



**UNIVALI**  
**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**FÁBIO LAZZAROTTO DE OLIVEIRA**

ANÁLISE FITOQUÍMICA de *Hedyosmum brasiliense* Miq.,  
Chloranthaceae.

**UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E**  
**SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS**

**FÁBIO LAZZAROTTO DE OLIVEIRA**

ANÁLISE FITOQUÍMICA de *Hedyosmum brasiliense* Miq.,  
Chloranthaceae.

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maique Weber Biavatti

Itajaí, Outubro de 2009

ANÁLISE FITOQUÍMICA de *Hedyosmum brasiliense* Miq.,  
Chloranthaceae.

**FÁBIO LAZZAROTTO DE OLIVEIRA**

‘Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Fitoquímica e atividade biológica e aprovada em sua forma final pelo Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.’

---

Maique Weber Biavatti, Dr<sup>a</sup>

---

Tânia Mari Bellé Bresolin, Dr<sup>a</sup>  
Coordenador do Programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a Banca Examinadora composta pelos Professores:

---

Dr<sup>a</sup>. Maique Weber Biavatti UNIVALI  
Presidente

---

Dr. Rivaldo Niero UNIVALI  
Membro interno

---

Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti UFSC  
Membro externo

Itajaí (SC), de 2009.

Dedico esta dissertação a todos que me apoiaram, principalmente aos meus pais, Ubiragy de Oliveira e Genir M<sup>a</sup> Lazzarotto de Oliveira e minha irmã Fabíola Lazzarotto de Oliveira, que com apoio incansável me ajudaram alcançar mais essa importante vitória.

**Dedicatória**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todas as pessoas que de uma forma ou outra contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente:

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Maique Weber Biavatti, pela conduta moral e profissional, com sua exemplar capacidade científica, ajudou-me a superar inúmeras dificuldades.

Sou enormemente grato a minha orientadora, seus ensinamentos serão inestimáveis para toda minha vida.

Agradeço a aluna do PIBIC, Gabriela Kuhnen por seu comprometimento com o trabalho e sempre vontade em aprender.

Agradeço as sempre presentes colaboradoras do departamento de Ciências Farmacêuticas da UNIVALI, Vania C. M. da Silva e Roselia Koerich.

Agradeço aos professores Dr. Rivaldo Niero e Dr<sup>a</sup> Angela Malheiros que acompanharam o andar dos trabalhos sempre aconselhando os melhores caminhos a serem seguidos.

Agradeço o professor Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti por aceitar fazer parte da banca examinadora.

"Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol."  
Pablo Picasso

**EPÍGRAFE**

# ANÁLISE FITOQUÍMICA de *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae.

**Fábio Lazzarotto de Oliveira**  
Outubro/2009

Orientadora: Maique Weber Biavatti, Doutora.  
Área de Concentração: Farmácia (4.03.00.00-5).  
Número de Páginas: 54.

O presente trabalho aborda a importância da pesquisa de plantas medicinais para o desenvolvimento de novos fármacos, na tentativa de descobrir princípios ativos com menores efeitos colaterais comparados a medicamentos sintéticos, assim como, substâncias que poderão tratar patologias que ainda não possuam um tratamento adequado. Nessa linha, foram estudadas as partes aéreas da planta *Hedyosmum brasiliense*, pertencente à família Chloranthaceae, popularmente conhecida como "Cidrão". Suas folhas são utilizadas na terapêutica popular como calmante, afrodisíaco e substituto do chá-verde. Porém, seu potencial do ponto de vista químico e de bioatividade permanece pouco explorado. Este trabalho teve como objetivo isolar e identificar os compostos das frações hexano (H), diclorometano (DCM) e acetato de etila (AE) utilizando técnicas fitoquímicas clássicas e espectroscópicas. Estas frações foram cromatografadas em coluna *flash* (sílica gel 60, 230-400 mesh), fornecendo por cristalização espontânea seis substâncias, que foram identificadas por Ressonância Magnética Nuclear (RMN): da fração H foram isolados o esteróide  $\beta$ -sitosterol (1) e a lactona sesquiterpênica podoandina (2), da fração DCM foram isolados as lactonas sesquiterpênicas podoandina (2) e 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo (3) e o fenólico cafeato de etila (4), e da fração AE foram isolados o aldeído protocatéquico (5) e uma nova lactona sesquiterpênica a [7,7a-b]oxiren-8-hidroxi-3,5,8-trimetil-4a,8,9,9a-tetrahidroazuleno[6,5-b]furan-2(4H)-ona (6). As substâncias 3, 4 e 5 estão sendo pela primeira vez descritas para esta espécie. Devido à abundância das mesmas no extrato, é provável seu envolvimento na atividade biológica, segundo o uso popular, premissa que será testada em trabalhos futuros.

Palavras-chave: Plantas medicinais, *Hedyosmum brasiliense*, Chloranthaceae, Fitoquímica, lactonas sesquiterpênicas, compostos fenólicos.

## ABSTRACT

### PHYTOCHEMICAL EVALUATION LEAVES OF *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae.

Fábio Lazzarotto de Oliveira

October/2009

Supervisor: Maique Weber Biavatti, Dr<sup>a</sup>.

Area of Concentration: Natural products and synthetic bioactive substances.

Number of Pages: 54.

This work addresses the importance of research on medicinal plants for the development of new drugs, in an attempt to discover active principles with lesser side effects than synthetic medicines, as well as substances capable of treating illnesses which still lack adequate drugs for treatment. In this context, the aerial parts were studied of *Hedyosmum brasiliense*, a plant of the Chloranthaceae family, popularly known as "Cidrão". Its leaves are used in folk medicine as a sedative and aphrodisiac, and as a substitute for green tea. However, its potential in terms of chemical bioactivity remains unexplored. The aim of this work was to isolate and to identify compounds of the hexane (H), dichlorometane (DCM) and ethyl acetate (AE) fractions, using classic and spectroscopic phytochemical techniques. These fractions were subjected to flash chromatography (silica gel 60, 230-400 mesh), yielding six substances by spontaneous crystallization, which were identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR): from fraction H,  $\beta$ -sitosterol (1) and the sesquiterpene lactone podoandin (2) were isolated; from fraction DCM, the sesquiterpene lactone podoandin (2) and 13-hydroxy-8,9-dihydroshizukanolide (3) and phenolic ethyl caffeate (4) were isolated; and from fraction AE, protocatechualdehyde (5) and a new sesquiterpene lactone the [7,7a-b]oxiren-8-hydroxy-3,5,8-trimethyl-4a,8,9,9a-tetrahydroazuleno[6,5-b]furan-2(4H)-one (6) were isolated. Of these, substances 3, 4 and 5 are being described for the first time for this species. Due to the abundance of these substances in the extract, it is likely that they are involved in the biological activity, according to popular use, a hypothesis that will be tested in future works.

Keywords: Medicinal plants, *Hedyosmum brasiliense*, Chloranthaceae, Phytochemical, sesquiterpene lactones, phenolic compounds.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	<i>Hedyosmum brasiliense</i> Miq.....	11
<b>Figura 2</b>	Principais classes de lactonas sesquiterpências.....	12
<b>Figura 3</b>	Esquema de formação do anel lactona.....	14
<b>Figura 4</b>	Ácido o-hidróxido-benzóico (Ácido salicílico).....	15
<b>Figura 5</b>	Fracionamento fitoquímico de <i>Hedyosmum brasiliense</i> .....	18
<b>Figura 6</b>	Etapas de purificação da fração hexano de <i>H. brasiliense</i> .....	21
<b>Figura 7</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da H 7 na região de 3,53 a 3,38 ppm.....	22
<b>Figura 8</b>	Sinal de RMN de <sup>1</sup> H da H7 no simulador FOMSC3 (duplo-duplo-duplo-duplete em $\delta$ 3,45).....	23
<b>Figura 9a</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da H 29 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	25
<b>Figura 9b</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da H 29 na região de 2,70 a 1,70 ppm (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	26
<b>Figura 10</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da H 29 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	26
<b>Figura 11</b>	Fluxograma das etapas realizadas na purificação da fração DCM de <i>H. brasiliense</i> .....	28
<b>Figura 12a</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da Lactona Podoandina (DCM 18) (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	29
<b>Figura 12b</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da DCM 18 na região de 4,80 a 2,00 ppm (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	29
<b>Figura 13a</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da DCM 46 (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	31
<b>Figura 13b</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H de DCM 46 na região de 3,10 a 0,85 ppm (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz).....	31
<b>Figura 14</b>	Espectro de RMN de <sup>13</sup> C da DCM 46 (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz).....	32
<b>Figura 15a</b>	Espectro de RMN de <sup>1</sup> H da DCM 65 (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz).....	34
<b>Figura 15b</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da DCM 65 na região de 7,65 a 6,18 ppm (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz).....	34
<b>Figura 15c</b>	Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup> H da DCM 65 na região de 4,35 a 1,18 ppm (acetona- <i>d</i> <sub>6</sub> , 300 MHz).....	35

<b>Figura 16</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da DCM 65 (acetona- $d_6$ , 75 MHz).....	35
<b>Figura 17</b>	Etapas de purificação da fração AE de <i>H. brasiliense</i> .....	37
<b>Figura 18a</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da AE 3 (acetona- $d_6$ , 300 MHz).....	38
<b>Figura 18b</b>	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da AE 3 na região de 7,55 a 6,45 ppm (acetona- $d_6$ , 300 MHz).....	39
<b>Figura 19</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da AE 3 (acetona- $d_6$ , 300 MHz).....	39
<b>Figura 20a</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	43
<b>Figura 20b</b>	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de AE 41 na região de 4,51 a 4,31 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	43
<b>Figura 20c</b>	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de AE 41 na região de 3,20 a 2,0 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	44
<b>Figura 20d</b>	Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ de AE 41 na região de 2,0 a 1,52 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	44
<b>Figura 21</b>	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	45
<b>Figura 22</b>	Espectro de correlação HMQC de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).....	45
<b>Figura 23</b>	Espectro de correlação HMBC de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	46
<b>Figura 24</b>	Espectro de massas de AE 41 – full scan.....	46
<b>Figura 25</b>	Espectro de massas de AE 41 – íons filhos ( $m/z$ 263).....	47
<b>Figura 26</b>	Estrutura química da substância AE 41 com suas correlações entre H e C.....	47

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da lactona H 29 (300 e 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com a literatura.....	27
<b>Tabela 2</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da lactona DCM 46 (300 e 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com a literatura.....	32
<b>Tabela 3</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do cafeato de etila DCM 65 (300 e 75 MHz, acetona- $d_6$ ) em comparação com a literatura.....	36
<b>Tabela 4</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ do aldeído protocatéquico AE 3 (300 e 75 MHz, acetona- $d_6$ ) em comparação com a literatura.....	40
<b>Tabela 5</b>	Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da substância AE 41 (300 e 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	41

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>6</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
2.1 Objetivo geral.....	8
2.2 Objetivos específicos.....	8
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>9</b>
3.1 Plantas medicinais .....	9
3.2 Família Chloranthaceae .....	10
3.3 Gênero <i>Hedyosmum</i> .....	10
3.4 <i>Hedyosmum brasiliense</i> .....	11
3.5 Lactonas sesquiterpênicas.....	12
3.6 Compostos fenólicos .....	14
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
4.1 Coleta do material vegetal e obtenção do extrato .....	16
4.2 Obtenção do extrato etanólico .....	16
4.3 Fracionamento cromatográfico do extrato.....	16
4.4 Elucidação estrutural .....	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>20</b>
5.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto .....	20
5.2 Caracterização das substâncias isoladas .....	20
5.2.1 Fração Hexano.....	20
5.2.1.1 Substância H 7 (Fitoesteróide $\beta$ -sitosterol).....	21
5.2.1.2 Substância H 29 (Lactona sesquiterpênica).....	23
5.2.2 Fração Diclorometano .....	28
5.2.2.1 Substância DCM 18 (Lactona sesquiterpênica) .....	28
5.2.2.2 Substância DCM 46 (Lactona sesquiterpênica) .....	30
5.2.2.3 Substância DCM 65 (Cafeato de etila).....	33
5.2.3 Fração acetato de etila .....	36
5.2.3.1 Substância AE 3 (Aldeído protocatéquico) .....	37
5.2.3.2 Substância AE 41 (Nova lactona sesquiterpênica).....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>50</b>

# 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais foram a base da medicina tradicional durante muitas décadas e aos poucos, devido ao surgimento de novas tecnologias, estes efeitos biológicos foram confirmados através de experimentos “*in vitro*” e “*in vivo*”. Seguindo o estudo bio-direcionado, inúmeros princípios ativos foram descobertos, alguns deles com potencial superior a de muitos fármacos disponíveis no mercado farmacêutico (CECHINEL-FILHO, 2000).

Devido ao aumento do consumo individual de medicamentos que se observa por todo o mundo, nos últimos anos, tem originado um interesse renovado pelas plantas medicinais, um retorno às fontes naturais para o tratamento de doenças. É importante enfatizar que entre as 2.000 doenças registradas, somente 30 - 40% são curáveis nos dias de hoje. O restante não há um tratamento ou então podem ser tratadas somente sintomaticamente (FERREIRA, 1998; YUNES; CECHINEL, 2007).

Um outro fator que contribui para que haja o desenvolvimento de pesquisa com plantas medicinais é a imensa reserva vegetal existente no planeta, cerca de 300.000 espécies de plantas, das quais apenas 30% foram investigadas. Portanto está disponível um grande potencial farmacêutico (CALIXTO, 2005; YUNES; CECHINEL, 2007).

Visto que as plantas ainda são pouco estudadas e sabendo disso utilizamos para este estudo uma espécie da família Chloranthaceae. Esta família possui inúmeras espécies medicinais, especialmente aquelas do gênero *Hedyosmum*. Além disso, é considerada uma das famílias mais antigas das angiospermas.

Espécies como, *Chloranthus japonicus*, *Chloranthus serratus* e *Chloranthus fortunei*, produzem sesquiterpênos que possivelmente são responsáveis pelas suas propriedades antiinflamatórias. Estes sesquiterpênos serviram de protótipo para mudanças estruturais e obtenção de novos compostos que apresentam um grande potencial farmacêutico (KAWABATA, 1998; YI-BO; ZHEN-YU, 1999; DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; KWON et al., 2006).

A *Hedyosmum brasiliense* é a única espécie de Chloranthaceae com ocorrência no território brasileiro. Comumente ela é conhecida em Santa Catarina e no Paraná como “Cidrão”, Cidreira ou Erva cidreira. Ela é utilizada popularmente como antiinflamatório. É uma espécie abundante e apresenta estudos ecológicos

que fornecem bases para o estabelecimento de cultivo e manejo sustentável (ZANIOLO, 2003).

Apesar da abundância e do uso popular da espécie, seu potencial permanece pouco explorado do ponto de vista químico e de bioatividade, uma vez que, somente uma lactona sesquiterpênica foi isolada e a sua propriedade antinociceptiva foi divulgada (GUEDES, 1997; TRENTIN et al., 1999).

Com o propósito de descobrir substâncias que poderão mais tarde serem utilizadas para o tratamento de diversas patologias, este estudo teve como foco encontrar e identificar outras substâncias ativas da *H. brasiliense*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar fitoquimicamente as partes aéreas de *Hedyosmum brasiliense*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Coletar e preparar extrato etanólico das partes aéreas de *H. brasiliense*;
- Concentrar o extrato bruto e proceder a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente;
- Re-fracionar as frações Hexano (H), Diclorometano (DCM) e Acetato de etila (AE) utilizando procedimentos cromatográficos de acordo com técnicas fitoquímicas clássicas, até que as substâncias estejam purificadas;
- Caracterizar as substâncias isoladas através de técnicas espectroscópicas de RMN.

## **3 REVISÃO DA LITERATURA**

### **3.1 Plantas medicinais**

As plantas medicinais são descritas pela humanidade desde épocas antigas. Existem relatos que os povos antigos, como chineses, hindus, gregos e egípcios, utilizavam as plantas como remédio e muitas destas tradições perpetuaram-se por muitos séculos e estão sendo utilizadas até hoje. Entre os anos de 467-377 a.C. Hipócrates juntamente com Dioscórides, Galeno e outros observadores contribuíram significativamente para o estudo das plantas medicinais (EVANS, 1991; ELDIN; DUNFORD, 2001; MENGUE, 2001; GURIB-FAKIM, 2006).

Em 1808 o Brasil, devido a sua ampla diversidade, deu seu primeiro passo no estudo das plantas medicinais. A fitoquímica brasileira contou com o empenho de Theodoro Peckolt. Com isso iniciava-se o crescimento da Química de Produtos Naturais que se desenvolvia nos boticários. Porém, com o início da produção de medicamentos em alta escala, proveniente ao surgimento da Revolução Industrial que incentivou a disputa entre os laboratórios, o interesse pela fitoquímica foi sendo esquecido e tomado pela química computacional (PINTO et al., 2002).

Sem recursos e com um mínimo tempo para resolver seus principais problemas de saúde, o Brasil e outros países, com o apoio da Organização Mundial de Saúde (OMS), começaram a dedicar-se a resgatar a medicina popular com o propósito de despertar novamente o interesse pelas plantas medicinais. De acordo com GURIB-FAKIM (2006), esta mesma organização realizou um estudo e constatou que aproximadamente 65 a 80% da população de países em desenvolvimento, devido à pobreza e ao não acesso a tratamento alopático, dependem essencialmente de plantas medicinais para a terapêutica de suas enfermidades.

Percebendo essa grande riqueza que as plantas medicinais apresentam a indústria farmacêutica, utilizando saberes de áreas da farmacologia, bioquímica, toxicologia e biologia molecular, vem investigando através de técnicas modernas de obtenção de compostos isolados, as plantas precursoras da terapêutica popular (CALIXTO et al., 2000).



### 3.2 Família Chloranthaceae

De acordo com Todzia (1993) a família *Chloranthaceae* é constituída por aproximadamente 75 espécies distribuídas em quatro gêneros que são: *Hedyosmum*, *Ascarina*, *Chloranthus* e *Sarcandra*. São plantas arbustivas, herbáceas ou arbóreas, com folhas opostas simples, pinadas e com margens serradas, pecioladas, com estípulas livres, no ápice, e soldadas, na base, entre si e com o pecíolo, formando uma bainha amplexicaule (METCALFE, 1957; REITZ, 1965). A família tem uma curiosa distribuição geográfica, compreendendo grandes áreas descontínuas – Américas, ilhas da Oceania e da Ásia oriental e tropical (OCCHIONI, 1954).

A família Chloranthaceae tem como característica a presença de lactonas sesquiterpênicas isoladas de diversos gêneros e espécies, tais como da *Chloranthus japonicus* e *Hedyosmum arborescens* (KAWABATA, 1998; BERCIÓN et al., 2005).

### 3.3 Gênero *Hedyosmum*

*Hedyosmum* sp., é o maior dos gêneros, único com ocorrência nas Américas, compreendendo espécies essencialmente tropicais e subtropicais americanas (OCCHIONI, 1954). Conforme Reitz (1965), o gênero totaliza 45 espécies e esta dispersa desde o México até Peru, Bolívia, Centro e Sul do Brasil, sendo Palhoça, em Santa Catarina, o seu limite austral.

No gênero *Hedyosmum* encontramos espécies usadas na medicina popular para diversos fins, como é o caso da *H. arborescens* que é uma planta característica da Jamaica e utilizada como digestiva e antitérmica. Nessa espécie foi encontrado um guaianoideo, extraído de suas partes aéreas, denominado 7,10-epoxy-hedyosminolide (BERCIÓN et al., 2005).

Na China foi encontrado cinco novos sesquiterpenos, do tipo guaiano, extraído de *H. orientale*, o 10 $\alpha$ -hidroxi-1,5 $\alpha$ H-guaia-3,7(11)-dien-8 $\alpha$ ,12-olideo, 9 $\alpha$ -hidroxiasterolideo, spathulenol, 13-hidroxi-8,9-deidroshi-zukanolideo e aromadendrane-4 $\beta$ ,10 $\beta$ -diol (SU et al., 2008a).

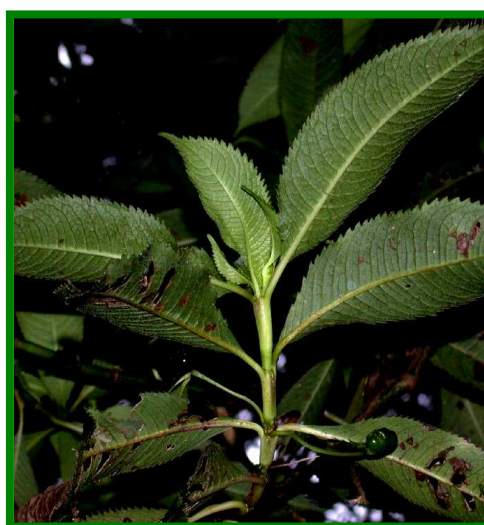
Lorenzo, Loayza e Dellacassa (2003) relatam em sua pesquisa o isolamento de alguns monoterpenos extraídos de *H. augustifolium* entre eles o 1,8-cineole e

linalool, e em *H. scabrum* principalmente o monoterpene  $\delta$ -3-carene e o sesquiterpene  $\alpha$ -gurjunene.

### 3.4 *Hedyosmum brasiliense*

*Hedyosmum brasiliense* Mart. (Figura 1) é uma espécie arbustiva que ocorre no Distrito Federal, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, podendo chegar até a Bolívia (OCCHIONI, 1954). Ela é conhecida como Âmbar vegetal, Canela cânfora (DF), Chá de bugre (DF, RJ, MG, SP), Chá de índio (SP) Chá de soldado ou Erva de soldado (RJ, DF), Erva almíscar, Erva de bugre (RJ), Hortelã do brejo (RJ, MG), Hortelã silvestre (DF), Cidreira e Erva cidreira (SC). Suas folhas são utilizadas na terapêutica popular para diversos fins, como calmante e afrodisíaco, entretanto, só foram comprovadas suas atividades analgésicas e antimicrobianas. (REITZ, 1965; GUEDES, 1997). Segundo Reitz (1965, p. 9):

Devido seus princípios aromáticos, analépticos e febrífugos é recomendada contra as enxaquecas e doenças do ovário, útil também para curar frieiras; a infusão das folhas dá um chá altamente estomáquico, refrigerante e diurético, agradável e idêntico ao Chá da Índia. As folhas servem ainda para o preparo de um vinho que passa por ser tônico e afrodisíaco (30 grs. da planta fresca para 600 grs. de vinho branco, segundo Peckolt).



