



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA



Dissertação de Mestrado

“Fitoquímica e Ensaaios Biológicos de Óleos Essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Hedychium coronarium* da Mata Atlântica do Estado de São Paulo”

Aluna: Bruna Cianciulli Barbosa dos Santos

Orientador: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata

Coorientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

Campinas

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP**

Sa59f Santos, Bruna Cianiulli Barbosa.
Fitoquímica e ensaios biológicos de óleos
essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* e
Hedychium coronarium da Mata Atlântica do Estado
de São Paulo / Bruna Cianiulli Barbosa dos Santos. --
Campinas, SP: [s.n], 2010.

Orientador: Lauro Euclides Soares Barata.
Coorientador: Fabio Augusto.

Dissertação - Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Química.

1. Óleo essencial. 2. *Pimenta pseudocaryophyllus*.
3. *Hedychium coronarium*. I. Barata, Lauro Euclides
Soares. II. Augusto, Fabio. III. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Título em inglês: Phytochemistry and biological activity of essential oils of
Pimenta pseudocaryophyllus and *Hedychium coronarium* from the Atlantic Rain
Forest of São Paulo State, Brazil

Palavras-chaves em inglês: Essential oil, *Pimenta pseudocaryophyllus*,
Hedychium coronarium

Área de concentração: Química Orgânica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Orgânica

Banca examinadora: Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata (orientador), Prof.
Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Júnior (UFTPR), Prof. Dr. Paulo Mitsuo Imamura
(IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 25/05/2010

*As flores de plástico não morrem.**
Mas também não produzem óleos essenciais.

* “Flores” - Titãs

Agradecimentos

A Deus, por ter sempre guiado meus passos e iluminado meu caminho, colocado as pessoas certas nos momentos certos e me dado vida, saúde e capacidade para realizar este trabalho.

A meus pais, Ruy e Marise, minha avó Iolanda, meu irmão Thales e a meu noivo, Elias, pelo apoio incondicional e compreensão constante.

Ao Instituto de Química da Unicamp por minha formação profissional e por esta oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao Prof. Dr. Lauro E. S. Barata, por ter me aberto as portas de seu laboratório e pela orientação.

Ao Prof. Dr. Fabio Augusto pela coorientação e pelas sugestões valiosas que enriqueceram este trabalho, e ao Márcio P. Pedroso, pela grande colaboração.

Ao pessoal do laboratório, pela enorme ajuda e paciência! Ritinha^I, Júlio^{II}, Margarete^{III}, Adriana^{IV} e Socorro^V, mais que colegas, vocês foram e são grandes amigos! Não teria feito metade do que fiz sem vocês!

À Aline, que me deu a oportunidade de atuar como coorientadora em um projeto de iniciação científica.

À Verona (*in memoriam*), cuja ajuda foi preciosa, que me indicou um local de coleta para o *Hedychium coronarium* bem próximo do laboratório e isto me possibilitou obter vários dados para este trabalho.

Ao José Jara, pela ajuda na manutenção do equipamento de GC-MS.

^I Rita de Cássia Zacardi de Souza

^{II} Júlio César Teixeira da Silva

^{III} Margarete Marques

^{IV} Adriana Schiozer

^V Maria do Socorro Sousa da Silva

Ao Prof. Dr. Palimécio G. Guerrero Jr. (UFTPR) pela colaboração, por várias amostras enviadas, pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. João Vicente C. Nunes (UNESP – Registro) pela identificação das espécies vegetais utilizadas neste trabalho.

À Prof. Dra. Gilda G. Leitão e ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (UFRJ) pela colaboração no trabalho envolvendo cromatografia contracorrente, do qual resultou o artigo mais importante de minha carreira até agora.

À Profa. Dra. Raquel M. Braga, cuja ajuda na interpretação dos espectros de RMN bidimensionais foi essencial para a identificação correta do chavibetol.

À Profa. Dra. Angélica Z. Schreiber e Luzia Lyra (FCM – Unicamp), pelos excelentes trabalhos envolvendo ensaios antimicrobianos.

Ao Prof. Dr. Jorge Y. Tamashiro, Cátia Urbanetz (IB – Unicamp), Max A. R. Lucas (Fazenda Folha Larga, Cananeia), Adriano G. Amarante e Lauro dos Santos (Divisão de Meio Ambiente – Unicamp) pela ajuda na coleta de *Pimenta pseudocaryophyllus*.

Aos funcionários do IQ – Unicamp, que direta ou indiretamente colaboraram com meu trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida, sem a qual este trabalho não teria sido possível.

Curriculum Vitae

Formação Acadêmica

* Universidade Estadual de Campinas - Unicamp
Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas – Dezembro/2006

Iniciação Científica

* Universidade Estadual de Campinas - Unicamp
Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Dias
Nome do projeto desenvolvido: “Síntese da Cadeia Lateral da Estavamicina, um inibidor do vírus do herpes”
Instituição financiadora: FAPESP (processo nº 04/03348-9)
(Outubro/2003 a Janeiro/2005)

Experiência Profissional

* Rede Municipal de Ensino de Vinhedo
Professora de Ciências – Ensino Fundamental II
(Fevereiro/2009 até os dias atuais)

* Instituto de Ensino Sant’Anna – Vinhedo
Professora Plantonista de Química e Física – Ensino Médio
(Maio/2009 a Dezembro/2009)

* GE Industrial, Plastics (atual Sabic IP)
Estágio em laboratório de desenvolvimento de produtos e qualidade assegurada. Desenvolvimento de compósito termoplástico com fibra vegetal, em convênio com o Prof. Dr. Marco-Aurélio De Paoli (IQ – Unicamp).
(Fevereiro/2005 a Dezembro/2006)

Apresentações Orais

* B. C. B. dos Santos, J. C. T. da Silva, L. K. Rauh, R. C. Z. de Souza, D. A. Cabrini, L. E. S. Barata, *Avaliação sazonal da composição química do óleo essencial de folhas de Virola surinamensis na atividade anti-inflamatória tópica*, XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X Congresso Internacional de Etnofarmacologia, 2008.

* B. C. B. dos Santos, J. C. T. da Silva, F. N. Costa, P. A. de Souza, P. G. Guerrero Jr., G. G. Leitão, L. E. S. Barata, *Isolation of chavibetol from*

Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum leaf essential oil by high speed countercurrent chromatography, 5th. International Conference on Countercurrent Chromatography, 2008.

Algumas Publicações Relevantes

* B. C. B. dos Santos, J. C. T. da Silva, P. G. Guerrero Jr., G. G. Leitão, L. E. S. Barata, *Isolation of chavibetol from essential oil of Pimenta pseudocaryophyllus leaf by high-speed counter-current chromatography*, Journal of Chromatography A, vol. 1216, pág. 4303, 2009.

* B. C. B. dos Santos, L. E. S. Barata, E. H. F. M Silva, P. G. Guerrero Jr., *Composition of Leaf and Rhizome Essential Oils of Hedychium coronarium Koen. from Brazil*, The Journal of Essential Oil Research, 2010 (aceito).

* B. C. B. dos Santos, L. E. S. Barata, C. Bolfarini, P. G. Guerrero Jr., *Composição Química do Óleo Essencial de Folhas de Hedychium coronarium (Koen.) da Mata Atlântica*, Livro de Resumos da 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, pág. PN-043, 2008.

* B. C. B. dos Santos, L. E. S. Barata, E. H. F. M Silva, P. G. Guerrero Jr., *Componentes Voláteis de Rizomas de Hedychium coronarium (Koen.) da Mata Atlântica*, Livro de Resumos da 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, pág. PN-044, 2008.

* J. C. T. da Silva, B. C. B. dos Santos, M. Marques, G. T. Kaufmann, A. M. O. Meirelles, F. N. Costa, B. R. Silva, C. N. Fraga, G. G. Leitão, L. E. S. Barata, *Combined high speed countercurrent and high performance liquid chromatographies for preparative purification and isolation of elemicin and neolignans from Virola surinamensis leaves*, 5th. International Conference on Countercurrent Chromatography, 2008.

* L. C. Dias, G. Z. Melgar, B. C. B. dos Santos, *Estudos Visando a Síntese da Cadeia Lateral C₁-C₈ da Estavamicina*, Livro de Resumos da 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, pág. QO-018, 2005.

Resumo

“Fitoquímica e Ensaio Biológicos de Óleos Essenciais de *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Hedychium coronarium* da Mata Atlântica do Estado de São Paulo”

O presente trabalho envolveu o estudo da composição química da fração volátil (óleos essenciais e *headspaces*) de *Hedychium coronarium* e *Pimenta pseudocaryophyllus* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS). O constituinte mais abundante no óleo essencial de folhas de *P. pseudocaryophyllus*, chavibetol, foi isolado através de cromatografia em camada delgada preparativa e por cromatografia contracorrente e caracterizado por espectrometria de massas e espectroscopia de RMN e no infravermelho. Um estudo sazonal de *H. coronarium* foi feito com quatro coletas ao longo do ano de 2008. Foram avaliadas as atividades antimicrobianas do óleo essencial de rizomas de *H. coronarium*, de folhas de *P. pseudocaryophyllus*, do chavibetol, do metileugenol e do eugenol através das técnicas de difusão com discos e microdiluição em caldo.

Abstract

“Phytochemistry and Biological Activity of Essential Oils of *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Hedychium coronarium* from the Atlantic Rain Forest of São Paulo State, Brazil”

This work involved the chemical composition study of the volatile fraction (essential oils and headspaces) of *Hedychium coronarium* and *Pimenta pseudocaryophyllus* using gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The most abundant constituent present in *P. pseudocaryophyllus* leaf, chavibetol, was isolated using preparative thin layer and countercurrent chromatographies and characterized by mass spectrometry and NMR and infrared spectroscopy. A seasonal study of *H. coronarium* was conducted using four different samples collected during the year 2008. The antimicrobial activities of the oils of *H. coronarium* rhizome and *P. pseudocaryophyllus* leaf, chavibetol, methyleugenol and eugenol were evaluated using the diffusion technique with discs and microdilution broth technique.

Lista de Abreviaturas

¹H: Hidrogênio

¹³C: Carbono 13

ACN: Acetonitrila

AcOEt: Acetato de etila

CCD: Cromatografia em camada delgada

CCDP: Cromatografia em camada delgada preparativa

CFM: Concentração fungicida mínima

CIM: Concentração inibitória mínima

COSY: Espectroscopia de correlação (*Correlation spectroscopy*)

DEPT: Aumento sem distorção por transferência de polarização
(*Distortionless enhancement by polarization transfer*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HMBC: Correlação heteronuclear a múltiplas ligações (*Heteronuclear multiple bond correlation*)

HPLC-PAD: Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (*High performance liquid chromatography with photodiode-array detection*)

HSCCC: Cromatografia contracorrente (*High-speed countercurrent chromatography*)

HSQC: Correlação heteronuclear de quantum simples (*Heteronuclear single quantum correlation*)

I: Índice de retenção

IV: Infravermelho

K_D: Constante de distribuição

MeOH: Metanol

n-BuOH: Álcool *n*-butilico

NOE: Efeito nuclear Overhauser (*Nuclear Overhauser enhancement*)

OE: Óleo essencial

p.e.: Ponto de ebulição

R_f: Fator de retenção

RMN: Ressonância magnética nuclear

TMS: tetrametilsilano

UV: Ultravioleta

Lista de Tabelas

Tabela 1. Materiais vegetais utilizados.....	10
Tabela 2. Sistemas de solventes testados para a corrida de HSCCC.....	14
Tabela 3. Composição química de OEs de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	24
Tabela 4. Valores de K_D para diferentes proporções do sistema de solventes hexano: <i>n</i> -BuOH:MeOH:água (v/v/v/v).....	31
Tabela 5. Frações coletadas na corrida de HSCCC.....	32
Tabela 6. Composição química de OEs de <i>H. coronarium</i>	36
Tabela 7. Composição química da fração volátil de folhas de <i>H. coronarium</i>	40
Tabela 8. Composição química da fração volátil de rizomas de <i>H. coronarium</i>	43
Tabela 9. Estudo sazonal da composição química dos OEs de folhas de <i>H. coronarium</i>	46
Tabela 10. Estudo sazonal da composição química dos OEs de rizomas de <i>H. coronarium</i>	49
Tabela 11. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição (mm) das amostras HCr-1, HCr-2 e CAT-2 frente a leveduras e bactérias.....	52
Tabela 12. Valores de CIM 100% e CFM ($\mu\text{g/mL}$) das amostras HCr-1 e CAT-2 frente a leveduras.....	53
Tabela 13. Valores de CIM e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-2 frente a fungos filamentosos.....	54
Tabela 14. Valores de CIM 100% e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-7, chavibetol, metileugenol e eugenol frente a leveduras.....	55
Tabela 15. Valores de CIM e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-7, chavibetol, metileugenol e eugenol frente a cepas de <i>Trichophyton spp.</i>	56

Tabela 16. Valores de CIM e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-7, chavibetol, metileugenol e eugenol frente a cepas de <i>Microsporum spp.</i>	57
---	----

Lista de Figuras

Figura 1. Fotografia de flores e folhas de <i>Hedychium coronarium</i>	5
Figura 2. Fotografias de rizomas de <i>Hedychium coronarium</i>	5
Figura 3. Fotografia de folhas de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	7
Figura 4. Placa de CCDP vista sob luz UV 254 nm após a separação dos constituintes da amostra CAT-1.....	13
Figura 5. Estruturas do chavibetol e metileugenol.....	17
Figura 6. Principais constituintes dos OEs de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	26
Figura 7. Parte do cromatograma GC-MS da amostra CAT-4, mostrando a separação dos picos correspondentes ao eugenol e chavibetol.....	27
Figura 8. Cromatograma CCC das frações coletadas, destacando-se as sub- frações resultantes, juntamente com o <i>spot</i> do OE.....	32
Figura 9. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ) do chavibetol.....	35
Figura 10. Principais constituintes dos OEs de <i>H. coronarium</i>	38

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O mercado de óleos essenciais.....	2
1.2. A importância do conhecimento científico.....	2
1.3. A Mata Atlântica do Estado de São Paulo.....	3
1.4. Conhecimento científico das plantas em estudo.....	4
1.4.1. <i>Hedychium coronarium</i> J. König (Zingiberaceae).....	4
1.4.2. <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (Gomes) Landrum (Myrtaceae).....	6
2. OBJETIVOS.....	8
3. EXPERIMENTAL.....	9
3.1. Solventes e reagentes.....	9
3.2. Material vegetal.....	10
3.3. Extração dos óleos essenciais.....	11
3.4. Análise da fração volátil por GC-MS.....	11
3.4.1. Análise dos OEs por injeção direta.....	11
3.4.2. Análise do <i>headspace</i> por microextração por fase sólida (HS-SPME)	12
3.4.3. Quantificação e identificação dos constituintes voláteis.....	12
3.5. Isolamento de chavibetol de OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	13
3.6. Isolamento de chavibetol de OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de cromatografia contracorrente (HSCCC).....	14

3.6.1. Determinação dos tempos de separação de fases e das constantes de distribuição (K_D)	14
3.6.2. Separação cromatográfica.....	15
3.6.3. Análise de pureza por HPLC-DAD.....	16
3.6.4. Quantificação em massa dos fenilpropanoides no OE.....	18
3.7. Isolamento de chavibetol do OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de extração ácido-base.....	18
3.8. Caracterização do chavibetol isolado do OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de espectroscopia.....	19
3.9. Síntese do metileugenol.....	20
3.10. Ensaio antimicrobianos.....	21
3.10.1. Técnica de difusão com discos para a avaliação de suscetibilidade de leveduras frente a OE.....	21
3.10.2. Técnica de difusão com discos para a avaliação de suscetibilidade de bactérias frente a OE.....	22
3.10.3. Técnica de microdiluição em caldo para a avaliação de suscetibilidade de leveduras frente a OE.....	22
3.10.4. Técnica de microdiluição em caldo para a avaliação de suscetibilidade de fungos filamentosos frente a OE.....	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
4.1. Análise da composição química dos OEs de <i>P. pseudocaryophyllus</i> por GC-MS.....	24
4.2. Isolamento de chavibetol de OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de CCDP.....	28
4.3. Isolamento de chavibetol de OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de HSCCC.....	29

4.3.1. Escolha do sistema de solventes.....	29
4.3.2. Separação cromatográfica.....	31
4.4. Caracterização do chavibetol isolado do OE de <i>P. pseudocaryophyllus</i> através de espectroscopia.....	33
4.5. Análise da composição química dos OEs de <i>H. coronarium</i> por GC-MS.....	36
4.6. Análise da composição química dos <i>headspaces</i> de <i>H. coronarium</i> e comparação com a composição dos OEs por GC-MS.....	39
4.7. Análise da variação da composição química dos OEs de <i>H. coronarium</i> em função da variação sazonal.....	46
4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	51
5. CONCLUSÕES.....	59
6. LISTA DE COLABORADORES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
8. ANEXOS.....	67
8.1. Espectro de massas do chavibetol.....	67
8.2. Espectro de RMN de ^1H do chavibetol.....	68
8.3. Espectro de RMN de ^{13}C do chavibetol.....	69
8.4. Espectro DEPT do chavibetol.....	70
8.5. Espectro COSY do chavibetol.....	71
8.6. Espectro HSQC do chavibetol.....	72
8.7. Espectro HMBC do chavibetol.....	73
9.8. Espectro NOE com irradiação em 3,30 ppm do chavibetol.....	74
8.9. Espectro no infravermelho do chavibetol.....	75

1. Introdução

A ISO (International Standard Organization) define óleos essenciais ou óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste a vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae). De forma geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, de baixa a média polaridade, geralmente odoríferas e líquidas, de aparência oleosa (daí a denominação “óleo essencial”). Estas substâncias, classificadas como metabólitos secundários, possuem funções ecológicas, como a inibição de germinação de sementes de outras plantas, na proteção contra predadores e parasitas, na atração de polinizadores, na proteção contra perda de água e aumento da temperatura, dentre outras.¹

Óleos essenciais são utilizados em medicamentos, mas também principalmente na indústria de perfumaria, cosméticos e cosmecêuticos, onde há demanda constante de novos produtos. O uso sustentável da biodiversidade dos ecossistemas brasileiros é uma alternativa real para suprir este mercado, como indicado pelo exemplo de sucesso de empresas nacionais de cosméticos como Chamma da Amazônia e Natura. Muito antes, porém, empresas como The Body Shop (UK) e Aveda (EUA) apostaram no uso sustentável dos produtos naturais originados de países como Brasil e outros, o que demonstra a importância dos estudos científicos aplicadas a óleos essenciais.

1.1. O mercado de óleos essenciais

No Brasil, o setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos cresceu 11% entre 2007 e 2008, atingindo um faturamento de R\$ 21,7 bilhões, sendo 14,8% deste faturamento correspondentes às fragrâncias². Já entre fevereiro de 2009 e fevereiro de 2010, o segmento de perfumaria e cosméticos cresceu 6,7%³.

Dados do Instituto Euromonitor de 2006 apontam o Brasil na terceira posição do mercado mundial de cosméticos com valores movimentados em torno de US\$ 8 bilhões, e portanto bem próximo do volume de vendas do mercado de medicamentos brasileiro (US\$ 11 bilhões em 2006)⁴.

1.2. A importância do conhecimento científico

O Brasil é o 4º maior produtor mundial de óleos essenciais, perdendo apenas para os EUA, França e Reino Unido. O Estado de São Paulo é o maior produtor nacional, e cerca de 90% de sua produção corresponde a óleos cítricos, principalmente laranja, limão e tangerina. Dos 10% restantes, apenas uma fração corresponde às matérias-primas aromáticas originadas da biodiversidade brasileira.

De maneira geral, os produtos exportados pelo Brasil são caracterizados pelo grande volume e baixo preço de mercado, consequência do baixo valor agregado. Enquanto o valor médio dos produtos comercializados pelo Brasil é de US\$ 1,34/kg, a França exporta para o Brasil óleos ao preço de US\$ 33,04/kg. O diferencial em valor é atribuído à adição de valor pela tecnologia, como purificação, destilação, padronização e controle de qualidade dos óleos

que importamos. Outrossim, existe um fator perverso relacionado aos óleos essenciais e produtos aromáticos da biodiversidade brasileira, que quase sempre são obtidos de forma predatória, como ocorre com o óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae) que está em perigo de extinção na Amazônia⁵.

Ao Brasil, falta agregar valor pela via tecnológica aos produtos de sua biodiversidade e aproveitar-se do enorme fascínio que o país e a Amazônia causam nos europeus⁶. Apesar da riqueza da biodiversidade e do crescente número de publicações na área de plantas aromáticas, ainda é muito pequena a contribuição do Brasil na pesquisa, desenvolvimento e inovação de matérias-primas e produtos com alto valor agregado para a indústria de perfumaria⁷. Neste sentido, pesquisas visando a melhoria da qualidade de óleos essenciais da rica e inexplorada biodiversidade brasileira é de fundamental importância.

