



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

Solomon Kweku Sagoe Amoah

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Hedyosmum brasiliense Miq., Chloranthaceae.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Florianópolis

2011

“INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO DE
Hedyosmum brasiliense Miq., Chloranthaceae”

POR

Solomon Kweku Sagoe Amoah

Dissertação foi julgada e aprovada
em sua forma final pelo(a)
orientador(a) e membros da Banca
Examinadora, composta pelos
Professores Doutores:

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa (UNESP – Membro Titular,

Prof. Dr. Moacir Geraldo Pizzolatti (UFSC – Membro Titular)

Profa. Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg (UFSC – Membro Titular)

Prof.^a, Dr.^a Maique Weber Biavatti (UFSC – Orientadora)

Prof. Dr. Eloir Paulo Schenkel
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 22 de Julho de 2011.

Dedicatória

Dedico a dissertação em primeiro lugar a Deus, o criador dos céus e a terra e tudo que nela há, pela a oportunidade de poder estudar um pouco do que Ele criou e pelo seu cuidado comigo.

Dedico também a todos que me apoiaram especialmente meus pais King David Amoah e Beatrice Amponsem Amoah e meus pais brasileiros José Alexandre Kuhn e Ester do Nascimento Kuhn que me entenderam, apoiaram e ajudaram para que alcançasse essa altura.

AGRADECIMENTOS

Ao governo brasileiro pela oportunidade dada a mim para estudar neste país amado.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

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

À Professora Dra Maique Weber Biavatti, a minha orientadora, por ter me aceito como orientando e também pelo apoio e incentivo. Isso nunca será esquecida.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina e à banca examinadora.

Ao Professor Dr. Ademir Reis pela ajuda na coleta e identificação do material vegetal, Professor Anderson Barison da Universidade Federal de Paraná, pela atenção e agilidade dispensada aos espectros de ressonância magnética nuclear das substâncias isoladas neste trabalho, Professores Dr. Norberto Peporine da Universidade de São Paulo e Dra. Francinete Campos da Universidade Federal de Paraná pelos espectros de massas das substâncias isoladas neste trabalho e Professores Marcia Maria de Souza, José Eduardo da Silva Santos e André Bafica pelos testes farmacológicos.

Às professoras do laboratório de Farmacotécnica especialmente Professora Dra. Angela Campos pela ajuda e oportunidade de usar o HPLC (Alberto) e outros equipamentos.

Às técnicas dos laboratórios, Claudinha e Solange e aos amigos e colegas dos laboratórios do departamento das Ciências Farmacêuticas, Andréia, Andressa, Carlos, Caroline, Cristian, Cristiane, Daniela, Everson, Gabriela, Geison, Karen, Luis, Maria Izabel, Maria Tereza, Simone, Tatiana, Talita, entre outros, por todo carinho, apoio e paciência, desabafo, churrascos brincadeiras, etc. Não esquecendo a Vanessa, que me apresentou à minha orientadora durante a graduação. Que Deus os abençoe imensamente.

Agradeço também à comunidade cristã em Florianópolis especialmente a minha igreja, os Peregrinos pelas orações e apoio quando precisei.

Aos meus pais e irmãos: Philip, Stephen, Vida, King David Junior, Giselle, Jaqueline e a minha namorada Clarissa e a sua família por todo amor e carinho e por acreditarem em mim.

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

O que as suas mãos tiverem que fazer, que o façam com toda a sua força, pois na sepultura para onde você vai, não há atividade nem planejamento, não há conhecimento nem sabedoria. Percebi ainda outra coisa debaixo do sol: Os velozes nem sempre vencem a corrida; os fortes nem sempre triunfam na guerra; os sábios nem sempre têm comida; os prudentes nem sempre são ricos; os instruídos nem sempre têm prestígio; pois o tempo e o acaso afetam a todos. Por isso, vou passar por este caminho, mas uma vez, qualquer bem que eu possa fazer ou qualquer bondade que eu possa mostrar a qualquer ser humano, deixe-me fazê-lo agora. Não me deixes adiar nem negligenciá-lo, pois eu não passarei neste caminho novamente.

Adaptado de Eclesiastes 9:10-11 e do Stephen Grellet (1773-1855).

Resumo

Hedyosmum brasiliense é um arbusto aromático que pertence à família Chloranthaceae e é popularmente usado como calmante e antiinflamatório, para tratar frieiras, enxaquecas e doenças de ovário. Este trabalho visou continuar a análise fitoquímica desta espécie que é conhecida popularmente como “Cidrão”. Foi possível isolar e identificar treze substâncias oriundas só das frações hexano e diclorometano do extrato etanólico. Dessas substâncias, quatro são inéditas na literatura e pertencem à classe das lactonas sesquiterpênicas 15-acetil-isogermafurenolídeo (H622), 1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina (HB 212), 15-hidroxi-isogermafurenolídeo (HB 21) e brasiliensolídeo (HL 33) que é uma lactona sesquiterpênica dimérica. Seis estão sendo descritas pela primeira vez para a espécie (monoglicerídeo de ácido esteárico, éster etílico do ácido linolênico, éster etílico do ácido linoléico, ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, escopoletina e vanilina), e três (podoandina, 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo (13HDS) e β -sitosterol) já foram descritas previamente para *H. brasiliense*. Quanto aos estudos farmacológicos, a podoandina mostrou atividade antidepressiva agindo sobre as vias adrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas; o extrato bruto e as lactonas, podoandina e 13HDS exibiram a atividade vasodilatadora e as lactonas sesquiterpênicas (H622, HB 212 e HB 21) não tiveram atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*. As substâncias foram identificadas pela espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹D, ²D, espectrometria de massas e dados da literatura.

Palavras chaves: *Hedyosmum brasiliense*, Chloranthaceae, lactonas sesquiterpênicas, fenólicos, disesquiterpenolídeo.

Abstract

Hedyosmum brasiliense is an aromatic shrub that belongs to the Chloranthaceae family and is popularly used as a calmativ and anti-inflammatory, for treating athlete's foot, migraines and diseases of the ovary. This work was done to continue the phytochemical analysis of this species which is popularly known as "Cidrão. It was possible to isolate and identify thirteen substances which were obtained from the hexane and dichloromethane fractions of the ethanol extract. Out of these substances, four are new and belong to the class of sesquiterpene lactones: 15-acetyl-isogermafurenolide (H622), 1-hydroxy-10,15-methylenepodoandin (HB 212), 15-hydroxy-isogermafurenolide (HB 21) and brasiliensolide (HL 33) which is a dimeric sesquiterpene lactone. Six are being described for the first time for this species (stearic acid monoglyceride, linolenic acid ethyl ester, linoleic acid ethyl ester, 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid, scopoletin and vanillin), and three (podoandin, 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide (13HDS) and β -sitosterol) were previously described for *H. brasiliense*. With regards to pharmacological studies, podoandin exhibited antidepressant activity by acting on adrenergic, dopaminergic and serotonergic pathways; the crude extract and the lactones podoandin and 13HDS exhibited vasodilator activity and the sesquiterpene lactones (H622, HB 212 and HB 21) showed no antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis*. The substances were identified by Nuclear magnetic resonance spectroscopy 1D, 2D, mass spectrometry and already published data.

Keywords: *Hedyosmum brasiliense*, Chloranthaceae, sesquiterpene lactones, phenolics, disesquiterpenolide.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 - <i>Hedyosmum brasiliense</i> Miq..... | 4 |
| Figura 2 - Substâncias isoladas por Guedes (1997) e Oliveira (2009).... | 6 |
| Figura 3 - Sete principais tipos de carboesqueletos de lactonas Sesquiterpênicas e o carboesqueleto lindenano..... | 7 |
| Figura 4 - Fluxograma do fracionamento fitoquímico de <i>Hedyosmum brasiliense</i> | 13 |
| Figura 5 Etapas para isolamento das substâncias da fração hexano de <i>Hedyosmum brasiliense</i> | 16 |
| Figura 6 - Espectros de RMN de ^1H da lactona H3 (300 MHz, CDCl_3) | 17 |
| Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C da lactona H3 (75MHz, CDCl_3).... | 17 |
| Figura 8 - Espectro de ^1H da lactona H5 (400 MHz, CDCl_3)..... | 19 |
| Figura 8a - Espectro de ^1H de H 5 ampliado na região de δ 1,68 a δ 0,82..... | 20 |
| Figura 9 - Espectro de ^{13}C de H 5 (100 MHz, CDCl_3)..... | 20 |
| Figura 10 - Espectro de ^1H da substância HB 223 (300 MHz, CDCl_3).. | 22 |
| Figura 11 - Espectro de ^{13}C da substância HB 223 (75 MHz, CDCl_3)...23 | |
| Figura 12 - Espectro de ^1H da substância HB 10 (400 MHz, acetona).. | 25 |
| Figura 12a - Espectro de RMN ^1H ampliado na região de 4,20 ppm a 3,50 ppm..... | 26 |
| Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C da substância HB 10 (100 MHz, acetona)..... | 26 |
| Figura 14 - Mapa de correlação de HMQC de HB 10..... | 28 |
| Figura 15 - Mapa de correlação HMBC do HB 10..... | 28 |
| Figura 16 - Espectro de RMN ^1H da substância H622 (400 MHz, CDCl_3)..... | 29 |
| Figura 16a - Espectro de RMN ^1H da substância H622 ampliada na região δ 5,8 a δ 4,4..... | 30 |

| | |
|--|----|
| Figura 16b - Espectro de RMN ^1H da substância H622 (400 MHz, CDCl_3)..... | 30 |
| Figura 16c – Espectro de RMN ^1H da substância H622 ampliada na região $\delta 5,08$ a $\delta 4,95$ | 31 |
| Figura 17 - Espectro de RMN ^{13}C da substância H622 (100 MHz, CDCl_3)..... | 31 |
| Figura 18 - Mapa de correlação HMBC do H622 ampliado..... | 32 |
| Figura 18a - Mapa de correlação HMBC do H622 ampliado mostrando carbonos $\delta 175$ e $\delta 171$ | 32 |
| Figura 19 - Mapa de correlação HMQC do H622 ampliado..... | 33 |
| Figura 20 - 15-Acetil-isogermafurenolídeo..... | 33 |
| Figura 21 - Espectro de massas (HR-MS) de H622..... | 34 |
| Figura 22 - Espectro de RMN ^1H da substância HB212 (100 MHz, CDCl_3)..... | 37 |
| Figura 22a - Espectro de RMN ^1H da substância HB212 ampliado na região $\delta 6,0$ a $\delta 4,6$ | 37 |
| Figura 22b - Espectro de RMN ^1H da substância HB212 ampliado na região $\delta 2,7$ a $\delta 1,7$ | 38 |
| Figura 22c - Espectro RMN ^1H da substância HB212 ampliado na região $\delta 2,7$ a $\delta 1,7$ | 38 |
| Figura 23 - Mapa de correlação de HMQC da substância HB212..... | 39 |
| Figura 24 - Mapa de correlação de HMBC da substância HB212..... | 39 |
| Figura 25 - Espectro de massas (HR-MS) de HB 212..... | 41 |
| Figura 26 - Estrutura da substância HB212..... | 41 |
| Figura 27 - Espectro de RMN ^1H de HL 33 a temperatura de 20°C (293 K). ampliado na região de 0 ppm a 5,5 ppm..... | 43 |
| Figura 28 - Espectro de RMN ^1H de HL 33 a temperatura de -20°C (253 K). ampliado na região de 0 ppm a 5,5 ppm..... | 43 |

| | |
|---|----|
| Figura 29 - Mapa HMQC da substância HL 33..... | 44 |
| Figura 30 - Mapa HMBC da substância HL 33..... | 44 |
| Figura 31 - Espectro de massas (HR-MS) modo negativo) de HL 33.. | 46 |
| Figura 32 Espectro de massas (HR-MS) modo negativo) de HL 33 – íon filho (m/z 555,2284)..... | 46 |
| Figura 33 Tipos de disesquiterpenoides..... | 47 |
| Figura 34 Estrutura de HL 33 brasiliensólídeo..... | 48 |
| Figura 35 Etapas para isolamento das substâncias da fração diclorometano de <i>Hedyosmum brasiliense</i> | 50 |
| Figura 36 - Espectro de RMN ¹ H de HB 21 (400 MHz; CDCl ₃)..... | 51 |
| Figura 36a - Espectro de RMN ¹ H de HB 21 ampliado na região δ5,40 a δ4,95..... | 51 |
| Figura 36b - Espectro de RMN ¹ H de HB 21 ampliado na região δ5,05 a δ4,95..... | 52 |
| Figura 36c - Espectro de RMN ¹ H de HB 21 ampliado na região δ5,77 a δ5,62..... | 52 |
| Figura 36d - Espectro de RMN ¹ H de HB 21 ampliado na região δ4,90 a δ3,95..... | 53 |
| Figura 37 - Espectro de RMN ¹³ C de HB 21 (100 MHz; CDCl ₃)..... | 53 |
| Figura 38 - Espectro de massas de HB 21 (HR-MS, modo positivo)..... | 55 |
| Figura 39 - Estrutura da substância HB 21..... | 55 |
| Figura 40 - Espectro de RMN ¹ H de HB 22 (400 MHz, CDCl ₃)..... | 56 |
| Figura 41 - Estrutura da substância HB 22..... | 57 |
| Figura 42 - Espectro de RMN ¹ H de HB 15 (400 MHz; CDCl ₃)..... | 58 |
| Figura 43 - Espectro de RMN ¹³ C de HB 15 (100 MHz; CDCl ₃)..... | 59 |
| Figura 44 - Cromatografia de camada delgada mostrando D 19..... | 59 |
| Figura 45 - Espectro de RMN ¹ H de D 19 (400 MHz, CDCl ₃)..... | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 45a - Espectro de RMN ^1H de D 19 ampliado na região δ 7,80 a δ 6,20..... | 60 |
| Figura 45b - Espectro de RMN ^1H de D 19 ampliado na região δ 4,10 a δ 3,80..... | 61 |
| Figura 46 - Estruturas das duas substâncias elucidadas de D19..... | 61 |
| Figura 47 - Mapa de HMQC da substância D19..... | 62 |
| Figura 48 - Mapa de HMBC da substância D19..... | 62 |
| Figura 49 - Cromatograma de H5 e D17..... | 65 |
| Figura 50 - Cromatograma de H5 e D17..... | 65 |
| Figura 51 - Cromatograma de H5, D17, FH e FD..... | 65 |
| Figura 52 - Estrutura química de dois tipos de hormônios em plantas.. | 66 |
| Figura 53 - Perfil cromatográfica do extrato das folhas (macho e Fêmea) de <i>Hedysosmum brasiliense</i> | 67 |
| Figura 54 - Cromatograma de <i>Hedysosmum brasiliense</i> com detecção em 260 nm..... | 67 |
| Figura 55 - A curva de resposta das concentrações das substâncias..... | 69 |

Lista de Quadros

| | | |
|-----------|--|----|
| Quadro 1 | Dados de Tempo, Fluxo e solventes para análise em CLAE..... | 14 |
| Quadro 2 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C da lactona H3 (300 MHz e 75 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura. | 18 |
| Quadro 3 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C da lactona H5 (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura. | 21 |
| Quadro 4 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C de HB 223 (300 MHz e 75 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura. | 24 |
| Quadro 5 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC de HB 10 (400 MHz e 100 MHz, acetona)..... | 27 |
| Quadro 6 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C e 2D da lactona H622..... | 35 |
| Quadro 7 | Dados de RMN de ^1H e ^{13}C e 2D da lactona HB212..... | 40 |
| Quadro 8 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C do lindenanólídeo dimérico brasiliensólídeo (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) em comparação com RMN ^{13}C de H5 (13HDS).(100 MHz, CDCl_3)..... | 49 |
| Quadro 9 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C e 2D da lactona HB 21 em comparação com H622..... | 54 |
| Quadro 10 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância HB 22 em comparação com literatura..... | 57 |
| Quadro 11 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C de escopoletina (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura..... | 63 |
| Quadro 12 | Dados de RMN ^1H e ^{13}C de vanilina (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3)..... | 63 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

WHO : World Health Organization
SUS: Sistema Único de Saúde
LS: Lactonas sesquiterpênicas
SNC: sistema nervoso central
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência
RMN: ressonância magnética nuclear
EM: espectrometria de massas
AAC: água (0,5% ácido fórmico)
UV: ultravioleta
13HDS: 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo
¹H RMN: Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
¹³C RMN: Ressonância magnética nuclear de carbono
HMQC: Heteronuclear Multiple Quantum Correlation
HMBC: Heteronuclear Multiple Bond Correlation
EXSY: Exchange spectroscopy
NOE: Nuclear overhauser effect
CC: Cromatografia em Coluna
CCD: Cromatografia de Camada Delgada
dl: duplete largo
sl: simpleto largo

Sumário

| | | |
|---------|---|----|
| 1. | Introdução..... | 1 |
| 2. | Revisão da Literatura..... | 2 |
| 2.1 | Plantas medicinais..... | 2 |
| 2.2 | Chloranthaceae..... | 2 |
| 2.3 | Gênero <i>Hedyosmum</i> | 3 |
| 2.4 | <i>Hedyosmum brasiliense</i> | 4 |
| 2.5 | Lactonas sesquiterpênicas (LS)..... | 5 |
| 2.6 | Compostos fenólicos..... | 8 |
| 3. | Objetivo..... | 9 |
| 3.1 | Objetivo Geral..... | 9 |
| 3.2 | Objetivos Específicos..... | 9 |
| 4. | Metodologia | 10 |
| 4.1 | Coleta do material vegetal e obtenção do extrato bruto..... | 10 |
| 4.2 | Obtenção do extrato etanólico..... | 10 |
| 4.3 | Fracionamento cromatográfico das frações..... | 10 |
| 4.4 | Elucidação estrutural..... | 11 |
| 4.5 | Cromatografia líquida de alta eficiência..... | 14 |
| 5. | Resultados e Discussão..... | 15 |
| 5.1 | Obtenção do extrato etanólico..... | 15 |
| 5.2 | Caracterização das substâncias isoladas..... | 15 |
| 5.2.1 | Fração Hexano..... | 15 |
| 5.2.1.1 | Substância H3 (Podoandina)..... | 16 |
| 5.2.1.2 | Substância H5 (13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo, 13HDS)..... | 19 |
| 5.2.1.3 | Substância HB 223 (β -sitosterol)..... | 22 |
| 5.2.1.4 | Substância Hb 10 (Monoglicerídeo de ácido esteárico)..... | 25 |
| 5.2.1.5 | Substância H622 (15-acetil-isogermafurenolídeo)..... | 29 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.2.1.6 | Substância HB212 (1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina)... | 36 |
| 5.2.1.7 | Substância HL 33(brasiliensolídeo)..... | 43 |
| 5.2.2 | Fração Diclorometano..... | 50 |
| 5.2.2.1 | Substância HB 21 (15-Hidroxiisogermafurenolídeo)..... | 51 |
| 5.2.2.2 | Substância HB 22 (Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico)..... | 56 |
| 5.2.2.3 | Substâncias HB 15 (Éster etílico do ácido linolênico e Éster etílico do ácido linoleico)..... | 58 |
| 5.2.2.4 | Substâncias da D 19 (escopoletina e vanilina)..... | 59 |
| 5.2.2.5 | Substância D17 (identificado com 13-Hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo – 13HDS)..... | 64 |
| 5.3 | Identificação dos principais marcadores no extrato em CLAE de fase reversa..... | 66 |
| 5.4 | Atividades Farmacológicas..... | 68 |
| 5.4.1 | Atividade no Sistema nervoso central..... | 68 |
| 5.4.2 | Atividade no Sistema cardiovascular..... | 68 |
| 5.4.3 | Atividade Antibacteriana..... | 69 |
| 6. | Conclusões..... | 70 |
| 7. | Perspectivas..... | 71 |
| | Referências..... | 72 |

Anexos

1. Espectros de NOE e EXSY da substância HL 33 (Brasiliensolídeo).
2. AMOAH, S. K. S.; CRUZ, A. C. H.; SOUZA, M. M.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. 2011. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hedyosmum brasiliense*. *Journal of Natural Products* submitted manuscript, 2011.
3. GONCALVES, A. E., AMOAH, S K. S., TOLARDO, R., BIAVATTI, M. W.; DE SOUZA, M.M. Antidepressant-Like Effect of *Hedyosmum brasiliense* and its Sesquiterpene Lactone, Podoandin in Mice: Evidence for the Involvement of Adrenergic, Dopaminergic and Serotonergic Systems *European journal of pharmacology* submitted manuscript, 2011.

1. Introdução

Plantas medicinais têm sido usadas por vários grupos étnicos nos continentes como Ásia, África e América do Sul e por vários séculos foram de grande importância para a sobrevivência destes povos (Leonti, 2011; Gurib-Fakim, 2006). Vários medicamentos como paclitaxel, podofilotoxina, pilocarpina entre outros, que são de grande importância no âmbito clínico foram obtidos de plantas medicinais (McChesney et al., 2007; De Abreu, 2005). Embora o Brasil seja um país que possui uma grande área de plantas medicinais (Braz-Filho, 1994), no âmbito pela busca por substâncias bioativas, há bem poucos estudos sobre essas (Guerra et al., 2001), em comparação ao seu tamanho, mesmo que pesquisas tenham aumentados nesta área (Calixto, 2005). Apesar de se saber pouco sobre os constituintes químicos das inúmeras plantas medicinais do Brasil, de acordo com a WHO (2008), plantas medicinais são lucrativas e em 2007 o Brasil arrecadou 160 milhões de dólares só em taxas e impostos. Tendo isso em vista, além de descobrir novos fitofármacos através dos estudos destes produtos naturais, a sua inserção no Sistema Único de Saúde (SUS) (Ministério de Saúde, 2006) pode gerar mais renda para o país.

Hedyosmum brasiliense pertence à família Chloranthaceae, e é endêmica no Brasil e em Santa Catarina, foi o objeto de análise. É conhecido popularmente como “Cidrão” e usado como calmante. É uma espécie que tem estudos ecológicos para o seu cultivo e manejo sustentável (Zaniolo, 2003). Embora seja usado na medicina tradicional, tem poucos estudos sobre os seus constituintes químicos e as suas atividades biológicas (Guedes, 1997; Trentin et al., 1999; Oliveira, 2009; Tolardo et al., 2010). No intuito de buscar mais substâncias que poderão ter atividades farmacológicas significantes para tratar patologias no futuro, este estudo teve como foco encontrar e identificar outras substâncias ativas de *H. brasiliense*.

2. Revisão da Literatura

2.1 Plantas Medicinais.

Atualmente tem sido descrito que cerca de 39% de medicamentos no mercado se originaram de produtos naturais (Bade et al., 2010) e algumas substâncias foram obtidos de plantas medicinais.

Aproximadamente, 10.000 plantas do mundo têm sido documentadas para uso medicinal (McChesney et al., 2007) onde só 150 a 200 desses agentes são inseridos na medicina ocidental.

As plantas que tem acompanhado ser humano por milhares de anos até agora (Leonti, 2011; Gurib-Fakim, 2006), foram usadas como alimentos e para fins medicinais por vários povos ou etnias espalhados nos continentes como África, Ásia e América do Sul, baseando-se em crença e ciência e acerca de 65% a 80% da população em países em desenvolvimento façam uso destas (WHO, 2008).

Percebendo a grande riqueza das plantas medicinais, tem sido proposta a necessidade de despertar estudos multidisciplinares entre áreas como botânica, farmacologia e Fitoquímica (Maciel et al., 2002), um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos e a indústria farmacêutica vem investigando através de novas técnicas, como poderia desenvolver ou padronizar essas plantas como fitoterápicos (Calixto, 2005) com conhecimento científico que proporciona segurança, qualidade e eficácia.

2.2 Chloranthaceae

A família Chloranthaceae é uma das angiospermas mais primitivas que compreende ervas, arbustos e árvores aromáticas. Possui 75 espécies aproximadamente que são distribuídas em quatro gêneros principais: *Ascarina*, *Chloranthus*, *Sarcandra* e *Hedyosmum* e são encontrados em locais como Madagascar, Himalayas tropical, sul, leste e sudeste da Ásia, Nova Zelândia e América tropical (Souza; Lorenzi, 2005; Takhtajan, 1997; Metcalfe & Chalk, 1950). Alguns autores sugerem que esta família é uma das mais primitivas entre as Angiospermas, pois ocupam uma posição importante na separação filogenética entre mono e dicotiledôneas (Kong, 2001; Souza; Lorenzi, 2005). Algumas espécies (especialmente de *Chloranthus* e *Hedyosmum*) possuem uso ornamental, medicinal e alimentar (em bebidas) (Kawabata; Tahara; Mizutani, 1981).

Quimicamente, já foram encontrados em Chloranthaceae: terpenóides, flavonóides, cumarinas, ácidos orgânicos, amidas e esteróides. Entre os terpenóides, já foram relatados monoterpenos, sesquiterpenos, sesterpenos, diterpenos e triterpenos, sendo os sesquiterpenos os componentes mais expressivos. As lactonas sesquiterpênicas do tipo lindenanolídeo (seus dímeros e trímeros) tem sido consideradas por alguns autores os principais marcadores quimiotaxonômicos da família (Kawabata; Mizutani, 1988; Acebey et al., 2007; Cao et al., 2008).

2.3 Gênero *Hedyosmum*

Hedyosmum é o maior gênero da família Chloranthaceae, o único com ocorrência nas Américas, compreendendo 46 espécies essencialmente tropicais e subtropicais americanas (Souza; Lorenzi, 2005) com só duas espécies que ocorre no Brasil: *Hedyosmum brasiliense*, que é a mais comum e *Hedyosmum racemosum* a mais rara que apresenta-se apenas no extremo norte do Amazonas e ainda na região Andina (Souza, Lorenzi, 2008). O nome *Hedyosmum* deriva do grego (*hedy-osmos*) e significa “aquele que cheira doce”, em alusão ao aroma agradável das folhas (Reitz, 1965). Apresenta-se como unissexual e é o único na família Chloranthaceae que a sua flor feminina possui um perianto (Endress, 2008). Muito pouco tem sido publicado sobre este gênero, apesar do uso popular de suas espécies. Nestes poucos trabalhos, alguns mostraram o isolamento de substâncias como lactonas sesquiterpênicas (Acebey et al., 2010; SU et al., 2008; Bercion et al., 2005); lactonas sesterpênicas (Acebey et al., 2007) e flavonóides (Cárdenas et al., 1993) enquanto alguns mostraram a análise do óleo essencial (Lorenzo; Loayza; Dellacassa, 2003; Mundina et al., 2000). As atividades biológicas do gênero *Hedyosmum* registradas são atividade antileishmania (Acebey et al., 2010), atividade analgésica (Cárdenas et al., 1993), e as atividades antinociceptiva (Trentin et al., 1999), antimicrobiana (Kirchner et al., 2010) e antidepressiva (Tolardo et al., 2010) as três últimas para a espécie *Hedyosmum brasiliense*.

2.4 *Hedyosmum brasiliense*

H. brasiliense é uma espécie endêmica do Brasil, ocorre em áreas alagáveis de altitude, por quase todo o território, exceto Amazônia e região Nordeste. No estado de Santa Catarina, encontra-se nos municípios de Araquari, Brusque, Itajaí, Palhoça, São Francisco do sul, Antonio Carlos, entre outros (Reitz, 1965). A base de dados, Tropicos.org (2011) considera *H. brasiliense* como sinônimo de *Hedyosmum bonplandianum* Kunth entre outros e o nome aceito seria *Hedyosmum racemosum*. Já Souza e Lorenzi (2008) consideram que ocorre no Brasil duas espécies deste gênero sendo que: *Hedyosmum racemosum* é a mais rara que apresenta-se apenas no extremo norte do Amazonas e ainda na região Andina e *Hedyosmum brasiliense* é a mais comum (Souza, Lorenzi, 2008). Trata-se de uma planta sublenhosa, geralmente de pequeno porte, raramente ultrapassando os 3 metros de altura, com folhas bastante carnosas e com agradável perfume de cidreira, quando machucadas. Os indivíduos são unissexuados, tendo a distinção entre plantas estaminadas e pistiladas bastante simples (Figura 1).



Parte pistilada

Parte estaminada

Figura 1: *Hedyosmum brasiliense* Miq. (partes aéreas)

Fonte: foto do autor

Suas folhas são bastante carnosas, opostas simples, pinadas e com margens serradas, pecioladas, com estípulas livres no ápice e soldadas na base entre si com o pecíolo, formando uma bainha amplexicaule (Souza, Lorenzi, 2008; Zaniolo; Boeger; Negrelle, 2001).

É usado popularmente como calmante, antiinflamatório, e considerada útil para tratar frieiras, enxaquecas e doenças de ovário. É conhecido como “cidrão”, “cidreira”, “erva-cidreira”, “âmbar-vegetal”, “canela-

cânfora”, “chá ou erva-de-bugre”, “chá-de-indio”, “chá ou erva-de-soldado”, “erva-almíscar”, “hortelã-do-brejo” e “hortelã-silvestre” (Reitz, 1965). Este espécie é notada pela sua capacidade de se desenvolver em ambientes com pouca ou grande quantidade de água e isso é justificado por sua plasticidade para modificar algumas características morfo-anatômicas e fisiológicas em função do déficit hídrico (Machado, 2004).

Hedyosmum brasiliense vem sendo estudado desde 1992, porém só os estudos de Guedes (1997) e Oliveira (2009) levaram ao isolamento de substâncias (figura 2).

Ainda, poucos estudos farmacológicos são registrados, como da atividade antimicrobiana do óleo essencial que obteve ação significativa contra bactéria gram positivos e fungos (Kirchner et al., 2010), atividades ansiolítica, hipnótica e antidepressiva do extrato bruto e o seu isolado, lactona sesquiterpênica (**2**), em roedores (Tolardo et al., 2010) e a atividade antinociceptiva da lactona sesquiterpênica (**1**) (Trentin et al., 1999).

2.5 Lactonas Sesquiterpênicas (LS)

Lactonas sesquiterpênicas são substâncias da subfamília de terpenóides. Possuem 15 carbonos que consistem em três unidades de isopreno (C5) e um grupo lactona. Até então, há aproximadamente 1500 publicações sobre estes compostos, mostrando as suas propriedades anticâncer e antiinflamatório, sendo que 90% foram publicados desde 1990 (Ghantous et al., 2010).

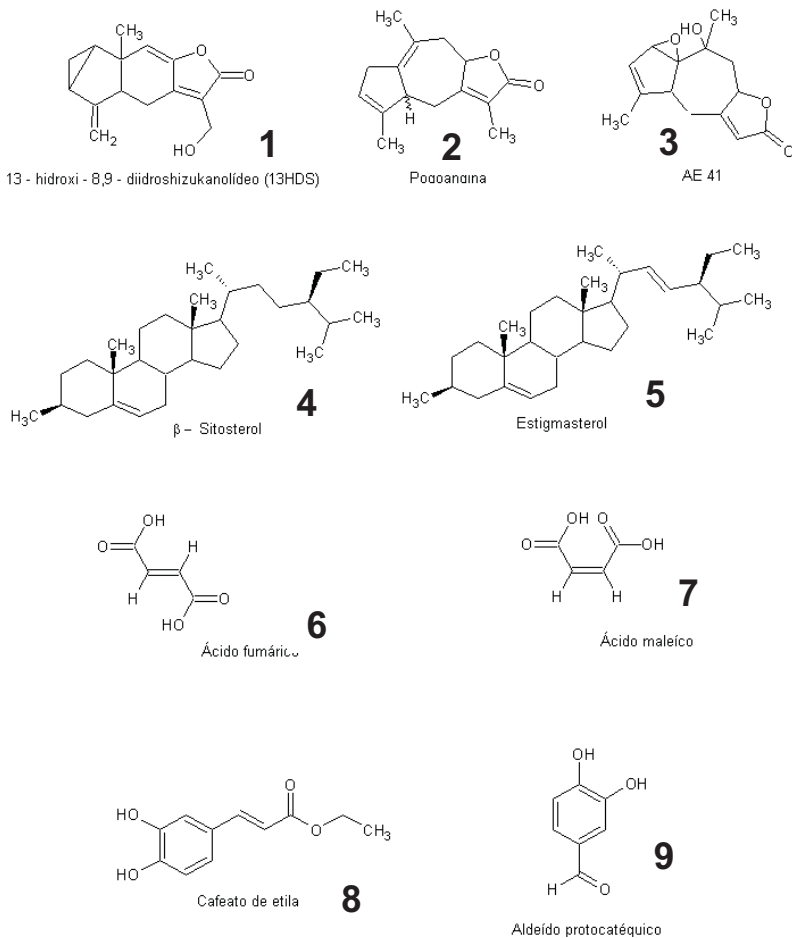


Figura 2. Substâncias isoladas por Guedes (1997) e Oliveira (2009)

As lactonas sesquiterpênicas podem ser classificadas pelos seus carboesqueletos. Há quase 100 tipos de carboesqueletos, porém a maioria das LS, cerca de (87%), se enquadram em só sete tipos de carboesqueletos conhecidos como germacranolídeos, elemanolídeos, eudesmanolídeos, eremofilanolídeos, guaianolídeos, xantanolídeos e pseudoguaianolídeos; biogeneticamente, o carboesqueleto de germacrano é o precursor dos demais. (Schmidt, 2006). A Figura 3

mostra os sete principais tipos de carboesqueletos. Entretanto, estudos sobre a família Chloranthaceae têm mostrado os lindenanos, outra classe de LS, como os principais marcadores químicos desta família (Kawabata; Mizutani, 1988). Guedes (1997) propôs uma rota biosintética para a formação deste tipo de LS e Bohlman descreve os lindenanos como eudesmanos modificados (Bohlman et al., 1980; Bohlman et al., 1981).

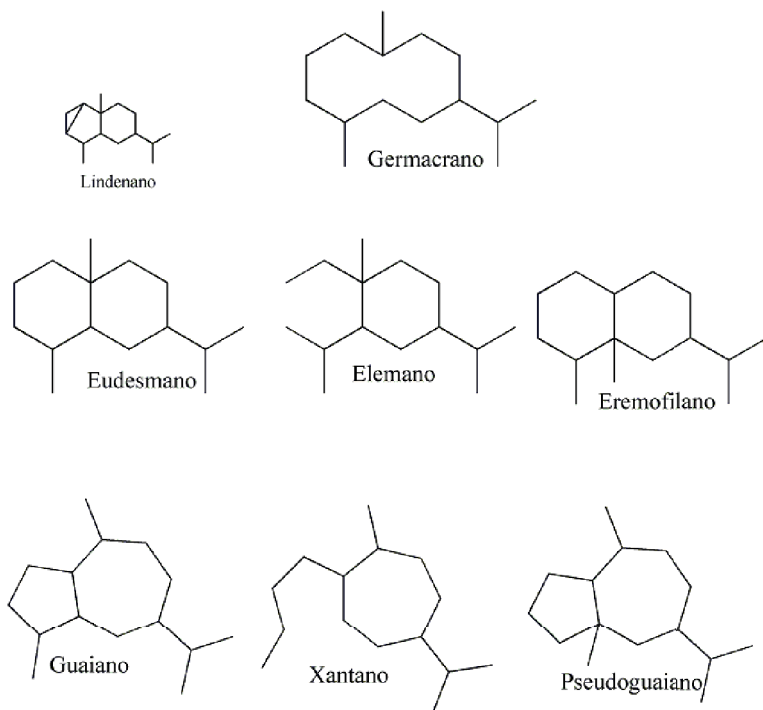


Figura 3. Sete principais tipos de carboesqueletos de lactonas sesquiterpênicas e o carboesqueleto lindenano.

Embora LS sejam metabólitos secundários característicos da Asteraceae, são conhecidas em outras Angiospermas, podendo ter atividades antioxidante, citotóxicas, antitumorgênicas, antibacteriana e antifúngica. (Repetto, Boveris, 2010; Khan et al., 2008; Dewick 2002; Picman, 1986). Estas substâncias têm propriedades químicas como reatividade do centro alquilante, lipofilicidade e caráter eletrônica e geometria molecular e estas propriedades são relacionadas às suas atividades biológicas. Entre as lactonas sesquiterpênicas que chegaram a testes

clínicos estão artemisimina, tapsigargina, partenolídeo e outros derivados sintéticos (Ghantous et al., 2010).

2.6 Compostos fenólicos

Fenólicos são compostos que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilas. São amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabólitos secundários mais abundantes das plantas, com mais de 8000 estruturas de compostos fenólicos. São geralmente envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por patógenos, parasitas e predadores. Além disso, contribuem para as cores das plantas (Dai, Mumper, 2010).

Estes metabólitos podem ser classificados em dois grupos: 1) compostos fenólicos amplamente distribuídos, como os derivados de ácidos benzoicos e de ácidos cinâmicos, cumarinas, flavonoides, e derivados de polimerização como taninos e ligninas e 2) compostos fenólicos de distribuição restrita como lignanas (Carvalho, Gosmann, Schenkel, 2000; Dai Mumper, 2010). Quanto a biogênese, os compostos fenólicos podem ser formados através de duas rotas biogênicas: pela via do ácido chiquímico ou pela via do acetato-polimalatos que inicia com acetil-coenzima A e malonil-coenzima A (Carvalho, Gosmann, Schenkel, 2001).

Estas substâncias contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos desses economicamente importantes pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas.

De acordo com a revisão de Dai e Mumper (2010), estas substâncias podem intervir em todos os estágios de desenvolvimento de câncer que dependem de mecanismos celulares básicos e um estudo extensivo é necessário para possível exploração farmacêutica na área de oncologia.

3. Objetivo

3.1 Objetivo Geral

Dar continuidade à investigação fitoquímica de *Hedyosmum brasiliense*, isolando as substâncias majoritárias para avaliação de atividade biológica e isolando metabólitos minoritárias para elucidação estrutural.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar metabólitos majoritários do extrato etanólico das folhas frescas de *Hedyosmum brasiliense* em quantidades suficientes para ensaios farmacológicos *in-vivo* no SNC.
- Isolar e caracterizar substâncias minoritárias do extrato etanólico através de técnicas espectroscópicas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM).
- Identificar os principais marcadores no extrato através de CLAE de fase reversa.

4. Metodologia

4.1 Coleta do Material vegetal e obtenção do extrato bruto

Hedyosmum brasiliense foi coletado no município de Antonio Carlos no Estado de Santa Catarina e identificado pelo Professor Dr. Ademir Reis do Centro de Ciências Biológicas e foi comparado com as exsiccatas depositadas no Herbário Lyman Bradford Smith (UNIVALI, Itajaí-SC), sob número 2031.

4.2 Obtenção do Extrato Etanólico e partição líquida:líquida

As folhas frescas (5 kg) obtidas foram trituradas em um liquidificador Metvisa LQ4, com etanol bidestilado e macerado por 15 dias. Após 15 dias de maceração, o extrato obtido foi filtrado e concentrado em rotavapor (HEIDOLPH Laborota 4000) até eliminação total do etanol. O etanol recuperado foi usado para re-maceração até esgotamento de extração. Obteve-se aproximadamente 210 g de extrato bruto (5% de rendimento). Uma alíquota do extrato concentrado foi armazenada para estudos de bioatividade. A atividade no SNC (atividade antidepressiva) foi avaliada por Professora Dra. Márcia Maria de Souza do núcleo de investigações químico-farmacêuticas (NQFAR) – UNIVALI, Itajaí. A atividade no sistema cardiovascular (vasodilatador) foi avaliada no laboratório do Professor Dr. José Eduardo da Silva Santos do departamento de Farmacologia – UFSC e a atividade antimicobacteriana foi avaliada no laboratório do Professor André Báfica – UFSC.

O restante (190 g) foi dissolvido em água para partição líquida – líquida e posteriormente à concentração no rotaevaporador, obteve-se as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e a fração aquosa foi liofilizada.

