

TIAGO LUIZ DA SILVA ALVES

Perfil químico micromolecular e análise quimiotaxonômica dos gêneros *Stevia* Cav. e *Mikania* Willd.(Asteraceae, Eupatorieae).

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Botânica do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientação: Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares  
Co-orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Mara Rejane Ritter

Porto Alegre  
2009

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de dedicar essa dissertação a todas as plantas, que com simplicidade e elegância sustentam toda a vida que existe, sem nada pedir em troca.

Ao meu orientador Geraldo Luiz Gonçalves Soares, mais que um professor, um amigo; às vezes um pai, mas no fundo, um irmão.

À minha co-orientadora Mara Rejane Ritter, por me mostrar a força da gentileza e da humildade. Sempre serás a responsável por eu ter escolhido o caminho da Botânica.

À minha noiva Lauren, por ser minha luz, meu caminho e minha vida.

Aos meus pais, Aureci e Sandra, que me ensinaram que “saber” é um verbo muito mais importante do que “possuir”.

A todos os meus demais familiares, que tenho certeza que estão e sempre estarão torcendo por mim.

Aos seguintes professores que de um modo ou de outro contribuíram decisivamente para minha formação acadêmica e realização desse trabalho: Artur Germano Fett Neto, Cláudia Alcaraz Zini, Gilsane Lino von Poser, Janete Palma Fett, Néelson Ivo Matzenbacher e Tatiana Teixeira de Souza Chies.

Ao César, ao Édson, à Valerí e ao Cássio: quatro amigos muito especiais cuja paciência e auxílio foram absolutamente indispensáveis durante esta caminhada.

Tive o privilégio de ter sido colega de ótimas pessoas em meu ambiente de trabalho. Deixo aqui um forte abraço de agradecimento para Jaqueline Durigon, Priscila Crespam, Ana Cláudia Fernandes, Rodrigo Leonel, Ernestino Guarino, Pâmela Perini, Jair Kray, Aline Pigatto, Talita Camargo, Marília Trojan, Maria Helena Reis e Malvina Indrusiak.

À bibliotecária Ida Rossi, pela presteza e eficiência no trâmite de comutações bibliográficas.

Ao Prof. Felix José Nonnenmacher, pela revisão do inglês.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Como invariavelmente são as paixões que movem o ser humano, gostaria de agradecer ao meu querido Sport Club Internacional. Só quem conhece a mim e a família Alves de perto compreende a dimensão e a beleza desta grande paixão.

“Preocupe-se mais com a sua consciência do que com sua reputação. Porque sua consciência é o que você é, e a sua reputação é o que os outros pensam de você”.

Bob Marley

“As convicções são inimigas mais perigosas da verdade do que as mentiras”.

Friedrich Nietzsche.

## SUMÁRIO

Apresentação .....	1
Referências bibliográficas gerais .....	3
Capítulo 1: Chemotaxonomy of Genus <i>Mikania</i> (Asteraceae) Based on Chemical Profile Database and Multivariate Analysis.....	6
Resumo .....	7
Abstract .....	8
Introduction .....	9
Metodology .....	10
The database .....	10
Geographic distribution .....	11
Infrageneric classification and inflorescence types .....	11
The occurrence number .....	11
The shikimate/acetate-isopentenyl pyrophosphate ratio (SH/AC+IPP).....	11
The flavone/flavonol ratio (FN/FL) .....	12
Selection of chemosystematic markers and cluster analysis .....	12
Principal component analysis (PCA) .....	13
Results and discussion.....	13
Monoterpenes .....	13
Non-lactone sesquiterpenes (NLSEs) .....	14
Sesquiterpene lactones (SLACs) .....	15
Diterpenes .....	18
Lignans .....	20
Coumarins .....	21
Triterpenes .....	22
Alkaloids .....	22
Flavonoids .....	23
Chromenes and chromones .....	24
Other arylpropanoids .....	24
The shikimate/acetate-isopentenyl pyrophosphate ratio .....	25
Flavone/flavonol ratio .....	25
Clustering and PCA .....	26
Conclusions .....	30
Figures .....	32
Captions .....	42
References .....	44

Capítulo 2: Relações quimiotaconômicas no gênero <i>Stevia</i> Cav. (Asteraceae, Eupatorieae)	47
Resumo	48
Abstract	49
Introdução	50
Metodologia	52
O Banco de dados	52
Informações taxonômicas e fitogeográficas	52
Número de ocorrências (NO)	53
A relação chiquimato/acetato-isopentenil pirofosfato [CH/(AC+IPP)]	53
A relação flavona/flavonol (FN/FL)	54
Seleção e classificação dos marcadores quimiotaconômicos	54
Análises de agrupamento	54
Análise de componentes principais (PCA)	55
Resultados e discussão	56
Perfil químico micromolecular	56
Lactonas sesquiterpenoídicas	56
Derivados do longipinano	59
Diterpenóides	59
Alcalóides pirrolizidínicos	61
Flavonóides e relação FN/FL	61
Relação CH/(AC+IPP)	62
Análise de agrupamento	63
Análise de componentes principais (PCA)	64
Conclusões	66
Figuras e tabelas	68
Referências bibliográficas	75
Considerações finais	81

## APRESENTAÇÃO

A Quimiotaxonomia Vegetal é uma área da botânica cujo objetivo central compreende a utilização de dados químicos para a resolução de problemas de natureza taxonômica (Gottlieb 1982). É inegável o seu papel como ferramenta na otimização e direcionamento de pesquisas em produtos naturais com atividade biológica (Gottlieb *et al.* 1996). O papel dos metabólitos secundários como caracteres de importância taxonômica adquiriu maior visibilidade à medida que seu uso em classificações botânicas tornou-se mais freqüente, fato este impulsionado pela importância farmacológica destas substâncias. Isto já pode ser verificado no sistema de classificação de linhagens de Angiospermas proposto por Dahlgren (1980).

A análise do padrão de ocorrência de metabólitos secundários contribui para o estabelecimento de grupos de marcadores químicos que em conjunto com outros caracteres favorecem a robustez dos estudos taxonômicos de linhagens vegetais. De fato, é digno de menção que caracteres químicos micromoleculares são de grande valia para a consolidação de filogenias estabelecidas (Wink 2003, Liscombe *et al.* 2005). Por sua vez, tais filogenias favorecem muitas vezes a visualização do desenvolvimento evolutivo desses caracteres tão importantes sob o ponto de vista de utilização humana.

O uso de dados químicos micromoleculares para estudos com grandes grupos vegetais, por meio de parâmetros químicos e morfológicos de avanço evolutivo, vem demonstrando a existência de gradientes químicos de afinidade entre tais grupos (Gottlieb 1982, Gottlieb *et al.* 1996), e tem sido aplicada com sucesso em muitas ocasiões (Castilho & Kaplan 2006, Emerenciano *et al.* 2001, Soares & Kaplan 2001, Figueiredo *et al.* 1995). No entanto, para níveis hierárquicos inferiores, tais como gêneros e espécies, a utilização de parâmetros químicos e morfológicos encontra algumas limitações de ordem analítica. Técnicas atuais de análise multivariada e métodos computacionais envolvendo inteligência

artificial surgem como uma alternativa moderna de abordagem para os estudos quimiotaxonômicos nesses casos (Emerenciano 2007, Da Costa 2005, Correia 2008, Cruz 2008, Ferreira 2005, Ferreira 2004, Alvarenga 2001).

Asteraceae possui posição destaque entre as Eudicotiledôneas por sua imensa diversidade biológica, inclusive no Brasil onde é representada por aproximadamente 180 gêneros e 1900 espécies (Barroso *et al.*, Nakajima & Semir 2001). Além disso, é uma das famílias com maior diversidade micromolecular, o que certamente tem relação com o papel adaptativo dessas substâncias. Este grupo é também constantemente citado pelas espécies amplamente utilizadas na medicina tradicional de diversos países (Roque & Bautista 2008), gerando interesse adicional devido as suas potencialidades farmacológicas.

Nesse contexto, *Mikania* Willd. e *Stevia* Cav. são dois gêneros de grande diversidade e interesse farmacológico dentro de Eupatorieae, uma tribo derivada de Asteraceae e que se relaciona intimamente com Heliantheae e Helenieae (Baldwin *et al.* 2002, Urbatsch *et al.* 2000). Tais gêneros provavelmente ocupam uma posição de divergência precoce na árvore filogenética de Eupatorieae. No entanto, esse posicionamento permanece carente de maior resolução (Ito *et al.* 2000a,b, Schilling *et al.* 1999, Schmidt & Schilling 2000).

Somado às questões de ordem evolutiva, existe ainda um amplo interesse econômico acerca do estudo da composição química e atividades biológicas das espécies de *Mikania* e *Stevia*. No caso de *Mikania* isso se deve principalmente às suas potencialidades farmacológicas sugeridas pelo amplo uso na medicina tradicional (Oliveira *et al.* 1984), enquanto que para *Stevia* há o interesse em substâncias com propriedades organolépticas, tais como as apresentadas pelos glicosídeos doces do steviol isolados de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

O objetivo fundamental desse trabalho foi elaborar um amplo banco de dados com informações micromoleculares e discutir os padrões quimiotaxonômicos de *Mikania e Stevia*. Para se alcançar essa meta, foi utilizada uma abordagem metodológica interdisciplinar que faz uso de técnicas estatísticas e computacionais para analisar os padrões de ocorrência de marcadores micromoleculares. Além disso, se pretendeu verificar a existência ou não de padrões que associem dados químicos com aspectos filogenéticos, morfológicos e/ou fitogeográficos. Deste modo, pretende-se também disponibilizar uma ferramenta que favoreça a racionalização de pesquisas de produtos naturais com atividade biológica nestes dois gêneros, através da análise de ocorrências de metabólitos secundários.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ALVARENGA, S.A.V., FERREIRA, M.J.P., EMERENCIANO, V.P. & CABROL-BASS, D. 2001. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System* 56:27-37.
- BALDWIN, B.G., WESSA, B.L. & JOSE L. PANERO, J.L. 2002. Nuclear rDNA evidence for major lineages of Helenioid Heliantheae (Compositae). *Systematic Botany* 27:161-198.
- BARROSO, G.M., PEIXOTO, A.L., COSTA, C.G., ICHASO, C.L.F., GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. 1991. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. v.3. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa.
- CASTILHO, R.O. & KAPLAN, M.A.C. 2006. Chemosystematics of the Rosiflorae. *Brazilian Journal of Biology* 68:633-640.
- CORREIA, M.V., SCOTTI, M.T., FERREIRA, M.J.P., VESTRI, S.A., ALVARENGA, S. A.V., RODRIGUES, G.V. & EMERENCIANO, V.P. 2008. Self-organizing maps as a new tool for classification of plants at lower hierarchical levels. *Natural Product Communications* 3:1723-1730.



- DA COSTA, F.B., TERFLOTH, L. & GASTEIGER, J. 2005. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry* 66:345-353.
- DAHLGREN, R.M.T. 1980. A revised system of classification of the Angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* 80:91-124.
- EMERENCIANO, V.R., BARBOSA, K.O., SCOTTI, M.T. & FERREIRA, M.J.R. 2007. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* 18:891-899.
- EMERENCIANO, V.P., MILITAO, J.S.L.T., CAMPOS, C.C., ROMOFF, P., KAPLAN, M.A.C., ZAMBON, M. & BRANT A.J.C. 2001. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29:947-957.
- FERREIRA, M.J.P., BRANT, A.J.C., ALVARENGA, S.A.V. & EMERENCIANO V.P. 2005. Neural networks in chemosystematic studies of asteraceae: A classification based on a dichotomic approach. *Chemistry & Biodiversity* 2:633-644.
- FERREIRA, M.J.P., BRANT, A.J.C., RUFINO, A.R., ALVARENGA, S.A.V., MAGRI, F.M.M. & EMERENCIANO, V.P. 2004. Prediction of occurrences of diverse chemical classes in the Asteraceae through artificial neural networks. *Phytochemical Analysis* 15:389-396.
- FIGUERIEDO, M.F., KAPLAN, M.A.C. & GOTTLIEB, O.R. 1995. Diterpenes, taxonomic markers? *Plant Systematic and Evolution* 195:149-158.
- GOTTLIEB, O.R., BORIN, M. R. M. B. & KAPLAN, M.A.C. 1996. Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico. 1ed. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. v.1. Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- GOTTLIEB, O. R. 1982. Micromolecular evolution, systematics and ecology an essay into a novel botanical discipline. Springer Verlag, Berlim e Nova Iorque.
- ITO, M., WATANABE, K., KITA, Y., KAWAHARA, T., CRAWFORD, D.J. & YAHARA, T. 2000a. Phylogeny and phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): insights from sequence data of the nrDNA ITS regions and cpDNA RFLP. *Journal of Plant Research* 1109:79-89.
- ITO, M., YAHARA, T., KING, R.M., WATANABE, K., OSHITA, S., YOKOYAMA, J. & CRAWFORD, D.J. 2000b. Molecular phylogeny of Eupatorieae (Asteraceae)

estimated from cpDNA RFLP and its implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe. *Journal of Plant Research* 1109:91-96.

LISCOMBE, D.K., MACLEOD, B.P., LOUKANINA, N., NANDI, O.I. & FACCHINI, P.J. 2005. Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in Angiosperms. *Phytochemistry* 66:1374-1393.

NAKAJIMA, N.J. & SEMIR, J. 2001. Asteraceae no Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 24:471-478.

OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M.A.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. 1984. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo* 20:169-183.

ROQUE, N. & BAUTISTA, H. 2008. Asteraceae: caracterização e morfologia floral. Salvador: Editora da Universidade Federal da Bahia.

SCHILLING, E. E., PANERO, J. L. & COX, P. B. 1999. Chloroplast DNA restriction site data support a narrowed interpretation of *Eupatorium* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 219:209-223.

SCHMIDT, G.J. & SCHILLING, E.E. 2000. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. *American Journal of Botany* 87:716-726.

SOARES, G.L.G. & KAPLAN, M.A.C. 2001. Analysis of flavone/flavonol ratio in Dicotyledoneae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135:61-66.

URBATSCH, L.E., BALDWIN, B.G. & MICHAEL J. DONOGHUE, M.J. 2000. Phylogeny of the coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequence and chloroplast DNA restriction site data. *Systematic Botany* 25:539-565.

WINK, M. 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogeny perspective. *Phytochemistry* 64:3-19.

## CAPÍTULO 1

Chemotaxonomy of Genus *Mikania* Willd. (Asteraceae) Based on  
Chemical Profile Database and Multivariate Analysis

Tiago L.S. Alves<sup>\*</sup>, Mara R. Ritter and Geraldo L. G. Soares.

(Artigo submetido para publicação no Journal of the Brazilian Chemical  
Society)

Chemotaxonomy of Genus *Mikania* Willd. (Asteraceae) Based on Chemical Profile  
Database and Multivariate Analysis.

Keywords: *Mikania*, Asteraceae, Principal Component Analysis, Chemotaxonomy, Kauranes.

Resumo: O gênero *Mikania* (Asteraceae, tribo Eupatorieae) apresenta aproximadamente 450 espécies, muitas delas especialmente importantes por seu uso em medicina tradicional. Para a análise quimiotaxonômica, um banco de dados acerca da composição micromolecular de *Mikania* foi criado. Foram elaboradas análises de agrupamento e de componentes principais, bem como o cálculo de parâmetros evolutivos usados em quimiotaxonomia. O perfil químico e a análise estatística multivariada demonstraram que diterpenóides, lactonas sesquiterpenoídicas e cumarinas são os marcadores químicos mais importantes para este gênero. A presença de dicotomia entre a produção de lactonas sesquiterpenoídicas e diterpenóides não foi estritamente confirmada para o gênero, embora esteja claro que a produção de um interfere negativamente na do outro. As relações SH/(AC+IPP) e FV/FL foram compatíveis com o posicionamento de *Mikania* na família Asteraceae. As análises de componentes principais (PCA) e de agrupamento forneceram informações que correlacionam caracteres morfológicos e geográficos com dados químicos. As espécies distribuídas predominantemente no Brasil são consideradas muito mais ricas em diterpenos do tipo kaurano, assim como tendem a apresentar inflorescências tirsóides. Por outro lado, espécies não-brasileiras tendem a acumular lactonas sesquiterpenoídicas e apresentar preferencialmente inflorescências do tipo corimbosa.

Abstract: The genus *Mikania* (Asteraceae, tribe Eupatorieae) encompasses around 450 species, many of which especially important due to their use in folk medicine. A database of the micromolecular composition of *Mikania* was generated for a chemotaxonomic analysis. Clustering and Principal Components Analysis (PCA) were performed, as well the calculation of evolutive parameters used in chemotaxonomy. The chemical profile and the statistical multivariate analysis demonstrated that diterpenes, sesquiterpene lactones and coumarins are the most important chemical markers in this genus. The presence of dicotomy between the production of sesquiterpene lactones and diterpenes was not strictly confirmed for the genus, although it is clear that the production of one interferes negatively with the other. The SH/(AC+IPP) and FV/FL ratios are compatible with the positioning of *Mikania* in the Asteraceae family. The PCA and clustering analysis provided information correlating morphological characters and geographical patterns with chemical data. The species distributed predominantly in Brazil are considered very rich in kaurane diterpenes quite prone to present thyrsoid inflorescences. In contrast, non-Brazilian species trend to accumulate mostly sesquiterpene lactones, preferentially presenting the corymbose inflorescence type.

## Introduction

Asteraceae is one of the largest families of flowering plants and represents about 10% of this group's species diversity<sup>1</sup>. Besides, it is considered a derived group among Eudicotyledons<sup>2</sup>. Chemosystematic studies using secondary metabolites as markers in Asteraceae have been consistently conducted in the past ten years<sup>3,4,5,6,7</sup>. The majority of these studies were focused on the tribe level, mostly because the phylogenetic relationship at this hierarchical level remains problematic. On the other hand, chemosystematic investigations at generic or infrageneric levels are uncommon for the family, although such studies have been performed for *Scalesia* Arn. (tribe Heliantheae)<sup>8</sup>, *Leontodon* Adans. (tribe Lactuceae)<sup>9</sup> and *Artemisia* L. (tribe Anthemideae)<sup>10</sup>. Thus, it is important to develop more elaborated studies also at generic level.

*Mikania* Willd. (tribe Eupatorieae) is considered a genus with high diversity in its tribe, and comprehends about 450 species with a pantropical distribution reaching the temperate America and southwest Africa<sup>11</sup>. The species of this genus are characterized by the scandent habit, though there are as well less commonly erect and decumbent representatives<sup>12</sup>. According to molecular studies based on Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) of plastidial DNA, *Mikania* is placed in a basal position in tribe Eupatorieae, together with the genera *Stevia* Cav. and *Ageratina* Spach<sup>13,14,15</sup>.

More detailed research about the chemosystematic markers of Eupatorieae is important in order to complement the biological knowledge established for tribe. In this context, sesquiterpene lactones (SLACs)<sup>16</sup>, diterpenes<sup>3</sup> and flavonoids<sup>17</sup> are considered the typical micromolecular markers of Asteraceae.

In Brazil, species belonging to *Mikania* are used in folk medicine and are known

by the vernacular name of “guaco”<sup>18</sup>. The ethnopharmacological use of plants is often the starting point for research on medicinal effects. Indeed, this approach is common for the genus and several of its medicinal effects are known, *e.g.* antiallergic<sup>19</sup>, antibacterial<sup>20</sup>, antiinflammatory<sup>21</sup>, antiprotozoan<sup>22</sup> and bronchodilating<sup>23</sup>.

The main advantage of investigating chemical characters side by side with those commonly used in systematic and phylogenetic studies is that the approach affords predicting the occurrence of secondary metabolites in a determined taxon. The usefulness of this approach to optimize pharmacological studies is undeniable<sup>24</sup>. The main objective of this article is to describe and to analyze the micromolecular chemical profile of the genus *Mikania*, associating morphological and geographic patterns with chemical data through multivariate statistical methods. It is also proposed a discussion about the chemical affinity of the species between themselves and with some related taxa belonging to Eupatorieae with enough chemical data available in the current literature.

## **Methodology**

### *The database*

Initially, a global bibliographic survey was conducted about the micromolecular chemical profile of *Mikania*. A comprehensive revision was performed in search for phytochemical information in internet databases and review articles<sup>25,26</sup>. As starting point, several scientific websites were consulted to construct a micromolecular database. In this bibliographic survey the keywords used were “*Mikania*” and “*Kanimia*” Gardner (a genus included recently in *Mikania*). The websites visited in this study were ISI Web of Knowledge, PubMed, Chemical Finder, Chemical Abstracts, Scielo and Science

Direct. No restriction date was established and the relevant articles were always thoroughly perused.

#### *Geographic distribution*

All *Mikania* species were classified into the following five categories, according to geographical distribution: Mesoamerican (including North America and Caribbean Islands), Andean, Brazilian, Argentine (including some south Brazil species) and Widespread. Phytogeographical data were obtained from specialized publications<sup>11,27,28</sup> and from an online herbarium database (Tropicos and IPNI).

#### *Infrageneric classification and inflorescence types*

The infrageneric classification of *Mikania* remains unclear and surrounded by controversy. The proposals made by two taxonomists<sup>27,28,29</sup> were considered as a source of information on inflorescence type in our analysis.

