

Avaliação de atividade fungitóxica e isolamento de aloaromadendrano - 4 α , 10 β - diol em *Hypericum cordatum*

SCALCO, N.¹; LADEIRA, A.M.¹; LAGO, J.H.G.²; YOUNG, M.C.M.¹; CARVALHO, L.R.^{3,1}

Instituto de Botânica, ¹Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, ³Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Caixa Postal 3005, CEP: 01031-970, São Paulo-Brasil, ²Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Exatas e da Terra (UNIFESP), Rua Prof. Artur Riedel, 275, Jardim Eldorado, CEP: 09972-270, Diadema, São Paulo-Brasil; *amladeira@yahoo.com.br

RESUMO: *Hypericum cordatum* é uma espécie do cerrado que foi selecionada em triagem de plantas com atividade fungitóxica. O objetivo do presente trabalho foi isolar e identificar compostos com atividade antifúngica em extratos de folhas em diclorometano. O pó das folhas das plantas foi submetido à extração exaustiva com éter de petróleo e diclorometano. O extrato em diclorometano, e as frações ativas, foram submetidos à fracionamentos biomonitorados em coluna de Sephadex LH-20, respectivamente, com os eluentes clorofórmio:metanol (1:1) e com um gradiente de hexano:diclorometano (1:4); diclorometano:acetona (3:2 e 1:4), metanol, e água. As frações que mostraram atividade foram submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa de sílica gel GF₂₅₄, sendo que o material de maior massa foi analisado em CLAE semipreparativa. A fração ativa foi analisada por RMN de ¹H, tendo sido identificado o aloaromadendrano - 4 α - 10 β - diol como componente principal da fração. Conclui-se, portanto, que este é um dos compostos responsáveis pela atividade fungitóxica de *Hypericum cordatum*.

Palavras-chave: Clusiaceae, *Hypericum cordatum*, atividade fungitóxica, fitoquímica, aloaromadendrano -4 α , 10 β - diol

ABSTRACT: *Evaluation of the fungitoxic activity and isolation of alloaromadendrene - 4 α , 10 β - diol in *Hypericum cordatum*.* The *Hypericum cordatum* is a species of the Brazilian Cerrado that was selected in a screening of plants with fungitoxic activities. The aim of this work was to isolate and identify the compounds with antifungal activity in leaf extracts in dichloromethane. For this end, the powder made from the leaves of the plants was submitted to exhaustive extraction with petroleum ether and dichloromethane. The extract in dichloromethane and the active fractions were submitted to bioassay-guided fractionation in Sephadex LH – 20 column, respectively, with the following eluents chloroform:methanol (1:1) and a gradient of hexane:dichloromethane (1:4); dichloromethane:acetone (3:3 and 1:4), methanol and water. Afterward, the fractions that showed some activity were submitted to preparative thin layer chromatography of silica gel GF₂₅₄ and the material with the greatest mass was submitted to semi-preparative HPLC. The active fraction obtained was analyzed by ¹H NMR, and the main component identified was alloaromadendrene-4 α -10 β - diol. We may then conclude that this is one of the compounds responsible for the fungitoxic activity of *Hypericum cordatum*.

Key words: Clusiaceae, *Hypericum cordatum*, fungitoxic activity, alloaromadendrene -4 α , 10 β - diol, phytochemistry

INTRODUÇÃO

O gênero *Hypericum* tem tido destaque na literatura devido ao emprego da espécie européia *Hypericum perforatum* como antidepressiva em crises fracas e moderadas (Barnes, 2001). Esta espécie é utilizada popularmente também como sedativa, adstringente, neurálgica, cicatrizante,

antimicrobiana, antitumoral, antifúngica (Duke, 1985; Volak & Stodola, 1990). Diversas dessas atividades biológicas vêm sendo confirmadas cientificamente e, em função disso, outras espécies do gênero vêm sendo estudadas.

Entre os compostos comuns no gênero

estão as xantonas (Hostettmann & Marston, 1994), como as identificadas em *H. sampsonii*, *H. reflexum*, *H. androseamum*, *H. japonicum*, *H. ascyron* e *H. mysorense* (Gunatilaka et al., 1979; Cardona et al., 1989; Wu et al., 1998; Hu et al., 1999; Dias et al., 2000; Di Hong et al., 2004).

