,91	1,7	0,62		
$\delta$ -elemeno	1331			0,58													
7-epi-silfiperfol-5-eno	1339													0,74			
$\alpha$ -cubebeno	1343									0,54							
silfiperfol-6-eno	1369			1,88		2,06		6,15		2,79		3,03		5,46			
$\beta$ -cubebeno	1383	1,44	2,52			1,11	1,27			3,12	1,31	0,59	1,27			1,76	1,01
$\beta$ -elemeno	1385	5,09	0,96	3,14	3,65	5,08	5,95	2,89	3,28	1,88	1,13	2,32	5	3,01	2,56		0,58
E-cariofileno	1412	8,57	6,24	3,06	2,80	7,73	5,75	2,99	2,80	3,70	2,14	8,87	7,25	3,31	2,88	2,59	2,17
$\beta$ -copaeno	1420				0,58											0,61	
$\beta$ -gurjuneno	1421			0,55				0,57					0,64				
$\alpha$ -humuleno	1443	1,28	1,04	0,67	0,61	1,22	0,89	0,82	0,65	0,80		1,40	1,11	0,85	0,68		

continua...

Composto	IK	Fase vegetativa				Fase de floração						Fase de Frutificação					
		Ramos		Folhas		Ramos		Folhas		Capitulos		Ramos		Folhas		Cipselas	
		PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE
allo-aromadendreno	1446																0,76
$\gamma$ -muuroleno	1462				0,87				0,70								
germacreno D	1467	20,15	12,80	49,97	45,19	27,15	22,96	52,07	44,61	31,65	16,44	16,60	23,66	49,72	53,18	8,84	11,63
$\beta$ -selineno	1472	1,34								0,55			1,07				
$\gamma$ -amorfenol	1474		0,81		1,20												0,62
$\alpha$ -E- $\beta$ -bergamoteno	1476	1,82															
biciclogermacreno	1478	10,12	18,56	9,37	9,09	10,84	12,49	7,04	8,75	5,87	2,63	8,83	13,54	8,75	10,57	1,35	
$\alpha$ -muuroleno	1480			0,82	0,98			0,61	0,81					0,59			
$\beta$ -cadineno	1484				0,56												
E-E- $\alpha$ -farneseno	1486	0,72		0,62	0,55		0,74	0,63	0,67				0,58	0,68	0,68		
cameroonan-7- $\alpha$ -ol	1493			0,61		0,88		2,14		1,29		1,61		2,09			
$\gamma$ -cadineno	1491				0,66				0,61				0,64		0,77		
$\delta$ -cadineno	1496	1,54	1,97	3,48	3,62	0,96	1,98	2,57	3,30	2,54	1,51	0,97	2,18	2,51	3,35	0,95	0,92
silfiperfolan-7- $\beta$ -ol	1499							0,68						0,68			
silfiperfolan-6- $\beta$ -ol	1530							0,55						0,53			
germacreno B	1541							0,57		0,60			1,02	1,78	0,55	0,57	
E-nerolidol	1548			2,26	1,75			1,52	1,85						1,39		
espatulenol	1563	0,77	1,52	0,80	0,88	1,25	1,14	0,95	3,01	0,74	0,84	1,16	1,45	1,46	1,79	1,21	
prenopsan-8-ol	1566							1,05			0,65			0,98			
óxido de cariofileno	1569	0,59										1,28					
globulol	1573	0,85	1,44	0,62	1,33	0,63	0,78		0,88			0,88	1,02		0,65		
presilfiperfolan-8-ol	1580			0,54		1,32		2,32		0,93		1,03		2,15			
viridiflorol	1582	0,55	0,75		1,00				0,52				0,80				
rosifoliol	1597	0,59	0,82									0,61	0,62				
NI 1	1598			0,59	0,95				0,86						0,65	0,67	
junenol	1612			0,82	1,13			0,66	0,79					0,63	0,62		
1-epi-cubenol	1619		0,57	0,54	0,85				0,64	0,76			0,57				
isoespatulenol	1624	1,00	1,45			0,66	0,71					0,88	1,02				
NI 2	1626			0,78	1,04			0,75	1,58					1,04	1,13		
NI 3	1630								0,75								
epi- $\alpha$ -cadinol	1635		0,89	1,73	2,39			1,02	2,20	0,61				0,98	1,59		

continua...

Composto	IK	Fase vegetativa				Fase de floração						Fase de Frutificação					
		Ramos		Folhas		Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas	
		PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE
epi- $\alpha$ -muurolol	1636			1,99	2,40	0,60	0,56	1,36	2,23				0,60	1,33	1,72		
$\alpha$ -muurolol	1639			0,80	1,06				0,87					4,01	0,62		
$\alpha$ -cadinol	1647	1,49	1,14	5,58	6,43	1,54	1,79	4,00	6,66			1,40	1,99		5,12	0,69	0,63
selin-11-en-4- $\alpha$ -ol	1650	0,66															
bulnesol	1657			0,85	0,54				0,63					0,84			
nor-copaanona	1660								1,91								
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1676									3,01						1,31	
shyobunol	1684								1,85						1,80		
n-pentadecanal	1705		0,61														
benzoato de benzila	1730									0,88							
fitol	2101							0,54	0,65						0,65		
n-tricosano	2154									1,00							
<b>Monoterpenos</b>																	
Hidrocarbonetos (%)		40,19	44,81	6,37	7,34	35,78	41,07	3,11	6,04	34,35	73,34	46,7	33,07	3,52	4,45	78,02	81,22
Oxigenados (%)		0,55	0	0	0	0	0,78	0	0	1,3	0	0,66	0	0	0	1,22	0
<b>Sesquiterpenos</b>																	
Hidrocarbonetos (%)		52,79	46,01	75,10	70,92	57,36	53,17	78,15	66,71	54,49	25,16	43,77	57,85	77,32	77,28	15,49	18,16
Oxigenados (%)		6,50	8,58	17,14	19,76	6,88	4,98	17,45	21,50	7,94	1,49	8,85	9,09	17,46	15,85	3,78	0,63
Outros (%)		0,00	0,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,54	2,56	1,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,65	1,54	0,00
Não identificados (%)		0,00	0,00	1,37	1,99	0,00	0,00	0,75	3,19	0,00	0,00	0,00	0,00	1,69	1,80	0,00	0,00
<b>Total de componentes agrupados (%)</b>		100,03	100,01	99,98	100,01	100,02	100,00	100,00	100,00	99,96	99,99	99,98	100,01	99,99	100,03	100,05	100,01

Legenda: IK = índice de retenção de Kováts calculado; IK ref = índice de retenção, encontrados na literatura. Em negrito os componentes majoritários e seus teores. NI 1: [m/z (rel int.): 149(100) 93(50) 91(44) 121(43) 79(38)]; NI 2: [m/z (rel int.): 91(100) 147(82) 175(75) 105(74) 133(58)]; NI 3: [m/z (rel int.): 80(100) 91(90) 79(84) 81(83) 123(74)].

## CLASSES DOS COMPOSTOS

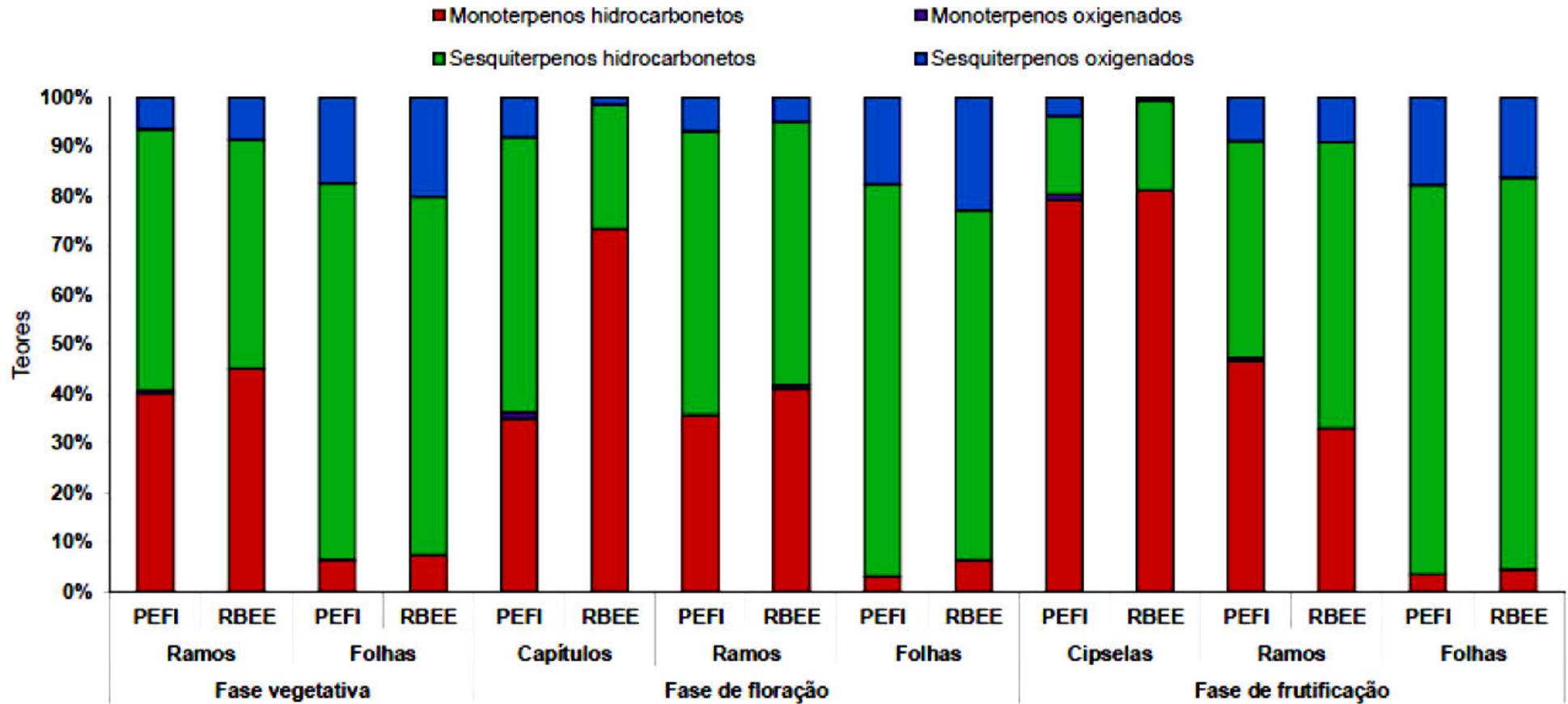


Figura 8. Teores de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados presentes nos óleos voláteis das diferentes partes de *Bidens segetum* coletadas no Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental (RBEE) de Mogi Guaçu e na Mata Atlântica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em diferentes fases fenológicas.

## PRINCIPAIS CONSTITUINTES

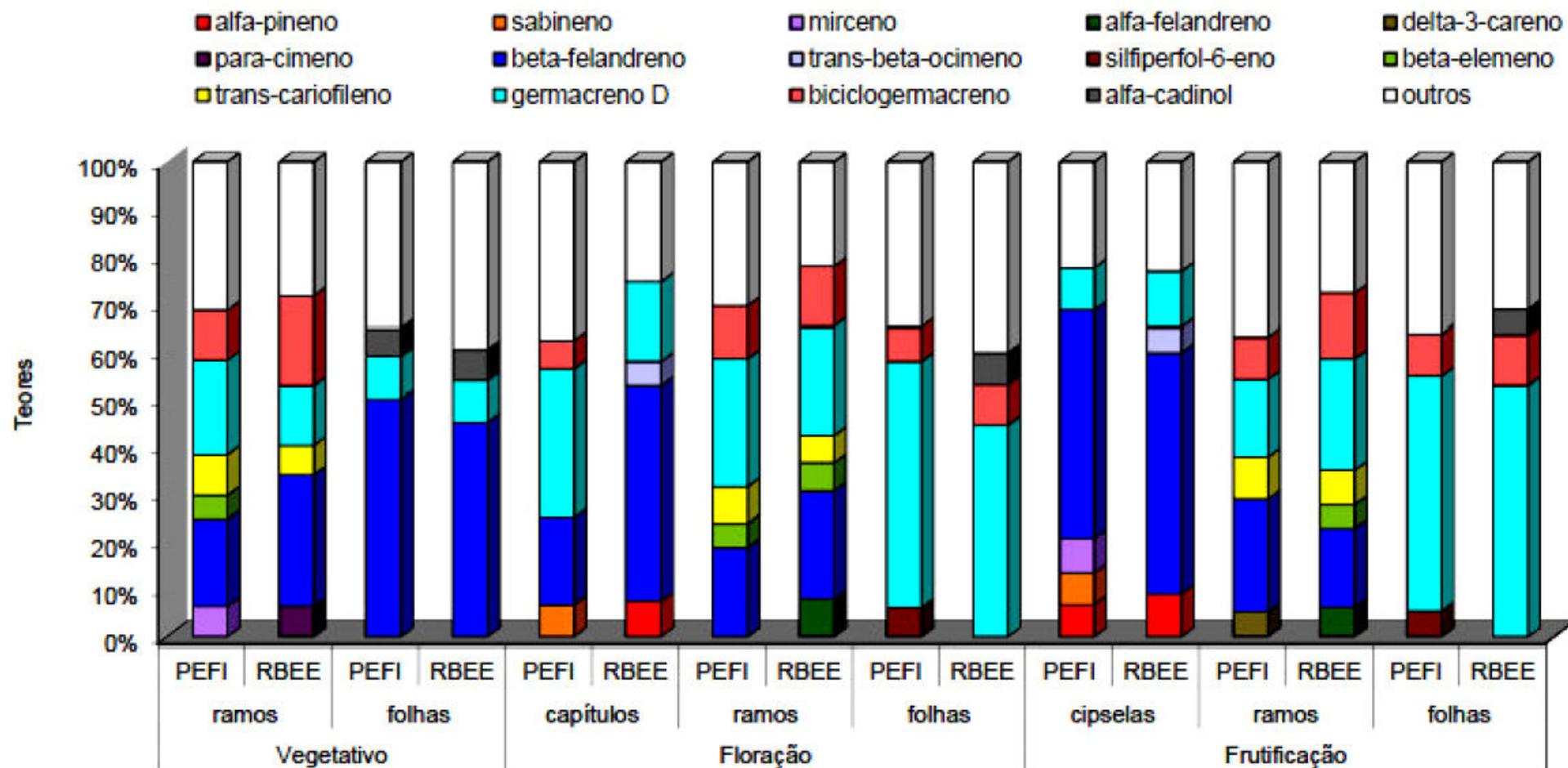


Figura 9. Componentes com picos acima de 5% de área presentes nos óleos voláteis das diferentes partes de *Bidens segetum* coletadas no Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental (RBEE) de Mogi Guaçu e na Mata Atlântica do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga em diferentes fases fenológicas.

