

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Composição química do óleo essencial de sete genótipos de
Lippia gracilis e reações de biotransformação de voláteis**

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2012

**Composição química do óleo essencial de sete genótipos de
Lippia gracilis e reações de biotransformação de voláteis**

HUGO CÉSAR RAMOS DE JESUS

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Péricles Barreto Alves

SÃO CRISTÓVÃO – SE

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

J58c Jesus, Hugo César Ramos de
Composição química do óleo essencial de sete genótipos de *Lippia gracilis* e reações de biotransformação de voláteis / Hugo César Ramos de Jesus ; orientador Péricles Barreto Alves. – São Cristóvão, 2012.
136 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2012.

1. Química orgânica. 2. *Lippia gracilis*. 3. Essências e óleos essenciais. 4. Biotransformação. I. Alves, Péricles Barreto, orient. II. Título.

CDU 547.913

Dedicação

*Dedico este trabalho a minha mãe Maria Auxiliadora, meu pai José
Edivaldo e meus irmãos Camilo Bruno e Thais Ramos.*

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por guiar meus caminhos.

Aos meus pais Auxiliadora e Edivaldo por todo amor, apoio e por ter me dado dois irmãos maravilhosos: Bruno e Thais.

Aos meus avós, tios e primos pelo companheirismo familiar.

Aos estimados amigos de infância da cidade de Malhador.

Ao Prof. Dr. Péricles Barreto Alves pela oportunidade concedida, apoio e valiosos ensinamentos durante esses cinco anos de convivência como seu orientado.

Aos docentes e técnicos do Departamento de Química da UFS, em especial aos Profs. Drs. Paulo César de Lima Nogueira, Emmanoel Vilaça Costa e Sandro Navickiene que contribuíram para minha formação e no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (IQSC-USP) por me receber muito bem em seu laboratório e pela enorme contribuição dada a esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Clóvis Roberto Pereira Franco do Departamento de Biologia da UFS, pela parceria desde o período de Iniciação Científica e conhecimento compartilhado.

Ao Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank e seus alunos do Departamento de Engenharia Agrônômica da UFS pela parceria e fornecimento do material vegetal.

Ao Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva do Núcleo de Química da UFS (Campus Profº Alberto Carvalho) pelo fornecimento do fungo *Aspergillus niger*.

Aos membros e técnicos do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise do IQSC-USP Sandra Ribeiro, Natália Alvarenga, Lenilson Coutinho, Ana Maria, Mariana Provedel, Julieta Rangel, Maríla Peret e João Pedro pelo auxílio nas análises, companheirismo e momentos de descontração durante o estágio realizado no IQSC.

Aos meus amigos membros e ex-membros do Laboratório de Produtos Naturais e do LABORGANICS, especialmente Alan Diego, Paloma Prata e Darlisson de Alexandria que foram e são muito importantes, Iara Lisboa, Edenilson Niculau, Adriano Aquino, Givanilton Brito, Givanildo Batista, Jammyson Romário, Rosany Máiaara, Leciley, e demais membros, pelo companheirismo e vários momentos inesquecíveis compartilhados.

À Universidade Federal de Sergipe.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMO.....	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.2. Plantas medicinais	2
1.2.1.Óleos essenciais	5
1.2.1.1 Aspectos econômicos	8
1.3. Análises estatísticas: Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise de componentes principais (PCA)	17
1.4. Biocatálise e biotransformação	18
1.4.1.Enzimas.....	19
1.4.2.Fungos em reações de biocatálise.....	23
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1. Óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>	26
2.2. Biotransformação de terpenos voláteis	27
2.2.1.Biotransformação da cânfora.....	30
2.2.2.Biotransformação da fenchona	31
2.2.3.Biotransformação do geraniol.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
3. METODOLOGIA.....	35
3.1. Parte I: Análise do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>	35
3.1.1.Local do estudo de campo	35
3.1.2.Extração do óleo essencial, análise cromatográfica por CG-EM e identificação dos compostos.....	36

3.1.3. Análise estatística	37
3.2. Parte II – Reações de biotransformação	38
3.2.1. Solventes e sais	38
3.2.2. Substratos	38
3.2.3. Cromatografia em coluna	38
3.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)	39
3.2.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)	39
3.2.6. Outros equipamentos	40
3.2.7. Coleta da alga e isolamento do fungo <i>Botryosphaeria</i> sp.	40
3.2.8. Isolamento do fungo <i>Aspergillus niger</i>	41
3.2.9. Cultivo dos microorganismos	42
3.2.10. Reações de biotransformação	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Parte I – Análise do óleo essencial de <i>Lippia gracilis</i>	44
4.1.1. Composição química	44
4.1.2. Biossíntese dos componentes do óleo essencial	52
4.2. Parte II – Reações de biotransformação	58
4.2.1. Reações usando o fungo marinho <i>Botryosphaeria</i> sp.	58
4.2.1.1. Biotransformação da cânfora	61
4.2.1.1.1 Análise das frações obtidas	63
4.2.1.2. Biotransformação da (+)- e (-)-fenchona	75
4.2.1.2.1. Análise das frações	77
4.2.2. Reações usando o fungo <i>Aspergillus niger</i>	83
4.2.2.1. Biotransformação do geraniol	85
4.2.2.2. Biotransformação da (+)- e (-)-fenchona	88
5. CONCLUSÕES	90
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.	3
Figura 2. Estrutura química de alguns monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides frequentemente encontrados em OEs	7
Figura 3. Mapa da exportação de óleos essenciais em 2011	11
Figura 4. Biossíntese do eugenol e do fenilacetaldeído	14
Figura 5. Formação de GPP a partir da condensação de DMPP e IPP.....	15
Figura 6. Formação de FPP a partir da condensação de DMPP e IPP	16
Figura 7. Resumo dos processos celulares envolvidos na síntese de voláteis.....	17
Figura 8. Aspectos da ligação de um substrato ao sítio ativo da enzima.	21
Figura 9. Biotransformação da progesterona por <i>Rhizopus stolonifer</i> e <i>Rhizopus arrhizus</i>	24
Figura 10. Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	27
Figura 11. Biotransformação da (-)-cânfora por <i>Salmonella typhimurium</i> OY1002/2A6	30
Figura 12. Biotransformação da (+)-cânfora por células vegetais de <i>Eucalyptus perriniana</i>	30
Figura 13. Biotransformação da cânfora pelo fungo <i>Penicillium brasilianum</i>	31
Figura 14. Principais produtos de biotransformação da (-)-canfoquinona por <i>A. niger</i> e da (+)-canfoquinona por <i>G. cingulata</i> , <i>M. mucedo</i> e cianobactérias.....	31
Figura 15. Biotransformação da (-)-fenchona por enzimas do citocromo P450 humano	32
Figura 16. Redução do geraniol a <i>R</i> -citronelol por <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 17. Mecanismo de degradação do geraniol por <i>P. italicum</i>	33
Figura 18. Mudanças de genótipos de <i>Lippia gracilis</i> cultivadas no Campus Rural da UFS.....	36
Figura 19. Resumo das etapas realizadas até a análise do óleo essencial.	37
Figura 20. Foto da alga marinha <i>Bostrychia radicans</i>	40
Figura 21. Estrutura química dos principais componentes do OE de <i>L. gracilis</i>	45
Figura 22. Dendrograma representando a relação de similaridade da composição química do OE sete genótipos de <i>L. gracilis</i> . A – com estresse; B – sem estresse.	49

Figura 23. Gráfico de escores para as amostras CE. A - Dispersão dos percentuais dos constituintes do OE de <i>L. gracilis</i> pelos CP1 e CP2. B - Separação dos genótipos pelos CP1 e CP2.....	50
Figura 24. Gráfico de escores para as amostras SE. A - Dispersão dos percentuais dos constituintes do OE de <i>L. gracilis</i> pelos CP1 e CP2. B - Separação dos genótipos pelos CP1 e CP2.....	50
Figura 25. Percentual de monoterpenos (A) e sesquiterpenos (B) no OE das folhas de <i>L. gracilis</i> nos dois experimentos.	51
Figura 26. Rota proposta para a biossíntese dos monoterpenos presentes no OE das folhas de <i>L. gracilis</i>	53
Figura 27. Rota proposta para biossíntese dos sesquiterpenos presentes no OE das folhas de <i>L. gracilis</i>	56
Figura 28. Estrutura química dos compostos usados nas reações de biotransformação.	58
Figura 29. Foto do fungo <i>Botryosphaeria</i> sp em placa de Patri.....	59
Figura 30. Cromatograma de íons totais (TIC) do controle e de alíquotas removidas após 24, 72 e 120 h de biotransformação por <i>Botryosphaeria</i> sp. usando os substratos cânfora (A), (-)-fenchona (B) e (+)-fenchona (C).	60
Figura 31. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação da cânfora após cinco dias de incubação com o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp.....	61
Figura 32. TIC de frações (A , B , C e D) após purificação por CC contendo produtos de biotransformação da cânfora	62
Figura 33. Numeração dos carbonos da cânfora. Em destaque os possíveis sítios de hidroxilação	62
Figura 34. Provável epimerização ocorrida quando a 6- <i>endo</i> -hidroxicanfora é deixada em repouso em CDCl ₃	64
Figura 35. TIC da fração A antes (a) e após diluição (b) e repouso em CDCl ₃ (azul)	64
Figura 36. Reação de biotransformação da <i>rac</i> -cânfora por fungos <i>Botryosphaeria</i> sp.	66
Figura 32. Espectros de massas dos produtos de hidroxilação da cânfora.....	67
Figura 38. Proposta de fragmentação por EM do par de diastereoisômeros <i>iso</i> -borneol e borneol.	68
Figura 39. Semelhança entre espectros de massas de diastereoisômeros bicíclicos com base nos M ⁺ formados	69
Figura 40. Proposta de fragmentação por EM para a 3- <i>exo</i> -hidroxicanfora.	70
Figura 41. Proposta de fragmentação por EM para a 5- <i>exo</i> -hidroxicanfora	72

Figura 42. Proposta de fragmentação por EM para a 5- <i>endo</i> -hidroxicânfora.	73
Figura 43. Proposta de fragmentação por EM para a 9-hidroxicânfora.	74
Figura 44. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona após cinco dias de incubação com o fungo <i>Botryosphaeria</i> sp.	76
Figura 45. TIC de frações (A e B), após purificação por CC, contendo produtos de biotransformação da (+)-fenchona.	76
Figura 46. Numeração dos carbonos da fenchona. Em destaque os possíveis sítios de hidroxilação.	77
Figura 47. Espectros de massas dos produtos de hidroxilação da fenchona.	79
Figura 48. Acetilação da (+)-6- <i>exo</i> -hidroxifenchona com anidrido acético/piridina.	80
Figura 49. TIC obtido do extrato da reação de biotransformação da (+)-fenchona, da (+)-6- <i>exo</i> -hidroxifenchona isolada e do produto da acetilação química da 6- <i>exo</i> -hidroxifenchona.	81
Figura 50. Espectro de massas do produto de acetilação química da (+)-6- <i>exo</i> -hidroxifenchona.	81
Figura 51. Formação do fragmento de m/z 168.	81
Figura 52. Reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona por <i>Botryosphaeria</i> sp.	82
Figura 53. Foto do fungo <i>Aspergillus niger</i> em placa de Patri.	83
Figura 54. TIC do controle e de alíquotas removidas após 24, 72 e 120 h de biotransformação por <i>A. niger</i> usando os substratos geraniol (A), (-)-fenchona (B) e (+)-fenchona (C).	84
Figura 55. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação do geraniol após cinco dias de incubação com o fungo <i>A. niger</i>	85
Figura 56. Espectros de massas dos produtos de biotransformação do geraniol por <i>A. niger</i>	86
Figura 57. Cromatograma do extrato da reação de biotransformação do geraniol por <i>A. niger</i> obtido em um CG-DIC usando uma coluna quiral.	87
Figura 58. Biotransformação do geraniol por <i>A. niger</i>	87
Figura 59. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona após cinco dias de incubação com o fungo <i>A. niger</i>	88
Figura 60. Espectros de massas dos produtos de hidroxilação da fenchona.	88
Figura 61. Reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona por <i>Aspergillus niger</i>	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Riqueza de espécies de fungos, algas e plantas terrestres por unidade da Federação.....	1
Tabela 2. Espécies vegetais com maior número de derivados registrados como fitoterápicos.	4
Tabela 3. Componentes majoritários de alguns óleos essenciais extraídos das folhas de espécies vegetais.....	6
Tabela 4. Principais países importadores de OE nos últimos quatro anos.	9
Tabela 5. Principais parceiros na importação de OE para o Brasil no período de 2008 a 2011	10
Tabela 6. Principais países exportadores de OE nos últimos quatro anos.....	11
Tabela 7. Exportação de óleo de laranja pelo Brasil	12
Tabela 8. Preço e quantidade dos principais OEs exportados pelo Brasil no período de 2008-2011.....	13
Tabela 9. Vantagem e desvantagens dos biocatalisadores sobre os catalisadores químicos... ..	19
Tabela 10. Exemplo de aplicação de enzimas em diferentes setores industriais.....	22
Tabela 11. Principais espécies da família Verbenaceae de origem ou cultivadas no Nordeste do Brasil	25
Tabela 12. Biotransformação de precursores para a produção de compostos voláteis por plantas e microorganismos.	28
Tabela 13. Dados de origem e do BAG dos genótipos de <i>L. gracilis</i>	35
Tabela 14. Teor de óleo essencial extraído das folhas de <i>L. gracilis</i>	44
Tabela 15. Composição química do OE de genótipos de <i>L. gracilis</i> submetidos ao estresse hídrico	46
Tabela 16. Composição química do OE de genótipos de <i>L. gracilis</i> sem estresse hídrico	47
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 6- <i>endo</i> -hidroxicânfora	63
Tabela 18. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 5- <i>exo</i> -hidroxicanfora	65
Tabela 19. Dados de EM para os produtos de hidroxilação da cânfora	74
Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 6- <i>exo</i> -hidroxifenchona.....	77
Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 5- <i>exo</i> -hidroxifenchona.....	78
Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para a 5- <i>exo</i> -hidroxifenchona.....	78
Tabela 23. Dados de EM para os produtos de hidroxilação da fenchona.....	80
Tabela 24. Dados de EM para os produtos de biotransformação do geraniol por <i>A. niger</i>	86
Tabela 25. Dados de EM para os produtos de hidroxilação da fenchona.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
BAG	Banco Ativo de Germoplasma
cc	Coeficiente de correlação cofenética
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CE	Com estresse hídrico
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
EM	Espectrometria de massas
FPP	Difosfato de farnesila
GPP	Difosfato de geranila
HCA	Análise hierárquica de agrupamentos
IPP	Difosfato de isopentenila
IR	Índice de retenção
LPP	Difosfato de linalila
M⁺	Íon molecular
MA	Migração de um grupo alquila
MEP	Metileritritol fosfato
MH	Migração de hidreto
MVA	Ácido mevalônico
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC1	Componente principal 1
PC2	Componente principal 2
PCA	Análise de componentes principais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SE	Sem estresse hídrico
TIC	Cromatograma de íons totais

RESUMO

No presente trabalho foi realizado o estudo da composição química do óleo essencial das folhas de sete genótipos de *Lippia gracilis* Schauer, além de verificar o efeito do estresse hídrico na composição química e no teor de óleo essencial (OE) produzido pela espécie vegetal. Foram identificados 32 compostos no OE de *L. gracilis* com predominância de monoterpenos. Os principais componentes identificados foram os monoterpenos fenólicos carvacrol, timol e *p*-cimeno. Os sete genótipos foram divididos em dois quimiotipos, o quimiotipo timol, representado pelo genótipo 106, e o quimiotipo carvacrol, formado pelos genótipos 107, 108, 109, 110, 201 e 202. Também foram realizadas reações de biotransformação de terpenos voláteis por duas espécies fúngicas: *Botryosphaeria* sp. e *Aspergillus niger*. Além dos principais componentes do óleo essencial de *L. gracilis*, carvacrol e timol, foram testados como substrato os monoterpenos (+)-pulegona, geraniol, (-)-citronelol, (+)-limoneno, *rac*-cânfora e o par de enantiômeros da fenchona. *Botryosphaeria* sp. catalisou a hidroxilação da cânfora e da fenchona em diferentes posições, o carbono 6-*endo* da cânfora e o carbono 6-*exo* da fenchona foram os principais sítio de hidroxilação. *Aspergillus niger* promoveu hidroxilação dos enantiômeros da fenchona e isomerização do geraniol, majoritariamente originando a 6-*exo*-hidroxifenchona e *rac*-linalol nas reações, respectivamente.

Palavras-chave: *Lippia gracilis*, óleos essenciais, biotransformação.

ABSTRACT

This work attempts to make a study of the chemical composition of the essential oil from leaves of seven *Lippia gracilis* genotypes. In addition, we investigated the effect of water stress on the chemical composition of the essential oil (EO) of the species. A total of 32 volatile compounds were identified with predominance of phenolic monoterpenes: carvacrol, thymol and *p*-cymene. The seven genotypes were divided into two chemotypes: thymol chemotype, represented by the 106 genotype, and carvacrol chemotype, formed by the 107, 108, 109, 110, 201 and 202 genotypes. Biotransformation reactions have also been carried out using *Botryosphaeria* sp and *Aspergillus niger* as biocatalyst. In addition to the major components of the *L. gracilis* essential oil (carvacrol and thymol), the monoterpenes (+)-pulegone, geraniol, (-)-citronellol, (+)-limonene, *rac*-camphor and the two enantiomers of the fenchone were evaluated as substrates for biotransformation reactions. *Botryosphaeria* sp. catalyzed the hydroxylation of the camphor and fenchone at different positions, the carbon 6-*endo* of the camphor and the carbon 6-*exo* of the fenchone was the major site of addition of the OH group. *Aspergillus niger* catalyzed the hydroxylation of fenchone enantiomers and the isomerization of geraniol, resulting in formation of 6-*exo*-hidroxifenchone and of *rac*-linalool, respectively.

Key words: *Lippia gracilis*, essential oils, biotransformation.

1. INTRODUÇÃO

A flora brasileira possui a maior diversidade genética vegetal do planeta. Estimativas relativamente recentes sugerem que existam 441.066-429.966 espécies de plantas e fungos, das quais o subtotal brasileiro (63.456-73.956 espécies) representa 15-17% da diversidade mundial (LEWINSON & PRADO, 2005). Giulietti et al. (2005) e Shepherd (2005) estimam que o Brasil possua 19-20% da flora mundial. Porém, segundo o Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil (BRASIL, 2010), os números totais de espécies de plantas e fungos registrados no país, variando entre 9,5 e 9,9% do total mundial, são mais baixos do que os anteriormente previstos pela maioria dos autores. A mesma fonte sugere que essa significativa diferença se dá devido à soma de dois fatores: análises anteriores que determinaram uma quantidade exagerada de espécies para o Brasil, atualmente sendo corrigida, e ao número de algas e fungos que é subestimado.

No nordeste, o estado da Bahia possui a maior diversidade (Tabela 1), alavancada por seu elevado número de angiospermas (7.686), ficando atrás apenas do estado de Minas Gerais (10.039) em abundância de representantes desse grupo no panorama nacional.

Tabela 1. Riqueza de espécies de fungos, algas e plantas terrestres por unidade da Federação

Região	Estado	Grupo/Registro de espécies						Total
		Fungos ¹	Algas ²	Plantas terrestres				
				Briófitas ³	Pteridófitas ⁴	Gimn.** ⁵	Ang.** ⁶	
Norte	Acre	61	29	169	182	8	3.740	4.189
	Amapá	88	123	94	75	1	2.198	2.579
	Amazonas	408	394	440	294	12	7.528	9.076
	Pará	302	271	320	171	4	5.626	6.694
	Rondônia	116	36	150	86	4	2.544	2.936
	Roraima	75	18	188	98	0	2.239	2.618
	Tocantins	5	36	56	20	0	1.354	1.471
Nordeste	Alagoas	290	157	77	65	1	1.102	1.692
	Bahia	584	680	468	313	2	7.686	9.733
	Ceará	106	250	158	96	0	1.888	2.498
	Maranhão	52	169	72	40	0	2.414	2.747
	Paraíba	261	203	82	29	0	1.272	1.847
	Pernambuco	937	584	321	164	1	2.421	4.428
	Piauí	139	29	57	21	0	1.416	1.662
	Rio Grande do Norte	148	380	16	8	0	707	1.259
	Sergipe	215	81	50	10	1	770	1.127
Centro-Oeste	Distrito Federal	77	131	163	107	3	2.672	3.153
	Goiás	104	175	277	178	5	4.818	5.557
	Mato Grosso	135	105	307	229	5	4.585	5.366
	Mato Grosso do Sul	82	44	191	104	1	2.816	3.238

Continuação da Tabela 1

Região	Estado	Grupo/Número de espécies						Total
		Fungos ¹	Algas ²	Plantas terrestres			Ang.** ⁶	
				Briófitas ³	Pteridófitas ⁴	Gimn.* ⁵		
Sudeste	Espírito Santo	45	740	419	331	3	3.971	5.509
	Minas Gerais	399	79	687	580	4	10.039	11.788
	Rio de Janeiro	443	1.809	873	552	5	6.768	10.450
	São Paulo	1.161	1.489	840	561	6	6.921	10.978
Sul	Paraná	529	995	469	426	6	5.262	7.687
	Rio Grande do Sul	856	1.095	526	326	7	3.673	6.483
	Santa Catarina	482	532	512	402	6	4.112	6.046

* Gimnospermas; ** Angiospermas.

¹MAIA & CARVALHO (2012); ²MENEZES & BICUDO (2012); ³COSTA (2012); ⁴PRADO & SYLVESTRE (2012); ⁵SOUZA (2012); ⁶FORZZA et al. (2012)

Sergipe, apesar de ter um considerável número de fungos catalogados (215), possui a menor diversidade, porém os números para o Estado refletem antes uma carência de estudos, informações e coleta do que baixa diversidade. O mesmo acontece com boa parte dos Estados brasileiros, mais expressivamente com o Domínio da Amazônia e Tocantins, onde os números apresentados na Tabela 1 não conjecturam a realidade de riqueza de fungos e plantas, mas o resultado da documentação deficiente acerca do assunto. Embora haja essa deficiência de conhecimento, o registro de espécies já catalogadas (Tabela 1) coloca o Brasil em primeiro lugar em diversidade genética de espécies, com ecossistemas riquíssimos e em grande parte exclusivos do território nacional. Isso deve servir de alerta para as dimensões da responsabilidade que a nação tem com relação à proteção da biodiversidade em termos mundiais (BRASIL, 2010).

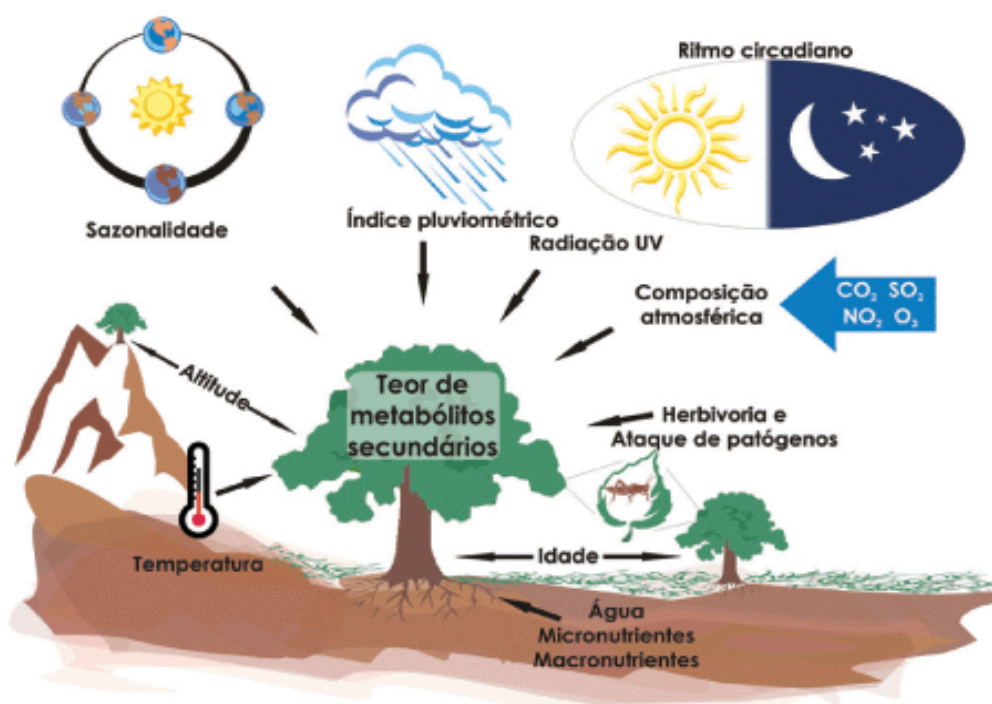
1.2. Plantas medicinais

Uma planta é considerada medicinal quando possui substâncias ativas que provocam no organismo humano reações que podem variar da cura ao abrandamento de determinada doença (SILVA JÚNIOR et al., 1994). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos (BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de várias comunidades e grupos étnicos. A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JUNIOR et al., 2005; AKERELE, 1993).

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem (MACIEL et al., 2002). Informações terapêuticas são acumuladas durante séculos pelos usuários de plantas medicinais, porém a composição química da espécie vegetal na maioria das vezes não é conhecida. Do ponto de vista científico, pesquisas mostraram que muitas dessas espécies possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos. (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Além disso, existem diversos fatores que influenciam diretamente no conteúdo dos componentes químicos de plantas medicinais (Figura 1) e, conseqüentemente, em seu valor terapêutico (LOPES & GOBBO-NETO, 2007).

Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas (LOPES & GOBBO-NETO, 2007).



Quando a planta medicinal é industrializada para se obter um medicamento, tem-se como resultado o fitoterápico. O processo possibilita a padronização da quantidade e a forma de utilização, permitindo uma maior segurança em seu uso.

Fitoterápicos, segundo a Agência Nacional de Legislação Sanitária (ANVISA), são medicamentos obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais. Os medicamentos fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2004).

No Brasil, em 2011, foi publicado o Formulário Nacional de Fitoterápicos (BRASIL, 2011), que é um tipo de guia para a fabricação de medicamentos fitoterápicos. Embora seja elaborado para a indústria farmacêutica, como guia de fabricação, seu conteúdo é acessível, de fácil entendimento e mostra informações sobre a forma correta de preparo de fitoterápicos e as indicações e restrições de uso de cada espécie de planta medicinal, podendo assim, ser de grande utilidade às comunidades que praticam a medicina tradicional.

Tabela 2. Espécies vegetais com maior número de derivados registrados como fitoterápicos.

Espécie vegetal	Nome popular	Nº de registros
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgo	33
<i>Aesculus hippocastanum</i>	Castanha da índia	29
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra	21
<i>Hypericum perforatum</i>	Hipérico	20
<i>Glycine max</i>	Soja	20
<i>Valeriana officinalis</i>	Valeriana	20
<i>Panax ginseng</i>	Ginseng	17
<i>Cassia angustifolia</i> , <i>Cassia senna</i> e <i>Senna alexandrina</i>	Sene	14
<i>Cimicifuga racemosa</i>	Cimicífuga	14
<i>Mikania glomerata</i>	Guaco	14
<i>Maytenus ilicifolia</i>	Espinheira-Santa	13
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	13

Fonte: CARVALHO et al., 2008.

Dentre as espécies vegetais nativas registradas como fitoterápicos destaca-se a *M. glomerata* (Guaco), indicada como expectorante e broncodilatador, *M. ilicifolia* (Espinheira-Santa), recomendada na cura de dispepsias e como coadjuvante no tratamento de úlceras

gástricas, e *P. cupana* (Guaraná), usada no tratamento de astenia e como estimulante do sistema nervoso central, com 14, 13 e 12 registros (CARVALHO et al., 2008).

Considerando os medicamentos atualmente disponíveis no mundo, estima-se que aproximadamente 40% foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microorganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001).

1.2.1. Óleos essenciais

Um dos principais produtos das plantas medicinais são os óleos essenciais, frações voláteis naturais, extraídas de plantas aromáticas que evaporam à temperatura ambiente (SANTOS et al., 2004; BELL & CHARLWOOD, 1980). Podem ser encontrados em vários órgãos vegetais e exercem diversas funções importantes à sobrevivência vegetal, como por exemplo, defesa contra microorganismos, proteção contra perda excessiva de água e irradiação UV (SIQUI et al., 2000).

A designação “óleo essencial” (OE) é derivada do termo “*Quinta essentia*”, criado pelo médico e cientista suíço Paracelsus von Hohenheim no século 16 (GUENTHER, 1948). Estima-se que sejam conhecidos 3000 diferentes óleos essenciais, dos quais cerca de 300 são comercialmente importantes (VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999).

A investigação dos óleos essenciais levou ao descobrimento de hidrocarbonetos isoméricos denominados terpenos, porém os óleos essenciais são misturas muito complexas e muito variáveis em seus constituintes, sendo encontrados somente os terpenos mais voláteis, dentre os quais se destacam aqueles de baixo peso molecular, como os monoterpenos com 10 átomos de carbonos em sua estrutura e os sesquiterpenos com 15 átomos de carbono (SIMÕES et al., 1999; DORAN & BROPHY, 1990). Além de mono- e sesquiterpenos, fenilpropanóides são comumente encontrados em óleos essenciais (Figura 2).

Tabela 3. Componentes majoritários de alguns óleos essenciais extraídos das folhas de espécies vegetais

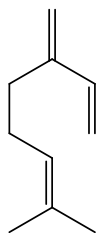
Nome científico	Nome comum	Componente(s) majoritário(s)	Percentual (%)	Referência
<i>Annona pickelii</i>	Jussara	Biciclogermacreno	45,4	Costa et al., 2011
<i>Annona salzmanii</i>	Araticum-da-mata	Biciclogermacreno (E)-Cariofileno	20,3 19,9	
<i>Bauhinia acuruana</i>	Pata-de-vaca	Espatulanol <i>epi</i> - α -Cadinol	23,4 20,7	Gois et al., 2011
<i>Hymenaea Courbaril</i> (frutos)	Jatobá	α -Copaeno Espatulanol	11,1 10,1	Aguiar et al., 2010
<i>Hyptis pectinata</i>	Sambacaitá	Calamusenona	67,8	Serafini et al., 2012
<i>Hyptis fruticosa</i>	Alecrim de tabuleiro	1,8-Cineol α -Pino	18,7 12,3	Franco et al., 2011
<i>Lippia gracilis</i>	Alecrim da chapada	Timol Metil timol	24,1 11,2	Mendes et al., 2010
<i>Pogostemon cablin</i>	Patchouli	Patchoulol	47,3	Santos et al., 2010

Os componentes de óleos essenciais geralmente possuem ponto de ebulição relativamente alto ($>150\text{ }^{\circ}\text{C}$), mas evaporam em temperatura ambiente. Devido a essa peculiaridade são caracterizados como compostos voláteis. O fenômeno pode ser explicado pela alta pressão de vapor desses compostos. Quanto maior a pressão de vapor de um composto, mais rapidamente ele passará para a fase de vapor. Pressão de vapor é a pressão exercida por um gás em equilíbrio com o seu estado sólido ou líquido. A pressão de vapor de um líquido depende da tendência das moléculas em deixar o estado líquido e passar para o gasoso, ou seja, é inversamente proporcional as forças intermoleculares, já que estas interações são cruciais no processo de evaporação. Algumas moléculas possuem energia suficiente para vencer as atrações intermoleculares e escapam da superfície líquida para a fase gasosa. Entre a maioria dos compostos de óleos essenciais, as forças intermoleculares predominantes são as interações de Van der Waals, considerada uma interação intermolecular fraca não é necessária muita energia para vencê-las e consequentemente a pressão de vapor será elevada e esses compostos evaporarão a temperatura ambiente. É importante ressaltar que, não apenas as interações intermoleculares, mas a massa molecular também exerce forte influência sobre a pressão de vapor. Compostos que tenham massa molecular relativamente baixa (menor que 250 g.mol^{-1}) e as interações intermoleculares predominantes sejam fracas, como os componentes de óleos essenciais, serão voláteis. Mas aqueles que, mesmo possuindo interações moleculares predominantemente fracas, tenham elevado peso molecular, como os ésteres de ácidos graxos, apresentaram pressão de vapor baixa e não serão voláteis.

Figura 2. Estrutura química de alguns monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides frequentemente encontrados em OEs

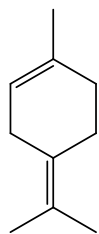
Monoterpenos

Acíclicos

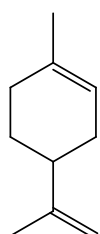


Mirceno

Monocíclicos

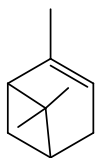


Terpinoleno

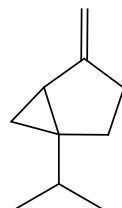


Limoneno

Bicíclicos



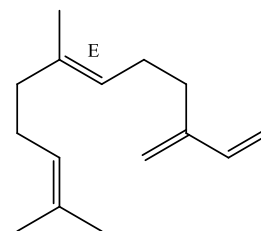
α-Pineno



Sabineno

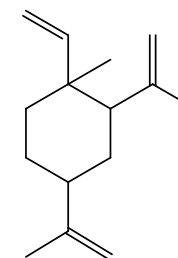
Sesquiterpenos

Acíclicos



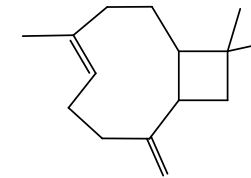
(E)-β-Farneseno

Monocíclicos



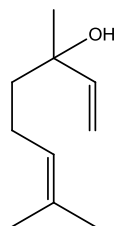
β-Elemeno

Bicíclicos



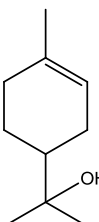
(E)-Cariofileno

Acíclicos oxigenados

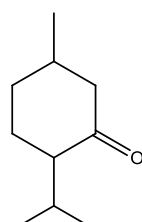


Linalol

Monocíclicos oxigenados

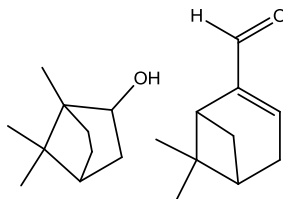


α-Terpineol

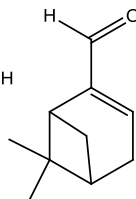


Mentona

Bicíclicos oxigenados

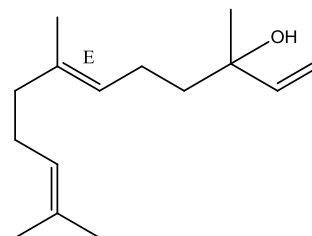


Borneol



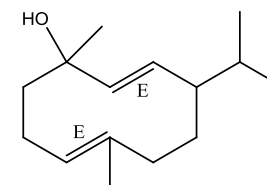
Mirtenal

Acíclicos oxigenados



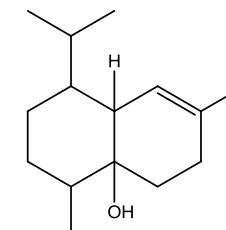
(E)-Nerolidol

Monocíclicos oxigenados



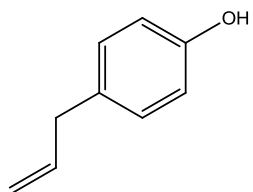
Germacrene D-4-ol

Bicíclicos oxigenados

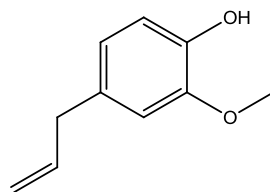


Cubenol

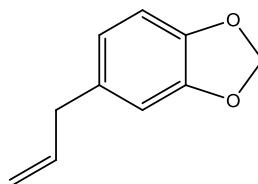
Fenilpropanóides



Chavicol



Eugenol



Safrol

Existem diversos métodos de extração de óleos essenciais, os principais são a arraste a vapor, extração com solvente lipofílico e com fluido supercrítico (geralmente CO₂).

O método mais empregado por centros de pesquisa e pela indústria é a destilação por arraste a vapor (VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999) que se baseia na passagem de um fluxo de vapor d'água através do material vegetal ocasionando a quebra das bolsas intercelulares e, pelo fato de os componentes do OE apresentarem maior pressão de vapor que a água, são arrastados pelo fluxo de vapor. Essa técnica pode ser usada direta (quando o fluxo de vapor é passado através do recipiente que contém o material vegetal) ou indiretamente (quando o material vegetal é colocado em um recipiente com água em ebulição).

O método de extração pode influenciar significativamente a composição química do OE, devendo ser selecionado de acordo com a finalidade da utilização do óleo. Por exemplo, para a utilização como perfumes, é preferível a extração com solventes lipofílicos e algumas vezes com dióxido de carbono supercrítico, que são metodologias mais brandas (BAKKALI et al., 2008). Dessa forma, quando se deseja realizar um estudo comparativo, entre espécies, quimiotipos de mesma espécie ou analisar o efeito de determinado fator sobre a composição química do OE é necessário que o método de extração seja padronizado.

1.2.1.1 Aspectos econômicos

O principal uso de OE está na indústria de alimentos (aromatizantes), de fragrâncias (perfumes e loções), farmacêutica (princípio ativo e/ou coadjuvantes em fármacos) e na indústria agrícola (controle de pragas) (BAUER & GARBE, 1985; VAN DE BRAAK & LEIJTEN, 1999).

O desenvolvimento da indústria de OE no Brasil foi impulsionado, num primeiro momento, pela escassez de matérias-primas durante e logo após a Segunda Guerra Mundial. A China, grande fornecedora do período antecedente à guerra, permaneceu em conflito interno após 1945, retardando a retomada das exportações de óleo. Neste cenário, floresceram as exportações de óleo de sassafrás, pau-rosa, menta e cítricos. Estes últimos como subprodutos da indústria de suco. Já na segunda metade dos anos 50 e início da década seguinte, diversas empresas produtoras de especialidades químicas e indústrias de alimentos se instalaram no Brasil, incrementando a demanda interna por óleos. O país passava por um processo de industrialização. É neste período que certas empresas produtoras de óleo tomam a iniciativa de introduzir espécies aromáticas no país (BIZZO et al., 2009).