#### *The occurrence number*

The occurrence number (NO) is a simple yet strong tool in chemosystematic studies. This variable was calculated taking into account the sum of the numbers of different secondary metabolites isolated for each taxon belonging to a determined class of compounds or metabolic pathways.

#### *The shikimate/acetate-isopentenyl pyrophosphate ratio [SH/(AC+IPP)]*

The SH/(AC+IPP) ratio was calculated from the quotient between the NO of metabolites deriving from shikimate biosynthetic pathway and the NO of metabolites deriving from the acetate or IPP pathway. As a rule, this value can be expressed as



percentage. Occurrence of the same compound in two or more species was cumulatively computed for genus analysis. Metabolites synthesized using precursors of both biosynthetic pathways were considered as occurrence for each one of them<sup>24</sup>.

#### *The flavone/flavonol ratio (FN/FL)*

The FN/FL ratio was established using the quotient between NO of flavones and the NO of flavonols. Other classes of flavonoids, like dihydroflavones and dihydroflavonols, were not considered. Occurrence of the same compound in two or more species was cumulatively computed for genus analysis<sup>30</sup>.

#### *Selection of chemosystematic markers and cluster analysis*

A cluster analysis was performed using the chemical data obtained from the database built with the occurrence of secondary metabolite in *Mikania*. For the cluster analysis, secondary metabolites regarded as two chemosystematic markers for Asteraceae (sesquiterpene lactones and diterpenes) together with coumarins were considered. A few species lacking the chemosystematic markers chosen were excluded from the cluster analysis and principal component analysis (PCA). A data matrix (NO matrix) was created using the NO of these selected chemosystematic markers divided in subgroups, according to their skeleton type.

The binary matrix was analyzed using the PAST<sup>®</sup> software. Qualitative data were chosen as input for the cluster analysis, and the Jaccard coefficient was used for grouping species according to their chemical similarity. This coefficient omits negative consideration for grouping and, despite its apparent mathematical simplicity, is very useful in phenetic approaches. The NO matrix was transformed into a binary matrix of qualitative (absence or occurrence) in which each *Mikania* species was considered as an

operational taxonomic unit (OTU). The occurrence of a character was represented by 1 and the absence by 0. Clustering was conducted using the unweighted pair group method with arithmetic averaging (UPGMA).

#### *Principal component analysis (PCA)*

The PCA was performed using the PAST<sup>®</sup> software in the same binary matrix constructed for the cluster analysis. This analysis was performed in order to support and complement the cluster analysis.

## **Results and discussion**

#### *Monoterpenes*

Monoterpenes seem to be well distributed in *Mikania*, although their occurrences were limited to about one third of the species analyzed. The presence of a considerable amount of monoterpenes has been reported in studies on essential oils<sup>31,32,33,34,35,36,37</sup>. However, the majority of phytochemical studies of *Mikania* are about isolation of non-volatile compounds — a fact which could explain the apparent absence of monoterpenes in some species.

Monoterpenes are not generally considered good taxonomic markers for Asteraceae, and this is also verified for *Mikania*. Most of the monoterpenes isolated in this genus are considered widespread in flowering plants and their occurrences are commonly associated with responses to environmental factors. On the other hand, some isolated and relevant occurrences should be pointed out. In *M. saltensis* Hieron., a species notably marked by anomalous micromolecular chemistry, unusual quiral menthane derivatives, which are new as natural products, were identified<sup>38</sup>.

Sesquiterpenes are the main compounds in the essential oil of *M. paranensis* Dusén, and no monoterpene derivative could be observed<sup>35</sup>. Similarly, the Amazonic species *M. amara* Willd. has been reported to have an essential oil particularly poor in terpenoids. It only provides the aromatic monoterpenes cymene and thymol in addition to a wide amount of linear aliphatic alcohols. In *M. pohlii* (Baker) R.M.King & H.Rob.<sup>39</sup>, *M. goyazensis* (B.L.Rob.) R.M.King & H.Rob.<sup>39</sup>, *M. shushunensis* W.C.Holmes & McDaniel<sup>40</sup>, *M. alvimii* R.M.King & H.Rob.<sup>41</sup>, *M. purpurascens* (Baker) R.M. King & H. Rob.<sup>42</sup> and *M. officinalis* Mart.<sup>43</sup>, we could observe some thymol derivatives and no other monoterpenes. These compounds were isolated mainly in studies designed to detect non-volatile compounds, and their chemosystematic relevance remains to be more consistently proved.

An accurate analysis of the classical works available on essential oil showed that monoterpenes of *Mikania* are very commonly found in unrelated plant species and are not considered taxonomic markers. Substances like  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, mircene,  $\alpha$ -thujene and linalol have been reported to be the major components of essential oils, being also the major monoterpene derivatives found in *Mikania* species.

#### *Non-lactone sesquiterpenes (NLSEs)*

Based on the chemical data available, we could observe the occurrence of NLSEs in about a half the species of *Mikania* investigated. Although these sesquiterpene derivatives show a larger distribution as compared to monoterpenes, the conclusions arrived at for each NLSEs are very similar to those reached for monoterpenes, in spite of some evident differences in percentage occurrence of these substances in *Mikania* species. NLSEs were considered bad taxonomic markers for the same reasons as monoterpenes. The greater occurrence that leads to a wider distribution

of sesquiterpenes — when compared with monoterpenes — can be explained by differences in molecular weight and polarity between these terpene derivatives. Thus, this greater occurrence is the consequence of the higher probability of detection of sesquiterpenes in studies designed to isolate non-volatile compounds.

Only for two species of this genus is the presence of NLSEs discussed. In *M. hirsutissima* DC. the presence of uncommon norhumulene type was cited<sup>44</sup>. Besides, *M. hirsutissima* is a very curious species due to its singular chemical profile characterized by the production of norsesquiterpene derivatives. As regards *M. shushunensis*, the occurrence of bisabolone derivatives as main compounds has been reported<sup>40</sup>.

#### *Sesquiterpene lactones (SLACs)*

SLACs were considered as good chemotaxonomic markers of Asteraceae and the same was also verified for *Mikania*. They were found in precisely 50% of the species analyzed. This value is a little lower than that observed for NLSE. At first sight, it does not seem to support the chemosystematic importance of SLACs. Nevertheless, the careful interpretation of the data points to the great importance of this class of terpenoids. It is important to bear in mind that NLSEs are not usually detected or that their occurrence is not mentioned. Due to their structural singularity and restricted distribution patterns, the isolation of SLACs is found in more specialized phytochemical articles. Several screening studies have been conducted for *Mikania* species and the fact that some do not report the isolation of SLAC is a likely indication of the absence of these compounds in a species of the genus.

SLACs are diverse in *Mikania*. It was verified the occurrence of six distinct skeleton types (Figure 1), mostly germacrane derivatives named germacrane lactones. Germacrane lactones were subcategorized into four groups according to the special

configuration of the two common double bonds (or their substitutes in some cases) in the 10 carbon ring (Figure 2). This skeleton classification was preferred because these different double bonds configurations are strong indications that they are synthesized by means of distinct precursors or that there are different ways of cyclization using the same precursor. In both cases, there is enough evidence that all germacrane lactones do not lie strictly on the same biogenetic pathway.

Germacrenolides *sensu stricto* are the typical SLAC of this sesquiterpene biogenetic group, occurring in 74% of the species which produce SLACs. The other germacrane lactones, although structurally similar to germacrenolides, exhibit a more restricted occurrence. Heliangolides are present in 19% of the SLACs-producing species and always co-occur with germacrenolides. Otherwise, melampolides, which are present in 22% of SLACs-producing species, co-occur with the germacrenolides only in a half of the cases. *Cis-cis* germacrenolides are exclusive compounds of *M. thapsoides* DC.<sup>45</sup>. Dimeric germacrenolides occur only in *M. pohlii*<sup>39</sup> and in *M. goyazensis*<sup>39</sup>.

Elemanolides are the second most common SLAC type in *Mikania*. They are present in 37% of SLACs-producing species. Eudesmanolides and guaianolides also are important SLACs produced by *Mikania*, and were found in 26% and 19% of the SLAC-producing species, respectively. Cadinanolides were found exclusively in *M. haenkeana* DC.<sup>46</sup>, while seco-germacrenolides were restricted to *M. vitifolia* DC.<sup>47</sup>.

The SLACs types found in *Mikania* can be considered less specialized, depending on their biogenetic stages. In chemosystematics studies, the predominant occurrence of less specialized compounds is generally associated with a basal status in plant lineages<sup>48</sup>. Germacrenolides are the most widespread and structurally diverse SLAC type in the genus and constitute the first biogenetic step in this hierarchic grid. The occurrence of compounds restricted to first and second biogenetic steps is another important aspect of the SLAC profile

of *Mikania*. This chemical profile is coherent with the ancestral position of *Mikania* in Eupatorieae.

Germacrane lactones and the second step SLACs derivatives are very common in basal or derived Eupatorieae species. The occurrence of a great diversity of germacranolides was observed in *Ageratina*. In this basal genus, eudesmanolides, heliangolides and guaianolides also occur, but there is no citation of more specialized SLAC types also absent in *Mikania*<sup>49</sup>. In the most derived genera of Eupatorieae, *Eupatorium* L. and *Critonia* P. Browne, basically the same types of SLACs found in *Ageratina* and *Mikania* were observed<sup>50,51</sup>. On the other hand, some taxa in tribes Helenieae and Heliantheae are richer in SLACs with more specialized skeletons like xanthanolides, ambrosanolides and helenanolides<sup>52</sup>. The tribes Helenieae, Heliantheae and Eupatorieae are members of the monophyletic “Helianthoid Clade” and a phylogenetic study at tribe level indicates that Eupatorieae is derived from a Heliantheae member<sup>13</sup>. The ancestral of tribe Heliantheae may be a poorly specialized SLAC-producing species and this state of character was retained from basal genera, like *Mikania* and *Ageratina*, and apparently does not evolve to more specialized skeletons with time. An alternative possibility was that in basal genera the ability of production of SLACs with more steps in the biogenetic pathway was rapidly lost, characterizing a reversion in this state of character in Eupatorieae.

The chemical profile of SLACs in *Mikania* produces some difficult interpretations in an evolutionary context, but it was very useful for grouping species according to chemical similarity. This phenetic analysis does not reflect necessarily the evolutionary trends, but undoubtedly it is very useful to optimize research on natural products.

## *Diterpenes*

Diterpenes were also considered chemosystematic markers for *Mikania*. These compounds were found in almost 57% of the species, including the occurrence of seven basic skeletal types in this genus (Figure 3). The diterpene chemistry of *Mikania* is a little less complex than its SLAC chemistry and is characterized by the most common skeletal types found in flowering plants.

Kauranes are very widespread in *Mikania* and are considered the most common diterpene type for this genus. It occurred in 71% of the diterpene-producing species, and in 45% of them kaurane was the only diterpene type detected. A great structural variety of kaurene acids with different specialization levels was also verified. Most of these compounds are commonly known as “kaurenoic acids” and are considered the main representatives of this diterpene type in *Mikania*. Kaurane glycosides are very common in *Stevia*, but considering the genus *Mikania* the compounds have been found only in *M. lasiandrae* DC.<sup>53</sup>. Nor-kaurane derivatives only occur in *M. banisteriae* DC.<sup>54</sup> and *M. hirsutissima*<sup>55</sup>. From the pharmacological point of view, kauranes form a particularly interesting diterpenoid category because of their wide array of biological activities<sup>56</sup>, and their occurrence in *Mikania* deserves to be underlined (Figure 4).

Phytanes were present in 23% of the species which produced diterpenes. Although linear diterpenes are chemically simple, they were maintained in this analysis because some species tend to produce a considerable amount of geranyl-geranyl derivatives. It is interesting to emphasize that in the few cases in which SLACs co-occur with diterpenes, the structural type more frequently considered is phytane, along with other geranyl-geranyl derivatives. This indicates that the presence of SLACs is associated to a quite retracted chemistry of diterpenes in *Mikania* (Figure 5). A strict

dichotomy was not verified, but it is clear that production and accumulation of one kind of secondary metabolite tends to interfere negatively with the other.

Labdanes were detected in 16% of the diterpene-producing species. It is relevant to mention that *M. pyramidata* Donn. Sm., *M. alvimii* and one new Brazilian species, which remain without specific epithet and is named henceforth as *Mikania* sp., preferentially produce labdane.

The occurrence of pimarane derivatives in species which produce diterpenes reaches 13%. *M. triangularis* Baker shows an uncommon diversity of pimarane derivatives.

Nor-labdanes are exclusive of *M. aff. jeffreyi*<sup>57</sup> and *M. alvimii*<sup>41</sup>.

Abietane derivatives were isolated only for *M. banisteriae*<sup>54</sup> and *M. triangularis*<sup>58</sup>. Beyeranes, structurally close to kauranes, are exclusive for *M. glomerata* Spreng.<sup>59</sup>. Erythroxylenes were found only in *Mikania* sp.<sup>60</sup>, a curious occurrence for its unusual tricyclic skeleton structurally related with clerodane.

In Asteraceae the occurrence of 82 diterpene skeleton types was verified, including nor-derivatives<sup>3</sup>. Despite this large diversity, the most common diterpenes found, with more than 50 occurrences in this family, were geranyl-geranyl derivatives, labdanes, pimaranes, clerodanes, abietanes, kauranes and trachylobanes. These diterpene types reach 82% of total occurrence of diterpenes in Asteraceae.<sup>2</sup> The diterpene profile of *Mikania* shows almost the same pattern verified for its family, except for the lack of trachylobanes, which are characteristic of the tribe Heliantheae, and the total absence of the relatively common clerodanes.

The diterpene profiles, like the SLAC profile, were shown to be useful as a chemical tool to detect chemical similarities among *Mikania* and other Eupatorieae genera. Indeed, *Mikania* has a diterpene chemistry which supports its positioning in



tribe Eupatorieae. Although the chemical data of the entire tribe remains fragmented, some inferences could be made. Similar diterpene profiles can be observed in other Eupatorieae genera, and the main difference is the apparent absence of clerodanes in *Mikania*. In spite of this fact, clerodanes are the main diterpene type in some Eupatorieae genera, such as *Ageratina*<sup>3</sup>. Otherwise this genus has a considerable occurrence of other diterpene types frequently found in *Mikania*, like kauranes and labdanes<sup>3,48</sup>. The diterpene chemistry of *Stevia* is also characterized by the great production of kauranes. Yet, the main difference in the diterpene profile of *Stevia* is the predominance of labdanes which are less common in *Mikania*<sup>3</sup>. A similar diterpene profile is also observed in *Eupatorium* and *Critonia*, which chiefly accumulate labdanes and kauranes<sup>4,49,50</sup>.

### *Lignans*

Lignans are a class of secondary metabolites characteristic of shikimate pathway associated to extreme basal lineages of Angiosperms<sup>24,48</sup>. They are particularly frequent and structurally diverse in Magnoliid lineages. As typical chemical markers of basal status, the occurrence of lignans in two species of *Mikania* was curiously verified. A brief search on literature data shows few occurrences of lignans in Asteraceae, but never in Eupatorieae<sup>61</sup>. Besides, the lignans of *Mikania* are pinosresinol derivatives which belong to a very common class of called furanofuranic lignans.

The occurrence of lignans is restricted to *M. saltensis*<sup>38</sup> and *M. haenkeana*<sup>46</sup>. Coincidentally these two species are uncommon in the chemical profile on the whole. *M. saltensis* does not produce diterpenes or SLACs, producing only some uncommon menthane derivatives. *Mikania haenkeana* is special in that the species is the only one that produces cadinanolides. Although the presence of furanofuranic lignans is

interesting, their occurrence is not enough to afford chemotaxonomic considerations.

### *Coumarins*

Coumarins occur in 20% of the species (Figure 6). Most of the pharmacological activities of medicinal species of *Mikania* are attributed to this class of secondary metabolites<sup>62</sup>. Together with their clear importance from the pharmacological point of view, coumarins seem to have significant value in chemotaxonomic approaches in Asteraceae. Although *Mikania* produces only the simple coumarin type, mainly 1,2-benzopyrone or its derivatives scopoletin and isoscapoletin, the occurrence of this class of compounds is considered important for two reasons. First, simple coumarins are abundant in some morphologically related well studied species, like *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker and *M. glomerata*. This fact could establish a link between chemical and morphological characters which may be very useful in chemotaxonomy. Second, simple coumarins are strict chemosystematic markers for genus *Pterocaulon* Elliott in tribe Plucheeae, Asteraceae<sup>63</sup>. These indicate that coumarins may be a useful character in Asteraceae taxonomy.

An in-depth evaluation of coumarin distribution in Angiosperms shows that Asteraceae produces only two types of coumarins: simple coumarin (in 98.68 % of times) and linear furanocoumarins (in the other 1.33%)<sup>64</sup>. For example, furanocoumarins were isolated from *Cicerbita alpina* Wallr. (tribe Lactuceae)<sup>65</sup> and *Chaptalia integerrima* (Vell.) Burkart (tribe Mutisieae)<sup>66</sup>, but apparently the compounds have not been detected in any Eupatorieae genera. In fact, production of simple coumarin types with low skeleton modifications are the typical trend in Asteraceae, and the chemical profile of *Mikania* concerning coumarins agrees with this observation.

### *Triterpenes*

Triterpenes occurred in 37% of the species with chemical data available. The skeletons found belong to ursane, oleanane, taraxastane, friedelane and lupane types. All of these are very common pentacyclic triterpenes, with a large distribution in flowering plants. As precursor of phytosterols, sometimes triterpenes are considered by many as a superimposition among primary and secondary metabolism. Besides, triterpenes are taxonomic markers for a few angiosperm families. Basically, triterpenes are good markers in Simaroubaceae<sup>67</sup>, Rutaceae<sup>68</sup> and Meliaceae<sup>68</sup>. The occurrence of very specialized and highly oxygenated nortriterpenes was observed in these families. Additionally, a brief survey of the literature database shows that Asteraceae is poor in triterpene diversity. In this scenario, it was verified that triterpenes of *Mikania* are probably worthless from a chemosystematic point of view.

### *Alkaloids*

So far, no record of alkaloids in *Mikania* species has been made. Although qualitative assays are sometimes positive for alkaloids, such results are probably due to cross-reaction with coumarins, which in actual fact should be considered false positive results<sup>18</sup>. Besides, for *M. guaco* Humb. & Bonpl. the presence of pyrrolizidine alkaloids (PAs) was not observed when specifically searched for<sup>69</sup>. The presence of aliphatic alkaloids in Asterales *sensu* APG, 2003 is largely mentioned and its occurrence in Asteraceae is characterized by the typical presence of PAs in some tribes. The presence of PA in members of tribes Senecioneae and Eupatorieae has been consistently characterized. It is noteworthy that these tribes are not strictly related and that the detection of PAs is an independent event in the evolution in each tribe<sup>70</sup>. The presence of PAs or any other alkaloid type in Eupatorieae is restricted to more derived genera, like

*Eupatorium*, *Critonia* and *Liatris* Gaertn. ex Schreb.

### *Flavonoids*

Flavonoids are considered excellent taxonomic markers for Asteraceae because they possess a high structural diversity, have been isolated in high scale and are widespread throughout the family<sup>71,72</sup>. Besides, there are chemosystematic approaches that use flavonoid data aimed at defining phylogenetic relationships of the family at tribe level<sup>6,17</sup>. These articles also show that Eupatorieae has a high number of occurrences of flavonoids, mostly flavonols and flavones. Surprisingly, flavonoids were verified in only in 22% of of *Mikania* species. In fact, flavonoids are virtually ubiquitous in land plants and the low occurrence was very probably associated with the design of phytochemical analysis of most of the studies used in the database. These works were focused mainly on the isolation of terpenoids, not phenolics. Thus, we chose to exclude flavonoids from the cluster analysis because the data were not enough in volume to afford grouping or characterizing species individually. Otherwise, at generic level we could observe some trends.

The flavonoids of *Mikania* are mainly flavonols. Kaempferol and quercetin, together with their derivatives, are the most common flavonol types found in *Mikania*. These flavonols are considered extremely common in plants. *M. cordata* (Burm. f.) B.L. Rob. and *M. micrantha* Kunth were the species in which more flavonoids were isolated. Analyzing the substitution pattern of the flavonoids isolated for this genus, we could observe the typical 4,6 OH or O-R substitution pattern in ring A and the equally characteristic 4' or the 3',4' OH substitution in ring B. The most special trend in this genus is the presence of methoxiles in position 6, observed in the vast majority of flavonoids isolated from *M. cordata* and *M. micrantha*. The general flavonoid profile of

*Mikania* is considered a very ancestral and low specialized pattern in flowering plants.

#### *Chromenes and chromones*

Chromenes are absent in *Mikania* and chromones were reported only in *Mikania alvimii*<sup>39</sup>. The chromenes and related compounds are interesting from the biosynthetic point of view because they can be synthesized through different pathways. In *Ageratum houstonianum* Mill. (Eupatorieae), the aromatic ring seems to be derived from the shikimate route, although the polyketide pathway, via acetate units, may be used for chromene biosynthesis in other occasions<sup>73</sup>.

A brief parallel with some related Eupatorieae genera affords to observe that the absence of chromenes in *Mikania* contrasts with the phylogenetically related genus *Ageratina*, which is quite rich and diverse in chromene chemistry<sup>50</sup>. By the way, the chromenes and chromones are probably useful in chemosystematic approaches in other Eupatorieae genera, but they have low importance for *Mikania* because they are particularly rare in this genus.

