

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE  
ESPÉCIES DE *Eupatorium* NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL E  
CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS DE LACTONAS  
SESQUITERPÊNICAS**

Tese de Doutorado

TIAGO JULIANO TASSO DE SOUZA

Porto Alegre, 2014



**ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS VOLÁTEIS DE  
ESPÉCIES DE *Eupatorium* NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL E  
CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS DE LACTONAS  
SESQUITERPÊNICAS**

Tese apresentada por **Tiago Juliano  
Tasso de Souza** para obtenção do  
TÍTULO DE DOUTOR em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Miriam Anders Apel

Porto Alegre, 2014

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovado em 17.11.2014, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Renata Pereira Limberger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr. Francisco Maikon Corrêa de Barros

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rubem Mario Figueiro Vargas

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Tiago Juliano Tasso de  
ESTUDO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS ÓLEOS  
VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE Eupatorium NATIVAS DO RIO  
GRANDE DO SUL E CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS DE  
LACTONAS SESQUITERPÊNICAS / Tiago Juliano Tasso de  
Souza. -- 2014.  
302 f.  
Orientadora: Miriam Anders Apel.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2014.

1. óleo volátil. 2. Eupatorium. 3. análise  
multivariada. 4. banco de dados. 5. RMN. I. Apel,  
Miriam Anders, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus da Saúde, Porto Alegre.

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro e pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.



*ducunt volentem fata, nolentem trahunt . (Seneca Minor)*  
*O destino conduz o que consente e arrasta o que resiste.*

*αρμονία αφανής, φανερός κρείττων. (Heráclito de Éfeso)*  
*A harmonia que não se vê é superior à que se pode ver.*





## AGRADECIMENTOS

Ao finalizar esta etapa, gostaria de expressar meu reconhecimento à Dra. Miriam Apel pela orientação na execução deste projeto.

Ao Dr. Sérgio Bordignon pela coleta e identificação das espécies analisadas.

Aos professores Dra. Renata Limberger, Dra. Gilsane von Poser, Dr. Rubem Vargas e ao Dr. Maikon de Barros pelas valiosas contribuições na elaboração deste documento.

Ao PPGCF, à Faculdade de Farmácia e à UFRGS por fornecerem as condições para a execução deste trabalho. Em especial ao PPGCF, gostaria de agradecer também por permitir meu afastamento quando da impossibilidade física de continuá-lo e por permitir meu retorno nos tempos devidos.

A todos os meus colegas e colaboradores do laboratório de farmacognosia da UFRGS e à professora Dra. Amélia Henriques, sua coordenadora e a Letícia pela colaboração e companhia.

Aos colegas e amigos da Bioensaios, em especial ao Alexandre Brandelli por todos os anos de apoio e confiança.

À Júlia e à Marina pela amizade. À Camila e ao Luiz Fernando por me mostrarem outros mundos. Ao Rodrigo.

Aos meus avós queridos e à minha mãe, por tudo. Ao meu irmão Dieiso por estes anos de convivência.

À memória de meu pai.



## RESUMO

O gênero *Eupatorium* L. (Asteraceae) apresenta muitas espécies comumente encontradas no Rio Grande do Sul e se caracteriza pela presença de óleos voláteis e outros derivados terpenoídicos entre seus metabólitos secundários. Neste trabalho, o óleo volátil de oito espécies de *Eupatorium* nativas do estado foi extraído por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e sua composição química foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM). As espécies analisadas foram: *E. inulifolium* Kunth, *E. polystachyum* DC, *E. picturatum* Malme, *E. tremulum* Hook. & Arn, *E. ivifolium* L., *E. laevigatum* Lam., *E. casarettoi* (B.L.Rob.) Steyerm., *E. itatiayense* Hieron. e *E. gaudichaudianum* DC. Os óleos voláteis de partes aéreas de *E. tremulum* analisados antes, durante e após a floração, aplicando-se análises multivariadas para identificar compostos com variação significativa em cada estágio de desenvolvimento da espécie. Os extratos diclorometano das mesmas espécies foram avaliados na busca de lactonas sesquiterpênicas utilizando como metodologia a mensuração da absorção característica de lactonas no espectro Infravermelho e aplicação de métodos de extração específicos para essa classe de compostos. Foi realizado fracionamento dos óleos voláteis em cromatografia em coluna aberta (CC), cromatografia flash (CC *flash*) e cromatografia líquida de média pressão (MPLC) com monitoramento das frações por CG/EM para o isolamento de compostos não identificados apenas por seu índice de retenção linear e espectro de massas. Utilizando essa abordagem foi isolado e identificado por seus dados espectrais de RMN um furanossesquiterpeno, 3-oxo-verboccidentafurano, descrito pela primeira vez em *Eupatorium*. Também foi realizado o fracionamento de extratos diclorometano (*E. casarettoi* e *E. inulifolium*) em CC *flash* e MPLC, com monitoramento das frações por CG/EM e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) na tentativa de isolamento de lactonas sesquiterpênicas. Um composto foi isolado e sua completa elucidação estrutural está em andamento. Considerando as dificuldades encontradas no processo de elucidação estrutural da molécula isolada do extrato de *E. inulifolium*, mesmo com a abundância de dados de ressonância magnética nuclear (RMN) <sup>13</sup>C disponíveis para consulta,

e que não foi encontrada uma base digital dedicada a lactonas sesquiterpênicas reunindo esses dados em uma plataforma facilmente acessível e utilizável, foi realizada a transposição de uma base de dados da literatura para um formato digital amigável (baseada em Excel®), com a visualização e comparação de dados facilitadas graças à utilização de formas gráficas em lugar das formas tabulares de apresentação dos espectros comuns na literatura.

Palavras-chave: óleo volátil, *Eupatorium*, análise multivariada, banco de dados, RMN.

## ABSTRACT

### **Study of chemical constituents of essential oils from *Eupatorium* species native in Rio Grande do Sul State and framing of a sesquiterpene lactone database**

The genus *Eupatorium* L. (Asteraceae) contains several species that are common in Rio Grande do Sul State and it is characterized by essential oils and other terpenic derivatives among its secondary metabolites. Through this survey, it was evaluated the chemical composition of the essential oil from eight species of *Eupatorium* natives to the State and their chemical composition was analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The following species were studied: *E. inulifolium* Kunth, *E. polystachyum* DC, *E. picturatum* Malme, *E. tremulum* Hook. & Arn, *E. ivifolium* L., *E. laevigatum* Lam., *E. casarettoi* (B.L.Rob.) Steyerm., *E. itatiayense* Hieron. and *E. gaudichaudianum* DC. Volatile oils from aerial parts of *E. tremulum* were analysed before, during and after blooming. Multivariate analyses were employed in order to identify compounds showing significant variation between each developmental stage. Dichloromethane extracts of these same species were evaluated for sesquiterpene lactones by measuring the typical infrared absorption for lactones and applying extraction methods directed to this class of compounds. The essential oils were fractionated by CC, CC *flash* and MPLC, with fractions being monitored by GC/MS for isolation of unknown compounds, whose retention index and mass spectrum were not enough for identification. Using this approach a furansesquiterpene, 3-oxo-verbocidentafuran, described for the first time for *Eupatorium*, was isolated and identified based on NMR spectral data. Dichloromethane extracts (*E. casarettoi* and *E. inulifolium*) were also fractionated by CC *flash* and MPLC, fractions were monitored by GC/MS and HPLC-DAD aiming the isolation of sesquiterpene lactones. One compound was isolated and its structural elucidation is ongoing. Considering difficulties faced in the process of structural elucidation of the compound isolated from the extract of *E. inulifolium*, even with plenty of NMR <sup>13</sup>C data available for search, and considering that no digital database dedicated to sesquiterpene lactones was found, that gathers these data in an easily accessible and user friendly platform, we performed the transposition of a bibliographic database to a more user friendly digital format

(baseada em Excel®), with enhanced data visualization and comparison, thanks to the use of graphical rather than the tabular spectral presentation usually found in the literature.

Keywords: essential oil, *Eupatorium*, multivariate analysis, database, NMR.

## LISTA DE ABREVIATÖES

AcOEt	=	Acetato de Etila
APG	=	grupo de filogenia de angiospermas
Ca-ATPase	=	Calcio-ATPase
CAPES	=	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CB <sub>2</sub>	=	receptor canabinoide 2
CBM	=	Concentração bactericida mínima
CC	=	cromatografia em coluna aberta
CC flash	=	cromatografia em coluna flash
CFM	=	concentração fungicida mínima
CG/EM	=	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CIM	=	concentração inibitória mínima
<i>cos</i>	=	Cosseno
COX-1	=	Ciclooxigenase (Prostaglandina H <sub>2</sub> Sintase) 1
COX-2	=	Ciclooxigenase (Prostaglandina H <sub>2</sub> Sintase) 2
DHA	=	cido docosa-hexaenoico
DHA	=	cido docosahehexanoico
DNA	=	cido Desoxirribonucleico
EtOOH	=	cido Acético
<i>ln</i>	=	Logaritmo natural
MALDI-EM	=	Ionização e dessorção a laser assistida por matriz – espectrometria de massas
MPLC	=	cromatografia líquida de média pressão
NF-κB	=	Fator Nuclear κB
NIRS	=	Espectroscopia no Infravermelho Próximo
NOS	=	xido nítrico sintase
p65	=	gene codificador da proteína 65
PGE <sub>2</sub>	=	Prostaglandia E <sub>2</sub>
RNA	=	cido Ribonucleico
ROS	=	espécies reativas de oxigênio
TBARS	=	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UV	=	ultravioleta





## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1: Estruturas secretoras de óleos voláteis:.....	34
Figura 2.2: Principais rotas de biossíntese de compostos voláteis em plantas .....	36
Figura 2.3: Estruturas representativas de sesquiterpenoides de cadeia aberta .....	53
Figura 2.4: Estruturas representativas de humulanos e cariofilanos. ....	54
Figura 2.5: Confômeros de germacrenos.....	56
Figura 2.6: Isômeros de núcleo cadinano.....	57
Figura 2.7: Relação estrutural entre monoterpênicos e sesquiterpenoides.....	66
Figura 2.8: Estrutura química de $\gamma$ -terpineno, timol e carvacrol.....	68
Figura 3.1: Espectro de IV de um extrato rico em lactonas (quadro superior 1765) e pobre em lactonas (quadro inferior 1709) .....	156
Figura 3.2: Tricomas glandulares de <i>T. parthenium</i> antes e após lavagem com clorofórmio.....	158
Figura 3.3: Espectro infravermelho dos extratos das folhas e das inflorescências de <i>E.inulifolium</i> . ....	174
Figura 3.4: Algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas de espécies de <i>Eupatorium</i> . Nomes, referências e absorção IV para cada substância podem ser localizadas na Tabela 3.3. ....	176
Figura 3.4: Espectros de massas do hexacosanal. ....	179
Figura 3.5: Cromatogramas da subfração 3: A) 210 nm;.....	184
Figura 3.5: Cromatogramas da subfração 3: B) 258 nm.....	185
Figura 3.6: Cromatogramas da subfração 2: A) 210 nm.....	187
Figura 3.6: Cromatogramas da subfração 2: B) 278 nm.....	188
Figura 3.7: Espectro de $^1\text{H}$ -RMN de Einulac1. ....	189
Figura 3.8: Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN de Einulac1 .....	190
Figura 3.9: Deslocamento químico do C12 de lactonas sesquiterpênicas. ....	191
Figura 4.1: Tipos de estruturas $\gamma$ -lactônicas.....	199
Figura 4.2: Estruturas comuns de substituintes derivados acila em lactonas sesquiterpênicas. ....	200
Figura 4.3: Excerto de uma tabela de dados de RMN de $^{13}\text{C}$ de BUDĚŠÍNSKY e ŠAMAN (1995), evidenciam a baixa qualidade gráfica do mesmo.....	202
Figura 4.4: Faixas de deslocamentos químicos para carbonos em diferentes ambientes eletrônicos. ....	206
Figura 4.5: Excerto de dados de $^{13}\text{C}$ RMN de 11 lactonas sesquiterpênicas .....	208
Figura 4.6 Representação gráfica dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ para exemplo no texto. ....	209
Figura 4.7: Representação gráfica dos sinais de RMN das 11 moléculas na Figura 4.5. ....	209
Figura 4.8: Espectros de RMN $^{13}\text{C}$ da Stizolina e do 4 $\alpha$ ,5 $\beta$ -epoxi-9 $\alpha$ -hidroxi-germacra-1(10),11(13)-dien-12,6 $\alpha$ -olídeo. ....	211
Figura 4.9: Superior: estrutura do moacetato de leucantanolídeo. ....	212
Figura 4.10: Interface do programa.. ....	214
Figura 4.11: Figura representativa da caixa de opções de núcleos de estruturas desenvolvido para o programa. ....	215
Figura 4.12: Dados de RMN do diidroperoxipartenolídeo na referência.....	216
Figura 4.13: Representação gráfica dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ do diidroperoxipartenolídeo no programa. ....	217

Figura 4.14: Representação tabular dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ para 8 $\alpha$ -metacrilóiloxi-2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal-vernomargólido na referência. ....	218
Figura 4.15: Representação gráfica dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ do 8 $\alpha$ -metacrilóiloxi-2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal-vernomargólido no programa. ....	220
Figura 4.16: Representação gráfica dos dados de RMN $^{13}\text{C}$ do 10-acetil,8 $\alpha$ -metacrilóiloxi-2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal-vernomargólido no programa. ....	222

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 2.1: Biossíntese de policetídeos e algumas estruturas representativas. ...	37
Esquema 2.2: Rota de biossíntese de derivados do chiquimato e algumas estruturas representativas.....	39
Esquema 2.3: Junção cabeça-cauda de esqueletos isoprênicos e alguns esqueletos representativos.....	40
Esquema 2.4: Relação entre as rotas mevalonato (MVA) e metileritritol (MEP) em diversos táxons .....	41
Esquema 2.6: Compartimentalização e intercâmbios entre as rotas MVA e MEP ...	43
Esquema 2.7: Biossíntese de monoterpênicos de cadeia aberta e <i>p</i> -mentano.....	45
Esquema 2.8: Estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos	46
Esquema 2.9: Rotas de biossíntese dos monoterpênicos cíclicos a partir do fosfato de geranila.....	49
Esquema 2.10: Ciclização do pirofosfato de farnesila por terpeno ciclases e os diversos núcleos sesquiterpênicos.....	52
Figura 2.3: Estruturas representativas de sesquiterpenoides de cadeia aberta .....	53
Figura 2.4: Estruturas representativas de humulanos e cariofilanos. ....	54
Esquema: 2.11: Biossíntese de germacrenos e seus derivados elementares.....	55
Esquema: 2.12: Germacreno A e germacreno B com conformação <i>Z,E</i> e o derivado elemeno de <i>Z,E</i> -germacreno A. ....	56
Esquema 2.13: Biossíntese de muurolanos, cadinanos, amorfanos e bulgaranos... ..	59
Esquema 2.14: Biossíntese de cadinanos via bisabolanos. ....	60
Esquema 2.15: Biossíntese de eudesmanos.....	61
Esquema 2.16: Biossíntese de eremofilanos.....	62
Esquema 2.17: Biossíntese de aromadendranos e guaiananos.....	64
Esquema 2.18. Biossíntese de sesquiterpenos derivados do cátion bisabolila .....	65
Figura 2.7: Relação estrutural entre monoterpênicos e sesquiterpenoides.....	66
Esquema 2.19: Biossíntese de mentol e carvona.....	69
Esquema 2.20: Biossíntese de mentol e mentofurano .....	70
Esquema 2.21: Biossíntese de (-)-mentofurano a partir de (-)-pulegona.....	71
Esquema 2.22: Biossíntese de capsidiol. ....	72
Esquema 2.23: Biossíntese de solavetivona e nootkatona .....	73
Esquema 2.24: Localização da tribo Eupatorieae na Família Asteraceae.....	86
Esquema 2.25: Novos gêneros e subtribos das espécies nativas de <i>Eupatorium</i> ( <i>sensu lato</i> ) no sistema King & Robinson (1997). ....	90
Esquema 3.1: Biossíntese de lactonas sesquiterpênicas utilizando amorfa-4,7(11)-dieno como precursor (Adaptado de TEOH, 2006). ....	159
Esquema 3.2: Biossíntese de lactonas sesquiterpênicas utilizando o germacreno A como precursor. ....	161
Esquema 3.3: Costunolídeo como precursor das quatro classes mais numerosas de lactonas sesquiterpênicas .....	162
Esquema 3.4: Germacreno A como precursor das lactonas sesquiterpênicas (apenas lactonas 6,12 são mostradas no esquema).....	164
Esquema 3.5: Representação da reação de $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas com sulfidrilas.. ..	165

Esquema 3.6: Derivatização/extração de $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas.....	170
Esquema 3.7: Desidratação e rearranjo de McLaferty em aldeídos. ....	180

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1: Tribos da subfamília Asteroideae: .....	87
Tabela 2.2: Subtribos da tribo Eupatorieae: .....	88
Tabela 2.3: Componentes do óleo volátil ou isolados de extratos de espécies de <i>Eupatorium</i> . .....	94
Tabela 3.1: banda de absorção IV típicas de ésteres e lactonas (Adaptado de Pavia, 2008 e Nakanishi, 1962). .....	157
Tabela 3.2: Lista de coletas para pesquisa de lactonas sesquiterpênicas. <i>E. tremulum</i> e <i>E. casarettoi</i> não foram inseridos na triagem. ....	168
Tabela 3.3: Absorção no IV dos extratos superficiais de espécies de <i>Eupatorium</i> . .....	172
Tabela 3.4: Absorbância do IV de artemisinina e de lactonas isoladas de espécies do gênero <i>Eupatorium</i> (região de 1600-1800 cm <sup>-1</sup> ). .....	175
Tabela 3.4: Fracionamento do extrato diclorometano superficial das partes aéreas de <i>E. casarettoi</i> . .....	177
Tabela 3.5: Rendimento das frações do extrato diclorometano de <i>E. casarettoi</i> :... ..	178
Tabela 3.6: Massa de compostos alifáticos (a massa observada para aldeídos é M-18, massa do íon molecular-massa da água):.....	181
Tabela 3.7: Fracionamento do extrato diclorometano superficial das partes aéreas de <i>E. inulifolium</i> . .....	182
Tabela 3.8: Frações do extrato diclorometano de <i>E. inulifolium</i> : .....	183
Tabela 3.9: Tratamento do extrato de <i>E. laevigatum</i> com acetato de chumbo.....	192



## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT .....	11
LISTA DE ABREVIACOES.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ESQUEMAS .....	17
LISTA DE TABELAS .....	19
SUMÁRIO.....	21
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	23
2. CAPÍTULO I - ESTUDO DO ÓLEO VOLÁTIL DE ESPCIAS DE <i>Eupatorium</i> (ASTERACEAE).....	27
2.2 OBJETIVO GERAL.....	30
2.3 REVISÃO DA LITERATURA .....	31
2.3.1 ÓLEOS VOLÁTEIS .....	31
2.3.2 Biossíntese de derivados Policetídeos.....	36
2.3.3 Biossíntese de derivados do ácido chiquímico.....	38
2.3.4 Biossíntese de Terpenoides.....	38
2.3.4.1 Monoterpenoides.....	44
2.3.4.2 Sesquiterpenoides.....	50
2.3.4.3 Funcionalizao de terpenoides.....	63
2.3.5 Propriedades farmacológicas.....	74
2.3.6 Família Asteraceae e o gênero <i>Eupatorium</i> .....	84
2.3.6.1 Aspectos taxonômicos.....	84
2.3.7 Análise Estatística.....	110
2.4 MANUSCRITO I.....	113
3. CAPÍTULO II - ESTUDO DO EXTRATO DICLOROMETANO DE ESPCIAS DE <i>Eupatorium</i> COM ÊNFASE EM LACTONAS SESQUITERPÊNICAS.....	151
3.1 INTRODUÇÃO .....	153
3.2 OBJETIVO GERAL.....	155
3.2.1 Objetivos específicos .....	155
3.3 REVISÃO DA LITERATURA .....	156
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	166
3.4.1 Material vegetal.....	166
3.4.2 Extrao por lavagem com diclorometano .....	166
3.4.3 Extrao Herz-Hgenauer.....	167
3.4.4 Extrao para $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas.....	169
3.4.5 Análise em Infravermelho.....	170
3.4.6 Cromatografia gasosa.....	170
3.4.7 Cromatografia em coluna flash .....	171
3.4.8 CLAE.....	171
3.4.9 Espectroscopia de RMN.....	171
3.5 RESULTADOS.....	172
3.5.1 Triagem para lactonas sesquiterpênicas superficiais.....	172
3.5.2 Lactonas sesquiterpênicas superficiais.....	177
3.5.2.1 Extrato diclorometano superficial de <i>Eupatorium casarettoi</i> .....	177
3.5.3 Lactonas sesquiterpênicas internas- Extrao Herz-Hgenauer .....	191
3.5.4 Lactonas sesquiterpênicas internas - Extrao/derivatizao com dimetilamina-Iodeto de metila .....	192

3.6	<i>DISCUSSÃO</i>	192
4.	CAPÍTULO III - CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DADOS DE <sup>13</sup> C	195
4.1	<i>INTRODUÇÃO</i>	197
4.2	<i>OBJETIVO GERAL</i>	198
4.2.1	Objetivos específicos	198
4.3	<i>REVISÃO DA LITERATURA</i>	199
4.4	<i>METODOLOGIA</i>	204
4.4.1	Seleção de compilações de dados de RMN <sup>13</sup> C para lactonas sesquiterpênicas	204
4.4.2	Seleção da plataforma para construção, armazenamento e disponibilização do banco de dados	204
4.4.3	Seleção da plataforma para construção, armazenamento e disponibilização do banco de dados	204
4.5	<i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	206
4.5.1	Interface	212
4.6	<i>Perspectivas</i>	223
4.6.1	Desenvolvimento de um software de busca de similaridade	223
4.6.2	Hospedagem da plataforma e com o software de busca de similaridade na web	225
5.	<i>DISCUSSÃO GERAL</i>	227
6.	<i>CONCLUSÕES</i>	231
	<i>REFERÊNCIAS</i>	235
	<i>ANEXO 1</i>	261
	<i>ANEXO 2</i>	267
	<i>ANEXO 3</i>	273



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As plantas são fontes naturais ricas em compostos capazes de exercer as mais diversas ações farmacológicas. Menos de 10% das aproximadamente 250 mil plantas conhecidas pelo mundo já foram cientificamente investigadas quanto a sua atividade farmacológica, tendo direta ou indiretamente originado 25% dos fármacos atualmente prescritos no mundo. Disto se deduz que os vegetais oferecem um vasto e inesgotável reservatório de novos fármacos com potencial atividade farmacológica. Essa característica, aliada à sua grande diversidade química, faz dos produtos de origem vegetal excelente matéria-prima para a síntese de novos fármacos. Entre os produtos do metabolismo vegetal mais promissores e de mais fácil acesso para a pesquisa de compostos ativos, encontram-se os terpenoides (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001; BRENNAN et al., 2003).

Espécies das famílias Lamiaceae, Myrtaceae, Poaceae, Lauraceae, Rosaceae e Asteraceae são bastante conhecidas por suas propriedades aromáticas relacionadas aos óleos voláteis, cuja composição química pode variar amplamente. Essa diversidade funcional, no entanto, pode ser agrupada em duas séries principais: a série dos derivados do fenilpropano e a série terpênica (BELL e CHARLWOOD, 1980). Na série dos fenilpropanoides são classificados os derivados do fenilpropano (C6-C3), oriundos do metabolismo do ácido chiquímico (como as cumarinas e alguns aldeídos aromáticos) (GEISSMAN e CROUT, 1969; GUIGNARD et al., 1985). Na série terpênica, quantitativamente mais numerosa e qualitativamente mais variada encontram-se os monoterpenos e os sesquiterpenos (CROTEAU, 1987; CANE, 1990).

Compostos derivados dos sesquiterpenoides, as lactonas sesquiterpênicas, apresentam um radical isopropila oxidado e convertido a uma lactona, usualmente uma  $\gamma$ -lactona. São de grande interesse, pois apresentam importantes atividades terapêuticas (De KRAKER et al., 2002). Este grupo de compostos ocorre em muitos gêneros da família Asteraceae e estudos evidenciaram atividades farmacológicas promissoras, como atividade anti-inflamatória (MELO et al., 2005); atividade inibitória sobre a liberação de elastase neutrofílica humana (ARAKAWA et al., 2008) e atividade antioxidante hormética (ativação em baixas doses das respostas antioxidantes do organismo) (UMEMURA et al., 2008), entre outras.

O gênero *Eupatorium* L. (Asteraceae) compreende centenas de espécies, sendo a grande maioria delas endêmica do continente Americano. No Rio Grande do Sul foram descritas 49 espécies (MATZENBACHER, 1979). O gênero é quimicamente caracterizado pela presença de óleos voláteis terpênicos, lactonas sesquiterpênicas, flavonóides e alcalóides pirrolizidínicos (KING e ROBINSON, 1987). A grande maioria das espécies ainda não foi avaliada quanto à sua composição química e potencial biológico, entretanto alguns autores, de SOUZA (2007) e de SOUZA e colaboradores (2007), por exemplo, determinaram a composição química do óleo volátil de 33 das espécies nativas no Rio Grande do Sul e avaliaram de forma preliminar suas atividades antioxidante e anticolinesterásica. Outros autores (MOREL et al., 2007; REIS et al., 2008; SCHOSSLER et al., 2009) também se voltaram para o estudo dos óleos voláteis de espécies deste gênero; MONKS e colaboradores (2002), por sua vez, avaliaram o potencial citotóxico de extratos de *E. laevigatum* e *E. macrocephalum* contra linhagens celulares de tumores sólidos e SCHMIDT e colaboradores (2009) incluíram *E. laevigatum* em alguns outros ensaios de atividade biológica. Ainda, de *Eupatorium rufescens* P.W. Lund ex DC. (Asteraceae) foram isolados e caracterizados dois peróxidos sesquiterpênicos, zengibereno-3,6- $\alpha$ -endoperóxido e zengibereno-3,6- $\beta$ -endoperóxido, ambos com atividade esquizotóxica contra *Plasmodium falciparum* (RÜCKER et al., 1996).

Entre as lactonas já isoladas de *Eupatorium* encontram-se germacranolídeos, guaianolídeos, heliangolídeos (KING e ROBINSON, 1987; HERZ, 2001), germacradienolídeos, elemanolídeos, elemadienolídeos, eudesmanolídeos, melampolídeos, partenolídeos, cronquistiolídeos, grazielolídeos e isoguaiagrazielolídeos (DE GUTIÉRREZ et al., 1995; HERZ, 2001; HERZ, 2004; HUO et al., 2004; YUE et al., 2004). Muitas lactonas isoladas de espécies de *Eupatorium* foram avaliadas quanto à sua atividade citotóxica *in vitro* contra células de várias linhagens tumorais - *E. cannabinum* (WOERDENBAG et al., 1988); contra células P-388 e A-549 - *E. lindleyanum* (HUO et al., 2004); *E. chinense* (LIAW et al., 2008); atividade inibitória sobre a degranulação em células RBL-2H3 de leucemia basofílica de ratos - *E. chinense* (ITOH et al., 2009) e atividade repelente contra formigas - *E. quadrangulare* (OKUNADE e WIEMER, 1985).

As lactonas sesquiterpênicas usualmente encontradas em espécies de *Eupatorium* pertencem aos quatro núcleos principais: germacranolídeo, guaianolídeo, eudesmanolídeo e elemanolídeo, que são também os quatro núcleos mais simples das lactonas encontradas em Asteraceae. Entretanto, a presença de muitos substituintes acila ligados a esses núcleos na forma de éteres ou ésteres, bem como a existência de vários centros quirais nos esqueletos carbônicos dessas moléculas, tornam o processo de identificação das mesmas bastante trabalhoso. Assim, apesar de técnicas de espectrometria de massas e análise de infravermelho serem utilizadas com frequência como auxiliares na identificação molecular de lactonas sesquiterpênicas, é a técnica de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  que fornece o maior número de informações estruturais no processo de elucidação. Dessa forma, a existência de bancos de dados abrangentes, detalhados e de fácil consulta é fundamental para desenvolvimento de um bom trabalho de elucidação.

Como parte de nosso trabalho sistemático envolvendo espécies aromáticas da família Asteraceae de ocorrência no Rio Grande do Sul, foi desenvolvido um projeto de mestrado (SOUZA, 2007), em nosso Programa de Pós-Graduação, no qual dezenas de espécies (33 espécies) do gênero *Eupatorium* L. foram analisadas quanto à composição química do óleo volátil e ensaiadas para atividade antioxidante e anticolinesterásica pelo método de bioautografia. Tais estudos geraram trabalhos que foram apresentados em diversos eventos científicos nacionais e internacionais, bem como originaram um manuscrito publicado (SOUZA et al., 2006a, 2006b, 2006c; SOUZA et al., 2007; APEL et al., 2008a, 2008b, 2008c; ANDRADE et al., 2008; BAUERMANN et al., 2008; APEL et al., 2009). Como resultado deste trabalho, observou-se potencial químico e biológico para as espécies. Desta forma, a presente tese de doutorado intencionou o aprofundamento nas investigações químicas de *Eupatorium*, incluindo as lactonas sesquiterpênicas, comuns neste gênero. Dentre essas espécies estudadas, foram selecionadas algumas com base em seu alto rendimento em óleos voláteis e na presença de compostos de interesse, para aprofundamento da investigação química e, paralelamente a isso, desenvolveu-se uma plataforma em Excel® para visualização e armazenamento de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ , cuja funcionalidade foi verificada em um banco de dados espectrais de lactonas sesquiterpênicas.

Esta tese é apresentada em capítulos. O capítulo I aborda óleos voláteis, sendo seus materiais e métodos, resultados e discussão apresentados no encarte do manuscrito I. O capítulo II aborda lactonas sesquiterpênicas, revisão bibliográfica e técnicas de isolamento. O capítulo III aborda o desenvolvimento de um programa para visualização de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de lactonas sesquiterpênicas.

**2. CAPÍTULO I - ESTUDO DO ÓLEO VOLÁTIL DE ESPÉCIES DE *Eupatorium*  
(ASTERACEAE)**



## 2.1 INTRODUÇÃO

A química de compostos voláteis está intimamente relacionada à integração das plantas ao seu meio. Assim, muitas vezes as plantas se utilizam deste tipo de substância para reagir a ataques biológicos, competir com outras plantas, ou se proteger do calor e da radiação excessivos (ANGIONI et al, 2006).

Dada a diversidade de estruturas e funções químicas presentes em óleos voláteis, estas substâncias têm potencial para uma gama de atividades farmacológicas, além do seu importante valor econômico no mercado de flavorizantes e cosméticos. Entretanto, muitas espécies vegetais nativas nunca foram quimicamente avaliadas, nem se tem conhecimento sobre seu potencial farmacológico. Dentre estas, podemos citar espécies do gênero *Eupatorium*. SOUZA (2007) avaliou a composição química de 33 espécies de *Eupatorium* nativas, entretanto, muitas permanecem inexploradas, além do fato de que a composição química de óleos voláteis pode variar, não apenas com a espécie, mas com as condições edafoclimáticas e fenofases (ANGIONI et al, 2006). Assim, uma única análise não caracteriza a variabilidade química de uma espécie.

Dessa forma, buscou-se neste capítulo foi o aprofundamento do estudo da composição química do óleo volátil de espécies de *Eupatorium*, com a inclusão de novas espécies, o acompanhamento da variabilidade fenofásica da composição química do óleo volátil de *E. tremulum* e o isolamento e identificação de substâncias não identificadas no trabalho anterior de SOUZA (2007). Ampliando assim o conhecimento químico do gênero, com adição de informações para estudos quimiotaxonômicos e geração de informações que possam contribuir para a conservação da espécie.

## 2.2 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste capítulo foi o estudo dos constituintes químicos dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* nativas do Rio Grande do Sul. O óleo volátil foi obtido das partes aéreas de *E. tweedieanum*, *E. polystachium*, *E. tremulum*, *E. picturatum*, *E. ericoides*, *E. buniifolium*, *E. laevigatum*, *E. serratum*, *E. gaudichaudieanum* e *E. clematideum* por hidrodestilação e analisados por cromatografia a gasosa.

### 2.2.1 Objetivos específicos

- Obtenção de óleos voláteis de folhas e inflorescências frescas de espécies de *Eupatorium* por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger;
- Identificação dos componentes por seus espectros de massa e índice de retenção.
- Isolamento cromatográfico de substâncias cuja identificação não seja possível por espectrometria de massas e índice de retenção;
- Elucidação estrutural das substâncias isoladas, utilizando técnicas espectroscópicas de RMN.
- Monitoramento por CG/EM da variabilidade na composição química do óleo volátil de *E. tremulum* durante a pré-floração, floração e pós-floração.



## 2.3 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.3.1 ÓLEOS VOLÁTEIS

Óleos voláteis ou essenciais são, por definição, misturas complexas de substâncias voláteis produzidas por organismos vivos e obtidas de plantas ou de partes de plantas utilizando-se apenas métodos físicos (prensagem ou destilação) (SELL, 2009). Todas as plantas têm a habilidade de produzir tais substâncias, mas muito frequentemente apenas em quantidades mínimas, pois a capacidade de acumular óleos voláteis não é onipresente no reino vegetal. Essa propriedade é um traço característico de certos grupos taxonômicos, dispersa em ou típica de algumas famílias vegetais e está intimamente associada à presença de estruturas anatômicas especializadas, nas quais tais substâncias são secretadas ou acumuladas: células secretoras (idioblastos) e cavidades ou dutos no interior dos tecidos vegetais e tricomas glandulares nas superfícies externas dos diferentes órgãos (FAHN, 1988; SVOBODA et al., 2000; BOUKHRIS et al., 2013).

#### Famílias botânicas

As famílias onde são encontradas espécies produtoras de óleos voláteis de interesse econômico ou medicinal estão distribuídas nas gimnospermas: Cupressaceae (*Cupressus sp.*, *Juniperus sp.*) e Pinaceae (*Abies sp.*, *Pinus sp.*); e nas angiospermas as monocotiledôneas: Poaceae (*Cymbopogon sp.*, *Vetiveria sp.*) e Zingiberaceae (*Elettaria sp.*, *Zingiber sp.*); e as dicotiledôneas: Apiaceae (*Apium sp.*, *Foeniculum sp.*), Geraniaceae (*Geranium sp.*, *Pelargonium sp.*), Illiciaceae (*Illicium sp.*), Lamiaceae (*Mentha sp.*, *Salvia sp.*, *Lavanda sp.*), Lauraceae (*Cinnamomum sp.*, *Laurus sp.*), Myristicaceae (*Myristica sp.*), Myrtaceae (*Syzygium sp.*, *Eugenia sp.*), Oleaceae (*Jasminum sp.*) Rosaceae (*Rosa sp.*), Santalaceae (*Santalum sp.*) e Asteraceae (*Artemisia sp.*, *Matricaria sp.*, *Achillea sp.*), dentre outros (SELL, 2009).

#### Glândulas

A presença de quantidades apreciáveis de óleos voláteis em espécies vegetais depende, anatomicamente, da existência de estruturas específicas para sua secreção e acúmulo. Espécies da Família Lamiaceae, por exemplo, caracterizam-se por acumular produtos voláteis em tricomas glandulares, como é o caso em *Rosmarinus*

*officinalis* (MARIN et al., 2006), *Lavandula pedunculata* (ZUZARTE et al., 2010), *Scutellaria agrestis* (OLIVEIRA et al., 2014), *Salvia crysophylla* (KAHRAMAN et al., 2010); já em Apiaceae, Cupressaceae e Pinaceae os dutos secretores é que acumulam estes produtos, como evidenciado para *Carum carvi* (SVOBODA, 2000), *Hladnikia pastinacifolia* (Apiaceae) (ŠAJNA et al., 2014), *Thuja plicata* (Cupressaceae) (FOSTER et al., 2013) e *Picea omorika* (Pinaceae) (NIKOLIĆ et al., 2013b). No gênero *Citrus*, por outro lado, os óleos são acumulados em cavidades secretoras, como evidenciado em *C. cinensis* e *C. limon* (BENNICI e TANI, 2004) e em *Piper sp.* (Piperaceae) foram relatadas células secretoras ou idioblastos (MARINHO et al., 2011), assim como em *Cymbopogon sp.* (Poaceae) (LEWINSOHN et al., 1998)

Na família Asteraceae os relatos mostram a ocorrência de tricomas glandulares, dutos secretores, hidatódios, idioblastos, cavidades, laticíferos, nectários extraflorais e apêndices glandulares (WERKER e FAHN, 1981; VERTREES e MAHLBERG, 1978; CASTRO et al., 1997).

Em *Matricaria chamomila* (Anthemideae, Asteraceae) ANDREUCCI e colaboradores (2008) relataram que tricomas glandulares e dutos secretores coocorrem no caule, folhas e brácteas. Na corola e no ovário, apenas tricomas glandulares são encontrados, enquanto no pedúnculo, receptáculo e estigma, os dutos secretores ocorrem sozinhos. Além disso, este autor relata que existem algumas diferenças nas secreções nessas duas estruturas: tricomas glandulares apresentam substâncias pécticas e maior quantidade de lipídeos quando comparados com dutos secretores, que não apresentam pectinas, mas produzem maior quantidade de óleos voláteis. Entretanto, a composição química destes grupos de metabólitos não foi descrita e não se sabe se existe diferença quali ou quantitativa nos óleos voláteis e lactonas sesquiterpênicas secretados nas duas estruturas.

Além de *Matricaria sp.*, outros gêneros de Asteraceae apresentam diversas estruturas secretoras (BARTOLI et al., 2011). CASTRO e colaboradores (1997) estudaram a morfoanatomia de espécies desta família botânica presentes no cerrado brasileiro e relataram que todas as 15 espécies de *Eupatorium* (tribo Eupatorieae) coletadas nesse local apresentaram dutos secretores, hidatódios e tricomas glandulares, sendo que em apenas uma delas também foi observada a presença de

idioblastos. Espécies de outros gêneros da tribo Eupatorieae incluídas no estudo, *Mikania* (3) e *Stevia* (2), apresentavam as mesmas estruturas, diferindo apenas na presença ou não de idioblastos, assim como ocorre em *Eupatorium*. O mesmo foi verificado nas espécies das tribos Astereae (5) e Heliantheae (13): todas apresentavam dutos, hidatódios e tricomas, e algumas também apresentavam idioblastos. Quanto às espécies das tribos Inuleae (2), Mutisieae (5) e Vernonieae (27) incluídas no estudo, todas apresentaram tricomas glandulares, mas apenas em uma espécie do gênero *Trixis* (Mutisieae) ocorrem dutos secretores. Idatódios e idioblastos não têm ocorrência constante nessas tribos. Mais recentemente PLOS e colaboradores (2011), estudando o gênero *Ophryosporus* (tribo Eupatorieae) verificaram que de 31 espécies observadas, apenas 16 apresentaram tricomas glandulares, entretanto, todas elas exibiram estruturas secretoras internas, como dutos ou cavidades.

Em *Eupatorium adenophorum*, entretanto, não foram relatados dutos secretores em um estudo farmacognóstico da folha dessa espécie (NEGI et al., 2010).

Além dessas variações observadas entre os gêneros, também podem ocorrer variações intraespecíficas. A interrelação entre estruturas especializadas para a secreção e o acúmulo de voláteis pode ser exemplificada pelo trabalho de PAOLINI e colaboradores (2009), onde os autores evidenciaram que duas das subespécies de *Cistus creticus* (Cistaceae) típicas do Mediterrâneo, *C. creticus eriocephalus* e *C. creticus corsicus*, divergem não apenas nos caracteres morfológicos que baseiam sua diferenciação, mas também fundamentalmente nos níveis histológico, químico e genético, no que se refere à produção de voláteis. Primeiramente, as folhas de ambas as subespécies possuem tricomas tectores, mas apenas *C. creticus corsicus* apresenta também tricomas glandulares. Essa subespécie é reconhecida pela produção de óleo volátil contendo sesquiterpenos além de ser fonte rica em diterpenos do grupo labdano, da mesma forma que outras espécies do gênero como *C. salvifolius*, *C. monspeliensis* e *C. ladanifer*, das quais se obtém uma resina muito utilizada na perfumaria, o ládano (ANGELOPOULOU et al., 2001; ANGELOPOULOU et al., 2002; GOMES et al., 2005; LOIZZO et al., 2013). O mesmo estudo, porém, revelou que mesmo não havendo rendimento mensurável de óleo volátil na extração

por hidrodestilação da subespécie *C. creticus eriocephalus*, ela produz monoterpenos, que puderam ser extraídos e analisados por extração em fase sólida (SPE).

Mesmo no nível individual pode haver diferenças. Isso pode ser exemplificado pelo trabalho de FOSTER e colaboradores (2013) que compararam ao nível químico, histológico e transcritômico dois espécimes de *Thuja plicata* (um selvagem e uma variante natural não produtora de monoterpenoides voláteis). Os resultados dessa comparação revelaram que a variante não produtora de monoterpenoides também não possuía glândulas/ductos secretoras/es (único local em que esses terpenoides eram sintetizados no espécime selvagem). Através da análise diferencial de seus transcriptomas foi possível identificar e isolar uma série de ácidos ribonucleicos (RNAs) dentre os quais um deles codificava para uma terpinoleno sintase e outro para uma sabineno sintase; ambos eram expressos em maior quantidade no selvagem. Terpinoleno e sabineno são precursores da  $\beta$ -tujaplicina e da  $\alpha$ -tujona, substâncias com reconhecida atividade antimicrobiana e dissuasória alimentar presentes em *T. plicata* e tidas como responsáveis pela alta resistência dessa espécie (selvagem) a pragas e à herbivoria. Alguns tipos de estruturas secretoras de óleos voláteis são apresentados na Figura 2.1.

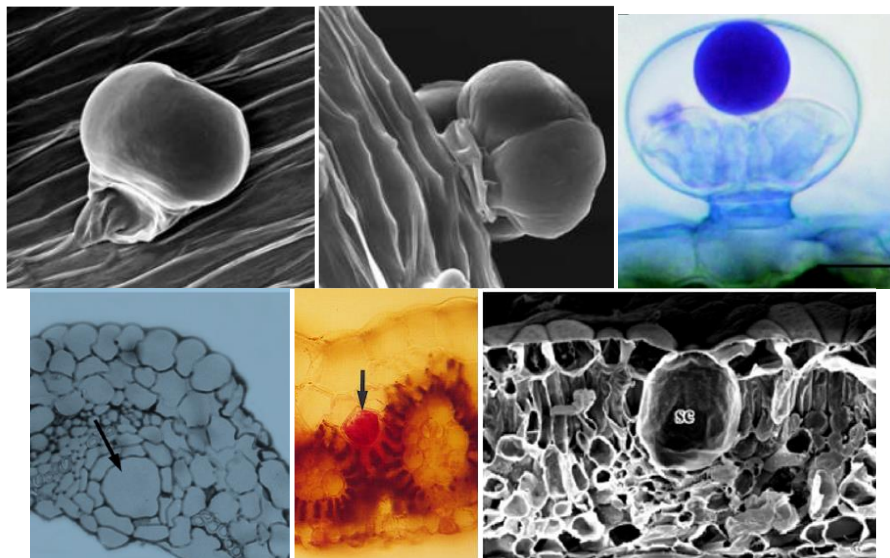


Figura 2.1: Estruturas secretoras de óleos voláteis: Da esquerda para a direita e de cima para baixo: tricoma glandular em *Eupatorium glehnii* (Asteraceae); tricoma glandular em *E. lindleyanum*; tricoma glandular em *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae); ducto secretor em *Matricaria chamomilla* (Asteraceae); célula secretora em *Cymbopogon citratus* (Poaceae); célula secretora (sc) em *Piper umbelatum* (Piperaceae). (Adaptado de LEWINSON et al., 1998; ANDREUCCI et al., 2008; ZUZARTE et al., 2010; MARINHO et al 2011; БОЙКО et al., 2012).

## Extração

Tipicamente a consistência do órgão em que o óleo volátil é acumulado influencia no processo de extração, determinando o processo de cominuição da amostra. Entretanto, para órgãos de consistência semelhante o tipo de estrutura acumuladora tem influência direta na eficiência dos métodos de extração. Por exemplo, ZIZOVIC e colaboradores (2007), determinaram que na extração por Dióxido de Carbono (CO<sub>2</sub>) supercrítico, o tamanho de partícula não influencia na taxa de extração quando o óleo volátil está contido em dutos secretores, como foi determinado para as Asteraceae (camomila e calêndula) e Apiaceae (funcho), mas influencia em plantas que acumulam óleos voláteis em células secretoras ou tricomas glandulares (Lamiaceae). Por isso são necessárias etapas específicas na extração por CO<sub>2</sub> supercrítico para romper estas estruturas previamente à extração (ZIZOVIC et al., 2005; STAMENIĆ et al., 2008; STAMENIĆ e ZIZOVIC, 2013).

O processo mais comum de obtenção de óleos voláteis é a hidrodestilação ou a destilação por arraste por vapor d'água. Dessa forma, neles são encontradas substâncias com baixa pressão de vapor. As características físicas que conferem essa propriedade são massas moleculares abaixo de 300 Daltons (Da) e relativa hidrofobicidade. Sendo assim, os óleos voláteis são definidos mais por suas propriedades físicas do que químicas, e existe na natureza uma grande variedade de substâncias que preenchem esses requisitos (SELL, 2009). Conseqüentemente, a composição química de óleos voláteis pode variar amplamente, desde hidrocarbonetos alifáticos e terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com nitrogênio e enxofre. Toda essa diversidade funcional, no entanto, é derivada de três rotas metabólicas principais: a via do metileritritol (A- monoterpenoides e diterpenoides), a via do mevalonato (B - sesquiterpenoides) e a via do chiquimato ( D - Indol, E - fenilpropenoides, F - salicilato de metila). Além disso, a via dos policetídeos (C – jasmonato de metila e hexanol) também contribui com moléculas em alguns óleos voláteis, como é ilustrado na Figura 2.2, representando compostos orgânicos voláteis com papel na interação entre plantas, entre plantas e patógenos e entre plantas e animais (MAFEI, 2010).

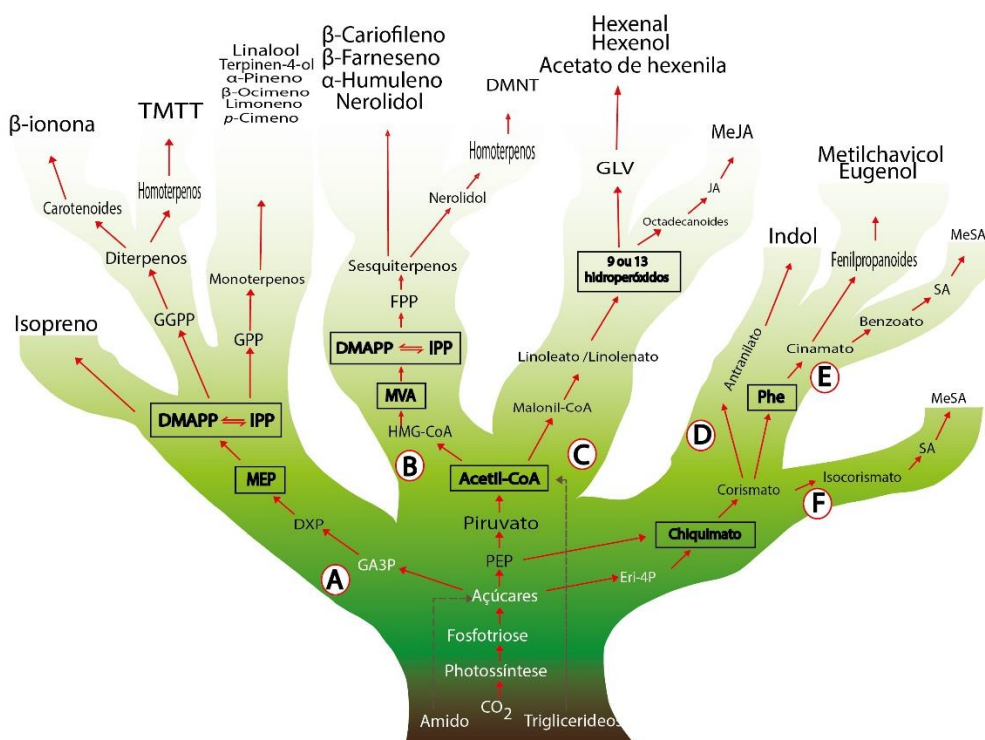


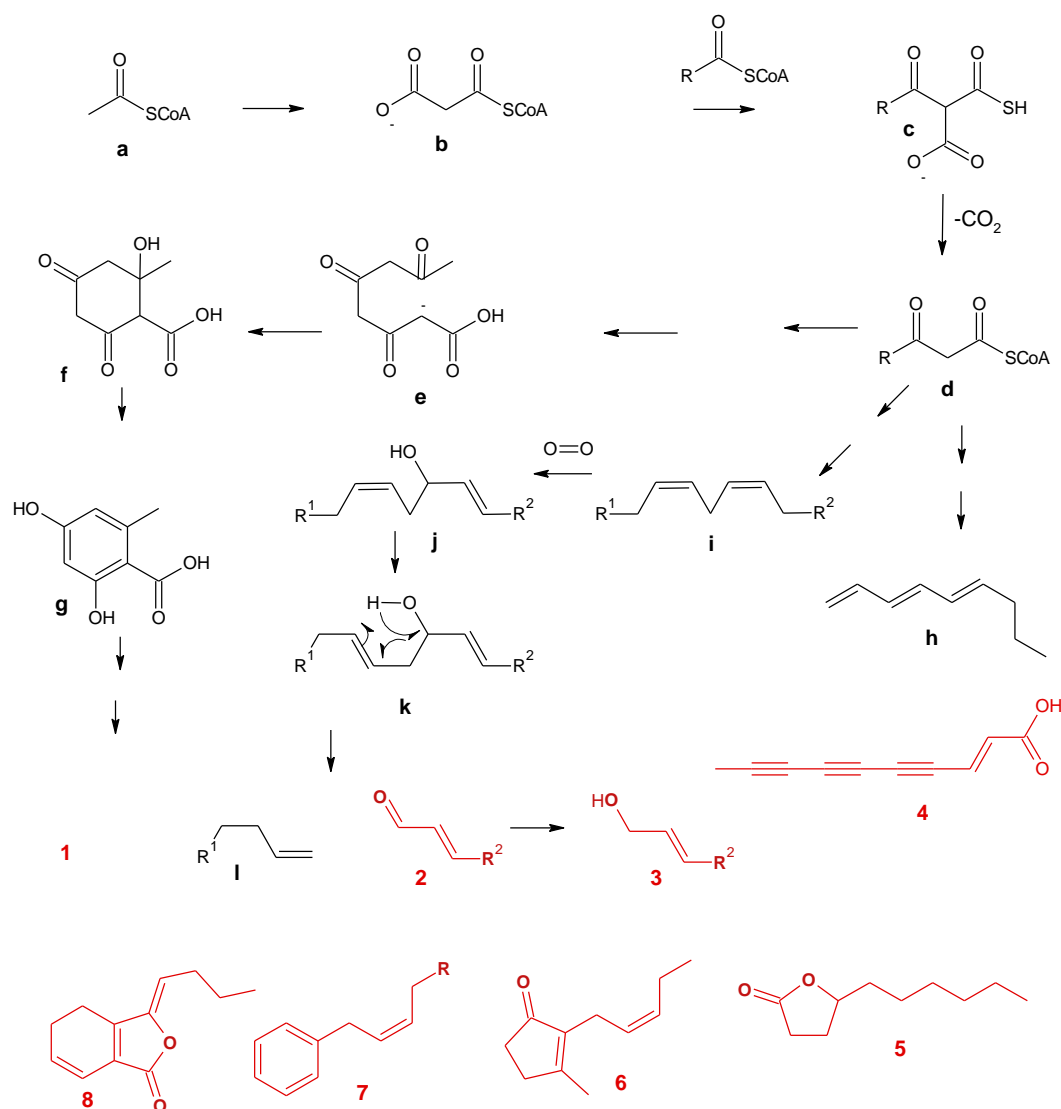
Figura 2.2: Principais rotas de biossíntese de compostos voláteis em plantas (Adaptado de MAFFEI, 2010). A: monoterpenóides e diterpenóides; B: sesquiterpenóides; C: – policetídeos; D: indol; E: fenilpropanóides; F salicilato de metila.

### 2.3.2 Biossíntese de derivados Policetídeos

Os policetídeos são um grupo de metabólitos secundários importantes no óleo volátil de algumas espécies vegetais. São biossintetizados, assim como os lipídeos, pela condensação enzimática de Acetil-CoA na forma de cadeias policetônicas, as quais podem sofrer  $\beta$ -oxidação, redução, lactonização ou condensação, dando origem a diversas substâncias alifáticas e aromáticas (não fenilpropanóides) presentes em óleos voláteis. Algumas delas são apresentadas no Esquema 2.1. Em líquens, por exemplo, o composto altamente sensibilizante atranol (1) pode estar presente no extrato utilizado na indústria de perfumaria e demanda rigor especial no controle de qualidade do produto (GIORDANO-LABADIE, 2011; LÓPEZ-NOGUEROLES et al., 2014). Também são importantes em hepáticas, onde metilorselinatos podem ser encontrados (RYCROFT et al., 1999). Em plantas superiores, como em Apiaceae, derivados dessa rota já foram identificados, como os derivados do virideno (7) no óleo volátil de *Ligusticum grayi* (COOL et al., 2011) e da lactona anti-inflamatória ligustilide

(8) na mesma espécie, em *Ligusticum chuanxiong* e em *Angelica sinensis* (HON et al., 1990; OR et al., 2011; CHUNG et al., 2012; HUANG et al., 2013; KARMAKAR et al., 2014).

Da biotransformação de lipídeos podem ser formados os acetilenos, a  $\gamma$ -lactona e a  $\delta$ -decalactona (WANG et al., 2009), jasmona e metiljasmonato além de alcoóis e aldeídos alifáticos, como o hexenal (2) e hexenol (3) (SELL, 2009) (Esquema 2.1).



Esquema 2.1: Biossíntese de policetídeos e algumas estruturas representativas (Adaptado de SELL, 2009). a: acetilCoa; b: malonilCoA; c: malonilCoA ataca o éster CoA de outro ácido graxo, que pode ser acético (R = CH<sub>3</sub>) ou outro; d:  $\beta$ -cetoéster originado na descarboxilação de c; e: ácido tricetoetanoico; f: produto da condensação aldol intramolecular de e; g: ácido orsenílico; h: (*E,Z*)-1,3,5-nonatrieno; i: ácido dienoico intermediário; j: álcool intermediário; k; l: alceno; 1: atranol; 2: aldeído; 3: álcool; 4: metil deca-2-em-4,6,8-triinoato; 5:  $\gamma$ -lactona; 6: jasmona; 7: virideno; 8: ligustilídeo.

### 2.3.3 Biossíntese de derivados do ácido chiquímico

A série de derivados do chiquimato é composta principalmente pelos fenilpropanoides (C6-C3) e por derivados do ácido benzoico, oriundos do metabolismo do ácido chiquímico. O chiquimato é formado nas plantas pela condensação enzimática de fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato, sofrendo uma série de reações enzimáticas, entre elas a de adição posterior de uma molécula de fosfoenolpiruvato, e depois eliminação de CO<sub>2</sub> e transaminação, originando a fenilalanina e a tirosina, as quais por sua vez são transformadas em ácido cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente (SELL, 2009).

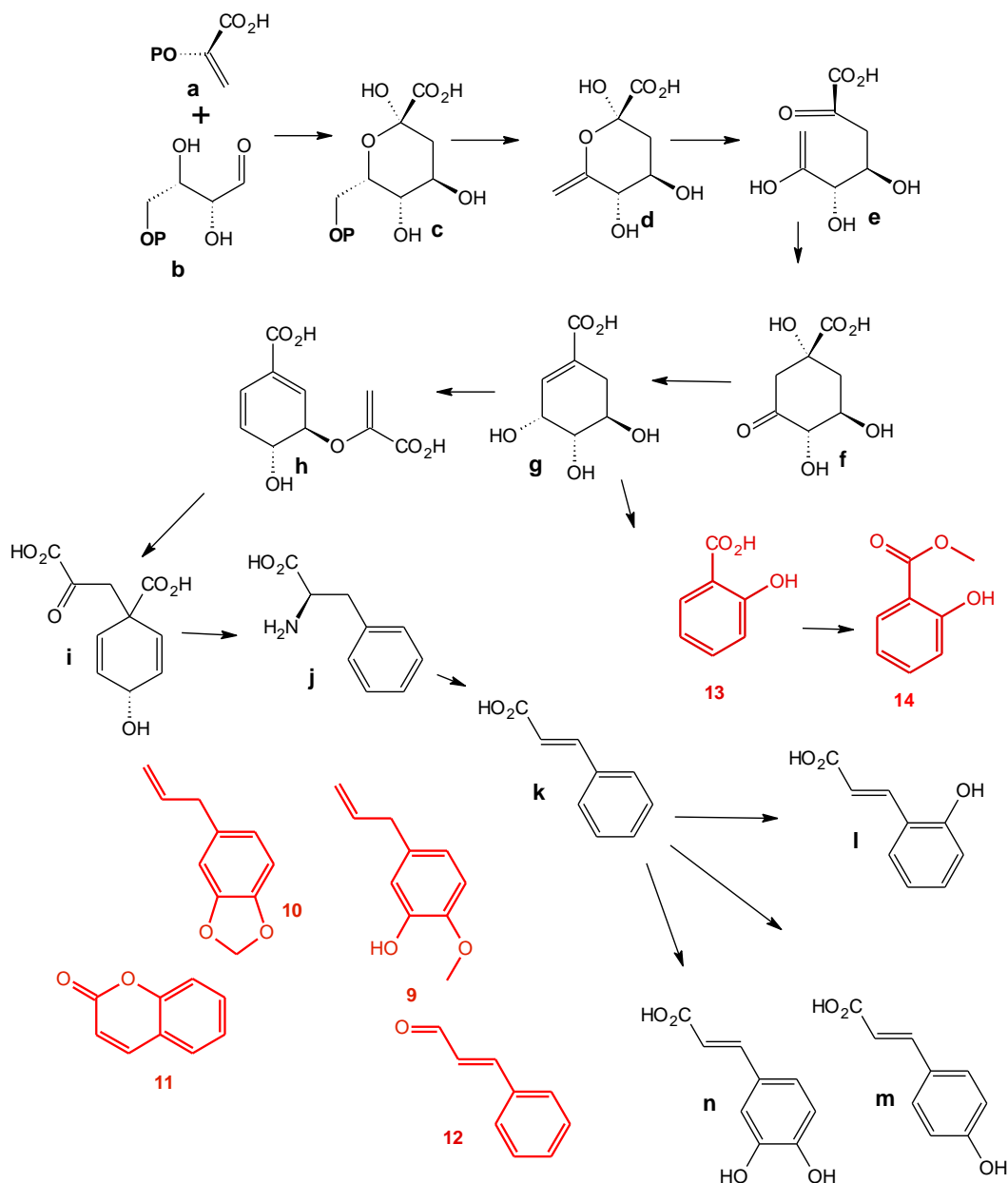
Algumas estruturas de derivados do chiquimato estão representadas no Esquema 2.2. Os derivados mais comuns em óleos voláteis são as cumarinas e fenóis: eugenol (9) [*Cinnamomum verum* (SUBKI et al., 2013) e *Syzygium aromaticum*], metileugenol [*Ocimum tenuiflorum* (KOTHARI et al., 2004)], safrol (10) [sassafrás (85% em *Sassafras albidum* (KAMDEM e GAGE, 1995) e *Ocotea*], cinamaldeído (12) (*Cinnamomum zeylanicum*), cumarina (11) [*Mikania glomerata* (OLIVEIRA et al., 2013); *Eupatorium triplinerve* (MALA et al., 1999)]. Além desses, alguns derivados diretos do ácido chiquímico antes da adição de fosfoenolpiruvato também são encontrados, como o ácido salicílico (13) e o salicilato de metila (14). O óleo volátil de *Gaultheria procumbens* (Ericaceae), por exemplo, pode apresentar mais de 96% de salicilato de metila (NIKOLIĆ et al., 2013a).

### 2.3.4 Biossíntese de Terpenoides

A série terpênica é o grupo químico de maior ocorrência e com maior variabilidade estrutural presente em óleos voláteis. Os terpenoides servem a diferentes funções nos vegetais: transporte de elétrons (quinonas), componentes de membranas, regulação subcelular (prenilação de proteínas), pigmentos fotossintéticos (clorofila), hormônios, compostos de defesa (monoterpenoides, sesquiterpenoides e diterpenoides), fotoproteção, termotolerância e resistência ao estresse oxidativo (carotenoides e monoterpenoides). Acredita-se que a termotolerância oferecida pelos monoterpenoides deva-se justamente à sua capacidade de captar radicais derivados do oxigênio oriundos do processo fotossintético, além de, por sua relativa



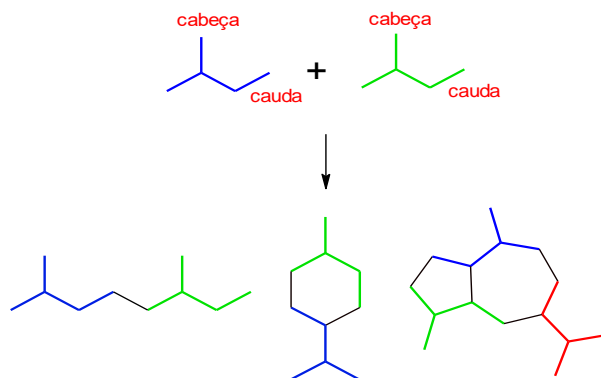
hidrofobicidade, propiciar um microambiente capaz de preservar o vegetal da perda de água (PEÑUELAS e LLUSIÀ, 2002; PEÑUELAS et al., 2005).



Esquema 2.2: Rota de biossíntese de derivados do chiquimato e algumas estruturas representativas (Adaptado de SELL, 2009). a: fosfoenolpiruvato; b: eritrose 4-fosfato; c: ácido monofosfato heptulosônico; d: ácido (2R,4R,5S)-2,4,5-trihidróxi-6-metilideno-oxano-2-carboxílico; e: ácido (4R,5S)-4,5,6-trihidróxi-2-oxohept-6-enoico; f: ácido 5-desidroquínico; g: ácido chiquímico; h: ácido corísmico; i: ácido prefênico; j: fenilalanina; k: ácido cinâmico; l: ácido *o*-cumárico; m: ácido *p*-cumárico; n: ácido cafeico; 9: eugenol; 10: safrol; 11: cumarina; 12: cinamaldeído; 13: ácido salicílico; 14: salicilato de metila.

Essas substâncias são formalmente derivadas do isopreno, um hidrocarboneto 'ramificado' com cinco átomos de carbono (5C). Os representantes dessa série são os mono- (10C), sesqui- (15C), di- (20C), tri- (30C) e tetraterpenoides (40C), com duas, três, quatro, seis e oito unidades isoprênicas, respectivamente. Os mais comuns em óleos voláteis são os monoterpenoides, substâncias cujo esqueleto é formado por 10 átomos de carbono e os sesquiterpenoides, com 15 átomos de carbono, arranjados em estruturas acíclicas, monocíclicas, bicíclicas e tricíclicas (CROTEAU, 1987; CANE, 1990); além destes, diterpenoides (20C), hemiterpenoides (5 C) e produtos de degradação de terpenos maiores também podem ser encontrados. Terpenoides maiores, como os triterpenoides e tetraterpenoides, devido à sua massa elevada, não tem pressão de vapor suficiente para serem extraídos por hidrodestilação.

A união das unidades isoprênicas para a biossíntese dos terpenoides é catalisada enzimaticamente e normalmente se dá por junções denominadas cabeça-cauda (regra do isopreno, conforme Esquema 2.3), apesar de haver algumas exceções, por exemplo, a junção cauda-cauda de duas unidades pirofosfato de farnesila para formar os tetraterpenos.

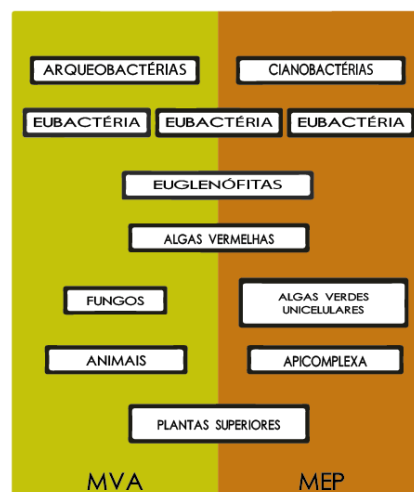


Esquema 2.3: Junção cabeça-cauda de esqueletos isoprênicos e alguns esqueletos representativos (na ordem: monoterpenoide aberto, monoterpenoide *p*-mentano e sesquiterpenoide guaiano).

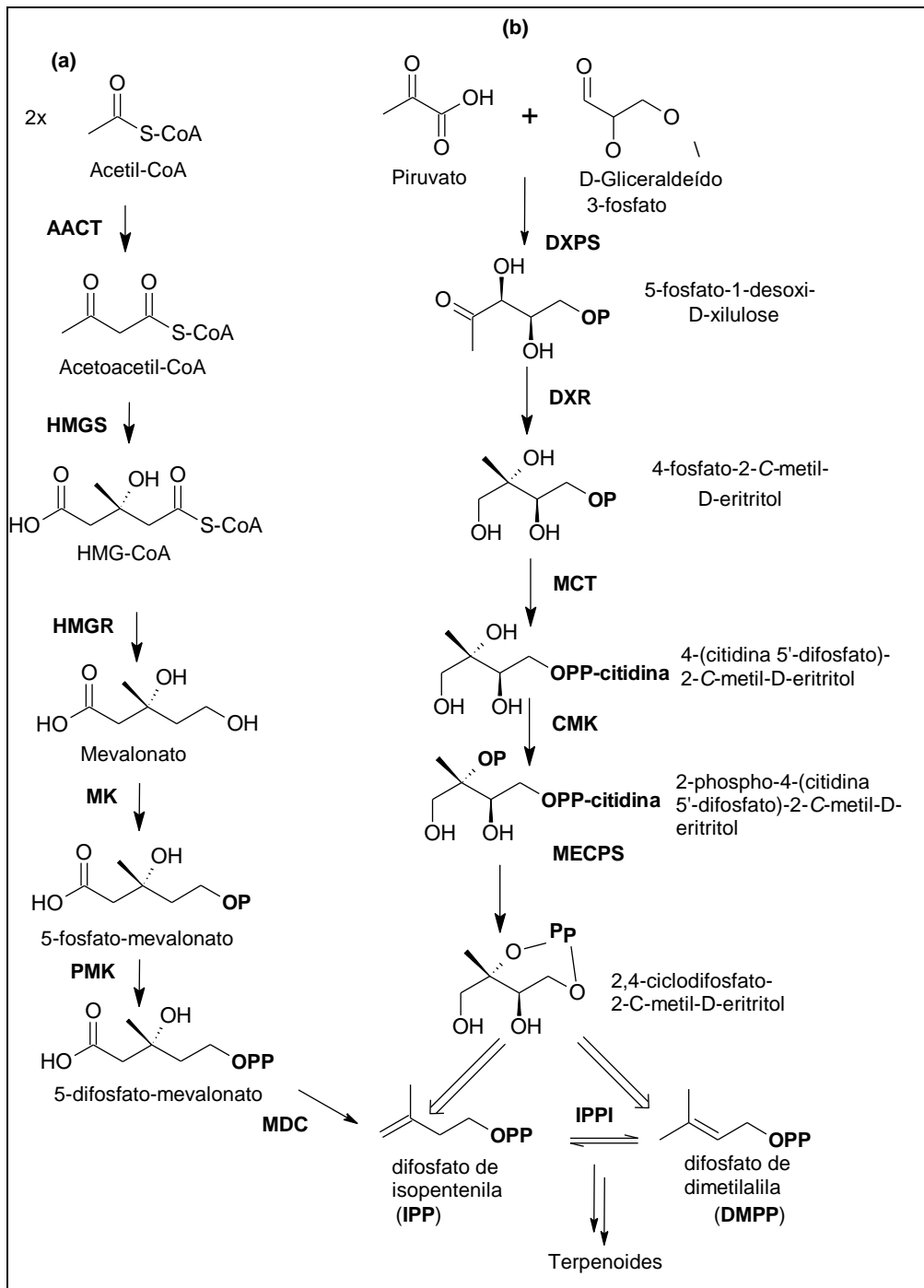
Segundo McGARVEY e CROTEAU (1995), os terpenoides podem ser formados pela condensação de duas até milhares de unidades isoprênicas, como ocorre na borracha, por exemplo. Entretanto, o primeiro passo para a biossíntese de qualquer uma dessas estruturas é a condensação enzimática de duas unidades

isoméricas básicas, o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e o pirofosfato de isopentenila (IPP), formando assim o pirofosfato de geranila (GPP), que é o primeiro intermediário comum da série terpênica, com 10 átomos de carbono.

A biossíntese das unidades isoméricas utilizadas na síntese dos terpenoides está intimamente relacionada ao metabolismo primário, utilizando acetato e piruvato/gliceraldeído oriundos do catabolismo da glicose. Existem duas rotas possíveis para a sua formação: a via do mevalonato (MVA) e a via do fosfato de metileritritol (MEP). A primeira via para formação do IPP (MVA), em animais e leveduras, inicia com a condensação de unidades acetato, na forma de acetilcoenzima-A (acetil-CoA) e procede através do ácido mevalônico (MVA) como intermediário. Em outros organismos (eubactérias, plastídeos de algas e plantas superiores) foram descobertos compostos derivados de IPP e sintetizados pela condensação de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato via 1-desoxixilulose-5-fosfato (DOX) e fosfato de metileritritol (LICHTENTHALER et al., 1997; SCHWENDER et al., 2001; DUBEY et al., 2003; HEMMERLIN et al., 2012). O Esquema 2.4 apresenta a distribuição dessas duas rotas nos diferentes reinos, evidenciando que ambas contribuem em vegetais e algas vermelhas. O Esquema 2.5 detalha cada uma das rotas.

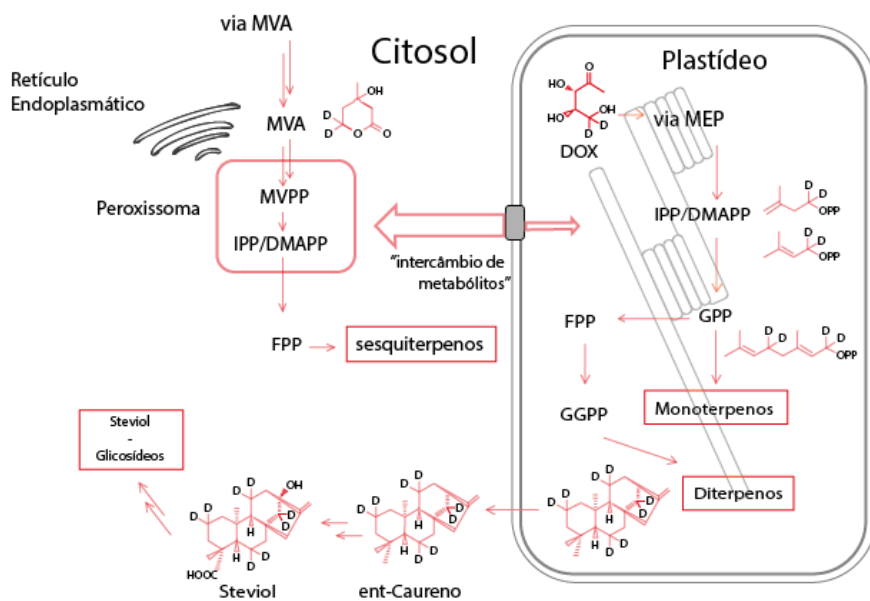


Esquema 2.4: Relação entre as rotas do mevalonato (MVA) e metileritritol (MEP) em diversos táxons (Adaptado de HEMMERLIN et al., 2012).



Esquema 2.5: Vias de formação dos precursores monoterpênicos: via do mevalonato (a) e 1-desoxixilulose-5-fosfato (b) para biossíntese de IPP/DMPP. HMGCoA: , 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA; AACT: Acetil-CoA:acetil-CoA C-acetiltransferase; CMK: 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol quinase; DXPS: 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase; DXR: 1-desoxixilulose-5-fosfato redutoisomerase; HMGR: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase; HMGS: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase; IPPI: pirofosfato de isopentenila isomerase; MCT: 2-C-metileritritol-4-fosfato citidiltransferase; MDC: mevalonato-5-fosfato descarboxilase; MECPS: 2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato sintase; MK: mevalonato quinase; PMK: fosfomevalonato quinase (Adaptado de MAHMOUD e CROTEAU, 2002; reproduzido de SOUZA, 2007).

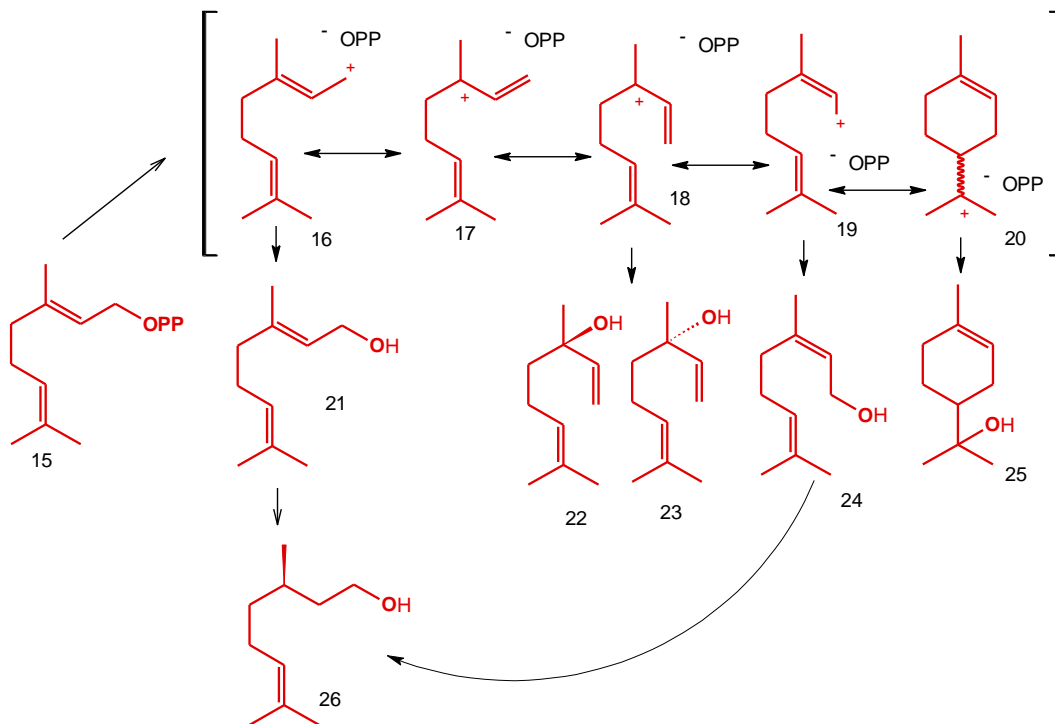
Muitos autores têm tentado determinar a extensão da utilização e compartimentalização de cada uma dessas rotas na biossíntese das classes de terpenos em vegetais. Entretanto, os resultados apontam para uma contribuição parcial de ambas as rotas em todas as classes, com predominância da via MEP nos plastídeos, onde são sintetizados os monoterpênicos, os diterpênicos e a clorofila, e da via MVA no citosol e mitocôndrias, onde são sintetizados sesquiterpênicos, triterpênicos, esteróis e ubiquinonas, com possibilidade de transporte extenso das subunidades IPP e DMAPP dos plastídeos para o citosol quando necessário, ou no sentido inverso, ainda que em menor extensão. Alguns autores apontam para a possibilidade de que em vez de transporte de unidades entre plastídeos e citosol, haja na verdade a presença de algumas monoterpeno sintases citosólicas. Os resultados apontam ainda para a modulação diferencial das enzimas destas rotas, facilitando a mobilização dos precursores em situações de estresse, quando a compartimentalização seria então ainda menos evidente, conforme Esquema 2.6 (UMLAUF et al., 2004; HAMPEL et al., 2005; HEMMERLIN et al., 2012; OPITZ et al., 2014; WÖLWER-RIECK et al., 2014).



Esquema 2.6: Compartimentalização e intercâmbios entre as rotas MVA e MEP (Adaptado de Wölwer-Rieck, 2014).

#### 2.3.4.1 Monoterpenoides

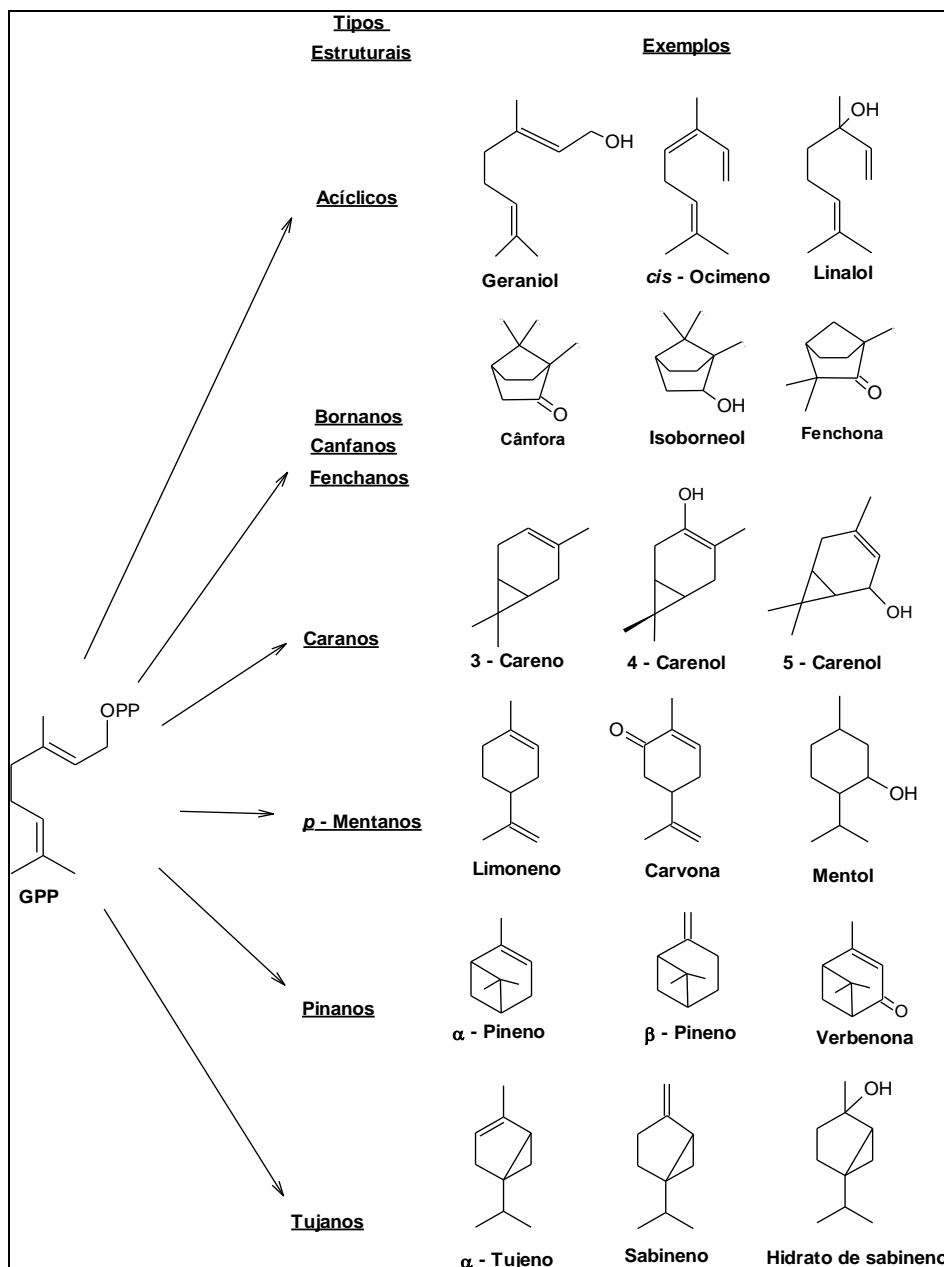
A formação dos terpenoides tem início com a isomerização do pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) a pirofosfato de isopentenila (IPP). Com a ionização do DMAPP, ocorre o ataque simultâneo do carbono 5 do IPP ao carbono 1 ionizado do DMAPP (adição eletrofílica), com eliminação de um hidrogênio, formando pirofosfato de geranila (GPP) (15) (Esquema 2.7). O GPP é então liberado da enzima GPP sintase, e sob o efeito catalítico de enzimas de outra classe (as terpeno sintases ou terpeno ciclases), pode ser ionizado e isomerizado, originando o cátion geranila (16), o pirofosfato de linalila (17/18) e seu isômero conformacional, pirofosfato de nerila (NPP) (19). Todos estes três isômeros podem originar monoterpenoides acíclicos por captura de oxigênio ou por perda de hidrogênios (geraniol, linalol, neral e  $\beta$ -mirceno, entre outros) (BELL e CHARLWOOD, 1980). Como exemplificado no trabalho de FISCHER e colaboradores (2013), em que uma geraniol sintase foi isolada de *Ocimum gratissimum* e expressa em outros organismos. Essa enzima passou então a produzir não apenas geraniol (21), mas também produtos minoritários como (*R*)-linalool (22) e (*S*)-linalool (23), nerol (24) e alfa-terpineol (25). Cada uma dessas substâncias é formada a partir de um carbocátion diferente: geraniol a partir do cátion geranila (16), linalool a partir dos cátions linalila transoide (17) ou cisoide (18), nerol a partir do cátion nerila (19) e alfa-terpineol a partir do cátion alfa-terpinila (20). Além dessas substâncias, também foi produzido como minoritário o citronelol (26). O citronelol é um produto da redução da ligação dupla, tanto do geraniol (21) quanto do nerol (24), entretanto, essa atividade redutora não está descrita para a geraniol sintase, indicando então a ação adicional de outras enzimas na catálise dessa reação em particular.



Esquema 2.7: Biossíntese de monoterpênicos de cadeia aberta e *p*-mentano (adaptado de FISCHER et al. 2013).

Todos esses produtos acíclicos têm importância no odor de óleos voláteis com valor comercial, como o de rosas e o de palmarosa, por exemplo. Entretanto, a grande diversidade estrutural dos monoterpênicos provém de seus exemplares cíclicos, oriundos de reações de ciclização enzimaticamente catalisadas. As monoterpêno ciclases, ou monoterpêno isomerase ciclases são enzimas capazes de isomerizar e ciclizar o GPP, seu substrato natural. Esse processo ocorre com o auxílio de um cátion metálico divalente para estabilizar o difosfato e formar um intermediário carbocatiônico ligado à enzima. Esse intermediário é o isômero alílico terciário do geraniol, 3*R*- ou 3*S*-pirofosfato de linalila (LPP) (18) (Esquema 2.7). A conformação *R* ou *S* do LPP dependerá da orientação inicial do GPP, a qual por sua vez é determinada pela topologia enzimática. O pirofosfato de linalila é formado do pirofosfato de geranila como conformero *transoide* (17), mas a existência de uma ligação simples permite a rotação para o conformero *s-cis*, o qual após a ionização pode ser ciclizado na forma *anti,endo* ao cátion correspondente 4*R*- ou 4*S*-terpinila (20) (CROTEAU, 1987; DEWICK, 1997; BOHLMANN et al., 1998). A partir desse intermediário a

reação pode seguir diferentes rotas (Esquema 2.8) incluindo adições à dupla ligação restante (originando os núcleos pinano e bornano), migração de hidrogênio, formando terpinen-4-ila (tujanos) ou rearranjo tipo Wagner-Meerwein (fenchanos), antes que o carbocátion seja desprotonado ou capture água, formando hidrocarbonetos e álcoois, respectivamente. Algumas estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos são apresentadas no esquema a seguir (Esquema 2.8).



Esquema 2.8: Estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos: GPP, pirofosfato de geranila (Adaptado de MAHMOUD e CROTEAU, 2002).



Dezenas de monoterpene ciclases já foram isoladas de plantas. Em geral elas precisam de cátions metálicos para catalisar suas reações e, além disso, de forma geral, a maioria delas é capaz de catalisar a formação não apenas de um, mas de uma série de monoterpenos diferentes. Usualmente todas elas produzem substâncias com uma mesma configuração enantiomérica (BOHLMANN, 1998; LU et al., 2002; LÜCKER et al., 2002). Dessa forma, a presença de dois enantiômeros de uma substância no óleo volátil de uma planta sugere dois conjuntos enzimáticos estereoespecíficos diferentes dedicados a sua produção (RUIZ Del CASTILLO et al., 2004).

Os principais carbocátions envolvidos na biossíntese de monoterpenos serão brevemente apresentados abaixo e estão representados nos esquemas 2.7 e 2.9:

#### Cátions geranila, linalina e nerila

São os carbocátions alifáticos apresentados no Esquema 2.7. Sua desprotonação ou hidroxilação origina monoterpenos ou monoterpênicos de cadeia aberta. Entretanto, dentro do sítio de ação enzimático podem sofrer ciclização, originando o carbocátion monocíclico terpinila.

#### Cátion terpinila

A formação do cátion terpinila, com carga em C7 é o primeiro passo para a biossíntese dos monoterpênicos com esqueleto *p*-mentano (BOHLMANN et al, 1998). A expulsão de prótons para estabilização desse cátion dará origem aos felandrenos, terpinenos e também ao limoneno (setas a, b, c, d, e, e f no Esquema 2.9).

#### Cátion tujila

O cátion terpinila pode, entretanto, sofrer rearranjos durante sua estabilização. Por exemplo, a formação de uma ligação entre os carbonos C4 e C2 do anel, propicia uma ciclização extra, originando o cátion bicíclico tujila (setas g, i e j no Esquema 2.9), o qual pode ser estabilizado como sabineno ou  $\alpha$ -tujeno (HALLAHAN e CROTEAU, 1988).

### Cátion carila

Pode ocorrer ainda eliminação 1,3 de H nos carbonos C5 ou C3 do cátion terpinila, com ligação entre o C7 do radical isopropila e os carbonos C3 ou C5, adjacentes a este radical (SAVAGE e CROTEAU, 1993). Nesse caso são formados os carenos (setas k e l no Esquema 2.9).

### Cátion pinila

Se, entretanto, a ligação adicional for entre os carbonos C7 e C2 de terpinila, o cátion bicíclico formado será o pinila (DAVIS e CROTEAU, 2000). O cátion pinila pode ser estabilizado como  $\alpha$ -pineno ou  $\beta$ -pineno (setas n e m no Esquema 2.9), ou sofrer rearranjos sequenciais.

### Cátion bornila

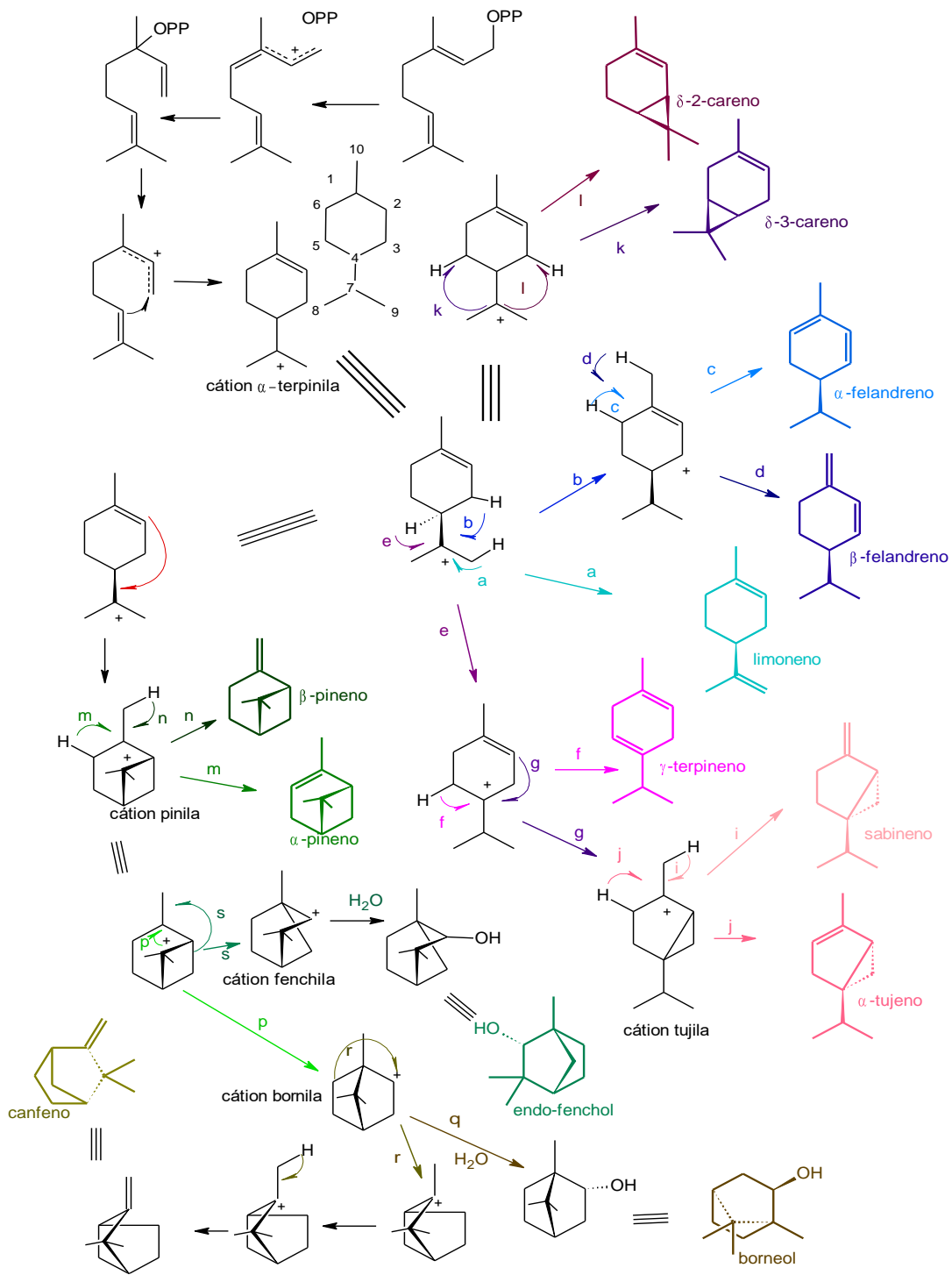
Outro rearranjo que pode ocorrer no cátion pinila é deslocamento da ligação 7,2-7,3 (seta p no Esquema 2.9), originando assim o cátion bornila, que pode ser estabilizado como borneol (seta q), de forma análoga ao fenchol, ou sofrer novo rearranjo (WEITMANN e MAJOR, 2010).

### Cátion canfila

O rearranjo 2,3-2,4 do cátion bornila (seta r no Esquema 2.9) origina o cátion canfila, precursor do canfeno (WEITMANN e MAJOR, 2010).

### Cátion fenchila

O rearranjo 1,2-1,3 do cátion pinila origina o cátion fenchila (seta s no Esquema 2.9), o qual pode ser estabilizado como endo-fenchol, pela captura de água ou hidroxila (WEITMANN e MAJOR, 2010).



Esquema 2.9: Rotas de biossíntese dos monoterpenoides cíclicos a partir do fosfato de geranila (Adaptado de BOHLMANN et al, 1998; HALLAHAN e CROTEAU, 1988; SAVAGE e CROTEAU, 1993; DAVIS e CROTEAU, 2000; WEITMANN e MAJOR, 2010). setas : **a**: eliminação de hidrogênio H9 do cátion  $\alpha$ -terpinila formando limoneno; **b**: deslocamento 1,3 de hidreto (3 $\rightarrow$ 8) no cátion  $\alpha$ -terpinila formando o cátion terpin-3-ila; **c**: eliminação de hidrogênio H6 no cátion terpin-3-ila formando  $\alpha$ -felandreno; **d**: eliminação de hidrogênio H10 no cátion terpin-3-ila formando  $\beta$ -felandreno; **e**: deslocamento 1,2 de hidreto no cátion  $\alpha$ -terpinila formando o cátion terpinen-4-

ila; **f**: eliminação de hidrogênio H5 no cátion terpinen-4-ila formando  $\gamma$ -terpineno; **g**: rearranjo do cátion terpinen-4-ila formando o cátion tujila; **i**: eliminação de H10 formando sabineno; **j**: eliminação de H6 formando  $\alpha$ -tujeno; **k**: eliminação 1,3 de hidrogênio H5 e rearranjo formando  $\delta$ -3-careno; **l**: eliminação 1,3 de hidrogênio H3 e rearranjo formando  $\delta$ -2-careno **m**: eliminação de H6 no cátion pinila formando  $\alpha$ -pineno; **n**: eliminação de H10 no cátion pinila formando  $\beta$ -pineno; **p**: rearranjo do cátion pinila formando o cátion bornila; **q**: estabilização do cátion bornila por captura de água, formando borneol; **r**: rearranjo do cátion bornila formando o cátion canfila, com posterior eliminação de H10 e formação do canfeno; **s**: rearranjo do cátion pinila formando o cátion fenchila, com posterior estabilização por captura de água e formação do endo-fenchol.

Como os sistemas vivos, constituídos por proteínas, são sistemas quirais, sua interação com moléculas diversas é influenciada pela quiralidade das mesmas. Nesse sentido o conhecimento da configuração enantiomérica dos compostos presentes nos óleos voláteis é de especial importância para as indústrias farmacêutica, alimentícia e de perfumaria uma vez que diferentes enantiômeros podem ter comportamentos diferentes quando interagem com organismos vivos (NORIN, 1996). Por exemplo, o (+)-limoneno, principal isômero presente no óleo de limão, tem odor de laranja, enquanto o (-)-limoneno tem odor de terebintina; o (+)-linalol tem odor de *petitgrain* (folhas de laranjeira), enquanto (-)-linalol tem odor de lavanda (LASKA e TEUBNER, 1999; OHLOFF e KLEIN, 1962).

A quiralidade de uma substância também pode influenciar no limiar ou limite de detecção, caracterizado como a menor concentração da substância (no ar) que pode ser consistentemente distinguida do ar puro e, portanto, diferentes estereoisômeros podem ter diferentes limites de detecção (BRENNAN et al., 2003). A cromatografia gasosa, utilizando colunas quirais de ciclodextrinas modificadas, tem permitido avaliar a composição quiral de óleos voláteis, garantindo um controle de qualidade mais rigoroso, uma vez que alterações sensíveis na razão entre enantiômeros podem ser resultado de adulterações (BENTLEY, 2006).

#### 2.3.4.2 Sesquiterpenoides

Os compostos terpênicos com 15 átomos de carbono são denominados sesquiterpenoides. Mais de 300 esqueletos sesquiterpênicos distintos já foram

identificados e milhares de derivados oxidados ou modificados de alguma outra maneira foram isolados de plantas, fungos e bactérias (FELICETTI e CANE, 2004). A enzima pirofosfato de farnesila sintase atua de modo semelhante à pirofosfato de geranila sintase, mas nesse caso o processo continua com a adição de mais uma unidade IPP ao GPP formado, originando pirofosfato de farnesila (FPP), o precursor dos sesquiterpenoides, com 15 átomos de carbono. Como nessa enzima a segunda adição é mais eficiente que a primeira, o intermediário GPP não se acumula e apenas FPP é detectado (CROTEAU, 1987).

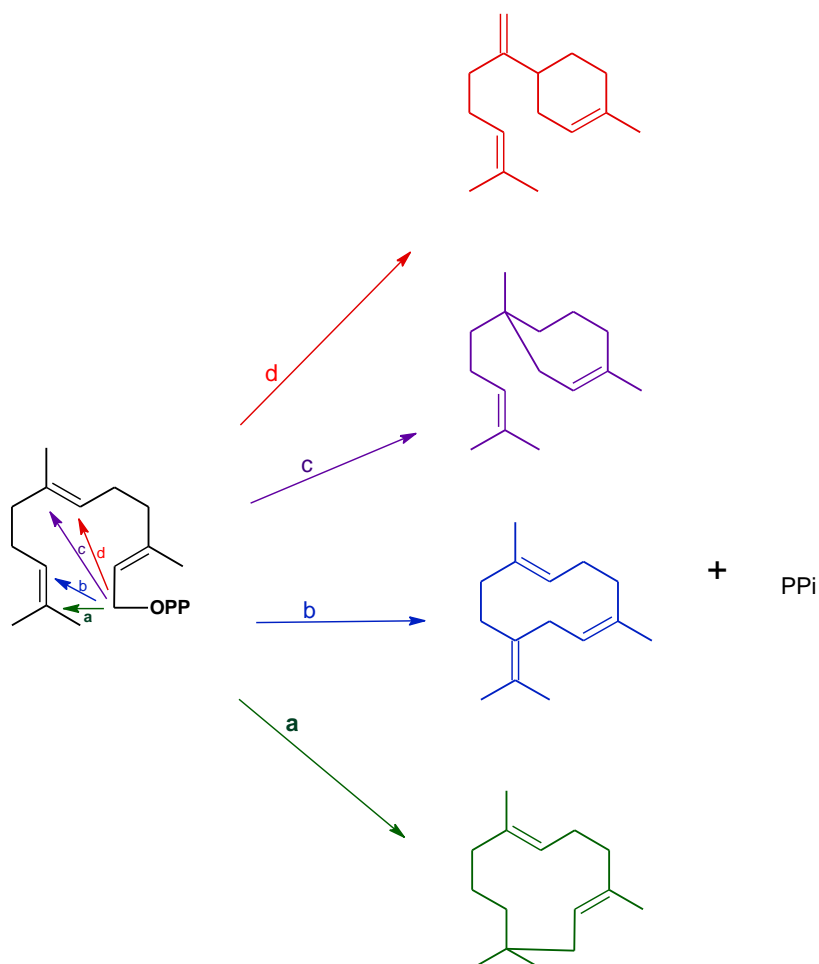
Esses compostos são formalmente derivados do pirofosfato de farnesila (FPP), sob a ação das sesquiterpeno sintases, que pode dar origem a compostos com núcleos de 6 átomos de carbono (bisabolano), 7 (carotano), 10 (germacrano) ou 11 (humulano), representados na Esquema 2.4, os quais após adição às duplas ligações, migração de hidrogênio ou rearranjos originam uma gama de estruturas incluindo cadinenos, selinenos e guaïenens, entre outros.

Muitas sesquiterpeno sintases já foram isoladas de plantas, bactérias e leveduras e tiveram seu mecanismo de ação estudado. A maioria catalisa a biossíntese de várias substâncias simultaneamente utilizando carbocátions como intermediários.

#### Cátion farnesila

O carbocátion farnesila é formado pela ionização do pirofosfato de farnesila, com abstração parcial de fosfato pelos metais do sítio enzimático. Esse cátion pode sofrer uma série de reações de ciclização, que darão origem a quase todos os sesquiterpenoides. Entretanto, caso a reação não prossiga para ciclização, o cátion farnesila pode ser finalizado por expulsão de próton ou captura de água, caso em que se formam os sesquiterpenoides acíclicos  $\alpha$ -farneseno,  $\beta$ -farneseno ou os seus derivados alcoóis, (*E,E*)-farnesol, (*Z,Z*)-farnesol, (*E*)-nerolidol, (*Z*)-nerolidol. Seus isômeros são apresentados a seguir (Figura 2.3). Em negrito estão representados aqueles mais comumente encontrados na natureza. Farnesenos em geral apresentam atividade

semioquímica muito importante, sendo sinalizadores para afídeos (pulgões) produzidos pelo tomateiro em resposta ao parasitismo (SALLAUD et al., 2009).



Esquema 2.10: Ciclagem do pirofosfato de farnesila por terpeno ciclases e os diversos núcleos sesquiterpênicos: PPI: pirofosfato; a – grupo humulano (anel de 11 membros); b – grupo germacrano (anel 10 membros); c – grupo carotano (anel de 7 membros); d – grupo bisabolano (anel de 6 membros) (Adaptado de CHAPPELL, 1995).