Comercialmente, os dez principais OEs são: laranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck), menta japonesa (*Mentha arvensis*), eucalipto (tipo cineol; *Eucalyptus globulus* Labill., *E. polybractea* R.T. Baker e *Eucalyptus* sp.), citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt e *C. nardus* (L.) Rendle), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), limão (*Citrus limon* (L.) N.L. Burm.), eucalipto (tipo citronela; *Eucalyptus citriodora* Hook.), cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* L.), cedro (*Juniperus virginiana* L. e *Juniperus ashei* Buchholz) e lima destilada (*Citrus aurantifolia* Swingle) (LAWRENCE, 1993). Outros óleos importantes no mercado mundial são o óleo de vetiver [*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash], citronela (*Cymbopogon winterianus* Jowitt), capim-limão [*Cymbopogon citratus* (DC ex Nees) Stapf] e patchouli [*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth].

Em 2011, os maiores consumidores de OE no mundo foram os Estados Unidos (18,7%), França (9,6%), Reino Unido (7,2%), Alemanha (7,0%) e Japão (6,2%), o Brasil ocupa a 15ª posição com 1,8% do total do valor das importações (Tabela 4). Os principais mercados fornecedores de OE para o Brasil podem ser visualizados na Tabela 5.

Tabela 4. Principais países importadores de OE nos últimos quatro anos.

País	Ano / Importações (US\$ milhões)			
	2008	2009	2010	2011
EUA	583,0	456,8	570,8	677,7
França	310,6	223,4	285,9	347,4
Reino Unido	223,5	208,2	236,4	262,1
Alemanha	223,0	181,5	202,2	251,6
Suíça	171,4	124,3	135,1	158,8
Japão	155,9	167,8	156,5	222,8
Singapura	117,8	97,0	118,9	167,2
China	116,7	113,5	120,7	163,3
Espanha	85,5	71,1	101,2	103,2
México	78,0	63,4	72,9	81,3
Índia	64,2	80,8	97,2	91,0
Holanda	64,0	52,0	86,0	134,4
Irlanda	61,8	44,4	44,9	145,5
Brasil	56,0	52,0	56,0	63,8
Itália	51,2	41,6	61,6	67,7
Canadá	49,9	42,5	53,9	63,1
Outros países	470,5	451,7	570,1	618,1
TOTAL	2.883,0	2.472,0	2.970,3	3.619,0

Fonte: COMTRADE, 2012

Foi observado um expressivo aumento no valor das importações de OE para o Brasil em 2011, antes girando entre US\$ 51-56 milhões e atingindo US\$ 63,8 milhões recentemente.

O fator determinante para esse acréscimo foi à importação de 8,1 milhões de dólares em OE de *Mentha arvensis* da Índia em 2011, quando o valor desta transação nunca havia ultrapassado US\$ 3,5 milhões. Porém esses valores não refletem um aumento da demanda interna (aproximadamente 760 mil kg/ano), mas a uma valorização de 47,2% do OE da espécie, sendo comercializado em 2011 por 24,3 dólares/kg.

Tabela 5. Principais parceiros na importação de OE para o Brasil no período de 2008 a 2011

País	Ano / Importações (US\$ milhões)			
	2008	2009	2010	2011
França	10,1	10,0	11,3	11,7
Argentina	7,6	4,3	3,0	3,6
EUA	6,3	7,5	9,1	8,8
Espanha	5,4	4,3	5,6	5,4
Índia	5,2	6,5	5,5	12,4
Paraguai	4,7	3,5	4,4	5,1
Suíça	3,3	2,5	2,2	2,2
China	2,2	1,6	2,7	4,2
Reino Unido	2,0	2,6	1,7	2,2
México	2,0	1,4	0,9	0,6
Alemanha	1,5	1,2	1,5	1,2
Itália	1,2	1,7	1,3	1,8
Indonésia	1,2	1,4	1,1	1,1
Uruguai	1,0	0,9	1,5	0,6
Haiti	0,5	0,7	0,5	0,4
Singapura	0,2	0,2	0,2	0,1
Irlanda	0,2	0,2	0,4	0,4
Outros países	1,6	0,9	3,5	2,4
TOTAL	56,0	51,2	56,0	63,8

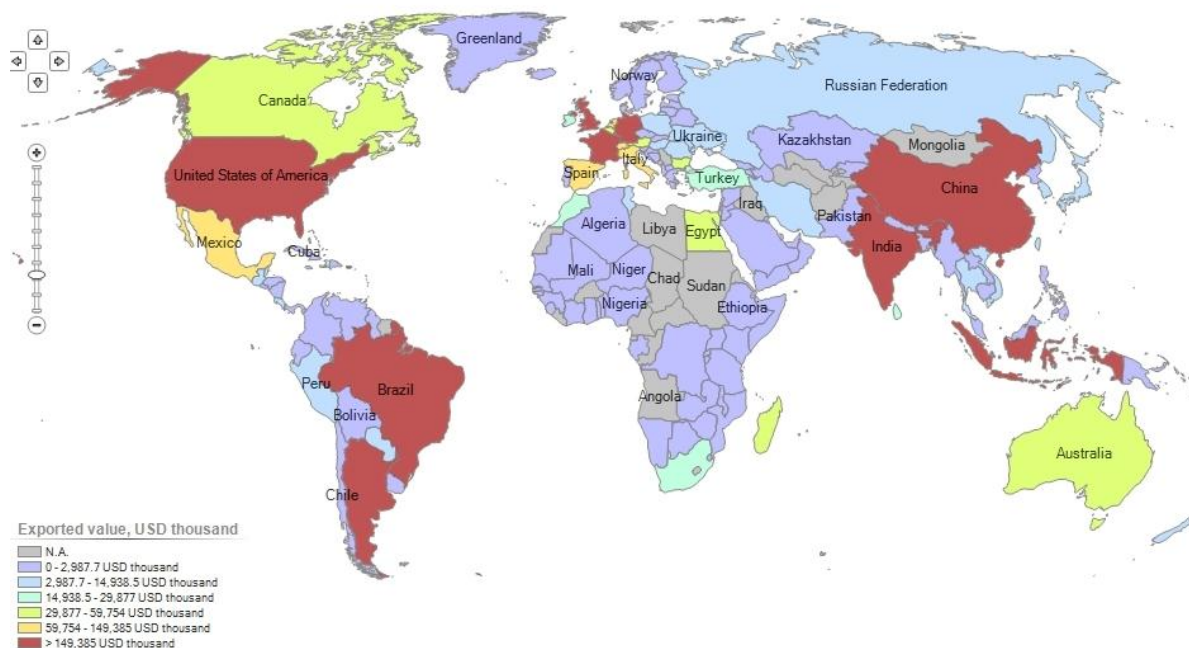
Fonte: COMTRADE, 2012

O Brasil se destaca, no panorama internacional, como 4º maior exportador de óleos essenciais, respondendo por 7,2% do total das exportações em 2011 (Tabela 6). No primeiro trimestre de 2012 o país exportou 16,1 milhões de kg de OEs, faturando o equivalente a US\$ 76,2 milhões, sendo ultrapassado apenas pelos Estados Unidos que faturou US\$ 117,6 milhões com a comercialização de 8,0 toneladas de OEs. No mesmo período do ano passado o Brasil exportou 11,1 milhões de kg de OEs (US\$ 40,7). O principal destino do OE brasileiro é os EUA, que gasta o equivalente a US\$ 57,8 milhões por ano na aquisição do produto, seguido da Holanda, Japão, Alemanha, Reino Unido e China com transações de US\$ 28,8, 15,1, 14,3, 10,4 e 10,2 milhões/ano, respectivamente.

Tabela 6. Principais países exportadores de OE nos últimos quatro anos.

País	Ano / Exportações (US\$ milhões)			
	2008	2009	2010	2011
EUA	431,9	405,8	431,3	472,6
Índia	376,1	278,2	334,6	453,1
França	292,2	256,4	276,5	295,9
Brasil	155,4	126,4	165,2	263,4
Indonésia	147,1	90,6	124,7	161,1
Reino Unido	142,4	121,7	189,3	213,4
Alemanha	126,3	107,0	124,8	168,0
China	119,6	119,9	190,7	227,0
Argentina	108,7	141,0	127,8	195,0
Suíça	90,3	55,9	70,4	69,9
Itália	88,8	71,0	104,2	111,5
Singapura	83,8	63,5	84,3	121,7
Espanha	73,6	62,6	78,5	90,6
México	61,9	51,7	65,0	79,2
Canadá	48,3	28,1	39,5	39,5
Austrália	39,3	33,0	45,4	52,2
Holanda	38,9	36,4	25,2	98,0
Outros países	385,3	366,9	472,3	521,3
TOTAL	2.771,0	2.379,7	2.924,5	3.633,4

Fonte: COMTRADE, 2012

Figura 3. Mapa da exportação de óleos essenciais em 2011 (ITC, 2012)

A posição de destaque do Brasil em exportação de óleos essenciais se deve a produção de OE de laranja [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Respondendo por 28,7% de todo o óleo de laranja comercializado no mundo, o país é o maior exportador. O crescimento na exportação de OE de laranja foi alavancado pela transação de 5,8 milhões de dólares com a Irlanda, que em 2011 se tornou o 5º maior consumidor do óleo brasileiro (Tabela 7).

O país é o único fornecedor de OE de pau-rosa (*Aniba roseaodora* var *amazonica* Ducke) no mundo, foi este o primeiro OE extraído em larga escala e exportado pelo Brasil. Sua exploração começou em 1925, inicialmente no Pará e depois no Amazonas. O interesse comercial no óleo de pau-rosa está na abundante presença de linalol. Com a entrada no mercado do linalol sintético, do óleo essencial das folhas de Ho (*Cinnamomum camphora*), rico em linalol, e da própria escassez do pau-rosa, a produção de OE da espécie, que teve seu pico nos anos 60 (500 toneladas/ano), vem progressivamente diminuindo. Atualmente, o mercado do óleo de pau-rosa é limitado à perfumaria fina, cuja demanda é reduzida (BIZZO et al., 2009; COPPEN, 1995).

Tabela 7. Exportação de óleo de laranja pelo Brasil

Destino	Ano / Exportação (US\$ milhões)			
	2008	2009	2010	2011
EUA	20,8	16,6	23,4	34,7
Holanda	12,7	8,7	14,7	21,0
Reino Unido	9,1	3,7	7,7	7,7
Alemanha	8,8	7,2	5,2	7,9
Índia	2,6	3,0	2,7	5,1
China	2,4	2,7	2,4	3,9
Singapura	1,9	1,1	1,5	1,6
Suíça	1,7	1,3	2,3	3,1
Israel	1,5	1,0	2,0	3,7
Espanha	1,2	1,0	2,5	2,4
Bélgica	1,0	0,9	0,6	0,8
Japão	0,9	1,4	0,5	1,4
Argentina	0,8	1,1	1,4	1,9
Indonésia	0,8	0,8	0,9	1,0
França	0,7	1,1	1,2	2,0
Itália	0,7	0,7	0,8	1,3
México	0,5	0,8	1,1	1,4
Irlanda	0,0	0,0	0,6	5,8
Outros países	3,3	3,6	4,7	12,1
TOTAL	70,9	55,9	74,5	111,6

Fonte: COMTRADE, 2012

O OE de laranja, extraído do pericarpo do fruto, é um subproduto da indústria do suco. Derivados de OE de laranja são usados em perfumaria, sabonetes e na área farmacêutica em geral, além de materiais de limpeza, em balas e bebidas. O rendimento máximo de extração de óleos cítricos é de 0,4%, ou seja, para cada tonelada de fruta processada são obtidos 4 kg de óleo (SILVA-SANTOS, 2002; BIZZO, 2009). Em 2011, o Brasil comercializou o óleo de laranja a um valor de 4,62 dólares/kg, outros OEs apresentam um valor bem mais elevado no mercado (Tabela 8).

Tabela 8. Preço e quantidade dos principais OEs exportados pelo Brasil no período de 2008-2011.

Óleo	Preço/kg (US\$)				Quantidade exportada (milhões de kg)			
	2008	2009	2010	2011	2008	2009	2010	2011
Laranja	2,36	1,97	2,58	4,62	30,08	28,41	28,83	24,15
Limão	23,62	24,37	29,25	33,13	0,26	0,26	0,26	0,18
Frutas cítricas*	27,34	21,67	29,96	21,43	0,40	0,20	0,42	0,51
<i>Mentha piperita</i>	33,74	30,41	34,80	17,09	0,01	0,01	0,02	0,02

* Exceto limão e laranja. Espécie de laranja: *Citrus sinensis* (L.) Osbeck; limão: *Citrus limon* (L.) N.L. Burm.
Fonte: COMTRADE, 2012

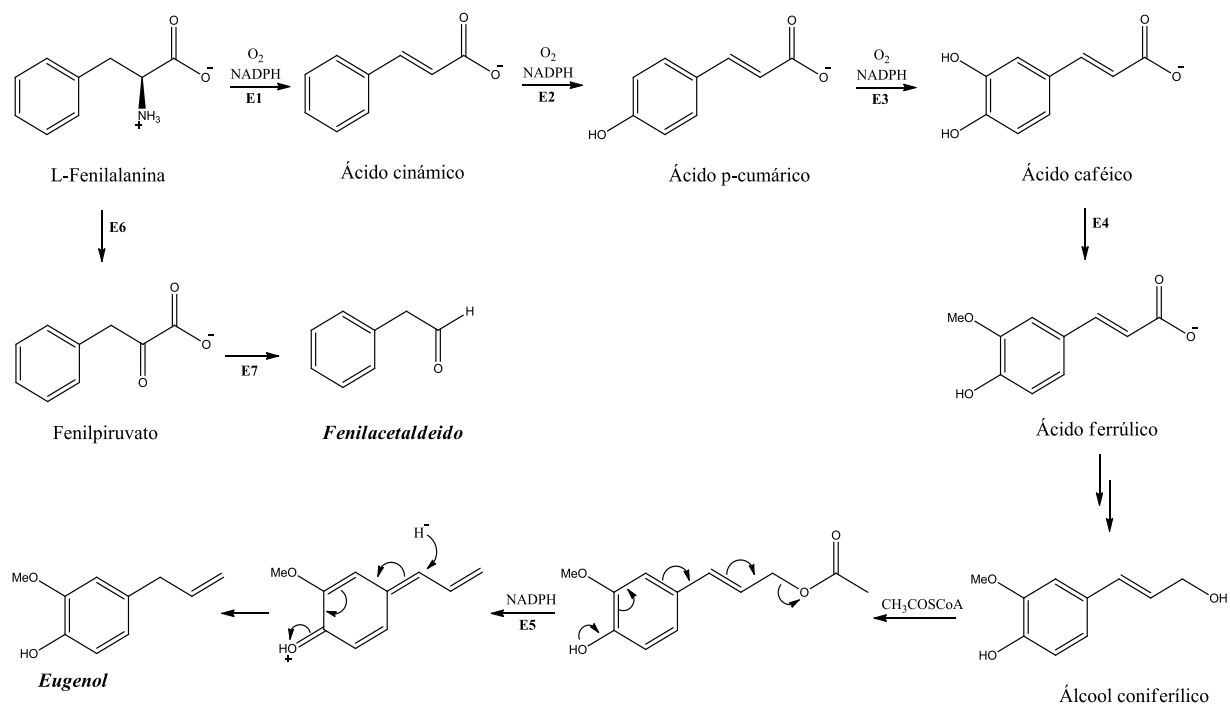
1.2.1.2. Biossíntese de voláteis

Os componentes dos óleos essenciais podem ser sintetizados por todos os órgãos vegetais, ou seja, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutos, raízes, dentre outros, e são armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares (BAKKALI et al., 2008). Nas flores, a biossíntese dos voláteis geralmente ocorre em células epidérmicas, facilitando a difusão dos compostos para a atmosfera (KOLOSOVA et al., 2001). Tricomas glandulares superficiais é outro órgão vegetal onde frequentemente ocorre a síntese dos voláteis, após a formação, os compostos são excretados das células e armazenados em um saco criado pela extensão da cutícula do vegetal (GANG et al., 2001; TURNER et al., 2000). Quando a síntese ocorre em estruturas internas, como em células especializadas ou ductos, os voláteis são liberados através de ruptura dessas estruturas (por exemplo, através da ação de um herbívoro). Os voláteis livres nas células podem se acumular em membranas e, em alguns casos, são glicosilados e armazenados em vacúolos (WATANABE et al., 2001; PICHERSKY et al., 2006).

Os compostos voláteis encontrados em óleos essenciais podem ser divididos em três grupos principais: componentes contendo um anel aromático (com exceção de terpenos fenólicos); hidrocarbonetos oxigenados de cadeia curta que não são derivados de isoprenóides (aldeídos, cetonas, ésteres, dentre outros); e terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos e, menos frequente, diterpenos).

Compostos contendo um anel aromático representam o segundo maior grupo de voláteis encontrados em OE, com destaque para os fenilpropanóides. Embora nem todas as reações que levam a síntese de seu esqueleto carbônico básico tenha sido determinada, a maioria são derivados de intermediários da via que converte chiquimato à fenilalanina e, em seguida, a uma série de metabolitos primários (como a lignina) e secundários não voláteis (DUDAREVA et al., 2004). Eugenol (majoritário no OE de cravo-da-índia), por exemplo, é um derivado do álcool coniferílico, um precursor da lignina (GANG et al., 2001; KOEDUKA et al., 2006). O fenilacetaldeído, presente no óleo essencial das folhas de tomate (*Solanum lycopersicum*; TADMOR et al., 2002), é derivado da fenilalanina, formado pela remoção oxidativa de um grupo amino e posterior descarboxilação (HAYASHI et al., 2004; HUA & XU, 2011).

Figura 4. Biossíntese do eugenol e do fenilacetaldeído (KOEDUKA et al., 2006; HUA & XU, 2011; DEWICK, 2009)



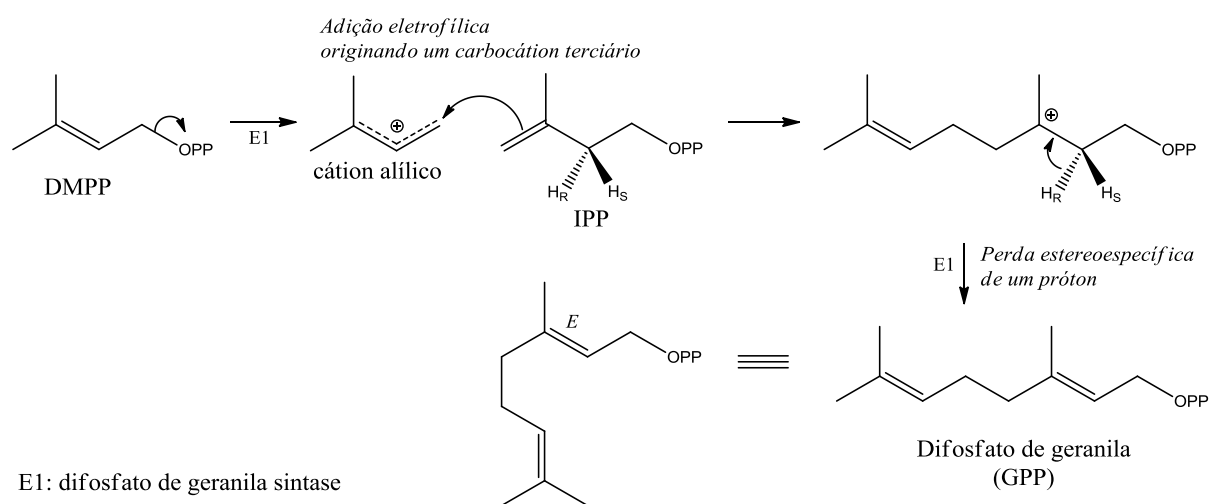
E1: Fenilalanina amônia-liase; E2: Cinamato 4-hidroxilase; E3: p-Cumarato 3-hidroxilase; E4: Ácido caferílico O-metiltransferase; E5: Eugenol sintase; E6: Transaminase; E7: Fenilpiruvato descarboxilase.

Hidrocarbonetos oxigenados de cadeia curta (não derivados de isoprenóides) é o grupo menos abundante de voláteis encontrados em OEs e são derivados da clivagem oxidativa e descarboxilação de vários ácido graxos. Pode-se citar a 2-undecanona, uma metilcetona presente no óleo essencial das folhas de *Lycopersicon hirsutum* (FRIDMAN et al., 2005).

A classe mais abundante de compostos presente em OEs são os terpenos, com destaque para os monoterpenos que constituem mais de 90% de uma grande variedade de óleos essenciais conhecidos (BAKKALI et al., 2008). A biossíntese de terpenos pode acontecer por dois caminhos diferentes: o caminho do mevalonato (MVA) no citoplasma das células e o caminho do metileritritol (MEP) nos plastídeos das células. Os precursores formados nestes caminhos são dois isômeros, o difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) que por condensações tipo Claisen e aldólica formam os terpenos (CROTEAU, 2000).

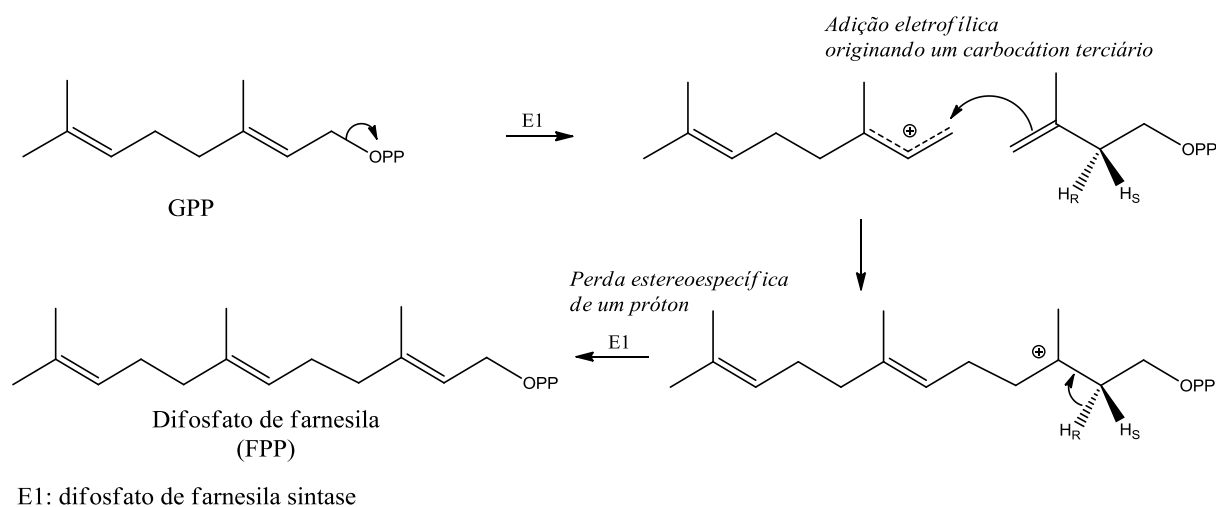
O difosfato de geranila, com dez átomos de carbono em sua estrutura, é o precursor dos monoterpenos e forma-se a partir da condensação do tipo cabeça-cauda de uma molécula de IPP com uma molécula de DMAPP (Figura 5; DEWICK, 2009).

Figura 5. Formação de GPP a partir da condensação de DMPP e IPP (Adaptado de DEWICK, 2009)



Uma segunda condensação, entre o GPP e uma molécula de IPP, fornece o precursor dos sesquiterpenos, o difosfato de farnesila (FPP; Figura 6), como consequência, todos os sesquiterpenos possuirão quinze átomos de carbono em sua estrutura. Diferentemente da síntese dos monoterpenos que ocorre nos plastídeos das células através da via do MEP, os sesquiterpenos formam-se no citoplasma das células através da via do MVA (PICHESKY et al., 2006).

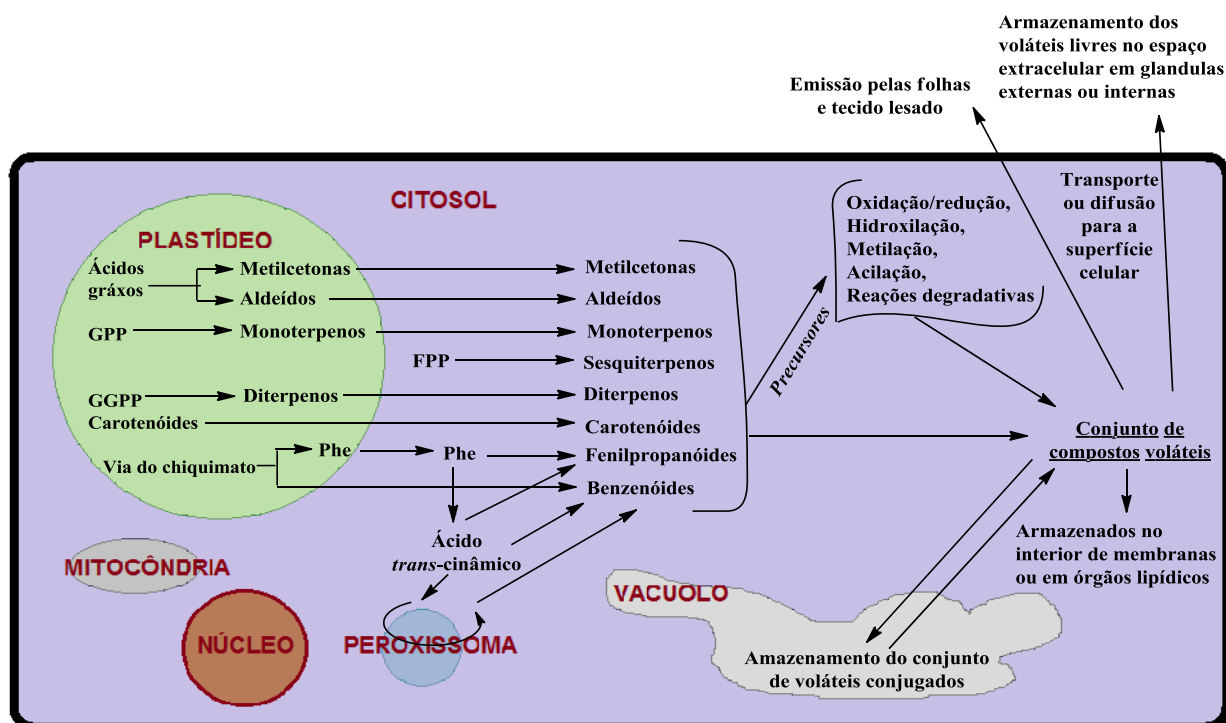
Figura 6. Formação de FPP a partir da condensação de DMPP e IPP (Adaptado de DEWICK, 2009)



Diterpenos dificilmente são encontrados em óleos essenciais, sua baixa volatilidade é um dos fatores determinantes. O substrato precursor dos diterpenos é o difosfato de geranylgeranila (GGPP), formado pela condensação do FPP com uma molécula de IPP. Semelhante à síntese dos monoterpenos, os diterpenos formam-se no plastídeo (Figura 7. Resumo dos processos celulares envolvidos na síntese de voláteis. (Adaptado de PICHERSKY et al., 2006) através da via do MVA. Dentre os diterpenos mais abundantes pode-se citar o fitol, que forma a cadeia lipofílica das clorofilas (DEWICK, 2009).

A maioria das reações de modificação dos voláteis (oxidações, reduções, hidroxilações, metilações, acilações e reações degradativas) ocorre no citosol, mas algumas podem ter origem em outros compartimentos subcelulares, incluindo plastídeos, mitocôndrias, peroxissomas e no retículo endoplasmático (Figura 7; PICHERSKY et al., 2006).

Figura 7. Resumo dos processos celulares envolvidos na síntese de voláteis. (Adaptado de PICHERSKY et al., 2006)



1.3. Análises estatísticas: Análise hierárquica de agrupamentos (HCA) e análise de componentes principais (PCA)

Há uma tendência normal em procurar agrupar amostras de mesmas características ou composição visando descrever, de maneira mais clara e sintética possível, a estrutura do sistema em estudo. Agrupar objetos consiste em reconhecer entre eles um grau de similaridade suficiente para reuni-los num mesmo conjunto.

A Análise de Agrupamento é uma técnica multivariada cuja finalidade é agregar objetos com base nas características que eles possuem. O resultado são grupos que exibem máxima homogeneidade de objetos dentro de grupos e, ao mesmo tempo, máxima heterogeneidade entre os grupos. A análise de agrupamento consegue uma perspectiva simplificada das observações. Assim, em vez de ver todas as observações como únicas, elas podem ser vistas como membros de um agrupamento e definidas por suas características gerais. Entre os algoritmos de hierarquização, pode-se citar como exemplo o método *Single Linkage* (ligação individual). Os dendogramas gerados na análise de agrupamentos estão

sujeitos a erro, alguns métodos estatísticos de análises, por exemplo, a análise de correlação cofenética (SOKAL & ROHLF, 1962) associadas à análise de agrupamento, podem ser empregados para aumentar a confiabilidade das conclusões frente à interpretação dos dendrogramas. A correlação cofenética é uma análise que estabelece uma correlação entre a matriz de similaridade ou dissimilaridade com o dendrograma gerado através desta, ou seja, compara as reais distâncias obtidas entre as amostras com as distâncias representadas graficamente sujeitas ao acúmulo de erro (KOPP et al., 2007).

A Análise de Componentes Principais (ACP) é um dos métodos estatísticos mais usados quando se pretendem analisar dados multivariados. Ela permite transformar um conjunto de variáveis originais, intercorrelacionadas, num novo conjunto de variáveis não correlacionadas, as componentes principais. A técnica de componentes principais foi inicialmente descrita por Karl Pearson *apud* Manly (2008). O objetivo mais imediato da ACP é verificar se existe um pequeno número das primeiras componentes principais que seja responsável por explicar uma proporção elevada da variação total associada ao conjunto original. Considerando p variáveis X_i , o objetivo é encontrar a partir destas variáveis, combinações Z_j (variáveis latentes), onde j igual a i , que não sejam correlacionadas e que descrevam o máximo de variação dos dados. Matematicamente a técnica ACP baseia-se em encontrar os autovalores e a matriz de autovetores a partir da matriz de covariâncias dos dados originais.

1.4. Biocatálise e biotransformação

Biotransformações são processos em que um agente biológico é utilizado para a conversão de um substrato (composto orgânico) por um número limitado de etapas, sendo uma(s) enzima(s), o principal agente dessas reações (SILVERMAN, 2000; DEMIRJIAN et al., 1999).

O termo biotransformação pode ser aplicado para modificações específicas ou interconversões químicas realizadas por enzimas presentes nas células ou na forma isolada (BOMMARIUS & RIEBEL, 2004). Já biocatálise é descrita como a transformação de um substrato definido para um produto alvo também definido com uma ou diversas etapas enzimáticas envolvidas.

A aplicação de catalisadores biológicos para prover determinadas conversões é conhecido há muito tempo, sendo o primeiro uso de biotransformação descrito por Pasteur em

1858, quando obteve *L*-tartarato de amônio a partir de *DL*-tartarato de amônio utilizando o fungo *Penicillium glaucum* (HANSON, 1992). A eficiência dos processos biocatalíticos era incerta e muitos pesquisadores não consideravam como uma metodologia promissora. Mas com o desenvolvimento de novas técnicas e o avanço da instrumentação analítica, as reações auxiliadas por biocatalisadores se tornaram uma importante ferramenta para produção de compostos orgânicos diversificados e enantiomericamente puros.

Um dos objetivos da biotransformação é substituir uma reação química convencional, geralmente de difícil execução, por uma via biológica de baixo custo e de fácil execução. O procedimento mais comumente utilizado é feito através de células totais de microrganismos cultivados em meios apropriados, onde toda a maquinaria enzimática está disponível, o que pode gerar uma mistura de produtos biotransformados.

Similar a outros catalisadores, os biocatalisadores aumentam a velocidade reacional, mas não afetam a termodinâmica da reação. Entretanto, eles oferecem características únicas frente aos catalisadores convencionais. A principal vantagem dos biocatalisadores é sua elevada seletividade (Tabela 9).

Tabela 9. Vantagem e desvantagens dos biocatalisadores sobre os catalisadores químicos

Vantagens	Desvantagens
Geralmente são mais eficientes (baixa concentração de enzima necessária)	Suscetível a inibição pelo substrato ou pelo produto
Podem ser modificados para aumentar a seletividade, estabilidade e atividade	O solvente usualmente é a água (alto ponto de ebulição e calor de vaporização, além de não solubilizar alguns substratos)
Mais seletivos (químio-, régio- e estereosseletivos)	Possui limitação de condições reacionais (enzimas tipicamente desnaturados em alta temperatura e/ou pH)
Promovem reações sob condições brandas (tipicamente em uma faixa de pH de 5-8 e temperatura de 20-40 °C)	Enzimas podem causar reações alérgicas
São completamente biodegradáveis	Muitas enzimas são dependentes de cofatores

(Fonte: FABER, 1997)

1.4.1. Enzimas

Para que ocorra a reação de biotransformação é necessário que o substrato entre em contato com as enzimas produzidas pelo microorganismo. Esse encontro pode ocorrer fora das células, quando as enzimas são extracelulares e estão dispersas no meio de cultura, ou pode ocorrer no interior das células, quando as enzimas são intracelulares, nesse caso o substrato

dever ser capaz de atravessar a membrana celular do microorganismo (CRUEGER & CRUEGER, 1993).

Enzimas são proteínas globulares, de estrutura terciária ou quaternária que agem como catalisadores biológicos, aumentando a velocidade das reações químicas, sem serem, elas próprias, alteradas neste processo (CHAMPE & HARVEY, 1989). São responsáveis por catalisar reações bioquímicas em células de todos os organismos. Os aumentos de velocidade de reações alcançados por enzimas podem chegar a vinte ordens de magnitude (LAD et al., 2003). Dos 20 aminoácidos que podem compor as enzimas, 19 deles são L-aminoácidos enantiopuros, proporcionando um microambiente assimétrico para a conversão de substratos com régio- e estereoespecificidade.

Mais de 3.000 enzimas já foram identificadas, e esse número tende a aumentar significativamente graças às contribuições por parte da pesquisa genômica e proteômica (KOELLER & WONG, 2001).

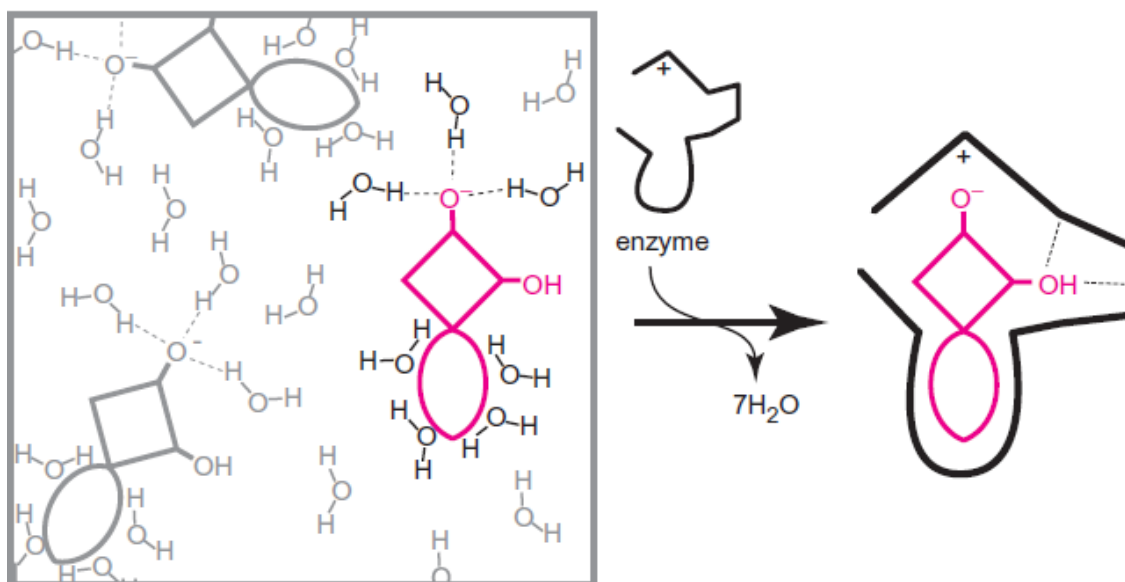
O extraordinário processo catalítico executado por enzimas permaneceu um mistério por muito tempo. A primeira hipótese que tentou explicar o processo de catálise enzimática foi formulada por Emil Fischer em 1894 (BENKOVIC & HAMMES-SCHIFFER, 2003), conhecida como teoria da “chave e fechadura”. Fisher propôs que as enzimas eram estruturalmente complementares aos seus substratos, de tal forma que se ajustariam similarmente a fechadura e sua chave complementar. Essa teoria, apesar de ter influenciado fortemente o desenvolvimento da bioquímica, não foi sustentada, principalmente pelo fato de que uma enzima totalmente complementar a seu substrato seria uma enzima muito pouco eficiente (LEHNINGER, 2002).

Um salto no conhecimento do mecanismo de catálise enzimática foi dado com o advento da teoria do estado de transição (BILLING & MIKKELSEN, 1996) nos anos 1930. Haldane (BENKOVIC & HAMMES-SCHIFFER, 2003) propôs que o substrato não "encaixa" exatamente na enzima, mas sofre uma distorção após a formação do complexo enzima-substrato (ES). Posteriormente Linus Pauling (PAULING, 1948) sugeriu que a enzima se liga mais fortemente ao estado de transição (TS) que ao substrato. Esta hipótese de Pauling apoia-se no conceito de estado de transição e diz que este é mais estabilizado no sítio ativo da enzima em relação à mesma espécie numa reação de referência em solução aquosa (ARANTES, 2008).

Em solução aquosa, geralmente os substratos são solvatados por moléculas de água. A enzima possui um sítio de ligação (sítio ativo) que é estericamente e eletrostaticamente

complementar, onde o substrato pode ligar-se após a perda das interações de hidrogênio com a água. O sítio ativo é previamente organizado para interagir com o substrato e, simultaneamente a formação das interações, ocorre a liberação das moléculas de água que solvatam o substrato, estas podendo agir como força motriz na formação da ligação enzima-substrato (FREY & HEGEMAN, 2007). Quando os substratos são hidrofílicos, pode-se imaginar que a perda das interações de hidrogênio com a água é desfavorável, porém, nesses casos, há no sítio ativo da enzima um ambiente propício que favorecerá a interação enzima-substrato.

Figura 8. Aspectos da ligação de um substrato ao sítio ativo da enzima (Adaptado de FREY & HEGEMAN, 2007)



A utilização de ciclos termodinâmicos e de corretas reações de referência é essencial para racionalização das interações e dos mecanismos catalíticos. Sem dúvida, cada enzima utiliza uma combinação das forças e interações (catálise covalente, catálise ácido-base geral, interação eletrostática, efeitos entrópicos, impedimento estérico e, efeitos quânticos e dinâmicos, dentre outras), dependendo da reação química catalisada. Contudo, a espécie que sofre influência determinante do ambiente enzimático é o estado de transição. Este é estabilizado principalmente por interações eletrostáticas geradas pelo sítio ativo e pela estrutura enzimática pré-organizados. Em média, reduções de cerca de 17 kcal/mol na energia de ativação podem ser obtidas por este mecanismo catalítico (ARANTES, 2008).