#### *Other arylpropanoids*

The presence of simple arylpropanoid derivatives was detected in 19% of the species analyzed. Although this value suggests a considerable importance for this kind of metabolite, from the chemosystematic standpoint this is a misinterpretation, because the phenylpropanoids isolated from *Mikania* form a miscellaneous array of common substances like cinnamic and coumaric acid derivatives, caffeates, and some components of essential oils like safrol and eugenol.

*The shikimate/acetate-isopentenyl pyrophosphate ratio [SH/(AC+IPP)]*

There are well established theories about the evolution of secondary metabolites in angiospermic lineages<sup>24,48</sup>. These theories were mostly based on some evolutionary trends like the loss of lignification towards a herbaceous habit, the gradual replacement of the shikimate pathway by acetate plus IPP pathway, gallic acid phenylalanine ammonia-lyase activation (PAL) losing space to caffeic acid PAL inhibition<sup>74,75</sup> and an enhancement of flavone production upon flavonol<sup>17,30</sup>.

The micromolecular chemistry of *Mikania* was undoubtedly directed to synthesize acetate/IPP pathway derivatives with simultaneous subutilization of the shikimate route, as verified by the low SH/(AC+IPP) ratio. The SH/(AC+IPP) ratio of *Mikania* was 0.097 (9.97%). A previous study showed a shikimate/acetate proportion of 19.9% in subclass Asteridae, which was the lowest value of all subclasses studied<sup>74</sup>. Our data suggest that the genus *Mikania* seems to follow the general evolutionary micromolecular trends observed in advanced lineages. It is also important to mention that in 46% of the genera analyzed in this paper the most common secondary metabolites from the shikimate pathway (i.e. arylpropanoids and flavonoids) were not found, and that only for *M. rimachii* W.C. Holmes & McDaniel the NO of shikimate derivatives exceeded the NO of acetate and IPP derivatives (data not shown). The poorness of shikimate pathway derivatives producer species and the very low SH/(AC+IPP) shows the convergence between chemical data and phylogenetic data, reinforcing the evolutionary advanced *status* of *Mikania*.

*Flavone/flavonol ratio*

The FN/FL ratio presents some peculiarities. In spite of the preference more derived families exhibit for flavone production, they present two different profiles: one

major group, which follows the general trend and possesses a high FN/FL ratio, and another group, with a low FN/FL ratio, despite the derived *status*. Asteraceae curiously belongs to the second group, with an FN/FL ratio of only 0.64<sup>30</sup>. The FN/FL of *Mikania* was 0.53, very similar to the ratio exhibited by the Asteraceae family.

As mentioned above, focused evaluations of relationships at specific level were difficult to perform because a relative low number of flavonoid occurrences were verified for each species. Otherwise, for all genera the data were enough to infer a few conclusions. The genus *Mikania* agrees with the general family and tribe trends presenting an FL/FN ratio considered very low. The retention of this ancestral state of character, even in Asteraceae and *Mikania*, is noteworthy. The reasons for this behavior in some derived groups remain unclear, and analyses at low hierarchic levels are necessary to yield more accurate interpretations.

#### *Clustering and PCA*

The cluster analysis showed four clear groups (Figure 7). Of these, two are small and dissimilar from all remaining species: one with only *M. thapsoides* and the other including *M. alvimii*, *M. triangularis* and *Mikania* sp., characterized by preferential production of pimarane diterpenes. The two remaining clusters group a larger number of species. The observation of these clusters shows that inflorescence type could be associated with chemical data. According to Barroso<sup>29</sup>, the genus *Mikania* was organized in five botanical sections, mostly in terms of leaf and inflorescence type. It is clear that some characters used in this classification system — mainly leaf morphology — were chosen in order to make botanical identification easier instead of reflecting phylogenetic relationships. There are some evidences that inflorescence type of *Mikania* could reflect evolutive trends, although studies indicate that the position of

subinvolucral bracts is the best character for infrageneric classification<sup>27,28</sup>. In fact, a broad interpretation of all classification proposals indicates that inflorescence type in *Mikania* seems to be a very useful character in an evolutionary context, in spite of the inexistence of a clear distinction in capitulescence types in some species. The main inflorescence types found in this genus are spikes, panicle, thyrses, glomerule and corymbes. The first three may be considered together, as a variation of the thyrsoid type. There is strong evidence that glomerules in *Mikania* are formed by the reduction in corymbose and thyrsoid inflorescences<sup>27</sup>.

The proposal of correlating the two main types of inflorescence in *Mikania* — thyrsoid and corymbose — with the chemical data indicates that one of the large clusters groups mainly species with thyrsoid inflorescences, while in the other there is a clear majority of species which present corymbes. It is uncommon to observe species with corymbes in the thyrsoid group and vice-versa. In the henceforth called thyrsoid group there is a large number of Brazilian species which chiefly produce kaurane diterpenes, except for *M. shushunensis*, *M. hoehnei* B.L.Rob. and *M. officinalis*. In Brazil, *Mikania glomerata* and *M. laevigata* are two extremely important species in terms of medicinal applications, including pharmaceutical formulations of syrups containing *M. glomerata* extracts. These two species with glomerule type inflorescence are morphologically very close, rich in kauranes and coumarins. The similarity of this species of thyrsoid group is very interesting because *M. glomerata* and *M. laevigata* have glomerules that seem to be a reduction and congestion of a thyrsoid or spike inflorescence. Additionally, *M. hookeriana* DC. is reported to be a species with glomerate capitulescences, possibly derived from spike congestion<sup>27</sup>. These evidences support that the inflorescence type is commonly associated with chemical data.

The other large cluster, henceforth called corymbose group, is characterized by a



very low number of species which produce kauranes: only *M. cordata*, *M. monagasensis* V.M.Badillo and *M. haenkeana* produce this diterpene type. On the other hand, the majority of species belonging to this group are very rich in SLACs, mainly germacrenolides. It is very interesting that *M. micrantha* and *M. cordifolia*, two very similar and extremely widespread species, are grouped together, with about 80% of similarity. Other species grouped with high chemical similarity are *M. periplocifolia* Hook. & Arn. and *M. cynanchifolia* Hook. & Arn. ex B. Robinson — two South American species which share great morphological similarity, presenting practically undistinguishable fruit surfaces<sup>76</sup>. In the same way, *M. trachypleura* B.L. Rob. presents fruit surfaces slightly different from those of the species mentioned above, and chemical similarity is also a little lower. These observations reinforce the frequent coherency between chemical and morphological characters in this genus. The positioning of *M. congesta* DC. in the corymbose group is another evidence of integration of inflorescence morphology and chemical data, because it was reported that the glomerules of this species seem to be derived from corymbe congestion<sup>27,28</sup>. This adds new evidence to the hypothesis of evolutionary relationship between glomerules and corymbose type inflorescences.

PCA was shown to be a powerful tool in defining more precisely the delimitation of its two main groups of species (Figure 8). This analysis allows detecting a dispersion of the species in two chemical groups characterized by two major inflorescence types. The corymbose and the thyrsoid groups are well delimited and the species with glomerules have followed the same pattern of placement verified in cluster analysis. These results help to sustain the hypothesis that the inflorescence type is associated with chemical characters in *Mikania*.

It is well known that geographic distribution of plants is an important aspect that

influences chemical composition. The genus *Mikania* is considered predominantly neotropical, spreading out to North America and Africa and presenting two centers of diversity: one in southeast Brazil and the other in Andean countries<sup>27,28</sup>. Analyzing the dendrogram constructed using chemical data, two major patterns could be observed. The first includes the absolute majority of Brazilian species, while the other is richer in species classified under other categories. It is important to stress that the group in which Brazilian species are predominant coincides almost perfectly with the thyrsoid group mentioned before. Besides, the thyrsoid group typically accumulates kaurane diterpenes. There are reports of the trend by Brazilian species of *Mikania* to accumulate kauranes<sup>57,77</sup>, and this hypothesis can now be reinforced and sustained by our analysis. The remaining group comprehends species that belong to different geographic regions, but the rarity of Brazilian species is evident. The majority of its species belong to the corymbose group, which chiefly produces germacrenolides and other SLACs. The PCA again supports cluster analysis, differentiating the majority of the Brazilian species from the remaining ones (Figure 9).

The PCA was used as a tool in order to define what chemical categories are more significant for grouping species (Figure 10). The first principal component (PC1), which is responsible for 27.15% of total variance, shows kaurane diterpenes and germacrenolides as very important chemical markers in *Mikania*. The PC1 axis indicates a clear and large separation of these metabolites, and it agrees with our hypothesis that kaurane diterpenes and germacrenolides are the most valuable micromolecular markers for this genus. The second principal component (PC2) accounts for 14.33% of the total variance and shows the interesting importance of coumarin occurrence. This result indicates that coumarin production is useful as taxonomic character for *Mikania*. A general interpretation of dispersion furnished by

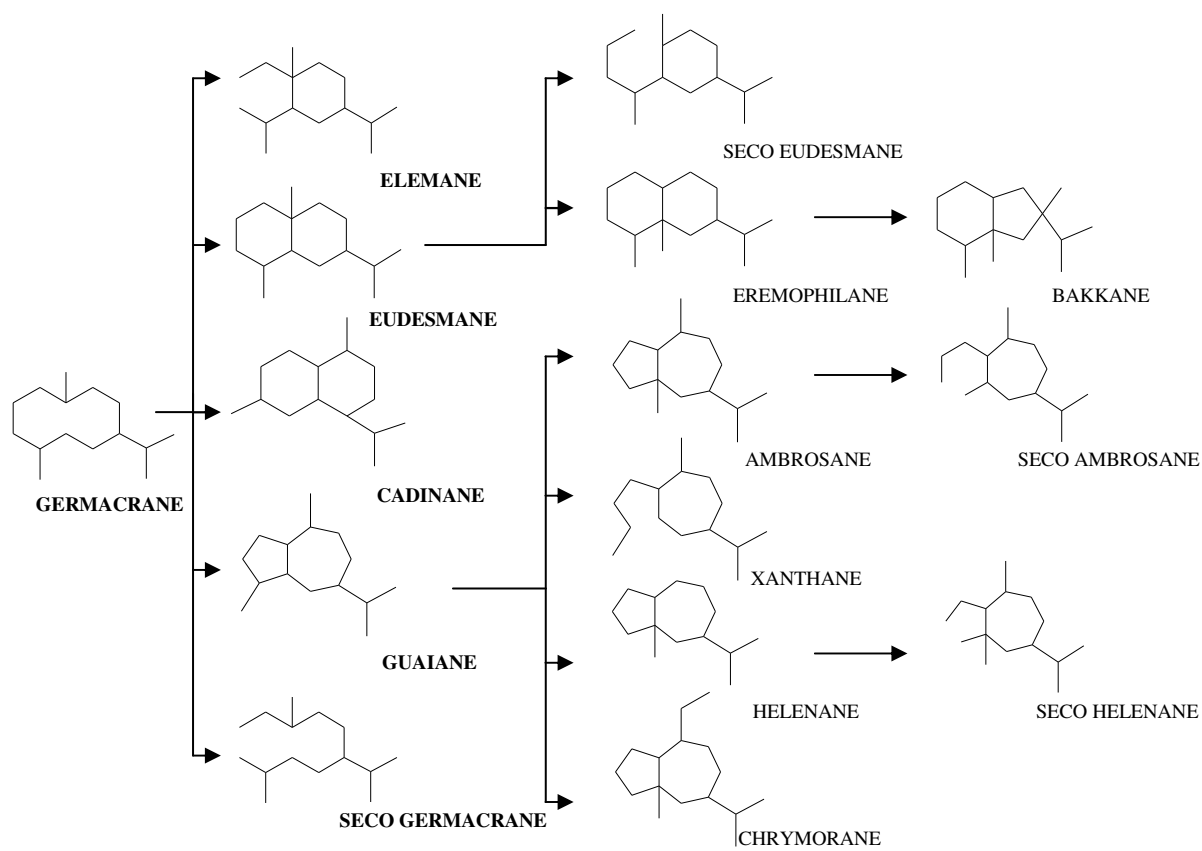
both axes together suggests that the diversity of SLACs is more efficient as a tool to differentiate species, as compared to diterpenes.

## Conclusions

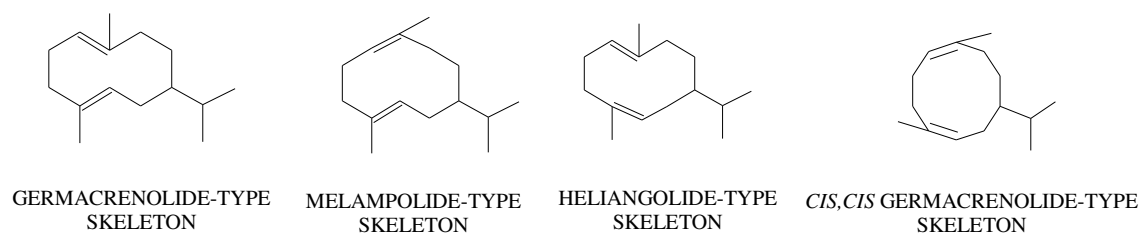
The genus *Mikania* was peculiar due to its high chemical heterogeneity. Although it shares some similarities with related genera, its secondary chemistry differs significantly when compared with large related genera in Eupatorieae, like *Stevia* and *Ageratina*. The small number of species producing both SLACs and diterpenes indicates that the evolution of secondary metabolism in *Mikania* chooses preferentially only one terpenoid production pathway. The competition for the availability of isoprenoid precursors could explain the apparent incompetence to concomitantly produce these two classes of substances, but environmental and hereditary factors certainly play a role in this characteristic. The establishment of coumarins — together with diterpene and SLACs — as chemical markers for the genus offers a novel standpoint, which helps to characterize and to identify species with pharmacological potential, since this class of substance exerts important biological action. The multivariate analysis showed an important integration between morphological, geographical and chemical data. The presence of a group of Brazilian species which produce kaurane diterpene and thyrsoid inflorescences indicates that these species underwent different selective processes in this region, developing adaptative characters that distinguish these groups from the remaining ones. The corymbose group trends to product SLACs, but it does not reach the geographic homogeneity of the thyrsoid group. The geographic distribution of its species is more scattered. It is interesting to observe that widespread species that belong to corymbose group, like *M. micrantha* and *M. cordifolia*, preferentially produce SLACs even when

collected in the area where Brazilian species are predominant. It appears that diterpene or SLAC production in *Mikania* is determined by a complex array of variables.

