

CYNTHIA MURAKAMI

Diversidade química e potencial farmacológico de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq.

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

SÃO PAULO

2017

CYNTHIA MURAKAMI

Diversidade química e potencial farmacológico de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq.

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

ORIENTADORA: DR^a MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Murakami, Cynthia

M972d Diversidade química e potencial farmacológico de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex
Miq. / Cynthia Murakami -- São Paulo, 2017.
285p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2017.
Bibliografia.

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

CDU: 547.913

ERRATA

MURAKAMI, C. 2017. Diversidade química e potencial farmacológico de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq.. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 285 p.

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
ix	16	FAPESP	FAPESP/CAPES

Aos meus pais, Helena e Koiti,
por sempre acreditarem no meu potencial, dedico.

“Quem conhece os homens é inteligente
Quem conhece a si mesmo é iluminado

Vencer os homens é ter força
Quem vence a si mesmo é forte
Quem sabe contentar-se é rico
Agir fortemente é ter vontade
Quem não perde a sua resistência, perdura
Quem morre mas não perece, eterniza-se”
(Lao Tse)

AGRADECIMENTOS

Hoje olho para mim mesma como uma pessoa diferente daquela que começou este doutorado em 2013. Por todo o meu crescimento, só tenho a agradecer...

Primeiramente, aos meus pais que, como sempre, me apoiaram quando eu quis pedir exoneração como professora para retomar minha carreira como cientista. Obrigada por me incentivarem a realizar mais este sonho!!!

Em seguida, à minha querida orientadora, Dr^a Maria Cláudia Marx Young, que aceitou me orientar quando estava prestes a se aposentar. Acreditou em mim e me incentivou, mesmo depois de anos afastada do laboratório. Me deu a oportunidade de aprender com ela todos os passos de como ser uma grande cientista! Me ensinou a perseverar diante dos obstáculos, escrever projetos, delinear experimentos, planejar orçamentos, fazer prestação de contas, participar de todos os eventos científicos possíveis para conhecer pessoas importantes com quem pude trabalhar em colaboração, viajar para cidades distantes onde pude aprender a operar equipamentos que não tínhamos no Botânico e a fazer análises que eu não dominava, mas sobretudo me ensinou a fazer amigos. Mais do que trabalhar, ela me ensinou a ter prazer pelo que faço, onde estiver e com quem estiver!

Ao Prof. Dr. Paulo R. H. Moreno, do Instituto de Química da USP, por toda a disposição em colaborar com as coletas em Paranapiacaba e na Ilha do Cardoso, pela valiosa colaboração intelectual desde a disciplina de “Análise espectrométrica de fármacos” até as correções de trabalhos, ensinando a ser mais objetiva e a desapegar das pequenezas, por todas as risadas e fotos em todos os congressos de que participamos juntos, mas sobretudo pela amizade e confiança ao longo de todos esses anos. Aprendi muito com você!!!

À Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani por todas as vezes que me recebeu de braços abertos no Instituto de Química da UNESP de Araraquara, permitindo que eu aprendesse muito com suas alunas e seus técnicos. Lá, pude acompanhar todas as etapas de purificação e análise de substâncias do meu extrato. À Dr^a Juliana

Rodrigues, técnica do laboratório de Química Orgânica, por toda a colaboração e boa vontade nas etapas fundamentais de purificação e identificação, ensinando o melhor modo de tratar as amostras e operar um HPLC, obtendo substâncias puras sem prejudicar o equipamento. A Juliana conseguiu pôr um HPLC semi-preparativo em funcionamento, após meses parado, só para me ajudar a purificar minhas frações no período em que fiquei em Araraquara! Ao Dr. Nivaldo Borallo, técnico de RMN e uma pessoa querida que tive o prazer de conhecer, que utilizou todo o seu conhecimento e experiência para realizar excelentes análises de RMN com minhas substâncias puras. Ao MSc. João Bronzel Junior por fazer as análises de massas de alta resolução das minhas substâncias puras e me ensinar o princípio do método, bem como a comparar aqueles espectros de massas. Às alunas do laboratório de Química Orgânica pela companhia em almoços, passeios, happy hours, açaís e afins...

À Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini, do Laboratório de Extrações da UNIP, pela rica colaboração com os ensaios antitumorais e antimicrobianos, permitindo que eu aprendesse em seu laboratório técnicas que não teria oportunidade de aprender em outro lugar, além da companhia nos simpósios de óleos essenciais em que estivemos juntas.

À Dr^a Vivian Tamaki, do Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do IBt, por permitir o uso de seu HPLC-DAD para a análise dos extratos, partições e frações provenientes dos meus extratos, que permitiu aprender a operar este equipamento, bem como selecionar as amostras mais puras para isolamento de substâncias. Ao mesmo tempo, agradeço à sua aluna, MSc. Sabrina Andrade, pela amizade, pelas conversas e por aprendermos juntas nas disciplinas que cursamos e no uso do HPLC-DAD.

À Dra. Inês Cordeiro, do Núcleo de Pesquisa Curadoria do Herbário, pela identificação e depósito dos exemplares da espécie de estudo do meu projeto.

Ao Prof. Dr. Marcus Tullius Scotti, do Laboratório de Quimioinformática do Departamento de Química da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por me

receber em seu laboratório e ensinar a realizar as análises estatísticas multivariadas com a composição química dos meus óleos essenciais. Foi uma experiência fantástica!

Aos Prof. Dr. João H. G. Lago, por aceitar colaborar conosco na determinação estrutural do sesterterpeno inédito, além das sugestões para a determinação estrutural do oxionoseriolídeo, que estava torcendo nossos neurônios destreinados e nos tirando o sono. Ainda tenho muito o que aprender com as mentes brilhantes que me cercam!

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do IBt, Ana Alice Martins Cardoso, Pedro Bige Wasinger e Amanda Guindalini Tartaglioni por todas as vezes que precisei de ajuda para resolver problemas burocráticos e técnicos, mas sobretudo pela amizade com que pude contar nestes anos de Doutorado.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, Ms. João Del Giudice Neto, Adão Martinho Barbosa e Elisamara Augusto da Silva Guilherme, pela emissão das autorizações de estudo na Reserva, por toda colaboração nas coletas e por nos receberem sempre muito bem. Foi um prazer poder contar com o apoio de pessoas boas e competentes como vocês.

Aos pesquisadores e funcionários do Núcleo de Pesquisa Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba, Simone Sayuri Sumida, Giuliano Lorenzini e Dra Maria de Fátima Scaf, pela emissão das autorizações de estudo na Reserva.

Aos coordenadores e funcionários do Programa de Pós-graduação, Célia Leite Sant'Anna, Silvia Ribeiro de Souza, Mutue Toyota Fujii, Márcia Regina Ângelo e Shirlei Dassi, por providenciarem tudo que precisei ao longo desses anos.

Aos funcionários da subfrota, Aliomar Oliveira Gomes "Mazinho", Luis Gustavo Zangueta Batista, Alfredo Miguel da Paz, José Roberto Morelli e Renato Faria por nos levarem nas viagens de coleta.

Aos funcionários da Prefeitura e da Secretaria de Gestão dos Recursos Naturais de Paranapiacaba e Parque Andreense, Edilene Vieira Fazza e Ingo

Grantsau, pela emissão das autorizações de estudo no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba, em Santo André.

Ao senhor Umberto Bittar, Auxiliar de Saneamento II do Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André (SEMASA), pelo fornecimento dos dados meteorológicos da região mais próxima a Paranapiacaba, em Santo André.

À Dr^a Silvia Ribeiro de Souza, do Núcleo de Pesquisas em Ecologia do IBt, à Dr^a Marcia Ortiz Mayo Marques, do Instituto Agrônomo de Campinas, e ao Prof. Dr. Marcelo José Pena Ferreira, do Instituto de Biociências da USP, pelas valiosas contribuições no meu exame de qualificação.

Ao Dr. Rodrigo Sant'Anna Cabral por ter sido tão solícito em tudo que precisei, desde a companhia na coleta na Ilha do Cardoso até me ensinar tudo que pôde a partir da sua vasta experiência em Química de Produtos Naturais. Não é por acaso que você se tornou um grande pesquisador e, se desejar, será também um brilhante professor.

Ao Dr. Marcos Enoque Leite Lima por ter cedido tantas plantas de *H. brasiliense* da sua parcela de estudo e pela divertida companhia em todas as coletas em Paranapiacaba.

À Msc. Marcela Castilho Boro, do Núcleo de Pesquisas em Micologia, pelas valiosas sugestões para cultivar melhor meus fungos, bem como todas as vezes que me recebeu na câmara de fluxo laminar para salvar os meus funguinhos.

Ao meu psicólogo, João Tuffanini, por todo suporte psicológico ao longo destes anos, contribuindo para o meu crescimento emocional e profissional.

Às minhas amigas de Araraquara, Bia e Gláucia, pela hospedagem todas as vezes em que estive em Araraquara realizando parte dos meus experimentos. Vocês são amigas queridas cujo sucesso espero acompanhar pelo resto da minha vida!

Aos amigos queridos, companheiros de laboratório, risadas garantidas nos almoços, companhias de passeios e por aí vai, Karina, Letícia, Simone, Juliana,

Ingrid, Manu, Michele, Alessandra Harumi, Leila, Elkin, Athos, Vinicio, Caio, Celso, Evandro. Sentirei muitas saudades desses momentos!

Ao meu amigo gênio Victor Almeida da Cruz, pelas planilhas salvadoras da pátria que fizeram meu trabalho render consideravelmente quando eu mais precisei!

À minha irmãzinha querida, Cristina Murakami, por me salvar todas as vezes que eu não sabia como consertar algum furdúncio que eu fazia no computador, analisando meus resultados, escrevendo os relatórios e a tese. Seu conhecimento em informática, design, pedagogia e, mais recentemente, direito me ajudaram demais!!! Sou muito grata por ter você na minha vida!

Ao Marcio Alves da Silva, meu querido namorado, por todo apoio de sempre e por me receber incontáveis vezes em sua casa para que eu pudesse trabalhar mais horas no laboratório e escrever a tese, a fim de descobrir alguma substância fantástica que irá revolucionar a ciência e nos tornar milionários! Obrigada por acreditar no meu potencial, mesmo que sonhando alto!

Ao CNPq, pela bolsa de Doutorado concedida (Proc. nº 164913/2013-0).

À FAPESP, pela bolsa de Doutorado concedida (Proc. nº 2014/17561-8), que me proporcionou tantas participações em congressos nacionais e internacionais e estágios em diversos laboratórios para o desenvolvimento de partes fundamentais do meu projeto, e pelo financiamento do Projeto Regular intitulado “Diversidade Química e Potencial Biológico de Espécies Seleccionadas da Flora Paulista” (Proc. nº 2014/15299-4), no qual o meu projeto esteve inserido.

E a todas as pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

Resumo	1
Abstract	3
Capítulo 1: Introdução Geral	
1 A Mata Atlântica e o Cerrado	5
2 Produtos naturais de plantas medicinais	9
3 O potencial medicinal da flora brasileira	11
4 <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex Miq. (Chloranthaceae)	12
5 Referências bibliográficas	17
Capítulo 2: Composição química e atividades farmacológicas dos óleos essenciais de <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) provenientes de Mata Atlântica e Cerrado do Estado de São Paulo	
Resumo	25
Abstract	26
Introdução	27
Material e Métodos	35
Resultados e Discussão	44
Conclusões	107
Referências bibliográficas	108
Capítulo 3: Estudo químico dos componentes fixos de <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex Miq. (Chloranthaceae)	
Resumo	119
Abstract	120
Introdução	121
Material e Métodos	124
Resultados e Discussão	138
Conclusão	248
Referências bibliográficas	248
Capítulo 4: Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of <i>Hedyosmum brasiliense</i> Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils	
Abstract	254
Introduction	254
Material and methods	255
Results	257
Discussion	261
Conclusions	263
References	264
Discussão geral e conclusões	267

Referências bibliográficas	271
----------------------------------	-----

Resumo

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae), popularmente conhecida como chá-de-bugre, é um arbusto dioico cujas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de enxaqueca, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, dores de estômago e como diurético. Estudos comprovaram as propriedades afrodisíaca, analgésica, ansiolítica e antidepressiva de suas lactonas sesquiterpênicas, bem como o potencial antimicrobiano e antifúngico de seus óleos essenciais. O estudo de plantas medicinais sob diferentes aspectos tem evidenciado que a sua composição química pode variar de acordo com a localização geográfica, a fase fenológica e até o gênero em plantas dioicas, podendo interferir no seu potencial farmacológico. Uma vez que a composição química pode variar por diversos fatores, os óleos essenciais de folhas frescas e secas, flores e frutos de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* coletadas em diferentes fases fenológicas e provenientes de Paranapiacaba (Mata Atlântica) e Mogi Guaçu (Cerrado) foram extraídos e testados para os ensaios antifúngico, antimicrobiano, antitumoral, antioxidante e anticolinesterásico. A ACP permitiu discriminar os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado, bem como da fase de floração, mas não distinguiu folhas masculinas e femininas. Os óleos essenciais provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos frente às atividades antimicrobiana, antifúngica e citotóxica, quando comparados com os óleos essenciais das plantas provenientes do Cerrado. Não foi observada variação fenológica significativa na atividade citotóxica dos óleos essenciais de folhas frescas da Mata Atlântica. Os óleos essenciais testados foram inativos para a atividade anticolinesterásica e antioxidante pelo método de sequestro do DPPH mas apresentaram atividade fraca pelo método do β -caroteno/ácido linoléico. Os componentes fixos de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* coletadas em Mata Atlântica e Cerrado também foram comparados pelos métodos de ^1H -RMN e ACP, CLAED-DAD e LC-MS/MS e testados para as atividades antifúngica, antibacteriana e citotóxica. Os extratos brutos de plantas masculinas e femininas foram semelhantes em ambas as populações, porém os extratos da Mata Atlântica foram selecionados para fracionamento e purificação por apresentarem forte potencial antifúngico quando comparado aos do Cerrado. Foram isoladas e identificadas oito substâncias puras, das quais duas são inéditas na literatura, o sesterterpeno hedyosulida e o éster vanilato de pinocarvila. Também foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas hedyosumina D, 15-acetoxi-isogermafurenolídeo, linderolídeo F, neolitacumona B e oxionoseriolídeo, além do bisnor-sesquiterpeno blumenol B. Três componentes identificados apresentaram atividade antifúngica, hedyosumina D, linderolídeo F e neolitacumona B. Os extratos brutos de ambas as populações apresentaram potencial

citotóxico, que se manteve nos resíduos das partições em hexano e diclorometano da população da Mata Atlântica. Os extratos brutos de ambas as populações e resíduos da partição em hexano da população da Mata Atlântica apresentaram potencial antibacteriano contra bactérias gram-positivas.

Palavras-chave: atividades biológicas, fases fenológicas, Cerrado, Mata Atlântica, Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba, óleos essenciais, lactonas sesquiterpênicas, sesterterpeno.

Abstract

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae), popularly known as “chá-de-bugre”, is a dioecious shrub. Its leaves has been used in folk medicine to treat of migraine, ovarium dysfunction, foot fungi, rheumatism, stomach pain and as diuretic. Studies have demonstrated aphrodisiac, analgesic, anxiolytic and antidepressive properties of their sesquiterpene lactones, as well as the antimicrobial and antifungal potential of their essential oils. The study of medicinal plants under different aspects has evidenced that their chemical composition may vary according to the geographic location, phenological phase and even gender in dioecious plants, which could interfere in their pharmacological potential. Since several factors could influence in the chemical composition of plants, the essential oils of fresh and dried leaves, flowers and fruits of male and female plants of *H. brasiliense* collected in different phenological phases and from Atlantic Forest and Cerrado were extracted and tested for antifungal, antimicrobial, antitumor, antioxidant and anticholinesterase assays. PCA allowed discriminating the essential oils of plants from Atlantic Forest and Cerrado, as well as from flowering phase, but not from male and female leaves. The essential oils from Atlantic Forest were more active against antimicrobial, antifungal and cytotoxic activities when compared to those from Cerrado. No significant phenological variation was observed in the cytotoxic activity of the fresh leaves essential oils from Atlantic Forest. The essential oils tested were inactive for the anticholinesterase assay and antioxidant by the DPPH radical scavenging method but showed weak β -carotene/linoleic acid antioxidant activity. Fixed metabolites of male and female plants of *H. brasiliense* from Atlantic Forest and Cerrado were compared by $^1\text{H-NMR}$ and PCA, CLAE-DAD and LC-MS/MS and tested for antifungal, antibacterial and cytotoxic activities. Crude extracts of male and female plants were similar in both populations, but crude extracts from Atlantic Forest were selected for fractionation and purification as they presented stronger antifungal activity when compared to those from Cerrado. Eight pure compounds were isolated and identified, of which two are unpublished, the sesterpene hedyosulide and the ester pinocarvyl vanillate. The sesquiterpene lactones hedyosumin D, 15-acetoxy-isogermafurenolide, linderolide F, neolitacumone B and oxyonoseriolide, and the bisnor-sesquiterpene blumenol B were also isolated. Three identified components presented antifungal activity, hedyosumin D, linderolide F and neolitacumone B. The crude extracts of both populations presented cytotoxic potential, which remained in the hexane and dichloromethane extracts of the Atlantic Forest population. The crude extracts of

both populations and the hexane extract of the Atlantic Forest population showed antibacterial potential against gram-positive bacteria.

Keywords: biological activities, phenological phases, Cerrado, Atlantic Forest, “Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba”, essential oils, sesquiterpene lactones, sesterpene.

1 A Mata Atlântica e o Cerrado

Dentre os biomas mais ameaçados do mundo encontram-se a Mata Atlântica e o Cerrado brasileiros. Ambos estão classificados entre os 35 “hotspots” mundiais, centros de altíssima biodiversidade e endemismo em que a extensão original foi dramaticamente reduzida, colocando em risco a sobrevivência de muitas espécies (Guedes *et al.* 2005; Mittermeyer *et al.* 2011; Myers *et al.* 2000; Silva *et al.* 2010). As florestas tropicais, principalmente as que correspondem aos hotspots, continuam sendo degradadas ao redor do mundo, em nome do desenvolvimento econômico (Melo *et al.* 2013). O desafio do milênio para a ciência brasileira consiste em encontrar meios de preservar as áreas remanescentes conduzindo estudos de plantas biologicamente ativas e contribuindo para o uso sustentável dessa vasta diversidade química, ainda pouco explorada (Silva *et al.* 2010).

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta tropical das Américas, logo após a Floresta Amazônica. Originalmente, cobria mais de 1,5 milhões de km² (Tabarelli *et al.* 2005), porém atualmente estima-se que restam apenas 15% de áreas remanescentes, conforme ilustra a **Figura 1** (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2017). Este bioma é constituído por uma parcela significativa de flora endêmica, sendo que estimativas indicam que a cada duas espécies arbóreas uma ocorre exclusivamente, ou seja, possui 50% de espécies exclusivas (Mori *et al.* 1981). Sua notável biodiversidade remanescente, com muitas espécies ainda desconhecidas, lhe confere grande potencial para a exploração química (Silva *et al.* 2010).

No Estado de São Paulo, estima-se que restam aproximadamente 16% de área natural remanescente (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2017), dos quais fazem parte o Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba (PNMNP), no Município de Santo André, e o Parque Estadual da Ilha do Cardoso (PEIC), no Município de Cananéia, locais de coleta deste estudo, indicados na **Figura 2**. De acordo com o Atlas do Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba – revelando o nosso Parque (2008), o PNMNP foi fundado em 2003, com área aproximada de 426 ha e altitude superior a 850 m. Faz divisa com o Parque Estadual da Serra do Mar e apresenta clima tropical úmido, com média pluviométrica anual de 3.000 mm, com chuvas distribuídas ao longo do ano, mais chuvoso de dezembro a março e menos chuvoso de maio a agosto. A temperatura média é de 22 °C nos meses mais quentes e 18 °C nos meses mais frios. Criado em 1962, o Parque Estadual da Ilha do Cardoso possui aproximadamente 22.500 ha de área de preservação ocupados por diferentes formações vegetais naturais. Apresenta clima megatérmico

superúmido, sem estação seca definida, com precipitação média anual de 3.000 mm e temperatura média anual de 22,6 °C (Bernardi *et al.* 2005).



Figura 1. Mapa identificando a área original (manchas claras) e os remanescentes florestais (manchas escuras) da Mata Atlântica no Brasil (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2017).

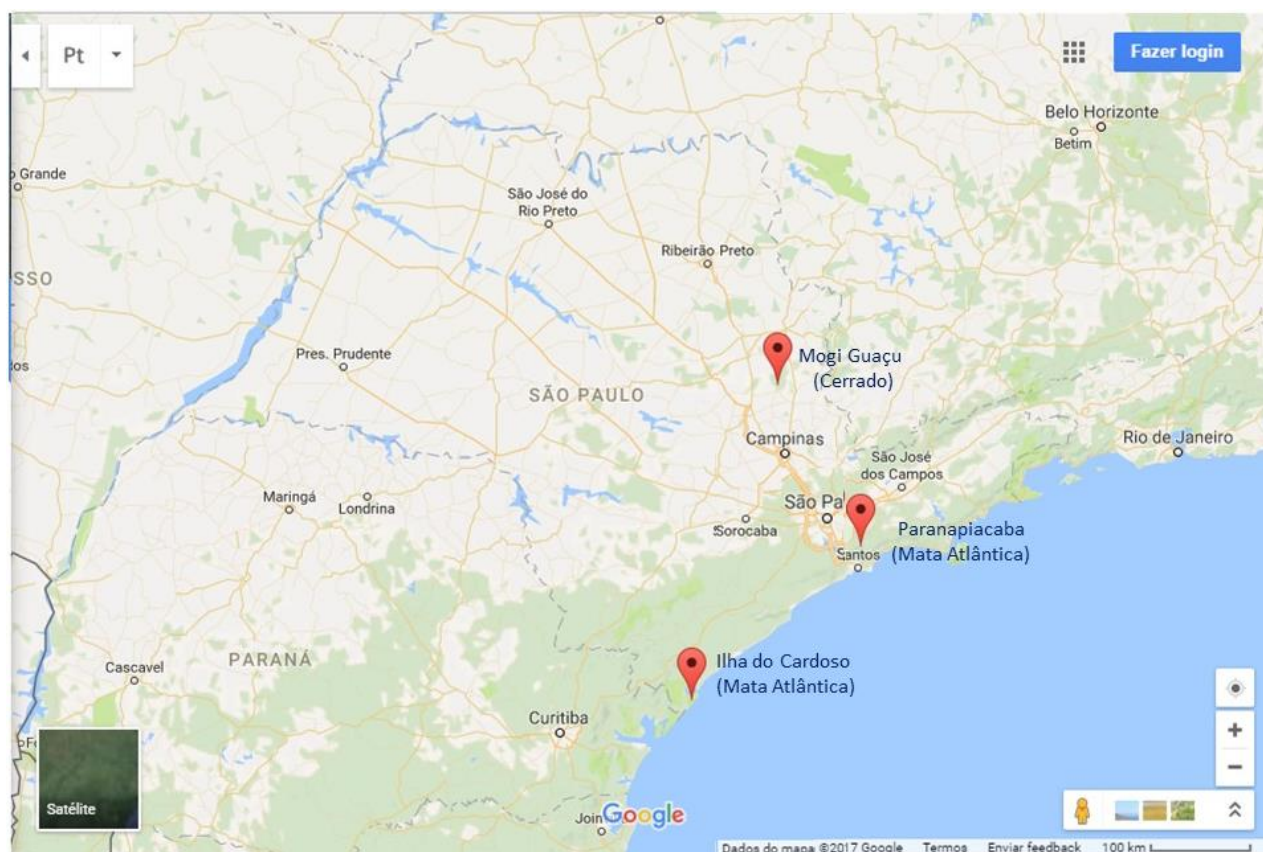


Figura 2. Mapa dos locais de coleta deste estudo, indicados pelas setas vermelhas: Paranapiacaba e Ilha do Cardoso, correspondentes a áreas de Mata Atlântica, e Mogi Guaçu, correspondente à área de Cerrado. Fonte: Google Maps.

O Cerrado é o mais antigo dos ambientes terrestres, com cerca de 35 milhões de anos. Devido à sua variação fisionômica, apresenta a mais rica flora dentre as savanas do mundo, estimada por Mendonça *et al.* (1998) em mais de 6 mil espécies de plantas, com alto grau de endemismo. Originalmente, ocupava aproximadamente 25% do território brasileiro, cobrindo aproximadamente 2 milhões de km², como mostra a **Figura 3**, mas devido à intensa devastação antrópica, principalmente para abertura de pastagens e áreas agrícolas (Silva *et al.* 2010), sua área remanescente é de apenas 20% (Myers *et al.* 2000), extremamente fragmentada em cerca de 8.300 pequenas áreas, o que dificulta a conservação do bioma e de suas espécies (Silva *et al.* 2010). Caracteriza-se por duas estações distintas: uma seca e outra chuvosa. Este bioma apresenta solos profundos, oligotróficos, ácidos e aluminotóxicos. A região abriga três grandes aquíferos: o Guarani, considerado o maior do mundo, Urucua e Bambuí (Felippe & Souza 2006). Considerada uma “floresta de cabeça para baixo”, a biomassa subterrânea do Cerrado é muitas vezes maior que a aérea, uma vez que o bioma é periodicamente renovado pelo fogo e as características da vegetação

como árvores baixas de troncos tortuosos e cascas grossas, esclerofilia e microfilia, sugerem que sejam resultado de um escleromorfismo oligotrófico, por escassez de nutrientes, ou um xeromorfismo aluminotóxico, por excesso de íons aluminotóxicos (Rizzini 1997).

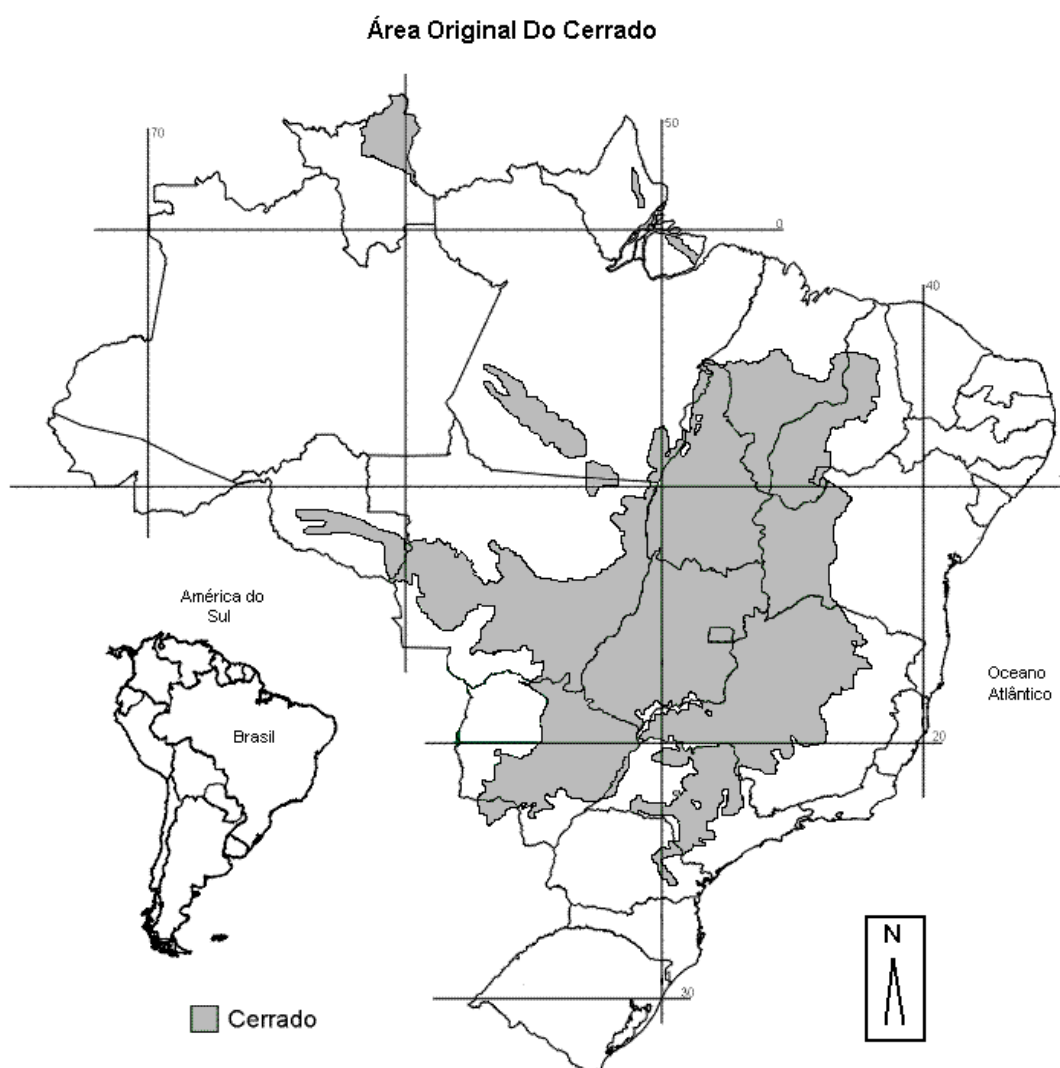


Figura 3. Mapa identificando a área original do Cerrado brasileiro (Felippe & Souza 2006).

No Estado de São Paulo, estima-se que em 1992 havia cerca de 7% de áreas remanescentes, sendo que apenas 0,51% dessas áreas são protegidas por unidades de conservação (Kronka *et al.* 1998). Dessa forma, a Reserva Biológica de Mogi-Guaçu (RBMG), correspondente a uma das áreas de estudo deste trabalho, indicada na **Figura 2**, atua como área de conservação e pesquisa dentro do Estado de São Paulo 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 1987).

O valor econômico da biodiversidade brasileira só será calculável, se explorada com base na pesquisa acadêmica multidisciplinar de excelência e inovação tecnológica. Assim, o aproveitamento e uso sustentável da biodiversidade exigem ações de curto, médio e longo prazo, materializados em programas de natureza multidisciplinar, com convergência de esforços tanto do setor acadêmico (Universidades e Institutos de Pesquisa), quanto do setor empresarial (indústrias), este último imprescindível para transformar o conhecimento gerado no ambiente acadêmico em desenvolvimento tecnológico (produtos) para posterior comercialização.

2 Produtos naturais de plantas medicinais

Os metabólitos secundários ou produtos naturais de origem vegetal são compostos orgânicos presentes em células especializadas, com papel fundamental na sua interação com o meio ambiente, atuando como compostos sinalizadores na interação das plantas com seu ambiente biótico e abiótico (Verpoorte 2000). Caracteristicamente, possuem alta plasticidade genética e diversidade química, que possibilitam às plantas adaptar-se às demandas do ambiente, continuamente variável (Hartmann 2007).

O estudo químico de plantas medicinais sob diferentes aspectos tem evidenciado que a sua composição química pode variar de acordo com o local de cultivo (Karousou *et al.* 2005), a localização geográfica (Schwob *et al.* 2004), a fase fenológica (Murakami *et al.* 2013), a sazonalidade, o quimiotipo (Gobbo-Neto & Lopes 2007; Perry *et al.* 1999) e até o gênero em plantas dioicas, cuja função ecológica dos metabólitos secundários em plantas masculinas e femininas pode variar, como observado no perfil químico de *Piper betle* (Bajpai *et al.* 2012), nos compostos fenólicos e terpenóides de *Juniperus oxycedrus* (Massei *et al.* 2006), nos óleos essenciais de *Baccharis trimera* (Lago *et al.* 2008) e nos compostos voláteis presentes somente nas flores masculinas de *Pandanus fascicularis* (Vinod *et al.* 2010), podendo interferir no seu potencial farmacológico (Simpson 2013).

As funções ecológicas dos metabólitos secundários sobre as plantas que os produzem sugerem que os mesmos possam atuar similarmente com efeitos medicinais em humanos, de forma que produtos envolvidos na defesa vegetal contra microrganismos patógenos, através de mecanismos de citotoxicidade, podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, assim como as substâncias envolvidas na defesa contra herbivoria através de ação neurotóxica, podem ter efeitos benéficos sobre humanos, atuando como antidepressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Briskin 2000).

Alguns exemplos clássicos de metabólitos secundários de origem vegetal utilizados pelo homem para o tratamento de doenças são: morfina, um alcalóide extraído dos frutos de *Papaver somniferum* (papoula), amplamente utilizada por sua forte ação analgésica (Hartmann 2007), utilizada para o alívio da dor moderada a forte causada pelo câncer e promoção de sensação de bem-estar (Hanks *et al.* 2001); taxol ou paclitaxel, um diterpeno extraído das cascas de *Taxus brevifolia* (Macías *et al.* 2007), vinblastina e vincristina, alcaloides extraídos de *Catharanthus roseus*, aplicados no tratamento antitumoral; quinina, um alcaloide extraído de *Cinchona officinalis*, e artemisina, um sesquiterpeno extraído de *Artemisia annua*, aplicados no tratamento da malária (Croteau *et al.* 2000).

Compostos bioativos extraídos de vegetais possuem papel relevante na economia mundial. Segundo a OMS, cerca de 80% da população mundial consome produtos naturais, um mercado estimado em US\$ 50 bilhões ao ano (Simões *et al.* 2012). Em 2011, as receitas chegaram a US\$ 5,3 bilhões somente nos Estados Unidos e a Associação Brasileira de Empresas de Fitoterápicos estima um mercado interno de R\$ 700 milhões a R\$ 1 bilhão. Durante o período de 1981 a 2014, 63% dos 1.562 novos fármacos desenvolvidos foram provenientes de produtos naturais ou substâncias desenvolvidas a partir deles (Newman *et al.* 2016). De acordo com os registros da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, há um total de 382 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil (ANVISA 2017), dos quais apenas dez foram produzidos a partir de plantas nativas do Brasil e apenas uma droga, o anti-inflamatório Acheflan, foi desenvolvida no Brasil (Portal Terra 2013).

Tanto o conhecimento tradicional indígena como o de povos quilombolas, que detêm o seu próprio conhecimento no uso de plantas medicinais nativas, adaptado ao longo do período em que têm vivido aqui, são fontes riquíssimas do uso de plantas nativas para o tratamento de doenças, constituindo ferramentas valiosas para os estudos etnobotânicos (Heinrich *et al.* 2004). Em 2003, a OMS divulgou que mais de 80% da população do continente africano utilizava-se da medicina tradicional para os cuidados básicos de saúde, cerca de 30-50% do consumo de medicamentos na China consistia de preparos herbais tradicionais e mais da metade da população da Europa e América do Norte já utilizaram medicina complementar ou alternativa pelo menos uma vez na vida, sendo que a Alemanha é responsável por consumir, tanto por automedicação como por prescrição médica (70% dos clínicos gerais prescrevem preparações com plantas medicinais), metade dos extratos vegetais comercializados na Europa para o tratamento de bronquite, gripe, resfriados,

doenças do trato gastrointestinal, dores de cabeça, nervosismo, insônia, fadiga e exaustão (Veiga Junior *et al.* 2005).

3 O potencial medicinal da flora brasileira

O Brasil possui uma flora riquíssima, constituída de aproximadamente 55 mil espécies de angiospermas, o equivalente a cerca de 10% de toda a biota terrestre (Machado *et al.* 2004), considerada uma fonte inesgotável de substâncias biologicamente ativas. Visto que as taxas de extinção vegetal têm aumentado rapidamente, sua preservação é fundamental, tanto pelo valor intrínseco dessa imensa riqueza biológica, como pelo seu enorme potencial como fonte de novos fármacos (Barreiro & Bolzani 2009). Um meio de se reverter este processo seria o estabelecimento de programas dedicados à exploração e conservação da biodiversidade remanescente, envolvendo botânicos, químicos e farmacologistas com o objetivo de provar o valor da biodiversidade através da descoberta de compostos biologicamente ativos por meio de modernos métodos de identificação e seleção de biomoléculas guias (Silva *et al.* 2010). Além disso, a análise, avaliação e efetiva utilização dos recursos disponíveis na natureza promovem avanços nos campos da educação, pesquisa científica e inovação, uma vez que a domesticação de plantas nativas de interesse médico requer avanços nas técnicas de cultivo e incentiva a criação de uma indústria química local (Monge *et al.* 2000). Todavia, no ano de 2000, o Brasil ocupava o 17º lugar no mundo com relação ao número de artigos publicados em estudos de componentes químicos de plantas (Gottlieb & Borin 2000), uma vez que países em desenvolvimento detêm uma rica biodiversidade com enorme potencial farmacológico, porém não dispõem dos mais avançados recursos científicos e tecnológicos para explorá-la satisfatoriamente (Monge *et al.* 2000).

Os produtos naturais possuem estrutura química complexa, com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de atividades biológicas, por isso são utilizados comercialmente como compostos bioativos (medicamentos, flavorizantes, fragrâncias, pesticidas). Tal variedade e complexidade são inalcançáveis por métodos laboratoriais (Viegas-Jr. *et al.* 2006). Portanto, perder biodiversidade significa perder informação de grande valor potencial (Monge *et al.* 2000). Em razão disso, a exploração racional e a conservação da biodiversidade são questões de prioridade e urgência (Bolzani *et al.* 1999), uma vez que podem gerar fitoterápicos.

No Brasil, o governo federal implantou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através do decreto n.º 5813 de 22 de junho de 2006, que estabeleceu linhas de ação prioritárias para o uso desses medicamentos de forma segura e racional, garantindo também a

sustentabilidade da biodiversidade e ampliando, dentro da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, as opções terapêuticas dos seus usuários. O uso de plantas medicinais no Brasil é bastante difundido por grande parte da população, embora a maioria das espécies nativas careça de estudos científicos sobre a composição química, eficácia e validação. A bioprospecção e estudos químicos e farmacológicos de espécies nativas com atividades antifúngica, antimicrobiana, anticolinesterásica, antioxidante e citotóxica são de fundamental importância neste contexto, considerando a grande demanda por medicamentos.

Os projetos “Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade Química e Prospeção de Novos Fármacos” e “Flora Aromática do Estado de São Paulo”, dentro do programa Biota-Fapesp, tiveram como focos principais a bioprospecção de extratos e de óleos essenciais de plantas nativas destes biomas, sendo o Instituto de Botânica de São Paulo fiel depositário e responsável pela coleta, identificação, obtenção de extratos e óleos essenciais e bioensaios para seleção de espécies com potencial anticolinesterásico, antioxidante, antimicrobiano e antitumoral. Como resultados destes projetos, houve a criação de um banco de extratos (Extratoteca) e de uma Oleoteca com cerca de 2300 extratos e 300 amostras de óleos essenciais, respectivamente, de espécies coletadas em regiões de Cerrado e Mata Atlântica do Estado de São Paulo, inclusive com patentes que contemplam o desenvolvimento de medicamentos a partir de algumas dessas espécies vegetais nativas (Patente DEINPI-010247, 2003; Patente WO2006039767-A1, 2006; Patente US2007244137-A1, 2008). O presente estudo esteve inserido na linha de pesquisa do Instituto de Botânica intitulada “Conservação e utilização sustentável da biodiversidade do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e investigação do potencial biológico de metabólitos secundários” e no Projeto Regular da Fapesp intitulado “Diversidade química e potencial biológico de espécies selecionadas da flora paulista” (Proc. nº 2014/15299-4).

4 Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. (Chloranthaceae)

Chloranthaceae é uma família botânica pantropical muito utilizada na medicina popular, com potencial farmacológico relativamente pouco investigada. É constituída por quatro gêneros, *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Ascarina* e *Hedyosmum*, e aproximadamente 75 espécies. Os três primeiros gêneros são encontrados no Oriente e o último apenas nas Américas (Balthazar & Endress 1999; Doyle *et al.* 2003; Eklund *et al.* 2004; Kong 2001; Todzia 1988; Todzia & Keating 1991).

Hedyosmum é o maior dos gêneros, compreendendo 40 espécies de árvores e arbustos. Distribui-se desde o México, percorrendo toda América Central até a Bolívia, leste das Guianas e

Antilhas. O nome do gênero *Hedyosmum* (do grego *hedy*, agradável; *osmum*, odor, fragrância) faz alusão a uma das características mais notáveis dessas plantas: o cheiro agradável proveniente de todas as suas partes (Reitz 1965; Todzia 1988).

Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. é um arbusto ou arvoreta que varia de 1,5 a 6 m de altura, ocorrendo do sul do Pará até Santa Catarina, principalmente na mata pluvial atlântica, estendendo-se para a região central do Brasil até o oeste do Paraguai, pelas matas de galeria (Rossi 2002). Popularmente, é conhecido por sinonímias vulgares que variam de acordo com a região: âmbar vegetal, canela cânfora (DF); chá-de-índio (SP); chá-de-bugre (DF, RJ, e MG); chá-de-soldado (DF e RJ); cidreira e cidrão (PR e SC); erva almíscar e erva-de-bugre (RJ); erva-de-soldado (DF, SP e MG); hortelã-do-brejo (RJ e MG) e hortelã silvestre (RJ). Segundo Occhioni (1954), as plantas desta espécie são dioicas e apresentam inflorescências com flores femininas pequenas, esverdeadas, inodoras, sésseis com brácteas carnosas e unidas entre si, e inflorescências masculinas do tipo espigas ovais ou cilíndricas, com flores também esverdeadas com brácteas lineares ou triangulares lanceoladas. Os frutos são pequenas drupas subcarnosas de coloração branco-lácteo. A **Figura 4** ilustra detalhadamente um arbusto (A), flores femininas (B) e masculinas (C) e frutos (D) de *H. brasiliense*.

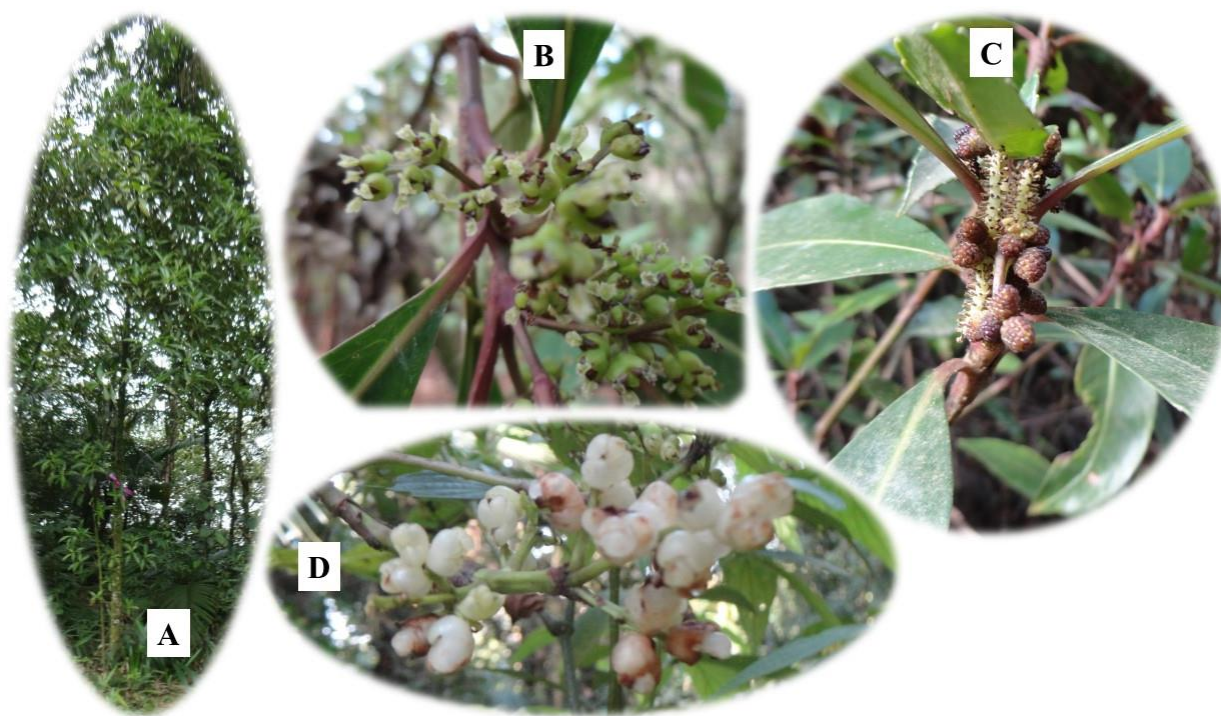


Figura 4. Arbusto (A), flores femininas (B), masculinas (C) e frutos (D) de *H. brasiliense*.

Muitas espécies de Chloranthaceae apresentam potencial medicinal, com atividades antimicrobiana, hepatoprotetora, imunoestimulante, anti-inflamatória e analgésica já comprovadas (Cao *et al.* 2008). Uma classe de compostos largamente encontrada nesta família, isolada de diferentes gêneros como *Chloranthus* e *Hedyosmum* (Bercion *et al.* 2005; Kawabata *et al.* 1998), são as lactonas sesquiterpênicas, grupo de substâncias que apresenta grande potencial farmacológico, com destaque para as atividades citotóxica, antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, antimalárica, esquistossomicida e antifúngica (Dewick 2002; Evans 1991; Kim *et al.* 2007). A maioria dos estudos fitoquímicos da família é mais frequente no Oriente, principalmente com os gêneros *Sarcandra* e *Chloranthus*, presentes em Farmacopeias da China e do Japão. Estudos recentes mostraram que o óleo essencial de folhas frescas de *H. arborecens*, espécie nativa do Caribe, apresentou atividade citotóxica frente a linhagens de células humanas de carcinoma hepático e de adenocarcinoma do cólon (Sylvestre *et al.* 2007). Adicionalmente, o óleo essencial de partes aéreas de *H. sprucei*, proveniente do Equador, apresentou atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica contra linhagem de células de adenocarcinoma de mama (Guerrini *et al.* 2016).

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

Existem poucos registros na literatura sobre a composição química de espécies do gênero *Hedyosmum*. Amoah *et al.* (2013) e Amoah *et al.* (2015b) identificaram, em folhas frescas de *H. brasiliense* proveniente de Santa Catarina, as lactonas sesquiterpênicas podoandina, 1,2-epoxi-10-hidroxi-podoandina, 1-hidroxi-10(15)-metileno-podoandina, onoseriolida, 8 α -9 α -hidroxi-onoseriolida, linderolida F e 15-acetoxi-isogermafurenolida, além de compostos fenólicos. Além destes, podem ser destacados trabalhos de identificação de lactonas sesquiterpênicas de *H. arborescens* (Bercion *et al.* 2005), flavonoides glicosídicos de *H. bonplandianum* (Cárdenas *et al.* 1993) e óleos essenciais de *H. brasiliense*, *H. sprucei*, *H. arborescens*, *H. scabrum*, *H. colombianum*, *H. angustifolium*, *H. mexicanum*, *H. bonplandianum* e *H. costaricense* (Delgado *et*

al. 2003; De Feo & Soria 2007; Guerrini *et al.* 2016; Kirchner *et al.* 2010; Mundina *et al.* 1999; Sylvestre *et al.* 2007).

O consumo de *H. brasiliense* na medicina popular se deve às suas características aromáticas, analépticas e febrífugas, portanto suas folhas são utilizadas no tratamento de enxaqueca, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, dores de estômago e como diurético (Reitz 1965; Todzia 1988). A população dos arredores da Reserva Biológica do Alto da Serra de Paranapiacaba relatou o uso do chá de suas folhas para combater a hipertensão. Algumas de suas atividades biológicas têm sido comprovadas cientificamente e relacionadas à sua composição química, como é o caso das atividades afrodisíaca (Leitolis *et al.* 2016), analgésica (Trentin *et al.* 1999), ansiolítica e antidepressiva de lactonas sesquiterpênicas (Tolardo *et al.* 2010), do efeito antidepressivo da lactona sesquiterpênica podoandina (Gonçalves *et al.* 2012). O extrato etanólico de folhas desta espécie coletada no Estado do Paraná mostrou-se ativo contra bactérias Gram-positivas (Cordova *et al.* 2010) e o extrato etanólico de folhas frescas coletadas em Santa Catarina apresentou efeito ansiolítico e antidepressivo (Gonçalves *et al.* 2012). Os óleos essenciais de folhas secas de *H. brasiliense* coletadas no Estado de São Paulo por Resende-Vido (2009) apresentaram atividade antimicrobiana forte, com inibição de até 100 % das bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, enquanto que os óleos de folhas frescas foram ativos até 100 % contra a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e o fungo *Candida albicans*, resultados semelhantes aos obtidos por Kirchner *et al.* (2010), cujos óleos essenciais de folhas frescas da mesma espécie coletada em Santa Catarina não apresentaram atividade inibidora contra bactérias Gram-negativas, mas foram fortemente ativas contra bactérias Gram-positivas e fungos. Apesar do potencial antimicrobiano ser semelhante entre folhas frescas dos diferentes locais, observou-se diferença na composição química desses óleos, cujos compostos majoritários (acima de 5 %) de folhas frescas das plantas coletadas em SP foram sabineno, (Z)- β -guaieno e pinocarvona (Resende-Vido 2009) e os das plantas provenientes de SC foram pinocarvona, curzereno e carotol (Kirchner *et al.* 2010). Além disso, Murakami *et al.* (2017) comprovaram forte atividade antifúngica dos óleos essenciais de folhas e flores de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* proveniente da Ilha do Cardoso (SP), por bioautografia contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, atribuindo a atividade observada principalmente ao curzereno, um dos componentes majoritários presentes nos óleos essenciais testados, e demonstraram que os mesmos óleos essenciais

apresentaram melhor atividade antioxidante pelo método de inibição da peroxidação lipídica do β -caroteno do que pelo método de sequestro do radical livre DPPH.

Substâncias que apresentam propriedades antimicrobianas têm grandes possibilidades de apresentar outras atividades farmacológicas, segundo um consenso na área farmacológica. Esses trabalhos são importantes e servem como instrumento para direcionar a identificação de princípios ativos de espécies frequentemente utilizadas na medicina popular, porém sem comprovação científica de sua atividade farmacológica.

O prosseguimento dos estudos de metabólitos secundários de *H. brasiliense* se justifica pela detecção de excelente atividade antifúngica e antibacteriana por parte dos óleos essenciais extraídos de suas folhas por Resende-Vido (2009). Tal atividade é de grande interesse para a indústria farmacêutica visto que, com o passar do tempo, a maioria dos micro-organismos adquire resistência a antibióticos. Além disso, muitas das espécies testadas, como *Candida albicans*, por exemplo, causam enfermidades em pacientes imunodeprimidos (Cowan 1999; Lima *et al.* 2006).

Uma vez que a composição química pode variar por diversos fatores, para complementar os dados obtidos anteriormente por Resende-Vido (2009) foram testadas as atividades antifúngica, antimicrobiana, citotóxica, antioxidante e anticolinesterásica dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de indivíduos masculinos e femininos localizados em biomas diferentes (Mata Atlântica e Cerrado) e em fases fenológicas distintas (vegetativa, floração e frutificação), bem como as atividades antifúngica, antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos e partições e a atividade antifúngica das substâncias isoladas das folhas de *H. brasiliense*.

O presente trabalho foi dividido em capítulos, abordando separadamente o estudo dos óleos essenciais e dos componentes fixos de *H. brasiliense*, sob diferentes aspectos. O capítulo 2 aborda a comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de plantas masculinas e femininas coletadas em diferentes fases fenológicas e provenientes de Cerrado e Mata Atlântica. O capítulo 3 apresenta a comparação dos componentes fixos e atividades biológicas de extratos etanólicos de plantas masculinas e femininas provenientes de Cerrado e Mata Atlântica, com o isolamento guiado pela atividade antifúngica e a identificação de substâncias puras. O capítulo 4 corresponde ao artigo científico publicado em 2017 na revista Medicines (MDPI), envolvendo o estudo da composição química e das atividades antifúngica e antioxidante dos óleos essenciais de folhas e flores de plantas masculinas e femininas provenientes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso.

5 Referências Bibliográficas

- Amoah, S.K., Oliveira, F.L., Cruz, A.C., Souza, N.M., Campos F.R., Barison, A., Biavatti, M.W. 2013. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry* 87: 126-132.
- Amoah, S.K., Kouloura, E., Dutra, L.M., Barison, A., Wildner, L.M., Bazzo, M.L., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A., Biavatti, M.W. 2015. Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry letters* 13: 267–274.
- ANVISA 2017. Fitoterápicos. Disponível em: <https://goo.gl/EPs8xu> (Acesso em: 02.08.2017)
- Atlas do Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba - revelando o nosso Parque 2008. 2a. ed. Prefeitura do Município de Santo André / Annablume, São Paulo, 78 p.
- Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – Período 2015-2016 – Relatório técnico. 2017. Fundação SOS Mata Atlântica, São Paulo, 69 p.
- Bajpai, V., Pandei, R., Negi, M.P.S., Bindu, K.H., Kumar, N., Kumar, B. 2012. Characteristic differences in metabolite profile in male and female plants of dioecious *Piper betle* L. *Journal of Bioscience* 37(6): 1061-1066.
- Balthazar, M. & Endress, P.K. 1999. Floral bract function, flowering process and breeding systems of *Sarcandra* and *Chloranthus* (Chloranthaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 218: 161-178.
- Barreiro, E.J. & Bolzani, V.S. 2009. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. *Química Nova*, 32(3): 679-688.
- Bercion, S., Martin, M.A.C.K., Baltaze, J.P., Bourgeois, P. 2005. A new α -methylene γ -lactone from *Hedyosmum arborecens*. *Fitoterapia* 76: 620-624.
- Bernardi, J.V.E., Landim, P.M.B., Barreto, C.L., Monteiro, R.C. 2005. Estudo espacial do gradiente de vegetação do Parque Estadual da Ilha do Cardoso, SP, Brasil. *Holos Environment*, 5(1): 1-22.
- Briskin, D. 2000. Medicinal plants and phytomedicines – Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology* 124: 507-514.

- Cao, C.M., Peng, Y., Shi, Q.W., Xiao, P.G.** 2008. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity* 5: 219-238.
- Cárdenas, L.C., Rodríguez, J., Villaverde, M.C., Riguera, R., Cadena, R., Otero, J.A.** 1993. The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Medica* 59 (1): 26-27.
- Cordova, S.M., Benfatti, C.S., Magina, M.D.A., Magina, M.D.A., Guedes, A., Cordova, C.M.M.** 2010. *RBAC* 42(4): 241-244.
- Cowan, M.M.** 1999. Plants products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 12: 564-582.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp.1250-1318.
- De Feo, V., Soria, R.U.** 2007. Composition of the Essential Oil of *Hedyosmum scabrum* (R. et P.) Solms (Chloranthaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 10: 41-45.
- Delgado, P.A., Quijano, C.E., Morales, G., Pino, J.A.** 2010. Composition of the Essential Oil From Leaves and Fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec. Grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research* 22: 234-236.
- Dewick, P.M.** 2002. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. 2 ed. London: John Wiley & Sons. Ltd.
- Doyle, J.A., Eklund, H. & Herendeen, P.S.** 2003. Floral evolution in Chloranthaceae: implications of a morphological phylogenetic analysis. *International Journal of Plant Sciences* 164 (5): S365-S382.
- Eklund, H., Doyle, J.A. & Herendeen, P.S.** 2004. Morphological phylogenetic analysis of living and fossil Chloranthaceae. *International Journal of Plant Sciences*. 165: 107-151.
- Evans, W.C.** 1991. *Farmacognosia*. 13 ed. México: Interamericana-McGraw-Hill.
- 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.

- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quimica Nova* 30: 374-381.
- Gonçalves, A.E., Burger, C., Amoah, S.K.S., Tolardo, R., Biavatti, M.W., Souza, M.M.** 2012. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology* 674 (2-3): 307-314.
- Gottlieb, O.R. & Borin, M.R.M.** 2000. Medicinal products: regulation of biosynthesis in space and time. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 95(1): 115-120.
- Guedes, M.L.S., Batista, M.A., Ramalho, M., Freitas, H.M.B., Silva, E.M.** 2005. Breve incursão sobre a biodiversidade da Mata Atlântica. In: C.R. Franke, P.L.B. Rocha, W. Klein, S.L. Gomes (orgs.). *Mata Atlântica e Biodiversidade*. Edufba, Salvador, pp. 37-92.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M., Scalvenzi, L.** 2016. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1638342>
- Hanks, G.W., De Conno, F., Cherny, N., Hanna, M., Kalso, E., McQuay, H.J., Mercadante, S., Meynadier, J., Poulain, P., Ripamonti, C., Radbruch, L., Roca, I., Casas, J., Sawe, J., Twycross, R.G., Ventafridda, V.** 2001. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. *British journal of cancer* 84(5): 587-593.
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to echochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2831-2846.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S., Williamson, E.M.** 2004. *Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy*, 1ed. London: Churchill Livingstone.
- Karousou, R., Koureas, D.N., Kokkini, S.** 2005. Essential oil composition is related to the natural habitats: *Coridothymus capitatus* and *Satureja thymbra* in NATURA 2000 sites of Crete. *Phytochemistry* 66: 2668-2673.
- Kawabata, J., Fukushi, E. & Mizutani, J.** 1998. Sesquiterpene dimer and trimer from *Chloranthus japonicus*. *Phytochemistry* 47 (2): 231-235.

- Kirchner, K., Wisniewski Jr, A., Cruz, A.B., Biavatti, M.W., Netz, D.J.A.** 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20 (5): 692-699.
- Kong, H.Z.** 2001. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 136: 279-294.
- 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.
- Lago, J.H.G., Romoff, P., Fávero, O.A., Souza, F.O., Soares, M.G., Baraldi, P.T., Corrêa, A.G.** 2008. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochemical Systematics and Ecology* 36: 737-740.
- Leitolis, A., Amoah, S.K.S., Biavatti, M.W., Silva-Santos, J.E.** 2016. Sesquiterpene lactones from *Hedyosmum brasiliense* induce *in vitro* relaxation of rat aorta and corpus cavernosum. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26: 363-368.
- Lima, I.O., Oliveira, R.A.G., Lima, E.O., Farias, N.M.P., Souza, E.L.** 2006b. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16 (2):197-201.
- Machado, L.P.** 2008. Avaliação do Potencial Antifúngico de Extratos de Macroalgas no Controle da Antracnose do Mamoeiro. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.
- Macias, F.A., Galindo, J.L.G., Galindo, J.C.G.** 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2917-2936.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1993. Florística do Cerrado na Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, SP. *Acta botanica brasiliica* 7: 33-60.
- Massei, G., Watkins, R., Hartley, S.E.** 2006. Sex-related growth and secondary compounds in *Juniperus oxycedrus macrocarpa*. *Acta Oecologica* 29: 15-140.

- Melo, F.P.L., Pinto, S.R.R., Brancalion, P.H.S., Castro, P.S., Rodrigues, R.R., Aronson, J., Tabarelli, M.** 2013. Priority setting for scaling-up tropical restoration projects: early lessons from the Atlantic Forest Restoration Pact. *Environmental Science & Policy* 33: 395-404.
- Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M.T., Silva Junior, M.C., Rezende, A.V., Filgueiras, T.S., Nogueira, P.E.** 1998. A flora vascular do Cerrado pp. 279-556. In: S.M. Sano & S.P. de Almeida (eds.). *Cerrado – ambiente e flora*. EMBRAPA, Planaltina.
- Mittermeyer, R.A., Turner, W.R., Larsen, F.W., Crooks, T.M., Gascon, C.** 2011. Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots pp. 3-22. In: F.E. Zachos & J.C. Habel (eds.). *Biodiversity hotspots*. Springer Nature, Germany.
- Monge, A., Chorghade, M., Erhardt, P.W., Ganellin, C.R., Koga, N., Lindberg, P., Perun, T.J., Topliss, J.G., Trivedi, B.K., Wermuth, C.G.** 2000. Medicinal chemistry on the development of societies – Biodiversity and natural products. *European Journal of Chemistry* 35: 1121-1125.
- Mori, S.M., Boom, B.M., Prance, G.T.** 1981. Distribution patterns and conservation of eastern Brazilian coastal forest tree species. *Brittonia* 33: 233-245.
- Mundina, M., Vila, R., Felix, T., Cicció, J.F., Ibañez, C., Adzet, T., Casanova, J. & Cañigual, S.** 2000. Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal* 15 (3): 201-205.
- Murakami, C., Lago, J.H.G., Perazzo, F.F., Ferreira, K.S., Lima, M.E.L., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Chromolaena laevigata* during flowering and fruiting stages. *Chemistry & Biodiversity* 10: 621-627.
- Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M.T., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2017. Chemical composition, antifungal and antioxidant activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) essential oils. *Medicines* 4 (3): 55.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 430: 853-858.
- Newman, D.J. & Cragg, G.M.** 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* 79: 629-661.

- Occhioni, P.** 1954. Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw. Tese (Doutorado - Professor Catedrático de Botânica Aplicada à Farmácia) - Faculdade Nacional de Farmácia, Rio de Janeiro, 176 p.
- Perry, N.B., Anderson, R.E., Brennan, N.J., Douglas, M.H., Heaney, A.J., McGimpsey, J.A., Smallfield, B.M.** 1999. Essential oils from Dalmatian sage (*Salvia officinalis* L.): Variations among individuals, plantp, seasons and sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 2048-2054.
- Reitz, R.** 1965. Clorantáceas. In: Reitz, R. *et al.* Flora catarinense. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 10p.
- Resende-Vido, D.L.** 2009. Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 92p.
- Rizzini, C.T.** 1997. Tratado de fitogeografia do Brasil. Âmbito cultural edições Ltda., Rio de Janeiro. 2º edição. 747 p.
- Rossi, L.** 2002. *Chloranthaceae*. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo, vol 2. Instituto de Botânica, São Paulo, 391p.
- 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.
- Silva, D.H.S., Castro-Gamboa, I, Bolzani, V.S.** 2010. Plant diversity from Brazilian Cerrado and Atlantic Forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In: Mander, L., Lui, H.-W. (Org.), Verpoorte (Ed.). *Comprehensive natural products II – Chemistry and biology*, Oxford: Elsevier, vol. 3, p. 95-133.
- Simões, E.R.B., Marques, L.G.A., Soares, B.M.P., Pascoalino, D., Santos, M.R.M.C., Pessoa, C.** 2012. Technological Forecasting on Phytotherapics - Development in Brazil. *International Journal of Medical, Health, Pharmaceutical and Biomedical Engineering* 6 (7): 7-11.

- Simpson, B.S.** 2013. Dioecy in plants – Is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Medica* 79: 613-615.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Martin, M.A.C.K., Bercion, S.R. & Legault, J.** 2007. Chemical composition of leaf essential oil of *Hedyosmum arborecens* and evaluation of its anticancer activity. *Natural Products Communications*. 2(12): 1269-1272.
- Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M. & Bedê, L.C.** 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade* 1: 132-138.
- Todzia, C.A.** 1988. *Flora Neotropica*. v. 48. The New York Botanical Garden, New York.
- Todzia, C.A. & Keating, R.C.** 1991. Leaf architecture of Chloranthaceae. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 78: 476-496.
- Tolardo, R., Zetterman, L., Bitencourtt, D.R., Mora, T.C., Oliveira, F.L., Biavatti, M.W., Amoah, S.K.S., Bürger, C. & Souza, M.M.** 2010. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 128: 63-70.
- Trentin, A.P., Santos, A.R., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A. & Calixto, J.B.** 1999. Antinociception caused by extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Medica*. 65 (6): 517-521.
- 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. Secondary metabolism. In: Verpoorte, R. & Alfermann, A.W. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, London, pp.1-29.
- Viegas-Jr, C., Bolzani, V.S. & Barreiro, E.J.** 2006. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova* 29 (2): 326-337.
- Vinod, M.S., Sankararamasubramanian, H.M., Priyanka, R., Ganesan, G., Parida, A.** 2010. Gene expression analysis of volatile-rich male flowers of dioecious *Pandanus fascicularis* using expressed sequence tags. *Journal of Plant Physiology* 167: 914-919.

Composição química e atividades biológicas
dos óleos essenciais de *Hedyosmum brasiliense*
Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) provenientes de
Mata Atlântica e Cerrado do Estado de São Paulo

Resumo

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae), popularmente conhecida como chá-de-bugre, é um arbusto dioico. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de enxaqueca, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, dores de estômago e como diurético. Estudos comprovaram as propriedades afrodisíaca, analgésica, ansiolítica e antidepressiva de suas lactonas sesquiterpênicas, bem como o potencial antimicrobiano e antifúngico de seus óleos essenciais. O estudo de plantas medicinais sob diferentes aspectos tem evidenciado que a sua composição química pode variar de acordo com o local de cultivo, a localização geográfica, a fase fenológica, a sazonalidade, o quimiotipo e até o gênero em plantas dioicas, podendo interferir no seu potencial farmacológico. Uma vez que a composição química pode variar por diversos fatores, os óleos essenciais de folhas frescas e secas, flores e frutos de plantas masculinas e femininas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas em diferentes fases fenológicas e provenientes de Paranapiacaba (Mata Atlântica) e Mogi Guaçu (Cerrado) foram extraídos por hidrodestilação e tiveram a sua composição química analisada por CG/EM e comparada por Análise de Componentes Principais (ACP). Todos os óleos essenciais foram testados para os ensaios antifúngico, antimicrobiano, citotóxico, antioxidante e anticolinesterásico. A ACP permitiu discriminar os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado, bem como da fase de floração, mas não distinguiu folhas masculinas e femininas. Os óleos essenciais provenientes da Mata Atlântica apresentaram maiores teores de monoterpenos em comparação com os provenientes do Cerrado. Observou-se também que os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos frente às atividades antimicrobianas, antifúngicas e antitumorais, quando comparados com os óleos essenciais das plantas provenientes do Cerrado. Não foi observada variação significativa na atividade citotóxica dos óleos essenciais de folhas masculinas e femininas provenientes da Mata Atlântica nas diferentes fases fenológicas. Os óleos essenciais testados foram inativos no ensaio de sequestro do DPPH e apresentaram fraca atividade antioxidante pelo método do β -caroteno/ácido linoléico, na concentração preliminar de 400 $\mu\text{g/mL}$, e foram inativos para a atividade anticolinesterásica, na concentração preliminar de 300 $\mu\text{g/mL}$.

Palavras-chave: chá-de-bugre, antifúngica, antimicrobiana, citotóxica, fases fenológicas, Cerrado, Mata Atlântica, Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba.

Abstract

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae), popularly known as “chá-de-bugre”, is a dioecious shrub. Its leaves has been used in folk medicine to treat migraine, ovarium dysfunction, foot fungi, rheumatism, stomach pain and as diuretic. Studies have demonstrated aphrodisiac, analgesic, anxiolytic and antidepressive properties of their sesquiterpene lactones, as well as the antimicrobial and antifungal potential of their essential oils. The study of medicinal plants under different aspects has evidenced that their chemical composition may vary according to the place of growth, geographic location, phenological phase, seasonality, chemotype and even gender in dioecious plants, which could interfere in their pharmacological potential. Since several factors could influence the chemical composition of plants, the essential oils of fresh and dried leaves, flowers and fruits of male and female plants of *Hedyosmum brasiliense* collected in different phenological phases and from Paranapiacaba (Atlantic Forest) and Mogi Guaçu (Cerrado) were extracted by hydrodistillation and their chemical composition was analyzed by GC/MS and compared by Principal Component Analysis (PCA). All essential oils were tested for antifungal, antimicrobial, antitumor, antioxidant and anticholinesterase assays. PCA allowed to discriminate the essential oils of plants from Atlantic Forest and Cerrado, as well as from flowering phase, but not from male and female leaves. The essential oils from Atlantic Forest presented higher levels of monoterpenes when compared to those from Cerrado. Also, the essential oils of plants from Atlantic Forest were more active against antimicrobial, antifungal and antitumor activities when compared to those from Cerrado. No significant variation was observed in the antitumor activity of the essential oils of male and female leaves from Atlantic Forest from the different phenological phases. The essential oils tested were inactive for the DPPH radical scavenging assay and showed weak β -carotene/linoleic acid antioxidant activity, at the preliminary concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$, and were inactive for the anticholinesterase assay, at the preliminary concentration of 300 $\mu\text{g/mL}$.

Keywords: “chá-de-bugre”, antifungal, antimicrobial, antitumor, phenological phases, Cerrado, Atlantic Rain Forest, “Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba”.

1 Introdução

Os óleos essenciais, também chamados de óleos voláteis, são misturas de substâncias voláteis (de 20 a 200 componentes), solúveis em solventes orgânicos apolares, em geral odoríferas e líquidas, obtidas por arraste a vapor d'água ou espremedura dos pericarpos de frutos cítricos. Atualmente, são conhecidas mais de 3.000 substâncias químicas detectadas em óleos essenciais (Heinzmann *et al.* 2017).

Dentro do reino vegetal, os óleos essenciais são raramente encontrados em gimnospermas, com exceção das coníferas, como em *Pinus densiflora* e *P. koraiensis* (Hong *et al.* 2004). Nas angiospermas, ocorrem em menor frequência em monocotiledôneas, podendo citar as famílias Poaceae e Zingiberaceae, como em *Cymbopogon winterianus* e *Zingiber officinale*, popularmente conhecidas como citronela e gengibre, respectivamente (Duarte *et al.* 2007; Schnitzler *et al.* 2007). Esta classe de compostos é mais abundantemente encontrada nas eudicotiledôneas, como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae e Rutaceae (Heinzmann *et al.* 2017).

Os óleos essenciais podem ser sintetizados em todos os órgãos das plantas, como folhas (eucalipto), ramos (alecrim), raízes (vetiver), rizomas (gengibre), flores (rosa), frutos (anis-estrelado), sementes (noz-moscada), madeira (pau-rosa) e casca do caule (canela), e são armazenados em estruturas especializadas como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae), canais oleíferos (Apiaceae), células epidérmicas e tricomas glandulares (Lamiaceae) (Bakkali *et al.* 2008; Heinzmann *et al.* 2017).

São constituídos em sua maior parte por terpenóides e fenilpropanóides, sendo os primeiros mais frequentes (Heinzmann *et al.* 2017). Os fenilpropanóides são formados por um esqueleto carbônico com um anel aromático ligado a uma cadeia de 3 carbonos (Croteau *et al.* 2000; Heinrich *et al.* 2004), enquanto que os terpenóides são formados por unidades de isopreno de 5 carbonos (**Figura 1**) (Croteau *et al.* 2000).

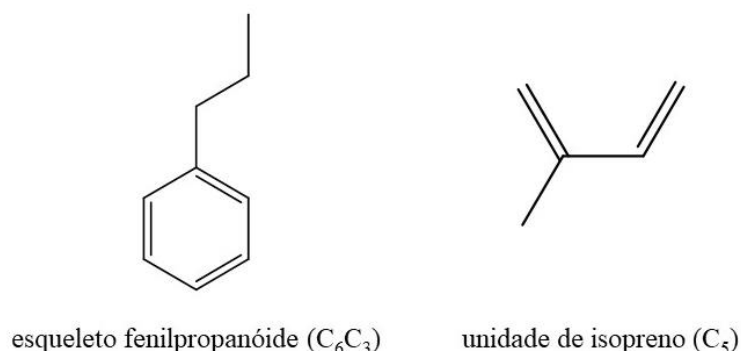


Figura 1. Unidades fundamentais de fenilpropanóides e terpenóides.

Os terpenóides são, possivelmente, a classe de produtos naturais vegetais mais variada estruturalmente (Croteau *et al.* 2000), constituindo mais de um terço de todos os metabólitos secundários conhecidos (Verpoorte 2000). Classificados de acordo com o número de unidades de isopreno, os óleos essenciais podem conter monoterpenos, formados por duas unidades de isopreno (C_{10}), sesquiterpenos, formados por três unidades de isopreno (C_{15}) e diterpenos, formados por quatro unidades de isopreno (C_{20}) que formam moléculas maiores e bem menos voláteis, por isso geralmente são encontrados em óleos essenciais extraídos com solventes orgânicos e por fluído supercrítico (Heinzmann *et al.* 2017).

As vias de biossíntese dos óleos essenciais, bem como de todo o metabolismo secundário, partem do metabolismo da glicose (**Figura 2**) (Kreis *et al.* 2017).

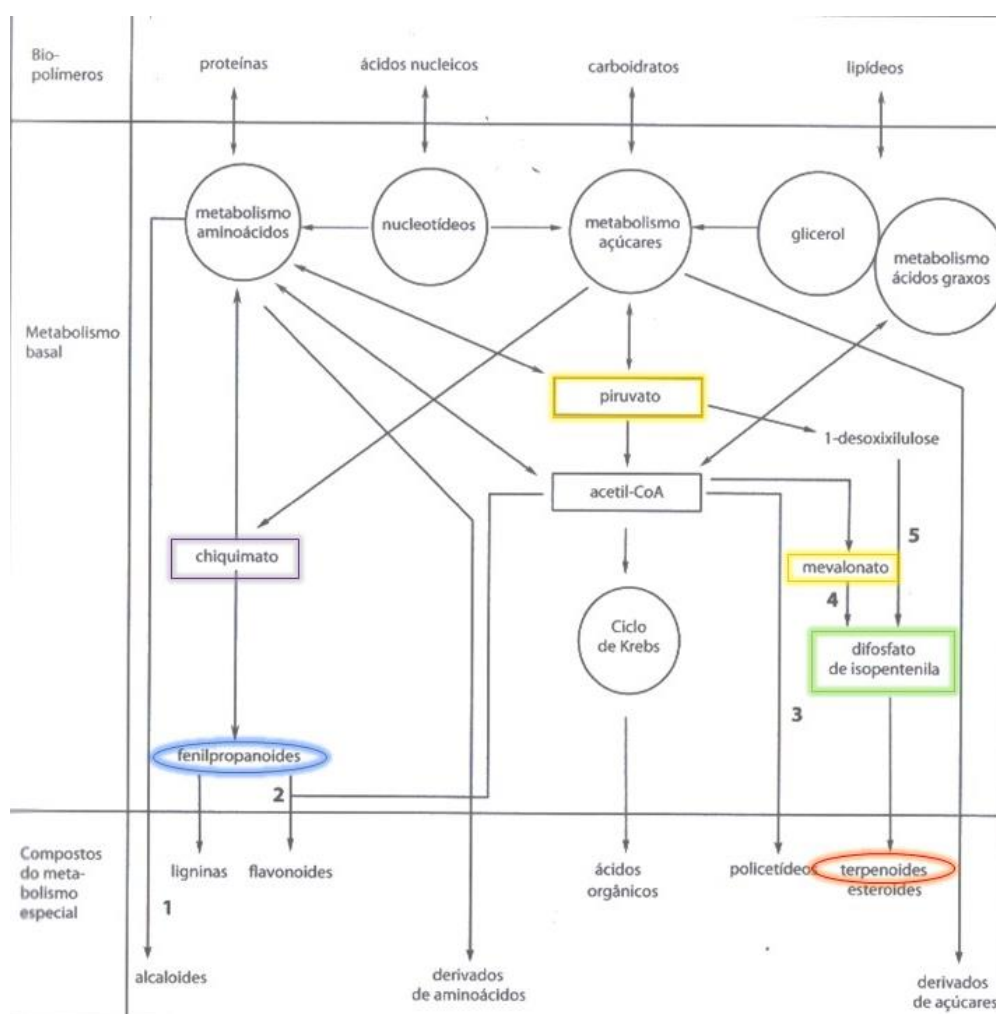


Figura 2. Via de biossíntese dos metabólitos secundários, com ênfase em fenilpropanóides e terpenóides (Kreis *et al.* 2017).

Os fenilpropanóides são formados a partir da via do ácido chiquímico, o qual gera o aminoácido aromático fenilalanina que, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), origina o ácido cinâmico que, por meio de reduções enzimáticas, forma os alilbenzenos e propenilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanóides (**Figura 3**) (Heinzmann *et al.* 2017). São exemplos desta classe de compostos: o eugenol, obtido do óleo volátil dos botões florais de *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry, popularmente conhecido como cravo (Srivastava *et al.* 2004), o trans-anetol e o estragol, presentes no óleo de *Foeniculum vulgare* Mill., popularmente conhecido como funcho (Politeo *et al.* 2006), o metil-eugenol, presente no óleo de *Melaleuca bracteata* F. Muell., e a miristicina, presente no óleo dos frutos de noz moscada, *Myristica fragrans* Houtt. (Adams 2007). Também são comumente encontrados nas famílias Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae e Rutaceae (Bakkali *et al.* 2008).

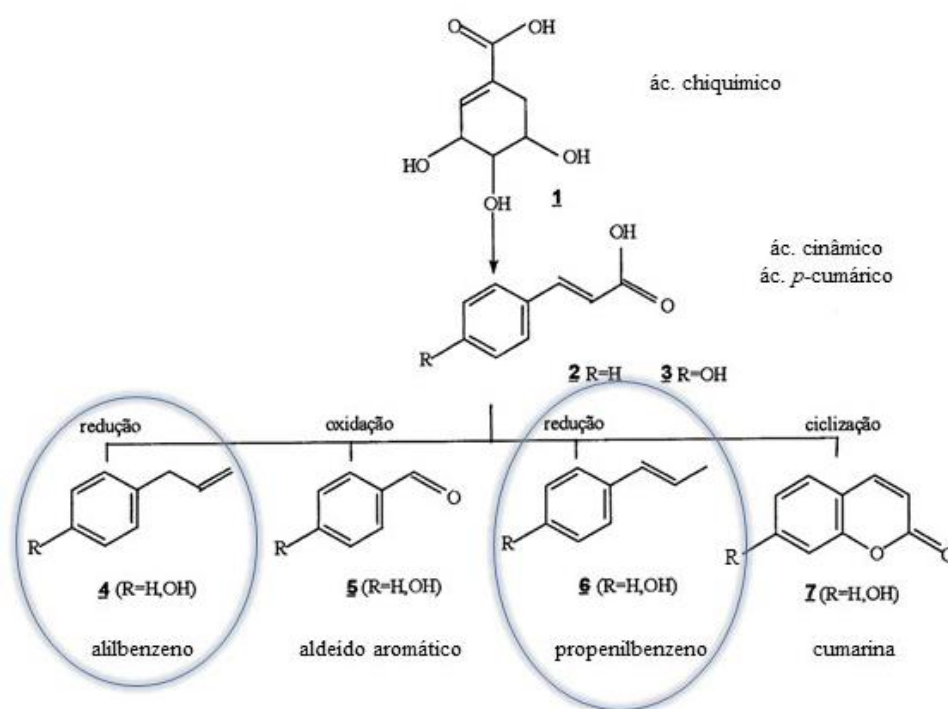


Figura 3. Via de biossíntese dos fenilpropanóides (Heinzmann *et al.* 2017).

Os terpenos podem ser formados a partir de duas vias de biossíntese: a via do mevalonato, responsável pela formação dos sesquiterpenos (C₁₅) e triterpenos (C₃₀), que ocorre no citosol e cujos precursores são piruvato e acetil-coenzima A; e a via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos (C₁₀), diterpenos (C₂₀) e tetraterpenos (C₄₀), ocorre nos plastídeos e cujos precursores são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Aharoni *et al.* 2006; Croteau *et al.* 2000; Verpoorte 2000). Em ambas as vias, há a formação do precursor difosfato de isopentenila (IPP), com 5 carbonos, que deve ser convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), através da enzima IPP isomerase, para iniciar a formação dos terpenos. Para a formação dos monoterpenos (C₁₀), uma unidade de IPP é adicionada a uma de DMAPP, através de uma preniltransferase, formando o seu precursor difosfato de geranila (GPP), com 10 carbonos. A adição de uma unidade de IPP ao GPP, através de uma preniltransferase, forma o difosfato de farnesila (FPP), com 15 carbonos, a partir do qual formam-se os sesquiterpenos (C₁₅). A adição de uma unidade de IPP ao FPP, por sua vez, forma o difosfato de geranilgeranila (GGPP), com 20 carbonos, que dá origem aos diterpenos (C₂₀). Os demais terpenos são formados da mesma forma, por adição de uma unidade de IPP aos seus respectivos precursores, de acordo com a **Figura 4** (Verpoorte 2000).

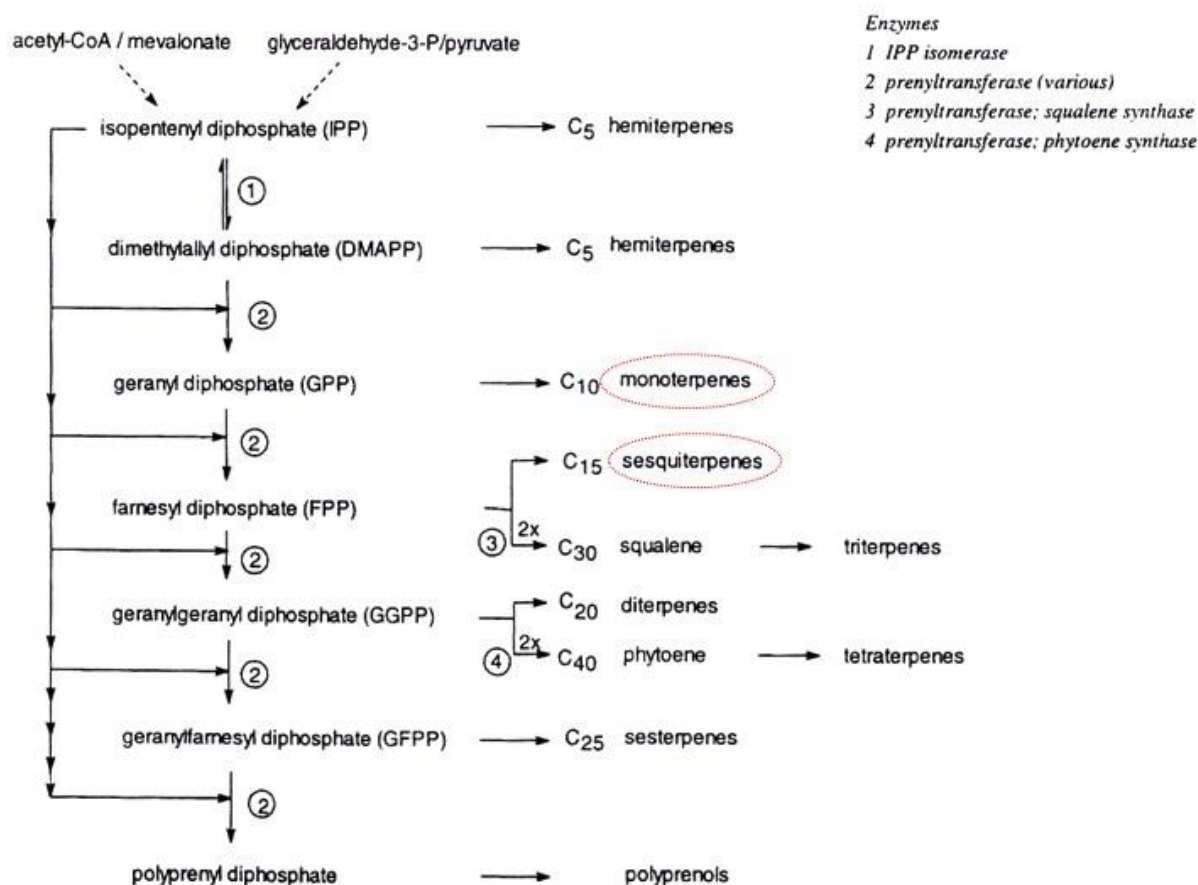


Figura 4. Via de biossíntese dos terpenos, com ênfase em monoterpenos e sesquiterpenos (Verpoorte 2000).

Os monoterpenos são altamente voláteis e são considerados os mais representativos da composição dos óleos (cerca de 90%). Podem ser classificados como hidrocarbonetos, formados apenas por carbono e hidrogênio, como mirceno, sabineno, α - e β -pineno, ou oxigenados com várias funções como linalol, mentol, α -terpineol e borneol (álcoois), geranial e citronelal (aldeídos), mentona, pulegona, cânfora e fenchona (cetona), acetato de linalila e mentila (ésteres) e 1,8-cineol e mentofurano (éteres). Os sesquiterpenos são caracterizados por uma cadeia carbônica maior, que permite a formação de uma enorme variedade de estruturas, e são menos voláteis que os monoterpenos. Também são classificados como hidrocarbonetos, como azuleno, α - e β -bisaboleno, cadinenos, β -cariofileno, curcumeno, α - e β -elemeno, ou oxigenados com várias funções como cedrol, β -nerolidol, farnesol, viridiflorol (álcoois), germacrona, β -vetivona, turmerona (cetona) e óxido de cariofileno e epóxido de humuleno (epóxidos) (Bakkali *et al.* 2008).

Os métodos mais comuns para a obtenção de óleos essenciais são enfloração, arraste por vapor de água ou hidrodestilação, prensagem a frio ou espremedura, extração com solventes orgânicos e extração por fluído supercrítico. Esses métodos variam de acordo com a localização do óleo essencial na planta e com a proposta de uso para ele. Na extração com solventes orgânicos pode haver contaminação por substâncias não voláteis ou presença de resíduos de solvente. Na hidrodestilação pode ocorrer degradação térmica de componentes termolábeis. Na prensagem a frio pode haver cumarinas e pigmentos vegetais misturados ao óleo essencial (Heinzmann *et al.* 2017). O próprio método de extração utilizado pode ser considerado um fator de variabilidade em relação à determinação da composição química dos óleos essenciais, pois cada método tem sua particularidade.

Fatores ambientais podem afetar a produção natural dos óleos essenciais e a sua composição nas plantas. As diferentes características geográficas e edafo-climáticas interferem diretamente sobre o modo como as plantas adaptam-se e desenvolvem-se, influenciando assim na produção dos metabólitos secundários produzidos de acordo com a sua necessidade (Hartmann 2007). O estudo da composição química dos óleos essenciais de *Hypericum perforatum* apresentou apenas dois componentes em comum quando comparada com a de espécimes coletadas em diferentes localidades (Schwob *et al.* 2004). Os óleos essenciais de *Ocimum basilicum* apresentaram variação sazonal, uma vez que observou-se maior teor de monoterpenos oxigenados no inverno e de sesquiterpenos hidrocarbonetos no verão (Hussain *et al.* 2008). A composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com a fase fenológica da planta, uma vez que *Guarea macrophylla* produziu níveis mais altos de sesquiterpenos hidrocarbonetos (mais voláteis) nos meses correspondentes às fases de floração e frutificação, possivelmente para favorecer sua polinização e dispersão (Lago *et al.* 2007). Zeraib *et al.* (2014) observaram que o óleo essencial de plantas femininas de *Juniperus thurifera* apresentou composição química diferente do óleo essencial de plantas masculinas, com atividade antibacteriana mais forte, indicando que as plantas femininas investem mais em defesa química que as plantas masculinas.

Os óleos essenciais estão envolvidos em diversas funções ecológicas no ambiente em que as plantas produtoras estão instaladas. Podem atuar na defesa constitutiva, induzida, direta ou indireta contra herbivoria (Baldwin & Preston 1999), contra a invasão de

fitopatógenos (Inoue *et al.* 2004), em interações mutualísticas e na atração de agentes polinizadores e dispersores de sementes (Gershenzon & Dudareva 2007).

As próprias funções ecológicas dos metabólitos secundários sobre as plantas que os produzem sugerem que os mesmos possam atuar similarmente com efeitos medicinais em humanos, de forma que produtos envolvidos na defesa vegetal contra microrganismos patógenos através de mecanismos de citotoxicidade, podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, assim como as substâncias envolvidas na defesa contra herbivoria através de ação neurotóxica, podem ter efeitos benéficos sobre humanos, atuando como anti-depressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Briskin 2000).

Estima-se que há cerca de 3.000 óleos essenciais conhecidos, dos quais 300 são comercialmente importantes na indústria farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumaria (Briskin 2000).

Existem poucos estudos que evidenciem os mecanismos de ação dos óleos essenciais. De um modo geral, a complexidade da composição química da maioria dos óleos essenciais lhes confere baixa especificidade (Bakkali *et al.* 2008), pois a atividade biológica não é atribuída a um único mecanismo de ação, uma vez que a grande variedade de grupos químicos presentes permite que haja vários alvos na célula (Burt 2004). O caráter lipofílico permite que os óleos essenciais atravessem a membrana plasmática e a mitocôndria dos microrganismos, desestabilizando essas estruturas e tornando-as mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos celulares. Compostos fenólicos presentes nos óleos essenciais também atuam desestabilizando a membrana plasmática, interrompendo a bomba de prótons, a transferência de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular (Burt 2004).

Quando se estudam as atividades biológicas de óleos essenciais, além de conhecermos a ação dos componentes majoritários isolados, é muito importante considerarmos a ação sinérgica das moléculas que os compõem, pois é possível que a atividade atribuída aos majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo, que atuam na penetração, distribuição celular e fixação destes nas paredes e membranas (Bakkali *et al.* 2008). Por outro lado, é possível que o efeito do óleo como um todo seja menor do que de um ou mais componentes individualmente, caracterizando um efeito antagonista (Burt 2004).

Vários estudos têm sido realizados com óleos essenciais de plantas e terpenos isolados, buscando novos tratamentos para o mal de Alzheimer, tendo como alvo principal a inibição da enzima acetilcolinesterase. O óleo essencial de folhas de *Centella asiatica* L., tradicionalmente indicada pela medicina Ayurvedica para restauração da juventude, memória e longevidade, é rico em monoterpenos como acetato de bornila, α -pineno, β -pineno e γ -terpineno, com comprovada atividade anticolinesterásica (Howes & Houghton 2003).

Um estudo realizado por Dorman & Deans (2000) para avaliar a atividade antimicrobiana de seis espécies de plantas aromáticas frente a nove cepas de bactérias gram-positivas e 16 gram-negativas demonstrou que os melhores resultados obtidos foram observados para os óleos essenciais de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* (Lamiaceae) e *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), além dos compostos isolados timol, carvacrol e α -terpineol. Botelho *et al.* (2007) também comprovaram forte atividade antimicrobiana de timol e carvacrol frente a patógenos orais, bem como do óleo essencial extraído de *Lippia sidoides*, sugerindo o uso destes para o controle preventivo da cárie.

Os óleos essenciais de sete espécies de plantas aromáticas foram testados contra fungos filamentosos patogênicos através de duas metodologias diferentes. Dentre as espécies estudadas por Tullio *et al.* (2006), os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Eugenia caryophyllata* foram os mais ativos sobretudo pelo método de contato de vapor de óleo, possivelmente devido a uma deposição direta do óleo essencial sobre o micélio dos fungos.

Um estudo realizado por Resende-Vido (2009) com óleos essenciais de folhas de *Hedyosmum brasiliense* provenientes de duas populações da Mata Atlântica apresentou atividade antifúngica e antibacteriana. Os óleos essenciais de folhas frescas da mesma espécie coletada em Santa Catarina por Kirchner *et al.* (2010) não apresentaram atividade inibidora contra bactérias gram-negativas, mas foram fortemente ativos contra bactérias gram-positivas e fungos. Os óleos essenciais de folhas e flores de *H. brasiliense* proveniente da Ilha do Cardoso apresentaram forte atividade antifúngica por bioautografia, atribuída principalmente ao curzereno, um dos componentes majoritários dos óleos essenciais testados, além de atividade antioxidante pelo método de inibição da peroxidação lipídica do β -caroteno (Murakami *et al.* 2017).

Uma vez que a composição química dos óleos essenciais pode variar por diversos fatores, este estudo teve como objetivo analisar a composição química e as atividades antifúngica, antimicrobiana, anticolinesterásica, antioxidante e citotóxica dos óleos essenciais de flores, frutos e folhas frescas e secas de indivíduos masculinos e femininos de *H. brasiliense* (Chloranthaceae) coletados em diferentes fases fenológicas e provenientes de Mata Atlântica e Cerrado.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas as folhas de indivíduos adultos de *Hedyosmum brasiliense*, previamente demarcados, em fases de floração, frutificação e vegetativa. As coletas foram realizadas em duas localidades do Estado de São Paulo: “Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba” (NP), correspondente a Floresta Ombrófila Densa Montana, 964 m de altitude, no município de Santo André, no bioma Mata Atlântica; e “Reserva Biológica de Mogi Guaçu” (MG), correspondente a Mata Ciliar, 600 m de altitude, no município de Mogi-Guaçu, no bioma Cerrado (**Figura 2 – Introdução geral**).

Os funcionários da Prefeitura e da Secretaria de Gestão dos Recursos Naturais de Paranapiacaba e Parque Andreense, Edilene Vieira Fazza e Ingo Grantsau, colaboraram com a emissão das autorizações de estudo e monitoria das expedições de coleta no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba, em Santo André.

Foram realizadas seis expedições de coleta de *H. brasiliense*. As primeiras foram realizadas no mês de setembro de 2014, correspondentes à fase de floração, em que foram realizadas a marcação e a coleta de cerca de 20 indivíduos masculinos e 20 femininos nas populações do Cerrado, na Reserva Biológica de Mogi-Guaçu (MG), e da Mata Atlântica, no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba (NP). Em fevereiro de 2015, as plantas se encontravam em fase de frutificação e entre junho e julho de 2015, em fase vegetativa. A **Tabela 1** apresenta as datas e os locais das expedições de coleta.

A identificação botânica foi realizada pela Dra. Inês Cordeiro e as exsicatas foram depositadas no Herbário (SP) Maria Eneyda P. K. Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob os números de depósito 475333 (Mogi Guaçu) e 475334 (Paranapiacaba).

Tabela 1. Datas e locais das expedições de coleta de *H. brasiliense*.

Data	Local	Atividade
23/09/2014	MG	Identificação e marcação das plantas ♂ e ♀; coleta de material vegetal para estudo dos óleos essenciais em fase de floração.
26/09/2014	NP	Identificação e marcação das plantas ♂ e ♀; coleta de material vegetal para estudo dos óleos essenciais em fase de floração.
09/02/2015	MG	Coleta de material vegetal de plantas ♂ e ♀ para estudo dos óleos essenciais em fase de frutificação.
24/02/2015	NP	Coleta de material vegetal de plantas ♂ e ♀ para estudo dos óleos essenciais em fase de frutificação.
23/06/2015	MG	Coleta de material vegetal de plantas ♂ e ♀ para estudo dos óleos essenciais em fase vegetativa.
03/07/2015	NP	Coleta de material vegetal de plantas ♂ e ♀ para estudo dos óleos essenciais em fase vegetativa.

Legenda: NP: Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba; MG: Reserva Biológica de Mogi Guaçu; ♂: masculino; ♀: feminino.

2.2 Extração e análise da composição química dos óleos essenciais

Para a comparação da composição dos óleos essenciais entre plantas masculinas e femininas, foram coletadas pela manhã as partes aéreas de, pelo menos, 20 indivíduos masculinos e 20 femininos, previamente demarcados em cada população, nas fases de floração, frutificação das plantas femininas e vegetativa. As partes aéreas foram separadas em folhas e flores masculinas e femininas e frutos. Metade das folhas foi dividida em três porções iguais representando a triplicata técnica representativa da população, em sacos plásticos, acondicionados em recipiente isolante térmico com gelo para o transporte até o laboratório e armazenados em freezer (-22°C) para posterior extração do óleo essencial. O restante das folhas foi dividido em três porções iguais (triplicata técnica) e submetido à secagem à sombra, em temperatura ambiente, até obtenção de massa constante, para posterior extração do óleo essencial. As flores masculinas e os frutos foram obtidos em baixa quantidade, por isso somente as flores femininas foram extraídas em triplicata.

A extração do óleo essencial foi realizada por hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, por um período 3 h e 30 minutos, conforme normas adaptadas da Farmacopeia

Brasileira (Farmacopeia Brasileira 2001). O óleo essencial foi separado com pentano e seco com sulfato de sódio anidro. O pentano foi eliminado com o auxílio de um evaporador rotatório e o óleo essencial, acondicionado em frasco com tampa e armazenado em freezer a -22°C para posterior análise da composição química e ensaios farmacológicos. O rendimento (%) foi calculado com base na massa do óleo essencial e do material fresco (MF) utilizado na extração, representado pela média $\pm$ desvio padrão da triplicata técnica (Raggi *et al.* 2015).

Para o isolamento da faixa azulada do óleo essencial de coloração azulada, alíquota de 1 mg de óleo essencial de folhas frescas de plantas masculinas do Cerrado em fase de floração foi solubilizada em 100 μ L de acetona, aplicada em cromatoplaça de sílica gel 60 GF₂₅₄ (5 cm de largura, Merck) e desenvolvida em cromatografia de camada delgada (CCD) com *n*-hexano/acetona (9:1, v/v). A faixa visivelmente azulada foi recortada, solubilizada em 500 μ L de acetona (Merck) e analisada por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM).

Os óleos essenciais foram solubilizados em acetona (Merck) na proporção 1:100 (v/v) e a fração azulada, em concentração indefinida, e 2 μ L de cada amostra foram analisados por CG-EM, utilizando cromatógrafo a gás Agilent Série 6890, acoplado a espectrômetro de massas quadrupolo Série 5973, equipado com coluna capilar Agilent DB-5MS (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno, com 0,25 μ m de espessura). As condições cromatográficas foram: temperatura do forno a 40 °C por 1 min, aumentando 3 °C/min até 240 °C e mantendo por 10 min, perfazendo o tempo total de análise de 77,6 min, utilizando hélio como gás de arraste (1 mL/min); injetor e detector a 250 °C; ionização eletrônica: 70 eV.

A **figura 5** ilustra algumas das etapas de extração e análise dos óleos essenciais.

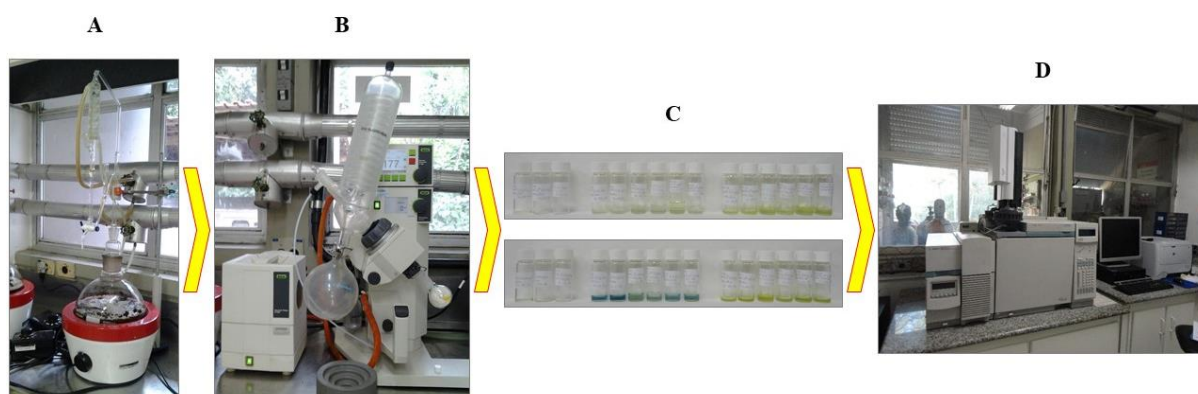


Figura 5. A) Hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger; B) Secagem do pentano em evaporador rotatório; C) Óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e secas em fase de floração, frutificação e vegetativa; D) Cromatógrafo a gás Agilent (6890 Series) acoplado a Espectrômetro de Massas (5973 Series). Fotos: Cynthia Murakami.