1.4.1.2. Aspectos econômicos no uso de enzimas

As enzimas encontradas na natureza têm sido usadas desde a antiguidade na produção de alimentos, tais como queijo, fermento, cerveja, vinho, vinagre, dentre outros, e na fabricação de produtos como couro e linho (GARDOSSI & MOLINARI, 2009).

O mercado de enzimas está dividido em dois grandes segmentos: enzimas industriais e enzimas especiais.

O comércio de enzimas industriais faturou em 2004 US\$ 2,3 bilhões e estima-se que o crescimento anual para os próximos dez anos seja de 5,7%. São classificadas como: enzimas técnicas, destinadas principalmente à indústria têxtil e de produtos de limpeza; enzimas para alimentos e bebidas, em constante crescimento devido à procura de novas aplicações na área de laticínios e panificação; e enzimas para ração animal, cujo crescimento tem sido mais acelerado devido ao grande interesse dos criadores de aves e suínos em aumentar o valor nutricional da ração e facilitar sua digestibilidade (SÁ-PEREIRA et al., 2007).

Tabela 10. Exemplo de aplicação de enzimas em diferentes setores industriais

Indústria	Classe da enzima	Aplicação
Detergentes	Proteases	Remoção de manchas de origem biológica
	Amilases	Remoção de manchas de resíduos de alimentos que contêm amido
	Lipases	Remoção de manchas causadas por gorduras
	Celulases	Limpeza, clareamento, anti-redeposição (algodão)
	Mananases	Remoção de manchas causadas pelos espessantes utilizados na indústria alimentícia
Alimentos (incluindo laticínios)	Proteases	Coagulante de leite, fórmulas infantis, Aromatizante
	Lipases	Aroma de queijo
	Lactase (β -galactosidase)	Remoção de lactose (leite)
	Pectina metil esterase	Reafirmante de produtos a base de frutas
	Pectinase	Produtos a base de frutas
Bebidas	Transglutaminase	Modificação de propriedades visco-elásticas
	Amilase	Sucos, bebidas de baixa caloria
	Acetolactato descarboxilase	Maturação (bebidas)
	Laccase	Clareamento de sucos, aromatizante (cervejas)
Têxtis	Celulase	Acabamento em jeans, amolecimento de algodão
	Amilase	Dimensionamento
	Pectato liase	Lavagem
	Catalase	Alvejante
	Laccase	Branqueamento
	Peroxidase	Remoção de corante em excesso

Fonte: GARDOSSI & MOLINARI, 2009.

Enzimas especiais são comercializadas na forma purificada e em menores quantidades, em relação às enzimas industriais, consequentemente apresentando custo muito mais elevado. O mercado mundial de enzimas especiais faturou em 2004 aproximadamente US\$ 1,4 bilhão, com taxa de crescimento estimada de 7,9% ao ano. São classificadas como: enzimas terapêuticas (anticoagulantes, antitumorais, antivirais, antibióticas, anti-inflamatórias, entre outras), enzimas utilizadas em diagnóstico, enzimas para pesquisa científica e enzimas para química fina. Esta última representa uma pequena parcela. O crescimento na comercialização de enzimas especiais vem sendo impulsionado pelas aplicações no campo farmacêutico e também por novas pesquisas em biocatálise (SÁ-PEREIRA et al., 2007).

1.4.2. Fungos em reações de biocatálise

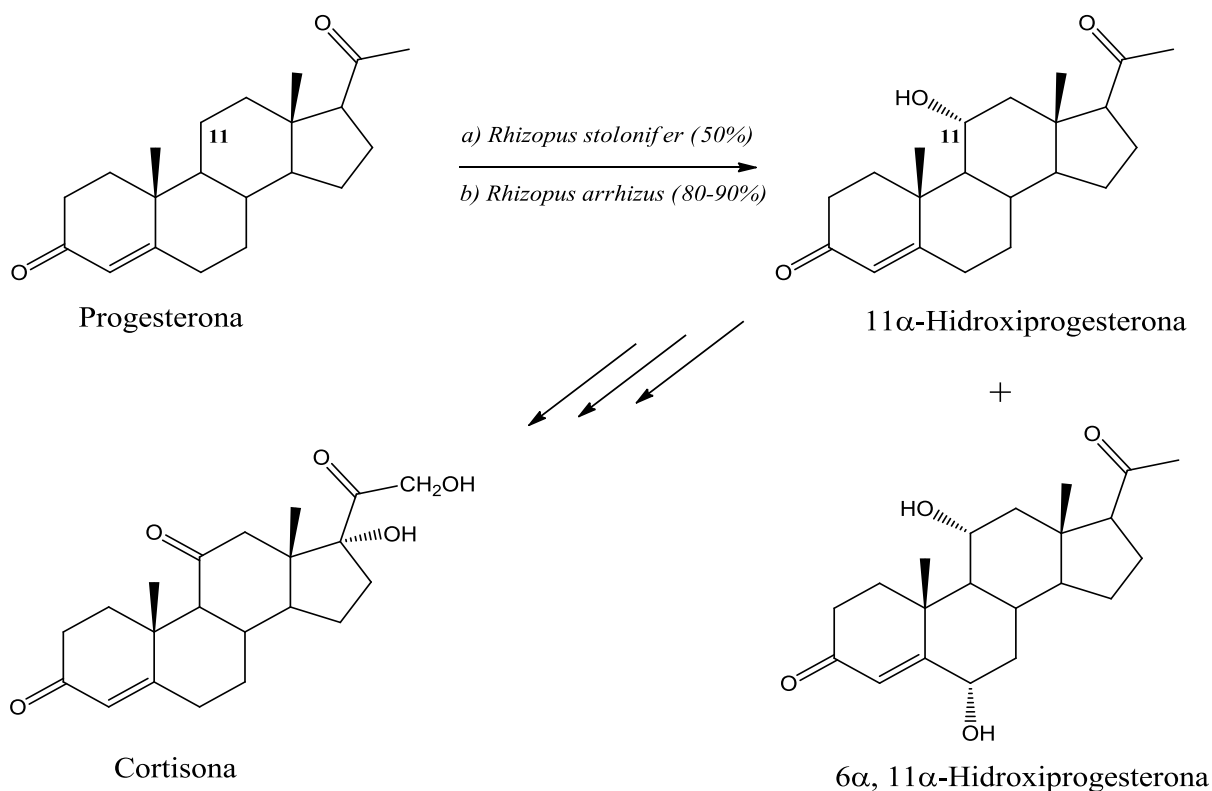
Os fungos tem sido instrumento interessante no estudo dos processos metabólicos, pois é de fácil manejo, crescimento rápido e utiliza meios de cultivo bem caracterizados quimicamente (TRABULSI et al., 1996). Estes organismos são muito utilizados em estudos de biotransformação de vários compostos inclusive de terpenos (DUETZ et al., 2001).

Há diferentes estimativas sobre a quantidade de espécies de fungos que habitam nosso planeta (MUELLER & SCHMIT, 2007). Estima-se que haja cerca de 1,5 milhões de fungos, dos quais apenas 80.000-120.000 mil espécies estão descritas (HAWKSWORTH, 2001; WEBSTER & WEBER, 2007). Lewinsohn & Prado (2006) relatam que o Brasil possui 1.043 gêneros e 13 mil espécies relatadas. Entretanto, os autores alertam que esses números se referem a inferências e estimativas que podem ter sido afetadas por uma combinação de problemas, uma vez que na época não havia qualquer lista de controle de nomes. O Catálogo de plantas e fungos do Brasil (2010) descreve que possui apenas 3,7% das espécies descritas mundialmente, com 78 ordens, 924 gêneros e 3.608 espécies. A Região Nordeste do país é a que possui registro de maior diversidade de espécies, com 1.749, seguida pela Sudeste com 1.411, Sul com 1.320, Norte com 743 e Centro-Oeste com 296.

Entre as espécies descritas no mundo, somente 16% têm sido cultivadas (DEMAIN, 1999). Os fungos filamentosos derivados de ambiente marinho são ainda menos conhecidos. Estes dados demonstram o grande potencial químico e biológico a ser explorado com estudos sobre o sistema enzimático fúngico e sua capacidade em realizar biotransformações.

Uma das transformações microbianas mais notáveis foi à produção de 11 α -hidroxiprogesterona a partir da progesterona promovida por *Rhizopus stolonifer* e *Rhizopus arrhizus* (Figura 9; PETERSON et al., 1952). A conversão régio- e estereoespecífica promoveu a funcionalização do C-11. O produto da biotransformação se tornou um intermediário chave para a síntese da cortisona. Inicialmente obtida através de 37 etapas com rendimento global de 0,15%, a cortisona passou a ser sintetizada em apenas seis etapas, derrubando de imediato o preço do composto de 200 para 6 dólares por grama (WACKETT & HERSHBERGER, 2001). A cortisona foi relatada em 1949, por um grupo de pesquisadores liderados por Philip Hench, como um esteróide de excepcional atividade antiinflamatória (HENCH, 1949) e ainda hoje é largamente vendida como fármaco antiinflamatório.

Figura 9. Biotransformação da progesterona por *Rhizopus stolonifer* e *Rhizopus arrhizus* (Adaptado de HOGG, 1992)



2. REVISÃO DA LITERATURA

O gênero *Lippia* Houtt., cujo nome deriva de August Lippi, um botânico italiano, é composto de cerca de 200 espécies representadas por ervas, arbustos e pequenas árvores que são frequentemente aromáticas e distribuídas nas Américas Central e do Sul e em territórios da África Tropical (TERBLANCHÉ & KORNELIUS, 1996). O maior número de espécies se encontra no Brasil, cerca de 150, com ocorrência especialmente em campos rupestres e cerrados (SALIMENA, 2000). O gênero é de grande importância econômica devido aos diferentes usos de seus óleos essenciais. Possui muitas representantes classificadas como espécies medicinais e compreende o segundo maior da família Verbenaceae.

No Nordeste, diversas espécies da família Verbenaceae (Tabela 11) são usadas pela comunidade local como método tradicional de tratamento de enfermidades.

Tabela 11. Principais espécies da família Verbenaceae de origem ou cultivadas no Nordeste do Brasil

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Indicação e forma de uso
<i>Lantana camara</i> L.	Chumbinho, camará, cambará	Folhas	Como emenagogo, diurético, expectorante e anti-reumático. Uma decocção de uma pequena massa das folhas em meio litro de água. É injerido periodicamente como chá até que os sintomas desapareçam.
<i>Lantana radula</i> Sw.	Chumbinho-branco	Folhas	A decocção é usada contra a tosse, gripe e bronquite.
<i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.	Erva cidreira	Folhas e partes aéreas	A infusão ou o xarope é usado contra gripe, resfriados e hipertensão e como digestivo e sedativo. Em banhos é usado contra úlceras externas.
		Raízes	A infusão é usada contra resfriado e tosse.
<i>Lippia alnifolia</i> Schauer	Alecrim-do-mato	Folhas	A decocção ou maceração em álcool é usada como antisséptico, no tratamento de dermatites e caspa.
<i>Lippia gracilis</i> Schauer	Alecrim-pimenta, alecrim-de-serrote, alecrim-da-chapada	Folhas	A decocção ou maceração em álcool é usada como antisséptico, no tratamento de dermatites e caspa.
<i>Lippia microphylla</i> Cham.	Alecrim-do-mato, alecrim-de-tabuleiro, alecrim-pimenta	Folhas	Usada como antisséptico e contra doenças respiratórias.

Continuação da Tabela 11

Nome científico	Nome popular	Parte usada	Indicação e forma de uso
<i>Stachytarpheta cayennensis</i> (Rich.)	Vahl, Gervão	Folhas	A decocção de uma pequena massa é diluída em um litro de água. Indicada no tratamento de doenças respiratórias. É injerida periodicamente como chá até que os sintomas desapareçam.
<i>Stachytarpheta elatior</i> Schrad. ex Schult.	Gervão	Planta inteira	Contra vitiligo. Além de injerida como chá, é usada para banhos.
<i>Vitex agnus-castus</i> L.	Liamba, teca	Folhas	Mesmo uso e indicações que os da espécie <i>S. cayennensis</i> (Rich.).
<i>Vitex gardneriana</i> Schauer	Jaramataia, tamanqueira	Folhas	Infusão usada contra asma e doenças renais.
<i>Vitex triflora</i> Vahl	Mama-cahorra	Folhas	A infusão é usada como calmante, digestivo e contra reumatismo.
			O suco é usado topicamente contra verrugas.

Fonte: AGRA, 2008

Lippia gracillis Schauer (Verbenaceae), popularmente conhecida como alecrim-de-tabuleiro ou alecrim-da-chapada, é um arbusto caducifólio, ramificado, de até 2,5 m de altura, flores miúdas amarelo-esbranquecidas, reunidas em espigas de eixo curto, própria da vegetação do semi-árido nordestino de terrenos bem drenados, sendo comum nos Estados da Bahia, Sergipe e Piauí (LORENZI & MATOS, 2002).

2.1. Óleo essencial de *Lippia gracilis*

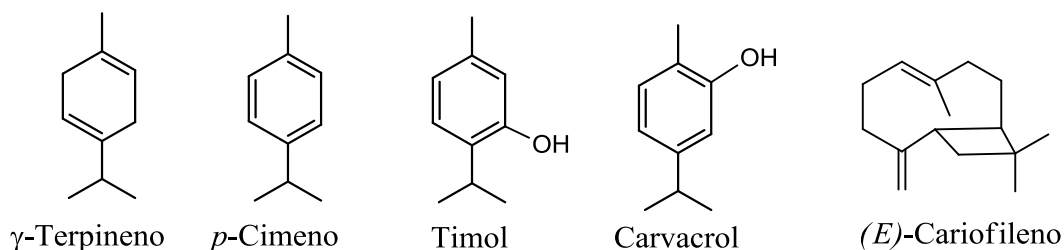
A composição química do óleo essencial de *Lippia gracilis* reportada na literatura mostra flutuações quantitativas dos componentes majoritários, provavelmente devido a condições genéticas, não padronização de cultivo e clima.

Três estudos demonstraram as seguintes variações na composição dos componentes majoritários do óleo: carvacrol 47,8%, 11,8% e 54,4%; timol 4,8%, 30,6% e 1,9% e *p*-cimeno 19,2%, 10,7% e 10,7% (LEMOS et al., 1992; MATOS et al., 1999; PESSOA et al., 2005).

Segundo Silva et al. (2008), o óleo essencial das folhas de *L. gracilis* é composto por 80,25% de monoterpenos e 18,14% de sesquiterpenos, sendo os principais constituintes carvacrol (44,43%), *o*-cimeno (9,42%), γ -terpineno (9,16%), β -cariofileno (8,83%) e timol (3,83%). Os mesmos autores determinaram que o óleo da planta apresenta potente atividade

larvicida ($IC_{50} = 98 \pm 1,99 \mu\text{g.mL}^{-1}$), frente a larvas de *Aedes aegypti*, e relacionaram o monoterpeno fenólico carvacrol, majoritário no óleo, como principal responsável por sua atividade. Mendes et al. (2010) relataram atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de *L. gracilis*, estando relacionadas a presença de timol.

Figura 10. Estrutura química dos principais componentes do óleo essencial de *L. gracilis*



Um estudo realizado por Teles et al. (2010) sobre a atividade moluscicida do óleo da espécie coletada no município de Tomar do Gero-SE revelou seu elevado potencial frente a caramujos *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeiro do *Schistosoma mansoni* no Brasil, com CL_{50} (concentração letal média) de $62,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O uso do óleo de *L. gracilis* foi considerado como uma alternativa potencial no combate ao trematódeo. Nesse estudo, o óleo essencial apresentou como principais componentes timol (24,0%), *p*-cimeno (15,9%), metil-timol (11,7%), γ -terpineno (10,9%) e (*E*)-cariofileno (7,8%). Os mesmos autores observaram um bom resultado no ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, sendo necessário apenas $23,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ do óleo para eliminar 50% das larvas. A Organização Mundial de Saúde considera tóxico compostos que apresentem valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *A. salina*.

2.2. Biotransformação de terpenos voláteis

A biocatálise têm se tornado uma ferramenta valiosa para a modificação estrutural de compostos orgânicos. Sua eficiência em promover reações de alta complexidade, dificilmente alcançadas por métodos convencionais, é seu principal atrativo. As reações de biotransformação são comumente realizadas empregando-se enzimas isoladas, microorganismos ou células vegetais.

Um problema comum em reações de biotransformações envolvendo terpenos voláteis é a não solubilização desses compostos em meio aquoso. Agentes que facilitem a sua solubilização podem ser usados para contornar esse problema, como dimetil sulfóxido, por exemplo. Deve-se ter em mente também que terpenos comumente apresentam atividade

fungicida ou bactericida, dessa forma, um limiar de concentração do substrato pode impedir o crescimento celular (GOUNARIS, 2010).

Outro problema é a volatilização do substrato durante a reação, métodos para a adição contínua do substrato, em concentrações não prejudiciais ao microorganismo, têm sido desenvolvidos e demonstrado eficiência. Dentre eles, o método de pervaporação (VANE, 2005) e a inclusão dos compostos diretamente ligados a materiais nos meio de cultura são comumente usados (GOUNARIS, 2010).

A Tabela 12 ilustra exemplos de biotransformação de compostos voláteis.

Tabela 12. Biotransformação de precursores para a produção de compostos voláteis por plantas e microorganismos.

Organismo	Substrato	Produto / efeito / rendimento
Plantas		
<i>Anethum graveolens</i>	Geraniol	Nerol foi detectado em 24h de reação. Após esse tempo, não foi observada a presença de nerol ou de geraniol.
<i>Asparagus officinalis</i>	Santonina, 0,2 g.L ⁻¹	Derivados hidroxilados, 120 mg.L ⁻¹
<i>Capsicum annuum</i>	Ácido ferrúlico, 2,5 mM	Vanilina, 10 mg.L ⁻¹
<i>Catharanthus roseus</i>	3-Careno e 2-pineno	Derivados epoxidados e hidroxilados
	Geraniol, nerol e carvona, 0,1 g.L ⁻¹	Hidroxilação em posições alílicas e redução de duplas ligações de grupos ceto, < 60 mg.L ⁻¹ cada
	Geraniol	Geranial e neral
	Piperitona	Derivados hidroxilados
<i>Dioscorea deltoidea</i>	Limoneno, 1,2 g.L ⁻¹	Carvona (240 mg.L ⁻¹) via carveol
<i>Eucalyptus perriniana</i>	Borneol, 0,5 g.L ⁻¹	Derivados glicosilados de borneol (240 mg.L ⁻¹ para o derivado mais abundante)
	Eugenol, timol e carvacrol, 0,8 mM	Derivados glicosilados de timol, carvacrol e eugenol acumulados nas células, conversões de 70-99%
	Óxido de cariofileno	Cariofila-3-en-5,14-diol-O-gentobiosídeo
<i>Euphorbia characias</i>	Geraniol	Geranial, neral
<i>Glycyrrhiza alba</i>	Aldeídos monoterênicos	Redução aos álcoois correspondentes
<i>Nicotiana tabacum</i>	Geraniol	Geranial, neral
<i>Peganum harmala</i>	Pinenos mentona	Verbenol, verbenona, mirtenol e mirtenal Mentol e piperitol
Fungos e algas		
<i>Aspergillus niger</i>	β-Ionona	Derivados hidroxi e oxo
	Nerol e geraniol, 0,1% v/v	Linalol, 43 mg.L ⁻¹ , α-terpineol 54 mg.L ⁻¹
	Ácido cáprico, ácido caprílico	Conversão a nonan-2-ona e heptan-2-ona com rendimento superior a 46%
	Fenilalanina	2-Feniletanol
<i>Beauveria bassiana</i>	Cadina-dien-3-ona	Vários derivados hidroxilados
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	Ácido α-linolênico	Ácidos jasmônico, 1100 mg.L ⁻¹ (100 mg.g ⁻¹ de células secas)

Continuação da Tabela 12.

Organismo	Substrato	Produto / efeito / rendimento
<i>Botryodiplodia theobromae</i>	(+)-Valenceno 0,4 g.L ⁻¹	Notkatona
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	(+)-Valenceno 0,4 g.L ⁻¹	Notkatona
<i>Candida sorbophila</i>	Ácido ricinoléico	γ -Decalactona, 40,9 g.L ⁻¹
<i>Chaetomium globosum</i>	Valenceno	Notekatona, 25 mg.L ⁻¹
<i>Curvularia lunata</i>	Squamulosa, 0,16% m/v	Vários aromadendranos, < 0,06% m/v
<i>Epicocum nigrum</i>	Óleo essencial de <i>Citrus sinensis</i>	Álcoois terpênicos
<i>Fusarium proliferatum</i>	Limoneno, 0,5%	Carveol, 35 mg.L ⁻¹
<i>Fusarium verticilloides</i>	Limoneno	Álcool perfílico
<i>Ganoderma applanatum</i>	Mirceno, 0,1% v/v	Mircenol e outros voláteis oxigenados
<i>Glomerella singulate</i>	β -Selineno	
<i>Gomgronella butlery</i>	Limoneno, 0,5%	
<i>Mucor circillenioides</i>	Decanoato de etila, caprinoato de etila	γ -Decalactona, 10,5 g.L ⁻¹
<i>Penicillium citrinum</i>	Limoneno, 0,5%	α -Terpineol, 80 mg.L ⁻¹
<i>Penicillium digitatum</i>	Limoneno, 0,5% Geraniol, nerol e citral, 1 mM	α -Terpineol, 506 mg.L ⁻¹ Metilheptanonas, 0,9 mM
<i>Pleurotus flabellatus</i>	Mirceno, 0,1% v/v	Mircenol e outros voláteis oxigenados
<i>Pleurotus sapidus</i>	Limoneno, 0,5% v/v	Carvona
<i>Pleurotus sapidus</i>	Limoneno, 0,5% v/v	Carveol (30 mg.L ⁻¹), carvona (55 mg.L ⁻¹)
Bacterias		
<i>Alcaligenes defragrans</i>	Limoneno + isolimoneno, 1 mM de cada	Isoterpinoleno, 250 μ M
<i>Rhodococcus</i> sp.	Geraniol	Ácido gerânico
<i>Xanthobacter</i> sp. C20	Limoneno, 1 mM	8,9-Epóxido de limonene, 0,8 g.L ⁻¹
<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	Óxido de α -pineno	Isonovalal, 16,4 g.L ⁻¹
<i>Pseudomonas</i> sp.	Pinenos, 1% v/v	Címeno (130 mg.L ⁻¹), terpineol, borneol, limoneno e terpinoleno (todos < 40 mg.L ⁻¹)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	Carveol, 50 mM	Carvona, 160 mM
<i>Rhodococcus opacus</i>	Limoneno	Carveol, carvona
<i>Serratia marcescens</i>	Eugenol, 0,4%	Vanilina, 3,8 g.L ⁻¹

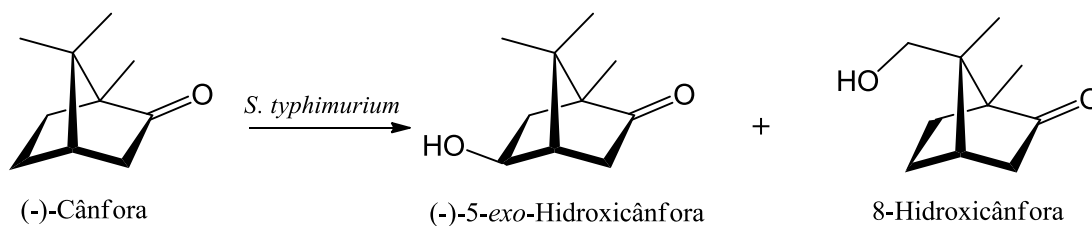
Fonte: (GOUNARIS, 2010).

2.2.1. Biotransformação da cânfora

A cânfora (1,7,7-trimetilbicyclo-[2.2.1]-heptan-2-ona) é um monoterpeneo bicíclico cetônico, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$, com estrutura do tipo norbornano. A cânfora pode ser obtida do canforeiro [*Cinnamomum canphora* (L.) J. Presl], da família Lauraceae, nativa do Taiwan, Japão e China. Outras fontes naturais são as plantas *Dryobalanops aromatica* e *Ocotea usambarensis* (ALVES & VICTOR, 2010).

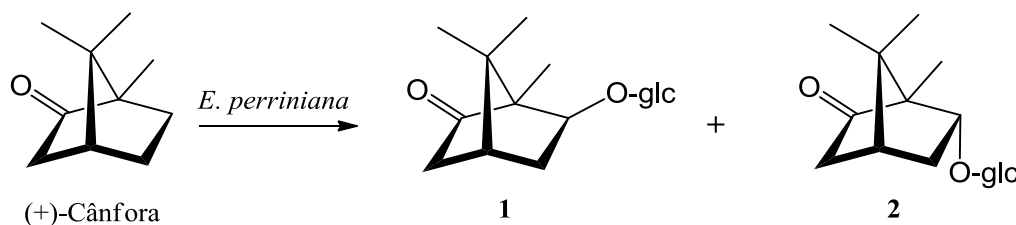
Nakahashi & Miyazawa (2011), usando *Salmonella typhimurium* OY1002/2A6 do citocromo humano P450 e NADPH-P450 redutase como biocatalisadores, observaram a hidroxilação da (-)-cânfora nas posições 5-*exo* e 8, produzindo (-)-5-*exo*-hidroxicânfora e (-)-8-hidroxicânfora, com rendimento de 7,6 e 0,6%, respectivamente (Figura 11).

Figura 11. Biotransformação da (-)-cânfora por *Salmonella typhimurium* OY1002/2A6

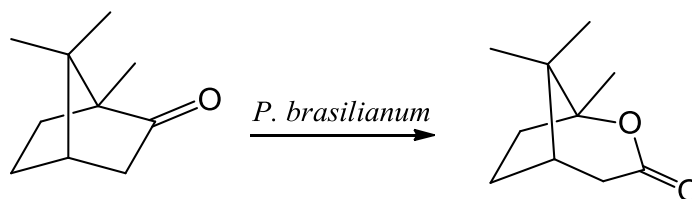


Sete produtos de biotransformação da (+)-cânfora foram identificados por Orihara et al. (1994) ao incubar o substrato com células vegetais de *Eucalyptus perriniana*. Os compostos majoritários foram a (+)-6-*O*- β -D-glicopiranosídeo-6-*exo*-hidroxicânfora (11,7%; Figura 12; **1**) e seu epímero, a (+)-6-*O*- β -D-glicopiranosídeo-6-*endo*-hidroxicânfora (3,1%; **2**).

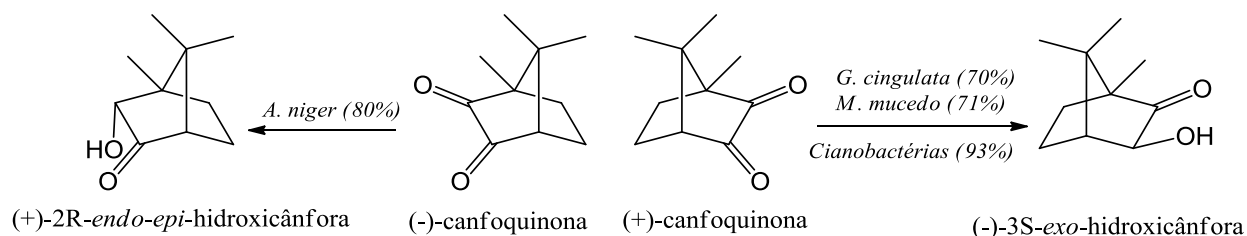
Figura 12. Biotransformação da (+)-cânfora por células vegetais de *Eucalyptus perriniana*.



Mihovilovic (2006) verificou a lactonização da cânfora por meio de uma reação de Baeyer-Villiger promovida por enzimas do fungo *Penicillium brasilianum*. No processo o substrato foi totalmente consumido.

Figura 13. Biotransformação da cânfora pelo fungo *Penicillium brasilianum*

Dois trabalhos distintos investigaram o potencial de fungos (MIYAZAWA, 1995) e cianobactérias (UTSUKIHARA et al., 2004) em biotransformar (+)- e (-)-canfoquinonas. Reduções de alta estereosseletividade foram observadas. (-)-Canfoquinona foi reduzida a (+)-2R-endo-*epi*-hidroxicânfora por *Aspergillus niger*, enquanto (+)-canfoquinona foi convertida principalmente em (-)-3S-*exo*-hidroxicânfora por espécies de *Glomerella cingulata* e *Mucor mucedo* (Figura 14). Utsukihara et al. (2004), usando cianobactérias (*Synechococcus elongatus* PCC 7942 e *Synechosystis* sp.), observaram a formação de (-)-3S-*exo*-hidroxicânfora a partir da (+)-canforquinona. Os autores verificaram que, em condições de baixa iluminação, ocorre diminuição da seletividade da redução.

Figura 14. Principais produtos de biotransformação da (-)-canfoquinona por *A. niger* e da (+)-canfoquinona por *G. cingulata*, *M. mucedo* e cianobactérias.

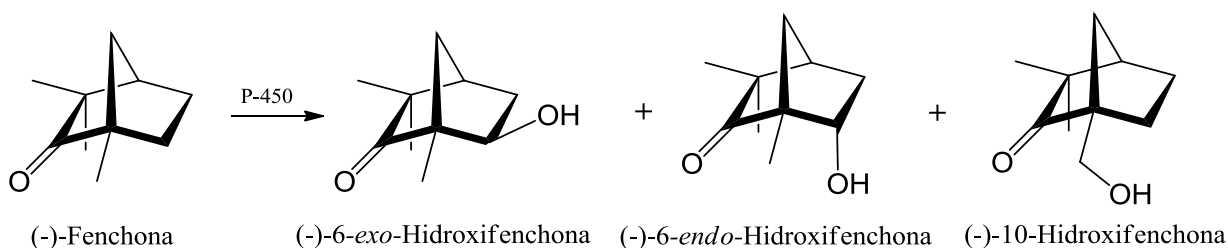
2.2.2. Biotransformação da fenchona

A fenchona (1,3,3-trimetilbiciclo-[2,2,1]-heptan-2-ona) é um monoterpeneo bicíclico como a cânfora, diferindo apenas desta pela posição de dois grupos metílicos. A (+)-fenchona pode ser obtida do óleo essencial de *Foeniculum vulgare*, enquanto o isômero levogiro é encontrado no óleo de *Thuja occidentalis* (HARBORNE & BAXTER, 1993). Há poucos relatos na literatura do uso de fenchona como substrato em processos biocatalíticos.

Miyazawa & Glyoubu (2007) examinaram a biotransformação da (-)-fenchona por enzimas do citocromo P450 humano. Foi observada a oxidação do substrato originando (-)-6-

exo-hidroxifenchona, 6-*endo*-hidroxifenchona e 10-hidroxifenchona (Figura 15). Segundo os autores, as enzimas CYP2A6 e CYP2B6 foram às principais responsáveis pela hidroxilação.

Figura 15. Biotransformação da (-)-fenchona por enzimas do citocromo P450 humano



Miyazawa & Miyamoto (2005), usando larvas de *Spodoptera litura* como biocatalisador, verificaram a conversão de (+)- e (-)-fenchona em, principalmente, derivados monohidroxilados. O carbono 6-*exo* foi o sítio preferencial de adição do grupo OH para a (+)-fenchona, enquanto a (-)-fenchona sofreu majoritariamente a hidroxilação no C10.

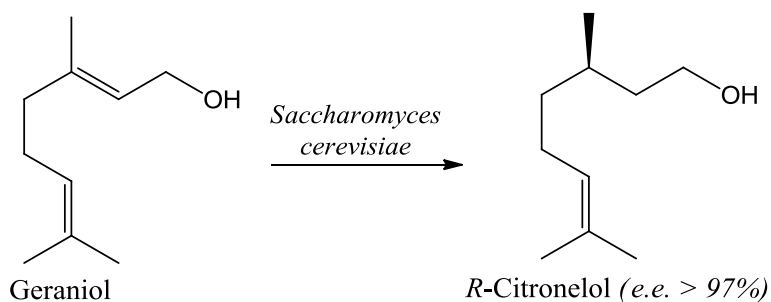
2.2.3. Biotransformação do geraniol

O geraniol (2*E*-3,7-dimetilocta-2,6-dien-1-ol) é um monoterpene oxigenado, encontrado principalmente nas flores de espécies de rosas (*Rosa hybrida*; BAYRAK, 1994) e no óleo essencial das folhas de várias plantas aromáticas, como *Ocimum basilicum* (SIMON et al., 1999), *Cymbopogon citratus* (Singh-Sangwan et al., 1993) e *Cymbopogon martinii* (SARMA et al., 1998).

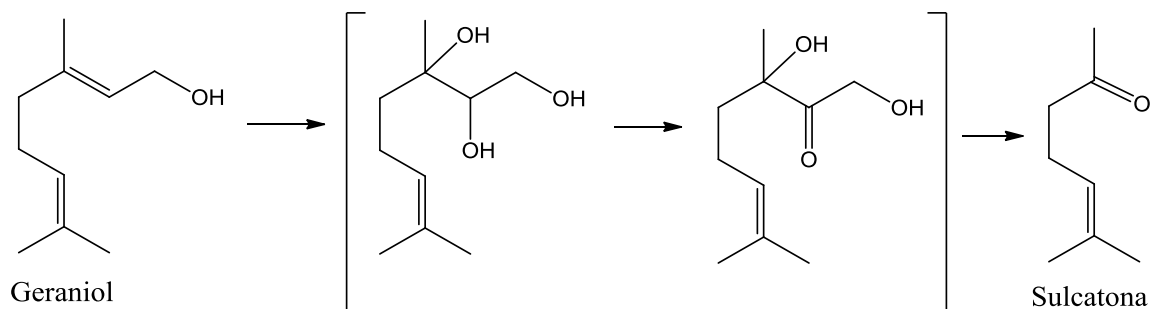
Guardiola et al. (1996), usando suspensões celulares de duas variações de *Vitis vinifera* L., verificaram a conversão de geraniol a nerol. Os autores observaram um rendimento de 40% quando a reação foi efetuada usando as células imobilizadas em poliuretano, enquanto, ao imobilizá-las em alginato de cálcio obteve-se um rendimento de 20% de conversão.

Chatterjee (2004), estudando a degradação microbiana do geraniol por cepas de *Rhodococcus* sp isoladas do solo, observou a oxidação do geraniol a ácido gerânico em uma temperatura ótima de 30 °C.

A reação utilizando *Saccharomyces cerevisiae* promoveu a redução regioseletiva de uma das duplas ligação do geraniol com 97% de excesso enantiomérico (Figura 16; GRAMATICA et al., 1982).

Figura 16. Redução do geraniol a *R*-citronelol por *S. cerevisiae*

Uma clivagem oxidativa do geraniol dando origem a sulcatona (6-metil-5-hepten-2-ona) foi conduzida por *Penicillium digitatum* (DEMYTTENAERE & KIMPE, 2001) e *Penicillium italicum* (DEMEYTTENARE & POOTER, 1996), com rendimento de 83% após três semanas e 69-76% após quatro dias de reação, respectivamente.

Figura 17. Mecanismo de degradação do geraniol por *P. italicum*. (Adaptado de DEMEYTTENARE & POOTER, 1996).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a composição química do óleo essencial de *Lippia gracilis* e realizar reações de biotransformação de compostos voláteis por espécies fúngicas.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Identificar os componentes químicos do óleo essencial das folhas secas de sete genótipos de *Lippia gracilis* obtido por hidrodestilação;
- ✓ Propor a rota biossintética de obtenção dos componentes presentes no óleo essencial de *L. gracilis*;
- ✓ Realizar análises estatísticas visando agrupar os genótipos através da similaridade na composição de seus óleos essenciais;
- ✓ Avaliar o efeito do estresse hídrico sobre o teor e composição química do óleo essencial da espécie;
- ✓ Realizar reações de biotransformação de voláteis por *Botryosphaeria* sp. e *Aspergillus niger*;

3. METODOLOGIA

3.1. Parte I: Análise do óleo essencial de *Lippia gracilis*

3.1.1. Local do estudo de campo

Os genótipos de *Lippia gracilis* Shauer (106, 107, 108, 109, 110) tiveram origem de Tomar do Geru-SE, coletados a uma altitude de 215, 214, 209, 207 e 205 metros, respectivamente. Enquanto os genótipos 201 e 202 originaram-se de Rio Real, município da Bahia, coletados a 200 e 197 metros de altitudes.

Os sete genótipos foram encaminhados para o Horto de Plantas Medicinais da Fazenda Experimental "Campus Rural da UFS" localizada no Município de São Cristóvão-SE. Quando as mudas apresentaram-se com três pares de folhas, foram levadas a campo para implantação do Banco Ativo de Germoplasma (BAG).

Os genótipos foram divididos em dois grupos e cultivados sob condições idênticas, exceto pelo fato de que um dos grupos foi submetido ao estresse hídrico (CE: com estresse) através da restrição do fornecimento de água e o outro grupo foi cultivado sob irrigação contínua por gotejamento (SE: sem estresse). Esse experimento foi realizado em quadruplicada (Figura 19) e teve como objetivo avaliar o efeito do estresse hídrico sobre o teor e composição química dos genótipos de *L. gracilis*.