1.3. A Mata Atlântica do Estado de São Paulo

A vegetação de São Paulo é formada, basicamente, pelos biomas Mata Atlântica e Cerrado. A importância desses ecossistemas foi recentemente reconhecida com a inclusão de ambos na lista de *hotspots* (regiões biologicamente mais ricas e ameaçadas do planeta) organizada pela ONG Conservation International⁸.

Atualmente restam menos de 10% da área original da Mata Atlântica no território brasileiro. Este índice é alarmante considerando que grande parte da flora desaparecida foi pouco estudada do ponto de vista químico e biológico. Apesar da devastação acentuada, a Mata Atlântica e o Cerrado ainda contêm uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil, com altíssimos níveis de endemismo. Porém, o potencial destes biomas foi pouco explorado e,

na maior parte dos casos, a exploração dos recursos naturais existentes tem sido exercida de forma predatória do ponto de vista social, econômico e ambiental.

Aliado à falta de fiscalização dos órgãos competentes, este fato tem possibilitado a substituição da floresta por usos menos nobres ou sustentáveis. Perde-se o patrimônio genético nacional exatamente no momento em que a biotecnologia e o uso sustentável da biodiversidade ganham força no mercado globalizado. O desenvolvimento de pesquisas, além de gerar um banco de dados de valor inestimável das espécies, pode vir a gerar desenvolvimento social.

1.4. Conhecimento científico das plantas em estudo

As espécies estudadas, embora possuam amplo conhecimento tradicional na zona costeira de São Paulo, tanto na medicina popular como em perfumaria, não possuem validação científico-terapêutica no tratamento das enfermidades das quais existem relatos de usos etnomédicos. Estas ocorrem em região de Mata Atlântica e a escolha foi baseada na presença de óleos essenciais e na escassez de informações na literatura científica.

1.4.1. *Hedychium coronarium* J. König (Zingiberaceae)

Popularmente conhecida como lírio-do-brejo e napoleão, esta espécie é cultivada como planta ornamental, tanto pela folhagem como pelas flores (Figura 1) que exalam um odor forte e agradável, sendo também útil para perfumaria⁹⁻¹¹. Os rizomas (Figura 2) são utilizados tradicionalmente no

Brasil, China e Índia como anti-inflamatório e antirreumático^{12,13} e na Índia para o tratamento de diabetes e difteria¹⁴. As folhas são utilizadas popularmente como diuréticas e também no tratamento de malária¹⁵.



Figura 1. Fotografia de flores e folhas de *Hedychium coronarium*^a



Figura 2. Fotografias de rizomas de *Hedychium coronarium*^b

^a <http://www.hear.org/starr/hiplants/images>

^b esquerda: <http://picasaweb.google.com/cherfol/PlantIDTropicals#>; direita: arquivo pessoal.

No Madagascar, a produção de óleos essenciais desta espécie é uma atividade econômica bastante rentável, uma vez que a planta é abundante na região e possui crescimento rápido, o que faz com que o mercado possa ser suprido regularmente¹⁶.

Apesar de existirem diversos estudos sobre a composição e atividade biológica dos metabólitos fixos desta espécie, até o momento existe pouca literatura acerca dos óleos essenciais, e destes artigos, apenas uma pequena parcela é de grupos de pesquisa brasileiros^{17,18}, e nenhum do Estado de São Paulo. Assim, nosso grupo de pesquisas pretende formar um banco de dados específico para a região de Mata Atlântica deste Estado.

1.4.2. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae)

As folhas da espécie *Pimenta pseudocaryophyllus* (Figura 3), popularmente conhecida como cataia, são largamente utilizadas na região de Ilha Comprida, no Estado de São Paulo, como aromatizante de cachaça. Este fato, aliado à baixa ocorrência de indivíduos desta espécie, torna a árvore rara nesta região. Também são utilizadas na forma de chá, tanto como bebida refrescante quanto como antigripal, para estados de fadiga e diurético, e também como afrodisíacas.

Existem poucos estudos fitoquímicos^{19,20} e apenas um artigo sobre composição química e atividade biológica²¹ desta espécie, indicando a necessidade de se obter mais informações científicas da mesma.



Figura 3. Fotografia de folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus*^c

^c www.arvoresdeirati.com

2. Objetivos

1. Estudo fitoquímico da fração volátil (óleos essenciais e *headspaces*) de folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* e folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS).
2. Isolamento, identificação e caracterização espectroscópica das principais substâncias presentes nos óleos essenciais.
3. Avaliação da influência da variação sazonal na composição química dos óleos essenciais.
4. Ensaio antimicrobianos dos óleos essenciais e seus principais constituintes.

3. Experimental

3.1. Solventes e reagentes

Todos os solventes (acetato de etila, acetona, acetonitrila, álcool *n*-bútílico, diclorometano, etanol, éter de petróleo, hexano, metanol e tolueno) e reagentes (ácido acético, ácido sulfúrico, carbonato de potássio, cloreto de sódio, hidrocarbonetos C₉-C₂₀, hidróxido de potássio, sulfato de dimetila, sulfato de sódio e vanilina) utilizados no trabalho possuíam grau de pureza analítico e foram utilizados sem tratamento prévio.

O eugenol (Aldrich) utilizado nos ensaios antimicrobianos foi filtrado em sílica antes do uso. O metileugenol foi sintetizado através da adição de sulfato de dimetila ao eugenol em meio básico (item 3.8).

A água utilizada na hidrodestilação e na corrida de HSCCC, bem como o diclorometano utilizado nas análises de GC-MS, foram previamente destilados. O gás hélio (White Martins) possuía grau de pureza 5.0 (99,999%).

O álcool isopropílico e o metanol utilizados na análise de HPLC possuíam grau de pureza HPLC. A água foi previamente destilada e purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA).

As placas para CCDP foram preparadas no próprio laboratório com espessura de 1 mm de sílica sobre lâmina de vidro. A sílica utilizada era uma mistura de sílica 60 H (Merck) e 60 G F254 (Vetec) (1:1, w/w). A revelação das placas foi feita pulverizando-se solução de vanilina em etanol (1% w/w) e ácido sulfúrico:metanol (1:1, v/v) seguida de aquecimento.

O clorofórmio deuterado utilizado nas análises de RMN continha o padrão tetrametilsilano (1% v/v, Aldrich).

3.2. Material vegetal

A Tabela 1 relaciona os materiais vegetais utilizados neste projeto. Todos foram moídos em liquidificador com gelo seco, logo após a coleta. A secagem, quando utilizada, foi feita em estufa com renovação e circulação de ar a 40 °C até massa constante, logo após a moagem.

As amostras de óleo essencial (OE) de plantas coletadas fora da cidade de Campinas (exceto aquelas coletadas na cidade de Cananeia) foram fornecidas pelo Prof. Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Jr. (Departamento de Química e Biologia – UFTPR). As espécies foram identificadas pelo Prof. Dr. João Vicente Coffani Nunes, UNESP, Unidade de Registro.

Tabela 1. Materiais vegetais utilizados.

Código	Espécie	Parte da planta	Local de coleta	Data de coleta	Exsicata nº
HCf-1	<i>H. coronarium</i>	folhas frescas	Registro	7/jun/07	890*
HCf-3	<i>H. coronarium</i>	folhas frescas	IB-Unicamp	16/jan/08	148097**
HCf-4	<i>H. coronarium</i>	folhas frescas	IB-Unicamp	17/abr/08	148097**
HCf-5	<i>H. coronarium</i>	folhas frescas	IB-Unicamp	10/jul/08	148097**
HCf-6	<i>H. coronarium</i>	folhas frescas	IB-Unicamp	16/out/08	148097**
HCf-7	<i>H. coronarium</i>	folhas secas	IB-Unicamp	17/jun/09	148097**
HCr-1	<i>H. coronarium</i>	rizomas frescos	Registro	7/jun/07	890*
HCr-2	<i>H. coronarium</i>	rizomas frescos	Guará	16/nov/06	-
HCr-3	<i>H. coronarium</i>	rizomas frescos	IB-Unicamp	16/jan/08	148097**
HCr-4	<i>H. coronarium</i>	rizomas frescos	IB-Unicamp	17/abr/08	148097**
HCr-5	<i>H. coronarium</i>	rizomas frescos	IB-Unicamp	10/jul/08	148097**
HCr-6	<i>H. coronarium</i>	rizomas frescos	IB-Unicamp	16/out/08	148097**
HCr-7	<i>H. coronarium</i>	rizomas secos	IB-Unicamp	17/jun/09	148097**
CAT-1	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas frescas	Ilha Comprida	4/ago/06	-
CAT-2	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas secas	Ilha Comprida	9/ago/07	-
CAT-3	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas frescas	Cananeia (continente)	26/abr/08	147995**

CAT-4	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas frescas	Cananeia (continente)	26/abr/08	147995**
CAT-5	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas frescas	Cananeia (continente)	26/abr/08	147995**
CAT-6	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas secas	Ilha Comprida	21/mai/08	-
CAT-7	<i>P. pseudocaryophyllus</i>	folhas secas	Ilha do Cardoso	11/jul/08	-

* Exsicata depositada no herbário da UNESP – Registro

** Exsicatas depositadas no herbário da Unicamp

3.3. Extração dos óleos essenciais

Todos os materiais relacionados na Tabela 1 foram hidrodestilados em aparelho Clevenger durante 4 horas. O OE extraído foi recolhido em 5 mL de hexano, seco com sulfato de sódio anidro, filtrado, o solvente removido em rotaevaporador e pesado para a determinação do rendimento.

3.4. Análise da fração volátil por GC-MS

3.4.1. Análise dos OEs por injeção direta

As análises foram feitas em um sistema de GC-MS HP5890/5970, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (5%-fenil-metilsiloxano, 30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme, Agilent) e hélio (1 mL/min) como gás de arraste. O fluxo de *split* foi ajustado para dar uma razão de 1:100. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 e 280 °C respectivamente, e injetou-se 1 µL de solução de OE na concentração de 10-15 mg/mL em diclorometano. A programação de temperatura do forno foi 60-240 °C a 3 °C/min, e a energia de impacto de elétrons do detector foi de 70 eV.

3.4.2. Análise do *headspace* por microextração por fase sólida (HS-SPME)

A um frasco de 25 mL lacrado com septo de teflon/silicone contendo 10 mL de solução saturada de cloreto de sódio, foram adicionados 10-15 mg de material vegetal moído. O frasco foi colocado em um banho termostatzado a 55 °C, onde permaneceu sob agitação magnética a 1200 rpm durante 5 minutos para que a amostra e o *headspace* atingissem a temperatura do banho. Após este tempo, a fibra de SPME permaneceu exposta ao *headspace* durante 25 minutos. Foram utilizados três tipos comerciais de fibra: PDMS 100 µm, Carboxen/PDMS 75 µm e PDMS/DVB 65 µm. Após a extração, a fibra foi inserida no injetor do cromatógrafo e aguardou-se 15 minutos para a dessorção dos analitos. As condições cromatográficas foram as mesmas utilizadas na injeção direta, com exceção da temperatura do injetor (220 °C).

3.4.3. Quantificação e identificação dos constituintes voláteis

As porcentagens relativas dos componentes dos OEs e *headspaces* foram calculadas através da integração das áreas dos picos dos respectivos cromatogramas, sem correção dos fatores de resposta, com auxílio do software *Data Analysis* (Hewlett-Packard). Os componentes foram identificados individualmente através da comparação de seus índices de retenção (*I*) referentes a uma série homóloga de hidrocarbonetos C₉-C₂₀²² e pela comparação de seus espectros de massas com os de compostos conhecidos,

constantes na literatura do método utilizado²² e também nas bases de dados Wiley 275, NIST 21, NIST 107²³.

3.5. Isolamento de chavibetol de OE de *P. pseudocaryophyllus* através de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Dissolveram-se 60 mg da amostra CAT-1 em 0,5 mL de diclorometano e aplicou-se a solução com o auxílio de um pequeno chumaço de algodão preso em uma pipeta de Pasteur em uma placa de CCDP recoberta com uma camada de sílica de 1 mm de espessura. Este procedimento foi repetido com uma segunda placa.

Em seguida, as placas foram eluídas duas vezes com tolueno, e após a evaporação do eluente uma das laterais foi revelada com vanilina sulfúrica e as placas foram visualizadas sob luz UV 254 nm (Figura 4).

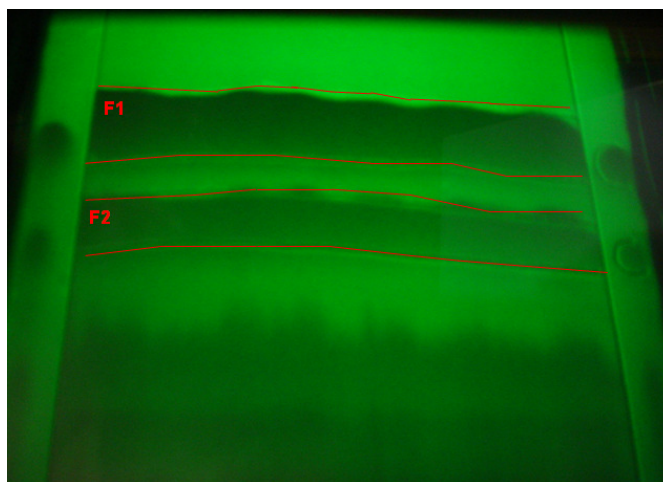


Figura 4. Placa de CCDP vista sob luz UV 254 nm após a separação dos constituintes da amostra CAT-1.

As frações F1 e F2 indicadas na Figura 4 foram coletadas juntamente com a sílica e transferidas para erlenmeyers separados. Em seguida adicionaram-se 20 mL de diclorometano:metanol 95:5 (v/v) a cada erlenmeyer, agitou-se magneticamente por 15 minutos e filtrou-se. O solvente foi removido em rotaevaporador, as frações foram pesadas e analisadas por GC-MS para identificação.

3.6. Isolamento de chavibetol de OE de *P. pseudocaryophyllus* através de cromatografia contracorrente (HSCCC)

3.6.1. Determinação dos tempos de separação de fases e das constantes de distribuição (K_D)

Os tempos de separação de fases de oito sistemas bifásicos de solventes (Tabela 2), contendo ou não o OE (CAT-2, 2 gotas), foram determinados através de agitação vigorosa (20 s) dos tubos de ensaio contendo os solventes e cronometrando-se o tempo necessário para a obtenção de duas fases distintas.

Tabela 2. Sistemas de solventes testados para a corrida de HSCCC.

Sistema	Solventes				Proporção (v/v/v/v)
1	hexano	acetato de etila	metanol	água	1:1:1:1
2	hexano	acetato de etila	álcool <i>n</i> -butilico	água	1:1:1:1
3	hexano	álcool <i>n</i> -butilico	metanol	água	1:1:1:1
4	éter de petróleo (p.e. 35-60 °C)	acetato de etila	metanol	água	1:1:1:1
5	éter de petróleo (p.e. 35-60 °C)	acetato de etila	acetonitrila	água	1:1:1:1

6	hexano	etanol	água	-	6:5:1
7	hexano	acetato de etila	etanol	água	1:1:1:1
8	hexano	metanol	água	-	6:5:1

A distribuição dos componentes do OE entre as duas fases foi estimada visualmente através de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo as placas eluídas duas vezes com tolueno. Os componentes foram visualizados sob luz UV 254 nm e as placas foram reveladas com vanilina sulfúrica.

Nos sistemas de solventes onde as concentrações dos fenilpropanoides nas duas fases eram aproximadamente iguais, o valor da constante de distribuição (K_D) foi calculado através de GC-MS: 1 mL de cada fase foi separado em um frasco, o solvente removido em rotaevaporador, o resíduo dissolvido em 0,5 mL de diclorometano e 1 μ L da solução resultante foi injetada. Foram utilizadas as mesmas condições cromatográficas descritas anteriormente, com exceção da taxa de aquecimento do forno (10 °C/min). Os valores de K_D foram calculados pela razão entre as áreas totais integradas dos picos. O sistema que resultou em um valor de K_D do chavibetol próximo da unidade foi selecionado para otimização.

3.6.2. Separação cromatográfica

Um sistema de HSCCC (modelo HSCCC n°. 403, PC Inc., Potomac, MD, EUA) contendo uma coluna de PTFE de 80 mL, uma bomba de HPLC (modelo M-45, Waters, EUA), uma válvula de injeção de baixa pressão (Rheodyne 5020, EUA) e uma alça de amostragem de PTFE de 5 mL foram utilizados. Este sistema foi acoplado a um coletor de frações (modelo L-7650, Merck, Alemanha) programado para coletar frações a cada 2 minutos.

Volumes apropriados dos solventes hexano:*n*-butanol:metanol:água (12:4:4:3, v/v/v/v) foram agitados vigorosamente em um funil de separação, transferidos para um frasco, desgaseificados em banho ultrassônico por 30 minutos e deixados em repouso à temperatura ambiente durante 1 hora. A eluição isocrática, conduzida à temperatura ambiente, foi feita no modo *tail-to-head* em fase normal (fase inferior aquosa como fase estacionária). A coluna foi preenchida com a fase estacionária na ausência de rotação. A rotação (850 rpm) então foi ligada, e após a estabilização da velocidade, a fase orgânica foi bombeada a 2,0 mL/min e aguardou-se o equilíbrio hidrodinâmico antes da introdução da amostra. A retenção da fase estacionária foi de 80%.

Dissolveram-se 600 mg da amostra CAT-2 em 5 mL do sistema de solventes bifásico (2,5 mL de cada fase) e a solução foi injetada. Foram coletadas 40 frações de 4 mL cada em 80 minutos de corrida. As frações e o *wash-off* (líquido retido na coluna) foram analisados por CCD.

Os solventes foram removidos em rotaevaporador e a pureza dos compostos isolados foi determinada através de HPLC-PAD.

3.6.3. Análise de pureza por HPLC-DAD

Um sistema de HPLC (modelo Prominence LC-20 AT, Shimadzu, Japão) acoplado a um detector UV-Vis de arranjo de fotodiodos (modelo Prominence SPD-M20A, Shimadzu) foi utilizado com uma coluna de aço inoxidável μ Bondapak (C_{18} , 300 mm de comprimento x 3,9 mm de diâmetro interno, 10 μ m de diâmetro de partícula).

Soluções em álcool isopropílico de chavibetol (100 μ g/mL) e de

metileugenol (100 $\mu\text{g/mL}$), previamente isolados por HSCCC, foram injetadas separadamente e a corrida foi realizada isocraticamente utilizando-se metanol:água (1:1, v/v) + 0,02% ácido acético (1 mL/min) como fase móvel. Os comprimentos de onda registrados pelo detector foram 217, 230, 254, 270, 300, 320, 350, 380, 410 e 450 nm. As estruturas destes compostos são mostradas na Figura 5.

Os cálculos de pureza dos compostos foram feitos utilizando-se a área sob a curva dos picos cromatográficos obtidos em todos os comprimentos de onda, com o auxílio do software Lab Solution (versão 3.0, Shimadzu) e através dos métodos “total peak” (razão das absorbâncias em diferentes comprimentos de onda em toda a extensão do pico) e “three point peak similarity” (similaridade entre os espectros no UV-Vis de três pontos do pico).

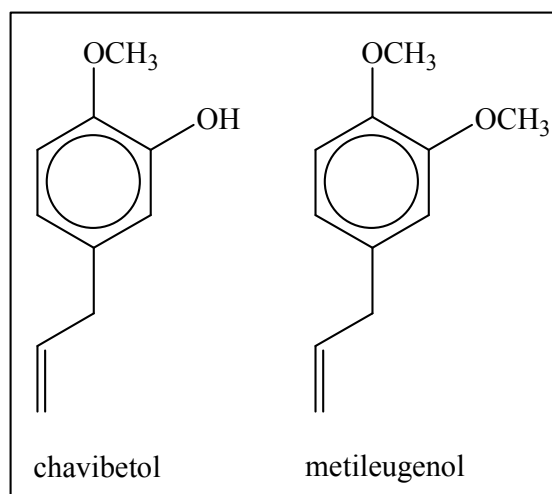


Figura 5. Estruturas do chavibetol e metileugenol.

3.6.4. Quantificação em massa dos fenilpropanoides no OE

Preparou-se uma solução estoque de 15 mg/mL de chavibetol e 15 mg/mL de metileugenol em diclorometano, que foi diluída para 12, 9, 6, 3 e 0,75 mg/mL. Às soluções diluídas adicionou-se catecol (6 mg/mL) como padrão interno e estas finalmente foram analisadas por GC-MS, sob as condições descritas em 3.4.1. A curva analítica foi então obtida através de regressão linear.