### Cátion humulila

A ciclagem 1,11 do cátion farnesila, origina o cátion humulila, com um anel de 11 membros. Esse cátion pode finalizar com a formação do  $\alpha$ -humuleno ou sofrer uma segunda ciclagem, formando o anel de quatro carbonos do cátion cariofilila

(um tipo de estrutura muito rara na natureza), originando o  $\beta$ -cariofileno ou o isocariofileno ( $\gamma$ -cariofileno) (DICKSCHAT, 2011). O  $\alpha$ -humuleno e o  $\beta$ -cariofileno geralmente ocorrem simultaneamente em óleos voláteis e ambos apresentam forte atividade anti-inflamatória (PASSOS et al, 2007). Seus óxidos geralmente são produtos de degradação dos óleos voláteis nos quais são encontrados.

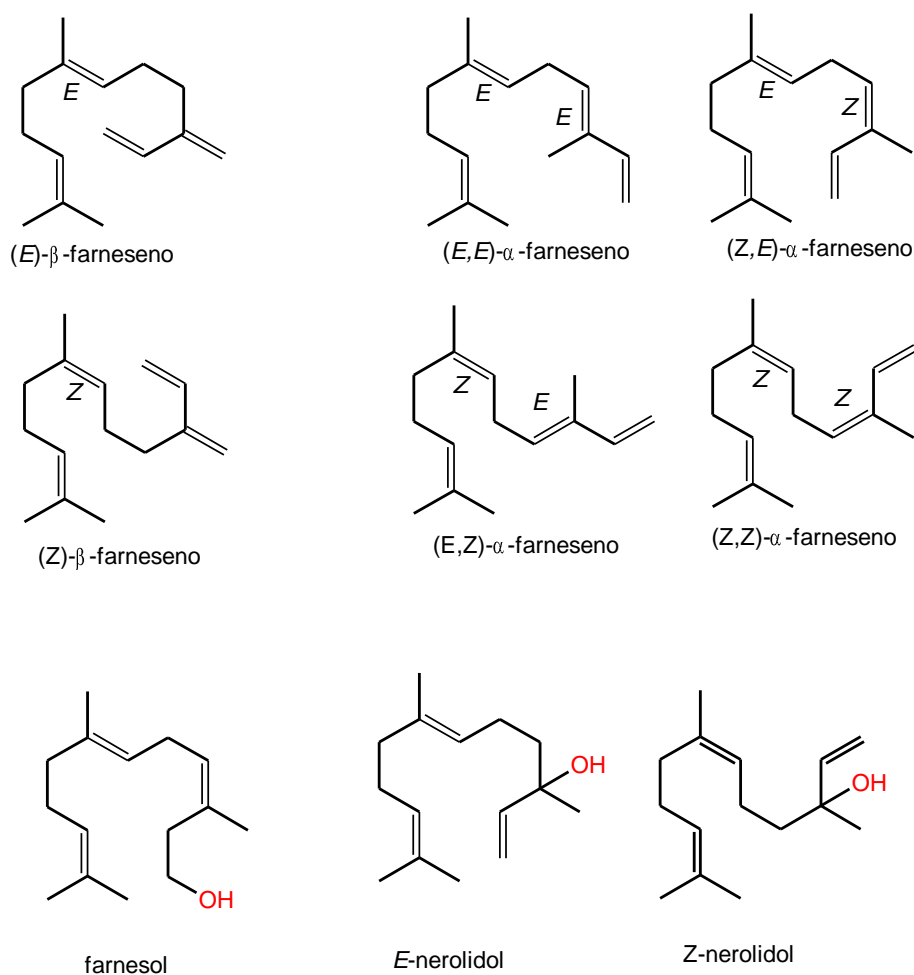


Figura 2.3: Estruturas representativas de sesquiterpenoides de cadeia aberta (Adaptado de SCHNEE et al., 2002).

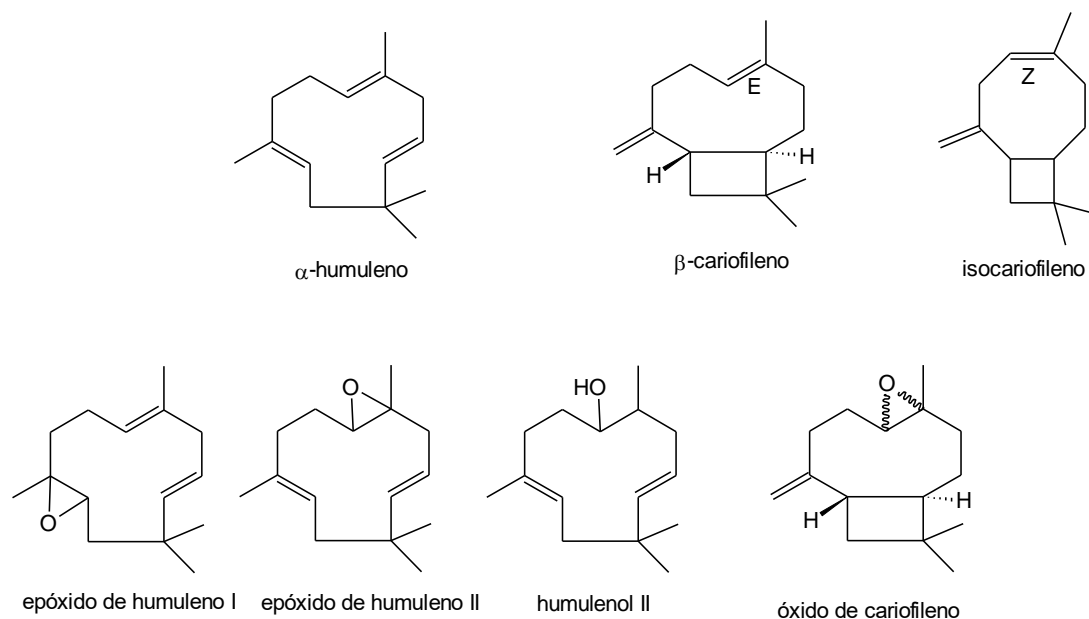


Figura 2.4: Estruturas representativas de humulanos e cariofilanos.

### Cátion germacrila

A ciclização 1,10 do cátion farnesila origina o cátion germacrila, cuja finalização por expulsão de próton dá origem aos germacrenos (Esquema 2.11). A exceção do germacreno D e do germacreno E, os demais são facilmente degradados pelo calor, sofrendo rearranjo de Cope e originando os elemenos no óleo volátil obtido por hidrodestilação.

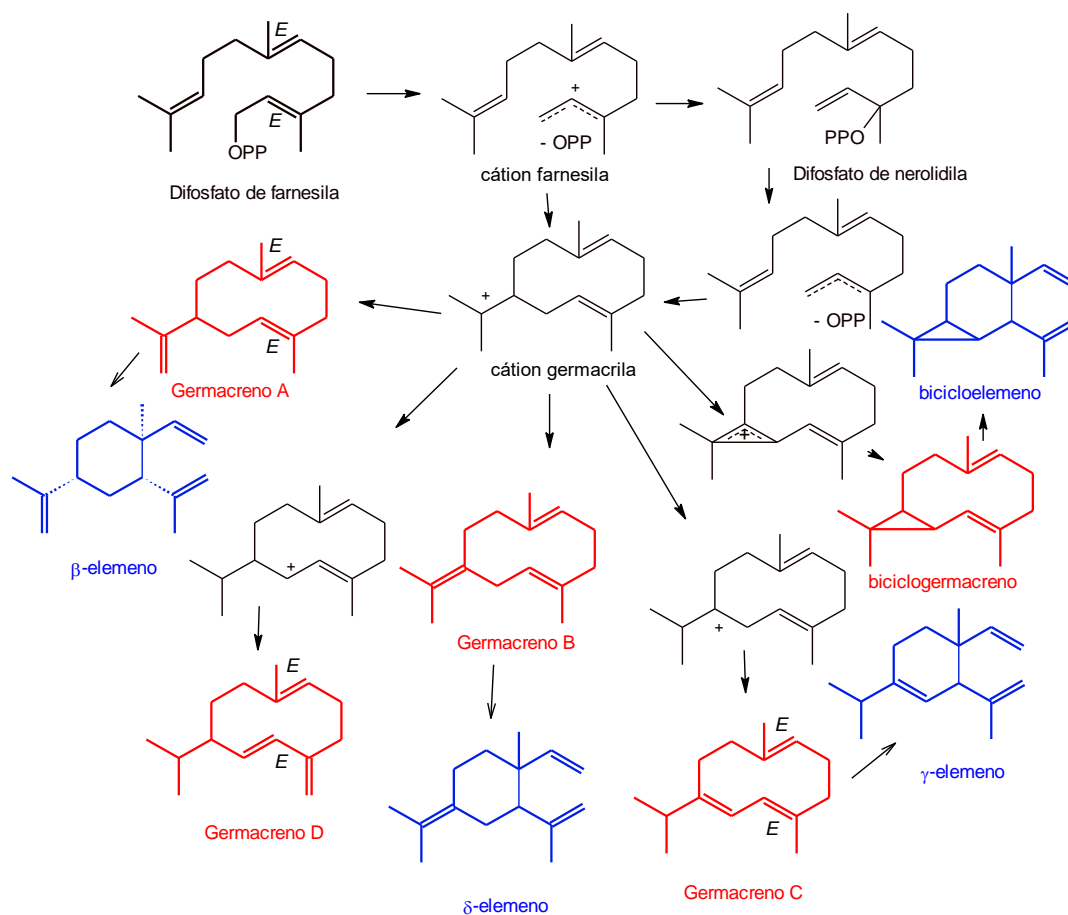
O germacreno D é possivelmente o mais amplamente distribuído no reino vegetal, mas o germacreno A e germacreno C são comuns em algumas plantas, por exemplo, *Solidago canadensis* e *Lycopersicum esculentum* (COLBY et al., 1998; SCHMIDT et al., 1999). O Esquema 2.11 apresenta uma rota de biossíntese dos germacrenos e seus respectivos produtos de degradação (rearranjo de Cope).

O cátion germacrila também pode originar o biciclogermacreno, pela formação de uma ligação entre os carbonos C6 e C11, formando um segundo ciclo de 3 carbonos. O biciclogermacreno sofre o mesmo tipo de rearranjo dos



germacrenos sob temperatura elevada, originando o bicicloelemeno, conforme Esquema 2.11.

Na natureza, a maioria dos exemplares dessa classe ocorre na forma (*E,E*) ou *trans,trans*, entretanto, os seus derivados, especialmente os lactonizados, podem ocorrer também nas formas *Z,E*, *E,Z* e *Z,Z*, sendo esta a ordem de sua frequência: (*E,E*)>(*Z,E*)>(*E,Z*)>(*Z,Z*) (ADIO, 2009). Germacreno A e germacreno B são encontrados também na configuração (*Z,E*), conforme Esquema 2.12. O isômero de germacreno A é identificado como helmintogermacreno e o de germacreno B como (*Z,E*)-germacreno B (STEELE et al., 1998; ADIO et al., 2009). A ocorrência desses isômeros é mais rara.



Esquema: 2.11: Biossíntese de germacrenos e seus derivados elemenos (Adaptado de ADIO, 2009).

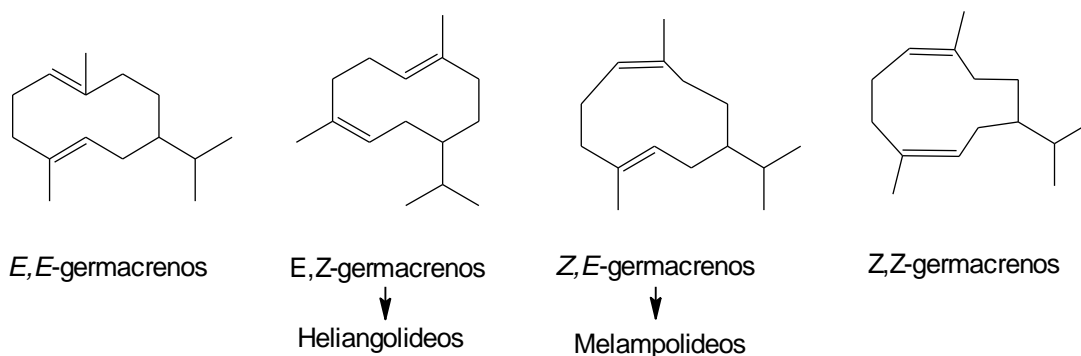
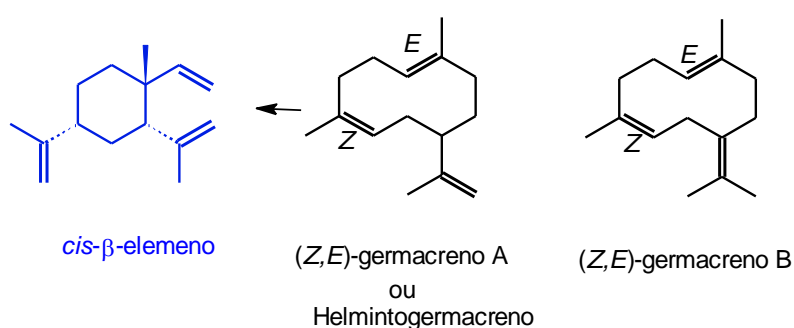


Figura 2.5: Conformeros de germacrenos (Adaptado de ADIO, 2009).



Esquema: 2.12: Germacreno A e germacreno B com conformação *Z,E* e o derivado elemeno de *Z,E*-germacreno A.

O cátion germacrila pode não ser finalizado nesses processos de abstração de próton e migração de hidreto que originam os germacrenos. Assim, podem ocorrer ciclizações subsequentes ou rearranjos do esqueleto carbônico, caso em que se formam os cátions precursores de algumas outras classes de sesquiterpenos.

### Cátion cadinila

A ciclização do carbocátion germacrila entre os carbonos C1 e C6 origina o carbocátion cadinila, com carga localizada em C10. A estabilização dessa carga por eliminação de próton ou captura de OH forma os cadinenos e os cadinois, respectivamente. A nomenclatura de cadinanos leva em consideração o tipo de fusão entre os dois anéis e a orientação do H no C6 (H6), dividindo-os

em quatro classes (Figura 2.6), além de seus enantiômeros. A fusão dos dois anéis que formam o esqueleto cadinano pode se dar em orientação *cis*, ou *trans*. O H6 pode estar em posição alfa ou beta. Assim, com anéis fusionados em *cis* existem os grupos amorfano (H6 $\alpha$ ) e muurolano (H6 $\beta$ ), com anéis fusionados em *trans* os grupos cadinano (6H $\beta$ ) e bulgarano (6H $\alpha$ ) (BORDOLOI et al., 1989). Bulgaranos são extremamente raros na natureza. Cadinanos e Muurolanos são os mais comuns desse grupo sendo o  $\delta$ -cadineno um dos mais comuns, geralmente ocorrendo juntamente com germacreno D. Dentre os amorfanos, amorfa-4,11-dieno é tido como um dos precursores da artemisinina em *Artemisia annua*. Enzimas amorfa-4,11-dieno sintase já foram isoladas dessa planta, produzindo além de amorfa-4,11-dieno uma série de outros sesquiterpenos (como é usual em sesquiterpeno sintases) (BROWN, 2010).

O cátion germacrila pode adquirir diversas conformações no sítio enzimático, de acordo com a topologia enzimática. Para a formação do cátion cadinila pode ocorrer um rearranjo 1,3 de hidreto no cátion (*Z,E*)-germacrila, por exemplo, com migração direta de um H6 para C11, caso em que o radical isopropila e H6 (restante) manterão a mesma configuração (Esquema 2.13), originando então os cadinanos e muurolanos. Entretanto, também pode ocorrer migração 1,2 de hidreto, duas vezes, com efeito final de inversão da configuração dessas duas unidades, é o que ocorreria nos amorfanos e bulgaranos (PROSSER et al., 2006). No Esquema 2.13 estão apresentando os principais derivados desses quatro grupos.

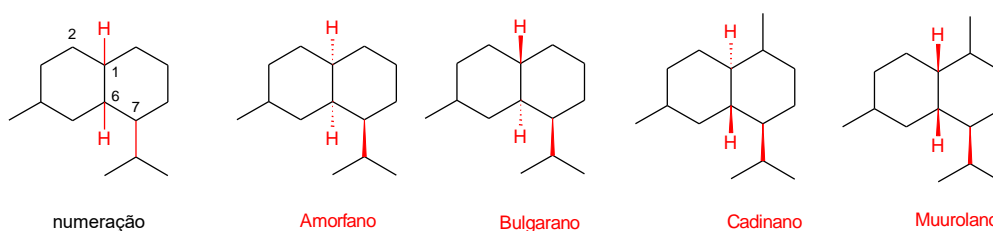


Figura 2.6: Isômeros de núcleo cadinano.

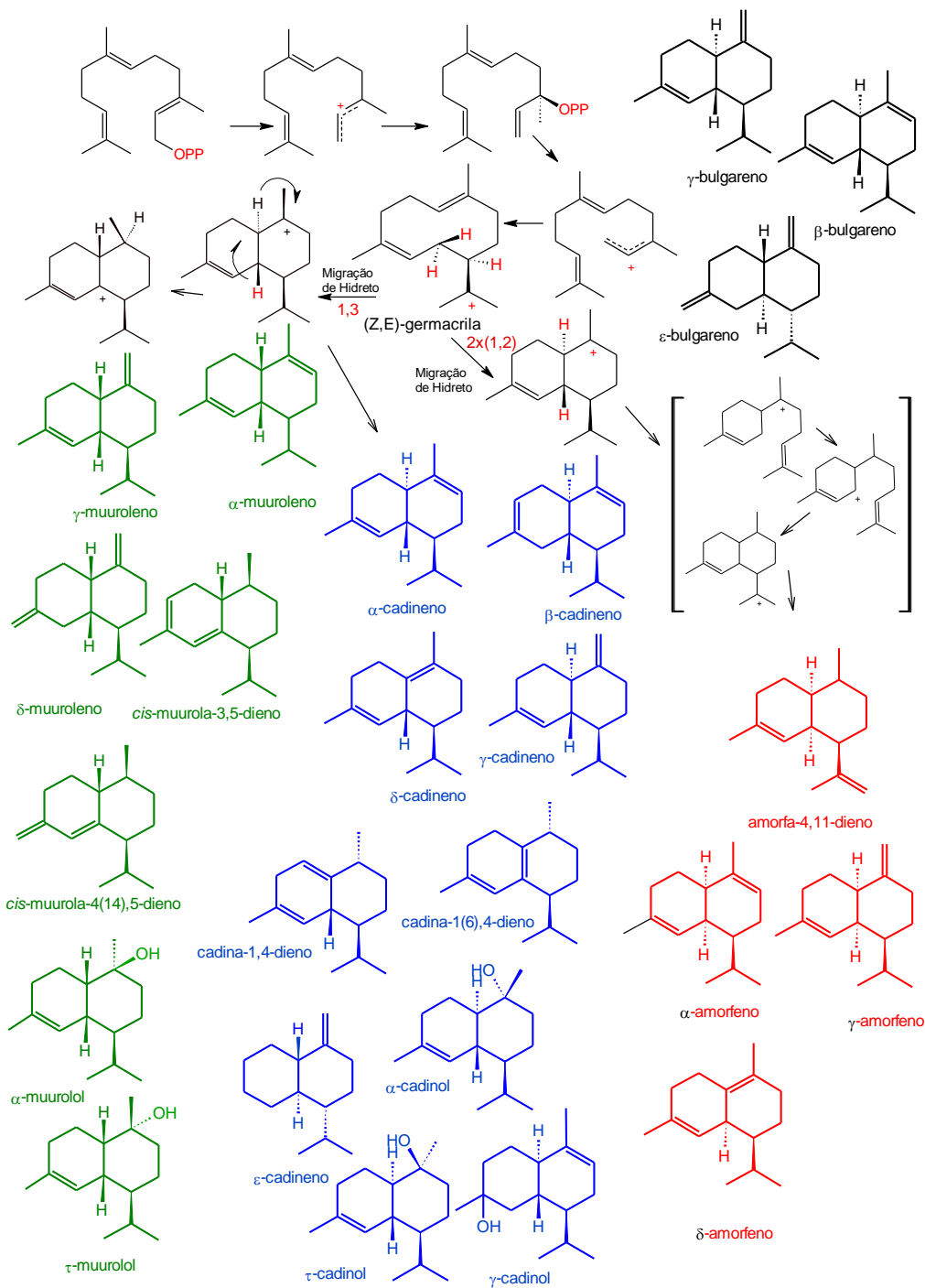
Contudo, alguns autores que estudaram o mecanismo de catálise das enzimas amorfa-4,11-dieno sintase de *Artemisia annua* e  $\delta$ -cadineno sintase de

*Gossipium arboreum* sugerem que estas enzimas catalisem a síntese de cadinanos via cátion bisabolila e não via cátion germacrila (CHANG et al., 2000; PICAUD et al., 2005; FARALDOS et al., 2012). Durante a formação do  $\delta$ -cadineno, por exemplo, o carbocátion bisabolila com carga em C7, seria estabilizado por uma migração 1,3 de hidrogênio entre C1 e C7, ocorreria então nova ciclização entre C1 e C10, com anéis em *trans*, e nessa conformação, o mesmo H que migrou de C1 para C7, faria nova migração 1,5, de C7 a C11. O carbocátion formado em C7 seria então finalizado pela expulsão de H6, conforme Esquema 2.14.

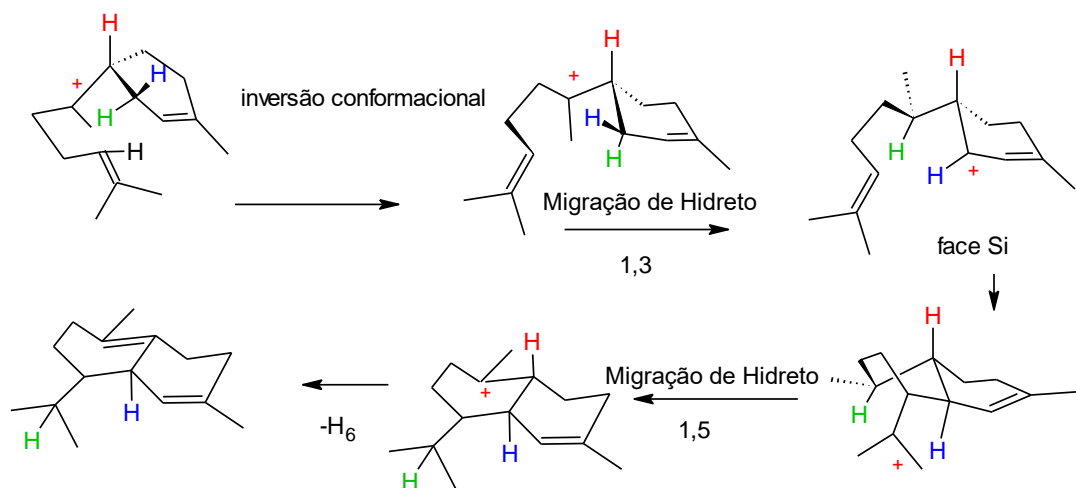
#### Cátions eudesmila e eremofilila

O rearranjo do cátion germacrila na sua conformação (*E,E*), ou do germacreno A nessa conformação, propicia a formação do cátion eudesmila, pela formação de uma ligação entre C5 e C10 (Esquema 2.15). Esse cátion pode sofrer os processos comuns de finalização (eliminação de próton ou captura de água, como ocorre com os cadinenos), formando os eudesmanos. Grande parte deles é identificada na literatura como selineno, seu nome usual anterior a 1950. Essa é uma classe muito frequente em Asteraceae, sendo  $\alpha$ -selineno,  $\beta$ -selineno e os vários isômeros eudesmois os mais usuais.

Entretanto, a finalização do cátion eudesmila pode não ocorrer com a expulsão de próton ou hidroxilação, mas em vez disso o cátion pode sofrer rearranjo 1,2 de hidreto (C5-C4), seguida pela migração da metila em C10 para C5, originando assim o cátion eremofilila (LÜCKER et al., 2004) (Esquema 2.16). Dependendo da fusão *cis*- ou *trans*- dos anéis no cátion eudesmila, a migração desse próton e metila resultará em substâncias com as duas metilas do mesmo lado do plano (aristoloqueno, valenceno) ou em lados opostos (5-*epi*-aristoloqueno, 4-*epi*-eremofileno), Esquema 2.16. O valenceno, e seu derivado oxidado, nootkatona, encontrados em *Vitis vinifera* e *Citrus maxima* são exemplos de terpenoides desse grupo. Além destes, o capsidiol, isolado de *Nitiana tabacum* e *Capsicum annuum* também apresenta esqueleto eremofilano (TAKAHASHI et al., 2005).



Esquema 2.13: Biossíntese de muurolanos, cadinanos, amorfanos e bulgaranos (Adaptado de BORDOLOI, 1989; PROSSER, 2006; AGGER et al., 2009; BROWN, 2010).

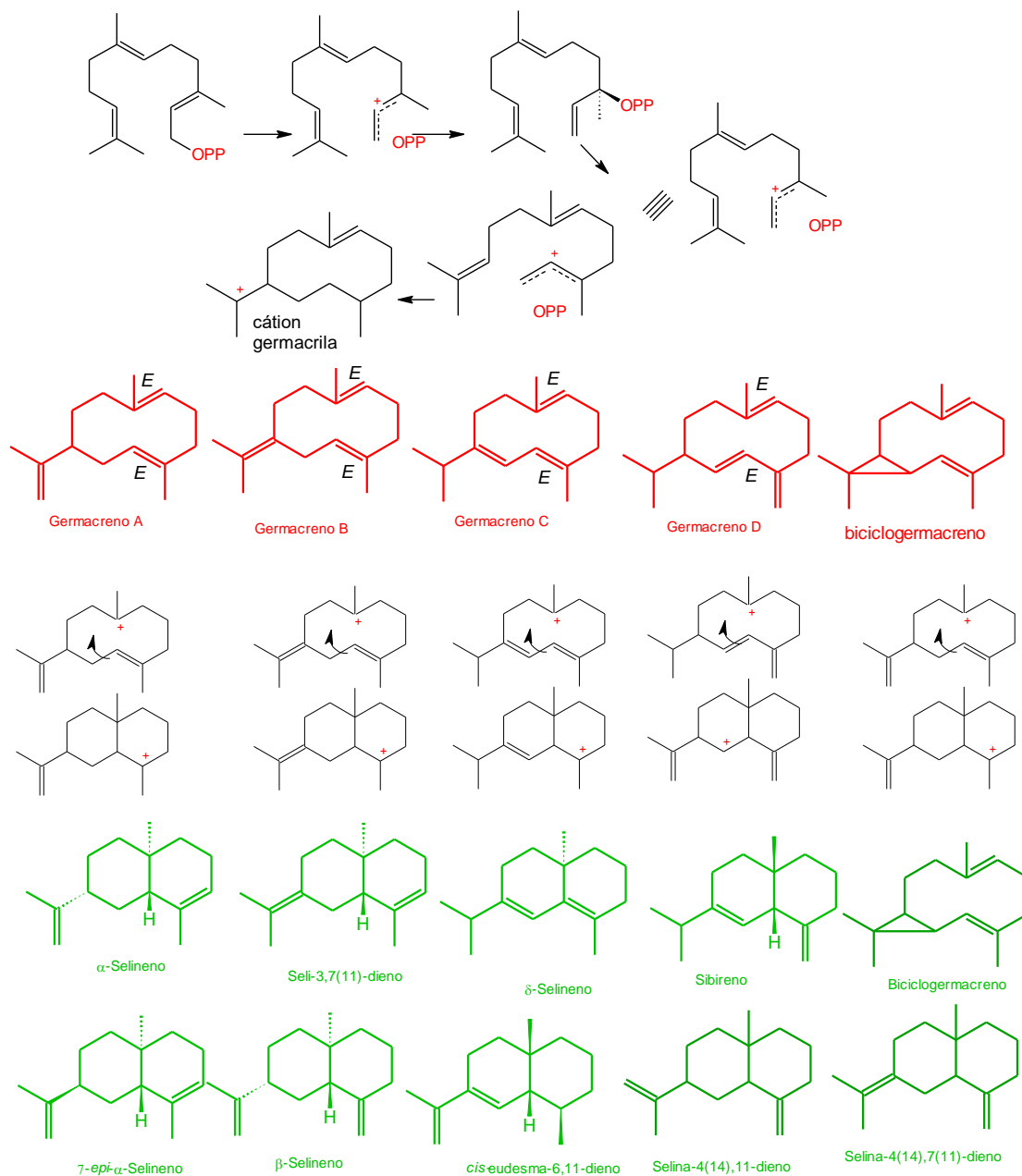


Esquema 2.14: Biossíntese de cadinanos via bisabolanos (Adaptado de FARALDOS et al., 2012).

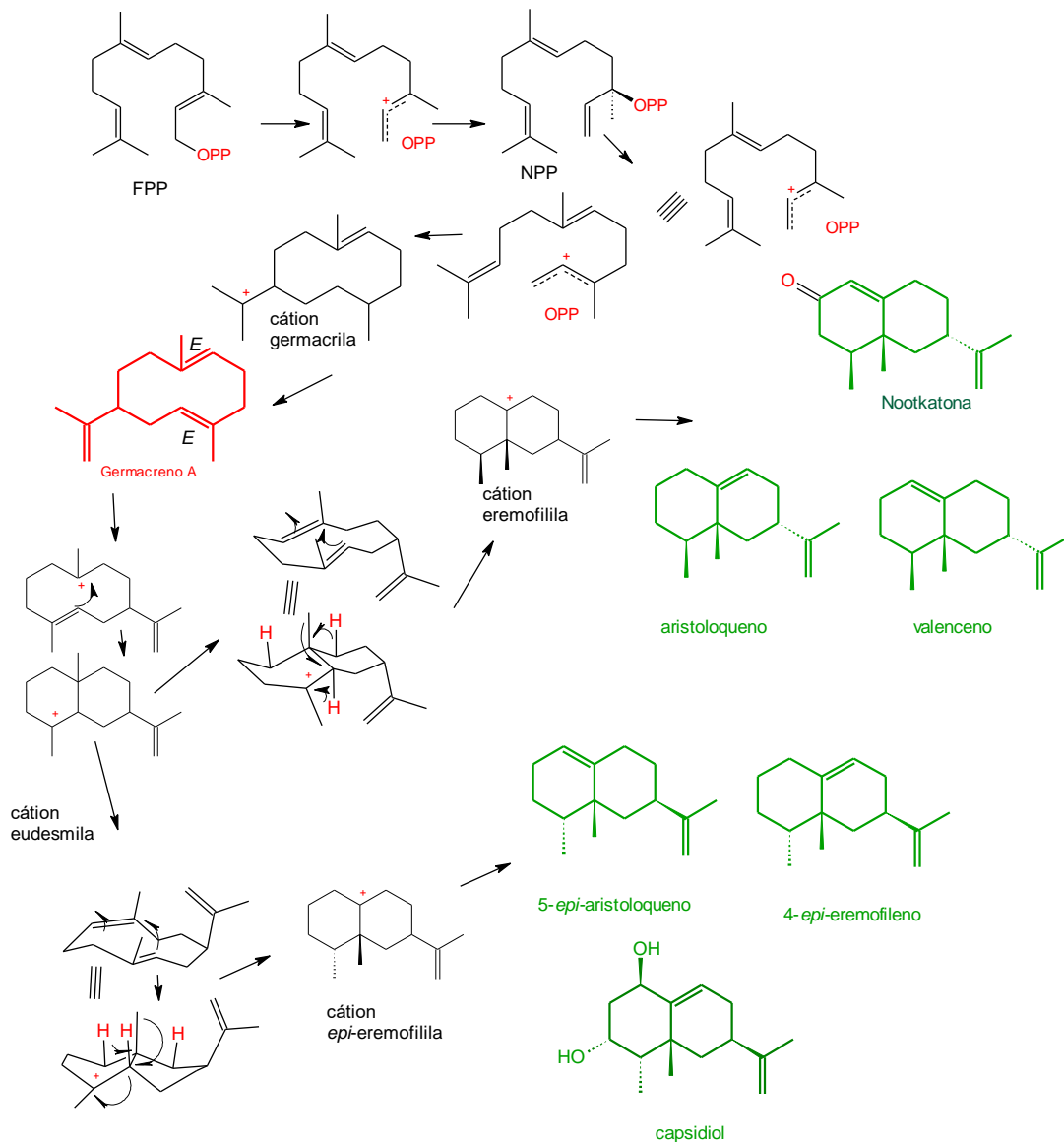
### Cátions aromadendrila e guaíla

Em vez da ciclização pela formação de uma ligação entre C5 e C10, o cátion germacrila pode ciclizar entre C5 e C1. Nesse caso o cátion formado é o guaíla, com dois ciclos, de 7 e 5 carbonos, respectivamente (DEWICK, 2002; KUMETA e ITO, 2010). A biossíntese de guaienos também pode ser teorizada via germacrenos (germacreno A). A finalização do cátion guaíla por expulsão de próton ou captura de água origina os guaienos e os guaiois encontrados nos óleos voláteis, como representado no Esquema 2.17.

De modo muito similar à formação dos guaianos via germacreno A, pode ser teorizada a formação dos aromadendranos via biciclogermacreno. Globulol e espatulenol são duas substâncias com núcleo aromadendrano presentes entre as substâncias majoritárias em muitos óleos voláteis.



Esquema 2.15: Biosíntese de eudesmanos (Adaptado de SHARON-ASA, 2003; LÜCKER et al., 2004).



Esquema 2.16: Biossíntese de eremofilanos/aristolocanos (Adaptado de TAKAHASHI et al., 2005). FPP (pirofosfato de farnesila), NPP (pirofosfato de nerolidila)

### Cátion bisabolila

A ciclização do cátion farnesila pode ocorrer de forma análoga à ciclização do cátion nerila nos monoterpenos, com formação de um anel de seis carbonos, o cátion bisabolila. O cátion bisabolila pode ter vários destinos, análogos aos do cátion terpinila:



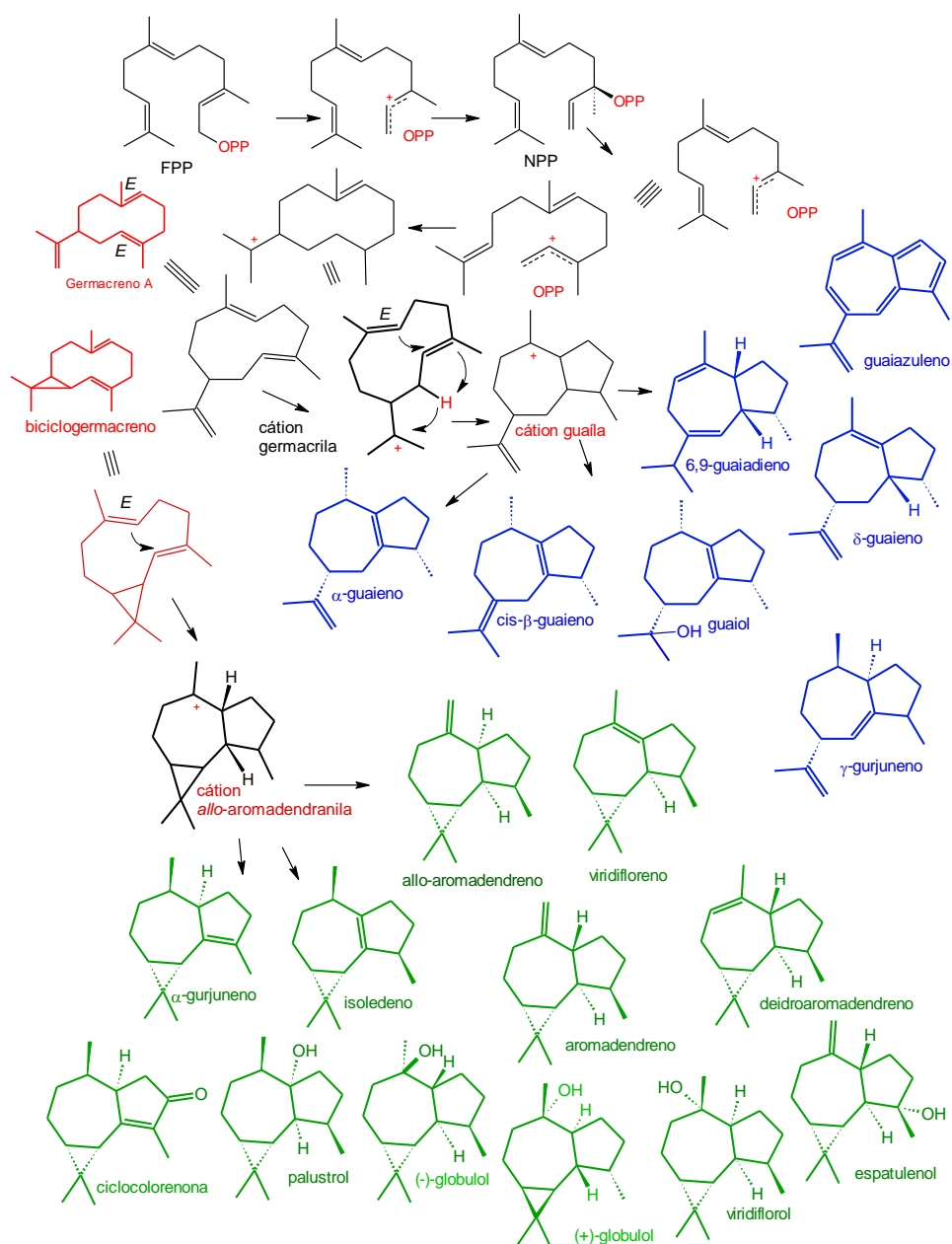
- a) Finalização por expulsão de prótons ou captura de água (bisabolenos, curcumenos, sesquifelandrenos, zingiberenos);
- b) Ciclização 6,2 (sesquisabineno A, sesquitujeno);
- c) Ciclização 7,2 (bergamotenos);
- d) Ciclização 7,3 seguida de ciclização 4,2 ( $\alpha$ -santaleno);
- e) Ciclização 7,3 seguida de rerarranjo 4,3-4,2 ( $\beta$ -santaleno).

A finalização do cátion bisabolila, bem como os sesquiterpenoides assim originados e os seus análogos monoterpénoides são apresentados no Esquema 2.18 e na Figura 2.7.

#### 2.3.4.3 Funcionalização de terpenoides

Até agora, a biossíntese de monoterpénoides e sesquiterpenoides foi abordada de forma compartimentada nesta revisão, em função dos carbocátions, a fim de criar uma noção lógica da origem de cada substância. Entretanto, ela pode de fato se dar de forma simultânea nas plantas, dependendo da topologia enzimática, como já foi mencionado. Uma única enzima pode catalisar a biossíntese de sesquiterpenoides acíclicos, de alguns com esqueleto bisabolano, germacrano, eudesmano ou cadinano, entre outros. Além disso, várias enzimas diferentes podem catalisar reações semelhantes, mas estar submetidas a diferentes mecanismos de regulação.

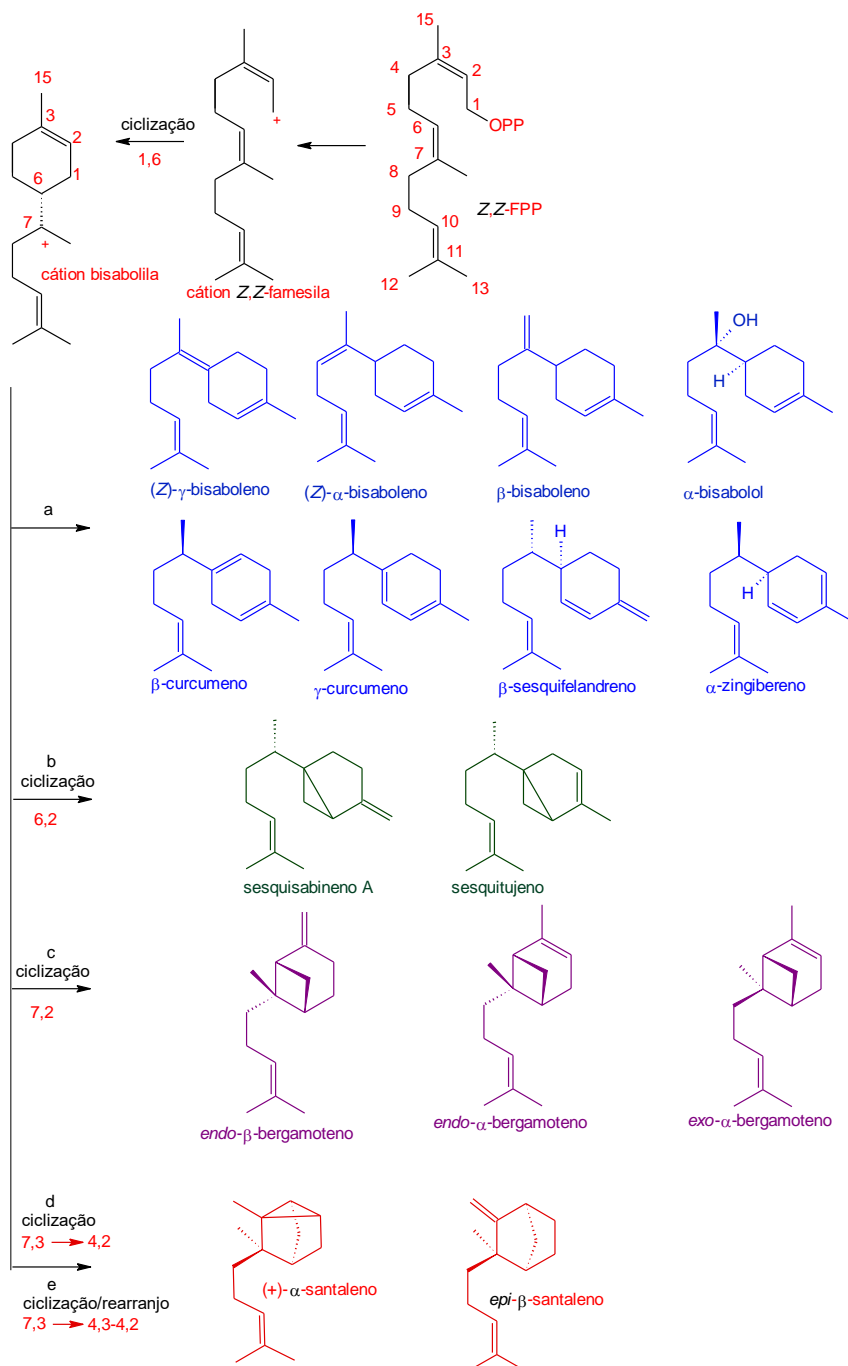
Por exemplo, CHENG e colaboradores (2007) isolaram duas enzimas sesquiterpeno sintases do arroz (*Oriza sativa*) após tratamento de plântulas dessa espécie com jasmonato de metila (MeJA). A enzima *Oriza sativa* Terpeno Sintase 3 (OsTPS3) incubada com FPP produziu (*E*)- $\beta$ -cariofileno (45,9%),  $\alpha$ -selineno (15,5%),  $\beta$ -elemeno (11,0%), eudesma-4(14),11-dieno (11%),  $\alpha$ -humuleno (6%),  $\gamma$ -elemeno (0,5%), aromadreno (0,5%) e  $\delta$ -cadineno (0,4%). Desses dados se percebe que OsTPS3 é capaz de ciclizar o FPP em C1-C11, formando o cátion humulila, que origina  $\alpha$ -humuleno e o cátion cariofilila, este finalizando como (*E*)- $\beta$ -cariofileno.



Esquema 2.17: Biossíntese de aromadendranos e guaianos (Adaptado de KUMETA e ITO, 2010; DEWICK et al., 2002). FPP (pirofosfato de farnesila), NPP (pirofosfato de nerolidila).

Além disso, essa mesma enzima também é capaz de realizar a ciclização em C1-C10, formando o germacreno A, bem como a posterior ciclização em C5-C10 do cátion (*E,E*)-germacrila, originando  $\alpha$ -selineno e eudesma-4(14),11-dieno. Além de produtos em menor quantidade como aromadendreno e  $\delta$ -cadineno, também teorizados como oriundos da ciclização posterior do cátion germacrila. A outra enzima isolada, OsTPS13, produziu (*E,E*)-farnesol (82,4%) e (*E*)-nerolidol (9,7%). Esta, portanto, não realiza a ciclização do FPP, mas apenas a

retirada do grupo fosfato e estabilização do radical farnesila como álcool, em duas posições diferentes, sendo que a atividade que adiciona hidroxila primária é mais forte do que a que adiciona hidroxila terciária.



Esquema 2.18. Biossíntese de sesquiterpenos derivados do cátion bisabolila (Adaptado de SALLAUD et al., 2009). *Z,Z*-FPP (pirofosfato de *Z,Z*-farnesila), a (finalização por expulsão de prótons ou captura de água), b (ciclização 6,2); c (ciclização 7,2); d (ciclização 7,3 seguida de ciclização 4,2); e (ciclização 7,3 seguida de rearranjo 4,3 $\rightarrow$ 4,2).

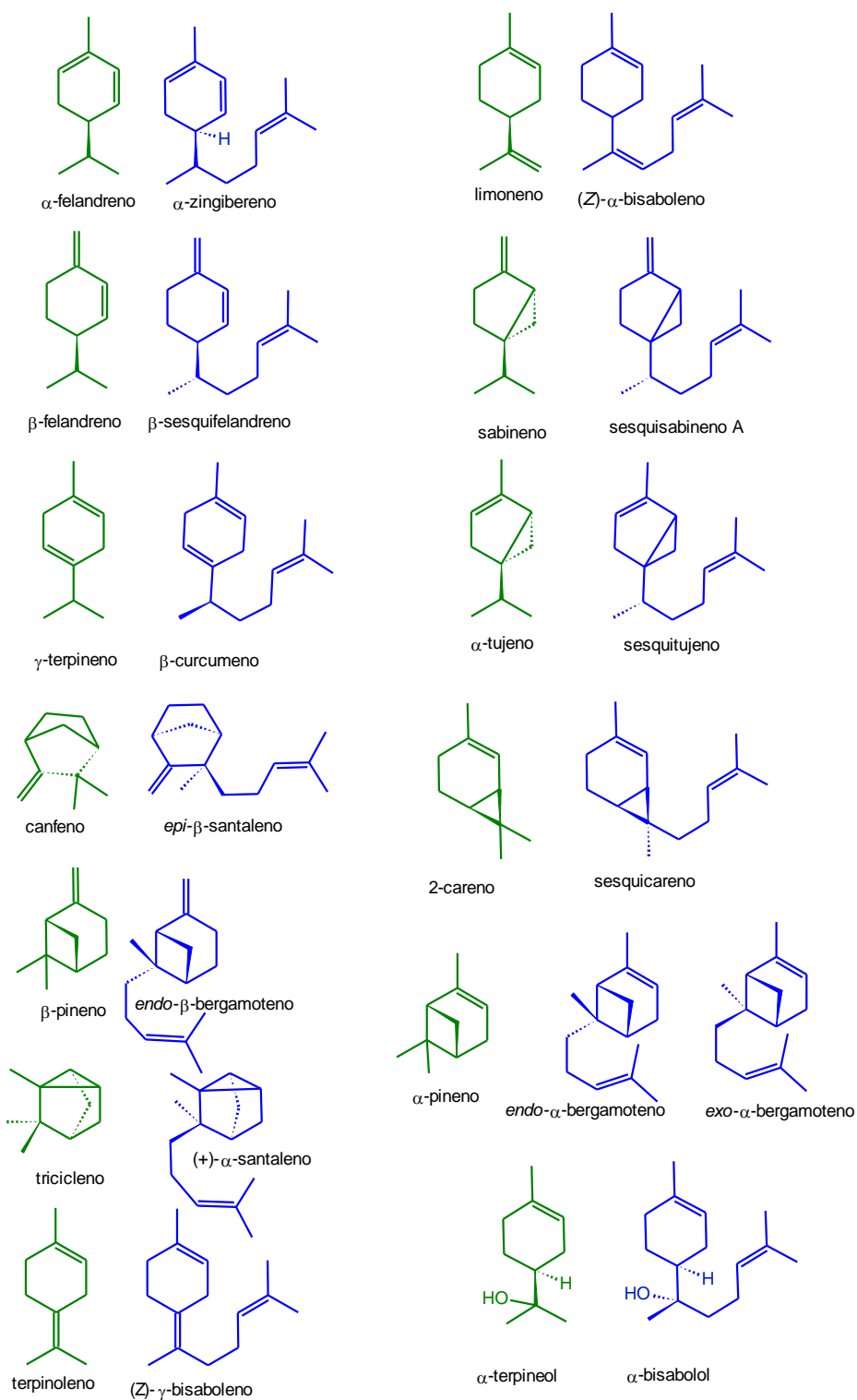


Figura 2.7: Relação estrutural entre sesquiterpenoides derivados do bisabolano e monoterpenoides.

Em 2010, KUMETA e ITO isolaram e expressaram em *Escherichia coli* quatro enzimas sesquiterpeno sintase de *Aquilaria crassna*, uma planta cuja resina é utilizada em incensos e perfumes. As enzimas produziram  $\delta$ -guaieno (~79%),  $\alpha$ -guaieno (~20%) e  $\alpha$ -humuleno (~1%). Apesar de muitas enzimas que sintetizam guaienos como produtos secundários já terem sido isoladas, esta foi a primeira capaz de produzir guaienos como produtos majoritários.

Uma  $\delta$ -cadineno sintase isolada de *Gossypium arboreum* e uma germacreno A sintase isolada de tricomas glandulares de *Artemisia annua* apresentam, contrariamente à maioria das outras sintases já isoladas, apenas uma substância como produto da reação com FPP (BERTEA et al, 2005; FARALDOS et al, 2012). Ambas as enzimas são induzidas *in planta* em resposta a ataque biológico, e seus produtos são precursores de substâncias de defesa: gossipol e lactonas, respectivamente. Outras enzimas, ao contrário, mesmo induzidas por ataque biológico catalisam a biossíntese de vários produtos, mas com um deles como majoritário. O que as diferencia de enzimas expressas constitutivamente, para as quais a regra é a produção de inúmeras substâncias, como relatado para a  $\delta$ -selineno e a  $\gamma$ -humuleno sintases de *Abies grandis* (STEELE et al, 1998).

Muitos óleos voláteis são caracterizados também pela presença de terpenoides funcionalizados, contendo grupamentos cetona, aldeído, éster e éter. Essas substâncias são produzidas pela ação de outras enzimas sobre os hidrocarbonetos ou alcoóis biossintetizados pelas terpeno sintases.

Os isômeros fenólicos terpenoídicos timol e carvacrol, Figura 2.8, por exemplo, estão presentes no óleo volátil de muitas espécies vegetais e apresentam atividade antimicrobiana e inseticida. Em orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) essas substâncias são particularmente importantes. CROCOLL e colaboradores (2010) e CROCOLL (2011) isolaram uma série de enzimas monoterpene sintases de ambas as espécies e compararam o perfil de voláteis da planta com o perfil de voláteis produzido pelas enzimas. A ausência de timol e carvacrol entre os produtos enzimáticos já era esperada pelos autores uma vez que estes fenóis são, teoricamente, formados

pela oxidação posterior do  $\gamma$ -terpineno ou do *p*-cimeno. Baseando-se na sequência nucleotídica de um gene codificando a monoterpene hidroxilase isolada de *Mentha sp.* (LUPIEN et al., 1999) os autores isolaram vários genes codificando CYP450 em diferentes linhagens e estágios de desenvolvimento de orégano e tomilho, dois dos quais foram expressos e suas proteínas caracterizadas. Como esperado, essas enzimas foram capazes de converter  $\gamma$ -terpineno (mas não o *p*-cimeno), além de outros *p*-mentenos com duas ligações duplas no hexociclo, em carvacrol, com oxidação em C2 (CYP71D180v1 e CYP71D181) ou em ambos, timol e carvacrol, com oxidação em C3 ou C2 (CYP71D178).

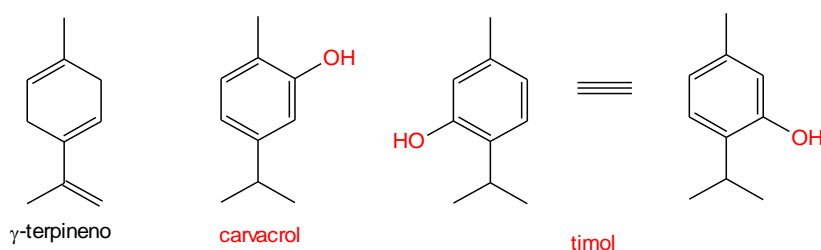
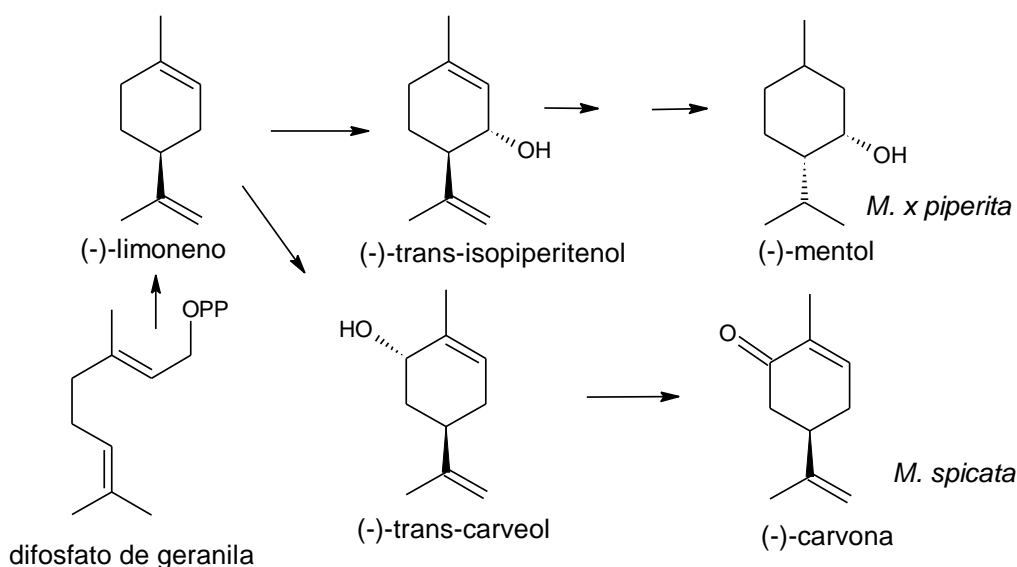


Figura 2.8: Estrutura química de  $\gamma$ -terpineno, timol e carvacrol (CROCOLL, 2011).

Os trabalhos de CROCOLL e colaboradores (2010) e CROCOLL (2011) se basearam em outro estudo importante para elucidação das rotas de biossíntese de monoterpênicos de interesse comercial ou farmacológico. A hortelã-pimenta (*Mentha x piperita* L.) e a hortelã-verde (*Mentha spicata* L.) são ambas conhecidas pela produção de *p*-mentanos oxigenados. *M. x piperita* produz monoterpênicos com oxigênio em C3 ((-)-mentol) e *M. spicata* produz os isômeros oxigenados em C6 ((-)-carvona), ambos os produtos são, entretanto, derivados da oxidação estereoespecífica de um mesmo precursor, o (-)-4*S*-limoneno, via (-)-*trans*-isopiperitenol no primeiro caso e via (-)-*trans*-carveol no segundo (Esquema 2.19). LUPIEN e colaboradores (1999) isolaram e caracterizam as duas enzimas CYP450 dessas espécies responsáveis pela hidroxilação do (-)-limoneno. CYP71D13 catalisa a oxidação em C3 e CYP71D18 catalisa a oxidação em C6, com bastante especificidade para o (-)-4*S*-limoneno. Entretanto, quando incubadas com (+)-4*S*-limoneno, CYP71D13 produz apenas

(+)-*trans*-isopiperitenol, enquanto CYP71D18 perde a especificidade e produz (+)-*cis*-carveol, além de quantidades menores de (+)-*trans*-carveol, (-)-*trans*-carveol e (+)-*trans*-isopiperitenol. Percebe-se então que cada uma dessas enzimas possui um modo próprio e diferenciado de atuação. A oxidação subsequente do *trans*-carveol a carvona e do *trans*-piperitenol a mentol (via isopiperitenona) é realizada por outras enzimas (WÜST et al., 2001).

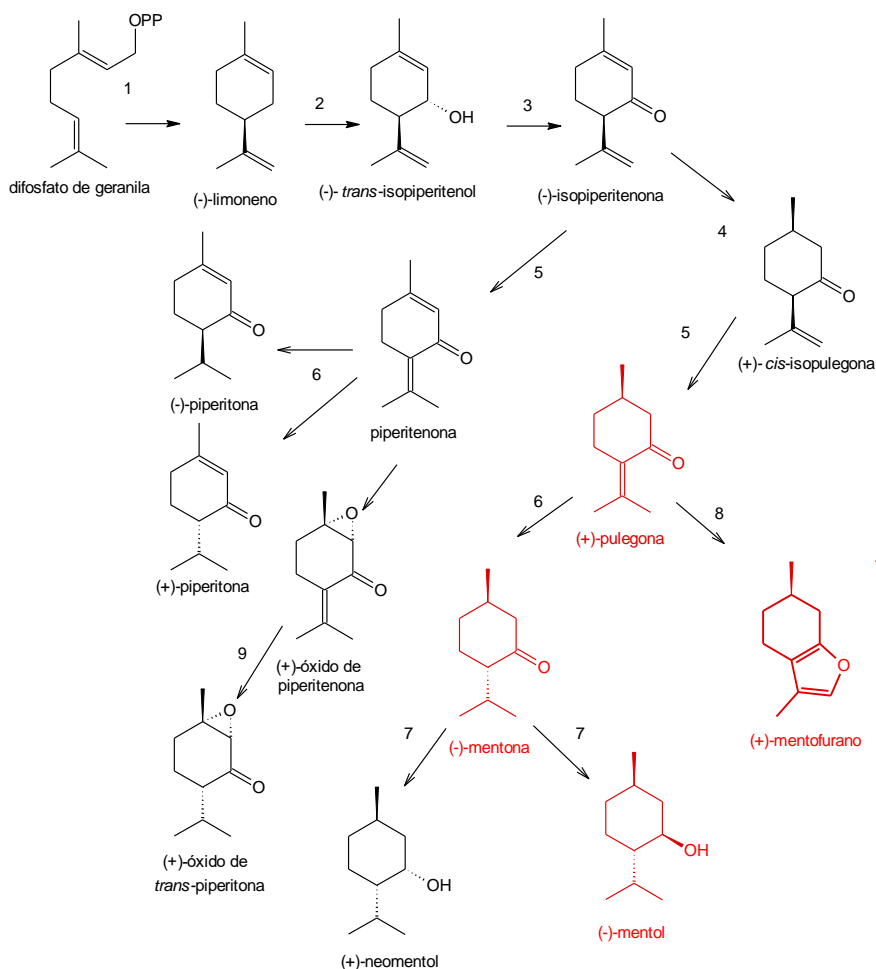


Esquema 2.19: Biossíntese de mentol e carvona (LUPIEN et al., 1999).

Ainda no gênero *Mentha*, o poejo (*M. pulegium*) e a hortelã-pimenta (*M. x piperita*) são espécies cujo consumo levanta preocupações de organismos regulatórios devido à presença potencialmente perigosa de pulegona e mentofurano. A presença dessas substâncias e sua toxicidade têm implicações tanto para a indústria, que utiliza o óleo de *M. x piperita* como flavorizante, como para a medicina/toxicologia. O poejo foi historicamente utilizado como inseticida e repelente de insetos, especialmente pulgas, de onde origina seu nome latino (*pulex* = pulga) e ainda em tempos recentes é eventualmente utilizado como abortivo, podendo seu uso ser letal (TELICI et al., 2010). A sua atividade está associada à presença da pulegona, que é tóxica tanto para insetos quanto para mamíferos. O mecanismo de toxicidade da pulegona, conforme E.C. (2002), envolve a sua oxidação pelo citocromo CYP450 a mentofurano e posterior

abertura do anel furano com formação de um  $\gamma$ -cetoal muito reativo. O óleo de *M. x piperita* também pode conter estes dois monoterpênicos, uma vez que a pulegona é um dos precursores do mentol e o mentofurano é o produto final de uma rota paralela de metabolização da mesma (Esquema 2.20).

*M. x piperita*

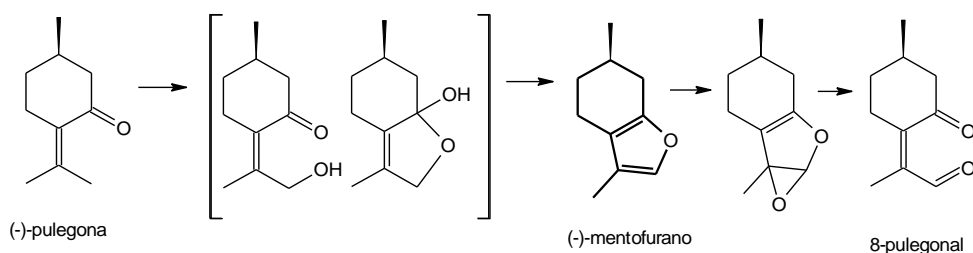


Esquema 2.20: Biossíntese de mentol e mentofurano. 1: (-)-limoneno sintase; 2: citocromo P450 (-)-limoneno-3-hidroxilase; 3: (-)-*trans*-isopiperitol desidrogenase; 4: (-)-isopiperitona redutase; 5: (+)-*cis*-isopulegona isomerase; 6: (+)-pulegona redutase; 7: (-)-mentona redutase; 8: citocromo P450 (+)-mentofurano sintase; 9: terpenoide oxidase (Adaptado de MAHMOUD e CROTEAU, 2002).

O mecanismo de biossíntese do mentol e sua regulação em *M. x piperita* são bastante complexos, com o envolvimento de muitas enzimas diferentes, fortemente influenciados pelo fotoperíodo a que as plantas estejam submetidas,



e diferenciados para folhas jovens e adultas. O sistema redutor responsável pela conversão da pulegona a mentona e mentol é ativado em folhas submetidas a fotoperíodo longo quando jovens (VOIRIN, 1990). Além disso, uma vez ativado o sistema oxidante que transforma pulegona em mentofurano, esse produto causa a infrarregulação ou retroalimentação negativa da expressão de pulegona redutase, interferindo negativamente na biossíntese de mentona e mentol (MAHMOUD e CROTEAU, 2002). Mecanicamente, a biossíntese do mentofurano ocorre espontaneamente após a ação da mentofurano sintase sobre a pulegona. Essa enzima catalisa a hidroxilação da pulegona em C8 (metila *syn* (*cis*-) ao grupo oxo), que espontaneamente cicliza como um hemiacetal e desidrata, formando o furano (Esquema 2.21). Um processo muito semelhante ocorre no metabolismo hepático da pulegona. Durante o metabolismo animal da pulegona, ocorre ainda a epoxidação e abertura do furano, com a formação de 8-pulegonal, principal responsável pela toxicidade tanto da pulegona quanto do mentofurano (CE 2002).

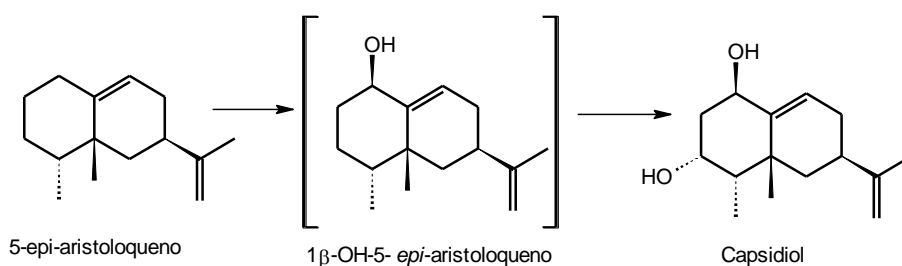


Esquema 2.21: Biossíntese de (-)-mentofurano a partir de (-)-pulegona (Adaptado de E.C., 2002).

Os padrões de acetilação de alcoóis monoterpênicos também foram estudados para algumas espécies e acrescentam complexidade ao cenário de produção de voláteis. No primeiro padrão, ambos os estereoisômeros do álcool estão presentes, mas apenas um estereoisômero do acetato correspondente é biossintetizado. Isso ocorre para o acetato de linalila em *Origanum dayi* e *O. syriacum*, para o acetato de hidrato de *trans*-sabineno em *O. dayi*, *O. vulgare* e *O. onites* e para o acetato de hidrato de *cis*-sabineno em *O. dayi*. Um segundo padrão é caracterizado pela presença de ambos os alcoóis e ambos os acetatos, como observado para o acetato de linalina em *O. vulgare* e *O. majorana* e para

o acetato de terpinen-4-ila em *O. vulgare* e *O. dayi*. No terceiro padrão observado apenas um estereoisômero do álcool está presente e apenas um (ou nenhum) estereoisômero do acetato é produzido (LARKOV et al., 2008).

Os sesquiterpenoides também estão sujeitos a mecanismos semelhantes de controle biossintético e oxidativo. Em solanáceas como tabaco e pimenta uma das respostas ao ataque fúngico ou bacteriano é a produção de capsidiol. No tabaco, *Nicotiana tabacum*, esse álcool sesquiterpênico capaz de prevenir a germinação e crescimento de vários fungos, é sintetizado através da hidroxilação estereoseletiva do 5-epiaristoloqueno realizada por uma enzima CYP450, 5-*epi*-aristoloqueno diidroxilase. A hidroxilação do 5-*epi*-aristoloqueno a capsidiol ocorre em duas etapas. Primeiramente uma hidroxila é adicionada em orientação *beta* em C1 e posteriormente outra hidroxila é adicionada, pela mesma enzima, em orientação *alfa* em C3, conforme Esquema 2.22 (TAKAHASHI et al., 2005).

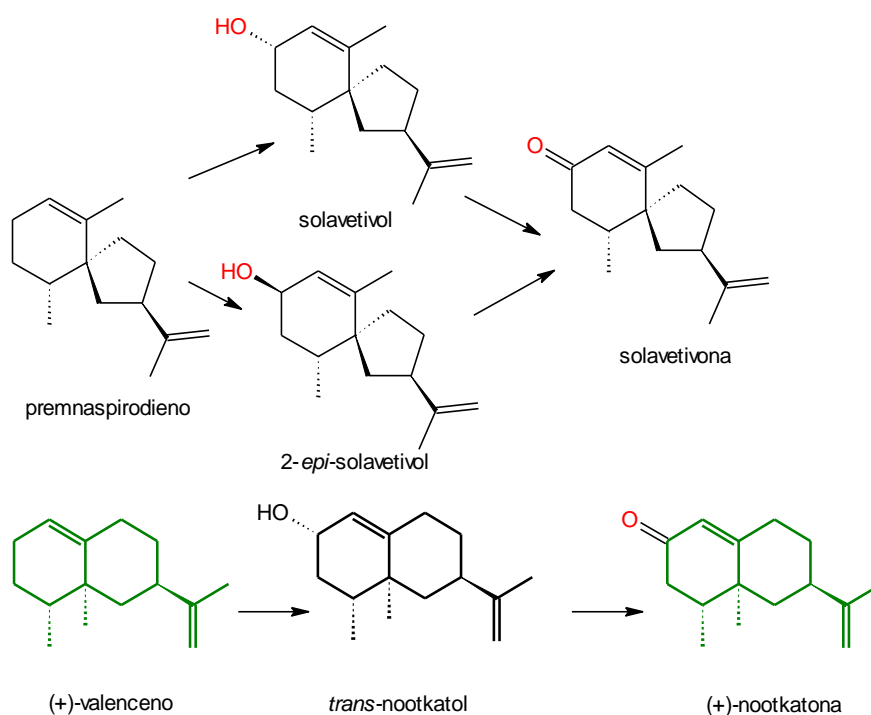


Esquema 2.22: Biossíntese de capsidiol (Adaptado de TAKAHASHI et al., 2005).

Outras solanáceas como tomateiro e meimendo acumulam solavetivona em resposta a ataque fúngico. A solavetivona pertence a uma classe de sesquiterpenos com esqueleto rearranjado em processo semelhante aos eremofilanos, mas em vez da migração da metila em C10, ocorre rearranjo da ligação C9-C10 para C9-C6. Do meimendo (*Hyoscyamus muticum*) foi isolada uma enzima *Hyoscyamus muticum* premnaspirodieno oxigenase (HPO) capaz de catalisar a hidroxilação de C1 de eremofilanos, como o valenceno e o 5-*epi*-aristoloqueno, e C2 de premnaspirodieno. No premnaspirodieno a oxidação

envolve adição sucessiva de duas hidroxilas no mesmo carbono e posterior desidratação, tendo uma cetona, solavetivona, como produto final. A solavetivona é substância com propriedades semelhantes ao capsidiol: possui atividade contra fungos e sua biossíntese é induzida por ataques biológicos (TAKAHASHI et al., 2007).

Como um de vários exemplos de aplicação prática destes estudos, podemos citar a criação de linhagens geneticamente modificadas de *Pichia pastoris* (uma levedura) expressando uma valenceno sintase de *Callitropsis nootkatensis* (para biossintetizar valenceno), HPO (para hidroxilar o sesquiterpeno produzido por esta enzima), e superexpressando suas próprias enzimas álcool desidrogenase (para produzir nootkatona) (Esquema 2.23). A nootkatona é uma substância valiosa muito utilizada como flavorizante cítrico e sua extração de fontes naturais, como o pomelo ou o cedro canadense, apresenta inconvenientes tanto comerciais como ambientais (WRIESSNEGER et al., 2014).



Esquema 2.23: Biossíntese de solavetivona e nootkatona (Adaptado de TAKAHASHI et al., 2007).

### 2.3.5 Propriedades farmacológicas

Muitos dos componentes dos óleos voláteis são fitoanticipinas ou fitoalexinas, quer dizer, são produzidos constitutivamente e armazenados para utilização quando necessários, ou são produzidos indutivamente, quando a planta está sob estresse ou ataque biológico. Apresentam propriedades antifúngicas, antimicrobianas, antivirais, antioxidantes, mimetizam feromônios de alarme de insetos ou atraem predadores de seus parasitas, entre outras atividades. Muitas destas propriedades são de interesse farmacológico, como as atividades antifúngicas, antibacterianas, antivirais e antioxidantes, outras atividades aparentemente não relacionadas ao seu papel biológico também são relatadas para óleos voláteis e seus componentes, como antitumoral e relaxante.

#### **Atividade Antitumoral**

Atividade antitumoral foi descrita para componentes isolados de óleos voláteis tanto *in vitro* quanto *in vivo*. De modo geral se observa baixa toxicidade, mesmo em doses elevadas, e potencial para ação sinérgica com antineoplásicos convencionais. O *d*-limoneno e o álcool perílico isolados de *Citrus sinensis* foram avaliados quanto à atividade contra câncer pulmonar induzido em camundongos e tumor pancreático em hamster. Ambos diminuíram a incidência de tumores e aumentaram a apoptose de células tumorais. Acredita-se que essas substâncias atuem como inibidoras da farnesiltransferase, uma enzima essencial para ativação das proteínas *ras* implicadas na oncogênese. Entretanto, a dose efetiva calculada para o *d*-limoneno em humanos seria de aproximadamente 80 mL/dia, o que obviamente apresenta inconvenientes. O álcool perílico é um intermediário no metabolismo do limoneno a ácido perílico e ácido diidroperílico em mamíferos, e sua atividade antineoplásica é maior do que a do limoneno, por isso tem sido estudado como alternativa a este (MILLS 1995; PHILLIPS 1995; STARK 1995; STAYROOK 1997; LÖW-BASELLI 2000). Este composto apresenta capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e tem fácil acesso ao sistema nervoso central. Em um estudo clínico de fase I e II de uma formulação para aplicação nasal do álcool perílico em 37 pacientes adultos com gliomas malignos

recorrentes, tratados com temozolomide, não apresentou toxicidade, e mais de 50% dos pacientes exibiu melhora ou permaneceu estável durante os 6 meses de tratamento (DA FONSECA et al., 2008). Um conjugado produzido pela união covalente do temozolomide e do álcool perílico resultou em uma substância com tempo de meia-vida mais elevado, e maior eficiência no tratamento de modelos de metástases cerebrais de câncer de mama em camundongos (CHEN et al., 2014).

Além desses, geraniol, carveol, farnesol, linalol,  $\beta$ -citroneol e especialmente o nerolidol, também inibem a prenilação proteica e foram ativos contra neoplasias induzidas no duodeno e intestino grosso de ratos. O nerolidol inibiu em até 82% a formação dos adenomas (WATTENBERG, 1991). Geraniol de *Cymbopogon martini* também apresentou atividade redutora da síntese de DNA em células tumorais *in vitro* (CARNESECCHI et al., 2004). O geraniol tem baixa toxicidade aguda e crônica, e sua co-administração com 5-fluorouracila aumenta o efeito antitumoral da mesma (McANALLY, 2003).

O  $\beta$ -eudesmol, isolado do óleo volátil de *Atractylodes lancea* e de outras fontes, pode ter aplicação no tratamento de neoplasias, pois evidenciou atividade inibitória da angiogênese em modelos *in vivo* e *in vitro* (TSUNEKI et al., 2005). Posteriormente, MA e colaboradores (2008) demonstraram que o  $\beta$ -eudesmol inibe a neovascularização e o crescimento de células tumorais por inibição da ligação a elementos de resposta a AMPc (CREB, cAMP response element binding). Além disso, também atua em células de leucemia promielocítica humana (HL60) pela clivagem e ativação das caspases 3 e 9, e liberação de citocromo C das mitocôndrias (LI et al., 2013). BOMFIM e colaboradores (2013) avaliaram não apenas o  $\beta$ -eudesmol, mas também seus isômeros  $\alpha$ -eudesmol e  $\gamma$ -eudesmol e verificaram que todos eles apresentam atividade em células de hepatocarcinoma celular (HepG2) pelo aumento da ativação da caspase-3 e indução de perda do potencial de membrana mitocondrial, levando a apoptose. Os autores determinaram concentração inibitória ( $IC_{50}$ ) para  $\alpha$ - e  $\gamma$ -eudesmol, variando de valores da ordem de 5-10  $\mu$ g/mL e 8-15  $\mu$ g/mL para células de melanoma murino (B16-F10) e leucemia mieloide (K562), respectivamente, e

IC<sub>50</sub> da ordem de 16-24 µg/mL para β-eudesmol em células de melanoma murino (B16-F10) e hepatocarcinoma celular (HepG2).

O linalol também foi submetido a ensaios de atividade antitumoral *in vitro*, tendo bons resultados contra linhagens malignantes hematológicas e de adenocarcinoma mamário humano multirresistente, ativando a fosfoproteína p53 (proteína supressora de tumores p53) e algumas proteínas inibidoras de quinases dependentes de ciclase, necessários à regulação do ciclo celular (GU et al., 2010), além de atuar via mitocôndrias e potencializar a atividade antitumoral da doxorrubicina (RAVIZZA et al., 2008). Entretanto, sua utilização *in vivo* enfrenta os mesmos obstáculos do limoneno, devido às altas doses necessárias (APROTOZOAIE et al., 2014).

O elemeno (uma mistura de β-, γ- e δ-elemeno, sendo o primeiro como majoritário) foi ativo contra linhagens tumorais cerebrais, mamárias e leucêmicas humanas e murinas (ADIO et al., 2009). Um estudo com linhagens celulares C6 e U251 de mioblastoma (um tumor cerebral) demonstrou que o elemeno atua via ativação da P38 MAPK por fosforilação. As MAPK são proteínas quinases ativadas por mitógenos e a MAPK P38 está envolvida no crescimento celular e na regulação das fases G1 e G2/M. Sua ativação levou a redução do crescimento das células tumorais *in vitro*, além disso, β-elemeno *in vivo* causou a redução do crescimento tumoral em camundongos (YAO et al., 2008). Entretanto, em outras linhagens tumorais o elemeno foi ativo por mecanismos diferentes. LI e colaboradores (2013b) demonstraram que na linhagem A549 de tumor pulmonar o β-elemeno atua por aumento da expressão de P53, uma proteína implicada no reparo de DNA danificado e na parada do ciclo celular em G1/S. Por outro lado, QIN e colaboradores (2012) demonstraram que o β-elemeno atua pela inibição da expressão de c-Met (receptor do fator de crescimento de hepatócito) em células H22 de hepatocarcinoma celular. A proteína MET está implicado na cicatrização e a sua superexpressão em tumores está normalmente associada a prognósticos ruins. O mecanismo de ação do δ-elemeno, ativo contra células HeLa, é a ativação da via de sinalização das caspases, com a conversão proteolítica da pro-caspase-3 em caspase-3 ativa, com envolvimento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que leva à apoptose celular (WANG et

al., 2006). XU e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antitumoral de derivados sintéticos nitrogenados do  $\beta$ -elemeno, para estas substâncias, contrariamente, a atividade inibitória não ocorre por apoptose, mas por inibição do crescimento celular via regulação negativa de mTOR, o alvo da rapamicina em mamíferos que é um regulador do crescimento e proliferação celular, transcrição e síntese proteica.

O  $\alpha$ -bisabolol, presente por exemplo no óleo volátil de *Matricaria chamomilla*, foi ativo contra tumores pancreáticos e gliomas malignos (KAMATOU e VILJOEN, 2010), resultando, nestes, em 100% de morte celular na dose de 10  $\mu$ M, com IC<sub>50</sub> de 2,5 a 3,5  $\mu$ M. O mecanismo de ação dessa molécula foi por apoptose, com liberação de citocromo c da mitocôndria para o citosol. Contrariamente a outras substâncias antitumorais, o  $\alpha$ -bisabolol tem eliminação lenta do organismo e fácil acesso ao SNC, sendo assim um bom candidato a medicamento para tumores cerebrais (CAVALIERI, 2004).

Muitos óleos voláteis ou seus componentes isolados também foram avaliados e apresentaram atividades inibitórias contra o crescimento de células tumorais *in vitro*. Dentre eles, o óleo volátil de *Melissa officinalis* (Lamiaceae), para linhagens de tumor de laringe, entre outros (ALLAHVERDIYEV, 2001; SOUZA, 2004), e o carvacrol, apresentou atividade inibitória contra a síntese de DNA mesmo em células tumorais já ativadas, além de atividade antígenotóxica (IPEK et al., 2003; ZEYTINOGLU, 2003). Dentre as asteráceas também foram avaliados o óleo de *Senecio mikanioides* e *Chrysanthemum boreale*, este último induzindo a apoptose de células KB (EI TANTAWY, 2000; CHA, 2005). As mirtáceas *Melaleuca alternifolia* ( $\alpha$ -terpineol) e *Eugenia caryophyllata* (eugenol) foram ativas contra melanoma humano e leucemia promielocítica humana, respectivamente (CALCABRINI, 2004; YOO, 2005).

### **Atividade Antiinflamatória**

Em 2007, PASSOS e colaboradores relataram a atividade anti-inflamatória *in vivo* do óleo volátil de *Cordia verbenacea* (300-600 mg/kg, v.o.) com redução do edema, dos leucócitos polimorfonucleares e do TNF $\alpha$ , mas sem redução de leucócitos mononucleares e PGE<sub>2</sub>. O óleo volátil também não teve

ação inibitória sobre a atividade de COX-1 e COX-2 *in vitro*. Os componentes isolados  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno (50 mg/kg v.o) também inibiram o edema induzido na pata de camundongos pela carragenina, com 58, 53, 69 e 40% de inibição após 0, 5, 1, 2 e 4h para  $\alpha$ -humuleno e 47, 55, 79 e 28% de inibição para o  $\beta$ -cariofileno no mesmo período.

FIORENZANI e colaboradores (2014) avaliaram uma formulação de  $\beta$ -cariofileno e DHA por via oral em modelo de dor crônica. O DHA é considerado uma molécula com importante atividade anti-inflamatória. Apesar de alguns trabalhos terem proposto que a atividade anti-inflamatória do  $\beta$ -cariofileno seja devida também ao aumento transiente dos níveis de hormônios sexuais (testosterona e estradiol) que o mesmo causa nos animais, a coaplicação com DHA (52-48%) teve melhor efeito anti-inflamatório do que  $\beta$ -cariofileno apenas, inibindo a alteração dos níveis causada pelo sesquiterpeno.

O  $\alpha$ -humuleno, apesar de ser estruturalmente semelhante ao  $\beta$ -cariofileno e de ser geralmente encontrado juntamente com ele, mesmo que em quantidades menores, nos ensaios *in vivo* apresenta atividades um pouco diferentes. Ambos inibem o edema causado por ovoalbumina em camundongos, bem como diminuem a expressão de bradicinina e do fator ativador de plaquetas, reduzem o edema induzido por carragenina, a produção de TNF $\alpha$ , de prostaglandina E<sub>2</sub>, de óxido nítrico sintase (NOS) e COX-2. Entretanto, apenas  $\alpha$ -humuleno inibe o edema causado por injeção de histamina, bem como a produção de interleucina-1 $\beta$  na indução do edema por carragenina (FERNANDES et al., 2007). Além disso,  $\alpha$ -humuleno não tem atividade sobre os receptores CB<sub>2</sub> (GERTSCH et al., 2008), portanto, estas duas substâncias devem apresentar mecanismos de ação diferentes.

### **Atividade Antioxidante**

Uma das principais utilizações industriais, farmacêuticas, cosméticas e alimentícias de óleos voláteis e seus componentes está relacionada à sua capacidade antioxidante. Os radicais livres são espécies instáveis e altamente reativas. Sua produção está relacionada à fumaça, óxidos de nitrogênio, metais



pesados, solventes orgânicos, halogenados, pesticidas, metabolismo oxidativo, exposição à luz UV, febre, infecções e inclusive a prática de esportes e a própria respiração, e que, no organismo, atacam preferencialmente DNA/RNA, proteínas e ácidos graxos poli-insaturados. Todos os organismos possuem sistemas enzimáticos e não-enzimáticos que os protegem desses radicais livres e quando há um desbalanço entre a produção e neutralização dos radicais, com mais oxidantes do que antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio mais comuns são os radicais superóxido, hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Entretanto, espécies reativas de nitrogênio e de enxofre também ocorrem. Os antioxidantes mais conhecidos e mais comumente utilizados são a vitamina C (ácido ascórbico), a vitamina E (e seu derivado hidrofílico trolox), o  $\beta$ -caroteno o hidroxianisol butilado (BHA) e o hidroxitolueno butilado (BHT) (HALLIWELL, 2012; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre têm sido relacionados a muitas doenças severas, como câncer, doenças cardiovasculares, incluindo aterosclerose e infarto, desordens neurológicas, renais, hepáticas, hipertensão, artrite reumatóide, doenças autoimunes, inflamação, desordens degenerativas associadas com o envelhecimento, diabetes mellitus e suas complicações, cataratas, obesidade, autismo, doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington, vasculite, glomerulonefrite, lúpus eritematoso, úlceras gástricas, hemocromatose e pré-eclâmpsia, entre outras. Entretanto, o papel dos antioxidantes, nutricionais ou não, *in vivo*, sobre essas doenças é controverso, as quantidades e fontes ideais não estão estabelecidas e, além disso, o uso de pró-oxidantes, que também pode ser eventualmente benéfico em baixas quantidades por estimular os sistemas antioxidantes enzimáticos endógenos não foi suficientemente estudado. Por outro lado, muitos dos antioxidantes naturais estudados podem, sob determinadas condições, agir como pró-oxidantes moderados (HALLIWELL, 2012; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

Foi demonstrada a atividade antioxidante de óleos voláteis e de seus principais componentes, como o éter 1,8-cineol, em ensaios com DPPH, às vezes com atividade comparável a das substâncias de referência em *Myrtus communis* (mirtaceae), *Mentha aquatica* (Lamiaceae) (YADEGARINIA et al.,

2006), *M. communis* (MIMICA-DUKIC et al., 2003). Muitas espécies do gênero *Thymus* (Lamiaceae), cujo óleo volátil continha 1,8-cineol, *p*-cimeno, carvacrol e timol entre os compostos majoritários também exerceram atividade antioxidante (MIGUEL et al., 2004; VARDAR-ÜNLÜ et al., 2003; DORMAN e DEANS, 2004; TEPE et al., 2004; CHIZZOLA et al., 2008; HAZZIT et al., 2006), assim como espécies do gênero *Artemisia* (Asteraceae) contendo 1,8-cineol, cânfora, *p*-cimeno,  $\alpha$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol (MASOTTI et al., 2003; BURITS et al., 2001).

Considerando as dificuldades de comparação dos resultados dos ensaios de atividade antioxidante com diferentes metodologias e realizados por diferentes grupos de pesquisa com diferentes controles positivos, ANTHONY e colaboradores (2012) realizaram a avaliação do potencial antioxidante de 423 amostras de óleos voláteis de 48 famílias botânicas. O método utilizado foi o de sequestro de radicais livres por DPPH, na dose de 1,25 mg/mL. De todas as amostras testadas, apenas 73 apresentaram inibição do radical DPPH em ou acima de 50%. Para todos esses foi determinada a  $CI_{50}$ . Óleos voláteis com  $CI_{50}$  menor do que 300  $\mu$ g/mL foram avaliados pelo método do  $\beta$ -caroteno e cromatografia para melhor caracterização. Óleos voláteis das famílias Frankincensea (Burseraceae), Lamiaceae, Lauraceae, Fabaceae, Magnoliaceae, Myrtaceae, Scrophulariaceae e Zingiberaceae foram os mais ativos; Annonaceae, Apiaceae, Asteraceae, Burseraceae, Cucurbitaceae, Cupressaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Poaceae, Ranunculaceae, Rosaceae, Rubiaceae, Schisandraceae, Solanaceae, Thymelaeaceae e Valerianaceae foram moderadamente ativos; Acoraceae, Alliaceae, Anacardiaceae, Betulaceae, Burseraceae, Canellaceae, Cannabaceae, Cistaceae, Clusiaceae, Cyperaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Meliaceae, Onagraceae, Pinaceae, Rutacea, Santalaceae, Verbenaceae e Vitaceae foram inativos ou fracamente ativos. Dentre os 20 mais ativos destaca-se a presença de timol, carvacrol, linalol e geraniol no óleo volátil das Lamiaceae, eugenol no óleo volátil das Myrtaceae (ANTHONY et al., 2012). Não é fornecida a lista ou composição dos óleos com baixa atividade antioxidante, o que certamente compromete o propósito comparativo do trabalho.

WOJTUNIK e colaboradores (2014) realizaram um estudo de relação estrutura-atividade antioxidante de monoterpenoides frente ao DPPH em diversos solventes. Seus resultados indicam que, em metanol, monoterpenoides desprovidos de ligações duplas ou com apenas uma ligação dupla não apresentam atividade antioxidante ou apresentaram atividade muito fraca ( $\alpha$ -pineno, 1,8-cineol, mentol, mentona, e terpinen-4-ol); substâncias com duas duplas ligações conjugadas exerceram atividade antioxidante forte e rápida (citrал, carvona, mirceno,  $\gamma$ -terpineno e pulegona), exceto  $\alpha$ -terpineno e  $\alpha$ -felandreno, onde a disposição das duplas ligações parece não favorecer a atividade antioxidante e o equilíbrio é mais lento, ou a atividade é menor, respectivamente. Quando um anel aromático é formado, a atividade antioxidante desaparece (*p*-cimeno) e quando um oxigênio é introduzido, a atividade retorna forte e com equilíbrio rápido como em compostos com duas ligações duplas conjugadas. Os autores acreditam que esse padrão de atividade antioxidante seja explicado pela capacidade que os dienos conjugados têm de perder hidrogênios alílicos, estabilizando assim o radical livre, e se estabilizando por ressonância ao deslocalizar a carga elétrica. Além disso, no mesmo trabalho é avaliada a influência do solvente: metanol, 2-butanona, clorofórmio, acetato de etila e *n*-heptano foram avaliados. A atividade antioxidante do  $\alpha$ -pineno, por exemplo, varia de 20% em metanol a 95% em *n*-heptano. O fato de o  $\alpha$ -pineno possuir apenas uma ligação dupla indica que outros mecanismos são necessários para explicar sua atividade em meio apolar. De modo geral, esses resultados são um pouco diferentes dos obtidos por RUBERTO e BARATTA (2000) que realizaram uma avaliação ampla da atividade antioxidante de componentes isolados de óleos voláteis em modelos de peroxidação lipídica (TBARS e peróxidos). Apesar de estes autores terem igualmente observado atividade mais elevada para timol e carvacrol, seus valores relativos para carvona, pulegona, mirceno e citral são bem menores, enquanto os valores para *p*-cimeno são bem maiores do que os observados por WOJTUNIK e colaboradores (2014). Isso confirma a ideia de que a grande quantidade de metodologias existentes para análise de atividade antioxidante dificulta a interpretação e comparação dos resultados. Por outro lado, os resultados de uma única metodologia não devem ser considerados como definitivos e a atividade

antioxidante de uma determinada substância deve levar em conta todos os diferentes mecanismos de atuação possíveis e metodologias disponíveis para testá-los.

### **Atividade Antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana de óleos voláteis, assim como a de seus componentes isolados, tem sido extensivamente avaliada contra patógenos humanos e alimentares e tem sido geralmente atribuída as suas características hidrofóbicas, que fazem com que eles se acumulem nas membranas celulares dos micro-organismos, alterando a permeabilidade das mesmas.

A atividade do timol frente a *Salmonella typhimurium* (*Salmonella enterica* entérica sorovar Typhimurium), um bacilo Gram-negativo, por exemplo, foi avaliada tanto em meio de cultura quanto em macrófagos murinos experimentalmente infectados. A concentração inibitória mínima (CIM) para *S. typhimurium* em meio de cultura foi de 750 mg/L. O timol age através da interação com a membrana citoplasmática da *Salmonella sp.*, tornando-a permeável e possibilitando o extravasamento de conteúdo intercelular, especialmente de potássio e ácidos nucleicos. Além disso, macrófagos infectados tratados com 30 mg/L de timol tiveram desempenho significativamente melhor na eliminação desse patógeno e apresentaram sinais indicativos de menor estresse oxidativo, quando comparados com o controle negativo. Estes dois dados são muito relevantes quando se considera que os macrófagos costumam matar os patógenos fagocitados ao criar um meio intracelular extremamente oxidativo, e que a *Salmonella sp.*, ao se abrigar dentro de macrófagos, consegue simultaneamente evitar antibióticos que tenham dificuldade de atravessar membranas celulares, e ainda criar mecanismos de escape ao ataque oxidativo, obrigando o macrófago a criar um meio oxidativo persistente que o leva à própria morte (CHAUHAN e KANG, 2014).

Mecanismo semelhante sobre a membrana celular foi observado por DIAO e colaboradores (2014) ao testar a atividade antimicrobiana do óleo de funcho (*Foeniculum vulgare*), composto majoritariamente de *trans*-anetol e estragol, contra diversos patógenos Gram-positivos e Gram-negativos

causadores de intoxicações alimentares (*Staphylococcus albus*, *Bacillus subtilis*, *S. thyphimurium*, *S. dysenteriae*, *Escherichia coli*). Com CIMs e CBMs variando de 0,125 a 0,5 mg/mL, esse estudo indica a possibilidade da utilização do óleo como conservante alimentar.

DORMAN e DEANS (2004) também avaliaram diversas especiarias: pimenta-do-reino (*Pipiper nigrum*), cravo (*Syzygium aromaticum*), noz-moscada (*Myristica fragrans*), orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) contra patógenos animais, vegetais e alimentares, determinando que a atividade foi mais ampla para tomilho, seguido de orégano, cravo, noz-moscada e pimenta-do-reino. Componentes isolados dos óleos também foram testados e o espectro de atividade foi maior para timol, seguido de carvacrol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, eugenol, (+)-linalol, tujona,  $\delta$ -3-careno, citral, nerol, geraniol, mentona,  $\beta$ -pineno, (+)-limoneno,  $\alpha$ -pineno,  $\alpha$ -terpineno, borneol, (+)-sabineno,  $\gamma$ -terpineno, citronelal, terpinoleno, 1,8-cineol, acetato de bornila, carvacrol metil éter, mirceno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -ocimeno, aromadendreno e *p*-cimeno, nessa ordem. Dessas atividades depreende-se que fenóis são bastante ativos e a posição da hidroxila no timol favorece sua atividade em relação ao carvacrol. A metilação do fenol, por outro lado, diminui sua atividade. Alcoóis também tem atividade bactericida. Citral foi menos ativo do que citronelal, contrariando a expectativa de que as duplas conjugadas ativem a carbonila e favoreçam a atividade.

OJEDA-SANA e colaboradores (2013) testaram a atividade antimicrobiana do óleo volátil de duas variedades de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Seus resultados indicam que a presença de  $\alpha$ -pineno está correlacionada com a atividade antibacteriana do óleo volátil rico nesse monoterprenoide, pois a CIM do óleo e do  $\alpha$ -pineno são muito parecidas. Entretanto, a outra variedade, rica em mirceno, 1,8-cineol e cânfora teve atividade contra alguns dos micro-organismos, com CIM que não pode ser explicada pela atividade de seus componentes majoritários isoladamente, mas pela ação sinérgica deles. Ainda, os autores verificaram que ao contrário do  $\alpha$ -pineno, o 1,8-cineol altera significativamente a permeabilidade da membrana de

*E. coli* (Gram-negativa) já na CIM de 8 µL/mL, podendo ser considerado bactericida.

O trabalho de De SOUSA e colaboradores (2012) ilustra esse aspecto do sinergismo na atividade bactericida de óleos voláteis ao testar carvacrol e 1,8-cineol (principais componentes dos óleos de orégano e alecrim) contra *Pseudomonas fluorescens*, uma bactéria Gram-negativa que deteriora alimentos minimamente processados, mesmo sob refrigeração. Os autores cultivaram a bactéria com 2,5 µL/mL de carvacrol e 10 µL/mL de 1,8-cineol (CIM) isoladamente. Nessas concentrações carvacrol e 1,8-cineol são bactericidas em 15 minutos. Entretanto, as mesmas substâncias aplicadas em conjunto possuem atividade bactericida já em 1/8 CIM, 0,3 e 1,25 µL/mL, respectivamente.

Mecanismo semelhante foi proposto para a atividade antifúngica do óleo volátil do *Anethum graveolens* (endro) contra *Candida albicans*. O óleo, composto majoritariamente de carvona, limoneno e apiol, primeiramente desestabilizou a membrana da levedura, diminuindo seu conteúdo de ergosterol, e posteriormente alterou o potencial de membrana mitocondrial, inibiu as desidrogenases e aumentou a concentração de ROS, levando finalmente à morte da levedura, com CIM de 0,625 e CFM (concentração fungicida mínima) de 1,25 µL/mL, mesmo em isolados resistentes ao fluconazol (CHEN et al., 2013).

### **2.3.6 Família Asteraceae e o gênero *Eupatorium***

#### **2.3.6.1 Aspectos taxonômicos**

Durante a última década a utilização de técnicas moleculares (DNA) para fins taxonômicos promoveu muitas alterações no entendimento das relações evolutivas entre os diversos táxons no reino vegetal, especialmente no grupo das angiospermas. Os trabalhos sucessivos do grupo de filogenia de angiospermas (APG) reorganizaram os níveis familiar e ordinal das plantas com flores. Asteraceae Brecht. & J. Presl. pertence à Ordem Asterales, agora no clado Campanulídeas (Campanulids) ou Euasterids II, das Euasterídeas (HASTON et

al., 2009). No nível infrafamiliar também muitos grupos foram reestruturados. A família Asteraceae, antes era composta por apenas 3 subfamílias (Barnadesioideae, Asteroideae e Chicoroideae) e 16 tribos, das quais a tribo Mutisieae de Chicoroideae formava um grupo muito heterogêneo (BREMER e KÁRE, 1994). A revisão dessa tribo em nível genético levou ao desmembramento da mesma, originando assim novas tribos que foram elevadas ao *status* subfamiliar.

Nas propostas mais recentes de reestruturação, Asteraceae está dividida em 13 subfamílias, distribuídas em 43 tribos (PANERO e FUNK, 2008; PANERO et al, 2014). Dentre estas 13 subfamílias, Asteroideae, a família que abriga o gênero *Eupatorium*, anteriormente era composta por 11 tribos, agora agrupa 20, conforme Esquema 2.24 e Tabela 2.1. Grande parte dos novos acréscimos é devida à separação de grupos em Heliantheae e Helenieae, que foram elevados ao status tribal e, juntamente com Eupatorieae, formam o grupo monofilético Helianthoide. Eupatorieae, entretanto, até esse momento recebeu pouca atenção nesse novo campo de pesquisa e as relações entre os mais de 180 gêneros que a compõem, bem como entre as subtribos propostas por KING e ROBSON (1987) ainda aguardam confirmação em nível genético.

Esquema 2.24: Localização da tribo Eupatorieae na Família Asteraceae (Adapatado de PANERO et al, 2014).

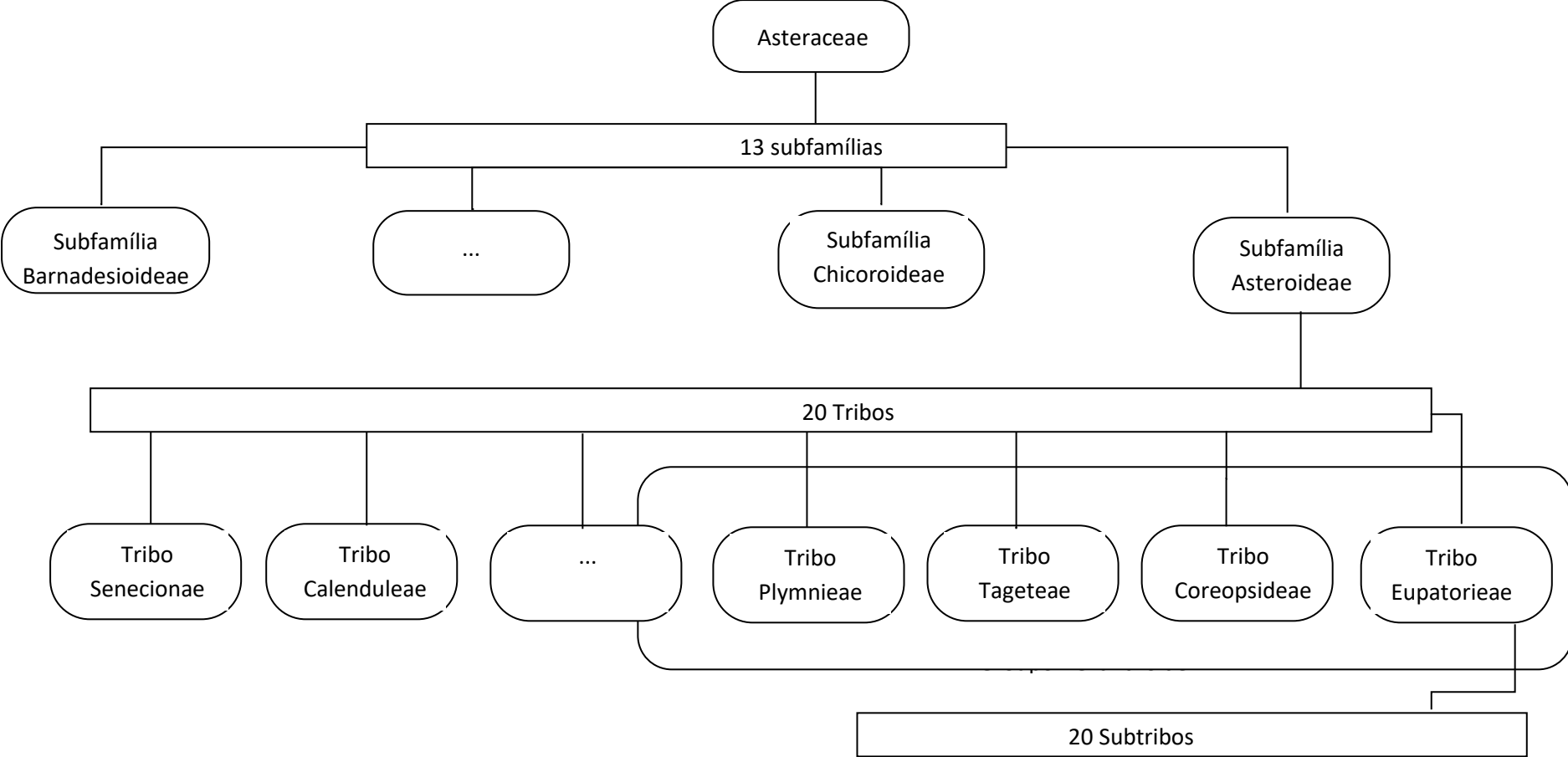




Tabela 2.1: Tribos da subfamília Asteroideae:

Tribo	Gêneros	Nº de espécies	Distribuição
Senecioneae	150	3000	Global
Calenduleae	12	120	+ Sul da África
Gnaphalieae	185	1240	Global
Astereae	222	3100	Global
Anthemideae	111	1800	+ Velho Mundo
Inuleae	66	687	+ Eurásia e Leste e Sul da África
Athroismeae	5	59	+ Paleotrópicos
Feddeae	1	1	Cuba
(Grupo Helianthoide)	477	5600	Global
Bahieae	20	83	+ América do Norte e México
Chaenactideae	3	29	América do Norte e México
Helenieae	13	120	Novo Mundo
Heliantheae	113	1500	+ pantropical
Madieae	36	200	+ América do Norte e México
Millerieae	34	400	+ Novo Mundo
Neurolaeneae	5	150	+ Trópicos do Novo Mundo
Perityleae	7	84	+ América do Norte e México
Polymnieae	1	3	América do Norte
Tageteae	32	270	+ América do Norte e México
Coreopsideae	30	550	Global
Eupatorieae	182	2200	+ Novo Mundo

Adaptado de Pelsner e Watson (2009).