**Figura 1:** *Hedyosmum brasiliense* Miq.

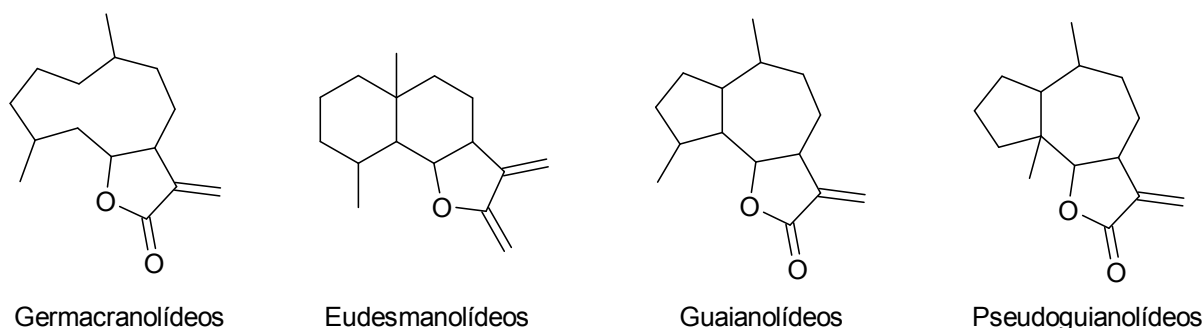
**Fonte:** Fotografia do autor

É uma espécie exclusiva do Brasil e abundante na Mata Atlântica, nos estados de Santa Catarina e Paraná. Suas folhas produzem óleo essencial com características organolépticas com aroma herbal, lembrando a “Cidreira”. Devido a essa característica, muitas vezes, em seu uso popular é substituto do “Chá-Verde” (REITZ, 1965). Ela possui um bom desenvolvimento em ambientes com pouca ou grande disponibilidade de água, justificado por sua plasticidade para modificar algumas características morfo-anatômicas e fisiológicas em função do déficit hídrico, o que nos possibilita um manejo sustentável (ZANIOLO, 2003; MACHADO, 2004).

### 3.5 Lactonas sesquiterpênicas

As lactonas sesquiterpênicas são compostos de grande ocorrência na natureza e representam um importante grupo de metabólitos secundários das famílias Asteraceae, Apiaceae, Burseraceae, Magnoliaceae e Lauraceae. Elas estão amplamente distribuídas nas plantas e mais de 7000 estruturas químicas dessa classe já foram descritas (MACIAS et al., 2006; NIERO; MALHEIROS, 2007).

Elas se classificam comumente de acordo com o tipo de núcleo que possuem com a terminação olídeo, que indica a existência de um grupo funcional lactona (NIERO; MALHEIROS, 2007). As principais classes de lactonas sesquiterpênicas são: germacranolídeos, eudesmanolídeos, guaianolídeos e pseudoguaianolídeos, cujos esqueletos carbônicos estão apresentados abaixo.



**Figura 2:** Principais classes de lactonas sesquiterpênicas.

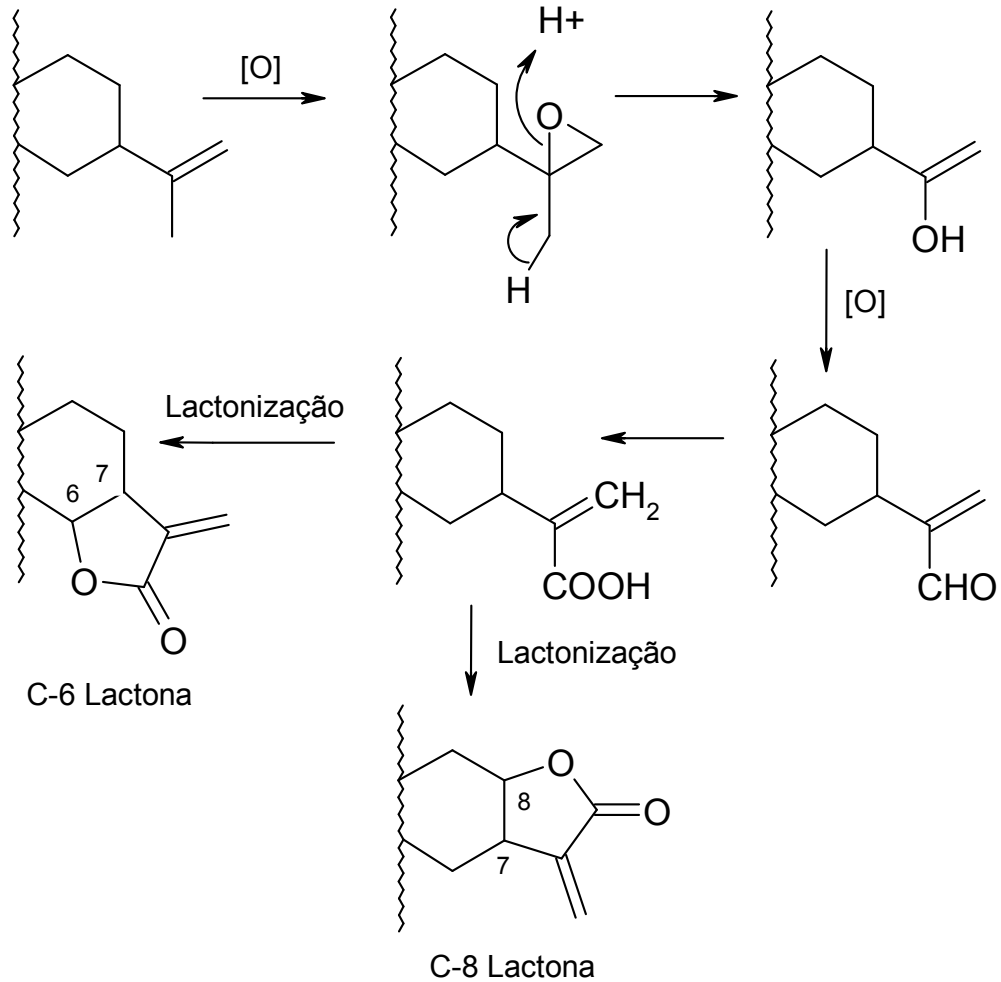
Elas constituem uma classe de substâncias com potencial para utilização na medicina, destacando-se as atividades citotóxica, antitumoral, antibacteriana, antiinflamatória, esquistossomicida, antimalárica e antifúngica (EVANS, 1991; DEWICK, 2002; KIM et al., 2006). Nos últimos anos a propriedade antitumoral das lactonas sesquiterpênicas tem atraído um extenso interesse em estudar as características dessa atividade, assim como, o mecanismo molecular e seu potencial preventivo e terapêutico (ZHANG, 2004). Bruneton (1991) afirma que tais lactonas formam um dos maiores grupos de compostos citotóxicos e antitumorais das plantas, que antigamente denominavam-se “princípios amargos”.

As funções presentes na estrutura dos componentes naturais são formadas através de reações enzimáticas. E devido à especificidade destas reações ainda é muito difícil realizar a síntese de uma substância isolada da planta, embora o conhecimento da rota biossintética possa ser útil como um modelo para a síntese destas substâncias (GUEDES, 1997). A figura 3 mostra um esquema da formação do anel lactona que é muito comum em sesquiterpenos e explica a formação dos compostos conhecidos como Shizukanolideos e Chlorantholactonas abundantes na família Chloranthaceae (GEISSMAN, 1969; GROS; POMILIO, 1985).

No setor agrícola as lactonas sesquiterpênicas também apresentam grande potencial de aplicabilidade. Algumas podem afetar a germinação e o crescimento de certas espécies de plantas, embora a natureza e extensão dos efeitos produzidos dependam de vários fatores, dentre eles a estrutura da lactona testada, sua concentração e a espécie na qual ela irá atuar. Esse efeito denomina-se alelopatia, e pode ser de grande importância na agricultura para o controle de plantas daninhas, desde que se estabeleça uma correta associação entre as espécies produtoras de substâncias alelopáticas e as espécies cultivadas (DEWICK, 2002).

Trentin et al. (1999) descreve o isolamento de uma lactona, a 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo, que possivelmente caracteriza o efeito analgésico da planta *H. brasiliense*.

O conhecimento do mecanismo da atividade biológica das lactonas, bem como o aumento da potência da atividade das mesmas, certamente evolui com a síntese e ensaios biológicos de novos compostos que sejam análogos estruturais da molécula considerada modelo ou protótipo (DEWICK, 2002).



**Figura 3:** Esquema de formação do anel lactona.

**Fonte:** Guedes (1997).

### 3.6 Compostos fenólicos

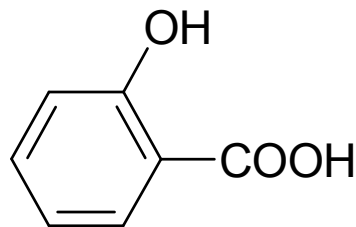
Os compostos fenólicos podem apresentar estruturas simples ou complexas, entretanto possuem pelo menos um anel aromático, sendo que um ou mais hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES et al., 2004).

Dentre os compostos fenólicos pertencentes ao metabolismo secundário dos vegetais encontram-se estruturas como ácidos fenólicos, dos derivados de cumarina, pigmentos hidrossolúveis, ligninas, taninos, e ainda fazem parte de proteínas, alcalóides e terpenóides. (SIMÕES et al., 2004).

As substâncias fenólicas são encontradas principalmente em alimentos que apresentam atividades funcionais, tais como prevenir ação de radicais livres,

hipercolesterolemia, hipertensão e outros, podendo exercer efeitos preventivos e/ou curativos em distúrbios fisiológicos (WINGE, et al., 1995; JORGE, et al. 1998; ANTOLOVICH, 2000).

Eles são amplamente utilizados como corantes de alimentos e bebidas, flavorizantes e como explosivos. Além disso são utilizados como matéria-prima na indústria farmacêutica, tanto como substância ativa quanto como adjuvante, entre eles se destacam o guaiacol como expectorante, ácido salicílico usado na indústria de cosméticos como abrasivo químico (Figura 4) e a vanilina em indústria alimentícia (SIMÕES et al., 2004).



**Figura 4:** Ácido o-hidróxido-benzóico (Ácido salicílico).

As folhas de *Cynara scolymus* L., popularmente conhecida como alcachofra, caracterizam-se com seus componentes químicos principais os flavonóides e os ácidos fenólicos, como ácido caféico, ácido clorogênico e cinarina. Também apresenta como característica a presença de óleo voláteis. Suas ações colerética e hipocolesterolêmica são atribuídas aos ácidos fenólicos (SIMÕES et al., 2004).

Os ésteres do ácido caféico tem despertado um interesse farmacológico, devido sua atividade antibacteriana e antiviral. Um exemplo em destaque é o equinocósideo, de ocorrência descrita em diversas espécies de *Echinacea*, assim como o plantamajosídeo de *Plantago major* L (SIMÕES et al., 2004).

De acordo com Bazzalo et al. (1985) os ácidos cafeico e ferúlico, além de outros derivados hidroxicinâmicos, são importantes protetores contra predadores de plantas, tais como herbívoros e alguns patógenos. Além destas funções eles possuem também outras atividades biológicas relevantes, tais como antioxidante e sequestradora de radicais livres (BRAÇA et al., 2003).

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Coleta do material vegetal e obtenção do extrato**

Partes aéreas de *H. brasiliense* foram coletadas no morro do Baú, em Luis Alves (SC), no final do verão de 2006, em local previamente determinado (Parque Botânico Morro do Baú) e sua identidade botânica foi confirmada pela Dra. Ana Claudia Araújo. Exsicatas representativas do material coletado foram tombadas no Herbário Lyman Bradford Smith (UNIVALI, Itajaí - SC), sob número 2031.

### **4.2 Obtenção do extrato etanólico**

O extrato etanólico foi obtido com as folhas frescas (7 kg), trituradas em liquidificador com etanol bidestilado e maceradas durante 15 dias na ausência de luz. Foram utilizados 18 litros de etanol bidestilado para 7 kg da planta. Posteriormente, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor (HEIDOLPH Laborota 4000) até total eliminação do etanol. Uma alíquota do extrato concentrado foi levada à secura com auxílio de secador de cabelo.

A análise farmacológica foi realizada em colaboração com o mestrando Rogério Tolardo (TOLARDO, 2008) onde foi feita à investigação “in vivo” em diversos modelos farmacológicos sobre o sistema nervoso central.<sup>1</sup>

Ao extrato bruto concentrado (21 g), que teve o rendimento de 0,3%, foi adicionado  $\frac{1}{3}$  de água para então ser submetido a uma partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: hexano, diclorometano e acetato de etila, com o propósito de realizar um refractionamento do extrato bruto de acordo com as polaridades de seus constituintes. As frações obtidas foram reduzidas à secura em rotaevaporador.

### **4.3 Fracionamento cromatográfico do extrato**

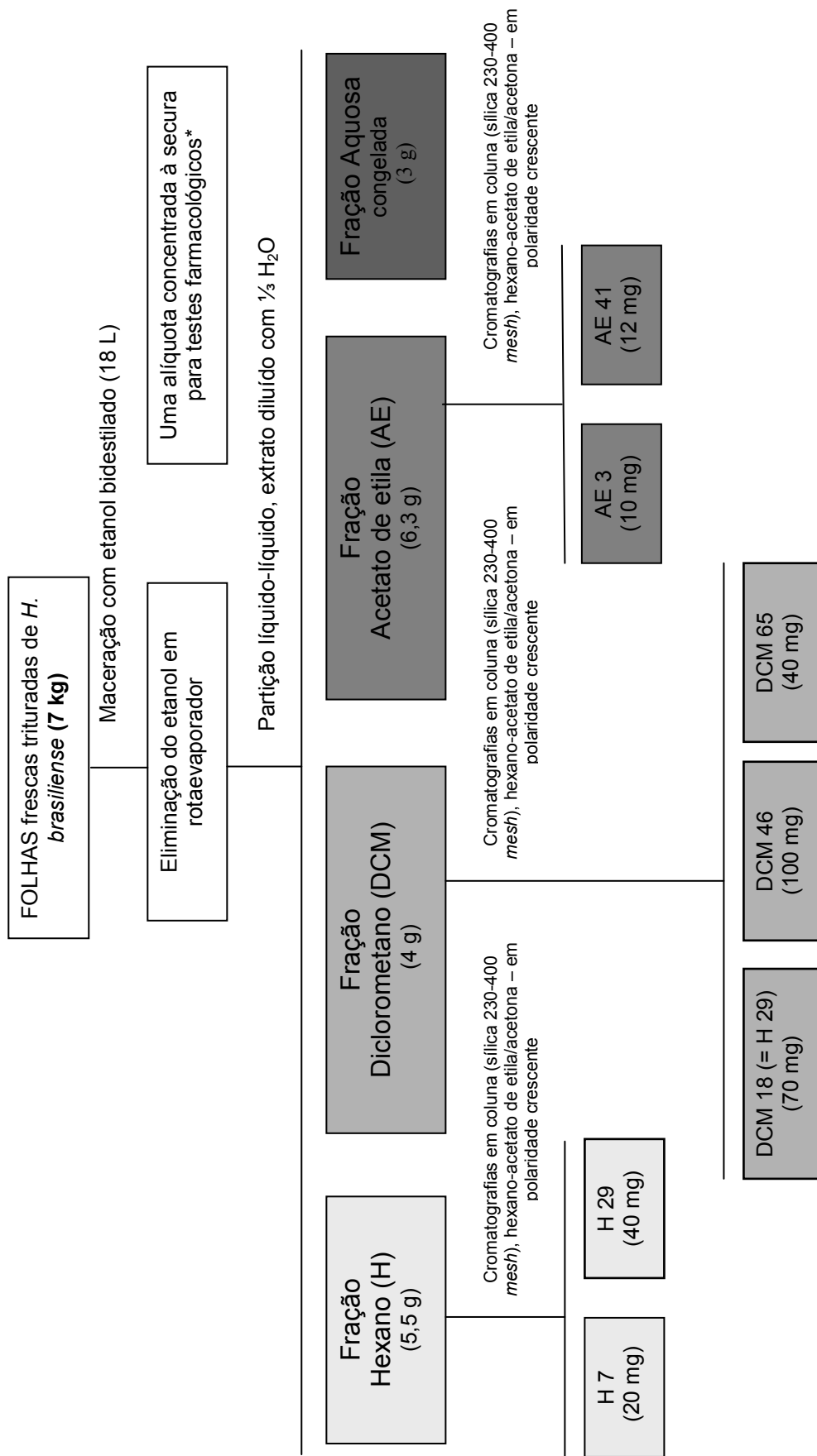
---

<sup>1</sup> *Nado forçado, suspensão pela cauda, labirinto em cruz elevado, convulsão induzida por pentilenotetrazol e estriçnicina, indução do sono por barbitúrico, modelo de deambulação, teste do open field, teste de esquivia inibitória.*

As frações obtidas conforme item 4.2 foram submetidas à cromatografia em coluna *flash* (CC), sendo utilizado sílica Gel 60 (230-400 mesh) como fase estacionária e como eluentes misturas binárias de hexano-acetato de etila ou acetona, variando o tipo e a proporção de acordo com o perfil da fração em cromatografia em camada delgada (CCD utilizando placas de sílica Gel 60 F<sub>254</sub>). Para revelar os compostos foram utilizados reveladores seletivos, entre eles o Ultra-Violeta como revelador não destrutivo, identificando compostos que possuem duplas ligações conjugadas, e o anisaldeído sulfúrico para terpenóides e esteróides que se apresentam em manchas de coloração rosa ou roxo (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001).

Os eluentes com o produto carregado foram recolhidos por gotejamento em frascos numerados seqüencialmente. Depois de analisado seu perfil cromatográfico, através de CCD, foram reunidos os conteúdos com características semelhantes. Quando observava-se a presença de apenas uma mancha em CCD ou havia cristalização espontânea nos frascos, submetia-se a amostra à análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Com este procedimento, foi possível isolar e identificar algumas substâncias contidas nas frações do extrato bruto etanólico, quais sejam: da fração H um fitoesteróide (H 7) e uma lactona sesquiterpênica (H 29); da fração DCM duas lactonas sesquiterpênicas (DCM 18 e DCM 46) e um éster fenólico (DCM 65); da fração AE um aldeído fenólico simples (AE 3) e a proposta AE 41. Para uma maior elucidação a seguir encontra-se um fluxograma explicativo dos procedimentos realizados:





**Figura 5:** Fracionamento fitoquímico de *Hedyosmum brasiliense*.

#### 4.4 Elucidação estrutural

Os compostos isolados foram submetidos a análises espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  no Laboratório de RMN (103), Bloco 17, na UNIVALI, em equipamento Bruker modelo AC200, 300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono. Os dados (FID) foram processados em programa MestreC (MESTRELAB RESEARCH, 2008). Os valores de rotação específica foram obtidos no polarímetro Rudolph, modelo Autopol III, à temperatura ambiente.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

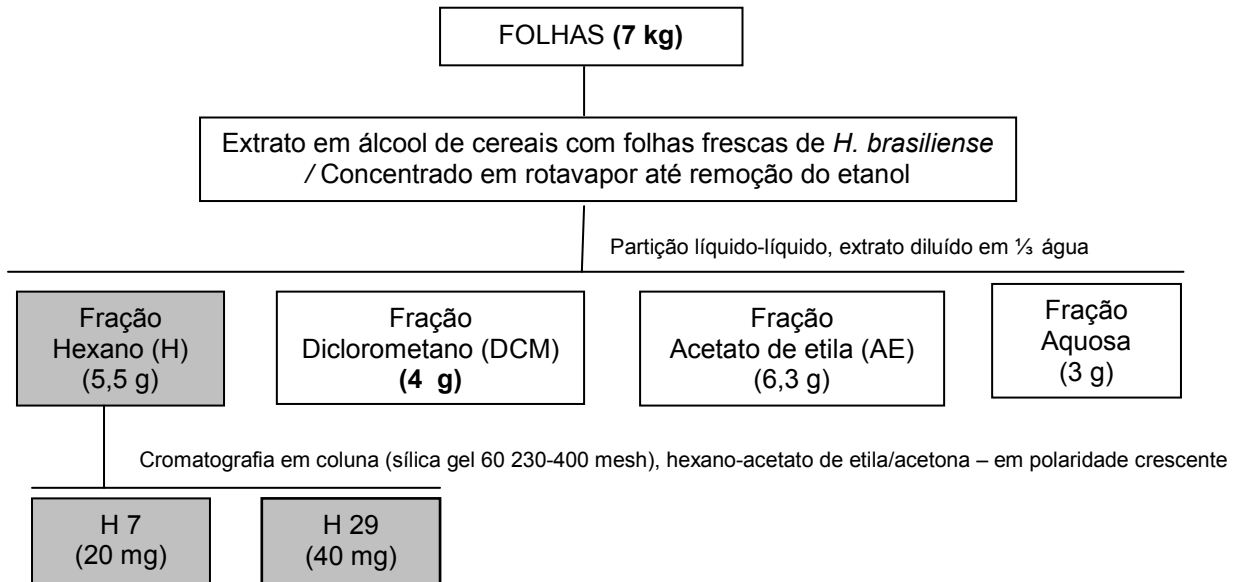
### **5.1 Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto**

As folhas frescas de *H. brasiliense* (7 kg) coletadas em março de 2006 e em agosto de 2006 foram trituradas em liquidificador de aço inoxidável com etanol bidestilado PA para aproximar o máximo do seu uso popular e evitar algumas contaminações presentes em outros solventes. Após foram armazenadas em frascos de vidro ao abrigo da luz até o momento da eliminação do solvente em rotaevaporador. Foi assim obtido 21 g (0,3%) de extrato bruto concentrado. Este extrato foi então submetido à partição líquido-líquido com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila, que permitiu obter a fração hexano com 21,19% de rendimento, a fração diclorometano com 19,5%, a fração acetato de etila com 30% e a fração aquosa com 14,26% do extrato bruto.