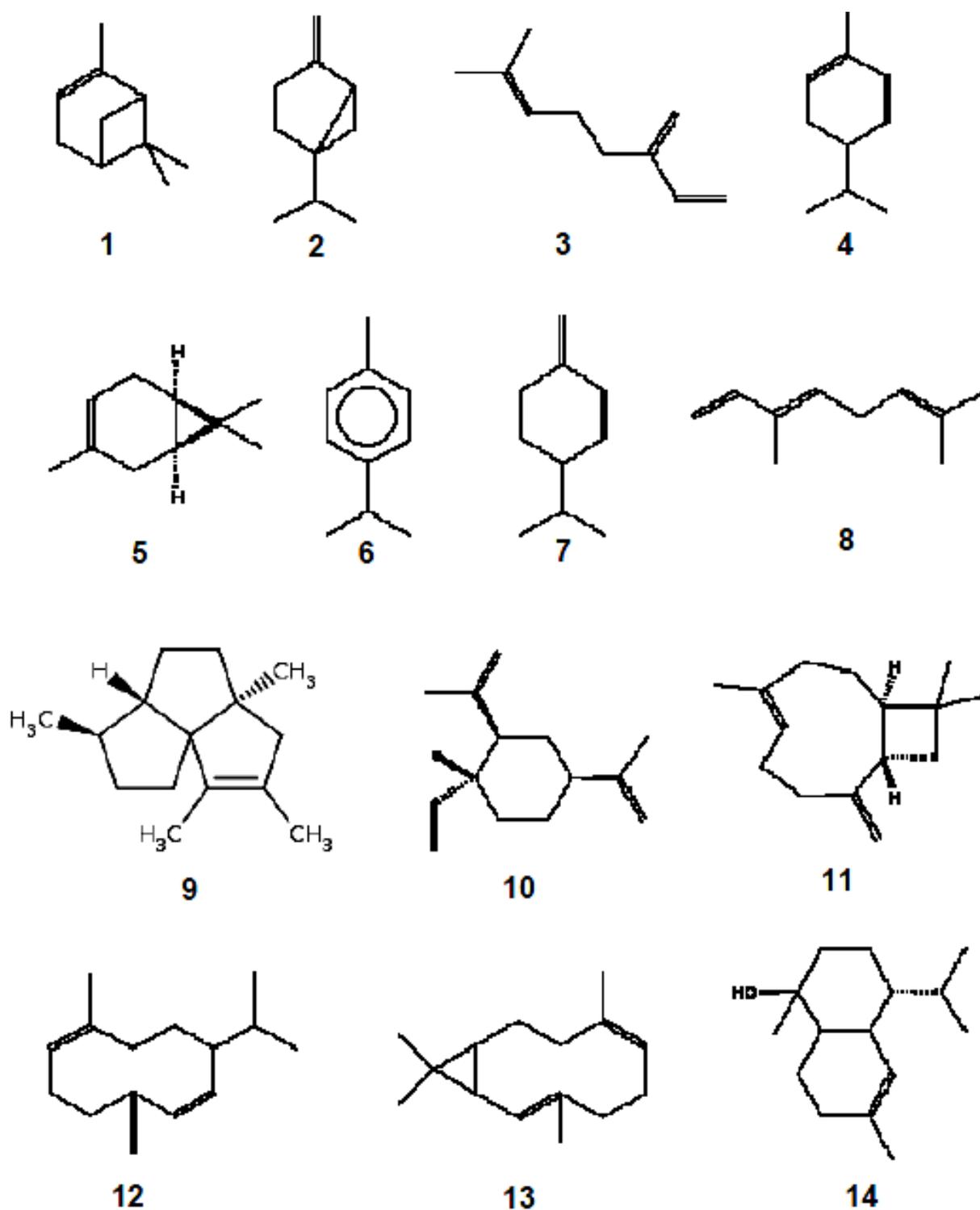


Figura 10. Estruturas químicas dos Componentes com picos acima de 5% de área presentes nos óleos voláteis de *Bidens segetum*. (1)  $\alpha$ -pineno, (2) sabineno, (3) mirceno, (4)  $\alpha$ -felandreno, (5)  $\delta$ -3-careno, (6) p-cimeno, (7)  $\beta$ -felandreno, (8) E- $\beta$ -ocimeno, (9) silfiperfol-6-eno, (10)  $\beta$ -elemeno, (11) E-cariofileno, (12) germacreno D, (13) biciclogermacreno, (14)  $\alpha$ -cadinol.

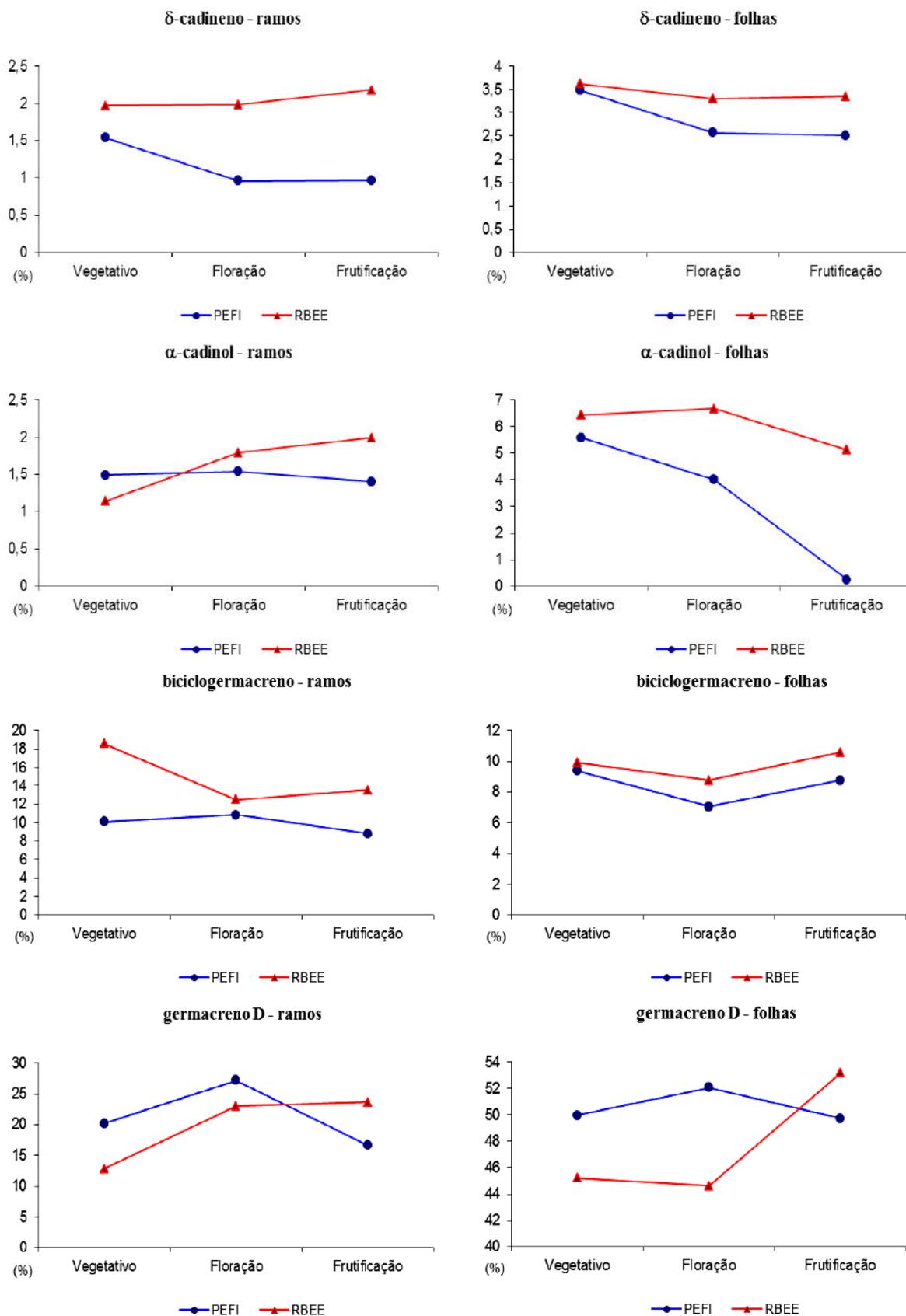


Figura 11A. Tendências fenológicas dos constituintes majoritários do óleo volátil de folhas e ramos de *Bidens segetum* ( $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -cadinol, bicylogermacreno e germacreno D).

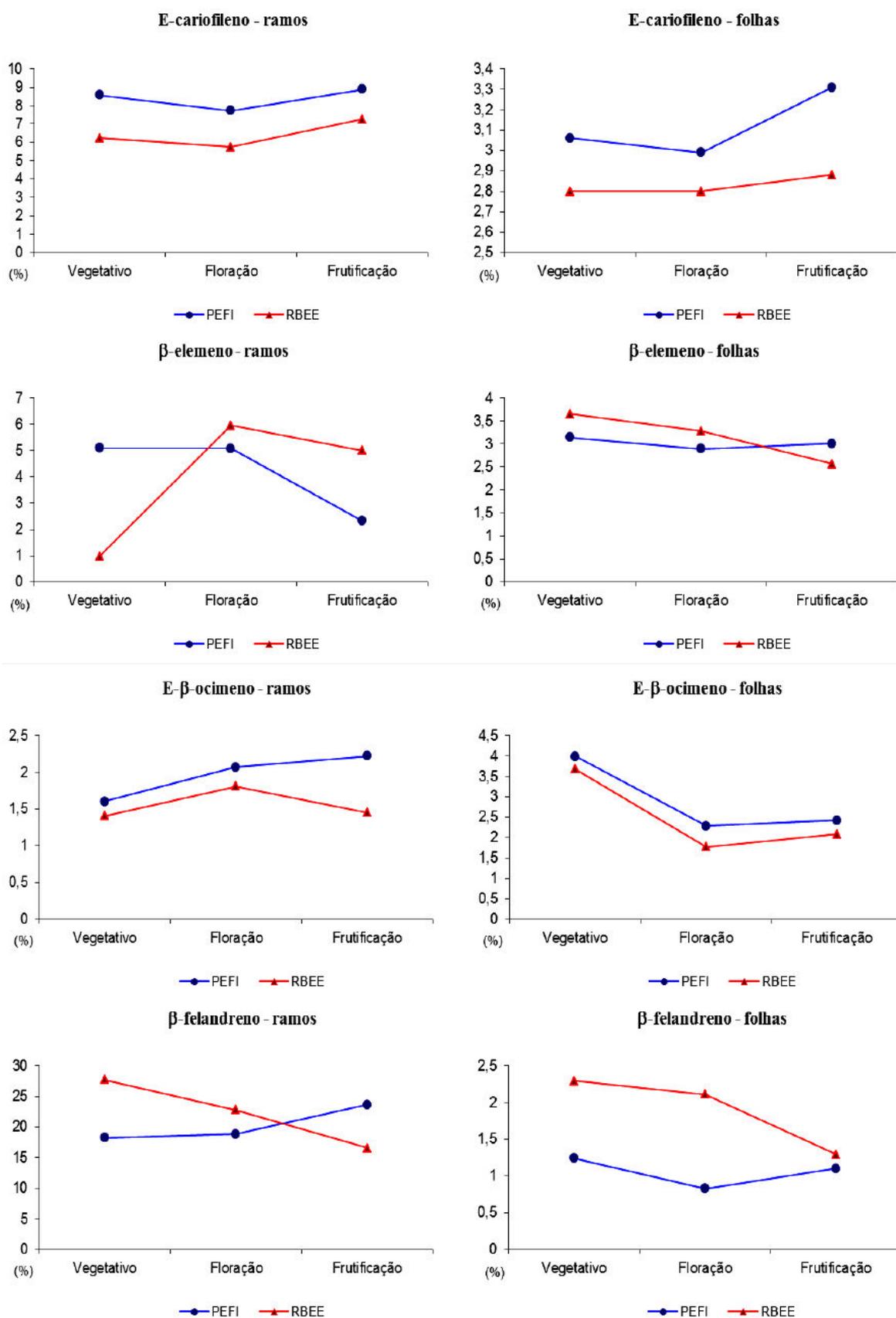


Figura 11B. Tendências fenológicas dos constituintes majoritários do óleo volátil de folhas e ramos de *Bidens setigera* (E-cariofileno,  $\beta$ -elemeno, E- $\beta$ -ocimeno e  $\beta$ -felandreno).