4.3 Fracionamento cromatográfico das Frações

Entre as frações obtidas conforme item 4.2 só as frações hexano e diclorometano foram submetidas à cromatografia em coluna *flash*

(CC). Utilizou-se sílica (230-400 mesh) como fase estacionária e como eluentes misturas binárias de hexano-acetato de etila ou acetona, ou trinária de hexano-diclorometano-acetona variando o tipo e a proporção de acordo com o perfil da fração em cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando placas de sílica Gel 60 F₂₅₄. Ultra-Violeta, anisaldeído sulfúrico, entre outros, foram usados como reveladores.

Para a purificação final de misturas pouco complexas contendo substâncias muito semelhantes quimicamente, foi utilizada cromatografia líquida de média pressão com coluna Lobar Si 60 (Merck) com eluentes isocráticos. Os eluentes com os componentes carreados foram recolhidos por gotejamento em frascos numerados seqüencialmente. Após análise do perfil cromatográfico através de CCD, foram reunidos os conteúdos com características semelhantes. Quando foi observada a presença de apenas uma mancha em CCD ou cristalização espontânea nos frascos, a amostra foi submetida à análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN), visando à identificação da substância. Com estes procedimentos foi possível isolar e identificar algumas substâncias contidas em só duas das frações do extrato bruto quais sejam: da fração hexano um fitosteroide HB 223, um monoglicerídeo HB 10 e cinco lactonas sesquiterpênicas H3, H5, H622, HB 212 e HL 33 sendo que as três últimas são novas propostas, da fração diclorometano uma mistura de ácidos graxos esterificados HB 15, três fenólicos: HB 23, HB 24 que foram identificados de D19 e HB 22, e mais duas lactonas sesquiterpênicas D 17 e HB 21 sendo que a última é uma nova proposta. Encontra-se na figura 4 um fluxograma sucinto dos procedimentos realizados.

4.4 Elucidação Estrutural

As substâncias isoladas foram submetidas a análises espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C e 2D em equipamento Bruker Avance 400 (400 MHz para hidrogênio e 100 MHz, carbono) do Departamento de Química, UFPR ou em equipamento Bruker modelo AC200 (300 MHz para Hidrogênio e 75 MHz Carbono) no laboratório de RMN (Bloco 17, UNIVALI). Os dados adquiridos (FID) foram processados pelo programa da ACD lab / MestRe-C.

Análises por espectrometria de massas foram realizadas em equipamento ultrOTOFQ –ESI-TOF Bruker Daltonics, Billerica, MA. (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, USP e em equipamento micrOTOF-Q II Centro de Estudos em Biofarmácia do Departamento de Farmácia da UFPR.

O ponto de fusão das substâncias foi obtido em equipamento MQRPF-301 do laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFSC.

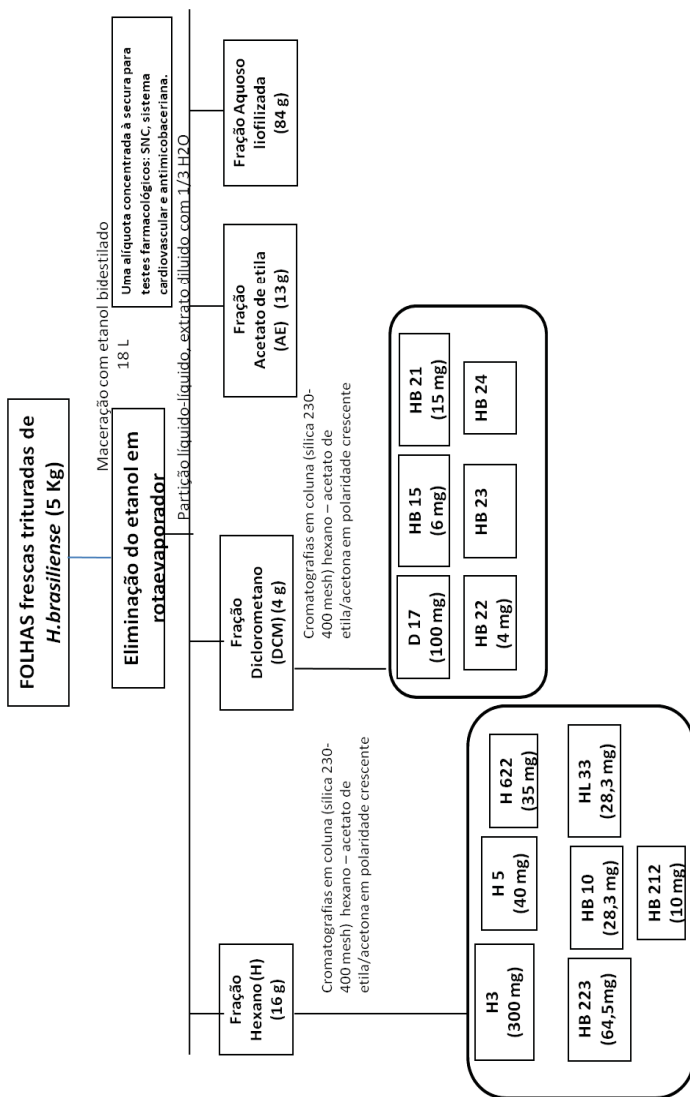


Figura 4. Fluxograma do fracionamento Fitoquímico de *Hedyosmum brasiliense*

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

Utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do laboratório de Farmacotécnica do Departamento de Ciências Farmacêuticas (CIF/CCS/UFSC) no Equipamento Perkin Elmer série 200. A análise do extrato etanólico e as substâncias isoladas foram em triplicata com fase móvel de gradiente (Quadro 1) em coluna C18 (Phenomenex synergi fusion 250 X 4,6 mm). A fase móvel usado foi Água (0,5% ácido Fórmico) : Acetonitrila. O volume de amostra injetado foi 20 µL. O tempo de análise foi 55 minutos com fluxo de 0,8 mL/min e detecção em 260 nm.

Quadro 1 Dados de Tempo de gradiente, Fluxo e solventes para análise em CLAE.

| Tempo (minutos) | Fluxo | Água (0,5% ácido fórmico) | Acetonitrila |
|-----------------|-------|---------------------------|--------------|
| 0,5 | 0,8 | 90 | 10 |
| 5 | 0,8 | 90 | 10 |
| 35 | 0,8 | 10 | 90 |
| 5 | 0,8 | 90 | 10 |
| 10 | 0,8 | 90 | 10 |

5. Resultados e Discussão

5.1 Obtenção do extrato etanólico e partição líquida-líquida

De cinco kilogramas das folhas frescas obteve-se aproximadamente 210 g de extrato bruto (5% de rendimento). Uma alíquota do extrato concentrado foi armazenada para estudos farmacológicos. Estudos farmacológicos foram feitos em parceria para avaliar atividades no sistema nervoso central (SNC), sistema cardiovascular e antimicobacteriana.

Dissolveu-se o restante (190 g) em água e através de partição líquida: líquida e subsequente a concentração no rotaevaporador, obteve-se 16 gramas de fração hexano, 4 gramas de fração diclorometano, 13 gramas de fração acetato de etila e 84 gramas de fração aquosa liofilizada.

5.2 Caracterização das substâncias isoladas

5.2.1 Fração *n*-Hexano

A fração *n*-hexano foi cromatografada em coluna com sílica gel CC (230-400 mesh) usando *n*-hexano e gradiente de polaridade com diclorometano (CH₂Cl₂) (0-70% CH₂Cl₂) e subsequente usando CH₂Cl₂ e gradiente de polaridade com acetato de etila (AcOEt) (0-70%). Assim, foram produzidas as sub-frações A, B, C, D, E, F, G, H. Cada sub-fração então foi cromatografada sobre sílica gel CC (230-400 mesh) e as suas misturas poucas complexas sob cromatografia líquida de média pressão com coluna Lobar Si 60 (Merck), com eluentes de gradiente de hexano-acetona ou acetato de etila. Da sub fração A substâncias HB 223 e HB212 foram isoladas. Pela recristalização da sub-fração B, H3 foi isolado. Da sub-fração C foi obtida H5. HL 33 foi obtido da sub-fração E e H622 e HB 10 foram isolados da sub-fração F. As substâncias isoladas foram elucidadas através de ressonância magnética nuclear (RMN) ¹H, ¹³C e 2D, pelo espectrometria de massas e em comparação com dados já publicados em literatura.

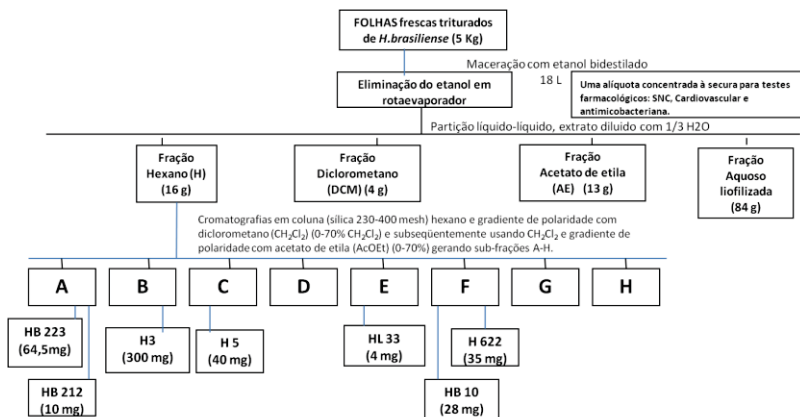


Figura 5 Etapas para isolamento das substâncias da fração *n*-hexano de *Hedyosmum brasiliense*.

5.2.1.1 Substância H3 (Podoandina)

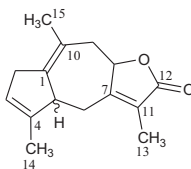
Apresentou-se como um sólido cristalino (PF=111 - 112°C) de coloração branca (300 mg). O seu espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de hidrogênio (Figura 6) apresentou um simpleto em δ 5,49 (1H) que corresponde o hidrogênio olefínico H-3. Os simpletos em 1,86 (3H) e 1,79 (6H) correspondem a metilas em carbono sp^2 . O sinal de duplete em 4,55 ppm ($J = 13,4$ Hz) se refere a um hidrogênio próximo a um grupo eletronegativo, neste caso oxigênio; atribuiu-se ao H-8. Na região de δ 2,62 um duplo-duplete com constantes de acoplamento 13,4 Hz e 3,7 Hz e um tripleto na região de δ 2,23 ($J = 12,5$ Hz) se refere aos H-9a e H-9b respectivamente.

O RMN de carbono (Figura 7) apresentou 15 sinais indicando um possível sesquiterpeno. Os sinais em δ 174,3 (carbonila); δ 163,5 (carbono β); δ 121,3 (carbono α) e δ 79,3 (carbono γ), são sinais típicos de γ -lactona α,β insaturada. Ainda apresentou sinais em δ 142,9; δ 140,7; δ 124,3; δ 122,7; que correspondem a carbonos olefínicos e assim indicando que há mais duas insaturações. Sua fórmula molecular é $C_{15}H_{18}O_2$. Os dados de RMN obtidos foram comparados com dados Kubo et al., (1992), Blay et al., (2000) e Oliveira, (2009) e são mostrados no Quadro 2.

Quadro 2 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C da lactona H3 (Podoandina) (300 MHz e 75 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura.

| POSIÇÃO | ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz) H3 | ^{13}C (ppm) H3 | Kubo et al., 1992 (500 e 125 MHz, CDCl_3) <i>J</i> (Hz) | | Blay et al., 2000 (400 e 100 MHz, CDCl_3) <i>J</i> (Hz) | |
|---------|--|--------------------------|---|-----------------------|--|-----------------------|
| | | | ^1H (ppm), ^{13}C (ppm) | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm), ^{13}C (ppm) | ^{13}C (ppm) |
| 1 | | 142,9 | | 143,2 | | 142,9 |
| 2 | a | 31,3 | α 1,78 <i>dd</i> (13,2; 1,5) β 2,97 <i>d</i> (13,2) | 31,5 | 1,90-1,70 (1H <i>m</i>) 3,10-2,90 (3H, <i>m</i>) | 31,2 |
| 3 | 5,49 <i>s</i> | 124,3 | 5,49 <i>dl</i> (1,5) | 124,5 | 5,49 (1H, <i>br s</i>) | 124,2 |
| 4 | | 140,7 | | 143,1 | | 140,6 |
| 5 | 2,90 <i>d</i> | 49,6 | 2,81 <i>dl</i> (12,2) | 50,0 | 2,87 (1H, <i>br d</i> , <i>J</i> 11,6) | 49,6 |
| 6 | 3,02 <i>m</i> a | 36,8 | 2,90 <i>m</i> 2,97 | 37,2 | 3,10-2,90 (3H, <i>m</i>) | 36,8 |
| 7 | | 163,5 | | 163,6 | | 163,5 |
| 8 | 4,55 <i>d</i> (13,4) | 79,3 | 4,54 <i>dl</i> (11,7) | 79,4 | 4,55 (1H, <i>br d</i> , <i>J</i> 12,0) | 79,3 |
| 9 | 2,23 <i>t</i> (12,5) 2,62 <i>dd</i> (13,4; 3,7) | 39,3 | α 2,18 <i>dd</i> (12,7; 11,7) β 2,55 <i>dl</i> (12,7) | 39,7 | 2,23 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> 12,8) 2,62 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> 3,6; 12,8) | 39,6 |
| 10 | | 122,7 | | 122,9 | | 122,7 |
| 11 | | 121,3 | | 121,6 | | 121,3 |
| 12 | | 174,3 | | 174,1 | | 174,3 |
| 13 | 1,86 <i>s</i> 3H | 8,3 | 1,81 <i>sl</i> | 8,3 | 1,84 3H <i>br s</i> | 8,2 |
| 14 | 1,79 <i>sl</i> 3H | 21,9 | 1,65 <i>sl</i> | 21,9 | 1,78 3H, <i>br s</i> | 21,9 |
| 15 | 1,79 <i>sl</i> 3H | 14,9 | 1,75 <i>sl</i> | 15,0 | 1,78 3H, <i>br s</i> | 14,9 |

^a – Sinais sobrepostos.



5.2.1.2 Substância H5 (13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo, 13HDS)

Apresentou-se como um sólido cristalino (PF=97 – 98°C) de coloração branca. O seu espectro de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de próton (Figura 8) apresentou um simpleto em δ 6,42 que corresponde a H-9. Os simpletos largos em δ 5,07 e δ 4,80 são hidrogênios em sp^2 que correspondem a H-15a e H-15b respectivamente. Já o simpleto em 0,82 ppm (3H) (Figura 8a) representa hidrogênios em sp^3 . O sinal em δ 4,48 (2H) representa possíveis hidrogênios próximos a oxigênio e correspondem a H-13a e H-13b. Os sinais de duplo-duplete em δ 2,93 e multiplete em δ 2,38 representam H-6a e H-6b respectivamente. O sinal de duplo-duplo-duplete em δ 1,68 (Figura 8a) corresponde H-1.

O RMN de carbono apresentou 15 sinais (Figura 9) indicando outro possível sesquiterpeno. Os sinais em δ 170,2 (carbonila); δ 150,1 (carbono β) e δ 124,3 (carbono α) são sinais típicos de γ -lactona α , β insaturada. Além disso, apresentou sinais em δ 149,6; δ 149,4; δ 122,9 e δ 106,9 que são carbonos que representam mais duas insaturações. Os dados de RMN obtidos foram comparados com os dados de Trentin et al., (1999) e Oliveira (2009) (Quadro 3) que confirmou a substância H5 como 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo.

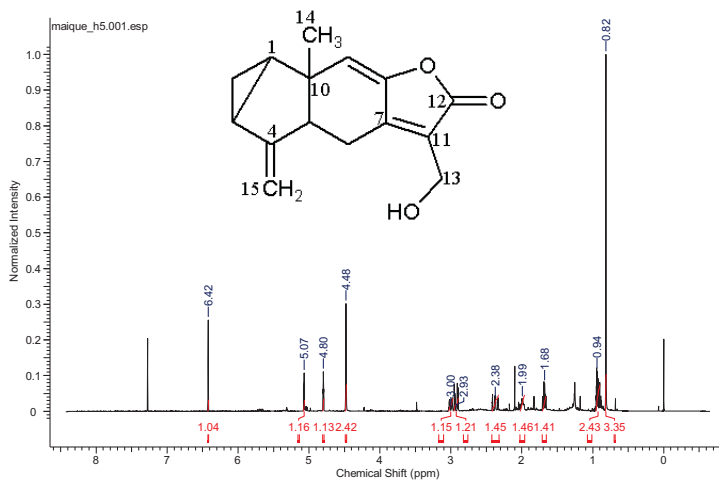


Figura 8 – Espectro de RMN de ^1H de H5 (13HDS) (400 MHz, CDCl_3).

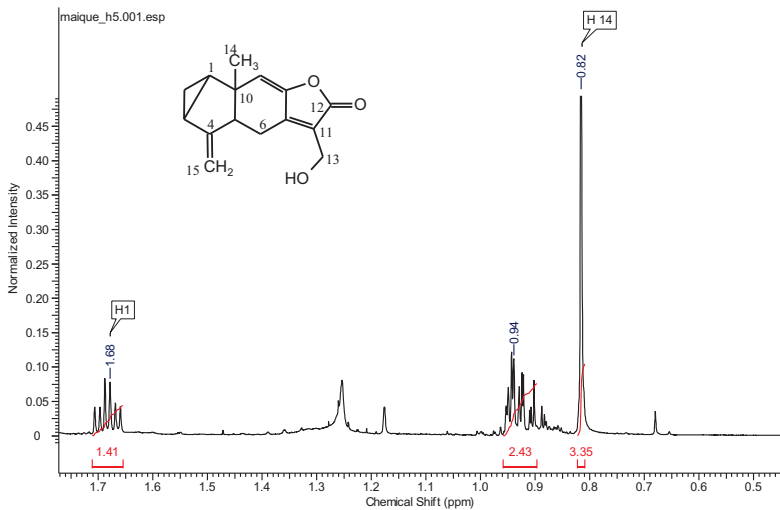


Figura 8a – Espectro de RMN de ^1H de H 5 (13HDS) ampliado na região de δ 1,68 a δ 0,82.

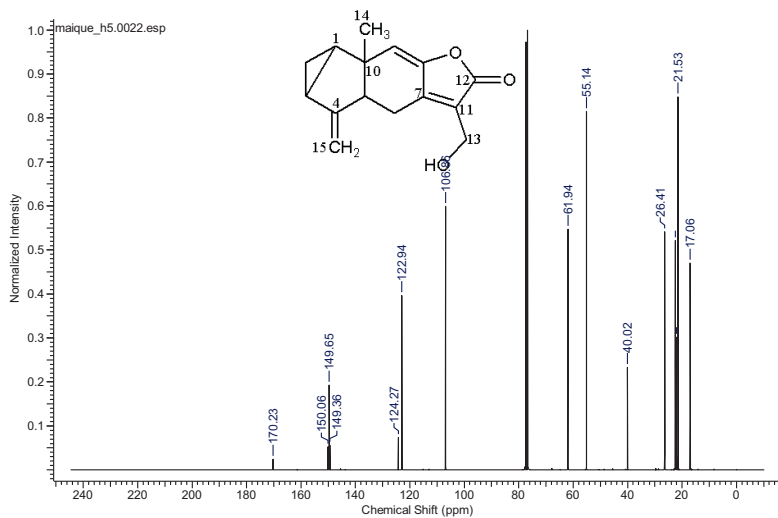
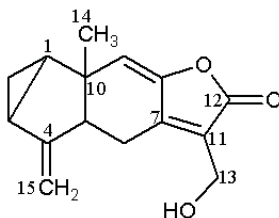


Figura 9 – Espectro de RMN ^{13}C de H 5 (13HDS) (100 MHz, CDCl_3).

Quadro 3 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C da lactona H5 (13HDS)
(400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura.

| Posição | H 5 ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz) | H 5 ^{13}C (ppm) | 13 HDS ^1H (ppm), <i>J</i> (Hz) (OLIVEIRA, 2009; 300 MHz, CDCl_3) | 13HDS ^{13}C (ppm) (TRENTIN et al., 1999, 50 MHz, CDCl_3) |
|---------|---|---------------------------------|--|--|
| 1 | 1,68 <i>ddd</i> (3,9; 3,8; 3,7) | 26,4 | 1,68 <i>ddd</i> (4,2; 3,6; 3,9) | 26,4 |
| 2 | 0,94 <i>m</i> | 17,1 | 0,93 <i>m</i> | 17,0 |
| 3 | 1,99 <i>m</i> | 22,4 | 1,98 <i>m</i> | 22,4 |
| 4 | | 149,6 | | 149,6 |
| 5 | 3,00 <i>m</i> | 61,9 | 3,01 <i>m</i> | 61,9 |
| 6 | 2,93 <i>dd</i> (3,74; 17,1) 2,38 <i>m</i> | 21,5 | 2,92 <i>d</i> (3,5) 2,38 <i>dd</i> (17,7; 14,1) | 21,5 |
| 7 | | 150,1 | | 150,4 |
| 8 | | 149,3 | | 149,3 |
| 9 | 6,42 <i>s</i> | 122,9 | 6,42 <i>s</i> | 123,0 |
| 10 | | 40,0 | | 40,0 |
| 11 | | 124,2 | | 124,3 |
| 12 | | 170,2 | | 170,4 |
| 13 | 4,48 <i>s</i> | 55,1 | 4,48 <i>s</i> | 54,9 |
| 14 | 0,82 <i>s</i> | 22,1 | 0,82 <i>s</i> | 22,0 |
| 15 | 5,07 <i>s</i> ; 4,80 <i>s</i> | 106,9 | 5,07 <i>s</i> ; 4,80 <i>s</i> | 106,9 |



5.2.1.3 Substância HB 223 (β -sitosterol)

O espectro de RMN de hidrogênio (Figura 10) apresentou um sinal em δ 5,35, simpleto (1H) que é um sinal típico de hidrogênio em sp^2 atribuído a hidrogênio ligado a C-6. O sinal em 3,53 ppm (1H), um multiplete representa o hidrogênio ligado ao carbono carbinólico C-3. O espectro de carbono (Figura 11) apresentou 29 sinais nas quais apareceram sinais em δ 140,8 e δ 121,7 que correspondem aos carbonos olefínicos C-5 e C-6 respectivamente. O sinal em δ 71,8 corresponde a carbono ligado a um oxigênio, neste caso C-3. Os dados de RMN obtidos foram comparados com Zhang et al., (2005). (Quadro 4).

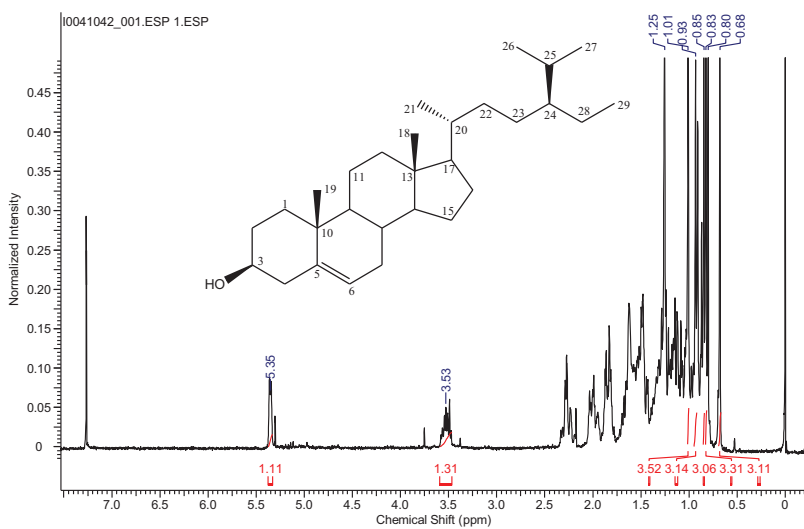


Figura 10 – Espectro de RMN de ^1H da substância HB 223 (sitosterol) (300 MHz, CDCl_3).

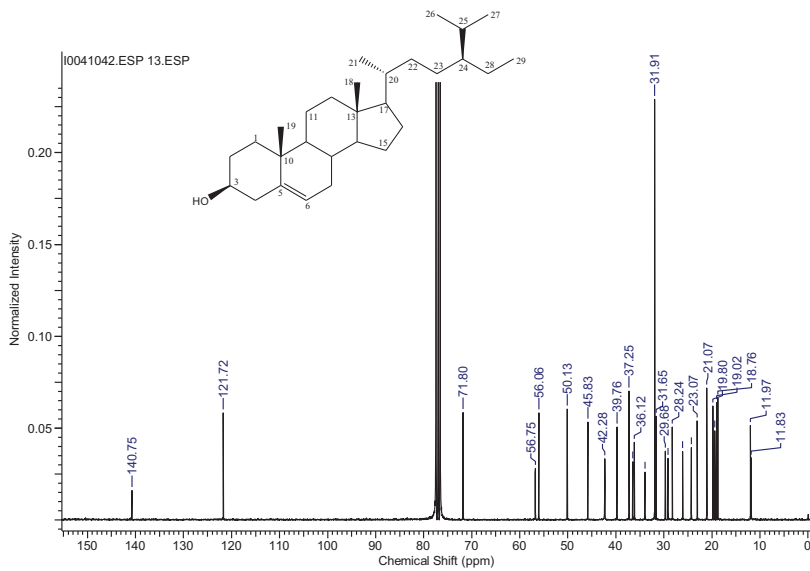


Figura 11 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância HB 223 (β -sitosterol)(75 MHz, CDCl_3).

Quadro 4 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de HB 223 (β -Sitosterol) (300 MHz e 75 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura.

| Posição | HB 223 | | β – Sitosterol (ZHANG et al., 2005 75 e 300 MHz $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) | |
|---------|-----------------|-------------------------|--|-------------------------|
| | ^{13}C | ^1H | ^{13}C | ^1H |
| 01 | 37,3 | | 37,3 | |
| 02 | 31,7 | | 31,6 | |
| 03 | 71,8 | 3,53 (1H, <i>m</i>) | 71,8 | 3,51 (1H, <i>m</i>) |
| 04 | 42,3 | | 42,3 | |
| 05 | 140,8 | | 140,8 | |
| 06 | 121,7 | 5,35 (1H, <i>br d</i>) | 121,7 | 5,34 (1H, <i>br d</i>) |
| 07 | 31,9 | | 32,1 | |
| 08 | 31,9 | | 32,1 | |
| 09 | 50,1 | | 50,2 | |
| 10 | 36,5 | | 36,5 | |
| 11 | 21,1 | | 21,1 | |
| 12 | 39,8 | | 39,8 | |
| 13 | 42,3 | | 42,3 | |
| 14 | 56,8 | | 56,8 | |
| 15 | 24,3 | | 24,3 | |
| 16 | 28,2 | | 28,3 | |
| 17 | 56,1 | | 56,1 | |
| 18 | 12,0 | 0,68 | 12,0 | 0,68 (3H, <i>s</i>) |
| 19 | 19,4 | 1,01 (3H, <i>s</i>) | 19,1 | 1,00 (3H, <i>s</i>) |
| 20 | 36,1 | | 36,2 | |
| 21 | 18,8 | 0,93 (3H, <i>d</i>) | 18,8 | 0,92 (3H, <i>d</i>) |
| 22 | 34,0 | | 34,0 | |
| 23 | 26,1 | | 26,2 | |
| 24 | 45,8 | | 45,2 | |
| 25 | 29,2 | | 29,2 | |
| 26 | 19,8 | 0,83 | 18,9 | 0,83 (3H, <i>d</i>) |
| 27 | 19,0 | 0,80 | 19,1 | 0,80 (3H, <i>d</i>) |
| 28 | 23,1 | | 23,1 | |
| 29 | 11,8 | | 11,9 | |

5.2.1.4 Substância Hb 10 (Monoglicerídeo de Ácido Esteárico)

O espectro de RMN de hidrogênio (Figura 12) apresentou um duplo-duplete em δ 4,13 (4,6; 11,2 Hz) (1H) que corresponde ao hidrogênio próximo a um oxigênio que se acopla com um hidrogênio (duplo-duplete) em δ 4,05 (6,3; 11,2 Hz) (1H) que então indica uma proximidade a oxigênio. Ainda apresentou um duplo-duplete em 3,82 ppm (1H) ($J= 5,2; 11,2$) e um triplete em 3,75 ppm (1H) ($J= 5,9$) (Figura 12a) que poderiam representar também hidrogênios próximos a outros oxigênios. O espectro apresentou também um simpleto alargado em δ 1,29 (28H) que corresponde um sinal típico de uma cadeia longa de metilenos (envelope de metilenos), indicando 14 carbonos. Ainda apresentou um triplete ($J = 7,2$ Hz) em 0,88 ppm (3H), um sinal típico de uma metila terminal de uma cadeia longa.

O espectro de RMN de carbono (Figura 13) apresentou sinais em δ 173,8 (carbonila) e δ 70,8; δ 66,2; δ 64,1 que correspondem aos carbonos carbinólicos. O quadro 5 elucida melhor os sinais de ^1H e ^{13}C . Com a correlação HMQC e a HMBC encontradas nas figuras 14 e 15 respectivamente foi possível observar e identificar os carbonos e hidrogênios com as suas vizinhanças (tabela 5) e conseqüentemente as suas posições dentro da estrutura química.

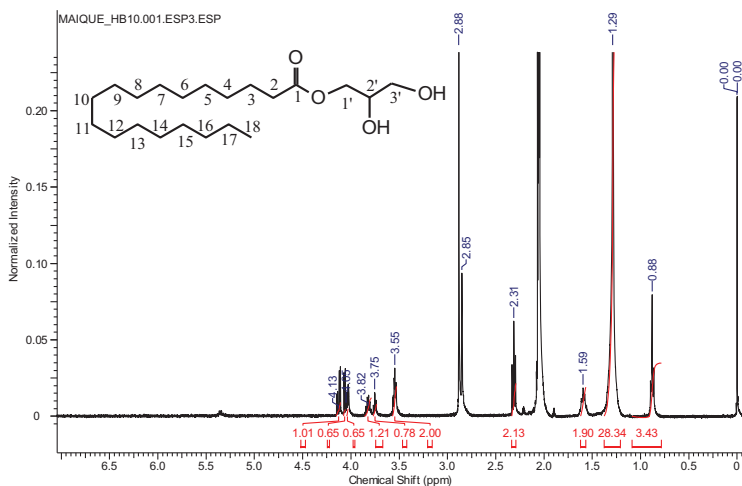


Figura 12 – Espectro de RMN de ^1H da substância HB 10 (Monoglicerídeo de ácido esteárico) (400 MHz, CD_3COCD_3).

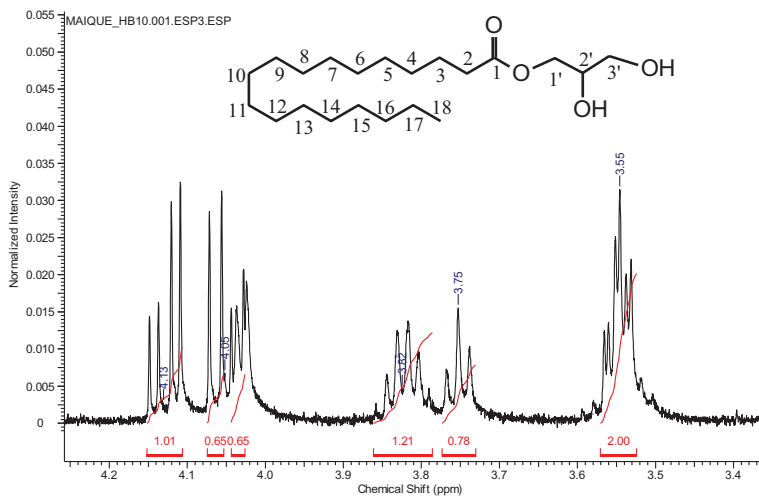


Figura 12a – Espectro de RMN ^1H , ampliado na região de 4,20 ppm a 3,50 ppm.

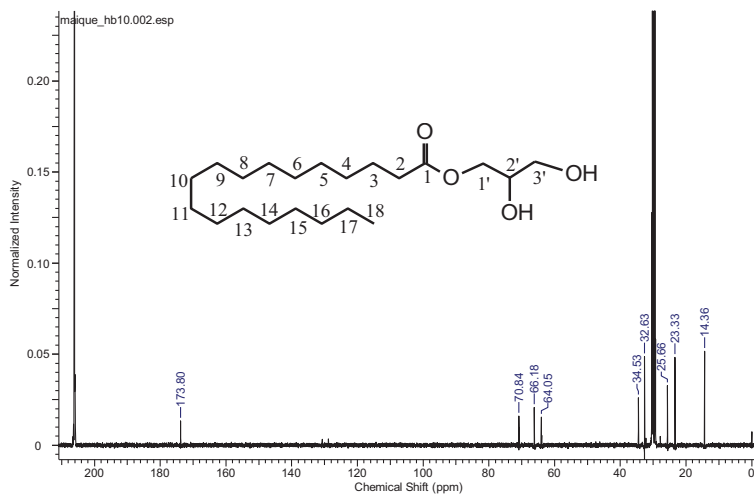
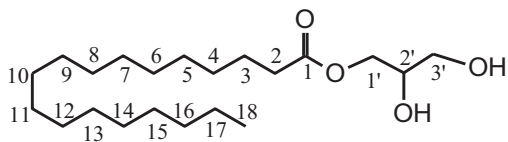


Figura 13 – Espectro de RMN de ^{13}C da substância HB 10 (Monoglicerídeo de Ácido Esteárico) (100 MHz, CD_3COCD_3).

Quadro 5 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C e HMBC de HB 10 (400 MHz e 100 MHz, CD_3COCD_3)

| POSIÇÃO | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) | Correlação HMBC |
|---------|--|-----------------------|-------------------------|
| 1 | | 173,7 | |
| 2 | 2,31 <i>t</i> (2H) (7,52) | 34,7 | 24,8; 25,7; 30,2; 173,7 |
| 3 | 1,59 <i>m</i> (2H) | 25,7 | 30,2 |
| 4-17 | 1,29 <i>s</i> (28H) | 29,6 | 30,3 |
| 18 | 0,88 <i>t</i> (3H) (7,2) | 14,4 | 23,5; 32,7 |
| 1' | 4,13 <i>dd</i> (4,6; 11,2) 4,05 <i>dd</i> (6,3; 11,2) | 66,2 | 64,0; 70,8; 173,7. |
| 2' | 3,55 <i>ddd</i> (2,1; 2,2; 2,4) | 64,0 | |
| 3' | 3,82 <i>dd</i> (5,2; 11,2) 3,75 <i>t</i> (5,9) | 70,8 | |



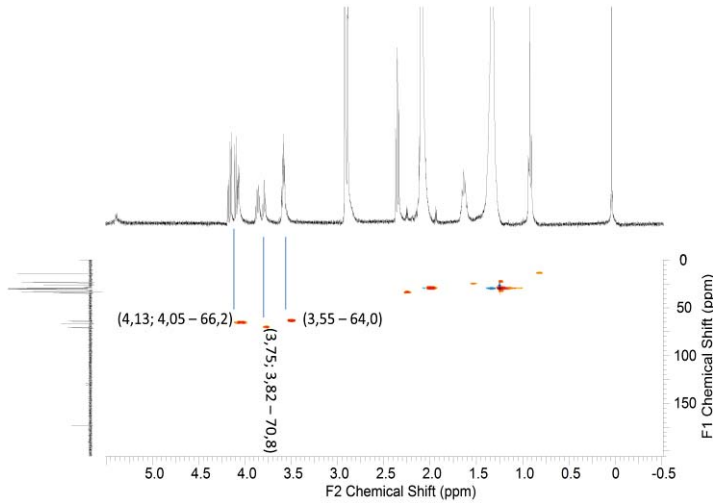


Figura 14 Mapa de Correlação de HMQC de HB 10.

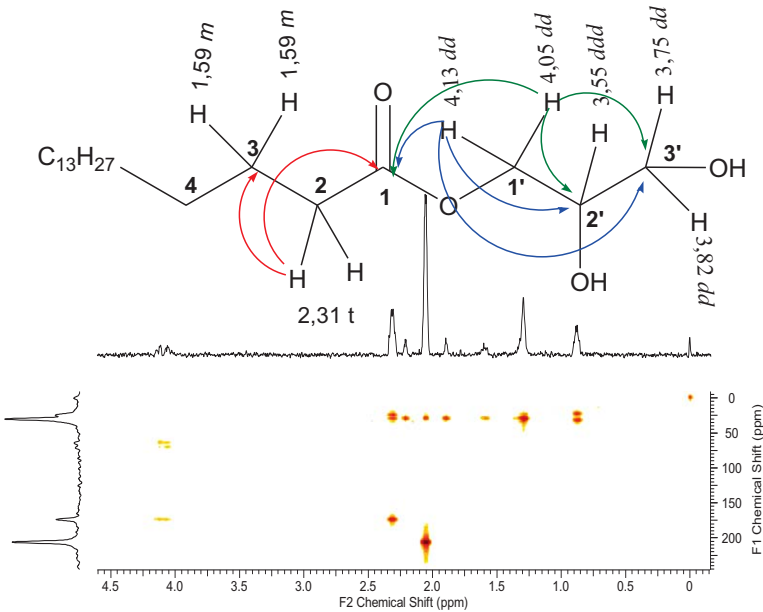


Figura 15 – Mapa de correlação HMBC do HB 10.

Através da análise dos espectros foi proposta a substância HB 10 como Monoglicerídeo de ácido esteárico, também conhecido como estearato de 2,3-dihidropropila.

5.2.1.5 Substância H622 (15-acetil-isogermafurenolídeo)

A substância H622 foi obtida como um líquido viscoso amarelo. Seu espectro de hidrogênio (Figura 16) apresentou um sinal em δ 5,32 (1H; 1,3 Hz e 1,3 Hz) e um simpleto largo em δ 5,05 (1H) (Figura 16a) que correspondem a H-3a e H-3b respectivamente. Apresentou ainda um simpleto em δ 1,18 (3H) e o outro em δ 2,1 (3H) (Figura 16b) indicando a presença de metilas terciárias. Além disso, apresentou um simpleto mais desblindado em δ 4,48 (2H) (Figura 16a) que indica hidrogênios próximos a um oxigênio. Em 5,05 ppm duplo-duplete (1H; 0,5 Hz e 10,7 Hz), e em 5,01 ppm duplo-duplete (1H; 0,5 Hz e 17,4 Hz) (Figura 16c) representam H-2a e H-2b respectivamente. Além disso, apresentou um duplo-duplete em 5,69 ppm (1H; 10,7, 17,4 Hz) (Figura 16a) indicando um hidrogênio ligado a um carbono sp^2 atribuído a H-1. O espectro ainda apresentou um multipletto em δ 4,85 (Figura 16a) que corresponde um hidrogênio provavelmente próximo a um grupo eletronegativo neste caso podendo ser oxigênio.

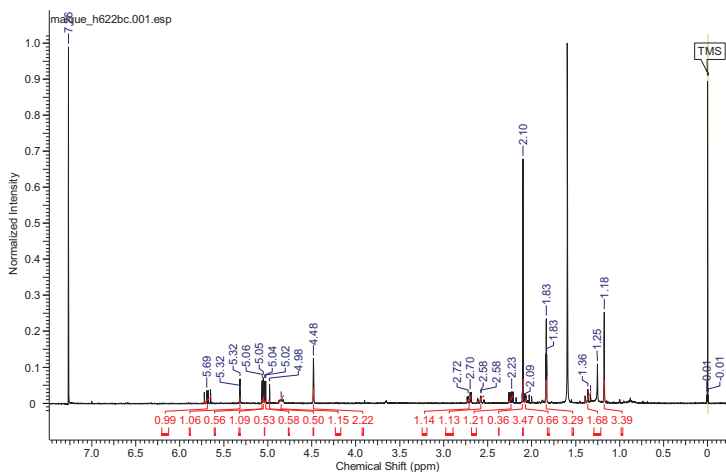


Figura 16 – Espectro de RMN de ^1H da substância H622 (400 MHz, CDCl_3).