Em se tratando de número de espécies, Eupatorieae, a tribo que abriga o gênero *Eupatorium*, é uma das maiores da subfamília Asteroideae. Em algumas classificações, o gênero *Eupatorium* perfaz mais de um terço delas, chegando a conter até 1200 espécies. Entretanto, em uma série de trabalhos utilizando características microanatômicas, KING e ROBINSON (1987) reestruturaram a tribo em nível genérico, agrupando as espécies em mais de 170 gêneros, dos quais aproximadamente 100 foram criados por esses autores. A grande maioria das espécies anteriormente em *Eupatorium* foram alocadas em outros gêneros pré-existentes na tribo, ou deram origem a gêneros novos, muitas vezes monotípicos, restando ao final no gênero *Eupatorium* apenas 44 espécies, todas com distribuição na América do Norte-Eurásia (arcto-terciária); todas as espécies de *Eupatorium* nativas da América do Sul foram todas alocadas em outros gêneros. Esses novos gêneros foram então agrupados em 16 subtribos,

conforme Tabela 2.2 e Esquema 2.25, ficando as espécies anteriormente congêneres em *Eupatorium*, agora não apenas em gêneros, mas também em subtribos diferentes, sem relação filogenética aparente. Na tabela 2.2 estão representadas apenas as espécies e gêneros que ocorrem no território do estado do Rio Grande do Sul. Entre parênteses estão anotados o número de espécies no Rio Grande do Sul e o total de espécies no gênero. Nenhuma das espécies ocorrentes no estado foi mantida no gênero *Eupatorium* na classificação de King e Robinson.

Tabela 2.2: Subtribos da tribo Eupatorieae:

<b>Subtribo</b>	<b>Gênero</b>
Oaxacaniinae	
Hofmeisteriinae	
Neomirandeiinae	
Trichocoroninae	
<b>Oxylobinae</b>	<i>Kaunia</i> (1/14)
Piqueriinae	
Mikaniinae	
Hebecliniinae	
Alomiinae	
<b>Ayapaninae</b>	<i>Heterocondylus</i> (1/15)
Adenostemmatinae	
<b>Critoniinae</b>	<i>Koanophyllon</i> (1/132), <i>Malmeanthus</i> (1/3), <i>Neocabreria</i> (1/6)
Fleischmanniinae	
Ageratinae	
<b>Gyptidinae</b>	<i>Barrosoa</i> (2/13), <i>Campuloclinium</i> (2/25), <i>Urolepis</i> (1/1), <i>Vittetia</i> (1/2), <i>Gyptis</i> (1/8)
<b>Disynaphiinae</b>	<i>Acanthostyles</i> (1/2), <i>Raulinoreitzia</i> (2/3), <i>Campovassouria</i> (1/3), <i>Disynaphia</i> (5/17), <i>Grazielia</i> (5/13), <i>Symphypappus</i> (4/20)
Liatrinae	
<b>Praxelinae</b>	<i>Chromolaena</i> (12/190), <i>Praxelis</i> (1/21)
<b>Eupatoriinae</b>	<i>Austroeupatorium</i> (3/19), <i>Hatschbachiella</i> (1/2), <i>Stomatanthes</i> (1/15)

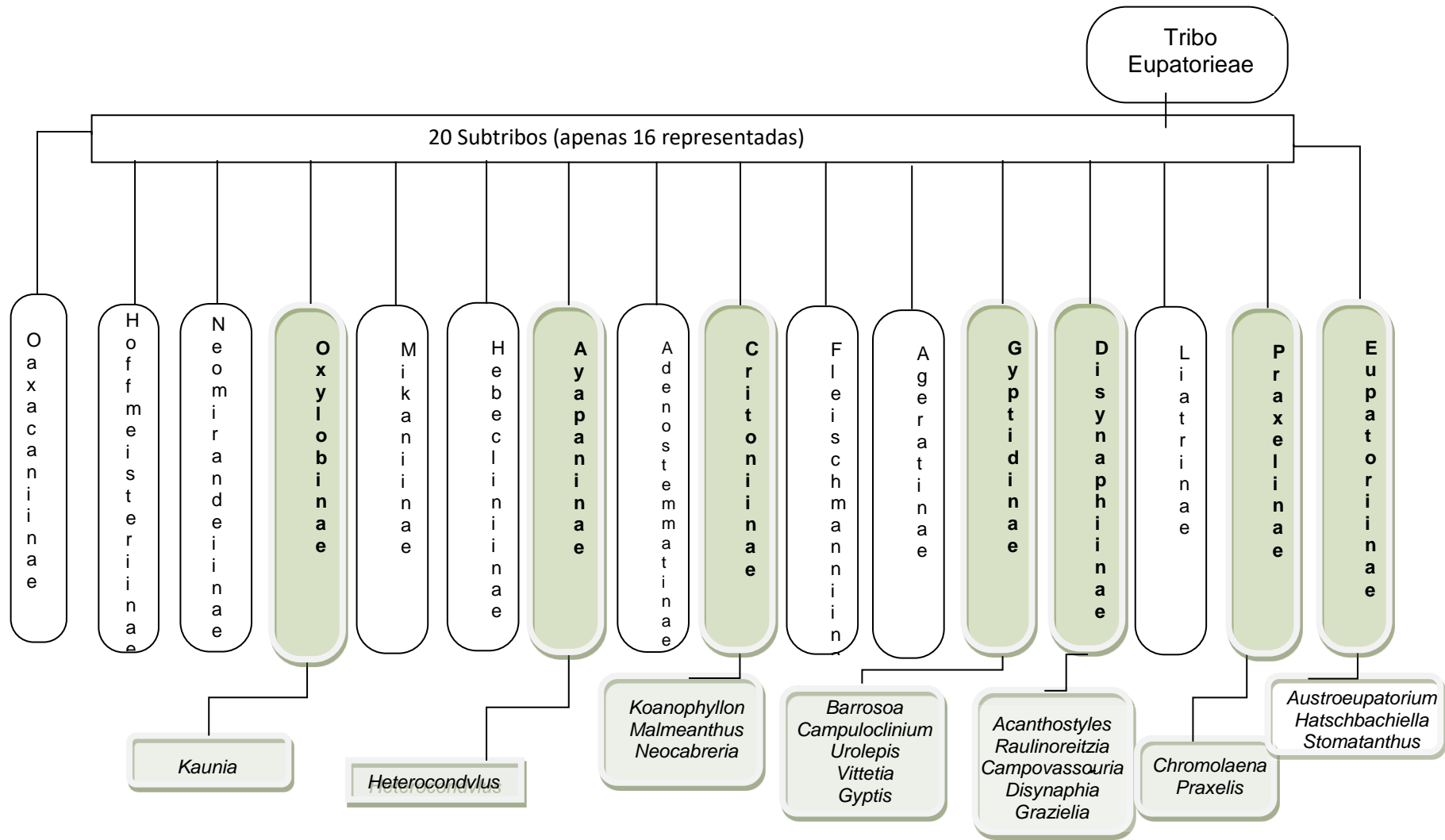
Subtribos e gêneros para os quais as espécies de *Eupatorium* descritas para o Estado do Rio Grande do Sul foram realocadas. Para cada gênero são indicados o número de espécies ocorrentes no Estado (em negrito) em relação ao número total de espécies descritas para o gênero. Apenas os gêneros representados no Estado constam nesta tabela.

Contudo, essa nova nomenclatura nunca foi completamente adotada pelos sinanterologistas e a antiga classificação utilizando *Eupatorium* em senso lato ainda é muitas vezes aceita. A contribuição da análise de DNA poderia ajudar a esclarecer a questão, como tem sido feito em outros grupos da família Asteraceae, mas até o momento apenas a relação das 44 espécies do núcleo de

*Eupatorium* entre si e com as 5 espécies de *Eupatoriadelphus*, que representam a separação mais controversa do gênero, foi avaliada. As análises comprovam a relação das espécies de *Eupatorium* da América do Norte entre si, formando um grupo com as espécies eurasiáticas. A divergência em relação a *Eupatoriadelphus* foi comprovada nesses estudos, bem como em relação a várias outras espécies, gêneros e subtribos de Eupatorieae utilizados como controles (*Austroeupatorium*, *Fleischmania*, *Chromolaena*) (ITO et al., 2000a, SCHILLING, 2011). Esses primeiros resultados genéticos parecem confirmar a visão de KING e ROBSON (1987) de *Eupatorium* completamente fragmentado, entretanto, uma análise mais completa da tribo ainda é necessária. Além disso, mesmo que confirmem a fragmentação de *Eupatorium*, estes primeiros resultados apontam para graves inconsistências nas propostas supragenéricas de KING e ROBINSON (1987), evidenciando a artificialidade da subtribo Eupatoriinae (*Eupatorium*, *Austroeupatorium*, *Hatschbachiella*), por exemplo. Esse resultado, entretanto, indica que os *Austroeupatorium* da América do Sul podem ser ainda mais distantes filogeneticamente de *Eupatorium* sensu KING e ROBINSON do que os próprios autores haviam suspeitado quando os retiraram desse gênero (ITO et al., 2000a, 2000b), SCHMIDT e SCHILLING, 2000; SCHILLING, 2011).

Os gêneros novos ou reabilitados para os quais foram transferidas as espécies que ocorrem especificamente no Rio Grande do Sul foram *Austroeupatorium*, *Stomathantes*, *Hatchbachiella*, *Heterocondylus*, *Neocabreria*, *Chromolaena*, *Barrosoa*, *Raulinoreitzia*, *Acanthostyles*, *Graziella*, *Dimorpholepis*, *Disynaphia*, *Campovassouria*, *Malmeanthus*, *Vittetia*, *Kaunia*, *Koanophyllon* e *Urolepis* (MATZENBACHER, 1979; KING e ROBINSON, 1987). A posição tribal destes gêneros, segundo KING e ROBINSON, está indicada na Tabela 2.2, bem como o número de espécies de ocorrência no Rio Grande do Sul que foram alocadas em cada um destes gêneros e o número total de espécies nos mesmos. Alguns desses gêneros novos são formados só por espécies retiradas de *Eupatorium*, outros contêm espécies anteriormente alocadas em outros táxons. Alguns gêneros, ao contrário, não são novos, mas passaram a abrigar as espécies antigas e as oriundas de *Eupatorium*.

Esquema 2.25: Novos gêneros e subtribos das espécies nativas de *Eupatorium* (*sensu lato*) no sistema King & Robonsion (1997).



Baseando-se nos diferentes esquemas de classificação as espécies incluídas neste trabalho foram:

MATZENBACHER (1979)	CABRERA e KLEIN (1989)	KING e ROBINSON (1987)
1 <i>E. inulifolium</i> Kunth	<i>E. laevigatum</i> Lam.	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M.King & H.Rob.
3 <i>E. picturatum</i> Malme	<i>E. picturatum</i> Malme	<i>Austroeupatorium picturatum</i> (Malme) R.M.King & H.Rob.
2 <i>E. polystachyum</i> DC.	<i>E. polystachyum</i> DC.	<i>Raulinoreitzia crenulata</i> (Sprengel) R.M.King & H.Rob.
4 <i>E. tremulum</i> Hook. & Arn.	<i>E. tremulum</i> Hook. & Arn.	<i>Raulinoreitzia tremula</i> (Hook. & Arn. ) R.M.King & H.Rob.
5 <i>E. ivifolium</i> L.	<i>E. ivifolium</i> L.	<i>Chromolaena ivifolia</i> (L.) R.M.King & H.Rob.
6 <i>E. laevigatum</i> Lam.	<i>E. laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M.King & H.Rob.
7 <i>E. casarettoi</i> (B.L.Rob.) Steyerm.	<i>S. casarettoi</i> (B.L.Rob.) Steyerm.	<i>Symphypappus casarettoi</i> B.L.Rob.
8 <i>E. itatiayense</i> Hieron.	<i>S. itatiayensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.	<i>Symphypappus itatiayensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.
9 <i>E. gaudichaudianum</i> DC.	<i>E. gaudichaudianum</i> DC.	<i>Grazielia gaudichaudeana</i> (DC.) R.M.King & H.Rob.

Em virtude de o trabalho de MATZENBACHER (1979) ter sido a última revisão de *Eupatorium* no Rio Grande do Sul, adotaremos a sua divisão do gênero neste trabalho. Em sua revisão a seguinte descrição é apresentada para o gênero *Eupatorium*:

“*Ervas, subarbustos ou arbustos, raras vezes sub-arborescentes, perenes ou anuais. Folhas opostas (com menor freqüência são alternas), sésseis ou pecioladas, denteadas a profundamente lobuladas. Capítulos de tamanho variável, dispostos em cimeiras corimbiformes, em panículas ou solitários. Invólucro cilíndrico, campanulado ou hemisférico; brácteas involucrais em várias séries, espiraladas, apertadamente ou frouxamente imbricadas, as exteriores gradualmente menores, às vezes alongadas, subuladas ou todas mais ou menos do mesmo tamanho. Receptáculo plano, convexo, cônico-ovalado ou cônico, glabro ou coberto por cerdas curtas (piloso). Flores 5 a numerosas, alvas, rosadas, lilases, violáceas, roxas, purpúreas ou azuis; isomorfas, hermafroditas, corola tubulosa com limbo penta-denteado ou penta-lobado. Anteras obtusas na base, com apêndices conetivais ovalados. Ramos do estilete lineares ou clavados, obtusos no ápice, densa e curtamente papilosos ou às vezes com papilas alongadas. Aquênios com 5 ângulos bem marcados, raramente 6 ou 7, truncados no ápice, com ou sem carpopódio. Pápus formado por numerosos pêlos ou cerdas rígidas, curtamente barbeladas, dispostas em uma só série.*” (MATZENBACHER, 1979, p.54).

### Revisão química e biológica

O óleo volátil de espécies de *Eupatorium* pode apresentar cromenos, cumarinas e compostos relacionados, como os benzofuranos, além de mono e sesquiterpenoides (KING e ROBINSON, 1987). Também são encontrados alguns terpenos raros, como ésteres de longipineno (HERZ, 2001) e derivados do timol. De *E. fortunei*, espécie comum no Japão, foram isolados e caracterizados 16 derivados do timol, compostos que também são encontrados em *E. cannabinum* e em *E. adenophorum* (DING et al., 1999; TORI et al., 2001; PAOLINI et al., 2005).

Entre os sesquiterpenoides são característicos os do grupo cadinano, sendo o principal composto responsável pela elevada toxicidade de *E. adenophorum* o 9-oxo-10,11-deidroageraforano (SANI et al., 1992; BHARDWAJ et al., 2001). O ácido cóstico, também um composto de núcleo cadinano, isolado de *E. capillifolium* apresenta atividade antibacteriana (SHARMA et al., 1998). Ainda são de interesse, apesar de bastante raros, os sesquiterpenoides tricíclicos de núcleo isocomano, silfinano, silfiperfolano e modfano relatados em *E. cannabinum* e *E. albicaule* (HERZ, 2004; PAOLINI et al., 2005). Outros sesquiterpenoides como nerolidol,  $\alpha$ -curcumeno,  $\alpha$ -zengibereno, germacreno D, germacreno B,  $\alpha$ - e  $\beta$ -cubebeno,  $\delta$ -cadineno,  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno e seu derivado, óxido de cariofileno, foram relatados em muitas espécies de *Eupatorium* (BOHLMANN et al., 1982; BAILAC et al., 2000; ALBUQUERQUE et al., 2001; ALBUQUERQUE et al., 2004; HERZ, 2004; PAOLINI et al., 2005).

Benzofuranos e diidrobenzofuranos são particularmente representados em *E. acuminatum*, *E. bishopii*, *E. rimbachii*, *E. kuntzei*, *E. glutinosum*, *E. heptanthum*, *E. chachapoyense*, *E. axilliflorum*, *E. piquerioides*, *E. cannabinum*, *E. purpureum*, *E. fistulosum* e *E. corumbense* (De GUTIERREZ et al., 2001; HERZ, 2001; HERZ, 2004). Os cromenos foram encontrados em *E. piquerioides*, *E. heptanthum*, *E. axilliflorum*, *E. chilca*, *E. chinense*, *E. fortunei*, *E. africanum*, *E. chapareense*, *E. inulifolium*, *E. lancifolium*, *E. toppingianum* e em *E. corumbense* (HERZ, 2001; HERZ, 2004). O composto 2,2-dimetil-6-vinilcroman-4-ona, isolado de *E. betonicaeforme* apresentou atividade larvicida contra *Aedes aegypti* L. (Diptera) (ALBUQUERQUE et al., 2004) e o metilripariocromeno, isolado das raízes de *E.*

*riparium*, apresentou ação antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* (SHARMA et al., 1998).

O óleo volátil de *E. patens* apresentou atividade virucida contra HVS-1 (*Herpes simplex*) e DEN-2 (vírus da dengue) (GARCIA et al., 2003). O óleo volátil obtido de outras espécies foi avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana. Para *E. odoratum* foi evidenciada atividade contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Enquanto o óleo de *E. triplinerve* apresentou atividade contra *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus anthracis*, *B. subtilis*, *Salmonella stanley*, *S. pullorum*, *S. richmond* e *Staphylococcus aureus* (SHARMA et al., 1998). O óleo volátil das espécies *E. odoratum* e *E. conyzoides* foi avaliado como um agente para o controle de pragas em armazéns de grãos por sua atividade inseticida (BOUDA et al., 2001). De *E. rufescens* foram isolados e caracterizados dois peróxidos sesquiterpênicos, zengibereno-3,6- $\alpha$ -endoperóxido e zengibereno-3,6- $\beta$ -endoperóxido, ambos com atividade esquizotóxica contra *Plasmodium falciparum* (RÜCKER et al., 1996).

A Tabela 2.3 a seguir traz um apanhado geral dos compostos majoritários no óleo volátil ou isolados de extratos de espécies de *Eupatorium* (*lato sensu*), incluindo a sinonímia das espécies segundo KING e ROBINSON (1987) e a tribo a que pertencem na sequência filogenética proposta por ROBINSON e colaboradores (2009).

Tabela 2.3: Componentes do óleo volátil ou isolados de extratos de espécies de *Eupatorium*.

	Eupatorium	Sinonímia	NT	MH	MO	SH	SO	REF
NEO	<i>Eupatorium angulare</i> B.L. Rob.	<i>Neomirandea angularis</i> (B.L. Rob.) R.M. King & H. Rob.				germacrene D (83.2 %) β-selinene (10.5 %)		WASHINGTON et al. (2010)
OXY	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	<i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.				γ-cadineno germacreno-D γ-elemeno		KUNDU et al., (2013)
OXY	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	<i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.				cadinan-3-en-2,7-diona 7-hydroxycadinan-3-en-2-ona 5,6-diidroxicadinan-3-en-2,7-diona cadinan-3,6-dien-2,7-diona 2-acetyl-cadinan-3,6-dien-7-ona		KUNDU et al. (2013)
OXY	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	<i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.		α-felandreno 1,5–9,6% canfeno ≤0,1–8,9%	acetate de bornila 7,6–15,9% p-cimeno 0,1–16,6%		amorfa-4-en-7-ol 5,8–17,7% 3-acetoxiamorfa-4,7(11)-dien-8-ona 0,3–16,3% α-bisabolol 1,7–7,8% α-cadinol 0,–6,2% amorfa-4,7(11)-dien-8-ona 3,2–5,7%	PADALIA et al. (2009)
OXY	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	<i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.					9-oxo-10,11-deidroageraforona (euptox A)	LIAO et al. (2014)
OXY	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	<i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.		p-cimeno 11,6%				PALÁ-PAÚL et al (2002)



OXY	<i>Eupatorium adenophorum</i> Spreng.	<i>Ageratina adenophora</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.			ácido (1 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )-8-hidroxi-2-careno-10-oico ácido (1 $\alpha$ ,6 $\alpha$ )-10-hidróxi-3-careno-2-ona ácido (-)-isochamínico			XU et al. (2014)
OXY	<i>Eupatorium aschenbornianum</i> S. Schauer	<i>Ageratina aschenborniana</i> (S. Schauer) R.M. King & H. Rob.	Eupatoriocromeno B, C, e outros cromenos					GOMEZ et al. (1982)*
OXY	<i>Eupatorium aschenbornianum</i> S. Schauer	<i>Ageratina aschenborniana</i> (S. Schauer) R.M. King & H. Rob.	Encecanescina (dímero cromeno)					SÁNCHEZ-MENDOZA et al. (2010)
OXY	<i>Eupatorium sternbergianum</i> DC.	<i>Ageratina sternbergiana</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.	Benzofuranos (eupatarone) precoceno II,				espatulenol	GONZALEZ et al. (1982)
OXY	<i>Eupatorium glechonophyllum</i> Less.	<i>Ageratina glechonophylla</i> (Less.) R.M. King & H. Rob.			8,9-diidroxi-10-acetóxitimolisobutirato 8,9,10-triidroxitimol			MONACHE et al. (1984)
OXY	<i>Eupatorium rufescens</i> P.W. Lund ex DC.	<i>Kaunia rufescens</i> (P.W. Lund ex DC.) R.M. King & H. Rob.	ácido hexadecanóico 0-12% heptacosano 0-8%			$\beta$ -cariofileno 4-41% $\alpha$ -humuleno 1-10% <i>cis</i> -cadina-1(6)-4-dieno 0-12% <i>ar</i> -curcumeno 0-11% $\alpha$ -zingibereno 16-17%		SOUZA (2007)
OXY	<i>Eupatorium rufescens</i> P.W. Lund ex DC.	<i>Kaunia rufescens</i> (P.W. Lund ex DC.) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 20-25% germacreno D 16-25% biciclogermacreno 28-33%	germacreno D-4-ol+espatulenol 2-7% óxido de cariofileno 1-5%	SOUZA (2007)
OXY	<i>Eupatorium rufescens</i> P.W. Lund ex DC.	<i>Kaunia rufescens</i> (P.W. Lund ex DC.) R.M. King & H. Rob.					zingiberene-3,6- $\beta$ -endoperóxido zingiberene-3,6- $\alpha$ -endoperóxido	RÜCKER et al. (1996)

ALO	<i>Eupatorium paniculatum</i> Mill.	<i>Brickellia paniculata</i> (Mill.) B.L. Rob.				$\beta$ -cariofileno 46,8%		MALA et al. (1999)
AYA	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M. King & H. Rob.			2,5-dimetoxi <i>p</i> -cimene 69,7%	$\beta$ -cariofileno 19,7%.		MALA et al. (1999)
AYA	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M. King & H. Rob.			dimetil timoidroquinona éter 80,3-86,9 %	$\beta$ -cariofileno 4-6 % $\beta$ -eudesmeno (6-10 %).		UNNIKRISH NAN et al. (2014)
AYA	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 14,7% $\delta$ -elemeno 5,9%	selina-4(15), 7(11)-dien-8-ona 36,6%	GUPTA et al (2004)
AYA	<i>Eupatorium triplinerve</i> Vahl	<i>Ayapana triplinervis</i> (Vahl) R.M. King & H. Rob.			dimetil timoidroquinona 89,9- 92,8%			GAUVIN-BIALECKI e MARODON (2008)
AYA	<i>Eupatorium grande</i> Sch. Bip. ex Baker	<i>Heterocondylus grandis</i> (Sch. Bip. ex Baker) R.M. King & H. Rob.				germacreno D 32-36% biclogermacreno 12-19% $\delta$ -cadineno 8-9%	$\alpha$ -muurolol 5-6% $\alpha$ -cadinol 8-9%	SOUZA (2007)
CRI	<i>Eupatorium villosum</i> Sw.	<i>Koanophyllon villosum</i> (Sw.) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno 11,3%		$\beta$ -cariofileno 17,0%	óxido de cariofileno 14,1%	PINO et al. (2005)
CRI	<i>Eupatorium consanguineum</i> DC.	<i>Koanophyllon consanguineum</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 15% germacreno D 22% $\alpha$ -zingibereno 13%	óxido de cariofileno 5%	SOUZA (2007)
CRI	<i>Eupatorium serrulatum</i> DC.	<i>Neocabreria serrulata</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 8% $\beta$ -pineno 12%		germacreno D 42% biclogermacreno 10%		SOUZA (2007)
CRI	<i>Eupatorium heptanthum</i>	<i>Ophryosporus heptanthus</i>	precoceno II 8%	santolinatrieno(~ 47% <i>p</i> -cimeno 4,8%				ARZE et al. (2004)

FLE	<i>Eupatorium pratense</i> Klatt	<i>Fleischmannia pratensis</i> (Klatt) R.M. King & H. Rob.				(E)- $\beta$ -cariofileno 26,1 % germacreno D 49,1 %		ROOKS et al. (2010)
GYP	<i>Eupatorium coelestinum</i> L.	<i>Conoclinium coelestinum</i> (L.) DC.	chavicol 97-45,2%	canfeno 0,3–11,9%	acetato de bornila 6,2–12,6%		<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol 5,2–10,9%	DUNG et al. (1998)
GYP	<i>Eupatorium coelestinum</i> L.	<i>Conoclinium coelestinum</i> (L.) DC.					5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoxi-4 $\alpha$ ,6 $\beta$ -diidroxiamorfan-2-ona 2 <i>R</i> *,3 <i>S</i> *-toxol-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo	HANG et al. (2011)
GYP	<i>Eupatorium betoniciforme</i> (DC.) Baker	Barrooa betoniciformis (DC.) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 29-47% germacreno D 16-26% biciclogermacreno 11-16%	(E)-nerolidol 5%	SOUZA (2007)
GYP	<i>Eupatorium macrocephalum</i> Less.	<i>Campuloclinium macrocephalum</i> (Less.) DC.	ácido hexadecanoico o 15% nonadecanal 4%				germacreno D-4-ol+espatulenol 17% óxido de cariofileno+globulol 16%	SOUZA (2007)
GYP	<i>Eupatorium macrocephalum</i> Less.	<i>Campuloclinium macrocephalum</i> (Less.) DC.	ácido hexadecanoico o 28% nonadecanal 30%					SOUZA (2007)
GYP	<i>Eupatorium macrocephalum</i> Less.	<i>Campuloclinium macrocephalum</i> (Less.) DC.	ácido hexadecanoico o 3-15%		acetato de geranila 10-11%	$\beta$ -cariofileno 12% germacreno D 12-16%	(E)-nerolidol 2-10% germacreno D-4-ol+espatulenol 10%	SOUZA (2007)
GYP	<i>Eupatorium purpurascens</i> Sch. Bip. ex Baker	<i>Campuloclinium purpurascens</i> (Sch. Bip. ex Baker) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 14% germacreno D 29% biciclogermacreno 15% $\delta$ -cadineno 5%		SOUZA (2007)

GYP	<i>Eupatorium hecatanthum</i> (DC.) Baker	<i>Urolepis hecatantha</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 6% germacreno D 38% biciclogermacreno 24%		SOUZA (2007)
GYP	<i>Eupatorium lanigerum</i> Hook. & Arn.	<i>Gyptis lanigera</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 4-14% germacreno D 11-13% biciclogermacreno 11-14%	espatulenol 8-24%	SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium buniifolium</i> Hook. ex Arn.	<i>Acanthostyles buniifolius</i> (Hook. ex Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 50,98% (+)-sabineno 7,45% limoneno 9,73% ocimeno 4,78%		$\beta$ -cariofileno 5,22%	espatulenol 4,93%	LANCELLE et al. (2009)
DIS	<i>Eupatorium buniifolium</i> Hook. ex Arn..	<i>Acanthostyles buniifolius</i> (Hook. ex Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 10%		$\beta$ -elemeno 5% $\beta$ -cariofileno 7% germacreno D 24% germacreno A 8% <i>trans</i> - $\beta$ -guaieno 22%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium spathulatum</i> Hook. & Arn.	<i>Disynaphia spathulata</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 7-12 $\beta$ -pineno 15-24% limoneno 12-13% ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno 2-13%		$\beta$ -cariofileno 7%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium spathulatum</i> Hook. & Arn.	<i>Disynaphia spathulata</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno 11%			espatulenol 23% $\alpha$ -cadinol 12%	SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium polystachyum</i> DC.	<i>Raulinoreitzia crenulata</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -tujeno 7% $\alpha$ -pineno 15% $\beta$ -pineno 19% limoneno 8%		$\beta$ -cariofileno 7% germacreno D 11% biciclogermacreno 10%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium polystachyum</i> DC.	<i>Raulinoreitzia crenulata</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno 10-15% mirceno 11-15% limoneno 21-23%		$\beta$ -cariofileno 10-15% germacreno D 7-9% biciclogermacreno 12-19%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium ligulaefolium</i> Hook. & Arn.	<i>Disynaphia ligulifolia</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno 5-9%		germacreno D 0-18% biciclogermacreno 0-11%	espatulenol 1-12% $\tau$ -cadinol+ $\tau$ -muurolol 8-13% $\alpha$ -cadinol 15-24%	SOUZA (2007)

DIS	<i>Eupatorium tremulum</i> Hook. & Arn.	<i>Raulinoreitzia tremula</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.				NI 10-12% β-bisaboleno 15-17% β-sesquifelandreno 7-8%	verbocidentafurano 12-16% epi-α-bisabolol 10-11% NI 4-15%	SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium ericoides</i> DC.	<i>Disynaphia ericoides</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.				β-elemeno 9% β-cariofileno 21% germacreno D 9% biciclogermacreno 15% germacreno A 5%	espatulenol 8%	SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium gaudichaudianum</i> DC.	<i>Grazielia gaudichaudeana</i> (DC.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis gaudichaudeana</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		α-tujeno 10% α-pineno 12% β-pineno 9% limoneno 37%		germacreno D 11% biciclogermacreno 8%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium gaudichaudianum</i> DC.	<i>Grazielia gaudichaudeana</i> (DC.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis gaudichaudeana</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 14-16% β-pineno 23-29% limoneno 18%			espatulenol 9-20%	SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium nummularium</i> Hook. & Arn.	<i>Grazielia nummularia</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis nummularia</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 3-8% β-pineno 10-20% limoneno 32-36%		germacreno D 10-26%		SOUZA (2007)

DIS	<i>Eupatorium serratum</i> Spreng.	<i>Grazielia serrata</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis serrata</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 17% β-pineno 17% mirceno 8% limoneno 10%		(E)-β-cariofileno 8% germacreno D 7% biciclogermacreno 17%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium serratum</i> Spreng.	<i>Grazielia serrata</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis serrata</i> (Spreng.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 30-32% β-pineno 14-17% mirceno 5% limoneno 19-21%		(E)-β-cariofileno 6%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium intermedium</i> DC.	<i>Grazielia intermedia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis intermedia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 16% β-pineno 17% mirceno 11% limoneno 20%		(E)-β-cariofileno 8% germacreno D 5% biciclogermacreno 9%		SOUZA (2007)
DIS	<i>Eupatorium intermedium</i> DC.	<i>Grazielia intermedia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob. <i>Dimorpholepis intermedia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 15-20% β-pineno 24% mirceno 4% limoneno 22-25%		(E)-β-cariofileno 7%		SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium chaseae</i> B.L. Rob.	<i>Chromolaena chaseae</i> (B.L. Rob.) R.M. King & H. Rob.					laevigatina verboccidentafurano	BOHLMAN N et al. (1982)
PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.				β-cariofileno 9,6% β-cubebeno 12,5% γ-elemenno 9,5% β-bisaboleno 6,6%	laevigatina 15,1%	DE OLIVEIRA et al. (1990)
PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.				germacreno D 11,66% Biciclogermacreno 9,33%	Levigatina 59,63%	SCHOSSLE R et al. (2009)

PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.				(E)- $\beta$ -cariofileno+cis- $\alpha$ -bergamoteno 6-9% $\alpha$ -santaleno 34-38%	laevigatina 12-25%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -elemeno 10% $\beta$ -bisaboleno 9%	levigatina 37%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.				germacreno D 25-39% biclogermacreno 7-12%	levigatina 21-42%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 1-6%		(E)- $\beta$ -cariofileno 11-19% germacreno D 36-38% biclogermacreno 13-24%	levigatina 12-13%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium laevigatum</i> Lam.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 6%		(E)- $\beta$ -cariofileno 7% germacreno D 28% biclogermacreno 23%	levigatina 21%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium arnottianum</i> Griseb.	<i>Chromolaena arnottiana</i> (Griseb.) R.M. King & H. Rob.		<i>p</i> -cimeno 30% $\alpha$ -pineno 13,7%	acetato de timila 12,32%	$\beta$ -cariofileno 11,70%		ZYGADLO et al. (1995)
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.			hidrato de cis-sabineno 5,7 %	$\delta$ -cadineno 3,5 % pregeijereno 14,2 %	<i>epi</i> - cubebol 9,8 % cubebol 8,6 % 10- <i>epi</i> - $\gamma$ -eudesmol 3.8 % germacreno-D-4- ol 3,6 %	JOSHI (2013)a
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.				germacreno D 24,8 % pregeijereno 12,5 % geijereno 12.6 % cipereno 7,8 %	10- <i>epi</i> - $\gamma$ -eudesmol 4,7 % $\alpha$ -muurolol 3,6 % khusimone 3,4 %	JOSHI (2013)a
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.	androencecalinol 14,1%			himachalol 24,2%		JOSHI (2013)b

						7-isopropil-1,4-dimetil-2-azulenol 17,6% 2-metóxi-6-(1-metóxi2-propenil)-naftaleno 5,6%		
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.			linalol 7,9 %	β-cariofileno 25,2 % germacreno D 18,8 %		KOBA et al. (2011)
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 14,3%	p-cimeno 22,2% acetate de timila 15,8%	pregeijereno+geijereno 34,1%-19% γ-muuroleno 9,8%		LAMATY et al. (1992)
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 8,4% β-pineno 5,6% trans-ocimene 2,2%		pregeijereno 17,6% germacreno D 11,1% β-cariofileno 7,3% δ-cadineno 4,9% geijereno 3,1%	vestitenona 6,5% bulnesol 2,9%	PISUTTHANAN et al. (2006)
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 9,64 % β-pineno 4,85 %		germacreno D 20,27% geijereno 25,10% trans-β- cariofileno 10,04 %		SHARMA et al. (2013)
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 8,6%		1) germacreno D 14-13,9 % pregeijereno 9,7-8,1% β-cariofileno 9,5-17,2% geijereno 8,0-9,5% 2) germacreno D 14,4% β-cariofileno 14,0% 3) β-cariofileno 21,3 % germacreno D 8,9 % pregeijereno 11,2 % γ-cadineno 8,2 % 4) β-cariofileno 16% germacreno D 15,4%	1) óxido de cariofileno 8,3-11,3 % 2) trans-longipinocarveol (14.0 %)	TONZIBO et al. (2007)



						pregeijereno 13% geijereno 11,1% 5) pregeijereno 20,8% germacrene D 18,2% 6) germacrene D 34,5% $\beta$ -cariofileno 15,4% pregeijereno 14,6%		
PRA	<i>Eupatorium odoratum</i> L.	<i>Chromolaena odorata</i> (L.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 8% sabineno 5,4%		pregeijereno 29,9 % germacrene D 21,6 % $\beta$ -cariofileno 14,3 % geijereno 10,1 %		KOSSOU H et al. (2011)
PRA	<i>Eupatorium ascendens</i> Sch. Bip. ex Baker	<i>Chromolaena ascendens</i> (Sch. Bip. ex Baker) R.M. King & H. Rob.	ácido hexadecanoico 31% hexadecanoato de etila 8%	$\beta$ -pineno 19%			espatulenol 6%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium ivifolium</i> L.	<i>Chromolaena ivifolia</i> (L.) R.M. King & H. Rob.				(E)- $\beta$ -cariofileno 7-47% germacreno D 16-54% biclogermacrene 11-20%		SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium ivifolium</i> L.	<i>Chromolaena ivifolia</i> (L.) R.M. King & H. Rob.				E)- $\beta$ -cariofileno 8% germacreno D 23% biclogermacrene 8% $\gamma$ -cadineno 11% $\delta$ -cadineno 7%		SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium subhastatum</i> Hook. & Arn.	<i>Chromolaena hirsuta</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 3-7% $\beta$ -pineno 9-12% limoneno 11-14%		(E)- $\beta$ -cariofileno 4-6% germacreno D 1-14% biclogermacrene 0-6%	germacreno D-4-ol+ espatulenol 8-13% óxido de cariofileno 1-11% $\tau$ -cadinol 3-9% $\alpha$ -cadinol 6-18%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium subhastatum</i> Hook. & Arn.	<i>Chromolaena hirsuta</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno 8% limoneno 13%		(E)- $\beta$ -cariofileno 11% germacreno D 20% biclogermacrene 32%		SOUZA (2007)

PRA	<i>Eupatorium congestum</i> Hook. & Arn.	<i>Chromolaena congesta</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.				(E)- $\beta$ -cariofileno 14% germacreno D 24% biciclogermacreno 28% $\delta$ -cadineno 6%		SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium pedunculatum</i> Hook. & Arn.	<i>Chromolaena pedunculata</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.				(E)- $\beta$ -cariofileno 26% germacreno D 27% biciclogermacreno 14%	espatulenol 18%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium clematideum</i> Griseb.	<i>Praxelis clematidea</i> R.M. King & H. Rob.				$\alpha$ -santaleno 11%	germacreno D-4-ol 16% espatulenol 8% óxido de humuleno I 22%	SOUZA (2007)
PRA	<i>Eupatorium clematideum</i> Griseb.	<i>Praxelis clematidea</i> R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -pineno 0-10%		$\beta$ -cariofileno 5-8% $\alpha$ -santaleno 10% $\alpha$ -humuleno 14-21% germacreno D 20-30% biciclogermacreno 11-13%	verbocidentafurano 5%	SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium picturatum</i> Malme	<i>Austroeupatorium picturatum</i> (Malme) R.M. King & H. Rob.				$\delta$ -elemeno 10% $\beta$ -cariofileno 7% germacreno D 14% biciclogermacreno 10% $\alpha$ -zingibereno 6% germacreno C 8%	calamenol 8-12%	SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.		limoneno 9,73%		$\delta$ -elemeno 10,57% $\beta$ -cariofileno 27,72% $\alpha$ -cariofileno 5,90% patchoulene 9,24% germacreno D 13,66%	viridiflorol 9,16%	LANCELLE et al. (2009)

EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 11% germacreno D 19% biciclogermacreno 22%		SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno (12-19%)		$\beta$ -cariofileno 11-15% germacreno D 14 - 17% biciclogermacreno 18-26%		SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 23% germacreno D 12% biciclogermacreno 32%		SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.	Nonadecanal 2-8% n-tricosano 0,3-15% n-pentacosano 0-13% n-heptacosano 0-13% n-nonacosano 26%			$\beta$ -cariofileno 2-39% biciclogermacreno 2-6%	espatulenol 19%	SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.				$\beta$ -cariofileno 9%	espatulenol 45% óxido de cariofileno 27%	SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium inulifolium</i> Kunth	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.					espatulenol 50% óxido de cariofileno 6%	SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium laete-virens</i> Hook. & Arn.	<i>Austroeupatorium laete-virens</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		mirreno 9%		$\delta$ -elemeno 7% $\beta$ -cariofileno 16% germacreno C 9% $\beta$ -sesquifelandreno 30%		SOUZA (2007)

EUP	<i>Eupatorium tweedieanum</i> Hook. & Arn.	<i>Hatschbachiella tweedieana</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\beta$ -pineno 0-33% $\beta$ -felandreno 0-29%		$\beta$ -cariofileno 5-9% germacreno D 12-16% biciclogermacreno 6-7%		SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium tweedieanum</i> Hook. & Arn.	<i>Hatschbachiella tweedieana</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.		$\alpha$ -felandreno 11% $p$ -cimeno 9-14%		$\beta$ -cariofileno 15-20% biciclogermacreno 20-23%		SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium oblongifolium</i> (Spreng.) Baker	<i>Stomatanthes oblongifolius</i> (Spreng.) H. Rob.		$\alpha$ -pineno 7-9% $\beta$ -pineno 18-19% limoneno/ $\beta$ -felandreno 16-19%		$\beta$ -cariofileno 13-15% germacreno D 20-27%		SOUZA (2007)
EUP	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.				acetato de nerila 7,9-9,4% timol metil éter ,7%	germacreno D 7,7-12,3% $\beta$ -bisaboleno 5,6-8,6%		JUDZENTIE NE (2007)
EUP	<i>Eupatorium cannabinum</i> L. ssp. <i>cannabinum</i>			$\delta$ -2-carene 6,5%		Germacreno D 33,5% $\alpha$ -farnesene 12,9%	elemol 2,8% $\alpha$ -cadinol 2,7%	SENATORE et al. (2001)
EUP	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.				acetato de nerila 0-8,9%	germacreno D 11.7–25.6% $\beta$ -bisaboleno 0–8,0% $\beta$ -ilangueno 0,6–6,2%		JUDZENTIE NE (2003)
EUP	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.				timol 7,8-12,2%		espatulenol 7,3-10,8%,	FLAMINI et al. (2003)
EUP	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.				timoquinona 6,2% acetato de nerila 8,7%	germacreno D 27,3-37,1% gemacreno B 12,4%-11.7% $\beta$ -cariofileno 8,6-10,1% valenceno 10,5-6,7%		MIRZA et al. 2006)
EUP	<i>Eupatorium cannabinum</i> L.		Benzofuranos					SIEBERTZ et al. (1989)

EUP	<i>Eupatorium capillifolium</i> (Lam.) Smal.I ex Porter & Britton			<i>p</i> -cimeno 23,68%	metil timol éter 8,85%	$\beta$ -bisaboleno 8,24%	selin-11-en-4 $\alpha$ -ol 12,28%	PINO et al. (1998)
EUP	<i>Eupatorium fortunei</i> Turcz.				timoidroquinona dimetil éter 73,6%	$\beta$ -cariofileno 8,9% Selina-4,11-diene 11%		DUÑG et al. (1991)
EUP	<i>Eupatorium fortunei</i> Turcz.		3 $\beta$ ,6-dimetil-2,3-diidrobenzofuran-2 $\alpha$ -ol 3 $\beta$ ,6-dimetil-2,3-diidrobenzofuran-2 $\beta$ -ol 3 $\beta$ ,6-dimetil-2,3-diidrobenzofuran 2 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo					JIANG et al. (2008)
EUP	<i>Eupatorium fortunei</i> Turcz.				(1 <i>S</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> )-2,5-diidróxi- <i>p</i> -mentano (1 <i>R</i> ,2 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>R</i> )-2,5-diidróxi- <i>p</i> -mentano (1 <i>S</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i> )-2,5-diidróxi- <i>p</i> -mentano timol 3-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo <i>p</i> -cimen-7-il- $\beta$ -D-glicopiranosídeo		6 $\alpha$ - <i>epi</i> -eudesm-4(14)-en-6-ol (1 $\beta$ ,7 $\alpha$ )-eudesm-4(14)-ene-1,7-diol	CHEN et al. (2013A)
EUP	<i>Eupatorium chinense</i> L.		$\alpha$ -( <i>E</i> )-acaridiol 8-O- $\beta$ -D-glicopyranosídeo $\alpha$ -( <i>E</i> )-acaridiol 9-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo 2-acetil-3-hidróxi-5-					WANG et al. (2011)

			(prop-1-inil)tiofen-3-O- β-D-glicopiranosid eo					
	<i>Eupatorium tanacetifolium</i> Gillies ex Hook. & Arn.		n-tricosano 10%			biciclogermacreno 0-8%	espatulenol 0-39% α-cadinol 6-11%	SOUZA (2007)
	<i>Eupatorium bupleurifolium</i> DC.	<i>Campovassouria bupleurifolia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		α-pineno 12-15% sabineno 5-9% β-pineno 5-7% limoneno 3-8%		β-cariofileno 12-13% germacreno D 6-10% biciclogermacreno 3-7%	espatulenol 5-8% óxido de cariofileno+globulol 7% epi-globulol 3-7%	SOUZA (2007)
	<i>Eupatorium bupleurifolium</i> DC.	<i>Campovassouria bupleurifolia</i> (DC.) R.M. King & H. Rob.		β-pineno 3-10%		β-cariofileno 3-6%	espatulenol 28-30% óxido de cariofileno+globulol 15-20% epi-globulol 14-15%	SOUZA (2007)
	<i>Eupatorium ballotifolium</i> Kunth	<i>Lourteigia ballotifolia</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.		limoneno 15,3% (E)-β-ocimeno 10,5%				ALBUQUERQUE et al. (2001)
	<i>Eupatorium ballotifolium</i> Kunth	<i>Lourteigia ballotifolia</i> (Kunth) R.M. King & H. Rob.				β-cariofileno 22,2-24,9%	espatulenol 12,4-17,7% epóxi- <i>allo</i> -aromadendreno 23,0-23,6%	ALBUQUERQUE et al. (2010)
	<i>Eupatorium viscidum</i> Hook. & Arn.	<i>Lorentzianthus viscidus</i> (Hook. & Arn.) R.M. King & H. Rob.			6-metil-5-hepten-2-ona 18,18%		espatulenol 25,16%	LANCELLE et al. (2009)
	<i>Eupatorium arnottii</i> Baker	<i>Austrobrickellia arnottii</i> (Baker) R.M. King & H. Rob.				β-cariofileno 7,92% γ-elemeno 5,92% germacreno D 9,83% δ-cadineno 5,83% germacreno B 4,30%	espatulenol 10,57% fitol 8,08%	LANCELLE et al. (2009)

<b>SYM</b>	<i>Eupatorium casarettoi</i> (B.L. Rob.) Steyerem.	<i>Symphyopappus casarettoi</i> B.L. Rob.		$\alpha$ -pineno 14-26% $\beta$ -pineno 7-28% limoneno 5-7% ( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimeno 3-7%		$\beta$ -cariofileno 6-14% germacreno D 9-10% biclogermacreno 7-13%		SOUZA (2007)
<b>SYM</b>		<i>Symphyopappus reticulatus</i> Baker		$\alpha$ -pineno 8% limoneno 16%		$\beta$ -cariofileno 15% germacreno D 34% biclogermacreno 11%		SOUZA (2007)
<b>SYM</b>		<i>Symphyopappus reticulatus</i> Baker		limoneno 6-12%		$\beta$ -cariofileno 22-29% $\alpha$ -humuleno 7-9% germacreno D 6-23% biclogermacreno 2-7%	espatulenol 6-15% óxido de cariofileno 3-16%	SOUZA (2007)

Tabela 2.3 NT: não terpenoide; MH: monoterpenoide hidrocarbonado; MO: monoterpenoide oxigenado; SH: sesquiterpenoide hidrocarbonado; SO: sesquiterpenoide oxigenado; subtribos: **NEO**: Neomirandaeinae; **OXY**: Oxylobinae; **ALO**: Alomiinae; **AYA**: Ayapaninae; **CRI**: Critoniinae; **FLE**: Fleischmanniinae; **GYP**: Gyptidinae; **DIS**: Disynaphinae; **PRA**: Praxelinae; **EUP**: Eupatorinae. **SYM**: *Symphyopappus*.

### 2.3.7 Análise Estatística

Considerando-se o grande número de componentes normalmente presentes em óleos voláteis e a alta variabilidade química associada com a localização, as fenofases, os quimiotipos, as variedades e as espécies, métodos multivariados de análise são necessários para avaliar as semelhanças e diferenças entre amostras de óleos voláteis. Algumas abordagens multivariadas frequentemente aplicadas à análise de óleos voláteis são brevemente comentadas em seguida.

PCA – Análise de Componentes Principais: cria variáveis novas (Componentes) pela combinação linear das variáveis originais. Nesse processo, o objetivo principal é maximizar a variabilidade e minimizar os resíduos, independentemente da estrutura (latente, ou dos grupos) dos dados.

LDA – Análise Discriminante Linear: produz uma combinação linear de características que melhor discrimina os grupos de amostras, isto é, maximiza a razão da covariância entre-grupos sobre dentro-dos-grupos.

PLSDA/OPLSDA/MLPLSDA – Quadrados Mínimos Parciais ou Projeção em Estruturas Latentes: combina linearmente as variáveis  $x$  para criar tantas variáveis novas  $t$  (estimativas de Variáveis Latentes) quantas sejam necessárias e preditivamente significativas, e então utiliza estas novas variáveis como preditores para os grupos  $y$ . Entretanto, como os pesos das variáveis originais em  $t$  combina ambas as variações que são preditivas (correlacionada) e as variações que não são correlacionadas a  $y$ , sua interpretação direta é difícil, a menos que uma expansão ortogonal dos parâmetros  $x$  seja aplicada separando as contribuições de cada parâmetro entre preditiva e não correlacionada a  $y$  (OPLS) (WOLD et al, 2001). Outra expansão útil da PLSDA é a MLPLSDA (Análise Discriminante Multinível dos Quadrados Mínimos Parciais), usada especificamente para lidar com estudos com desenhos cruzados, onde cada amostra é o seu próprio controle (van VELZEN et al, 2008, WESTERHUIS et al 2010).

EFA – Análise Exploratória de Fatores: avalia a correlação entre as variáveis e separa a variância que é compartilhada por muitas variáveis das variâncias particulares e devidas ao erro, para revelar estruturas de fatores subjacentes que



direcionam a manifestação das variáveis medidas; apenas a variância que é compartilhada aparece na solução.

Métodos quimiométricos de resolução têm sido regularmente aplicados para melhorar a resolução em técnicas cromatográficas, especialmente para análise de óleos voláteis de plantas utilizadas individualmente ou em pares na medicina tradicional chinesa (GUO, 2004; LI et al 2003; XIAO-RU, et al, 2007; GONG et al, 2001, Jalali-Heravi et al, 2006).

Ferramentas de análise multivariada (HCA - análise de conglomerados) foram aplicadas a compostos voláteis para caracterizar a origem geográfica ou os quimiotipos de populações cretenses selvagens de *Cistus creticus* (DEMETZO et al, 2002). PCA e HCA foram usadas para diferenciar populações de duas espécies de *Thymus* coletadas na Espanha (CAÑIGUERAL et al, 1994), bem como populações de *Notopterygium incisum* na China (QIU et al, 2007) e três espécies comumente identificadas como camomila (WANG et al, 2014). A mesma técnica foi usada para avaliação dos óleos voláteis de *Daucus carota* ssp. *sativa* (FLAMINE et al, 2014), e do *Eucalyptus globulus* em Portugal. Nesta espécie, foi observada correlação entre a composição química e a idade da folha, mas não entre a composição e a estação de coleta ou a localização geográfica (SILVESTRE et al, 1996). Quimiotipos de *Tagetes minuta* foram caracterizados usando PCA e HCA e os compostos responsáveis pela discriminação foram determinados por OPLS (TANKEU et al, 2013). OPLS também foi aplicada para discriminação da origem geográfica de *Curcuma longa* (HU et al, 2014), bem como da origem geográfica e das partes *Cinnamomum cassia* (DENG et al, 2014). BESTEN et al (2012) aplicaram Análise Hierárquica de Grupos para avaliar os óleos voláteis de espécimes masculino e feminino de cinco espécies de *Baccharis* e não encontraram diferenças significativas entre plantas masculinas e femininas de uma mesma espécie.

PLS foi utilizada conjuntamente com dados de NIRS (uma técnica geralmente menos trabalhosa do que a cromatografia) de óleos voláteis para caracterizar e discriminar entre quimiotipos de tomilho, orégano e camomila (SCHULTZ et al, 2003); discriminar entre variedades de lavanda e lavandim (LAF AHL et al, 2016); entre espécies basais e híbridas de *Citrus* (JING et al, 2015),

e também, entre diferentes estágios de maturação de *Ananas comosus* (STEINGASS et al, 2015). Escalamento multidimensional foi usado para relacionar atributos sensoriais a compostos voláteis individuais em amostras de azeite de oliva (MORALES et al, 1995).

PCA e Regressão Logística Múltipla gradual foram utilizados para determinar os compostos voláteis responsáveis pela inibição de contrações uterinas induzidas por oxitocina (SU et al, 2008). PLS e OPLS foram usados com o mesmo propósito em relação à atividade antimicrobiana de *Myrtus communis* (EBRAHIMABADI et al, 2016) entre outras espécies (MILADINOVIĆ et al, 2012, MAREE et al, 2014).

Uma etapa importante, anterior à aplicação do método de análise multivariada escolhido, é o pré-tratamento dos dados. Existem vários modos descritos para o pré-tratamento de dados para análise multivariada, sendo mais comumente utilizados: centralização, escalonamento (pareto, padrão, amplitude, nível, estabilizante de variância (Vast)) e transformação ( $\ln$  e  $\cos$ ), entre outros. Cada tratamento tem um objetivo específico. Por exemplo, quando todas as variáveis são obtidas nas mesmas dimensões e escalas, apenas a centralização dos dados já é suficiente para aplicação da análise multivariada. Caso as variáveis sejam medidas em dimensões diferentes, em escalas numéricas diferentes, as variáveis numericamente maiores poderão dominar a análise. Afim de evitar este comportamento, pode-se aplicar a padronização dos dados (divisão de cada valor pelo desvio padrão da respectiva variável). Após a padronização, os dados passam a refletir a variabilidade e não a grandeza numérica de cada variável. Este último tratamento, entretanto, tem a desvantagem de superestimar a variabilidade do ruído da análise e deve ser substituído pelo tratamento de pareto (divisão de cada valor pela raiz quadrada do desvio padrão da respectiva variável) em dados que contenham grande quantidade de ruído, afim de diminuir o peso deste na análise (van den BERG et al, 2006).

## 2.4 MANUSCRITO I

A metodologia relacionada a este capítulo, bem como os resultados e discussão dos mesmos serão apresentados a seguir na forma de um manuscrito publicado no *Journal of Natural Products*.



## A Chemometrics Approach to the Investigation of the Intraspecific Variability of the Volatile Oil of *Eupatorium tremulum* from Southern Brazil

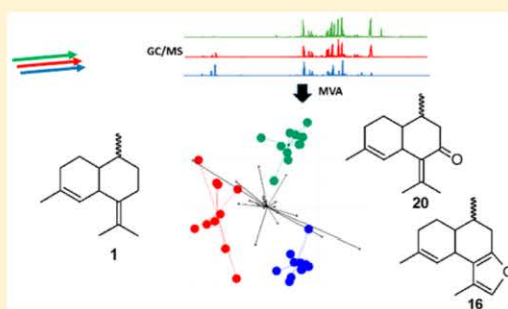
Tiago J. T. de Souza,<sup>\*,†</sup> Sérgio A. L. Bordignon,<sup>‡</sup> and Miriam A. Apel<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90610-000, Porto Alegre, Brazil

<sup>‡</sup>Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, Centro Universitário La Salle, Canoas, Brazil

### Supporting Information

**ABSTRACT:** *Eupatorium tremulum* is a South American shrub reported to cause cattle digestive intoxication, of which the volatile oil, mainly composed by bisabolane- and amorphane-type sesquiterpenoids, exhibits high quantitative variability. This report describes the application of chemometric tools for the identification of volatile compounds that characterize phenophase changes in the plant. Prebloom, blooming, and postblooming specimens were paired-sampled and submitted to hydrodistillation and GC-MS analysis. Differential results were analyzed by orthogonal projection to latent structures-discriminant analysis (OPLS-DA), and the substances with different distribution in each phase were highlighted. Mean results between phases were submitted to factor analysis (FA), and correlations between the variables were demonstrated. Prebloom to blooming phase change was characterized by decreased levels of amorphane-4-en-7-ol (13) and *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19) and increased amounts of amorphane-4,7(11)-diene (1). Blooming to postblooming change was characterized by decreases in 1, germacrene D (2), and  $\beta$ -bisabolene (4) and increases in 13 and 19. Finally, enhanced levels of 1, 4, and 2 reflected the change from the postblooming to the prebloom phase. FA revealed a strong correlation in the variability between the bisabolane hydrocarbons, possibly related to its common enzymatic origin. Another strong source of negative correlation showed bisabolane- and amorphane-type alcohols, on one side, and amorphane-type furans, on the other side, to occur in two alternative oxidation routes. Finally, 1 was strongly negatively correlated to its oxidized furan and ketofuran derivatives [verbocidentafuran (16) and 3-oxo-verbocidentafuran (23)] and additionally to a third compound, putatively identified as a biosynthetic intermediate between this hydrocarbon and the furans, amorphane-4,7(11)-dien-8-one (20).

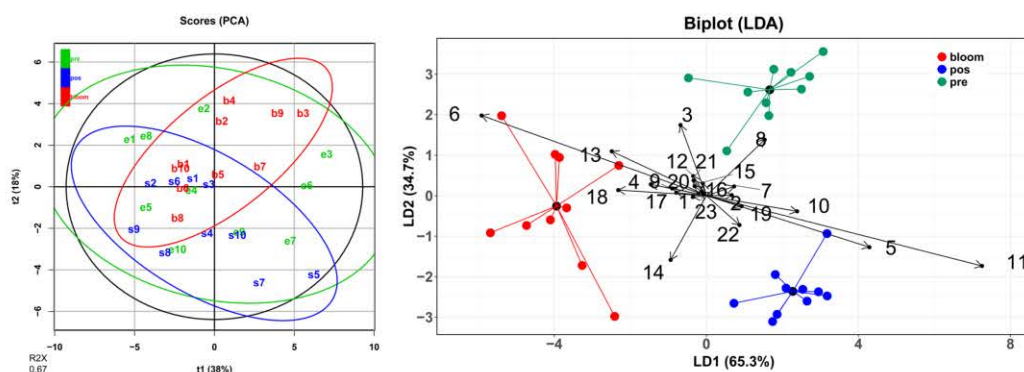


**E**upatorieae is one of the largest tribes in the family Asteraceae, currently comprising 182 genera and 2200 mainly New World species.<sup>1</sup> Most of these were assigned previously to the genera *Mikania*, *Stevia*, and *Eupatorium*. King and Robinson<sup>2</sup> reorganized this tribe, splitting up *Eupatorium* into several smaller (sometimes monotypic) genera and joining them in new subtribes. Only 44 species from North America, Europe, and Asia were maintained in the genus, in a drastic approach without there being a consensus among the synanthology community, since some authors still accept the classification system where *Eupatorium* (*sensu lato*) contains more than 600 species.<sup>3–5</sup> Molecular analysis of nrITS and cpDNA has shown, however, that *Eupatorium* (*sensu stricto*) may be indeed even more distant from South American species than King and Robinson estimated when they were in the same subtribe (Eupatoriinae) after splitting the genus.<sup>6–8</sup>

American *Eupatorium* (s.l.) species have become economically threatening weeds throughout Africa, Asia, and Oceania, mainly due to the strong allelopathic activity of their volatile compounds.<sup>9</sup> Other *Eupatorium* species are used in American,

Chinese, and Indian traditional medicine (e.g., *E. odoratum*, *E. cannabinum*, *Ayapana triplinervis*, and others).<sup>10</sup> The essential oils from most *Eupatorium* (s.l.) species have not been characterized chemically to date. This is also valid for *Eupatorium tremulum* Hook. & Arn., a strongly scented 2–3 m tall South American shrub<sup>11</sup> (Figure S1, Supporting Information), for which the spontaneous and experimental toxicity have been determined for cattle in Santa Catarina State of Brazil. Neither the chemical composition nor the compounds responsible for the toxicity were reported from the specimens evaluated.<sup>12</sup> In a previous report from our group, *Eupatorium* species from the state of Rio Grande do Sul (Brazil) were characterized by high quantitative variability of their rare furan sesquiterpene verbocidentafuran and some unidentified compounds.<sup>13</sup>

Received: April 7, 2016



**Figure 1.** Multivariate analysis of the raw variability in *E. tremulum* volatile oil: (left) first two components of PCA; (right) two discriminants of LDA (bloom, blooming samples; pos, postblooming samples; pre, preblooming samples). Numbers in the LDA biplot correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.

This contribution addresses two main aspects of volatile oil production in *E. tremulum*. First, chemical changes accompanying phenophysical changes in the plant were characterized through the identification of compounds positively or negatively correlated to each phase. In a related study, the hypothesis that furansesquiterpenes and their putative precursor in the volatile oil [3-oxo-verbococcidentafuran, verbococcidentafuran, and amorpha-4,7(11)-diene] could be differentially related to those phenophases was evaluated. In a second aspect, the hypothesis was tested that multivariate analysis can not only unravel these phenophysical transformations but also afford support evidence for the identification of potential biosynthetic intermediates linking the furansesquiterpenes and their parent hydrocarbons, allowing one to use this information in the identification of some of the originally uncharacterized compounds.

## RESULTS AND DISCUSSION

High variability has been observed in the composition of the essential oil of *E. tremulum* in previous collections.<sup>13</sup> In an attempt to better characterize this variability, 10 specimens of this species were selected randomly from a stable population in a specific area in southern Brazilian pampa biome and collected during the preblooming period. The same specimens were re-collected in full bloom and in the postblooming period, when the infructescences were completely dry. Despite an attempt made to isolate edaphoclimatic and genetic variations by re-collecting the same individuals in a small geographical area, high variability was observed again in the chemical composition of the volatile oils in each collection, and no clear chemical pattern was readily observable.

Volatile oil samples from *E. tremulum* were all composed solely by terpenoid compounds, mainly hydrocarbon and oxygenated sesquiterpenes. Traces of the monoterpenes  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, limonene, and (*Z*)- $\beta$ -ocimene were also present, but these were not included in this analysis, which was concerned with sesquiterpenoid production in *Eupatorium*. The identified sesquiterpenoid compounds (Table S1, Supporting Information) could be grouped biogenetically into two main classes: bisabolanes and cadinanes. In the former group,  $\beta$ -bisabolene (4),  $\beta$ -sesquiphellandrene (5), and *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19) were identified, and in the second group a series of amorphane-type derivatives, amorpha-4,7(11)-diene (1), amor-

pha-4-en-7-ol (13), amorpha-4,7(11)-dien-8-one (20), verbococcidentafuran (16), and 3-oxo-verbococcidentafuran (23), and germacrene D (2), occurred (Chart 1). Amorphane structures are commonly associated with the terpenoid production in another Asteraceae genus, *Asteris* (tribe Anthemideae).<sup>14–16</sup> However, in this genus, amorpha-4,11-diene oxidation routes tend to produce lactonized products (including artemisinin), while in *Eupatorium tremulum*, the oxidation routes of amorpha-4,7(11)-diene resulted in furan ring-containing compounds (structurally related furans have been reported also in other *Eupatorium* species).<sup>13</sup>

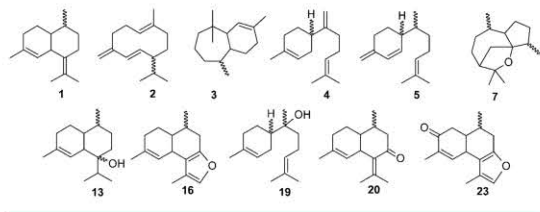
Amorphane and bisabolane derivatives are reported to be very closely related, with some isolated enzymes known to be able to convert the bisabolyl cation into the cadinyl cation through conformational inversion and a 1,3-hydride shift.<sup>14–16</sup> Thus, all the main compounds in the volatile oil of *E. tremulum* could be eventually derived from only one enzymatic system.

Variability in the percentage contribution of the 23 main components is shown in Table S1 (Supporting Information). Statistical analysis allowed inferences on the dominant variables in each sampling period. Two distinct approaches were used. First, the original data, identified here as *raw variability*, were analyzed by means of unsupervised (principal component analysis, PCA) and supervised (linear discriminant analysis, LDA) multivariate techniques. Second, raw variability was split into *within-sample variability* and *between-sample variability*. The first subset, within-sample variability, was pairwise-analyzed by supervised techniques, PLS-DA and OPLS-DA. Between-sample variability was factor analyzed.

**Raw Variability.** Raw data were pareto- and autoscaled previous to PCA. As exemplified by PCA of the centered and autoscaled data set (Figure 1, left), no class separation was obtained for the three classes nor for each possible pair of them. PCA, as an unsupervised technique that aims for maximization of variability and dimension reduction, would only achieve good class (phenophase) separation if classes were the main source of variation in the data, which was not observed for the *E. tremulum* volatile oil samples.

Linear discriminant analysis, contrary to PCA, aims to model the data as a function of prior classes, so this approach was also applied. Figure 1 (right) shows LDA results for the three-class problem, with good separations for prebloom, bloom, and postbloom samples. LDA is insensitive to scaling, since it works

Chart 1



in the maximization of the relation between the variability within and between classes. The first discriminant, responsible for 65.26% of the variance, discriminated blooming and nonblooming samples. In the second discriminant (34.74%), pre- and postblooming samples were discriminated. The main contributions to the discriminant functions were from compounds 6, 13, 5, and 11 (LD1) and compounds 11, 14, 5, 13, 8, 3, and 6 (LD2). However, since the main objective was the discrimination of pairs of phenophases and the compounds involved in each change, a multilevel multivariate approach was attempted.

The total variance in a data set is composed by variance derived from several sources such as from the treatment/class effect, from individual effect, and from error.<sup>17</sup> When considering a simple example (A) using low individual variability and high class variability as a univariate set composed by two samples (a, b) measured in two different situations ( $t_1$ ,  $t_2$ ), if the measured values at  $t_1$  were (3; 4) and at  $t_2$  were (7; 8.01), a  $t$  test would show that the means are different at 95% confidence ( $p = 0.03008$ ). This difference can be considered as the treatment effect (Figure S2A, Supporting Information). For a second example (B), with high individual variability and low class variability, a second variable was measured at  $t_1$  (3; 7) and at  $t_2$  (4; 8.01), and a  $t$  test would show that the means are not different at 95% confidence ( $p = 0.7566$ ). The most reliable interpretation of this scenario would be the absence of a difference in the means for the second variable and no effect associated with the treatment. Since the individual variation was bigger than the treatment effect, the last one was missed and, even if observed, would be not statistically significant (group means are not significantly different because their dispersions superimposed on one another; Figure S2B, Supporting Information). However, the usual  $t$  test is not the most appropriate test in a design where samples are not independent. A most suitable paired  $t$  test would show that, in example C, the means are indeed different at 95% confidence ( $p = 0.003167$ ). In this situation, the differences within each sample were analyzed instead of the whole data, improving the statistical power of the analysis (Figure S2C, Supporting Information). This process of splitting variability into between-samples and within-samples and treating each part independently is called multilevel analysis.

Samples such as plant volatiles sometimes behave similarly to example 2B (Figure S2B, Supporting Information), in presenting high individual variability and low class variability (phenophases, seasonal, or edaphoclimatic). In such cases, the use of paired samples can improve the statistical power of the tests and allows the achievement of significance with smaller sample sizes, in the same way as in the univariate example above.

Multivariate analysis, such as PCA, is usually thought of as more suitable for analysis of the so-called " $n > p$ " case, where

there are more samples than measured variables. Projection to latent structures (PLS), on the other hand, can easily deal with both  $n > p$  and  $n < p$  cases. An improvement of PLS, OPLS (orthogonal projection to latent structures),<sup>18</sup> makes the interpretation of PLS results easier by splitting the variation into predictive and uncorrelated (thus orthogonal), even though the predictivity of the models is not really enhanced by this approach.<sup>19</sup>

Considering that our data set was produced in a paired way (each specimen was sampled in the three phases), this multilevel approach (MLPLSDA<sup>17,20</sup>) was used to separate the confounding sources of variation (variation between and within the same class, in the two occasions). Variation between samples is the mean value of the measured variable and accounts for the individual variation. In this matrix the variables responsible for the variability can be analyzed between each individual sample. On the other hand, variation within samples is the difference between each occasion for each sample and harbors the treatment/class effect. In this difference matrix, the variables responsible for changes in composition can be analyzed when the plant goes from one phenophase to another. For each pair of classes (prebloom  $\times$  bloom; bloom  $\times$  postbloom, postbloom  $\times$  prebloom) two matrices were calculated: a difference matrix and a mean matrix. Then these two variation sources were evaluated independently, by different multivariate methods.

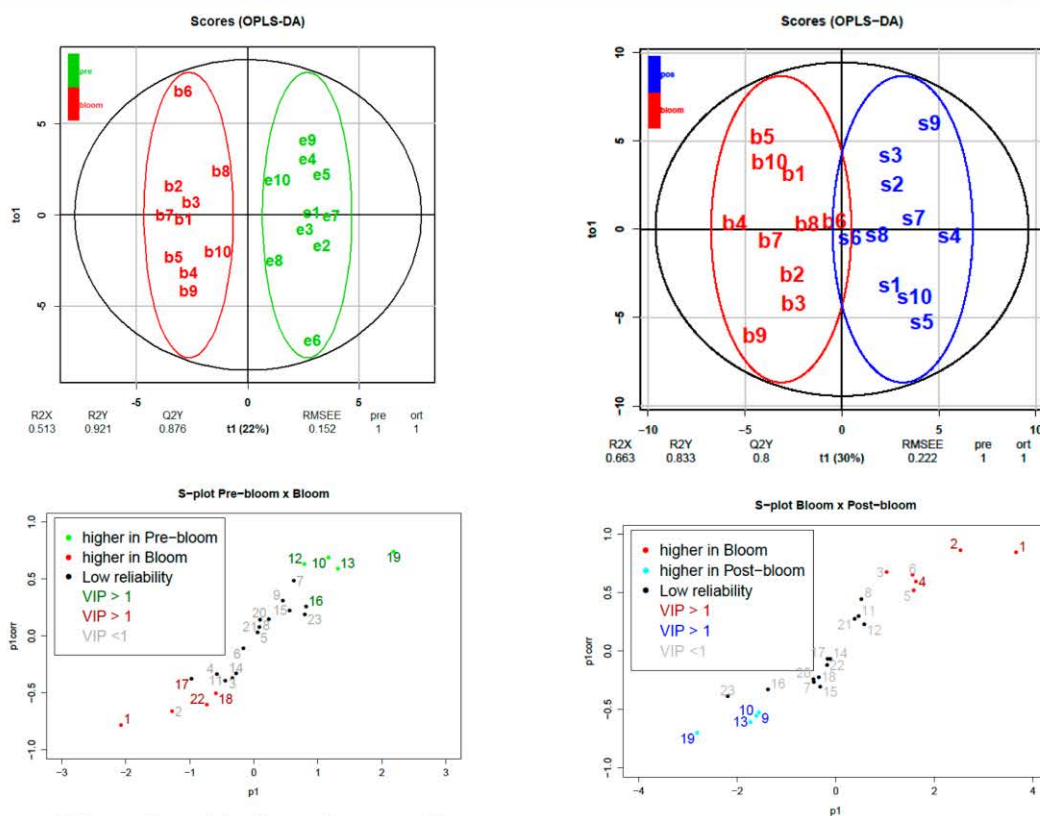
The within-sample variation was analyzed by OPLS-DA. The quality of the model was evaluated by R2X, R2Y, and Q2Y metrics. R2X and R2Y quantify the goodness of fit, while Q2Y reflects the predictability of the model.<sup>21</sup> VIP (variable importance on projection) with a jack-knife-calculated confidence interval was used to assess the importance of the variables in the differentiation between classes. Usually values higher than 1 are considered important,<sup>17</sup> but some authors consider 0.8 as an adequate value.<sup>21–23</sup> Permutation tests are necessary to ensure that a model based on a subset of the data can perform equally well on other subsets, and this can be assessed by cross-validation. The between-sample variation for each pair was merged and submitted to exploratory factor analysis (EFA) in an attempt to uncover underlying common factors driving the manifestation of the subsets of variables.

**Within-Samples Variability.** To investigate the hypothesis that PLS-DA/OPLS-DA could afford more informative models than PCA for the differential data from each pairwise comparison, and thus unravel variables that influence class separation (differentially distributed in the classes), each data set was analyzed by all three techniques. VIP values and S-plots, derived from OPLS-DA models, were used to confirm reliability of the variables influencing class separation. Each subset was independently analyzed by PCA and PLS-DA (Figures S3–S5, Supporting Information). PLS-DA analysis was followed by OPLS-DA (Figures 2, 3, and S5, Supporting Information), and the OPLS-DA model was cross-validated (Figures S3–S5, Supporting Information, for scores and loadings). VIP values were obtained from OPLS-DA, and their confidence interval was determined through jack-knifing (Figures S3–S5, Supporting Information). S-plots were generated for each OPLS-DA model (Figures 2, 3, and S5, Supporting Information). Simultaneous PLS analysis of more than two classes is feasible, but poses a series of concerns regarding the computational aspects of the process.<sup>24</sup>

**Pre-Bloom  $\times$  Bloom.** PLS-DA/OPLS-DA of the within data set from the pair prebloom  $\times$  bloom resulted in complete

C

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00313  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX



**Figure 2.** Within-sample variability from prebloom × blooming samples: OPLS-DA scores (b = blooming samples, e = prebloom samples); S-plot from OPLS-DA (green circles: positive correlation >0.5 with prebloom samples; red circles: positive correlation >0.5 with blooming samples; black circles: correlation <0.5; green label: VIP values >1 (for variables positively correlated to prebloom samples); red label: VIP values >1 (for variables positively correlated to blooming samples); gray label: VIP values <1). Numbers in the S-plot correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.

**Figure 3.** Within-sample variability from blooming × postblooming samples: OPLS-DA scores (b = blooming samples, s = postblooming samples); S-plot from OPLS-DA (blue circles: positive correlation >0.5 with blooming samples; red circles: positive correlation >0.5 with postblooming samples; black circles: correlation <0.5; blue label: VIP values >1 (for variables positively correlated to postblooming samples); red label: VIP values >1 (for variables positively correlated to blooming samples); gray label: VIP values <1). Numbers in the S-plot correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.

separation of the two sample sets, as shown in Figure S3, Supporting Information (upper right) for PLS, Figure S3, Supporting Information (middle right) for cross-validated OPLS-DA, and Figure 2 (upper) for OPLS-DA. The metrics R2X, R2Y, and Q2Y were high for both the predictive and the cross-validated models from OPLS (Table 1). PCA, on the other hand, was not effective in separating the classes [Figure S3, Supporting Information (upper left)]. The cross-validation resulted in 80% of samples being correctly assigned. Influential variables chosen from VIP values higher than 1.0 [(Figure S3, Supporting Information (lower))] and from the S-plot [Figure 2 (lower)] were *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19), amorpha-4-en-7-ol (13), and two minor unidentified compounds (higher in prebloom samples) and amorpha-4,7(11)-diene (1) (higher in blooming samples, Figure 4). Variables for which the confidence interval of VIP values passed through zero and/or  $p_1[\text{corr}] < 0.5$  on the S-plot were not considered significant in any of the pairwise models.

**Bloom × Postbloom.** Comparable results were achieved in the models for the blooming and postblooming samples

(Figure 3 and Figure S4, Supporting Information) with high metrics and cross-validation of 80% (Table 1). Discriminating variables were formed by germacrene D (2), amorpha-4,7(11)-diene (1), and  $\beta$ -bisabolene (4) (higher in blooming samples) and *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19) and amorpha-4-en-7-ol (13) (higher in postblooming samples, Figure 4).

**Prebloom × Postbloom.** The groups pre- and postbloom were also evaluated searching for changes that would take place hypothetically from one blooming period to another, and OPLS-DA was able to separate the classes (Figure S5, Supporting Information). Cross-validation resulted in 80% of the samples being correctly assigned. Three minor unidentified sesquiterpenoids were higher in postblooming samples, and amorpha-4,7(11)-diene (1), germacrene D (2),  $\beta$ -bisabolene (4), and 6 were higher in prebloom samples. Confidence intervals for VIP values were higher for this model when compared to the others, likely reflecting a tendency for the higher superposition in the dispersion range for the differential

D

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00313  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX



Table 1. Metrics from PCA, PLS-DA, OPLS-DA, and Cross-Validated OPLS-DA

	PCA		PLS-DA				OPLS-DA				CV OPLS-DA				
	$t_1$	$t_2$	$t_1$	$t_2$	R2X	R2Y	Q2Y	$t_1$	R2X	R2Y	Q2Y	$t_1$	R2X	R2Y	Q2Y
prebloom × bloom	0.34	0.27	0.26	0.25	0.712	0.944	0.766	0.22	0.513	0.921	0.876	0.38	0.614	0.984	0.971
bloom × postbloom	0.43	0.25	0.36	0.30	0.761	0.902	0.832	0.30	0.663	0.833	0.800	0.29	0.737	0.951	0.881
postbloom × prebloom	0.48	0.17	0.20	0.39	0.723	0.917	0.705	0.14	0.596	0.801	0.763	0.10	0.706	0.948	0.808

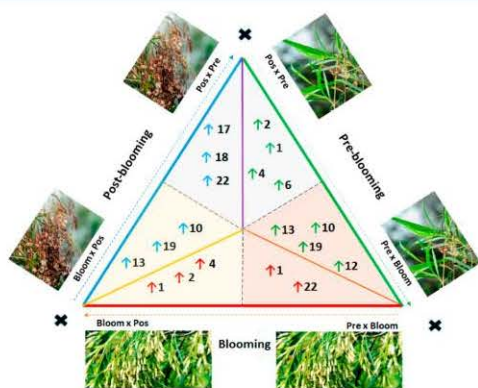


Figure 4. Discriminant compounds with VIP > 1.0 and correlation > 0.5 in OPLS-DA. ↑: general trend for higher concentration in the respective phase (green, preblooming; red, blooming; blue, post-blooming). Numbers correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.

values of each variable in postblooming and preblooming samples (Figure S6, Supporting Information).

Figure 4 summarizes the general tendencies revealed from OPLS-DA analysis. From preblooming to blooming there was an increase of the hydrocarbon amorph-4,7(11)-diene (1) and decreases of alcohols *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19) and amorph-4-en-7-ol (13). From blooming to postblooming a reverse behavior was observed through an increase of the alcohols 19 and 13 and decreases of the hydrocarbons 1, germacrene D (2), and  $\beta$ -bisabolene (4). From postblooming to preblooming the trend reversed again, increasing hydrocarbons 1, 2, and 4 (Figure 4). Those observations were all consistent since amorph-4-en-7-ol (13) and *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19) are hydroxylation products of amorph-4,7(11)-diene (1) and  $\beta$ -bisabolene (4), respectively, and both behaved oppositely to their hydrocarbon precursors.

Amorph-4,7(11)-diene (1) and the at-the-time unidentified sesquiterpenol amorph-4-en-7-ol (13) showed a clear negative correlation mimicking and accompanying the correlation between  $\beta$ -bisabolene (4) and *epi*- $\alpha$ -bisabolol (19). From this observation, a hypothesis was constructed wherein 13 is a hydroxylated derivative of 1, absent from the libraries and bibliographic references available, and then possible oxidation products of amorph-4,7(11)-diene (1) were followed. An active search for such hydroxylation products resulted in a compound with the same mass spectrum as 13, allowing for the tentative identification of amorph-4-en-7-ol (13) as one of the main compounds in the volatile oil of *E. tremulum*.<sup>25</sup>

It is well documented that essential oil biosynthesis is under strong and multifactorial species-specific regulation. The amount and identity of the diverse structures constitutively present in the oils can depend on the climate, soil, season, luminosity, and humidity and can be specific to an organ or

developmental stage of that organ. In addition, induced alterations in the biosynthesis can occur after herbivore or pathogen eliciting.<sup>26</sup> MicroRNA156 (miR156)-targeted squamosa promoter binding protein-like (SPL) factors function as a major age cue in regulating developmental phase transition and flowering, spatiotemporally regulating not only plant development but also sesquiterpene biosynthesis, as exemplified by (*E*)- $\beta$ -caryophyllene in flowering *Arabidopsis thaliana*, where this sesquiterpene can directly inhibit bacterial growth on the stigma, and patchulol in older *Pogostemon cablin* plants.<sup>27</sup> In most species, volatile oil production in the leaves occurs in the first stages of leaf development, along with the development of glandular trichomes. In other species, like *Salvia* spp., glandular trichomes are generated continuously throughout the leaf lifespan, and the production of volatile oils accompanies these.<sup>26</sup> In the Asteraceae species *Matricaria chamomilla*, volatile oil production occurs both and differentially in glandular trichomes and secretory ducts spreading throughout the plant, although concentrated in different locations of the flower heads.<sup>28</sup> It is difficult to trace a parallel with *E. tremulum* since the exact location and identity of secretory structures in flowers of this species are not known, with only secretory ducts found in mature leaves (de Souza, unpublished).<sup>29</sup> Some other closely related Eupatorieae, including *Ophryosporus* species, were also reported to lack glandular trichomes and have well-developed secretory reservoirs.<sup>30</sup> Since in the present work aerial parts of *E. tremulum* were not separated in the leaves and inflorescences, it is not possible to infer if the observed alterations occurred in the whole plant or if the volatile oil production occurred differentially in the leaves, flowers, and seeds. However, one can hypothesize that the sesquiterpenes amorph-4,7(11)-diene (1),  $\beta$ -bisabolene (4), and germacrene D (2) were synthesized mainly in the flowers, for either pollinator attraction or herbivore deterrence. In preblooming and postblooming samples, hydroxylated derivatives predominated. Those compounds could be either directly produced from farnesyl pyrophosphate (FPP) by sesquiterpene cyclases [e.g., amorph-4,11-diene synthase from *Artemisia annua* is able to convert FPP mainly to amorph-4,11-diene, but it produces also minor amounts of amorph-4-en-7-ol (13) and  $\alpha$ -bisabolol]<sup>31,32</sup> or produced from sesquiterpenes through the regulated action of CYP450 enzymes.<sup>33–35</sup>

**Between-Sample Variability.** The collection of samples from the same restricted area potentially eliminated climatic, edaphic, and luminosity factors that usually influence the chemical composition of essential oils. Trophic interactions, such as the attraction of pollinators and herbivore predators, as well as antifeeding effects on herbivores, usually mediated by changes in the composition of volatiles, were also possibly eliminated since all specimens were likely to be submitted to the same biotic conditions. In the present set, after splitting the total variability into within- and between-sample variation, the phenophysical variation (retained in the within data set) was also eliminated and the remaining variability (between) contained only variation associated with the individuals. Such

E

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00313  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

a data set was not suitable for discriminant analysis (LDA, PLS-DA, OPLS-DA) since no class separation was expected. PCA, on the other hand, could deal with this data. However, this technique would essentially create a first “principal component” explaining as much as possible of the variability in the correlation or covariance matrices of the data set. In an iterative way, other (orthogonal) principal components would be calculated to account for the maximum of the remaining variability that was not explained by the first component, and so on. At the end of the process the model would ideally explain the whole variability in the data set. In this way, PCA may explain all the variability in the data set irrespective of any underlying relation between the variables. Each principal component, therefore, would be hardly interpretable in physical terms since the variability being explained is composed by covariation (correlated variation) and by variation that is unique to each variable, or sampling- and equipment-derived.

In a different way, EFA may account for the underlying relations between variables, eliminating in the results the variation that is unique to each variable and keeping only the so-called common variation, or the variation that is shared by different variables (also called common factor analysis). In such analysis, each (orthogonal) common factor accounts for the maximum possible of the shared variation, which was not explained by the previous factors. Factor analysis is usually more easily interpretable in physical ways than PCA, since each factor is a linear combination of common contributions from each variable, meaning that there is some common force driving the manifestation of that particular set of variables. Despite the differences between PCA and FA, PCA is a usual method for performing factor analysis, besides minimum residuals, generalized weighted least-squares, maximum likelihood, and principal axes factoring.

There are several prior studies on the preconditions for applying FA to a data set regarding the number of samples ( $n$ ) and the samples/variables ratio ( $n/p$ ). Despite the number of studies, there is no consensus on this subject. Some earlier authors stated rules of thumb such as  $n > 500$  and  $n/p > 20$ ; however, more recent work has shown evidence of no direct correlation between  $n$  and  $n/p$  and the goodness of fit of the generated model. The most interesting relation is the variables/factors ratio ( $p/f$ ), and the stronger the variable load on the factor, the smaller the sample number needed. Some authors reported good results even with less than 20 samples.<sup>36,37</sup>

On the basis of the correlogram of the (between) data set some clear variable correlation clusters can be seen (Figure S7, Supporting Information, lower left), justifying why EFA was a good tool for analyzing this data set and decrypting the common factors behind each correlation cluster. EFA results are usually presented as biplots, similar to those for PCA and PLS; however, since in EFA all factors are important and several biplots would be necessary, a newly proposed presentation was adopted, the correlogram plotted aside a bar graph depicting the percentage contribution of each factor in a given variable.<sup>38,39</sup>

The present data set with 30 samples and 23 variables was rather small, and thus some factors could be under-represented in the variables. The analysis was performed, and some of the quality criteria for FA were not achieved. For example, the root-mean-square residual (RMSR) parameter only converged to significant values ( $<0.08$ ) with five factors, with the last factor being very poorly represented. Therefore, a solution was accepted with four factors, despite an RMSR of 0.09. The PCA

method for extraction of factors with four components resulted in a model in which factor 1 (PC1) contributed positively mainly to the variation on 5, 6, 4, and 3 and (low) negatively to most other variables. Actually, respectively 93%, 89%, 86%, and 76% of the variability in those variables were explained by PC1. This factor seemed to be driving mainly “bisabolane synthase activity”, since  $\beta$ -bisabolene (4),  $\beta$ -sesquiphelandrene (5), and  $\gamma$ -himachalene (3) all have a common biogenetic source. Besides, 6 had a mass spectrum (Figure S8, Supporting Information) and retention index very similar to those of  $\beta$ -sesquiphelandrene (5) and possibly shares the same biosynthetic origin. However, attempts to find in the literature a compound with a similar retention index to 6 were not successful.

Factor 3 (PC3) had a high positive influence on the variability of 9, 19, and 13 (respectively 88%, 79%, and 80%) and high negative influence on 16 and 23 (48% and 80%). *epi*- $\alpha$ -Bisabolol (19) and amorpha-4-en-7-ol (13) are hydroxylated derivatives of  $\beta$ -bisabolene (4) and amorpha-4,(11)-diene (1), respectively, while verbocidentafuran (16) and 3-oxo-verbocidentafuran (23) are furan derivatives of amorpha-4,7(11)-diene (1). Accordingly, PC3 could be related to some factor driving the hydroxylation of amorphanes and bisabolanes alternatively to furanization of amorphanes.

A fourth factor (PC4) had high positive contributions on the variability of 1 and 2 (70% and 51%) and high negative contributions on 20, 16, and 18 (72%, 60%, and 52%). This factor contributed differentially to the variability exhibited by the hydrocarbons amorpha-4,7(11)-diene (1) and germacrene D (2) on one side and the oxidized amorphanes amorpha-4,7(11)-dien-8-one (20) and verbocidentafuran (16) on the other side; clearly, this was another factor driving oxidation of the hydrocarbon 1 to its keto and furan derivatives 18 and 16. The fact that PC4 included germacrene D (2) in these correlations could be linked either to the large positive correlation between amorpha-4,7(11)-diene (1) and germacrene D (2) in virtually all samples, reflecting their common enzymatic origin and, therefore, making it difficult to statistically discriminate between them, or even to the known possibility of 2 being converted by acid-catalyzed rearrangement to an amorphenyl cation and then to 1 or its derivatives. PC1 was hardly interpretable since all high contributions came from still unidentified compounds (Figures S7 and S8, Supporting Information).

Other methods were attempted for factor extraction and resulted in very similar models. Factor analysis using the method of minimum residuals resulted in similar relations for the first three factors, but the fourth was very different probably because some variables had high variability that is unique to each of them (data not shown). Reduction of the number of variables with exclusion of those poorly represented in the original data set and/or poorly loading on the factors and repeating the analysis with the maximum likelihood method resulted in a similar model, with ML1 contributing to variability in 4, 5, 6, and 3. ML3 contributed positively to 9, 13, and 19 and negatively for 16 and 23. ML4 contributed positively for 1 and 2 and negatively for 20, 16, and 23. Finally, ML2 contributed positively for 7 and 19 and negatively for 12 and 10.

Results from EFA, specifically PC4 (1, 2  $\times$  18, 20, 16) and ML4 (1, 2  $\times$  20, 16, 23), revealed a clear pattern correlating verbocidentafuran (16) and 3-oxo-verbocidentafuran (23) negatively to their precursor, amorpha-4,7(11)-diene (1), but

F

DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00313  
J. Nat. Prod. XXXX, XXX, XXX–XXX

positively to amorpho-4,7(11)-dien-8-one (**20**). On the basis of this information, we hypothesized that **20** was an intermediate in the biosynthesis of verbocidentafuran (**16**) and 3-oxo-verbocidentafuran (**23**) from amorpho-4,7(11)-diene (**1**). A putative route paralleling the biosynthesis of menthofuran from pulegone<sup>40</sup> was proposed, and a search for the hypothetical intermediate between **1** and **16** resulted in the compound amorpho-4,7(11)-dien-8-one with the same mass spectrum as **20** (not previously included in a published databank).<sup>41</sup>

This is the first report on the chemical composition of the essential oils of *E. tremulum*. The occurrence of furanesquiterpenes in this species correlates it to two other *Eupatorium* species known to produce very similar and even identical furanesquiterpenes: *E. laevigatum* (*Chromolaena laevigata*) and *E. itatyaiensis*, both native of the state of Rio Grande do Sul, Brazil. The three species, however, were assigned to different sections in Cabrera and Klein's subdivision of the genus *Eupatorium* and to different genera and subtribes in King and Robinson's system; therefore the chemical similarity observed between them does not correspond to a botanical proximity in any of the current systematic approaches to Eupatorieae.<sup>13</sup>

Different samples of *E. tremulum* volatile oils exhibited high quantitative variability. The individual variability in this species was higher than variability due to phenophasal changes, for example. This observation has complicated the statistical analysis of randomly collected samples, although paired sampling allowed for the identification of compounds changing regularly in each phenophase (preblooming, blooming, and postblooming) with a small *n* value, even if they were not the main source of variation.

PCA was not useful for identifying patterns in phenophasal changes. However, LDA and OPLSDA were very successful approaches. Through OPLSDA of the differences in percentage composition between each phenophase, it was possible to identify a series of compositional changes in the volatile oil, between either the main (identified) or the minor (yet unidentified) compounds, and helped in the identification of amorpho-4-en-7-ol (**13**) as a main hydroxylation product of amorpho-4,7(11)-diene (**1**).

Finally, the reduction of edaphic, climatic, and genetic variability through the sampling of a geographically delimited population and the reduction of the phenophasal variability through the mean centering of paired-sampled data resulted in a data set from which the relations between different (sets of) compounds could be assessed, revealing possible biogenetic relations between them. This approach proved to be useful in the identification of amorpho-4-en-7-ol (**13**) as a putative hydroxylation product of amorpho-4,7(11)-diene (**1**) and of amorpho-4,7(11)-dien-8-one (**20**) as a putative biosynthetic intermediate between amorpho-4,7(11)-diene (**1**) and the furanesquiterpenes verbocidentafuran (**16**) and 3-oxo-verbocidentafuran (**23**).

## EXPERIMENTAL SECTION

**Plant Material.** Aerial parts of *E. tremulum* Hook. & Arn. [syn. *Raulinoreitzia tremula* (Hook. & Arn.) R.M.King & H.Rob.] were collected in the municipality of Guaíba, RS, Brazil (GPS S 30°2'45.7" W 051°21'41.1", altitude 20 ft (6 m)) (Figure S1, Supporting Information). Voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Federal University of Rio Grande do Sul (ICN 106808). The plants were collected in the period of January–June 2014. Combined aerial parts were submitted to water distillation for 4 h using a Clevenger-type apparatus. Essential oil yield was around 0.5% for all specimens (v/w, from fresh material).

**GC-MS Analysis.** GC-MS analysis was performed in a Shimadzu GC-17A instrument (Tokyo, Japan) equipped with a Shimadzu QP-5000-quadrupole MS system, operating with an ionization energy of 70 eV and an interface temperature of 250 °C. A DB-5 fused silica capillary column (30 m, 0.25 mm; film thickness 0.25 µm; Supelco) was used. Injector and detector temperatures were set at 220 and 250 °C, respectively; the oven temperature was programmed from 60 to 300 °C at 3 °C/min, and helium was employed as carrier gas (1 mL min<sup>-1</sup>). The percentage compositions were obtained from electronic integration measurements, by normalization. Scan time and mass range were 1 s and *m/z* 40–500, respectively, and the injection volume was 1 µL. Duplicate injections were performed for the first 10 samples. Variation between replicates was more than 1 order of magnitude lower than between samples, and the remaining samples were analyzed once. Identification of compounds was performed by comparing retention indices (RI, determined relatively to the retention times of a series of *n*-alkanes (*n*C10–*n*C30)) and mass spectra with those of authentic samples, with literature data<sup>42</sup> and an electronic library database (NIST 62).

**Data Pretreatment and Statistical Analysis.** Percentage areas for the 23 main sesquiterpenoids were tabulated. Initially, the whole data set (three phases) for raw variability was evaluated. For an unsupervised approach (PCA) the data set was centered and scaled (pareto, standard), and each data pretreatment procedure was analyzed. In the supervised approach (LDA, a scale-insensitive technique) only centered data were used. After, the difference for each variable between each pair of classes was calculated. Pareto-scaled differences were submitted to PLSDA and OPLSDA (PCA was also performed for comparison). Mean values between each pair of classes (between-sample variability) were determined and used in FA analysis. Multivariate analyses were performed in R v.3.2.3 (2015-12-10). The MASS package (v. 7.3-45) was used in LDA,<sup>43</sup> ropls (v.1.3.12) was used in PCA, PLS, and OPLS analysis,<sup>44</sup> and muma was used for S-plots.<sup>45</sup> psych (v.1.5.8) was used in factor analysis,<sup>46</sup> and corrram (v.1.8) was used for correlograms.<sup>47</sup> Supervised techniques (PLS-DA, OPLS-DA) were applied in the analysis of within-sample variability of pairs of classes. Each OPLSDA model was cross-validated (seven groups). The ropls package was adapted for calculating confidence intervals for each predictive VIP value by cross-validation/jack-knifing. S-plots were obtained from the adapted muma package. Mean values between each pair of classes (between-sample variability) were determined and used in FA analysis with both principal component and maximum likelihood extraction methods.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b00313.

Tabulated GC-MS results, PCA and PLS score plots, OPLS-DA predictive VIPs with cv-confidence intervals and boxplot of discriminant variables for each supervised pairwise model, and correlogram and factor loading plots for FA (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*Tel (T. J. T. de Souza): +55 51 3308 5258. Fax +55 51 3308 5437. E-mail: souzatjt@gmail.com.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Dr. E. Thèvenot and Dr. A. Taketa for assistance with and discussions on multivariate analyses. M.A.A. received funding from Conselho Nacional de

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number 302586/2015-6, and T.J.T. de S. received funding from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) grant number 941616.

## REFERENCES

- (1) Pelsner, P. B.; Watson, L. In *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*; Funk, V. A.; Susanna, A.; Stuessy, T. F.; Bayer, R., Eds.; International Association for Plant Taxonomy: Vienna, 2009; Chapter 33, pp 495–502.
- (2) King, R. M.; Robinson, H. *The Genera of the Eupatorieae (Asteraceae)*, Monographs in Systematic Botany; Missouri Botanical Garden: St. Louis, MO, 1987; Vol. 22.
- (3) Cabrera, A. L. *Tribo Eupatorieae. Flora Ilustrada Catarinense, 1 parte, As plantas, Monografia. Compostas*, Vol. 4; Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, Brazil, 1989.
- (4) Gleason, H. A.; Cronquist, A. *Manual of Vascular Plants of Northeastern United States and Adjacent Canada*; New York Botanical Garden: Bronx, New York, 1991.
- (5) Heywood, V. H.; Harborne, J. B.; Turner, B. L. *The Biology and Chemistry of the Compositae*, Vols. 1–2; Academic Press: London, 1977.
- (6) Ito, M.; Watanabe, K.; Kita, Y.; Kawahara, T.; Crawford, D. J.; Yahara, T. *J. Plant Res.* **2000**, *113*, 79–89.
- (7) Schmidt, G. J.; Schilling, E. E. *Am. J. Bot.* **2000**, *87*, 716–726.
- (8) Schilling, E. E. *Syst. Bot.* **2011**, *36*, 1088–1100.
- (9) Zhang, F.; Guo, J.; Chen, F.; Liu, W.; Wan, F. *Weed Sci.* **2012**, *60*, 205–211.
- (10) Garcia Sanchez, E.; Ramirez Lopez, C. B.; del Rio Torres, R. E. N.; Martinez Pacheco, M. M. *Phyton (Buenos Aires)* **2011**, *80*, 139–146.
- (11) Matzembacher, N. I. Estudo Taxonômico do Gênero *Eupatorium* L. (Compositae) no Rio Grande do Sul – Brasil. M.S. Thesis, UFRGS, Porto Alegre, Brazil, 1979.
- (12) Lucio, J.; Furlan, F. H.; Mezaroba, S.; Traverso, S. D.; Gava, A. *Pesquisa Vet. Brasil.* **2007**, *27*, 442–445.
- (13) de Souza, T. J. T. Determinação da Composição Química e Avaliação Preliminar das Atividades Antioxidante e Anticolinérgica dos Óleos Voláteis de Espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae). M.S. Thesis, UFRGS, Porto Alegre, Brazil, 2007.
- (14) Picaud, S.; Olofsson, L.; Brodelius, M.; Brodelius, P. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *436*, 215–226.
- (15) Faraldos, J. A.; Miller, D. J.; González, V.; Yoosuf-Aly, Z.; Cascón, O.; Li, A.; Allemann, R. K. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5900–5908.
- (16) Kim, S. H.; Heo, K.; Chang, Y. J.; Park, S. H.; Rhee, S. K.; Kim, S. U. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 758–762.
- (17) Westerhuis, J. A.; van Velzen, E. J.; Hoefsloot, H. C.; Smilde, A. K. *Metabolomics* **2010**, *6*, 119–128.
- (18) Trygg, J.; Wold, S. *J. Chemom.* **2002**, *16*, 119–128.
- (19) Bylesjö, M.; Rantalainen, M.; Cloarec, O.; Nicholson, J. K.; Holmes, E.; Trygg, J. *J. Chemom.* **2006**, *20*, 341–351.
- (20) Yde, C. C.; Westerhuis, J. A.; Bertram, H. C.; Knudsen, K. E. B. *Br. J. Nutr.* **2012**, *107*, 1603–1615.
- (21) Zheng, P.; Wang, Y.; Chen, L.; Yang, D.; Meng, H.; Zhou, D.; Zhong, J.; Lei, Y.; Melgiri, N. D.; Xie, P. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12*, 207–214.
- (22) Hug, C.; Sievers, M.; Ottermanns, R.; Hollert, H.; Brack, W.; Krauss, M. *Chemosphere* **2015**, *138*, 176–182.
- (23) Thomas, D. R.; Hughes, E.; Zumbo, B. D. *Soc. Indic. Res.* **1998**, *45*, 253–275.
- (24) Brereton, R. G.; Lloyd, G. R. *J. Chemom.* **2014**, *28*, 213–225.
- (25) Reichling, J.; Bisson, W.; Becker, H.; Schilling, G. *Z. Naturforsch. C* **1983**, *38*, 159–164.
- (26) Sangwan, N. S.; Farooqi, A. H. A.; Shabih, F.; Sangwan, R. S. *Plant Growth Regul.* **2001**, *34*, 3–21.
- (27) Yu, Z. X.; Wang, L. J.; Zhao, B.; Shan, C. M.; Zhang, Y. H.; Chen, D. F.; Chen, X. Y. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 98–110.
- (28) Andreucci, A. C.; Ciccarelli, D.; Desideri, I.; Pagni, A. M. *Ann. Bot. Fenn.* **2008**, *45*, 11–18.
- (29) de Souza, T. J. T. Personal communication.
- (30) Plos, A.; Sancho, G.; Iharlegui, L. *J. Torrey Bot. Soc.* **2011**, *138*, 391–399.
- (31) Attia, M.; Kim, S. U.; Ro, D. K. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *527*, 37–44.
- (32) Mercke, P.; Bengtsson, M.; Bouwmeester, H. J.; Posthumus, M. A.; Brodelius, P. E. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, *381*, 173–180.
- (33) Ricigliano, V.; Kumar, S.; Kinison, S.; Brooks, C.; Nybo, S. E.; Chappell, J.; Howarth, D. G. *Phytochemistry* **2016**, *125*, 43–53.
- (34) Rani, A.; Ravikumar, P.; Reddy, M. D.; Kush, A. *Gene* **2013**, *527*, 642–648.
- (35) Weitzel, C.; Simonsen, H. T. *Phytochem. Rev.* **2015**, *14*, 7–24.
- (36) Costello, A. B.; Osborne, J. W. *Pract. Assess. Res. Eval.* **2005**, *10*, 1–9.
- (37) Williams, B.; Brown, T.; Onsmann, A. *Austr. J. Paramed.* **2012**, *8*, 1–13.
- (38) Mirman, D.; Chen, Q.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Faseyitan, O. K.; Coslett, H. B.; Schwartz, M. F. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 7762.
- (39) Mirman, D.; Zhang, Y.; Wang, Z.; Coslett, H. B.; Schwartz, M. F. *Neuropsychologia* **2015**, *76*, 208–219.
- (40) Bertea, C. M.; Schalk, M.; Karp, F.; Maffei, M.; Croteau, R. *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *390*, 279–286.
- (41) Weyerstahl, P.; Marschall, H.; Seelmann, I.; Kaul, V. K. *Flavour Fragrance J.* **1997**, *12*, 387–396.
- (42) Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*; Allured Business Media: Carol Stream, IL, 2009.
- (43) Venables, W. N.; Ripley, B. D. *Modern Applied Statistics with S (Statistics and Computing)*, 4th ed.; Springer: New York, 2002.
- (44) Thévenot, E. A.; Roux, A.; Xu, Y.; Ezan, E.; Junot, C. *J. Proteome Res.* **2015**, *14*, 3322–3335.
- (45) Gaude, E.; Chignola, F.; Spiliotopoulos, D.; Mari, S.; Spitaleri, A.; Ghitti, M. *Muma: Metabolomics Univariate and Multivariate Analysis*, R Package Version 1.4; 2012.
- (46) Revelle, W. *Psych: Procedures for Personality and Psychological Research*, version 1.5.8; Northwestern University: Evanston, IL, 2015.
- (47) Wright, K. *Corrgram: Plot a Correlogram*, R Package Version 1.8; 2015.

