



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

SOLOMON KWEKU SAGOE AMOAH

ESTUDO QUÍMICO DE *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae

Florianópolis
2015

Solomon Kweku Sagoe Amoah

**ESTUDO QUÍMICO DE *Hedyosmum brasiliense* Miq.,
Chloranthaceae**

Tese submetido ao programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do grau de Doutor em Farmácia.
Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

**Florianópolis
2015**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Amoah, Solomon Kweku Sagoe
ESTUDO QUÍMICO DE *Hedyosmum brasiliense* Miq.,
Chloranthaceae / Solomon Kweku Sagoe Amoah ; orientadora,
Maigue Weber Biavatti - Florianópolis, SC, 2015.
142 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Hedyosmum brasiliense*. 3.
Chloranthaceae. 4. Lactonas sesquiterpênicas. 5. Fenólicos.
I. Biavatti, Maigue Weber. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III.
Título.

AGRADECIMENTOS

Somente a partir da aliança de um, trabalhando com e através do outro, que nascem grandes coisas. Este trabalho não seria uma tese sem a colaboração de muitas pessoas.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pela força, graça e vida que me deu durante este período para poder começar e completar estes estudos.

Ao governo brasileiro e à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade dada para estudar nesta universidade e país amado, Brasil.

À minha família, especialmente meus pais de Gana e do Brasil, pelo amor, apoio e investimento, não esquecendo o incentivo dos meus irmãos de Gana e do Brasil.

À Professora Maique Weber Biavatti, por aceitar ser minha orientadora e me aturar desde a iniciação científica, pelo profissionalismo, apoio e incentivo demonstrados durante esta caminhada: uma experiência que nunca será esquecida.

Aos colegas do laboratório GEPRONAS, pela amizade, apoio, brincadeiras e momentos de descontração especialmente à Vanessa Rocha Machado, que me apresentou a Professora Maique. Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina e à banca examinadora.

Ao Professor Dr. Ademir Reis, pela ajuda na coleta e identificação do material vegetal, ao Professor Anderson Barison da Universidade Federal de Paraná, pela atenção e agilidade dispensada aos espectros de ressonância magnética nuclear das substâncias isoladas neste trabalho, à Professora Francinette Campos e Professores Marcia Maria de Souza, José Eduardo da Silva Santos, Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira e Maria Luíza Bazzo, pelos testes biológicos. Às técnicas do Laboratório Central de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) Elis Amaral Rosa, Martina Blank e Vanessa Almeida de Oliveira, pelo apoio durante as análises no CEBIME.

À equipe do CHEMBIOFIGHT PROJECT, especialmente do Department of Pharmacognosy and Natural Product Chemistry, National & Kapodistrian University of Athens – Grécia, pela oportunidade de pesquisa e aprendizagem.

Às técnicas dos laboratórios do departamento das Ciências Farmacêuticas, Claudia, Roberta, Solange e todos os colegas do PGFar. Agradeço também à comunidade cristã em Florianópolis e Porto Alegre especialmente a minha igreja, Igreja Metodista e Igreja Brasa pelas orações e apoio.

Ao Rei eterno, o Deus único, imortal e invisível, sejam honra e glória para todo o sempre. Amém.

Success is not measured by what you accomplish, but by the opposition you have encountered and the courage with which you have maintained the struggle against overwhelming odds. So, one thing I do: forgetting what is behind and straining toward what is ahead, I press on toward the goal to win the prize for which God has called me heavenward in Christ Jesus.

Adaptado do Orison Swett Marden e Filipenses 3:13-14

Resumo

Hedyosmum brasiliense Miq. Chloranthaceae é um arbusto dioico e endêmico no Brasil. Pertencente à família Chloranthaceae, usa-se popularmente como calmante, anti-inflamatório e afrodisíaco na forma de chá ou macerado em vinho branco. O presente trabalho é uma continuação dos estudos anteriores que teve como objetivo estudar fitoquimicamente as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa do extrato etanólico e também o extrato aquoso desta espécie. Cinco sesquiterpenoides (um inédito) e onze fenólicos foram isolados e caracterizados neste trabalho. Das frações diclorometano, acetato de etila e aquosa foram isoladas e caracterizadas seis substâncias que estão sendo descritas pela primeira vez para *Hedyosmum brasiliense* (aromadendrane-4 β ,10 α -diol, ácido rosmarínico, rosmarinato de etila, canferol, canferol-3- β -*O*-glucuronídeo e oresbiusina) e três substâncias (3,4-dihidroxibenzaldeído, ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico e escopoletina) que já foram descritas previamente para *Hedyosmum brasiliense*. Entre estas substâncias podoandina, aromadendrano-4 β ,10 α -diol e onoseriolídeo foram avaliadas contra o efeito induzido pelo peptídeo β -amiloide 1-42 (A β 1-42) na tarefa de esQUIVA passiva, um modelo de Alzheimer em camundongos. Do extrato aquoso a lactona sesquiterpênica inédita 1- β -acetoxyeudesma-3,7(11) – dien – 8,12 – olídeo foi isolada e caracterizada. Ainda, pelo método desenvolvido por cromatografia de partição centrífuga, ácido rosmarínico foi isolado em uma etapa única. Além disso, ácido isorínico, urolignosídeo, (7*S*,8*R*)-5-metoxidiidrodesidrodiconiferil álcool-4-*O*- β -D-glicopiranosídeo, canferol, canferol-3- β -*O*-D-glucuronídeo, podoandina, onoseriolídeo e 15-hidroxi-isogermafurenolídeo foram isolados e identificados. O extrato aquoso e o ácido rosmarínico foram avaliados contra *Mycobacterium tuberculosis*. As substâncias foram elucidadas através de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, em comparação com dados já publicados. A metodologia desenvolvida por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por *electrospray* proporcionou a quantificação do ácido rosmarínico (188 mg/g do extrato aquoso), onoseriolídeo (1,7 mg/g do extrato aquoso) e podoandina (1,9 mg/g do extrato). Quanto aos testes biológicos, a podoandina, aromadendrano-4 β ,10 α -diol e onoseriolídeo reverteram significativamente o efeito induzido pelo peptídeo β -amiloide 1-42 (A β 1-42) na tarefa de esQUIVA passiva, um modelo de Alzheimer em camundongos. Ainda a podoandina, onoseriolídeo e 15-acetoxi-isogermafurenolídeo relaxaram os anéis

aórticos e corpo cavernoso. Entretanto, a avaliação do extrato aquoso e ácido rosmarínico contra *Mycobacterium tuberculosis* não mostrou nenhuma atividade.

Palavras chaves: Chloranthaceae, *Hedyosmum brasiliense*, sesquiterpenoides, fenólicos

Abstract

Hedyosmum brasiliense Miq. Chloranthaceae is a dioecious shrub and endemic in Brazil. Belonging to the Chloranthaceae family, it is popularly used as a sedative, anti-inflammatory and aphrodisiac in the form of tea or macerated in white wine. The present work is the continuation of previous studies that has as its objective to study phytochemically the dichloromethane, ethyl acetate and water fractions of the ethanol extract and the aqueous extract of this species. Five sesquiterpenoids (one new) and eleven phenolic compounds were isolated and characterized in this work. Six substances that were isolated and characterized from the dichloromethane, ethyl acetate and aqueous fractions, are being described for the first time for this species (aromadendrane-4 β , 10 α -diol, rosmarinic acid, ethyl rosmarinate, kaempferol, kaempferol-3-O- β -D-glucuronide and oresbusin) and three substances (3,4-dihydroxybenzaldehyde, 4-hydroxy-3-methoxy benzoic acid and scopoletin) which have been previously described for this species. Among these substances, podoandin aromadendrane-4 β , 10 α -diol and onoseriolide were evaluated against the β -amyloid peptide 1-42 (A β 1-42) in the passive avoidance task, a model of Alzheimer in mice. From the aqueous extract the new sesquiterpene lactone 1- β -acetoxyeudesma-3,7 (11) - dien - 8,12 - olide was isolated and characterized. Furthermore, through a one-step method by centrifugal partition chromatography rosmarinic acid was isolated from the aqueous extract. Moreover, isorinic acid, urolignoside, (7*S*, 8*R*) -5-alcohol methoxydihydrodehydrodiconiferyl-4-O- β -D-glucopyranoside, kaempferol, kaempferol-3-O- β -D-glucuronide, podoandin, onoseriolide and 15-hydroxy-isogermafurenolide were isolated and identified as already known substances. The aqueous extract and rosmarinic acid were evaluated against *Mycobacterium tuberculosis*, while podoandina, onoseriolide and 15-acetoxy-isogermafurenolide were evaluated. The compounds were elucidated by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry and in comparison with previously reported data. A methodology based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry with electrospray ionization, was used for the quantification of rosmarinic acid (188 mg/g of aqueous extract), onoseriolide (1.7 mg/g of aqueous extract) and podoandin (1.9 mg/g of the aqueous extract). For biological tests, podoandin aromadendrane-4 β , 10 α -diol and onoseriolide significantly ameliorated the damage caused by the β -amyloid peptide 1-42 (A β 1-42) in the passive avoidance task, a model of Alzheimer in mice. Moreover, podoandin, onoseriolide and 15-acetoxy-isogermafurenolide

relaxed aortic rings and corpus cavernosum. However, the evaluation of the aqueous extract and rosmarinic acid against *Mycobacterium tuberculosis* did not demonstrate any activity.

Keywords: Chloranthaceae, *Hedyosmum brasiliense*, sesquiterpenoids, phenolic compounds

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Substâncias encontradas em Chloranthaceae	31
Figura 2. <i>Hedyosmum brasiliense</i> Miq Chloranthaceae (autores)....	32
Figura 3. Fluxograma do isolamento da substância HBH57	40
Figura 4. Etapas para isolamento das substancias da fração acetato de etila de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	41
Figura 5. Etapas para isolamento das substancias da fração aquosa de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	42
Figura 6. Espectro de RMN de ^1H da substância HBH57 (400 MHz, CDCl_3).....	46
Figura 7. Espectro de RMN de ^1H da substância HBH57 ampliada na região δ 0,26 a δ 1,34.	47
Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C da substância HBH57 (100 MHz, CDCl_3).....	48
Figura 9. Espectro de RMN de Dept 135 da substância HBH57 (100 MHz, CDCl_3).....	49
Figura 10. Mapa de correlação de HSQC da substância HBH57.	50
Figura 11. Mapa de correlação de HSQC da substância HBH57 ampliado.	51
Figura 12. Mapa de correlação de HMBC da substância HBH57 ampliado.	52
Figura 13. Cromatoplaça das subfrações da fração acetato de etila.	54
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da substância HBL2C12-13 (400 MHz, CD_3OD).....	55
Figura 15. Espectro de RMN ^1H da substância HBL2C12-13 ampliada na região δ 6,24 a δ 7,57.	56
Figura 16. Mapa de correlação de HSQC da substância HBL2C12-13 ampliado.	57
Figura 17. Mapa de correlação de HMBC da substância HBL2C12-13 ampliado mostrando a presença de duas carbonilas.	58
Figura 18. Estrutura de HBL2C12-13 (ácido rosmarínico).....	60

Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da substância HBO44 (600 MHz, CD_3OD).	61
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da substância HBO44 ampliado mostrando δ 4,16 a 4,13 e 1,22 a 1,18 (600 MHz, CD_3OD).	62
Figura 21. Mapa de correlação de HSQC da substância HBO44 ampliado mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios em 4,15 ppm e 1,21 ppm.	63
Figura 22. Mapa de correlação de HMBC da substância HBO44 mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios em 4,15 ppm e 1,21 ppm.	64
Figura 23. Estrutura de HBO44.	67
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H da substância HBI43 (600 MHz, CD_3OD).	67
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H da substância HBI43 ampliado na região 6,18 ppm a 8,12.	68
Figura 26. Espectro de Massas no <i>ion-trap</i> HBI43 (Modo negativo) full Scan.	69
Figura 27. Fragmento característico de Retro-Diels-Alder (RDA).	70
Figura 28. Espectro de massas no íon- trap HBI43 (ESI Modo negativo) mostrando a fragmentação do íon molecular 285.	70
Figura 29. Estrutura química da substância HBI43.	71
Figura 30. Espectro de RMN de ^1H da amostra HBD44 (600 MHz, CD_3OD).	72
Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da amostra HBD44 ampliado na região 6,50 ppm a 7,60 ppm.	73
Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da amostra HBD44 ampliado na região 2,70 ppm a 4,40 ppm.	74
Figura 33. Mapa de correlação de HSQC da amostra HBD44 ampliado mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios.	75
Figura 34. Mapa de correlação de HMBC expandido da amostra HBD44 mostrando os carbonos δ 193,0; δ 175,6 e δ 171,3.	76
Figura 35. Estrutura química de oresbiusina A.	78

Figura 36. Estrutura química do aldeído protocatéquico.....	79
Figura 37. Estrutura química do ácido vanílico.....	80
Figura 38. Espectro de RMN de ¹ H da substância HB33 (400 MHz, CD ₃ OD).....	81
Figura 39. Espectro de RMN de ¹ H da substância HB33 ampliado na região δ 6,1 a δ 8,2.	82
Figura 40. Espectro de RMN de ¹ H da substância HB33 ampliado na região δ 3,3 a δ 5,3.	83
Figura 41. Mapa de correlação de HSQC da substância HB33 mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios.	84
Figura 42. Mapa de correlação de HMBC da substância HB33.....	85
Figura 43. Estrutura química da substância HB33.	87
Figura 44. Espectro de RMN de ¹ H da substância HB34 (400 MHz, CD ₃ COCD ₃).	87
Figura 45. Espectro de RMN de ¹ H da substância HB34 ampliado na região δ 3,90 a δ 7,62.	88
Figura 46. Mapa de correlação de HSQC expandido da substância HB34.	89
Figura 47. Mapa de correlação de HMBC expandido da substância HB34.	90
Figura 48. Estrutura química da substância HB34.....	91
Figura 49. Espectro de RMN de ¹ H da substância HB36 (400 MHz, CDCl ₃).....	92
Figura 50. Estrutura química da substância HB36.	93
Figura 51 Efeitos da fracção de hexano de <i>Hedyosmum brasiliense</i> (HFHB) sobre os anéis aórticos de ratos isolados e tiras de corpo cavernoso.....	94
Figura 52 Relaxamento vascular em anéis aórticos com endotélio e sem endotélio induzido por lactonas sesquiterpênicas isoladas de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	95
Figura 53 Relaxamento de tiras de corpo cavernoso de ratos por lactonas sesquiterpênicas isoladas de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	95

Figura 54 O efeito das substâncias administradas em ratos que receberam o peptídeo β -amilóide 1-42	96
Figura 55: Cromatograma do íon total (TIC) do extrato (a) e íon molecular extraído (EIC) do RA (b) (Rt = 9,0 minutos).	116
Figura 56. Cromatograma do íon total (TIC) (a) e dos íons moleculares extraídos (EIC) do ONS (Rt = 14 minutos) (b) e PDN (Rt = 19,3 minutos) (c).	117
Figura 57. Sesquiterpenoides isolados de <i>Hedyosmum brasiliense</i> dos extratos etanólico e aquoso.	126
Figura 58. Estruturas de ácidos fenólicos e derivados isoladas de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	128
Figura 59. Estruturas de neolignananas e flavonóides isoladas de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de RMN ^1H e ^{13}C E 2D da HBH57 (solvente CDCl_3) em comparação com literatura.	53
Tabela 2. Dados de RMN ^1H , ^{13}C da HBL2C12-13 (solvente CD_3OD) em comparação com literatura.....	59
Tabela 3. Dados de RMN ^1H e ^{13}C e 2D da HBO44 em comparação com os dados de HBL2C12-13.	66
Tabela 4. Dados de ^1H RMN de HBI43 em comparação com dados na literatura.....	71
Tabela 5. Dados de RMN da oresbiusina (HBD44) em comparação com dados na literatura.....	78
Tabela 6. Dados de RMN do aldeído protocatéquico (HBD44) em comparação com dados na literatura.	79
Tabela 7. Dados de RMN da ácido vanílico (HBD44) em comparação com dados na literatura.	80
Tabela 8. Dados de RMN (HB33) em comparação com dados na literatura.	86
Tabela 9. Dados de RMN ácido vanílico (HB34) em comparação com dados na literatura.....	91
Tabela 10. Dados de ^1H RMN (HB36) em comparação com dados na literatura.	93
Tabela 11. Tempo de retenção e íon molecular dos compostos de interesse.....	117
Tabela 12. Dados de linearidade e sensibilidade para os compostos de interesse.	118
Tabela 13. Dados de RA para repetibilidade e exatidão.....	120
Tabela 14. Dados de RA para precisão intermediária.	120
Tabela 15. Dados de ONS para repetibilidade e exatidão.	121
Tabela 16. Dados de ONS para precisão intermediária.....	121
Tabela 17. Dados de PDN para repetibilidade.	121
Tabela 18. Dados de PDN para precisão intermediária.....	122

Tabela 19. Dados de robustez para ONS e PDN.	122
Tabela 20. Dados de inclinação das curvas das amostras CQ em matriz e solvente.	123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach - cloreto de acetilcolina
APCI - Ionização Química a Pressão Atmosférica
BAW - butanol:acetic acid:water (butanol:ácido acetic: água)
CC - Cromatografia em coluna
CCD - Cromatografia em camada delgada
CDCl₃ - clorofórmio deuterado
CD₃COCD₃ - acetona deuterada
CD₃OD - Metanol deuterado
CLV - Cromatografia líquida a vácuo
CQ - Controle de Qualidade
CQA - Controle de Qualidade nível Alto
CQB - Controle de Qualidade nível Baixo
CQM - Controle de Qualidade nível Médio
DAD - Detecção por arranjo de diodos
Dept 135 - Distortionless enhancement by polarization transfer 135
(Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização 135)
EIC - Extracted Ion Chromatogram (cromatograma de ion extraído)
EM - Espectrometria de Massas
ESI - Ionização por Eletrospray
FAE - Fração acetato de etila
FID - Free inductive decay (Decaimento livre da indução)
FT-ICR - Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (Ressonância
Ciclotrônica de íons por transformada de fourier)
HB - *Hedyosmum brasiliense*
HMBC - Heteronuclear multiple Bond correlation (correlação heteronuclear
a long distância)
HPLC - High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia líquida de
alta eficiência)
HSQC - Heteronuclear Single Quantum Coherence (correlação heteronuclear
a uma ligação)
icv – intracerebroventricular
KCl - cloreto de potássio

LC - Liquid Chromatography (cromatografia líquida)
LC-MS - Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry
(cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas)
LD - Limite de Detecção
L-NAME - Ng-nitro-L-arginina metil éster
LQ - Limite de Quantificação
LS - Lactonas sesquiterpênicas
MeOH – Metanol
ONS – Onoseriolídeo
PDN – Podoandina
PE - cloridrato de epinefrina
RA – Ácido rosmarínico
RDA – Retro-Diels-Alder
RMN - Ressonância magnética nuclear
¹³C RMN - Ressonância magnética nuclear de carbono
¹H RMN - Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
QTOF-MS - Quadruple Time of Flight - Mass Spectrometry
(Espectrometria de massas - quadrupolo tempo-de-vôo)
RP - Reversed Phase (Fase reversa)
SSF - solução salina fisiológica
TOF - Time-of-Flight (Tempo-de-vôo)
UFLC - Ultra Fast Liquid Chromatography
(cromatografia líquida de ultra rápida)
UHPLC-MS - Ultra High Performance Liquid Chromatography coupled
to Mass Spectrometry (cromatografia líquida de ultra alta eficiência
acoplada a espectrometria de massas)

SUMÁRIO

Introdução Geral.....	27
Capítulo 1 - Revisão da Literatura: Plantas medicinais, Chloranthaceae, <i>Hedyosmum brasiliense</i> e seus principais constituintes químicos.....	29
1.1 Plantas Medicinais	29
1.2 Chloranthaceae.....	29
1.3 <i>Hedyosmum</i>	31
Capítulo 2 Estudo fitoquímico das frações diclorometano, acetato de etila e aquosa do extrato etanólico de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	38
2.1 Introdução	38
2.2 Objetivo Geral.....	39
2.2.1 Objetivos Específicos	39
2.3 Materiais e Métodos.....	39
2.3.1 Material de partida	39
2.3.2 Fracionamento cromatográfico	40
2.3.3 Elucidação Estrutural	43
2.3.4 Atividades Biológicas.....	43
2.3.4.1 Sistema cardiovascular	43
2.3.4.2 Sistema nervoso central.....	44
2.4 Resultados e discussão.....	45
2.4.1 Caracterização das substâncias isoladas.....	45
2.4.1.1 Subfração da fração diclorometano.....	45
2.4.1.1.1 Substância HBH57 (aromadendrano-4 β ,10 α -diol)	45
2.4.1.2 Fração acetato de etila (FAE)	54

2.4.1.2.1	Substância HBL2C12-13 (ácido rosmarínico)	54
2.4.1.2.2	Substância HBO44 (Rosmarinato de etila)	60
2.4.1.2.3	Substância HBI43 (Canferol)	67
2.4.1.2.4	Amostra HBD44 (Oresbuisina A, Ácido vanílico, Aldeído protocatéquico)	71
2.4.1.3	Fração aquosa.....	80
2.4.1.3.1	Substância HB33 (Canferol-3 β - <i>O</i> -glucuronídeo)	80
2.4.1.3.2	Substância HB34 (ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzoico)	87
2.4.1.3.3	Substância HB36 Escopoletina	92
2.4.2	Atividades farmacológicas	93
2.4.2.1	Atividades farmacológicas no sistema cardiovascular.	93
2.4.2.2	Atividades farmacológicas no sistema nervoso central	95
2.5	Conclusões	96
3	Capítulo 3 – Análise fitoquímica do chá de <i>Hedyosmum brasiliense</i>	97
3.1	Introdução	97
3.2	Objetivos	97
3.3	Resultados e discussão	98
3.3.1	Artigo publicado.....	98
4	Capítulo 4 Quantificação de um ácido fenólico e duas lactonas sesquiterpênicas no extrato aquoso de <i>Hedyosmum brasiliense</i> por UHPLC-MS	107
4.1	Introdução	107
4.1.1	LC-MS	107

4.2	Objetivos.....	110
4.3	Materiais e Métodos.....	110
4.3.1	Equipamentos e solventes.....	110
4.3.2	Material vegetal.....	111
4.3.3	Preparação do extrato	111
4.3.3.1	Preparação da matriz.....	111
4.3.3.2	Preparação das amostras.....	112
4.3.4	Padrões para curva	112
4.3.5	Validação do método	112
4.3.5.1	Validação do ácido rosmarínico.....	113
4.3.5.2	Validação das lactonas onoseriolídeo e podoandina	114
4.3.5.3	Tratamento de dados	115
4.4	Resultados e discussão.....	115
4.4.1	Desenvolvimento do método	115
4.4.2	Validação.....	116
4.4.2.1	Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)	118
4.5	Conclusão	123
	Capítulo 5 - Discussão geral.....	125
	Conclusões gerais	130
	Perspectivas	131
	Referências.....	132

Introdução Geral

O nosso universo complexo está em constante crescimento, seja na sua expansão (BRUSTEIN; KUPFERMAN, 2012) ou em conhecimento (BRADFORD, 2014; FRANZONI; SAUERMAN, 2014; TATEO, 2014). Segundo Hefner (2012), a nossa espécie, *Homo sapiens*, apareceu neste mundo há cerca de 200.000 anos atrás e deparou-se com a necessidade de utilizar a sua imaginação e inteligência para desfrutar da natureza em busca da sobrevivência. Nesse processo, *Homo sapiens* tem explorado várias frentes, inclusive plantas, das quais tem aproveitado para uso medicinal, como fonte de alimentação, material de construção, para uso ornamental, entre outros. Um dos primeiros relatos do uso das plantas para fins medicinais foi em 2600 a.C. pelo povo da Mesopotâmia, onde a informação sobre o uso de algumas plantas medicinais como *Cedrus* spp, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, espécies de *Commiphora* e *Papaver somniferum* foram escritas em tabuletas de argila (GURIB-FAKIM, 2006).

Atualmente, os relatos de plantas medicinais aumentaram e podem ser encontrados em livros, páginas da internet, bancos de dados entre outros (IWU, 2014; SOFOWORA, 2010). A Organização Mundial de Saúde tem incentivado os estudos sobre plantas medicinais, visto que cerca de 65% a 80% da população em países em desenvolvimento fazem uso destas. Por isso, este órgão tem publicado monografias que foram avaliadas pelos especialistas oriundos de mais de 40 países para ser referência científica não só para as autoridades de saúde, mas para cientistas, farmacêuticos e o público em geral (WHO, 2014).

A busca constante por substâncias ativas é feita através de técnicas fitoquímicas como cromatográficas e espectroscopia de ressonância nuclear, que por sua vez vem sendo aprimoradas ou melhoradas. Isso tem levado ao isolamento de vários produtos naturais de importância clínica como artemisinina, vincristina e paclitaxel de plantas como *Artemisia annua*, *Catharanthus roseus*, e *Taxus brevifolia*, respectivamente (DESMARCHELIER, 2010). Além disso, várias espécies como *Ginkgo biloba* e *Panax ginseng* já apresentam extratos padronizados fitoquimicamente para o uso como fitoterápicos (GILLIS, 1997; OKEN *et al.*, 1998), demonstrando o crescimento desta área.

Hedyosmum brasiliense conhecido popularmente como “Cidrão”, é um arbusto que pertence à família Chloranthaceae, sendo usado popularmente como calmante, anti-inflamatório e afrodisíaco na forma de chá ou extrato em vinho branco (REITZ, 1965). Embora esta espécie apresente-se de forma endêmica no Brasil e usada na medicina tradicional, são poucos os estudos sobre os seus constituintes químicos e suas atividades biológicas (AMOAHA *et al.*, 2013; GONCALVES *et al.*, 2012; KIRCHNER *et al.*, 2010; TOLARDO *et al.*, 2010; TRENTIN *et al.*, 1999). Este trabalho é a continuação do trabalho anterior (AMOAHA, 2011) e busca aprofundar a pesquisa desta espécie uma vez que são encontrados documentados na literatura apenas nove artigos sobre *Hedyosmum brasiliense* e destes somente três descrevem o isolamento e caracterização de metabólitos secundários.

Para fins didáticos este trabalho está organizado em quatro capítulos apresentados a seguir:

O capítulo 1 apresenta uma revisão sobre plantas medicinais, a família Chloranthaceae, *Hedyosmum brasiliense*, as classes de substâncias que já foram isolados de *Hedyosmum brasiliense* e as suas atividades biológicas ou farmacológicas.

O capítulo 2 apresenta a continuação do isolamento e caracterização de substâncias oriundos das frações remanescentes durante o projeto anterior, ao saber: frações diclorometano, acetato de etila e aquosa.

O capítulo 3 descreve o processo de isolamento e caracterização das substâncias encontradas no extrato aquoso de *Hedyosmum brasiliense* usando técnicas como cromatografia de partição centrífuga, cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e

O capítulo 4 apresenta a quantificação das principais substâncias no extrato aquoso desta planta usando LC-MS.

Ao final, é apresentada o capítulo 5 que trata a discussão geral dos resultados obtidos, assim como conclusões e perspectivas.

Capítulo 1 - Revisão da Literatura: Plantas medicinais, Chloranthaceae, *Hedyosmum brasiliense* e seus principais constituintes químicos.

1.1 Plantas Medicinais

Plantas medicinais podem ser de fácil acesso e por esta razão, o seu uso está crescendo com popularidade em países ricos e a sua utilização continua a ser generalizada em países em desenvolvimento. A organização mundial de saúde estima que aproximadamente 65% a 80% da população em países em desenvolvimento façam uso destas e o mercado global de plantas medicinais chegará ao valor de cinco trilhões de dólares em 2050 (CHAUDHARY; SINGH, 2011). Recentemente, Cragg e colaboradores (2014) mostraram a importância de produtos naturais onde plantas medicinais participam também como uma importante fonte no desenvolvimento de medicamentos.

A região neotropical abrange um terço da biodiversidade botânica do planeta (DESMARCHELIER, 2010), porém há poucos estudos sobre as espécies pertencentes à esta região. O Brasil, que possui 15 a 20% da biodiversidade mundial não foge muito desta realidade. Percebendo a importância de plantas medicinais como matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos, além da sua utilização em práticas populares e tradicionais como remédios, o governo brasileiro criou uma política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos (PNPMF) (SAÚDE, 2006). A PNPMF tem como objetivo garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional. Alguns autores propuseram a necessidade de despertar estudos multidisciplinares como botânica, farmacologia e fitoquímica em parceria com a indústria farmacêutica para descobrir novos medicamentos e padronizar plantas medicinais como fitoterápicos (BOHLIN *et al.*, 2010; MACIEL *et al.*, 2002).

1.2 Chloranthaceae

Chloranthaceae é uma das famílias de angiospermas mais primitivas que tem desempenhado um papel de destaque na compreensão da origem e diversificação inicial de angiospermas e evolução das suas

flores (ANTONELLI; SANMARTÍN, 2011; SU *et al.*, 2014). Compreendendo ervas, arbustos e árvores aromáticas, a Chloranthaceae possui entre 65 a 75 espécies que são distribuídas em quatro gêneros: *Ascarina*, *Chloranthus*, *Sarcandra* e *Hedyosmum* (ANTONELLI; SANMARTÍN, 2011; SOUZA *et al.*, 2008; SU *et al.*, 2014). Podem ser encontradas em locais como Madagascar, Himalaias tropical, sul, leste e sudeste da Ásia, Nova Zelândia e América tropical (METCALFE; CHALK, 1979; SOUZA *et al.*, 2008).

Quimicamente, já foram encontrados na família Chloranthaceae: terpenóides, flavonóides, cumarinas, ácidos orgânicos, amidas e esteróides. Entre os terpenóides, já foram relatados monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, e triterpenos, sendo os sesquiterpenos os componentes mais expressivos. Mais de 70 sesquiterpenos e derivados já foram encontrados, e os esqueletos típicos identificados até o momento são: lindenano, eudesmano, germacrano, elemeno, cadinano e acorano. As lactonas sesquiterpênicas do tipo lindenanolídeo (seus dímeros e trímeros) têm sido consideradas por alguns autores os principais marcadores quimiotaxonômicos da família (ACEBEY *et al.*, 2007; CAO *et al.*, 2008; KAWABATA; MIZUTANI, 1988). A figura 1 mostra algumas substâncias que foram encontradas em Chloranthaceae.

Entre as atividades biológicas verificadas para algumas espécies investigadas (especialmente de *Chloranthus*) tem-se: atividade antitumoral (relacionada aos flavonóides, sesquiterpenos e óleo essencial), atividade antimicrobiana (óleo essencial, sesquiterpenos e ácidos orgânicos), ação hepatoprotetora (sesquiterpenos glicosilados), atividade imunoestimulante (flavonóides), anti-inflamatória, antiúlcera e analgésica (CAO *et al.*, 2008).

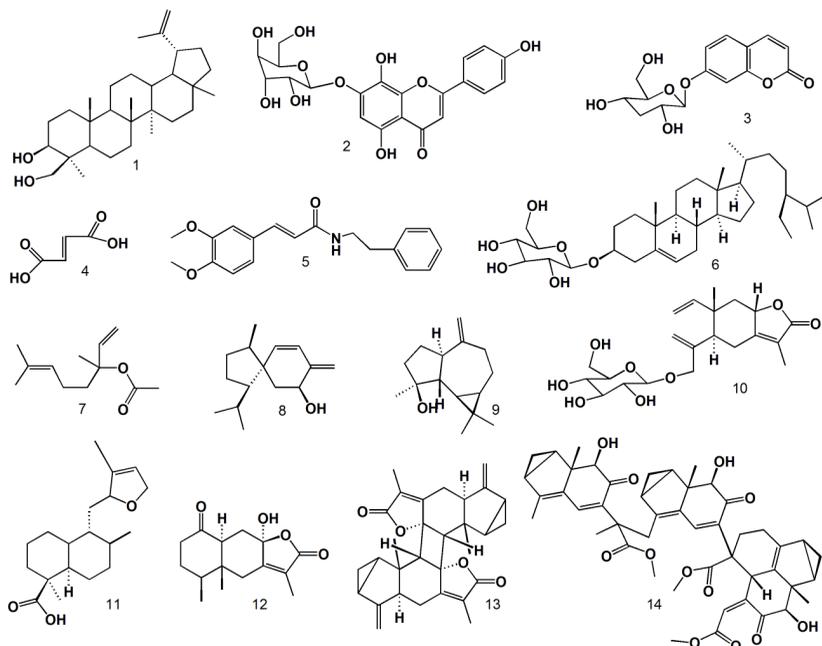


Figura 1. Substâncias encontradas em Chloranthaceae

1- 24-hidroxilupeol, **2-** isovitexina, **3-** calucantosídeo, **4-** ácido fumárico, **5-** 3-(3,4-dimetoxifenil)-N-(2-feniletil)prop-2-enamide, **6-** daucosterol, **7-** acetato de linalool, **8-** skizukaacroadienol, **9-** spatulenol, **10-** sarcaglabosídeo, **11-** ácido (5 α H,9 β H)-12,15-epoxilabda-8(17),13-dien-19-oico, **12-** istambulina A, **13-** fotodímero de clorantalactona A, **14-** trishizukaol A

1.3 *Hedyosmum*

Hedyosmum é o maior gênero da família Chloranthaceae e o único com ocorrência nas Américas, compreendendo 46 espécies essencialmente tropicais e subtropicais americanas (SOUZA *et al.*, 2008). No entanto, há relatos da ocorrência de uma espécie na China (*Hedyosmum orientale*) (LI-BING ZHANG; SUSANNE RENNER, 2003). O nome *Hedyosmum* deriva do grego (*hedy-osmos*) e significa “aquele que cheira doce”, em alusão ao aroma agradável das folhas (REITZ, 1965).

Botanicamente, apresenta-se como unissexual e é o único gênero na família Chloranthaceae em que a flor feminina possui um perianto.

Existem poucos trabalhos na literatura sobre este gênero, apesar do uso popular de suas espécies. Nestes trabalhos alguns pesquisadores mostraram o isolamento de substâncias como lactonas sesquiterpênicas (ACEBEY *et al.*, 2010; BERCION *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2008); lactonas sesterpênicas (ACEBEY *et al.*, 2007) e flavonóides (CARDENAS *et al.*, 1993), enquanto alguns mostraram a análise do óleo essencial (LORENZO *et al.*, 2003; MUNDINA *et al.*, 2000).

Com relação a avaliação das atividades biológicas do gênero *Hedyosmum* estão relatadas a atividade antileishmania (ACEBEY *et al.*, 2010), atividade analgésica (CARDENAS *et al.*, 1993) e as atividades antinociceptiva (TRENTIN *et al.*, 1999), antimicrobiana (KIRCHNER *et al.*, 2010) e antidepressiva (TOLARDO *et al.*, 2010), sendo que as três últimas foram investigadas da espécie *Hedyosmum brasiliense*. Recentemente, Picard e colaboradores (2014) mostraram em um ensaio *in-vitro* que esta espécie age no sistema nervoso central através da via do ácido γ -amino butírico (GABA), uma via que está envolvida com a ansiedade.

H. brasiliense é uma espécie endêmica do Brasil, ocorre em áreas alagáveis de altitude, por quase todo o território, exceto Amazônia e região Nordeste. Trata-se de uma planta sublenhosa, geralmente de pequeno porte, raramente ultrapassando os três metros de altura, com folhas bastante carnosas. Os indivíduos são unissexuados, sendo a distinção entre plantas estaminadas e pistiladas bastante simples (figura 2). Suas folhas são opostas simples, pinadas e com margens serreadas, pecioladas, com estípulas livres no ápice e soldadas na base entre si com o pecíolo, formando uma bainha amplexicaule (ZANIOLO *et al.*, 2001).