### **5.2 Caracterização das substâncias isoladas**

#### **5.2.1 Fração Hexano**

Conforme a figura 6 foi realizado procedimentos cromatográficos em coluna com sistema *flash* (sílica 230-400 mesh) para o fracionamento da fração hexano, utilizando gradiente de hexano-acetona ou acetato de etila. A eluição foi monitorada através de CCD, utilizando luz UV (254 e 365 nm) e anisaldeído sulfúrico como reveladores, evidenciando a presença de diversos compostos terpênicos. Duas sub-frações cristalizaram espontaneamente nos frascos após evaporação do solvente, denominadas H 7 e H 29, que foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e os espectros obtidos foram comparados com dados de literatura.

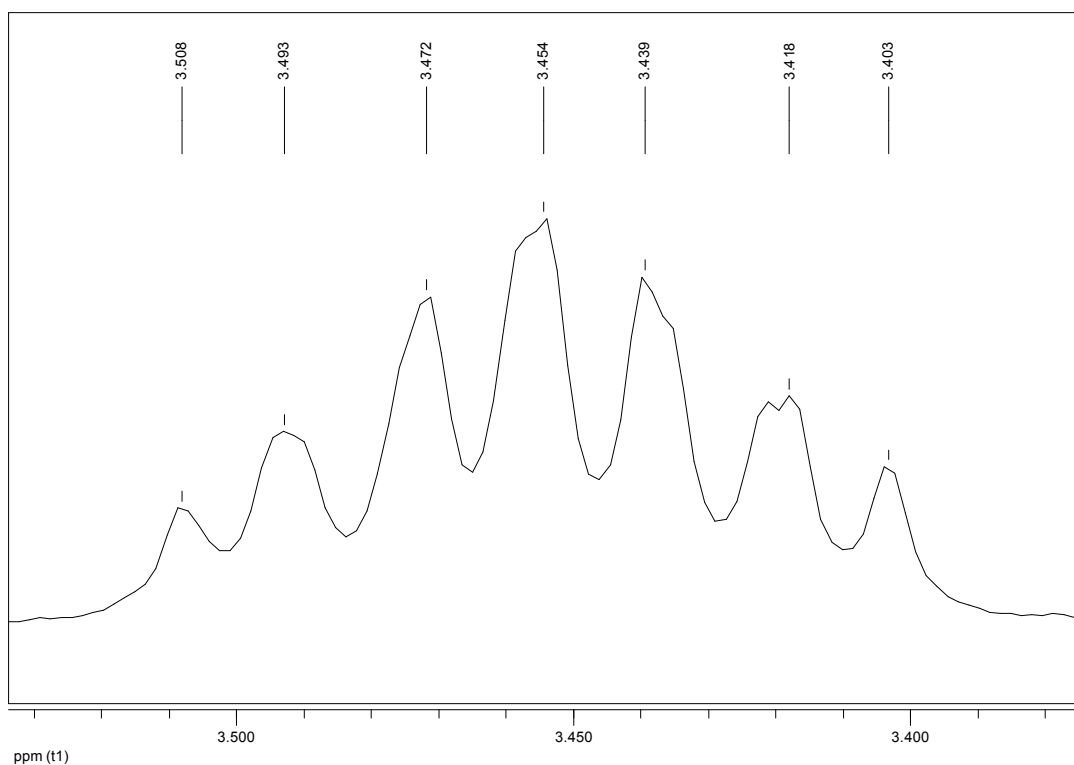
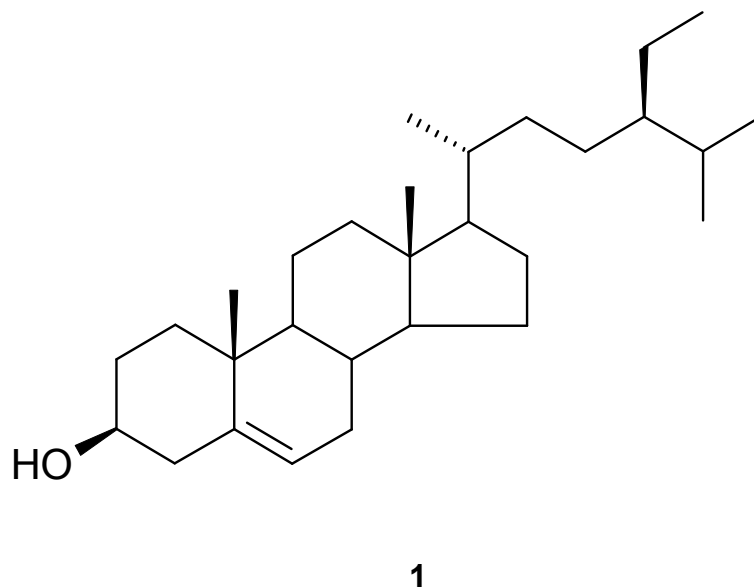


**Figura 6:** Etapas de purificação da fração hexano de *H. brasiliense*

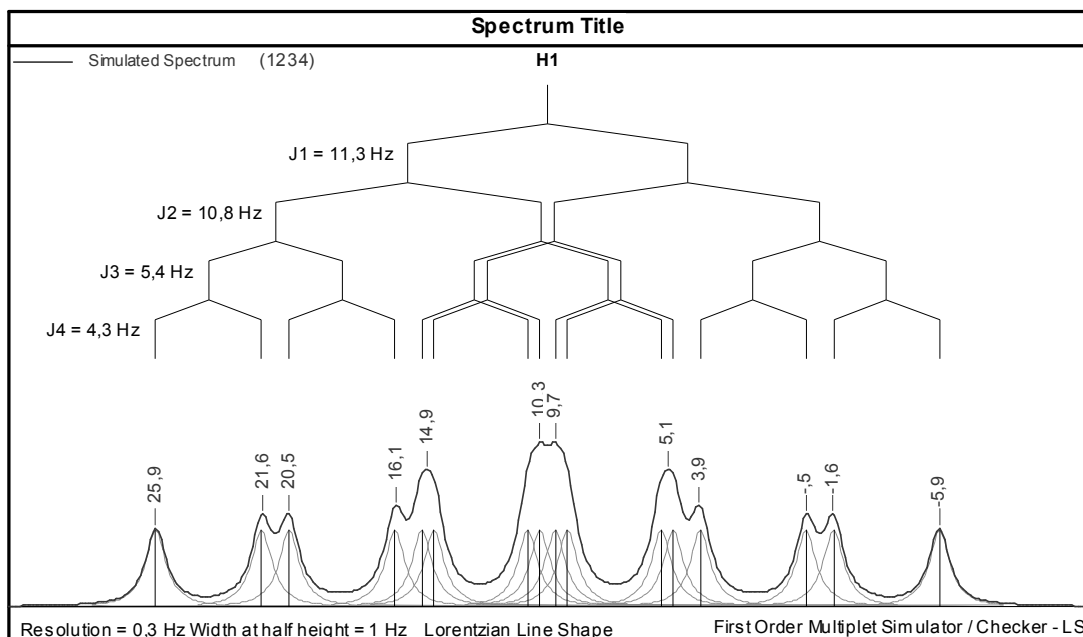
### 5.2.1.1 Substância H 7 (Fitoesteróide $\beta$ -sitosterol)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de H 7 apresentou sinais característicos de substância esteroidal, evidenciados pela presença de multipletos em região de deslocamento químico menor, de duplo-duplo-duplo-duplete em  $\delta$  3,45 ( $J = 11,3; 10,8; 5,4; 4,3$  Hz) (Figura 7), atribuído ao hidrogênio alfa do carbono carbinólico C-3, o qual foi utilizado um simulador FOMSC3 que associa as constantes de acoplamento com o número de hidrogênios que estão acoplado com o hidrogênio em questão (Figura 8). Também verificou-se a presença de um duplete em  $\delta$  5,29 ( $J = 5,1$  Hz), atribuível ao hidrogênio olefínico ligado a C-6. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou 29 sinais; entre os quais, dois sinais em  $\delta$  141,0 e 121,9 referentes aos carbonos olefínicos C-5 e C-6. A análise dos dados observados e a comparação com os reportados na literatura (KONGDUANG, WUNGSINTAWEEKUL, DE-EKNAMKUL, 2008) possibilitou a identificação do fitoesteróide  $\beta$ -sitosterol (24 $\alpha$ -etil-colestan-5-eno-3 $\beta$ -ol) (**1**), que é amplamente distribuído no reino vegetal e está envolvido na estabilização das membranas celulares.

Estudos in vivo em animais demonstraram que o  $\beta$ -sitosterol livre e glicosilado exibiram atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imuno modulatória (BOUIC et al., 1999). Estudos in vitro demonstraram sua atividade na prevenção de câncer em células de cólon (CHOI et al., 2003). Abaixo observa-se a estrutura do  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 7:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da H 7 na região de 3,53 a 3,38 ppm.



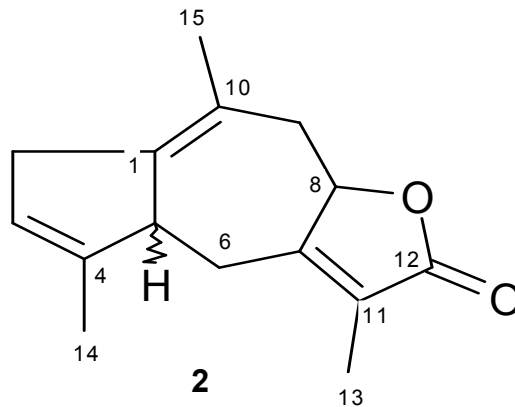
**Figura 8:** Sinal de RMN de  $^1\text{H}$  da H7 no simulador FOMSC3 (duplo-duplo-duplo-duplo em  $\delta$  3,45).

### 5.2.1.2 Substância H 29 (Lactona sesquiterpênica)

Apresentou-se como sólido cristalino (PF= 114-116 °C) de coloração branca. Seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observado na figura 9a-b, apresenta um simpleto largo em  $\delta$  5,49 (1H) atribuído ao H-3. Já os simpletos em 1,85 (3H) e 1,79 (6H) indicam a presença das metilas em carbono  $\text{sp}^2$ . O sinal em  $\delta$  4,55, referente ao H-8, está relacionado a um hidrogênio próximo de um oxigênio e aparece como um duplete, devido ao efeito das constantes de acoplamento de H-9a e H-9b. Na região de  $\delta$  2,62 apresenta um duplo-duplete com constantes de acoplamento de  $J = 13,5; 3,6$  Hz e o sinal na região  $\delta$  2,22 aparece como um tripleto largo que são atribuídos aos H-9b e H-9a respectivamente. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10) apresentou um total de 15 sinais, caracterizando um provável sesquiterpeno. Também sinais típicos de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada:  $\delta$  174,3 (carbonila), 163,5 ( $\beta$ -C), 121,3 ( $\alpha$ -C) e 79,3 ( $\gamma$ -C). Apresentou ainda sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  142,9, 140,7, 124,3 e 122,7, indicando a presença provável de mais duas insaturações na molécula da lactona

sesquiterpênica. Sua fórmula molecular é  $C_{15}H_{18}O_2$  e seu grau de saturação é sete. Bercion et al. (2005) publicaram o isolamento e caracterização de um guaianolídeo epoilado das folhas de *H. arborescens*, chamado 7,10-epoxiguaianolídeo.

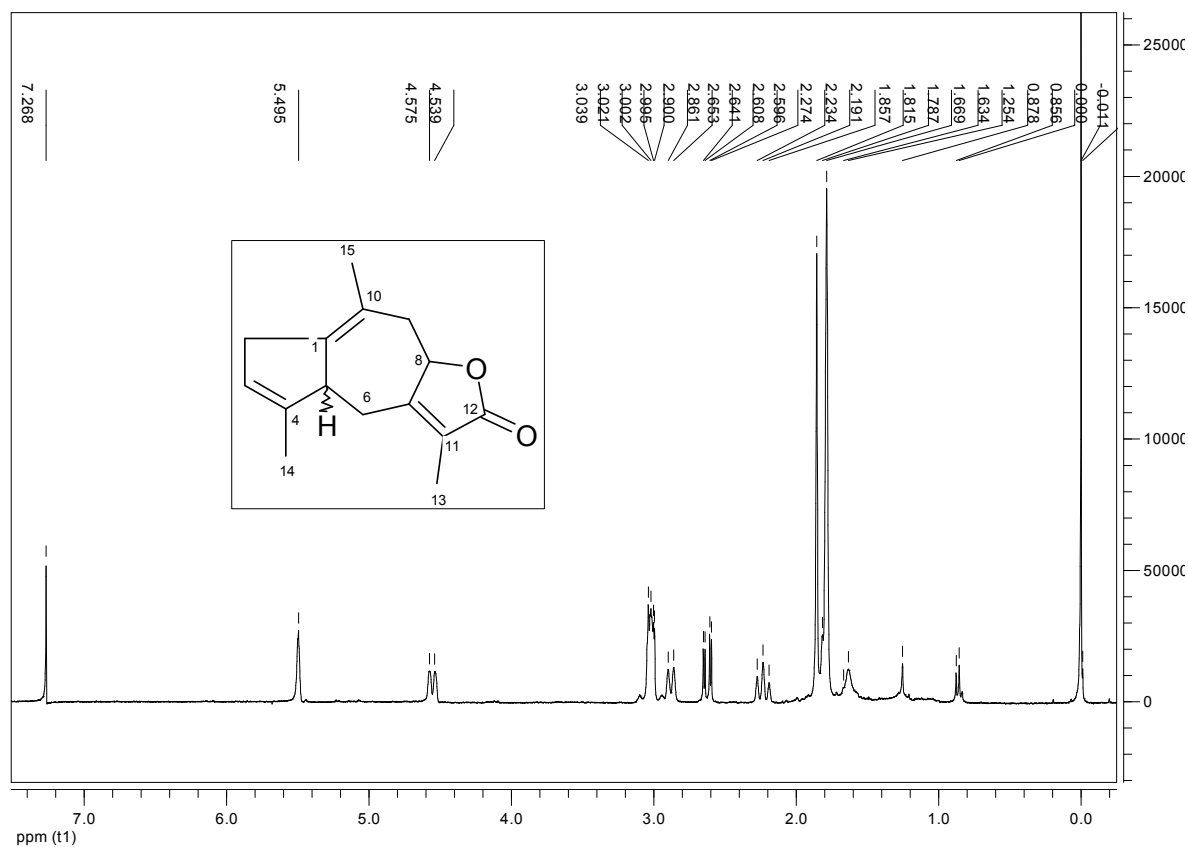
Pela comparação dos dados espectrais de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  da substância publicada com os da substância H 29, foi possível observar diferenças apenas nos carbonos e hidrogênios envolvidos na ligação epóxido e metileno terminal, sendo correspondentes a duplas ligações e metila quaternária na substância H 29. Desta forma, propôs-se a estrutura **2**.



Baseados nesta proposta buscou-se por substâncias equivalentes publicadas, e assim foi encontrada a podoandina, cujo sua nomenclatura química é (4aS)-3,5,8-trimetil-4a,7,9,9a-tetrahidroazuleno[6,5-b]furan-2(4H)-ona, lactona sesquiterpênica isolada anteriormente de *Podocarpus andina* (KUBO et al., 1992). Os dados espectrais de H 29 em comparação com os da podoandina são mostrados na tabela 1. Como pode ser observado, há uma grande semelhança nos dados espectroscópicos das duas lactonas e os dados da H 29 também foram consistentes aos dados publicados na literatura (BLAY et al., 2000).

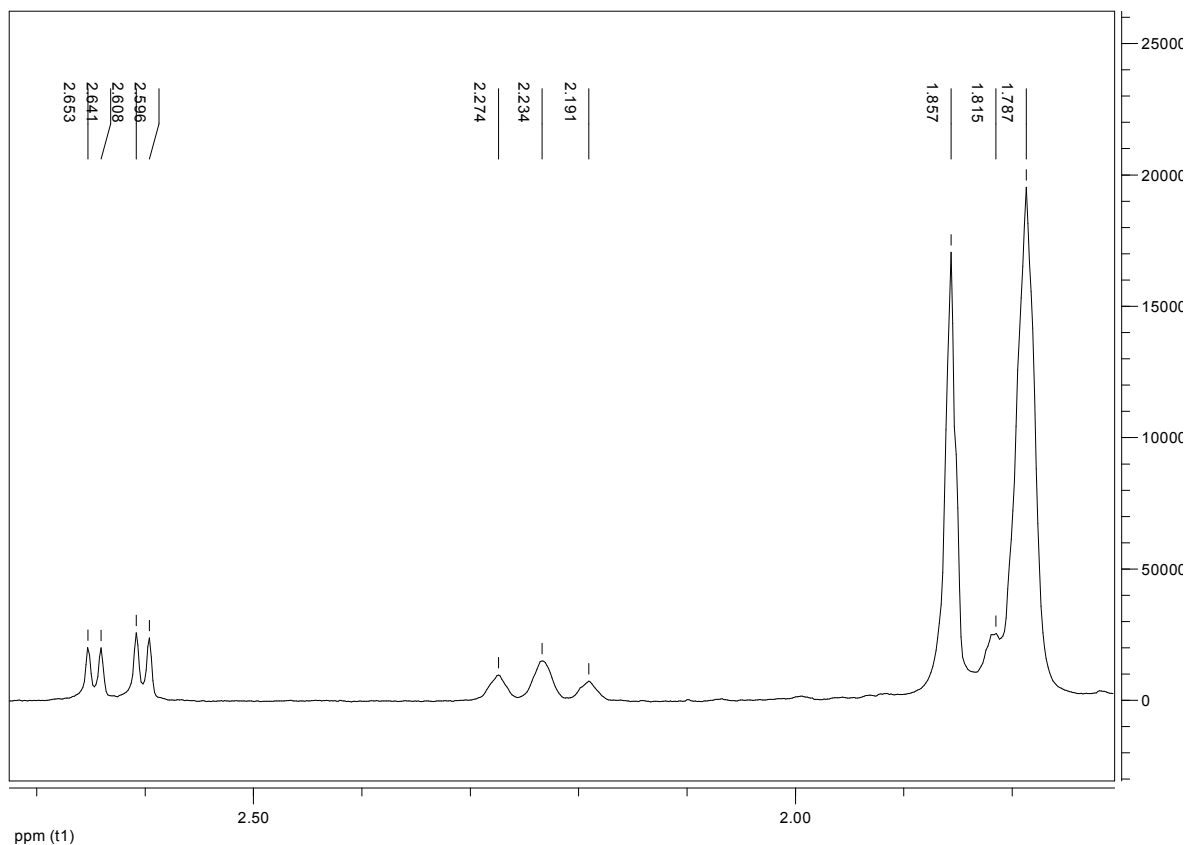
A lactona podoandina havia sido descrita apenas para a Gimnosperma *Podocarpus andina* (binômio científico correto é *P. andinus*), sendo este o segundo relato de ocorrência desta substância, a qual apresentou atividade moluscicida sobre *Biomphalaria glabrata* e inibiu a germinação de sementes de *Lactuca sativa* (KUBO et al., 1992).

Uma série de lactonas sesquiterpênicas tipo guaianolideo foram isoladas de *H. orientale* e denominadas Hediosuminas A-E, as quais não apresentaram atividade antitumoral in vitro (adenocarcinoma humano A-549 e leucemia humana HL-60) (SU et al., 2008a)

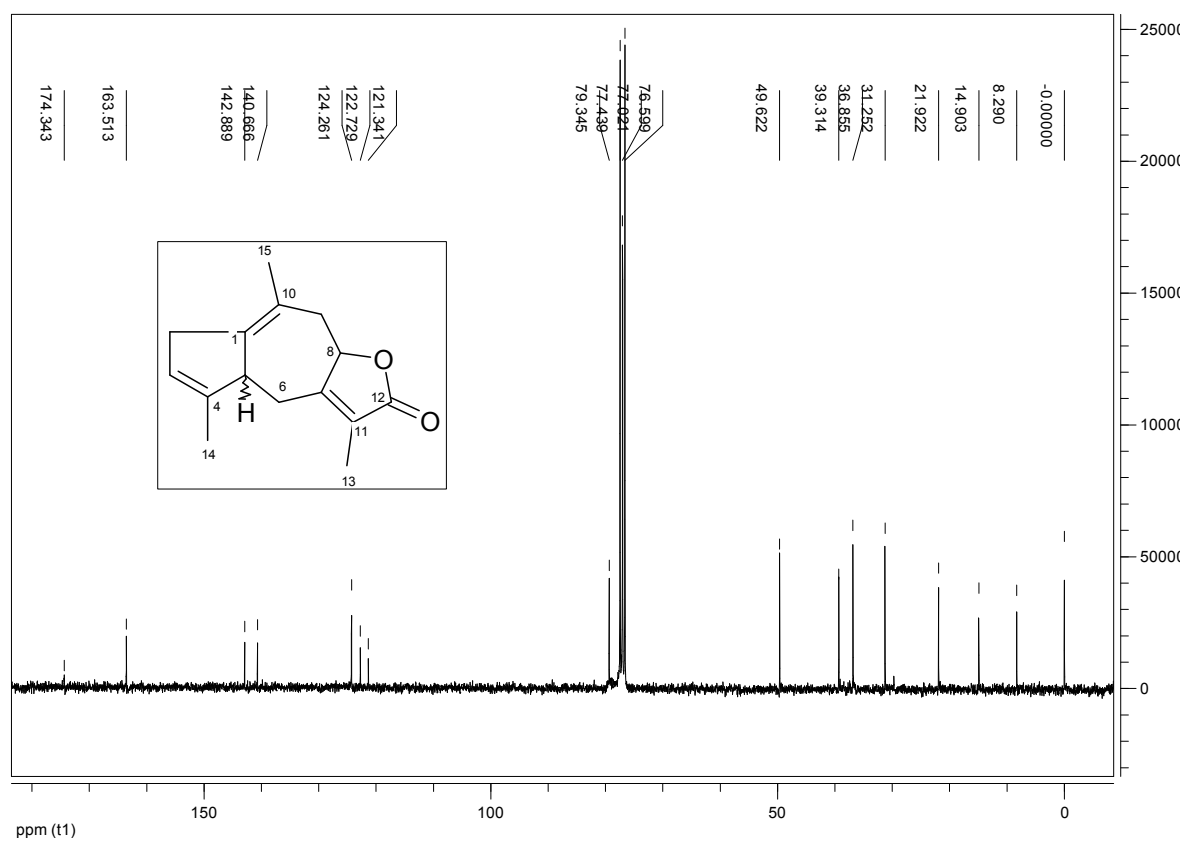


**Figura 9a:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da H 29 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).