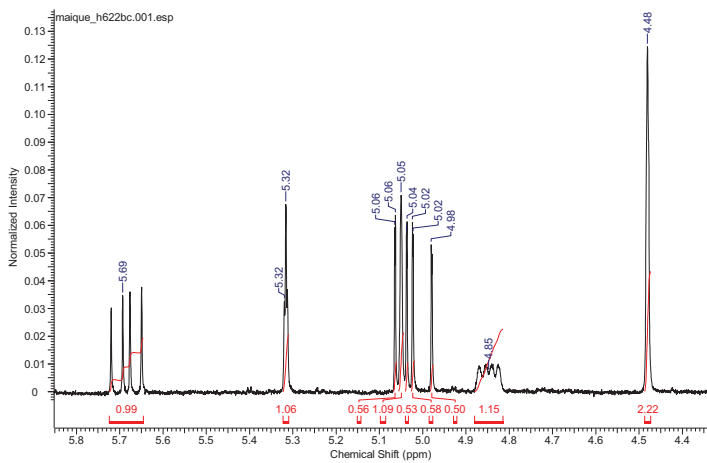


Figura 16a – Espectro de RMN ¹H da substância H622 ampliada na região δ5,8 a δ4,4.

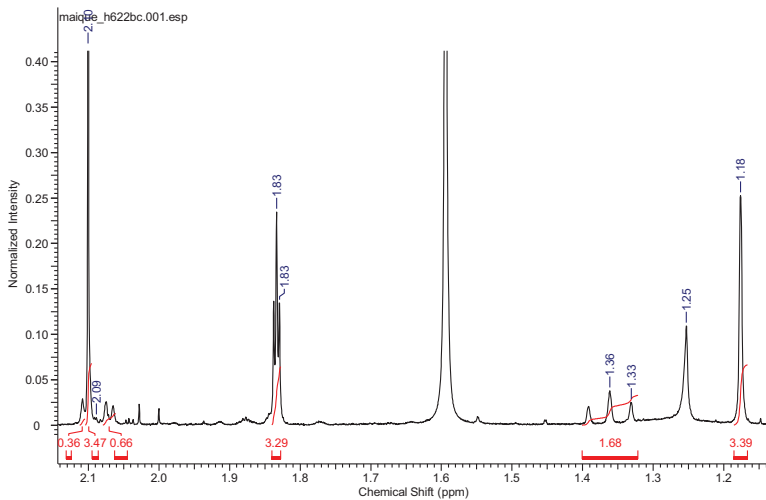


Figura 16b – Espectro de RMN ¹H da substância H622 (400 MHz, CDCl₃).

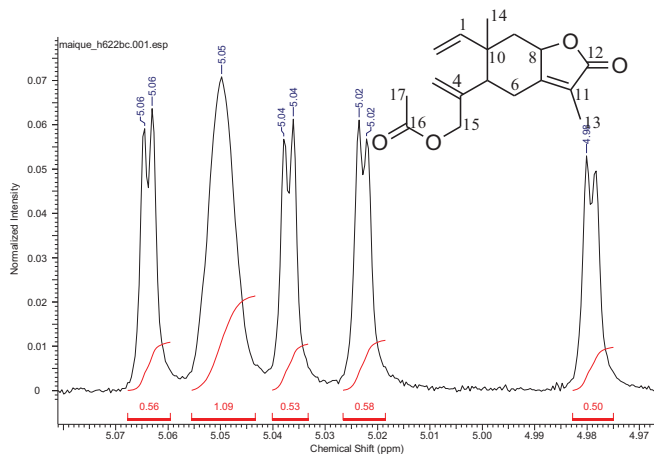


Figura 16c – Espectro de RMN ^1H da substância H622, ampliado na região δ 5,08 a δ 4,95.

Foi possível identificar 15 carbonos sendo que 13 foram observados no espectro de Carbono (Figura 17) e os outros dois (δ 175,1/ C-12 e em δ 171,0/ C-16) no HMBC (Figura 18a).

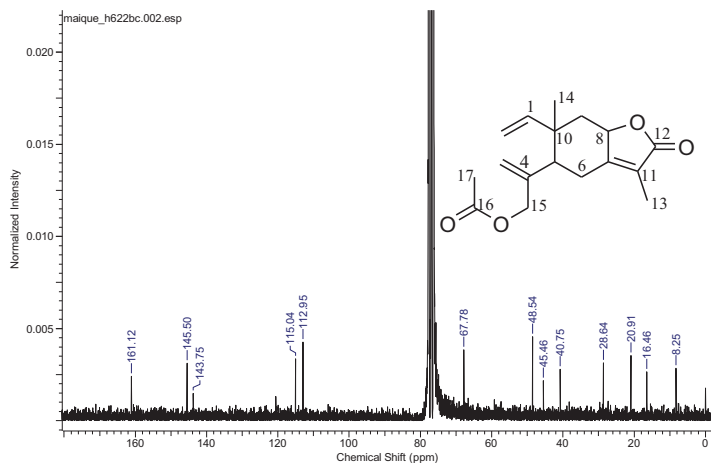


Figura 17 – Espectro de RMN ^{13}C da substância H622 (100 MHz, CDCl_3).

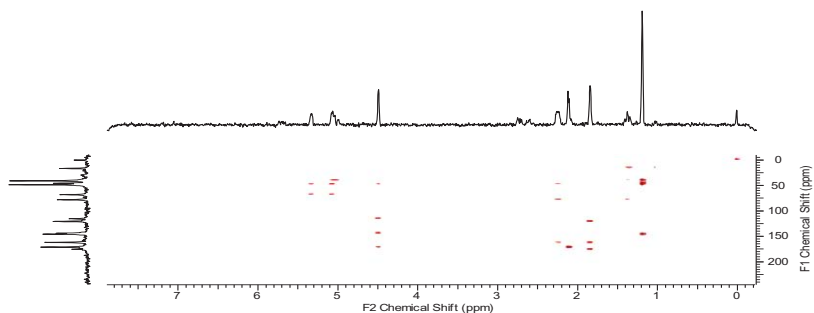


Figura 18- Mapa de correlação HMBC do H622 ampliado.

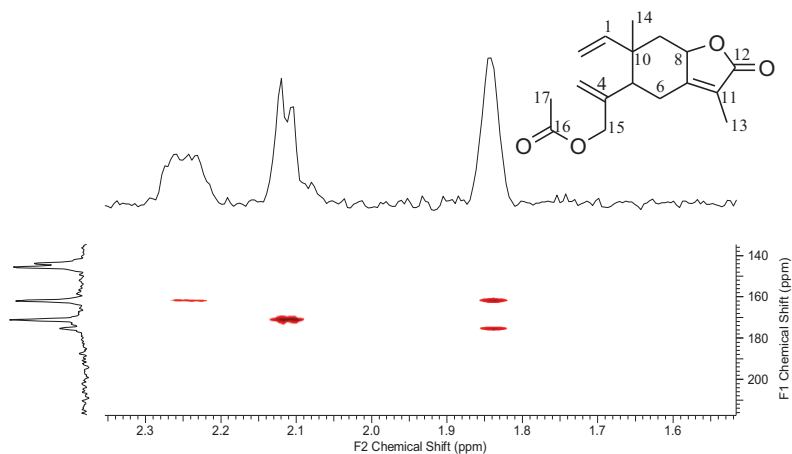


Figura 18a - Mapa de correlação HMBC do H622 ampliado mostrando carbonos δ 175 e δ 171.

Por isso a estrutura de sesquiterpeno foi proposta. Os espectros então indicaram sinais típicos de γ -lactona, α , β , insaturada, sendo, δ 175,1 (C=O); δ 120,4 (α -C) e 161,8 (β -C). Ainda apresentou carbonos em δ 145,7; δ 143,6; δ 113,1 e δ 115,3 indicando carbonos em sp^2 e assim, mais duas insaturações.

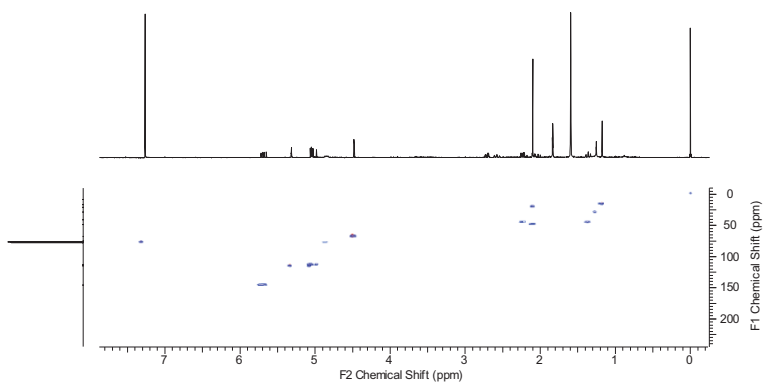


Figura 19 – Mapa de correlação HMQC do H622 ampliado

Com todos estes dados a substância H622 então foi elucidada como Isogermafurenolídeo-15-acetato ou 15-acetil-isogermafurenolídeo, um elemanolídeo.

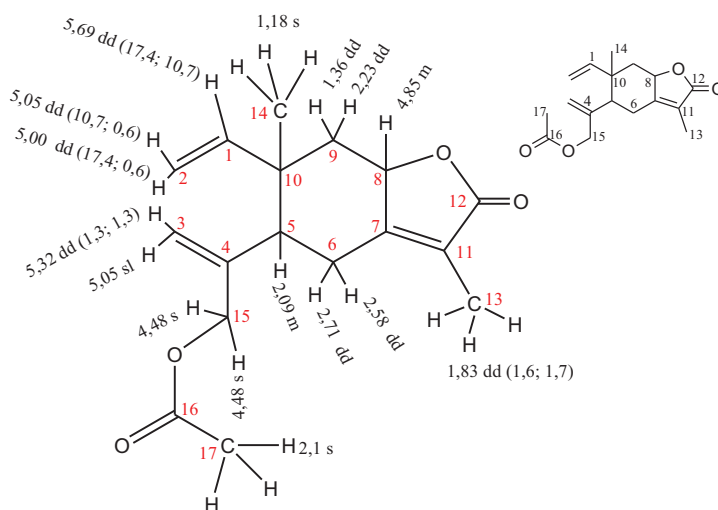


Figura 20. Estrutura de 15-acetilisogermafurenolídeo (H622).

Pela espectrometria de massas (HR-MS modo positivo), (Figura 21) obteve-se a massa do íon molecular como 291,1516 $[M+H]^+$. ESI(+)- MS/MS mostrou íons filhos em m/z 273, 213, 185, 157 e 143 podendo ser as perdas de água (H_2O), dióxido de carbono (COO), monóxido de carbono (CO), eteno (C_2H_4), e metileno (CH_2). Estes fragmentos são compatíveis com a estrutura proposta.

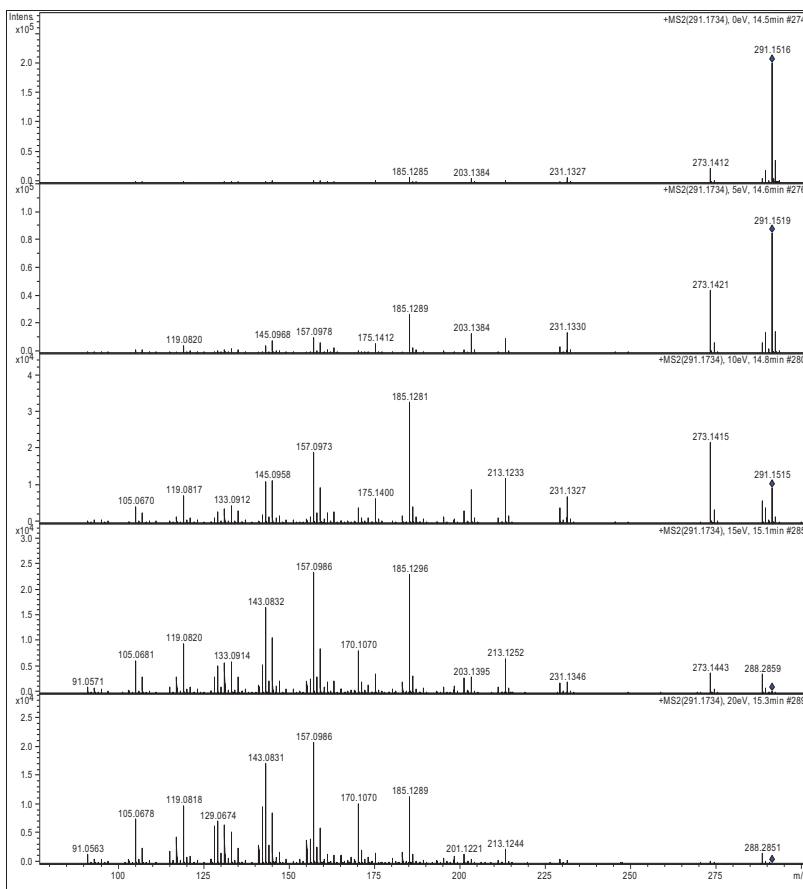


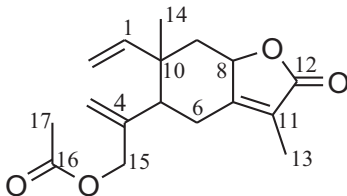
Figura 21 – Espectro de Massas de alta resolução H622 (Modo Positivo) full scan.

A configuração relativa do H622 foi estabelecida baseada nos experimentos de RMN de NOE 1D. A irradiação seletiva no sinal de

hidrogênio em δ 1,18 (3H) (H-14) causou uma alteração nos sinais em 5,00 ppm (H-2a), 5,05 ppm (H-3a), 4,85 ppm (H-8), 2,23 ppm (H-9) e 2.58 ppm (H-6). Isso então permitiu propor a configuração relativa de H622.

Quadro 6 Dados de RMN ^1H e ^{13}C E 2D da lactona H622

| POSIÇÃO | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) | Correlação HMBC |
|---------|--|-----------------------|-----------------------------------|
| 1 | 5,69 <i>dd</i> (10,7, 17,4) | 145,7 | 14, 10, 5. |
| 2 | 5,05 <i>dd</i> (0,5; 10,7) 5,00 <i>dd</i> (0,5; 17,4) | 113,1 | 10, 5. |
| 3 | 5,32 <i>dd</i> (1,3; 1,3) 5,05 <i>sl</i> | 115,3 | 5, 15, 4. |
| 4 | | 143,6 | |
| 5 | 2,09 <i>m</i> | 48,6 | 6, 10, 15, 4, 16 |
| 6 | 2,71 <i>dd</i> (4,24, 14,52) 2,58 <i>dd</i> (14,52) | 28,9 | 10, 5, 8, 11, 7. 5, 11 7 |
| 7 | | 161,8 | |
| 8 | 4,85 <i>m</i> | 78,0 | |
| 9 | 2,23 <i>dd</i> (6,03, 12,33) 1,36 <i>dd</i> (12,16) | 45,6 | 14, 10, 5, 8, 7. 14, 10, 8, 1. |
| 10 | | 40,7 | |
| 11 | | 120,4 | |
| 12 | | 175,1 | |
| 13 | 1,83 <i>dd</i> 3H (1,6; 1,7) | 8,2 | 11, 7, 12. |
| 14 | 1,18 <i>s</i> 3H | 16,6 | 10, 9, 5, 1. |
| 15 | 4,48 <i>s</i> 2H | 68,0 | 5, 3, 4, 16. |
| 16 | | 171,0 | |
| 17 | 2,1 <i>s</i> 3H | 20,9 | 16 |



Foi relatado o isolamento de Isogermafurenolídeo, o núcleo de H622 de outras espécies como *Chloranthus spicatus* (Tesso et al., 2006) e *Lindera strychnifolia* (Takeda, Horibe, Minato, 1968). Dois elemanolídeos que foram isolados da *Vernonia lasiopus* tiveram atividades citotóxicas contra linhagens de células cancerígenas humanas *in-vitro* (Koul et al., 2003) e Friedrich e Bohlmann (1988) sintetizaram vários elemanolídeos partindo de uma cicloexanona.

5.2.1.6 Substância HB212 (1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina)

A substância HB212 foi obtida como um pó branco com ponto de fusão 133 °C - 135 °C. O seu espectro de hidrogênio (Figura 22) apresentou um singleto em δ 5,47 (1H) (Figura 22a) que indica um hidrogênio ligado a carbono sp^2 . Ainda, apresentou dois simpletos largos em δ 5,29 (1H) e em δ 5,39 (1H) que correspondem a H-15a e H-15b respectivamente. Em δ 2,28, o espectro apresentou um duplete ($J=11,9$ Hz) (Figura 22b) que corresponde a H-5. Apresentou também um duplo-duplete em δ 4,65 ($J= 11,6; 4,8$ Hz) (Figura 22a) que pode representar um hidrogênio próximo a um oxigênio. Em 1,76 ppm (1H) e 2,65 ppm (1H) (Figura 22b) apresentaram-se um multiplete e duplo-duplete ($J=13,7; 1,6$ Hz) que correspondem H-6a e H-6b respectivamente. O espectro ainda apresentou sinais em 2,40 ppm (1H) e 2,98 ppm (1H) (Figura 22c) que foram designados aos H-9a e H-9b respectivamente. Observou-se também sinais em δ 1,84 (3H) e δ 1,85 (3H) que correspondem a metilas ligados a carbonos sp^2 .

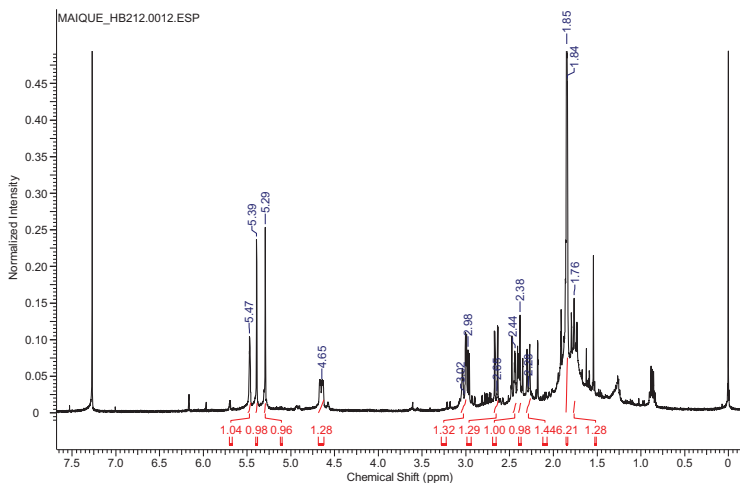


Figura 22 – Espectro de RMN ^1H da substância HB212 (100 MHz, CDCl_3).

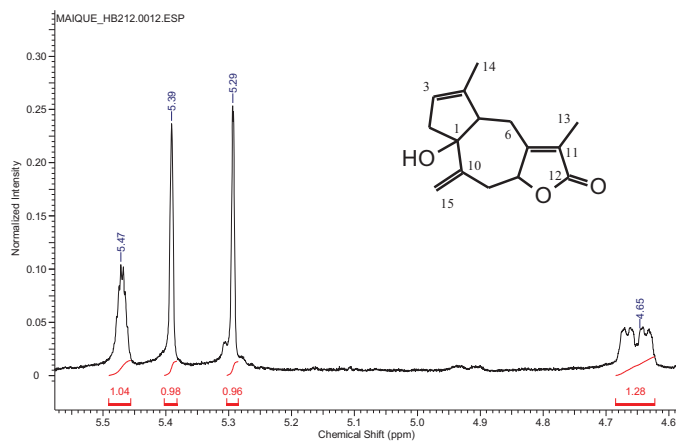


Figura 22a – Espectro de RMN ^1H da substância HB212, ampliado na região $\delta 6,0$ a $\delta 4,6$.

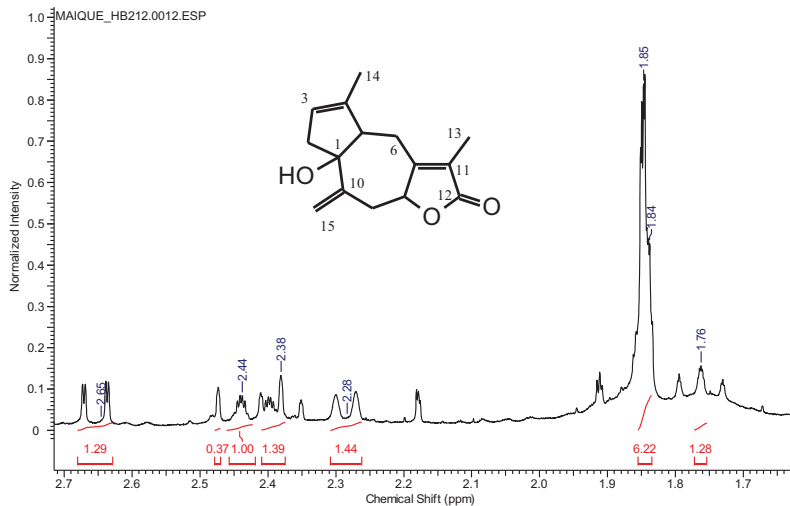


Figura 22b – Espectro de RMN ^1H da substância HB212, ampliado na região δ 2,7 a δ 1,7.

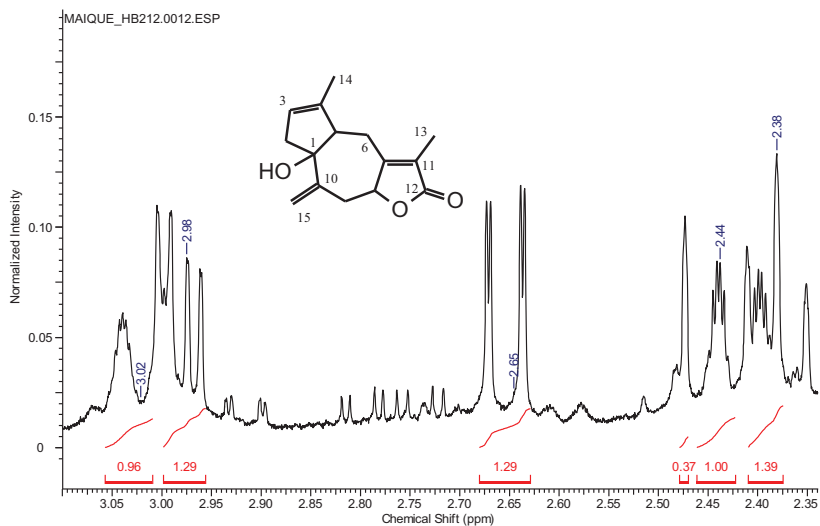


Figura 22c – Espectro RMN ^1H da substância HB212, ampliado na região δ 2,7 a δ 1,7.

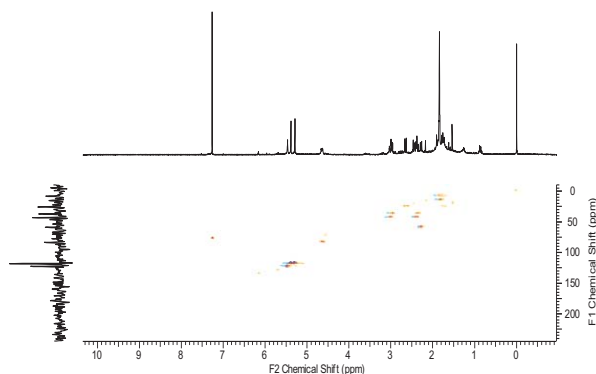


Figura 23 – Mapa de Correlação de HMBC da substância HB212.

O espectro de carbono apresentou 15 sinais onde foram identificados carbonos típicos de γ -lactona, α , β , insaturada (δ 174,4/C=O; δ 162,7/ β -C; δ 121,8/ α -C e δ 83,5/ γ -C). Ainda, observou-se um sinal em 85,1 ppm correspondendo a um carbono carbinólico. Com as correlações de HMBC e HMBC foi possível propor uma estrutura que possui o carboesqueleto do tipo guaianolídeo e substância inédita na literatura que foi nomeada 1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina. O quadro 7 que contém os dados de ^1H , ^{13}C e as suas correlações de HMBC elucidam melhor a estrutura de HB212.

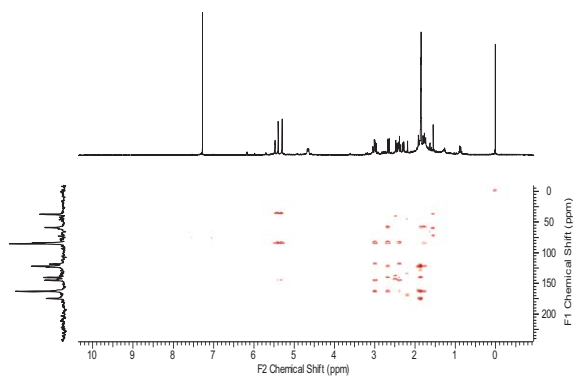
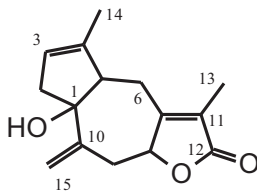


Figura 24 – Mapa de Correlação de HMBC da substância HB212.

Ainda observou-se pela espectrometria de massas de alta resolução (ESI, modo positivo) (Figura 25) um íon molecular 247,1311. ESI(+)- MS/MS mostrou íons filhos em m/z 229, 211, 201, 183 and 173. O íon em m/z 229 poderia representar a perda de H_2O . Os íons em m/z 211 e 201 poderiam representar mais uma perda de H_2O ou a perda de CO respectivamente. Ainda, o íon em m/z 201 poderia perder H_2O em m/z 183 ou CO em m/z 173. Assim o HB212 foi confirmado como uma lactona sesquiterpenica (guaianólídeo) com o nome 1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina.

Quadro 7 - Dados de RMN de 1H e ^{13}C e 2D da lactona HB212.

| POSIÇÃO | 1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) | Correlação HMBC |
|---------|---|----------------|------------------------------|
| 1 | | 85,1 | |
| 2 | 2,44 <i>m</i> 3,02 <i>m</i> | 43,3 | |
| 3 | 5,47 <i>s</i> | 122,7 | 2, 5, 1. |
| 4 | | 140,2 | |
| 5 | 2,28 <i>d</i> (11,9) | 58,7 | 6, 1, 3, 4, 7. |
| 6 | 1,76 <i>m</i> 2,65 <i>dd</i> (13,7; 1,6) | 25,7 | 1, 11. 5, 8, 1, 11, 4, 7. |
| 7 | | 162,7 | |
| 8 | 4,65 <i>dd</i> (11,6; 4,8) | 83,5 | |
| 9 | 2,40 <i>m</i> 2,98 <i>dd</i> (12,1; 5,3) | 37,1 | 8, 1, 15, 10, 7. |
| 10 | | 144,8 | |
| 11 | | 121,8 | |
| 12 | | 174,4 | |
| 13 | 1,85 <i>dd</i> (1,8; 0,8) | 7,8 | 11, 7, 12. |
| 14 | 1,84 <i>m</i> | 15,1 | 5, 3, 4. |
| 15 | 5,29 <i>sl</i> 5,39 <i>s</i> | 118,3 | 9, 1, 10. 9, 1, 10. |



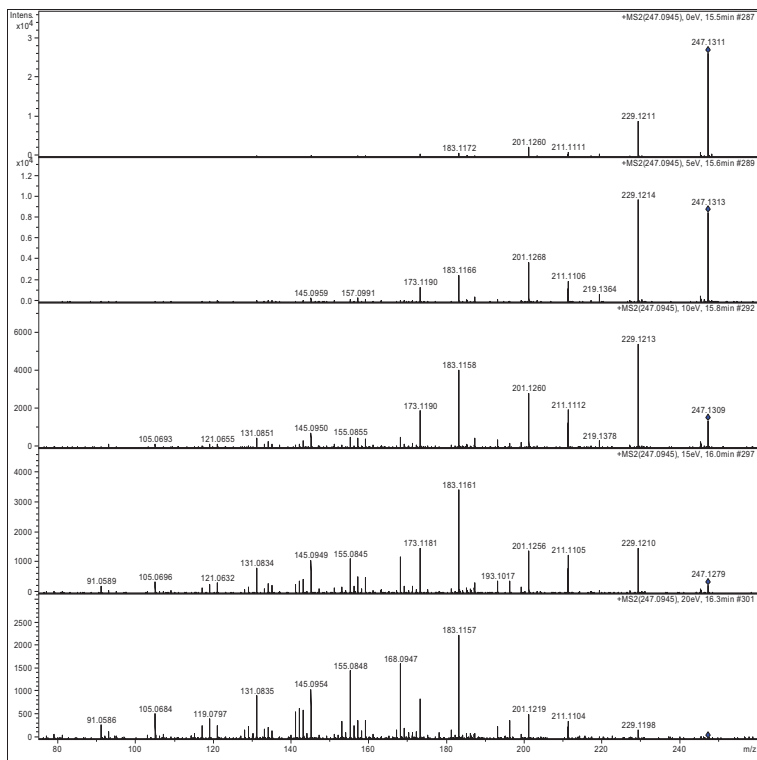


Figura 25 – Espectro de Massas de alta resolução de HB212 (modo positivo) full scan.

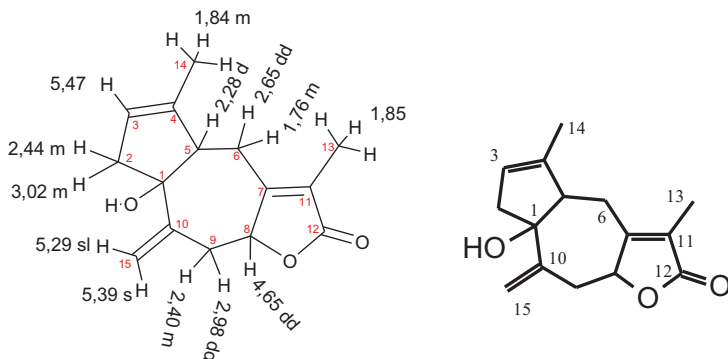


Figura 26 – Estrutura da substância HB212.

A configuração relativa do HB 212 foi deduzida através de experimentos de NOE 1D. A irradiação seletiva do próton em 4,65 ppm causou uma alteração nos sinais dos hidrogênios em δ 5,29 e δ 5,39 (H-15a and H-15b respectivamente) e também nos sinais em δ 1,76 e 2,98 (H-6 ax and H-9 eq respectivamente). A irradiação do sinal em δ 2,65 (H-6) alterou o sinal em δ 2,28 (H-5) e a irradiação do sinal em δ 2,28 também alterou o sinal em δ 2,65 (H-6). Assim a configuração relativa de HB 212 foi obtida.

Os guaianolídeos são substâncias que têm atividades biológicas dos quais várias foram isoladas das famílias de Asteraceae e Apiaceae. Uma dessas substâncias é tápsigargina que tem produzido resultados promissores para o tratamento de câncer de próstata (Drew et al., 2009).

5.2.1.7 Substância HL 33(brasiliensólido).

O RMN de hidrogênio da HL 33 obtido a temperatura ambiente apresentou sinais largas que foram difíceis analisar (Figura 27). Observou-se que os sinais dos espectros melhoraram enquanto diminuía a temperatura na qual os dados de RMN foram adquiridos.

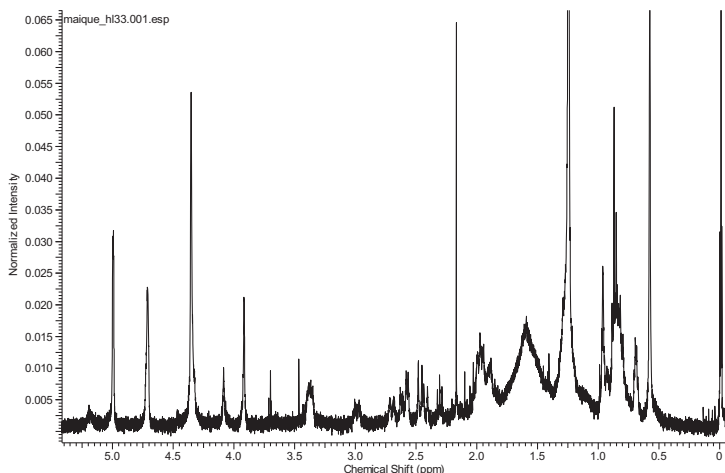


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H de HL 33 a temperatura de 20 °C (293 K) ampliado na região de 0 ppm a 5,5 ppm (400 MHz, CDCl_3).

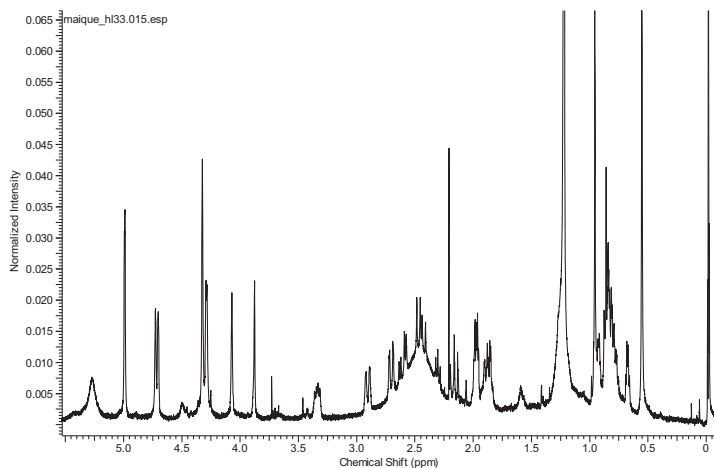


Figura 28 Espectro de RMN de ^1H de HL 33 a temperatura de -20 °C (253 K). ampliado na região de 0 ppm a 5,5 ppm.(400 MHz, CDCl_3).

O espectro de RMN adquirida na baixa temperatura a 253K (Figura 28) ajudou a melhorar os sinais. Isso indicou que a substância possuía provavelmente um ciclo grande com prováveis confômeros. Dos espectros de RMN obtidos (HMQC – Figura 29, HMBC – Figura 30) foi possível deduzir que a substância apresenta 30 carbonos quase com deslocamentos duplicadas tais como 150,5/151,6 ppm atribuídos a C-4 e 106,3/106,5 ppm atribuídos a C-15 do exo-metileno; 16,0/15,6 ppm atribuído a C-2 e 54,5/53,6 ppm atribuído a C-13. Foi possível observar ainda sinais típicas de γ -lactona α,β -insaturada em δ 172,3/172,7 (C=O); 127,2/126,2 (α -C); 162,6/163,3 (β -C) .

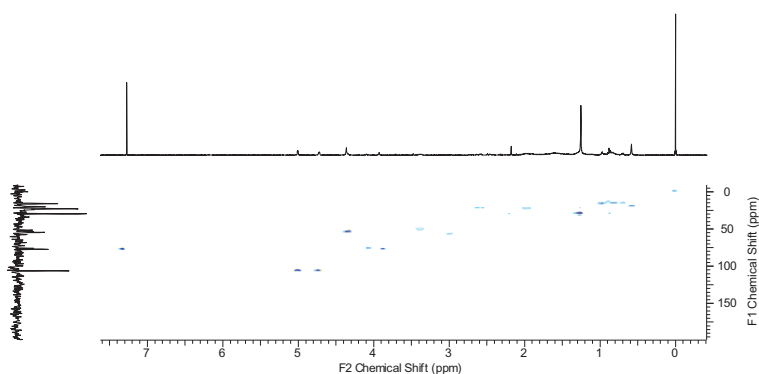


Figura 29 Mapa HMQC da substância HL 33.

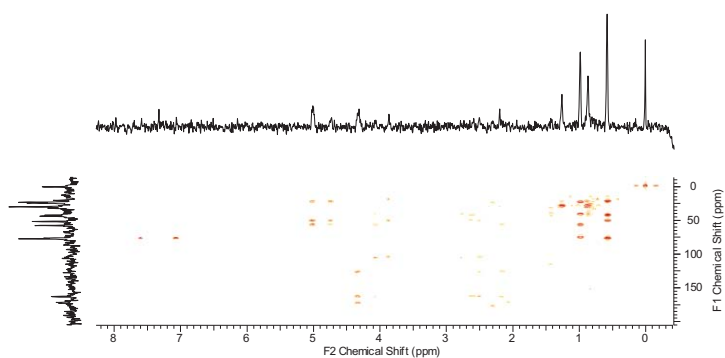


Figura 30 Mapa HMBC da substância HL 33.

Também observou-se deslocamento em δ 20,2/16,4 que foi atribuído às metilas terciárias. Esses sinais indicam o esqueleto lindenano semelhante ao 13HDS, podendo ser uma mistura ou dimerizado. Para resolver essa questão, foi feito um HR-MS (Espectrometria de massas de alta resolução) no modo negativo que apresentou um íon molecular a 555,2265 (Figura 31) com baixa intensidade e mostrou também o pico base como 277,1111. Ao fragmentar esse íon molecular em 555 (Figura 32), observou-se o íon molecular 277,1106 como pico base que é a massa molecular de uma das subunidades de HL 33. Assim deduziu a fórmula molecular como $C_{30}H_{36}O_{10}$. Entretanto quando experimentos de NOE (1D) foram realizados para obter a configuração relativa, observou-se que a irradiação seletiva de qualquer hidrogênio afetou simultaneamente o hidrogênio na outra subunidade da substância HL 33. Para investigar isso, um experimento de RMN de EXSY (espectro em anexo número 1) foi realizado que demonstrou que todos os pares de hidrogênios no espectro de RMN de 1H são trocáveis mutualmente, revelando então que HL 33 é uma só substância com confômeros e não uma substância em mistura. A diferença nos deslocamentos químicos para o brasiliensolídeo em relação a 13HDS foi observado só em H9/C9 C8, indicando que a dupla ligação de 13HDS parece ter sofrido uma oxidação para um diol no brasiliensolídeo com H9 em δ 3,89/4,09 ligado a C9 em δ 77,2/75,9 e com C8 em δ 104,6/106,0 que indica um carbono hemiacetal. Com esses dados e a massa molecular obtida a estrutura de brasiliensolídeo foi proposta para HL33. O quadro 8 mostra os dados de RMN para elucidação de HL 33.

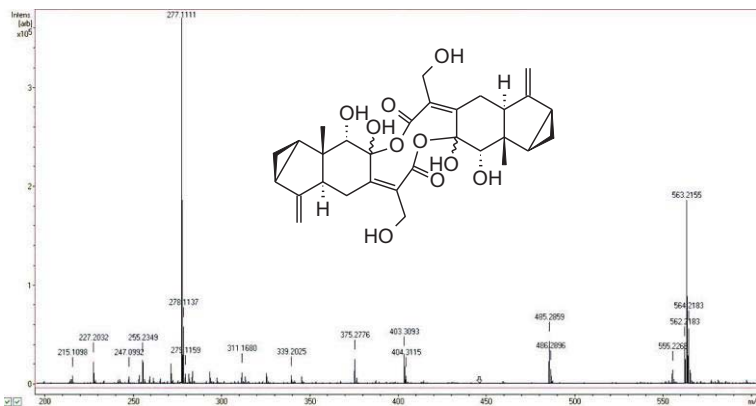


Figura 31 Espectro de massas (ESI modo negativo) de HL 33 – Full Scan.

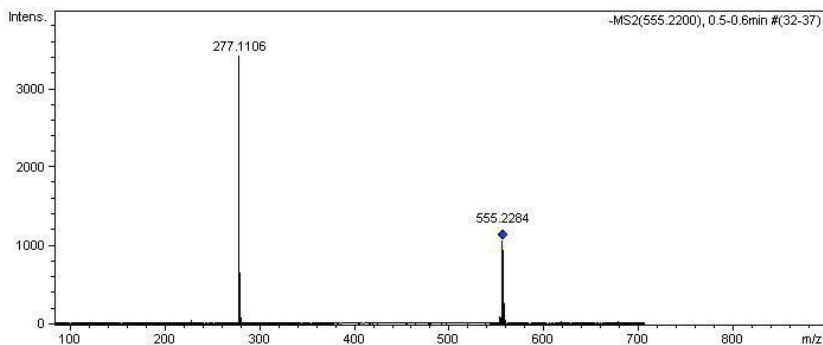


Figura 32 Espectro de massas de alta resolução (ESI modo negativo) de HL 33 – íon filho (m/z 555,2284).