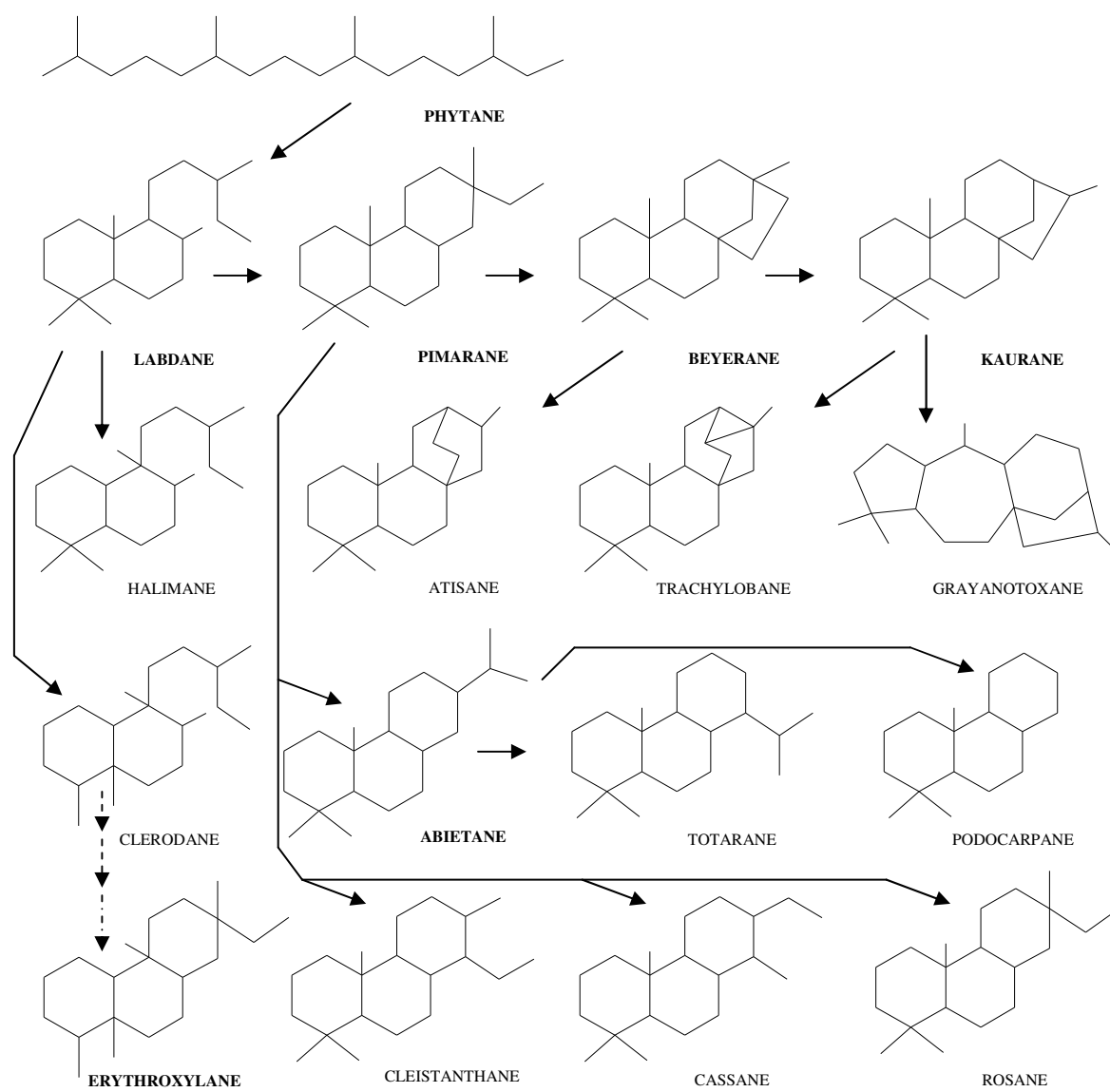
## Figures



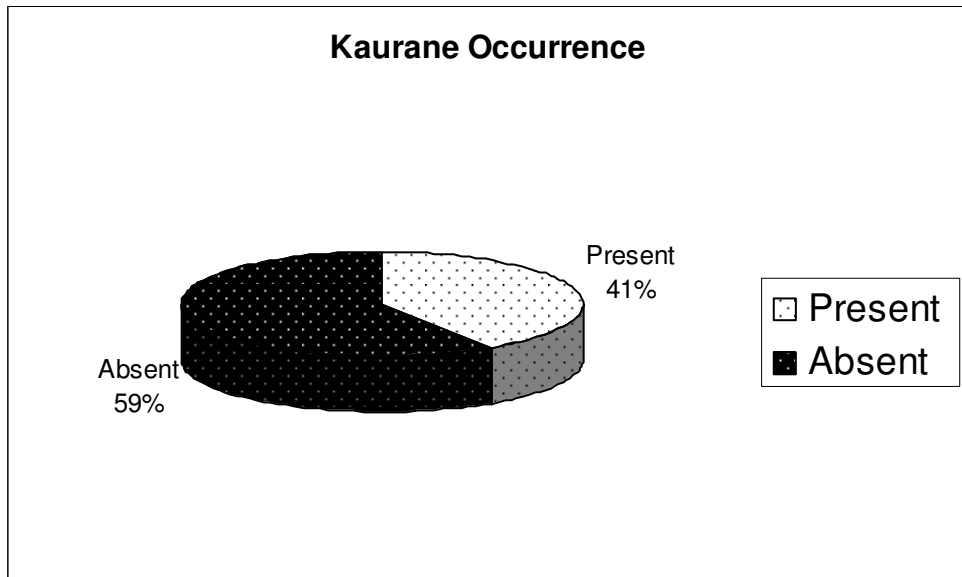
**Figure 1.**



**Figure 2.**

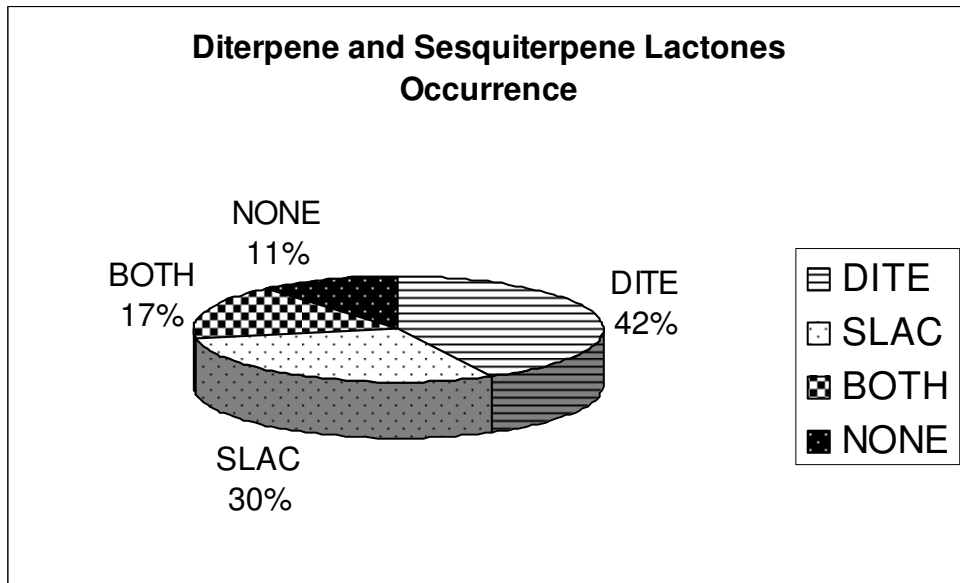


**Figure 3.**

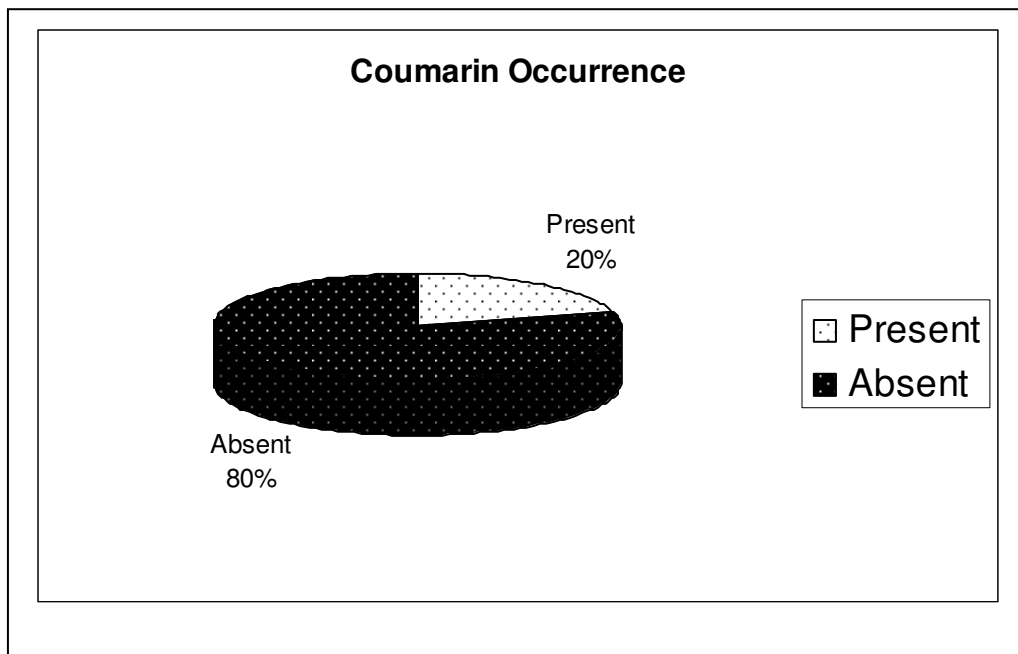


**Figure 4.**

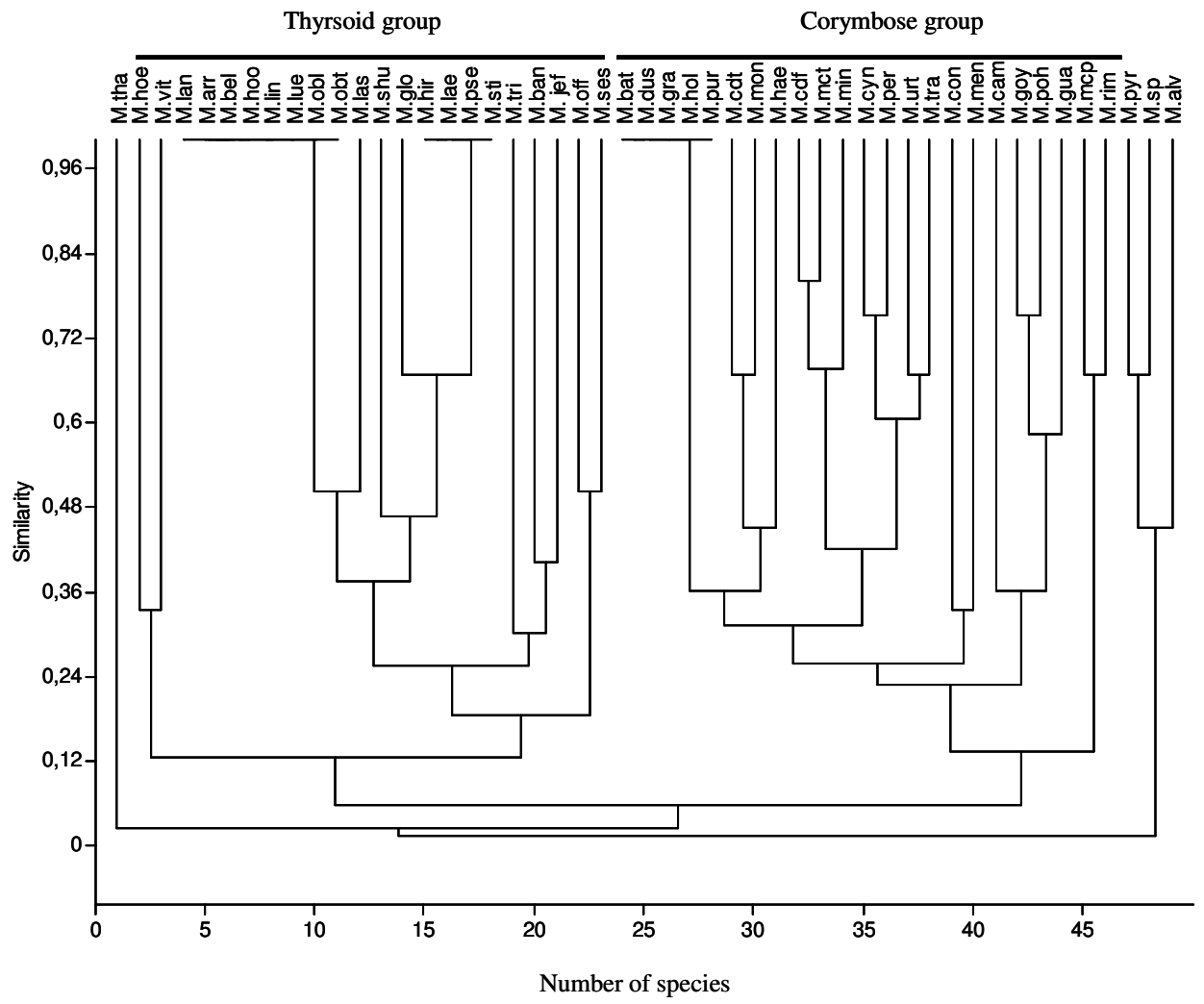




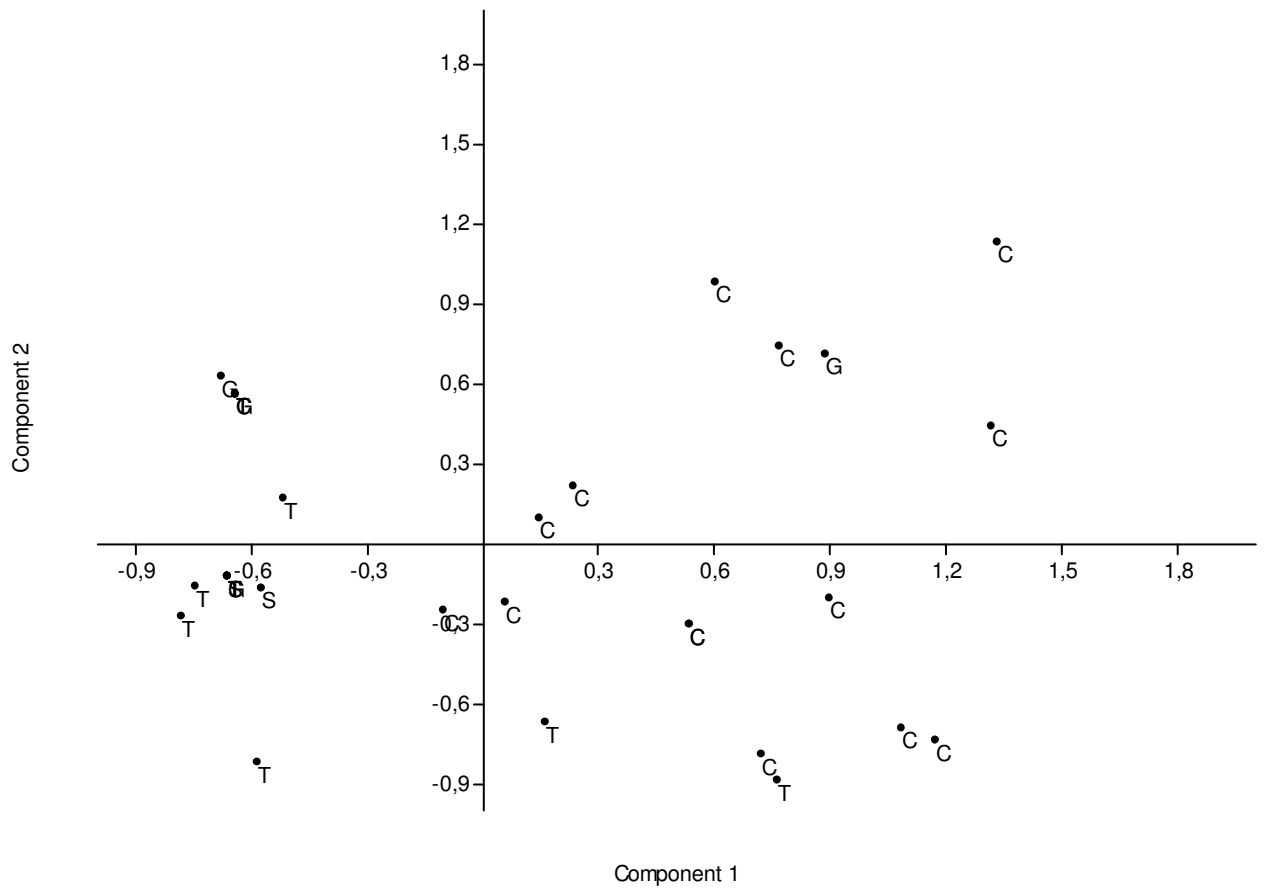
**Figure 5.**



**Figure 6.**

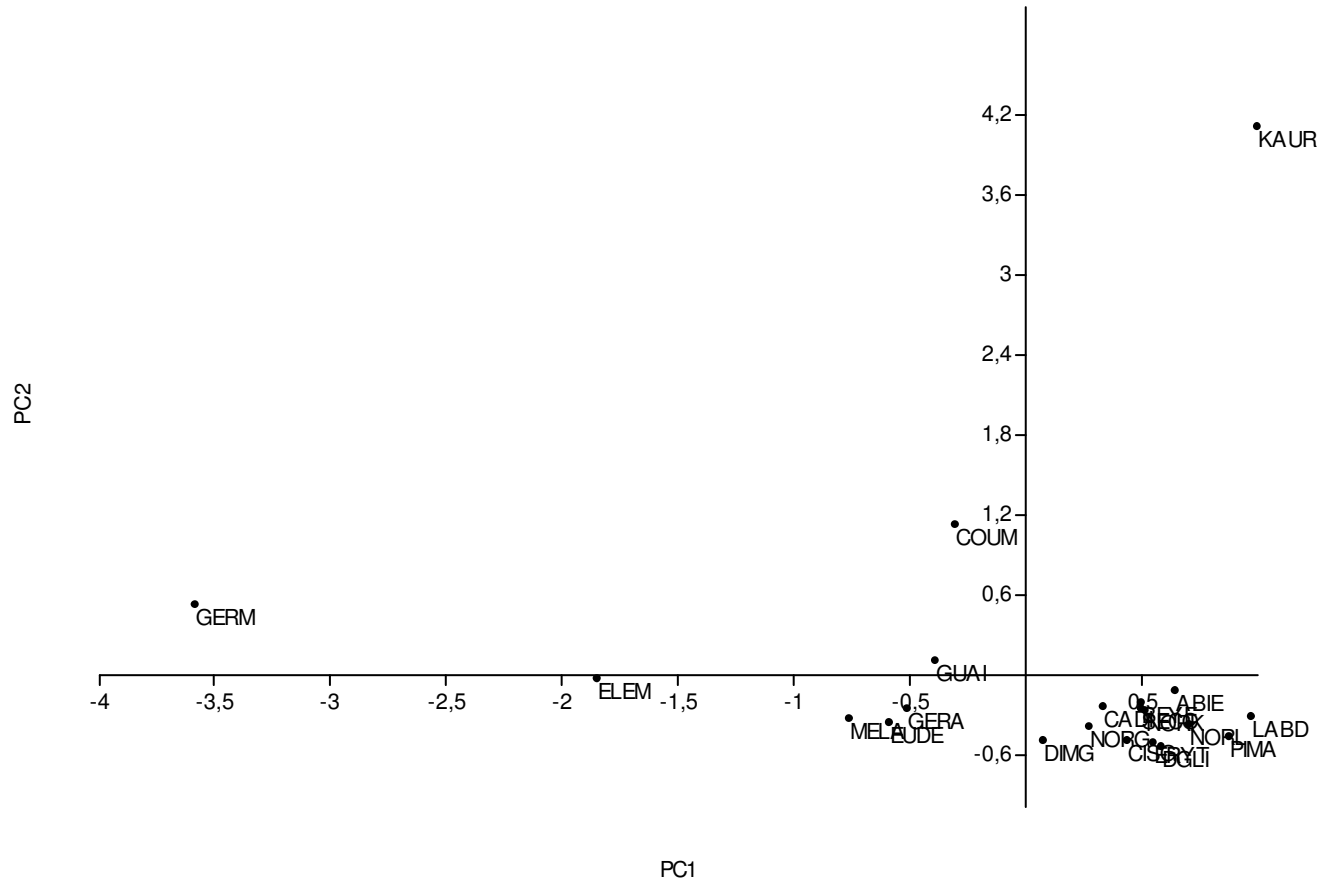


**Figure 7.**



**Figure 8.**





**Figure 10.**

## Captions

Figure 1: Biogenetic grid of SLACs showing different steps of complexity. Each arrow represents one step of biogenetic complexity. Names in bold indicate the types found in *Mikania*. Adapted from Herz<sup>52</sup>.

Figure 2: Germacrane lactones subtypes found in *Mikania* according to the configuration of double bonds.

Figure 3: Biogenetic grid of most common diterpenes skeletons showing different steps of complexity. Each arrow represents one step of biogenetic complexity. Names in bold indicate the types found in *Mikania*. Dashed arrows indicate probable biogenetic pathways still not established. Adapted from Gottlieb<sup>78</sup>.

Figure 4: Relative occurrence of kaurane diterpenes in *Mikania*.

Figure 5: Relative occurrence of kaurane diterpenes and SLACs.

Figure 6: Relative occurrence of coumarins in *Mikania*.

Figure 7: Clustering analysis of *Mikania* species based on micromolecular markers.

Abbreviations: M.alv. (*M. alvimii*), M.arr. (*M. arrojadoi*), M.ban. (*M. banisteriae*), M.bat. (*M. batatifolia*), M.bel. (*M. belemii*), M.cam. (*M. campanulata*), M.con. (*M. congesta*), M.cdt (*M. cordata*), M.cdf. (*M. cordifolia*), M.cyn. (*M. cynanchifolia*), M.dus. (*M. dusenii*), M.glo. (*M. glomerata*), M.goy. (*M. goyazensis*), M.gra. (*M. grazielae*), M.gua. (*M. guaco*), M.hae. (*M. haenkeana*), M.hir. (*M. hirsutissima*), M.hoe. (*M. hoehnei*), M.hol. (*M. holwayana*), M.hoo. (*M. hookeriana*), M.jef. (*M. aff. jeffreyi*), M.lae. (*M. laevigata*), M.lan. (*M. lanuginosa*), M.las. (*M. lasiandrae*), M.lin. (*M. lindbergii*), M.lue. (*M. luetzelburgii*), M.men. (*M. mendocina*), M.mct. (*M. micrantha*), M.mpt. (*M. microptera*), M.min. (*M. minima*), M.mon. (*M. monagasensis*),

M.obl. (*M.oblongifolia*), M.obt. (*M.obtusata*), M.off.(*M.officinalis*), M.per. (*M.periplocifolia*), M.poh. (*M.pohlii*), M.pse. (*M.pseudohoffmanianna*), M.pur. (*M.purpurascens*), M.pyr. (*M.pyramidata*), M.rim. (*M.rimachii*), M.ses. (*M.sessilifolia*), M.shu. (*M.shushunensis*), M sp. (*Mikania* species still undescribed), M.sti.(*M.stipulacea*), M.tha. (*M.thapsoides*), M.tra. (*M.trachypleura*), M.tri. (*M.triangularis*), M.urt. (*M.urticifolia*), M.vit. (*M.vitifolia*).

Figure 8: Score plot (PC1 versus PC2) of *Mikania* species according to inflorescence type. Abbreviations: corymbes (C), glomerules (G), spikes (S), thyrses (T).

Figure 9: Score plot (PC1 versus PC2) of *Mikania* species according phytogeographical distribution. Abbreviations: Andean (AND), Argentinian (ARG), Brazilian (BRA), Mesoamerican (MES) and Widespread (WID).

Figure 10: Plot of the X-loadings of selected chemical markers in the PC1–PC2 coordinate system. Abbreviations: germacrenolides *sensu strictum* (GERM), heliangolides (HELI), melampolides (MELA), *cis-cis*-germacrenolides (CISG), elemanolides (ELEM), guaianolides (GUAI), nor-guaianolides (NORG), cadinanolides (CADI), dimeric germacrenolides (DIMG), geranyl-geranyls (GERA), pimaranes (PIMA), labdanes (LABD), nor-labdanes (NORL), nor-kauranes (NORK), kauranes (KAUR), abietanes (ABIE), erythroxylenes (ERYT), beyeranes (BEYE), kaurane glycosides (KAUG) and coumarins (COUM).



## References

1. Magallón, S.; Crane, P. R.; Herendeen, P. S.; *Ann. Missouri Bot. Gard.* **1999**, *86*, 297.
2. APG II; *Bot. J. Linn. Soc.* **2003**, *141*, 399.
3. Alvarenga, S.A.V.; Ferreira M.J.P.; Rodrigues, G.V.; Emerenciano, V.P.; *Bot. J. Linn. Soc.* **2005**, *147*, 291.
4. Alvarenga, S.A.V.; Ferreira, M.J.P.; Emerenciano, V.P.; Cabrol-Bass, D.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *56*, 27.
5. Hristozov, D.; Da Costa, F.B.; Gasteiger, J.; *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 9.
6. Emerenciano, V.R.; Barbosa, K.O.; Scotti, M.T.; Ferreira, M.J.R.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 891.
7. Calábria, L.M.; Emerenciano, V.P.; Ferreira, M.J.P.; Scotti, M.T.; Mabry, T.J.; *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 277.
8. Spring, O.; Heil, N.; Eliasson, U.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 277.
9. Zidorn, C.; Stuppner, H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 827.
10. Valant-Vetschera, K.M.; Fischer, R; Wollenweber, E.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 487.
11. Ritter, M.R.; Waechter, J.L.; *Acta Bot. Bras.* **2004**, *18*, 643.
12. Ritter, M.R.; Miotto, S.T.S.; *Hoehnea* **2005**, *32*, 309.
13. Ito, M.; Yahara, T.; King, R.M.; Watanabe, K.; Oshita, S.; Yokoyama, J.; Crawford, D.J.; *J. Plant Res.* **2000**, *1109*, 91.
14. Ito, M.; Watanabe, K.; Kita, Y.; Kawahara, T.; Crawford, D.J.; Yahara, T.; *J. Plant Res.* **2000**, *1109*, 79.
15. Schilling, E.E.; Panero, J.L.; Cox, P.B.; *Plant Syst. Evol.* **1999**, *219*, 209.
16. Emerenciano, V.D.; Kaplan, M.A.C.; Gottlieb, O.R.; Bonfanti, M.R.D.; Ferreira, Z.S.; Comegno, L.M.A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1986**, *14*, 585.
17. Emerenciano, V. P.; Militão, J.S.L.T., Campos, C.C.; Romoff, P.; Kaplan, M.A.C.; Zambon, M.; Brant, A.J.C.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 947.
18. Oliveira, F; Alvarenga, M.A.; Akisue, G.; Akisue, M.K.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **1984**, *20*, 169.
19. dos Santos, S.C.; Krueger, C.L.; Steil, A.A.; Kreuger, M.R.; Biavatti, M.W.; Junior, A.W.; *Planta Med.* **2006**, *72*, 679.
20. Yatsuda, R.; Rosalen, P.L.; Cury, J.A.; Murata, R.M.; Rehder, V.L.G.; Melo, L.V.; Koo, H.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 183.
21. do Nascimento, A.M.; Chaves, J.S.; Albuquerque, S.; de Oliveira, D.C.R.; *Fitoterapia* **2004**, *75*, 381.
22. Suyenaga, E.S.; Reche, E. Farias, F.M.; Schapoval, E.E.S.; Chaves, C.G.M.; Henriques, A.T.; *Phytother. Res.* **2002**, *16*, 519.
23. Celeghini, R.M.S.; Vilegas, J.H.Y.; Lanças, F.M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 706.
24. Gottlieb, O.R.; Borin, M.R.M.B.; Kaplan, M.A.C.; *Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico*, 1<sup>st</sup> ed., Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 1996.
25. Herz, W. In *New trends in natural products chemistry. Studies in Organic Chemistry*, Rahman, A.; le Quesne, P.W., eds.; Amsterdam: Elsevier, 1986.
26. Herz, W.; *J. Indian Chem. Soc.* **1998**, *75*, 559.
27. Holmes, W.C. In *Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Kew, 1994*; Hind, D.J.N., Beentje, H.J., eds.; Kew: Royal Botanic Gardens, Kew, 1996, v.2.