Para a quantificação dos fenilpropanoides na amostra CAT-2 por GC-MS, preparou-se uma solução contendo o OE (13,2 mg/mL) e catecol (6 mg/mL). As porcentagens em massa dos fenilpropanoides no OE foram calculadas pela razão entre as concentrações (em mg/mL) dos fenilpropanoides e do OE na solução da amostra.

3.7. Isolamento de chavibetol do OE de *P. pseudocaryophyllus* através de extração ácido-base

Pequenas porções (2 a 5 mL) de OE de *P. pseudocaryophyllus* contendo apenas chavibetol (e não eugenol) foram diluídas em quantidades apropriadas de diclorometano e extraídas exaustivamente com solução de hidróxido de potássio 1 mol/L. Adicionou-se à fase aquosa volumes ligeiramente superiores de solução de ácido clorídrico 1 mol/L, a solução aquosa resultante foi extraída com diclorometano, a fase orgânica foi lavada com solução saturada de cloreto de sódio, seca com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rotaevaporador.

3.8. Caracterização do chavibetol isolado do OE de *P. pseudocaryophyllus* através de espectroscopia

O chavibetol isolado por CCDP foi analisado por espectroscopia no IV e de RMN de ^1H , de ^{13}C , DEPT 135, DEPT 90, COSY, HSQC e HMBC.

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos nos aparelhos Bruker Avance DPX e Varian Inova 500. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) tendo como referência interna o clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 7,26 ppm) e o tetrametilsilano (TMS, 0 ppm) para RMN de ^1H e o clorofórmio deuterado (77,0 ppm) para RMN de ^{13}C . As multiplicidades das bandas de absorção dos prótons nos espectros de RMN de ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (singleto), sl (singleto largo), d (dubleto), dl (dubleto largo), t (triplete), tl (triplete largo), q (quarteto), dd (duplo dubleto), ddd (duplo duplo dubleto), dt (duplo triplete), td (triplete de dubletos), ddt (duplo duplo triplete), dq (duplo quarteto), dq (quarteto de dubletos), qt (quinteto), st (sexteto), sp (septeto), dsp (duplo septeto), m (multipletto) e ap (aparente). Os dados espectrométricos referentes aos espectros de RMN de ^1H estão organizados segundo a convenção: deslocamento químico (multiplicidade, constante de acoplamento em Hz, número de prótons), e os referentes aos espectros de RMN de ^{13}C estão organizados por deslocamento químico.

RMN de ^1H (250 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): δ 3,30 (d, J 6,7 Hz, 2H); 3,88 (s, 3H); 5,07 (m, 2H); 5,59 (s, 1H); 5,95 (m, 1H); 6,68 (dd, J 8,2; 2,0 Hz, 1H); 6,79 (d, J 2,1 Hz, 1H); 6,80 (d, J 8,1 Hz, 1H).

RMN de ^{13}C (62,5 MHz, CDCl_3 , δ (ppm)): δ 145,5; 144,9; 137,6; 133,4; 119,8; 115,5; 114,8; 110,6; 56,0; 39,6.

Os espectros no infravermelho foram obtidos na forma de filme em um aparelho Bomen série MB, modelo B-100, resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras. Os dados espectrométricos referentes aos espectros no infravermelho estão organizados por número de onda.

IV (cm^{-1}): 3518, 3080, 3007, 2939, 2842, 1635, 1592, 1509, 1441, 1343, 1270, 1236, 1212, 1173, 1124, 1022, 993, 964, 905, 862, 198, 755, 642.

3.9. Síntese do metileugenol

Este procedimento foi realizado a fim de se obter material para ensaios biológicos.

A um balão de fundo redondo foram adicionados 40 g de eugenol (24,2 mmol), 6,8 g de carbonato de potássio (48,8 mmol) e 8,0 g de sulfato de dimetila ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$, 64,9 mmol) dissolvidos em 30 mL de acetona. A mistura foi deixada em refluxo durante a noite.

Após este período, o solvente foi removido em rotaevaporador e o produto da reação extraído com diclorometano. As fases orgânicas reunidas foram lavadas três vezes com hidróxido de potássio 1 mol/L e uma vez com solução saturada de cloreto de sódio, secas com sulfato de sódio anidro e o solvente removido em rotaevaporador.²⁴

3.10. Ensaios antimicrobianos

3.10.1. Técnica de difusão com discos para a avaliação de suscetibilidade de leveduras frente a OE

Foram avaliadas cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 e ATCC 76615; *C. krusei* ATCC 6258 (espécie resistente a fluconazol) e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Utilizou-se o meio de cultura RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio (Sigma), suplementado com glicose (2%), tamponado com ácido morfilenopropanosulfônico (MOPS) 0,165 mol/L (Sigma), esterilizado por filtração e incorporado com 1,5% de ágar estéril.

O meio de cultura foi inoculado com a suspensão de microorganismos e a tampa foi deixada entreaberta de 3 a 5 minutos para permitir que qualquer excesso de umidade fosse absorvido antes da aplicação dos discos impregnados com as amostras de OE.

A cada disco de papel de filtro estéril (CEFAR) foram adicionados 20 µL de OE e em seguida os discos foram acondicionados em placas de Petri em estufa até completa secagem, depois mantidos entre 2-8°C até o momento do teste. Os discos foram pressionados de encontro ao meio de cultura inoculado, de maneira a assegurar contato completo com sua superfície, sendo distribuídos de forma que a distância entre eles permitisse perceber a presença de qualquer atividade do extrato sobre o microrganismo.

Após 24-48 horas de incubação, examinou-se cada placa. Se a placa foi satisfatoriamente semeada, e o inóculo era correto, como consequência os halos de inibição resultantes eram uniformemente circulares e havia um crescimento microbiano confluyente e homogêneo. Os diâmetros dos halos de

inibição total (julgadas a olho nu) foram mensurados, incluindo o diâmetro do disco. Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua, que é encostada na parte de trás da placa de Petri invertida.^{25,26}

3.10.2. Técnica de difusão com discos para a avaliação de suscetibilidade de bactérias frente a OE

Foram avaliadas cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 110699 e ATCC 27853.

Utilizou-se a mesma metodologia utilizada para a avaliação de leveduras, exceto pelo meio de cultura, que foi ágar Mueller-Hinton, e pelo tempo de incubação de 16-18 horas.^{25,26}

3.10.3. Técnica de microdiluição em caldo para a avaliação de suscetibilidade de leveduras frente a OE

Foram avaliadas cepas de *C. albicans* ATCC 90028 e ATCC 76615; *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* ATCC 22019.

Inicialmente preparou-se a placa de diluição: em uma placa de Elisa, foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a todos os poços com exceção dos poços 11 e 12, que são os controles, positivo e negativo, respectivamente. Em seguida, 100 µL da solução-mãe (0,1 mL da amostra + 0,1 mL DMSO + 1,8 mL água) foram adicionados ao poço 10 (1º poço de diluição). Para diluição à metade, 100 µL do conteúdo do 1º poço foram transferidos para o 2º, do 2º para o 3º e assim por diante até o 10º poço, e

então desprezado. O volume foi completado com 900 µL de água em todos os poços.

Foram adicionados 20 µL da solução-mãe à placa de diluição, aos respectivos poços com exceção dos de número 11 e 12 (controles), seguidos de 160 µL de meio de cultura RPMI, em todos os pocinhos, e 20 µL do inóculo, exceto no pocinho 12 (controle negativo).

As placas inoculadas foram incubadas a 35 °C por 48 horas, e então realizou-se a leitura. O crescimento fúngico em cada poço deve ser comparado com o do controle positivo, observado visualmente com o auxílio de um espelho. A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada considerando-se a menor concentração da droga capaz de inibir qualquer crescimento fúngico visível (100%).

A partir da concentração considerada a CIM (com 80% ou 100% de inibição de crescimento), retirou-se uma alíquota de cada um dos pocinhos onde não foi observado crescimento do microrganismo, e transferida para uma placa de Petri contendo meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose, sem adição de amostra. Após 24 horas de incubação a 35°C foi realizada a leitura. Deste modo, a menor concentração de amostra que não permitiu crescimento do microrganismo foi considerada a concentração fungicida mínima (CFM).²⁷

3.10.4. Técnica de microdiluição em caldo para a avaliação de suscetibilidade de fungos filamentosos frente a OE

Foram avaliadas as cepas: *Aspergillus flavus* – P40; *A. fumigatus* – Lif21; *Fusarium oxysporum* – 40c; *F. solani* – Lif08; 25 cepas de *Tricophyton spp.* e 6 cepas de *Microsporum spp.*, de acordo com o CLSI M38-A.²⁸

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise da composição química dos OEs de *P. pseudocaryophyllus* por GC-MS

A Tabela 3 relaciona as composições químicas dos OEs referentes às amostras CAT-1 a CAT-7. São mostrados apenas os picos cuja identificação foi possível.

Tabela 3. Composição química de OEs de *P. pseudocaryophyllus*.

Pico	Dados	Amostra							Identificação tentativa	
		CAT-1	CAT-2	CAT-3	CAT-4	CAT-5	CAT-6	CAT-7	Composto	I calculado
1	t _{R(A)} (min)	5,375	5,088	5,114	5,12	5,147	5,052	4,956	tricicleno	925 / 926
	% Área	0,3	2,5	0,2	0,3	0,7	2,8	2,9		
2	t _{R(A)} (min)	5,563	5,267	5,296	5,302	5,329	5,228	5,131	α-thujeno	932 / 933
	% Área	0,5	6,5	1,4	2,5	4,6	1,9	7,1		
3	t _{R(A)} (min)	6,733	6,387	6,425	6,431	6,47	6,348	6,238	sabineno	976 / 977
	% Área	0,4	6,3	5,7	6,7	9,4	0,3	6,5		
4	t _{R(A)} (min)	-	6,754	6,783	6,789	6,828	6,713	6,595	mirceno	990 / 991
	% Área	-	1,2	1,5	1,4	1,8	1,4	1,5		
5	t _{R(A)} (min)	7,546	7,19	7,222	7,228	7,267	7,145	7,027	α-felandreno	1005 / 1006
	% Área	0,4	5,7	2,8	2,8	4,1	8,0	6,4		
6	t _{R(A)} (min)	7,744	7,369	7,411	7,411	7,456	7,327	7,202	δ-3-careno	1010 / 1011
	% Área	0,4	2,3	1,0	0,9	1,5	3,4	2,9		
7	t _{R(A)} (min)	-	7,577	7,607	7,613	7,659	7,53	7,405	α-terpineno	1016 / 1017
	% Área	-	1,0	0,7	0,8	1,2	1,7	1,4		
8	t _{R(A)} (min)	8,210	7,825	7,871	7,877	7,915	7,786	7,661	o-cimeno	1023 / 1024
	% Área	2,7	4,3	5,0	2,0	2,2	6,4	8,0		
9	t _{R(A)} (min)	8,349	7,974	4,971	8,012	8,057	7,928	7,803	limoneno + β-felandreno	1028
	% Área	0,4	2,4	3,6	3,5	3,9	2,7	3,1		
10	t _{R(A)} (min)	8,478	8,053	8,107	8,113	8,152	8,022	7,89	1,8-cineol	1030 / 1031
	% Área	1,1	2,2	11,9	4,5	5,6	1,8	5,0		
11	t _{R(A)} (min)	9,013	8,618	8,662	8,667	8,706	8,569	8,437	trans-ocimeno	1046 / 1047
	% Área	0,4	3,6	2,6	4,5	4,4	3,0	2,8		
12	t _{R(A)} (min)	9,410	9,005	9,053	9,059	9,104	8,961	8,821	γ-terpineno	1057 / 1058
	% Área	0,3	4,3	3,6	4,2	4,5	6,4	4,4		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

13	t _{R(A)} (min)	10,530	10,105	10,148	10,154	10,198	10,055	9,908	terpinoleno	1088 / 1089
	% Área	0,9	8,0	8,1	9,3	9,7	13,0	9,3		
14	t _{R(A)} (min)	-	-	-	-	-	10,487	-	linalol	1100 / 1011
	% Área	-	-	-	-	-	0,4	-		
15	t _{R(A)} (min)	14,168	13,685	13,757	-	13,811	13,619	13,470	4-terpineol	1177
	% Área	0,8	1,6	1,8	-	0,6	2,3	2,3		
16	t _{R(A)} (min)	14,505	14,002	-	-	-	-	13,807	p-cimen-8-ol	1184 / 1185
	% Área	0,5	0,1	-	-	-	-	0,6		
17	t _{R(A)} (min)	-	14,25	14,331	-	-	14,2	14,036	α-terpineol	1189 / 1191
	% Área	-	0,3	0,8	-	-	0,4	0,7		
18	t _{R(A)} (min)	22,020	-	21,636	21,581	21,638	21,410	21,248	eugenol	1357 / 1358
	% Área	tr*	-	47,4	10,7	0,5	tr*	1,4		
19	t _{R(A)} (min)	22,634	22,122	-	22,142	22,198	22,011	21,869	chavibetol	1371 / 1372**
	% Área	68,6	34,1	-	14,9	21,7	32,0	26,2		
20	t _{R(A)} (min)	24,092	23,59	-	23,655	23,711	23,482	23,333	metileugenol	1406
	% Área	19,8	11,3	-	8,7	12,2	10,2	7,2		
21	t _{R(A)} (min)	-	-	-	27,446	27,513	-	-	biciclogermacreno	1496
	% Área	-	-	-	2,7	2,0	-	-		
22	t _{R(A)} (min)	-	27,903	27,961	27,987	28,033	27,776	-	(E,E)- α-farneseno	1509 / 1510
	% Área	-	1,4	0,9	15,8	8,3	1,4	-		
23	t _{R(A)} (min)	30,397	-	-	-	-	-	-	elemicina	1558
	% Área	0,4	-	-	-	-	-	-		
24	t _{R(A)} (min)	31,190	-	-	-	-	-	-	espatulenol	1578
	% Área	0,8	-	-	-	-	-	-		

* traços

**I de acordo com Pino *et al.*²⁹

As amostras CAT-1, CAT-2 e CAT-6 são de OEs extraídos de *P. pseudocaryophyllus*, de folhas frescas (CAT-1) e secas (CAT-2 e CAT-6), coletadas nos meses de agosto de 2006, agosto de 2007 e maio de 2008, respectivamente, na cidade de Ilha Comprida, SP. As amostras CAT-3, CAT-4 e CAT-5 são de folhas frescas coletadas em abril de 2008 na porção continental da cidade de Cananeia, SP. A amostra CAT-7 é de folhas secas coletadas em julho de 2008 no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananeia, SP. Todas as amostras foram coletadas em região de Mata Atlântica (Tabela 1).

Foram identificados nestas amostras, respectivamente, 19, 20, 18, 19, 20, 21 e 20 constituintes, correspondendo a 98,6; 98,9; 99,1; 96,2; 99,1; 99,4 e

100% da área total integrada dos picos do cromatograma. O constituinte mais abundante em todas as amostras, exceto CAT-3 e CAT-4, foi o fenilpropanoide 5-alil-2-metoxifenol (chavibetol, 68,6; 34,1; 0,0; 14,9; 21,7; 32,0 e 26,2%). O constituinte mais abundante na amostra CAT-3 foi o fenilpropanoide 4-alil-2-metoxifenol (eugenol, 47,4%), e na amostra CAT-4 o sesquiterpeno (*E,E*)- α -farneseno (15,8%). Além destes, foram encontrados em grande porcentagem o 4-alil-1,2-dimetoxibenzeno (metileugenol), *o*-cimeno, terpinoleno e 1,8-cineol. As estruturas destes constituintes são mostradas na Figura 6.

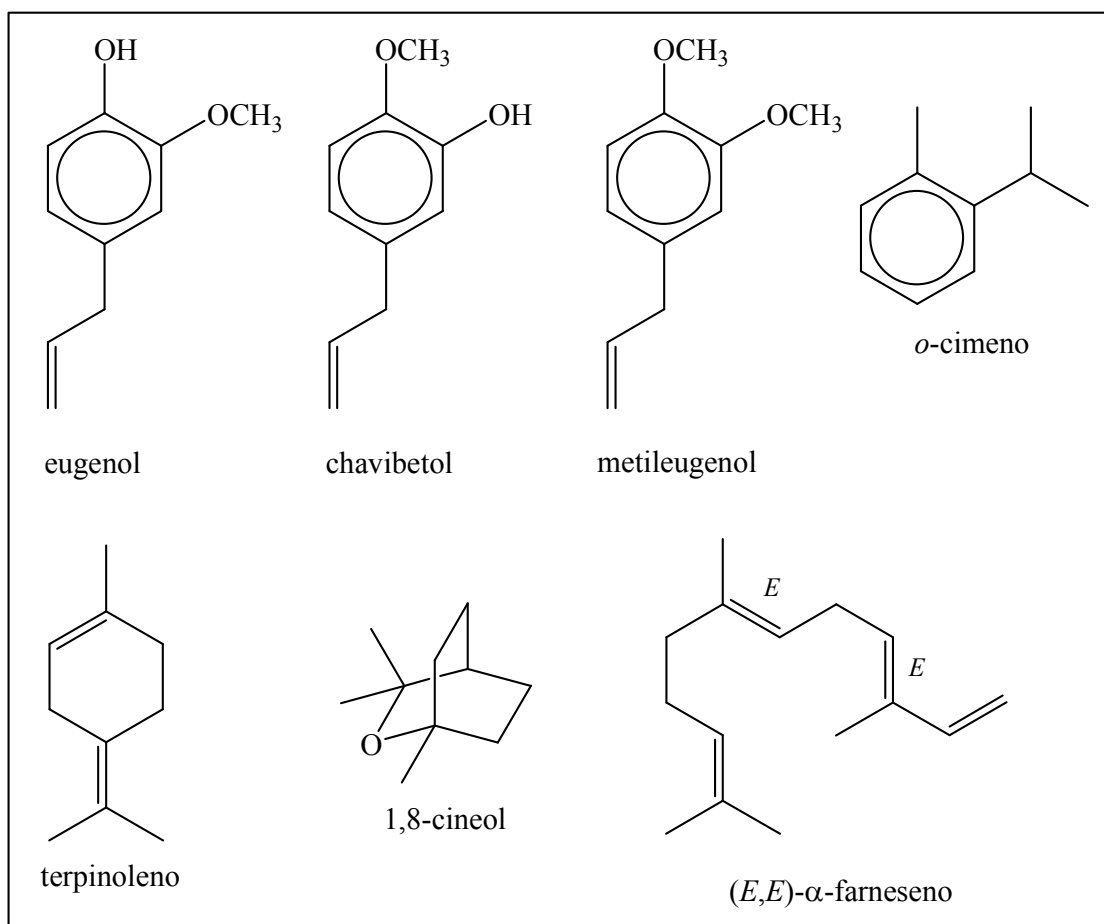


Figura 6. Principais constituintes dos OEs de *P. pseudocaryophyllus*.

Um estudo feito por Lima e colaboradores²¹ sugeriu a presença de eugenol (71,9%) no OE de folhas coletadas no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, e metileugenol (94,6%) no OE de folhas coletadas no Parque Municipal Nascentes de Paranapiacaba, Santo André, região metropolitana de São Paulo. Contudo, não foi citada a data de coleta do material vegetal e nem foi descrita a metodologia de identificação dos constituintes ou referência bibliográfica que confirme estes dados. Pela análise dos cromatogramas obtidos, observou-se que o espectro de massas do eugenol e do chavibetol são semelhantes, porém o índice de retenção (*I*) do primeiro (1356)²² é diferente do segundo (1374)²⁹. Esta diferença de 12 unidades de *I* corresponde a cerca de 30 segundos de diferença entre os tempos de retenção dos picos cromatográficos. Este tempo é suficiente para que ocorra uma boa separação dos dois compostos nas condições utilizadas, conforme mostrado na Figura 7, porém, devido à proximidade dos picos, a análise deve ser bastante cuidadosa para assegurar a correta identificação do constituinte.