Parte pistilada

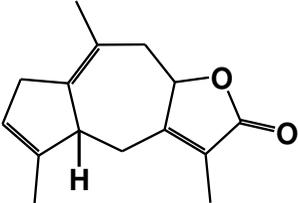
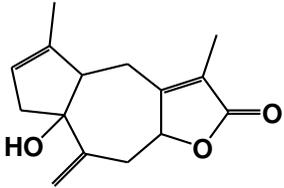
Parte estaminada

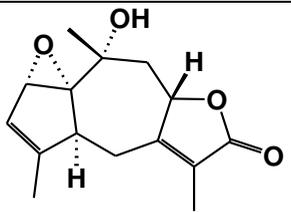
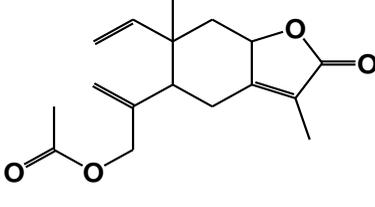
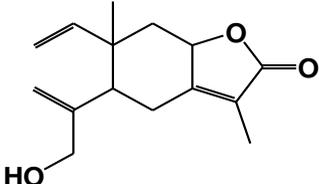
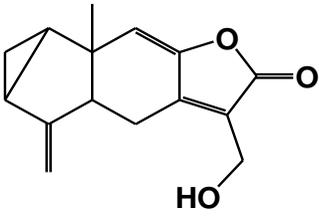
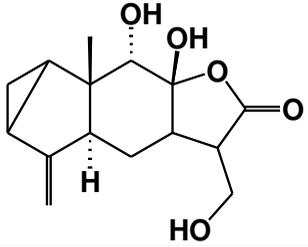
Figura 2. *Hedyosmum brasiliense* Miq Chloranthaceae (autores)

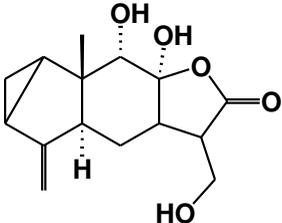
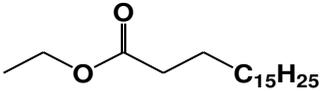
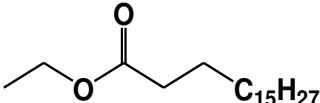
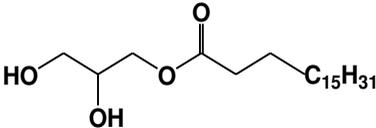
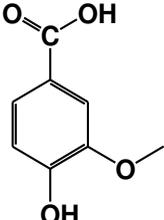
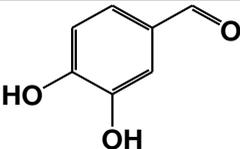
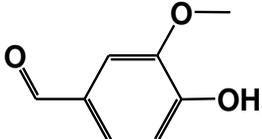
Nos estados de Santa Catarina e Paraná esta espécie é mais conhecida como Cidrão, e desenvolve-se bem em ambientes com pouca ou grande disponibilidade de água, justificado por sua plasticidade para modificar algumas características morfo-anatômicas e fisiológicas em função do déficit hídrico (MACHADO, 2004).

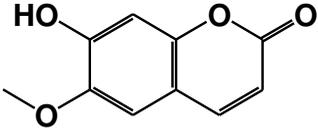
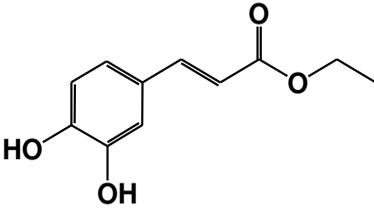
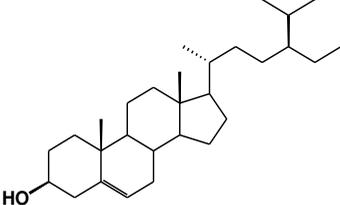
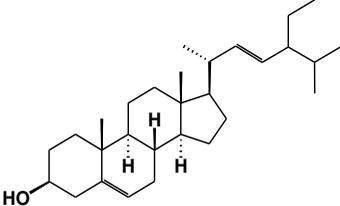
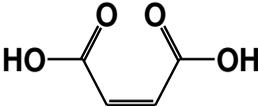
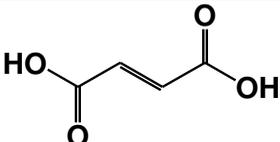
Foi isolada previamente de *H. brasiliense* uma lactona sesquiterpênica tipo lindenanolídeo: 13-hidroxi-8,9-diidros Hizukanolídeo (TRENTIN *et al.*, 1999) que é o derivado hidroxilado da chlorantalactona A (ou shizukanolídeo B), anteriormente isolada de espécies de *Chloranthus* e de *Sarcandra glabra*. Esta mesma lactona é conhecida como onoseriolídeo já que foi isolada também da *Onoseris albicans* (BOHLMANN *et al.*, 1980). Os lindenanolídeos têm sido considerados marcadores quimiotaxonômicos da família Chlorantaceae (KAWABATA; MIZUTANI, 1988). Recentemente, um estudo fitoquímico feito sobre *H. brasiliense* mostrou o isolamento de outras classes de lactonas sesquiterpênicas como guaianolídeos e elemanolídeos, bem como alguns fenólicos (AMOAHA *et al.*, 2013). O quadro abaixo mostra as substâncias que já foram isoladas desta espécie.

Quadro 1. Substâncias já isoladas e caracterizadas de *H. brasiliense*

Nº.	Substâncias	Estrutura química	Referências
1	podoandina		(AMOAHA <i>et al.</i> , 2013; OLIVEIRA, 2009)
2	1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina		(AMOAHA <i>et al.</i> , 2013)

3	1,2-epoxi-10-hidroxi-podoandina		(OLIVEIRA, 2009)
4	15-acetoxi-isogermafurenolídeo		(AMOAH <i>et al.</i> , 2013)
5	15-hidroxi-isogermafurenolídeo		(AMOAH <i>et al.</i> , 2013)
6	onoseriolídeo		(AMOAH <i>et al.</i> , 2013; GUEDES, 1997; OLIVEIRA, 2009; TRENTIN <i>et al.</i> , 1999)
7	8 β ,9 α -hidroxionoseriolídeo.		(AMOAH <i>et al.</i> , 2013)

8	8 α ,9 α -hidroxionoseri olídeo.		(AMOAH <i>et al.</i> , 2013)
9	éster etílico do ácido linolênico		(AMOAH, 2011)
10	éster etílico do ácido linoleico		(AMOAH, 2011)
11	monoglicerídeo de ácido esteárico		(AMOAH, 2011)
12	ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico		(AMOAH, 2011)
13	aldeído protocatéquico		(OLIVEIRA, 2009)
14	vanilina		(AMOAH, 2011)

15	escopoletina		(AMOAH, 2011)
16	cafeato de etila		(OLIVEIRA, 2009)
17	β -sitosterol		(AMOAH, 2011; OLIVEIRA, 2009)
18	estigmasterol		(GUEDES, 1997)
19	ácido maleico		(GUEDES, 1997)
20	ácido fumárico		(GUEDES, 1997)

Quanto aos estudos biológicos ou farmacológicos sobre *H. brasiliense*, Kirchner e colaboradores (2010) demonstraram que o óleo essencial possui atividade significativa contra bactérias gram positivas e fungos. O extrato bruto e o composto isolado, a lactona sesquiterpênica podoandina, exibiram atividades ansiolítica, hipnótica e antidepressiva

em roedores nos modelos do teste de nado forçado e campo aberto (TOLARDO *et al.*, 2010), e supostamente usam as vias serotoninérgicas, noradrenérgicas e dopaminérgicas do sistema nervoso central (GONÇALVES *et al.*, 2012). A lactona sesquiterpênica 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo ou onoseriolídeo demonstrou atividade antinociceptiva (TRENTIN *et al.*, 1999). Os sesquiterpenolídeos, 15-hidroxi-isogermafurenolídeo, 15-acetoxi-isogermafurenolídeo e 1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina foram testados contra *Mycobacterium tuberculosis*, mas nenhum dos compostos apresentou atividade contra este microorganismo (AMOAHA *et al.*, 2013).

Capítulo 2 Estudo fitoquímico das frações diclorometano, acetato de etila e aquosa do extrato etanólico de *Hedyosmum brasiliense*.

2.1 Introdução

Plantas medicinais não são consideradas confiáveis por muitos profissionais de saúde por causa da falta de pesquisa científica que apoie a sua eficácia e segurança. Em geral, os médicos se sentem inseguros ao prescrever plantas medicinais pois a maioria destas não são estudadas clinicamente, fitoquimicamente e os seus principais metabólitos secundários não são determinados (CANUTO *et al.*, 2012).

Agraciado por uma flora gigantesca e diversificada, a qual engloba muitas plantas medicinais, o Brasil tem apresentado uma grande evolução na produção de artigos científicos nesta área. No entanto, não há informações suficientes e adequadas sobre o registro de extratos e produtos fitoterápicos (BUFAINO, 2013). Isso pode ser devido à falta de pesquisa consistente da parte dos pesquisadores sobre uma planta medicinal específica.

As primeiras documentações sobre estudos fitoquímicos sobre *H. brasiliense* foram em 1997 e 1998 sobre o isolamento das substâncias químicas do extrato etanólico (GUEDES, 1997) e análise do seu óleo essencial (GABRIEL *et al.*, 1998). Após um período de cerca de dez anos, os estudos fitoquímicos foram redocumentados a partir de 2009, onde Oliveira (2009) mostrou o isolamento de algumas lactonas sesquiterpênicas, triterpenos e alguns fenólicos descritos no capítulo 1. Amoah (2011) continuou a exploração do extrato etanólico de *H. brasiliense*, mais especificamente as frações hexano e diclorometano isolando e caracterizando substâncias inéditas e outras já relatadas pelos pesquisadores anteriores. Sendo assim, o presente trabalho buscou dar continuidade aos estudos fitoquímicos nas outras frações e subfrações do extrato etanólico, uma vez que o material se apresentava pronto para exploração e precisava ser estudado para poder elucidar mais metabólitos secundários, assim criando mais informações fitoquímicas adequadas sobre esta espécie.

2.2 Objetivo Geral

Dar continuidade à investigação fitoquímica do extrato etanólico de *Hedyosmum brasiliense*, isolando as substâncias majoritárias e minoritárias para a completa caracterização química e avaliação de atividade biológica.

2.2.1 Objetivos Específicos

- Isolar os metabólitos secundários das frações diclorometano, acetato de etila e da fração aquosa do extrato etanólico das folhas frescas de *Hedyosmum brasiliense* em quantidades suficientes para os ensaios farmacológicos nos sistemas nervoso central (SNC) e cardiovascular.
- Identificar os metabólitos secundários isolados por técnicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM).

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Material de partida

As frações foram preparadas a partir de 5 kg de folhas frescas trituradas em um liquidificador Metvisa LQ4, com etanol bidestilado e macerado por 15 dias. Após este período, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida (HEIDOLPH Laborota 4000) até eliminação total do etanol. O etanol recuperado foi usado para uma nova maceração até o esgotamento extrativo. Foram obtidos aproximadamente 210 g de extrato bruto (5% de rendimento), sendo que deste montante 190 g foram solubilizados em água para a partição líquido – líquido com solventes de diferentes polaridades: hexano, diclorometano e acetato de etila. As frações correspondentes foram concentradas em rotaevaporador, exceto a fração residual aquosa, que foi liofilizada (Liofilizador EC MicroModulyo).

2.3.2 Fracionamento cromatográfico

A subfração diclorometano N (300 mg) foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e como fase móvel diclorometano e gradiente com acetona. O perfil da fração e subfrações foram avaliadas em cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica Gel 60 F254 até o isolamento das substâncias. Ultravioleta e solução de anisaldeído-ácido sulfúrico foram usados como agentes reveladores. Por este procedimento a substância HBH57 foi isolada. A figura 3 mostra o fluxograma do isolamento do HBH57.

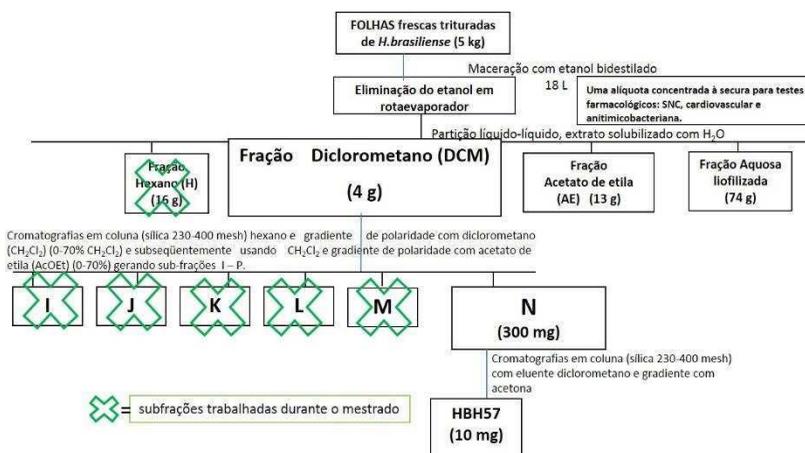


Figura 3. Fluxograma do isolamento da substância HBH57

A fração acetato de etila (10 g) foi submetida a cromatografia líquida a vácuo (CLV) com 200 mL de diclorometano:acetato de etila (9:1 v/v) e aumentando a polaridade com acetato de etila (AE) até 100%. Subsequentemente, aumentou-se a polaridade com metanol até 100%. Assim foram obtidas subfrações 2A, 2B, 2C, 2D, 2E, 2F, 2G, 2H. As subfrações 2B e 2C então foram submetidas a cromatografia sobre sephadex[®] LH-20 empregando metanol como eluente. Após, as suas misturas poucas complexas foram submetidas a sílica gel CC (230-400 mesh) e cromatografia com eluentes variáveis como diclorometano-acetona ou metanol até o isolamento das substâncias. Da subfração 2C foi

isolada as substâncias HBL2C12-13 e da subfração 2B, HBDO44, HBI43 e amostra HBD44 sendo que HBD44 se apresenta como uma mistura de substâncias. A Figura 4 mostra as etapas para o isolamento das substâncias.

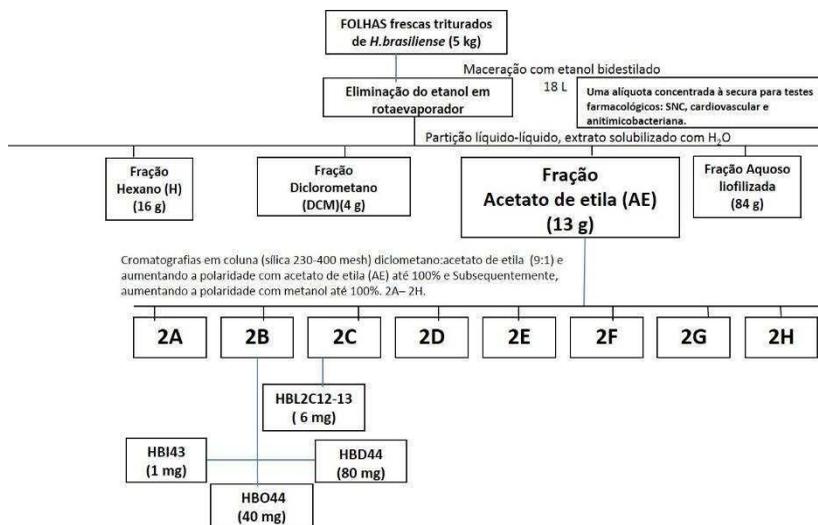


Figura 4. Etapas para isolamento das substâncias da fração acetato de etila de *Hedyosmum brasiliense*.

A fração aquosa (74 g) foi submetida a resina de adsorção XAD-4 com o intuito de adsorver os metabólitos secundários e eliminar os açúcares, já que um dos objetivos deste trabalho é isolar os metabólitos secundários. Primeiramente, a resina foi lavada com água e em seguida colocada em uma coluna de cromatografia. Metanol foi usado como solvente para acondicionar ou ativar a resina por pelo menos cinco horas. Em seguida, a resina foi lavado com água (300 mL) três vezes e subsequentemente a fração aquosa que foi solubilizada em água foi aplicada na coluna com a resina com um fluxo baixo até o termino de adsorção. Após, a resina na coluna foi lavada com água (300 mL) para remover excesso de açúcares

e em seguida as substâncias adsorvidas na resina foram eluídas com metanol. A subfração de metanol obtida (XAD-4MeOH) foi submetida a secagem em um rota evaporador. XAD-4MeOH da fração aquosa então foi submetida a CC em fase normal ou fase reversa ou sephadex LH-20 empregando solventes como acetato de etila–metanol/butanol:ácido acético:água (BAW) ou metanol-água ou metanol respectivamente. A separação cromatográfica levou a isolamento do ácido fenólico HB31, um flavonóide glicosilado HB33, um ácido fenólico simples HB 34 e uma cumarina HB36. As substâncias foram elucidadas através de ressonância magnética nuclear (RMN) 1H, e 2D e em comparação com dados já publicados em literatura. A figura 5 mostra as etapas de isolamento das substâncias.

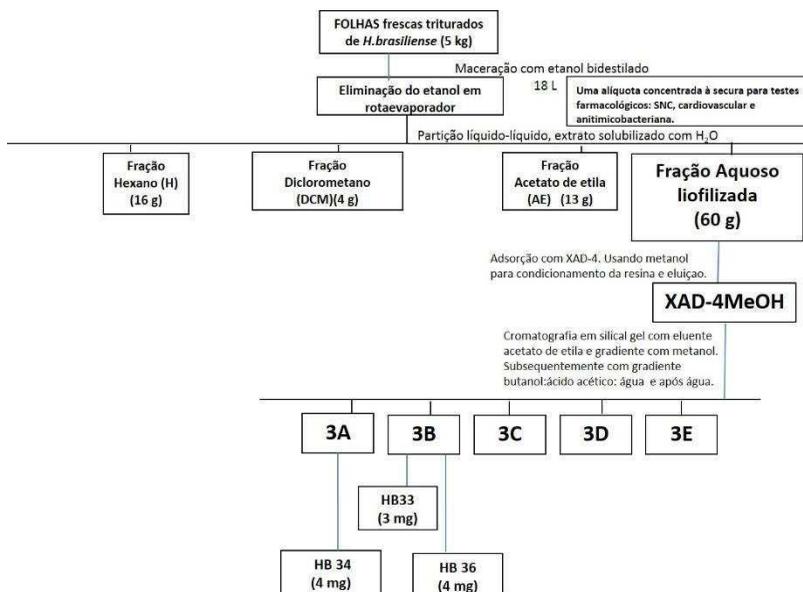


Figura 5. Etapas para isolamento das substâncias da fração aquosa de *Hedyosmum brasiliense*.

2.3.3 Elucidação Estrutural

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C e 2D em equipamento Bruker Avance 400 (400 MHz para hidrogênio e 100 MHz, carbono) ou Bruker Avance 600 (600 MHz para hidrogênio e 150 MHz, carbono), do Departamento de Química, UFPR. Os solventes deuterados empregados foram clorofórmio CDCl_3 , acetona (CD_3COCD_3) e metanol (CD_3OD) conforme a solubilização de cada amostra nos respectivos solventes. Os dados adquiridos (FID) foram processados pelo programa da ACD lab / MestRe-C.

Análises por espectrometria de massas foram realizadas em equipamento micrOTOFQ –ESI-TOF Bruker Daltonics, Billerica, MA ou de íon trap amaZon X (Centro de Biologia Molecular Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC) e em equipamento micrOTOF-Q II (Centro de Estudos em Biofarmácia do Departamento de Farmácia da UFPR).

2.3.4 Atividades Biológicas

As substâncias isoladas foram avaliadas no sistema cardiovascular e no sistema nervoso central (SNC), em colaboração com outros grupos de pesquisa.

2.3.4.1 Sistema cardiovascular

No sistema cardiovascular, o efeito de relaxamento das substâncias foi avaliado em anéis aórticos e corpos cavernoso de ratos. Este estudo foi desenvolvido em colaboração com o Professor José Eduardo da Silva Santos (Departamento de Farmacologia) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para a realização deste estudo foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*), de 3 a 4 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. No dia dos experimentos os animais foram eutanasiados por *overdose* da mistura anestésica de cetamina e xilazina. Após a abertura de sua cavidade torácica para remoção da artéria aorta, o pênis foi cuidadosamente removido e ambos os tecidos foram mantidos em solução salina fisiológica (SSF) para a retirada dos tecidos aderentes. A aorta torácica foi seccionada em anéis de aproximadamente 3-4 mm e o isolamento de duas tiras de corpo cavernoso deu-se pela remoção da veia dorsal peniana

e do tecido esponjoso. Para esses experimentos, anéis de aorta tiveram seu endotélio vascular mantido (E+) ou removido mecanicamente (E-) e após um período de estabilização de 60 minutos os tecidos foram expostos à cloreto de potássio (KCl -120 mM) por 15 minutos. Para testar a viabilidade do endotélio vascular, os tecidos foram novamente estabilizados durante 30 minutos. No ápice da contração causada por essa substância, os tecidos foram expostos a para a adição de cloreto de acetilcolina (Ach - 1 μ M). Anéis aórticos cuja adição de Ach provocou vasodilatação superior a 80% foram considerados com endotélio intacto.

Para a obtenção das curvas de relaxamento as substâncias foram adicionadas às cubas de incubação (10 nM à 100 μ M) logo após um novo período de estabilização de 45 min para o corpo cavernoso e 60 min para os anéis aórticos e exposição à cloridrato de epinefrina (PE - 1 μ M para anéis aórticos, 10 μ M para corpo cavernoso). Em alguns anéis com endotélio íntegro foi previamente incubado em Ng-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME -100 μ M) durante 30 min. Nos experimentos utilizando a fração de hexano (HFHB), os anéis e o corpo cavernoso foram estabilizados por igual período, seguido de pré-contração com PE (1 μ M para os anéis aórticos e 10 μ M para corpo cavernoso) e a curva de relaxamento foi obtida pela adição cumulativa da fração nas concentrações de 3, 10, 30 100 e 300 μ g. Experimentos controle com DMSO (usado para diluição da fração e as substâncias isoladas) foram realizados. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prism® versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA. Para análise das curvas concentração-efeito utilizou-se análise de variância (ANOVA) duas vias, seguida pelo post hoc de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

2.3.4.2 Sistema nervoso central

No SNC, as substâncias foram avaliadas contra o peptídeo β -amiloide 1-42 (A β 1-42) na tarefa de esquiva passiva em camundongos, reconhecida como um modelo de Alzheimer. A avaliação foi desenvolvida em colaboração com a Professora Márcia Maria de Souza (Núcleo de Investigações Químico Farmacêuticas - NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí.

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos Swiss albino de 3 meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade do Vale do Itajaí. Os camundongos foram injectados com o péptideo A β 1-42 (400 pmol/camundongo) ou solução controle (solução

tampão fosfato 0,5 μ L) por via intracerebroventricular (icv) e foram subsequentemente injectados (icv) com as substâncias isoladas. A galantamina (0,1mg/kg, s.c.) foi utilizada como controle positivo. Nove dias após tratamento, os animais tiveram sua memória avaliadas na tarefa de esQUIVA passiva. Na sessão de treinamento, a latência ou tempo de permanência (para descer e colocar as quatro patas na plataforma) foi medida e imediatamente seguida por um choque de 0,4 mA por 3 segundos. Sessões de teste de retenção de memória, idênticos a sessão de treinamento, foram realizadas 24 h após treinamento, sem choque e com latência limitado a 180 s, ou seja, sessão de testes com valores superiores a 180 s foram contados como 180 s. Estatística não paramétrica foi empregada para avaliar os dados. Os dados são expressos como mediana (intervalo interquartil). Usou-se o teste U de Mann-Whitney para avaliar as diferenças entre as sessões de testes e de controles e o teste de Wilcoxon para avaliar as diferenças entre as sessões de treinamento e de teste de retenção.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Caracterização das substâncias isoladas

2.4.1.1 Subfração da fração diclorometano

2.4.1.1.1 Substância HBH57 (aromadendrano-4 β ,10 α -diol)

A substância HBH57 foi obtida como um líquido viscoso. O seu espectro de hidrogênio (Figura 6) apresentou simpletos em δ 1,17 e δ 1,25 com cada sinal apresentando integração de três hidrogênios. Estes correspondem às metilas em posições H-15 e H-14, respectivamente. Ainda houve um sinal em δ 1,04 que integra para seis hidrogênios indicando a presença de mais dois grupos de metilas. Estes foram atribuídos aos hidrogênios em posições H-12 e H-13, respectivamente.

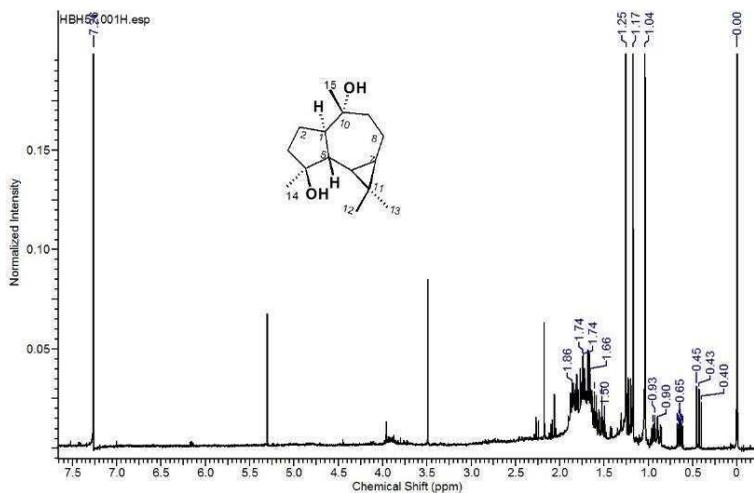


Figura 6. Espectro de RMN de ¹H da substância HBH57 (400 MHz, CDCl₃).

O espectro de RMN de hidrogênio (Figura 7) ainda apresentou um duplete em 1,2 ppm (1H; $J=10,4$ Hz) atribuído à H-5. Ainda, sinais de duplo duplete em 0,43 ppm (1H; $J=9,4$; $J=10,7$ Hz) e duplo duplo duplete 0,67 ppm (1H; $J=6,3$; $J=9,4$; $J=11,0$ Hz) foram atribuídos aos H-6 e H-7, respectivamente. O espectro de RMN de carbono (Figura 8) apresentou 15 sinais indicando um sesquiterpeno. Entre eles, dois sinais desblindados em δ 75,2 e δ 80,5 sugerindo a presença de dois carbonos carbinólicos que foram atribuídos a C-10 e C-4, respectivamente.

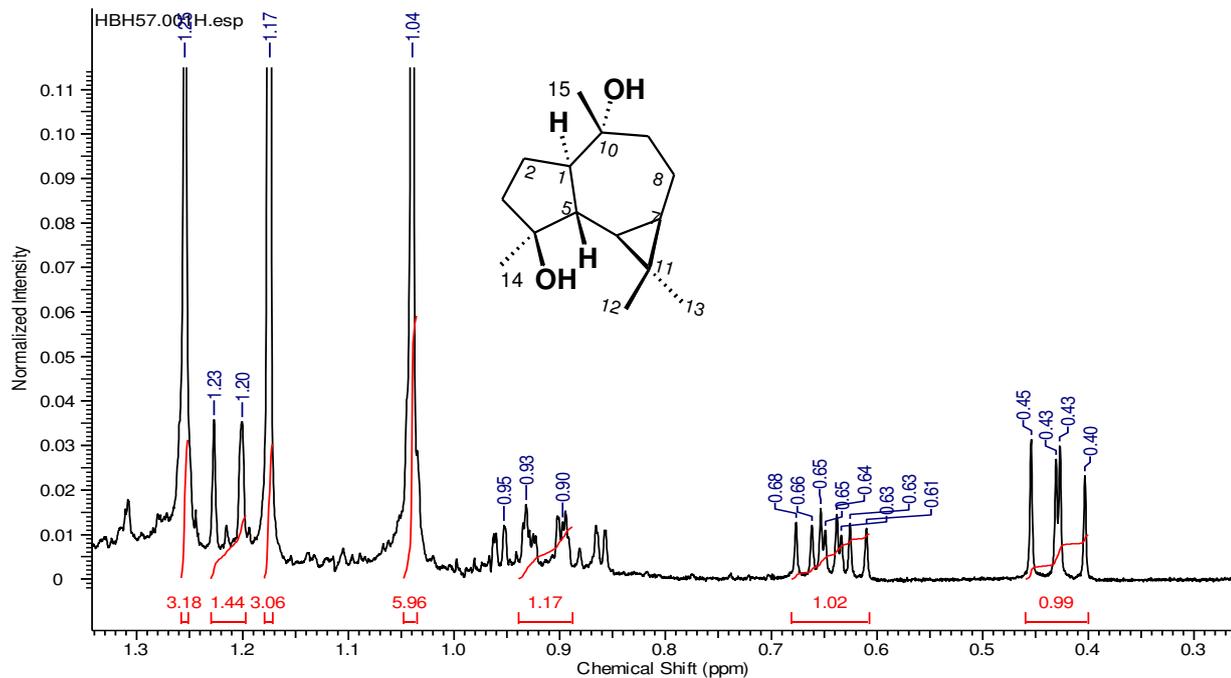


Figura 7. Espectro de RMN de ^1H da substância HBH57 ampliada na região δ 0,26 a δ 1,34.

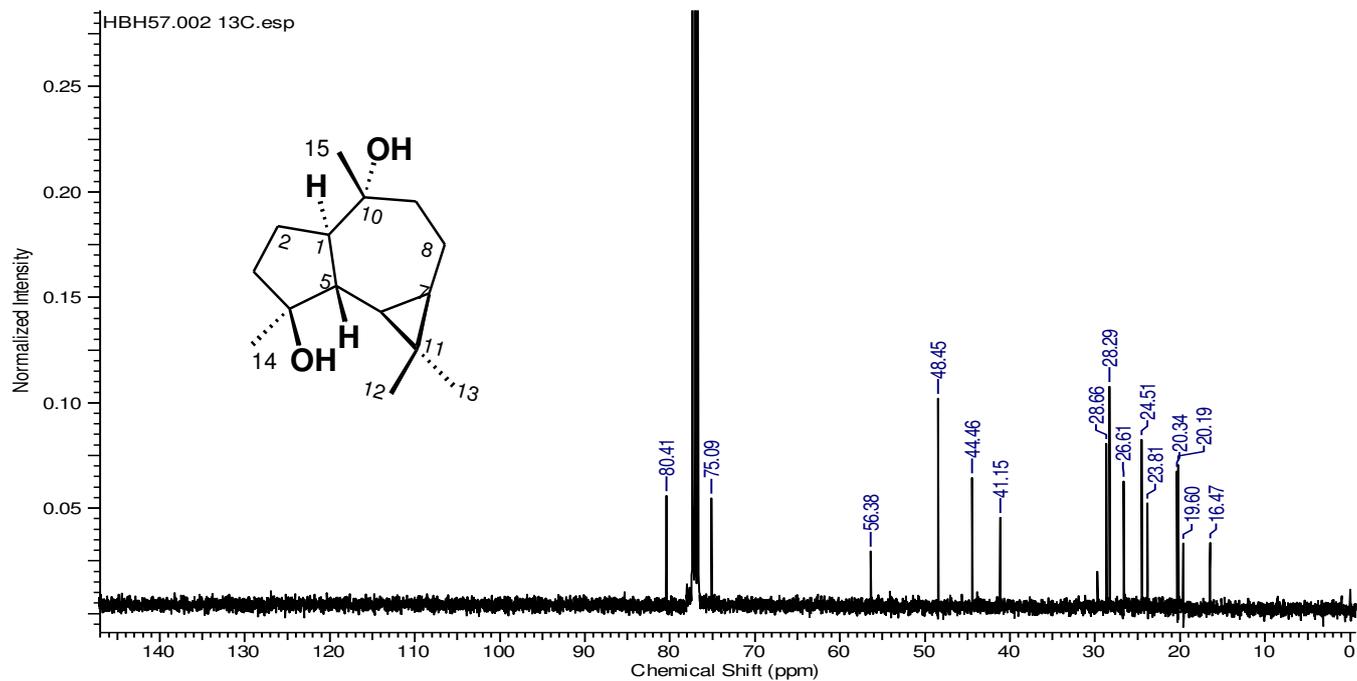


Figura 8. Espectro de RMN de ^{13}C da substância HBH57 (100 MHz, CDCl_3).

Alguns dados para elucidação foram encontrados no espectro de carbono de DEPT 135 (Intensificação sem Distorção por Transferência de Polarização) (Figura 9). Os sinais em 20,2 ppm, 23,8 ppm, 41,2 ppm e 44,5 ppm indicaram a presença de metilenos que foram atribuídos a C-8, C-2, C-3 e C-9 respectivamente. Com os mapas de correlação HSQC (correlação heteronuclear a uma ligação) (Figuras 10 e 11) e HMBC (correlação heteronuclear a longa distância) (Figura 12), foi possível elucidar a estrutura de HBH57 como aromadendrano-4 β ,10 α -diol. A tabela 1 mostra os dados de RMN para elucidação desta substância em comparação com os dados na literatura (MOREIRA *et al.*, 2003). A estereoquímica da estrutura foi determinada comparando os deslocamentos químicos com os dados obtidos por Moreira e colaboradores (2003) que isolaram e caracterizaram vários aromadendranos da *Xylopia brasiliensis*.

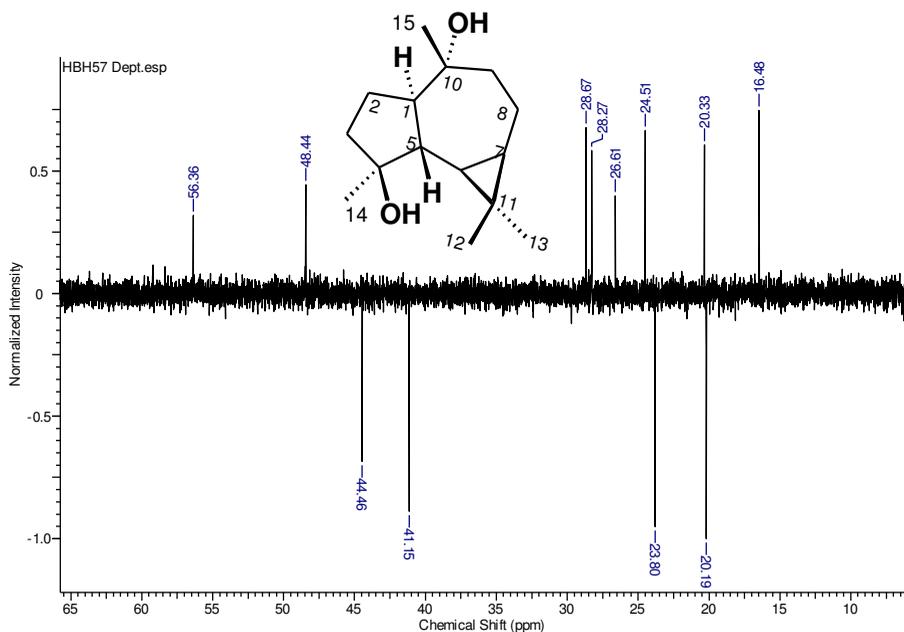


Figura 9. Espectro de RMN de Dept 135 da substância HBH57 (100 MHz, CDCl_3).

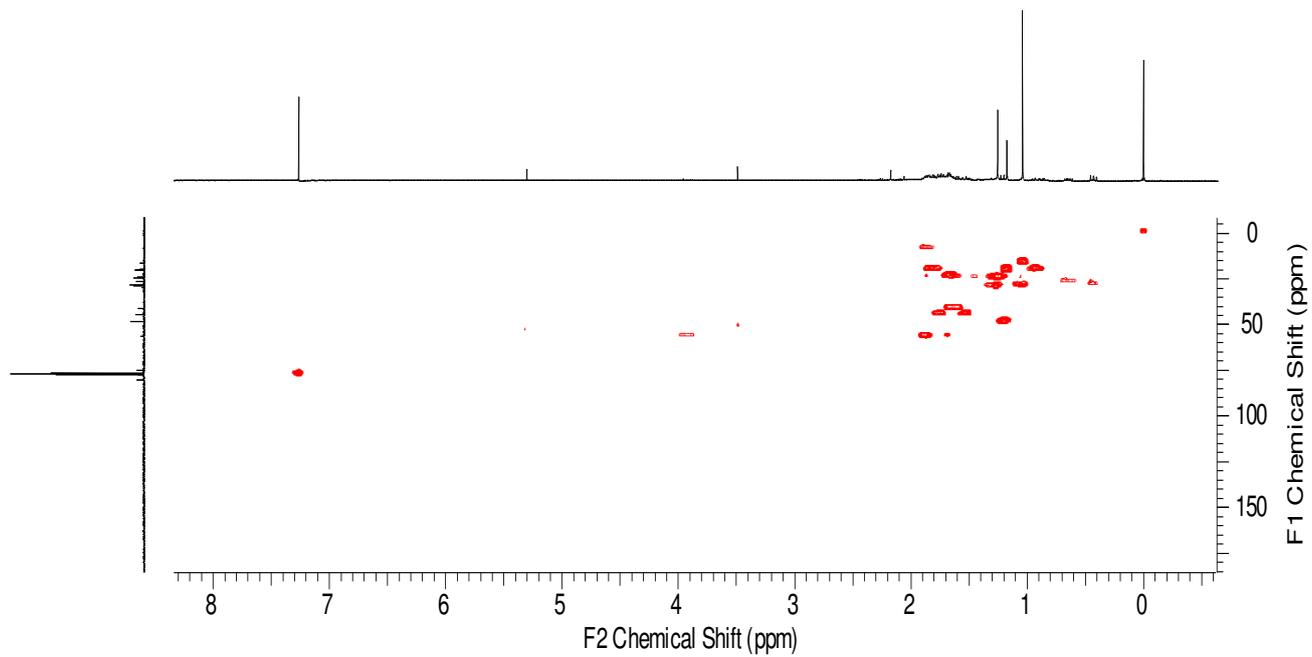


Figura 10. Mapa de correlação de HSQC da substância HBH57.