No Brasil, nenhuma das vinte e duas espécies nativas existentes é empregada popularmente como medicinal (Mendes et al., 2002). A mais estudada é a *H. brasiliense*, da qual foram isolados floroglucínóis, γ -pirona, xantonas, ácido betulínico e flavonóides. As xantonas (1,5-dihydroxyxanthone, 5-hydroxy-1-methoxyxanthone e 6-dioxyjacareubin) e os floroglucínóis mostraram atividade antifúngica e antibacteriana (Rocha et al., 1994; 1995; 1996), e extratos de *H. brasiliense* não tiveram efeito genotóxico sobre células de medula óssea de ratos (Espósito et al., 2005).

Outras sete espécies do gênero foram estudadas por Ferraz et al., 2004 e nelas foram identificados ácido filicínico e floroglucínóis derivados desse ácido, substâncias que conferem atividade antimicrobiana às plantas. *Hypericum ternuum* mostrou atividade antifúngica contra várias espécies, em especial contra *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. rubrum*, os dois últimos microorganismos responsáveis pela maioria das infecções em pacientes imunodeficientes (Femner et al., 2005a). Gnerr et al. (2001) analisaram a atividade inibidora da monoaminooxidase em várias espécies de *Hypericum* e Ferraz et al. (2005b) verificaram que benzopiranos alteravam o ciclo celular, e assim conferiam atividade antitumoral a *Hypericum polyanthum*. Viana et al. (2005) constataram atividade antidepressiva em *Hypericum caprifoliatum*, em função da presença de floroglucínóis.

Gallina (1999) detectou flavonóides em extratos metanólicos de folhas e caules de *Hypericum cordatum* e verificou atividade antifúngica em extratos em éter de petróleo, em clorofórmio e no óleo essencial. Dourado & Ladeira (2008) identificaram quercetina, quercitrina, canferol e rutina em extratos metanólicos, e verificaram que a atividade fungitóxica era produzida por uma mistura de compostos presentes nos extratos em diclorometano.

Ladeira et al. (2009) analisaram o óleo essencial de folhas da planta, que mostrou como principais componentes o α -pineno, mirceno e limoneno, e atividade antibacteriana contra *Saccharomyces aureus*.

O presente estudo dá andamento aos ensaios que vêm sendo realizados com *H. cordatum*, uma espécie do cerrado, restrita às regiões sudeste e sul do Brasil (Robson, 1981) e selecionada em triagem de plantas com atividade fungitóxica (BIOTA/

FAPESP Proc. Nº 98/05074-0).

O objetivo do presente trabalho foi realizar o isolamento e a identificação de composto(s) fungitóxico(s) dos extratos em diclorometano de *Hypericum cordatum*.

MATERIAL E MÉTODO

Materiais vegetais

Hypericum cordatum – Cordeiro 1702 (SP) e *Hypericum brasiliense* – Cordeiro 1706 (SP) foram coletadas em campos abertos alterados com cobertura de gramíneas, nas proximidades da rodovia SP250, Km 63, às margens da Rua Caieiras, em Ibiúna, São Paulo. Exsicatas foram depositadas no Herbário “Maria Eneyda P.K. Fidalgo” do Instituto de Botânica de São Paulo.

H. cordatum foi coletada em diferentes meses, nos anos de 1999 a 2005 e *H. brasiliense*, em 2001. Esta última espécie foi utilizada apenas para comparar a atividade fungitóxica e o perfil cromatográfico das duas espécies

Procedimentos gerais

Todas as amostras coletadas foram secas à temperatura ambiente e em seguida tiveram as folhas separadas dos caules. Esses materiais foram pulverizados em moinho Technal e submetidos à extração seqüencial exaustiva em éter de petróleo, diclorometano e metanol. Após evaporação dos solventes sob pressão reduzida os extratos em diclorometano de *H. cordatum* (19,09 g) e de *H. brasiliense* (0,44 g) foram submetidos à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (Rocha et al., 1994).

Cromatografias em colunas de Sephadex:

Utilizou-se coluna de 4,5 cm de diâmetro x 50 cm de altura, e como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1) de onde foram obtidas 86 frações de *H. cordatum* que foram reunidas em 21 grupos após análise por cromatografia em camada delgada (CCD), e 35 frações de *H. brasiliense* reunidas em 6 grupos.