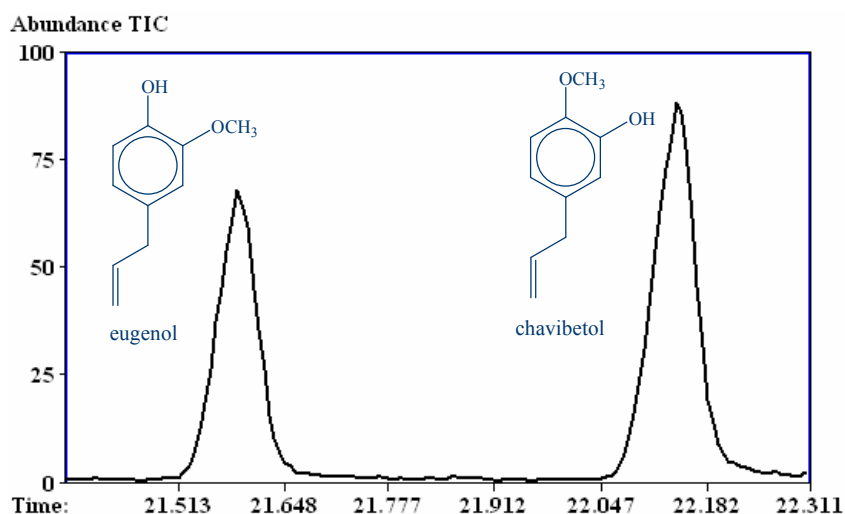


Figura 7. Parte do cromatograma GC-MS da amostra CAT-4, mostrando a separação dos picos correspondentes ao eugenol e chavibetol.

A semelhança entre os espectros de massa do eugenol e do chavibetol, e também a diferença entre seus índices de retenção, sugeriram que estes dois compostos são isômeros de posição dos substituintes no anel aromático. Como na análise da primeira amostra (CAT-1) não foi possível identificar corretamente o chavibetol, optou-se pelo isolamento deste constituinte a fim de submetê-lo a análise de espectroscopia no infravermelho (IV) e de ressonância magnética nuclear (RMN) e confirmar sua identidade.

Após a análise dos espectros, o constituinte foi identificado como chavibetol, e uma busca na literatura confirmou que seu I (1374)²⁹ é bastante próximo ao calculado, e assim esta informação se tornou suficiente para a correta identificação do chavibetol nas amostras posteriormente analisadas.

4.2. Isolamento de chavibetol de OE de *P. pseudocaryophyllus* através de CCDP

Nesta separação foram utilizados 120 mg da amostra CAT-1, cujas áreas totais integradas dos picos do cromatograma correspondentes ao chavibetol e ao metileugenol somam 88,4% da área total. Assim, esperava-se que a soma das massas obtidas fosse próxima da massa aplicada na cromatoplaça, porém foram obtidos apenas 64,2 mg.

As frações obtidas (Figura 4) foram analisadas por GC-MS para identificação. A fração F1 (52,3 mg) corresponde ao chavibetol e a fração F2 (11,9 mg) corresponde ao metileugenol.

Apesar dos constituintes isolados estarem com pureza satisfatória, praticamente metade da massa inicial foi perdida. Assim, a cromatografia contracorrente foi investigada como método preparativo e desenvolveu-se uma

metodologia de separação utilizando-se esta técnica.

4.3. Isolamento de chavibetol de OE de *P. pseudocaryophyllus* através de HSCCC

A cromatografia contracorrente é uma técnica amplamente utilizada na separação e isolamento de produtos naturais bioativos de extratos de plantas e óleos essenciais em escala semipreparativa e preparativa³⁰⁻³⁷. O método de isolamento em escala semipreparativa dos fenilpropanoides presentes no OE de *P. pseudocaryophyllus* foi desenvolvido a fim de permitir ensaios biológicos nos constituintes puros.

4.3.1. Escolha do sistema de solventes

No método desenvolvido foi utilizada a modalidade denominada cromatografia contracorrente de alta velocidade (*high speed countercurrent chromatography*, HSCCC). Em uma separação deste tipo, é desejável que as concentrações do constituinte a ser isolado em ambas as fases sejam iguais (ou próximas), ou seja, que seu valor de K_D seja o mais próximo possível da unidade, e também diferente dos valores de K_D dos demais constituintes presentes na mistura. A análise visual da placa de CCD permite apenas uma estimativa, por isto é necessária a utilização de um método instrumental (GC ou HPLC) para se calcular os valores de K_D com exatidão e precisão. Este valor é definido como³⁸:

$$K_D = \frac{C_{\text{solute na Fase Estacionária (FE)}}}{C_{\text{solute na Fase Móvel (FM)}}$$

Em uma separação em fase normal, a FE é mais polar que a FM, assim a fase aquosa (FA) é utilizada como FE e a fase orgânica (FO) é utilizada como FM. Assim:

$$K_D = \frac{C_{\text{FA}}}{C_{\text{FO}}}$$

Como C_{FA} e C_{FO} são proporcionais às massas de soluto injetadas (considerando-se os mesmos volumes de solução), o valor de K_D de cada composto é numericamente igual à razão entre as áreas totais integradas de seus picos dos cromatogramas da fase aquosa e da orgânica.

Os sistemas bifásicos de solventes testados (Tabela 2) contêm solventes comumente utilizados em laboratório, bem como curto tempo de separação de fases, levando-se em conta a polaridade dos constituintes a serem separados. Dentre todos os oito sistemas testados, foram calculados (por GC-MS) os valores de K_D para aqueles em que as concentrações dos fenilpropanoides nas duas fases eram aproximadamente iguais (estimativa visual por CCD). Dentre os sistemas testados por GC-MS, apenas o sistema 3 [hexano:*n*-BuOH:MeOH:água (1:1:1:1, v/v/v/v)] foi selecionado para otimização. Para este sistema, o valor de K_D do chavibetol foi igual a 1,48 e o do metileugenol igual a 0,73.

A fim de diminuir o valor de K_D do chavibetol, aproximando-o mais da unidade (pelo aumento de sua concentração na fase orgânica), a proporção de hexano foi aumentada, resultando no sistema hexano:*n*-BuOH:MeOH:água (3:1:1:1, v/v/v/v ou 12:4:4:4, v/v/v/v), resultando em K_D igual a 1,27 para

chavibetol e 0,63 para metileugenol. Finalmente, uma diminuição na proporção de água, para hexano:*n*-BuOH:MeOH:água (3:1:1:0.75, v/v/v/v ou 12:4:4:3, v/v/v/v), causou uma pequena diminuição em ambos os valores de K_D , que chegaram a 1,22 para chavibetol, 0,57 para metileugenol, e próximo de zero para os demais constituintes (terpenos pouco solúveis na fase aquosa, Tabela 4).

Tabela 4. Valores de K_D para diferentes proporções do sistema de solventes hexano:*n*-BuOH:MeOH:água (v/v/v/v).

Composto	K_D		
	1:1:1:1	12:4:4:4	12:4:4:3
chavibetol	1,48	1,27	1,22
metileugenol	0,73	0,63	0,57

4.3.2. Separação cromatográfica

Neste experimento foram utilizados 600 mg da amostra CAT-2, que contém 35,3% (w/w) de chavibetol e 11,3% (w/w) de metileugenol.

As frações coletadas na corrida de CCC foram agrupadas em quatro subfrações, de acordo com a semelhança dos fatores de retenção (R_f) de seus componentes (Tabela 5 e na Figura 8). Os terpenos, que apresentaram valor de K_D próximo de zero, eluíram nas primeiras frações. Além disto, foram obtidos 50 mg de metileugenol e 200 mg chavibetol. Estes compostos foram completamente separados na corrida (subfrações 3 e 4, respectivamente).

Tabela 5. Frações coletadas na corrida de HSCCC.

Fração	Subfração	Conteúdo
9-12	1	terpenos
13	2	terpenos e metileugenol
14-18	3	metileugenol
22-38	4	chavibetol

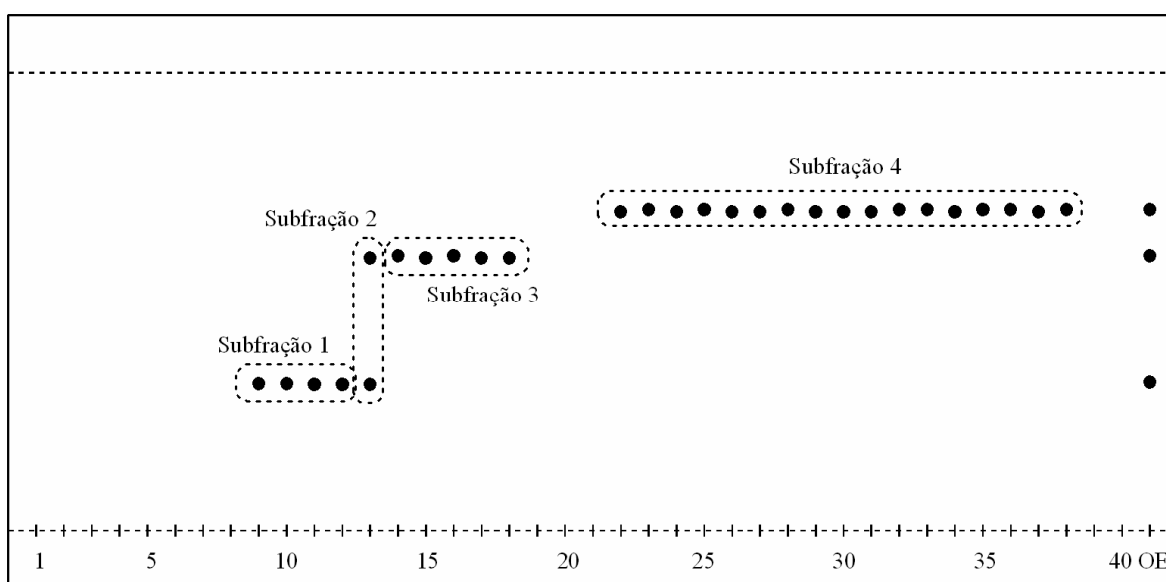


Figura 8. Cromatograma CCC das frações coletadas, destacando-se as subfrações resultantes, juntamente com o *spot* do OE.

Considerando-se a massa de OE utilizada na separação e as porcentagens em massa dos dois fenilpropanoides nele presentes, foram recuperadas 94,4% da massa de chavibetol e 73,7% da massa de metileugenol. As purezas dos compostos isolados, determinadas por HPLC-PAD, foram de 98 e 96%, respectivamente. Estes resultados mostram que o método desenvolvido é apropriado para a separação destes compostos.

As técnicas de CCC são conhecidas pela alta porcentagem de massa de amostra recuperada e por requerer menores volumes de solvente em relação às técnicas de partição sólido-líquido (CCDP, cromatografia em coluna clássica, cromatografia *flash*, etc.). O isolamento de chavibetol por HSCCC se mostrou mais vantajoso em relação à CCDP, pois além de se realizar a separação em uma escala maior (semipreparativa), obteve-se alta pureza e recuperação quase quantitativa da massa injetada, enquanto que com a utilização de CCDP perdeu-se aproximadamente 39% da massa de chavibetol.

4.4. Caracterização do chavibetol isolado do OE de *P. pseudocaryophyllus* através de espectroscopia

Ao se analisar o cromatograma GC-MS da primeira amostra de OE de *P. pseudocaryophyllus* injetada (CAT-1), observou-se que o espectro de massas do constituinte mais abundante (chavibetol) era semelhante ao do eugenol, porém seu *I* possuía cerca de 15 unidades a mais, sugerindo que estes dois compostos são isômeros de posição dos substituintes no anel aromático. Então, o chavibetol (até então não identificado) foi isolado e submetido a análises espectroscópicas a fim de ter sua identidade conhecida.

Os espectros de RMN de ^{13}C , DEPT 135 e DEPT 90 confirmaram a presença de 10 átomos de carbono na estrutura da molécula, sendo um carbono primário (CH_3) em δ 56,0; dois carbonos secundários (CH_2) em δ 115,5 e 39,6; quatro carbonos terciários (CH) em δ 137,6; 119,8; 114,8 e 110,6 e três carbonos quaternários (C_0) em δ 145,5; 144,9 e 133,4.

O espectro de RMN de ^1H confirmou a presença de 12 átomos de hidrogênio na molécula. Os singletos em δ 3,88 e 5,59 correspondem,

respectivamente, à metoxila e à hidroxila. Os sinais em δ 5,07; 5,95 e 3,30 correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos C^{C1} (insaturado terminal), C^{C2} (insaturado) e C^{C3} (saturado) da cadeia alílica, respectivamente. Os demais sinais correspondem aos hidrogênios ligados aos carbonos do anel.

O sinal em δ 6,68 (H^{A1}) é um duplo dubleto com constantes de acoplamento iguais a 8,2 e 2,0 Hz, ou seja, H^{A1} é *orto* ao hidrogênio em δ 6,80 (H^{A2}) e *meta* ao hidrogênio em δ 6,79 (H^{A3}). O sinal em $\delta \approx 6,8$ na verdade são dois dubletos sobrepostos, correspondentes a H^{A2} e H^{A3} . Como estes não acoplam um com o outro, estão em posição *para*. Assim, pela posição relativa de H^{A1} , H^{A2} e H^{A3} , conclui-se que o anel aromático é 1,3,4-trissubstituído.

O espectro COSY não forneceu nenhuma informação adicional a respeito da estrutura do composto, pois os sinais obtidos mostram apenas correlações entre os hidrogênios da cadeia alílica.

O espectro HSQC mostrou, dentre outras, correlações entre o carbono em 110,6 ppm e H^{A2} ou H^{A3} ($\delta \approx 6,8$), entre o carbono em δ 114,8 e H^{A2} ou H^{A3} e entre o carbono em δ 119,8 (C^{A1}) e H^{A1} (δ 6,68).

A análise do espectro HMBC forneceu as seguintes informações:

- A correlação entre H^{C3} (δ 3,30) e C^{A1} (δ 119,8) mostra que existe proximidade entre C^{A1} e a cadeia alílica. Assim, a cadeia alílica é *orto* a dois dos hidrogênios do anel, sendo um deles H^{A1} ; conseqüentemente a hidroxila é *orto* à metoxila. (Observação: Esta proximidade foi confirmada através de um experimento NOE: ao se irradiar H^{C3} , o núcleo do hidrogênio H^{A1} (δ 6,68) foi perturbado).

- Sabe-se que o composto em questão não é eugenol, assim, a hidroxila é *meta* em relação à cadeia alílica. Então, conclui-se que o composto analisado é 5-alil-2-metoxifenol (chavibetol).

Outras correlações mostradas pelo espectro HMBC permitiram a correta atribuição dos deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C do chavibetol (Figura 9), que estão de acordo com os previamente publicados por Momim *et al.*³⁹. Dentre elas, são destacadas as mais importantes:

- A correlação entre os hidrogênios da metoxila e o carbono do anel em δ 144,9; que mostra que a metoxila está ligada a este carbono e, conseqüentemente, o carbono do anel em δ 145,5 está ligado à hidroxila.
- A correlação entre o hidrogênio da hidroxila e o carbono em δ 114,8 ($\text{C}^{\text{A}3}$), que mostra que este carbono é *orto* ao carbono em δ 145,5. Portanto, $\text{C}^{\text{A}3}$ é *meta* a $\text{C}^{\text{A}1}$ (δ 119,8) e *para* a $\text{C}^{\text{A}2}$ (δ 110,6).

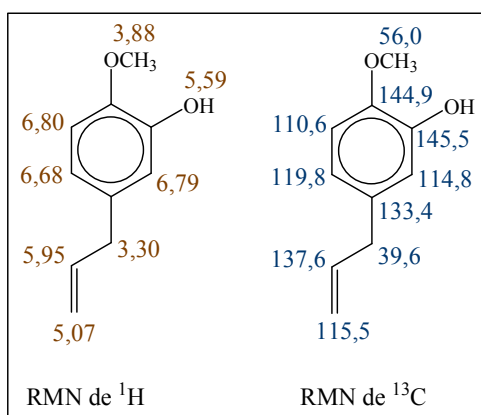


Figura 9. Atribuição dos deslocamentos químicos (δ) do chavibetol.

O espectro no infravermelho confirmou a presença da função fenol ($\nu_{\text{C-H arom}}$ em 3038 cm^{-1} , $\nu_{\text{C=C arom}}$ entre 1591 e 1440 cm^{-1} , ν_{OH} em 3518 cm^{-1} e $\nu_{\text{C-O}}$ em 1236 cm^{-1} .⁴⁰

4.5. Análise da composição química dos OEs de *H. coronarium* por GC-MS

A Tabela 6 relaciona as composições químicas dos OEs referentes às amostras HCf-1, HCr-1 e HCr-2. São mostrados apenas os picos cuja identificação foi possível.

Tabela 6. Composição química de OEs de *H. coronarium*.

Pico	Dados	Amostra			Identificação tentativa	
		HCf-1	HCr-1	HCr-2	Composto	I calculado
1	$t_{R(A)}$ (min)	-	5,088	5,376	α -thujeno	925 / 926
	% Área	-	0,4	0,3		
2	$t_{R(A)}$ (min)	5,568	5,276	5,564	α -pineno	933
	% Área	1,4	8,5	7,6		
3	$t_{R(A)}$ (min)	-	5,643	5,951	α -fencheno / canfeno*	947 / 948
	% Área	-	0,7	0,4		
4	$t_{R(A)}$ (min)	6,629	6,307	-	sabineno	973
	% Área	1,1	0,4	-		
5	$t_{R(A)}$ (min)	6,729	6,406	6,735	β -pineno	976 / 977
	% Área	11,6	22,9	17,8		
6	$t_{R(A)}$ (min)	7,086	6,753	7,092	mirceno	990 / 991
	% Área	0,2	0,6	0,5		
7	$t_{R(A)}$ (min)	-	7,18	7,538	α -felandreno	1005
	% Área	-	0,5	0,5		
8	$t_{R(A)}$ (min)	-	7,378	-	δ -3-careno	1011
	% Área	-	0,2	-		

9	$t_{R(A)}$ (min)	-	7,576	-	α -terpineno	1016
	% Área	-	0,2	-		
10	$t_{R(A)}$ (min)	8,217	7,834	8,213	<i>o</i> -cimeno	1024
	% Área	0,2	1,3	0,8		
11	$t_{R(A)}$ (min)	8,355	7,983	8,352	limoneno	1028
	% Área	2,0	4,5	3,2		
12	$t_{R(A)}$ (min)	8,445	8,082	8,461	1,8-cineol	1030 / 1031
	% Área	7,3	41,5	53,2		
13	$t_{R(A)}$ (min)	9,407	9,014	9,413	γ -terpineno	1057
	% Área	0,5	1,0	0,9		
14	$t_{R(A)}$ (min)	-	10,521	-	linalol	1100
	% Área	-	0,5	-		
15	$t_{R(A)}$ (min)	13,663	13,188	13,669	borneol	1165
	% Área	0,5	1,2	1,4		
16	$t_{R(A)}$ (min)	14,159	13,684	14,13	4-terpineol	1177
	% Área	2,3	5,1	3,2		
17	$t_{R(A)}$ (min)	14,714	14,259	14,72	α -terpineol	1190 / 1191
	% Área	1,4	10,5	10,3		
18	$t_{R(A)}$ (min)	24,664	-	-	β -cariofileno	1420
	% Área	43,1	-	-		
19	$t_{R(A)}$ (min)	26,092	-	-	α -humuleno	1454
	% Área	2,3	-	-		
20	$t_{R(A)}$ (min)	31,389	-	-	óxido de cariofileno	1583
	% Área	12,1	-	-		

* não foi possível a diferenciação por GC-MS

As amostras HCf-1 e HCr-1 são de OEs extraídos de *H. coronarium*, respectivamente, de folhas e rizomas frescos de coletados na mesma data (07/jun/2007) na cidade de Registro, SP, região de Mata Atlântica. A amostra HCr-2 é de OE extraído de rizomas frescos e coletados em novembro de 2006 na cidade de Guará, SP, região de Cerrado (Tabela 1).

Foram identificados, nas amostras HCf-1, HCr-1 e HCr-2, respectivamente, 14, 17 e 13 constituintes, correspondendo a 86,0; 100 e 100% da área total integrada dos picos do cromatograma.

Os constituintes mais abundantes no OE das folhas são β -cariofileno (43,1%), óxido de cariofileno (12,1%) e β -pineno (11,6%), e nos rizomas são 1,8-cineol (41,5 e 53,2%), β -pineno (22,9 e 17,8%) e α -terpineol (10,5 e 10,3%), respectivamente para Registro e Guará. As estruturas destes constituintes são mostradas na Figura 10.