28. Holmes, W.C. In *Advances in Compositae Systematics*; Hind, D.J.N.; Jeffrey, C.; Pope G.V., eds.; Kew: Royal Botanic Gardens, 1995.
29. Barroso, G.M.; *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, **1958**, *16*, 239.
30. Soares, G.L.G.; Kaplan, M.A.C.; *Bot. J. Linn. Soc.* **135**, 61.
31. Nicollier, G.; Thompson, A.C.; *Phytochem.* **1981**, *20*, 2587.
32. Da Silva, M.L.; Luz, A.I.R.; Zoghbi, M.G.B.; Ramos, L.S.; Maia, J.G.S.; *Phytochem.* **1984**, *23*, 2374.
33. Limberger, R.; Suyenaga, E.S.; Henriques, A.T. *J. Essent. Oil Res.*, **1998**, *10*, 363.
34. Bedi, G.; Tonzibo, Z.F.; N'Guessan, T.Y.; Chalchat, J.C.; *J. Essent. Oil Res.* **2003**, *15*, 198.
35. Limberger, R.P.; Aboy, A.L.; Bassani, V.L.; Moreno, P.R.H.; Ritter, M.R.; Henriques, A.T.; *J. Essent. Oil Res.*, **2001**, *13*, 225.
36. Nuñez, C.V.; Lago, J.H.G.; Amendola, M.C.; Moreno, P.R.H.; Looman, A.P.; Roque, N.F.; *J. Essent. Oil Res.*, **2002**, *14*, 425.
37. Oliveira, F.; Rodrigues, R.F.O.; Machado, M.I.L.; Craveiro, A.A.; *Lecta*, **1999**, *17*, 21.
38. Cuenca, M.D.; Catalán, C.A.N.; Díaz, J.G.; Herz, W.; *J. Nat. Prod.*, **1991**, *54*, 1162.
39. Bohlmann F.; Adler, A.; Jakupovic, J.; King, R.M.; Robinson, H.; *Phytochem.* **1982**, *21*, 1349.
40. Gutierrez, A.B.; Herz, W.; *Phytochem.* **1988**, *27*, 3871.
41. Bohlmann F.; Adler, A.; King, R.M.; Robinson, H.; *Phytochem.* **1981**, *21*, 173.
42. Bohlmann F.; Singh, P.; Jakupovic, J.; Robinson, H. ; King, R.M; *Phytochem.* **1981**, *21*, 705.
43. Bohlmann, F.; Adler, A.; Schuster, A.; Gupta, R.K.; King, R.M.; Robinson, H.; *Phytochem.* **1981**, *20*, 1899.
44. Ohkoshi, E.; Makino, M.; Fujimoto, Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1436.
45. Catalan, C.A.N.; Cuenca, M.D.; Hernandez, L.R.; Joseph-Nathan, P.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 949.
46. Cuenca, M.D.; Borkosky, S.; Catalán, C.A.N.; Diaz, J.G.; Herz, W.; *Phytochem.* **1992**, *31*, 3521.
47. Castro, V.; Jakupovic, J.; Bohlmann, F.; *Phytochem.* **1986**, *25*, 1750.
48. Gottlieb, O.R.; 1982.; *Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology. An Essay into a Novel Botanical Discipline*, 1<sup>st</sup> ed., Springer Verlag: Berlin, 1982.
49. Herz, W.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 963.
50. Herz, W.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *33*, 1159.
51. Herz, W.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 1115.
52. Herz, W. In *The Biology and Chemistry of the Compositeae*, Heywood, V.H.; Harborne, J.B.; Turner, B.L. eds.; London: Academic Press, 1977.
53. Soares, A.P.; Nascimento, A.M.; Taleb-Contini, S.H., Oliveira, D.C.R.; *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 708.
54. Castro, V.; Jacupovic, J.; *Phytochem.* **1985**, *24*, 2450.
55. Ohkoshi, E.; Makino, M.; Fujimoto Y.; *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *17*, 1436.
56. García, P.A., de Oliveira, A.B.; Batista, R.; *Molecules* **2007**, *12*, 455.
57. Mendes, C.C.; Cruz, F.G.; Guedes, M.L.D.; Roque, N.F.; *Z. Naturforsch., B: Chem. Sci.* **2005**, *60*, 875.
58. Cruz, F.G.; Roque, N.F.; *Phytochem.* **1991**, *31*, 2793.
59. Veneziani, R.C.S.; Camilo, D.; de Oliveira, R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 99.
60. Nunez, C.V.; Amendola, M.C.; Henrique, J.; Lago, G.; Roque, N.F.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 233.
61. Ferguson, C.A.; Nahar, L.; Finnie, D.; Kumarasamy, Y.; Reid, R.; Mir-Babayev,

- N.F. Sarker, S.D.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 303.
62. Celeghini, R.M.S.; Vilegas, J.H.Y.; Lanças, F.M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2001**, *12*, 706.
63. Stein, A.C.; Fritz, D.; Lima, L.F.P.; Matzenbacher, N.I.; Schripsema, J.; Pires, V.; Sonnet, P.; von Poser, G.L.; *Chem. Nat. Compd.* **2007**, *43*, 691.
64. Ribeiro CVC, Kaplan MAC.; *Quim. Nova* **2002**, *25*, 533.
65. Appendino, G.; Tettamanzi, P.; Gariboldi, P.; *Phytochem.* **1991**, *30*, 1319.
66. Zottis, A.; Vidotti, G.J.; Sarragiotto, M.H.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2001**, *29*, 755.
67. Almeida, M.M.B.; Arriaga, A.M.C.; dos Santos, A.K.L.; Lemos, T.L.G.; Braz, R.; Vieira, I.J.C.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 935.
68. Roy, A.; Saraf, S.; *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 191.
69. Rungeler, P.; Brecht, V.; Tamayo-Castillo, G.; Merfort, I.; *Phytochem.* **2000**, *56*, 475.
70. Moll, S.; Anke, S.; Kahmann, U.; Hansch, R.; Hartmann, T.; Ober, D.; *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 47.
71. Harborne, J.B.; Baxter, H.; *The Handbook of Natural Flavonoids*. Wiley: Chichester, 1999.
72. Harborne; J.B.; *The Flavonoids: Advances in Research Since*. Chapman & Hall: London, 1994.
73. Siebertz, R.; Proksch, P.; Wray, V.; Witte, L.; *Phytochem.* **1989**, *28*, 789.
74. Gottlieb O. R.; Borin, M.R.M.B.; *Phytochem.* **1998**, *49*, 1.
75. Gottlieb; O. R.; Borin, M.R.M.B.; *An. Acad. Bras.* **1988**. *70*, 719.
76. Ritter, M.R.; Miotto, S.T.S.; *Acta bot. Bras.* **2006**. *20*, 241.
77. Fabbri, H.; Oliveira, D.C.R.; Vichnewski, W.; Herz, W.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1997**, *25*, 563.
78. Figueiredo, M.R.; Kaplan, M.A.C.; Gottlieb, O.R.; *Plant Syst. Evol.* **1995**, *195*, 149.

## CAPÍTULO 2

Relações quimiotaxonômicas no gênero *Stevia* Cav. (Asteraceae,  
Eupatorieae)

Tiago L.S. Alves, Mara R. Ritter e Geraldo L. G. Soares.

(Artigo a ser submetido para a Revista Brasileira de Botânica)

Relações quimiotaxonômicas no gênero *Stevia* Cav. (Asteraceae, Eupatorieae).

Resumo: *Stevia* Cav. (Asteraceae, Eupatorieae) conta com cerca de 230 espécies, das quais *S. rebaudiana* é a mais conhecida por apresentar folhas que contêm derivados doces do steviol. Um banco de dados acerca da composição micromolecular de *Stevia* foi criado para a elaboração de uma análise quimiotaxonômica baseada fundamentalmente em análise de componentes principais (PCA) e no cálculo de parâmetros evolutivos utilizados em quimiotaxonomia. O perfil químico e a análise estatística demonstraram que diterpenóides derivados do labdano, lactonas sesquiterpenoídicas do tipo guaianolídeo e longipinanos são os marcadores químicos principais para este gênero. As relações chiquimato/acetato mais isopentenil-pirofosfato [SH/(AC+IPP)] e flavona/flavonol (FV/FL) foram coerentes com o posicionamento de *Stevia* na família Asteraceae. A química de lactonas sesquiterpenoídicas de *Stevia* é peculiar pela presença de alguns esqueletos incomuns em Eupatorieae e geralmente associados a gêneros de outras tribos de Asteraceae, sobretudo Heliantheae. A análise de agrupamento e a PCA forneceram informações que associam padrões geográficos de distribuição com dados químicos. As espécies distribuídas principalmente pela América do Norte têm uma propensão de produzir predominantemente longipinanos, enquanto as espécies Sul-Americanas produzem preferencialmente lactonas sesquiterpenoídicas, sobretudo guaianolídeos.

Palavras-chave: *Stevia*, Asteraceae, quimiotaxonomia, longipinanos, análise de componente principal.

Chemotaxonomic relationships in genus *Stevia* Cav. (Asteraceae, Eupatorieae).

Abstract: The genus *Stevia* Cav. comprises about 230 species, of which *S. rebaudiana* Bertoni is the best known because it presents leaves that contain sweet steviol derivatives. A databank set of micromolecular occurrences was created in order to prepare a chemotaxonomic analysis based on principal component analysis (PCA) and on the calculation of evolutionary parameters used in chemotaxonomy. The chemical profile and the statistical analysis showed that labdane derivatives diterpenes, sesquiterpene lactones of the guaianolide type and longipinanes are the main chemical markers of this genus. The SH/(AC+IPP) and FV/FL ratios were consistent with *Stevia* placement in Asteraceae. The sesquiterpene lactone chemistry of *Stevia* is uncommon among Eupatorieae by the presence of some carbon skeletons generally associated with other Asteraceae tribes, mainly Heliantheae. The cluster analysis and the PCA provided information that associate geographic distribution patterns with chemical data. The species distributed mainly in North America exhibit a trend to produce chiefly longipinanes, while South-American species produce a majority of sesquiterpene lactones, chiefly guaianolides.

Keywords: *Stevia*, Asteraceae, chemotaxonomy, longipinanes, principal component analysis (PCA).

## INTRODUÇÃO

*Stevia* Cav. (Asteraceae, tribo Eupatorieae) conta com cerca de 230 espécies (King & Robinson 1987) de distribuição natural exclusivamente Neotropical tanto em áreas tropicais quanto subtropicais (Monteiro 1982). É um gênero filogeneticamente bem delimitado, mas seu posicionamento correto em nível de tribo ainda carece de melhor sustentação. Isso evidencia porque *Stevia* é um taxon de divergência precoce em Eupatorieae e cujas relações com gêneros afins, como *Ageratina* Spach e *Mikania* Wild., ainda são problemáticas (Ito *et al.* 2000a,b, Schilling *et al.* 1999, Schmidt & Schilling 2000).

As relações de parentesco dentro do gênero *Stevia* são ainda mais desafiadoras devido à ausência de trabalhos taxonômicos abrangentes e atualizados. Ainda assim, existem algumas propostas de classificação infragenérica (Robinson 1930, Grashoff 1972) que, embora úteis e interessantes, infelizmente não possuem a amplitude geográfica necessária para a caracterização do gênero. Portanto, de um modo geral *Stevia* carece de um estudo taxonômico mais aprofundado, em especial baseado na análise de marcadores químicos.

Uma substancial parcela do interesse científico neste gênero advém da presença de glicosídeos de sabor doce, encontrados nas folhas de *S. rebaudiana* Bertoni. Esses metabólitos secundários são diterpenóides tetracíclicos glicosilados do tipo kaurano, comumente denominados de glicosídeos do steviol, cuja biossíntese foi elucidada recentemente (Brandle & Telmer 2007). De fato, a presença dessas substâncias em particular confere a essa espécie um interesse econômico diferencial e por isso ela se torna constante objeto de pesquisa nos mais diversos aspectos, sendo certamente a espécie mais bem estudada no gênero.

A utilização de caracteres químicos micromoleculares para resolver problemas taxonômicos e caracterizar grupos é bem conhecida e bastante utilizada, sobretudo para a família Asteraceae. Estudos de cunho quimiotaxonômico têm sido uma tônica para o grupo nesta década (Emerenciano *et al.* 2007, Calábria *et al.* 2007, Da Costa *et al.* 2005, Alvarenga *et al.* 2005, 2001). A busca por caracteres químicos úteis para a caracterização da tribo Eupatorieae já remonta a estudos ainda anteriores que já caracterizam *Stevia*, *Mikania* e *Liatris* Schreb. como gêneros com altíssima heterogeneidade química micromolecular (Gage 1985). Foi realizada uma revisão extensa e minuciosa sobre a química do gênero, o que proporcionou uma excelente caracterização deste, reafirmando assim a alta heterogeneidade química de *Stevia*. Confirmaram-se como metabólitos principais do gênero, e possíveis marcadores quimiosistemáticos, os derivados do longipinano, as lactonas sesquiterpenoídicas e os diterpenóides (Hernández *et al.* 1998).

O uso de novas abordagens quimiotaxonômicas por meios estatístico-computacionais e banco de dados fitoquímicos vêm surgindo como ferramenta interessante para resolver problemas taxonômicos (Correia *et al.* 2008, Cruz *et al.* 2008, Emerenciano *et al.* 2007, Da Costa *et al.* 2005, Ferreira *et al.* 2005, 2004, Alvarenga *et al.* 2001).

Nesse contexto atual, o presente trabalho propõe uma abordagem interdisciplinar, aliando técnicas estatísticas, como a análise de componentes principais (*principal component analysis, PCA*), ao estudo de padrões de ocorrência de caracteres químicos micromoleculares. Deste modo poderão ser associados os padrões químicos observados com outros de natureza fitogeográfica. Pretende-se ainda fornecer uma ferramenta que auxilie em futuros estudos filogenéticos do gênero *Stevia*.



## METODOLOGIA

### O BANCO DE DADOS

Foi realizado um levantamento amplo de ocorrências de micromoléculas em espécies pertencentes ao gênero *Stevia*. A excelente revisão de Hernández, 1998 serviu como base para computar as ocorrências micromoleculares até 1997. As ocorrências desta data em diante foram obtidas por meio de pesquisa sistemática e exaustiva em bases científicas especializadas e reconhecidamente confiáveis para pesquisa científica (*ISI Web of Science, Scopus, Scirus, Scielo e Chemical Abstracts*). O levantamento não incluiu restrição na data das publicações.

O perfil quimiotaxonômico de *Stevia* foi elaborado a partir do tabulamento das informações de ocorrência de metabólitos secundários. Esse tabulamento foi empregado na elaboração de uma matriz de ocorrência, a qual foi submetida às análises de agrupamento.

### INFORMAÇÕES TAXONÔMICAS E FITOGEOGRÁFICAS

Informações taxonômicas e fitogeográficas referentes às espécies de *Stevia* foram obtidas de trabalhos publicados sobre o gênero (Robinson 1930, Grasshoff 1972, Monteiro 1982, King & Robinson 1987, Nakajima 1991), bem como por meio da utilização de bancos de dados internacionais especializados em botânica taxonômica (*International Plant Name Index (IPNI) e Tropicos*).

## NÚMERO DE OCORRÊNCIAS (NO)

Essa variável é calculada levando em conta a soma do número de diferentes metabólitos secundários isolados para cada táxon pertencentes a uma determinada classe de substâncias ou rota metabólica (Gottlieb *et al.* 1996, Soares & Kaplan 1995, Gottlieb 1982). O número de ocorrências é a base para o cálculo de relações biossintéticas já utilizadas para a análise da evolução de rotas metabólicas em diversos grupos vegetais (Gottlieb *et al.* 1996).

## A RELAÇÃO CHIQUIMATO/ACETATO + ISOPENTENIL-PIROFOSFATO [CH/(AC+IPP)]

A relação CH/(AC+IPP) é um parâmetro quimiotaxonômico que tem como objetivo fornecer uma informação quantitativa acerca da utilização das principais rotas metabólicas vegetais, verificando a diversidade químico-estrutural final dos produtos de biossíntese de cada uma das rotas de forma comparativa. Isso propicia uma interpretação sobre as tendências evolutivas metabólicas globais dos táxons em análise. Esse parâmetro é calculado efetuando-se o quociente entre o NO de metabólitos derivados da rota biossintética do acetato ou do IPP e o NO de metabólitos derivados da via do chiquimato. A ocorrência de um mesmo composto em duas ou mais espécies distintas de um dado gênero foi contada cumulativamente para o gênero. Substâncias sintetizadas a partir de precursores de ambas as rotas de biossíntese, como os flavonóides, foram considerados ocorrência para cada uma delas (Gottlieb & Borin 1998).

## A RELAÇÃO FLAVONA/FLAVONOL (FN/FL)

De modo análogo à relação CH/(AC+IPP), a relação FN/FL também tem como característica fornecer informações sobre tendências evolutivas biossintéticas globais em táxons vegetais. No entanto, esse parâmetro restringe-se à ocorrência de flavonóides, para os quais algumas tendências evolutivas importantes já estão estabelecidas (Soares & Kaplan 2001). A relação FN/FL é estabelecida pela razão entre o NO de flavonas e o NO de flavonóis. Outras classes de flavonóides, como as diidroflavonas e os didroflavonóis, não foram consideradas. A ocorrência de um mesmo composto em duas ou mais espécies distintas foi contada cumulativamente para o gênero.

## SELEÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUIMIOTAXONÔMICOS

Os marcadores micromoleculares foram determinados e escolhidos de acordo com a amplitude de sua ocorrência e sua diversidade estrutural nos táxons analisados. Essa seleção foi direcionada primordialmente às classes de metabólitos mais comumente elencados como marcadores para a família, mas outras categorias foram utilizadas de acordo com a apresentação das informações no banco de dados. Os marcadores selecionados foram agrupados de acordo com seus tipos estruturais químicos em subcategorias mais específicas quando apropriado.

## ANÁLISES DE AGRUPAMENTO

Uma matriz de dados foi criada usando o NO dos marcadores quimiotaconômicos selecionados divididos de acordo com a categoria fitoquímica a que pertencem. Flavonóides não foram incluídos, pois sua eventual ausência é atribuída a um direcionamento e metodologia focada principalmente em terpenóides para várias espécies. Essa matriz foi convertida em uma matriz binária, sendo que a última foi

utilizada como entrada para a performance das análises de agrupamento com base no coeficiente de Jaccard. A matriz binária foi analisada utilizando o programa PAST<sup>®</sup>. O agrupamento foi conduzido usando o modo *unweighted pair group method with arithmetic averaging* (UPGMA). Algumas espécies de *Stevia* tiveram de ser excluídas das análises de agrupamento por não apresentarem os marcadores selecionados, todos terpenóides. Entretanto tal ausência se justifica pelo fato de que apenas flavonóides foram pesquisados nessas espécies, sendo essa a causa provável do não isolamento de terpenóides.

#### ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A PCA é uma técnica estatística multivariada que possui como uma de suas principais vantagens comprimir o espaço amostral com uma perda mínima de informação. Como consequência, a interpretação dessa análise pode nos levar à delimitação de agrupamentos definidos pelas variáveis que mais contribuem com a maximização da variância. Desse modo, a análise extrai do conjunto de dados originais as informações mais relevantes para o melhor entendimento de um determinado problema. Um detalhamento mais profundo acerca da utilização, vantagens, limitações e aspectos matemáticos deste tipo de abordagem pode ser encontrado na literatura (Wold 1987). A matriz de entrada para essa análise é a própria matriz baseada em NOs. A análise foi realizada novamente pelo programa PAST<sup>®</sup>. Espécies que não apresentaram os marcadores selecionados foram excluídas da PCA, pelos mesmos motivos de sua exclusão das análises de agrupamento.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### PERFIL QUÍMICO MICROMOLECULAR

A presença de dados químicos micromoleculares foi verificada para 58 espécies de *Stevia*, sendo metade delas distribuídas preferencialmente na América do Sul e a outra metade, na América do Norte (incluindo a América Central) (tabela 1). Algumas poucas espécies classificadas como norte-americanas conseguem alcançar a América do Sul (*S. elatior* Kunth, *S. ovata* Willd., *S. lucida* Lag. e *S. triflora* DC.) mas ainda assim são claramente predominantes na América do Norte. A maioria das substâncias isoladas para o gênero foram terpenóides, predominando sesquiterpenóides e diterpenóides. Flavonóides e cromenos ocorrem de forma mais ocasional no gênero. A presença de derivados nitrogenados, como alcalóides, não foi verificada. As classes de micromoléculas de ocorrência mais ampla e maior variabilidade estrutural, selecionadas como marcadores quimiotaxonômicos, têm a ocorrência detalhada a seguir. Muito embora alcalóides estejam virtualmente ausentes de *Stevia*, esse fato é considerado na discussão sobre perfil químico a seguir, uma vez que esse perfil alcaloídico é marcador geral de Eupatoriae. Estas substâncias foram escolhidas para as análises de agrupamento e PCA com exceção dos alcalóides pirrolizidínicos e dos flavonóides.