Material Suplementar.

**A Chemometrics Approach to the Investigation of the Intraspecific Variability of the Volatile Oil of *Eupatorium tremulum* from Southern Brazil**

Tiago J. T. de Souza;<sup>†,\*</sup> Sérgio A. L. Bordignon;<sup>‡</sup> Miriam A. Apel<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 90610-000, Porto Alegre, Brazil

<sup>‡</sup>Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, Centro Universitário La Salle, Canoas, Brazil



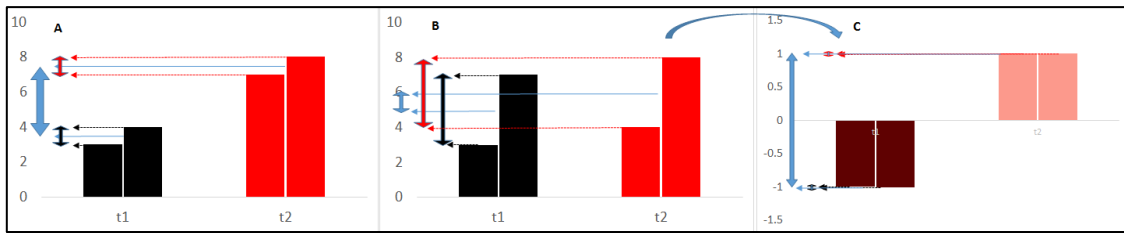
**Figure S1.** Location and general aspect of *Eupatorium tremulum*. Left upper: Google Earth view of the collection site; left lower: lateral view of the collection site; right: a frontal view of one specimen.

**Table S1. Percentage area Composition of the Essential Oil of *Eupatorium tremulum*.**

class		1 <sup>b</sup>	2 <sup>c</sup>	3 <sup>d</sup>	4 <sup>e</sup>	5 <sup>f</sup>	6 <sup>g</sup>	7 <sup>h</sup>	8 <sup>i</sup>	9 <sup>j</sup>	10 <sup>k</sup>	11 <sup>l</sup>	12 <sup>m</sup>	13 <sup>n*</sup>	14 <sup>o</sup>	15 <sup>p</sup>	16 <sup>q</sup>	17 <sup>r</sup>	18 <sup>s</sup>	19 <sup>t</sup>	20 <sup>u*</sup>	21 <sup>v</sup>	22 <sup>w</sup>	23 <sup>x</sup>	total
		MS	MS	MS	MS, Ref	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS, Ref	MS	MS	MS, Ref	MS	MS	MS	MS, Ref	MS
	RI <sup>a</sup>	1461	1462	1463	1465	1490	1505	1510	1514	1591	1599	1604	1615	1623	1632	1638	1658	1660	1662	1681	1690	1717	1779	1865	-
Pre-Bloom	e1	4.3	2.6	1.5	1.9	2.1	2.1	0.6	0.6	2.6	5.1	ND	4.5	8.4	1.1	6.7	8.5	ND	ND	14.0	0.6	0.2	ND	20.5	87.9
	e2	6.5	2.6	2.2	6.1	7.0	4.8	1.3	0.4	1.7	3.9	0.6	1.0	9.8	ND	ND	10.6	ND	ND	14.1	0.4	ND	ND	14.2	87.2
	e3	12.5	6.3	2.3	4.8	5.7	4.1	1.6	0.3	3.9	3.7	1.0	1.8	12.6	ND	ND	1.5	3.0	ND	18.9	1.0	ND	0.7	2.6	88.3
	e4	7.6	3.5	1.3	2.5	3.0	2.8	1.4	0.4	3.4	4.7	0.8	1.9	11.0	ND	ND	7.1	3.2	ND	17.9	1.2	0.8	ND	18.7	93.2
	e5	4.2	2.8	1.3	2.2	2.5	2.4	1.1	0.2	4.3	6.7	ND	0.9	10.7	ND	ND	14.1	ND	ND	16.6	1.7	1.2	ND	17.9	90.8
	e6	9.5	5.3	1.7	4.4	4.1	3.6	0.8	0.6	4.0	4.1	1.0	2.2	11.8	ND	ND	0.8	3.5	ND	19.5	1.5	0.9	ND	2.9	82.2
	e7	5.7	2.9	1.4	5.2	6.3	4.0	1.4	0.3	3.7	3.5	1.0	2.3	14.1	ND	ND	3.6	2.0	ND	22.8	3.7	1.1	ND	4.9	89.9
	e8	5.6	4.7	1.5	3.9	3.7	3.1	0.5	0.3	1.6	3.6	1.1	1.1	10.0	ND	ND	17.4	ND	0.8	14.6	2.1	0.6	ND	18.2	94.4
	e9	3.9	3.8	2.1	4.9	5.2	3.6	0.8	0.2	2.7	3.5	1.3	1.2	12.5	ND	0.5	6.1	4.0	1.1	21.8	2.9	0.8	ND	12.3	95.2
	e10	2.5	2.4	1.2	3.2	2.7	1.8	0.9	0.2	2.4	4.2	1.3	1.5	13.2	ND	ND	6.1	4.9	0.7	18.1	2.5	1.0	0.7	19.5	91.0
Bloom	f1	6.3	3.8	1.8	2.4	2.1	1.9	0.7	0.6	3.2	3.9	1.1	3.6	10.3	1.2	ND	5.1	3.9	ND	14.0	2.3	0.9	ND	17.9	87.0
	f2	8.9	4.1	1.9	4.0	5.1	3.9	0.9	0.4	2.3	2.7	0.9	1.3	9.4	ND	ND	5.1	4.3	ND	14.0	1.4	0.7	0.5	15.5	87.3
	f3	13.6	4.6	2.3	3.3	5.1	3.6	ND	0.3	3.6	3.0	0.8	1.0	10.1	ND	ND	1.6	2.3	0.9	14.7	1.1	0.7	0.6	2.3	75.5
	f4	12.4	5.7	1.8	4.2	4.0	3.5	1.0	0.5	1.9	3.1	1.1	1.5	9.9	ND	ND	6.1	3.0	0.5	14.5	1.0	0.5	0.3	15.1	91.6
	f5	6.3	4.7	1.6	3.6	3.7	3.4	1.3	ND	3.6	4.6	0.9	0.9	10.2	0.5	ND	8.1	4.1	0.9	15.0	1.7	0.7	0.6	11.4	87.8
	f6	7.0	4.2	1.1	2.9	2.1	2.1	1.2	0.2	2.2	4.2	1.1	1.2	11.0	0.6	ND	5.1	4.6	0.8	16.5	1.3	0.6	0.5	20.7	91.2
	f7	7.4	3.8	1.8	6.2	3.6	2.9	0.5	0.5	3.1	2.9	1.1	1.3	10.6	ND	ND	6.1	2.5	0.5	17.3	1.6	0.3	1.2	5.9	81.1
	f8	4.8	2.7	1.3	3.4	2.5	2.2	0.7	ND	2.2	5.2	1.3	1.1	12.6	ND	ND	10.0	4.0	1.2	16.2	1.8	0.6	0.7	16.2	90.7
	f9	9.7	6.1	2.1	6.0	6.9	4.7	0.7	ND	2.5	2.6	0.8	0.7	9.9	ND	ND	6.1	1.8	1.2	15.6	2.6	0.8	0.8	6.3	87.9

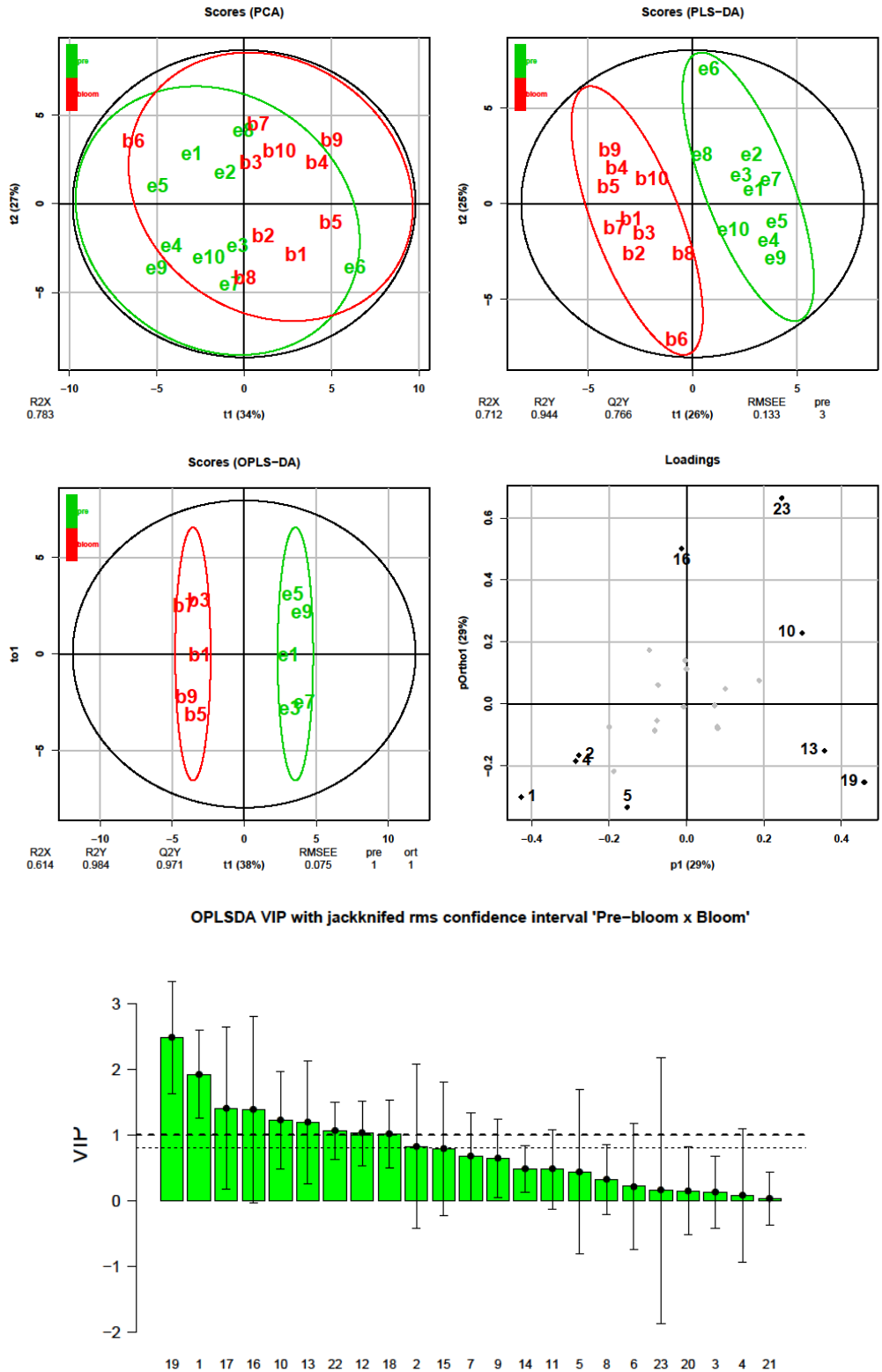
	f1 0	4.6	3.4	1.3	4.1	4.4	3.1	0.4	0.2	2.4	3.2	1.0	1.0	10.8	0.2	ND	7.1	3.4	0.6	14.4	2.0	0.9	0.8	19.3	88.6
Post-Bloom	s1	4.1	2.0	1.9	3.9	5.4	3.5	0.5	ND	ND	3.7	0.4	ND	11.0	0.5	ND	5.1	1.6	0.6	17.4	2.3	1.0	ND	17.5	82.4
	s2	5.5	1.8	1.1	3.1	2.7	2.3	1.2	0.1	1.4	2.5	1.7	1.4	10.4	ND	ND	6.0	3.8	0.9	16.3	2.2	0.2	0.5	25.7	90.8
	s3	6.5	2.8	1.7	2.8	2.7	1.6	0.9	0.4	4.9	3.9	0.9	2.9	11.1	1.4	ND	6.1	2.1	ND	15.3	1.9	0.8	ND	12.3	83.0
	s4	3.9	1.9	1.5	4.0	5.4	3.3	0.6	ND	4.8	4.7	0.6	ND	12.1	ND	ND	7.1	2.7	0.7	18.8	1.8	1.0	1.3	15.7	91.9
	s5	6.6	4.6	1.0	2.9	4.0	2.7	2.8	ND	5.5	3.9	1.2	0.7	14.4	ND	ND	0.7	4.4	1.5	22.2	1.0	0.8	0.7	1.4	83.0
	s6	6.2	5.1	1.1	2.9	2.1	2.1	1.2	0.2	2.2	4.2	1.1	1.2	11.0	ND	ND	7.1	2.6	0.8	16.5	1.3	0.6	0.5	20.7	90.7
	s7	4.7	3.5	1.2	3.3	3.3	2.7	ND	ND	5.8	6.3	1.1	0.5	13.6	ND	0.6	3.2	5.6	0.5	20.9	1.8	ND	1.0	7.8	87.4
	s8	3.6	1.7	0.9	2.4	2.1	1.8	0.5	ND	3.6	5.5	1.2	1.2	11.9	ND	0.4	15.1	3.5	1.7	18.2	2.2	0.8	0.8	13.1	92.2
	s9	3.4	2.5	1.0	2.1	2.4	2.0	0.4	0.1	3.4	7.0	ND	0.6	10.4	ND	ND	13.1	2.0	1.8	16.9	2.6	0.1	1.2	20.0	93.0
	s1 0	4.9	2.6	1.7	2.8	4.4	3.0	1.3	ND	6.0	4.3	ND	ND	10.8	ND	ND	5.0	3.3	ND	20.8	ND	ND	ND	11.4	82.3

<sup>a</sup>: Retention Index; <sup>b</sup>: **1** (amorpha-4,7(11)-diene); <sup>c</sup>: **2** (germacrene D); <sup>d</sup>: **3** ( $\gamma$ -himachallene); <sup>e</sup>: **4** ( $\beta$ -bisabolene); <sup>f</sup>: **5** ( $\beta$ -sesquiphellandrene); <sup>g</sup>: **6** (unknown); <sup>h</sup>: **7** (liguloxide); <sup>i</sup>: **8** (unknown); <sup>j</sup>: **9** (unknown); <sup>k</sup>: **10** (unknown); <sup>l</sup>: **11** (unknown); <sup>m</sup>: **12** (unknown); <sup>n</sup>: **13** (amorpha-4-en-7-ol); <sup>o</sup>: **14** (unknown); <sup>p</sup>: **15** (unknown); <sup>q</sup>: **16** (verboccidentafuran); <sup>r</sup>: **17** (unknown); <sup>s</sup>: **18** (unknown); <sup>t</sup>: **19** (*epi*- $\alpha$ -bisabolol); <sup>u</sup>: **20** (amorpha-4,7(11)-dien-8-one); <sup>v</sup>: **21** (unknown); <sup>w</sup>: **22** (unknown); <sup>x</sup>: **23** (3-oxo-verboccidentafuran); total: percentage area of the sesquiterpenes included in the analysis; MS: substance identified by comparison of mass spectrum with literature data, Ref: substance identified by comparison with authentic samples; ND: not detected; \* putatively identified using combined multivariate results and spectral data;

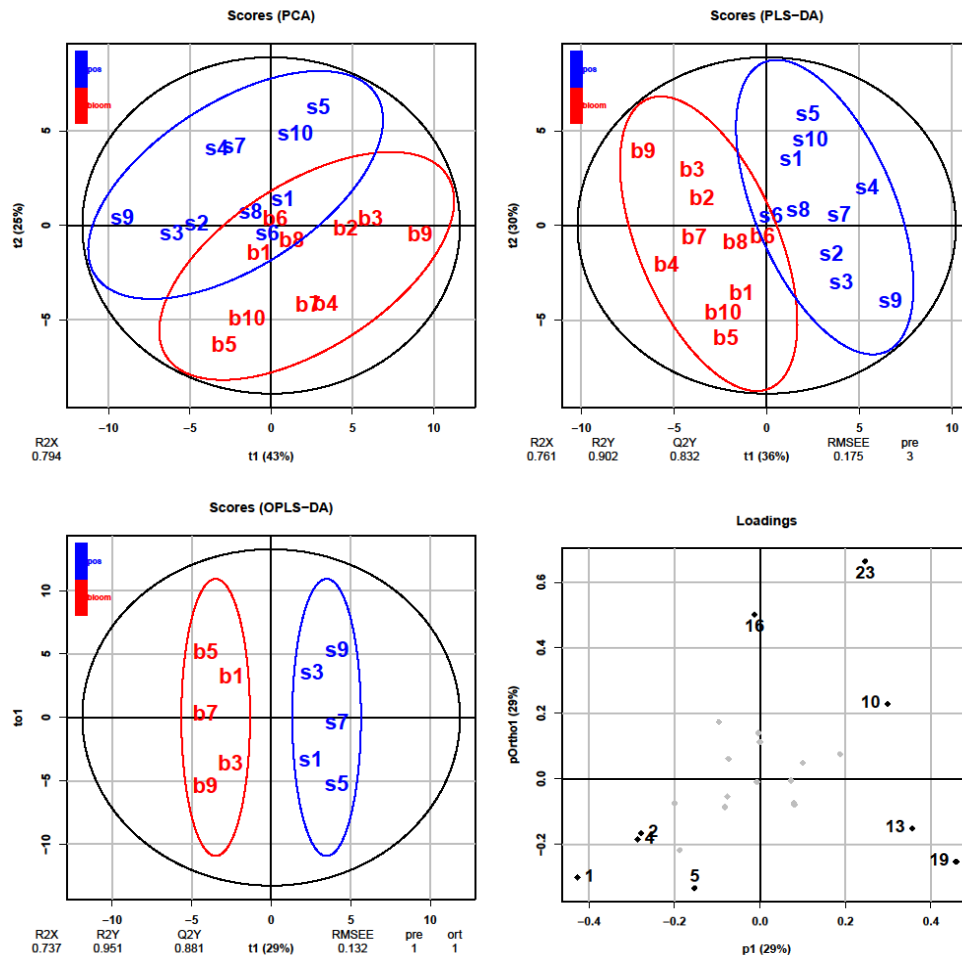


**Figure S2.** a simulated univariate dataset with two sampling units and two sampling times (t1 and t2). A) Low individual and high class variability; B) high individual and low class variability; C) Differences from B for a paired dataset. Bold double arrows - Differences; black – between t1 samples; red – between t2 samples; blue – between means

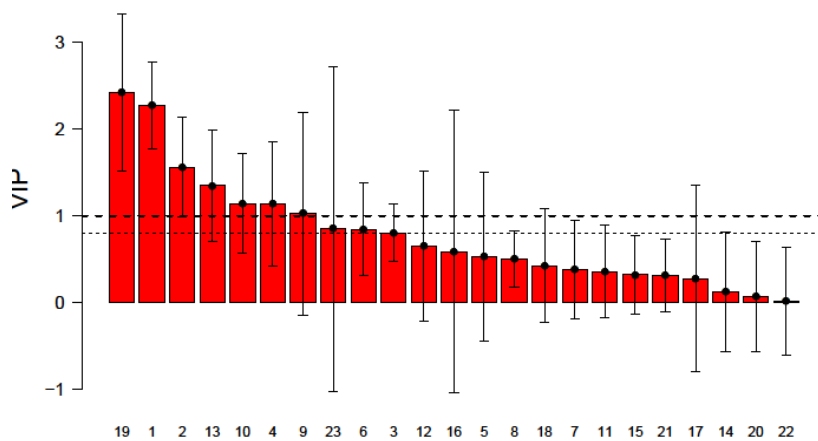




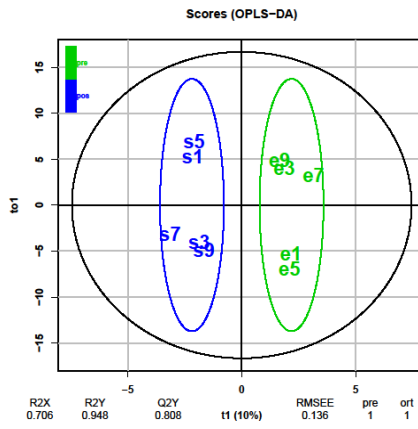
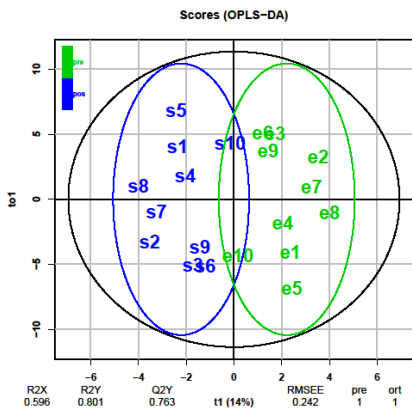
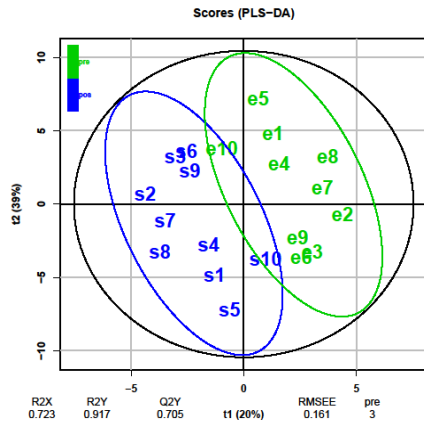
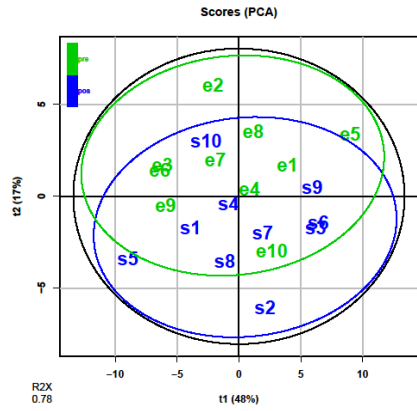
**Figure S3.** *within*-samples variability from Pre-blooming x Blooming samples: PCA scores (b=blooming samples, e=pre-blooming samples), PLS-DA scores; cross-validated OPLS-DA scores and loadings; OPLS-DA VIP values with jack-knife confidence interval. Numbers in the Figure correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.



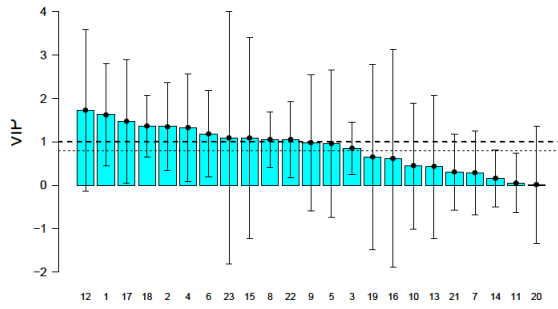
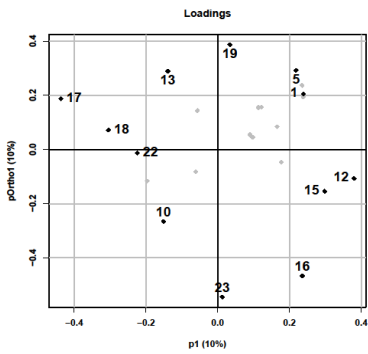
OPLS-DA VIP with jackknifed rms confidence interval 'Bloom x Post-bloom'



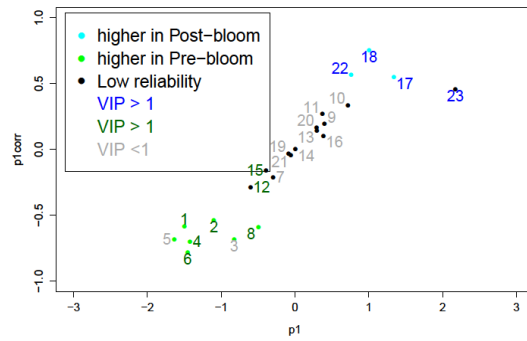
**Figure S4.** *within*-samples variability from Blooming x Post-blooming samples: PCA scores (b=blooming samples, s=post-blooming samples), PLS-DA scores; cross-validated OPLS-DA scores and loadings; OPLS-DA VIP values with jack-knife confidence interval. Numbers in the Figure correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.



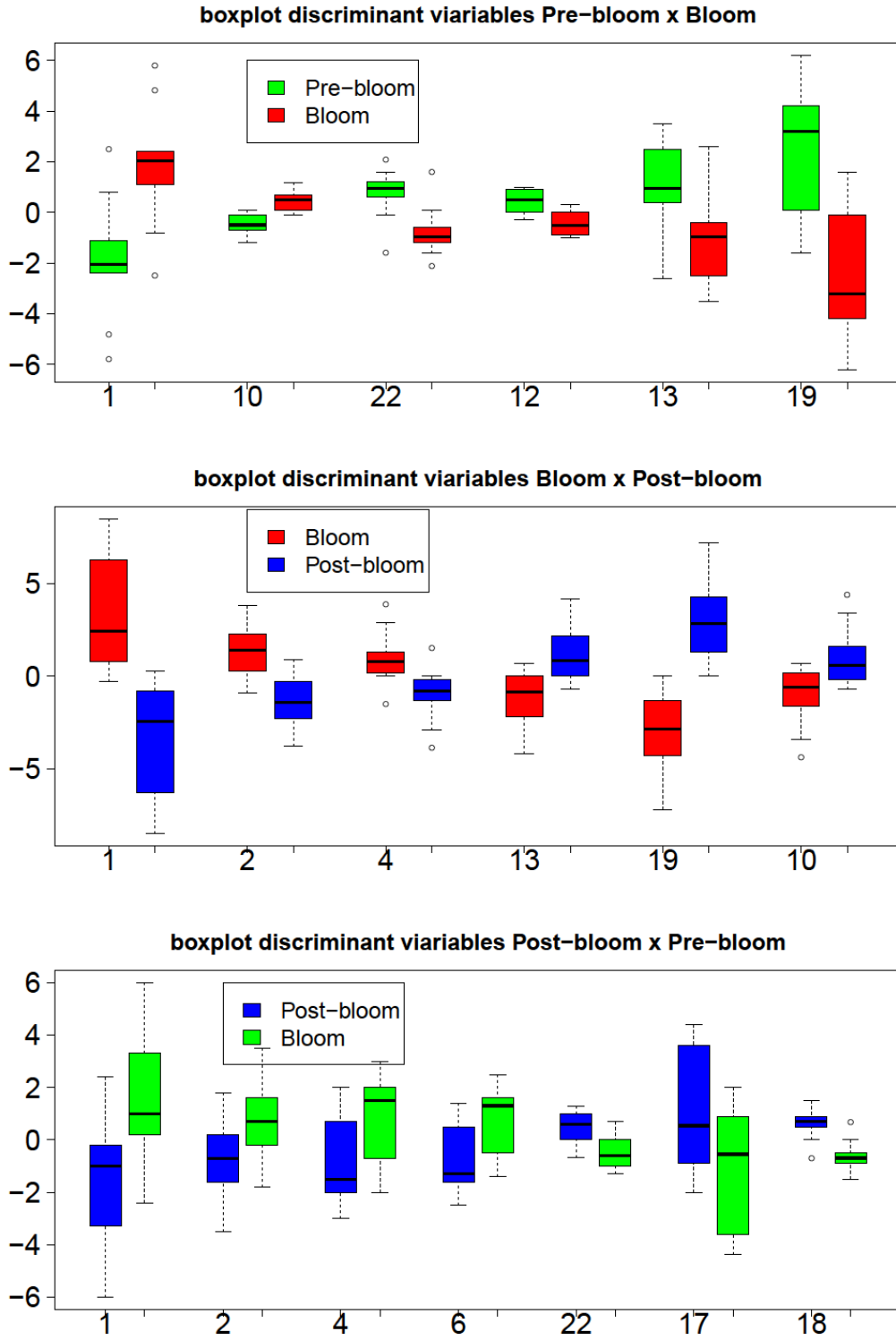
OPLSDA VIP with jackknifed rms confidence interval 'Post-bloom x Pre-bloom'



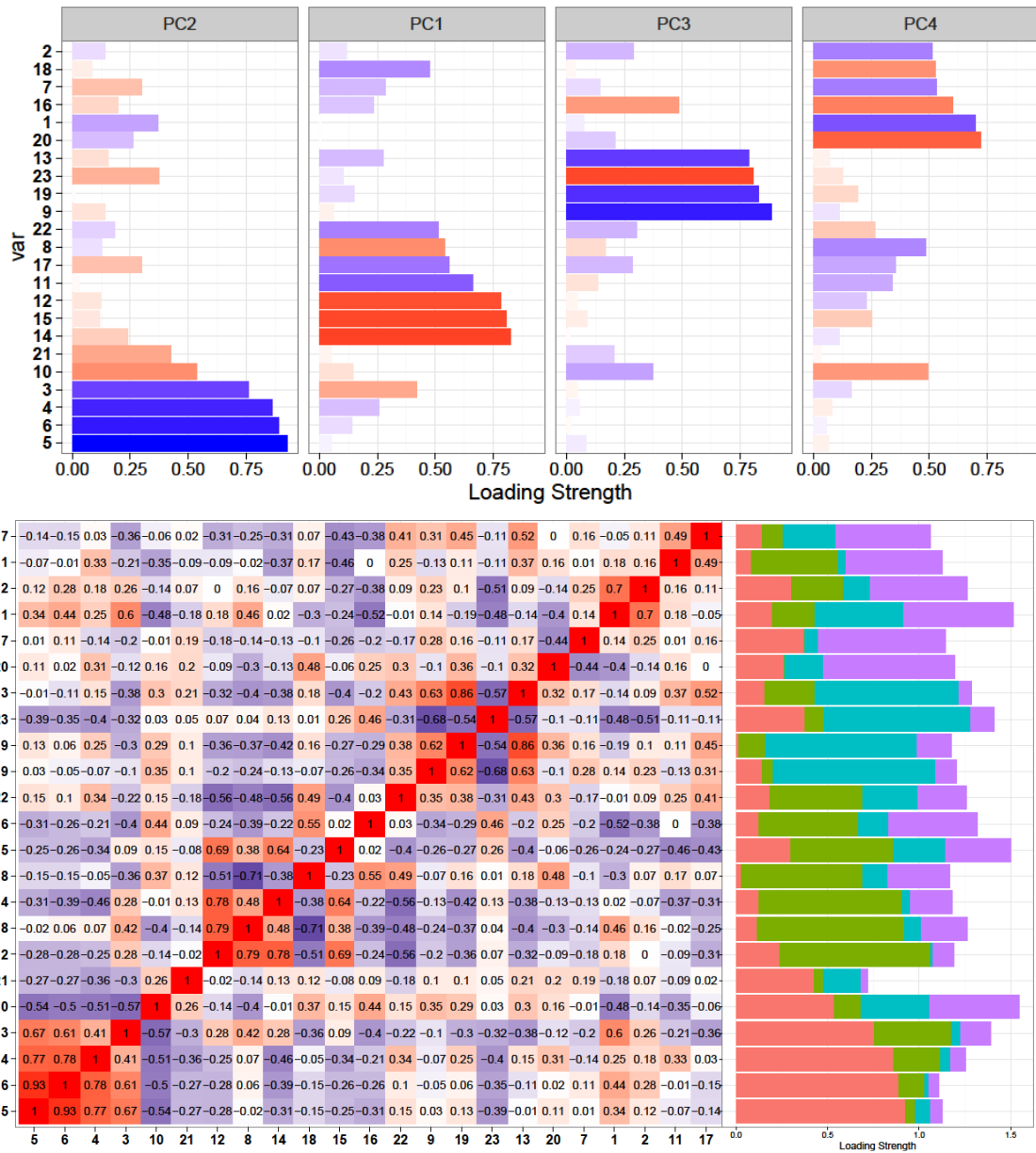
S-plot Post-bloom x Pre-bloom



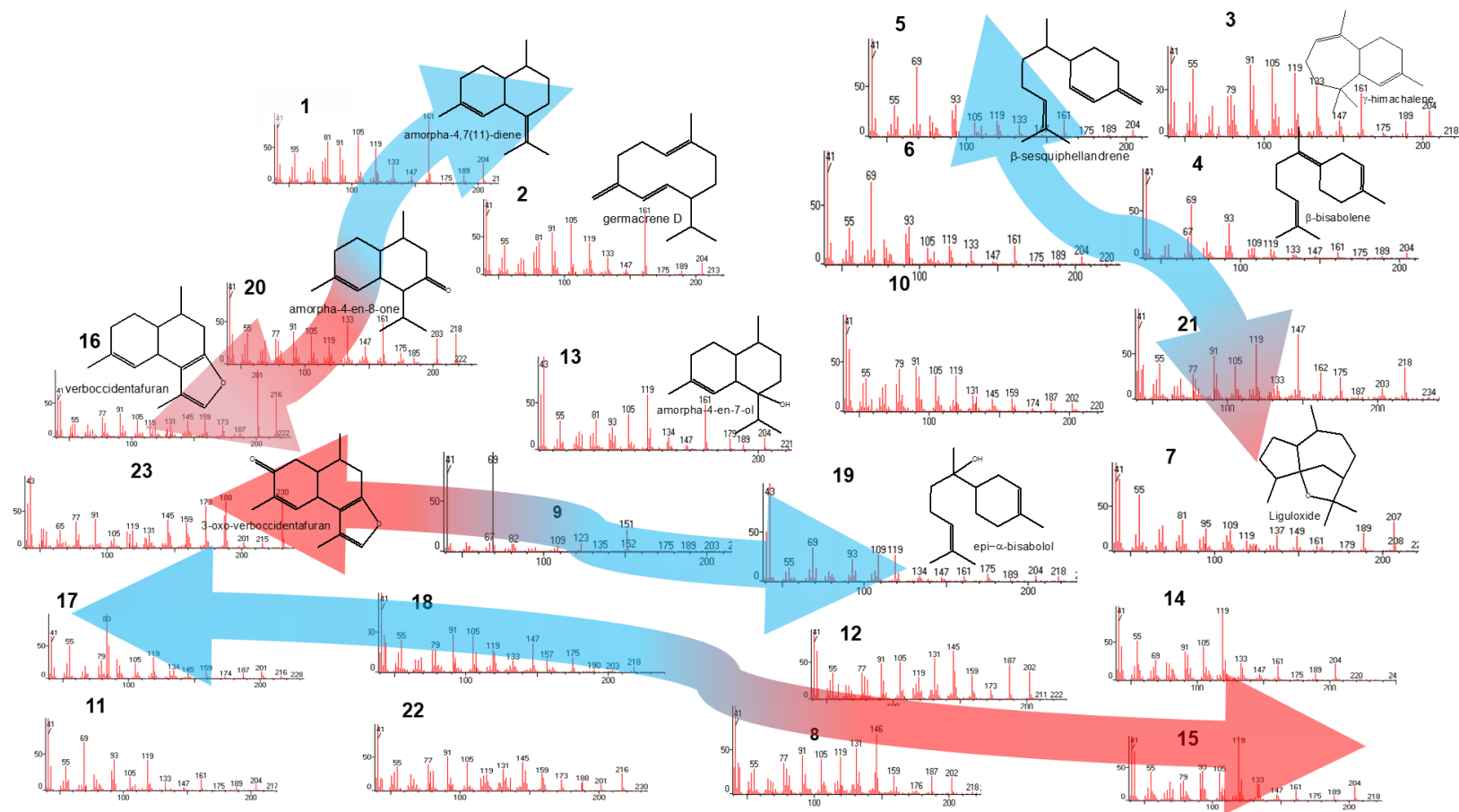
**Figure S5.** *within*-samples variability from Post-blooming x Pre-blooming x samples: PCA scores (e=pre-blooming samples, s=post-blooming samples), PLS-DA scores; OPLS-DA scores, cross-validated -OPLS-DA scores, cross-validated OPLS-DA loadings, OPLS-DA VIP values with jack-knife confidence interval, S-plot from OPLS-DA (blue circles: positive correlation >0.5 with Post-blooming samples; green circles: positive correlation >0.5 with Pre-blooming samples; black circles: correlation < 0.5; blue label: VIP values >1 (for variables positively correlated to Post-blooming samples); green label: VIP values >1 (for variables positively correlated to Pre-blooming samples); grey label: VIP values < 1). Numbers in the Figure correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.



**Figure S6.** Boxplot depicting differential range for discriminating variables in each model. Numbers in the Figure correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.



**Figure S7.** FA with PCA extraction (23 variables). Upper: contribution of the factors in each variable. Lower: correlogram (red: positive correlations, blue: negative correlations); Lower right bar chart: representation of the contribution of each factor on each variable, aligned to the correlation clusters. Bold numbers in the Figure correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.



**Figure S8.** Compounds Identified in the essential oil of *Eupatorium tremulum*. Arrows represent factors extracted with the maximum likelihood method. Arrow colours as in Figure S7 (upper). Bold numbers in the Figure correspond to those in Chart 1 and Table S1, Supporting Information.





## **2.1 MANUSCRITO II**

A metodologia relacionada a este capítulo, bem como os resultados e discussão dos mesmos serão apresentados a seguir na forma de um manuscrito a ser submetido para publicação.



**Inter- and intraspecific variability in chemical composition of essential oils from southern Brazilian Eupatorieae (Asteraceae) species**

Souza, T.J.T.<sup>1</sup>; Brodignon, S.L.A.<sup>2</sup>; Apel, M.A.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>PPGCF, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Avaliação de Impactos Ambientais, Centro Universitário La Salle, Canoas, Brasil

\**Adress for Correspondence:* Miriam Anders Apel - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Brasil. Tel.: +55 51 3308 5258. E-mail address: [miriam.apel@gmail.com](mailto:miriam.apel@gmail.com)

**Keywords:** Essential oils, Asteraceae, *Eupatorium*, 3-oxo-verbocidentafuran.

Abstract

*Eupatorium* is a mainly New World distributed genus in the Asteraceae family. Most species have been moved to several smaller genera in the past decades. In this paper, we describe the volatile chemistry of 8 formerly *Eupatorium* species now assigned to *Chromolaena*, *Austroeupatorium*, *Raulinoreitzia*, *Grazielia* and *Symphyopappus*. The essential oil from *E. laevigatum*, *E. tremulum*, and *E. itatiayensis* is rich in furansesquiterpenes, laevigatin, verbocidentafuran and 3-oxo-verboxidentafuran.

1. Introduction

Eupatorieae is one of the biggest tribes in Asteraceae, currently comprising 182 genera and 2200 mainly New World species (PELSER and WATSON, 2009). Most of them belonged previously to genera *Mikania*, *Stevia* and specially *Eupatorium*. King & Robinson (1987) reorganized the tribe, splitting up *Eupatorium* in several smaller (sometimes monotypic) genera and joining them

in many subtribes. Only 44 species from North America, Europe and Asia were maintained in the genus, in a drastic approach that have not attained consensus in the synanthology community, with some authors still accepting the classification system where *Eupatorium* (*sensu* Cabrera) contains more than 600 species (Cabrera & Klein, 1989; Gleason and Cronquist, 1991; Turner, 1997). Molecular analysis of nrITS and cpDNA have shown that indeed *Eupatorium* (*sensu* stricto) may be even more distant from South American species than King & Robinson estimated when put them in the same subtribe (Eupatoriinae) after splitting the genus (ITO, 2000; Schmidt & Schilling, 2000; Schilling 2011).

Some American *Eupatorium* species have become economically threatening weeds throughout Africa, Asia and Oceania, mainly due to strong allelopathic activity of their volatile compounds (Zhang et al., 2012), others are important for their toxic effects on cattle and some of them are used in traditional American, Chinese and Indian medicine, like *E. odoratum*, *E. cannabinum*, *Ayapana triplinervis* and others (Garcia Sanchez et al, 2011). The essential oils from most species of *Eupatorium*, however, have yet not been chemically characterized.

The aim of this study was to characterize interspecific variability in the chemical composition of the essential oils from aerial parts of eight Southern Brazilian *Eupatorium* species, now in genera *Chromolaena*, *Austroeupatorium*, *Raulinoreitzia*, *Grazielia* and *Symphyopappus* and characterize phenophasical variability in *Eupatorium tremulum* (syn. *Raulinoreitzia tremula*).

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant material

Aerial parts of eight species of *Eupatorium* (s.l.) were collected in Southern Brazil (Rio Grande do Sul State), in the municipalities of Canela, Guaíba and Três Cachoeiras. Species collected were *E. ivifolium* L. (syn. *Chromolaena ivifolia* (L.) R.M.King & H.Rob.), *E. laevigatum* Lam. (*Chromolaena laevigata* (Lam.) R.M.King & H.Rob.), *E. inulifolium* Kunth (syn. *Austroeupatorium inulifolium* (Kunth) R.M.King & H.Rob.), *E. picturatum* Malme (*Austroeupatorium picturatum*

(Malme) R.M.King & H.Rob.), *E. polystachyum* DC. (syn. *Raulinoreitzia crenulata* (Sprengel) R.M.King & H.Rob.), *E. tremulum* Hook. & Arn. (syn. *Raulinoreitzia tremula* (Hook. & Arn. ) R.M.King & H.Rob), *E. gaudichaudianum* DC. (*Grazielia gaudichaudeana* (DC.) R.M.King & H.Rob), and *E. itatiayense* Hieron. (syn. *S. itatiayensis* (Hieron.) R.M.King & H.Rob.) in April 2010, January 2011, and May-July 2013, according to Table 1.

Voucher specimens were deposited at the Herbarium of the Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

## 2.2. Sampling and essential oils isolation

Leaves, inflorescences or combined aerial parts were submitted to water distillation for 4 h using a Clevenger-type apparatus. Essential oil yield, ranged between 0.05% and 0.97% (v/w, from fresh material).

## 2.3. GC/MS analyses

GC/MS analysis was performed using a Shimadzu GC-17A chromatograph (Tokyo, Japan) and Shimadzu QP-5000-quadrupole MS system, operating with ionization energy of 70 eV and an interface temperature of 250 °C. Scan time and mass range were 1 s and 40 - 400 m/z, respectively, and the injection volume was 1 µL. A DB-5 fused silica capillary column (30 m, 0.25 mm; film thickness 0.25 µm; Supelco) was used. Injector and detector temperatures were set at 220°C and 250°C, respectively; the oven temperature was programmed from 60°-300°C at 3°C/min and helium was employed as carrier gas (1 mL/min). Percentage compositions were obtained from electronic integration measurements, by normalization. Compound identification was performed by comparing retention indices (RI, determined relatively to the retention times of a series of n-alkanes) and mass spectra with those of authentic samples and with literature data (Adams, 2009) and an electronic library database (NIST 62).

	a	b	c	d	e	f	g	h
Eupatorium Section (Cabrera & Klein)	Sect. <i>Cylindrocephala</i>		Sect. <i>Subimbricata</i>				Sect. <i>Dimorpholepis</i>	Seção <i>Symphypappus</i>
Species (Cabrera & Klein)	<i>E. ivifolium</i> L.	<i>E. laevigatum</i> Lam.	<i>E. inulifolium</i> Kunth	<i>E. picturatum</i> Malme	<i>E. polystachyum</i> DC.	<i>E. tremulum</i> Hook. & Arn.	<i>E. gaudichaudianum</i> DC.	<i>E. itatiayense</i> Hieron.
Synonymy (King e Robinson)	<i>Chromolaena ivifolia</i> (L.) R.M.King & H.Rob.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M.King & H.Rob.	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M.King & H.Rob.	<i>Austroeupatorium picturatum</i> (Malme) R.M.King & H.Rob.	<i>Raulinoreitzia crenulata</i> (Sprengel) R.M.King & H.Rob.	<i>Raulinoreitzia tremula</i> (Hook. & Arn. ) R.M.King & H.Rob.	<i>Grazielia gaudichaudeana</i> (DC.) R.M.King & H.Rob.	<i>S. itatiayensis</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.
Subtribe (King e Robinson)	Praxelinae	Praxelinae	Eupatoriinae	Eupatoriinae	Disynaphiinae	Disynaphiinae	Disynaphiinae	Disynaphiinae
GPS	S 29°14'29.6" W 050°44'06.1"	S 29°16'03.5" W 050°44'21.3"	S 29°27'55.2" W 050°33'25.8"	S 29°16'28.1" W 050°44'20.8"	S 29°16'03.5" W 050°44'21.3"	S 30°2'45.7" W 051°21'41.1"	S 29°15'58.9" W 050°44'15.8"	S 29°23'56.9" W 049°54'57."
Altitude	2692 ft = 821 m	2297 ft = 700 m	1916 ft = 583 m	2050 ft = 625 m	2297 ft = 700 m	20 ft =6 m	2365 ft = 721 m	70 ft = 21 m
Time	14:50 h	16:00 h	12:45 h	16:30	16:00 h	10:00h	15:50 h	-
Date	13/04/2010	13/04/2010	13/04/2010	13/04/2010	13/04/2010	14/01/2011	13/04/2010	14/01/2011
ICN	150829	146973	146978	146979	146980	106808	146974	-
Sampled parts	<i>aerial parts</i>	<i>aerial parts</i>	<i>Inflorescence</i> <i>leaves</i>	<i>leaves</i>	<i>aerial parts</i>	<i>aerial parts</i>	<i>aerial parts</i>	<i>aerial parts</i>
Oil yield (%)	<b>0.06</b>	<b>0.31</b>	<b>0.05</b> <b>0.10</b>	<b>0.50</b>	<b>0.97</b>	<b>0.50</b>	<b>0.55</b>	<b>0.42</b>

Table 1: Species collected and submitted to chemical investigation.

## 2.4. RP- MPLC isolation of **1**

Essential oil of *E. tremulum* (2 mL) was diluted in methanol:water (1:9 v/v) and submitted to reversed-phase medium pressure liquid chromatography (RP-MPLC), carried out on a BUCHI system equipped with a B-688 BUCHI chromatography pump, a B-687 BUCHI gradient former, and a BUCHI borosilicate column filled out with RP-18 LiChrospher® (Merck, Darmstadt, Germany) using isocratic ACN:water 40:60 (v/v) as mobile phase. Twenty fractions were collected according to variation in absorbance at 210 nm and monitored by GC/MS.

## 2.5 <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>Carbon NMR analyses

NMR spectra of isolated compound in deuterated chloroform (Sigma-Aldrich) were acquired on a Brüker DPX-400 operating at 400 and 100 MHz, for <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, respectively. Chemical shifts are given in  $\delta$  (ppm) using TMS as internal standard.

2.6 Identification of 3-oxo-verboccidentafuran **1**: RI, 1854; <sup>1</sup>H NMR (400.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>) and <sup>13</sup>C NMR (100.1 MHz, CDCl<sub>3</sub>), see Table 3; m/z (rel int.): 43 (100) 55(33) 77(37) 91(44) 105(20) 119(34) 128(22) 145(42) 159(44) 173(78) 188(84) 201(8) 215(8) 230(95).

## 3. Results and discussion

Essential oil yield varied between 0.05 and 0.97% for inflorescences of *E. inulifolium* and aerial parts (mixed inflorescences and leaves) of *E. polystachium*, respectively. *E. ivifolium* was also a poor essential oil producer, with 0.06% yield. The other four species yielded 0.3-0.5% of essential oil. Some variability between yielding from leaves and inflorescences of *E. inulifolium* was also observed.

Through chromatographic analysis of the oils 105 compounds were identified (Table 2) representing 50.7 – 93.46% of the total oil components. Aliphatics were overall inexpressive, completely absent in *E. polystachyum* and *E. gaudichaudianum* and

reaching maximum 3.09% for tricosane in inflorescences of *E. inulifolium* whose leaves also contained 0.36% of a chiquimate derivative, benzaldehyde. The remainder compounds were of terpenic origin, ranging from 9.69% to 60.51% for monoterpenes and 34.98% to 84.56% for sesquiterpenes. This is in agreement with the reports of essential oil composition for most of *Eupatorium* species analyzed to date, with rare exceptions, like *E. heptanthum* (syn. *Ophryosporus heptanthus*), *E. aschenbornianum* (syn. *Ageratina aschenborniana*), *E. sternbergianum* (*Ageratina aschenborniana*) and *E. betoniciforme* (syn. *Barrosoa betoniciformis*) which produce chromenes (Arze et al., 2004; Gomez et al., 1982; Sánchez-Mendoza et al., 2010; Gonzalez et al., 1982); *E. coelestinum* (syn. *Conoclinium coelestinum*) which produces chavicol (Dung et al., 1998) and *E. macrocephalum* (syn. *Campuloclinium macrocephalum*), *E. ascendens* (syn. *Chromolaena ascendens*), and *E. inulifolium* (syn. *Austroeupatorium inulifolium*) whose oils can attain high percentage of aliphatics, like hexadecanoic acid and nonodecanal (SOUZA, 2007).

Hydrocarbon monoterpenes were almost 60% of the essential oil from aerial parts of *E. polystachium* and 53.86% in *E. gaudichaudianum*. Limonene was the main compound in *E. polystachium*, reaching 22.28%, followed by myrcene,  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and sabinene. The hydrocarbon  $\beta$ -myrcene was also a majoritary compound in the essential oil from *E. ivifolium* (19.95%), whilst an inseparable mixture of p-menthane and limonene represented 29.55% of the essential oil from *E. gaudichaudianum*. These monoterpenes, however, are of general occurrence and have no taxonomical value. Besides, the three species *E. polystachium*, *E. gaudichaudianum* and *E. ivifolium* are completely apart one from another both in Crabrera's and King & Robinson's systems (Table 1).

Except for *E. polystachium* and *E. gaudichaudianum*, the essential oils from the other studied species were dominated by their sesquiterpene fractions. In the essential oils from *E. inulifolium* and *E. polystachium* this fraction was dominated by  $\beta$ -caryophyllene, germacrene D and bicyclogermacrene in a range between 10 and 20% each, with only quantitative differences between leaves and inflorescences of *E. inulifolium*. This is in agreement with previous reports for the volatiles composition from this species (Souza, 2007; Lancelle, 2009). Also, the sesquiterpene fraction of



the essential oil from *E. gaudichaudianum* was characterized by the presence of germacrene D and bicyclogermacrene (19.65 and 10.07%, respectively).

The chemical composition of the essential oil from *E. laevigatum* has already been described in the literature. Main hydrocarbons are usually from germacrane, cadinane or bisabolane skeletons, with some intraspecific variability, whilst the oxygenated sesquiterpene fraction is almost always dominated by a furansesquiterpene named laevigatin **5**, a chemotaxonomic marker for this species, in ranges from 10 to 60%. Other furan sesquiterpenes like verbocidentafuran **2** occur sometimes, but in minor amounts (De Oliverira et al 1990; Schossler et al 2009, Souza, 2007).

The oxygenated sesquiterpene fraction of the essential oil from the other four species had high amounts of substances, which we were not able to identify through GC/MS, however, attempts for isolating most of them have been frustrated until now. In *E. inulifolium* an unidentified substance (RI 1632) reached 23.98% of the essential oil. The same substance was detected in the essential oil from *E. picturatum* (11.39%), which had also 7.03 and 11.26% of other two unidentified sesquiterpenoids.

**Table 2.** Percentual composition of the essential oils from *Eupatorium* species.

RI	Compound	a	b	c1	c2	d	e	f	g	h
	<b>Aliphatics</b>	<b>1.1</b>	<b>0.0</b>	<b>0.4</b>	<b>4.9</b>	<b>0.9</b>	-	<b>0.4</b>	-	<b>0.3</b>
868	<i>cis</i> -2-hexenal	0.0	-	0.2	-	0.5	-	-	-	-
872	3-hexen-1-ol	-	-	0.2	-	-	-	0.4	-	-
873	<i>trans</i> -2-hexenal	0.1	-	-	-	0.1	-	-	-	-
898	N-nonane	-	0.0	-	-	0.0	-	-	-	-
975	3-octanone	0.8	-	-	-	-	-	-	-	-
981	6-methyl-5-hepten-2-one	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-
993	3-octanol	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
1966	hexadecanoic acid	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-
2092	eneicosane	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-
2105	nonadecanal	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3
2276	tricosane	-	-	-	3.1	-	-	-	-	-
2445	pentacosane	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-
	<b>Chiquimate derivatives</b>	-	-	<b>0.4</b>	-	-	-	-	-	-
956	benzaldehyde	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-
	<b>Hydrocarbon Monoterpenes</b>	<b>28.6</b>	<b>20.8</b>	<b>19.5</b>	<b>13.6</b>	<b>9.7</b>	<b>59.3</b>	<b>5.6</b>	<b>53.9</b>	-
905	santolinatriene	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-
921	tricyclene	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
922	$\alpha$ -thujene	0.6	4.5	-	0.2	0.2	0.4	-	4.9	-
927	$\alpha$ -pinene	0.7	7.3	1.8	0.7	0.4	7.9	0.4	5.4	-
941	camphene	-	-	-	-	-	0.1	-	0.0	-

965	sabinene	0.3	0.9	0.8	0.4	0.2	5.7	-	3.1	-
969	$\beta$ -pinene	0.6	1.4	5.5	4.2	0.7	8.3	1.0	5.8	-
984	myrcene	20.0	2.1	1.9	3.4	0.4	10.1	-	2.2	-
995	$\delta$ -2-carene	-	-	-	-	0.2	0.3	-	-	-
999	$\alpha$ -phelandrene	0.9	0.1	0.1	-	1.7	0.3	-	0.4	-
1002	$\delta$ -3-carene	-	-	-	-	-	0.0	-	-	-
1010	$\alpha$ -terpinene	-	0.0	-	-	0.0	0.1	-	0.1	-
1016	<i>p</i> -cymene	0.1	0.3	0.2	0.2	0.2	0.6	-	-	-
1025	<b><i>p</i>-cymeno+limonene</b>	-	-	-	-	-	-	-	29.6	-
1020	limonene	1.0	2.9	5.2	4.2	-	22.3	-	-	-
1020	$\beta$ -phelandrene	-	-	-	-	3.0	-	-	-	-
1029	( <i>Z</i> )- $\beta$ -ocimene	0.1	-	0.1	-	0.0	0.2	0.4	0.2	-
1038	( <i>E</i> )- $\beta$ -ocimene	4.3	0.7	3.8	0.2	2.3	2.4	3.8	1.4	-
1047	$\gamma$ -terpinene	0.1	0.3	-	-	0.1	0.2	-	0.3	-
1075	terpinolene	0.1	0.3	-	-	0.3	0.1	-	0.4	-
1087	dehydrosabinacetate	-	-	-	-	-	0.0	-	-	-
	<b>Oxygenated Monoterpenes</b>	<b>0.8</b>	<b>0.4</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>0.0</b>	<b>1.2</b>	<b>0.0</b>	<b>1.5</b>	<b>0.0</b>
1090	linalool	0.7	-	-	-	-	0.0	-	0.0	-
1161	terpinen-4-ol	-	0.4	-	-	-	0.4	-	1.3	-
1176	$\alpha$ -terpineol	0.1	-	-	-	-	0.1	-	0.2	-
1351	neryl acetate	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-
	<b>Hydrocarbon Sesquiterpenes</b>	<b>33.6</b>	<b>40.8</b>	<b>65.7</b>	<b>53.1</b>	<b>38.5</b>	<b>34.0</b>	<b>22.3</b>	<b>36.1</b>	<b>62.4</b>
1308	silphiperfol-5-ene B	-	-	-	-	-	-	-	-	tr
1322	$\alpha$ -elemene	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
1324	$\delta$ -elemene	4.6	-	-	-	8.3	-	-	0.1	tr
1328	7- <i>epi</i> -silphiperfol-5-ene	-	-	-	-	-	-	-	-	1.5
1335	$\alpha$ -cubebene	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1360	$\alpha$ -copaene	0.6	0.1	1.4	1.2	0.2	0.1	0.3	0.3	0.3
1367	$\beta$ -bourbonene	-	-	0.3	0.3	-	0.0	-	0.1	0.2
1373	$\beta$ -cubebene	-	-	0.1	0.2	0.1	0.0	-	0.2	-
1375	$\beta$ -elemeno	1.4	1.0	0.6	0.7	0.9	0.2	-	0.1	-
1389	$\alpha$ -gurjunene	-	-	-	-	-	-	-	0.0	-
1396	$\alpha$ - <i>cis</i> -bergamotene	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
1400	<b><math>\beta</math>-caryophyllene</b>	5.7	6.4	14.3	18.3	2.7	11.5	0.8	1.8	1.2
1401	<b><math>\alpha</math>-santalene</b>	-	8.3	-	-	-	-	-	-	-
1408	$\beta$ -gurjunene	-	0.0	-	-	-	0.0	-	-	-
1416	<i>trans</i> - $\alpha$ -bergamotene	0.1	0.3	-	-	-	-	-	-	-
1416	$\gamma$ -elemeno	-	-	-	-	0.1	-	-	-	-
1418	aromadendrene	-	0.2	0.1	0.1	-	0.1	-	0.0	0.2
1421	$\alpha$ -amorphene	0.2	-	-	-	0.2	-	-	-	-
1423	( <i>Z</i> )- $\beta$ -farnesene	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
1427	<i>epi</i> - $\beta$ -santalene	-	0.7	-	-	-	-	-	-	-
1433	$\alpha$ -humulene	1.1	0.4	1.7	2.0	0.3	0.8	-	0.4	0.6
1439	( <i>E</i> )- $\beta$ -farnesene+ $\beta$ -santalene	-	2.5	-	-	-	-	-	-	-
1439	( <i>E</i> )- $\beta$ -farnesene	0.3	-	-	-	0.1	-	-	-	-
1438	sesquisabinene	-	-	-	-	-	-	-	-	2.4
1440	<i>allo</i> -aromadendrene	-	-	0.3	0.2	-	-	-	0.1	-
1457	$\gamma$ -muuroleno	0.1	0.2	0.1	0.1	0.3	-	-	-	-
1457	<b>amorpha-4,7(11)-diene</b>	-	-	-	-	-	-	7.6	-	15.4
1461	<b>cadina-1(6),4-dieno+germacreno D</b>	-	10.5	-	-	-	-	-	-	-
1463	<b>germacreno D</b>	2.6	-	19.3	12.4	6.0	9.9	-	19.7	-
1470	<i>epi</i> -bicyclo-sesquiphellandrene	-	-	-	-	-	0.0	-	-	-
1462	NI	-	-	-	-	-	-	8.0	-	-
1466	$\beta$ -selinene	-	-	0.2	0.1	0.3	-	-	-	-
1470	$\delta$ -selinene	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-
1470	<i>cis</i> - $\beta$ -guaiene	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-
1472	$\alpha$ -alasquene+ $\beta$ -curcumene	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-
1477	<b>bicyclogermacrene</b>	2.0	5.2	22.3	12.5	4.3	8.6	-	10.1	31.1
1478	$\alpha$ -zingiberene	-	-	-	-	4.1	-	-	-	-
1481	$\alpha$ -muurolene	0.2	0.2	0.3	0.4	0.4	0.2	-	0.1	-
1485	germacrene A	1.9	0.7	0.7	0.8	1.4	0.3	9.7	0.3	tr
1489	$\beta$ -bisabolene	-	2.6	-	-	-	-	-	-	4.3
1492	BHT	1.8	-	1.5	2.3	0.4	-	-	1.9	-
1492	BHT+ $\gamma$ -cadinene	-	-	-	-	-	0.4	2.0	-	-
1497	$\gamma$ -cadinene	0.1	0.2	0.3	0.1	0.3	0.1	-	0.1	0.6
1495	( <i>Z</i> )- $\gamma$ -bisabolol	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-
1501	NI	-	-	-	-	-	-	7.1	-	-
1502	germacrene C	5.0	-	-	-	-	-	-	-	3.9
1502	$\delta$ -cadinene	5.5	-	1.7	1.1	-	0.9	-	0.9	-
1503	$\delta$ -cadinene+ $\beta$ -sesquiphellandrene	-	1.1	-	-	-	-	0.7	-	0.8

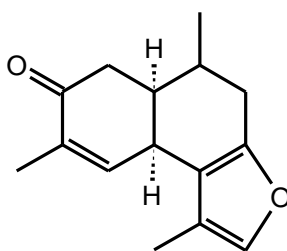
1503	germacrene C+ $\beta$ -sesquiphellandrene	-	-	-	-	7.2	-	0.1	-	-
1512	cadin-1,4-diene	-	-	-	-	-	tr	-	-	-
1518	$\alpha$ -cadinene	-	-	-	-	-	0.0	0.2	-	-
1540	germacrene B	0.0	-	0.6	0.5	0.4	0.1	-	0.2	-
	<b>Oxygenated Sesquiterpenes</b>	<b>1.3</b>	<b>32.2</b>	<b>8.0</b>	<b>19.3</b>	<b>2.2</b>	<b>2.6</b>	<b>38.2</b>	<b>3.1</b>	<b>22.1</b>
1512	( <i>E</i> )- $\gamma$ -bisabolol	-	0.1	-	-	-	-	-	-	-
1533	elemol	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-
1551	( <i>E</i> )-nerolidol	0.2	-	-	0.4	-	0.1	-	-	-
1562	germacrene D-4-ol	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
1556	spathulenol+germacrene D-4-ol	-	-	-	-	-	-	0.4	2.3	-
1555	spathulenol	0.2	2.2	6.2	<b>14.4</b>	-	1.3	1.5	0.1	1.7
1569	caryophyllene oxide	0.7	0.4	1.0	3.0	1.3	0.8	0.5	0.5	0.1
1571	globulol	0.1	0.5	0.8	1.5	0.2	0.4	-	0.2	0.9
1572	<i>epi</i> -globulol	-	-	-	-	0.5	-	-	-	0.6
1581	NI	1.8	-	1.9	1.6	-	0.4	-	0.3	-
1591	5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - $\alpha$ -eudesmol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
1612	<i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.2
1618	$\tau$ -cadinol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1622	NI	-	-	-	-	-	-	<b>8.1</b>	-	-
1622	NI	2.5	-	-	-	3.4	-	-	-	1.2
1632	NI	<b>24.0</b>	-	-	-	<b>11.4</b>	-	-	-	-
1633	$\alpha$ -muurolol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.7
1646	$\alpha$ -cadinol	-	-	-	-	-	-	-	-	1.0
1654	NI	-	-	-	-	<b>7.0</b>	-	-	-	-
1657	verbocidentafuran	-	0.6	-	-	-	-	<b>14.2</b>	-	<b>6.4</b>
1669	NI	-	-	-	-	<b>11.3</b>	-	-	-	-
1676	$\alpha$ -bisabolol	-	-	-	-	-	-	<b>11.4</b>	-	-
1678	<i>epi</i> - $\alpha$ -bisabolol	-	-	-	-	-	-	-	-	4.9
1731	laevigatin	-	<b>28.2</b>	-	-	-	-	-	-	-
1758	Z-lanceol	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3
1854	3-oxo-verbocidentafuran*	-	-	-	-	-	-	<b>10.3</b>	-	4.0
		29.4	21.2	19.5	13.6	9.7	60.5	5.6	55.4	0.0
		35.0	73.0	73.6	72.4	40.6	36.5	60.5	39.2	84.6

RI: Retention Index in a DB5 column; a: *E. ivifolium* aerial parts; b: *E. laevigatum* aerial parts; c1: *E. inulifolium* leaves; c2: *E. inulifolium* inflorescences; d: *E. picturatum* aerial parts; e: *E. polystachyum* aerial parts; f: *E. tremulum* aerial parts; g: *E. gaudichaudianum* aerial parts; h: *E. itatiayense* aerial parts. \*identified by NMR spectra.

The essential oil from *E. tremulum* and *E. itatiayensis* also had some unidentified sesquiterpenoids. RI 1854 was common for both species (10.27 and 4.0%), whilst *E. tremulum* had another unidentified at RI 1622 (8.09%). Both species, however, had expressive amounts (14.06 and 6.4%) of the rare minor furansesquiterpene verbocidentafuran **2**, present in the essential oil of *E. laevigatum*; amorpho-4,7(11)-diene (7.45 and 15.42%, respectively), as well as some traces of laevigatin **5** for one species.

In an attempt to isolate these unidentified compounds the essential oil from *E. tremulum* (2 ml) was submitted to RP-MPLC. The first eluted fraction was composed by a single peak of pure **1**. Through  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Carbon NMR analyses the structure **1** was proposed, which is in agreement with data from DOMINGUES et al (1988).

From  $^{13}\text{C}$  RMN and DEPT 3 methyl, 2 methylene and 5 methine carbons were inferred, one of them from a keto group. From  $^1\text{H}$ -NMR, HMBC and NOESY experiments structure **1** was proposed, however, we did not observe correlation between H6 and any other proton or carbon in the structure. From the small coupling constant between H5 and H10 in  $^1\text{H}$  NMR ( $\sim 4.5$  Hz), a *cis* fusion between decalin rings was inferred, either a muurolane or an amorphane group. Biogenetic considerations from the presence of amorpha-4,7(11)-diene in the same oils led us to propose this amorphane skeleton.

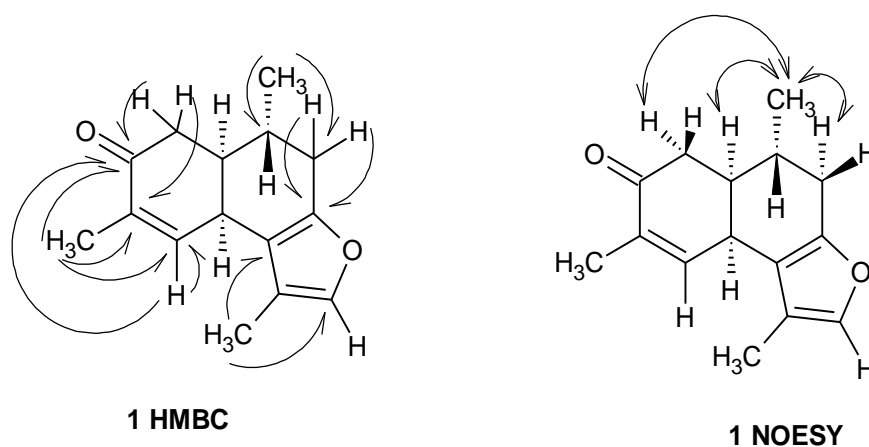


**1**

Furaneudesmanes are very common sesquiterpenoids, specially in the Asteraceae tribe Senecionae. Furancadinanes however, are very rare structures. Ketofuransesquiterpene **1** has been previously isolated from another Asteraceae species, *Smallhantus uvedalia* (syn. *Polymnia uvedalia*, tribe Millerieae, from the same subfamily Asteroideae, DOMINGUES et al., 1988).

Attempts to correlate data from the literature with other unidentified compounds were made based on putative biosynthetic rout (scheme 1) from amorpha-4,7(11)-diene to **2** (based on known biosynthetic rout from the monoterpene analogs pulegone and menthofuran, Berteau et al, 2001) and from **2** to **1** based on known biosynthetic conversion of premnaspirodiene to solavetivone and valencene to nootkatone by HPO (*Hyocissus muticum* premnaspirodiene oxygenase, TAKAHASHI et al., 2007). Structures **6**, **9** and **12** were not found in the literature (Scifinder) and mass spectral data from structures **7**, **8**, **10**, **11**, **13** and **14** did not match the ones obtained from the unidentified compounds in the essential oil of *E. tremulum* or *E. itatiayensis*, most of them, however, have only been isolated from Asteraceae species (*Baccharis* and *Artemisia*), specially *E. adenophorum*

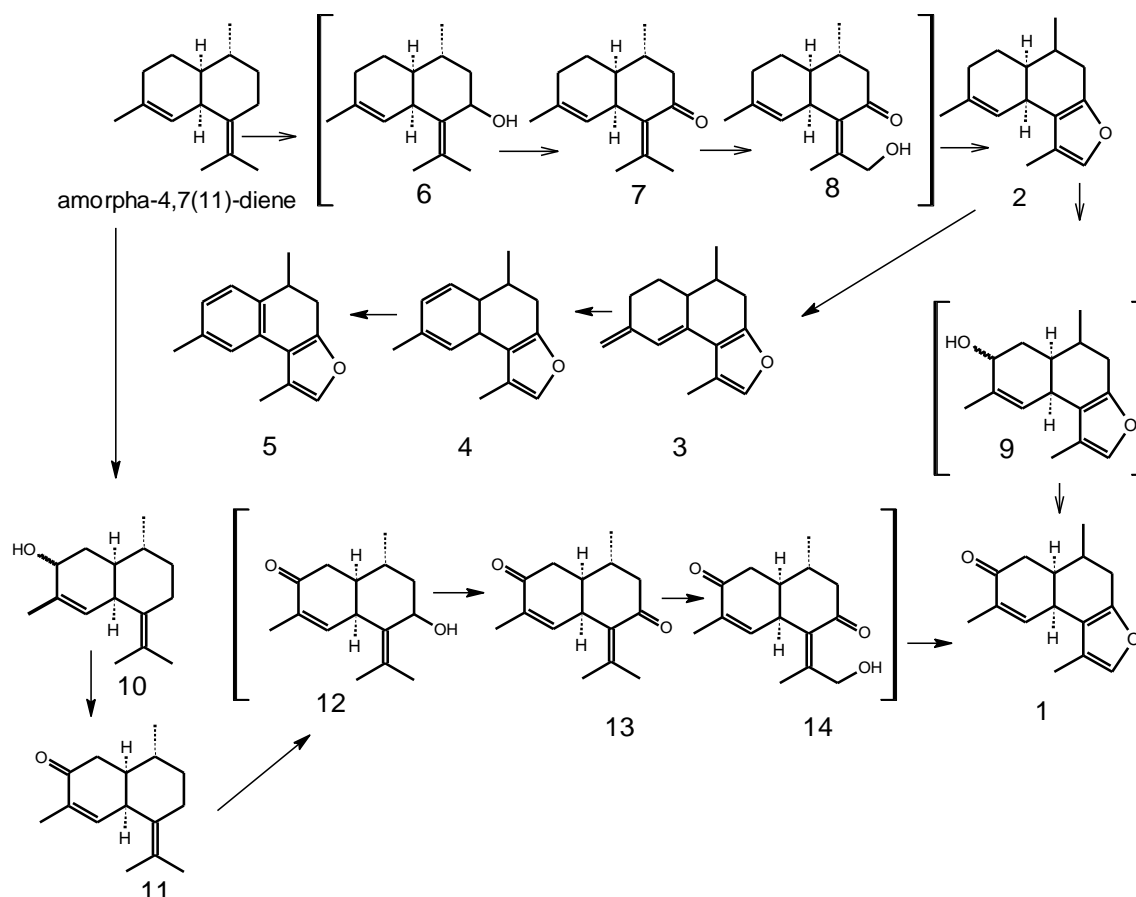
(*Ageratina adenophora*), indicating a possible chemotaxonomical value for these kind of oxygenated cadinane.



Scheme 1. HMBC and NOESY correlations for **1**.

Table 3:  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR shifts from **1**.

	C	multiplicity	H	multiplicity
1	28.5	s	2.05	m
2	40.4	d	2.82	dtd
			2.78	dtd
3	198.7	q	-	-
4	133.8	q	-	-
5	145.3	s	6.60	m
6	34.6	s	3.60	br s
7	117.8	q	-	-
8	150.6	q	-	-
9	30.7	d	2.78	m
10	41.7	s	2.21	m
11	118.6	q	-	-
12	137.8	s	7.08	br s
13	18.5	t	2.05	d
14	9.2	t	1.75	dd
15	15.5	t	1.05	d



Scheme 2: Putative biosynthetic routes to **1** from amorph-4,7(11)-diene.

High variability was found in the percentage of **1** in the essential oil of *E. tremulum* in different collections we have made with isolation purpose, so we chose a stable population in Guaíba municipality and ten different individuals were collected simultaneously once a month prior to, during and after bloom. Variability in the percentage of compounds was published in dealt with in another publication of our group.

### 3. Conclusions

This is the first report on the chemical composition of the essential oils of *E. itatiayensis*. Its composition was found to be very similar to the volatile composition of *E. tremulum*. Both species are nestled in different section of genus *Eupatorium* in Cabrera & Klein's botanical system, but in different genera from the same Eupatorieae subtribe (Disynaphiinae) in the King & Robinson's system.

From the oils, a very rare ketofuransesquiterpene with an amorphane skeleton was isolated. This compound, 3-oxo-verbocidentafuran, has been previously isolated from a species in another subtribe from Eupatorieae. Co-occurrence of this compound on both species, together with verbocidentafuran relates them to *E. laevigatum* a species from a different section in Cabrera & Klein's system, and different genus and subtribes in King & Robinson's systems. This two new reports of production of furancadinanes (amorphanes) in Asteraceae, reinforces its lack of chemotaxonomical significance on supraspecific level, since very few species, in phylogenetically very distant genera and subtribes are capable of biosynthesizing them.

## Acknowledgements

The authors are grateful to CNPq for their financial support.

## References

- Adams RP. (2009). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Carol Stream, Allured Publis. Corp.
- ARZE, Javier Bernardo Lopez et al. Essential Oils from Bolivia II. Asteraceae: Ophryosporus heptanthus (Wedd.) H. Rob. et King. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 374-376, 2004.
- BERTEA, Cinzia M. et al. Demonstration That Menthofuran Synthase of Mint (< i> Mentha</i>) Is a Cytochrome P450 Monooxygenase: Cloning, Functional Expression, and Characterization of the Responsible Gene. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 390, n. 2, p. 279-286, 2001.
- CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. Flora Ilustrada Catarinense. I parte. 1989.
- DE OLIVEIRA, Alaide B. et al. The Essential oil of Eupatorium laevigatum. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, n. 1, p. 49-50, 1990.
- DOMINGUEZ, X. A. et al. Cadinene derivatives from< i> Smallanthus uvedalia</i>. **Phytochemistry**, v. 27, n. 6, p. 1863-1865, 1988.
- DUNG, Nguyễn Xuân et al. Volatile constituents of the stem and leaf oils of Eupatorium coelestinum L. from Vietnam. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 478-482, 1998.
- GARCIA SANCHEZ, E. et al. A revision of Eupatorium (Compositae: Eupatorieae) from Michoacan. **Phyton (Buenos Aires)**, v. 80, p. 139-146, 2011.
- GLEASON, Henry Allan; CRONQUIST, Arthur. Manual of vascular plants of northeastern United States and adjacent Canada. 1991.

- GÓMEZ, F. et al. 2, 2-Dimethylchromenes from *Eupatorium aschenbornianum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2095-2097, 1982.
- GONZÁLEZ, Antonio G. et al. Eupatarone, A 2-acetylbenzofuran from *Eupatorium sternbergianum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1826-1827, 1982.
- HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. 1977 The biology and chemistry of the Compositae: vol. 1-2. **London, Academic Press**, v. 2, p. 1-7, 1977.
- ITO, Motomi et al. Phylogeny and phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): insights from sequence data of the nrDNA ITS regions and cpDNA RFLP. **Journal of Plant Research**, v. 113, n. 1, p. 79-89, 2000.
- KING, Robert Merrill; ROBINSON, Harold. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). **Monographs in Systematic Botany**, v. 22, 1987.
- LANCELLE, Hugo G. et al. Chemical composition of four essential oils from *Eupatorium* spp. biological activities toward *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 68, n. 3-4, p. 329-338, 2009.
- PELSER, Pieter B.; WATSON, Linda E. Introduction to Asteroideae. **Systematics, evolution and biogeography of Compositae**, v. 495, p. 502, 2009.
- SÁNCHEZ-MENDOZA, María Elena et al. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: Role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 66-71, 2010.
- SCHILLING, Edward E. Systematics of the *Eupatorium album* complex (Asteraceae) from eastern North America. **Systematic Botany**, v. 36, n. 4, p. 1088-1100, 2011.
- SCHMIDT, Gregory J.; SCHILLING, Edward E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 5, p. 716-726, 2000.
- SCHOSSLER, Patrícia et al. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 277-287, 2009.
- SOUZA, Tiago Juliano Tasso de. Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae). 2007.
- ZHANG, Fengjuan et al. Identification of volatile compounds released by leaves of the invasive plant croftonweed (*Ageratina adenophora*, Compositae), and their inhibition of rice seedling growth. **Weed Science**, v. 60, n. 2, p. 205-211, 2012.



**3. CAPÍTULO II - ESTUDO DO EXTRATO DICLOROMETANO DE ESPÉCIES DE *Eupatorium* COM ÊNFASE EM LACTONAS SESQUITERPÊNICAS**



### 3.1 INTRODUÇÃO

A família Asteraceae em geral pode ser quimicamente caracterizada pela produção de lactonas sesquiterpênicas. Estas substâncias, no entanto, tendem a ser quimicamente mais complexas na subfamília Asteroideae do que no restante da família, mesmo estando ausentes em algumas subtribos (Tageteae e Calendulae) e sendo bastante raras em Astereae. Especialmente na tribo Eupatorieae, a ocorrência de lactonas  $\beta$ -substituídas é um traço compartilhado que reforça sua proximidade com Heliantheae (PELSER e WATSON, 2009).

Algumas revisões sobre a diversidade química em subtribos de Eupatorieae (Critoniinae, Disynaphinae, Oxylobinae, Eupatoriinae) especialmente focadas em diterpenos e lactonas sesquiterpênicas foram elaboradas há alguns anos (DE GUTIÉRREZ et al, 2001; HERZ, 2001; HERZ, 2003; HERZ, 2004). De modo geral, depreende-se que apesar de lactonas sesquiterpênicas serem recorrentes nas diversas subtribos, elas não são onipresentes, havendo muitas ocorrências de espécimes, espécies e mesmo gêneros inteiros em que sesquiterpenoides lactonizados não foram localizados durante a prospecção química. Em muitas espécies de *Eupatorium* esse tipo de substância também já foi isolada.

Quando presentes, estas substâncias podem ser desde muito simples a altamente funcionalizadas, o que pode ter valor taxonômico importante, especialmente nesta família em que os diversos modos de propagação, reprodução, hibridização e microespeciação, costumam confundir os limites entre espécies e dificultar o estabelecimento de relações filogenéticas entre os táxons (ITO et al., 2000a, ITO et al., 2000b, SCHILLING, 2011, SCOTT et al., 2012).

As lactonas sesquiterpênicas, apresentando um radical isopropila oxidado e convertido a uma lactona, usualmente uma  $\gamma$ -lactona, são de grande interesse, pois apresentam importantes atividades terapêuticas (DE KRAKER et al., 2002), como atividade anti-inflamatória (MELO et al., 2005); atividade inibitória sobre a liberação de elastase neutrofílica humana (ARAKAWA et al., 2008) e atividade antioxidante hormética (ativação em baixas doses das respostas antioxidantes do organismo), entre outras (UMEMURA et al., 2008).

Dada a grande diversidade química e atividades farmacológicas dessa classe de substâncias, bem como a frequência com que são encontradas em Asteraceae, este capítulo tem por objetivo a investigação da presença de lactonas sesquiterpênicas em espécies de *Eupatorium* nativas do Rio Grande do Sul.

## 3.2 OBJETIVO GERAL

Como uma contribuição ao conhecimento da química de terpenoides de espécies de *Eupatorium*, o objetivo do trabalho descrito neste capítulo foi a caracterização da presença de lactonas sesquiterpênicas nas partes aéreas de espécies de *Eupatorium* (s.l.) nativas no Rio Grande do Sul.

### 3.2.1 Objetivos específicos

- Obtenção do extrato diclorometano por lavagem de folhas e inflorescências íntegras de seis espécies de *Eupatorium para triagem*.
- Análise do extrato diclorometado em IV (Infravermelho) para caracterização da presença e intensidade da banda de absorção característica de lactonas.
- Obtenção do extrato diclorometano por lavagem de folhas e inflorescências íntegras de *E. inulifolium* e *E. casarettoi* e fracionamento cromatográfico dos extratos obtidos.
- Obtenção do extrato rico em lactonas de *E. laevigatum* pelo método de Herz-Högenauer
- Utilização do método de Herz-Högenauer modificado (HERZ e HOGENAUER, 1961) para obtenção de um extrato específico para lactonas das partes aéreas de *E. laevigatum*.
- Obtenção do extrato lactônico de *E. tremulum* pelo método daderivatização/extração com dimetilamina-Iodeto de metila
- Aplicação da técnica específica para obtenção de extrato enriquecido em  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas a partir do extrato diclorometano de *E. tremulum*.

### 3.3 REVISÃO DA LITERATURA

#### Definição

As lactonas sesquiterpênicas são um grupo bastante diversificado na classe dos terpenoides. Mais de 4000 estruturas diferentes já foram elucidadas (LIU et al 2013), sendo que a grande maioria delas é encontrada em plantas da família Asteraceae, bem como em Apiaceae, Acanthaceae, Anacardiaceae, Amaranthaceae entre outras (DURAIPANDIAN et al , 2012). Essas substâncias têm como característica distintiva a forte absorção na região de  $1760\text{ cm}^{-1}$  do espectro de infravermelho, conforme Figura 3.1 (IRANSHAHI et al, 2007), o que pode ser facilmente utilizado em triagens para a localização de espécies produtoras desta classe de terpenos.

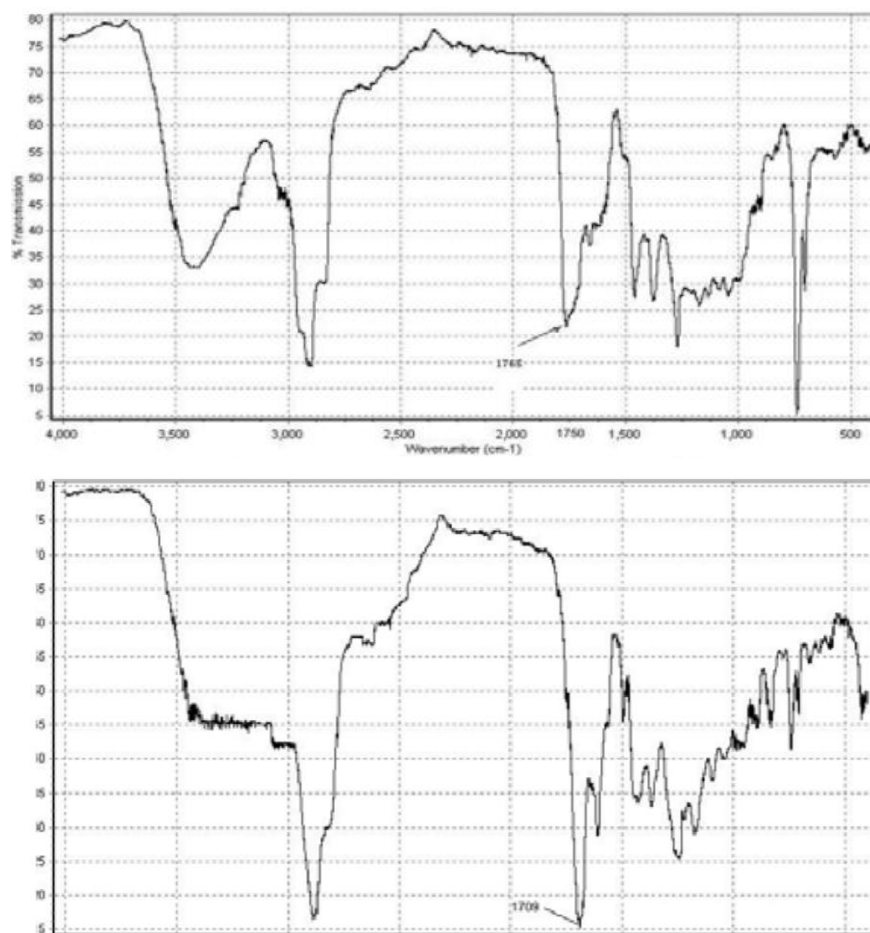
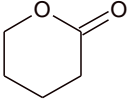
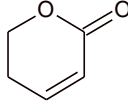
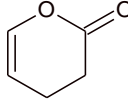
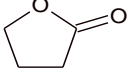
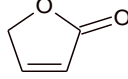
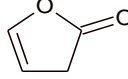



Figura 3.1: Espectro de IV de um extrato rico em lactonas (quadro superior 1765) e pobre em lactonas (quadro inferior 1709) (IRANSHAHI et al, 2007).

Tabela 3.1: banda de absorção IV típicas de ésteres e lactonas (Adaptado de Pavia, 2008 e Nakanishi, 1962).

$\text{R}^1-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^1$		
1750-1735		
		
1735	1725	1760
		
1770	1750	1800
		
1820		

### **Distribuição e Localização**

O padrão de distribuição das lactonas sesquiterpênicas nas plantas está normalmente correlacionado com o padrão de seus precursores, os sesquiterpenoides (germacreno A e amorfa-4,7(11)-diene). Ou seja, são encontrados em tricomas glandulares nas flores das Asteraceae em que o precursor é sintetizado nesse tipo de estrutura (*Artemisia*, *Tanacetum*, *Pyrethrum*, *Smallanthus*) e nos canais laticíferos quando esta é estrutura secretora de sesquiterpenoides (*Lactuca sp.*, *Cichorium sp.*), etc.

MENIN e colaboradores (2012) isolaram uma germacreno A sintase da alcachofra e a correlacionaram positivamente com o teor de cinaropicrina (lactona sesquiterpênica responsável pelo amargor) nos diferentes órgãos (a alcachofra não possui tricomas glandulares ou canais laticíferos, como ocorre em *Tanacetum* e *Lactuca*), mas a relação com os dutos secretores não foi avaliada.

Em 2011, MAJDI e colaboradores descreveram a produção de partenólídeo em *Tanacetum parthenium* (partenólídeo é um derivado epoxidado do

costunolídeo). Essa substância está positivamente correlacionada com a expressão de germacreno A sintase (ocorrem num gradiente, desde ausentes nas raízes até a concentração máxima no ovário das flores tuberosas do capítulo floral durante o início da floração) e com a concentração de tricomas glandulares nos diferentes órgãos. Dessas correlações se conclui que o partenolídeo é sintetizado via germacreno A nos tricomas glandulares das flores. Nesse experimento, o partenolídeo foi extraído diretamente dos tricomas por lavagem com clorofórmio, que é uma metodologia de extração que só solubiliza o material externo à planta (Figura 3.2).

LOPES e colaboradores (2013) demonstraram a biossíntese dos melampolídeos uvedalina e enidrina em *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) via MEP, com incorporação de epoxitiglatos via isoleucina e localizaram esse processo nos tricomas glandulares pela utilização de imageamento com MALDI-EM.

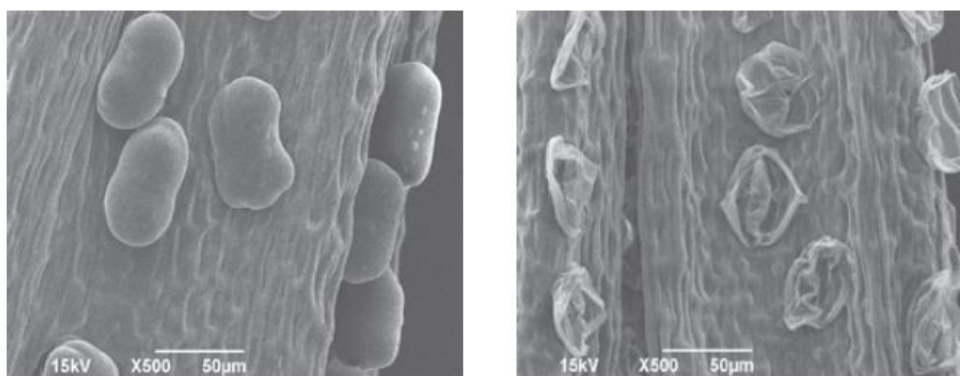


Figura 3.2: Tricomas glandulares de *T. parthenium* antes e após lavagem com clorofórmio. Essa técnica possibilita a extração do conteúdo glandular sem extrair o material interno da planta (Adaptado de MAJDI, 2011).

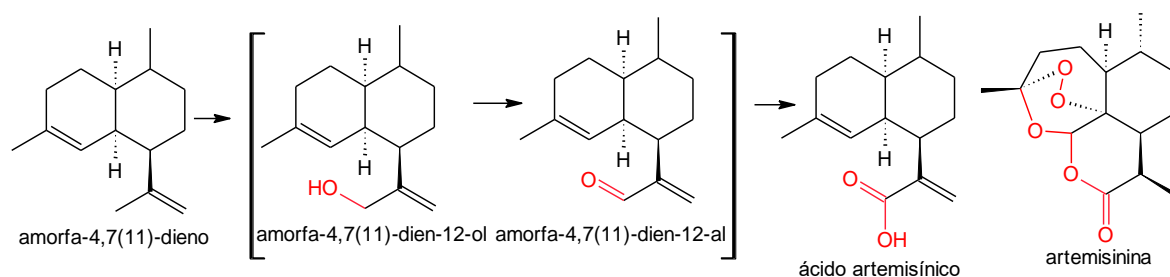
### **Estrutura e Biogênese**

Estruturalmente, boa parte dos esqueletos das lactonas sesquiterpênicas são idênticos aos esqueletos de sesquiterpenoides. Entretanto, a grande maioria delas está biossinteticamente relacionada ao germacreno A, pela modificação posterior desse precursor sesquiterpenoídico já lactonizado, e não pela lactonização posterior dos esqueletos rearranjados, como poderia parecer em uma



simples comparação das estruturas. Uma exceção a essa regra são as lactonas sesquiterpênicas derivadas do amorfa-4,7(11)-dieno, como a artemisinina, para as quais foram identificadas enzimas específicas que levam do precursor já ciclizado aos derivados lactonizados (TEOH et al, 2006).

Enzimas implicadas na oxidação de terpenoides em Lactuceae, por exemplo, são caracterizadas pela grande quantidade de substratos que são capazes de oxidar (desde que possuam um radical isoprop(en)ila: germacrenos, bisabolenos, selinenos) (DE KRAKER et al, 2003). Pelo contrário, a enzima com essa atividade em *Artemisia annua*, CYP71AV1, é extremamente específica, catalisando a oxidação em três passos: do amorfa-4,7(11)-dieno, a amorfa-4,7(11)-dien-12-ol, a amorfa-4,7(11)-dien-12-al e finalmente, deste a ácido amorfa-4,7(11)-dien-12-oico, sem aceitar outros substratos, conforme Esquema 3.1 (TEOH et al, 2006).

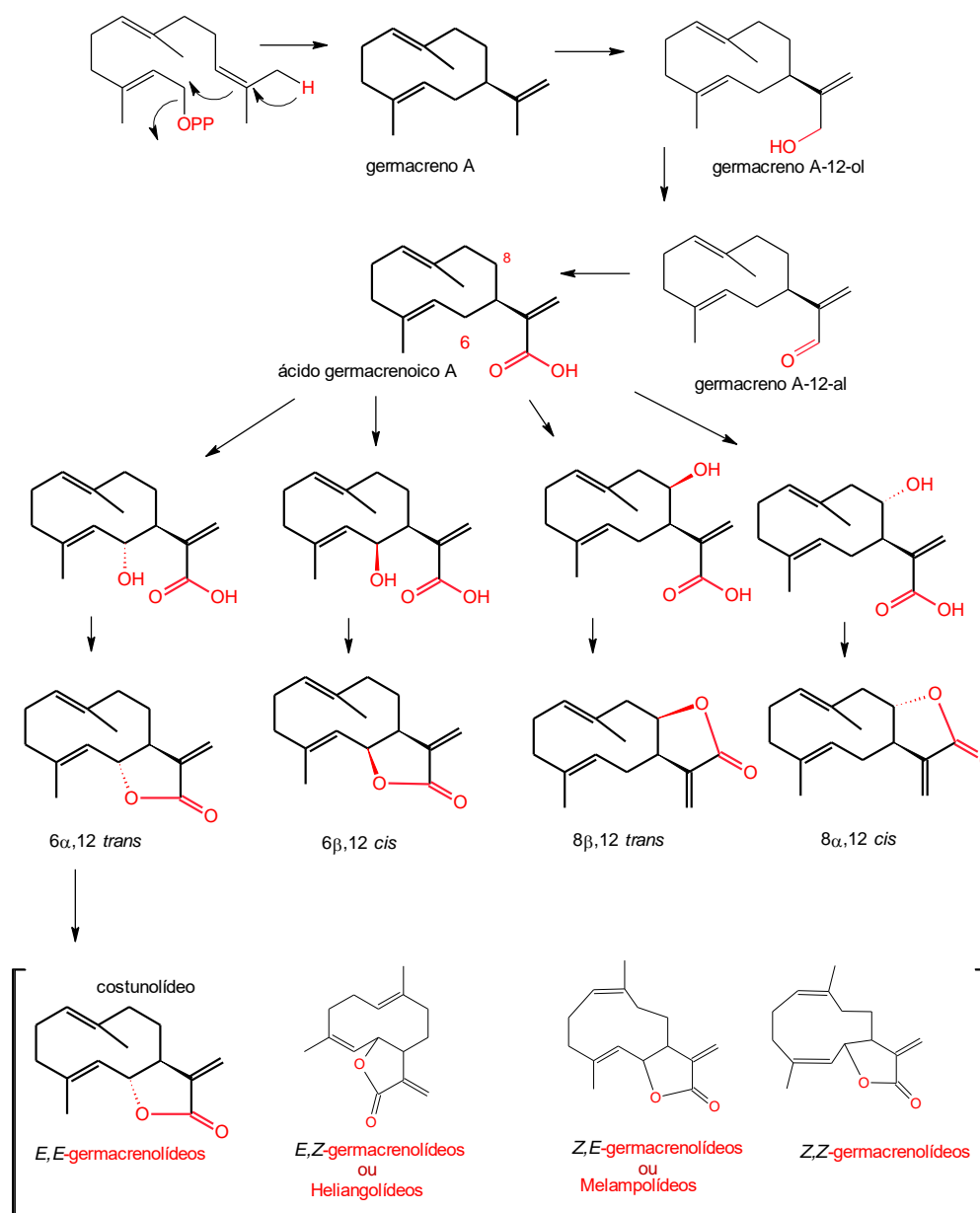


Esquema 3.1: Biossíntese de lactonas sesquiterpênicas utilizando amorfa-4,7(11)-dieno como precursor (Adaptado de TEOH, 2006).

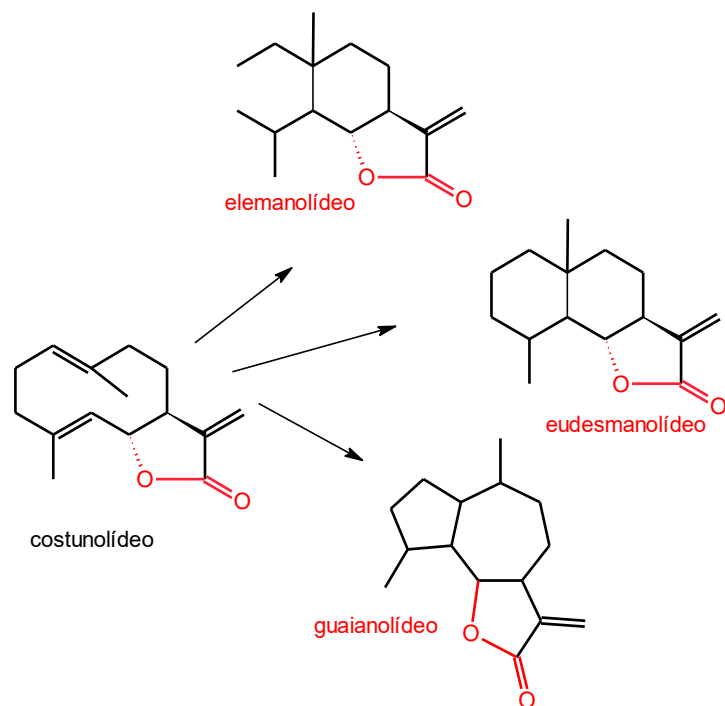
Ainda, considerando a estrutura das lactonas sesquiterpênicas, normalmente a lactonização ocorre no radical isopropila ou isopropenila, tanto em C6 quanto em C8, depois que esses carbonos são hidroxilados. Como o radical isoprop(en)ila está sempre em posição  $\beta$  (por razões biogenéticas), e as hidroxilas em C6 e C8 podem estar tanto em posição  $\alpha$  quanto  $\beta$ , existem basicamente quatro grupos de lactonas quanto à posição do anel ciclopentano  $\gamma$ -lactônico: 6,12 *cis* e 8,12 *cis*; 6,12 *trans* e 8,12 *trans*, conforme Esquema 3.2 (YOSHIOKA et al, 1973). O precursor primário das lactonas sesquiterpênicas é o costunolídeo, derivado direto da lactonização do germacreno A, a partir do qual todas as outras estruturas são

formadas (exceto aquelas relacionados à artemisinina). Modificações posteriores desse precursor dão origem aos quatro grandes principais grupos de estruturas de lactonas sesquiterpênicas: os germacranolídeos (com os quatro subgrupos apresentados no Esquema 3.2), os elemanolídeos, os eudesmanolídeos e os guaianolídeos. Além disso, quanto à conformação das duplas ligações internas, existem quatro grupos de germacranolídeos: *trans,trans*-germacranolídeos, heliangolídeos, melampolídeos, e *cis,cis*-germacranolídeos (TASHKHODZHAEV & ABDUAZIMOV, 1997). Modificações posteriores desses esqueletos originam estruturas biogeneticamente cada vez mais evoluídas, formando um gradiente com valor quimiotaxonômico (FISCHER et al., 1979; TASHKHODZHAEV & ABDUAZIMOV, 1997).

A implicação do germacreno A na rota biossintética das lactonas sesquiterpênicas já foi provada diretamente pelo isolamento de todas as enzimas relacionadas ao processo em muitas espécies de Asteraceae, como as Lactuceae *Cichorium intybus* e *Lactuca sativa*, a Carduoideae *Cinara scolymus*, a Anthemideae *Tanacetum parthenium* e outras (DE KRAKER et al., 1998; DE KRAKER et al., 2002; DE KRAKER et al., 2003; IKEZAWA et al., 2011; LOPES et al., 2013), sendo o costunolídeo a lactona sesquiterpênica básica. Alguns rearranjos do costunolídeo ocorrem após a epoxidação das ligações duplas internas (4,5 – guaianolídeos; 1,10–eudesmanolídeos) (Esquema 3.3). Modificação enzimáticas posteriores e funcionalização em várias posições originam as mais diversas estruturas que compõem esta classe de terpenos.