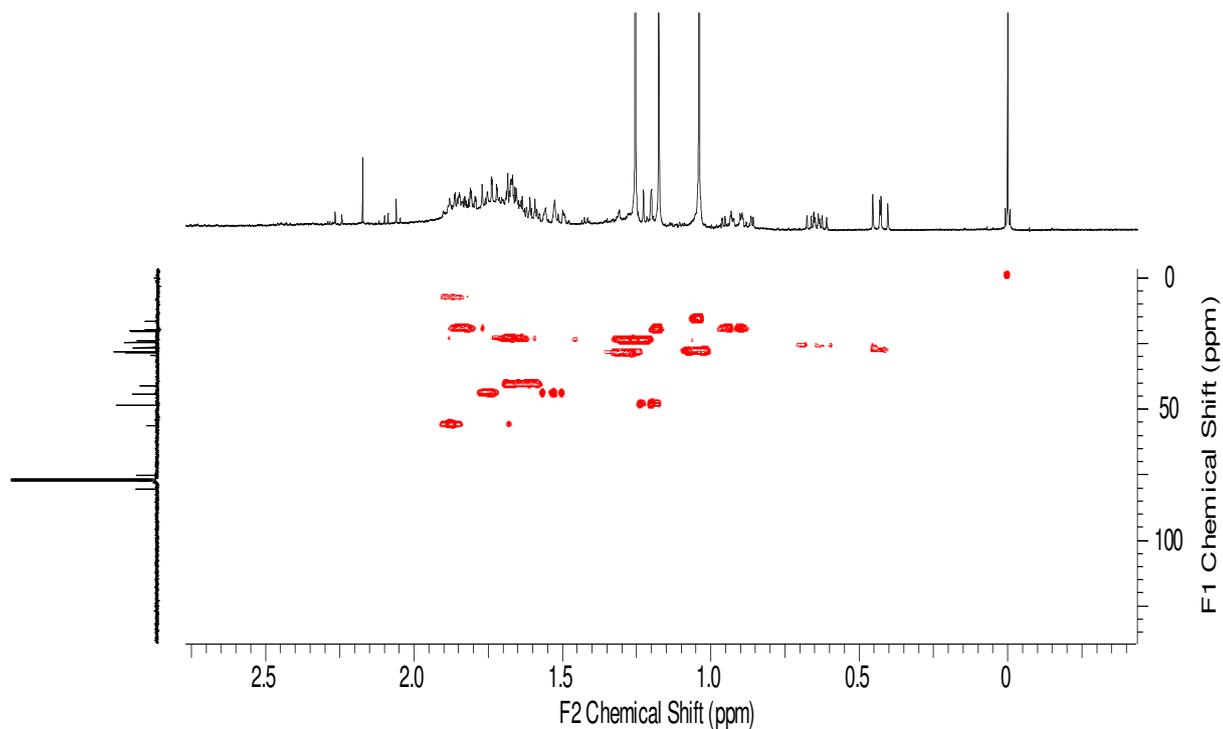


Figura 11. Mapa de correlação de HSQC da substância HBH57 ampliado.

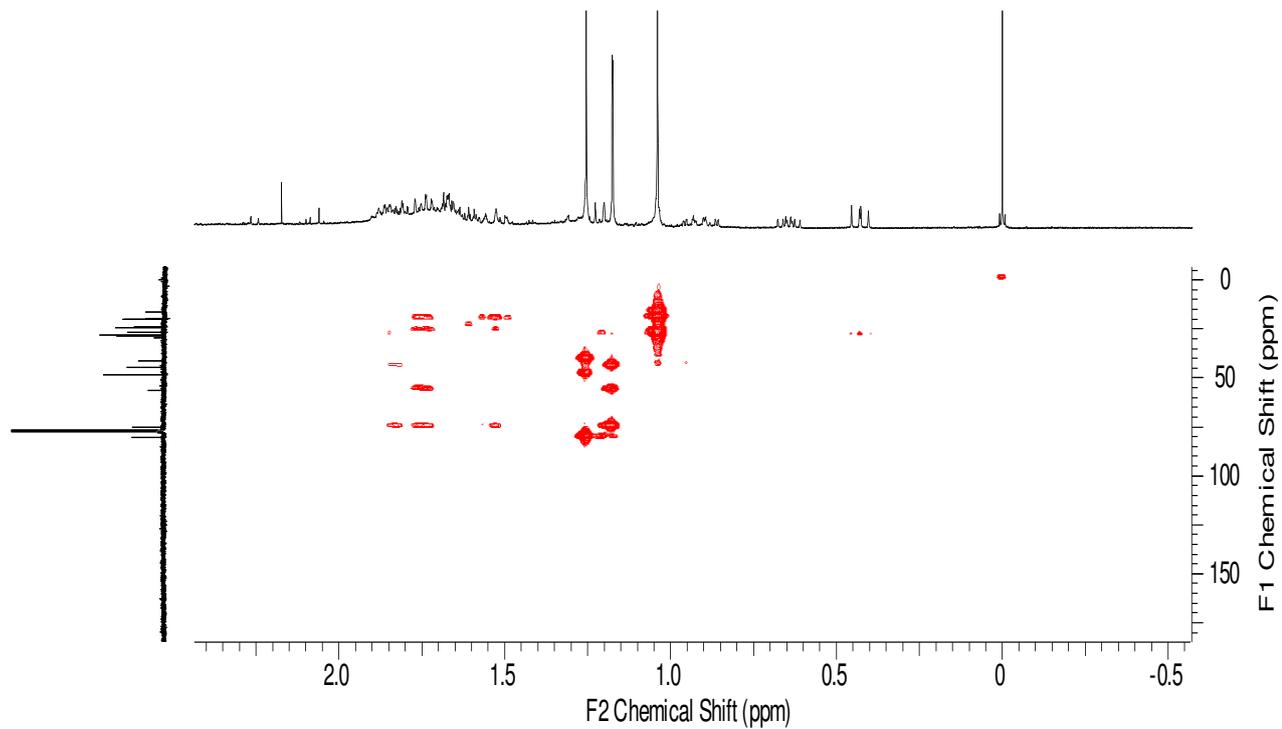


Figura 12. Mapa de correlação de HMBC da substância HBH57 ampliado.

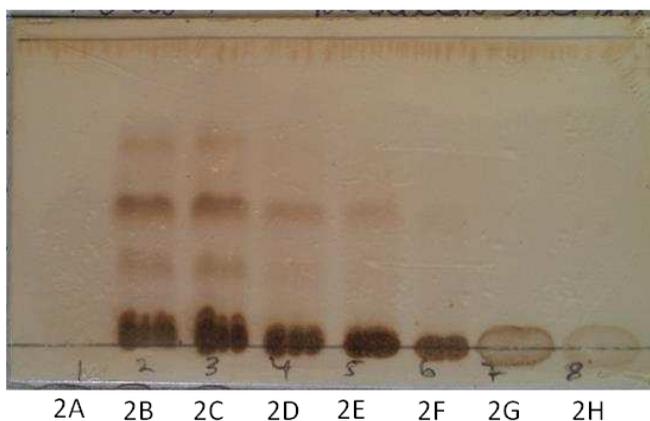
Tabela 1. Dados de RMN ^1H e ^{13}C E 2D da HBH57 (solvente CDCl_3) em comparação com literatura.

Posição	HBH57 ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz)	HBH57 ^{13}C (ppm)	HBH57 HMBC	^{13}C (ppm) (Moreira et al 2003; 75 MHz, CDCl_3)
1	1,87 m	56,4	6, 9, 10	56,2
2	1,65 2H m	23,8	3	23,7
3	1,60 m 1,66 m	41,2	2, 4	41,0
4		80,5		80,1
5	1,20 d (10,7)	48,4	4	48,2
6	0,43 dd (9,4; 10,7)	28,3	7	28,3
7	0,68 ddd (11,0; 9,4; 6,3)	26,6	6	26,5
8	0,92 m 1,82 m	20,2	6, 9, 10,	20,0
9	1,52 m 1,74 m	44,5	1, 7, 8, 10	44,3
10		75,2		74,8
11		19,6		19,4
12	1,04 s	28,7	7, 8, 11, 13,	28,5
13	1,04 s	16,5	7, 8, 11, 12,	16,3
14	1,25 s	24,5	3, 4, 5	24,3
15	1,17 sl	20,3	1, 9, 10	20,0

Xylopi *brasiliensis* é empregado na medicina popular como calmante e analgésico. Os aromadendranos já foram encontrados em corais marinhos (BEECHAN *et al.*, 1978) e em *Landolphia dulcis* (STÆRK *et al.*, 2004). Recentemente, um aromadendrano foi isolado de *Chlorantus elatior* (XIONG *et al.*, 2013) que pertence à mesma família de *Hedyosmum brasiliense*.

2.4.1.2 Fração acetato de etila (FAE)

A figura 13 mostra a CCD das subfrações produzidas da FAE após a CLV. Subfrações 2B e 2C mostram perfis cromatográficos mais complexos. Portanto foram submetidas ao procedimento conforme item 2.3.2, o qual levou ao isolamento de HBL2C12-13, HBDO44, HBI43 e amostra HBD44.



Fase móvel – diclorometano:metanol (7:3)

Reagente – solução de anisaldeído-ácido sulfúrico e aquecimento

Figura 13. Cromatoplaça das subfrações da fração acetato de etila.

2.4.1.2.1 Substância HBL2C12-13 (ácido rosmarínico)

O espectro de RMN de hidrogênio (Figura 14) mostrou sinais típicos de hidrogênios de anéis aromáticos em δ 7,55; δ 7,05; δ 6,95; δ 6,78; δ 6,75, δ 6,70; δ 6,61; δ 6,27 com acoplamentos entre si, indicando que a substância poderia ser um fenólico. Os sinais de duplo duplete em δ 6,95 (1H, $J= 8,2; 2,1$ Hz), duplete em δ 6,78 (1H, $J= 8,2$ Hz) e duplete em 7,05

(1H, $J=2,1$ Hz) (Figura 15) indicando um sistema ABX foram atribuídos aos hidrogênios H-6, H-5, H-2, respectivamente. Os sinais em 6,61 ppm (1H, dd; $J= 8,1; 2,1$ Hz), 6,70 ppm (1H, d; $J= 8,1$ Hz) e 6,75 ppm (d; $J= 2,1$ Hz) indicando um sistema ABM foram atribuídos à H-6', H-5' e H-2', respectivamente. Ainda, os sinais de dupletos em 7,55 ppm e 6,27 ppm, cada um com constante de acoplamento $J= 15,9$ Hz, foram atribuídos aos hidrogênios em H-7 e H-8, respectivamente, indicando a configuração *trans* dos hidrogênios olefínicos. Os sinais em δ 3,00 (1H, dd; $J= 14,4; 8,4$ Hz) e 3,10 (1H, dd; $J= 14,4; 4,4$ Hz) foram atribuídos a H-7'a e H-7'b, respectivamente. O sinal de duplo duplete em δ 5,19 (1H, $J= 8,4; 4,4$ Hz) foi atribuído a H-8'.

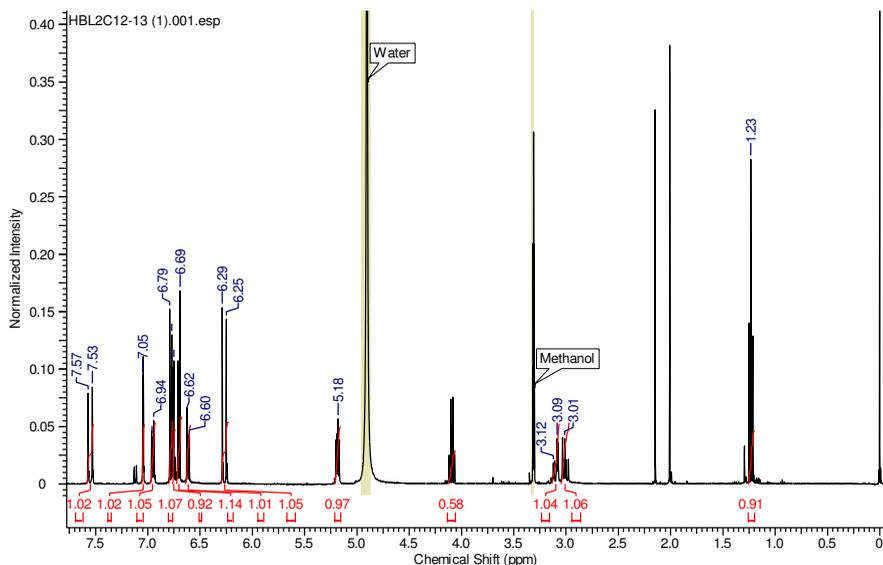


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H da substância HBL2C12-13 (400 MHz, CD_3OD).

Observou-se ainda, sinais em δ 4,09 e δ 1,23, indicando hidrogênios ligados a um átomo eletronegativo e uma metila, respectivamente. Entretanto, a integração do sinal em δ 4,09 foi 0,58 e o sinal em δ 1,23

integrou para 0,91 e estes hidrogênios não se correlacionaram com nenhum carbono no espectro de correlação de HSQC (Figura 16). Sendo assim, estes sinais foram considerados como impurezas ou sinais de uma substância em mistura, mas em pequena quantidade.

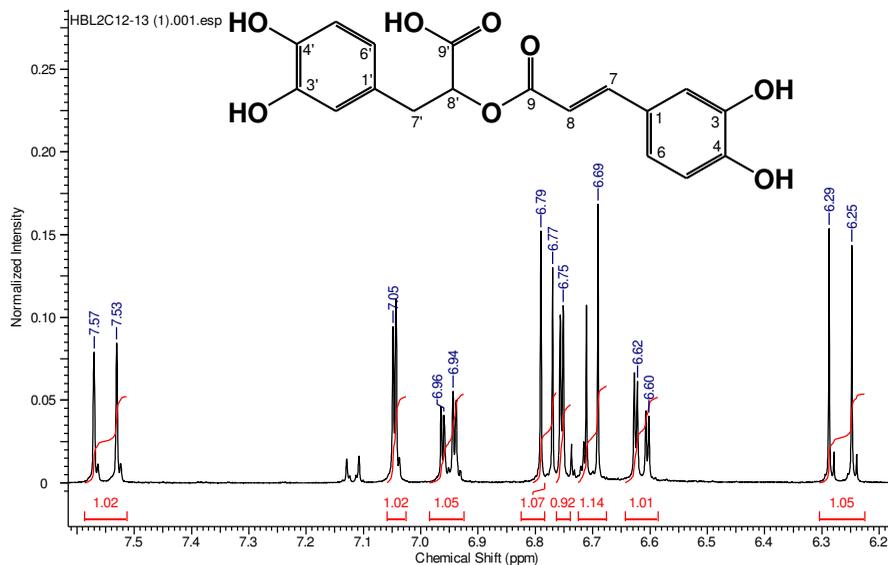


Figura 15. Espectro de RMN ^1H da substância HBL2C12-13 ampliada na região δ 6,24 a δ 7,57.

Com o mapa de correlação HSQC (Figura 16) foi possível correlacionar os hidrogênios com os respectivos carbonos. Já no mapa de correlação HMBC (Figura 17) foram encontrados os carbonos com δ 168,6 e 173,6 mostrando a presença de duas carbonilas.

Com a correlação HSQC e a HMBC foi possível observar e identificar os carbonos e hidrogênios com as suas vizinhanças (tabela 2) e em comparação com dados da literatura (HA *et al.*, 2012), a substância HBL2C12-13 foi elucidada como sendo o ácido rosmarínico (Figura 18).

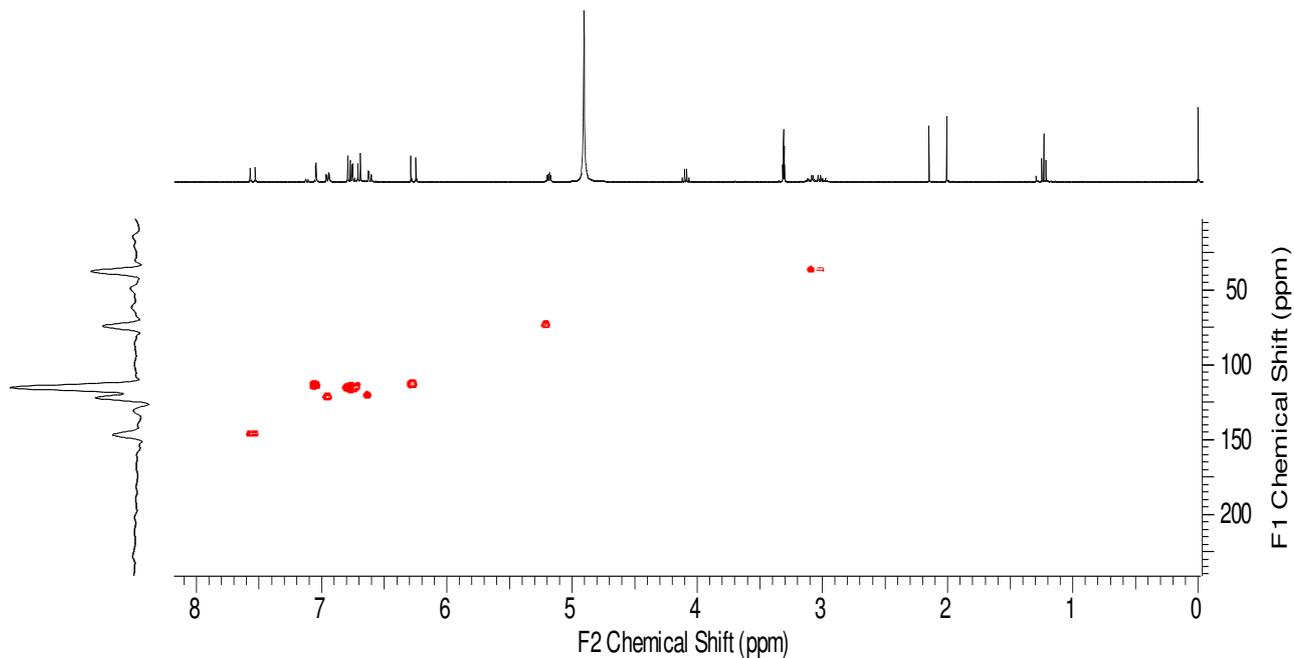


Figura 16. Mapa de correlação de HSQC da substância HBL2C12-13 ampliado.

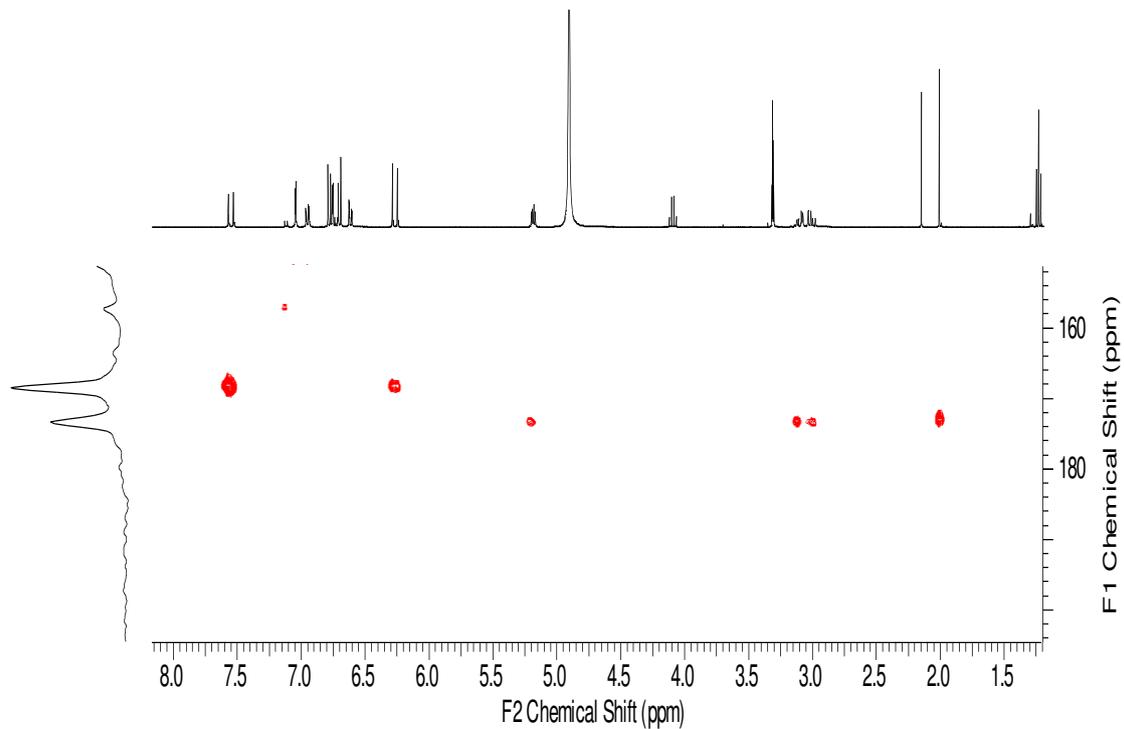


Figura 17. Mapa de correlação de HMBC da substância HBL2C12-13 ampliado mostrando a presença de duas carbonilas.

O ácido rosmarínico é um fenólico ubíquo que se encontra especialmente nas famílias Boraginaceae e Lamiaceae (PETERSEN, 2013). Foi isolado pela primeira vez da *Rosmarinus officinalis* e possui atividades biológicas e farmacológicas, como antitumoral e propriedades neuroquímicas e antioxidantes (KRAJCOVICOVÁ; MELUS, 2013). Cabe destacar que está é a primeira vez que esta substância está sendo relatada para *H. brasiliense*.

Tabela 2. Dados de RMN ^1H , ^{13}C da HBL2C12-13 (solvente CD_3OD) em comparação com literatura.

	^1H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	^{13}C RMN	HMBC ^b	Ha et al. 2012 500 MHz, 125 MHz (CD_3OD)	
				^1H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	^{13}C RMN
1	-	127,8		-	128,1
2	7,05 (<i>d</i> ; 2,1)	115,2	4/6/7	7,04 (<i>d</i> ; 2,0)	115,6
3	-	146,9		-	147,2
4	-	149,7		-	150,1
5	6,78 (<i>d</i> ; 8,2)	117,0	1/3/4	6,77 (<i>d</i> ; 8,1)	116,9
6	6,95 (<i>dd</i> ; 8,2; 2,1)	123,1	2/4/7	6,94 (<i>dd</i> ; 8,2; 2,0)	123,6
7	7,55 (<i>d</i> ; 15,9)	147,7	1/2/6/8/9	7,54 (<i>d</i> ; 15,9)	148,1
8	6,27 (<i>d</i> ; 15,9)	114,3	1/9	6,26 (<i>d</i> ; 15,9)	114,9
9	-	168,6		-	168,9
1'	-	129,4		-	129,8
2'	6,75 (<i>d</i> ; 2,1)	117,7	4'/6'/7'	6,74 (<i>d</i> ; 2,0)	117,9
3'	-	146,3		-	146,6
4'	-	145,3			145,7
5'	6,70 (<i>d</i> ; 8,1)	115,9	1'/3'	6,69 (<i>d</i> ; 8,0)	116,7
6'	6,61(<i>dd</i> ; 8,1; 2,1)	121,9	2'/4'/7'	6,61(<i>dd</i> ; 8,1; 2,0)	122,2
7'	3,00 (<i>dd</i> ; 14,4; 8,4)	38,0	1'/2'/6'/8 '/9'	3,00 (<i>dd</i> ; 14,4; 8,5) 3,09 (<i>dd</i> ; 14,4; 4,28)	38,4
	3,10 (<i>dd</i> ; 14,4; 4,4)		1'/2'/6'/8 '/9'		
8'	5,19 (<i>dd</i> ; 8,4; 4,4)	74,6	9/1'/7'/9'	5,17 (<i>dd</i> ; 8,4; 4,2)	75,2
9'	-	173,6		-	174,1

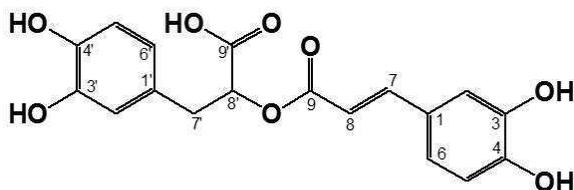


Figura 18. Estrutura de HBL2C12-13 (ácido rosmarínico).

2.4.1.2.2 Substância HBO44 (Rosmarinato de etila)

O espectro de hidrogênio de HBO44 (Figura 19) mostrou sinais de hidrogênios similares com o espectro do ácido rosmarínico, sendo: δ 7,56; 7,05; 6,96; 6,78; 6,73; 6,71; 6,59; 6,27. As únicas diferenças foram encontradas nos sinais nos deslocamentos químicos 4,15 ppm (2H, q; $J=7,1$ Hz) e 1,21 ppm (3H, t; $J=7,1$ Hz) (Figura 20) que correlacionaram no mapa de correlação de HSQC (Figura 21) com os carbonos em 62,2 e 14,3 ppm, respectivamente. Estes hidrogênios foram atribuídos a H-1'' e H-2'', respectivamente.

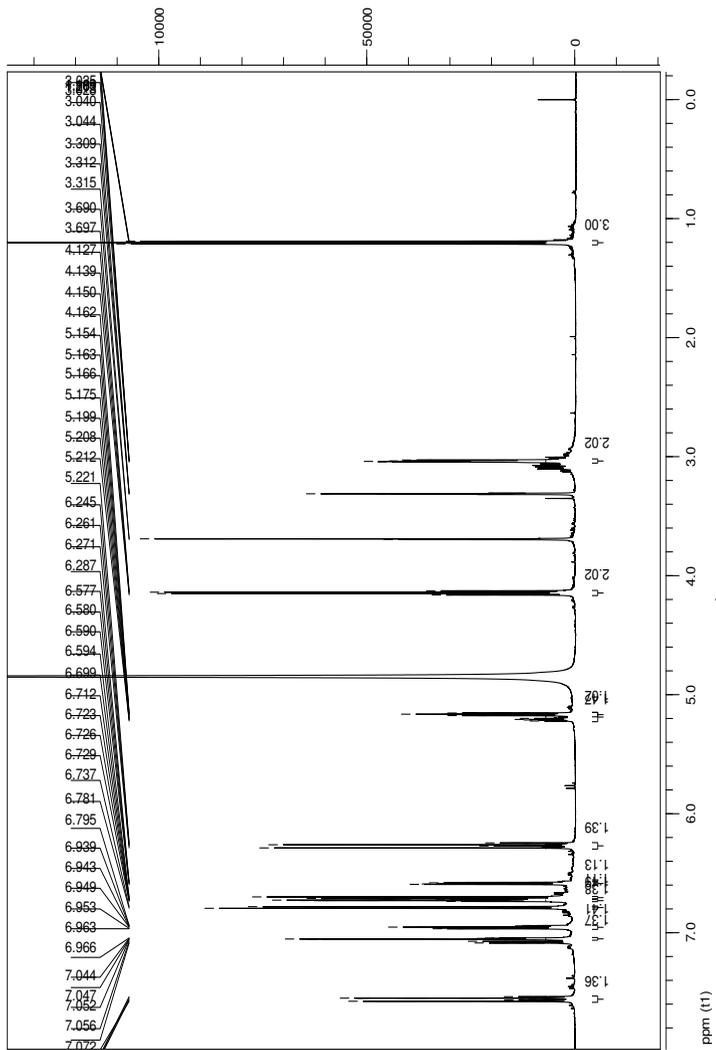


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H da substância HBO44 (600 MHz, CD_3OD).

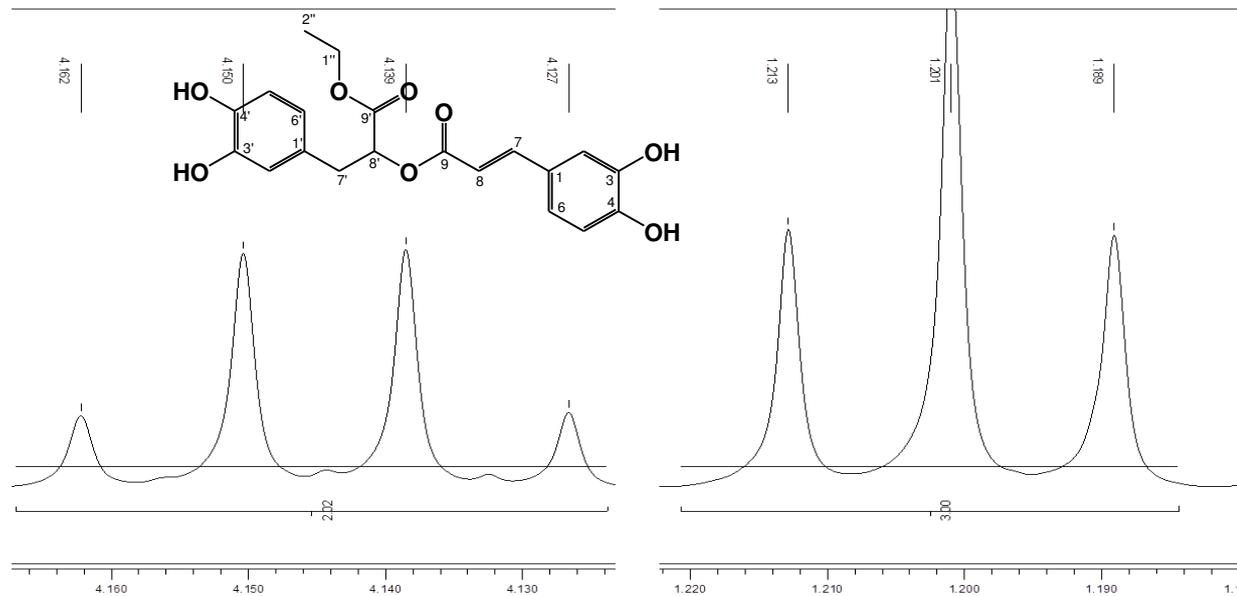


Figura 20. Espectro de RMN de ¹H da substância HBO44 ampliado mostrando δ 4,16 a 4,13 e 1,22 a 1,18 (600 MHz, CD₃OD).

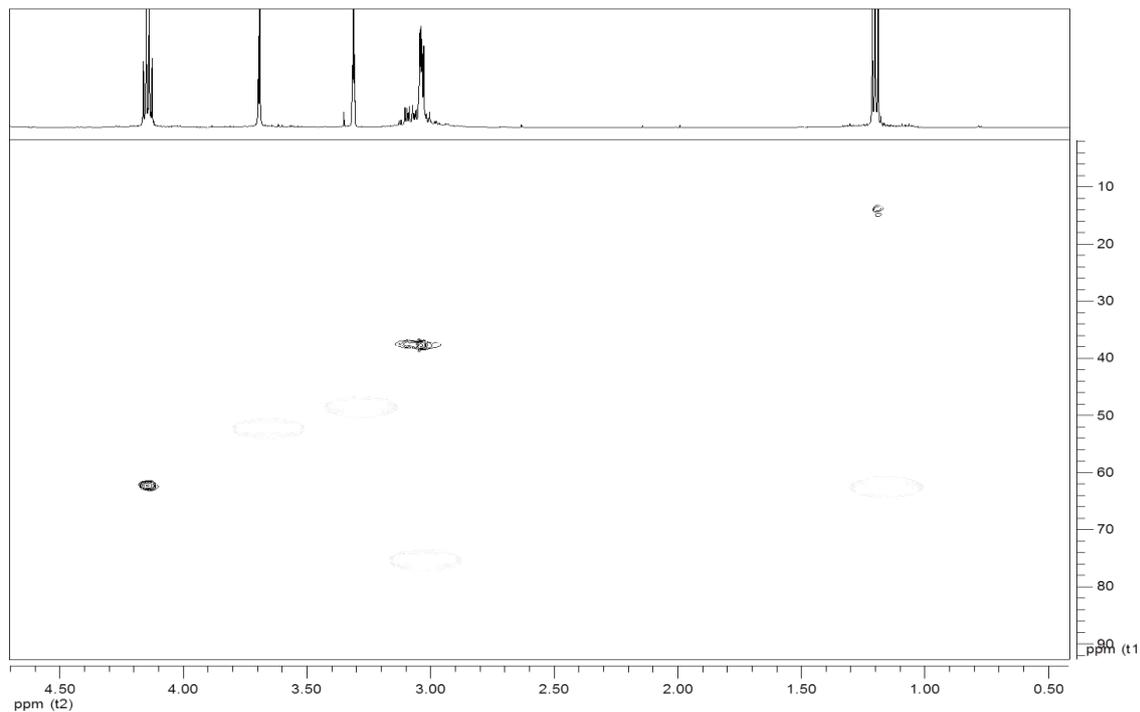


Figura 21. Mapa de correlação de HSQC da substância HBO44 ampliado mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios em 4,15 ppm e 1,21 ppm.

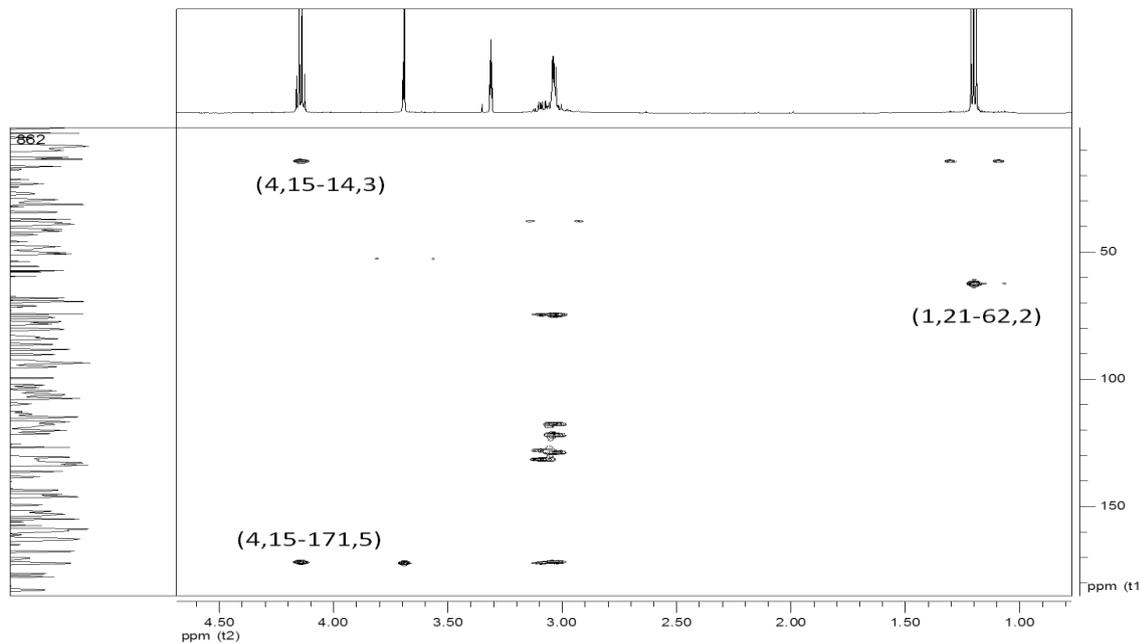


Figura 22. Mapa de correlação de HMBC da substância HBO44 mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios em 4,15 ppm e 1,21 ppm.

Ainda, o sinal de hidrogênio em 4,15 ppm, correlacionou-se no mapa de correlação HMBC com os carbonos em 171,5 ppm (C-9') e 14,3 ppm (C-2'') (Figura 22). Diante do exposto foi possível inferir que o grupo carboxílico na posição 9' na substância HBL2C12-13 (ácido rosmarínico – item 4.2.2.1) tinha sido esterificado com um grupo etila, um artefato que pode ser produzido durante o processo de extração com etanol. A substância HBO44 foi elucidada como rosmarinato de etila (figura 23). Na tabela 3 estão compilados os dados de RMN de 1D e 2D do composto HBO44 em comparação com os dados obtidos do ácido rosmarínico.

Tabela 3. Dados de RMN ^1H e ^{13}C e 2D da HBO44 em comparação com os dados de HBL2C12-13.