### LACTONAS SESQUITERPENÓIDICAS

Lactonas sesquiterpenoídicas ocorrem em 35 das 58 espécies de *Stevia* estudadas. Os tipos encontrados no gênero são dados pela figura 1. Há uma alta diversidade de tipos estruturais e a ocorrência de tipos mais raros em geral se limita a uma ou poucas espécies. Este é o caso dos jujuyensolídeos, um novo tipo estrutural de lactona sesquiterpenoídica

isolado exclusivamente de *Stevia jujuyensis* Cabrera (de Gutiérrez *et al.* 1992, Gil *et al.* 1992). Os níveis de complexidade biogenética estrutural das lactonas sesquiterpenoídica podem servir como parâmetro útil em análises quimiotaxonômicas, já que fornecem uma orientação em relação ao *status* evolutivo de um táxon (Emerenciano *et al.* 1986, Emerenciano *et al.* 1985).

Atualmente, novas evidências baseadas em estudos teóricos suportam de maneira mais consistente as propostas biogenéticas clássicas, mostrando que lactonas sesquiterpenoídicas consideradas mais complexas realmente são obtidas a partir de mais passos de reação em simulações *in vitro* (Barquera-Lozada & Cuevas 2009). Isso torna provável a existência de possíveis passos enzimáticos adicionais ou ainda de mecanismos diferentes de ciclização e migração de grupos alquila também *in vivo*.

A presença de guaianolídeos como o grupo de maior amplitude de ocorrência em *Stevia* é bastante relevante já que são lactonas sesquiterpenoídicas de uma complexidade biogenética imediatamente maior quando comparadas aos germacrenolídeos (Barquera-Lozada & Cuevas 2009, Zdero & Bohlmann 1989). Esses, por sua vez, são lactonas sesquiterpenoídicas de biogênese menos complexa, predominantes em gêneros aparentados, como *Mikania* (Alves *et al.* não publicado).

A presença constante e a expressiva diversidade estrutural dos guaianolídeos fornecem um indício de que o metabolismo de lactonas sesquiterpenoídicas direciona-se num sentido predominante de maior complexidade estrutural em *Stevia*. De fato, a presença de algumas ocorrências, embora esparsas, de lactonas do terceiro nível de complexidade biogenética (xanthanolídeos, pseudoguaianolídeos e eremofilanolídeos) em algumas espécies do gênero é fato que reforça essa hipótese e que possui relevância quimiotaxonômica.

A ocorrência de lactonas sesquiterpenoídicas do terceiro nível de complexidade não foi observada nos demais representantes de Eupatorieae. Tais lactonas sesquiterpenoídicas são mais comuns em Senecioneae (eremofilanolídeos) e em alguns grupos restritos de Heliantheae (xanthanolídeos e pseudoguaiolídeos).

Do ponto de vista filogenético, Eupatorieae está estritamente relacionada com Heliantheae (Ito *et al.* 2000) e Helenieae. Estas três tribos formam um grande grupo monofilético responsável por cerca de 25% da diversidade da família (Baldwin *et al.* 2002, Urbatsch *et al.* 2000). O perfil de lactonas sesquiterpenoídicas em *Stevia* fornece dados importantes para discutir suas relações de parentesco.

A ocorrência de lactonas de alta complexidade biogenética do tipo xanthanolídeo e pseudoguaianolídeo em *Stevia* faz com que esse gênero seja o único em sua tribo a compartilhar estes caracteres com membros de Helianthaeae. Dada a posição basal de *Stevia* em Eupatorieae, pode-se inferir que a ocorrência desses caracteres químicos micromoleculares ajuda a sustentar a ancestralidade desse gênero em sua tribo, embora pouco contribua para inferir parentescos dentro de Eupatorieae devido à ausência destas substâncias nos demais membros da tribo.

Por outro lado, a ocorrência em *Stevia* de eremofilanolídeos que se observam principalmente em espécies de Senecioneae, uma tribo menos aparentada com Eupatorieae, pode ser atribuída a um fenômeno de paralelismo. Situação análoga foi descrita para a ocorrência de alcalóides pirrolizidínicos, que são igualmente compartilhados por representantes de Eupatorieae e Senecioneae. A biossíntese desses alcalóides surgiu a partir de eventos independentes nessas duas linhagens (Anke *et al.* 2004).

## DERIVADOS DO LONGIPINANO

Derivados do longipinano (figura 1) ocorrem em 26 das 58 espécies de *Stevia* estudadas. A ocorrência destes sesquiterpenóides não-lactônicos é uma característica peculiar e do gênero, sendo que tais substâncias são isoladas muitas vezes de raízes. Existem espécies particularmente diversas nessa categoria, como *S. polycephala* Bertol., *S. salicifolia* Cav. e *S. serrata* Cav., por exemplo.

Esses terpenóides aparecem quase sempre poliesterificados, o que lhes confere uma altíssima diversidade químico-estrutural pelos múltiplos arranjos possíveis de esterificações. Os derivados do longipinano são alvo de extensa pesquisa por serem moléculas tricíclicas altamente oxigenadas (Cerdeira-García-Rojas *et al.* 2006, 2002) com uma configuração espacial propensa a rearranjos moleculares distintos (Román *et al.* 2001, 1996). Apesar dos estudos no âmbito da química estrutural, pouco se sabe sobre a biossíntese desses sesquiterpenóides. A ocorrência corriqueira de longipinanos em *Stevia* em quantidade e diversidade apreciáveis elegem-nos como uma categoria de terpenóides que merece atenção quimiotaxonômica, embora muitos aspectos de suas propriedades biológicas mereçam ser mais bem esmiuçadas para uma melhor compreensão de sua ocorrência no gênero.

## DITERPENÓIDES

Diterpenóides ocorrem em 24 das 58 espécies de *Stevia* estudadas. Os tipos encontrados no gênero são dados pela figura 2. Há uma diversidade considerável de diterpenóides no gênero, e os labdanos são predominantes, seguidos pelos kauranos, sendo que muitos destes são poliglicosilados. É evidente a química diterpenoídica distinta em relação à *Mikania* (Alves *et al.* não publicado). Apesar da proximidade



filogenética entre esses gêneros, *Mikania* apresenta predominância nos derivados do kaurano. *Stevia* possui algumas ocorrências de clerodanos que não ocorrem em *Mikania*. Além disso, *Mikania* apresenta algumas espécies que produzem pimaranos e diterpenóides alicíclicos, o que não é observado em *Stevia*.

Se o padrão de ocorrências de lactonas sesquiterpênicas em *Stevia* se aproxima da tribo Heliantheae, o mesmo não é observado no padrão de ocorrência de diterpenóides. Em Heliantheae, os derivados do clerodano são praticamente ausentes a despeito da ocorrência ampla e da alta diversidade de diterpenóides (Alvarenga *et al.* 2005, Figueiredo *et al.* 1995, Zdero & Bohlmann 1990). Nesta tribo os derivados do kaurano claramente preponderam sobre os labdanos ocorrendo justamente o inverso em *Stevia*, assim como em outros gêneros de Eupatorieae (Alvarenga *et al.* 2005, Figueiredo *et al.* 1995, Zdero & Bohlmann 1990). Assim, uma interpretação sobre a tendência global de produção de diterpenóides de *Stevia* sugere uma grande compatibilidade com o perfil encontrado em Eupatorieae.

A produção de diterpenóides glicosilados ocorre em algumas espécies de *Stevia*, além de *S. rebaudiana*. Porém, em sua maioria não são glicosídeos exatamente relacionados aos derivados doces do steviol (Román *et al.* 1995), exceção feita à *S. phlebophylla* A.Gray, espécie que inclusive se cogita como possivelmente extinta (Kinghorn *et al.* 1984). De fato, já parece haver indícios evidentes que a ocorrência significativa dessas substâncias no gênero esteja restrita a *S. rebaudiana* (Kinghorn *et al.* 1984, Soejarto *et al.* 1983, 1982). Isso torna conveniente cogitar como pouco provável a existência de glicosídeos do steviol em outras espécies de *Stevia* nas concentrações encontradas em *S. rebaudiana* embora haja ainda um bom número de espécies não estudadas sob tal enfoque.

## ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Não foi verificada a presença de alcalóides pirrolizidínicos em *Stevia*, tal qual para *Mikania* (Herz 1998, Alves *et al.* não publicado) e *Ageratina* (Herz 2003). É um fato relevante que essa característica química comum ocorra justamente em gêneros de divergência precoce em Eupatorieae. Por outro lado, alcalóides pirrolizidínicos são comuns em gêneros mais derivados como *Eupatorium* (Herz 2001). Esse é um aspecto bastante interessante, pois parece bastante possível que o surgimento desse caractere tenha ocorrido depois da divergência de *Stevia*, *Mikania* e *Ageratina*. A lacuna de ocorrência de alcalóides pirrolizidínicos em parte de Eupatorieae confere aos alcalóides pirrolizidínicos um papel de marcador químico para a tribo.

## FLAVONÓIDES E RELAÇÃO FN/FL

Os flavonóides ocorrem em 22 das 57 espécies de *Stevia* estudadas. Ocorreram apenas flavonas e flavonóis no gênero, muitos deles sob a forma de glicosídeos. A importância dos flavonóides como marcadores micromoleculares mais adequados para níveis hierárquicos inferiores (Crawford 1978) serve de motivação para seu estudo em *Stevia*. Infelizmente, a informação sobre flavonóides no gênero permanece fragmentada, pois comumente o enfoque de isolamento e identificação de substâncias recai sobre os terpenóides, gerando lacunas que impossibilitam uma avaliação quimiotaxonômica precisa suficiente para comparar espécies. Para o gênero algumas inferências podem ser feitas por meio da relação FN/FL. Tal parâmetro apresentou valor igual a 0,61 para *Stevia*. Para *Mikania* (Alves, *et al.* não publicado) e Asteraceae (Soares & Kaplan 2001), tais valores são iguais a 0,53 e 0,84 respectivamente. Em Eupatorieae igualmente se verifica uma maior produção de flavonóis em detrimento das flavonas (Emerenciano *et al.* 2001).

Eudicotiledôneas mais lenhosas e de posição ancestral apresentam, de maneira geral, uma maior tendência na produção de flavonóis, gerando valores decimais para esse índice quimioevolutivo (Soares & Kaplan, 2001). Apesar das excelentes correlações encontradas para esse parâmetro com índices de polarização evolutiva (Soares & Kaplan, 2001), Asteraceae é tida como uma exceção à regra, retendo um perfil associado a grupos mais ancestrais, atestados pela sua FN/FL menor do que 1. Esse fato pode estar relacionado à tendência de abandono da via do chiquimato, concomitante ao aumento na produção de derivados das rotas do acetato e do IPP verificada em angiospermas derivadas (Gottlieb & Borin 1998, Gottlieb *et al.* 1996, Gottlieb 1982). Tal tendência é confirmada no gênero *Stevia*.

#### RELAÇÃO CH/(AC+IPP)

A relação CH/(AC+IPP) de *Stevia* foi 0,089 (8.9%). De acordo com preceitos clássicos em quimiotaxonomia para grandes níveis hierárquicos taxonômicos vegetais, esse perfil é perfeitamente condizente com uma tendência global estabelecida de progressiva subutilização da rota do chiquimato em detrimento ao desenvolvimento das rotas do acetato e do IPP ao longo da evolução (Gottlieb & Borin 1998, Gottlieb *et al.* 1996, Gottlieb *et al.* 1995, Gottlieb 1982).

Tal resultado apenas manifesta claramente no gênero essa tendência de abandono da rota do chiquimato, já que quase a totalidade das ocorrências micromoleculares derivadas dessa rota são flavonóides. É importante aqui salientar que flavonóides são metabólitos de via biossintética mista, sendo que parte do seu esqueleto deriva da rota do chiquimato e parte deriva da rota do acetato. Esse resultado também entra em concordância com o verificado para *Mikania*, outro gênero basal de Eupatorieae (Alves *et al.* não publicado).

## ANÁLISE DE AGRUPAMENTO

A análise de agrupamentos indica que as espécies de *Stevia* são realmente pouco similares, confirmando uma uniformidade baixa já mencionada (Bohlmann *et al.* 1982, Hernández *et al.* 1998, Hernández *et al.* 1994). Embora análises de similaridade sejam comuns e úteis em quimiotaxonomia (Alvarenga *et al.* 2005, Zidorn 2006, Alves *et al.* não publicado), elas servem primordialmente para procurar padrões preliminares mais evidentes de homogeneidade, que serão mais bem esmiuçados por análises mais elaboradas, como a PCA. Ainda assim, podemos verificar um conjunto de espécies de *Stevia* bastante dissimilares das restantes devido a ocorrências isoladas muito peculiares destes táxons (figura 3). Para *S. isomeca* Grashoff, por exemplo, só foram isoladas lactonas sesquiterpenoídicas do terceiro grau de complexidade biogenética, elegendo-a como uma espécie interessante para estudos posteriores já que tal espécie compartilha caracteres químicos pouco comuns em Eupatorieae com Heliantheae. Além disso, *S. rebaudiana* e *S. phlebophylla* são altamente dissimilares da maioria das espécies, agrupando-se juntas exatamente pela presença de kauranos glicosilados.

O estabelecimento de padrões geográficos associados a dados químicos não é nítido nessa abordagem embora sejam perceptíveis em determinados momentos quando do agrupamento de espécies de mesma localização geográfica. Por outro lado, tal tendência não é observável em alguns agrupamentos, ao menos de forma clara. A baixa similaridade entre as espécies dificulta a interpretação e reduz a robustez dos agrupamentos estabelecidos mostrando que a detecção de padrões associativos nem sempre é possível com análises mais simplificadas que tratam caracteres químicos de forma binária. Entretanto presença de padrões geográficos preliminares serve de ponto

de partida para um aprofundamento dessas questões em análises mais elaboradas como a PCA.

#### ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)

A PCA confirma a relevância dada a diterpenóides, lactonas sesquiterpenoídicas e longipinanos (figura 4). Além disso, estabelece os labdanos como diterpenóides que mais contribuem para a separação das espécies, seguidos em importância pelos kauranos glicosilados e pelos kauranos simples. No âmbito das lactonas sesquiterpenoídicas, os guaianolídeos são os que mais contribuem para os agrupamentos, seguidos pelos germacrenolídeos. Os derivados do longipinano, um grupo que não se sub-categoriza em diferentes tipos, apresentam um papel determinante na disposição das espécies contribuindo de forma determinante para a topologia final da análise. Essa disposição topológica nos permite afirmar que os principais marcadores químicos micromoleculares do grupo são os longipinanos, os guaianolídeos e os labdanos.

A existência de padrões geográficos e taxonômicos relacionando espécies de *Stevia* com dados químicos ainda não está estabelecida. A existência de um padrão geográfico associando caracteres químicos com morfologia e fitogeografia já foi verificada para *Mikania* (Alves *et al.* não publicado). Historicamente, as espécies de *Stevia* são divididas em dois grupos definidos geograficamente, cada qual contendo três seções botânicas: Norte-Americanas, contendo as Seções Podocephalae, Corymbosae e Fruticosae; e Sul-Americanas compreendendo Multiaristateae, Eustevia e Breviaristateae (Robinson 1930, Grashoff 1972, Hernández *et al.* 1988).

A distribuição geográfica é preferencialmente utilizada como parâmetro para realizar inferências nesse trabalho principalmente por que faltam evidências que sustentem as seções de *Stevia* como agrupamentos naturais. As espécies desses dois grandes grupos geográficos, no entanto são substancialmente diferentes em vários

aspectos morfológicos (Grashoff 1972, Kinghorn *et al.* 1984). A distribuição das espécies no gráfico PC1 vs. PC2 de biplotagem (*scores* e *loadings*), cujo percentual de explicação total é igual a 67,91%, mostra um gradiente visível em relação a PC1 associando espécies Norte-Americanas de *Stevia* a valores mais negativos e espécies Sul-Americanas a valores mais positivos, com algumas discrepâncias. A interpretação dos *loadings* correspondente aos marcadores químicos indica uma polarização de longipinanos em direção às espécies predominantemente Norte-Americanas, enquanto o oposto ocorre com os guaianolídeos cujo *loading* os associa às espécies Sul-Americanas. O papel dos labdanos e alguns outros diterpenóides no diagrama se evidencia pela observação preferencial próxima à origem dos eixos, e aparentemente integrando-se de forma menos evidente ao padrão geográfico, embora um pouco mais relacionado com espécies Norte-Americanas. De fato, uma melhor interpretação a respeito dos diterpenóides pode ser efetuada pela observação de diagramas contendo o eixo PC3, que explica sozinho substanciais 18,50% da variância (figuras 5 e 6).

Essa observação mostra de forma evidente que *S. rebaudiana* é uma espécie que, além de concentrar estudos sobre diterpenóides, é naturalmente bastante dissimilar em relação às demais. Além disso, por sua vasta ocorrência labdanos e kauranos glicosilados, a simples presença dessa espécie justifica sua alta influência nos *loadings* dessas variáveis, causando certo ruído sobre a interpretação.

Verifica-se ainda que ocorre um padrão de distribuição geográfica de espécies em direção ao longo de um gradiente que envolve duas tendências gerais de polarização, onde num extremo há a produção preferencial de lactonas sesquiterpenoídicas (sobretudo guaianolídeos e germacrenolídeos) e no outro, de longipinanos. É evidente que situações que fogem à regra podem ser observadas, mas isso pode ocorrer em algumas espécies em decorrência da plasticidade de certos caracteres químicos. Portanto

não há uma relação de dicotomia entre a produção de nenhuma dessas classes de terpenóides quando comparadas entre si, já que co-ocorrências são comuns.

Certamente, aspectos adaptativos e condições ambientais estão envolvidos nessa produção diferencial de metabólitos. Os motivos fundamentais de existência desse gradiente entre lactonas sesquiterpoídicas e derivados do longipinano, numa direção sul-norte permanecem ainda em aberto, sendo necessária uma maior compreensão da função e do metabolismo dessas classes de terpenóides. Ainda assim, a determinação das tendências de produção desses táxons em dada área geográfica sem dúvida ajuda a direcionar e otimizar pesquisas futuras em *Stevia* e outros grupos vegetais de alta diversidade biológica e metabolismo secundário desenvolvido.

## CONCLUSÕES

O gênero *Stevia* possui uma alta heterogeneidade química, produzindo uma vasta gama de derivados terpenóides. Sua composição química a sustenta plenamente como um gênero de posição basal em Eupatorieae por sua alta compatibilidade com o verificado para essa tribo, com ressalva feita apenas à química de lactonas sesquiterpenoídicas, que sugere parentesco com Heliantheae.

Há um estabelecimento bastante claro de que derivados do longipinano, guaianolídeos e labdanos são os marcadores quimiotaxonômicos mais importantes para o gênero, mostrando que a produção preferencial de determinados tipos estruturais pode ser estabelecida a despeito da baixa homogeneidade do grupo. A ausência virtual de alcalóides pirrolizidínicos no gênero é motivo de destaque por ser um caráter compartilhado apenas por gêneros basais de Eupatorieae.

A existência de gradiente de separação entre espécies Norte-Americanas e Sul-Americanas baseada em dados químicos é um achado importante que estabelece a influência de fatores hereditários, provavelmente fixados pela seleção ambiental na

produção de terpenóides pelo gênero. Esse fato ressalta o valor adaptativo de tais micromoléculas e permite vislumbrar o valor da quimiotaxonomia na otimização da pesquisa de produtos naturais. A importância científica desse resultado é inegável para a caracterização de *Stevia*, um gênero de alta diversidade biológica e ampla distribuição na América.



## FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Estruturas dos esqueletos carbônicos dos sesquiterpenóides considerados marcadores químicos micromoleculares de *Stevia*. Ligações duplas desenhadas apenas nos esqueletos derivados do germacrano. \* Única estrutura relativa a um sesquiterpenóide não-lactônico.