Algumas lactonas sesquiterpênicas se encontram na forma de dímeros. Neste caso, podem ser chamados disesquiterpenolídeos ou dímeros de lactonas sesquiterpenolídeos. Estes podem ser classificados em três grupos principais conhecidos como: disesquiterpenolídeos verdadeiras (tipo A), pseudo-disesquiterpenolídeos (tipo B) e dímeros sesquiterpenolídeos (tipo C) (Zhan et al., 2010). Os tipos A possuem estrutura na qual as duas unidades são ligadas diretamente por um ou dois ligações carbono –

carbono (C – C) (Figura 33) Nos tipos B as unidades são ligadas por um éster, éter ou um outro grupo (Figura 33). Enquanto os tipos A e tipo B são encontrados principalmente nas famílias de Asteraceae e Chloranthaceae, os tipos C são encontrados em micróbios e organismos marinhos (Zhan et al., 2010).

A substância HL33 é um pseudo-disesquiterpenolídeo, um dímero de lindenanolídeo, isolada pela primeira vez do gênero *Hedyosmum*. Shizukaol B, e shizukaol F são dímeros de sesquiterpenolídeos isolados de *Chloranthus japonicus*, que inibem adesão de monócitos (Cao et al., 2008).

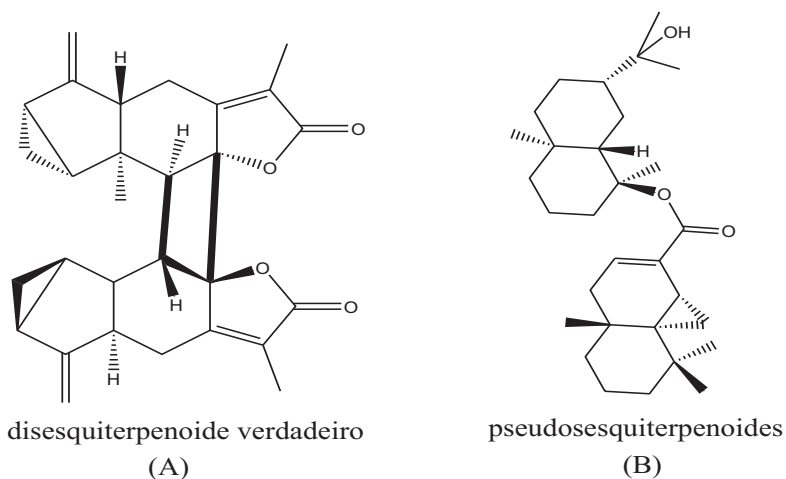


Figura 33 Tipos A e B de disesquiterpenoides.

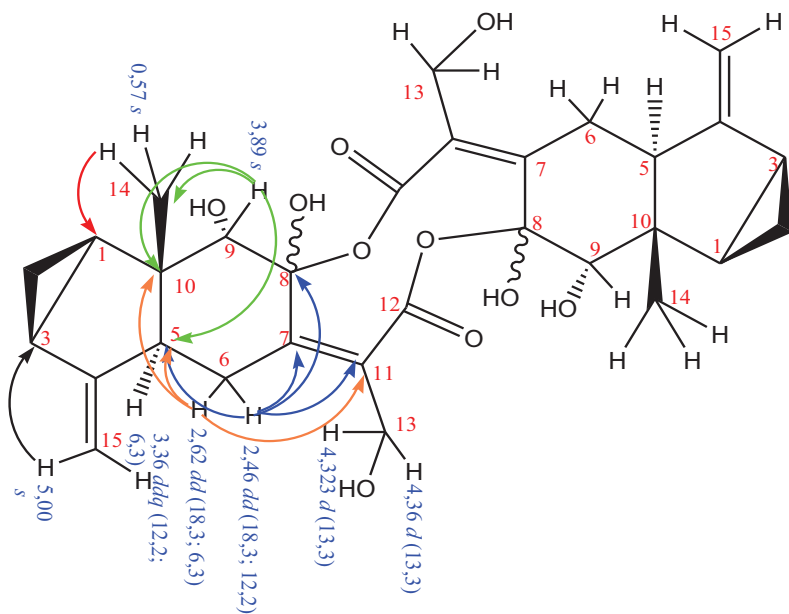
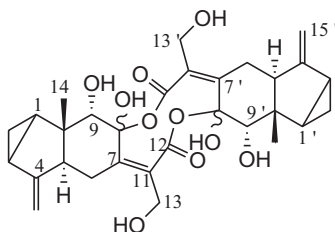


Figura 34 Correlações de HMBC da estrutura de HL 33 brasiliensólido.

Quadro 8 Dados de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do lindenanolídeo dimérico brasiliensolídeo em comparação com RMN ^{13}C de H5 (13HDS). (100 MHz, CDCl_3).

| Carbono | Confoômero A | | | Confoômero B | | | 13HDS ^{13}C RMN |
|---------|--|------------------------|--------------------------------------|---|------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| | ^1H RMN (multi., <i>J</i> Hz) | ^{13}C RMN | HMBC | ^1H RMN (multi., <i>J</i> Hz) | ^{13}C RMN | HMBC | |
| 1 | 1,89 <i>m</i> | 23,0 | | 1,91 <i>m</i> | 24,2 | | 26,4 |
| 2 | 0,94 <i>m</i> 0,81 <i>m</i> | 16,0 | | 0,69 <i>m</i> 0,80 <i>m</i> | 15,6 | 4 | 17,1 |
| 3 | 1,99 <i>m</i> | 23,9 | | 1,99 <i>m</i> | 23,0 | | 22,4 |
| 4 | | 150,5 | | | 151,6 | | 149,6 |
| 5 | 3,36 <i>ddq</i> (12,2; 6,3) | 51,5 | | 2,99 <i>ddq</i> (13,4; 2,2; 1,0) | 57,4 | | 61,9 |
| 6 | 2,46 <i>dd</i> (18,3; 12,2) 2,62 <i>dd</i> (18,3; 6,3) | 22,2 | 7, 11, 5, 8 7, 11 5, 10 | 2,18 <i>dd</i> (12,9; 13,4) 2,72 <i>dd</i> (12,9; 2,2) | 22,7 | 7, 11, 5 7, 8, 10 | 21,5 |
| 7 | | 162,6 | | | 163,3 | | 150,1 |
| 8 | | 104,6 | | | 106,0 | | 149,3 |
| 9 | 3,89 <i>s</i> | 77,2 | 5, 8, 10, 14 | 4,09 <i>s</i> | 75,9 | 5, 8, 10, 11 | 122,9 |
| 10 | | 43,5 | | | 42,1 | | 40 |
| 11 | | 127,2 | | | 126,2 | | 124,2 |
| 12 | | 172,3 | | | 172,7 | | 170,2 |
| 13 | 4,329 <i>d</i> (13,3) 4,36 <i>d</i> (13,3) | 54,5 | 7, 11, 12 7, 11, 12 | 4,28 <i>d</i> (13,3) 4,325 <i>d</i> (13,3) | 53,6 | 7, 11, 12 7, 11, 12 | 55,1 |
| 14 | 0,57 <i>s</i> | 20,2 | 1, 10, 5, 9 | 0,97 <i>s</i> | 16,4 | 1, 10, 5, 9 | 22,1 |
| 15 | 5,00 <i>s</i> 4,72 <i>s</i> | 106,3 | 3, 5 | 5,01 <i>s</i> 4,74 <i>s</i> | 106,5 | 3 | 106,9 |



5.2.2 Fração diclorometano

A fração diclorometano foi cromatografada em coluna com sílica gel CC (230-400 mesh) usando hexano e gradiente de polaridade com diclorometano (CH_2Cl_2) (0-70% CH_2Cl_2) e subsequentemente usando CH_2Cl_2 e gradiente de polaridade com acetato de etila (AcOEt) (0-100%). Assim foram obtidas as sub-frações I, J, K, L, M, N, O e P. Cada sub-fração e as suas misturas poucas complexas então foram cromatografadas sobre sílica gel CC (230-400 mesh) e cromatografia líquida de média pressão com coluna Lobar Si 60 (Merck) respectivamente, com eluentes de gradiente de hexano-acetona ou acetato de etila. Da sub fração K, HB 15 foi isolado e D 17, D 19, HB 21, HB 22 foram isoladas e identificadas da sub-fração M, sendo que D19 é uma mistura de substâncias da qual escopoletina e vanilina (HB 23 e HB 24 respectivamente) foram identificadas. As substâncias foram elucidadas através de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H , ^{13}C e $^{2\text{D}}$, pelo espectrometria de massas e em comparação com dados já publicados em literatura.

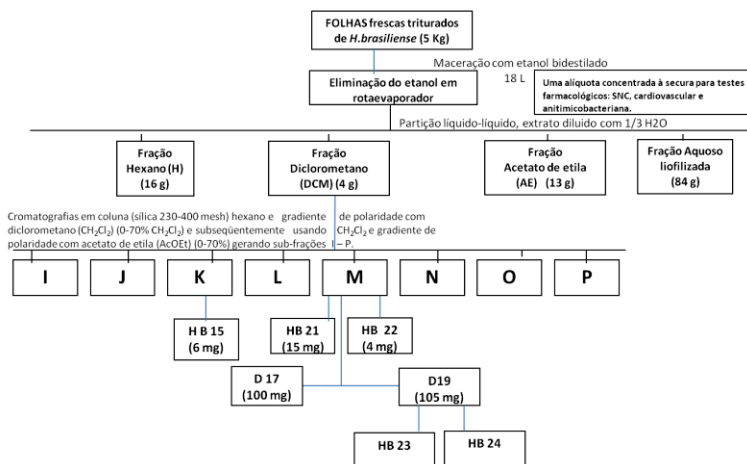


Figura 35 Etapas para isolamento das substâncias da fração diclorometano de *Hedyosmum brasiliense*.

5.2.2.1 Substância HB 21 (15-Hidroxi-isogermafurenoídeo).

O espectro de hidrogênio de HB 21 (Figura 36) apresentou sinais parecidos com a substância H622. Observou-se um duplo-duplete em δ 5,35 ($J = 1,5$ Hz; $1,5$ Hz) e um simpleto largo em δ 5,00 que foi atribuído a H-3a e H-3b respectivamente. Apresentou ainda um simpleto em δ 1,18 (3H) que indica a presença de uma metila. Os sinais em δ 5,03, duplo-duplete (1H, 0,6 Hz e 10,7 Hz) e δ 4,99, duplo-duplete (1H, 0,6 Hz e 17,4 Hz) foram atribuídos aos H-2a e H-2b respectivamente.

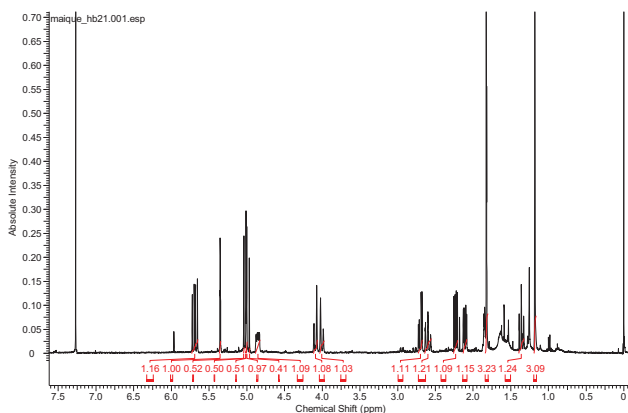


Figura 36 – Espectro de RMN ^1H de HB 21 (400 MHz; CDCl_3).

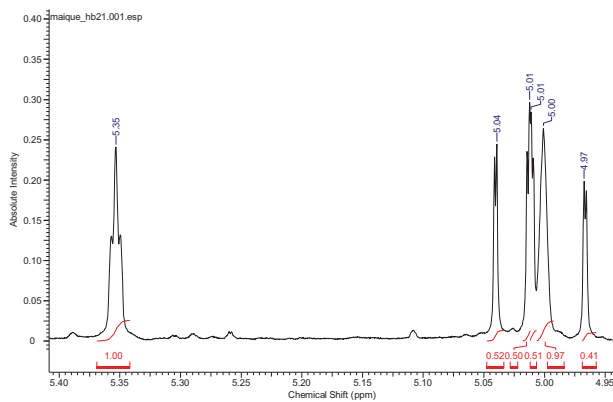


Figura 36a – Espectro de RMN ^1H de HB 21, ampliado na região δ 5,40 a δ 4,95.

Observou-se ainda um duplo-duplete em 5,69 ppm (1H; 10,7 Hz e 17,4 Hz) que foi atribuído a H-1. O espectro também apresentou um multiplete em δ 4,85 (1H) (Figura 36d) que corresponde um hidrogênio próximo a um oxigênio e foi atribuído a H-8. Ainda apresentou sinais desblindados em 4,09 ppm e 4,00 ppm que foram atribuídos aos H-15a e H-15b.

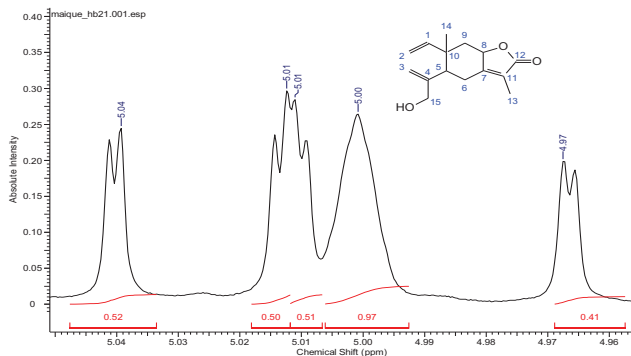


Figura 36b – Espectro de RMN ^1H de HB 21, ampliado na região δ 5,05 a δ 4,95.

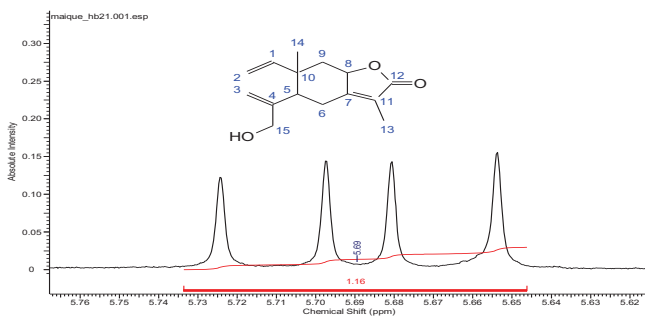


Figura 36c – Espectro de RMN ^1H de HB 21, ampliado na região δ 5,77 a δ 5,62.

O espectro de carbono (Figura 37) apresentou 15 carbonos indicando um sesquiterpeno. Observou-se carbonos típicos de γ -lactona, α , β , insaturada que foram identificados como carbonila (δ 174,7), β -carbono (δ 161,5), α -carbono (δ 120,4) e γ -carbono (δ 77,8).

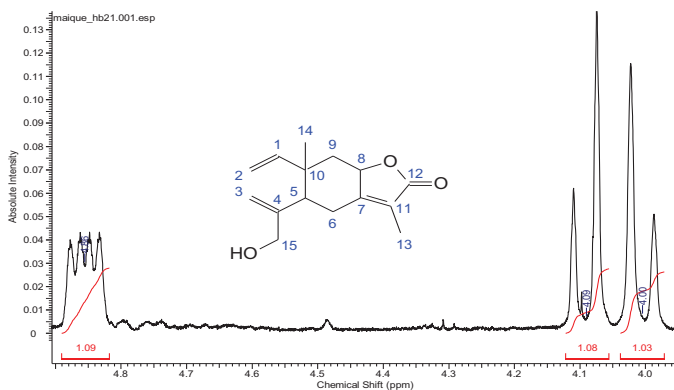


Figura 36d – Espectro de RMN ^1H de HB 21, ampliado na região δ 4,90 a δ 3,95.

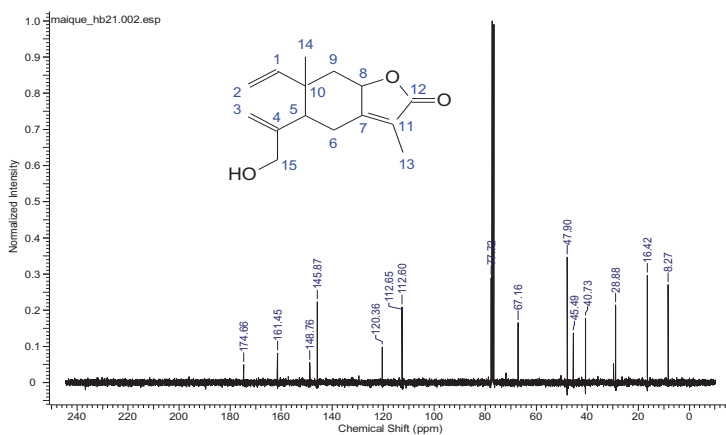


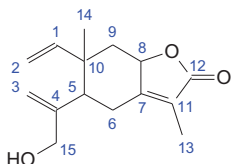
Figura 37 – Espectro de RMN ^{13}C de HB 21 (100 MHz; CDCl_3).

Além disso, foi observado um sinal em δ 67,2 indicando um carbono carbinólico. O espectro ainda apresentou sinais em δ 112,6; δ 112,7; δ 145,9 e δ 148,8 que indicam carbonos típicos em sp^2 assim apresentando mais duas insaturações. Sua fórmula molecular é $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$, tendo seis como o seu grau de insaturação. Os dados de ^1H e ^{13}C e as suas correlações de HMQC proporcionaram a elucidação da substância HB 21 como um elemanolídeo, 15-hidroxi-isogermafurenolídeo. Os dados obtidos são apresentados no quadro 9 e

comparados com os dados de 15-acetilisogermafurenolídeo (H622). Pode-se observar que há semelhanças nos dados exceto os dados do carbono 15 e a falta dos carbonos 16 e 17 na substância HB 21.

Quadro 9. Dados de RMN ^1H e ^{13}C e 2D da lactona HB 21 em comparação com H622.

| POSIÇÃO | Dados de HB 21 | | Dados de H622 | |
|---------|---|-----------------------|--|-----------------------|
| | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) |
| 1 | 5,69 <i>dd</i> (10,7, 17,4) | 145,9 | 5,69 <i>dd</i> (10,7, 17,4) | 145,7 |
| 2 | 5,03 <i>dd</i> (0,6; 10,7) 4,99 <i>dd</i> (0,6; 17,4) | 112,7 | 5,05 <i>dd</i> (0,5; 10,7) 5,00 <i>dd</i> (0,5; 17,4) | 113,1 |
| 3 | 5,35 <i>dd</i> (1,5; 1,5) 5,00 <i>sl</i> | 112,6 | 5,32 <i>dd</i> (1,3; 1,3) 5,05 <i>sl</i> | 115,3 |
| 4 | | 148,8 | | 143,6 |
| 5 | 2,11 <i>dd</i> (4,3; 13,1) | 47,9 | 2,09 <i>m</i> | 48,6 |
| 6 | 2,70 <i>dd</i> (4,24, 14,52) 2,60 <i>dd</i> (14,52) | 28,9 | 2,71 <i>dd</i> (4,24, 14,52) 2,58 <i>dd</i> (14,52) | 28,9 |
| 7 | | 161,5 | | 161,8 |
| 8 | 4,85 <i>m</i> | 77,8 | 4,85 <i>m</i> | 78,0 |
| 9 | 2,23 <i>dd</i> (6,2; 12,4) 1,36 <i>dd</i> (12,0, 12,2) | 45,5 | 2,23 <i>dd</i> (6,03, 12,33) 1,36 <i>dd</i> (12,2) | 45,6 |
| 10 | | 40,8 | | 40,7 |
| 11 | | 120,4 | | 120,4 |
| 12 | | 174,7 | | 175,1 |
| 13 | 1,82 <i>dd</i> 3H (1,6; 1,6) | 8,3 | 1,83 <i>dd</i> 3H (1,6; 1,7) | 8,2 |
| 14 | 1,18 <i>s</i> 3H | 16,4 | 1,18 <i>s</i> 3H | 16,6 |
| 15 | 4,09 <i>d</i> (14,0) 4,00 <i>d</i> (14,0) | 67,2 | 4,48 <i>s</i> 2H | 68,0 |
| 16 | | | | 171,0 |
| 17 | | | 2,1 <i>s</i> 3H | 20,9 |



O espectro de massas de alta resolução (ESI, modo positivo) apresentou um íon molecular 249,1484 com íons filhos em m/z 231, 185

e 157 (Figura 38) podendo representar a. perda de H₂O, de H₂O e CO e eteno respectivamente. Com estes dados a HB 21 foi proposta como 15-hidroxi-isogermafurenoídeo.

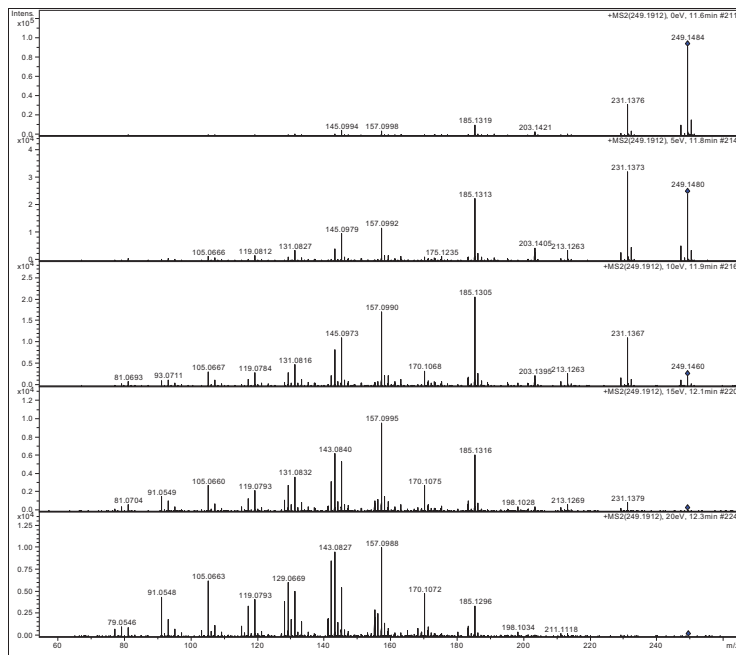


Figura 38 – O Espectro de Massas de HB 21 de alta resolução (ESI, modo positivo) full scan.

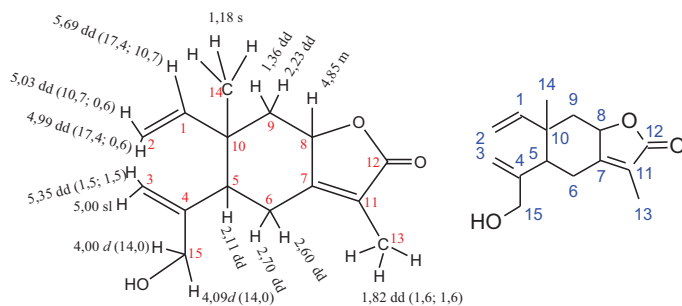


Figura 39 – Estrutura da substância HB 21.

5.2.2.2 Substância HB 22 (Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico)

O espectro de hidrogênio de HB 22 (Figura 40) apresentou sinais de uma substância fenólica com deslocamentos em δ 7,56 (*d*, $J = 1,9$), δ 6,91 (*d*, $J = 8,3$) e δ 7,63 (*dd*, $J = 8,3; 1,9$). Ainda apresentou um simpleto em 3,94 ppm (3H) que corresponde um grupo metoxila.

O espectro de carbono apresentou seis sinais aromáticos, sendo que três são substituídos (121,9 ppm, 146,7 ppm e 150,9 ppm) e os outros três hidrogenados (112,3 ppm, 115,1 ppm e 124,1 ppm). Ainda apresentou um sinal em δ 168,9 que corresponde uma carbonila e o outro sinal em δ 58,1 indicando um carbono ligado a um oxigênio. Os dados obtidos foram comparados com dados na literatura e foi possível confirmar a substância como ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico.

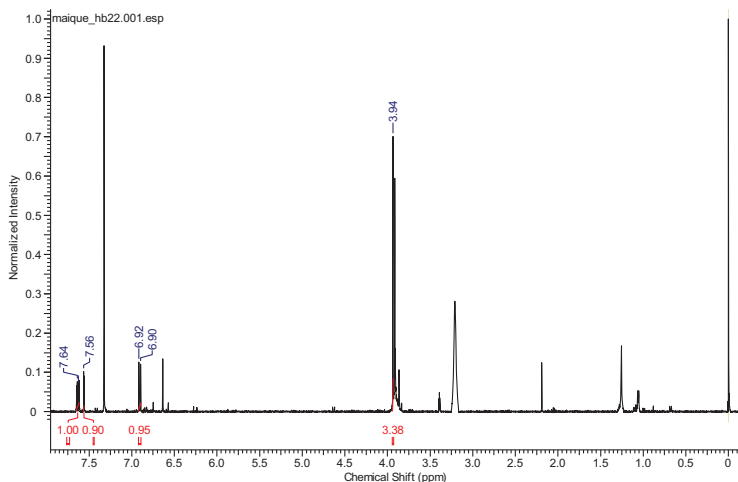


Figura 40 Espectro de RMN ¹H de HB 22 (400 MHz, CDCl₃).

Fenólicos são metabólitos secundários que são amplamente distribuídos no reino vegetal, e que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos de hidroxilas. Estas substâncias são reconhecidas pelas suas propriedades antioxidantes e pelos seus efeitos marcados na prevenção de doenças associadas à estresse oxidativa como câncer (Dai e Mumper, 2010). Ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico também conhecido como ácido valínico foi isolada pela primeira vez do extrato hidroalcoólico de *Hedyosmum brasiliense*. O quadro 10 mostra os dados de RMN em comparação com Teke et al., (2010).

Quadro 10 Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância HB 22 em comparação com literatura.

| POSIÇÃO | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) | Teke et al., (2010) 500 MHz e 125 MHz (CD_3OCD_3) | |
|---------|---------------------------------|-----------------------|---|-----------------------|
| | | | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) |
| 1 | | 121,9 | | 121.9 |
| 2 | 7,56 <i>d</i> (1,9) | 112,3 | 7. 57 <i>s</i> 1H | 112.5 |
| 3 | | 146,7 | | 147.1 |
| 4 | | 150,9 | | 151.1 |
| 5 | 6,91 <i>d</i> (8,3) | 115,1 | 6.93 <i>d</i> 1H (8.0) | 114.9 |
| 6 | 7,63 <i>dd</i> 1H (8,3; 1,9) | 124,1 | 7.61 <i>d</i> 1H (8,0) | 123.9 |
| 7 | | 168,9 | | 166.5 |
| OMe | 3,94 <i>s</i> 3H | 58,1 | | 55.3 |

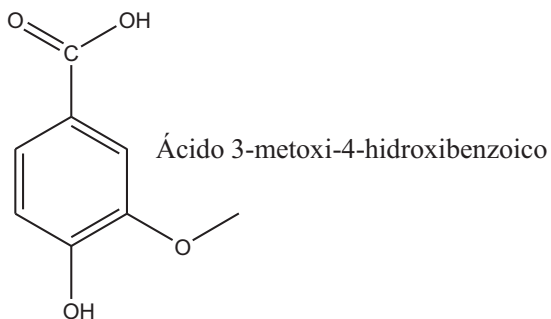


Figura 41 Estrutura da substância HB 22.

5.2.2.3 Substâncias HB 15 (Éster Etílico do ácido linolênico e Éster Etílico do ácido linoléico).

O espectro de hidrogênio (Figura 42) apresentou um tripleto em δ 0,98 (3H) e o outro em δ 0,90 (3H) que representam metilas terminais típicas. Estes foram atribuídos aos H-18 do ester etílico do ácido linolênico e do ester etílico do ácido linoléico respectivamente. Em δ 5,37 foi observado um sinal com integração de 10 hidrogênios que representam hidrogênios em sp^2 . Seis destes hidrogênios foram atribuídos aos H-9, H-10, H-12, H-13, H-15 e H-16 do ester etílico do ácido linolênico e o restante foram atribuídos aos H-9, H-10, H-12 e H-13 do ester etílico do ácido linoléico. Ainda, o espectro apresentou um sinal em δ 4,12 (4H) que correspondem hidrogênios ligados a oxigênio sendo que dois dos hidrogênios pertencem o grupo carbinólico do ester etílico do ácido linolênico e os outros dois, ester etílico do ácido linoléico.

O espectro de carbono (Figura 43) apresentou dez carbonos típicos de carbonos em sp^2 . Sendo que δ 130,3; δ 127,7; δ 128,3, δ 128,3; δ 127,1 e δ 132,0 foram atribuídos aos C-9, C-10, C-12, C-13, C-15 e C-16 respectivamente para ester etílico do ácido linolênico. Os outros, δ 130,1; δ 128,0; δ 129,7 e δ 130,2 foram atribuídos aos C-9, C-10, C-12 e C-13 respectivamente para ester etílico do ácido linoléico. Foi observado ainda sinais em 173,9 ppm e 60,2 ppm que são carbonos que representam carbonila e carbono carbinólicos respectivamente. Os dados de 1H e ^{13}C foram comparados com Chang et al., (2000).

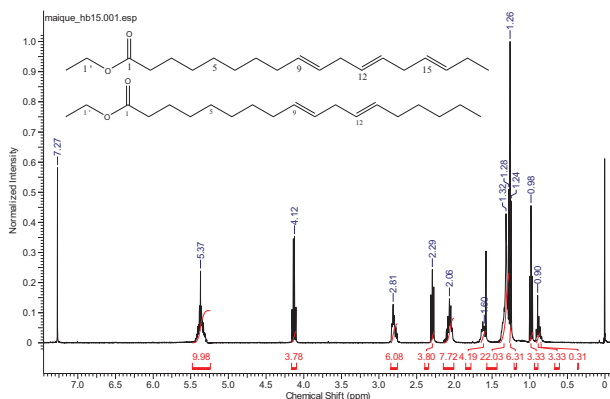


Figura 42 Espectro de RMN de 1H de HB 15 (400 MHz; $CDCl_3$).

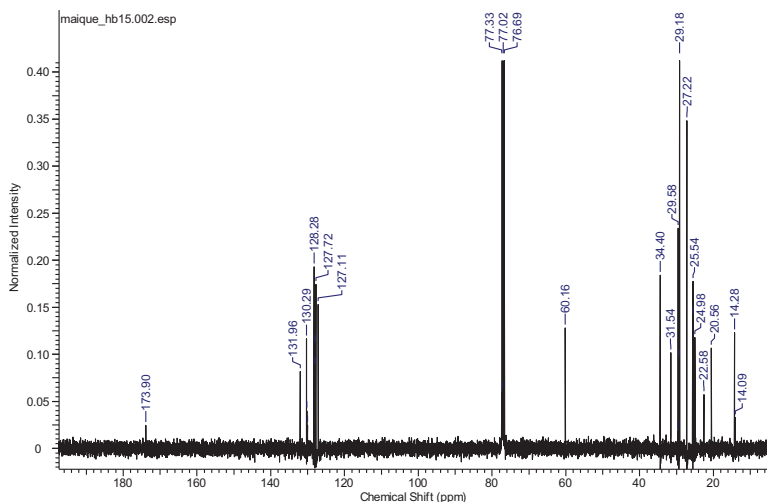


Figura 43 Espectro de RMN de ^{13}C de HB 15 (100 MHz; CDCl_3).

5.2.2.4 As substâncias do D 19 (escopoletina e vanilina)

Fracionamento cromatográficas da sub-fração M produziu sub-frações Ma, Mb, Mc, Md, Me, Mf, Mg, Mh, Mi, Mj and Mk. A cromatografia em sílica da sub-fração Mj com um gradiente de eluente de diclorometano e acetato de etila (9:1 a 3:7) proporcionou o isolamento de D19 que ao avaliar na Cromatografia de camada delgada (CCD) revelada com reagente natural apareceu uma mancha amarelo indicando a presença de uma substância fenólica (Figura 44).



Figura 44 Cromatografia de camada delgada mostrando D 19
 Eluente: Hexano:Acetona (6:4) revelador – Reagente Natural
 $R_f=0,38$.

Mas após a análise dos dados de espectroscopia de RMN (1D e 2D) observou-se que não era só uma substancia, mas a mistura de vários fenólicos,. dos quais foram possível identificar duas substâncias. O espectro de próton (Figura 45) apresentou sinais típicos de fenólicos em δ 7,63; δ 7,61; δ 7,43; δ 7,34; δ 7,00; δ 6,92; δ 6,90; δ 6,88; δ 6,85; 6,28.entre outros (Figura 45a).

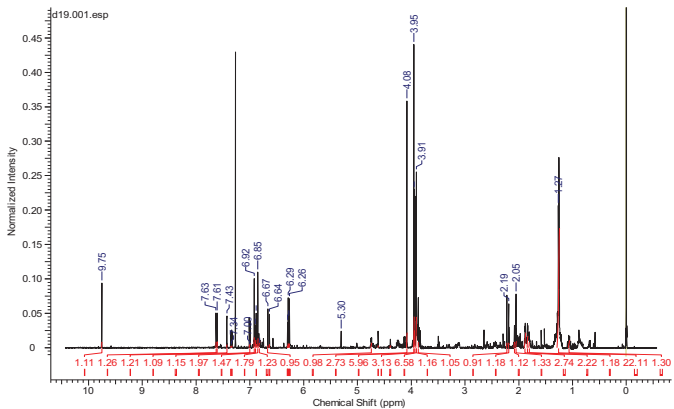


Figura 45 Espectro de RMN ^1H de D 19 (400 MHz, CDCl_3).

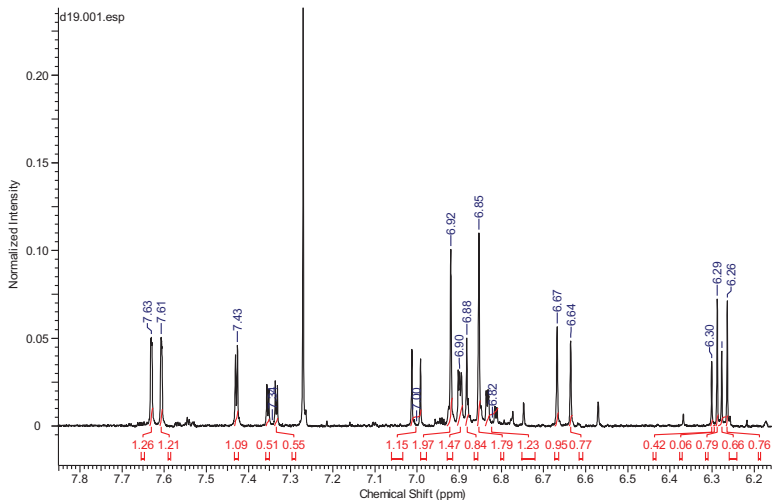


Figura 45a Espectro de RMN ^1H de D 19, ampliado na região δ 7,80 a δ 6,20.

Observou-se ainda sinais de simpletos na faixa de δ 4,08 a δ 3,91 (Figura 45b) que integram para seis hidrogênios ou três hidrogênios indicando a presença de prováveis grupos de metoxilas.

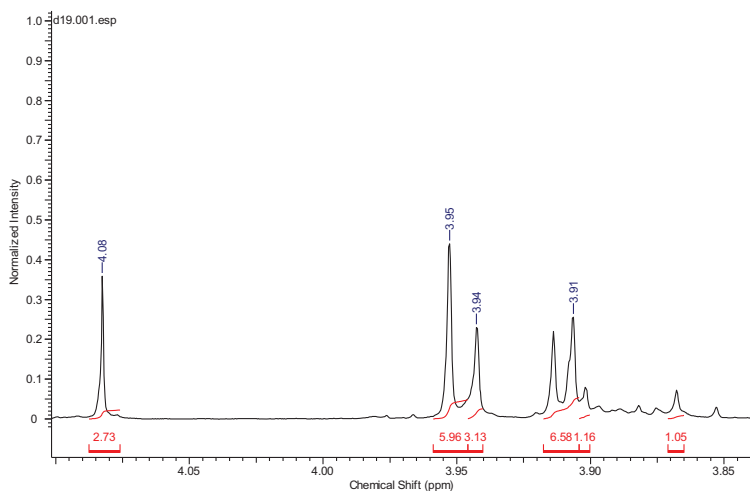


Figura 45b Espectro de RMN ^1H de D 19, ampliado na região δ 4,10 a δ 3,80.

Observou-se também um sinal em δ 9,75 (1H) que é um sinal característico de um hidrogênio de aldeído. Com as correlações de HMQC (Figura 47), HMBC (Figura 48) e em comparação com dados na literatura foi possível identificar duas substâncias como a Escopoletina (Vasconcelos et al., 1998) e Vanilina (Sun et al., 2001). Os quadros 11 e 12 mostram os dados de RMN obtidos em comparação com os dados na literatura para a confirmação destas substâncias.

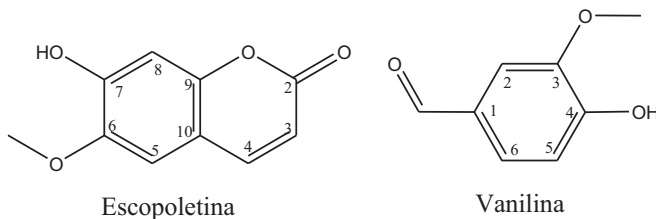


Figura 46 Estruturas das duas substâncias elucidadas de D19.

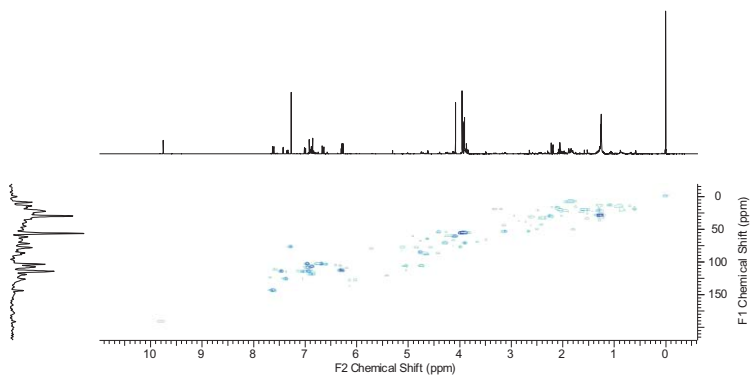


Figura 47 Mapa de HMBC da substância D19.

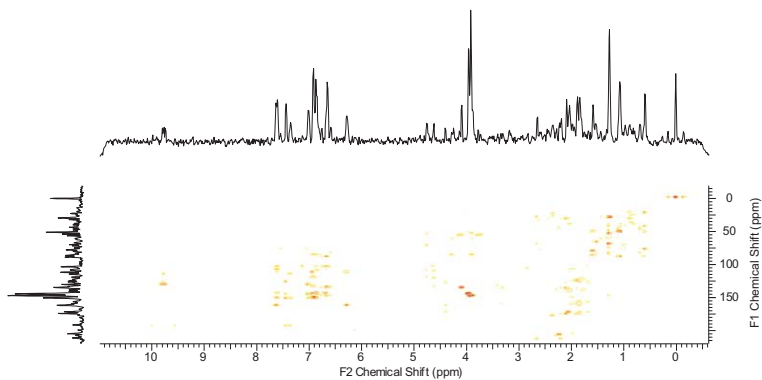


Figura 48 Mapa de HMBC da substância D19.