Tabela 13. Dados de origem e do BAG dos genótipos de *L. gracilis*

Código	Local de origem	Dados geográficos	Nº Voucher Herbário UFS
106	Tomar do Geru – SE	11 19' 16,7" S; 37 55' 09,2" W	14733
107	Tomar do Geru – SE	11 19' 20,1" S; 37 55' 13,5" W	14737
108	Tomar do Geru – SE	11 19' 22,4" S; 37 55' 12,6" W	14734
109	Tomar do Geru – SE	11 19' 20,7" S; 37 55' 16,9" W	14735
110	Tomar do Geru – SE	11 19' 21,1" S; 37 55' 14,9" W	14732
201	Rio Real – BA	11 23' 38,7" S; 38 00' 54,1" W	14736
202	Rio Real – BA	11 23' 45,3" S; 38 00' 51,3" W	14731

Figura 18. Mudas de genótipos de *Lippia gracilis* cultivadas no Campus Rural da UFS



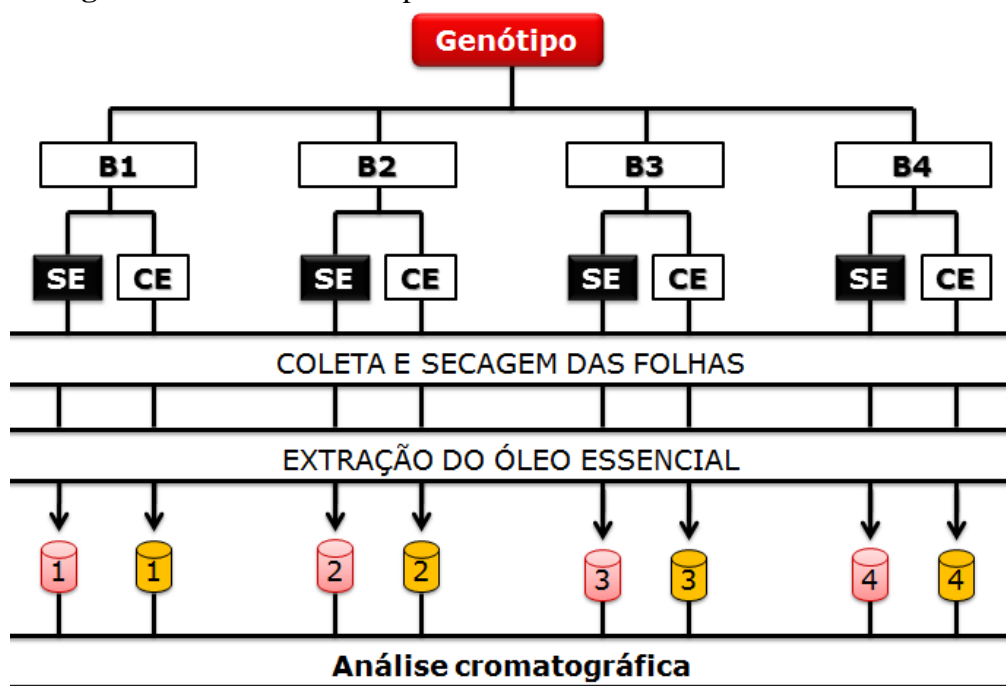
3.1.2. Extração do óleo essencial, análise cromatográfica por CG-EM e identificação dos compostos

O óleo essencial foi extraído (em quadruplicata) através da técnica de hidrodestilação usando aparelhagem do tipo Clevenger. Utilizou-se 100 g de folhas secas que foram adicionadas a um balão de fundo redondo com capacidade para três litros junto com dois litros de água destilada, o processo de hidrodestilação teve duração de 160 minutos após o início da condensação do vapor no Clevenger e o óleo essencial obtido foi separado da solução aquosa por decantação, seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), transferido para frascos de vidro âmbar e armazenado em freezer.

A análise da composição química do óleo essencial foi realizada em um cromatógrafo à gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM; Shimadzu, modelo QP 5050A; Kyoto, Japão), equipado com um autoinjeter AOC-20i (Shimadzu) e coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm de espessura de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; temperatura do forno foi programada mantendo-se constante a 50 °C durante 1,5 min, seguido de um aumento de 4 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 200 °C, depois a 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 250 °C mantendo constante esta temperatura por 5 min.; temperatura do injetor de 250°C e temperatura do detector de 280 °C; volume de injeção foi de 0,5 μL do óleo diluído em acetato de etila (25 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 64,20 kPa. As condições do EM foram: detector de captura iônica operando com ionização por impacto de elétrons a 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos/s e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

Os componentes do óleo essencial foram identificados através da comparação de seu espectro de massas com espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007) e com espectros do banco de dados do equipamento (WILEY8 e NIST05), bem como pela comparação dos índices de retenção (IR), que foram determinados utilizando uma série homologa de *n*-alcanos (C₈-C₁₈) injetada nas mesmas condições cromatográficas das amostras e calculados de acordo com a equação de Van den Dool & Kratz (1963).

Figura 19. Resumo das etapas realizadas até a análise do óleo essencial.



3.1.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de *clusters* utilizando o pacote estatístico do software STATISTICA® versão 9.0 (2009). A dissimilaridade entre as amostras foi medida através do cálculo da distância euclidiana. Os genótipos foram agrupados utilizando o método de Ward (ROMESBURG, 1984).

3.2. Parte II – Reações de biotransformação

Para promover as bioconversões foram utilizadas duas espécies fúngicas: *Aspergillus niger* e *Botryosphaeria* sp. Todas as etapas do processo reacional usando *Botryosphaeria* sp. foram realizadas no Laboratório do Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto (Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise/Instituto de Química de São Carlos/USP).

3.2.1. Solventes e sais

Foram utilizados solventes (acetato de etila, hexano, éter dietílico, metanol e éter de petróleo) grau de análise (PA) nos processos de biotransformação e grau HPLC na diluição dos componentes isolados, adquiridos da Synth, Vetec, Merck e Tedia. Clorofórmio deuterado (CDCl₃) usado na obtenção dos espectros RMN e o padrão interno tetrametilsilano (TMS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os sais utilizados foram obtidos de fontes comerciais (Synth, Merck e Vetec).

3.2.2. Substratos

Nas reações de biotransformação foram usados como substrato, além dos principais componentes do OE de *L. gracilis*, carvacrol e timol, os compostos (+)-pulegona, geraniol, (–)-citronelol, (+)-limoneno e os monoterpenos bicíclicos *rac*-cânfora, (1*R*,4*S*)-(+)-fenchona, (1*S*,4*R*)-(–)-fenchona, adquiridos da empresa Sigma-Aldrich.

3.2.3. Cromatografia em coluna

Para o isolamento dos produtos da reação empregou-se a técnica de cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel *flash* 60 (230-400 mesh) da Across. O progresso reacional foi acompanhado através de cromatografia em camada delgada (CCD), usando cromatofolhas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Sorbent Technologies. As cromatofolhas foram observadas em câmera com luz UV (254 nm) e reveladas com solução de anisaldeído (100 mL de ácido acético, 1 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de *p*-anisaldeído) ou solução alcoólica de vanilina (125 mL de etanol, 25 mL de ácido sulfúrico concentrado e 6 g de vanilina). Foi usado um sistema hexano:acetato de etila como fase móvel na eluição dos componentes. Iniciando com 100% hexano (175 mL) e elevando a polaridade gradualmente:

9,5:0,5 (75 mL); 9,0:1,0 (75 mL); 8,5:1,5 (75 mL); 8,0:2,0 (150 mL); 7,5:2,5 (200 mL); 7,0:3,0 (200 mL); 6,5:3,5 (100 mL).

3.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C foram obtidos em um espectrofotômetro Bruker/AC-200, operando na frequência de 200 MHz e 50 MHz, respectivamente. Utilizou-se CDCl_3 como solvente e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS.

As análises de RMN foram realizadas junto à Central Analítica do Instituto de Química de São Carlos (CAQI-USP).

3.2.5. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

Os cromatogramas e espectros de massas foram obtidos em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu, modelo QP-2010plus; Kyoto, Japão), equipado com um autoinjeter Shimadzu 2010 e coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific DB-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolisiloxano) de 30 m x 0,25 mm d.i., 0,25 μm de filme, usando He (99,995% de pureza) como gás de arraste com fluxo de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e pressão de 88,2 kPa; volume de injeção das amostras de 0,5 μL em uma razão de *split* de 1:20; a temperatura do injetor e detector foi mantida em 250 °C. Foram desenvolvidos dois métodos, para análise dos produtos de biotransformação da canfora e da fenchona, método 1 e 2, respectivamente. No método 1, a temperatura do forno foi programada para 50 °C por 1 min, seguido de aquecimento a taxa de 7 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até 232 °C, finalizando com uma isoterma de 3 min nesta temperatura. No método 2, a temperatura do forno foi programada para 50 °C por 1 min, seguido de aquecimento a taxa de 5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir 180 °C, mantendo-se constante por 3 min. Ambos métodos apresentam tempo de programa total de 30 min. As condições do EM foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos $\cdot\text{s}^{-1}$ e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da.

3.2.6. Outros equipamentos

A eliminação das solventes nos extratos e frações foi realizada em rotaevaporadores a pressão reduzida em equipamentos das marcas Fisaton e Tecnal T – 210, ambos equipados com bomba de vácuo TE – 058 e refrigeração Tecnal Modelo TE – 2005.

As alíquotas retiradas periodicamente para monitoramento do processo de biotransformação foram centrifugadas a 6000 rpm durante 6 minutos em uma centrífuga modelo Hermle.

O crescimento dos fungos em meio líquido e as reações de biocatálise foram realizadas em agitadores modelos Tecnal TE-421 e Superohn, usando temperatura constante de 32 °C e velocidade de rotação de 150 rpm.

Balança analítica modelo AY 220 – Shimadzu, capela de fluxo laminar Veco, autoclaves verticais modelo Phoenix e medidor de pH modelo 8010 – Qualxtron.

3.2.7. Coleta da alga e isolamento do fungo *Botryosphaeria* sp.

A alga *Bostrychia radicans* foi coletada pela Profa. Dra. Hosana M. Deboni da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP). A identificação da espécie foi realizada pela Dra. Nair S. Yokoya do Instituto de Botânica de São Paulo (IB/SP). A alga foi coletada em setembro de 2007 no Manguezal da Praia Brava em Ubatuba, litoral Norte do Estado de São Paulo. Foram coletados 2 Kg de algas, as quais foram armazenadas separadamente em pequenas porções em embalagens plásticas sob refrigeração em sacos plásticos (- 14 °C).

Figura 20. Foto da alga marinha *Bostrychia radicans*



O isolamento dos fungos endofíticos foi realizado pelos alunos do grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica do Ambiente Marinho (FCFRP/USP), sob a orientação da Profa. Dra. Hosana M. Debonisi.

A alga *B. radicans* foi lavada com água do mar para remoção de impurezas (areia, folhas). A desinfecção superficial deste material para o isolamento dos microorganismos endofíticos foi realizada por três diferentes metodologias:

- (a) Incubação em etanol 70% por 15 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.
- (b) Incubação em etanol 70% por 10 segundos, incubação em hipoclorito de sódio (0,01%) por 5 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.
- (c) Incubação em etanol 70% por 5 segundos, incubação em hipoclorito de sódio (0,01%) por 15 segundos e três lavagens em água do mar esterilizada.

As amostras esterilizadas foram fragmentadas com uso de pinça e bisturi cirúrgico estéreis e os fragmentos foram transferidos para placas de Petri com meios de cultivo sólidos de agar-agar e batata-dextrose-agar (BDA).

O meio agar-agar foi preparado pesando-se 20 g de alga *B. radicans*, os quais foram fragmentados em liquidificador com 200 mL de água do mar esterilizada. Em seguida foram adicionados cloranfenicol (200 mg), agar (15 g) e água do mar (1 L). As placas foram incubadas em estufa a 28 °C e os microorganismos que se desenvolveram nas placas foram sucessivamente repicados até a obtenção das linhagens puras. O fungo isolado e nomeado de Br-09 foi selecionado para ser usado nas reações por apresentar potencial de conversão dos substratos. Pertencente ao gênero *Botryosphaeria*, identificado pela Dra. Lara D. Sette no Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrárias (CPQBA/UNICAMP), sua espécie ainda está em processo de identificação no mesmo centro de pesquisa.

3.2.8. Isolamento do fungo *Aspergillus niger*

A espécie fúngica *Aspergillus niger* foi isolada de folhas de *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida por mangabeira, pelo grupo de pesquisa do prof. Dr. Geraldo Humberto Silva do Núcleo de Química da UFS (Campus Profº Alberto Carvalho).

No processo de isolamento, a superfície da folha do vegetal foi esterilizada por imersão em hipoclorito de sódio (2%) durante 5 minutos e em etanol (70%) por 1 minuto, posteriormente foi lavada duas vezes em água estéril por 10 minutos e colocada para secar.

Pedaços de folhas cortados assepticamente foram depositados em placas de Petri contendo os meios de BDA, todos contendo antibiótico (sulfato de gentamicina) para impedir o crescimento bacteriano.

Após o crescimento de varias linhagens fúngicas, foram realizados sucessivos repiques até a obtenção da espécie pura. Sua pureza foi determinada pela aparência uniforme nas placas com os meios apropriados.

A linhagem pura foi classificada como *Aspergillus niger* pelo Prof. Dr. João Basílio de Mesquita do Departamento de Agronomia Agrônômica da UFS.

3.2.9. Cultivo dos microorganismos

- *Água do mar artificial*

A água do mar artificial para o cultivo de *Botryosphaeria* sp. foi prepara a partir da dissolução de vários sais em água destilada. Composição (1L): $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,00 g), Na_2HSO_4 (0,14 g), Na_2SO_4 (3,47 g), NaHCO_3 (0,17 g), KBr (0,10 g), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g) e H_3BO_3 (0,03 g).

- *Composição do meio de cultura e cultivo dos fungos*

Os fungos *Botryosphaeria* sp. e *Aspergillus niger* foram previamente cultivados em meio sólido, preparado através da adição de 4 g de extrato de malte, 4 g de agar e 200 mL de água destilada (*A. niger*) ou água do mar artificial (*Botryosphaeria* sp.) em um frasco do tipo *shott*. O pH da solução foi ajustado para 8,0 com solução de KOH (2 mol.L^{-1}) para o cultivo de *Botryosphaeria* sp., enquanto que, para o cultivo de *A. niger*, o pH não foi alterando, mantendo-se igual ao pH do meio de cultura. Posteriormente, o frasco foi autoclavado durante 20 min a 120 °C. O meio preparado foi adicionado sobre placas de Petri, para cada placa usou-se 25 mL de meio. Numa capela de fluxo laminar, fez-se o repique da cultura pura do fungo para as placas de Petri. As placas foram mantidas em estufa a temperatura constante de 32 °C e na presença de luz.

O meio de cultura líquido usado nos experimentos foi preparado através da adição de 2 g de extrato de malte e 100 mL de água destila (*A. niger*) ou água do mar artificial (*Botryosphaeria* sp.) em Erlenmeyer de 250 mL. O pH da solução foi ajustado (apenas no cultivo de *Botryosphaeria* sp.) para 8,0 com solução de KOH (2 mol.L^{-1}) e os frascos foram fechados (usando rolhas preparadas com algodão embrulhado em gaze) e autoclavados a 120

°C por 20 min. O inóculo dos fungos em meio líquido foi realizado a partir em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio. Os Erlenmeyers foram levados para um agitador orbital, onde foram mantidos por 3 dias à 32 °C e 150 rpm.

3.2.10. Reações de biotransformação

Após três dias de crescimento dos fungos em meio líquido (100 mL) contido em Erlenmeyer de 250 mL, fez-se a adição dos substratos usados nas reações. Adicionou-se, separadamente, 50 mg dos compostos diluídos em 400 µL de DMSO, no fundo dos frascos Erlenmeyer com auxílio de uma pipeta Pasteur. Os Erlenmeyers foram levados ao agitador rotativo (150 rpm; 32 °C) e periodicamente realizou-se a remoção de alíquotas para observar o progresso reacional. Nos intervalos de 24, 48, 72 e 120 h coletou-se 2 mL do meio e, em tubos falcon, misturou-se com 2 mL de acetato de etila. Os tubos foram agitados em um aparelho Vortex e centrifugados a 6.000 rpm por 6 min. A fase orgânica foi coletada e injetada em um CG-EM.

No quinto dia de reação, fez-se a extração dos produtos com acetato de etila (3 x 50 mL). A fase orgânica obtida foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente eliminado em um rotaevaporador. O resíduo obtido foi purificado por cromatografia em coluna (Item 3.2.3), onde foi feito o isolamento dos produtos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parte I – Análise do óleo essencial de *Lippia gracilis*

O teor de óleo essencial extraído das folhas secas de genótipos de *L. gracilis* variou de 3,52 a 6,00% para os genótipos submetidos ao estresse hídrico e de 2,83 a 5,25% para os genótipos que não foram submetidos ao estresse hídrico (Tabela 14). A maior produção de óleo por parte dos genótipos com deficiência hídrica está de acordo com resultados encontrados por outros autores (MORAIS, 2009). Gouinguéné & Turlings (2002), ao avaliar o teor de umidade do solo e a umidade do ar na emissão de voláteis por espécies de milho, verificaram uma maior emissão ao cultivar as plantas em solo seco. *Ocimum basilicum*, sob estresse hídrico, apresenta menor rendimento de massa seca total, porém, o rendimento de seu óleo essencial é duas vezes maior nessa condição (SIMON et al., 1992).

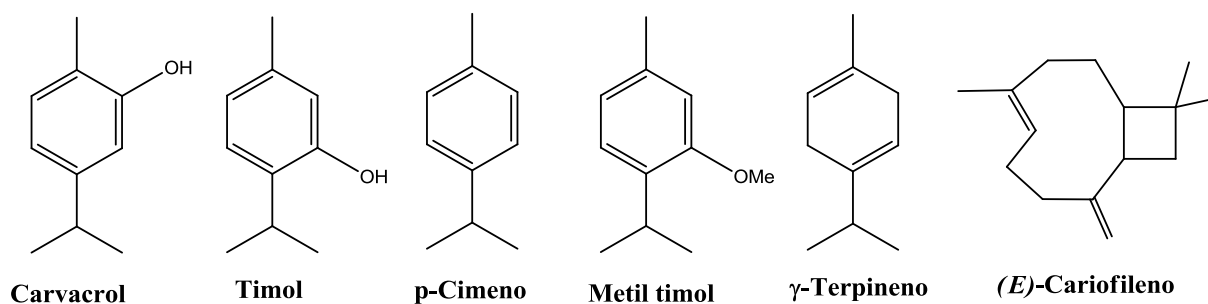
Tabela 14. Teor de óleo essencial extraído das folhas de *L. gracilis*

Genótipo	Teor (%)													
	106		107		108		109		110		201		202	
	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE	CE	SE
	3,52	3,17	4,21	3,67	4,63	4,13	3,83	2,83	3,83	2,83	5,40	5,25	6,00	3,50

4.1.1. Composição química

Foi analisado o óleo essencial extraído das folhas de sete genótipos de *L. gracilis* (106, 107, 108, 109, 110, 201 e 202) e verificado o efeito do estresse hídrico sobre o teor e composição química do óleo essencial dos genótipos. Para avaliar o efeito do estresse hídrico os genótipos foram divididos em dois grupos iguais (SE: sem estresse; CE: com estresse) e cultivados em condições idênticas, exceto pelo fato de que para um dos grupos (SE) foi fornecida água através de irrigação contínua por gotejamento durante todo o período de cultivo, enquanto o outro (CE), foi cultivado sem o fornecimento de água.

A análise por CG-EM do OE dos sete genótipos, em ambos os grupos, permitiu identificar um total de 32 compostos com predominância de monoterpenos. Mais de 80% do OE da planta é constituído por carvacrol, timol, *p*-cimeno, metil timol, γ -terpineno e (*E*)-cariofileno (Figura 21; Tabela 15 e Tabela 16).

Figura 21. Estrutura química dos principais componentes do OE de *L. gracilis*

O genótipo 106 apresentou timol (CE: 57,7%; SE: 57,2%) como componente majoritário, enquanto os genótipos 107, 108, 109, 110, 201 e 202 possuem carvacrol (CE: 36,7–52,2%; SE: 36,–48,6%) como principal componente do óleo.

Tabela 15. Composição química do OE de genótipos de *L. gracilis* submetidos ao estresse hídrico

Nº	Composto	IR	IR lit.	Genótipo / Área relativa do pico (%; média de quatro repetições ± desvio padrão)						
				106	107	108	109	110	201	202
1	α -Tujeno	924	924	0,4±0,1	0,8±0,1	0,9±0,1	0,8±0,2	0,9±0,1	1,3±0,3	1,1±0,1
2	α -Pineno	931	932	0,2±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0	0,4±0,1	0,3±0,0
3	Canfeno	947	946	nd	nd	0,4±0,0	nd	nd	0,4±0,0	0,5±0,1
4	Sabineno	971	969	0,0±0,0	nd	0,1±0,1	nd	nd	0,2±0,0	nd
5	β -Pineno	975	974	0,1±0,1	nd	0,1±0,1	nd	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0
6	Mirceno	988	988	2,0±0,2	2,4±0,2	1,9±0,1	1,8±0,2	2,5±0,2	2,9±0,2	2,5±0,2
7	α -Felandreno	1005	1002	nd	0,2±0,0	nd	0,1±0,1	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,1
8	α -Terpineno	1016	1014	0,8±0,0	2,3±0,2	1,8±0,1	1,8±0,2	1,9±0,2	2,9±0,3	1,7±0,3
9	p-Cimeno	1023	1020	8,1±0,7	12,0±0,9	13,2±0,7	13,2±1,0	15,5±1,1	14,4±1,9	15,3±1,4
10	Limoneno	1029	1024	0,4±0,0	0,3±0,0	0,5±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0	0,4±0,0
11	1,8-Cineol	1031	1026	5,4±0,6	1,2±0,1	3,1±0,2	nd	3,1±0,3	2,3±0,0	0,2±0,4
12	γ -Terpineno	1057	1054	3,4±0,2	14,3±1,1	9,3±0,7	9,8±0,9	9,8±0,9	20,1±1,7	8,9±1,3
13	Linalol	1099	1095	0,4±0,0	0,7±0,0	0,5±0,0	0,6±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,7±0,0
14	Cânfora	1146	1141	nd	nd	0,9±0,0	0,3±0,0	nd	nd	nd
15	Borneol	1171	1165	nd	nd	0,3±0,0	nd	nd	1,0±0,2	1,4±0,2
16	Terpinen-4-ol	1179	1174	0,7±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0
17	α -Terpineol	1194	1186	0,6±0,1	0,3±0,0	nd	nd	0,1±0,1	0,3±0,0	nd
18	Metil timol	1228	1232	11,1±0,6	4,9±0,3	7,1±0,1	5,8±0,1	5,6±0,1	0,2±0,0	6,5±0,2
19	Metil Carvacrol	1237	1241	nd	nd	0,3±0,0	0,3±0,0	0,3±0,0	nd	0,1±0,1
20	Timol	1289	1289	57,7±1,7	5,0±0,1	3,4±0,1	2,6±0,5	3,0±0,1	5,5±0,6	3,6±0,4
21	Carvacrol	1298	1298	0,8±0,2	44,3±1,2	45,6±1,0	52,2±1,5	50,3±1,2	36,7±3,2	48,3±2,5
22	Acetato de Carvacroila	1363	1270	nd	nd	nd	0,5±0,1	nd	nd	0,5±0,1
23	(E)-Cariofileno	1418	1417	5,6±2,0	4,4±0,5	2,8±0,4	4,8±0,4	2,1±0,2	5,2±1,0	3,2±0,7
24	α -trans Bergamoteno	1432	1432	nd	0,1±0,10	nd	0,3±0,0	0,1±0,1	0,3±0,1	0,1±0,1
25	Aromadendreno	1436	1439	nd	0,1±0,1	0,2±0,2	0,2±0,0	Nd	0,1±0,1	0,1±0,1
26	α -Humuleno	1454	1452	0,3±0,2	0,6±0,1	0,7±0,1	0,3±0,0	0,1±0,1	0,4±0,1	0,3±0,1
27	Viridifloreno	1489	1496	nd	0,2±0,3	0,4±0,0	0,3±0,1	ND	0,2±0,2	0,2±0,3
28	Biciclogermacreno	1494	1500	0,1±0,1	1,3±0,2	1,5±0,3	0,5±0,0	0,1±0,1	1,1±0,3	0,6±0,2
29	β -Bisaboleno	1506	1505	nd	0,1±0,1	nd	0,3±0,0	0,1±0,1	0,1±0,1	nd
30	7- <i>epi</i> - α -Selineno	1517	1520	nd	0,5±0,1	nd	nd	nd	0,1±0,1	nd
31	Espatuleno	1576	1577	nd	0,6±0,1	1,0±0,2	0,5±0,1	0,3±0,0	0,6±0,1	0,6±0,1
32	Óxido de Cariofileno	1581	1582	1,3±0,3	0,7±0,1	0,7±0,1	1,0±0,1	0,8±0,1	0,9±0,2	1,0±0,1
<i>Hidrocarbonetos monoterpênicos</i>				15,5	32,5	28,4	27,7	31,6	43,3	30,8
<i>Monoterpenos oxigenados</i>				76,8	57,1	61,9	62,8	63,6	47,1	61,84
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>				6,0	7,1	5,7	6,7	2,5	7,4	4,6
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>				1,3	1,4	1,7	1,5	1,2	1,5	1,7
Total				99,6	98,1	97,7	98,7	98,9	99,3	98,9

nd = não detectado; IR = índice de retenção experimental calculado usando a equação de Van den Dool (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963); IR lit. = índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) calculado usando a equação de Van den Dool.

Tabela 16. Composição química do OE de genótipos de *L. gracilis* sem estresse hídrico

Nº	Composto	IR	IR lit.	Genótipo / Área relativa do pico (%; média de quatro repetições ± desvio padrão)						
				106	107	108	109	110	201	202
1	α -Tujeno	924	924	0,5±0,0	1,0±0,0	1,0±0,0	0,9±0,0	1,0±0,1	1,2±0,0	1,2±0,1
2	α -Pineno	931	932	0,3±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0	0,2±0,0	0,3±0,0	0,4±0,0	0,3±0,1
3	Canfeno	947	946	nd	nd	0,4±0,1	nd	nd	0,3±0,0	0,4±0,3
4	Sabineno	971	969	nd	nd	0,03±0,05	nd	nd	0,13±0,02	nd
5	β -Pineno	975	974	0,2±0,0	nd	0,2±0,0	nd	0,1±0,1	0,1±0,0	0,1±0,0
6	Mirceno	988	988	2,3±0,1	2,4±0,0	1,8±0,1	2,0±0,1	2,6±0,0	2,7±0,1	2,5±0,1
7	α -Felandreno	1005	1002	nd	0,2±0,0	nd	0,1±0,1	0,1±0,0	0,2±0,0	0,1±0,0
8	α -Terpineno	1016	1014	0,9±0,0	2,5±0,0	1,9±0,1	2,1±0,1	2,2±0,0	3,0±0,1	2,3±0,2
9	p-Cimeno	1023	1020	8,0±0,3	11,6±0,6	12,2±1,1	13,1±0,7	14,3±0,3	13,4±0,7	12,9±1,3
10	Limoneno	1029	1024	0,4±0,0	0,3±0,1	0,5±0,0	0,2±0,0	0,4±0,0	0,5±0,0	0,4±0,1
11	1,8-Cineol	1031	1026	4,9±0,3	0,8±0,0	3,0±0,2	Nd	2,9±0,8	1,9±0,2	0,2±0,4
12	γ -Terpineno	1057	1054	3,5±0,1	15,1±0,1	9,9±0,5	10,5±0,3	11,4±0,2	19,5±0,6	12,1±2,3
13	Linalol	1099	1095	0,4±0,0	0,5±0,0	0,2±0,2	0,6±0,0	0,5±0,0	0,5±0,0	0,6±0,0
14	Cânfora	1146	1141	nd	nd	0,9±0,2	0,1±0,1	nd	nd	nd
15	Borneol	1171	1165	nd	nd	0,3±0,0	nd	nd	0,8±0,0	1,1±0,7
16	Terpinen-4-ol	1179	1174	0,6±0,0	0,6±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0	0,8±0,1	0,7±0,0	0,3±0,4
17	α -Terpineol	1194	1186	0,5±0,1	nd	nd	nd	0,1±0,1	0,2±0,0	0,4±0,4
18	Metil timol	1228	1232	10,7±0,3	4,5±0,0	7,0±0,2	5,8±0,2	5,9±0,6	0,2±0,0	6,1±0,9
19	Metil Carvacrol	1237	1241	nd	nd	0,2±0,0	0,3±0,0	0,3±0,1	nd	nd
20	Timol	1289	1289	57,1±0,9	4,8±0,3	3,2±0,1	3,5±0,3	3,8±0,1	6,9±0,2	4,4±0,4
21	Carvacrol	1298	1298	0,6±0,2	43,3±0,3	44,4±0,8	48,6±1,2	46,5±2,0	36,2±0,7	44,6±1,2
22	Acetato de Carvacroila	1363	1270	nd	nd	nd	0,4±0,1	nd	nd	0,3±0,2
23	(E)-Cariofileno	1418	1417	7,3±0,6	5,3±0,2	3,8±0,4	4,9±0,1	3,1±0,4	5,7±0,9	4,1±0,8
24	α -trans Bergamoteno	1432	1432	nd	0,1±0,1	nd	0,3±0,0	0,1±0,1	0,3±0,1	0,1±0,1
25	Aromadendreno	1436	1439	nd	0,1±0,1	0,4±0,1	0,3±0,0	nd	0,2±0,0	0,1±0,1
26	α -Humuleno	1454	1452	0,4±0,0	0,7±0,0	1,0±0,1	0,2±0,1	0,2±0,0	0,5±0,1	0,4±0,2
27	Viridifloreno	1489	1496	nd	0,7±0,1	0,7±0,1	0,5±0,0	nd	0,5±0,1	0,5±0,1
28	Biciclogermacreno	1494	1500	nd	1,6±0,0	2,3±0,3	0,5±0,0	0,3±0,2	1,2±0,2	1,0±0,4
29	β -Bisaboleno	1506	1505	nd	nd	nd	0,3±0,0	0,1±0,1	0,1±0,1	0,1±0,1
30	7- <i>epi</i> - α -Selineno	1517	1520	Nd	0,5±0,0	nd	nd	nd	0,1±0,1	0,1±0,2
31	Espatuleno	1576	1577	nd	0,6±0,1	1,1±0,1	0,6±0,0	0,4±0,0	0,6±0,1	0,6±0,1
32	Óxido de Cariofileno	1581	1582	1,1±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1	1,1±0,1	0,8±0,1	1,0±0,1	0,8±0,1
<i>Hidrocarbonetos monoterpênicos</i>				16,1	33,3	28,3	29,1	32,6	41,5	32,2
<i>Monoterpenos oxigenados</i>				74,8	54,5	59,8	60,1	60,7	47,5	58,0
<i>Hidrocarbonetos sesquiterpênicos</i>				7,7	9,0	8,2	6,9	3,8	8,5	6,4
<i>Sesquiterpenos oxigenados</i>				1,1	1,2	1,8	1,7	1,2	1,5	1,4
Total				99,7	98,0	98,1	97,8	98,3	99,0	98,0

nd = não detectado; IR = índice de retenção experimental calculado usando a equação de Van den Dool (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963); IR lit. = índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007) calculado usando a equação de Van den Dool.

Diante de um grande número de dados, faz-se necessário utilizar um método de análise que proporcione melhor visualização e classificação do sistema amostral. A Análise de Agrupamentos engloba uma variedade de técnicas e algoritmos cujo objetivo é encontrar e separar objetos em grupos similares.

Na análise de agrupamento é necessário utilizar um método de ligação entre os genótipos. Dentre vários existentes na literatura, optou-se por utilizar o método de Ward (ROMESBURG, 1984) ou método pela variância mínima, sendo altamente eficiente, onde um grupo será reunido a outro se essa junção proporcionar o menor aumento da variância intragrupo.

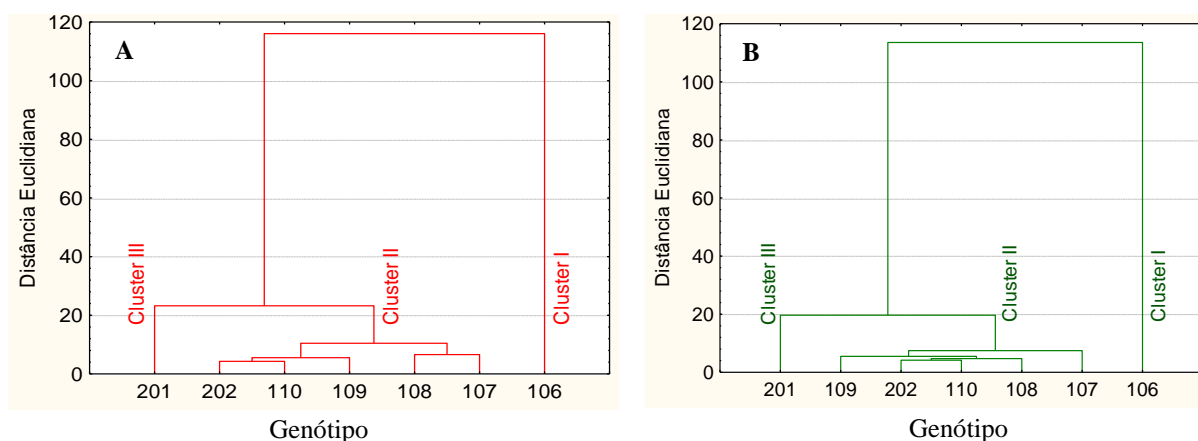
A análise de agrupamentos aplicada aos dados das Tabelas 15 e 16 gerou dendrogramas bastante similares (Figura 22) e verificou-se a formação de três grupos ou *clusters*. O *cluster I*, formado pelo genótipo 106, foi caracterizado pelo alto teor de timol (CE: 57,7%; SE: 57,2%) e metil timol (CE: 11,1%; SE: 10,7%). Nota-se também um baixo teor de carvacrol (CE: 0,85%; SE: 0,65), quando se tem percentual acima de 35% nos demais genótipos. O *cluster III*, genótipo 201, distingue-se principalmente por sua alta quantidade de γ -terpineno (CE: 20,1%; SE: 19,5%) e menor percentual de carvacrol (CE: 36,7%; SE: 36,2%) e, mais significativamente, de metil timol (CE: 0,3%, SE: 0,2%) em relação ao *cluster II*, que é formado por cinco genótipos que apresentam elevado conteúdo de carvacrol (107, 108, 109, 110, 202). A expressiva variação no teor timol e carvacrol do genótipo 106 frente aos demais, além da elevada distância euclidiana observada no dendrograma, caracteriza a presença de diferentes quimiotipos. O quimiotipo timol, genótipo 106, e o quimiotipo carvacrol, genótipos 107, 108, 109, 110, 201 e 202.

Entre os representantes do quimiotipo carvacrol, há certa dissimilaridade (ou distância euclidiana), a ponto de separar o genótipo 201 dos demais em diferentes *clusters*, principalmente devido a seu alto conteúdo de γ -terpineno como mencionando anteriormente, porém não é considerada aqui como significativa para caracterizar esse genótipo como um quimiotipo diferente. Definições para distinguir quimiotipos de uma espécie vegetal é motivo de discordância entre vários autores, não havendo na literatura um conceito preciso.

A confiabilidade dos dendrogramas obtidos em representar graficamente os dados analisados foi avaliada através do coeficiente de correlação cofenética (*cc*). Esse coeficiente pode variar de 0 a 1 e é calculado através da correlação entre os correspondentes elementos da matriz de similaridade original e da matriz cofenética (matriz de distância entre os pontos obtidos a partir do dendrogramas). As duas matrizes, obtidas a partir do software STATISTICA® 9.0 (2009), e os cálculos realizados podem ser visualizados em Anexo III.

Rao & Srinivas (2006) considera valores de coeficiente cofenético superiores a 0,80 como um alto indicativo de que o dendrograma não distorce a estrutura original dos dados. Rohlf & Fisher (1968) consideram valores maiores que 0,91 como muito bons. O *cc* para o dendrograma dos genótipos submetidos ao estresse hídrico (Figura 22A) foi de 0,996 (Anexo III), enquanto que para o dendrograma dos genótipos sem estresse (Figura 22B) foi de 0,998, considerados, dessa forma, excelentes e os dendogramas obtidos representativos para o sistema amostral.

Figura 22. Dendrograma representando a relação de similaridade da composição química do OE sete genótipos de *L. gracilis*. **A** – com estresse; **B** – sem estresse.



A análise de componentes principais (ACP) permite transformar um conjunto de variáveis originais, intercorrelacionadas, num novo conjunto de variáveis não correlacionadas, os componentes principais (CP1 e CP2). As Figuras 23 e 24 ilustram o gráfico de escores e a separação dos genótipos pelo componente principal primário e secundário.

O componente principal primário (CP1) representa 33,35 e 32,90% das informações totais, nas amostras CE e SE, respectivamente. Já o componente principal secundário (CP2) representa 22,15 e 24,70% das mesmas. Confirmando a formação dos *clusters* obtidos na análise de agrupamentos, o CP1 separa claramente o genótipo 106 (maior peso na região positiva do CP1) dos demais, tanto nas amostras CE (Figura 23B) como nas amostras SE (Figura 24B), assegurando a caracterização do genótipo 106 como um diferente quimiotipo.

Timol, composto majoritário no genótipo 106, relaciona-se positivamente ao CP1 (Figuras 23 A e 24A), apresentando coeficiente de correlação (*r*) igual a 0,91 (CE) e 0,96 (SE).

Dentre os compostos presentes em considerável conteúdo, além do timol, estão ligados positivamente, nas amostras CE e SE, ao CP1 1,8-cineol [*r* = 0,67 (CE); 0,78 (SE)], metil

timol [$r = 0,83$ (CE); $0,79$ (SE)] e (*E*)-cariofileno [$r = 0,36$ (CE); $0,61$ (SE)], em oposição, α -terpineno [$r = -0,86$ (CE); $-0,89$ (SE)], p-cimeno [$r = -0,81$ (CE); $-0,84$ (SE)] e carvacrol [$r = -0,80$ (CE); $-0,91$ (SE)] projetam-se negativamente ao CP1. Nenhum dos compostos que apresenta percentual maior que 2% na maior parte dos genótipos relacionam-se negativamente ao componente principal secundário (CP2), porém mirceno [$r = 0,72$ (CE); $0,48$ (SE)] está relacionado positivamente ao CP2 em todas as amostras e γ -terpineno projeta-se negativamente ao CP1, apresentado coeficiente de correlação $-0,78$ (CE) e $-0,83$ (SE).

Figura 23. Gráfico de escores para as amostras CE. **A** - Dispersão dos percentuais dos constituintes do OE de *L. gracilis* pelos CP1 e CP2. **B** - Separação dos genótipos pelos CP1 e CP2.