Cromatografia em camada delgada:

os 27 grupos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia planar (CP) realizada em placas prontas da Merck, para caracterização de xantonas e de floroglucínóis. Foram utilizados como eluentes: benzeno:clorofórmio (1:1); benzeno:acetato de etila (3:1); clorofórmio:acetato de etila(8:2); clorofórmio:metanol (98:2); clorofórmio:ácido acético (4:1); n-butanol:ácido acético:água (3:1:1) (Harborne, 1984) e como reveladores o reagente de Godin, solução de KOH 5% em metanol, vanilina sulfúrica seguida de observação na luz ultravioleta (Sthal, 1969; Harborne, 1984) e o bioensaio para avaliação do potencial antifúngico pelo método da

bioautografia (Homans & Fuchs, 1970).

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): Utilizou-se equipamento da Varian, modelo CP 3800 equipado com sistema de bombas quaternário, detector UV-VIS. A coluna empregada foi analítica Reselut C₁₈, (150 X 4,6 mm; 5C, 1890 Å). A fase móvel consistiu em mistura de água deionizada (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% (v/v) de ácido trifluoracético, com o gradiente de eluição de 0,0 min até 5 min, 30% de B; 20 min, 80% de B; 32 min, 100% de B; 40 min, 30% de B. Fluxo constante de 1 mL min⁻¹ e o comprimento de onda de 254 nm (Abreu, 2004a). O padrão empregado foi Xantona Sigma.

Utilizou-se também cromatógrafo da Dionex, bomba Dionex P680, operando no Programa Chromeleon, com coluna cromatográfica C18, semipreparativa 9,4 X 250 mm, 5 micron, Zorbax ODS, e detector Dionex UVD 340U UV/VIS. O fluxo utilizado foi de 2 mL min⁻¹ e o sistema de eluentes o mesmo descrito acima.

Deteção e identificação de xantona: Uma das frações inativas do extrato *H. cordatum* (1062,5 mg) mostrou apenas um componente com tempo de retenção equivalente ao do padrão de xantona. A identificação desse componente foi realizada em CLAE pela análise do resultado da co-eluição dessa fração (10mg.mL⁻¹) com o padrão de xantona (1mg.mL⁻¹) em cromatógrafo da Varian, e por obtenção dos espectros dos componentes e do padrão na luz UV em cromatógrafo da Dionex

Análise da fração ativa: a fração ativa que mostrou maior pureza no fracionamento por CLAE foi submetida à análise em ressonância magnética nuclear (RMN).

O espectro de RMN de ¹H foi registrado em espectrômetro Bruker AC 200, operando em 200 MHz. Os espectros de massa foram registrados em espectrômetro INCOS 50 Finnigan-Mat (quadrupolo) operando com impacto eletrônico 1 E a 70 eV, usado nas análises por CG/EM, acoplado ao cromatógrafo 3400 Varian (coluna crosslinked methyl silicone gum, 25 m, 0.2 mm, 0.33 espessura do filme).

Isolamento e identificação de componente ativo: Os grupos com atividade antifúngica obtidas de extratos de plantas coletadas em diferentes anos foram reunidos em uma amostra de *Hypericum cordatum* (Hc) (3,572 g) e uma de *H. brasiliense* (Hb) (0,499 g). Estas foram submetidas à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20. Utilizaram-se colunas com 4,5 e 2,0 cm de diâmetro e 35 e 17 cm de altura. Como eluente foi utilizado gradiente de hexano:diclorometano (1:4), diclorometano:acetona (3:2) e (1:4), metanol e água (Cardelina II, 1983). Deste processo foram obtidas 170 frações, que foram reunidas em 11 grupos, destes os codificados como 2,3,4,10 e 11 mostraram

maior potencial fungitóxico.

Em seguida os grupos ativos (560 mg) foram submetidos à CCD preparativa (clorofórmio:metanol 98:2) Uma pequena faixa de cada placa foi revelada pelo bioensaio de atividade fungitóxica com *C. sphaerospermum*, e os compostos ativos das frações foram eluídos da sílica em clorofórmio e metanol (98:2) e reunidos, fornecendo 5,9 mg da fração bioativa. Este material foi submetido à CLAE semi-preparativa em cromatógrafo Dionex. As frações obtidas foram submetidas à CP preparativa e a fração ativa obtida à análise em RMN de ¹H conforme metodologia descrita acima.