Quadro 11 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de Escopoletina (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3) em comparação com literatura.

| POSIÇÃO | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) | Escopoletina (7-hydroxy-6-methoxycumarin)(Vasconcelos et al., 1998; 300 and 75 MHz, CDCl_3) ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) |
|---------|----------------------------------|--------------------------|---|-----------------------|
| 2 | | 161.7 | | 161.5 |
| 3 | 6.27 <i>d</i> (9.4) | 113.3 | 6.28 <i>d</i> 1H (9,5) | 113.4 |
| 4 | 7.62 <i>d</i> (9.4) | 143.5 | 7.60 <i>d</i> 1H (9,5) | 143.3 |
| 5 | 6.85 <i>s</i> 1H | 107.5 | 6.85 <i>s</i> 1H | 107.4 |
| 6 | | 144.2 | | 144.0 |
| 7 | a | 149.7 | 6.17 <i>s</i> 1H (OH) | 150.2 |
| 8 | 6.92 <i>s</i> 1H | 103.2 | 6.92 <i>s</i> 1H | 103.2 |
| 9 | | 150.5 | | 150.2 |
| 10 | | 111.5 | | 111.5 |
| OMe | 3.95 <i>s</i> 1H | 56.6 | 3.96 <i>s</i> 3H | 56.4 |

^a não observado no espectro

Quadro 12 Dados de RMN ^1H e ^{13}C de vanilina (400 MHz e 100 MHz, CDCl_3).

| POSIÇÃO | ^1H (ppm), J (Hz) | ^{13}C (ppm) |
|---------|-----------------------------|-----------------------|
| 1 | | 129,9 |
| 2 | 7,34 <i>dd</i> 1H(8,1; 1,9) | 126,1 |
| 3 | 7,00 <i>d</i> 1H(8,1) | 115,1 |
| 4 | | 150,8 |
| 5 | | 144,5 |
| 6 | 7,43 <i>d</i> 1H (1,9) | 114,4 |
| 7 | 9,75 | 191,2 |
| OMe | 3,94 <i>s</i> 3H | 56,6 |

Cumarinas são substâncias fenólicas que são encontradas em várias plantas e são compostas pela fusão dos anéis benzílico e α -pirona (Hoult e Payát, 1996). Escopoletina é conhecida também como 7-hidroxi-6-metoxicoumarina. Recentemente, atividade antidepressiva de escopoletina foi avaliada pelo Capra *et al.*, (2010) onde teve atividade sobre os sistemas serotoninérgicos, noradrenergicos e dopaminérgicos. A presença de escopoletina nesta espécie podendo ser uma das substâncias responsáveis pelo seu uso como calmante.

A vanilina um fenólico, é um dos principais componentes da baunilha, o aromatizante mais popular usado por vários séculos (Sun *et al.*, 2001). Haridas Nidhina *et al.*, (2011) relata a sua capacidade de induzir diferenciação celular de pré-adipócitos murinos (3T3-L1) em adipócitos, os quais mostraram sensibilidade a insulina e demonstraram aumento significativa na absorção de glicose. É pela primeira vez que uma cumarina e vanilina estão sendo relatadas para esta espécie.

5.2.2.5 Substância D17 (identificado com 13-Hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo – 13HDS).

A substância D17 foi obtida como uma mancha (contaminada com clorofila) na cromatografia de camada delgada (CCD) que extingue na luz UV e revela-se com a anisaldeído sulfúrico adquirindo uma cor marrom. O R_f observado pareceu-se com o R_f do H5 (13HDS), o lindenanolídeo isolado da fração hexano. Por isso foi necessário avaliá-la na CCD com a substância H5 (13HDS). Após a avaliação, a substância D17 foi realmente constatada como 13HDS. As figuras 49 e 50 mostram as cromatogramas da substância D17 em comparação com a 13HDS. A figura 51 mostra a presença das substâncias H5 e D17 nas frações hexano (FH) e diclorometano (FD).



Eluente – hexano:acetona (8:2)

Revelador: Luz ultravioleta (254 nm)

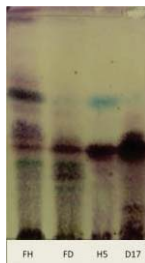
Figura 49 Cromatograma de H5 e D17.



Eluente – hexano:acetona (7:3)

Revelador: anisaldeído
sulfúrico e aquecimento

Figura 50 Cromatograma de H5 e D17.



Eluente – hexano:acetona (8:2)

Revelador: anisaldeído
sulfúrico e aquecimento

Figura 51 Cromatograma de H5, D17, FH e FD.

5.3 Identificação dos principais marcadores no extrato em CLAE de fase reversa.

Os marcadores isolados de *Hedyosmum brasiliense*: H3 (podoandina), H5 (13-hidroxi-8,9-shizukanolideo) e HB 212 (1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina), e o extrato bruto (macho e fêmea), foram analisados como descrito no item 4.5.

A idéia de análise do extrato bruto macho e fêmea surgiu filosoficamente pelo fato que os hormônios responsáveis pela diferenciação sexual em seres humanos são diferentes; por exemplo estrogênio em sexo feminino e testosterona em sexo masculino e por isso poderia ter diferenças nos marcadores químicos nos sexos desta espécie. Alguns hormônios identificados no reino vegetal são as auxinas e as giberelinas. As auxinas são reconhecidas como os promotores de feminilidade em flores dióicas. São sintetizados do aminoácido triptofano e a principal auxina na maioria das plantas é ácido indolacético (Figura 52), que é um alcaloide. Já as giberelinas são responsáveis pela indução de masculinidade em flores dióicas, sintetizados do ácido mevalônico e a principal giberelina disponível é o ácido giberélico (Figura 51), que é um diterpeno (Davies, 1990).

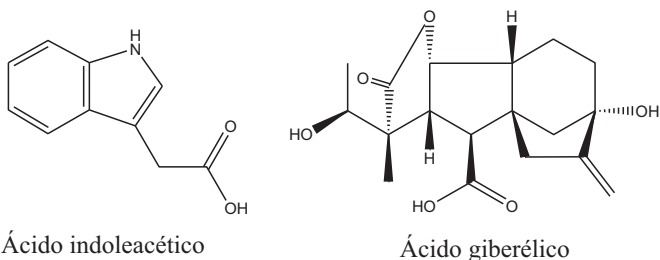


Figura 52 Estrutura química de dois tipos de hormônios em plantas.

A análise das folhas (macho e fêmea) em cromatografia de alta eficiência (CLAE) mostrou perfis cromatográficos semelhantes (figura 53). Entretanto outros métodos e detectores podem ser explorados para poder afirmar ou não a semelhança dos constituintes nos extratos.

Foi possível identificar as substâncias isoladas H3 (podoandina, 1), H5 (13-hidroxi-8,9-shizukanolideo, 2) e HB 212 (1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina, 6) no extrato bruto. 1 mg de cada substancia foi dissolvido em 10 ml de álcool 70% e analisado pelo método em item 4.5. Os tempos de retenção foram obtidos e comparados com o cromatograma do extrato bruto. Este método então possibilitou a identificação destes marcadores químicos, que são lactonas sesquiterpênicas, no extrato (Figura 54).

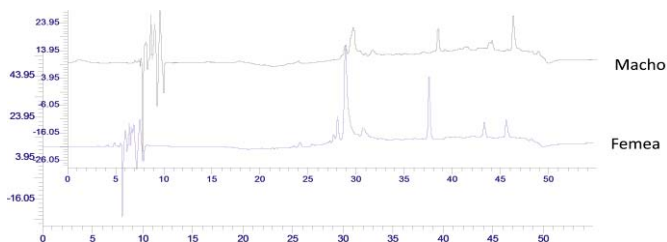


Figura 53- Perfil cromatográfico do extrato das folhas (macho e Fêmea) de *Hedysosmum brasiliense*. Condições cromatográficas item 4.5.

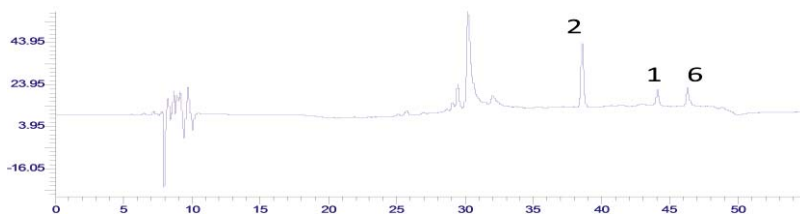


Figura 54: Cromatograma de *Hedysosmum brasiliense* com detecção em 260 nm. 1. Podoandina; 2. 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolideo; 6. 1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina. Condições cromatográficas item 4.5.

5.4 Atividades Farmacológicas

5.4.1 Atividade no Sistema Nervoso Central

Um dos usos populares de *Hedyosmum brasiliense* é como calmante. Por isso o estudo do seu efeito sobre o sistema nervoso central vem sendo estudado. Nossos resultados mostraram que o extrato etanólico e um dos compostos isolados, (podoandina), apresentaram atividades psicofarmacológicas, como efeitos ansiolítico, antidepressivo e hipnótico em roedores. Estes efeitos foram constatados usando modelos farmacológicos típicos como teste de campo aberto, tempo de sono induzido pelo barbitúricos, teste de cruz elevado e teste de nado forçado (Tolardo et al., 2010). Devido a tais resultados, outros estudos foram realizados para explorar os mecanismos pelos quais o extrato e a podoandina exibiam suas atividades antidepressivas. Através do teste de nado forçado, confirmou-se que o mecanismo de ação dá-se através das vias adrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas (Gonçalves et al., 2011, *submetido*, em anexo).

5.4.2 Atividade no Sistema Cardiovascular

A atividade vasodilatadora do extrato bruto, podoandina e 13HDS foi avaliada nos anéis aórticos de camundongos. Os anéis aórticos foram montados em uma solução nutritiva e foram pré-contraídos com fenilepinefrina (1 μ M). Após, uma curva de resposta com várias concentrações das substâncias foi realizada. A Figura 55 mostra que o extrato bruto, Podoandina e 13HDS atenuaram a contração nos anéis aórticos induzida pela fenilepinefrina, assim mostrando atividade vasodilatadora. Mais estudos estão sendo conduzidos para identificar o mecanismo de ação destas substâncias e do extrato.

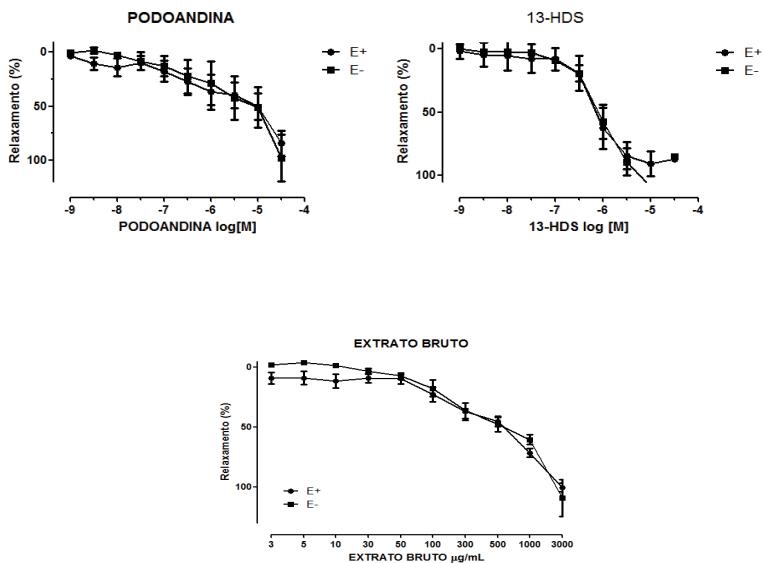


Figura 55 A curva de resposta das concentrações das substâncias. E+ Anéis aórticas com endotélio e E- Anéis aórticas sem endotélio.

5.4.3 Atividade Antibacteriana

As lactonas sesquiterpênicas, H622 (15-acetil-isogermafurenolídeo), HB212 (1-hidroxi-10,15-metilenopodoandina) e HB 21 (15-hidroxi-isogermafurenolídeo) foram avaliados *invitro* para atividade antibacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv com isoniazida como padrão, não apresentando atividade. A metodologia do ensaio está descrito em Amoah et al., (2011 *submetido* em anexo).

6. Conclusões

Foram isoladas e identificadas da espécie *Hedyosmum brasiliense* 13 substâncias. Dessas, quatro são inéditas na literatura e pertencem à classe das lactonas sesquiterpênicas (H622, HB 212, HL 33 e HB 21); seis pela primeira vez estão sendo descritas para a espécie (monoglicerídeo de ácido esteárico, ester etílico do ácido linolênico, ester etílico do ácido linoleico, ácido 3-metoxi-4-hidroxibenzoico, escopoletina e vanilina), e três (podoandina, 13-hidroxi-8,9-diidroshizukanolídeo e β -sitosterol) foram descritas previamente para a *H. brasiliense*.

A caracterização destas lactonas no extrato confirma a importância destas substâncias como marcadores químicos desta família Chloranthaceae.

A substância H5 pode ser encontrada na fração hexano e na fração diclorometano do extrato etanólico.

Quanto aos testes biológicos, a podoandina apresentou atividade antidepressiva, com mecanismo de ação através das vias adrenérgicas, dopaminérgicas e serotoninérgicas.

O extrato etanólico, podoandina e 13HDS parecem ter atividade vasodilatadora e por isso, mais estudos devem ser feitos para identificar o mecanismo de ação.

As lactonas H622, HB 212 e HB não têm atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*.

7. Perspectivas

Como perspectivas mais estudos podem ser feitos para explorar os extratos brutos macho e fêmea. Ainda, mais análises fitoquímicas podem ser feitas para explorar as frações acetato de etila e aquosa.

Referências

ACEBEY, L.; SAUVAIN, M.; BECK, S.; MOULIS, C.; GIMENEZ, A.; JULLIAN, V. Bolivianine, a new sesterpene with an unusual skeleton from *Hedyosmum angustifolium*, and its isomer, isobolivianine. *Organic Letters*, v. 9, n. 23, p. 4693-4696, 2007.

ACEBEY L.; JULLIAN, V.; SERENO, D.; CHEVALLEY, S.; ESTEVEZ, Y.; MOULIS, C.; BECK, S.; VALENTIN, A.; GIMENEZ, A.; SAUVAIN M. Anti-Leishmanial Lindenane Sesquiterpenes from *Hedyosmum angustifolium*. *Planta Medica* n. 76, p. 365-368, 2010.

AMOAHA, S. K. S.; CRUZ, A. C. H.; SOUZA, M. M.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. 2011. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hedyosmum brasiliense*. *Journal of Natural Products* submitted manuscript, 2011.

BADE, R.; CHAN, H. F.; REYNISSON, J. Characteristics of known drug space. Natural products, their derivatives and synthetic drugs *European Journal of Medicinal Chemistry* n. 45, p. 5646-5652, 2010.

BERCION, S.; MARTIN, M. A. C. K.; BALTAZE, J. P.; BOURGEOIS, P. A new alpha-methylene gamma-lactone sesquiterpene from *Hedyosmum arborescens*. *Fitoterapia*, [S.l.], v. 76, p. 620-624, 2005.

BLAY, G.; BARGUES, V.; CARDONA, L.; GARCIA, B.; PEDRO, J. R. Stereoselective synthesis of 7,11-guaien-8,12-olides from santonin. Synthesis of Podoandin and (\pm) zedolactone A. *Journal of Organic chemistry* v. 65, p. 6703-6707, 2000.

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

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; ROBINSON, H.; KING, R. M. Modified eudesmanolides and other sesquiterpene lactones from *Wunderlichia mirabilis* and *Actinoseris polymorpha*. *Phytochemistry* v.20 n. 7, p. 1631-1634, 1981.

BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos naturais: Importância, Interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. *Química nova* n.17, n.5, p. 405-445,1994.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America A personal view. *Journal of Ethnopharmacology* n. 100, p. 131–134, 2005.

CAO, C. M.; PENG, Y.; SHI, Q. W.; XIAO, P. G. Chemical Constituents and Bioactivities of Plants of Chloranthaceae. *Chemistry & Biodiversity*, [S.l.], v.5, p. 219-290, 2008.

CAPRA, J. C.; CUNHA, M. P; MACHADO, D. G.; ZOMKOWSKI, A. D. E.; MENDES B. G.; SANTOS A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; RODRIGUES A. L. S. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: Evidence for the involvement of monoaminergic systems. *European Journal of Pharmacology* v.643, p.232–238, 2010.

CÁRDENAS, L. C.; RODRÍGUEZ, J.; VILLAVERDE, M. C.; RIGUERA, R.; CADENA, R.; OTERO, J. A. The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum*: flavonoid glycosides. *Planta Medica*, v. 59, n.1, p. 26-27, 1993.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, M. O. *et al* (Eds) Farmacognosia : da planta ao medicamento. 3. ed. rev. Florianópolis, SC: Editora da UFSC, 2001. 833.

CHANG M. H., WANG G. J., KUO Y. H. , LEE C. K. The Low Polar Constituents from *Bidens Pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff *Journal of the Chinese Chemical Society*. v.47, p.1131-1136, 2000.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, v.15, p. 7313-7352, 2010.

DAVIES, Peter J. Plant hormones : and their role in plant growth and development. Dordrecht: Kluwer, 1990. 681p.

DE ABREU, I. N. A.; SAWAYA, C. H. F.; EBERLIN, M. N.; MAZZAFERA P. Production of Pilocarpine in callus of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf). *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* n. 41, p. 806–811, 2005.

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

DREW, D. P.; KRICHAU, N.; REICHWALD, K.; SIMONSEN, H. T. Guaianolides in Apiaceae: perspectives on pharmacology and biosynthesis. *Phytochemistry Reviews* v.8, p. 581–599, 2009.

ENDPRESS, P. K. Perianth biology in the basal grade of Extant Angiosperms. *International Journal of Plant Science* v. 169, n. 7, p. 844 – 862, 2008.

FRIEDRICH, D.; BOHLMANN, F. Total synthesis of various elemanolides. *Tetrahedron* v. 44, n. 5, p. 1369-1392, 1988.

GHANTOUS, A.; GALI-MUHTASIB, H., VUORELA, H.; SALIBA N. A.; DARWICHE N. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? *Drug Discovery Today* v. 15, n. 15/16, p. 668-678, 2010.

GONCALVES, A. E., AMOAH, S K. S., TOLARDO, R., BIAVATTI, M. W.; DE SOUZA, M.M. Antidepressant-Like Effect of *Hedyosmum brasiliense* and its Sesquiterpene Lactone, Podoandin in Mice: Evidence for the Involvement of Adrenergic, Dopaminergic and Serotonergic Systems *European journal of pharmacology* submitted manuscript, 2011.

GUEDES, A. Estudo químico e avaliação da atividade analgésica e antimicrobiana de *Hedyosmum brasiliense* Mart.ex.Miq (Chloranthaceae).1997. 127f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, M. O. *et al.* (Eds) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre:UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p.15

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

HARIDAS NIDHINA, P. A.; POULOSE, N.; GOPALAKRISHNAPILLAI, A. Vanillin induces adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells by activating extracellular signal regulated kinase 42/44 *Life Sciences* v.88, n. 15-16, p. 675-680, 2011.

HOULT, J. R. S.; PAYÁT M. Pharmacological and Biochemical Actions of Simple Coumarins: Natural Products with Therapeutic Potential. *General Pharmacology* v. 27, p.713-722, 1996.

KAR, A. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Kent: Anshan, 2 ed xvii, 879p, 2008.

KAWABATA, J.; TAHARA, S.; MIZUTANI, J. Isolation and structural elucidation of four sesquiterpenes from *Chloranthus japonicus* (Chloranthaceae). *Agricultural and Biological Chemistry*, [S.l.], v. 45 n. 6, p. 1447-1453, 1981.

KAWABATA, J.; MIZUTANI, J. Distribution of lindenanolides in the Chloranthaceae. *Agricultural and Biological Chemistry*, [S.l.], v. 52, n. 11, p. 2965-2966, 1988.

KHAN, A. L.; KHAN, H.;HUSSAIN, J.; ADNAN, M.; HUSSAIN, I.; KHAN, T.; KHAN, A. R. Sesquiterpenes: The potent antioxidants. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research* v. 51, n. 6, p. 343-350, 2008.

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

KONG, H. Z. Comparative morphology of leaf epidermis in the Chloranthaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, [S.l.], v.136, p. 279–294, 2001.

KOUL, J. L.; KOUL, S.; SINGH, C.; TANEJA, S. C.; SHANMUGAVEL, M.; KAMPASI, H.; SAXENA, A.K.; QAZI, G.N.

In vitro cytotoxic elemanolides from *Vernonia lasiopus*. *Planta Medica* v. 69, n. 2, p. 164-166, 2003.

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

LEONTI, M. The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology *Journal of Ethnopharmacology* n. 134, p. 542–555, 2011.

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

MACHADO, A. V. Efeitos do estresse hídrico em plantas jovens de *Hedyosmum brasiliense* MART. (CHLORANTHACEAE). 2004. 65 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova* v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MCCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* v. 68, n. 14, p. 2015-2022, 2007.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. Anatomy of the Dicotyledons. Oxford: Clarendon Press, 1950, v. 1.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos Ministério de Saúde, Brasília – DF 2006 p.1-57

MUNDINA, M.; VILA, R.; TOMI, F.; CICCÍÓ, J. F.; CARLES IBAÑEZ, C.; ADZET, T.; CASANOVA, J.; CAÑIGUERAL, S. Composition of the essential oils from leaves and fruits of three *Hedyosmum* species from Costa Rica. *Flavour and Fragrance Journal*, [S.l.], v. 15, p. 201–205, 2000.

OLIVEIRA, F. L. Análise fitoquímica de *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae 2009. Dissertação (Mestrado) Universidade do Vale do Itajaí, Centro de Ciências da Saúde.

PICMAN, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology* v.14, n. 3, p. 255-281,1986.

REITZ, R. Clorantáceas. Flora Ilustrada Catarinense. Itajaí, parte I, p. 4-10, 1965.

REPETTO, M. G.; BOVERIS, A. Bioactivity of sesquiterpenes: compounds that protect from alcohol-induced gastric mucosal lesions and oxidative damage. *Mini reviews in medicinal chemistry* v.10 n. 7, p. 615-662, 2010.

SCHMIDT, T. J. Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones *Studies in Natural Products Chemistry* v.33 (PART M), p. 309-392, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa (SP): Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 704p

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

SUN, R.; SACALIS, J. N.; CHIN, C. K.; STILL, C. C. Bioactive aromatic compounds from leaves and stems of *Vanilla fragrans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* v. 49, n. 11, p. 5161-5164, 2001.

TAKEDA, K.; HORIBE, I.; MINATO, H. Components of the root of *Lindera strychnifolia* Vill. Part XIV. Sesquiterpene lactones from the root of *Lindera strychnifolia* Vill. *Journal of the Chemical Society C: Organic*, pp. 569-572, 1968.

TAKHTAJAN, L. A. (Leon Arminovich). Diversity and classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1997. 643p

TEKE, G.N.; KUIATE, J. R.; KUETÉ, V.; TEPONNO, R. B.; TAPONDJOU, L. A.; TANE, P.; GIACINTI, G.; VILAREM, G. Bio-guided isolation of potential antimicrobial and antioxidant agents from the stem bark of *Trilepisium madagascariense*. *South African Journal of Botany* v. 77, n. 2, p. 319-327, 2011.

TESSO, H.; KÖNIG, WILFRIED A.; SON, P. T.; GIANG P. M. Composition of the essential oil of flowers of *Chloranthus spicatus* (Thunb.) Makino. *Flavour and Fragrance Journal* v. 21, p. 592–597, 2006.

TOLARDO, R.; ZETTERMAN, L.; BITTENCOURTT, D. R.; MORA, T. C.; OLIVEIRA, F. L.; BIAVATTI, M. W.,; AMOAH, S. K. S.; BÜRGER, C.; de SOUZA, M. M. Evaluation of behavioral and pharmacological effects of *Hedyosmum brasiliense* and isolated sesquiterpene lactones in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*. v.128, p. 63-70, 2010.

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

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em <http://www.tropicos.org> Acesso em Jun 2011.

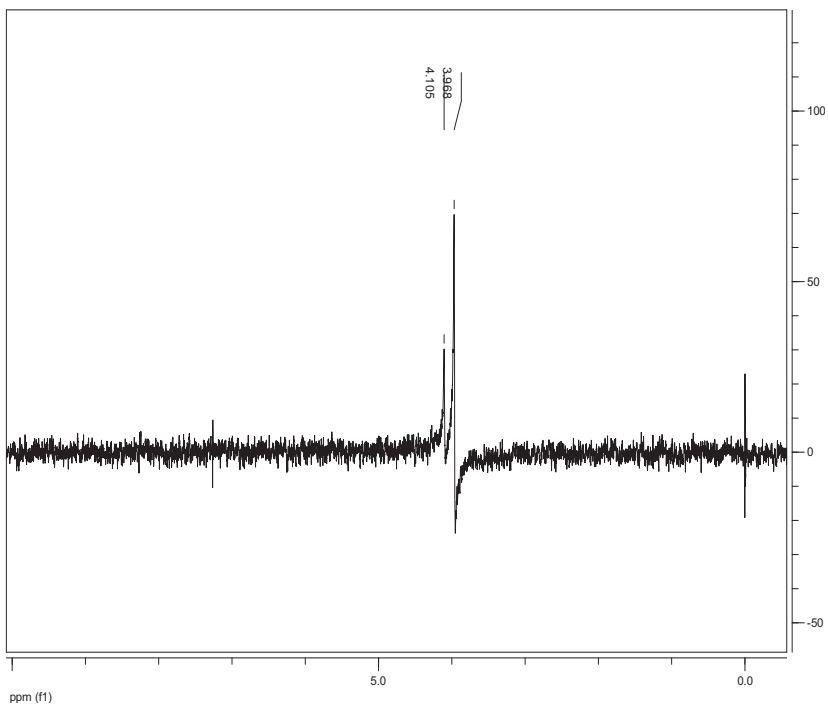
VASCONCELOS, J. M. J.; SILVA, A. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S. Chromones and flavanones from *Artemisia campestris* Subsp. *Maritima*. *Phytochemistry* v. 38, n. 4, p. 1421-1424, 1998.

Who – World Health Organization - Traditional medicine 2008. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> Acesso em jun 2011.

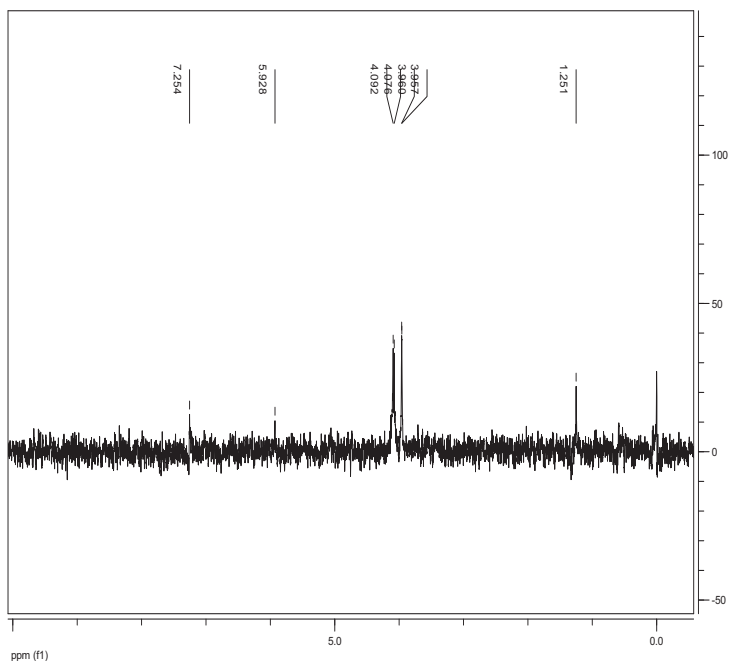
Anexo 1

ESPECTROS DE NOE E EXSY DA SUBSTANCIA HL 33
(BRASILIENSOLÍDEO)

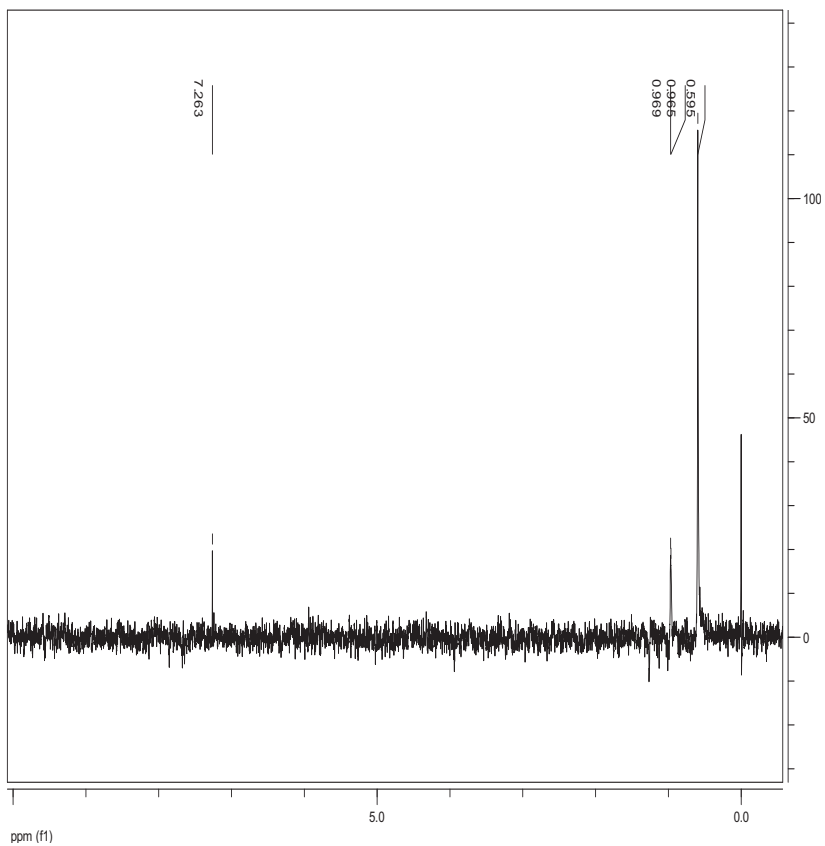
Espectro de NOE de HL 33 irradiado em 4,10 ppm.



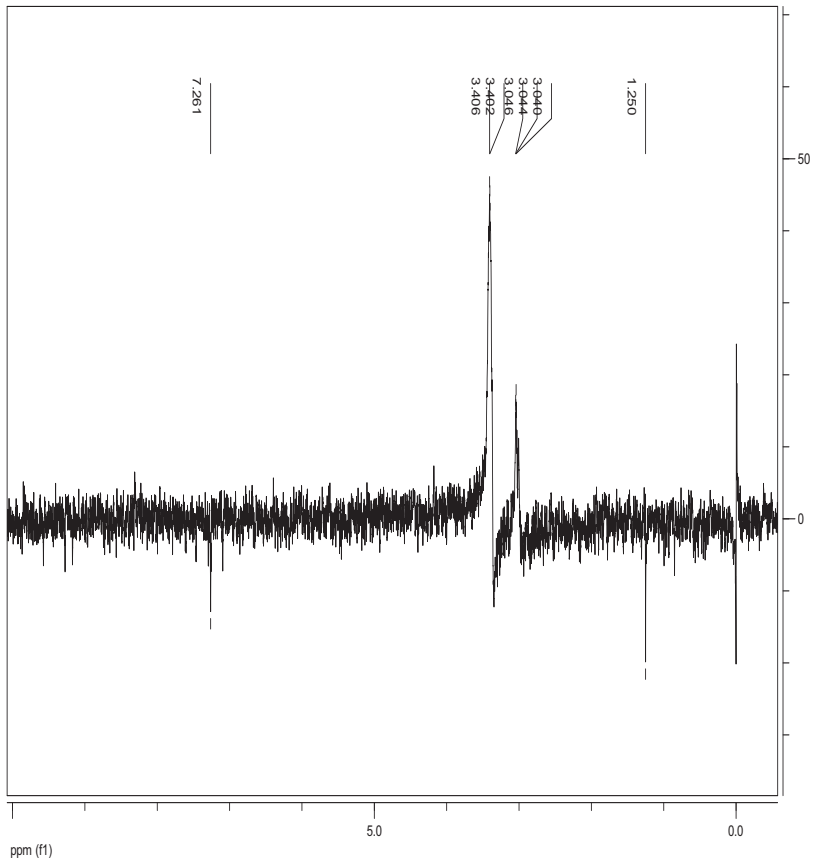
Espectro de NOE de HL 33 irradiado em 5,93 ppm.



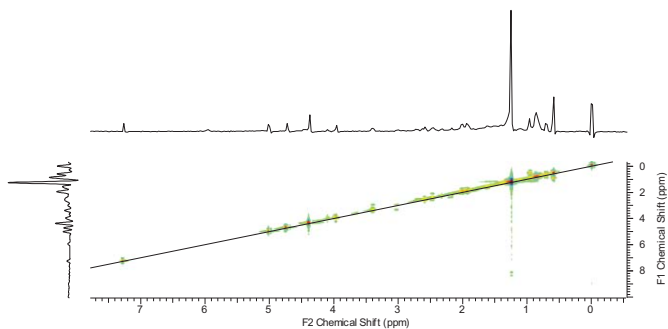
Espectro de NOE de HL 33 irradiado em 0,97 ppm



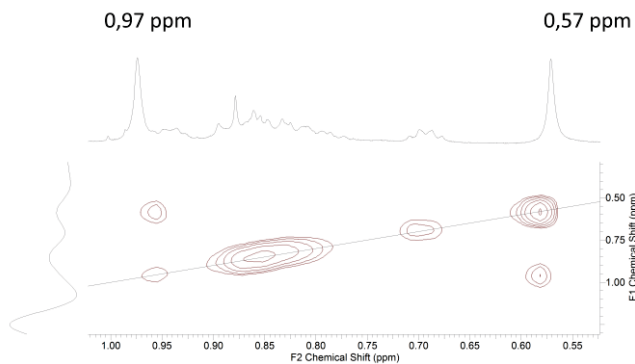
Espectro de NOE de HL 33 irradiado em 3,04 ppm.



Espectro de EX-SY substância HL 33 (Brasiliensólido)



Espectro de EX-SY substância HL 33 mostrando a troca entre 0,97 ppm e 0,57 ppm.



Anexo 2

AMOAHA, S. K. S.; CRUZ, A. C. H.; SOUZA, M. M.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; BIAVATTI, M. W. 2011. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hedyosmum brasiliense*. *Journal of Natural Products* submitted manuscript, 2011.