O índice de retenção (IR) foi calculado em coluna DB-5MS, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C8 – C40, Sigma) submetida às mesmas condições de análise cromatográfica. A identificação dos componentes dos óleos essenciais foi feita por comparação entre os espectros de massas obtidos com aqueles registrados na base de dados da biblioteca do equipamento, Willey 10 + NIST 14 (Agilent) e Adams (2007), e literatura especializada. A quantificação da porcentagem de área de cada componente do óleo foi calculada com base na média $\pm$ desvio padrão da triplicata de óleos analisada.

2.3 Atividades biológicas

2.3.1 Ensaio da atividade antifúngica por bioautografia

O ensaio antifúngico por bioautografia direta sobre placa de cromatografia de camada delgada (CCD) foi realizado no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

Os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* Penz (CCIBt 491) e *C. cladosporioides* Fresen de Vries (CCIBt140) foram utilizados como reveladores no bioensaio de detecção de substâncias fungitóxicas. Para a obtenção das culturas, os fungos foram mantidos em placas de Petri com meio de cultura Batata Dextrose Ágar (BDA), incubadas a 24°C, no escuro, por 14 dias. As suspensões de esporos dos fungos foram extraídas em solução de sais e glicose (6:1, v/v) e armazenadas em freezer.

Amostras de 200, 100, 50, e 25 μ g dos óleos essenciais foram solubilizadas em 10 μ L de acetona e aplicadas em cromatoplas de sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck), em triplicata, para avaliação dos limites de detecção da atividade antifúngica. Após a eliminação completa do solvente, as cromatoplas foram nebulizadas com as suspensões de esporos (5×10^7 esporos/mL) dos fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, separadamente, e incubadas em câmara úmida a 27°C, no escuro, por 48 horas (Homans & Fuchs 1970). Ácido cinâmico (5 μ g), timol (5 μ g) e nistatina (5 μ g) foram utilizados como controles positivos.

Halos claros em um fundo de coloração escura indicaram a inibição do crescimento dos fungos.

2.3.2 Ensaio da atividade antifúngica por microdiluição em caldo

O ensaio antifúngico por microdiluição em caldo foi realizado no Laboratório de Extrações da Universidade Paulista (UNIP), pela Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

As técnicas utilizadas foram descritas anteriormente (Suffredini *et al.* 2004; Younes *et al.* 2007). A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo. Os óleos essenciais foram solubilizados em DMSO na concentração de 10% (v/v). A suspensão leveduriforme foi preparada a 0,5 MacFarland, em meio Sabouraud Dextrose Caldo. A avaliação foi feita visualmente, através da análise de turbidez. A levedura utilizada foi *Candida albicans* (ATCC 10231). Os óleos essenciais que apresentaram inibição de crescimento leveduriforme visual foram submetidos à subcultura em Sabouraud Dextrose Agar, para confirmação de crescimento microbiano. Os óleos essenciais que apresentaram meio límpido e sem crescimento na subcultura, foram submetidos à análise da CIM (concentração inibitória mínima) e da CFM (concentração fungicida mínima), sendo que a classificação de CIM e CFM referem-se à menor concentração na qual se observa meio límpido sem crescimento na subcultura. Como controle positivo, foi utilizada nistatina.

2.3.3 Ensaio da atividade antibacteriana por microdiluição em caldo

O ensaio antibacteriano foi realizado no Laboratório de Extrações da Universidade Paulista (UNIP), pela Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

As técnicas utilizadas foram descritas anteriormente (Suffredini *et al.* 2004; Younes *et al.* 2007). A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada através da técnica de microdiluição em caldo. Os óleos essenciais foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 10% (v/v). A suspensão bacteriana foi preparada a 0,5 MacFarland, em meio Müller-Hinton Caldo. A avaliação foi feita visualmente, através da análise de turbidez. As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os óleos essenciais que apresentaram inibição de crescimento leveduriforme visual foram submetidos à subcultura em Müller-Hinton Agar, para confirmação de crescimento microbiano. Os óleos essenciais que apresentaram meio

límpido e sem crescimento na subcultura, foram submetidos à análise da CIM (concentração inibitória mínima) e da CBM (concentração bactericida mínima), sendo que a classificação de CIM e CBM referem-se à menor concentração na qual se observa meio límpido sem crescimento na subcultura. Como controle positivo, foi utilizado digluconato de clorexidina.

2.3.4 Ensaio da atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais humanas

O ensaio citotóxico foi realizado no Laboratório de Extrações da Universidade Paulista (UNIP), pela Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

A atividade citotóxica dos óleos essenciais foi testada em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3) (Suffredini *et al.* 2006 e 2007). Os óleos essenciais foram solubilizados em DMSO na concentração de 10 % (v/v). As linhagens celulares foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (10 %), glutamina (2 mM), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina 100 U/mL, a 37 °C com 5% de CO². As células foram colocadas em microplacas de 96 cavidades (0.3 x 10⁶ células/cavidade em 100 µL de meio). Após 24 h, amostras em diluição seriada dos óleos essenciais (2.5 x 10⁻¹ a 2.5 x 10⁻⁵ µL/mL) foram dissolvidas em meio RPMI, adicionadas em cada cavidade e incubadas por 72 h, em 6 replicatas de cada amostra. Grupos controle receberam o mesmo volume de meio RPMI. O crescimento da célula tumoral foi quantificado pelo método MTT (Mosmann 1983). Os resultados da atividade citotóxica foram apresentados como porcentagem de redução do corante em relação ao controle (doxorrubicina), em leitor de Elisa ao comprimento de onda de 550 nm. Foram calculados os valores de IC₅₀ de todos os óleos essenciais testados como a média ± desvio padrão das triplicatas de cada óleo essencial. A análise estatística foi realizada pelo método de análise de variância (ANOVA) de uma via e as diferenças foram consideradas significativas quando P<0,05 entre os óleos analisados.

2.3.5 Ensaio da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (IACHe)

O ensaio da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

A atividade anticolinesterásica dos óleos essenciais foi avaliada pelo método quantitativo em microplaca, usando um leitor BIOTEK KC4, absorvância a 405 nm, baseado no método de Ellman (Ellman *et al.* 1961). Os óleos essenciais foram solubilizados em

metanol na solução estoque a 30 mg/mL. Nas 96 cavidades da placa, 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 óleo essencial solubilizada em metanol e diluída 10 vezes na solução (A) para obter uma concentração final (após a adição da enzima) de 300 µg/mL (Rhee *et al.* 2001). Como controle negativo foi utilizado metanol e como controle positivo, fisostigmina (0,05 µg/mL, Sigma). A absorbância 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 absorbância medida novamente a cada 10 minutos por 2 vezes.

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 na solução A, considerada atividade total da AChE, 100%). Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos como média ± erro padrão.

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 50mM, pH=8, com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de MgCL₂ .6H₂ O.

2.3.6 Ensaio da atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH

O ensaio da atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada usando o DPPH (hidrato de 2,2-difenil-1-picrilhidroxila) pelo método colorimétrico de Xiong *et al.* (1996), adaptado para microplaca, que se baseia na redução do radical livre DPPH.

Neste ensaio, alíquotas de 400 µg/mL dos óleos essenciais foram submetidas à análise quantitativa em microplaca. Nas 96 cavidades da microplaca, foram adicionados 178 µL da amostra de óleo essencial na concentração de 560 µg/mL e 72 µL de DPPH (0,3 mM). A leitura do branco foi realizada com a amostra teste antes da incubação do radical DPPH. Como controle negativo, foi utilizado o metanol. Como controle positivo, foram utilizados quercetina (20 µg/mL) e extrato de *Ginkgo biloba* (31,25 µg/mL, Herbarium). A microplaca

foi mantida a temperatura ambiente, no escuro, durante 30 minutos e a absorbância medida a 518 nm, em aparelho BIOTEK KC4.

A absorbância foi convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a fórmula:

$$AA\% = \frac{100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}}$$

Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

2.3.7 Ensaio da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico

O ensaio da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada pelo método de descoloramento do β -caroteno, baseado na oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos da lipoperoxidação do ácido linoléico (Duarte-Almeida *et al.* 2006).

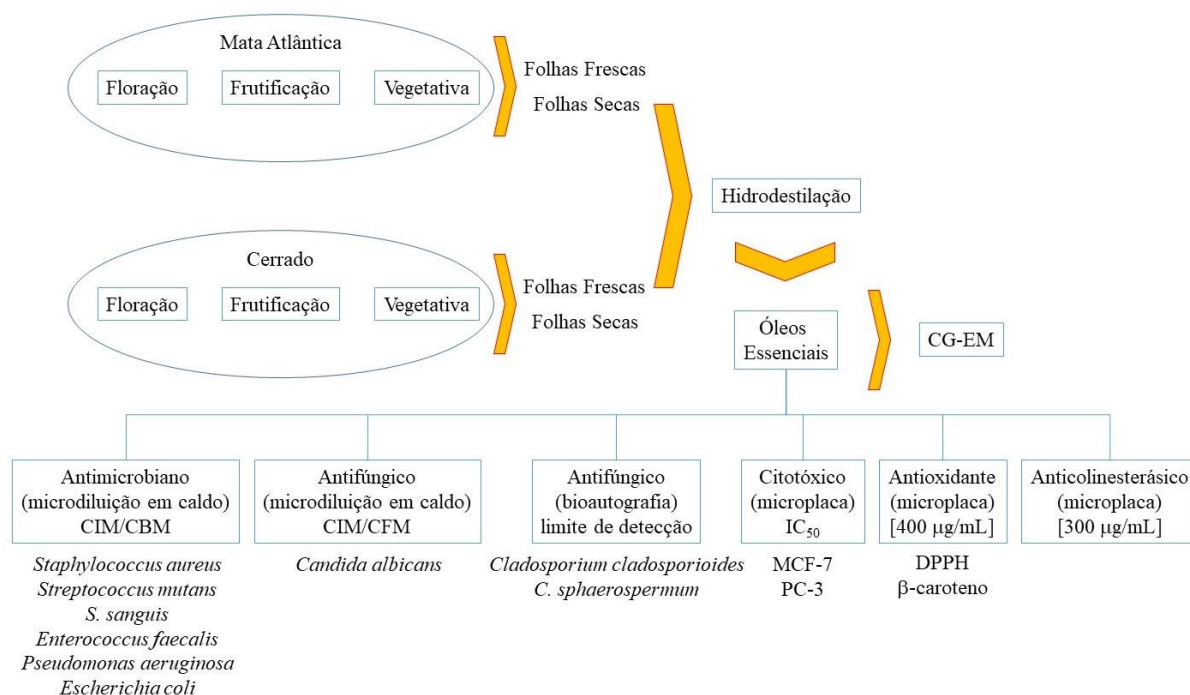
Neste ensaio, alíquotas de 400 μ g/mL dos óleos essenciais foram submetidas à análise quantitativa em microplaca. Nas 96 cavidades da microplaca, foram adicionados 10 μ L da amostra de óleo essencial na concentração de 10,4 mg/mL e 250 μ L de solução reativa composta por β -caroteno e ácido linoléico em água saturada com O₂. Como controle negativo, foi utilizado o metanol. Como controle positivo, foram utilizados hidroxitolueno de butila (BHT, 20 μ g/mL) e hidroxianisol de butila (BHA, 20 μ g/mL). A microplaca foi mantida a 45 °C no escuro e a absorbância medida a 518 nm, em aparelho BIOTEK KC4, imediatamente após a adição da solução reativa e a cada 30 min por 2 horas.

A absorbância foi convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AA) usando a fórmula:

$$AA\% = \frac{100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100]}{Abs_{controle}}$$

Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão.

2.4 Delineamento experimental



2.5 Expressão dos Resultados

Para o cálculo de rendimento dos óleos essenciais foi utilizada a análise de variância unidirecional (ANOVA) e as médias das triplicatas técnicas foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa Past Versão 2.17c.

Para avaliar a variabilidade química dos óleos essenciais, a comparação dos óleos essenciais foi realizada por Análise dos Componentes Principais (ACP), utilizando os dados de fragmentos de massas e tempos de retenção registrados pelo CG-EM e extraídos pelo programa on-line XCMS, ou os dados de porcentagem relativa dos componentes de cada óleo essencial. Todas as variáveis foram padronizadas e normalizadas e os gráficos de escores e contribuições foram gerados pelo programa The Unscrambler X Versão 9.7 (CAMO Software, Olso, Noruega).

Os resultados quantitativos das atividades biológicas *in vitro* foram representados como médias $\pm$ erro padrão. A porcentagem de inibição dos ensaios foi calculada

comparando-se a velocidade de reação das amostras analisadas em relação ao controle negativo. Todos os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata.

3 Resultados e Discussão

3.1 Extração e análise da composição química dos óleos essenciais

As coletas para o estudo dos óleos essenciais de *H. brasiliense* foram realizadas no período entre setembro de 2014 e julho de 2015. Dados das médias das temperaturas máxima e mínima, umidade relativa do ar e precipitação total mensal do período entre agosto de 2014 e julho de 2015 estão apresentados na **Figura 6**.

As médias das temperaturas máximas das regiões de Santo André (Mata Atlântica) e de Mogi Guaçu (Cerrado) não foram muito diferentes no período avaliado, porém a amplitude térmica observada na Mata Atlântica foi mais evidente do que no Cerrado, proporcionando um microclima fresco, característico deste bioma. A precipitação foi mais acentuada nos meses de dezembro de 2014 a março de 2015 na Mata Atlântica e menos representativa nos meses de janeiro e março no Cerrado. A média mensal de pluviosidade registrada nos meses mais secos em Paranapiacaba é de cerca de 140 mm (Atlas do PNMN Paranapiacaba 2008), porém o período entre 2014 e 2015 foi excepcionalmente seco, registrando menos de 100 mm mensais nos meses de agosto, setembro e outubro de 2014, abril, maio e junho de 2015. Na região de Mogi Guaçu também foram registrados acumulados mensais acima de 100 mm apenas nos meses de dezembro de 2014 e fevereiro de 2015. As médias da umidade relativa do ar na região da Mata Atlântica também permaneceram mais altas, com valores entre 75 e 90% de agosto de 2014 a abril de 2015, quando comparadas às médias da região do Cerrado, com valores entre 47 e 78% ao longo do período registrado.

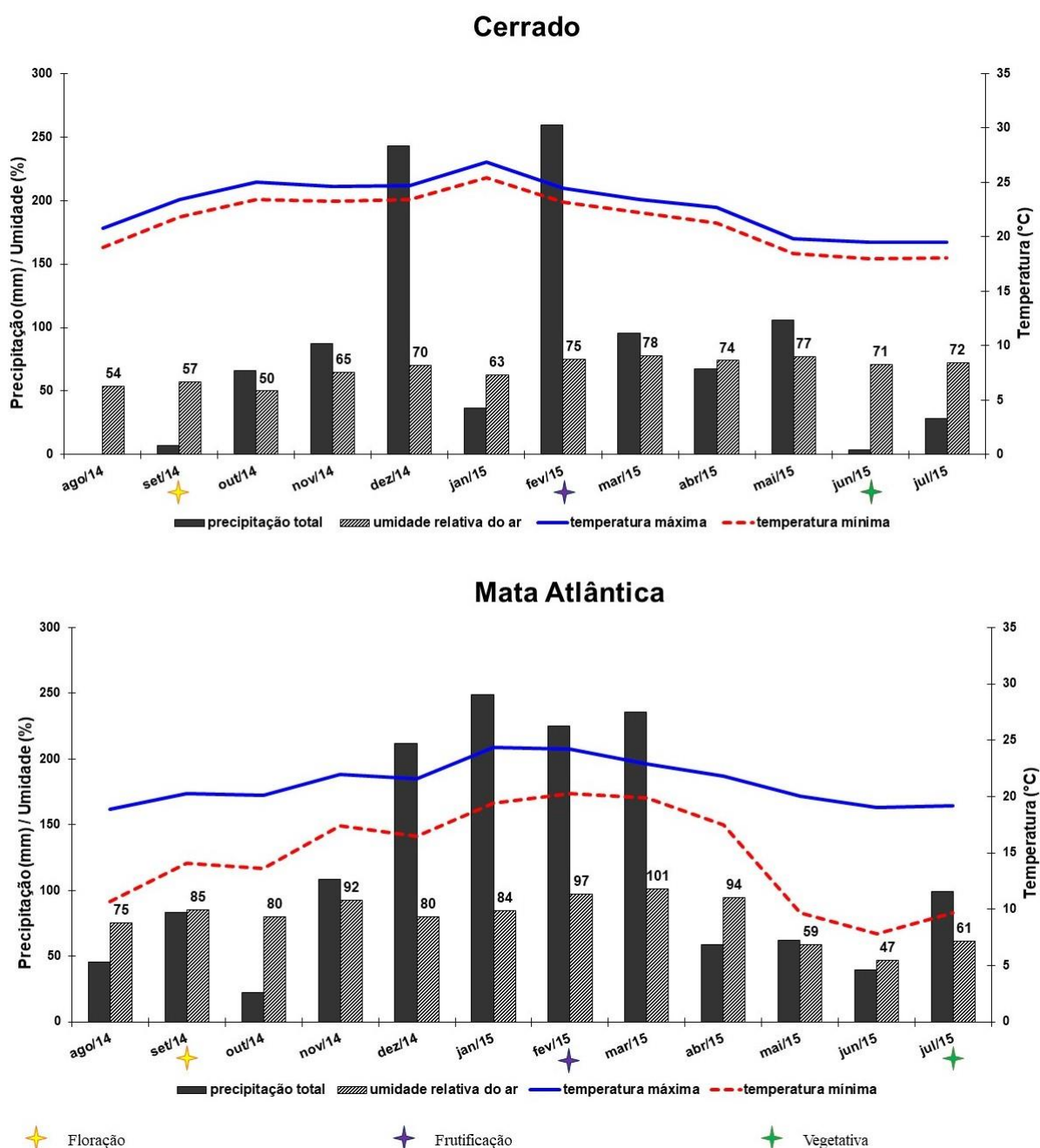


Figura 6. Médias das temperaturas máxima e mínima, umidade relativa do ar e precipitação mensal total dos locais de coleta no Cerrado e na Mata Atlântica. Os meses de coleta e as respectivas fases fenológicas estão marcados abaixo dos gráficos. Fontes: Serviço de Armazenamento de Dados Meteorológicos (SADMET) do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e Serviço Municipal de Saneamento Ambiental de Santo André (SEMASA).

As **Tabelas 2, 3 e 4** apresentam as médias $\pm$ desvio padrão dos rendimentos dos óleos essenciais obtidos dos órgãos reprodutivos (flores e frutos), folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense*, coletados em fase de floração, frutificação e vegetativa, das populações provenientes do Cerrado (MG) e da Mata Atlântica (NP) em relação à Massa Fresca de cada material (% MF). Não foi possível fazer a extração em triplicata das flores masculinas e dos frutos devido à baixa quantidade de material.

Tabela 2. Rendimento (média $\pm$ desvio padrão) dos óleos essenciais dos órgãos reprodutivos (flores e frutos) de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica.

		Órgãos reprodutivos (% MF)	
		Flores	Frutos
Cerrado	Feminina	0,19 $\pm$ 0,01	0,05
	Masculina	0,05	-
Mata Atlântica	Feminina	0,20 $\pm$ 0,01	0,09
	Masculina	0,07	-

Tabela 3. Rendimento (média $\pm$ desvio padrão) dos óleos essenciais de folhas frescas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica em fase de floração, frutificação e vegetativa. Letras iguais não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

		Folhas Frescas (% MF)		
		Floração	Frutificação	Vegetativa
Cerrado	Feminina	0,13 $\pm$ 0,01 ^a	0,10 $\pm$ 0,00 ^a	0,10 $\pm$ 0,01 ^a
	Masculina	0,14 $\pm$ 0,01 ^a	0,12 $\pm$ 0,00 ^a	0,11 $\pm$ 0,00 ^a
Mata Atlântica	Feminina	0,18 $\pm$ 0,02 ^b	0,18 $\pm$ 0,01 ^b	0,20 $\pm$ 0,01 ^b
	Masculina	0,17 $\pm$ 0,01 ^b	0,20 $\pm$ 0,00 ^b	0,16 $\pm$ 0,00 ^b

Tabela 4. Rendimento (média $\pm$ desvio padrão) dos óleos essenciais de folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica em fase de floração, frutificação e vegetativa. Letras iguais não diferem entre si ($p \leq 0,05$).

		Folhas Secas (% MF)		
		Floração	Frutificação	Vegetativa
Cerrado	Feminina	0,09 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,01 ^b
	Masculina	0,09 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^c	0,10 ± 0,01 ^b
Mata	Feminina	0,11 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,04 ^d	0,12 ± 0,01 ^b
Atlântica	Masculina	0,10 ± 0,00 ^b	0,14 ± 0,04 ^d	0,10 ± 0,00 ^b

O teor de óleo essencial das flores femininas foi cerca de 4 vezes maior que o das flores masculinas, tanto no Cerrado como na Mata Atlântica, possivelmente devido ao maior investimento da planta no órgão reprodutivo que dará origem aos frutos e sementes, em relação às flores masculinas que caem logo após a polinização. Zeraib *et al.* (2014) compararam plantas masculinas e femininas de *Juniperus thurifera* (Cupressaceae) e observaram que a diferença na composição química dos óleos essenciais das folhas proporcionou maior potencial antimicrobiano às plantas femininas, sugerindo que estas investiram mais no seu mecanismo de defesa químico do que as plantas masculinas. O teor de óleo essencial dos frutos da Mata Atlântica (0,09%) foi quase o dobro dos frutos do Cerrado (0,05%), mas estes valores não foram comparáveis aos obtidos por Delgado *et al.* (2010) pois o óleo essencial dos frutos de *H. colombianum* foi obtido de material seco, com rendimento de 0,65%. O maior rendimento de óleo essencial das folhas e dos frutos da Mata Atlântica poderia ser explicado pela maior proporção de matéria seca em relação ao óleo essencial nas plantas do Cerrado. As folhas das plantas da Mata Atlântica apresentaram massa seca entre 18 e 19 %, enquanto que as plantas do Cerrado, entre 20 e 23 %, pois são adaptadas ao clima mais quente e seco e à alta luminosidade característicos deste bioma, produzindo mais cera epicuticular para proteção e redução da perda de água para o ambiente (Scariot *et al.* 2005). Com relação à variação fenológica, não foi observado padrão aparente no rendimento, sendo que a fase de desenvolvimento das plantas não influenciou no teor de óleo essencial das plantas estudadas.

A composição química dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e secas de plantas masculinas e femininas de *Hedyosmum brasiliense* provenientes da Mata Atlântica está apresentada nas **tabelas 5, 6 e 7** e a composição química dos óleos essenciais de flores,

frutos, folhas frescas e secas de plantas masculinas e femininas de *Hedyosmum brasiliense* provenientes do Cerrado, nas **tabelas 8, 9 e 10**.

Diversos fatores de variabilidade dos óleos essenciais foram analisados neste estudo. Primeiramente, foi comparada a composição química dos óleos essenciais das plantas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica, então entre as diferentes fases fenológicas e, por fim, entre plantas masculinas e femininas. Para tanto, além das tabelas de composição química já apresentadas, também foi utilizada a análise dos componentes principais (ACP), uma ferramenta holística que permite comparar cada óleo essencial como uma matriz complexa, pois é capaz de extrair informações relevantes a partir de um grande número de amostras com muitas variáveis envolvidas, que tornariam uma análise manual impossível (Yamaguchi *et al.* 2011).

Tabela 5. Composição química (média $\pm$ desvio padrão da % relativa de área) dos óleos essenciais de flores e frutos de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica.

Componente	IR	IR Ref	Área (%)		
			Flores		Frutos
			♂	♀	♀
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	841	839 a	0,92 $\pm$ 0,00	0,78 $\pm$ 0,09	1,45 $\pm$ 0,01
α -pineno	933	939 a	0,57 $\pm$ 0,00	1,50 $\pm$ 0,26	1,22 $\pm$ 0,02
canfeno	949	954 a			0,63 $\pm$ 0,01
sabineno	972	975 a	5,47 $\pm$ 0,02	9,64 $\pm$ 1,02	7,17 $\pm$ 0,07
β -pineno	976	979 a	1,83 $\pm$ 0,01	2,08 $\pm$ 0,14	1,59 $\pm$ 0,02
mirceno	990	990 a		0,79 $\pm$ 0,05	0,78 $\pm$ 0,01
α -terpineno	1016	1017 a	0,76 $\pm$ 0,00		
limoneno	1028	1029 a	0,80 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,03	1,02 $\pm$ 0,01
1,8-cineol	1031	1031 a	0,63 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,00
(Z)- β -ocimeno	1036	1037 a	0,68 $\pm$ 0,00		2,30 $\pm$ 0,02
(E)- β -ocimeno	1048	1050 a	1,57 $\pm$ 0,02	4,53 $\pm$ 0,11	14,05 $\pm$ 0,24
γ -terpineno	1059	1059 a	1,87 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,1	1,06 $\pm$ 0,01
linalol	1097	1096 a	2,11 $\pm$ 0,01	2,00 $\pm$ 0,12	1,96 $\pm$ 0,01
pinocarvona	1161	1164 a	6,56 $\pm$ 0,02	3,90 $\pm$ 0,27	4,11 $\pm$ 0,04
cis-crisantenol	1162	1164 a		1,75 $\pm$ 0,13	
borneol	1170	1169 a		0,20 $\pm$ 0,34	
terpinen-4-ol	1177	1177 a	4,4 $\pm$ 0,01	1,97 $\pm$ 0,41	1,81 $\pm$ 0,02
α -terpineol	1191	1188 a	1,28 $\pm$ 0,00	0,93 $\pm$ 0,07	
					Cont.

Cont.

Componente	IR	IR Ref	Área (%)		
			Flores		Frutos
			♂	♀	♀
acetato de <i>cis</i> -crisantenila	1255	1265 a	1,79 ± 0,00	2,03 ± 0,17	9,63 ± 0,06
acetato de bornila	1279	1288 a		0,77 ± 0,07	5,22 ± 0,05
acetato de <i>cis</i> -pinocarvila	1303	1312 a	2,00 ± 0,01	1,02 ± 0,11	1,51 ± 0,01
para-mentha-1,4-dien-7-ol			1,48 ± 0,01		
δ-elemeno	1327	1338 a	0,60 ± 0,01	1,31 ± 0,08	1,05 ± 0,01
elixeno	1342	1339 b		0,39 ± 0,34	
acetato de α-terpinila	1344	1349 a			3,01 ± 0,02
β-elemeno	1384	1390 a	1,86 ± 0,00	1,47 ± 0,08	1,25 ± 0,01
metil eugenol	1394	1403 a	1,65 ± 0,02	0,88 ± 0,10	
α-santaleno	1412	1417 a	1,46 ± 0,01	0,72 ± 0,03	
γ-elemeno	1423	1436 a	1,29 ± 0,01	0,83 ± 0,06	0,72 ± 0,01
trans-α-bergamoteno	1428	1434 a	0,98 ± 0,01		
(E)-β-farneseno	1449	1456 a	1,69 ± 0,01	1,13 ± 0,08	
β-santaleno	1454	1459 a	1,03 ± 0,01		
germacreno D	1477	1485 a	3,03 ± 0,05	5,01 ± 0,4	4,05 ± 0,04
biciclogermacreno	1490	1500 a	8,41 ± 0,06	7,33 ± 0,49	4,63 ± 0,03
E,E-α-farneseno	1500	1505 a	2,81 ± 0,01	6,91 ± 0,45	6,20 ± 0,05
β-bisaboleno	1502	1505 a	1,35 ± 0,01		
δ-cadineno	1511	1523 a	0,65 ± 0,01		
(Z)-α-bisaboleno	1539	1507 a	18,1 ± 0,05	16,56 ± 1,35	4,67 ± 0,05
elemol	1542	1549 a			1,13 ± 0,02
germacreno B	1551	1561 a	0,96 ± 0,08	0,64 ± 0,03	
(E)-nerolidol	1556	1563 a	2,40 ± 0,02	0,89 ± 0,08	1,30 ± 0,02
espatulenol	1570	1578 a	5,18 ± 0,03	2,80 ± 0,29	3,45 ± 0,03
viridiflorol	1578	1592 a		0,70 ± 0,11	
M+ 222: 161(100) 105(95) 107(94) 91(83) 93(71)	1578		1,05 ± 0,01		
M+ 222: 161(100) 105(93) 107(83) 93(81) 91(78)	1586		1,31 ± 0,01		
salvial-4(14)-en-1-ona	1589	1594 a			0,25 ± 0,43
carotol	1596	1594 a	3,19 ± 0,01	0,65 ± 0,58	
β-atlantol	1601	1608 a	1,05 ± 0,00	0,99 ± 0,08	
epóxido de humuleno II	1606	1608 a			1,06 ± 0,01
muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1624	1631 a	1,37 ± 0,01	0,77 ± 0,08	1,02 ± 0,01
<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol	1636	1636 a	0,88 ± 0,19		
α-muurolol	1644	1646 a			0,81 ± 0,04
α-eudesmol	1648	1653 a	1,75 ± 0,01	2,00 ± 0,33	4,89 ± 0,06
			Cont.		

Cont.

Componente	IR	IR Ref	Área (%)		
			Flores		Frutos
			♂	♀	♀
M+ 222: 95(100) 69(99) 109(86) 179(81) 41(80)	1665		1,22 ± 0,01		0,71 ± 0,02
14-hidroxi- α -muuroleno	1743	1780 a			0,99 ± 0,36
M+ 230: 91(100) 105(91) 119(71) 230(67) 159(48)	1891				1,94 ± 0,01
M+ 230: 91(100) 105(92) 230(62) 119(60) 159(41)	1909				0,59 ± 0,01
nonadecano	1942	1900 a		0,21 ± 0,37	
clorantalactona A	1964	1943 c		0,82 ± 0,04	
eicosano	2039	2000 a		1,09 ± 1,89	
hexacosano	2623	2600 a		9,72 ± 2,33	
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			14,18 ± 0,06	20,81 ± 01,35	30,61 ± 0,38
Monoterpenos oxigenados (%)			20,56 ± 0,03	15,35 ± 01,62	28,71 ± 0,19
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			43,25 ± 0,13	41,66 ± 3,11	22,58 ± 0,18
Sesquiterpenos oxigenados (%)			16,79 ± 0,24	10,27 ± 1,13	14,88 ± 0,74
Fenilpropanóides (%)			1,65 ± 0,02	0,88 ± 0,10	
Hidrocarbonetos (%)				11,03 ± 04,42	
Não identificados (%)			3,58 ± 0,01		3,24 ± 0,03
Total identificado (%)			96,42 ± 0,02	99,99 ± 0,02	96,79 ± 0,03

Legenda: IR Ref. a - Adams (2007); b - Kirschner *et al.* (2010); c - NIST 69 (2016); ♂ - masculino;

Tabela 6. Composição química (média $\pm$ desvio padrão da % relativa de área) dos óleos essenciais de folhas frescas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Frescas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	841	839	0,96 $\pm$ 0,09	1,00 $\pm$ 0,04	1,38 $\pm$ 0,05	1,38 $\pm$ 0,05	1,59 $\pm$ 0,03	1,61 $\pm$ 0,08
α -pineno	933	939	3,07 $\pm$ 0,18	2,71 $\pm$ 0,34	3,17 $\pm$ 0,58	3,39 $\pm$ 0,37	3,90 $\pm$ 0,14	3,33 $\pm$ 0,11
sabineno	972	975	30,29 $\pm$ 0,81	25,81 $\pm$ 2,97	20,27 $\pm$ 1,57	21,47 $\pm$ 1,02	20,91 $\pm$ 0,25	20,82 $\pm$ 0,57
β -pineno	976	979	5,39 $\pm$ 0,16	4,95 $\pm$ 0,45	5,07 $\pm$ 0,51	5,34 $\pm$ 0,37	5,74 $\pm$ 0,15	5,28 $\pm$ 0,14
mirceno	990	990	1,51 $\pm$ 0,08	1,57 $\pm$ 0,07	1,58 $\pm$ 0,17	1,95 $\pm$ 0,09	1,51 $\pm$ 0,05	1,68 $\pm$ 0,05
α -terpineno	1016	1017	1,75 $\pm$ 0,14	1,63 $\pm$ 0,07	1,93 $\pm$ 0,21	1,92 $\pm$ 0,17	1,94 $\pm$ 0,17	1,78 $\pm$ 0,09
limoneno	1028	1029	1,60 $\pm$ 0,04	1,37 $\pm$ 0,05	1,85 $\pm$ 0,13	1,84 $\pm$ 0,10	1,82 $\pm$ 0,07	1,69 $\pm$ 0,04
1,8-cineol	1031	1031	1,50 $\pm$ 0,04	1,23 $\pm$ 0,28	1,69 $\pm$ 0,09	1,82 $\pm$ 0,10	1,69 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,05
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1048	1050	1,33 $\pm$ 0,06	1,31 $\pm$ 0,07	1,33 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,05	1,08 $\pm$ 0,03	1,24 $\pm$ 0,02
γ -terpineno	1059	1059	2,71 $\pm$ 0,20	2,60 $\pm$ 0,09	2,97 $\pm$ 0,25	2,94 $\pm$ 0,19	2,98 $\pm$ 0,26	2,71 $\pm$ 0,14
terpinoleno	1082	1088	0,63 $\pm$ 0,05	0,61 $\pm$ 0,02	0,85 $\pm$ 0,06	0,85 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,06	0,77 $\pm$ 0,03
linalol	1097	1096	3,47 $\pm$ 0,14	3,86 $\pm$ 0,15	3,54 $\pm$ 0,02	4,42 $\pm$ 0,08	3,17 $\pm$ 0,08	4,03 $\pm$ 0,09
pinocarvona	1161	1164	8,76 $\pm$ 0,18	8,32 $\pm$ 0,23	8,06 $\pm$ 0,14	8,36 $\pm$ 0,20	7,72 $\pm$ 0,34	8,02 $\pm$ 0,10
terpinen-4-ol	1177	1177	5,36 $\pm$ 0,34	5,10 $\pm$ 0,46	5,62 $\pm$ 0,42	5,57 $\pm$ 0,30	5,49 $\pm$ 0,48	4,98 $\pm$ 0,25
α -terpineol	1191	1188	0,66 $\pm$ 0,02	0,63 $\pm$ 0,05	0,91 $\pm$ 0,06	0,84 $\pm$ 0,03	0,93 $\pm$ 0,07	0,82 $\pm$ 0,02
acetato de <i>cis</i> -crisantenila	1255	1265	3,44 $\pm$ 0,12	2,59 $\pm$ 0,21	3,89 $\pm$ 0,20	3,21 $\pm$ 0,01	3,55 $\pm$ 0,09	2,65 $\pm$ 0,03
acetato de <i>cis</i> -pinocarvila	1303	1312	1,66 $\pm$ 0,06	1,37 $\pm$ 0,10	1,60 $\pm$ 0,06	1,42 $\pm$ 0,02	1,67 $\pm$ 0,06	1,51 $\pm$ 0,02
δ -elemeno	1327	1338	1,47 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,23	2,25 $\pm$ 0,17	1,97 $\pm$ 0,14	1,97 $\pm$ 0,06	1,97 $\pm$ 0,11
acetato de α -terpinila	1344	1349	0,64 $\pm$ 0,01	0,64 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,05	1,04 $\pm$ 0,01	0,86 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,03
Cont.								

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Frescas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
β-elemeno	1384	1390	1,04 ± 0,04	1,07 ± 0,17	1,70 ± 0,16	1,51 ± 0,09	1,40 ± 0,13	1,45 ± 0,07
metil eugenol	1394	1403	1,53 ± 0,16	1,77 ± 0,14	1,68 ± 0,07	0,96 ± 0,02	1,53 ± 0,04	1,03 ± 0,01
α-santaleno	1412	1417			0,19 ± 0,33		0,23 ± 0,4	0,40 ± 0,34
γ-elemeno	1423	1436	0,59 ± 0,02	0,65 ± 0,10	1,04 ± 0,08	0,84 ± 0,07	0,84 ± 0,03	0,82 ± 0,04
α-trans-bergamoteno	1428	1434		0,58 ± 0,04	0,66 ± 0,08	0,43 ± 0,37	0,73 ± 0,06	0,85 ± 0,04
β-santaleno	1454	1459					0,19 ± 0,33	
germacreno D	1477	1485	1,12 ± 0,08	1,42 ± 0,20	1,29 ± 0,10	1,10 ± 0,10	1,44 ± 0,05	1,47 ± 0,08
biciclogermacreno	1490	1500	8,17 ± 0,13	9,23 ± 1,16	9,24 ± 0,63	8,35 ± 0,47	8,57 ± 0,24	8,64 ± 0,32
β-bisaboleno	1502	1505		0,62 ± 0,09	0,42 ± 0,37	0,67 ± 0,06	0,42 ± 0,37	0,88 ± 0,02
(Z)-α-bisaboleno	1539	1507	7,26 ± 0,23	9,99 ± 0,76	6,98 ± 0,93	7,96 ± 0,72	7,18 ± 0,67	10,29 ± 0,22
germacreno B	1551	1561			0,69 ± 0,04	0,40 ± 0,35	0,59 ± 0,02	0,20 ± 0,34
(E)-nerolidol	1556	1563	1,05 ± 0,06	0,88 ± 0,15	1,33 ± 0,07	1,13 ± 0,04	1,34 ± 0,03	1,05 ± 0,02
espatulenol	1570	1578	1,65 ± 0,22	1,98 ± 0,36	1,57 ± 0,20	1,79 ± 0,05	2,27 ± 0,02	2,67 ± 0,58
viridiflorol	1578	1592	0,25 ± 0,43	0,60 ± 0,10	0,82 ± 0,10	0,75 ± 0,04	0,49 ± 0,43	0,47 ± 0,41
M+ 222: 109(100) 161(91) 107(90) 43(88) 105(86)	1587			0,36 ± 0,31	0,79 ± 0,09	0,48 ± 0,42	0,69 ± 0,07	0,43 ± 0,37
carotol	1596	1594			0,73 ± 0,08		0,88 ± 0,01	
muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1624	1631	0,19 ± 0,33	0,43 ± 0,38	0,64 ± 0,08	0,69 ± 0,04	0,69 ± 0,02	0,75 ± 0,03
α-eudesmol	1648	1653	0,97 ± 0,08	1,37 ± 0,30	1,38 ± 0,13	1,54 ± 0,08	1,14 ± 0,05	1,25 ± 0,01
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			49,76 ± 1,14	43,8 ± 4,07	40,71 ± 3,51	43,15 ± 2,49	42,41 ± 0,88	40,91 ± 1,08
Monoterpenos oxigenados (%)			24,96 ± 0,43	23,52 ± 1,03	25,89 ± 0,72	26,24 ± 0,51	24,97 ± 1,11	24,47 ± 0,46
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			19,64 ± 0,37	25,29 ± 2,44	23,76 ± 2,66	22,84 ± 2,00	22,96 ± 2,18	26,77 ± 1,20

Sesquiterpenos oxigenados (%)	4,10 ± 1,08	5,26 ± 1,20	7,17 ± 0,54	6,32 ± 0,58	7,41 ± 0,41	6,40 ± 0,29
Fenilpropanóides (%)	1,53 ± 0,16	1,77 ± 0,14	1,68 ± 0,07	0,96 ± 0,02	1,53 ± 0,04	1,03 ± 0,01
Hidrocarbonetos (%)						
Não identificados (%)		0,36 ± 0,31	0,79 ± 0,09	0,48 ± 0,42	0,69 ± 0,07	0,43 ± 0,37
Total identificado (%)	100,00 ± 0,02	99,63 ± 0,30	99,21 ± 0,12	99,51 ± 0,44	99,28 ± 0,08	99,58 ± 0,36

Legenda: IR Ref. a - Adams (2007); ♂ - masculino; ♀ - feminino.

Tabela 7. Composição química (média ± desvio padrão da % relativa de área) dos óleos essenciais de folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica.

Componente	IR	IR Ref	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	841	839 a	1,17 ± 0,14	1,23 ± 0,04	1,25 ± 0,25	1,5 ± 0,17	1,63 ± 0,08	1,98 ± 0,08
α-tujeno	926	930 a	2,70 ± 0,32	2,85 ± 0,52	2,07 ± 0,31	2,38 ± 0,42	2,12 ± 0,08	2,08 ± 0,11
α-pineno	933	939 a	2,96 ± 0,36	3,00 ± 0,53	3,11 ± 0,35	2,97 ± 0,47	3,59 ± 0,19	3,56 ± 0,15
sabineno	972	975 a	9,48 ± 0,79	8,63 ± 1,06	7,80 ± 0,32	7,35 ± 0,40	8,69 ± 0,13	11,00 ± 0,31
β-pineno	976	979 a	5,37 ± 0,42	5,51 ± 0,64	5,17 ± 0,23	4,85 ± 0,56	5,40 ± 0,14	5,54 ± 0,15
α-terpineno	1016	1017 a	2,39 ± 0,15	2,27 ± 0,12	2,21 ± 0,30	2,24 ± 0,30	1,93 ± 0,08	1,97 ± 0,08
ρ-cimeno	1023	1024 a	3,55 ± 0,14	3,84 ± 0,23	2,94 ± 0,11	3,39 ± 0,21	2,95 ± 0,05	2,54 ± 0,04
limoneno	1028	1029 a	1,52 ± 0,07	1,46 ± 0,09	1,63 ± 0,07	1,55 ± 0,13	1,51 ± 0,02	1,59 ± 0,04
1,8-cineol	1031	1031 a	2,12 ± 0,14	2,06 ± 0,09	1,94 ± 0,15	2,16 ± 0,11	2,08 ± 0,03	2,08 ± 0,03
γ-terpineno	1059	1059 a	5,33 ± 0,15	4,97 ± 0,28	3,69 ± 0,36	3,75 ± 0,39	3,26 ± 0,08	3,30 ± 0,08
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1069	1070 a			1,32 ± 0,34	1,60 ± 0,20	1,48 ± 0,15	1,66 ± 0,13
terpinoleno	1082	1088 a	0,90 ± 0,03	0,85 ± 0,01	1,00 ± 0,10	1,00 ± 0,08	0,85 ± 0,03	0,68 ± 0,06

Cont.

Cont.								
Componente	IR	IR Ref	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
linalol	1097	1096 a	4,31 ± 0,05	4,70 ± 0,14	3,77 ± 0,17	4,84 ± 0,08	3,27 ± 0,06	4,41 ± 0,26
cis-p-ment-2-en-1-ol	1123	1121 a			0,20 ± 0,35	0,20 ± 0,35		
4-acetil-1-metil ciclohexeno	1128	1137 c	1,11 ± 0,10	1,44 ± 0,08	1,26 ± 0,09	2,17 ± 0,11	1,37 ± 0,07	1,95 ± 0,02
trans-sabinol	1139	1142 a					0,66 ± 0,02	0,59 ± 0,02
cânfora	1146	1146 a	0,68 ± 0,04	0,66 ± 0,02	0,79 ± 0,04	0,90 ± 0,02	0,90 ± 0,02	0,87 ± 0,01
sabina cetona	1156	1159 a				0,61 ± 0,01	0,67 ± 0,04	0,59 ± 0,02
pinocarvona	1161	1164 a	6,80 ± 0,18	6,08 ± 0,16	6,00 ± 0,09	5,87 ± 0,12	4,64 ± 0,06	5,50 ± 0,05
cis-crisantenol	1162	1164 a					0,71 ± 0,10	
terpinen-4-ol	1177	1177 a	7,42 ± 0,54	7,00 ± 0,51	7,29 ± 0,56	7,76 ± 0,26	6,52 ± 0,24	6,28 ± 0,25
α-terpineol	1191	1188 a	1,35 ± 0,06	0,97 ± 0,24	1,62 ± 0,03	1,64 ± 0,03	1,74 ± 0,02	1,37 ± 0,03
cuminal	1240	1241 a					0,40 ± 0,35	
acetato de cis-crisantenila	1255	1265 a	5,08 ± 0,03	4,04 ± 0,02	5,10 ± 0,19	4,35 ± 0,17	4,5 ± 0,09	3,66 ± 0,12
acetato de bornila	1279	1288 a			0,69 ± 0,03	0,42 ± 0,36	0,68 ± 0,02	
acetato de cis-α-necrodol	1289	1299 a			0,65 ± 0,04	0,44 ± 0,38	0,22 ± 0,39	
acetato de cis-pinocarvila	1303	1312 a	2,61 ± 0,03	2,19 ± 0,10	2,07 ± 0,06	1,83 ± 0,07	2,52 ± 0,04	2,05 ± 0,01
p-mentha-1,4-dien-7-ol	1327	1327 a					0,60 ± 0,01	
acetato de α-terpinila	1344	1349 a	0,98 ± 0,02	0,90 ± 0,03	1,04 ± 0,05	1,22 ± 0,03	1,04 ± 0,03	1,15 ± 0,03
M+ 150: 91(100) 150(82) 107(77) 135(63) 79(55)	1390							0,20 ± 0,35
metil eugenol	1394	1403 a	1,12 ± 0,06	1,48 ± 0,07	1,13 ± 0,10		1,30 ± 0,08	0,93 ± 0,05
α-santaleno	1412	1417 a	0,74 ± 0,06	0,75 ± 0,10	1,17 ± 0,07	1,00 ± 0,08	1,41 ± 0,02	1,06 ± 0,04

Cont.

Cont.

Componente	IR	IR Ref	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
α -trans-bergamoteno	1428	1434 a		0,19 $\pm$ 0,33	0,82 $\pm$ 0,04	0,65 $\pm$ 0,06	0,95 $\pm$ 0,02	0,73 $\pm$ 0,03
M+ 207: 68(100) 67(86) 95(57) 79(45) 93(39)	1438					0,43 $\pm$ 0,38		0,60 $\pm$ 0,03
β -santaleno	1454	1459 a		0,39 $\pm$ 0,34	1,13 $\pm$ 0,08	0,99 $\pm$ 0,08	1,29 $\pm$ 0,01	1,05 $\pm$ 0,04
M+ 207: 91(100) 71(81) 92(58) 119(57) 43(41)	1488							0,86 $\pm$ 0,03
β -bisaboleno	1502	1505 a	1,10 $\pm$ 0,15	1,68 $\pm$ 0,23	1,34 $\pm$ 0,08	1,87 $\pm$ 0,21	1,48 $\pm$ 0,10	2,21 $\pm$ 0,10
(Z)- α -bisaboleno	1539	1507 a	6,17 $\pm$ 1,32	8,82 $\pm$ 1,07	4,48 $\pm$ 0,66	5,44 $\pm$ 0,83	4,00 $\pm$ 0,62	6,50 $\pm$ 0,30
(E)-nerolidol	1556	1563 a	1,23 $\pm$ 0,04	0,99 $\pm$ 0,06	1,62 $\pm$ 0,09	1,24 $\pm$ 0,10	1,44 $\pm$ 0,06	1,10 $\pm$ 0,03
espatulenol	1570	1578 a	13,39 $\pm$ 0,28	13,62 $\pm$ 0,29	12,24 $\pm$ 0,75	12,27 $\pm$ 0,93	11,63 $\pm$ 0,38	10,76 $\pm$ 0,19
viridiflorol	1578	1592 a	0,19 $\pm$ 0,33					
carotol	1596	1594 a	0,78 $\pm$ 0,11		1,16 $\pm$ 0,15		1,62 $\pm$ 0,03	
β -atlantol	1601	1608 a	0,68 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,06	1,00 $\pm$ 0,08	0,69 $\pm$ 0,6	0,87 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,02
M+ 218: 119(100) 105(93) 91(83) 145(74) 93(72)	1620				0,68 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,12	0,61 $\pm$ 0,03	
M+ 220: 105(100) 119(95) 91(85) 93(74) 43(61)	1626		1,90 $\pm$ 0,11	1,80 $\pm$ 0,06	2,27 $\pm$ 0,11	1,88 $\pm$ 0,21	1,58 $\pm$ 0,09	1,61 $\pm$ 0,05
M+ 220: 79(100) 81(71) 93(64) 91(33) 94(30)	1637							0,40 $\pm$ 0,34
daucol	1637	1642 a			0,21 $\pm$ 0,36		0,72 $\pm$ 0,03	
epi- α -muurolol	1640	1642 a	0,65 $\pm$ 0,02		0,83 $\pm$ 0,05		0,80 $\pm$ 0,02	
M+ 220: 94(100) 93(71) 91(66) 162(66) 105(66)	1643		0,94 $\pm$ 0,05	1,09 $\pm$ 0,07	1,23 $\pm$ 0,11	1,37 $\pm$ 0,21	1,04 $\pm$ 0,04	1,18 $\pm$ 0,08
α -eudesmol	1648	1653 a	2,06 $\pm$ 0,06	2,39 $\pm$ 0,14	2,08 $\pm$ 0,20	2,66 $\pm$ 0,33	2,07 $\pm$ 0,09	1,80 $\pm$ 0,08
M+ 220: 94(100) 93(85) 67(58) 79(56) 41(52)	1652				0,42 $\pm$ 0,36	0,55 $\pm$ 0,48		
(Z)- α -santalol	1670	1675 a	1,21 $\pm$ 0,10	1,44 $\pm$ 0,49	1,59 $\pm$ 0,11	1,27 $\pm$ 0,22	1,22 $\pm$ 0,06	0,41 $\pm$ 0,35
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1675	1686 a						1,01 $\pm$ 0,04

Cont.

Componente	IR	IR Ref	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			36,32 ± 2,30	35,44 ± 3,52	31,56 ± 1,69	31,64 ± 3,02	32,38 ± 0,54	34,34 ± 0,85
Monoterpenos oxigenados (%)			31,53 ± 0,96	29,21 ± 0,97	33,05 ± 0,59	35,34 ± 1,18	33,57 ± 0,48	32,07 ± 0,10
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			8,01 ± 1,52	11,84 ± 1,97	8,94 ± 0,63	9,95 ± 1,25	9,12 ± 0,77	11,55 ± 0,50
Sesquiterpenos oxigenados (%)			20,19 ± 0,25	19,13 ± 0,96	20,73 ± 1,62	18,13 ± 2,08	20,38 ± 0,13	15,96 ± 0,50
Fenilpropanóides (%)			1,12 ± 0,06	1,48 ± 0,07	1,13 ± 0,10		1,30 ± 0,08	0,93 ± 0,05
Não identificados (%)			2,84 ± 0,16	2,89 ± 0,12	4,59 ± 0,62	4,94 ± 1,14	3,24 ± 0,15	4,84 ± 0,67
Total identificado (%)			97,16 ± 0,17	97,11 ± 0,11	95,42 ± 0,62	95,06 ± 1,13	96,75 ± 0,16	94,86 ± 0,22

Legenda: IR Ref. a - Adams (2007); c - NIST 69 (2016); ♂ - masculino; ♀ - feminino.

Tabela 8. Composição química (média $\pm$ desvio padrão da % relativa de área) dos óleos essenciais de flores e frutos de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado.

Componente	IR	IR Ref ^a	Área (%)		
			Flores	Frutos	
			♂	♀	♀
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	841	839	0,80 $\pm$ 0,04	0,76 $\pm$ 0,14	1,26 $\pm$ 0,08
α -pineno	933	939		1,79 $\pm$ 0,40	1,63 $\pm$ 0,21
canfeno	949	954		0,74 $\pm$ 0,14	0,44 $\pm$ 0,38
sabineno	972	975			1,54 $\pm$ 0,16
β -pineno	976	979		0,44 $\pm$ 0,38	0,93 $\pm$ 0,07
mircenol	990	990	1,94 $\pm$ 0,03	1,47 $\pm$ 0,20	1,21 $\pm$ 0,08
α -felandreno	1003	1002		0,41 $\pm$ 0,35	
limoneno	1028	1029			0,67 $\pm$ 0,03
1,8-cineol	1031	1031		4,44 $\pm$ 0,15	1,37 $\pm$ 0,06
cânfora	1146	1146	0,95 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,05	1,49 $\pm$ 0,03
α -terpineol	1191	1188		0,73 $\pm$ 0,04	0,19 $\pm$ 0,33
citronelol	1224	1225		0,98 $\pm$ 0,11	3,75 $\pm$ 0,29
acetato de bornila	1279	1288		1,15 $\pm$ 0,04	1,77 $\pm$ 0,09
timol	1285	1290	1,50 $\pm$ 0,02		
δ -elemeno	1327	1338	1,41 $\pm$ 0,03	1,56 $\pm$ 0,05	1,54 $\pm$ 0,04
α -cubebeno	1342	1348	0,69 $\pm$ 0,01	0,63 $\pm$ 0,01	
α -copaeno	1370	1376	0,95 $\pm$ 0,01		
β -elemeno	1384	1390	2,38 $\pm$ 0,04	2,10 $\pm$ 0,03	2,10 $\pm$ 0,04
(E)-cariofileno	1412	1419	1,17 $\pm$ 0,04	1,31 $\pm$ 0,03	1,73 $\pm$ 0,05
γ -elemene	1423	1436	1,13 $\pm$ 0,02	0,98 $\pm$ 0,04	1,10 $\pm$ 0,04
α -humuleno	1449	1454	1,45 $\pm$ 0,02	1,28 $\pm$ 0,01	1,64 $\pm$ 0,04
allo-aromadendreno	1455	1460	0,94 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,01	0,80 $\pm$ 0,03
γ -muuroleno	1471	1479	0,79 $\pm$ 0,02		0,67 $\pm$ 0,03
germacreno D	1477	1485	12,36 $\pm$ 0,22	18,35 $\pm$ 0,45	15,61 $\pm$ 0,22
trans-muurola-4(14),5-dieno	1485	1493		0,64 $\pm$ 0,06	
biciclogermacreno	1490	1500	8,53 $\pm$ 0,16	9,32 $\pm$ 0,01	8,17 $\pm$ 0,22
α -muuroleno	1492	1500	1,23 $\pm$ 0,03		
E,E- α -farneseno	1500	1505	4,42 $\pm$ 0,11	8,75 $\pm$ 0,18	9,25 $\pm$ 0,55
β -bisaboleno	1502	1505	0,61 $\pm$ 0,04		
δ -amorfeno	1508	1512	0,44 $\pm$ 0,38		
δ -cadineno	1511	1523	2,40 $\pm$ 0,04	1,76 $\pm$ 0,12	1,65 $\pm$ 0,18
(Z)- α -bisaboleno	1539	1507	0,83 $\pm$ 0,01		
elemol	1542	1549	0,74 $\pm$ 0,04	1,15 $\pm$ 0,02	1,51 $\pm$ 0,08

Cont.

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Área (%)		
			Flores		Frutos
			♂	♀	♀
germacreno B	1551	1561	0,39 ± 0,34		
M+ 220: 159(100) 119(99) 145(66) 105(53) 131(42)	1556		1,62 ± 0,02	0,68 ± 0,05	0,81 ± 0,02
espatulenol	1570	1578	7,58 ± 0,08	3,02 ± 0,17	5,42 ± 0,33
viridiflorol	1578	1592	1,49 ± 0,02	0,87 ± 0,14	0,82 ± 0,05
M+ 222: 161(100) 105(95) 107(94) 91(83) 93(71)	1578		1,31 ± 0,03	0,78 ± 0,14	0,49 ± 0,42
carotol	1596	1594	13,02 ± 0,58	8,20 ± 0,31	7,67 ± 0,07
rosifoliol	1598	1600	0,52 ± 0,45		
M+ 220: 105(100) 91(93) 131(87) 159(78) 69(73)	1609				0,20 ± 0,35
M+ 222: 189(100) 161(81) 204(66) 133(48) 91(38)	1618		0,86 ± 0,06	0,73 ± 0,09	0,85 ± 0,02
1-epi-cubenol	1619	1628	1,13 ± 0,05	0,65 ± 0,07	0,95 ± 0,04
muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1624	1631	2,08 ± 0,05	0,86 ± 0,09	1,17 ± 0,06
cis-cadin-4-en-7-ol	1636	1636	0,75 ± 0,03	0,70 ± 0,11	
epi-α-cadinol	1636	1640			0,20 ± 0,35
epi-α-muurolol	1640	1642	0,84 ± 0,02	0,72 ± 0,11	0,66 ± 0,05
M+ 220: 208(100) 193(80) 161(49) 105(33) 119(26)	1641			1,75 ± 0,06	
α-muurolol	1644	1646	2,29 ± 0,09		2,32 ± 0,08
α-eudesmol	1648	1653	8,89 ± 0,09	9,70 ± 0,68	8,95 ± 0,93
M+ 220: 93(100) 91(88) 119(83) 105(75) 79(67)	1651		1,29 ± 0,14		1,40 ± 0,44
M+ 220: 205(100) 93(98) 105(89) 119(88) 159(85)	1661		0,45 ± 0,40		
(Z)-α-santalol	1670	1675	0,70 ± 0,09		
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-α-ol	1675	1686	0,41 ± 0,36	1,05 ± 0,14	1,20 ± 1,04
eudesma-4(15),7-dien-1β-ol	1682	1688	0,21 ± 0,36		0,83 ± 0,04
14-hydroxy-α-muuroleno	1743	1780			0,20 ± 0,34
14-hidroxi-δ-cadineno	1784	1803	0,39 ± 0,34		
HB-8 ^b	2001		6,09 ± 0,13	7,56 ± 0,26	3,13 ± 0,62
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			1,94 ± 0,03	9,30 ± 1,62	7,79 ± 0,85
Monoterpenos oxigenados (%)			3,25 ± 0,06	4,89 ± 0,35	8,46 ± 0,13
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			41,74 ± 1,09	47,39 ± 0,40	44,26 ± 1,18
Sesquiterpenos oxigenados (%)			47,52 ± 0,69	34,47 ± 0,98	35,01 ± 0,96
Não identificados (%)			5,53 ± 0,50	3,93 ± 0,23	3,74 ± 0,53
Total identificado (%)			94,45 ± 0,51	96,06 ± 0,25	95,52 ± 0,52

Legenda: IR Ref. a - Adams (2007); b – Guedes (1997); ♂ - masculino; ♀ - feminino.

Tabela 9. Composição química (média $\pm$ desvio padrão da % relativa de área) dos óleos essenciais de folhas frescas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Frescas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	841	839	1,02 $\pm$ 0,07	0,98 $\pm$ 0,10	1,17 $\pm$ 0,11	1,04 $\pm$ 0,02	1,20 $\pm$ 0,02	1,35 $\pm$ 0,18
α -pineno	933	939	2,39 $\pm$ 0,45	1,73 $\pm$ 0,41	3,08 $\pm$ 0,23	2,63 $\pm$ 0,01	2,67 $\pm$ 0,11	2,03 $\pm$ 0,15
canfeno	949	954			0,19 $\pm$ 0,33		0,39 $\pm$ 0,34	0,19 $\pm$ 0,33
sabineno	972	975	1,79 $\pm$ 0,28	0,23 $\pm$ 0,40	1,95 $\pm$ 0,11	1,35 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,02	0,61 $\pm$ 0,02
β -pineno	976	979	1,11 $\pm$ 0,19	0,48 $\pm$ 0,42	1,42 $\pm$ 0,11	1,26 $\pm$ 0,01	0,73 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,05
mirceno	990	990	10,48 $\pm$ 1,26	10,9 $\pm$ 1,50	10,85 $\pm$ 0,65	12,21 $\pm$ 0,06	10,53 $\pm$ 0,08	11,03 $\pm$ 0,48
α -felandreno	1003	1002	1,01 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,27	1,39 $\pm$ 0,10	2,08 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,05	1,65 $\pm$ 0,02
limoneno	1028	1029	0,87 $\pm$ 0,10	0,84 $\pm$ 0,14	1,44 $\pm$ 0,07	1,56 $\pm$ 0,01	1,31 $\pm$ 0,02	1,29 $\pm$ 0,08
1,8-cineol	1031	1031	2,87 $\pm$ 0,50	4,70 $\pm$ 1,80	5,81 $\pm$ 0,32	6,23 $\pm$ 0,08	4,32 $\pm$ 0,36	3,80 $\pm$ 0,25
linalol	1097	1096	1,24 $\pm$ 0,18	0,94 $\pm$ 0,22	1,54 $\pm$ 0,07	1,45 $\pm$ 0,01	3,55 $\pm$ 0,16	1,45 $\pm$ 0,15
cânfora	1146	1146			0,61 $\pm$ 0,01	0,57 $\pm$ 0,00	0,37 $\pm$ 0,32	
terpinen-4-ol	1177	1177			0,20 $\pm$ 0,35			
α -terpineol	1191	1188		0,19 $\pm$ 0,32	0,97 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,01	0,71 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,35
citronelol	1224	1225	1,29 $\pm$ 0,03	1,13 $\pm$ 0,17	1,68 $\pm$ 0,02	2,85 $\pm$ 0,01	1,57 $\pm$ 0,03	3,21 $\pm$ 0,12
timol	1285	1290	0,73 $\pm$ 0,05		0,73 $\pm$ 0,04	0,60 $\pm$ 0,01	0,79 $\pm$ 0,04	0,74 $\pm$ 0,05
δ -elemeno	1327	1338	1,84 $\pm$ 0,05	2,48 $\pm$ 0,22	2,10 $\pm$ 0,07	2,13 $\pm$ 0,02	2,40 $\pm$ 0,07	2,74 $\pm$ 0,12
α -ylangeno	1366	1375					0,62 $\pm$ 0,03	
α -copaeno	1370	1376	0,94 $\pm$ 0,06		0,89 $\pm$ 0,05		0,77 $\pm$ 0,05	
β -elemeno	1384	1390	1,97 $\pm$ 0,21	1,63 $\pm$ 0,11	2,15 $\pm$ 0,22	1,62 $\pm$ 0,02	2,30 $\pm$ 0,05	1,92 $\pm$ 0,08

Cont.

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Frescas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
metil eugenol	1394	1403				0,67 ± 0,01		
(E)-cariofileno	1412	1419	1,19 ± 0,06	1,18 ± 0,08	1,29 ± 0,07	1,08 ± 0,02	1,36 ± 0,06	1,29 ± 0,07
β-copaeno	1423	1432	0,65 ± 0,04	0,60 ± 0,05	0,78 ± 0,04	0,60 ± 0,01	0,87 ± 0,03	0,73 ± 0,03
α-humuleno	1449	1454	1,00 ± 0,05	1,00 ± 0,07	1,05 ± 0,04	0,96 ± 0,01	1,11 ± 0,03	1,14 ± 0,05
allo-aromadendreno	1455	1460		0,18 ± 0,31			0,38 ± 0,33	0,61 ± 0,04
γ-muuroleno	1471	1479	0,19 ± 0,33		0,66 ± 0,01		0,77 ± 0,04	0,19 ± 0,33
germacreno D	1477	1485	17,46 ± 1,18	19,89 ± 1,78	12,24 ± 0,37	11,49 ± 0,04	12,7 ± 0,49	13,88 ± 0,45
biciclogermacreno	1490	1500	11,81 ± 0,52	14,64 ± 01,31	9,97 ± 0,61	9,53 ± 0,04	11,46 ± 0,30	12,31 ± 0,45
cubebol	1507	1515	0,76 ± 0,09		0,85 ± 0,14	0,20 ± 0,35		0,45 ± 0,39
δ-cadineno	1511	1523	2,25 ± 0,15	1,68 ± 0,39	2,05 ± 0,04	1,40 ± 0,01	0,83 ± 0,14	1,51 ± 0,03
(Z)-α-bisaboleno	1539	1507	0,78 ± 0,04				1,99 ± 0,11	
α-calacoreno	1536	1545					0,98 ± 0,06	
elemol	1542	1549	0,70 ± 0,02	0,75 ± 0,04	1,06 ± 0,04	0,94 ± 0,01	0,96 ± 0,02	0,95 ± 0,03
M+ 220: 159(100) 119(99) 145(66) 105(53) 131(42)	1556		1,52 ± 0,03	0,64 ± 0,04	1,70 ± 0,02	0,91 ± 0,01	1,64 ± 0,02	0,86 ± 0,05
espatulenol	1570	1578	4,47 ± 0,23	4,60 ± 0,12	4,53 ± 0,14	5,15 ± 0,04	4,67 ± 0,26	4,87 ± 0,20
viridiflorol	1578	1592	1,46 ± 0,49	1,75 ± 0,11	2,06 ± 0,27	2,41 ± 0,01	2,09 ± 0,28	1,31 ± 0,05
M+ 222: 109(100) 161(91) 107(90) 43(88) 105(86)	1587							1,01 ± 0,04
carotol	1596	1594	8,93 ± 0,62	6,19 ± 0,33	3,30 ± 0,42	4,17 ± 0,01	0,19 ± 0,32	5,21 ± 0,17
rosifoliol	1598	1600	0,19 ± 0,33	0,37 ± 0,32	0,69 ± 0,02	0,70 ± 0,01	0,76 ± 0,03	0,68 ± 0,01
10-epi-γ-eudesmol	1619	1623			0,67 ± 0,06	0,75 ± 0,01	0,77 ± 0,02	0,76 ± 0,01

Cont.

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Frescas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
1-epi-cubenol	1619	1628	0,75 ± 0,03	0,38 ± 0,33	0,93 ± 0,02	0,81 ± 0,01	1,00 ± 0,03	0,77 ± 0,01
M+ 220: 105(100) 119(95) 91(85) 93(74) 43(61) 162 159	1626		1,09 ± 0,06	1,03 ± 0,01	1,23 ± 0,03	1,36 ± 0,01	1,44 ± 0,07	1,32 ± 0,02
epi- α -cadinol	1636	1640	0,38 ± 0,33	0,18 ± 0,31	0,67 ± 0,01	0,65 ± 0,01	0,66 ± 0,03	0,59 ± 0,01
epi- α -muurolol	1640	1642		0,41 ± 0,35	0,71 ± 0,01	0,81 ± 0,01	0,71 ± 0,02	0,72 ± 0,02
α -muurolol	1644	1646	2,02 ± 0,01	2,05 ± 0,04	2,19 ± 0,07	2,60 ± 0,02	2,47 ± 0,05	2,41 ± 0,05
α -eudesmol	1648	1653	7,05 ± 0,27	8,48 ± 0,35	7,30 ± 0,12	7,36 ± 0,29	7,07 ± 0,12	7,31 ± 0,27
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1675	1686	0,84 ± 0,09	1,14 ± 0,05	1,04 ± 0,13	1,57 ± 0,02	1,17 ± 0,20	1,37 ± 0,10
amorpha-4,9-dien-2-ol	1687	1700					0,19 ± 0,33	
HB-8 ^b	2001		4,96 ± 0,60	5,42 ± 0,37	4,60 ± 0,65	5,37 ± 0,04	4,96 ± 0,61	4,57 ± 0,56
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			20,51 ± 2,89	20,09 ± 4,69	26,13 ± 1,79	27,32 ± 0,07	22,14 ± 0,83	21,32 ± 1,29
Monoterpenos oxigenados (%)			4,27 ± 0,17	3,23 ± 0,58	6,90 ± 0,48	7,46 ± 0,03	8,20 ± 0,22	7,16 ± 0,68
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			40,09 ± 2,60	43,27 ± 4,23	33,18 ± 1,50	28,82 ± 0,11	38,54 ± 1,45	36,32 ± 1,51
Sesquiterpenos oxigenados (%)			32,53 ± 1,24	31,73 ± 01,24	30,60 ± 01,24	33,49 ± 0,22	27,66 ± 1,72	31,99 ± 0,64
Fenilpropanóides (%)						0,67 ± 0,01		
Não identificados (%)			2,61 ± 0,07	1,68 ± 0,05	2,93 ± 0,05	2,28 ± 0,01	3,08 ± 0,06	3,20 ± 0,09
Total identificado (%)			97,40 ± 0,08	98,33 ± 0,05	96,81 ± 0,40	97,75 ± 0,02	96,54 ± 0,41	96,79 ± 0,09

Legenda: IR Ref. a - Adams (2007); b – Guedes (1997); ♂ - masculino; ♀ - feminino.

Tabela 10. Composição química (média $\pm$ desvio padrão da % relativa de área) dos óleos essenciais de folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
4-hidroxi-4-metil-2-pentanona	841	839	0,99 $\pm$ 0,08	1,35 $\pm$ 0,23	1,06 $\pm$ 0,14	1,09 $\pm$ 0,19	1,61 $\pm$ 0,11	1,94 $\pm$ 0,20
α -pineno	933	939	1,46 $\pm$ 0,65	1,20 $\pm$ 0,26	2,20 $\pm$ 0,43	1,99 $\pm$ 0,26	1,89 $\pm$ 0,28	1,18 $\pm$ 1,02
canfeno	949	954			0,42 $\pm$ 0,37	0,46 $\pm$ 0,4	0,21 $\pm$ 0,36	0,42 $\pm$ 0,37
sabineno	972	975			0,44 $\pm$ 0,38			
β -pineno	976	979	0,59 $\pm$ 0,52		1,06 $\pm$ 0,18	0,84 $\pm$ 0,07	0,20 $\pm$ 0,34	0,91 $\pm$ 0,55
mirceno	990	990	1,76 $\pm$ 0,40	1,25 $\pm$ 0,17	2,63 $\pm$ 0,43	1,99 $\pm$ 0,27	2,77 $\pm$ 0,30	2,14 $\pm$ 0,21
ρ -cimeno	1023	1024	0,70 $\pm$ 0,11	0,79 $\pm$ 0,12	0,84 $\pm$ 0,07	1,53 $\pm$ 0,16	0,99 $\pm$ 0,12	1,11 $\pm$ 0,04
limoneno	1028	1029	0,20 $\pm$ 0,34		0,88 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,08	0,81 $\pm$ 0,06	0,78 $\pm$ 0,05
1,8-cineol	1031	1031	3,26 $\pm$ 0,76	4,83 $\pm$ 0,90	4,66 $\pm$ 0,57	5,32 $\pm$ 0,44	3,56 $\pm$ 1,04	4,42 $\pm$ 0,11
linalol	1097	1096	1,17 $\pm$ 0,08	1,08 $\pm$ 0,07	1,64 $\pm$ 0,12	1,25 $\pm$ 0,07	2,35 $\pm$ 0,39	1,00 $\pm$ 0,03
cânfora	1146	1146	0,71 $\pm$ 0,04	0,71 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,01	0,94 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,13	0,77 $\pm$ 0,03
terpinen-4-ol	1177	1177	0,19 $\pm$ 0,32		0,20 $\pm$ 0,34			
α -terpineol	1191	1188	0,19 $\pm$ 0,33		0,88 $\pm$ 0,04	0,89 $\pm$ 0,05	0,67 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,01
citronelol	1224	1225	0,92 $\pm$ 0,09	1,16 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,05	1,96 $\pm$ 0,03	1,40 $\pm$ 0,11	2,07 $\pm$ 0,07
acetato de bornila	1279	1288				0,19 $\pm$ 0,33		0,58 $\pm$ 0,03
timol	1285	1290	0,94 $\pm$ 0,10	0,42 $\pm$ 0,37	0,63 $\pm$ 0,02		0,95 $\pm$ 0,07	0,49 $\pm$ 0,43
α -cubebeno	1342	1348					0,66 $\pm$ 0,02	
acetato de timol	1344	1352	0,67 $\pm$ 0,05		0,61 $\pm$ 0,01			0,62 $\pm$ 0,10
Cont.								

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
α -ylangeno	1366	1375	0,90 $\pm$ 0,05	0,90 $\pm$ 0,06	1,15 $\pm$ 0,07	1,06 $\pm$ 0,04	2,23 $\pm$ 0,23	1,54 $\pm$ 0,15
α -copaeno	1370	1376	1,11 $\pm$ 0,11		1,16 $\pm$ 0,09		1,65 $\pm$ 0,08	0,19 $\pm$ 0,33
(E)- β -farneseno	1449	1456					0,20 $\pm$ 0,35	
allo-aromadendreno	1455	1460	0,22 $\pm$ 0,38		0,64 $\pm$ 0,04	0,70 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,03	0,82 $\pm$ 0,04
γ -muuroleno	1471	1479	0,42 $\pm$ 0,37		0,80 $\pm$ 0,11	0,51 $\pm$ 0,45	1,39 $\pm$ 0,09	0,81 $\pm$ 0,14
trans-muurola-4(14),5-dieno	1485	1493					0,23 $\pm$ 0,40	
epi-cubebol	1489	1494	0,44 $\pm$ 0,38		0,92 $\pm$ 0,06	0,65 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,04
α -muuroleno	1492	1500	0,86 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,04	0,96 $\pm$ 0,12	0,90 $\pm$ 0,04	1,61 $\pm$ 0,14	1,02 $\pm$ 0,10
cubebol	1507	1515	0,20 $\pm$ 0,35		1,16 $\pm$ 0,13	1,00 $\pm$ 0,10	1,08 $\pm$ 0,08	0,89 $\pm$ 0,14
δ -amorfenol	1508	1512						
δ -cadineno	1511	1523	0,91 $\pm$ 0,10	0,19 $\pm$ 0,33	0,98 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,03	1,34 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,37
α -calacoreno	1536	1545	0,18 $\pm$ 0,32				0,66 $\pm$ 0,04	
elemol	1542	1549				0,20 $\pm$ 0,34		
M+ 220: 123(100) 91(78) 105(75) 131(74) 81(51)	1553			0,62 $\pm$ 0,02	0,68 $\pm$ 0,03	0,97 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,06	0,83 $\pm$ 0,02
M+ 220: 159(100) 119(99) 145(66) 105(53) 131(42)	1556		1,56 $\pm$ 0,30	0,65 $\pm$ 0,04	1,58 $\pm$ 0,06	0,93 $\pm$ 0,02	2,01 $\pm$ 0,46	0,62 $\pm$ 0,03
M+ 220: 93(100) 69(86) 119(67) 41(62) 91(52)	1557				0,67 $\pm$ 0,03			
M+ 220: 159(100) 119(54) 91(52) 107(52) 105(51)	1559							0,62 $\pm$ 0,03
M+ 220: 123(100) 96(97) 119(92) 93(88) 81(86)	1563					0,67 $\pm$ 0,02		
espatulenol	1570	1578	26,69 $\pm$ 1,56	34,64 $\pm$ 1,65	21,52 $\pm$ 0,33	25,12 $\pm$ 0,80	24,25 $\pm$ 0,16	28,05 $\pm$ 0,83
M+ 220: 93(100) 119(66) 91(62) 105(56) 107(39)	1588		1,95 $\pm$ 0,09	2,24 $\pm$ 0,07	1,86 $\pm$ 0,05	2,06 $\pm$ 0,03	2,16 $\pm$ 0,11	2,13 $\pm$ 0,07
salvial-4(14)-en-1-ona	1589	1594	1,80 $\pm$ 0,37	1,98 $\pm$ 0,08	1,87 $\pm$ 0,05	1,94 $\pm$ 0,04	2,01 $\pm$ 0,11	1,91 $\pm$ 0,04
Cont.								

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
carotol	1596	1594	15,53 ± 1,10	10,04 ± 01,19	7,98 ± 0,24	8,26 ± 0,38		4,91 ± 0,79
M+ 220: 93(100) 91(95) 121(95) 79(92) 107(80)	1598			1,15 ± 0,02				
epóxido de humuleno II	1606	1608	1,98 ± 0,09	2,25 ± 0,02	3,19 ± 0,09	3,76 ± 0,08	3,38 ± 0,17	3,54 ± 0,09
M+ 220: 131(100) 159(96) 91(92) 105(90) 93(70)	1613		1,49 ± 0,18	1,81 ± 0,04	1,64 ± 0,04	2,02 ± 0,05	1,73 ± 0,09	1,99 ± 0,02
M+ 222: 189(100) 161(81) 204(66) 133(48) 91(38)	1618		0,52 ± 0,46	0,91 ± 0,06	1,00 ± 0,04	1,09 ± 0,04	0,95 ± 0,06	0,98 ± 0,02
1-epi-cubenol	1619	1628	1,60 ± 0,14	1,39 ± 0,01	1,83 ± 0,07	1,62 ± 0,03	1,97 ± 0,06	1,50 ± 0,08
muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1624	1631	2,43 ± 0,14	2,10 ± 0,04	2,37 ± 0,04	2,20 ± 0,07	2,70 ± 0,22	2,45 ± 0,04
daucol	1637	1642	1,93 ± 0,13	1,76 ± 0,23	1,39 ± 0,14	1,67 ± 0,10	0,42 ± 0,37	0,84 ± 0,02
α-muurolol	1644	1646	3,80 ± 0,11	3,54 ± 0,15	3,97 ± 0,13	3,76 ± 0,04	4,93 ± 0,16	4,13 ± 0,09
α-eudesmol	1648	1653	10,69 ± 0,73	12,98 ± 0,31	10,92 ± 0,24	10,51 ± 0,56	10,41 ± 0,20	9,62 ± 0,06
M+ 220: 93(100) 91(88) 119(83) 105(75) 79(67)	1651							0,79 ± 0,08
M+ 220: 157(100) 177(59) 123(45) 159(41) 142(40)	1662		0,75 ± 0,03	0,76 ± 0,01	0,96 ± 0,05	0,85 ± 0,07	0,97 ± 0,06	0,84 ± 0,03
M+ 218: 91(100) 159(84) 93(72) 105(69) 79(63)	1662		0,59 ± 0,02	0,39 ± 0,34	0,71 ± 0,07	0,86 ± 0,31	0,76 ± 0,02	1,27 ± 0,02
(Z)-α-santalol	1670	1675	1,65 ± 0,04	1,35 ± 0,04	1,65 ± 0,11	1,30 ± 0,08	1,64 ± 0,04	1,24 ± 0,04
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1-a-ol	1675	1686	0,94 ± 0,02		1,06 ± 0,05		1,23 ± 0,18	
eudesma-4(15)7-dien-1β-ol + cis-14-nor-muurol-5-en-4-ona	1681	1688, 1689		0,99 ± 0,04		1,03 ± 0,06		1,01 ± 0,14
eudesma-4(15)7-dien-1β-ol	1681	1689	1,97 ± 0,11	2,25 ± 0,08	1,86 ± 0,09	2,08 ± 0,16	2,11 ± 0,18	2,23 ± 0,16
amorpha-4,9-dien-2-ol	1687	1700			0,60 ± 0,03		0,69 ± 0,04	0,18 ± 0,32
M+ 220: 93(100) 81(87) 91(80) 107(79) 79(74)	1716				0,87 ± 0,11	0,29 ± 0,50	0,67 ± 0,03	0,38 ± 0,33
γ-costol	1719	1746	0,74 ± 0,05				0,84 ± 0,24	
			Cont.					

Cont.

Componente	IR	IR Ref ^a	Folhas Secas					
			Floração		Frutificação		Vegetativa	
			♂	♀	♂	♀	♂	♀
14-hidroxi- α -muuroleno	1743	1780	0,80 $\pm$ 0,09	0,20 $\pm$ 0,35	0,62 $\pm$ 0,54	0,81 $\pm$ 0,22	0,95 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,19
M+ 236: 81(100) 91(82) 79(65) 105(62) 93(60)	1755		0,64 $\pm$ 0,03	0,86 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,44	0,96 $\pm$ 0,16	0,79 $\pm$ 0,04	0,94 $\pm$ 0,07
14-hidroxi- δ -cadineno	1784	1803	0,66 $\pm$ 0,10	0,63 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,35	0,76 $\pm$ 0,09	0,40 $\pm$ 0,34
Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			7,97 $\pm$ 2,66	8,06 $\pm$ 1,36	13,13 $\pm$ 2,45	13,03 $\pm$ 1,65	10,43 $\pm$ 1,75	10,98 $\pm$ 1,15
Monoterpenos oxigenados (%)			5,78 $\pm$ 0,64	4,73 $\pm$ 0,54	7,01 $\pm$ 0,28	6,33 $\pm$ 0,61	7,76 $\pm$ 0,58	8,11 $\pm$ 0,46
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			4,60 $\pm$ 1,27	1,73 $\pm$ 0,39	5,69 $\pm$ 0,40	3,87 $\pm$ 0,48	10,86 $\pm$ 0,54	4,81 $\pm$ 0,89
Sesquiterpenos oxigenados (%)			73,84 $\pm$ 2,20	76,08 $\pm$ 1,54	63,63 $\pm$ 1,12	66,09 $\pm$ 1,07	60,26 $\pm$ 1,45	64,32 $\pm$ 0,75
Não identificados (%)			7,49 $\pm$ 0,68	9,39 $\pm$ 0,47	10,47 $\pm$ 0,84	10,69 $\pm$ 0,71	10,70 $\pm$ 0,89	11,37 $\pm$ 0,62
Total identificado (%)			92,19 $\pm$ 0,53	90,60 $\pm$ 0,49	89,46 $\pm$ 0,96	89,31 $\pm$ 0,69	89,31 $\pm$ 0,87	88,21 $\pm$ 0,98

Legenda: IR Ref. a - Adams (2007); ♂ - masculino; ♀ - feminino.

À primeira vista, uma das diferenças mais marcantes entre os óleos essenciais de folhas frescas e flores provenientes das plantas do Cerrado em relação às da Mata Atlântica foi a coloração azulada ou esverdeada, como mostra a **figura 7**. Os componentes responsáveis pela coloração observada foram fracionados por CCD, analisados por CG-EM e estão apresentados na **tabela 11**. Assim, a substância mais abundante (pico 12), correspondente a 27,93 % da fração, com $m/z = 230$ e fórmula molecular $C_{15}H_{18}O_2$, foi identificada como HB-8, por comparação do seu espectro de massas (**figura 8**) com dados da dissertação de Guedes (1997), que isolou este componente do extrato hidroetanólico de folhas frescas de *H. brasiliense* proveniente do Morro do Baú, Santa Catarina. Embora não haja relato da coloração desta substância, nenhuma substância das três bibliotecas instaladas no CG-EM apresentou um espectro de massas tão semelhante como em relação ao da substância mais abundante da fração azul. Nas plantas provenientes do Estado de São Paulo, este componente só foi encontrado nos óleos essenciais azuis de material fresco do Cerrado, sendo ausente nos óleos essenciais da Mata Atlântica e de material seco de ambos os biomas.



Figura 7. Imagem dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de *H. brasiliense* em diferentes fases fenológicas e provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado. Foto: Cynthia Murakami.

Tabela 11. Componentes identificados na fração de coloração azul isolada do óleo essencial de folhas frescas masculinas provenientes do Cerrado em fase de floração.

	Componente	IR	IR Ref ^a	% Área
1	1,8-cineol	1031	1031	16,93
2	cânfora	1146	1146	4,50
3	timol	1285	1290	6,41
4	metil eugenol	1394	1403	2,97
5	M+ 220: 159(100) 119(99) 145(66) 105(53) 131(42)	1556		9,69
6	espatulenol	1570	1578	10,16
7	viridiflorol	1578	1592	2,96
8	carotol	1596	1594	8,03
9	1-epi-cubenol	1619	1628	3,78
10	epi- α -cadinol	1636	1640	3,24
11	α -muurolol	1644	1646	3,40
12	HB-8 ^b	2001		27,93
	Hidrocarbonetos monoterpênicos (%)			0,00
	Monoterpenos oxigenados (%)			27,84
	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos (%)			0,00
	Sesquiterpenos oxigenados (%)			59,50
	Fenilpropanóides (%)			2,97
	Não identificados (%)			9,69
	Total identificado (%)			90,31

Legenda: a – Adams (2007); b – Guedes (1997).

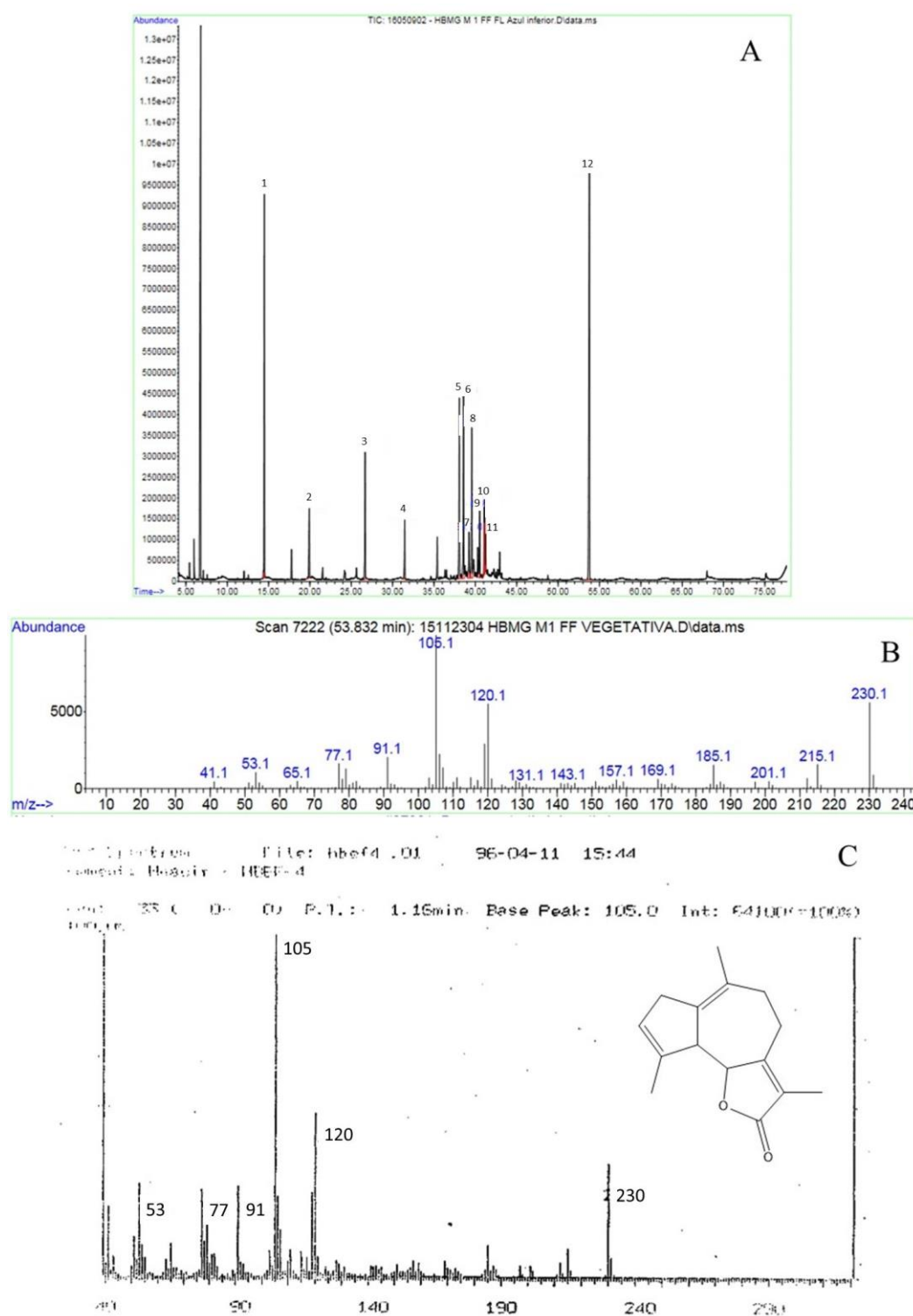
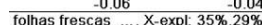


Figura 8. Cromatograma da fração de coloração azul isolada do óleo essencial de folhas frescas masculinas provenientes do Cerrado em fase de floração (A) e espectro de massas do componente majoritário da fração de coloração azul (B), identificado por comparação com Guedes (1997) como HB-8 (C).

A



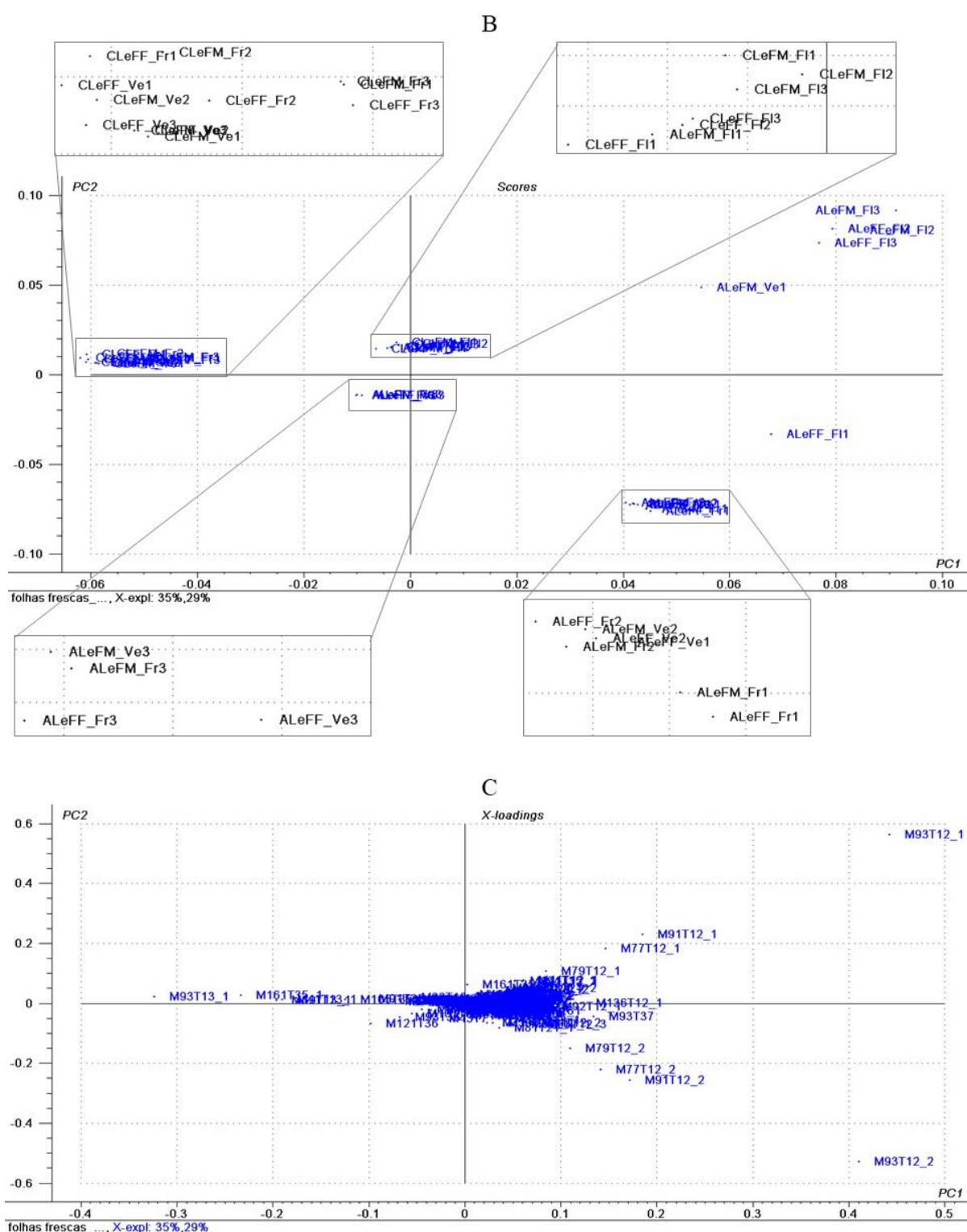


Figura 9. Gráficos dos dois componentes principais (CP1 e CP2) extraídos na ACP dos óleos essenciais de folhas frescas de plantas masculinas e femininas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica, com variância total explicada de 64%: A) Escores, B) Escores ampliado e C) Contribuições de CP1 x CP2; os círculos delimitam as populações discriminadas pela ACP.

Códigos das amostras: A – Mata Atlântica; C – Cerrado; LeFF – folhas frescas femininas; LeFM – folhas frescas masculinas; Fl – floração; Fr – frutificação; Ve – vegetativa.

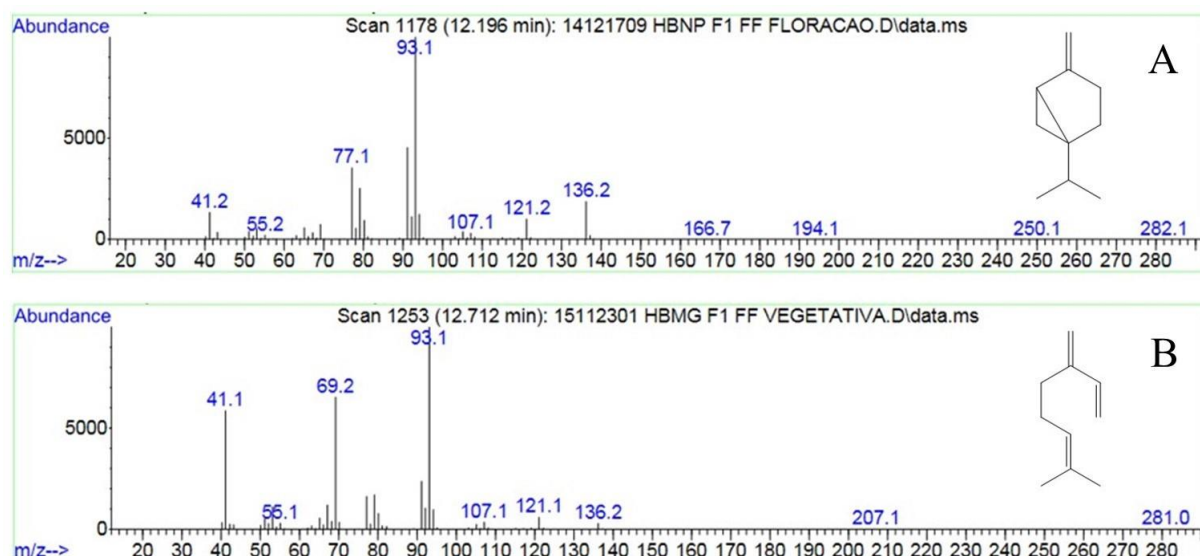


Figura 10. Espectros de massas e estruturas químicas do sabineno (A) e do mirceno (B).

A composição química dos óleos essenciais de folhas frescas de *H. brasiliense* da Mata Atlântica e do Cerrado apresentou componentes majoritários em comum com todas as populações da espécie relatadas em estudos anteriores. A pinocarvona e o sabineno foram encontrados em altas concentrações nos óleos essenciais de Paranapiacaba, assim como nas populações da Serra da Mantiqueira e da Serra do Mar (Resende-Vido 2009) e da Ilha do Cardoso (Murakami *et al.* 2017); o carotol foi encontrado em altos teores na população do Cerrado e da Ilha do Cardoso (Murakami *et al.* 2017); o espatulenol foi um dos componentes principais das populações do Cerrado e de Santa Catarina (Kirchner *et al.* 2013); a população de Paranapiacaba apresentou altos teores de terpinen-4-ol e a população de Santa Catarina, α -terpineol (Kirchner *et al.* 2013); e o curzereno foi abundante nos óleos essenciais de Santa Catarina (Kirchner *et al.* 2013) e da Ilha do Cardoso (Murakami *et al.* 2017). Observou-se a presença do fenilpropanóide metil eugenol nos óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica, ainda que não tenham ultrapassado 2 %, o que também foi relatado por Murakami *et al.* (2017), com teores de até 4,5 % nos óleos essenciais de folhas frescas e flores provenientes da Ilha do Cardoso, e por Resende-Vido (2009), em três das quatro plantas estudadas em outra população de ocorrência natural em Paranapiacaba, porém um dos espécimes apresentou teores entre 23 e 32 % de metil eugenol, possivelmente mais

relacionado a fatores genéticos do que ambientais. Resende-Vido (2009) e Kirchner *et al.* (2010) também detectaram a presença do fenilpropanóide metil chavicol nos óleos essenciais de folhas frescas de *H. brasiliense*, com teores entre 0,6 e 1,2 % em um dos espécimes estudados em outra população de ocorrência natural em Paranapiacaba, e de 0,59 % no espécime proveniente de Santa Catarina. A **figura 11** ilustra a comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de folhas secas das diferentes populações de *H. brasiliense*.