Posição	HBO44 (150 e 600 MHz, CD_3OD)			HBL2C12-13 (100 e 400 MHz, CD_3OD)	
	^1H NMR (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	^{13}C NMR	HMBC ^b	^1H NMR (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	^{13}C NMR
1	-	127,5		-	127,8
2	7,05 (<i>d</i> ; 2,0)	115,2	3/4/6/7	7,05 (<i>d</i> ; 2,1)	115,2
3	-	147,2		-	146,9
4	-	149,8		-	149,7
5	6,78 (<i>d</i> ; 8,2)	116,3	1/3/4	6,78 (<i>d</i> ; 8,2)	117,0
6	6,96 (<i>dd</i> ; 8,2, 2,0)	123,3	2/4/7	6,95 (<i>dd</i> ; 8,2, 2,1)	123,1
7	7,56 (<i>d</i> ; 15,8)	147,7	2/6/8/9	7,55 (<i>d</i> ; 15,9)	147,7
8	6,27 (<i>d</i> ; 15,8)	114,1	1/9	6,27 (<i>d</i> ; 15,9)	114,3
9	-	168,6		-	168,6
1'	-	128,9		-	129,4
2'	6,73 (<i>d</i> ; 2,1)	117,5	4'/6'/7'	6,75 (<i>d</i> ; 2,1)	117,7
3'	-	146,2		-	146,3
4'	-	145,5		-	145,3
5'	6,71 (<i>d</i> ; 8,0)	116,1	1'/3'	6,70 (<i>d</i> ; 8,1)	115,9
6'	6,59 (<i>dd</i> ; 8,0, 2,1)	121,6	2'/4'/5'/ 7'	6,61(<i>dd</i> ; 8,1, 2,1)	121,9
7'	3,04 m	37,8	2'/6'/8'/ 9' 2'/6'/8'/ 9'	3,00 (<i>dd</i> ; 14,4, 8,4) 3,10 (<i>dd</i> ; 14,4, 4,4)	38,0
8'	5,15 (<i>dd</i> ; 7,5, 5,9)	74,7	9/1'/7'/ 9'	5,19 (<i>dd</i> ; 8,4, 4,4)	74,6
9'	-	171,5			173,6
1''	4,15 (<i>q</i> ; 7,1)	62,2	9'/2''		
2''	1,21 (<i>t</i> ; 7,1)	14,3	1''		

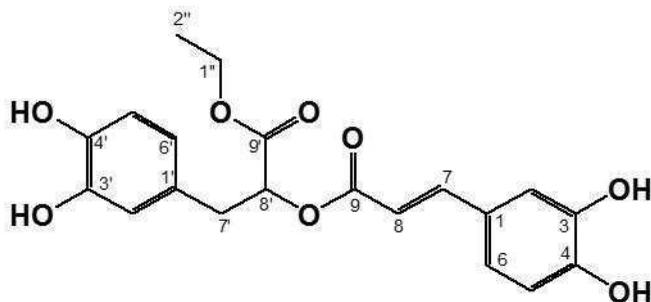


Figura 23. Estrutura de HBO44.

2.4.1.2.3 Substância HBI43 (Canferol)

A substância HBI43 foi isolada como um pó amarelo (1 mg). O espectro de RMN hidrogênio de HBI43 (Figura 24) mostrou os sinais de hidrogênios em sp^2 , típicos de uma substância fenólica com sinais de hidrogênios entre 6,19 ppm a 8,09 ppm.

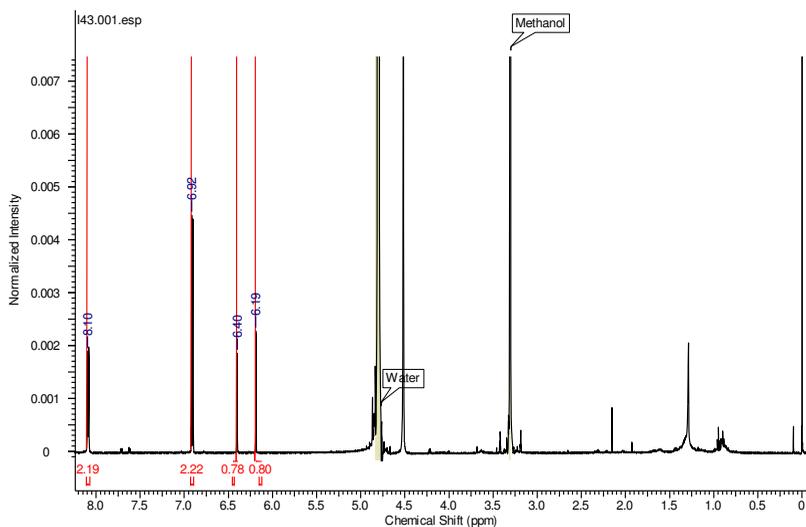


Figura 24. Espectro de RMN de 1H da substância HBI43 (600 MHz, CD_3OD).

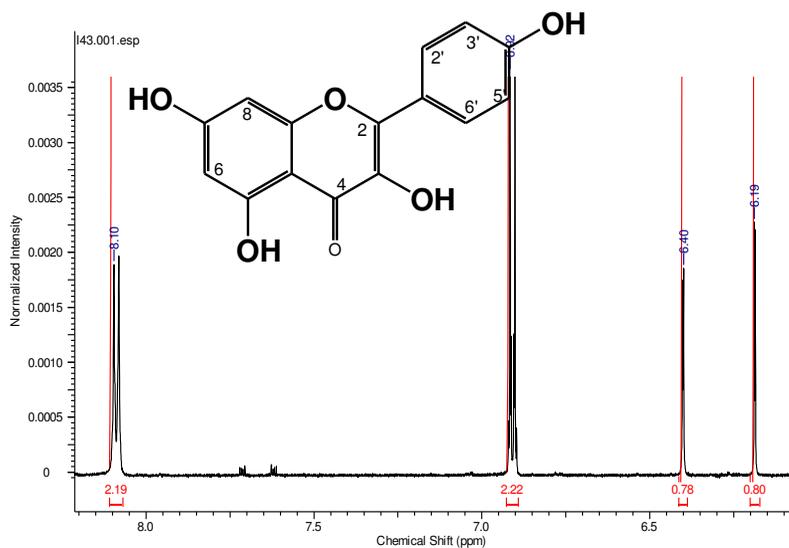


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H da substância HBI43 ampliado na região 6,18 ppm a 8,12.

O espectro de RMN de hidrogênio mostrou um anel com o sistema tipo AB no anel A com um acoplamento em *meta*, uma vez que foi possível observar dois sinais de dupletos em δ 6,19 (H-6; $J= 2,0$ Hz) e δ 6,40 (H-8; $J= 2,0$ Hz) (Figura 25) caracterizando os hidrogênios nos C-6 e C-8 de flavonóis. O espectro ainda apresentou dois sinais de dupletos em δ 8,09 (2H, $J= 8,9$ Hz) e δ 6,91 (2H, $J= 8,9$ Hz) caracterizando um sistema de anel na forma de AA'XX'. Os dois hidrogênios em 8,09 ppm foram atribuídos a H-2' e H-6' e os outros dois hidrogênios em 6,91 ppm foram atribuídos a H-3' e H-5'. Os dados obtidos foram comparados com dados da literatura (HADIZADEH *et al.*, 2003) e, assim, este flavonol foi identificado como o composto kaempferol (Figura 29). A tabela 4 mostra os dados de RMN ^1H de kaempferol em comparação com os dados na literatura. Ainda o espectro de massas obtido no *ion-trap* no (ESI-modo negativo) mostrou um íon molecular em 285,36 Da (Figura 26).

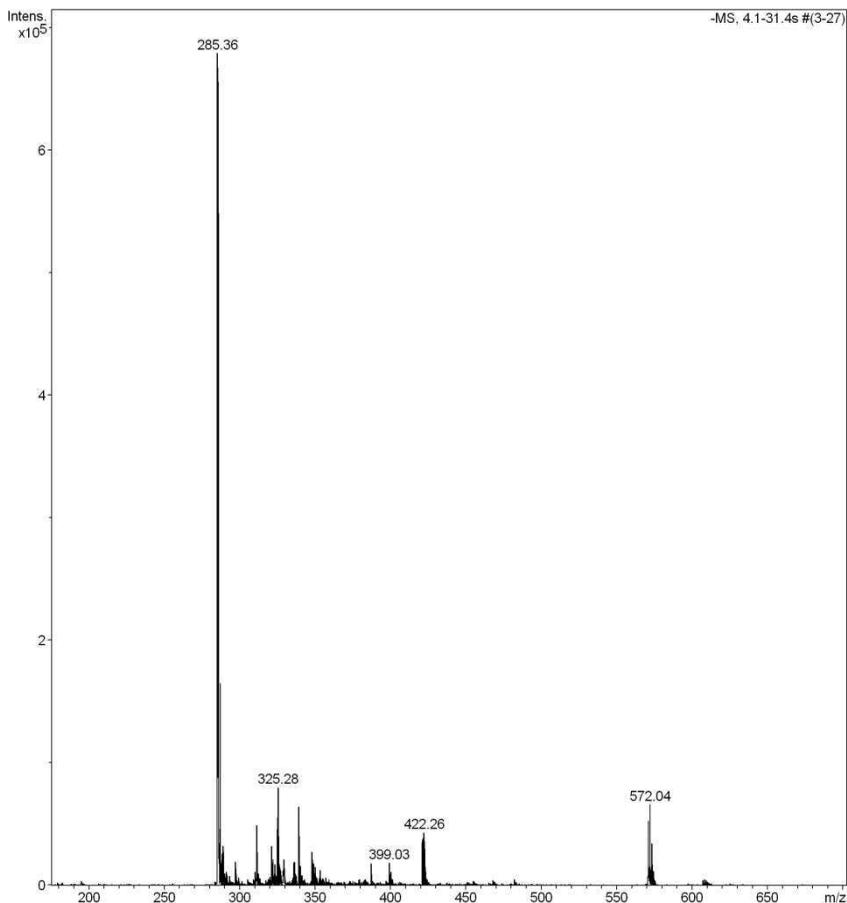


Figura 26. Espectro de Massas no *ion-trap* HBI43 (Modo negativo) full Scan.

A fragmentação do íon molecular gerou íon filhos em m/z 257 que indica a perda do grupo C=O (Figura 28) e o íon filho em m/z 151, o qual é um fragmento característico de Retro-Diels-Alder (RDA) de um flavonol como demonstrado (Figura 27) (FABRE *et al.*, 2001). Os dados estão concordantes com os dados descritos por Elabbar et al (ELABBAR *et al.*, 2014), corroborando assim com a identificação de HBI43 como

kaempferol (Figura 29). É pela primeira vez que o isolamento de um flavonoide de *H. brasiliense* está sendo relatado.

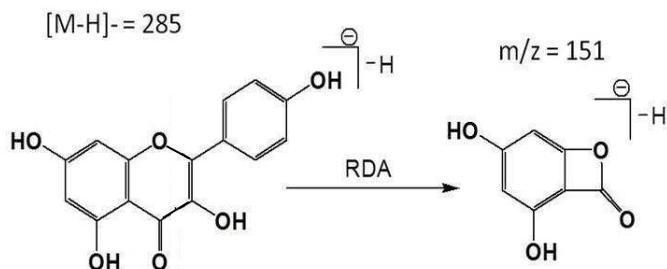


Figura 27. Fragmento característico de Retro-Diels-Alder (RDA)

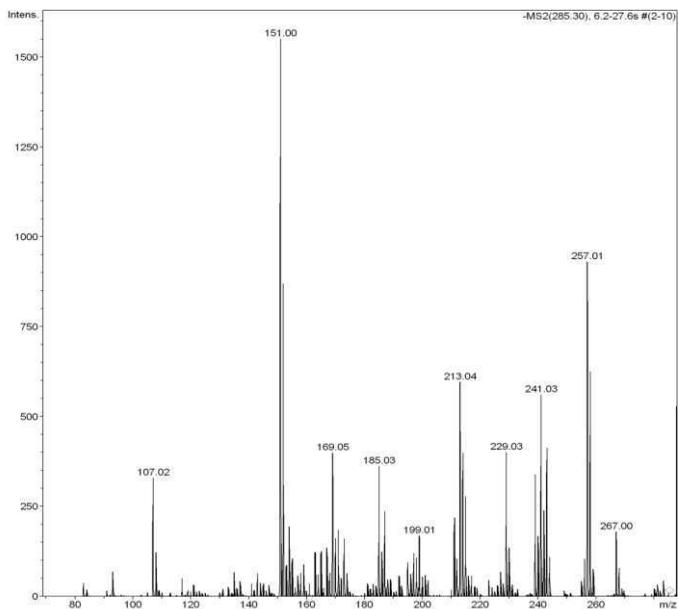


Figura 28. Espectro de massas no íon-trap HBI43 (ESI Modo negativo) mostrando a fragmentação do íon molecular 285.

Tabela 4. Dados de ^1H RMN de HBI43 em comparação com dados na literatura.

	HBI43 (600 MHz) CD_3OD	(HADIZADEH <i>et al.</i> , 2003; 100 MHz) CD_3OD
Posição	^1H RMN (<i>mult.</i> J Hz)	^1H RMN (<i>mult.</i> ; J Hz)
6	6,19 (<i>d</i> ; 2,0)	6,27 (<i>d</i> ; 1,9)
8	6,40 (<i>d</i> ; 2,0)	6,46 (<i>d</i> ; 1,94)
2'	8,09 (<i>d</i> ; 8,9)	8,15 (<i>d</i> ; 8,86)
3'	6,91 (<i>d</i> ; 8,9)	6,99 (<i>d</i> ; 8,87)
5'	6,91 (<i>d</i> ; 8,9)	6,99 (<i>d</i> ; 8,87)
6'	8,09 (<i>d</i> ; 8,9)	8,15 (<i>d</i> ; 8,86)

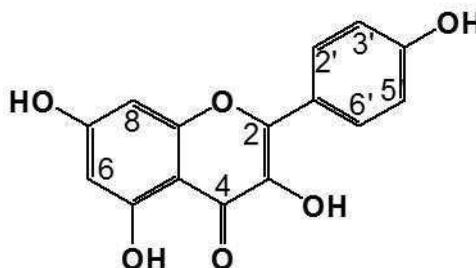


Figura 29. Estrutura química da substância HBI43.

2.4.1.2.4 Amostra HBD44 (Oresbusina A, Ácido vanílico, Aldeído protocatéquico)

O espectro de hidrogênio de HBD44 (Figura 30) mostrou um simpleto em δ 9,69 (1H) um sinal típico de um grupo aldeído. Ainda, foram observados sinais de hidrogênio ligados a carbonos sp^2 típicos de uma substância fenólica com deslocamento entre 6,50 ppm a 7,56 ppm (Figura 31).

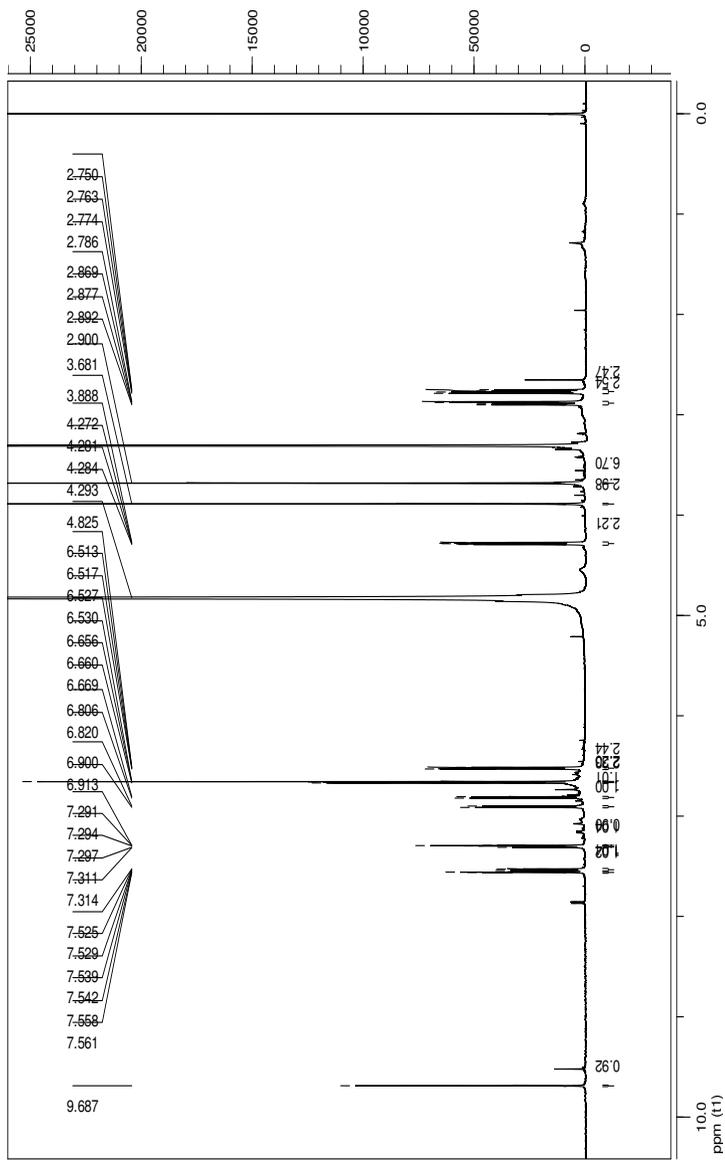


Figura 30. Espectro de RMN de ¹H da amostra HBD44 (600 MHz, CD₃OD).

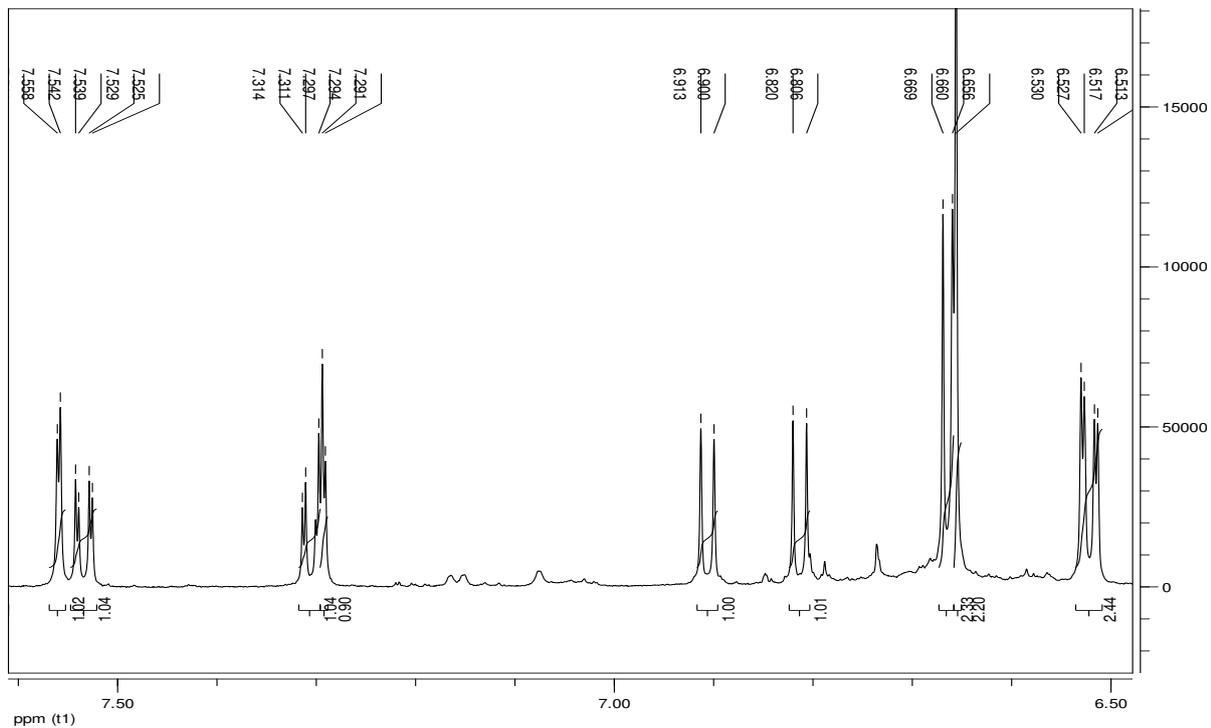


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H da amostra HBD44 ampliado na região 6,50 ppm a 7,60 ppm.

Ao analisar o espectro de hidrogênio, observaram-se sinais em δ 7,56 (d; $J=1,9$ Hz), δ 7,54 (dd; $J= 8,0; 1,9$ Hz), δ 7,30 (dd; $J=8,0; 1,8$ Hz), δ 7,29 (d; $J= 1,8$ Hz), δ 6,91 (d; $J= 8,0$ Hz), δ 6,82 (d; $J= 8,0$ Hz) sendo que cada sinal integrava para um hidrogênio (1H). Já os sinais em δ 6,67 (d; $J= 8,0$), δ 6,66 (d; $J= 2,2$), δ 6,52 (dd; $J= 8,0; 2,0$) apresentavam integração para dois hidrogênios (2H). Ainda, observou-se hidrogênios em 4,28 ppm (dd; $J= 7,4; 5,2$ Hz), 2,88 ppm (dd; $J= 13,9; 5,3$ Hz) e 2,77 ppm (dd; $J= 13,9; 7,5$ Hz) e cada sinal integrava para dois hidrogênios (2H). Pode-se observar também sinais em 3,89 ppm (s, 3H) e 3,68 ppm (s, 6H) que são sinais típicos de metoxilas (Figura 32).

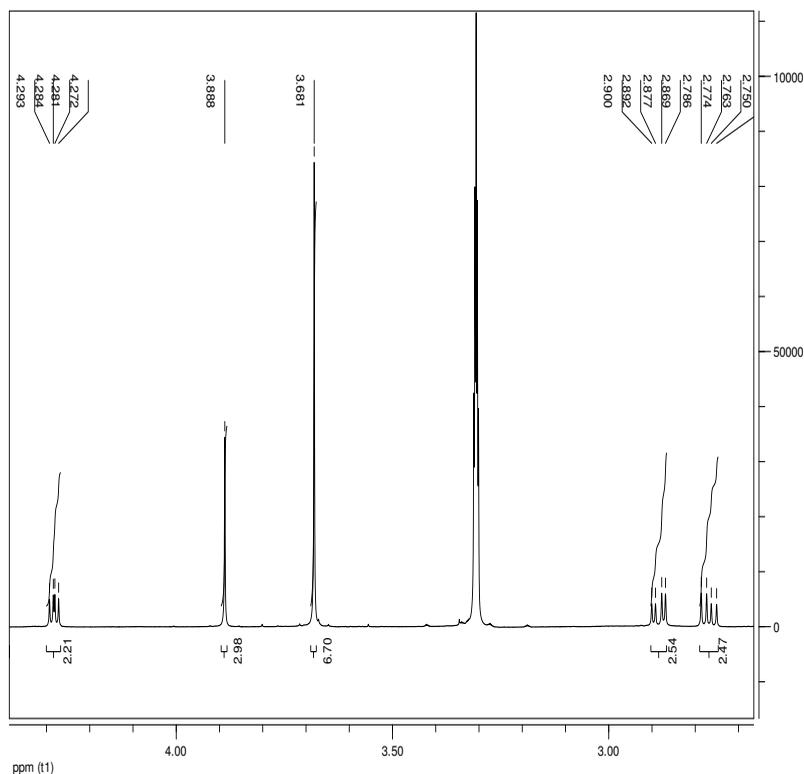


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H da amostra HBD44 ampliado na região 2,70 ppm a 4,40 ppm.

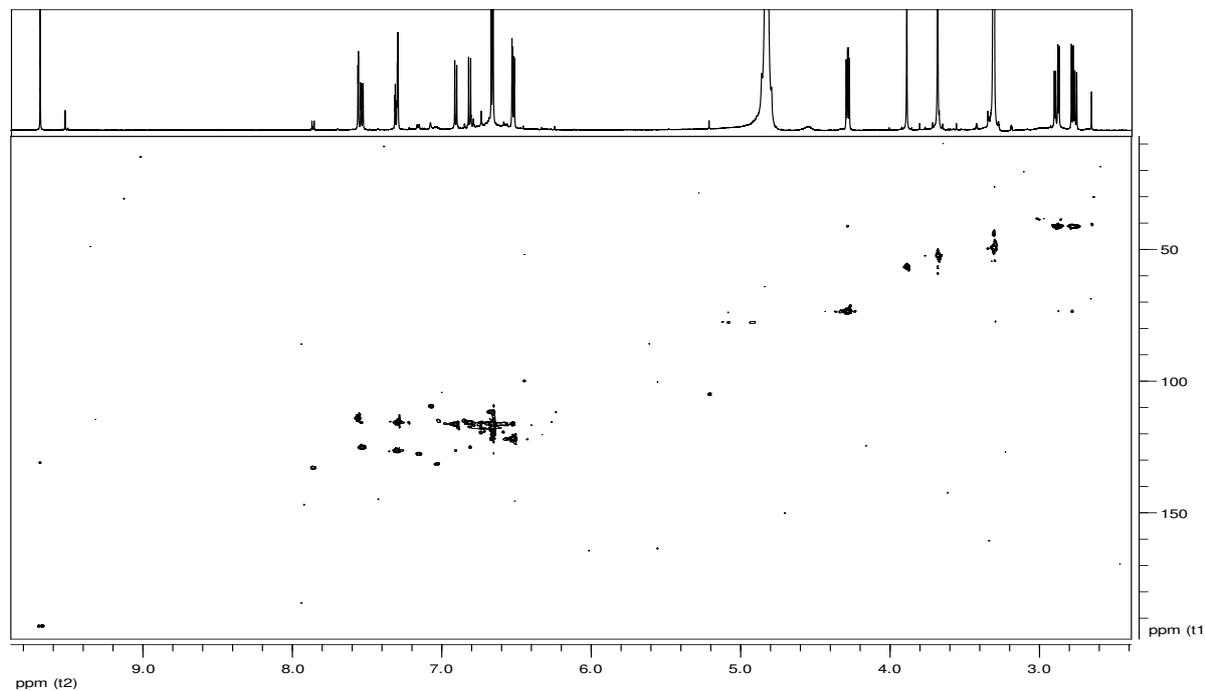


Figura 33. Mapa de correlação de HSQC da amostra HBD44 ampliado mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios.

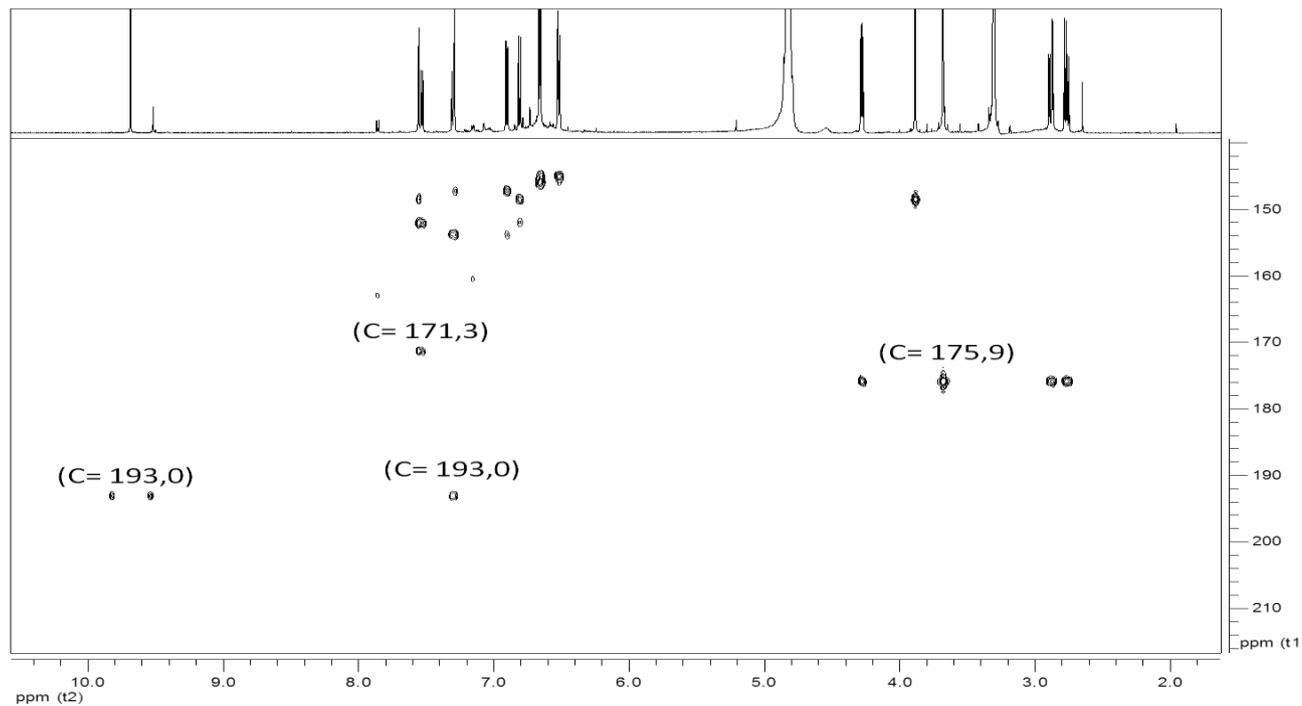


Figura 34. Mapa de correlação de HMBC expandido da amostra HBD44 mostrando os carbonos δ 193,0; δ 175,6 e δ 171,3.

A análise do mapa de correlação HSQC (Figura 33) mostrou os carbonos ligados aos hidrogênios citados. Ao analisar o mapa de correlação HMBC (Figura 34) foi possível observar presença de carbonos em δ 193,0 que indica um carbono típico de aldeído, e δ 175,9 e δ 171,3 que indica a presença de grupos de carbonilas.

Inicialmente, achava-se que HBD44 era uma substância só. Mas ao analisar criticamente com todos os dados de RMN 1D e 2D, entendeu-se que HBD44 encontra-se como uma mistura de três substâncias nas proporções de 2:1:1. Sendo que os sinais de hidrogênio em δ 6,67 (*d*; 8,0), δ 6,66 (*d*; 2,2), δ 6,52 (*dd*; 8,0; 2,0), 4,28 ppm (*dd*; 7,4; 5,2 Hz), 2,88 ppm (*dd*; 13,9; 5,3 Hz) e 2,77 ppm (*dd*; 13,9; 7,5 Hz) que integrava para 2H cada um e o sinal em 3,68 ppm que integrava para 6H pertencem a uma substância conhecida como oresbiusina A (Figura 35). Os outros sinais e as suas correlações de HSQC e HMBC pertencem às substâncias aldeído protocatéquico (3,4-dihidroxibenzaldeído) (Figura 36) e ácido vanílico (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico) (figura 37). As tabelas 5, 6 e 7 mostram os dados de RMN das substâncias oresbiusina A, aldeído protocatéquico e ácido vanílico respectivamente em comparação com os dados na literatura (PRACHAYASITTIKUL *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2014; ZOU *et al.*, 2010). É pela primeira vez que a substância oresbiusina A está sendo identificada em *Hedyosmum brasiliense*. Ácido vanílico e aldeído protocatéquico já foram relatados por esta espécie (AMOA, 2011; OLIVEIRA, 2009).

Tabela 5. Dados de RMN da oresbusina (HBD44) em comparação com dados na literatura.

Posição	HBD44 - Oresbusina A (600 e 150 MHz, CD ₃ OD)			ZOU <i>et al.</i> 2010 (300 e 75 MHz CD ₃ OD)	
	¹ H RMN (mult.; J Hz)	¹³ C RMN	HMBC	¹ H RMN (mult.; J Hz)	¹³ C RMN
1		175,9			176,4
2	4,28 (dd; 7,4; 5,2)	73,4	1, 3, 1'	4,29 (dd; 7,4; 5,2)	73,8
3	2,88 (dd; 13,9; 5,3) 2,77 (dd; 13,9; 7,5)	41,2	1, 2, 6, 2', 1'	2,91 (dd; 14,0; 5,2) 2,79 (dd; 14,0; 7,6)	41,6
4	3,68 s	52,3	1	3,68 s	52,7
1'		129,9			130,3
2'	6,66 (d; 2,2)	117,7	3, 6, 1', 3'	6,65 (d; 2,4)	118,1
3'		146,0			146,6
4'		145,2			145,6
5'	6,67 (d; 8,0)	116,2	1', 3'	6,67 (d; 8,0)	116,6
6'	6,52 (dd; 8,0; 2,0)	121,9	3, 2', 4', 5'	6,53 (dd; 8,0; 2,0)	122,3

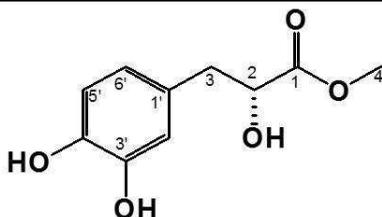


Figura 35. Estrutura química de oresbusina A.

Oresbusina A foi isolada primeiramente da planta *Ranunculus chinensis* (ZOU *et al.*, 2010) e em seguida Hwu e colaboradores (2012) fizeram uma síntese total desta substância e o composto levógiro apresentou atividade antiviral de forma dose dependente em células H9 (HIV-1). Recentemente, alguns autores têm mostrado a importância do aldeído protocatéiquico e o seu derivado ácido vanílico para tratamento de doenças

cardiovasculares (BYRNE *et al.*, 2014) e na inibição de 5'-nucleotidase do veneno da cobra entre outros (HELENO *et al.*, 2015).

Tabela 6. Dados de RMN do aldeído protocatéquico (HBD44) em comparação com dados na literatura.

Posição	HBD44 –3,4- dihidroxibenzaldeído (600 e 150 MHz, CD ₃ OD)			PRACHAYASITTIKUL <i>et al.</i> , 2008 (400 e 100 MHz, CD ₃ OD)	
	¹ H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	¹³ C RMN	HMBC	¹ H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	¹³ C RMN
1		130,9			129,29
2	7,29 (<i>d</i> ; 1,8)	115,6	3, 4, 6, 7	7,25 <i>sl</i>	113,97
3		147,4			145,18
4		153,7			151,74
5	6,91 (<i>d</i> ; 8,0)	116,3	1, 3, 4	6,87 (<i>d</i> ; 8,0)	114,9
6	7,30 (<i>dd</i> ; 8,0; 1,8)	126,4	2, 4	7,23 <i>dl</i>	125,83
7	9,69 <i>s</i>	193,0		9,63 <i>s</i>	191,93

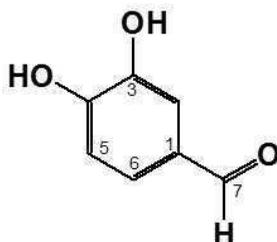


Figura 36. Estrutura química do aldeído protocatéquico.

Tabela 7. Dados de RMN da ácido vanílico (HBD44) em comparação com dados na literatura.

Posição	HBD44 –ácido vanílico (600 e 150 MHz, CD ₃ OD)			YANG <i>et al.</i> , 2014 (400 e 100 MHz, CD ₃ OD)	
	¹ H RMN (mult.; J Hz)	¹³ C RMN	HMBC	¹ H NMR (mult.; J Hz)	¹³ C RMN
1		123,2			123,2
2	7,56 (d; 1,9)	114,1	3, 4, 6, 7	7,55 (d; 2,0)	115,8
3		148,6			148,6
4		152,1			152,6
5	6,82 (d; 8,2)	115,9	1, 3, 4	6,84 (d; 8,8)	113,8
6	7,54 (dd; 8,0; 1,9)	125,1	2, 4	7,56 (dd; 8,8; 2,0)	125,6
7		171,3			170,1
OMe	3,89 s	56,4		3,89 s	56,4

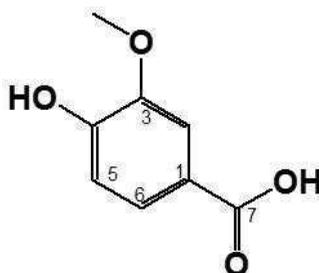


Figura 37. Estrutura química do ácido vanílico.

2.4.1.3 Fração aquosa

2.4.1.3.1 Substância HB33 (Canferol-3 β -O-glucuronídeo)

O espectro de hidrogênio de HB33 (Figura 38 e Figura 39) mostrou um duplete em δ 8,06 (2H; J = 8,9 Hz) que acopla com outro duplete em δ 6,87 (2H; J = 8,9 Hz) representando um anel com o sistema tipo AA'XX'. Ainda apresentou um duplete em δ 6,39 (1H; J = 2,0 Hz) que acopla com um duplete em δ 6,19 (1H; J = 2,0 Hz) representando um anel com o sistema tipo AB. Estes deslocamentos inferiram a presença de um flavonol.

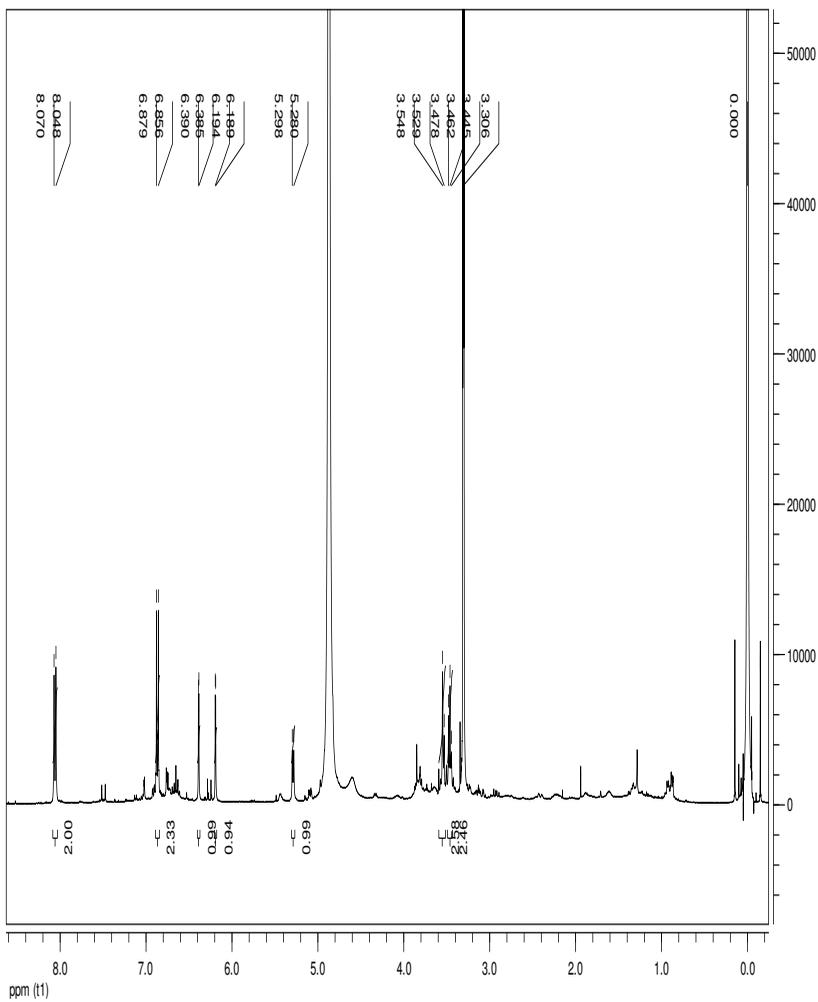


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H da substância HB33 (400 MHz, CD_3OD).