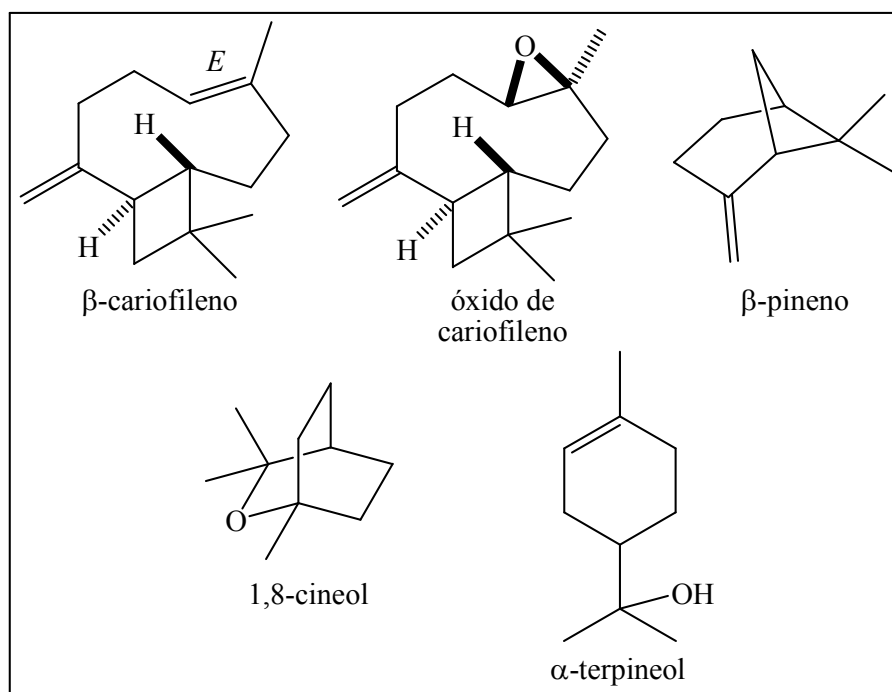


Figura 10. Principais constituintes dos OEs de *H. coronarium*.

Um estudo feito em Fiji⁴¹ revelou a presença de β -pineno (53,6%) como constituinte majoritário do OE extraído das folhas. Estudos feitos com rizomas em diferentes localidades revelaram, como constituintes majoritários, 1,8-cineol em Fiji (55,9%) e no sul da Índia⁴² (45,5%) e α -murolol (16,8%) na Ilha Maurício⁴³.

Aparentemente, esta espécie produz diferentes metabólitos voláteis em resposta às características do ecossistema onde ocorre (local de coleta em si e época do ano) e cujas porcentagens relativas variam de acordo com seu período fisiológico. Assim, com o objetivo de se analisar comparativamente a composição química dos OEs em função da variação sazonal, foram realizadas novas coletas no IB-Unicamp em diferentes estações do ano.

4.6. Análise da composição química dos *headspaces* de *H. coronarium* e comparação com a composição dos OEs por GC-MS

Neste experimento foram utilizados folhas e rizomas secos coletados no mês de junho de 2009 (Tabela 1). O objetivo foi a comparação quali e quantitativa das frações voláteis destes materiais vegetais através de duas diferentes técnicas de extração: a hidrodestilação, que tem resultado quantitativo em OE que pode ser bioensaiado ou ainda comercializado; e a microextração por fase sólida (SPME), realizada em escala analítica, que é uma ferramenta bastante útil para análises rápidas de compostos voláteis de matrizes vegetais⁴⁴.

As Tabelas 7 e 8 relacionam as composições químicas das frações voláteis das amostras HCf-7 e HCr-7, respectivamente, sendo a primeira coluna de cada tabela correspondente aos OEs e as demais colunas correspondentes aos *headspaces* extraídos com as fibras PDMS 100 µm, Carboxen/PDMS 75 µm e PDMS/DVB 65 µm. São mostrados apenas os picos cuja identificação foi possível.

Tabela 7. Composição química da fração volátil de folhas de *H. coronarium*.

Pico	Dados	Folhas de <i>H. coronarium</i>				Identificação tentativa	
		OE	PDMS	CAR/PDMS	PDMS/DVB	Composto	<i>I</i> calculado
1	t _{R(A)} (min)	-	-	4,806	4,816	tricicleno	920
	% Área	-	-	0,7	1,1		
2	t _{R(A)} (min)	4,969	4,974	4,974	4,984	α -thujeno	926 / 927
	% Área	0,3	6,0	5,2	8,2		
3	t _{R(A)} (min)	5,145	-	5,341	5,341	α -pineno	933 / 941
	% Área	11,8	-	0,1	0,3		
4	t _{R(A)} (min)	6,151	5,965	5,966	5,976	sabineno	966 / 973
	% Área	2,7	2,3	5,7	4,4		
5	t _{R(A)} (min)	6,259	6,065	6,085	6,105	β -pineno	970 / 971 / 978
	% Área	25,4	17,2	13,5	20,6		
6	t _{R(A)} (min)	6,611	6,412	6,412	6,422	mirceno	984 / 992
	% Área	0,2	0,2	0,9	0,9		
7	t _{R(A)} (min)	7,421	-	7,215	7,215	α -terpineno	1011 / 1017
	% Área	0,3	-	0,2	0,4		
8	t _{R(A)} (min)	-	-	7,473	7,463	<i>o</i> -cimeno	1018 / 1019
	% Área	-	-	0,4	0,4		
9	t _{R(A)} (min)	7,806	7,582	7,602	7,602	limoneno	1022 / 1028
	% Área	2,1	1,3	3,6	2,9		
10	t _{R(A)} (min)	7,914	7,691	7,701	7,721	1,8-cineol	1025 / 1026 / 1031
	% Área	1,7	8,7	6,0	11,8		
11	t _{R(A)} (min)	-	-	8,227	8,236	(Z)- β -ocimeno	1040
	% Área	-	-	0,2	0,3		
12	t _{R(A)} (min)	-	-	8,623	8,623	(E)- β -ocimeno	1052
	% Área	-	-	0,3	0,9		
13	t _{R(A)} (min)	8,84	8,96	8,95	8,95	γ -terpineno	1058 / 1061
	% Área	0,6	0,2	0,7	0,7		
14	t _{R(A)} (min)	-	-	9,179	9,179	<i>cis</i> -óxido de linalol	1068
	% Área	-	-	0,2	0,3		
15	t _{R(A)} (min)	-	-	-	9,724	isoterpinoleno	1083
	% Área	-	-	-	0,2		
16	t _{R(A)} (min)	-	-	9,813	9,773	<i>trans</i> -óxido de linalol	1085 / 1086
	% Área	-	-	0,6	0,5		
17	t _{R(A)} (min)	9,913	-	10,13	10,14	terpinoleno	1089 / 1095
	% Área	0,3	-	0,5	0,5		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

18	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	10,864	10,874	<i>trans</i> -thujona	1114
	% Área	-	-	0,3	0,2		
19	$t_{R(A)}$ (min)	11,393	11,231	11,231	11,231	α -canfonelal	1122 / 1126
	% Área	0,4	1,0	2,6	1,8		
20	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	11,548	11,539	<i>cis</i> -óxido de limoneno	1130
	% Área	-	-	0,1	0,1		
21	$t_{R(A)}$ (min)	11,899	11,746	11,747	11,737	<i>trans</i> -pinocarveol	1135 / 1139
	% Área	0,6	0,4	1,1	1,1		
22	$t_{R(A)}$ (min)	12,885	12,738	12,738	12,738	pinocarvona	1159 / 1163
	% Área	0,7	0,8	1,5	1,6		
23	$t_{R(A)}$ (min)	-	12,867	12,867	12,867	borneol	1162
	% Área	-	0,2	0,4	0,9		
24	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	12,937	12,937	δ -terpineol	1164
	% Área	-	-	0,5	0,4		
25	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	13,244	13,234	isopinocanfona	1171 / 1172*
	% Área	-	-	0,2	0,2		
26	$t_{R(A)}$ (min)	13,486	13,353	13,373	13,373	4-terpineol	1174 / 1175 / 1177
	% Área	1,5	1,1	4,1	3,2		
27	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	13,561	13,561	mirtanal	1179**
	% Área	-	-	0,4	0,2		
28	$t_{R(A)}$ (min)	14,061	13,928	13,988	13,968	α -terpineol	1188 / 1189 / 1190 / 1191
	% Área	1,0	1,7	7,8	5,8		
29	$t_{R(A)}$ (min)	14,29	14,166	14,186	14,186	mirtanal	1194 / 1195 / 1197
	% Área	1,4	1,1	2,8	2,3		
30	$t_{R(A)}$ (min)	-	20,294	20,294	20,294	δ -elemeno	1336
	% Área	-	0,4	0,1	0,1		
31	$t_{R(A)}$ (min)	-	20,829	20,85	20,84	acetato de α -terpinila	1348 / 1349
	% Área	-	0,3	0,2	0,2		
32	$t_{R(A)}$ (min)	23,854	23,824	23,864	23,834	β -cariofileno	1419
	% Área	20,9	22,7	16,3	11,7		
33	$t_{R(A)}$ (min)	-	24,181	24,191	24,191	α -(<i>E</i>)-ionona	1427
	% Área	-	0,5	0,5	0,4		
34	$t_{R(A)}$ (min)	25,252	25,212	25,223	25,213	α -humuleno	1452 / 1453
	% Área	1,3	1,5	1,1	0,9		
35	$t_{R(A)}$ (min)	25,462	25,421	25,431	25,421	(<i>E</i>)- β -farneseno	1457 / 1458
	% Área	0,5	2,8	0,9	1,5		
36	$t_{R(A)}$ (min)	-	26,63	26,641	26,631	β -(<i>E</i>)-ionona	1486
	% Área	-	0,5	0,3	0,2		
37	$t_{R(A)}$ (min)	30,568	30,537	30,557	30,528	óxido de cariofileno	1582 / 1583
	% Área	14,3	11,5	6,4	2,4		

38	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	31,559	-	epóxido de humuleno II	1608
	% Área	-	-	0,2	-		

* I de acordo com Macchioni *et al*⁴⁵

** I de acordo com Papandreou *et al*⁴⁶

Na amostra de folhas foram identificados 20, 22, 37 e 37 constituintes, totalizando 88,1; 82,4; 86,5 e 89,3% da área total integrada dos picos do cromatograma, respectivamente na ordem apresentada na Tabela 7.

Dentre os constituintes identificados, predominaram o β -pineno (25,4; 17,2; 13,5 e 20,6%) e o β -cariofileno (20,9; 22,7; 16,3 e 11,7%), além do óxido de cariofileno (14,3% no OE e 11,5% no *headspace* extraído com a fibra de PDMS), α -terpineol (7,8% no *headspace* extraído com a fibra CAR/PDMS) e 1,8-cineol (11,8% no *headspace* extraído com a fibra de PDMS/DVB).

Observou-se que há diferenças importantes entre as porcentagens relativas dos principais constituintes, porém a técnica de HS-SPME se mostrou uma ótima ferramenta de análise dos principais compostos voláteis de folhas de *H. coronarium*, já que estas diferenças podem ser devidas à própria heterogeneidade da amostra e à pequena quantidade utilizada (15 mg) em relação à hidrodestilação (100 g). Além do fato de requerer pouca quantidade de amostra, esta técnica também é vantajosa pelo fato de dispensar a etapa de hidrodestilação, bastante demorada (4 horas), e em poucos minutos os analitos são transferidos do *headspace* diretamente para a fibra de extração, podendo ser analisados por GC-MS.

Também foi possível observar que vários compostos minoritários foram observados nos *headspaces* mas não no OE. Isto indica que a técnica de HS-SPME pode complementar a hidrodestilação na análise de metabólitos secundários voláteis deste material vegetal, e também evidenciou que na

hidrodestilação alguns compostos podem ser perdidos e/ou formados (oxidação, degradação térmica, hidrólise, etc.). De um modo geral, a utilização da fibra simples de PDMS resultou em um cromatograma semelhante ao do OE, porém as fibras mistas (CAR/PDMS e PDMS/DVB) foram mais eficientes na extração dos compostos, pois permitiram identificar vários compostos que não estavam presentes nos outros cromatogramas. Isto se deve à sua natureza bipolar, que lhes confere a capacidade de extrair compostos de baixa a alta polaridade, resultando em um maior número de compostos extraídos.

Tabela 8. Composição química da fração volátil de rizomas de *H. coronarium*.

Pico	Dados	Rizomas de <i>H. coronarium</i>				Identificação tentativa	
		OE	PDMS	CAR/PDMS	PDMS/DVB	Composto	I calculado
1	t _{R(A)} (min)	-	4,818	4,797	4,813	tricicleno	919 / 920
	% Área	-	0,1	0,6	0,5		
2	t _{R(A)} (min)	4,952	4,986	4,965	4,982	α -thujeno	926 / 927
	% Área	0,4	3,8	3,1	3,5		
3	t _{R(A)} (min)	5,135	5,353	5,332	5,349	α -pineno	933 / 941 / 942
	% Área	5,3	0,3	0,2	0,4		
4	t _{R(A)} (min)	5,499	-	-	-	α -fencheno / canfeno*	947
	% Área	0,5	-	-	-		
5	t _{R(A)} (min)	6,141	5,968	5,967	5,984	sabineno	966 / 967 / 973
	% Área	0,8	0,5	1,5	0,7		
6	t _{R(A)} (min)	6,256	6,077	6,076	6,112	β -pineno	970 / 972 / 977
	% Área	20,9	15,3	10,4	13,6		
7	t _{R(A)} (min)	6,594	6,424	6,413	6,43	mirceno	984 / 991
	% Área	0,8	0,6	1,7	1,1		
8	t _{R(A)} (min)	7,019	7,019	7,008	7,015	α -felandreno	1005 / 1006
	% Área	0,7	0,2	0,5	0,2		
9	t _{R(A)} (min)	7,208	7,217	7,216	7,233	δ -3-careno	1011 / 1012
	% Área	0,4	0,1	0,6	0,4		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

10	$t_{R(A)}$ (min)	7,404	-	-	-	α -terpineno	1017
	% Área	0,3	-	-	-		
11	$t_{R(A)}$ (min)	7,661	7,465	7,484	7,511	<i>o</i> -cimenos	1018 / 1019 / 1020 / 1024
	% Área	1,2	0,7	2,2	1,4		
12	$t_{R(A)}$ (min)	7,803	7,604	7,653	7,63	limoneno	1026 / 1027 / 1028
	% Área	3,9	2,1	5,9	1,4		
13	$t_{R(A)}$ (min)	7,911	7,743	7,772	7,838	1,8-cineol	1026 / 1029 / 1030 / 1031
	% Área	22,1	32,0	25,3	38,3		
14	$t_{R(A)}$ (min)	-	8,626	8,624	8,631	<i>(E)</i> - β -ocimenos	1052
	% Área	-	0,7	1,7	1,3		
15	$t_{R(A)}$ (min)	8,816	8,973	8,952	8,958	γ -terpineno	1057 / 1061
	% Área	1,4	0,3	1,0	0,9		
16	$t_{R(A)}$ (min)	9,896	9,736	9,725	9,732	terpinoleno	1083 / 1084 / 1088
	% Área	0,4	0,2	0,6	0,5		
17	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	-	10,743	endo-fenchol	1111
	% Área	-	-	-	0,1		
18	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	11,242	11,239	α -canfonelal	1123
	% Área	-	-	0,4	0,2		
19	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	-	11,755	trans-pinocarveol	1135
	% Área	-	-	-	0,3		
20	$t_{R(A)}$ (min)	12,868	12,761	12,749	12,756	pinocarvona	1159 / 1160 / 1162
	% Área	0,2	0,2	0,4	0,4		
21	$t_{R(A)}$ (min)	12,976	12,87	12,868	12,875	borneol	1162 / 1163 / 1165
	% Área	1,6	0,5	0,7	1,4		
22	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	12,948	12,935	δ -terpineol	1164
	% Área	-	-	0,8	0,6		
23	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	13,245	13,232	isopinocanfona	1171 / 1172**
	% Área	-	-	0,1	0,2		
24	$t_{R(A)}$ (min)	13,463	13,365	13,414	13,411	4-terpineol	1175 / 1176 / 1177
	% Área	3,1	1,8	7,7	5,2		
25	$t_{R(A)}$ (min)	14,044	13,95	14,078	14,055	α -terpineol	1189 / 1191 / 1192
	% Área	7,9	4,3	18,8	12,6		
26	$t_{R(A)}$ (min)	14,287	14,208	14,227	14,224	mirtenal	1195 / 1196 / 1197
	% Área	0,3	0,2	0,9	0,6		
27	$t_{R(A)}$ (min)	-	20,287	20,295	20,292	δ -elemeno	1336
	% Área	-	0,3	0,1	0,1		
28	$t_{R(A)}$ (min)	20,872	20,832	20,841	20,838	acetato de α - terpinila	1347 / 1349
	% Área	0,3	1,0	0,8	0,6		

29	$t_{R(A)}$ (min)	23,81	23,787	23,796	23,793	β -cariofileno	1418
	% Área	2,0	3,6	2,2	1,4		
30	$t_{R(A)}$ (min)	25,235	25,215	25,224	25,201	α -humuleno	1451 / 1452
	% Área	0,2	0,3	0,2	0,1		
31	$t_{R(A)}$ (min)	-	26,802	-	-	δ -selineno	1490
	% Área	-	0,2	-	-		
32	$t_{R(A)}$ (min)	30,537	30,52	30,519	30,516	óxido de cariofileno	1582
	% Área	0,8	1,2	0,8	0,3		

* não foi possível a diferenciação por GC-MS

** *I* de acordo com Macchioni *et al*⁴⁵

Na amostra de rizomas foram identificados 23, 25, 27 e 29 constituintes, totalizando 75,6; 70,5; 89,4 e 88,1% da área total integrada dos picos do cromatograma, respectivamente na ordem apresentada na Tabela 8.

Dentre os constituintes identificados, predominaram o 1,8-cineol (22,1; 32,0; 25,3 e 38,3%), o β -pineno (20,9; 15,3; 10,4 e 13,6%), o α -terpineol (7,9; 4,3; 18,8 e 12,6%) e um composto não identificado (*I* superior a 2000, 18,6% no OE e 15,4% no *headspace* extraído com a fibra de PDMS).

Assim como ocorreu com as folhas, observaram-se diferenças razoáveis entre as porcentagens relativas dos principais constituintes, porém estas diferenças não atrapalham a análise qualitativa, já que os componentes mais abundantes são os mesmos em todas as análises. Além disso, as fibras bipolares se mostraram mais eficientes que a fibra simples e a hidrodestilação em relação ao número de compostos identificados.

Estes resultados indicam que a técnica de HS-SPME é uma ferramenta muito útil no estudo fitoquímico da fração volátil de plantas aromáticas, por oferecer uma correlação qualitativa com os componentes mais abundantes dos respectivos OEs extraídos por hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor, além de permitir a detecção de compostos não aparentes no OE. Esta é uma técnica complementar à clássica hidrodestilação, pois enquanto a

primeira permite a detecção precisa de todos os metabólitos secundários voláteis produzidos por uma determinada planta, a segunda técnica é mais indicada no estudo do produto final da hidrodestilação, que pode ser comercializado ou bioensaiado. Porém, deve-se tomar cuidado com a correlação quantitativa, já que muitas vezes os teores de um mesmo composto não são próximos devido à própria variação qualitativa e aos métodos de extração em si, que possuem princípios e finalidades diferentes.

4.7. Análise da variação da composição química dos OEs de *H. coronarium* em função da variação sazonal

As amostras utilizadas para avaliação sazonal foram coletadas no IB-Unicamp nos meses de janeiro, abril, julho e outubro de 2008, às 09:00 (Tabela 1). Foram avaliados os OEs de folhas (Tabela 9) e rizomas (Tabela 10) frescos.

Tabela 9. Estudo sazonal da composição química dos OEs de folhas de *H. coronarium*.