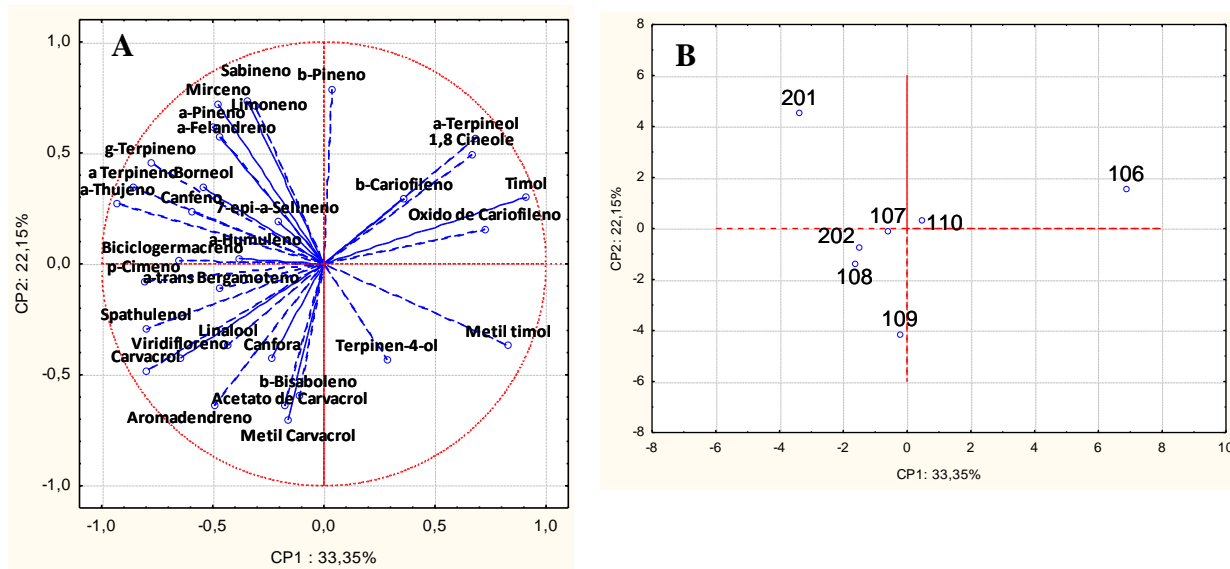
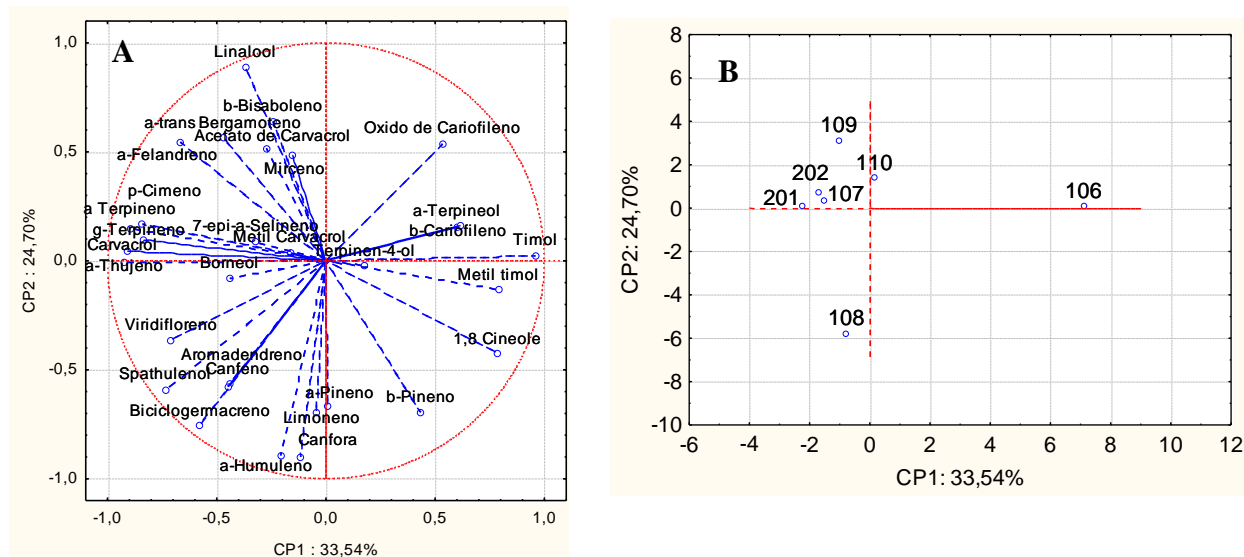


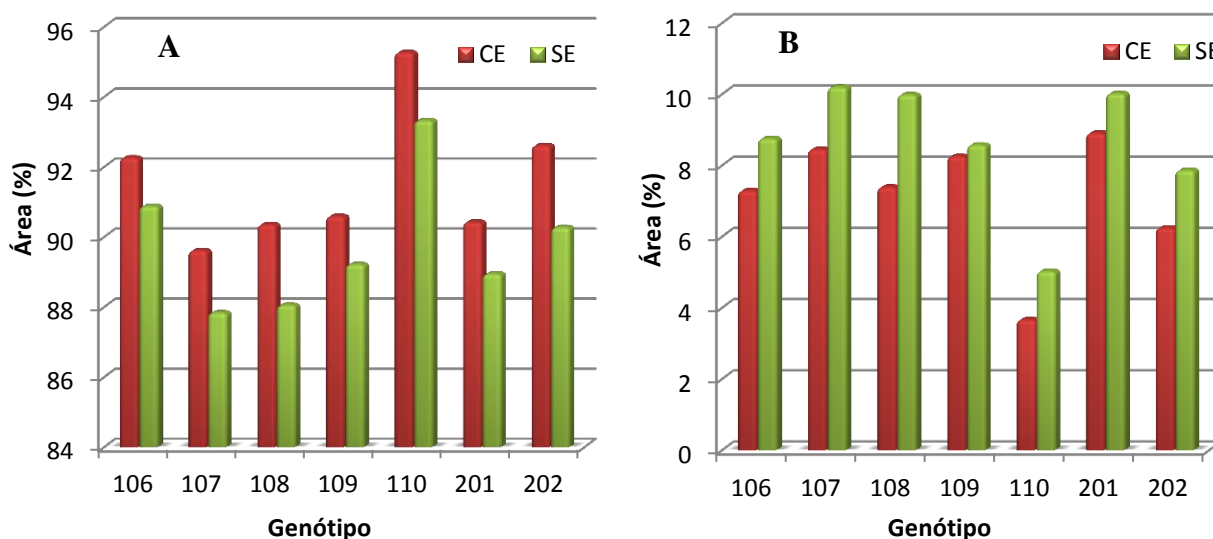
Figura 24. Gráfico de escores para as amostras SE. **A** - Dispersão dos percentuais dos constituintes do OE de *L. gracilis* pelos CP1 e CP2. **B** - Separação dos genótipos pelos CP1 e CP2.



Aparentemente não há distinção significativa ao comparar individualmente a composição química do OE dos genótipos que foram submetidos ao estresse hídrico (Tabela 15) com aqueles que não foram submetidos ao estresse hídrico (Tabela 16). Porém, ao analisar as classes dos componentes verifica-se que sua produção é influenciada pelo fator estudado. Todos os sete genótipos que foram submetidos ao estresse hídrico, embora possuam a mesma composição química que os genótipos não estressados, quantitativamente apresentaram maior conteúdo de monoterpenos e menor de sesquiterpenos (Figura 25). Estes resultados mostram que a espécie estudada, como resposta adaptativa a condição de estresse hídrico, favorece a produção de monoterpenos e/ou desfavorece a formação de sesquiterpenos.

Não há relatos na literatura do efeito do estresse hídrico sobre o teor e composição química do óleo essencial de *L. gracilis*. Dados para outras espécies, como *O. basilicum* (SIMON et al., 1992), demonstram redução no percentual de sesquiterpenos e aumento no percentual de monoterpenos em condições de deficiência hídrica, porém, o efeito do estresse hídrico no teor e composição química de óleos essenciais é particular para cada espécie, havendo respostas diferentes para espécies diferentes. *Mentha piperita*, por exemplo, produz uma quantidade maior de óleo essencial, quando as plantas da espécie são submetidas à irrigação (BERNÁTH, 1992). Já *Lippia alba*, produz menos óleo essencial em condições de abundância hídrica, como verificado por Nagao et al. (2004) ao avaliar o teor de óleo essencial da espécie durante as épocas seca e chuvosa.

Figura 25. Percentual de monoterpenos (A) e sesquiterpenos (B) no OE das folhas de *L. gracilis* nos dois experimentos.



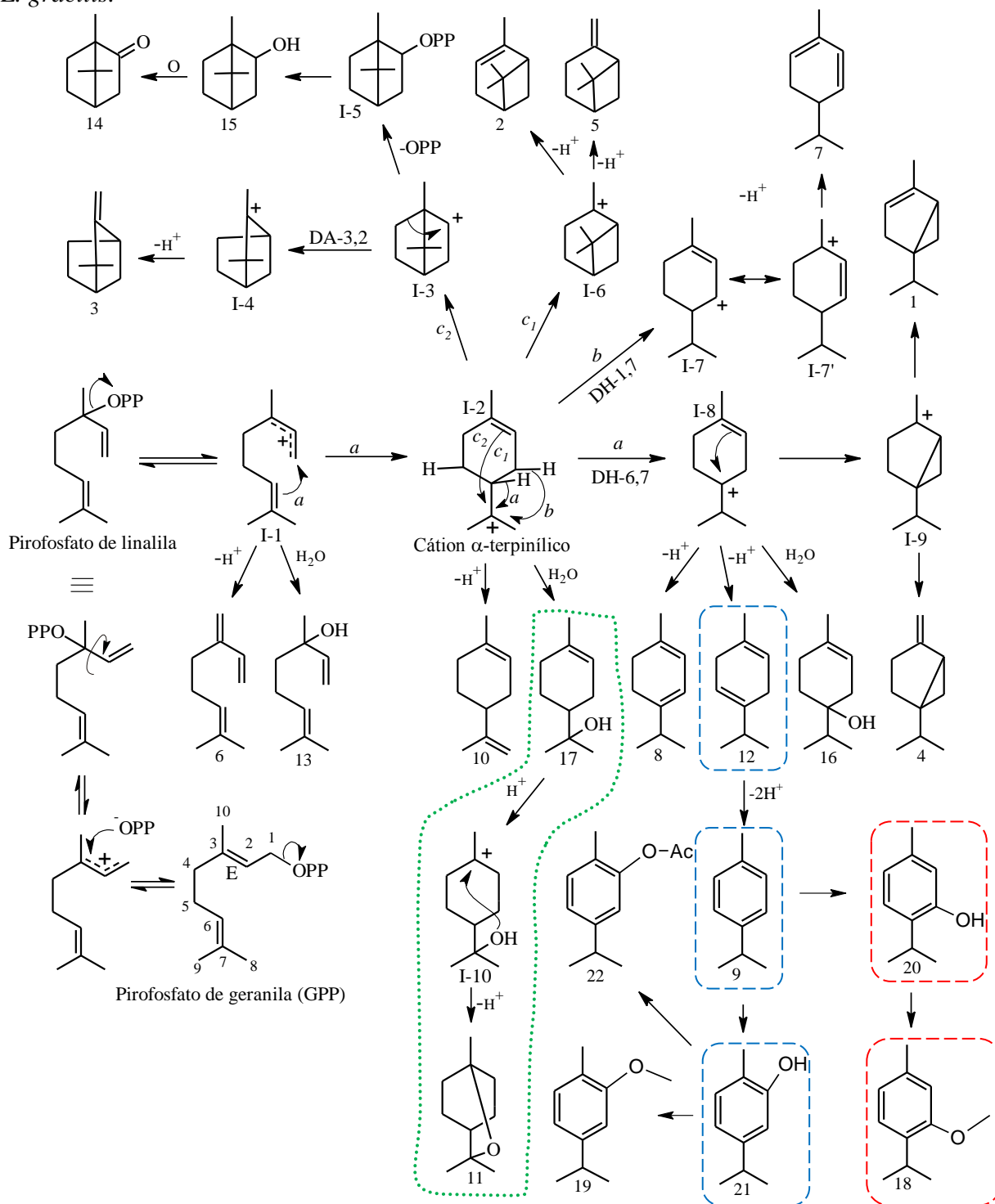
4.1.2. Biossíntese dos componentes do óleo essencial

O estudo de rotas metabólicas que dão origem aos terpenos não é recente. Há vários relatos na literatura propondo os possíveis caminhos de formação dos componentes dessa classe (KÖLLNER, 2004; DUDAREVA, 2004; CROTEAU, 1988). A rota de biossíntese dos mono e sesquiterpenos (Figuras 26 e 27) presentes no óleo essencial de *L. gracilis* foi elaborada com base nos dados disponíveis na literatura e algumas proposições. A numeração observada abaixo das estruturas dos compostos das Figuras 26 e 27 é relativa à numeração dos compostos das Tabelas 15 e 16.

Os monoterpenos são formados pela condensação do tipo cabeça-cauda de uma unidade de difosfato de dimetilalila (DMAPP) com uma unidade de difosfato de isopentenila (IPP) gerando o difosfato de geranila (GPP; Figura 5). O GPP ao sofrer nova condensação com o IPP dá origem ao difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (Figura 6; HAMPEL et al., 2005; DEWICK, 2009).

Após a formação do GPP, a biossíntese dos monoterpenos (Figura 26) tem início com a ionização e a isomerização do GPP a difosfato de linalila (LPP), posteriormente o grupo difosfato é liberado formando o cátion nerílico (I-1), uma ciclização entre o C1 e o C6 gera o cátion α -terpinílico (I-2), intermediário comum a todos os monoterpenos cíclicos. Após estas primeiras etapas, diferentes enzimas agem para produzir os diversos monoterpenos encontrados no óleo essencial da planta. A formação do LPP permite a rotação entre C2-C3 favorecendo uma conformação adequada à ciclização. (HYATT, 2005; CROTEAU, 2005; HYLEMON, 1999).

Figura 26. Rota proposta para a biossíntese dos monoterpênos presentes no OE das folhas de *L. gracilis*.



- Rota biossintética favorecida no genótipo 106;
- Rota biossintética favorecida nos genótipos 107, 108, 109, 110, 201, 202;
- Rota ausente no genótipo 109 e favorecida no 106.

I-n = Intermediário n

DA-x,y = Deslocamento de grupo Alquil do carbono x para o y

DH-x,y = Deslocamento de hidreto do carbono x para o y

O cátion nerílico (I-1) é desprotonado no C10 ou hidratado no C3 para gerar o mirceno (6) ou linalol (13), respectivamente. Através do ataque eletrofílico do C1 a dupla ligação entre C6-C7 ocorre uma ciclização e formação do intermediário bastante importante à biossíntese dos monoterpenos cíclicos, o cátion α -terpinílico (I-2). Este é desprotonado no C8 para dar origem ao limoneno (10).

Segundo Croteau et al. (1994), o α -terpineol (17) é o precursor do 1,8-cineol (11). Este primeiro é biossintetizado através da hidroxilação no C7 do I-2. Uma posterior protonação no C2 (I-10), seguida do ataque nucleofílico do oxigênio do grupo hidroxila ao carbono catiônico (C3) dá origem ao anel heterocíclico do 1,8-cineol.

O cátion α -terpinílico pode sofrer um deslocamento 6,7 de hidreto (rota *a*), ou rearranjo do tipo Wagner-Meerwein, para gerar o cátion terpinen-4-ílico (I-8). A hidroxilação no C6 ou desprotonação no C1 ou C5 do intermediário 8 fornece o terpinen-4-ol (16), α -terpineno (8) e γ -terpineno (12), respectivamente. Segundo Poulouise & Croteau (1978) o γ -terpineno assume um papel fundamental no processo de aromatização cujo produto é o p-cimeno (9). Merece destaque o elevado percentual de γ -terpineno no genótipo 201 (20,1%), que pode estar relacionado à alta atividade da enzima responsável pela produção do composto. A baixa atividade catalítica da enzima que converte p-cimeno em carvacrol (21), no genótipo 201, também pode estar relacionada ao elevado conteúdo de γ -terpineno. Como uma menor quantidade de p-cimeno é exigida para a conversão em carvacrol, ocorre o acúmulo de γ -terpineno, precursor desses dois monoterpenos aromáticos.

Espera-se que o principal componente do óleo essencial do genótipo 106, timol (20), seja formado a partir da hidroxilação do anel benzênico do p-cimeno no C1, enquanto a hidroxilação no C2 forneça o carvacrol (21), composto majoritário nos genótipos 107 a 202. O composto 20, ao sofrer uma metilação dá origem ao metil timol (18). Além do mesmo tipo de reação, que fornece o metil carvacrol (19), o composto 21, por meio de uma acetilação, é convertido em acetato de carvacroila (22), presente em baixo conteúdo nos genótipos 109 (0,5%) e 202 (0,5%).

O intermediário 8 pode, através de uma adição eletrofílica, formar um anel de três membros (I-9) que, ao perder um próton no C4 ou C10, leva a formação, do α -tujeno (1) e sabineno (4), respectivamente.

Quando o cátion α -terpinílico (I-2) sofre um deslocamento de hidreto do C1 para o C7 (rota *b*), forma-se o cátion felandrenílico (I-7) que, após o deslocamento da dupla para fornecer um intermediário mais estável (I-7'), perde um próton no C4 e origina o α -felandreno

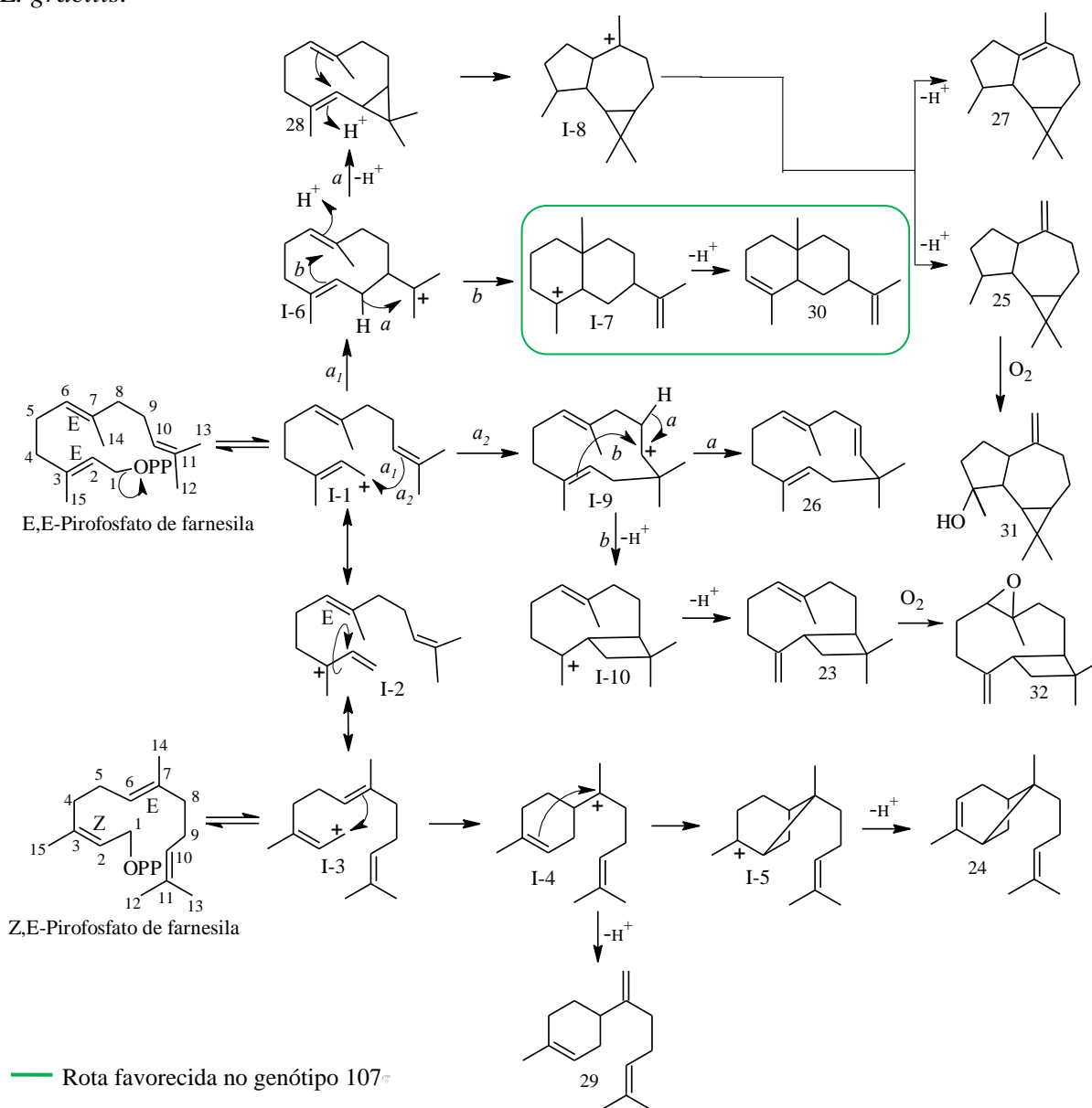
(7). O cátion α -terpinílico pode também, através de uma adição eletrofílica, formar um anel de quatro (rota c_1) e cinco membros (rota c_2).

Na rota c_1 , forma-se a ligação entre o C2 e o C7, dando origem ao anel de quatro membros do cátion pinílico (I-6), que ao ser desprotonado no C4 ou C10 dá origem, respectivamente, ao α -pineno (2) ou β -pineno (5). Quando o carbocátion secundário e o anel de cinco membros são gerados (rota c_2), por meio da ligação do C3 ao C7, forma-se o cátion bornílico (I-3), um posterior deslocamento do grupo alquil do C3 para o C2 gera o cátion isocanfílico (I-4) que, ao ser desprotonado no C10, fornece o canfeno (3). De acordo com Bohlmann et al. (1998) o difosfato de bornila (I-5) é formado a partir do cátion bornílico. Este primeiro é o substrato precursor do borneol (15), cuja oxidação, origina a cânfora (14) (CROTEAU, 1985).

O substrato precursor dos sesquiterpenos, difosfato de farnesila (FPP), é produzido a partir da condensação do GPP com o IPP (Figura 6; HAMPEL et al., 2005; DEWICK, 2009)

O FPP pode dar origem a sesquiterpenos lineares e cíclicos. Devido ao maior comprimento da cadeia e da adição de uma nova ligação dupla, o número de ciclizações possíveis é aumentado em comparação com o GPP, sendo que podem ser formadas uma grande variedade de estruturas mono, bi e tricíclicas (DEWICK, 2009).

Figura 27. Rota proposta para biossíntese dos sesquiterpenos presentes no OE das folhas de *L. gracilis*.



A dupla ligação entre C2-C3 do FPP pode adotar uma configuração *E* ou *Z*. A configuração *E* é observada no *E,E*-difosfato de farnesila, este é ionizado formando seu respectivo cátion (I-1) que, ao ser isomerizado ao cátion nerolidílico (I-2), possibilita a rotação da ligação entre C2-C3 e uma nova isomerização para dar origem ao cátion *Z,E*-farnesílico (I-3) e o estereoisômero com configuração *Z*, o *Z,E*-difosfato de farnesila (KÖLLNER, 2009; STEELE, 1998).

Segundo Köllner et al. (2009) a reação começa com a conversão do *E,E*-FPP no cátion *E,E*-farnesílico (I-1) através da ação de uma enzima que utiliza como cofator um íon

metálico. De acordo com Rynkiewicz et al. (2001), geralmente os íons divalentes Mg^{+2} ou Mn^{+2} estão envolvidos no processo.

Os elétrons da dupla ligação entre C10-C11 do cátion *E,E*-farnesílico pode ligar-se ao carbono catiônico em C1 formando um anel cíclico de dez (rota a_1) ou onze (rota a_2) membros. Na rota a_1 forma-se um carbocátion em C11 e uma ligação entre C10 e C1 dando origem ao cátion germacrílico (I-6; AGGER, 2009). Na rota a_2 , o C11 liga-se ao C1 formando o cátion humulílico (I-9; CANE, 1990).

O cátion germacrílico (I-6) formado é desprotonado no C1 e os elétrons da ligação atacam o carbono catiônico em C11 para gerar o biciclogermacreno (28; rota a). Este, após a protonação em C3 e formação da ligação entre o C6 e o C2, dá origem ao cátion gualílico (I-8), um intermediário triciclo que é desprotonado em C6 ou em C14 para formar viridifloreno (27) ou aromadendreno (25) que, ao ser hidroxilado no C3, fornece o espatulenol (31).

Outra provável rota que o cátion germacrílico segue é a desprotonação no C12, para formar uma dupla ligação entre C11-C12, e ciclização, originando o intermediário 7, que posteriormente é desprotonado no C4 e fornece o 7-*epi*- α -selineno (30).

A biossíntese do α -humuleno (26) se dá através da desprotonação no C9 (rota *a*) do cátion humulílico (I-9) para formar uma terceira ligação π no composto (DEWICK, 2009). De acordo com Cai et al. (2002) o cátion humulílico pode, através de uma adição eletrofílica (rota *b*), originar um anel ciclobutano do cátion cariofilílico (I-10), este conduz a formação do (*E*)-cariofileno (23) por meio da desprotonação do C15.

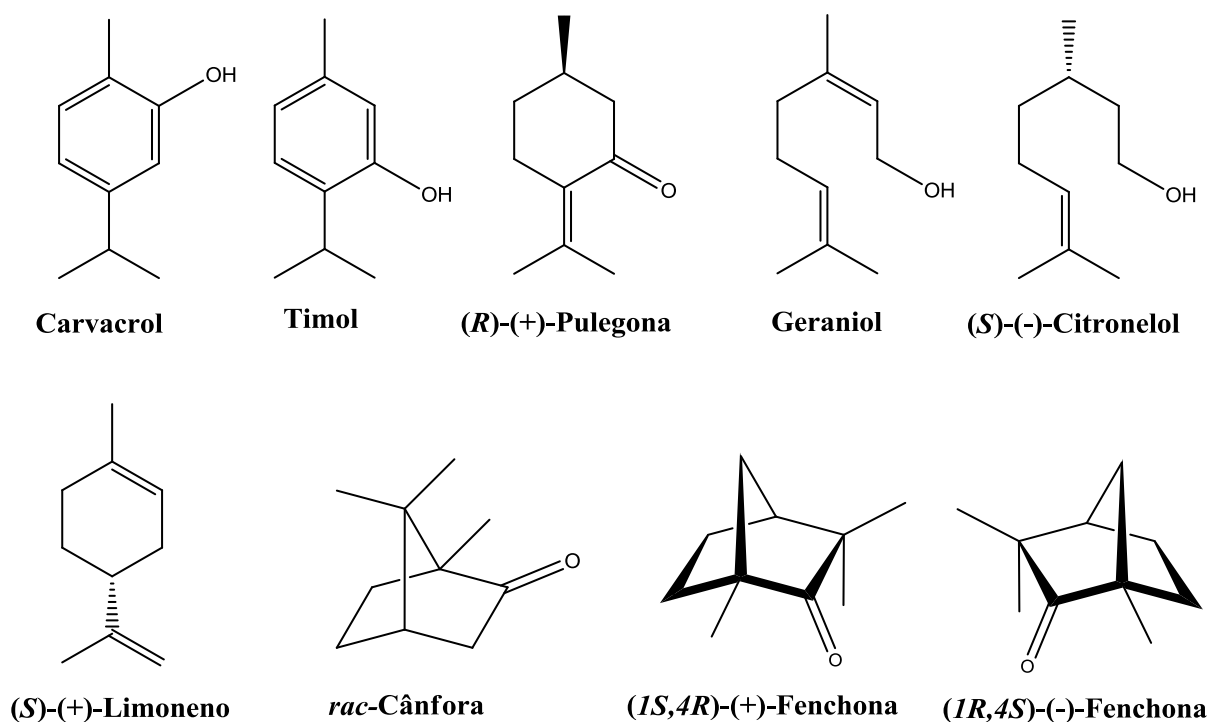
Após a ciclização do *Z,E*-difosfato de farnesila (I-3) forma-se o intermediário 4, que dá origem ao β -bisaboleno (29) e, a partir de uma nova ciclização (I-5) e posterior desprotonação, ao α -*trans*-bergamoteno (24).

Levando em consideração a pequena quantidade de óxido de cariofileno (32) no óleo essencial de *L. gracilis*, sugere-se que a presença do composto seja resultado da auto-oxidação do (*E*)-cariofileno através da sua exposição ao oxigênio do ar, como observado por Sköld et al. (2006).

4.2. Parte II – Reações de biotransformação

Foram testados nas reações de biotransformação, além dos principais componentes do OE de *L. gracilis*, carvacrol e timol, os monoterpênicos (+)-pulegona, geraniol, (-)-citronelol, (+)-limoneno, (+/-)-cânfora e o par de enantiômeros da fenchona (Figura 28) frente ao fungo *Botryosphaeria* sp., isolado da alga vermelha *Bostrychia radicans* (Figura 29A) pelo grupo de pesquisa da Profª Drª. Hosana Deboni (USP/Ribeirão Preto), e *Aspergillus niger*, obtido das folhas da mangabeira (*Hancornia speciosa*) pelo grupo de pesquisa do Prof. Dr. Geraldo Humberto (UFS/Campus de Itabaiana).

Figura 28. Estrutura química dos compostos usados nas reações de biotransformação.



4.2.1. Reações usando o fungo marinho *Botryosphaeria* sp.

A Figura 29B ilustra a espécie fúngica *Botryosphaeria* sp. desenvolvida em placa de Petri contendo meio sólido (25 mL de água do mar artificial, 0,5 g de extrato de malte e 0,5 g de ágar, pH 8,0). Após cinco dias de crescimento fez-se o inóculo em Erlenmeyer de 250 mL contendo meio líquido (100 mL de água do mar artificial e 2 g de extrato de malte) a partir da transferência de 0,5 cm² do meio sólido com a linhagem fúngica crescida. Após três dias verificou-se visualmente a formação de uma quantidade de massa miceliar significativa e 50

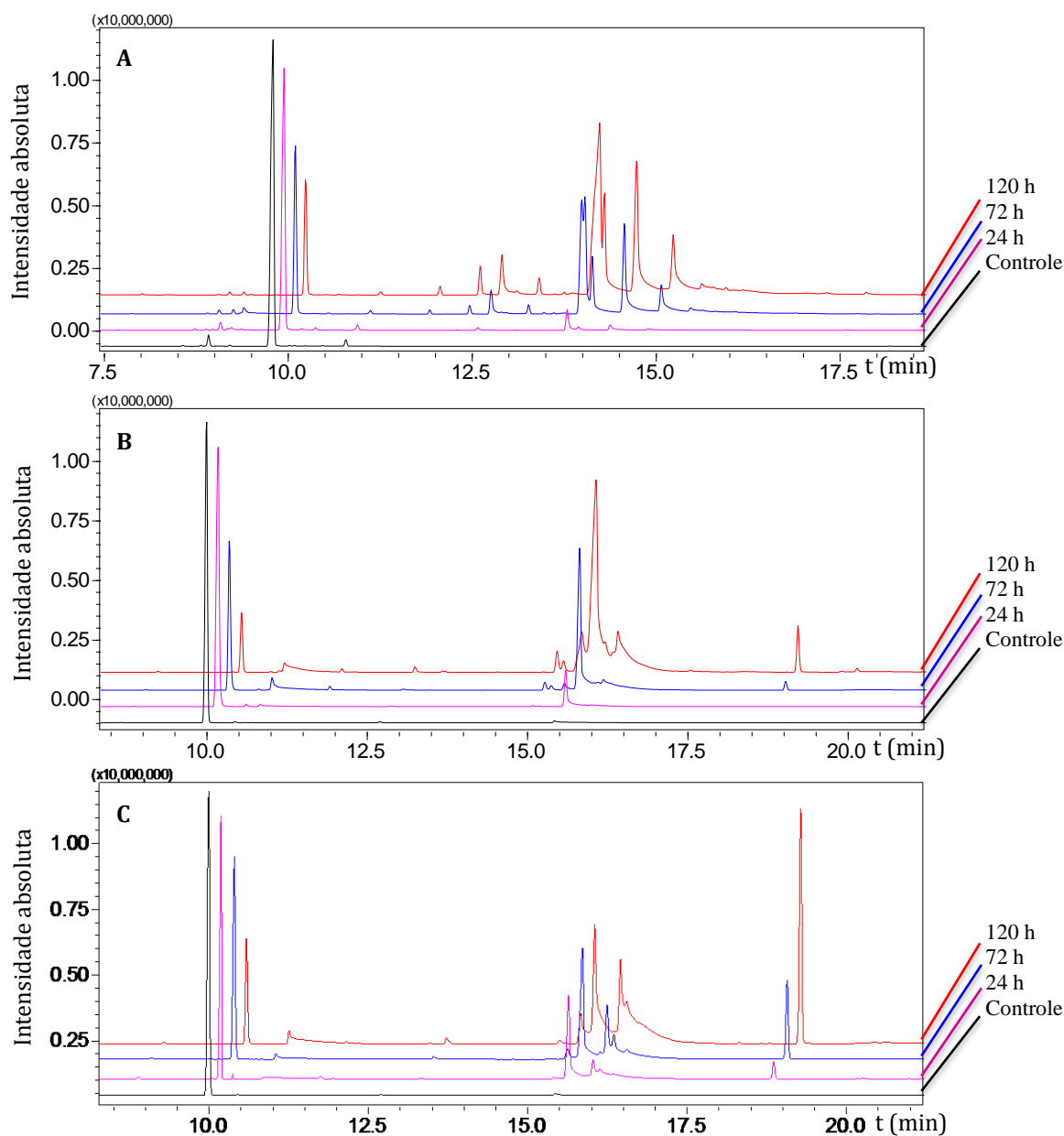
mg dos substratos (carvacrol, timol, (+)-pulegona, geraniol, (-)-citronelol, (+)-limoneno, *rac*-cânfora e os enantiômeros (+)- e (-)-fenchona) diluídos em 400 μ L de DMSO foram adicionados separadamente em Erlenmeyers.

Figura 29. Foto do fungo *Botryosphaeria* sp em placa de Patri



Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação rotativa (150 rpm; 32 °C) e o progresso reacional monitorado a partir da remoção periódica de alíquotas e análise por CG-EM. Apenas nas reações usando os substratos *rac*-cânfora, (-)- e (+)-fenchona verificou-se alterações no perfil cromatográfico, evidenciando a ocorrência da biotransformação. Essa alteração aconteceu até o tempo de 120h de reação, após esse período não foi observada diminuição da área do pico dos substratos e consequente formação de produtos. Dessa forma, 120h foi o tempo determinado como ideal para cessar a reação e realizar a extração dos produtos.

Figura 30. Cromatograma de íons totais (TIC) do controle e de alíquotas removidas após 24, 72 e 120 h de biotransformação por *Botryosphaeria* sp. usando os substratos cânfora (**A**), (-)-fenchona (**B**) e (+)-fenchona (**C**).



Alguns compostos sofrem uma ou diversas reações espontâneas, quando submetidos a determinadas condições, que às vezes são erroneamente associadas a conversões enzimáticas. Por exemplo, a formação de verbenol e/ou verbenona a partir de α -pineno é bem reportada na literatura como uma reação enzimática (ANTUNES, 2005), mas esse processo também pode ser obtido na ausência de um biocatalisador, pela oxidação espontânea do α -pineno.

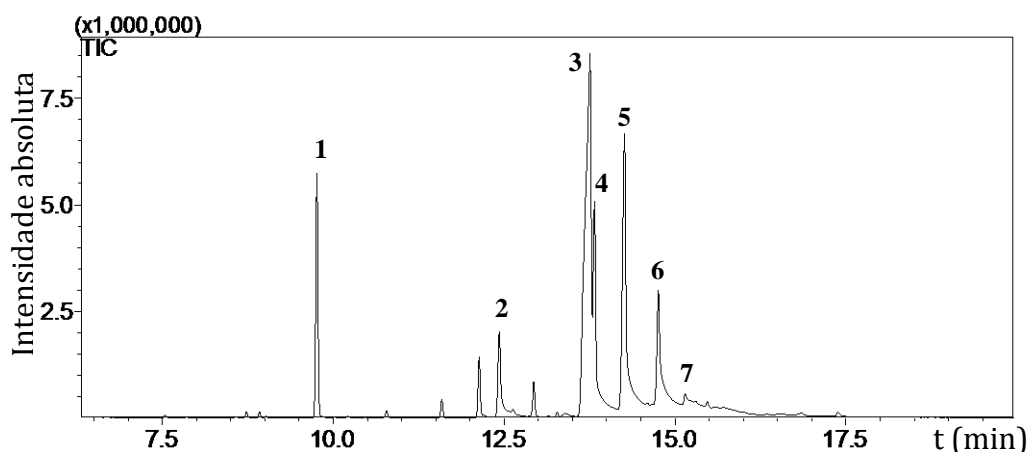
Os substratos usados neste trabalho foram adicionados ao meio de cultura na ausência dos fungos (controle; Figura 30) para avaliar sua estabilidade frente às condições reacionais do experimento. Tanto a cânfora, quanto os enantiômeros da fenchona, permaneceram

intactos ao longo do período monitorado, demonstrando que os picos observados no cromatograma das amostras contendo o biocatalisador são originados da conversão promovida por enzimas fúngicas. Alíquotas do meio com os fungos desenvolvidos e na ausência do substrato também foram analisadas por CG-EM, nenhum pico com área considerável foi observado, provavelmente, devido à pequena massa de metabólitos secundários produzida pelos fungos e ao baixo volume (2 mL) das alíquotas removidas.

4.2.1.1. Biotransformação da cânfora

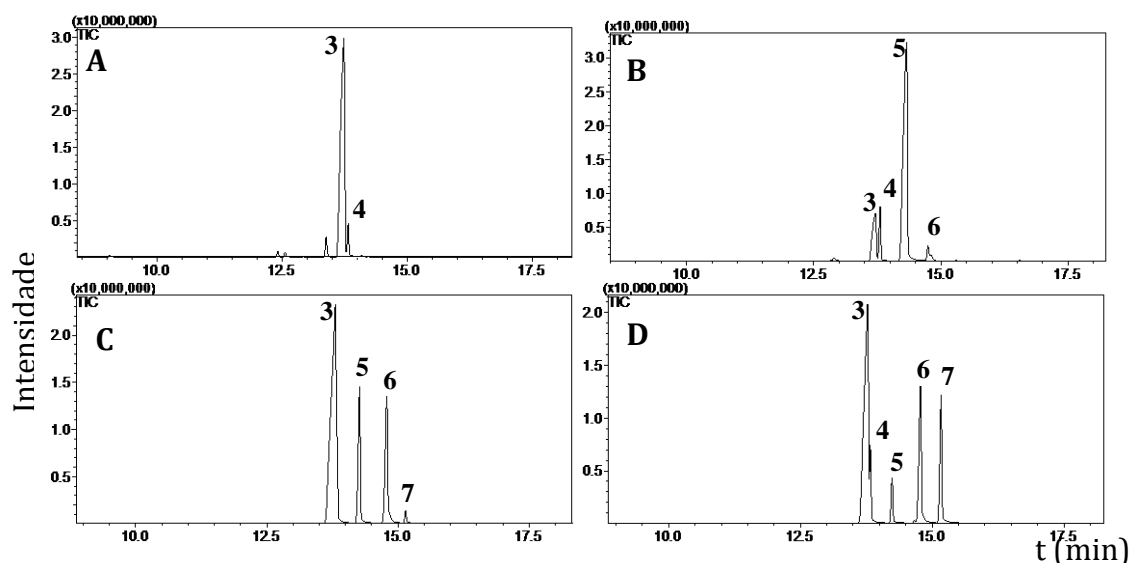
No cromatograma de íons totais (TIC) da biotransformação da cânfora (Figura 31), verificou-se a presença de seis picos (2-7) específicos com íon molecular (M^{+}) de razão massa/carga (m/z) 168, indicando a adição de um grupo hidroxila ao substrato (1) que apresenta M^{+} com valor de m/z 152.