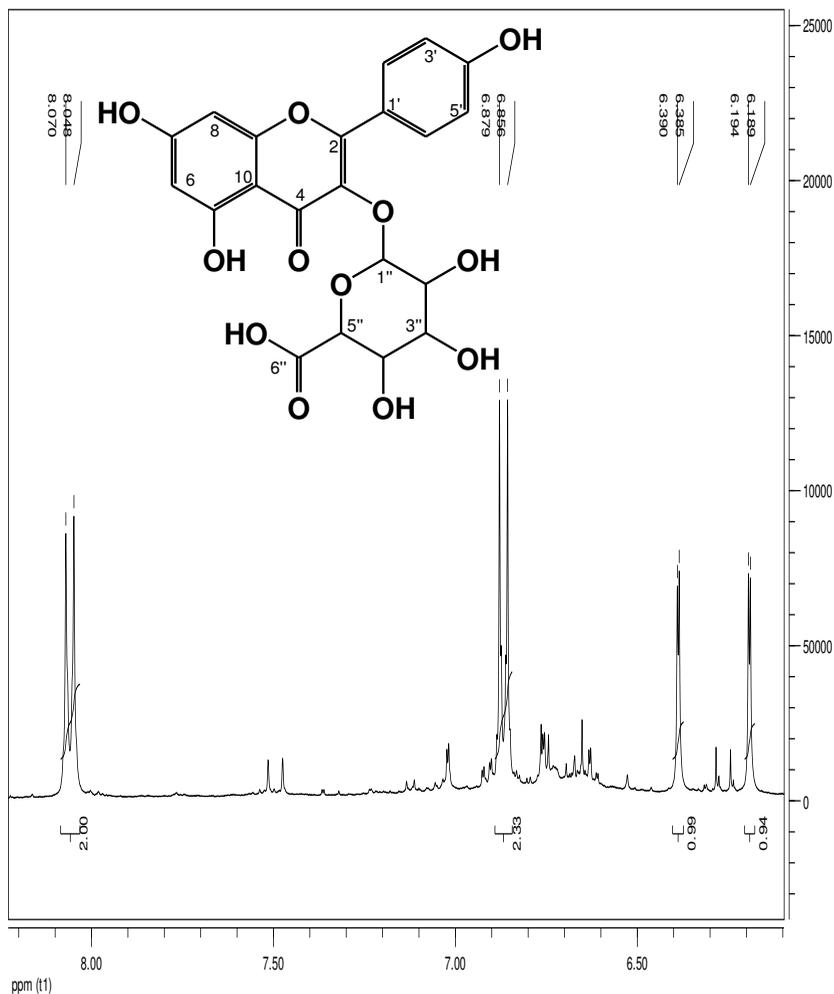


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H da substância HB33 ampliado na região δ 6,1 a δ 8,2.

Observou-se um duplete em δ 5,29 (1H; $J=7,3$ Hz) e multipletos entre δ 3,40 a δ 3,60 (4H) (Figura 40), os quais indicam que estes hidrogênios se apresentam ligados a carbonos com grupos eletronegativos,

especialmente oxigênio. Dessa forma, inferiu-se a presença de um grupamento glicosídeo ligado a um grupo flavonol. A orientação beta da ligação glicosídica com o flavonóide foi determinada baseada na constante de acoplamento de 7,3 Hz referente ao hidrogênio com deslocamento químico em δ 5,29, ligado ao carbono anomérico.

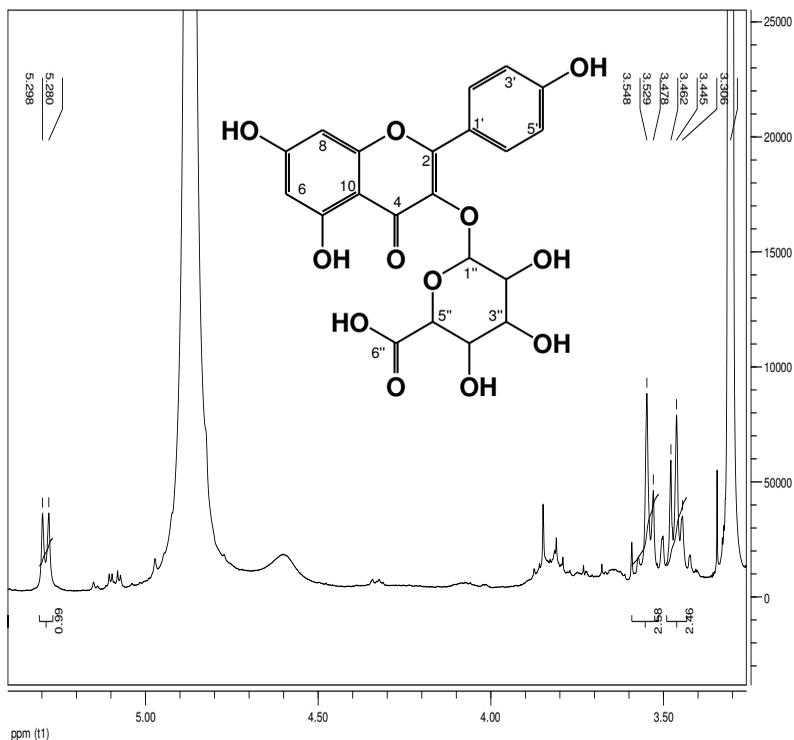


Figura 40. Espectro de RMN de ¹H da substância HB33 ampliado na região δ 3,3 a δ 5,3.

No mapa de correlação HSQC (Figura 41), observaram-se os deslocamentos químicos dos carbonos ligados aos hidrogênios em δ 8,06; δ 6,87; δ 6,39; δ 6,19 e δ 5,29 como δ 132,4; 116,2; 94,8; 100,0 e 104,4, respectivamente; sendo que o último refere-se a um deslocamento típico

de um carbono anomérico. Os multipletos entre δ 3,40 a δ 3,60 apresentaram correlação com quatro carbonos (4C) e os sinais em δ 3,59; 3,58; 3,50 e 3,497 correlacionam-se com os carbonos em δ 73,3; 77,5; 75,5 e 77,5, respectivamente. Ao avaliar o mapa HMBC (Figura 42) observou-se outros carbonos com deslocamento químicos δ 105,9; 158,6; 159,6; 162,9; 165,8 e 176,5 com o último sendo um carbono típico de uma carbonila de ácido.

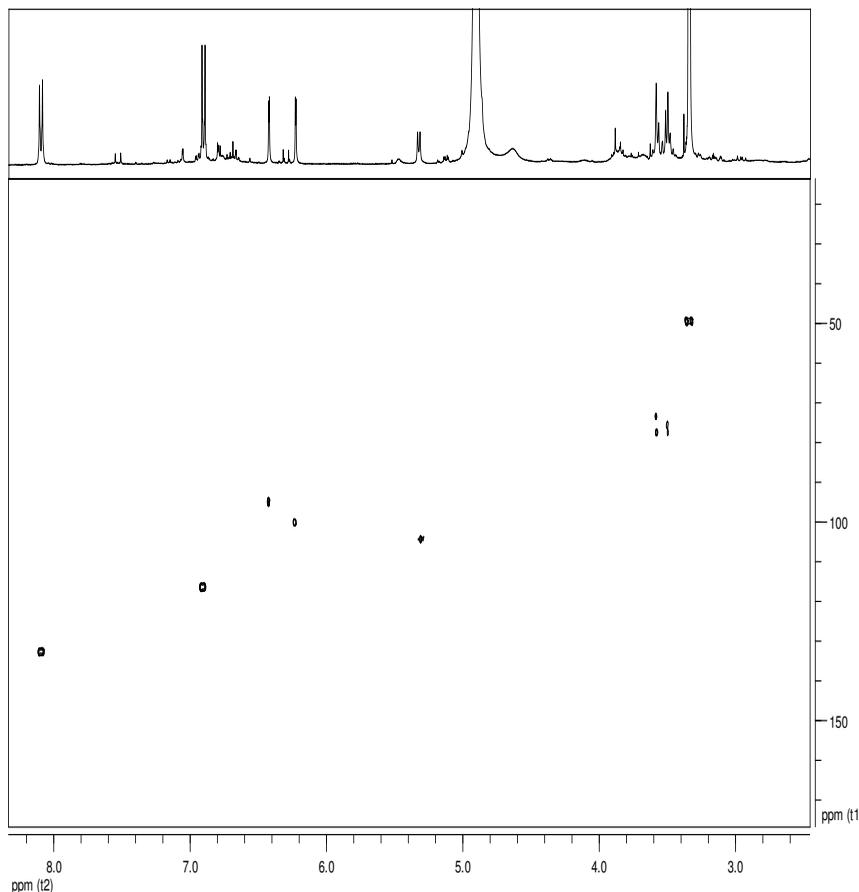


Figura 41. Mapa de correlação de HSQC da substância HB33 mostrando os carbonos que correlacionam com os hidrogênios.

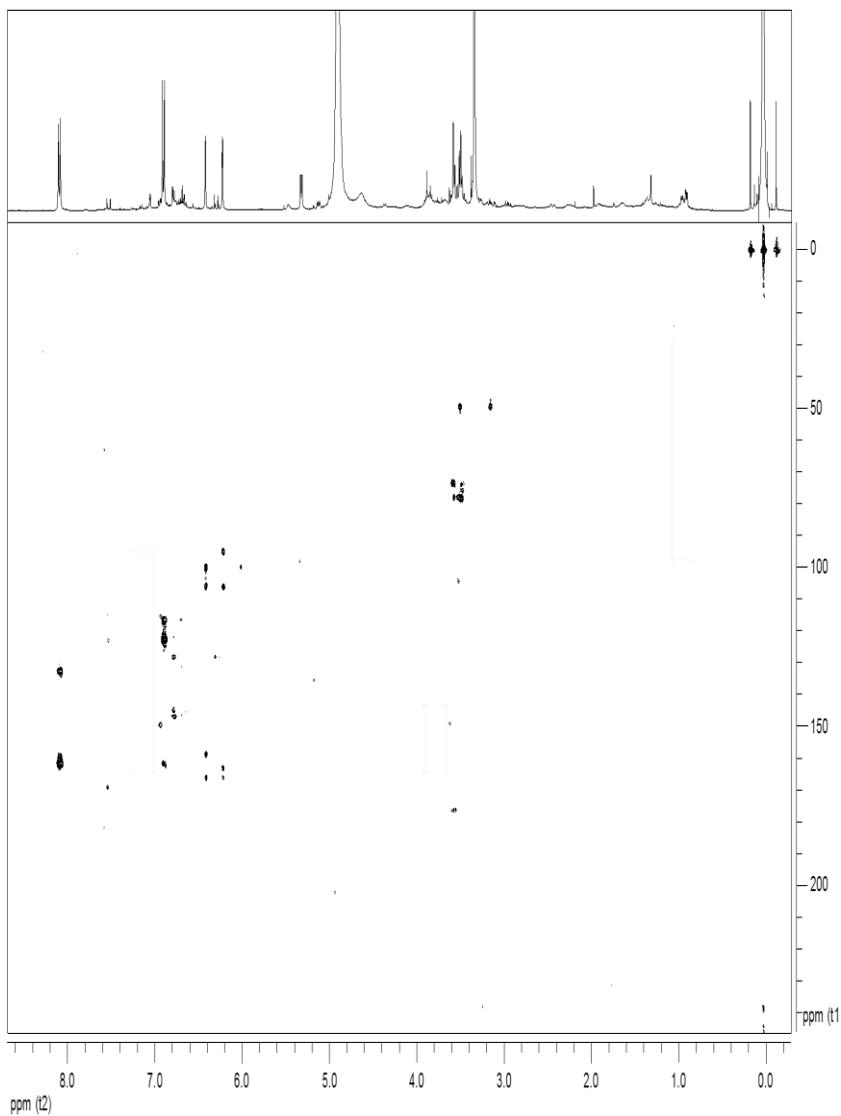


Figura 42. Mapa de correlação de HMBC da substância HB33.

Com os dados de RMN 1D e 2D foi possível elucidar a substância HB33 como canferol-3- β -*O*-glucuronídeo (Figura 43), uma substância que foi isolada pela primeira vez de *H. brasiliense*. Os dados de RMN

comparados com dados na literatura (GRANICA *et al.*, 2013) indicou HB33 como canferol-3- β -*O*-glucuronídeo. A tabela 8 apresenta os dados de RMN obtidos em comparação com os dados da literatura.

Tabela 8. Dados de RMN (HB33) em comparação com dados na literatura.

HB33 (400 e 100 MHz, CD ₃ OD)				(GRANICA <i>et al.</i> , 2013; 300 e 75 MHz, CD ₃ OD)	
Posição	¹ H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	¹³ C RMN	HMBC	¹ H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	¹³ C RMN
2		159,6			159,3
5		162,9			163,2
6	6,19 (<i>d</i> ; 2,0)	100,0	5, 6, 7, 8	6,21 (<i>d</i> ; 1,6)	95,0
7		165,8			166,2
8	6,39 (<i>d</i> ; 2,0)	94,8	6, 7, 9, 10	6,40 (<i>d</i> ; 1,6)	100,1
9		158,6			158,6
10		105,9			105,8
1'		122,7			122,6
2'	8,06 (<i>d</i> ; 8,9)	132,4	2, 4', 6'	8,05 (<i>d</i> ; 8,7)	132,5
3'	6,87 (<i>d</i> ; 8,9)	116,2	1', 4', 5'	6,87 (<i>d</i> ; 8,8)	116,2
4'		161,4			161,8
5'	6,87 (<i>d</i> ; 8,9)	116,2	1', 3', 4'	6,87 (<i>d</i> ; 8,8)	116,2
6'	8,06 (<i>d</i> ; 8,9)	132,4	2, 2', 4'	8,05 (<i>d</i> ; 8,7)	132,5
1''	5,32 (<i>d</i> ; 7,3)	104,4		5,32 (<i>d</i> ; 7,0)	104,5
2''	3,501 <i>m</i>	75,5		3,53 – 3,42 <i>m</i>	75,6
3''	3,497 <i>m</i>	77,5		3,53 – 3,42 <i>m</i>	77,7
4''	3,59 <i>m</i>	73,3		3,57 (<i>t</i> ; 8,7)	73,0
5''	3,58 <i>m</i>	77,5	6''	3,73 (<i>d</i> ; 9,5)	77,2
6''		176,5			172,5

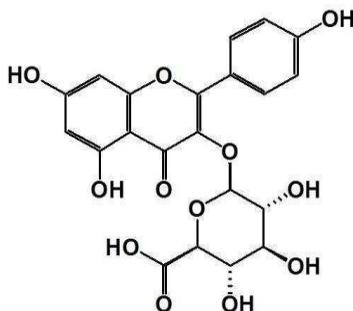


Figura 43. Estrutura química da substância HB33.

2.4.1.3.2 Substância HB34 (ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoico)

O espectro de hidrogênio de HB34 (Figuras 44 e 45) apresentou sinais típicos de fenólicos simples. Observou-se um duplete em δ 7,59 (1H; $J= 8,2$; 1,9 Hz), um duplete em δ 6,91 (1H; $J= 8,2$ Hz) e um duplete em δ 7,56 (1H; $J= 1,9$ Hz). Ainda, foi possível observar um simpleto em δ 3,91 (3H).

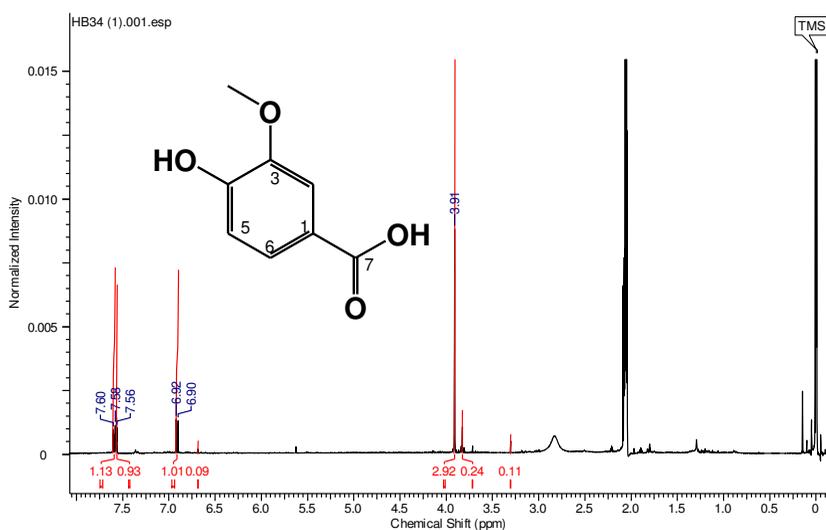


Figura 44. Espectro de RMN de ^1H da substância HB34 (400 MHz, CD_3COCD_3).

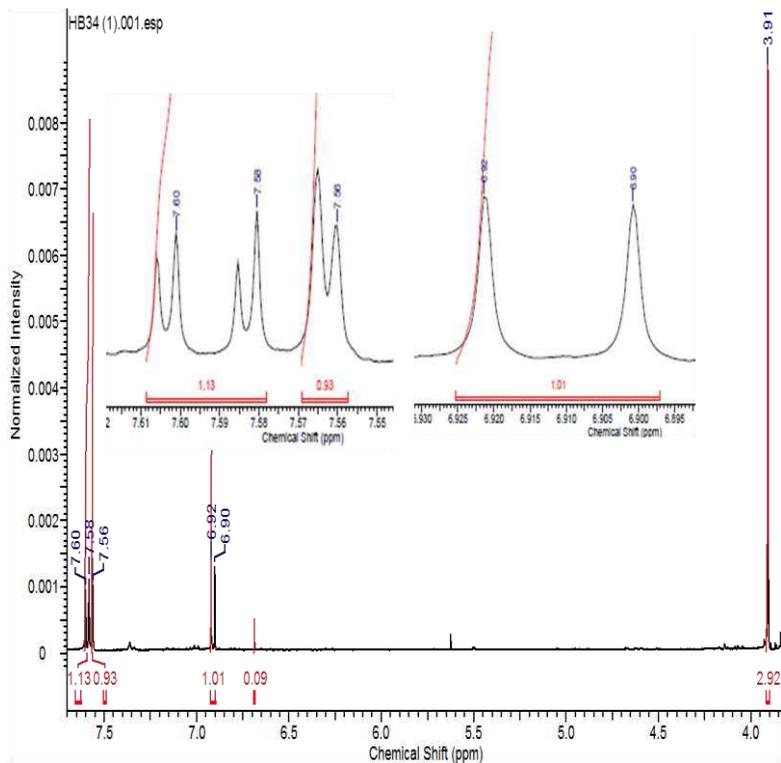


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H da substância HB34 ampliado na região δ 3,90 a δ 7,62.

O mapa de correlação HSQC (Figura 46) mostrou as correlações de carbono dos sinais dos hidrogênios acima citados, sendo que os sinais com deslocamentos químicos em δ 7,59; 7,56; 6,91 e 3,91 correlacionam-se com os carbonos em δ 125,3; 113,8; 115,8 e 56,4, respectivamente. Por meio da análise do mapa HMBC (Figura 47) foi possível observar carbonos quaternários como 167,5; 152,1; 148,6 e 123,2.

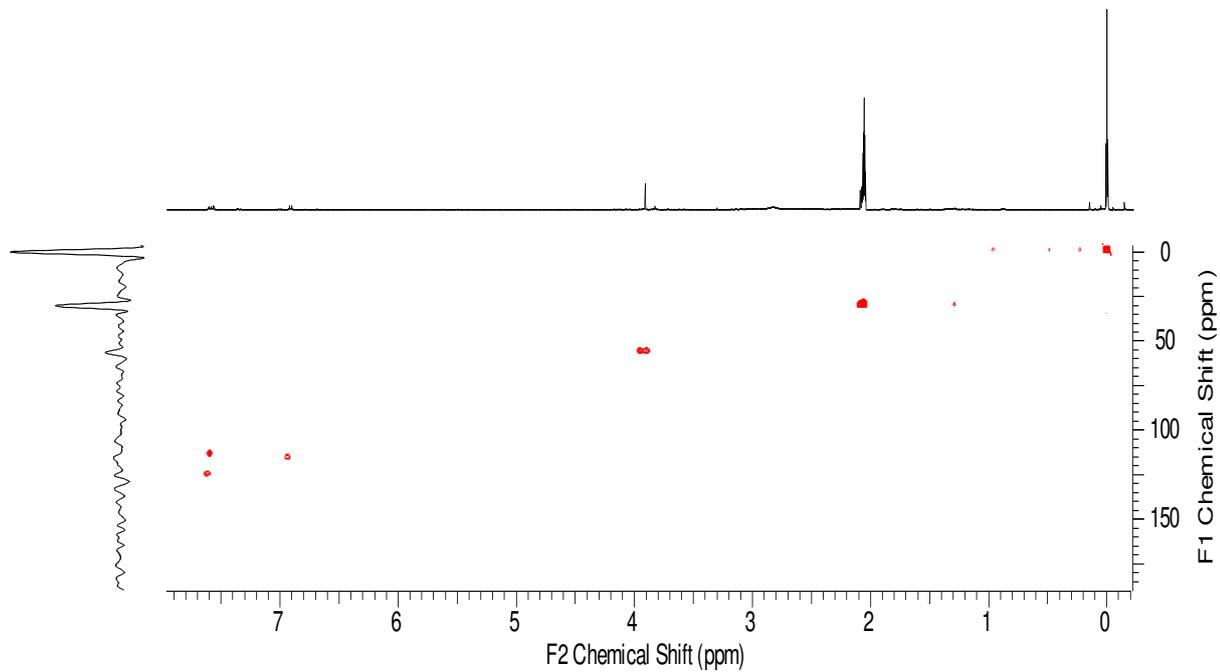


Figura 46. Mapa de correlação de HSQC expandido da substância HB34.

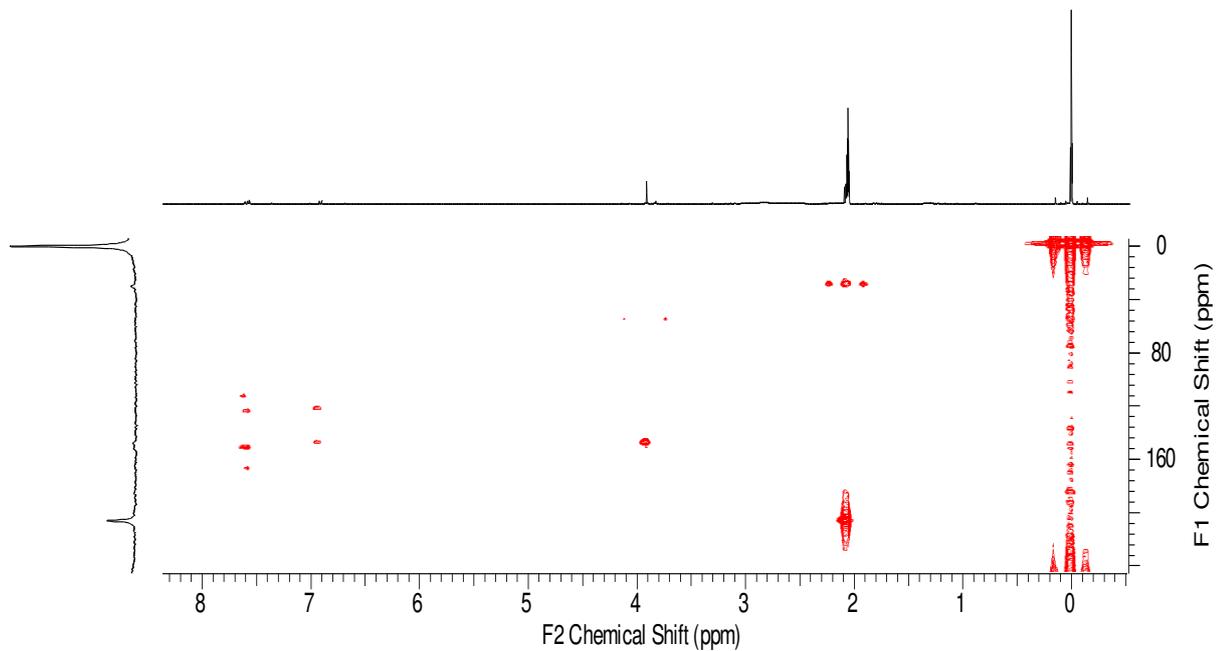


Figura 47. Mapa de correlação de HMBC expandido da substância HB34.

Dessa forma, baseado nos dados de RMN de 1D e 2D foi possível elucidar o HB34 como sendo o ácido 4-hidroxi-3-metoxi-benzóico, conhecido com ácido vanílico (Figura 48). Trata-se de uma substância que já havia sido caracterizada em mistura na amostra HBD44. Na tabela 9 encontram-se os dados de RMN obtidos em comparação com os dados de RMN obtidos da literatura.

Tabela 9. Dados de RMN ácido vanílico (HB34) em comparação com dados na literatura.

Posição	HB34 –Ácido vanílico (400 e 100 MHz, CD ₃ COCD ₃)			YANG <i>et al.</i> , 2014 (400 e 100 MHz, CD ₃ OD)	
	¹ H RMN (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	¹³ C RMN	HMBC	¹ H NMR (<i>mult.</i> ; <i>J</i> Hz)	¹³ C RMN
1		123,2			123,2
2	7,56 (<i>d</i> ; 1,9)	114,1	3, 4, 6, 7	7,55 (<i>d</i> ; 2,0)	115,8
3		148,6			148,6
4		152,1			152,1
5	6,91 (<i>d</i> ; 8,2)	115,9	1, 3, 4	6,84 (<i>d</i> ; 8,8)	113,8
6	7,59 (<i>dd</i> ; 8,2; 1,9)	125,1	2, 4	7,56 (<i>dd</i> ; 8,8; 2,0)	125,6
7		167,5			170,1
OMe	3,91 s	56,4		3,89 s	56,4

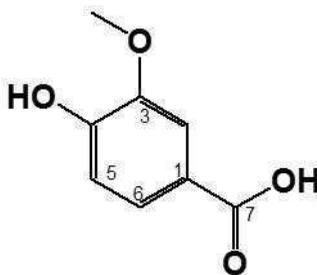


Figura 48. Estrutura química da substância HB34

2.4.1.3.3 Substância HB36 Escopoletina

O espectro de hidrogênio de HB36 (Figura 49) apresentou sinais típicos de fenólicos. Observou-se um duplete em δ 7,60 (1H; $J= 9,5$ Hz) que acopla com o duplete em δ 6,28 (1H; $J= 9,5$). Ainda, observaram-se três simpletos em δ 6,92 (1H); δ 6,85 (1H) e δ 6,13 (1H).

Observou-se também um simpleto em δ 3,96 (3H) indicando a presença de um grupo metoxila. Percebeu-se com estes deslocamentos químicos que, esta substância já tinha sido isolada de *Hedyosmum brasiliense*. Por isso, estes dados foram comparados e realmente confirmou que a HB36 se encontra como escopoletina (Figura 50). A tabela 10 mostra os deslocamentos químicos da substância HB36 em comparação com os dados de RMN que o Vasconcelos e colaboradores (1998) obtiveram.

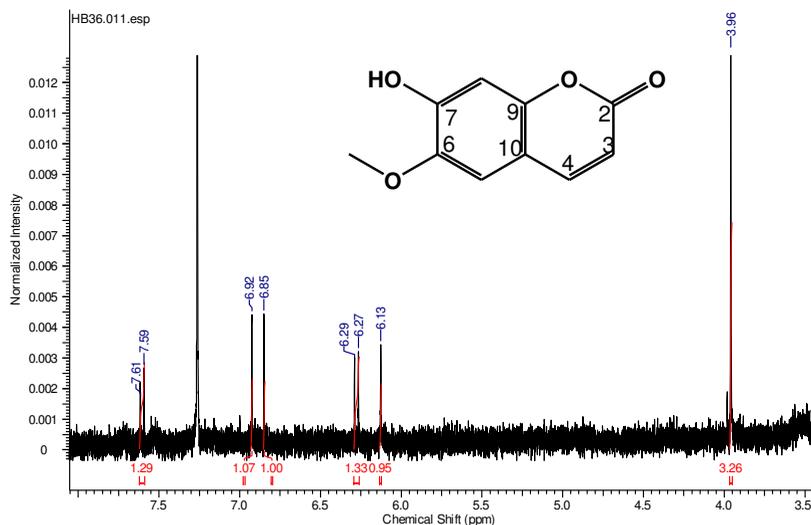


Figura 49. Espectro de RMN de ¹H da substância HB36 (400 MHz, CDCl₃).

Tabela 10. Dados de ^1H RMN (HB36) em comparação com dados na literatura.

Posição	HB36 Escopoletina (400 e MHz, CDCl_3) ^1H (ppm), J (Hz)	Escopoletina (7-hidroxi-6- metoxicumarina)(VASCONCELOS <i>et al.</i> , 1998; 300 MHz, CDCl_3) ^1H (ppm), J (Hz)
3	6,28 <i>d</i> (9,5)	6,28 <i>d</i> 1H (9,5)
4	7,60 <i>d</i> (9,5)	7.60 <i>d</i> 1H (9,5)
5	6.85 <i>s</i> 1H	6.85 <i>s</i> 1H
7	6,13 <i>s</i> 1H (OH)	6.17 <i>s</i> 1H (OH)
8	6.92 <i>s</i> 1H	6.92 <i>s</i> 1H
OMe	3.96 <i>s</i> 1H	3.96 <i>s</i> 3H

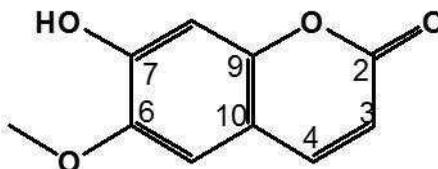


Figura 50. Estrutura química da substância HB36.

2.4.2 Atividades farmacológicas

2.4.2.1 Atividades farmacológicas no sistema cardiovascular

Com o intuito de dar continuidade aos estudos no sistema cardiovascular que iniciou-se por Amoah (2011) em colaboração com o Professor José Eduardo da Silva Santos (Departamento da Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina), as lactonas sesquiterpênicas (podoandina, 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo – 13HDS e 15-acetoxi-isogermafurenolídeo – H622) e a fração hexano (HFHB) foram avaliadas em anéis aórticos e corpos cavernosos de ratos. Sumariamente,

a fração hexano conseguiu relaxar os anéis aórticos com endotélio e sem endotélio e o corpo cavernoso (figura 51). O efeito da concentração cumulativa de HFHB foi avaliado em anéis aórticos sem endotélio (A) e com endotélio (B), bem como em tiras de corpo cavernoso de rato (C), previamente contraídos pela fenilefrina.

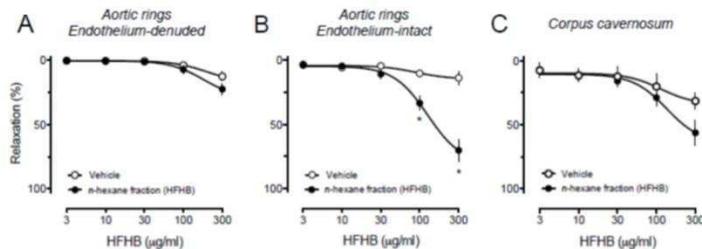


Figura 51 Efeitos da fração de hexano de *Hedyosmum brasiliense* (HFHB) sobre os anéis aórticos de ratos isolados e tiras de corpo cavernoso.

Além disso, as substâncias sob este estudo conseguiram induzir relaxamento nos anéis aórticos com endotélio e sem endotélio como mostrada na figura 52. Concentrações cumulativas de 13HDS (A), podoandina (B), e H622 (C) foram obtidos em anéis com endotélio (E+; círculos abertos), anéis sem endotélio (E-; círculos fechados), ou anéis aórticos com endotélio intacto que foram previamente incubadas com o inibidor de óxido nítrico sintase, L-NAME (quadrados). Estes dados obtidos indicam que o relaxamento envolve mecanismos diferentes, podendo ser através dos mediadores de endotélio como óxido nítrico ou outros que não agem pela via de óxido nítrico. Pois, nos anéis aórticos sem endotélio (linhas indicadas pela legenda como E-), observa-se um relaxamento reduzido, mas não é totalmente abolido. O mesmo acontece nos vasos expostos ao L-NAME, que inibe a síntese de NO.

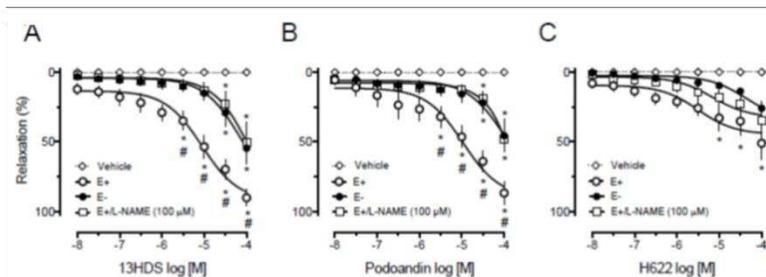


Figura 52 Relaxamento vascular em anéis aórticos com endotélio e sem endotélio induzido por lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Hedyosmum brasiliense*.

Ainda as substâncias 13HDS, podoandina e H622 induziram relaxamento em corpo cavernoso (figura 53).

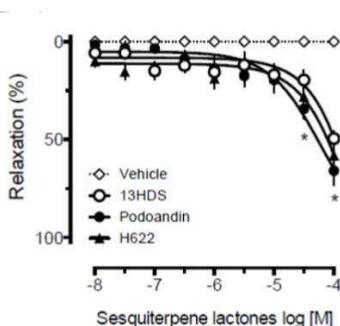


Figura 53 Relaxamento de tiras de corpo cavernoso de ratos por lactonas sesquiterpênicas isoladas de *Hedyosmum brasiliense*.

2.4.2.2 Atividades farmacológicas no sistema nervoso central

A substância HBH57 (aromadendrano-4 β ,10 α -diol), um sesquiterpeno e outras lactonas sesquiterpênicas (podoandina – H3, 1,2-epoxi-10 α -hidroxi-podoandina – AE41, 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo – 13HDS, 15-hidroxi-isogermafurenolídeo – HB21, 15-acetoxi-isogermafurenolídeo – HB22) que foram isoladas

previamente de *H. brasiliense* (AMOA *et al.*, 2013) foram avaliadas contra o efeito de peptídeo β -amilóide 1-42 (A β 1-42) em camundongos. A galantamina que é um farmaco utilizado no tratamento de Alzheimer foi empregado como controle positivo. Neste estudo, as substâncias HBH57, H3 e 13HDS bem como a galatamina conseguiram impedir o efeito do A β 1-42 (figura 54), indicando o potencial destas substâncias no tratamento da Doença de Alzheimer.

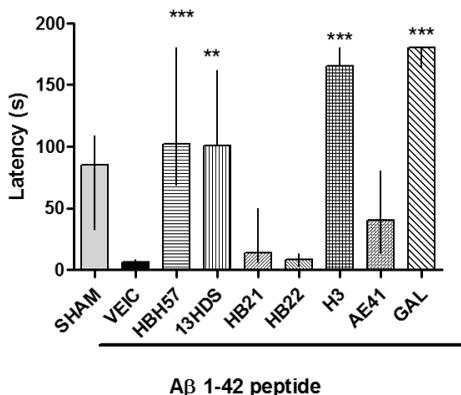


Figura 54 O efeito das substâncias administradas em ratos que receberam o peptídeo β -amilóide 1-42

2.5 Conclusões

A continuação dos estudos fitoquímicos das subfrações e frações de diclorometano, acetato de etila e aquosa levou ao isolamento e caracterização de seis substâncias que estão sendo descritas pela primeira vez para *Hedyosmum brasiliense* (aromadendrane-4 β ,10 α -diol, ácido rosmarínico, rosmarinato de etila, canferol, canferol-3- β -*O*-glucuronídeo e oresbiusina A) e três substâncias (aldeído protocatéquico, ácido vanílico e cumarina) que já foram descritas previamente para esta espécie.

Quanto aos testes biológicos, a aromadendrano-4 β ,10 α -diol apresentou um atividade contra o efeito do peptídeo β -amilóide 1-42 (A β 1-42) em camundongos.

A podoandina, 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo e 15-acetoxi-isogermafurenolídeo relaxaram os anéis aórticos e corpos cavernosos.