Esquema 3.2: Biossíntese de lactonas sesquiterpênicas utilizando o germacreno A como precursor. Entre colchetes, os quatro isômeros geométricos (*E,Z*) em relação às ligações duplas internas no esqueleto sesquiterpênico. Acima, os quatro isômeros em relação ao anel lactônico (6 ou 8, *cis* ou *trans*) (Adaptado de FISCHER et al, 1979).



Esquema 3.3: Costunolídeo como precursor das quatro classes mais numerosas de lactonas sesquiterpênicas (costunolídeo também é o precursor das lactonas com esqueleto germacrano).

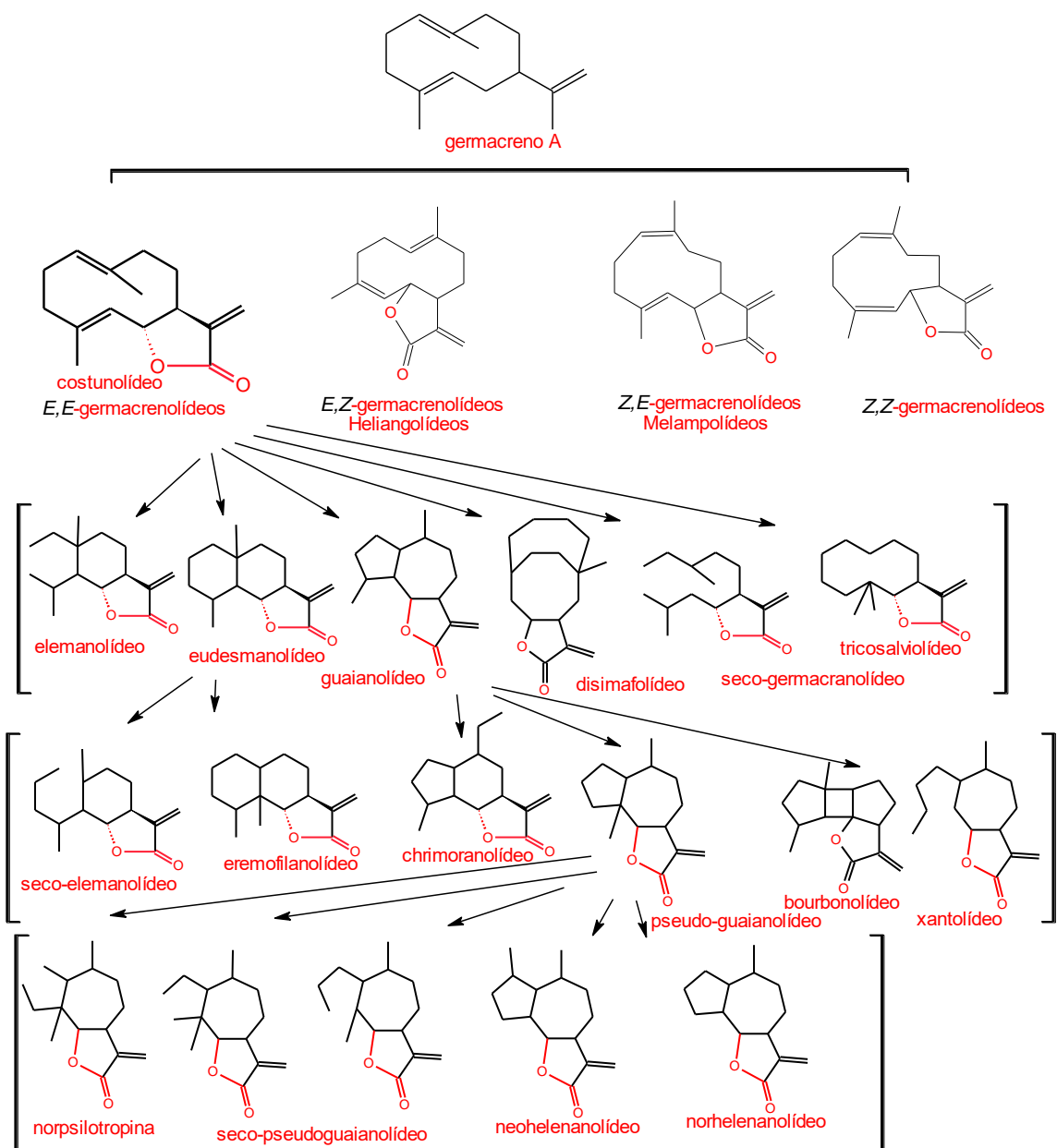
O conjunto do gene e da enzima codificada CYP540 (CYP71BL1) foi recentemente isolado de *Helianthus annuus* (girassol), cuja atividade é a catálise da hidroxilação  $8\beta$  do ácido germacrenoico A. A busca por sequências similares em *Lactuca sativa* resultou na identificação de uma enzima (CYP71BL2) que catalisa a hidroxilação  $6\alpha$  do mesmo ácido. Assim, as duas enzimas realizam atividades com diferentes régio- e estereosseletividades. A caracterização dos produtos formados revelou ainda que o ácido  $8\beta$ -OH-germacrenoico A é relativamente estável, enquanto o ácido  $6\alpha$ -OH-germacrenoico A lactoniza-se espontaneamente mesmo em temperatura ambiente e pH neutro, formando a mais simples das lactonas sesquiterpênicas, o costunolídeo.

A diferença em estabilidade das duas moléculas se deve principalmente à conformação preferencial do anel induzida pela presença do grupo ácido isopropílico em posição  $\beta$ ; nessas conformações, a hidroxila em  $\alpha$  fica muito mais próxima ao grupo carboxílico do que a hidroxila em  $\beta$  (de certo modo, isso pode ser correlacionado com observações muito antigas de que  $6\alpha$ -OH-8,12-lactonas e  $8\beta$ -OH-6,12-lactonas, após abertura do anel em meio alcalino, sempre relactonizam

como 8 $\beta$ -OH-6,12-lactonas (YSHIOKA et al, 1973)). A comparação dos genes para as duas enzimas, com milhares de sequências depositadas em bancos especializados revelou a presença de genes com alta similaridade com CYP71BL2, costunolídeo sintase, em praticamente toda a família asteraceae, juntamente com as enzimas germacreno A sintase e germacreno A oxidase, responsáveis pela biossíntese do germacreno A e sua transformação em ácido germacrenoico A, respectivamente. CYP71BL2 apenas não foi localizado na tribo Heliantheae, coincidentemente onde são localizados homólogos de CYP71BL1. Dessa forma, postula-se que a hidroxilação em 8 $\beta$  ou a presença da enzima CYP71BL1, seja uma evolução recente em Heliantheae, decorrente de uma mutação em CYP71BL2 ocorrida em um ancestral dessa tribo, enquanto a produção de germacreno A, sua oxidação a ácido germacrenoico A e a hidroxilação e simultânea lactonização deste, seja um traço basal e conservado em todo o restante da família (pelo menos ao nível genético) (IKEZAWA et al, 2011). Como a lactonização de ácido 8 $\beta$ -OH-germacrenoico não ocorre espontaneamente, deve haver algum sistema enzimático que a catalise, mas ainda não foi identificado.

Uma característica distintiva de lactonas sesquiterpênicas em Asteraceae e em Apiaceae é a estereoquímica em C6. Lactonas sesquiterpênicas do grupo guaianolídeo em Asteraceae são 6 $\alpha$ ,12-*trans* enquanto as de Apiaceae são 6 $\beta$ ,12-*cis*, entretanto, a sua biossíntese ainda não foi suficientemente estudada (HOLUB & BUDĚŠÍNSKÝ, 1986).

No Esquema 3.4 está representado um quadro geral da diversidade estrutural de lactonas sesquiterpênicas. A partir de uma estrutura inicialmente muito simples, o costunolídeo, germacranolídeos, eudesmanolídeos e guaianolídeos são formados. Modificações dessas estruturas, como a síntese de eudesmanolídeos ou pseudoguaianolídeos, indica certa evolução química das plantas que as realizam. Já as modificações do esqueleto pseudoguaianolídeo são evolutivamente bem mais recentes, conforme Esquema 3.4.



Esquema 3.4: Germacreno A como precursor das lactonas sesquiterpênicas (apenas lactonas 6,12 são mostradas no esquema). Cada grupo entre colchetes indica um novo passo evolutivo nas espécies que os sintetizam (Adaptado de YOSHIOKA et al, 1973; FISCHER et al, 1979).

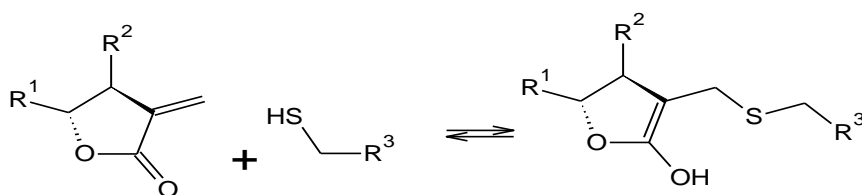
## Atividades

Foi apresentada uma revisão das lactonas sesquiterpênicas já isoladas na tribo Chicorieae (Lactuceae) de Asteraceae. Nessa tribo estão agrupadas muitas espécies comestíveis (alface, chicória, almeirão), e às lactonas sesquiterpênicas é

atribuído o amargor característico das mesmas. Além disso, como sesquiterpenoides exercem uma grande variedade de atividades, que incluem toxicidade para algumas linhagens tumorais e indução de enzimas desintoxicantes, o conteúdo de sesquiterpenoides de espécies da tribo Chicorieae pode contribuir para as propriedades promotoras da saúde atribuídas às mesmas. Quimicamente, as mais de 350 estruturas já isoladas de espécies da tribo se restringem a apenas 3 esqueletos: guaianolídeos (243), eudesmanolídeos (73) e germacranolídeos (44), com um padrão muito diversificado de substituições, especialmente glicosilação (ZIDORN, 2008).

De uma espécie da tribo Anthemideae, *Tanacetum parthenium*, foi isolado o partenolídeo, o principal responsável pelas atividades contra febre e enxaqueca atribuídas a esta planta. A lactona é comercializada para o tratamento da enxaqueca, e recentemente sua atividade antitumoral por inibição de NF-κB tem merecido destaque. Entretanto, a substância apresenta muito baixa hidrossolubilidade, o que dificulta sua utilização na terapia, mas a recente produção de derivados hidroxilados e esterificados pode facilitar sua utilização terapêutica.

A grande maioria das lactonas sesquiterpênicas farmacologicamente ativas possuem uma lactona do tipo ciclopentano α-metileno γ-lactona α,β-insaturada. Esse tipo de estrutura é bastante reativa, podendo interagir com sulfidrilas proteicas, inativando-as (não é o caso para as lactonas ciclopentano α-metila γ-lactona). Esse é o mecanismo proposto, por exemplo, para a lactona 1β-hydroxyalantolactone, isolada dos extratos de *Inula japonica*, para a qual se atribui a atividade de inibição da ubiquitinação durante a ativação de NF-κB desencadeada por TNFα. A 1β-hydroxyalantolactone se ligaria covalentemente à cisteína do sítio ativo da enzima ubiquitinadora, impedindo a ubiquitinação da necessária à cascata inflamatória (LIU et al, 2014).



Esquema 3.5: Representação da reação de α-metileno-γ-lactonas com sulfidrilas..

Tapsigargina e helenalina são duas lactonas com esqueleto guaianolídeo (6,12 e 8,12, respectivamente). A primeira inibe as bombas Ca-ATPase do retículo endoplasmático e sarcoplasmático. A helenalina inibe a via do NF- $\kappa$ B através da inibição da ligação de p65 ao DNA, sendo utilizada topicamente como anti-inflamatória, mas tem recebido muita atenção devido à implicação de NF- $\kappa$ B no câncer. A santonina (eudesmano) apresenta um longo histórico de utilização como antiparasitário (DUPLAN et al, 2014). Muitas lactonas sesquiterpênicas com estrutura  $\alpha$ -metila- $\gamma$ -lactona também exercem atividades farmacológicas, como a tapsigargina, a artemisinina e a santonina.

### **Eupatorium**

Entre as lactonas já isoladas de *Eupatorium* encontram-se germacranolídeos, guaianolídeos, heliangolídeos (KING e ROBINSON, 1987; HERZ, 2001), germacradienolídeos, elemanolídeos, elemadienolídeos, eudesmanolídeos, melampolídeos, partenolídeos, cronquistiolídeos, grazielolídeos e isoguaiagrazielolídeos (HERZ, 2001; HERZ, 2004; HUO et al., 2004; YUE et al., 2004). Muitas lactonas isoladas de espécies de *Eupatorium* foram avaliadas quanto à sua atividade citotóxica *in vitro* contra células de várias linhagens tumorais - *E. cannabinum* (WOERDENBAG et al, 1988); contra células P-388 e A-549 – *E. lindleyanum* (HUO et al. 2004); *E. chinense* (LIAW et al. 2008); atividade inibitória sobre a degranulação em células RBL-2H3 de leucemia basofílica de ratos - *E. chinense* (ITOH et al, 2009) e atividade repelente contra formigas – *E. quadrangulare* (OKUNADE e WIEMER, 1985).

## **3.4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.4.1 Material vegetal**

As espécies foram coletadas de populações nativas do Estado do Rio Grande do Sul. A identificação botânica foi realizada pelo botânico Prof. Dr. Sérgio L. Bordignon. Uma exsicata de cada exemplar foi depositada no herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul – ICN, conforme Tabela 3.2.

### **3.4.2 Extração por lavagem com diclorometano**



Inicialmente, para triagem, uma amostra de 5 g de folhas não rasuradas e/ou flores de cada planta coletada foi extraída (lavada) com 30 mL de diclorometano durante 30 s em Erlenmeyer. A solução extrativa foi filtrada em algodão e concentrada em evaporador rotativo a 40°C. Os extratos foram ressuspensos em 1,6 mL de metanol, centrifugados a 8000 rpm (5min), filtradas com filtro TPFE 45/25 e secos em fluxo de N<sub>2</sub> e então analisadas em IV.

Posteriormente, o material vegetal fresco intacto (1,5 kg de partes aéreas de *E. inulifolium* e 5,0 kg de *E. casaretto*) foi submetido à extração por lavagem com diclorometano em uma proveta de 1 L. Para isso, galhos da planta foram imersos na proveta contendo 1 L de diclorometano e agitados manualmente durante 30 s. Ao final desse tempo, novos galhos foram submetidos ao processo com o mesmo solvente. O solvente da solução extrativa foi evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida em banho termostático a 40 °C.

### **3.4.3 Extração Herz-Högenauer**

Partes aéreas frescas trituradas de *E. laevigatum* (240 g) foram maceradas com 1 L de diclorometano em um frasco de vidro protegido da luz com papel alumínio por uma semana. A solução extrativa foi filtrada e o solvente foi eliminado em evaporador rotativo (HERZ e HÖGENAUER, 1961).

Tabela 3.2: Lista de coletas para pesquisa de lactonas sesquiterpênicas.

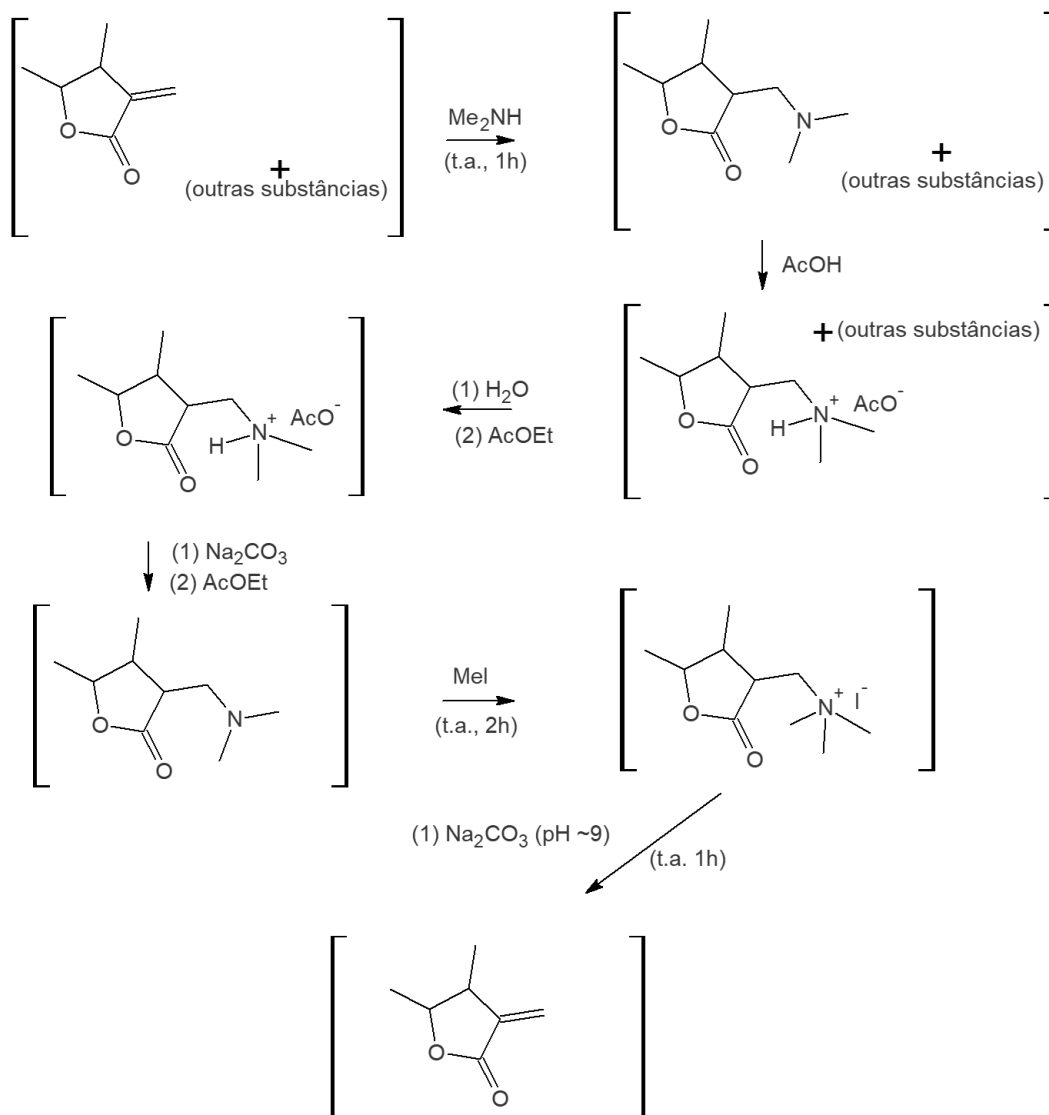
ICN: Código do Herbário; GPS: sistema de geoposicionamento global

<i>Eupatorium</i> Seção (Cabrera)	<i>Sect. Cylindrocephala</i>		<i>Sect. Subimbricata</i>				<i>Sect. Dimorpholepis</i>	<i>Seção Symphyopappus</i>
Espécie (Cabrera)	<i>E. ivifolium</i> L.	<i>E. laevigatum</i> Lam.	<i>E. inulifolium</i> Kunth	<i>E. picturatum</i> Malme	<i>E. polystachyum</i> DC.	<i>E. tremulum</i> Hook. & Arn.	<i>E. gaudichaudianum</i> DC.	<i>E. casarettoi</i> Hieron.
Sinonímia (King e Robinson)	<i>Chromolaena ivifolia</i> (L.) R.M.King & H.Rob.	<i>Chromolaena laevigata</i> (Lam.) R.M.King & H.Rob.	<i>Austroeupatorium inulifolium</i> (Kunth) R.M.King & H.Rob.	<i>Austroeupatorium picturatum</i> (Malme) R.M.King & H.Rob.	<i>Raulinoreitzia crenulata</i> (Sprengel) R.M.King & H.Rob.	<i>Raulinoreitzia tremula</i> (Hook. & Arn.) R.M.King & H.Rob.	<i>Grazielia gaudichaudeana</i> (DC.) R.M.King & H.Rob.	<i>S. casarettoi</i> (Hieron.) R.M.King & H.Rob.
Subtribo (King e Robinson)	Praxelinae	Praxelinae	Eupatoriinae	Eupatoriinae	Disynaphiinae	Disynaphiinae	Disynaphiinae	Disynaphiinae
GPS	S 29°14'29.6" W 050°44'06.1"	S 29°16'03.5" W 050°44'21.3"	S 29°27'55.2" W 050°33'25.8"	S 29°16'28.1" W 050°44'20.8"	S 29°16'03.5" W 050°44'21.3"	S 30°2'45.7" W 051°21'41.1"	S 29°15'58.9" W 050°44'15.8"	S 29°57'29.27" W050°08'08.50"
Altitude	2692 ft = 821 m	2297 ft = 700 m	1916 ft = 583 m	2050 ft = 625 m	2297 ft = 700 m	20 ft =6 m	2365 ft = 721 m	20 ft =6 m
Hora	14:50 h	16:00 h	12:45 h	16:30	16:00 h	10:00h	15:50 h	11:00h
Data	13/04/2010	13/04/2010	13/04/2010	13/04/2010	13/04/2010	14/01/2011	13/04/2010	13/03/2010
ICN	150829	146973	146978	146979	146980	106808	146974	148831
órgão	flores   folhas	flores   folhas	flores   folhas	flores   folhas	partes aéreas	flores   folhas	partes aéreas	flores   folhas

O extrato (9,51 g) foi suspenso em água:metanol (80:20) e submetido a tratamento com acetato de chumbo para precipitação de clorofilas e gorduras. Esse procedimento foi realizado duas vezes, com volumes diferentes de solução de acetato de chumbo, devido a dificuldade para solubilização da amostra na primeira tentativa, com rendimentos de 0,5 e 7,5 g, respectivamente.

#### **3.4.4 Extração para $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas**

Partes aéreas frescas trituradas de *E. tremulum* (1.0 kg) foram maceradas com 3 L de diclorometano em um frasco de vidro protegido da luz com papel alumínio por uma semana. A solução extrativa foi filtrada e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório, resultando 80 g de um extrato viscoso. Uma alíquota de 6 g foi dissolvida em AcOEt (10 mL) e foi adicionada dimetilamina (solução aquosa 33%, 2 mL). Depois de 1h a mistura foi diluída com AcOEt (5 mL) e lavada com água (3x 10 mL). A fase orgânica foi concentrada (1mL) e ácido acético glacial EtOOH (2 mL) foi adicionado com homogeneização contínua. Os acetatos foram extraídos em água (6 x 10 mL) e a fase aquosa foi lavada com AcOEt (6 x 10 mL), neutralizada com solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, e então reextraída com AcOEt (6 x 10 mL). O extrato AcOEt foi seco (MgSO<sub>3</sub>), filtrado e concentrado (~80 mL). Iodeto de metila (1 mL) foi adicionado e a mistura reagiu por 2 h. Uma solução saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> foi adicionada (pH ~9) e a mistura resultante deixada a temperatura ambiente por 1 h. Depois foi adicionado água (5 mL) e a mistura foi extraída com AcOEt (6 x 10 mL), seca em (MgSO<sub>3</sub>) e evaporada sob pressão reduzida a 40 °C (Esquema 3.6) (LIMA et al, 1985; ALVES, 2012).



Esquema 3.6: Derivatização/extração de  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas: t.a. (temperatura ambiente),  $\text{Me}_2\text{NH}$  (dimetilamina); MeI (iodeto de metila). Detalhes no texto (seção 3.4.5).

### 3.4.5 Análise em Infravermelho

As análises de espectroscopia no Infravermelho foram realizadas em um equipamento Spectrum BX da Perkin Elmer, com amostra sólida ou pastosa, sem diluição.

### 3.4.6 Cromatografia gasosa

Extratos de lactonas sesquiterpênicas foram ressuspensos em diclorometano. As análises foram realizadas em um equipamento CG 7890A acoplado ao detector de massas 5975c EM (Agilent Technologies, CA, USA) ou QP5000 (Shimadzu, Quito, Japão), equipados com coluna DB-5 (25 m, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm de espessura) operando com energia de ionização de 70 eV e temperatura de interface de 250°C. A temperatura foi programada de 60°C a 300°C a 3°C/min, com hélio como gás carreador a 80 kPa e fluxo de 1 mL/min. Alternativamente, um método com temperatura programada de 60°C a 300°C em 12 min foi utilizado para análise das frações.

#### **3.4.7 Cromatografia em coluna flash**

Para cromatografia em coluna aberta foi utilizada sílica gel 60G 70–230 Mesh e solventes pentano, hexano, éter etílico, acetato de etila, metanol Merck e Vetec.

#### **3.4.8 CLAE**

Para a análise das frações da CC *flash* da fração acetato de etila do extrato diclorometano de *E. inulifolium* foi utilizado CLAE/DAD (Waters, detector PDA) com coluna de fase reversa C18 (250x4.6 mm, 5µm, marca MN) utilizando um gradiente de ACN:água 0 a 100 em 20 min (o tempo total foi ajustado para 30 ou 40 min, mantendo-se o fluxo, dependendo da complexidade da amostra), com 4 min de manutenção em 100% de eluente orgânico ao final da corrida.

#### **3.4.9 Espectroscopia de RMN**

As análises de espectroscopia de RMN foram realizadas em um equipamento FTNMR de 60 MHz da Anassazi (Central analítica da FACFAR). As análises em 300 MHz foram realizadas em um equipamento Varian Inova (Central Analítica do IQ/UFRGS) ou Bruker DPX400 (LabRMN da UFSM). Utilizando CDCl<sub>3</sub> como solvente.

### 3.5 RESULTADOS

Foram avaliadas inicialmente, pelo método de lavagem com diclorometano e análise IV do extrato 6 das espécies coletadas. Posteriormente, duas delas foram novamente extraídas e o extrato foi fracionado e analisado. Alternativamente, a extração proposta por Herz-Högenauer para lactonas foi realizada em *E. laevigatum* e a extração específica para  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas foi aplicada a *E. tremulum*.

#### 3.5.1 Triagem para lactonas sesquiterpênicas superficiais

O estudo das lactonas sesquiterpênicas de *Eupatorium* seguiu a metodologia proposta por IRANSHAHI e colaboradores (2007): lavagem com diclorometano, evitando assim a extração de clorofila, e posterior análise em IV para detecção de banda de lactona. A banda característica de lactonas sesquiterpênicas ocorre logo acima de  $1760\text{ cm}^{-1}$ . As espécies analisadas e os resultados encontram-se na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Absorção no IV dos extratos superficiais de espécies de *Eupatorium*.

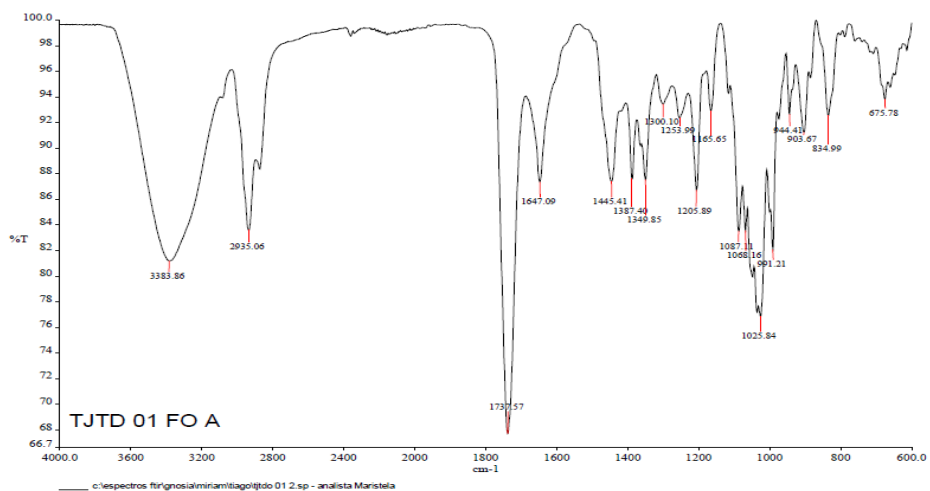
Espécie	Órgão	$\lambda\text{ cm}^{-1}$	Formato da banda
<i>E. ivifolium</i>	Folhas	1672	fraca, aguda
<i>E. ivifolium</i>	Flores	1692	fraca
<i>E. laevigatum</i>	Folhas	1720	fraca
<i>E. laevigatum</i>	Flores	1652	fraca
<i>E. inulifolium</i>	Folhas	<b>1737</b>	<b>forte, estreita</b>
<i>E. inulifolium</i>	Flores	1732	fraca, estreita
<i>E. picturatum</i>	Folhas	1706	aguda
<i>E. picturatum</i>	Flores	1654	fraca
<i>E. polystachyum</i>	Partes aéreas	1679	forte, aguda
<i>E. gaudichaudianum</i>	Partes aéreas	1692	forte, aguda

Como pode ser observado, nenhum dos extratos analisados apresentou a banda de absorção pronunciada (forte e larga) na região esperada, como característico de  $\gamma$ -lactonas, sinalizando a presença em concentração muito baixa ou até mesmo a ausência deste tipo de composto na maioria dos extratos analisados. Os espectros encontram-se na Figura 3.3 e no Anexo I. A Tabela 3.4 apresenta o máximo de absorção IV de lactonas sesquiterpênicas selecionadas

já isoladas de espécies de *Eupatorium*, com diferentes núcleos e com C13  $\alpha$ -metileno ou  $\alpha$ -metila. Todas apresentam a banda de lactona acima de 1760  $\text{cm}^{-1}$ . Suas estruturas podem ser visualizadas na Figura 3.4. Nessa mesma figura pode-se perceber que as lactonas sesquiterpênicas frequentemente são funcionalizadas pela esterificação com ácidos com estrutura isoprênica (ácido tíglico, ácido angélico, ácido isovalérico e seus epóxidos). Essas estruturas absorvem na faixa de 1700-1750 do infravermelho (ésteres), mas sua absorção não se confunde com a absorção típica de  $\gamma$ -lactonas.

Ainda na Tabela 3.3, na Figura 3.3 e no Anexo I, pode ser observado que, diferentemente dos outros extratos analisados, o extrato das folhas de *E. inulifolium* apresenta uma banda bastante forte e muito característica em 1737  $\text{cm}^{-1}$  que, apesar de não poder ser descrita como larga, como se esperaria de uma banda de absorção de uma lactona, pode certamente indicar a presença em concentração elevada de um composto com uma carbonila. Sobre a absorção no infravermelho pode-se dizer que bandas em 1715  $\text{cm}^{-1}$ , características de cetonas, estão no centro de dispersão das absorções observadas em compostos carbonílicos, logo acima (1725  $\text{cm}^{-1}$ ) aparecem os aldeídos, e em 1735  $\text{cm}^{-1}$  os ésteres. Uma banda de absorção em 1735  $\text{cm}^{-1}$ , poderia ser originada tanto por um éster simples, quanto cíclico (lactona), desde que contendo seis ou mais membros (não tensionado). Um número menor de membros no anel, com conseqüente aumento de tensão, seria refletido em um aumento da frequência de absorção (1770  $\text{cm}^{-1}$  para 5 membros, como usual em lactonas sesquiterpênicas e 1820  $\text{cm}^{-1}$  para 4 membros). Estes aumentos de frequência observados em anéis menores e mais tensos, poderiam ser exacerbados por ligações duplas adjacentes ao oxigênio não carbonílico (1760-1800  $\text{cm}^{-1}$ ) ou contrabalanceados por ligações duplas adjacentes à carbonila (1725-1750  $\text{cm}^{-1}$ ) (Tabela 3.1) (PAVIA et al., 2005; NAKANISHI, 2008).

### *Eupatorium inulifolium* - folhas



### *Eupatorium inulifolium* - inflorescências

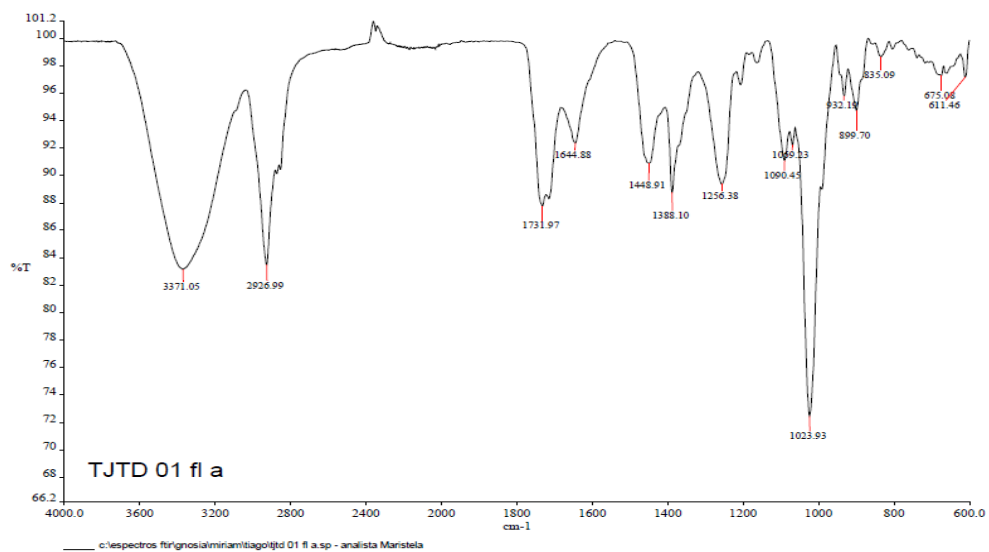


Figura 3.3: Espectro infravermelho dos extratos das folhas e das inflorescências de *E. inulifolium*.



Tabela 3.4: Absorbância do IV de artemisinina e de lactonas isoladas de espécies do gênero *Eupatorium* (região de 1600-1800 cm<sup>-1</sup>).

	espécie	núcleo	nome	lactona	éster	aldeído	cetona	alceno
1	<i>E. glaberrimum</i>	heliangolídeo	4'-desidrochromolaenideo	1760		1690		
2	<i>E. ballotaefolium</i>	heliangolídeo	conoprasiolídeo-5-O-acetato	1772	1735		1705	
3	<i>E. altissimum</i>	heliangolídeo	8β-tigloiloxipreeuparundin	1760	1730		1710	
4	<i>E. nelsonii</i>	germacranolídeo	4'-hidroxiliacilindrolídeo	1755	1710		1645	
5	<i>E. intermedium</i>	germacranolideo	8β-angeloiloxi-9β--hidroxicaunilídeo	1780	1730			
6	<i>E. intermedium</i>	germacranolideo	disifiolídeo	1775	1750	1725	1640	
7	<i>E. intermedium</i>	elemanolídeo	disinafiolídeo	β-lactona 1835; γ-lactona 1775	1730		1685	
8	<i>E. lindeleyanum</i>	cadinanolídeo	eupalinilídeo M	1761	1709		1676	
9	<i>E. lasiophthalmum</i>	guaianolídeo	1β,10β-epoxi-2β-hidroxikaunilídeo	1772			1667	
10	<i>Artemisia annua</i>	cadinanolídeo	artemisinina	δ-lactona - 1750				

1: AHMED et al (1985); 2: BOHLMANN et al 1980; 3: BOEKER et al (1986); 4: BOHLMANN et al (1985); 5: BOHLMANN et al (1981); 6: BOHLMANN et al (1981); 7: BOHLMANN et al (1981); 8: YE et al (2008); 9: De GUTIERREZ et al (1990)

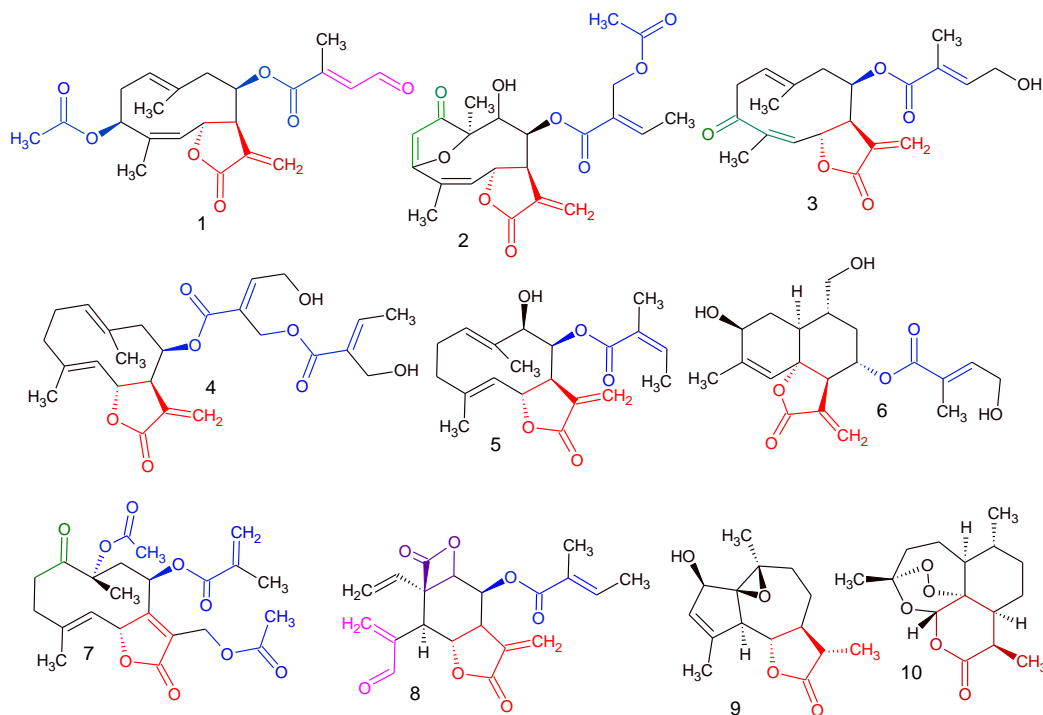


Figura 3.4: Algumas lactonas sesquiterpênicas isoladas de espécies de *Eupatorium*. Nomes, referências e absorção IV para cada substância podem ser localizadas na Tabela 3.3.

Dentre as seis espécies analisadas neste trabalho, apenas as amostras obtidas da lavagem das folhas de *E. inulifolium* apresentaram uma banda de absorção forte característica de carbonilas, suficiente para indicar abundância do material no extrato. Entretanto, seu valor, consideravelmente abaixo de  $1750\text{ cm}^{-1}$  indica que não seja uma  $\gamma$ -lactona. Segundo IRANSHAHI e colaboradores (2007), apenas bandas acima de  $1765\text{ cm}^{-1}$ , fortes e largas, deveriam ser consideradas em triagens. Outras fontes dão ainda o valor de  $1770\text{ cm}^{-1}$  como referência para  $\gamma$ -lactonas, sendo os valores entre  $1750$  e  $1735\text{ cm}^{-1}$  encontrados em  $\delta$ -lactonas e ésteres abertos, respectivamente.

Como exposto, nenhuma das amostras analisadas no ensaio preliminar revelou a presença da banda de absorção no IV característica de  $\gamma$ -lactonas sesquiterpênicas. Entretanto, afim de avaliar a possibilidade de que outros compostos mais abundantes contendo carbonilas, estivessem mascarando a

banda de absorção de  $\gamma$ -lactonas, as espécies *E. casarettoi*, *E. inulifolium* e *E. tremulum* foram extraídas em maior quantidade e submetidas a técnicas específicas para lactonas.

### 3.5.2 Lactonas sesquiterpênicas superficiais

Foi realizada extração por lavagem com diclorometano de material de três espécies coletadas em maior quantidade.

#### 3.5.2.1 Extrato diclorometano superficial de *Eupatorium casarettoi*

Foi realizada a lavagem superficial de partes aéreas de *E. casarettoi*, com posterior evaporação do solvente, obtendo-se ao final 238 g de um extrato resinoso de aspecto vítreo.

Material vegetal:	5 kg
Diclorometano:	5 L
Resíduo Seco:	238 g (4,8%)

O extrato seco (10 g) foi pulverizado com gel de sílica e submetido a cromatografia em coluna aberta (Flash) (20x10 cm) com solventes de polaridade crescente, obtendo-se 17 frações. Foram coletadas frações de 100 mL, conforme Tabela 3.5 e o rendimento de cada fração está descrito na Tabela 3.6: Inicialmente foi planejada a análise dessas frações no Infravermelho para identificação daquelas frações potencialmente compostas por lactonas sesquiterpênicas, entretanto, devido a dificuldades técnicas com o equipamento durante aquele período, as análises prosseguiram levando em conta outros critérios, como rendimento do extrato e ocorrência de precipitação ou cristalização, por exemplo.

Tabela 3.5: Fracionamento do extrato diclorometano superficial das partes aéreas de *E. casarettoi*.

Sílica	60 g	
Amostra	10 g	(frações) 100 mL
Solvente	Hexano (H)	1,2,3,4

	Éter etílico (E)	5,6,7
	Diclorometano (D)	8,9,10
	Acetato de etila (A)	11,12,13,14
	Etanol (Et)	15,16
	Metanol/ácido acético (M)	17

Tabela 3.6: Rendimento das frações do extrato diclorometano de *E. casarettii*.

Fração			Massa (g)	(%)
1	H	H1	0	0,0%
2		H2	0	0,0%
3		H3	0	0,0%
4		H4	0	0,0%
5	E	E1	0	0,0%
<b>6</b>		<b>E2</b>	<b>1,85</b>	<b>18,5%</b>
<b>7</b>		<b>E3</b>	<b>2,25</b>	<b>22,5%</b>
<b>8</b>	D	<b>D1</b>	<b>2,64</b>	<b>26,4%</b>
<b>9</b>		<b>D2</b>	<b>0,91</b>	<b>9,1%</b>
10		D3	0,4	4,0%
11	A	A1	0,2	2,0%
<b>12</b>		<b>A2</b>	<b>1,3</b>	<b>13,0%</b>
13		A3	0,1	1,0%
14		A4	0,4	4,0%
15	Et	Et1	0,1	1,0%
16		Et2	0,1	1,0%
17	M	M1	0,1	1,0%
Total			10,35	103,5%

H: frações hexano; E: éter etílico; D: diclorometano; A: acetato de etila; Et: etanol; M: metanol

O rendimento das frações indica que o extrato particionou pouco, ficando distribuído entre as frações éter etílico e diclorometano, principalmente. Todas elas tiveram perfil cromatográfico em CCD (sistema eluente hexano:clorofórmio (60:40)) bastante semelhantes entre si (dados não mostrados).

As frações DD3 (fração 10, diclorometano), e DE23 (frações 6 e 7, E2 e E3) foram analisadas mais detalhadamente.

### **Fração D3**

A fração DD3 formou um precipitado branco apenas solúvel em tolueno, e sua análise cromatográfica CG/MS revelou a presença de aldeídos de cadeia longa como principais componentes: aldeído mirístico, cerótico, montânico e melíssico

(C24, C26, C28 e C30), bem como seus álcoois correspondentes. Não foi possível calcular o índice de retenção para identificação dessas substâncias, entretanto, o espectro de massas é idêntico ao apresentado para esses aldeídos na literatura, e a série homóloga apresenta os mesmos picos principais (GUTIÉRREZ et al, 2006; PEREZ-CAMINO et al, 2003). Os espectros de massa e cromatogramas representativos encontram-se no ANEXO 2.

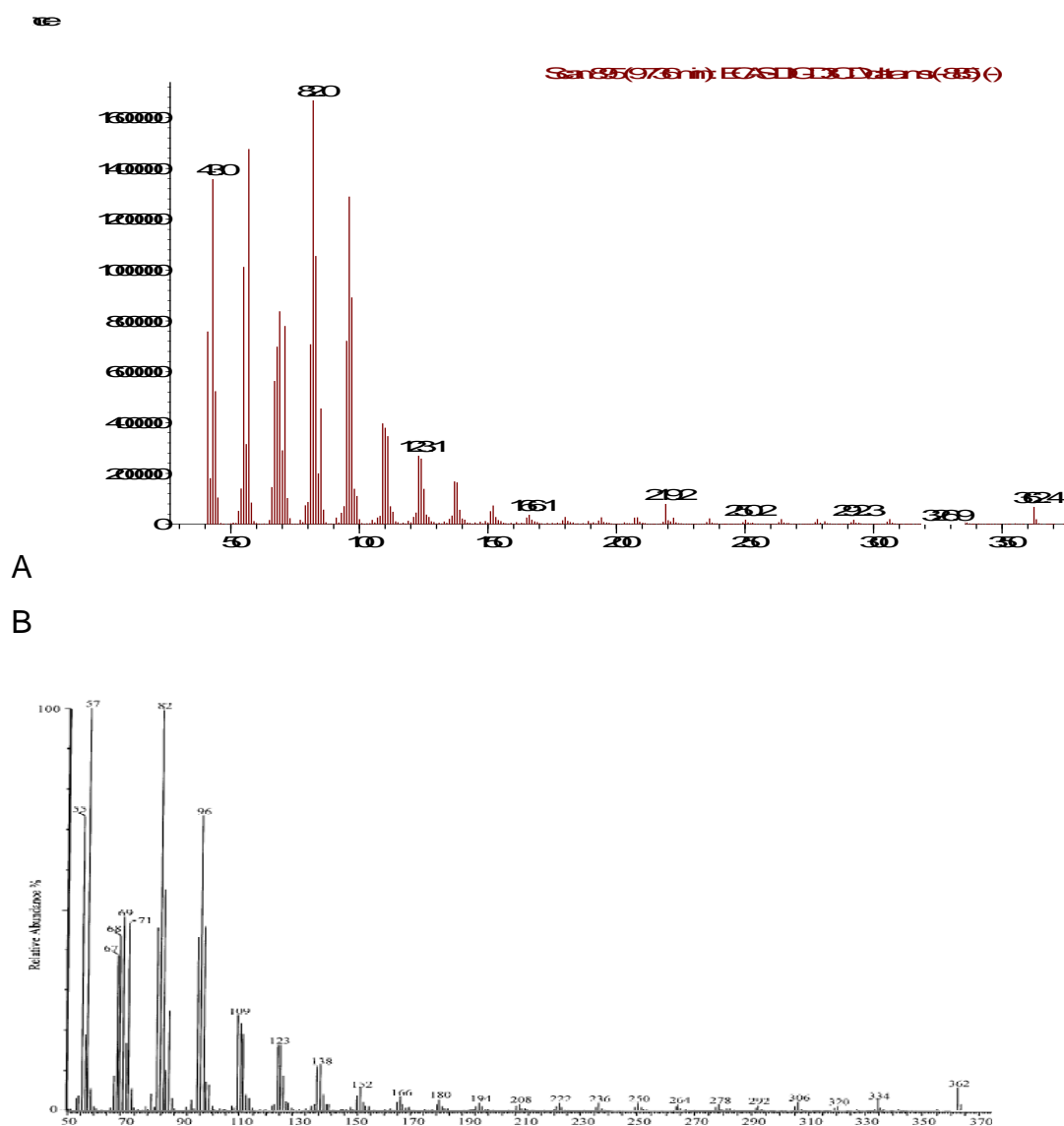
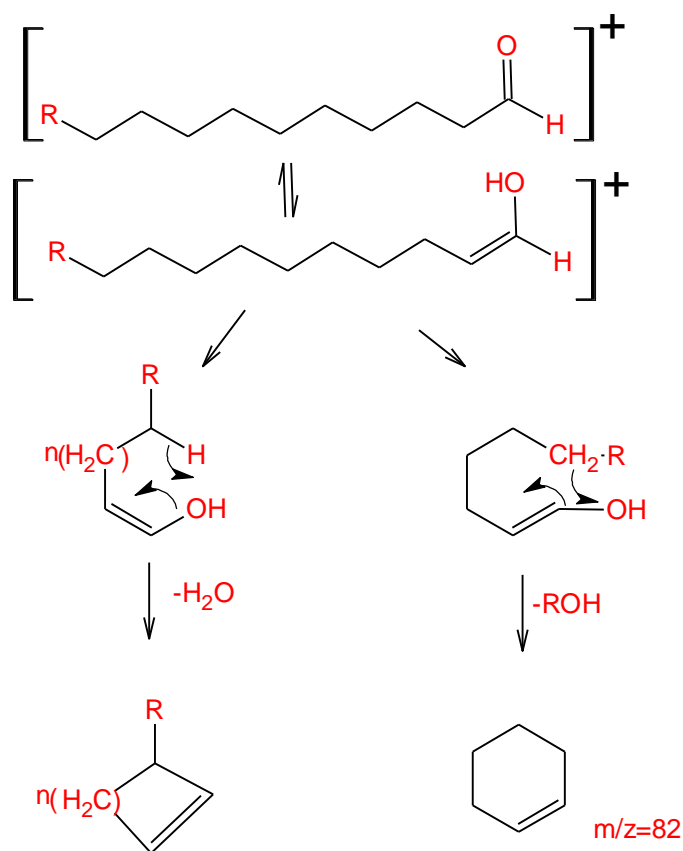


Figura 3.4: Espectros de massas do hexacosanal. A) Espectro de massas do Hexacosanal obtido na análise da fração D3. B) Espectro de massas do Hexacosanal obtido da literatura (PEREZ-CAMINO et al, 2003).

Aldeídos de cadeia longa podem facilmente desidratar e seu íon molecular não é visualizado no espectro de massas. O íon de maior relação m/z é oriundo da

perda de água (M-18). Além disso, aldeídos também podem sofrer rearranjo de McLafferty, originando íon 82, característico destas substâncias (Esquema 3.7)



Esquema 3.7: Desidratação e rearranjo de McLafferty em aldeídos.

A outra série homóloga presente no cromatograma, também é alifática, como se deduz de seus espectros de massa (álcoois), de forma que podemos sugerir que o precipitado recolhido dessa fração seja proveniente das ceras cuticulares de *E. casarettoi*, não sendo então mais utilizado no estudo, uma vez que ceras não fazem parte do objetivo deste trabalho e apresentam o inconveniente de muito baixa solubilidade.

A Tabela 3.7 lista as massas moleculares dos homólogos de 20-34 carbonos, alcanos, álcoois, aldeídos ácidos e ésteres metílicos.

Tabela 3.7: Massa de compostos alifáticos (a massa observada para aldeídos é M-18, massa do íon molecular-massa da água):

	alcano	álcool	aldeído	ácido	éster metílico do ácido	Nome comum
C20	282	298	296	312	326	araquídico
C21	296	312	310	326	340	
C22	310	326	324	340	354	beênico
C23	324	340	338	354	368	
<b>C24</b>	<b>338</b>	<b>354</b>	<b>352</b>	<b>368</b>	<b>382</b>	<b>mirístico</b>
C25	352	368	366	382	396	
<b>C26</b>	<b>366</b>	<b>382</b>	<b>380</b>	<b>396</b>	<b>410</b>	<b>cerótico</b>
C27	380	396	394	410	424	
<b>C28</b>	<b>394</b>	<b>410</b>	<b>408</b>	<b>424</b>	<b>438</b>	<b>mantânico</b>
C29	408	424	422	438	452	
<b>C30</b>	<b>422</b>	<b>438</b>	<b>436</b>	<b>452</b>	<b>466</b>	<b>melíssico</b>
C31	436	452	450	466	480	
C32	450	466	464	480	494	
C33	464	480	478	494	508	
C34	478	494	492	508	522	

Massa em u.m.a. (unidade de massa atômica).

### **Fração DE23**

As frações 6 e 7 do extrato diclorometano das partes aéreas de *E. casarettoi*, foram misturadas e identificadas como DE23 (Extrato original Diclorometano, fração Éter etílico 2 e 3) com perfil cromatográfico em CCD muito semelhante, foram submetidas a uma nova CC Flash, com misturas de polaridade crescente de hexano:diclorometano (100:0 a 0:100).

O solvente das diferentes frações foi evaporado em rotavapor, ressuspenso em éter etílico e submetido a CG/EM para avaliação do perfil.

As frações DE23-1 e DE23-2 são compostas majoritariamente por ésteres metílicos dos ácidos hexacosanoico e octacosanoico (cerótico e montânico), bem como componentes não identificados; as frações DE23-3 e DE23-4 são compostas majoritariamente por alfa-amirina. Nas demais frações não foi possível identificar

os componentes e nenhuma delas apresentou-se suficientemente pura ou com rendimento para realização de RMN.

Após a análise cromatográfica dessas frações, verificou-se que não havia nenhuma delas suficientemente purificada e com o rendimento necessário para dar sequência às etapas do isolamento (cromatogramas e espectros de massa no Anexo 3).

### 3.5.2.2 Extrato diclorometano superficial de *Eupatorium inulifolium*

Foi realizada a lavagem superficial de partes aéreas de *E. inulifolium* da mesma forma que com *E. casarettoi*, obtendo-se ao final 20 g de um extrato ceroso. Dois (2) gramas desse material foram submetidas à cromatografia flash, obtendo-se 12 frações, conforme apresentado na Tabela abaixo.

#### Extrato diclorometano por lavagem da planta fresca intacta:

Material vegetal: 1,5 kg

Diclorometano: 3 L

Resíduo Seco: 20 g (1,3%)

Foi obtido um extrato de aspecto ceroso. Uma pequena fração deste foi submetida a cromatografia flash. O extrato seco foi pulverizado com gel de sílica e submetido à cromatografia em coluna aberta (Flash) com solventes de polaridade crescente. Foram coletadas frações de 100 mL (Tabela 3.8).

Tabela 3.8: Fracionamento do extrato diclorometano superficial das partes aéreas de *E. inulifolium*.

Sílica	60 g	
Amostra	2 g	(frações) 100
Solvente	Hexano (H)	1,2,3,4
	Éter etílico (E)	5,6,7,
	Acetato de etila (A)	8,9,10
	Metanol	11, 12



A fração 9, acetato de etila (denominada EinulAc – *Eupatroium inulifolium* fração acetato de etila ), foi selecionada com base no menor número de manchas em CCD de gel de sílica (eluída com hexano:clorofórmio 50:50 e revelada com vapores de iodo metálico) para novo fracionamento em coluna *flash*, com hexano: clorofórmio, clorofórmio: metanol, conforme Tabela 3.9.

Tabela 3.9: Frações do extrato diclorometano de *E. inulifolium*:

Sílica	60 g	
Amostra	2 g	(frações)
Solvente	Hexano	1,2
	Hexano:clorofórmio 1:1	3,4,5
	Clorofórmio	6,7,8
	Clorofórmio:metanol 1:1	9,10,11
	metanol	12

As frações foram analisadas em HPLC com detector UV-DAD para determinação de seu perfil cromatográfico (não foi determinado rendimento).

Para a análise das frações da CC *flash* da fração acetato de etila do extrato diclorometano de *E. inulifolium* foi utilizado HPLC com coluna de fase reversa. Esse sistema foi escolhido a fim de evitar a degradação de alguns compostos, como as lactonas sesquiterpênicas, com o calor do injetor do cromatógrafo a gás.

#### Análise das frações:

De modo geral foram observados poucos picos nos cromatogramas das frações. A fração 3, Hexano:clorofórmio 1:1; foi a que apresentou um pico aparentemente com maior pureza, como pode ser observado abaixo, com os cromatogramas obtidos em 210 nm e em 258 nm, respectivamente (Figura 3.5 e Figura 3.6).

A:



tjteinul

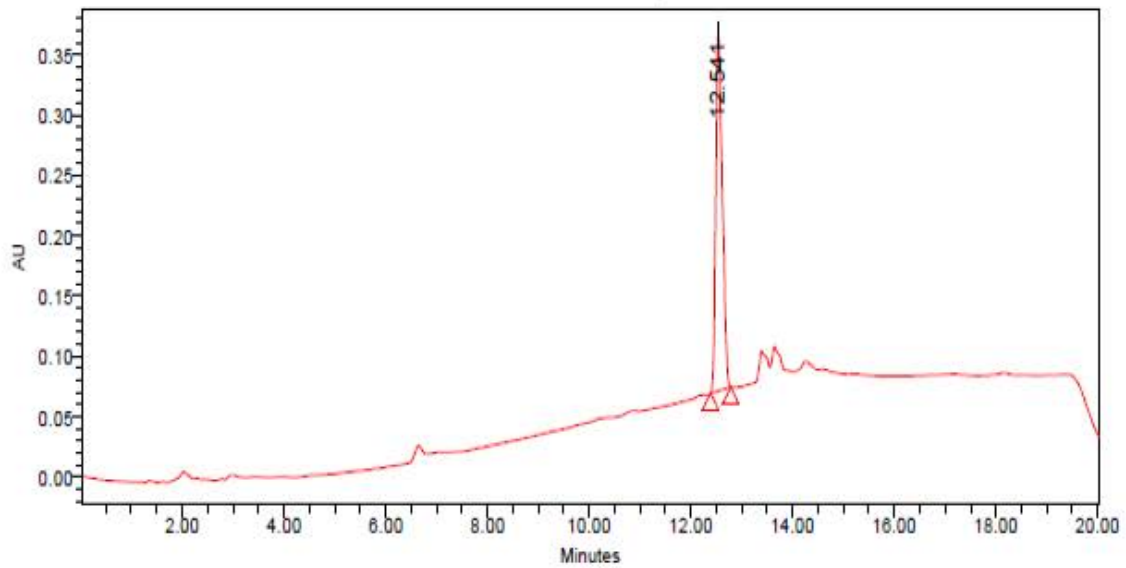
Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	einul3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	6/3/2011 7:30:57 PM
Vial:	3	Acq. Method Set:	Eupatoriumb
Injection #:	1	Date Processed:	6/8/2011 4:02:37 PM
Injection Volume:	10.00 ul	Processing Method:	tjteinul
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	Wvin Ch1
Sample Set Name:	einulAC	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 210.8 nm

### Auto-Scaled Chromatogram



### Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	12.541	2642667	296761		



tjteinul

Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

### Spectrum Index Plot

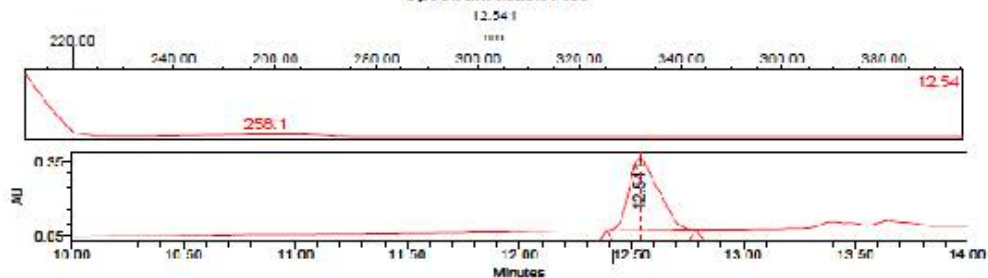


Figura 3.5: Cromatogramas da subfração 3: 210 nm;

B:



tjteinul

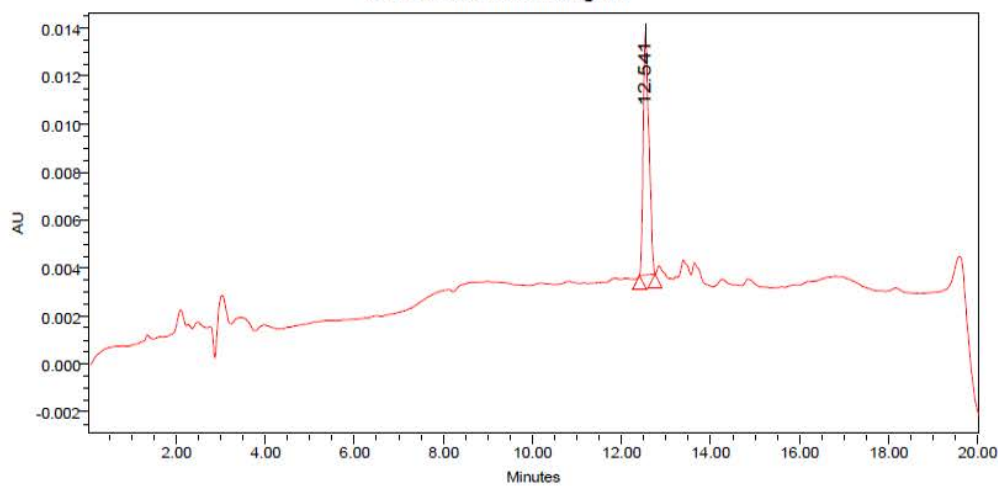
Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

### SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	einul3	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	6/3/2011 7:30:57 PM
Vial:	3	Acq. Method Set:	Eupatoriumb
Injection #:	1	Date Processed:	6/8/2011 4:02:16 PM
Injection Volume:	10.00 ul	Processing Method:	tjteinul
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	WIn Ch1
Sample Set Name:	einulAC	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 258.7 nm

### Auto-Scaled Chromatogram



### Peak Results

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	12.541	88459	10076		



tjteinul

Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

### Spectrum Index Plot

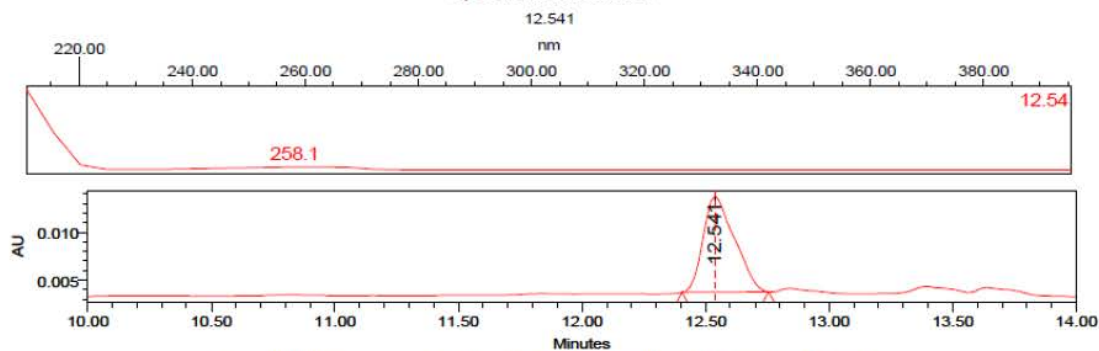


Figura 3.6: Cromatogramas da subfração 3: 258 nm.

Os espectros de UV indicam máximo de absorção em 210 nm. Outros picos nas frações analisadas apresentam o mesmo espectro e comportamento

cromatográfico semelhante, indicando tratar-se de alguma forma de isômeros ou derivados. Por exemplo, na fração 2, juntamente com o pico em 12,54 min, observou-se um pico com espectro semelhante em 12,17 min, além de algumas impurezas, mas com absorção muito baixa (Figura 3.7 e Figura 3.8).

A fração 3 foi codificada como Einulac1. Apresentou rendimento de 50 mg, massa suficiente para a realização de alguns experimentos de RMN, entretanto tentativas de determinar sua massa molecular em CG/EM foram infrutíferas pois a mesma aparenta degradar-se em contato com o injetor do equipamento.

#### Experimentos de RMN:

Foram realizados para Einulac1 experimentos de  $^1\text{H}$ -RMN em um espectrômetro Varian Inova de 300 MHz e os demais ( $^{13}\text{C}$  e correlações) em um espectrômetro Anasazi de 60 MHz. Os dados são apresentados abaixo, nas Figuras 3.9 e 3.10, entretanto, ainda estão em processo de avaliação para a elucidação estrutural da molécula e não serão discutidos neste momento.

A busca na literatura científica por faixas de valores usuais para carbonilas de lactonas sesquiterpênicas indica que deslocamentos de 160 a 180 ppm são os mais comuns, variando muito pouco em função da classe, ou do tipo de substituição no anel lactônico ( $\alpha$ -metileno ou  $\alpha$ -metila). Na Figura 3.11, estão apresentados os deslocamentos do C12 para mais de duas mil lactonas sesquiterpênicas. Nas estruturas em que o sinal do C12 não está na faixa de 160-180 ppm (na região em torno de 2000 no gráfico, por exemplo) é porque se trata de lactonas atípicas, em que a lactonização não ocorre no radical isoprop(en)ila. Entretanto, Einulac1 apresenta absorção semelhante à do extrato superficial das folhas de *E. inulifolium* (ANEXO I), ~1740, num claro indício de não se tratar de uma lactona, mas de um éster.

A

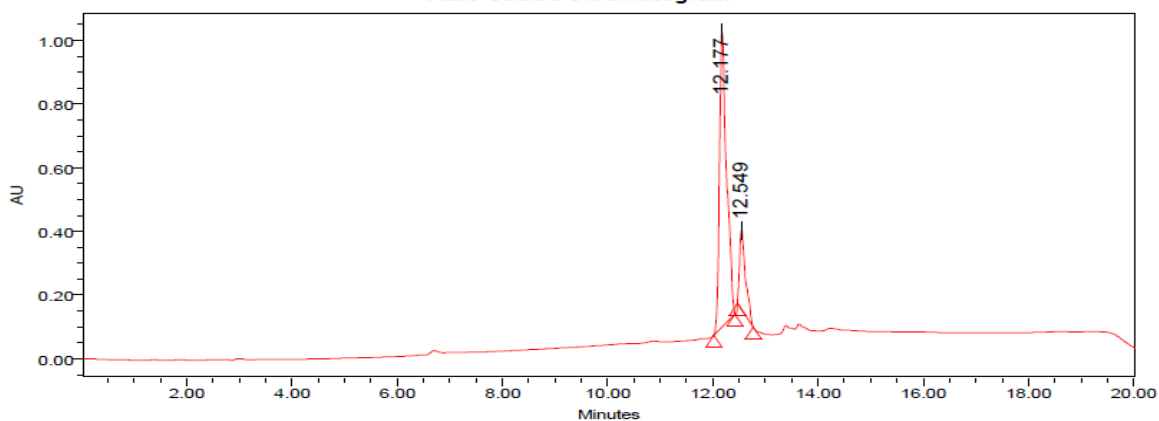
Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

**SAMPLE INFORMATION**

Sample Name:	einul2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	6/3/2011 6:49:09 PM
Vial:	2	Acq. Method Set:	Eupatoriumb
Injection #:	1	Date Processed:	6/8/2011 3:59:43 PM
Injection Volume:	10.00 ul	Processing Method:	tjteinul
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	WVn Ch2
Sample Set Name:	einulAC	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 210.8 nm

**Auto-Scaled Chromatogram**



**Peak Results**

Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1	12.177	8739868	935573		
2	12.549	1953086	249860		

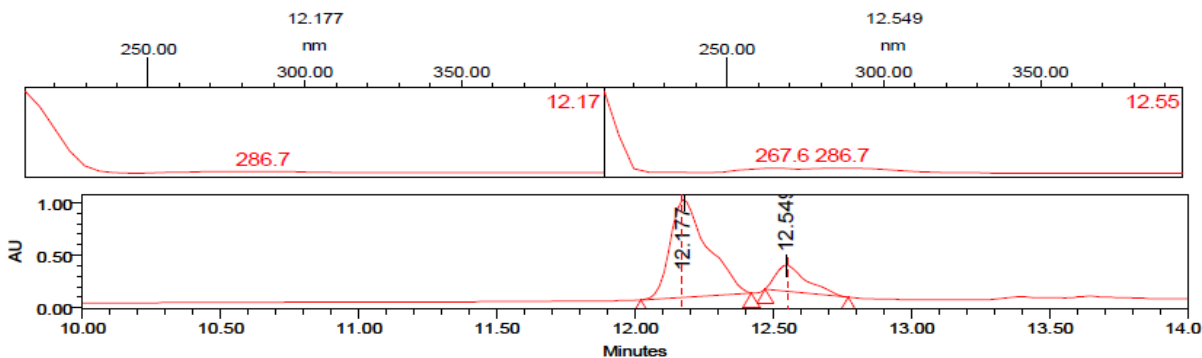


tjteinul

Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

**Spectrum Index Plot**

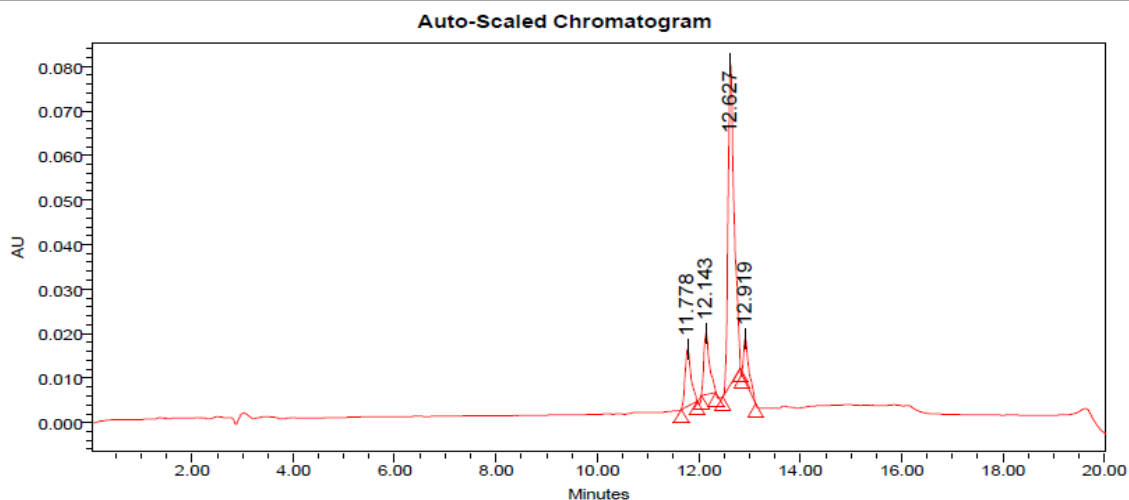


SampleName einul2; Vial 2; Injection 1; Date Acquired 6/3/2011 6:49:09 PM

Figura 3.7: Cromatogramas da subfração 2: 210 nm.

B

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	einul2	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	6/3/2011 6:49:09 PM
Vial:	2	Acq. Method Set:	Eupatoriumb
Injection #:	1	Date Processed:	6/8/2011 4:01:00 PM
Injection Volume:	10.00 ul	Processing Method:	tjteinul
Run Time:	20.0 Minutes	Channel Name:	WVIn Ch2
Sample Set Name:	einulAC	Proc. Chnl. Descr.:	PDA 278.1 nm



**Peak Results**

	Name	RT	Area	Height	Amount	Units
1		11.778	105780	12884		
2		12.143	109366	13948		
3		12.627	603227	72781		
4		12.919	68873	9690		



tjteinul

Reported by User: System

Project Name: TiagoTJTD

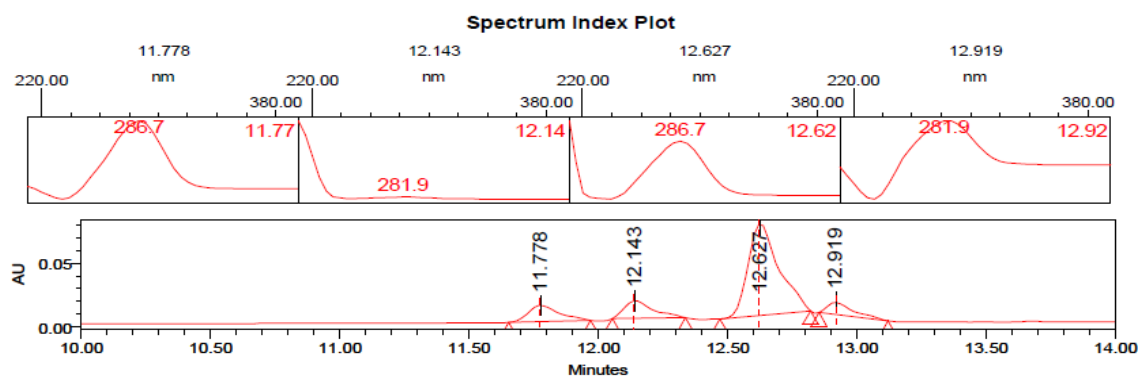


Figura 3.8: Cromatogramas da subfração 2: 278 nm.

**Experimento  $^1\text{H}$ -RMN de Einulac1:**

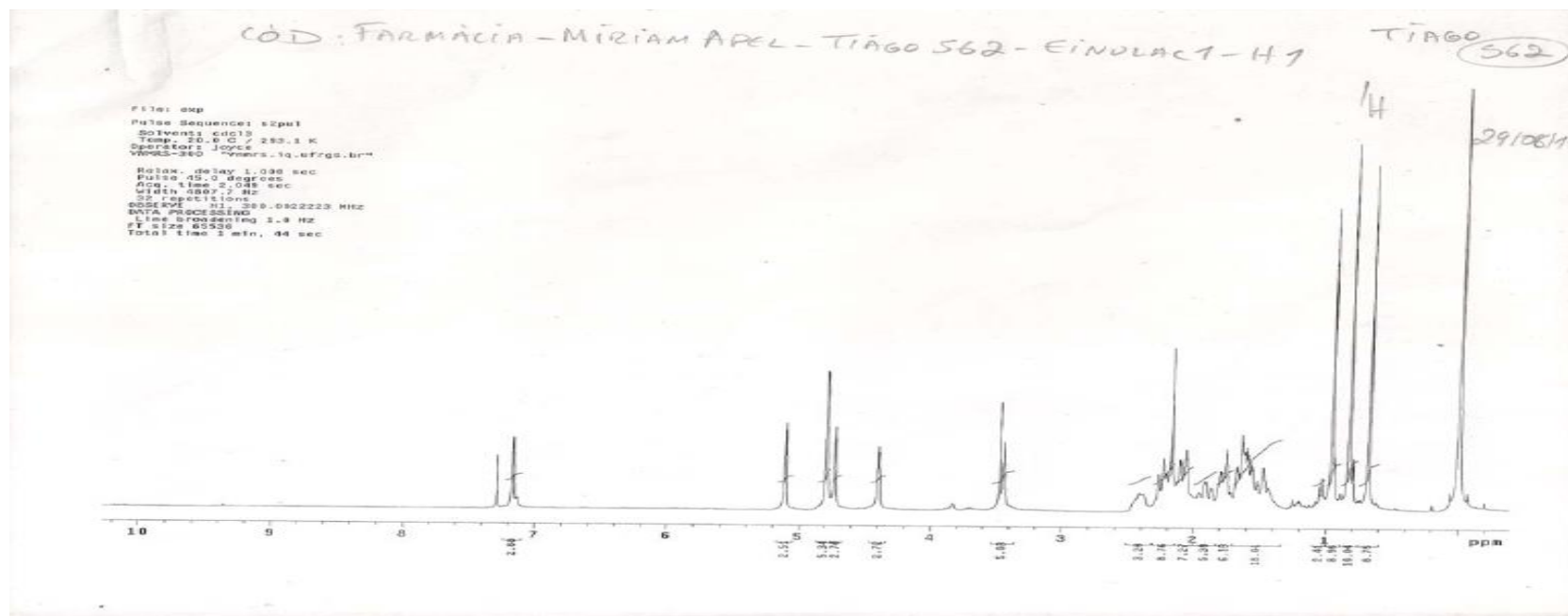


Figura 3.9: Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de Einulac1.

**Experimento <sup>13</sup>C-RMN de Einulac1:**

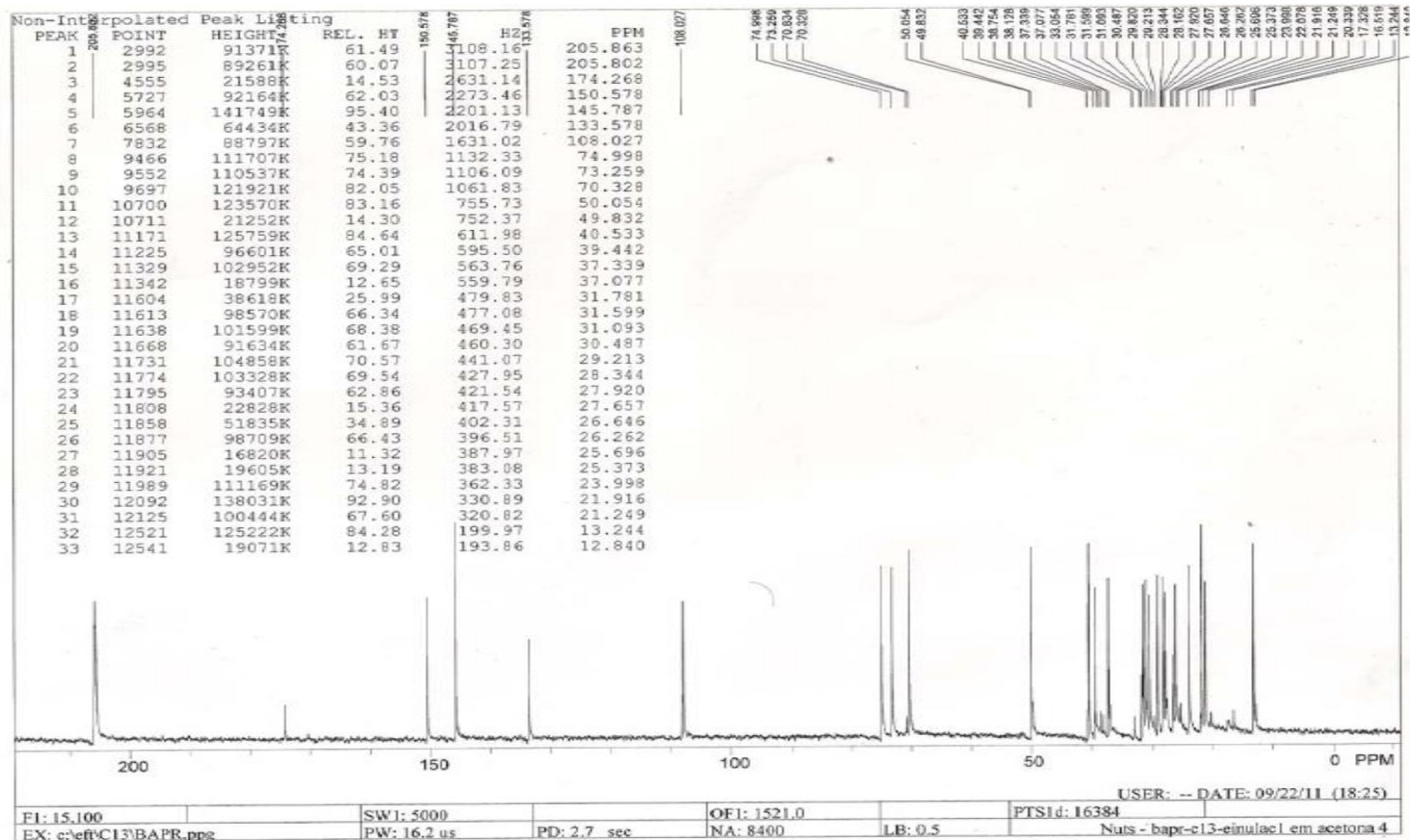


Figura 3.10: Espectro de <sup>13</sup>C-RMN de Einulac1



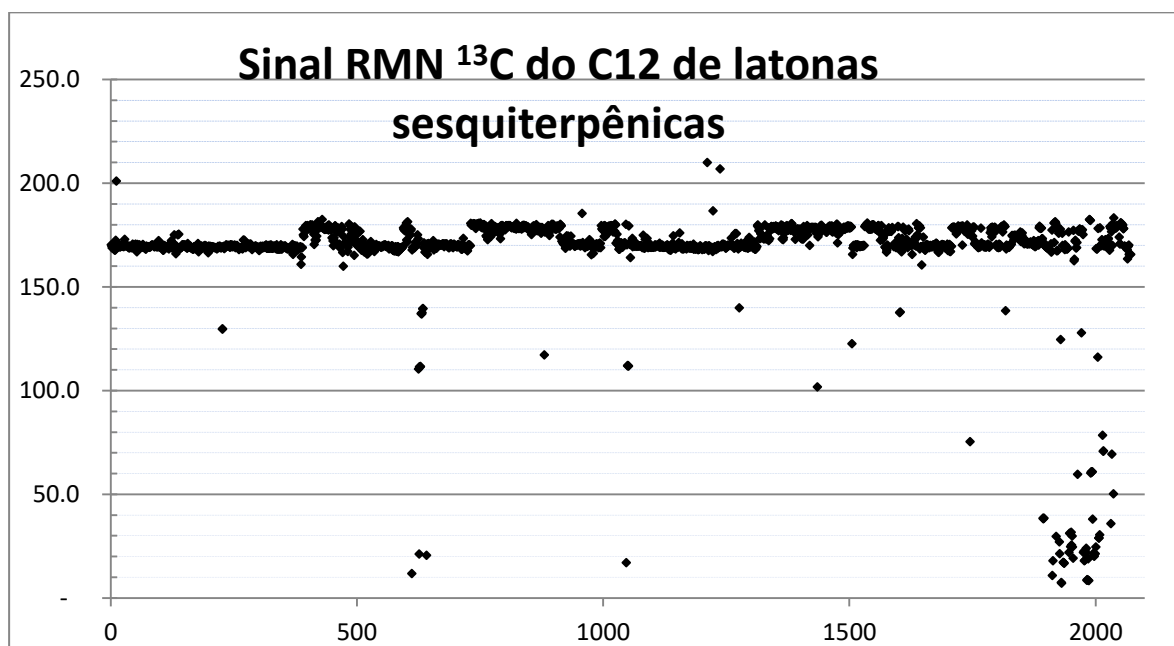


Figura 3.11: Deslocamento químico do C12 de lactonas sesquiterpênicas.

### 3.5.3 Lactonas sesquiterpênicas internas- Extração Herz-Högenauer

Para avaliar a possibilidade da extração por lavagem não ser eficiente para a extração das lactonas sesquiterpênicas nas partes aéreas de *E. laevigatum*, pelo fato de que poderiam estar armazenadas em canais secretores internos, por exemplo, partes aéreas desta espécie foram extraídas por maceração em diclorometano. Como essa extração carrega muita clorofila, foi aplicado o método de HERZ-HÖGENAUER (1961) para obtenção de um extrato enriquecido em lactonas.

O extrato (9,51 g) foi suspenso em água: metanol (80:20) e submetido a tratamento com acetato de chumbo para precipitação de clorofila e gorduras. Esse procedimento foi realizado duas vezes, com volumes diferentes de solução de acetato de chumbo, devido a dificuldade para solubilização da amostra na primeira tentativa, com rendimentos de 0,5 e 7,5 g.

Tabela 3.9: Tratamento do extrato de *E. laevigatum* com acetato de chumbo.

	Massa	tratamento com acetato de chumbo
Tara do balão	359,29 g	
balão+extrato mole	368,80 g	
Extrato	<b>9,51 g</b>	
tara frasco	4,8911 g	1º PP com acetato de chumbo (50mL)
frasco+amostra	5,44 g	
Amostra	0,549 g = <b>5,8%</b>	
tara frasco	8,422 g	1º PP com acetato de chumbo (300 mL)
frasco+amostra	15,87 g	
Amostra	7,448 g = <b>78,3%</b>	

A análise espectroscópica do material obtido revelou sinais semelhantes ao que já haviam sido observados na extração por lavagem com diclorometano .

### 3.5.4 Lactonas sesquiterpênicas internas - Extração/derivatização com dimetilamina-iodeto de metila

O extrato macerado de *E. tremulum* foi submetido à técnica específica para fracionamento de  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas. A técnica resultou em rendimento desprezível, impossível de analisar, indicando claramente que também em *E. tremulum* as lactonas sesquiterpênicas não são acumuladas.

## 3.6 DISCUSSÃO

A família Asteraceae é caracterizada quimicamente pela produção de substâncias de origem terpênica, em especial as lactonas sesquiterpênicas. Estudos genômicos inclusive indicam que os três genes essenciais para este processo (Germacreno A Sintase, Germacreno A Oxidase e Costunolídeo Sintase) são conservados em toda a família, desde os táxons basais (*Barnadesia*), até os evolutivamente mais recentes, como Eupatorieae (com desvios apenas em Heliantheae e alguns táxons muito próximos). Contudo, estes estudos indicam apenas a presença dos genes, não a funcionalidade das proteínas ou das rotas metabólicas.

Revisões químicas da tribo *Eupatorieae* ou de suas subtribos, usualmente são focadas em diterpenos e lactonas sesquiterpênicas porque essas duas classes de substâncias são de fato, as mais características na tribo. Entretanto, não são ubíquas. Na subtribo Eupatoriinae, enquanto algumas espécies eventualmente não acumulam nenhum terpeno (*E. leucolepis*), outras não acumulam nenhuma lactona sesquiterpênica, como as espécies de *Eupatorium* transferidas por KING e ROBINSON (1987) para o gênero *Stomathantes*, ou as espécies de *Eupatorium* *senso strictu*, que formam o grupo Uncasia, de ocorrência mais restrita à América do Norte. Ambos os grupos não acumulam lactonas sesquiterpênicas (HERZ, et al 2001). As espécies *E. inulifolium* e *E. picturatum* incluídas neste trabalho pertencem a esse mesmo grupo, pois na classificação alternativa de KING e ROBINSON (1987) foram transferidas para o gênero *Austroeupatorium*, que pertence à tribo Eupatoriinae. Relatos para o gênero *Austroeupatorium* não registraram a ocorrência de lactonas sesquiterpênicas, mas de labdanos e norlabdanos (BOHLMANN et al., 1977; BOHLMANN et al., 1984; OBERTI et al., 1984; TRIANA et al., 1993).

Dentre as espécies que constituem a tribo Critoniinae, 40 foram analisadas e apenas 14 produzem lactonas sesquiterpênicas (HERZ, 2004); Já na tribo Oxylobinae, das 47 espécies de *Ageratina* analisadas, apenas 10 produzem lactonas. Isso, de certa forma, é contrabalançado pela produção de terpenoides mais raros (derivados do timol), cromenos e diterpenos (*Ageratina adenophora* = *Eupatorium adenophorum*). Em *Kaunia*, 3 das 5 espécies produzem guaianolídeos e em *Oxylobus* são encontrados eudesmanolídeos e em 3 das 4 *Piptothrix* são encontrados heliangolídeos.

Na tribo Disynaphinae, *Acanthostyles* produz apenas diterpenos labdanos, da mesma forma que *Symphypappus itatiayensis* e *S. reticulatus*. *S. compressus*, por outro lado, produz diterpenos labdanos e lactonas guaianolídeos. (VICHNEWSKI, et al., 1979; BOHLMANN et al., 1982; BOHLMANN et al., 1984, CAULA et al., 1991, MUSCHIETTI et al., 1994, CARRERAS et al., 1998; GUTIÉRREZ et al., 2001). *E. casarettoi* (syn= *S. casarettoi*) incluído neste trabalho, pertence a este mesmo grupo, portanto, a não ocorrência de lactonas sesquiterpênicas não é algo incomum no grupo.

Ainda nesta tribo, são classificados *E. polystachium*, *E. tremulum* e *E. gaudichaudianum*, (syn= *Raulinoretzia crenulata*, *R. tremula* e *Grazielia gaudichaudiana*). Um espécime de *G. gaudichaudiana* foi coletado em Minas Gerais e quimicamente analisado. Também não foram localizadas lactonas sesquiterpênicas nessa análise, mas diterpenos *ent*-caurano. Outras espécies do gênero, pelo contrário, produzem um tipo especial de lactona sesquiterpênica, com um anel  $\beta$ -lactônico juntamente com o anel  $\gamma$ -lactônico mais usual (TALEB et al, 1999). Para as outras espécies não foram localizados relatos de análise química.

O isolamento e identificação de lactonas sesquiterpênicas de espécies do gênero *Eupatorium* era um dos objetivos inicialmente propostos para este trabalho. A utilização de uma técnica simples, com lavagem de pequenas quantidades de material vegetal com diclorometano e análise do extrato obtido em IV, permitiu descartar a grande maioria dos espécimes coletados como fonte promissora dessas substâncias, por não apresentarem a banda característica de  $\gamma$ -lactonas sesquiterpênicas em torno de 1750-1760  $\text{cm}^{-1}$ . Outro método de extração (Herz-Högenauer) também foi utilizado para *E. laevigatum* com resultados similares. Dentre as espécies analisadas *E. inulifolium* apresentou o espectro de IV mais promissor, apesar da banda proeminente estar um pouco abaixo do predito para lactonas sesquiterpênicas (1737  $\text{cm}^{-1}$ ). O extrato dessa planta foi fracionado utilizando-se cromatografia em coluna *flash* isolando-se uma substância de origem terpênoídica cuja estrutura está em processo de elucidação.

#### **4. CAPÍTULO III - CONSTRUÇÃO DE UM BANCO DE DADOS DE <sup>13</sup>C**



## 5.1 INTRODUÇÃO

As lactonas sesquiterpênicas são um dos maiores grupos de metabólitos dentro da classe dos terpenoides. Apresentam grande diversidade estrutural e de funcionalização, além de distribuição generalizada em Asteraceae, e em algumas outras famílias. Estruturalmente, quatro fatores contribuem para a diversificação: a estereoquímica e regioquímica do anel lactônico; a saturação da metila em C13; os diferentes modos de ciclização/abertura do precursor costunolídeo originando os 4 esqueletos primários de lactonas sesquiterpênicas (garmacranolídeo, eudesmanolídeo, guaianolídeo e elemanolídeo) e o padrão de oxidação/substituição dos esqueletos sesquiterpênicos. Destes quatro grupos principais, os garmacranolídeos são os que possuem maior número de estruturas já isoladas.

O método mais comum de identificação estrutural é a ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ , por não apresentar desdobramento dos sinais (ao contrário da RMN  $^1\text{H}$ ) e por cada sinal ser muito característicos do ambiente atômico. De modo geral, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  é de mais fácil interpretação do que o de  $^1\text{H}$  RMN. Entretanto, além do treino e conhecimento teórico, para a identificação de uma determinada estrutura é muito importante a disponibilidade de um bom banco de dados, abrangente, detalhado e cuja consulta seja prática.

Dessa forma, o objetivo deste capítulo foi a construção de um banco de dados RMN  $^{13}\text{C}$  de lactonas sesquiterpênicas que seja prático, detalhado e abrangente, para utilização tanto no auxílio à elucidação estrutural de substâncias que venham a ser isoladas pelo grupo, quanto no treino de habilidades relacionadas à interpretação de espectros de RMN e, ainda, que possa ser distribuído à comunidade acadêmica.

## 5.2 OBJETIVO GERAL

Construção de um banco de dados digital de RMN  $^{13}\text{C}$  de lactonas sesquiterpênicas.

### 5.2.1 Objetivos específicos

- Avaliação da literatura especializada e seleção de compilações abrangentes e detalhadas sobre RMN  $^{13}\text{C}$  de lactonas sesquiterpênicas.
- *Seleção de uma plataforma que facilite tanto quanto possível o intercâmbio do material desenvolvido e sua utilização.*



### 5.3 REVISÃO DA LITERATURA

A importância da existência de ferramentas de auxílio à identificação estrutural de lactonas sesquiterpênicas reside no fato de estas substâncias possuírem potencial quimiotaxonômico, especialmente em Asteraceae, e às muitas atividades biológicas já descritas para lactonas sesquiterpênicas, bem como à existência de mais de 4000 estruturas já isoladas e identificadas para essa classe de compostos.

As lactonas sesquiterpênicas são formalmente derivadas dos sesquiterpenos, entretanto, observa-se menor diversidade estrutural nas lactonas do que nos seus precursores. A grande maioria das lactonas já isoladas apresenta um destes seis núcleos principais: germacrano, eudesmano, guaiano, pseudoguaiano, elemano e eremofilano. Geralmente possuem uma função  $\alpha$ -exometileno- $\gamma$ -lactona (ou algum derivado equivalente formado pela modificação das duplas ligações, conforme Figura 4.1) formada pela oxidação do carbono 12 e lactonização com uma hidroxila no carbono 6 ou no carbono 8, formando os 12,6-olídeos e os 12,8-olídeos.

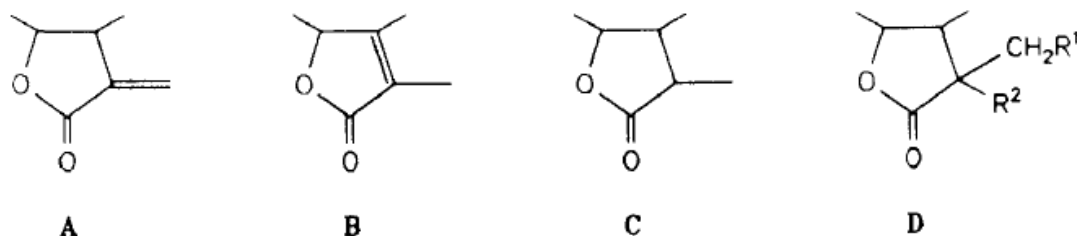


Figura 4.1: Tipos de estruturas  $\gamma$ -lactônicas.

Entretanto, estruturas em que ocorre oxidação dos carbonos 14 ou 15, e lactonização em C2 ou C6 também são encontradas, mesmo que muito mais raramente (BUDĚŠÍNSKÝ e ŠAMAN, 1995), e estas, obviamente, não possuem o grupo  $\alpha$ -exometileno.

Apesar de haver poucos núcleos comuns a todas as estruturas de lactonas sesquiterpênicas, uma grande complicação para sua elucidação estrutural advém

do fato de muitas delas apresentarem uma grande diversidade de substituintes acila, em diversas posições (Figura 4.2), o que pode explicar o número de substâncias publicadas cuja estrutura é posteriormente revisada.

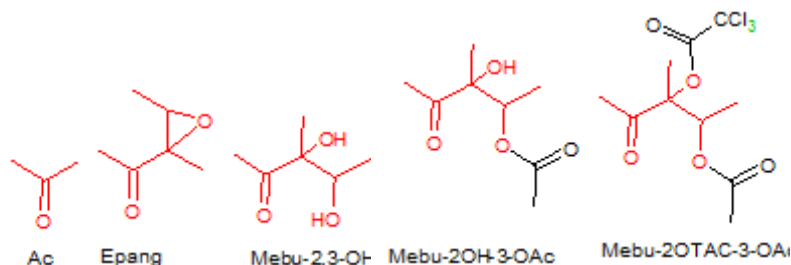


Figura 4.2: Estruturas comuns de substituintes derivados acila em lactonas sesquiterpênicas. Ac (acetato), Epang (epoxiangelato), Mebu-2,3-OH (metil-butil-2,3-OH), Mebu-2-OH-3-OAc (metil-butil-2OH-3-acetato), Mebu-2OTAC-3-OAc (metil-butil-2-tricloroacetato-3-acetato)

A existência de bancos de dados abrangentes e de fácil utilização é um fator importante para a viabilização da realização de tarefas comuns em um laboratório de fitoquímica, como por exemplo, a identificação estrutural de substâncias químicas isoladas de extratos ou óleos voláteis de espécies vegetais de interesse farmacêutico.

No que se refere especificamente aos óleos voláteis, os trabalhos de R. P. Adams (*Identification of Essential Oils by Ion Trap Mass Spectrometry*) em suas várias edições, contendo espectros de massas de mais de duas mil substâncias de origem alifática, terpenoídica ou fenilpronoídica, se constitui em umas das bases da pesquisa nesse campo. Como grandes vantagens dessa compilação podem ser citadas, além do fato de reunir dados sobre muitas moléculas em uma única fonte, a sua facilidade de utilização, tanto por apresentar esses dados em uma ordem intuitiva para o pesquisador habituado a esse campo (elencados por seu índice de retenção), como também por apresentá-los graficamente, de forma semelhante à que são apresentados quando registrados no equipamento durante uma análise cromatográfica/espectroscópica, acompanhados da estrutura molecular, e não na forma tabular em que muitas vezes é encontrado nas revistas especializadas (ADAMS, 2001; ADAMS, 2007).

Segundo alguns autores, como Meyer e colaboradores (1999), a apresentação de um conjunto de dados em forma gráfica facilita a percepção de padrões, além de esta ser a forma preferível para a apresentação de conjuntos

grandes de dados. Recurso semelhante a este pode, muitas vezes, ser adquirido juntamente com o equipamento utilizado nas análises (cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas), em forma eletrônica, na qual apresenta ainda a comodidade extra de um software de busca de similaridade espectral. Juntas, estas ferramentas promoveram enormes avanços na área da pesquisa de óleos voláteis, facilitando, por assim dizer, a caracterização de inúmeras espécies, e permitindo que maiores esforços fossem direcionados para o isolamento e identificação estrutural de compostos desconhecidos destas bases de dados ou já previamente identificados e que se tencionasse obter em maior grau de pureza.

Outras áreas da fitoquímica não apresentam esta comodidade. Apesar de existirem bancos de dados de espectros de massa, infravermelho, e de  $^1\text{H}$  RMN e de  $^{13}\text{C}$  RMN, a muitos deles falta a abrangência e acessibilidade que os espectros de massa de óleos voláteis oferecem ao pesquisador.

Durante a revisão bibliográfica deste capítulo localizamos algumas compilações de dados de RMN de lactonas sesquiterpênicas (MOSS et al 1974; MARCO e CARDA, 1987; DÍAZ et al 1985), entretanto, a maioria delas era dedicada a apenas determinado núcleo estrutural, ou apresentava os deslocamentos sem atenção à atribuição (carbono exato a que determinado sinal está vinculado) ou ainda não era muito metódico quanto aos grupos estruturais da lactonas.

Como um exemplo prático desta diferença citaremos o trabalho de BUDĚŠÍNSKÝ e ŠAMAN (1995), uma excelente compilação, abrangente e detalhada, de espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de mais de duas mil moléculas de lactonas sesquiterpênicas divididas nas diversas classes estruturais (germacranolídeos, eudesmanolídeos, guaianolídeos, pseudoguaianolídeos, elemanolídeos). Dentro de cada classe, as estruturas estão agrupadas pela regioquímica do anel lactônico (6,12 ou 8,12) e ainda, dentro desse grupo, divididas entre  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactonas e  $\alpha$ -metila- $\gamma$ -lactonas. Mais ainda, cada sinal de RMN  $^{13}\text{C}$  tabelado está atribuído ao respectivo carbono no núcleo sesquiterpênico ou nos radicais acila que normalmente esterificam essa classe de compostos.

A disponibilidade de um banco de dados com este grau de informação poderia exercer, na pesquisa de lactonas, influência semelhante à que exercem no campo de óleos voláteis os já citados trabalhos de R. P. Adams (2007). Entretanto,

apesar da abrangência e riqueza de detalhes referentes à estrutura química e à atribuição inequívoca de deslocamentos químicos para os carbonos do núcleo de cada estrutura bem como de eventuais radicais a ela ligados, essa compilação apresenta todos os seus dados de forma tabulada, o que torna a busca extremamente improdutivo.

Além disso, a alta qualidade técnica deste trabalho não é acompanhada pela qualidade gráfica do mesmo, como pode ser visualizado na Figura 4.3.