Pico	Dados	Folhas de <i>H. coronarium</i>				Identificação tentativa	
		jan/08	abr/08	jul/08	out/08	Composto	I calculado
1	t _{R(A)} (min)	-	5,286	-	5,078	α-pineno	932
	% Área	-	2,0	-	7,2		
2	t _{R(A)} (min)	-	6,313	-	6,077	sabineno	972
	% Área	-	0,7	-	2,6		
3	t _{R(A)} (min)	-	6,421	6,294	6,199	β-pineno	976 / 977
	% Área	-	7,0	0,3	17,2		
4	t _{R(A)} (min)	-	-	-	6,529	mirceno	990
	% Área	-	-	-	0,7		

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5	$t_{R(A)}$ (min)	-	7,989	7,859	7,717	limoneno	1027
	% Área	-	0,7	0,3	2,1		
6	$t_{R(A)}$ (min)	-	8,104	7,96	7,819	1,8-cineol	1030
	% Área	-	1,1	0,5	1,5		
7	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	-	8,008	<i>cis</i> -ocimeno	1035
	% Área	-	-	-	0,5		
8	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	-	8,366	<i>trans</i> -ocimeno	1046
	% Área	-	-	-	0,7		
9	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	-	8,744	γ -terpineno	1057
	% Área	-	-	-	0,8		
10	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	9,976	-	terpinoleno	1088
	% Área	-	-	0,4	-		
11	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	11,959	-	<i>trans</i> -pinocarveol	1138
	% Área	-	-	0,4	-		
12	$t_{R(A)}$ (min)	13,772	13,746	13,537	13,388	4-terpineol	1177
	% Área	1,4	2,4	1,0	1,2		
13	$t_{R(A)}$ (min)	14,347	14,314	14,111	13,968	α -terpineol	1191
	% Área	1,3	1,3	1,2	0,9		
14	$t_{R(A)}$ (min)	-	14,551	14,353	-	mirtenol	1196 / 1197
	% Área	-	0,7	1,4	-		
15	$t_{R(A)}$ (min)	20,721	20,686	20,437	20,294	δ -elemeno	1337 / 1338
	% Área	1,1	0,6	0,3	0,8		
16	$t_{R(A)}$ (min)	21,593	-	-	-	eugenol	1358
	% Área	6,2	-	-	-		
17	$t_{R(A)}$ (min)	24,304	24,22	23,984	23,865	β -cariofileno	1420 / 1421
	% Área	77,0	63,9	45,7	51,8		
18	$t_{R(A)}$ (min)	25,669	25,612	25,36	25,222	α -humuleno	1453
	% Área	6,2	4,2	3,3	3,8		
19	$t_{R(A)}$ (min)	25,845	25,802	25,549	25,424	<i>(E)</i> - β -farneseno	1457 / 1458
	% Área	3,3	2,2	2,2	1,9		
20	$t_{R(A)}$ (min)	30,975	30,931	30,675	30,528	óxido de cariofileno	1583 / 1584
	% Área	3,5	7,4	15,2	3,5		

Nas amostras de OEs de folhas, foram identificados 8, 13, 13 e 16 constituintes, totalizando 100; 94,1; 72,2 e 97,2% da área total integrada dos picos do cromatograma, respectivamente para os materiais vegetais coletados em janeiro, abril, julho e outubro de 2008.

Em todas as amostras, o constituinte mais abundante foi o β -cariofileno (77,0; 63,9; 45,7 e 51,8%, respectivamente), porém, cada uma delas apresentou diferentes constituintes secundários no estudo sazonal: eugenol (6,2%) e α -humuleno (6,2%) em janeiro, óxido de cariofileno (7,4%) e β -pineno (7,0%) em abril, óxido de cariofileno (15,2%) e α -humuleno (3,3%) em julho e β - (17,2%) e α -pineno (7,2%) em outubro.

A amostra HCf-1, coletada em Registro em junho de 2007, e a amostra coletada em Campinas em julho de 2008 (épocas do ano próximas), apresentaram teores semelhantes de β -cariofileno (43,1 e 45,7%) e óxido de cariofileno (12,1 e 15,2%), porém teores diferentes de β -pineno (11,6 e 0,3%).

Estes resultados indicam que, dentre as amostras de OEs de folhas testadas, a variação da composição química foi mais pronunciada devido à variação sazonal do que devido à variação do local onde a planta se desenvolve. Observou-se maior variação entre as amostras coletadas no mesmo local (Campinas) e em diferentes estações do ano do que entre as amostras coletadas na mesma época do ano (transição outono-inverno) e em diferentes locais.

Tabela 10. Estudo sazonal da composição química dos OEs de rizomas de *H. coronarium*.

Pico	Dados	Rizomas de <i>H. coronarium</i>				Identificação tentativa	
		jan/08	abr/08	jul/08	out/08	Composto	I calculado
1	t _{R(A)} (min)	5,13	5,114	5,021	4,907	α -thujeno	925 / 926
	% Área	0,2	0,4	0,2	0,5		
2	t _{R(A)} (min)	5,312	5,297	5,197	5,083	α -pineno	932 / 933
	% Área	7,0	8,2	4,6	9,2		
3	t _{R(A)} (min)	5,691	5,675	5,574	5,447	α -fencheno / canfeno*	947
	% Área	0,4	0,5	0,3	0,8		
4	t _{R(A)} (min)	6,34	6,324	6,208	6,082	sabineno	972 / 973
	% Área	1,1	1,4	0,4	1,7		
5	t _{R(A)} (min)	6,455	6,432	6,316	6,21	β -pineno	977
	% Área	25,4	28,0	16,0	32,3		
6	t _{R(A)} (min)	6,806	6,783	6,667	6,534	mirceno	990
	% Área	0,8	1,1	0,6	1,6		
7	t _{R(A)} (min)	7,245	7,222	7,099	6,959	α -felandreno	1005
	% Área	1,9	1,7	0,6	1,9		
8	t _{R(A)} (min)	7,428	7,412	-	7,142	δ -3-careno	1010 / 1011
	% Área	0,3	0,3	-	0,5		
9	t _{R(A)} (min)	7,637	7,608	7,483	7,337	α -terpineno	1016
	% Área	0,3	0,6	0,3	0,6		
10	t _{R(A)} (min)	7,894	7,871	7,739	7,594	<i>o</i> -cimeno	1023 / 1024
	% Área	1,0	0,5	0,5	0,6		
11	t _{R(A)} (min)	8,036	8,006	7,874	7,736	limoneno	1028
	% Área	4,6	4,6	2,9	4,9		
12	t _{R(A)} (min)	8,138	8,108	7,975	7,857	1,8-cineol	1030 / 1031
	% Área	31,4	22,6	29,8	30,2		
13	t _{R(A)} (min)	9,077	9,054	8,899	8,748	γ -terpineno	1057
	% Área	1,4	1,8	1,4	2,0		
14	t _{R(A)} (min)	10,166	10,142	9,985	9,822	terpinoleno	1088
	% Área	0,4	0,5	0,5	0,6		
15	t _{R(A)} (min)	10,618	10,584	10,424	10,26	linalol	1100 / 1101
	% Área	0,3	0,4	1,5	0,9		
16	t _{R(A)} (min)	13,282	13,29	13,061	-	borneol + <i>p</i> -menta- 1,5-dien-8-ol	1165 / 1167
	% Área	1,8	1,7	3,2	-		

17	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	-	12,893	borneol	1165
	% Área	-	-	-	1,2		
18	$t_{R(A)}$ (min)	13,782	13,743	13,56	13,379	4-terpineol	1176 / 1177
	% Área	4,1	3,2	7,5	2,6		
19	$t_{R(A)}$ (min)	14,356	14,324	14,14	13,96	α -terpineol	1191
	% Área	10,0	9,8	17,4	5,3		
20	$t_{R(A)}$ (min)	-	21,217	20,978	-	acetato de α -terpinila	1350
	% Área	-	0,3	0,6	-		
21	$t_{R(A)}$ (min)	24,219	24,19	23,932	23,748	β -cariofileno	1418 / 1419
	% Área	1,8	1,9	3,9	1,2		
22	$t_{R(A)}$ (min)	-	-	25,355	-	α -humuleno	1453
	% Área	-	-	0,4	-		
23	$t_{R(A)}$ (min)	-	30,934	30,656	-	óxido de cariofileno	1583
	% Área	-	0,2	0,6	-		

* não foi possível a diferenciação por GC-MS

Nas amostras de OE de rizomas, foram identificados 19, 22, 22 e 19 constituintes, totalizando 94,1; 89,5; 93,1 e 98,4% da área total integrada dos picos do cromatograma, respectivamente para os materiais vegetais coletados em janeiro, abril, julho e outubro de 2008.

Em todas as amostras, os constituintes mais abundantes foram o 1,8-cineol (31,4; 22,6; 29,8 e 30,2%), β -pineno (25,4; 28,0; 16,0 e 32,3%) α -terpineol (10,0; 9,8 e 17,4%), com exceção da amostra coletada em outubro, cujo terceiro constituinte mais abundante foi o α -pineno (9,2%). Observou-se que a cada estação do ano houve uma inversão nas porcentagens relativas dos dois constituintes mais abundantes: no início do verão (janeiro) e do inverno (julho) os teores de 1,8-cineol foram maiores que os de β -pineno, porém no início do outono (abril) e primavera (outubro) ocorreu o inverso. Além disso, observou-se que não houve variação significativa nos teores de α -terpineol no primeiro semestre (janeiro e abril), mas no segundo semestre (julho e outubro) houve variações significativas deste composto.

As amostras HCr-1, coletada em Registro em junho de 2007, e a amostra coletada em Campinas em julho de 2008 (épocas do ano próximas), apresentaram variação nos teores dos constituintes principais 1,8-cineol (41,5 e 29,8%), β -pineno (22,9 e 16,0%) e α -terpineol (10,5 e 17,4%). Além disso, também houve diferença significativa entre os teores de 1,8-cineol (53,2 e 30,2%), β -pineno (17,8 e 32,3) e α -terpineol (10,3 e 5,3%) da amostra HCr-2, coletada em Guará em novembro de 2006, e da amostra coletada em Campinas em outubro de 2008 (épocas do ano próximas).

Estes resultados indicam que, além da sazonalidade, o local onde a planta se desenvolve também interferiu na composição química dos OEs de rizomas testados. Assim como ocorreu com o OE das folhas, a composição do OE dos rizomas foi fortemente influenciada pela sazonalidade, porém as folhas foram menos influenciadas pelo local de coleta do que os rizomas.

4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana

Na primeira etapa dos ensaios antimicrobianos utilizou-se a técnica de difusão com discos, que avalia, através da medida do halo de inibição, o potencial inibitório, bactericida ou fungicida de um determinado óleo essencial, extrato, fração ou substância frente a uma cepa de microorganismos. Esta medida é um parâmetro muito importante que guia a etapa seguinte, que utiliza a técnica de microdiluição em caldo. Foram determinados os diâmetros de halos de inibição das amostras HCr-1, HCr-2 e CAT-2 frente a leveduras e bactérias. Os resultados obtidos estão relacionados na Tabela 11.

Tabela 11. Medidas dos diâmetros dos halos de inibição (mm) das amostras HCr-1, HCr-2 e CAT-2 frente a leveduras e bactérias.

Cepas	HCr-1	HCr-2	CAT-2
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	35	18	35
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	35	≥20	35
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	17	13	38
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	>35	13	>35
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20	15	21
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	R	R	R
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	R	R	R
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 110699	R	não determinado	R
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	R	não determinado	R

R: resistência

A medida do halo de inibição é um teste qualitativo que permite verificar a atividade antimicrobiana de uma amostra desconhecida. Ao se observar determinada inibição, a amostra é avaliada através da técnica de microdiluição em caldo a fim de se quantificar a inibição, ou seja, determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida ou fungicida mínima desta amostra frente à cepa avaliada. As amostras que apresentaram resistência, ou seja, aquelas que não apresentaram inibição, não foram selecionadas para esta segunda etapa. Já os fungos filamentosos foram diretamente avaliados através da microdiluição em caldo.

Pela análise da Tabela 11 observou-se o potencial das amostras HCr-1, HCr-2 e CAT-2 contra leveduras e a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, sendo que as amostras HCr-1 e CAT-2 apresentaram resultados semelhantes, com exceção da levedura *Candida krusei* que foi melhor inibida pela amostra

CAT-2. A amostra HCr-2 apresentou resultados inferiores em relação à amostra HCr-1. Isto pode ser devido à ligeira diferença de composição química entre estes óleos (Tabela 6): como a amostra HCr-1 apresenta um menor teor de 1,8-cineol e um maior teor de β -pineno, provavelmente a atividade antimicrobiana do OE de rizomas de *H. coronarium* é devida à presença deste composto. Nenhuma das amostras inibiu as demais bactérias.

Foram determinadas a CIM e a concentração fungicida mínima (CFM) das amostras HCr-1 e CAT-2 e do chavibetol frente às leveduras e da amostra CAT-2 frente aos fungos filamentosos. As Tabelas 12 e 13 relacionam os resultados obtidos.

Tabela 12. Valores de CIM 100% e CFM ($\mu\text{g/mL}$) das amostras HCr-1 e CAT-2 frente a leveduras.

Cepas	HCr-1		CAT-2	
	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	9000	>9000	2250	4500
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	9000	>9000	2250	4500
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	>9000	>9000	2250	4500
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	>9000	>9000	1125	4500

Intervalos de concentração realizados na microdiluição:

9000/4500/2250/1125/562,5/281,25/140,6/70,3/35,15/17,58

Tabela 13. Valores de CIM e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-2 frente a fungos filamentosos.

Cepas	CIM 80%	CIM 100%	CFM
<i>A. flavus</i> - P40	2025	6300	8100
<i>A. fumigatus</i> - Lif21	2025	5400	7200
<i>F. oxysporum</i> - 40c	505,5	3600	4500
<i>F. solani</i> - Lif08	3600	5400	5400
<i>M. canis</i> - Lif673	505,8	2025	não determinado
<i>M. gypseum</i> - Lif463	505,5	2025	não determinado
<i>T. rubrum</i> - Lif45	<505,5	2025	não determinado
<i>T. mentagrophytes</i> - Lif-10	<505,5	2025	não determinado

Intervalo de concentração realizado na microdiluição:
8100/7200/6300/5400/4500/4050/3600/2025/1013,5/505,8

Através da Tabela 12 observou-se que o OE de rizomas de *H. coronarium* não apresenta potencial como novo agente contra leveduras, pois os valores de CIM e CFM encontrados são iguais ou superiores a 9000 $\mu\text{g/mL}$, que é a maior concentração do intervalo realizado. Já o OE de folhas de *P. pseudocaryophyllus* apresentou resultados ligeiramente melhores, porém não satisfatórios.

Pela análise da Tabela 13 observou-se que o OE de folhas de *P. pseudocaryophyllus* (CAT-2) apresentou menores valores de CIM frente aos fungos filamentosos *Fusarium oxysporum*, *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*, e o menor valor de CFM frente a *Microsporium spp.* e *Trichophyton spp.*, dentre as cepas avaliadas. Esses valores estão entre as menores concentrações do intervalo realizado.

Observou-se também que existe uma diferença grande entre os valores de CIM 80% e CIM 100%, o que caracteriza uma droga fungistática.

Frente a estes resultados, uma nova amostra de OE de folhas de *P. pseudocaryophyllus* (CAT-7) foi novamente avaliada frente às cepas de leveduras, de *Microsporum spp.* e *Trichophyton spp.* Também foram avaliadas as atividades do chavibetol (isolado do OE), metileugenol (sintético) e eugenol (comercial, item 3.1). Os resultados são mostrados nas tabelas 14, 15 e 16.

Tabela 14. Valores de CIM 100% e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-7, chavibetol, metileugenol e eugenol frente a leveduras.

Cepas	CAT-7		Chavibetol		Metileugenol		Eugenol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	2025	2025	505,8	505,8	2025	2025	1014	1014
<i>C. albicans</i> ATCC 76615	2025	2025	505,8	505,8	3600	3600	1014	1014
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2025	2025	505,8	505,8	2025	2025	1014	1014
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1014	2025	505,8	505,8	2025	2025	505,8	505,8

Intervalo de concentração realizado na microdiluição:

8100/7200/6300/5400/4500/4050/3600/2025/1013,5/505,8/450/360

Observando-se as Tabelas 12 e 14, nota-se que os valores de CIM frente a leveduras das amostras CAT-2 e CAT-7 são semelhantes, porém os valores de CFM da amostra CAT-2 foram maiores que o da amostra CAT-7, portanto esta possui maior atividade fungicida. Isto pode ser devido a diferenças entre as composições químicas destas amostras, já que a atividade antifúngica está diretamente relacionada com a composição química da droga.

Ainda na Tabela 14, observa-se que a atividade antifúngica do chavibetol é maior que a do OE bruto, e também maior que a do eugenol, tradicionalmente utilizado como agente antimicrobiano em aplicações odontológicas, sugerindo que este composto é responsável pela atividade do OE. Além disto, o chavibetol apresentou atividade antifúngica frente à cepa de *C. krusei*, que apresenta resistência ao fármaco comercial fluconazol, porém, os valores de CIM e CFM são bastante superiores a valores de referência de diversos antifúngicos comerciais.²⁷ Adicionalmente, verifica-se que o metileugenol não é responsável pela atividade do OE, dado que seus valores de CIM e CFM são iguais ou superiores aos do OE.

Tabela 15. Valores de CIM e CFM ($\mu\text{g/mL}$) da amostra CAT-7, chavibetol, metileugenol e eugenol frente a cepas de *Trichophyton spp.*

Cepas	CAT-7			Chavibetol			Metileugenol			Eugenol		
	80%	100%	CFM	80%	100%	CFM	80%	100%	CFM	80%	100%	CFM
9	40	>1000	>1000	20	300	>1000	30	>1000	>1000	20	500	>1000
10	40	>1000	>1000	20	300	>1000	20	1000	>1000	20	400	>1000
11	20	>1000	>1000	20	200	>1000	≤ 10	1000	>1000	≤ 10	>1000	>1000
12	40	>1000	>1000	≤ 10	1000	>1000	20	>1000	>1000	<10	500	>1000
45	40	>1000	>1000	<10	300	>1000	20	1000	>1000	<10	400	>1000
47	40	>1000	>1000	≤ 10	300	>1000	≤ 10	300	>1000	30	400	>1000
142	40	>1000	>1000	≤ 10	300	>1000	20	500	>1000	≤ 10	400	>1000
178	40	>1000	>1000	≤ 10	300	>1000	20	500	>1000	<10	400	>1000
207	40	>1000	>1000	≤ 10	300	>1000	30	500	>1000	30	>1000	>1000
208	30	>1000	>1000	≤ 10	300	>1000	20	500	>1000	30	>1000	>1000
233	30	>1000	>1000	≤ 10	200	>1000	20	500	>1000	10	400	>1000
249	30	>1000	>1000	≤ 10	100	>1000	20	>1000	>1000	≤ 10	300	>1000
280	40	500	>1000	≤ 10	200	400	50	1000	>1000	50	500	500
367	40	500	>1000	<10	100	>1000	50	500	>1000	50	400	>1000
371	30	1000	>1000	<10	300	>1000	≤ 10	500	>1000	40	400	>1000
393	40	>1000	>1000	20	300	>1000	30	>1000	>1000	30	400	>1000
424	20	1000	>1000	20	300	500	20	1000	>1000	20	500	>1000

434	30	1000	>1000	<10	200	>1000	≤10	500	>1000	100	400	>1000
437	40	500	1000	<10	200	>1000	≤10	400-500	>1000	≤10	400	>1000
508	100	1000	>1000	≤10	400	500	50	500	>1000	50	300	1000
509	200	>1000	>1000	30	300	>1000	200	>1000	>1000	300	>1000	>1000
547	100	500	>1000	<10	100	300	100	1000	>1000	100	1000	1000
1158	50	1000	>1000	<10	50	>1000	50	400	>1000	100	400	500
1172	100	1000	>1000	≤10	100	300	100	400	1000	40	300	400
1321	50	1000	>1000	≤10	50	300	100	500	>1000	50	300	>1000

Intervalo de concentração realizado na microdiluição:

1000/500/400/300/200/100/50/40/30/20/10

Tabela 16. Valores de CIM e CFM (µg/mL) da amostra CAT-7, chavibetol, metileugenol e eugenol frente a cepas de *Microsporium spp.*

Cepas	CAT-7			Chavibetol			Metileugenol			Eugenol		
	80%	100%	CFM	80%	100%	CFM	80%	100%	CFM	80%	100%	CFM
64	30	1000	>1000	≤10	400	>1000	40	1000	>1000	20	400	>1000
229	40	1000	>1000	≤10	300	>1000	40	1000	>1000	50	400	>1000
343	100	500	>1000	20	200	400	40	500-1000	>1000	30	300-400	500
412	100	500	>1000	20	300	>1000	100	500	>1000	100	300	>1000
463	200	500-1000	>1000	20	300	1000	50	500	>1000	100	400	1000
673	40	>1000	>1000	20	>1000	>1000	50	>1000	>1000	30	>1000	>1000

Intervalo de concentração realizado na microdiluição:

1000/500/400/300/200/100/50/40/30/20/10

Os valores de CIM 80% da amostra CAT-2 frente a *Trichophyton spp.* e *Microsporium spp.* mostrados na Tabela 13 são iguais ou inferiores à menor concentração utilizada, o que levou à realização de um novo ensaio utilizando concentrações menores. Na Tabela 15, que mostra os resultados da amostra CAT-7 frente a *Trichophyton spp.*, observa-se que este valor é inferior a 50 µg/mL frente à maioria da cepas testadas, em algumas chegando 20 µg/mL, que é um valor próximo ou inferior a valores de referência de antifúngicos

comerciais²⁸, mostrando o potencial deste OE como novo agente antifúngico. Novamente observa-se que o chavibetol apresentou atividade fungistática superior ao do OE bruto e dos demais compostos puros, sendo que na maioria das cepas o valor de CIM 80% foi inferior a 10 µg/mL.