**Figura 9b:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da H 29 na região de 2,70 a 1,70 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Figura 10:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da H 29 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

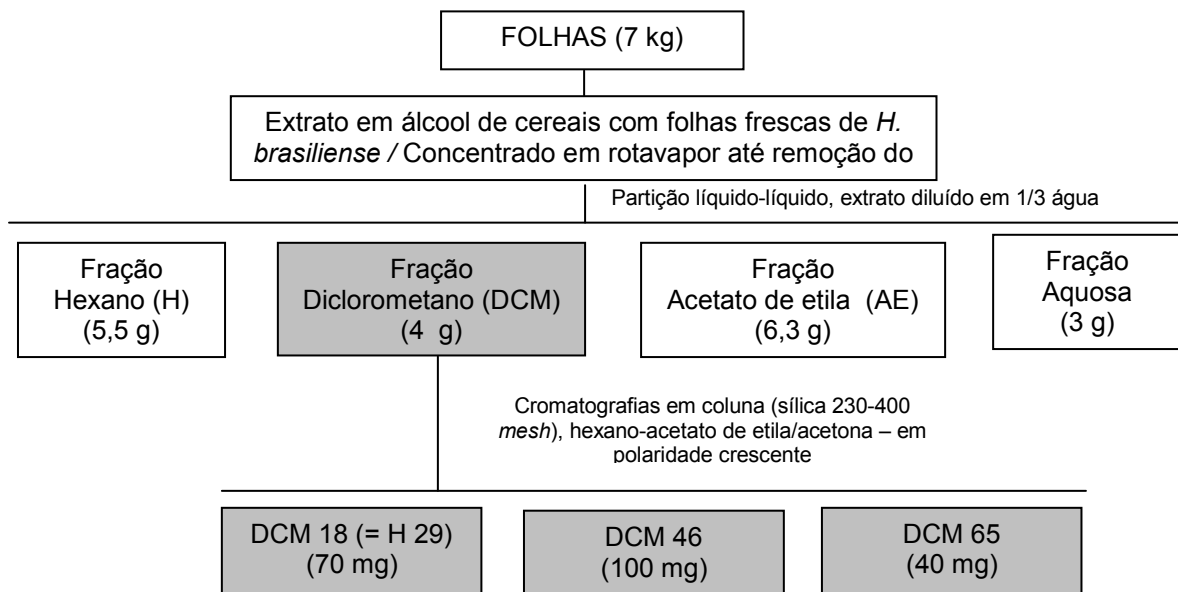
**Tabela 1** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da lactona H 29 (300 e 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com a literatura.

Posição	H 29 (2)		Podoandina (KUBO et al., 1992) (500 e 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )		Podoandina (BLAY et al., 2000) (400 e 200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm), J (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1		142,9		143,2		142,9
2	a	31,3	$\alpha$ 1,78 <i>dd</i> (13,2; 1,5) $\beta$ 2,97 <i>d</i> (13,2) 5,44 <i>dl</i> (1,5)	31,5	1,90-1,70 (1H, <i>m</i> ), 3,10-2,90 (3H, <i>m</i> ), 5,49 (1H, <i>br s</i> ),	31,2
3	5,49 <i>sl</i>	124,3		124,5		124,2
4		140,7		143,1		140,6
5	2,87 <i>dl</i> (11,6)	49,6	2,81 <i>dl</i> (12,2)	50,0	2,87 (1H, <i>br d</i> , J ) 11,6),	49,6
6	3,02 <i>m</i>	36,8	2,90 <i>m</i>	37,2	3,10-2,90 (3H, <i>m</i> ),	36,8
7	a	163,5	2,97	163,6		163,5
8	4,55 <i>dl</i> (11,7)	79,3	4,54 <i>dl</i> (11,7)	79,4	4,55 (1H, <i>br d</i> , J ) 12,0)	79,3,
9	$\alpha$ 2,22 <i>tl</i> $\beta$ 2,62 <i>dd</i> (13,5; 3,6)	39,3	$\alpha$ 2,18 <i>dd</i> (12,7; 11,7) $\beta$ 2,55 <i>dl</i> (12,7)	39,7	2,23 (1H, <i>t</i> , J ) 12,8), 2,62 (1H, <i>dd</i> , J ) 3,6, 12,8),	39,6
10		122,7		122,9		122,7
11		121,3		121,6		121,3
12		174,3		174,1		174,3
13	1,85 <i>sl</i>	8,3	1,81 <i>sl</i>	8,3	1,84 (3H, <i>br s</i> )	8,2
14	1,79 <i>sl</i>	21,9	1,65 <i>sl</i>	21,9	1,78(6H, <i>br s</i> );	21,9
15	1,79 <i>sl</i>	14,9	1,75 <i>sl</i>	15,0	1,78(6H, <i>br s</i> );	14,9

<sup>a</sup> – sinais sobrepostos

### 5.2.2 Fração Diclorometano

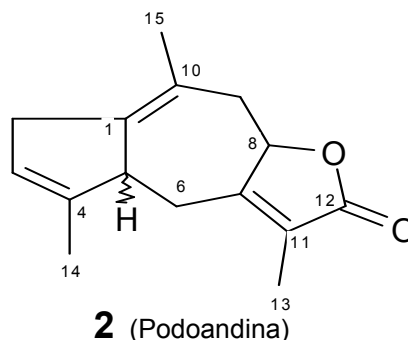
Conforme descrito para a fração hexano foi obtido por cristalização espontânea três substâncias denominadas DCM 18, DCM 46 e DCM 67 utilizando procedimentos cromatográficos em coluna com sistema *flash* (sílica 230-400 mesh). Em seguida foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , e os espectros obtidos comparados com dados de literatura. Um fluxograma das operações realizadas no processo de purificação encontra-se a seguir:

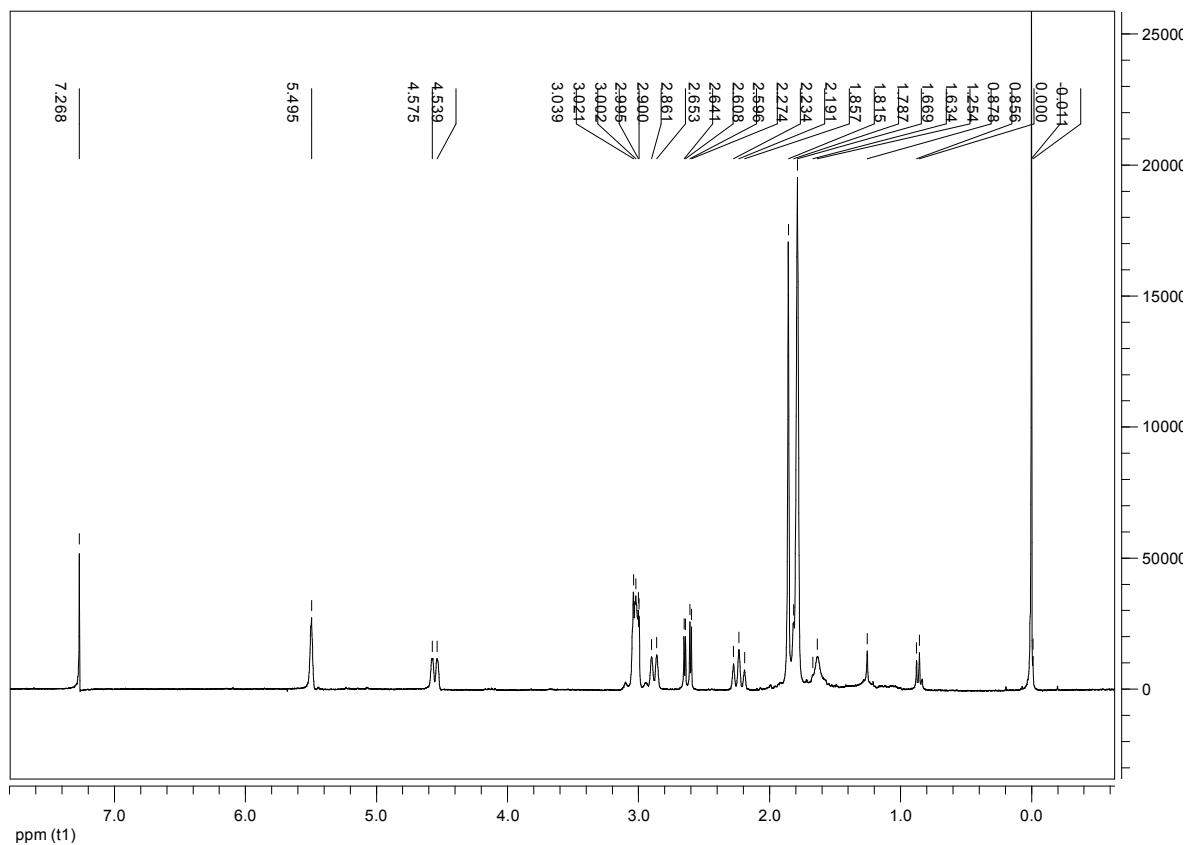


**Figura 11:** Fluxograma das etapas realizadas na purificação da fração DCM de *H. brasiliense*

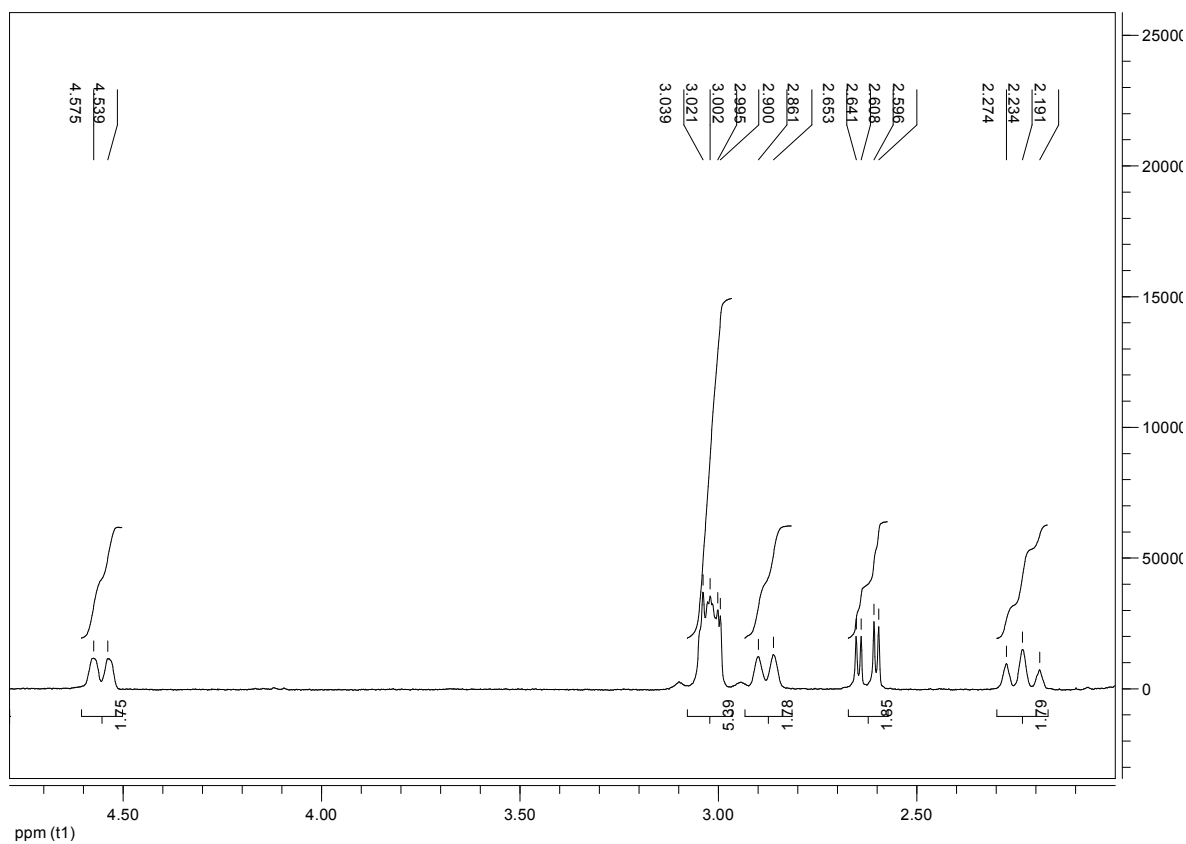
#### 5.2.2.1 Substância DCM 18 (Lactona sesquiterpênica)

Pela comparação dos dados espectrais (Figuras 12a-b) da substância **(3)** com os de H 29 evidenciou tratar-se da mesma isolada da fração Hexano.





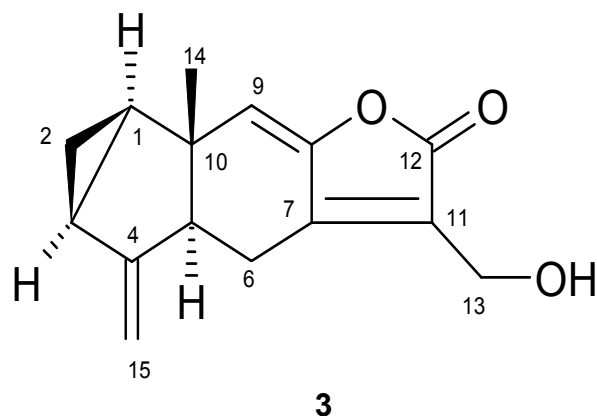
**Figura 12a:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Lactona Podoandina (DCM 18) ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Figura 12b:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da DCM 18 na região de 4,80 a 2,00 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

### 5.2.2.2 Substância DCM 46 (Lactona sesquiterpênica)

A substância DCM 46 foi obtida como um sólido cristalino (PF= 90-93 °C). Diferentemente de H 29 o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou simpletos em  $\delta$  6,41 (1H) e 5,06 (1H) e 4,80 (1H) que indicam a presença de hidrogênios em carbono  $\text{sp}^2$  referentes aos H-9, H-15a e H-15b respectivamente. Na região de  $\delta$  4,47 (2H) foi encontrado um hidrogênio ligado ao carbono que faz ligação com uma hidroxila, o qual se refere ao H-13 (Figura 13a) e nas regiões de  $\delta$  2,92 e 2,38 um duplete e um duplo-duplete referente respectivamente do H-6a e H-6b (Figura 13b). Além disso, seu espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , encontrado na figura 14, apresentou também um total de 15 sinais, caracterizando mais um provável sesquiterpeno. Os sinais  $\delta$  170,3 (C=O), 150,4 ( $\beta$ -C) e 124,3 ppm ( $\alpha$ -C) são típicos de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Sinais de carbonos olefínicos foram encontrados em  $\delta$  149,6, 149,3, 123,0, e 106,9 ppm. Com este perfil típico de lactona sesquiterpênica, seus dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram comparados aos da lactona descrita por Trentin e col. (1999) (Tabela 2), confirmando tratar-se de 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo ou 13-HDS (**3**), anteriormente isolado de *H. brasiliense*.



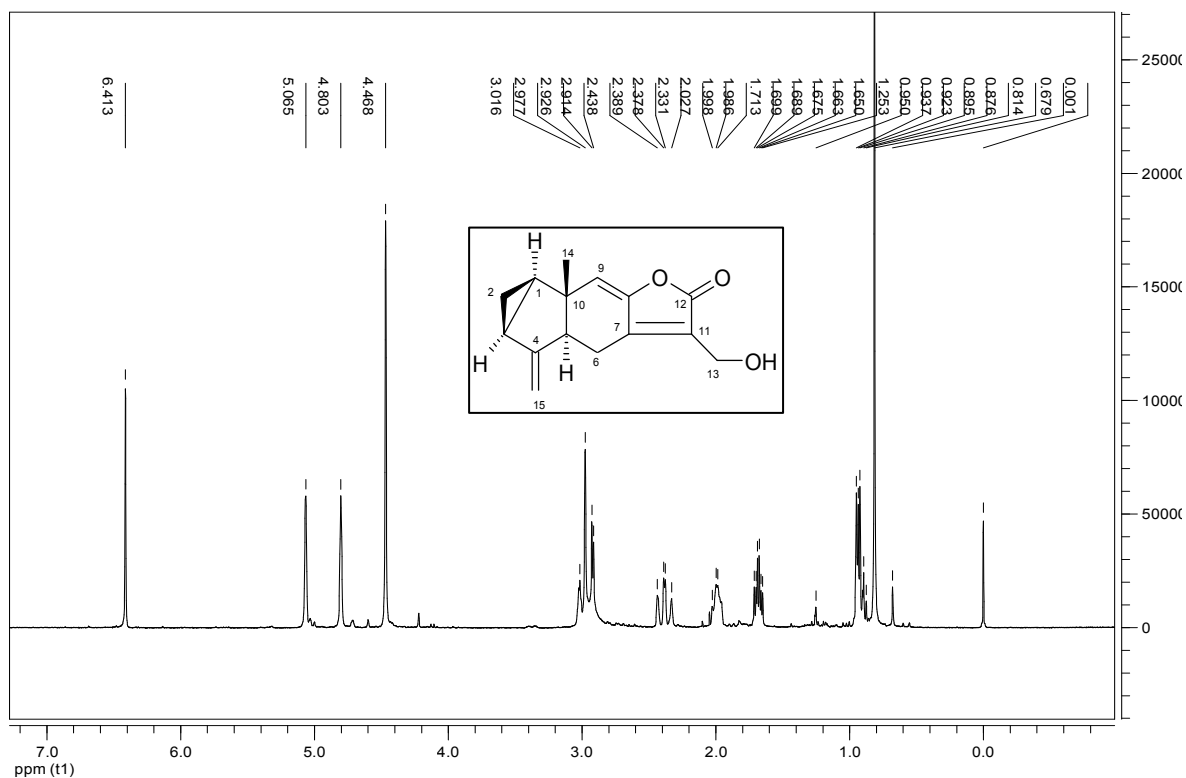


Figura 13a: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da DCM 46 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

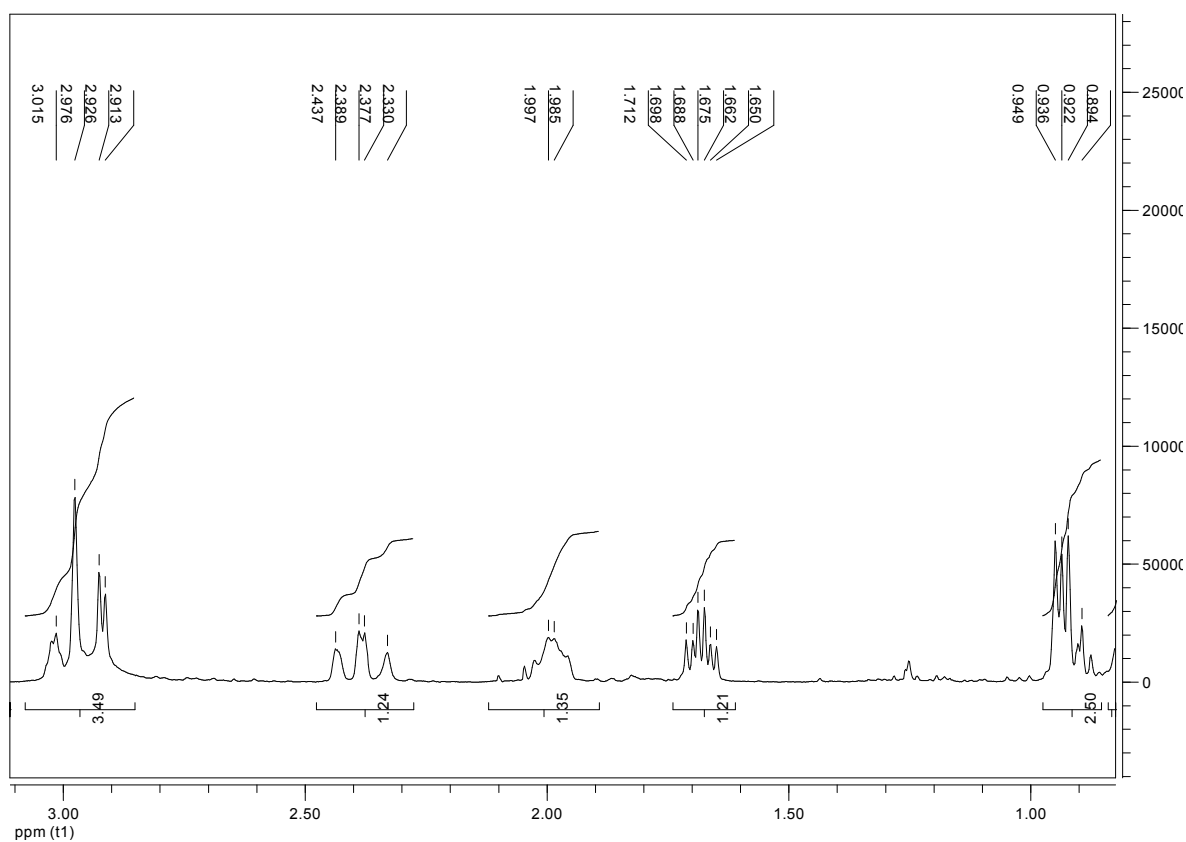


Figura 13b: Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de DCM 46 na região de 3,10 a 0,85 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