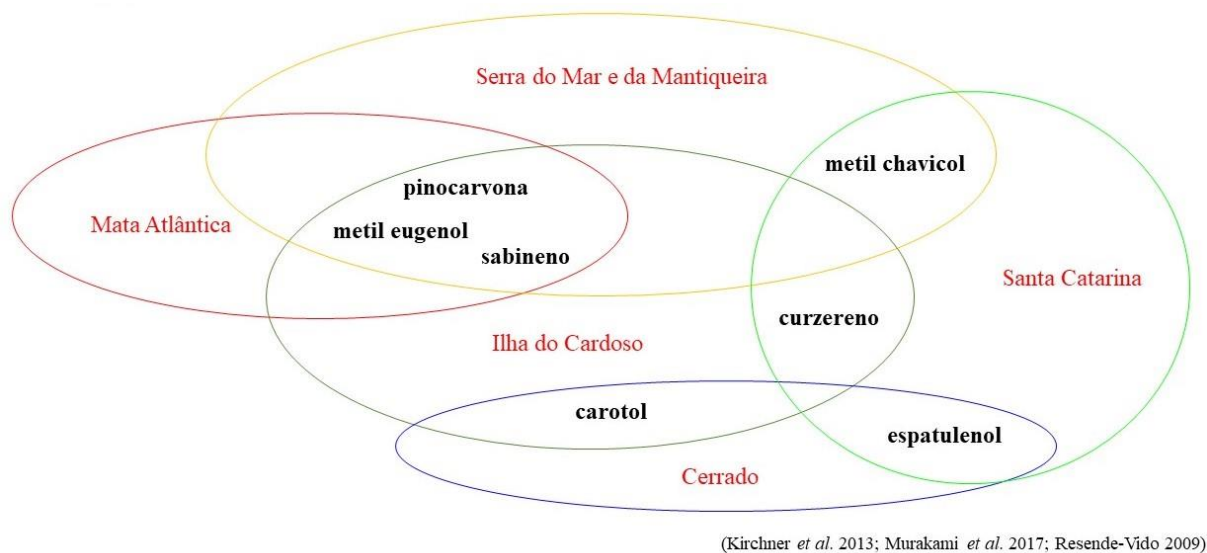
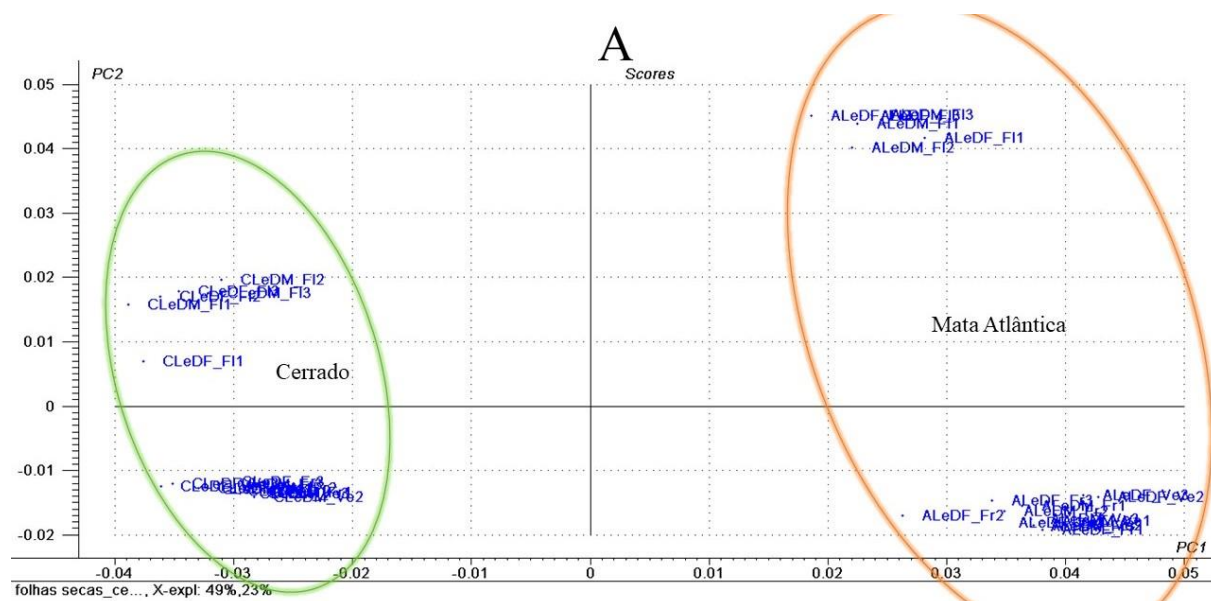


Figura 11. Ilustração da comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de folhas frescas de diferentes populações de *H. brasiliense*.

Foram identificados 45 componentes nos óleos essenciais de folhas secas das plantas provenientes da Mata Atlântica, cujos majoritários (acima de 5%) foram: espatulenol, sabineno, terpinen-4-ol, pinocarvona, (Z)- α -bisaboleno, β -pineno e γ -terpineno. Foram identificados 48 componentes nos óleos essenciais de folhas secas das plantas provenientes do Cerrado, cujos majoritários (acima de 5%) foram: espatulenol, carotol, α -eudesmol e 1,8-cineol. A ACP destes óleos essenciais mostrou distinção entre os óleos essenciais das folhas secas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica. Os dois primeiros componentes, CP1 x CP2, explicaram juntos 70 % da variância total (**figura 12**) em que os fragmentos M93T12, M91T12, M77T12 e M79T12 representam o β -pineno (**figura 13 A**), componente majoritário dos óleos essenciais de folhas secas da Mata Atlântica, e os fragmentos M161T40 (carotol, **figura 13 B**), M149T42 e M59T42 (α -eudesmol, **figura 13 C**) e M112T39 e M205T39

(espatulenol, **figura 13 D**) representam os componentes majoritários dos óleos essenciais de folhas secas do Cerrado.



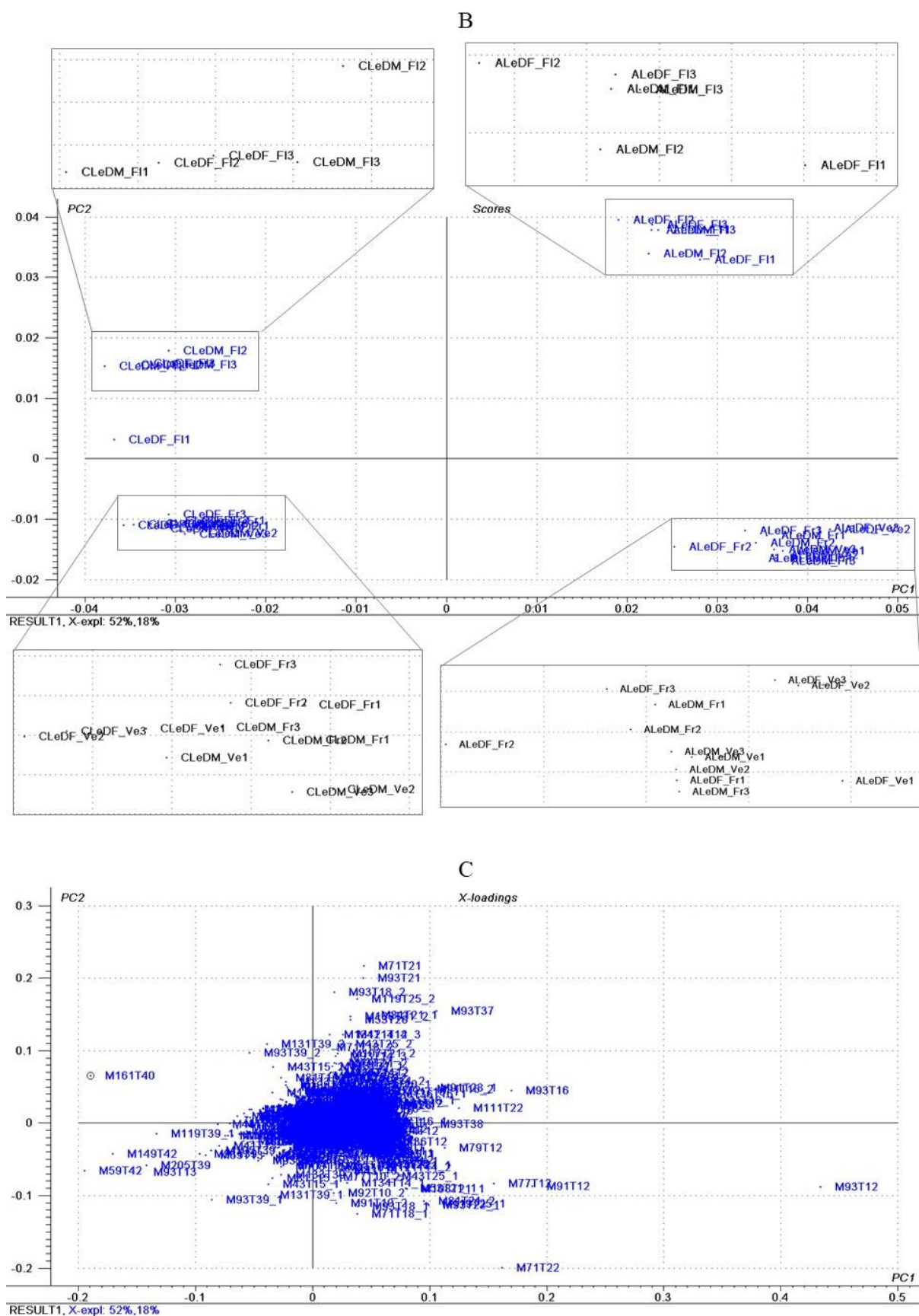


Figura 12. Gráficos dos dois componentes principais (CP1 e CP2) extraídos na ACP dos óleos essenciais de folhas secas de plantas masculinas e femininas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica, com variância total explicada de 70 %: A) Escores, B) Escores ampliado e C) Contribuições de CP1 x CP2; os círculos delimitam as populações discriminadas pela ACP. Códigos das amostras: A – Mata Atlântica; C – Cerrado; LeDF – folhas secas femininas; LeDM – folhas secas masculinas; Fl – floração; Fr – frutificação; Ve – vegetativa.

Somente um estudo químico foi descrito com óleos essenciais de folhas secas de *H. brasiliense* proveniente de duas áreas de Mata Atlântica do Estado de São Paulo, Paranapiacaba, representativa da Serra do Mar, e Pindamonhangaba, representativa da Serra da Mantiqueira (Resende-Vido 2009). Os óleos essenciais de folhas secas das plantas da Mata Atlântica deste estudo apresentaram alguns componentes majoritários em comum com a população estudada previamente de Paranapiacaba, tais como espatulenol, sabineno, pinocarvona, β -pineno e γ -terpineno. Os óleos essenciais de folhas secas das plantas do Cerrado apresentaram somente espatulenol como componente majoritário em comum com as populações estudadas por Resende-Vido (2009). A **figura 14** ilustra a comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de folhas secas das diferentes populações de *H. brasiliense*. Embora o espatulenol tenha sido detectado em todos os óleos essenciais de folhas frescas de *H. brasiliense*, seu teor aumentou nos óleos essenciais de folhas secas, o que confirmou a hipótese de que este sesquiterpeno também constitui um artefato gerado pela oxidação de outros terpenos no processo de secagem do material vegetal (Kashiwagi *et al.* 2010; Njoroge *et al.* 1996).

A secagem de plantas medicinais é uma prática corriqueira para aumentar o seu período de comercialização (Silva & Casali 2000), porém enzimas como oxidases, peroxidases, hidrolases e isomerases permanecem ativas nas plantas durante o processo de secagem, podendo alterar a sua composição química (Fennel *et al.* 2004). Os próprios óleos essenciais tendem a ser voláteis e termolábeis, podendo sofrer reações de isomerização, oxidação, desidrogenação, polimerização ou rearranjos termais, desde o interior da planta até durante o manuseio do óleo essencial (Turek & Stintzing 2013).

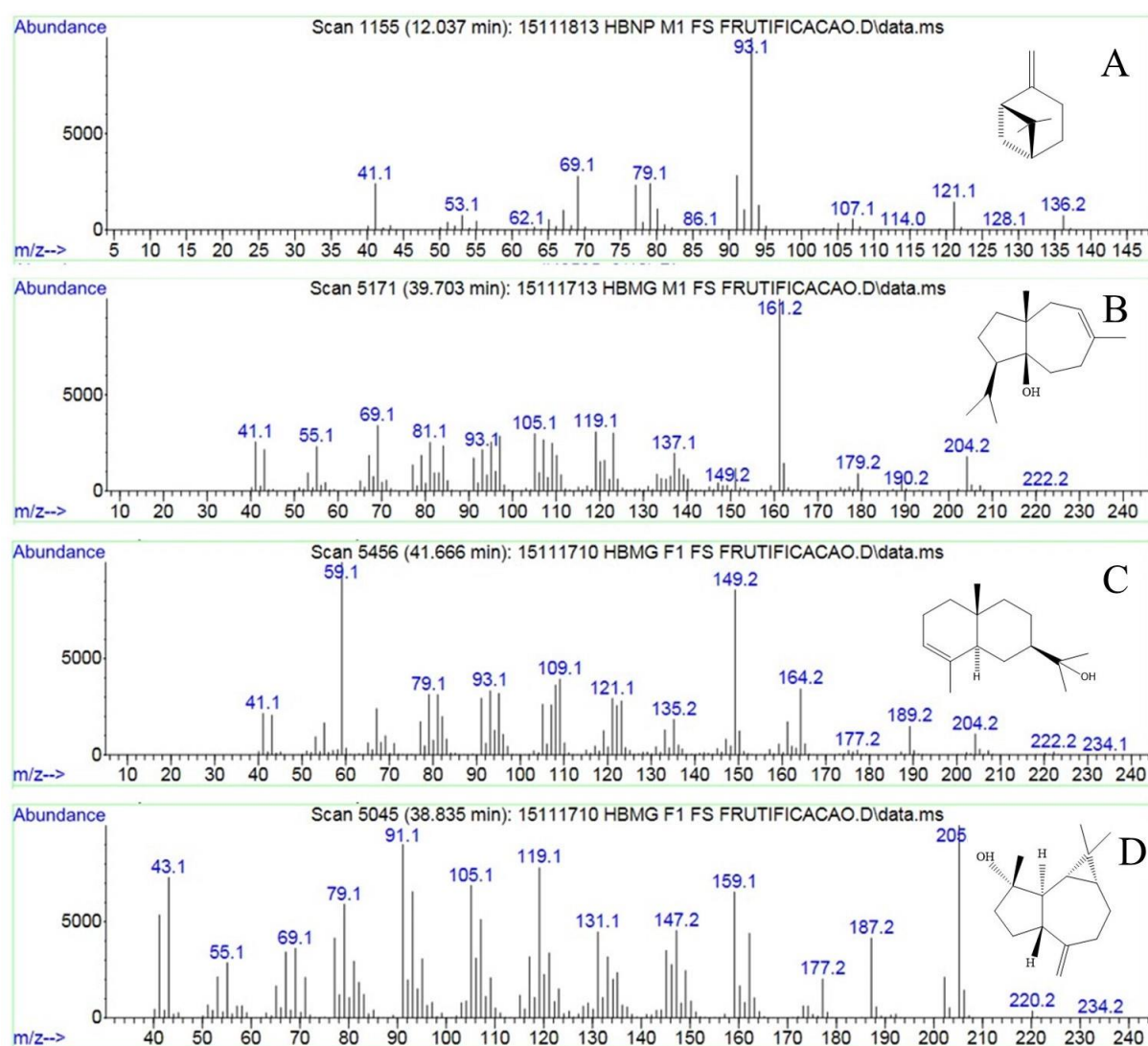


Figura 13. Espectros de massas e estruturas químicas do β -pineno (A), carotol (B), α -eudesmol (C) e spatulenol (D).

A comparação intrapopulacional da composição química dos óleos essenciais de plantas masculinas e femininas coletadas em três fases fenológicas exigiu uma análise multivariada, devido ao grande número de variáveis e componentes envolvidos. A comparação interpopulacional da composição química dos óleos essenciais foi realizada pelo método de ACP com base nos fragmentos de massas e tempos de retenção. Porém, o mesmo método não pôde ser aplicado para a comparação dos óleos essenciais intrapopulacionais, pois os fragmentos que discriminavam as diferentes matrizes se confundiam. Por isso, aplicou-se a ACP com base na tabela da composição dos óleos essenciais apresentada anteriormente.

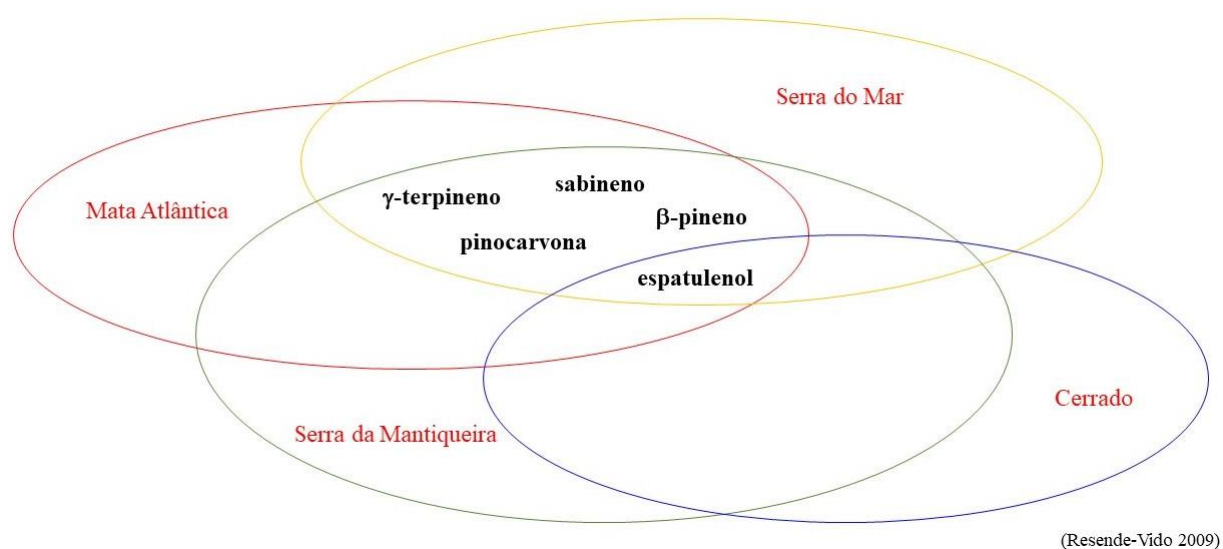


Figura 14. Ilustração da comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de folhas secas de diferentes populações de *H. brasiliense*.

A comparação da composição química dos óleos essenciais das folhas frescas das plantas provenientes da Mata Atlântica foi realizada por ACP, em que CP1 x CP2 discriminaram, com 92 %, a fase de floração das demais fases, atribuindo ao monoterpreno sabineno a variação explicada (**figura 15**). Dessa forma, a variação dos demais componentes dos óleos essenciais tiveram menor relevância em relação às fases fenológicas. Por sua vez, a ACP dos óleos essenciais de folhas frescas das plantas provenientes do Cerrado discriminou, com CP1 x CP2 de 81 %, a fase de floração das demais fases, atribuindo aos sesquiterpenos germacreno D, carotol e biciclogermacreno, a variação explicada (**figura 16**).

Foi possível discriminar a composição química dos óleos essenciais de folhas frescas e secas entre plantas masculinas e femininas nas ACPs das populações durante a fase de floração (**figuras 15A, 16A, 17A e 18A**), porém o mesmo padrão não foi detectado nas outras fases fenológicas. Amoah *et al.* (2015b) observaram que os extratos aquosos preparados por infusão de folhas frescas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes de Santa Catarina apresentaram composição semelhante, porém estas plantas foram coletadas no mês de dezembro, 3 meses após a fase de floração, que ocorre em setembro, o que justificaria a semelhança química entre os gêneros.

A comparação da composição química dos óleos essenciais das folhas secas das plantas provenientes da Mata Atlântica foi realizada por ACP, em que CP1 x CP2

discriminaram, com 68 % de variância, a fase de floração em relação às demais fases, atribuindo a variação explicada ao (Z)- α -bisaboleno (**figura 17**). No entanto, os óleos essenciais de plantas femininas da fase vegetativa se destacaram das demais, devido ao teor de sabineno destas amostras, padrão que não se repetiu com os óleos essenciais de plantas femininas das demais fases fenológicas. Já os óleos essenciais de folhas secas das plantas provenientes do Cerrado em fase de floração foram discriminados das plantas nas demais fases fenológicas devido ao teor de carotol e espatulenol, em que CP1 x CP2 discriminaram com 89 % a variação explicada pela ACP (**figura 18**).

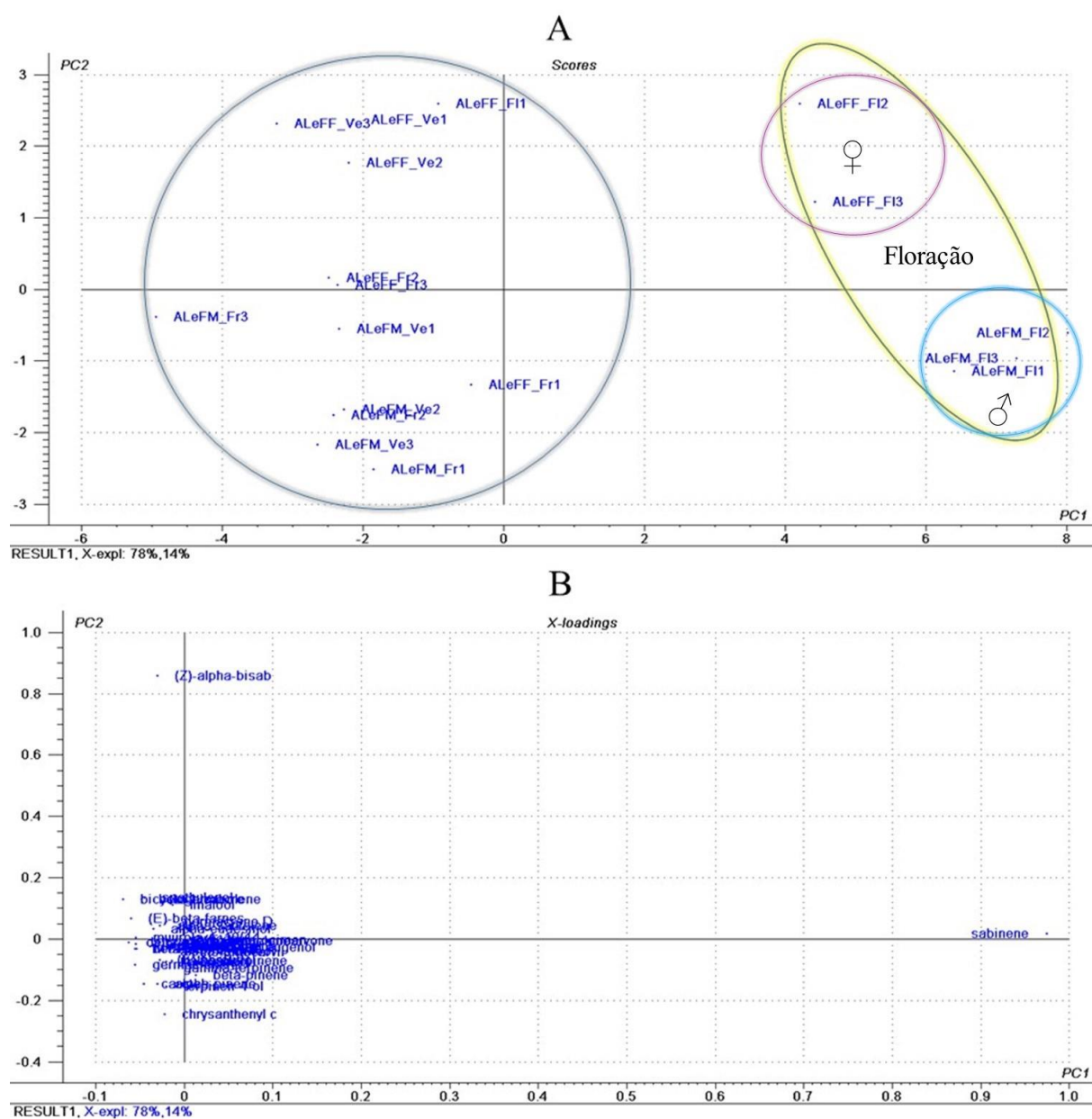


Figura 15. Gráficos dos dois componentes principais (CP1 e CP2) extraídos na ACP dos óleos essenciais de folhas frescas de plantas masculinas e femininas provenientes da Mata Atlântica, com variância total explicada de 92 %: A) Escores e B) Contribuições de CP1 x CP2; os círculos delimitam as populações discriminadas pela ACP. Códigos das amostras: A – Atlântica; LeFF – folhas frescas femininas; LeFM – folhas frescas masculinas; Fl – floração; Fr – frutificação; Ve – vegetativa.

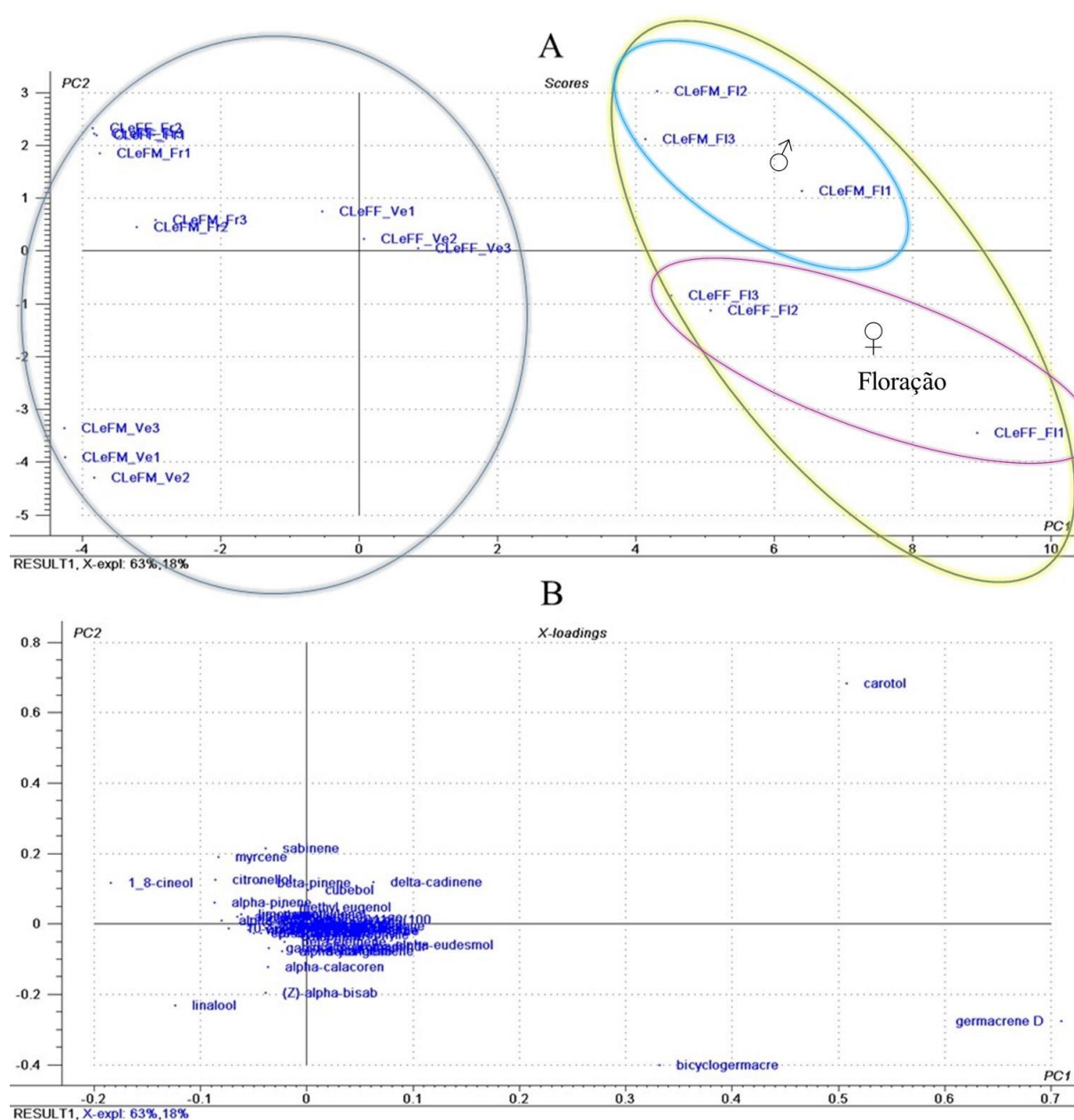


Figura 16. Gráficos dos dois componentes principais (CP1 e CP2) extraídos na ACP dos óleos essenciais de folhas frescas de plantas masculinas e femininas provenientes do Cerrado, com variância total explicada de 81 %: A) Escores e B) Contribuições de CP1 x CP2; os círculos delimitam as populações discriminadas pela ACP. Códigos das amostras: C - Cerrado; LeFF – folhas frescas femininas; LeFM – folhas frescas masculinas; FI – floração; Fr – frutificação; Ve – vegetativa

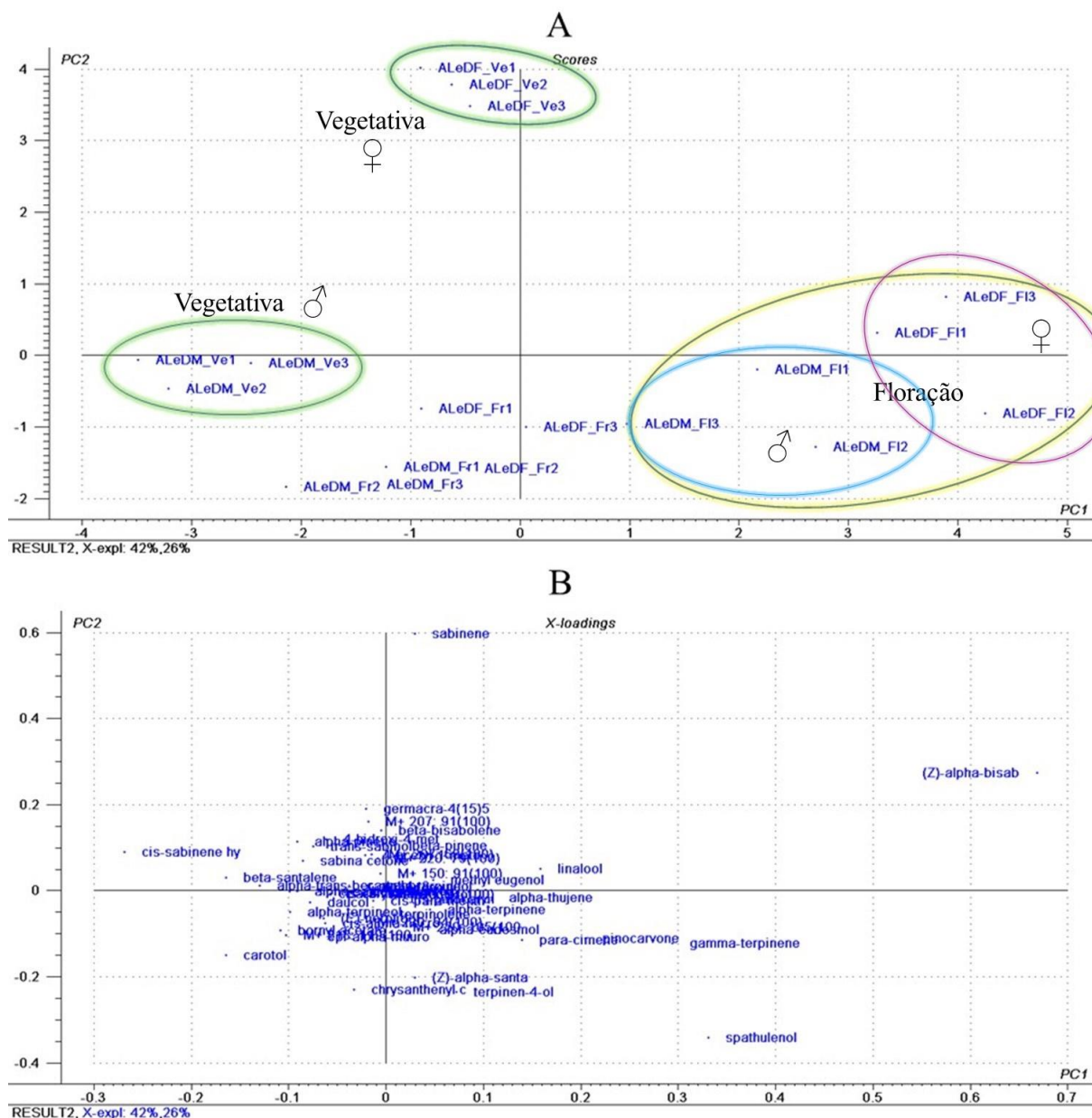


Figura 17. Gráficos dos dois componentes principais (CP1 e CP2) extraídos na ACP dos óleos essenciais de folhas secas de plantas masculinas e femininas provenientes da Mata Atlântica, com variância total explicada de 68 %: A) Escores e B) Contribuições de CP1 x CP2; os círculos delimitam as populações discriminadas pela ACP. Códigos das amostras: A – Atlântica; LeDF – folhas secas femininas; LeDM – folhas secas masculinas; Fl – floração; Fr – frutificação; Ve – vegetativa.

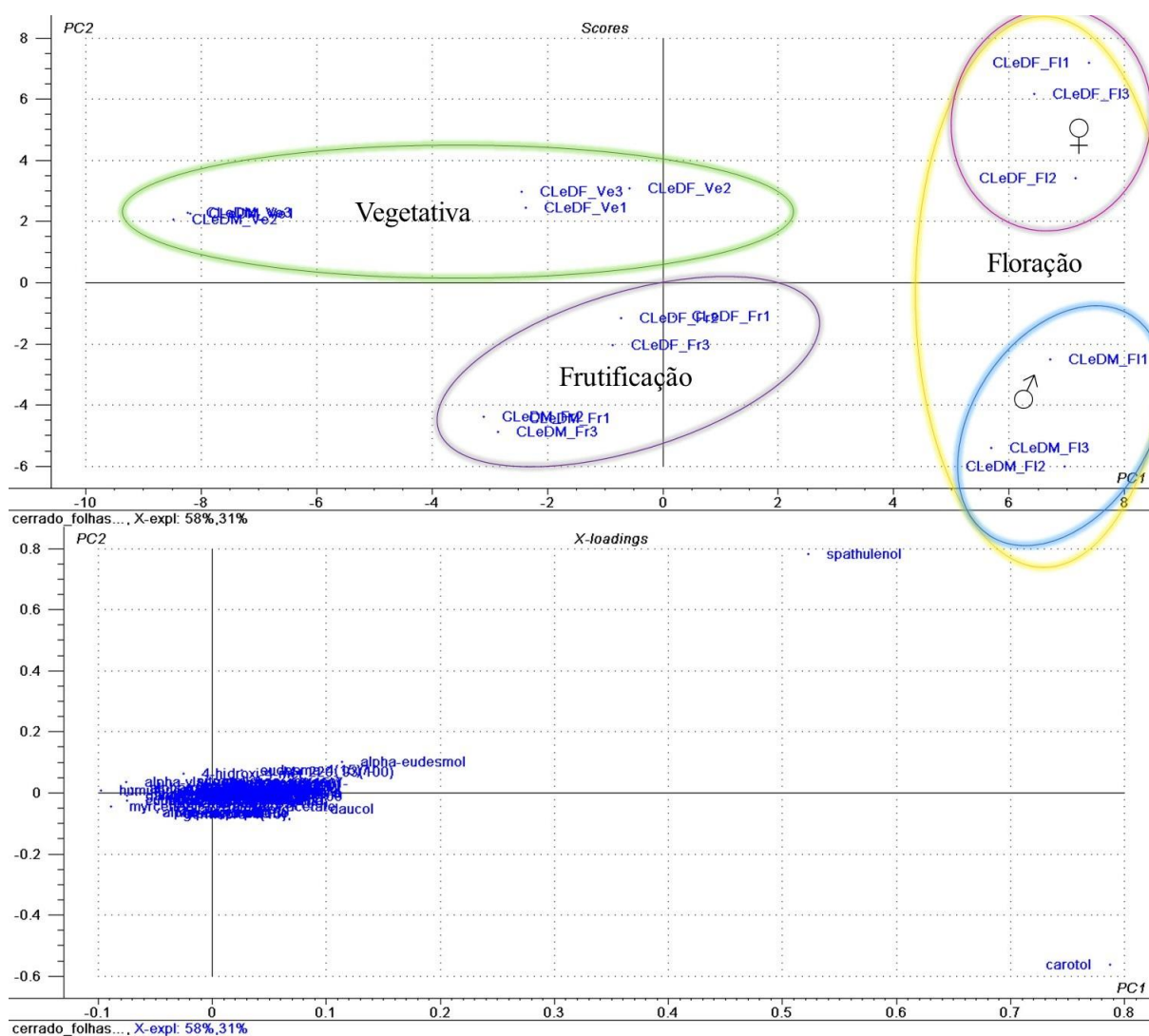


Figura 18. Gráficos dos dois componentes principais (CP1 e CP2) extraídos na ACP dos óleos essenciais de folhas secas de plantas masculinas e femininas provenientes do Cerrado, com variância total explicada de 89 %: A) Escores e B) Contribuições de CP1 x CP2; os círculos delimitam as populações discriminadas pela ACP. Códigos das amostras: C - Cerrado; LeDF – folhas secas femininas; LeDM – folhas secas masculinas; Fl – floração; Fr – frutificação; Ve – vegetativa.

A composição química do óleo essencial de outras espécies do gênero *Hedyosmum* tem sido descrita na literatura. O óleo essencial de folhas secas de *H. colombianum* Cuatrec. apresentou como componentes majoritários (acima de 5%) β -pineno (16,5 %), pinocarvona

(13,4 %), curzereno (7,1 %), atractilona (6,5 %), (E)- β -ocimeno (6,1 %) e crisantenona (5,3 %) (Delgado *et al.* 2010), mostrando maior semelhança com os óleos essenciais das plantas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica do que do Cerrado. O óleo essencial de folhas frescas de *H. arborescens* provenientes do Caribe apresentaram componentes majoritários (acima de 5%) em comum com ambas as populações deste estudo, com α -felandreno (11,4 %), biciclogermacreno (10,6 %), sabineno (9,7 %), espatulenol (7,5 %), β -pineno (6,1 %) entre outros (Sylvestre *et al.* 2007). Lorenzo *et al.* (2003) descreveram a composição química dos óleos essenciais de duas espécies de *Hedyosmum* provenientes da Bolívia, sendo que *H. angustifolium* (Ruiz & Pavón) Solms-Laubach apresentou α -pineno (24 %), β -pineno (23,5 %), sabineno (6,4 %) e linalol (6,1 %) como componentes principais, semelhante aos óleos essenciais de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica, enquanto que *H. scabrum* (Ruiz & Pavón) Solms-Laubach apresentou composição mais diversa, cujos componentes majoritários (acima de 5%) foram (E)- β -farneseno (13 %), δ -3-careno (12,1 %), γ -gurjuneno (6,6 %), 3',4'-dimetoxipropiofenona (6,6 %) e 1,8-cineol (5,7 %), sendo somente o último comum com as plantas do Cerrado. Mundina *et al.* (2000) caracterizaram o óleo essencial de folhas de três espécies de ocorrência na Costa Rica, sendo *H. costaricensis* C.E. Wood composto predominantemente por sesquiterpenos, assim como a população do Cerrado, com germacreno D (32 %), (E,E)- α -farneseno (8 %), β -cariofileno (6,1 %) e β -bourboneno (5,6 %), enquanto que *H. bonplandianum* Kunth e *H. mexicanum* Cordemoy apresentaram equilíbrio entre mono- e sesquiterpenos e composição química mais parecida com a das plantas da Mata Atlântica, com sabineno (14 %), (E)- β -ocimeno (10,8 %), α -bisaboleno (10,3 %), terpinen-4-ol (7 %) e biciclogermacreno (5,6 %) entre os componentes majoritários (acima de 5%) da primeira espécie, e sabineno (28 %), furanodieno (20 %), germacreno B (4,7 %), β -pineno (4,6 %) e biciclogermacreno (3,7 %), entre os componentes majoritários (acima de 5%) da segunda espécie.

Observou-se, portanto, que a variação na composição química de diferentes espécies de *Hedyosmum* sofreu influência tanto da matriz biossintética de cada espécie como do ambiente em que se desenvolveram as plantas. *H. costaricensis* proveniente da Costa Rica, cujo clima é equatorial, apresentou apenas 4,5 % de monoterpenos nas folhas, enquanto que *H. mexicanum* e *H. bonplandianum*, originários da mesma região, apresentaram teores de mono- e sesquiterpenos equilibrados, entre 50 %. *H. scabrum* natural de Macu Pichu, a 2.000

m de altitude, acumulou 62 % de fenilpropanóides enquanto que a mesma espécie, ocorrente na Bolívia, não apresentou fenilpropanóides em sua composição. Da mesma forma, *H. brasiliense* apresentou composição química diversa quando originária de regiões climáticas distintas. Estas semelhanças e diferenças sugerem que *H. brasiliense* apresenta a mesma matriz biossintética, podendo sintetizar componentes de acordo com as necessidades ambientais das plantas, o que promoveu a flutuação observada entre os componentes dos óleos essenciais e pode influenciar nas suas propriedades farmacológicas.

A **figura 19** ilustra a comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Hedyosmum*.

- | | | |
|---|---|--|
| <p>➤ <i>H. brasiliense</i> da Mata Atlântica: monoterpenos e fenilpropanóides</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Sabineno ➤ Biciclogermacreno ➤ Pinocarvona ➤ Z-α-Bisaboleno ➤ β-Pineno ➤ Terpinen-4-ol | <p>➤ <i>H. scabrum</i> de Machu Pichu, Peru (2.000 m de altitude):</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Estragol ➤ Anetol ➤ α-Pineno | <p>➤ <i>H. anfastifolium</i> da Bolívia:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ α-Pineno ➤ β-Pineno ➤ Sabineno ➤ Linalol |
| <p>➤ <i>H. brasiliense</i> do Cerrado: sesquiterpenos</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Germacreno D ➤ Biciclogermacreno ➤ Mirceno ➤ Carotol ➤ α-Eudesmol ➤ Espatulenol ➤ HB-8 ➤ 1,8-Cineol | <p>➤ <i>H. sprucei</i> da região amazônica de Pastaza, Equador:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Germacreno D ➤ β-Cariofileno ➤ δ-Cadineno ➤ α-Copaeno | <p>➤ <i>H. arborescens</i> do Caribe:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ α-Felandreno ➤ Biciclogermacreno ➤ Sabineno ➤ Espatulenol ➤ β-Pineno <p>➤ <i>H. scabrum</i> da Bolívia:</p> <ul style="list-style-type: none"> ➤ (E)-β-Farneseno ➤ δ-3-Careno ➤ γ-Gurjuneno ➤ 3',4'-Dimetoxipropiofenona ➤ 1,8-Cineol |

(De Feo & Soria 2007; Guerrini *et al.* 2016; Lorenzo *et al.* 2003; Sylvestre *et al.* 2007)

Figura 19. Comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de diferentes espécies do gênero *Hedyosmum*.

O óleo essencial de flores masculinas das plantas provenientes da Mata Atlântica apresentou 42 componentes e as flores femininas 41, com variações quali- e quantitativas (**Tabela 5**), inclusive nos componentes majoritários (acima de 5%) como sabineno (5 % ♂ e 10 % ♀), pinocarvona (7 % ♂ e 4 % ♀), germacreno D (3 % ♂ e 5 % ♀), biciclogermacreno (8 % ♂ e 7 % ♀), *E,E*- α -farneseno (3 % ♂ e 7 % ♀), (Z)- α -bisaboleno (18 % ♂ e 17 % ♀), espatulenol (5 % ♂ e 3 % ♀) e hexacosano (10 % ♀). O óleo essencial de flores masculinas das plantas provenientes do Cerrado apresentou 43 componentes, enquanto que as flores femininas 38, com variações quali- e quantitativas (**Tabela 8**), mas com os mesmos componentes principais, tais como germacreno D (12 % ♂ e 18 % ♀), carotol (13 % ♂ e 8 %

♀), α -eudesmol (9 % ♂ e 10 % ♀), biciclogermacreno (9 % ♂ e ♀), espatulenol (8 % ♂ e 3 % ♀), HB-8 (6 % ♂ e 8 % ♀) e *E,E*- α -farneseno (4 % ♂ e 9 % ♀). Flores femininas e frutos apresentaram maior teor de monoterpenos hidrocarbonetos (entre 8 e 9 %) em relação às flores masculinas (2 %).

Flores provenientes da Mata Atlântica apresentaram de 2 a 7 vezes mais monoterpenos do que as flores provenientes do Cerrado. No estudo realizado por Murakami *et al.* (2017), o óleo essencial das flores femininas e masculinas das plantas de *H. brasiliense* provenientes de uma área de Mata Atlântica localizada na Ilha do Cardoso (SP) apresentaram 45 e 54 % de monoterpenos, respectivamente, mais do que os teores de monoterpenos apresentados pelas flores provenientes da Mata Atlântica neste estudo. A composição química dos óleos essenciais das flores de *H. brasiliense* provenientes da Ilha do Cardoso também pode ser comparada com a deste estudo. Germacreno D foi o único componente majoritário de flores femininas comum às três populações. Carotol foi um componente majoritário comum às flores masculinas e femininas da Ilha do Cardoso e do Cerrado de Mogi Guaçu. Altos teores do monoterpeno sabineno foram detectados nas flores masculinas e femininas da Ilha do Cardoso e de Paranapiacaba. E o monoterpeno 1,8-cineol discriminou o óleo essencial de flores femininas da Ilha do Cardoso e foi detectado somente nas flores femininas do Cerrado, mas foi encontrado em quantidades iguais nas plantas de Paranapiacaba. A **figura 20** ilustra a comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de flores das diferentes populações de *H. brasiliense*.



(Murakami *et al.* 2017)

Figura 20. Ilustração da comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de flores de diferentes populações de *H. brasiliense*.

O óleo essencial dos frutos da Mata Atlântica apresentou 37 componentes (**Tabela 5**), mas seus componentes principais foram diferentes dos óleos essenciais das flores femininas, como (E)- β -ocimeno (14 %), acetato de *cis*-crisantenila (10 %), sabineno (7 %), *E,E*- α -farneseno (6 %), acetato de bornila (5 %), biciclogermacreno (5 %), (Z)- α -bisaboleno (5 %) e α -eudesmol (5 %). O óleo essencial dos frutos do Cerrado foi bastante semelhante ao das flores femininas, com 42 componentes (**Tabela 8**), entre eles germacreno D (16%), *E,E*- α -farneseno (9 %), α -eudesmol (9 %), biciclogermacreno (8 %), carotol (8%) e espatulenol (5 %). Foram comuns aos frutos de ambas as populações apenas *E,E*- α -farneseno, α -eudesmol e biciclogermacreno. Os frutos provenientes da Mata Atlântica, assim como as flores, também apresentaram maior teor de monoterpenos (59 %) quando comparado aos frutos do Cerrado (16 %). Um estudo realizado por Delgado *et al.* (2010) mostrou que o óleo essencial dos frutos de *H. colombianum* Cuatrec proveniente da Colômbia apresentou predominância de monoterpenos, tal qual os frutos da Mata Atlântica, porém com uma composição química diferente da observada neste estudo, com pinocarvona (14 %), β -pineno (11 %), terpinen-4-ol (10 %), neral (10 %), crisantenona (6 %) e acetato de *cis*-crisantenila (4 %), sendo apenas este último encontrado no óleo essencial dos frutos de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica. O óleo essencial de frutos secos de *H. mexicanum* Cordemoy proveniente da Costa Rica também apresentou alto teor de monoterpenos (76 %), com predominância de sabineno (24,6 %), terpinen-4-ol (13,3 %), β -pineno (8 %) e γ -terpineno (7,5 %) (Mundina *et al.* 2000), componentes presentes no óleo essencial de frutos de *H. brasiliense* proveniente da Mata Atlântica. A **figura 21** ilustra a comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de frutos de diferentes espécies do gênero *Hedyosmum*.

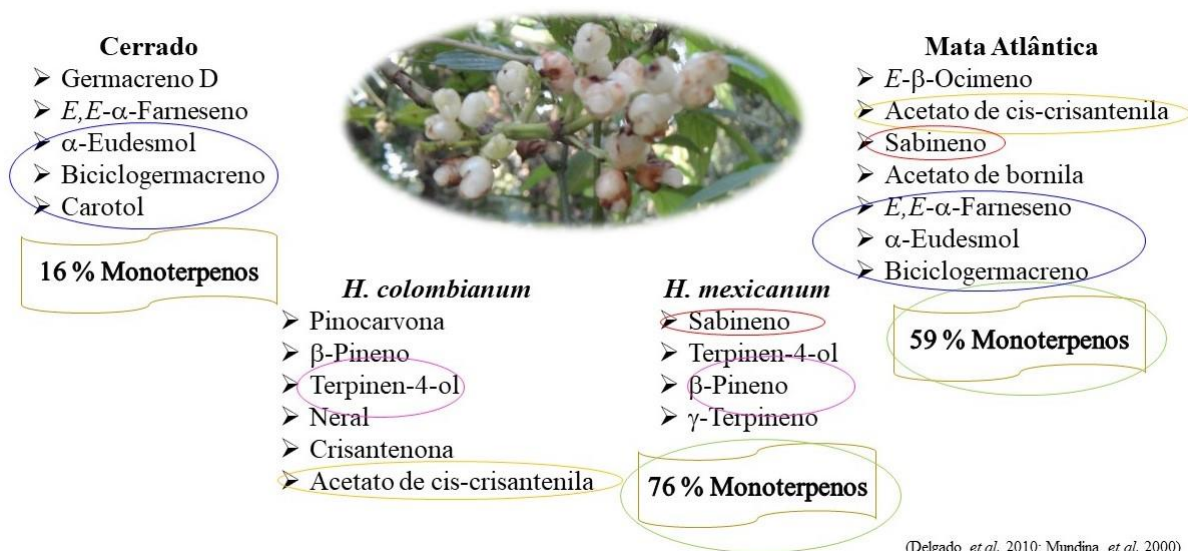


Figura 21. Ilustração da comparação dos componentes principais dos óleos essenciais de frutos de diferentes espécies do gênero *Hedyosmum*.

Estima-se que aproximadamente 6% das angiospermas são dióicas, chegando a $\frac{1}{4}$ das espécies em regiões tropicais. Algumas espécies dióicas são conhecidas por suas propriedades farmacológicas, como *Cannabis sativa* (psicoativa), *Salix alba* (anti-inflamatória) e *Taxus brevifolia* (anti-câncer). Fisiologicamente, plantas masculinas tendem a investir mais em crescimento vegetativo, enquanto que plantas femininas investem mais em reprodução e defesa química (Simpson 2013). Da mesma forma, flores masculinas e femininas possuem funções ecológicas distintas, sendo que as flores masculinas são responsáveis pela propagação do pólen e logo são descartadas pelas plantas, enquanto que a estrutura floral feminina deve permanecer na planta durante todo o desenvolvimento dos frutos e então atrair dispersores de sementes, importantes para a proliferação da espécie. Neste sentido, a variação no teor e na composição química de óleos essenciais em flores masculinas e femininas e nos frutos é previsível em plantas dióicas, podendo agir como defesa induzida sob pressão herbivórica e microbiana (Simpson 2013). Por isso, as flores masculinas de *Pandanus fascicularis* (Pandanaceae) produzem óleos essenciais perfumados responsáveis por atrair polinizadores, enquanto suas flores femininas são naturalmente desprovidas de óleo essencial (Vinod *et al.* 2010). Miyazawa *et al.* (2016) também relataram diferenças químicas significativas entre os óleos essenciais e compostos ativos no aroma das flores masculinas e femininas de *Eurya japonica* (Pentaphylacaceae), sugerindo que estas diferenças podem influenciar no comportamento de insetos em relação às flores. Todos estes argumentos poderiam justificar a

variação da composição química dos óleos essenciais de flores masculinas e femininas de *H. brasiliense* observada neste estudo.

3.2 Atividades biológicas

3.2.1 Ensaio da atividade antifúngica por bioautografia

Os óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa foram testados pelo método de bioautografia frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. As tabelas 12 e 13 apresentam os resultados do limite de detecção (200, 100, 50 e 25 µg) dos óleos essenciais e do padrão nistatina (5 µg).

Tabela 12. Limite de detecção por bioautografia dos óleos essenciais (200, 100, 50 e 25 µg) de flores (FLF), frutos (FRF), folhas frescas (FF) e folhas secas (FS) de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense*, em fase de floração, frutificação e vegetativa provenientes de plantas da Mata Atlântica, frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* (A) e *C. sphaerospermum* (B).

(A) <i>C. cladosporioides</i>												
Amostra	Floração				Frutificação				Vegetativa			
	200	100	50	25	200	100	50	25	200	100	50	25
FLF ♀	***	**	**	*	-	-	-	-	-	-	-	-
FLF ♂	**	**	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
FRF ♀	-	-	-	-	***	***	**	*	-	-	-	-
FF ♀	***	**	*	*	**	*	i	i	**	*	*	i
FF ♂	***	**	*	*	**	*	i	i	**	*	*	i
FS ♀	***	**	*	*	**	*	i	i	**	*	*	i
FS ♂	***	**	*	*	**	*	i	i	**	*	*	i
nistatina	5 µg ***											

(B) <i>C. sphaerospermum</i>												
Amostra	Floração				Frutificação				Vegetativa			
	200	100	50	25	200	100	50	25	200	100	50	25
FLF ♀	**	*	i	i	-	-	-	-	-	-	-	-
FLF ♂	**	*	i	i	-	-	-	-	-	-	-	-
FRF ♀	-	-	-	-	**	*	*	i	-	-	-	-

FF ♀	**	*	i	i	*	i	i	i	**	*	*	i
FF ♂	**	*	i	i	*	i	i	i	**	*	*	i
FS ♀	**	*	i	i	*	i	i	i	**	*	*	i
FS ♂	**	*	i	i	*	i	i	i	**	*	*	i

nistatina 5 µg ***

Legenda: *** : atividade forte; ** : atividade média; * : atividade fraca; i : inativo; - : não se aplica.

Tabela 13. Limite de detecção por bioautografia dos óleos essenciais (200, 100, 50 e 25 µg) de flores (FLF), frutos (FRF), folhas frescas (FF) e folhas secas (FS) de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense*, em fase de floração, frutificação e vegetativa provenientes de plantas do Cerrado, frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* (A) e *C. sphaerospermum* (B).

Amostra	(A) <i>C. cladosporioides</i>											
	Floração				Frutificação				Vegetativa			
	200	100	50	25	200	100	50	25	200	100	50	25
FLF ♀	***	***	**	*	-	-	-	-	-	-	-	-
FLF ♂	***	**	**	**	-	-	-	-	-	-	-	-
FRF ♀	-	-	-	-	***	**	*	*	-	-	-	-
FF ♀	***	**	*	**	*	*	*	i	**	**	*	i
FF ♂	***	**	*	*	*	*	i	i	**	**	*	i
FS ♀	***	***	**	**	**	*	*	i	**	**	*	i
FS ♂	***	***	**	*	**	*	*	i	**	**	*	i

nistatina 5 µg ***

Amostra	(B) <i>C. sphaerospermum</i>											
	Floração				Frutificação				Vegetativa			
	200	100	50	25	200	100	50	25	200	100	50	25
FLF ♀	**	**	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
FLF ♂	**	**	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
FRF ♀	-	-	-	-	**	*	*	i	-	-	-	-
FF ♀	**	**	*	*	*	*	*	i	**	**	*	i
FF ♂	**	**	*	*	*	*	*	i	**	**	*	i
FS ♀	*	*	i	i	i	i	i	i	*	i	i	i
FS ♂	*	*	i	i	i	i	i	i	*	i	i	i

nistatina 5 µg ***

Legenda: *** : atividade forte; ** : atividade média; * : atividade fraca; i : inativo; - : não se aplica.

Cladosporium spp. são fungos filamentosos fitopatogênicos que costumam ser selecionados para ensaios bioautográficos devido à sua alta sensibilidade e por permitir a detecção de substâncias fungitóxicas por contraste com a sua coloração escura (Homans & Fuchs 1970). Este bioensaio detecta o potencial antifúngico dos óleos essenciais em contato direto com o fungo filamentoso, sem interferência da difusibilidade destes em meio sólido ou líquido, uma vez que a amostra é solubilizada em acetona, aplicada na cromatoplaça de sílica-gel e o solvente, evaporado naturalmente antes da aplicação dos esporos do fungo. A atividade antifúngica é classificada visualmente como forte (***), média (**), fraca (*) ou inativa (i), de acordo com a ausência ou presença em pequena, média ou grande quantidade do crescimento dos fungos sobre a área em que as amostras foram aplicadas.

O fungo *C. cladosporioides* mostrou-se mais sensível à ação dos óleos essenciais do que *C. sphaerospermum*. Da mesma maneira, os óleos essenciais de flores femininas e frutos de ambos os biomas apresentaram potencial antifúngico mais forte do que os de algumas folhas, que foram inativos com 50 e 25 µg, demonstrando maior investimento das plantas na defesa dos órgãos reprodutivos contra o ataque de micro-organismos. Considerando-se apenas os óleos essenciais de folhas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica, o potencial antifúngico mostrou-se mais forte na fase de floração e mais fraco, na fase de frutificação. Os óleos essenciais de folhas secas das plantas provenientes do Cerrado foram mais ativos contra *C. cladosporioides* e os de folhas frescas, contra *C. sphaerospermum*.

Murakami *et al.* (2017) identificaram o curzereno como potente componente antifúngico nos óleos essenciais de folhas frescas e flores de *H. brasiliense* provenientes da Ilha do Cardoso, pelo ensaio de bioautografia com os mesmos fungos filamentosos. Este sesquiterpeno compôs 82 e 97 % da fração mais ativa no Rf 0,67, em folhas e flores, respectivamente, porém, não foi encontrado nos óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado no presente trabalho.

Guerrini *et al.* 2016 conseguiram isolar, por ensaio bioautográfico do óleo essencial de *Hedyosmum sprucei* Solms frente à bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*, os componentes responsáveis pela forte atividade antibacteriana presente no Rf 0,2 a 0,4, tais como α -cadinol, α -muurolol e τ -muurolol, e os componentes responsáveis pela moderada

atividade antibacteriana presente no Rf 0,5, tais como óxido de cariofileno, metil eugenol, 1,10-di-epi-cubenol e 1,2-epóxido de humuleno. Destes, apenas o α -muurolol foi detectado nos óleos essenciais das plantas provenientes do Cerrado e o metil eugenol, nos da Mata Atlântica, porém em baixos teores, em torno de 2 e 3 %, respectivamente.

3.2.2 Ensaio da atividade antifúngica por microdiluição em caldo

Os óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em diferentes fases fenológicas também foram testados no ensaio antifúngico pelo método de microdiluição em caldo contra *Candida albicans*, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das amostras ativas e os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 14**. Devido à turbidez conferida ao meio de cultura líquido pelos óleos essenciais, não é possível determinar em que concentração de óleo essencial ocorre a inibição do crescimento da levedura, pois o meio não fica translúcido, e em que concentração ela morre. Por isso, a mesma concentração que matou a levedura dentro do meio de cultura e na subcultura, determinada pela Concentração Fungicida Mínima (CFM), foi utilizada para quantificar a concentração que inibiu o seu crescimento, determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Tabela 14. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (média $\pm$ desvio padrão, mg/mL) dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* em fase de floração, frutificação e vegetativa provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado, frente ao fungo leveduriforme *Candida albicans*.

Fases fenológicas	Partes	Sexo	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra <i>Candida albicans</i> - (mg/mL)	
			Mata Atlântica	Cerrado
Floração	Flores	♀	*	*
	Folhas Frescas	♀	0,99 $\pm$ 0,01	-
		♂	2,07 $\pm$ 0,01	-
		♀	2,66 $\pm$ 0,39	-
	Folhas Secas	♂	2,05 $\pm$ 0,01	1,98 $\pm$ 0,01
Frutificação	Frutos	♀	*	*
	Folhas Frescas	♀	1,64 $\pm$ 0,20	-

	♂	*	-
	♀	1,50 ± 0,15	3,65 ± 0,01
Folhas Secas	♂	1,55 ± 0,17	-
	♀	1,89 ± 0,01	-
Folhas Frescas	♂	3,02 ± 0,67	-
Vegetativa	♀	3,03 ± 0,40	4,00 ± 0,05
Folhas Secas	♂	1,29 ± 0,35	4,14 ± 0,01

Legenda: * - Não testado.

Neste ensaio, foi possível observar que os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos que os do Cerrado, tanto qualitativa como quantitativamente, apresentando valores de CIM e CFM menores que os do Cerrado. Estes resultados estiveram de acordo com os obtidos no ensaio de bioautografia, em que os óleos da Mata Atlântica foram mais ativos que os do Cerrado.

3.2.3 Ensaio da atividade antibacteriana por microdiluição em caldo

Os óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa foram testados no ensaio antimicrobiano pelo método de microdiluição em caldo, contra as bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *Enterococcus faecalis*, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras ativas e os resultados obtidos estão apresentados nas **tabelas 15 e 16**. Da mesma forma que no ensaio contra *Candida albicans*, a mesma concentração que matou as bactérias no meio de cultura e na subcultura (CFM) foi utilizada para quantificar a concentração que inibiu o seu crescimento (CIM).

Tabela 15. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (média ± erro padrão, mg/mL) dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* em fase de floração, frutificação e vegetativa provenientes da Mata Atlântica, frente às bactérias gram-negativas *Pseudomonas*

aeruginosa e *Escherichia coli* e gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *Enterococcus faecalis*.

Fases fenológicas	Partes	Sexo	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) - (mg/mL)					
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
Floração	Flores	♀	-	-	-	5,32 ± 0,50	5,03 ± 0,45	2,86 ± 0,40
	Folhas	♀	-	-	-	-	-	4,16 ± 0,07
	Frescas	♂	-	-	-	-	-	-
	Folhas	♀	-	4,04 ± 0,01	-	5,30 ± 0,36	4,66 ± 0,41	1,99 ± 0,01
	Secas	♂	-	4,08 ± 0,04	-	6,00 ± 0,37	5,44 ± 0,37	4,09 ± 0,03
Frutificação	Frutos	♀	-	-	-	-	-	-
	Folhas	♀	-	5,72 ± 0,01	-	-	-	-
	Frescas	♂	-	-	-	-	-	-
	Folhas	♀	-	-	-	5,89 ± 0,01	-	3,65 ± 0,10
	Secas	♂	-	-	-	-	-	3,13 ± 0,74
Vegetativa	Folhas	♀	-	-	-	-	-	-
	Frescas	♂	-	-	-	-	-	-
	Folhas	♀	-	-	-	5,80 ± 0,01	5,08 ± 0,34	3,87 ± 0,01
	Secas	♂	-	-	-	-	5,50 ± 0,44	3,99 ± 0,02

Tabela 16. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) (média ± erro padrão, mg/mL) dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* em fase de floração, frutificação e vegetativa provenientes do Cerrado, frente às bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *Enterococcus faecalis*.

Fases	Partes	Sexo	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) - (mg/mL)					
			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>
Floração	Flores	♀	-	-	-	-	4,22 ± 0,02	2,10 ± 0,01

	Folhas	♀	-	-	-	-	3,81 ± 0,04	1,92 ± 0,02
	Frescas	♂	-	-	-	-	4,43 ± 0,36	2,56 ± 0,45
	Folhas	♀	-	-	-	-	3,66 ± 0,03	3,01 ± 0,35
	Secas	♂	-	-	-	-	-	2,65 ± 0,38
Frutificação	Frutos	♀	-	-	-	5,62 ± 0,62	-	-
	Folhas	♀	-	-	-	-	4,05 ± 0,01	4,05 ± 0,01
	Frescas	♂	-	-	-	-	3,86 ± 0,05	2,59 ± 0,39
	Folhas	♀	-	-	-	-	3,73 ± 0,04	3,18 ± 0,32
	Secas	♂	-	-	-	-	3,20 ± 0,35	2,57 ± 0,36
Vegetativa	Folhas	♀	-	-	-	-	-	4,03 ± 0,72
	Frescas	♂	-	-	-	-	3,06 ± 0,49	3,37 ± 0,38
	Folhas	♀	-	-	-	-	2,68 ± 0,35	3,42 ± 0,82
	Secas	♂	-	-	-	-	2,21 ± 0,01	-

De um modo geral, os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos em comparação com os do Cerrado (**Tabelas 15 e 16**). As bactérias mais sensíveis à ação da maioria dos óleos essenciais foram as Gram-positivas *Streptococcus mutans* e *S. sanguis*, sendo que *Staphylococcus aureus* foi sensível a alguns óleos essenciais, como de flores e folhas secas da Mata Atlântica e frutos do Cerrado. Somente os óleos essenciais de folhas secas da fase de floração e folhas frescas femininas da fase de frutificação da Mata Atlântica foram ativos contra a bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*. As bactérias Gram-positiva *Enterococcus faecalis* e Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* foram resistentes a todos os óleos essenciais testados. A maior resistência de bactérias Gram-negativas é conhecida no meio científico em razão da complexidade de sua dupla camada de membrana celular em comparação com a camada simples das bactérias Gram-positivas (Teixeira *et al.* 2013). Chao *et al.* (2011) testaram 45 óleos essenciais contra 8 bactérias, 2 fungos e 1 levedura e também notaram que *P. aeruginosa* foi o micro-organismo mais resistente entre todas as bactérias testadas, bem como as bactérias Gram-negativas foram geralmente mais resistentes do que as Gram-positivas.

O óleo essencial de partes aéreas de *Hedyosmum sprucei* Solms, rico em germacreno D (23 %), β -cariofileno (15,5 %), δ -cadineno (5,5 %) e α -copaeno (5 %), foi testado por

microdiluição em caldo contra bactérias patogênicas humanas e vegetais, e apresentou forte atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (MIC 62 µg/mL), moderada atividade contra a gram-positiva *Listeria grayi* (MIC 250 µg/mL) e as gram-negativas *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (MIC 250 µg/mL) e *Agrobacterium tumefaciens* (MIC 500 µg/mL) e fraca atividade contra a gram-positiva *Staphylococcus aureus* (MIC 1000 µg/mL) e a gram-negativa *Agrobacterium vitis* (MIC 2000 µg/mL; Guerrini *et al.* 2016). Destes, somente o germacreno D foi encontrado em altos teores (11 a 20 %) nos óleos essenciais de folhas frescas das plantas provenientes do Cerrado, contudo estes não foram mais ativos contra as bactérias do que os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica.

O óleo essencial de *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae) é um bom antimicrobiano, conhecido pelos altos níveis de sabineno, α -pineno, β -felandreno, γ -elemeno, δ -elemeno, β -cariofileno e γ -cariofileno, mas testes conduzidos com o óleo essencial e o sabineno isolado mostraram valores de concentração inibitória mínima (CIM) clinicamente irrelevantes. Contudo, o sabineno mostrou-se um potencial modulador de resistência bactericida, reduzindo a CIM dos antibióticos testados contra bactérias resistentes (Matias *et al.* 2016). Os altos níveis de sabineno nos óleos essenciais das plantas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica poderiam explicar, parcialmente, o maior potencial desses óleos essenciais contra as bactérias, quando comparados aos óleos essenciais do Cerrado.

Diversos estudos têm sido publicados, principalmente com espécies cultivadas, buscando compreender como a variação fenológica da composição química de plantas de interesse alimentício e medicinal pode afetar o seu potencial farmacológico.

Um estudo realizado por Pirbalouti *et al.* (2013) com o óleo essencial de *Artemisia camaemelefolia* Vill. (Asteraceae) proveniente de diferentes locais do Irã, coletada em fase vegetativa e de floração, diferenciou três quimiotipos. O óleo essencial da população de Pelor teve maior teor de 1,8-cineol na fase de floração. O óleo essencial da população de Kandovar teve maiores teores de artemisia cetona, cânfora e borneol na fase vegetativa e maior teor de davanona na fase de floração. Já o óleo essencial da população de Gadok teve maiores teores de crisantenona e davanona na fase vegetativa e maior teor de viridiflorol na fase de floração. O rendimento de todos os óleos essenciais de *H. brasiliense* foi maior na fase de floração,

contudo o potencial antimicrobiano e antioxidante desses óleos essenciais foi mais forte na fase vegetativa.

Ebrahimi *et al.* (2008) analisaram a variação fenológica da composição química e do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *Thymus carmanicus* L. (Lamiaceae), uma espécie de tomilho popularmente utilizada no Iran no tratamento de reumatismo, distúrbios de pele e como um agente antibacteriano. O maior rendimento de óleo essencial foi registrado na fase de floração plena, assim como um aumento no teor de seu componente majoritário, o composto fenólico carvacrol, nas fases de botão floral e floração plena (67 e 69 %) quando comparado com as fases vegetativa e de dispersão de sementes (59 e 60 %, respectivamente). Os óleos essenciais apresentaram ótimo potencial antimicrobiano contra todas as bactérias testadas, com MIC's de 0,45 a 14,4 mg/mL, sendo que a maioria dos micro-organismos não apresentou diferença na sensibilidade aos óleos das diferentes fases fenológicas, exceto por duas bactérias, *Staphylococcus epidermidis* (MIC = 0,9 mg/mL) e *Klebsiella pneumoniae* (MIC = 1,8 mg/mL), cujo aumento do teor de carvacrol nas fases de botão floral e floração plena resultou em aumento do potencial antimicrobiano.

Três estudos envolvendo a variação da composição química dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L., Lamiaceae) em diferentes fases fenológicas apresentaram algumas controvérsias e semelhanças. Jordán *et al.* (2013) e Salido *et al.* (2003) observaram aumento do rendimento do óleo essencial na fase de frutificação, enquanto que Zaouali *et al.* (2013) observaram aumento do rendimento na fase de floração. Além disso, no estudo de Jordán *et al.* (2013), o teor de hidrocarbonetos monoterpenos, como α -terpineno, γ -terpineno e terpinoleno, aumentaram em relação à fase de floração, enquanto que o teor de *p*-cimen-8-ol aumentou na fase de floração, e Zaouli *et al.* (2013) também registraram maior teor de monoterpenos, tanto hidrocarbonetos como oxigenados, na fase vegetativa e de frutificação.

Jordán *et al.* (2013) também avaliaram o efeito da variação fenológica do óleo essencial de *R. officinalis* em sua atividade antimicrobiana, detectando que houve aumento do potencial bactericida contra *Salmonella typhimurium* e *E. coli* na fase de frutificação, cujo teor de α -terpineno, γ -terpineno e terpinoleno aumentou, mas não contra *Staphylococcus aureus* e *L. monocytogenes*, o que sugere que estas últimas bactérias não foram sensíveis ao aumento do teor desses monoterpenos. Os valores de CIM e CBM contra *E. coli* foram mais altos, demonstrando maior resistência desta bactéria gram-negativa sobre os óleos essenciais

testados. O aumento da atividade do óleo essencial de *R. officinalis* na fase de frutificação sugere, portanto, que esta espécie desenvolveu um mecanismo de defesa maior para a proteção de suas sementes.

A ocorrência de contradições nos resultados de estudos fenológicos com a mesma espécie pode ser justificada pois a produção de óleos essenciais depende tanto do fator genético das plantas como dos fatores ecológicos a que elas estão expostas. Este foi o primeiro estudo registrado da composição química e atividades biológicas do óleo essencial de *H. brasiliense* sob tantos fatores de variabilidade: de plantas masculinas e femininas coletadas nas fases vegetativa, de floração e frutificação, provenientes de dois biomas distintos, Mata Atlântica e Cerrado.

3.2.4 Ensaio da atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais humanas

A Concentração Inibitória de 50 % (IC₅₀) da atividade citotóxica dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa foi testada contra linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3) e os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 17**.

A análise de variância unidirecional (ANOVA) comparando o potencial citotóxico dos óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado frente às células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3), em cada fase fenológica, confirmou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre populações para algumas amostras (**figura 22**).

É possível observar uma que os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos contra as células tumorais do que os óleos essenciais das plantas do Cerrado, especialmente contra as células de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

A **figura 23** apresenta a comparação dos valores de IC₅₀ dos óleos essenciais de flores, frutos e folhas frescas da população da Mata Atlântica. A análise de variância unidirecional (ANOVA) desses óleos essenciais não mostrou diferenças significativas nas diferentes fases

fenológicas, indicando que o potencial citotóxico permaneceu equivalente em qualquer fase do desenvolvimento em que as plantas foram coletadas.

Tabela 17. IC₅₀ da atividade citotóxica (média ± desvio padrão - µg/mL) dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa e do padrão doxorubicina (DOXO – mM) contra linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3).

		IC ₅₀ (µg/mL)			
		MCF-7		PC-3	
		Mata Atlântica	Cerrado	Mata Atlântica	Cerrado
Floração	♀ Flores	28,00 ± 6,71	51,13 ± 7,07	24,85 ± 5,22	28,38 ± 3,51
	♀ Folhas frescas	30,59 ± 11,11	68,08 ± 5,15	20,22 ± 4,43	51,57 ± 8,26
	♂ Folhas frescas	25,26 ± 10,26	50,81 ± 11,81	40,01 ± 24,56	64,61 ± 15,49
	♀ Folhas secas	43,69 ± 4,89	41,83 ± 3,36	49,84 ± 20,68	21,40 ± 3,20
	♂ Folhas secas	18,01 ± 3,64	70,21 ± 33,46	26,86 ± 5,37	41,34 ± 17,84
	DOXO (mM)	0,13 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,25 ± 0,05	0,19 ± 0,01
Frutificação	Frutos	24,26 *	169,04 ± 28,61	25,13 *	76,08 ± 8,43
	♀ Folhas frescas	21,05 ± 2,96	1573,83 *	32,67 ± 24,98	1043,60 *
	♂ Folhas frescas	31,32 ± 6,74	1143,49 ± 217,76	75,24 ± 34,13	866,24 ± 296,35
	♀ Folhas secas	26,51 ± 2,18	818,32 ± 206,42	20,98 ± 7,95	509,11 ± 135,27
	♂ Folhas secas	27,50 ± 6,30	808,78 ± 105,04	24,18 ± 5,42	438,37 ± 61,75
	DOXO (mM)	0,02 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,28 ± 0,01	0,27 ± 0,01
Vegetativa	♀ Folhas frescas	17,77 ± 4,54	199,94 ± 79,48	99,11 ± 24,90	156,37 ± 68,81
	♂ Folhas frescas	18,42 ± 0,69	332,18 ± 63,99	41,44 ± 6,23	195,19 ± 37,50
	♀ Folhas secas	55,42 ± 12,10	88,91 ± 39,15	96,20 ± 9,49	60,24 ± 17,41
	♂ Folhas secas	58,13 ± 4,38	55,05 ± 7,55	74,67 ± 13,72	37,02 ± 1,43
	DOXO (mM)	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01

Legenda: * não teve triplicata técnica na extração do óleo essencial.

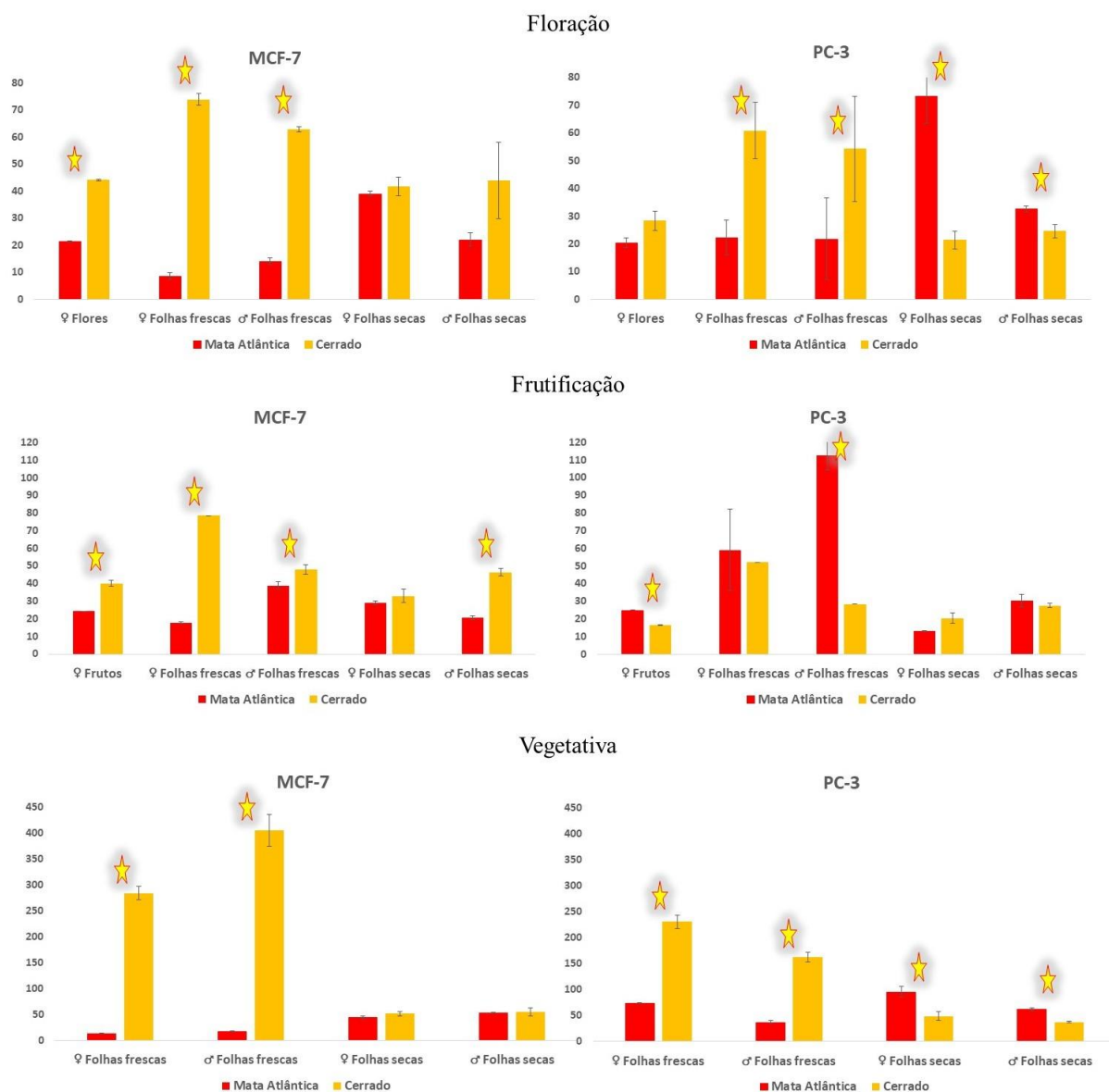


Figura 22. Comparação dos valores de IC₅₀ da atividade citotóxica dos óleos essenciais de flores, frutos, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa frente a células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3). A estrela indica o par de amostras significativamente diferente, pela análise de variância unidirecional (ANOVA, $p < 0,05$).

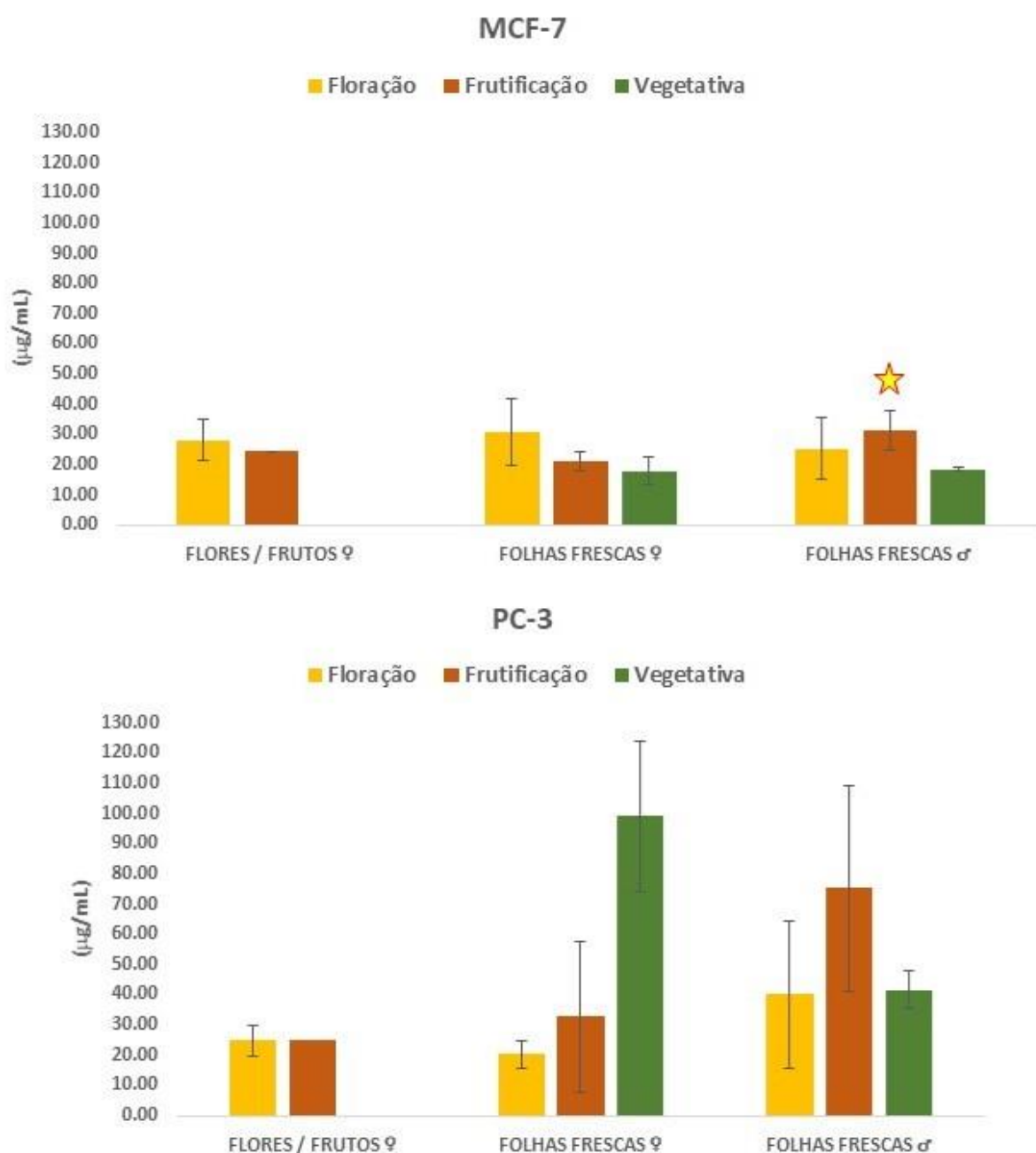


Figura 23. Comparação dos valores de IC₅₀ da atividade citotóxica dos óleos essenciais de de flores, frutos e folhas frescas de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica em fase de floração, frutificação e vegetativa, frente a células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3). A estrela indica o par de amostras significativamente diferente, pela análise de variância (ANOVA, $p < 0,05$).

Uma classificação de citotoxicidade de substâncias *in vitro* e predição *in vivo* de substâncias indica que os óleos essenciais que apresentam IC₅₀ entre 20 e 200 µg/mL apresentam baixa toxicidade (Reichling *et al.* 2009). Já o Instituto Nacional do Câncer americano determinou que valores de IC₅₀ abaixo de 30 µg/mL representam bom potencial quimiopreventivo para extratos (Talib & Mahasneh 2010). A partir destas classificações, a maioria dos óleos essenciais provenientes da Mata Atlântica apresentaram valores considerados bons quanto ao potencial quimiopreventivo e baixa toxicidade.

Muitos estudos têm demonstrado bom potencial citotóxico de óleos essenciais de diferentes espécies vegetais frente a linhagens de células tumorais. Um estudo realizado por Guerrini *et al.* (2016) descreveu o óleo essencial de *Hedyosmum sprucei* Solms, rico em germacreno D e β-cariofileno, como fonte promissora de compostos ativos para estratégias terapêuticas ou preventivas contra células humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7), pois apresentou bom potencial quimiopreventivo contra MCF-7 (IC₅₀ 33,64 ± 0,43 µg/mL) e moderado potencial contra células humanas de câncer de pulmão (A549, IC₅₀ 43,55 ± 2,80 µg/mL).

Loizzo *et al.* (2008) testaram o potencial citotóxico de diversos mono- e sesquiterpenos puros contra células de melanoma humano (C32) e adenocarcinoma renal humano (ACHN), demonstrando bom potencial citotóxico do linalol (IC₅₀ = 23 µg/mL contra C32 e 24 µg/mL contra ACHN), β-cariofileno (IC₅₀ = 20 µg/mL contra C32 e 22 µg/mL contra ACHN) e α-cedrol (IC₅₀ = 44 µg/mL contra C32 e 41 µg/mL contra ACHN), enquanto que os demais (α-pineno, sabineno, limoneno, 1,8-cineol, α-humuleno, α-terpineno, δ-3-careno, α-terpinil acetato, terpinen-4-ol e α-felandreno) foram inativos contra as linhagens celulares tumorais testadas. Por outro lado, Lampronti *et al.* (2006) observaram inibição do crescimento de células de eritroleucemia K562, com IC₅₀ = 117,3 µM, sob ação do α-pineno. α- e β-Pineno mostraram citotoxicidade contra linfócitos e outras linhagens celulares (Sobral *et al.* 2014). Sabe-se que o α-pineno sozinho pode ser inativo, mas com outros componentes citotóxicos de óleos essenciais, pode agir em sinergismo contra células tumorais (Wright *et al.* 2007). Outro componente majoritário dos óleos essenciais de *H. brasiliense* da Mata Atlântica, o terpinen-4-ol apresentou potencial antitumoral por induzir a apoptose em células de câncer de pulmão *in vitro* e *in vivo* em um estudo realizado por Wu *et al.* (2012) e mostrou-se um promissor agente para o tratamento de numerosos tumores, pois melhorou

significativamente o efeito de vários agentes biológicos (anticorpos) e quimioterapêuticos, induzindo a morte celular sozinho e em combinação, em um estudo realizado por Shapira *et al.* (2016). Componentes majoritários dos óleos essenciais de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica, como sabineno e terpinen-4-ol, e do Cerrado, como 1,8-cineol, podem ser inativos contra algumas linhagens de células tumorais e ativos contra outras, agindo em sinergismo com os componentes minoritários dos óleos essenciais.

Bonfim *et al.* (2013) testaram os isômeros α -eudesmol, β -eudesmol e γ -eudesmol isolados do óleo essencial de *Guatteria friesiana* (Annonaceae) contra linhagens celulares humanas de carcinoma hepatocelular e confirmaram que todos os isômeros mostraram potencial citotóxico, além de reduzir a proliferação celular e induzir a morte celular por apoptose. Ma *et al.* (2008) comprovaram que o β -eudesmol isolado do rizoma de *Atractylodes lancea* (Asteraceae) inibiu o crescimento de várias linhagens de células tumorais pela inibição da neovascularização e proliferação celular. Sghaier *et al.* (2016) comprovaram que a proliferação das células tumorais de pulmão e de cólon foi inibida pelo sesquiterpeno β -eudesmol isolado do óleo essencial das folhas de *Teucrium ramosissimum* (Lamiaceae), além de inibir a sua adesão e migração. α -Eudesmol foi um dos componentes majoritários presentes nos óleos essenciais de folhas frescas e secas de *H. brasiliense* proveniente do Cerrado, podendo ter influenciado no potencial citotóxico de alguns desses óleos essenciais.

3.2.5 Ensaio da atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH e co-oxidação do sistema β -caroteno/ ácido linoléico

Os óleos essenciais de flores, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa foram testados no ensaio antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH e os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 18**.

Os óleos essenciais de flores, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa foram testados no ensaio antioxidante pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico e os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 19**.

Tabela 18. Porcentagem de inibição do radical livre DPPH pelos óleos essenciais [400 µg/mL] de flores, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* em fase de floração, frutificação e vegetativa, provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado.

	Mata Atlântica			Cerrado		
	Floração	Frutificação	Vegetativa	Floração	Frutificação	Vegetativa
Flores ♀	7 ± 4	-	-	12 ± 1	-	-
Flores ♂	5 ± 0	-	-	4 ± 0	-	-
Folhas frescas ♀	8 ± 5	2 ± 14	11 ± 2	6 ± 3	7 ± 4	10 ± 0
Folhas frescas ♂	16 ± 8	-7 ± 17	15 ± 2	5 ± 0	5 ± 0	10 ± 1
Folhas secas ♀	10 ± 5	-6 ± 8	8 ± 3	5 ± 1	8 ± 5	5 ± 1
Folhas secas ♂	21 ± 4	-1 ± 2	11 ± 4	6 ± 1	16 ± 8	6 ± 1
Quercetina [20 µg/mL]			94 ± 0			
<i>Ginkgo biloba</i> [31,25 µg/mL]			93 ± 0			

Tabela 19. Porcentagem de inibição da co-oxidação do sistema β-caroteno/ ácido linoléico pelos óleos essenciais [400 µg/mL] de flores, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa.

	Mata Atlântica			Cerrado		
	Floração	Frutificação	Vegetativa	Floração	Frutificação	Vegetativa
Flores ♀	4 ± 5	-	-	-8 ± 4	-	-
Flores ♂	11 ± 0	-	-	6 ± 0	-	-
Folhas frescas ♀	46 ± 2	71 ± 4	32 ± 2	35 ± 2	40 ± 0	49 ± 2
Folhas frescas ♂	54 ± 1	70 ± 7	36 ± 0	46 ± 6	44 ± 0	64 ± 7
Folhas secas ♀	35 ± 3	69 ± 8	32 ± 2	31 ± 6	32 ± 1	51 ± 8
Folhas secas ♂	42 ± 3	57 ± 2	33 ± 4	35 ± 1	41 ± 1	53 ± 6
BHT [20µg/mL]			85 ± 4			
BHA [20µg/mL]			83 ± 5			

O potencial antioxidante dos óleos essenciais de *H. brasiliense* foi considerado fraco na concentração preliminar de 400 µg/mL pelo método de sequestro do radical livre DPPH, pois a inibição não passou de 21%, independentemente do bioma ou da fase fenológica em que as plantas foram obtidas, e até estimularam a oxidação, quando apresentaram valores de inibição negativa, sobretudo quando comparado ao padrão de extrato de *Ginkgo biloba* (31,25 µg/mL). Os óleos essenciais de *H. brasiliense* apresentaram melhor potencial antioxidante pelo método de co-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico quando comparado ao resultado obtido no ensaio de DPPH.

De um modo geral, os óleos essenciais provenientes da população da Mata Atlântica, especialmente na fase de frutificação, apresentaram maior potencial antioxidante que os da população do Cerrado, a uma concentração preliminar de 400 µg/mL. Na ACP dos óleos essenciais das plantas da Mata Atlântica, somente a fase de floração se diferenciou pelos teores de sabineno (**Figura 15**), mas não houve distinção da fase de frutificação em relação às demais. Murakami *et al.* (2017) obtiveram resultados mais significativos quando testaram os óleos essenciais de *H. brasiliense* provenientes da Ilha do Cardoso pelo método de co-oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico, com valores de IC₅₀ entre 71 e 180 µg/mL. Os resultados um pouco melhores no ensaio do β-caroteno indicaram que os óleos essenciais de *H. brasiliense*, especialmente da Mata Atlântica em fase de frutificação, apresentaram capacidade de inibir os hidroperóxidos conjugados formados pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico.

De acordo com Karadag *et al.* (2009), o potencial antioxidante está relacionado a compostos capazes de proteger sistemas biológicos do efeito prejudicial de espécies reativas de oxigênio. O resultado de apenas um ensaio pode não representar o potencial antioxidante de um óleo essencial, por isso foram realizados dois métodos antioxidantes com os óleos essenciais de *H. brasiliense*, com base em diferentes mecanismos de ação. O ensaio de sequestro do DPPH é representado pela transferência de elétrons, enquanto que o ensaio do β-caroteno/ácido linoléico mede a supressão da oxidação do β-caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (Lai *et al.* 2011; Ueno *et al.* 2014). O resultado do ensaio de sequestro do DPPH indicou fraca capacidade de transferência de elétrons. Estes resultados são comparáveis aos obtidos com o óleo essencial de *Salvia tomentosa* Mill. (Lamiaceae), rico em β-pineno, α-pineno e cânfora, mas não foi considerado

ativo pelos métodos de DPPH, nem de β -caroteno/ácido linoléico (Tepe *et al.* 2005). Da mesma forma, sete espécies de *Artemisia* foram testadas pelos mesmos métodos e mostraram atividade fraca, uma vez que sua composição química foi marcadamente rica em compostos não fenólicos (Lopes-Lutz *et al.* 2008).

Os compostos fenólicos antioxidantes de óleos essenciais mais conhecidos são eugenol, carvacrol, timol, mentol e safrol, entre outros (Brewer 2011). Um teste com 98 componentes puros de óleos essenciais revelou que compostos fenólicos, como timol e carvacrol, foram os mais ativos, seguidos pelos álcoois mono- e sesquiterpenos e cetonas, enquanto que os hidrocarbonetos apresentaram atividade antioxidante muito fraca (Anthony *et al.* 2012). Em um ensaio bioautográfico da atividade antioxidante por sequestro do radical livre DPPH, Guerrini *et al.* (2016) relacionaram o potencial do óleo essencial de *Hedyosmum sprucei* principalmente aos sesquiterpenos α -cadinol, α -muurolol, óxido de cariofileno e ao fenilpropanóide metil eugenol. Estes componentes apresentaram-se de forma minoritária nos óleos essenciais de *H. brasiliense*, cujo potencial antioxidante de sequestro do radical livre DPPH mostrou-se fraco.

Uma vez que a atividade antioxidante de um óleo essencial representa o resultado da interação de todos os componentes, dificilmente se pode atribuir a atividade do óleo essencial a apenas um componente, uma vez que a ação do sinergismo ou antagonismo de vários componentes pode contribuir para o seu potencial antioxidante (Miguel 2010; Mimika-Duki *et al.* 2016).

Mitic-Culafic *et al.* (2009) demonstraram o efeito protetor dos monoterpenos linalol, mircenol e 1,8-cineol contra a peroxidação lipídica. Embora estes monoterpenos façam parte da composição química dos óleos essenciais das plantas do Cerrado em maior quantidade que da Mata Atlântica, os melhores efeitos antioxidantes no ensaio de inibição da peroxidação do β -caroteno foram obtidos dos óleos essenciais da Mata Atlântica, especialmente provenientes da fase de frutificação. Isso indica que outros componentes podem ter influenciado no potencial antioxidante desses óleos essenciais testados, por ação sinérgica ou antagônica.

3.2.6 Ensaio da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (IAChE)

Os óleos essenciais de flores, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração,

frutificação e vegetativa foram testados no ensaio anticolinesterásico pelo método de microplaca e os resultados obtidos estão apresentados na **tabela 20**.

Tabela 20. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos óleos essenciais [300 µg/mL] de flores, folhas frescas e folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado em fase de floração, frutificação e vegetativa.

	Mata Atlântica			Cerrado		
	Floração	Frutificação	Vegetativa	Floração	Frutificação	Vegetativa
Flores ♀	83 ± 1	-	-	57 ± 2	-	-
Flores ♂	44 ± 0	-	-	-	-	-
Folhas Frescas ♀	20 ± 1	25 ± 1	-30 ± 2	32 ± 2	29 ± 0	27 ± 0
Folhas Frescas ♂	11 ± 2	24 ± 1	-25 ± 1	24 ± 2	33 ± 0	33 ± 1
Folhas Secas ♀	48 ± 2	42 ± 3	0 ± 7	21 ± 2	25 ± 2	26 ± 0
Folhas Secas ♂	45 ± 2	44 ± 3	22 ± 1	21 ± 0	32 ± 2	31 ± 2
Fisostigmina [1,56 µg/mL]	82 ± 3					

De um modo geral, os óleos essenciais de *H. brasiliense* não apresentaram potencial anticolinesterásico, com exceção das flores femininas das plantas provenientes da Mata Atlântica, cujo percentual de inibição da enzima alcançou 83%, a uma concentração preliminar de 300 µg/mL.

Foi realizado um estudo da atividade anticolinesterásica de *Satureja thymbra* (Lamiaceae), em que o óleo essencial apresentou IC₅₀ = 150 µg/mL, enquanto que o timol apresentou o melhor resultado, com IC₅₀ = 47,5 µg/mL, seguido do γ-terpineno (IC₅₀ = 181 µg/mL) e carvacrol (IC₅₀ = 182 µg/mL), mas o p-cimeno foi considerado inativo, com IC₅₀ > 1000 µg/mL (Ozturk 2012). Outro estudo, realizado por Kiendrebeogo *et al.* (2011), revelou que os óleos essenciais de *Eucalyptus camaldulensis* (Myrtaceae) e *Ocimum canum* (Lamiaceae) apresentaram ótimo potencial anticolinesterásico com IC₅₀ de 18,98 µg/mL e 36,16 µg/mL, respectivamente, cujos componentes majoritários foram 1,8-cineol (34 % em *E. camaldulensis* e 60 % em *O. canum*), α-pineno, p-cimeno e limoneno (12,5, 12,3 e 11,5 %, respectivamente, em *E. camaldulensis*), cânfora e β-pineno (8,1 e 5,8 %, respectivamente, em *O. canum*). E Owokotomo *et al.* (2015) testaram a atividade anticolinesterásica dos óleos

essenciais de quatro espécies de plantas de uso medicinal, *Ocimum gratissimum* K. Schum (Lamiaceae), *Crassocephalum crepidioides* Benth S. More (Asteraceae), *Aframomum melegueta* K. Schum (Zingiberaceae) e *Monodora myristica* Gaertn (Annonaceae) e obtiveram valores de IC₅₀ entre 6,54 e 28,97 mg/mL. Seis dos dez óleos essenciais testados apresentaram entre os componentes majoritários cariofileno (α -, β - ou óxido), o que sugere que a estrutura em comum a eles estaria relacionada com melhor inibição da enzima acetilcolinesterase. Mesmo assim, os demais óleos essenciais apresentaram outros componentes majoritários como α -pineno, timol, germacreno-D-4-ol, γ -cadineno, acetato de mirtenila, acetato de pinocarvila e limoneno, entre outros, o que demonstra que diversos esqueletos terpenos podem influenciar na inibição da enzima, assim como outros componentes em menor teor que estejam agindo sinergisticamente.

Os óleos essenciais das flores femininas da população proveniente da Mata Atlântica não apresentaram composição química muito diferente dos frutos ou das folhas, bem como não apresentaram altas concentrações dos componentes mencionados nas referências citadas acima, de modo que é difícil atribuir a atividade elevada a algum dos componentes da matriz complexa que consiste o óleo essencial em questão.

4 Conclusões

Os óleos essenciais de folhas frescas foram discriminados pela presença de sabineno na Mata Atlântica e de mirceno no Cerrado. Já os óleos essenciais de folhas secas foram discriminados pela presença de β -pineno na Mata Atlântica e carotol, α -eudesmol e espatulenol no Cerrado.

Os óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos que os do Cerrado quanto aos potenciais antifúngico, antimicrobiano e antitumoral.

Os óleos essenciais das flores de ambas as populações apresentaram bom potencial antifúngico, antimicrobiano e antitumoral e os óleos essenciais dos frutos, bom potencial antitumoral e fraco potencial antifúngico.

Não foi possível atribuir as atividades biológicas detectadas neste estudo a componentes específicos dos óleos essenciais, pois a atividade pode ser atribuída a vários

componentes, em quantidades variáveis, atuando em sinergismo ou antagonismo na matriz complexa que constitui cada óleo essencial.

Este foi o primeiro estudo que comparou a composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de flores e folhas de plantas masculinas e femininas e frutos de *H. brasiliense* provenientes de Cerrado e Mata Atlântica em diferentes fases fenológicas.

5 Referências bibliográficas

Adams, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gás chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. 804 p.

Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. & Bouwmeester, H.J. 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry Reviews* 5: 49-58.

Amoah, S.K., Kouloura, E., Dutra, L.M., Barison, A., Wildner, L.M., Bazzo, M.L., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A. & Biavatti, M.W. 2015. Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry Letters* 13: 267–274.

Anthony, K.P., Deolu-Sobogun, S.A. & Saleh, M.A. 2012. Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils. *Journal of Food Science* 77: C839–C843.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-475.

Baldwin, I.T. & Preston, C.A. 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208: 137-145.

Bonfim, D.S., Ferraz, R.P.C., Carvalho, N.C., Soares, M.B.P., Pinheiro, M.L.B., Costa, E.V. & Bezerra, D.P. 2013. Eudesmol isomers induce caspase-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 113: 300–306.

Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S. & Brito, G.A.C. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40: 349-356.

- Brewer, M.S.** 2011. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action and potential applications. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 10: 221–247.
- Briskin, D.** 2000. Medicinal plants and phytomedicines – Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant Physiology* 124: 507-514.
- Burt, S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
- Chao, S.C., Young, D.G. & Oberg, C.J.** 2011. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal of Essential Oil Research* 12: 639-649.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In: B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones (eds.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, 1367 p.
- De Feo, V. & Soria, R.U.** 2007. Composition of the essential oil of *Hedyosmum scabrum* (R. et P.) Solms (Chloranthaceae). *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 10 (1): 41-45.
- Delgado, P.A., Quijano, C.E., Morales, G. & Pino, J.A.** 2010. Composition of the essential oil from leaves and fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec. grown in Colombia. *Journal of Essential Oil Research* 22 (3): 234-236.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G.** 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88: 308-316.
- Duarte-Almeida, J.M., Santos, R.J., Genovese, M.I. & Lajolo, F.M.** 2006. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 26 (2): 446-452.
- Duarte, M.C., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M. & Sartoratto, A.** 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of Ethnopharmacology* 111: 197-202.
- Ebrahimi, S.N., Hadian, J., Mirjalili, M.H., Sonboli, A. & Yousefzadi, M.** 2008. Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Food Chemistry* 110: 927–931.

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.

Farmacopéia brasileira IV 2001. 4ed. São Paulo: Editora Atheneu.

Fennel, C.W., Light, M.E., Sparg, S.G., Stafford, G.I. & Van Staden, J. 2004. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: agricultural and storage practices. *Journal of Ethnopharmacology* 95: 113-121.

Gershenzon, J. & Dudareva, N. 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology* 3(7): 408-414.

Guedes, A. 1997. Estudo químico e avaliação da atividade analgésica e antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina.

Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M. & Scalvenzi, L. 2016. Cytotoxic effect and TLC bioautography-guided approach to detect health properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* essential oil. Evidence-based complementary and alternative medicine. Article ID 1638342: 8 p.

Hartmann, T. 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846.

Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. & Williamson, E.M. 2004. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, 1ed. London: Churchill Livingstone.

Heinzmann, B.M., Spitzer, V. & Simões, C.M.O. 2017. 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: do produto natural ao medicamento, Porto Alegre, Artmed, p. 168-183.

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

Hong, E.J., Na, K.J., Choi, I.G., Choi, K.C. & Jeung, E.B. 2004. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27: 863-866.

- Howes, M.-J.R. & Houghton, P.J.** 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 75: 513-527.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H. & Przybylski, R.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food Chemistry* 108: 986-995.
- Inoue, Y., Sgiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H. & Shimada, J.** 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS Microbiology Letters* 237: 325-331.
- Jordán, M.J., Lax, V., Rota, M.C., Lorán, S., Sotomayor, J.A.** 2013. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. *Industrial Crops and Products* 48: 144– 152.
- Karadag, A., Ozcelik, B. & Saner, S.** 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods* 2, 41–60.
- Kashiwagi, T., Phi, N.T.L. & Sawamura, M.** 2010. Compositional changes in yuzu (*Citrus junos*) steam-distilled oil and effects of antioxidants on oil quality during storage. *Food Science and Technology Research* 16 (1): 51 – 58.
- Kiendrebeogo, M., Coulibaly, A.Y., Nebie, R.C.H., Zeba, B., Lamien, C.E., Lamien-Meda, A. & Nacoulma, O.G.** 2011. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21 (1): 63-69.
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz, A.B., Biavatti, M.W. & Netz, D.J.A.** 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20 (5): 692-699.
- Kreis, W., Munkert, J. & Pádua, R.M.** 2017. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick eds. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*, Porto Alegre, Artmed, p. 147-167.

- Lago, J.H.G., Romoff, P., Pirani, J.R. & Roque, N.F.** 2007. Essential oil from *Guarea macrophylla* Vahl var. *tuberculata* Vellozo (Meliaceae) leaves – variation in the chemical component proportions. *Journal of Essential Oil Research* 19: 338-341.
- Lai, H.Y. & Lim, Y.Y.** 2011. Evaluation of antioxidant activities of the methanolic extracts of selected ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development* 2(6): 442-447.
- Lampronti, I., Saab, A.M. & Gambari, R.** 2006. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. *International Journal of Oncology* 29, 989–995.
- Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A. & Menichini, F.** 2008. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Proliferation* 41: 1002–1012.
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S. & Kolodziejczyk, P.P.** 2008. Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analysis Methods* 69: 1732–1738.
- Lorenzo, D., Loayza, I. & Dellacassa, E.** 2003. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour and Fragrance Journal* 18: 32–35.
- Ma, E.-L., Li, Y.-C., Tsuneki, H., Xiao, J.-F., Xia, M., Wang, M.-W. & Kimura, I.** 2008. β -Eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumour cell proliferation. *Journal of Asian Natural Products Research* 10 (2): 159–167.
- Matias, E.F.F., Alves, E.F., Silva, M.K.N., Carvalho, V.R.A., Figueiredo, F.G., Ferreira, J.V.A., Coutinho, H.D.M., Silva, J.M.F.L., Ribeiro-Filho, J. & Costa, J.G.M.** 2016. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC (Boraginaceae) and the sabinene. *Industrial Crops and Products* 87: 45–53.
- Mimika-Dukic, N.; Orcic, D.; Lesjak, M. & Sibul, F.** 2016. Essential oils as powerful antioxidants: misconception or scientific fact? In: *Medicinal and aromatic crops: production, phytochemistry and utilization*; American Chemical Society: Washington, DC, USA, pp. 187–208.
- Mitic-Culafic, D., Zegura, B., Nikolic, B., Vukivic-Gacic, B., Knezevic-Vukcevic, J. & Filipic, M.** 2009. Protective effect of linalool, myrcene and eucalyptol against t-butyl

hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells. Food and Chemical Toxicology 47: 260–266.

Miyazawa, M., Usami, A., Tanaka, T., Tsuji, K., Takehara, M. & Hori, Y. 2016. Sexual differences in chemical composition and aroma-active components of essential oil from flower buds of *Eurya japonica*. Journal of Oleo Science 65 (4): 357-363.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunology Methods 65 (1-2): 55-63.

Mundina, M., Vila, R., Felix, T., Cicció, J.F., Ibañez, C., Adzet, T., Casanova, J. & Cañigueral, S. 2000. Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. Flavour and Fragrance Journal 15(3): 201-205.

Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M.T., Moreno, P.R.H. & Young, M.C.M. 2017. Chemical composition, antifungal and antioxidant activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) essential oils. Medicines 4: 55 (doi:10.3390/medicines4030055).

NIST 69 (National Institute of Standards and Technology) 2016. <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (acesso em: 10.07.2016)

Njoroge, S.M., Ukeda, H. & Sawamura, M. 1996. Changes in the volatile composition of yuzu (*Citrus junos* Tanaka) cold-pressed oil during storage. Journal of Agriculture and Food Chemistry 44: 550-556.

Owokotomo, I.A., Ekundayo, O., Abayomi, T.G. & Chukwuka, A.V. 2015. *In-vitro* anti-cholinesterase activity of essential oil from four tropical medicinal plants. Toxicology Reports 2: 850–857.

Ozturk, M. 2012. Anticholinesterase and antioxidant activities of savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. Food Chemistry 134: 48–54.

Pirbalouti, A.G., Firoznejhad, M., Craker, L. & Akbarzadeh, M. 2013. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. Brazilian Journal of Pharmacognosy 23: 861-869.

Politeo, O., Juki, M. & Milo, M. 2006. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. Croatica Chemical Acta 79(4): 545-552.

Raggi, L., Cordeiro, I., Moreno, P.R.H. & Young, M.C.M. 2015. Differentiation of two *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. subspecies by the essential oil composition. *Journal of Essential Oil Research* 27 (1): 30-33.

Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U. & Saller, R. 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forsch Komplementmed* 16:79–90.

Resende-Vido, D.L. 2009. Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. provenientes da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica). Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.

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.

Salido, S., Altarejos, J., Nogueras, M., Sánchez, A. & Luque, P. 2003. Chemical composition and seasonal variations of rosemary oil from Southern Spain. *Journal of Essential Oil Research* 15 (1): 10-14.

Scariot, A., Souza-Silva, J.C. & Felfili, J.M., 2005. Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília, Ministério do Meio Ambiente.

Schnitzler, P., Koch, C. & Reichling, J. 2007. Susceptibility of drug-resistant clinical HSV-1 strains to essential oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51: 1859-1862.

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.

Sghaier, M.B., Mousslimb, M., Pagano, A., Ammari, Y., Luis, J. & Kovacic, H. 2016. β -Eudesmol, a sesquiterpene from *Teucrium ramosissimum*, inhibits superoxide production, proliferation, adhesion and migration of human tumor cell. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 46: 227–233.

Shapira, S., Pleban, S., Kazanov, D., Tirosh, P. & Arber, N. 2016. Terpinen-4-ol: a novel and promising therapeutic agent for human gastrointestinal cancers. *Plos One* (DOI:10.1371/journal.pone.0156540).

Silva, F. & Casali, V.W.D. 2000. Plantas medicinais e aromáticas: pós-colheita e óleos essenciais. Departamento de Fitotecnia, UFV, Viçosa, 153 p.

Simpson, B.S. 2013. Dioecy in plants – Is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Medica* 79: 613-615.

Sobral, M.V., Xavier, A.L., Lima, T.C. & Sousa, D.P. 2014. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. *The Scientific World Journal* 2014, 35 págs (doi.org/10.1155/2014/953451).

Srivastava, A.K., Srivastava, S.K. & Syamsundar, K.V. 2004. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal* 20(1): 51-53.

Suffredini, I.B., Paciencia, M.L.B., Frana, S.A., Varella, A.D. & Younes, R.N. 2007. In vitro breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. *Die Pharmazie* 62: 798-800.

Suffredini, I.B., Sader, H.S., Gonçalves, A.G., Reis, A.O., Gales, A.C., Varella, A.D. & Younes, R.N. 2004. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 37 (3): 379-384.

Suffredini, I.B., Varella, A.D., Younes, R.N. & Paciencia, M.L.B. 2006. In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. *Die Pharmazie* 61: 722-724.

Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Martin, M.A.C.K., Bercion, S.R. & Legault, J. 2007. Chemical composition of leaf essential oil of *Hedyosmum arborecens* and evaluation of its anticancer activity. *Natural Products Communications* 2 (12): 1269-1272.

Talib, W.H. & Mahasneh, A.M. 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Scientia Pharmaceutica* 78 (1): 33–45.

Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Neng, N.R. & Nogueira, J.M.F. 2013. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. *Industrial Crops and Products* 43: 587– 595.

- Tepe, B., Daferera, 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.
- 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.
- Turek, C. & Stintzing, F.C.** 2013. Stability of essential oils: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 12: 40-53.
- Ueno, H., Yamakura, S., Arastoo, R.S., Oshima, T. & Kokubo, K.** 2014. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using β -carotene bleaching assay. *Journal of Nanomaterials* 2014: 1-7 (www.hindawi.com/journals/jnm/2014/802596).
- Verpoorte, R.** 2000. Secondary metabolism. In: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, 1ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-29.
- Vinod, M.S., Sankararamasubramanian, H.M., Priyanka, R., Ganesan, G. & Parida, A.** 2010. Gene expression analysis of volatile-rich male flowers of dioecious *Pandanus fascicularis* using expressed sequence tags. *Journal of Plant Physiology* 167: 914-919.
- Wright, B.S., Bansal, A., Moriarity, D.M., Takaku, S. & Setzer, W.N.** 2007. Cytotoxic leaf essential oils from neotropical lauraceae: synergistic effects of essential oil components. *Natural Product Communication* 2: 1241–1244.
- Wu, C.-S., Chen, Y.-J., Chen, J.J.W., Shieh, J.-J., Huang, C.-H., Lin, P.-S., Chang, G.-C., Chang, J.-T. & Lin, C.-C.** 2012. Terpinen-4-ol induces apoptosis in human nonsmall cell lung cancer in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 13 pages.
- Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. & Namba, T.** 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 19: 1580-1585.

Yamaguchi, L.F., Freitas, G.C., Yoshida, N.C., Silva, R.A., Gaia, A.M., Silva, A.M., Scotti, M.T., Emerenciano, V.P., Guimarães, E.F., Floh, E.I.S., Colombo, C.A., Siqueira, W.J. & Kato, M.J. 2011. Chemometric analysis of ESIMS and NMR data from *Piper* species. *Journal of Brazilian Chemical Society* 22 (12): 2371-2382.

Younes, R.N., Varella, A.D. & Suffredini, I.B. 2007. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. *Clinics* 62 (6): 763-768.

Zaouali, Y., Chograni, H., Trimech, R. & Boussaid, M. 2013. Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Product* 43: 412–419.

Zeraib, A., Ramdani, M., Boudjedjou, L., Chalard, P. & Figuredo, G. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of *Juniperus thurifera* L. essential oils. *Journal of Biosciences and Biotechnology* 3 (2): 147-154.

Composição química e atividades biológicas
dos componentes fixos de *Hedyosmum*
brasiliense Mart. ex Miq. (Chloranthaceae)

Resumo

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae), popularmente conhecida como chá-de-bugre, é um arbusto dioico. Suas folhas são utilizadas na medicina popular para o tratamento de enxaqueca, disfunções do ovário, frieira, reumatismo, dores de estômago e como diurético. Estudos comprovaram as propriedades afrodisíaca, analgésica, ansiolítica e antidepressiva de suas lactonas sesquiterpênicas, bem como o potencial antimicrobiano e antifúngico de seus óleos essenciais. O estudo de plantas medicinais sob diferentes aspectos tem evidenciado que a sua composição química pode variar de acordo com a localização geográfica, a fase fenológica e até o gênero em plantas dioicas, podendo interferir no seu potencial farmacológico. Uma vez que a composição química pode variar por diversos fatores, os componentes fixos de plantas masculinas e femininas de *Hedyosmum brasiliense* coletadas em Paranapiacaba (Mata Atlântica) e Mogi Guaçu (Cerrado) foram comparados por ^1H -RMN e ACP, CLAED-DAD e LC-MS/MS e testados para as atividades antifúngica, antibacteriana e citotóxica. Os extratos brutos de plantas masculinas e femininas foram semelhantes em ambas as populações, porém os extratos da Mata Atlântica foram selecionados para fracionamento e purificação por apresentarem forte potencial antifúngico quando comparado aos do Cerrado. Foram isoladas e identificadas oito substâncias puras, das quais duas são inéditas na literatura, o sesterterpeno hedyosulida e o vanilato de pinocarvila. Também foram isoladas as lactonas sesquiterpênicas hedyosumina D, 15-acetoxi-isogermafurenolídeo, linderolídeo F, neolitacumona B e oxionoseriolídeo, além do bisnor-sesquiterpeno blumenol B. Esta foi a segunda vez que um sesterterpeno foi isolado em Chloranthaceae. Três componentes isolados apresentaram atividade antifúngica, a hedyosumina D, o linderolídeo F e a neolitacumona B. Os extratos brutos de ambas as populações apresentaram potencial citotóxico, que se manteve nos resíduos das partições em hexano e diclorometano da população da Mata Atlântica. Os extratos brutos de ambas as populações e resíduos da partição em hexano da população da Mata Atlântica apresentaram potencial antibacteriano contra bactérias gram-positivas.

Palavras-chave: Cerrado, Mata Atlântica, lactonas sesquiterpênicas, sesterterpeno, antifúngica, Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba.

Abstract

Hedyosmum brasiliense (Chloranthaceae), popularly known as “chá-de-bugre”, is a dioecious shrub. Its leaves has been used in folk medicine to treat migraine, ovarium dysfunction, foot fungi, rheumatism, stomach pain and as diuretic. Studies have demonstrated aphrodisiac, analgesic, anxiolytic and antidepressive properties of their sesquiterpene lactones, as well as the antimicrobial and antifungal potential of their essential oils. The study of medicinal plants under different aspects has evidenced that their chemical composition may vary according to the geographic location, phenological phase and even gender in dioecious plants, which could interfere in their pharmacological potential. Since several factors could influence in the chemical composition of plants, fixed metabolites of male and female plants of *Hedyosmum brasiliense* from Paranapiacaba (Atlantic Forest) and Mogi Guaçu (Cerrado) were compared by ¹H-NMR and PCA, CLAE-DAD and LC-MS/MS and tested for antifungal, antibacterial and antitumor activities. Crude extracts of male and female plants were similar in both populations, but crude extracts from Atlantic Forest were selected for fractionation and purification as they presented stronger antifungal activity when compared to those from Cerrado. Eight pure compounds were isolated and identified, of which two are unpublished, the sesterpene hedyosulide and pinocarvyl vanillate. The sesquiterpene lactones hedyosumin D, 15-acetoxy-isogermafurenolide, linderolide F, neolitacumone B and oxynoseriolide, and the bisnor-sesquiterpene blumenol B were also isolated. This was the second time that a sesterpene was isolated from the Chloranthaceae. Three isolated components presented antifungal activity, hedyosumin D, linderolide F and neolitacumone B. The crude extracts of both populations presented citotoxic potential, which remained in the hexane and dichloromethane extracts of the Atlantic Forest population. The crude extracts of both populations and the hexane extract of the Atlantic Forest population showed antibacterial potential against gram-positive bacteria.

Keywords: Cerrado, Atlantic Forest, sesquiterpene lactones, sesterpene, antifungal, “Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba”.

1 Introdução

Os produtos naturais provenientes de plantas com potencial medicinal têm sido fonte para o desenvolvimento de fármacos desde os primórdios. Preparações obtidas de fontes naturais foram a base da farmacoterapia até meados do século XIX. A grande diversidade estrutural aliada às atividades biológicas/farmacológicas provenientes de processos coevolutivos resultaram em uma sofisticada maquinaria biossintética, que pode ser empregada *in natura*, em fitoterápicos, como fármacos (ingredientes ativos dos medicamentos) ou ser usada para a obtenção de moléculas farmacologicamente ativas por meio de processos de síntese parcial ou servir como modelos moleculares para o planejamento e a síntese total de novos fármacos (Braga *et al.* 2017).

Investimentos em equipamentos, mão-de-obra e tempo necessários para o isolamento e a elucidação estrutural de novos metabólitos com propriedades biológicas potentes têm limitado o desempenho dos programas de rastreamento de produtos naturais. Muitos esforços são feitos hoje para evitar a redescoberta de compostos já conhecidos pelo desenvolvimento de novos procedimentos de desreplicação, no entanto, o isolamento de produtos naturais ainda é necessário, uma vez que são necessários estudos de elucidação da estrutura, ensaios biológicos ou de formulação. Os processos de purificação desenvolvidos são, muitas vezes, baseados em técnicas disponíveis em cada laboratório, nem sempre bem adaptado às necessidades. Um processo de purificação eficiente geralmente deve combinar várias técnicas de separação, o que permite a introdução de diferentes critérios de seletividade para reduzir o número de etapas de purificação necessárias para a obtenção de compostos alvo com alto rendimento e pureza (Renault 2015).

As condições ambientais, o período do ano e do dia, o estágio de desenvolvimento da planta e até interações interespecíficas com micro-organismos endofíticos podem afetar a composição química e as propriedades farmacológicas da planta estudada de modo significativo. É importante considerar a origem do material vegetal e a necessidade de obtenção de grandes quantidades de matéria-prima para os estudos pré-clínicos e clínicos, de formulação e analíticos com o produto natural de interesse, com a garantia da preservação da espécie em seu habitat natural, desenvolvendo plantio sustentável, cultura *in vitro*, bioprocessos e até síntese química (Braga *et al.* 2017).

Chloranthaceae é uma família pequena, constituída por 4 gêneros. Os gêneros *Sarcandra*, *Ascarina* e *Chloranthus* são menores, com 3, 12 e 15 espécies, respectivamente. O gênero *Hedyosmum* é o maior, com 41 espécies distribuídas principalmente nas Américas. Atualmente, existem duas grandes revisões bibliográficas referentes aos constituintes químicos e atividades biológicas das espécies pertencentes à família Chloranthaceae, publicadas por Cao *et al.* (2008) e Zhang *et al.* (2016). De acordo com elas, os principais metabólitos secundários de ocorrência na família são terpenos, cumarinas, lignanas, flavonoides, ácidos orgânicos, amidas e esteróis. As principais atividades biológicas relatadas são citotóxica, antiviral, antifúngica, antibacteriana, hepatoprotetora, anti-úlceras, anti-inflamatória, analgésica e imuno-estimulante.

Um dos grupos de compostos mais representativo na família é constituído pelos sesquiterpenos (**Figura 1**), com destaque para os tipos de esqueleto eudesmano (ex. 1 α -acetoxieudesma-3,7(11)-dien-8,12-olida de *H. brasiliense*; Amoah *et al.* 2015b), lindenano (onoseriolida de *H. brasiliense*; Trentin *et al.* 1999), guaiano (podoandina de *H. brasiliense*; Amoah *et al.* 2013), germacrano (furanodienona de *C. serratus*; Kawabata *et al.* 1985), cadinano (pirocurzerenona de *C. henryi*; Wu *et al.* 2007), aromadendrano (aromadendrano-4 α ,10 β -diol de *C. glaber*; Takeda *et al.* 1993) e elemano (15-hidroxi-isogermafurenolida de *H. brasiliense*; Amoah *et al.* 2015b).

Estudos comprovaram o potencial afrodisíaco (Leitolis *et al.* 2016), analgésico (Trentin *et al.* 1999), ansiolítico e antidepressivo (Gonçalves *et al.* 2012; Tolardo *et al.* 2010) de lactonas sesquiterpênicas isoladas de *H. brasiliense*. O extrato etanólico de folhas desta espécie coletada no Estado do Paraná mostrou-se ativo contra bactérias gram-positivas (Cordova *et al.* 2010) e o extrato etanólico de folhas frescas coletadas em Santa Catarina apresentou efeito ansiolítico e antidepressivo (Gonçalves *et al.* 2012). Kirchner *et al.* (2010) comprovou que os óleos essenciais de folhas desta espécie proveniente de Santa Catarina não apresentaram atividade contra bactérias gram-negativas, mas foram fortemente ativas contra bactérias gram-positivas e fungos. Murakami *et al.* (2017) observaram moderada atividade antioxidante e forte atividade antifúngica contra os óleos essenciais desta espécie proveniente de São Paulo frente a fungos filamentosos, atribuindo o potencial fungitóxico ao curzereno.

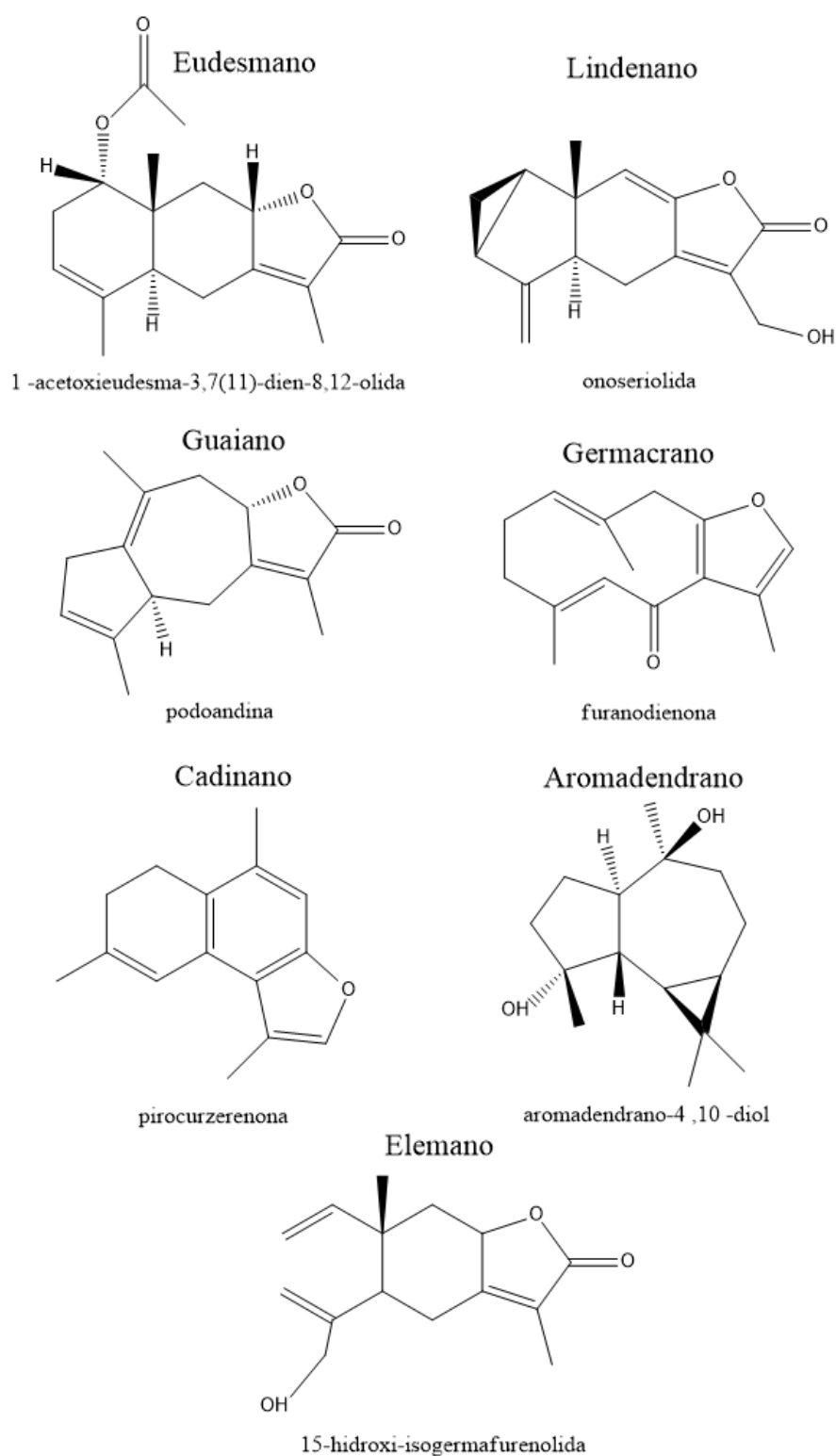


Figura 1. Tipos de esqueleto sesquiterpeno mais comuns em Chloranthaceae: eudesmano, lindenano, guaiano, germacrano, cadinano, aromadendrano e elemeno.

Uma vez que a composição química pode variar por diversos fatores, o objetivo do presente trabalho foi ampliar o conhecimento a respeito de *H. brasiliense*, ao comparar o perfil químico dos extratos brutos etanólicos de folhas secas de plantas masculinas e femininas coletadas em áreas de Mata Atlântica e Cerrado, selecionar o extrato mais ativo pelo ensaio antifúngico de bioautografia, purificar e identificar estruturalmente as substâncias isoladas, testar a atividade antifúngica das substâncias isoladas por bioautografia e avaliar o potencial antifúngico, antibacteriano, anticolinesterásico e citotóxico dos extratos e resíduos das partições.

2 Material e Métodos

2.1 Material vegetal

Para o desenvolvimento deste estudo, foram utilizadas as folhas de indivíduos adultos de *Hedyosmum brasiliense*, previamente demarcados. As coletas foram realizadas em duas localidades do Estado de São Paulo: “Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba” (NP), correspondente a Floresta Ombrófila Densa Montana, 964 m de altitude, no município de Santo André, no bioma Mata Atlântica; e “Reserva Biológica de Mogi Guaçu” (MG), correspondente a Mata Ciliar, 600 m de altitude, no município de Mogi-Guaçu, no bioma Cerrado. Dez plantas masculinas e dez femininas provenientes de cada população foram coletadas para obtenção dos extratos brutos e estudo dos componentes fixos.

A **tabela 1** apresenta a relação das datas e dos locais das expedições em que foram realizadas as coletas.

Tabela 1. Datas e locais das expedições de coleta de *Hedyosmum brasiliense*; NP: Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba; MG: Reserva Biológica de Mogi Guaçu; ♂: masculino; ♀: feminino.

Data	Local	Atividade
23/09/2014	MG	Identificação e marcação das plantas ♂ e ♀; coleta de material vegetal para estudo dos componentes fixos.
26/09/2014	NP	Identificação e marcação das plantas ♂ e ♀; coleta de material vegetal para estudo dos componentes fixos.
09/02/2015	MG	Coleta de material vegetal de plantas ♂ e ♀ para estudo dos componentes fixos.
24/02/2015	NP	Coleta de material vegetal de plantas ♂ e ♀ para estudo dos componentes fixos.

A identificação botânica foi realizada pela Dra. Inês Cordeiro e as exsiccatas foram depositadas no Herbário (SP) Maria Eneyda P. K. Fidalgo, do Instituto de Botânica de São Paulo, sob os números 475333 (Mogi Guaçu) e 475334 (Paranapiacaba).

2.2 Extração dos componentes fixos de folhas secas de *H. brasiliense*

A extração dos componentes fixos foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

Para a extração dos componentes fixos de *H. brasiliense*, foi coletado o material vegetal de, pelo menos, 10 indivíduos masculinos e 10 femininos previamente demarcados em cada população. As folhas foram separadas e secas à sombra, em temperatura ambiente, moídas em moinho de facas e submetidas à maceração a frio com etanol (EtOH) comercial (92°). O solvente foi trocado a cada 3 dias, perfazendo um total de 15 dias de extração. Os extratos etanólicos brutos (EE) foram reunidos, filtrados, concentrados em evaporador rotatório (Büchi) e secos em banho de aquecimento, a 50°C, até eliminação do solvente. Alíquotas de 1 mL dos extratos obtidos em cada etapa de extração foram pesadas para obtenção da massa seca de extrato bruto, bem como para o cálculo do rendimento em relação à massa inicial.

2.3 Comparação dos EEs de plantas masculinas e femininas provenientes de Cerrado e Mata Atlântica

A análise de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

Os EEs de plantas masculinas e femininas provenientes de Cerrado e Mata Atlântica foram comparados para verificar se havia diferença na sua composição química. Alíquotas de 400 µg de cada extrato foram solubilizadas em 10 µL de metanol (MeOH), aplicadas em cromatoplasas de sílica-gel (Merck), desenvolvidas em (CCD) com Clorofórmio/Acetona (6:1) e fotografadas em sistema CAMAG sob os comprimentos de onda de 254 nm (UV curto) e 366 nm (UV longo).

O estudo metabolômico dos EEs foi realizado no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (IQAr-UNESP), com o acompanhamento da aluna de Iniciação Científica Jhennifer Priscila Nastri, da pós-doc Dr^a Denise Selegato, do

responsável técnico pelo equipamento de RMN, Dr. Nivaldo Boralle, e sob supervisão da Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani.

As triplicatas dos extratos etanólicos brutos (5 mg) foram liofilizadas, diluídas em 700 μ L de clorofórmio deuterado (CDCl_3 , Sigma), filtradas e transferidas para tubos de vidro de 5 mm. Um total de 12 amostras foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H -RMN, Bruker Ascend 600 MHz). Todas as linhas de base dos espectros foram ajustadas e os deslocamentos químicos referenciados pelo sinal do tetrametilsilano (TMS) no programa TopSpin. Antes de normalizar os dados das matrizes, as regiões correspondentes ao TMS e ao CDCl_3 de todos os espectros foram suprimidas (Nastri *et al.* 2015). A Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada com todos os sinais obtidos nos espectros, pelo método de NIPALS, no programa estatístico Matlab R2014a Student Version.

2.4 Partição dos EEs com solventes de polaridades crescentes

A partição dos EEs foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

Os EEs de plantas provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado foram submetidos a partição líquido/líquido com solventes de diferentes graus de polaridade: *n*-hexano (Hex), diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt). Para tanto, os EEs foram ressuspensos em metanol/água ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 8:2). A proporção de H_2O na mistura aumentou à medida que os solventes foram trocados, para formar fases entre os solventes. As partições obtidas no processo foram concentradas em evaporador rotatório (Büchi) para eliminação dos solventes, levadas ao banho de aquecimento (50°C) para a completa eliminação dos solventes e o resíduo hidrometanólico foi seco em liofilizador. Ao final do processo, foram obtidas as partições em hexano, em diclorometano, em acetato de etila e o resíduo hidrometanólico (**Figura 2**). Os resíduos das partições obtidos foram pesados para obtenção da massa seca, bem como para o cálculo do rendimento em relação à massa de EE inicial.

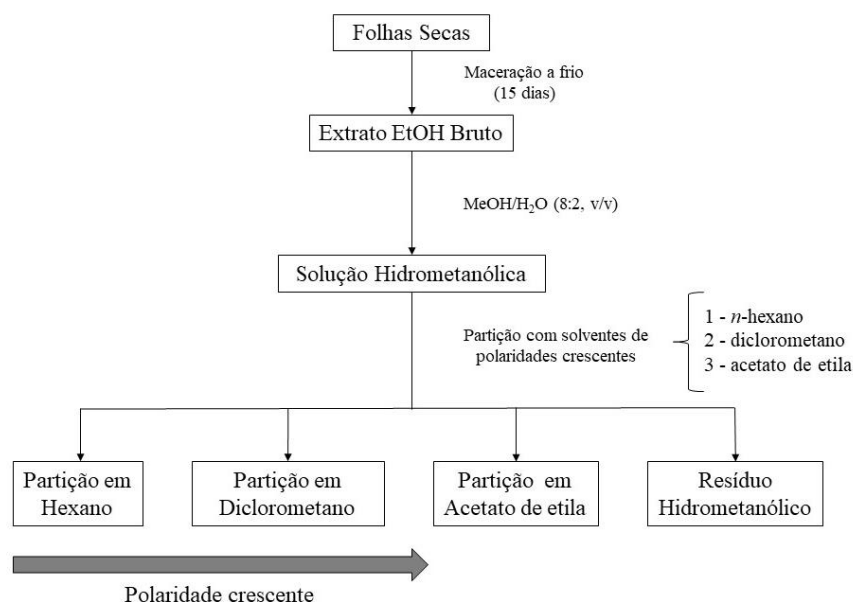


Figura 2. Fluxograma representativo da partição líquido-líquido dos EEs com solventes de polaridades crescentes.

2.5 Análise do perfil cromatográfico dos EEs e partições por CLAE-DAD

A análise do perfil cromatográfico dos EEs e partições foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo.

Alíquotas de 1 mL dos EEs [5 mg/mL] de plantas masculinas e femininas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica e das partições [1 mg/mL] obtidas de plantas femininas provenientes da Mata Atlântica foram solubilizadas em MeOH, filtradas em filtro Millipore (0.45 µm, Merck) e analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD, Agilent 1260 Infinity) para o estabelecimento das condições de fracionamento e purificação. As condições cromatográficas foram: gradiente de eluição de H₂O/MeOH na proporção 30:70 (v/v) a MeOH puro por 60 minutos e mais 15 minutos de MeOH puro, com fluxo de 1 mL/min, detecção em luz ultravioleta nos comprimentos de onda (λ) de 210, 230, 254, 270, 300 e 366 nm em coluna analítica Phenomenex Luna C-18 (250 x 4,6 mm x 5 µm, 100A), com coluna guarda Phenomenex C-18.

2.6 Comparação do perfil cromatográfico das partições em diclorometano por LC-MS/MS

A comparação do perfil químico das partições em diclorometano foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (IQAr-UNESP), pela Dr^a Juliana Rodrigues, responsável técnica pelo equipamento de LC-MS/MS, sob supervisão da Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani.

As partições em diclorometano do EE das plantas femininas provenientes do Cerrado e da Mata Atlântica foram submetidas a um clean-up em cartuchos de C-18 (5mL) com MeOH 95%, secas em speed vac e pesadas em balança analítica. As amostras foram solubilizadas à concentração de 1 mg/mL em MeOH/H₂O (1:1, v/v) e centrifugadas a 10 rpm por 5 min. Foi aplicado 1 µL de cada amostra no LC-MS/MS (Bruker Amazon SL, Shimadzu LC-20AD Prominence Liquid Chromatograph, SIL – 20A HT Prominence Auto Sampler), primeiramente no modo alternado (+/-), para selecionar o modo mais adequado de análise das partições, em seguida no modo positivo, para realizar a fragmentação (MS/MS) ao longo de todo o cromatograma. Foi utilizado o mesmo gradiente de eluição aplicado para a análise dos EEs e partições no CLAE-DAD: H₂O:MeOH na proporção 30:70 v/v a MeOH puro por 60 minutos e mais 6 minutos de MeOH puro, com fluxo de 1 mL/min, em coluna analítica Phenomenex Luna C-18 (250 x 4.6 mm x 5 µm, 100A). Os cromatogramas foram tratados no programa Data Analysis e os espectros de massas com fragmentação em MS/MS foram selecionados para a comparação dos perfis químicos das partições.

2.7 Fracionamento em coluna cromatográfica de topo aberto da partição em diclorometano de plantas femininas provenientes da Mata Atlântica

O fracionamento da partição em diclorometano foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

O resíduo da partição em diclorometano (12 g) do EE de plantas femininas provenientes da Mata Atlântica foi ressuspendido em 100% CH₂Cl₂ (50 mL) e aplicado sobre a sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm Merck, 70 – 230 mesh ASTM) ativada e equilibrada em 100% CH₂Cl₂, obedecendo a proporção de 1 g de amostra para cada 20 g de sílica gel, em coluna de vidro de topo aberto (4 cm de diâmetro x 65 cm de altura). Foram utilizados 580 mL para cada sistema de solventes CH₂Cl₂ (Carlo Erba), AcOEt (JT Baker) e MeOH (Merck),

equivalente ao volume de solvente contido em 46 cm de altura de sílica gel empacotada, e foram coletadas 9 frações de cada sistema de solventes, perfazendo um total de 128 frações de aproximadamente 60 mL cada (**Tabela 2**). Todas as frações foram concentradas em evaporador rotatório, secas em temperatura ambiente até evaporação completa do solvente e pesadas em balança analítica para o cálculo da massa seca de cada fração (mg).

Tabela 2. Sistema de solventes utilizado na coluna de topo aberto para o fracionamento da partição em diclorometano das plantas femininas da Mata Atlântica.

Código	Eluente
T01 - T09	CH ₂ Cl ₂ 100 %
T10 - T18	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (9:1)
T19 - T27	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (8:2)
T28 - T36	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (7:3)
T37 - T45	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (6:4)
T46 - T54	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (4:6)
T55 - T63	CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (2:8)
T64 - T72	AcOEt 100 %
T73 - T81	AcOEt / MeOH (9:1)
T82 - T90	AcOEt / MeOH (8:2)
T91 - T99	AcOEt / MeOH (7:3)
T100 - T107	AcOEt / MeOH (6:4)
T108 - T116	AcOEt / MeOH (4:6)
T117 - T125	AcOEt / MeOH (2:8)
T126 - T128	MeOH 100 %

2.8 Análise do perfil cromatográfico das frações por CLAE-DAD

A análise do perfil cromatográfico das frações foi realizada no Núcleo de Pesquisa em Plantas Ornamentais do Instituto de Botânica de São Paulo.

Alíquotas de 500 µL de cada uma das 128 frações obtidas foram solubilizadas em MeOH [1 mg/mL], filtradas em filtro Millipore (0,45 µm) e analisadas por CLAE-DAD (Agilent 1260 Infinity). Foi utilizado o mesmo gradiente de eluição aplicado para a análise dos EEs e partições: H₂O:MeOH na proporção 30:70 v/v a MeOH puro por 60 minutos e mais 6 minutos de MeOH puro, com fluxo de 1 mL/min, detecção em luz ultravioleta nos comprimentos de onda (λ) de 210, 220, 230, 240, 254, 260, 280, 300 e 366 nm, em coluna analítica Phenomenex Luna C-18 (250 x 4.6 mm x 5 µm, 100A), com coluna guarda

Phenomenex C-18. O perfil químico de todas as frações foi comparado ao da partição em diclorometano.

2.9 Isolamento de substâncias puras por CLAE semi-preparativo

O isolamento de substâncias puras por CLAE semi-preparativo foi realizado no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (IQAr-UNESP), com o acompanhamento da Dr^a Juliana Rodrigues, responsável técnica pelos equipamentos de CLAE semi-preparativos, sob supervisão da Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani.

As frações mais puras, de acordo com o perfil cromatográfico analisado por CLAE-DAD, foram selecionadas para purificação por CLAE semi-preparativo, em coluna semi-preparativa Phenomenex Luna C-18 (150 x 21,2 mm x 5 µm, 100A), com os seguintes equipamentos:

- Equipamento 1: HPLC Analítico/Preparativo, marca Shimadzu, equipado com duas bombas LC-6AD, degasser DGU-20A5R, detector de Arranjo de Diodo SPD-M20A, Controladora CBM-20A e injetor manual Rheodyne 7725.
- Equipamento 2: HPLC Preparativo, marca Shimadzu, equipado com duas bombas LC-8A, detector de Arranjo de Diodo SPD-10AVP, Controladora SCL-10AVP e injetor automático SIL-10AF.

Para tanto, as frações foram submetidas a um clean-up em cartuchos de C-18 (5mL) com MeOH 95%, secas em speed vac, ressuspensas em MeOH/H₂O (10% acima da concentração de MeOH em que o pico de interesse foi detectado no perfil analítico) e filtradas em filtro Millipore (0,2 µm). Foram injetados de 0,5 a 1,2 mL das frações, quantas vezes foram necessárias, utilizando gradiente de eluição isocrático de MeOH/H₂O (8% abaixo da concentração de MeOH em que o pico de interesse foi detectado no perfil analítico), por tempo variável (de acordo com os testes analíticos realizados para cada fração), com fluxo de 10 mL/min e detecção em luz ultravioleta nos comprimentos de onda adequados para cada fração (**tabela 3**). As alíquotas correspondentes às substâncias isoladas foram secas em speed vac e pesadas em balança analítica para o cálculo do rendimento (%), enquanto que os resíduos anteriores e posteriores ao material isolado foram evaporados em evaporador rotatório, liofilizados e guardados.

Tabela 3. Condições de preparo e análise por CLAE analítica e semi-preparativa para a purificação da partição em diclorometano do EE de folhas femininas de *H. brasiliense* proveniente da Mata Atlântica.

Fração de origem		CLAE Preparativo ^b					
		CLAE Analítico ^a	λ UV (nm)	Solvente de preparo da amostra	Número e volume de injeções (μL)	Método (rampa)	
						Tempo (min)	MeOH (%)
T12	75 % MeOH	220	68 % MeOH	1 injeção de 200	0	62	
				2 injeções de 500	40	62	
	88 % MeOH			45	76		
				65	76		
				67	100		
				77	100		
T14-15	70 % MeOH	220	68 % MeOH	1 injeção de 500	0	62	
				3 injeções de 700	40	62	
				42	100		
				52	100		
T17	88 % MeOH	254	86 % MeOH	1 injeção de 500	30	78	
				3 injeções de 700	32	78	
				42	100		
				44	100		
Cont.							
Cont.							
Fração de origem		CLAE Preparativo ^b					
		CLAE Analítico ^a	λ UV (nm)	Solvente de preparo da amostra	Número e volume de injeções (μL)	Método (rampa)	
						Tempo (min)	MeOH (%)
T20-21	70 % MeOH	300	66 % MeOH	1 injeção de 500	0	62	
				3 injeções de 700	25	62	
					27	100	
					37	100	
T27	60 % MeOH	220 / 254	57 % MeOH	3 injeções de 500	0	52	
				1 injeção de 700	30	52	
					32	100	

			42	100
T31-35	64 % MeOH	1 injeção de 500	0	56
		4 injeções de 1000	30	56
	230 / 320 62 % MeOH		32	100
			42	100
T45	55 % MeOH	2 injeções de 500	0	46
		1 injeção de 1000	25	46
			27	76
	210 / 230 51 % MeOH		47	76
			49	100
			59	100
T56-61	42 % MeOH	1 injeção de 500	0	34
		3 injeções de 1000	25	34
	240 / 254 37 % MeOH		27	100
			37	100

^a: proporção de MeOH no eluente do CLAE analítico, no momento da detecção do pico majoritário; ^b: condições para isolamento do(s) pico(s) majoritário(s) no CLAE semi-preparativo.

2.10 Análises químicas das substâncias isoladas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI-QqTOF-MS)

As análises químicas foram realizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista de Araraquara (IQAr-UNESP), pelo Dr. Nivaldo Boralle, responsável técnico pelo equipamento de RMN, e pelo MSc. João Luiz Bronzel Junior, responsável técnico pelo equipamento de EMAR, sob supervisão da Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani.

Para a realização das análises homo- e heteronucleares de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (¹H e ¹³C-RMN, Bruker Ascend 600 MHz), as substâncias isoladas foram solubilizadas em 200 µL de clorofórmio deuterado sem TMS (CDCl₃, Sigma), à concentração máxima de 3 mg/mL, e transferidas para tubos de vidro de 3 mm. Todas as linhas de base dos espectros foram ajustadas e os deslocamentos químicos referenciados pelo sinal do solvente (δ_C ppm CDCl₃ em 77.0 e δ_H ppm CDCl₃ em 7.20) no programa MNova NMR (Mestre Lab Research).

Para a realização das análises de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (Espectrômetro de Massas Bruker QqTOF Maxis Impact), as substâncias isoladas foram secas e solubilizadas à concentração de 4 mg/mL em MeOH (Merck), 0,5 µL deste foi dissolvido em 1 mL de MeOH/H₂O (1:1) e ácido fórmico 0,1%, obtendo-se uma concentração final de 2 ppm. As amostras foram aplicadas por infusão direta contínua, durante o período de coleta dos dados dos espectros de massas e fragmentação. Os espectros de massas obtidos (ESI-QqTOF-MS) foram analisados no programa Compass Data Analysis 4.1 para a obtenção das fórmulas moleculares e valores de massas de alta resolução e sugestões de estruturas foram obtidas na base de dados Compound Crawler.

2.11 Atividades biológicas

2.11.1 Ensaio da atividade antifúngica por bioautografia

O ensaio antifúngico por bioautografia direta foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo.

Os fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* Penz (CCIBt 491) e *C. cladosporioides* Fresen de Vries (CCIBt140) foram utilizados como reveladores no bioensaio de detecção de substâncias fungitóxicas. Para a obtenção das culturas, os fungos foram mantidos em placas de Petri com meio de cultura batata – dextrose – ágar (BDA), incubadas a 24°C, no escuro, por 14 dias. As suspensões de esporos dos fungos foram extraídas em solução de sais e glicose (6:1, v/v) e armazenadas em freezer (-20 °C).

Os EEs, partições, frações e substâncias isoladas de *H. brasiliense* foram submetidos ao ensaio antifúngico por bioautografia, para detecção do potencial antifúngico das amostras.

Para avaliar o potencial antifúngico dos EEs e das partições, 400 µg dos EEs solubilizados em 10 µL de MeOH e 200 µg das partições solubilizadas em 10 µL de clorofórmio (CHCl₃) ou MeOH foram aplicados em cromatoplasas de sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) e submetidos a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), com o eluente Clorofórmio/Acetona (6:1). Para avaliar o potencial antifúngico das 128 frações obtidas, 100 µg de cada fração foram solubilizados em 10 µL de CHCl₃ ou MeOH e aplicados em cromatoplasas de sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck), em spot único, para seleção das mais bioativas. As frações que apresentaram atividade mais forte foram aplicadas novamente (100

µg) e submetidas a CCD, desenvolvida em CHCl₃/MeOH (98:2), para separação e detecção das substâncias bioativas. Para avaliar o potencial antifúngico das substâncias isoladas, 100 µg de cada substância foram solubilizados em 10 µL de CHCl₃ e submetidas a CCD, desenvolvida em CHCl₃/MeOH (98:2), para detecção das substâncias bioativas.

Após a eliminação completa dos solventes, as cromatoplasmas foram fotografadas em sistema CAMAG sob luz visível e nos comprimentos de onda de 254 nm (UV curto) e 366 nm (UV longo), nebulizadas com as suspensões de esporos (5×10^7 esporos/mL) dos fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, separadamente, e incubadas em câmara úmida a 27°C, no escuro, por 48 horas (Homans & Fuchs 1970).

Ácido cinâmico (5 µg), timol (5 µg) e nistatina (5 µg) foram utilizados como controles positivos. Halos claros em um fundo de coloração escura indicaram a inibição do crescimento dos fungos.

2.11.2 Ensaio da atividade antifúngica por microdiluição em caldo

O ensaio antifúngico por microdiluição em caldo foi realizado no Laboratório de Extrações da Universidade Paulista (UNIP), pela Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

As técnicas utilizadas foram descritas anteriormente (Suffredini *et al.* 2004; Younes *et al.* 2007). A avaliação da atividade antifúngica foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo. Os EEs e partições em hexano e em diclorometano foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 400 µg/mL e diluídas 20 vezes no ensaio da microdiluição em caldo (Sabouraud Dextrose Caldo, Oxoid). A suspensão leveduriforme foi preparada a 0,5 MacFarland, em meio Sabouraud Dextrose Caldo. A avaliação foi feita visualmente, através da análise de turbidez. A levedura utilizada foi *Candida albicans* (ATCC 10231). Os extratos que apresentaram inibição de crescimento leveduriforme visual foram submetidos à subcultura em Sabouraud Dextrose Agar, para confirmação de crescimento microbiano. Os extratos que apresentaram meio límpido e sem crescimento na subcultura, foram submetidos à análise da CIM (concentração inibitória mínima) e da CFM (concentração fungicida mínima), sendo que a classificação de CIM refere-se à menor concentração na qual se observa meio límpido e CFM, a menor concentração na qual se observa meio límpido sem crescimento na subcultura. O padrão antifúngico utilizado foi a nistatina.

2.11.3 Ensaio da atividade antibacteriana por microdiluição em caldo

O ensaio antibacteriano foi realizado no Laboratório de Extrações da Universidade Paulista (UNIP), pela Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

As técnicas utilizadas foram descritas anteriormente (Suffredini *et al.* 2004; Younes *et al.* 2007). A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo. Os EEs e partições em hexano e em diclorometano foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 400 µg/mL e diluídas 20 vezes no ensaio da microdiluição em caldo (Müller-Hinton caldo, Oxoid). A suspensão bacteriana foi preparada a 0,5 MacFarland, em meio Müeller-Hinton Caldo. A avaliação foi feita visualmente, através da análise de turbidez. As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Os extratos que apresentaram inibição de crescimento bacteriano visual foram submetidos à subcultura em Müller-Hinton Agar, para confirmação de crescimento microbiano. Os extratos que apresentaram meio límpido e sem crescimento na subcultura, foram submetidos à análise da CIM (concentração inibitória mínima) e da CBM (concentração bactericida mínima), sendo que a classificação de CIM refere-se à menor concentração na qual se observa meio límpido e CBM, a menor concentração na qual se observa meio límpido sem crescimento na subcultura. O padrão antibacteriano utilizado foi o digluconato de clorexidina.

2.11.4 Ensaio da atividade citotóxica frente a linhagens celulares tumorais humanas

O ensaio citotóxico foi realizado no Laboratório de Extrações da Universidade Paulista (UNIP), pela Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini.

A atividade citotóxica dos EEs e partições em hexano e em diclorometano foi testada em linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e de câncer de próstata (PC-3) (Suffredini *et al.* 2006 e 2007). Os EEs e partições em hexano e em diclorometano foram solubilizados em DMSO na concentração de 400 µg/mL. As linhagens celulares foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino (10 %), glutamina (2 mM), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina 100 U/mL, a 37 °C com 5 % de CO². As células foram colocadas em microplacas de 96 cavidades (0.3 x 10⁶ células/cavidade

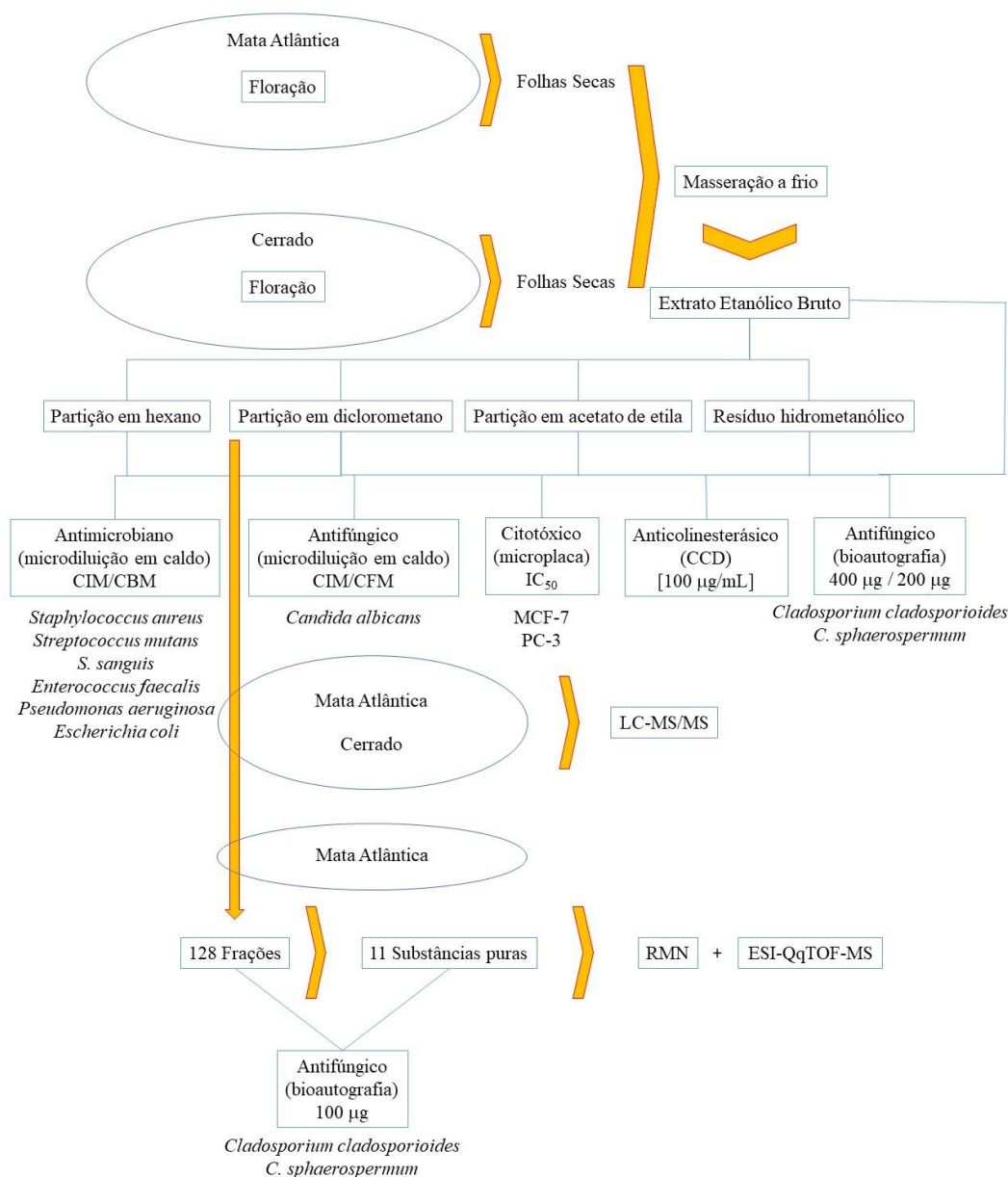
em 100 μL de meio). Após 24 h, as amostras (2.5×10^{-1} a 2.5×10^{-5} $\mu\text{L/mL}$) foram dissolvidas em meio RPMI, adicionadas em cada cavidade e incubadas por 72 h, em 6 replicatas de cada amostra. Grupos controle receberam o mesmo volume de meio RPMI. O crescimento da célula tumoral foi quantificado pelo método MTT (Mosmann 1983). Os resultados da atividade citotóxica foram apresentados como porcentagem de redução do corante em relação ao controle (doxorrubicina), em leitor de Elisa ao comprimento de onda de 550 nm. Foram calculados os valores de IC_{50} de todas as amostras testadas, com o cálculo da média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelo método de análise de variância (ANOVA) de uma via e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$ entre as amostras analisadas.

2.11.5 Ensaio da atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

O ensaio da atividade anticolinesterásica foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica de São Paulo. Os EEs e partições foram solubilizados em MeOH na concentração de 20 e 10 mg/mL, respectivamente. Alíquotas de 10 μL de cada amostra de EE (200 μg) e partição (100 μg) foram analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) de sílica gel 60 F_{254} (0,2 mm, Merck). Como controle positivo foi utilizada fisostigmina (0,05 μg) solubilizada em MeOH.

As placas cromatográficas dos EEs e partições foram eluídas com a fase móvel CHCl_3 :Acetona (6:1). Após o desenvolvimento da placa cromatográfica, a mesma foi observada em λ 254 nm e 366 nm e fotografada em sistema CAMAG. Em seguida, borrifada com uma solução de enzima acetilcolinesterase (6,66 U) acrescida de albumina bovina fração V (0,1%). Logo após, a placa cromatográfica foi 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). Após este procedimento, a coloração roxa foi observada em aproximadamente 2 minutos. A detecção de manchas brancas sobre um fundo de coloração roxa indicou inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. Os valores de R_f (fator de retenção) foram calculados onde houve inibição da reação enzimática, ou seja, presença de halos de cor branca indicadores de inibição da acetilcolinesterase.

2.12 Delineamento Experimental



2.13 Expressão dos Resultados

Os resultados dos ensaios biológicos em CCD foram expressos como valores de R_f (fator de referência) dos halos de cor branca indicadores de atividade inibidora da acetilcolinesterase ou halos de inibição do crescimento dos fungos filamentosos.

Os resultados quantitativos das atividades biológicas *in vitro* foram representados como médias $\pm$ erro padrão das médias. A porcentagem de inibição foi calculada

comparando-se a reação das amostras analisadas em relação ao controle negativo. Todos os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata.

3 Resultados e Discussão

3.1 Preparação do extrato etanólico bruto (EE)

Foram obtidos quatro extratos etanólicos brutos (EEs) a partir de folhas secas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba (MA ♂ e ♀, Mata Atlântica) e da Reserva Biológica de Mogi Guaçu (CE ♂ e ♀, Cerrado). O rendimento obtido em todas as extrações está descrito na **Tabela 4**.

Tabela 4. Rendimento (%) dos EEs de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica (MA) e do Cerrado (CE); ♂: masculinas; ♀: femininas.

Plantas	Folhas secas em pó (g)		Extrato etanólico bruto (g)		Rendimento (%)	
	MA	CE	MA	CE	MA	CE
♂	1729	317	108,1	18,6	6,3	5,9
♀	1936	389	122,3	22,8	6,3	5,9

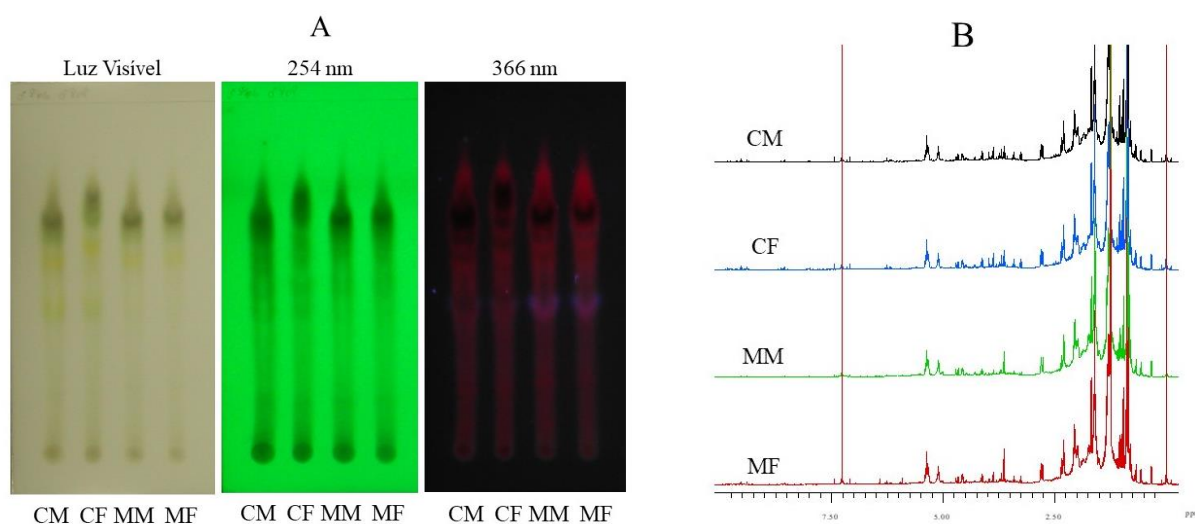
Os rendimentos dos EEs de folhas das plantas masculinas foram iguais aos das femininas nas duas populações, sendo que os EEs de folhas do Cerrado apresentaram rendimento mais baixo, possivelmente devido à maior espessura das folhas devido ao aumento de produção de cera epicuticular, uma característica típica de plantas adaptadas ao clima quente e seco do Cerrado (Scariot *et al.* 2005).

3.2 Comparação dos EEs de plantas masculinas e femininas provenientes de Cerrado e Mata Atlântica por CCD, ACP de ¹H-RMN e bioautografia

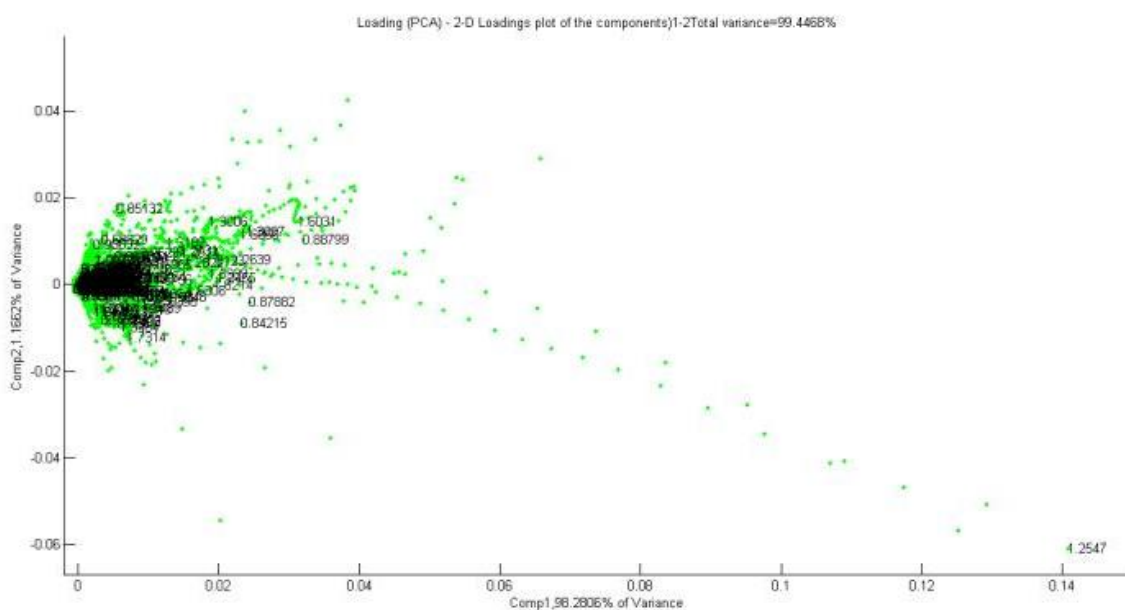
Os EEs de plantas masculinas e femininas provenientes de Cerrado e Mata Atlântica foram comparados quanto à sua composição química por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Análise dos Componentes Principais (ACP) de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H-RMN).

Não foi possível distinguir os EEs de Cerrado e Mata Atlântica apenas pela fluorescência dos extratos sob luz UV nas placas de CCD (**Figura 3-A**).

A análise metabolômica dos EEs por ^1H -RMN, com comparação dos seus espectros por ACP, demonstrou semelhança química entre plantas masculinas e femininas mas discriminou as populações com 98% de variância em CP1, com base nos sinais de deslocamento de ^1H em $\delta = 1.25$ ppm, característico de sinais de cadeias de CH_2 , possivelmente representando o maior teor de ceras epicuticulares das plantas provenientes do Cerrado (**Figuras 3-B, C e D**). O único registro da comparação da composição química de folhas frescas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense*, publicado 2 anos após o início deste projeto, mostrou que esta espécie apresentou perfil de metabólitos secundários semelhante no extrato aquoso (infusão), independentemente do sexo da planta (Amoah *et al.* 2015b).



C



D

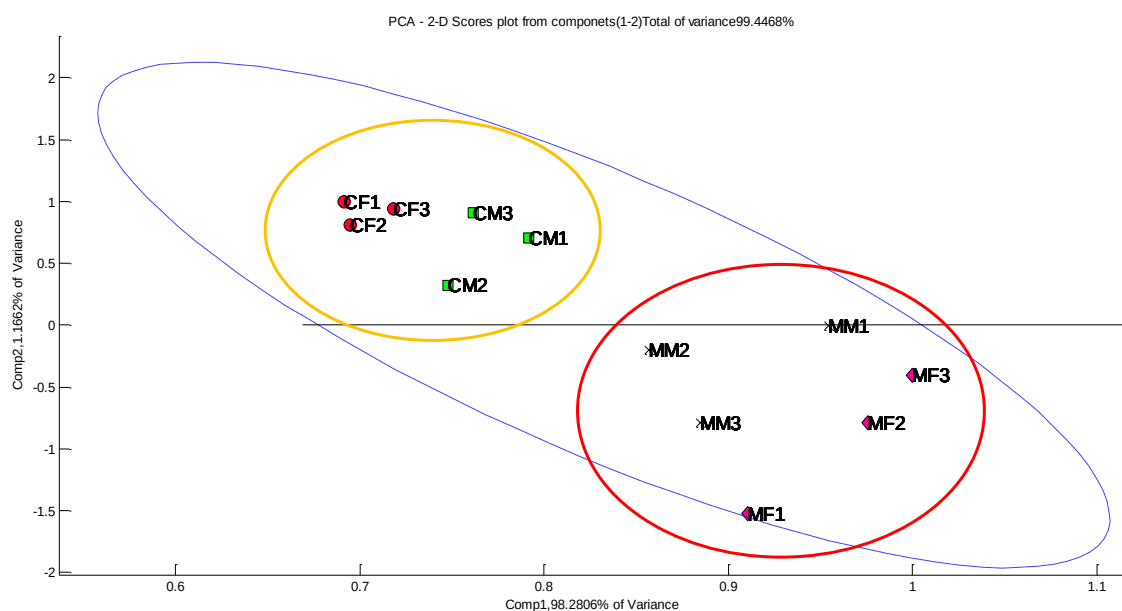


Figura 3. Análises comparativas dos EEs de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes de Mata Atlântica e Cerrado por: A) CCD sob luz visível, UV curto (254 nm) e UV longo (366 nm); B) Espectros de ^1H -RMN (600 MHz, CD_3OD); C) Contribuições 2-D de ACP; e D) Escores 2-D de CP1 x CP2, com variância total explicada de 99,4%. CF – Cerrado

feminino; CM – Cerrado masculino; MF – Mata Atlântica feminino; MM – Mata Atlântica masculino.

Na comparação do potencial antifúngico dos EEs das duas populações, os EEs de plantas masculinas e femininas provenientes da Mata Atlântica apresentaram forte atividade no Rf de 0,53 a 0,67, enquanto que os EEs do Cerrado foram inativos no mesmo Rf (**Figura 4**), reforçando que os EEs de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* são quimicamente similares, mas as condições ambientais em que se desenvolveram as plantas das diferentes populações influenciaram na biossíntese dos metabólitos secundários. Desta forma, o ensaio antifúngico corroborou o resultado obtido pela análise metabolômica por ^1H -RMN e ACP.

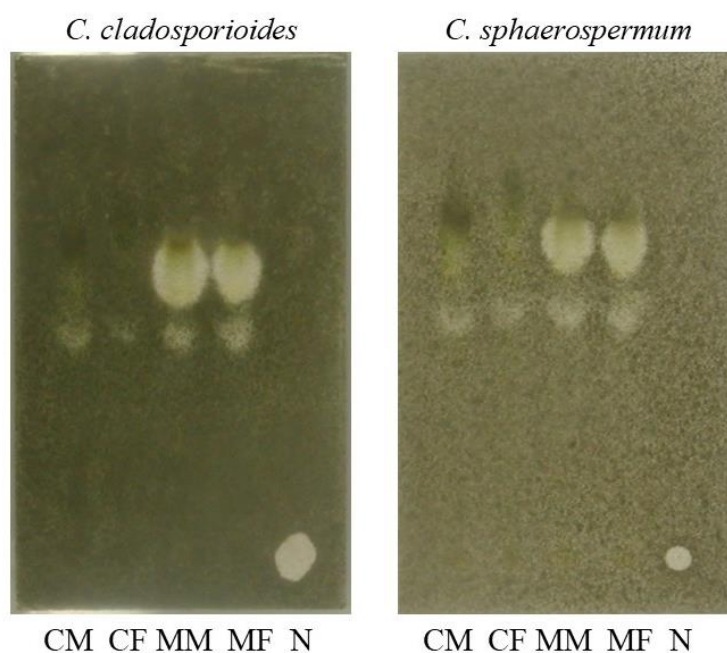


Figura 4. Ensaio antifúngico por bioautografia dos EEs de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes de Cerrado e Mata Atlântica frente aos fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Legenda: CF – Cerrado feminino; CM – Cerrado masculino; MF – Mata Atlântica feminino; MM – Mata Atlântica masculino; N – nistatina.

Uma vez que os EEs de plantas masculinas e femininas apresentaram perfil químico e potencial antifúngico semelhantes e os EEs da Mata Atlântica foram muito mais ativos que os do Cerrado, estes resultados justificaram a seleção do EE de plantas femininas provenientes

da Mata Atlântica para o estudo guiado pela atividade antifúngica até a purificação e identificação das substâncias isoladas.

3.3 Partição dos EEs com solventes de polaridades crescentes e comparação dos perfis químicos por CLAE-DAD

Para reduzir a complexidade dos EEs, separando os componentes por graus de polaridade crescente, foi realizada a partição líquido/líquido com os EEs de plantas masculinas e femininas provenientes da Mata Atlântica, obtendo-se três resíduos de partições (em hexano, em diclorometano e em acetato de etila) e o hidrometanólico, conforme descrito na **Tabela 5**.

Tabela 5. Rendimento dos resíduos das partições obtidos a partir dos EEs de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica.

Partição	Plantas Masculinas		Plantas Femininas	
	Massa (mg)	Rendimento (%)	Massa (mg)	Rendimento (%)
<i>n</i> -hexano	3538,4	35	2896,0	29
diclorometano	4186,6	42	3567,4	36
acetato de etila	461,0	5	265,9	3
resíduo hidrometanólico	446,0	5	515,4	5

Para permitir a comparação do perfil químico das plantas provenientes da Mata Atlântica com as do Cerrado, o EE de plantas femininas provenientes do Cerrado também foi submetido a partição líquido/líquido, conforme descrito na **Tabela 6**. O resíduo hidrometanólico não foi seco pois os liofilizadores do laboratório permaneceram quebrados por um longo período de tempo, mas também pois não eram o foco deste trabalho.

Tabela 6. Rendimento dos resíduos das partições obtidos a partir do EE de folhas de plantas femininas de *H. brasiliense* provenientes do Cerrado.

Partição	Plantas Femininas	
	Massa (mg)	Rendimento (%)
<i>n</i> -hexano	3496,0	35
diclorometano	4640,0	46
acetato de etila	939,4	9
resíduo hidrometanólico	*	*

Legenda: *: valores desconhecidos.

O perfil químico dos extratos e partições provenientes de plantas masculinas e femininas da Mata Atlântica foi comparado pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD) no que diz respeito à análise qualitativa destes com a finalidade de observar se houve segregação dos componentes nas diferentes partições, de acordo com os graus de polaridade crescentes.

A **figura 5** apresenta os cromatogramas dos EEs das plantas masculinas (A) e femininas (B), em que se pode notar perfis semelhantes, com uma variação quantitativa entre os picos principais, corroborando os resultados obtidos neste estudo por ^1H -RMN, CCD e bioautografia, além dos obtidos por Amoah *et al.* (2015b), de que as plantas masculinas e femininas desta espécie sintetizam os mesmos metabólitos secundários. Também foi importante observar que os constituintes menos polares ficaram retidos nas partições em hexano (C e D) e os constituintes de média polaridade, nas partições em diclorometano (E e F), reduzindo a complexidade dessas matrizes para fracionamentos posteriores.

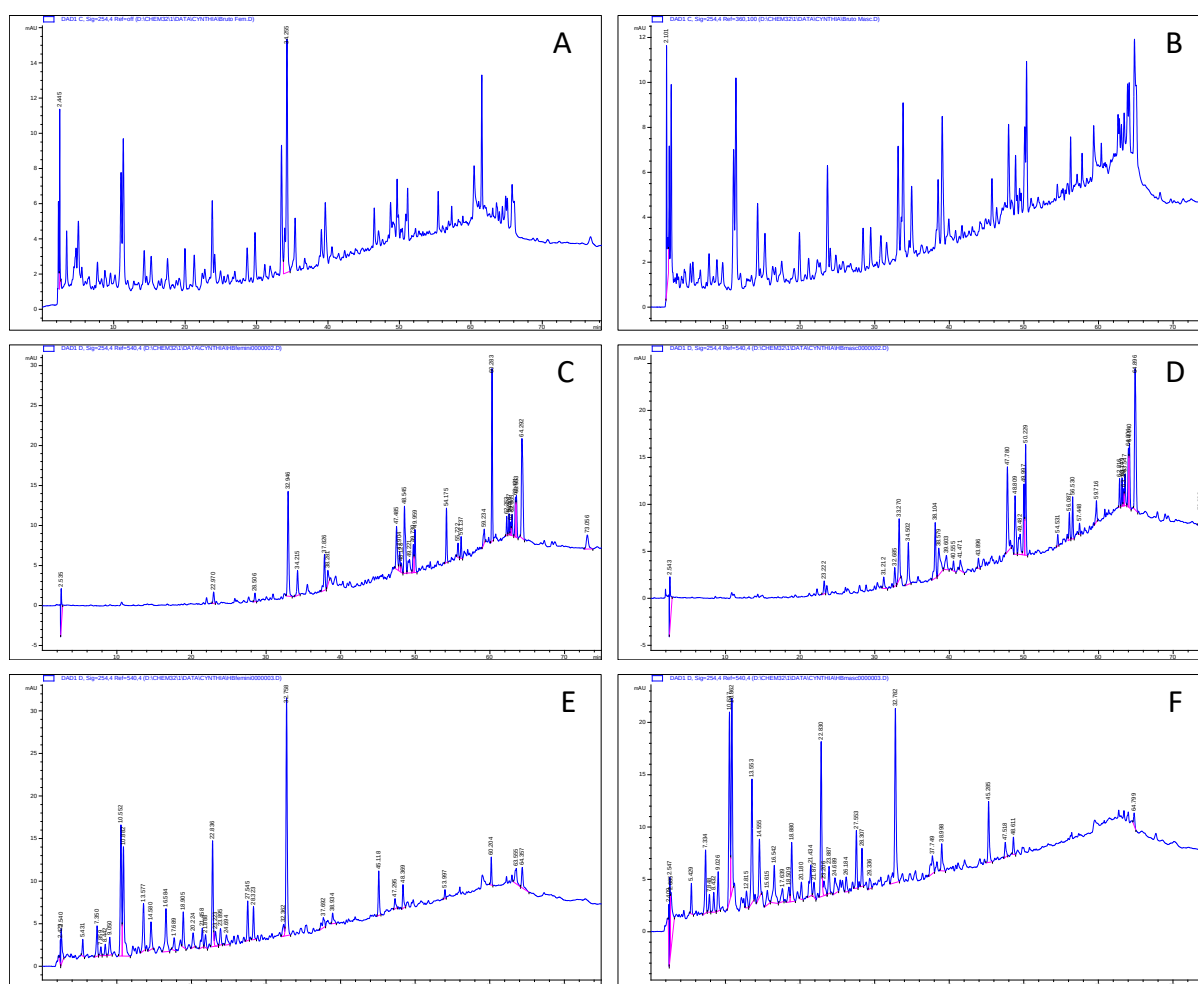


Figura 5. Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos EEs de plantas masculinas e femininas (A e B), partições em hexano (C - masculinas e D - femininas) e em diclorometano (E - masculinas e F - femininas) de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica.

3.4 Ensaio antifúngico por bioautografia dos EEs e partições de plantas provenientes da Mata Atlântica

Para comparar o potencial antifúngico das partições de plantas da Mata Atlântica, bem como selecionar a partição de interesse para o estudo químico bio-guiado, placas de CCD foram reveladas com *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Os EEs e as partições em hexano e em diclorometano, tanto de plantas masculinas como de plantas femininas, apresentaram atividade forte contra os fungos nos mesmos R_f's (entre 0,80 e 0,90), como mostra a **Tabela 7**, comprovando haver semelhança química em relação aos componentes bioativos, independente do gênero da planta. As partições em diclorometano também apresentaram atividade antifúngica nos R_f's 0,50 e 0,67, indicando a presença de outras substâncias bioativas, que apareceram em maior proporção em relação aos EEs. Este resultado direcionou a seleção da partição em diclorometano para o fracionamento e purificação em busca dos componentes antifúngicos das plantas provenientes da Mata Atlântica.

Tabela 7. Resultado do ensaio antifúngico por bioautografia (R_f's) dos EEs e partições de folhas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica contra os fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
♂ extrato bruto	0,82 a 0,90***	0,66* / 0,80 a 0,87***
♂ partição em hexano	0,83 a 0,90***	0,80 a 0,88***
♂ partição em diclorometano	0,67* / 0,82 a 0,90***	0,65* / 0,81* / 0,82 a 0,88***
♂ partição acetato de etila	i	i
♂ partição hidrometanólica	i	i
♀ extrato bruto	0,72*** / 0,81 a 0,89***	0,50* / 0,62 a 0,70***
♀ partição em hexano	0,81 a 0,89***	0,65 a 0,72***
♀ partição em diclorometano	0,67*** / 0,81 a 0,89***	0,50* / 0,70***
♀ partição acetato de etila	i	i

Cont.

Cont.		
Amostra	<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
♀ partição hidrometanólica	i	i
Nistatina	origem***	origem***

Legenda: i = inativo, * = atividade fraca, ** = atividade média, *** = atividade forte

3.5 Comparação do perfil químico das partições em diclorometano dos EEs provenientes de Mata Atlântica e Cerrado por LC-MS/MS

O perfil químico das partições em diclorometano dos EEs provenientes de Mata Atlântica e Cerrado foi comparado por LC-MS/MS. Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD e por LC-MS/MS diferem entre si pelo princípio de cada método. O primeiro apresenta a abundância das substâncias com base na sua absorbância no comprimento de onda UV, por isso somente moléculas cuja estrutura química apresente cromóforos serão detectáveis por este método. O segundo, por sua vez, apresenta a abundância das substâncias com base na sua massa molecular, detectando todas as substâncias presentes na matriz analisada, além de ser capaz de fragmentar as moléculas de interesse, quando possível. Por isso, a comparação dos perfis químicos por LC-MS/MS veio a complementar os dados já obtidos na análise por CLAE-DAD.

Primeiramente, foram excluídos os picos correspondentes à contaminação da coluna utilizada na análise, como mostra a **figura 6**.

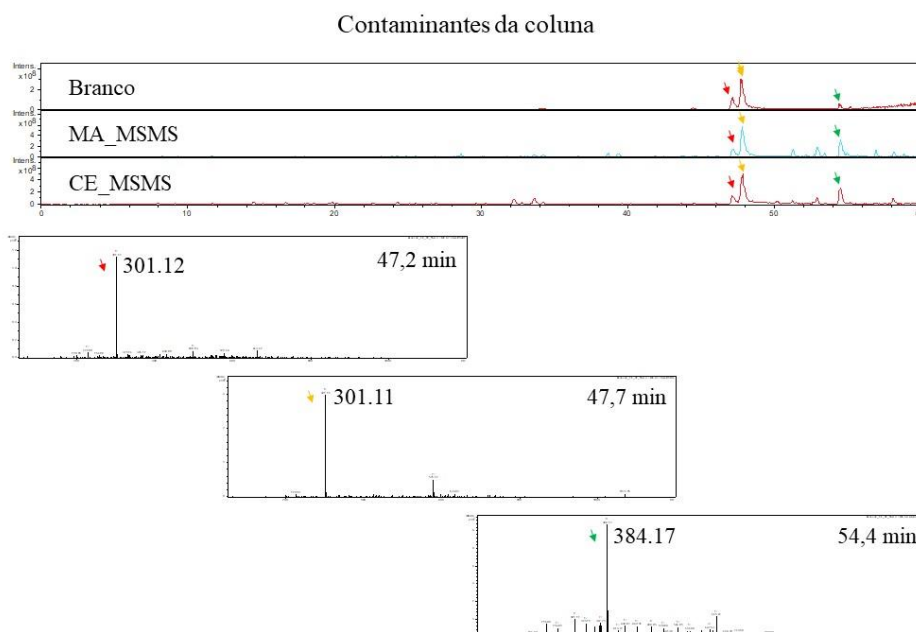
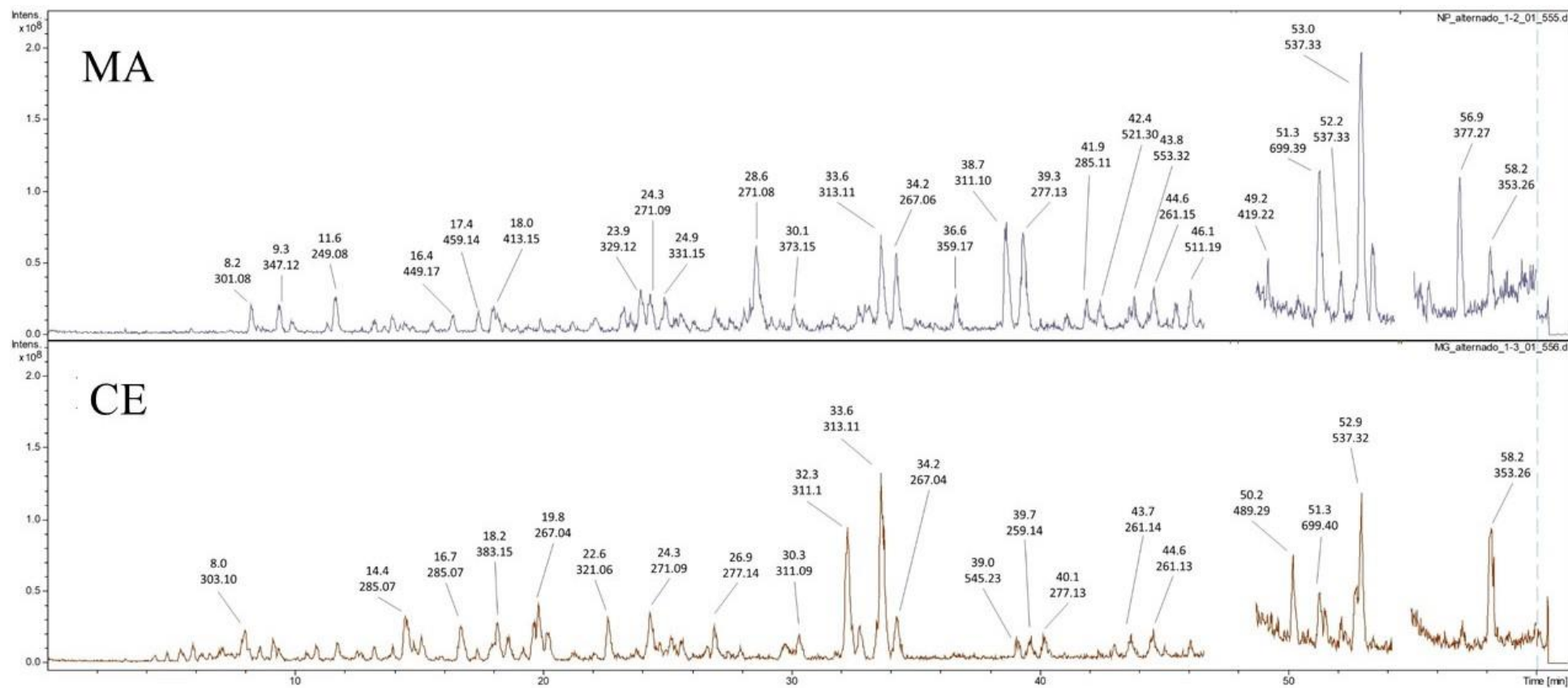


Figura 6. Picos correspondentes à contaminação da coluna, presentes nos cromatogramas do controle negativo (MeOH puro), e das partições em diclorometano de EEs provenientes da Mata Atlântica (MA) e do Cerrado (CE).

A primeira análise das partições foi feita no modo alternado, a fim de verificar o melhor modo (positivo ou negativo) de fragmentação das substâncias presentes nas amostras e para obtenção de picos mais bem definidos nos cromatogramas. Para a fragmentação das massas de todos os picos (MS/MS) foi selecionado o modo positivo. Os picos principais dos perfis químicos das partições foram identificados em cada cromatograma (**Figura 7**).

De um modo geral, foram destacados 27 picos na partição da Mata Atlântica e 21 picos na partição do Cerrado, correspondentes aos componentes mais abundantes detectados pelas suas massas moleculares. Comparando os cromatogramas das partições das duas populações, observou-se 9 picos em comum, com variações quantitativas entre eles: 8.2 min ($m/z = 303.08$), 24.3 min ($m/z = 271.09$), 33.6 min ($m/z = 313.11$), 34.2 min ($m/z = 267.06$), 39.3 min ($m/z = 277.13$), 44.6 min ($m/z = 261.15$), 51.3 min ($m/z = 699.39$), 53.0 min ($m/z = 537.33$) e 58.2 min ($m/z = 353.26$).

Figura 7. Cromatogramas em LC-MS/MS (modo positivo) das partições em diclorometano dos EEs provenientes da Mata Atlântica (MA) e do Cerrado (CE).



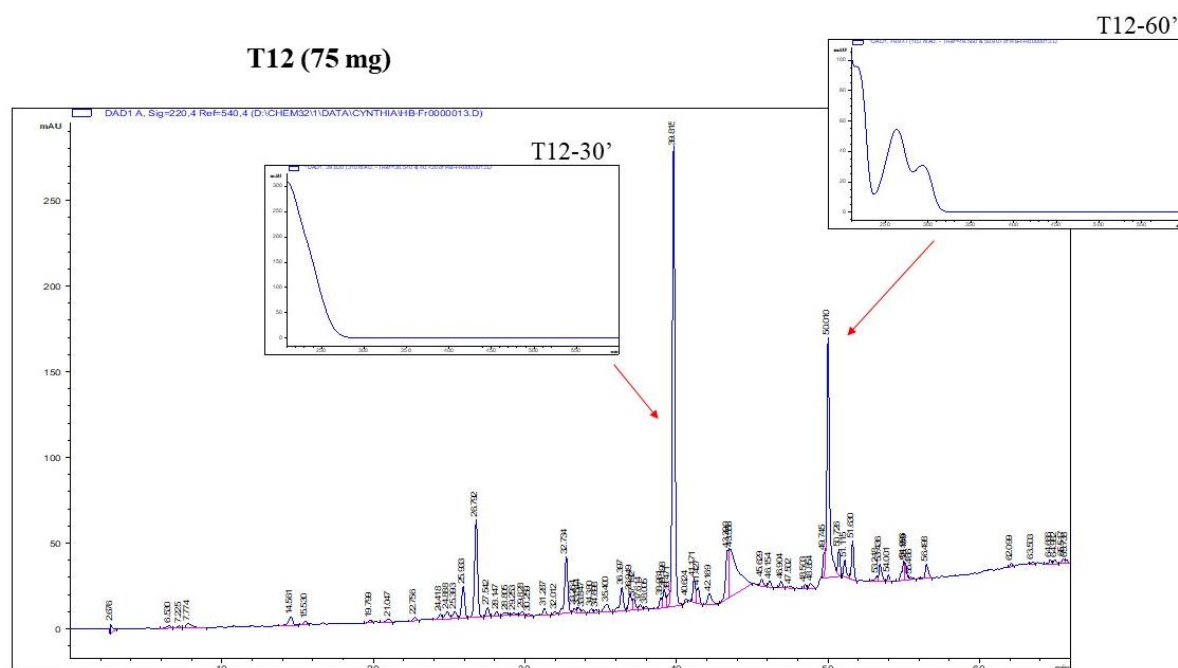
3.6 Fracionamento em coluna de topo aberto da partição em diclorometano de plantas femininas provenientes de Mata Atlântica

O estudo prévio com os EEs e partições de *H. brasiliense* coletados na Mata Atlântica e no Cerrado demonstraram que as plantas provenientes da Mata Atlântica apresentaram maior potencial antifúngico e que, entre elas, plantas masculinas e femininas apresentaram potencial antifúngico semelhante. Além disso, a partição em diclorometano obtida do EE das plantas provenientes da Mata Atlântica se destacou por apresentar fortes halos de inibição dos fungos em diferentes Rf's, por isso foi selecionada para o fracionamento e purificação, em busca das substâncias responsáveis pela atividade antifúngica.

O fracionamento em coluna cromatográfica de topo aberto foi realizado com o objetivo de obter frações mais puras, de modo a facilitar o isolamento das substâncias mais abundantes nestas. Para tanto, foram utilizados 12 g da partição em diclorometano e foram obtidas 128 frações.

3.7 Análise do perfil químico das frações por CLAE-DAD

Para a comparação dos seus perfis químicos, todas as frações foram solubilizadas na concentração de 1 mg/mL em MeOH e analisadas por CLAE-DAD, de modo a reunir as frações semelhantes e selecionar as frações menos complexas, cujos picos majoritários pudessem ser isolados e caracterizados pelos seus espectros de UV. Dessa forma, foram selecionadas as frações T12, T14-15, T17, T20-21, T27, T31-35, T45 e T56-61 de acordo com os seus perfis químicos. As **Figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 15** apresentam os cromatogramas dessas frações, cujos picos foram selecionados para purificação e seus espectros de UV registrados, para fins de comparação. O tempo indicado em cada espectro de UV é ilustrativo do pico isolado no HPLC semi-preparativo. As frações T12 e T45 apresentaram mais de um pico majoritário nos seus cromatogramas, indicando a possibilidade de isolamento de mais de uma substância.



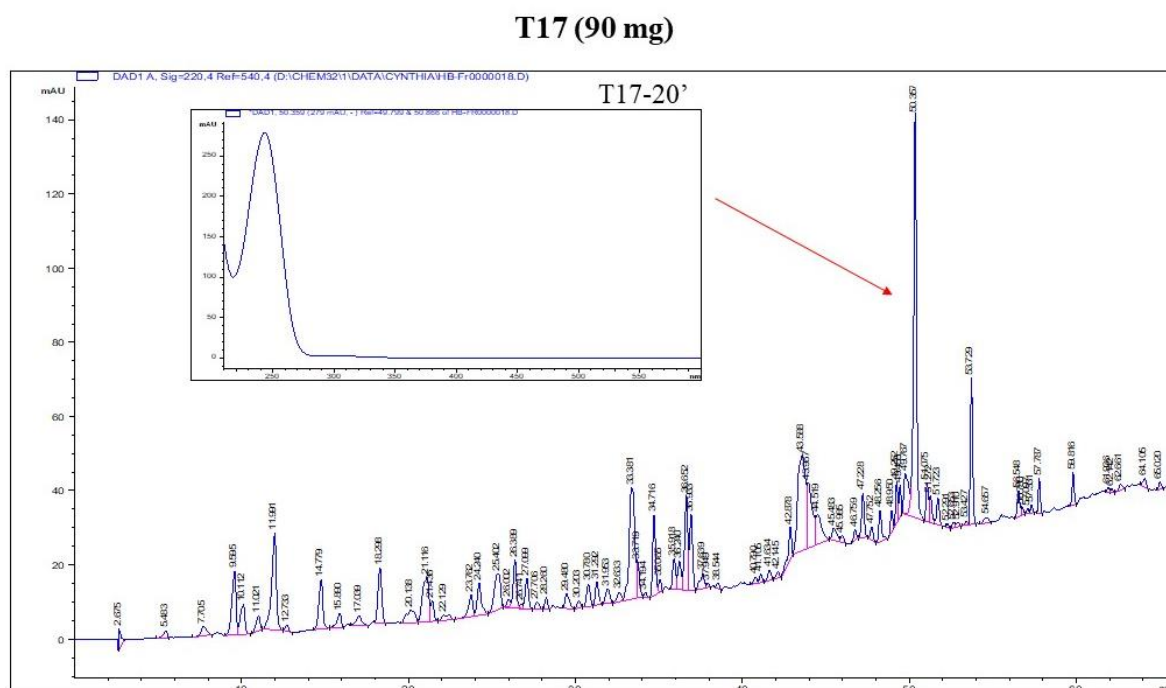


Figura 10. Cromatograma da fração T17 obtida por CLAE-DAD em $\lambda=220$ nm, e espectro de UV do pico majoritário selecionado para purificação.

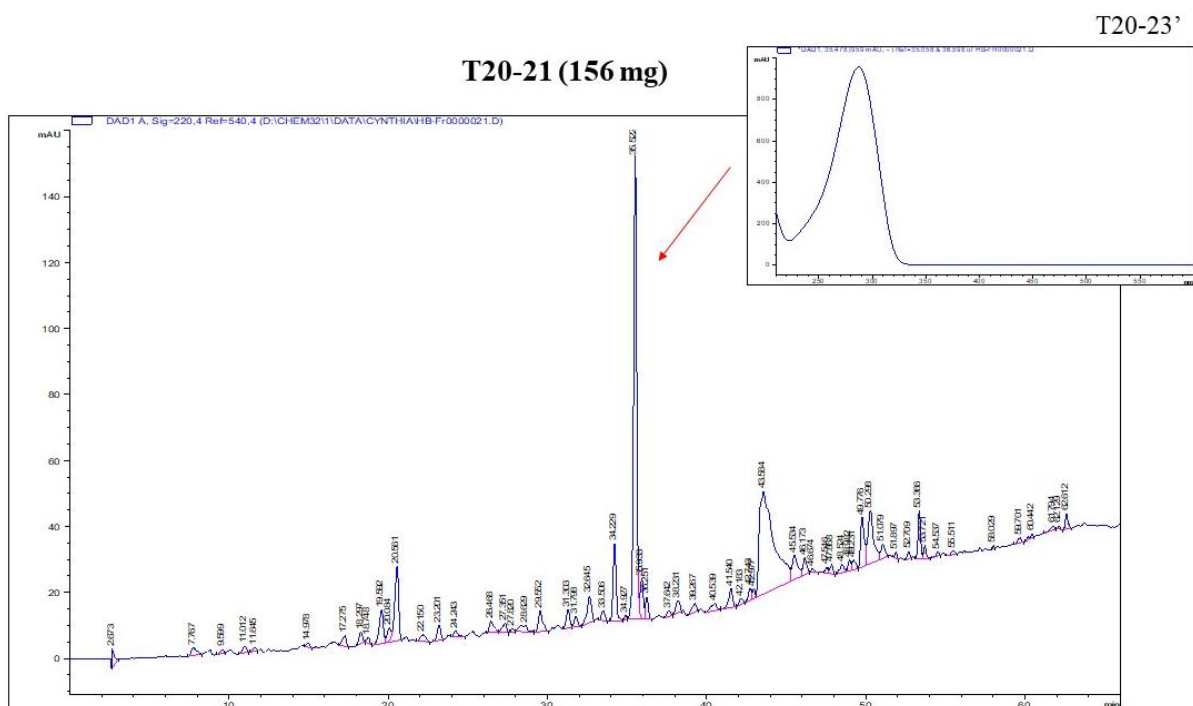


Figura 11. Cromatograma da fração T20-21 obtida por CLAE-DAD em $\lambda=220$ nm, e espectro de UV do pico majoritário selecionado para purificação.

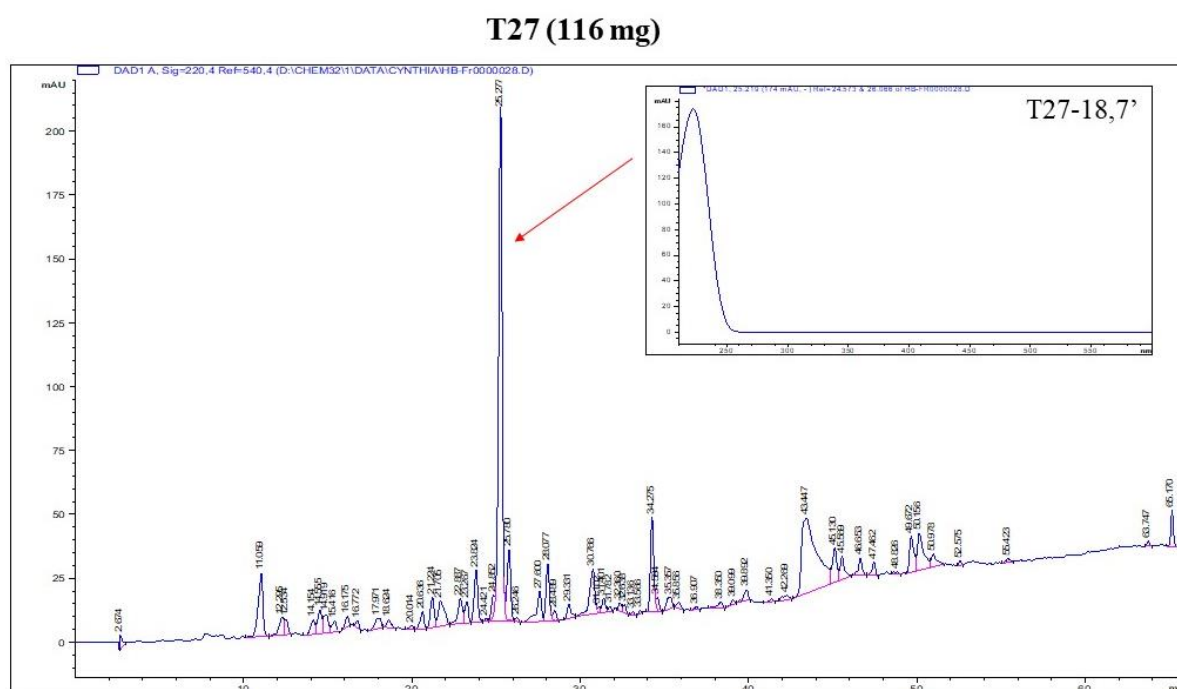


Figura 12. Cromatograma da fração T27 obtida por CLAE-DAD em $\lambda=220$ nm, e espectro de UV do pico majoritário selecionado para purificação.