No.	Mol. formula		Name / Chemical shifts	Chemical shifts												Sol.	Ref.			
	C-1	C-2		C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14			C-15		
80	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>		Provincialin, 4'-desoxy-3-desacetoxy-3 $\alpha$ -hydroxy	124.0	33.9	68.5	140.4	124.3	77.2	49.0	74.1	43.4	133.9	137.6	169.3	125.7	18.5	17.1	C	204
81	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>		(3R,6R,7R,8R)-Heliangolide-1(10),4,11(13)-trien-12,6-olide, 3-hydroxy-8-(5'-hydroxytigloyloxy)	123.4 <sup>a</sup>	33.4	67.3	140.5	125.5 <sup>b</sup>	79.3 <sup>c</sup>	48.6	74.3 <sup>d</sup>	43.0	133.8	137.2	169.6	124.6	18.2	17.0	C	236
82	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>		Eucannabinolide, 3-epi, desacyl	122.9	30.6	70.9	139.3	125.7	73.8	50.2	78.2	46.9	138.1	135.4	170.0	123.4	19.1	18.0	C	126
83	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>		Eucannabinolide, 3-epi = Eupaformosanin	124.3	30.6	70.7	137.2	125.0	74.4	48.8	79.7	43.3	136.1	135.9	170.2	125.2	18.6	18.0	C	126
				124.1	30.4	70.6 <sup>a</sup>	135.9	125.0	79.5	48.5	74.4 <sup>b</sup>	43.1	135.8	137.0	169.7	125.0	18.5	17.9	C	617
84	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub>		Eupaformosanin, 5'-(4"-acetoxytigloyloxy)	125.5	30.6	80.0	137.4	124.5	74.3	48.7	70.8	43.2	a	135.9	170.2	124.8	18.6	18.0	C	444
85	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>		Eupaformosanin, 4'-(4"-acetoxytigloyloxy)	124.2	29.8	74.1	137.2	125.2	80.1	48.9	70.3	43.2	135.3	134.0	170.2	124.2	18.0 <sup>b</sup>	18.4 <sup>c</sup>	C	198
86	C <sub>27</sub> H <sub>32</sub> O <sub>10</sub>		Provincialin, 3-epi, 4"-oxo-5"-desoxy	124.3 <sup>a</sup>	29.6	74.1	137.2	125.2	80.1	48.9	70.4	43.2	135.3	133.8	170.1	124.2 <sup>b</sup>	17.9 <sup>c</sup>	18.4 <sup>d</sup>	C	198
87	C <sub>17</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>		Eucannabinolide, desacyl	126.9	29.3	75.5 <sup>a</sup>	139.3	128.2	76.7 <sup>b</sup>	50.0	76.7	47.0	137.1	135.4	170.0	123.3	19.8	23.0	C	126
88	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>8</sub>		Provincialin, 4'-desoxy-3-desacetoxy-3 $\beta$ -hydroxy	123.8	31.8	78.6	140.1	126.4	75.7	48.4	75.3	43.3	134.7	137.9	169.5	125.1	19.5	22.9	C	204
89	C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>		Hiodorilactone C, acetate	125.0	29.4	78.0	137.4	126.6	75.3	48.4	75.3	43.4	136.0	135.2	169.5	124.0	19.4	23.0	C	199
90	C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>		Santhemoidin A	125.3	29.6	77.0	137.8	126.7	78.7	48.7	75.7	43.5	136.5	135.5	169.6	124.3	19.4	23.1	C	510
91	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>		Chromolaenide	125.3 <sup>a</sup>	29.5	76.9 <sup>b</sup>	137.7	126.5 <sup>c</sup>	78.7 <sup>d</sup>	48.5	76.9 <sup>e</sup>	43.4	136.6	135.6	170.1	124.7	19.4	23.0	C	16
92	C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>		Chromolaenide, 4'-dehydro	125.5 <sup>a</sup>	29.6	76.8 <sup>b</sup>	137.3	126.4 <sup>c</sup>	78.8 <sup>d</sup>	48.4	75.6	43.3	134.9	134.3	169.7	124.9	19.6	23.1	C	16
93	C <sub>22</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>		Eucannabinolide	125.1 <sup>a</sup>	29.4	76.8 <sup>b</sup>	137.3	126.0 <sup>c</sup>	76.0 <sup>d</sup>	48.3	79.1 <sup>e</sup>	43.2	136.6 <sup>f</sup>	135.4 <sup>g</sup>	170.2	125.1	19.4	23.0	C	279
94	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> O <sub>8</sub>		Santhemoidin B	125.6	29.6	76.9	137.3	126.6	79.0	48.5	75.5	43.4	169.7	135.1	169.3	124.5	19.5	23.1	C	510
95	C <sub>25</sub> H <sub>34</sub> O <sub>8</sub>		Eucannabinolide, 3-desacetyl, 3-isovaleryl	125.2 <sup>a</sup>	29.6	77.7 <sup>b</sup>	137.4	126.2 <sup>c</sup>	79.2 <sup>d</sup>	48.5	76.0 <sup>e</sup>	43.2	136.6 <sup>f</sup>	135.4 <sup>g</sup>	170.2	125.0	19.5	23.1	C	279
96	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub>		Douglasine	150.8	25.7	39.0	135.7	124.7	81.6	54.1	75.4 <sup>a</sup>	73.3 <sup>b</sup>	144.7	127.4	169.4	122.0	168.9	17.4	C	617
97	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>		Germacra-1(10)E,4E,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olide-15- <i>oic acid</i>	126.9	27.0	36.0	141.8	134.2	83.2	47.1	27.4	41.5	135.6	139.4	172.4	124.6	15.7	175.3	M	642
98	C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>7</sub>		Germacra-1(10)E,4Z,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olide, 3 $\beta$ -acetoxy-8 $\beta$ -hydroxy-9 $\beta$ -(2'-methylbutanoyloxy)	124.7	28.7	74.2 <sup>a</sup>	138.5	126.9	76.4 <sup>b</sup>	47.8	80.9 <sup>c</sup>	78.8 <sup>d</sup>	136.2	135.6	169.7	123.6	14.2	23.1	C	276
99	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>		Germacra-1(10)Z,4Z,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olide, 8 $\beta$ -angeloyloxy-3,14-epoxy-15-hydroxy	128.5	29.4	71.1	137.8	125.1	73.8	46.5	78.4	40.7	144.2	136.8	169.3	124.4	63.6	63.1	S	25
100	C <sub>25</sub> H <sub>32</sub> O <sub>9</sub>		Schkuhrippingnatolide C	127.6	29.3	79.8	137.6	130.2	76.0	47.1	74.8	44.7	135.7	134.1	170.3	124.7	46.0	22.9	C	214
101	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>		Urospermal A, 8-desoxy	153.7	27.3	33.2	142.1	127.7	79.6	46.1	22.1 <sup>a</sup>	24.3 <sup>b</sup>	144.9	140.8	170.3	118.1	196.1	60.4	P	42
102	C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>		Iscerin B	153.4	27.1	33.5	138.4	129.7	79.4	46.1	22.1 <sup>a</sup>	24.1 <sup>b</sup>	145.0	140.5	170.1	118.2	196.1	67.8	P	42
103	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>		Iscerin G	153.3	27.3	33.3	138.1	129.7	79.5	46.2	22.2	24.3	145.0	140.6	170.1	118.2	195.9	67.4	P	41
104	C <sub>29</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>		Iscerin C	153.4	27.4	33.9	138.3	130.0	79.6	46.1	22.1 <sup>a</sup>	24.2 <sup>b</sup>	145.0	140.6	170.2	118.2	196.1	68.1	P	42
105	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>		Germacra-1(10)E,4Z,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olide-14,15-dihydroxy	123.6	25.3	34.5	142.3	126.8	79.4	45.9	26.0	24.1	141.4	142.5	170.3	117.6	65.6	60.6	P	40
106	C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> O <sub>5</sub>		Germacra-1(10)E,4Z,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olide-15-hydroxy-14- <i>oic acid methyl ester</i>	141.0	25.3	25.8	140.0	125.5	78.2	43.8	23.8	32.7	132.6	139.2	167.7	123.0	170.1	66.2	C	620

Figura 4.3: Excerto de uma tabela de dados de RMN de <sup>13</sup>C de BUDĚŠÍNSKÝe ŠAMAN (1995), evidenciano a baixa qualidade gráfica do mesmo.

A inspeção de mais de duzentas páginas de tabelas na busca de dados similares aos obtidos nos experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$  de uma molécula seria por si só uma tarefa cansativa, exigindo alguns dias de dedicação do pesquisador. Entretanto, na prática isto é mais complicado do que parece em uma primeira análise. Os dados de RMN são publicados geralmente após a identificação estrutural da molécula a que pertencem, e cada sinal é atribuído a um carbono específico. Este carbono é identificado por um número, de forma pouco intuitiva, de acordo com a rota biogenética pela qual a molécula foi, presumidamente, biossintetizada. A tabulação dos dados na publicação utiliza, por conseguinte, a ordem (crescente/decrescente) destes números pelos quais os carbonos são identificados como critério organizador, não havendo assim qualquer ordem intrínseca nos dados de RMN em si.

Identificar o espectro de uma molécula particular deste contexto exigiria a comparação de mais de dois mil conjuntos de no mínimo 15, chegando até a mais de 30 valores, completamente desordenados. Os dados obtidos de um experimento de RMN  $^{13}\text{C}$ , entretanto, são apresentados em ordem (crescente/decrescente) de deslocamento químico, e a comparação direta com os dados tabelados é impossível, exatamente porque não se sabe a correlação entre os sinais obtidos no experimento e os carbonos na estrutura da molécula (aliás, realizar essa correlação é justamente o objetivo ou o que permitirá a identificação/elucidação da estrutura).

Em face dessa dificuldade, idealizamos realizar a transformação desta base de dados tabular em uma base gráfica, capaz de apresentar ao usuário a mesma riqueza de dados, de forma significativamente mais eficiente, oferecendo a possibilidade de comparação visual dos dados espectrais em forma semelhante à que são obtidos no experimento, diminuindo assim a carga de trabalho exigida no processo de comparação e tornando o mesmo mais eficiente.

## **5.4 METODOLOGIA**

### **5.4.1 Seleção de compilações de dados de RMN <sup>13</sup>C para lactonas sesquiterpênicas**

Após a pesquisa bibliográfica selecionamos dentre as referências localizadas (MOSS et al 1974; MARCO e CARDA, 1987; DÍAZ et al 1985), uma que apresentou uma coleção relevante de dados, referentes a moléculas representativas de todos os núcleos sesquiterpênicos usuais, com separação de 12,8 e 12,6-olídeos e com atribuição de cada sinal ao carbono numerado biogeneticamente (BUDĚŠÍNSKÝ e ŠAMAN, 1995).

### **5.4.2 Seleção da plataforma para construção, armazenamento e disponibilização do banco de dados**

Para hospedar a base de dados do arquivo original *.pdf* foi escolhido inicialmente, por sua facilidade de utilização, sem necessidade de treinamento específico em linguagens de programação, o editor de planilhas Excel® 2007 da Microsoft, ideal para o trabalho com dados tabulares.

A linguagem de programação VBA (Visual Basic for Applications), está integrada em todos os produtos Microsoft Office® e foi utilizada para a criação dos macros responsáveis pela apresentação dos dados ao usuário na forma gráfica. O Excel® permite ainda a utilização de controles ActiveX que facilitam a importação das estruturas moleculares das lactonas e sua apresentação ao usuário utilizando as mesmas macros.

Para esse fim, todas as 2071 estruturas foram redesenhadas respeitando a estereoquímica apresentada no arquivo original e acrescentando os radicais acila, que estavam descritos separadamente no original. Para tanto, utilizou-se o programa ACD/Chemsketch® ver. 11.01 e as figuras foram exportadas em formato *.bmp*.

### **5.4.3 Seleção da plataforma para construção, armazenamento e disponibilização do banco de dados**

Um conjunto de macros foi desenvolvido para:

Agrupar as estruturas em função de seu núcleo estrutural e apresentar ao usuário uma lista com a opção de escolha do grupo que deseja visualizar;

Carregar a lista das substâncias contendo aquele núcleo específico e apresentar em uma lista de opções para escolha da substância que deseja visualizar;

Carregar os dados de RMN referentes à molécula escolhida e apresentá-los em uma tabela e em um gráfico;

Carregar, de um arquivo de figuras à parte, aquela correspondente à estrutura química do composto selecionado e apresentá-lo junto ao gráfico contendo os dados de RMN.

Alternativamente, foram criadas macros para:

Carregar a figura com a estrutura química e a tabela e o gráfico com os dados de RMN para cada substância, sempre que o código numérico específico da mesma seja digitado em um campo criado com este fim;

Autocompletar (ou apresentar a opção para completar) sempre que as letras iniciais do nome de uma lactona sesquiterpênica sejam escritas em campo específico para isso.

## 5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Lactonas sesquiterpênicas são compostos terpenoides com um núcleo sesquiterpenoide (15 átomos de carbono). Em espectroscopia de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (RMN  $^{13}\text{C}$ ), cada um destes carbonos origina um sinal (raramente sobreposto) em uma região que depende da vizinhança eletrônica do átomo em questão. Estes sinais são apresentados numa escala de ppm (parte por milhão). Sinais de carbono, normalmente são encontrados entre -10 até 220 ppm (Figura 4.4). De forma bastante generalizada pode-se dizer que:

- carbonos metílicos [-CH<sub>3</sub>] originam sinais na região de 5-20 ppm.
- carbonos metilênicos [-CH<sub>2</sub>] originam sinais na região de campo mais baixo (>ppm) de 20-30 ppm.
- carbonos metínicos [-CH] originam sinais na região de 30-50 ppm;
- carbonos ligados a átomos eletronegativos [C-O, C-Cl] apresentam sinais na região de 50-90 ppm (ou mais, caso sejam metilênicos ou alcenos);
- carbonos em alcenos originam sinais na região de 120-160 ppm;
- carbonos em carbonilas [C=O] originam sinais em ~180 ppm para lactonas, ~200 ppm para cetonas;

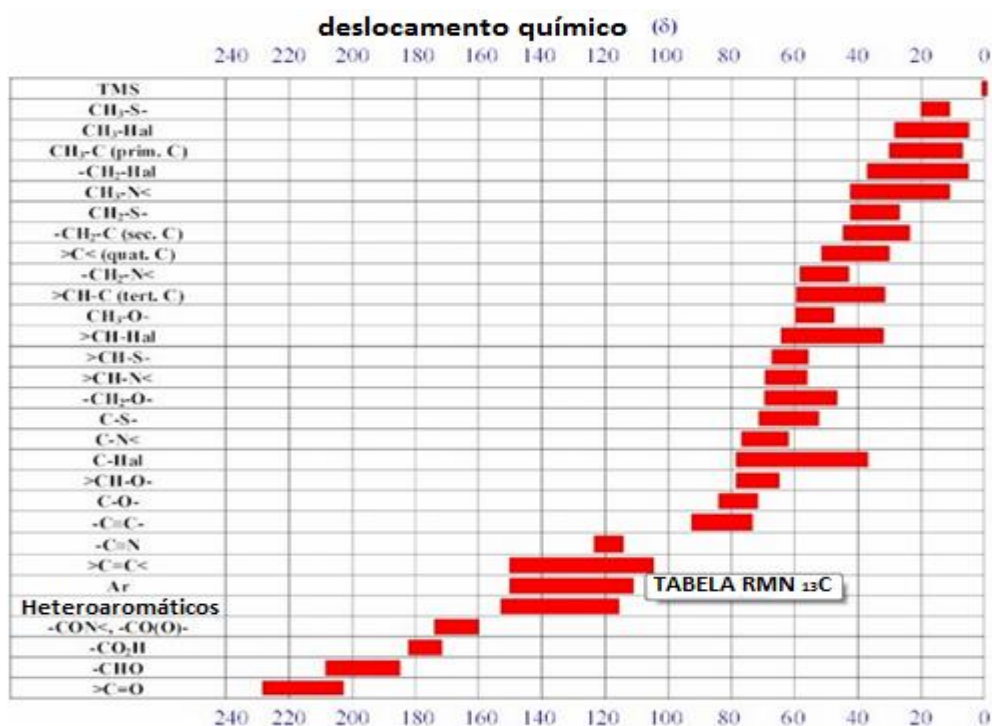


Figura 4.4: Faixas de deslocamentos químicos para carbonos em diferentes ambientes eletrônicos. (<http://winter.group.shef.ac.uk/crystal/projects-ug/sillitoe/html/cshift.htm>).



Assim, um espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de uma lactona sesquiterpênica apresenta, normalmente, 15 sinais distribuídos ao longo desse espectro e o valor destes sinais varia em função no número de ligações duplas ou substituintes hidroxila e cetona [C-OH, C=O], por exemplo, bem como suas posições relativas. Ao comparar dados práticos com os dados tabelados, por exemplo, na compilação de BUDĚŠÍNSKÝe ŠAMAN (1995), certamente teríamos dificuldade em perceber que especificamente, um destes conjuntos de dados (dentre mais de dois mil apresentados) é equivalente ao que obtivemos nos nossos experimentos. Além disso, tabelas espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  costumam apresentar separadamente os dados do núcleo e de eventuais radicais substituintes, complicando ainda mais o trabalho de comparação.

Tomemos como exemplo um conjunto aleatório de deslocamentos que tivessem sido obtidos em um experimento de RMN  $^{13}\text{C}$ . Eles estão ordenados por ordem crescente de deslocamento, a partir dos obtidos no experimento:

17.4 18.1 24.7 35.7 52 52.2 61.5 66.4 71.3 78.3 128 128.5 130 134 169.8

A comparação com dados tabelados (Figura 4.5) tem o inconveniente de que os dados são distribuídos por ordem crescente da numeração biogenética do carbono (além da baixa qualidade gráfica).

No.	Mol. formula		Name / Chemical shifts													Sol.	Ref.
	C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9	C-10	C-11	C-12	C-13	C-14	C-15		
<b>160</b>	<i>C15H20O3</i>		<b>Parthenolide</b>														
a	125.3	24.2 <sup>b</sup>	36.5 <sup>b</sup>	61.5	66.4	82.5	47.7	30.2 <sup>b</sup>	41.2 <sup>b</sup>	134.7	139.5	169.3	121.0	17.3	17.0	C	190
b	125.3	24.2	36.2	61.5	66.4	82.5	47.7	41.7	30.2	134.7	139.5	169.3	121.0	17.3	17.0	C	539
<b>161</b>	<i>C15H20O4</i>		<b>Stizolin</b>														
	128.0	24.7	35.7	61.5	66.4	78.3	52.2	71.3	52.0	130.0	134.0	169.8	128.5	18.1	17.4	C	121
<b>162</b>	<i>C17H22O5</i>		<b>Lanuginolide, 11,13-dehydro</b>														
a	127.4	24.3	35.9	61.0	66.5	72.5	49.6	80.1	47.3	129.6	133.9	169.0	125.2	18.3	17.3	A	181
b	127.5	24.3	36.0	60.9	66.7	80.0	49.8	72.4	47.6	129.7	133.9	170.1 <sup>b</sup>	125.3	18.2	17.3	C	121
<b>163</b>	<i>C17H22O5</i>		<b>Lipiferolide</b>														
a	129.1	44.0	36.4	61.8	66.8	76.4	49.4	74.5	24.5	132.0	137.9	169.1	121.9	19.7	17.2	P	179
b	129.1	24.5	36.4	61.8	66.8	76.4	49.4	74.5	44.0	132.0	137.9	169.1	121.9	19.7	17.2	P	680
c	128.9	43.8	35.8	61.8	66.5	75.4	49.3	73.5	24.2	131.4	136.1	168.5	122.5	19.6	17.1	C	126
<b>164</b>	<i>C20H26O5</i>		<b>Germacra-1(10),11(13)-dien-12,6<math>\alpha</math>-olide, 4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxy-8<math>\beta</math>-tigloyloxy</b>														
	128.8	24.3	35.9	61.9	66.6	75.7	49.7	74.0	44.0	131.7	136.3	168.6	122.6	19.6	17.2	C	277
<b>165</b>	<i>C20H26O6</i>		<b>Eupassopilin</b>														
a	128.5	23.9	35.6	61.8	66.2	75.6	49.1	74.0	43.5	131.2	136.0	168.5	122.3	19.4	16.9	C	313
b	128.5	23.9	35.6	61.8	66.2	75.6	49.1	74.0	43.5	131.2	136.0	168.5	122.3	19.4	16.9	C	277
<b>166</b>	<i>C25H32O8</i>		<b>Eulantanaefolide</b>														
	129.1	24.2	35.8	62.0	66.6	75.7	49.5	74.3	43.8	131.3	136.0	168.4	122.5	19.6	17.1	C	126
<b>167</b>	<i>C28H32O10Cl3N</i>		<b>Eulanthaefolide + TAI</b>														
	129.2	24.2	35.8	61.9	66.5	75.4	49.4	74.8	43.7	131.1	136.0	168.2	122.5	19.7	17.0	C	126
<b>168</b>	<i>C25H32O8</i>		<b>Parthenolide, 8<math>\beta</math>-(3'-angeloyloxy-4'-hydroxyethylacryloyloxy)</b>														
a	129.3	24.3	35.9	61.8	66.6	75.3	49.6	74.4	44.0	131.2	136.0	168.4	122.7	20.5	17.2	C	192
b	129.3	24.3	35.9	61.8	66.6	75.3	49.6	74.4	44.0	131.2	136.0	168.4	122.7	20.5	17.2	C	192
<b>169</b>	<i>C15H20O4</i>		<b>Germacra-1(10),11(13)-dien-12,6<math>\alpha</math>-olide, 4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxy-9<math>\alpha</math>-hydroxy</b>														
	121.9	23.5	36.3	61.3	66.6	82.4	37.6	37.6	71.4	137.5	139.8	169.4	121.1	16.4	17.3	C	121
<b>170</b>	<i>C17H22O5</i>		<b>Germacra-1(10),11(13)-dien-12,6<math>\alpha</math>-olide, 9<math>\alpha</math>-acetoxy-4<math>\alpha</math>,5<math>\beta</math>-epoxy</b>														
	122.7	23.5	35.6	61.2	66.5	82.2	38.7	36.2	73.2	133.5	139.3	169.5 <sup>b</sup>	121.3	16.4	17.3	C	121

Other carbons: **143** Ac: 169.5 20.2; **144** Tig: 166.7 127.9 139.0 14.6 12.0 Ac: 169.8 21.0; **146** OMe: 62.4; **151** Tig-4,5-OH: 166.2 132.1 146.2 58.8 56.5; **152** Tig-4,5-OH: 166.0 131.9 146.4 58.8 56.4; **153a** Ac: 170.8 21.0; **153b** Ac: 170.2 21.0; **154** Tig-4,5-OiProp: 163.8 132.3 142.2 60.7 59.6 102.3 23.6 23.6; **156** Tig: 167.9 138.2 139.7 15.4<sup>c</sup> 12.6<sup>c</sup>; **157** Ang: 166.8 127.2 139.5 15.9 20.5; **159** Ang-5-OH: 166.1 131.3 142.6 14.3 56.4; **162a** Ac: 170.2 21.0; **162b** Ac: 168.9<sup>b</sup> 21.0; **163a** Ac: a; **163b** Ac: 169.9 20.6; **163c** Ac: 169.5 20.9; **164** Tig: 166.4 127.9 138.7 14.5 12.2; **165a** Tig-4-OH: 165.9 126.7 142.6 59.1 12.4; **165b** Tig-4-OH: 165.9 126.7 142.6 59.1 12.4; **166** Tig-4-OH-5-OAng: 164.7 126.7 147.9 59.4 57.5 167.7 126.9 139.5 15.8 20.4; **167** Tig-4-OTAC-5-OAng: 163.9 129.7 140.6 62.9 57.2 167.0 126.6 139.9 15.8 20.4; **168a** Ac-2-CH(OAng)CH<sub>2</sub>OH: 164.4 138.6 69.8 67.0 127.5 168.2 127.1 139.5 15.9 19.7; **168b** Ac-2-CH(OAng)CH<sub>2</sub>OH: 164.2 138.6 69.8 67.0 127.5 168.2 127.1 139.6 15.9 19.7; **170** Ac: 168.8<sup>b</sup> 21.1

Figura 4.5: Excerto de dados de <sup>13</sup>C RMN de 11 lactonas sesquiterpênicas (Adaptado de BUDĚŠINSKÝ e ŠAMAN, 1995).

Se entretanto, tivermos a possibilidade de representar estes dados em forma gráfica, e compará-los com os dados bibliográficos, também em forma gráfica, onde além disso, os dados bibliográficos estejam representados com os sinais relativos aos seus substituintes já inseridos no mesmo conjunto gráfico (Figura 4.7), a identificação da molécula em estudo se torna apenas uma tarefa de comparação visual.

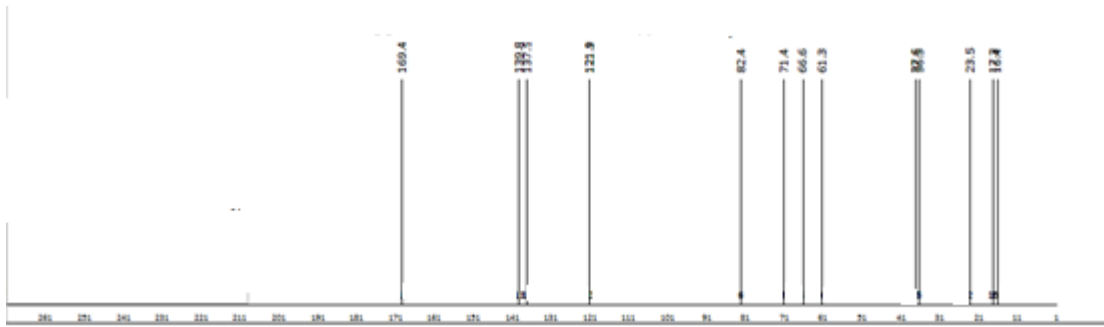


Figura 4.6 Representação gráfica dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  para exemplo no texto.

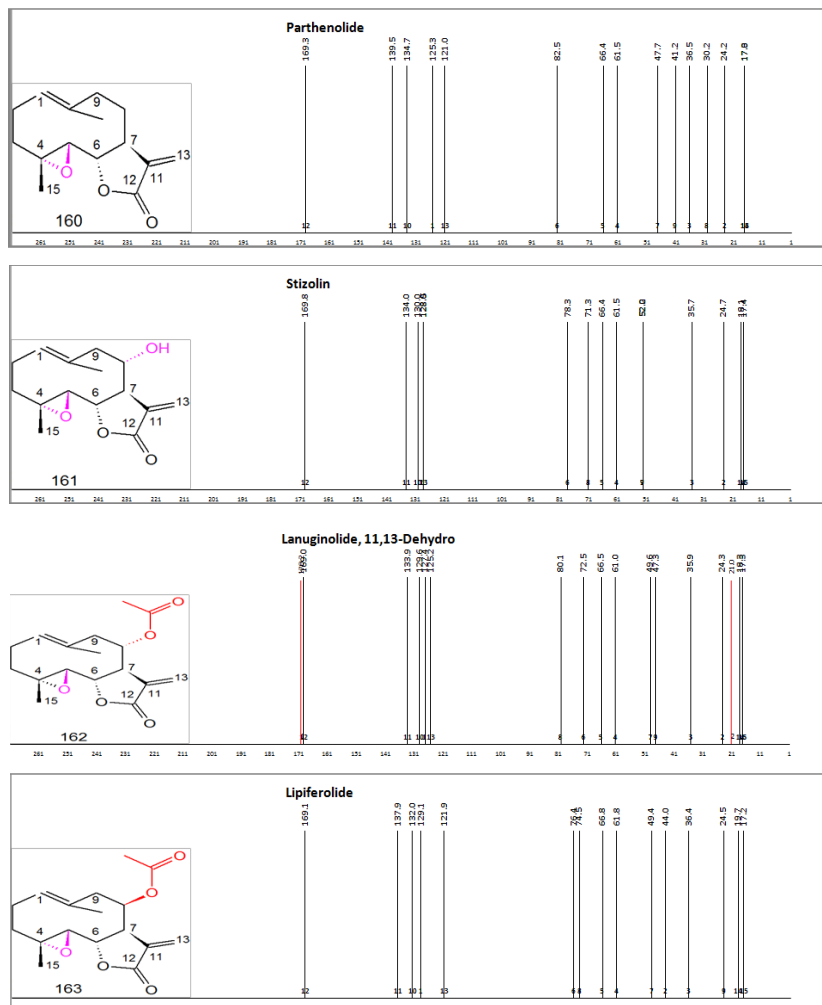


Figura 4.7: Representação gráfica dos sinais de RMN das moléculas na Figura 4.5.

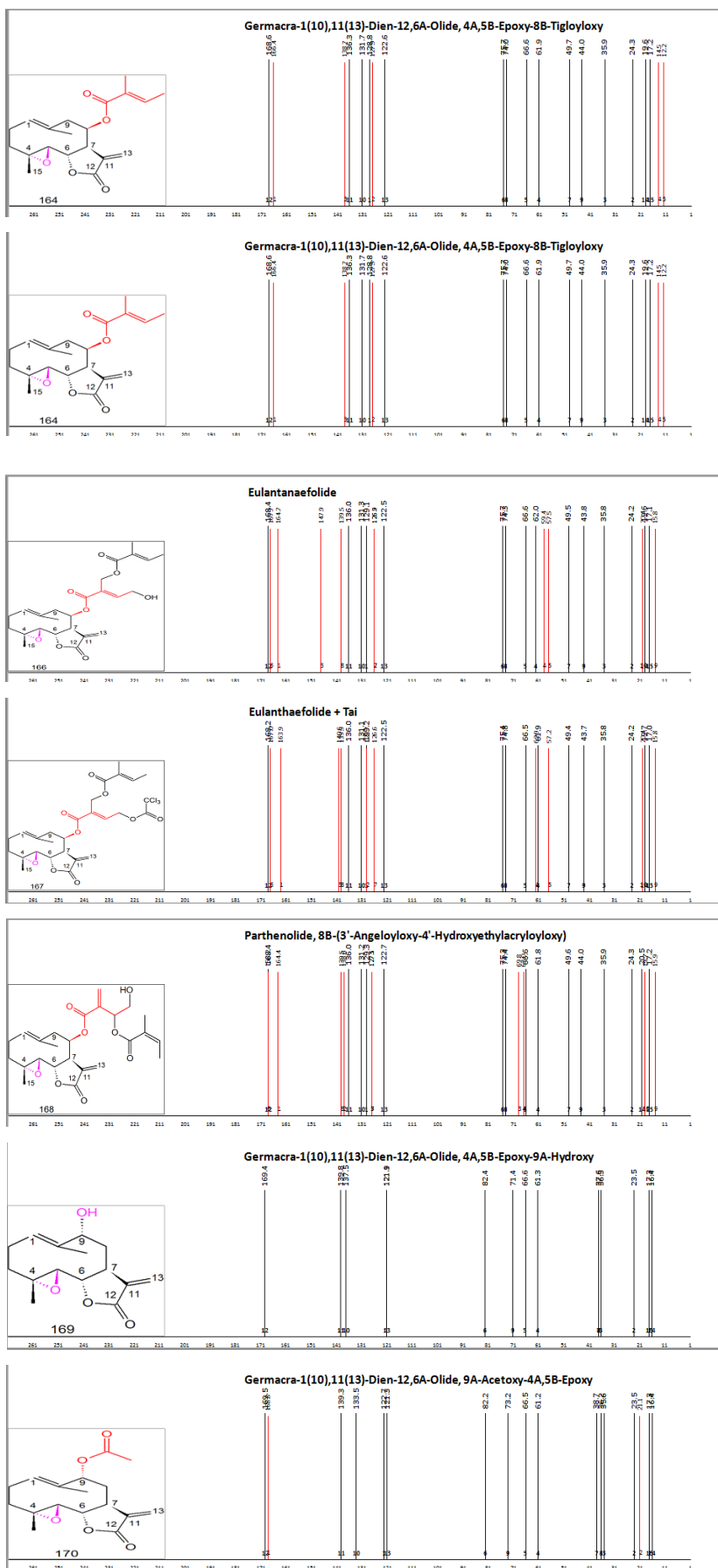


Figura 4.7: Continuação: Representação gráfica dos sinais de RMN das moléculas na Figura 4.3.

Podemos assim facilmente associar os dados da Figura 4.5 com o 4 $\alpha$ ,5 $\beta$ -epoxi-9 $\alpha$ -hidroxi-germacra-1(10),11(13)-dien-12,6 $\alpha$ -olídeo. Ainda, podemos perceber as diferenças sutis que uma hidroxila em posição 8 $\alpha$  teria sobre o espectro (Figura 4.8), bem como a posição dos sinais de substituintes comum em lactonas, o que ajudaria na eventual identificação do outros substituintes em um caso real.

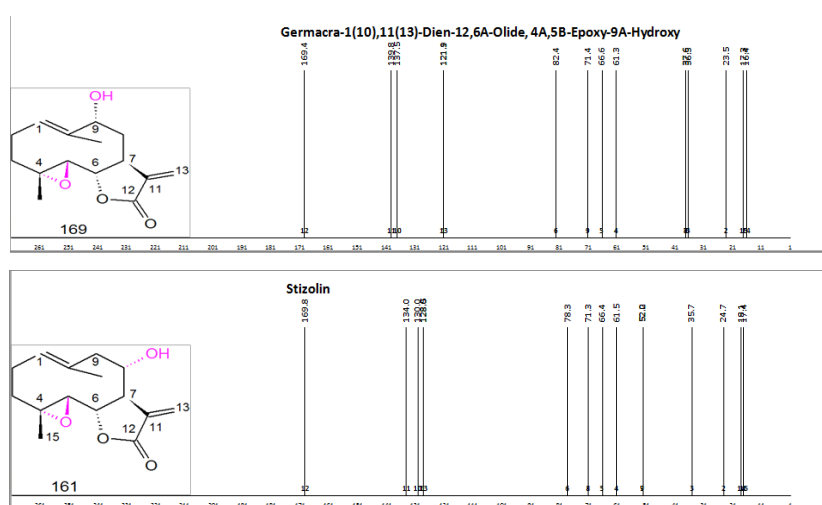


Figura 4.8: Espectros de RMN <sup>13</sup>C da Stizolina e do 4 $\alpha$ ,5 $\beta$ -epoxi-9 $\alpha$ -hidroxi-germacra-1(10),11(13)-dien-12,6 $\alpha$ -olídeo.

Outra característica importante é que as lactonas sesquiterpênicas, formalmente derivadas de sesquiterpenoides, podem apresentar-se com diferentes estruturas cíclicas ou policíclicas, assim como seus precursores. Característica utilizada na sua classificação em grupos (germacrano, guaiano, elemano, etc.).

Finalmente, a grande variedade estrutural das lactonas sesquiterpênicas se deve não apenas à presença de ciclizações, ligações duplas, radicais hidroxila e oxo, mas também, e especialmente, à presença de outros substituintes orgânicos em funções éter ou éster adicionadas aos radicais hidroxila do núcleo característico de cada grupo. A presença desses substituintes orgânicos implica na presença de mais sinais de carbono no espectro de RMN (radicais metóxi, acetato, propionato, etc.) e dessa forma, uma determinada lactona sesquiterpênica pode apresentar os 15 sinais característicos do núcleo, mais 1, 2, 3, ... n... sinais dos radicais orgânicos ligados ao núcleo. No exemplo abaixo, além dos 15 sinais do núcleo, são

observados os 4 sinais do radical isopropionato (em vermelho) e os 2 sinais do radical acetato (em verde).

Os experimentos de RMN  $^{13}\text{C}$  são realizados com as substâncias em solução, comumente de clorofórmio deuterado, mas também se pode usar benzeno, metanol, água, ou qualquer outro solvente deuterado, e a alteração do solvente pode causar um pequeno deslocamento no sinal observado.

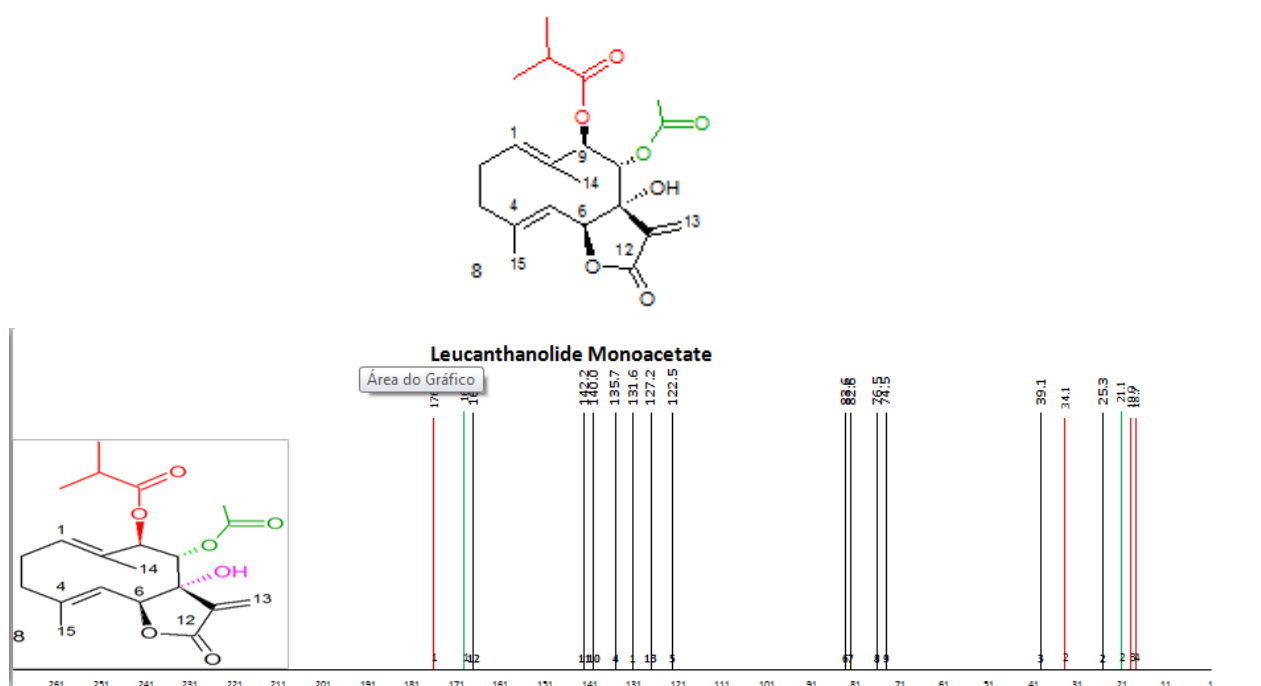


Figura 4.9: Superior: estrutura do monoacetato de leucantanolídeo. Inferior: Representação gráfica do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do monoacetato de leucantanolídeo, indicando a posição dos sinais dos substituintes acila.

### 5.5.1 Interface

A interface desenvolvida apresenta três regiões (Figura 4.10). Na primeira região, no canto superior esquerdo, foram inseridas caixas de rolagem para seleção da classe de lactonas (3), do nome da lactona (4), do código numérico da estrutura na base original (1) e ainda uma seta direcional para “zapear” a partir de um determinado código numérico escolhido (2).

Na segunda região, central superior, são apresentados os dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do núcleo da molécula selecionada (5) e dos radicais, quando presentes (6).

A terceira região apresenta estes dados em forma gráfica para o núcleo (8), e radicais (9) e ainda a estrutura molecular da lactona (7).

(1) Neste campo pode-se digitar o código numérico de qualquer uma das 2071 estruturas presentes na base de dados;

(2) A ferramenta 'seta direcional' permite 'zapear' as estruturas por seu código numérico em ordem crescente ou decrescente;

(3) A caixa de seleção permite selecionar qualquer um entre os 37 itens listados na Figura 4.11, sendo que o item 'TODOS', permite trabalhar com todas as substâncias na base (Figura 4.11);

(4) Com base na seleção realizada no item (3), esta caixa de seleção carrega todas as moléculas contendo aquele núcleo específico;

(5) Os dados de RMN dos núcleos sesquiterpênicos, conforme listados na base original, são apresentados nesta linha atribuídos a cada carbono com sua numeração;

(6) Os dados de RMN dos radicais orgânicos, conforme listados na base original, são apresentados nesta linha atribuídos a cada carbono com sua numeração;

(7) A estrutura química da molécula selecionada é carregada de um arquivo *.bmp* e apresentada neste controle ActiveX;

(8) Os dados de RMN do núcleo sesquiterpênico são apresentados graficamente neste espaço, preservando numeração do carbono ao qual são atribuídos;

(9) Os dados de RMN do(s) radical(is) orgânico(s) são apresentados graficamente neste espaço, preservando numeração do carbono ao qual são atribuídos.

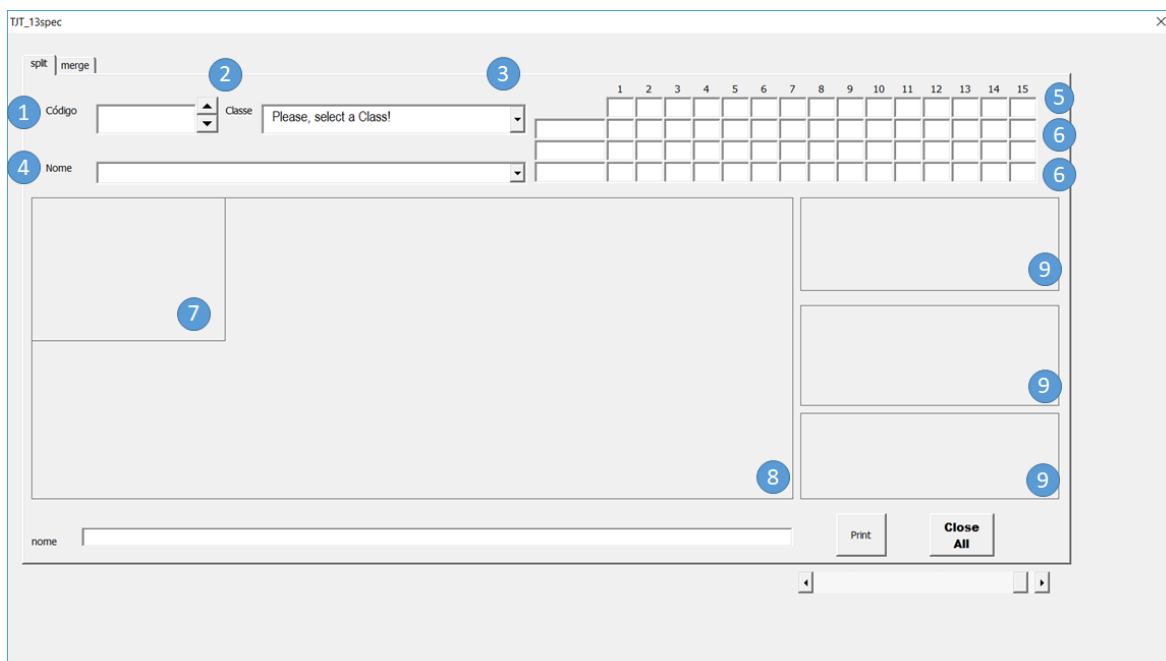


Figura 4.10:Interface do programa. Legenda: 1: código numérico da estrutura na base original; 2: setas direcionais; 3: caixa de rolagem para selecionar a classe de lactona sesquiterpênica; 4: caixa de rolagem para selecionar o nome da lactona sesquiterpênica; 5: dados tabelados de RMN do núcleo; 6: dados tabelados dos radicais; 7: estrutura química; 8: representação gráfica dos dados de RMN do núcleo; 9: representação gráfica dos dados de RMN do(s) radical(is).

Exemplo 1: apresentamos na sequencia dados espectroscópicos referentes ao diidropoxidopartenólídeo, inicialmente na forma tabelada disponível (Fig. 4.12) e posteriormente a forma gráfica gerada no programa (Fig 4.13).

Exemplo 2: Apresentamos também um exemplo de visualização de dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do  $8\alpha$ -metacrilóiloxi-2-*epi*1,4-semiacetal-vernomargólido. Na Figura 4.14 podemos visualizar os dados da forma como são apresentados no artigo de BUDEZINSKI e SAMAN (1995) e na Figura 4.15 podemos visualizar a representação gráfica do mesmo, com a respectiva estrutura química. Apenas clicando na seta direcional é possível comparar o espectro dessa substância com outras similares. Por exemplo, um derivado 10-Acetoxi, identificado pelo código 1906 (Figura 4.16) ( $8\alpha$ -metacrilóiloxi-2-*epi*1,4-semiacetal-vernomargólido tem o código 1905).



TODOS  
Germacran-12,6-olide (Methylene)  
Germacran-12,6-olide (Methyl)  
Germacran-12,8-olide (Methylene)  
Germacran-12,8-olide (Methyl)  
Germacranolides - Modified  
Eudesmen-12,6-olide (Methylene)  
Eudesma-12,6-olide (Methyl)  
Eudesma-12,8-olide (Methylene)  
Eudesma-12,8-olide (Methyl)  
Eudesmanolides - Modified  
Guaien-12,6-olide (Methylene)  
Guaien-12,6-olide (Methyl)  
Guaianolides - Modified  
Pseudoguaian-12,6-olide (Methylene)  
Pseudoguaian-12,6-olide (Methyl)  
Pseudoguaian-12-8-olide (Methylene)  
Pseudoguaian-12-8-olide (Methyl)  
Pseudoguaian-12,6-olides - Modified  
Elemen-12,6-olide (Methylene)  
Elemen-12,6-olide (Methyl)  
Elemen-12,6-olides - Modified  
Elemen-12,8-olide (Methylene)  
Elemen-12,8-olide (Methyl)  
Elemen-12,8-olides - Modified  
Eremophilanolide  
Eremophilanolides - Modified  
other types - Emmotin  
other types - Cacalol  
other types - Furodysin  
other types - Cadinane  
other types - Vernomargolide  
other types - Copaane  
other types - Daucane  
other types - Cyclobutane  
other types  
Dimers

Figura 4.11: Figura representativa da caixa de opções de núcleos de estruturas desenvolvido para o programa.

Ref	Chemical Shift (ppm)	Assignment	Integration	Reference
487	C15H20O5	<b>Eleganin, 15-deoxy-11,13-dihydro</b>	60.9 55.9 53.6 131.1 127.6 75.6 51.8 70.5 44.8 57.5 41.0 179.5 17.8 20.1 21.1	C 290
488	C19H22O6	<b>Eremantholide A</b>	205.5 104.7 187.4 130.6 135.1 81.8 64.1 78.2 44.2 90.2 61.1 175.6 20.5 21.3 20.2	A 305
489	C20H24O6	<b>Eremantholide B</b>	205.5 104.4 186.8 130.0 134.7 81.3 63.7 77.6 43.9 90.0 60.4 174.2 20.5 21.2 20.3	C 305
490	C20H22O7	<b>Atripliciolide, 8β-O-angelate-11,13-dihydro-11α,13-epoxy</b>	205.4 104.0 184.7 132.7 134.1 78.8 47.5 71.1 41.7 87.4 59.6 172.0 50.0 21.9 20.5	C 204
491	C20H22O8	<b>Atripliciolide, 8β-O-angelate-11,13-dihydro-11α,13-epoxy-15-hydroxy</b>	205.2 104.7 182.4 138.4 133.5 75.3 46.9 70.4 41.8 87.8 135.9 172.3 49.9 20.7 62.1	C 478
492	C15H20O5	<b>Parthenolide, peroxy, dihydro</b>	91.2 25.7 <sup>b</sup> 27.9 <sup>b</sup> 60.6 64.0 80.2 47.8 26.3 <sup>b</sup> 34.6 <sup>b</sup> 145.5 42.0 178.4 12.9 117.7 18.2	P 190
493	C15H20O3	<b>11βH-Germacra-3Z,10(14)-dien-12,6α-olide, 1β,5β-epoxy</b>	72.0 34.4 122.2 131.2 73.4 85.0 42.6 <sup>b</sup> 25.7 <sup>c</sup> 26.7 <sup>c</sup> 150.4 42.9 <sup>b</sup> 177.9 13.9 114.2 21.2	C 243
494	C21H24O9	<b>Vernocinerolide, 8-(4'-hydroxymethacrylate)</b>	57.2 56.0 44.4 58.1 65.0 80.5 162.7 67.4 35.8 138.4 127.6 165.2 55.1 118.0 18.5	C 340
495	C21H30O8	<b>Arucanolide, 11βH,13-tetrahydro</b>	79.4 123.2 136.0 28.7 38.9 78.2 34.5 69.9 74.6 76.0 37.8 179.0 8.8 26.7 21.8	C 203
496	C15H22O4	<b>4βH,11βH-Germacran-12,6α-olide, 3α,8β-dihydroxy-3β,10β-epoxy</b>	38.5 33.3 110.2 35.5 37.8 80.0 60.0 69.4 47.1 78.5 42.9 178.7 13.6 28.5 15.6	C 580
497	C19H24O6	<b>(4S,6R,7S,8S,10R,11S,16R)-Eremantholide C, 4,5-dihydro</b>	205.8 105.1 192.6 33.4 44.0 81.5 66.4 76.9 42.3 90.4 60.2 175.8 22.6 21.0 18.9 <sup>a</sup>	C 659
498	C19H24O7	<b>(4S,6R,7S,8S,10R,11S,16R,17R)-Eremantholide C, 4,5-dihydro-17,18-epoxy</b>	205.8 105.1 192.5 33.2 43.6 81.6 67.1 76.5 42.2 90.2 60.0 <sup>b</sup> 175.0 21.3 20.9 18.5	C 659

Figura 4.12: Dados de RMN do diidroperoxipartenolídeo na referência.



Figura 4.13: Representação gráfica dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do dihidroperoxipartenolídeo no programa.

	70.7 <sup>a</sup>	36.3	33.3	75.8 <sup>b</sup>	72.7	90.8	163.0	69.3	27.8	31.4	122.3	170.5	55.3	13.1	27.0	C	51
1899	C24H32O11	Vernojalcanolide, 13-O-methyl, 8-methacrylate															
a	89.1	30.3	35.9	89.1	73.2	77.1	157.1	66.3	34.4	84.4	130.1	169.3	33.2	19.6	23.4	C	420
b	89.2	29.4	35.3	72.7	75.7	77.0	157.7	66.0	33.9	84.2	129.4	169.1	32.7	19.2	22.9	C	124
1900	C25H34O11	Vernojalcanolide, 13-O-ethyl, 8-methacrylate															
a	88.9	30.8	35.9	88.9	73.2	76.5	157.2	66.2	34.3	84.3	130.6	169.1	61.5	19.7	23.5	C	420
b	88.8	30.8	35.9	73.2	76.4	77.0	157.1	66.2	34.2	84.2	130.5	169.1	61.4	19.7	23.4	C	124
1901	C22H30O11	Vernojalcanolide, 13-O-methyl, 8-acetate															
	89.2	30.6	35.9	73.3	76.1	76.9	157.1	64.9	34.1	84.4	129.7	168.9	63.1	19.1	23.4	C	355
1902	C24H32O12	Vernojalcanolide, 13-O-methyl, 4,8-diacetate															
	88.9	29.9	32.5	84.1	73.1	75.9	156.8	64.6	33.9	84.4	130.6	168.6	63.0	19.6	18.7	C	355
1903	C20H26O8	Vernomargolide, 8 $\alpha$ -tigloyloxy															
	211.8	53.8	31.1	73.4	78.6	74.9	40.6	70.5	39.9	85.5	133.6	169.3	125.4	27.9	26.3	C	346
1904	C20H26O8	Vernomargolide, 2- <i>epi</i> -1,4-cyclosemiacetal, 8 $\alpha$ -tigloyloxy															
	105.9	44.8	35.9	71.6	87.4	80.3	50.6	70.7	35.4	83.9	137.3	168.5	126.1	22.9	22.2	C	346
1905	C19H24O8	Vernomargolide, 2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal, 8 $\alpha$ -methacryloyloxy															
	105.4	43.2	35.9	72.8	79.2	87.3	50.4	70.1	35.2	69.8	137.8	168.5	126.0	24.0	21.8	C	530
1906	C21H26O9	Vernomargolide, 2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal, 10-acetyl-8 $\alpha$ -methacryloyloxy															
	104.0	44.4	36.5	83.5	79.9	88.2	50.7	70.4	30.8	81.0	137.8 <sup>b</sup>	168.5	125.0 <sup>c</sup>	22.7	22.0	C	530
1907	C21H26O9	Vernomargolide, 2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal, 5-acetyl-8 $\alpha$ -methacryloyloxy															
	106.1	43.9	36.4	82.7	80.5	83.8	50.9	70.3	35.3	70.6	137.1 <sup>b</sup>	168.1	125.6 <sup>c</sup>	23.7	21.9	C	530
1908	C23H28O10	Vernomargolide, 2- <i>epi</i> -1,4-semiacetal, 5,10-diacetyl-8 $\alpha$ -methacryloyl															
	104.8	44.6	36.5	83.0	80.3	84.2	50.8	70.0	31.0	81.5	136.8 <sup>b</sup>	167.7	125.5 <sup>c</sup>	22.6	21.9	C	530
1909	C22H28O8	Copa-7(11)- <i>en</i> -12,6 $\alpha$ -olide, 2 $\beta$ -acetoxy-4 $\alpha$ -hydroxy-13-methoxy-8 $\alpha$ -methacryloyloxy															
	58.8	62.7	43.8	72.2	59.1	83.3	165.1	69.4	40.1	36.6	123.9	170.8	64.2	21.3	33.0	C	350
1910	C15H20O2	Fastigiolide															
	43.1	40.1	27.2	160.6	53.5	77.6	126.2	136.9	30.2	38.6	119.6	166.8	12.6	16.7	28.6	C	96

Other carbons: **1885** Ac: 169.6 20.8; **1886a** Ac: 169.6 20.8; **1886b** Ac: 169.6 20.7; **1887** Ac: a ; **1888** 2xAc: 169.7 19.8 170.9 21.1; **1891** 2xAc: 167.7 19.8 168.8 20.1; **1892** 2xAc: 167.7 19.8 168.8 20.1; **1894** OMe: 49.9; **1895** OEt: 58.4 14.9; **1898** 2xAc: 170.0 20.3 169.6 19.8 Tig: 166.0 127.9 139.0 14.4 12.0; **1899a** 2xAc: 170.4 23.5 171.6 20.3 Mac: 167.8 136.4 125.6 18.2 OMe: 58.5; **1899b** 2xAc: 171.6 22.8 171.1 19.9 Mac: 167.5 135.9 125.4 17.7 OMe: 58.0; **1900a** 2xAc: 171.3 23.4 171.7 20.4 Mac: 167.6 136.4 125.7 18.2 OEt: 66.4 15.1; **1900b** 2xAc: 71.7 23.4 171.3 20.4 Mac: 167.6 136.3 125.8 18.2 OEt: 66.4 15.1; **1901** 3xAc: 171.3 22.9 171.1 21.1 70.4 20.4 OMe: 58.5; **1902** 4xAc: 170.7 22.4 170.6 22.1 169.4 21.1 168.9 20.1 OMe: 58.5; **1903** Tig: 166.8 127.5 139.9 14.7 11.9; **1904** Tig: 165.7 128.1 139.0 14.8 12.3; **1905** Mac: 165.6 135.8 124.8 17.8; **1906** Mac: 165.5 136.1<sup>b</sup> 125.4<sup>c</sup> 18.2 Ac: 169.8 19.0; **1907** Mac: 165.8 136.1<sup>b</sup> 126.1<sup>c</sup> 18.2 Ac: 169.8 20.7; **1908** Mac: 165.5 136.4<sup>b</sup> 126.0<sup>c</sup> 18.3 2xAc: 169.9 19.3 169.9 20.7; **1909** Ac: 171.4 21.2 OMe: 51.9 Mac: 165.9 135.7 126.6 18.3; **1911** Bz-4'-OMe: 164.7 122.3 131.4 114.0 163.7 114.0 131.4 55.5

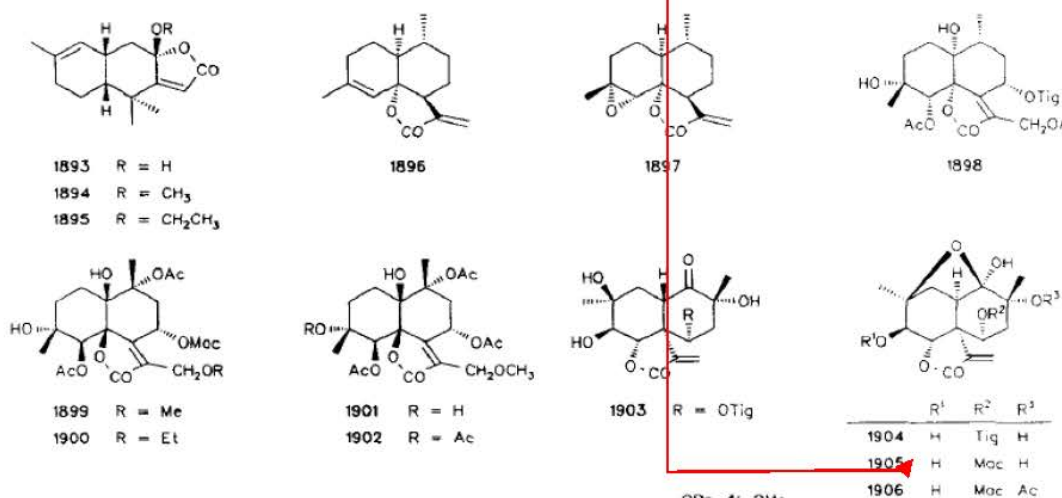


Figura 4.14: Representação tabular dos dados de RMN <sup>13</sup>C para 8 $\alpha$ -metacrilóiloxi-2-*epi*-1,4-semiacetal-vernomargólido na referência.

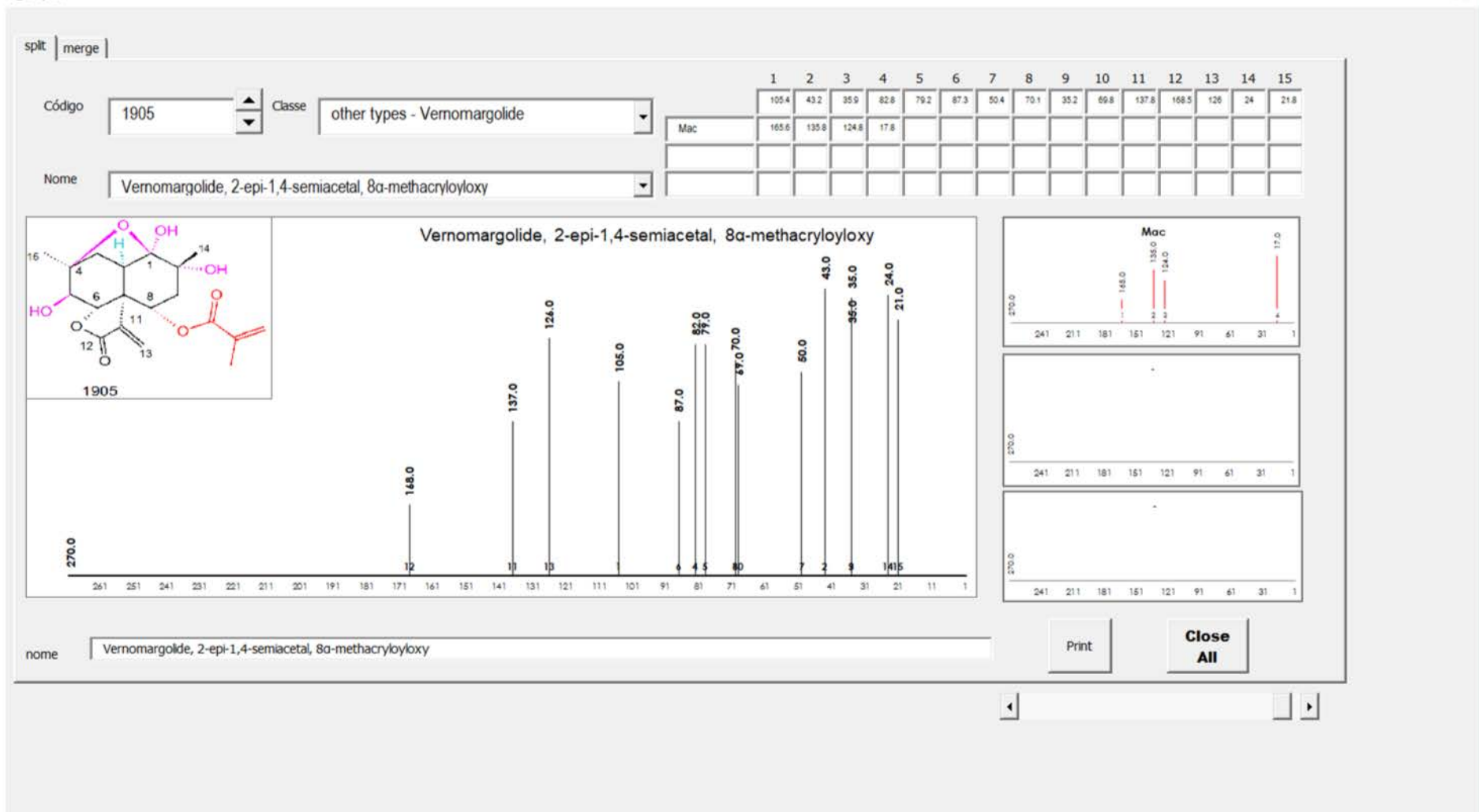


Figura 4.15: Representação gráfica dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do 8 $\alpha$ -metacrilóioxi-2-epi-1,4-semiacetal-vernomargólido no programa.

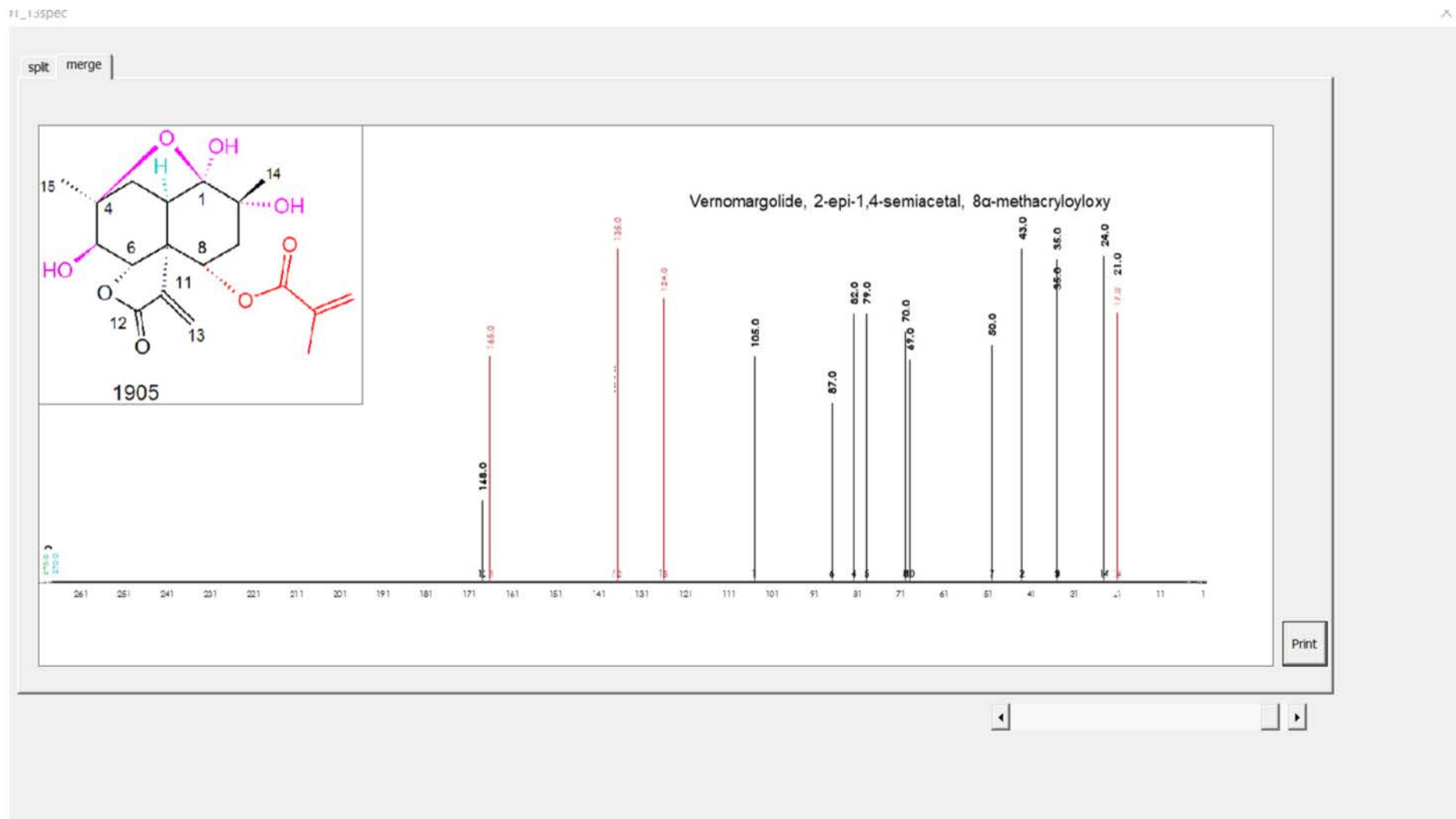


Figura 4.15 Continuação: Representação gráfica dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do 8 $\alpha$ -metacrilóiloxi-2-*epi*-1,4-semiacetal-vernomargólido no programa.

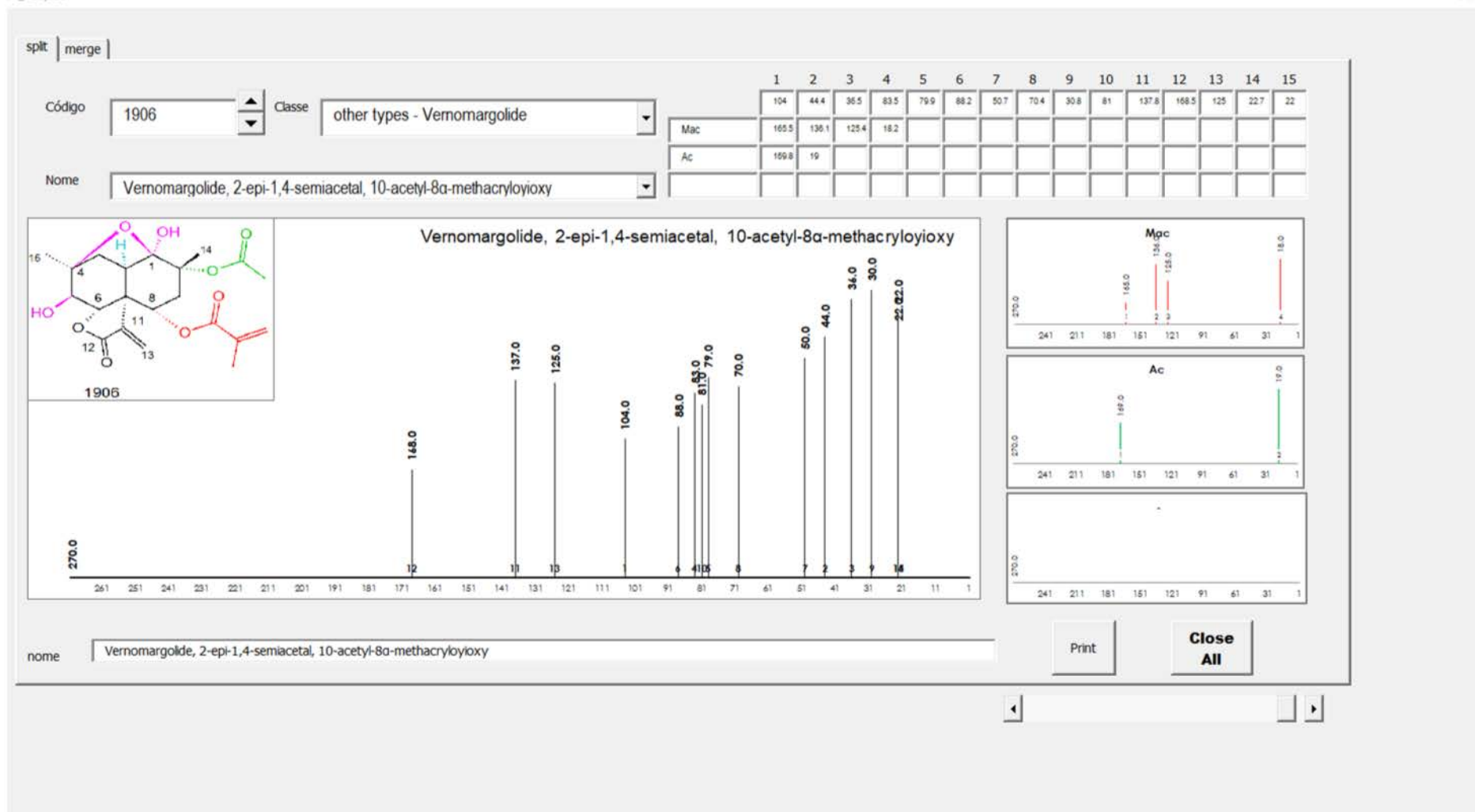


Figura 4.16: Representação gráfica dos dados de RMN <sup>13</sup>C do 10-acetil,8α-metacrilóiloxi-2-epi-1,4-semiacetal-vernomargólido no programa.

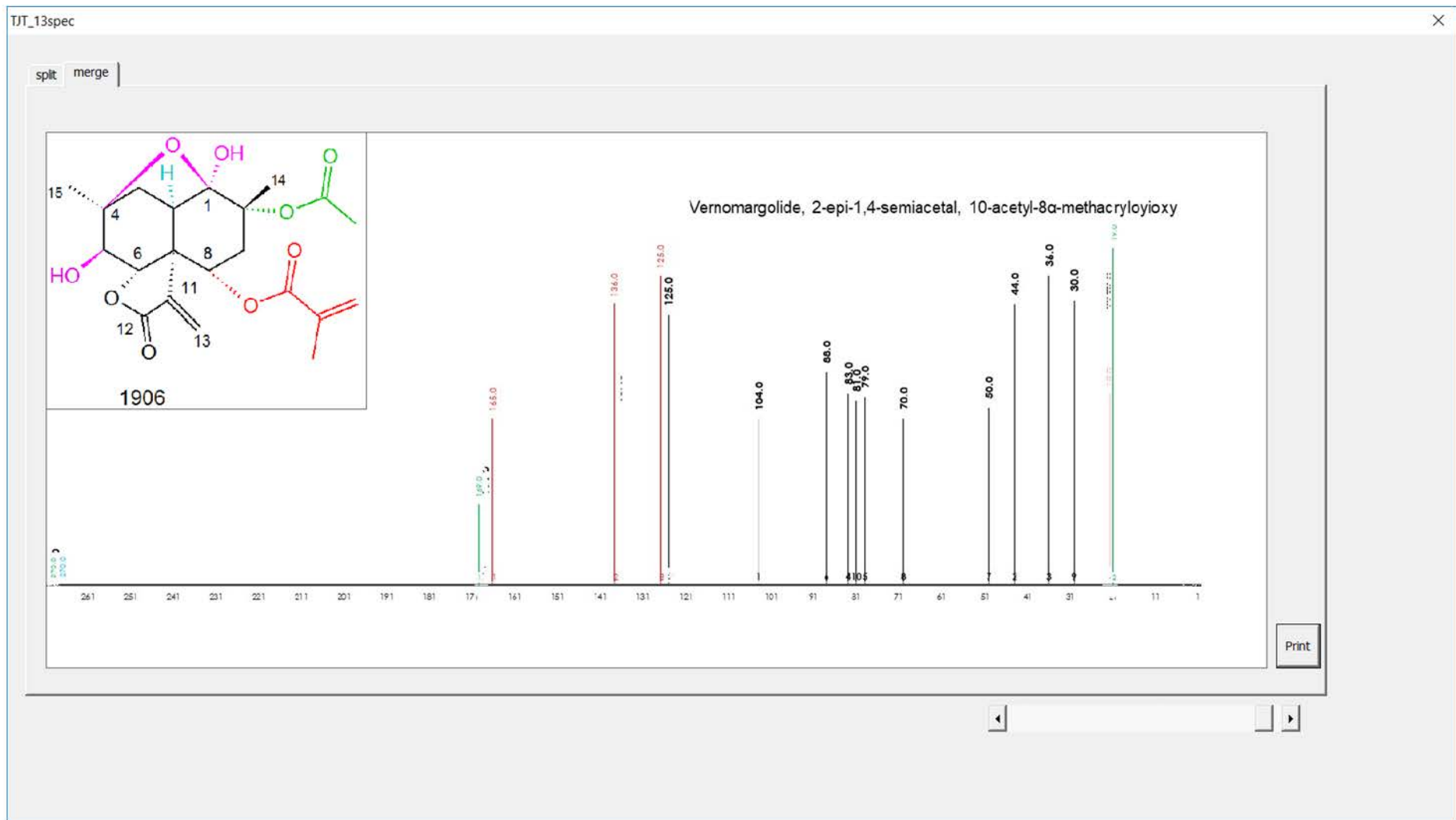


Figura 4.16 Continuação: Representação gráfica dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do 10-acetil,8 $\alpha$ -metacrilóiloxi-2-*epi*-1,4-semiacetal-vernomargólido no programa.



## 5.6 Perspectivas

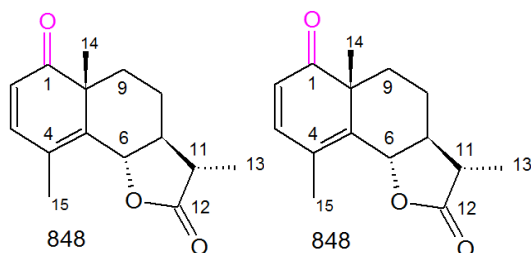
### 5.6.1 Desenvolvimento de um software de busca de similaridade

Considerando esta breve introdução, e munidos de um banco com espectros de RMN de mais de 2000 moléculas objetivamos o desenvolvimento de uma ferramenta que permita a comparação de um espectro de uma amostra real (com número de sinais aleatório de 15 a 30, por exemplo) com os dados do banco, na busca de similaridade total ou parcial.

Mais especificamente:

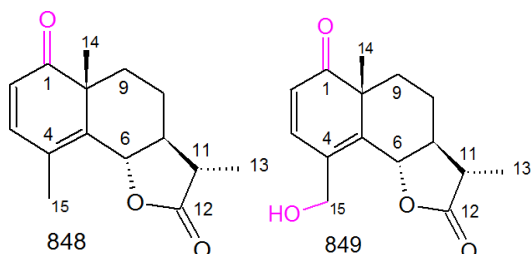
Caso 1. Dado um espectro com 15 sinais, escanear o banco na busca de uma correspondência exata ou aproximada de outras moléculas com 15 sinais;

Exata:



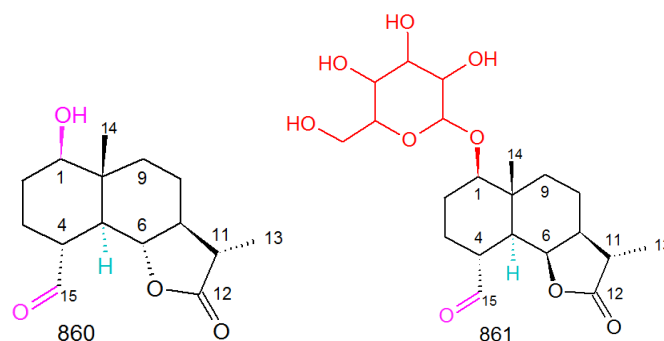
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
848	204.6	123.5	149.0	121.5	143.1	81.8	54.1	23.4	35.4	50.5	41.1	178.0	12.4	26.2	19.1

Parcial:



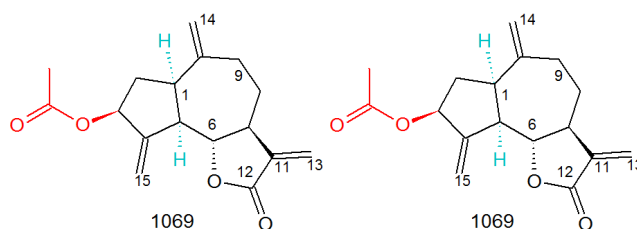
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
848	204.6	123.5	149.0	121.5	143.1	81.8	54.1	23.4	35.4	50.5	41.1	178.0	12.4	26.2	19.1
849	204.1	123.8	145.6	126.9	144.6	81.6	54.0	23.1	36.0	50.7	40.7	177.9	12.4	26.1	59.8

Caso 2. Dado um espectro com 15 sinais, escanear o banco na busca de uma correspondência parcial, considerando-se a possibilidade de que haja uma identificação parcial, por exemplo, com uma substância do banco que apresente além destes 15 sinais (quase) coincidentes, sinais de um radical extra que não estão presentes na amostra em questão, o que seria de grande valia na identificação estrutural do composto;



C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
860	76.8	29.4	24.9	48.8	49.0	81.6	52.8	23.1	37.3	41.8	41.3	178.3	12.6	12.1	203.2							
861	<b>83.2</b>	<b>25.5</b>	24.6	48.9	48.9	81.5	52.7	22.9	37.1	41.3	40.9	178.4	12.7	12.8	203.1	<b>102.2</b>	<b>75.1</b>	<b>78.3</b>	<b>72.1</b>	<b>78.6</b>	<b>63.3</b>	

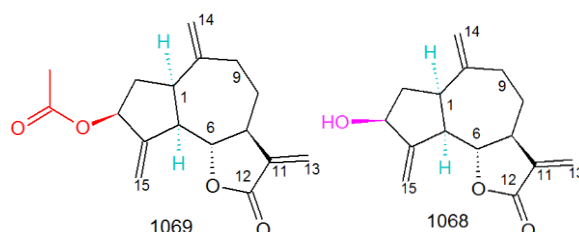
Caso 3. Dado um espectro com mais de 15 sinais, escanear o banco na busca de uma correspondência exata ou bem aproximada, com outras moléculas com o mesmo número de sinais;



C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1069	44.6	36.5	74.7	148.0	45.3	83.8	50.3	34.5	30.6	139.6	147.6	169.9	120.4	114.4	113.6	170.8	21.3

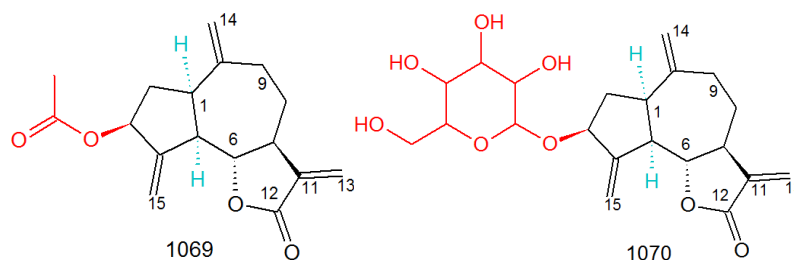
Caso 4. Dado um espectro com mais de 15 sinais, escanear o banco na busca de uma correspondência parcial, considerando-se a possibilidade de que haja uma identificação parcial, por exemplo, com:

a) uma substância do banco que apresente apenas 15 sinais (quase) coincidentes, indicando assim que a molécula em estudo conteria o núcleo principal identificado e ainda sinais extra (os quais poderiam ser então isolados, para possibilitar a identificação do radical aí presente);



C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1069	44.6	36.5	74.7	148.0	45.3	83.8	50.3	34.5	30.6	139.6	147.6	169.9	120.4	114.4	113.6	170.8	21.3
1068	44.1	38.9	73.4	<b>152.8</b>	45.5	83.7	49.9	34.0	30.5	139.7	147.8	169.6	119.9	114.3	111.2		

b) uma substância do banco que apresente mais de 15 sinais, com um número aleatório de sinais coincidentes, o que poderia ser também utilizado na identificação da molécula em questão ;



C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17				
1069	44.6	36.5	74.7	148	45.3	83.8	50.3	34.5	30.6	139.6	147.6	169.9	120.4	114.4	113.6	170.8	21.3				
1070	44.9	38.2	80.6	150.6	50.4	83.7	45.3	30.7	34.2	149	141.1	170	119.4	114	112.5	104.1	75.4	78.6	72	78.3	63.1

## 5.6.2 Hospedagem da plataforma e com o software de busca de similaridade na web

O objetivo final deste capítulo é o desenvolvimento de um software de busca de similaridade espectral, integrado ao banco de dados, e sua disponibilização no site da UFRGS para consulta pública.



## **6. DISCUSSÃO GERAL**



A análise multivariada dos dados da composição química de óleos voláteis pode ser aplicada muito eficientemente tanto para a caracterização ou identificação de amostras, suas origens, suas variações sazonais, bem como para produzir informações sobre as relações biogenéticas entre os diferentes componentes de amostras complexas. Neste trabalho, através da utilização da OPLS e do pareamento das amostras foi possível identificar alguns componentes do óleo volátil de *E. tremulum* com ocorrência diferenciada nos períodos de pré-floração, floração e pós-floração, mesmo em amostras com perfil cromatográfico extremamente variável e nas quais foi inicialmente impossível determinar diferenças sazonais utilizando as técnicas multivariadas mais comumente aplicadas a óleos voláteis, como a PCA.

Foi possível relacionar os álcoois amorfa-4-en-7-ol e *epi*- $\alpha$ -bisabolol e os hidrocarbonetos germacreno D,  $\beta$ -bisaboleno e amorfa-4,7(11)-dieno com o seu ciclo de desenvolvimento, o que é um dado novo para a espécie. Nossa suspeita inicial de que os compostos furanizados presentes no óleo volátil da espécie também estivessem de alguma forma relacionados aos eventos do ciclo vegetativo ou ao clima não foram confirmadas.

A química volátil de *E. tremulum*, *E. itatiayensis* e de *E. laevigatum* é muito interessante do ponto de vista biogenético, pela presença de compostos raros que apresentam furanização dos esqueletos sesquiterpênicos do grupo cadinano, relacionando-se assim, à química do gênero *Artemisia*, onde ocorre lactonização deste mesmo grupo de compostos, na mesma posição biogenética. A tentativa de relacionar biogeneticamente os furanosesquiterpenos e as lactonas sesquiterpênicas foi frustrada pela dificuldade de localizar e isolar lactonas sesquiterpênicas nas espécies selecionadas para este fim, mesmo com a utilização de metodologias específicas de extração. Entretanto, durante a execução desta etapa do projeto, sentimos a necessidade de otimizar a apresentação de dados espectroscópicos de RMN, o que nos levou a desenvolver um software de apresentação de dados de RMN  $^{13}\text{C}$  de lactonas sesquiterpênicas com potencial para ser estendido e utilizado também como um banco de dados de espectros de massa para GC/MS.





## **7. CONCLUSÕES**



- Os óleos voláteis de *E. polystachyum* e de *E. gaudichaudianum* se caracterizaram predominantemente pela presença de monoterpenoides hidrocarbonados, sendo limoneno, mirceno,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno e sabineno os majoritários. Os monoterpenoides identificados nos óleos voláteis dessas espécies têm ocorrência generalizada e, portanto, não possuem valor taxonômico.
- Entre os sesquiterpenoides hidrocarbonados, os majoritários foram  $\beta$ -cariofileno, germacreno D e biciclogermacreno nos óleos voláteis de *E. inulifolium* e *E. polystachyum*, estando estes dois últimos como majoritários também no óleo volátil de *E. gaudichaudianum*.
- Um furanossesquiterpeno, 3-oxo-verbocidentafurano, foi isolado e identificado do óleo volátil de *E. tremulum*. A mesma substância estava presente no óleo volátil de *E. itatiayensis*, assim como o verbocidentafurano, seu possível precursor, identificado no óleo volátil de ambas as espécies. Este é o primeiro relato da ocorrência de 3-oxo-verbocidentafurano em *E. tremulum* e em *E. itatiayensis*.
- O óleo volátil de *E. laevigatum* foi caracterizado pela presença de laevigatina e traços de verbocidentafurano. Assim, a presença de furanossesquiterpenos parece ser um traço comum a estas três espécies: *E. tremulum*, *E. itatiayensis* e *E. laevigatum*.
- Um programa em plataforma Excel® foi desenvolvido para a visualização de dados espectrais de RMN  $^{13}\text{C}$  na forma gráfica. A aplicabilidade do programa foi demonstrada em comparação a um banco de dados tabular.



## REFERÊNCIAS



ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 455p. 2001.

ADAMS, R.P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4th edition. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 803p, 2007.

ADIO, A. M. Germacrenes A–E and related compounds: thermal, photochemical and acid induced transannular cyclizations. **Tetrahedron**, v. 65, n. 8, p. 1533-1552, 2009.

AGGER, S.; LOPEZ-GALLEGO, F.; SCHMIDT-DANNERT, C. Diversity of sesquiterpene synthases in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. **Molecular Microbiology**. v. 72, n. 5, p. 1181–1195, 2009.

ALBUQUERQUE, M. R. J.; DE SOUZA, E. B.; MESQUITA, E. F.; NUNES, E. P.; CUNHA, A. N.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents from leaves of *Vernonia chalybaea* Mart. and *Eupatorium ballotaefolium* HBK. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 5, p. 376-377, 2001.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S.; SOUZA, E. B.; SILVA, R. M.; MENEZES, J. E. S. A.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, S. M. Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotaefolium* Kunth, Asteraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 615-620, 2010.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SILVEIRA, E. R.; DE A. UCHÔA; D. E.; LEMOS; T. L. G.; SOUZA; E. B.; SANTIAGO, G. M. P.; PESSOA, O. D. L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforme* (DC) Baker (Asteraceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6708-6711, 2004.

ALLAHVERDIYEV, A.; DURAN, N.; CETINER, OZGUVEN, S. M. Investigation of the anticancerogenic effect of the essential oil of *Melissa officinalis* L. **Pharmaceutical and Pharmacological Letters**, v. 11, n. 1, p. 26-29, 2001.

ALVES, J.C.F. A Review on the Chemistry of Eremanthine: A Sesquiterpene Lactone with Relevant Biological Activity. **Organic Chemistry International**, v. 2011, 2011.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, p. 4364-4370, 2006.

ANDRADE, J. M. M.; SOUZA, T. J. T.; NEVES, B. M.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; HENRIQUES, A. T.; APEL, M. A. Composição química e atividades biológicas do óleo volátil das espécies *Eupatorium polystachium*, *Eupatorium macrocephalum* e *Eupatorium laevigatum*. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, São Paulo, SP, 2008. **Anais do XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology**, 2008.

ANDREUCCI, A. C.; CICCARELLI, D.; DESIDERI, I.; PAGNI, A. M. Glandular hairs and secretory ducts of *Matricaria chamomilla* (Asteraceae): morphology and histochemistry. In: **Annales Botanici Fennici**. Finnish Zoological and Botanical Publishing Board, p. 11-18, 2008.

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D. An interpopulation study of the essential oils of *Cistus parviflorus* L. growing in Crete (Greece). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 4, p. 405-415, 2001.

ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 3, p. 189-203, 2002.

ANTHONY, K P.; DEOLU-SOBOGUN, S. A.; SALEH, M. A. Comprehensive assessment of antioxidant activity of essential oils. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 8, p. C839-C843, 2012.

APEL, M. A.; SOUZA, T. J. T.; ANDRADE, J. M. M.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; HENRIQUES, A. T. *Eupatorium rufescens*, *E. grande* e *E. consanguineum*: avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica e determinação da composição química do óleo volátil. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, SP, 2008. **Anais do 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2008a.

APEL, M. A.; SOUZA, T. J. T.; ANDRADE, J. M. M.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; HENRIQUES, A. T. *Eupatorium subhastatum*, *Eupatorium pedunculatum* e *Eupatorium congestum*: composição química e atividades antioxidante e anticolinesterásica do óleo volátil. In: COLACRO XII, Florianópolis, Santa Catarina, 2008. **Anais do COLACRO XII**, 2008b.

APEL, M. A.; SOUZA, T. J. T.; ANDRADE, J. M. M.; KONRATH, E.; da SILVA, R. B.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composición química y actividad biológica de *Eupatorium polystachyum* y *E. macrocephalum* (Asteraceae). In: Congreso Iberoamericano de Química: 75 Anos de la Sociedad Química del Peru y XXIV Congreso Peruano de Química, Cusco, Perú, 2008. **Anais do Congreso Iberoamericano de Química: 75 Anos de la Sociedad Química del Peru y XXIV Congreso Peruano de Química**, 2008c.

APEL, M. A.; SOUZA, T. J. T.; ANDRADE, J. M. M.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies do gênero *Eupatorium* *bupleurifolium*, *E. tweedeanum* e *E. spathulatum*: análise química e avaliação *in vitro* das atividades antioxidante e anticolinesterásica. In: 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Fortaleza, CE, 2009. **Anais do 32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

APROTOSOAIE, A. C.; HÂNCIANU, M.; COSTACHE, I. I.; MIRON, A. Linalool: a review on a key odorant molecule with valuable biological properties. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 4, p. 193-219, 2014.

ARAKAWA, N. S.; SCHORR, K.; AMBROSIO, S. R.; MERFORT, I.; DA COSTA, F. B. Further sesquiterpene lactones from *Viguiera robusta* and the potential anti-inflammatory activity of a heliangolide: Inhibition of human neutrophil elastase release. **Zeitschrift für Naturforschung. C. A Journal of Biosciences**, v. 63, n. 11, p. 533, 2008.

ARZE, J. B. L.; COLLIN, G.; GARNEAU, F. X.; JEAN, F. I.; GAGNON, H. Essential oils from Bolivia II. Asteraceae: *Ophryosporus heptanthus* (Wedd.) H. Rob. et King. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 374-376, 2004.

BAILAC, P. N.; DELLACASA, A. D.; BERNASCONI, H. O.; FIRPO, N. H.; PONZI, M. I. Composition of the essential oil and antimicrobial activity of *Eupatorium patens*. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, n. 2, p. 207-211, 2000.

BARTOLI, A.; GALATI, B. G.; TORTOSA, R. D. Anatomical studies of the secretory structures: Glandular trichomes and ducts, in *Grindelia pulchella* Dunal (Astereae, Asteraceae). **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 12, p. 1063-1068, 2011.

BAUERMANN, L.; SOUZA, T. J. T.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividades antioxidante e anticolinesterásica do óleo volátil de quatro espécies de *Eupatorium* nativas do Sul do Brasil. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology, São Paulo, SP, 2008. **Anais do XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congresso of Ethnopharmacology**, 2008.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. **Secondary plant products**. [Encyclopedia of Plant Physiology]. Berlin, Heidelberg, New York.: Springer-Verlag, 1980.

BENTLEY, R.. The nose as a stereochemist. Enantiomers and odor. **Chemical reviews**, v. 106, n.9, p.4099-4112, 2006.



- BENNICI, A.; TANI, C. Anatomical and ultrastructural study of the secretory cavity development of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: evaluation of schizolysigenous ontogeny. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 199, n. 6, p. 464-475, 2004.
- BERTEA, C. M.; VOSTER, A.; VERSTAPPEN, F. W.; MAFFEI, M.; BEEKWILDER, J.; BOUWMEESTER, H. J. Isoprenoid biosynthesis in *Artemisia annua*: Cloning and heterologous expression of a germacrene A synthase from a glandular trichome cDNA library. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 448, n. 1, p. 3-12, 2005.
- BESTEN, M. A.; NUNES, D. S.; WISNIEWSKI JR, A.; SENS, S. L.; GRANATO, D.; SIMIONATTO, E. L.; SCHARF, D. R.; DALMARCO, J. B.; MATZENBACHER, N.I. Chemical composition of volatiles from male and female specimens of *Baccharis trimera* collected in two distant regions of southern Brazil: a comparative study using chemometrics. **Quimica Nova**, v. 36, n. 8, p. 1096-1100, 2013.
- BHARDWAJ, R.; SINGH, A.; SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K.; KURADE, N. P.; MAHATO, S. B. Hepatotoxicity and cholestasis in rats induced by the sesquiterpene, 9-oxo-10, 11-dehydroageraphorone, isolated from *Eupatorium adenophorum*. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 15, n. 5, p. 279-286, 2001.
- BOEKER, R.; JAKUPOVIC, J.; BOHLMANN, F.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Further heliangolides and guaianolides from *Eupatorium altissimum*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1669-1672, 1986.
- BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; VOGEL, W. 11-Hydroxy- $\alpha$ - and  $\beta$ -cubebene from *Eupatorium serotinum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1153-1154, 1982.
- BOHLMANN, F.; SINGH, P.; JAKUPOVIC, J.; KING, R. M.; ROBINSON H. Three cadinene derivatives and a prostaglandin-like acid from *Chromolaena* species. **Phytochemistry**, v. 21, n. 2, p. 371-374, 1982.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; GRENZ, M. Weitere Inhaltsstoffe aus Vertretern der *Eupatorium*-Gruppe. **Chemische Berichte**, 110, 1034-1041, 1977.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; TURNER, B. L. Germacranolides from *Eupatoriastrium nelsonii*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1263-1266, 1985.
- BOHLMANN, F.; SCHEIDGES, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Five labdane derivatives from *Koanophyllon conglobatum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 5, p. 1190-1192, 1984.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. New heliangolides from *Conocliniopsis prasiifolia*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 7, p. 1547-1549, 1980.
- BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Germacranolides, a guaianolide with a  $\beta$ -lactone ring and further constituents from *Grazielia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1069-1075, 1981.
- BOHLMANN, J.; MEYER-GAUEN, G.; CROTEAU, R. Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 8, p. 4126-4133, 1998.
- BOMFIM, D. S.; FERRAZ, R. P.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B.; PINHEIRO, M. L.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Eudesmol isomers induce caspase-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 113, n. 5, p. 300-306, 2013.
- BORDOLOI, M.; SHUKLA, V. S.; NATH, S. C.; SHARMA, R. P. Naturally occurring cadinenes. **Phytochemistry**, v. 28, n. 8, p. 2007-2037, 1989.

BOUDA, H.; TAPONDJOU, L. A.; FONTEM, D. A.; GUMEDZOE, M. Y. D. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 2, p. 103-109, 2001.

BOUKHRIS, M.; NASRI-AYACHI, M. B.; MEZGHANI, I.; BOUAZIZ, M.; BOUKHRIS, M.; SAYADI, S. Trichomes morphology, structure and essential oils of *Pelargonium graveolens* L'Hér. (Geraniaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 604-6010, 2013.

BREMER, K.; ANDERBERG, A. A. Asteraceae: cladistics and classification. Portland, Or.: Timber Press, 1994.

BRENNA, E.; FUGANTI, C.; SERRA, S. Enantioselective perception of chiral odorants. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 1, p. 1-42, 2003.

BROWN, G. D. The biosynthesis of artemisinin (Qinghaosu) and the phytochemistry of *Artemisia annua* L. (Qinghao). **Molecules**, v. 15, p. 7603–7698, 2010.

BURITS, M.; ASRES, K.; BUCAR, F. The antioxidant activity of the essential oils of *Artemisia afra*, *Artemisia abyssinica* and *Juniperus procera*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 103-108, 2001.

BUDĚŠÍNSKÝ, M.; ŠAMAN, D. Carbon-13 NMR spectra of sesquiterpene lactones. **Annual Reports on NMR Spectroscopy**, v. 30, p. 231-475, 1995.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. Compostas (Eupatoriae). **Flora Illustrada Catarinense**, 1989.

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TOCCACIELI, L.; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, n. 2, p. 349-360, 2004.

CANE, D. E. Enzymic formation of sesquiterpenes. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 7, p. 1089-1103, 1990.

CAÑIGUERAL, S.; VILA, R.; VICARIO, G.; TOMAS, X.; ADZET, T. Chemometrics and essential oil analysis: chemical polymorphism in two *Thymus* species. **Biochemical systematics and ecology**, v. 22, n. 3, p.307-315, 1994.

CARNESECCHI, S.; BRAS-GONÇALVES, R.; BRADAIA, A.; ZEISEL, M.; GOSSÉ, F.; POUPON, M. F.; RAUL, F. Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. **Cancer Letters**, v. 215, n. 1, p. 53-59, 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

CARRERAS, C. R.; OSSOMANDO, P. C.; GIORDANO, O. S. Entlabdanes in *Eupatorium buniifolium*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 1031–1034, 1998.

CASTRO, M. M.; LEITÃO-FILHO, H. F.; MONTEIRO, W. R. Utilização de estruturas secretoras na identificação dos gêneros de Asteraceae de uma vegetação de cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, v. 20, n. 2, p. 163-174, 1997.

CAULA, S. A.; VILLAR, S. I.; MARTINO, V. S.; COUSSIO, J. D.; FERRARO, G. Polyphenols isolated from *Eupatorium buniifolium*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 22, p. 1–3, 1991.

- CAVALIERI, E.; MARIOTTO, S.; FABRIZI, C.; DE PRATI, A. C.; GOTTARDO, R.; LEONE, S.; SUZUKI, H.  $\alpha$ -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 315, n. 3, p. 589-594, 2004.
- CHA, J.-D.; JEONG, M.-R.; LEE, Y.-E. Induction of apoptosis in human oral epidermoid carcinoma cells by essential oil of *Chrysanthemum boreale* Makino. **Food Science and Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 350-354, 2005.
- CHANG, Y. J.; SONG, S. H.; PARK, S. H.; KIM, S. U. Amorpha-4, 11-diene synthase of *Artemisia annua*: cDNA isolation and bacterial expression of a terpene synthase involved in artemisinin biosynthesis. **Archives of Biochemistry and biophysics**, v. 383, n. 2, p. 178-184, 2000.
- CHAPPELL, J. The biochemistry and molecular biology of isoprenoid metabolism. **Plant physiology**, v. 107, n. 1, p. 1, 1995.
- CHAUHAN, A. K.; KANG, S. C. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser. typhimurium* in vitro and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 559-565, 2014.
- CHEN, T. C.; CHO, H. Y.; WANG, W.; BARATH, M.; SHARMA, N.; HOFMAN, F. M.; SCHÖNTAL, A. H. A novel temozolomide–perillyl alcohol conjugate exhibits superior activity against breast cancer cells in vitro and intracranial triple-negative tumor growth in vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 13, n. 5, p. 1181-1193, 2014.
- CHEN, Y. J.; JIANG, H. X.; GAO, K. One novel nortriterpene and other constituents from *Eupatorium fortunei* Turcz. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 47, p. 1-4, 2013a.
- CHEN, Y.; ZENG, H.; TIAN, J.; BAN, X.; MA, B.; WANG, Y. Antifungal mechanism of essential oil from *Anethum graveolens* seeds against *Candida albicans*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 8, p. 1175-1183, 2013b.
- CHENG, A. X.; XIANG, C. Y.; LI, J. X.; YANG, C. Q.; HU, W. L.; WANG, L. J.; CHEN, X. Y. The rice (*E*)- $\beta$ -caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes. **Phytochemistry**, v. 68, n. 12, p. 1632-1641, 2007.
- CHIZZOLA, R.; MICHITSCH, H.; FRANZ, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 56, n. 16, p. 6897-6904, 2008.
- CHUNG, J. W.; CHOI, R. J.; SEO, E. K.; NAM, J. W.; DONG, M. S.; SHIN, E. M.; KIM, Y. S. Anti-inflammatory effects of (*Z*)-ligustilide through suppression of mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- $\kappa$ B activation pathways. **Archives of Pharmacal Research**, v. 35, n. 4, p. 723-732, 2012.
- COLBY, S. M.; CROCK, J.; DOWDLE-RIZZO, B.; LEMAUX, P. G.; CROTEAU, R. Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 5, p. 2216-2221, 1998.
- COOL, L. G.; TAKEOKA, G. R.; VERMILLION, K. E. Volatile non-terpenoid hydrocarbons from *Ligusticum grayi* roots. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 158-160, 2011.
- CROCOLL, C. **Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme**. 2011. Tese de Doutorado. PhD Thesis, Friedrich-Schiller-Universität.

CROCOLL, C.; ASBACH, J.; NOVAK, J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. **Plant Molecular Biology**, v. 73, n. 6, p. 587-603, 2010.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 929-954, 1987.

DA FONSECA, C. O.; SCHWARTSMANN, G.; FISCHER, J.; NAGEL, J.; FUTURO, D.; QUIRICO-SANTOS, T.; GATTASS, C. R. Preliminary results from a phase I/II study of perillyl alcohol intranasal administration in adults with recurrent malignant gliomas. **Surgical Neurology**, v. 70, n. 3, p. 259-266, 2008.

DAVIS, E. M.; CROTEAU, R. Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes. In: **Biosynthesis**. Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 53-95.

DE GUTIÉRREZ, A. N.; BARDON, A.; CATÁLAN, C. A. N.; GEDRIS, T. B.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Disynaphia multicrenulata* from Argentina. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 633-647, 2001.

DE GUTIÉRREZ, A. N.; SIGSTAD, E. E.; CATÁLAN, C. A. N.; GUTIÉRREZ, A. B.; HERZ, W. Guaianolides from *Kaunia lasiophthalma*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1219-1225, 1990.

DE GUTIÉRREZ, A. N.; CATALÁN, C. A.; DÍAZ, J. G.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, a labdane and other constituents of *Urolepis hecatantha* and *Chromolaena arnottiana*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 4, p. 795-800, 1995.

DE KRAKER, J. W.; FRANSSSEN, M. C.; DE GROOT, A.; KONIG, W. A.; BOUWMEESTER, H. J. (+)-Germacrene A Biosynthesis the committed step in the biosynthesis of bitter sesquiterpene lactones in chicory. **Plant Physiology**, v. 117, n. 4, p. 1381-1392, 1998.

DE KRAKER, J. W.; FRANSSSEN, M. C.; JOERINK, M.; DE GROOT, A.; BOUWMEESTER, H. J. Biosynthesis of costunolide, dihydrocostunolide, and leucodin. Demonstration of cytochrome P450-catalyzed formation of the lactone ring present in sesquiterpene lactones of chicory. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 257-268, 2002.

DE KRAKER, J. W.; SCHURINK, M.; FRANSSSEN, M. C. R.; KÖNIG, W. A.; GROOT, A.; BOUWMEESTER, H. J. Hydroxylation of sesquiterpenes by enzymes from chicory (*Cichorium intybus* L.) roots. **Tetrahedron**, v. 59, n. 3, p. 409-418, 2003.

De OLIVEIRA, A. B.; CARAZZA, F.; RAMOS, L. S.; MAIA, J. G. S. The Essential oil of *Eupatorium laevigatum*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 2, n. 1, p. 49-50, 1990.

De SOUSA, J. P.; TORRES, R. D. A.; DE AZERÊDO, G. A.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; VASCONCELOS, M. A. D. S.; DE SOUZA, E. L. Carvacrol and 1, 8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of *Pseudomonas fluorescens* in a vegetable-based broth. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, n. 1, p. 9-13, 2012.