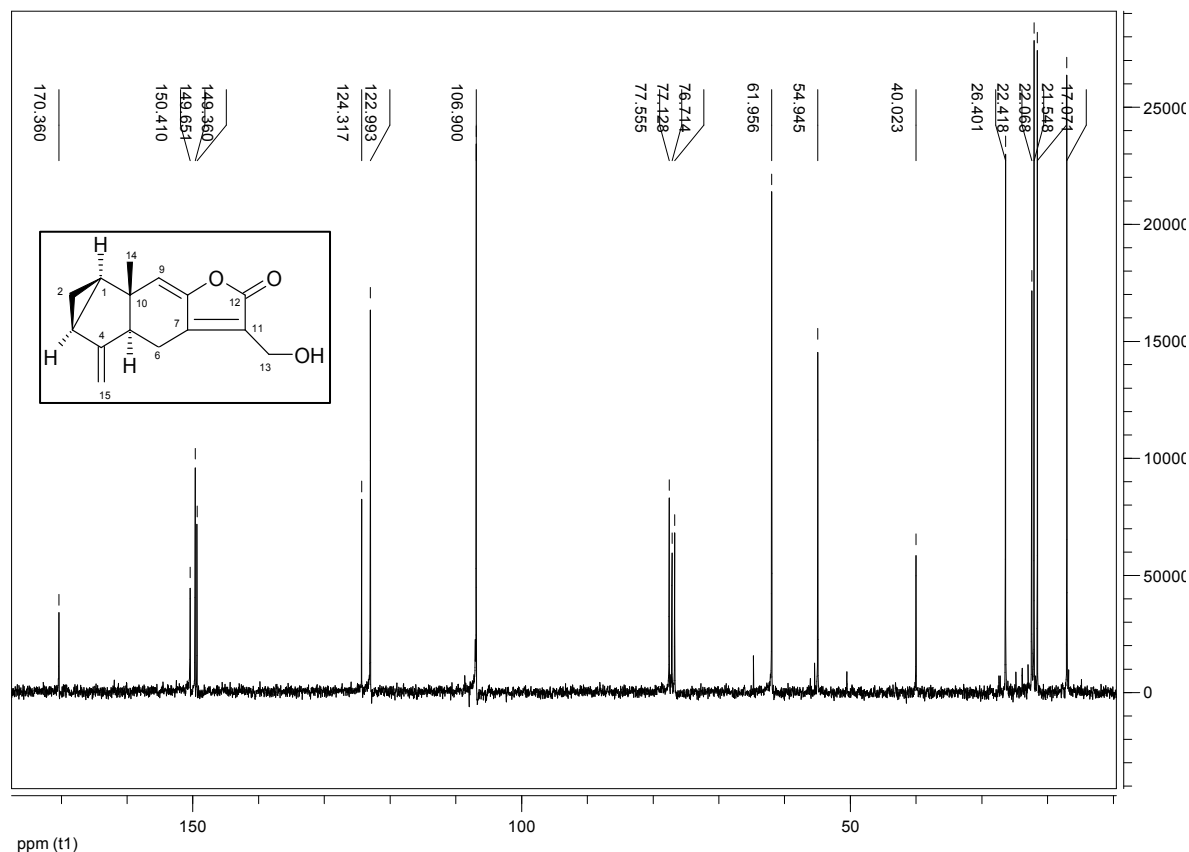


Figura 14: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da DCM 46 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz)

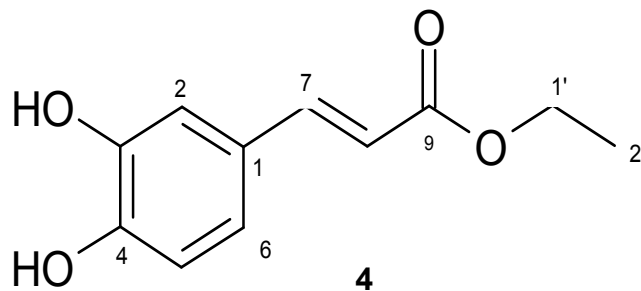
Tabela 2 – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da lactona DCM 46 (300 e 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) em comparação com a literatura.

Posição	DCM 46 (3)		13-HDS	
	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz) (GUEDES, 1997, 200 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$^{13}\text{C}$ (ppm) (TRENTIN et al., 1999, 50 MHz, $\text{CDCl}_3$ )
1	1,68 <i>ddd</i> (4,2; 3,6; 3,9)	26,4	1,68 <i>ddd</i> (6,95, 6,95, 4,5)	26,4
2	0,93 <i>m</i>	17,0	0,94 <i>m</i>	17,0
3	1,98 <i>m</i>	22,4	1,94 <i>ddl</i>	22,4
4		149,6		149,6
5	3,01 <i>m</i>	61,9	3,00 <i>m</i>	61,9
6	2,92 <i>d</i> (3,5) 2,38 <i>dd</i> (17,7; 14,1)	21,5	2,95 2,37	21,5
7		150,4		150,0
8		149,3		149,3
9	6,41 <i>s</i>	123,0	6,42 <i>s</i>	123,0
10		40,0		40,0
11		124,3		124,2
12		170,4		170,2
13	4,47 <i>s</i>	54,9	4,48 <i>s</i>	55,1
14	0,81 <i>s</i>	22,0	0,81 <i>s</i>	22,0
15	5,06 <i>s</i> , 4,80 <i>s</i>	106,9	5,08 <i>s</i> , 4,80 <i>s</i>	106,8

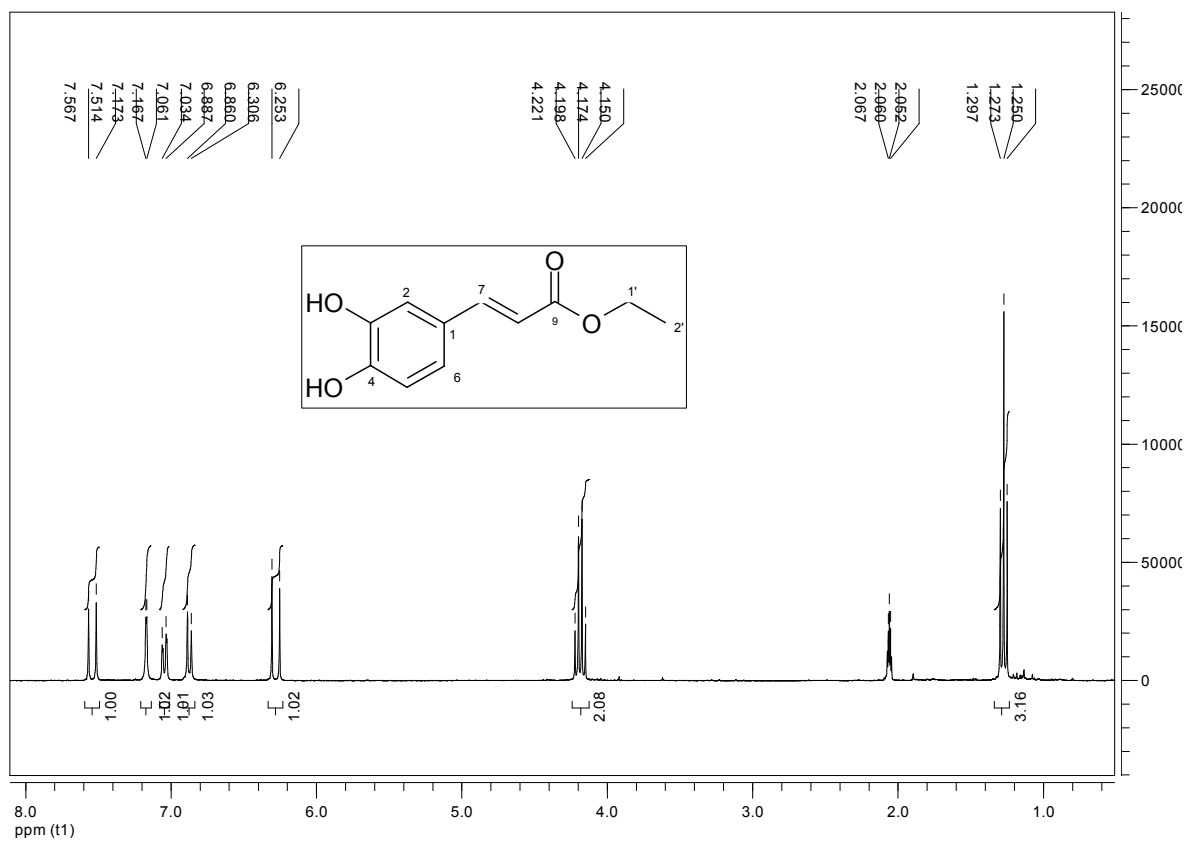
### 5.2.2.3 Substância DCM 65 (Cafeato de etila)

A substância DCM 65 apresentou cristais incolores e sinais característicos de substância fenólica, sendo evidente os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  referentes a uma dupla ligação *trans* em  $\delta$  7,54 ppm (1H,  $J = 16$  Hz) e 6,28 ppm (1H,  $J = 16$  Hz), os quais são mostrados na figura 15a. O anel aromático encontra-se tri-substituído, contando com três hidrogênios distintos: em  $\delta$  7,16 ppm ( $d$ ,  $J=1,4$  Hz), 7,05 ppm ( $dd$ ,  $J = 8,4$  e 1,4 Hz) e 6,87 ppm ( $d$ ,  $J = 8,4$  Hz) (Figura 15b). A presença de um quarteto em  $\delta$  4,18 ppm (2H,  $J = 7,0$  Hz) e tripleto em  $\delta$  1,27 ppm (3H,  $J = 7,0$  Hz) caracterizam a presença de um etoti na molécula (Figura 15c). Na figura 16, onde está o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , evidencia-se a presença de carbonila de éster ( $\delta$  167,4 ppm), dois carbonos aromáticos hidroxilados ( $\delta$  148,8 e 146,4 ppm), três carbonos aromáticos hidrogenados ( $\delta$  116,4, 115,7, 115,2 ppm), dois carbonos olefínicos ( $\delta$  127,6, 122,5 ppm), e os carbonos referentes ao radical etila ( $\delta$  60,5 e 14,7 ppm). A análise conjunta dos dados espectroscópicos conduziu a identificação de um éster etílico do ácido cafeico, cafeato de etila (**4**), provável artefato formado no momento da extração com etanol. Para certificarmos desta confirmação a substância DCM 65 foi comparada com os dados espectrais do éster de ácido cafeico isolado por SU et al. (2008b) descrito na literatura, conforme mostrado na tabela 3.

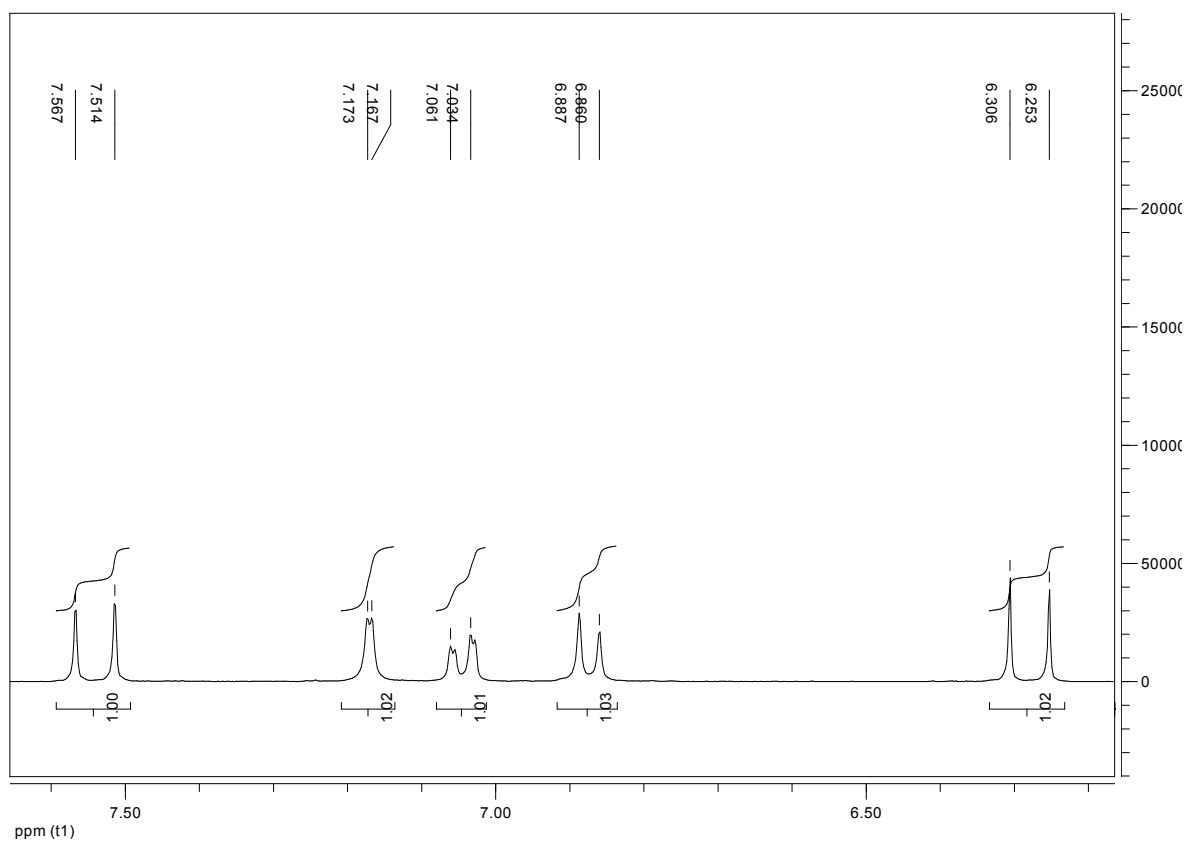
O correspondente ácido cafeico é um fenólico de ocorrência ampla, com reconhecida atividade antioxidante. O cafeato de etila (1  $\mu\text{M}$ ) protegeu a LDL da oxidação, sendo mais ativo que o próprio ácido cafeico (5  $\mu\text{M}$ ) (CHALAS et al., 2001). Também demonstrou potente atividade antiinflamatória, pela atenuação da ativação do fator NF- $\kappa\text{B}$ , e pela supressão das suas proteínas regulatórias (CHIANG et al., 2005).



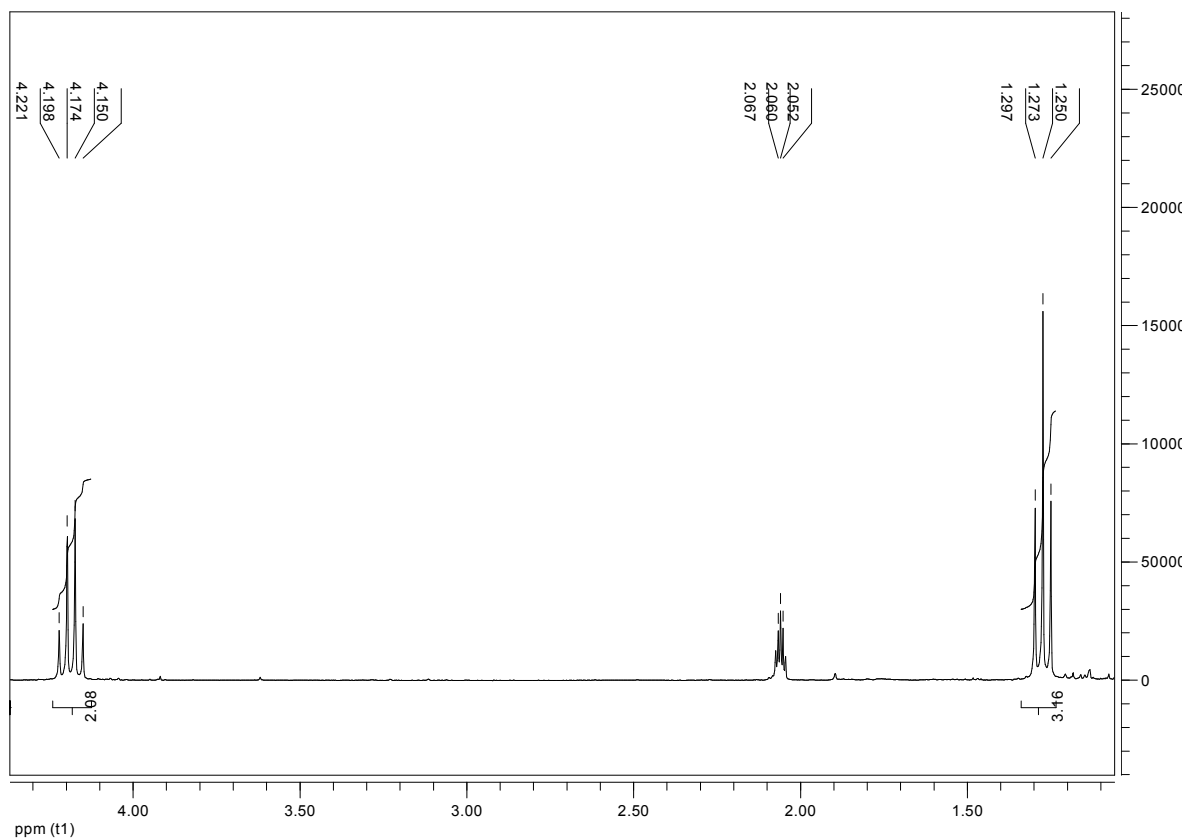




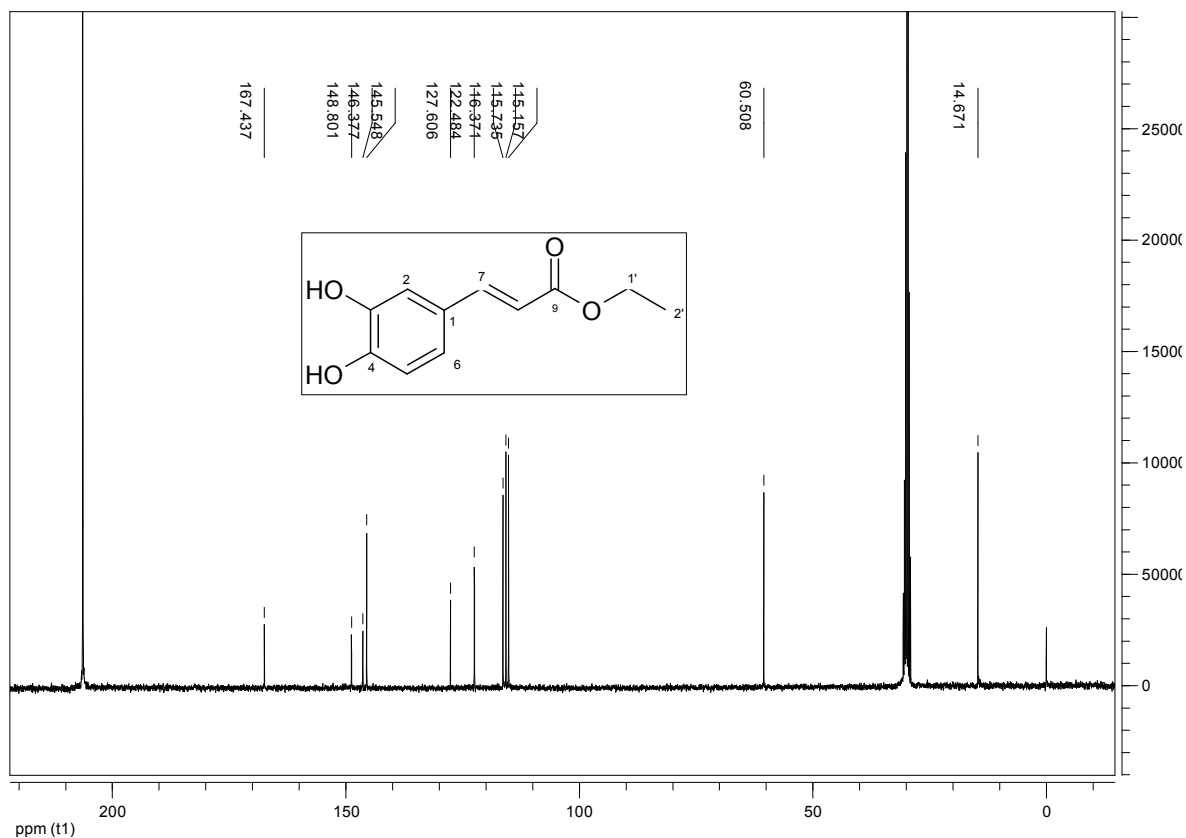
**Figura 15a:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da DCM 65 (acetona- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 15b:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da DCM 65 na região de 7,65 a 6,18 ppm (acetona- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 15c:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da DCM 65 na região de 4,35 a 1,18 ppm (acetona- $d_6$ , 300 MHz).



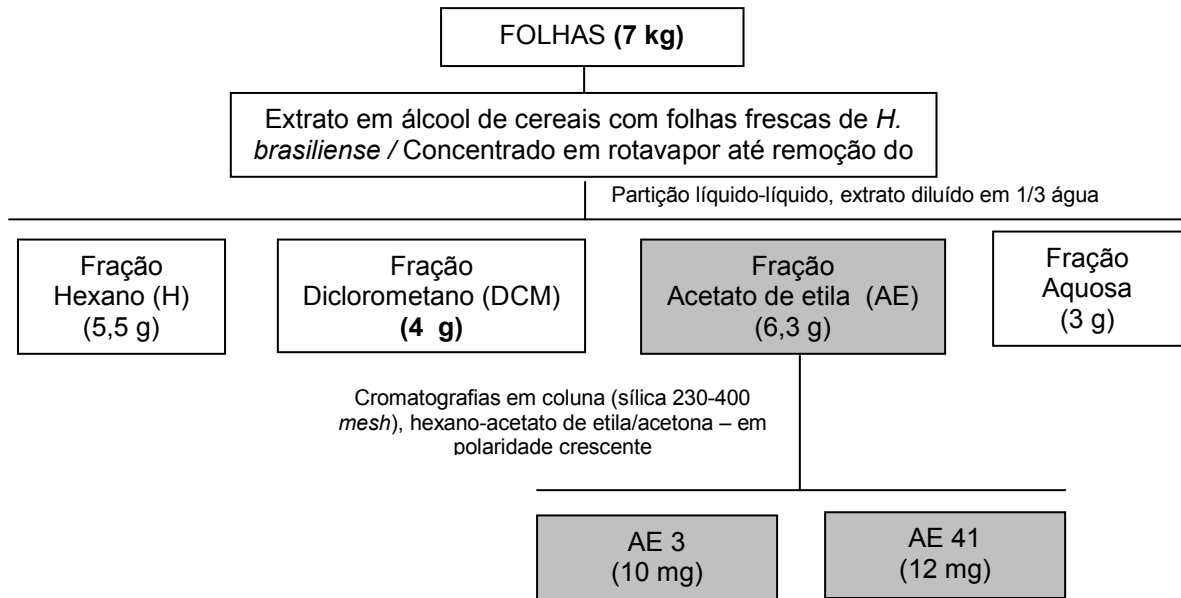
**Figura 16:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da DCM 65 (acetona- $d_6$ , 75 MHz).