Para comparação da composição química do aroma das flores de *Bidens segetum* em relação à de seus óleos extraídos por hidrodestilação, os concentrados dos óleos obtidos por microextração em fase sólida (SPME) foram dessorvidos diretamente na câmara do injetor do cromatógrafo a gás nas mesmas condições de corrida dos hidrodestilados. Os perfis cromatográficos são mostrados na Figura 12 e a composição química dos óleos e do aroma pode ser vista na Tabela 4. Ao todo foram detectados 49 constituintes com área de pico superior a 0,5%, sendo que: apenas dezesseis destes foram comuns ao aroma e aos óleos de ambas as populações estudadas; dezoito só foram detectados na composição dos hidrodestilados e; quinze se mostraram exclusivos à composição do aroma, embora em baixos teores. Mais especificamente o aroma apresentou 31 componentes (picos com área superior a 0,5%), número semelhante ao encontrado no óleo volátil da população do PEFI (29 constituintes; 14 em comum) e significativamente superior à quantidade detectada no óleo obtido da população da RBEE, que apresentou dezenove constituintes, porém com doze destes sendo comum também aos encontrados no aroma.

As principais classes de componentes observadas no aroma foram os hidrocarbonetos monoterpênicos (61,5%) e os sesquiterpênicos (31,5%), com os compostos oxigenados ocorrendo em proporções reduzidas. Considerando os constituintes com picos acima de 5% de área como componentes majoritários o hidrocarboneto monoterpênico  $\beta$ -felandreno foi o componente majoritário (38,4%), seguido por E- $\beta$ -ocimeno (10,4%), germacreno D (8,17%) e  $\delta$ -cadineno (5,01%), este último aparecendo como componente comum a todas as amostras de óleos obtidos, porém se apresentando como constituinte principal apenas no aroma. Observou-se também uma proporção aumentada de E- $\beta$ -ocimeno em relação a sua ocorrência nos hidrodestilados, corroborando com a hipótese deste estar relacionado com a função de reprodução da planta (Gauvin & Smadja 2005; Murakami 2009). Outro hidrocarboneto monoterpênico, comum tanto para os hidrodestilados quanto para o aroma, que mostrou percentagem aumentada neste último, porém não ultrapassando os 5% de área de pico, foi o mirceno que é

reconhecido na literatura como inseticida ou repelente de insetos, podendo conferir proteção contra herbivoria aos capítulos sem, no entanto, interferir na atração de polinizadores (Viegas Junior 2003).

Além desses, de um modo geral, também se destacam os constituintes que ocorreram exclusivamente na composição do aroma: eugenol, metil cinamato,  $\gamma$ -elemeno, aromadendreno, viridifloreno, E-cadina-1,4-dieno,  $\alpha$ -cadineno, selina-3,7(11)-dieno e 3Z-benzoato de hexenila que embora ocorram em teores mínimos podem desempenhar um papel relevante na interação inseto-planta como no caso das antenas de *Melanophila acuminata* que detecta derivados de guaiacol em concentrações tão baixas quanto algumas partes por bilhão (Schütz *et al.* 1999). A explicação para a presença ou ausência de constituintes pode não ser tão simples, componentes como o  $\alpha$ -tujeno quando submetido a meio aquoso acidificado pelas altas temperaturas da hidrodestilação, pode transformar-se em  $\gamma$ -terpineno e 4-terpineol. Da mesma forma, hidrocarbonetos sesquiterpênicos também podem sofrer diversos rearranjos por causas térmicas, fotoquímicas ou catalisadas por baixos pHs (Schossler *et al.* 2009).

Os componentes que se apresentaram como majoritários estiveram sempre presentes nos óleos e no aroma, apenas variando quantitativamente. Essa variação apenas quantitativa entre o majoritários também foi observada com o linalol extraído de folhas e galhos de *Aniba roseodora*, que apesar de constante no produto obtido por hidrodestilação, apresentou variação sazonal em seus teores quando extraído por SPME, fato semelhante ao ocorrido em outros estudos e que levaram os autores a indicar essa técnica de extração como alternativa mais prática para detecção de quimiotipos ou em triagens de compostos de interesses abundantes em matrizes mais complexas (Couto *et al.* 2003, Siqueira *et al.* 2007, Sabino *et al.* 2012).

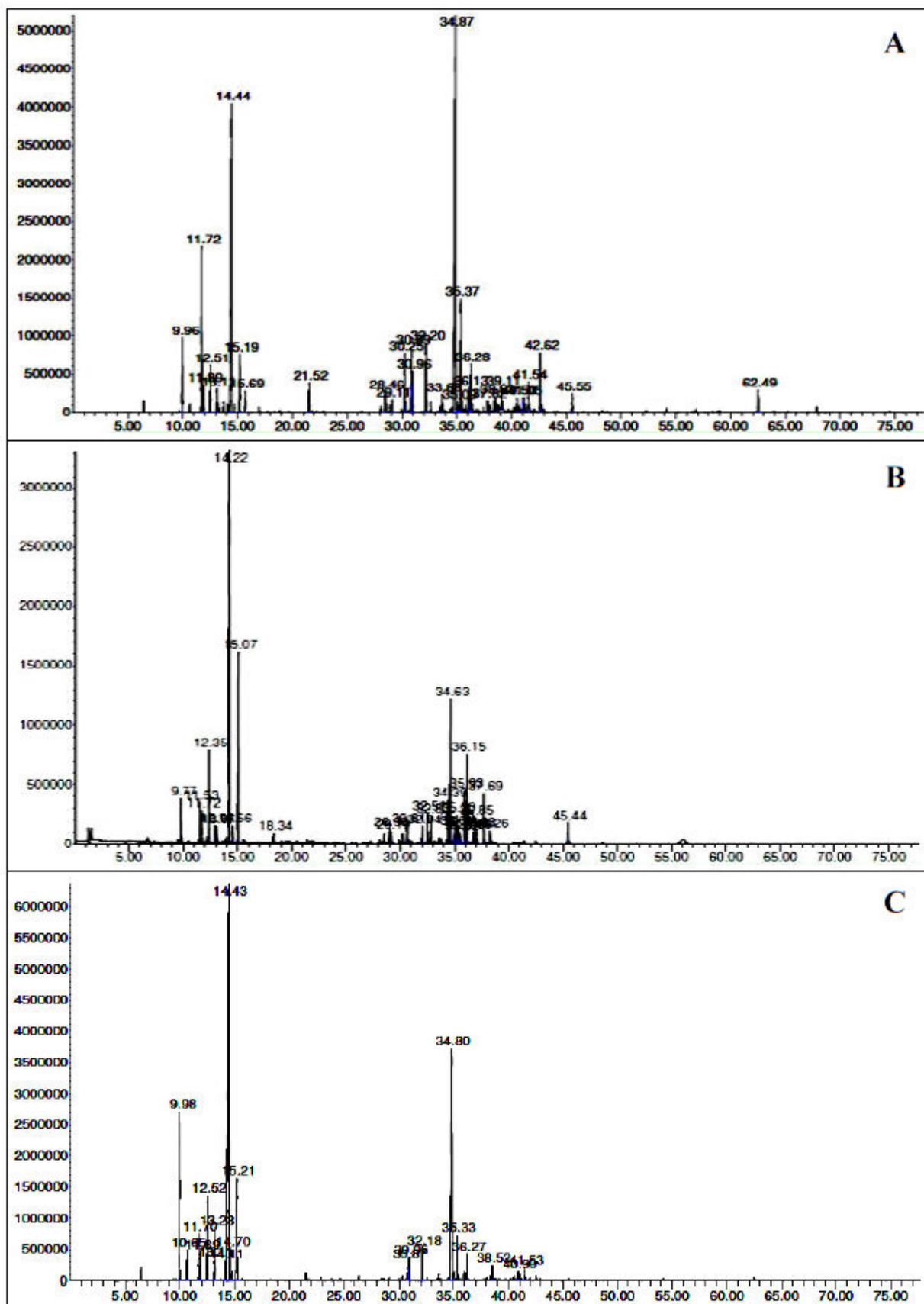


Figura 12. Perfis cromatográficos dos óleos voláteis extraídos por hidrodestilação (A= PEFI e C= RBEE) e do aroma obtido por microextração em fase sólida – SPME (B= PEFI).

Tabela 5. Composição química dos óleos voláteis extraídos por hidrodestilação dos capítulos *Bidens segetum* coletados no Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu (RBEE) e na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) e do aroma obtido por microextração em fase sólida – SPME (PEFI).

Composto	IK	PEFI		RBEE
		óleo	aroma	óleo
$\alpha$ -pineno	933	2,61	1,79	7,49
canfeno	950			1,08
sabinene	973	6,72	1,78	3,05
$\beta$ -pineno	977	0,95	1,62	1,04
mirreno	991	1,76	4,71	3,87
p-menta-1(7),8-dieno	1002	0,89	0,85	1,31
$\alpha$ -felandreno	1005		1,13	2,27
p-cimeno	1025			1,22
$\beta$ -felandreno	1032	18,36	38,41	45,67
Z- $\beta$ -ocimeno	1038		0,86	1,27
E- $\beta$ -ocimeno	1048	2,23	10,4	5,07
$\gamma$ -terpineno	1058	0,83		
NI 1	1108		0,58	
4-terpineol	1176	1,3		
bicicloelemeno	1327	1,05		
$\alpha$ -cubebeno	1343	0,54	0,72	
eugenol	1345		0,6	
silfiperfol-6-eno	1369	2,79		
metil cinamato	1377		0,96	
$\beta$ -cubebeno	1383	3,12		1,31
$\beta$ -elemeno	1385	1,88		1,13
E-cariofileno	1412	3,70	1,07	2,14
$\gamma$ -elemeno	1418		1,67	
aromadendreno	1425		1,49	
$\alpha$ -humuleno	1443	0,80		
$\gamma$ -muuroloeno	1462		2,54	
germacreno D	1467	31,65	8,17	16,44
viridiflorene	1471		1,10	
$\beta$ -selineno	1472	0,55		
$\gamma$ -amorfo	1474		1,11	
biciclogermacreno	1478	5,87	1,61	2,63
$\alpha$ -muuroloeno	1480		0,81	
$\beta$ -cadineno	1484		0,57	
cameroonan-7- $\alpha$ -ol	1493	1,29		
$\gamma$ -cadineno	1491		2,83	
$\delta$ -cadineno	1496	2,54	5,01	1,51
E-Cadina-1,4-dieno	1506		0,55	
$\alpha$ -cadineno	1511		1,45	
Selina-3,7(11)-dieno	1517		0,77	
germacreno B	1541	0,60	2,82	
3Z-benzoato de hexenila	1554		0,61	
espatulenol	1563	0,74		0,84
prenopsan-8-ol	1566			0,65
presilfiperfolan-8-ol	1580	0,93		

continua...

Composto	IK	PEFI		RBEE
		óleo	aroma	óleo
1-epi-cubenol	1619	0,76		
epi- $\alpha$ -cadinol	1635	0,61		
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol	1676	3,01		
benzoato de benzila	1730	0,88	1,42	
n-tricosano	2154	1,00		
<b>Monoterpenos</b>				
Hidrocarbonetos (%)		34,35	61,55	73,34
Oxigenados (%)		1,30	1,56	0,00
<b>Sesquiterpenos</b>				
Hidrocarbonetos (%)		54,49	31,47	25,16
Oxigenados (%)		7,94	2,82	1,49
Outros (%)		1,88	2,03	0,00
Não identificados (%)		0,00	0,58	0,00
<b>Total de componentes agrupados (%)</b>		99,96	100,01	99,99

Legenda: IK = índice de retenção de Kovátz calculado. Em negrito os componentes principais e seus teores. NI 1: [m/z (rel int.): 71(100) 43(84) 81(68) 67(61) 79(47)].

Aproveitando uma parcela das raízes, secas a sombra, coletadas para a triagem das atividades biológicas proposta para os componentes fixos de *B. segetum*, promoveu-se a extração de seus óleos voláteis por hidrodestilação e sua composição química pode ser observada na Tabela 6. O rendimento do óleo volátil obtido não apresentou variação significativa entre as fases fenológicas e foi sempre muito baixo (0,03% para a fase vegetativa e 0,02% para as fases de floração e frutificação). Quanto à composição química, esses óleos se mostraram bastantes diferentes quando comparados aos extraídos das partes aéreas. Caracterizando-se, principalmente, pela grande proporção de alcoóis e ácidos graxos, seguido por sesquiterpenos oxigenados, com as outras classes de constituintes normalmente encontradas nos óleos voláteis de plantas representadas por percentagens muito baixas. Ao todo foram detectados 33 constituintes com área de picos superior a 0,5%, sendo que: vinte e dois destes foram comuns nas fases vegetativas e de reprodução; apenas quatro se mostraram restritos a fase vegetativa, todos em baixas proporções; e sete foram exclusivos a fase reprodutiva, com o acetato de

isoeugenol apresentando percentagens relativamente altos no período. De fato, o principal constituinte dos óleos voláteis das raízes foi o álcool graxo 9,12-octadecadieno-1-ol, independente da fase fenológica. Os outros constituintes com picos de área superior a 5%, considerados majoritários, foram: óxido de cariofileno, único constituinte majoritário da classe dos sesquiterpenos, n-hexadecanol, ácido palmítico, 9,12,15-octadecatrieno-1-ol, ácido linoleico, 9,12,15, ácido octadecatrienóico e um componente não identificado, presente nos três óleos e majoritário nas fases reprodutivas. De forma geral, esses óleos não apresentaram grandes variações qualitativas em função da fenologia, apenas variações quantitativas com alguns dos constituintes principais aparecendo em altas concentrações em fases específicas, como é o caso do ácido palmítico e do 9,12,15-ácido octadecatrienóico que aparecem como majoritários apenas na fase vegetativa e do composto não identificado (NI 1) que se mostrou como componente principal apenas na fase reprodutiva.