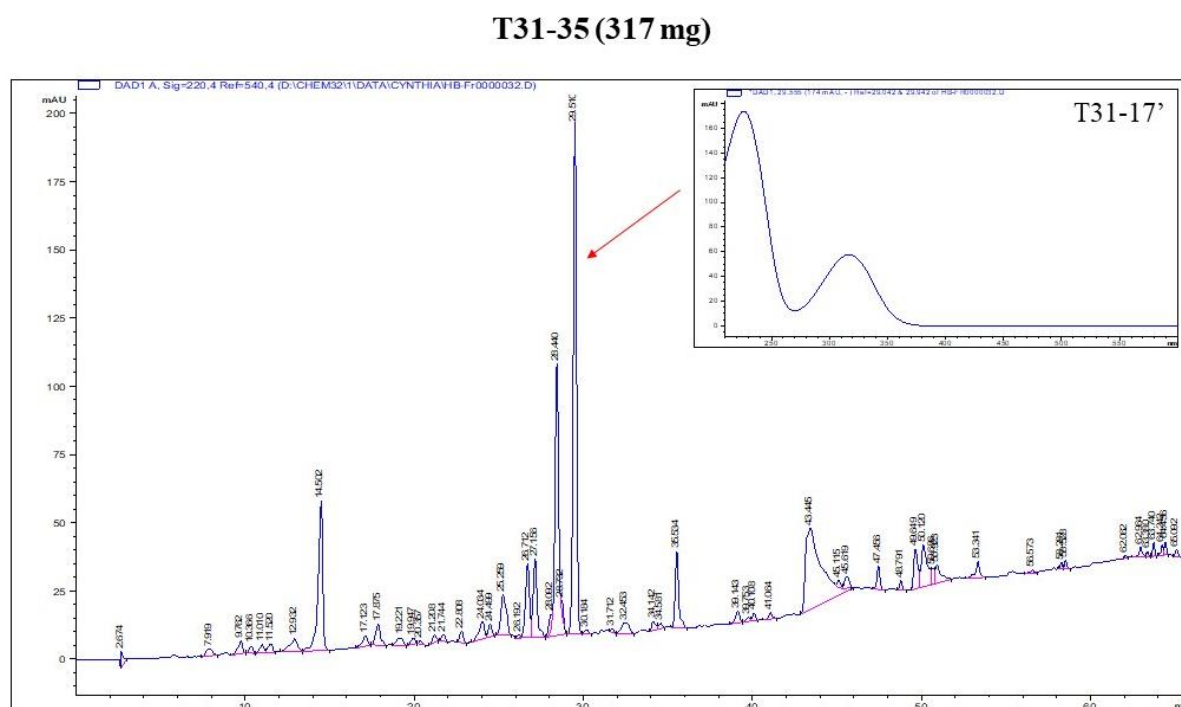


Figura 13. Cromatograma da fração T31-35 obtida por CLAE-DAD em $\lambda=220$ nm, e espectro de UV do pico majoritário selecionado para purificação.

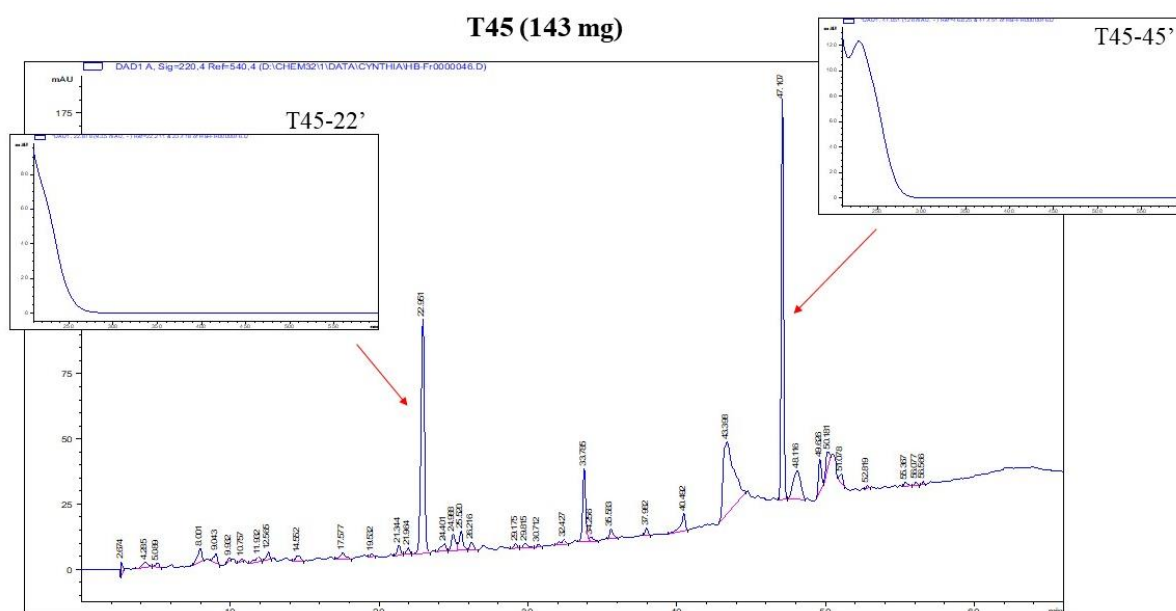


Figura 14. Cromatograma da fração T45 obtido por CLAE-DAD em $\lambda=220$ nm, e espectros de UV dos picos majoritários selecionados para purificação.

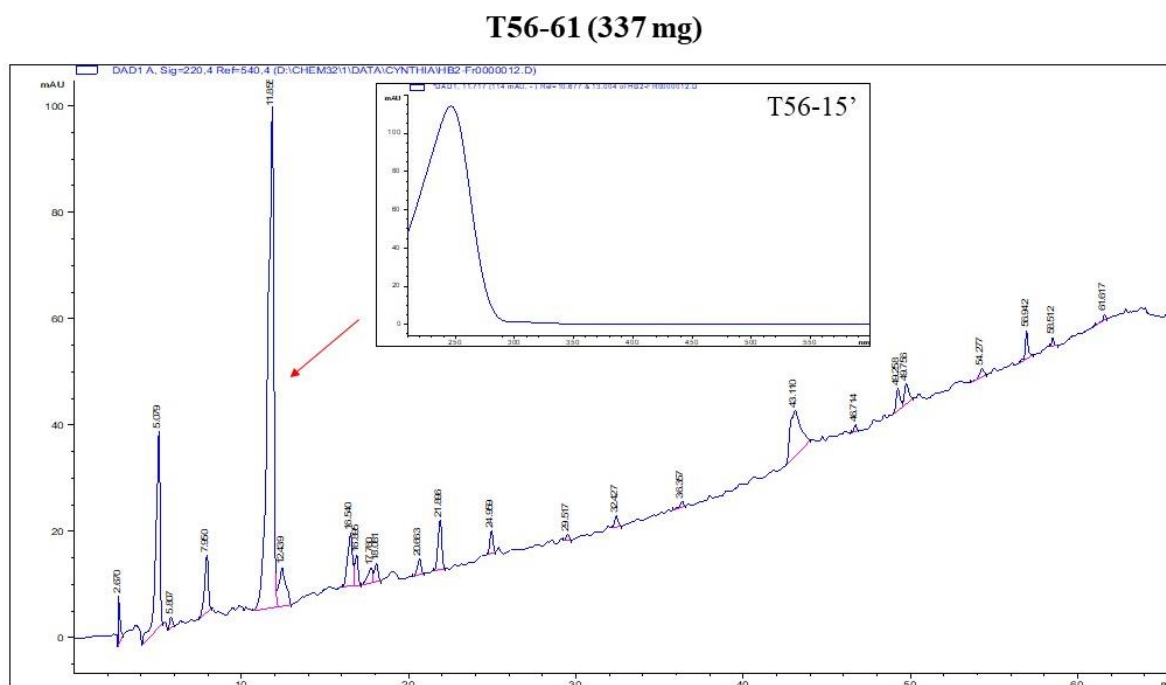


Figura 15. Cromatograma da fração T56-61 obtido por CLAE-DAD em $\lambda=220$ nm, e espectro de UV do pico majoritário selecionado para purificação.

3.8 Ensaio antifúngico por bioautografia das frações

As 128 frações obtidas do resíduo da partição em diclorometano de plantas femininas provenientes de Mata Atlântica foram testadas por bioautografia, em spot único (100 µg), frente aos fungos filamentosos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*, como mostra a **Figura 16**.

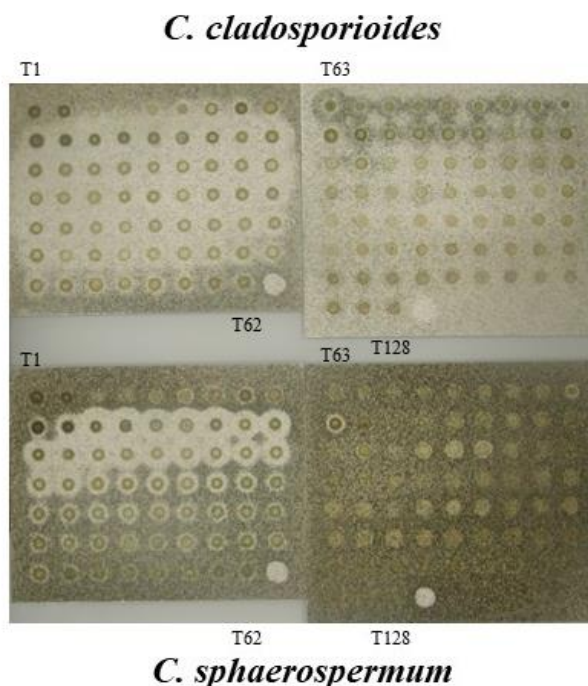


Figura 16. Ensaio antifúngico por bioautografia em spot único (100 µg) das 128 frações obtidas da partição em diclorometano de plantas femininas provenientes da Mata Atlântica frente aos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. As manchas brancas representam os halos de inibição das frações ativas.

As frações que apresentaram atividade antifúngica mais forte (T11 a T40, T72 e T84 a T86) foram aplicadas novamente (100 µg) e desenvolvidas em CHCl₃/MeOH (98:2), para separação das substâncias bioativas. Devido a problemas de contaminação das culturas dos fungos e limitação da quantidade de suspensão de esporos disponível no momento, foi possível realizar a bioautografia somente com o fungo *C. sphaerospermum* e as frações com

perfil cromatográfico semelhante não foram aplicadas, sendo testadas as seguintes frações: T11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 27, 28, 29, 30, 31, 36, 37, 72 e 84.

A **Figura 17** apresenta a comparação do perfil destas frações sob luz ultravioleta curto (254 nm) e longo (366 nm) e o resultado do ensaio antifúngico. Algumas interpretações podem ser sugeridas com relação a este resultado. Algumas substâncias ativas não foram visíveis sob luz UV e podem não ter sido detectadas em CLAE-DAD. Do mesmo modo, substâncias ativas no mesmo Rf apresentaram absorção em comprimentos de onda diferentes, indicando que podem ser quimicamente diferentes. Algumas frações selecionadas para purificação por CLAE-DAD apresentaram forte atividade antifúngica em até quatro Rf's diferentes, mas somente um ou dois picos majoritários, indicando que substâncias minoritárias ativas devem estar presentes nestas frações e poderiam ser purificadas futuramente. Da mesma forma, outras frações de perfil cromatográfico complexo, que dificilmente poderiam ser purificadas por CLAE semi-preparativo, apresentaram forte atividade antifúngica em até quatro Rf's diferentes, indicando potencial para a identificação de substâncias ativas, porém demandariam mais etapas de purificação, como por exemplo cromatografia em camada delgada preparativa e separação das faixas dos Rf's onde se observaram as atividades antifúngicas. Dessa forma, o potencial de descoberta de substâncias diferentes com forte atividade antifúngica é promissor, porém exige muito trabalho experimental.

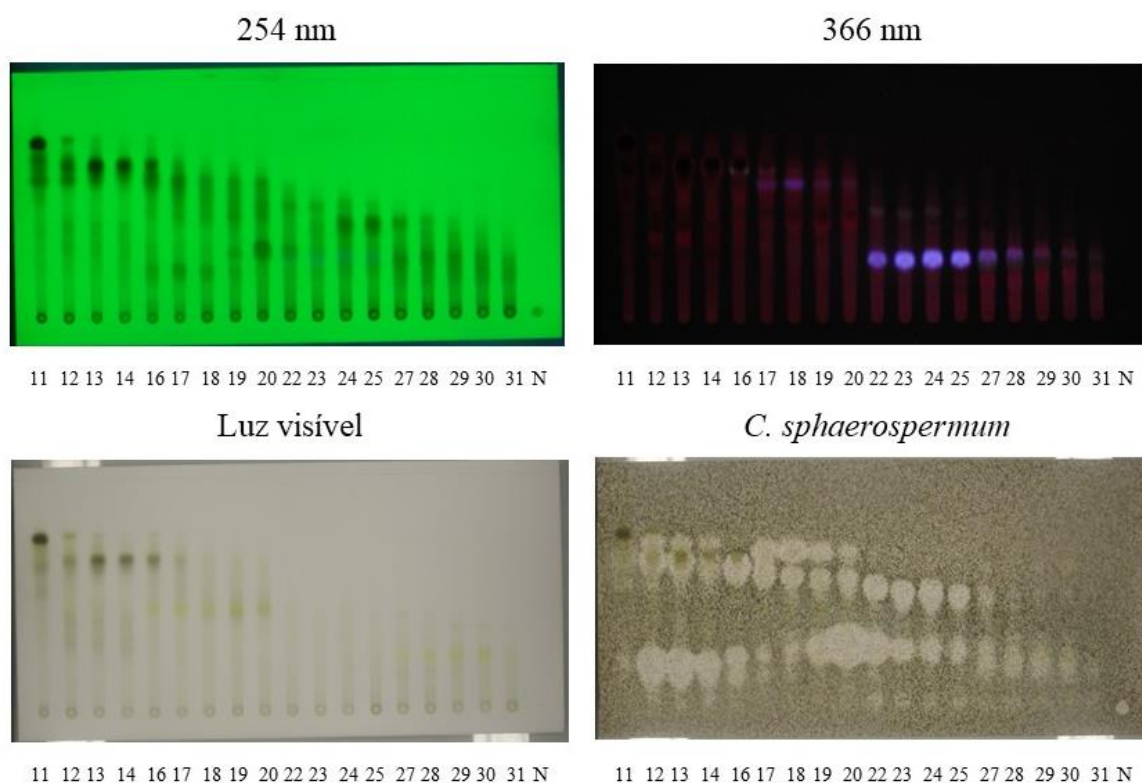


Figura 17. Revelação das placas em UV curto (254 nm) e longo (366 nm) e ensaio antifúngico por bioautografia (100 µg) das frações obtidas da partição em diclorometano do EE de plantas femininas provenientes da Mata Atlântica frente ao fungo *Cladosporium sphaerospermum*.

3.9 Isolamento de substâncias puras de algumas frações por CLAE semi preparativo

A comparação do perfil cromatográfico das frações por CLAE-DAD permitiu a seleção de 8 frações para a purificação dos picos majoritários por CLAE semi-preparativo, das quais 13 substâncias foram isoladas no Laboratório de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara (IQAr-UNESP), conforme descrito na **Tabela 8**.

Algumas frações apresentaram mais de um pico majoritário nos cromatogramas obtidos durante o CLAE semi preparativo, permitindo o isolamento de mais de uma substância, como foram os casos das frações T12, T27, T31-35 e T45.

Tabela 8. Condições cromatográficas para o isolamento das substâncias majoritárias das frações selecionadas e sua identificação.

Fração de origem	Código da substância isolada	Identificação da amostra (#)	Massa (mg)
T12	T12-30'	2	2,5
	T12-62'	3	1,5
T14-15	T14-17'	4	9,2
T17	T17-20'	5	3,2
T20-21	T20-23'	6	6,4
T27	T27-18'	7	0,8
	T27-18,7'	8	2,8
T31-35	T31-17'	9	1,7
	T31-18'	10	5,4
T45	T45-22'	11	2,9
	T45-45'	12	1,4
T56-61	T56-15'	13	10,9

3.10 Análise das substâncias isoladas por Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massas de Alta Resolução

Após o isolamento de 13 substâncias por CLAE semi-preparativo, estas foram imediatamente submetidas à análise por Ressonância Magnética Nuclear para verificar a pureza das amostras. Os espectros de ^1H -RMN nos deram a informação de que as amostras # 1 e 7 estavam impuras, uma vez que apresentavam muitos sinais de hidrogênio de misturas de substâncias, o que inviabilizou o prosseguimento das análises destas.

As demais substâncias isoladas foram submetidas às análises de ^1H e ^{13}C homo- e heteronucleares, mono- e bidimensionais, conforme a complexidade individual de cada amostra, observada no momento das análises pelo técnico de RMN Dr. Nivaldo Boralle. Apenas as amostras # 2, 3, 4 e 5 puderam ser analisadas imediatamente, pois o equipamento Bruker Ascend 600 MHz parou de funcionar neste período e as demais amostras só puderam ser analisadas 5 meses depois, após o reparo do equipamento. Devido ao intervalo de cinco meses entre o isolamento e a análise das substâncias por RMN, as amostras # 6 e 10 sofreram modificação química pois tiveram sua solubilidade em diclorometano alterada para metanol e seus espectros de ^1H -RMN nos deram a informação de que estavam impuras, tornando

inviável o restante das suas análises por RMN. As demais amostras, # 8, 9, 11, 12 e 13, tiveram suas análises homo- e heteronucleares, mono- e bidimensionais analisadas por RMN.

Mesmo assim, todas as amostras consideradas puras pela análise de ^1H -RMN puderam ser analisadas por Espectrometria de Massas de Alta Resolução (ESI-QqTOF-MS) imediatamente após o seu isolamento.

3.11 Determinação estrutural das substâncias isoladas da partição em diclorometano do EE de folhas femininas de H. brasiliense proveniente da Mata Atlântica

Os dados de ESI-QqTOF-MS das substâncias isoladas forneceram as massas de alta resolução e fórmulas moleculares que, por sua vez, indicaram o número de insaturações da molécula. Os dados de ^1H - e ^{13}C -RMN foram extraídos e comparados com dados presentes na literatura. Os espectros de COSY apresentaram os sinais de acoplamento entre os δ_{H} até a distância de 4 ligações. Os espectros de HSQC indicaram acoplamentos entre δ_{C} e δ_{H} , bem como quais deles correspondem a sinais de CH_2 , apresentados sob coloração azul. Os espectros de HMBC mostraram os acoplamentos à distância (J_2 e J_3) dos δ_{H} com os δ_{C} . No caso do sesterterpeno inédito, para melhor distinção dos sinais de δ_{C} dentre os 25 carbonos, o espectro de DEPT 135 indicou os sinais de CH_2 (sinal negativo), CH e CH_3 (sinal positivo). Em alguns casos, para elucidar os sinais de multipletos de H, foram analisados os espectros de TOCSY-1D, que utilizam o princípio da excitação seletiva, uma vez que se irradia em um sinal específico de δ_{H} no espectro e a sequência de pulsos transfere a magnetização do spin excitado para outros spins acoplados no mesmo sistema de spin, que aparecem como sinais com intensidades decrescentes conforme se afastam do sinal irradiado, enquanto que os demais sinais de δ_{H} são desacoplados e desaparecem do espectro. Em outros casos, foram analisados os espectros de NOESY-1D, cujo princípio se baseia na inversão seletiva e depende da proximidade espacial dos prótons através do Efeito Nuclear Overhauser (Nuclear Overhauser Effect - NOE), em que se irradia em um sinal δ_{H} , que aparece invertido no espectro, e os sinais espacialmente próximos aparecem como picos positivos.

A partir destas análises, foi possível identificar as substâncias inéditas hedyosulida (sesterterpeno proposto a partir da cicloadição entre hedyosumina A e mirceno) e vanilato de pinocarvila (éster proposto a partir da esterificação do pinocarveol com o ácido vanílico), os

sesquiterpenos hedyosumina D, 15-acetoxi-isogermafurenolida, linderolida F, neolitacumona B e oxionoseriolida e o bis-nor sesquiterpeno blumenol B. Os resultados que levaram à identificação desses componentes estão descritos a seguir.

3.11.1 Substância # 5 – *hedyosulida*

A substância # 5, proveniente da fração T17-20', apresentou-se na forma de um líquido viscoso amarelo (3,2 mg). O espectro no ultravioleta (UV) mostrou uma banda em 240 nm (**figura 10**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS (**figura 18**) forneceram a fórmula molecular $C_{25}H_{32}O_4$, que requer 10 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 397.2375 $[M+H]^+$ (calculada 397.2379).

Os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, TOCSY 1-D 1.95 e 2.48 ppm e DEPT 135 (**Figuras 19 a 26**) apresentaram sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise de ESI-QqTOF-MS. Os espectros de ^{13}C -RMN e DEPT apresentaram 25 ressonâncias de carbono, compreendendo 4 metílicos (δ_C = 8.9, 25.8, 18.7 e 26.8 ppm de C-14, C-15, C-23 e C-24, respectivamente), 8 metilênicos (δ_C = 38.6, 33.6, 39.7, 30.0, 27.8, 37.0, 27.6 e 25.1 ppm de C-2, C-6, C-9, C-13, C-16, C-19, C-20 e C-25, respectivamente), 4 metínicos (δ_C = 49.9, 117.7 e 124.9 ppm de C-1, C-17 e C-21, respectivamente, e um oxigenado em δ_C = 85.5 ppm de C-8), 9 quaternários (δ_C = 48.1 ppm de C-11, 4 oxigenados em δ_C = 208.1, 91.1, 87.0 e 181.2 de C-3, C-7, C-10 e C-12, respectivamente, e 4 olefínicos em δ_C = 139.9, 168.9, 138.1 e 132.7 de C-4, C-5, C-18 e C-22, respectivamente), uma carbonila de cetona (C-3) e uma carbonila de éster (C-12). Estas funções comprometeram 5 dos 10 graus de insaturação requeridos, assim os demais graus de insaturação exigem que a substância # 5 seja pentacíclica. Com base nos dados espectroscópicos mencionados, a substância # 5 foi determinada como um sesterterpeno guaiano com uma ponte de oxigênio entre C-7 em δ_C (ppm) 91.1 e C-10 em δ_C (ppm) 87.0 para gerar a estrutura pentacíclica. Parte dos dados de RMN da substância # 5 apresentou similaridade com os da hedyosumina A, uma lactona sesquiterpênica de esqueleto guaianolídeo ($C_{15}H_{16}O_4$) isolada de *H. orientale* (Su *et al.* 2008). A outra parte dos dados de RMN da substância # 5 apresentou similaridade com os do mirceno (Bohlmann & Zeisberg 1975; Ferreira *et al.* 1998), **Tabela 9**. Algumas diferenças foram observadas nos carbonos intermediários entre as estruturas do sesquiterpeno e do monoterpene. O carbono metínico em C-11 foi substituído por um carbono quaternário e os carbonos metilênicos olefínicos terminais em C-13, C-16 e C-25 foram substituídos por

carbonos metilênicos sp^3 , apresentando δ_C (ppm) 30.0, 27.8 e 25.1, respectivamente. Os sinais de COSY e HMBC mostraram correlações entre as duas partes da molécula (**Figura 27**).

Uma proposta para a biogênese desta molécula (**Figura 28**) pode ser sugerida a partir de dois precursores, a lactona sesquiterpênica guaianolida hedyosumina A ($C_{15}H_{16}O_4$) e o monoterpene mirceno ($C_{10}H_{16}$), por reação de Diels-Alder, também conhecida como cicloadição [4+2] (Hendrickson *et al.* 1970). Reação semelhante foi descrita por Appendino *et al.* (2009) para explicar a biogênese da genepolida, um sesterterpene isolado de *Artemisia umbelliformis* (Asteraceae), formado pela reação de Diels-Alder entre a lactona sesquiterpênica costunolida e o monoterpene mirceno. A bolivianina, o primeiro sesterterpene isolado em Chloranthaceae, proveniente de folhas de *H. angustifolium* coletado na Bolívia (Acebey *et al.* 2007), também teve sua biogênese parcialmente explicada por reações de cicloadição a partir da onoseriolida e do β -E-ocimeno (Yuan *et al.* 2013). Uma lactona sesquiterpênica guaianolida semelhante ao precursor deste sesterterpene, a hedyosumina D, foi isolada deste mesmo extrato, assim como o mirceno foi detectado nos óleos essenciais das mesmas plantas coletadas e estudadas no capítulo 2 desta tese.

O espectro de massas deste sesterterpene (**Figura 18**) confirmou sua estrutura química uma vez que apresentou o pico do íon molecular em 397.2375 $[M+H]^+$ e o pico base em 161.0959, confirmando a quebra da molécula na ligação spiro, extremamente instável. A **Figura 29** ilustra a proposta de fragmentação da molécula.

A comparação destes resultados com os dados da literatura para a hedyosumina A (Su *et al.* 2008) e o mirceno (Bohlmann & Zeisberg 1975; Ferreira *et al.* 1998), bem como as hipóteses de biogênese da bolivianina e da genepolida (Appendino *et al.* 2009; Yuan *et al.* 2013) levaram à identificação da substância # 5 como sendo a nova lactona sesterterpênica guaianolida **hedyosulida** (**Figura 28**), descrita pela primeira vez na literatura.

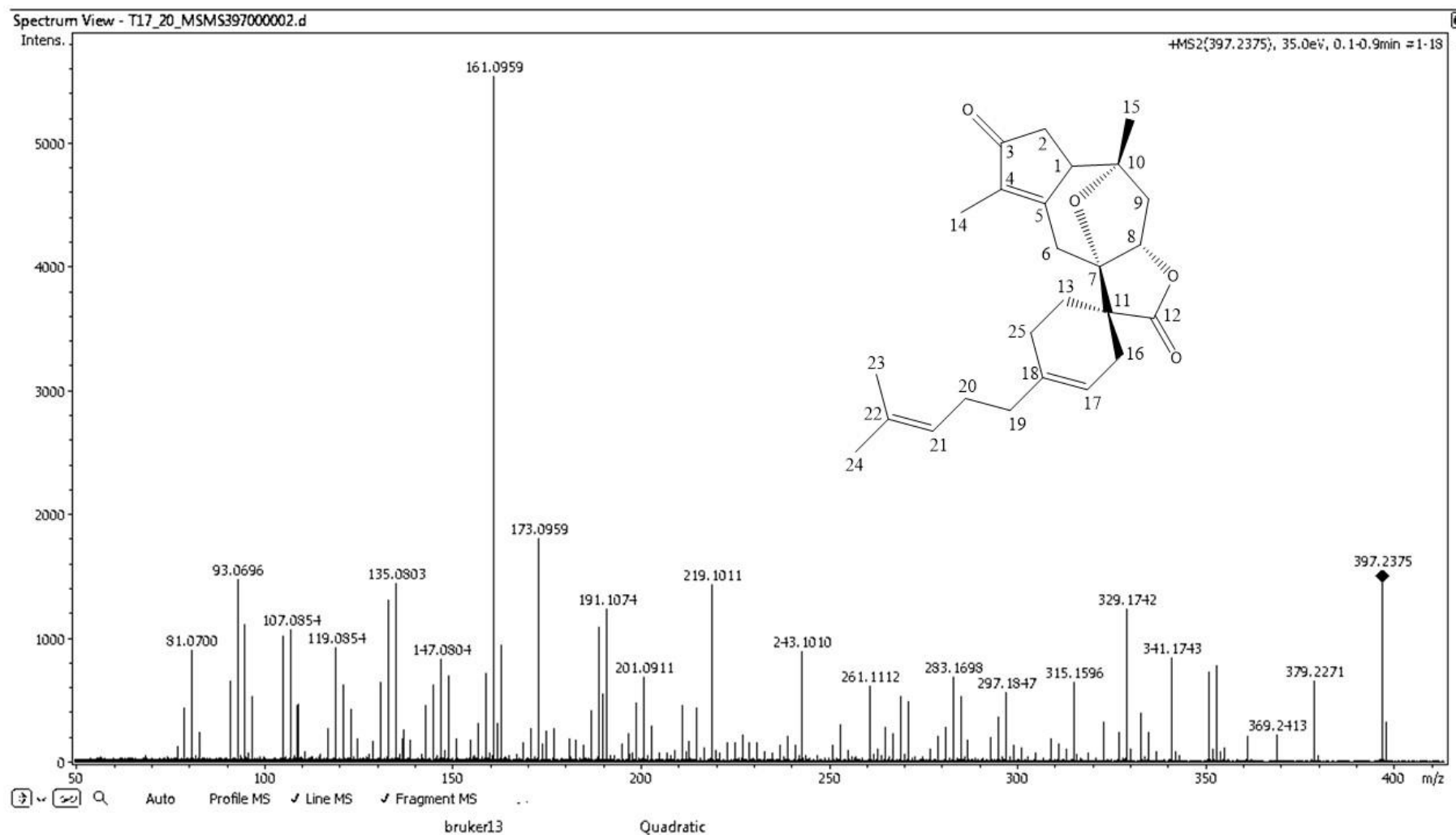


Figura 18. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

Tabela 9. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 5 (**hedyosulida**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	# 5 (hedyosulida)			hedyosumina A (Su et al. 2008)		mirceno (Ferreira et al. 1998)	
	d_C	d_H (mult., J Hz)	HMBC	d_C	d_H (mult., J Hz)	d_C	d_H (mult., J Hz)
1	49.9	2.77 (m, 1H)	C-2, C-4, C-5, C-10	48.7	2.87 (m, 1H)		
2 α	38.6	2.10 (m, 1H)		36.1	2.48 (dd, 18.8, 6.8, 1H)		
2 β		1.80 (dd, 15.8, 2.2, 1H)			1.85 (dd, 18.8, 2.7, 1H)		
3	208.1			206.5			
4	139.9			138.2			
5	168.9			165.6			
6 α	33.6	2.67 (d, 12.3, 1H)	C-5, C-11	32.9	2.95 (d, 14.0, 1H)		
6 β		2.53 (dt, 12.3, 1H)	C-4, C-5, C-7, C-8		2.75 (d, 14.0, 1H)		
7	91.1			84.2			
8	85.5	4.31 (dd, 5.7, 1.5, 1H)	C-6, C-7, C-9, C-10, C-12	85.2	4.38 (dd, 7.2, 2.4, 1H)		
9 α	39.7	1.70 (m, 1H)		39.1	1.80 (dd, 13.7, 2.4, 1H)		
9 β		2.53 (m, 1H)			2.12 (dd, 13.7, 7.2, 1H)		
10	87.0			87.8			
11	48.1			136.5			
12	181.2			168.4			
13 α	30.0	1.68 (dt, 12.2, 1.5, 1H)	C-12	125.5	5.99 (s, 1H)		
13 β		1.95 (m, 1H)			6.46 (s, 1H)		
14	8.9	1.70 (s, 3H)	C-3, C-4, C-5	8.0	1.71 (s, 3H)		
15	25.8	1.41 (s, 3H)	C-1, C-9, C-10	24.5	1.42 (s, 3H)		
16 α	27.8	2.15 (m, 1H)	C-12			115.5 (t)	*
16 β		2.20 (m, 1H)					
17	117.7	5.30 (br s, 1H)	C-11, C-16, C-19, C-25			139.1 (d)	*

Cont.

Cont.	# 5 (<i>hedyosulida</i>)			<i>hedyosumina</i> A (Su <i>et al.</i> 2008)		<i>mirceno</i> (Ferreira <i>et al.</i> 1998)	
Posição	d _C	d _H (mult., J Hz)	HMBC	d _C	d _H (mult., J Hz)	d _C	d _H (mult., J Hz)
18	138.1					146.3 (s)	*
19	37.0	1.99 (m, 2H)	C-17, C-18, C-20, C-21			31.7 (t)	*
20	27.6	2.06 (m, 2H)				27.0 (t)	*
21	124.9	5.03 (br t, 1H)	C-19, C-23, C-24			124.4 (s)	*
22	132.7					131.5 (d)	*
23	18.7	1.57 (s, 3H)	C-21, C-22, C-24			17.7 (q)	*
24	26.8	1.60 (s, 3H)	C-22, C-23			27.7 (q)	*
25 α	25.1	1.93 (dd, 12.1, 5.8, 1H)				112.9 (t)	*
25 β		2.46 (dd, 15.9, 5.8, 1H)	C-11				

Legenda: * dados não encontrados

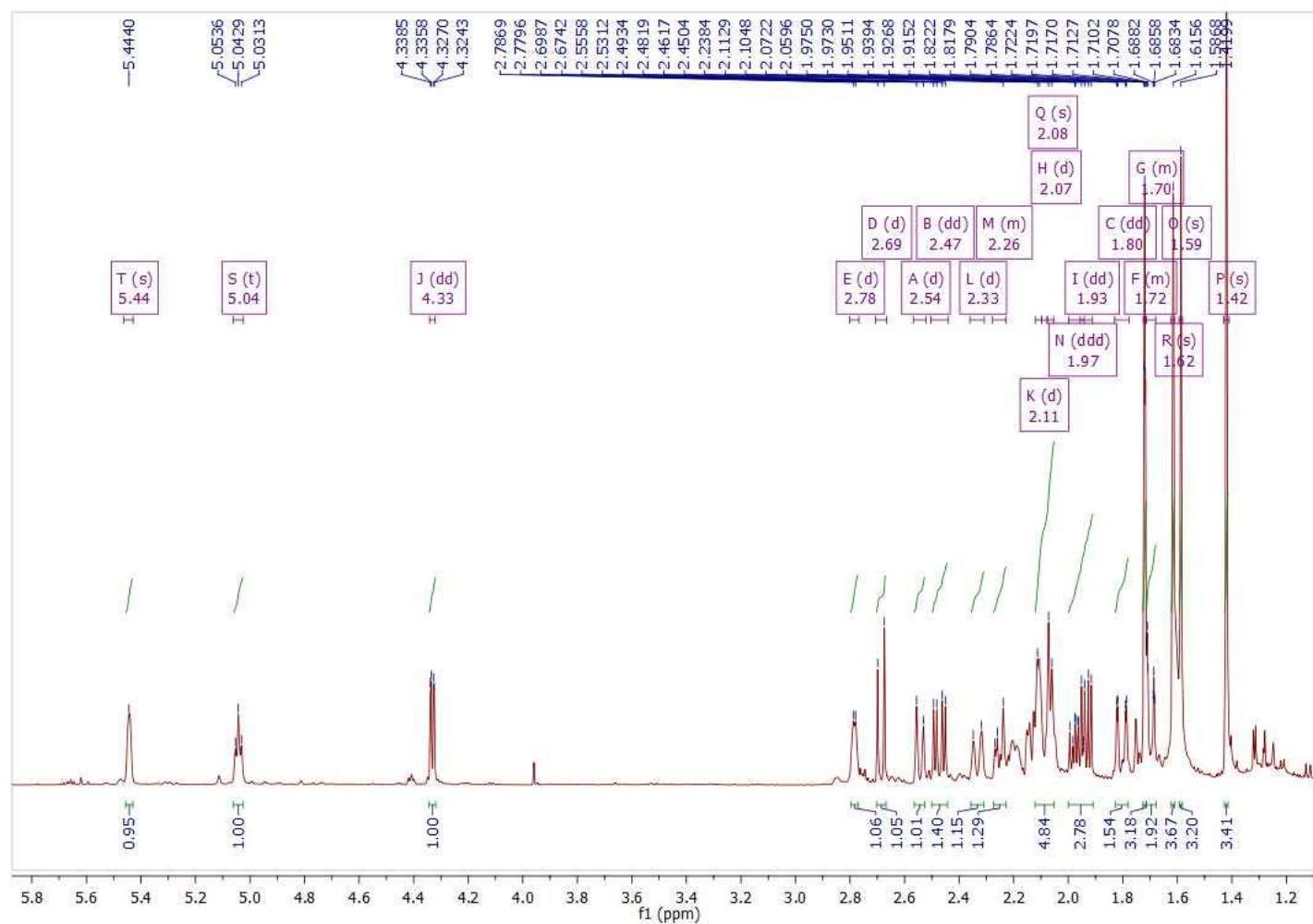


Figura 19. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

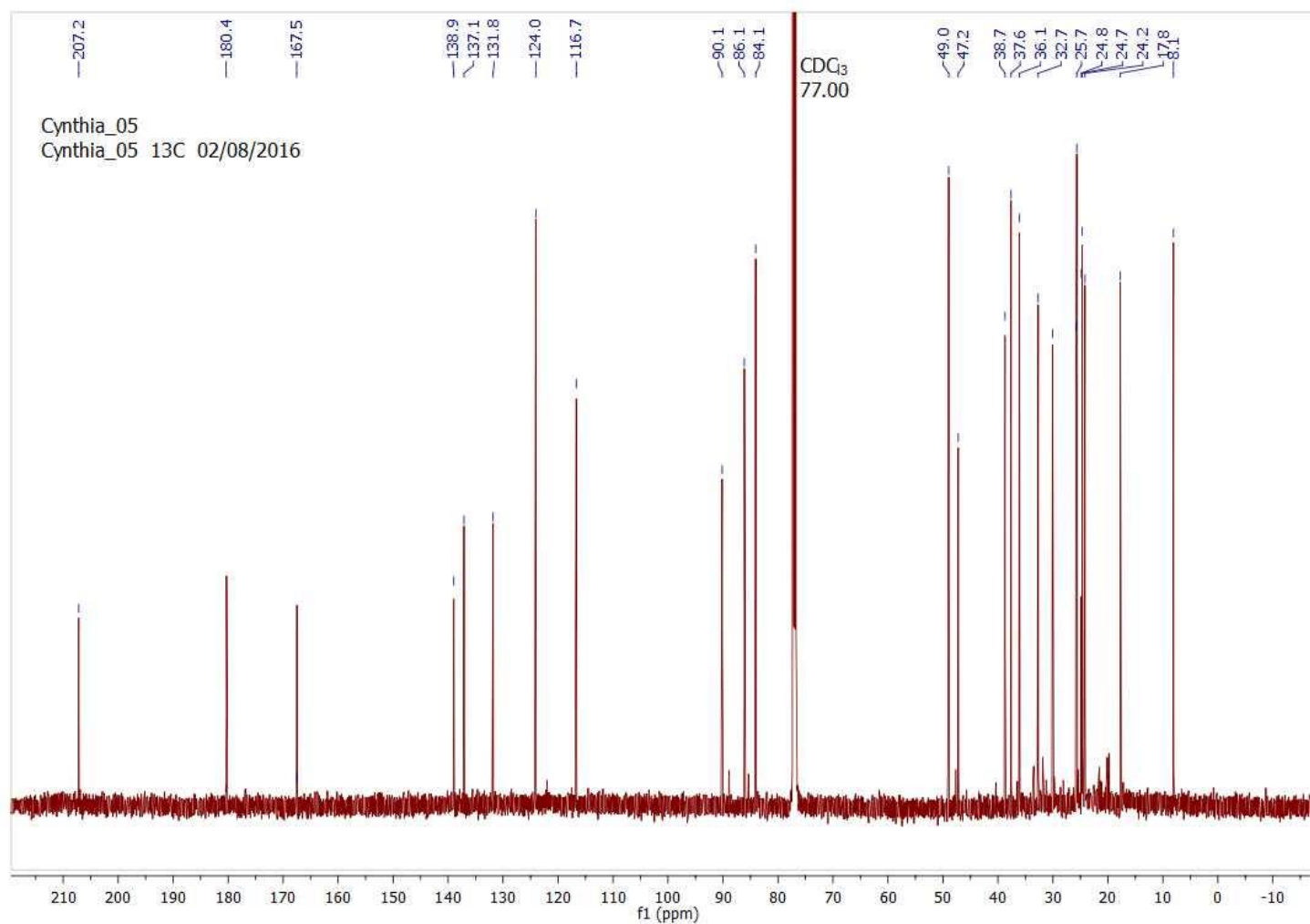


Figura 20. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

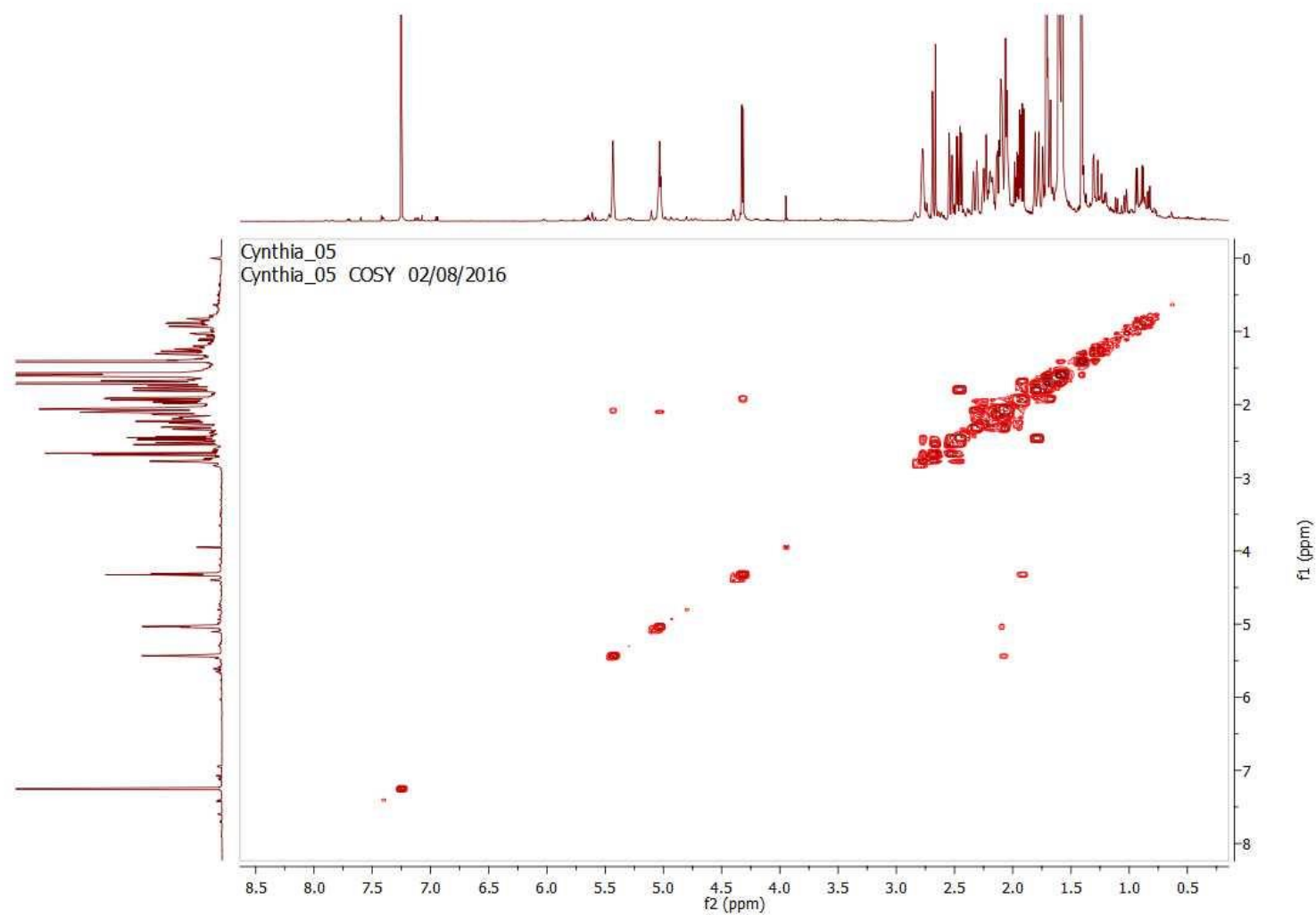


Figura 21. Espectro de COSY (CDCl₃) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

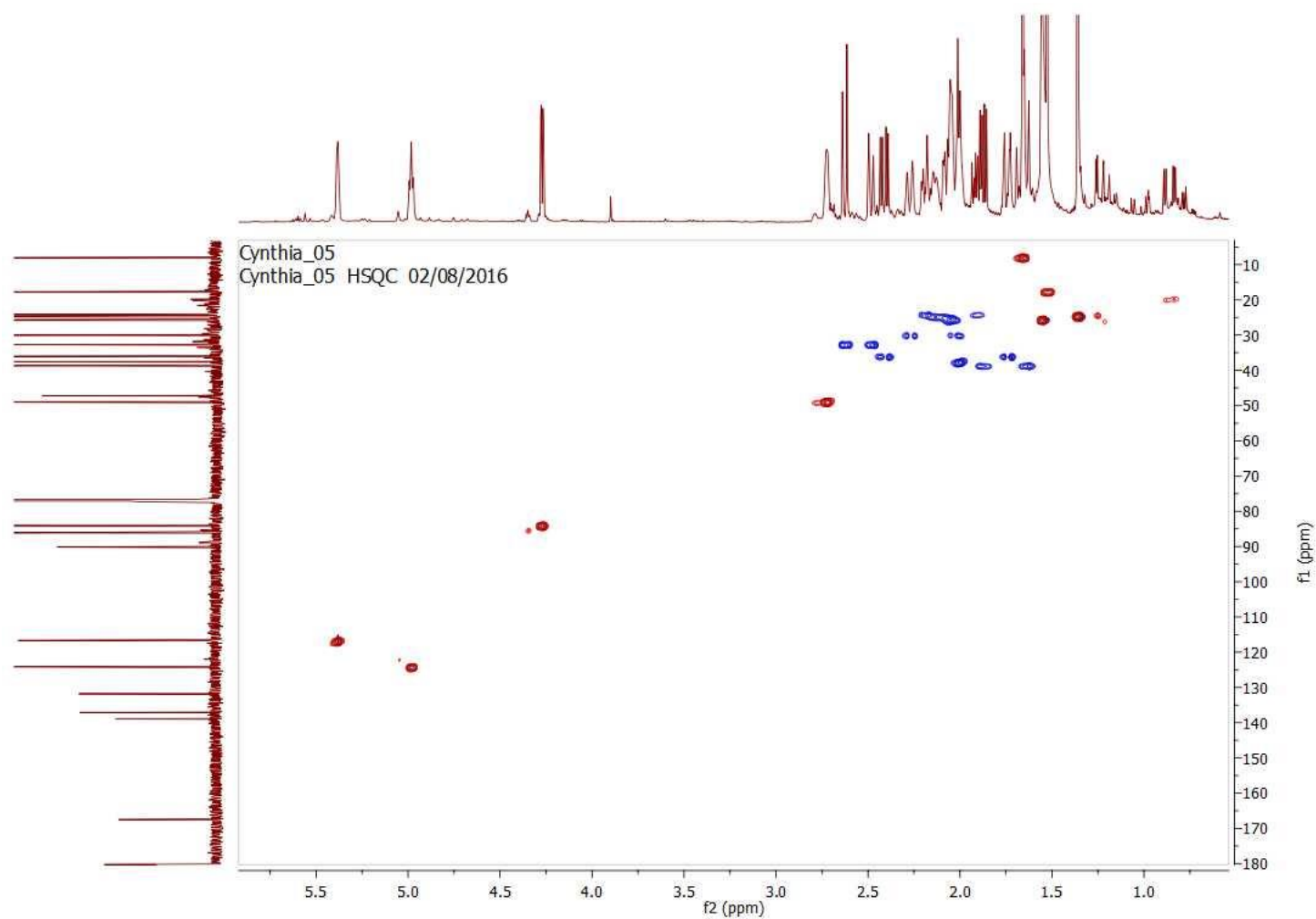


Figura 22. Espectro de HSQC (CDCl₃) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

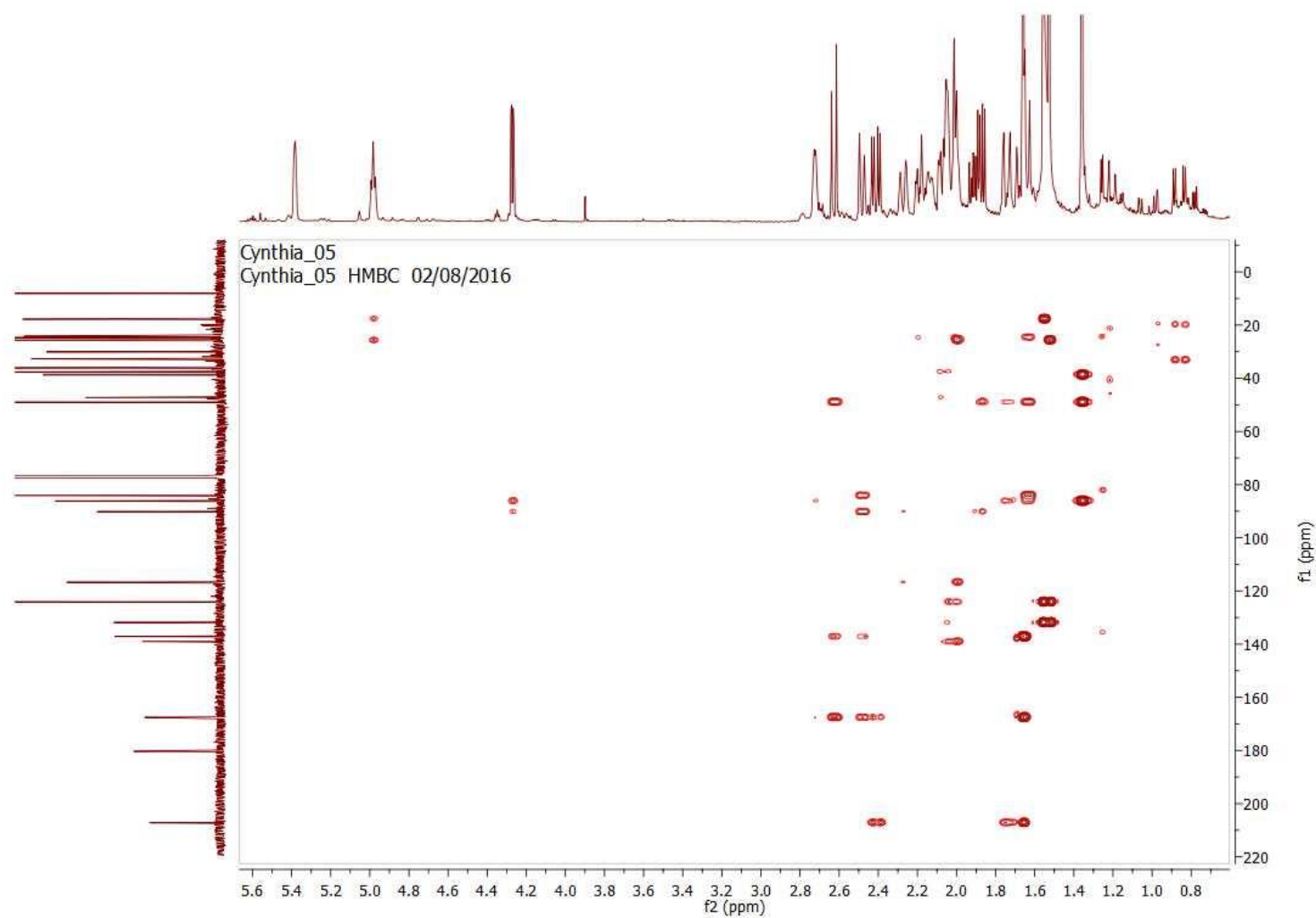


Figura 23. Espectro de HMBC (CDCl_3) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

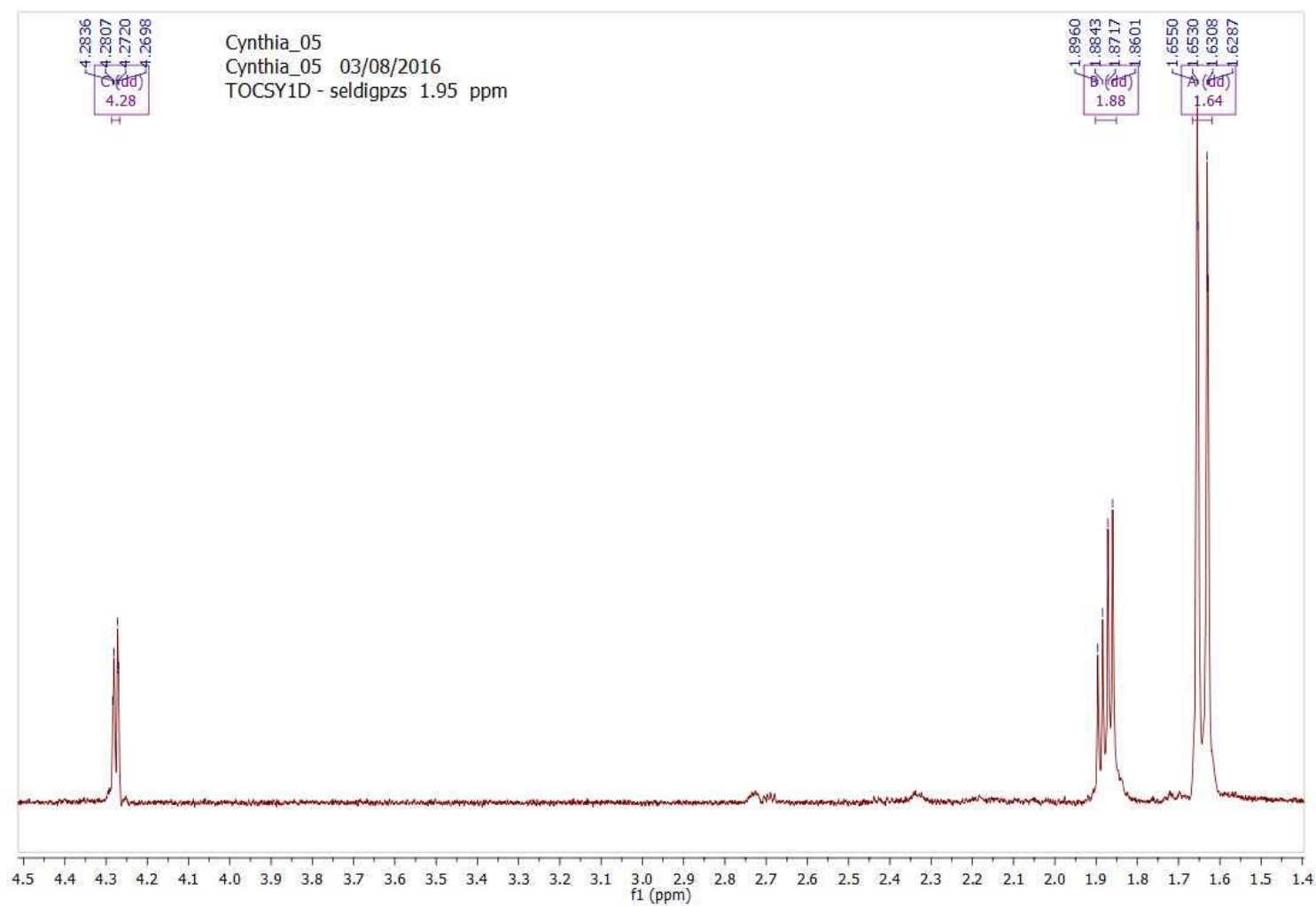


Figura 24. Espectro de TOCSY 1-D 1.88 ppm (600 MHz, CDCl_3) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

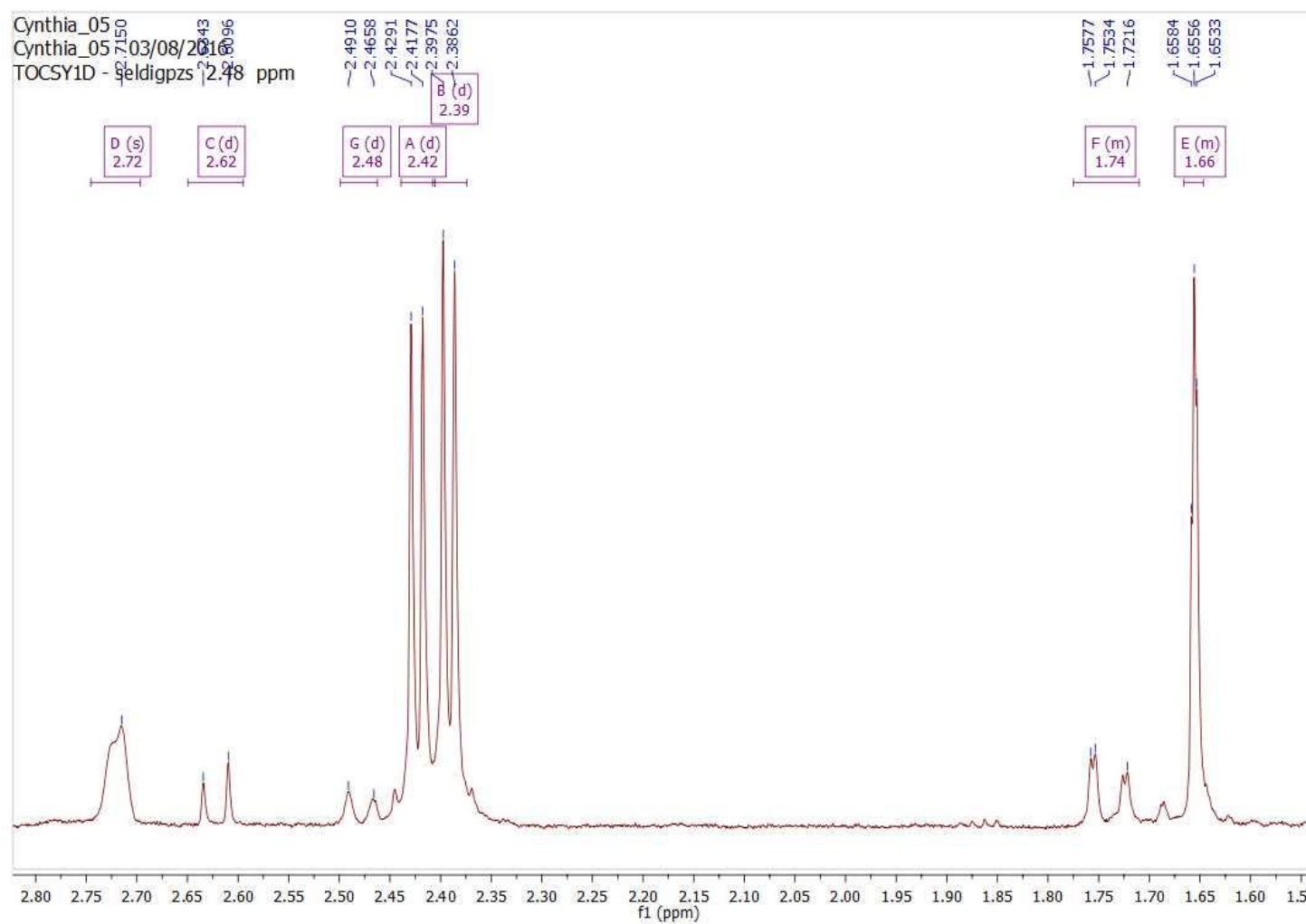


Figura 25. Espectro de TOCSY 1-D 2.42 ppm (600 MHz, CDCl_3) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**..

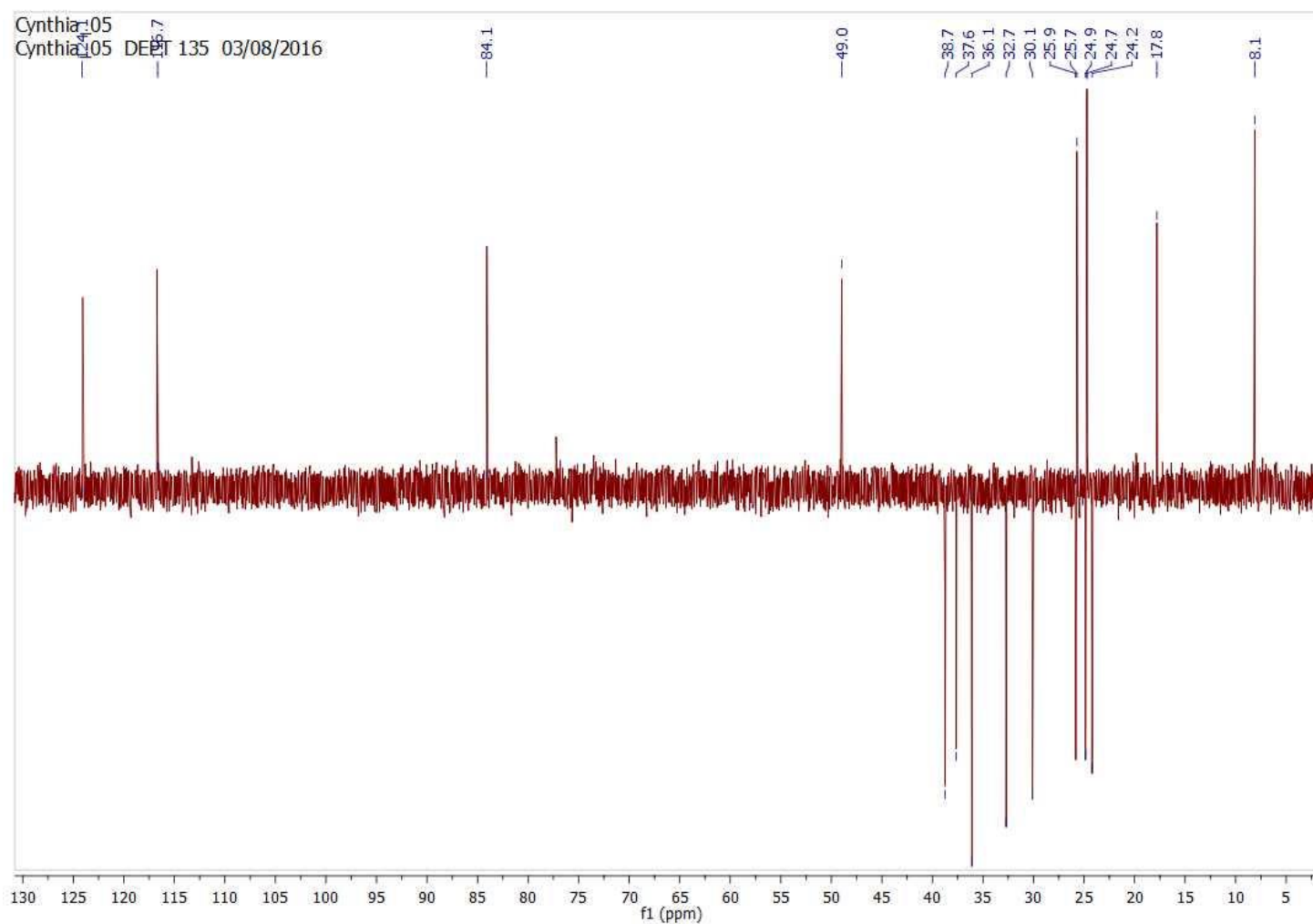


Figura 26. Espectro de DEPT 135 (150 MHz, CDCl_3) da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**.

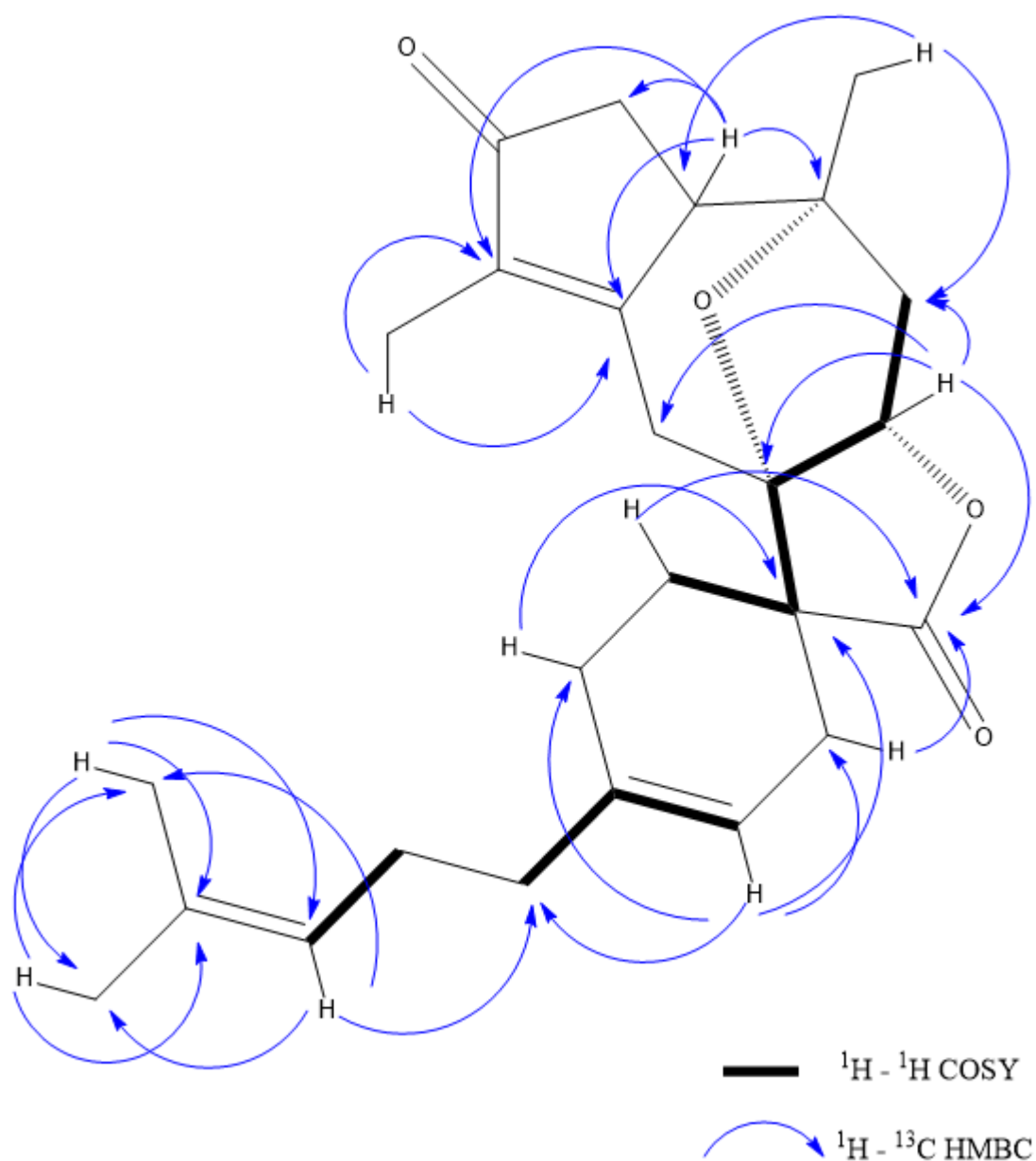


Figura 27. Correlações de COSY e HMBC da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**, isolado das folhas de *H. brasiliense*

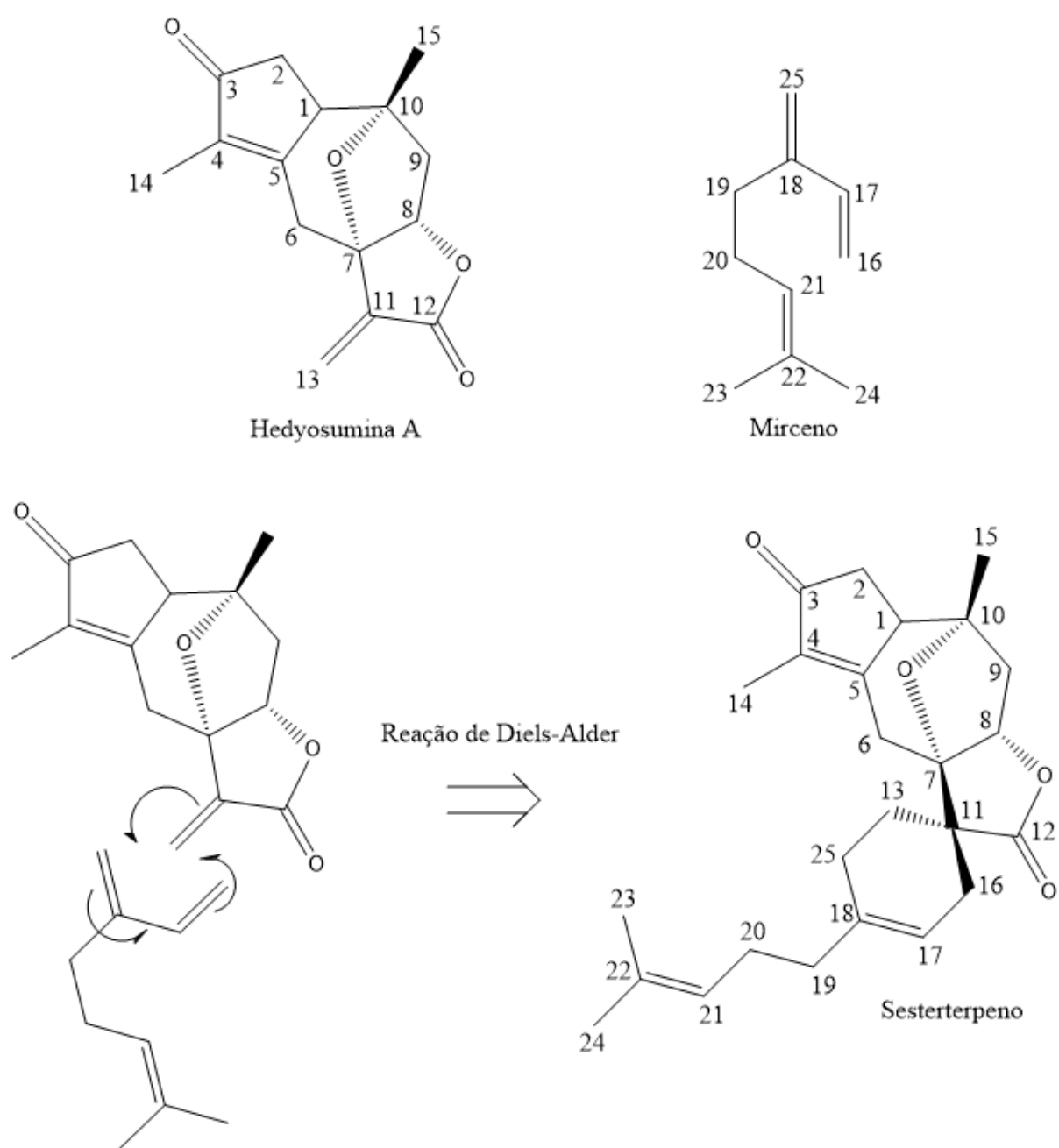


Figura 28. Proposta de biogênese da substância # 5 pela reação de Diels-Alder entre os precursores hedyosumina A e mirceno para a formação do sesterterpeno inédito **hedyosulida**, isolado das folhas de *H. brasiliense*.

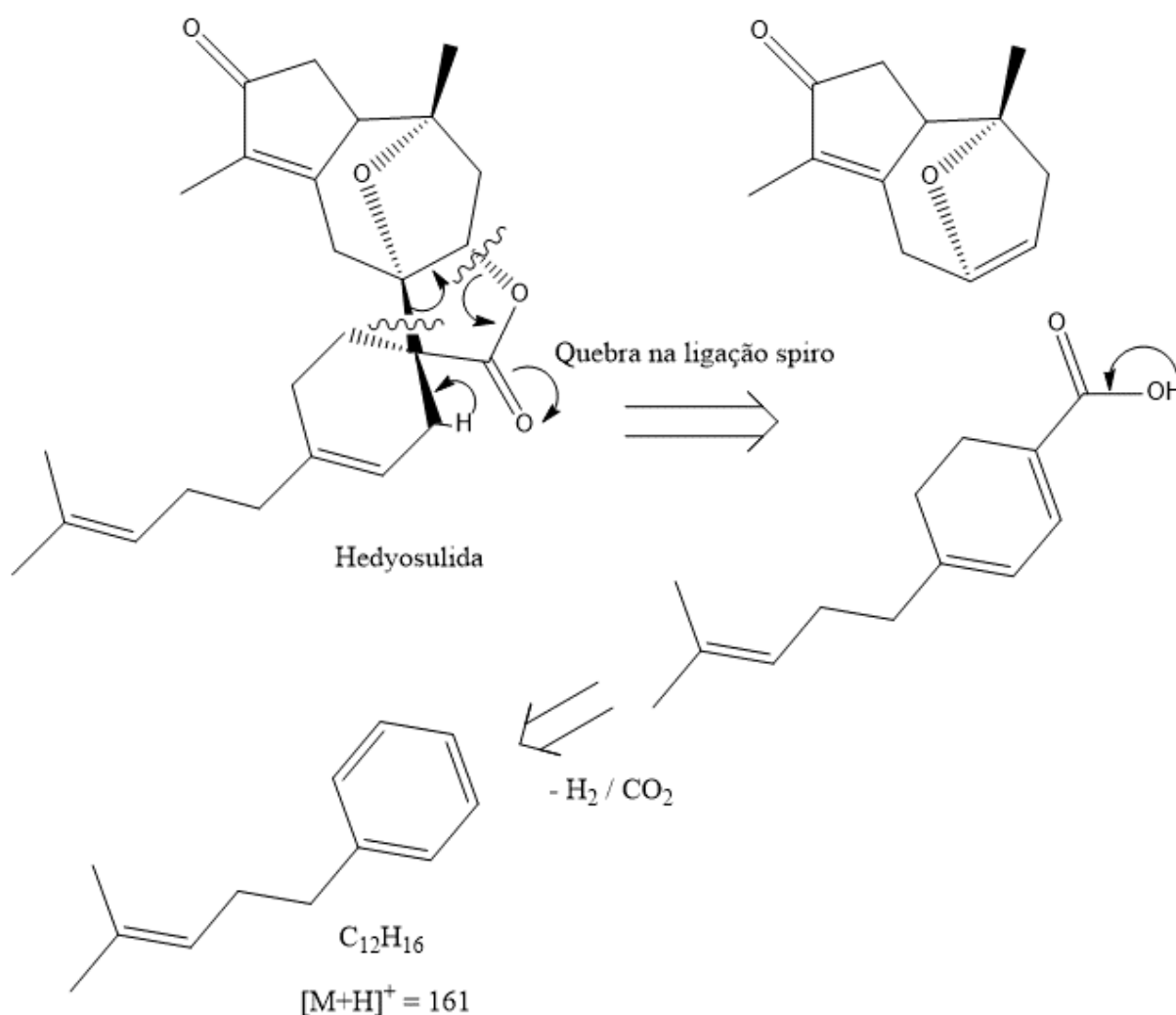


Figura 29. Proposta de fragmentação da substância # 5, identificada como o sesterterpeno inédito **hedyosulida**, isolado das folhas de *H. brasiliense*.

3.11.2 Substância # 3 – vanilato de pinocarvila

A substância # 3, proveniente da fração T12-60', apresentou-se na forma de um líquido viscoso amarelado (1,5 mg). O espectro no UV mostrou uma banda em 220 nm e outra banda dupla em 260 e 290 nm (**figura 8**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS forneceram a fórmula molecular C₁₈H₂₂O₄, que requer 8 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 303.1591 [M+H]⁺ (calculada 303.1597). ESI-QqTOF-MS mostrou pico base em m/z 151, indicando a quebra preferencial da molécula ao meio, formando fragmentos compatíveis com a estrutura proposta (**figura 30**), formada pela esterificação da hidroxila do pinocarveol com o ácido carboxílico do ácido vanílico.

Os espectros de RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, NOESY 1-D em δ_{H} (ppm) 0.88 e 1.31, e TOCSY 1-D em δ_{H} (ppm) 5.91 (**Figuras 31 a 38**) apresentaram sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise de ESI-QqTOF-MS. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 18 sinais. Foram observados sinais característicos de CH aromáticos da porção vanílica em δ_{C} (ppm) 111.8, 114.0 e 124.2 e em δ_{H} (ppm) 7.64 (d, 1.9 Hz, 1H), 6.98 (d, 8.3 Hz, 1H) e 7.74 (dd, 8.3, 1.9 Hz, 1H), respectivamente, indicativos de acoplamentos de H em orto entre C-5' e C-6' (8.3 Hz) e em meta entre C-2' e C-6' (1.9 Hz). Um sinal em δ_{C} (ppm) 146.2 foi atribuído ao carbono quaternário aromático C-3' ligado ao grupo metoxila (-O-CH₃). Os sinais em δ_{C} (ppm) 56.1 e δ_{H} (ppm) 3.99 (s, 3H) foram atribuídos ao grupo oximetílico. O hidrogênio da hidroxila apresentou δ_{H} (ppm) 6.04, sem acoplamento em HSQC, mas com sinais de acoplamento à distância em HMBC com C-3', C-4' e C-5'. Sinais característicos de carbono quaternário aromático foram atribuídos a C-1' e C-4' em δ_{C} (ppm) 122.6 e 149.8, respectivamente, e de carbonila de éster foi atribuído ao C-7' em δ_{C} (ppm) 166.1. Estes dados (**Tabela 10**) estão de acordo com os descritos na literatura para o ácido vanílico, cuja fórmula molecular é C₈H₈O₄ (Chang *et al.* 2009). Os demais sinais encontrados apresentaram deslocamentos químicos compatíveis com os do pinocarveol, registrados na literatura (Abraham *et al.* 1973; Ferreira *et al.* 1998). Os sinais em δ_{C} (ppm) 150.0 e 107.7 foram atribuídos a uma dupla ligação exocíclica entre C-2 e C-10, com δ_{H} (ppm) 4.84 (m, 1H) e 4.97 (dd, 2.5, 1.2 Hz, 1H) ligados ao C-10. O sinal em δ_{C} (ppm) 68.0 foi atribuído ao C-3 ligado ao oxigênio do ester, acoplado ao δ_{H} (ppm) 5.92 (ddt, 9.5, 6.9, 2.5 Hz, 1H). As duas metilas em C-8 e C-9 foram atribuídas aos sinais em δ_{C} (ppm) 25.7 e δ_{H} (ppm) 1.31 (s, 3H) e δ_{C} (ppm) 21.4 e δ_{H} (ppm) 0.88 (s, 3H), respectivamente. A correlação de COSY entre os sinais entre C-5' e C-6' e dos sinais do anel aromático, bem como a correlação de HMBC entre os sinais δ_{H} (ppm) 5.92 (ddt, 9.5, 6.9, 2.5 Hz, 1H) do C-3 do pinocarveol e δ_{C} (ppm) 166.1 do C-7' do ácido vanílico, confirmaram a ligação entre as moléculas (**Figura 39**).

Sugere-se que a reação de esterificação entre o ácido carboxílico do ácido vanílico e o álcool do pinocarveol pode ter levado à formação de um éster, com a liberação de uma molécula de água. A proposta de biogênese deste ester nesta espécie, apresentada na **Figura 40**, pode ser justificada, uma vez que o ácido vanílico foi detectado no extrato hidroetanólico das folhas de *H. brasiliense* proveniente de Santa Catarina (Amoah *et al.* 2013) e níveis variáveis de pinocarvona foram identificados nos óleos essenciais de *H. brasiliense*

provenientes de Santa Catarina (Kirchner *et al.* 2010) e de três populações localizadas em São Paulo, Ilha do Cardoso (Murakami *et al.* 2017), Paranapiacaba e Mogi Guaçu (Capítulo 2 desta tese). A comparação destes resultados com os dados da literatura (Abraham *et al.* 1973; Chang *et al.* 2009; Ferreira *et al.* 1998) levou à elucidação estrutural da substância # 3 como sendo o **vanilato de pinocarvila** (Figura 40), identificado pela primeira vez na literatura.

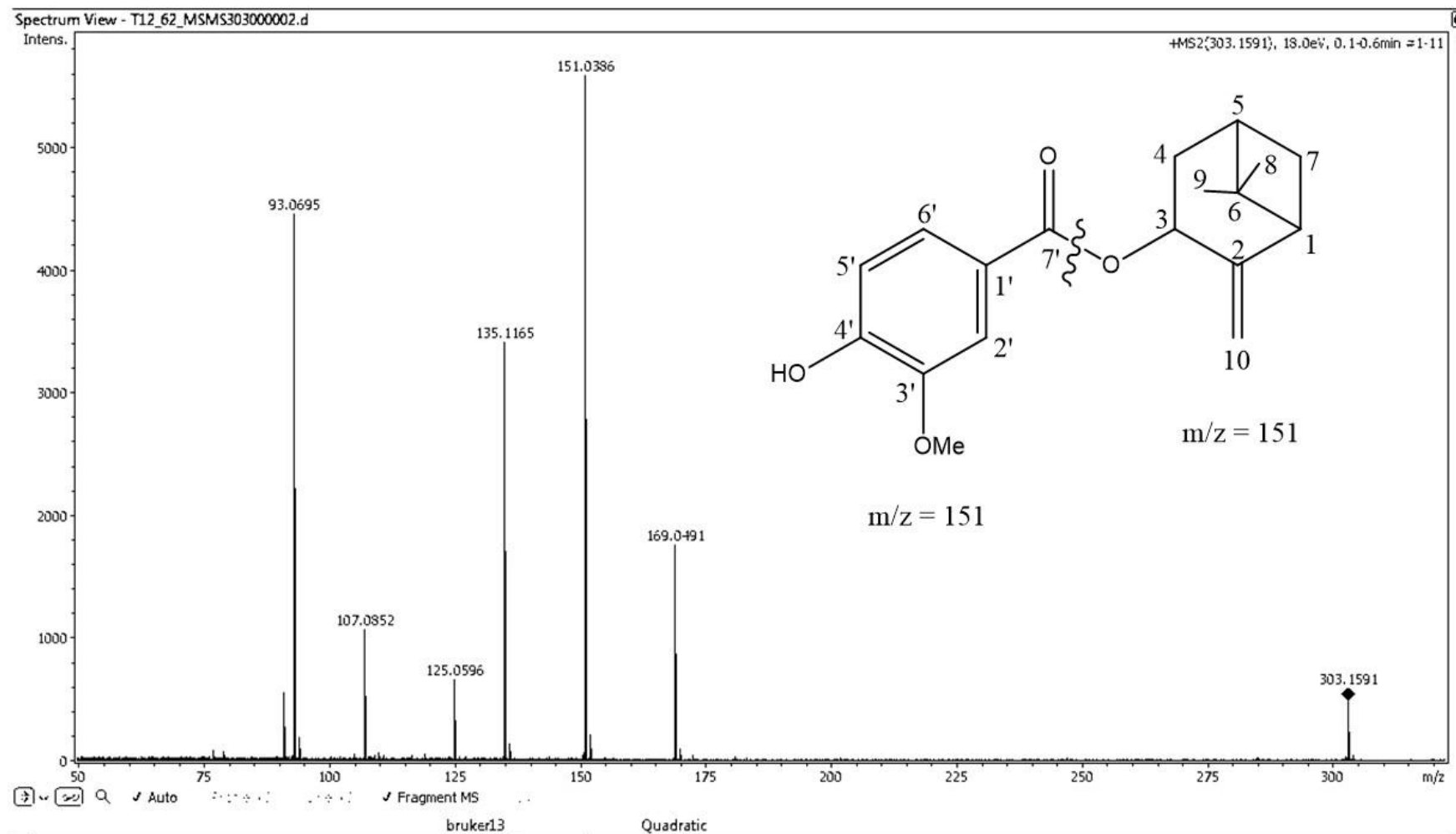


Figura 30. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

Tabela 10. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 3 (**vanilato de pinocarvila**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	# 3 (vanilato de pinocarvila)			<i>cis</i> -pinocarveol ^{a, b}		ácido vanílico ^c	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
1	50.8	2.64 (m, 1H)		50.8	2.57		
2	150.0			149.1			
3	68.0	5.92 (ddt, 9.5, 6.9, 2.5 Hz, 1H)	C-2, C-4, C-10, C-7'	69.4	4.57		
4	31.9	1.85 (ddt, 13.5, 6.9, 1.6 Hz, 1H)	C-3, C-5, C-7	31.8	1.66		
		2.65 (m, 1H)			2.42		
5	40.1	2.09 (td, 6.0, 1.6 Hz, 1H)		40.1	2.00		
6	41.7			41.7			
7	26.7	2.39 (m, 1H)	C-4, C-6	25.7	2.25		
		1.58 (d, 10.4 Hz, 1H)			1.42		
8	25.7	1.31 (s, 3H)	C-1, C-5, C-9	25.7	1.25		
9	21.4	0.88 (s, 3H)	C-1, C-5, C-8	21.4	0.73		
10	107.7	4.84 (m, 1H)	C-1, C-3	108.1	4.75		
		4.97 (dd, 2.5, 1.2 Hz, 1H)	C-1, C-3		5.05		
1'	122.6					124.1	
2'	111.8	7.64 (d, 1.9 Hz, 1H)	C-6', C-4'			116.5	7.58 (d, 2.0 Hz, 1H)
3'	149.8					151.4	
4'	146.2					147.5	
5'	114.0	6.98 (d, 8.3 Hz, 1H)	C-1', C-3'			114.6	6.82 (d, 8.5 Hz, 1H)
6'	124.2	7.74 (dd, 8.3, 1.9 Hz, 1H)	C-2', C-4'			122.9	7.54 (d, 8.5, 2.0 Hz, 1H)
7'	166.1					167.6	
CH ₃ O-	56.1	3.99 (s, 3H)	C-3'			55.2	3.89 (s, 3H)
HO-		6.04 (s, 1H)	C-3', C-4', C-5'				

Legenda: a) Abraham *et al.* 1973; b) Ferreira *et al.* 1998; c) Chang *et al.* 2009.