**Tabela 3** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do cafeato de etila DCM 65 (300 e 75 MHz, acetona- $d_6$ ) em comparação com a literatura.

Posição	DCM 65 (4)		Cafeato de etila (SU et al., 2008b, 500 e 125 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	
	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm),	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1		127,6		127,6
2	7,16 <i>d</i> (1,4)	115,2	7,48 (s, 1H)	115,1 (d)
3		146,4		146,6 (s)
4		148,8		149,4 (s)
5	6,87 <i>d</i> (8,4)	116,4	6,79 ( <i>d</i> , 1H, $J = 8,0$ Hz)	116,4 (d)
6	7,05 <i>dd</i> (8,4 e 1,4)	122,5	6,94 ( <i>d</i> , 1H, $J = 8,0$ Hz)	122,8 (d)
7	7,54 <i>d</i> (16,0)	145,5	7,60 ( <i>d</i> , 1H, $J = 15,0$ Hz)	146,8 (d)
8	6,28 <i>d</i> (16,0)	115,7	6,25 ( <i>d</i> , 1H, $J = 15,0$ Hz)	115,2 (d)
9		167,4		169,2 (s)
1'	4,18 <i>q</i> (7,0)	60,5		-
2'	1,27 <i>t</i> (7,0)	14,7		-

### 5.2.3 Fração acetato de etila

Conforme descrito para as frações anteriores e observando a figura 17 foram realizados procedimentos cromatográficos em coluna com sistema *flash* (sílica 230-400 mesh) para a purificação da fração acetato de etila. Da mesma forma, houve cristalização espontânea em alguns frascos após evaporação do solvente. As subfrações denominadas AE 3 e AE 41 foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparados com dados de literatura. A AE 3 foi identificada como o aldeído protocatéquico. Já a subfração AE 41 os dados supõem uma provável lactona sesquiterpênica.

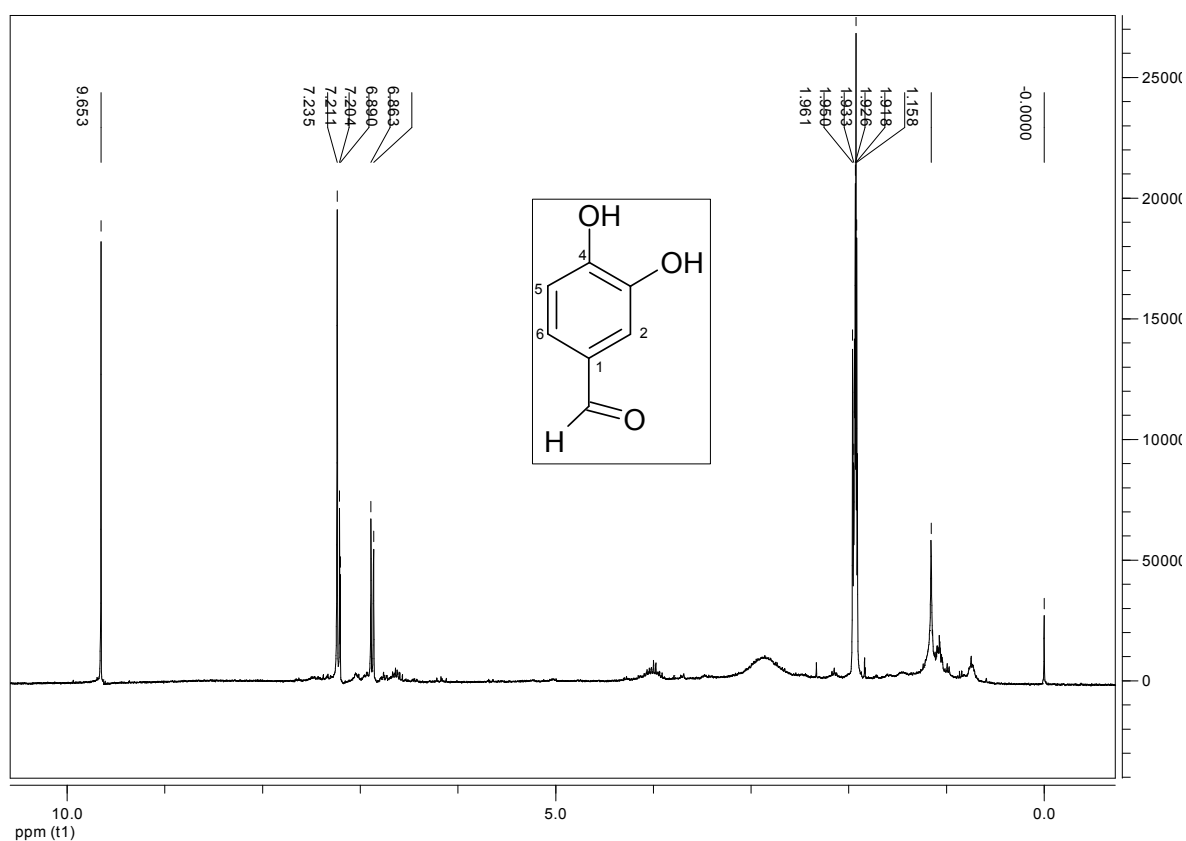


**Figura 17:** Etapas de purificação da fração AE de *H. brasiliense*

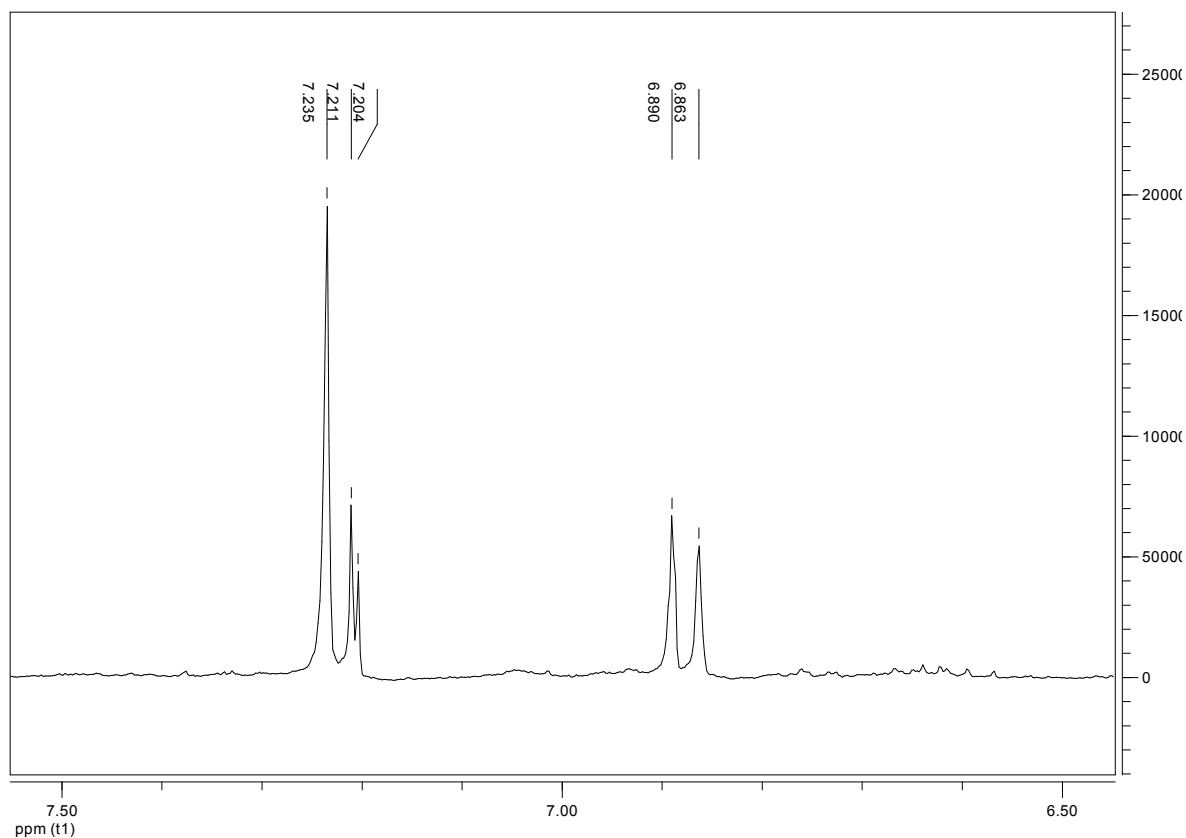
### 5.2.3.1 Substância AE 3 (Aldeído protocatéquico)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 18a-b) apresentou sinais de uma substância aromática simples, tri-substituída, com um sinal complexo em  $\delta$  7,23 (1H) ppm e  $\delta$  7,22 ppm (1H,  $J=8,2$  e  $2,2$  Hz) e um duplete em  $\delta$  6,87 ppm (1H,  $J=8,1$  Hz). Além disso apresenta um simpleto em  $\delta$  9,65 ppm (1H), característico de hidrogênio de aldeído. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 19) apresentou seis sinais aromáticos, três carbonos aromáticos substituídos em  $\delta$  152,4, 146,5 e 131,0 ppm e mais três carbonos aromáticos hidrogenados em  $\delta$  125,5, 116,2 e 115,2 ppm. E um sinal em  $\delta$  191,2 ppm de carbonila de aldeído. A análise conjunta dos dados apontou para duas possibilidades: 3,4-diidroxibenzaldeído ou 3,4-diidroxibenzaldeído. Após simulação dos espectros destas duas substâncias e comparação com base de dados espectrais (SDBS, 2008), o qual é observado na tabela 4, foi possível confirmar que a substância AE 3 é o 3,4-diidroxibenzaldeído, produto natural mais

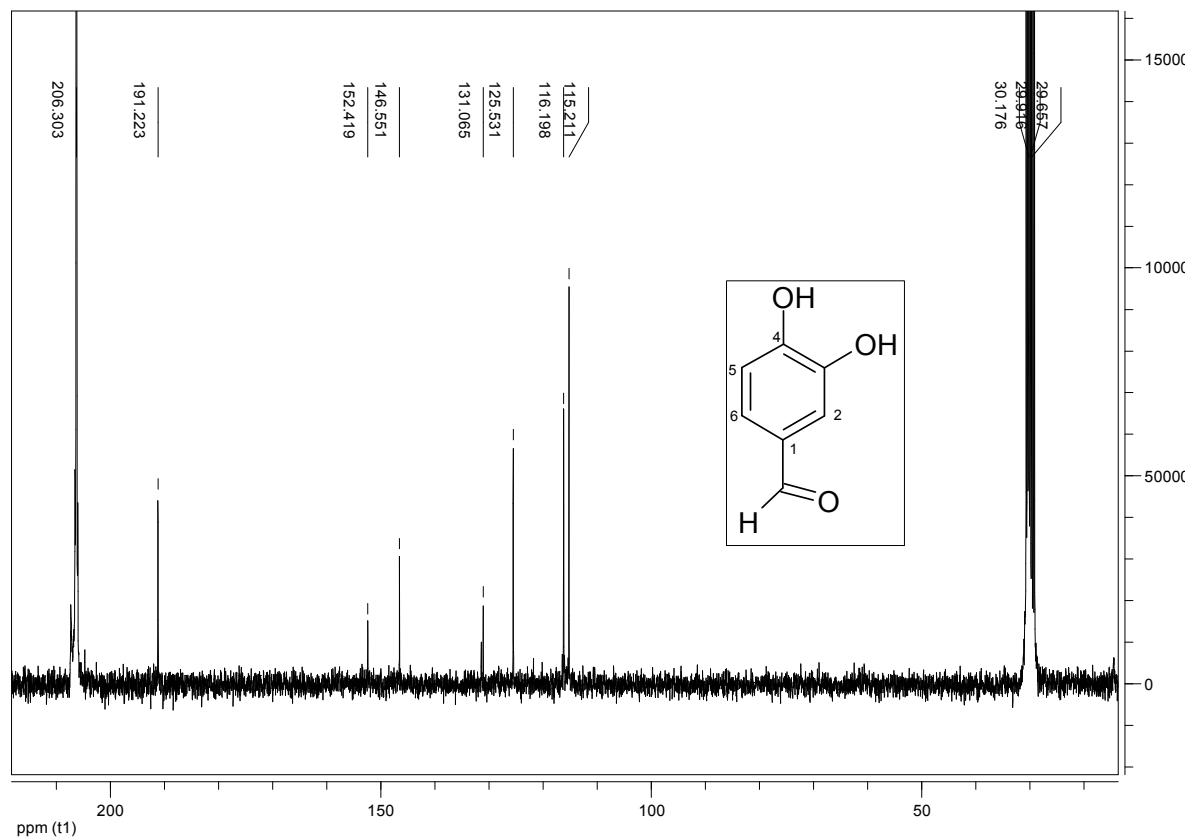
conhecido como aldeído protocatéquico (**5**). Esta substância tem demonstrado uma série de efeitos biológicos de interesse, como: inibidor de mecanismos proateroscleróticos (ZHOU et al., 2005), inibidor da replicação do vírus da hepatite B (ZHOU et al., 2007), redutor da glucose sanguínea e inibidor da catarata (KIM et al., 2007). É descrito como um dos produtos da oxidação do ácido cafeico e um importante fator para a formação de polímeros e pigmentos em vinhos brancos (LUTTER et al., 2007).



**Figura 18a:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da AE 3 (acetona-d<sub>6</sub>, 300 MHz).



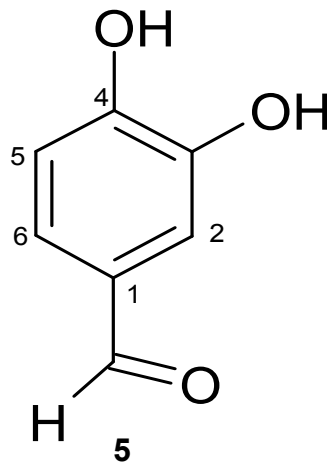
**Figura 18b:** Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da AE 3 na região de 7,55 a 6,45 ppm (acetona- $d_6$ , 300 MHz).



**Figura 19:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da AE 3 (acetona- $d_6$ , 75 MHz).

**Tabela 4** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do aldeído protocatéutico AE 3 (300 e 75 MHz, acetona- $d_6$ ) em comparação com a literatura.

Posição	AE 3 (5)		Aldeído protocatéutico (SDBS, 2008, 400 e 125 MHz, DMSO- $d_6$ )	
	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm),	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	131,00	-	129,02
2	7,23	116,20	7,28 s	115,62
3	-	146,50	-	145,95
4	-	152,40	-	152,17
5	6,87 <i>d</i> (8,1)	115,20	6,95 <i>d</i> (8,0)	114,52
6	7,22 (8,2 e 2,2)	125,50	7,30 <i>dd</i> (8,0 e 2,0)	124,56
7	9,65 s	191,20	9,73 s	191,02



### 5.2.3.2 Substância AE 41 (Nova lactona sesquiterpênica)

A substância AE 41 foi obtida como um sólido cristalino. Seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , que se encontra na figura 20a, apresentou simpletos em  $\delta$  1,63 e 1,93 ppm que indica a possível presença de metilas (figura 20d). Em  $\delta$  4,40 ppm é observado um duplo-duplete, com uma constante de acoplamento de  $J = 1,8$  e  $0,9$  Hz, indicando uma possível ligação de um hidrogênio ligado a um carbono

carbinólico (C2) (Figura 20b). Além desse foi encontrado em  $\delta$  2,76 e 3,07 ppm dois duplo-dupletes em região típica de hidrogênios ligados a carbonos desblindados (Figura 20c). Na figura 21 está o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  que também apresentou um total de 15 sinais caracterizando mais um provável sesquiterpeno. Os sinais  $\delta$  173,9 (carbonila), 161,0 ( $\beta$ -C) e 122,3 ( $\alpha$ -C) são típicos de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Possíveis sinais de carbonos olefínicos foram encontrados em  $\delta$  149,4 e 127,3 e em  $\delta$  74,5 um carbono  $\text{sp}^3$  ligado a uma hidroxila. A tabela 5 elucida melhor os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  com suas respectivas posições.

**Tabela 5** – Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da substância AE 41 (300 e 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posição	AE 41 (6)	
	$^1\text{H}$ (ppm), $J$ (Hz)	$^{13}\text{C}$ (ppm),
1	-	59,6
2	4,40 <i>dd</i> (1,8 e 0,9)	79,9
3	5,79 <i>sl</i>	127,3
4	-	149,4
5	2,16 <i>m</i>	50,2
6	2,28 <i>m</i>	30,7
	3,07 <i>dd</i> (10,5 e 1,5)	
7	-	161,0
8	4,86 <i>dl</i> (9,6)	79,0
9	1,59 <i>m</i>	42,1
	2,76 <i>dd</i> (9,9 e 2,1)	
10	-	74,5
11	-	122,3
12	-	173,9
13	1,84 <i>t</i> (0,9)	8,3
14	1,63 <i>s</i>	20,7
15	1,93 <i>s</i>	15,6

Com a correlação HMQC e a HMBC, encontrados respectivamente nas figuras 22 e 23, foi possível observar a correlação entre hidrogênios e carbonos, que ajudou a identificar as vizinhanças e conseqüentemente suas posições dentro na estrutura química. O hidrogênio em  $\delta$  4,40 ppm, o qual foi discutido anteriormente, apresentou correlação HMBC com  $\delta$  149,5 (C4), 74,5 (C10), 50,2 (C5) e 127,3 ppm



(C3). No quadro a seguir, e também na figura 26, estão mais bem representadas as correlações entre o hidrogênio e carbono:

**Quadro 1** – Quadro de correlação HMBC da proposta AE 41.

	H2	H3	H5	H6	H8	H9	H13	H14	H15
<b>C1</b>						X		X	
<b>C2</b>		X	X						
<b>C3</b>	X		X						X
<b>C4</b>	X	X	X	X					X
<b>C5</b>	X	X		X					X
<b>C6</b>			X						
<b>C7</b>			X	X	X	X	X		
<b>C8</b>				X		X			
<b>C9</b>								X	
<b>C10</b>	X	X	X	X		X		X	
<b>C11</b>				X			X		
<b>C12</b>							X		
<b>C13</b>									
<b>C14</b>						X			
<b>C15</b>		X							

Nas figuras 23 e 24 encontra-se o espectro de massas obtido por inserção direta (eletronspray modo positivo) que indica íon de intensidade 100% (pico base) em  $m/z$  263 e apresenta fragmentos intensos em  $m/z$  245,  $m/z$  227,  $m/z$  199,  $m/z$  171,  $m/z$  156 e  $m/z$  142. No mesmo espectro possui picos relacionados a perda de  $H_2O$  (-18 Da) em  $m/z$  245 e 227 formado respectivamente a partir de  $m/z$  263 e 245.

Os íons  $m/z$  199 e  $m/z$  171 provavelmente são formados pela perda de acetileno ou CO (-28 Da) a partir de  $m/z$  227 e  $m/z$  199. O íon  $m/z$  156 pode ser formado pela perda de metil (-15 Da) a partir de  $m/z$  171 e o íon  $m/z$  142 pela perda de metileno (-14 Da) a partir de  $m/z$  156.

O valor da rotação óptica observada para esta substância foi de  $[\alpha]_{20}^D = -5,6$  na concentração de  $0,198 \cdot 10^{-2} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . E seu nome químico é [7,7a-b]oxiren-8-hidroxi-3,5,8-trimetil-4a,8,9,9a-tetrahidroazuleno[6,5-b]furan-2(4H)-ona.