DEMETZO, C.; ANASTASAKI, T.; PERDETZOGLU, D. A chemometric interpopulation study of the essential oils of *Cistus creticus* L. growing in Crete (Greece). **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 57, n.1-2, p. 89-94, 2002.

DEMYTTENAERE, J.; DE KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi: Study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4, p. 265-270, 2001.

DENG, X.; LIAO, Q.; XU, X.; YAO, M.; ZHOU, Y.; LIN, M.; ZHANG, P.; XIE, Z. Analysis of essential oils from cassia bark and cassia twig samples by GC-MS combined with multivariate data analysis. **Food analytical methods**, v. 7, n. 9, p. 1840-1847, 2014.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. **Natural product reports**, v. 14, n. 2, p. 111-144, 2002.

DIAO, W. R.; HU, Q. P.; ZHANG, H.; XU, J. G. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 2014.

DÍAZ, D. A. **Síntesi de la lactona (S)-(+)-[beta]-angèlica a partir de l'àcid (L)-(+)-tartàric: tesi de llicenciatura**. 1985.

DICKSCHAT, J. S. Isoprenoids in three-dimensional space: the stereochemistry of terpene biosynthesis. **Natural Product Reports**, v. 28, n. 12, p. 1917-1936, 2011.

DING, Z. H.; DING, J. K. Eupatoranolide, a new sesquiterpene lactone from *Eupatorium adenophorum*. **Chinese Chemical Letters**, v. 10, n. 6, p. 491-494, 1999.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Chemical composition, antimicrobial and in vitro antioxidant properties of *Monarda citriodora* var. *citriodora*, *Myristica fragrans*, *Origanum vulgare* ssp. *hirtum*, *Pelargonium* sp. and *Thymus zygis* oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 2, p. 145-150, 2004.

DUBEY, V. S.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637-646, 2003.

DUNG, N. X.; CU, L. D.; VAN KHIÊN, P.; MUSELLI, A.; CASANOVA, J.; BARTHEL, A.; LECLERCQ, P. A. Volatile constituents of the stem and leaf oils of *Eupatorium coelestinum* L. from Vietnam. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 478-482, 1998.

DUÑG, N. X.; TÂRN, N. T.; KRUK, C.; LECLERCQ, P. A. Composition of the oil of *Eupatorium stoechadosmum* Hance from Vietnam. **Journal of Essential Oil Research**, v. 3, n. 2, p. 115-116, 1991.

DUPLAN, V.; SERBA, C.; GARCIA, J.; VALOT, G.; BARLUENGA, S.; HOERLÉ, M.; CUENDET, M.; WINSSINGER, N. Synthesis of sesquiterpene-inspired derivatives designed for covalent binding and their inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 2, p. 370-375, 2014.

EBRAHIMABADI, E. H.; GHOREISHI, S. M.; MASOUM, S.; EBRAHIMABADI, A. H. Combination of GC/FID/Mass spectrometry fingerprints and multivariate calibration techniques for recognition of antimicrobial constituents of *Myrtus communis* L. essential oil. **Journal of Chromatography B**, v. 1008, p. 50-57, 2016.

E.C. EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Opinion of the Scientific Committee on Food on pulegone and menthofuran 2002 [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out133\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out133_en.pdf). acessado em 03/11/2014.

EL TANTAWY, M. E. Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Senecio mikanioides* Otto. cultivated in Egypt. **Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 294-306, 2000.

FAHN, A. Secretory tissues in vascular plants. **New phytologist**, v. 108, n. 3, p. 229-257, 1988.

FARALDOS, J. A.; MILLER, D. J.; GONZÁLEZ, V.; YOOSUF-ALY, Z.; CASCÓN, O.; LI, A. ALLEMANN, R. K. A 1, 6-ring closure mechanism for (+)- $\delta$ -cadinene synthase?. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 13, p. 5900-5908, 2012.

FELICETTI, B.; CANE, D. E. Aristolochene synthase: mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 23, p. 7212-7221, 2004.

FERNANDES, E. S.; PASSOS, G. F.; MEDEIROS, R.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

FIORENZANI, P.; LAMPONI, S.; MAGNANI, A.; CECCARELLI, I.; MARIA, A. In vitro and in vivo characterization of the new analgesic combination beta-caryophyllene (BCP) and docosahexaenoic acid (DHA). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. vol. 2014.

FISCHER, M. J.; MEYER, S.; CLAUDEL, P.; PERRIN, M.; GINGLINGER, J. F.; GERTZ, C. KARST, F. Specificity of *Ocimum basilicum* geraniol synthase modified by its expression in different heterologous systems. **Journal of Biotechnology**, v. 163, n. 1, p. 24-29, 2013.

FISCHER, N. H.; OLIVIER, E. J.; FISCHER, H. D. The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones. In **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, Springer Vienna, p. 47-320, 1979.

FLAMINI, G.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. Analysis of the essential oil of the leaves and flowers/fruits of *Eupatorium cannabinum* L. from South Tuscany (Central Italy). **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 2, p. 127-129, 2003.

FLAMINI, G.; COSIMI, E.; CIONI, P. L.; MOLFETTA, I.; BRACA, A. Essential-Oil Composition of *Daucus carota* ssp. *major* (Pastinocello Carrot) and Nine Different Commercial Varieties of *Daucus carota* ssp. *sativus* Fruits. **Chemistry & biodiversity**, v. 11, n. 7, p. 1022-1033, 2014.

FOSTER, A. J.; HALL, D. E.; MORTIMER, L.; ABERCROMBY, S.; GRIES, R.; GRIES, G.; MATTSSON, J. Identification of genes in *Thuja plicata* foliar terpenoid defenses. **Plant Physiology**, v. 161, n. 4, p. 1993-2004, 2013.

GARCIA, C. C.; TALARICO, L.; ALMEIDA, N.; COLOMBRES, S.; DUSCHATZKY, C.; DAMONTE, E. B. Virucidal activity of essential oils from aromatic plants of San Luis, Argentina. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 9, p. 1073-1075, 2003.

GAUVIN-BIALECKI, A.; MARODON, C. Essential oil of *Ayapana triplinervis* from Reunion Island: A good natural source of thymohydroquinone dimethyl ether. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 11, p. 853-858, 2008.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. Freeman Cooper & Co, 1969.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J. Z.; XIE, X. Q.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 26, p. 9099-9104, 2008.

GIORDANO-LABADIE, F. Composants parfumés. Nouvelles sources d'exposition aux allergènes de la batterie standard. **Revue Française d'Allergologie**, v. 51, n. 3, p. 306-309, 2011.

GOMES, P. B.; MATA, V. G.; RODRIGUES, A. E. Characterization of the Portuguese-grown *Cistus ladanifer* essential oil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 2, p. 160-165, 2005.

GÓMEZ, F.; QUIJANO, L.; CALDERÓN, J. S.; PERALES, A.; RÍOS, T. 2-Dimethylchromenes from *Eupatorium schembornianum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2095-2097, 1982.

GONG, F.; LIANG, Y. Z.; XU, Q. S. AND CHAU, F. T. Gas chromatography–mass spectrometry and chemometric resolution applied to the determination of essential oils in *Cortex Cinnamomi*. **Journal of Chromatography A**, v. 905, n.1, p. 193-205, 2001.

GONZÁLEZ, A. G.; FRAGA, B. M.; HERNANDEZ, M. G.; GARCÍA, V. P. Eupatarone, a 2-acetylbenzofuran from *Eupatorium sternbergianum*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1826-1827, 1982.

GU, Y.; TING, Z.; QIU, X.; ZHANG, X.; GAN, X.; FANG, Y.; XU, R. Linalool preferentially induces robust apoptosis of a variety of leukemia cells via upregulating p53 and cyclin-dependent kinase inhibitors. **Toxicology**, v. 268, n. 1, p. 19-24, 2010.

GUIGNARD, J. L.; COSSON, L.; HENRY, M. **Abrégé de phytochimie**. Masson, Paris, 1985.

GUO, F. Q.; LIANG, Y. Z.; XU, C. J.; LI, X. N. ; HUANG, L. F. Analyzing of the volatile chemical constituents in *Artemisia capillaris* herba by GC–MS and correlative chemometric resolution methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 35, n.3, p.469-478, 2004.

GUPTA, D.; CHARLES, R.; GARG, S. N. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Eupatorium triplinerve* Vahl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 5, p. 473-475, 2004.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I. M.; DEL RÍO, J. C. Chemical characterization of lignin and lipid fractions in industrial hemp bast fibers used for manufacturing high-quality paper pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 6, p. 2138-2144, 2006.

HALLAHAN, T. W.; CROTEAU, R. Monoterpene biosynthesis: demonstration of a geranyl pyrophosphate: sabinene hydrate cyclase in soluble enzyme preparations from sweet marjoram (*Majorana hortensis*). **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 264, n. 2, p. 618-631, 1988.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 70, n. 5, p. 257-265, 2012.

HAMPEL, D.; MOSANDL, A.; WÜST, M. Biosynthesis of mono- and sesquiterpenes in carrot roots and leaves (*Daucus carota* L.): metabolic cross talk of cytosolic mevalonate and plastidial methylerythritol phosphate pathways. **Phytochemistry**, v. 66, n. 3, p. 305-311, 2005.

HANG, D. T. T.; HANH, T. T. H.; VAN MINH, C.; VAN KIEM, P.; THAI, T. H.; LEE, D.; DAT, N. T. An amorphane sesquiterpene and a benzofuran glucoside from *Eupatorium coelestinum*. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 3, p. 377-379, 2011.

HASTON, E.; RICHARDSON, J. E.; STEVENS, P. F.; CHASE, M. W.; HARRIS, D. J. The Linear Angiosperm Phylogeny Group (LAPG) III: a linear sequence of the families in APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 161, n. 2, p. 128-131, 2009.

HAZZIT, M.; BAALIOUAMER, A.; FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6314-6321, 2006.

HEMMERLIN, A.; HARWOOD, J. L.; BACH, T. J. A *raison d'être* for two distinct pathways in the early steps of plant isoprenoid biosynthesis?. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 2, p. 95-148, 2012.

HERZ, W. Chemistry of the Eupatoriinae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 11, p. 1115-1137, 2001.

- HERZ, Werner. Chemistry of the Oxylobinae. **Biochemical systematics and ecology**, v. 31, n. 9, p. 963-993, 2003
- HERZ, W. Chemistry of the Critoniinae. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1159-1185, 2004.
- HERZ, W.; HÖGENAUER, G. Isolation and structure of Coronopilin, a new sesquiterpene lactone<sup>1</sup>. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 5011-5013, 1961.
- HERZ, W.; HÖGENAUER, G. Ivalin, a new sesquiterpene Lactone<sup>1</sup>. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 27, n. 3, p. 905-910, 1962.
- HOLUB, M.; BUDĚŠÍNSKÝ, M. Sesquiterpene lactones of the Umbelliferae. **Phytochemistry**, v. 25, n. 9, p.2015-2026, 1986.
- HON, P. M.; LEE, C. M.; CHOANG, T. F.; CHUI, K. Y.; WONG, H. N. A ligustilide dimer from *Angelica sinensis*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 4, p. 1189-1191, 1990.
- HU, Y.; KONG, W.; YANG, X.; XIE, L.; WEN, J.; YANG, M. GC–MS combined with chemometric techniques for the quality control and original discrimination of *Curcumae longae rhizome*: Analysis of essential oils. **Journal of separation science**, v. 37, n.4, p.404-411, 2014.
- HUANG, J.; LU, X. Q.; ZHANG, C.; LU, J.; LI, G. Y.; LIN, R. C.; WANG, J. H. Anti-inflammatory ligustilides from *Ligusticum chuanxiong* Hort. **Fitoterapia**, v. 91, p. 21-27, 2013.
- HUO, J.; YANG, S. P.; DING, J.; YUE, J. M. Cytotoxic sesquiterpene lactones from *Eupatorium indleyanum*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 9, p. 1470-1475, 2004.
- IKEZAWA, N.; GÖPFERT, J. C.; NGUYEN, D. T.; KIM, S. U.; O'MAILLE, P. E.; SPRING, O.; RO, D. K. Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio- and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 24, p. 21601-21611, 2011.
- İPEK, E.; TÜYLÜ, B. A.; ZEYTİNOĞLU, H. Effects of carvacrol on sister chromatid exchanges in human lymphocyte cultures. **Cytotechnology**, v. 43, n. 1-3, p. 145-148, 2003.
- IRANSHAHI, M.; EMAMI, S. A.; MAHMOUD-SOLTANI, M. Detection of sesquiterpene lactones in ten *Artemisia* species population of Khorasan Provinces. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 10, n.3, p. 183-188, 2007.
- ITO, M.; WATANABE, K.; KITA, Y.; KAWAHARA, T.; CRAWFORD, D. J.; YAHARA, T. Phylogeny and phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): insights from sequence data of the nrDNA ITS regions and cpDNA RFLP. **Journal of Plant Research**, v. 113, n. 1, p. 79-89, 2000a.
- ITO, M.; YAHARA, T.; KING, R. M.; WATANABE, K.; OSHITA, S.; YOKOYAMA, J.; CRAWFORD, D. J. Molecular phylogeny of *Eupatorieae* (Asteraceae) estimated from cpDNA RFLP and its implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe. **Journal of Plant Research**, v. 113, n. 1, p. 91-96, 2000b.
- ITOH, T.; OYAMA, M.; TAKIMOTO, N.; KATO, C.; NOZAWA, Y.; AKAO, Y.; IINUMA, M. Inhibitory effects of sesquiterpene lactones isolated from *Eupatorium chinense* L. on IgE-mediated degranulation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells and passive cutaneous anaphylaxis reaction in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 3189-3197, 2009.
- JIANG, H. X.; LIU, Q.; GAO, K. Benzofuran derivatives from *Eupatorium fortunei*. **Natural Product Research**, v. 22, n. 11, p. 937-941, 2008.



- JING, L.; LEI, Z.; ZHANG, G.; PILON, A. C.; HUHMANN, D. V.; XIE, R.; XI, W.; ZHOU, Z.; SUMNER, L. W. Metabolite profiles of essential oils in citrus peels and their taxonomic implications. **Metabolomics**, v. 11, n. 4, p. 952-963, 2015.
- JOSHI, R. K. Chemical composition of the essential oils of aerial parts and flowers of *Chromolaena odorata* (L.) RM King & H. Rob. from Western Ghats region of North West Karnataka, India. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 2013a.
- JOSHI, R. K. Chemical composition of the essential oil of *Chromolaena odorata* (L.) RM King & H. Rob. roots from India. **Journal of Chemistry**, v. 2013, 2013b.
- JUDZENTIENE, A. Chemical composition of leaf and inflorescence essential oils of *Eupatorium cannabinum* L. from Eastern Lithuania. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 5, p. 403-406, 2007.
- JUDZENTIENE, A. Chemical composition of the essential oils of wild *Eupatorium cannabinum* L from Lithuania. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 6, n. 3, p. 161-165, 2003.
- KAHRAMAN, A.; CELEP, F.; DOGAN, M. Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 2, p. 187-195, 2010.
- KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. A review of the application and pharmacological properties of  $\alpha$ -bisabolol and  $\alpha$ -bisabolol-rich oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 1, p. 1-7, 2010.
- KAMDEM, D. P.; GAGE, D. A. Chemical composition of essential oil from the root bark of *Sassafras albidum*. **Planta Medica**, v. 61, n. 06, p. 574-575, 1995.
- KARMAKAR, R.; PAHARI, P.; MAL, D. Phthalides and phthalans: synthetic methodologies and their applications in the total synthesis. **Chemical Reviews**, 2014.
- KING, R. M.; ROBINSON, H. **The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. St. Louis: Missouri Botanical Garden, 581 p, 1987.
- KOBA, K.; NÉNONÉNÉ, A. Y.; CATHERINE, G.; RAYNAUD, C.; CHAUMONT, J.; SANDA, K.; LAURENCE, N. Chemical composition and cytotoxic activity of essential oil of *Chromolaena odorata* L. growing in Togo. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 4, p. 423-429, 2011.
- KOSSOUOH, C.; MOUDACHIROU, M.; ADJAKIDJE, V.; CHALCHAT, J.; FIGUÉRÉDO, G.; CHALARD, P. Volatile constituents of *Chromolaena odorata* (L.) RM King & H. Rob. leaves from Benin. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 2, p. 224-228, 2011.
- KOTHARI, S. K.; BHATTACHARYA, A. K.; RAMESH, S. Essential oil yield and quality of methyl eugenol rich *Ocimum tenuiflorum* Lf (syn. *O. sanctum* L.) grown in south India as influenced by method of harvest. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 67-72, 2004.
- KUMETA, Y.; ITO, M. Characterization of  $\delta$ -guaiene synthases from cultured cells of *Aquilaria*, responsible for the formation of the sesquiterpenes in agarwood. **Plant Physiology**, v. 154, n. 4, p. 1998-2007, 2010.
- KUNDU, A.; SAHA, S.; WALIA, S.; SHAKIL, N. A.; KUMAR, J.; ANNAPURNA, K. Cadinene sesquiterpenes from *Eupatorium adenophorum* and their antifungal activity. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, n. 6, p. 516-522, 2013.
- LAFHAL, S.; VANLOOT, P.; BOMBARDA, I.; KISTER, J.; DUPUY, N. Chemometric analysis of French lavender and lavandin essential oils by near infrared spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 156-164, 2016.

LAMATY, G.; MENUT, C.; ZOLLO, P. A.; KUIATE, J. R.; BESSIERE, J.; OUAMBA, J. M. SILOU, T. Aromatic plants of tropical central Africa IV. Essential oils of *Eupatorium odoratum* L. from Cameroon and Congo. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 2, p. 101-105, 1992.

LANCELLE, H. G.; GIORDANO, O. S.; SOSA, M. E.; TONN, C. E. Chemical composition of four essential oils from *Eupatorium* spp. biological activities toward *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). **Revista de la Sociedad Entomológica Argentina**, v. 68, n. 3-4, p. 329-338, 2009.

LARKOV, O.; ZAKS, A.; BAR, E.; LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; MAYER, A. M.; RAVID, U. Enantioselective monoterpene alcohol acetylation in *Origanum*, *Mentha* and *Salvia* species. **Phytochemistry**, v. 69, n. 14, p. 2565-2571, 2008.

LASKA, M. ; TEUBNER, P. Olfactory discrimination ability of human subjects for ten pairs of enantiomers. **Chemical senses**, v. 24, n. 2, p. 161-170, 1999.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR, I.; RAVID, U. Z. I.; PUTIEVSKY, E. L. I.; JOEL, D. M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.; Poaceae). **Annals of Botany**, v. 81, n. 1, p. 35-39, 1998.

LI, X. N.; CUI, H.; SONG, Y. Q.; LIANG, Y. Z. ; CHAU, F. T. Analysis of volatile fractions of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. using GC-MS and chemometric resolution. **Phytochemical Analysis**, v. 14, n.1, p. 23-33, 2003.

LI, Q. Q.; WANG, G.; HUANG, F.; LI, J. M.; CUFF, C. F.; REED, E. Sensitization of lung cancer cells to cisplatin by  $\beta$ -elemene is mediated through blockade of cell cycle progression: antitumor efficacies of  $\beta$ -elemene and its synthetic analogs. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2013a.

LI, Y.; LI, T.; MIAO, C.; LI, J.; XIAO, W.; MA, E.  $\beta$ -Eudesmol induces JNK-dependent apoptosis through the mitochondrial pathway in HL60 cells. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 3, p. 338-343, 2013b.

LIAO, F.; HU, Y.; TAN, H.; WU, L.; WANG, Y.; HUANG, Y.; WEI, Y. Acaricidal activity of 9-oxo-10, 11-dehydroageraphorone extracted from *Eupatorium adenophorum* in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 140, p. 8-11, 2014.

LIAW, C.-C.; KUO Y.-H.; HWANG, T.-L.; SHEN, Y.-C. Eupatozansins A - C, sesquiterpene lactones from *Eupatorium chinense* var. *tozanense*. **Helvetica Chimica Acta**, 91, 2115 – 2121, 2008.

LICHTENTHALER, H. K.; ROHMER, M.; SCHWENDER, J. Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. **Physiologia Plantarum**, v. 101, n. 3, p. 643-652, 1997.

LIMA, P. D. D. B.; GARCIA, M.; RABI, J. A. Selective extraction of  $\alpha$ -methylene- $\gamma$ -lactones. Reinvestigation of *Vanillosmopsis erythropappa*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 6, p. 986-988, 1985.

LIU, Y.; BARRY, B. D.; YU, H.; LIU, J.; LIAO, P.; BI, X. Regiospecific 6-endo-annulation of in situ generated 3, 4-dienamides/acids: synthesis of  $\delta$ -lactams and  $\delta$ -lactones. **Organic Letters**, v. 15, n. 11, p. 2608-2611, 2013.

LIU, L., HUA, Y., WANG, D., SHAN, L., ZHANG, Y., ZHU, J., JIN, H., LI, H., HU, Z.; ZHANG, W. A sesquiterpene lactone from a medicinal herb inhibits proinflammatory activity of TNF- $\alpha$  by inhibiting ubiquitin-conjugating enzyme UbcH5. **Chemistry & biology**, v. 21, n. 10, p.1341-1350, 2014.

LOIZZO, M. R.; BEN JEMIA, M.; SENATORE, F.; BRUNO, M.; MENICHINI, F.; TUNDIS, R. Chemistry and functional properties in prevention of neurodegenerative disorders of five *Cistus* species essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 586-594, 2013.

LOPES, A. A.; PINA, E. S.; SILVA, D. B.; PEREIRA, A. M. S.; SILVA, M. F. G. F.; DA COSTA, F. B.; LOPES, N. P.; PUPO, M. T. A biosynthetic pathway of sesquiterpene lactones in *Smallanthus sonchifolius* and their localization in leaf tissues by MALDI imaging. **Chemical Communications**, v. 49, n. 85, p. 9989-9991, 2013.

LÓPEZ-NOGUEROLAS, M.; CHISVERT, A.; SALVADOR, A. Determination of atranol and chloroatranol in perfumes using simultaneous derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 826, p. 28-34, 2014.

LÖW-BASELLI, A.; HUBER, W. W.; KÄFER, M.; BUKOWSKA, K.; SCHULTE-HERMANN, R.; GRASL-KRAUPP, B. Failure to demonstrate chemoprevention by the monoterpene perillyl alcohol during early rat hepatocarcinogenesis: a cautionary note. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 10, p. 1869-1877, 2000.

LU, S.; XU, R.; JIA, J. W.; PANG, J.; MATSUDA, S. P.; CHEN, X. Y. Cloning and functional characterization of a  $\beta$ -pinene synthase from *Artemisia annua* that shows a circadian pattern of expression. **Plant Physiology**, v. 130, n. 1, p. 477-486, 2002.

LÜCKER, J.; BOWEN, P.; BOHLMANN, J. *Vitis vinifera* terpenoid cyclases: functional identification of two sesquiterpene synthase cDNAs encoding (+)-valencene synthase and (-)-germacrene D synthase and expression of mono- and sesquiterpene synthases in grapevine flowers and berries. **Phytochemistry**, v. 65, n. 19, p. 2649-2659, 2004.

LÜCKER, J.; EL TAMER, M. K.; SCHWAB, W.; VERSTAPPEN, F. W.; VAN DER PLAS, L. H.; BOUWMEESTER, H. J.; VERHOEVEN, H. A. Monoterpene biosynthesis in lemon (*Citrus limon*). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 13, p. 3160-3171, 2002.

LUPIEN, S.; KARP, F.; WILDUNG, M.; CROTEAU, R. Regiospecific cytochrome P450 limonene hydroxylases from Mint (*Mentha*) species: cDNA isolation, characterization, and functional expression of (-)-4S-Limonene-3-hydroxylase and (-)-4<S>-limonene-6-hydroxylase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 368, n. 1, p. 181-192, 1999.

MA, E. L.; LI, Y. C.; TSUNEKI, H.; XIAO, J. F.; XIA, M. Y.; WANG, M. W.; KIMURA, I. K. U. K. O.  $\beta$ -Eudesmol suppresses tumour growth through inhibition of tumour neovascularisation and tumour cell proliferation. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 10, n. 2, p. 159-167, 2008.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 4, p. 612-631, 2010.

MAHMOUD, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trends in Plant Science**, v. 7, n. 8, p. 366-373, 2002.

MAJDI, M.; LIU, Q.; KARIMZADEH, G.; MALBOOBI, M. A.; BEEKWILDER, J.; CANKAR, K.; VOS, R. D.; TODORVIĆ, S.; SIMONVIĆ, A.; BOUWMEESTER, H. Biosynthesis and localization of parthenolide in glandular trichomes of feverfew (*Tanacetum parthenium* L. Schulz Bip.). **Phytochemistry**, v. 72, n. 14, p. 1739-1750, 2011.

MALA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; DA SILVA, M. H. L.; ANDRADE, E. H. A. Essential oils of *Eupatorium triplinerve* Vahl and *E. paniculatum* Poepp. et Endl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, n. 5, p. 541-544, 1999.

MARCO, J. A.; CARDA, M. <sup>13</sup>C NMR spectra of eudesmanolides I—eudesman-12, 6-olides. **Magnetic resonance in chemistry**, v. 25, n. 7, p. 628-634, 1987.

MAREE, J.; KAMATOU, G.; GIBBONS, S.; VILJOEN, A.; van VUUREN, S. The application of GC–MS combined with chemometrics for the identification of antimicrobial compounds from selected commercial essential oils. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 130, p. 172-181, 2014.

MARIN, M.; KOKO, V.; DULETIĆ-LAUŠEVIĆ, S.; MARIN, P. D.; RANČIĆ, D.; & DAJIC-STEVANOVIĆ, Z. Glandular trichomes on the leaves of *Rosmarinus officinalis*: Morphology, stereology and histochemistry. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 3, p. 378-382, 2006.

MARINHO, C. R.; ZACARO, A. A.; VENTRELLA, M. C. Secretory cells in *Piper umbellatum* (Piperaceae) leaves: a new example for the development of idioblasts. **Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 206, n. 12, p. 1052-1062, 2011.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J. M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 24, p. 7115-7121, 2003.

MATZENBACHER, N. I. **Estudo Taxonômico do Gênero *Eupatorium* L. (Compositae) no Rio Grande do Sul, Brasil**. 1979. Tese de Doutorado. Universidade de Federal do Rio Grande do Sul.

MCANALLY, J. A.; JUNG, M.; MO, H. Farnesyl-O-acetylhydroquinone and geranyl-O-acetylhydroquinone suppress the proliferation of murine B16 melanoma cells, human prostate and colon adenocarcinoma cells, human lung carcinoma cells, and human leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 202, n. 2, p. 181-192, 2003.

McGARVEY, D. J.; CROTEAU, R. Terpenoid metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1015, 1995.

MELO, M. M.; HABERMEHL, G. G.; CASTRO, V.; MERFORT, I. Topic utilization of sesquiterpene lactone from *Milleria quinqueflora* on treatment of bothropic envenomation in rabbits. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 57, 548-552, 2005.

MENIN, B.; COMINO, C.; PORTIS, E.; MOGLIA, A.; CANKAR, K.; BOUWMEESTER, H. J.; LANTERI, S.; BEEKWILDER, J. Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. **Plant Science**, v. 190, p. 1-8, 2012.

MEYER, J.; SHAMO, M. K.; GOPHER, D. Information structure and the relative efficacy of tables and graphs. **Human Factors: The Journal of the Human Factors and Ergonomics Society**, v. 41, n. 4, p. 570-587, 1999.

MIGUEL, G.; SIMOES, M.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; CARVALHO, L. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 183-188, 2004.

MILADINOVIĆ, D. L.; ILIĆ, B. S.; MIHAJLOV-KRSTEV, T. M.; NIKOLIĆ, N. D.; MILADINOVIĆ, L. C.; CVETKOVIĆ, O. G. Investigation of the chemical composition–antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 4, p. 1007-1018, 2012.

MILLS, J. J.; CHARI, R. S.; BOYER, I. J.; GOULD, M. N.; JIRTLE, R. L. Induction of apoptosis in liver tumors by the monoterpene perillyl alcohol. **Cancer Research**, v. 55, n. 5, p. 979-983, 1995.

MIMICA-DUKIĆ, N.; BOŽIN, B.; SOKOVIĆ, M.; MIHAJLOVIĆ, B.; MATAVULJ, M. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oils. **Planta Medica**, v. 69, n. 05, p. 413-419, 2003.

- MIRZA, M.; NAJAFPOUR NAVAEI, M.; DINI, M. Volatile constituents of essential oils isolated from flowers and leaves of *Eupatorium cannabinum* L. from Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, p. 149-152, 2006.
- MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D.; BECERRA, J.; SILVA, M.; MENICHINI, F. Thymol derivatives from *Eupatorium glechonophyllum*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 1947-1950, 1984.
- MONKS, N. R.; FERRAZ, A.; BORDIGNON, S.; MACHADO, K. R.; LIMA, M. F.; ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G. In vitro cytotoxicity of extracts from Brazilian Asteraceae. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 7, p. 494-500, 2002.
- MOREL, A. F.; STÜKER, C. Z.; PORTO, C.; SILVA, U.F.; DALCOL, I. I. Óleo essencial de *Eupatorium buniifolium* (ASTERACEAE). In: IV simpósio brasileiro de óleos essenciais, 2007.
- MOSS, G. P.; PREGOSIN, P. S.; RANDALL, E. W. Assignments in the carbon-13 fourier spectra of eudesmanolides. **Journal of Chemical Society, Perkin Transactions**. 1, p. 1525-1527, 1974.
- NAKANISHI, K. **Infrared absorption spectroscopy, practical**. Nankodo, Tokyo, Japan; Holden-Day, San Francisco, Calif., 1962.
- MUSCHIETTI L.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; COUSSIO, J. 5,7,5'-Trihydroxy-3,6,2',4'-tetramethoxyflavone from *Eupatorium buniifolium*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1085-1086, 1994.
- MORALES, M. T.; ALONSO, M. V.; RIOS, J. J.; APARICIO, R. Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2925-2931, 1995.
- NEGI, A.; UPADHYAY, A.; SEMWAL, A.; WAHI, A K. Pharmacognostical Studies on the Leaves of *Eupatorium adenophorum* Spreng. **Pharmacognosy Journal**, v. 2, n. 15, p. 1-7, 2010.
- NIKOLIĆ, M.; MARKOVIĆ, T.; MOJOVIĆ, M.; PEJIN, B.; SAVIĆ, A.; PERIĆ, T.; SOKOVIĆ, M. Chemical composition and biological activity of *Gaultheria procumbens* L. essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 561-567, 2013a.
- NIKOLIĆ, B.; TEŠEVIĆ, V.; ĐORĐEVIĆ, I.; TODOSIJEVIĆ, M.; JADRANIN, M.; BOJOVIĆ, S.; MARIN, P. D. Variability of n-alkanes and nonacosan-10-ol in natural populations of *Picea omorika*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 3, p. 473-483, 2013b.
- NORIN, T. Chiral chemodiversity and its role for biological activity. Some observations from studies on insect/insect and insect/plant relationships. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, n. 11, p. 2043-2049, 1996.
- OBERTI, J. C.; SOSA, V. E.; KULANTHAIVEL, P.; HERZA, W. *Ent*-norlabdane triols from *Austroeupatorium inulaefolium*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 9, p. 2003-2006, 1984.
- OHLOFF, G.; KLEIN, E. Die absolute Konfiguration des Linalools durch Verknüpfung mit dem Pinansystem. **Tetrahedron**, v. 18, n. 1, p. 37-42, 1962.
- OJEDA-SANA, A. M.; VAN BAREN, C. M.; ELECHOSA, M. A.; JUÁREZ, M. A.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, n. 1, p. 189-195, 2013.
- OKUNADE, A. L.; WIEMER, D. F. Ant-repellent sesquiterpene lactones from *Eupatorium quadrangulare*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 1199-1201, 1985.
- OLIVEIRA, A. B.; BARBOSA, G. S.; VERDAM, M. C.; OHANA, D. T.; MENDONÇA, M. S.; MEIRA, R. M. S. A. Efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de trevo-roxo

(*Scutellaria agrestis* A. St.-Hil. ex Benth.-Lamiaceae) em roedores. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 174-181, 2014.

OLIVEIRA, A. L.; POZZA, L. N. L.; SANTOS, D. N.; KAMIMURA, E. S.; VICENTE, E.; CABRAL, F. A. Supercritical extraction of coumarin from guaco (*Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*) for pharmaceutical applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 83, p. 65-71, 2013.

OPITZ, S.; NES, W. D.; GERSHENZON, J. Both methylerythritol phosphate and mevalonate pathways contribute to biosynthesis of each of the major isoprenoid classes in young cotton seedlings. **Phytochemistry**, v. 98, p. 110-119, 2014.

OR, T. C.; YANG, C. L.; LAW, A. H.; LI, J. C.; LAU, A. S. Isolation and identification of anti-inflammatory constituents from *Ligusticum chuanxiong* and their underlying mechanisms of action on microglia. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 6, p. 823-831, 2011.

PADALIA, R. C.; BISHT, D. S.; JOSHI, S. C.; MATHELA, C. S. Chemical composition of the essential oil from *Eupatorium adenophorum* Spreng. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, n. 6, p. 522-524, 2009.

PALA-PAUL, J.; PEREZ-ALONSO, M. J.; VELASCO-NEGUERUELA, A.; SANZ, J. Analysis by gas chromatography–mass spectrometry of the volatile components of *Ageratina adenophora* Spreng.; growing in the Canary Islands. **Journal of Chromatography A**, v. 947, n. 2, p. 327-331, 2002.

PANDEY, A. K.; MOHAN, M.; SINGH, P.; PALNI, U. T.; TRIPATHI, N. N. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activity of essential oil of *Eupatorium adenophorum* Spreng. from Eastern Uttar Pradesh, India. **Food Bioscience**, v. 7, p. 80-87, 2014.

PANERO, J. L.; FREIRE, S. E.; ESPINAR, L. A.; CROZIER, B. S.; BARBOZA, G. E.; CANTERO, J. J. Resolution of deep nodes yields an improved backbone phylogeny and a new basal lineage to study early evolution of Asteraceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 80, p. 43-53, 2014.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 757-782, 2008.

PAOLINI, J.; COSTA, J.; BERNARDINI, A. Analysis of the essential oil from aerial parts of *Eupatorium cannabinum* subsp. *corsicum* (L.) by gas chromatography with electron impact and chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1076, n. 1, p. 170-178, 2005.

PAOLINI, J.; FALCHI, A.; QUILICHINI, Y.; DESJOBERT, J. M.; CIAN, M. C. D.; VARESI, L.; COSTA, J. Morphological, chemical and genetic differentiation of two subspecies of *Cistus creticus* L. (*C. creticus* subsp. *eriocephalus* and *C. creticus* subsp. *corsicus*). **Phytochemistry**, v. 70, n. 9, p. 1146-1160, 2009.

PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; DA CUNHA, F. M.; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323-333, 2007.

PAVIA, D.; GARY, M.; LAMPMAN, G. S.; KRIZ; JAMES, A. V. **Introduction to spectroscopy**, Cengage Learning, 2008.

PELSER, P. B.; WATSON, Linda E. Introduction to Asteroideae. **Systematics, evolution and biogeography of Compositae**, v. 495, p. 502, 2009.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J. Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, v. 155, n. 2, p. 227-237, 2002.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÀ, J.; ASENSIO, D.; MUNNÉ-BOSCH, S. Linking isoprene with plant thermotolerance, antioxidants and monoterpene emissions. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 3, p. 278-286, 2005.

PÉREZ-CAMINO, M. C.; MOREDA, W.; MATEOS, R.; CERT, A. Simultaneous determination of long-chain aliphatic aldehydes and waxes in olive oils. **Journal of Chromatography A**, v. 983, n. 1, p. 283-288, 2003.

PHILLIPS, L. R.; MALSPEIS, L.; SUPKO, J. G. Pharmacokinetics of active drug metabolites after oral administration of perillyl alcohol, an investigational antineoplastic agent, to the dog. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 23, n. 7, p. 676-680, 1995.

PICAUD, S.; OLOFSSON, L.; BRODELIUS, M.; BRODELIUS, P. E. Expression, purification, and characterization of recombinant amorpho-4, 11-diene synthase from *Artemisia annua* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 436, n. 2, p. 215-226, 2005.

PINO, J. A.; ROSADO, A.; FUENTES, V. Essential Oil of *Eupatorium capillifolium* (Lam.) Small from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 1, p. 79-80, 1998.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; PAYO, A.; CHAO, D.; HERRERA, P.; MARTÍ, M. P. Leaf oil of *Koanophyllon villosum* (Sw.) King et Robins. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 4, p. 427-428, 2005.

PLOS, A.; SANCHO, G.; IHARLEGUI, L. Secretory structures of leaves of *Ophryosporus* Meyen (Asteraceae, Eupatorieae), a genus with medicinal properties. **Journal of the Torrey Botanical Society**, v. 138, n. 4, p. 391-399, 2011.

PISUTTHANAN, N.; LIARUANGRATH, B.; LIARUANGRATH, S.; BARAMEE, A.; APISARIYAKUL, A.; KORTH, J.; BREMNER, J. B. Constituents of the essential oil from aerial parts of *Chromolaena odorata* from Thailand. **Natural Product Research**, v. 20, n. 06, p. 636-640, 2006.

PROSSER, I. M.; ADAMS, R. J.; BEALE, M. H.; HAWKINS, N. D.; PHILLIPS, A. L.; PICKETT, J. A.; FIELD, L. M. Cloning and functional characterisation of a *cis*-muuroladiene synthase from black peppermint (*Mentha x piperita*) and direct evidence for a chemotype unable to synthesise farnesene. **Phytochemistry**, v. 67, n. 15, p. 1564-1571, 2006.

QIN, Y.; GUO, Y.; WEI, W.; WANG, B.; JIN, H.; SUN, J.; ZUO, Y. Anti-tumor effect of  $\beta$ -elemene in murine hepatocellular carcinoma cell line H22 depends on the level of c-Met downregulation. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 91-98, 2012.

QIU, Y.; LU, X.; PANG, T.; ZHU, S.; KONG, H.; XU, G. Study of traditional Chinese medicine volatile oils from different geographical origins by comprehensive two-dimensional gas chromatography–time-of-flight mass spectrometry (GC $\times$  GC–TOFMS) in combination with multivariate analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, n. 5, p. 1721-1727, 2007.

RAVIZZA, R.; GARIBOLDI, M. B.; MOLTENI, R.; MONTI, E. Linalool, a plant-derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. **Oncology Reports**, v. 20, n. 3, p. 625-630, 2008.

REIS, M. H.; ALVES, T. L. S.; SOARES, G. L. G.; ZINI, C. A. Composição Química e Atividade Antioxidante do Óleo Essencial de Folhas de *Eupatorium ligulaefolium* Hook. & Arn (Asteraceae). In: XII COLACRO Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas, 2008, Florianópolis. **Anais do XII COLACRO Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas**, 2008.

ROBINSON, H.; SCHILLING, E.; PANERO, J. L. Eupatorieae. **Systematics, evolution and biogeography of Compositae**, eds. VA Funk, A. Susanna, TF Stuessy, and RJ Bayer. Vienna: IAPT, p. 731-744, 2009.

ROOKS, L. E.; TUTEN, J. A.; HABER, W. A.; LAWTON, R. O.; SETZER, W. N. The antimicrobial activity and composition of *Fleischmannia pratensis* leaf essential oil from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 2, p. 219-223, 2010.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

RÜCKER, G.; SCHENKEL, E. P.; MANNS, D.; MAYER, R.; HEIDEN, K.; HEINZMANN, B. M. Sesquiterpene peroxides from *Senecio selloi* and *Eupatorium rufescens*. **Planta Medica**, v. 62, n. 06, p. 565-566, 1996.

RUIZ DEL CASTILLO, M. L.; BLANCH, G. P.; HERRAIZ, M. Natural variability of the enantiomeric composition of bioactive chiral terpenes in *Mentha piperita*. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 87-93, 2004.

RYCROFT, D. S.; COLE, W. J.; ASLAM, N.; LAMONT, Y. M.; GABRIEL, R. Killarniensolide, methyl orsellinates and 9,10-dihydrophenanthrenes from the liverwort *Plagiochila killarniensis* from Scotland and the Azores. **Phytochemistry**, v. 50, n. 7, p. 1167-1173, 1999.

ŠAJNA, N.; ŠUŠTAR-VOZLIČ, J.; KALIGARIČ, M. New insights into the anatomy of an endemic *Hladnikia pastinacifolia* Rchb. **Acta Botanica Croatica**, v. 73, n. 2, p. 375-384, 2014.

SALLAUD, C.; RONTEIN, D.; ONILLON, S.; JABÈS, F.; DUFFÉ, P.; GIACALONE, C.; TISSIER, A. A novel pathway for sesquiterpene biosynthesis from Z, Z-farnesyl pyrophosphate in the wild tomato *Solanum habrochaites*. **The Plant Cell Online**, v. 21, n. 1, p. 301-317, 2009.

SÁNCHEZ-MENDOZA, M. E.; REYES-TREJO, B.; SÁNCHEZ-GÓMEZ, P.; RODRÍGUEZ-SILVERIO, J.; CASTILLO-HENKEL, C.; CERVANTES-CUEVAS, H.; ARRIETA, J. Bioassay-guided isolation of an anti-ulcer chromene from *Eupatorium aschenbornianum*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfydryls. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 66-71, 2010.

SANI, Y.; HARPER, P. A. W.; COOK, R. L.; SEAWRIGHT, A. A.; NG, J. C.; JAMES, L. F.; HEGARTY, M. P. The toxicity of *Eupatorium adenophorum* for the liver of the mouse. In **Poisonous plants. Proceedings of the Third International Symposium**. Iowa State University Press. pp. 626-629, 1992.

SAVAGE, T. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of monoterpenes: regio- and stereochemistry of (+)-3-carene biosynthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 305, n. 2, p. 581-587, 1993.

SCHILLING, E. E. Hybrid genera in Liatrinae (Asteraceae: Eupatorieae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 59, n. 1, p. 158-167, 2011.

SCHMIDT, C. O.; BOUWMEESTER, H. J.; FRANKE, S.; KÖNIG, W. A. Mechanisms of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*. **Chirality**, v. 11, n. 5-6, p. 353-362, 1999.

SCHMIDT, G. J.; SCHILLING, E. E. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. **American Journal of Botany**, v. 87, n. 5, p. 716-726, 2000.

SCHMIDT, C.; FRONZA, M.; GOETTERT, M.; GELLER, F.; LUIK, S.; FLORES, E. M. M.; MERFORT, I. Biological studies on Brazilian plants used in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 3, p. 523-532, 2009.



SCHNEE, C.; KÖLLNER, T. G.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)- $\beta$ -farnesene, (E)-nerolidol, and (E, E)-farnesol after herbivore damage. **Plant Physiology**, v. 130, n. 4, p. 2049-2060, 2002.

SCHOSSLER, P.; SCHNEIDER, G. L.; WUNSCH, D.; SOARES, G. L. G.; ZINI, C. A. Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 277-287, 2009.

SCHULZ, H.; QUILITZSCH, R.; KRÜGER, H. Rapid evaluation and quantitative analysis of thyme, origano and chamomile essential oils by ATR-IR and NIR spectroscopy. **Journal of Molecular Structure**, v. 661, p.299-306, 2003.

SCHWENDER, J.; GEMÜNDEN, C.; LICHTENTHALER, H. K. Chlorophyta exclusively use the 1-deoxyxylulose 5-phosphate/2-C-methylerythritol 4-phosphate pathway for the biosynthesis of isoprenoids. **Planta Medica**, v. 212, n. 3, p. 416-423, 2001.

SCOTT, S. L.; AARSSSEN, L. W. Within-species leaf size–number trade-offs in herbaceous angiosperms. **Botany**, v. 90, n. 3, p. 223-235, 2012.

SELL, C. **Chemistry of Essential Oils**. In: **Handbook of essential oils: Science, technology, and applications**, CRC PRESS, Boca Raton, London, New York p. 121, 2009.

SENATORE, F.; DE FUSCO, R.; NAPOLITANO, F. *Eupatorium cannabinum* L. ssp. *cannabinum* (Asteraceae) essential oil: chemical composition and antibacterial activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 13, n. 6, p. 463-466, 2001.

SHARMA, K.; SAIKIA, A. K.; SHARMA, H.; SAHARIAH, B. J.; DEKA S.; DAS, B. Chemical composition and antimicrobial study of essential oil from the leaves of *Eupatorium odoratum* Linn. from upper Assam region. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 482-488, 2013.

SHARMA, O. P.; DAWRA, R. K.; KURADE, N. P.; SHARMA, P. D. A review of the toxicosis and biological properties of the genus *Eupatorium*. **Natural Toxins**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 1998.

SHARON-ASA, L.; SHALIT, M.; FRYDMAN, A.; BAR, E.; HOLLAND, D.; OR, E.; EYAL, Y. Citrus fruit flavor and aroma biosynthesis: isolation, functional characterization, and developmental regulation of *Cstps1*, a key gene in the production of the sesquiterpene aroma compound valencene. **The Plant Journal**, v. 36, n. 5, p. 664-674, 2003.

SIEBERTZ, R.; PROKSCH, P.; WRAYA, V.; WITTE, L. Accumulation and biosynthesis of benzofurans in root cultures of *Eupatorium cannabinum*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 3, p. 789-793, 1989.

SILVESTRE, A. J.; CAVALEIRO, J. S.; DELMOND, B.; FILLIATRE, C.; BOURGEOIS, G. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 1, p.27-33, 1997.

SOUSA, A. C.; GATTASS, C. R.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. *Melissa officinalis* L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 5, p. 677-681, 2004.

SOUZA, T. J. T. *Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de Eupatorium L. (Asteraceae)*. Dissertação de Mestrado. Porto Alegre: UFRGS (2007) 232p.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium ivifolium* L. var. *hirsutum* e *Eupatorium inulifolium* HBK. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia, SP. **Anais do 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2006a.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. In: XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Salvador, Bahia, 2006. **Anais do XIX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2006b.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZEMBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium macrocephalum* Less. (Asteraceae). In: Primeiro Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, Cidade do México, México, 2006. **Anais do Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia**, 2006c.

SOUZA, T. J.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 368-372, 2007.

STAMENIĆ, M.; ZIZOVIC, I. The mathematics of modelling the supercritical fluid extraction of essential oils from glandular trichomes. **Computers & Chemical Engineering**, v. 48, p. 89-95, 2013.

STAMENIĆ, M.; ZIZOVIC, I.; ORLOVIĆ, A.; SKALA, D. Mathematical modelling of essential oil SFE on the micro-scale-classification of plant material. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 3, p. 285-292, 2008.

STARK, M. J.; BURKE, Y. D.; MCKINZIE, J. H.; AYOUBI, A. S.; CROWELL, P. L. Chemotherapy of pancreatic cancer with the monoterpene perillyl alcohol. **Cancer Letters**, v. 96, n. 1, p. 15-21, 1995.

STAYROOK, K. R.; MCKINZIE, J. H.; BURKE, Y. D.; BURKE, Y. A.; CROWELL, P. L. Induction of the apoptosis-promoting protein Bak by perillyl alcohol in pancreatic ductal adenocarcinoma relative to untransformed ductal epithelial cells. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 8, p. 1655-1658, 1997.

STEELE, C. L.; CROCK, J.; BOHLMANN, J.; CROTEAU, R. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of  $\delta$ -selinene synthase and  $\gamma$ -humulene synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2078-2089, 1998.

STEINGASS, C. B.; JUTZI, M.; MÜLLER, J.; CARLE, R.; SCHMARR, H. G. Ripening-dependent metabolic changes in the volatiles of pineapple (*Ananas comosus* (L.) Merr.) fruit: II. Multivariate statistical profiling of pineapple aroma compounds based on comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 407, n. 9, p.2609-2624, 2015.

SU, S.; HUA, Y.; DUAN, J. A.; SHANG, E.; TANG, Y.; BAO, X.; LU, Y.; DING, A. Hypothesis of active components in volatile oil from a Chinese herb formulation, 'Shao-Fu-Zhu-Yu decoction', using GC-MS and chemometrics. **Journal of separation science**, v. 31, n. 6-7, p. 1085-1091, 2008.

SUBKI, S. Y.; JAMAL, J. A.; HUSAIN, K.; MANSHOOR, N. Characterisation of leaf essential oils of three *Cinnamomum* species from Malaysia by gas chromatography and multivariate data analysis. **Pharmacognosy Journal**, v. 5, n. 1, p. 22-29, 2013.

SVOBODA, K. P.; SVOBODA, T. G.; SYRED, A. D.; SYRED, P. M. **Secretory structures of aromatic and medicinal plants: a review and atlas of micrographs**. Microscopix Publications, 2000.

- WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. **Chemometrics and intelligent laboratory systems**, v. 58, n. 2, p. 109-130, 2001.
- TAKAHASHI, S.; YEO, Y.; GREENHAGEN, B. T.; MCMULLIN, T.; SONG, L.; MAURINA-BRUNKER, J.; ROSSON, R.; NOEL, J. P.; CHAPPELL, J.. Metabolic engineering of sesquiterpene metabolism in yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 170-181, 2007.
- TAKAHASHI, S.; ZHAO, Y.; O'MAILLE, P. E.; GREENHAGEN, B. T.; NOEL, J. P.; COATES, R. M.; CHAPPELL, J. Kinetic and molecular analysis of 5-epiaristolochene 1, 3-dihydroxylase, a cytochrome P450 enzyme catalyzing successive hydroxylations of sesquiterpenes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 5, p. 3686-3696, 2005.
- TANKEU, S. Y.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M.; SANDASI, M.; KAMATOU, G. P. Essential oil variation of *Tagetes minuta* in South Africa—A chemometric approach. **Biochemical systematics and ecology**, v. 51, p.320-327, 2013.
- TASHKHODZHAEV, B.; ABDUAZIMOV, B.K. Stereochemistry of sesquiterpenes of the germacrane type. **Chemistry of natural compounds**, v. 33, n. 4, p.382-388, 1997.
- TELICI, I.; DEMIRTAS, I.; BAYRAM, E.; ARABACI, O.; KACAR, O. Environmental variation on aroma components of pulegone/piperitone rich spearmint (*Mentha spicata* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 588-592, 2010.
- TALEB, H. S.; OLIVEIRA, D. C. R.; LOPES, J. L. C. Constituents of *Grazielia gaudichaudiana* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 5, p. 547-549, 1999.
- TEOH, K. H.; POLICHUK, D. R.; REED, D. W.; NOWAK, G.; COVELLO, P S. *Artemisia annua* L.(Asteraceae) trichome-specific cDNAs reveal CYP71AV1, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the antimalarial sesquiterpene lactone artemisinin. **FEBS letters**, v. 580, n. 5, p. 1411-1416, 2006.
- TEPE, B.; DONMEZ, E.; UNLU, M.; CANDAN, F.; DAFERERA, D.; VARDAR-UNLU, G.; SOKMEN, A. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). **Food Chemistry**, v. 84, n. 4, p. 519-525, 2004.
- TONZIBO, Z. F.; WOGNIN, E.; CHALCHAT, J. C.; N'GUESSAN, Y.T.. Chemical investigation of *Chromolaena odorata* L. King Robinson from ivory coast. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. 2, p. 94-100, 2007.
- TORI, M.; OHARA, Y.; NAKASHIMA, K.; SONO, M. Thymol derivatives from *Eupatorium fortunei*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 8, p. 1048-1051, 2001.
- TRIANA, J.; BAHSAS, A.; DELGADO, P.; JAIMES, R.; TREJO, C. D. *Ent*-Norlabdanes and other constituents of four Venezuelan species previously classified in the genus *Eupatorium*. **Journal of Natural Products**, v. 58, 744–747. 1993.
- TSUNEKI, H.; MA, E. L.; KOBAYASHI, S.; SEKIZAKI, N.; MAEKAWA, K.; SASAOKA, T.; KIMURA, I. Antiangiogenic activity of  $\beta$ -eudesmol in vitro and in vivo. **European Journal of Pharmacology**, v. 512, n. 2, p. 105-115, 2005.
- UMEMURA, K.; ITOH, T.; HAMADA, N.; FUJITA, Y.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; MATSUURA, N.; IINUMA, M.; ITO, M. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Nrf2/ARE activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 4, p. 948-954, 2008.

UMLAUF, D.; ZAPP, J.; BECKER, H.; ADAM, K. P. Biosynthesis of the irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and other isoprenoids in *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 17, p. 2463-2470, 2004.

UNNIKRISHNAN, P. K.; VARUGHESE, T.; SREEDHAR, S.; BALAN, N.; BALACHANDRAN, I.; REMA SHREE, A. B.. Study on *Eupatorium triplinerve* Vahl from South India, a rich source for thymohydroquinone dimethylether and its antimicrobial activity. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 4, p. 652-657, 2014.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANDAN, F.; SÖKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, M.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 63-67, 2003.

van den BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H. C.; WESTERHUIS, J. A.; SMILDE, A. K.; van der WERF, M. J. Centering, scaling, and transformations: improving the biological information content of metabolomics data. **BMC genomics**, v. 7, n. 1, p. 142, 2006.

van VELZEN, E. J.; WESTERHUIS, J. A.; van DUYNHOVEN, J. P.; van DORSTEN, F. A.; HOEFSLOOT, H. C.; JACOBS, D. M.; SMIT, S.; DRAIJER, R.; KRONER, C. I.; SMILDE, A. K. Multilevel data analysis of a crossover designed human nutritional intervention study. **J. Proteome Res.**; v. 7, n. 10, p. 4483-4491, 2008.

VERTREES, G. L.; MAHLBERG, P. G. Structure and ontogeny of laticifers in *Cichorium intybus* (Compositae). **American Journal of Botany**, p. 764-771, 1978.

VICHNEWSKI, W.; MURARI, R.; HERZ, W. New clerodanes from *Symphiopappus itatiayensis*. **Phytochemistry**, v. 18, n. 1, p. 129-130, 1979.

VOIRIN, B.; BRUN, N.; BAYET, C. Effect of day length on the essential oil of leaves of *Mentha piperita*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 749-755, 1990.

WANG, M.; AVULA, B.; WANG, Y.H.; ZHAO, J.; AVONTO, C.; PARCHER, J. F.; RAMAN, V.; ZWEIGENBAUM, J. A.; WYLIE, P. L.; KHAN, I. A. An integrated approach utilising chemometrics and GC/MS for classification of chamomile flowers, essential oils and commercial products. **Food chemistry**, v. 152, p.391-398, 2014.

WANG, W. J.; WANG, Y.; ZHANG, Q. W.; ZHANG, X. Q.; YANG, T. T.; DAI, Y.; WANG, L.; ZHANG, L. H.; YE, W. C. Chemical constituents from *Eupatorium chinense*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 9, p. 845-850, 2011.

WANG, Y.; SINGH, R.; LEFKOWITCH, J. H.; RIGOLI, R. M.; CZAJA, M. J. Tumor necrosis factor-induced toxic liver injury results from JNK2-dependent activation of caspase-8 and the mitochondrial death pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 22, p. 15258-15267, 2006.

WANG, Y.; YANG, C.; LI, S.; YANG, L.; WANG, Y.; ZHAO, J.; & JIANG, Q. Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HP-SPME with GC-MS. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 356-364, 2009.

WASHINGTON, V. D.; PALAZZO, M. C.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. The chemical composition and antibacterial activity of the leaf essential oil of *Neomirandea angularis* (Asteraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 13, n. 1, p. 108-111, 2010.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3, 7, 11-trimethyl-, 6, 10-dodecatriene (nerolidol). **Carcinogenesis**, v. 12, n. 1, p. 151-152, 1991.

- WEITMANN, M.; MAJOR, D. T. Challenges posed to bornyl diphosphate synthase: diverging reaction mechanisms in monoterpenes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 18, p. 6349-6360, 2010.
- WERKER, E.; FAHN, A. Secretory hairs of *Inula viscosa* (L.) Ait.-development, ultrastructure, and secretion. **Botanical Gazette**, p. 461-476, 1981.
- WESTERHUIS, J. A.; van VELZEN, E. J.; HOEFSLOOT, H. C.; SMILDE, A.K. Multivariate paired data analysis: multilevel PLSDA versus OPLSDA. **Metabolomics**, v. 6, n. 1, p. 119-128, 2010.
- WOERDENBAG, H. J.; HENDRIKS, H.; MALINGRÉ, T. M.; VAN STRALEN, R.; VAN DEN BERG, K. J.; KONINGS, A. W. T. In vitro cytotoxicity of sesquiterpene lactones from *Eupatorium cannabinum* L. and semi-synthetic derivatives from eupatoriopicrin. **Phytotherapy Research**, v. 2, n. 3, p. 109-114, 1988.
- WOJTUNIK, K. A.; CIESLA, L. M.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 37, p. 9088-9094, 2014.
- WÖLWER-RIECK, U.; MAY, B.; LANKES, C.; WÜST, M. Methylerythritol and mevalonate pathway contributions to biosynthesis of mono-, sesqui-, and diterpenes in glandular trichomes and leaves of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 11, p. 2428-2435, 2014.
- WRIESSNEGGER, T.; AUGUSTIN, P.; ENGLEDER, M.; LEITNER, E.; MÜLLER, M.; KALUZNA, I.; PICHLER, H. Production of the sesquiterpenoid (+)-nootkatone by metabolic engineering of *Pichia pastoris*. **Metabolic Engineering**, v. 24, p. 18-29, 2014.
- WÜST, M.; LITTLE, D. B.; SCHALK, M.; CROTEAU, R. Hydroxylation of limonene enantiomers and analogs by recombinant (-)-limonene 3- and 6-hydroxylases from Mint (*Mentha*) species: evidence for catalysis within sterically constrained active sites. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 387, n. 1, p. 125-136, 2001.
- XIAO-RU, L.; YI-ZENG, L.; FANG-QIU, G.; XIAO-NING, L.; ZHONG-DA, Z. Analysis of Volatile Oil in *Semen Persicae-Flos Carthami* by Gas Chromatography-Mass Spectrometry and Chemometric Resolution Method. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 35, n.4, p. 532, 2007.
- XU, L.; TAO, S.; WANG, X.; YU, Z.; WANG, M.; CHEN, D.; DONG, J. The synthesis and anti-proliferative effects of  $\beta$ -elemene derivatives with mTOR inhibition activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 15, p. 5351-5356, 2006.
- XU, Q. L.; ZHANG, M.; ZHOU, Z. Y.; LIU, W. X.; WAN, F. H.; WANG, H. F.; TAN, J. W. Two new carene-type monoterpenes from aerial parts of *Ageratina adenophora*. **Phytochemistry Letters**, v. 9, p. 123-126, 2014.
- YADEGARINIA, D.; GACHKAR, L.; REZAEI, M. B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Phytochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, 2006.
- YAO, Y. Q.; DING, X.; JIA, Y. C.; HUANG, C. X.; WANG, Y. Z.; XU, Y. H. Anti-tumor effect of  $\beta$ -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. **Cancer Letters**, v. 264, n. 1, p. 127-134, 2008.

YE, G.; HUANG, X. Y.; LI, Z. X.; FAN, M. S.; HUANG, C. G. A new cadinane type sesquiterpene from *Eupatorium lindleyanum* (Compositae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 9, p. 741-744, 2008.

YOO, C. B.; HAN, K. T.; CHO, K. S.; HA, J.; PARK, H. J.; NAM, J. H.; LEE, K. T. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer Letters**, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005.

YOSHIOKA, H.; MABRY, T. J.; TIMMERMANN, B. N.; **Sesquiterpene Lactones - Chemistry, NMR and Plant Distribution**; University of Tokyo Press: Japan, 1973, p. 336.

YUE, J. M.; HUO, J.; WANG, Y.; LOU, L. G.; YANG, S. P. Cytotoxic sesquiterpenoids from *Eupatorium chinense*. **Journal of Natural Products**, 67, 638-643, 2004.

ZEYTINOGLU, H.; INCESU, Z.; BASER, K. H. C. Inhibition of DNA synthesis by carvacrol in mouse myoblast cells bearing a human *N-RAS* oncogene. **Phytomedicine**, v. 10, n. 4, p. 292-299, 2003.

ZIDORN, C. Sesquiterpene lactones and their precursors as chemosystematic markers in the tribe Cichorieae of the Asteraceae. **Phytochemistry**, v. 69, n. 12, p. 2270-2296, 2008.

ZIZOVIC, I.; STAMENIĆ, M.; ORLOVIĆ, A.; SKALA, D. Supercritical carbon dioxide essential oil extraction of Lamiaceae family species: Mathematical modelling on the micro-scale and process optimization. **Chemical Engineering Science**, v. 60, n. 23, p. 6747-6756, 2005.

ZIZOVIC, I.; STAMENIĆ, M.; ORLOVIĆ, A.; SKALA, D. Supercritical carbon dioxide extraction of essential oils from plants with secretory ducts: mathematical modelling on the micro-scale. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 39, n. 3, p. 338-346, 2007.

ZUZARTE, M. R.; DINIS, A. M.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. R.; CANHOTO, J. M. Trichomes, essential oils and *in vitro* propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 3, p. 580-587, 2010.

ZYGADLO, J. A.; LAMARQUE, A. L.; GROSSO, N. R.; ESPINAR, L. A. Analysis of the essential oil of the leaves of *Eupatorium arnotianum* Griseb. **Journal of Essential Oil Research**, v. 7, n. 6, p. 677-678, 1995.

БОЙКО, Э. В.; ВОЙКО, Е. В. ТРИХОМЫ СЕМЯНОК ВИДОВ ASTERACEAE. II. ЖЕЛЕЗИСТЫЕ ВОЛОСКИ АЧЕНЕ TRICHOMES OF ASTERACEAE. II. GLANDULAR HAIRS. *Turczaninowia*, v. 15, n. 2, p. 85-95, 2012.

## ANEXO 1





## Análise infravermelho dos extratos diclorometano superficiais das partes aéreas de espécies de *Eupatorium*

### *Eupatorium ivifolium* – partes aéreas

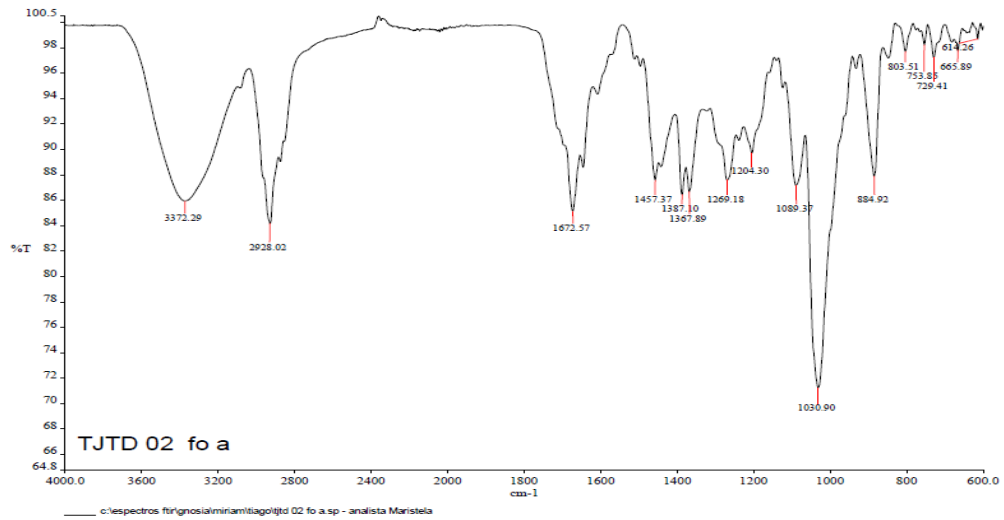


Figura A1.1: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das partes aéreas de *Eupatorium ivifolium*.

### *Eupatorium gaudichaudianum* – partes aéreas

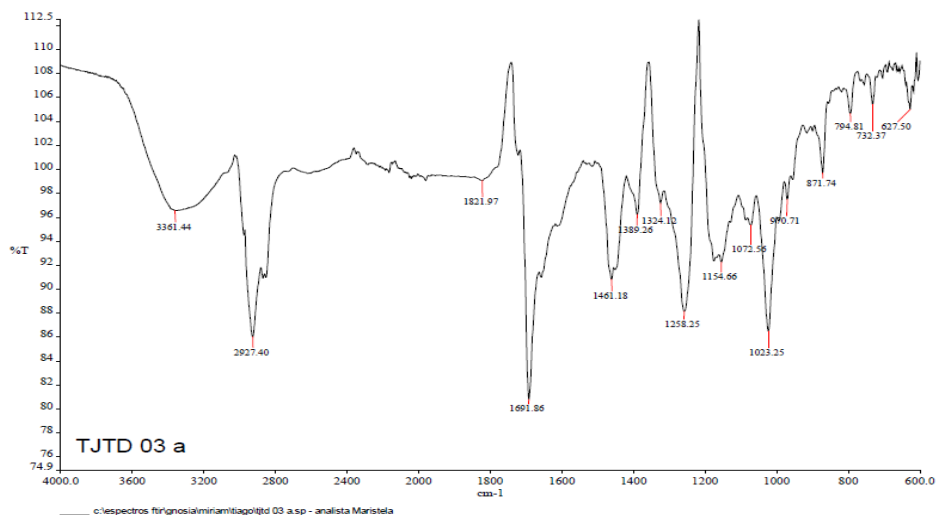


Figura A1.2: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das partes aéreas de *Eupatorium gaudichaudianum*.

### *Eupatorium polystachyum* – partes aéreas

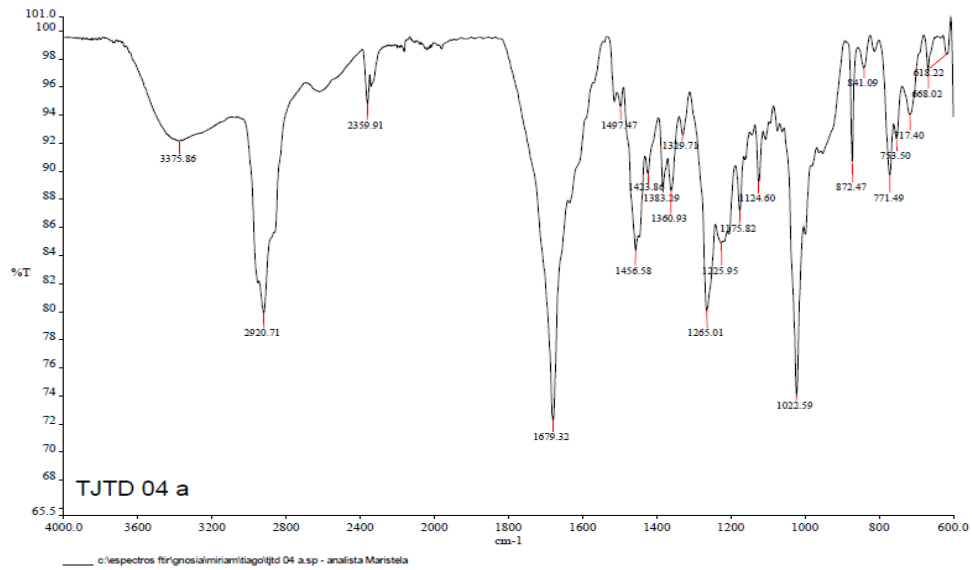


Figura A1.3: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das partes aéreas de *Eupatorium polystachyum*.

### *Eupatorium laevigatum* – folhas

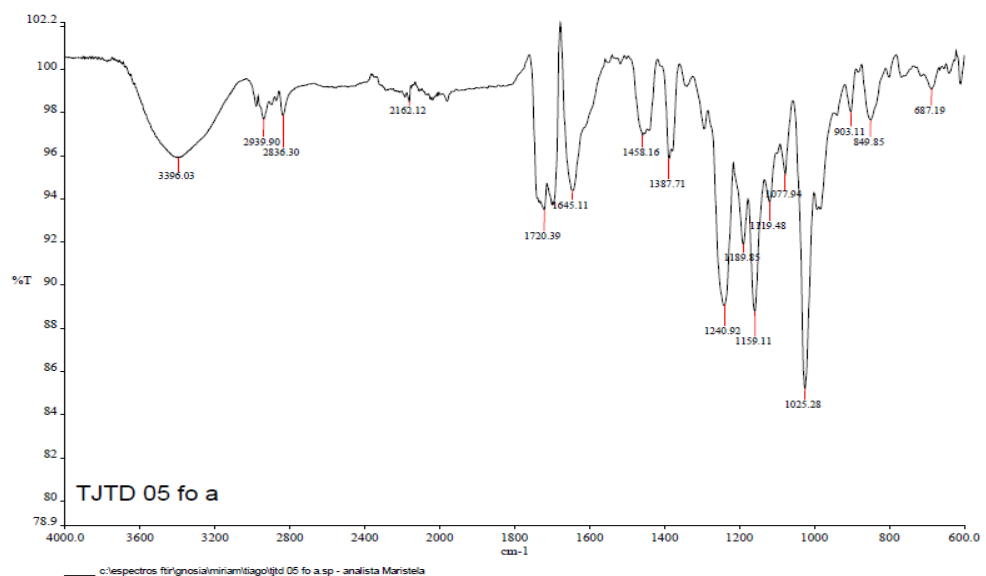


Figura A1.4: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das folhas de *Eupatorium laevigatum*.

### *Eupatorium laevigatum* – inflorescências

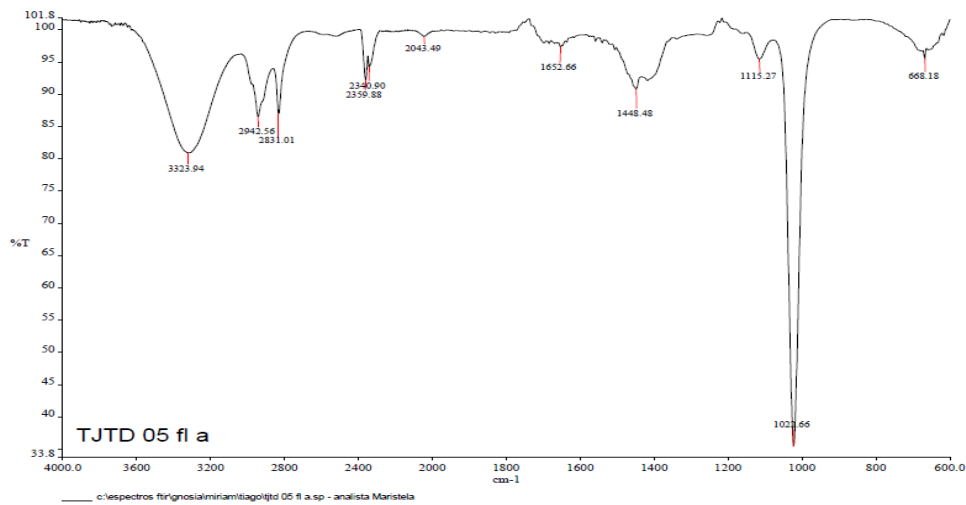


Figura A1.5: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das inflorescências de *Eupatorium laevigatum*.

### *Eupatorium picturatum* – folhas

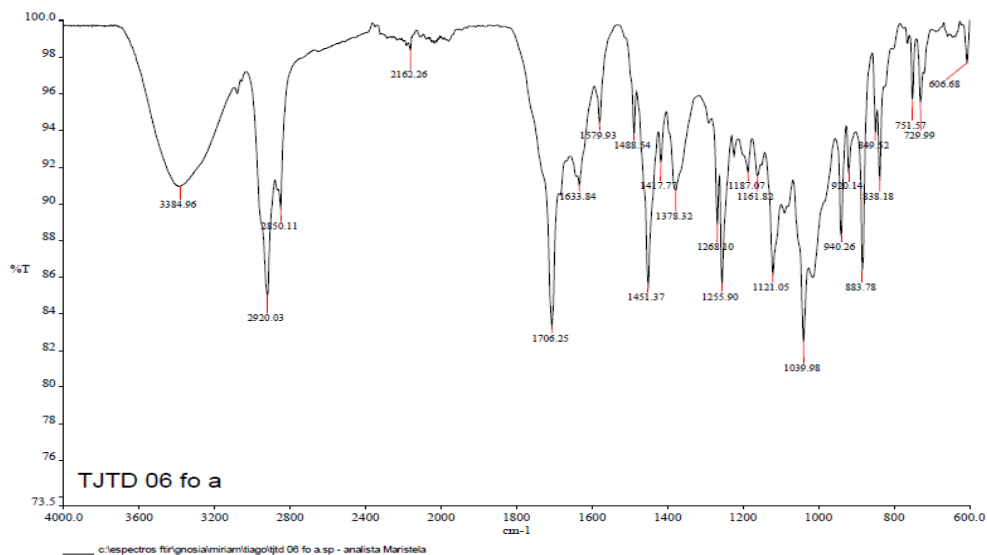


Figura A1.6: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das folhas de *Eupatorium ivifolium*.

## *Eupatorium picturatum* – inflorescências

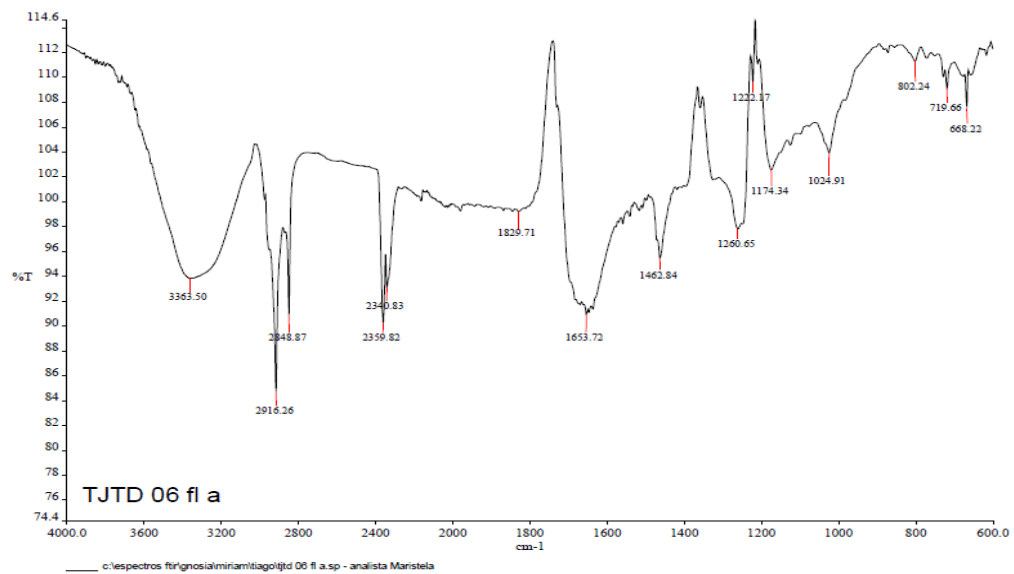
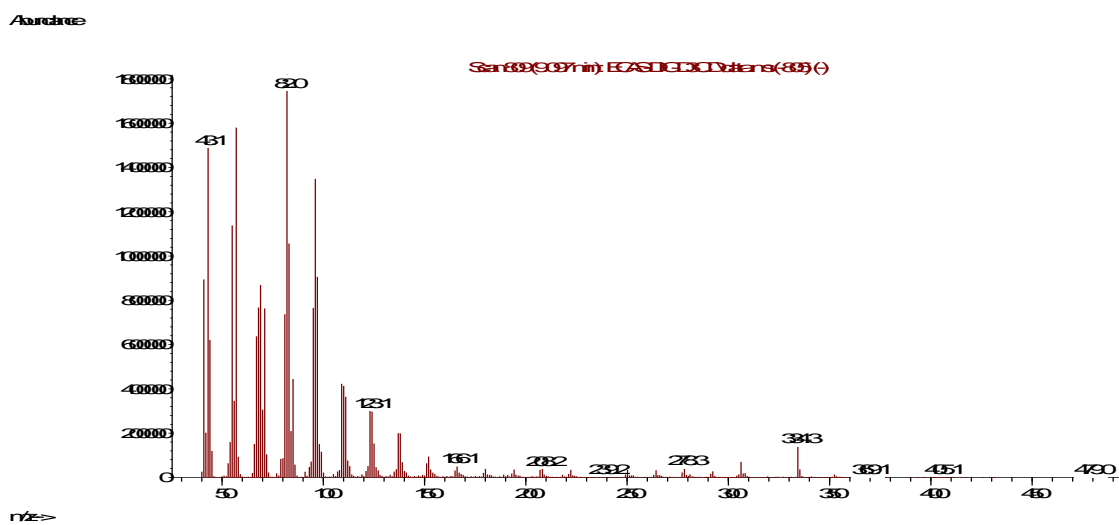


Figura A1.7: Espectro infravermelho do extrato diclorometano das inflorescências de *Eupatorium picturatum*.

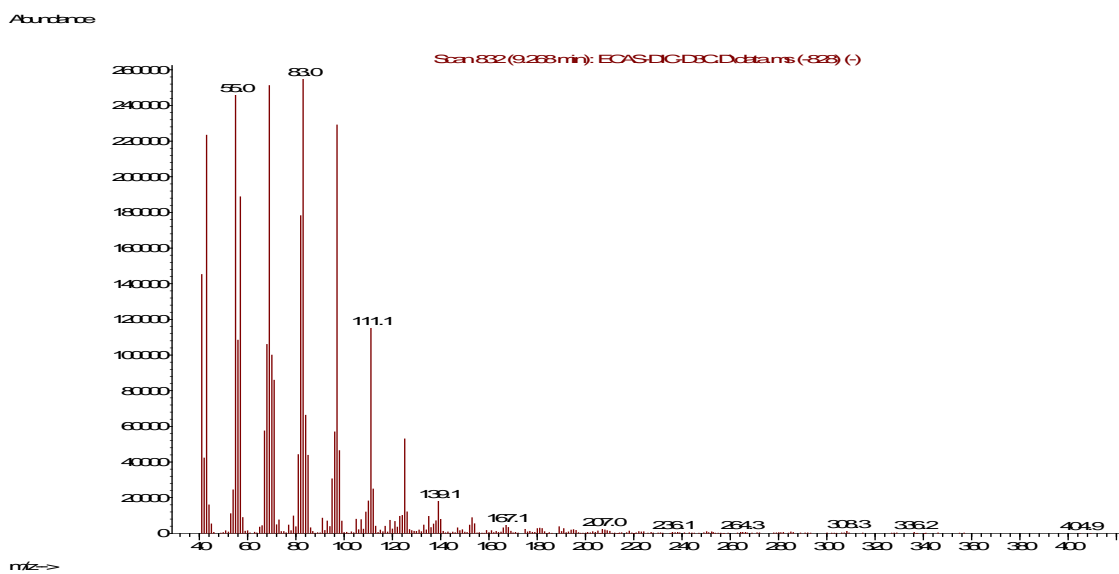
## ANEXO 2



## Espectros de massa da fração D3 do extrato diclorometano de *Eupatorium casarettoi*

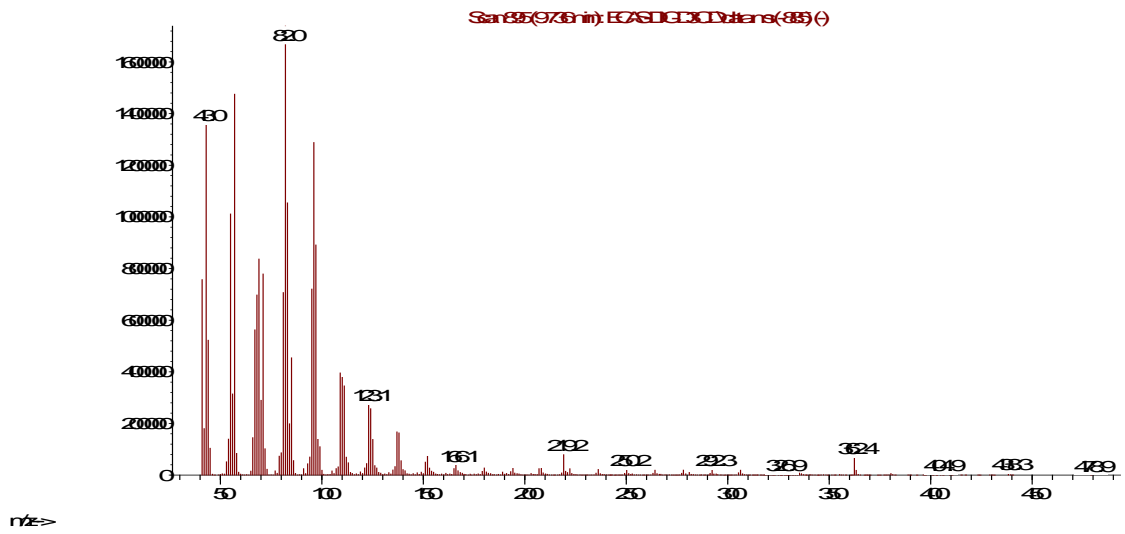


Espectro de massas identificado como tetracosanal (aldeído mirístico).



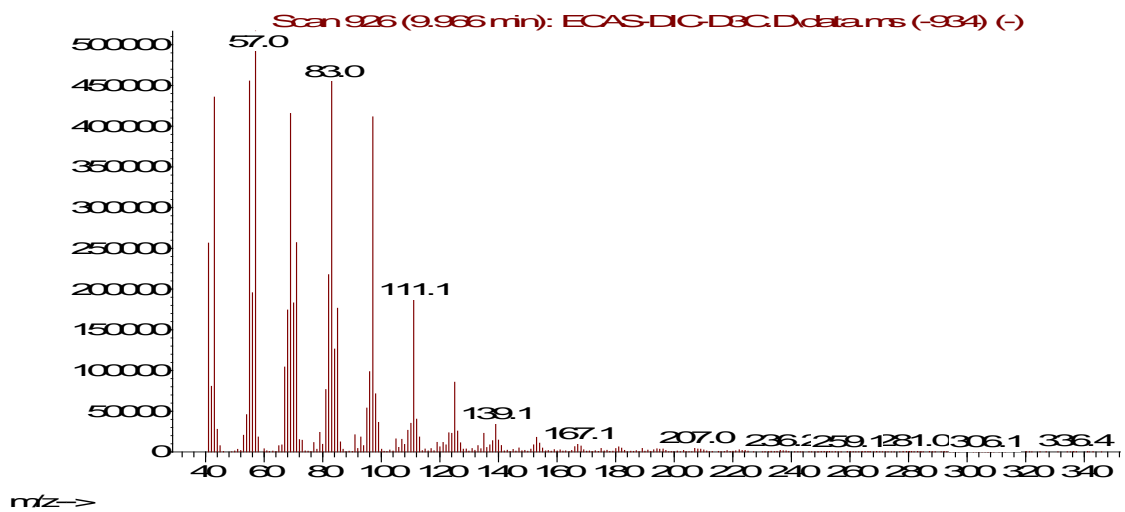
Não identificado

Abundance



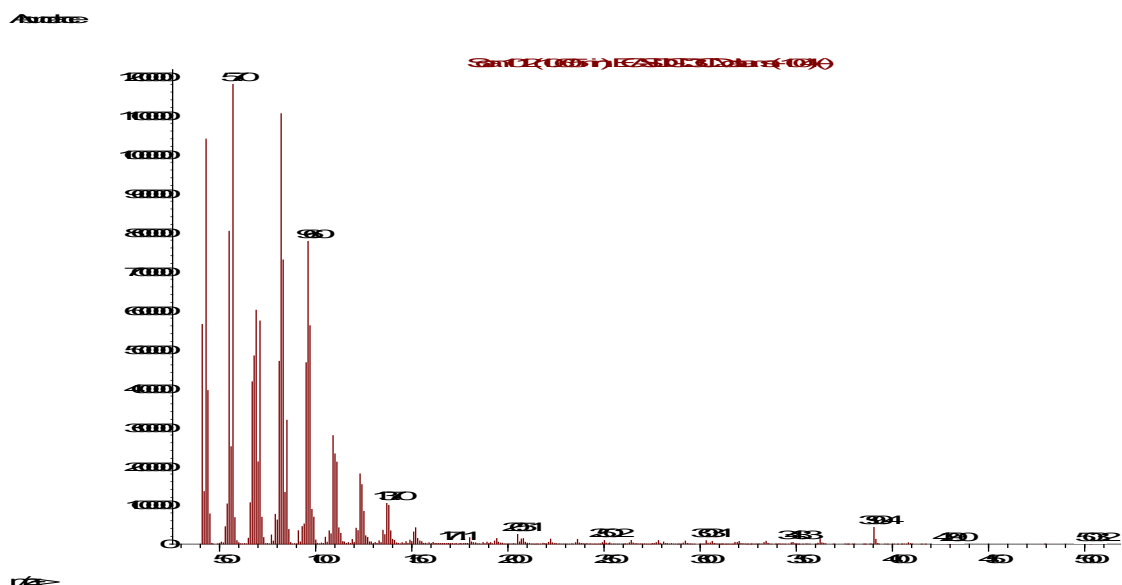
Espectro de massas identificado como hexacosanal (aldeído cerótico).

Abundance

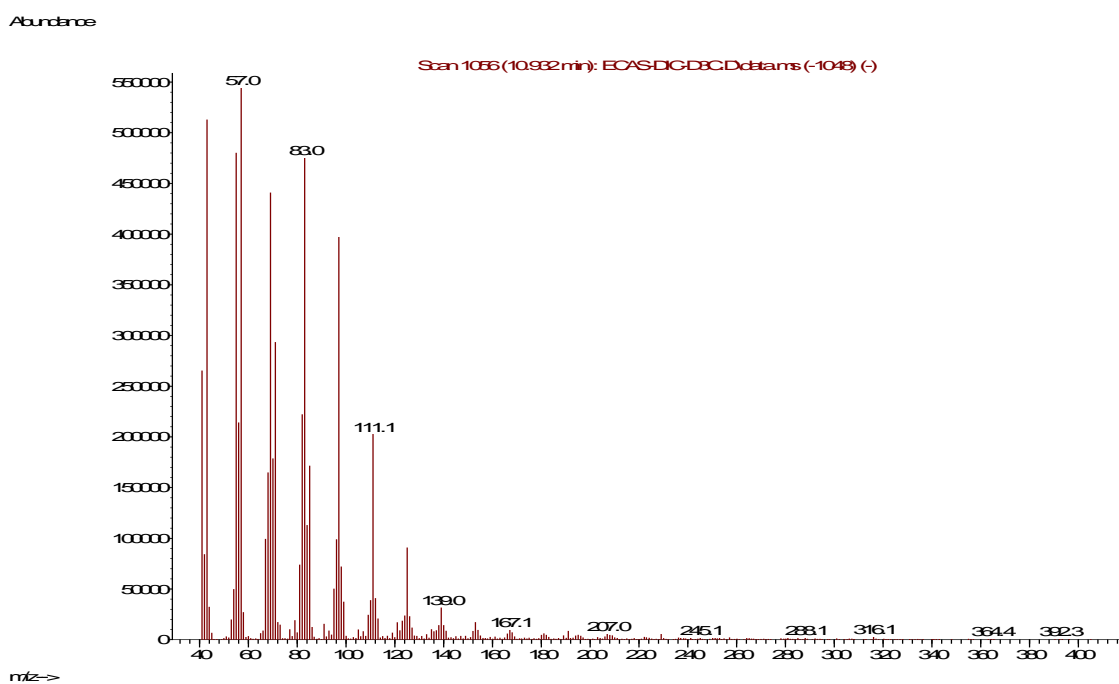


Não identificado

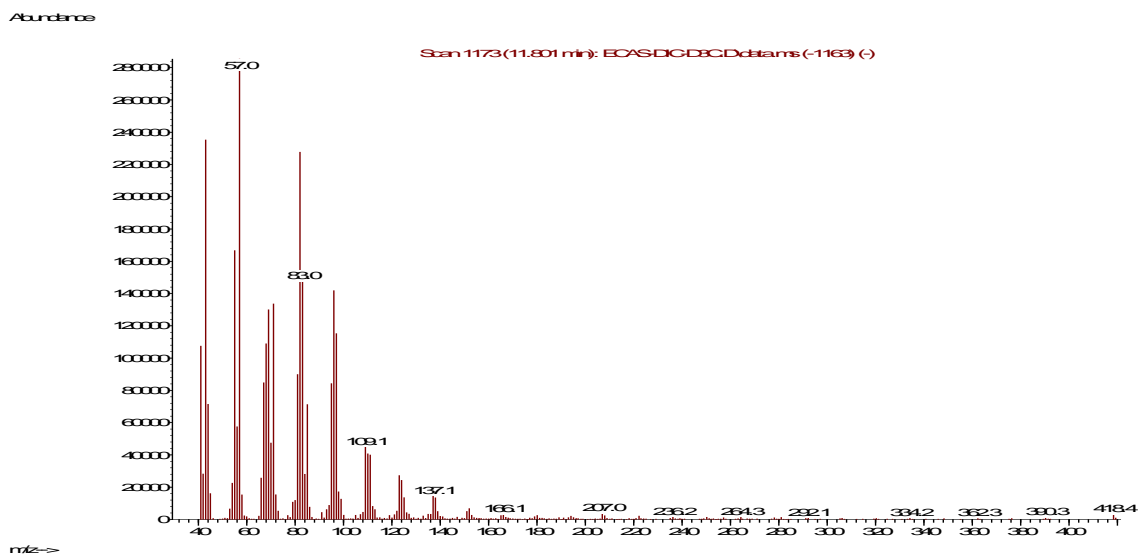




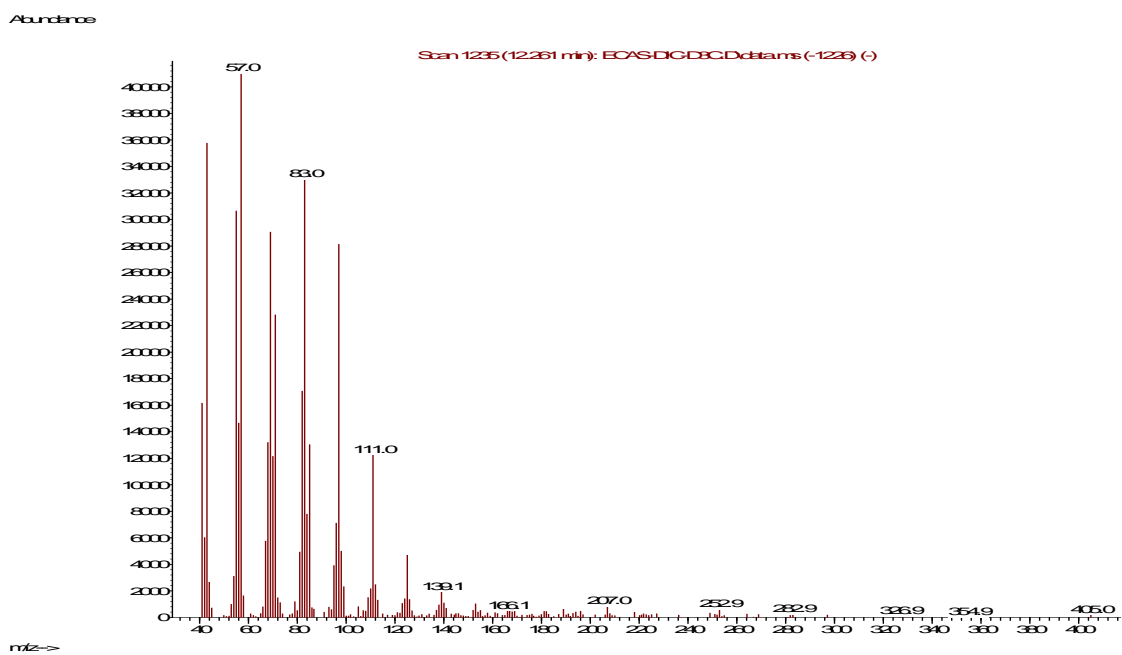
Espectro de massas identificado como octacosanal (aldeído montânico).



Não identificado



Espectro de massas identificado como triacontanal (aldeído melissico).



Não identificado

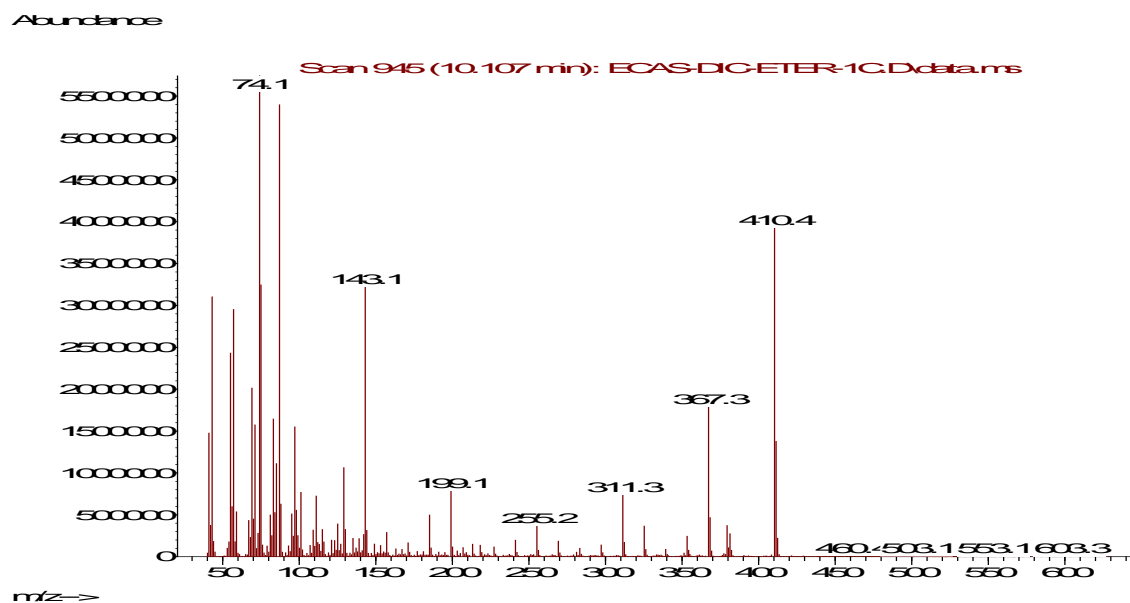
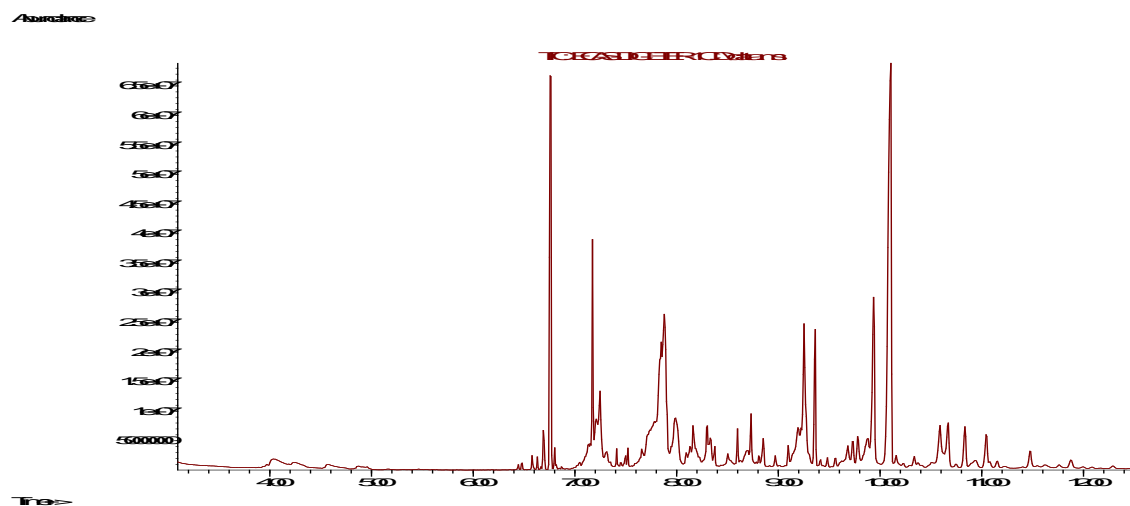
## **ANEXO 3**



## Espectros de massa da fração DE23

### Fração DE23-1 CG/EM

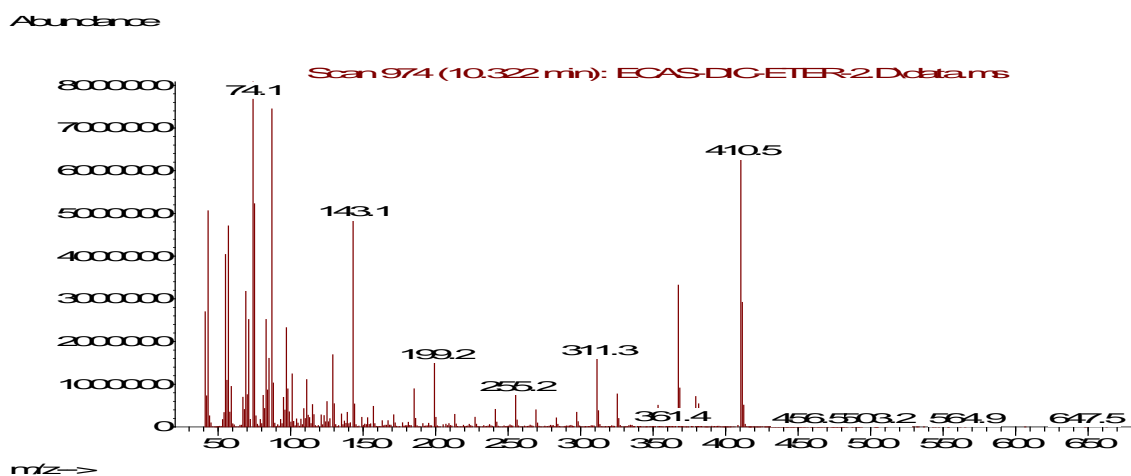
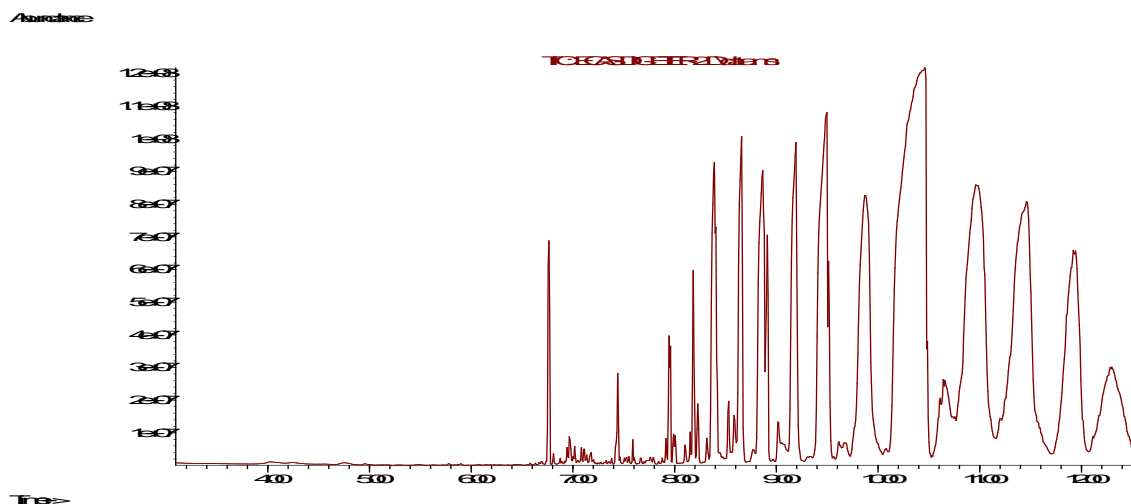
O pico majoritário foi identificado por seu espectro de massas como o hexacosanoato de metila.