**Sesquiterpene lactones and other constituents from
*Hedyosmum brasiliense***

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Journal of Natural Products</i> |
| Manuscript ID: | np-2011-00384e.R1 |
| Manuscript Type: | Full Paper |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Amoah, Solomon; UFSC Oliveira, Fabio; UNICAMP Cruz, Ana; UFSC Souza, Nicole; UFSC campos, francinete; UFPR Barison, Andersson; UFPR Biavatti, Maique; UFSC |
| | |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hedyosmum*
***brasiliense* (Chloranthaceae)**

Solomon K. S. Amoah,[†] Fabio L. de Oliveira,[‡] Ana Caroline H. da Cruz,[§]
Nicole M. de Souza,[§] Francinete R. Campos,[⊥] Andersson Barison,[⊥] Maique
W. Biavatti^{†*}

[†]CIF, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brazil,

[‡]Cristalografia, Departamento de Química, UNICAMP, Campinas, SP – Brazil,

[§]LIDI, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brazil,

[⊥]Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brazil

*Corresponding author:

Telephone/Fax: + 55 48 3721 5075/9542; maique@ccs.ufsc.br

[†]CIF, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brazil

[‡]Cristalografia, Departamento de Química, UNICAMP, Campinas, SP - Brazil

[§]LIDI, CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brazil

[⊥]Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba – PR, Brazil

1
2
3
4
5 *Hedyosmum brasiliense* Miq. is an endemic, aromatic arborescent shrub,
6
7 and is the only representative of Chlorantaceae in Brazil. There have been
8
9 few studies that seek to determine its chemical composition and/or
10
11 pharmacological effects. This work describes five new compounds,
12
13 including two guaianolides, two elemanolides and a dimeric lindenanolide,
14
15 which were tested against *Mycobacterium tuberculosis*, together with
16
17 podoandin and onoseriolide, and some widespread phenolics. All the
18
19 structures of the isolated compounds were determined based on extensive
20
21 analysis of 1D and 2D NMR and MS data, as well as comparison with the
22
23 published data. The new compounds found were: 1,2-epoxy-10 α -hydroxy-
24
25 podoandin, 1-hydroxy-10,15-methylenepodoandin, 15-acetyl-
26
27 isogermafurenolide, 15-hydroxy-isogermafurenolide and brasiliensolide –
28
29 which is the first dimeric sesquiterpenolid identified in the *Hedyosmum*
30
31 genus. The phenolic compounds isolated were scopoletin, vanillin, vanillic
32
33 acid, protocatechuic aldehyde and ethyl caffeate. The isolated sesquiterpene
34
35 lactones, at concentrations in the range of 1-30 μ M, did not show *in vitro*
36
37 anti-mycobacterial activity, since *M. tuberculosis* cultures exposed to the
38
39 *Hedyosmum brasiliense*-derived substances kept growing but were sensitive
40
41 to isoniazid, an antibacterial agent.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 *Hedyosmum brasiliense* Miq. is an aromatic arborescent shrub, commonly
4
5 known as “Cidrão”, a species of the largest genus of the primitive
6
7 angiosperm Chloranthaceae family, which is neotropical except for one
8
9 Asian species (*H. orientale*). *H. brasiliense* is endemic to Brazil, where it is
10
11 the sole representative of Chloranthaceae.¹ Although widely used as a
12
13 calmate, hypnotic, antidepressant, stomachic and aphrodisiac, and to treat
14
15 migraine and diseases of the ovary,^{2,3} there have been few studies to
16
17 determine its chemical composition and validate its pharmacological effects.
18
19 Only its antinociceptive effect⁴ was investigated previously in our series of
20
21 investigations, including analysis of the essential oil composition and
22
23 antimicrobial activity,⁵ neurochemical properties of the ethanol extract, its
24
25 fractions, and the antidepressant effect of isolated sesquiterpene lactones
26
27 (onoseriolide or 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide and podoandin).⁶
28
29 However, there are a series of studies on other species of this genus,
30
31 focusing mainly on the essential oil composition⁷⁻¹¹ and the isolation of
32
33 sesquiterpene lactones, guaianolides and lindenanolides.¹²⁻¹⁷
34
35 This work describes five new compounds: two guaianolides, two
36
37 elemanolides and a dimeric lindenanolide, which were tested against
38
39 *Mycobacterium tuberculosis*, together with podoandin and onoseriolide, and
40
41 some widespread phenolics.
42
43
44
45

46 **Results and Discussion**

47

48 All structures of isolated compounds from *Hedyosmum brasiliense* were
49
50 established based on extensive 1D and 2D NMR and MS analysis.
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Compound **1** was identified as the guaianolide podoandin **1** after, comparing its spectrometric data with those reported in the literature. The ^1H NMR spectrum of **1** showed methyl signals at 1.79 ppm (H-13 and H-14) and 1.85 ppm (H-13), and methine hydrogens at 5.29 (H-3), 2.87 (H-5) and 4.55 ppm (H-8). The $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectrum of **1** showed 15 carbon signals, comprising three α -methyl olefins, one of which was strongly shielded due to the anisotropic effect of a vicinal lactone carbonyl 8.3 (C-13), 21.9 (C-14), 14.9 ppm (C-15)], six additional olefin signals at 140.7 and 124.3 (C-3 and C-4) and 142.9 and 122.7 ppm (C-1 and C-10), and typical signals of a α,β -unsaturated γ -lactone [174.3 (carbonyl), 121.3 (α -carbonyl), 163.5 (β -carbonyl) and 79.3 (γ -Carbonyl)]. Podoandin (**1**) is an abundant guaianolide previously found in *H. brasiliense*,⁶ as is compound **2** (the lindenanolide onoseriolide). Compound **2** was identified by comparison of its spectrometric data with those described in literature.^{4,6}

Compound **3** was obtained as a colorless gum, with molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_4$, as determined by HRESIMS (observed m/z 263.1263 [$\text{M} + \text{H}^+$]) and NMR data. The ^1H and ^{13}C NMR spectra of **3** (Table 1) were similar to those of podoandin (**1**), indicating the presence of a guaianolide. The signals at 1.63, 1.84 and 1.93 ppm were attributed to the methyl groups H-15, H-13 and H-14, respectively. According to single bond ^1H - ^{13}C correlations from the HSQC NMR experiment, these hydrogens are directly bonded to the carbons at 20.6, 8.4 and 15.6 ppm (C-15, C-13 and C-14), respectively (Table 1). A double quartet (2.8 and 1.5 Hz) at 4.40 ppm was also observed in the ^1H NMR spectrum, which according to the HSQC experiment, is bonded to the carbon at 79.9 ppm (C-2). The locations of the methyl groups

1
2
3 were established by long-range ^1H - ^{13}C correlations from the HMBC NMR
4
5 experiment. The methyl hydrogens at 1.63 ppm (H-15) showed correlation
6
7 with the carbons at 74.5 (C-10) and 59.7 ppm (C-1), suggesting the presence
8
9 of a hydroxyl and an epoxy group in the structure. The methyne hydrogen
10
11 (H-2) at 4.40 ppm showed correlations with the oxygenated carbon at 74.5
12
13 ppm, as well as with the olefin carbons at 127.2 and 149.6 ppm (C-3 and C-
14
15 4, respectively). The overall analysis of 1D and single-bond and long-range
16
17 ^1H - ^{13}C experiments enabled the structure to be fully elucidated, and
18
19 complete and unambiguous ^1H and ^{13}C NMR chemical shift assignments of
20
21 **3** to be performed (Table 1). The ESI(+)-MS/MS ion fragmentation
22
23 experiments at m/z 263 showed mainly daughter ions at m/z 245, 227, 199,
24
25 171 and 156, which represents two consecutive losses of water, to form the
26
27 ion fragments at m/z 245 and 227, respectively, followed by two consecutive
28
29 losses of CO, to form the ion fragments at m/z 199 and 171. After the loss of
30
31 a methyl group, the ion fragment was produced at m/z 156. Therefore,
32
33 compound **3** was identified as a new guaianolide, named 1,2-epoxy-10-
34
35 hydroxy-podoandin.
36
37

38
39 Compound **4** was also obtained in the form of a colorless gum, with
40
41 molecular formula $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$, as determined by HRESIMS (observed m/z
42
43 247.1309 $[\text{M}+\text{H}]^+$) and NMR data. The ^1H and $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra of **4**
44
45 (Table 1) were similar to those of podoandin (**1**) and 1,2-epoxy-10-hydroxy-
46
47 podoandin (**3**), indicating the presence of another guaianolide. The main
48
49 difference observed in the ^1H NMR spectrum of **4** was the presence of two
50
51 signals at 5.29 and 5.39 ppm (H-15a and H-15b) replacing one of the methyl
52
53 signals in **1**. Both of these hydrogens showed correlation with the same
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 carbon at 118.3 ppm in the HSQC NMR experiment, indicating the presence
4
5 of an exocyclic double bond in **4**. However, the methyl signals at 1.84 (H-
6
7 13) and 1.85 ppm (H-14) remained, showing a correlation, in the HSQC
8
9 NMR experiments, with the carbons at 7.8 (C-13) and 15.1 ppm (C-14),
10
11 respectively, which is characteristic of methyl groups attached to olefins, as
12
13 in podoandin (**1**) and 1,2-epoxy-10-hydroxy-podoandin (**3**). Both methylene
14
15 hydrogens at 5.29 and 5.39 ppm showed long-range ^1H - ^{13}C correlation in
16
17 the HMBC NMR experiments with a carbon at 85.1 ppm, indicating the
18
19 presence of a vicinal oxygenated carbon in C-1, which was confirmed by the
20
21 long-range ^1H - ^{13}C correlations observed for the hydrogens H-5, H-6 and H-
22
23 9 (Table 1). Extensive analysis of 1D and single-bond and long-range ^1H -
24
25 ^{13}C experiments was helpful in the complete structure elucidation of **4**, as
26
27 well as enabling the complete and unambiguous ^1H and ^{13}C NMR chemical
28
29 shift assignments to be performed (Table 1). The relative configuration of **4**
30
31 was deduced based on 1D NOE experiments. The selective irradiation of
32
33 resonance frequency of H-8 at 4.65 ppm caused a NOE enhancement in the
34
35 signal of hydrogens H-15a and H-15b at 5.29 and 5.39 ppm, as well as in
36
37 the signals of hydrogens H-6 ax and H-9 eq at 1.76 and 2.98 ppm,
38
39 respectively (Figure 2). Selective irradiation of the resonance frequency of
40
41 hydrogen H-6 eq at 2.65 ppm showed NOE intensification in the signal of
42
43 hydrogen H-5 signal at 2.28 ppm, and conversely, irradiation at 2.28 ppm
44
45 showed NOE intensification in the hydrogen H-5 signal at 2.65 ppm
46
47 revealing the relative configuration of **4** shown in figure 2, which is in
48
49 agreement with similar guaianolide structures described in the literature.^{18,19}
50
51 The ESI(+)-MS/MS experiments of ion at m/z 247 showed a similar profile
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 of fragmentation to that observed for **3**, with mainly daughter ions at m/z
3
4 229, 211, 201, 183 and 173. These fragments represent an initial loss of
5
6 water in order to produce the ion fragment at m/z 229. Subsequently, this
7
8 fragment may suffer another loss of water followed by a loss of CO to form
9
10 the ion fragments at m/z 211 and 183, respectively, or it may first suffer a
11
12 loss of CO followed by a loss of water to form the ion fragment at m/z 201
13
14 and the same ion fragment at m/z 183. Alternatively, the ion fragment at m/z
15
16 201 may suffer a loss of CO to form the ion fragment at m/z 173. Therefore,
17
18 compound **4** was established as a new guaianolide named 1-hydroxy-10,15-
19
20 methylenepodoandin. Other guaianolides, such as hedyosminolide,
21
22 hedyosumins or hedyosmum, have recently been found in the *Hedyosmum*
23
24 species.^{12,18,19}

25
26
27 Compound **5** was obtained as a colorless gum, with the molecular formula
28
29 $C_{17}H_{22}O_4$, as deduced by HRESIMS, (observed m/z 291.1590 $[M+H]^+$) and
30
31 NMR data. The 1H NMR of **5** showed two methyl signals at 1.18 (H-14) and
32
33 1.83 (H-13) ppm as well as a third signal at 2.11 ppm that showed long-
34
35 range 1H - ^{13}C correlations, in the HMBC NMR experiment, with a carbon at
36
37 171.0 ppm, indicating the presence of an acetate group in **5**. A series of
38
39 signals characteristic of olefinic hydrogens was also observed in the 1H
40
41 NMR spectrum. The hydrogens at 5.00 (dd 17.4 and 0.5 Hz, H-2b) and 5.05
42
43 (dd 10.7 and 0.5 Hz, H-2a) ppm showed single-bond 1H - ^{13}C correlation, in
44
45 the HSQC NMR experiments, with the same carbon at 113.1 (C-2) ppm,
46
47 while the hydrogens at 5.06 (H-3a) and 5.32 (H-3b) showed correlation, in
48
49 the HSQC NMR experiment, with the same carbon at 115.3 (C-3) ppm,
50
51 indicating the presence of two olefinic methylenes. A fifth signal at 5.68 (dd
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 17.4 and 10.7 Hz, H-1) showed single-bond ^1H - ^{13}C correlation with the
4
5 carbon at 145.5 (C-1) ppm characterizing an isolated olefin group. The
6
7 methyl hydrogens at 1.83 ppm, which were attached to C-13 at 8.3 ppm,
8
9 according to the HSQC NMR experiment, showed long-range ^1H - ^{13}C
10
11 correlations with the carbons at 120.4 (C-11), 161.7 (C-7) and 175.1 ppm
12
13 (C-12), characterizing a lactone ring. The methyl hydrogens at 1.18, which
14
15 were attached to C-14 at 16.5 ppm, according to the HSQC NMR
16
17 experiment, showed correlations, in the HMBC NMR experiment, with the
18
19 carbons at 40.7 (C-10), 45.5 (C-9) and 145.5 (C-1). The methylene
20
21 hydrogens at 4.48 ppm, that are attached to C-15 at 67.9 ppm, according to
22
23 HSQC NMR experiment, showed correlations in the HMBC NMR
24
25 experiment with the carbons at 48.6 (C-5), 143.7 (C-4), 115.3 (C-3), as well
26
27 as with the carbon at 171.0 ppm, assuring the position of the acetyl group in
28
29 **5**. These features enabled us to establish the presence of an elemanolide.
30
31 The overall analysis of 1D and 2D NMR data enabled the complete structure
32
33 of **5** to be elucidated, and the complete and unambiguous determination of
34
35 ^1H and ^{13}C NMR chemical shift assignments of **5** to be performed (Table 2).
36
37 The relative configuration of **5** was established based on 1D NOE NMR
38
39 experiments. The selective irradiation of the resonance frequency of the
40
41 methyl hydrogens at 1.18 ppm (H-14) caused a NOE enhancement in the
42
43 signals at 5.00 (H-2a), 5.06 (H-3a), 4.85 ppm (H-8), 2.23 (H-9 eq) and 2.58
44
45 (H-6 ax). All 1D NOE investigations led to the stereo structure of **5**, as
46
47 shown in figure 2, which is in accordance with the stereostructure of the
48
49 previously isolated elemanolide isogermafurenolide.²⁰ The ESI(+)-MS/MS
50
51 experiments for ion at m/z 291 showed mainly daughter ions at m/z 273,
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 213, 185, 157 and 143, which represents consecutive loss of water, acetate,
4
5 CO, ethene and methane, respectively. Therefore, compound **5** was
6
7 identified as a new elemenolide, named 15-acetyl-isogermafurenolide.

8
9 Compound **6** was obtained as a colorless gum, with the molecular formula
10
11 $C_{15}H_{20}O_3$, as deduced by HRESIMS, (mass observed in m/z 249.1484
12
13 $[M+H]^+$) and NMR data. The 1H and ^{13}C NMR data of **6** were very similar
14
15 to those of **5** (Table 2), except for the absence of the acetyl group, which
16
17 was replaced by a hydroxyl at C-15 in structure **6**, as well as by the shifting
18
19 of the methylene hydrogen signals to 4.00 and 4.09 ppm (H-15). The NMR
20
21 investigations enabled the complete structure of **6** to be elucidated, and its
22
23 complete and unambiguous 1H and ^{13}C NMR chemical shift assignments to
24
25 be performed (Table 2). The ESI(+)-MS/MS experiments of ion at m/z 249,
26
27 showed a similar profile of fragmentation to that observed for **5**, with
28
29 mainly daughter ions at m/z 231, 185 and 157, which represents the
30
31 consecutive loss of water, water plus CO and ethene respectively.
32
33 Therefore, compound **6** was established as a new elemenolide, named 15-
34
35 hydroxy-isogermafurenolide. Elemene derivatives have been found in
36
37 *Hedyosmum* essential oil,⁷⁻¹⁰ but no elemenolide has been described from
38
39 this genus. Isogermafurenolide has been found in the essential oil of
40
41 *Chloranthus spicatus*,²⁰ as well as glycosylated elemanolides in *Sarcandra*
42
43 *glabra*,²¹ which belong to the Chloranthaceae genera.

44
45
46
47 Compound **7** was obtained as a colorless gum, with the molecular formula
48
49 $C_{30}H_{37}O_{10}$, according to HRESIMS, (mass observed in m/z 555.2211 $[M-H]^-$
50
51) and NMR data. The 1H NMR spectra of **7** obtained in $CDCl_3$ at room
52
53 temperature (~ 295 K) showed very broad signals, indicating the occurrence
54
55
56
57

1
2
3 of some dynamic processes. In contrast, when the ^1H NMR spectra were
4
5 acquired at lower temperatures, the signals were sharpened. The lower the
6
7 temperature, the sharper the signals in the ^1H NMR spectra. The $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$
8
9 NMR spectra showed two sets of signals with different intensities, with 15
10
11 signals in each, such as those at 150.5/151.6 ppm (C-4) and 106.3/106.5
12
13 ppm (C-15) indicating the presence of an exocyclic double bond, as in **2**,
14
15 and those at 172.3/172.7 (C-12), 127.2/126.2 (C-11), 162.6/163.3 (C-7)
16
17 which are typical of a α,β -unsaturated γ -lactone (Table 3), as in **1-6**.
18
19 Exhaustive analysis of ^1H , $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectra and the single-bond and
20
21 long-range ^1H - ^{13}C correlations from the HSQC and HMBC NMR
22
23 experiments (Table 3) revealed two completely independent sets of NMR
24
25 data, and led to the initial conclusion that there are two very similar
26
27 compounds in **7**. The two sets of NMR data were similar to those found for
28
29 lindenanolide onoseriolide (**2**), except for the absence of a double bond in
30
31 C-8-C-9, which was replaced by two OH groups in compound **7**. The OH
32
33 groups at C-8 and C-9 were established based on single-bond ^1H - ^{13}C
34
35 correlation of the hydrogens at 3.89/4.09 (H-9) ppm with the carbons at
36
37 77.2/75.9 ppm (C-9), as well as the long-range ^1H - ^{13}C correlation with the
38
39 carbons at 104.6/106.0 ppm (C-8) (Table 3). This finding was supported by
40
41 the long-range ^1H - ^{13}C correlations of the OH-9 and 9' at 4.59/6.07 with the
42
43 carbons at 104.8/105.9 (C-8), 76.6/78.3 (C-9) and 43.1/44.4 ppm (C-10) and
44
45 the correlations of the OH-8 and 8' at 6.29/6.44 with the carbons at
46
47 161.6/161.8 (C-7), 104.8/105.9 (C-8) and 76.6/78.3 ppm (C-9) when the
48
49 experiments were performed in acetone- d_6 .
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

According to the NMR data, the molecular mass for the compound was expected to be around 278 Da. However, both ESIMS and HRESIMS investigations showed that **7** has a molecular ion with m/z 555.1 and 555.2211 [M-H]⁻ respectively, revealing that **7** has the molecular formula C₃₀H₃₆O₁₀. This evidence was supported by daughter and precursor ion ESIMS/MS experiments, performed at low and high resolutions. The HRESIMS spectra showed a high intensity ion at m/z 277.1055, but the ion precursor experiment revealed that this ion fragment was derived from the ion at m/z 555.2211. Moreover, the HRESIMS/MS experiment of ion at m/z 555.2211 showed mainly the daughter ion at m/z 277.1055 and other ion fragments with very low intensities. These observations led us to conclude that **7** is composed of dimeric compounds. The ESI(-)MS/MS experiments of ion at m/z 277 showed mainly ion fragments at m/z 259 and 215, which represents loss of water, followed by loss of CO, respectively.

Although all the NMR data previously obtained showed two independent sets of signals of different intensities, the hypothesis that these are two very similar compounds was nevertheless considered. However, when 1D NOE experiments were performed to obtain the relative configuration, it was observed that selective irradiation at a specific resonance frequency simultaneously affected its associated NMR frequency on the other supposedly similar compound. To investigate this finding, an EXSY NMR experiment was performed, which revealed that the all pairs of hydrogens in the ¹H NMR spectra are mutually exchangeable, revealing that **7** is one compound, but with two mutually-exchangeable conformations (Table 3). The configuration of C-9 was established by NOE experiments.

1
2
3 The NOE correlations observed between H-14 and H-9 indicated a β -
4 configuration in C-9 and C-9', as described for hydroxylated lindenanolides
5 from *Sarcandra*.²¹⁻²³ Therefore, compound **7** was identified as a new
6
7 dimeric lindenanolide named brasiliensolide, described for the first time in
8
9 the literature, and the first dimeric sesquiterpenolid found for the genus
10
11 *Hedyosmum*. From the four genera found in Chloranthaceae, species of
12
13 *Chloranthus* and *Sarcandra* have presented dimeric lactones, but only
14
15 species of *Chloranthus* have been described as producing several lindenane
16
17 dimers.²⁴⁻²⁶ However, the hydroxyl is β -oriented in C-9 of the *Chloranthus*
18
19 dimers. The isolated sesquiterpene lactones, at concentrations of 1 to 30
20
21 μM , did not present *in vitro* anti-mycobacterial activity, since
22
23 *Mycobacterium tuberculosis* cultures exposed to *Hedyosmum brasiliense*-
24
25 derived substances continued growing, but were sensitive to isoniazid, an
26
27 antibacterial agent. In spite of these results, some guaianolides,
28
29 germacranolides and eudesmanolides were reported to have important
30
31 inhibitory action against *M. tuberculosis*, with MIC ranging from 16 to 128
32
33 $\mu\text{g/ml}$.²⁷⁻²⁸

40 Experimental Section

41
42 *General experimental procedures.* Optical rotations were recorded on a
43
44 Jasco P-2000 polarimeter at 20°C. All the NMR data were acquired in
45
46 CDCl_3 at 295 for compounds **1-6** and in CDCl_3 and acetone- d_6 at 295-253 K
47
48 for compound **7**, on Bruker AVANCE 400 and AVANCE III 400 NMR
49
50 spectrometers, both operating at 9.4 T, observing ^1H and ^{13}C nuclei at
51
52 400.13 and 100.61 MHz, respectively. The spectrometers were equipped
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
with a 5 mm multinuclear direct detection probe with z -gradient or a 5 mm
multinuclear inverse detection probe with z -gradient. Single-bond and long-
range ^1H - ^{13}C correlations from the HSQC and HMBC NMR experiments
were performed with the average coupling constants $^1J_{(\text{C,H})}$ and $^{1\text{R}}J_{(\text{C,H})}$
optimized for 140 and 8 Hz, respectively. 1D NOE experiments were
performed by selective excitation of each ^1H NMR frequency and gradient
selection using the double-pulsed field gradient spin-echo (DPFGSE)-NOE
experiment with a constant mixing time of 300 ms. The 2D exchange
spectroscopy (EXSY) NMR experiment was acquired using a NOESY pulse
sequence with a mixing time of 300 ms, using the States phase-cycling
method in order to generate pure absorption phase signals. All ^1H and ^{13}C
NMR chemical shifts (δ) are given in ppm related to TMS as internal
reference at 0.00 ppm, and the coupling constant (J) in Hz. All the pulse
programs used were supplied by Bruker. The HRESIMS spectra were
carried out in the positive and negative ion modes, on hybrid Bruker
UltrTOF-Q and micrTOF-Q II mass spectrometers equipped with
electrospray ionization (ESI) sources.

38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
Plant material. Aerial parts of *Hedyosmum brasiliense* Miq. Chloranthaceae
were collected in Antonio Carlos, Santa Catarina, Brazil, in October 2009,
and were identified by the botanist Dr. Ademir Reis. A voucher specimen
(2031) was deposited in the Lyman Bradford Smith Herbarium (UNIVALI,
Itajaí - Santa Catarina).

48
49
50
51
52
53
54
55
Extraction and Isolation. Fresh leaves of *H. brasiliense* (5 Kg) were
extracted, at room temperature, with ethanol (bi-distilled) for 15 days. The
solvent was removed from the extract under reduced pressure and used to

1
2 re-extracted the plant material. The resulting crude extracts, after solvent
3 removal, were combined (190 g) and kept in a desiccator under vacuum for
4 residual solvent removal. The extract was initially redissolved in H₂O and
5 partitioned with increasing polarity solvents, yielding *n*-hexane (16 g),
6 CH₂Cl₂ (4 g), EtOAc (13 g) as well as residual aqueous fraction, which was
7 stored at -18°C.
8

9
10 Hexane fraction was submitted to flash silica gel (240-400 mesh) column
11 chromatography (CC) and eluted in a gradient system consisting of
12 increasing concentrations of CH₂Cl₂ in *n*-hexane (0-70%, 200 ml) followed
13 by EtOAc in CH₂Cl₂ (0-70%, 200 ml), yielding eight sub-fractions (A-H).
14 Sub-fraction A was purified by silica gel (230-400 mesh) CC, eluted with
15 increasing amounts of *n*-hexane in acetone (from 9:1 to 3:7) yielding
16 guaianolide (**4**, 10 mg) and β-sitosterol (64.5 mg). Re-crystallization of sub-
17 fraction B led to the isolation of guaianolide podoandin (**1**, 300 mg),
18 identified by comparison with previously spectrometric data described in the
19 literature.²⁹ From sub-fraction C, 13-Hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide or
20 onoseriolide (**2**, 40 mg) crystallized spontaneously and was identified by
21 comparing its spectrometric data with those reported in the literature.⁴ Sub-
22 fraction E was fractionated by silica gel CC (240-400 mesh) eluted with *n*-
23 hexane-acetone (80:20) yielding sub-fractions E1-E4. Additional
24 chromatographic separation of sub-fraction E4 by charcoal, followed by
25 medium pressure (Lobar 240-10 Lichroprep Si 60 Merck) CC eluted with *n*-
26 hexane-EtOAc (80:20), resulted in a new dimeric lindenane sesquiterpene
27 lactone, named brasiliensolide (**7**, 4 mg). Sub-fraction F was subjected to
28 silica gel CC, eluted with *n*-hexane-CH₂Cl₂-acetone (4:5:1), yielding
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

elemanolide 15-acetylisogermafurenolide (**5**, 35 mg) and monoglyceride of stearic acid (30 mg).

Dichloromethane fraction was also subjected to flash silica gel (240-400 mesh) CC, to yield sub-fractions I-P. Sub-fraction K was submitted to medium pressure (Lobar 240-10 Lichroprep Si 60 Merck) CC, yielding a mixture of linolenic and linoleic acids, ethyl esters (6 mg). Sub-fraction M was purified on silica gel CC, eluted with increasing concentrations of *n*-hexane in acetone (from 9:1 to 3:7) yielding 11 new sub-fractions (M1-M11). Sub-fraction M8 (111 mg) was further subjected to silica gel CC, eluted with a gradient system of increasing concentrations of EtOAc in CH₂Cl₂ (from 9:1 to 3:7), which led to the isolation of 15-hydroxyisogermafurenolide (**6**, 15 mg) and ethyl caffeate (40 mg).³⁰ Sub-fraction M10 (113 mg) was also fractionated on silica gel CC, eluted with *n*-hexane-acetone (70:30), to yield scopoletin³¹ and 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin).³² Additional chromatographic purification of sub-fraction M11 on silica gel CC (240-400 mesh), eluted with *n*-hexane-EtOAc (1:1), afforded 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid (vanillic acid, 4 mg).³²

EtOAc fraction was purified by successive silica gel CC, eluted with increasing amounts of acetone in *n*-hexane (from 9:1 to 3:7), yielding 1,2-epoxy-10-hydroxypodoandin (**3**, 15 mg) and protocatechuic aldehyde (10 mg).³²

1
2
3 **1,2-epoxy-10 α -hydroxy-podoandin (3)**: colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$ -5.6 (*c* 0.2,
4 CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1; ESIMS/MS (daughter ions, 25
5 eV) *m/z* 263 ([M+H]⁺, 25%), 245 (25), 227 (50), 199 (98), 171 (100) 156
6
7 (80); HRESIMS *m/z* 263.1263 (calculated for C₁₅H₁₈O₄ + H⁺, 263.1283).
8

9 **1-hydroxy-10,15-methylenepodoandin (4)**: (4a*S*,7a*S*,9a*S*)-7a-hydroxy-3,5-
10 dimethyl-8-methylidene-4a,7,7a,8,9,9a-hexahydroazulenol[6,5-*b*]furan-
11 2(4*H*)-one. Colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$ +281.6 (*c* 0.07, CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR
12 data, see Table 1; ESIMS/MS (daughter ions, 15 eV) *m/z* 247.1 ([M + H]⁺,
13 25%), 229 (100), 211 (40), 201 (50), 183 (75), 173 (50); HRESIMS *m/z*
14 247.1309 (calculated for C₁₅H₁₈O₃ + H⁺, 247.1334).
15
16

17 **15-acetyl-isogermafurenolide (5)**: colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$ +93.3 (*c* 0.1,
18 CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2; ESIMS/MS (daughter ions, 15
19 eV): *m/z* 291.1 ([M + H]⁺, 25%), 273 (21), 213 (35), 185 (97), 157 (100),
20 143 (75), 119 (45); HRESIMS *m/z* 291.1590 (calculated for C₁₇H₂₂O₄ + H⁺,
21 291.1596).
22
23

24 **15-hydroxy-isogermafurenolide (6)** colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$ +207.6 (*c* 0.25,
25 CHCl₃); ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2; ESIMS/MS (daughter ions, 10
26 eV): *m/z* 249.1 ([M + H]⁺, 25%), 231 (50), 185 (100), 170 (10), 157 (70),
27 145 (45); HRESIMS *m/z* 249.1484 (calculated for C₁₅H₂₀O₃ + H⁺,
28 249.1490).
29
30

31 **Brasiliensolide (7)** colorless gum; $[\alpha]_D^{20}$ -15.0 (*c* 0.3, CHCl₃); ¹H and ¹³C
32 NMR data, see Table 3; ESIMS/MS (daughter ions, -20 eV): *m/z* 555.1 ([M
33 - H]⁻, 6%), 277 (100); ESIMS/MS (daughter ions, -20 eV): *m/z* 277.1 ([M -
34 H - 278]⁻, 50%), 259 (10), 215 (100); HRESIMS *m/z* 555.2211 (calculated
35 for C₃₀H₃₆O₁₀ - H⁺, 555.2230).
36
37
38
39
40
41
42
43
44

1
2
3 *Antimicrobial assay.*

4 **Bacterial strains.** *Mycobacterium tuberculosis*, a virulent laboratory strain
5 H37Rv, kindly donated by MSc. Darcita Rovaris of LACEN-SC, was
6
7 cultured in Löwenstein-Jensen medium (LJ) (Difco) and incubated for 4
8
9 weeks at 37°C. The growing colonies were disrupted and transferred to
10
11 liquid 7H9 broth supplemented with 10% OADC for preparation of the
12
13 bacteria suspension. The concentration of bacteria was determined using the
14
15 McFarland scale.³³ After the assays, the mycobacteria were inactivated by
16
17 heat treatment at 100°C for 30 min in boiling water.
18
19

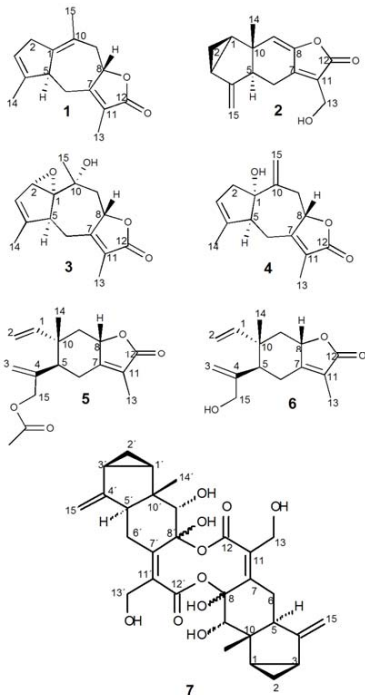
20
21 **Mycobacterium tuberculosis toxicity assay.** The MTT (3-(4,5-
22 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay was carried
23
24 out as described by Mshana *et al.*,³⁴ with some modifications. The MTT
25
26 (Amresco, U.S.A) solution was prepared just before the assay of reduction
27
28 of MTT, at a concentration of 1 mg/ml in PBS with 10% of Tween-80. To
29
30 summarize, each well of a flat-bottomed microtiter plate received 100 µl of
31
32 drug solution, at concentrations ranging from 0.0 to 30.0 µM followed by
33
34 the addition of 100 µl of a bacterial suspension (3×10^6 bacteria per well).
35
36 The plates were sealed with Parafilm and incubated at 37°C in an
37
38 atmosphere of 5% CO₂ for 7 days. After the incubation period, fifty
39
40 microliters of the MTT solution was then added to each well and the plate
41
42 was incubated for 4 h at 37°C with 5% of CO₂. Fifty microliters of a lysing
43
44 buffer containing 20% sodium dodecyl sulfate in 50% *N,N*-
45
46 dimethylformamide (pH 4.7) were then added to each well, and the plates
47
48 were incubated overnight at 37°C with 5% of CO₂. Absorbance was
49
50 measured with an ELISA microplate reader (Biotek ELX 800) at a
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2 wavelength of 540 nm. Wells containing 7H9-OADC and incubated with
3
4 MTT were used as negative control. All the samples were tested in triplicate
5
6 and the results are expressed as mean values.
7
8
9

10 **Acknowledgements**

11 The authors are grateful to CNPq, CAPES, FINEP and UFPR for financial
12 support, and Norberto P. Lopes and José C. Tomaz (FCFRP-USP) and
13 Luciano F. Huergo (Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular-
14 UFPR) for the MS analysis and André Báfica (Laboratório de
15 Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas-UFSC) for the antimicrobial
16 assay.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

STRUCTURES



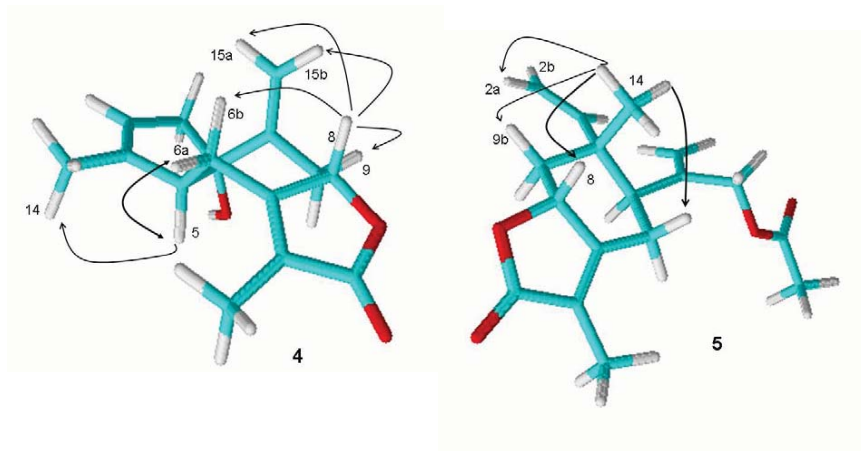


Fig. 2: Key NOE correlations observed for compounds 4 and 5.

Table 1. NMR spectroscopy data (400 MHz, CDCl₃) for compounds **3** and **4**.^a

| Position | 3 | | | 4 | | |
|----------|---|---------------------|-------------------|---|---------------------|-------------------|
| | ¹ H NMR (mult., <i>J</i> Hz) | ¹³ C NMR | HMBC ^b | ¹ H NMR (mult., <i>J</i> Hz) | ¹³ C NMR | HMBC ^b |
| 1 | | 59.7 | | | 85.1 | |
| 2 | 4.40 dq (2.8, 1.5) | 79.9 | 3, 4, 5, 10 | a 2.42 ddq (16.7, 2.7, 1.5) | 43.3 | 1, 3, 4, 10 |
| 3 | 5.79 dq (2.8, 1.9) | 127.2 | 2, 4, 5, 10, 14 | b 3.02 ddq (16.7, 1.3, 0.7) | 122.7 | 1, 3, 4, 10 |
| 4 | | 149.6 | | 5.47 qdd (3.3, 2.7, 1.3) | 140.2 | 1, 5, 14 |
| 5 | 2.15 dd (13.2, 2.2) | 50.1 | 2, 3, 4, 6, 7, 10 | 2.28 ddq (11.9, 1.6, 1.2) | 58.7 | 1, 3, 4, 6, 7 |
| 6 | ax 2.29 dddd (14.2, 13.2, 1.9, 1.5) | 30.9 | 5, 7, 10, 11 | ax 1.76 ddq (13.7, 11.9, 0.8) | 25.7 | 1, 11 |
| 7 | eq 3.08 dd (14.2, 2.2) | 161.0 | 5, 7, 8, 10, 11 | eq 2.65 dd (13.7, 1.6) | 162.7 | 1, 4, 5, 8, 11 |
| 8 | 4.86 dddd (13.0, 2.9, 1.9, 1.5) | 78.9 | 7, 9 | 4.65 ddq (11.6, 5.3, 1.8) | 83.5 | 7, 9 |
| 9 | ax 1.58 dd (13.3, 13.0) | 42.0 | 1, 7, 8, 15 | ax 2.38 dddd (12.1, 11.6, 0.8, 0.5) | 37.1 | 1, 7, 8, 10 |
| 10 | eq 2.75 dd (13.3, 2.9) | 74.5 | 1, 7, 8, 10, 15 | eq 2.98 dddd (12.1, 5.3, 0.7, 0.4) | 144.8 | 1, 7, 8, 10 |
| 11 | | 122.4 | | | 121.8 | |
| 12 | | 173.9 | | | 174.4 | |
| 13 | 1.84 dd (1.5, 1.5) | 8.4 | 7, 11, 12 | 1.85 dd (1.8, 0.8) | 7.8 | 7, 11, 12 |
| 14 | 1.93 dd (1.9, 1.5) | 15.6 | 3, 4, 5 | 1.84 dddd (3.3, 1.5, 1.2, 0.7) | 15.1 | 3, 4, 5 |
| 15 | 1.63 s | 20.6 | 1, 9, 10 | a 5.29 ddd (1.4, 0.5, 0.4) | 118.3 | 1, 9, 10 |
| | | | | b 5.39 ddd (1.4, 0.8, 0.7) | | 1, 9, 10 |

^a The experiments were recorded in CDCl₃ and all NMR chemical shifts are given in ppm related to the TMS signal at 0.00 ppm as internal reference and coupling constants (*J*) are given in Hz. The unambiguous ¹H and ¹³C NMR chemical shift assignments were established by a combination of 1D and 2D NMR including single-bond and long-range ¹H-¹³C correlation experiments. Long-range ¹H-¹³C HMBC correlations, optimized for 8 Hz, are from hydrogen(s) stated to the indicated carbon. ax = axial, eq = equatorial.

Table 2. NMR spectroscopy data (400 MHz, CDCl₃) for compounds **5** and **6**.^a

| Position | 5 | | | 6 | | |
|----------|--|---------------------|---------------------------------|--|---------------------|------------------------|
| | ¹ H NMR (mult., <i>J</i> /Hz) | ¹³ C NMR | HMBC ^b | ¹ H NMR (mult., <i>J</i> /Hz) | ¹³ C NMR | HMBC ^b |
| 1 | 5.68 dd (17.4, 10.7) | 145.5 | 5.9, 10, 14 | 5.69 dd (17.4, 10.7) | 145.9 | 5.9, 10, 14 |
| 2 | a 5.00 dd (17.4, 0.5) | 113.1 | 1, 10 | a 4.99 dd (17.4, 0.6) | 112.7 | 1, 10 |
| 7 | b 5.05 dd (10.7, 0.5) | | 1, 10 | b 5.03 dd (10.7, 0.6) | | 1, 10 |
| 8 | a 5.06 dd (1.3, 1.0) | 115.3 | 4, 5, 15 | a 5.00 ddd (1.6, 1.1, 0.7) | 112.6 | 4, 5, 15 |
| 9 | b 5.32 dd (1.3, 1.3) | | 4, 5, 15 | b 5.35 ddd (1.6, 1.3, 0.6) | | 4, 5, 15 |
| 10 | | 143.7 | | | 148.8 | |
| 11 | 2.09 ddq (13.1, 4.2, 0.6) | 48.6 | 1, 3, 4, 6, 10, 14, 15 | 2.11 ddq (13.1, 4.3, 0.6) | 47.9 | 1, 3, 4, 6, 10, 14, 15 |
| 12 | ax 2.58 dddq (14.4, 13.1, 1.6, 0.9) | 28.7 | 5, 7, 10 | ax 2.60 dddq (14.4, 13.1, 1.6, 0.9) | 28.9 | 5, 7, 10 |
| 13 | eq 2.71 dd (14.2, 4.2) | | 5, 7, 8, 10, 11 | eq 2.70 dd (14.4, 4.3) | | 5, 7, 8, 10, 11 |
| 14 | | 161.7 | | | 161.5 | |
| 7 | 4.85 ddq (11.6, 6.1, 1.4, 0.9) | 77.9 | 1, 8, 10, 14 | 4.85 ddq (11.7, 6.1, 1.4, 0.9) | 77.8 | 1, 8, 10, 14 |
| 8 | ax 1.36 ddq (12.4, 11.6, 0.3) | 45.5 | 5, 7, 8, 10, 14 | ax 1.36 ddq (12.4, 11.6, 0.3) | 45.5 | 5, 7, 8, 10, 14 |
| 9 | eq 2.23 dd (12.4, 6.1) | | | eq 2.23 dd (12.4, 6.1) | | |
| 10 | | 40.7 | | | 40.8 | |
| 11 | | 120.4 | | | 120.4 | |
| 12 | | 175.1 | | | 174.7 | |
| 13 | 1.83 dd (1.6, 1.4) | 8.3 | 7, 11, 12 | 1.82 dd (1.6, 1.4) | 8.3 | 7, 11, 12 |
| 14 | 1.18 dd (0.6, 0.3) | 16.5 | 1, 5, 9, 10 | 1.18 dd (0.6, 0.3) | 16.4 | 1, 5, 9, 10 |
| 15 | 4.48 dd (1.3, 1.0) | 67.9 | 3, 4, 5, CH ₃ COO-15 | a 4.00 ddd (14.4, 0.7, 0.6) | 67.2 | 3, 4, 5 |
| 23 | | | | | | |
| 24 | | | | | | |
| 25 | CH ₃ COO-15 | 20.9 | CH ₃ COO-15 | b 4.09 ddd (14.4, 1.3, 1.1) | | |
| 26 | CH ₃ COO-15 | 171.0 | | | | |

^aThe experiments were recorded in CDCl₃ and all NMR chemical shifts are given in ppm related to the TMS signal at 000 ppm as internal reference and coupling constants (*J*) are given in Hz. The unambiguous ¹H and ¹³C NMR chemical shift assignments were established by a combination of 1D and 2D NMR including ¹H-¹H, single-bond and long-range ¹H-¹³C correlation experiments. ^bLong-range ¹H-¹³C HMBC correlations, optimized for 8 Hz, are from hydrogen(s) stated to the indicated carbon. ax = axial, eq = equatorial.

Table 3. NMR spectroscopy data (400 MHz, CDCl₃) for compound 7.^a

| Position | conformer A | | conformer B | | HMBC ^b |
|------------|---|---------------------|---|---------------------|-------------------|
| | ¹ H NMR (mult., <i>J</i> Hz) | ¹³ C NMR | ¹ H NMR (mult., <i>J</i> Hz) | ¹³ C NMR | |
| 1 and 1' | 1.89 m | 23.0 | 1.91 m | 24.2 | |
| 2 and 2' | a 0.69 m b 0.81 m | 15.7 | a 0.80 m b 0.94 m | 16.0 | 4 |
| 3 and 3' | 1.99 m | 23.9 | 1.99 m | 23.0 | |
| 4 and 4' | | 151.6 | | 150.5 | |
| 5 and 5' | 3.36 ddq (12.2, 6.3) | 51.5 | 2.92 ddq (13.4, 2.2, 1.0) | 57.4 | 7, 11, 5 |
| 6 and 6' | a 2.46 dd (18.3, 12.2) b 2.62 dd (18.3, 6.3) | 22.2 | a 2.18 dd (12.9, 13.4) b 2.72 dd (12.9, 2.2) | 22.7 | 7, 8, 10 |
| 7 and 7' | | 161.7 | | 162.7 | |
| 8 and 8' | | 104.6 | | 106.0 | |
| 9 and 9' | 3.89 s | 77.2 | 4.09 s | 75.9 | 5, 8, 10, 11 |
| 10 and 10' | | 43.3 | | 42.1 | |
| 11 and 11' | | 127.2 | | 126.2 | |
| 12 and 12' | | 172.3 | | 172.7 | |
| 13 and 13' | a 4.329 d (13.3) b 4.36 d (13.3) | 54.8 | a 4.28 d (13.3) b 4.325 d (13.3) | 53.8 | 7, 11, 12 |
| 14 and 14' | 0.57 s | 20.2 | 0.97 s | 16.4 | 7, 11, 12 |
| 15 and 15' | a 4.72 s b 5.00 s | 106.5 | a 4.74 s b 5.01 s | 106.3 | 1, 10, 5, 9 |
| | | | | | 3 |

^a The experiments were recorded in CDCl₃ and all NMR chemical shifts are given in ppm related to the TMS signal at 0.00 ppm as internal reference and coupling constants (*J*) are given in Hz. The unambiguous ¹H and ¹³C NMR chemical shift assignments were established by a combination of 1D and 2D NMR including ¹H-¹H, single-bond and long-range ¹H-¹³C correlation experiments. ^b Long-range ¹H-¹³C HMBC correlations, optimized for 8 Hz, are from hydrogen(s) stated to the indicated carbon.