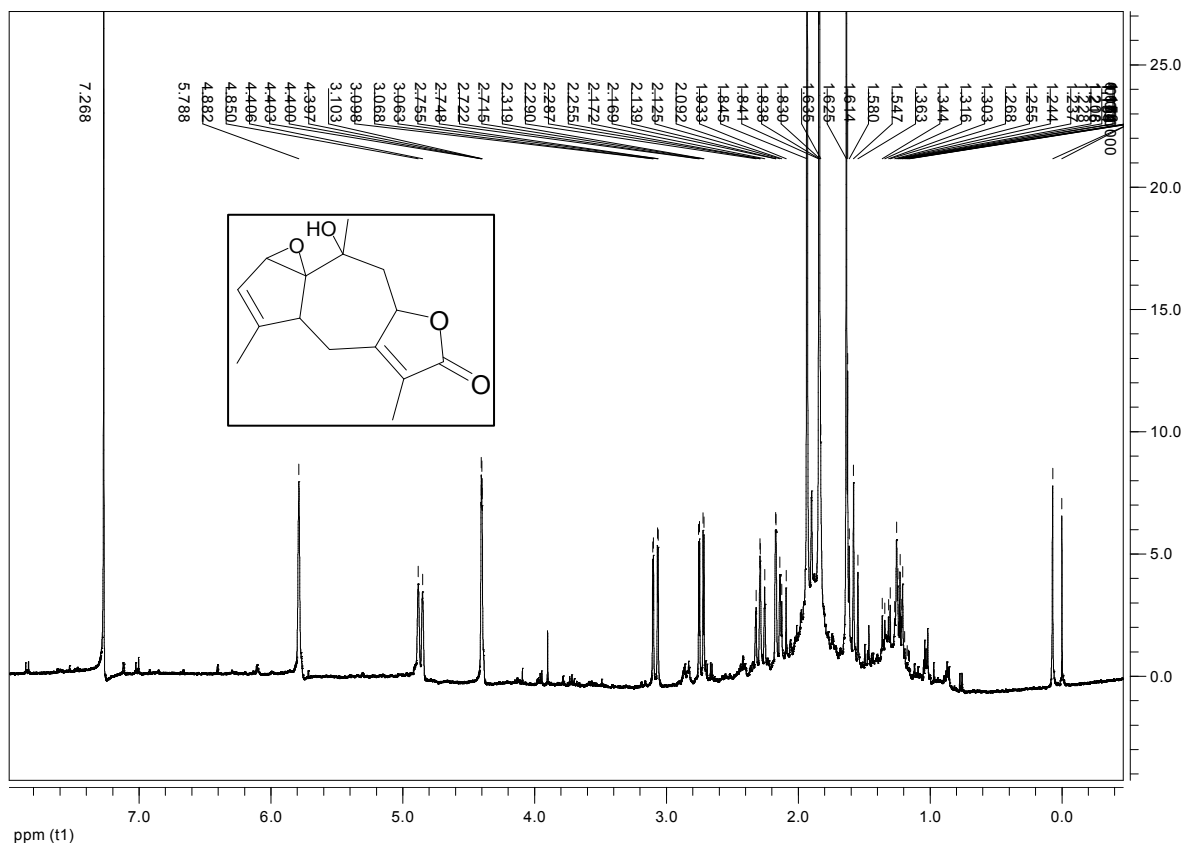


Figura 20a: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

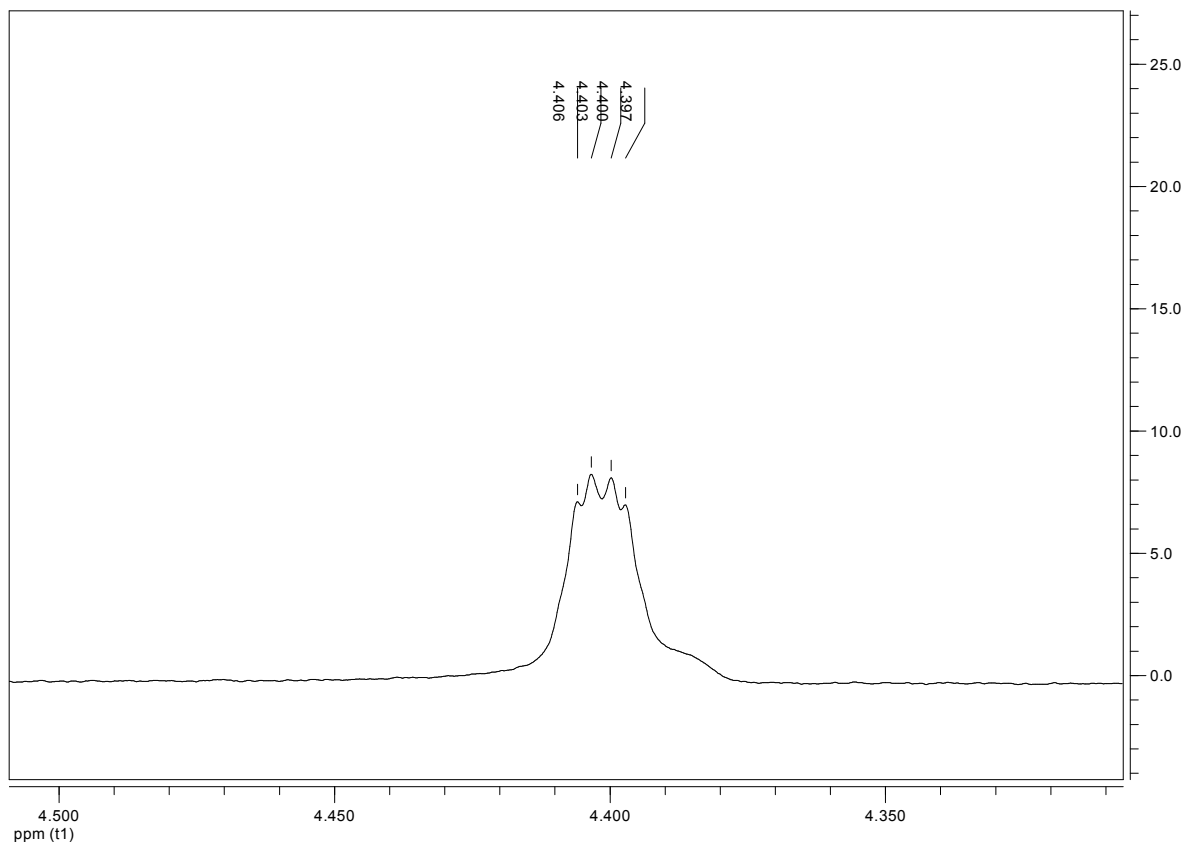
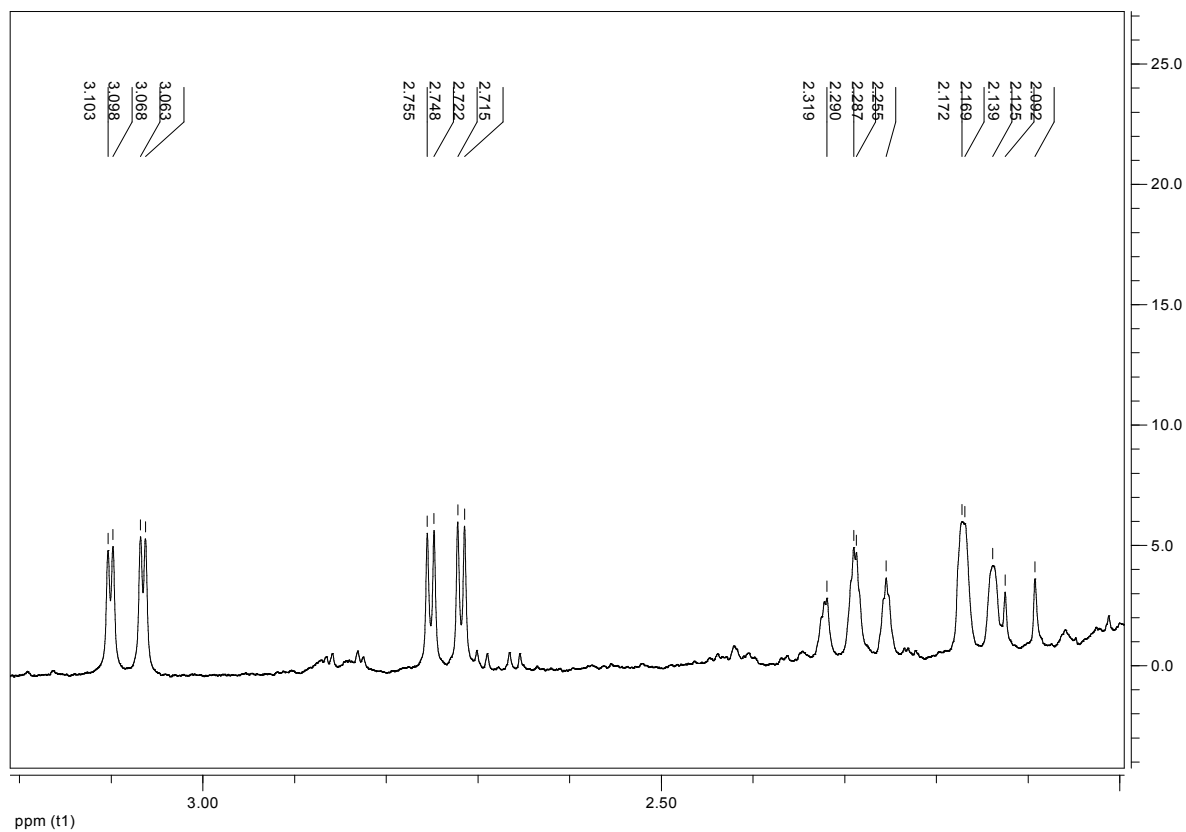
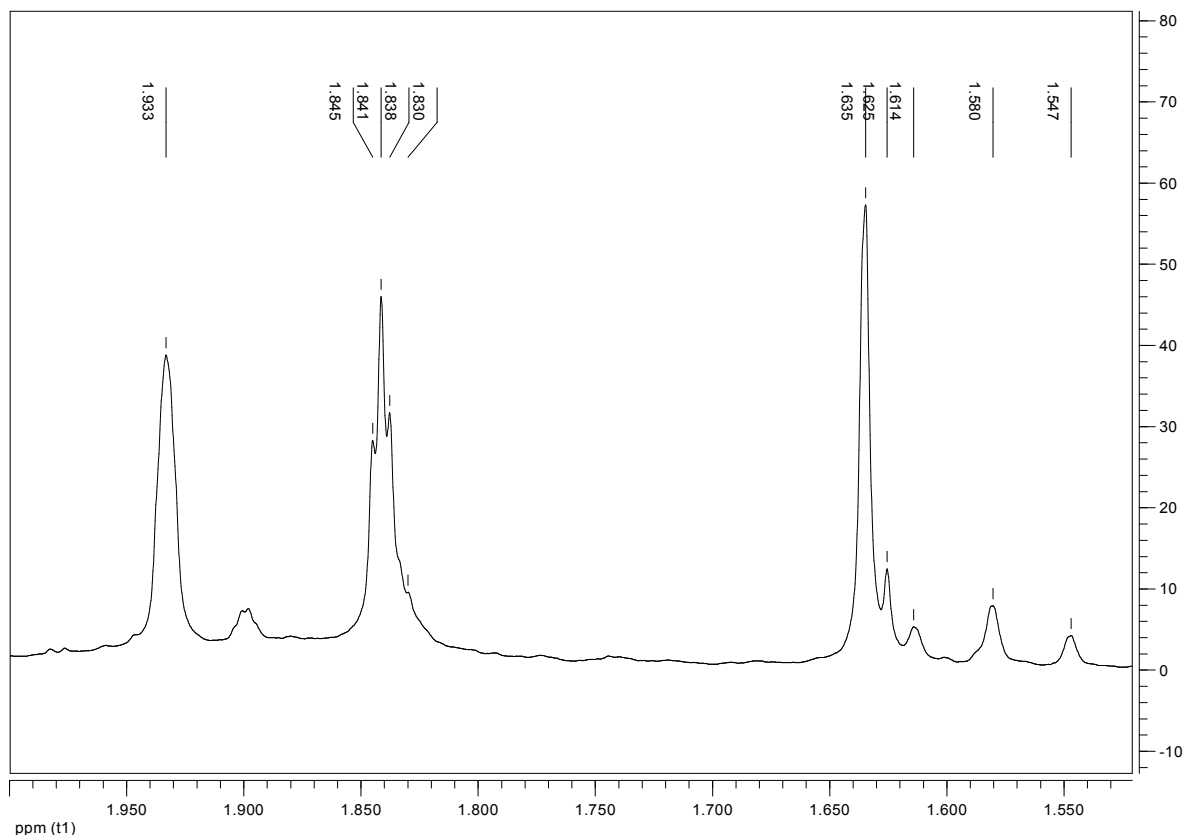


Figura 20b: Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AE 41 na região de 4,51 a 4,31 ppm ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Figura 20c:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de AE 41 na região de 3,20 a 2,0 ppm (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz).



**Figura 20d:** Expansão do espectro de RMN de <sup>1</sup>H de AE 41 na região de 2,0 a 1,52 ppm (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz)..

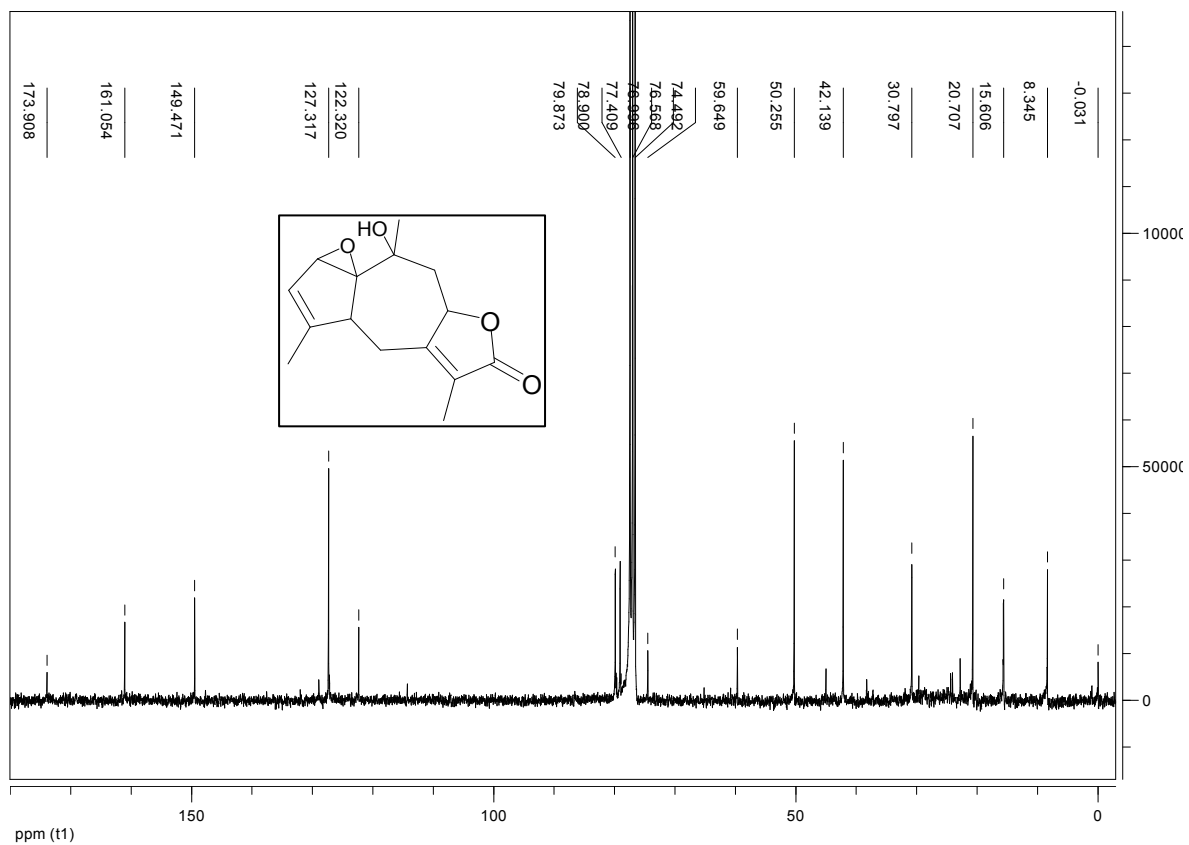


Figura 21: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

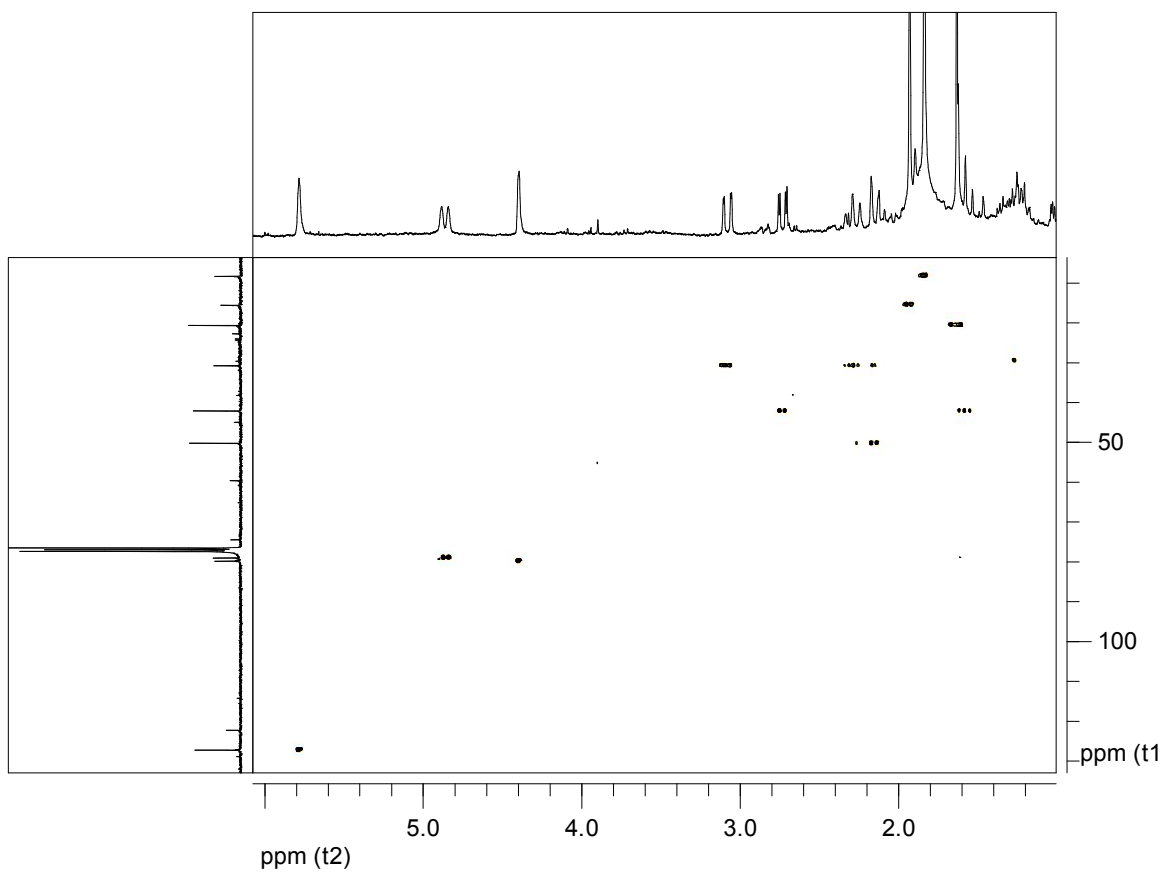
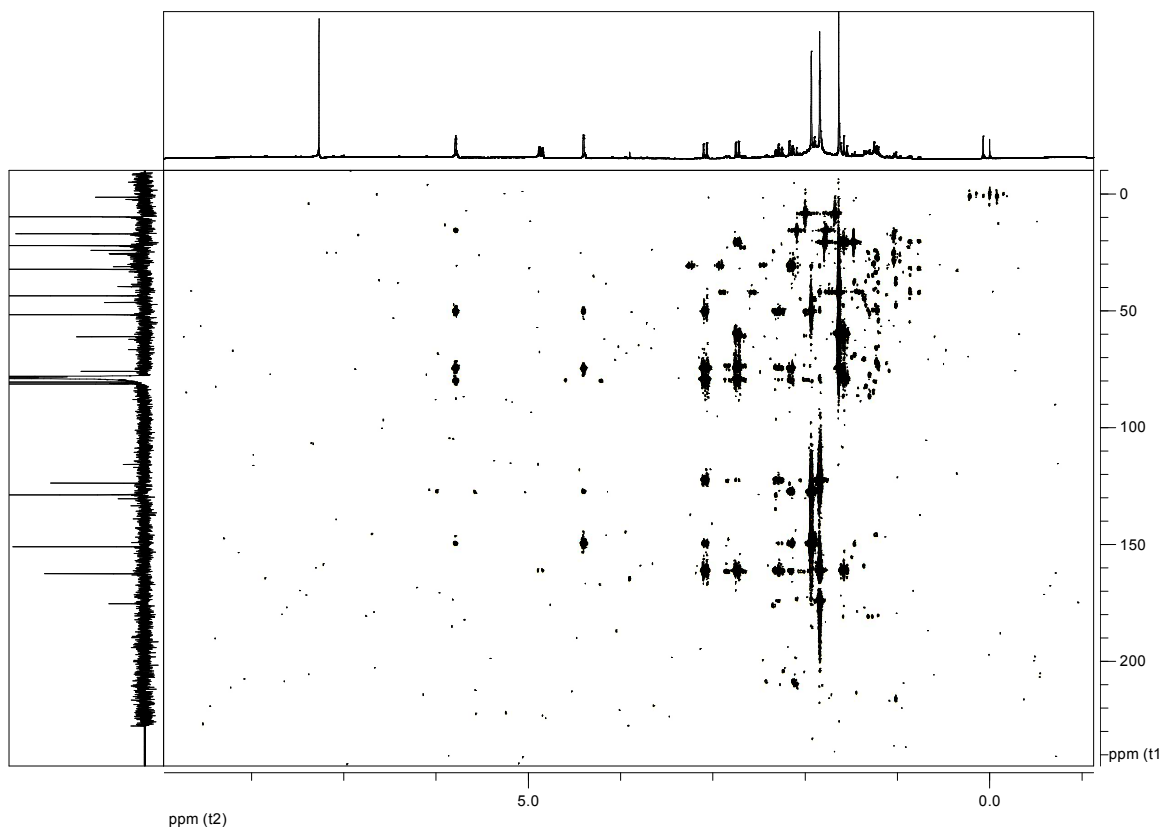
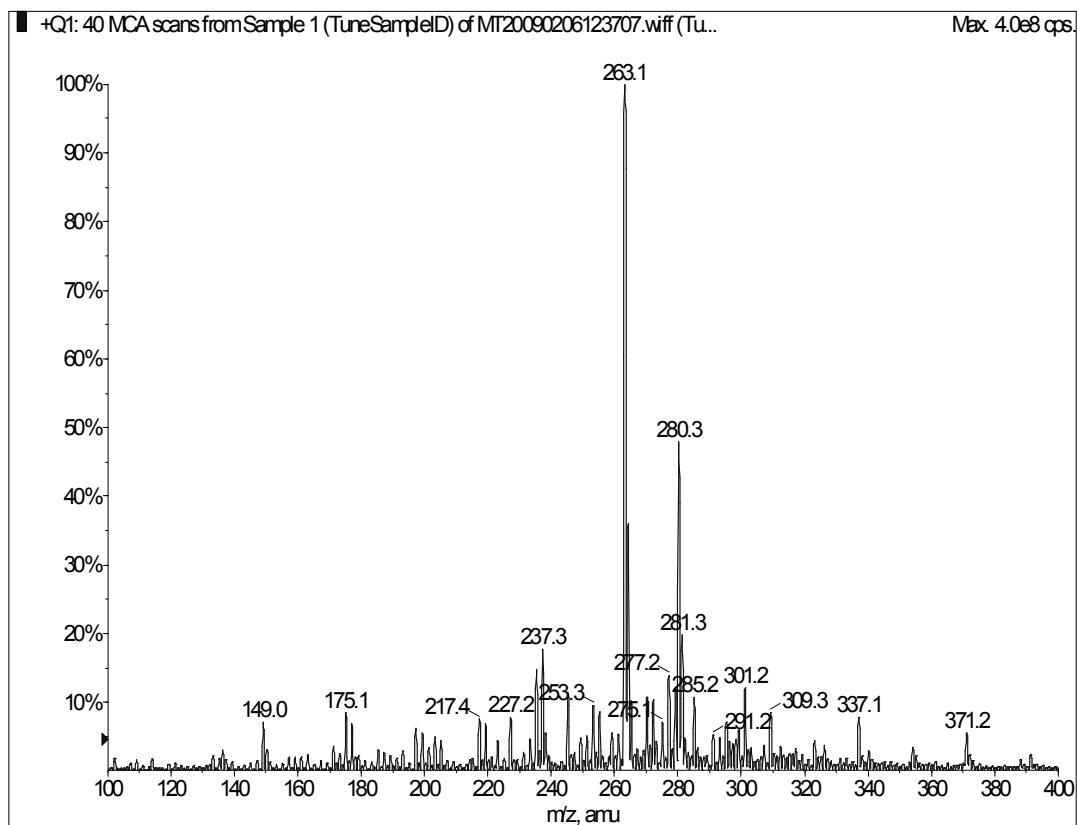


Figura 22 – Espectro de correlação HMQC de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 200 MHz).