Figura 31. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação da cânfora após cinco dias de incubação com o fungo *Botryosphaeria* sp



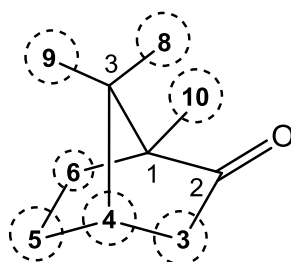
Através da técnica de cromatografia em coluna (CC), fez-se o isolamento dos produtos da reação. Os compostos **3** e **5** foram isolados com 81% e 75% de pureza (Figura 32A e B), respectivamente. Na fração C (Figura 32C), os compostos **6** e **7** foram obtidos como uma mistura, junto com os compostos 3 e 5. Uma quarta fração contendo a mistura de produtos foi obtida (Figura 32D), divergindo da fração ilustrada na Figura 32C pela presença da substância **4** e elevado conteúdo da **7**. Todas as frações obtidas apresentaram-se como um sólido branco após evaporação do solvente.

Figura 32. TIC de frações (A, B, C e D) após purificação por CC contendo produtos de biotransformação da cânfora



A identificação das posições onde os grupos hidroxila foram adicionados se deu através da análise, por RMN e CG-EM, das frações obtidas e comparação de seus respectivos espectros com aqueles presentes na literatura (MARCO et al., 1997; MIYAZAWA & MIYAMOTO, 2004). Há a possibilidade de ligação em dez sítios diferentes da cânfora (Figura 33), já que a hidroxilação nos carbonos **3**, **5** ou **6** pode ocorrer pela face inferior ou superior da molécula, fornecendo produtos *endo* ou *exo*, respectivamente.

Figura 33. Numeração dos carbonos da cânfora. Em destaque os possíveis sítios de hidroxilação



4.2.1.1.1. Análise das frações obtidas

- *Ressonância Magnética Nuclear*

A análise detalhada dos espectros de RMN de ^1H das frações na região de hidrogênios carbinólicos foi determinante para a identificação da posição em que os grupos hidroxila foram adicionados.

No espectro de RMN de ^1H da fração **A** (Anexo I, Figura 1) foi observado um sinal de duplo dubleto em δ_{H} 4,18 ($J = 8,0$ e $2,0$ Hz), que foi atribuído ao hidrogênio 6-*exo* da 6-*endo*-hidroxicânfora (3). Outros sinais característicos podem ser visualizados na Tabela 17.

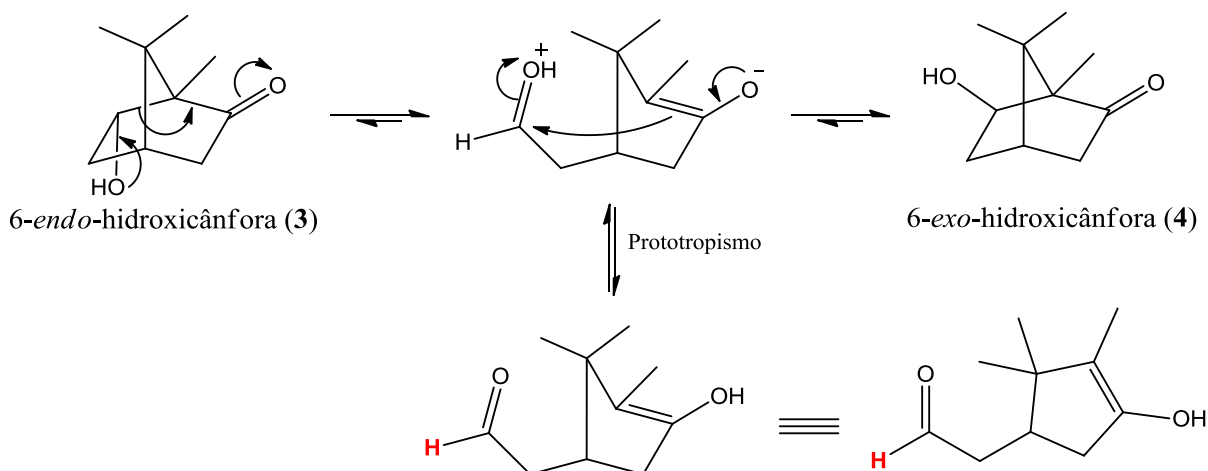
Tabela 17. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 6-*endo*-hidroxicânfora

Posição	Observado		MARCO et al. (1997)	
	δ_{H} <i>mult.</i>	(ppm) J (Hz)	δ_{H} (ppm) <i>mult.</i>	J (Hz)
3-endo	1,99 d	18,0	1,98 d	18,5
3-exo	2,35-2,48 m	-	2,43 ddd	18,5; 5,0 e 3,0
4	2,15 t (largo)	4,0	2,14 dd (largo)	5,0 e 4,5
5-endo	1,34 dd	14,0 e 2,0	1,33 dd	13,5 e 2,5
5-exo	2,50-2,61 m	-	2,54 dddd	13,5; 10; 4,5 e 3,0
6-exo	4,18 dd	8,0 e 2,0	4,16 dd (largo)	10,0 e 2,5
8 e 10	0,98 s (6H)	-	0,96 s (6H)	-
9	0,83 s (3H)	-	0,82 s (3H)	-

s = singleto; d = dubleto; dd = duplo dubleto; ddd = duplo duplo dubleto; dddd = duplo duplo duplo dubleto; t = tripleto; m = multipeto

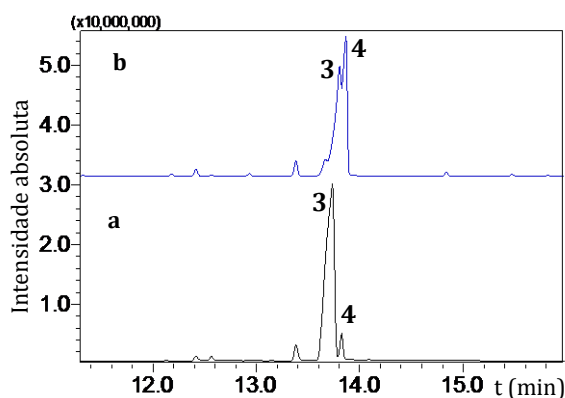
O sinal em δ_{H} 9,86 no espectro da fração **A** certamente não é atribuído a nenhum hidrogênio da molécula. Acredita-se que seja proveniente de um intermediário aldeído formado quando a amostra majoritariamente formada pela 6-*endo*-hidroxicânfora é solubilizada e deixada em repouso em clorofórmio deuterado. De acordo com Grogan et al. (2002) o composto sofre uma epimerização através de uma reação retro-aldeído evidenciada pelo sinal no RMN de ^1H em 9,82 ppm. Na Figura 34 é sugerido o mecanismo de isomerização de 6-*endo* a 6-*exo*-hidroxicânfora e formação do aldeído responsável pelo sinal em δ_{H} 9,86.

Figura 34. Provável epimerização ocorrida quando a 6-*endo*-hidroxicanfora é deixada em repouso em CDCl_3 . Destacado em vermelho hidrogênio atribuído ao sinal em δ_{H} 9,86.



A análise por CG-EM da amostra após a diluição e repouso em CDCl_3 (Figura 35) comprovou a ocorrência de uma epimerização. Foi observada alteração no perfil cromatográfico, com aumento significativo da área correspondente ao pico 4 e consequente diminuição da área do pico 3. A maior estabilidade do diastereoisômero *exo* (4) explica o deslocamento do equilíbrio para formação do mesmo.

Figura 35. TIC da fração A antes (a) e após diluição (b) e repouso em CDCl_3 (azul)



A fração B, composta majoritariamente pela substância 5 (75%), apresentou, em seu espectro de RMN de ^1H (Anexo I, Figura 2), na região de hidrogênios carbinólicos, sinal de duplo dubleto em δ_{H} 4,02 ppm que foi atribuído ao hidrogênio 5-*endo* da 5-*exo*-hidroxicanfora (5). As constantes de acoplamento (J) de 6,0 e 4,0 Hz para o dubleto indicam uma relação *endo-endo*, entre os H-5 e H-6 desta orientação, e *endo-exo*, entre o H-5*endo* e H-6*exo*, respectivamente. Um segundo sinal de baixa intensidade na mesma região (m, δ_{H}

4,10-4,21) foi relacionado a 6-*endo*-hidroxicanfóra (**3**), segundo maior componente em proporção na fração (15%). A Tabela 18 mostra os demais sinais.

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 5-*exo*-hidroxicanfóra

Posição	Observado			MIYAZAWA & MIYAMOTO (2004)		
	δ_{H} mult.	(ppm)	J (Hz)	δ_{H} mult.	(ppm)	J (Hz)
3-endo	1,70 d		18	1,70 d		18,5
3-exo	2,34 dd		18 e 6	2,33 dd		18,5 e 5
4	2,16 d		6	2,16 dd		5 e 1
5-endo	4,02 dd		6 e 4	4,02 dd		7,5 e 3,5
6-endo	1,85 m		-	1,85 dd		14 e 7,5
6-exo	1,81 m		-	1,79 ddd		14; 3,5 e 1
8	0,85 s (3H)		-	0,85 s (3H)		-
9	1,25 s (3H)		-	1,25 s (3H)		-
10	0,93 s (3H)		-	0,93 s (3H)		-

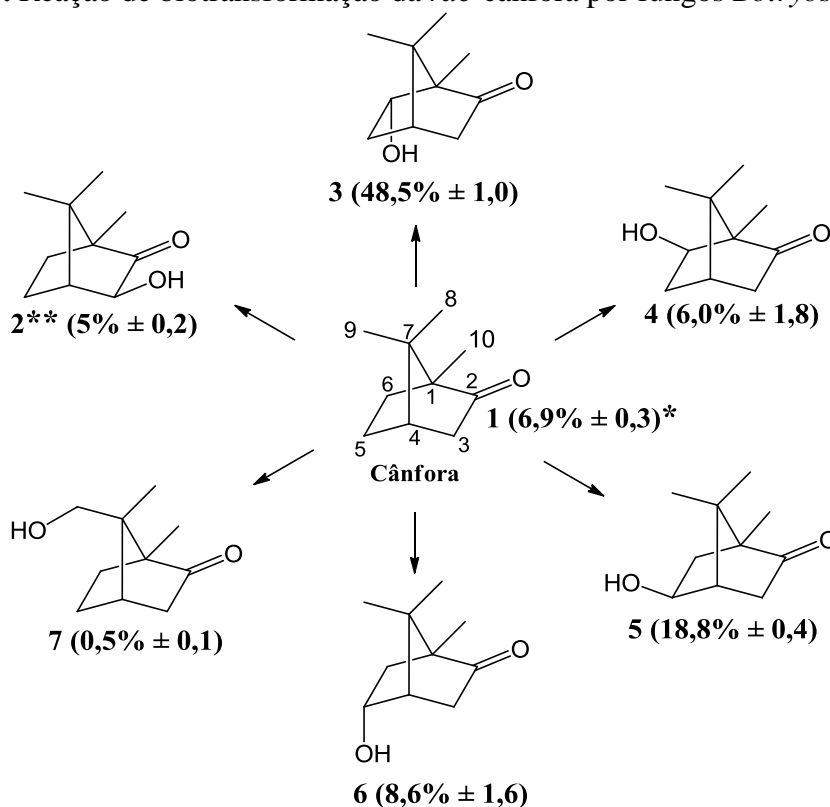
O espectro de RMN de ^1H da fração **C** revelou a presença de três grupos de sinais característicos de hidrogênios carbinólicos (Anexo I, Figura 3). O mais intenso, em δ_{H} 4,18 ppm (dd, $J = 10$ e 2 Hz), referente ao H-6*exo* da 6-*endo*-hidroxicanfóra (**3**), o de intensidade intermediária, em δ_{H} 4,02 (dd, $J = 6$ e 4 Hz), relativo ao H-5*endo* da 5-*exo*-hidroxicanfóra (**5**) e o terceiro sinal, um multiplete em δ_{H} 4,58-4,66 ppm, foi atribuído ao H-5*exo* da 5-*endo*-hidroxicanfóra, o que está de acordo com os dados obtidos por Miyazawa & Miyamoto (2004). Segundo os pesquisadores, a 5-*endo*-hidroxicanfóra apresenta um dddd centrado em δ_{H} 4,64 ($J = 9,5$, 4,5, 4,0 e 2,0 Hz).

Na análise da fração **D**, além dos sinais já observados anteriormente para os produtos de hidroxilação nas posições 6-*endo* (δ_{H} 4,18 ppm, dd, $J = 10$ e 2 Hz), 5-*exo* (δ_{H} 4,02 ppm, dd, $J = 6,5$ e 4 Hz) e 5-*endo* (4,58-4,664 ppm, m), verificou-se a presença de dois dubletos em 3,50 ppm (d, $J = 12$ Hz) e 3,74 ppm (d, $J = 12$ Hz), habitualmente designados como efeito de telhado, que foram atribuídos aos dois hidrogênios carbinólicos diastereotópicos da 9-hidroxicanfóra (**7**; Anexo I, Figura 4). Miyazawa & Miyamoto (2004) atribuíram sinais em 3,52 ppm (d, $J = 11,0$ Hz) e 3,74 ppm (d, $J = 11,0$ Hz) aos hidrogênios do C-9 da 9-hidroxicanfóra.

O composto representado pelo pico **2** (Figura 31) não foi isolado, acredita-se que seja um produto de hidroxilação na posição 3-*exo*, porém não há uma confirmação concreta.

A Figura 36 ilustra a estrutura dos compostos obtidos na biotransformação da cânfora por fungos *Botryosphaeria* sp. O produto de hidroxilação na posição 6-*endo* foi o componente majoritário da ração ($48,5\% \pm 1,0$), seguido pela 5-*exo*-hidroxicânfora ($18,8\% \pm 0,4$). Miyazawa & Miyamoto (2004), usando larvas de *Spodoptera litura*, observaram a hidroxilação da cânfora em três diferentes posições (5-*endo*, 5-*exo* e 9), sendo o produto 5-*endo*-hidroxicânfora formado preferencialmente.

Figura 36. Reação de biotransformação da *rac*-cânfora por fungos *Botryosphaeria* sp.

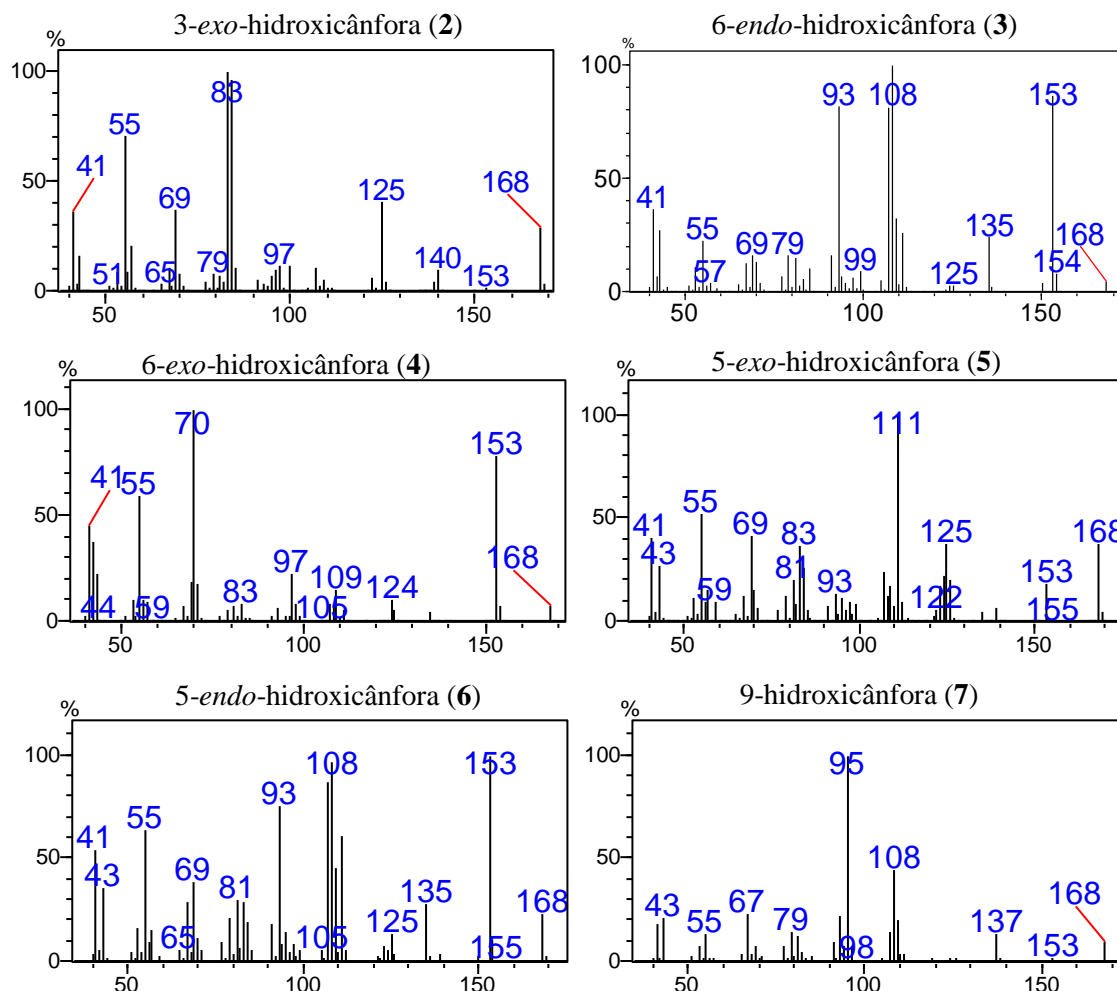


*Pico [área normalizada do pico (%)]; ** O composto não foi isolado, sua estrutura foi proposta com base em seu espectro de massas

Os produtos de hidroxilação nas posições 3-*exo*, 6-*endo*, 6-*exo*, 5-*exo*, 5-*endo* e 9 apresentaram valores para o índice de retenção experimental de 1280, 1359, 1362, 1383, 1406 e 1430, respectivamente. Não há na literatura índices de retenção publicados para os compostos.

- *Espectrometria de massas*

Figura 37. Espectros de massas dos produtos de hidroxilação da cânfora



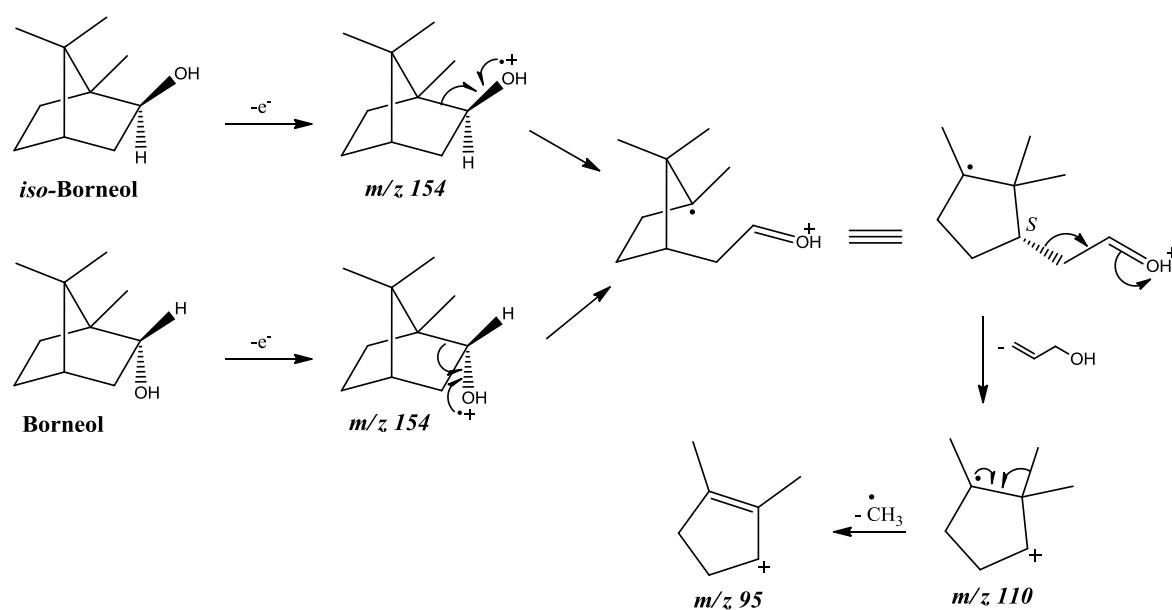
É sabido que os elétrons que são removidos na etapa inicial do processo de ionização para dá origem ao íon molecular (M^{+}) são aqueles localizados em orbitais moleculares de maior energia potencial. Assim, é mais fácil remover um elétron de um orbital não-ligante (n) do que tirar um elétron de um orbital π . Da mesma forma, é muito mais fácil remover um elétron de um orbital π em comparação com um orbital σ (PAVIA, et al., 2008)

Seguindo esse princípio, acredita-se que o M^{+} para os produtos de hidroxilação da cânfora, sejam formados a partir da remoção de um elétron do orbital molecular n do oxigênio da carbonila e/ou do oxigênio da hidroxila.

Os pares de diastereoisômeros de estrutura bicíclica borneol (hidroxila na posição *endo*) e *iso*-borneol (hidroxila na posição *exo*), *endo*- e *exo*-fenchol, *cis* e *trans*-hidrato de pineno, *cis* e *trans*-pinocarveol, *cis* e *trans*-mirtanol, 2-etil-*endo* e 2-etil-*exo*-fenchol, *neoiso*-

verbenol e verbenol, *neo-verbenol* e *iso-verbenol*, *cis* e *trans*-pineno, pinocanfeol e *iso*-pinocanfeol, além de vários outros, apresentam espectros de massas idênticos (como pode ser observado em Anexo IV). Isso acontece porque, na etapa inicial de fragmentação desses compostos, ocorre a quebra do sistema bicíclico e, em consequência, forma-se a mesma espécie catiônica (Figura 38).

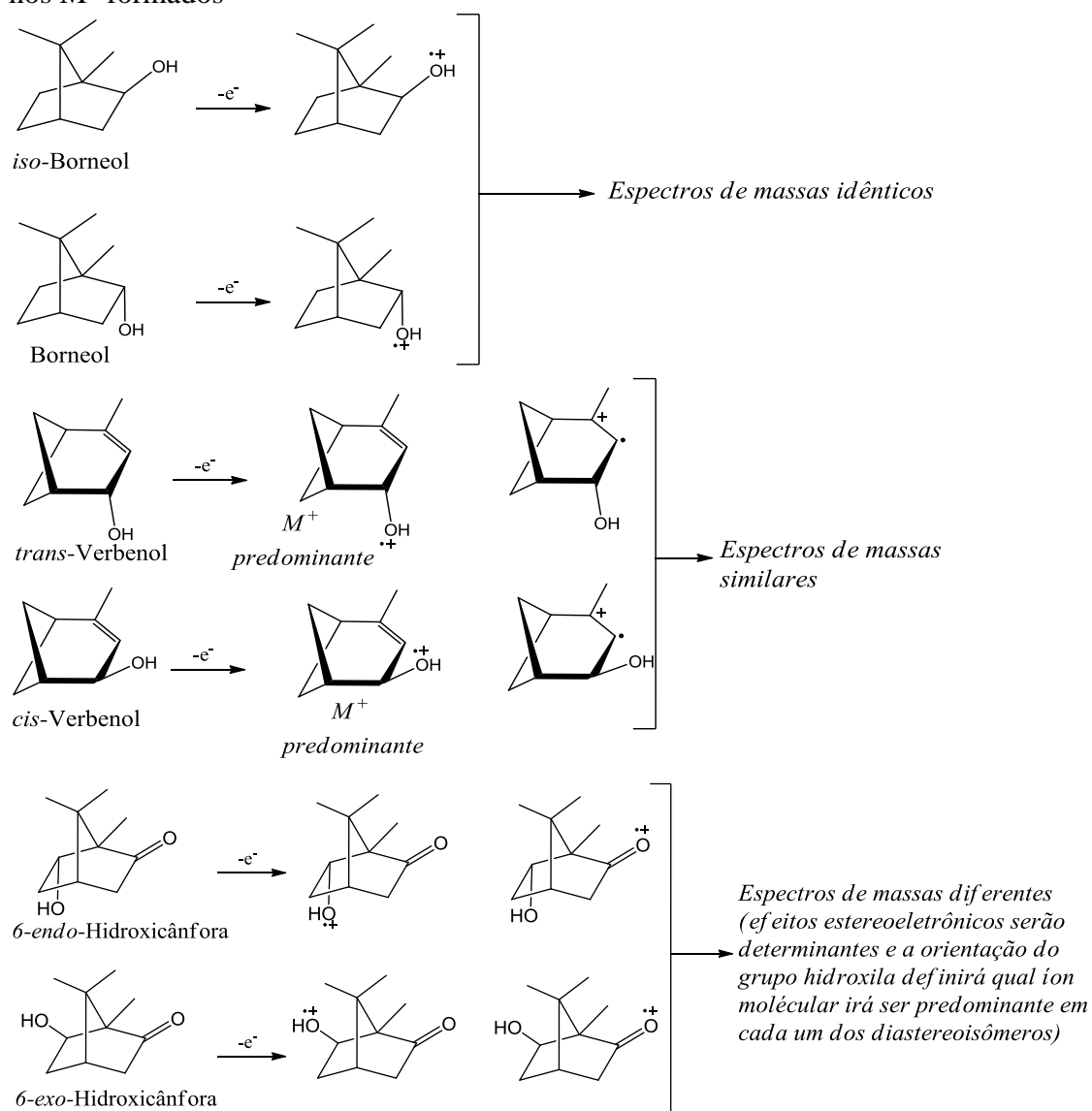
Figura 38. Proposta de fragmentação por EM do par de diastereoisômeros *iso*-borneol e borneol.



Assim como acontece com os pares de diastereoisômeros de estrutura bicíclicas citados anteriormente, seria esperado que os pares de diastereoisômeros formados na reação de biotransformação da cânfora (*5endo* e *5exo*-hidroxicânfora e *6endo* e *6exo*-hidroxicânfora) apresentassem espectros de massas muito similares, com no mínimo, os principais fragmentos em comum. Isso não foi observado. Sugere-se que a divergência entre os espectros de massas dos diastereoisômeros *exo* e *endo* é resultado da formação preferencial de diferentes íons moleculares ($M^{+\bullet}$). As hidroxicânforas possuem, cada uma, dois oxigênios. Os principais fragmentos de massas podem ser formados a partir do $M^{+\bullet}$ gerado pela ejeção de um elétron não-ligante do oxigênio da hidroxila ou a partir da ejeção de um elétron não-ligante do oxigênio da carbonila ou até mesmo de uma mistura de ambos $M^{+\bullet}$. Para que seja formado espectros de massas significativamente distintos, como observado para os pares de diastereoisômeros das hidroxicânforas, é necessário que o íon molecular predominante para o composto *exo* seja diferente daquele predominante para o com orientação *endo*.

O mesmo acontece com o *cis* e o *trans*-verbenol (Anexo IV), como pode haver dois íons moleculares distintos (a partir da ejeção de um elétron do oxigênio da hidroxila e a partir da ejeção de um elétron π da dupla ligação), seus espectros de massas não são idênticos. Porém são similares, porque o íon molecular gerado da remoção de um elétron da hidroxila é preferencialmente formado em ambos isômeros. Para os diastereoisômeros das hidroxicânforas, o elétron removido na formação de qualquer um dos íons moleculares preferenciais é de mesma natureza (elétron não ligante de um oxigênio), logo, deve ser exigido uma quantidade similar de energia para remover um ou outro elétron, seja ele da carbonila ou da hidroxila, e a orientação espacial dos grupamentos hidroxila exercerá um influência significativa para o íon molecular que será formado e, conseqüentemente, os isômeros *endo* e *exo* terão espectros de massas bastante distintos.

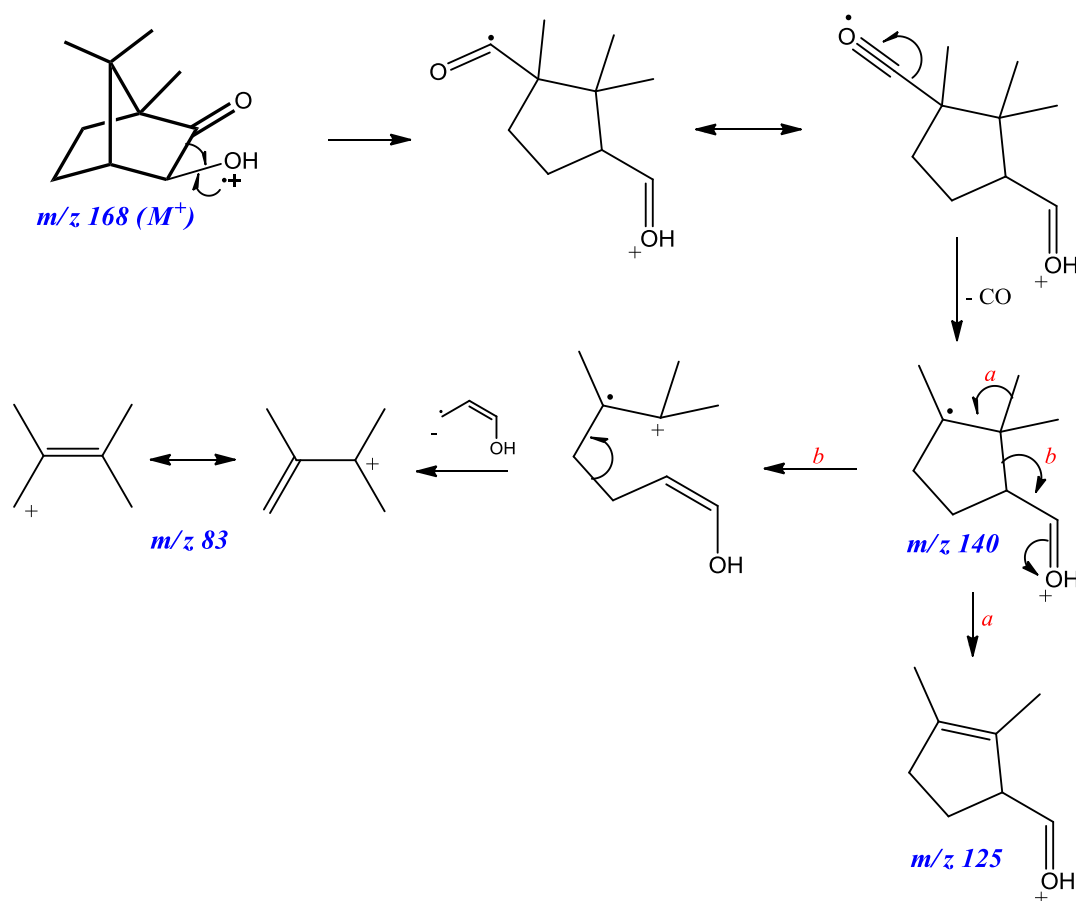
Figura 39. Semelhança entre espectros de massas de diastereoisômeros bicíclicos com base nos M^+ formados



Em todos os espectros de massas dos produtos de hidroxilação da cânfora identificados, foi observado o $M^{+\bullet}$ de razão m/z 168 e o pico gerado pela eliminação de um radical metila ($M^{+\bullet} - \bullet\text{CH}_3$; m/z 153). As Figuras 40, 41, 42 e 43 mostram a proposta de fragmentação para a 3-*exo*, 5-*exo*, 5-*endo* e 9-hidroxicânfora, respectivamente.

Na fragmentação da 3-*exo*-hidroxicânfora, após a quebra do anel bicíclico, ocorre eliminação de CO e formação do fragmento m/z 140, a posterior eliminação de um radical metila fornece o cátion de razão m/z 125 (rota *a*) e a clivagem heterolítica do anel de cinco membros (rota *b*) leva ao fragmento do pico base de m/z 83.

Figura 40. Proposta de fragmentação por EM para a 3-*exo*-hidroxicânfora.



A rota de fragmentação proposta para a 5-*exo*-hidroxicânfora tem início com uma clivagem homolítica do anel bicíclico. A partir daí sugere-se dois caminhos, conforme Figura 30.

Na rota *a*, ocorre uma cisão heterolítica, dando origem a um enol que fornece os íons de m/z 153, através da perda de um radical metila, 83, por meio da liberação de $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{O}$, e 126, quando elimina $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$. Este último fragmento (m/z 126) sofre um rearranjo para

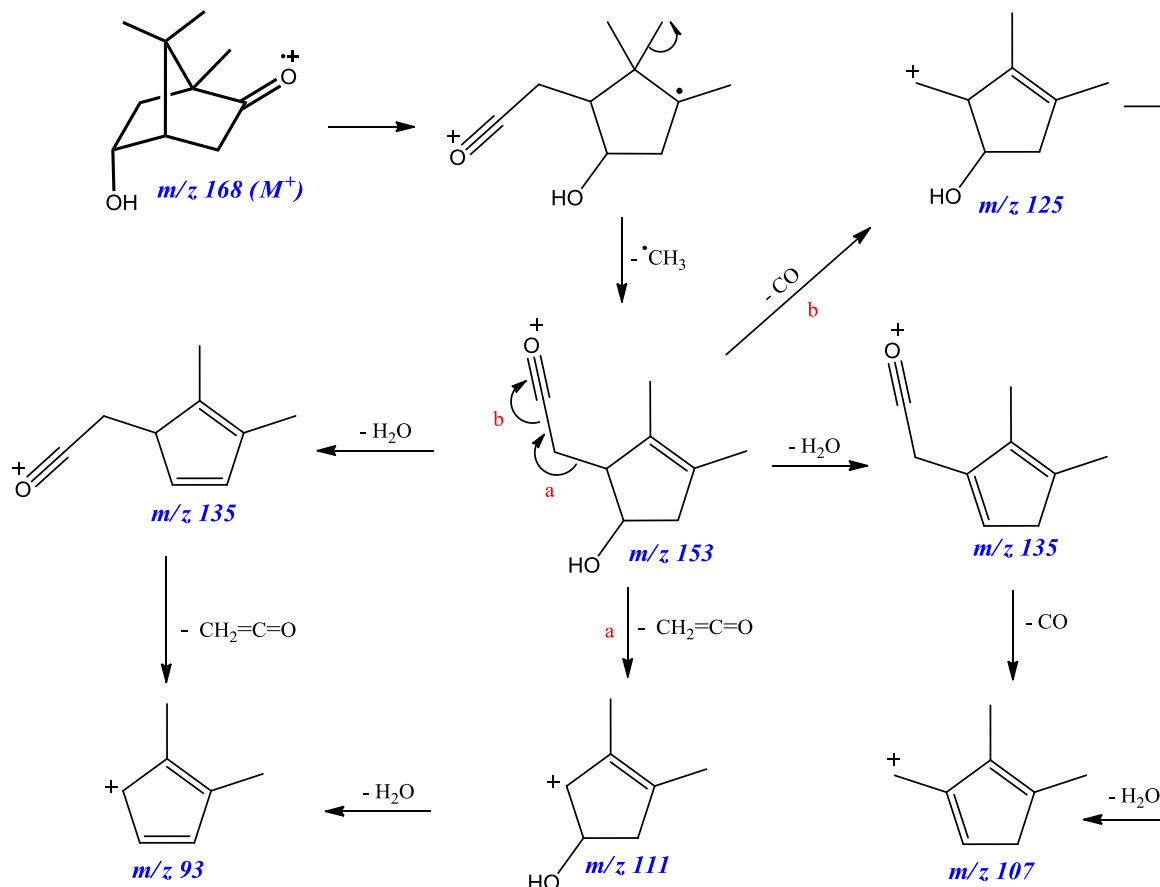
fornecer um carbocátion mais estável e, em sequência, perde CH_3 radicalar, gerando o íon de razão m/z 111.

Na rota *b*, há uma clivagem do anel ciclopropil, originando o íon que dá origem ao fragmento de m/z 139, após a perda de HCO^\cdot , e ao fragmento de razão m/z 126. Este íon, além de sofrer um rearranjo, através da migração de um grupo alquila (MA), seguido de perda de hidrogênio radicalar para fornecer o m/z 125, pode, ao liberar um radical metila ou um grupo $^\cdot\text{CH}=\text{CH}-\text{OH}$, gerar os fragmentos de m/z 111 ou 83, respectivamente.