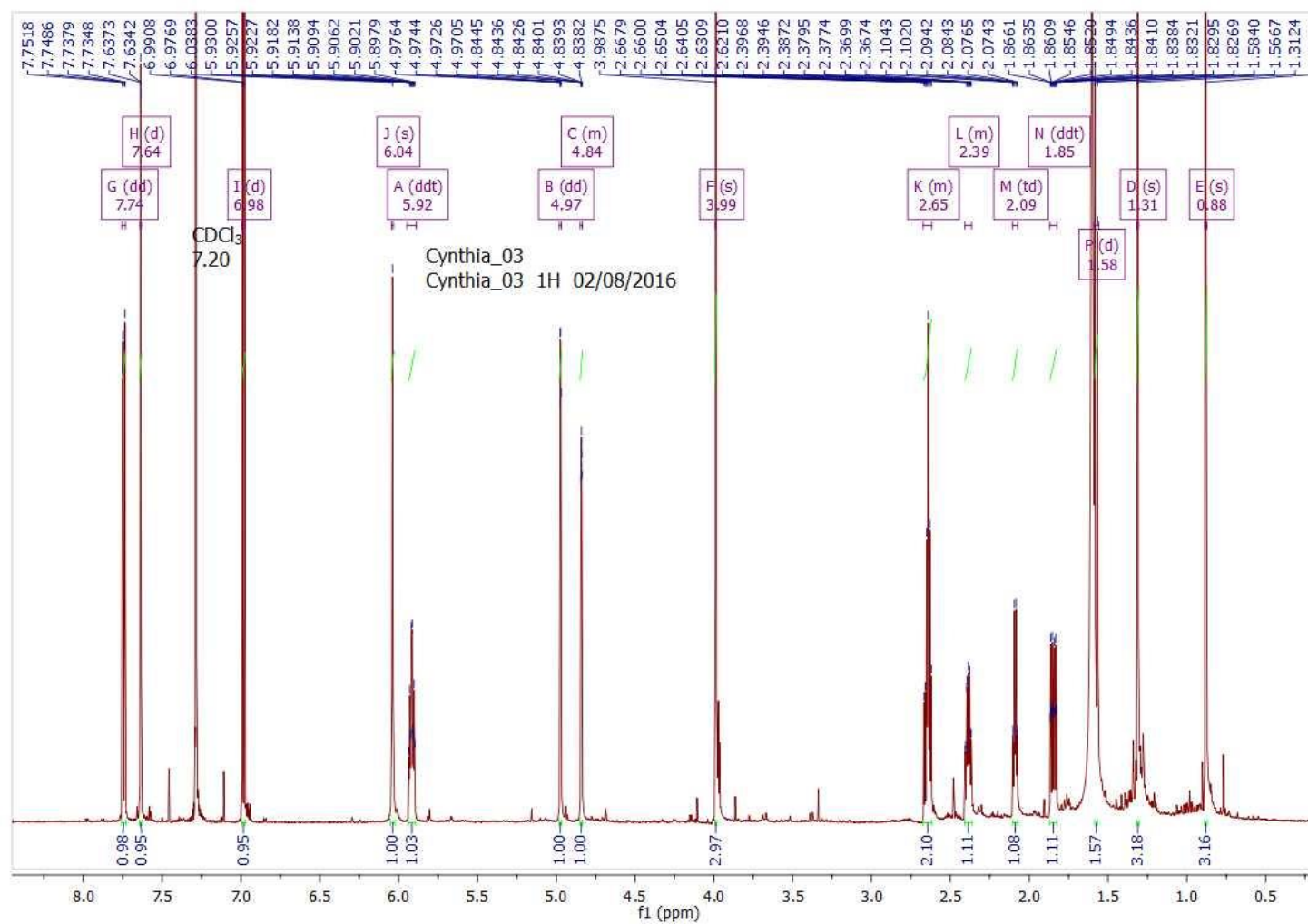


Figura 31. Espectro de ¹H (600 MHz, CDCl₃) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

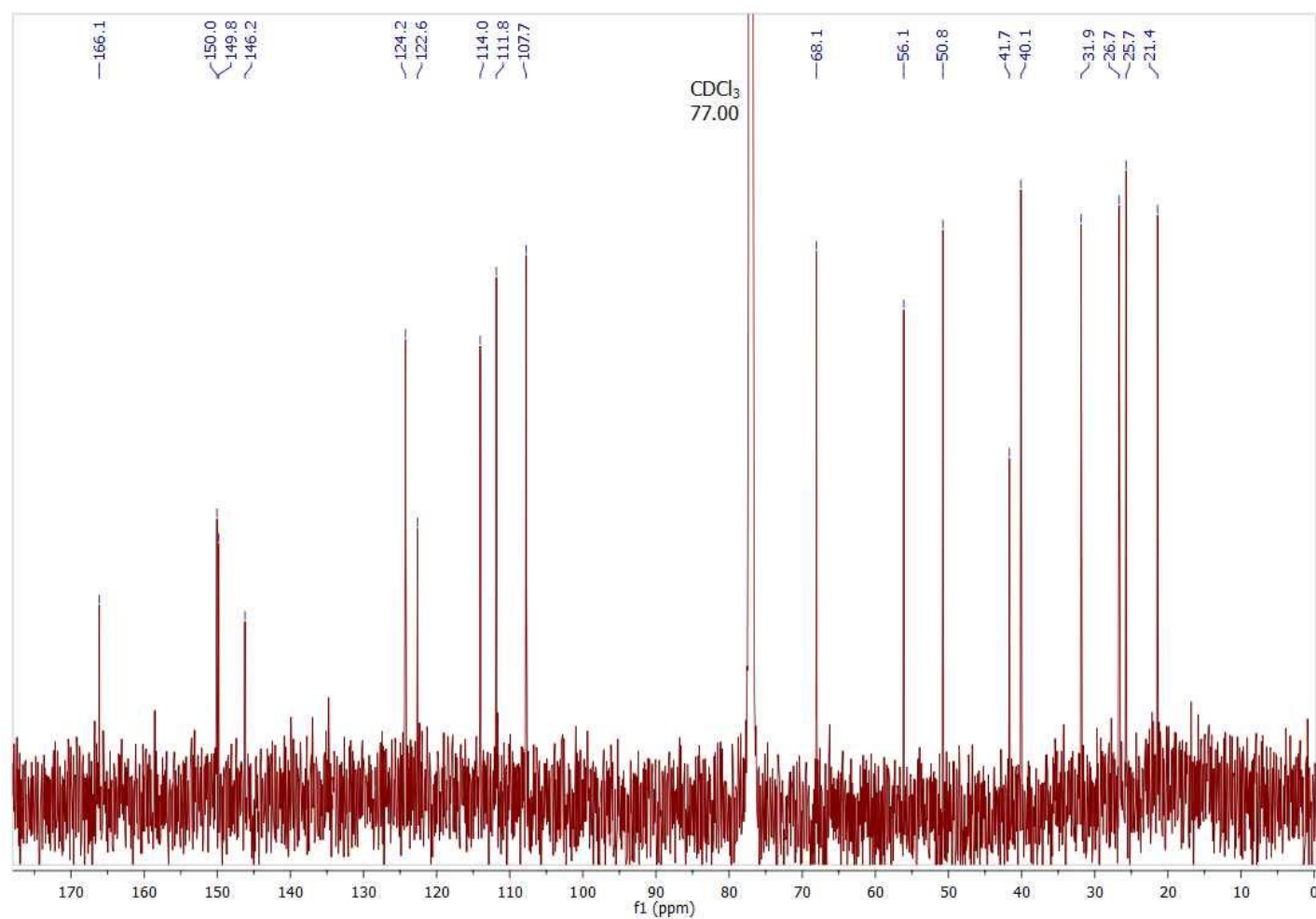


Figura 32. Espectro de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

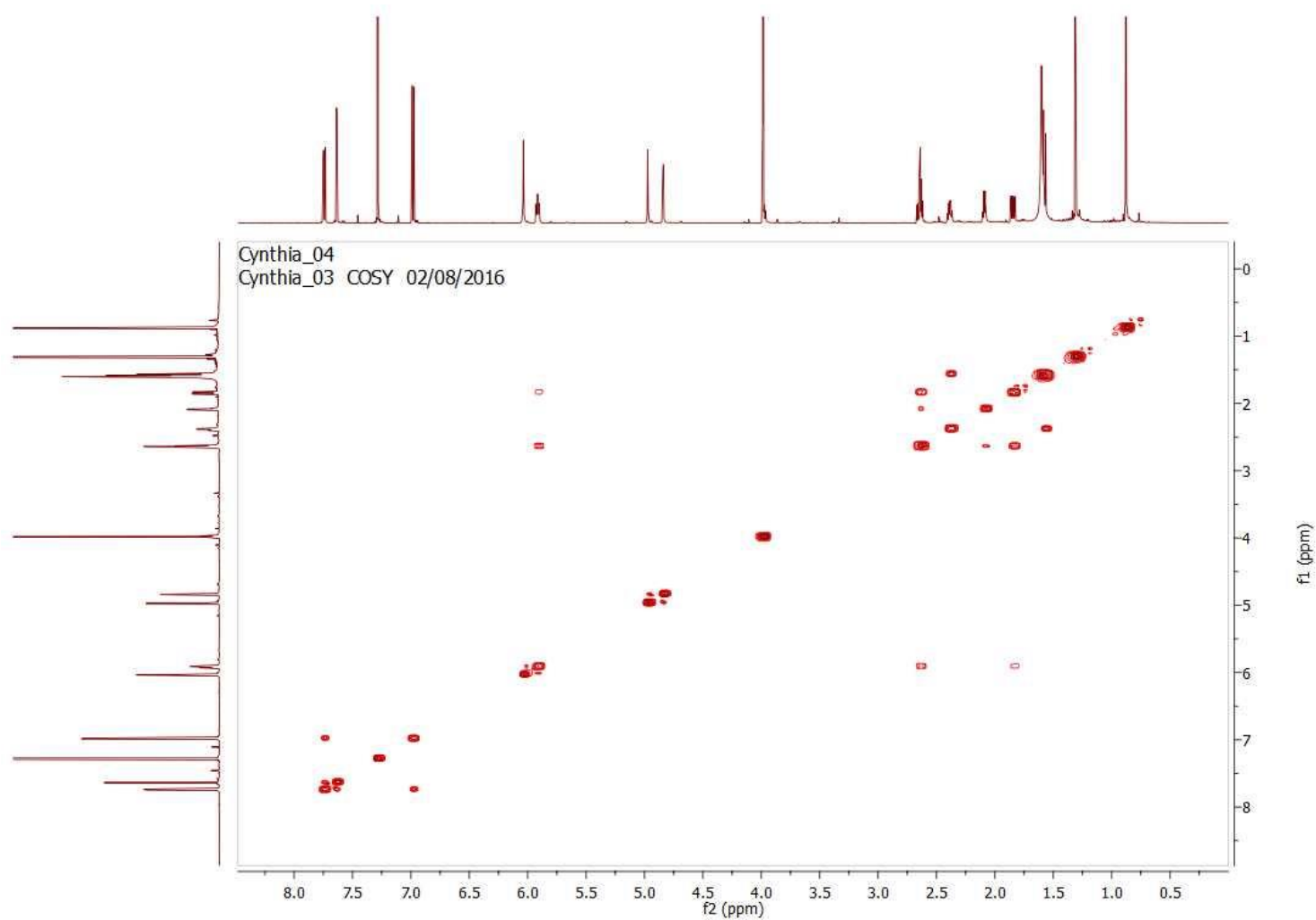


Figura 33. Espectro de COSY (CDCl₃) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

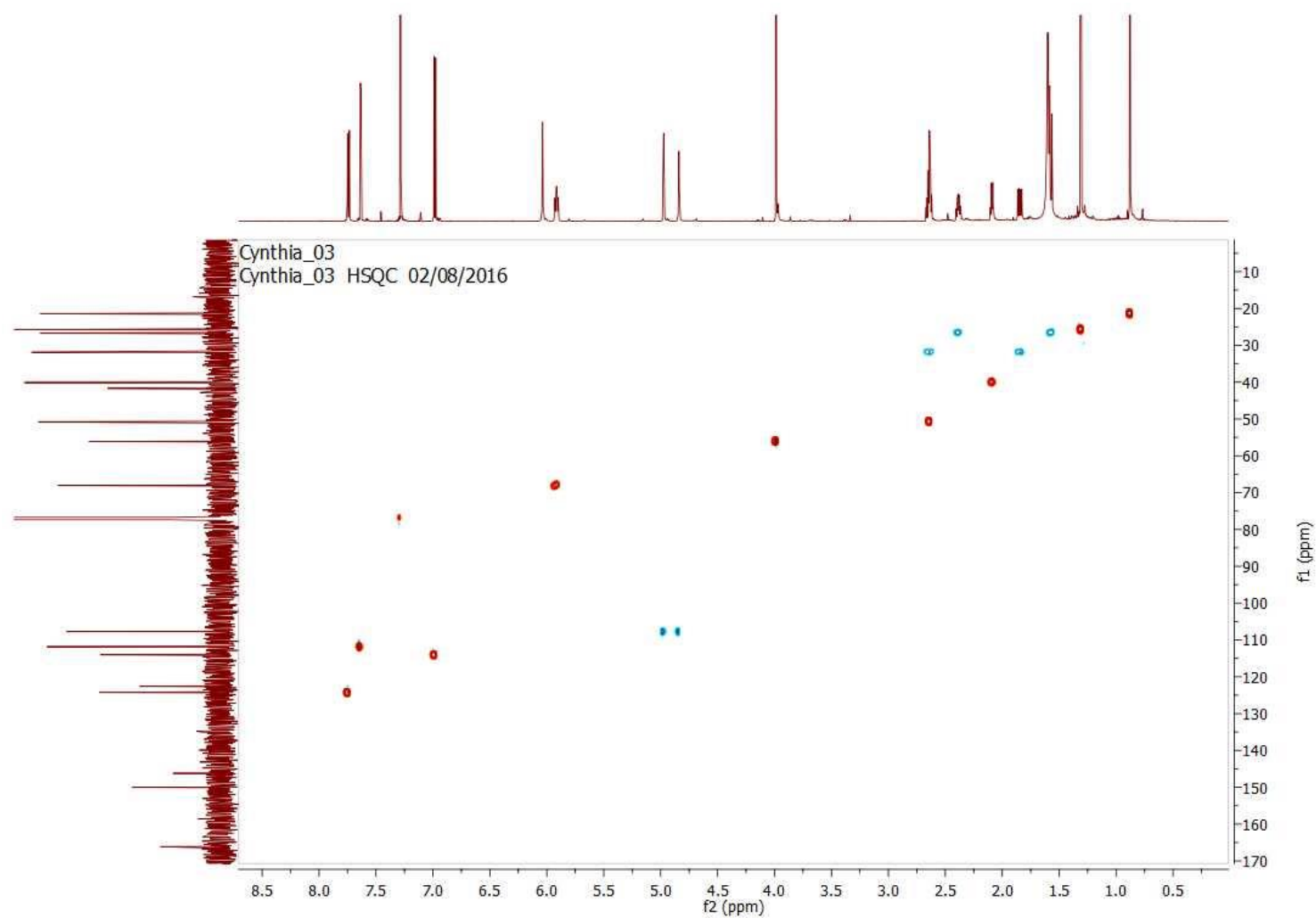


Figura 34. Espectro de HSQC (CDCl_3) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

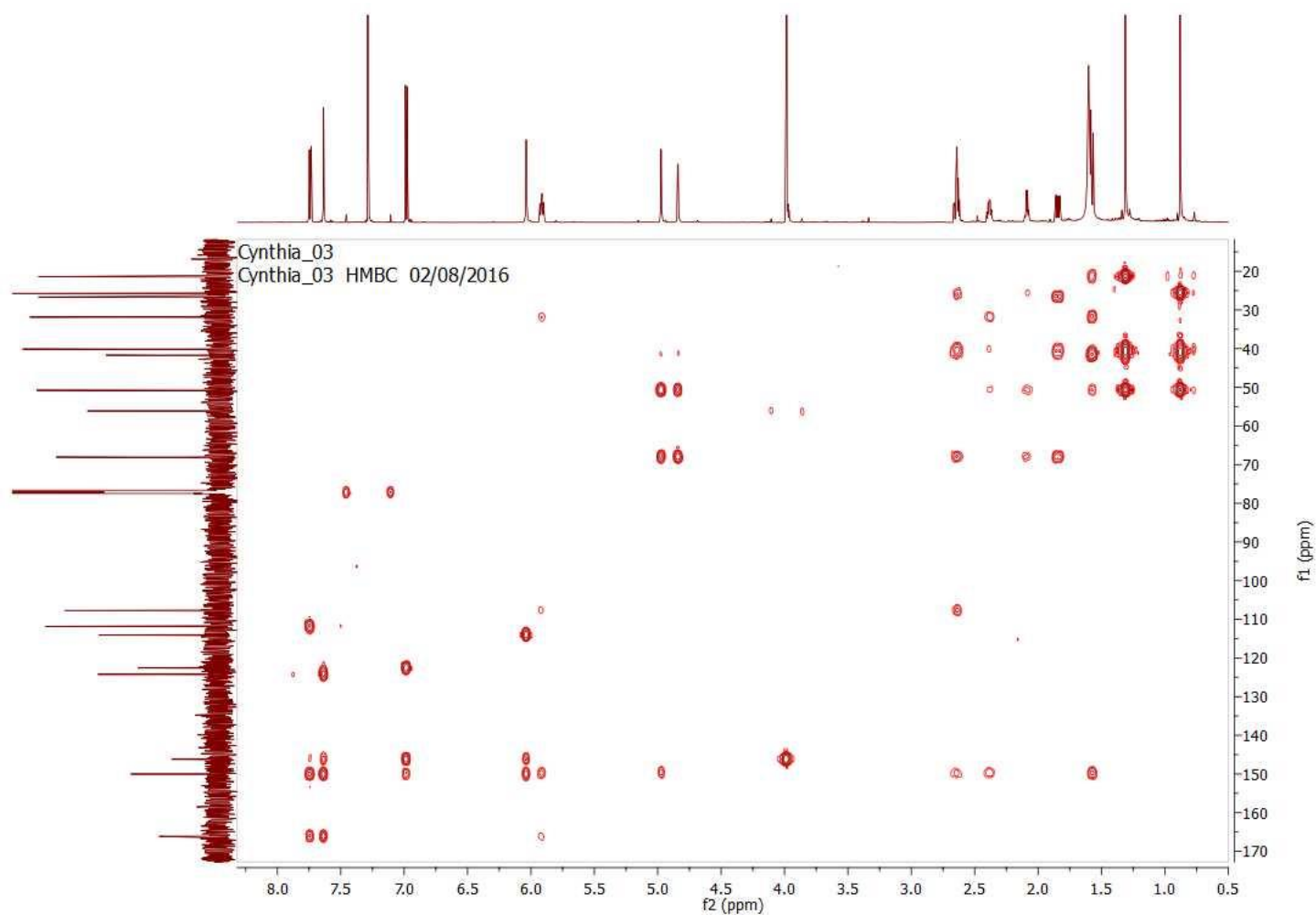


Figura 35. Espectro de HMBC (CDCl₃) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

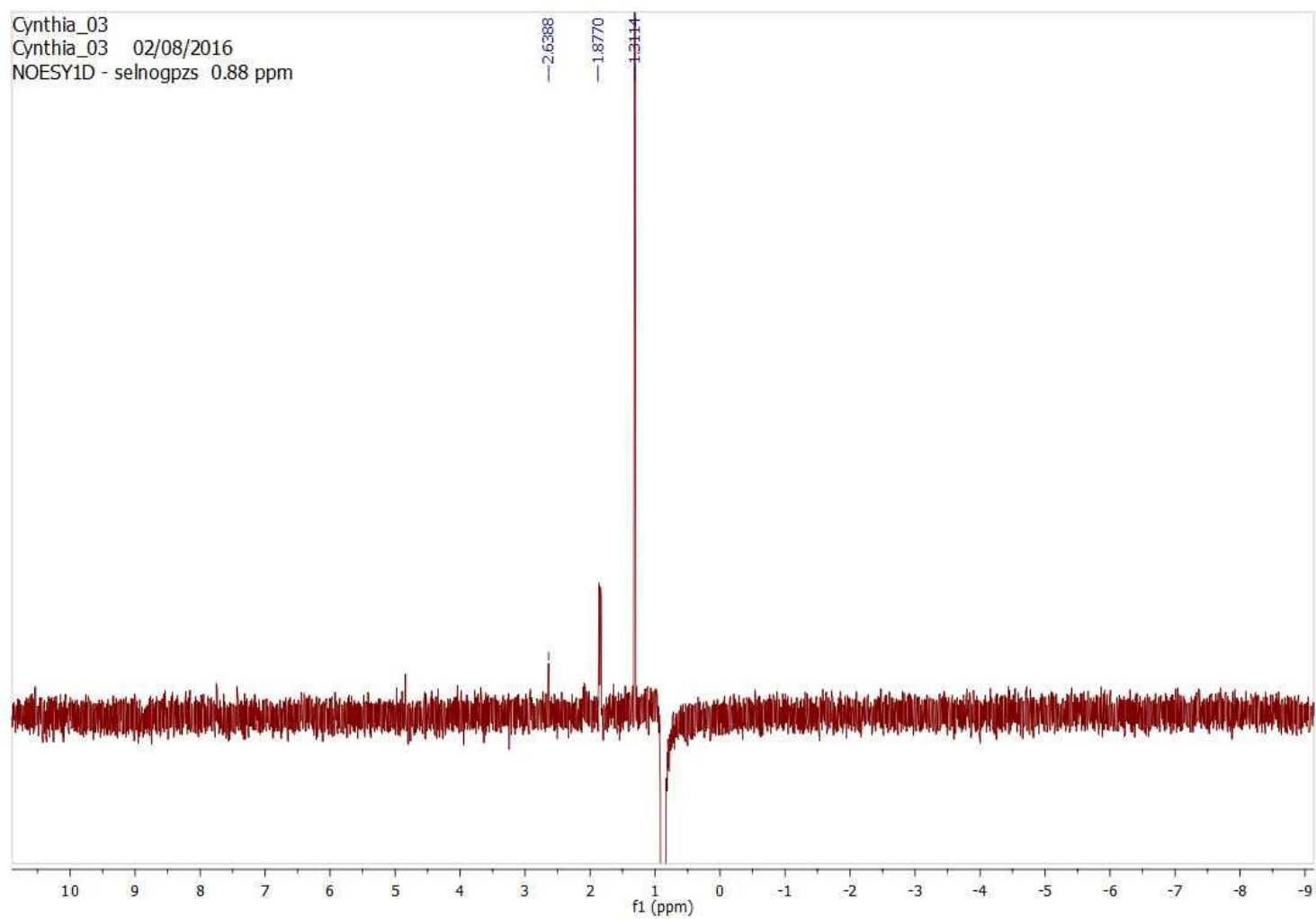


Figura 36. Espectro de NOESY 1-D em δ_H (ppm) 0.88 (600 MHz, $CDCl_3$) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

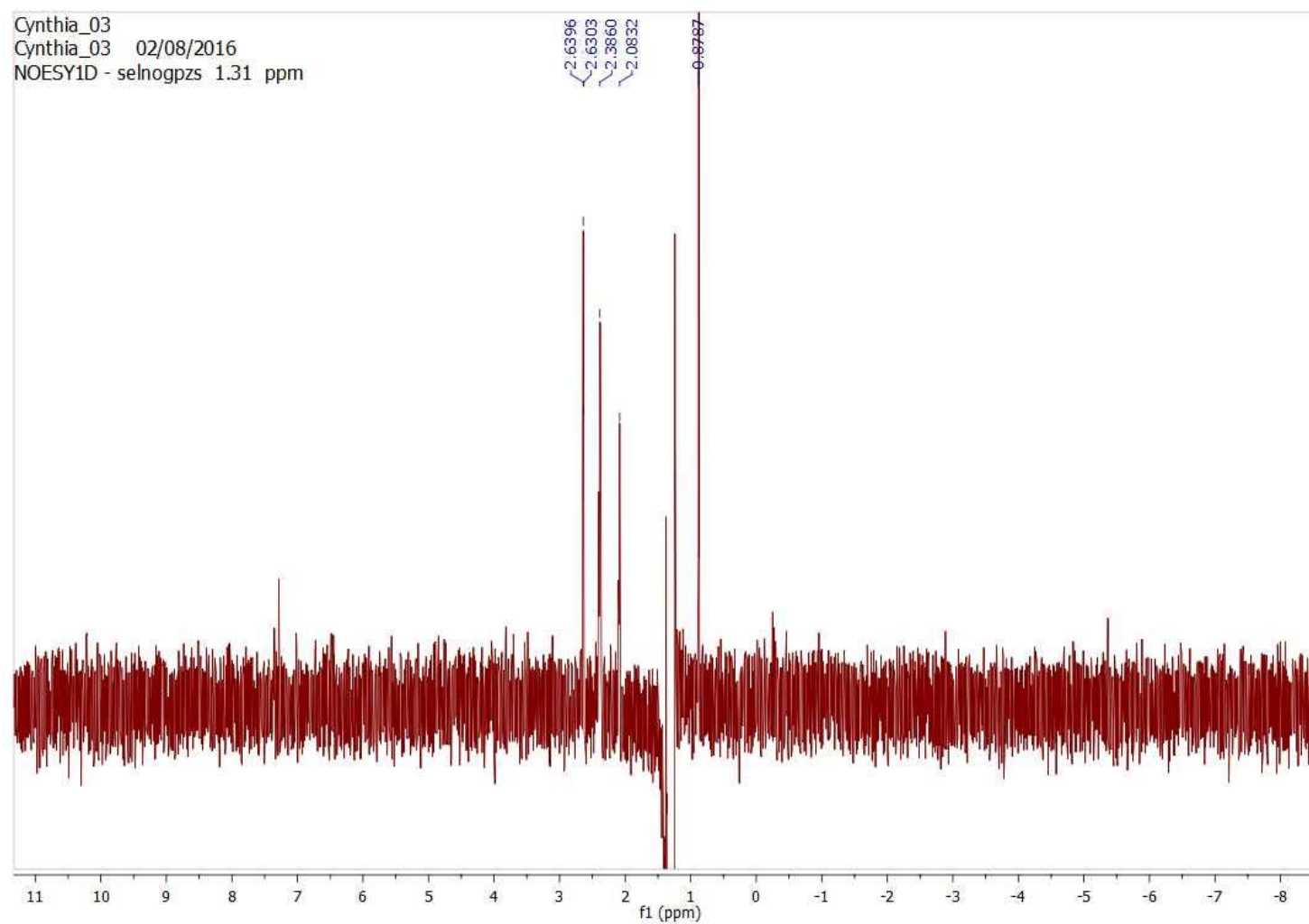


Figura 37. Espectro de NOESY 1-D em δ_H (ppm) 1.31 (600 MHz, $CDCl_3$) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

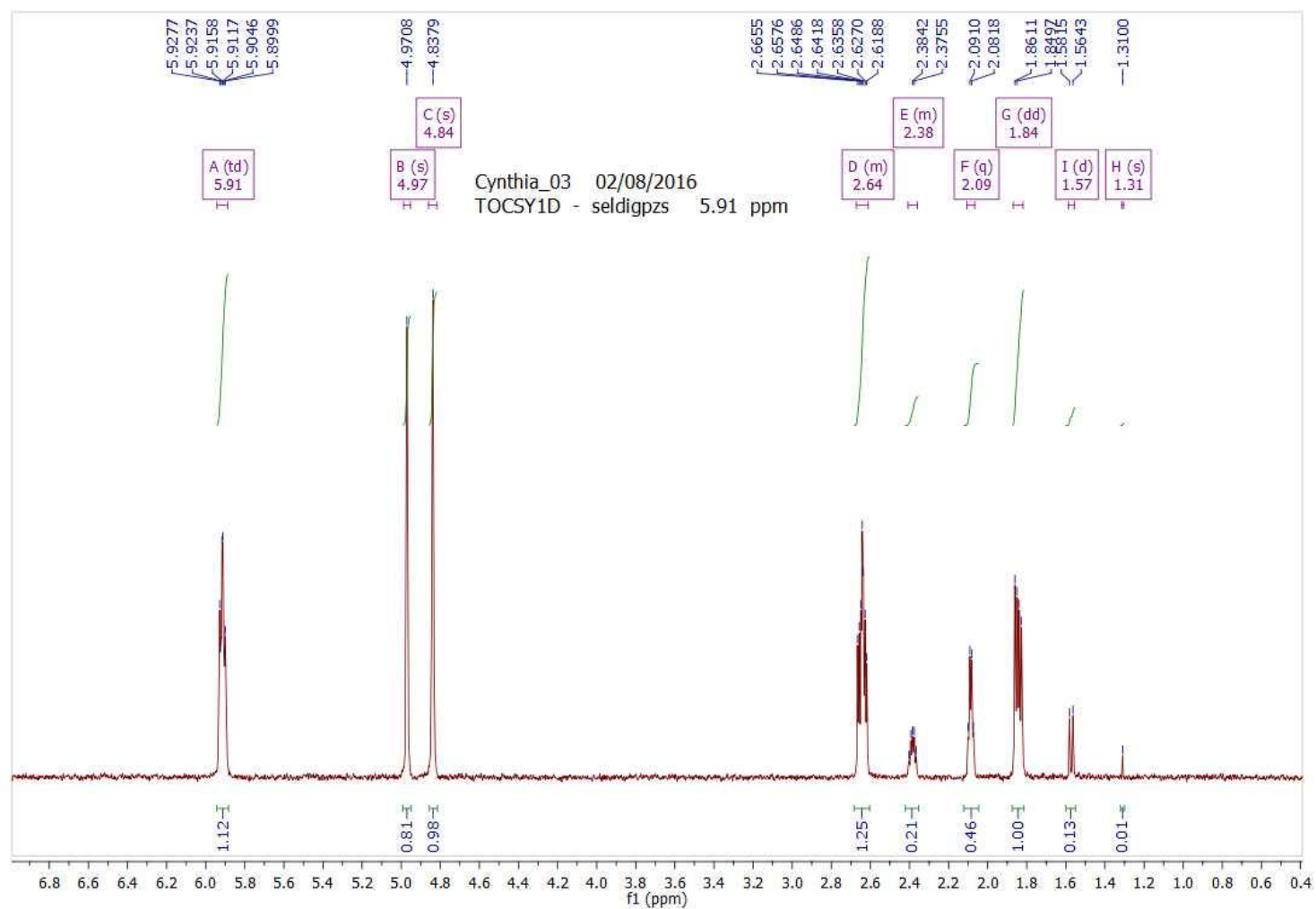


Figura 38. Espectro de TOCSY 1-D δ_H (ppm) 5.91 (600 MHz, $CDCl_3$) da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**.

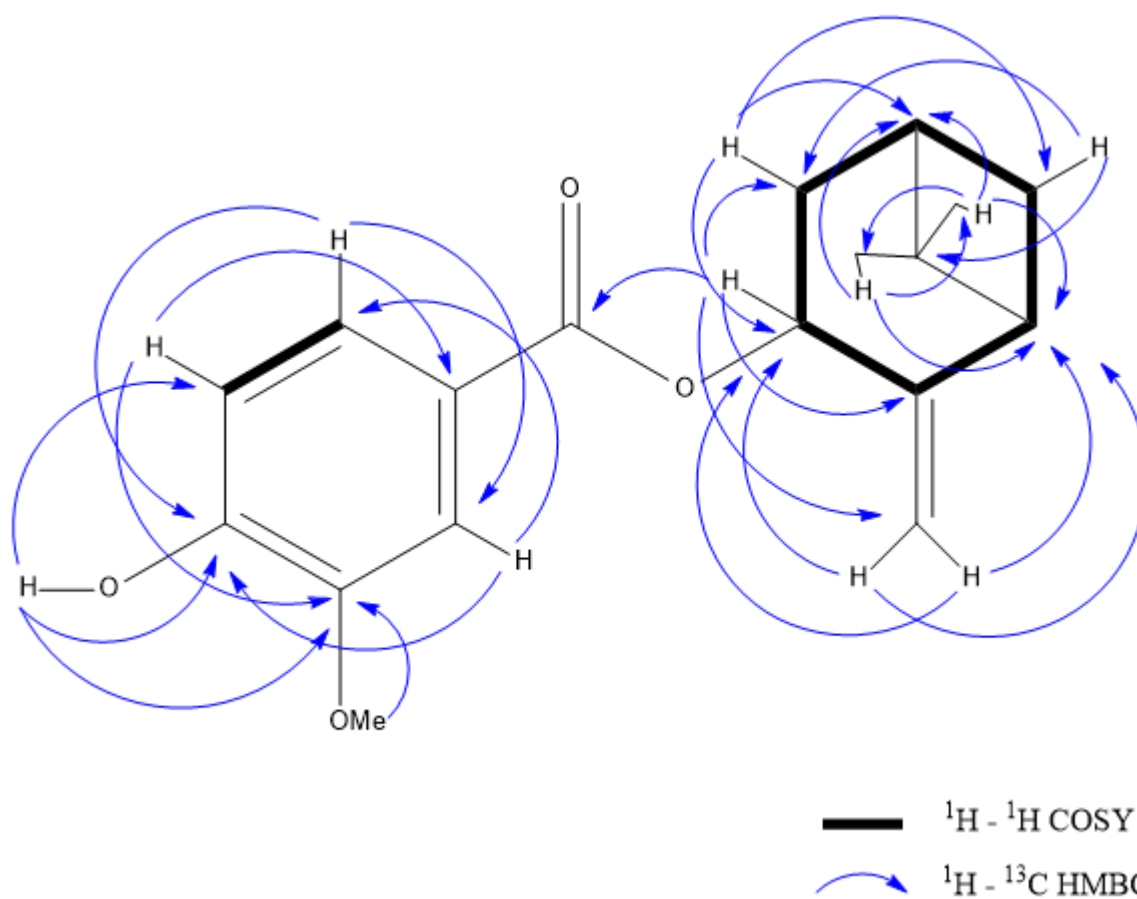


Figura 39. Correlações de COSY e HMBC da substância # 3, identificada como **vanilato de pinocarvila**, isolada das folhas de *H. brasiliense*.

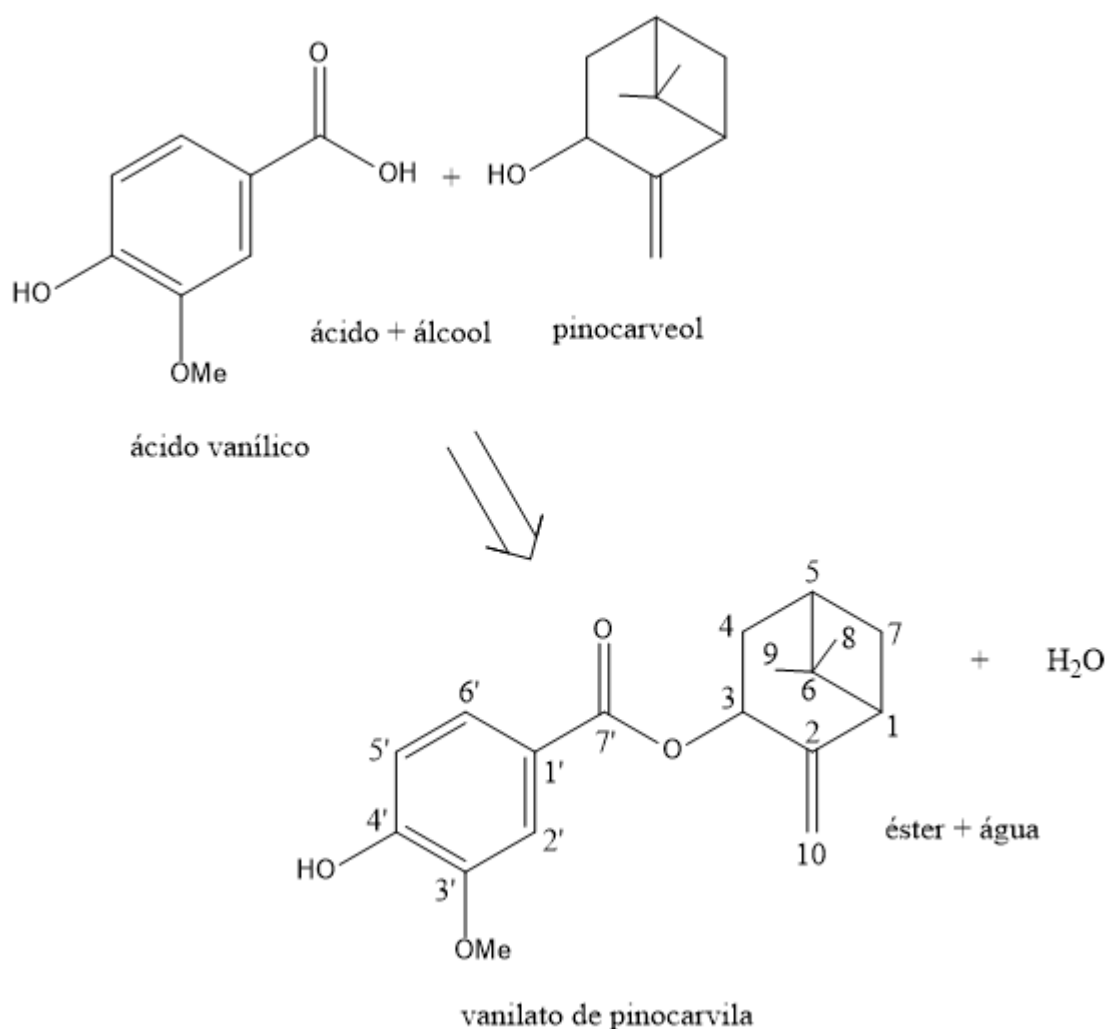


Figura 40. Proposta de biogênese da substância # 3 pela reação de esterificação entre os precursores ácido vanílico e pinocarveol para a formação do éster inédito **vanilato de pinocarvila**, isolado das folhas de *H. brasiliense*.

3.11.3 Substância # 2 – *hedyosumina D*

A substância # 2, proveniente da fração T12-30', apresentou-se na forma de um pó branco (2,5 mg). O espectro no UV mostrou uma banda em 210 nm (**figura 8**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS forneceram a fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_4$, que requer 8 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 289.1435 $[M+H]^+$ (calculada 289.1440). ESI-QqTOF-MS (**figura 41**) mostrou íons filhos em m/z 247 e 229, indicando as perdas de $COCH_2$ e H_2O , fragmentos compatíveis com a estrutura proposta.

Os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC e TOCSY 1-D em 2.76 e 4.67 ppm (**Figuras 42 a 48**) apresentaram sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise de ESI-QqTOF-MS. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 17 sinais. Foram observados sinais característicos de γ -lactona α , β , insaturada com δ_{C} (ppm) 170.4 (C=O), δ_{C} (ppm) 120.7 (α – C-11) e δ_{C} (ppm) 170.6 (β – C-7). O sinal em δ_{C} (ppm) 172.5 foi atribuído ao carbono carbonílico quaternário da acetila. Os sinais em δ_{C} (ppm) 142.9 e 141.3 foram atribuídos aos carbonos quaternários olefínicos C-10 e C-4, respectivamente. O sinal em δ_{C} (ppm) 116.4 foi característico de CH_2 olefínico exocíclico, com sinais de δ_{H} (ppm) 5.02 (s, 1H) e 5.11 (s, 1H). Os sinais em δ_{C} (ppm) 125.1 e δ_{H} (ppm) em 5.39 (s, 1H) foram atribuídos ao carbono metínico em C-3. Sinais em δ_{C} (ppm) 15.0 e δ_{H} (ppm) em δ_{H} (ppm) 1.72 (d, 1.9 Hz) foram atribuídos à metila em C-14 e sinais em δ_{C} (ppm) 20.8 e δ_{H} (ppm) em 2.02 (s), à metila da acetila. Estes dados (**Tabela 11**) estão de acordo com os descritos na literatura e levaram à identificação da substância # 2 como sendo a lactona sesquiterpênica acetilada de esqueleto guaianolídeo **hedyosumina D** (13-acetoxi-1 α ,5 α H-guaia-3,7(11),10(15)-trien-8 α -12-olida, **Figura 49**), encontrada pela primeira vez em *Hedyosmum orientale* (Chloranthaceae) proveniente da China (Su *et al.* 2008). Esta foi a primeira vez que esta substância foi isolada de *H. brasiliense*.

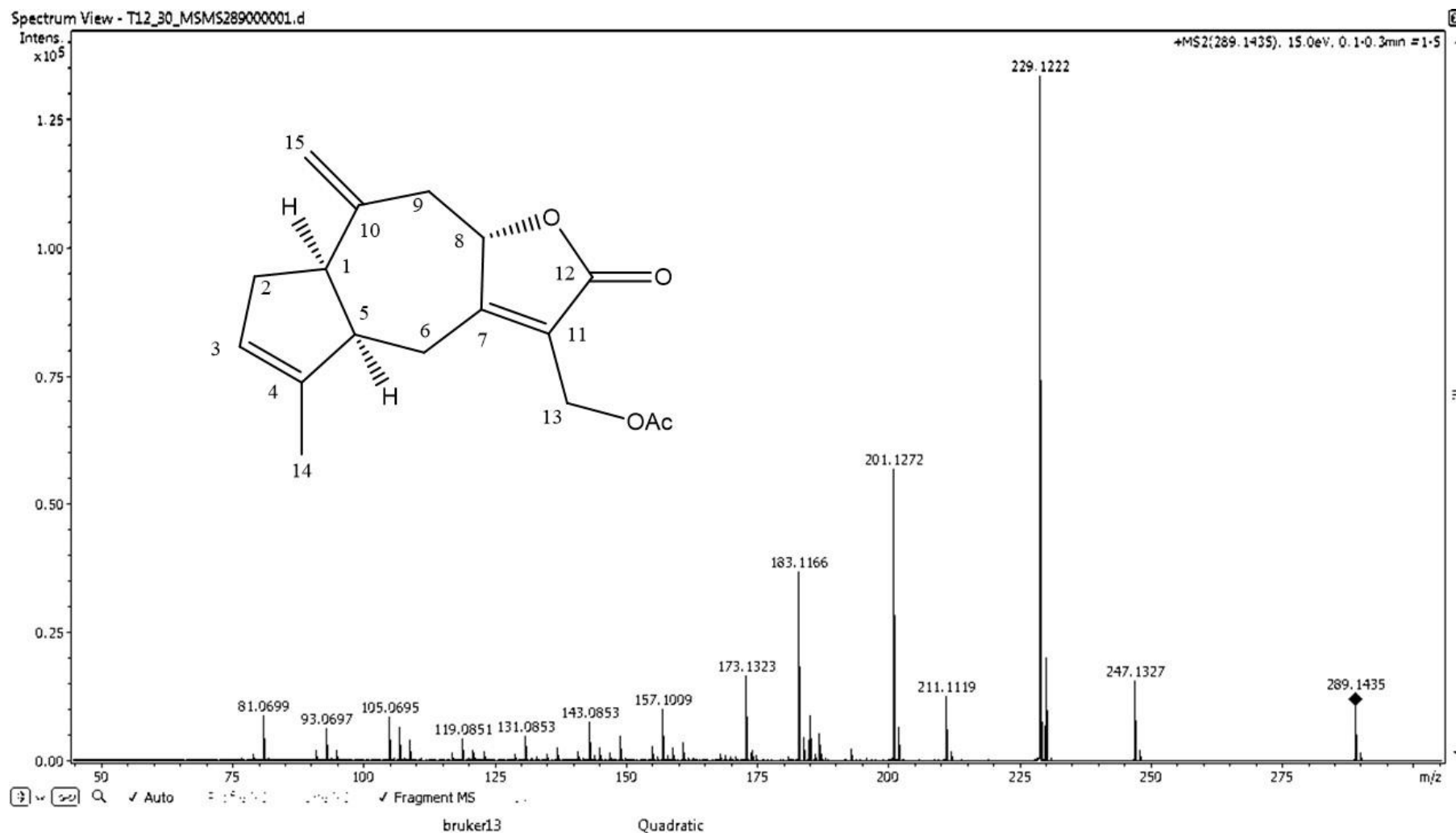


Figura 42. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

Tabela 11. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 2 (**hedyosumina D**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura (Su *et al.* 2008).

Posição	# 2 (hedyosumina D)			Literatura (Su <i>et al.</i> 2008)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz,)	HMBC	d_{C}	d_{H} (mult., J Hz)
1	48.9	3.06 (m, 1H)	C-2, C-5, C-6, C-8, C-10, C-15	48.9	3.09 (m, 1H)
2 α	34.5	2.39 (br d, 8.5, 1H)	C-1, C-3, C-4	34.5	2.43 (br d, 8.4, 1H)
2 β		2.39 (br d, 8.5, 1H)			2.43 (br d, 8.4, 1H)
3	125.1	5.39 (s, 1H)		124.9	5.42 (s, 1H)
4	141.3			141.2	
5	50.8	2.47 (m, 1H)	C-2, C-3, C-4, C-6	50.7	2.51 (m, 1H)
6 α	25.8	1.93 (m, 1H)	C-5, C-11, C-12	25.8	1.95 (d, 13.2, 1H)
6 β		2.75 (d, 13.1, 1H)			2.79 (d, 13.2, 1H)
7	170.6			170.5	
8	83.7	4.67 (dd, 11.3, 5.6, 1H)		83.6	4.71 (dd, 10.5, 5.5, 1H)
9 α	40.0	2.00 (m, 1H)		39.9	2.05 (dd, 12.0, 10.5, 1H)
9 β		3.04 (dd, 11.9, 5.6, 1H)			3.05 (dd, 12.0, 5.5, 1H)
10	142.9			142.9	
11	120.7			120.6	
12	170.4			170.2	
13	54.7	4.75 (dd, 2.6, 5.9, 2H)	C-11, C-12	54.7	4.79 (d, 2.5, 2H)
14	15.0	1.72 (d, 1.9, 3H)	C-3, C-4, C-5	14.9	1.75 (s, 3H)
15	116.4	5.02 (s, 1H)	C-1, C-9	116.4	5.06 (s, 1H)
		5.11 (s, 1H)			5.15 (s, 1H)
$\text{CH}_3\text{COO-}$	20.8	2.02 (s, 3H)		20.8	2.06 (s, 3H)
$\text{CH}_3\text{COO-}$	172.5			172.4	

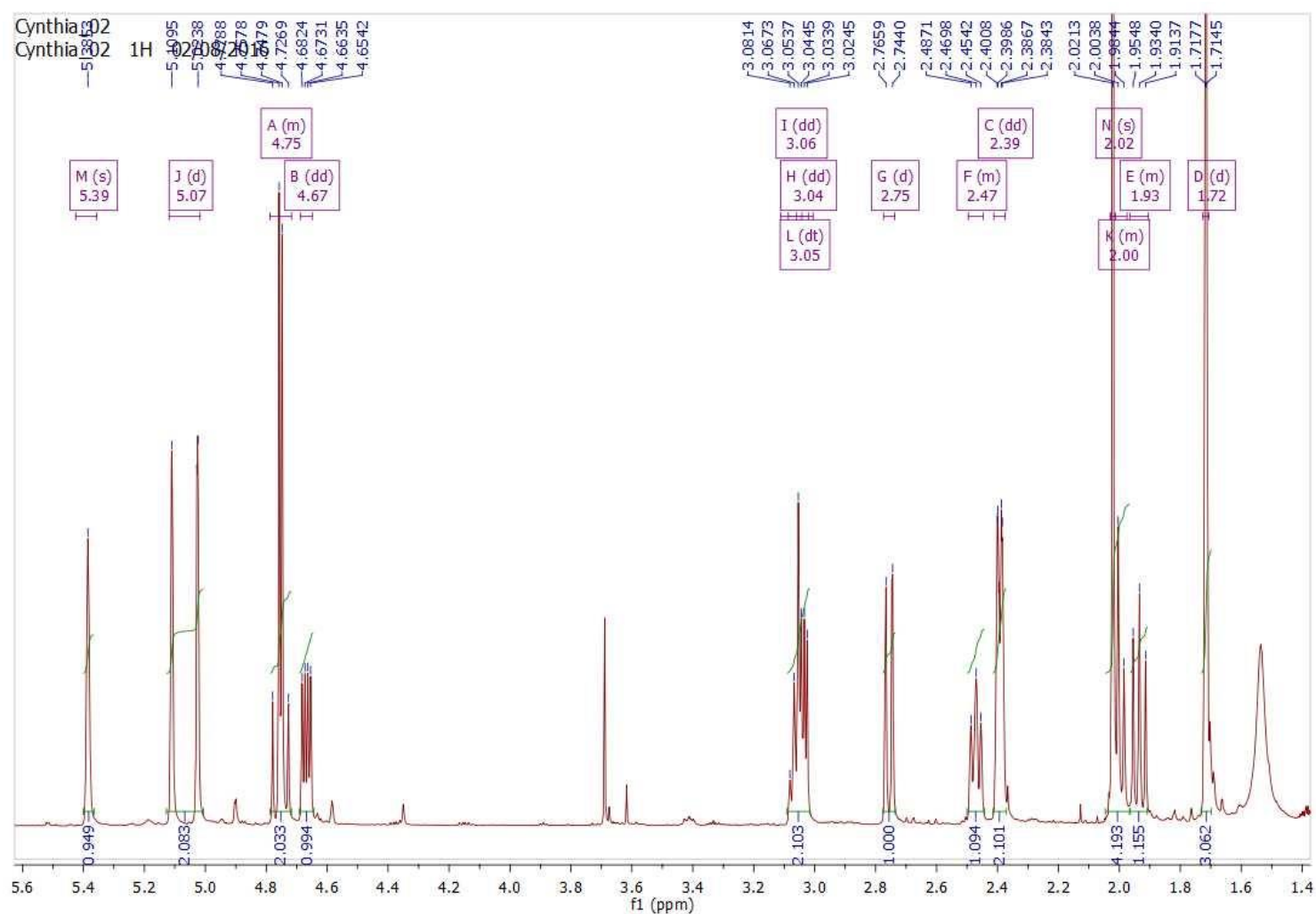


Figura 43. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

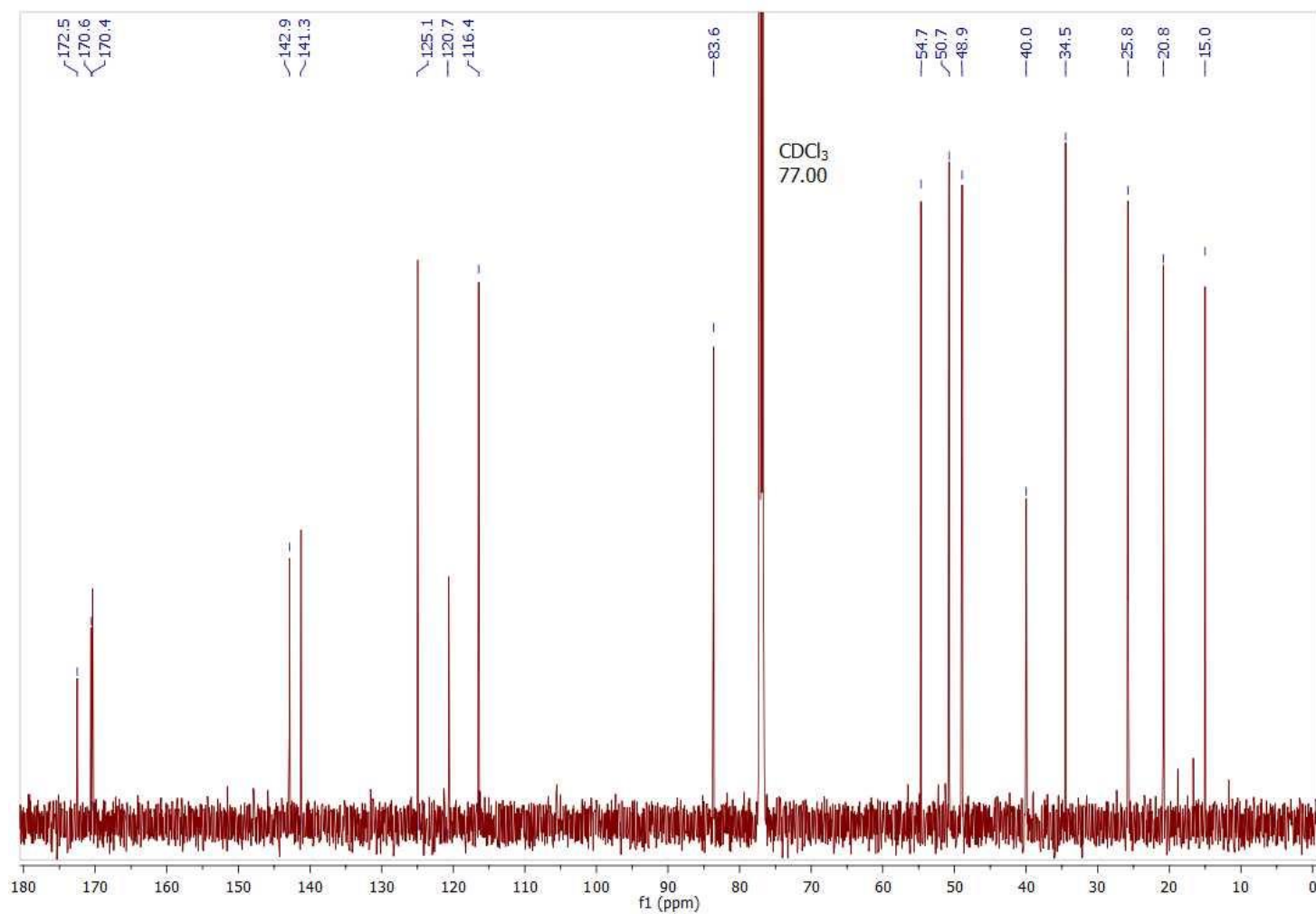


Figura 44. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

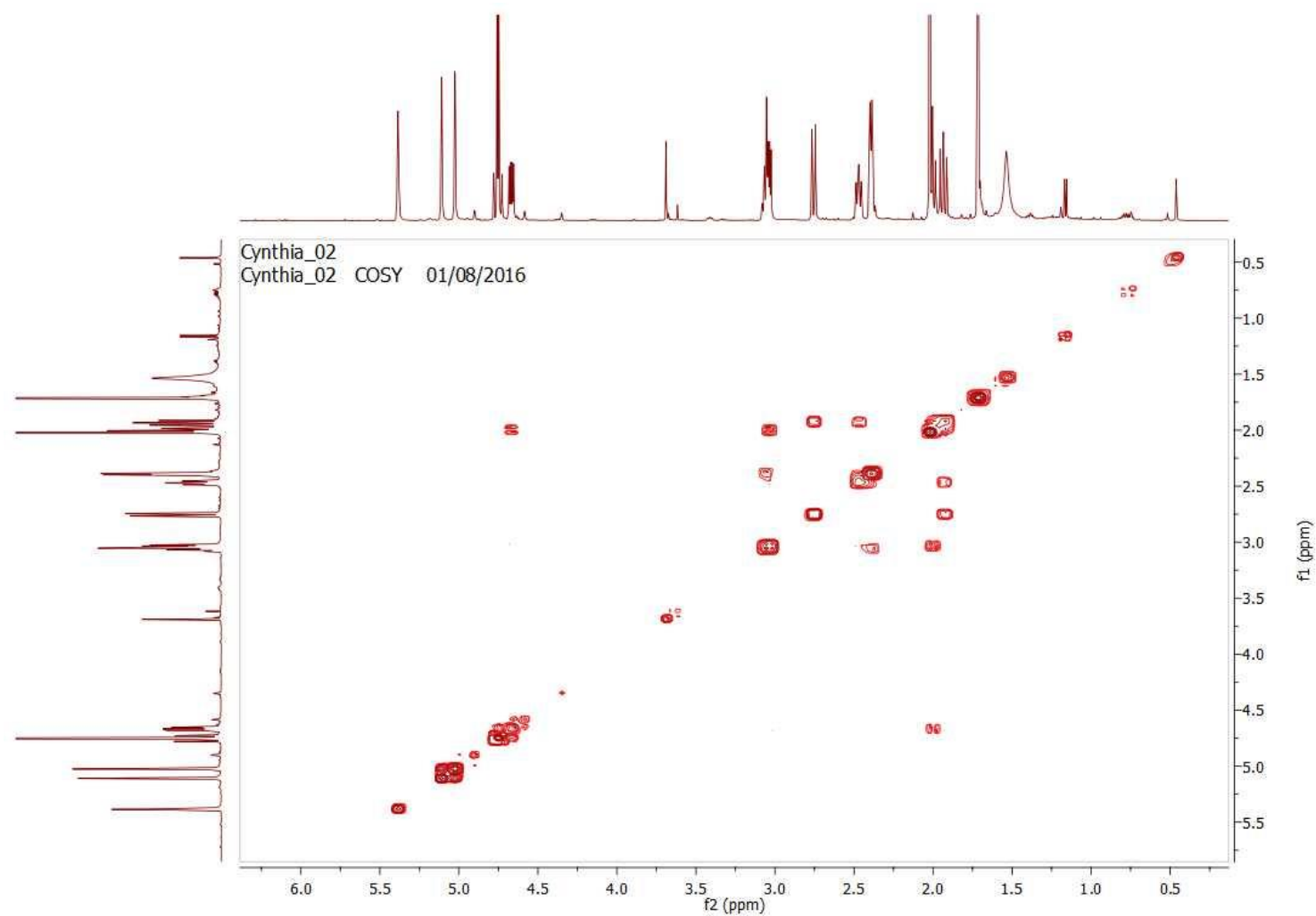


Figura 45. Espectro de COSY (CDCl_3) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

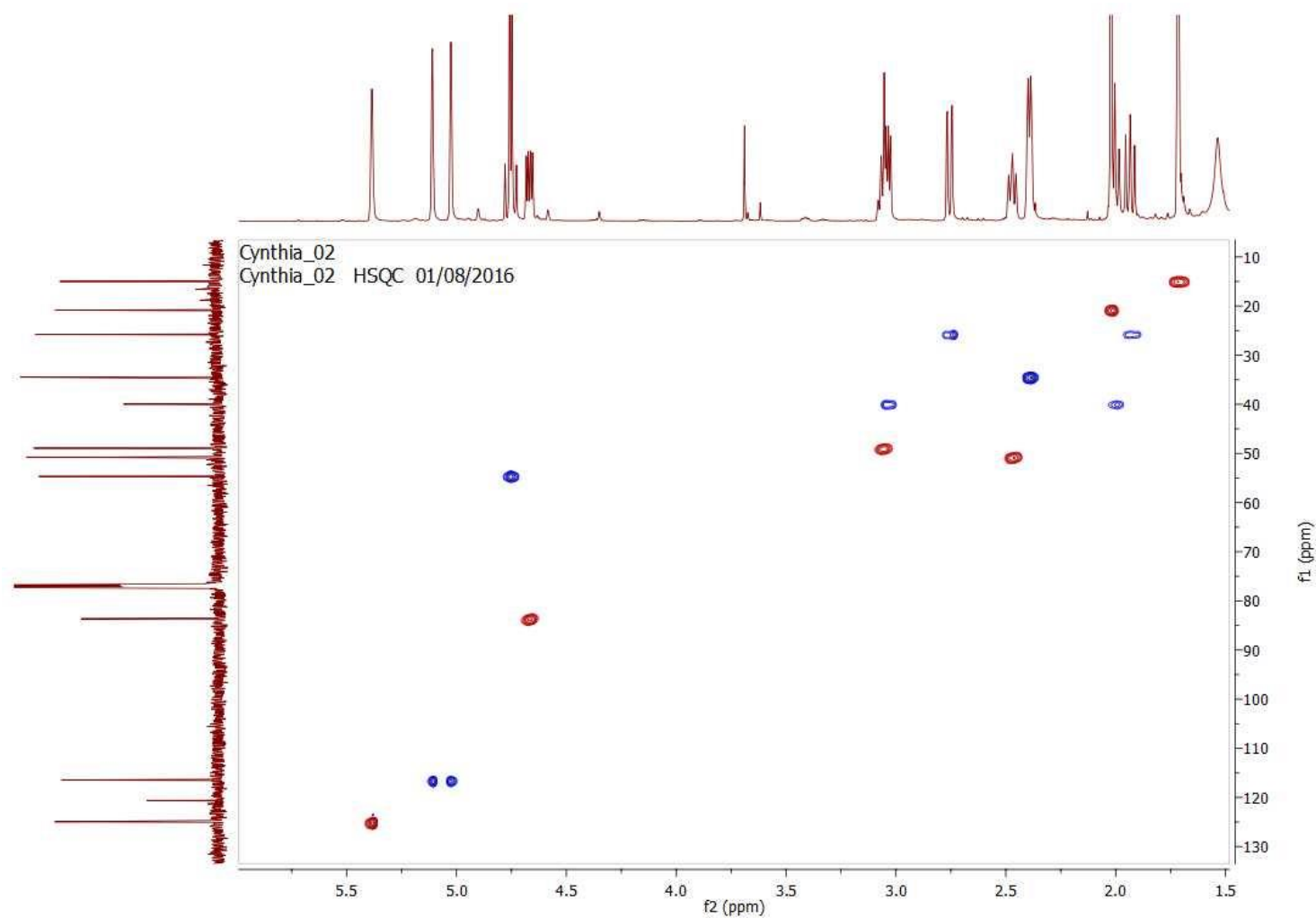


Figura 46. Espectro de HSQC (CDCl_3) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

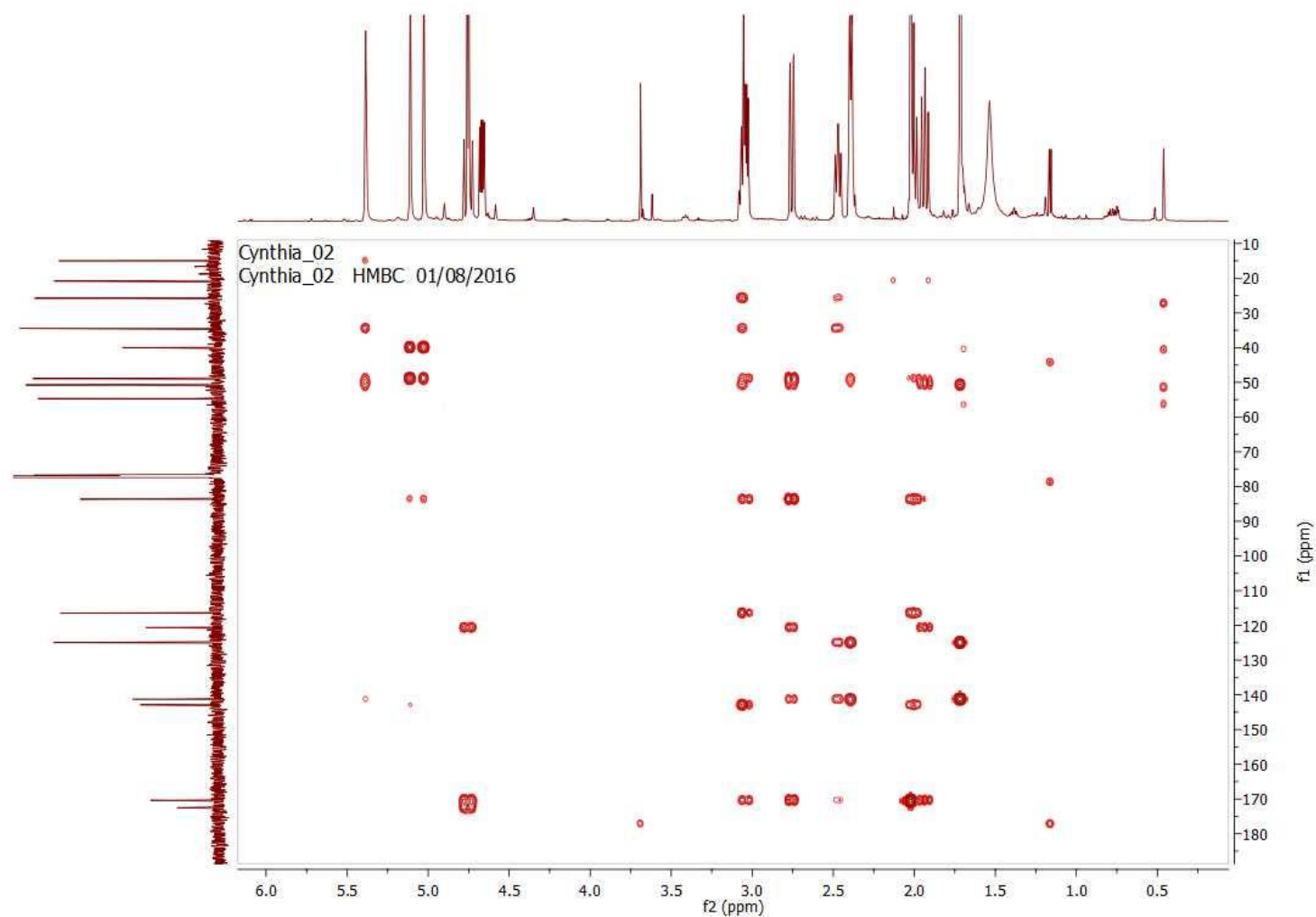


Figura 47. Espectro de HMBC (CDCl_3) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

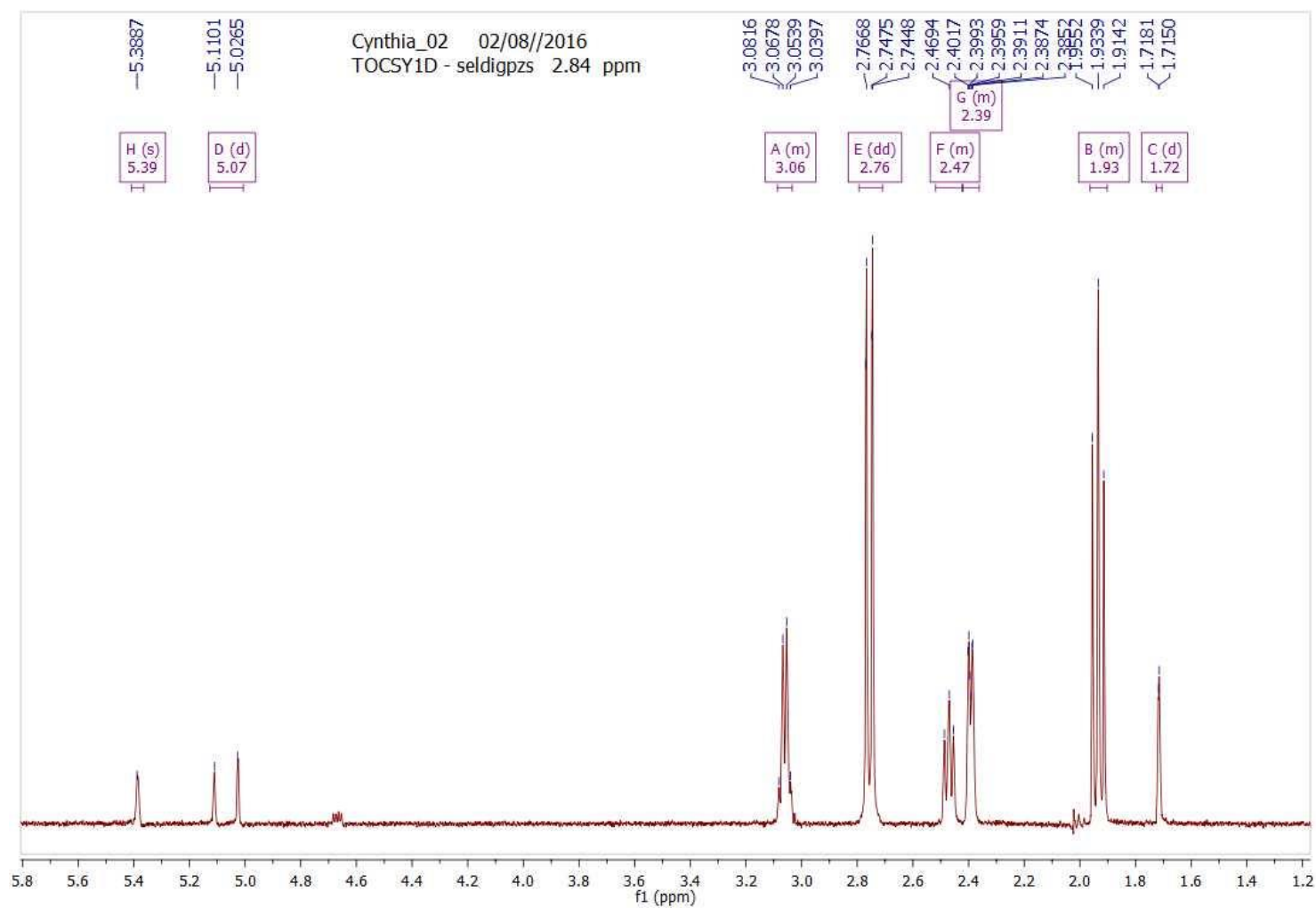


Figura 48. Espectro de TOCSY 1-D δ_H (ppm) 2.76 (600 MHz, $CDCl_3$) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

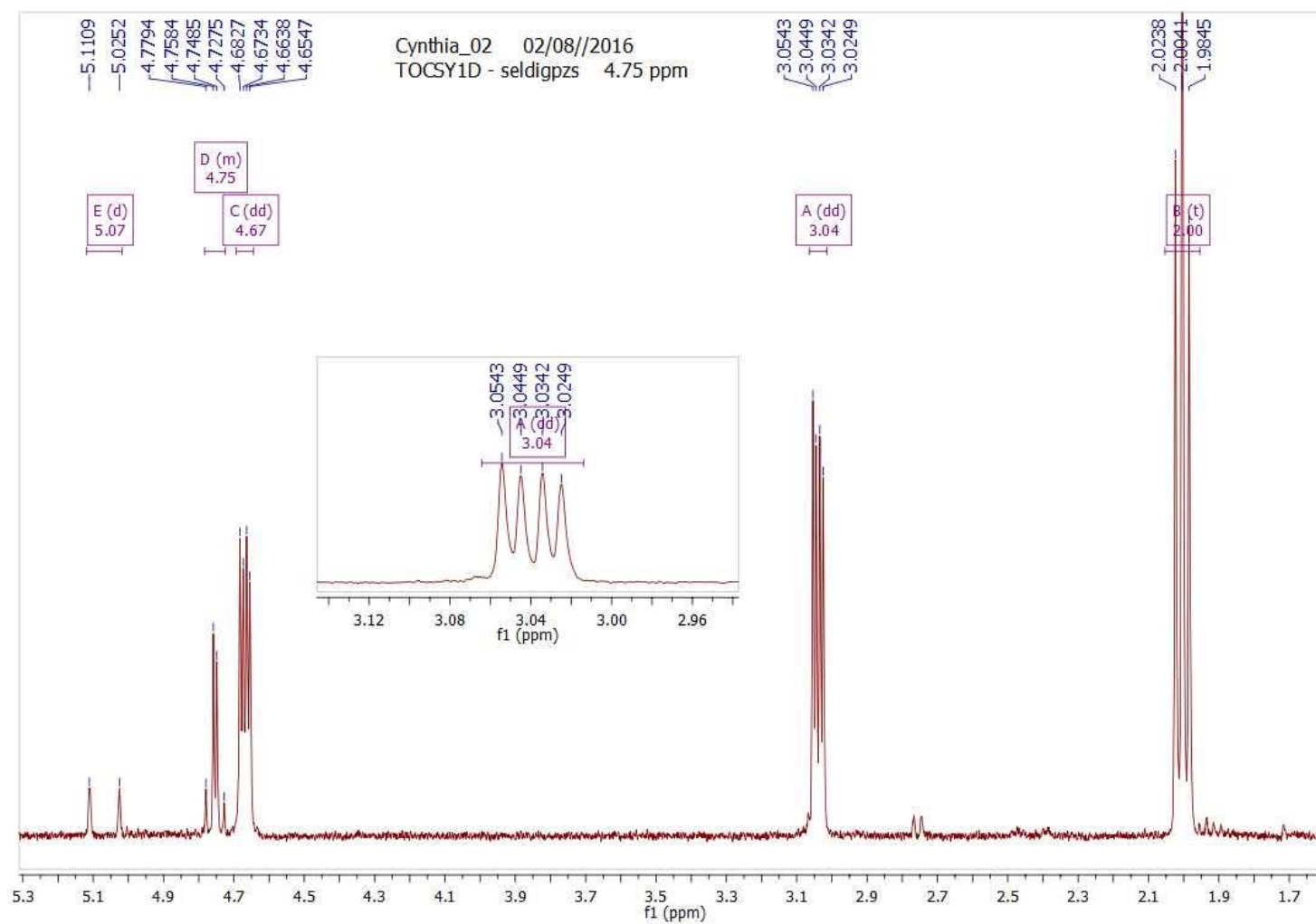


Figura 49. Espectro de TOCSY 1-D δ_H (ppm) 4.67 (600 MHz, $CDCl_3$) da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**.

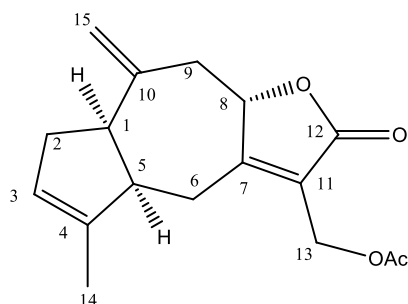


Figura 50. Estrutura química da substância # 2, identificada como **hedyosumina D**, isolada das folhas de *H. brasiliense*.

3.11.4 Substância # 4 – 15-acetoxi-isogermafurenolídeo

A substância # 4, proveniente da fração T14-17', apresentou-se na forma de um líquido viscoso amarelo (9,2 mg). O espectro no UV mostrou uma banda em 220 nm (**figura 9**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS forneceram a fórmula molecular $C_{17}H_{22}O_4$, que requer 7 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 291.1587 $[M+H]^+$ (calculada 291.1597). ESI-QqTOF-MS (**figura 51**) mostrou íons filhos em m/z 273, 231, 213 e 185, indicando as perdas de H_2O , $COCH_2$, H_2O e $CH_2=CH_2$, respectivamente, fragmentos compatíveis com a estrutura proposta.

Todos os sinais foram extraídos dos espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 52 a 56**) e estão apresentados na **Tabela 12**. Foram observados sinais característicos de γ -lactona α , β , insaturada com δ_C (ppm) 174.6 (C=O), δ_C (ppm) 120.6 (α – C-11) e δ_C (ppm) 161.2 (β – C-7). O sinal em δ_C (ppm) 170.6 foi atribuído ao carbono carbonílico de éster e o sinal em δ_C (ppm) 143.7, ao carbono quaternário olefínico C-4. Os sinais em δ_C (ppm) 113.0 e 115.0 foram atribuídos aos CH_2 olefínicos terminais em C-2 e C-3, respectivamente, com sinais de δ_H (ppm) 4.93 (dd, 17.5, 0.5 Hz, 1H) e 4.97 (dd, 10.8, 0.5 Hz, 1H) acoplados a C-2 e sinais de δ_H (ppm) 4.98 (t, 1H) e 5.24 (t, 1H) acoplados a C-3. O sinal em δ_C (ppm) 145.5 foi atribuído ao C-1 com um sinal de δ_H (ppm) 5.61 (dd, 17.5, 10.8 Hz, 1H). Sinais em campo mais alto a δ_C (ppm) 8.3, 16.4 e 21.0 foram característicos das metilas em C-13, C-14 e da acetila, respectivamente. A comparação destes resultados com os dados da literatura levou à identificação da substância # 4 como sendo a lactona sesquiterpênica acetilada de esqueleto elemanolídeo **15-acetoxi-isogermafurenolídeo** (1-hidroxi-10(15)-metilenopodoandina, **Figura 57**), encontrada pela primeira vez em *H. brasiliense* (Chloranthaceae) proveniente de Santa Catarina (Amoah *et al.* 2013).

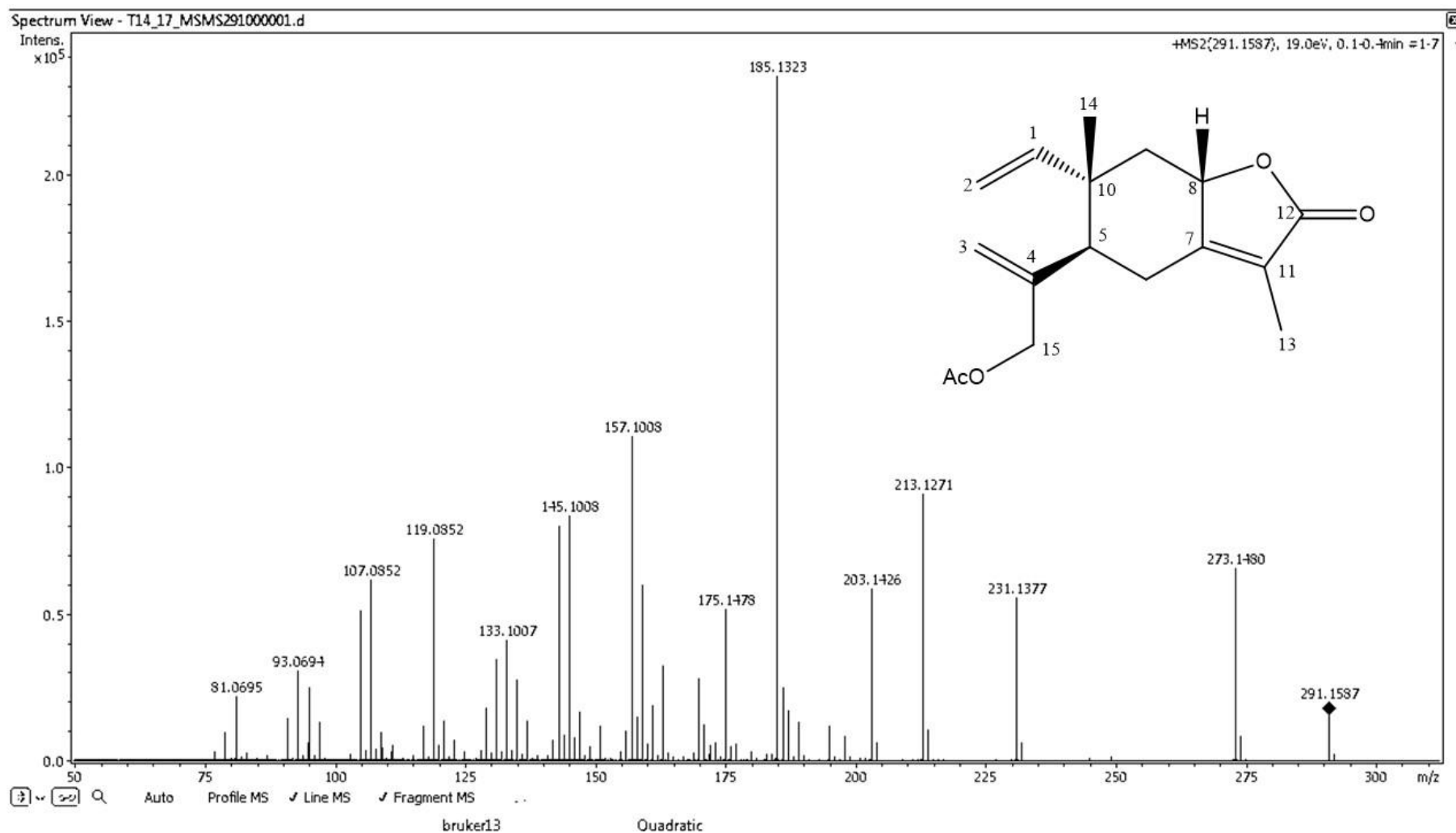


Figura 51. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermafurenolideo**.

Tabela 12. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 4 (15-acetoxi-isogermafurenolídeo, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	# 4 (15-acetoxi-isogermafurenolídeo)			Literatura (Amoah <i>et al.</i> 2013)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
1	145.5	5.61 (dd, 17.5, 10.8, 1H)		145.5	5.68 (dd, 17.4, 10.7, 1H)
2a	113.0	4.93 (dd, 17.5, 0.5, 1H)	C-10	113.1	5.00 (dd, 17.4, 0.5, 1H)
2b		4.97 (dd, 10.8, 0.5, 1H)	C-10		5.05 (dd, 10.7, 0.5, 1H)
3a	115.1	4.98 (t, 1H)	C-5, C-15	115.3	5.06 (dd, 1.3, 1.0, 1H)
3b		5.24 (t, 1H)	C-5, C-15		5.32 (dd, 1.3, 1.3, 1H)
4	143.7			143.7	
5	48.5	2.00 (dd, 10.3, 4.1, 1H)		48.6	2.09 (ddq, 13.1, 4.2, 0.6, 1H)
6ax	28.6	2.51 (ddd, 14.5, 2.4, 1.2, 1H)		28.7	2.58 (ddqd, 14.4, 13.1, 1.6, 0.9, 1H)
6eq		2.63 (dd, 14.5, 4.1, 1H)			2.71 (dd, 14.2, 4.2, 1H)
7	161.2			161.7	
8	77.7	4.77 (dd, 11.7, 6.1, 1H)		77.9	4.85 (ddqd, 11.6, 6.1, 1.4, 0.9, 1H)
9ax	45.4	1.28 (t, 1H)		45.5	1.36 (ddq, 12.4, 11.6, 0.3, 1H)
9eq		2.16 (dd, 12.1, 6.1, 1H)			2.23 (dd, 12.4, 6.1, 1H)
10	40.8			40.7	
11	120.6			120.4	
12	174.6			175.1	
13	8.3	1.76 (t, 1.2, 3H)	C-7, C-11, C-12	8.3	1.83 (dd, 1.6, 1.4, 3H)
14	16.4	1.10 (s, 3H)	C-1, C-5, C-9, C-10	16.5	1.18 (dd, 0.6, 0.3, 3H)
15	67.8	4.40 (s, 2H)	C-3, C-4, C-5, CH_3COO -15	67.9	4.48 (dd, 1.3, 1.0, 2H)
CH_3COO -15	21.0	2.02 (s, 3H)	CH_3COO -15	20.9	2.11 (s, 3H)
CH_3COO -15	170.6			171.0	

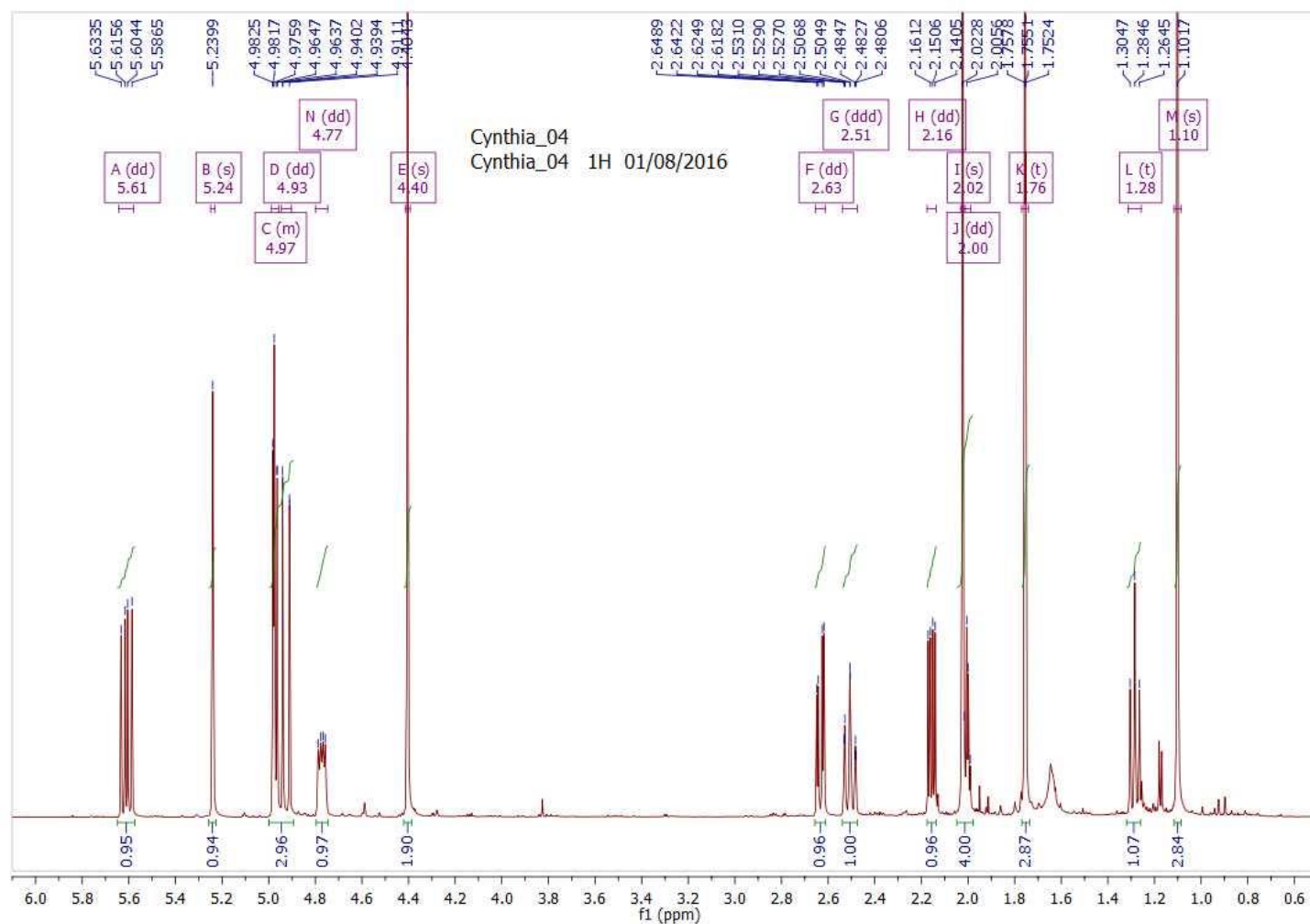


Figura 52. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermafirenolídeo**.

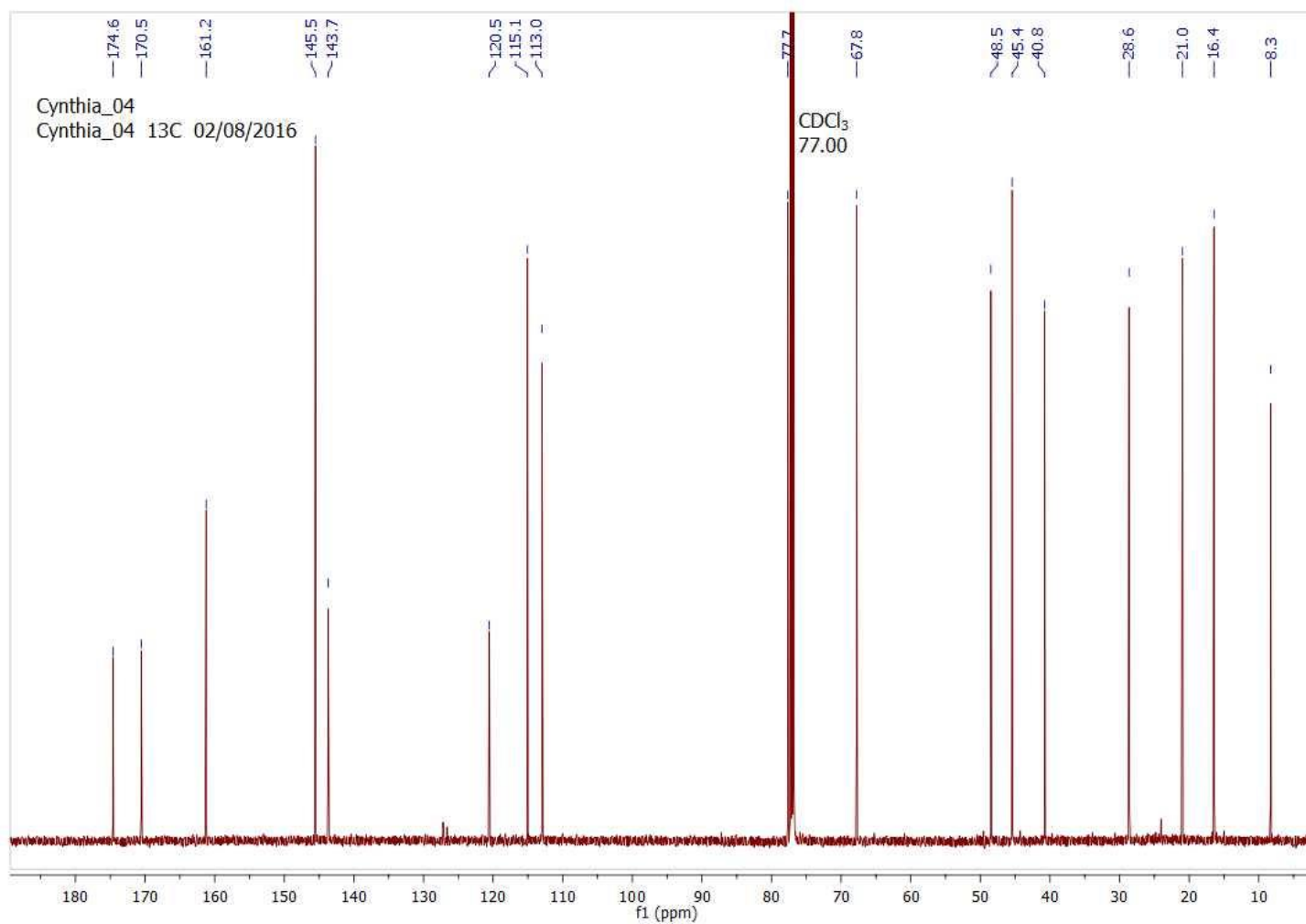


Figura 53. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermafurenolídeo**.

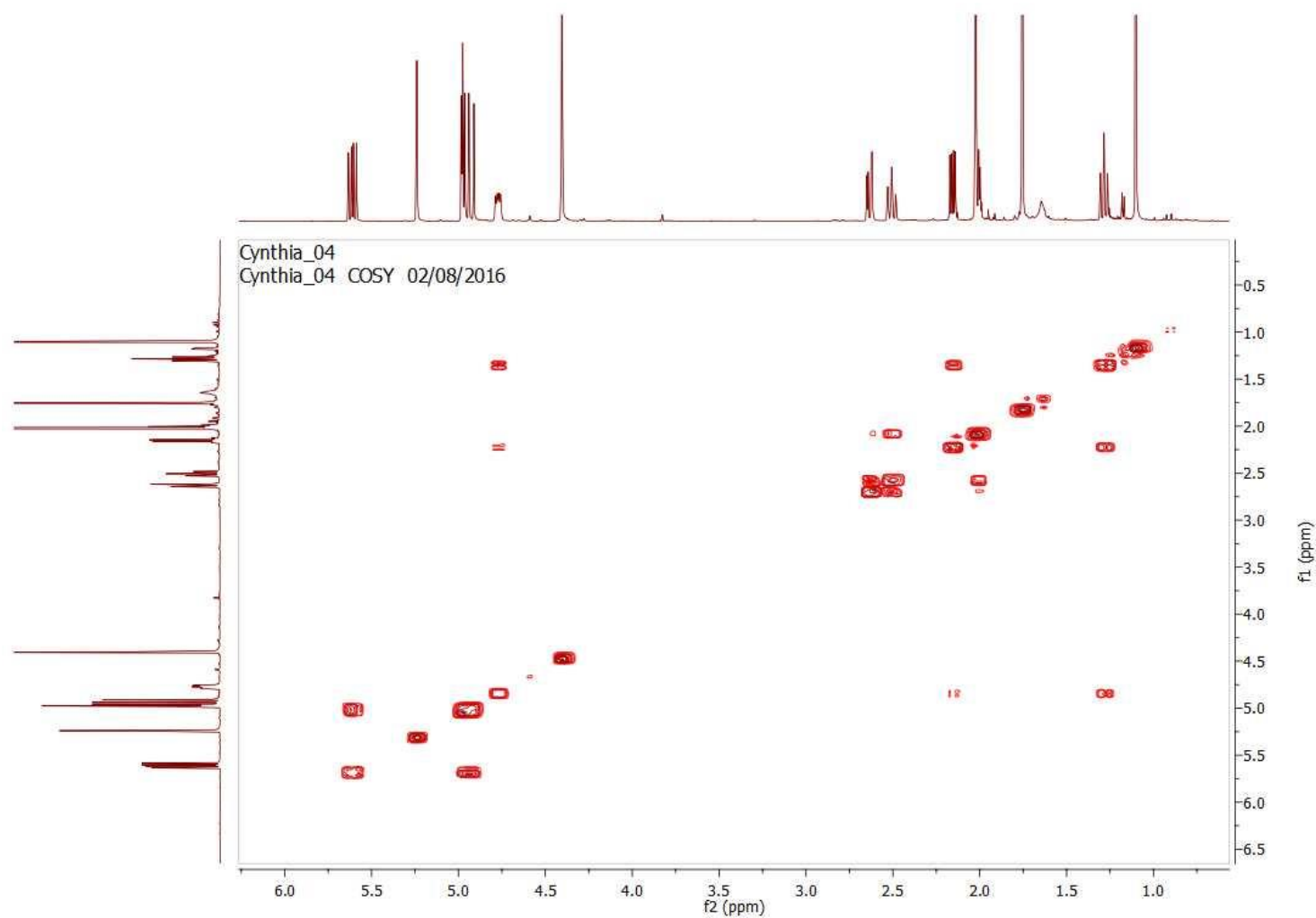


Figura 54. Espectro de COSY (CDCl_3) da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermafurenolídeo**.

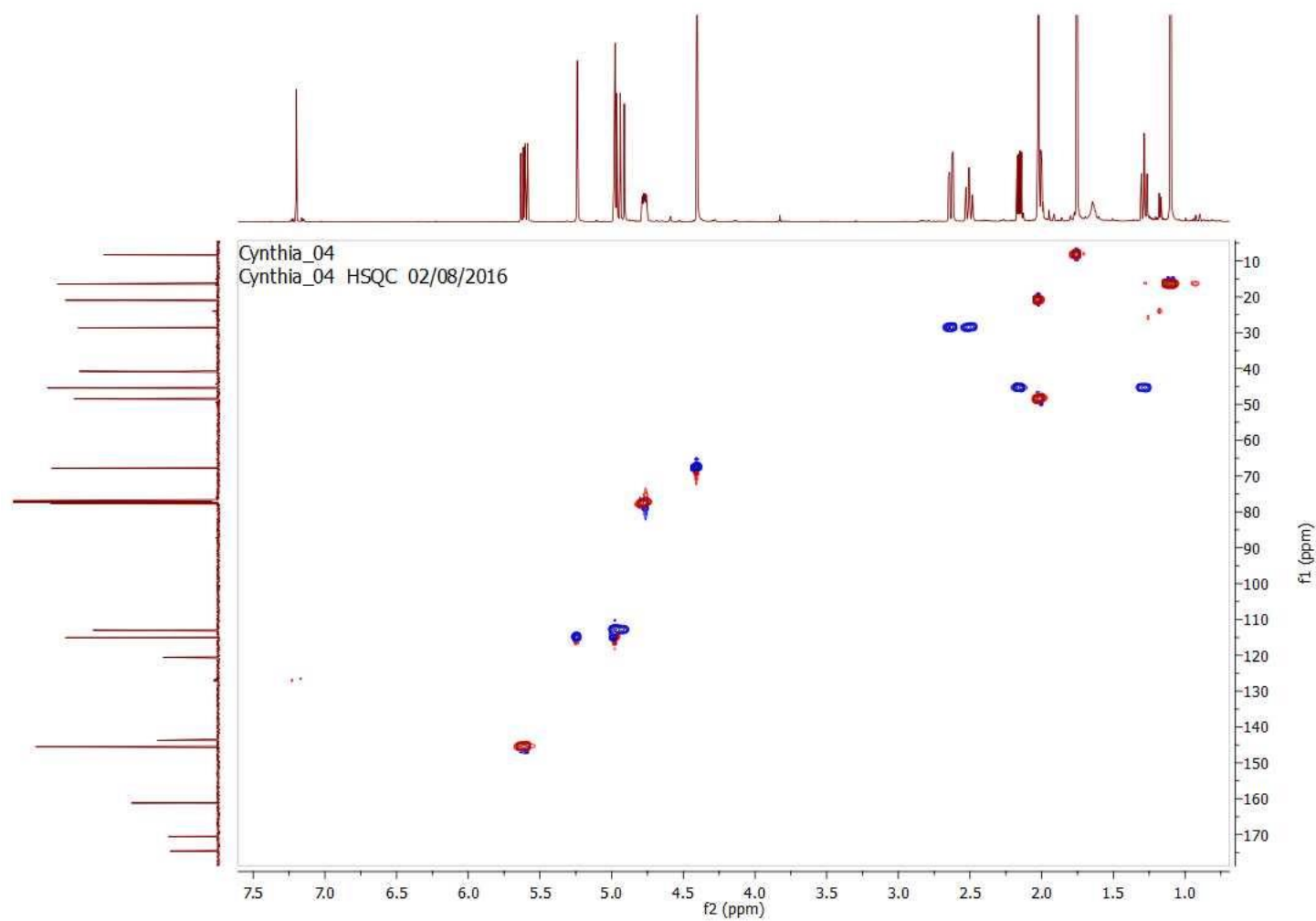


Figura 55. Espectro de HSQC (CDCl₃) da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermafurenolídeo**.

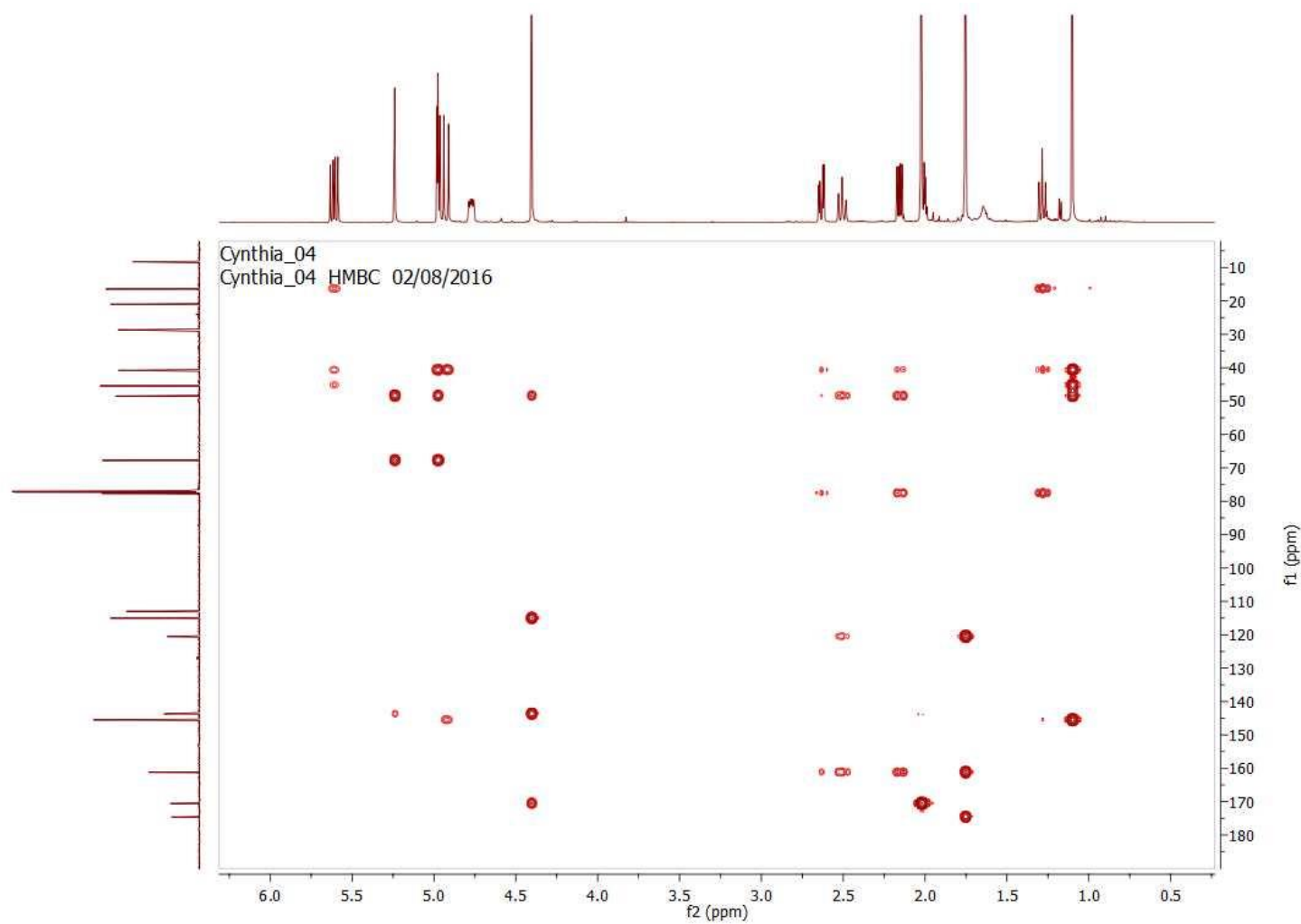


Figura 56. Espectro de HMBC (CDCl₃) da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermacreneolideo**.

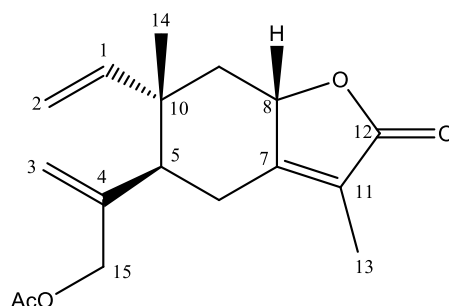


Figura 57. Estrutura química da substância # 4, identificada como **15-acetoxi-isogermafurenolídeo**, isolada das folhas de *H. brasiliense*.

3.11.5 Substância # 8 – *linderolídeo F*

A substância # 8, proveniente da fração T27-18,7', apresentou-se na forma de um líquido viscoso amarelo (2,8 mg). O espectro no UV mostrou uma banda em 220 nm (**figura 12**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS forneceram a fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_3$, que requer 6 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 249.1480 $[M+H]^+$ (calculada 249.1491). ESI-QqTOF-MS (**figura 58**) mostrou íons filhos em m/z 231, 213 e 185, indicando as perdas de H_2O , H_2O e $CH_2=CH_2$, respectivamente, fragmentos compatíveis com a estrutura proposta.

Os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 59 a 63**) apresentaram sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise de ESI-QqTOF-MS. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 15 sinais. Foram observados sinais característicos de γ -lactona α , β , insaturada com δ_C (ppm) 174.7 (C=O), δ_C (ppm) 120.4 (α – C-11) e δ_C (ppm) 161.5 (β – C-7). Um sinal em δ_C (ppm) 148.8 foi atribuído ao carbono quaternário olefínico em C-4. Os sinais em δ_C (ppm) 112.6 e 112.6 foram atribuídos aos CH_2 olefínicos terminal em C-2 e C-3, respectivamente, com sinais de δ_H (ppm) 4.92 (d, 17.4 Hz, 1H) e 4.95 (d, 10.8 Hz, 1H) acoplados a C-2 e sinais de δ_H (ppm) 4.93 (s, 1H) e 5.28 (s, 1H) acoplados a C-3. Os sinais em δ_C (ppm) 145.9 e δ_H (ppm) 5.62 (dd, 17.4, 10.7 Hz, 1H) foram atribuídos ao carbono metínico olefínico em C-1. Sinais em campo mais alto a δ_C (ppm) 8.3 e 16.4 foram característicos das metilas em C-13 e C-14, respectivamente. Todos os sinais estão apresentados na **Tabela 13**. A comparação destes resultados com os dados da literatura levou à identificação da substância # 8 como sendo a lactona sesquiterpênica de esqueleto elemanolídeo **linderolídeo F** (15-hidroxi-isogermafurenolida, **Figura 64**), encontrada pela primeira vez em *Lindera strychnifolia* (Lauraceae; Sumioka *et al.* 2011) e também em folhas

de *H. brasiliense* (Chloranthaceae) proveniente de Santa Catarina (Amoah *et al.* 2013). Esta molécula difere da anterior, 15-acetoxi-isogermafurenolida, pela presença de um –OH no C-15, ao invés da acetila na mesma posição.

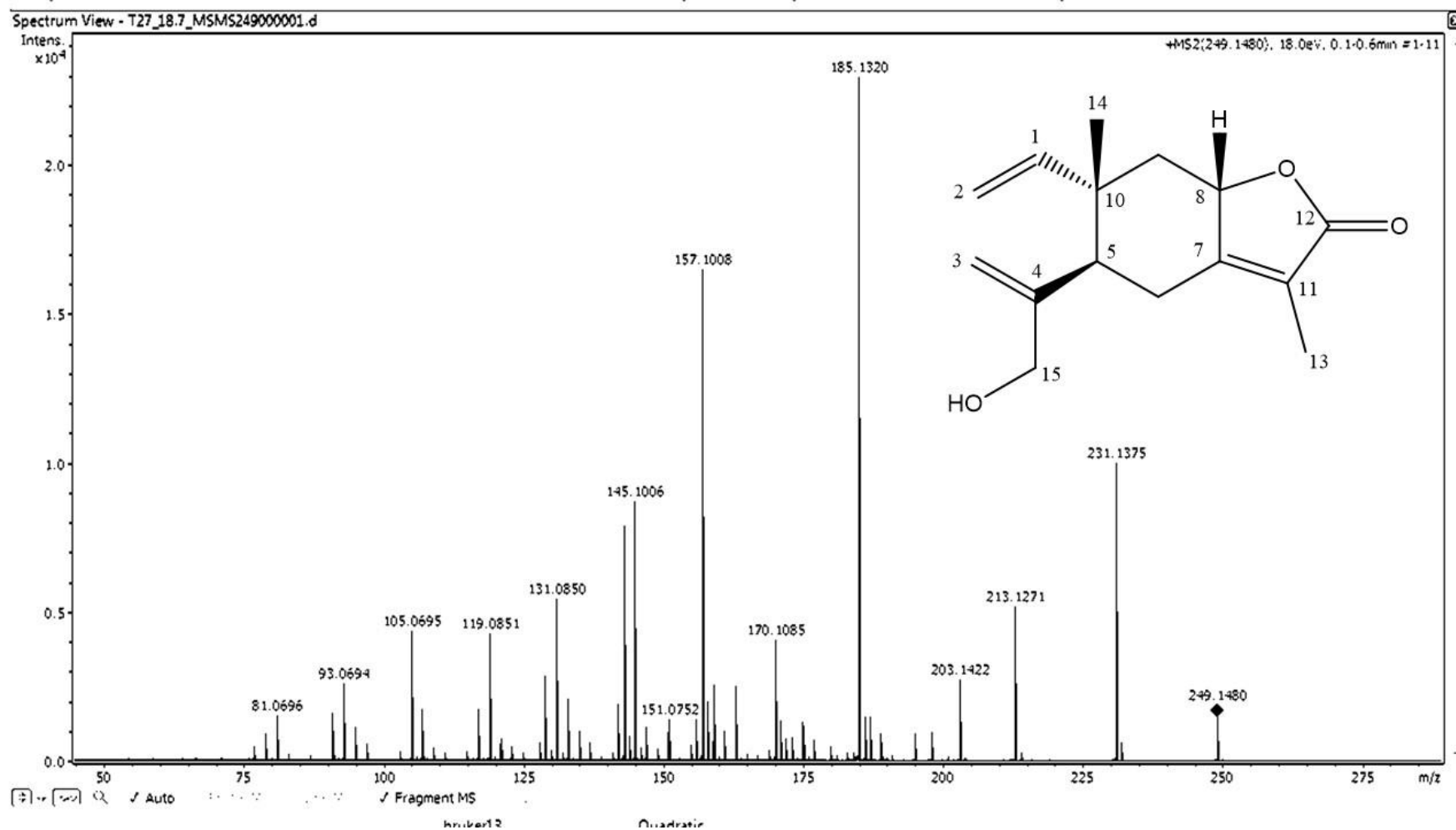


Figura 58. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**.

Tabela 13. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 8 (**linderolídeo F**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	# 8 (linderolídeo F)			Literatura ^{a, b}	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
1	145.9	5.62 (dd, 17.4, 10.8, 1H)		145.9	5.69 (dd, 17.4, 10.7, 1H)
2a	112.6	4.92 (d, 17.4, 1H)	C-10	112.7	4.99 (dd, (17.4, 0.6, 1H)
2b		4.95 (d, 10.8, 1H)	C-10		5.03 (dd, 10.7, 0.6, 1H)
3a	112.6	4.93 (s, 1H)	C-5, C-15	112.6	5.00 (ddd, 1.6, 1.1, 0.7, 1H)
3b		5.28 (s, 1H)	C-5, C-15		5.35 (ddd, 1.6, 1.3, 0.6, 1H)
4	148.8			148.8	
5	47.9	2.04 (dd, 13.3, 4.1, 1H)		47.9	2.11 (ddq, 13.1, 4.3, 0.6, 1H)
6ax	28.9	2.53 (t, 1H)		28.9	2.60 (ddqd, 14.4, 13.1, 1.6, 0.9, 1H)
6eq		2.63 (dd, 14.4, 4.1, 1H)			2.70 (dd, 14.4, 4.3, 1H)
7	161.5			161.5	
8	77.8	4.78 (dd, 11.6, 6.1, 1H)		77.8	4.85 (ddqd, 11.7, 6.1, 1.4, 0.9, 1H)
9ax	45.5	1.29 (t, 1H)		45.5	1.36 (ddq, 12.4, 11.6, 0.3, 1H)
9eq		2.16 (dd, 12.4, 6.1, 1H)			2.23 (dd, 12.4, 6.1, 1H)
10	40.7			40.8	
11	120.4			120.4	
12	174.7			174.7	
13	8.3	1.75 (s, 3H)	C-7, C-11, C-12	8.3	1.82 (dd, 1.6, 1.4, 3H)
14	16.4	1.11 (s, 3H)	C-1, C-5, C-9, C-10	16.5	1.18 (dd, 0.6, 0.3, 3H)
15a	67.1	3.93 (d, 14.1, 1H)	C-3, C-4, C-5	67.2	4.00 (ddd, 14.4, 0.7, 0.6, 1H)
15b		4.02 (d, 14.1, 1H)			4.09 (ddd, 14.4, 1.3, 1.1, 1H)

Legenda: a) Sumioka *et al.* (2011) e b) Amoah *et al.* (2013).