**Figura 23** – Espectro de correlação HMBC de AE 41 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Figura 24** – Espectro de massas de AE 41 – full scan.

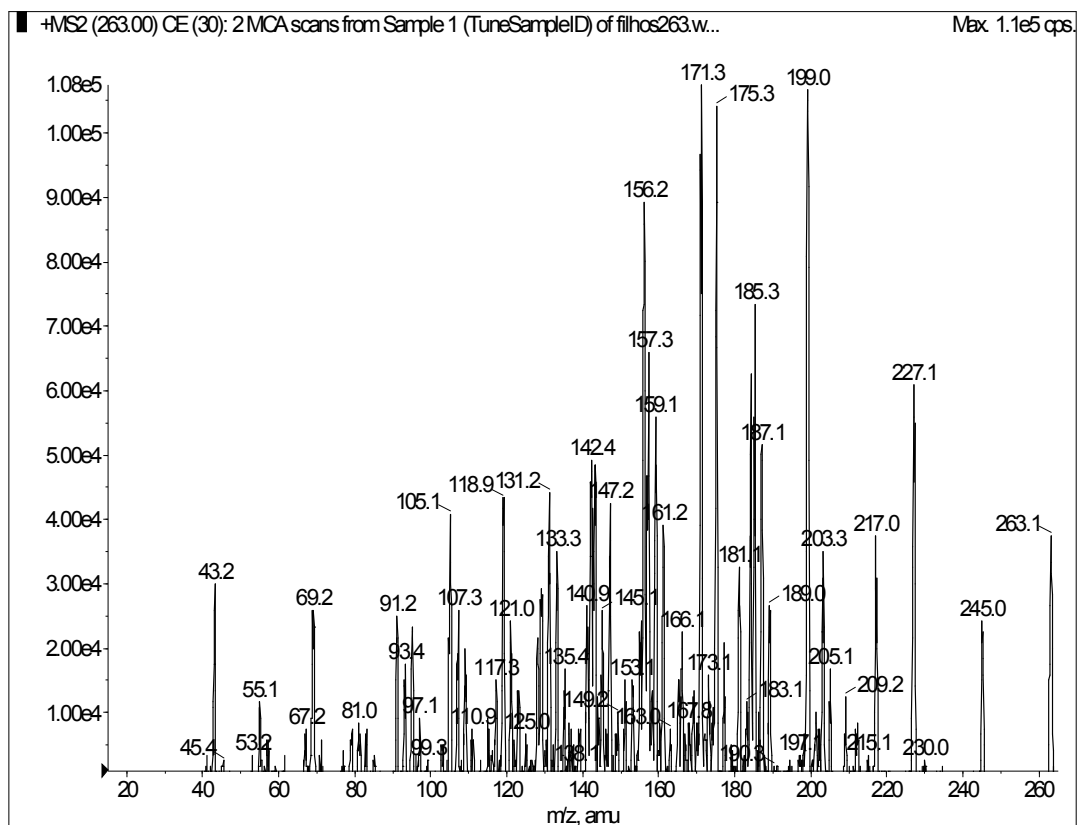


Figura 25 – Espectro de massas de AE 41 – íons filhos (m/z 263).

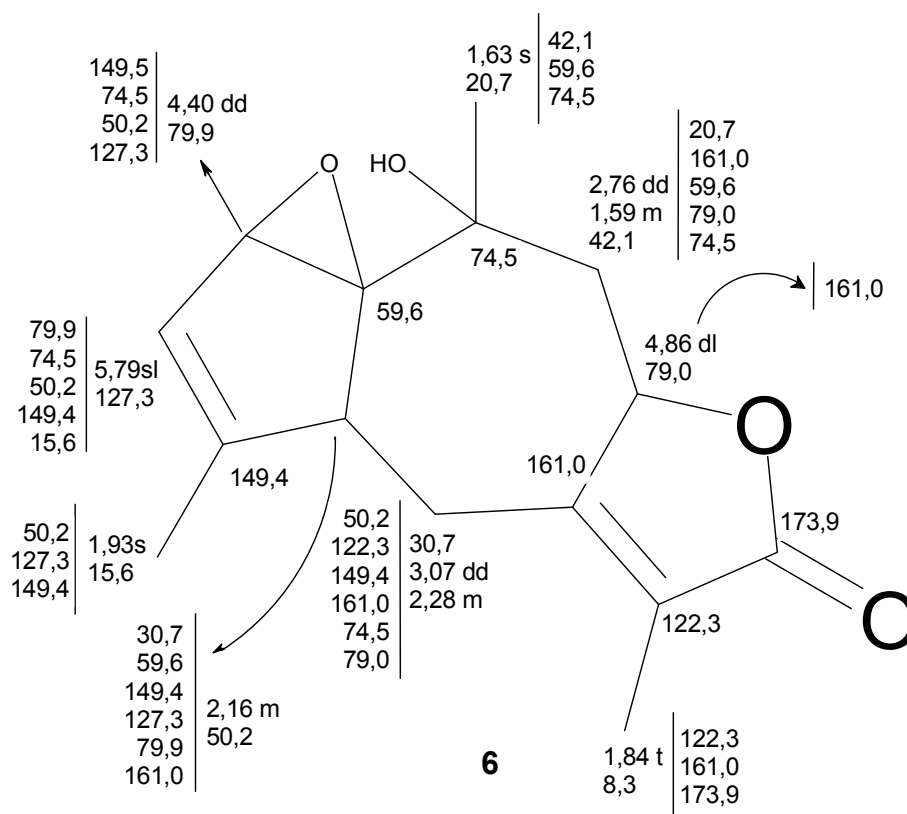


Figura 26 – Estrutura química da substância AE 41 com suas correlações entre H e C.

A cristalização espontânea destas substâncias durante o processo de fracionamento fitoquímico, desenvolvido neste trabalho, pode estar relacionada com alta quantidade das mesmas no tecido vegetal, temperatura e polaridade da solução extratora (GONÇALVES, D. et al. 1988), sendo bastante provável o seu envolvimento na atividade biológica do extrato, segundo o conhecimento popular.

A presença de ácido cafeico e de seu produto de oxidação, aldeído protocatéquico, duas substâncias com alto poder antioxidante, pode justificar parcialmente o uso do chá das folhas de *H. brasiliense* como substituto do chá-verde.

O aroma agradável de cidreira facilmente é associado com o uso popular da erva-cidreira (*Melissa officinalis*), do capim-limão (*Cymbopogon citratus*), ou da cidreira-verbena (*Aloysia tryphylla*) como calmantes. Entretanto, não pode ser justificado por uma analogia com a composição de voláteis destas espécies, sendo que estas apresentam um predomínio de componentes como neral, citronelal, geranial e linalol (PENGETLY, 2004), que de acordo com Kirchner e Marquetti (2008) não foram encontrados em *H. brasiliense*.

A presença de majoritária lactonas sesquiterpênicas com características únicas faz com que estas sejam consideradas além de bons marcadores quimiotaxonômicos, bons marcadores para padronização do extrato no desenvolvimento de um medicamento fitoterápico. Idealmente, um bom marcador deve ser também componente ativo. Em estudo farmacológico paralelo, foi investigado o efeito no SNC do extrato bruto e também das lactonas isoladas, DCM 18 e DCM 46. Resumidamente, De acordo com Tolardo (2008) quando os resultados dos ensaios farmacológicos realizados “in vivo” são analisados em conjunto, sugere-se que o extrato hidroalcoólico de *H. brasiliense* apresenta efeitos hipnóticos, amnésicos e antidepressivos, havendo nesta propriedade a participação dos sistemas adrenérgico, via receptor  $\alpha_1$ , do sistema dopaminérgico via receptor D2, e do sistema serotoninérgico via receptores 5-HT<sub>1A</sub>. Ainda, a lactona DCM 18 pode ser um dos princípios ativos presentes no extrato, efeito que não foi verificado para a lactona DCM 46. Com relação ao efeito ansiolítico, parece ser esta propriedade mediada pelo sistema GABAérgico (TOLARDO, 2008).

## 6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foram identificadas seis substâncias, após cromatografia em coluna, de frações oriundas do extrato etanólico das folhas frescas: o esteróide  $\beta$ -sitosterol, as lactonas sesquiterpênicas podoandina e 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo e os fenólicos cafeato de etila, aldeído protocatéquico e a nova lactona sesquiterpênica AE 41.

Por fim, pretende-se continuar a prospecção fitoquímica do extrato etanólico, a fim de caracterizar outras substâncias presentes em menor quantidade, isolar os marcadores principais em maior quantidade para aprofundar estudos de atividade biológica englobando estudos de sinergia e desenvolver e validar metodologia analítica através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para quantificação dos principais marcadores do extrato, as lactonas sesquiterpênicas.



## REFERÊNCIAS

- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, K. R.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, n. 125, p. 989-1009, 2000.
- BERCION S, COUPPE DE K MARTIN MA, BALTAZE JP, BOURGEOIS P. A new alpha-methylene gamma-lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. **Fitoterapia**. v. 76, p. 620-624, 2005.
- BLAY, G.; BARGUES, V.; CARDONA, L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R. Stereoselective synthesis of 7,11-guaien-8,12-olides from santonin. Synthesis of podoandin and (+)-zedolactone A. **Journal of Organic Chemistry**, v. 65, p. 6703-6707, 2000.
- BAZZALO, M. E.; HEBER E. M.; MARTINEZ M. A.; DELPERO, CASO O. H. Phenolic compounds in ítems of sunflower plant inoculated with *sclerotinia-sclerotiorum* and their inhibitory effects on the fungus. **Phytothol Z**, 1985; 23-322.
- BOUIC, P. J. D.; LAMPRECHT, J. H. Plant sterol and sterolins: A review of their immunomodulating properties. **Alternative Medicine Review**, v4 (3), p. 170-177, 1999.
- BRAÇA A.; POLITI M.; SANOGO R.; SANOU H.; MORELLI I.; PIZZA C.; DE TOMMASI N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. **J Agric Food Chem**, v. 51, p. 6689-95, 2003.
- BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.
- CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Naturally-occurring antinociceptive substances from plants: a review. **Phytother. Res.**, v.14, p. 1-18, 2000.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 134-131, 2005.
- CECHINEL-FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na párea de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/UNIVALI. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 680-685, 2000.
- CHALAS, J.; CLAISE, C.; EDEAS, M.; MESSAOUDI, C.; VERGNES, L.; ABELLA, A.; LINDENBAUM, A. Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.l.], v. 55, p. 54-60, 2001.
- CHEN, Z. Y.; CHAN, P. T.; ZHANG, Z.; CHUNG, H. Y. Antioxidative activity of green tea catechin extract compared with that of Rosemey extract. **Journal Analytical Official Chemistry Society**, v. 75, n. 9, p. 327-333, 1998.
- CHIANG, Y. M.; LO, C. P.; CHEN, Y. P.; WANG, S. P.; YANG, N. S.; KUO, Y. H.; SHYUR, L. F. Ethyl caffeate suppresses NF-κB activation and its downstream inflammatory mediators,

iNOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin. **British Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 146, p. 352–363, 2005.

CHOI, Y. H.; KONG, K. R.; KIM, Y. A.; JUNG, K. O.; KILL, J. H.; RHEE, S. H.; PARK, K. Y. Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. **Int. J. of Oncology**, v. 23 (6), 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 2. ed. London: John Wiley & Sons, Ltd, 2002.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora Universidade Estadual Paulista, 2002. p. 604.

DOMÍNGUEZ, Xorge Alejandro. *Métodos de investigación fitoquímica*. México: Limusa, 1973. 295p.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. **Fitoterapia na atenção primária à saúde**. São Paulo: Manole, 2001.

EVANS, W. C. **Farmacognosia**. 13. ed. Mexico: Interamericana-McGraw-Hill, 1991.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFSC / UFRGS, 2001.

FERREIRA, S. H. (Organizador). **Medicamentos: a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998, 129p.

GEISSMAN, T. A. **Organic Chemistry of Secondary Pant Metabolism**. Freeman, Cooper & Company. 2ª ed. Peru: Fondo Editorial, 299p.

GONÇALVES, D.; WAL, E.; ALMEIDA, R. R. **Química orgânica e experimental**. Curitiba: Ed. McGraw-Hill, 1988.

GROS, E. G; POMILIO, A. B. et al. **Introduccion al Estudio de los Productos Naturales**. Facultad de ciências exactas y naturales, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 1985.

GUEDES, A. **Estudo químico e avaliação da atividade analgésica e antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex. Miq. (Chloranthaceae)**. Florianópolis. Dissertação (Mestrado em química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, UFSC. 1997. 125p.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 27, p. 1-93, 2006.

JORGE, P. A. R.; NEYRA, R. M. O.; ALMEIDA, E.; BRAGNOLO, N. Efeito da berinjela sobre os lípides plasmáticos, a peroxidação lipídica e a reversão da disfunção endotelial na hipercolesterolemia experimental. *Arquivo Brasileiro de Cardiologia*, v. 70, n. 2, p. 87-91, 1998.

KAWABATA, J.; FUKUSHI, E.; MIZUTANI, J. SESQUITERPENE DIMER AND TRIMER FROM *CHLORANTHUS JAPONICUS*. **Phytochemistry**. v. 47, n. 2, p. 231-235, 1998.

KIM, Y. S.; KIM, N. H.; LEE, S. W.; LEE, Y. M.; JANG, D. S.; KIM, J. K. Effect of protocatechualdehyde on receptor for advanced glycation end products and TGF-β1

expression in human lens epithelial cells cultured under diabetic conditions and on lens opacity in streptozotocin-diabetic rats. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 569, p. 171–179, 2007.

KIM, S. H.; SONG, J. H.; CHOI, B. G.; KIM, H.; KIM, T. S.; Chemical modification of santonin into a diacetoxy acetal form confers the ability to induce differentiation promyelocytic leukemia cells via the down-regulation of NF- $\kappa$ B DNA binding activity. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, 19, 13117-13125.

KONGDUANG, D.; WUNGSINTAWEEKUL, J.; DE-EKNAMKUL, W. Biosynthesis of b-sitosterol and stigmasterol proceeds exclusively via the mevalonate pathway in cell suspension cultures of *Croton stellatopilosus*. **Tetrahedron Letters**, [S.l.], v. 49, p. 4067–4072, 2008.

KIRCHNER, K. MARQUETTI, T. S. **Caracterização Fitoquímica, análise sensorial e avaliação da atividade microbiana do óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense***. Itajaí (Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, UNIVALI, 2008, p 69.

KWON, O. E.; LEE, H. S.; LEE, S. W.; BAE, K.; KIM, K.; HAYASHI, M.; RHO, M. C.; KIM, Y. K. Dimeric sesquiterpenoids isolated from *Chloranthus japonicus* inhibited the expression of cell adhesion molecules. **Journal of Ethnopharmacology**. v.104, n.1-2, p.270-277, 2006.

KUBO, I.; et al. Podoandin, a molluscicidal sesquiterpene lactone from *Podocarpus andina*. **Phytochemistry**, v. 31, n.5, p. 1545-1548, 1992.

LUTTER, M.; CLARK, A. C.; PRENZLER, P. D.; SCOLLARY, G. R. Oxidation of caffeic acid in a wine-like medium: Production of dihydroxybenzaldehyde and its subsequent reactions with (+)-catechin. **Food Chemistry**, [S.l.], v. 105, p. 968–975, 2007.

MACHADO, A. V. **EFEITOS DO ESTRESSE HÍDRICO EM PLANTAS JOVENS DE *Hedyosmum brasiliense* MART. (CHLORANTHACEAE)**. Dissertação – Mestrado em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004. 65 p.

MACIAS, F. A.; FERNANDEZ, A.; VARELA, R. M.; MOLINILLO, J. M. G.; TORRES, A.; ALVES, P. L. C. A.; Sesquiterpene lactones as allelochemicals. **J. Nat. Prod.**, 69, p. 795-800, 2006.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, p. 21-35, 2001.

MESTRELAB RESEARCH, 2008. Disponível em: <[www.mestrec.com](http://www.mestrec.com)>. Acesso em 20 ago.2008.

METCALFE C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**. Oxford: Claredon Press, 1957. Vol. I e II.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos**. Itajaí: UNIVALI, 2007a. p. 11-32.

OCCHIONI, P. **Contribuição ao estudo da família Chloranthaceae com especial referência ao gênero *Hedyosmum* Sw**. Rio de Janeiro. Tese (Professor Catedrático de

Botânica Aplicada à Farmácia) – Faculdade Nacional de Farmácia, Universidade do Brasil, 1954, 176p.

PENGELLY, A. Essential oils and resins. In: PENGELLY, A. **The Constituents of Medicinal Plants**: An introduction to the chemistry and therapeutics of herbal medicine. 2.ed. Cambridge: CABI Publishing, p. 85-109, 2004.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, São Paulo, v. 25, supl. 1, p. 45-61, 2002.

REITZ, R. Clorantáceas. Flora Ilustrada Catarinense. **HBR: Itajaí**. p. 4-10, 1965.

SDBS, Spectral Database for Organic Compounds, 2008. Disponível em: <[http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_top.cgi](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi)>. Acesso em: 20 ago. 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I Quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal Science and Food Agricultural*, n. 10, p. 63-68, 1959.

SU, Z. S.; YIN, S.; ZHOU, Z. W.; WU, Y.; DING, J.; YUE, J. M. Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. **Journal of Natural Products**, [S.l.], v. 71, n. 8, p.1410-1413, 2008a.

SU, Y. O.; ZHANG, W. D.; ZHANG, C.; LIU, R. H.; SHEN, Y. H. A new caffeic ester from *Incarvillea mairei* var. *grandiflora* (Wehrhahn) Grierson. **Chinese Chemical Letters**, [S.l.], v.19, p. 829–831, 2008b.

TRENTIN, A. P.; SANTOS, A. R.; GUEDES, A.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociception caused by the extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. **Planta Medica**. v. 65, n. 6, p.517-521, 1999.

TODZIA, C. A. Chloranthaceae. In: KUBITZKI, J. G.; BITTRICH, V. **The families and genera of vascular plants. II. Flowering plants – dicotyledons**. Springer-verlag, 1993.

TOLARDO, R. **Avaliação farmacológica dos efeitos da *Hedyosmum brasiliense* miq. sobre o Sistema Nervoso Central**. Itajaí. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UNIVALI, 2008.

WINGE, H. et al. *Erva-mate*: biologia e cultura no Cone Sul. Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 1995. 410p.

YI-BO, L.; ZHEN-YU, L. Pollination Ecology of *Chloranthus serratus* (Thunb.) Roem. et Schult. And *Ch. fortunei* (A. Gray) Solms-Laub. (Chloranthaceae). **Annals of Botany**. v.83, p. 489, 499, 1999.

YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. **Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna**. Itajaí: UNIVALI, 2007. p. 11-32.

ZANIOLO, S.R. Ecologia de *Hedyosmum brasiliense* Mart. Ex. Miq. (Chloranthaceae): subsídio para cultivo e manejo sustentável. **Scientia Agraria**, v.4, n.1-2, p.81-96, 2003.

ZHANG, et. al. Suppressed NF- $\kappa$ B and sustained JNK activation contribute to the sensitization effect of parthenolide to TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in human cancer cells. **Oxford Journals**, Oxford, [s.v.], [s.p.], 2004.

ZHOU, Z.; LIU, Y.; MIAO, A. D.; WANG, S. Q. Protocatechuic aldehyde suppresses TNF- $\alpha$ -induced ICAM-1 and VCAM-1 expression in human umbilical vein endothelial cells. **European Journal of Pharmacology**, [S.l.], v. 513, p. 1– 8, 2005.

ZHOU, Z.; ZHANG, Y.; DING, X. R.; CHEN, S. H.; YANG, J.; WANG, X. J.; JIA, G. L.; CHEN, H. S.; BO, X. C.; WANG, S. Q. Protocatechuic aldehyde inhibits hepatitis B virus replication both in vitro and in vivo. **Antiviral Research**, [S.l.], v. 74, p. 59–64, 2007.