1
2
3 **Supporting Information Available**
4
5
6
7
8
9

10 **S1(a-d):** $^1\text{H}/2\text{D}$ NMR and HR-MS spectra of the sesquiterpene lactone **3**.
11
12

13
14 **S2(a-d):** $^1\text{H}/2\text{D}$ NMR and HR-MS spectra of the sesquiterpene lactone **4**.
15
16
17

18
19 **S3(a-d):** $^1\text{H}/2\text{D}$ NMR and HR-MS spectra of the sesquiterpene lactone **5**.
20
21
22

23 **S4(a-c):** $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR and HR-MS spectra of the sesquiterpene lactone **6**.
24
25
26

27 **S5(a-d):** $^1\text{H}/2\text{D}$ NMR and HR-MS spectra of the sesquiterpene lactone **7**.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

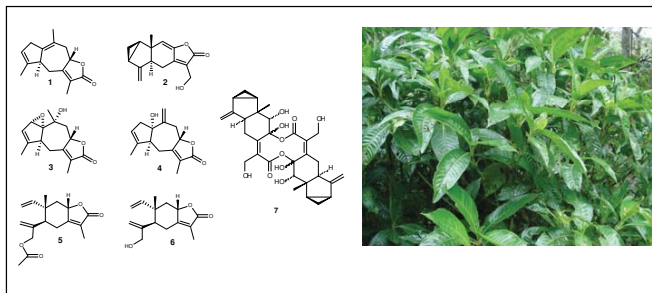
- (1) Souza, V. C.; Lorenzi, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum: Nova Odessa, 2005.
- (2) Reitz, R. Clorantáceas. *Flora Ilustrada Catarinense*. **1965**, parte I, 4-10.
- (3) Di Stasi, L.; Costa, M.; Mendacollp, S.; Kirizawa, M.; Gomes, C.; Trolin, G. J. *Ethnopharmacol.* **1988**, *24*, 205-211
- (4) Trentin, A. P.; Santos, A. R.; Guedes, A.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *Planta Med*, **1999**, *65*, 517-521.
- (5) Kirchner, K.; Wisniewski Júnior, A.; Cruz, A. B.; Biavatti, M.W.; Netz, D. J. A. *Rev. Bras. Farmacogn*, **2010**, *20*, 692-699.
- (6) Tolardo, R.; Zetterman, L.; Bitencourt, D.R.; Mora, T.C.; De oliveira, F.L.; Biavatti, M.W; Amoah, S.K.S.; Bürger, C.; De Souza, M.M. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *128*, 63-70.
- (7) Delgado, P. A.; Quijano, C.E.; Morales, G.; Pino, J. *J. Essent. Oil Res.* **2010**, *22*, 234-236.
- (8) De Feo, V; Soria, R.U. *J. Essent. Oil Bear. Pl.* **2007**, *10*, 41-45.
- (9) Sylvestre, M.; Pichette, A.; Longtin, A.; Martin, M.K.; Bercion, S. R.; Legault, J. *Nat. Prod. Comm.* **2007**, *2*, 1269-1272.
- (10) Lorenzo, D.; Loayza, I.; Dellacassa, E. *Flavour Frag. J.* **2003**, *18*, 32-35.
- (11) Mundina, M.; Vila, R.; Tomi, F.; Ciccio, J. F.; Ibañez, C.; Adzet, T.; Casanova, J.; Cañigueral, S. *Flavour Frag. J.* **2000**, *15*, 201-205.
- (12) Rao, G.W.; Zhan, Z. J.; Li, C.P.; Shan, W.G. *J. Chem. Res.* **2010**, *34*, 697-698.
- (13) Acebey, L.; Jullian, V.; Sereno, D.; Chevalley, S.; Estevez, Y.; Moulis, C.; Beck, S.; Valentin, A.; Gimenez, A.; Sauvain, M. *Planta Med.* **2010**, *76*, 365-368.
- (14) Su, Z. S.; Yin, S.; Zhou, Z.W.; Wu, Y.; Ding, J.; Yue, J.M. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1410-1413.
- (15) Acebey, L.; Sauvain, M.; Beck, S.; Moulis, C.; Gimenez, A.; Jullian, V. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 4693-4696.
- (16) Bercion, S.; Coupe De K. Martin, M.A.; Baltaze, J.P.; Bourgeois, P. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 620-624.
- (17) Cárdenas, L.C.; Rodríguez, J.; Villaverde, M.C.; Riguera, R.; Cadena, R.; Otero, J.A. *Planta Med.* **1993**, *59*, 26-27.
- (18) Su, Z.S.; Yin, S.; Zhou, Z.W.; Wu, Y.; Ding, J.; Yue, J.M. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1410-1413.

Formatted: English U.S.

- 1
2
3 (19) Bercion, S.; Buffeteau, T.; Lespade, L.; Coupe De K. Martin, M.A.;
4 *J. Mol. Struct.* **2006**, *791*, 186-192.
- 5 (20) Tesso, H.; König, W. A.; Son P. T.; Giang, P. M. *Flavour Frag. J.*
6 **2006**, *21*, 592-597.
- 7 (21) Hu, X.; Yang, J. S.; Xu, X. *Chem. Pharm. Bull.* **2009**, *57*, 418-420.
- 8 (22) Li, Y.; Zhang, D.M.; Li, J.B.; Yu, S.S.; Li, Y.; Luo, Y.M. *J. Nat.*
9 *Prod.* **2006**, *69*, 616-620.
- 10 (23) Zhu, L.P.; Li, Y.; Yang, J.Z.; Zuo, L.; Zhang, D.M. *J. Asian Nat. Prod.*
11 *Res.* **2008**, *10*, 541-545.
- 12 (24) Ran, X.H.; Teng, F.; Chen, C.X.; Wei, G.; Hao, X.J.; Liu, H.Y. *J. Nat.*
13 *Prod.* **2010**, *73*, 972-975.
- 14 (25) Kim, S.Y.; Kashiwada, Y.; Kawazoe, K.; Murakami, K.; Sun, H.D.;
15 Li, S.L.; Takaiishi, Y. *Tet. Lett.* **2009**, *50*, 6032-6035.
- 16 (26) Wang, X.C.; Zhang, Y.N.; Wang, L.L.; Ma, S.P.; Liu, J.H.; Hu, L.H. *J.*
17 *Nat. Prod.* **2008**, *71*, 674-677.
- 18 (27) Fischer, N. H.; Lu, T.; Cantrell, C. L.; Castaneda-Acosta, J.; Quijano,
19 L.; Franzblau, S.G. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 559-564.
- 20 (28) Luna-Herrera, J.; Costa, M. C.; Gonzalez, H. G.; Rodrigues, A. I.;
21 Castilho, P. C. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 548-552.
- 22 (29) Blay, G.; Barges, V.; Cardona, L.; Garcia, B.; Pedro, J. R. *J. Org.*
23 *Chem.* **2000**, *65*, 6703-6707.
- 24 (30) Su, Y. O.; Zhang, W. D.; Zhang, C.; Liu, R. H.; Shen, Y. H. *Chinese*
25 *Chem. Lett.* **2008**, *19*, 829-831.
- 26 (31) Vasconcelos, J.; Silva, A. M. S.; Cavaleiro, J. A. S. *Phytochemistry*
27 **1998**, *38*, 310-313.
- 28 (32) SDBS, Spectral Database for Organic Compounds, 2011.
29 <http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_top.cgi>. Accessed
30 in 20 March 2011.
- 31 (33) Perilla, M.J.; Ajello, G.; Bopp, C.; Elliott, J.; Facklam, R.; Knapp, J.S.;
32 Popovic, T.; Wells, J.; Dowell, S.F.
33 <http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/WHO_CDS_CSR_RMD_2003_6/en/>. 27 March 2011.
- 34 (34) Mshana, R.; Tadesse, G.; Gentaun, A.; Mörner, H. *J. Clin. Microbiol.*
35 **1998**, *36*, 1214-1219.

Formatted: English U.S.

TOC GRAPHIC



Anexo 3

GONCALVES, A. E., AMOAH, S K. S., TOLARDO, R., BIAVATTI, M. W.; DE SOUZA, M.M. Antidepressant-Like Effect of *Hedyosmum brasiliense* and its Sesquiterpene Lactone, Podoandin in Mice: Evidence for the Involvement of Adrenergic, Dopaminergic and Serotonergic Systems *European journal of pharmacology* submitted manuscript, 2011.

Manuscript Number: EJP-34422

Title: Antidepressant-Like Effect of Hedyosmum brasiliense and its Sesquiterpene Lactone, Podoandin in Mice: Evidence for the Involvement of Adrenergic, Dopaminergic and Serotonergic Systems

Article Type: Research Paper

Section/Category: Behavioral pharmacology

Keywords: Hedyosmum brasiliense; Podoandin; sesquiterpene lactone; hypnotic; antidepressant effect; forced swimming test

Corresponding Author: Dr Marcia Souza,

Corresponding Author's Institution: UNIVALI

First Author: Ana Elisa Gonçalves

Order of Authors: Ana Elisa Gonçalves; Solomon Amoah; Rogerio Tolardo; Maique Biavatti; Marcia Souza

Abstract: We have recently shown that the ethanol extract from leaves of *Hedyosmum brasiliense* exhibit antidepressant-like effect in the tail suspension and forced swimming tests in mice. The present study investigates the mechanisms involved in the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract together with the antidepressant potential of Podoandin, an isolated sesquiterpenolide. *H. brasiliense* (50 mg/kg, i.p) and Podoandin (10 mg/kg, i.p.) decreased the immobility time in the forced swimming test without accompanying changes in ambulation in the open-field test. The anti-immobility effect of the *H. brasiliense* extract was prevented by pre-treatment of mice with ondansetron, NAN 190, pindolol, prazosin, yohimbine, haloperidol, SCH23390, and sulpiride. On the other hand, the pre-treatment of mice with: p-chlorophenylalanine (4 consecutive days), ketanserin, naloxone, naltrindole, bicuculline, phaclofen, or L-arginine did not block the antidepressant-like effect of *H. brasiliense*. In addition, pre-treatment of animals with methylene blue, NG-nitro-L-arginine or 7-nitroindazole, at subeffective doses, did not cause a synergistic effect with *H. brasiliense* extract at an effective dose in the forced swimming test. The anti-immobility effect of Podoandin was also prevented by pre-treatment of mice with NAN-190, ondansetron, prazosin, yohimbine, sulpiride and haloperidol. The results indicate that the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* (and Podoandin) is dependent on the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems but not GABAergic, opioid and oxidonitrgic systems.

**Antidepressant-Like Effect of *Hedyosmum brasiliense* and its
Sesquiterpene Lactone, Podoandin in Mice: Evidence for the
Involvement of Adrenergic, Dopaminergic and Serotonergic Systems**

Ana Elisa Goncalves¹, Solomon K. S. Amoah², Rogério Tolardo¹, Maique W. Biavatti²
and Márcia M. de Souza^{1*}

¹Centro de Ciências da Saúde, CCS- Mestrado em Ciências Farmacêuticas,
UNIVALI, Itajaí, SC - Brazil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, CCS, Universidade Federal de Santa
Catarina – UFSC, Florianópolis, SC - Brazil

Running title:

**Mechanism of the antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and
Podoandin**

*Correspondence: Tel.: +55 47 3341 7932, r. 8066; fax: +55 47 3341 7600. NIQFAR/CCS/UNIVALI, R.
Uruguai, 458, CP 360, 88302-202, Itajaí, SC, Brazil. **E-mail:** msouza@univali.br (Márcia Maria de Souza)

ABSTRACT

We have recently shown that the ethanol extract from leaves of *Hedyosmum brasiliense* exhibit antidepressant-like effect in the tail suspension and forced swimming tests in mice. The present study investigates the mechanisms involved in the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract together with the antidepressant potential of Podoandin, an isolated sesquiterpenolide. *H. brasiliense* (50 mg/kg, i.p) and Podoandin (10 mg/kg, i.p.) decreased the immobility time in the forced swimming test without accompanying changes in ambulation in the open-field test. The anti-immobility effect of the *H. brasiliense* extract was prevented by pre-treatment of mice with ondansetron, NAN 190, pindolol, prazosin, yohimbine, haloperidol, SCH23390, and sulpiride. On the other hand, the pre-treatment of mice with: *p*-chlorophenylalanine (4 consecutive days), ketanserin, naloxone, naltrindole, bicuculline, phaclofen, or *L*-arginine did not block the antidepressant-like effect of *H. brasiliense*. In addition, pre-treatment of animals with methylene blue, NG-nitro-*L*-arginine or 7-nitroindazole, at subeffective doses, did not cause a synergistic effect with *H. brasiliense* extract at an effective dose in the forced swimming test. The anti-immobility effect of Podoandin was also prevented by pre-treatment of mice with NAN-190, ondansetron, prazosin, yohimbine, sulpiride and haloperidol. The results indicate that the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* (and Podoandin) is dependent on the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems but not GABAergic, opioid and oxidonitric systems.

Keywords: *Hedyosmum brasiliense*; Podoandin; sesquiterpene lactone; hypnotic; antidepressant effect; forced swimming test.

1. INTRODUCTION

After about 50 years of the discovery of the first antidepressant (Castrén 2005), depression which is a chronic, relapsing and potentially fatal disease seems to be increasing. Currently, it affects about 20% of the population worldwide and it is considered one of the ten leading causes of morbidity and mortality. It is estimated that by the year 2020 it will be the 2nd leading contributor to the global burden of disease (WHO 2011). Numerous antidepressant compounds are now available, presumably acting via different mechanisms including serotonergic, noradrenergic and/or dopaminergic systems. The therapy available for treating this disease, including tricyclic antidepressants, monoamine oxidase inhibitors, serotonin reuptake inhibitors, is often associated with several undesirable side effects and its efficacy touches only a certain part of the population (Berton and Nestler 2006). Moreover, most therapies require several weeks of treatment before improvement of signs and symptoms are observed. Despite the advances in drug discovery and therapeutic options, there are still multiple shortcomings that need to be improved. Medical plant therapies may be effective alternatives in the treatment of depression, and has progressed significantly in the past decade (Machado et al., 2007; WHO 2011) and this has led to the search for new alternatives for its treatment (Buller and Legrand 2001).

Hedyosmum brasiliense is an aromatic shrub, commonly known as Cidrão, which is part of the largest genus of the Chloranthaceae family and endemic in Brazil. The genus consists of 46 species that are found in tropical and subtropical regions of America (Souza and Lorenzi 2005). Although widely used as a calmative, hypnotic, antidepressant, stomachic, aphrodisiac, anti-migraine and for diseases of the ovary

(Reitz 1965), studies that seek to validate the pharmacological effects are limited. Only its antinociceptive effect (Trentin et al., 1999) was conducted previously to our series of investigations, that includes the essential oil composition analysis and its antimicrobial activity (Kirchner et al., 2010) and the neurochemical properties of the ethanol extract, fractions and the antidepressant effect of isolated sesquiterpene lactones (onoseriolide or 13-hydroxy-8,9-dehydroshizukanolide and Podoandin, 1) which were assessed by the open field, elevated-plus-maze, pentobarbital induced sleeping time, forced swimming, strychnine and pentilenoctazole-induced seizure and inhibitory avoidance tests (Tolardo et al., 2010). In the latter, an antidepressant effect was only observed for the sesquiterpenolide Podoandin which exhibited a significant reduction in immobility time. Continuing this research, this paper proposes the mechanistic investigation of the antidepressive effect of the extract, as well as that of Podoandin which is an isolated sesquiterpene lactone of the guaianolide type. Some guaianolides recently investigated showed antiprotozoal (Sun et al., 2010; Maas et al., 2011), analgesic and sedative (Wesolowska et al., 2006) and cytotoxic (Bruno et al., 2005) effects.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Extract and compound isolation

Aerial parts of *Hedyosmum brasiliense* Miq. Chloranthaceae were collected in October of 2009 in Antonio Carlos, Santa Catarina State, Brazil. Voucher specimens were analyzed by the botanist Dr. Ademir Reis, and deposited at the Herbarium Lyman Bradford Smith (UNIVALI, Itajaí - SC) (number 2031). Five Kilograms of fresh leaves of

H. brasiliense was blended with bi-distilled alcohol and macerated for 15 days. The extract obtained was then concentrated in a rotary evaporator. The recovered ethanol was used to re-macerate the plant, and the combined concentrated extracts were kept in a desiccator under vacuum to remove residual solvent, yielding 200 g of crude extract of which an aliquot was used for the pharmacological tests and was named: extract from *H. brasiliense*. To isolate the sesquiterpene lactone Podoandin, the rest of the extract was then diluted in water and partitioned with solvents of increasing polarity yielding the following fractions: hexane (16 g), dichloromethane (4 g), ethyl acetate (13 g) and the residual aqueous fraction, which was kept in the freezer. The hexane fraction was then subjected to *flash* column chromatography with silica gel CC (230-400 mesh) using *n*-hexane with increasing concentrations of CH₂Cl₂ (0-70%) and subsequently using CH₂Cl₂ with increasing concentrations of EtOAc (0-70%), (200 ml for each concentration) which yielded sub-fractions A to H. Re-crystallization of sub-fraction B led to the isolation of the guaianolide Podoandin (**1**, 300 mg) identified by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectra in comparison with previously published data (Blay et al., 2000).

2.2 Animals

Male Swiss mice at 8 weeks of age, weighing 23–30 g were maintained at constant room temperature (22–27 °C) with free access to water and food, under a 12:12 h light-dark cycle (lights on at 07:00 h). Mice were allowed to acclimatize to the holding room for 24 h before the behavioral procedure. All experiments were carried out between

13:00 and 17:00 h, with each animal used only once (N=8–10 animals per group). All the experiments were conducted blind in terms of the treatment condition of the animals. The USA National Institute of Health Guidelines for Animal Care and Use were followed, and the experiments were approved by the Animal Care and Ethical Committees of the University do Vale do Itajaí under number 007/10. Each animal was used only once. All efforts were made to minimize animal suffering and to reduce the number of animals used in the experiments.

2.3. *Drugs and treatment*

The following drugs were used: *L*-arginine, methylene Blue, 7- nitroindazole, NG-nitro-*L*-arginine, parachlorophenylalanine (pCPA), ketanserin, Nan 190, prazosin, phaclofen, bicuculline, yohimbine, haloperidol, pimozide, naloxone, naltrindrole and pindolol all provided from Sigma Chemicals (St. Louis,MO, USA). Ondansetron was provided from Cristallia (Brazil).The extract from *H. brasiliense* and Podoandin were dissolved in saline with 10% Tween 80, whereas all the other drugs were dissolved in isotonic saline solution (NaCl 0.9%) immediately before use. All drugs, Podoandin and *H. brasiliense* extract were administered by intraperitoneal (i.p.) route, in a volume of 10 ml/kg body weight. Control animals received appropriate vehicle. Podoandin (1), *H. brasiliense*, or vehicle were administered by intraperitoneal route 30 min before the forced swimming test, or open-field test.

The doses of drugs used were selected on the basis of experiments previously performed in our laboratory and literature data which were previously reported of not

affecting locomotor activity (Tolardo et al., 2010; Jesse et al., 2010; O'Neill and Conway 2001; Zomkowski et al., 2004).

2.4. Forced swimming test (FST)

The test was conducted using the method of Porsolt et al. (1977) with some modifications. Mice were individually forced to swim in an open plexiglas cylinder (diameter 10 cm, height 25 cm), containing 19 cm of water at 25±1 °C and the total duration of immobility during a 6 min test was scored live. This test procedure was carried out according to the previously standardized and validated animal in our and other laboratories (Tolardo et al., 2010; Brocardo et al., 2008; Rosa et al., 2008; Zomkowski *et al.*, 2004). As reported, classical antidepressants decrease immobility time in this paradigm (Brocardo et al., 2008; Dhir and Kulkarni 2007; Kaster et al., 2007; Rosa et al., 2008; Yamada et al., 2004). Each animal was judged to be immobile when it ceased struggling and remained floating or motionless in the water, making only those movements necessary to keep its head above water. The absence of hind leg movement was recorded as immobility by stopwatch accumulation by a single observer during the exposures.

2.5 Mechanisms involved in the antidepressant-like effect of H. brasiliense extract and Podoandin

To address some of the mechanisms by which *H. brasiliense* extract or Podoandin causes antidepressant-like action in the forced swimming test, animals were pretreated with different pharmacological agents.

In order to investigate the possible contribution of the serotonergic system to the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract or Podoandin in the FST, animals were pretreated with pCPA (100 mg/kg, an inhibitor of serotonin synthesis) or saline, once a day, for 4 consecutive days. In previous studies, this treatment regimen of pCPA produced greater than 90% depletion of brain serotonin concentration in rats (Wang et al., 2008). The animals received treatment with *H. brasiliense* extract (50 mg/kg, i.p.) Podoandin (10 mg/kg, i.p.) or vehicle 24 h after the last pCPA or saline injection and were tested in the FST 30 min later. In other experiments, animals were pretreated with ondansetron (a 5HT₃ selective receptor antagonist, (0.3 mg/Kg), NAN 190 a 5-HT_{1A} selective receptor antagonist (0.5 mg/kg, i.p.), ketanserin a 5-HT_{2A} receptor antagonist, (5 mg/kg, i.p.), pindolol a 5-HT_{1A/1B} receptor antagonist (10 mg/kg, i.p.) or vehicle 15 min before the administration of *H. brasiliense* extract or Podoandin and were tested in the FST 45 min later.

We investigated the possible involvement of the noradrenergic system in the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract or Podoandin in the forced swimming test. Thus, animals were pretreated with prazosin (1 mg/kg, i.p., an α 1-adrenoceptor antagonist), yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α 2-adrenoceptor antagonist), or vehicle 15 min before administration of *H. brasiliense* extract, Podoandin (10 mg/kg, i.p.) being tested in the FST 45 min later.

In order to investigate the influence of the dopaminergic system in the antidepressant-like effect of the *H. brasiliense* extract and Podoandin, animals were pretreated with haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a nonselective dopaminergic receptor antagonist), SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a dopamine D1 receptor antagonist), sulpiride (50 mg/kg,

i.p., a dopamine D2 receptor antagonist), or vehicle 15 min before administration of *H. brasiliense* extract or Podoandin (10 mg/kg, i.p.) and then tested in the FST 45 min later.

To investigate whether the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract or Podoandin is mediated through the involvement of the *L*-arginine-nitric oxide pathway in the forced swimming test, mice were pretreated with *L*-arginine, a precursor of nitric oxide (750 mg/kg, i.p., a dose that produces no effect in the forced swimming test) or vehicle 15 min before administration of *H. brasiliense* extract or Podoandin (10 mg/kg, i.p.) being tested in the FST 45 min later. The dose of *L*-arginine was chosen based on a previously reported dose-response curve in the forced swimming test (Da Silva et al., 2000). In another experiment, we also investigated the effect of *H. brasiliense* extract (5 mg/kg, a sub-effective dose) with sub-effective doses of 7-nitroindazole (50 mg/kg, i.p., a specific neuronal NO synthase inhibitor), methylene blue (20 mg/kg, i.p., an inhibitor of both NO synthase and soluble guanylate cyclase) or of NG-nitro-*L*-arginine (0.3 mg/kg, i.p., an inhibitor of nitric oxide synthase). The doses of 7-nitroindazole and methylene blue were chosen based on a previous report (Brocardo et al., 2008) and the dose of NG-nitro-*L*-arginine was also based on a previous report (Jesse et al., 2010). *H. brasiliense* extract or vehicle was administered 15 min before the drugs and 15 min later, the animals were tested in the forced swimming test.

To investigate whether the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract is mediated through the involvement of the opioid system, mice were pretreated with naloxone (1 mg/kg, i.p., a nonselective opioid receptor antagonist) or vehicle 15 min before administration of *H. brasiliense* extract being tested in the FST 45 min later. In

another experiment, mice were pretreated with naltrindole (3 mg/kg, i.p., a selective δ -opioid receptor antagonist) or vehicle 15 min before administration of *H. brasiliense* extract and were tested in the FST 45 min later. The doses of naloxone and naltrindole were chosen based on a previously reported paper (Brocardo et al., 2008).

In the same model, the possible participation of the GABAergic system on the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract was investigated. With this aim, the animals were pretreated with bicuculline, an antagonist of GABA_A receptor (1.0 mg/kg, i.p., phaclofen, an antagonist of GABA_B receptor (2.0 mg/kg, i.p.) or vehicle and after 15 min, they received *H. brasiliense* extract (50 mg/Kg, i.p.) being tested in the FST 45 min later.

2.6 Interaction of H. brasiliense extract and Podoandin with fluoxetine in the mice FST

We also investigated the ability of *H. brasiliense* extract and Podoandin to potentiate the antidepressant-like effect of fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor. With this aim in mind, animals were pretreated with a subeffective dose of *H. brasiliense* extract (5 mg/kg), Podoandin (1 mg/kg) or saline, and 20 min later the animals were treated with a subeffective dose of fluoxetine (20 mg/kg). The dose of fluoxetine was chosen based on a previous report (Ulak et al., 2010). The FST test was carried out 30 min later.

2.7. Open-field test

To assess the possible effect of *H. brasiliense* and Podoandin on exploratory behavior, the animals were submitted to the open-field paradigm as previously described (Capra et al., 2010). Mice were individually placed in a wooden box (40×60×50 cm) with the floor of the arena divided into 12 equal squares. The number of squares crossed with all paws (crossing) was considered as indicative of locomotor activity and the number of rising with the front paws (rearing) was indicative of the exploratory behavior. These behavioral parameters were registered during a period of 6 min (Capra et al., 2010, Tolardo et al., 2010).

3. Results

3.1. Involvement of the serotonergic system

The results depicted in Fig. 2A shows that the pretreatment of mice with the antagonist of serotonin 5HT_{2A} receptor Ketanserin (5 mg/kg, i.p.), was not able to reverse the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract (50 mg/kg) in the forced swimming test ($F(26.10) = 1.44/ p > 0.05$). In addition, Fig. 2B shows that the pre-treatment of mice with the inhibitor of 5-HT synthesis PCPA (100 mg/kg, i.p., once a day by 4 consecutive days) also did not affect ($F(12.76) = 0.72/ p > 0.05$) the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract (50 mg/kg). On the other hand, the pre-treatment of mice with antagonists of serotonin 5HT_{1A}, 5-HT_{1A/1B}, 5-HT₃ receptors, NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p.), pindolol (10 mg/kg, i.p.) or ondansetron respectively, were able to reverse the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract in the forced swimming test (Fig. 2 C, D and E,

respectively, $F(49.75) = 7.56/p < 0.001$; $F(13.44) = 3.75/ p < 0.05$ and $F(13.65) = 5.10/ p < 0.01$ respectively).

3.2. Involvement of the noradrenergic system

Fig. 3 A and B shows that pretreatment of mice with the α_1 -adrenoceptor antagonist prazosin (1mg/kg, i.p.) and the α_2 -adrenoceptor antagonist yohimbine (1 mg/kg, i.p.) were able to reverse ($F(45.26) = 5.87/p < 0.001$; $F(4.45) = 4.42/p < 0.05$, respectively) the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract (50 mg/kg) in the forced swimming test.

3.3. Involvement of the dopaminergic system

Fig 4A shows that the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract (50 mg/kg, i.p.) was significantly ($F(39.98) = 6.47/ p < 0.001$) prevented by pre-treatment of mice with haloperidol (0.2 mg/kg, i.p.). Similarly, sulpiride (50 mg/kg, i.p.) and SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c.) administrations (Fig. 4B and 4C) were also able to reverse the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract in the FST ($F(21.79) = 4.56/ p < 0.01$; $F(16.20) = 3.34/ p < 0.05$, respectively).

3.4. Involvement of the L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate systems

Concerning the involvement of the L-arginine-nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate systems on the anti-immobility effect of the extract, the results demonstrated that the pre-treatment of mice with L-arginine (750 mg/kg, i.p., a nitric

oxide precursor) did not reverse the anti-immobility effect elicited by *H. brasiliense* extract (50 mg/kg,i.p.) in the FST ($F(28.41)=1.03/ P.<.05$) (Fig 5 A). In addition, the results also show that the administration of NG-nitro-*L*-arginine (an inhibitor of nitric oxide synthase, 0.3 mg/kg i.p., a subeffective dose), 7-nitroindazole (25 mg/kg i.p., a specific neuronal nitric oxide synthase inhibitor) or methylene blue (10 mg/kg i.p., a subeffective dose, a direct inhibitor of both nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase) in combination with *H. brasiliense* extract (5.0 mg/kg, i.p., subeffective dose) did not produce an antidepressant-like effect in FST ($F(0.1968)= 0.2630/ p>0.05$; $F(0.44)=0.71/P>0.05$; $F(0.11)= 0.75/ p>0.05$, respectively, when compared to the administration of each drug alone (FIG 5. B, C and D).

3.5 Involvement opioid system

Our results also show that pre-treatment of animals with naloxone (1 mg/kg, i.p.), a nonselective opioid receptor antagonist or naltrindole (3 mg/kg, i.p., a selective δ - opioid receptor antagonist) did not prevent the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract (5.0 mg/kg, i.p.) in the FST ($F(0.11) = 0.75/ p>0.05$; $F(26.23) = 0.54/p>0.05$, respectively (FIG 6A and B).

3.6 Involvement GABAergic system

The antidepressant effect of *H. brasiliense* extract appears not to involve the GABAergic system. Our results also showed that pre-treatment of animals with bicuculline, an antagonist of GABA_A receptor (1.0 mg/kg, i.p.) or phaclofen, an antagonist of GABA_B

receptor (2.0 mg/kg, i.p.) also did not prevent the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract (5.0 mg/kg, i.p.) in the FST (FIG 7A and B).

3.7 Involvement of systems in the mechanism of action of antidepressant property of Podoandin

Since the mechanism of action of anti-immobility effect of the extract appears to be mediated by the serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems, the anti-immobility effect of Podoandin also was evaluated only in these systems. The results shown in Table 1 demonstrate that the anti-immobility effect of the compound in study is reversed by pre-treatment of animals with NAN-190, ondansetron, prazosin, yohimbine, sulpiride and haloperidol. However, pre-treatment of animals with SCH23390 and pindolol was unable to reverse this effect.

3.8 Interaction of *H. brasiliense* extract and Podoandin with fluoxetine in the mice FST

In figure 8 it is observed that the treatment of animals with Podoandin or *H. brasiliense* extract or fluoxetine in subeffective doses (1.0 mg/kg, 5.0 mg/Kg and 20 mg/Kg respectively) does not alter the immobility time in FST compared with their respective controls. However, the treatment with Podoandin and *H. brasiliense* extract (in subeffective doses of 1.0 mg/kg and 5.0 mg/Kg, respectively) given in combination with a subeffective dose of fluoxetine (20 mg/kg) significantly reduced the immobility time in the FST ($F(12,57)= 5.18/ P<0.01$; $F(12,57)=8.64/ P<0.001$).

3.9. Effects of drugs on locomotor activity

Since antidepressant-like effects in the forced swimming test can be also evoked by drugs which induce hyperactivity, the effect of Podoandin (10 mg/kg, i.p.) and *H. brasiliense* extract (50 mg/kg,i.p) on the locomotor activity was concurrently evaluated. The treatments with *H. brasiliense* extract or Podoandin given 30 min beforehand, did not affect the locomotor activity in the open-field test when compared to mice that received vehicle (results not shown).

4. Discussion

The present study contributes to the understanding of the mechanisms underlying the effects of the ethanolic extract of *H. brasiliense* in the forced swimming test. Here we provide convincing evidence that this effect is dependent on an interaction with serotonergic, noradrenergic and dopaminergic systems. In addition, our results also demonstrated that the reduction in the immobility time in the forced swimming test elicited by *H. brasiliense* extract and Podoandin was not accompanied by changes in the locomotor activity assessed in the open-field test, which means that the anti-immobility effect observed in forced swimming test cannot be attributable to a psychostimulant activity. Taking into account that psychostimulant drugs may give a false positive result in the animal models of depression as tail suspension test for example (Mitchell and Redfern, 2005), our results demonstrate that the antidepressant-like effect of the ethanolic extract or Podoandin is specific.

Currently, the most efficacious treatment of major depression is considered to involve an increase in serotonin and/or noradrenaline neurotransmission (Brunello et al., 2002). However, studies have shown that other neurotransmitter systems such as GABAergic (Uppal et al., 2010), glutamatergic (Lin et al., 2011), opioid (Schreiber et al., 2002) and oxidonitrgic (Krass et al., 2011) may also be involved in the pathogenesis of this disease.

PCPA is an inhibitor of the enzyme tryptophan hydroxylase and its administration for four consecutive days depletes the endogenous stores of serotonin by about 60% in mice (Redrobe et al., 1998). Our results show that the decrease in the serotonin levels in the synapse did not play a critical role on the effect of *H. brasiliense* extract once anti-immobility effect was not reversed by pre-treatment with PCPA.

Recent studies have revealed new insights into the therapeutic role of 5-HT1A receptors in treating various CNS disorders, including not only depressive disorders (Prieto et al., 2010), but also schizophrenia (Yasuno et al., 2004) and Parkinson's disease. The discovery of WAY 100635, the first highly selective, potent and silent 5-HT1 receptor antagonist (Forster et al., 1995), enabled further clarification on the role of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effects of drugs. It was previously shown that the blockade of 5-HT1A receptors by NAN-190 prevented the antidepressant-like responses of serotonergic agonists (8-OH-DPAT and buspirone) and the tricyclic antidepressant desipramine in the FST in rats (Detke et al., 1995). Here, we showed the involvement of 5-HT1A receptors in the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract, since NAN-190 was able to prevent its anti-immobility effect in the forced swimming test. This supposition was supported by our results with pindolol, which is a 5-HT1A/1B receptor

antagonist, also able to prevent the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract in the forced swimming test.

It has been reported that DOI, a preferential 5-HT_{2A} receptor partial agonist enhances the antidepressant-like effect of some compounds (Zomkowski et al., 2004). Moreover, 5HT₂ receptor blockade by ketanserin, a preferential 5-HT_{2A} receptor antagonist, explains the mechanism of action of several compounds with proven antidepressant activity (Jesse et al., 2010). In this study, the pre-treatment with ketanserin, failed to reverse the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract, suggesting that the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract in the forced swimming test did not depend on an interaction with 5-HT_{2A} receptors.

Our result is also in agreement with the hypothesis that an activation of the 5-HT₃ receptors can afford antidepressant-like responses, since the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract was prevented by the pretreatment of mice with the 5-HT₃ antagonist ondansetron. The involvement of 5-HT₃ receptors in the mechanism of action of antidepressants has been indicated by the fact that, different classes of antidepressants act as functional antagonists of these receptors (Eisensamer et al., 2003). However, there is evidence showing that electroconvulsive therapy, was able to potentiate the function of 5-HT₃ receptors in the hippocampus (Ishihara and Sasa 2001).

Several clinical and pre-clinical studies have shown the link between depression and catecholamines, especially noradrenaline. This is largely true because, many of the first generation antidepressants, the tricyclics, increase synaptic concentrations of noradrenaline (Dell'osso et al., 2010). In our study, α ₁-adrenoceptor antagonist prazosin

and the α 2-adrenoceptor antagonist yohimbine were able to reverse the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract in the forced swimming test suggesting the involvement of the adrenergic system in this effect.

Since dopamine is the main neurotransmitter involved in the mesolimbic reward pathways, it has been proposed that an increase in dopaminergic neurotransmission might counteract anhedonia which is considered a core feature of major depressive disorder (Gorwood 2008). In addition, electroconvulsive therapy (ECT) used to treat depressive states that are resistant to the usual antidepressant drugs is considered one of the most effective therapies for depression and has beneficial motor effects in parkinsonian patients (Landau et al., 2011).

Our results showed that the dopaminergic system is clearly involved in the antidepressant-like action of *H. brasiliense* extract since the pre-treatment of animals with haloperidol, SCH23390 and sulpiride, prevented the antidepressant-like effect evoked by the extract. Dopamine D1 and D2 receptors are implicated in the anti-immobility action of antidepressants in the mouse forced swimming test. Yamada et al. (2004) showed that the dopamine D1 selective antagonist SCH23390 or the selective D2 antagonist sulpiride, prevented the antidepressant-like effect of two dopamine reuptake inhibitors, bupropion and nomifensine in the forced swimming test.

Many GABAergic effects are mediated via ionotropic GABA(A) receptors, which are functionally defined by their α subunit (α 1- α 6) although it remains unknown which specific GABA(A) receptor population mediates depressive-like effects. Clinical and post-mortem studies reveal changes in GABAergic transmission localized in the cortical depression network (Ghose et al., 2011). However, our results showed that the

GABAergic system did not involve in the antidepressant-like action of *H. brasiliense* extract since the pretreatment of animals with bicuculline, or phaclofen, did not prevent the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract.

Preclinical studies have also indicated that antidepressant-like effects in the forced swimming test are produced by the administration of μ and δ - opioid receptor agonists (Villard et al., 2011). Furthermore, clinical trials indicate that opioid compounds such as beta-endorphin and buprenorphine have antidepressant effects (Dinas et al., 2010) and ECT and acupuncture increases the plasma levels of beta-endorphin, indicating that the treatment of refractory depression may be also mediated by opioid peptides (Ghadirian et al., 1988). In the present study, we show that the pretreatment with naloxone, t or naltrindole, failed to reverse the antidepressant-like effect elicited by *H. brasiliense* extract indicating that its effect is not mediated by an interaction with the opioid system.

Nitric oxide modulates norepinephrine (O'Sullivan et al., 2009) serotonin (Ulak et al., 2008), dopamine (Dhir and Kulkarni 2007) and glutamate (Boix et al., 2011), the major neurotransmitters involved in the neurobiology of major depression. Clinical studies have also confirmed the nitric oxide modulatory activity of various antidepressants particularly belonging to the class of selective serotonin reuptake inhibitors (Crespi et al., 2010). Further support for the hypothesis that the inhibition of nitric oxide synthase, with a subsequent decrease in the concentration of cyclic guanosine monophosphate (Snyder 1992), may produce antidepressant-like effects, at least under certain conditions, comes from the reported reduction in the immobility time in the forced swimming test elicited either by the administration of methylene blue, which acts as a direct inhibitor of both nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase (Jesse et al.,

2010) or by the specific inhibitor of soluble guanylate cyclase activity, 1H-(1,2,4)-oxodiazolo (4,3-a)quinoxalin-1-one (Ergün and Ergün 2007). In this study, we show that the pre-treatment of mice with *L*-arginine did not produce any effect in forced swimming test and thus did not inhibit the anti-immobility effect caused by *H. brasiliense* extract. Furthermore, a synergistic antidepressant-like effect was not observed when *H. brasiliense* extract was administered with NG-nitro-*L*-arginine, 7-nitroindazole or methylene blue, indicating that antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract does not involve the oxidonitric system.