Alguns dos constituintes presentes nos óleos obtidos das raízes de *B. segetum* também foram encontrados nos produtos da hidrodestilação de rizomas nas espécies do gênero *Curcuma* e da espécie *Rheum palmatum*, entre eles: ácido palmítico, ácido pentadecanóico, ar-curcumeno, xatorrizol, acetato de bornila, óxido de cariofileno e o linalol (Zwaving & Bos 1992, Miyazawa, Minamino & Kameoka 1996).

Tabela 6. Composição química dos óleos voláteis das raízes de *Bidens segetum* coletadas na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) em diferentes fases fenológicas.

Composto	IK	Fase Fenológica		
		Vegetativa	Floração	Frutificação
linalol	1098	0,9		
acetato de bornila	1282			0,83
E-cariofileno	1412	0,68	0,97	0,71
geranil acetona	1447	0,63	0,72	1,17
ar-curcumeno	1476			0,76
E-nerolidol	1548	1,66	1,24	1,86
espatulenol	1563	2,30	1,18	0,73
óxido de cariofileno	1569	5,04	5,21	3,75
widdrol	1602	0,91	0,9	0,94
junenol	1612	0,76		0,96
fluoreno	1629		0,73	
caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 $\alpha$ -ol	1631	0,66		
acetato de isoeugenol	1648		2,05	4,71
ácido butírico, undecil ester	1656	1,89	2,81	4,33
caryophylla-3,8(13)-dien-5.beta.-ol	1666	1,85	0,83	0,64
xantorrizol	1723		0,58	1,39
n-pentadecanol	1760		0,56	
hexadecanal	1808	0,81		1,32
ácido pentadecanóico	1860	0,58		
n-hexadecanol	1881	5,07	5,37	7,58
Z-9-ácido hexadecanóico	1955	0,54		1,05
ácido palmítico	1971	13,46	9,33	6,09
Z-9,17-octadecadienal	1984	2,30	1,27	2,51
9,12,15-Octadecatrienal	2066	0,56		
NI 1	2078	3,56	5,02	5,80
9,12-Octadecadien-1-ol	2087	26,80	34,16	30,67
9,12,15-Octadecatrien-1-ol	2088	10,98	15,89	10,39
ácido linoleico	2110	8,46	3,62	1,80
9,12,15-ácido octadecatrienóico	2111	5,02	1,38	0,65
ácido butírico, hexadecil ester	2112		1,13	2,39
Z-6,17-Octadecadien-1-ol acetato	2121	0,78	0,89	1,68
2-Z,Z-9,12-Octadecadieniloxietanol	2156	3,23	2,62	4,57
linolenato de etila	2156	0,59	0,62	0,72

Legenda: IK = índice de retenção de Kovátz calculado; IK ref = índice de retenção, encontrados na literatura. Em negrito os componentes principais e seus teores. NI 1: [m/z (rel int.): 180(100) 43(80) 162(65) 250(34) 131(33)].

Os limites de detecção dos óleos voláteis de *B. segetum* testados contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum* revelaram potencial antifúngico, variando entre as populações, partes vegetais e fases fenológicas. Define-se por atividade forte a inibição total do crescimento do fungo, moderada a inibição parcial do desenvolvimento deste, e fraca quando há pouca alteração no desenvolvimento.

De acordo com a Tabela 7, o maior potencial inibidor contra ambos os fungos foi observado nos óleos voláteis extraídos a partir das raízes coletadas no período vegetativo (limite de detecção= 5 µg), sendo que essa inibição se mostrou moderada nas demais fases fenológicas. Entre as diferenças observadas em relação a composição química desses óleos, estão os maiores teores de ácido hexadecanóico, ácido linoleico e 9,12,15-ácido octadecatrienóico, e a ocorrência, exclusiva aos óleos da fase vegetativa, dos constituintes cariofila-4(12),8(13)-dieno-5 $\alpha$ -ol, ácido pentadecanóico, 9,12,15-octadecatrienal e do linalol, este último com atividade antifúngica já descrita na literatura (Bakkali *et al.* 2008), porém todos em concentrações bastante reduzidas.

Atividades relevantes também foram encontradas para os óleos dos capítulos e cipselas de ambas as populações frente aos dois fungos (limites de detecção= 10 µg para *C. sphaerospermum* e 25 µg para *C. cladosporioides*). Os óleos dos ramos, em geral, apresentaram atividades moderadas nas fases reprodutivas, com exceção daqueles obtidos dos ramos da RBEE na fase de frutificação. É oportuno observar que a composição desses óleos nessas fases reprodutivas se assemelhou aos extraídos dos capítulos e cipselas. Já na fase vegetativa, estes óleos foram praticamente inativos, só exibindo uma fraca inibição mesmo em altas concentrações (> 100 µg). Analisando a composição química dos óleos dos ramos, capítulos e cipselas, não foi possível atribuir essa atividade diferencial a nenhum de seus constituintes, sendo provavelmente fruto da interação entre estes. Estudos apontaram a classe dos monoterpenos, principalmente os oxigenados, como responsáveis por esse tipo de atividade biológica, o que pode explicar, em parte, esses resultados, todavia não explica a fraca inibição observada para os ramos na fase vegetativa (Tullio *et al.* 2006, Bakkali *et al.* 2008). Existe ainda

pouca informação sobre a atividade antifúngica de sesquiterpenos, contudo Chang *et al.* 2008 apontou para uma forte atividade dos sesquiterpenos epi- $\alpha$ -muurolol e  $\alpha$ -cadinol, isolados do óleo volátil das folhas de *Calocedrus macrolepis*, no crescimento micelial de *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*, e Silva *et al.* 2006 atribuiu ao biciclogermacreno e ao germacreno B as atividades antifúngicas frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum* observadas para os extratos e frações de *Cissus verticillata*. Estes sesquiterpenos também foram encontrados em teores diversos nos óleos das partes aéreas de *B. segetum*, porém com percentagens superiores naqueles obtidos das folhas, que em geral não apresentaram atividades antifúngicas relevantes.

A atividade inibidora da ação da enzima acetilcolinesterase dos óleos voláteis obtidos das diferentes partes de *B. segetum* foi, primeiro, triada em CCDA. Nessa técnica a formação de halos claros indica que a reação da acetilcolinesterase com o acetato de 1-naftila foi inibida, não havendo assim a formação do  $\alpha$ -naftol, que reagiria com o sal FAST BLUE B para formar o complexo diazo de coloração roxa, indicando assim a inibição da atividade enzimática (Marston *et al.* 2002), porém essa técnica não se mostrou viável para os óleos voláteis de *B. segetum* porque houve a formação de halos alaranjados, provavelmente devido a reação dos componentes do óleo com aqueles utilizados pela técnica, mascarando os resultados. Desta forma, optou-se por utilizar o ensaio em microplaca pelo método colorimétrico de Ellman (Ellman *et al.* 1961) modificado por Rhee *et al.* (2001). Alíquotas de 200  $\mu\text{g/ml}$  dos óleos foram testadas em triplicatas e aquelas que atingiram valores de inibição igual ou superior a 50% foram selecionadas para o ensaio quantitativo para a determinação da curva de inibição e da  $\text{IC}_{50}$ . Nas análises quantitativas a formação de coloração clara nos poços da microplaca indica que não houve hidrólise da acetiltiocolina pela acetilcolinesterase, não ocorrendo à formação de tiocolina livre que reage com DTNB para formar 5-tio-2-nitrobenzoato (de coloração amarela) e 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina, indicando que houve inibição da atividade enzimática (Rhee *et al.* 2001, Trevisan *et al.* 2003).

Tabela 7. Limite de detecção da atividade antifúngica dos óleos voláteis de raízes, folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Bidens segetum* provenientes da população de ocorrência natural no Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (RBEE) e da população mantida em canteiros na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI) em diferentes fases fenológicas, pelo método de bioautografia direta contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

		Fase vegetativa						Fase de floração						Fase de Frutificação									
		Raízes		Ramos		Folhas		Raízes		Ramos		Folhas		Capítulos		Raízes		Ramos		Folhas		Cipselas	
		PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE	PEFI	RBEE
<b><i>C. cladosporioides</i></b>																							
200	µg	***	*	*	**	**	***	***	***	**	**	***	***	***	***	**	**	**	***	***			
100	µg	***	*	*	*	*	***	***	***	*	**	***	***	***	***	**	*	*	***	***			
50	µg	***	i	i	i	*	**	**	**	*	*	***	**	**	**	*	i	*	*	***			
25	µg	***	i	i	i	i	*	*	*	i	i	**	*	*	*	i	i	i	*	*			
10	µg	**	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i			
5	µg	*	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i			
Controle		***																					
<b><i>C. sphaerospermum</i></b>																							
200	µg	***	i	*	*	*	***	***	***	*	**	***	***	***	***	*	*	*	***	***			
100	µg	***	i	i	i	i	***	***	***	i	*	***	***	***	***	i	i	i	***	***			
50	µg	***	i	i	i	i	**	***	**	i	i	***	***	**	***	i	i	i	**	***			
25	µg	***	i	i	i	i	i	*	*	i	i	*	**	i	*	i	i	i	*	**			
10	µg	**	i	i	i	i	i	i	i	i	i	*	*	i	i	i	i	i	i	i			
5	µg	*	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i			
Controle		***																					

Legenda: \*\*\*= atividade forte; \*\*= média; \*= fraca; i= inativo; controle= Nistatina (1,0 µg)

Os óleos que apresentaram atividade inibidora da acetilcolinesterase (IAChE) de forma dose/dependente (200 µg/ml até 3,12 µg/ml) até concentrações reduzidas foram: ramos na fase de frutificação (IAChE=  $8 \pm 1,4\%$  a  $96 \pm 0,5\%$  com  $IC_{50} = 22,6$  µg/ml), ramos da fase de floração (IAChE=  $1 \pm 0,9\%$  a  $89 \pm 0,8\%$  com  $IC_{50} = 43,8$  µg/ml), capítulos (IAChE=  $1 \pm 0,7\%$  a  $81 \pm 0,5\%$  com  $IC_{50} = 74,2$  µg/ml) cipselas (IAChE=  $1 \pm 1,1\%$  a  $71 \pm 1,2\%$  com  $IC_{50} = 93,4$  µg/ml), todos provenientes das plantas cultivadas no PEFI (Figura 13). Além destes, destacam-se aqueles que apresentaram inibição acima de 50% na triagem da atividade, porém com a curva dose/resposta irregular, como os óleos obtidos dos capítulos ( $89 \pm 0,8\%$ ), cipselas ( $92 \pm 0,4\%$ ) e dos ramos na fase de floração ( $84 \pm 0,3\%$ ) e de frutificação ( $54 \pm 2,7\%$ ), todos provenientes da população da RBEE. De maneira geral, os ramos na fase vegetativa das duas populações, as raízes do PEFI e as folhas de ambas as populações, nos três estádios fenológicos, não apresentaram atividade inibidora relevante, com exceção das folhas coletadas no período de frutificação ( $52 \pm 2,13\%$ ).

Registros na literatura apontam para os monoterpenos como os principais responsáveis pela atividade anticolinesterásica dos óleos voláteis de plantas, corroborando com o fato das maiores atividades terem sido observadas para os óleos voláteis de *B. segetum* que se apresentaram mais ricos nessa classe de compostos (Miyazawa *et al.* 1997, Barbosa Filho *et al.* 2006). Todavia as maiores atividades foram observadas para o óleo volátil dos ramos que apresentou apenas uma proporção intermediária entre monoterpenos e sesquiterpenos quando comparados às outras estruturas.

Embora os valores de inibição dos óleos voláteis sejam relativamente inferiores aos da fisostigmina usada como padrão, eles apresentam relevância por se tratar de óleos brutos constituídos por vários componentes dos quais é possível se isolar substâncias ou combinações de componentes com atividades mais potentes e de maior eficácia para serem testadas *in vitro* e *in vivo*. Estudos sugerem que os compostos voláteis de um óleo essencial interagem entre si de forma sinérgica ou antagônica, potencializando ou reduzindo o potencial de acordo com as

proporções dos compostos presentes. Seguindo essa linha, Savelev *et al.* (2003), em seu estudo com o óleo volátil de *Salvia lavandulaefolia* e seus compostos terpênicos isolados, demonstraram que as atividades anticolinesterásicas dos compostos majoritários testados isoladamente nas concentrações encontradas no óleo não foram tão fortes como a proporcionada pelo óleo bruto. Por isso, também é importante ressaltar aqueles compostos cuja ausência de atividade foi comprovada, o que pode auxiliar na compreensão das relações antagonísticas entre os compostos presentes nos óleos voláteis.

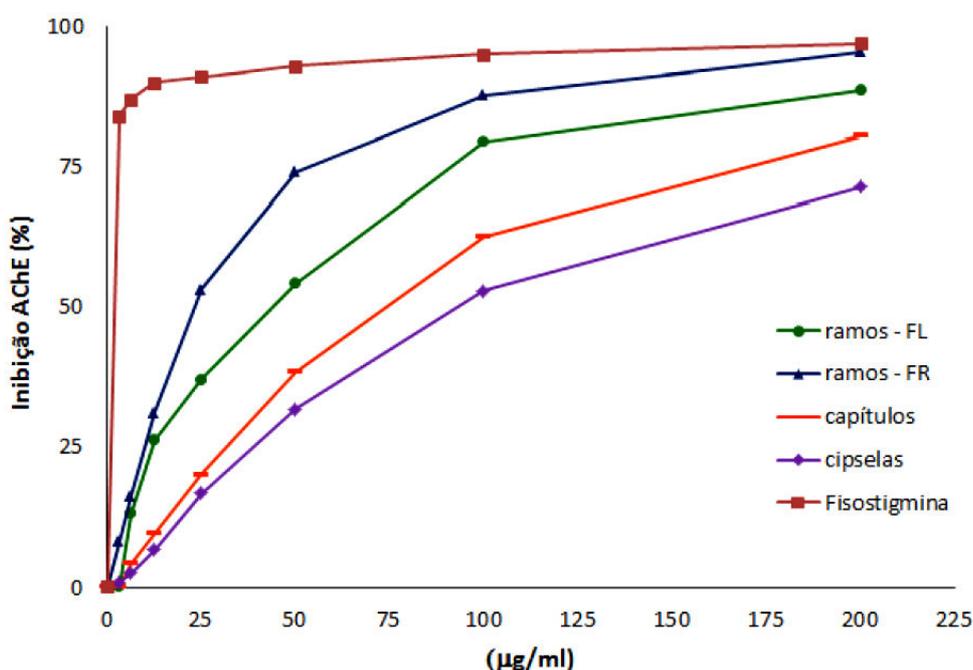


Figura 13: Avaliação quantitativa da atividade anticolinesterásica dos óleos voláteis obtidos dos ramos, capítulos e cipselas de *Bidens segetum* coletados a partir da população mantida em canteiros na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI). Ramos – FL = ramos coletados na fase de floração e ramos – FR = ramos coletados na fase de frutificação.