Bioensaio de atividade antifúngica: As frações obtidas foram submetidas à CP em cromatoplaça de sílica GF₂₅₄ da Merck. Utilizou-se 200 µg de cada fração e 100 µg de cada sub-fração, e os eluentes: hexano:acetato de etila (7:3) ou clorofórmio:metanol (98:2). As placas foram reveladas com uma suspensão de esporos dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*, incubadas em estufa a 25°C durante 48h. Como fungo revelador nas análises das sub-frações utilizou-se apenas *C. sphaerospermum*. A quantificação da atividade fungitóxica foi feita a partir de comparação com o padrão de nistatina (1 µg). (Homans & Fuchs, 1970). Definiu-se por atividade forte (++++) a inibição total do crescimento do fungo, média (++) , quando a inibição é parcial, e fraca (+), quando há pouca alteração no desenvolvimento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frações obtidas no fracionamento dos extratos em diclorometano por cromatografia em coluna de Sephadex de *Hypericum cordatum* e de *Hypericum brasiliense* e analisadas em cromatografia em camada delgada mostraram tanto na revelação na luz UV como no bioensaio de atividade fungitóxica compostos comuns às duas espécies. Entretanto, não foram detectadas em *H. cordatum* compostos que após a revelação apresentassem coloração arroxeadada na luz UV, característica para xantonas e que foram verificadas em *H. brasiliense*.

Nas análises realizadas em CLAE analítica foi possível confirmar as semelhanças nos perfis obtidos para algumas frações de *H. cordatum* e *H. brasiliense*.

Três compostos se destacaram por estarem presentes em 90% das frações inativas das duas espécies, seus tempos de retenção são 22, 29 e 31 minutos. Variações foram observadas apenas na quantidade de cada um em cada espécie.

O composto da fração inativa 2Hc permitiu a identificação do composto de TR 22,4 como

uma xantona (TR 22,2). Segundo Hostettmann e Marston (1994) xantonas simples não têm atividade fungitóxica como também foi verificado neste trabalho.

Atividade antifúngica

A Tabela 1 mostra a massa das frações obtidas após a cromatografia em coluna dos materiais ativos dos quais foram retirados ácidos graxos, e o resultado da CP após a revelação pela bioautografia com os dois fungos. Quando se compara o extrato de Hc com o Hb verifica-se atividade fungitóxica média nas frações 2 e 4 de *Hypericum cordatum* e atividades fraca, média e forte nas frações 3, 4, e 5 de *Hypericum brasiliense*. Ambas espécies apresentam compostos com atividade antifúngica semelhantes na origem e no Rf 0,21/0,22. Atividades nos Rfs 0,06 e 0,31 mostram compostos ativos específicos de *Hypericum cordatum*. Foram observadas diferenças na sensibilidade de cada fungo aos compostos ativos, sendo *C. cladosporioides* o fungo mais sensível.

H. brasiliense mostrou atividade fungitóxica mais forte que *H. cordatum*, e maior número de compostos ativos.

A presença de xantonas ou floroglucínóis

não foi determinada nas análises realizadas em cromatografia em camada delgada dos extratos Hc e Hb para nenhuma fração ativa.

Tendo em vista as massas obtidas neste fracionamento apenas a fração 2 foi objeto de novo fracionamento por CP com o eluente clorofórmio:metanol (98:2) e mostrou agora compostos com atividades fungitóxicas nos Rfs 0,12 (F2.1); 0,34 (F2.2) e 0,50 (F2.3).

Esses materiais eluídos e fracionados por CLAE semi-preparativa produziram respectivamente 27, 19 e 19 sub-frações. A análise dessas frações por CP mostrou que a fração 2.1 continha compostos com atividade média na origem e forte no RF 0,51 (Tabela 2). A fração 2.2, atividade fraca do composto de Rf 0,37 e a 2.3, atividade fraca dos compostos de Rfs 0,6; 0,52 e 0,38.