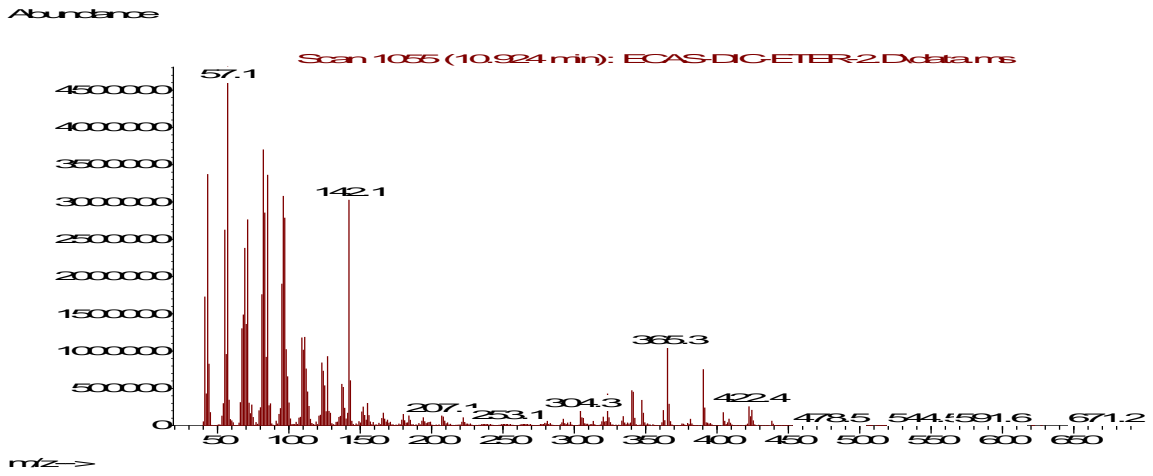
Espectro de massas do composto identificado como hexacosanoato de metila.

## Fração DE23-2 CG/EM

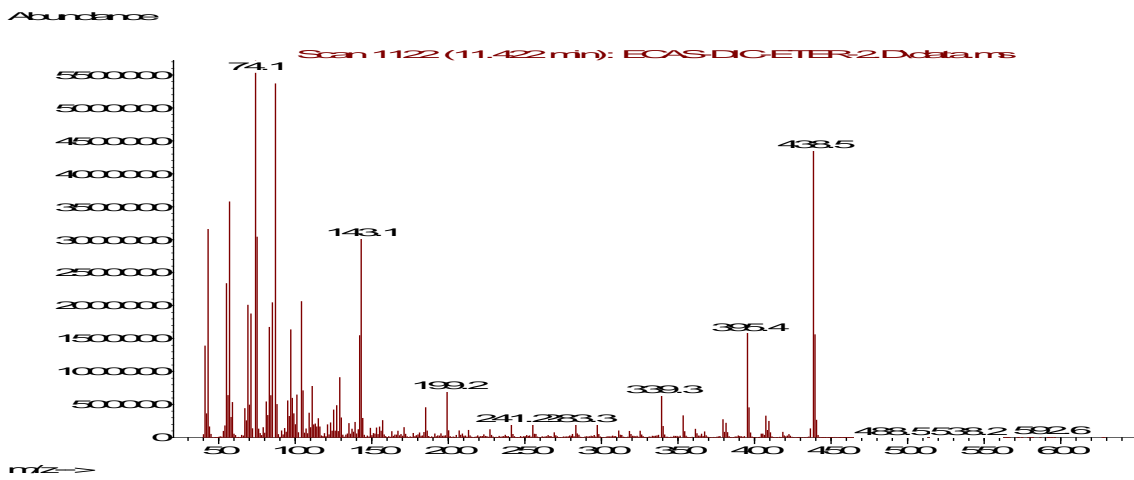
Os picos majoritários dessa fração foram identificados como hexacosanoato de metila e octacosanoato de metila. Os outros componentes não foram identificados.



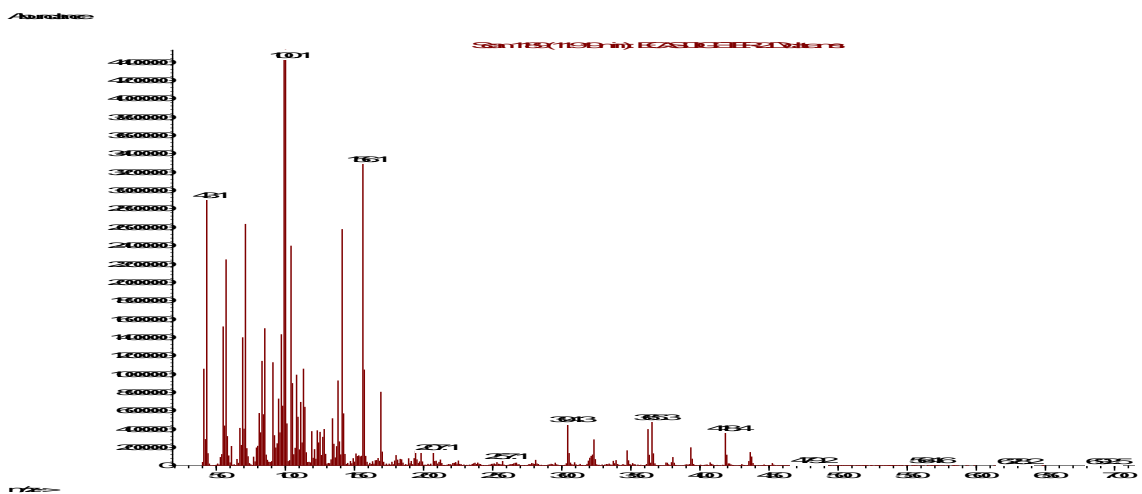
Espectro de massas do composto identificado como hexacosanoato de metila.



NI



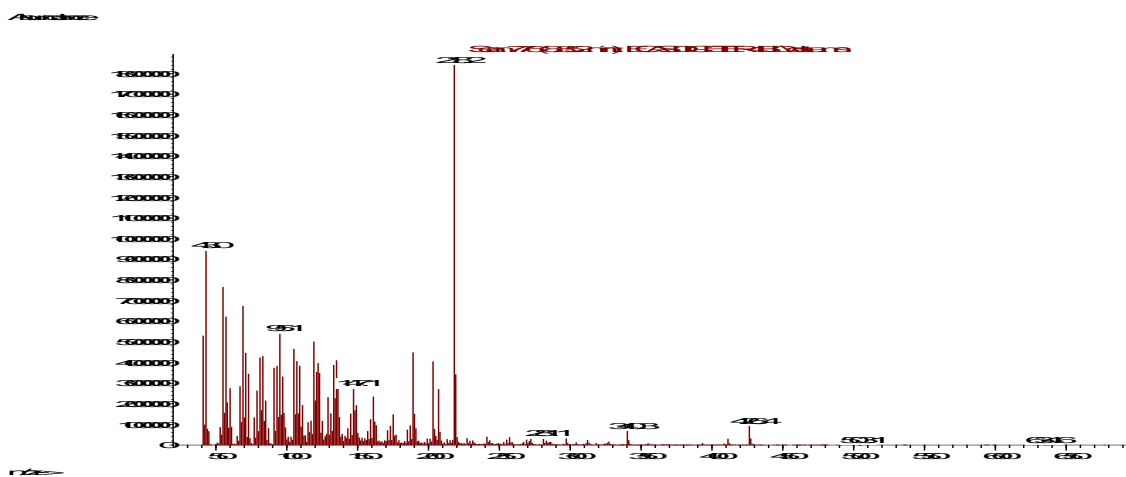
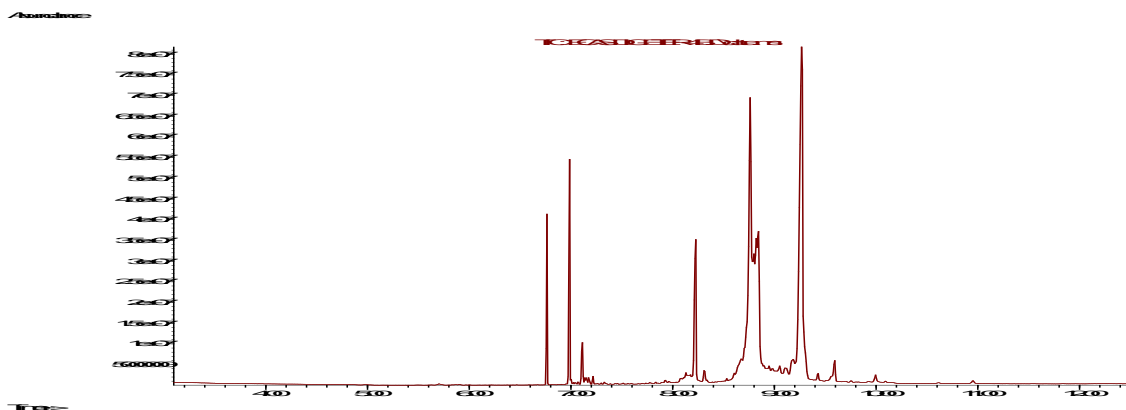
Espectro de massas do composto identificado como octacosanoato de metila.



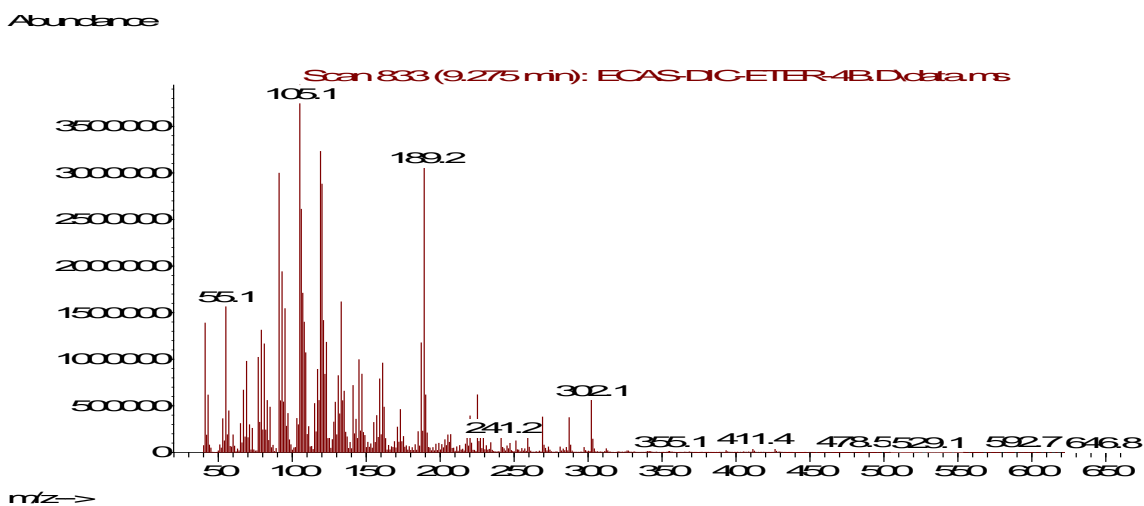
NI







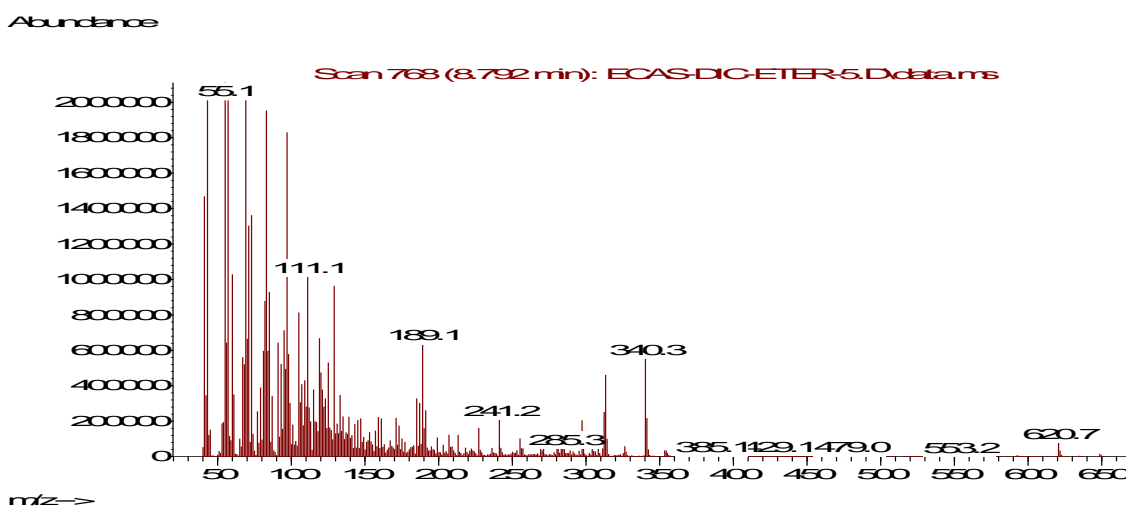
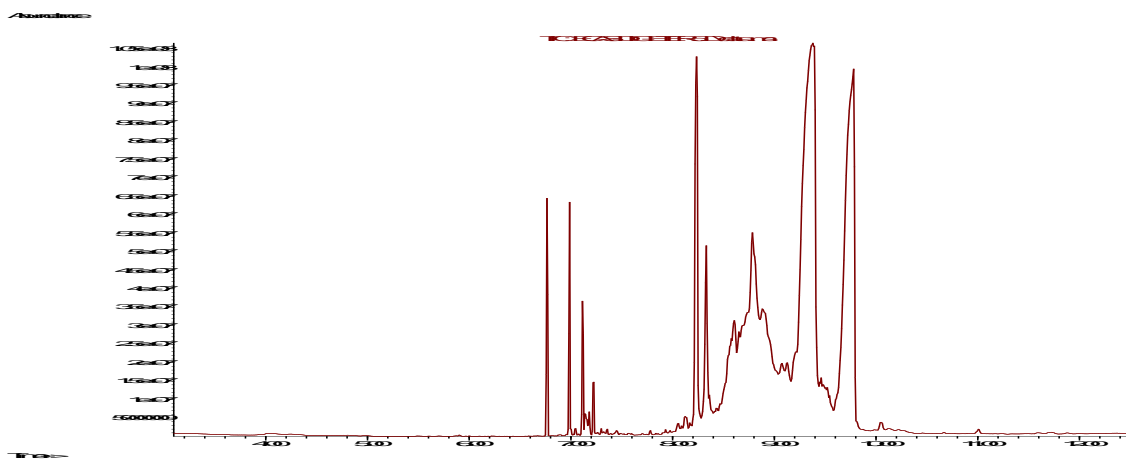
Espectro de massas do composto identificado como alfa-amirina.



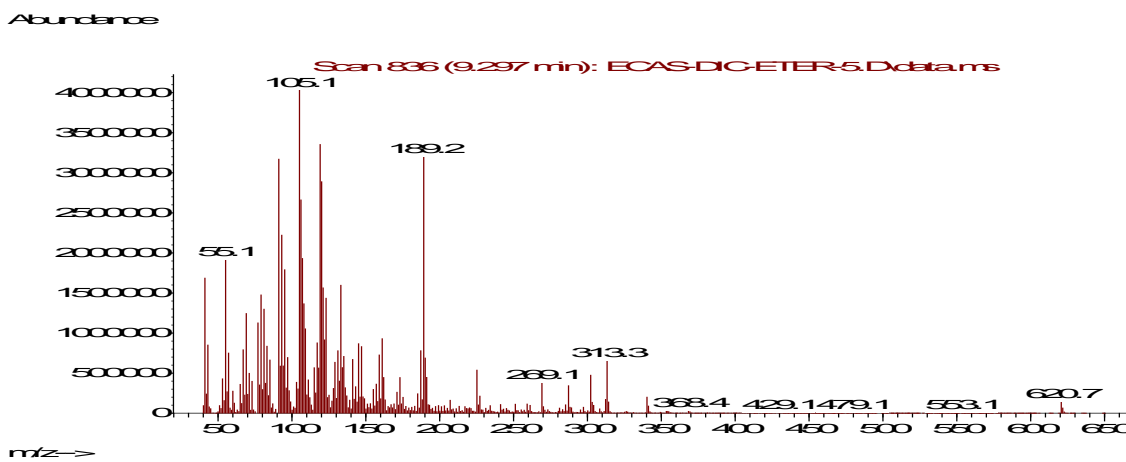
Não identificado

Fração DE23-5 CG/EM

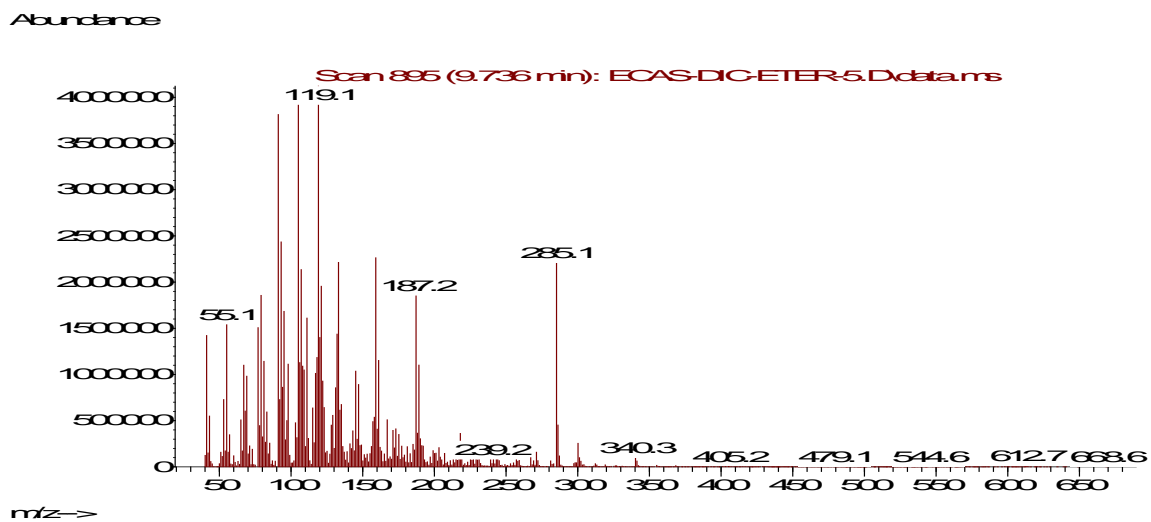
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado



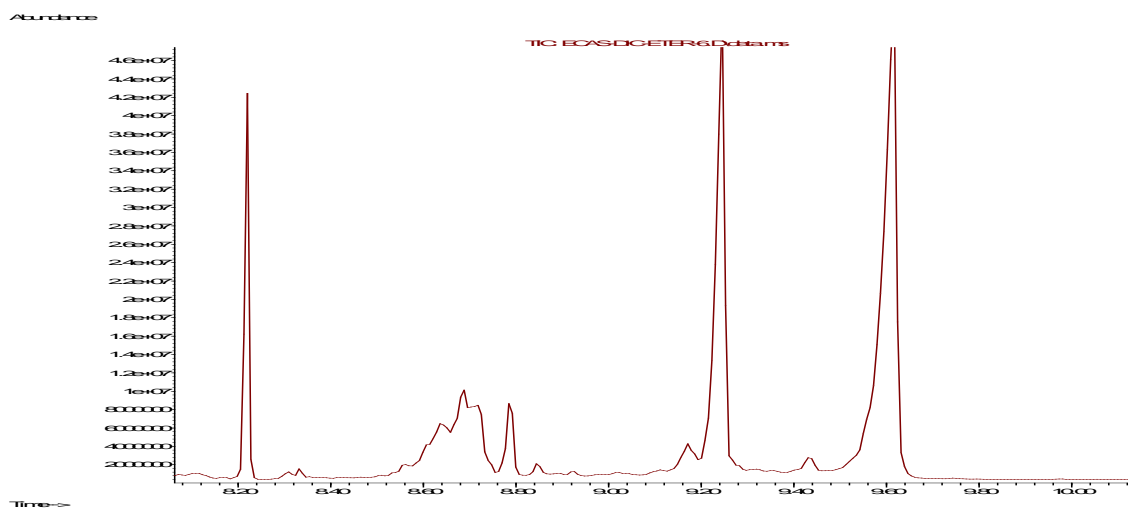
Não identificado

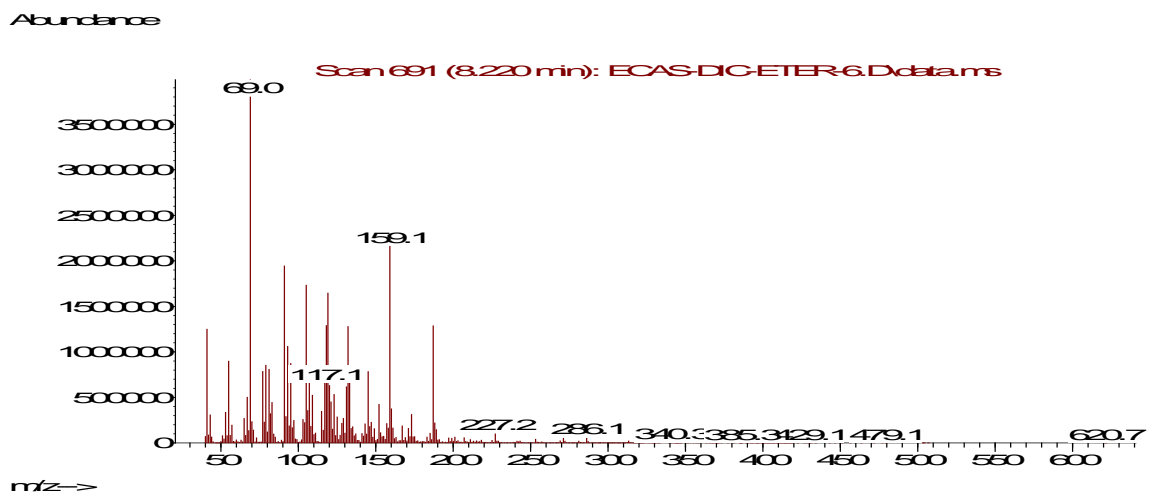


Não identificado

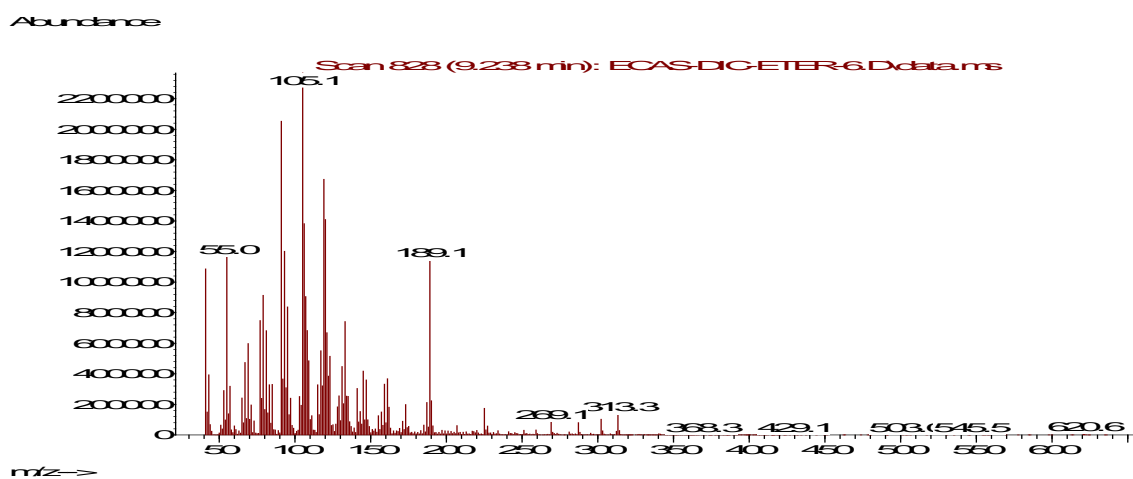
Fração DE23-6 CG/EM

Nenhum componente dessa fração foi identificado.

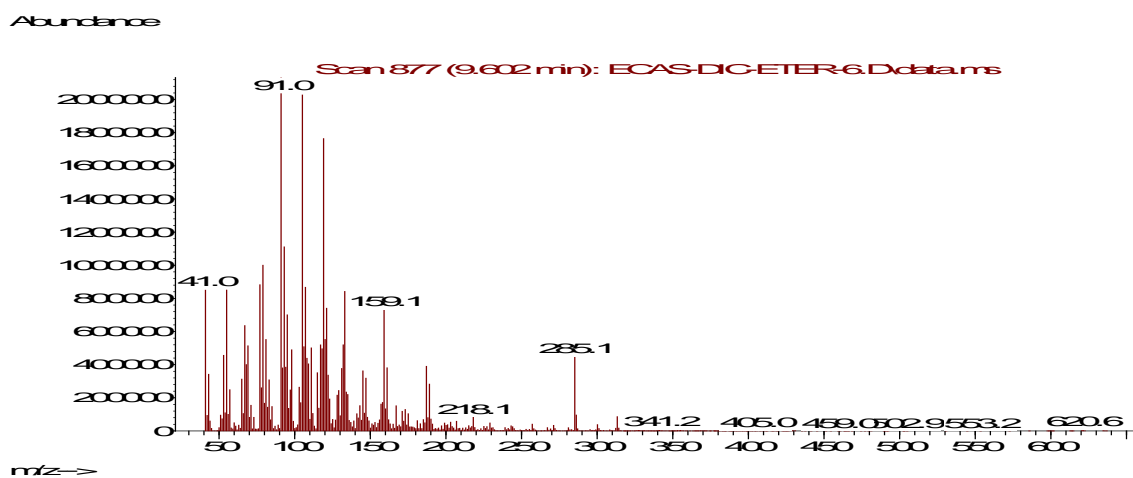




Não identificado



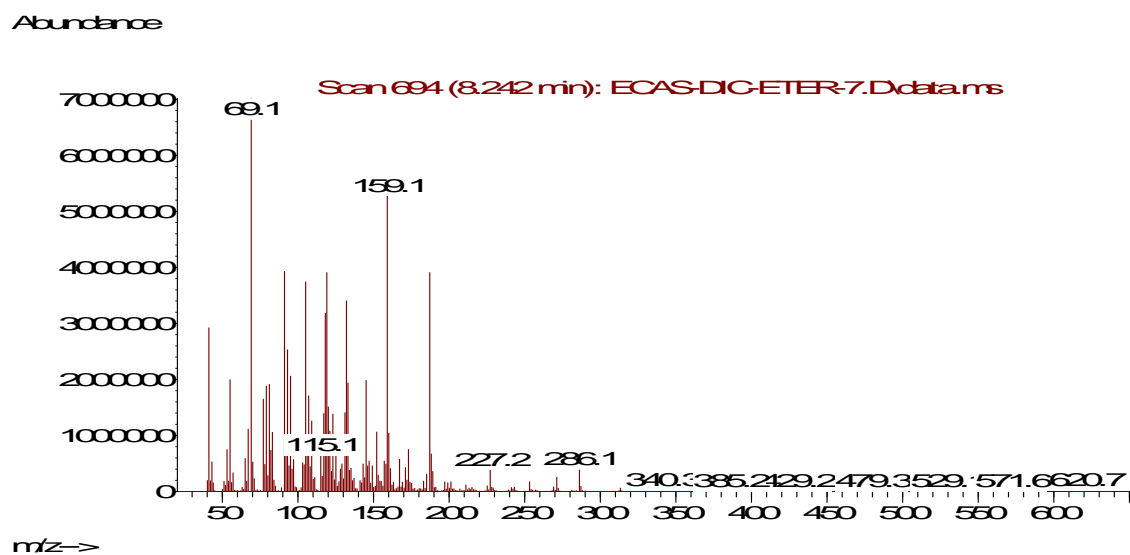
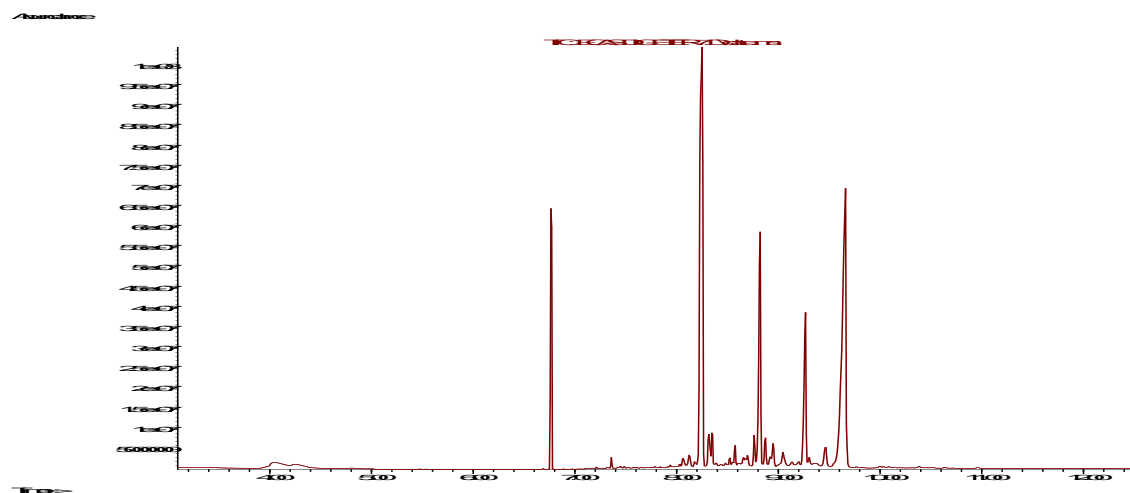
Não identificado



Não identificado

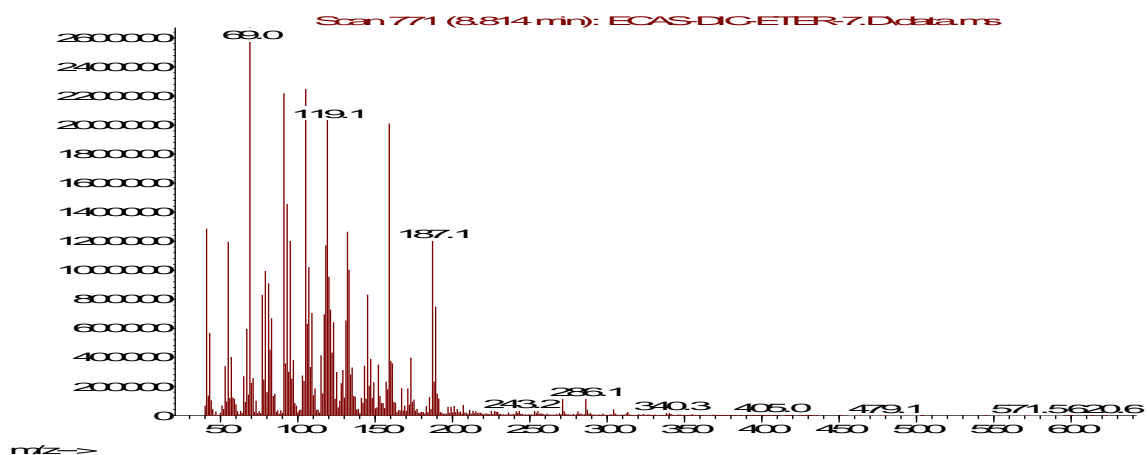
## Fração DE23-7 CG/EM

Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

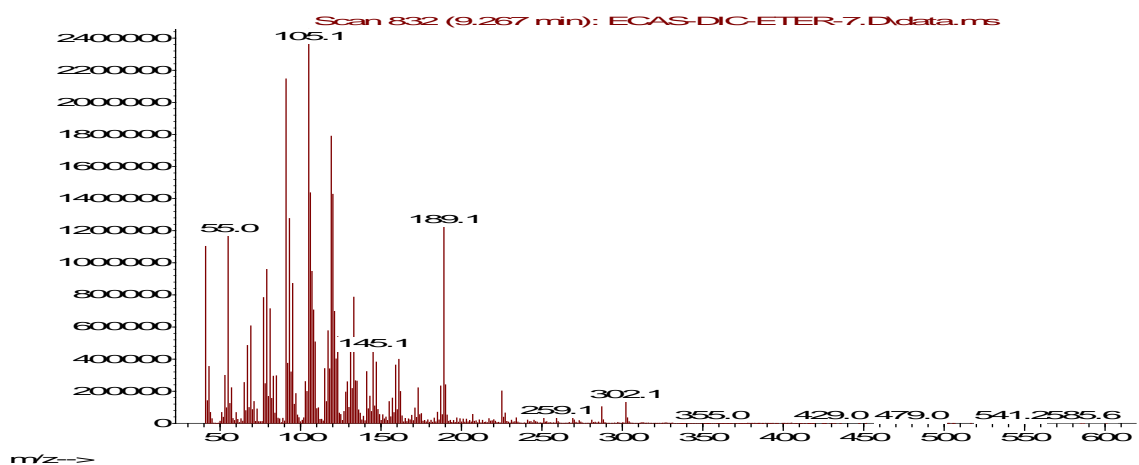
Abundance



m/z-->

NI

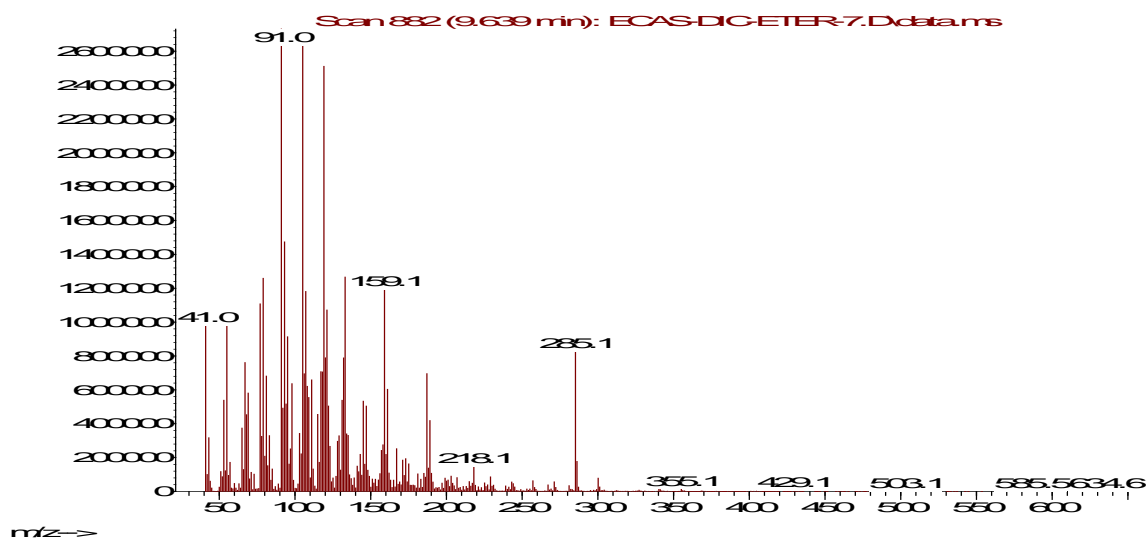
Abundance



m/z-->

NI

Abundance



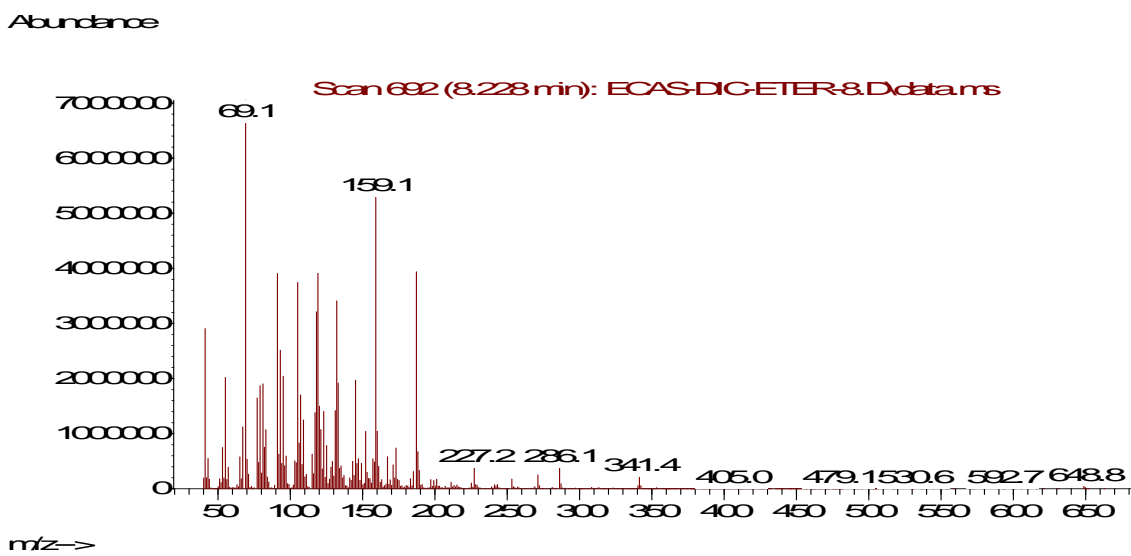
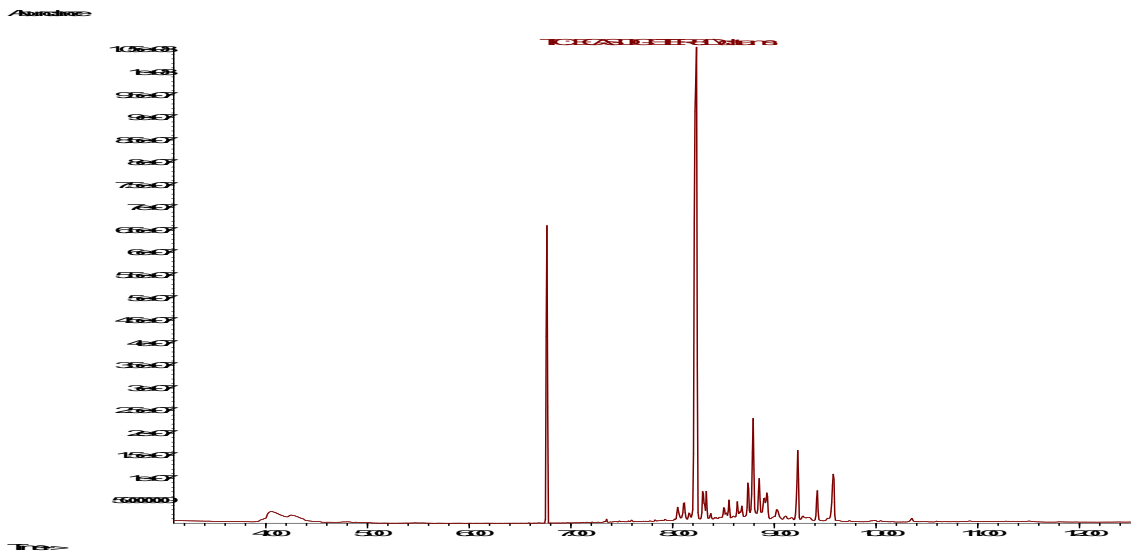
m/z-->

NI

284

Fração DE23-8 CG/EM

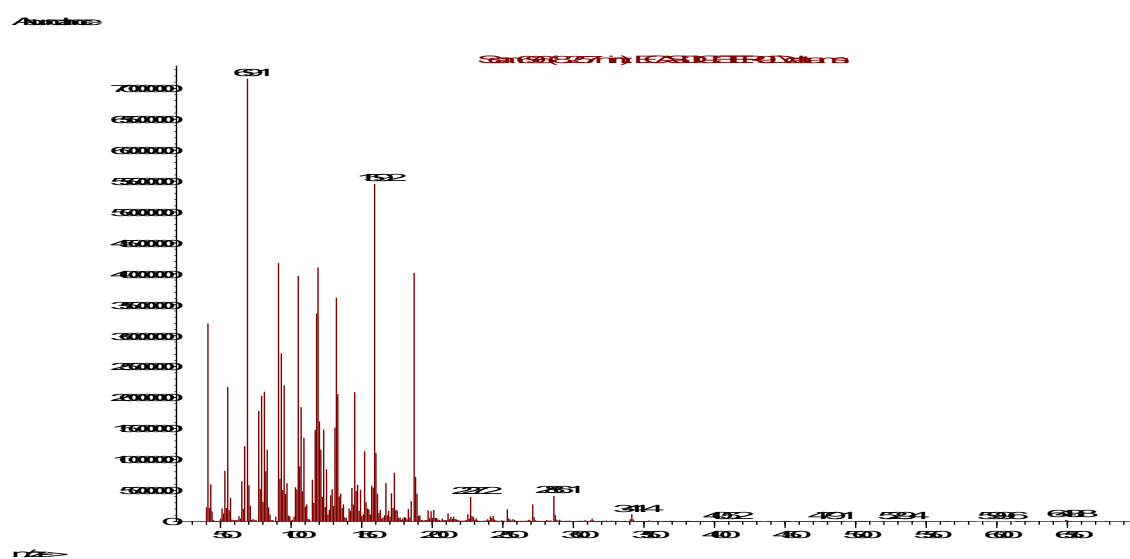
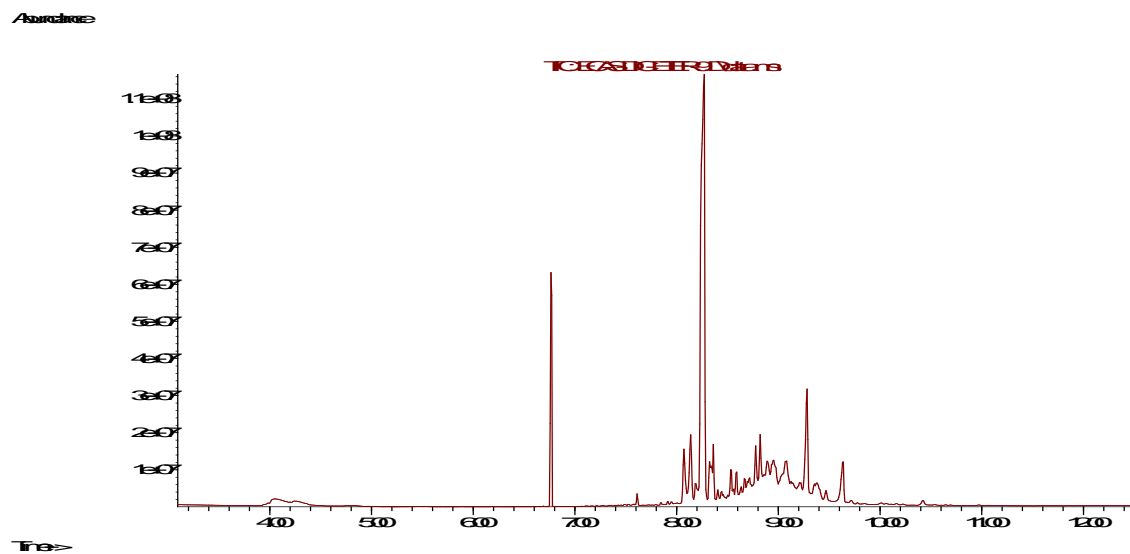
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-9 CG/EM

Nenhum componente dessa fração foi identificado.

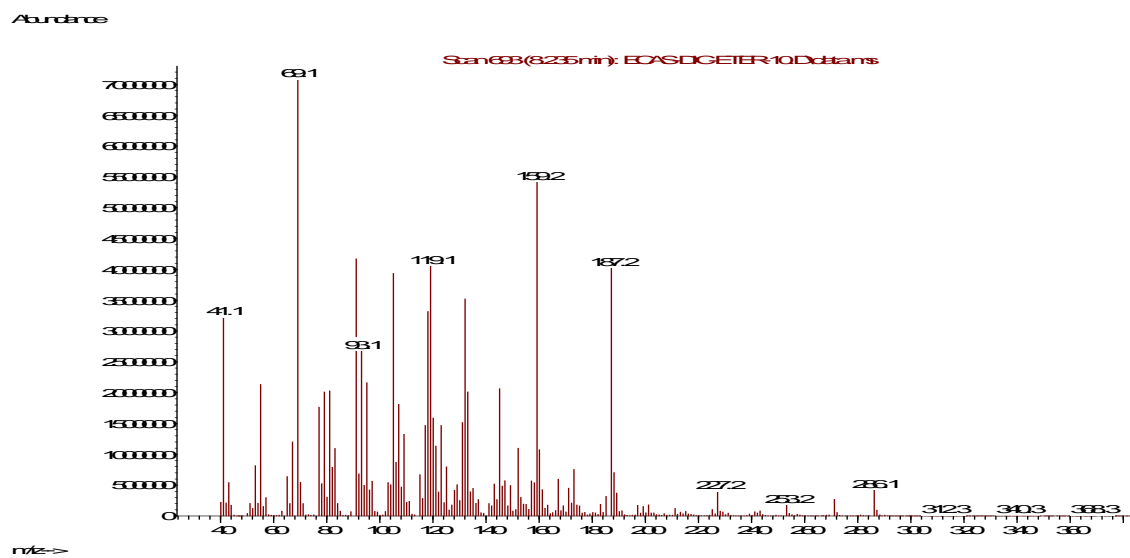
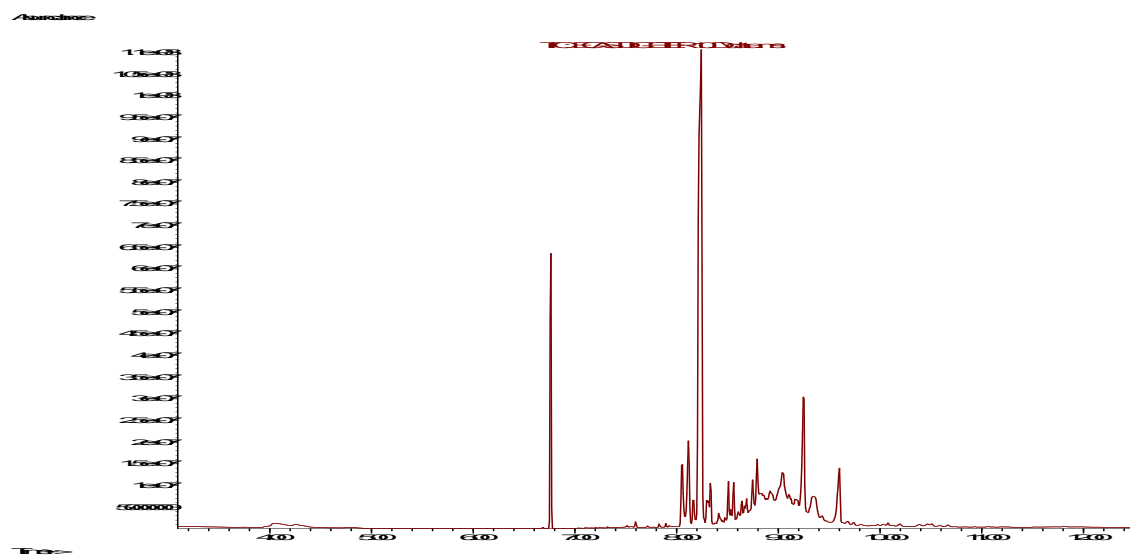


Não identificado



## Fração DE23-10 CG/EM

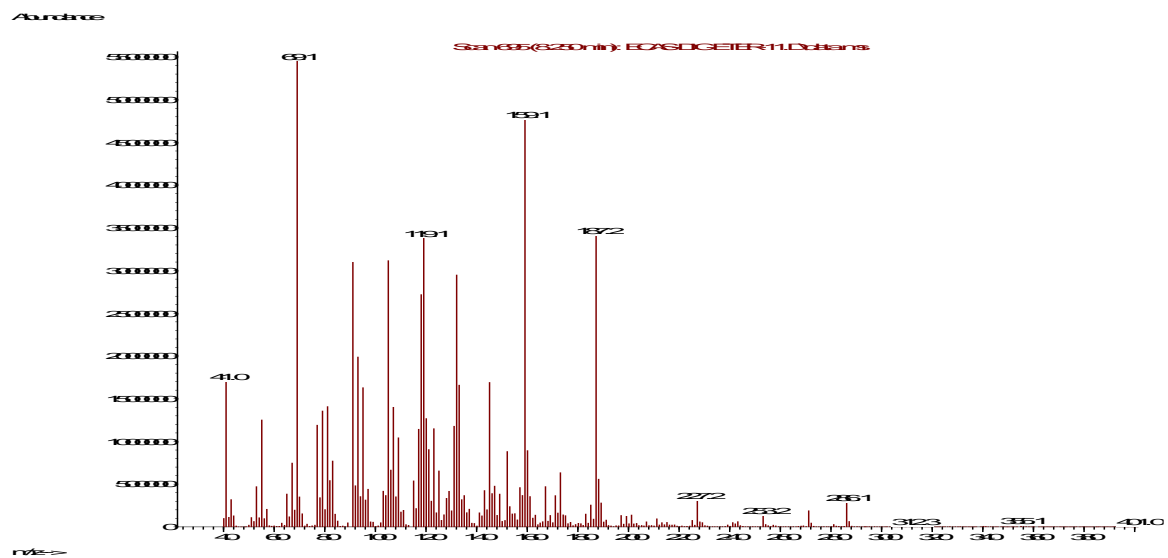
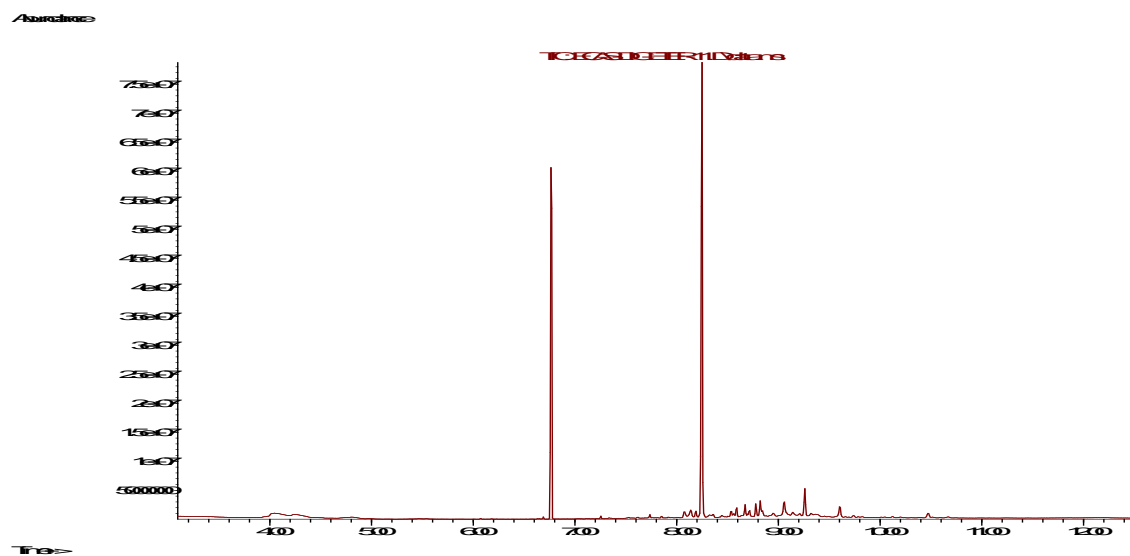
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-11 CG/EM

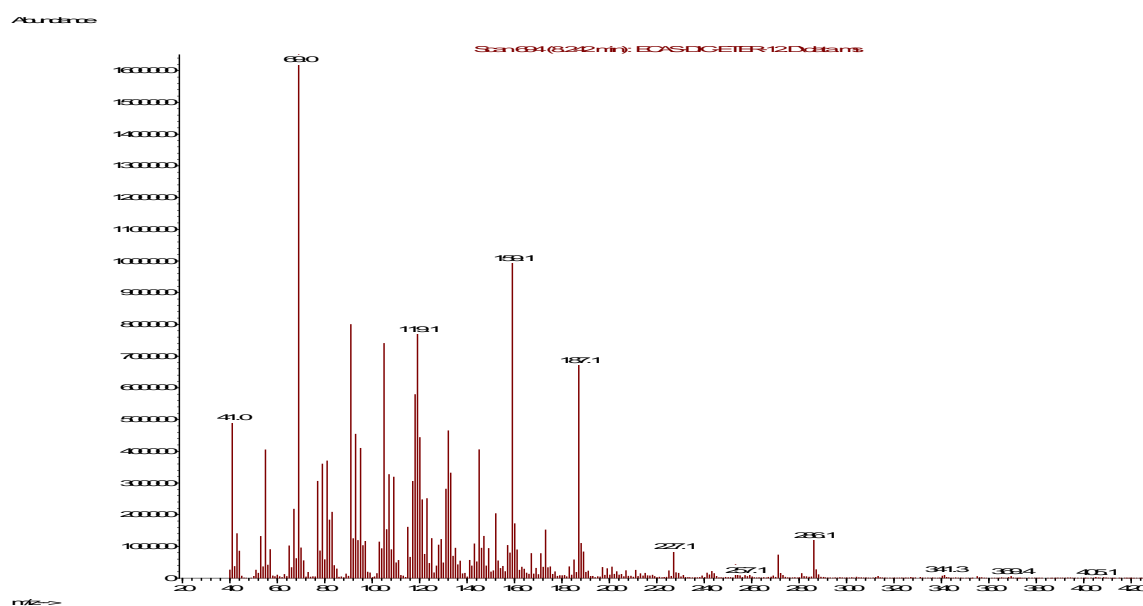
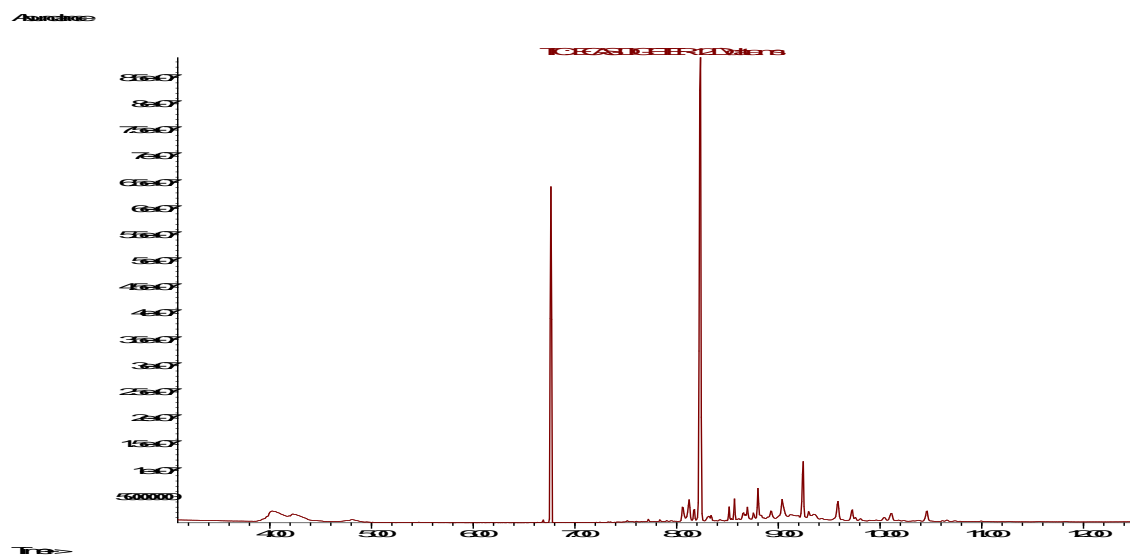
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-12 CG/EM

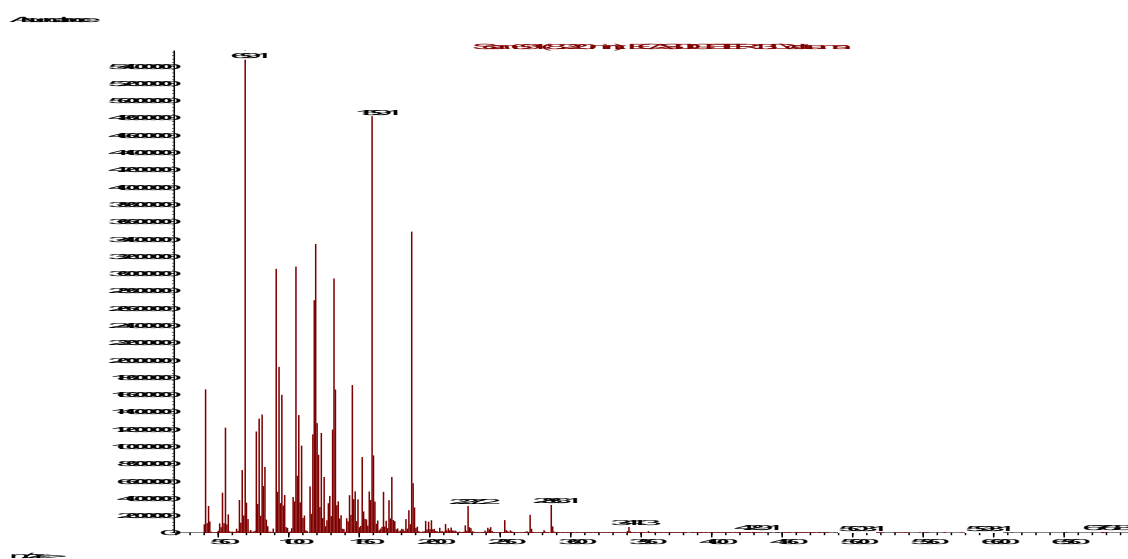
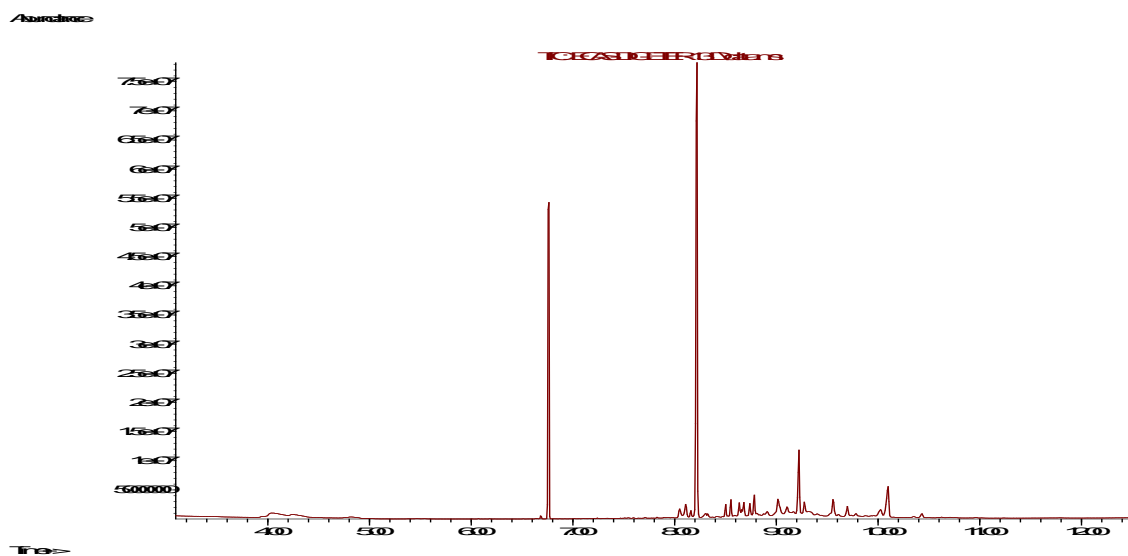
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-13 CG/EM

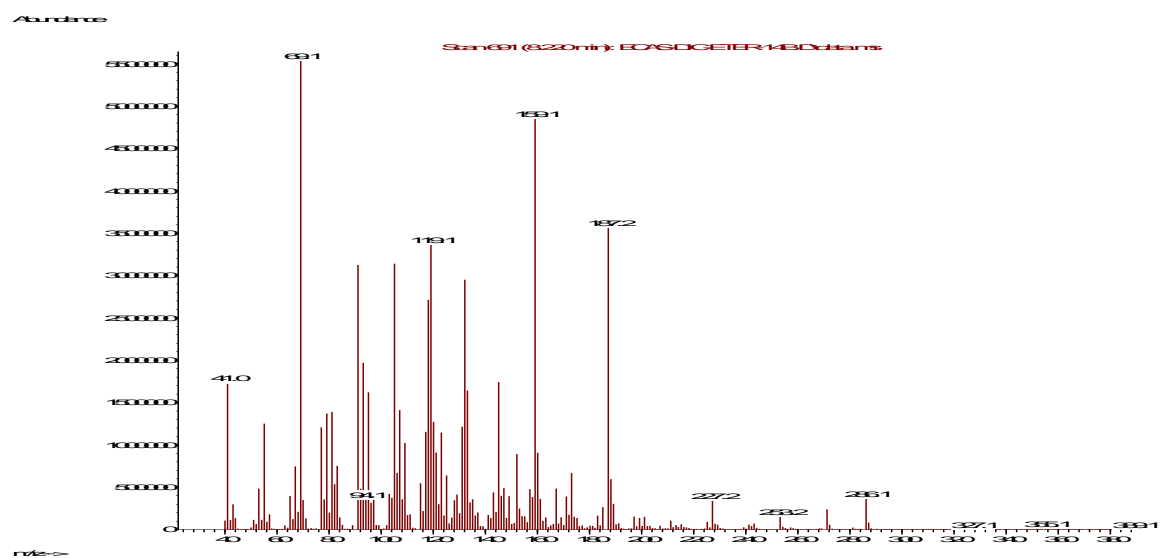
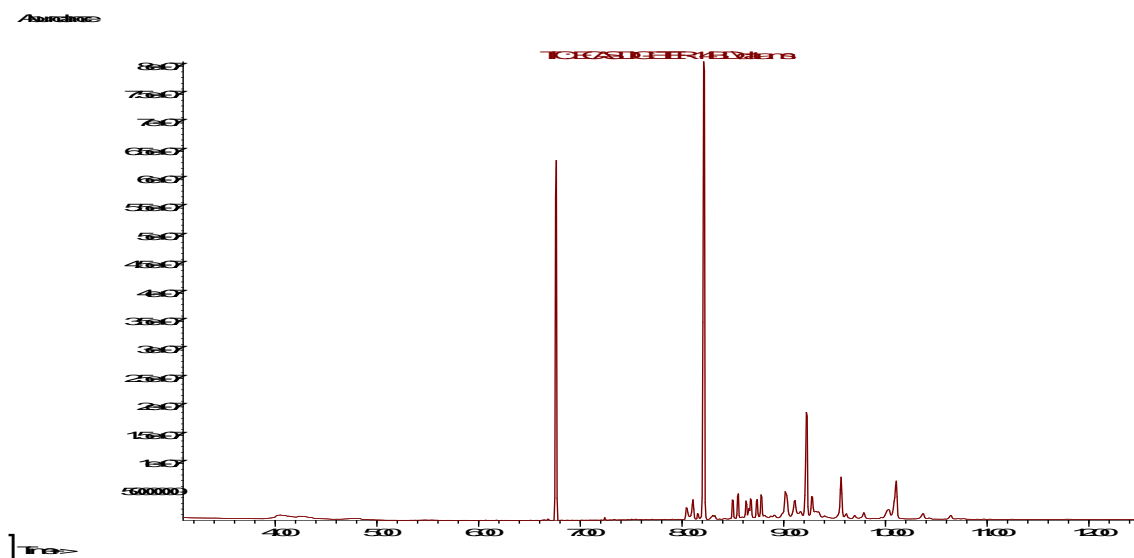
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-14 CG/EM

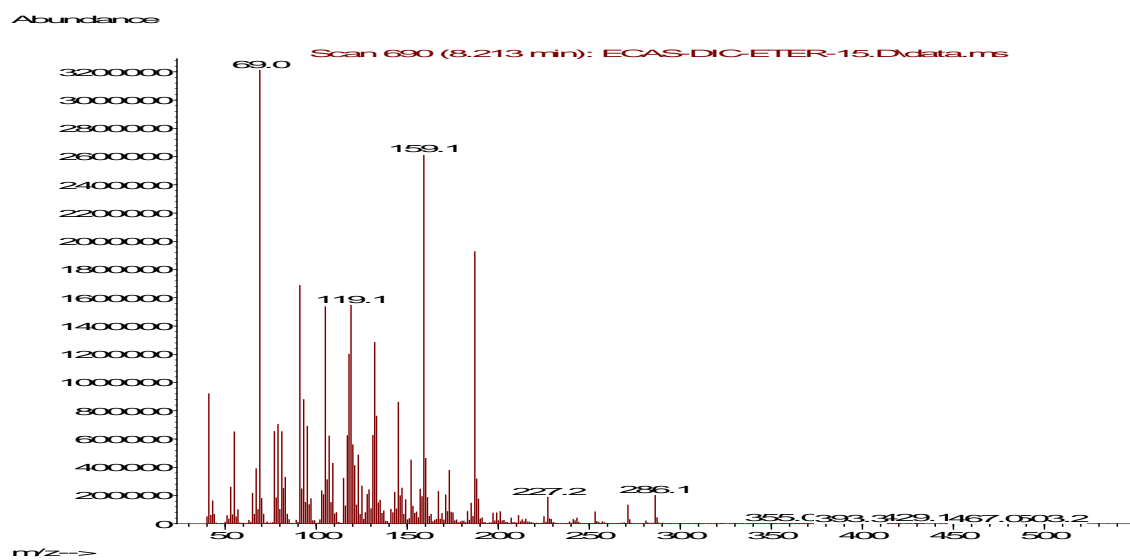
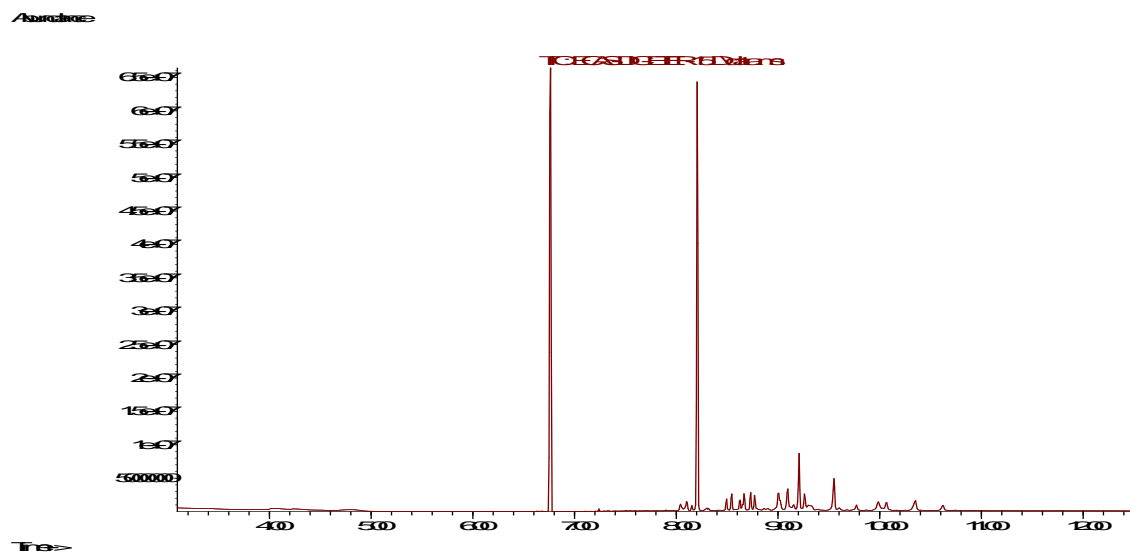
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-15 CG/EM

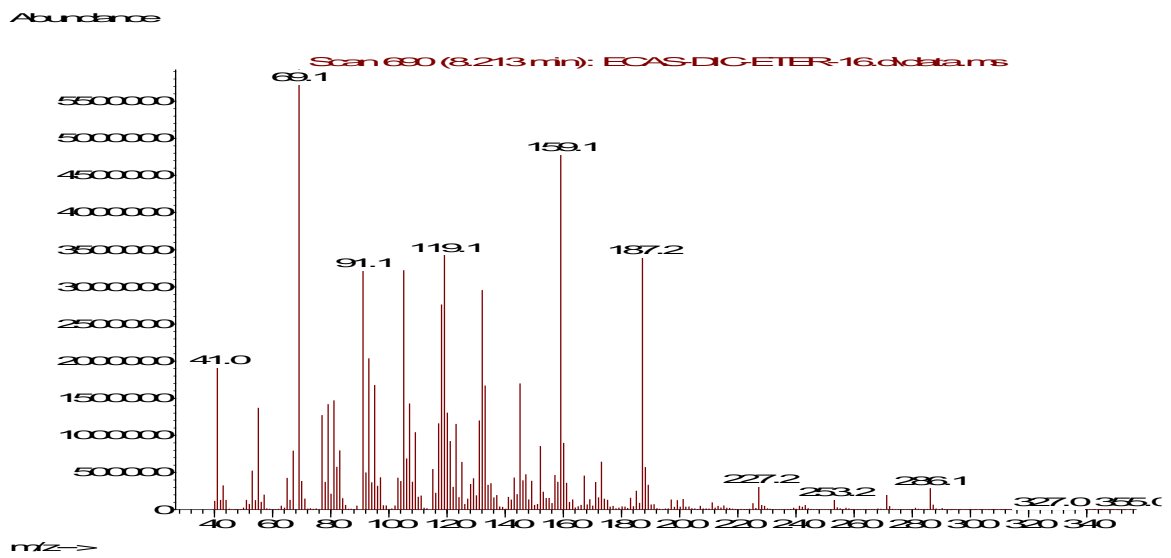
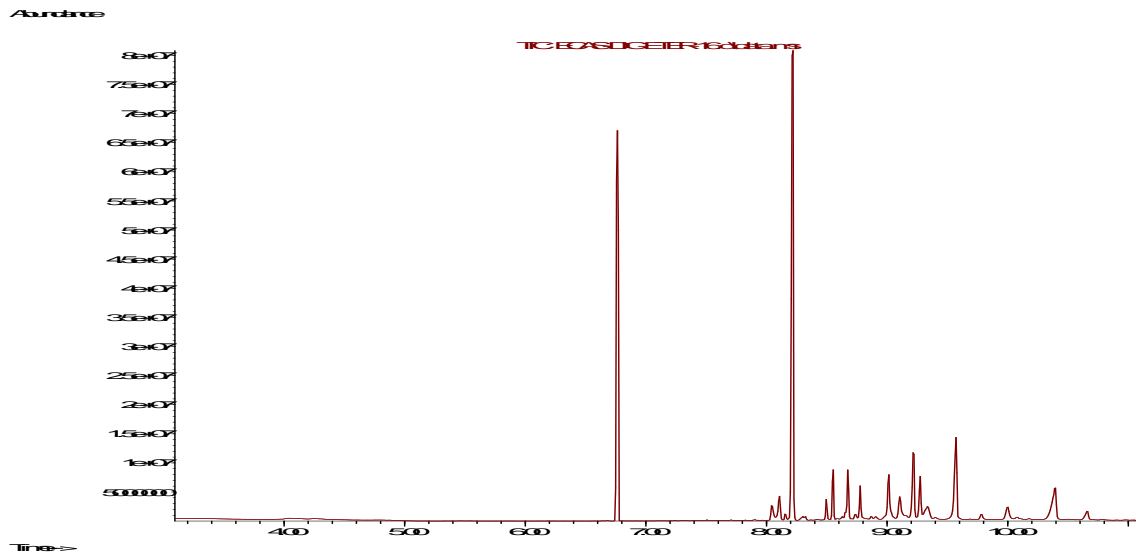
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

Fração DE23-16 CG/EM

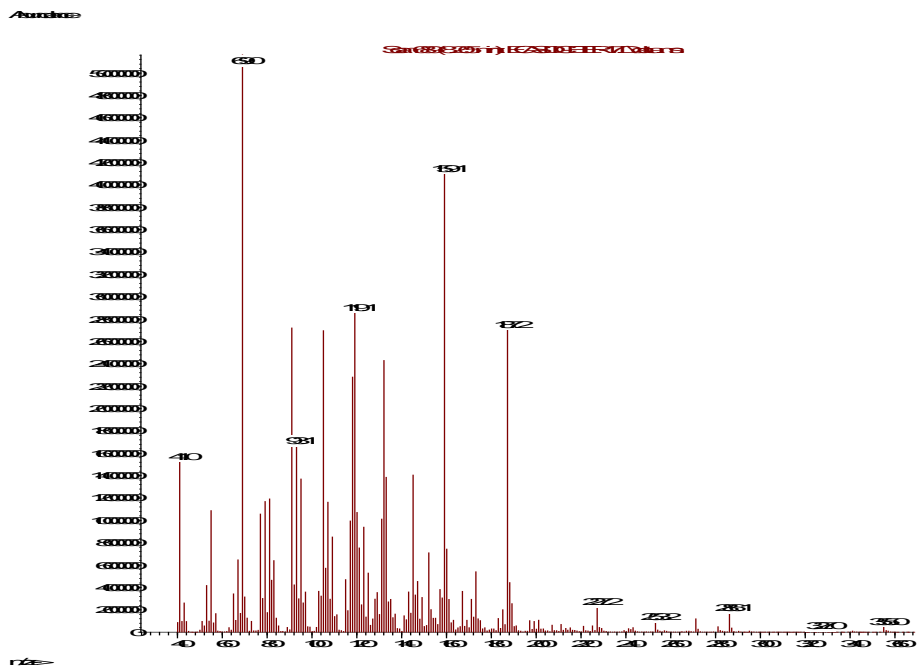
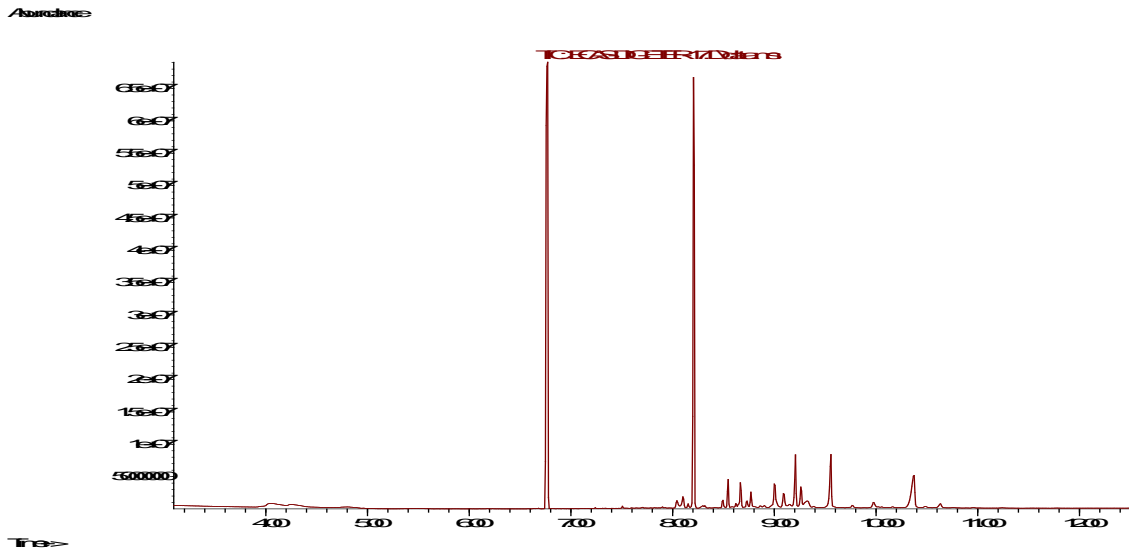
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

## Fração DE23-17 CG/EM

Nenhum componente dessa fração foi identificado.

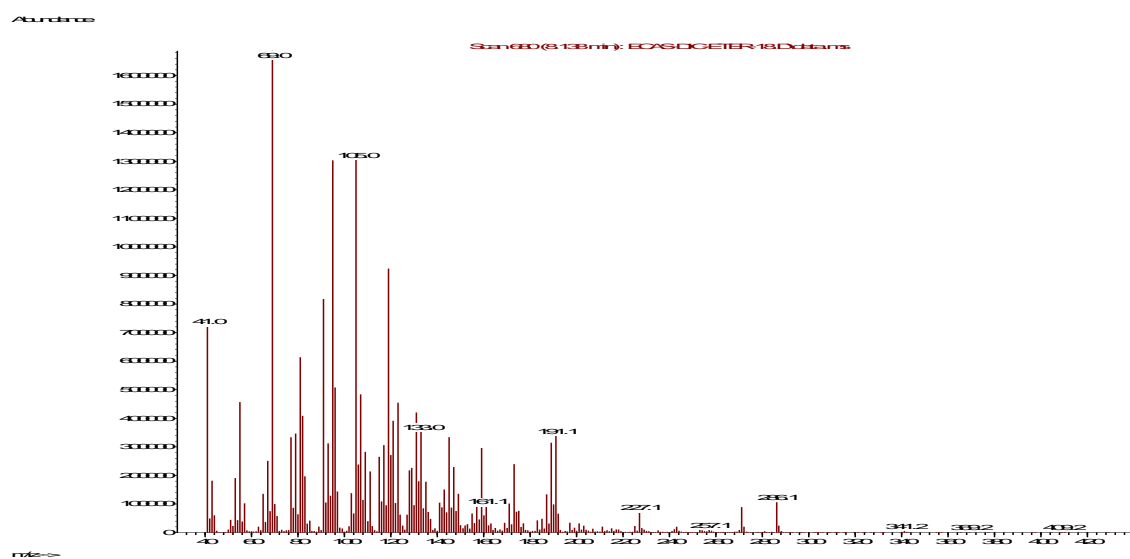
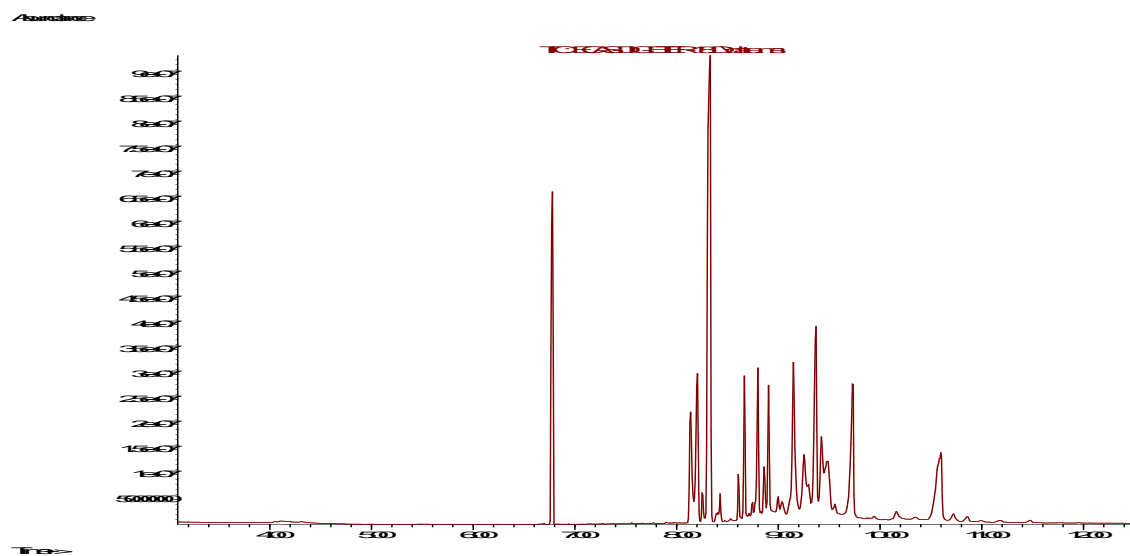


Não identificado

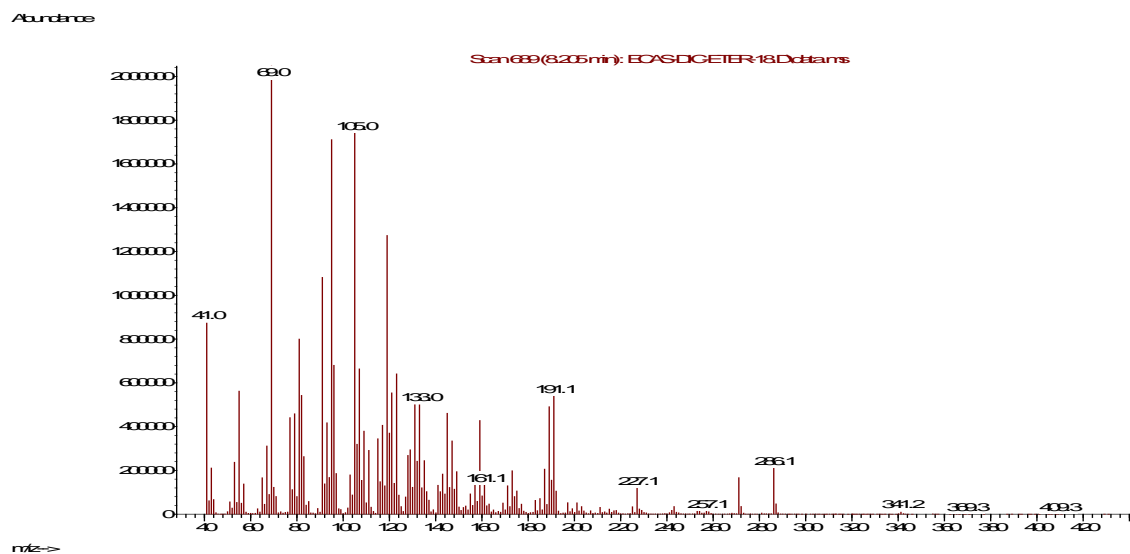


## Fração DE23-18 CG/EM

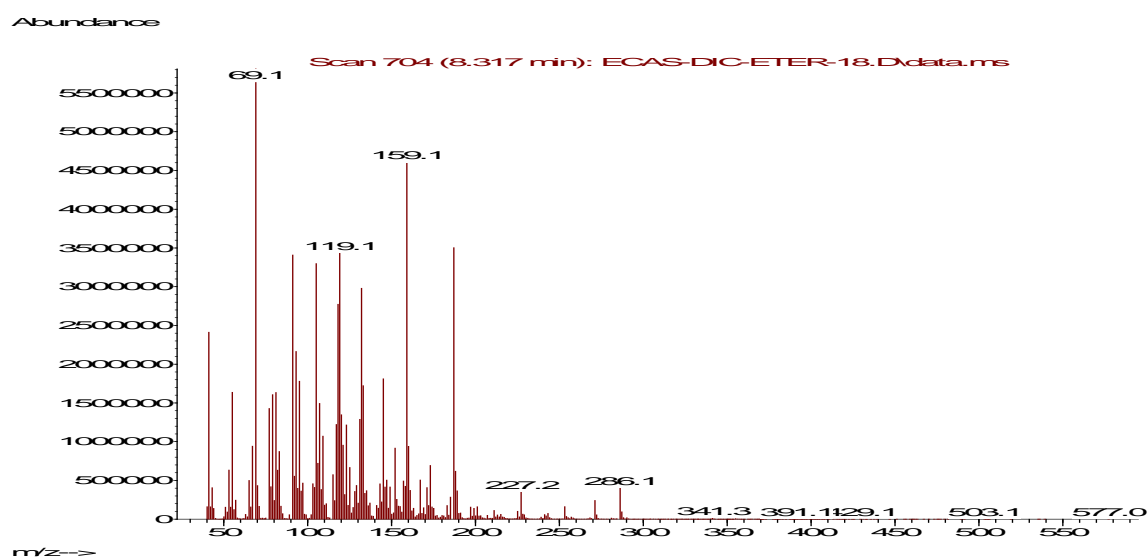
Nenhum componente dessa fração foi identificado.



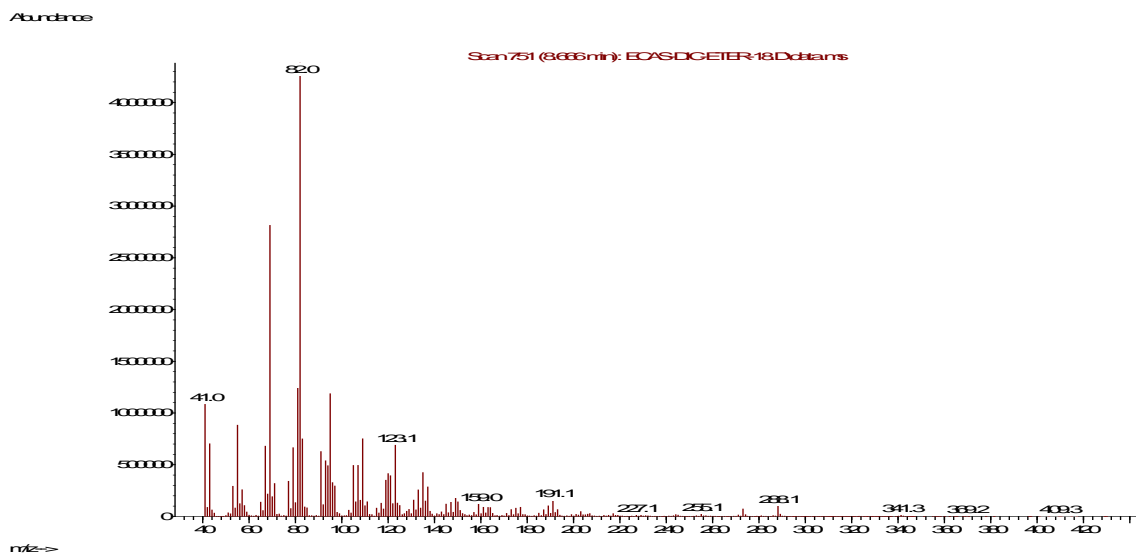
Não identificado



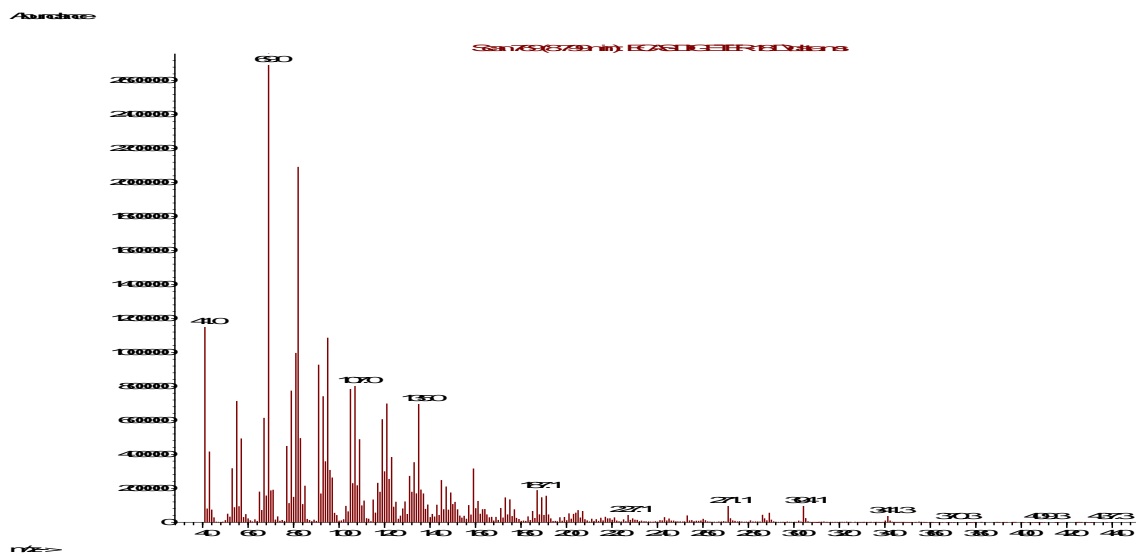
Não identificado



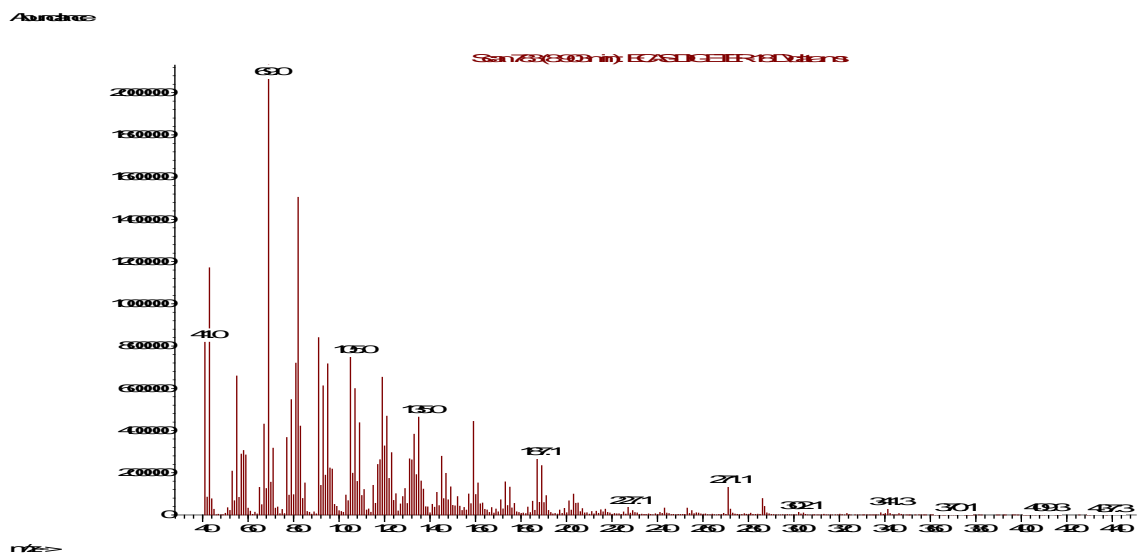
Não identificado



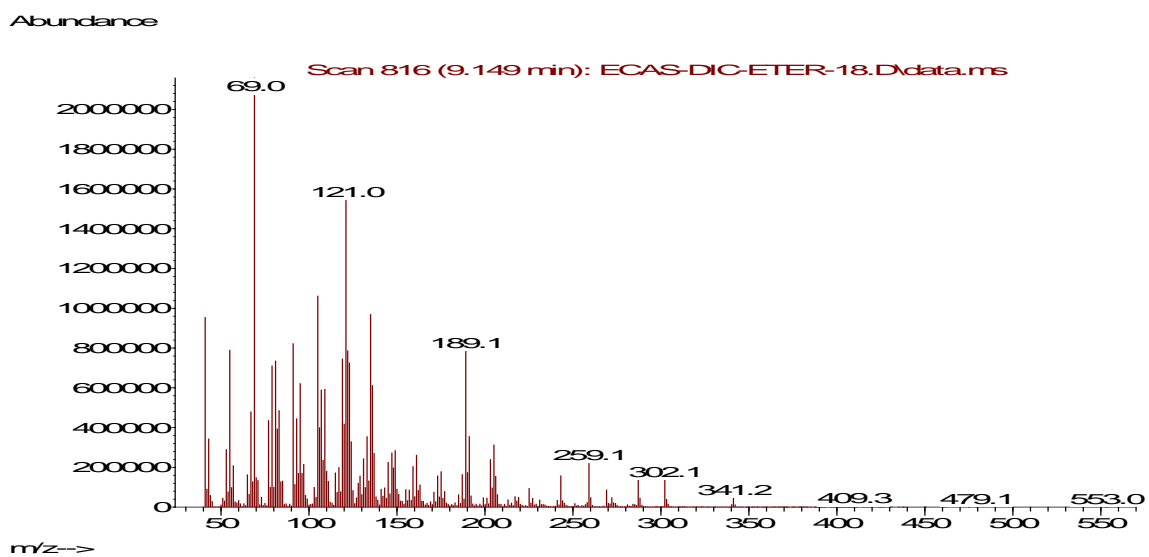
NI



NI

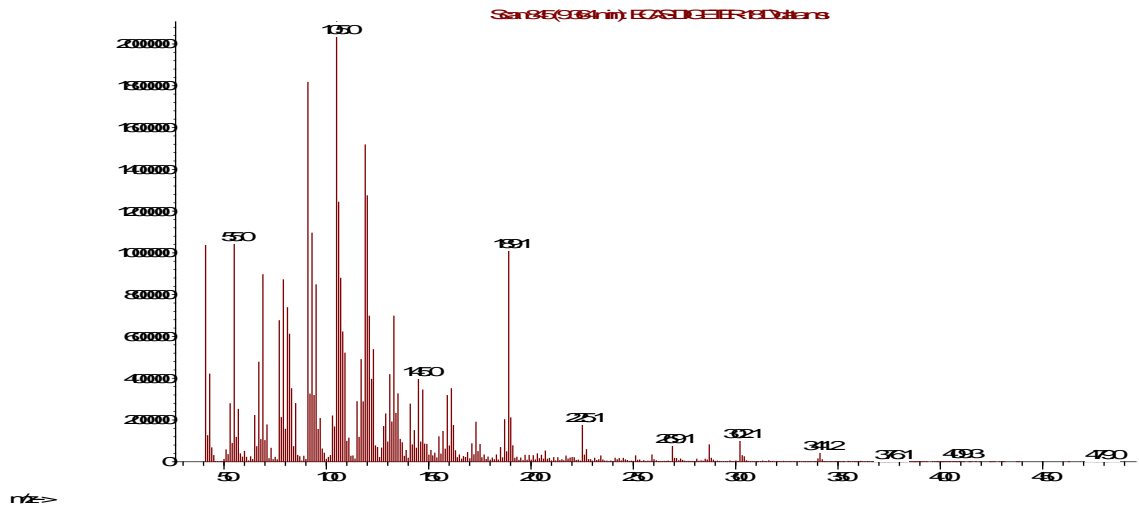


Não identificado



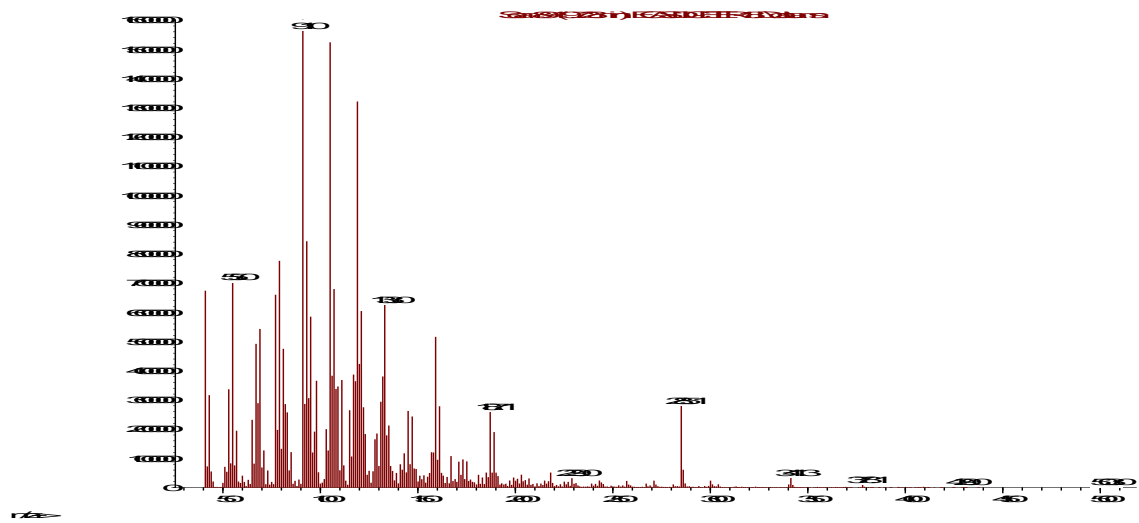
Não identificado

Abundância

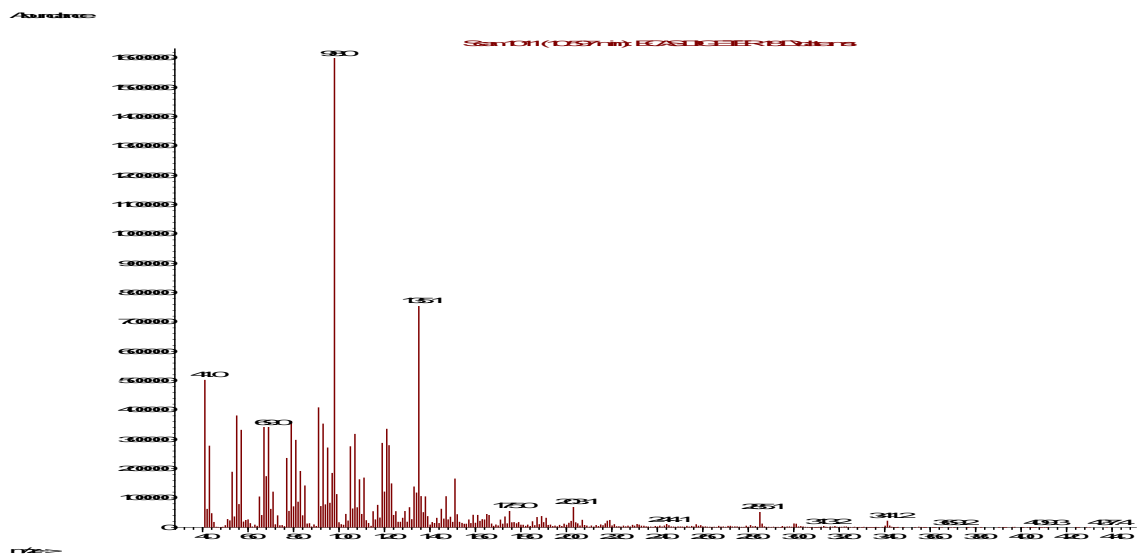


Não identificado

Abundância



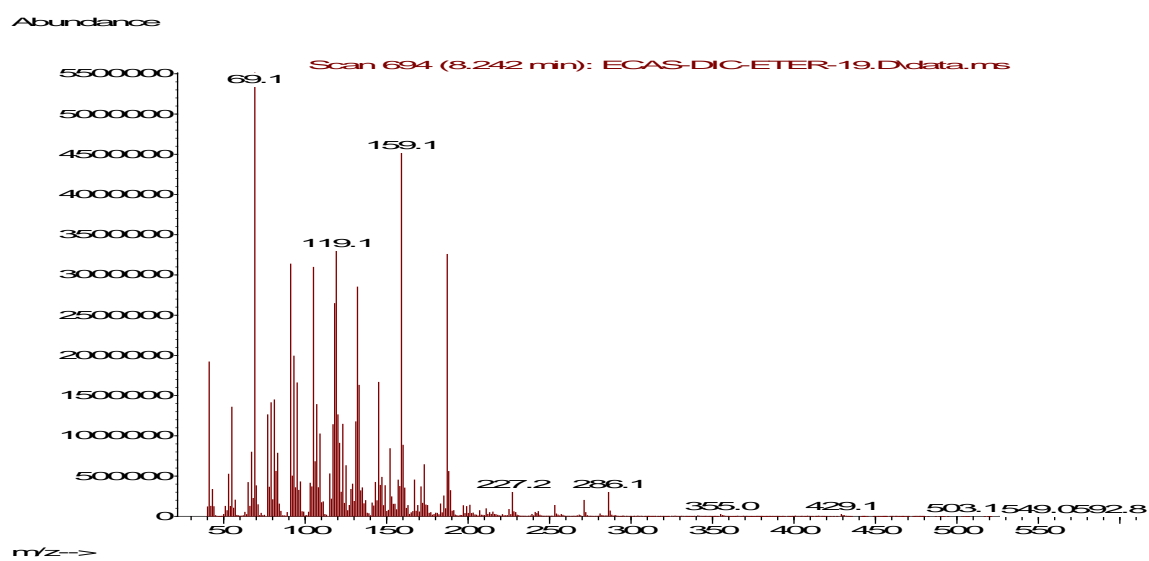
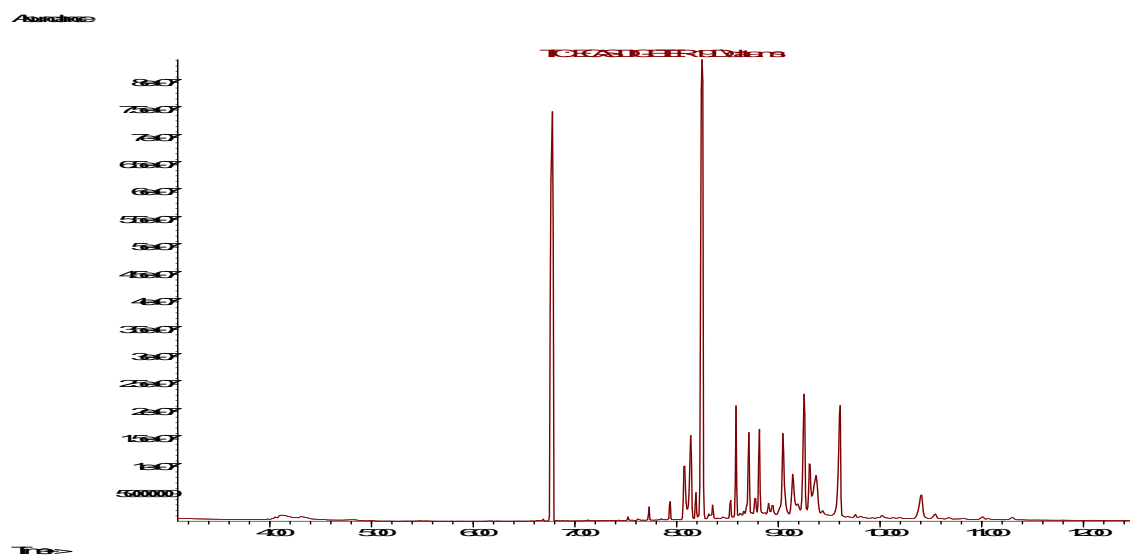
Não identificado



Não identificado

## Fração DE23-19 CG/EM

Nenhum componente dessa fração foi identificado.



Não identificado