A atividade antioxidante dos óleos voláteis de *B. segetum* foi avaliada pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura, podendo ser observada por manchas claras nas cromatoplacas ou medidas as absorbâncias por um leitor espectroscópico. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do

antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (Duarte-Almeida *et al.* 2006). De maneira geral, os óleos apresentaram atividade sequestradora de radicais livres nos ensaios qualitativos de triagem, realizados em placa cromatográfica (Figura 14). Entretanto, na análise quantitativa nenhum deles ultrapassou os 50% de atividade.

São muitos os estudos sobre a atividade antioxidante dos óleos voláteis. Sacchetti *et al.* 2005 estudaram a composição química e a atividade antiradicalar de onze espécies vegetais e apenas cinco apresentaram resultados promissores sendo que as espécies ricas em monoterpenos eram quase ineficazes. Entre os componentes majoritários dos óleos voláteis de *B. segetum* o mirceno, o biciclogermacreno, o germacreno D e o E-cariofileno também foram encontrados como constituintes principais do óleo de *Eupatorium polystachyum* que apresentou atividade antioxidante, no entanto, o E-cariofileno também representa o principal componente do óleo de *Aniba panurensis* e *Licaria martiniana* que mostraram fraca atividade antioxidante, embora o autor aponte para a associação desse constituinte com compostos fenólicos que tem seu potencial antioxidante aumentado pela ação sinérgica (Souza *et al.* 2007; Alcântara *et al.* 2010).

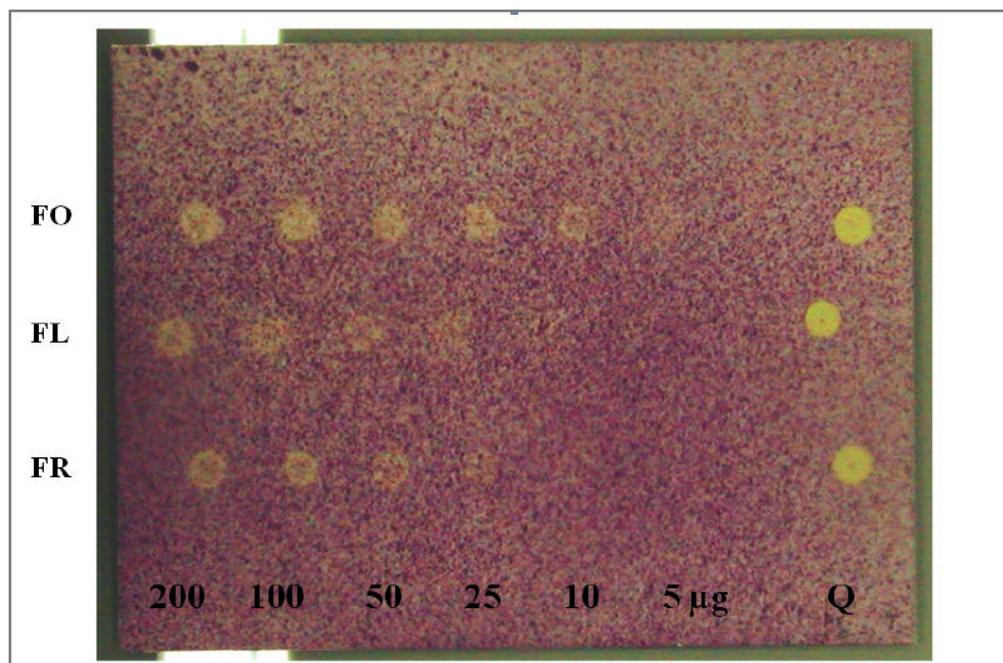


Figura 14. Limite de detecção da atividade antioxidante de óleos voláteis de *B. segetum*. FO = Folhas; FL = Flores; FR = Frutos e Q = Quercetina (padrão).

Parte do material vegetal coletado para o estudo dos óleos voláteis foi separada, seca à sombra, e utilizada para a triagem das atividades biológicas dos extratos etanólicos (EE) e de suas frações proposta pelo presente estudo. A Tabela 8 mostra o rendimento dos extratos obtidos após as extrações realizadas no Extrator Automático ASE (Accelerated Solvent Extraction) e secagem sob pressão reduzida em evaporador rotatório. De forma geral, o rendimento dos extratos das folhas foi superior para aqueles obtidos da população da RBEE quando comparado ao apresentado pela população do PEFI, sendo sempre maior na fase vegetativa e decrescendo com a evolução das fases fenológicas em ambas as populações. Esse decréscimo também foi observado para os extratos dos ramos das duas populações, porém nestes os maiores rendimentos ocorreram no material coletado da população do PEFI durante a floração, diminuindo nas fases subsequentes. De forma semelhante, as raízes também mostraram diminuição no rendimento de seus extratos no decorrer da fenologia e apresentaram resultados semelhantes aos das folhas. Capítulos e cipselas apresentaram rendimentos semelhantes entre eles e superiores aos das estruturas vegetativas, principalmente para aqueles provenientes da população da RBEE, sendo que o baixo rendimento observado para as cipselas desta população ocorreu devido a um problema técnico (vazamento) no extrator automático no momento da preparação desse extrato.

Tabela 8. Rendimento médio dos extratos etanólicos das diferentes partes de *B. segetum* de acordo com a fase fenológica e o local de coleta.

Coleta	Óleos	Fase Fenológica		
		Floração	Frutificação	Vegetativo
RBEE	Folhas	11,70*	11,36	16,68
	Ramos	9,65	7,87	6,01
	Capítulos	21,40	-	-
	Cipselas	-	5,25	-
PEFI	Folhas	10,86	9,02	12,34
	Ramos	12,31	10,45	9,60
	Capítulos	16,78	-	-
	Cipselas	-	15,87	-
	Raízes	11,03	7,54	12,24

RBEE = Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi Guaçu; PEFI = Parque Nacional Fontes do Ipiranga; \* valores em porcentagem (%).

Os teores de umidade das estruturas vegetativas de *B. segetum* secas a sombra foram determinados. Este foi maior nas folhas (TU = 76,7%), seguido pelos ramos (TU = 66,7%) e raízes (TU = 52,8%), respectivamente. Não apresentando, portanto, correlação significativa entre este parâmetro em relação ao rendimento dos extratos.

Diversos fatores, como os fisiológicos (nutrição, fenologia, genética), anatômicos (parte da planta utilizada), climáticos (precipitação, temperatura, radiação solar), geográficos (altitude, poluição atmosférica) e ecológicos (competição, herbivoria) atuando em conjunto podem alterar a taxa de produção e acúmulo dos metabólitos secundários (Gobo-Neto & Lopes 2007).

A triagem das atividades biológicas dos extratos das diferentes partes de *B. segetum* foi realizada em cromatografia de camada delgada (CCD). Os extratos foram analisados para as atividades anticolinesterásica, antiradicalar (sequestradora do radical DPPH•) e antifúngica frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. Para tanto, as amostras de EE (200 µg) foram aplicadas em placas de sílica gel 60 F254 e desenvolvidas com sistemas de eluentes apropriados em duas etapas com polaridades crescentes, conforme descrito anteriormente no item 3.2.1. O perfil cromatográfico foi semelhante entre os órgãos, independente do estágio fenológico ou local de coleta (Figura 15).

Os EEs das folhas (fase de frutificação), raízes (fase de floração), capítulos e cipselas, coletados no PEFI, e que apresentaram atividades antifúngicas e antiradicalar, após partições sucessivas com hexano, diclorometano e acetato de etila, tiveram seus resíduos, novamente, submetidos à bioautografia direta (100 µg) desenvolvidas com os mesmos sistemas de eluentes. As maiores atividades antifúngicas foram observadas nas frações diclorometânicas dos capítulos e cipselas (Rf 0,72, para ambos) e das raízes em hexano e diclorometano (Rfs 0,89; 0,82, respectivamente). O maior potencial redutor do DPPH foi observado nas frações de acetato de etila das folhas (Rfs 0,56; 0,46; 0,28) e raízes (Rf 0,28) (Figura 16).

Os resultados não foram conclusivos para o ensaio anticolinesterásico e, desta forma, os extratos e suas frações foram analisados quantitativamente em microplaca pelo método de

Ellman (Ellman et al. 1961) modificado por Rhee et al. (2001), porém nenhum deles apresentou resultado relevante, sendo que a maior atividade foi observada para fração diclorometânica das folhas coletadas na população do PEFI, na fase de frutificação, mesmo assim, não ultrapassando os 50% de inibição da atividade enzimática.

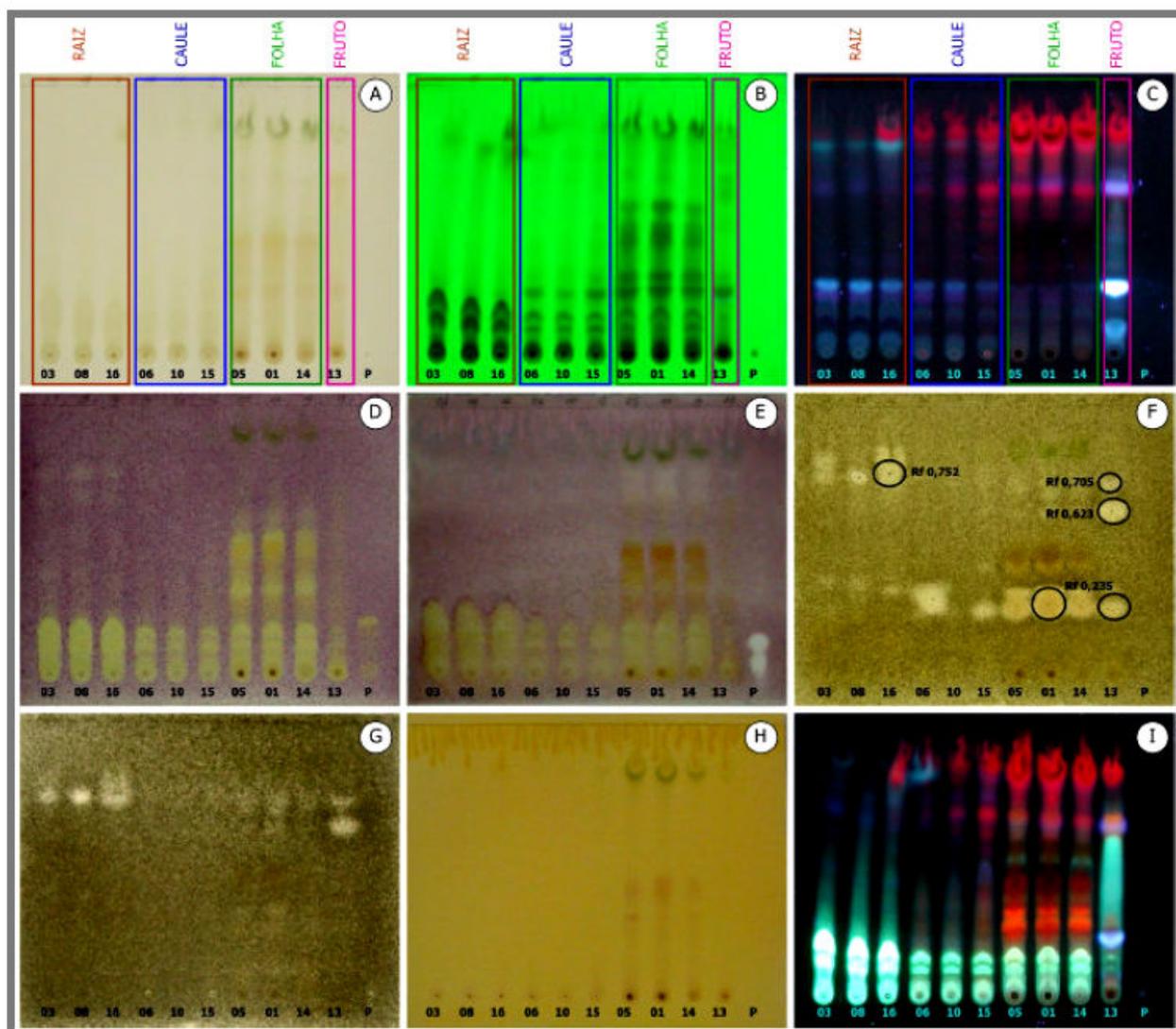


Figura 15 - Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos etanólicos de *B. segetum*. [A] UV/Vis; [B] UV/Curto (254 nm); [C] UV/ Longo (366 nm); [D] Antiradicalar (DPPH); [E] Anticolinesterásico; [F] *C. cladosporioides*; [G] *C. sphaerospermum*; [H] Dragendorff; [I] NP/PEG; Rf = fator de retenção.