A fração 2.1 foi analisada por RMN de ^1H onde foram observados, dentre outros sinais, singletos em δ_{H} 1,00 (6H); 1,17 (3H) e em 1,35 (3H) que associados ao tripleto em δ_{H} 0,01 (J= 9,7Hz) puderam ser atribuídos aos hidrogênios H-12/h-13, H-14, h-15 e h-6 de um derivado sesquiterpênico de esqueleto aloaromadendrano. A amostra foi analisada através de CG/EM indicando a predominância de uma substância de tr = 26,2

TABELA 1. Massa das subfrações obtidas após a cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 do material ativo de *Hypericum cordatum* (Hc), e do material de *Hypericum brasiliense* (Hb), Rf obtido na CP de sílica em clorofórmio: metanol 98:2 e resultado obtido na bioautografia com os fungos *C. cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Fração	Massa(mg)	Rf	Atividade Antifúngica	
			<i>C. cladosporioides</i>	<i>C. sphaerospermum</i>
F2 Hc	528,3	0,06	++	+
		0,21	++	+
		0,31	++	+
F4 Hc	80,6	origem	++	+
F3 Hb	51,8	0,22	+	-
		0,26	+	-
F4 Hb	11,5	0,40	++	-
		0,67	+++	++
		0,78	++	+
F5 Hb	39,7	origem	++	++

Legenda: - ausência de atividade; + fraca atividade; ++ média atividade; +++ forte atividade

TABELA 2. Massa das sub-frações obtidas após a cromatografia líquida de alta eficiência da fração 2.1 de *Hypericum cordatum* e resultado das cromatografias em camada delgada após as revelações com luz UV (λ_{max} 360 nm) e com o fungo *C. sphaerospermum*.

Fração	Massa (mg)	RF	UV	<i>C. sphaerospermum</i>
2.1 (1-5)	0,9	Origem	Azulado	++
2.1 (6- 16)	3,5	0,51	Azulado	+++
2.1 (17-18)	2,2	0,49	Azulado	-
2.1 (19-27)	22,1	Origem	Esverdeado	-

Legenda: - ausência de atividade; + fraca atividade; ++ média atividade; +++ forte atividade

min (82%), cujo espectro de massas mostrou o pico do íon molecular em m/z 238, indicativo da fórmula molecular $C_{15}H_{26}O_2$. A comparação dos dados espectroscópicos de RMN e de massas com aqueles descritos na literatura permitiu caracterizar o composto bioativo como aloaromadendrano - 4 α , 10 β - diol o qual foi descrito anteriormente como um dos responsáveis pelo potencial fungitóxico de *Xylopia brasiliense*.

Aloaromadendrano tem sido identificado no óleo essencial de várias espécies de *Hypericum* (Erken et al., 2001; Baser et al., 2002; Abou-Jawdah et al., 2002; Couladis et al., 2003; Schowb et al., 2004; Raduziene et al., 2005; Demirei et al., 2005; Petrakis et al., 2005; Morteza-Semnami et al., 2005; Saroglou et al., 2007), mas não foi identificado no óleo essencial de *H. cordatum* (Ladeira et al., 2009). O óleo essencial de *H. brasiliense* contém 7,152% de aromadendreno (Abreu et al., 2004).

De modo geral os trabalhos da literatura analisam a composição dos óleos essenciais, e a atividade antimicrobiana do óleo e não de seus diferentes componentes (Rabanal et al., 2002; Schwob et al., 2002; Cakir et al., 2005; Mastelic et al., 2005).

No presente trabalho a fração fungitóxica contém como maior componente aloaromadendrano 1 α , 10 β - diol. Podemos então sugerir que esse componente é um dos componentes ativos dos extratos de folhas em diclorometano.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa PIBIC concedida e á FAPESP pelos auxílios concedidos, Proc. Nº 98/05074-0 e 00/05761-0.

REFERÊNCIA

ABOU-JAWDAH, Y.; SOBH, H.; SALAMEH, A. Antimicrobial activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.50, n.11, p.3208–3213, 2002.

ABREU, I.N.; PORTO, A.L.M.; MARSAIOLI, A.J.; MAZZAFERA, P. Distribution of bioactive substances in *Hypericum brasiliense* during plant growth. **Plant Science**, v. 167, p. 949-954, 2004a.