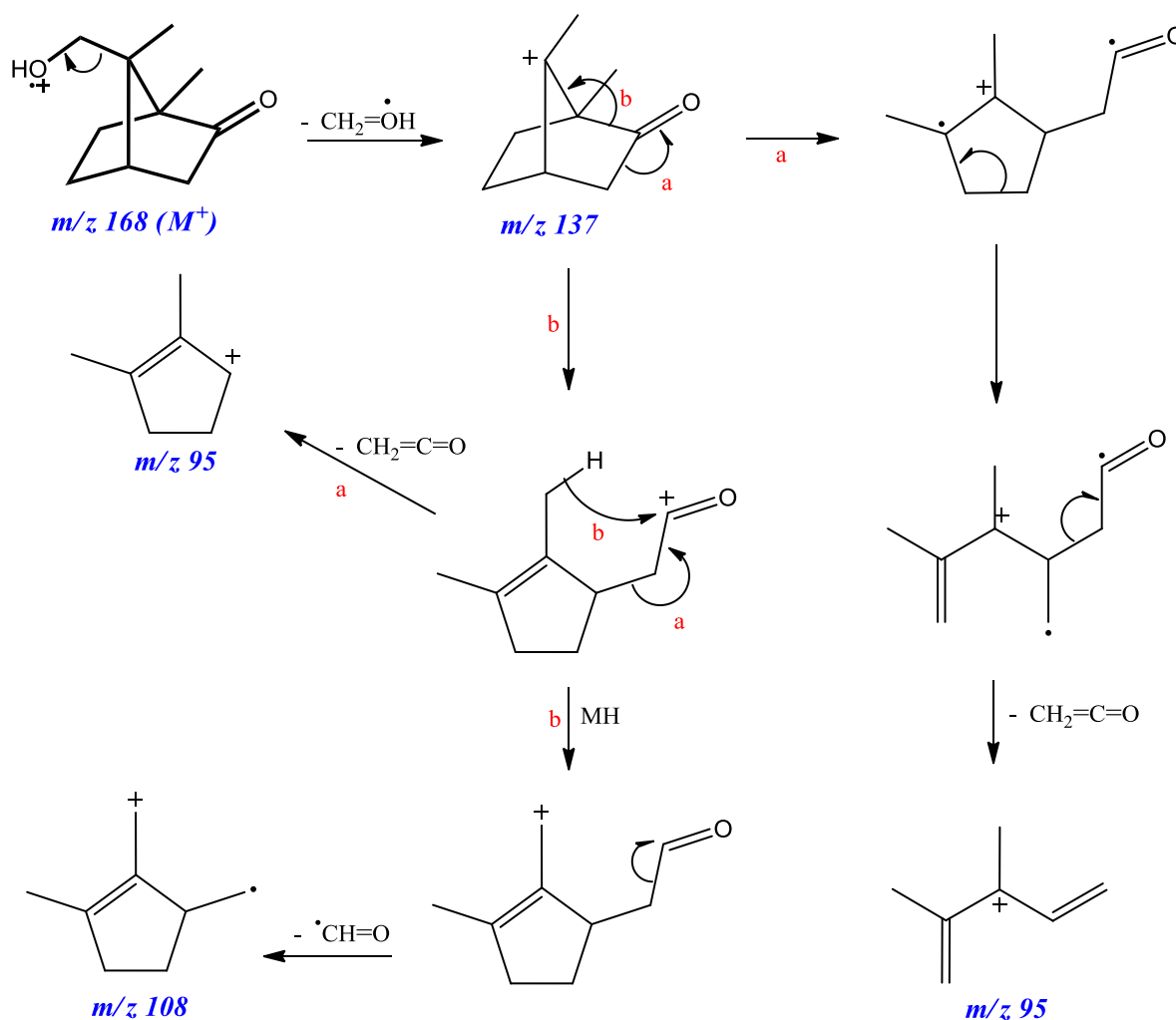
O pico base (m/z 111), formado por duas rotas distintas, é estabilizado pela deslocalização eletrônica proporcionada por dois sistemas π conjugados e por um par de elétrons não-ligantes do oxigênio.

ligação mais estável, trissubstituída, que fornece o intenso fragmento de m/z 107 após eliminação de CO. O íon de razão m/z 153 também pode liberar $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ (rota *a*) para originar o fragmento de m/z 111 ou eliminar CO para fornecer o cátion de m/z 125 (rota *b*).

Figura 42. Proposta de fragmentação por EM para a 5-*endo*-hidroxicânfora.



Na fragmentação da 9-hidroxicânfora foi proposto que os principais íons são derivados do cátion de m/z 137 formado pela perda inicial de 31 Da através da eliminação de um radical $\text{CH}_2=\text{OH}$, dando origem ao íon de m/z 137. Este, após uma clivagem hemolítica de ligação (rota *a*) e posterior eliminação de $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$, leva ao íon de m/z 95 (pico base). Outro caminho (rota *b*), através de uma cisão heterolítica, além de também levar a um fragmento de razão m/z 95, fornece o fragmento de m/z 108 após uma migração de hidreto (MH) e perda de $\cdot\text{CH}=\text{O}$.

Figura 43. Proposta de fragmentação por EM para a 9-hidroxicânfora.

A Tabela 19 ilustra os fragmentos de massas e sua abundância relativa para os produtos de hidroxilação da cânfora em comparação com os dados existentes na literatura para os compostos. Não foram encontradas informações espectrais de massas para a 6-*exo*-hidroxicânfora.

Tabela 19. Dados de EM para os produtos de hidroxilação da cânfora

9-Hidroxicânfora							
Observado				Miyazawa & Miyamoto (2004)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	7	91	8	168	9	91	10
153	1	79	11	153	1	79	15
137	14	67	19	137	12	67	22
109	17	55	5	109	18	55	16
108	37	43	15	108	37	43	27
95	100			95	100		

Continuação da Tabela 19.

6- <i>endo</i> -Hidroxicânfora							
Observado				Marco et al. (1997)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	5	108	100	168	8	108	100
153	86	107	82	153	62	107	96
135	24	93	82	135	16	93	84
111	26	81	15	111	38	81	34
109	33	69	17	109	46	69	37

5- <i>exo</i> -Hidroxicânfora							
Observado				Miyazawa & Miyamoto (2004)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	34	107	19	168	36	107	23
153	13	93	9	153	15	93	11
150	1	83	34	150	2	83	37
135	3	69	43	135	3	69	48
125	34	55	45	125	38	55	53
111	100	41	37	111	100	41	66
109	15			109	22		

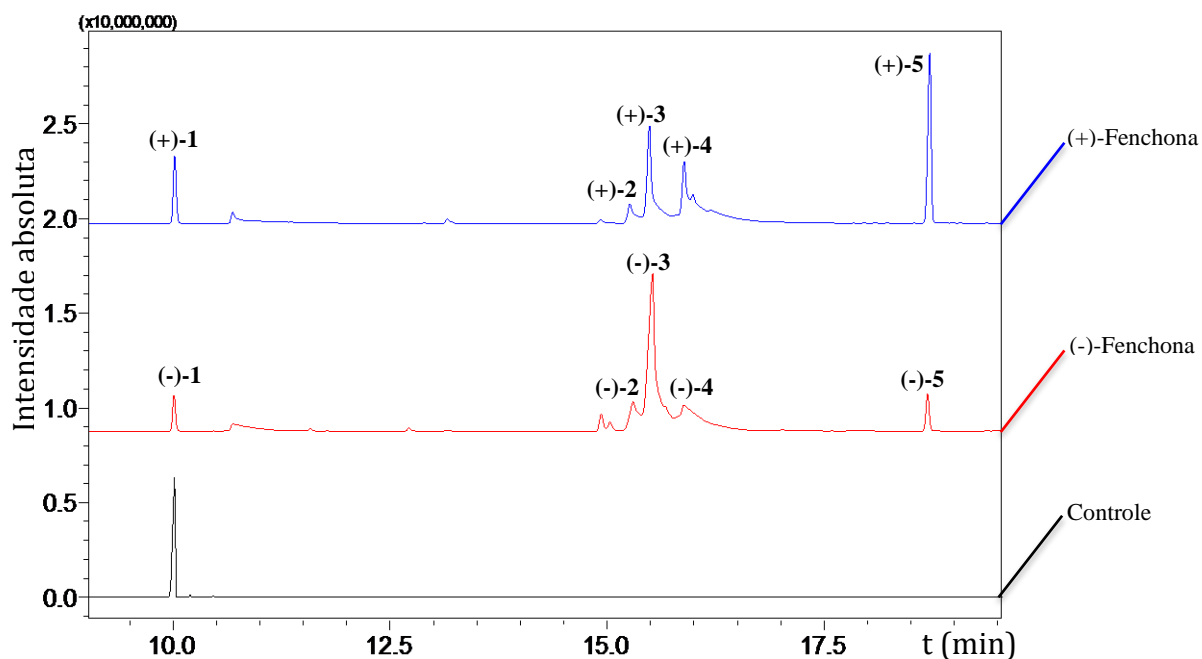
5- <i>endo</i> -Hidroxicânfora							
Observado				Miyazawa & Miyamoto (2004)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	23	108	86	168	21	108	87
153	100	107	76	153	100	107	83
150	4	93	58	150	2	93	62
135	27	83	24	135	15	83	30
125	13	81	24	125	15	81	29
111	61	69	34	111	68	69	47
109	44	57	10	109	42	57	19

3- <i>exo</i> -Hidroxicânfora							
Observado				Xu & Lu (2002)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	30	100	10	168	54	100	12
153	3	83	100	153	3	83	100
140	9	69	36	140	12	69	23
125	40	55	70	125	32	55	25
107	11	53	9	107	7	53	4

4.2.1.2. Biotransformação da (+)- e (-)-fenchona

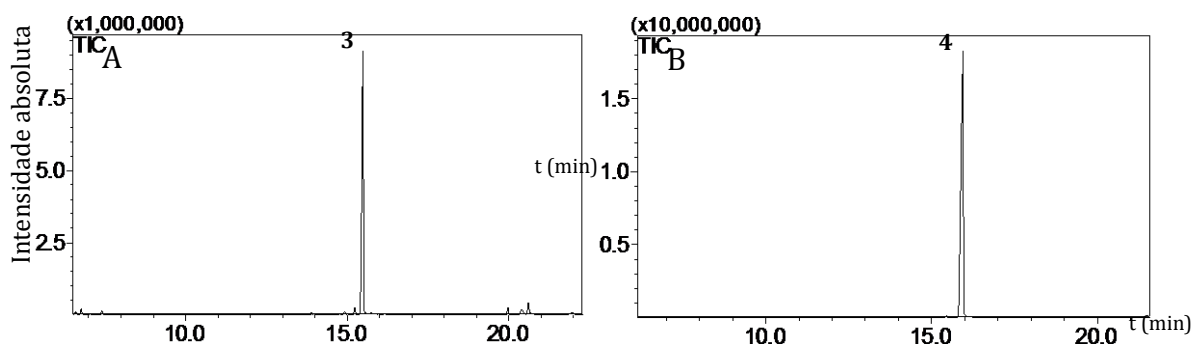
Semelhante à cânfora, a reação com os isômeros dextrogiro [(+)] e levogiro [(-)] da fenchona (**1**; M^+ : m/z 152) apresentou picos (**2-4**) com fragmentos de massas de m/z 168 (M^+) que foram atribuídos a produtos de hidroxilação do substrato. Também foi observado um pico (**5**) de maior retenção na coluna cromatográfica, com M^+ de baixa intensidade de razão m/z 210, atribuído a um produto de acetilação enzimática da fenchona hidroxilada (Figura 44).

Figura 44. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona após cinco dias de incubação com o fungo *Botryosphaeria* sp



O isolamento dos produtos da reação, por CC, resultou na obtenção de frações contendo as substâncias **3** e **4**, como ilustrado na Figura 45. O composto representado pelo pico **3** foi obtido com 83% de pureza, enquanto o **4** foi isolado com 99% de pureza. Devido a baixa massa do composto **2** não foi possível isolá-los. O composto **5** também não foi obtido após purificação por CC, acredita-se que o mesmo tenha sofrido decomposição na sílica gel.

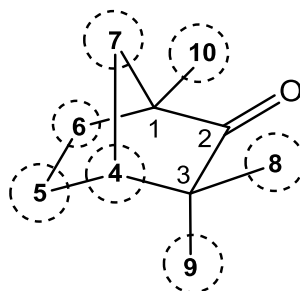
Figura 45. TIC de frações (A e B), após purificação por CC, contendo produtos de biotransformação da (+)-fenchona



Os compostos **3** e **4** foram identificados por espectroscopia de RMN e espectrometria de massas, enquanto o produto **2** teve sua estrutura elucidada pela comparação de seu espectro de massas com espectro presente na literatura (MIYAZAWA & GYOUBU, 2007).

A Figura 46 mostra os possíveis sítios de hidroxilação da fenchona. Nas posições 5 e 6, o grupo OH pode ser adicionado pela face superior (produto *exo*) ou inferior (produto *endo*) da molécula.

Figura 46. Numeração dos carbonos da fenchona. Em destaque os possíveis sítios de hidroxilação.



4.2.1.2.1. Análise das frações

Os espectros de RMN e de massas são representativos para ambos enantiômeros da molécula, já que as técnicas de aquisição não diferenciam os mesmos.

- *Ressonância Magnética Nuclear*

O espectro de RMN de ^1H da fração **A** (Anexo II, Figura 1) apresentou um multipletto na região de hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,60-3,65 ppm, que foi atribuído ao H6-*endo* da 6-*exo*-hidroxifenchona. Devido ao sistema rígido, livre de rotação, são observados dois sinais distintos para hidrogênios ligados ao C-7. O primeiro, multipletto em δ_{H} 1,73-1,79 ppm, é atribuído ao hidrogênio voltado para os carbonos 2 e 3, e o segundo, que aparece em campo mais baixo (m, δ_{H} 1,87-1,93 ppm) devido ao efeito anisotrópico da carbonila, corresponde ao hidrogênio posicionado em direção aos carbonos 5 e 6, como determinado por Miyazawa & Miyamoto (2005). A Tabela 19 mostra os dados para os demais hidrogênios.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 6-*exo*-hidroxifenchona

Posição	Observado		Miyazawa & Miyamoto (2005)	
	δ_{H} (ppm) mult.	J (Hz)	δ_{H} (ppm) mult.	J (Hz)
4	2,18-2,20 m	-	2,18-2,20 m	-
5-endo	2,34-2,46 m	-	2,40 ddd	13,8, 6,9 e 2,9
5-exo	1,51-1,60 m	-	1,55 ddd	13,8; 4,5 e 3,5
6-endo	3,60-3,65 m	-	3,62 ddd	6,9; 3,5 e 1,5
7	1,73-1,79 m	-	1,76 dddd	10,9; 2,9; 1,5 e 1,2
	1,87-1,93 m	-	1,90 dd	10,9 e 1,7

Continuação da Tabela 20.

Posição	Observado		Miyazawa & Miyamoto (2005)	
	δ_H (ppm) mult.	J (Hz)	δ_H (ppm) mult.	J (Hz)
8	1,06 s (3H)	-	1,06 s (3H)	-
9	0,97 s (3H)	-	0,96 s (3H)	-
10	1,14 s (3H)	-	1,14 s (3H)	-

A fração **B**, contendo o composto **4** com elevada pureza (99%), apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (Anexo II, Figura 2), na região dos carbinólicos, um dubleto largo centrado em δ_H 4,38 ppm atribuído ao H5-*endo* da 5-*exo*-hidroxifenchona, que acopla com o H6-*endo* com constante de 6,0 Hz. O H6-*endo* fornece um sinal de duplo duplo dubleto em δ_H 1,89 ppm ($J = 13,5; 6,0$ e $2,0$ Hz). Outros sinais são mostrados na Tabela 21.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) para a 5-*exo*-hidroxifenchona

Posição	Observado		Miyazawa & Miyamoto (2005)	
	δ_H (ppm) mult.	J (Hz)	δ_H (ppm) mult.	J (Hz)
4	2,15 s (largo)	-	2,13-2,16 m	-
5-endo	4,38 d (largo)	6,0	4,38 ddd	6,3; 1,8 e 1,7
6-endo	1,89 ddd	14,0; 6,0 e 2,0	1,89 ddd	14,3; 6,3 e 2,3
6-exo	1,46 d (largo)	14,0	1,46 ddd	14,3; 1,8 e 1,4
7	1,74 d (largo)	10,0	1,74 dddd	10,9; 2,3; 1,7 e 1,5
	2,08 d (largo)	10,0	2,07 dd	10,9 e 2,0
8	1,06 s (3H)	-	1,06 s (3H)	-
9	1,03 s (3H)	-	1,03 s (3H)	-
10	1,15 s (3H)	-	1,15 s (3H)	-

Também foi obtido o espectro de RMN de ^{13}C para a fração **B** (Anexo II, Figura 3). O carbono carbinólico (C-5) é atribuído a absorção em δ_c 70,5 ppm (Tabela 22). O sinal em δ_c 222,3 ppm foi relacionado ao carbono do grupo C=O (C-2). As três absorções mais blindadas, em δ_c 14,2, 21,2 e 23,6 ppm, correspondem aos três grupos metila da molécula, C-10, C-9 e C-8, respectivamente.

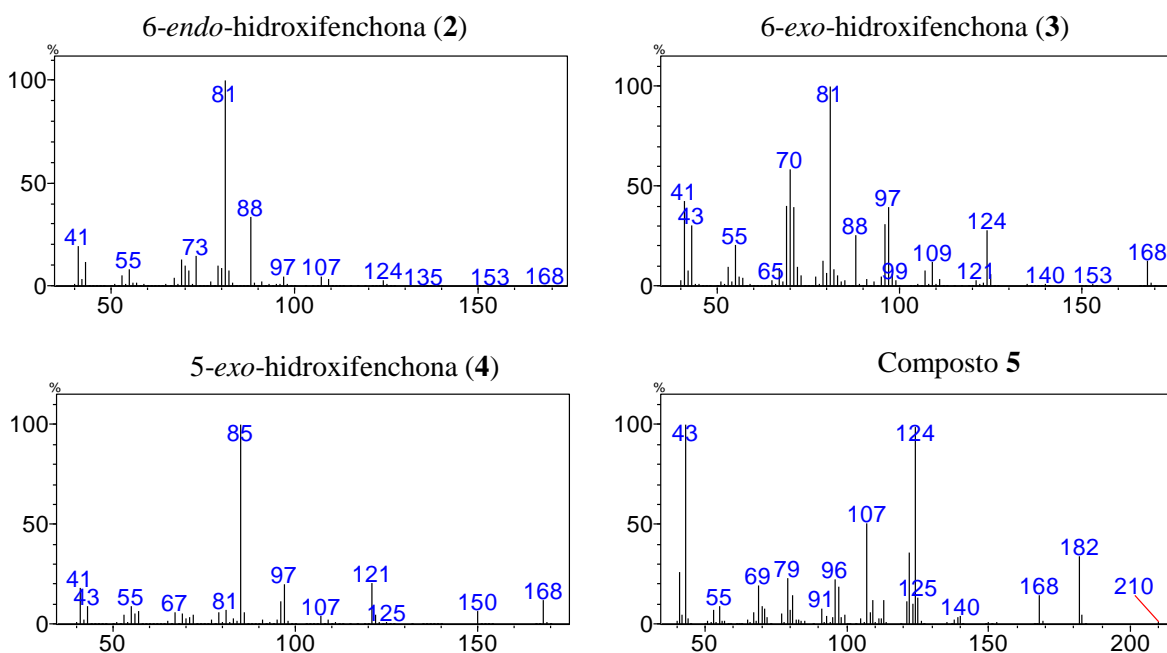
Tabela 22. Dados de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) para a 5-*exo*-hidroxifenchona

Carbono	Observado	Miyazawa & Miyamoto (2005)
	δ_c (ppm) mult.	δ_c (ppm) mult.
1	53,5	53,6 s
2	222,3	222,1 s
3	45,2	45,3 s
4	53,1	53,2 d

Continuação da Tabela 22.

Carbono	Observado	Miyazawa & Miyamoto (2005)
	δ_C (ppm) mult.	δ_C (ppm) mult.
5	70,5	70,7 d
6	43,1	43,2 t
7	37,4	37,4 t
8	23,6	23,6 q
9	21,2	21,3 q
10	14,2	14,2 q

- *Espectrometria de massas*

Figura 47. Espectros de massas dos produtos de hidroxilação da fenchona.

O composto **2** foi relacionado a 6-*endo*-hidroxfenchona. Seu espectro de massas apresenta elevada correlação com aquele apresentado por Miyazawa & Gyoubu (2007) para este composto (Tabela 23). O íon molecular (m/z 168) e o fragmento de perda do radical metila (m/z 153) são quase imperceptíveis (intensidade relativa menor que 1%). O pico base é observado em m/z 81, mas merece destaque o fragmento de m/z 88 relativamente intenso (34%), por não ser um íon comum em espectrometria de massas é um importante fragmento para a caracterização da 6-*endo*-hidroxfenchona.

Tabela 23. Dados de EM para os produtos de hidroxilação da fenchona

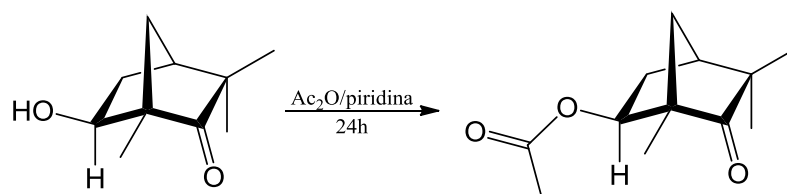
6- <i>endo</i> -Hidroxifenchona							
Observado				Miyazawa & Gyoubu (2007)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	1	88	34	168	2	88	35
153	1	81	100	153	1	81	100
140	0	69	13	140	1	69	21
124	3	55	9	124	8	55	7
109	3	53	6	109	4	53	6
107	4	43	11	107	5	43	6
97	5	41	19	97	9	41	19

6- <i>exo</i> -Hidroxifenchona							
Observado				Miyazawa & Miyamoto (2005)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	13	96	31	168	18	96	35
153	1	88	25	153	3	88	34
140	1	81	100	140	3	81	100
124	28	70	59	124	41	70	37
109	12	69	41	109	16	69	30
97	40	55	21	97	55	55	12

5- <i>exo</i> -Hidroxifenchona							
Observado				Miyazawa & Miyamoto (2005)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	12	97	20	168	11	97	18
150	7	85	100	150	4	85	100
135	1	81	7	135	1	81	7
122	5	55	9	122	4	55	7
121	21	43	9	121	15	43	7
107	4	41	18	107	3	41	20

Na Figura 48 pode ser observado o espectro de massas do composto **5**. Embora se verifique a presença do fragmento de m/z 168 (M^+ dos produtos de hidroxilação da fenchona), o íon molecular para a substância **5** possui razão m/z 210. O que se sugere ser um produto de acetilação da hidroxifenchona, porém não há, na literatura, informações espectrais para compostos do tipo.

A confirmação estrutural foi obtida após acetilação química de uma das frações contendo a (+)-6-*exo*-hidroxifenchona (**3**).

Figura 48. Acetilação da (+)-6-*exo*-hidroxifenchona com anidrido acético/piridina.

O produto da acetilação ilustrada na Figura 48 apresentou mesmo tempo de retenção (Figura 49) e espectro de massas idêntico (Figura 50) ao do composto **5** que foi caracterizado como acetato de 6-*exo*-hidroxifenchona.

Figura 49. TIC obtido do extrato da reação de biotransformação da (+)-fenchona, da (+)-6-*exo*-hidroxifenchona isolada e do produto da acetilação química da 6-*exo*-hidroxifenchona.

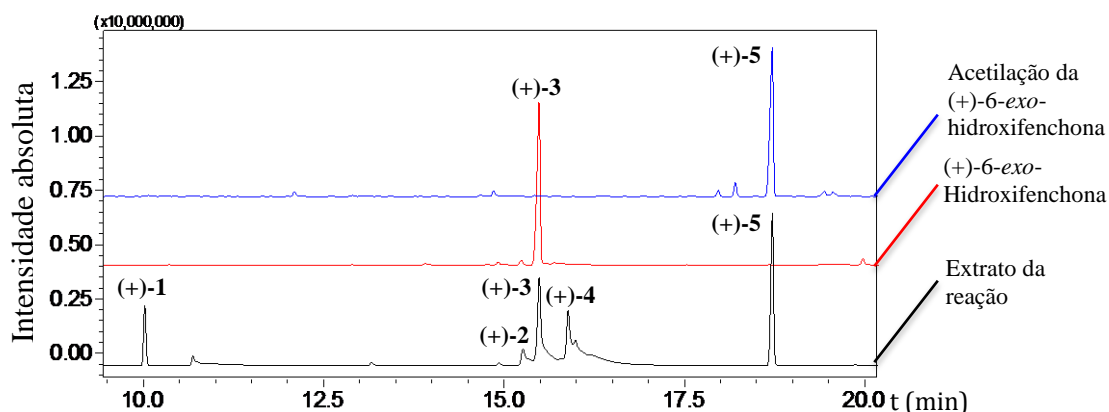
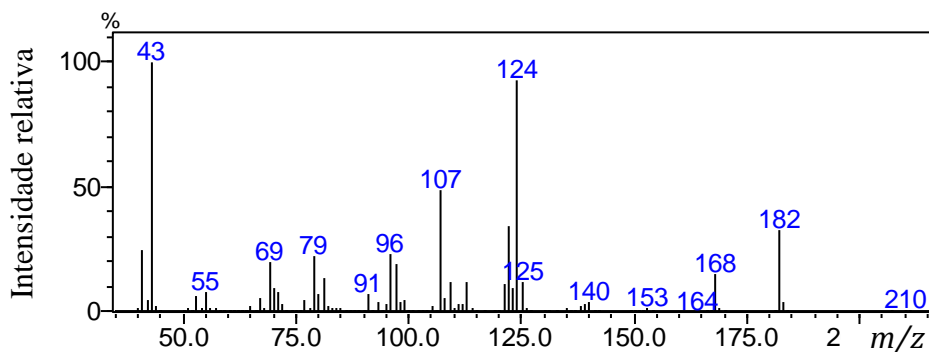
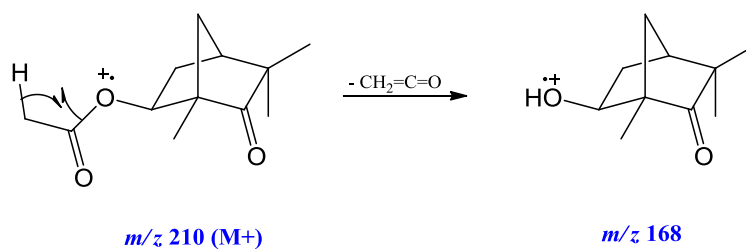


Figura 50. Espectro de massas do produto de acetilação química da (+)-6-*exo*-hidroxifenchona



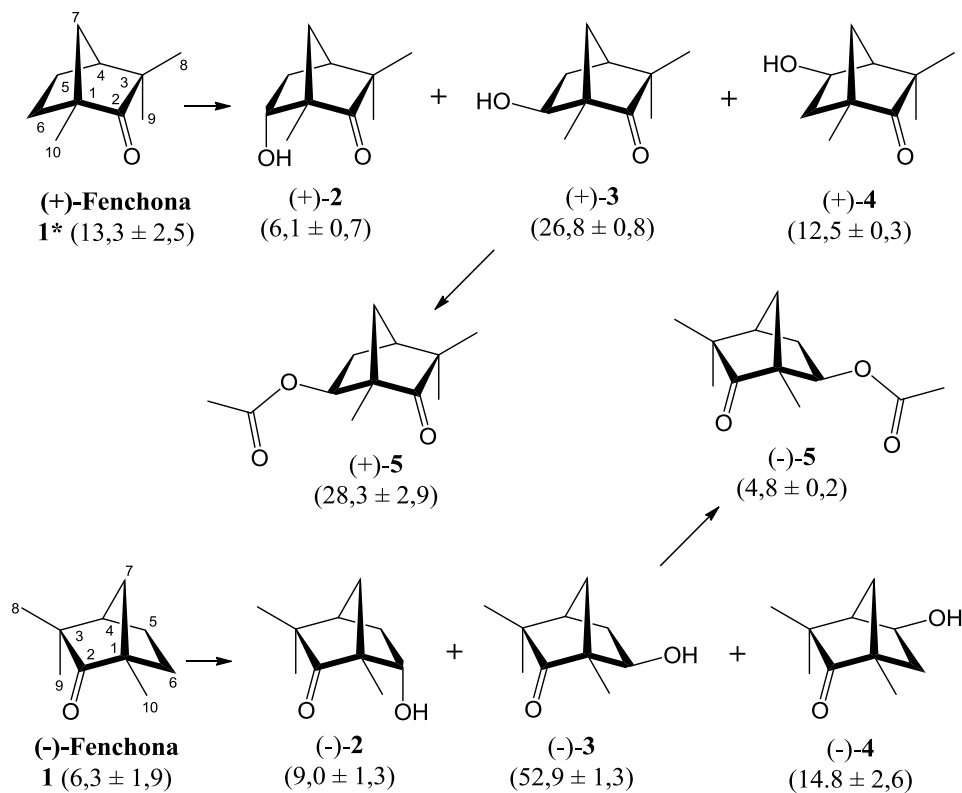
A perda inicial de 42 Da ($M^+ - 168$) é característica de alguns ésteres, atribuída à eliminação de $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ (Figura 51).

Figura 51. Formação do fragmento de m/z 168



A Figura 52 ilustra os compostos obtidos na biotransformação da (+)- e (-)-fenchona por *Botryosphaeria* sp.

Figura 52. Reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona por *Botryosphaeria* sp.



*Pico [média aritmética de três repetições da área normalizada do pico (%) \pm desvio padrão]

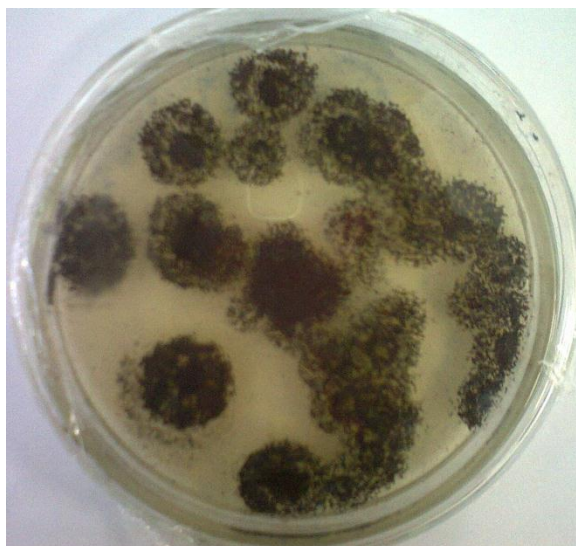
Não houve diferenciação qualitativa na biotransformação dos enantiômeros da fenchona por parte dos fungos. Ambos sofreram hidroxilação nas posições 6-*endo*, 6-*exo* e 5-*exo*, além de acetilação enzimática da 6-*exo*-hidroxicânfora. Os índices de retenção calculados para estes compostos foram de 1278, 1289, 1300 e 1380, respectivamente.

A face *exo* do C-6 foi o sítio preferencial de adição do grupo OH. Houve diferença significativa no percentual dos isômeros acetilados. A acetilação do dextrorrotatório foi favorecida, produzindo 28,3% de acetato de (+)-6-*exo*-hidroxicânfora. Enquanto apenas 4,8% do isômero levorrotatório foram formados.

4.2.2. Reações usando o fungo *Aspergillus niger*

A Figura 53 ilustra os fungos *Aspergillus niger* desenvolvidos em placa de Petri contendo meio sólido (25 mL de água destilada, 0,5 g de extrato de malte e 0,5 g de ágar). Após cinco dias de crescimento foi feito o inóculo em Erlenmeyer de 250 mL contendo meio líquido (100 mL de água destilada e 2 g de extrato de malte). Os Erlenmeyers foram mantidos sob agitação rotativa (150 rpm; 32 °C) por três dias e, posteriormente, 50 mg dos substratos (carvacrol, timol, (+)-pulegona, geraniol, (-)-citronelol, (+)-limoneno, *rac*-cânfora e os enantiômeros (+)- e (-)-fenchona) diluídos em 400 µL de DMSO foram adicionados separadamente aos Erlenmeyers contendo os fungos desenvolvidos.

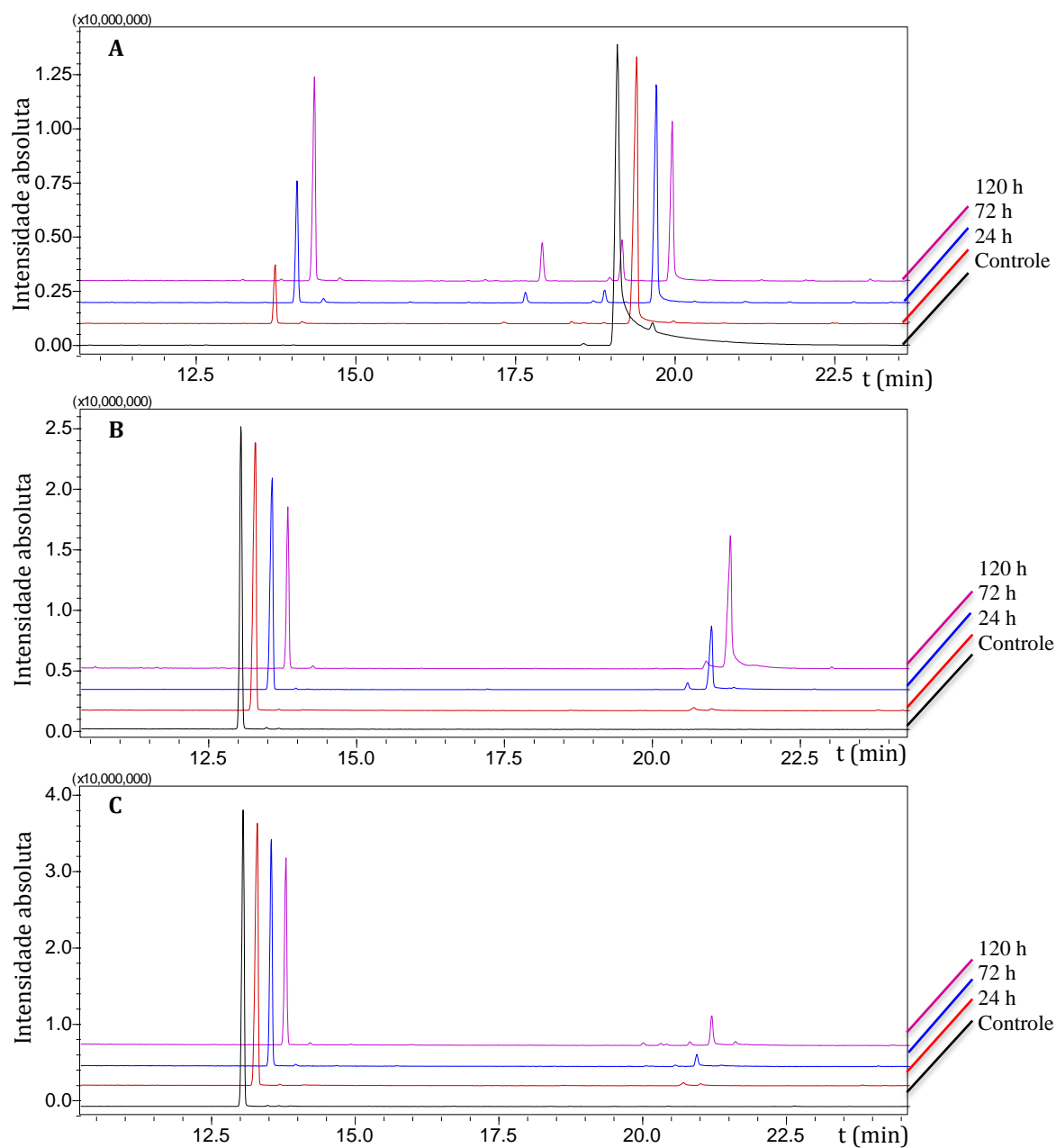
Figura 53. Foto do fungo *Aspergillus niger* em placa de Petri



Através do monitoramento reacional por CG-EM, foi verificada capacidade de conversão dos substratos geraniol e (-)-fenchona pelo fungo *A. niger*. O composto (+)-fenchona também foi metabolizado, porém, em pequena quantidade, sofrendo pouca variação percentual (área relativa do pico no cromatograma) ao longo do período monitorado (Figura 54). Dessa forma, o fungo *A. niger* pode ser considerado enantiosseletivo na biotransformação da (-) e (+)-fenchona.

Assim como na reação usando o fungo *Botryosphaeria* sp, o tempo de 120 h foi determinado como ideal para cessar a reação e realizar a extração dos produtos.

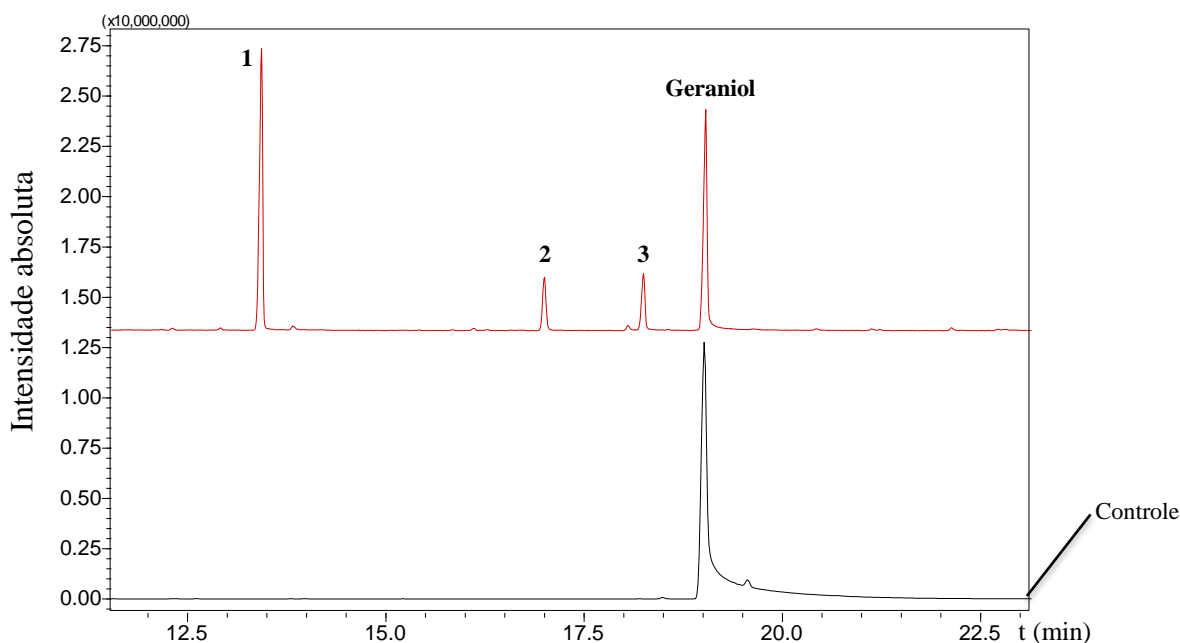
Figura 54. TIC do controle e de alíquotas removidas após 24, 72 e 120 h de biotransformação por *A. niger* usando os substratos geraniol (**A**), (-)-fenchona (**B**) e (+)-fenchona (**C**).



4.2.2.1. Biotransformação do geraniol

Na biotransformação do geraniol por *A. niger* foi observada a formação de três compostos, picos **1**, **2** e **3** (Figura 55).

Figura 55. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação do geraniol após cinco dias de incubação com o fungo *A. niger*



O composto representado pelo pico **1** foi caracterizado como linalol e representa o produto majoritário da reação ($39,7\% \pm 2,7$). Sua identificação foi feita através da coinjeção de um padrão autêntico Aldrich do linalol. Os compostos **2** e **3** foram caracterizados como α -terpineol ($6,7\% \pm 1,9$) e hidrato de linalila ($7,1\% \pm 2,1$), respectivamente. Foram identificados através da comparação de seus espectros de massas (Figura 56) com respectivos espectros presentes na literatura (ADAMS, 2007; PARK et al., 2002; MIYAZAWA et al., 2000) e com base no índice de retenção experimental calculado através da equação de Van den Dool (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963).