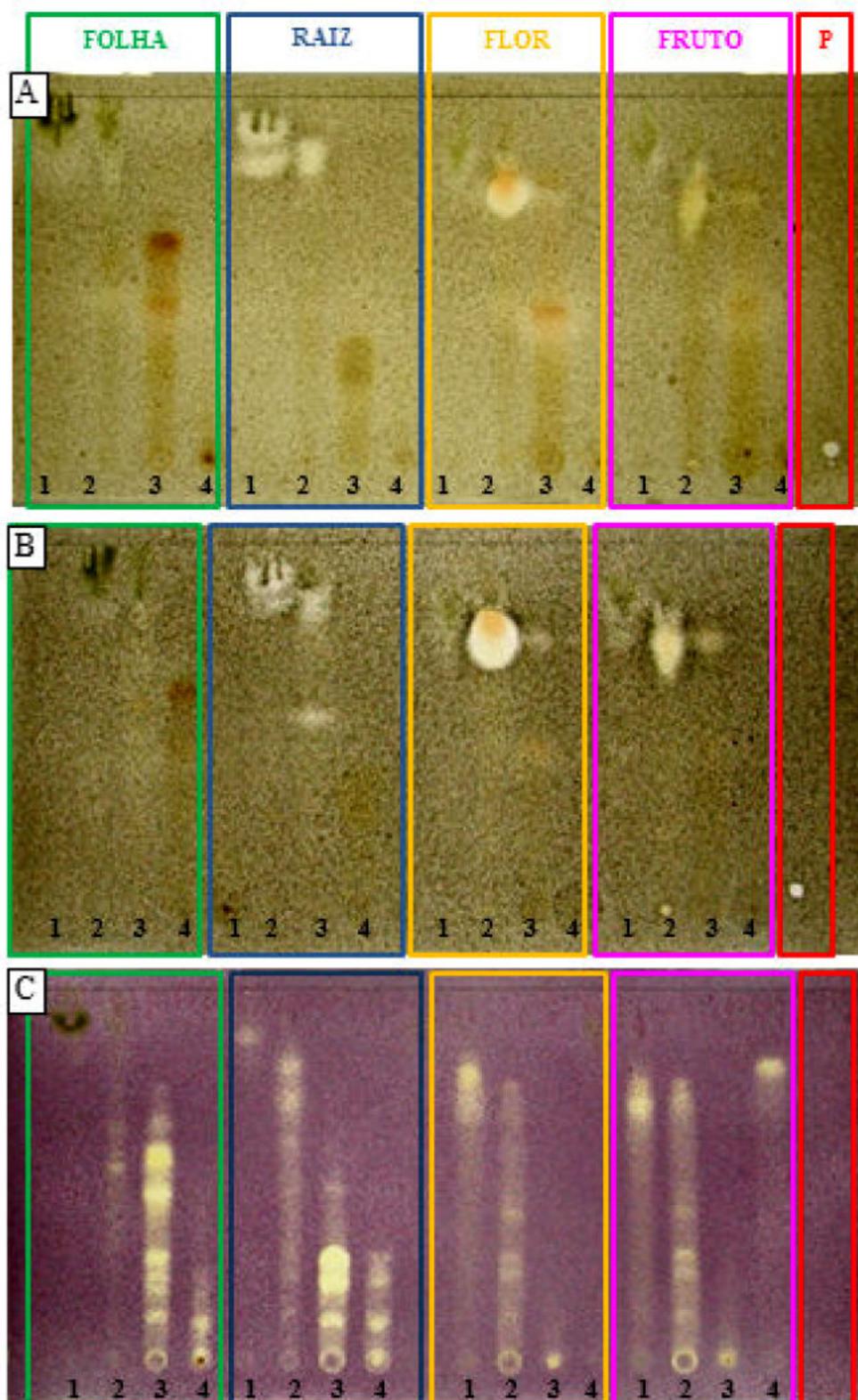


Figura 16 – Cromatografia em Camada Delgada das frações obtidas a partir dos extratos etanólicos de *B. segetum*. [A] *C. cladosporioides*; [B] *C. sphaerospermum*; [C] Antiradicalar (DPPH); [1] Hexânica; [2] Diclorometânica; [3] Acetato de Etila; [4] Resíduo hidro-metanólico; [P] Nistatina (antifúngico) e Quercetina (antiradicalar).

O poder redutor do radical livre DPPH•, das frações dos extratos de *B. segetum* também foi avaliado quantitativamente em microplaca. Os resultados foram comparados com os padrões comerciais de *Ginkgo biloba*, comercializado como fitoterápico em farmácias, e com a quercetina, substância pura com ação antioxidante reconhecida. A Figura 17 mostra a curva dose/resposta (100 µg/ml até 1 µg/ml) determinada para as frações em acetato de etila das folhas, raízes, capítulos e cipselas e para os controles.

Com exceção das frações hexânica, todas as demais mostraram forte atividade antioxidante, com as frações de acetato de etila das folhas ( $15 \pm 1,1\%$  a  $96 \pm 0,1\%$  com  $IC_{50} = 3,4$  µg/ml), raízes ( $8 \pm 2,7\%$  a  $96 \pm 0,1\%$  com  $IC_{50} = 3,9$  µg/ml), capítulos ( $7 \pm 0,9\%$  a  $94 \pm 0,4\%$  com  $IC_{50} = 4,8$  µg/ml) e cipselas ( $15 \pm 1,3\%$  a  $95 \pm 0,2\%$  com  $IC_{50} = 3,1$  µg/ml) se destacando entre as demais, superando inclusive a atividade apresentada pelo *Ginkgo biloba* ( $0,1 \pm 0,1\%$  a  $95 \pm 0,3\%$  com  $IC_{50} = 14,8$  µg/ml); a quercetina apresentou  $IC_{50} = 0,9$  µg/ml. Estes resultados corroboram com aqueles encontrados para os extratos das inflorescências (Fabri *et al.* 2011) e frações em acetato de etila da parte aérea de *Bidens segetum* (Silveira *et al.* 2009), previamente relatados pelos autores.

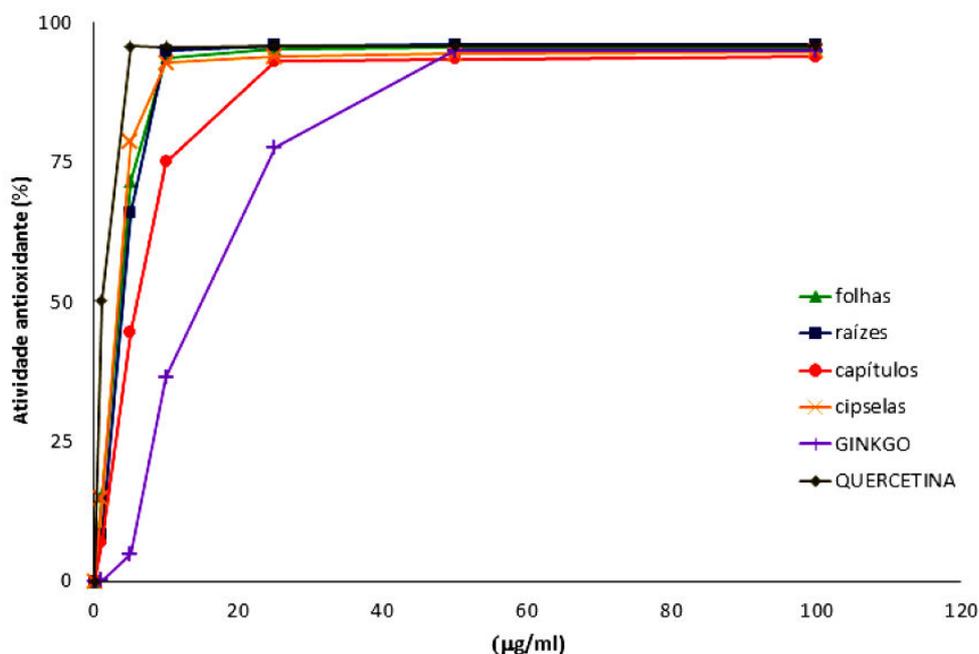


Figura 17: Avaliação quantitativa do poder redutor do radical livre DPPH• das frações em acetato de etila dos extratos de *B. segetum* coletadas a partir da população mantida em canteiros na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI).

Os extratos vegetais brutos, e mesmo suas frações, constituem uma matriz bem complexa contendo centenas ou milhares de metabólitos, que diferem consideravelmente em seus parâmetros físico-químicos e espectroscópicos. Na tentativa de melhorar as caracterizações das frações que se mostraram ativas e para reunir o maior número de informações sobre os constituintes presentes nessas amostras, assim como, as substâncias responsáveis pelas atividades biológicas detectadas, foram utilizadas técnicas cromatográficas hífenadas (cromatografia + módulo de identificação/ quantificação) que são de grande valia, pois fornecem numerosas informações estruturais dos metabólitos antes mesmo do seu isolamento (Rodrigues *et al.* 2006).

Ao todo foram caracterizados dezenove metabólitos constituintes das frações ativas, sendo que, de maneira geral, as análises por cromatografia a gás, de amostras derivatizadas, indicaram diversos açúcares, gliceróis, polióis e ácidos orgânicos. Já para as análises em cromatografia líquida, os resultados sugeriram a presença de outras substâncias, como flavonoides, mas que não puderam ser caracterizados apenas com os dados de LC/DAD e LC-MS-MS/ESI(+).

Na Tabela 9 são apresentados os componentes das frações que puderam ser caracterizados, sua ocorrência e método utilizado para sua determinação.

Após preparadas conforme descrito em material e métodos (3.1.6), amostras das frações, analisadas em CG-EM, apresentaram entre seus constituintes os seguintes componentes: na fração diclorometânica das raízes, ácido ferúlico (tempo= 37.41 min; área= 1,75%), estigmasterol (tempo= 47.94 min; área= 6,42%) e (3-hidroxi-4-metoxifenil) etileno glicol (tempo= 38.15 min; área= 3,05%), detectado também na fração em acetato de etila, deste órgão (tempo= 34.32 min; área= 2,93%); na fração hexânica das raízes foram encontrados uma série de ácidos graxos, semelhante ao observado para os seus óleos voláteis; na fração em acetato de etila das folhas, ácido cafeíco (tempo= 37.56 min; área= 4,04%), presente também na fração diclorometânica dos capítulos que apresentaram ainda o esteroide estigmasterol (tempo= 47.91 min; área= 23,41%); na fração em acetato de etila dos capítulos, ácido chiquímico (tempo= 0.62

min; área= 4,92%), ácido para-cumárico (tempo= 31.14 min; área= 1,83%) e ácido protocatecólico (tempo= 31.25 min; área= 1,82%); na fração diclorometânica das cipselas, ácido palmítico (tempo= 34.59 min; área= 4,69%), ácido linoleico (tempo= 37.86 min; área= 2,79%), ácido esteárico (tempo= 38.08 min; área= 4,11%), escopoletina (tempo= 39.05 min; área= 2,29%), esculetina (tempo= 39.41 min; área= 22,21%) e estigmasterol (tempo= 47.97 min; área= 10,85%) e; na fração em acetato de etila das cipselas, esculetina (tempo= 39.41 min; área= 8,7%), ácido chiquímico (tempo= 30.62 min; área= 6,02%) e ácido protocatecólico (tempo= 31.25 min; área= 1,83%).

Tabela 9. Constituintes químicos das frações ativas provenientes da participação dos extratos etanólicos obtidos das diferentes partes de *Bidens segetum* coletadas na Mata Atlântica do Parque Estadual Fontes do Ipiranga (PEFI).

Composto	Frações ativas								Método de identificação	
	Raízes			Folhas		Capítulos		Cipselas		
	HEX	DCM	AcOEt	AcOEt	DCM	AcOEt	DCM	AcOEt		
hexadecanal	+	-	-	-	-	-	-	-	GC	
ácido palmítico	+	-	-	-	-	-	+	-	GC	
ácido 9,12-octadecadienóico	+	-	-	-	-	-	-	-	GC	
Ácido esteárico	-	-	-	-	-	-	+	-	GC	
ácido linoleico, etil éster	+	-	-	-	-	-	+	-	GC	
ácido $\alpha$ -linolenico	+	-	-	-	-	-	-	-	GC	
etanol, 2-(9,12-octadecadieniloxi)-(Z,Z)-	+	-	-	-	-	-	-	-	GC	
ácido ferúlico	-	+	-	-	-	-	-	-	GC	
(3-hidroxi-4-metoxifenil) etileno glicol	-	+	+	-	-	-	-	-	GC	
estigmasterol	-	+	-	-	+	-	+	-	GC	
4,5-di-O-E-ácido cafeoilquinico	-	-	+	+	-	-	-	-	LC	
ácido cafeico	-	-	-	+	+	-	-	-	GC	
ácido cafeoilquinico	-	-	-	+	-	-	-	-	LC	
esculetina	-	-	-	-	+	-	+	+	LC - GC	
escopoletina	-	-	-	-	+	-	+	-	LC - GC	
apigenina	-	-	-	-	+	-	-	-	LC	
ácido chiquímico	-	-	-	-	-	+	-	+	GC	
ácido para-cumárico	-	-	-	-	-	+	-	-	GC	
ácido protocatecólico	-	-	-	-	-	+	-	+	GC	

Legenda: HEX = fração hexânica; DCM = fração diclorometânica; AcOEt = fração em acetato de etila; GC = Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas; LC = Cromatografia líquida com detector seletivo de massas tandem.