3 Capítulo 3 – Análise fitoquímica do chá de *Hedyosmum brasiliense*.

3.1 Introdução

Hedyosmum brasiliense é um arbusto aromático e dioico usado na forma de chá ou tônico na medicina popular para tratar enxaqueca e doenças do ovário além de ser usado como calmante, anti-inflamatório, diurético e afrodisíaco. Embora representado por plantas masculinas e femininas, na medicina popular, não há relatos mostrando qual das plantas é usado para este fim (REITZ, 1965). Estudos farmacológicos e biológicos têm mostrado resultados sobre o extrato etanólico (TOLARDO *et al.*, 2010; TRENTIN *et al.*, 1999) e o óleo essencial (KIRCHNER *et al.*, 2010). Recentemente, mostrou-se o isolamento de lactonas sesquiterpênicas e fenólicos das frações do extrato etanólico (AMOAHA *et al.*, 2013). Entretanto, não há nenhum estudo fitoquímico sobre o chá desta espécie embora seja usado popularmente como um substituto para chá verde (REITZ, 1965). Ainda, não há nenhum estudo aprofundado para ver se há diferenças entre os perfis químicos das partes masculinas ou femininas desta espécie.

Este capítulo é apresentado na forma de manuscrito proposto para publicação, o qual descreve o isolamento dos metabólitos secundários do chá e também mostra o estudo comparativo entre os chás das partes masculinas e femininas desta espécie.

3.2 Objetivos

- Realizar uma análise comparativa dos extratos aquosos das folhas da parte masculina e feminina de *Hedyosmum brasiliense* por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.
- Isolar e caracterizar as substâncias do extrato aquoso de *Hedyosmum brasiliense*.

3.3 Resultados e discussão

Os resultados e discussão se apresentam no manuscrito a seguir intitulado: “The phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*” formatado conforme as normas da revista *Phytochemistry Letters*.

3.3.1 Artigo publicado

The phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*

Amoah, Solomon; Kouloura, Eirini; Macedo, Livia; Barison, Andersson; Wildner, Leticia; Bazzo, Maria; Halabalaki, Maria; Skaltsounis, Alexios Leandros; Biavatti, Maique.

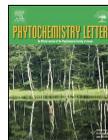
Artigo publicado



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Phytochemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/phytol

Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*

Solomon K.S. Amoah^a, Eirini Kouloura^b, Livia Macedo Dutra^d, Andersson Barison^d,
Letícia M. Wildner^c, Maria L. Bazzo^c, Maria Halabalaki^b, Leandros A. Skaltsounis^b,
Maique W. Biavatti^{a,*}

^a Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, SC, Brazil

^b Laboratory of Pharmacognosy & Natural Products Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Athens, Panepistimioupoli, Zografou, 15771 Athens, Greece

^c Laboratório de Biologia Molecular e Micobactérias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^d NMR Center, Universidade Federal do Paraná–UFPR, Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2015

Received in revised form 23 June 2015

Accepted 6 July 2015

Available online 24 July 2015

Keywords:

Hedyosmum brasiliense

Sesquiterpene lactones

Eudesmanolide

Neolignans

Rosmarinic acid

CPC

ABSTRACT

The leaves of the neotropical dioecious shrub *Hedyosmum brasiliense* (HB) are employed popularly as a sedative, aphrodisiac and as a substitute for green tea.

The aim of this work was to study the composition of the hot tea infusion from the fresh leaves of HB, comparing its androecious or gynoecious parts, including the isolation and identification of new secondary metabolites. The characterization of the HB tea infusion was achieved by means of UHPLC–ESI (±)–HRMS and the isolation of its secondary metabolites was done through FCPC and MPLC. Both female and male plant extracts presented similar chemical profiles, with rosmarinic acid (RA) as the main compound. The FCPC analysis led to a one-step isolation of RA 97% pure. A new sesquiterpene lactone (1- α -acetoxyeudesma-3,7(11)-dien-8,12-olide) is reported herein for the first time. The additional compounds isolated and characterized by NMR and LC–MS are isorinic acid, a glycosylated flavonol, two neolignans reported for the first time for HB and three other sesquiterpene lactones which were previously isolated from the ethanol extract. Neither the extract nor its major constituent (RA) exhibited *in-vitro* antimicrobial activity.

© 2015 Phytochemical Society of Europe. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hedyosmum brasiliense Miq., Chloranthaceae (HB) is an aromatic and dioecious neotropical shrub endemic to Brazil (Souza and Lorenzi, 2008). It is employed in folk medicine irrespective of its androecious or gynoecious parts, in the form of tea or brewed in white wine as a sedative, anti-inflammatory, diuretic, aphrodisiac and also for the treatment of migraines and diseases of the ovary as well as a substitute for green tea (Di Stasi et al., 1988; Reitz, 1965). Reported pharmacological or biological information indicate that the ethanol extract, the essential oil and sesquiterpene lactones from *H. brasiliense* possess antinociceptive (Trentin et al., 1999), antimicrobial (Kirchner et al., 2010) and neurochemical properties (Goncalves et al., 2012; Tolardo et al., 2010). Recently, some sesquiterpene lactones and phenolic

compounds from fractions of the ethanol extract have been isolated (Amoah et al., 2013). However, the composition of the aqueous infusion of this species has not been studied and no study has been done to ascertain whether there are differences in the chemical profiles of its androecious and gynoecious plants.

The objective of this work was to find out the secondary metabolites composition of the hot tea infusion from the fresh leaves of *H. brasiliense* using a UHPLC–ESI(±)–HRMS platform for the comparison of the female and male plant of HB. Moreover, the isolation of its secondary metabolites was performed using orthogonal techniques, such as centrifugal partition chromatography (CPC) and medium pressure liquid chromatography (MPLC), with an enrichment step using adsorption resin. This study reports the isolation and identification of nine secondary metabolites from HB, one of them is a new sesquiterpene lactone, together with known phenolic acids, flavonoids and neolignans. Considering the previous reported antimicrobial activity of HB (Kirchner et al., 2010) the antimicrobial activity of the aqueous extract and its main compound was also investigated in this work.

* Corresponding author at: Laboratório de Farmacognosia, Cif/CCS/UFSC Campus Universitário/Trindade–88.040–900 Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55 48 3721 3493. E-mail address: maique.biavatti@ufsc.br (M.W. Biavatti).

2. Experimental

2.1. General procedures (instruments and solvents)

All nuclear magnetic resonance (NMR) experiments were performed on an Avance III 600 spectrometer (Bruker BioSpin, Rheinstetten, Germany) operating at 600 and 150 MHz for ^1H and ^{13}C , respectively, equipped with a 5 mm BBI probe. 1 and 2D NMR spectra were recorded using deuterated chloroform (CDCl_3) or methanol (CD_3OD). Chemical shifts (δ) are expressed in ppm with reference to the solvent signals ($\delta_{\text{H}} 7.26/\delta_{\text{C}} 77.0$) and ($\delta_{\text{H}} 3.34/\delta_{\text{C}} 49.86$), respectively, and coupling constants in Hz. The 2D NMR experiments (COSY, HSQC, HMBC, and NOESY) were performed using standard Bruker microprograms. Mass spectrometry analyses were performed on an LTQ-Orbitrap Discovery instrument (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA) coupled or not to an Accela LC system consisting of pump and autosampler. Xcalibur software version 2.0.7 was used for the acquisition and the processing of data.

Fast centrifugal partition chromatography (FCPC) was performed using a CPC Kromaton with a 1000 mL column and a Laboratory Alliance pump with a pressure safety limit of 50 bar. A manual sample injection valve was used to introduce the samples into the column, with the rotation adjusted at 600 rpm and the

flow rate held at 20 mL/min. MPLC separation was carried out using a Sepacore MPLC system (Büchi C-650 pump) with a maximum applied pressure of 10 bar. Chromatographic separations were performed on a Büchi PP Cartridge with dimensions 12 mm \times 150 mm filled with normal phase silica gel (Merck 0.02–0.04 mm).

Solvents used for centrifugal partition chromatography (CPC), medium pressure liquid chromatography (MPLC) and preparative thin layer chromatography were of analytical grade (Fisher Scientific). Ultra gradient grade solvents (MeOH, ACN) for HPLC separations were purchased from Carlo Erba, and deionized water with a resistivity of 18M Ωcm was used. Solvents of LC–MS grade were purchased from Fluka/Riedel-de Haën (Switzerland).

2.2. Plant material and extraction

H. brasiliense leaves from androecious and the gynoecious plants were separately collected at the municipal area of Antonio Carlos in the Santa Catarina State, Brazil in December 2011. The plant was identified by Dr. Ademir Reis and compared with the voucher specimen (#2031) deposited at the Lyman Bradford Smith Herbarium (UNIVALI, Itajaí—Santa Catarina).

The fresh harvested leaves of the androecious and the gynoecious plant (2 kg each) were infused with hot deionized water (10 L

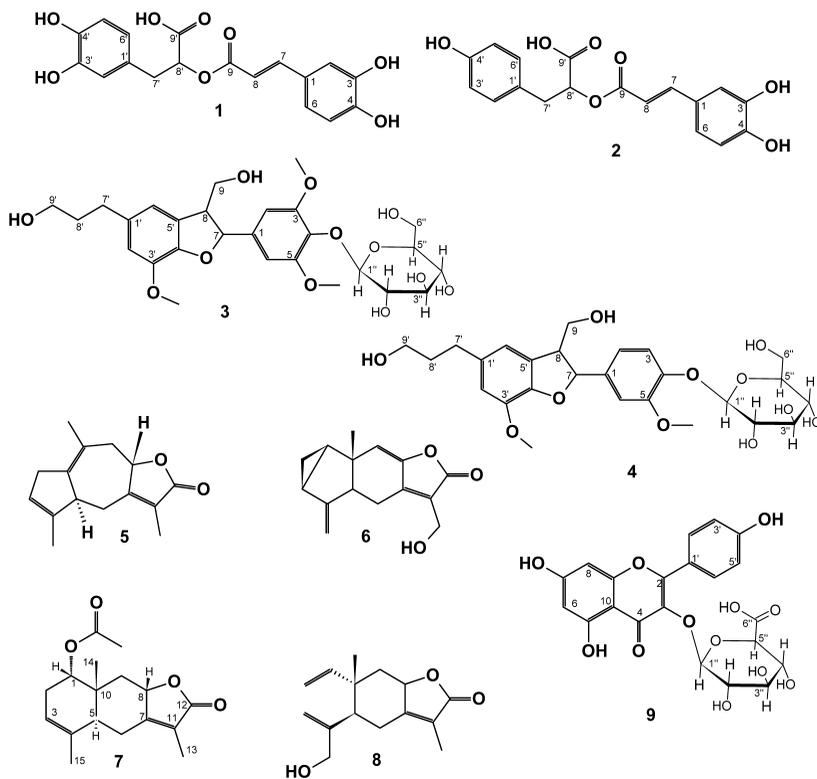


Fig. 1. Compounds from *Hedyosmum brasiliense*.

each) ($\approx 100^\circ\text{C}$) for 30 min. The resulting extracts were frozen and freeze-dried to yield 31 and 28 g of the *male* crude aqueous extract (MCE) and *female* crude aqueous extract (FCE), respectively.

2.3. Sample preparation

All samples (extracts, fractions and isolated compounds) were diluted in methanol. For LC–MS analysis, solutions of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the extracts and of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for the isolated compounds were used. For Semi preparative HPLC, fractions were diluted to obtain a solution of 20 mg/mL .

2.4. LC–MS analysis

A Hypersil Gold (100 \times 2.1 mm, 3 μm) column was used for the analysis and a flow rate of 0.5 mL/min , with a mobile phase of water –0.1% formic acid (solvent A) and methanol (solvent B) was applied according to the following stepwise gradient program (v/v): 0 min 1% B linear, 3 min 1% B, 8 min 60% B, 22 min 100% B, 25 min 100% B, 27 min 1% B, 30 min 1% B. The ionization was performed using an ESI source in the positive and negative modes. ESI–MS parameters were as follows in positive mode: Source voltage 4.5 kV, capillary voltage 25 V, tube lens voltage 85 V, capillary temperature 300 $^\circ\text{C}$, Sheath gas 37, auxiliary gas flow (N_2) 10 and in negative mode: Source voltage 3.5 kV, capillary voltage –17 V, tube lens voltage –65 V, capillary temperature 300 $^\circ\text{C}$, Sheath gas 40, auxiliary gas flow (N_2) 10. Full scans were acquired in profile mode at 30,000 (FWHM). Resolution and detection were performed considering a mass range of m/z 100–1000. For direct infusion experiments, a syringe pump (500 μL syringe, Hamilton Bonaduz AG, Bodanuz, Switzerland) was coupled with the LTQ–Orbitrap mass spectrometer. For these experiments, the ESI operation parameters and the acquisition parameters were identical to the aforementioned apart from the nitrogen flow which was adjusted to 12 and 6 arb units as sheath and auxiliary gas, respectively. The flow rate of the injection was set at 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

2.5. LC–DAD analysis

The chromatographic profiling of all extracts, fractions, and purity determination of isolated compounds was performed by LC–DAD. An ultrafast liquid chromatography (Prominence UFLC

Shimadzu, Japan) apparatus connected to a SPD-20A UFLC UV–vis detector was applied using a Zorbax Eclipse XDB–C18 column (2.1 $\text{mm} \times 150 \text{ mm}$, 3.5 μm). The mobile phase was composed of H_2O –MeOH (0.1% of formic acid in H_2O 80:20 – 20:80) gradient at a flow-rate of 0.2 mL/min and was detected at 254 nm, 280 nm and 330 nm.

2.6. Isolation of compounds

In order to obtain an enriched fraction of secondary metabolites (Fig. 1, adsorption on Amberlite FPX66 resin (Dow Chemicals, 5 kg) was used, activated in a separatory funnel with methanol. Subsequently, the methanol was removed and the resin was washed thoroughly with deionized water (4L). 5 g of the FCE was dissolved in 700 mL of water and poured into the separating funnel containing the resin, allowed to stand for an hour with intermittent stirring with a rod. The extract was then removed and the resin washed with water to remove excess sugars (discarded). Subsequently, elution was done with methanol to obtain a methanol fraction (FCE–M). This process was repeated four times such that 20 g of the FCE were treated. The combined methanol extracts were dried under reduced pressure to afford 7.5 g of FCE–M.

The fractionation of the FCE–M was performed by FCPC using a two-phase solvent system consisted of *n*-butanol–ethyl acetate–water (4:1:5). In details, for the preparation of the two-phase solvent system, each solvent was added to a separatory funnel and the mixture was equilibrated at room temperature. The two phases were separated and the stationary phase consisting of the lower phase (polar) was pumped into the column and then the upper (mobile) phase was pumped in the descending mode until equilibration of the biphasic solvent system. FCE–M (5 g) was injected into the column diluted in 50 mL of the lower phase and the separation yielded 20 fractions: A1–A13 in ascending mode and A14–A20 in the descending mode.

CPC fractions A4–A6 afforded rosmarinic acid (RA) (1.7 g) (**1**) 97% pure. Fractions A9, A10 and A18 were combined (246 mg) due to their similarity and subjected to gel filtration on Sephadex (LH-20) with methanol as the mobile phase. This led to the subfractions A23–T23. Subfraction E23 (27.9 mg) was subjected to normal phase preparative TLC eluted with dichloromethane–ethyl acetate (9:1) which led to compound **3** (3.0 mg), identified as the neolignan (7*S*, 8*R*)-5-methoxydihydrodehydroconiferlyl

Table 1
NMR data (600 MHz, CDCl_3) for **7**.

Position	δ ^1H (mult., J Hz)	δ ^{13}C	HMBC	COSY
1	4.72 _{eq} m	74.5		H-2 _{peq}
2	2.46 _{peq} m 2.11 _{peq} m	29.0	C-2, C-3, C-5, C-10, and COMe	H-2 _{peq} , H-1
3	5.34 m	119.0		H-2 _{peq} , H-2 _{peq} and H-15
4		132.8		
5	2.29 m	41.2		H-6 _{ax} and H-6 _{eq}
6	2.18 _{ax} ddm (13.8, 13.6) 3.01 _{eq} dd (13.8; 3.8)	24.8	C-5, C-7 and C-11 C-5, C-7, C-8, C-10, and C-11	H-6 _{eq} and H-5 H-6 _{ax} and H-5
7		161.4		
8	4.92 _{ax} m	78.4	7	H-9 _{ax} , H-9 _{eq}
9	2.08 _{eq} m 1.33 _{ax} dd (11.9, 11.8)	41.0	C-1, C-8, C-10, and C-14 C-1, C-5, C-7, C-8, C-10, and C-14	H-8 and H-9 _{ax} H-8 and H-9 _{eq}
10		37.2		
11		120.9		
12		174.5		
13	1.87 s	8.3	C-7, C-11 and C-12	H-8
14	1.00 s	16.0	C-1, C-5, C-9, and C-10	
15	1.77 s	21.0	C-3, C-4 and C-5	H-3
COMe		170.4		
COMe	2.02 s	21.2	COMe	

NMR chemical shifts are given in ppm relative to TMS as an internal reference at δ 0.0. Long-range ^1H – ^{13}C (HMBC) correlations were optimised for 8 Hz, and are from the stated hydrogen(s) to the indicated carbon.

alcohol-4-O- β -D-glucopyranoside. Subfractions K23–M23 (50.2 mg) were submitted to semiprep-HPLC using H₂O–MeOH (90:10 → 10:90) as gradient at a flow rate of 3 mL/min, from which **1** (3 mg) and **2** (4.2 mg, Isorinic acid) were obtained. Similarly, the CPC fraction A8 (134.5 mg) was also subjected to semiprep-HPLC and afforded **9** (1.5 mg) identified as the flavonoid kaempferol-3-O- β -D-glucuronide. CPC fraction A15 (30.6 mg) was submitted to MPLC starting with dichloromethane (50%) in hexane increasing to 100% dichloromethane. Subsequently, separation was continued by increasing polarity with ethyl acetate (EtOAc) until 100%. This led to the production of subfractions A25–K25 as well as A26–P26. There was a spontaneous crystallization of B25 affording **5** (11.8 mg) which was elucidated as the sesquiterpene lactone podoandin. Subfraction K25 (19 mg) was submitted to TLC-prep which led to the isolation of compounds **6** (4.9 mg) and **7** (1.3 mg) identified also as sesquiterpene lactones onoseriolide and 1- α -acetoxyeudesma-3,7(11)-dien-8,12-olide respectively, with compound **7** as a new eudesmanolide. Subfraction C26 (4.9 mg) was also subjected to TLC-prep which yielded **8** and was characterized as the sesquiterpene lactone 15-hydroxyisogerma-furenolide. CPC fraction A13 (15.7 mg) was subjected to Prep RP-TLC (H₂O–MeOH, 6:4) which afforded **4** identified as the neolignan (7S, 8R)-urologinoside (2 mg).

1- α -acetoxyeudesma-3,7(11)-dien-8,12-olide (**7**), (4aS,8S,8a-R,9aS)-3,5,8a-trimethyl-2-oxo-2,4,4a,7,8,8a,9,9a-octahydronaphtho[2,3-b]furan-8-yl acetate. HR-ESI-MS ([M+H]⁺): m/z found: 291.1587, calculated = 291.159086. HR-ESI-MS ([M+Na]⁺): 313.1405. Molecular formula C₁₇H₂₂O₄; ¹H and ¹³C NMR data (CDCl₃): See Table 1 spectra available as supplementary information.

2.7. Antimycobacterial assay

The extracts and isolated compounds were screened for antimycobacterial activity in concentrations ranging from 100 μ g/mL to 1.56 μ g/mL against the reference strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. The resazurin microtiter assay plate was carried out as described by Palomino et al. (2002) with the

following modifications. The method was performed in 7H9-S medium containing Middlebrooks broth (Himedia, India), 0.5% glycerol (Amresco, USA) and supplemented with OADC (oleic acid, albumin, dextrose and catalase) enrichment (Himedia, India). One hundred microliters of serial two fold dilutions of each extract or isolated compound were added in 96-well microplates, followed by 100 μ L of the inoculum, which was prepared in 7H9-S medium, adjusted to a McFarland tube no. 1 and diluted 1:20. Isoniazid (Sigma–Aldrich, USA) 1.0 μ g/mL was used as positive control and sterility control without inoculation and a growth control containing no drug were also included. The plates were covered, sealed and incubated at 37 °C. After 7 days of incubation, 30 μ L of 0.01% resazurin solution (Sigma, USA) was added to each well and the plates were re-incubated for 24 h. A color change from blue to pink indicates reduction of resazurin and therefore bacterial growth.

3. Results and discussion

3.1. Comparative LC–MS profiling of male and female HB extracts and its HR-MS analysis

Lokvam and Braddock (1999) have shown differences in the LC profiles of resins from the male and female neotropical dioecious plant *Clusia grandiflora*. Considering that people use indiscriminately HB infusion as remedy made from both sexes, LC–MS analysis in the negative mode of separate plants were conducted. Similarities in their profiles were found (Fig 2). Both sexes showed rosmarinic acid (**1**) as a major peak with a molecular ion at 359.077 m/z [M–H][−] and minor peaks at retention times of about 11.3, 11.6 and 13.3 min. The total ion chromatogram of both FCE and MCE extracts showed no significant differences. The profiling of both male and female extracts of HB by UHPLC–ESI–MS led to the detection of all described compounds in both extracts (Table 2). In particular, the ionization of all compounds was feasible in positive mode (Figs. 4 and 5).

Hydroxycinnamic acid derivatives, compounds **1** and **2**, were detected at 12.20 and 13.22 min respectively from their molecular ions [M+H]⁺ in positive mode. Interestingly, the fragmentation of

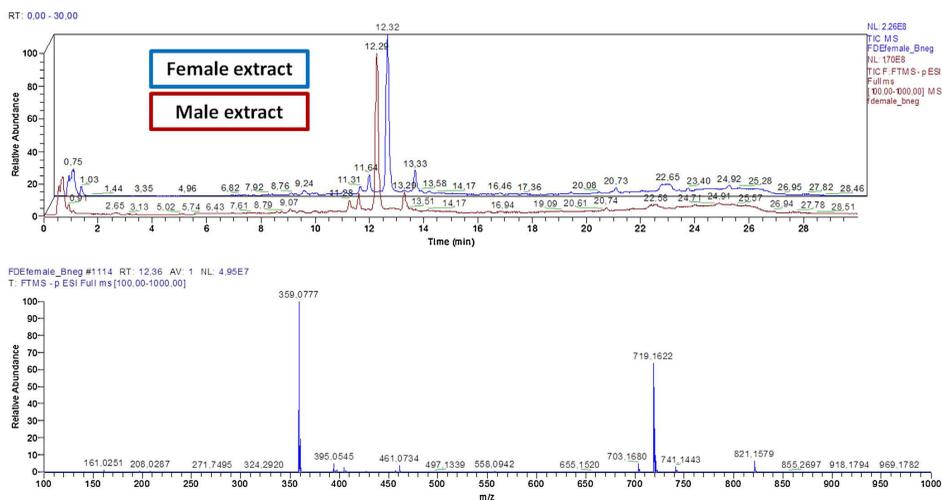


Fig. 2. Total Ion chromatogram of the FCE (Female crude extract) and MCE (Male crude extract).

both compounds led to the generation of caffeoyl ions at m/z 163.0369 corresponding to $C_9H_7O_3$. This finding is in accordance with studies reporting the presence of this typical ion under CID fragmentation in ESI(–) (Hossain et al., 2010).

The neolignans **3** and **4** ionized only in positive mode generating ions $[M+Na]^+$ (Table 2). Their detection at 11.21 and 10.86 min respectively, confirmed their relative polar nature. The fragmentation of the $[M+Na]^+$ ion resulted in the cleavage of the glycoside moiety leading to the loss of 162 Da from the structure. The sesquiterpene derivatives were observed between 15.5 and 18.1 min due to their nonpolar properties, generating both molecular $[M+H]^+$ and $[M+Na]^+$ ions. The fragmentation of podoandin (**5**) in ESI(+) revealed a major fragment ion at m/z 213.1277 corresponding to the loss of a H_2O and an ion at m/z 185.1327 corresponding to an additional loss of carboxyl group (–28 Da) suggesting the rupture of the lactone ring. In the case of onoseriolide (**6**), a fragment ion at m/z 199.0756 denotes the cleavage of a C_2H_6O moiety probably due to of the localization of the double bond at C8–C9 which probably hampers the elimination of the carboxylate group. Finally, compound (**7**) presented a fragment ion at m/z 231.1383 revealing the loss of an acetoxy group from the core structure.

3.2. Isolation and identification of compounds from female HB extract

Since the chemical profiles of the FCE and MCE extracts were similar, the FCE extract was chosen for fractionation with the FPX66 resin and subsequently subjected to FCPC. Macroporous resins have been useful for phytochemical analysis in natural products due to an extensive presence of sugar compounds in polar extracts (Ma et al., 2011; Papaspyridi et al., 2012; Zhang et al., 2008). The resin was used to separate carbohydrates from other secondary metabolites. The obtained fraction (FCE-M) which represents 37% of the crude aqueous extract was subjected to FCPC technique for separation and purification of the metabolites.

This orthogonal technique is highly efficient because of its lack of irreversible adsorption to a stationary phase and also by the complete recovery of sample making its use in combination with other techniques an interesting strategy to maximize the separation and isolation of metabolites (Simmler et al., 2014). The FCPC analysis of FCE-M with the biphasic solvent *n*-butanol-ethyl acetate–water (4:1:5), led to a one-step isolation of rosmarinic acid (RA) (**1**) in high purity (97%). When analyzed on the UFLC it was found to possess a purity index of 0.96 (Fig. 3). This is the first time that RA is reported for this species. RA was identified by extensive 1D and 2D NMR and comparison with published data (Ha et al., 2012). Previously, RA had been identified in *Chloranthus officinalis*

(Petersen et al., 2009) and *Sarcandra glabra* (Zhu et al., 2008). RA is known to possess many biological and pharmacological activities including anticancer and neurochemical properties as well as potent antioxidant properties (Krajcovicová and Melus, 2013). The presence of this compound as a major component in the hot infusion of *H. brasiliense* may be one of the reasons why it used to treat various affections in folk medicine (Reitz, 1965). *H. brasiliense* may be considered a source of RA for the food and cosmetic industries due to the high yield of this compound which is employed in food preservation and cosmetics. From the same FCE-M fraction subjected to FCPC, the following compounds were obtained:

Compound **2** was identified as isoronic acid (Satake et al., 1999), also known as caffeoyl-4'-hydroxy-phenyllactic acid, that is assumed to be one of the intermediates for the biosynthesis of **1** (Petersen et al., 2009). Compounds **3** and **4** were identified as neolignans (7S, 8R)-5-methoxydihydrohydrodiconiferil alcohol-4-O- β -D-glucopyranoside (Takara et al., 2003) and (7S, 8R)-urologinsone (Shen et al., 1998) respectively. These compounds are being described for the first time in the genus *Hedyosmum* although they have also been found in other Chloranthaceae species such as *Chloranthus japonicus* (Kuang et al., 2009) and *Sarcandra glabra* (Wu et al., 2012). Compounds **2–4** were identified through MS and NMR data comparing to those reported in the literature. Likewise compounds **5** and **6** were found to be the sesquiterpene lactones podoandin and onoseriolide respectively based on their MS and NMR data comparing to those reported in the literature (Kubo et al., 1992) (Trentin et al., 1999). Recently, a series of pharmacological assays have shown that the sesquiterpene lactone podoandin has antidepressant activities in mice (Goncalves et al., 2012; Tolardo et al., 2010).

The new sesquiterpene lactone **7** was obtained as a colourless gum with a molecular formula $C_{17}H_{22}O_4$, deduced from its NMR data and its HR-ESIMS showing the pseudo-molecular peak at m/z 291.1587 $[M+H]^+$ (calc. 291.159086) and m/z 313.1405 $[M+Na]^+$ and NMR data. The 1H NMR spectrum of **7** showed methyl singlets at δ 1.00 (H-14), 1.77 (H-15) and 1.87 (H-13) as well as a singlet at δ 2.02 characteristic of an acetate methyl group. The methyl hydrogens at δ 1.87 showed direct 1H - ^{13}C correlation with a carbon at δ 8.3 according to HSQC NMR experiment which is consistent with the presence of a neighboring carbonyl group. Moreover, these hydrogens showed long-range 1H - ^{13}C correlations with the carbons at δ 161.4 (C-7), 120.9 (C-11) and 174.5 (C-12), according to HMBC NMR experiment indicating the presence of a five-member α,β -unsaturated- γ -lactone. The hydrogens at δ 2.02 showed direct 1H - ^{13}C correlation with a carbon at δ 21.2, and a long-range 1H - ^{13}C correlation with an acetate carbonyl at δ

Table 2
HR-MS and Tandem data of (**1–9**) in ESI(+).

No	Rt	$[M+H]^+$				$[M+Na]^+$				RDB	Molecular formula
		m/z Experimental	Delta (ppm)	MS/MS	Loss	m/z Experimental	Delta (ppm)	MS/MS	Loss		
1	12.2	361.0909	2.51						11	$C_{18}H_{16}O_8$	
2	13.22	345.0964	2.97	163.0369	$C_9H_7O_3$	367.0783	2.97		11	$C_{18}H_{16}O_7$	
3	11.21					575.2081	2.97	413.157	10	$C_{27}H_{36}O_{12}$	
4	10.86					545.1987	2.22		10	$C_{26}H_{34}O_{11}$	
5	18.09	231.1374	2.23	213.1277	H_2O	253.1194	2.17		7	$C_{15}H_{18}O_2$	
6	16.02	245.1169	1.51	185.1327	CH_2O_2	267.0988	1.56		8	$C_{15}H_{16}O_3$	
				227.1069	H_2O						
7	15.74	291.1587	1.36	199.0756	C_2H_6O	313.1405	1.59		7	$C_{17}H_{22}O_4$	
				273.1491	H_2O						
8	13.51	249.1480	2.17	231.1383	$C_2H_4O_2$	271.1299	2.08		6	$C_{15}H_{20}O_3$	
				231.1381	H_2O						
				203.1431	CH_2O_2						
9	12.25	463.0862	2.14	185.1325	CH_4O_3	485.0679	3.03		13	$C_{12}H_{18}O_{12}$	
				287.0554	$C_6H_6O_6$						

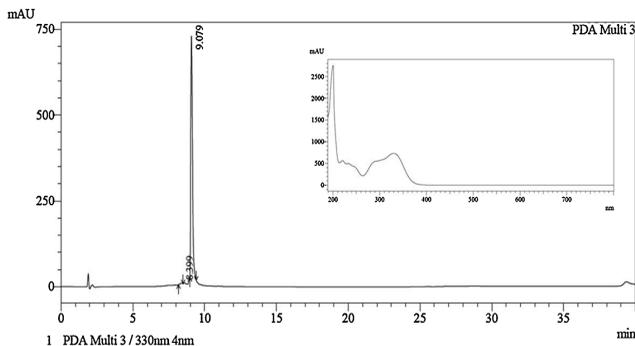


Fig. 3. Chromatogram and UV spectrum of rosmarinic acid (1).

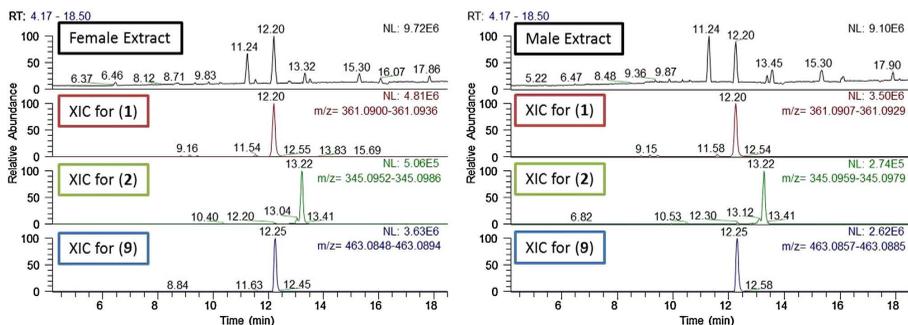


Fig. 4. Base peak chromatograms of the female and male HB extracts in ESI(+) and extracted ion chromatograms for compounds 1, 2, 9.

170.4. The location of the acetyl group was established based on the long-range ^1H - ^{13}C correlation observed for the hydrogen at δ 4.72 (H-1) with the carbonyl at δ 170.4; H-1 showed further HMBC correlations with carbons resonating at δ 37.2 (C-10), 41.2 (C-5) and 119.0 (C-3). The hydrogens of the methyl group at δ 1.00 showed

direct ^1H - ^{13}C correlation with the carbon at δ 16.0 (C-14) and ^1H - ^{13}C long-range correlations with the carbons at δ 74.5 (C-1), 41.2 (C-5), 41.0 (C-9), and 37.2 (C-10). The hydrogens of the methyl group at δ 1.77 showed direct ^1H - ^{13}C correlation with the carbon at δ 21.0 (C-15) and ^1H - ^{13}C long-range correlations with the carbons

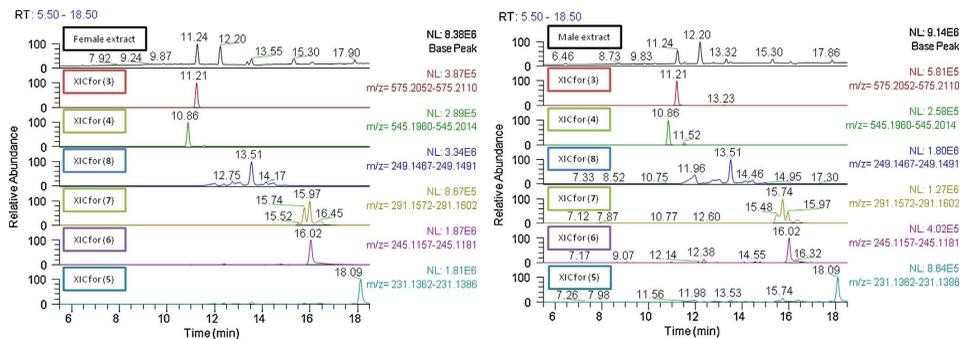


Fig. 5. Base peak chromatograms of the female and male HB extracts in ESI(+) and extracted ion chromatograms for compounds 3–8.

at δ 41.2 (C-5), and with the olefin carbons at δ 132.8 (C-4) and 119.0 (C-3). According to the HSQC experiment, C-3 is bound to hydrogen at δ 5.34 (H-3). According to ^1H - ^1H correlations from COSY NMR experiment, this hydrogen couples to the hydrogens at δ 2.46 (H-2peq) and 2.11 (H-2pax) which are directly connected to the carbon at δ 29.0 as observed in the HSQC NMR experiment. Further COSY correlations were revealed between the hydrogens at δ 2.46 (H-2peq) and 2.11 (H-2pax) and the deshielded hydrogen at δ 4.72 (H-1).

The methylene hydrogen signals at δ 2.08 (H-9eq) and 1.33 (H-9ax) gave a direct ^1H - ^{13}C correlation with the carbon at δ 41.0, and showed HMBC correlations with the carbons at δ 161.4 (C-7) and 78.3 (C-8). Moreover, COSY correlations indicated a coupling between these hydrogens and the deshielded hydrogen at δ 4.92 (H-8ax). Additionally, the quaternary carbon at δ 161.4 (C-7) showed ^1H - ^{13}C long-range correlations with the methylene hydrogens at δ 2.18 (H-6ax) and 3.01 (H-6eq) which in turn correlated with the carbon at δ 41.2 (C-5).

In order to determine the relative stereochemistry of the molecule, 1D NOE NMR experiments were performed. By irradiation of the methyl hydrogens H-14 a positive NOE was observed on H-1, H-8, H-2pax, H-6ax and also H-9eq, with no enhancement of the signal from the hydrogen H-5. The irradiation of H-1, caused a NOE enhancement on the signals of H-14, H-2pax. These data confirmed the *trans*-fused decalin system of the eudesmane skeleton (Ando et al., 1994), leading to the identification of compound **7** as the new eudesmane sesquiterpene lactone 1- α -acetoxyeudesma-3,7(11)-dien-8,12-olide and the overall analysis of 1D and 2D NMR data enabled complete and unequivocal ^1H and ^{13}C NMR chemical shifts assignments (Table 1). Previously, only two similar semisynthetic compounds have been reported, one that was acetylated (Zdero and Bohlmann, 1989) and the other derived from the germacranolide laurenbiolide (Haruhiko and Kenichi, 1976). This is the first eudesmanolide described in the genus *Hedyosmum*. Some eudesmane sesquiterpene lactones have been previously identified in *Chloranthus elatior* (Wang et al., 2012).

Differently from compound **7**, compound **8** presented typical NMR data of terminal methylenes of the elemene skeleton, turned it also to be a sesquiterpene lactone identified as 15-hydroxyisogermafenolide based on its NMR data in conjunction with those published in the literature (Amoah et al., 2013).