Observando-se as tabelas 13 e 16, nota-se que os resultados obtidos com a amostra CAT-7 frente a *Microsporum spp.* foram melhores que os da amostra CAT-2. Além disto, foi possível observar novamente que o chavibetol é o composto responsável por esta atividade, por ter apresentado valores de CIM e CFM menores que os do OE bruto.

Estes resultados mostram que o chavibetol e o OE de folhas de *P. pseudocaryophyllus* possuem potencial como novos agentes antifúngicos frente a *Trichophyton spp.* e *Microsporum spp.*, que são gêneros dermatófitos e causam dermatites, micoses e infecções nas unhas de seres humanos e animais.

5. Conclusões

- Os óleos essenciais de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* e de folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* coletados no Estado de São Paulo foram caracterizados quimicamente através de GC-MS.
- O chavibetol foi isolado do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* por cromatografia em camada delgada preparativa e por cromatografia contracorrente e caracterizado por de espectrometria de massas e espectroscopia de RMN e no infravermelho.
- O metileugenol foi sintetizado a partir do eugenol, identificado por GC-MS e utilizado nos ensaios antimicrobianos.
- A técnica de HS-SPME se mostrou rápida e prática, porém não substituiu a injeção do óleo essencial em todos os casos, sendo assim complementar à hidrodestilação.
- Os estudos sazonais mostraram que houve variação significativa da composição química dos óleos essenciais de *H. coronarium* ao longo do ano de 2008, e que o local de coleta também influenciou na composição química.
- O óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* apresentou atividade antifúngica significativa frente às cepas de leveduras e fungos filamentosos, principalmente às das espécies *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*.
- A atividade antifúngica do chavibetol, metileugenol e eugenol foi avaliada com o propósito de encontrar a(s) substância(s) ativa(s) do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*. Esta metodologia mostrou o chavibetol como responsável pela atividade antifúngica deste óleo

frente às cepas de *Trichophyton spp.* e *Microsporum spp.*, pois seus valores de CIM e CFM são iguais ou inferiores aos do óleo bruto.

- Os resultados dos ensaios antimicrobianos mostram que o chavibetol e o óleo essencial de folhas de *P. pseudocaryophyllus* possuem potencial como novos agentes antifúngicos frente a *Trichophyton spp.* e *Microsporum spp.*, que são gêneros dermatófitos e causam dermatites, micoses e infecções nas unhas de seres humanos e animais. A atividade antifúngica do chavibetol ainda se mostrou comparável à atividade de antifúngicos comerciais.

6. Lista de Colaboradores

- Prof. Dr. Palimécio Gimenes Guerrero Jr. (Departamento de Química e Biologia – UTFPR) – envio de amostras de OEs.
- Prof. Dr. João Vicente Coffani Nunes (UNESP – Registro) e Dra. Cátia Urbanetz (Instituto de Biologia – Unicamp) – identificação das espécies vegetais.
- Profa. Dra. Gilda Guimarães Leitão (Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais – UFRJ) – isolamento do chavibetol por HSCCC.
- Profa. Dra. Angélica Zaninelli Schreiber e Luzia Lyra (Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp) – ensaios antimicrobianos.

7. Referências Bibliográficas

1. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. de Mello, L. A. Mentz, P. R. Petrovick, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 1ª edição, Editora da UFRGS/Ed. da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 1999.
2. www.abihpec.org.br, acessado em abril de 2010.
3. Dados da produção industrial brasileira divulgados no site www.ibge.gov.br (acesso em abril de 2010).
4. www.euromonitor.com, acessado em abril de 2010.
5. L. E. S. Barata e R. Q. de Carvalho, *Amazon Scents: Replacing Rosewood in Perfumery?*, Parte I, *Perfumer & Flavorist*, 3, 32 (2007).
6. L. E. S. Barata, R. Q. de Carvalho e A. M. Vilha, III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Campinas, SP, 2005.
7. E. Mattoso, *Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia*, Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Unicamp, 2005.
8. <http://www.conservation.org.br/como/index.php?id=8>, acessado em janeiro de 2010.
9. H. Lorenzi, *Plantas Daninhas do Brasil*, Ed. Plantarum, Nova Odessa, 3ª ed., 2000, pág. 607.
10. http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Hedychium_coronarium.htm, acessada em 05/02/2007.
11. M. P. Corrêa, *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Ministério da Agricultura, Inst. Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, Rio de Janeiro, 1984, pág. 674-675.
12. H. Matsuda, T. Morikawa, Y. Sakamoto, I. Toguchida and M. Yoshikawa, *Labdane-type diterpenes with inhibitory effects on increase in vascular permeability and nitric oxide productions from Hedychium coronarium*, *Bioorg. Med. Chem.*, 10, 2527-2534 (2002).

13. S. Oh, I. H. Jeong, W. S. Shin, Q. Wang and S. Lee, *Synthesis and biological activity of (+)-hedychilactone A and its analogs from (+)-sclareolide*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 1656-1659 (2006).
14. M. J. Bhandary, K. R. Chandrashekar and K. M. Kaveriappa, *Medical ethnobotany of the Siddis of Uttara Kannada District, Karnataka, India*, J. Ethnopharmacol., 47, 149-158 (1995).
15. M. R. F. de Lima *et al.*, *Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants*, J. Ethnopharmacol., 105, 137-147 (2006).
16. Ph. R. Randriamiharisoa, *Essential oil of Hedychium coronarium from Madagascar*, Rivista Italiana EPPOS, 7, 692-699 (1996).
17. O. R. Gottlieb, M. T. Magalhães, *Eucalyptole in the essential oil of the rhizomes of Hedychium coronarium*, Anais da Associação Brasileira de Química, vol. 18, pág. 179-180, Rio de Janeiro, 1959.
18. L. S. Moreira e V. A. Facundo, *Estudo Fitoquímico e Farmacológico dos Constituintes Fixos e Voláteis De Hedychium coronarium J. Koen. (Zingiberaceae)*, Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica, Universidade Federal de Rondônia (UNIR), 2005.
19. J. A. M. Paula *et al.*, *Estudo Farmacognóstico das Folhas de Pimenta pseudocaryophyllus (GOMES) L. R. Landrum – Myrtaceae*, Revista Eletrônica de Farmácia, 2 (2), 153-156 Suplemento (2005).
20. J. A. M. Paula *et al.*, *Estudo Farmacognóstico da Casca de Pimenta pseudocaryophyllus (GOMES) L. R. Landrum – Myrtaceae*, Revista Eletrônica de Farmácia, 3 (2), 1-3 Suplemento (2006).
21. M. E. L. Lima *et al.*, *Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Two Specimens of Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) Native from São Paulo State – Brazil*, Pharmacologyonline, 3, 589-593 (2006).
22. R. P. Adams, *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, 1995.

23. National Institute of Standards and Technology, PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database, US Department of Commerce, Gaithersburg, MD, 1998.
24. H. K. A. C. Coolen, J. A. M. Meeuwis, P. W. N. M. van Leeuwen, R. J. M. Nolte, *Substrate Selective Catalysis by Rhodium Metallohosts*, J. Am. Chem. Soc., 117, 11906-11913 (1995).
25. CLSI (*Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests – Approved Standard*, 8th ed. CLSI document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]).
26. J. L. Tudella, L. Rodero, M. C. Estrella e S. Córdoba, *III Curso Hispano-Argentino de Micología Médica – Determinación de la Resistencia a los Antifúngicos en el Laboratorio*, São Paulo, 4^a ed., 2001.
27. CLSI M27-A2 (*Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada*, 2^a Edição, 2002).
28. CLSI M38-A (*Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada*, 2002).
29. J. A. Pino, R. Marbot, M. P. Martí, *Chemical Composition of the Essential Oil of *Helenium amarum* (Raf.) H. Rock from Cuba*, J. Essent. Oil Res., 18 (4), 438-439 (2006).
30. A. Marston, K. Hostettmann, *Isolation of Antifungal and Larvicidal Constituents of *Dzplolophzum buchana* by Centrifugal Partition Chromatography*, J. Nat. Prod., 58, 128-130 (1995).
31. G. G. Leitão, P. A. de Souza, A. A. Moraes, L. Brown, *Step-Gradient CCC Separation of Phenylpropanoid and Iridoid Glycosides from Roots of *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., 28, 2053-2060 (2005).
32. A. P. Foucault, L. Chevolot, *Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification*, J. Chromatogr. A, 808, 3-22 (1998).

33. A. Marston, K. Hostettmann, *Developments in the application of counter-current chromatography to plant analysis*, J. Chromatogr. A, 1112, 181-194 (2006).
34. A. Marston, *Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry*, Phytochemistry, 68, 2785–2797 (2007).
35. J. Xie, S. Wang, B. Sun, F. Zheng, *Preparative Separation and Purification of β -Caryophyllene from Leaf Oil of Vitex negundo L. var. heterophylla (Franch.) Rehd. by High Speed Countercurrent Chromatography*, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., 31 (17), 2621-2631 (2008).
36. J. Yan, G. Chen, S. Tong, Y. Feng, L. Sheng, J. Lou, *Preparative isolation and purification of germacrone and curdione from the essential oil of the rhizomes of Curcuma wenyujin by high-speed counter-current chromatography*, J. Chromatogr. A, 1070, 207-210 (2005).
37. J. C. T. da Silva, G. N. Jham, R. D. L. Oliveira, L. Brown, *Purification of the seven tetranortriterpenoids in neem (Azadirachta indica) seed by counter-current chromatography sequentially followed by isocratic preparative reversed-phase high-performance liquid chromatography*, J. Chromatogr. A, 1151, 203-210 (2007).
38. A. Berthod, *Countercurrent Chromatography: The Support-Free Liquid Stationary Phase*, 1st Ed., Elsevier, Amsterdã, 2002.
39. R. A. Momin, R. S. Ramsewak, M. G. Nair, *Bioactive Compounds and 1,3-Di[(cis)-9-octadecenoyl]-2-[(cis,cis)-9,12-octadecadienoyl]glycerol from Apium graveolens L. Seeds*, J. Agric. Food Chem., 48, 3785-3788 (2000).
40. R. M. Silverstein, F. X. Webster, *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, LTC Editora, Rio de Janeiro, 6^a ed., 2000.
41. Ali, S. Sotheeswaran, M. Tuiwawa and R. M. Smith, *Comparison of the composition of the essential oils of Alpinia and Hedychium species – Essential oils of Fijian plants, part 1*, J. Essent. Oil Res., 14, 409-411 (2002).
42. B. Sabulal, G. Varughese, D. Mathew and N. S. Pradeep, *Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from the*

rhizomes of four Hedychium species from South India, J. Essent. Oil Res., 19, 93-97 (2007).

43. A. Gurib-Fakim, N. Maudarbaccus, D. Leach, L. Doimo and H. Wohlmuth, *Essential oil composition of Zingiberaceae species from Mauritius*, J. Essent. Oil Res., 14, 271-273 (2002).

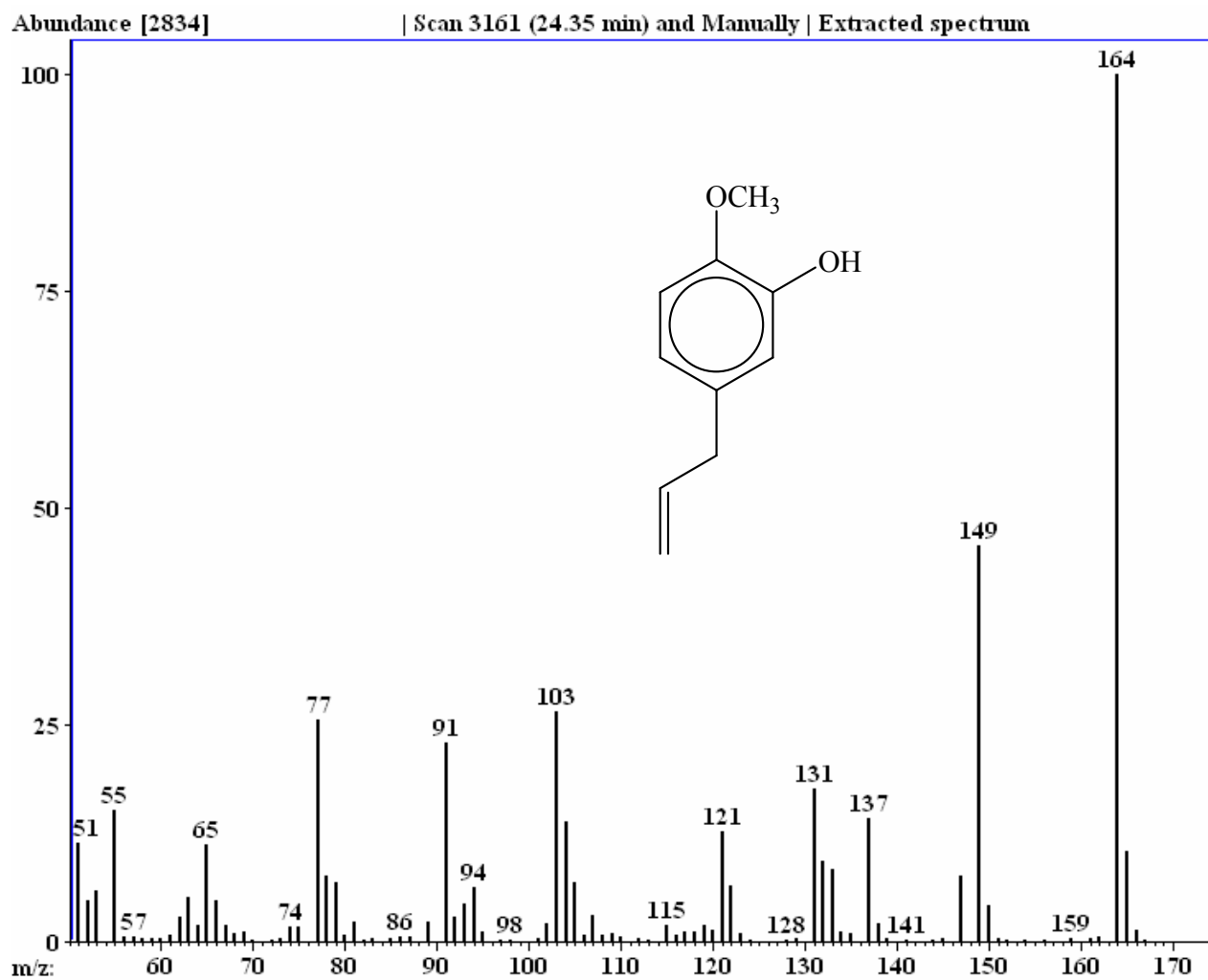
44. A. L. P. Valente, F. Augusto, *Microextração por Fase Sólida*, Química Nova, 23 (4), 523-530 (2000).

45. F. Macchioni, P. L. Cioni, G. Flamini, I. Morelli, S. Maccioni, M. Ansaldi, *Chemical composition of essential oils from needles, branches and cones of Pinus pinea, P. halepensis, P. pinaster and P. nigra from central Italy*, Flavour Fragr. J., 18, 139-143 (2003).

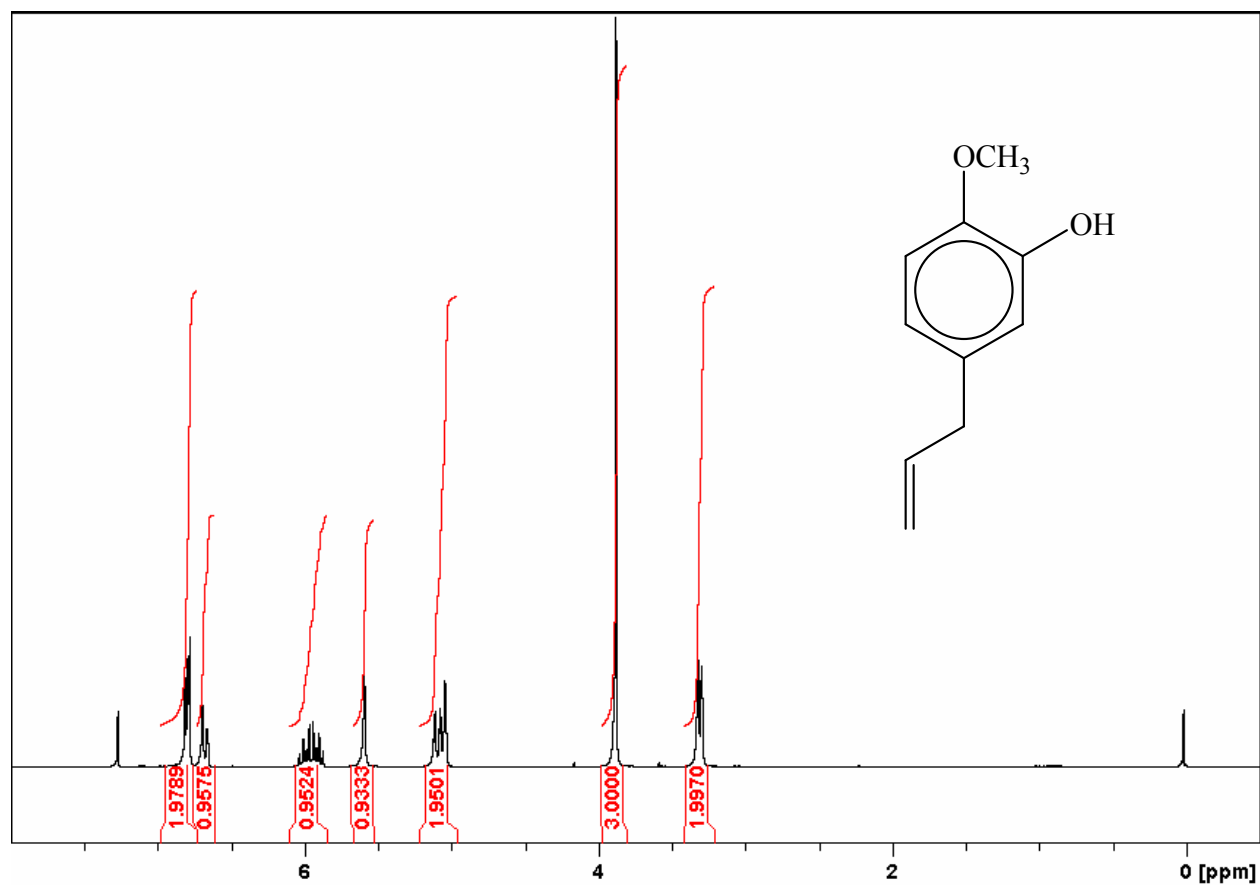
46. V. Papandreou, P. Magiatis, I. Chinou, E. Kalpoutzakis, A.-L. Skaltsounis, A. Tsarbopoulos, *Volatiles with antimicrobial activity from the roots of Greek Paeonia taxa*, J. Ethnopharmacol., 81, 101-104 (2002).