Além desses, com base nos resultados das análises por LC/DAD e LC-MS-MS/ESI(+) confrontados com dados da literatura, puderam ser propostos os seguintes componentes: ácido cafeoilquinico  $m/z$  355  $[M+H]^+$ , na fração em acetato de etila das folhas (tempo= 8.4 min); apigenina  $m/z$  271  $[M+H]^+$ , na fração diclorometânica dos capítulos (tempo= 18.0 min); 4,5-di-O-E-ácido cafeoilquinico  $m/z$  517  $[M+H]^+$ , nas frações em acetato de etila das raízes (tempo= 14.6 min) e das folhas (tempo= 14.7 min). Outros dois constituintes já detectados nas análises em cromatografia a gás tiveram sua presença confirmada pelas análises em cromatografia líquida, são eles: as cumarinas esculetina  $m/z$  179  $[M+H]^+$ , nas frações diclorometânicas dos capítulos e em acetato de etila das cipselas (tempo= 10.2 min, para ambas) e; escopoletina  $m/z$  193  $[M+H]^+$ , na fração diclorometânica dos capítulos (tempo= 13.8 min) (Dordevic *et al.* 2000, Santos *et al.* 2008, Jaiswal *et al.* 2011).

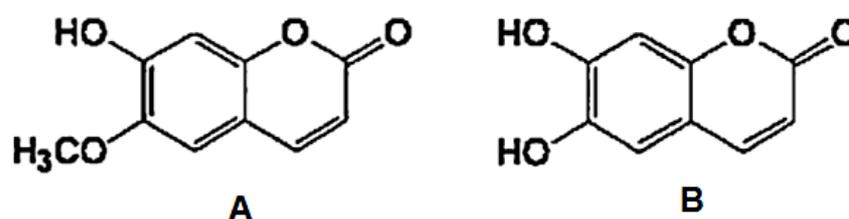


Figura 18 - Estruturas químicas das cumarinas [A] escopoletina e [B] esculetina detectadas nas análises por CG-EM e por LC/DAD e LC-MS-MS/ESI(+) das frações diclorometânicas dos capítulos e cipselas de *Bidens segetum* Mart. Ex Colla.

## 5. Conclusões

O estudo de *Bidens segetum* Mart. Ex Colla (Asteraceae) de uma população nativa do Cerrado da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu (RBEE) e de outra mantida em canteiros no Instituto de Botânica (domínio da Mata Atlântica), em diferentes fases fenológicas, indicou um rendimento maior para as estruturas reprodutivas (capítulos e cipselas) do que para suas estruturas vegetativas (folhas, ramos caulinares e raízes), tanto para os componentes voláteis quanto para os fixos.

Nas partes aéreas de *B. segetum*, destacam-se os voláteis  $\beta$ -felandreno e o germacreno D com teores até superiores a 50%. Já as raízes apresentaram constituintes distintos dos demais óleos estudados apresentando em sua composição sesquiterpenos oxigenados, nenhum monoterpene e se caracterizaram pela grande percentagem de alcoóis e ácidos graxos como o 9,12-Octadecadieno-1-ol e o 9,12,15-Octadecatrieno-1-ol.

Destaca-se neste trabalho o estudo do aroma dos capítulos de *B. segetum*, empregando-se a técnica HS-SPME de amostras provenientes da população mantida no PEFI, onde se observou um maior teor do monoterpene, como o majoritário  $\beta$ -felandreno (38,4%), e menor teor de sesquiterpenos, como germacreno D (8,2%), o inverso foi observado para o óleo volátil.

A atividade antifúngica de *B. segetum* para os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* dos voláteis, mostrou-se mais efetivos para as raízes, ramos, capítulos e cipselas, com maior ênfase para as plantas provenientes do PEFI (domínio da Mata Atlântica).

A enzima acetilcolinesterase tem sua atividade reduzida, no regime de dose/resposta, principalmente, pelos óleos voláteis dos ramos coletados nas fases reprodutivas da população mantida nos canteiros do PEFI.

De forma geral, os óleos voláteis de *B. segetum* se mostraram ineficientes para a atividade antioxidante avaliada pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•).

Este trabalho também se estendeu ao estudo de extratos e frações de *B. segetum* os quais foram analisados por CG-EM e por técnicas hífenadas como LC/DAD e LC-MS-MS/ESI(+), permitindo identificar compostos como alcoóis e ácidos graxos, flavonóis, esteroides, cumarinas e outros fenólicos nas frações mais ativas para as atividades antifúngica e antioxidante.

É oportuno ressaltar que as frações em acetato de etila das folhas, raízes, capítulos e cipselas de *B. segetum*, coletadas na população do PEFI, apresentaram potencial redutor do radical DPPH• superior ao do padrão comercial (*Ginkgo biloba*) utilizado como controle positivo.

Concluindo, este trabalho permitiu e trouxe resultados inéditos sobre a composição química e as atividades biológicas dos constituintes voláteis e fixos das espécies de *Bidens* da flora brasileira.

## 6. Resumo

*Bidens segetum* Mart ex Colla (Asteraceae) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro com poucos estudos realizados até o presente momento. O uso de plantas aromáticas com propriedades farmacológicas é bastante difundido, no entanto os teores e a composição de seus princípios ativos podem variar em função de fatores ambientais e genéticos. O objetivo do presente trabalho foi descrever a composição química do aroma das flores e dos óleos voláteis das diferentes partes de *Bidens segetum* coletadas de populações de ocorrência natural no Cerrado e de plantas cultivadas no Instituto de Botânica a partir de suas sementes, além de analisar as atividades biológicas de seus componentes fixos e voláteis. Para tanto, folhas, ramos, raízes, capítulos e cipselas frescos foram extraídos por hidrodestilação (3 horas) e os extratos etanólicos foram obtidos de parte desse material seco em extrator automático, analisados GCMS, LC/DAD e LC-MS-MS/ESI(+). A atividade antifúngica avaliada pelo método de bioautografia direta utilizando como fungos reveladores *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. As atividades anticolinesterásicas e antioxidantes foram triadas por autografias e quantificadas por ensaios colorimétricos em microplacas. Os rendimentos foram maiores para as estruturas reprodutivas tanto para os componentes fixos quanto para os voláteis. O aroma e óleo volátil dos capítulos e cipselas se mostraram ricos em hidrocarbonetos monoterpênicos, enquanto que no óleo das folhas os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram a classe principal e para os ramos houve um balanço entre essas duas classes. O óleo das raízes se apresentou bastante diferente dos demais pela grande percentagem de alcoóis e ácidos graxos (>75%). A composição dos óleos mostrou alterações quali- e quantitativas significantes. Porém, seus componentes principais o germacreno D (9 – 53%) e  $\beta$ -felandreno (17 – 51%) estiveram sempre presentes nos óleos e no aroma, apenas variando suas percentagens. Os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum* se mostraram mais sensíveis ao óleo volátil das raízes na fase vegetativa (limite detecção= 5  $\mu$ g) e as frações diclorometânicas das raízes (Rfs 0,89), capítulos e cipselas (Rf 0,72, para ambos) de *B. segetum*. A enzima acetilcolinesterase teve sua

atividade reduzida, no regime de dose/resposta, pelos óleos voláteis dos ramos coletados nas fases de floração ( $IC_{50}= 22,6 \mu\text{g/ml}$ ) e de frutificação ( $IC_{50}= 43,8 \mu\text{g/ml}$ ). As frações em acetato de etila das folhas ( $IC_{50}= 3,4 \mu\text{g/ml}$ ), raízes ( $IC_{50}= 3,9 \mu\text{g/ml}$ ), capítulos ( $IC_{50}= 4,8 \mu\text{g/ml}$ ) e cipselas ( $IC_{50}= 3,1 \mu\text{g/ml}$ ) de *B. segetum* apresentaram potencial redutor do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•).

## 7. Abstract

*Bidens segetum* Mart ex Colla (Asteraceae) is a native species to the Brazilian Cerrado with few studies to date. The use of aromatical plants with medicinal properties is widespread, however the levels and composition of its active compounds can vary due to environmental and genetic factors. The aim of this study was to describe the chemical composition of the aroma of flowers and volatile oils from different parts of *Bidens segetum* collected from populations naturally occurring in the Cerrado and cultivated plants in the Instituto de Botânica de São Paulo from its seeds, besides analyzing the biological activities of its fixed and volatile components. To do it the essential oils of leaves, branches, roots, fresh chapters and cipselas were extracted by hydrodistillation (3 hours) and the ethanolic extracts of these same organs were obtained from the dry material in equipment ASE300 (Accelerated Solvent Extractor) under pressure and temperature, and after analyzed in GC-MS, LC-DAD and LC-MS/MS ESI(+). The antifungal activity was evaluated by the method of direct bioautography using as revealing of the activity fungi *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Anticholinesterase* and antioxidant activities were also evaluated by autographs and quantified by colorimetric assays in microplates. The yields were higher in reproductive structures for both, fixed and volatile components, when compared to other structures. The aroma and volatile oil of the chapters and cipselas proved being rich in monoterpene hydrocarbons, whereas in the leaf oil sesquiterpene hydrocarbons are the main class, and in the branches there was a balance between these two classes. The oil of the roots appeared quite different from the others by the large proportion of alcohols and fatty acids (>75%). The composition of the oils showed quali and quantitative significant changes. However, its main components the germacrene D (9-53%) and  $\beta$ -phellandrene (17-51%) were always present in oils and aroma, just varying their percentages. The fungi *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum* were more sensitive to volatile oil from roots in the vegetative phase (detection limit= 5 $\mu$ g), and the dichloromethane fractions of the roots (Rf= 0.89), chapters and cipselas (Rf= 0.72, for both). The enzyme acetylcholinesterase

had its activity reduced in the regime of dose / response for the volatiles oils of the branches collected in flowering ( $IC_{50}= 22.6 \mu\text{g/ml}$ ) and fruiting ( $IC_{50}= 43.8 \mu\text{g/ml}$ ) stages. The fraction in ethyl acetate of the leaves ( $IC_{50}= 3.4 \mu\text{g/ml}$ ), roots ( $IC_{50}= 3.9 \mu\text{g/ml}$ ), chapters ( $IC_{50}= 4,8 \mu\text{g/ml}$ ) and cipselas ( $IC_{50}= 3.1 \mu\text{g/ml}$ ) showed reducing potential in free radical 2,2-diphenyl-1-picrilhidrazila (DPPH•).

## 8. Referências bibliográficas

- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gás chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. 804p.
- Agra, M.F.; Baracho, G.S.; Nurit, K.; Basílio, I.J.L.D. ; Coelho, V.P.M.** 2007. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *Journal of ethnopharmacology* 111: 383-395.
- Alcântara, J. M., Yamaguchi, K. K. L., Veiga Junior, V. F., Lima, E. S.** 2010. Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. *Química Nova* 33(1): 141-145.
- Almeida, A.M.; Fonseca, C.R.; Prado, P.I.; Almeida-Neto, M.; Diniz, S.; Kubota, U.; Braun, M.R.; Raimundo, R.L. G.; Anjos, L.A.; Mendonça, T.G.; Futada, S.M. & Lewinsohn, T.M.** 2005. Diversidade e ocorrência de Asteraceae em Cerrados de São Paulo. *Biota Neotropica* 5: 1-17.
- Andrade, F.M.C. & Casali, V.W.D.** 1999. Plantas medicinais e aromáticas: relação com o ambiente, colheita e metabolismo secundário. Universidade Federal de Viçosa 139 p.
- Astudillo-Vázquez, A.; Valle, H.D.; De Jesús, L.; Herrera, G.; Navarrete, A.** 2008. Investigation of *Alternanthera repens* and *Bidens odorata* on gastrointestinal disease. *Fitoterapia* 79: 577-580.
- Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – período de 2000 a 2005.** 2008. Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and chemical toxicology* 46: 446-475.
- Barroso, G.M.** 1991. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV Imprensa universitária. 326 p.
- Barbosa Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., da-Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S. & Quintans-Júnior, L.J.** 2006.

Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2): 258-285.

**Bell, E.A.** 1981. The physiological role(s) of secondary (natural) products. In: Conn, E.E. (ed.) *The Biochemistry of Plants*. New York: Academic Press 7: 1-19.

**Brandão, M.G.L.; Krettli, A.U.; Soares, L.S.R.; Nery, C.G.C.; Marinuzzi, H.C.** 1997. Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and flavonoid compounds. *Journal of ethnopharmacology* 57: 131-138.

**Bremer, K.** 1994. *Cladistics and classification*. Portland, Oregon: Timber press. 727 p.

**Bülow, N. & König, W.A.** 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis investigations of acid catalysed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55: 141-168.

**Caccere, R., Teixeira, S. P., Centeno, D. C., Figueiredo-Ribeiro, R. C. L., Braga, M. R.** 2013. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. *Journal of Plant Physiology*.

**Chang, H.T., Cheng, Y. H., Wu, C. L., Chang, S. T., Chang, T. T., Su, Y. C.** 2008. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource technology* 99: 6266-6270.

**Chien, S.-C.; Young, P.H.; Hsu, Y.-J.; Chen, C.-H.; Tien, Y.-J.; Shiu, S.-Y.; Li, T.-H.; Yang, C.-W.; Marimuthu, P.; Tsai, L.F.-L.; Yang, W.-C.** 2009. Anti-diabetic properties of three common *Bidens pilosa* variants in Taiwan. *Phytochemistry* 70: 1246-1254.

**Collins, C.H. & Braga, G.L.** 1988. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. 3ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP.

- Coutinho, L. M.** 2002. O bioma do Cerrado. Separata de: KLEIN, A. L. (Org.). Eugen Warming e o Cerrado brasileiro: um século depois. São Paulo: Editora da UNESP, 77-91.
- Couto, H. A. R., Silva, A. C. M., Andrade, H. A., Maia, J. G. S.** 2003. Estudo sazonal da produção de óleo essencial de pau-rosa e de espécimes identificados como suas variedades morfológicas. *Horticultura Brasileira* 21(2).
- Cuendet, M.; Hostettmann, K.; Potterat, O.** 1997. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80: 1144-1152.
- Deba, F.; Xuan, T.D.; Yasuda, M.; Tawata, S.** 2008. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. var. *Radiata*. *Food control* 19: 346-352.
- Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz-Junior, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H.; Reis, M.S.** 2002. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia* 73: 69-91.
- Dordevic, S., Cakic, M., Amr, S.** 2000. The Extraction of Apigenin and Luteolin from the Sage *Salvia Officinalis* L. from Jordan. *Working and Living Environmental Protection* 1(5): 87-93.
- Duarte-Almeida, J. M., Santos, R. J., Genovese, M. I., Lajolo, F. M.** 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26(2): 446-452.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7: 88-95.
- Fabri, R.L.; Nogueira, M.S.; Dutra, L.B.; Bouzada, M.L.M.; Scio, E.** 2011. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu* 13 (2): 183-189.