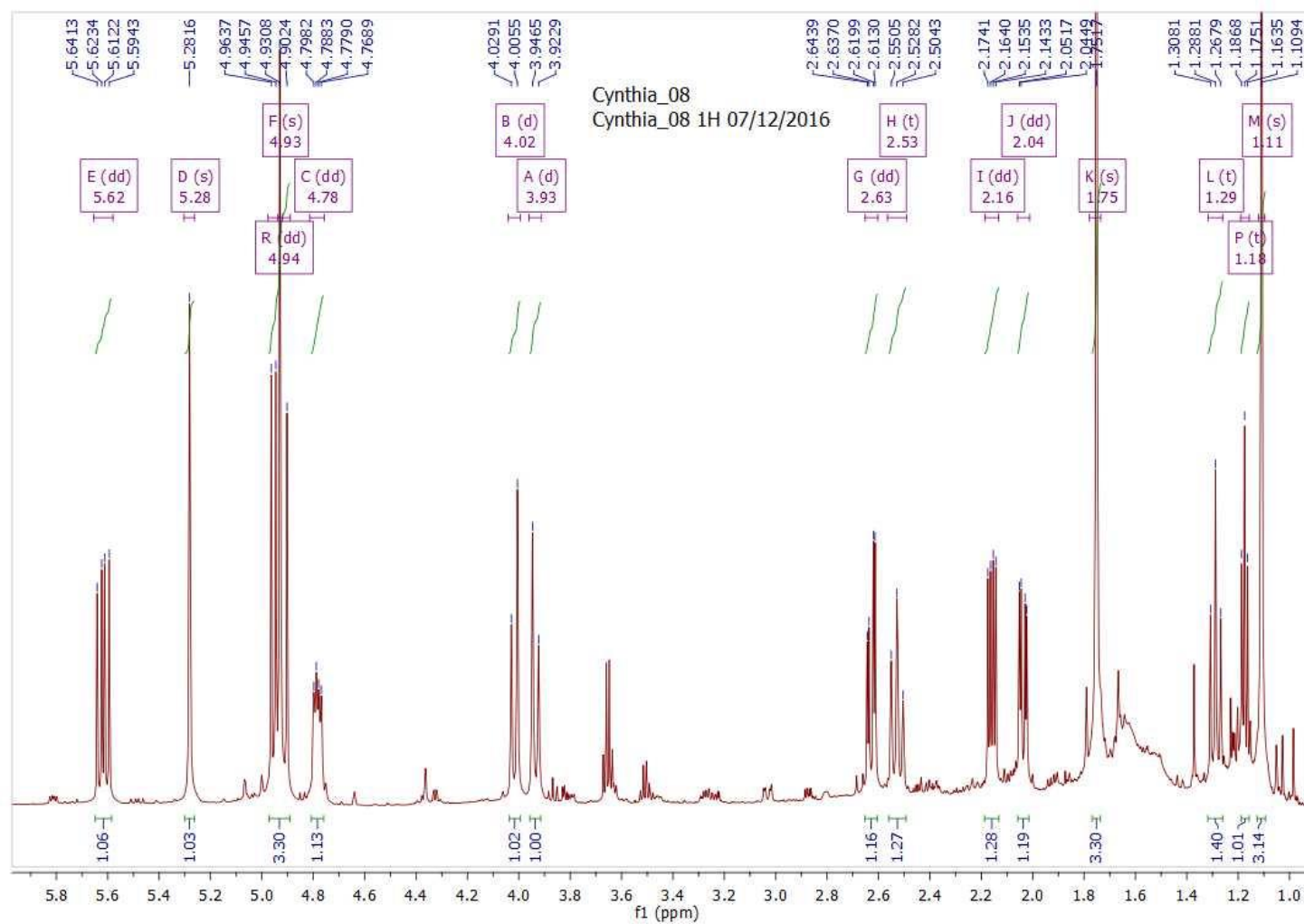


Figura 59. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**.

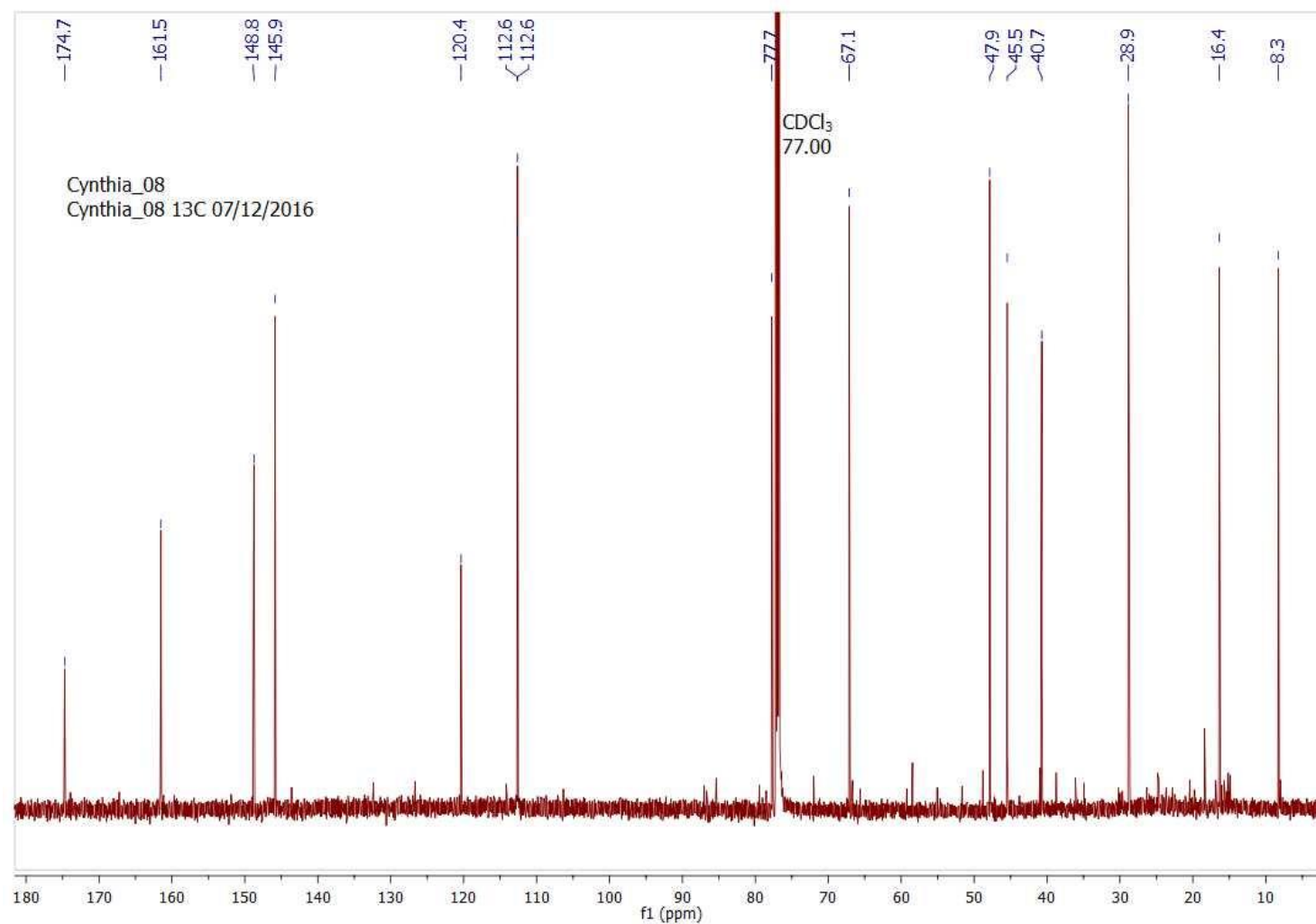


Figura 60. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**.

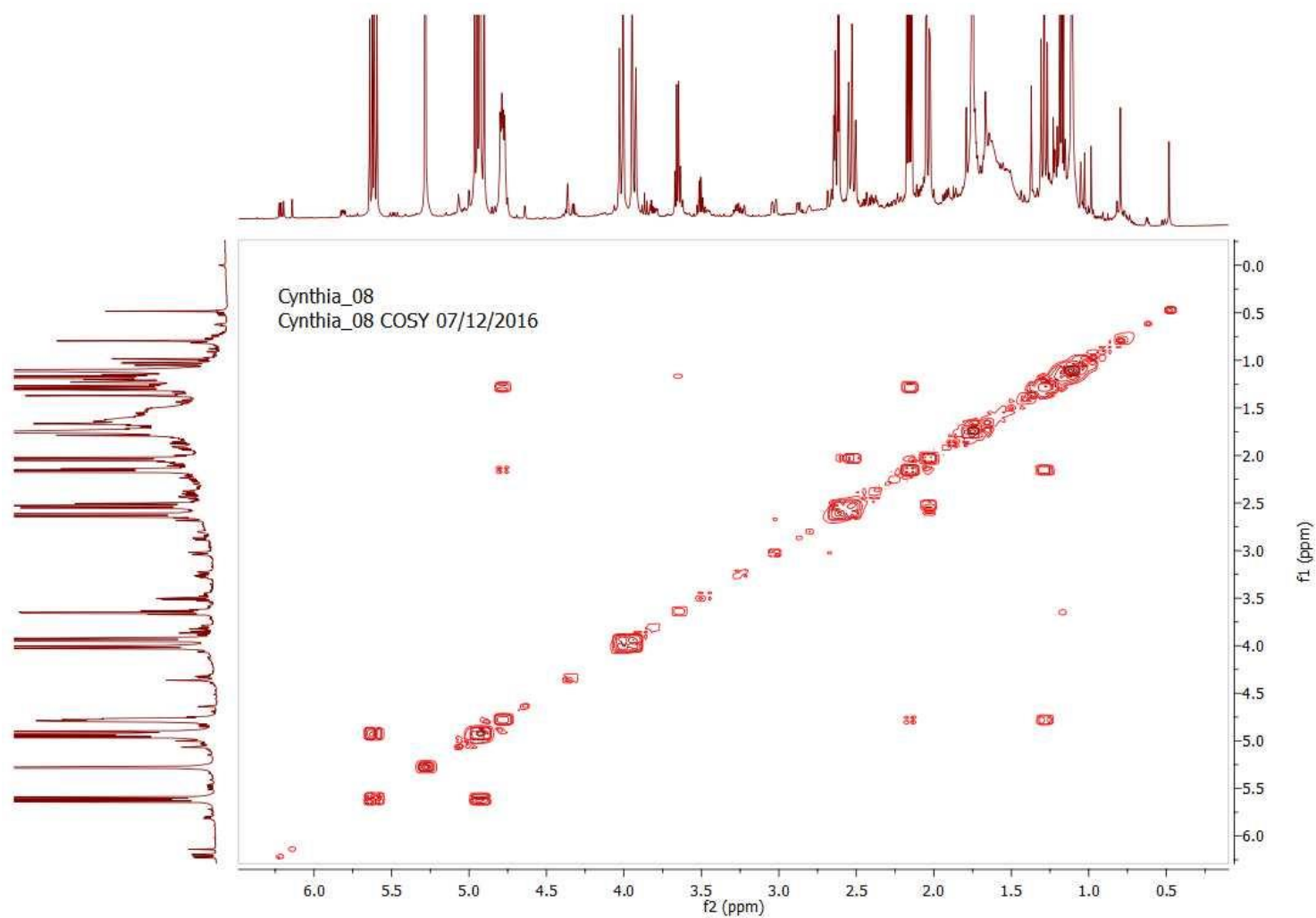


Figura 61. Espectro de COSY (CDCl₃) da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**.

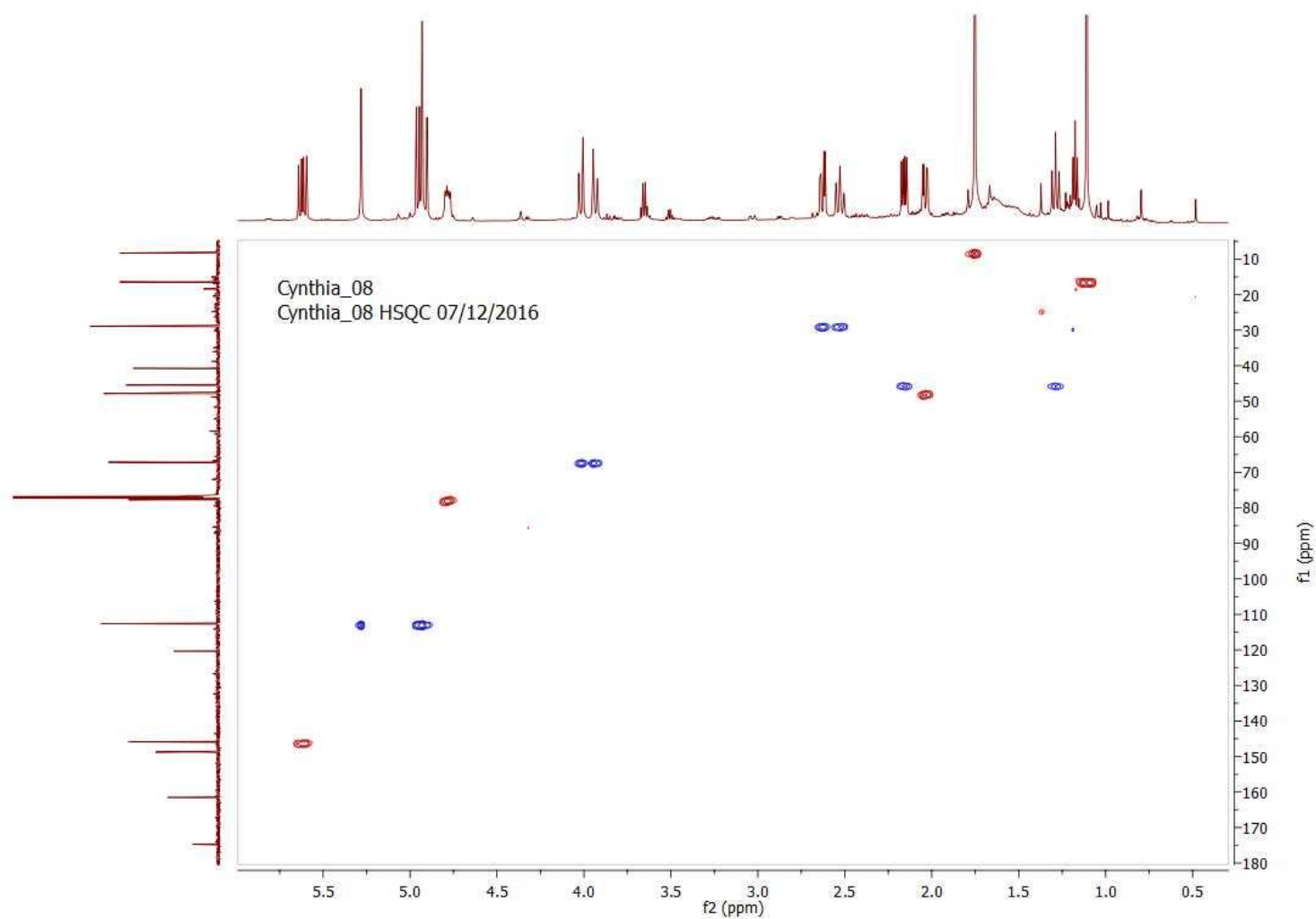


Figura 62. Espectro de HSQC (CDCl₃) da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**.

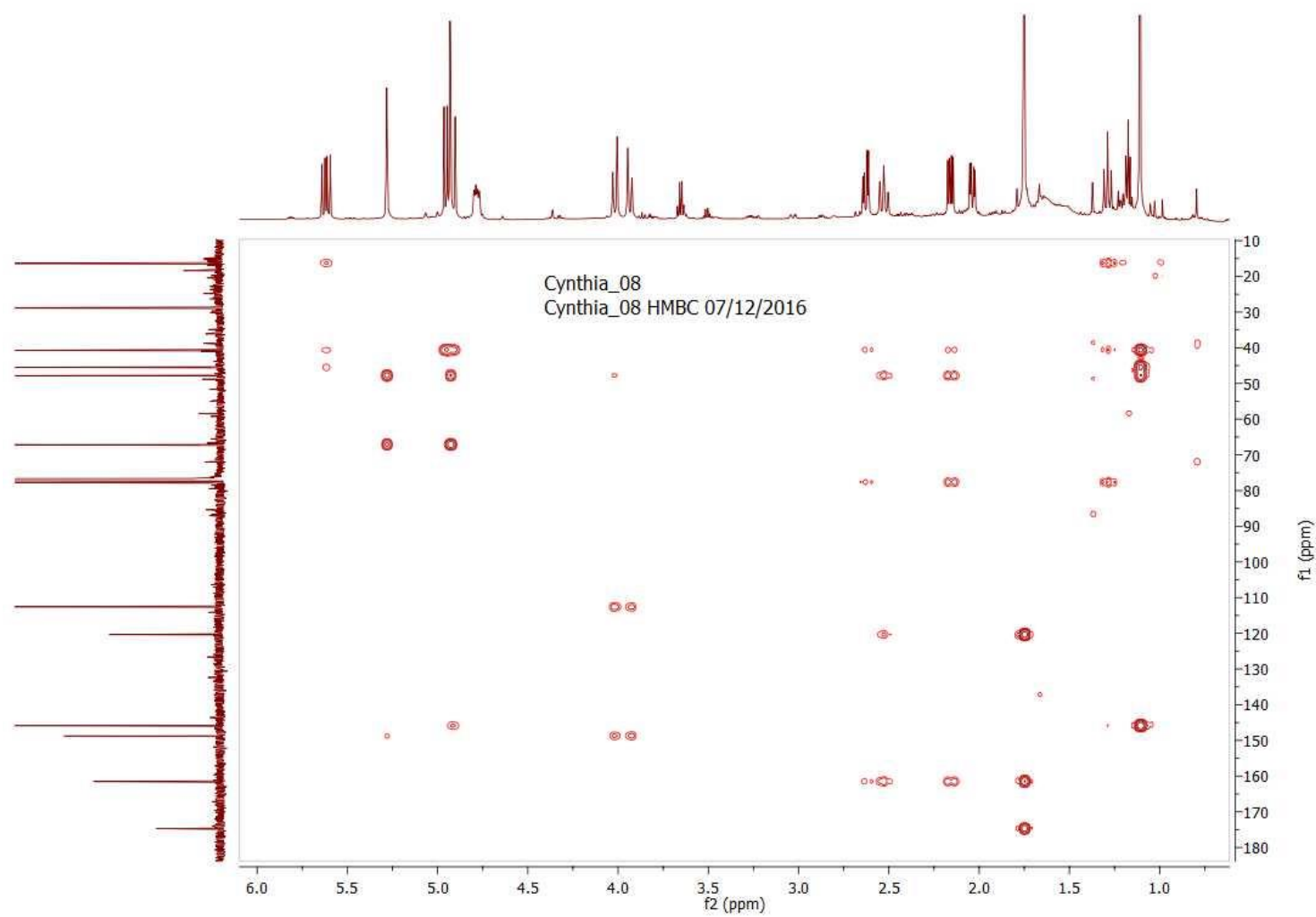


Figura 63. Espectro de HMBC (CDCl_3) da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**.

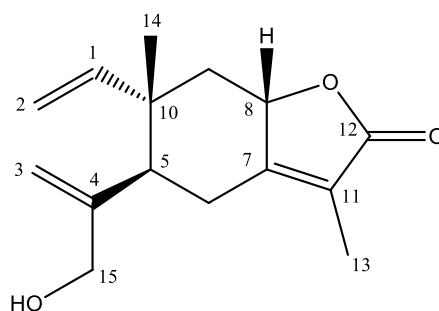


Figura 64. Estrutura química da substância # 8, identificada como **linderolídeo F**, isolada das folhas de *H. brasiliense*

3.11.6 Substância # 9 – *neolitacumona B*

A substância # 9, proveniente da fração T31-17', apresentou-se na forma de um líquido viscoso amarelo (1,7 mg). O espectro no UV mostrou uma banda dupla em 230 e 320 nm (**figura 13**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS forneceram a fórmula molecular $C_{15}H_{20}O_3$, que requer 6 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 249.1480 $[M+H]^+$ (calculada 249.1491). ESI-QqTOF-MS (**figura 65**) mostrou íons filhos em m/z 231, 213 e 185, indicando as perdas de água H_2O , H_2O e $CH_2=CH_2$, respectivamente, fragmentos compatíveis com a estrutura proposta.

Os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 66 a 70**) apresentaram sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise de ESI-QqTOF-MS. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 15 sinais. Foram observados sinais característicos de γ -lactona α , β , insaturada com δ_C (ppm) 174.8 ($C=O$), δ_C (ppm) 120.4 (α – C-11) e δ_C (ppm) 162.0 (β – C-7). O sinal em δ_C (ppm) 146.5 foi atribuído ao carbono quaternário olefínico C-4 e o sinal em δ_C (ppm) 108.3 foi atribuído ao CH_2 olefínico terminal em C-15, com sinais de δ_H (ppm) 4.61 (s, 1H) e 4.86 (s, 1H). Os sinais em δ_C (ppm) 77.8 e δ_H (ppm) 3.37 (dd, 11.6, 4.6 Hz, 1H) foram atribuídos à oximetina em C-1. Sinais em campo mais alto δ_C (ppm) 8.3 e 10.5 foram atribuídos às metilas em C-13 e C-14, respectivamente. Todos os sinais foram extraídos dos espectros de e estão apresentados na **Tabela 13**. A comparação destes resultados com os dados da literatura levou à identificação da substância # 9 como sendo a lactona sesquiterpênica de esqueleto eudesmanolídeo **neolitacumona B** (1 β -hidroxieudesman-4(15),7(11)-dieno-8 α ,12-olide, **Figura 71**), encontrada pela primeira vez em *Neolitsea acuminatissima* (Lauraceae; Chang *et al.* 2002) e posteriormente em *Chloranthus spicatus* (Chloranthaceae) proveniente da China (Yang *et al.* 2012).

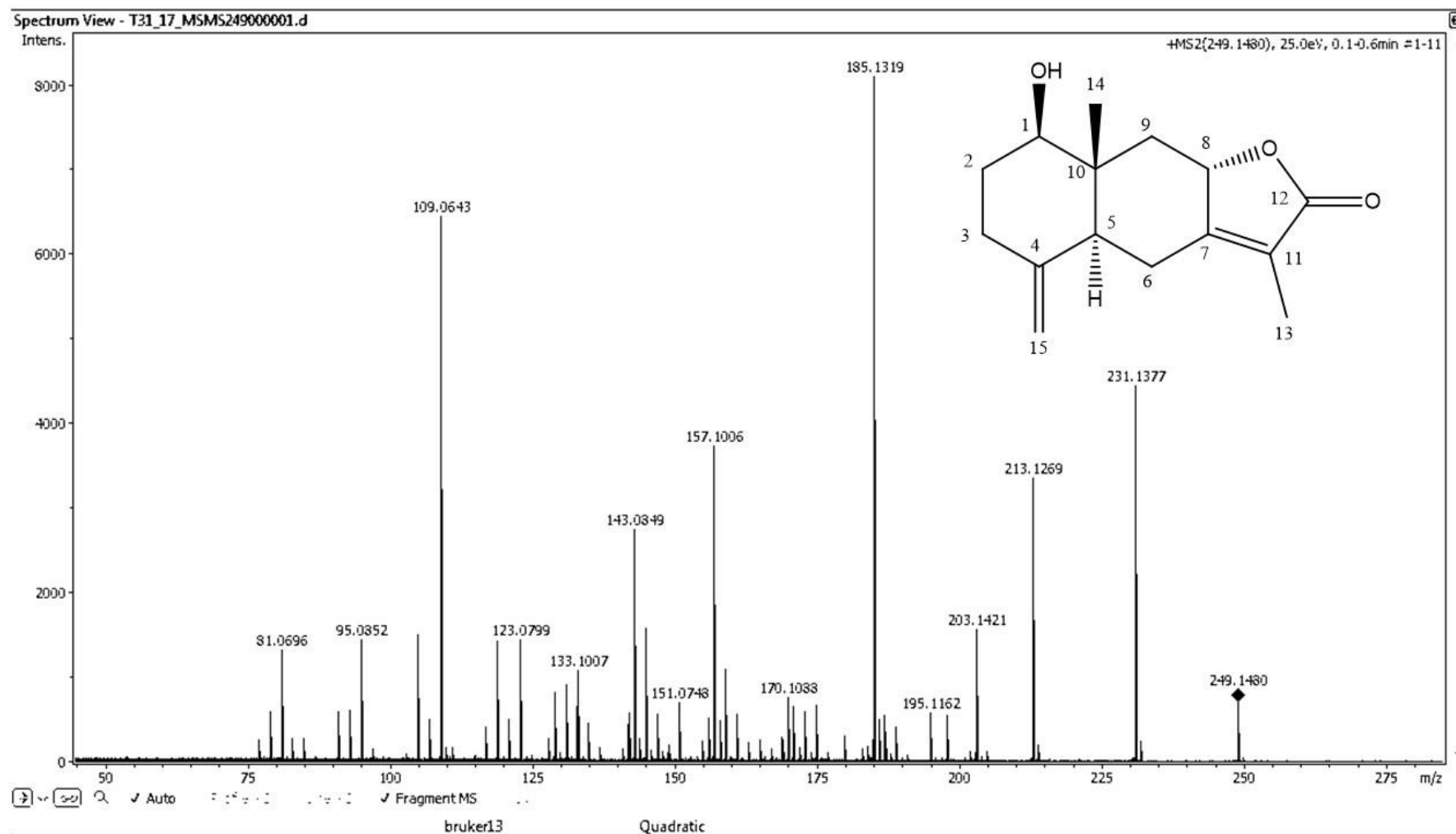


Figura 65. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 9, identificada como **neolitacumona B**.

Tabela 14. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 9 (**neolitacumona B**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	# 9 (neolitacumona B)			Literatura ^{a, b}	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
1	77.8	3.37 (dd, 11.6, 4.8, 1H)		77.6	3.24 (dd, 11.4, 4.4, 1H)
2 α	30.7	1.53 (ddd, 17.4, 13.0, 4.8, 1H)		30.1	1.66 (ddd, 13.2, 4.4, 1.0, 1H)
2 β		1.79 (m, 1H)			1.42 (ddd, 13.2, 4.8, 1.0, 1H)
3 α	33.7	2.03 (ddd, 13.8, 5.2, 1H)		33.5	1.90 (td, 13.6, 4.4, 1H)
3 β		2.31 (t, 1H)			2.35 (td, 13.6, 4.4, 1H)
4	146.5			146.8	
5	47.9	1.76 (s, 1H)		47.6	1.66 (m, 1H)
6 α	25.2	2.31 (dd, 13.8, 2.3, 1H)		24.9	2.22 (d, 13.9, 1H)
6 β		2.70 (dd, 13.8, 3.8, 1H)			2.56 (dd, 13.9, 3.2, 1H)
7	162.0			162.9	
8	78.0	4.75 (dd, 12.2, 6.4, 1H)		78.3	4.66 (dd, 10.4, 6.4, 1H)
9 α	43.7	0.98 (t, 1H)		43.5	0.82 (t, 12.0, 1H)
9 β		2.74 (dd, 12.2, 6.4, 1H)	C-5, C-7, C-8, C-10		2.65 (dd, 12.0, 6.4, 1H)
10	41.4			41.2	
11	120.4			119.9	
12	174.8			175.3	
13	8.3	1.76 (s, 3H)	C-7, C-11, C-12	7.8	1.62 (d, 1.6, 3H)
14	10.5	0.81 (s, 3H)	C-5, C-9, C-10	10.1	0.69 (s, 3H)
15	108.3	4.61 (s, 1H)	C-3, C-5	107.9	4.48 (br s, 1H)
		4.86 (s, 1H)	C-3, C-5		4.72 (br s, 1H)

Legenda: a) Chang *et al.* (2002) e b) Yang *et al.* (2012).

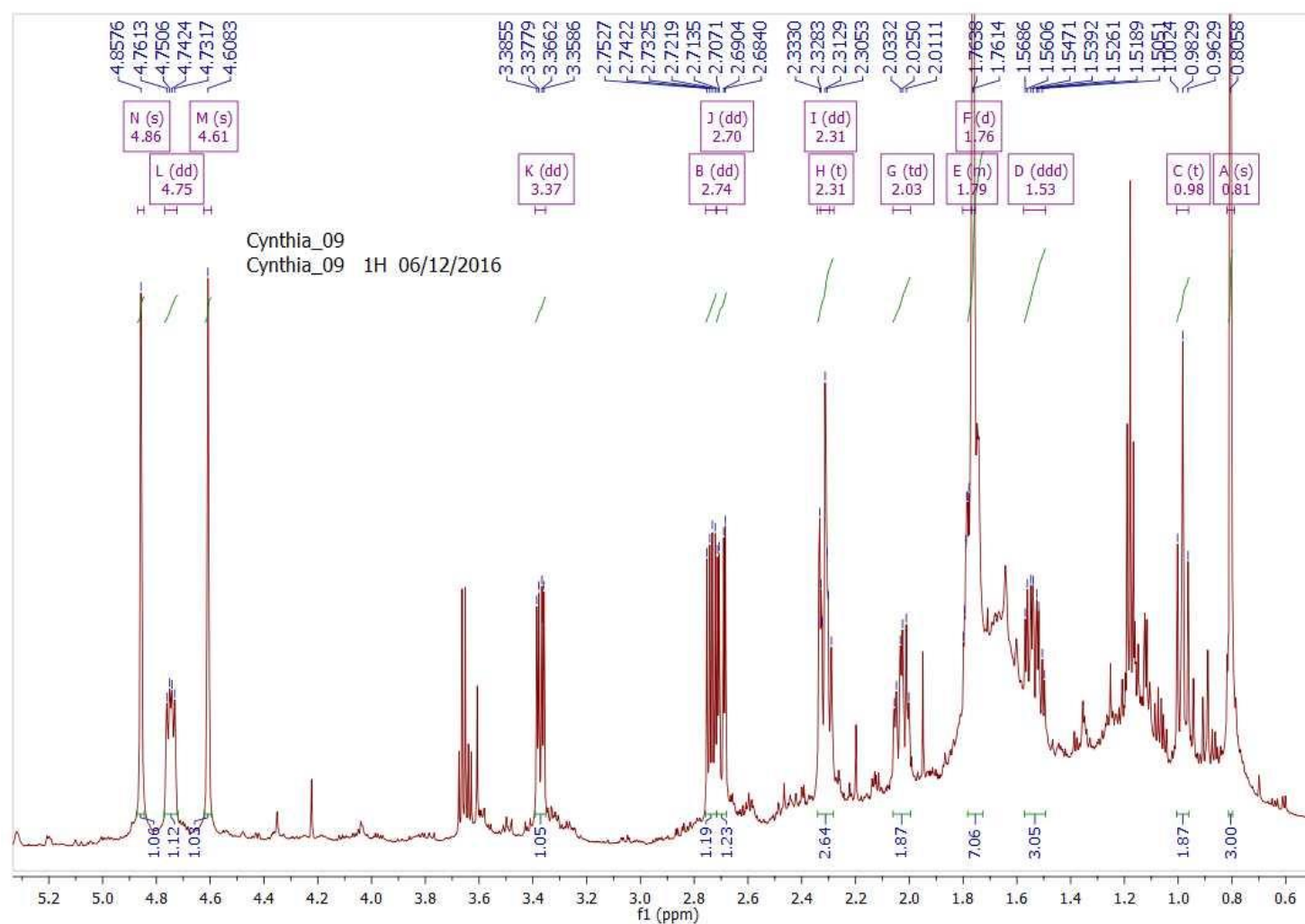


Figura 66. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) da substância # 9, identificada como **neolitacumona B**.

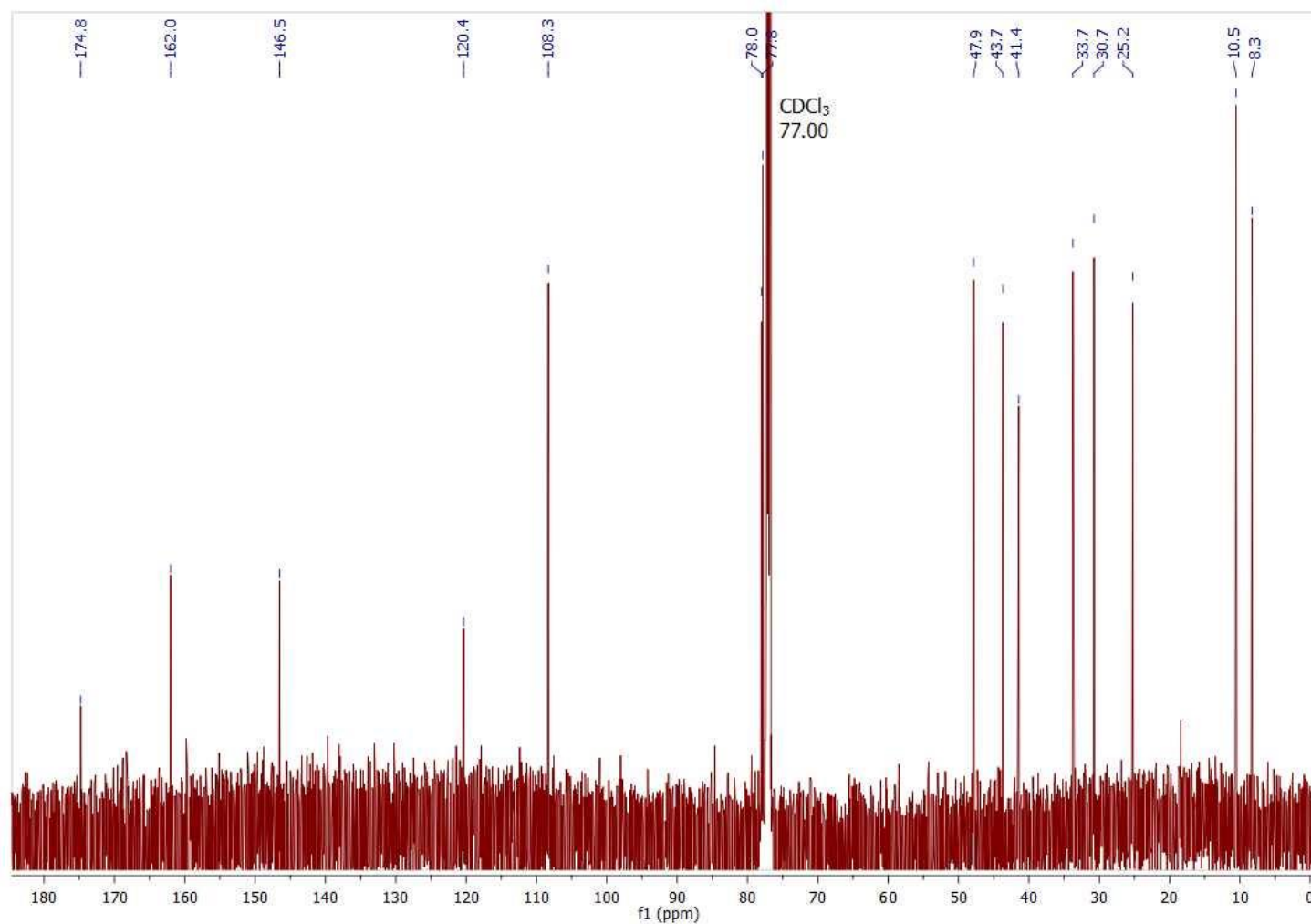


Figura 67. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 9, identificada como **neolitacumona B**.

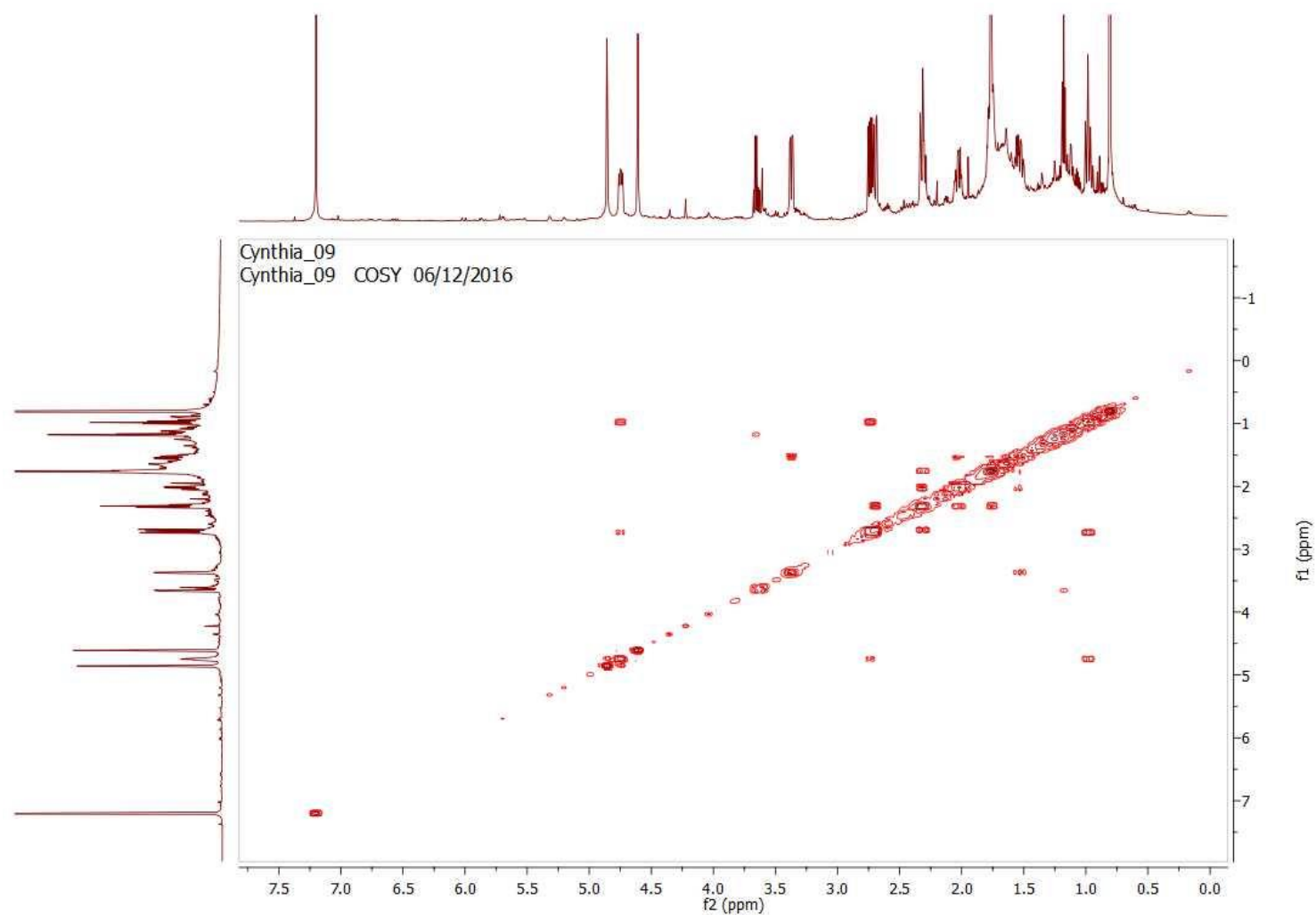


Figura 68. Espectro de COSY (CDCl_3) da substância # 9, identificada como **neolitacumona B**.

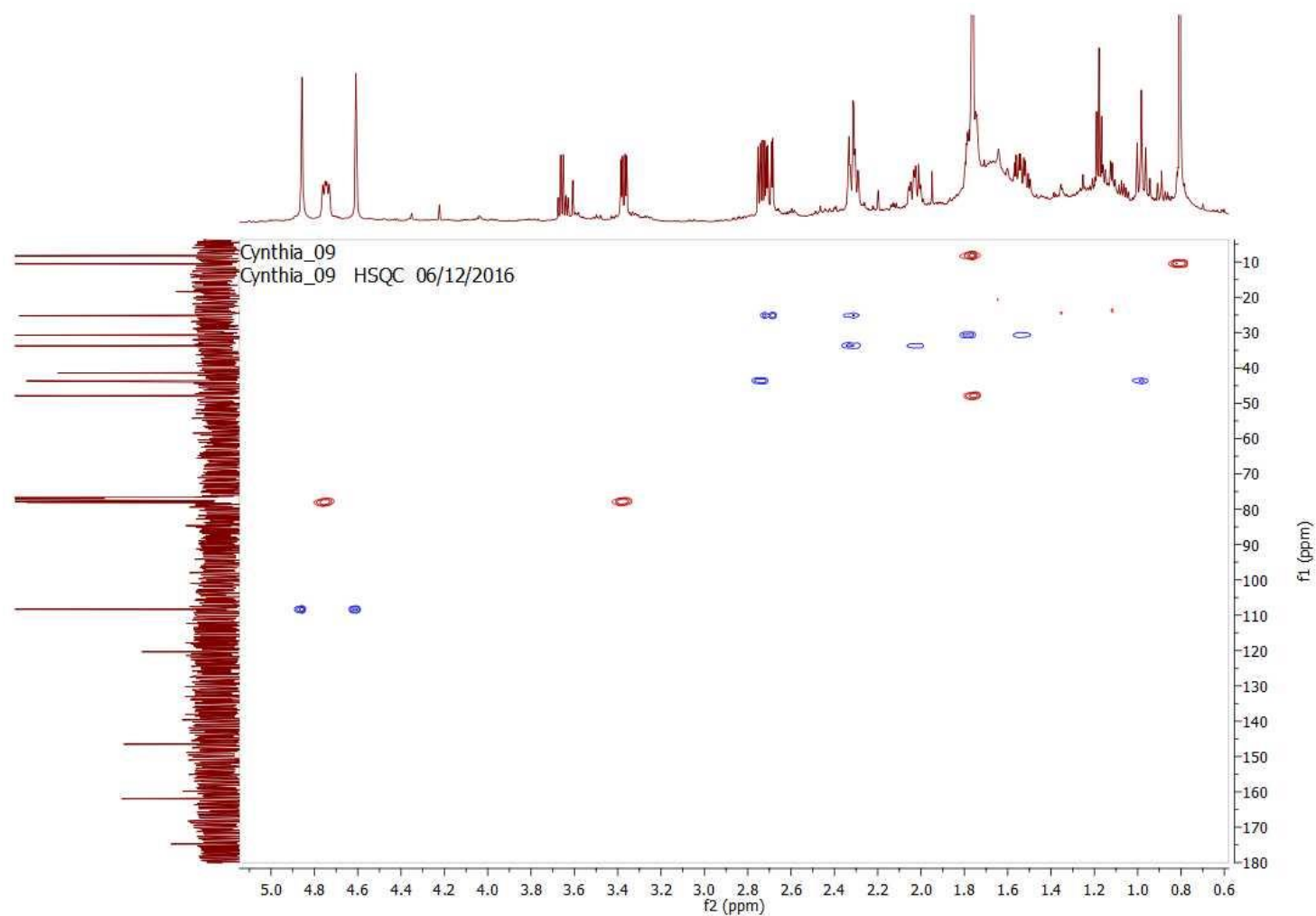


Figura 69. Espectro de HSQC (CDCl₃) da substância # 9, identificada como **neolitacumona B**.

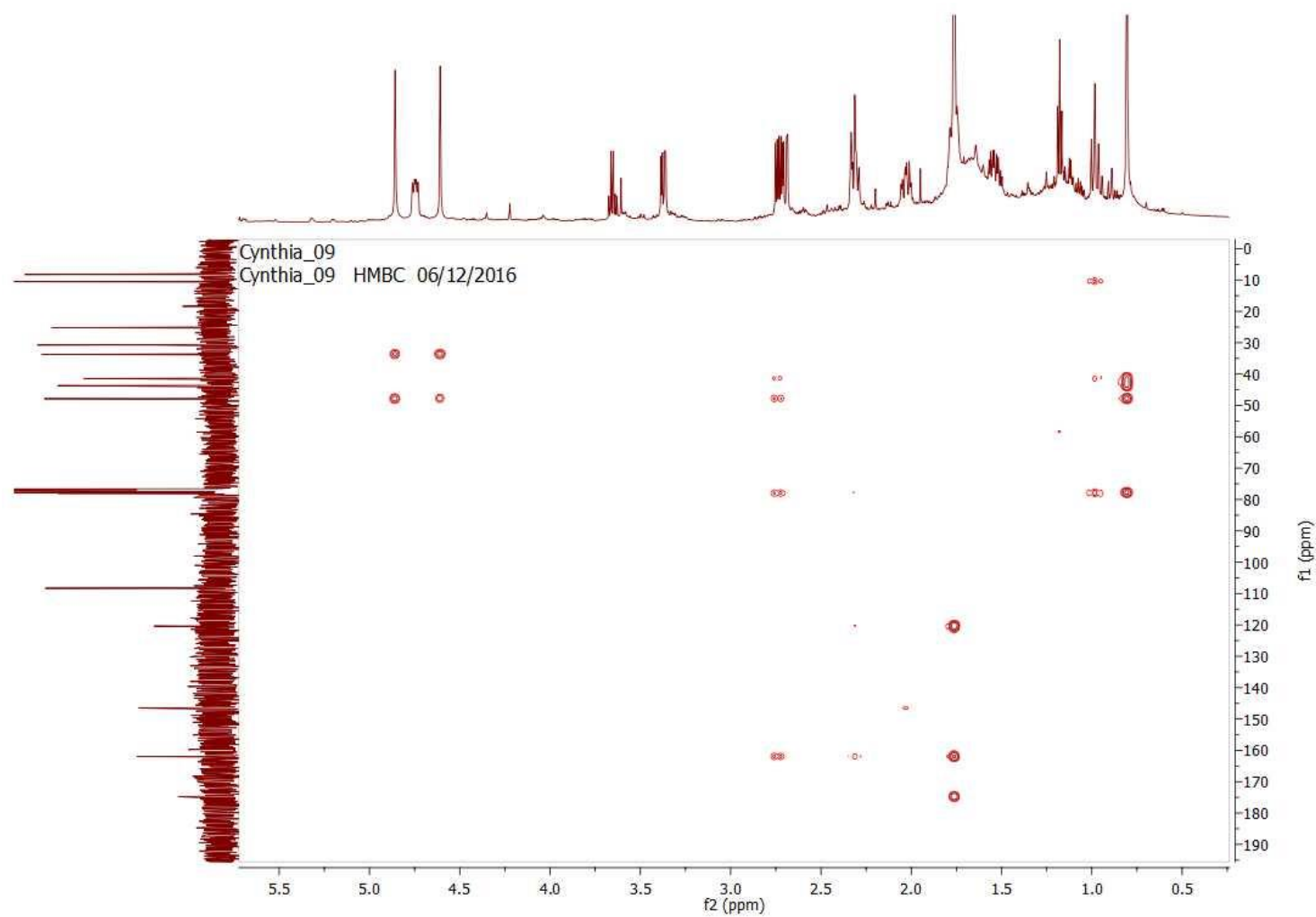


Figura 70. Espectro de HMBC (CDCl_3) da substância # 9, identificada como **neolitacumona B**.

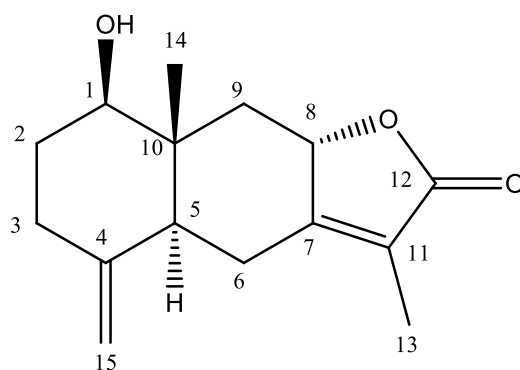


Figura 71. Estrutura química da substância # 9 identificada como **neolitacumona B**, isolada das folhas de *H. brasiliense*

3.11.7 Substância # 12 - oxionoseriolídeo

A substância # 12, proveniente da fração T45-45', apresentou-se na forma de um pó branco (1,4 mg). O espectro no UV mostrou uma banda em 230 nm (**figura 14**).

Os dados de RMN obtidos estão apresentados na **Tabela 15**. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 15 sinais, dos quais 6 carbonos quaternários, 4 metilênicos (CH_2), 4 metínicos (CH) e 1 metílico (CH_3). Foi possível identificar a presença de uma função γ -lactona α , β insaturada, um ciclopropano, um epóxido e um álcool. Os sinais em δ_{C} (ppm) 171.2 ($\text{C}=\text{O}$), δ_{C} (ppm) 127.3 (α – C-11) e δ_{C} (ppm) 163.6 (β – C-7) foram atribuídos à γ -lactona α , β insaturada. O sinal em δ_{C} (ppm) 150.6 foi atribuído ao carbono quaternário olefínico C-4, ligado ao CH_2 olefínico exocíclico em C-15 com sinais em δ_{C} (ppm) 107.2 e δ_{H} (ppm) 4.84 (s, 1H) e 5.12 (s, 1H). Um sinal em δ_{C} (ppm) 91.3 foi atribuído ao carbono quaternário vizinho a dois oxigênios em C-8. Um sinal em δ_{C} (ppm) 55.1 foi atribuído ao carbono oximetilênico em C-13. Foram observados sinais do anel propano, característico de sesquiterpenos lindenanos, com carbonos metínicos em δ_{C} (ppm) 23.9 e 24.0 e um carbono metilênico em δ_{C} (ppm) 16.4. Todos os sinais foram extraídos dos espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 72 a 76**).

Os dados de RMN permitiram determinar a fórmula molecular da substância como $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_4$, que requer 8 graus de insaturação, com massa molecular calculada 245.1178. A comparação destes resultados com os dados da literatura levou à identificação da substância # 12 como sendo a lactona sesquiterpênica de esqueleto lindenanolídeo **oxionoseriolídeo**

(**Figura 77**), encontrada pela primeira vez em *H. angustifolium* (Chloranthaceae) proveniente da Bolívia (Acebey Castellon 2007).

Acebey Castellon (2007) isolou pela primeira vez o oxionoseriolídeo, porém os dados de RMN dele foram obtidos em benzeno d-6 (C₆D₆) e os dados deste estudo foram obtidos em CDCl₃, por isso os dados de RMN da substância # 12 também foram comparados com os dados obtidos em CDCl₃ da chlorantalactona F, uma lactona sesquiterpênica de esqueleto lindenanolídeo encontrada em *Chloranthus glaber* (Chloranthaceae; Takeda *et al.* 1993), com esqueleto similar ao do oxionoseriolídeo, com excessão de uma função álcool ligada ao C-13, como destacado na **tabela 15**. Esta foi a primeira vez que esta substância foi isolada de *H. brasiliense*.

Tabela 15. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 12 (**oxionoseriolídeo**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	#12 (oxionoseriolídeo)			oxionoseriolídeo (Acebey Castellon 2007)		chloranthalactona F (Takeda <i>et al.</i> 1993)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	HMBC	δ_{C} (400 mHz, C_6D_6)	δ_{H} (mult., J Hz)	δ_{C} (100 MHz, CDCl_3)	δ_{H} (mult., J Hz)
1	24.1	2.14 (t, 1H)	C-1, C-3, C-4, C-10	23.9	1.34 (ddd, 7.7, 7.7, 3.6, 1H)	23.9	1.45 (m, 1H)
2a	16.4	0.86 (m, 1H)		16.6	0.59 (ddd, 9.0, 7.7, 5.4, 1H)	16.3	0.82 (m, 1H)
2b		0.92 (m, 1H)			0.66 (ddd, 5.4, 3.7, 3.6, 1H)		0.90 (m, 1H)
3	23.9	1.48 (m, 1H)		23.0	1.81 (m, 1H)	23.7	2.10 (m, 1H)
4	150.6			150.0		151.1	
5	53.2	3.77 (m, 1H)		50.7	3.41 (m, 1H)	48.1	3.77 (m, 1H)
6a	24.1	2.92 (dd, 18.5, 6.6, 1H)	C-5, C-7, C-10, C-11	21.3	2.25 (ddt, 19.5, 5.2, 1.4, 1H)	24.1	2.82 (m, 1H)
6b		2.58 (18.5, 12.2, 1H)	C-5, C-7, C-8, C-11		1.96 (ddt, 19.5, 13.3, 1.6, 1H)		2.32 (dd, 18.0, 12.1, 1H)
7	163.6			154.0		160.5	
8	91.3			88.0		91.1	
9	48.3	3.16 (s, 1H)	C-5, C-8, C-10, C-14	64.2	3.82 (s, 1H)	53.1	3.07 (s, 1H)
10	41.1			40.7		41.4	
11	127.3			131.2		124.8	
12	171.2			168.7		172.3	
13a	55.1	4.36 (s, 2H)	C-7, C-11, C-12	55.7	4.05 (d, 14.6, 1H)	8.9	1.78 (s, 3H)
13b					4.11 (d, 14.6, 1H)		
14	20.1	0.61 (s, 3H)	C-5, C-6, C-9, C-10	16.4	0.29 (s, 3H)	19.9	0.53 (s, 3H)
15a	107.2	4.84 (s, 1H)	C-3, C-5	106.6	4.59 (d, 2.8, 1H)	106.3	4.81 (s, 1H)
15b		5.12 (s, 1H)	C-3, C-5		5.05 (ddd, 2.8, 1.4, 0.6, 1H)		5.09 (br s, 1H)

Legenda: o negrito marca os dados discrepantes entre as substâncias comparadas.

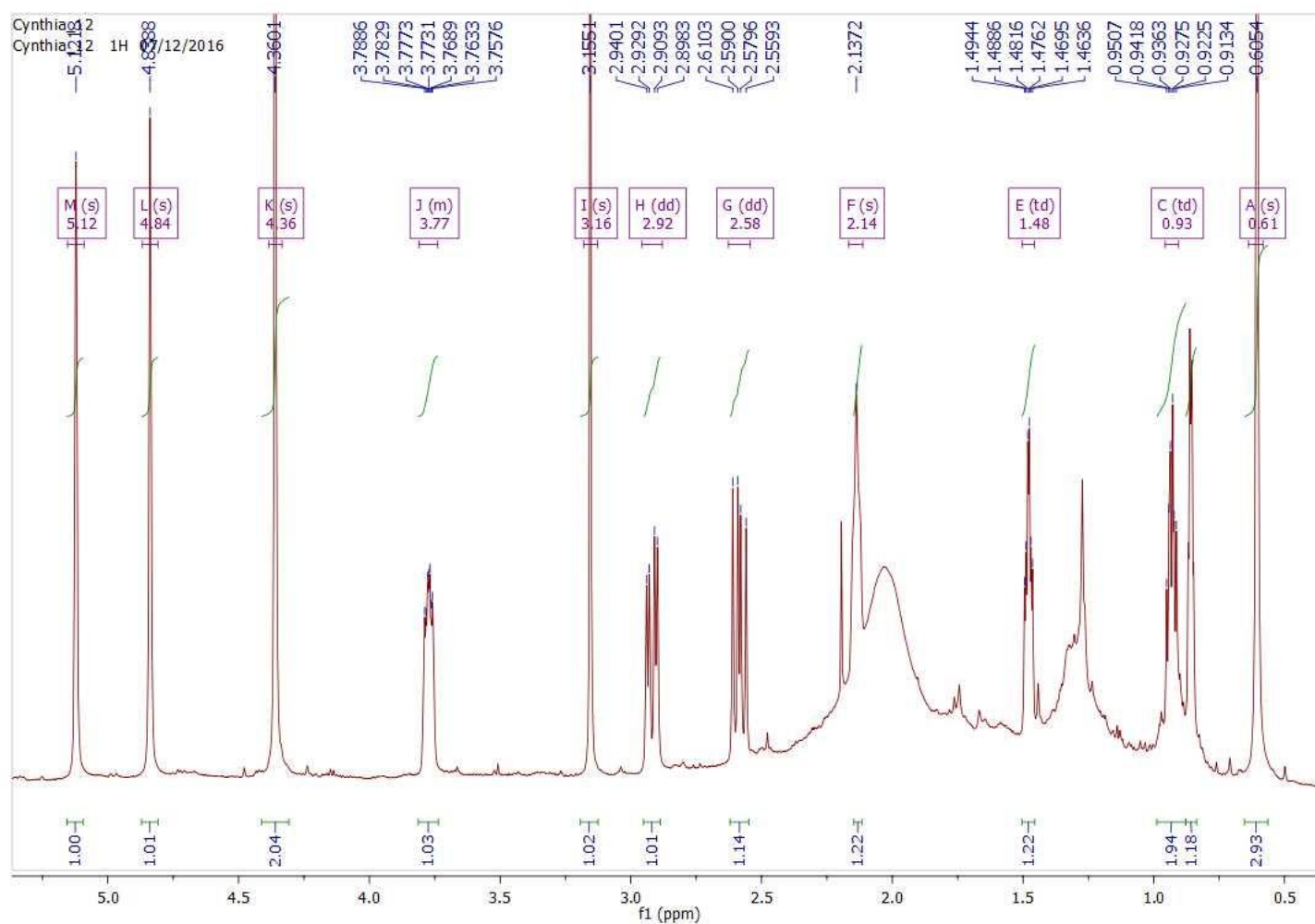


Figura 72. Espectro de ¹H-RMN (600 MHz, CDCl₃) da substância # 12, identificada como **oxionoseriolídeo**.

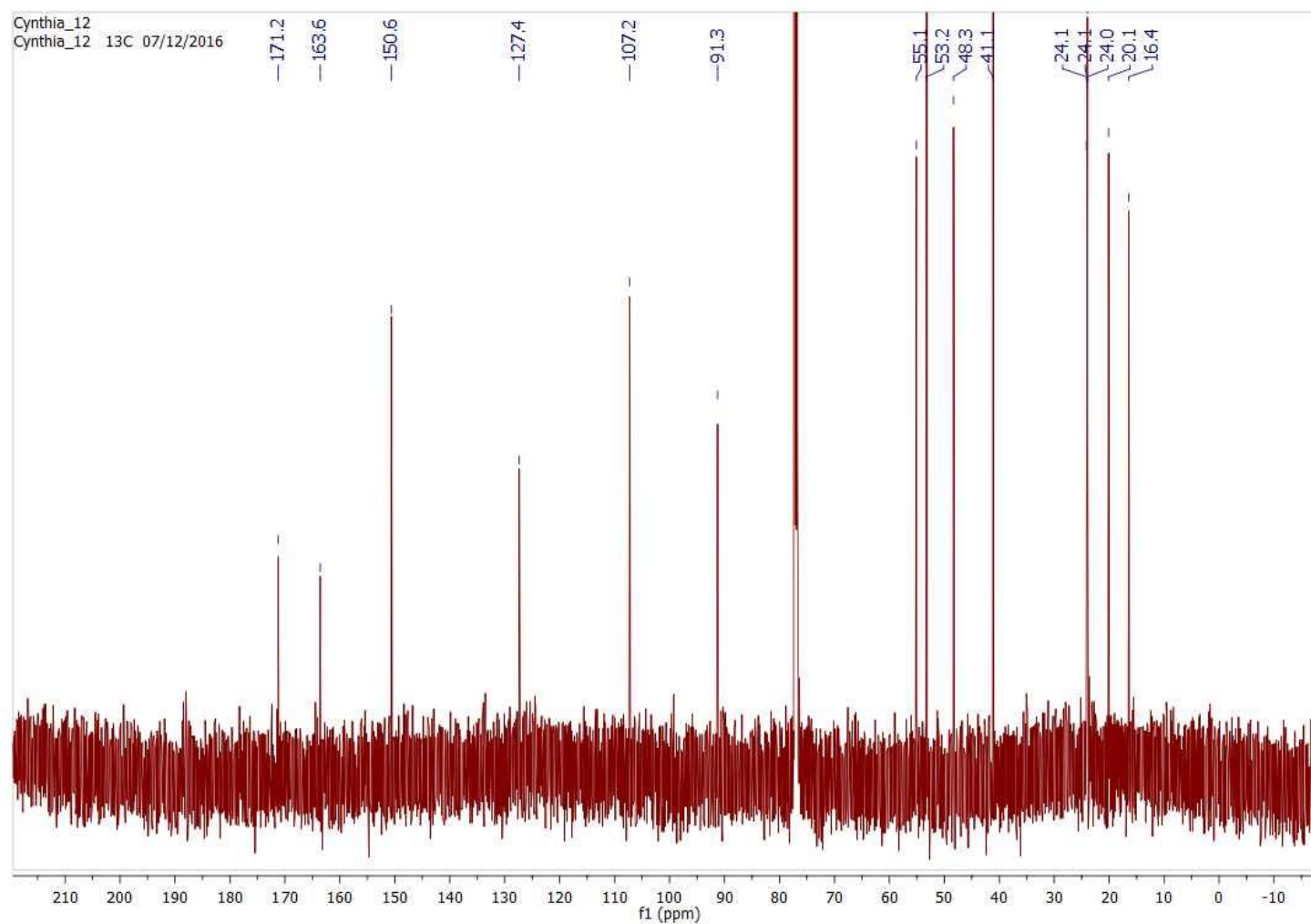


Figura 73. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 12, identificada como **oxonoserialídeo**.



Figura 74. Espectro de COSY (CDCl_3) da substância # 12, identificada como **oxionoseriolídeo**.

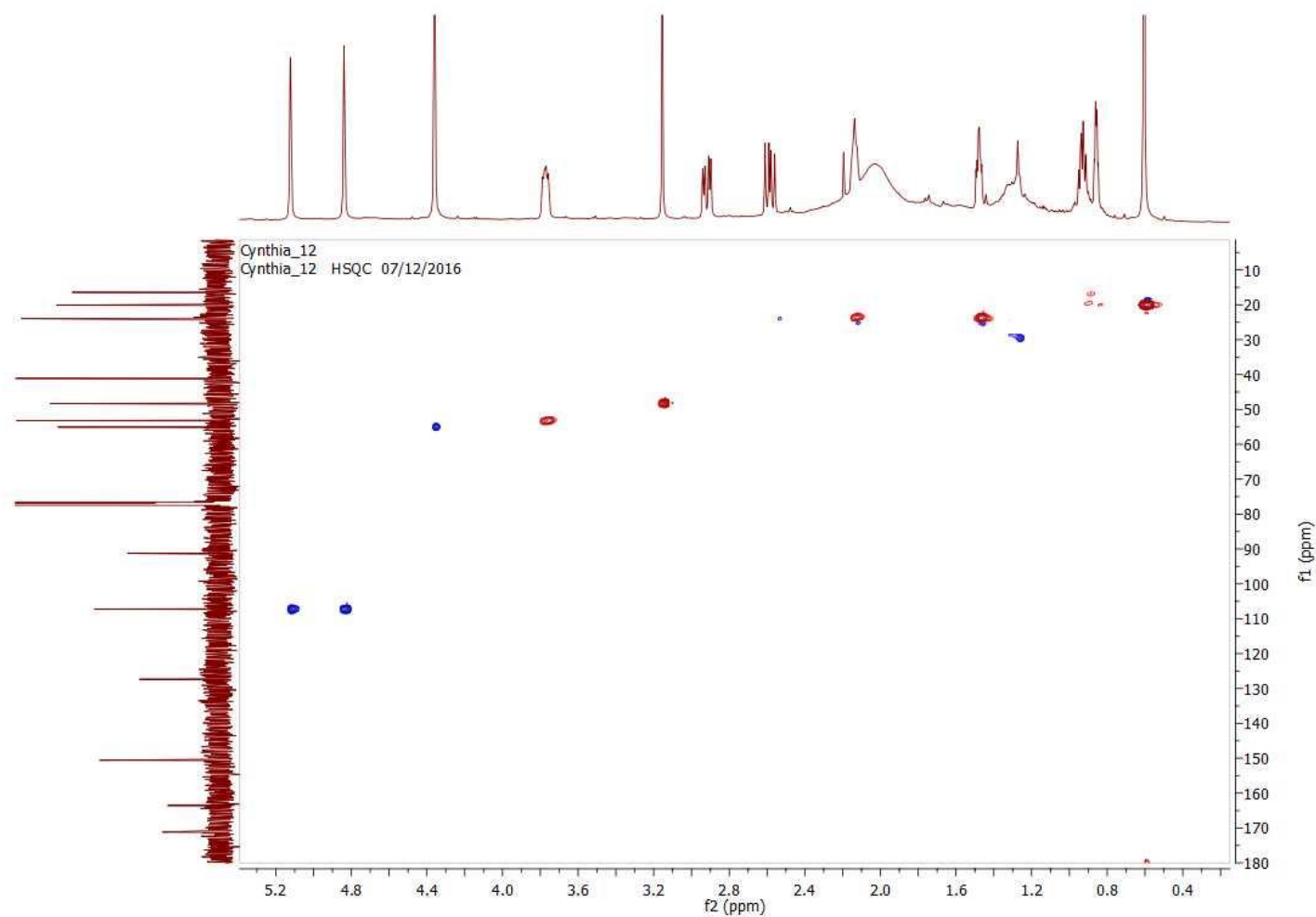


Figura 75. Espectro de HSQC (CDCl_3) da substância # 12, identificada como **oxionoseriolídeo**.

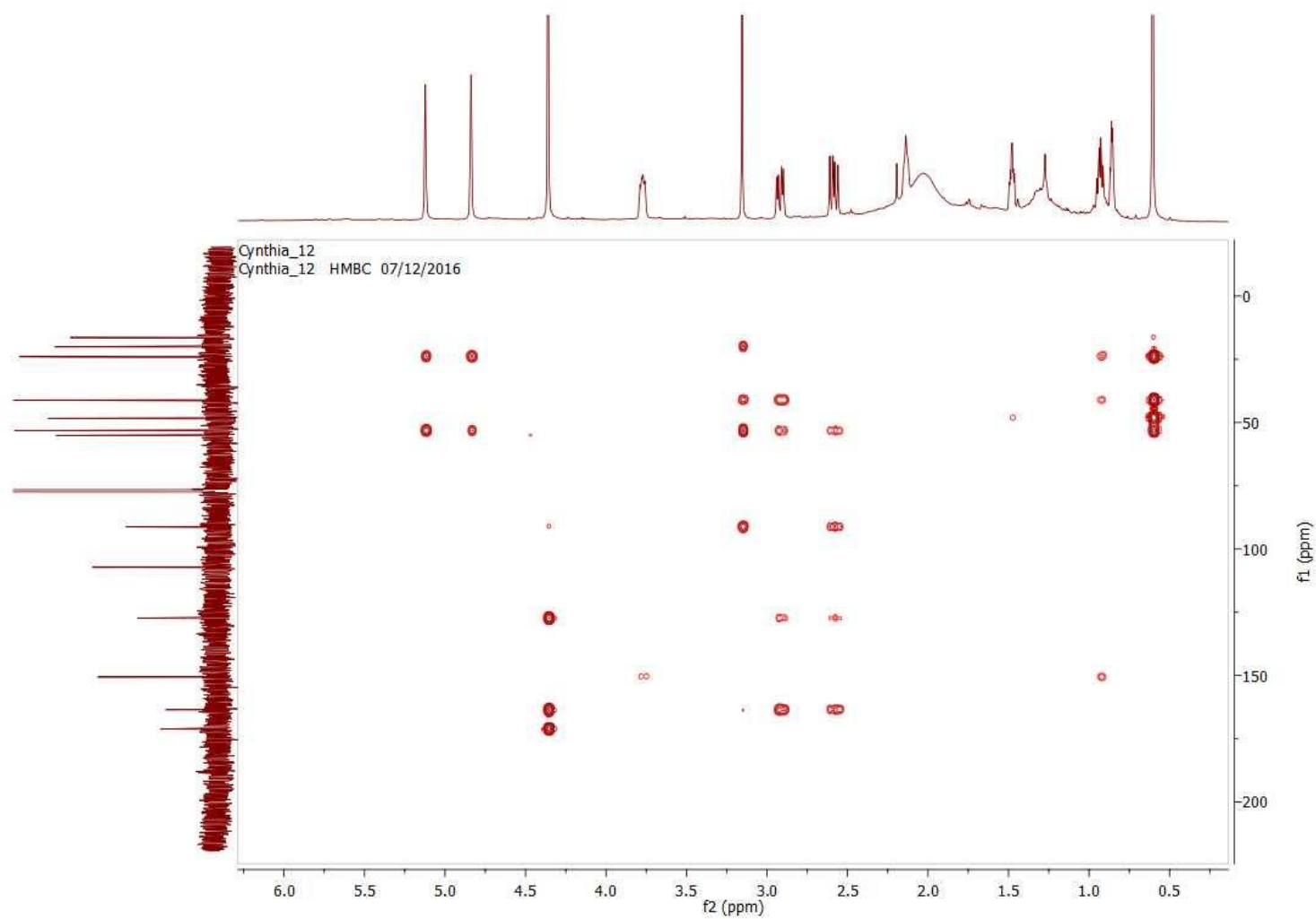


Figura 76. Espectro de HMBC (CDCl_3) da substância # 12, identificada como **oxionoseriolídeo**.

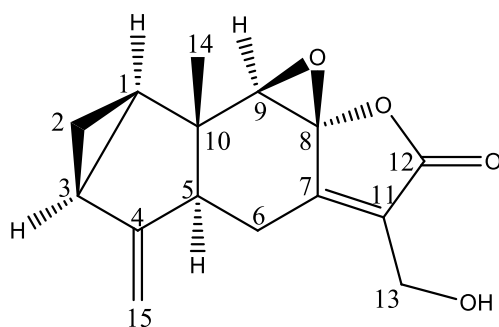


Figura 77. Estrutura química da substância # 12, identificada como **oxionoseriolídeo**, isolada das folhas de *H. brasiliense*

3.11.8 Substância # 13 – *blumenol B*

A substância # 13, proveniente da fração T56-15', apresentou-se na forma de um líquido viscoso amarelo (10,9 mg). O espectro no UV mostrou uma banda em 250 nm (**figura 15**). Os dados obtidos por ESI-QqTOF-MS forneceram a fórmula molecular $C_{13}H_{22}O_3$, que requer 3 graus de insaturação, com massa experimental do íon molecular 227.1641 $[M+H]^+$ (calculada 227.1648). ESI-QqTOF-MS (**figura 78**) mostrou íons filhos em m/z 209, 191 e 149, indicando as perdas de H_2O , H_2O e $COCH_2$, respectivamente, fragmentos compatíveis com a estrutura proposta.

Os espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC e HMBC (**Figuras 79 a 83**) apresentaram sinais condizentes com a fórmula molecular gerada pela análise de ESI-QqTOF-MS. O espectro de ^{13}C -RMN apresentou 13 sinais. Um sinal de carbono carbonílico em δ_C (ppm) 198.2 ($C=O$) e dois sinais de carbono oxigenado em δ_C (ppm) 77.7 e 68.6 permitiram a identificação dos três átomos de oxigênio da fórmula molecular como uma cetona e álcoois terciário e secundário, respectivamente. O sinal em δ_C (ppm) 168.2 foi atribuído ao carbono quaternário olefínico em C-5 e o sinal em δ_C (ppm) 125.8, ao carbono metínico olefínico em C-4. Sinais em campo mais alto δ_C (ppm) 21.1, 23.7, 23.8 e 23.9 foram característicos das metilas em C-13, C-10, C-11 e C-12, respectivamente. Todos os sinais estão apresentados na **Tabela 16**. A comparação destes resultados com os dados da literatura levou à identificação da substância # 13 como sendo o bisnor-sesquiterpeno **blumenol B** (**Figura 78**), encontrado em *Heliotropium angiospermum* (Boraginaceae) mas também um importante componente em tabaco, chá e frutas (Erosa-Rejón *et al.* 2009). Esta foi a primeira vez que esta substância foi isolada de *H. brasiliense*.

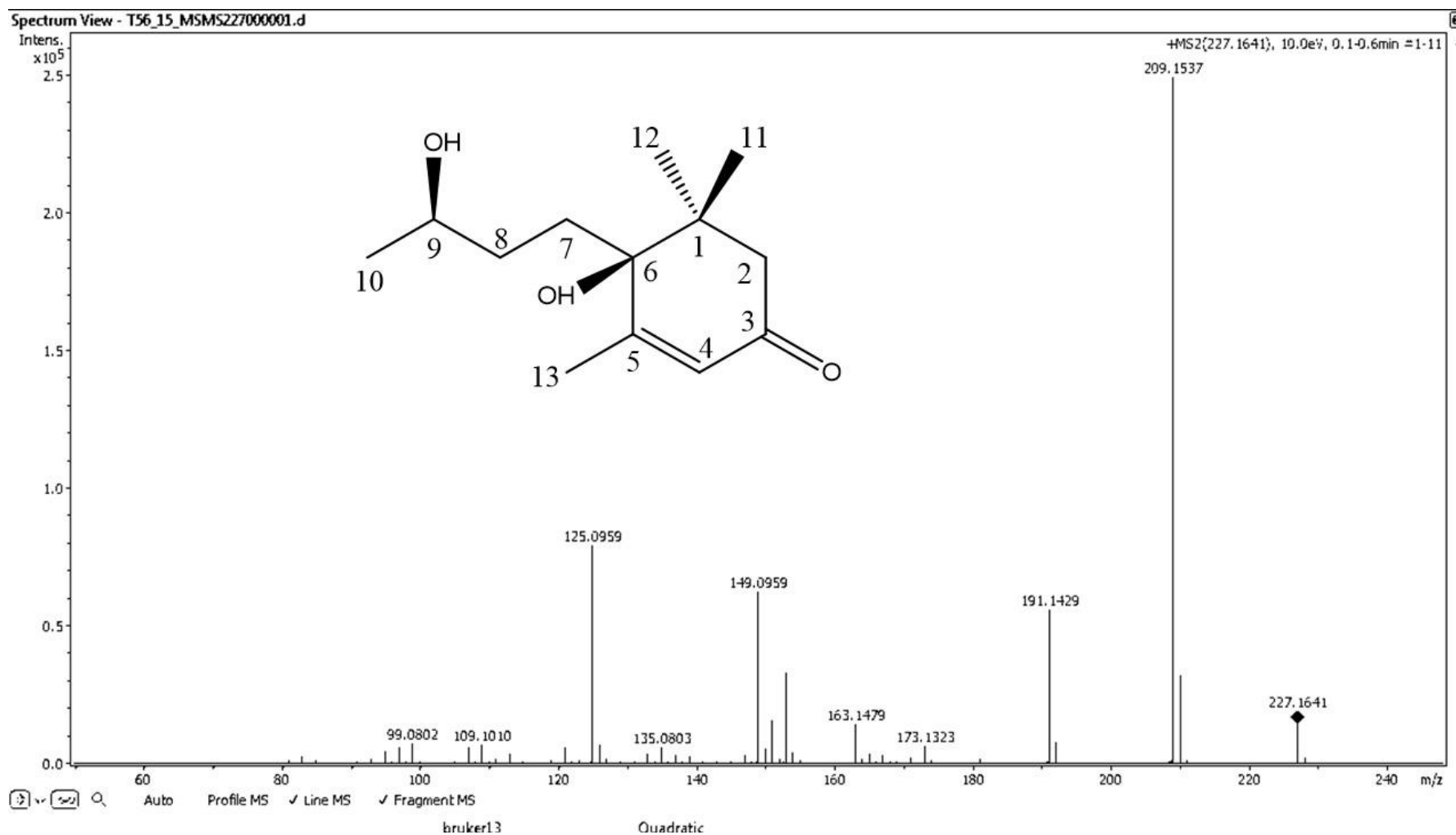


Figura 78. Espectro de ESI-QqTOF-MS (modo positivo) da substância # 13, identificada como **blumenol B**.

Tabela 16. Dados de ^1H (600 MHz) e ^{13}C -RMN (150 MHz) da substância # 13 (**blumenol B**, em CDCl_3) e dados presentes na literatura.

Posição	# 13 (blumenol B)			Literatura (Erosa-Rejón <i>et al.</i> 2009)	
	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)	HMBC	δ_{C}	δ_{H} (mult., J Hz)
1	41.7			41.7 s	
2	50.0	2.15 (dd, 18.0, 1.1 Hz, 1H) 2.45 (d, 18.0, 1H)	C-6 C-11, C-12	49.9 t	2.23 (d, 18 Hz, 1H) 2.48 (d, 18 Hz, 1H)
3	198.2			198.3 s	
4	125.8	5.78 (s, 1H)		125.9 d	5.84 (s, 1H)
5	168.2			168.9 s	
6	77.7			77.3 s	
7	33.37	1.82 (m, 2H)		34.7 t	1.80 (m, 2H)
8	33.2	1.45 (dddd, 13.9, 9.2, 7.9, 6.2 Hz, 1H) 1.65 (tdd, 9.6, 6.0, 3.9 Hz, 1H)		33.3 t	1.50 (m, 2H)
9	68.6	3.76 (m, 1H)		68.5 d	3.73 (m, 1H)
10	23.7	1.15 (d, 6.2 Hz, 3H)	C-8, C-9	23.6 q	1.21 (d, 6.2 Hz, 3H)
11	23.8	0.98 (s, 3H)	C-1, C-2, C-6, C-12	23.8 q	1.04 (s, 3H)
12	23.9	1.02 (s, 3H)	C-1, C-2, C-6, C-11	24.1 q	1.08 (s, 3H)
13	21.1	1.96 (s, 3H)	C-3, C-4, C-6	21.8 q	2.05 (s, 3H)

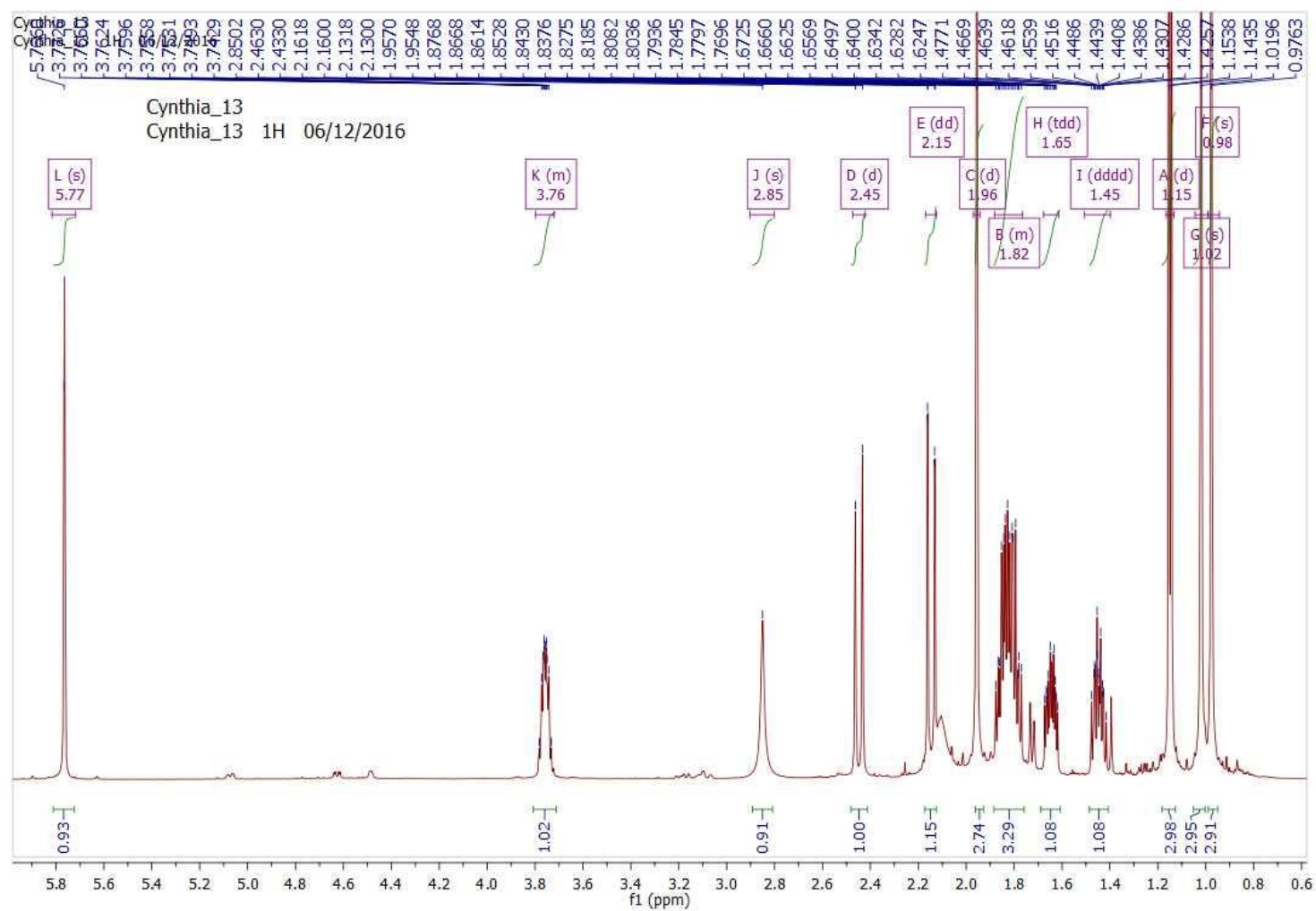


Figura 79. Espectro de ^1H -RMN (600 MHz, CDCl_3) da substância # 13, identificada como **blumenol B**.

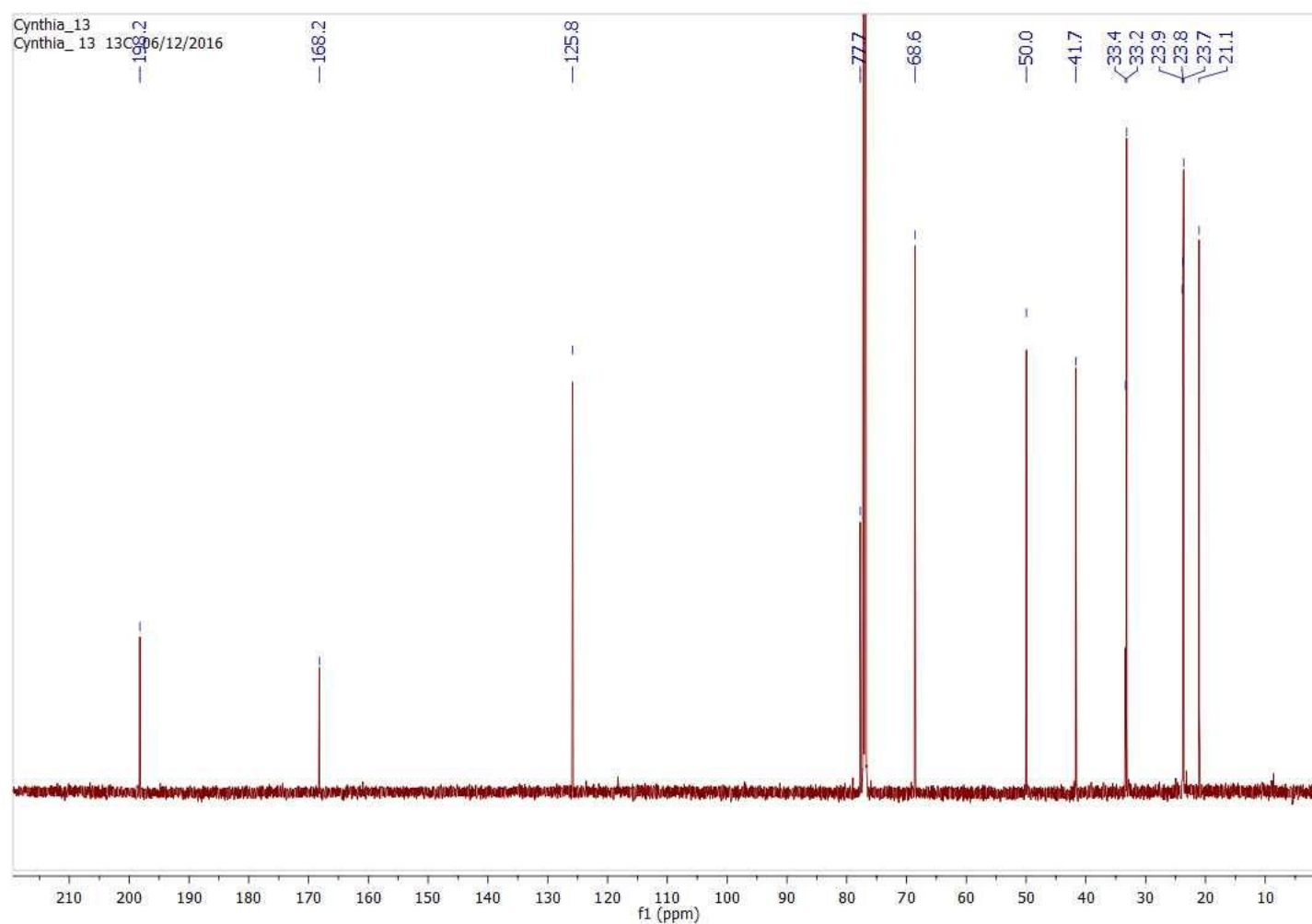


Figura 80. Espectro de ^{13}C -RMN (150 MHz, CDCl_3) da substância # 13, identificada como **blumenol B**.

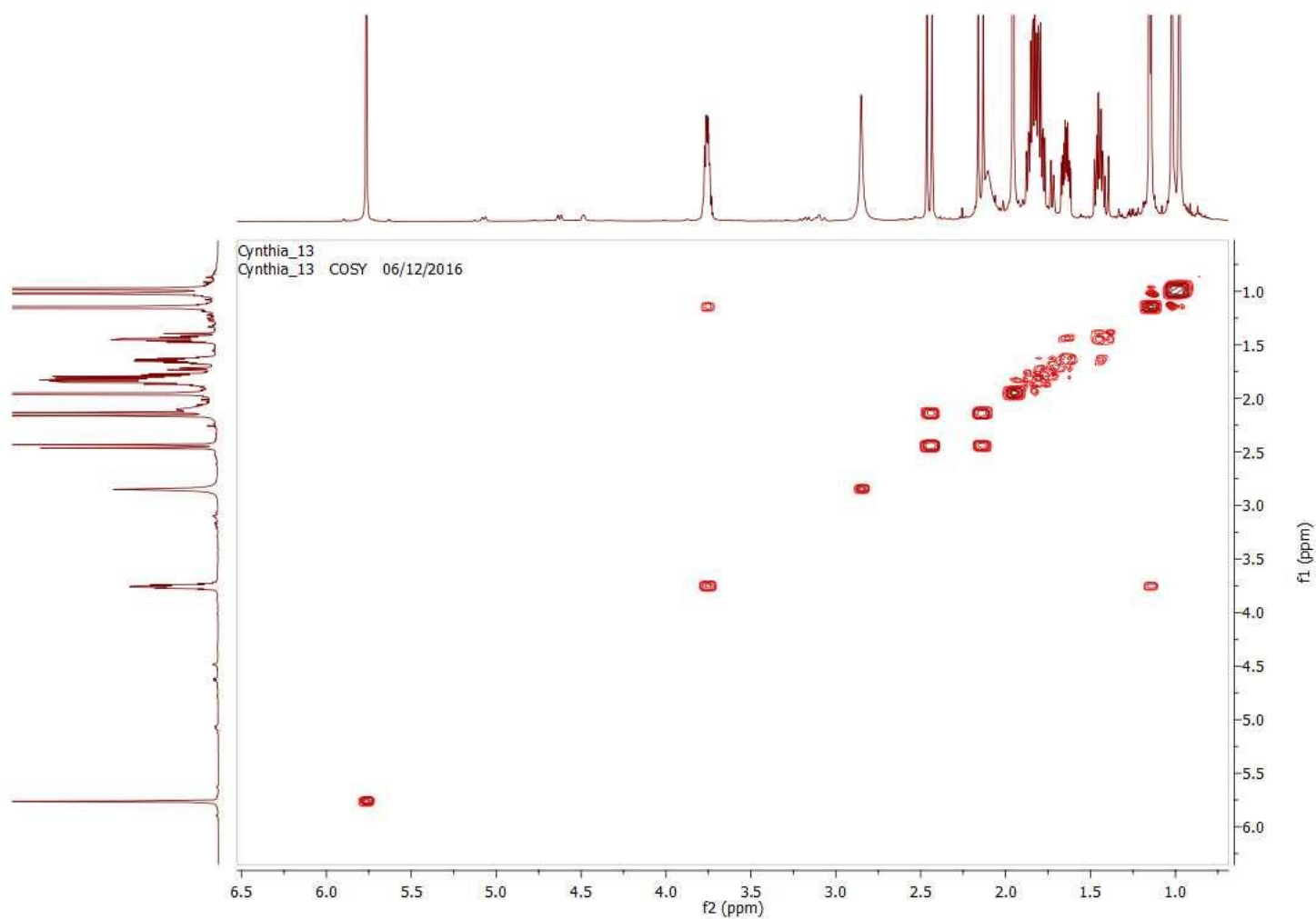


Figura 81. Espectro de COSY (CDCl_3) da substância # 13, identificada como **blumenol B**.

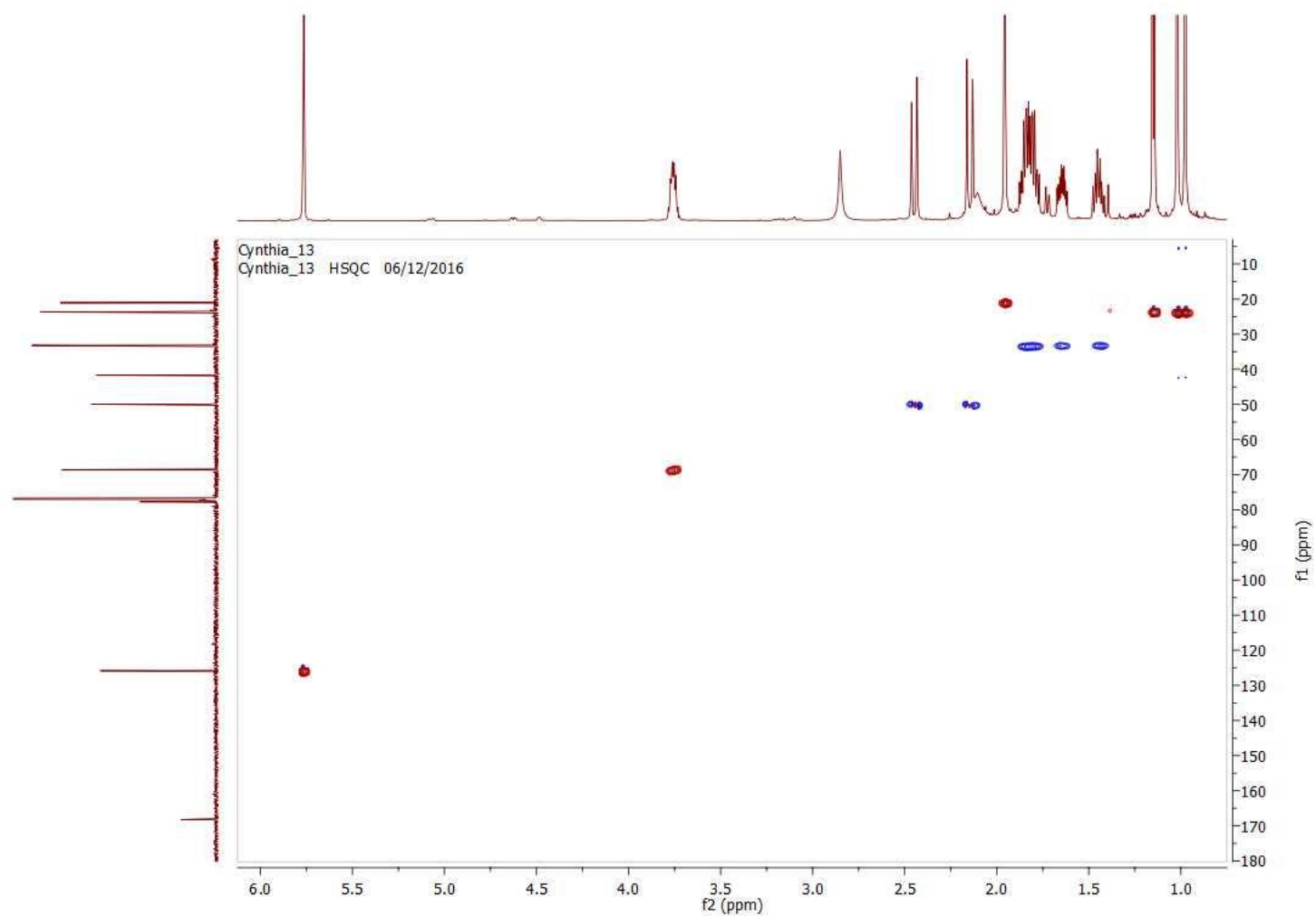


Figura 82. Espectro de HSQC (CDCl_3) da substância # 13, identificada como **blumenol B**.

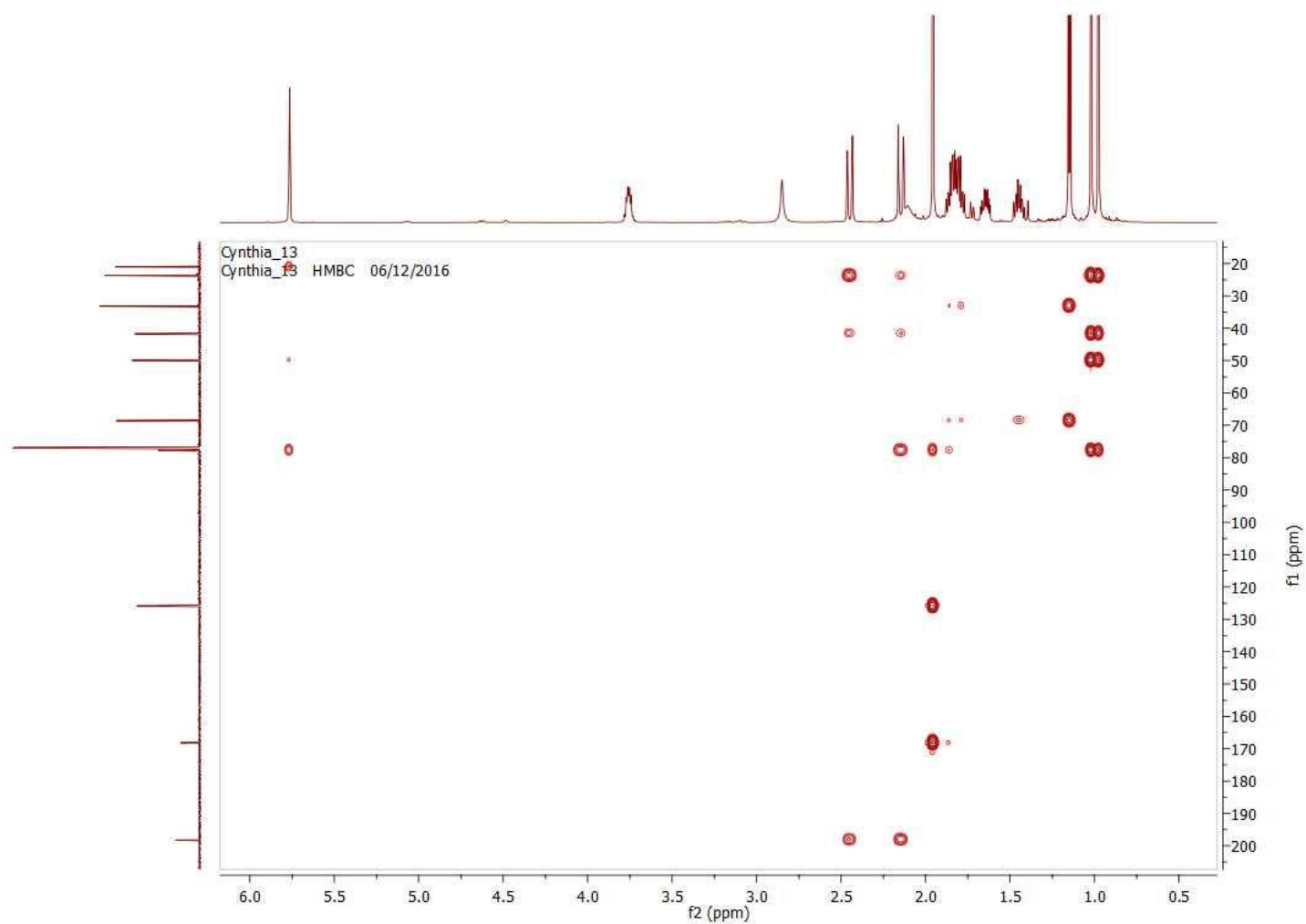


Figura 83. Espectro de HMBC (CDCl_3) da substância # 13, identificada como **blumenol B**.

Das oito substâncias isoladas (**Figura 84**), duas foram inéditas: a hedyosulida e o vanilato de pinocarvila. Entre as substâncias já descritas na literatura, duas já haviam sido identificadas nesta espécie (15-acetoxi-isogermafurenolídeo e linderolídeo F), duas de outras espécies do gênero *Hedyosmum* (hedyosumina D e oxionoseriolídeo), uma de outra espécie de Chloranthaceae (neolitacumona B) e duas delas também foram encontradas em espécies de Lauraceae. O bisnor-sesquiterpeno blumenol B possui ampla distribuição taxonômica, não sendo considerado um marcador taxonômico.

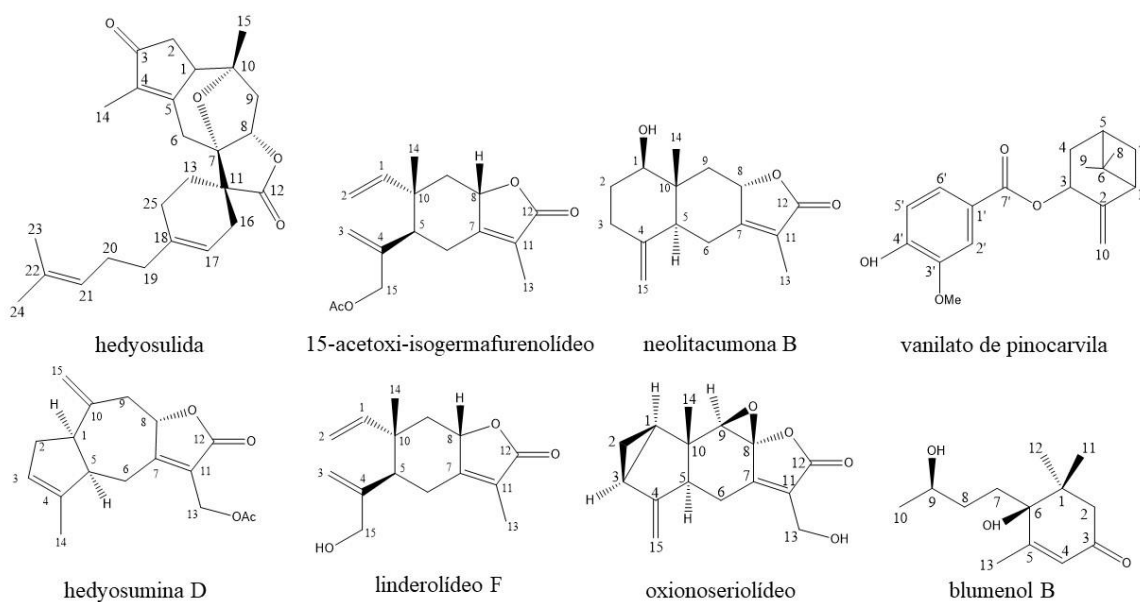


Figura 84. Substâncias puras isoladas das folhas de *H. brasiliense*.