ABREU, I. N.; MAZZAFERA, P.; MARSAIOLI, A.J.; REIS, M. G. Essential oil composition of *Hypericum brasiliense* Choise. **Flavour and Fragrance Journal**, v.19, no1, p. 80-82, 2004b.

BASER, K.H.C.; OZEK, T.; NURIDDINOV, H. R., DEMIRCI, A. B. Essential oils of two *Hypericum* species from Uzbekistan. **Chemistry of Natural Compounds** v. 38, n.1, p.54 – 57, 2002.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A., PHILLIPSON, J.D. St. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties.

Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 53, p. 583-600, 2001.

CAKIR, A; KORDALI,S.; KILIC, H., KAYA A,E. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 33, p.245 – 256, 2005.

CARDELLINA II, J.H. Step gradient elution in gel permeation chromatography. A new approach to natural products separations. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 2, p.196-199, 1983.

CARDONA, M. L.; FERNANDEZ, I.; PEDRO,J.R. ; SERRANO, A. Xanthenes from *Hypericum sampsonii*. **Phytochemistry**, v.29, n. 9, p.3003 -3006, 1990.

COULADIS, M.; CHINO, I.B.; TZAKOU, O.; PETRAKIS, P.V. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hypericum rumeliacum* subs. Apollinis (Boiss & Heldr.) **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 152 – 154, 2003.

DEMIRCI, B.; BASER, K.H.C.; CROCKETT, S. L.; KHAN, I.A. Analysis of the volatile constituents of Asian *Hypericum* L. (Clusiaceae, Hyperidoideae) species. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p. 659 – 663, 2005.

DIAS, A.C.P.; SEABRA, R.M.; ANDRADE, P.B.; FERRERES, F.; FERNANDES-FERREIRA, M. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. **Plant Science**, v.150, p. 93 -101, 2000.

DI HONG, F.Y.; HU, L-H AND LU, P. Sulphonated xanthenes from *Hypericum sampsonii*. **Phytochemistry**, v.65, p. 2595 – 2598, 2004.

DOURADO, R.S.; LADEIRA, A.M. Identificação de Flavonóides em *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n.4, p.611 – 620, 2008.

DUKE, J.A. **Handbook of medicinal herbs**. CRC Press, 1985.

ERKEN, S.; MALYER, H.; DEMIRCI, F.; DEMIRCI, B.; BASER, K.H.C. Chemical investigations on some *Hypericum* species growing in Turkey –1. **Chemistry of Natural Compounds**, v.37, n.5, p. 434 –438, 2001.

ESPÓSITO, A.V; PEREIRA, D.M.V.; ROCHA, L.M.; CARVALHO, J.C.T.; MAISTRO, E.L. Evaluation of genotoxic potential of *Hypericum brasiliense* (Gutiferae) in mammalian cell system in vivo. **Genetic and Molecular Biology**, v. 28, p. 152-155, 2005.

FERRAZ, E.M.N.; ARAÚJO, E.L.; SILVA, S.I. Floristic similarities between lowland and montane of Atlantic Coastal Forest in Northeastern Brazil. **Plant Ecology**, v. 74, p. 59-71, 2004.

FERNNER, R.; SORTINO, M.; KUZE RATES, S.M.; DALL'AGNOL, R.; FERRAZ, A.; BERNARDI, A.P.; ALBRING, D.; NÖR, C.; von POSER, G.; SCHAPOVAL, E.; ZACHINNO, S. Antifungal Activity of some Brazilian *Hypericum* Species. **Phytomedicine**, v. 5, p. 213-217, 2005a.

GALLINA, P. **Análise de compostos secundários em *Hypericum cordatum* (Vell.conc.) N.Robson, comb Nov (Gutiferae)**. Monografia apresentada à Universidade Metodista 47 p., 1999.