The structure of compound **9** was established as kaempferol-3-O- β -D-glucuronide (Granica et al., 2013). To the best of our knowledge this is the first time that this flavonoid glycoside is reported in *H. brasiliense*. This compound has been previously found in the *n*-butanol extract of *S. glabra* and shown to have activity against *Staphylococcus aureus* (Yuan et al., 2008). The isolation of other flavonoid glycosides like kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl (1 \rightarrow 6)- β -D-glucopyranoside and kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside have been reported for *H. bonplandianum* (Cardenas et al., 1993) and from other Chloranthaceae species (Cao et al., 2008).

3.3. Antimycobacterial assay

The FCE-M extract and its isolated major compound (**1**) did not show any significant activity against *M. tuberculosis*. However, extracts of *Thymbra spicata* var *spicata*, *Salvia tomentosa*, *Salvia fruticosa* and *Origanum onites* which have 1 as one of the major constituents have shown moderate-high activities against *M. tuberculosis*, suggesting minority compounds can be more active in these above mentioned plant extracts (Askun et al., 2009).

4. Conclusion

From the aqueous extract of *H. brasiliense* nine compounds were isolated and characterized, in which five are reported for the first time in HB and one of them is a new sesquiterpene lactone (1- α -acetoxyeudesma-3,7(11)-dien-8,12-olide), for the first time reported. Additionally, three sesquiterpene lactones previously isolated from the ethanol extract were also found in the aqueous hot infusion of *H. brasiliense*. The male and female plants of this dioecious plant possess the same profile of secondary metabolites.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to CAPES, CNPq, Finep, Fundação Araucária, UFPR and the CHEMBIOFIGHT PROJECT (code number 269301) for financial support and fellowships and the Centro de Biologia Molecular (CEBIME) from UFSC for LC- DAD analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.07.013>.

References

- Amoah, S.K.S., de Oliveira, F.L., da Cruz, A.C.H., de 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.
- Ando, M., Arai, K., Kikuchi, K., Isogai, K., 1994. Synthetic studies of sesquiterpenes with a cis-fused decalin system. 4. Synthesis of (+)-5 β H-eudesma-3, 11-diene, (-)-5 β H-eudesma-4 β , 11-diol, and (+)-5 β H-eudesma-4 α , 11-diol, and structure revision of a natural eudesmane-4, 11-diol isolated from *Pluchea arguta*. *J. Nat. Prod.* 57, 1189–1199.
- Askun, T., Tumen, G., Satil, F., Ates, M., 2009. In vitro activity of methanol extracts of plants used as spices against *Mycobacterium tuberculosis* and other bacteria. *Food Chem.* 116, 289–294.
- Cao, C.M., Peng, Y., Shi, Q.W., Xiao, P.G., 2008. Chemical constituents and bioactivities of plants of Chloranthaceae. *Chem. Biodivers.* 5, 219–238.
- Cardenas, L.C., Rodriguez, J., Villaverde, M.C., Riguera, R., Cadena, R., Otero, J.A., 1993. The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Med.* 59, 26–27.
- Di Stasi, L.C., Costa, M., Mendaicooli, S.L.J., Krizawa, M., Gomes, C., Troin, G., 1988. Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of Sao Paulo, J. *Ethnopharm.* 24, 205–211.
- Goncalves, A.E., Burger, C., Amoah, S.K., Toifado, R., Biavatti, M.W., de 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. *Eur. J. Pharmacol.* 674, 307–314.
- Granica, S., Czerwińska, M.E., Zyzynska-Granica, B., Kiss, A.K., 2013. Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. *Fitoterapia* 91, 180–188.
- Ha, T.J., Lee, J.H., Lee, M.-H., Lee, B.W., Kwon, H.S., Park, C.-H., Shim, K.-B., Kim, H.-T., Baek, I.-Y., Jang, D.S., 2012. Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. *Food Chem.* 135, 1397–1403.
- Haruhiko, T., Kenichi, T., 1976. Sesquiterpenes of lauraceae plants. IV. Germacranolides from *Laurus nobilis* L. *Chem. Pharm. Bull.* 24, 667–671.
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2010. Characterization of phenolic composition in lamiaeae species by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* 58, 10576–10581.
- 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. *Rev. Bras. Farmacogn.* 20, 692–699.
- Krajcovicová, Z., Melus, V., 2013. Bioactivity and potential health benefits of Rosmarinic acid. *Univ. Rev.* 7, 8–14.
- Kuang, H.-X., Xia, Y.-G., Yang, B.-Y., Wang, Q.-H., Lü, S.-W., 2009. Lignan constituents from *Chloranthus japonicus* Sieb. *Arch. Pharm. Res.* 32, 329–334.

- Kubo, I., Ying, B.P., Castillo, M., Brinen, L.S., Clardy, J., 1992. Podoandin, a molluscicidal sesquiterpene lactone from *Podocarpus andina*. *Phytochemistry* 31, 1545–1548.
- Lokvam, J., Braddock, J.F., 1999. Anti-bacterial function in the sexually dimorphic pollinator rewards of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Oecologia* 119, 534–540.
- Ma, C.H., Liu, T.T., Yang, L., Zu, Y.G., Yang, F.J., Zhao, C.J., Zhang, L., Zhang, Z.H., 2011. Preparation of high purity biphenyl cyclooctene lignans from *Schisandra* extract by ion exchange resin catalytic transformation combined with macroporous resin separation. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 879, 3444–3451.
- Palomino, J.-C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., Portaels, F., 2002. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 2720–2722.
- Papaspyridi, L.M., Aliagiannis, N., Topakas, E., Christakopoulos, P., Skaltsounis, A.L., Fokialakis, N., 2012. Submerged fermentation of the edible mushroom *Pleurotus ostreatus* in a batch stirred tank bioreactor as a promising alternative for the effective production of bioactive metabolites. *Molecules* 17, 2714–2724.
- Petersen, M., Abdullah, Y., Benner, J., Eberle, D., Gehlen, K., Huecherig, S., Janiak, V., Kim, K.H., Sander, M., Weitzel, C., Wolters, S., 2009. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70, 1663–1679.
- Reitz, R., 1965. Clorantaceae.—Flora Illustrada Catarinense. *Herbário Barbosa Rodrigues*, Itajaí 4–10.
- Satake, T., Kamiya, K., Saiki, Y., Hama, T., Fujimoto, Y., Kitanaka, S., Kimura, Y., Uzawa, J., Endang, H., Umar, M., 1999. Studies on the constituents of fruits of *Helicteres isora* L. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 1444–1447.
- Shen, Y.C., Hsieh, P.W., Kuo, Y.H., 1998. Neolignan glucosides from *Jasminum urophyllum*. *Phytochemistry* 48, 719–723.
- Simmler, C., Nikolić, D., Lankin, D.C., Yu, Y., Friesen, J.B., van Breemen, R.B., Lecomte, A., Le Que'mener, Audo, G.C., Pauli, G.F., 2014. Orthogonal analysis underscores the relevance of primary and secondary metabolites in licorice. *J. Nat. Prod.* 77, 1806–1816.
- Souza, V.C., Lorenzi, H., 2008. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa.
- Takara, K., Matsui, D., Wada, K., Ichiba, T., Chinen, I., Nakasone, Y., 2003. New phenolic compounds from Kokuto, non-centrifuged cane sugar. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 67, 376–379.
- Tolardo, R., Zetterman, L., Bitencourt, D.R., Mora, T.C., de Oliveira, F.L., Biavatti, M. W., Amoah, S.K.S., Burger, C., de Souza, M.M., 2010. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *J. Ethnopharmacol.* 128, 63–70.
- Trentin, A.P., Santos, A.R.S., Guedes, A., Pizzolatti, M.G., Yunes, R.A., Calixto, J.B., 1999. Antinociception caused by the extract of *Hedyosmum brasiliense* and its active principle, the sesquiterpene lactone 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide. *Planta Med.* 65, 517–521.
- Wang, F., Zhou, D.-S., Wei, G.-Z., Ren, F.-C., Liu, J.-K., 2012. Chlorantholides A–F, eudesmane-type sesquiterpene lactones from *Chloranthus elatior*. *Phytochemistry* 77, 312–317.
- Wu, H., Hu, X., Zhang, X., Chen, S., Yang, J., Xu, X., 2012. Benzyl 2-β-Glucopyranosyloxybenzoate, a new phenolic acid glycoside from *Sarcandra glabra*. *Molecules* 17, 5212–5218.
- Yuan, K., Zhu, J.X., Si, J.P., Cai, H.K., Ding, X.D., Pan, Y.J., 2008. Studies on chemical constituents and antibacterial activity from n-butanol extract of *Sarcandra glabra*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 33, 1843–1846.
- Zdero, C., Bohlmann, F., 1989. Eremophilanolides, eudesmanolides, guaianolides and other constituents from *Ondetia linearis*. *Phytochemistry* 28, 1653–1660.
- Zhang, L., Yang, L., Niu, H., Zu, Y., 2008. Separation of vindoline, catharanthine and vinblastine from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don with macroporous adsorption resin. *Huagong Xuebao* 59, 607–614.
- Zhu, L.P., Li, Y., Yang, J.Z., Zuo, L., Zhang, D.M., 2008. Studies on chemical constituents of *Sarcandra glabra*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 33, 155–157.

4 Capítulo 4 Quantificação de um ácido fenólico e duas lactonas sesquiterpênicas no extrato aquoso de *Hedyosmum brasiliense* por UHPLC-MS

4.1 Introdução

No capítulo anterior, mostrou-se o isolamento de algumas substâncias do extrato aquoso de *Hedyosmum brasiliense*. Entre eles, as lactonas sesquiterpênicas (podoandina, onoseriolídeo, 1- β -acetoxi-eudesma-3,7(11) – dien – 8,12 – olideo e 15-hidroxi-isogermafurenolídeo), neolignananas (urolignosídeo e (-)-(7*S*, 8*R*)-5-metoxidiidrodesidrodiconiferil álcool 4-*O*- β -D-glicopiranosídeo, o flavonóide kaempferol-3-*O*- β -D-glucuronídeo e os dois ácidos fenólicos (ácido rosmarínico e ácido isorínico), sendo que o ácido rosmarínico é o composto majoritário do extrato aquoso. Neste capítulo buscou-se quantificar principais substâncias do extrato aquoso.

4.1.1 LC-MS

Ultimamente, o uso de cromatografia líquida para separação e o seu acoplamento a espectrometria de massas para caracterizar e analisar a composição de produtos naturais tem crescido. Este crescimento deve-se a rapidez, ionização suave e a abrangência de análise de vários tipos de metabólitos. Ainda oferece uma metodologia robusta, confiável e econômica para análise quantitativa dos componentes de um produto natural sobre uma faixa de concentração ampla e dinâmica (YAN *et al.*, 2013). As vantagens em acoplar um LC com detecção de MS incluem sensibilidade e reprodutibilidade do sinal. Além disso, promove a identificação dos picos individuais dos analitos de interesse e dos interferentes nos cromatogramas, sendo que picos que estejam co-eluindo podem ser isolados por seletividade das suas massas (WU *et al.*, 2013).

Da perspectiva de separação, a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RP-HPLC) é a mais usada em análises fitoquímicas. Para cada aplicação, as propriedades químicas e físicas de empacotamento da coluna (dimensão da coluna e tamanho de partícula) devem ser levadas em consideração (STECHEER *et al.*, 2002). A separação rápida e eficiente

pode ser obtida trabalhando com colunas que possuem partículas de fase estacionária porosas com tamanho $>2 \mu\text{m}$.

A cromatografia de ultra eficiência (UHPLC do inglês ultra high performance liquid chromatography) fundamenta-se nos mesmos princípios de separação da HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas (5-15 cm de comprimento e diâmetros internos de 1-2,1 mm) e também nas partículas da fase estacionária que são $\leq 2 \mu\text{m}$. Estes parâmetros junto com as altas velocidades lineares de fase móvel aumentam a resolução, detectabilidade e ainda diminuem significativamente o tempo de análises. Entretanto, a pressão do sistema é aumentada e por isso é empregado um equipamento capaz de resistir ou operar em altas pressões acima de até 10000 bar ou até 15000 psi (MALDANER; JARDIM, 2012). Em comparação com HPLC convencional, a eficiência da separação por UHPLC e a resolução são aumentadas com picos mais definidos (LI; LEGIDO-QUIGLEY, 2008).

O princípio de espectrometria de massas baseia-se na capacidade de separar e filtrar os íons de analitos sob estudo de acordo com a sua massa/carga (m/z). Um espectrômetro de massas possui uma fonte de ionização, um analisador de massas e um detector. Algumas técnicas de ionização mais usadas são a ionização por *eletrospray* (ESI) e a ionização química a pressão atmosférica (APCI) (STEINMANN; GANZERA, 2011). A técnica de ESI é uma técnica branda de ionização para uma faixa larga de compostos e tem se difundido em diversas áreas de ciência. A ionização por *eletrospray* pode gerar três tipos de íons sendo: íons moleculares (M^{+}) ou (M^{-}); moléculas protonadas ($[M+H]^{+}$) ou desprotonadas ($[M-H]^{-}$) (íons *quasi*-moleculares) e moléculas cationizadas ($[M+Na]^{+}$, $[M+K]^{+}$) ou anionizadas ($[M+Cl]^{-}$ etc) (CROTTI *et al.*, 2006). No processo de ionização por *eletrospray*, os analitos são ionizados em solução e em seguida os íons são transferidos para a fase gasosa por meio de aplicação de spray e voltagem específica, seguida da evaporação do solvente. Outro fator importante para estudos de massas é o tipo de analisador de massas. Alguns analisadores de massas empregados para análise qualitativa e quantitativa são denominados: quadrupolo, *ion trap*, o tempo de vôo (*time-of-flight* - TOF) e o FT-ICR (*Fourier transform ion cyclotron resonance*) (WU *et al.*, 2013). O TOF é um analisador que permite uma análise com elevada exatidão e resolução na determinação de massas. Além disso, possui uma alta sensibilidade e velocidade de aquisição para identificar espécies de íons não conhecidos

e para diferenciar dois compostos que possuem a mesma massa nominal, mas diferentes composições elementais. Quando o TOF é acoplado a um quadrupolo, QTOF-MS permite análise de MS/MS e produz massas exatas para os íons precursores e filhos (LACORTE; FERNANDEZ-ALBA, 2006). Atualmente, por causa de combinação tandem do mesmo ou diferentes analisadores de massas, gerou-se resultados mais eficientes em espectrometria de massas no caso para elucidação estrutural e análise quantitativa de produtos naturais (WU *et al.*, 2013). Isso então aprimora seletividade e sensibilidade para análises quantitativas. Os analisadores em tandem mais usados incluem o triplo quadrupolo (QqQ ou TQ), Q-Trap, IT-IT (LTQ Orbitrap), IT-TOF e o Q-TOF.

O uso de equipamentos de LC-TOF para quantificação tem aumentado em várias áreas de pesquisa. Têm sido usados para quantificação em matrizes biológicas, alimentos, amostras ambientais, materiais explosivos e extratos de plantas (WILLIAMSON; BARTLETT, 2007). Avula e colaboradores (2009) utilizaram este conjunto para quantificar ginkgolídeos e bilobalídeo em amostras de plantas e suplementos dietéticos. (KIVILOMPOLO; HYÖTYLÄINEN, 2007). Ainda Pól e colaboradores (2007) usaram uma cromatografia bidimensional (LCxLC) acoplada a TOF para quantificar glicosídeos da *Stevia rebaudiana* e Kivilompolo e Hyötyläinen (2007) como também quantificar ácidos fenólicos, inclusive ácidos rosmarínico, nos extratos de plantas da família Lamiaceae.

H. brasiliense é usado popularmente na forma de chá, mas não há nenhum trabalho que busca desenvolver um método analítico para quantificar as substâncias no mesmo. Neste sentido, o presente trabalho fez uso de um equipamento UHPLC-ESI-QTOF para quantificar um ácido fenólico e duas lactonas sesquiterpênicas no extrato aquoso de *Hedyosmum brasiliense*. O motivo para quantificar o RA e as duas lactonas PDN e ONS é pelos estudos biológico e farmacológico já apresentados na literatura e pela sua presença na infusão ou chá das folhas de *H. brasiliense*. Enquanto RA apresenta várias atividades biológicas como anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, antineurodegenerativa entre outras (KRAJCOVICOVÁ; MELUS, 2013), a PDN exibiu-se atividade antidepressiva (GONCALVES *et al.*, 2012; TOLARDO *et al.*, 2010) e a ONS atividade antinociceptiva (TRENTIN *et al.*, 1999) e citotóxica.

4.2 Objetivos

Investigar quantitativamente por metodologia LC-MS os compostos ácido rosmarínico (RA), a podoandina (PDN) e onoseriolídeo (ONS) no extrato aquoso de *Hedyosmum brasiliense*.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Equipamentos e solventes

Foram utilizados os equipamentos disponíveis nos laboratórios de farmacognosia, central analítica, Centro de Biologia Molecular (CEBIME) da Universidade Federal de Santa Catarina e também no laboratório do Department of Pharmacognosy and Natural Products Chemistry em Atenas, Grécia.

A secagem dos extratos foi realizada em um liofilizador EC MicroModulyo. A concentração de frações foi realizada em evaporador rotatório Buchi equipado com bomba V700, controlador de pressão, sob temperatura não superior a 40 °C.

As análises por cromatografia líquida de ultra eficiência e de massas foram realizadas em um equipamento do modelo de Prominence UFLC, Shimadzu (Japan), com injetor automático e forno, acoplado a um MicroTOF-Q II da Bruker Daltonics GmbH (Bremen, Germany), com fontes de ionização: ESI (Ionização por eletrospray), APCI (Ionização química à pressão atmosférica) e APPI (Fotoionização à pressão atmosférica) com operação em modo positivo e negativo não simultaneamente. A fonte empregada para este estudo foi ESI. Os solventes empregados para LC-MS foram de grau analítico (MS) de origem Tedia e Sigma. A coluna empregada foi Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 mm x 150 mm, 3,5µm) doada pela Professora Francinette Ramos Campos da Universidade Federal do Paraná. Forno foi usado à temperatura de 40°C e a fase móvel consistiu em solvente A (H₂O 0.1% de ácido fórmico) e solvente B (MeOH). A metodologia para o sistema de UFLC foi gradiente a um fluxo de 0,2 mL/min por 40 mins: 0 a 3 mins:

20% B, 3 a 5 min: 60% B, 5 a 12 min: 67% B, 12 a 25 min: 100% B, 25 a 35 min: 100% B, 35 a 37 min: 20% B, 37 a 40 min: 20% B. Volume de injeção foi 5 µl. Os parâmetros de MS para ionização do RA foram: ESI modo negativo, Scan Begin 150 m/z, Scan End 650 m/z, Set Capillary 2500 V, Set End Plate Offset -500 V, Set Collision Cell RF 150,0 Vpp, Set Nebulizer 1,0 Bar, Set Dry Heater 180 °C e Set Dry Gas 10,0 l/min. Os parâmetros para ionização das lactonas foram a seguir: ESI modo positivo, Scan Begin 50 m/z, Scan End 650 m/z, Set Capillary 4500 V, Set End Plate Offset -500 V, Set Collision Cell RF 160,0 Vpp, Set Nebulizer 1.5 Bar, Set Dry Heater 180 °C, Set Dry Gas 10.0 l/min.

Para preparação das amostras foram empregados metanol grau HPLC e/ou água purificada em sistema Milli-Q (Millipore®).

4.3.2 Material vegetal

Hedyosmum brasiliense foi coletado no município de Antônio Carlos, na Grande Florianópolis – Santa Catarina em dezembro de 2011. A planta foi identificada pelo botânico Professor Ademir Reis, professor do departamento de botânica da Universidade Federal de Santa Catarina e foi comparada com a exsicata (no. 2031) depositada no herbário Lyman Bradford Smith (UNIVALI, Itajaí – Santa Catarina).

4.3.3 Preparação do extrato

As folhas frescas foram extraídas por infusão com água deionizada (≈ 100 °C) por 30 minutos na proporção planta:solvente de 1:5 (m/v). Posteriormente, os extratos foram filtrados, congelados e liofilizados, como já descrito no capítulo 3.

4.3.3.1 Preparação da matriz

Para obtenção da matriz, o extrato foi adsorvido na resina FPX66, conforme já descrito no capítulo 3. A fração aquosa seca (matriz) foi obtida através de liofilização. Uma solução mãe de 5 mg/mL foi preparada.

4.3.3.2 Preparação das amostras

As amostras foram preparadas pela dissolução do extrato em água deionizada e metanol. O extrato aquoso foi usado na quantificação do ácido rosmarínico (RA) e a fração diclorometano foi empregada na quantificação das lactonas podoandina (PDN) e onoseriolídeo (ONS). O extrato aquoso foi preparado para obter uma concentração de 5 mg/mL como solução mãe. Para que a concentração de RA ficasse dentro da faixa de linearidade da curva analítica, o extrato foi dissolvido para 10 µg/mL. Para obtenção da fração diclorometano, aproximadamente 50 mg do extrato aquoso foi dissolvido em água deionizada e submetido a partição líquido:líquido com diclorometano. A fração diclorometano e a fração aquosa foram secas sob vácuo para obter 1,1 mg e 48,6 mg respectivamente. A fração diclorometano foi dissolvido em metanol para obter uma concentração de 1 mg/mL e a fração aquosa foi dissolvida em água. A fração diclorometano foi diluída a fim de obter a concentração 50 µg/mL para que a concentração de PDN e ONS ficasse dentro da faixa de linearidade. Todas estas amostras foram sonicadas e filtradas em membranas de 0,22 µm.

4.3.4 Padrões para curva

Os padrões empregados para quantificação foram as substâncias RA, ONS e PDN isoladas no capítulo 3, todas com pureza acima de 97%. A pureza foi calculada baseada na determinação da porcentagem dos picos de impurezas em relação a área do pico dos compostos que foram analisados no UHPLC-DAD. Os padrões foram dissolvidos em metanol para obter uma concentração de 1 mg/mL e na sequência sonicados e filtrados em membranas de 0,22 µm para obter as soluções mães que foram armazenadas no refrigerador.

4.3.5 Validação do método

Para validação de método foram avaliados a seletividade, limites de detecção (LD) e de quantificação, a linearidade e a precisão (intra-dia e inter-dia), a exatidão e a robustez de acordo com RE 899 da ANVISA empregando o método de padrão externo.

4.3.5.1 Validação do ácido rosmarínico

A linearidade foi obtida utilizando sete diferentes concentrações (0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,5; 3,75 e 5 µg/mL) obtidas a partir da solução estoque de 1 mg/mL. Amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas em três níveis de concentrações: níveis de concentração baixa (CQB – 0,25 µg/mL), médio (CQM – 1,0 µg/mL) e alta (CQA – 5,0 µg/mL).

Para avaliar a seletividade, determinou-se o efeito matriz por meio dos pontos CQB, CQM e CQA. A avaliação do efeito matriz foi feita com base na comparação das inclinações das curvas das amostras CQB, CQM e CQA no metanol e na matriz onde uma concentração de 50 µg/mL da matriz foi utilizada. As análises foram em triplicata. O cálculo para a avaliação do efeito matriz foi feito utilizando a equação abaixo:

$$C\% = 100 \times (1 - S_m/S_s)$$

Onde: S_m = inclinação da curva obtida pela injeção das amostras de CQ de soluções cada analito, preparados na matriz; S_s = inclinação da curva obtida pela injeção das amostras de CQ de cada analito, preparados no solvente.

Todas as soluções foram preparadas e analisadas em triplicata. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados conforme os cálculos abaixo:

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{b}$$

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{b}$$

onde:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

DPa = desvio padrão do intercepto da curva de regressão

b = inclinação da curva analítica

A precisão intra-dia e inter-dia foi avaliada por meio dos níveis de CQB, CQM e CQA. A análise inter-dia foi realizada em dois dias consecutivos. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (%DPR). A

exatidão foi determinada para as mesmas amostras como o erro padrão (% EP) entre as médias das concentrações calculadas e as concentrações nominais. Para avaliar a robustez, o fluxo foi alterado $\pm 5\%$. Os fluxos avaliados foram 0,19 mL/min e 0,21 mL/min. Os experimentos foram feitos no nível de CQM.

4.3.5.2 Validação das lactonas onoseriolídeo e podoandina

A linearidade foi obtida utilizando sete diferentes concentrações (0,50; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$) obtidas a partir da solução estoque de 1 mg/mL. Amostras de controle de qualidade (CQ) foram preparadas em três níveis de concentrações: níveis de concentração baixa (CQB – 1,0 $\mu\text{g/mL}$), médio (CQM – 4,0 $\mu\text{g/mL}$) e alta (CQA – 6,0 $\mu\text{g/mL}$).

Para avaliar a seletividade, determinou-se o efeito matriz por meio dos pontos CQB, CQM e CQA. A avaliação do efeito matriz foi feita com base na comparação das inclinações das curvas das amostras CQB, CQM e CQA em metanol e na matriz onde uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ da matriz foi utilizada. As análises foram em triplicata. O cálculo para a avaliação do efeito matriz foi feito utilizando a equação abaixo:

$$C\% = 100 \times (1 - S_m/S_s)$$

Onde: S_m = inclinação da curva obtida pela injeção das amostras de CQ de soluções cada analito, preparados na matriz; S_s = inclinação da curva obtida pela injeção das amostras de CQ de cada analito, preparados no solvente. Todas as soluções foram preparadas e analisadas em triplicata. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram determinados conforme o método visual e os cálculos abaixo:

$$LD = \frac{3 \times DP_a}{b}$$

b

$$LQ = \frac{10 \times DP_a}{b}$$

b

onde:

LD = limite de detecção

LQ = limite de quantificação

Dpa = desvio padrão do intercepto da curva de regressão

b = inclinação da curva analítica

A precisão intra-dia e inter-dia foi avaliada por meio dos níveis de CQB, CQM e CQA. A análise inter-dia foi realizada em dois dias consecutivos. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativos (%DPR). A exatidão foi determinada para as mesmas amostras como o erro padrão (% EP) entre as médias das concentrações calculadas e as concentrações nominais. Para avaliar a robustez, o fluxo foi alterado $\pm 5\%$. Sendo que os fluxos avaliados foram 0,19 mL/min e 0,21 mL/min. Os experimentos da robustez foram feitos no nível de CQM.

4.3.5.3 Tratamento de dados

Para tratamento de dados foram empregados os programas de DataAnalysis e QuantAnalysis da Bruker e também Excel 2013 da Microsoft.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Desenvolvimento do método

Com o intuito de estudar as três classes de compostos e determinar o ácido fenólico (RA) e as lactonas sesquiterpênicas (ONS e PDN) precisava-se de uma metodologia que promovesse a análise rápida, seletiva e também a quantificação dos compostos. O equipamento de UHPLC-ESI-QTOF-MS foi escolhido por ser um equipamento sensível e por sua capacidade de detectar e quantificar substâncias em quantidades baixas em amostras (YAN *et al.*, 2013). Além disso, é reconhecido por ser econômico e diminuir o gasto de solvente. O uso da coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (2.1 mm x 150 mm, 3,5 μ m), também facilitou o estudo por ser capaz de reduzir tempo de análise, uso de solvente e por produzir picos mais definidos. Com um fluxo de 0,2 μ L/min e tempo de 40 minutos foi possível separar os compostos a ser estudados. Estudos prévios desenvolvidos pelo autor, empregando solventes como acetonitrila, metanol, água (ácido fórmico 0,1%) mostraram que o metanol e água (ácido fórmico 0,1%), foram melhores para a análise pois melhoravam a

resolução dos picos. Parâmetros espectrométricos de massas mostrados no item 4.3.1, foram otimizados adequadamente, para obter o sinal mais alto para os compostos de interesse. As áreas dos íons extraídos (EIC) dos compostos de interesse foram empregadas para a validação.

4.4.2 Validação

O método de padronização externa foi contemplado neste estudo. Para o composto RA que foi analisado no modo negativo ($[M-H]^-$), o íon molecular extraído em $359,0761 \pm 0,02$ foi empregado. A figura 55 mostra os cromatogramas do íon total (TIC – total ion chromatogram) do extrato e do íon molecular extraído (EIC – extracted ion chromatogram) do RA.

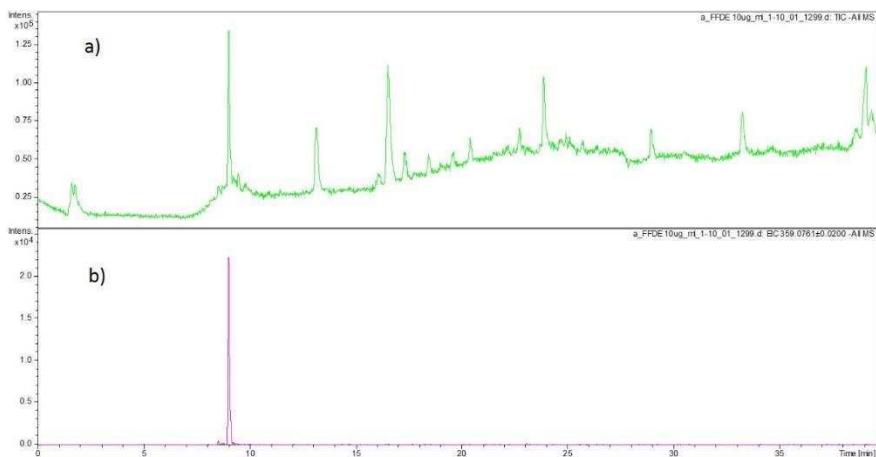


Figura 55: Cromatograma do íon total (TIC) do extrato (a) e íon molecular extraído (EIC) do RA (b) ($R_t = 9,0$ minutos).

Para os compostos PDN e ONS, os íons moleculares extraídos no modo positivo ($[M+H]^+$) em $231,1421 \pm 0,02$ m/z e $245,1211 \pm 0,02$ m/z respectivamente foram empregados. A figura 56 mostra os

chromatogramas do TIC da fração diclorometano e EIC's dos compostos PDN e ONS.

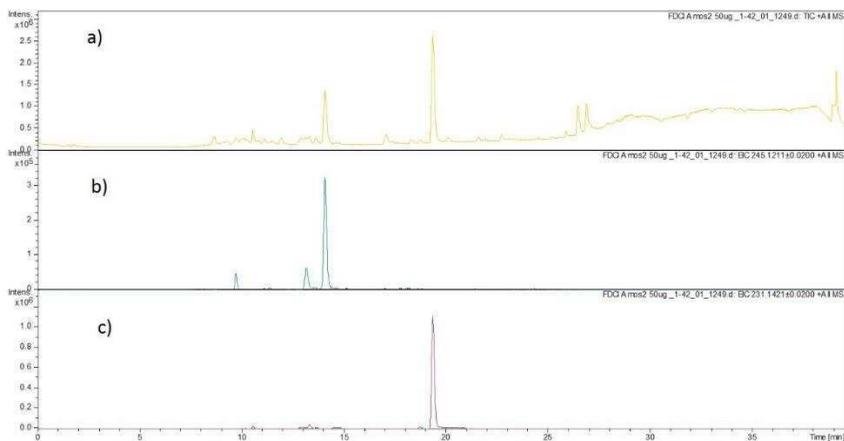


Figura 56. Cromatograma do íon total (TIC) (a) e dos íons moleculares extraídos (EIC) do ONS ($R_t = 14$ minutos) (b) e PDN ($R_t = 19,3$ minutos) (c).

O tempo de retenção (R_t) e íon molecular de cada analito se encontra na tabela 11.

Tabela 11. Tempo de retenção e íon molecular dos compostos de interesse.

Composto/PI	Tempo de retenção (R_t) minutos	m/z	
		$[M-H]^-$	$[M+H]^+$
RA	9,0	$359,0761 \pm 0,02$	
ONS	$14,0 \pm 0,1$		$245,1211 \pm 0,02$
PDN	$19,3 \pm 0,1$		$231,1421 \pm 0,02$

4.4.2.1 Determinação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ)

As curvas de calibração de RA (0,25 – 5,0 µg/mL), PDN (1,0 – 6,0 µg/mL), ONS (faixa linear: 1,0 – 6 µg/mL) foram lineares, com coeficiente de correlação (r) >0,99. As equações das retas e os respectivos coeficientes de correlação são demonstrados na Tabela 12. O coeficiente de correlação (r) é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida. Quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado um dado ideal para a linha de regressão. No entanto, a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO um valor acima de 0,90 (RIBANI *et al.*, 2004).

Tabela 12. Dados de linearidade e sensibilidade para os compostos de interesse.

Composto	Faixa linear (µg/mL)	Equação da reta	Coefficiente de correlação (r)	LD µg/mL	LQ µg/mL
RA	0,25 – 5,0	Y= 66137,4x + 189,8	0,999	0,009	0,029
ONS	1,0 – 6,0	Y= 769251,3x + 77327,3	0,999	0,3	1,0
PDN	1,0 – 6,0	Y= 2152286,2x + 789095	0,998	0,3	1,0

Y=área do analito; x=conc. do analito

O limite de detecção (LD) é conhecido como a menor concentração do composto de interesse analisado no qual o método é capaz de diferenciar do ruído de fundo. Já o limite de quantificação (LQ) define-se como a menor concentração do composto de interesse em uma amostra que pode ser medida quantitativamente com valores aceitáveis de precisão e exatidão. O LD e LQ podem ser calculados empregando três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Neste trabalho, empregou o método visual e o método baseado em parâmetros da curva analítica que levaram aos dados apresentados na tabela 13 para cada composto de interesse. É pela primeira vez que estes compostos estão sendo quantificados em *Hedyosmum brasiliense*. Entretanto, o ácido fenólico (RA) tem sido quantificado em várias espécies de plantas empregando outros métodos analíticos inclusive HPLC-DAD (MODARRES *et al.*, 2014), ressonância magnética nuclear (RMN) (JEMIA *et al.*, 2013) e infravermelho (SALTAS *et al.*, 2013). Recentemente, quantificaram-se desse sete compostos incluindo ácido rosmarínico e Chloranthalactone E, uma lactona sesquiterpênica, em *Sarcandra glabra* por cromatografia líquida acoplada a um triplo-quadrupolo (SU *et al.*, 2014). Encontraram os LD's do ácido rosmarínico e Chloranthalactone E como 0,90 ng/mL e 1,25 ng/mL respectivamente. WU e colaboradores (2013) numa revisão mostraram que os equipamentos de triplo-quadrupolos são bem mais sensíveis para quantificação do que os QTOF's.

A precisão pode ser medida através da estimativa do desvio padrão relativo (DPR), também conhecido como coeficiente de variação (CV) e é empregada para avaliar a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão pode ser avaliada de três maneiras: através da repetibilidade (precisão intra-dia); precisão intermediária (precisão inter-dia) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro.

A repetibilidade, a precisão intermediária e exatidão para o ácido fenólico e as lactonas sesquiterpênicas foram adequados neste estudo. A repetibilidade do RA foi avaliada empregando as amostras de CQ. As amostras não apresentaram DPR maior que 6%. A respeito da precisão intermediária, os DPR's das amostras não foram maiores que 11%. Os dados das áreas do RA para a repetibilidade e a exatidão se encontram na

tabela 13. Os dados da precisão intermediária para os CQ's se encontram na tabela 14. A repetibilidade e precisão intermediária e exatidão do RA foram determinadas avaliando replicatas (n=3) nas concentrações de controle de qualidade CQB, CQM e CQA. A precisão intermediária foi avaliada por dois dias consecutivos.

Tabela 13. Dados de RA para repetibilidade e exatidão.

Replicata	Áreas de RA		
	CQB	CQM	CQA
1	22368	90658	474790
2	20490	90150	452976
3	22675	91721	471151
Média	221844,3	90843 801,7	466305,7
Desvio padrão	1182,9		11686,3
^a DPR %	5,4	0,9	2,5
Exatidão % em ^b EP	8,3	3,8	1,7

^a Desvio Padrão Relativo, ^b Erro Padrão

Tabela 14. Dados de RA para precisão intermediária.

Dia	Replicata	Áreas de RA		
		CQB	CQM	CQA
1	1	22368	91051	474790
	2	20490	90150	452976
	3	22675	91721	471151
2	1	26884	95268	443541
	2	25678	87719	452006
	3	25354	92441	443028
	Média	24074,8	91391,7	456248,7
	Desvio padrão	2174,9	2505,3	13644,
	^a DPR %	10,2	2,8	3,0

^a Desvio Padrão Relativo

Para ONS e PDN, a repetibilidade das amostras de CQ não ultrapassou 7% e 7,5%, respectivamente. Os dados de repetibilidade, exatidão e precisão intermediária para ONS se encontram nas tabelas 15 e 16, respectivamente. Os dados de repetibilidade e precisão intermediária para PDN se encontram nas tabelas 17 e 18. A precisão intermediária foi avaliada por 2 dias consecutivas.

Tabela 15. Dados de ONS para repetibilidade e exatidão.

Replicata	Áreas de ONS		
	CQB	CQM	CQA
1	799755	3454275	4992630
2	728165	3421836	5089734
3	707990	3539424	5108037
Média	745303,3	3471845	5063467
Desvio padrão	48223,4	60731,1	62025,5
^a DPR %	6,5	1,7	1,2
Exatidão % em ^b EP	3,2	1,0	0,7

^a Desvio Padrão Relativo, ^b Erro Padrão

Tabela 16. Dados de ONS para precisão intermediária.