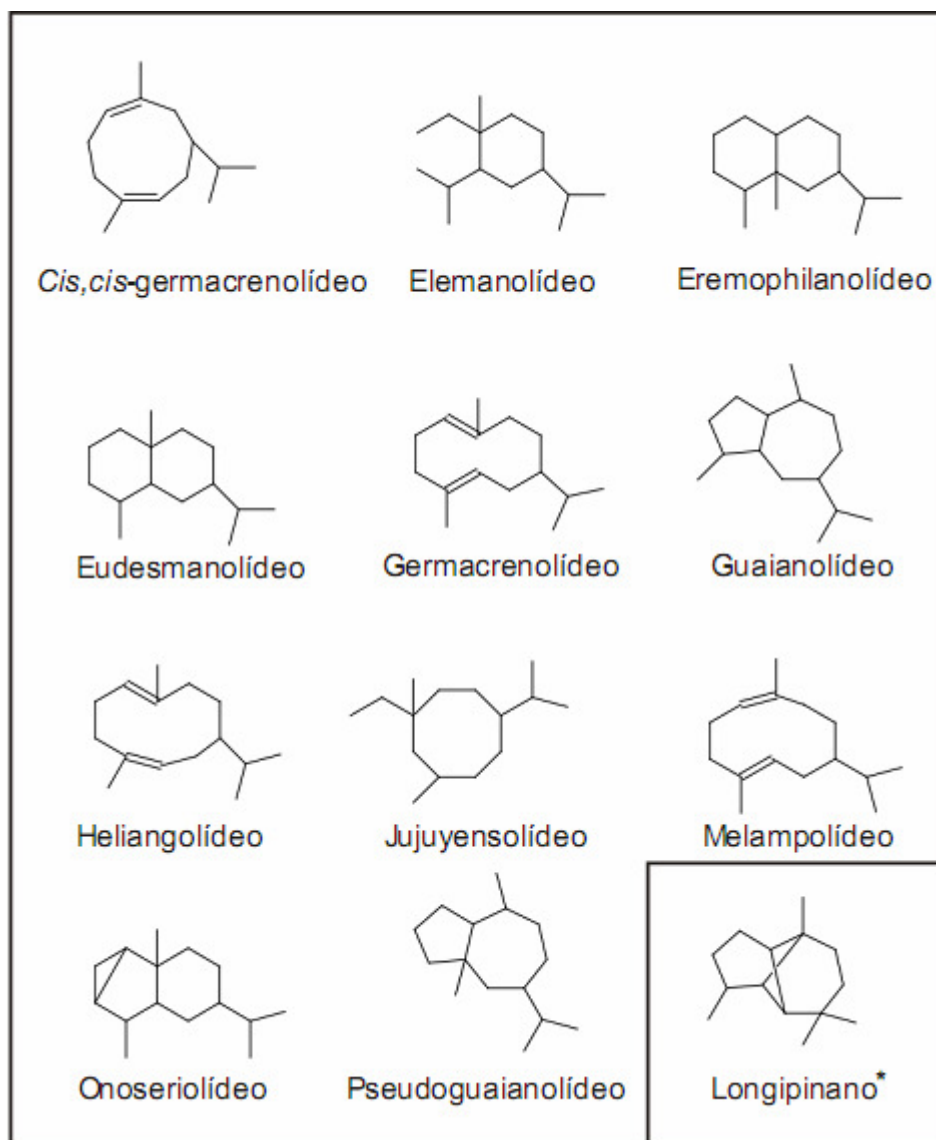


Figura 2: Estrutura dos esqueletos carbônicos dos diterpenóides considerados marcadores químicos micromoleculares de *Stevia*. Kauranos ocorrem glicosilados ou como agliconas. Atisanos ocorrem somente na forma glicosilada. \* Esqueleto da Steviasalicinona, relacionado ao tipo clerodano, mas ainda sem denominação própria.

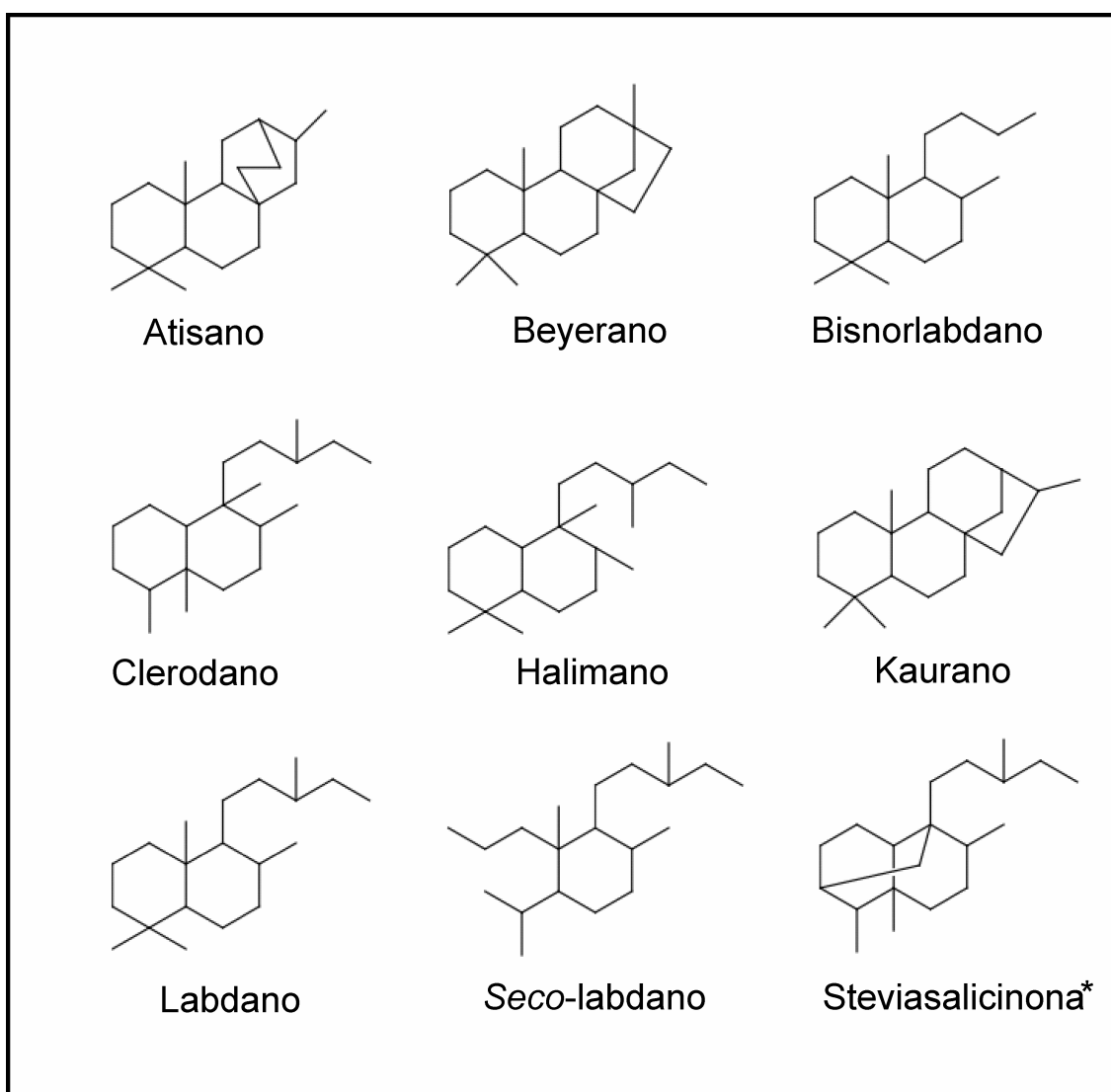


Figura 3. Dendrograma de agrupamento (coeficiente de Jaccard) das espécies de *Stevia*

baseado em dados químicos micromoleculares. Para códigos, vide tabela 1.

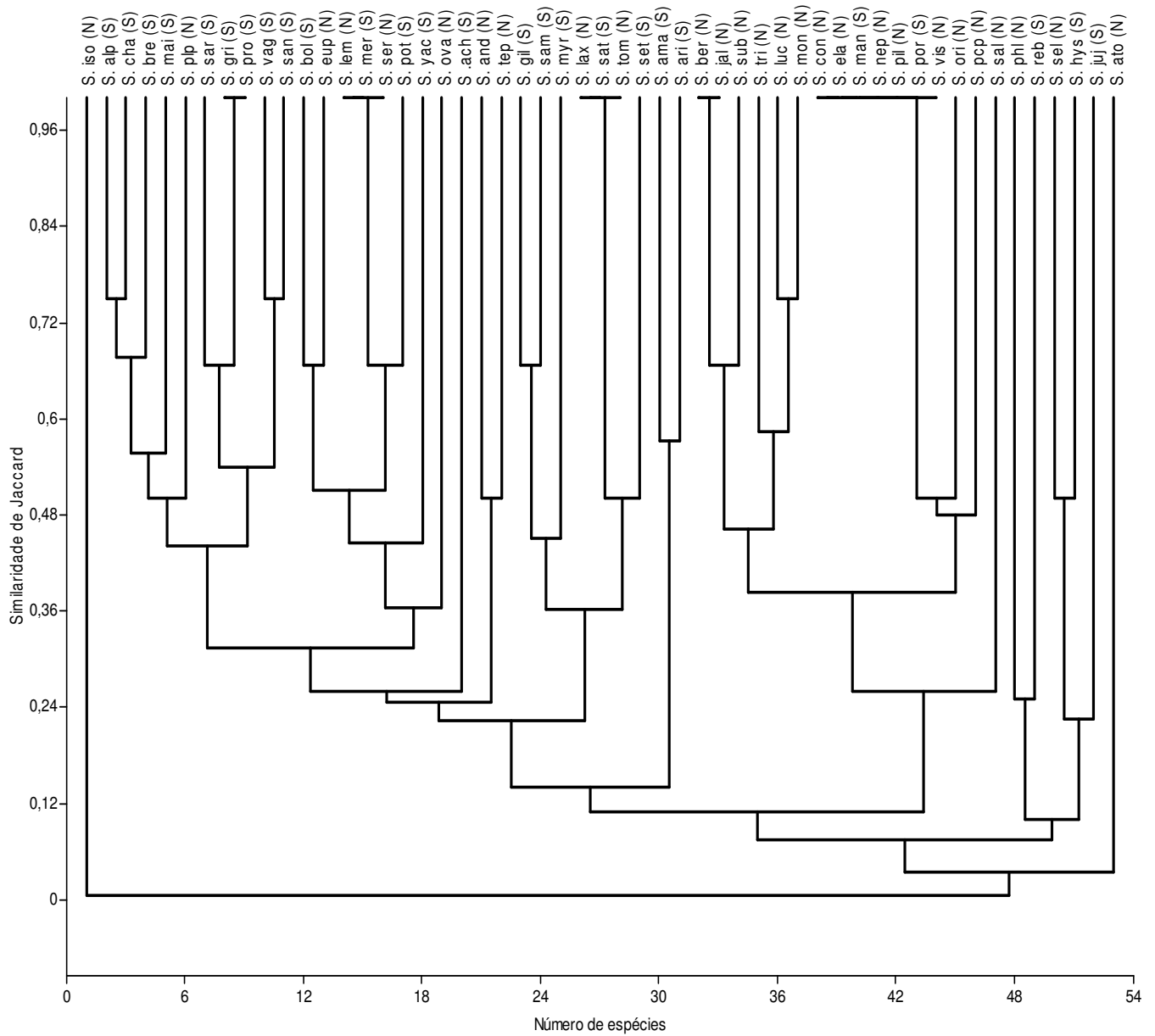
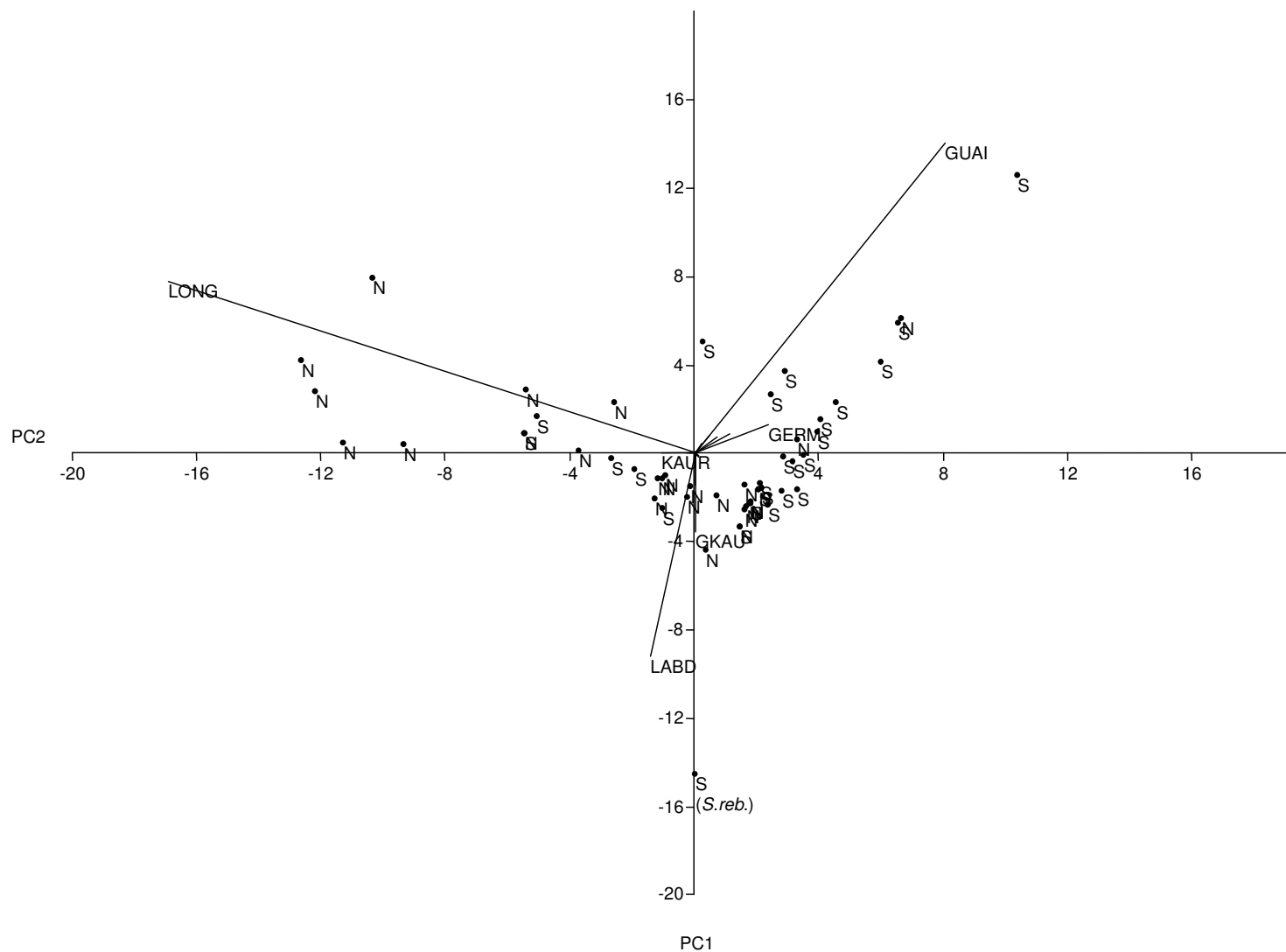


Figura 4. Diagrama de ordenação por PCA com biplotagem, mostrando o primeiro e o segundo eixos principais (PC1 vs. PC2). Apenas *S. rebaudiana* (*S. Reb.*) é nomeada por sua importância. Abreviaturas: norte (N), sul (S), germacrenolídeos (GERM), guaianolídeos (GUAI), kauranos (KAUR), kauranos glicosilados (GKAU) e



longipinanos (LONG).

Figura 5: Diagrama de ordenação por PCA com biplotagem, mostrando o primeiro e o terceiro eixos principais (PC1 vs. PC3). Apenas *S. rebaudiana* (*S. Reb.*) é nomeada por sua importância. Abreviaturas: norte (N), sul (S), germacrenolídeos (GERM), guaianolídeos (GUAI), kauranos (KAUR), kauranos glicosilados (GKAU) e longipinanos (LONG).

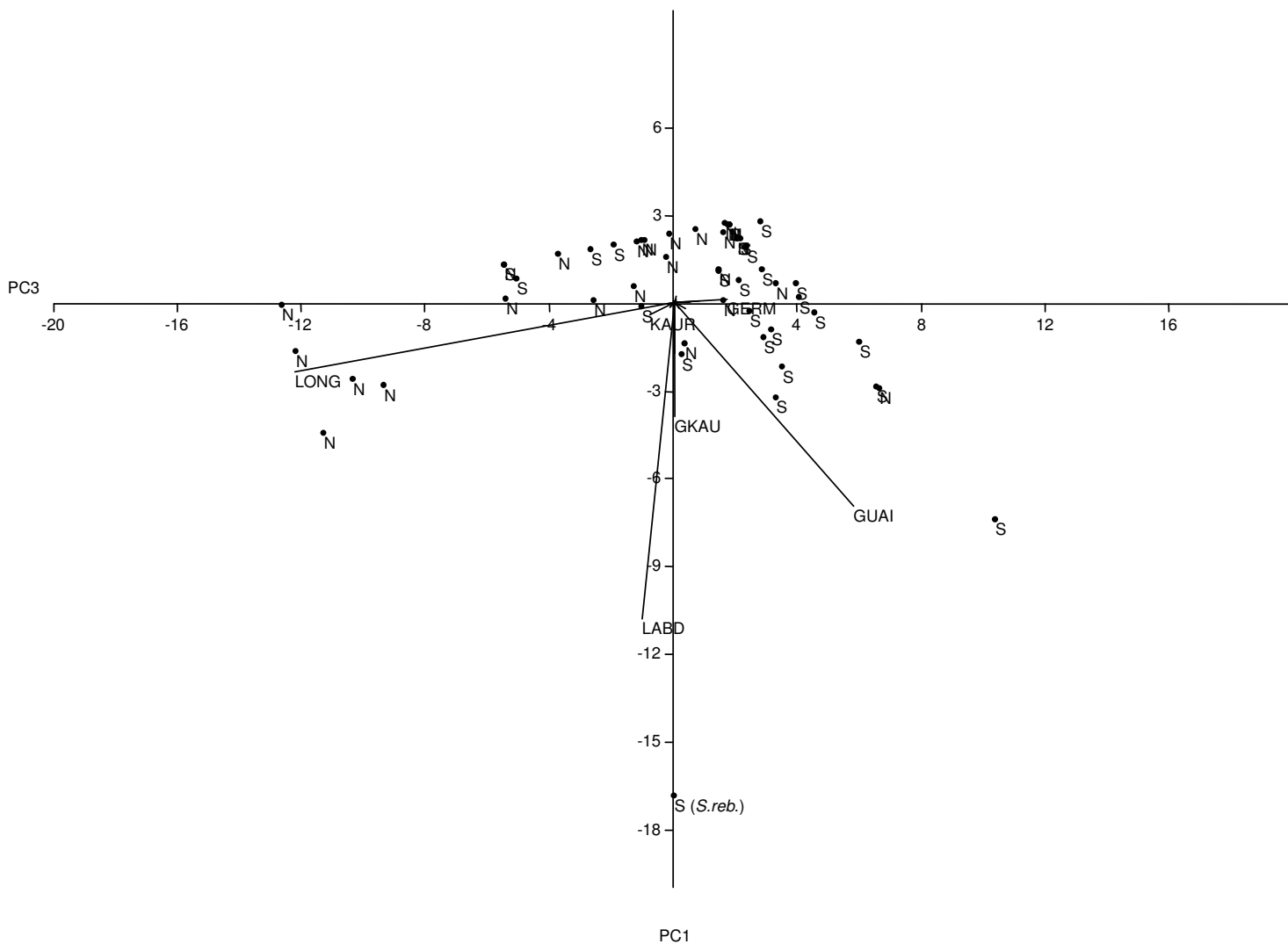


Figura 6. Diagrama de ordenação por PCA com biplotagem, mostrando o segundo e o terceiro eixos principais (PC2 vs. PC3). Apenas *S. rebaudiana* (*S. Reb.*) é nomeada por sua importância. Abreviaturas: norte (N), sul (S), germacrenolídeos (GERM), guaianolídeos (GUAI), kauranos (KAUR), kauranos glicosilados (GKAU) e longipinanos (LONG).

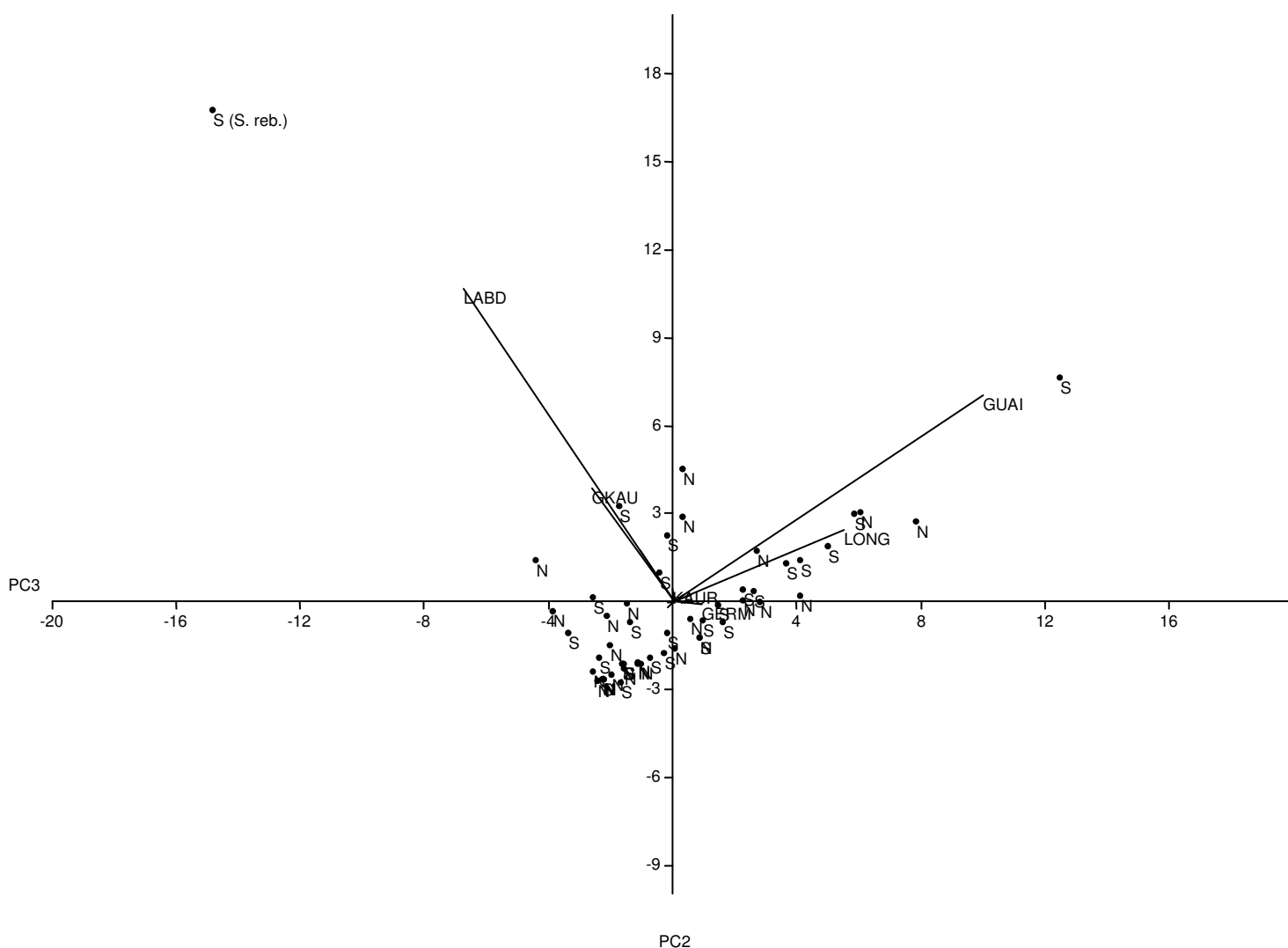


Tabela 1. Lista de espécies de *Stevia* com dados fitoquímicos disponíveis e sua distribuição geográfica no continente americano.