Another finding of this study was that the classical antidepressant fluoxetine was able to potentiate the action of subeffective doses of *H. brasiliense* extract in the in the forced swimming test. This result suggests in part that the effect of this extract seems to be similar to the effect of fluoxetine, regarding the interaction with 5-HT receptor subtypes.

Concerning the chemical constituents of *H. brasiliense* extract used in our experiments, classical phytochemical methods indicated sesquiterpenolides (SL) and simple phenolics as the main constituents (Amoah et al., 2011, submitted manuscript). SL are a very large group of secondary metabolites of high diversity, with respect to chemical structure as well as biological activity. The majority of SL exerts their biological activity by interference with the function of cellular macromolecules through formation of covalent bonds between electrophilic partial structures of the SL and nucleophilic centers of biological targets. A good number of these molecules show strong activity on neural systems; mainly neuroprotective activities (Chung et al., 2010) and these compounds can be pharmacological targets for neurodegenerative diseases like

Parkinson's and Alzheimer's. In this study, it was demonstrated that Podoandin exhibits antidepressant-like effect as the *H. brasiliense* extract, and its antidepressant-like effect was reverted by treatment of animals with NAN-190, ondansetron, prazosin, yohimbine, sulpiride and haloperidol but not by SCH23390 and pindolol suggesting that this compound may be also responsible for the antidepressant-like effect of *H. brasiliense* extract, that seems to be mediated by interaction with the noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems, but not with the GABAergic, opioid and oxido-nitric systems.

Finally, our group has already started pharmacological tests to ascertain whether *H. brasiliense* or Podoandin may or may not produce tolerance.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Apoio a Pesquisa Científica e Tecnológica do Estado de Santa Catarina (FAPESC), and the Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação, Extensão e Cultura of the Universidade do Vale do Itajaí (ProPPEC/UNIVALI), Brazil. Solomon K. S. Amoah and Rogerio Tolardo were MSc students in Pharmaceutical Science supported by grants from the CNPq.

References

- Amoah, S.K.S., Cruz, A.C.H., Souza, M.M., Campos, F.R., Barison, A., Biavatti, M.W., 2011. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Hedyosmum brasiliense*. J. Nat. Prod. submitted manuscript, 2011.
- Berton, O., Nestler, E.J., 2006. New approaches to antidepressant drug discovery: Beyond monoamines. *Nature Rev. Neurosci.* 7, 137-151.
- Blay, G., BARGUES, V., Cardona, L., García, B., Pedro, J.R., 2000. Stereoselective Synthesis of 7,11-Guaien-8,12-olides from Santonin. Synthesis of Podoandin and (-)-Zedolactone A. *J. Org. Chem.* 65, 6703-6707.
- Boix, J., Llansola, M., Cabrera-Pastor, A., Felipo, V., 2011. Metabotropic glutamate receptor 5 modulates the nitric oxide-cGMP pathway in cerebellum in vivo through activation of AMPA receptors. *Neurochem. Int.* 58, 599-604.
- Brocardo, P.S., Budni, J., Lobato, K.R., Kaster, M.P., Rodrigues, A.L.S., 2008. Antidepressant-like effect of folic acid: involvement of NMDA receptors and l-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway. *Eur. J. Pharmacol.* 598, 37–42.
- Brunello, N., Mendlewicz, J., Kasper, S., Leonard, B., Montgomery, S., Nelson, J. Paykel, E., Versiani, M., Racagni, G., 2002. The role of noradrenaline and selective noradrenalinereuptake inhibition in depression. *Eur. J. Pharmacol.* 12, 461–475.
- Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A., Raccuglia, R.A., Bastow, K.F., Lee, K.H., 2005. Cytotoxic Activity of Some Natural and Synthetic Guaianolides. *J. Nat. Prod.* 68, 1042-1046.
- Buller, R., Legrand, V., 2001. Novel treatments for anxiety and depression: Hurdles in bringing them to the market. *Drug Discov. Today* 6, 1220-1230.
- Capra, J.C., Cunha, M.P., Machado, D.G., Zomkowski, A.D., Mendes, B.G., Santos, A.R., Pizzolatti, M.G., Rodrigues, A.L., 2010. Antidepressant-like effect of scopoletin, a Márcia M. de Souza*

coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. *Eur. J. Pharmacol.* 643, 232-238.

Castrén, E., 2005. Is mood chemistry? *Nature Rev. Neurosci.* 6, 241-246.

Chung, I.M., Kim, E.H., Jeon, H.S., Moon, H.I., 2010. Protective effects of isosafrole from *Paulownia coreana* against glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells. *Nat. Prod. Commun.* 5, 851-852.

Crespi, F., 2010. The selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine reduces striatal in vivo levels of voltammetric nitric oxide (NO): a feature of its antidepressant activity? *Neurosci. Lett.* 470, 95-99.

Da Silva, G.D., Matteussi, A.S., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., Rodrigues, A.L.S., 2000. Evidence for dual effects of nitric oxide in the forced swimming test and in the tail suspension test in mice. *Neuroreport* 11, 3699–3702.

Dell'osso, B., Palazzo, M.C., Oldani, L., Altamura, A.C., 2010. The Noradrenergic Action in Antidepressant Treatments: Pharmacological and Clinical Aspects. *CNS Neuroscience and Therapeutics*. Print copy in press (originally published online Dec 14, 2010, at www.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-5949.2010.00217.x/pdf)

Detke, M.J., Wieland, S., Lucki, I. 1995. Blockade of the antidepressant-like effects of 8-OH-DPAT, buspirone and desipramine in the rat forced swim test by 5HT_{1A} receptor antagonists. *Psychopharmacol.* 119, 47-54.

Dhir, A., Kulkarni, S.K., 2007. Involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of venlafaxine in mice. *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 31, 921–925.

Dinas, P.C., Koutedakis, Y., Flouris, A.D., 2010. Effects of exercise and physical activity on depression. *Irish Journal of Medical Science*, Print copy in press (originally published online Nov 13, 2010 at www.springerlink.com/content/d1m700632856r26w/)

Eisensamer, B., Rammes, G., Gimpl, G., Shapa, M., Ferrari, U., Hapfelmeier, G., Bondy, B., Parsons, C., Gilling, K., Zieglgänsberger, W., Holsboer, F., Rupprecht, R., 2003. Antidepressants are functional antagonists at the serotonin type 3 (5-HT₃) receptor. *Mol. Psychiatry* 12, 994-1007.

Ergün, Y., Ergün, U.G., 2007. Prevention of pro-depressant effect of l-arginine in the forced swim test by NG-nitro-l-arginine an [1H-[1, 2, 4]Oxadiazole[4, 3-a]quinoxalin-1-one]. *Eur. J. Pharmacol* 554, 150–154.

Forster, E.A., Cliffe, I.A., Bill, D.J., Dover, G.M., Jones, D., Reilly, Y. Fletcher, A., 1995. A pharmacological profile of the selective silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY 100635. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 81–88.

Ghadirian, A.M., Gianoulakis, C.H., Nair, N.P., 1988. The effect of electroconvulsive therapy on endorphins in depression. *Biol. Psychiatry* 23, 459–464.

Ghose, S., Winter, M.K., McCarson, K.E., Tamminga, C.A., Enna, S.J., 2011. The GABA B receptor as a target for antidepressant drug action. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1-17.

Gorwood, P., 2008. Neurobiological mechanisms of anhedonia. *Dialogues Clin. Neurosci.* 10, 291-299.

Ishihara, K., Sasa, M., 2001. Potentiation of 5-HT₃ receptor functions in the hippocampal CA1 region of rats following repeated electroconvulsive shock treatments. *Neurosci. Lett.* 307, 37–40.

Jesse, C.R., Wilhelm, E.A., Bortolatto, C.F., Rocha, J.B.T., Nogueira, C.W., 2010. Involvement of L-arginine–nitric oxide–cyclic guanosine monophosphate pathway in the antidepressant-like effect of bis selenide in the mouse tail suspension test. *Eur. J. Pharmacol.* 635, 135–141.

Jesse, C.R., Wilhelm, E.A., Bortolato, C.F., Nogueira, C.W., 2010. Evidence for the involvement of the serotonergic 5-HT_{2A/C} and 5-HT₃ receptors in the antidepressant-like effect caused by oral administration of bis selenide in mice. *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 34, 294-302.

Kaster, M.P., Raupp, I., Binfaré, R.W., Andreatini, R., Rodrigues, A.L.S., 2007. Antidepressant-like effect of lamotrigine in the mouse forced swimming test: evidence for the involvement of the noradrenergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 565, 119–124.

Kirchner, K., Wisniewski, Jr A., Cruz, A.B., Biavatti, M.W., Netz, D.J.A., 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of *Hedyosmum brasiliense* Miq., Chloranthaceae, essential oil. *Rev. Bras. Farmacog.* 20, 692-699.

Krass, M., Wegener, G., Vasar, E., Volke, V., 2011. The antidepressant action of imipramine and venlafaxine involves suppression of nitric oxide synthesis. *Behav. Brain Res.* 218, 57-63.

Landau, A.M., Chakravarty, M.M., Clark, C.M., Zis, A.P., Doudet, D.J., 2011. Electroconvulsive therapy alters dopamine signaling in the striatum of non-human primates. *Neuropsychopharmacol.* 36, 511-518.

Lin, T.Y., Yang, T.T., Lu, C.W., Wang, S.J., 2011. Inhibition of glutamate release by bupropion in rat cerebral cortex nerve terminals. *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 35, 598-606.

Maas, M., Hensel, A., da Costa, F.B., Brun, R., Kaiser, M., Schmidt, T.J., 2011. An unusual dimeric guaianolide with antiprotozoal activity and further sesquiterpene lactones from *Eupatorium perfoliatum*. *Phytochemistry* 72, 635-644.

Machado, D.G., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Dias, M., Santos, A.R. Pizzolatti, M.G., Brighente, I.M., Rodrigues, A.L., 2007. Antidepressant-like effect of the extract from leaves of *Schinus molle* L. in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr* 31, 421–428.

Mitchell, P.J., Redfern, P.H., 2005. Animal Models of Depressive Illness: The Importance of Chronic Drug Treatment. *Curr. Pharm. Des.* 11, 171-203.

O'Neill, M.F., Conway, M.W., 2001. Role of 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} receptors in the mediation of behavior in the forced swim test in mice. *Neuropsychopharmacol.* 24, 391–398.

O'Sullivan, J.B., Ryan, K.M., Curtin, N.M., Harkin, A., Connor, T.J., 2009. Noradrenaline reuptake inhibitors limit neuroinflammation in rat cortex following a systemic inflammatory challenge: implications for depression and neurodegeneration. *Int. J. Neuropsychop.* 12, 687-699.

Porsolt, R.D., Le Pichon, M., Jalfre, M., 1977. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730–732.

Prieto, E., Mico, J.Á., Meana, J.J., Majadas, S., 2010. Neurobiological bases of quetiapine antidepressant effect in the bipolar disorder. *Actas Esp. Psiquiatr.* 38, 22-32.

Redrobe, J.P., Bourin, M., Colombel, M.C., Baker, G.B., 1998. Dose-dependent noradrenergic and serotonergic properties of venlafaxine in animal models indicative of antidepressant activity. *Psychopharmacol.* 138,1–8.

Reitz, R., 1965. Clorantáceas. Itajaí, Flora Ilustrada Catarinense.

Rosa, A.O., Kaster, M.P., Binfaré, R.W., Morales, S., Martín-Aparicio, E., Navarro-Rico, Martínez, A., Medina, M., García, A.G., López, M.G., Rodrigues, A.L., 2008. Antidepressant-like effect of the novel thiadiazolidinone NP031115 in mice. *Progr. Neuro Psychopharmacol. Biol. Psychiatr* 32, 1549–1556.

Schreiber, S., Bleich, A., Pick, C.G., 2002. Venlafaxine and mirtazapine: different mechanisms of antidepressant action, common opioid-mediated antinociceptive effects—a possible opioid involvement in severe depression? *J. Mol. Neurosci.* 18, 143–149.

Snyder, S.H., 1992. Biosensors. NO release for good measure. *Nature* 358, 623.

Souza, V.C. Lorenzi, H. 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum: Nova Odessa SP.

Sun, L., Shah, F., Helal, M.A., Wu, Y., Pedduri, Y., Chittiboyina, A.G. Gut, J., Rosenthal, P.J., Avery, M.A., 2010. Design, Synthesis, and Development of Novel Guaianolide - Endoperoxides as Potential Antimalarial Agents. *J. Med. Chem.* 53, 7864-7868

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

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

Ulak, G., Mutlu, O., Akar, F.Y., Komsuoğlu, F.I., Tanyeri, P., Erden, B.F., 2008. Neuronal NOS inhibitor 1-(2-trifluoromethylphenyl)-imidazole augment the effects of antidepressants acting via serotonergic system in the forced swimming test in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 563-568.

Ulak, G., Mutlu, O., Tanyeri, P., Komsuoğlu, F.I., Akar, F.Y., Erden, B.F., 2010. Involvement of serotonin receptor subtypes in the antidepressant-like effect of TRIM in the rat forced swimming test. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 95, 308-314.

Uppal, A., Singh, A., Gahtori, P., Ghosh, S.K., Ahmad, M.Z., 2010. Antidepressants: current strategies and future opportunities. *Curr. Pharm. Des.* 16, 4243-4253.

Villard, V., Meunier, J., Chevallier, N., Maurice, T., 2011. Pharmacological Interaction With the Sigma (1) ($\sigma(1)$)-Receptor in the Acute Behavioral Effects of Antidepressants. *J. Pharmacol. Sci.* 115, 279-292.

Wang, R., Xu, Y., Wu, H.L., Li, Y.B., Li, Y.H., Guo, J.B. and Li, X.J. 2008 The antidepressant effects of curcumin in the forced swimming test involve 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors, *Eur. J. Pharmacol.* 578, 43-50.

Wesolowska, A., Nikiforuk, A., Michalska, K., Kisiel, W., Chojnacka-Wojcik, E., 2006. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. *J. Ethnopharmacol.* 107, 254-258.

Who: Depression. World Health Organization 2011; [cited 2011 Apr 12] Available from http://www.who.int/mental_health/management/depression/definition/en/

Who: Traditional Medicine. World Health Organization 2011; [cited 2011 Apr 12] Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>

Yamada, J., Sugimoto, Y., Yamada, S., 2004. Involvement of dopamine receptors in the anti-immobility effects of dopamine re-uptake inhibitors in the forced swimming test. *Eur. J. Pharmacol.* 504, 207–211.

Yasuno, F., Suhara, T., Ichimiya, T., Takano, A., Ando, T., Okubo, Y., 2004. Decreased 5-HT_{1A} receptor binding in amygdala of schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 55, 439–444.

Zomkowski, A.D.E., Rosa, A.O., Lin, J., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., Rodrigues, A.L.S., 2004. Evidence for serotonin receptor subtypes involvement in agmatine antidepressant-like effect in the mouse forced swimming test. *Brain Res.* 1023, 253–263.

Titles and legends

Fig.1. Structure of Podoandin (**1**), isolated from *H. brasiliense*

Fig. 2. Effect of pre-treatment of ketanserin (5 mg/kg, i.p., a 5-HT_{2A/2C} receptor antagonist, panel A), PCPA (5-HT synthesis inhibitors, 100 mg/kg, i.p., for 4 consecutive days, panel B), NAN-190 (0.5 mg/kg, i.p. a 5-HT_{1A} receptor antagonist, panel C), pindolol (10 mg/kg, i.p., a 5-HT_{1A/1B} receptor antagonist, panel D) or Ondansetron (0.3 mg/Kg, i.p., a 5HT₃ selective receptor antagonist, panel E) on *H. brasiliense* extract (50mg/kg,i.p) induced decrease in the immobility time in the forced swimming test. All values are presented as mean±S.E.M. (n=10–12).***P<0.001, compared with the control group; ##P<0.01 or #### P<0.001 compared with the same group pre-treated with only Podoandin

Fig. 3. Effect of pre-treatment of mice with prazosin (1 mg/kg, i.p., an α 1-adrenoceptor antagonist, panel A) or yohimbine (1 mg/kg, i.p., an α 2-adrenoceptor antagonist, panel B) on *H. brasiliense* extract (50mg/kg, i.p) -induced reduction in immobility time in the forced swimming test. Values are expressed as mean+S.E.M. (n=10-12). *P< 0.05, ***P<0.001, compared with the control group; #P<0.05 or #### P<0.001 compared with the same group pre-treated with only Podoandin.

Fig. 4. Effect of pre-treatment of mice with haloperidol (0.2 mg/kg, i.p., a non selective dopaminergic receptor antagonist, panel A), sulpiride (50 mg/kg, i.p., a dopamine D₂ receptor antagonist, panel B) or SCH23390 (0.05 mg/kg, s.c., a dopamine D₁ receptor antagonist, panel C) on *H. brasiliense* extract (50mg/kg, i.p) -induced reduction in

immobility time in the forced swimming test. Values are expressed as mean+S.E.M. (n=10-12). ***P<0.001 as compared with the control group (vehicle); #P<0.05, ##P<0.01 or ###P<0.001, as compared with the group pretreated with the same group pre-treated with only Podoandin.

Fig. 5. Effect of pre-treatment of mice with *L*-arginine (750 mg/kg, i.p., panel A) on *H. brasiliense* extract (50mg/kg, i.p) -induced reduction in immobility time in the forced swimming test. The potentiating effect of (B) NG-nitro-*L*-arginine (0.3 mg/kg, i.p.), (C) 7-nitroindazole (25 mg/kg, i.p.) and (D) methylene blue (10 mg/kg, i.p.) on the action of *brasiliense* extract (10mg/kg, i.p) i.p. in the forced swimming test. Values are expressed as mean±S.E.M. (n=10-12 mice/group). ***P<0.001 as compared with the control group (vehicle).

Fig. 6. Effect of pre-treatment of mice with naloxone (1mg/Kg, i.p., a non selective opioid receptor antagonist, panel A) and naltrindole (3mg/kg, i.p., panel B), on the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract (50mg/kg,i.p) in the forced swimming test. Values are expressed as mean±S.E.M. (n = 10-12). ***p < 0.001 as compared with the vehicle-treated control

Fig. 7. Effect of pre-treatment of mice with bicuculline, (1.0 mg/kg, i.p., an antagonist of GABA_A receptor, panel A) and phaclofen, (2.0 mg/kg, i.p., an antagonist of GABA_B receptor, panel B) on the anti-immobility effect of *H. brasiliense* extract (50 mg/kg,i.p) in

the forced swimming test. Values are expressed as mean±S.E.M. (n = 10-12). **p < 0.01 as compared with the vehicle-treated control.

Fig. 8. Effect of co-administration of the subeffective doses of of *H. brasiliense* extract (10 mg/kg), Podoandin (1.0 mg/kg), and fluoxetine (20 mg/kg) on immobilization time in forced swimming test in mice. Values are expressed as mean±S.E.M. (n = 10-12). **p < 0.01, ***p < 0.01 as compared with the vehicle-treated control.

Table I Summary of the effects of the various drugs on the anti-immobility effect caused by Podoandin assessed in the FST.

| Treatment | Dose (mg/Kg) | Immobility Time |
|-------------------------|--------------|--------------------------|
| Control | 0 | 120.14±8.28 |
| Prazosin | 1.0 | 114.4±4.1 |
| Yohimbine | 1.0 | 168.7±5.63 |
| Podoandin | 10.0 | 42.28±4.5*** |
| Podoandin +yohimbine | 10.0/1.0 | 91.42±6.22#### |
| Podoandin + Prazosin | 10.0/1.0 | 85.4±10.50## |
| Control | 0 | 173.37±6.92 |
| NAN-190 | 0.5 | 168.85±10-2 |
| Ondansetron | 0.3 | 136.42±21.0 |
| Pindolol | 10.0 | 151.14±11.03 |
| Podoandin | 10.0 | 41.28±4.21*** |
| Podoandin + NAN190 | 10.0/0.5 | 85.16±3.19# |
| Podoandin +Ondansetron | 10.0/0.3 | 81.10±10.69# |
| Podoandin +Pindolol | 10.0/10.0 | 40.40±4.71 ^{NS} |
| Control | 0 | 104.62±14.03 |
| Haloperidol | 0.2 | 115.33±15.71 |
| Sulpiride | 50.0 | 106.28±15.54 |
| SCH23390 | 0.05 | 109.33±18.15 |
| Podoandin | 50.0 | 38.40±4.1*** |
| Podoandin + Haloperidol | 10.0/0.2 | 156.66±13.48#### |
| Podoandin +Sulpiride | 10.0/ 50.0 | 105.28±5.27## |
| Podoandin +SCH23390 | 10.0/0.05 | 42.85±3.16 ^{NS} |

^{NS}., not significant, p<0.01, *** p<0.001 compared with respective controls
p< 0.05, ## p<0.01, ### p<0.001 compared with Podoandin values without the antagonist in each experiment .

To the editor-in-Chief:
European Journal of Pharmacology

Florianópolis/SC, May 5th, 2011

Dear Editor,

Please find enclosed the revised manuscript entitled: "**Antidepressant-Like Effect of *Hedyosmum brasiliense* and its Sesquiterpene Lactone, Podoandin in Mice: Evidence for the Involvement of Adrenergic, Dopaminergic and Serotonergic Systems**", to be published in the *European Journal of Pharmacology*.

I look forward to hearing from you, and remain at your disposal.

Dr. Maique Weber Biavatti – maique@ccs.ufsc.br

Laboratório de Farmacognosia
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC
Campus Universitário/Trindade - 88040-900
Florianópolis, SC - Brasil

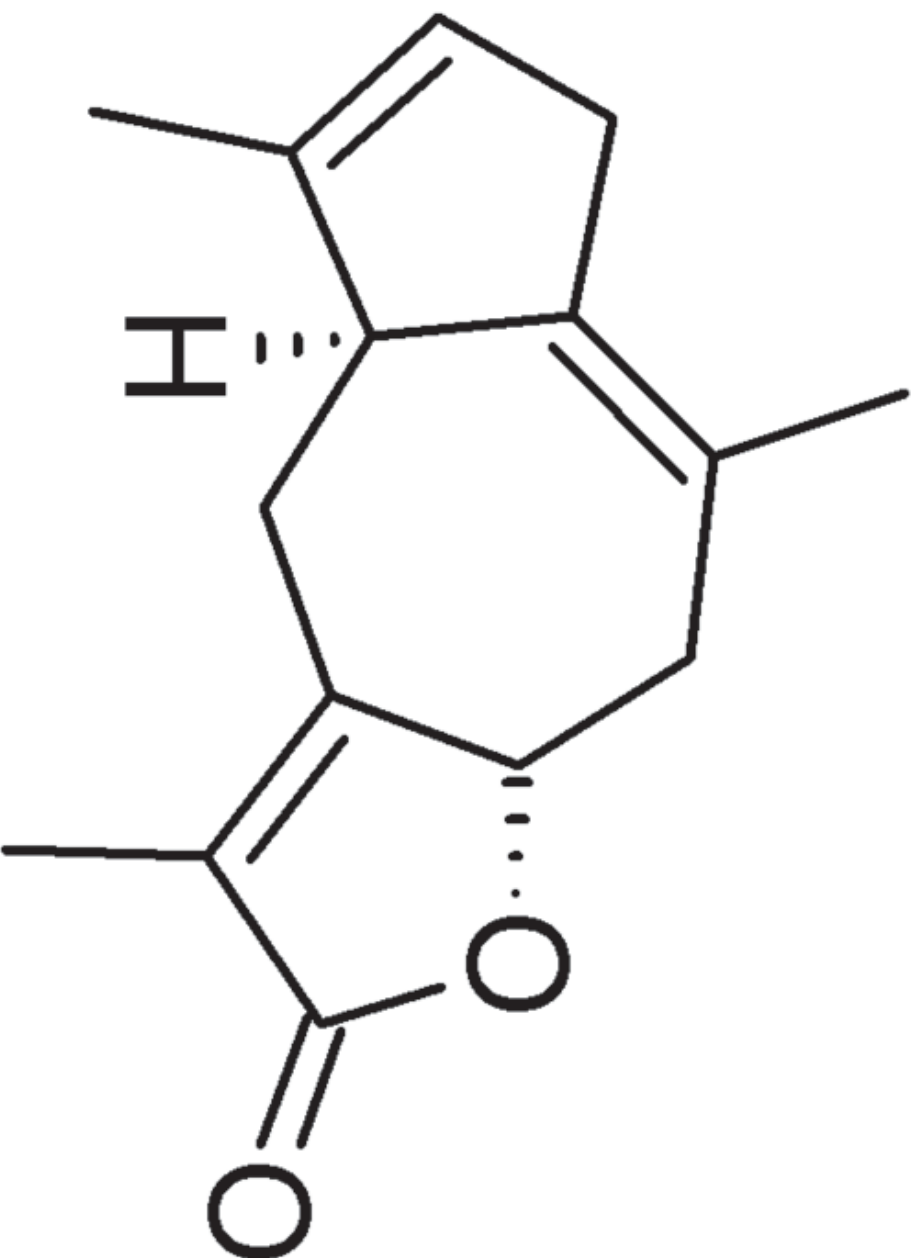


Figure2
[Click here to download high resolution image](#)

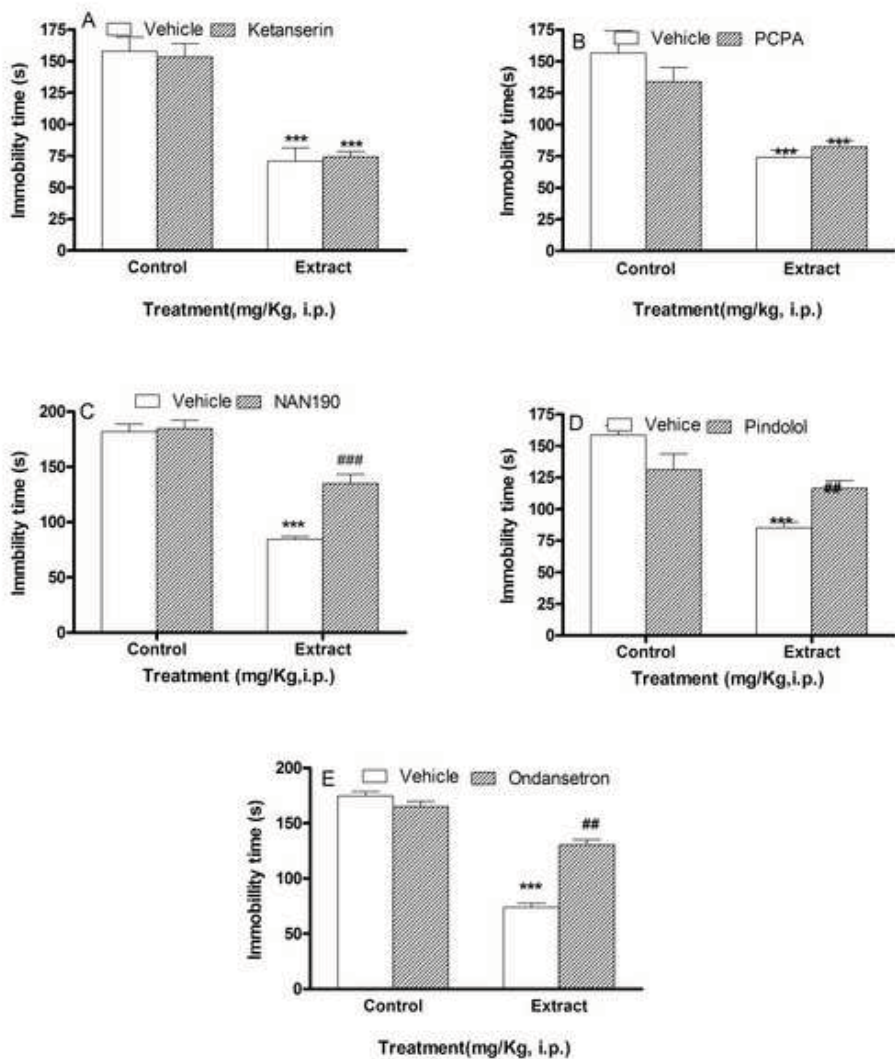


Figure3
[Click here to download high resolution image](#)

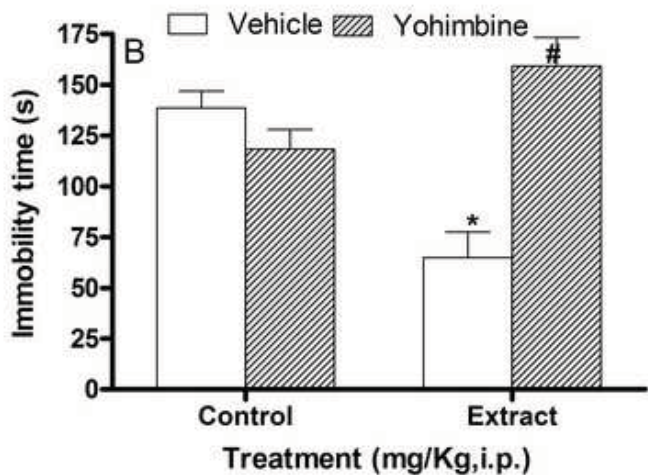
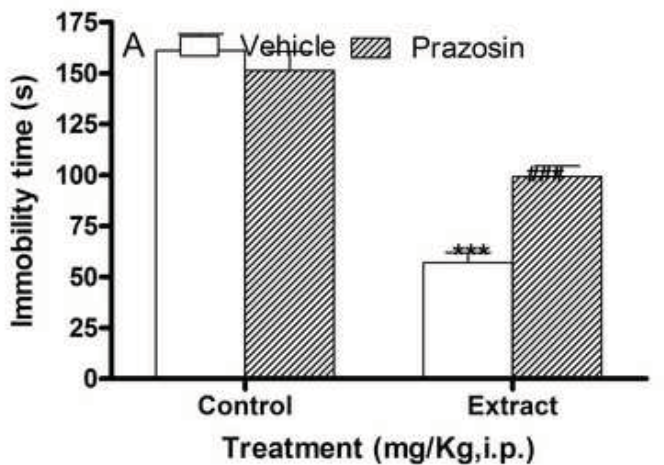
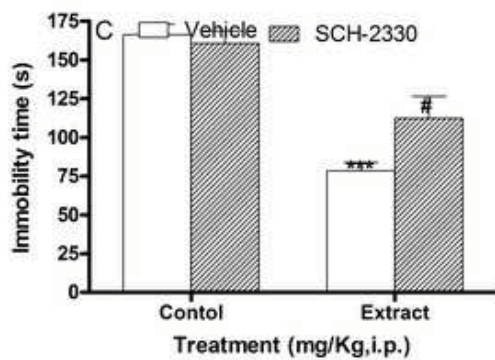
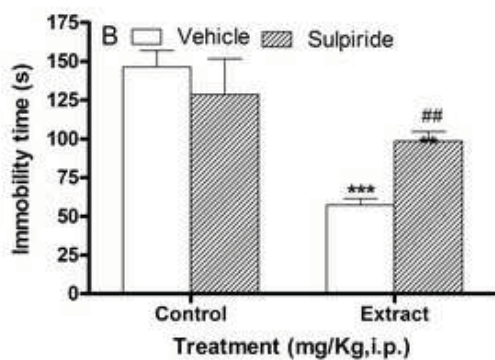
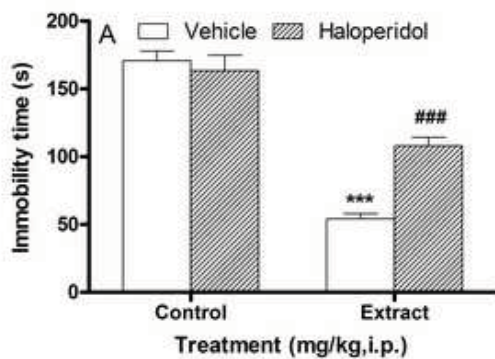


Figure4
[Click here to download high resolution image](#)



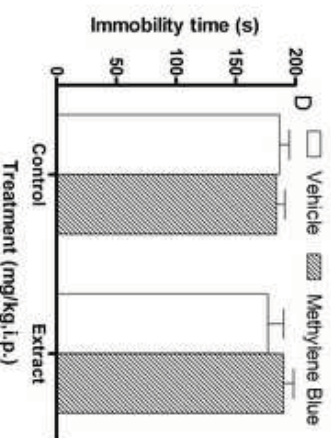
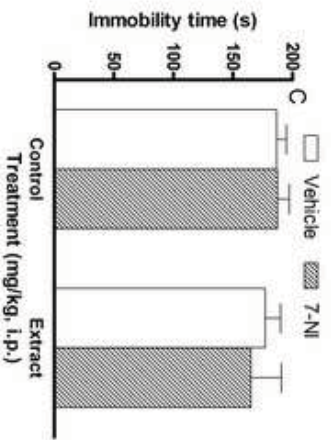
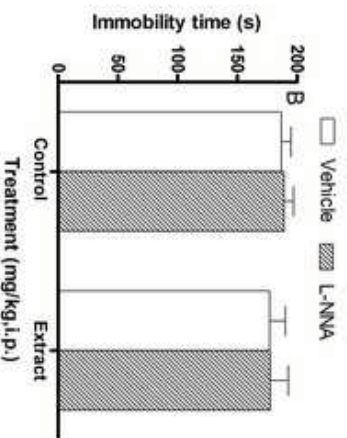
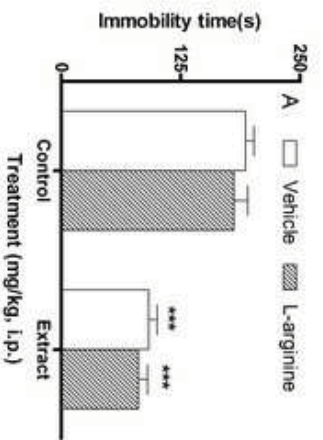


Figure6
[Click here to download high resolution image](#)

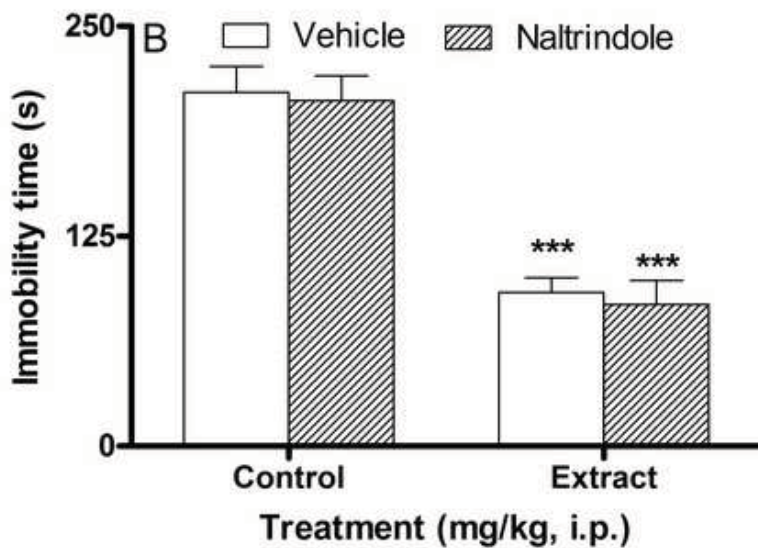
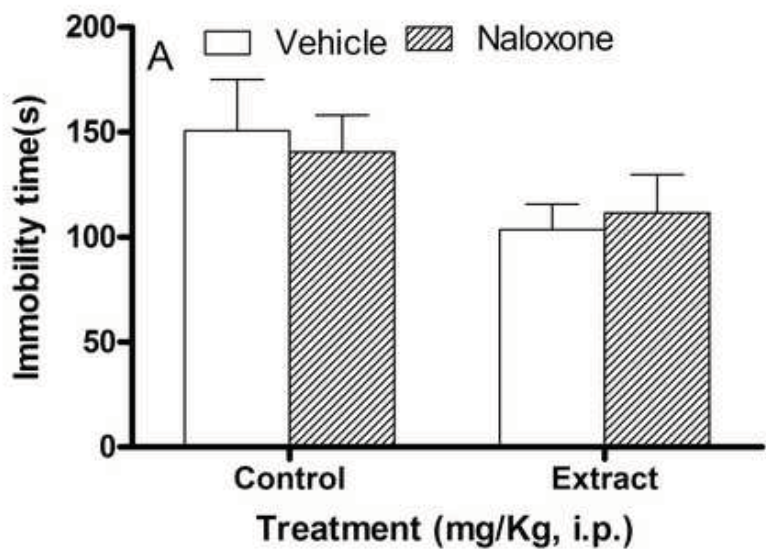
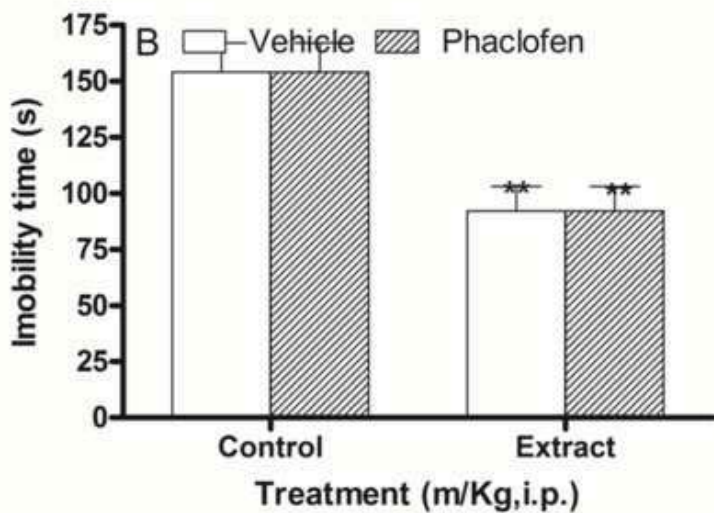
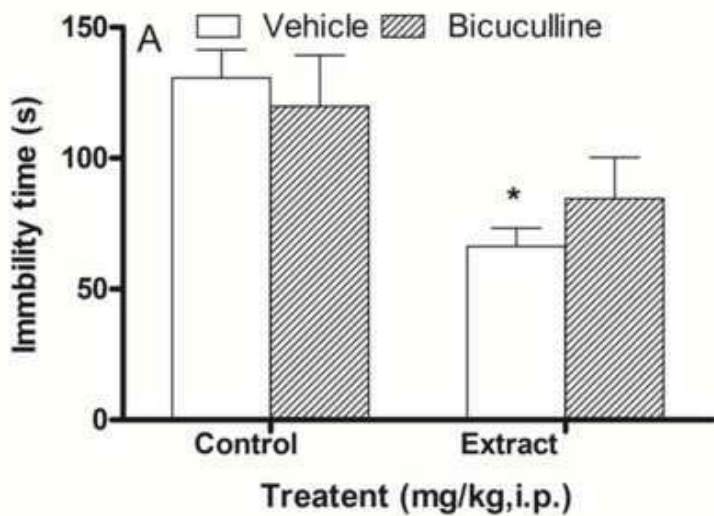


Figure7
[Click here to download high resolution image](#)



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

ZANIOLO, S. R.; BOEGER, M. R.; NEGRELLE, R. R. B. Estrutura da folha de *Hedyosmum brasiliense* Mart. ex Miq. (Chloranthaceae) como subsídio para o controle de qualidade. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Botucatu, v.4, n.1, p. 29-34, 2001.

ZHAN, Z.J.; YING, Y. M.; MA, L. F.; SHAN W. G. Natural disesquiterpenoids. *Natural Product Reports* v. 28, p. 594–629, 2011.

ZHANG, X.; GEOFFROY, P.; MIESCH, M.; JULIEN-DAVID, D.; RAUL, F.; AOUDE-WERNER, D.; MARCHIONI, E. Gram-scale chromatographic purification of β -sitosterol Synthesis and characterization of β -sitosterol oxides. *Steroids* v.70 , p.886–895, 2005.

ZHENG, W.; WANG, S.; HU, X. C. Z. Analysis of *Sarcandra glabra* and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. *Talanta*, [S.l.], v. 60, n. 5, p. 955-960, 2003.