GNERR C.; von POSER, G.; FERRAZ, A.; VIANA, A.; TESTA, B.; RATES, S.M.T. Monoamine Oxidase Inhibitory Activity of Some *Hypericum* Species Native to

- South Brazil. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.1273 -1279, 2001.
- GUNATILAKA, A A L.; BALASUBRAMANIAM, S. and KUMAR, V. Studies on medicinal and related plants Sri-Lanka 1–2, 3–dimethoxyxanthone from *Hypericum mysorensense*. **Phytochemistry**, v. 18,n.1, p. 182.-183,1979.
- HARBORNE, J.B. **Phytochemical Methods. A guide to Modern Techniques of Plant analysis**. Londres. Chapman and Hall. 288p., 1984.
- HOMANS, A.L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substance. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A .Search for new antifungal compounds from higher plants. **Pure & Applied Chemistry**, v.66, n.10/11, p. 2231 –2234, 1994.
- HU, L-H, YIP,S-C; SIM, K-Y. Xanthenes from *Hypericum ascyron* **Phytochemistry**, v.52, p. 1371 -1373, 1999.
- LADEIRA, A.M.; SILVA, G.B.; RAGGI, L.; YOUNG, M.C.M.; AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; MORENO, P.R.H. Chemical Composition and antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Hypericaceae). **Journal Essential Oil Research**, v 21, p. 558 -560, 2009.
- MASTELIC, J.; POLITEO, O.; JERKIVIC, I.; RADOSEVIC, N. Composition and antimicrobial of *Helichrysum italicum* essential oil and its terpene and terpenoids fractions. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 41, n.1, p.35 – 40, 2005.
- MORTEZA – SEMNAMI, K; SAEEDI, M. The essential oil composition of *Hypericum androsaemum* L leaves and flowers from Iran. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, p. 332 –334, 2005.
- MENDES, F.R.; MATTEI, R.; CARLINI, E.L.A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**., v. 73, p. 462-471, 2002.
- PETRAKIS,P.V.; COULADIS,M.; ROUSSIS,V. A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: the case of five Hellenic *Hypericum* L. species. **Biochemical Systematic and Ecology**, v.33, p. 873 – 898, 2005.
- RABANAL, R.M.; ARIAS, A; PRADO, B.; HERNANDEZ-PEREZ,M.; SANCHEZ-MATEO, C.C.2002. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.287 – 292, 2002. RADUZIENE, J.; JUDZENTIENE, A, BERNOTIENE,G. Essential oil composition and variability of *Hypericum perforatum* L. growing in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 113 – 124, 2005.
- ROBSON, N.K.B. Studies in the genus *Hypericum* L. (Guttiferae) 2. Characters of the genus. **Bulletin Brazilian Museum National of History** (Bol), v. 8, n. 2, p. 55 – 226, 1981.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI-EVANS, H.; THULL, U.; TESTA, B.; HOSTETTMANN. An Antifungal γ -pyrone and xanthenes with monoamine oxidase inhibitory activity from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 36, n 6, p.1381-1385, 1994.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KAPLAN, M. A. C.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial Phloroglucinols and Flavonoids from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 40, n.5, p. 1447-1452, 1995.
- ROCHA, L.; MARSTON, A.; POTTERAT, O.; KEPLAN, M. A. C.; HOSTETTMANN, K. More Phloroglucinols from *Hypericum brasiliense*. **Phytochemistry**, v. 42, n.1, p. 185-188, 1996.
- SARAGLOW, V.; MARIN, P.D.; RANCIC, A; VELJIC, M.; SKALTA, H. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of six *Hypericum* species from Serbia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p. 146 –152, 2007.
- SCHWOB, I.; BESSIERE, J.M.; DHERBOMEZ, M.; VIANO, J. Composition and antimicrobial activity of essential oil of *Hypericum coris*. **Fitoterapia** , v. 73, p. 511 – 513, 2002.
- STHAL, E. **Thin Layer Chromatography**. [s.e.]. New York, Springer Vertag, 1969.
- TOWAFEK, O; NACER, A; KABOUCHE, AE; KABOUCHE, Z. Analysis of the essential oil of Algerian *Hypericum perforatum*(L.) **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p.669 –670, 2005.
- VIANA, A.; REGO, J.C.; von POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J.; RATES S.M.K. The antidepressant effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Guttiferae) on forced swimming test result from an inhibition of neuronal monoamino uptake. **Neuropharmacology**., v. 49, p.1042-1052, 2005.
- VOLAK, J.; STODOLA, J. Plantas Mediciniais. Editorial Inquerito, 319p., 1990.
- WU, Q-L; WAMG, S-P; DU, L-J.; YANG, J-S; XIAO, P-G. Xanthenes from *Hypericum japonicum* and *H. henryi*. **Phytochemistry**, v.49,n.5, p. 1395 -1402, 1998.