Dia	Replicata	Áreas de ONS		
		CQB	CQM	CQA
1	1	799755	3454275	4992630
	2	728165	3421836	5089734
	3	707990	3539424	5108037
2	1	738165	3609007	5066213
	2	854906	3568522	5268392
	3	737364	3552419	5416813
	Média	771196,7	3524247,2	5156969,8
	Desvio padrão	55834,2	71487,9	156264,4
	^a DPR %	7,3	2,0	3,0

^a Desvio Padrão Relativo

Tabela 17. Dados de PDN para repetibilidade.

Replicata	Áreas de PDN		
	CQB	CQM	CQA
1	2988142	9009117	13126629
2	2669752	9871770	13061120
3	3054236	9788297	13231461
Média	2904043,3	9556394,7	13139736,7
Desvio padrão	205575,8	475790,4673	85923,6
^a DPR %	7,1	5,0	0,6
Exatidão % em ^b EP	4,0	1,6	2,6

^a Desvio Padrão Relativo, ^b Erro Padrão

Tabela 18. Dados de PDN para precisão intermediária.

Dia	Replicata	Áreas de PDN		
		CQB	CQM	CQA
1	1	2988142	9009117	13126629
	2	2669752	9871770	13061120
	3	3054236	9788297	13231461
2	1	3236911	9395950	14146003
	2	3339427	9591986	13254946
	3	3111454	9386570	14034324
Média		3066653,7	9507281,7	13475747,2
Desvio padrão		232055,6	314366,1	482385,5
^a DPR %		7,6	3,3	3,6

^a Desvio Padrão Relativo

Para garantir que uma metodologia é insensível às pequenas alterações nas condições experimentais é importante demonstrar a robustez. Neste experimento, a robustez foi avaliada empregando a amostra de CQM para ONS e PDN e alterando o fluxo para 0,19 mL/min ou 0,21 mL/min. Nenhuma destas alterações afetou significativamente a área da amostra CQM comparando com os dados de precisão que foram obtidos com o fluxo de 0,2 mL/min. Sendo assim, os desvios padrão relativos (DPRs) das áreas obtidos em relação a repetibilidade não foram maiores que 5%. A tabela 19 mostra os dados das áreas obtidos para ONS e PDN durante a alteração do fluxo e os seus respectivos DPRs em relação aos dados do CQM obtidos durante a repetibilidade.

Tabela 19. Dados de robustez para ONS e PDN.

Composto	Fluxo	Área (média)	^c DPR%
ONS	0,19	3499131,5	0,6
	0,21	3686532,5	4,2
PDN	0,19	9836787,2	2,0
	0,21	10237638,8	4,9

^cDPR – Desvio padrão relativo entre a repetibilidade os dados obtidos para robustez

O efeito matriz foi de 4,0; 17,0 e 0% para RA, ONS e PDN, respectivamente. O efeito matriz é considerado baixo para intervalos entre $-20\% < C\% < 20\%$, médio para os intervalos $-50\% < C\% < -20\%$ ou $20\% < C\% < 50\%$ e elevado para os intervalos $C\% < -50\%$ ou $C\% > 50\%$ (CERQUEIRA *et al.*, 2011). Portanto, pode-se verificar que o efeito matriz na quantificação dos compostos de interesse é baixo. A tabela 20 mostra os dados de inclinação das curvas obtidas pela injeção das amostras de CQ de soluções de cada analito, preparados na matriz e no solvente.

Tabela 20. Dados de inclinação das curvas das amostras CQ em matriz e solvente.

Composto	Inclinação		Efeito matriz (C%)
	Solvente	Matriz	
RA	93669	89853	4
ONS	867202	721522	17
PDN	2×10^6	2×10^6	0

A quantidade do RA, ONS e PDN encontradas no extrato aquoso foram 188 mg/g, 1,7 mg/g, e 1,9 mg/g de extrato, respectivamente empregando as médias das áreas encontradas nas amostras para a quantificação (124762,7 = RA; 3380638 = ONS; 11068326 = PDN). Através da metodologia por UHPLC-ESI-QTOF foi possível quantificar os constituintes químicos de *Hedyosmum brasiliense* RA, ONS e PDN.

4.5 Conclusão

A partir destes resultados foi possível concluir que:

- A metodologia empregada neste trabalho foi seletiva, precisa e robusta.
- O efeito matriz avaliada para todas as amostras não foi maior que 18%

- Os coeficientes de correlação foram $> 0,99$.
- As quantidades de RA, ONS e PDN no extrato aquoso liofilizado foram 188 mg/g, 1,7 mg/g e 1,9 mg/g respectivamente.

Capítulo 5 - Discussão geral

“Devido aos seus constituintes aromáticos, analépticos e febrífugos *Hedyosmum brasiliense* é utilizado contra enxaquecas, doenças de ovário e é útil para tratar frieiras. Ainda, a infusão das folhas pode produzir um chá altamente estomáquico, refrigerante e diurético. As folhas frescas ainda podem ser empregadas como um tônico e afrodisíaco ao macerar 30 g em 600 g de vinho branco (REITZ, 1965)”. A busca para validar estes usos populares cientificamente tem levado alguns pesquisadores das áreas de farmacognosia, farmacologistas e botânicos a trabalhar em conjunto. Aos autores deste trabalho, a planta foi apresentada pelo Professor Ademir Reis, um botânico atualmente aposentado do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina. Até então, os autores têm trabalhado em conjunto com farmacologistas e outros pesquisadores na UFSC e em outras instituições. Por causa do uso desta espécie como afrodisíaco em vinho branco e como chá, os autores buscaram estudar a planta fitoquimicamente isolando e caracterizando os compostos nos extratos etanólico e aquoso. Além disso, se preocuparam em validar farmacologicamente alguns usos populares. O seu uso popular por ser afrodisíaco e calmante foi contemplado. Por isso, farmacologistas nas áreas de sistema cardiovascular e sistema nervoso central foram contatados para possível colaboração. O Professor José Eduardo da Silva Santos do departamento de farmacologia da UFSC avaliou o extrato etanólico, as suas frações e alguns dos seus constituintes isolados no sistema cardiovascular para avaliar os efeitos de relaxamento em artérias e corpo cavernoso de camundongos. A Professora Márcia Maria de Souza (Núcleo de Investigações Químicas Farmacêuticas - NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí, e Professora Rubia Weffort da Universidade Federal de Maringá investigaram o extrato e algumas substâncias isolados no sistema nervoso central em camundongos e ratos.

Os constituintes químicos isolados até o momento de *Hedyosmum brasiliense* estão descritos nos capítulos 1, 2 e 3. As técnicas fitoquímicas tradicionais como partição líquido:líquido e cromatografia em coluna com técnicas aprimoradas como cromatografia de partição centrífuga (CPC) e LC-MS foram empregadas para este fim. Os principais compostos encontrados em *Hedyosmum brasiliense* podem ser classificados em sesquiterpenoides, fenólicos, esteróides, ácidos e ésteres alifáticos sendo que neste trabalho atual, foram encontrados sesquiterpenoides e fenólicos. É interessante ressaltar que alguns dos

compostos isolados e caracterizados no extrato etanólico se encontram também no extrato aquoso.

Os sesquiterpenoides encontrados neste trabalho possuem os carboesqueletos guaiano (1), lindenano (2), elemano (3), eudesmano (4) e aromadendrano (5) (Figura 57).

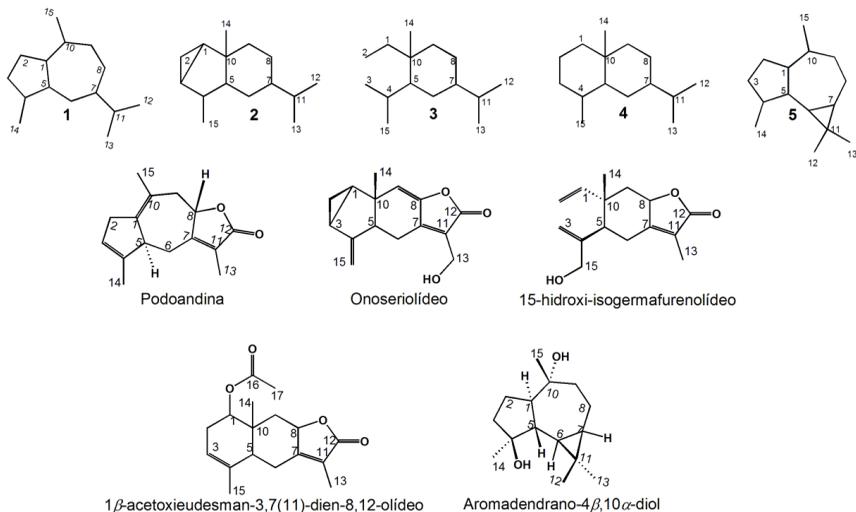


Figura 57. Sesquiterpenoides isolados de *Hedyosmum brasiliense* dos extratos etanólico e aquoso.

A podoandina, onoseriolídeo, 15-hidroxi-isogermafurenolídeo e o composto inédito 1-β-acetoxyeudesma-3,7(11) – dien – 8,12 – olídeo foram isolados do extrato aquoso (capítulo 3) e o aromadendrano-4β,10α-diol foi isolado da fração diclorometano do extrato etanólico (capítulo 2 – item 2.4.3.1). Embora os lindenanos sejam atribuídos como marcadores químicos da família Chloranthaceae (KAWABATA e MIZUTANI, 1988), em *Hedyosmum brasiliense* encontrou-se outros quatro tipos de sesquiterpenoides. A podoandina, onoseriolídeo e 15-hidroxi-isogermafurenolídeo já foram isolados e caracterizados no extrato etanólico (AMOA *et al.*, 2013). Os sesquiterpenoides possuem vários tipos de atividades biológicas, entre elas antioxidantes, citotóxicas, antitumorgênicas, antibacteriana e antifúngica (FERRARI *et al.*, 2013; MERFORT, 2011; ROSSINI *et al.*, 2012).

A podoandina que foi primeiramente isolada do *Podocarpus andina* e mostrou atividade moluscicida (KUBO *et al.*, 1992), tem mostrada que possui possíveis atividades antidepressivas (GONCALVES *et al.*, 2012), anti-Alzheimer e relaxante. Por causa da sua atividade antidepressiva, buscou-se continuar os estudos para saber se após a sua administração crônica a podoandina continuará efetuando a sua atividade antidepressiva. Este estudo foi avaliado pela aluna de iniciação científica, Jéssica Mendes Bonato da Professora Rúbia Maria Monteiro Weffort de Oliveira do departamento de farmacologia e terapêutica da Universidade Estadual de Maringá. Entretanto, o efeito antidepressivo se perdeu após administração crônica, podendo ser por causa do desenvolvimento de tolerância (resultados não mostrados - os resultados foram entregues como relatório para o Programa de iniciação científica na Universidade Estadual de Maringá). Todavia, este estudo poderia ser aprofundado para comprovar a causa da tolerância. É interessante ressaltar que uma nova coleta de *Hedyosmum brasiliense* que foi feita em uma época diferente com o intuito de isolar mais podoandina mostrou a falta desta no extrato. Porém, mais de 300 mg tinha sido isolada desta espécie (AMOA, 2011). Esta ausência do composto no extrato pode ser por causa de fatores abióticos ou bióticos (GOUVEA, GOBBO-NETO E LOPES, 2012), um assunto que poderia ser pesquisado. Onoseriolídeo tem mostrada atividade antinociceptiva (TRENTIN *et al.*, 1999) que então pode ser responsável pela atividade anti-inflamatória exibida por *Hedyosmum brasiliense*. Estudos farmacológicos que foram avaliados recentemente mostrou que ela possui atividade relaxante junto com a 15-acetoxi-isogermafurenolídeo e podoandina e ainda atividade citotóxica (*resultados não publicados*).

O aromadendrano-4 β ,10 α -diol já foi isolada da *Xylopiya brasiliensis* e mostrou atividade antifúngica (MOREIRA *et al.*, 2003) entretanto, esta substância impediu o efeito do peptídeo β -amiloide 1-42 (A β 1-42) nos neurônios em camundongos. O composto inédito 1- β -acetoxyeudesma-3,7(11) – dien – 8,12 – olídeo não foi testado farmacologicamente por ter pouca quantidade. Todavia, alguns eudesmanolídeos têm exibidos atividades citotóxicas em células A549 (adenocarcinoma pulmonar humano) e V79379A (fibroblasto pulmonar de camundongos) (ROSSELLI *et al.*, 2012).

Os fenólicos que foram encontrados podem ser classificados em ácidos fenólicos e seus derivados (figura 58), flavonóides e neolignanas (figura

59). Segundo DAI e MUMPER (2010), os fenólicos são potentes antioxidantes e podem ter atividades antitumoral . Além disso, estas substâncias podem exibir efeitos cardioprotetor, anti-inflamatório e neuroprotetor entre outros (LI *et al.*, 2014). Sendo assim, algumas destas substâncias podem ser responsáveis pelas atividades indicadas no uso popular.

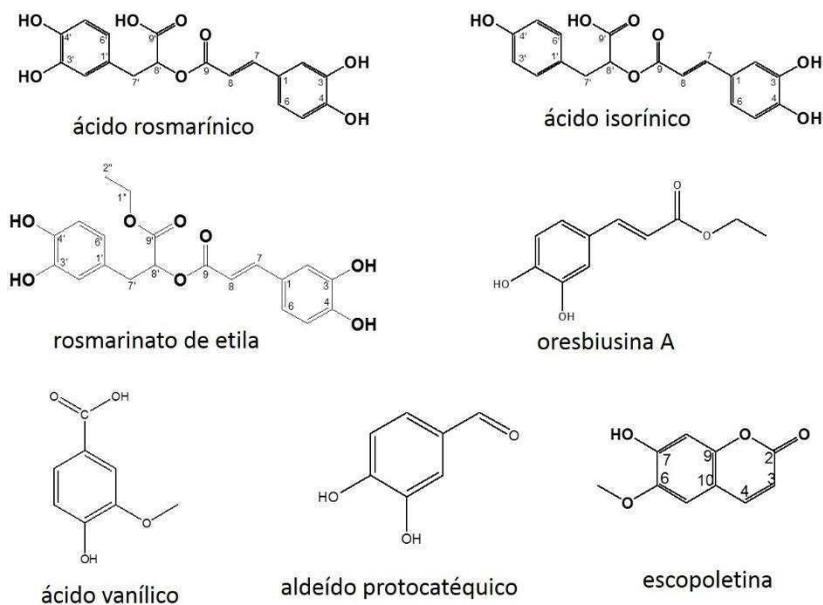


Figura 58. Estruturas de ácidos fenólicos e derivados isoladas de *Hedyosmum brasiliense*.

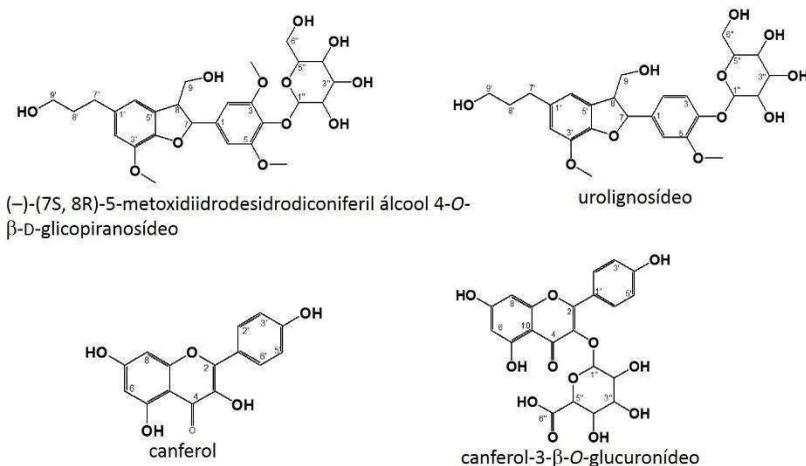


Figura 59. Estruturas de neolignan e flavonóides isoladas de *Hedyosmum brasiliense*.

Através do método de CPC, o ácido rosmarínico foi isolado e identificado como a substância majoritária no extrato aquoso (capítulo 3). Além disso, foi encontrado nas frações acetato de etila e aquosa do extrato etanólico (capítulo 2). Esta substância é responsável por inúmeras atividades biológicas como antibacteriana, antiangiogênica, antidepressiva entre outros (BULGAKOV *et al.*, 2012; KRAJCOVICOVÁ; MELUS, 2013; PETERSEN, 2013). Entretanto, um estudo biológico em colaboração mostrou que o ácido rosmarínico não possui atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* (capítulo 3). Esta substância já foi encontrada em várias famílias no reino vegetal (PETERSEN *et al.*, 2009), mas é a primeira vez que se encontra nesta espécie. Além disso, é usada nas indústrias cosméticas e de alimentos como conservante. A grande quantidade desta substância sintetizada pela *H. brasiliense* deve ser para a sua proteção inclusive dos raios ultravioletas e infecções. Para as indústrias, pode ser interessante para conservação de alimentos e cosméticos. Mais informações sobre esta substância se encontra numa revisão preparada intitulada “Rosmarinic acid- pharmaceutical and clinical aspects” (AMOAHA *et al.*, 2015 – *submetida*).

No capítulo 4 uma metodologia foi desenvolvida e validada para quantificar o ácido rosmarínico, onoseriolídeo e podoandina no extrato aquoso, empregando o equipamento UHPLC-ESI-QTOF do Centro de biologia molecular (CEBIME). Decidiu-se explorar desta maneira, pois o chá de *H. brasiliense* é a forma mais usada na medicina popular e conhecendo quantidades de algumas substâncias principais, especialmente ácido rosmarínico, podoandina e onoseriolídeo que já tem mostradas atividades biológicas e farmacológicas será de grande importância para consolidar pesquisa científica que apoiaria o seu uso, a sua eficácia e segurança. Além disso, o método escolhido é considerado sensível e altamente capaz de detectar quantidades mínimas de substâncias (WU *et al.*, 2013). Neste estudo, conseguiu-se desenvolver uma metodologia que gerou curvas com coeficiente de correlação maiores que 0,99 como estipulado pelo RE 899 da ANVISA e a repetibilidade e precisão intermediária com desvio padrão relativo (DPR) menores que 11%. A quantificação de ácido rosmarínico indicou uma concentração de 188 mg/g no extrato, uma quantidade alta em comparação com outras plantas especialmente da família de Lamiaceae que sintetizam ácido rosmarínico (PETERSEN, *et al.*, 2009; SALTAS *et al.*, 2013; SHEKARCHI *et al.*, 2012). Portanto, o uso desta espécie como fonte de ácido rosmarínico para indústrias de alimentos, cosméticos e farmacêuticas pode ser contemplado.

Conclusões gerais

- Cinco sesquiterpenoides (um sendo inédito) e onze fenólicos foram isolados e caracterizados neste trabalho
- A continuação dos estudos fitoquímicos das subfrações e frações de diclorometano, acetato de etila e aquosa levou ao isolamento e caracterização de seis (6) substâncias que estão sendo descritas pela primeira vez para *Hedyosmum brasiliense* (aromadendrano-4 β ,10 α -diol, ácido rosmarínico, rosmarinato de etila, canferol, canferol-3- β -*O*-glucuronídeo e oresbiusina A) e três substâncias (aldeído protocatéquico, ácido vanílico e escopoletina) que já foram descritas previamente para *Hedyosmum brasiliense*.
- A análise fitoquímica do extrato aquoso gerou o isolamento e caracterização de de 1- β -acetoxyeudesma-3,7(11) – dien – 8,12 – olide que é uma substancia inédita. Ainda, pelo método desenvolvida por cromatografia de partição centrifugal, ácido

rosmarínico foi isolado através de um só passo. Além disso, ácido isorínico, urolignosídeo, (7*S*, 8*R*)-5-metoxidiidrodesidrodiconiferil álcool-4-*O*-β-*D*-glicopiranosídeo, canferol, canferol-3-β-*O*-glucuronídeo podoandina, onoseriolídeo e 15-hidroxi-isogermafurenolídeo foram isolados e identificados.

- O método de quantificação por UHPLC-ESI-MS proporcionou a quantificação do ácido rosmarínico, onoseriolídeo e podoandina no extrato aquoso com precisão (RSD < 11%) e exatidão (EP < 5). As curvas foram lineares com coeficiente de correlação maiores que 0,99.
- Quanto aos testes biológicos, a podoandina e aromadendrano-4β,10α-diol reverteram significativamente o depósito do peptídeo β-amilóide 1-42 (Aβ1-42) nos neurônios em roedores. A podoandina, onoseriolídeo e 15-acetoxi-isogermafurenolídeo relaxaram os anéis aórticos e corpo cavernoso e o ácido rosmarínico não mostrou nenhuma atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Perspectivas

Estudar a sazonalidade de *Hedyosmum brasiliense* avaliando o óleo essencial e produção dos outros metabólitos secundários.

Referências

- ACEBEY, L.; JULLIAN, V.; SERENO, D.; *et al.* Anti-leishmanial lindenane sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*. **Planta Medica**, v. 76, n. 4, p. 365–368, 2010.
- ACEBEY, L.; SAUVAIN, M.; BECK, S.; *et al.* Bolivianine, a new sesterpene with an unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. **Organic Letters**, v. 9, n. 23, p. 4693–4696, 2007.
- AMOAHA, S. K. S. **Investigação fitoquímica do extrato etanólico de *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae**. Florianópolis - Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.
- AMOAHA, S. K. S.; OLIVEIRA, F. L. DE; CRUZ, A. C. H. DA; *et al.* Sesquiterpene lactones from the leaves of *Hedyosmum brasiliense* (Chloranthaceae). **Phytochemistry**, v. 87, p. 126–132, 2013.
- ANTONELLI, A.; SANMARTÍN, I. Mass Extinction, Gradual Cooling, or Rapid Radiation? Reconstructing the Spatiotemporal Evolution of the Ancient Angiosperm Genus *Hedyosmum* (Chloranthaceae) Using Empirical and Simulated Approaches. **Systematic Biology**, v. 60, n. 5, p. 596–615, 2011.
- AVULA, B.; WANG, Y.-H.; SMILLIE, T. J.; KHAN, I. A. Column Liquid Chromatography/Electrospray Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry and Ultrapformance Column Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Methods for the Determination of Ginkgolides and Bilobalide in the Leaves of Ginkgo biloba and Dietar. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 2, p. 645–652, 2009.
- BEECHAN, C. M.; DJERASSI, C.; EGGERT, H. Terpenoids-LXXIV: The sesquiterpenes from the soft coral *Simularia mayi*. **Tetrahedron**, v. 34, n. 16, p. 2503–2508, 1978.
- BERCION, S.; COUPPE DE KMARTIN, M. A.; BALTAZE, J. P.; BOURGEOIS, P. A new α -methylene γ -lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7-8, p. 620–624, 2005.

BOHLIN, L.; GÖRANSSON, U.; ALSMARK, C.; WEDÉN, C.; BACKLUND, A. Natural products in modern life science. **Phytochemistry Reviews**, v. 9, n. 2, p. 279–301, 2010.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Onoseriolid, ein neues sesquiterpenlacton aus *Onoseris albicans*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 4, p. 689–691, 1980.

BRADFORD, G. Knowledge, Achievement, and Manifestation. **Erkenn**, v. 80, p. 97–116, 2014.

BRUSTEIN, R.; KUPFERMAN, J. The creation of the world-according to science. **History and Philosophy of the Life Sciences**, v. 34, n. 3, p. 361–372, 2012.

BUFAINO, E. M. Phytotherapy in Brazil: Recovering the concepts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 22–27, 2013.

BULGAKOV, V. P.; INYUSHKINA, Y. V.; FEDOREYEV, S. A. Rosmarinic acid and its derivatives: Biotechnology and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 3, p. 203–217, 2012.

BYRNE, M. M.; MURPHY, R. T.; RYAN, A. W. Epigenetic modulation in the treatment of atherosclerotic disease. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. OCT, 2014.

CANUTO, K. M.; BEZERRA, A. M. E.; SILVEIRA, E. R.; VIANA, G. S. B.; LEAL, L. K. A. M. **Phytochemistry, Pharmacology and Agronomy of Medicinal Plants: Amburana Cearensis, an Interdisciplinary Study** In: Phytochemicals - a global perspective of their role in nutrition and health, 2012.

CAO, C. M.; PENG, Y.; SHI, Q. W.; XIAO, P. G. Chemical constituents and bioactivities of plants of chloranthaceae. **Chemistry and Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 219–238, 2008.

CARDENAS, L. C.; RODRIGUEZ, J.; VILLAVERDE, M. C.; *et al.* The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: Flavonoid glycosides. **Planta Medica**, v. 59, n. 1, p. 26–27, 1993.

CERQUEIRA, M. B. R.; DIAS, A. N.; CALDAS, S. S.; *et al.* Validação de método para determinação de ácidos orgânicos voláteis em efluentes de reatores anaeróbios empregando cromatografia líquida. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 156–159, 2011.

CHAUDHARY, A.; SINGH, N. Contribution of world health organization in the global acceptance of Ayurveda. **Journal of Ayurveda and Integrative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 179–186, 2011.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New Horizons for Old Drugs and Drug Leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, p. 287–292, 2006.

DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 791–799, 2010.

ELABBAR, F. A.; HABEL, A. M.; BOZKEHA, N. M. A.; AWINA, T. M. Isolation and identification of some compounds from *Cyclamen rohlfsianum* (primulaceae) from libya. **Scientific reviews and chemical communications**, v. 4, n. 1, p. 1–10, 2014.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E. DE; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 12, n. 6, p. 707–15, jun 2001.

FERRARI, F. C.; FERREIRA, L. C.; SOUZA, M. R.; *et al.* Anti-inflammatory sesquiterpene lactones from *Lychnophora trichocarpa* spreng. (Brazilian Arnica). **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p. 384–389, 2013.

FRANZONI, C.; SAUERMAN, H. Crowd science: The organization of scientific research in open collaborative projects. **Research Policy**, v. 43, n. 1, p. 1–20, 2014.

GABRIEL, M. M.; MOREIRA, E. A.; MIGUEL, O. G.; NAKASHIMA, T.; LOPES, M. Phytochemical study of essential oil from *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. Chloranthaceae. **Estudo fitoquímico do óleo essencial de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. Chloranthaceae**, v. 79, n. 3-4, p. 65–68, 1998.

GILLIS, C. N. *Panax ginseng* pharmacology: A nitric oxide link? **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 1997.

GONÇALVES, A. E.; BÜRGER, C.; AMOAH, S. K. S.; *et al.* 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**, v. 674, n. 2-3, p. 307–314, 2012.

GOUVEA, D. R., GOBBO-NETO, L. AND LOPES, N. P. **Plant Bioactives and Drug Discovery**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2012.

GRANICA, S.; CZERWIŃSKA, M. E.; ŻYŻYŃSKA-GRANICA, B.; KISS, A. K. Antioxidant and anti-inflammatory flavonol glucuronides from *Polygonum aviculare* L. **Fitoterapia**, v. 91, n. 0, p. 180–188, 2013.

GUEDES, A. **Estudo químico e avaliação da atividade analgésica e antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Mart.ex.Miq (Chloranthaceae)**. Florianópolis - Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina, 1997.

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

HA, T. J.; LEE, J. H.; LEE, M.-H.; *et al.* Isolation and identification of phenolic compounds from the seeds of *Perilla frutescens* (L.) and their inhibitory activities against α -glucosidase and aldose reductase. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1397–1403, 2012.

HADIZADEH, F.; KHALILIA, N.; HOSSEINZADEH, H.; KHAIR-ALDINEA, R. Kaempferol from Saffron Petals. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 2, p. 251–252, 2003.

HEFNER, P. A fuller concept of evolution-big bang to spirit. **Zygon**, v. 47, n. 2, p. 298–307, 2012.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, n. 0, p. 501–513, 2015.

HWU, J. R.; VARADARAJU, T. G.; ABD-ELAZEM, I. S.; HUANG, R. C. C. First Total Syntheses of Oresbiusins A and B, Their Antipodes, and Racemates: Configuration Revision and Anti-HIV Activity. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2012, n. 25, p. 4684–4688, 2012.

IWU, M. M. **Handbook of African Medicinal Plants, Second Edition**. [S.l.]: Taylor & Francis, 2014.

JEMIA, M. BEN; TUNDIS, R.; MAGGIO, A.; *et al.* NMR-based quantification of rosmarinic and carnosic acids, GC–MS profile and bioactivity relevant to neurodegenerative disorders of *Rosmarinus officinalis* L. extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1873–1882, 2013.

KAWABATA, J.; MIZUTANI, J. Distribution of Lindenanolides in the Chloranthaceae(Organic Chemistry). **Agricultural and biological chemistry**, v. 52, n. 11, p. 2965–2966, 1988.

KIRCHNER, K.; WISNIEWSKI JR, A.; CRUZ, A. B.; BIAVATTI, M. W.; NETZ, D. J. A. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 5, p. 692–699, 2010.

KIVILOMPOLO, M.; HYÖTYLÄINEN, T. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, n. 1-2, p. 155–164, 2007.

KRAJCOVICOVÁ, Z.; MELUS, V. Bioactivity and potential health benefits of Rosmarinic acid . **University Review**, v. 7, n. 2, p. 8–14, 2013.

KUBO, I.; YING, B. P.; CASTILLO, M.; BRINEN, L. S.; CLARDY, J. Podoandin, a molluscicidal sesquiterpene lactone from *Podocarpus andina*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1545–1548, 1992.

LACORTE, S.; FERNANDEZ-ALBA, A. R. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 25, n. 6, p. 866–880, 2006.

LI, A.-N.; LI, S.; ZHANG, Y.-J.; *et al.* Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020–6047, 2014.

LI, X.; LEGIDO-QUIGLEY, C. Advances in separation science applied to metabonomics. **Electrophoresis**, v. 29, n. 18, p. 3724–3736, 2008.

LI-BING ZHANG; SUSANNE RENNER. The Deepest Splits in Chloranthaceae as Resolved by Chloroplast Sequences. **International Journal of Plant Sciences**, v. 164, n. S5, p. S383–S392, 2003.

LORENZO, D.; LOAYZA, I.; DELLACASSA, E. Composition of the essential oils from leaves of two *Hedyosmum spp.* from Bolivia. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 18, n. 1, p. 32–35, 2003.

MACHADO, A. V; SANTA CATARINA. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL, U. F. DE. **Efeitos do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* Mart. (Chloranthaceae).** [S.l.]: Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pos-Graduação em Biologia Vegetal., 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197–207, 6 jul 2012.

MERFORT, I. Perspectives on sesquiterpene lactones in inflammation and cancer. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 11, p. 1560–1573, 2011.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of the dicotyledons.** [S.l.]: Clarendon Press, 2 ed. 1979.

MODARRES, M.; ASILI, J.; LAHOUTI, M.; *et al.* Simultaneous determination of rosmarinic acid, salvianolic acid b and caffeic acid in *Salvia leriifolia* benth. root, leaf and callus extracts using a high-performance liquid chromatography with diode-array detection technique. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 37, n. 12, p. 1721–1730, 2014.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; ROQUE, N. F. Antifungal Aromadendrane Sesquiterpenoids from the Leaves of *Xylopia brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 5, p. 828–831, 2003.

MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; *et al.* Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 3, p. 201–205, 2000.

OKEN, B. S.; STORZBACH, D. M.; KAYE, J. A. The efficacy of Ginkgo biloba on cognitive function in Alzheimer disease. **Archives of Neurology**, v. 55, n. 11, p. 1409–1415, 1998.

OLIVEIRA, F. L.; BIAVATTI, M. W. **Análise fitoquímica de *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae.** Itajaí - Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí, 2009.

PETERSEN, M. Rosmarinic acid: new aspects. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 1, p. 207–227, 2013.

PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J.; *et al.* Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1663–1679, 2009.

PICARD, G. .; VALADEAU, C. .; ALBÁN-CASTILLO, J. .; *et al.* Assessment of in vitro pharmacological effect of Neotropical Piperaceae in GABAergic bioassays in relation to plants traditionally used for folk illness by the Yanasha (Peru). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1500–1507, 2014.

PÓL, J.; HOHNOVÁ, B.; HYÖTYLÄINEN, T. Characterisation of *Stevia Rebaudiana* by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1150, n. 1–2, p. 85–92, 2007.

- PRACHAYASITTIKUL, S.; BURAPARUANGSANG, P.; WORACHARTCHEEWAN, A.; *et al.* Antimicrobial and Antioxidative Activities of Bioactive Constituents from *Hydnophytum formicarum* Jack. **Molecules**, v. 13, n. 4, p. 904–921, 2008.
- REITZ, R. Clorantaceas. - **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário “Barbosa Rodrigues”, 1965. v. Part 1p. 4–10.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- ROSSELLI, S.; BRUNO, M.; RAIMONDO, F. M.; *et al.* Cytotoxic effect of eudesmanolides isolated from flowers of *Tanacetum vulgare* ssp. *siculum*. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 17, n. 7, p. 8186–95, jan 2012.
- ROSSINI, M.; SCOTTI, M. T.; CORREIA, M. V; *et al.* Sesquiterpene lactones with anti-hepatitis C virus activity using molecular descriptors. **Letters in Drug Design and Discovery**, v. 9, n. 9, p. 881–890, 2012.
- SALTAS, D.; PAPPAS, C. S.; DAFERERA, D.; TARANTILIS, P. A.; POLISSIOU, M. G. Direct Determination of Rosmarinic Acid in Lamiaceae Herbs Using Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy (DRIFTS) and Chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 13, p. 3235–3241, 2013.
- SAÚDE. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. (D. de A. Farmacêutica, Ed.). Brasília -DF: Ministério da Saúde. , 2006
- SHEKARCHI, M.; HAJIMEHDIPOOR, H.; SAEIDNIA, S.; GOHARI, A. R.; HAMEDANI, M. P. Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. **Pharmacognosy Magazine**, v. 8, n. 29, p. 37–41, 2012.
- SOFOWORA, A. **Plantes médicinales et médecine traditionnelle d’Afrique**. [S.l.]: Karthala, 2010.
- SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; FLORA, I. P. DE E. DA. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de**

Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II. [S.l.]: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008.

STÆRK, D.; SKOLE, B.; JØRGENSEN, F. S.; *et al.* Isolation of a library of aromadendranes from *Landolphia dulcis* and its characterization using the volsurf approach. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 799–805, 2004.

STECHER, G.; HUCK, C. W.; STÖGGL, W. M.; *et al.* High performance separation technologies and spectroscopic tools for plant extract characterization in phytomics. **Phytochemistry Reviews**, v. 1, n. 3, p. 413–426, 2002.

STEINMANN, D.; GANZERA, M. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 55, n. 4, p. 744–757, 2011.

SU, K.; LI, Z.; CHEN, Z. CsPI from the perianthless early-diverging *Chloranthus spicatus* show function on petal development in *Arabidopsis thaliana*. **Botanical Studies**, v. 55, n. 1, 2014.

SU, Z. S.; YIN, S.; ZHOU, Z. W.; *et al.* Sesquiterpenoids from *Hedyosmum orientale*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1410–1413, 2008.

TATEO, L. Science at the Supermarket: Multiplication, Personalization and Consumption of Science in Everyday Life. **Integrative Psychological and Behavioral Science**, v. 48, p. 161–175, 2014.

TOLARDO, R.; ZETTERMAN, L.; BITENCOURTT, D. R.; MORA, T. C.; OLIVEIRA, F. L. DE; BIAVATTI, M. W.; AMOAH, S. K. S.; BURGER, C.; *et al.* Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 1, p. 63–70, 2010.

TRENTIN, A. P.; SANTOS, A. R. S.; GUEDES, A.; *et al.* 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.

VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* subsp. *maritima*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 5, p. 1421–1424, 1998.

WHO. **Essential Medicines and Health Products Information Portal**. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4927e/>>. acesso em 23 de julho de 2014.

WILLIAMSON, L. N.; BARTLETT, M. G. Quantitative liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 21, n. 6, p. 567–576, 2007.

WU, H.; GUO, J.; CHEN, S.; *et al.* Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, n. 0, p. 267–291, 2013.

XIONG, J.; LIU, S.-T.; TANG, Y.; *et al.* Sesquiterpenoids from the aerial parts of *Chloranthus elatior*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 4, p. 586–589, 2013.

YAN, G. L.; ZHANG, A. H.; SUN, H.; *et al.* An effective method for determining the ingredients of Shuanghuanglian formula in blood samples using high-resolution LC-MS coupled with background subtraction and a multiple data processing approach. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 19, p. 3191–3199, 2013.

YANG, D.; XIE, H.; YANG, B.; WEI, X. Two tetrahydroisoquinoline alkaloids from the fruit of *Averrhoa carambola*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, n. 0, p. 217–220, 2014.

ZANIOLO, S. R.; BOEGER, M. R.; NEGRELLE, R. R. B. Quality control of *Hedyosmum brasiliense* Mat. ex Miq. (Chloranthaceae) through its leaf structure. Estrutura da folha de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) como subsídio para o controle de qualidade. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 4, n. 1, p. 29–34, 2001.

ZOU, Y.; TAN, C.; WANG, B.; JIANG, S.; ZHU, D. Phenolic compounds from *Ranunculus chinensis*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 46, n. 1, p. 19–21, 2010.