3.12 Ensaio antifúngico por bioautografia das substâncias isoladas

Após as análises por RMN e Espectrometria de Massas de Alta Resolução, todas as substâncias isoladas foram testadas por bioautografia para detectar as substâncias responsáveis pela atividade antifúngica das frações de origem. A **figura 85** mostra o resultado do ensaio antifúngico das substâncias isoladas.

Como foi observado, as substâncias # 2 e 6 apresentaram atividade forte, enquanto que as substâncias # 8 e 9 apresentaram atividade fraca frente aos fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. O fracionamento bio guiado de extratos vegetais pode prosseguir até o

isolamento das substâncias bioativas ou somente até a obtenção de frações biologicamente ativas pois, após o isolamento, pode ocorrer a redução ou até a perda da atividade biológica devido à ação do sinergismo entre diferentes constituintes químicos. Em certos casos, até mesmo a escolha inadequada do bioensaio pode gerar resultados falso-negativos (Braga *et al.* 2017).

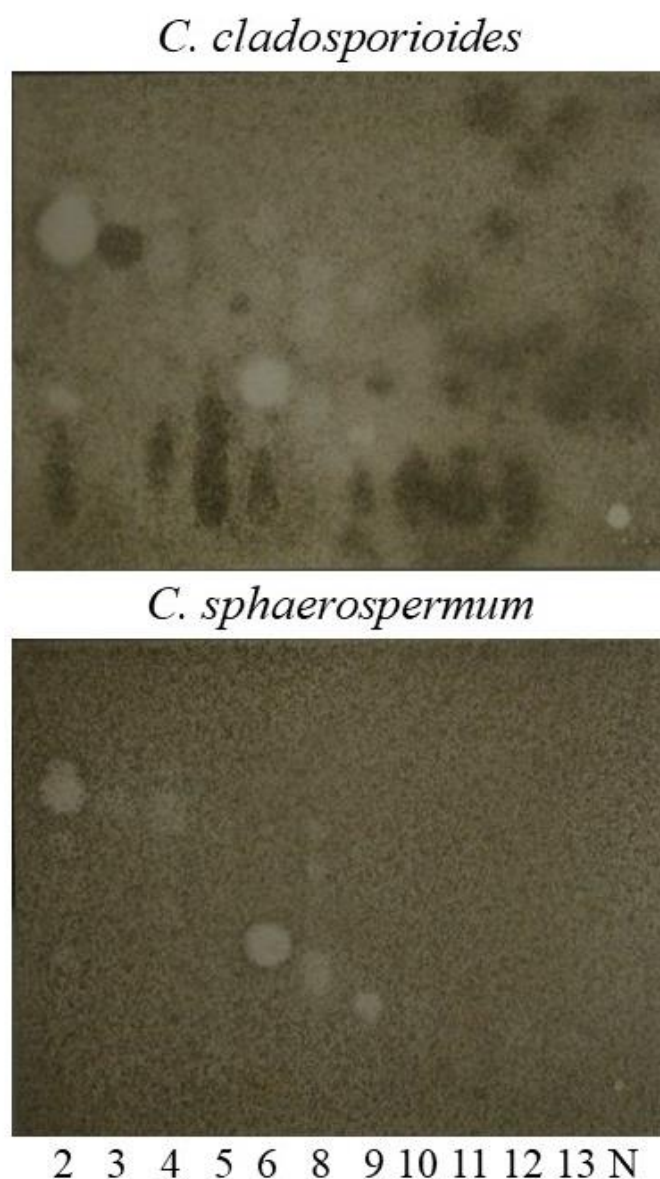


Figura 85. Ensaio antifúngico por bioautografia das substâncias isoladas da partição em diclorometano do EE de *Hedyosmum brasiliense* frente aos fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*. Os halos claros sob fundo

de coloração escura representam inibição do crescimento dos fungos pelas substâncias puras testadas. Legenda: N = nistatina (5 µg).

A **tabela 17** apresenta resumidamente as análises realizadas com as amostras selecionadas. As substâncias # 1 e 7 não foram analisadas pois não estavam puras pela análise de ^1H -RMN. As substâncias # 6 e 10 sofreram degradação no período entre o isolamento e as análises por RMN. A substância # 11 não pôde ser identificada por apresentar dados imprecisos de ^{13}C -RMN.

Como indicado na **tabela 17**, apesar de a amostra # 6 ter apresentado forte atividade antifúngica, sua identificação não foi possível devido à degradação da amostra no período entre o isolamento e as análises por RMN, em razão da quebra do equipamento na época em que foi isolado. O mesmo ocorreu com a amostra # 10, porém esta não apresentou potencial antifúngico.

As substâncias linderolídeo F e 15-acetoxi-isogermafurenolídeo, ambas de esqueleto elemanolídeo, diferem entre si apenas pela função álcool ligada ao C-15 na primeira, e pela função acetila ligada ao C-15 na segunda molécula. Porém, enquanto linderolídeo F apresentou potencial antifúngico, mesmo que fraco, no ensaio de bioautografia, 15-acetoxi-isogermafurenolídeo foi inativo no mesmo ensaio. Neste caso, é possível afirmar que o substituinte influenciou no potencial antifúngico destas substâncias. Não é possível fazer a relação estrutura-atividade das demais substâncias pois tratam-se de esqueletos diferentes. A neolitacumona B, que apresenta função álcool ligada ao C-1, e a hedyosumina D, que apresenta uma acetila ligada ao C-13, foram ativas frente aos fungos filamentosos, porém a atividade não pode ser atribuída aos substituintes álcool e acetila, uma vez que apresentam esqueletos diferentes e não temos suas versões com os substituintes acetila e álcool, respectivamente, para comparar as atividades.

Tabela 17. Análises realizadas com as substâncias isoladas de *H. brasiliense*.

Amostra #	Fração de origem	Identificação da substância	[M+H] ⁺	Fórmula molecular	RMN	C. <i>sphaerospermum</i>	C. <i>cladosporioides</i>	Ref. das substâncias identificadas
5	T17 - 20'	hedyosulida	397.2375	C ₂₅ H ₃₂ O ₄	¹ H, ¹³ C	i	i	Appendino <i>et al.</i> (2009); Ferreira <i>et al.</i> (1998); Su <i>et al.</i> (2008)
3	T12 - 62'	vanilato de pinocarvila	303.1591	C ₁₈ H ₂₂ O ₄	¹ H, ¹³ C	i	i	Abraham <i>et al.</i> (1973); Chang <i>et al.</i> (2009); Ferreira <i>et al.</i> (1998)
2	T12 - 30'	hedyosumina D	289.1435	C ₁₇ H ₂₀ O ₄	¹ H, ¹³ C	ativo ***	ativo ***	Su <i>et al.</i> (2008)
4	T14 - 17'	15-acetoxi-isogermafurenolídeo	291.1587	C ₁₇ H ₂₂ O ₄	¹ H, ¹³ C	i	i	Amoah <i>et al.</i> (2013)
8	T27 - 18,7'	linderolídeo F	249.1480	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	¹ H, ¹³ C	ativo *	ativo *	Amoah <i>et al.</i> (2013); Sumioka <i>et al.</i> (2011)
9	T31 - 17'	neolitacumona B	249.1480	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	¹ H, ¹³ C	ativo *	ativo *	Chang <i>et al.</i> (2002); Yang <i>et al.</i> (2012)
12	T45 - 45'	oxionoseriolídeo	-	C ₁₅ H ₁₆ O ₄	¹ H, ¹³ C	i	i	Acebey Castellon (2007); Takeda <i>et al.</i> (1993)
13	T56 - 15'	blumenol B	227.1641	C ₁₃ H ₂₂ O ₃	¹ H, ¹³ C	i	i	Erosa-Rejón <i>et al.</i> (2009); Ferreira <i>et al.</i> (1998)
6	T20 - 23'	-	245.1161	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	¹ H	ativo ***	ativo ***	-
10	T31-18'	-	249.1480	C ₁₅ H ₂₀ O ₃	¹ H	i	i	-
11	T45 - 22'	-	279.1223	C ₁₅ H ₁₈ O ₅	¹ H, ¹³ C	i	i	-

Legenda: i: inativo; *: atividade fraca; ***: atividade forte.

3.13 Ensaio anticolinesterásico por CCD dos EEs e partições

Para avaliar o potencial inibidor da enzima acetilcolinesterase dos EEs e partições de plantas masculinas e femininas provenientes da Mata Atlântica, as placas foram reveladas pelo método de autografia em placas de CCD. O resultado está apresentado na **Tabela 18**.

Tabela 18: Resultado do ensaio anticolinesterásico (R_f) dos EEs e resíduos das partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidrometanólico de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica; i: inativo; *: atividade fraca; ***: atividade forte.

Amostra	Atividade anticolinesterásica (R_f)
EE ♂	i
resíduo da partição em hexano ♂	i
resíduo da partição em diclorometano ♂	i
resíduo da partição acetato de etila ♂	i
resíduo hidrometanólico ♂	i
EE ♀	0,36* / 0,53*
resíduo da partição em hexano ♀	0,36* / 0,53*
resíduo da partição em diclorometano ♀	0,36* / 0,70*
resíduo da partição acetato de etila ♀	i
resíduo hidrometanólico ♀	i
fisostigmina (0,05 µg)	origem***

O EE e os resíduos das partições em hexano e em diclorometano de plantas femininas apresentaram fraca atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase nos R_f 's 0,36, 0,53 e 0,70, enquanto que o restante das amostras foi inativo. Este resultado demonstrou que *H. brasiliense* não apresentou potencial acetilcolinesterásico para o tratamento do Mal de Alzheimer.

Propriedades neuroquímicas de *H. brasiliense* têm sido descritas na literatura, uma vez que extratos e frações de folhas mostraram efeitos sedativos, hipnóticos, ansiolíticos e antidepressivos (Tolardo *et al.* 2010). Um estudo realizado por Amoah *et al.* (2015a) demonstrou que lactonas sesquiterpênicas com esqueleto guaiano e lindenano isoladas de *H. brasiliense* seriam potenciais candidatas para a terapia do Mal de Alzheimer por outro mecanismo de ação, com base em seu potencial neuroprotetivo, ao demonstrar melhora da memória induzida de ratos suíços em testes de prevenção inibitória.

3.14 Ensaio antifúngico e antimicrobiano por microdiluição em caldo dos EEs e partições

Os EEs de plantas masculinas e femininas das duas populações e os resíduos das partições da população da Mata Atlântica foram testados nos ensaios antifúngico e antimicrobiano por microdiluição frente às bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *Enterococcus faecalis* e fungo leveduriforme *Candida albicans*, com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) das amostras ativas, e os resultados estão apresentados na **tabela 19**.

Os EEs das duas populações apresentaram atividade antibacteriana frente a *S. sanguis* e *S. mutans* foi sensível aos resíduos da partição em hexano de plantas masculinas e femininas provenientes da população da Mata Atlântica. Os demais extratos testados foram inativos contra todos os micro-organismos testados. As bactérias gram-positivas foram mais sensíveis e sabe-se, no meio científico, que bactérias gram-negativas costumam ser mais resistentes em razão da complexidade de sua dupla camada de membrana celular, quando comparada com a camada simples das bactérias gram-positivas (Teixeira *et al.* 2013).

Três componentes isolados neste estudo, hedyosumina D, linderolida F, neolitacumona B, além da substância # 6, que não pôde ser identificada, apresentaram atividade pelo método de bioautografia frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. O estudo dos óleos essenciais de *H. brasiliense* apresentado no Capítulo 2 desta tese mostrou potencial antimicrobiano e antifúngico, bem como óleos essenciais desta espécie provenientes de Santa Catarina e de São Paulo (Kirchner *et al.* 2010; Murakami *et al.* 2017; Resende-Vido 2009). Porém, não foi observada atividade antifúngica dos componentes fixos de *H. brasiliense* frente a *C. albicans* neste estudo.

Tabela 19. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) (média, mg/mL) dos EEs e resíduos de partição em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidrometanólico de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado, frente às bactérias gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. sanguis* e *Enterococcus faecalis*, e fungo leveduriforme *Candida albicans*.

Extratos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida/Fungicida Mínima (CBM/CFM) - (mg/mL)						
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Candida albicans</i>
Cerrado							
EE ♂	-	-	-	-	-	3,0	-
EE ♀	-	-	-	-	-	1,0	-
Mata Atlântica							
EE ♂	-	-	-	-	-	2,0	-
hexano ♂	-	-	-	-	3,0	-	-
diclorometano ♂	-	-	-	-	-	-	-
acetato de etila ♂	-	-	-	-	-	-	-
hidrometanólico ♂	-	-	-	-	-	-	-
EE ♀	-	-	-	-	-	2,0	-
hexano ♀	-	-	-	-	2,0	2,0	-
diclorometano ♀	-	-	-	-	-	-	-
acetato de etila ♀	-	-	-	-	-	-	-
hidrometanólico ♀	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: - inativo.

Uma revisão sobre a composição química e atividades biológicas de espécies de *Chloranthaceae* descreve a atividade antimicrobiana e antifúngica de sesquiterpenos com esqueleto eudesmano isolados de diversas espécies de *Chloranthus* frente às bactérias *Helicobacter pylori*, *Cryptococcus neoformans* e *Staphylococcus aureus*, e aos fungos *Candida albicans*, *Alternaria kikuchiana*, *Colletotrichum lagenarium*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cineria*, *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani*. Polímeros de sesquiterpenos isolados de várias espécies de *Chloranthus* também apresentaram potencial antibacteriano frente a *C. neoformans* e antifúngico frente a *A. kikuchiana*, *B. cinerea*, *C. lagenarium*, *M. grisea*, *P. ultimum* e *Phytophthora infestans* (Zhang et al. 2016).

3.15 Ensaio citotóxico dos EEs e partições

Os EEs de plantas masculinas e femininas das duas populações e os resíduos das partições da população da Mata Atlântica foram testados no ensaio citotóxico contra células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3) e os resultados estão apresentados na **tabela 20**.

Tabela 20. IC₅₀ (µg/mL) da atividade citotóxica dos EEs e resíduos das partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e hidrometanólico de plantas masculinas (♂) e femininas (♀) de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica e do Cerrado contra células de adenocarcionma de mama (MCF-7) e câncer de próstata (PC-3).

Extratos	IC ₅₀ (µg/mL)			
	MCF-7		PC-3	
	Mata Atlântica	Cerrado	Mata Atlântica	Cerrado
EE ♂	17,12	16,62	26,25	28,67
hexano ♂	23,85	*	20,77	*
diclorometano ♂	12,12	*	12,97	*
acetato de etila ♂	166,30	*	251,60	*
hidrometanólico ♂	343,30	*	737,80	*
EE ♀	15,68	26,43	18,30	25,33
hexano ♀	7,92	*	12,85	*
diclorometano ♀	12,92	*	14,06	*
acetato de etila ♀	53,06	*	160,10	*
hidrometanólico ♀	1191,00	*	609,30	*
doxorubicina (mM)	0,03	0,03	0,31	0,31

Os EEs das plantas provenientes da Mata Atlântica apresentaram menores valores de IC₅₀ quando comparados às plantas do Cerrado, porém os EEs de ambas as populações apresentaram potencial citotóxico. Uma classificação de citotoxicidade de substâncias *in vitro* determina que extratos vegetais que apresentam IC₅₀ entre 20 e 200 µg/mL possuem baixo potencial citotóxico (Reichling *et al.* 2009), enquanto que o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos determinou que valores de IC₅₀ para extratos abaixo de 30 µg/mL representam bom potencial quimiopreventivo (Talib & Mahasneh 2010). Observou-se que a partição dos EEs com solventes de graus crescentes de polaridade separou as substâncias citotóxicas, mais concentradas nos resíduos das partições menos polares, em diclorometano e hexano, tanto de plantas masculinas como femininas, com os menores valores de IC₅₀. Os resíduos das partições em solventes mais polares não apresentaram potencial citotóxico. Estes resultados sugerem que as substâncias menos polares foram responsáveis pela atividade citotóxica observada nos EEs de *H. brasiliense*.

Vários estudos têm comprovado o potencial citotóxico de substâncias isoladas de espécies da família Chloranthaceae contra diversas linhagens de células tumorais. Entre elas, podem ser destacados sesquiterpenos eudesmanos provenientes de *Hedyosmum orientale*, *Chloranthus henryi* e *C. japonicus*, lindenanos de *C. japonicus*, cadinanos de *C. henryi* e dímeros de sesquiterpenos de espécies de *Chloranthus* spp. e *Sancandra* spp. (Cao *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2016).

Poucos estudos com o gênero *Hedyosmum* têm apresentado resultados frente a linhagens celulares tumorais. Su *et al.* (2008) isolaram várias lactonas sesquiterpênicas de *H. orientale* e comprovaram moderada atividade citotóxica da 9R-hidroxiasterolida contra células de adenocarcinoma humano de pulmão (A-549) e leucemia humana (HL-60), com valores de IC₅₀ de 3,1 e 8,8 mM, respectivamente. Sylvestre *et al.* (2007) observaram que o óleo essencial de *H. arborescens*, constituído por 59 % de monoterpenos e 37 % de sesquiterpenos, apresentou moderada atividade citotóxica contra células de carcinoma de pulmão (A-549) e adenocarcinoma de cólon (DD-1). O óleo essencial de *H. sprucei* apresentou potencial citotóxico contra linhagens celulares de adenocarcinoma humano de pulmão (A-549) e adenocarcinoma de mama (MCF-7) com IC₅₀ de 43.55 e 33.64 µg/mL, respectivamente (Guerrini *et al.* 2016).

Os estudos mencionados sugerem que as substâncias que proporcionaram a atividade citotóxica observada nos resíduos das partições em hexano e diclorometano podem ser da classe dos terpenos, os principais componentes responsáveis pelo potencial citotóxico nesta família. Não foi possível realizar o ensaio citotóxico com as substâncias isoladas neste estudo devido ao baixo rendimento e à possibilidade de realização de novas análises químicas, por isso somente o ensaio bioautográfico realizado com elas pois requer pouca quantidade de material.

4 Conclusões

A composição química dos EEs de *H. brasiliense* não variou entre plantas masculinas e femininas, porém a população da Mata Atlântica foi quimicamente diferente da do Cerrado e mais ativa contra os fungos filamentosos.

Duas substâncias inéditas foram isoladas de *H. brasiliense*: o sesterterpeno hedyosulida e o éster vanilato de pinocarvila. Esta foi a segunda vez que um sesterterpeno foi isolado de Chloranthaceae. Os demais componentes já foram encontrados em outras espécies de Chloranthaceae, com exceção do blumenol B, comum em diversas espécies vegetais.

Hedyosumina D e a substância não identificada # 6 apresentaram as atividades antifúngicas mais fortes, enquanto que linderolida F e neolitacumona B apresentaram atividades fracas.

Os extratos e resíduos de partições menos polares apresentaram potencial antifúngico contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, antibacteriano contra *Streptococcus sanguis* e *S. mutans* e citotóxico frente às células de adenocarcinoma de mama e câncer de próstata, reforçando o potencial farmacológico de *H. brasiliense*.

5 Referências bibliográficas

Abraham, R.J., Cooper, M.A., Indyk, H., Siverns, T.M., Whittaker, D. 1973. The NMR spectra and conformations of cyclic compounds – VII: the conformations of β -pinene, pinocarvone and the *cis*- and *trans*-pinocarveols. Organic magnetic resonance 5 (8): 373–377.

- Acebey Castellon, I.L.** 2007. Caractérisation de terpènes antileishmaniens isolés par bioguidage d'une plante bolivienne *Hedyosmum angustifolium* (Ruiz & Pavon) Solms. l'Institut National Polytechnique de Toulouse. Tese de doutorado. Toulouse, França. 255 p.
- Acebey, L., Sauvain, M. Beck, S., Moulis, C., Gimenez, A., Jullian, V.** 2007. Bolivianine, a new sesterpene with an unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. *Organic letters* 9 (23): 4693-4696.
- Amoah, S.K., Oliveira, F.L., Cruz, A.C., Souza, N.M., Campos F.R., Barison, A., Biavatti, M.W.** 2013. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry* 87: 126-132.
- Amoah, S.K.S., Dalla Vecchia, M.T., Pedrini, B., Carnhelutti, G.L., Gonçalves, A.E., Santos, D.A., Biavatti, M.W., Souza, M.M.** 2015a. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 β ,10 α -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. *European journal of pharmacology* 769: 195-202.
- Amoah, S.K., Kouloura, E., Dutra, L.M., Barison, A., Wildner, L.M., Bazzo, M.L., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A., Biavatti, M.W.** 2015b. Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry letters* 13: 267-274.
- Appendino, G., Tagliatela-Scafati, O., Romano, A., Pollastro, F., Avonto, C. Rubiolo, P.** 2009. Genepolide, a sesterpene γ -lactone with a novel carbon skeleton from mountain wormwood (*Artemisia umbelliformis*). *Journal of natural products* 72: 340-344.
- Bohlmann, F., Zeisberg, R.** 1975. ^{13}C -NMR Spektren von Monoterpenen. *Organic magnetic resonance* 7: 426-432.
- Braga, F.C., Rates, S.M.K., Simões, C.M.O.** 2017. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. *In*: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick eds. *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*, Porto Alegre, Artmed, p. 53-68.
- Cao, C.M., Peng, Y., Shi, Q.W., Xiao, P.G.** 2008. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity*. 5: 219-238.

- Chang, F.-R., Hsieh, T.-J., Huang, T.-L., Chen, C.-Y., Kuo, R.-Y., Chang, Y.-C., Chiu, H.-F., Wu, Y.-C.** 2002. Cytotoxic constituents of the stem bark of *Neolitsea acuminatissima*. *Journal of natural products* 65: 255-258.
- Chang, S.W., Kim, K.H., Lee, I., Choi, S.U., Ryu, S.Y., Lee, K.R.** 2009. Phytochemical Constituents of *Bistorta manshuriensis*. *Natural product sciences* 15 (4): 234-240.
- Cordova, S.M., Benfatti, C.S., Magina, M.D.A., Magina, M.D.A., Guedes, A., Cordova, C.M.M.** 2010. RBAC 42(4) : 241-244.
- Erosa-Rejón, G., Peña-Rodríguez, L.M., Sterner, O.** 2009. Secondary metabolites from *Heliotropium angiospermum*. *Journal of mexican chemical society* 53 (2): 44-47.
- Ferreira, M.J.P., Emerenciano, V.P., Linia, G.A.R., Romoff, P., Macari, P.A.T., Rodrigues, G.V.** 1998. ¹³C NMR spectroscopy of monoterpenoids. *Progress in nuclear magnetic resonance spectroscopy* 33: 153–206.
- Gonçalves, A.E., Burger, C., Amoah, S.K.S., Tolardo, R., Biavatti, M.W., Souza, M.M.** 2012. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology* 674 (2-3): 307-314.
- Hendrickson, J.B., Cram, D., Hammond, G.S.** 1970. Organic chemistry. McGraw-Hill Book Company, New York. 3rd ed. 1279 p.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. *Journal of chromatography* 51: 327-329.
- Kawabata, J., Fukushi, E., Tahara, S., Mizutani, J.** 1985. Studies on the chemical constituents of Chloranthaceae plants. Part IV. Structures of novel sesquiterpene ketones from *Chloranthus serratus* (Chloranthaceae). *Agricultural and biological chemistry* 49: 1479-1485.
- Kirchner, K., Wisniewski, A., Cruz, A.B., Biavatti, M.W., Netz, D.J.A.** 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian journal of pharmacognosy* 20 (5): 692-699.
- Leitolis, A., Amoah, S.K.S., Biavatti, M.W., Silva-Santos, J.E.** 2016. Sesquiterpene lactones from *Hedyosmum brasiliense* induce *in vitro* relaxation of rat aorta and corpus cavernosum. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26: 363-368.

- 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.
- Mosmann, T.** 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunology methods* 65 (1-2): 55-63.
- Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M.T., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2017. Chemical composition, antifungal and antioxidant activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) essential oils. *Medicines* 4: 55 (doi:10.3390/medicines4030055).
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U., Saller, R.** 2009. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forsch komplementmed* 16:79–90.
- Renault, J.-H.** 2015. Modern separation techniques for the isolation of natural products. *Planta medica* 81: 1569.
- Rendrickson, J.B., Cram, D.J., Hammond, G.S.** 1970. Organic chemistry. 3rd. ed. McGraw-Hill Book Company. New York, 1279 p.
- Resende-Vido, D.L.** 2009. Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex Miq. provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 92p.
- Scariot, A., Souza-Silva, J.C., Felfili, J.M.,** 2005. Cerrado: ecologia, biodiversidade e conservação. Brasília, Ministério do Meio Ambiente.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Martin, M.A.C.K., Bercion, S.R. & Legault, J.** 2007. Chemical composition of leaf essential oil of *Hedyosmum arborecens* and evaluation of its anticancer activity. *Natural products communications* 2 (12): 1269-1272.
- Suffredini, I.B., Paciencia, M.L.B., Frana, S.A., Varella, A.D., Younes, R.N.** 2007. In vitro breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. *Die pharmazie* 62: 798-800.
- Suffredini, I.B., Sader, H.S., Gonçalves, A.G., Reis, A.O., Gales, A.C., Varella, A.D., Younes, R.N.** 2004. Screening of antibacterial active extracts obtained from plants native to

Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. Brazilian journal of medical and biological research 37 (3): 379-384.

Suffredini, I.B., Varella, A.D., Younes, R.N., Paciencia, M.L.B. 2006. In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. Die pharmazie 61: 722-724.

Sumioka, H., Harinantenaina, L., Matsunami, K., Otsuka, H., Kawahata, M., Yamaguchi, K. 2011. Linderolides A-F, eudesmane-type sesquiterpene lactones and linderolide, a germacrene-type sesquiterpene from the roots of *Lindera strychnifolia* and their inhibitory activity on NO production in RAW 267.7 cells in vitro. Phytochemistry 72: 2165-2171.

Su, Z.-S., Yin, S., Zhou, Z.-W., Wu, Y., Ding, J., Yue, J.-M. 2008. Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. Journal of natural products 71: 1410–1413.

Takeda, Y., Yamashita, H., Matsumoto, T., Terao, H. 1993. Chloranthalactone F, a sesquiterpenoid from the leaves of *Chloranthus glaber*. Phytochemistry 33: 713-715.

Talib, W.H., Mahasneh, A.M. 2010. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. Scientia pharmaceutica 78 (1): 33–45.

Tolardo, R., Zetterman, L., Bitencourt, D.R., Mora, T.C., Oliveira, F.L., Biavatti, M.W., Amoah, S.K.S., Bürger, C. & Souza, M.M. 2010. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. Journal of ethnopharmacology. 128:63-70.

Trentin, A.P., Santos, A.R., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A. & Calixto, J.B. 1999. Antinociception caused by extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. Planta medica. 65(6): 517-521.

Wu, B., He, S., Wu, X.-D., Wu, D.-K., Pan, Y.-J. 2007. Cadinane and eudesmane sesquiterpenoids from *Chloranthus henryi*. Helvetica chimica acta 90: 1586-1592.

Yang, S., Chen, H., Yue, J. 2012. Sesquiterpenoids from *Chloranthus spicatus*. Chinese Journal of Chemistry 30: 1243—1248.

Younes, R.N., Varella, A.D., Suffredini, I.B. 2007. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. *Clinics* 62 (6): 763-768.

Yuan, C., Du, B., Yang, L., Liu, B. 2013. Bioinspired total synthesis of bolivianine: a Diels-Alder/intramolecular hetero-Diels-Alder cascade approach. *Journal of the american chemical society* 135 (25): 9291–9294.

Zhang, M., Liu, D., Fan, G., Wang, R., Lu, X., Gu, Y., Shi, Q.-W. 2016. Constituents from Chloranthaceae plants and their biological activities. *Heterocyclic communications* 22 (4): 175–220.



Article

Chemical Composition, Antifungal and Antioxidant Activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) Essential Oils

Cynthia Murakami ^{1,2,*}, Inês Cordeiro ², Marcus Tullius Scotti ³ , Paulo Roberto H. Moreno ⁴ and Maria Cláudia M. Young ²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo 04301-902, Brazil

² Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo 04301-902, Brazil; isandona@uol.com.br (I.C.); marxyoungmc@gmail.com (M.C.M.Y.)

³ Laboratório de Quimioinformática, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 58051-900, Brazil; mtscotti@gmail.com

⁴ Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; prmoreno@iq.usp.br

* Correspondence: cynmurakami@gmail.com; Tel.: +55-11-5067-6174

Academic Editor: Eleni Skaltsa

Received: 30 June 2017; Accepted: 13 July 2017; Published: 17 July 2017

Abstract: Background: *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) is a dioecious shrub popularly used in Brazil to treat foot fungi and rheumatism. This work investigated the chemical composition, antifungal, and antioxidant activities of flowers and leaves of *H. brasiliense* essential oils; **Methods:** *H. brasiliense* male and female flowers and leaves were collected at Ilha do Cardoso (São Paulo) and the essential oils were extracted by hydrodistillation and analyzed by GC/MS and their similarity compared by Principal Component Analysis. Antifungal activity was performed by bioautography and antioxidant potential by 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) free radical scavenging and β -carotene/linoleic acid system; **Results:** The major compounds for all oils were sabinene, curzerene, and carotol, but some differences in their chemical composition were discriminated by Principal Component Analysis (PCA) analysis. Bioautography showed two antifungal bands at Rf's 0.67 and 0.12 in all samples, the first one was identified as curzerene. The oils presented stronger antioxidant potential in β -carotene/linoleic acid bioassay, with IC₅₀'s from 80 to 180 μ g/mL, than in DPPH assay, with IC₅₀'s from 2516.18 to 3783.49 μ g/mL; **Conclusions:** These results suggested that curzerene might be responsible for the antifungal activity of *H. brasiliense* essential oils. Besides, these essential oils exhibited potential to prevent lipoperoxidation, but they have a weak radical scavenger activity.

Keywords: *Hedyosmum brasiliense*; essential oil; GC-MS; bioautography; curzerene; antioxidant; Atlantic Rain Forest

1. Introduction

The family Chloranthaceae includes plants grouped in four genera: *Sarcandra* Gardner, *Chloranthus* Sw., *Ascarina* J.R. Forst. and G. Forst., and *Hedyosmum* Sw. The genus *Hedyosmum* comprises 40 species of shrubs and small trees distributed from Mexico, throughout Central America to Bolivia, east of the Guianas and the Antilles [1]. The name *Hedyosmum* comes from the Greek “pleasant fragrance” and alludes to one of the most remarkable characteristics of these plants, the pleasant aromatic smell coming from all its parts [1,2]. According to Todzia [1], different *Hedyosmum* species have been popularly used all around Central and South America for different purposes: *H. scabrum* (Ruiz & Pav.) Solms for conception stimulation; *H. scabrum* and *H. scaberrimum* Standl. as stomach pain

relievers; *H. sprucei* Solms for snake bites; *H. cumbalense* H. Karst. as a stimulant; and *H. racemosum* (Ruiz & Pav.) G. Don as a treatment to joint pain. The essential oil composition from some species of this genus (*H. sprucei*, *H. arborescens* Sw., *H. scabrum*, *H. colombianum* Cuatrec., *H. angustifolium* (Ruiz & Pav.) Solms, *H. mexicanum* C. Cordem., *H. bonplandianum* Mart., and *H. costaricense* C.E. Wood ex W.C. Burger) have previously been described [3–8], as well as their antioxidant and cytotoxic properties [3,4].

Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq., popularly known as “chá de bugre”, “cidreira”, or “cidrão”, is a dioecious shrub distributed throughout central and southern Brazilian regions and western Paraguay [9,10]. Its leaves have been used in folk medicine to treat migraine, ovarium dysfunction, foot fungi, rheumatism, stomach pain, and as a diuretic [1,2]. Chemical and pharmacological studies with the aerial parts of *H. brasiliense* indicated analgesic, anxiolytic, antidepressive, and aphrodisiac effects for the crude extracts and for some isolated sesquiterpene lactones [11–16]. There are also some reports on the antimicrobial activity for the ethanol extract [17] and the essential oils [18,19], however none of them could attribute the observed bioactivity to a specific compound. The essential oil presented as major compounds specimen sabinene, (Z)- β -guaiene and pinocarvone, for a São Paulo State [18], and pinocarvone, curzerene and carotol, for one from Santa Catarina State [19]. To the best of our knowledge, this is the first report on the chemical composition and biological activities of *H. brasiliense* flower essential oils. In addition, this is also the first time that the antioxidant activity is described for this species. Therefore, this work aims to investigate the chemical composition of the essential oils from *H. brasiliense* male and female flowers and leaves collected at Ilha do Cardoso (São Paulo, Brazil) and to compare their antifungal and antioxidant activities, as well as to identify the main antifungal constituents in the essential oils.

2. Materials and Methods

2.1. Plant Material

Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) flowers and leaves were collected from male and female specimens at Parque Estadual da Ilha do Cardoso, São Paulo, Brazil (25°05' S and 47°55' W, 14 m alt) in September of 2015. The taxonomic identity was confirmed by Dr. Inês Cordeiro (Instituto de Botânica, São Paulo, Brazil). The voucher specimens were deposited in the Herbarium at the Instituto de Botânica, São Paulo, Brazil, with the accession No. SP 475335.

2.2. Extraction of the Essential Oils

Nine male and female specimens were collected. Leaves and flowers were pooled to provide representative homogeneous samples of the population, separated into three replicates and stored under refrigeration (−22 °C) until extraction. Essential oil was obtained by hydrodistillation for 3.5 h in a Clevenger-type apparatus. The crude oil was separated, dried over anhydrous sodium sulfate and stored in a glass flask at −22 °C until GC-MS analysis and biological activities. The oil yields were calculated based on the oil and fresh plant material weights as mean $\pm$ standard deviation of the triplicates [18].

2.3. GC-MS Analysis

Essential oils were solubilized in acetone 1:100 *v/v* (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Chemical analysis of the essential oils was performed on an Agilent 6890 Series GC (Agilent, Santa Clara, CA, USA), interfaced with a 5973 Series quadrupole MS detector (Agilent, Santa Clara, CA, USA) and equipped with a DB-5MS column (30 m $\times$ 0.25 mm i.d. $\times$ 0.25 μ m) (Agilent J&W, Santa Clara, CA, USA). Chromatography conditions were as follows; oven temperature program: 40 °C for 1 min with subsequent temperature increase of 3 °C/min up to 240 °C, keeping it at this temperature for 10 min.; carrier gas: He at a flow rate of 1 mL/min; injector and detector temperature of 250 °C; electron ionization: 70 eV. The component abundances were expressed as the mean $\pm$ standard deviation of the triplicates. The essential oil components were identified by comparing the retention

indices (evaluated in relation to the retention times of a series of *n*-alkanes) and by comparison of their mass spectra with those reported in the literature [20,21].

2.4. Principal Component Analysis of the Essential Oils

Principal Component Analysis (PCA) was performed using composition of *H. brasiliense* essential oils. Prior to the PCA analysis, all the variables were standardized for a normalized PCA. The Unscrambler® X version 9.7 (CAMO Software, Oslo, Norway) was used to perform PCA analysis and generate score and loading plot [22].

2.5. Antifungal Activity

The microorganisms used in antifungal assay, *Cladosporium cladosporioides* (Fresen de Vries (CCIBt 140) and *C. sphaerospermum* Penz (CCIBt 491), have been maintained at Instituto de Botânica, São Paulo, SP, Brazil. For the antifungal assay, carried out by bioautography adapted from Homans & Fuchs method [23], 10 µL of solutions corresponding to 200, 100, 50, and 25 µg of essential oils in methanol were applied as single spots on pre-coated Thin Layer Chromatography (TLC) plates (GF₂₅₄ silica-gel chromatoplates, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Nystatin, thymol, and cinnamic acid (5 µg) were used as positive controls. The plates were sprayed with a suspension of salts and glucose (6:1) containing fungus spores ($> 2 \times 10^6$ spores/mL) of *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. The plates were incubated in moist chambers at 27 °C for 48 h, in the dark. After the incubation period, clear inhibition zones were observed as antifungal activity of the essential oils.

The components responsible for the antifungal activities were determined by applying 400 µg of each essential oil onto three TLC plates and developed with *n*-hexane/acetone, 90:10 *v/v*. In one plate, the separated fraction bands were visualized with UV light (254 nm) and sprayed with Vanilin-Sulfuric Acid (VS) reagent followed by heating to 110 °C for 5 min [24]. The other two plates were used for the bioautography assay. According to the antifungal activity result, 7 mg of female flower and leaf essential oils were applied on chromatoplates, separately, and developed with the same solvent system. At the exact *R_f*'s of the active bands, the plate was cut horizontally, washed with 1 mL of acetone, filtered (0.22 µm filters, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and further analyzed by GC-MS, at the same conditions as the essential oils [25].

2.6. In Vitro Antioxidant Activities

The antioxidant activity was performed by the 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl hydrate (DPPH) free radical scavenging method [26], adapted for microplates. 178 µL of the essential oils solubilized in methanol at concentrations between 4480–560 µg/mL were added to a 96-well microplate and 72 µL of DPPH (0.3 mmol/L) solubilized in methanol were added. Blank reading was performed with the test sample prior to the DPPH radical incubation. As a negative control, 178 µL of methanol was used. As positive controls, quercetin from 20 to 0.625 µg/mL and *Ginkgo biloba* extract (Herbarium Laboratório Botânico S.A., Paraná, Brazil) from 40 to 1.25 µg/mL were used. The microplate was incubated in the dark for 30 min at room temperature. Then, the absorbance was measured at a wavelength of 518 nm using a multi-well scanning spectrophotometer (BIOTEK KC4, Winooski, VT, USA). The absorbance was converted to percentage of antioxidant activity (AA) using the formula $AA\% = 100 - \{[(Abs_{sample} - Abs_{blank}) \times 100] / Abs_{control}\}$. All samples were tested in triplicate and the results are expressed by mean $\pm$ standard deviation. The amount of essential oil required to reduce the initial DPPH concentration in the reaction by 50% is referred to as the inhibitory concentration (IC₅₀).

The antioxidant activity was also evaluated by the β -carotene bleaching test, which is based on spectrophotometric measurements of the β -carotene oxidation induced by the lipoperoxidation products from linoleic acid [27] to determine the concentration providing 50% inhibition (IC₅₀). The essential oil (10 µL) solubilized in methanol at concentrations between 10,400–325 µg/mL was added in a 96-well microplate, together with 250 µL of a reactive solution composed by β -carotene and linoleic acid in water saturated with O₂. Methanol (10 µL) was used as the negative control and as

the positive controls, butylhydroxytoluene (BHT) and butylhydroxyanisole (BHA) at concentrations between 130–4.1 µg/mL. The microplate was incubated in the dark at 45 °C and subsequently the absorbance was read at 450 nm (multi-well scanner BIOTEK KC4, Winooski, VT, USA), immediately after adding the reactive solution and every 30 min for 2 h. The absorbance was converted to percentage of antioxidant activity (AA) using the $AA\% = 100 - \{[(Abs_{final} - Abs_{initial}) \times 100] / Abs_{control}\}$. All samples were tested in triplicate and the results are expressed by mean $\pm$ standard deviation.

3. Results

3.1. Chemical Composition of the Essential Oil

The essential oil yields for male and female *H. brasiliense* flowers were 0.24 ± 0.01 and $0.38 \pm 0.01\%$, respectively. The yield of leaf essential oils, both male and female, presented a yield of $0.33 \pm 0.01\%$ (Table 1).

Fifty compounds were identified from all essential oils analyzed, comprising 96–98% of the total components. The major compounds for all *H. brasiliense* essential oils were sabinene, curzerene, and carotol. Leaf essential oils presented mostly monoterpenes (53% ♂ and 55% ♀), followed by sesquiterpenes (39% ♂ and 41% ♀), and phenylpropanoids (2% ♀ and 5% ♂). Flower essential oils presented monoterpenes (54% ♀ and 45% ♂), sesquiterpenes (40% ♂ and 50% ♀), and phenylpropanoids (1% ♂ and 2% ♀). The leaf main constituents were sabinene (16%), β-pinene (5%), 1,8-cineole (3–7%), methyl eugenol (2–5%), curzerene (17–18%), and carotol (6%), while flowers presented sabinene (8–10%), α-phellandrene (1–8%), 1,8-cineole (2–7%), germacrene D (4–6%), curzerene (11%), and carotol (9%) as major compounds.

Principal Component Analysis (PCA) data from Table 1 generated a plot, which condensed scores and loadings of the first two components, PC1 and PC2, which explain 61% and 34% of total variance (Figure 1). Leaves presented higher amounts of sabinene and curzerene than flowers, while flowers presented higher amounts of carotol, as discriminated by PCA (Figure 1). Furthermore, PCA analysis showed that female flowers and leaves presented higher amounts of 1,8-cineole than the male counterparts (Figure 1).

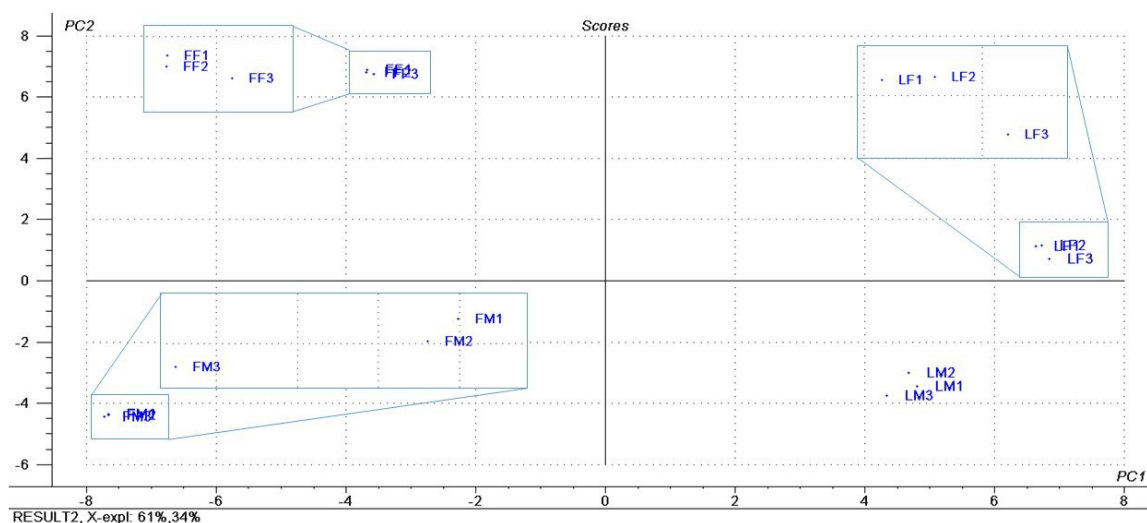
Table 1. Chemical composition of *Hedyosmum brasiliense* essential oils.

Compound	RI	RI _{ref} (a)	Relative Amount (%)			
			♂ Flowers	♀ Flowers	♂ Leaves	♀ Leaves
4-hydroxy-4-methyl-2-pentanone	841	839	1.58 $\pm$ 0.02	1.44 $\pm$ 0.03	1.53 $\pm$ 0.06	1.49 $\pm$ 0.02
α-pinene	933	939	2.23 $\pm$ 0.02	1.96 $\pm$ 0.02	3.16 $\pm$ 0.10	3.66 $\pm$ 0.11
sabinene	972	975	9.46 $\pm$ 0.04	8.05 $\pm$ 0.11	15.81 $\pm$ 0.19	15.81 $\pm$ 0.17
β-pinene	976	979	3.91 $\pm$ 0.03	2.73 $\pm$ 0.04	4.64 $\pm$ 0.13	5.21 $\pm$ 0.19
myrcene	990	990	1.75 $\pm$ 0.02	1.45 $\pm$ 0.02	2.48 $\pm$ 0.05	2.79 $\pm$ 0.14
α-phellandrene	1003	1002	8.14 $\pm$ 0.07	1.10 $\pm$ 0.01	2.79 $\pm$ 0.44	0.82 $\pm$ 0.06
α-terpinene	1016	1017	1.07 $\pm$ 0.01	0.91 $\pm$ 0.01	1.18 $\pm$ 0.12	1.09 $\pm$ 0.12
ρ-cymene	1023	1024	1.51 $\pm$ 0.01			
limonene	1028	1029	2.53 $\pm$ 0.01	1.08 $\pm$ 0.01	1.68 $\pm$ 0.06	1.46 $\pm$ 0.05
1,8-cineole	1031	1031	1.65 $\pm$ 0.01	7.22 $\pm$ 0.07	3.44 $\pm$ 0.04	6.86 $\pm$ 0.17
(Z)-β-ocymene	1036	1037	2.26 $\pm$ 0.01	0.66 $\pm$ 0.01		
(E)-β-ocymene	1048	1050	1.85 $\pm$ 0.01	3.00 $\pm$ 0.04	0.90 $\pm$ 0.06	1.91 $\pm$ 0.01
γ-terpinene	1059	1059	1.76 $\pm$ 0.01	1.44 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.16	1.68 $\pm$ 0.17
terpinolene	1082	1088			0.57 $\pm$ 0.00	
linalool	1097	1096	1.53 $\pm$ 0.01	1.5 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.03	1.31 $\pm$ 0.03
camphor	1146	1146		0.73 $\pm$ 0.01		
pinocarvone	1161	1164	3.65 $\pm$ 0.02	3.15 $\pm$ 0.02	4.49 $\pm$ 0.11	3.94 $\pm$ 0.07
terpinen-4-ol	1177	1177	3.34 $\pm$ 0.02	3.11 $\pm$ 0.04	3.30 $\pm$ 0.36	3.09 $\pm$ 0.32
α-terpineol	1191	1188	1.07 $\pm$ 0.01	1.37 $\pm$ 0.01	0.61 $\pm$ 0.07	0.76 $\pm$ 0.06
citronellol	1224	1225			0.60 $\pm$ 0.03	
chrysanthemyl cis-acetate	1255	1265		1.21 $\pm$ 0.01	1.03 $\pm$ 0.08	1.55 $\pm$ 0.03
bornyl acetate	1279	1288		0.58 $\pm$ 0.00		
thymol	1285	1290	3.63 $\pm$ 0.05		1.11 $\pm$ 0.20	

Table 1. Cont.

Compound	RI	RI _{ref} (a)	Relative Amount (%)			
			♂ Flowers	♀ Flowers	♂ Leaves	♀ Leaves
pinocarvyl cis-acetate	1303	1312		1.16 ± 0.01	0.72 ± 0.03	1.05 ± 0.02
δ-elemene	1327	1338		1.33 ± 0.01	2.24 ± 0.11	2.30 ± 0.07
α-terpinyl acetate	1344	1349	1.47 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.93 ± 0.04	1.19 ± 0.02
α-copaene	1370	1376	0.71 ± 0.00	0.66 ± 0.00		
β-elemene	1384	1390	1.27 ± 0.01	1.68 ± 0.01	1.43 ± 0.09	1.58 ± 0.05
methyl eugenol	1394	1403	1.41 ± 0.02	1.96 ± 0.02	4.53 ± 0.21	1.85 ± 0.17
(E)-caryophyllene	1412	1419	0.65 ± 0.01	0.69 ± 0.00		
γ-elemene	1423	1436	0.69 ± 0.00	0.72 ± 0.01	0.70 ± 0.06	0.76 ± 0.02
α-humulene	1449	1454	0.80 ± 0.02	0.72 ± 1.36	0.59 ± 0.04	0.58 ± 0.00
germacrene D	1477	1485	4.23 ± 0.04	5.76 ± 0.02	3.74 ± 0.21	3.35 ± 0.13
curzerene	1489	1499	11.09 ± 0.11	11.68 ± 0.05	17.02 ± 0.66	17.78 ± 0.30
β-bisabolene	1502	1505	0.97 ± 0.01	2.66 ± 0.01		
δ-cadinene	1511	1523	0.98 ± 0.01	1.51 ± 0.01	0.63 ± 0.02	0.71 ± 0.02
(Z)-α-bisabolene	1539	1507	0.63 ± 0.01	0.95 ± 1.36	0.80 ± 0.11	1.86 ± 0.04
elemol	1542	1549		0.61 ± 0.00		
N.I. 1	1556		1.17 ± 0.01	1.66 ± 0.01	0.86 ± 0.01	0.80 ± 0.02
spathulenol	1570	1578	4.53 ± 0.04	3.08 ± 0.01	3.05 ± 0.44	2.23 ± 0.08
viridiflorol	1578	1592	0.81 ± 0.01	0.82 ± 0.00		
N.I. 2	1587		0.67 ± 0.00	0.86 ± 0.01		
carotol	1596	1594	9.72 ± 0.04	9.36 ± 0.05	6.48 ± 0.10	5.91 ± 0.15
N.I. 3	1620			0.78 ± 0.01		0.75 ± 0.03
epi-α-cadinol	1626	1640	0.93 ± 0.01		0.96 ± 0.17	
daucol	1636	1642	0.61 ± 0.00			
N.I. 4	1641		0.74 ± 0.01		0.84 ± 0.09	
α-muurolol	1643	1646		0.74 ± 0.08		
α-eudesmol	1648	1653	1.66 ± 0.02	3.08 ± 0.02	1.06 ± 0.04	1.79 ± 0.08
(Z)-α-santalol	1661	1675		0.57 ± 0.00		
ferula lactone I	2001	1974	1.75 ± 0.02	3.70 ± 0.02	1.88 ± 0.69	2.48 ± 0.70
Monoterpene hydrocarbon (%)			38.12 ± 0.09	29.6 ± 0.27	38.08 ± 1.44	41.28 ± 0.97
Oxygenated monoterpene (%)			16.27 ± 0.06	15.00 ± 0.10	15.33 ± 0.60	14.38 ± 0.46
Sesquiterpene hydrocarbon (%)			10.93 ± 0.06	16.68 ± 0.05	9.93 ± 0.74	10.75 ± 0.50
Oxygenated sesquiterpene (%)			29.03 ± 0.19	33.45 ± 0.31	29.39 ± 1.61	30.18 ± 1.21
Phenylpropanoid (%)			1.41 ± 0.02	1.96 ± 0.02	4.53 ± 0.21	1.85 ± 0.17
Not identified (%)			4.24 ± 0.04	3.30 ± 0.01	2.76 ± 0.13	1.56 ± 0.02
Total identified (%)			95.75 ± 0.04	96.69 ± 0.01	97.26 ± 0.11	98.44 ± 0.02
Yield (%)			0.24 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.33 ± 0.01

RI = Retention indices on DB-5 column; RI_{ref} (a) = [20]; ♂ = male; ♀ = female; NI 1: M+ 220: 159(100) 119(99) 145(66) 105(53) 131(42); NI 2: M+ 222: 109(100) 161(91) 107(90) 43(88) 105(86); NI 3: M+ 220: 119(100) 91(84) 105(82) 93(75) 162(59); NI 4: M+ 220: 208(100) 161(93) 193(86) 119(51) 105(49).



A

Figure 1. Cont.

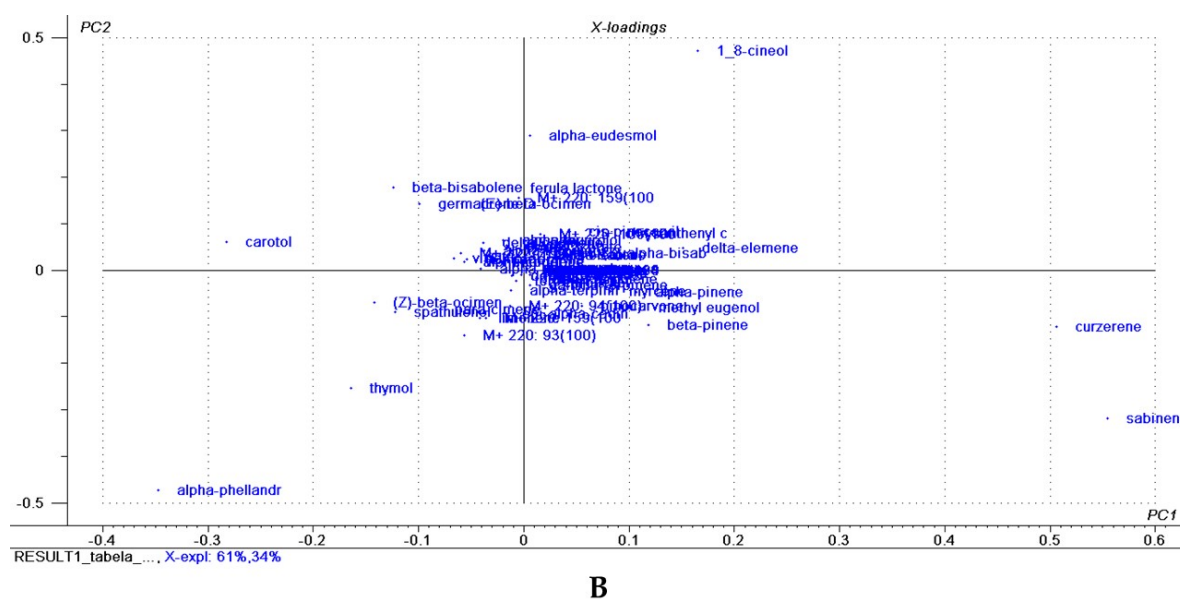


Figure 1. (A) Scores and (B) Loadings of Principal Component Analysis (PCA) of the chemical composition of *Hedyosmum brasiliense* essential oils; FF 1, 2, 3 = female flowers; FM 1, 2, 3 = male flowers; LF 1, 2, 3 = female leaves; LM 1, 2, 3 = male leaves.

3.2. Antifungal Activity

The essential oils of *H. brasiliense* presented clear inhibition zones corresponding to antifungal activity in the limit of detection against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum* (Figure 2). Female flowers presented the strongest activity for both fungi from 200 µg until 25 µg of essential oil tested, but the other oils presented weaker inhibition, up to 50 µg against *C. sphaerospermum* and to 25 µg against *C. cladosporioides*.

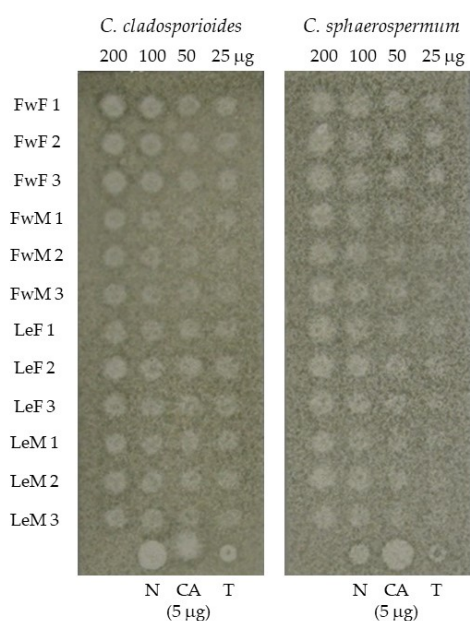


Figure 2. Preliminary antifungal activity of *Hedyosmum brasiliense* essential oils against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. FwF = female flowers; FwM = male flowers; LeF = female leaves; LeM = male leaves; N = nystatin; CA = cinnamic acid; T = thymol.

After TLC elution of the most active oils, two inhibition bands, at retention factors (R_f 's) of 0.67 and 0.12, were observed in all samples (Figure 3). After scraping the active bands, the GC-MS analysis indicated that curzerene (Table 2, Figure 4) was the main compound for the R_f 0.67 fractions, comprising 97% and 82% for both flower and leaf oils. The band at R_f 0.12 was composed by a complex mixture, with predominance of α -terpineol, α -eudesmol, and ferula lactone I (Figure 4) in different proportions, not allowing to point only one single active compound, as presented in Table 2.

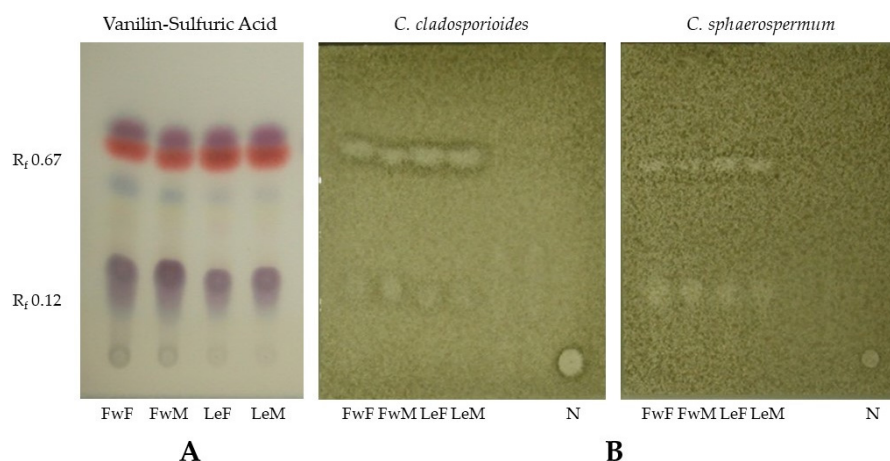


Figure 3. (A) Detection of terpenes of *H. brasiliense* essential oils by Vanilin-Sulfuric Acid (VS) spray reagent followed by heating to 110 °C; (B) Antifungal activity of *Hedyosmum brasiliense* essential oils, developed with *n*-hexane/acetone (90:10, *v/v*), against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. R_f 0.67 = strong activity; R_f 0.12 = weak activity; FwF = female flowers; FwM = male flowers; LeF = female leaves; LeM = male leaves; N = nystatin.

Table 2. Chemical composition of the active antifungal fractions of *H. brasiliense* female flowers and leaves essential oils isolated by bioautography-guided TLC.

Compound	RI	RI _{ref} (a)	FwF (%)		LeF (%)	
			R_f 0.67	R_f 0.12	R_f 0.67	R_f 0.12
1,8-cineole	1031	1031			12.69	
terpinolene	1082	1088		2.24		4.65
dehydro-sabina ketone	1121	1120		1.25		2.72
cis- β -terpineol	1143	1144		0.89		
2-(1Z)-propenyl-phenol	1146	1150		0.73		
cis-chrysanthanol	1162	1164		0.89		
terpinen-4-ol	1177	1177		1.87		
α -terpineol	1191	1188		9.77		10.45
δ -elemene	1327	1338			0.99	
β -elemene	1384	1390			0.92	
germacrene D	1477	1485	2.98		1.45	
curzerene	1489	1499	97.02		82.08	
δ -amorphene	1508	1512		1.50		
elemol	1542	1549		3.80		3.81
spathulenol	1570	1578		9.42		4.99
viridiflorol	1578	1592		4.35		6.57
epi- α -cadinol	1636	1640		0.80		
epi- α -muurolol	1640	1642		4.75		5.12
α -eudesmol	1648	1653		20.95		22.53
valerianol	1651	1658		2.23		
atractylone	1652	1658			1.87	
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol	1675	1686		0.71		
ferula lactone I	2001	1974		21.83		28.29
Intensity of antifungal activity			strong	weak	strong	weak
Total identified (%)			100	87.98	100	89.13

RI = Retention indices on DB-5 column; ref. RI_{ref} (a) = [20]; fractions R_f 0.67 = strong antifungal activity; fractions R_f 0.12 = weak antifungal activity.

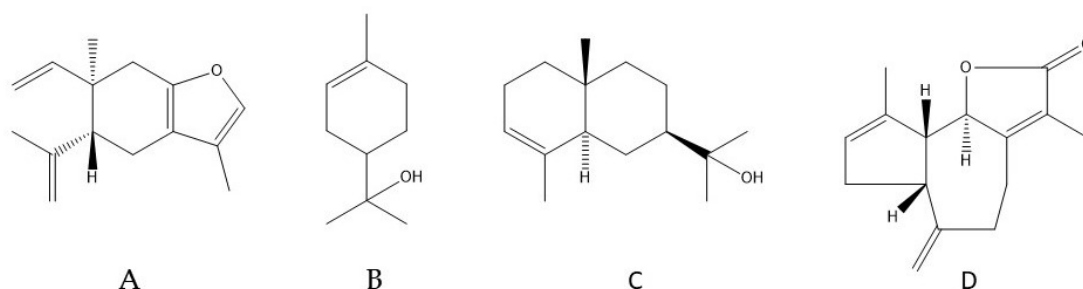


Figure 4. Chemical structures of the main compounds found in the active fractions of *H. brasiliense* essential oils: curzerene (A); α-terpineol (B); α-eudesmol (C); and ferula lactone I (D).

3.3. Antioxidant Activity

Antioxidant activity was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging and β-carotene bleaching methods. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) were calculated and the IC₅₀ values are presented in Table 3. Quercetin and *Ginkgo biloba* extract were employed as positive controls showing IC₅₀ 2.5 ± 0.09 and 13.5 ± 0.5 µg/mL, respectively, for DPPH assay, while butylhydroxytoluene (BHT) and butylhydroxyanisole (BHA) were the positive controls for β-carotene assay, showing IC₅₀ 0.08 ± 0.09 and 0.27 ± 0.02 µg/mL, respectively.

Table 3. Antioxidant activities (IC₅₀, mean ± SD) by DPPH free radical scavenging and β-carotene/linoleic acid methods of the essential oils from flowers and leaves of *H. brasiliense*.

Samples	IC ₅₀ (µg/mL)	
	DPPH	β-carotene/linoleic acid
♀ Flowers	3162.79 ± 40.72	180.71 ± 22.95
♂ Flowers	2516.18 ± 131.87	113.46 ± 11.38
♀ Leaves	3542.01 ± 45.31	71.12 ± 9.07
♂ Leaves	3783.49 ± 132.76	86.47 ± 18.63
Quercetin	2.50 ± 0.09	-
<i>Ginkgo biloba</i>	13.50 ± 0.50	-
BHT	-	0.08 ± 0.09
BHA	-	0.27 ± 0.02

DPPH = 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; BHT = butylhydroxytoluene; BHA = butylhydroxyanisole; ♂ = male; ♀ = female.

4. Discussion

Although there were previous studies on the essential oils from *H. brasiliense* leaves, none of them discriminated among male and female plants [18,19,28] and, to the best of our knowledge, this is the first report with flower essential oils. In our study, the essential oil yields were similar for flowers and leaves of *H. brasiliense*, with the male flowers presenting the lowest oil amounts. Regarding the leaf oil contents, the results were like those found for a Paraná State specimen (Brazil) [28], collected in an area not far from Ilha do Cardoso (São Paulo State, Brazil). However, these values were lower than those found for a specimen collected in Santa Catarina State (Brazil), whose leaves yielded 0.5% (v/w) [19], but this place is further south from our collection site.

The essential oil analysis for the Parana (Brazil) specimen was not complete, most of the oil components were not identified [28]. Nonetheless, with the composition published it was possible to detect 23 common compounds with the São Paulo (Brazil) specimen, but only sabinene (7%) was a common major compound. However, for the Santa Catarina (Brazil) study were found 22 compounds in common [19], having as major compounds α-terpineol (10%), curzerene (9%), pinocarvone (8%), β-thujene (7%), and carotol (6%). Curzerene (Figure 4A) was the only common major compound with the present analysis, but with 17–18% in the leaves and 11% in flowers.

The essential oils from other *Hedyosmum* species leaves (*H. mexicanum*, *H. bonplandianum*, *H. arborescens*, and *H. angustifolium*) have also presented high amounts of sabinene in their composition [4,7,8], as well as β -pinene, pinocarvone, and curzerene in the essential oil from *H. colombianum* leaves [6], similarly to our study.

Hedyosmum spp essential oils are known to contain several phenylpropanoids [3,5,6], sometimes in high amounts, as in essential oil from *H. scabrum* leaves, which contained 55.8% of estragole and 6.6% of anethole [5]. Also, some *H. brasiliense* specimens from different geographic origins have shown methyl chavicol, eugenol acetate, methyl eugenol, and estragole [18,19,28]. However, the only phenylpropanoid detected in our study was methyl eugenol, but in small amounts.

PCA plot shows that leaves have a higher percentage of sabinene and curzerene than flowers, which have a more significant amount of carotol, responsible for differentiating them. Besides that, PCA was also able to discriminate male flowers and leaves from the female ones by the 1,8-cineole abundance, which was higher in the female counterparts (Table 1 and Figure 1). These results showed that it is important to analyze separately male and female individuals, part of the variable results on the chemical composition might be explained by not separating the plant genders.

Cladosporium spp. are phytopathogenic filamentous fungi usually chosen for bioautographic assays, as they present high sensitivity and permit the detection of fungitoxic substances by contrast with their dark color [23]. Preliminary assays for the detection limit with bioautography confirmed the antifungal activity for the *H. brasiliense* specimen from São Paulo against *C. cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, with the highest activity for the female flower essential oil (Figure 2). In a previous study, the antimicrobial activity of *H. brasiliense* leaf essential oils has already been confirmed for Gram-positive bacteria and fungi such as the dermatophytes *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, and *T. rubrum* and the yeasts *Candida albicans* and *C. parapsilosis* [19].

The bioautography followed by TLC separation has been useful to determine antimicrobial activity of essential oils and to isolate the active compounds. A bioautography study with five aromatic plants (*Thymus vulgaris*, *Lavandula angustifolia* Chaix, *Eucalyptus globulus* Labill., *Mentha spicata* L., and *Cinnamomum zeylanicum* Blume) against five bacteria (*Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, and *S. aureus*) allowed to attribute the activity of *Thymus vulgaris* essential oil to thymol, comparing to a pure standard, as well as the activity of *C. zeylanicum* essential oil to eugenol, by the same principle [29]. A bioautography assay with *Mentha x piperita* L. essential oil against *Candida albicans*, followed by TLC separation of the active fraction, indicated that menthol was responsible for this activity [25]. Also, Guerrini et al. [3] detected α -cadinol, α -muurolol, τ -muurolol, and linalool in the active fraction with antibacterial activity against *S. aureus* using High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) plates for separation of *H. sprucei* essential oil. In our study, the bioautography methodology indicated curzerene as the main compound for the active band found at R_f 's 0.67 and α -terpineol, α -eudesmol and ferula lactone I for the active band at R_f 0.12 (Table 2). The *H. brasiliense* leaf essential oil collected at Santa Catarina (Brazil) presented antifungal activity and it was also rich in curzerene (8.9%) and α -terpineol (10.2%) (Figure 4 A,B) [25], supporting our results.

Curzerene has been known for its toxic effects against *Anopheles subpictus* (LC_{50} = 4.14 μ g/mL), *Aedes albopictus* (LC_{50} = 4.57 μ g/mL), and *Culex tritaeniorhynchus* (LC_{50} = 5.01 μ g/mL) [30]. In addition, curzerene also showed antiproliferative effects in SPC-A1 human lung carcinoma, with IC_{50} = 47 μ mol/L in 72 h (in vitro) and 135 mg/kg daily (in vivo) [31]. *Eugenia uniflora* L. essential oil, rich in curzerene (42.6%), showed antifungal activity, inhibiting completely *Paracoccidioides brasiliensis* at 62.5 μ g/mL [32]. Moreover, another *E. uniflora* essential oil composed by 47.3% of curzerene presented anti-*Leishmania* activity, with IC_{50} = 3.04 μ g/mL against promastigotes and IC_{50} = 1.92 μ g/mL against amastigotes of *L. amazonensis* [33].

The antioxidant activity of essential oils is already well known [34–37]. According to Karadag et al. [38], the antioxidant potential is related to compounds capable of protecting a biological system against the potentially harmful effect of reactive oxygen species. The results of a single-assay

can give only a narrow view of the essential oil antioxidant properties. Therefore, the antioxidant potential of *H. brasiliense* essential oils was determined by two different mechanisms of action: DPPH free radical scavenging, that works as electron transfer, and β -carotene/linoleic acid assay, measuring the suppression of lipoperoxides. In the DPPH assay, the IC₅₀ values for all the oils ranged from 2516.18 to 3783.49 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2), indicating a weak electron transfer capacity for the oils when compared to the positive controls quercetin and *G. biloba* extract, that presented IC₅₀ values of 2.5 and 13.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. These results are comparable to those obtained for *Salvia tomentosa* Mill. essential oils [36], which was rich in β -pinene (39.7%), α -pinene (10.9%) and camphor (9.7%), and it was not considered effective as antioxidant by DPPH and β -carotene/linoleic acid assay. Similarly, the essential oils of seven *Artemisia* spp. were tested by the same methods and showed weak activities, as their composition were markedly rich in non-phenolic components [39]. The antioxidant capacity of essential oils, by the DPPH method normally, is not very high when compared with that obtained for extracts and fractions rich in phenolic compounds. The major antioxidative plant phenolic compounds known are eugenol, carvacrol, thymol, menthol, and saffrole, among others [34]. In a test with 98 pure essential oil components for their antioxidant activity, phenols, such as thymol and carvacrol, were the most active compounds, followed by alcohols mono- and sesquiterpenes and ketones α,β -unsaturated, however hydrocarbons presented very low antioxidant activity [40]. On the other hand, our results indicated that the essential oils of *H. brasiliense* were much more active in the β -carotene bleaching assay, presenting IC₅₀ values from 71.12 to 180.71 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2), indicating their ability in destroying the conjugated diene hydroperoxides, the end products of linoleic acid peroxidation. In this way, the low radical scavenging activity observed for the *H. brasiliense* essential oils might be explained by the low amounts of phenolic compounds present in the oil, only 1.11 to 3.63% of thymol, and the high amounts of mono- and sesquiterpene hydrocarbons (Table 1). Since antioxidant activity of the entire oil is the result of the interaction of all constituents [41], it is hard to attribute the essential oils activity to a single compound, as other oil components may contribute exhibiting synergistic or antagonistic effects [42].

5. Conclusions

The leaf and flower essential oils were dominated by sabinene, 1,8-cineole, curzerene, and carotol. However, the contents of these constituents differed according to the plant part and gender.

This was the first report of antifungal activity of curzerene, explaining partially the activity of *H. brasiliense* essential oils by bioautography. Moreover, the complex mixture of α -terpineol, α -eudesmol, and ferula lactone I may have acted synergistically to the antifungal activity observed. Bioautography assay helped to detect antifungal fractions in a complex matrix of essential oils and guided to the isolation of target-directed constituents. Further studies are necessary to isolate higher amounts of pure curzerene, in order to test its limit of detection.

Antioxidant activity of essential oils from *H. brasiliense* was more effective by β -carotene discoloration assay than by DPPH assay, indicating their higher ability in quenching conjugated hydroperoxides than free radicals. The inhibition of lipid peroxidation may have been a result of the interaction of all constituents of the essential oils, since it was not possible to attribute antioxidant activity to a single compound.

Supplementary Materials: The following are available online at www.mdpi.com/2305-6320/4/3/55/s1, Figure S1: Mass spectrum of Non-identified compound 1 (N.I. 1) detected in the essential oil of *H. brasiliense* from Ilha do Cardoso; Figure S2: Mass spectrum of Non-identified compound 2 (N.I. 2) detected in the essential oil of *H. brasiliense* from Ilha do Cardoso; Figure S3: Mass spectrum of Non-identified compound 3 (N.I. 3) detected in the essential oil of *H. brasiliense* from Ilha do Cardoso; Figure S4: Mass spectrum of Non-identified compound 4 (N.I. 4) detected in the essential oil of *H. brasiliense* from Ilha do Cardoso.

Acknowledgments: The authors wish to thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc. N. 309762/2012-0 and 164913/2013-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Proc. N. 2014/15299-4 and 2014/17561-8) for financial support and scholarships.

Author Contributions: Cynthia Murakami, Paulo Roberto H. Moreno, and Maria Cláudia M. Young carried out the experiments and analyzed the data. The Principal Component Analysis was performed and analyzed by Marcus Tullius Scotti. The plant location and botanical identity was performed by Inês Cordeiro.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Todzia, C.A. Chloranthaceae: *Hedyosmum*. *Fl. Neotrop. Monogr.* **1988**, *48*, 1–140.
2. Reitz, R. Clorantáceas. In *Flora Ilustrada Catarinense*; Reitz, R., Ed.; parte I, fasc. Clor.; Herbário ‘Barbosa Rodrigues’: Itajaí, Brazil, 1965; pp. 1–10.
3. Guerrini, A.; Sacchetti, G.; Grandini, A.; Spagnoletti, A.; Asanza, M.; Scalvenzi, L. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2016**, *2016*, 1638342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Martin, M.A.C.D.K.; Bercion, S.R.; Legault, J. Chemical Composition of Leaf Essential Oil of *Hedyosmum arborescens* and Evaluation of Its Anticancer Activity. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 1269–1272.
5. De Feo, V.; Soria, R.U. Composition of the Essential Oil of *Hedyosmum scabrum* (R. et P.) Solms (Chloranthaceae). *J. Essent. Oil Bearing Plants* **2007**, *10*, 41–45. [[CrossRef](#)]
6. Delgado, P.A.; Quijano, C.E.; Morales, G.; Pino, J.A. Composition of the Essential Oil From Leaves and Fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec. Grown in Colombia. *J. Essent. Oil Res.* **2010**, *22*, 234–236. [[CrossRef](#)]
7. Lorenzo, D.; Loayza, I.; Dellacassa, E. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum* spp. from Bolivia. *Flavour Fragr. J.* **2003**, *18*, 32–35. [[CrossRef](#)]
8. Mundina, M.; Vila, R.; Tomi, F.; Cicció, J.F.; Ibañez, C.; Adzet, T.; Casanova, J.; Cañigual, S. Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour Fragr. J.* **1999**, *4*, 190–194. [[CrossRef](#)]
9. Rossi, L. Chloranthaceae. In *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*; Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C., Eds.; Instituto de Botânica: São Paulo, Brazil, 2002; Volume 2, pp. 83–84.
10. Occhioni, P. Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw. In *Tese de Doutorado*; Faculdade Nacional de Farmácia: Rio de Janeiro, Brazil, 1954.
11. Trentin, A.P.; Santos, A.R.; Guedes, A.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Antinociception caused by extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Med.* **1999**, *65*, 517–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tolardo, R.; Zetterman, L.; Bitencourt, D.R.; Mora, T.C.; Oliveira, F.L.; Biavatti, M.W.; Amoah, S.K.S.; Bürger, C.; Souza, M.M. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 63–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Gonçalves, A.E.; Burger, C.; Amoah, S.K.S.; Tolardo, R.; Biavatti, M.W.; Souza, M.M. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* **2012**, *674*, 307–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Leitolis, A.; Amoah, S.K.S.; Biavatti, M.W.; Silva-Santos, J.E. Sesquiterpene lactones from *Hedyosmum brasiliense* induce in vitro relaxation of rat aorta and corpus cavernosum. *Braz. J. Pharmacog.* **2016**, *26*, 363–368. [[CrossRef](#)]
15. Amoah, S.K.; Oliveira, F.L.; Cruz, A.C.; Souza, N.M.; Campos, F.R.; Barison, A.; Biavatti, M.W. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry* **2013**, *87*, 126–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Amoah, S.K.; Vecchia, M.T.D.; Pedrini, B.; Carnhelutti, G.L.; Gonçalves, A.E.; Santos, D.A.; Biavatti, M.W.; Souza, M.M. Inhibitory effect of sesquiterpene lactones and the sesquiterpene alcohol aromadendrane-4 β ,10 α -diol on memory impairment in a mouse model of Alzheimer. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *769*, 195–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cordova, S.M.; Benfatti, C.S.; Magina, M.D.A.; Guedes, A.; Cordova, M.M. Evaluation of the antibacterial activity of extracts isolated from native plants of the Brazilian flora against *Mycoplasma arginine*, *M. hominis* and *Ureaplasma urealyticum*. *Braz. J. Clin. Anal.* **2010**, *42*, 241–244.

18. Resende-Vido, D.L. *Comparação da Composição Química e das Atividades Biológicas dos óleos Essenciais de Folhas de Populações de Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. Provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica)*; Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente: São Paulo, Brazil, 2009.
19. Kirchner, K.; Wisniewski, A., Jr.; Cruz, A.B.; Biavatti, M.W.; Netz, D.J.A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Braz. J. Pharmacog.* **2010**, *20*, 692–699. [CrossRef]
20. Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass Spectroscopy*, 4th ed.; Academic Press: New York, NY, USA, 2007; p. 804.
21. NIST. National Institute of Standards and Technology. U.S. Department of Commerce. Available online: <http://webbook.nist.gov/chemistry> (accessed on 20 December 2016).
22. Amaral-Baroli, A.; Lago, J.H.G.; Almeida, C.V.; Almeida, M.; Scotti, M.T.; Leone, G.F.; Soares, M.G.; Cavallari, A.A.; Sartorelli, P. Variability in essential oil composition produced by micropropagated (in vitro), acclimated (ex vitro) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). *Ind. Crops Prod.* **2016**, *86*, 180–185. [CrossRef]
23. Homans, A.L.; Fuchs, A. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxi substances. *J. Chromatogr. A* **1970**, *51*, 327–329. [CrossRef]
24. Wagner, H.; Bladt, S. *Plant Drug Analysis: A Thin-Layer Chromatography Atlas*, 2nd ed.; Springer: Berlin, Germany, 2001; p. 384.
25. Iscan, G.; Kirimer, N.; Kurkcuoglu, M.; Baser, K.H.C.; Demirci, F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 3943–3946. [CrossRef] [PubMed]
26. Xiong, Q.; Kadota, S.; Tani, T.; Namba, T. Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 1580–1585. [CrossRef] [PubMed]
27. Duarte-Almeida, J.M.; Santos, R.J.; Genovese, M.I.; Lajolo, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 446–452. [CrossRef]
28. Gabriel, M.M.; Moreira, E.A.; Miguel, O.G.; Nakashima, T.; Lopes, M. Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. Chloranthaceae. *Rev. Bras. Farm.* **1998**, *79*, 65–68.
29. Horváth, G.; Jámbo, N.; Végh, A.; Boszorményi, A.; Lemberkovics, E.; Héthelyi, E.; Kovács, K.; Kocsis, B. Antimicrobial activity of essential oils: The possibilities of TLC–bioautography. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 178–182. [CrossRef]
30. Govindarajan, M.; Rajeswary, M.; Senthilmurugan, S.; Vijayan, P.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Benelli, G. Curzerene, trans- β -elemenone, and γ -elemene as effective larvicides against *Anopheles subpictus*, *Aedes albopictus*, and *Culex tritaeniorhynchus*: Toxicity on non-target aquatic predators. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2017**. [CrossRef] [PubMed]
31. Wang, Y.; Li, J.; Guo, J.; Wang, Q.; Zhu, S.; Gao, S.; Yang, C.; Wei, M.; Pan, X.; Zhu, W.; et al. Cytotoxic and antitumor effects of curzerene from *Curcuma longa*. *Planta Med.* **2017**, *83*, 23–29. [CrossRef] [PubMed]
32. Costa, D.; Alves Filho, E.G.; Silva, L.M.A.; Santos, S.C.; Passos, X.S.; Silva, M.R.R.; Seraphin, J.C.; Ferri, P.H. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 851–858. [CrossRef]
33. Rodrigues, K.A.F.; Amorim, L.V.; Oliveira, J.M.G.; Dias, C.L.; Moraes, D.F.C.; Andrade, E.H.A.; Maia, J.G.S.; Carneiro, S.M.P.; Carvalho, F.A.A. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. *Evid. Based Complement. Altern. Med.* **2013**, *2013*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
34. Brewer, M.S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2011**, *10*, 221–247. [CrossRef]
35. Tepe, B.; Sihoglu-Tepe, A.; Daferera, D.; Polissiou, M.; Sokmen, A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. *Food Chem.* **2007**, *103*, 766–770. [CrossRef]
36. Tepe, B.; Daferera, D.; Sokmen, A.; Sokmen, M.; Polissiou, M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chem.* **2005**, *90*, 333–340. [CrossRef]
37. Takayama, C.; De-Faria, F.M.; Almeida, A.C.A.; Dunder, R.J.; Manzo, L.P.; Socca, E.A.R.; Batista, L.M.; Salvador, M.J.; Souza-Brito, A.R.M.; Luiz-Ferreira, A. Chemical composition of *Rosmarinus officinalis* essential

- oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2016**, *6*, 677–681. [[CrossRef](#)]
38. Karadag, A.; Ozcelik, B.; Saner, S. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2009**, *2*, 41–60. [[CrossRef](#)]
39. Lopes-Lutz, D.; Alviano, D.S.; Alviano, C.S.; Kolodziejczyk, P.P. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Anal. Methods* **2008**, *69*, 1732–1738.
40. Anthony, K.P.; Deolu-Sobogun, S.A.; Saleh, M.A. Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils. *J. Food Sci.* **2012**, *77*, C839–C843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Mimika-Dukic, N.; Orcic, D.; Lesjak, M.; Sibul, F. Essential Oils as Powerful Antioxidants: Misconception or Scientific Fact? In *Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization*; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 2016; pp. 187–208.
42. Miguel, M.G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants—a review. *Flavour Fragr. J.* **2010**, *25*, 291–312. [[CrossRef](#)]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussão Geral

O Brasil possui uma flora riquíssima, constituída de aproximadamente 55 mil espécies de angiospermas, o equivalente a cerca de 10% de toda a biota terrestre (Machado *et al.* 2004), considerada uma fonte inesgotável de substâncias biologicamente ativas. A Mata Atlântica e o Cerrado são considerados “hotspots” mundiais, centros de altíssima biodiversidade e endemismo em que a extensão original foi dramaticamente reduzida, colocando em risco a sobrevivência de muitas espécies (Guedes *et al.* 2005; Myers *et al.* 2000). O desafio do milênio para a ciência brasileira consiste em encontrar meios de preservar as áreas remanescentes conduzindo estudos de plantas biologicamente ativas e contribuindo para o uso sustentável dessa vasta diversidade química, ainda pouco explorada (Silva *et al.* 2010). O valor econômico da biodiversidade brasileira só será calculável, se explorada com base na pesquisa acadêmica multidisciplinar de excelência e inovação tecnológica.

Os metabólitos secundários ou produtos naturais de origem vegetal atuam como compostos sinalizadores na interação das plantas com seu ambiente biótico e abiótico (Verpoorte 2000) e possuem alta plasticidade genética e diversidade química, que possibilitam às plantas adaptar-se às demandas do ambiente (Hartmann 2007). Dessa forma, sua composição química pode variar de acordo com a localização geográfica, a fase fenológica, o quimiotipo e até o gênero em plantas dioicas (Bajpai *et al.* 2012; Gobbo-Neto & Lopes 2007; Murakami *et al.* 2013; Schwob *et al.* 2004), podendo interferir no seu potencial farmacológico (Simpson 2013). As funções ecológicas dos metabólitos secundários sobre as plantas que os produzem sugerem que os mesmos possam atuar similarmente com efeitos medicinais em humanos (Briskin 2000). Alguns exemplos clássicos de metabólitos secundários de origem vegetal utilizados pelo homem para o tratamento de doenças são a morfina (analgésica), o taxol (antitumoral), a quinina e a artemisina (antimaláricos) (Croteau *et al.* 2000; Hartmann 2007; Macías *et al.* 2007).

Chloranthaceae é uma família botânica pantropical muito utilizada na medicina popular, constituída por aproximadamente 75 espécies distribuídas entre os gêneros *Sarcandra*, *Chloranthus*, *Ascarina* e *Hedyosmum* (Eklund *et al.* 2004; Todzia 1988). *Hedyosmum* é o maior dos gêneros, compreendendo 40 espécies de árvores e arbustos distribuídos por toda América Central até o Paraguai, e suas folhas têm sido utilizadas na medicina popular (Reitz 1965, Todzia 1988). Muitas espécies de Chloranthaceae apresentam potencial medicinal, com algumas atividades biológicas comprovadas, e uma classe de compostos largamente encontrada nesta família são as lactonas sesquiterpênicas, grupo de substâncias que apresenta grande

potencial farmacológico (Cao *et al.* 2008; Zhang *et al.* 2016). Existem poucos registros na literatura sobre a composição química de espécies do gênero *Hedyosmum*, com destaque para o isolamento de lactonas sesquiterpênicas e óleos essenciais (Amoah *et al.* 2013; Amoah *et al.* 2015b; Bercion *et al.* 2005; De Feo & Soria 2007; Delgado *et al.* 2003; Guerrini *et al.* 2016; Kirchner *et al.* 2010; Mundina *et al.* 1999, Sylvestre *et al.* 2007).

Hedyosmum brasiliense Mart. ex Miq. é um arbusto ou arvoreta conhecida por diversos nomes populares, entre eles chá de bugre e cidrão, encontrada no Brasil e no Paraguai (Rossi 2002). Seu potencial farmacológico tem sido estudado, com destaque para as atividades afrodisíaca, analgésica, ansiolítica, antidepressiva, antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Cordova *et al.* 2010; Gonçalves *et al.* 2012; Kirchner *et al.* 2010; Leitolis *et al.* 2016; Murakami *et al.* 2017; Resende-Vido 2009; Tolardo *et al.* 2010; Trentin *et al.* 1999).

Uma vez que a composição química pode variar por diversos fatores, foram testadas as atividades antifúngica, antimicrobiana, citotóxica, antioxidante e anticolinesterásica dos óleos essenciais de folhas frescas e secas de indivíduos masculinos e femininos localizados em biomas diferentes (Mata Atlântica e Cerrado) e em fases fenológicas distintas (vegetativa, floração e frutificação), bem como as atividades antifúngica, antimicrobiana e citotóxica dos extratos brutos e resíduos de partições e a atividade antifúngica das substâncias isoladas das folhas de *H. brasiliense*.

O presente trabalho foi dividido em capítulos. O capítulo 2 aborda a comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* coletadas em diferentes fases fenológicas e provenientes de Cerrado e Mata Atlântica. O capítulo 3 apresenta a composição química e as atividades biológicas dos componentes fixos de plantas masculinas e femininas provenientes de Cerrado e Mata Atlântica, com o isolamento e a identificação de substâncias puras da Mata Atlântica testadas para a atividade antifúngica. O capítulo 4 corresponde ao artigo científico publicado em 2017 na revista Medicines (MDPI), envolvendo o estudo da composição química e das atividades antifúngica e antioxidante dos óleos essenciais de folhas e flores de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes do Parque Estadual da Ilha do Cardoso.

Os óleos essenciais das plantas de *H. brasiliense* provenientes da Mata Atlântica acumularam maior teor de monoterpenos, enquanto que os do Cerrado, maior teor de sesquiterpenos, devido ao clima da Mata Atlântica, com temperaturas mais baixas e maior precipitação, e do Cerrado, mais quente e seco. A ACP discriminou os óleos essenciais de folhas

frescas das populações com base no sabineno e no mirceno, componentes majoritários dos óleos essenciais da Mata Atlântica e do Cerrado, respectivamente. Já os óleos essenciais de folhas secas da Mata Atlântica e do Cerrado foram discriminados com base no sabineno e no (Z)- α -bisaboleno, respectivamente.

O potencial antifúngico, antimicrobiano e citotóxico foi mais pronunciado nos óleos essenciais das plantas provenientes da Mata Atlântica, porém os óleos essenciais testados não apresentaram potencial anticolinesterásico nem antioxidante por sequestro do radical livre DPPH e apresentaram fraco potencial de inibição da peroxidação lipídica pelo método do β -caroteno/ácido linoleico. Os óleos essenciais das flores das duas populações apresentaram bom potencial antifúngico, antimicrobiano e citotóxico, fraco potencial anticolinesterásico e nenhum potencial antioxidante. Os óleos essenciais dos frutos apresentaram bom potencial citotóxico, fraco potencial antifúngico, não apresentaram potencial antimicrobiano e não foram testados para os ensaios antioxidante e anticolinesterásico. Não foi possível atribuir as atividades biológicas detectadas neste estudo a componentes específicos dos óleos essenciais, pois embora haja estudos que comprovem o potencial farmacológico de componentes isolados de óleos essenciais, a atividade pode ser atribuída a vários componentes em quantidades variáveis, atuando em sinergismo ou antagonismo no óleo essencial.

Com relação aos componentes fixos de *H. brasiliense*, plantas masculinas e femininas apresentaram composição química semelhante dentro da mesma população, contudo as plantas do Cerrado apresentaram composição química diferente das plantas da Mata Atlântica. Os extratos das plantas provenientes da Mata Atlântica foram mais ativos contra os fungos filamentosos que os extratos das plantas do Cerrado e por isso foram selecionados para o isolamento de substâncias puras.

Foram isolados e identificados oito componentes fixos, dos quais duas substâncias são inéditas na literatura, o sesterterpeno hedyosulida e o éster vanilato de pinocarvila. Esta foi a segunda vez que um sesterterpeno foi isolado em Chloranthaceae. Os demais componentes identificados, hedyosumina D, 15-acetoxi-isogermafurenolídeo, linderolídeo F, neolitacumona B e oxionoseriolídeo, foram característicos de Chloranthaceae, com exceção do bisnor-sesquiterpeno blumenol B, de ampla distribuição taxonômica.

O isolamento das substâncias permitiu detectar que a hedyosumina D e a substância não identificada # 6 apresentaram forte atividade antifúngica por bioautografia, enquanto que linderolídeo F e neolitacumona B apresentaram atividade fraca. Os extratos e resíduos de

partições menos polares apresentaram potencial antifúngico contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, antibacteriano contra *Streptococcus sanguis* e *S. mutans* e citotóxico frente às células de adenocarcinoma de mama e câncer de próstata, reforçando o potencial farmacológico de *H. brasiliense*.

Apesar de apresentarem alguns componentes em comum com as plantas provenientes de Mata Atlântica (Paranapiacaba) e de Cerrado (Mogi Guaçu), os óleos essenciais das plantas provenientes da região da Ilha do Cardoso (Mata Atlântica) foram ligeiramente diferentes devido à presença de altos teores de curzereno, um dos principais componentes responsáveis pela atividade antifúngica nestes óleos essenciais, uma vez que foi possível identificá-lo na fração mais ativa por cromatografia em camada delgada (CCD), confirmando a sua contribuição para esta atividade biológica. Os óleos essenciais das plantas provenientes da Ilha do Cardoso também apresentaram melhor potencial de inibição da peroxidação lipídica quando comparados às outras populações, mas não apresentaram inibição do radical livre DPPH.

Diante do exposto, concluímos:

- As condições ambientais influenciaram na composição química dos componentes fixos e voláteis de *H. brasiliense*;
- Os óleos essenciais da população da Mata Atlântica apresentaram melhor atividade citotóxica, antifúngica e antimicrobiana do que os da população do Cerrado;
- Os óleos essenciais da Ilha do Cardoso apresentaram forte atividade antifúngica, atribuída principalmente ao curzereno, além de moderada atividade antioxidante pelo método de peroxidação lipídica;
- A composição química das flores e dos frutos teria função protetora contra o ataque de patógenos em seu ambiente natural.

Este foi o primeiro estudo que comparou a composição química e as atividades biológicas dos óleos essenciais de flores, frutos e folhas de plantas masculinas e femininas de *H. brasiliense* provenientes de dois biomas distintos, Cerrado e Mata Atlântica, em diferentes fases fenológicas.

O estudo químico de *H. brasiliense* vem contribuir para ampliar o conhecimento da composição química e das atividades biológicas desta espécie.

Referências Bibliográficas

- Amoah, S.K., Oliveira, F.L., Cruz, A.C., Souza, N.M., Campos F.R., Barison, A., Biavatti, M.W.** 2013. Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). *Phytochemistry* 87: 126-132.
- Amoah, S.K., Kouloura, E., Dutra, L.M., Barison, A., Wildner, L.M., Bazzo, M.L., Halabalaki, M., Skaltsounis, L.A., Biavatti, M.W.** 2015b. Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. *Phytochemistry letters* 13: 267–274.
- Bajpai, V., Pandei, R., Negi, M.P.S., Bindu, K.H., Kumar, N., Kumar, B.** 2012. Characteristic differences in metabolite profile in male and female plants of dioecious *Piper betle* L. *Journal of Bioscience* 37(6): 1061-1066.
- Bercion, S., Martin, M.A.C.K., Baltaze, J.P., Bourgeois, P.** 2005. A new α -methylene γ -lactone from *Hedyosmum arborecens*. *Fitoterapia* 76: 620-624.
- Briskin, D.** 2000. Medicinal plants and phytomedicines – Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology* 124: 507-514.
- Cao, C.M., Peng, Y., Shi, Q.W., Xiao, P.G.** 2008. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chemistry and Biodiversity* 5: 219-238.
- Cordova, S.M., Benfatti, C.S., Magina, M.D.A., Magina, M.D.A., Guedes, A., Cordova, C.M.M.** 2010. *RBAC* 42(4): 241-244.
- Croteau, R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, USA, pp.1250-1318.
- De Feo, V., Soria, R.U.** 2007. Composition of the essential oil of *Hedyosmum scabrum* (R. et P.) Solms (Chloranthaceae). *Journal of essential oil bearing plants* 10 (1): 41-45.
- Delgado, P.A., Quijano, C.E., Morales, G., Pino, J.A.** 2010. Composition of the essential oil from leaves and fruits of *Hedyosmum colombianum* Cuatrec. grown in Colombia. *Journal of essential oil research* 22 (3): 234-236.
- Eklund, H., Doyle, J.A. & Herendeen, P.S.** 2004. Morphological phylogenetic analysis of living and fossil Chloranthaceae. *International Journal of Plant Sciences*. 165: 107-151.
- Gobbo-Neto, L. & Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* 30: 374-381.

- Gonçalves, A.E., Burger, C., Amoah, S.K.S., Tolardo, R., Biavatti, M.W., Souza, M.M.** 2012. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. *European Journal of Pharmacology* 674 (2-3): 307-314.
- Guedes, M.L.S., Batista, M.A., Ramalho, M., Freitas, H.M.B., Silva, E.M.** 2005. Breve incursão sobre a biodiversidade da Mata Atlântica. In: C.R. Franke, P.L.B. Rocha, W. Klein, S.L. Gomes (orgs.). *Mata Atlântica e Biodiversidade*. Edufba, Salvador, pp. 37-92.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Grandini, A., Spagnoletti, A., Asanza, M., Scalvenzi, L.** 2016. Cytotoxic Effect and TLC Bioautography-Guided Approach to Detect Health Properties of Amazonian *Hedyosmum sprucei* Essential Oil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1638342>
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to echochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry*. 68: 2831-2846.
- Kirchner, K., Wisniewski Jr, A., Cruz, A.B., Biavatti, M.W., Netz, D.J.A.** 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20 (5): 692-699.
- Leitolis, A., Amoah, S.K.S., Biavatti, M.W., Silva-Santos, J.E.** 2016. Sesquiterpene lactones from *Hedyosmum brasiliense* induce *in vitro* relaxation of rat aorta and corpus cavernosum. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 26: 363-368.
- Machado, L.P.** 2008. Avaliação do Potencial Antifúngico de Extratos de Macroalgas no Controle da Antracnose do Mamoeiro. Monografia de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Espírito Santo, Espírito Santo.
- Macias, F.A., Galindo, J.L.G., Galindo, J.C.G.** 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2917-2936.
- Mundina, M., Vila, R., Felix, T., Cicció, J.F., Ibañez, C., Adzet, T., Casanova, J. & Cañigüeral, S.** 2000. Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal* 15 (3): 201-205.
- Murakami, C., Lago, J.H.G., Perazzo, F.F., Ferreira, K.S., Lima, M.E.L., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2013. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Chromolaena laevigata* during flowering and fruiting stages. *Chemistry & Biodiversity* 10: 621-627.

- Murakami, C., Cordeiro, I., Scotti, M.T., Moreno, P.R.H., Young, M.C.M.** 2017. Chemical composition, antifungal and antioxidant activities of *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) essential oils. *Medicines* 4 (3): 55.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 430: 853-858.
- Resende-Vido, D.L.** 2009. Comparação da composição química e das atividades biológicas dos óleos essenciais de folhas de populações de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. provenientes da Serra do Mar e Serra da Mantiqueira (Mata Atlântica). Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo. 92p.
- Rossi, L.** 2002. *Chloranthaceae*. In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C. (eds.) *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, vol 2. Instituto de Botânica, São Paulo, 391p.
- 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.
- Silva, D.H.S., Castro-Gamboa, I, Bolzani, V.S.** 2010. Plant diversity from Brazilian Cerrado and Atlantic Forest as a tool for prospecting potential therapeutic drugs. In: Mander, L., Lui, H.-W. (Org.), Verpoorte (Ed.). *Comprehensive natural products II – Chemistry and biology*, Oxford: Elsevier, vol. 3, p. 95-133.
- Simpson, B.S.** 2013. Dioecy in plants – Is it an important factor for phytochemists to consider? *Planta Medica* 79: 613-615.
- Sylvestre, M., Pichette, A., Longtin, A., Martin, M.A.C.K., Bercion, S.R. & Legault, J.** 2007. Chemical composition of leaf essential oil of *Hedyosmum arborecens* and evaluation of its anticancer activity. *Natural Products Communications*. 2(12): 1269-1272.
- Todzia, C.A.** 1988. *Flora Neotropica*. v. 48. The New York Botanical Garden, New York.
- Tolardo, R., Zetterman, L., Bitencourtt, D.R., Mora, T.C., Oliveira, F.L., Biavatti, M.W., Amoah, S.K.S., Bürger, C. & Souza, M.M.** 2010. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. 128: 63-70.

- Trentin, A.P., Santos, A.R., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A. & Calixto, J.B.** 1999. Antinociception caused by extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Medica*. 65 (6): 517-521.
- Verpoorte, R.** 2000. Secondary metabolism. *In*: Verpoorte, R. & Alfermann, A.W. *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*. Kluwer Academic Publishers, London, pp.1-29.
- Zhang, M., Liu, D., Fan, G., Wang, R., Lu, X., Gu, Y., Shi, Q.-W.** 2016. Constituents from Chloranthaceae plants and their biological activities. *Heterocyclic communications* 22 (4): 175–220.