8. Anexos

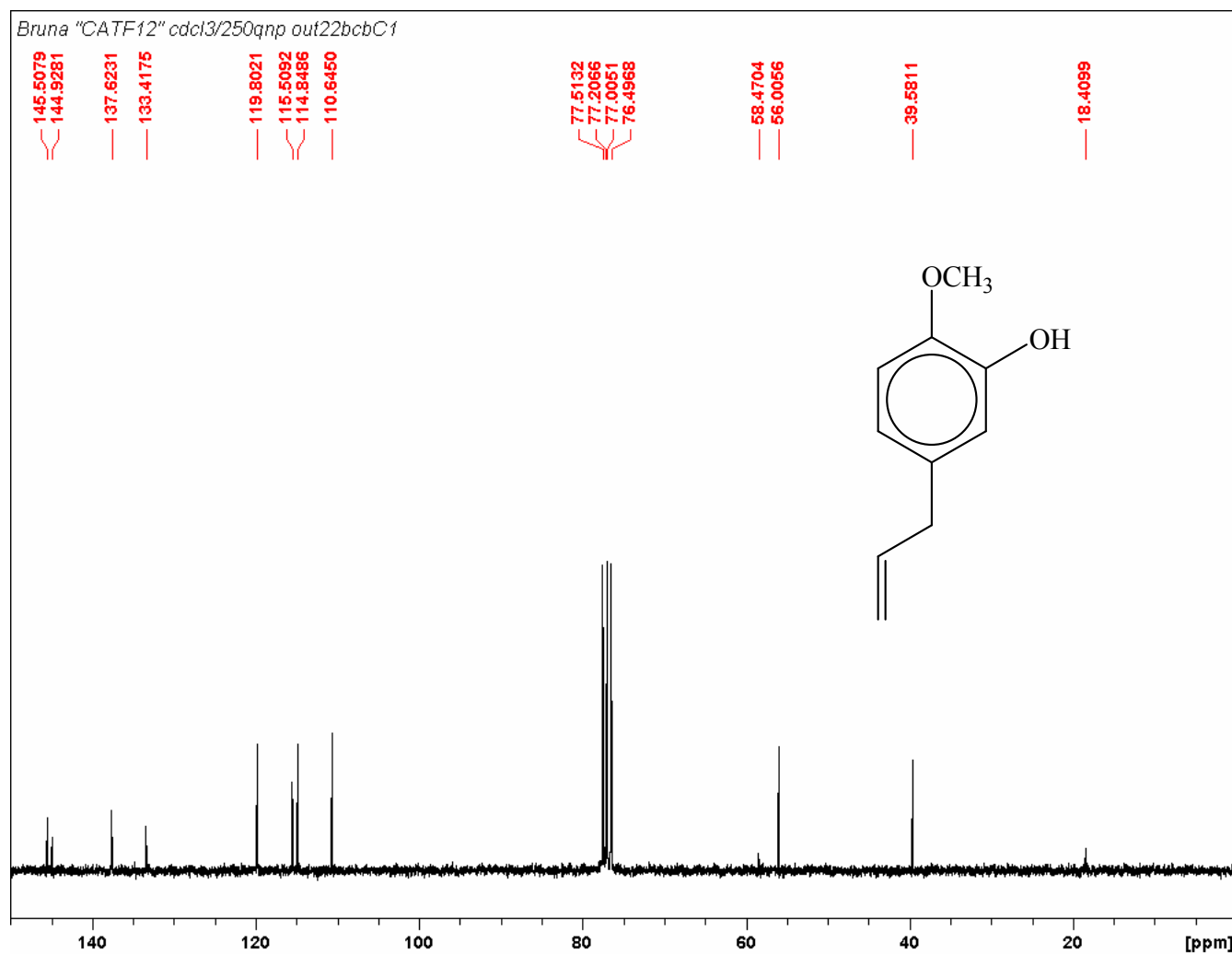
8.1. Espectro de massas do chavibetol



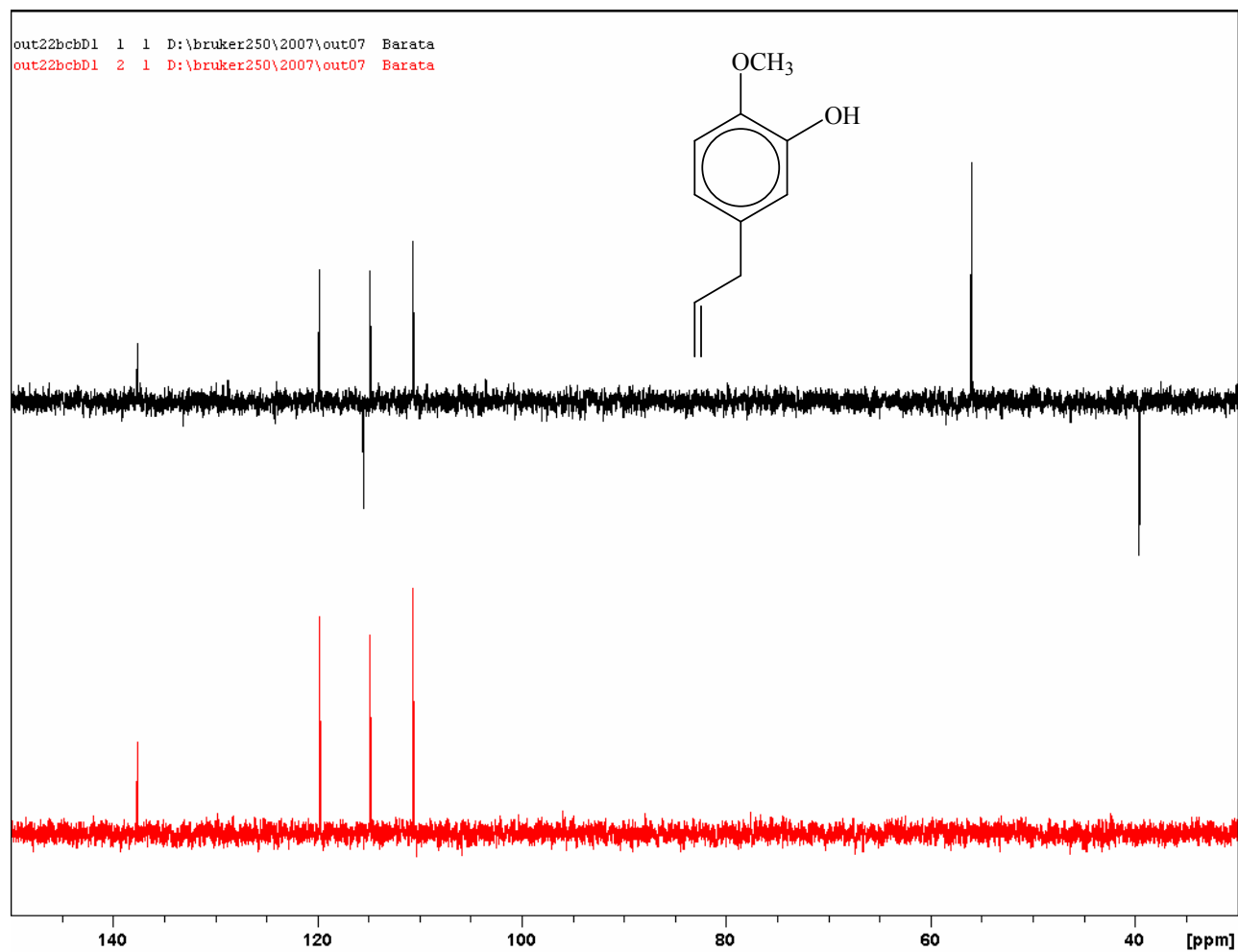
8.2. Espectro de RMN de ^1H do chavibetol



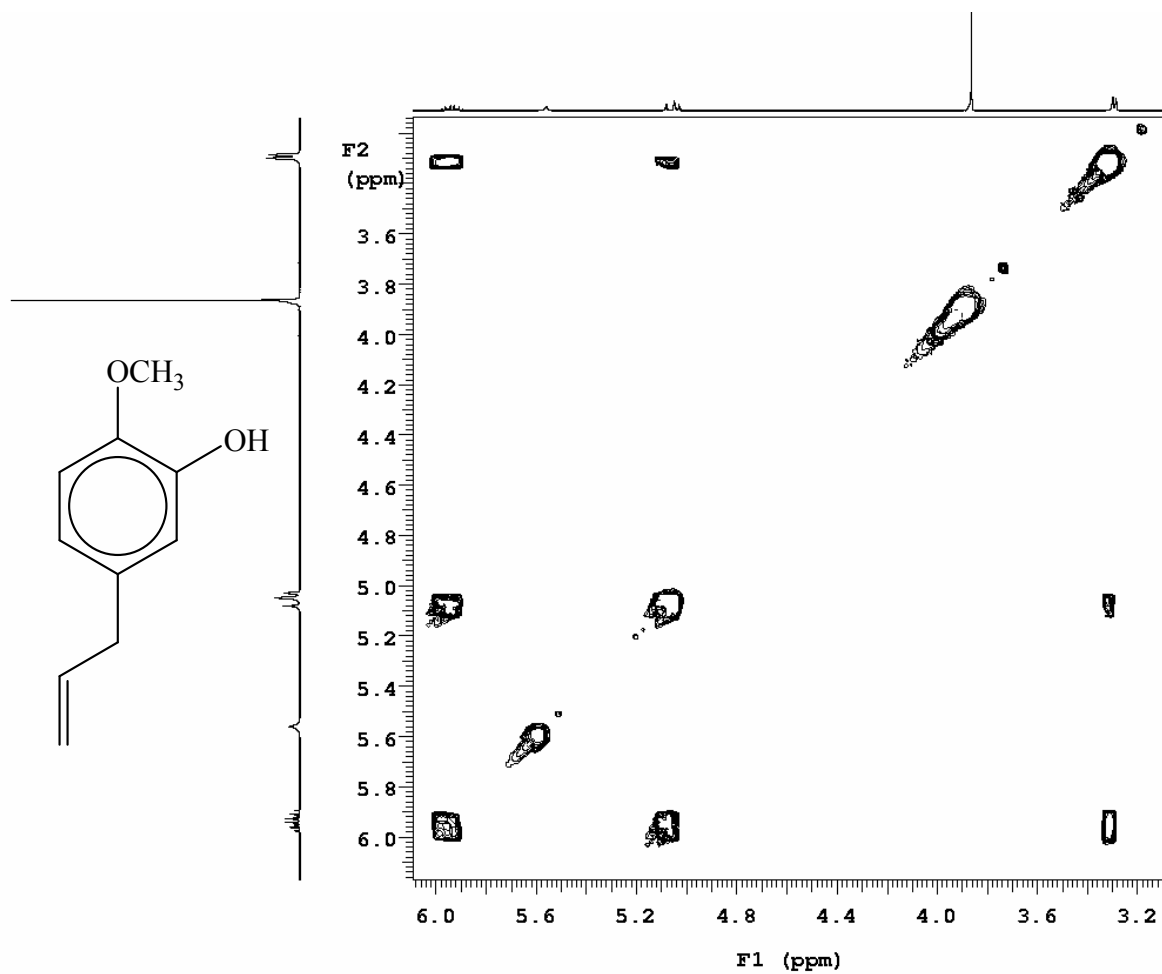
8.3. Espectro de RMN de ^{13}C do chavibetol



8.4. Espectro DEPT do chavibetol



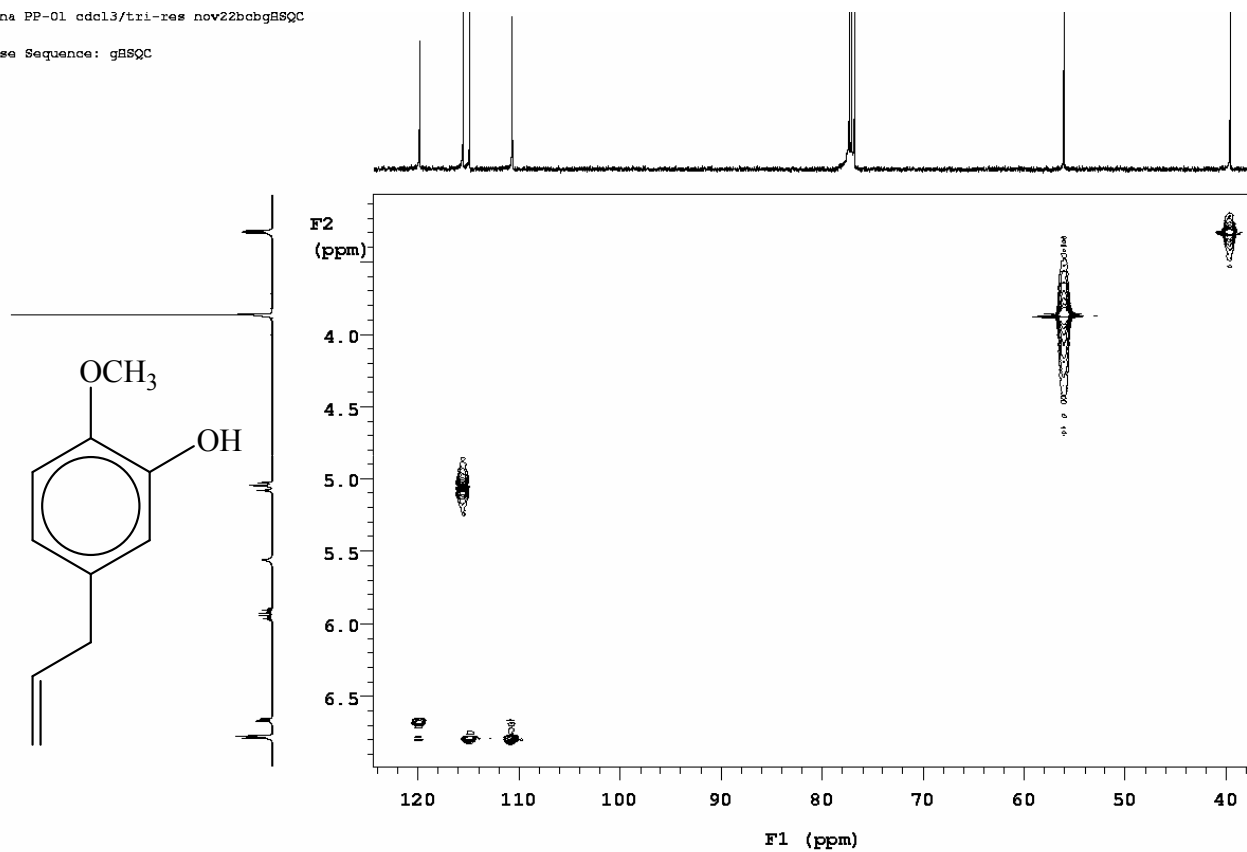
8.5. Espectro COSY do chavibetol



8.6. Espectro HSQC do chavibetol

Bruna PP-01 cdcl3/tri-res nov22bcbg88QC

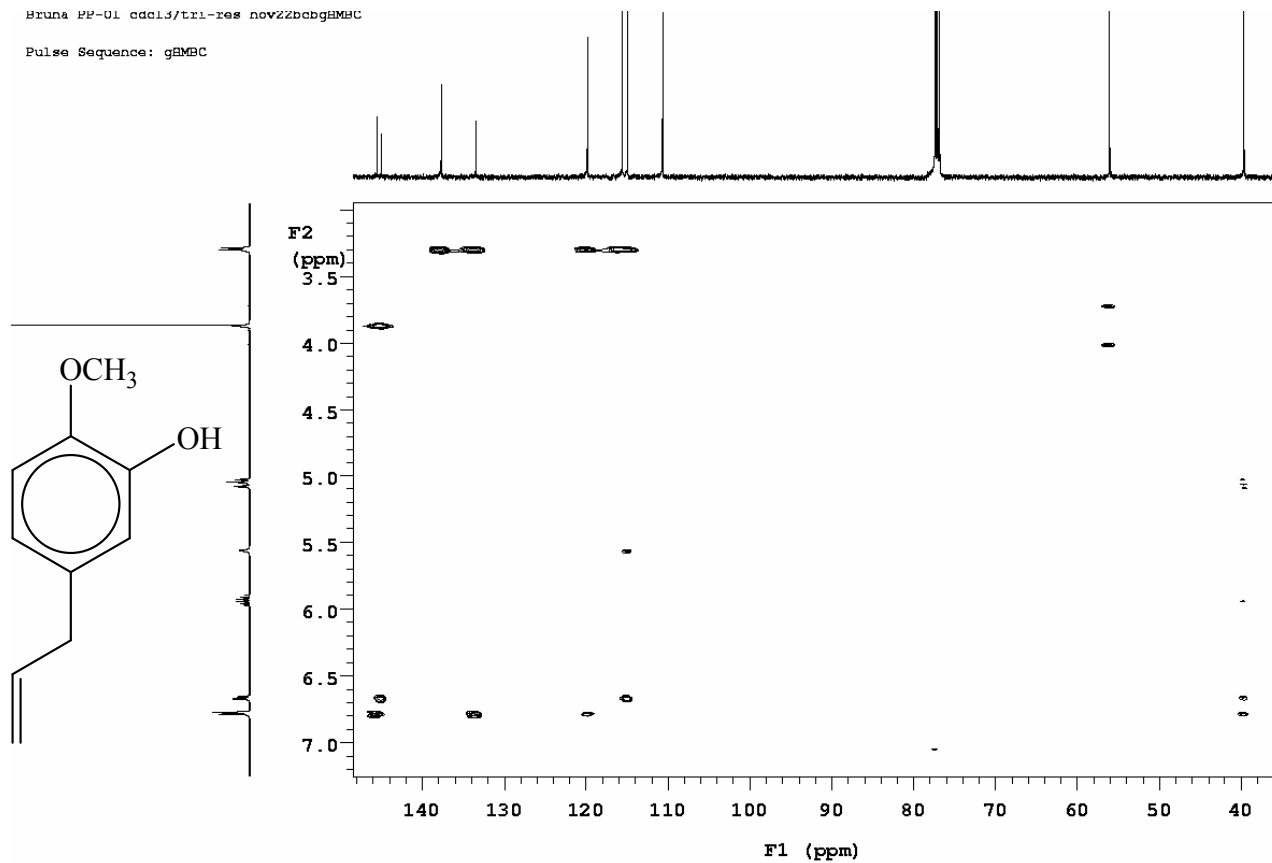
Pulse Sequence: g88QC



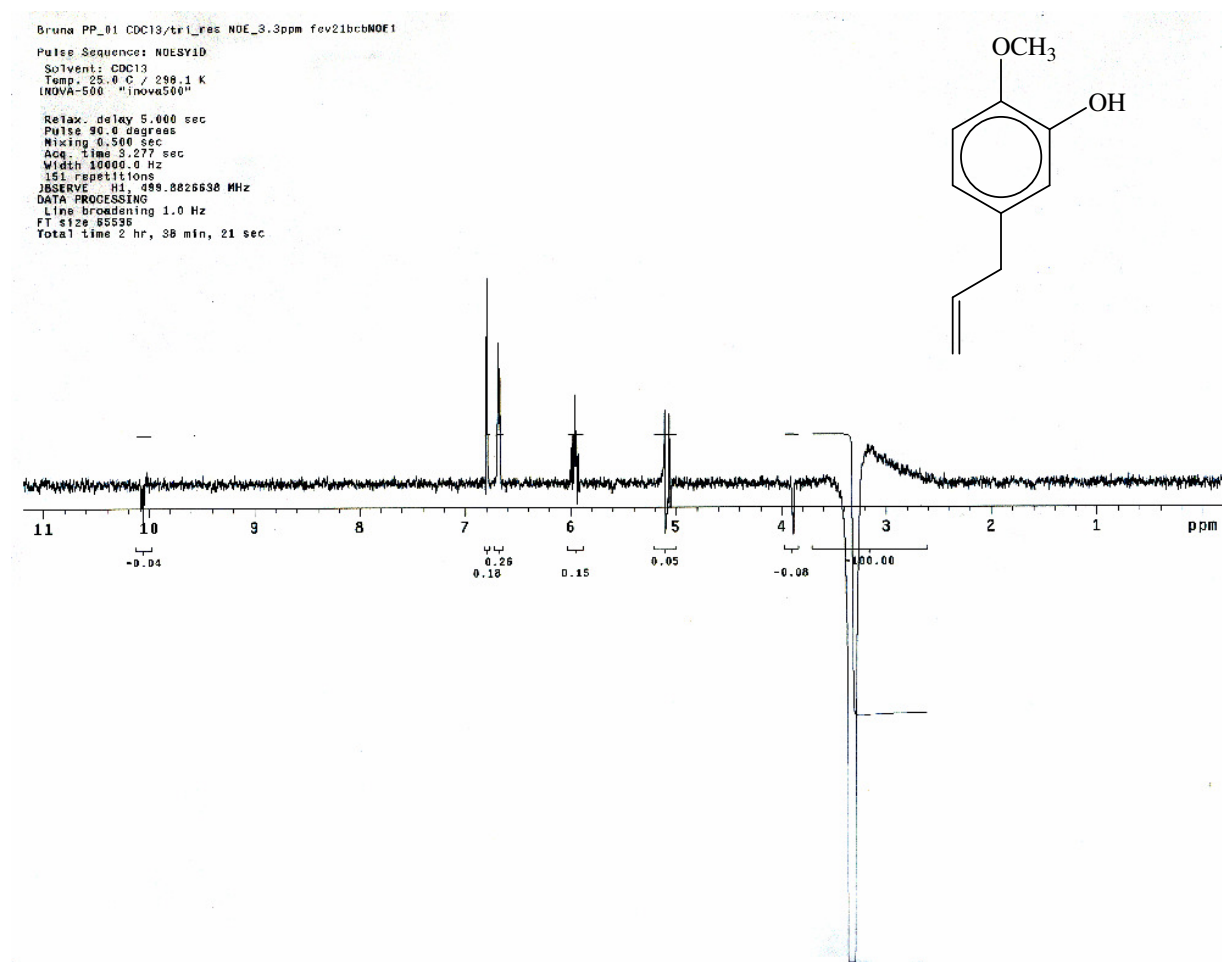
8.7. Espectro HMBC do chavibetol

Bruna PP-01 cdc1.3/txl-res nov22bcbgBMBC

Pulse Sequence: gBMBC



8.8. Espectro NOE com irradiação em 3,30 ppm do chavibetol



8.9. Espectro no infravermelho do chavibetol