- Falkenberg, M. B., Santos, R. I., Simões, C. M. O.** 1999. Introdução à análise fitoquímica. In: Simões, C. M. O., Skenkel, E. P., Grosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 5ed. Florianópolis: Editora da UFSC 163-179.
- Farmacopéia brasileira** 2001. 4 ed. Parte II Fascículo 2. In: Diário Oficial, Suplemento n.1.
- Felippe, M.F. & Souza, T.A.R.** 2006. A biogeografia do Cerrado em concomitância com sua história econômica e suas perspectivas para o futuro. Enciclopédia biosfera 01: 1-33.
- Francis, P.T., Palmer, A.M., Snape, M., Wilcock, G.K.** 1999. The Cholinergic Hypothesis of Alzheimer Disease: A Review of Progress. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 66: 137-147.
- Gauvin, A. & Smadja, J.** 2005. Essential oil composition of four *Psiadia* species from Reunion Island: a chemotaxonomic study. Biochemical systematics and ecology 33: 705-714.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova 30: 374-381.
- Grombone-Guaratini, M. T., Silva-Brandão, K. L., Solferinia, V. N., Semirc, J., Trigo, J. R.** 2005. Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil. Biochemical Systematics and Ecology 33: 479-486.
- Gurib-Fakim, A.** 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Molecular aspects of medicine 27: 1-93.
- Harborne, J. B.** 1988. Introduction to Ecological biochemistry. 3ª ed. Londres: Academic, 356p.
- Hoog, G. S. & Garro, J.** 1995. Atlas of Clinical Fungi. CBS, Spain.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. Journal of Chromatography 51: 327-329.

- Hsu, Y.-J.; Lee, T.-H.; Chang, C.L.-T.; Huang, Y.-T.; Yang, W.-C.** 2009. Antihyperglycemic effects and mechanism of *Bidens pilosa* water extract. Journal of ethnopharmacology 122: 379-383.
- Jaiswal, R., Kiprotich, J., Kuhnert, N.** 2011. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae Family. Phytochemistry 72: 781–790.
- Junqueira, R. G. Mata, A., Nelson, D. L., Afonso, R. J. C. F., Glória, M. B. A.** 2004. Identificação de compostos voláteis da cúrcuma empregando microextração por fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Ciência e Tecnologia de Alimentos 24(1): 151-157.
- Kronka, F.J.N., Nalon, M.A., Matsukuma, C.K., Pavão, M., Guillaumon, J.R., Cavalli, A.C., Giannotti, E., Iwane, M.S.S., Lima, L.M.P.R., Montes, J., Del Cali, I.H. & Haack, P.G.** 1998. Áreas de domínio do cerrado no Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Instituto Florestal, São Paulo.
- Lahlou, M.** 2004. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. Flavour and fragrance journal 19: 159-165.
- Lelis, S.M.** 2008. Biologia reprodutiva de *Bidens segetum* Mart. ex Colla (Heliantheae, Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 56 p.
- Liu, Z. Q.** 2010. Chemical Methods To Evaluate Antioxidant Ability. Chemical Reviews. 110 (10): 5675-5691.
- Lorenzi, H.** 1991. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Nova Odessa - SP : Ed. Plantarum, 440 p.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A.** 2002. Plantas medicinais do Brasil. 4.ed. Nova Odessa - SP: Ed. Plantarum, 576 p.
- Machado, E.C., Medina, C.L., Gomes, M.M.A., Habermann, G.** 2002. Variação sazonal da fotossíntese, condutância estomática e potencial da água na folha de laranjeira ‘valência’. Scientia Agricola 59 (1): 53-58.

- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Caldas, E., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K. & Steininger, M.** 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação internacional, Brasília, DF.
- Magenta, M. A. G.** 1998. As subtribos Ambrosiinae, Galinsoginae e Coreopsidinae (Heliantheae – Asteraceae) no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade São Paulo, São Paulo, 140 p.
- Mantovani, M. & Martins, F.R.** 1993. Florística do Cerrado na Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, SP. Acta botânica brasílica 7: 33-60.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K.** 2002. A Rapid TLC Bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. Phytochemical Analysis, 13: 51-54.
- Mendes, M. A. S., Silva, V. L., Dianese, J. C. Ferreira, M. A. S. V., Santos, C. E. N., Gomes Neto, E., Urben, A. F., Castro, C.** 1998. Fungos em plantas no Brasil. Brasília, DF: EMBRAPA-SPI, EMBRAPA-CENARGEN. 569 p.
- Miguel, M. G.** 2010. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. Flavour and Fragrance Journal. 25: 291–312
- Miyazawa, M., Minamino, Y., Kameoka, H.** 1996. Volatile components of the rhizomes of *Rheum palmatum* L. Flavour and Fragrance Journal 11(1): 57-60.
- Murakami, C.** 2009. Estudo da composição química e atividades biológicas de óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. Em diferentes fases fenológicas. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo – Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 95 p.
- Myers, N., Mittermeller, R.A., Mittermeller, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature 403: 853-858.

- Nakajima, J.N.** 2000. A família Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas 457 p.
- Nascimento, A.L.** 2008. Estudo da composição química e das atividades biológicas do óleo essencial das folhas, flores e frutos de *Bidens segetum* Martius Ex Colla. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Centro Universitário Fundação Santo André, Santo André, 58 p.
- Njoroge, S.M., Ukeda, H. & Sawamura, M.** 2003. Changes of the volatile profile and artifact formation in daidai (*Citrus aurantium*) cold-pressed peel oil on storage. Journal of agriculture and food chemistry 51(14): 4029-4035.
- Organização Mundial da Saúde (OMS)** 1998. Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials. <http://apps.who.int/medicinedocs/fr/d/Jh1791e/12.html> (acesso em 04.12.2009).
- Organização Mundial da Saúde (OMS)** 2003. Traditional medicine. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> (acesso em 05.11.2008).
- Pavón, J.L.P.; Pena, A.G.; Pinto, C.G.; Cordero, B.M.** 2006. Differentiation of types of crude oils in polluted soil samples by headspace-fast gas chromatography-mass spectrometry. Journal of chromatography A 1137: 101-109.
- Pawliszyn, J & Arthur, C.** 1990. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Analytical Chemistry 62: 2145-2148.
- Pinto, S. C., Leitão, G. G., Oliveira, D. R., Bizzo, H. R., Ramos, D. F., Coelho, T. S., Silva, P. E. A., Lourenço, M. C. S., Leitão, S. G.** 2009. Chemical Composition and Antimycobacterial Activity of the Essential Oil from *Anemia tomentosa* var. *anthriscifolia*. Natural Product Communications 4 (12): 1675-1678.
- Rhee, I.K., 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 : 217-223.

**Rizzini, C.T.** 1997. Tratado de fitogeografia do Brasil. 2º ed Rio de Janeiro: Âmbito cultural edições Ltda, 747 p.

**Romanuic Neto, S., Godoi, J. V., Villagra, B. L. P., Almeida-Scabbia, R. J., Melo, M. M. R. F.** 2012. Caracterização florística, fitossociológica e fenológica de trepadeiras de mata ciliar da Fazenda Campininha, Mogi Guaçu, SP, Brasil. Hoehnea 39(1): 145-155.

**Rybalchenko, N.P., Prykhodko, V.A., Nagorna, S.S., Volynets, N.N., Ostapchuk, A.N., Klochko, V.V., Rybalchenko, T.V., Avdeeva, L.V.** 2010. In vitro antifungal activity of phenylheptatriyne from *Bidens cernua* L. against yeasts. Fitoterapia 81 (5): 336-338.

**Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A.** 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. Ciência e agrotecnologia 25:102-123.

**Rodrigues, M. V. N., Rehder, V. L. G., Sartoratto, A., Boaventura Júnior, S., Santos, A. S.** 2006 O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais In: Construindo a História dos Produtos Naturais. Multi Ciência: 7.

**Sabino, J. F. P., Reyes, M. M., Barrera, C. D. F., Silva, A. J. R.** 2012. Análise e discriminação de quimiotipos de *Lippia graveolens* H.B.K. da Guatemala por microextração em fase sólida, GC-EM e análise multivariada. Química Nova 35 (1): 97-101.

**Sacchetti G., Maietti S., Muzzoli M., Scaglianti M., Manfredini S., Radice M., Bruni, R.** 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. Food Chemistry 91: 621-632.

**Sandra, P. & Bicchi, C.** 1987. Capillary Gas Chromatography in Essential Oil Analysis. Huething. New York

- Santos, P. & Funari, F.L.** 2002. Clima local. In: Bicudo, D.C., Forti M.C. & Bicudo, C.E.M. (Eds.). Parque Estadual Fontes do Ipiranga: uma reserva biológica na cidade de São Paulo, São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, SP, 29-48.
- Santos, M. D., Lopes, N. P., Iamamoto, Y.** 2008. HPLC-ESI-MS/MS analysis of oxidized dicaffeoylquinic acids generated by metalloporphyrin-catalyzed reactions. *Química Nova* 31 (4): 767-770.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. & Perry, E.K.** 2003. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenóides in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, biochemistry and behavior* 75: 661-668.
- Schmidt, B.; Ribnicky, D.M.; Poulev, A.; Logendra, S.; Cefalu, W.T.; Raskin, I.** 2008. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism clinical and experimental* 57: S3-9
- Schossler, P., Schneider, G.L., Wunsch, D., Soares, G.L.G., Zini, C. A.** 2009. Volatile Compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using Solid Phase Microextraction and Hydrodistillation. *Journal Brazilian Chemical Society* 20(2): 277-287.
- Schwob, I., Bessiere, J.-M., Masotti, V. & Viano, J.** 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical systematics and ecology* 32: 735-745.
- Sherff, E.E.** 1937. The genus *Bidens*: part 1. Field Museum of Natural History, Chicago.
- Schütz, S., Weissbecker, B., Hummel, H. E., Apel, K. H., Schmitz, H., Bleckmann, H.** 1999. Insect antenna as a smoke detector. *Nature* 398: 298-299.
- Silva, F.** 2005. Avaliação do teor e da composição química do óleo essencial de plantas medicinais submetidas a processos de secagem e armazenamento. Tese de Doutorado Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 168 p.
- Silva, C.M., Bolzan, A.A. & Heinzmann, B.M.** 2006. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. *Química nova* 29: 1047-1053.

- Silveira, C.S.; Martins, F.O.; Costa, C.S.; Romanos, M.T.V.; Kaplan, M.A.C.; Menezes, F.S.** 2009. In vitro cytotoxic, antioxidant and antiviral effects of *Pterocaulon alopecuroides* and *Bidens segetum* extracts. Brazilian journal of Pharmacognosy 19: 343-348.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V.** 2004. Óleos voláteis. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick eds. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 397-425.
- Siqueira, E. P., Alves, T. M. A., Zani, C. L.** 2007. Fingerprint of volatiles from plant extracts based on SPME-GC-MS. Revista Brasileira de Farmacognosia 17(4): 565-571.
- Soobrattee, M.A.; Neergheen, V.S.; Luximon-Ranma, A.; Aruoma, O.I.; Bahorun, T.** 2005. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. Mutation research 579: 200-213.
- Souza, T. J. T., Apel, M. A., Bordignon, S., Matzenbacher, N. I., Zuanazzi, J. A. S., Henriques, A. T.** 2007. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Revista Brasileira de Farmacognosia 17(3): 368-372.
- 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 – Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, São Paulo, 351 p.
- 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.
- 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: 132-138.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2006. Fisiologia Vegetal. 3a ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p.

- Tellez, M.R., Canel, C., Rimando, A.M. & Duke, S.O.** 1999. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. *Phytochemistry* 52: 1035-1040.
- Tepe, B.; Dafefera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M.** 2005. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food chemistry* 90: 333-340.
- Trevisan, M.T.S.; Macedo, F.V.V.; Van De Meent, M.; Rhee, In K.; Verpoorte, R.** 2003. Seleção de Plantas com Atividade Anticolinesterase para Tratamento da Doença de Alzheimer. *Química Nova* 26 (3): 301-304.
- Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A.M., Alonzo, V. & Carlone, N.A.** 2006. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *Journal of applied microbiology* 102: 1544-1550.
- Valente, A. L. P. & Augusto, F.** 2000. Microextração por fase sólida. *Química Nova* 23(4): 523-530.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C. & Maciel, M.A.M.** 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química nova* 28(3): 519-528.
- Verpoorte, R.** 2000. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology* 52: 253-262.
- Wolniak, M.; Tomczykowa, M.; Tomczyk, M.; Gudej, J.; Wawer, I.** 2007. Antioxidant activity of extracts and flavonoids from *Bidens tripartita*. *Acta poloniae pharmaceutics – drug research* 63: 441-447.
- Yuan, L.-P.; Chen, F.-H.; Ling, L.; Bo, H.; Chen, Z.-W.; Li, F.; Zhong, M.-M.; Xia, Z.-J.** 2008. Protective effects of total flavonoids of *Bidens bipinnata* L. against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats *Journal of pharmacy and pharmacology* 60: 1393-1402.

**Zwaving, J.H. & BOS, R.** 1992. Analysis of the essential oils of five *Curcuma* species. Flavour and Fragrance Journal 7: 19-22.