Espécie	Código	Distribuição	Espécie	Código	Distribuição
<i>Stevia achalensis</i> Hieron.	<i>S. ach</i>	S	<i>Stevia myriadenia</i> Sch.Bip. ex Baker	<i>S. myr</i>	S
<i>Stevia</i> aff. <i>tomentosum</i>	<i>S. ato</i>	N	<i>Stevia nepetifolia</i> Kunth	<i>S. nep</i>	N
<i>Stevia alpina</i> Griseb.	<i>S. alp</i>	S	<i>Stevia origanoides</i> Kunth	<i>S. ori</i>	N
<i>Stevia amambayensis</i> B.L.Rob.	<i>S. ama</i>	S	<i>Stevia ovata</i> Willd.	<i>S. ova</i>	N
<i>Stevia andina</i> B.L.Rob.	<i>S. and</i>	N	<i>Stevia phlebophylla</i> A.Gray	<i>S. phl</i>	N
<i>Stevia aristata</i> D.Don ex Hook. & Arn.	<i>S. ari</i>	S	<i>Stevia pilosa</i> Lag.	<i>S. pil</i>	N
<i>Stevia berlandieri</i> A.Gray	<i>S. ber</i>	N	<i>Stevia polycephala</i> Bertol.	<i>S. pcp</i>	N
<i>Stevia boliviensis</i> Sch.Bip	<i>S. bol</i>	S	<i>Stevia polyphylla</i> DC.	<i>S. plp</i>	N
<i>Stevia breviaristata</i> Hook. & Arn.	<i>S. bre</i>	S	<i>Stevia porphyrea</i> McVaugh	<i>S. por</i>	S
<i>Stevia chamaedrys</i> Griseb.	<i>S. cha</i>	S	<i>Stevia potrerensis</i> Hieron.	<i>S. pot</i>	S
<i>Stevia connata</i> Lag.	<i>S. con</i>	N	<i>Stevia procumbens</i> Hieron.	<i>S. pro</i>	S
<i>Stevia cuzcoensis</i> Hieron.	<i>S. cuz</i>	S	<i>Stevia purpurea</i> Pers.	<i>S. pur</i>	M
<i>Stevia elatior</i> Kunth	<i>S. ela</i>	N	<i>Stevia rebaudiana</i> Bertoni	<i>S. reb</i>	S
<i>Stevia eupatoria</i> (Spreng.) Willd.	<i>S. eup</i>	N	<i>Stevia salicifolia</i> Cav.	<i>S. sal</i>	N
<i>Stevia galeopsidifolia</i> Hieron.	<i>S. gal</i>	S	<i>Stevia samaipatusensis</i> B.L.Rob.	<i>S. sam</i>	S
<i>Stevia gilliesii</i> Hook. & Arn.	<i>S. gil</i>	S	<i>Stevia sanguinea</i> Hieron.	<i>S. san</i>	S
<i>Stevia grisebachiana</i> Hieron.	<i>S. gri</i>	S	<i>Stevia sarensis</i> B.L.Rob.	<i>S. sar</i>	S
<i>Stevia hyssopifolia</i> Kunth	<i>S. hys</i>	S	<i>Stevia satureifolia</i> Cav.	<i>S. sat</i>	S
<i>Stevia isomeca</i> Grashoff	<i>S. iso</i>	N	<i>Stevia seleriana</i> B.L.Rob.	<i>S. sel</i>	N
<i>Stevia jaliscensis</i> B.L.Rob.	<i>S. jal</i>	N	<i>Stevia serrata</i> Cav.	<i>S. ser</i>	N
<i>Stevia jujuyensis</i> Cabrera	<i>S. juj</i>	S	<i>Stevia setifera</i> Rusby ex B.L.Rob.	<i>S. set</i>	S
<i>Stevia laxiflora</i> DC.	<i>S. lax</i>	N	<i>Stevia soratensis</i> Hieron.	<i>S. sor</i>	S
<i>Stevia lemmonii</i> A.Gray	<i>S. lem</i>	N	<i>Stevia subpubescens</i> Lag.	<i>S. sub</i>	N
<i>Stevia lucida</i> Lag.	<i>S. luc</i>	N	<i>Stevia tephrophylla</i> S.F.Blake	<i>S. tep</i>	N
<i>Stevia maimarensis</i> (Hieron.) Cabrera	<i>S. mai</i>	S	<i>Stevia tomentosa</i> Kunth	<i>S. tom</i>	N
<i>Stevia mandonii</i> Sch.Bip.	<i>S. man</i>	S	<i>Stevia triflora</i> DC.	<i>S. tri</i>	N
<i>Stevia mercedensis</i> Hieron.	<i>S. mer</i>	S	<i>Stevia vaga</i> Griseb.	<i>S. vag</i>	S
<i>Stevia microchaeta</i> Sch.Bip.	<i>S. mic</i>	N	<i>Stevia viscida</i> Kunth	<i>S. vis</i>	N
<i>Stevia monardifolia</i> Kunth	<i>S. mon</i>	N	<i>Stevia yaconensis</i> Hieron.	<i>S. yac</i>	S

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, S.A.V., FERREIRA, M.J.P., RODRIGUES, G.V. & EMERENCIANO, V.P. 2005. A general survey and some taxonomic implications of diterpenes in the Asteraceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 291-308.

ALVARENGA, S.A.V., FERREIRA, M.J.P., EMERENCIANO, V.P. & CABROL-BASS, D. 2001. Chemosystematic studies of natural compounds isolated from Asteraceae: characterization of tribes by principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory System* 56:27-37.

ALVES, T.L.S., RITTER, M.R. & SOARES, G.L.G. Chemotaxonomy of genus *Mikania* (Asteraceae) based on chemical profile database and multivariate analysis. Submetido para o *Journal of the Brazilian Chemical Society*.

ANKE, S., NIEMULLER, D., MOLL, S., HANSCH, R. & OBER D. 2004. Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of Homospermidine Synthase. *Plant Physiology* 136: 4037-4047.

BALDWIN, B.G., WESSA, B.L. & JOSE L. PANERO, J.L. 2002. Nuclear rDNA evidence for major lineages of Helenioid Heliantheae (Compositae). *Systematic Botany* 27: 161-198.

BARQUERA-LOZADA, J.E. & CUEVAS, G. 2009. Biogenesis of sesquiterpene lactones pseudoguaianolides from germacranolides: theoretical study on the reaction mechanism of terminal biogenesis of 8-epiconfertifin. *Journal of Organic Chemistry* 74: 874-883.

BOHLMANN, F., ZDERO, C., KING, R.M. & ROBINSON, H. 1982. Sesquiterpenes, guaianolides and diterpenes from *Stevia myriadenia*. *Phytochemistry* 21:2021-2025.

BRANDLE, J.E. & TELMER, P.G. 2007. Steviol glycoside biosynthesis. *Phytochemistry* 68: 1855-1863.

CALABRIA, L.M., EMERENCIANO, V.P., FERREIRA, M.J.P., SCOTTI, M.T. & MABRY, T.J. 2007. A phylogenetic analysis of tribes of the Asteraceae based on phytochemical data. *Natural Products Communications* 3:277-285.

CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M., GUERRA-RAMIREZ, D., ROMÁN-MARIN, L.U., HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, J.D., JOSEPH-NATHAN, P. 2006. DFT molecular modeling



and NMR conformational analysis of a new longipinenetriolone diester. *Journal of Molecular Structure* 789: 37-42.

CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M., FLORES-SANDOVAL, C.A., ROMÁN, L.U., HERNÁNDEZ, J.D. & JOSEPH-NATHAN, P. 2002. A regioselective Wagner-Meerwein rearrangement directed towards the six-membered ring of the longipinane skeleton. *Tetrahedron* 58:1061-1068.

CORREIA, M.V., SCOTTI, M.T., FERREIRA, M.J.P., VESTRI, S.A., ALVARENGA, S. A.V., RODRIGUES, G.V. & EMERENCIANO, V.P. 2008. Self-organizing maps as a new tool for classification of plants at lower hierarchical levels. *Natural Product Communications* 3:1723-1730.

CRAWFORD, D.J., 1978. Flavonoid chemistry and Angiosperm evolution. *Botanical reviews* 44:431-456.

CRUZ, A.V.M., FERREIRA, M.J.P., SCOTTI, M.T., KAPLAN, M.A.C. & EMERENCIANO, V.P. 2008. Chemotaxonomic relationships in Celastraceae inferred from Principal Component Analysis (PCA) and Partial Least Squares (PLS). *Natural Product Communications* 3:911-917.

DA COSTA, F.B., TERFLOTH, L. & GASTEIGER, J. 2005. Sesquiterpene lactone-based classification of three Asteraceae tribes: a study based on self-organizing neural networks applied to chemosystematics. *Phytochemistry* 66: 345-353.

DE GUTIÉRREZ, A.N., CATALAN, C.A.N., DIAZ J.G. & HERZ, W. 1992. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Stevia jujuyensis*. *Phytochemistry* 31:1818-1820.

EMERENCIANO, V.R., BARBOSA, K.O., SCOTTI, M.T. & FERREIRA, M.J.R. 2007. Self-organizing maps in chemotaxonomic studies of Asteraceae: a classification of tribes using flavonoid data. *Journal Of The Brazilian Chemical Society* 18:891-899.

EMERENCIANO, V.P., MILITAO, J.S.L.T., CAMPOS, C.C., ROMOFF, P., KAPLAN, M.A.C., ZAMBON, M. & BRANT A.J.C. 2001. Flavonoids as chemotaxonomic markers for Asteraceae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 947-957.

EMERENCIANO, V.P., BONFANTI, M.R.M., FERREIRA, Z.S., KAPLAN, M.A.C. & GOTTLIEB, O.R. 1986. The evolution of sesquiterpene lactones in Asteraceae., *Biochemical Systematics and Ecology* 14: 585-589.

EMERENCIANO, V. P., KAPLAN, M.A.C. & GOTTLIEB, O.R 1985. The evolution of sesquiterpene lactones in Angiosperms. *Biochemical Systematics and Ecology* 13:145-166.

FERREIRA, M.J.P., BRANT, A.J.C., ALVARENGA, S.A.V. & EMERENCIANO V.P. 2005. Neural networks in chemosystematic studies of asteraceae: A classification based on a dichotomic approach. *Chemistry & Biodiversity* 2:633-644.

FERREIRA, M.J.P., BRANT, A.J.C., RUFINO, A.R., ALVARENGA, S.A.V., MAGRI, F.M.M. & EMERENCIANO, V.P. 2004. Prediction of occurrences of diverse chemical classes in the Asteraceae through artificial neural networks. *Phytochemical Analysis* 15:389-396.

FIGUEIREDO, M.F., KAPLAN, M.A.C. & GOTTLIEB, O.R. 1995. Diterpenes, taxonomic markers? *Plant Systematics and Evolution* 195: 149-158.

GAGE, D. 1985. Chemical data and their bearing upon genetic delineations in the Eupatorieae. *Taxon* 34: 61-71.

GIL, R.R., PACCIARONI, A.D.V., OBERTI J.C., DIAZ, J.G. & HERZ, W. 1992. A rearranged germacranolide and other sesquiterpene lactones from *Stevia jujuyensis*. *Phytochemistry* 31: 593-596.

GOTTLIEB, O.R. & BORIN, M.R.D.B. 1998. Evolution of Angiosperms via modulation of antagonisms. *Phytochemistry* 49: 1-15.

GOTTLIEB, O.R., BORIN, M. R. M. B. & KAPLAN, M.A.C. 1996. Biodiversidade: Um Enfoque Químico-Biológico. 1ed. Rio de Janeiro: Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro. v.1. Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

GOTTLIEB, O.R., BORIN, M.R.D.B. & KAPLAN, M.A.C. 1995. Biosynthetic interdependence of lignins and secondary metabolites in Angiosperms: *Phytochemistry* 40: 99-113.

GOTTLIEB, O. R. 1982. Micromolecular evolution, systematics and ecology an essay into a novel botanical discipline. Springer Verlag, Berlin e Nova Iorque.

GRASHOFF, J.L. 1972. A systematic study of the North and Central American species of *Stevia*. Tese de Ph.D, Universidade do Texas, Texas.

HERNÁNDEZ, L.R., CATALÁN, C.A.N. & JOSEPH-NATHAN, P. 1998. The chemistry of the genus *Stevia* (Asteraceae). *Revista da Academia Colombiana de Ciências* 22: 229-279.

HERNÁNDEZ, L.R.H., CATALÁN, C.A.N., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M. & JOSEPH-NATAN, P. 1994. Sesquiterpene lactones from *Stevia breviflora*. *Phytochemistry* 37: 1331-1335.

HERZ, W. 2003. Chemistry of the Oxylobinae. *Biochemical Systematics and Ecology* 31: 963-993.

HERZ, W. 2001. Chemistry of the Eupatoriinae. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 1115-1137.

HERZ, W. 1998. Terpenoid chemistry of *Mikania* species. *Journal of the Indian Chemical Society* 75:559-564.

ITO, M., WATANABE, K., KITA, Y., KAWAHARA, T., CRAWFORD, D.J. & YAHARA, T. 2000a. Phylogeny and phytogeography of *Eupatorium* (Eupatorieae, Asteraceae): insights from sequence data of the nrDNA ITS regions and cpDNA RFLP. *Journal of Plant Research* 1109: 79-89.

ITO, M., YAHARA, T., KING, R.M., WATANABE, K., OSHITA, S., YOKOYAMA, J. & CRAWFORD, D.J. 2000b. Molecular phylogeny of Eupatorieae (Asteraceae) estimated from cpDNA RFLP and its implication for the polyploid origin hypothesis of the tribe. *Journal of Plant Research* 1109: 91-96.

KING, R.M. & ROBINSON, H. 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). *Monographs in systematic botany*. v.22. Missouri Botanical Garden, St. Louis.

KINGHORN, A.D., SOEJARTO, D.D., NANAYAKKARA, N.P.D., COMPADRE, C.M., MAKAPUGAY, H.C., HOVANECBROWN, J.M., MEDON, P.J. & KAMATH, S.K. 1984.

Potential sweetening agents of plant-origin 4. A phytochemical screening-procedure for sweet *ent*-kaurene glycosides in the genus *Stevia*. *Journal of Natural Products* 47: 439-444.

MONTEIRO, R. 1982. Estudos taxonômicos em *Stevia* série *Multiaristatae* no Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 5:5-15.

NAKAJIMA, J.N. 1991. Taxonomia fenética das séries *Paleaceoaristatae* e *Pauciaristatae* de *Stevia* Cav. (Asteraceae, Eupatorieae). Tese de mestrado, UNESP, São Paulo.

ROBINSON, B.L. 1930. Record preliminary to a general treatment of the Eupatorieae. VIII. Observations on the genus *Stevia*. The *Stevias* of the Argentina Republic. The *Stevias* of Paraguay. The *Stevias* of North America. *Contributions of the Gray Herbarium* 90:3-161.

ROMÁN, L.U., MORALES, N.R., HERNÁNDEZ, J.D., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M., ZEPEDA, L.G., FLORES-SANDOVAL, C.A. & JOSEPH-NATHAN, P. 2001. Generation of the new quirogane skeleton by a vinylogous retro-Michael type rearrangement of longipinene derivatives. *Tetrahedron* 57: 7269-7275.

ROMÁN, L.U., ZEPEDA, L.G., MORALES, N.R., FLORES, S., HERNÁNDEZ, J.D., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M., JOSEPH-NATHAN, P. 1996. Mechanistic studies of the longipinane to arteagane rearrangement. *Journal of Natural Products* 59: 391-395.

ROMÁN, L.U., TORRES, J.M., REYES, R., HERNÁNDEZ, J.D., CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M. & JOSEPH-NATHAN, P. 1995. *Ent*-kaurane glycoside from *Stevia subpubescens*. *Phytochemistry* 39: 1133-1137.

SCHILLING, E. E., PANERO, J. L. & COX, P. B. 1999. Chloroplast DNA restriction site data support a narrowed interpretation of *Eupatorium* (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 219:209-223.

SCHMIDT, G.J. & SCHILLING, E.E. 2000. Phylogeny and biogeography of *Eupatorium* (Asteraceae: Eupatorieae) based on nuclear ITS sequence data. *American Journal of Botany* 87: 716-726.

SOARES, G.L.G. & KAPLAN, M.A.C. 2001. Analysis of flavone/flavonol ratio in Dicotyledoneae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 135: 61-66.

SOARES, G. L. G. & KAPLAN, M.A.C. 1995. Estudo químico da ordem Caryophyllales. *Revista Brasileira de Farmácia* 76: 69-72.

SOEJARTO, D.D., COMPADRE, C.M., MEDON, P.J., KAMATH, S.K. & KINGHORN, A.D. 1983. Potential sweetening agents of plant-origin. Potential sweetening agents of plant-origin 2. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany* 37: 71-79.

SOEJARTO, D.D., KINGHORN, A.D. & FARNSWORTH, N.R. 1982. Potential sweetening agents of plant-origin 3. Organoleptic evaluation of *Stevia* leaf herbarium samples for sweetness. *Journal of Natural Products* 45: 590-599.

URBATSCH, L.E., BALDWIN, B.G. & MICHAEL J. DONOGHUE, M.J. 2000. Phylogeny of the coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequence and chloroplast DNA restriction site data. *Systematic Botany* 25: 539-565.

WOLD, S., ESBENSEN, K. & GELADI, P. 1987. Principal component analysis. *Chemometrics And Intelligent Laboratory Systems* 2: 37-52.

ZDERO, C. & BOHLMANN, F. 1990. Systematic and evolution within the Compositeae seen with the eyes of a chemist. *Plant Systematic and Evolution* 171:1-14.

ZDERO, C. & BOHLMANN, F. 1989. Eremophilanolides, eudesmanolides, guaianolides and other constituents from *Ondetia linearis*. *Phytochemistry* 28: 1653-1660.

ZIDORN, C. 2006. Sesquiterpenoids as chemosystematic markers in the subtribe Hypochaeridinae (Lactuceae, Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 34: 144-159.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma interpretação conjunta dos dados indica que *Mikania* e *Stevia* são gêneros que possuem em comum uma química voltada predominantemente para a produção de terpenóides. Ambos os gêneros possuem perfil flavonoídico pouco especializado baseados em metabólitos de ocorrência comum em linhagens angiospérmicas. Além disso, observa-se em *Mikania* e *Stevia* uma virtual ausência de alcalóides pirrolizidínicos, o que sustenta a hipótese do surgimento desses metabólitos apenas em gêneros de divergência tardia em Eupatoriae.

Embora esses gêneros produzam lactonas sesquiterpenoídicas e diterpenóides com alta diversidade estrutural, os tipos mais frequentemente encontrados são substancialmente diferentes em ambos. Outro fator distintivo para *Mikania* é a ocorrência de um marcador não terpenoídico: as cumarinas. O gênero *Stevia* não apresenta metabólitos das vias do acetato e do chiquimato com padrões de ocorrência que os caracterize como marcadores. Por outro lado este gênero possui marcadores aparentemente exclusivos que são os derivados do longipinano.

A presença de padrões que associam caracteres químicos com morfologia e/ou geografia foi verificada para ambos os gêneros. Em *Mikania* tal relação pareceu bastante clara associando espécies com um dado padrão químico à distribuição geográfica e morfologia de inflorescência.

Em *Stevia* foi possível encontrar um padrão apenas de distribuição geográfica, mais polarizado e com menos consistência quando comparado ao verificado para *Mikania*. Para ambos os gêneros existem exceções pontuais em relação ao seguimento das tendências estabelecidas, entretanto, a grande maioria das espécies segue os padrões

determinados demonstrando ser possível a integração de caracteres químicos com aspectos biológicos e geográficos nesses gêneros.