O índice de retenção calculado experimentalmente para o linalol, α -terpineol e hidrato de linalila foram 1100, 1195 e 1230 e o índice de retenção reportado na literatura para esses compostos é 1095 (ADAMS, 2007), 1186 (ADAMS, 2007), e 1237 (ROCHA et al., 2007), respectivamente, demonstrando correlação e maior segurança na caracterização dos compostos.

Figura 56. Espectros de massas dos produtos de biotransformação do geraniol por *A. niger*

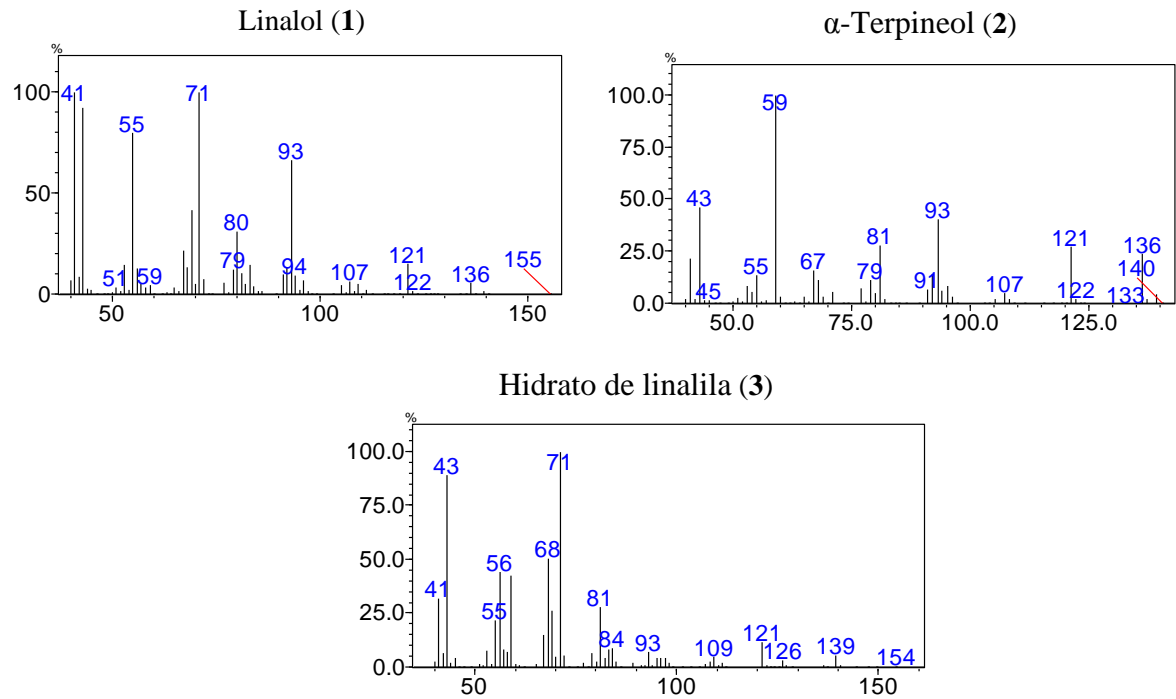


Tabela 24. Dados de EM para os produtos de biotransformação do geraniol por *A. niger*

Linalol (1)							
Observado				Nazemiyeh et al. (2011)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
154	< 1	93	65	154	< 1	93	67
136	5	80	31	136	5	80	22
121	15	71	100	121	18	71	100
107	6			107	7		

α-Terpineol (2)							
Observado				Park et al. (2002)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
136	25	81	25	136	28	81	30
121	28	59	100	121	33	59	100
93	44	41	22	93	44	41	23

Hidrato de linalila (3)							
Observado				Miyazawa et al. (2000)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
139	6	81	28	139	8	81	30
136	1	71	100	136	1	71	100
121	12	68	51	121	12	68	43
109	5	59	42	109	5	59	36
93	7	43	89	93	6	43	72

Na conversão do geraniol a linalol e α-terpineol há a formação de um centro quiral, enquanto à conversão a hidrato de linalila leva a formação de dois novos centros de quiralidade. Não foi observado seletividade na formação de linalol e de α-terpineol, já que ambos enantiômeros foram observados com razão aproximada de 1:1 ao analisar a amostra em uma coluna quiral (ciclodextrina-β) por CG-DIC (cromatógrafo a gás com detector de

ionização de chama). O hidrato de linalila pode ter sido produzido enantiômericamente puro, a presença de dois centros quirais (quatro estereoisômeros possíveis) dificulta a confirmação, pois a possibilidade de coeluição entre os enantiômeros é alta. Como pode ser observado na Figura 57, usando a coluna quiral, houve uma mudança na ordem de eluição em comparação com a DB-5 (usada no CG-EM; Figura 55), sendo que nesta primeira o hidrato de linalila apresentou a maior interação dentre os compostos presentes na solução, a hidroxila adicional do hidrato de linalila é a principal responsável pela alteração.

Figura 57. Cromatograma do extrato da reação de biotransformação do geraniol por *A. niger* obtido em um CG-DIC usando uma coluna quiral.

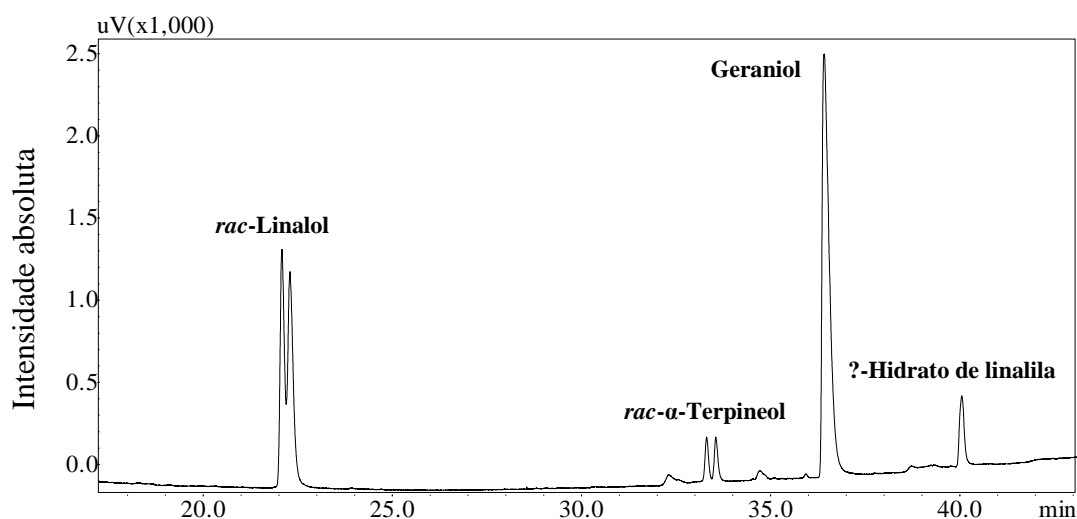
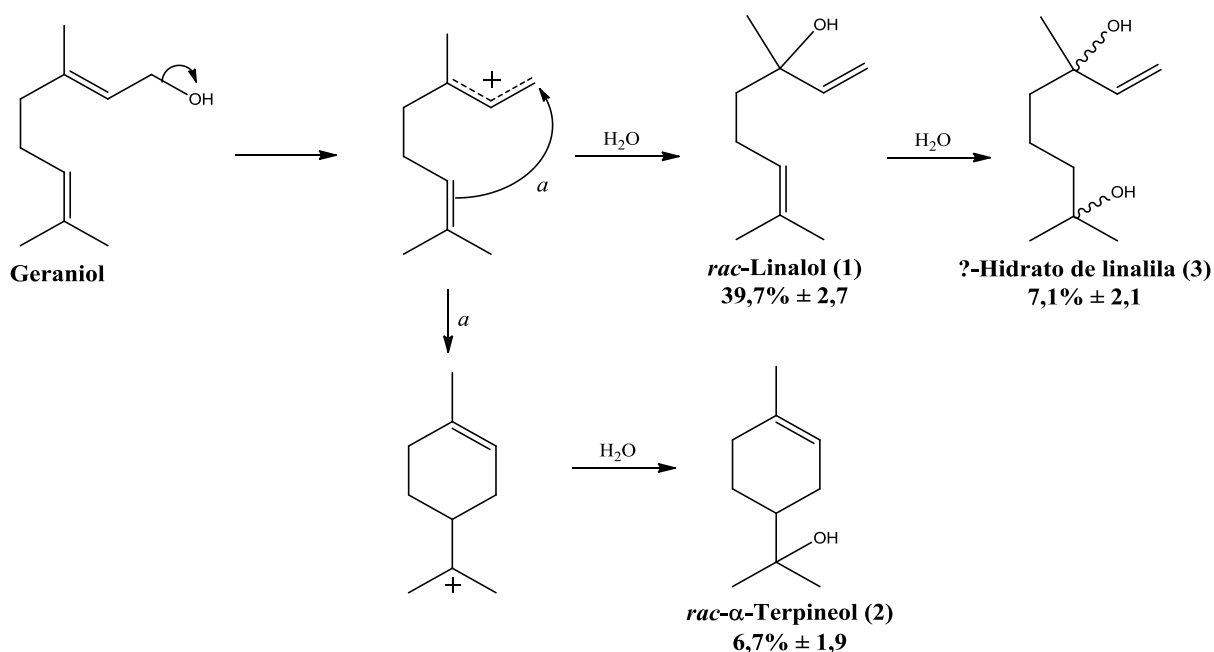


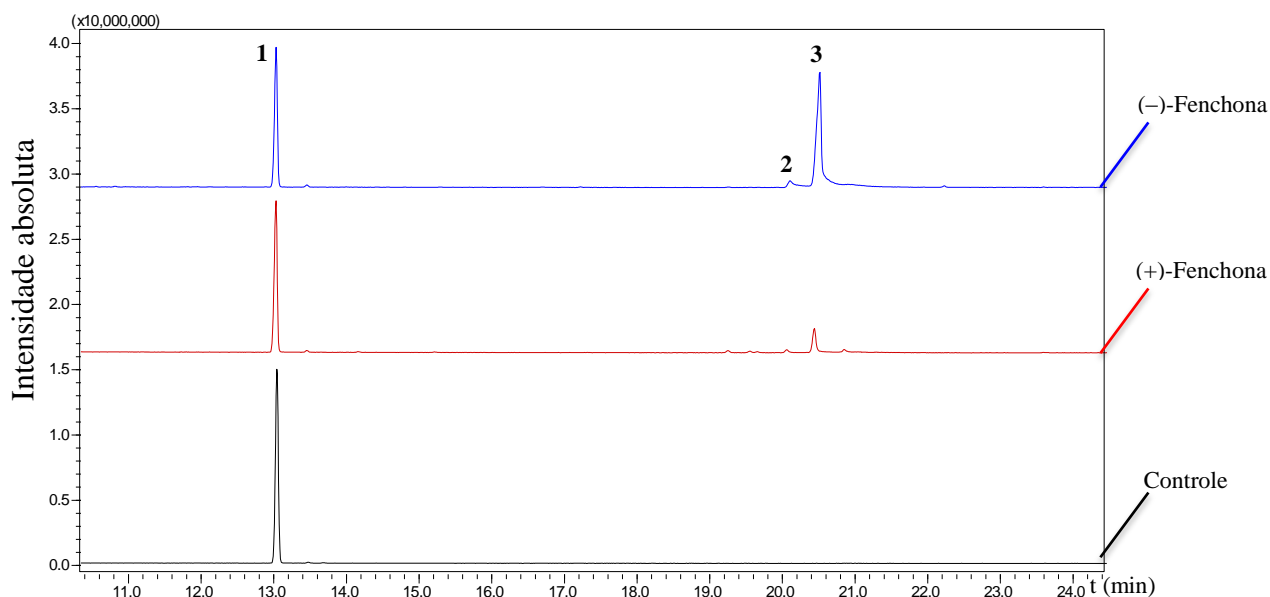
Figura 58. Biotransformação do geraniol por *A. niger*



4.2.2.2. Biotransformação da (+)- e (-)-fenchona

Dois compostos, representados pelos picos **2** e **3** (Figura 59), foram observados na biotransformação da (+)- e (-)-fenchona por *A. niger*. Houve diferenciação quantitativa dos enantiômeros por parte do biocatalisador. A área relativa no TIC dos compostos **2** e **3** formados na biotransformação do enantiômero dextrorrotatório foi de 1,6 e 14,7% respectivamente, enquanto que, a reação com o enantiômeros levorrotatório produziu 3,6 e 58,0% de **2** e **3**.

Figura 59. TIC obtido por CG-EM do extrato da reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona após cinco dias de incubação com o fungo *A. niger*.



Os compostos **2** e **3** foram relacionados a 6-*endo* e 6-*exo*-hidroxifenchona. Seus espectros de massas (Figura 60) apresentam elevada semelhança com aqueles observados para os produtos de hidroxilação nas posições 6-*endo* e 6-*exo* da fenchona por *Botryosphaeria* sp. (Figura 47).

Figura 60. Espectros de massas dos produtos de hidroxilação da fenchona.

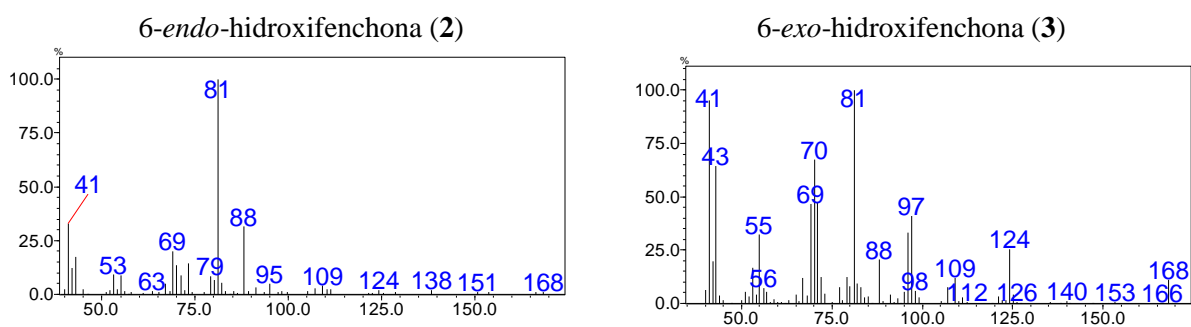
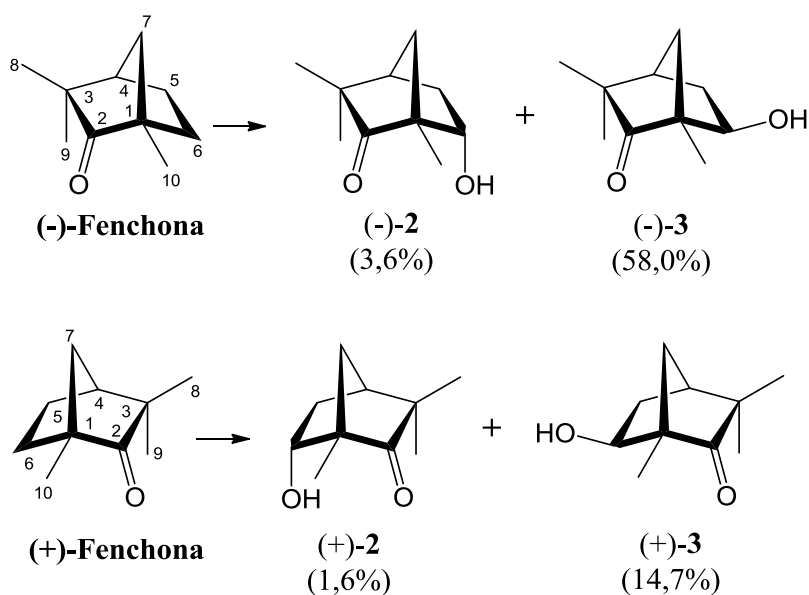


Tabela 25. Dados de EM para os produtos de hidroxilação da fenchona.

6- <i>endo</i> -Hidroxifenchona							
Observado				Miyazawa & Gyoubu (2007)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	1	88	32	168	2	88	35
153	1	81	100	153	1	81	100
140	0	69	20	140	1	69	21
124	2	55	9	124	8	55	7
109	4	53	9	109	4	53	6
107	3	43	18	107	5	43	6
97	1	41	33	97	9	41	19

6- <i>exo</i> -Hidroxifenchona							
Observado				Miyazawa & Miyamoto (2005)			
m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)	m/z	(%)
168	11	96	29	168	18	96	35
153	1	88	21	153	3	88	34
140	1	81	100	140	3	81	100
124	26	70	67	124	41	70	37
109	12	69	47	109	16	69	30
97	41	55	32	97	55	55	12

Assim como na reação usando *Botryosphaeria* sp., o sítio de hidroxilação preferencial ao usar *A. niger* como biocatalisador foi a posição *exo* do carbono 6. O índice de retenção experimental para estes compostos foi de 1278 (6-*endo*-hidroxifenchona) e 1289 (6-*exo*-hidroxifenchona). Não há na literatura índice de retenção reportado para os compostos.

Figura 61. Reação de biotransformação da (+)- e (-)-fenchona por *Aspergillus niger*.

5. CONCLUSÕES

Constituindo mais de 80% do óleo essencial obtido das folhas da planta, os monoterpenos são a classe predominante em *L. gracilis*. A análise de agrupamentos apresentou um excelente coeficiente de correlação cofenético ($> 0,99$) e revelou a presença de três *clusters* dentre os sete genótipos. O *cluster I*, formado pelo genótipo 106, distinguiu-se dos demais pelo alto teor de timol (57,66%) e metil timol (11,12%). O *cluster III*, genótipo 201, é relativamente similar ao *cluster II* (genótipos 107, 108, 109, 110 e 202), mas distingue-se deste por sua alta quantidade de γ -terpineno (20,08%) e menor percentual de carvacrol (36,73%) e, mais significativamente, de metil timol (0,26%).

A elevada dissimilaridade entre o *cluster I* e os *clusters II* e *III* caracteriza a presença de dois quimiotipos. O quimiotipo timol, genótipo 106, e o quimiotipo carvacrol, genótipos 107, 108, 109, 110, 201 e 202.

O estudo do efeito do estresse hídrico permitiu verificar que *L. gracilis* produz uma quantidade maior de óleo essencial em condições de carência hídrica. Além disso, todos os genótipos cultivados sob estresse hídrico apresentaram maior conteúdo de monoterpenos e menor de sesquiterpenos, quando comparados com aqueles cultivados sob irrigação.

Nas reações de biotransformação realizadas, não foi observada modificação estrutural nos principais componentes do óleo essencial de *L. gracilis* (timol e carvacrol) por espécies de *Botryosphaeria* sp. e *Aspergillus niger*. Porém, *Botryosphaeria* sp., com suas enzimas associadas, demonstrou ser um eficiente biocatalisador para efetuar hidroxilações em cetonas bicíclicas do tipo norbornano, como cânfora e fenchona. *Aspergillus niger*, além de hidroxilação da (-)-fenchona, realizou isomerização do geraniol.

A *rac*-cânfora foi hidroxilada em seis diferentes posições por *Botryosphaeria* sp., sendo a reação na face *endo* do carbono 6 o principal produto formado (48,5%). É importante ressaltar que a adição de um grupo OH usando reagentes convencionais na posição 6-*endo* da cânfora é uma tarefa de elevada complexidade. Não há relatos na literatura de tal síntese na ausência de um biocatalisador.

A reação usando como substrato (+)- e (-)-fenchona promovida pelo fungo *Botryosphaeria* sp. apresentou três produtos de hidroxilação. O carbono 6-*exo* foi o sítio principal de adição do grupo OH, sendo produzidos 26,8% do composto dextrorrotatório e 52,9% do levorrotatório. Foi verificado também um produto de acetilação da 6-*exo*-hidroxifenchona. A formação preferencial do (+)-acetato de 6-*exo*-hidroxifenchona (28,3%)

frente ao (–)-acetato de 6-*exo*-hidroxifenchona (4,8%) comprova que a acetilação foi promovida por enzimas fúngicas, além disso, a biotransformação foi efetuada na ausência de reagentes acetilantes.

O par de enantiômeros da fenchona também foi hidroxilado por *A. niger*. Assim como na reação com *Botryosphaeria* sp., o carbono 6-*exo* foi o sítio principal de hidroxilação, sendo formado 58,0% da (–)-6-*exo*-hidroxifenchona e 14,7% da (+)-6-*exo*-hidroxifenchona. *A. niger* demonstrou enantiosseletividade frente aos estereoisômeros da fenchona, alterações no pH do meio e/ou de outros fatores podem ser realizadas com o objetivo de obter a máxima seletividade possível.

Além da hidroxilação da fenchona, o fungo *A. niger* promoveu isomerização do geraniol a *rac*-linalol (39,7%) e *rac*- α -terpineol (6,7%) e hidroxilação do *rac*-linalol a ?-hidrato de linalila (7,1%).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy**, 4th ed, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2007.

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

AGRA, M.F., SILVA, K.N., BASÍLIO, I.J.L.D., FRANÇA, P.F., BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 472-508, 2008.

AGUIAR, J.C.D., SANTIAGO, G.M.P., LAVOR, P.L., VERAS, H.N.H., FERREIRA, Y.S., LIMA, M.A.A., ARRIAGA, A.M.C., LEMOS, T.L.G., LIMA, J.Q., JESUS, H.C.R., ALVES, P.B., BRAZ FILHO, R. Chemical Constituents and Larvicidal Activity of *Hymenaea courbaril* Fruit Peel. **Natural Product Communications**, v. 5, p. 1977-1980, 2010.

AKERELE O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **HerbalGram**, v. 28, p. 13-19, 1993.

ALVES, P.B., VICTOR, M.M. Reação da cânfora com boroidreto de sódio: uma estratégia para o estudo da estereoquímica da reação de redução. **Química Nova**, v. 33, p. 2274-2278, 2010.

ANTUNES, O.A.C. Interfaces com a indústria. **Química Nova**, v. 28, suppl., p. S64-S75, 2005.

ARANTES, G.M. Uma perspectiva computacional sobre catálise enzimática. **Química Nova**, v. 31, p. 377-383, 2008.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.

BAUER, K., GARBE, D. Common Fragrance and Flavor Materials. Preparation, Properties and Uses. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, p. 213, 1985.

BAYRAK, A. Volatile oil composition of Turkish rose (*Rosa damascena*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 64, p. 441–448, 1994.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. Essential Oils. **Secondary Plants Products**, cap. 5, New York: Springer-Verlag, 1980.

BENKOVIC, S.J., HAMMES-SCHIFFER, S. A perspective on enzyme catalysis. **Science**, v. 301, p. 1196-202, 2003

BERNÁTH, J. **Production ecology of secondary plant products**. In: CRACKER, L.. E. & SIMON, J.E. (eds.): Herbs, Spices and Medicinal Plants. Recent advances in Botany, Horticulture and Pharmacology. New York: The Haworth Press, Inc., v. 1, p. 185-234, 1992.

BILLING, G.D., MIKKELSEN, V. **Introduction to Molecular Dynamics and Chemical Kinetics**. Wiley: New York, 1ed., 1996.

BIZZO, H.R., HOVELL, A.M., REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.

BOMMARIUS, A.S.; RIEBEL, B.R. **Biocatalysis: fundamentals and applications**. WILEY-VCH: Weinheim, cap. 1, 2004.

BRASIL. Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil [organização Rafaela Campostrini Forzza, et al.], Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 48 de 16 de março de 2004. Aprova o regulamento técnico de medicamentos fitoterápicos junto ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária. DOU. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, Brasília, 18 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada no. 60 de 10 de novembro de 2011. Aprova o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. DOU. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, DF, Brasília, 11 de novembro de 2011.

BULLETIN OF THE WORLD HEALTH ORGANIZATION. Regulatory situation of herbal medicines. **A worldwide review**, Geneva, 1998.

CALIXTO, J.B., SCHEIDT, C., OTUKI, M., SANTOS, A.R. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 2, p. 261-279, 2001.

CANE, D. E. Enzymatic Formation of Sesquiterpenes. **Chemical Reviews**, v. 90, p. 1089-1103, 1990.

CARVALHO, A.C.B., BALBINO, E.E., MACIEL, A., PERFEITO, J.P.S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 314-19, 2008.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Enzimas. In: **Bioquímica Ilustrada**. 2 ed. São Paulo: Artes Médicas, p. 53-66, 1989.

CHATTERJEE, T. Biotransformation of geraniol by *Rhodococcus* sp. strain GR3. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 39, p. 303-306, 2004.

COMTRADE, 2012. United Nations Commodity Trade Statistics Database. Disponível em: <http://comtrade.un.org/db/> Acesso em 25 jun. 2012, 14:00.

COPPEN, J.J.W. Flavours and Fragrances of Plant Origin, FAO: Roma, 1995.

COSTA, D.P. Briófitas in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000003> Acesso em 10 jun. 2012, 14:06.

COSTA, E.V., DUTRA, L.V., JESUS, H.C.R., NOGUEIRA, P.C.L., MORAES, V.R.S., SALVADOR, M.J., CAVALCANTI, S.C.H., DOS SANTOS, R.L.C., PRATA, A.P.N. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the Essential Oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural Product Communications**, v. 6, p. 907-9012, 2011.

CROTEAU, R., ALONSO, W.R., KOEPP, A.E., JOHNSON, M.A. Biosynthesis of monoterpenes: partial purification, characterization, and mechanism of action of 1,8-cineole synthase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 309, p-184-192, 1994.

CROTEAU, R., DAVIS, E.D., RINGER, K.L., WILDUNG, M.R. (-)-Menthol biosynthesis and molecular genetics, **Naturwissenschaften**, v. 92, p. 562-577, 2005.

CROTEAU, R., SATTERWHITE, D.M., CANE, D.E., CHANGN, C.C. Biosynthesis of monoterpenes. Enantioselectivity in the enzymatic cyclization of (+)- and (-)-linalyl pyrophosphate to (+)- and (-)-pinene and (+)- and (-)-camphene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 10063-10071, 1988.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (eds.). Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: **Americam Society of Plant Physiologists**, p.1250-1318, 2000.

CRUEGER, W., CRUEGER, A. **Biotecnologia: manual de microbiologia industrial**. 3ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., p. 413, 1993.

DEMAIN, A.L. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 52, p. 455, 1999.

DEMIRJIAN, D.C.; SHAH. P. C.; MORIS-VAS, F. **Biocatalysis - From Discovery To Application**. Springer: Berlin, v. 200, p. 12, 1999.

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

DEMYTTENAERE, J.C.R., De POOTER, H.L. Biotransformations of geraniol and nerol by spores of *Penicillium italicum*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 1079–1082, 1996.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3rd Edition, Chichester, UK: John Wiley and Sons, 2009.

DORAN, J.C.; BROPHY, J. J. Tropical red gums: a source of 1,8-cineole-rich Eucalyptus oil. **New Forest: Dordrecht**, n. 4, p. 157-178, 1990.

DUDAREVA N., PICHERSKY E, GERSHENZON J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

DUDAREVA, N., PICHERSKY, E., GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.

DUETZ, W.A., FJALLMAN, A.H.M., REN, S.Y., JOURDAT, C., WITHOLT, B. Biotransformation of D-limonene to (+) trans-carveol by toluene-grown *Rhodococcus opacus* PWD4 cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, p. 2829–2832, 2001.

FABER, K. **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**. 3rd Edition, Springer-Verlag: Berlin, Germany, 1997.

FORZZA, R.C., COSTA, A., WALTER, B.M.T., PIRANI, J.R., MORIM, M.P., QUEIROZ, L.P., MARTINELLI, G., PEIXOTO, A.L., COELHO, M.A.N., BAUMGRATZ, J.F.A., STEHMANN, J.R., LOHMANN, L.G., HOPKINS, M. *Angiospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000003> Acesso em 11 jun. 2012, 02:00.

FRANCO, C.R.P., ANTONIOLLI, A.R., GUIMARÃES, A.G., ANDRADE, D.M., DE JESUS, H.C.R., ALVES, P.B., BANNET, L.E., PATRUS, A.H., AZEVEDO, E.G., QUEIROZ, D.B., QUINTANS JÚNIOR, L.J., BOTELHO, M.C. Bioassay-guided Evaluation of Antinociceptive Properties and Chemical Variability of the Essential Oil of *Hyptis fruticosa*. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1693-1699, 2011.

FREY, P.A., HEGEMAN, A.D. **Enzymatic Reaction Mechanisms**. Oxford University Press, Oxford, p. 34-35, 2007.

FRIDMAN, E., WANG, J., IJIMA, Y., FROEHLICH, J.E., GANG, D.R., OHLROGGE, J., PICHERSKY, E. Metabolic, genomic and biochemical analyses of glandular trichome from the wild tomato species *Lycopersicon hirsutum* identify a key enzyme in the methylketone biosynthetic pathway. **Plant Cell**, v. 17, p. 1252-1267, 2005.

GANG, D.R., WANG, J., DUDAREVA, N., NAM, K.H., SIMON, J., LEWINSOHN, E., PICHERSKY, E. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Plant Physiology**, v. 125, p. 539–555, 2001.

GARDOSSI, L., MOLINARI, F. Biocatalytic processes in: **Catalysis**. Encyclopedia of Life Support Systems-EOLSS, UNESCO, 2009.

GIULIETTI, A.M., HARLEY, R.M., QUEIROZ, L.P., WANDERLEY, M.G.L., VAN DEN BERG, C. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 52-61, 2005.

GÓIS, R.W.G.S., DE SOUSA, L.M., LEMOS, T.L.G., ARRIAGA, A.M.C., ANDRADE-NETO, M., SANTIAGO, G.M.P., FERREIRA, Y.S., ALVES, P.B. ; DE JESUS, H.C.R. Chemical Composition and Larvicidal Effects of Essential Oil from *Bauhinia acuruana* (Moric) against *Aedes aegypti*. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 59-62, 2011.

GOINGUENÉ, S.P., TURLINGS, T.C.J. The effects of abiotic factors on induced volatile emissions in corn plants. **Plant Physiology**, v.129, p. 1296-1307, 2002.

GOUNARIS, Y. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 367-386, 2010.

GRAMATICA, P., MANITTO, P., RANZI, B.M., DELBIANCO, A., FRANCAVILLA, M. Stereospecific reduction of geraniol to *R*-(+)-citronellol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Experientia**, v. 38, p. 775–776, 1982.

GROGAN, G., ROBERTS, G.A., PARSONS, S., TURNER, N.J. AND FLITSCH, S.L. P450_{camr}, a cytochrome P450 catalysing the stereospecific 6-*endo*-hydroxylation of (1*R*)-(+)-camphor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 449–454, 2002.

GUARDIOLA, J., IBORRA, J.L., RÓDENAS, L. CANOVAS, M. Biotransformation from geraniol to nerol by immobilized grapevine cells (*V. vinifera*). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 56, p. 169-180, 1996.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**. D. Van Nostrand, New York, 1948.

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

HANSON, J.R. The microbiological transformations of diterpenoids. **Natural Product Reports**, v. 9, p. 139, 1992.

HARBORNE, J.B., BAXTER, H. **Phytochemical Dictionary, A Handbook of Bioactive Compounds from Plants**. Taylor and Francis, London, 1993.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422-1434, 2001.

HAYASHI, S., YAGI, K., ISHIKAWA, T., KAWASAKI, M., ASAI, T., PICONE, J., TURNBULL, C., HIRATAKE, J., SAKATA, K., TAKADA, M., OGAWA, K., WATANABE, N. Emission of 2-phenylethanol from its beta-D-glucopyranoside and the biogenesis of these compounds from [H-2(8)] L-phenylalanine in rose flowers. **Tetrahedron**, v.60, p.7005-7013, 2004.

HENCH, P.S., KENDALL, E.C., SLOCUMB, C.H., POLLEY, H.F. The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-hydroxy-11-dehydrocorticosterone: compound E). **Proceeding Staff Meet Mayo Clinic**, v. 24, p. 181-197, 1949.

HOGG, J.A. Steroids, the steroid community, and Upjohn in perspective: a profile of innovation. **Butterworth-Heinemann**, v. 57, p. 593-616, 1992.

HUA, D., XU, P. Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 654-660, 2011.

HYATT, D.C, CROTEAU, R. Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: Altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 439, p 222-233, 2005.

HYLEMON, P.B., HARDER, J. Biotransformation of monoterpenes, bile acids, and other isoprenoids in anaerobic ecosystems. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 475-488, 1999.

KOEDUKA, T., FRIDMAN, E., GANG, D.R., VASSÃO, D.G., JACKSON, B.L., KISH, C.M., ORLOVA, I., SPASSOVA, S.M., LEWIS, N.G., NOEL, J.P., BAIGA, T.J., DUDAREVA, N., PICHESKY, E. Eugenol and isoeugenol, characteristic aromatic constituents of spices, are biosynthesized via reduction of a coniferyl alcohol ester. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 10128-10133, 2006.

KOELLER, K.M., WONG, C.H. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, p. 232-241, 2001.

KÖLLNER, T. G., GERSHENZON, J., DEGENHARDT, J. Molecular and biochemical evolution of maize terpene synthase 10, an enzyme of indirect defense. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1139-1145, 2009.

KÖLLNER, T.G., SCHNEE, C., GERSHENZON, J., DEGENHARDT, J. The sesquiterpene hydrocarbons of maize (*Zea mays*) form five groups with distinct developmental and organ-specific distributions. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1895–1902, 2004.

KOLOSOVA, N., SHERMAN, D., KARLSON, D., DUDAREVA, N. Cellular and Subcellular Localization of S-Adenosyl-L-Methionine:Benzoic Acid Carboxyl Methyltransferase, the Enzyme Responsible for Biosynthesis of the Volatile Ester Methylbenzoate in Snapdragon Flowers. **Plant Physiology**, v. 126, p. 956, 2001.

KOPP, M.M., de SOUZA, V.Q., COIMBRA, J.L.M., da LUZ, V.K., MARINI, N., de OLIVEIRA, A.C. Melhoria da correlação cofenética pela exclusão de unidades experimentais na construção de dendrogramas. **Revista da FZVA**, v. 14, p. 46-53, 2007.

LAD. C., WILLIAMS, N.H., WOLFENDEN, R. The rate of hydrolysis of phosphomonoester dianions and the exceptional catalytic proficiencies of protein and inositol phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 5607-5610, 2003.

LAWRENCE, B.M. In: New crops; JANICK, J.; SIMON. J. E., eds.; Wiley: New York, p. 620, 1993.

- LEHNINGER, M., NELSON, D. L. **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, p. 194-195, 2002.
- LEMOS, E.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; BARBOSA, R.C.S.B.; LIMA, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 63, p. 266-268, 1992.
- LEWINSOHN, T.L., PRADO, P.I. Quantas espécies há no Brasil? **Megadiversidade**, v. 1, p. 36-42, 2005.
- LEWINSOHN, T.M., PRADO, P.I. Síntese do conhecimento atual da biodiversidade brasileira. In: Lewinsohn T.M. (org.). **Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2006.
- LOPES, N.P., GOBBO-NETO, L. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 20, p. 374-381, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 544, 2002.
- MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA JUNIOR, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MAIA, L.C., CARVALHO JR., A. A. Fungos in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000003> Acesso em 10 jun. 2012, 12:03.
- MANLY, B.F.J. **Métodos Estatísticas Multivariados: Uma Introdução**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- MARCO, J.A., SANZ-CERVERA, J.F., GARCIA-LLISO, V., BATLLE, N. Sesquiterpene lactones from *Artemisia lucentica*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 755-763, 1997.
- MATOS, F.J.A., MACHADO, M.I.L., CRAVEIRO, A.A., ALENCAR, J.W., SILVA, M.G. V. Medicinal plants of northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sidoides* Cham. and *Lippia gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). **Journal Essential Oil Research**, v. 11, p. 666-668, 1999.
- MENDES, S.S., BOMFIM, R.R., JESUS, H.C.R., ALVES, P.B., BLANK, A.F., ESTEVAM, C.S., ANTONIOLLI, A.R., THOMAZZI, S.M. Evaluation of the analgesic and anti-

inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391-397, 2010.

MENEZES, M., BICUDO, C.E.M. Algas in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000003> Acesso em 10 jun. 2012, 13:24.

MIHOVILOVIC, M.D. Enzyme Mediated Baeyer-Villiger Oxidations. **Current Organic Chemistry**, v. 10: 1265-1287, 2006.

MIYAZAWA, M., AKAZAWA, S., SAKAI, H., NANKAI, H. Biotransformation of (-)-dihydromyrcenyl acetate using the plant parasitic fungus *Glomerella cingulata* as a biocatalyst. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4826-4829, 2000.

MIYAZAWA, M., GYOUBU, K. Metabolism of (2)-fenchone by CYP2A6 and CYP2B6 in human liver microsomes. **Xenobiotica**, v. 37, p. 194-204, 2007.

MIYAZAWA, M., MIYAMOTO, Y. Biotransformation of (1R)-(+)-and (1S)-(-)-camphor by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 27, p. 83-89, 2004.

MIYAZAWA, M.; MIYAMOTO, Y. Biotransformation of (+)-(1R)- and (-)-(1S)-fenchone by the larvae of common cutworm (*Spodoptera litura*). **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 32, p. 123-130, 2005.

MORAIS, L.A.S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MUELLER, G.M., SCHMIT, J.P. Global diversity and distribution of macrofungi. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 1, p-37, 2007.

NAGAO, E.O., INNECCO, R., MATTOS, S.H., FILHO, S. M., MARCO, C. A. Efeito do horário de colheita sobre o teor e constituintes majoritários de óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br., quimiotipo cristal-limoneno. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 35, nº 2, p. 355-360, 2004.

NAKAHASHI, H., MIYAZAWA, M. Biotransformation of (-)-Camphor by *Salmonella typhimurium* OY1002/2A6 Expressing Human CYP2A6 and NADPH-P450 reductase. **Journal of Oleo Science**, v. 60, p. 545-548, 2011.

NAZEMIYEH, H., LATIFPOOR, F., DELAZAR, A., RAZAVI, S. M., ESNA-ASHARI, S., KASEBI, N., TALEBPOUR, A-H., NAHAR, L., SARKER, S. D. Chemical composition, and antibacterial and free-radical-scavenging activities of the essential oil of a citronellol producing new chemotype of *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak. **Records of Natural Products**, v. 5, p. 184-192, 2011.

ORIHARA, Y., NOGUCHI, T., FURUYA, T. Biotransformation of (+)-camphor by cultured cells of *Eucalyptus perriniana*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 941-945, 1994.

PARK, Y.K., ALENCAR, S.M., SCAMPARINI, A.R.P., AGUIAR, C.L. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, p. 997-1003, 2002.

PAULING, L. Nature of forces between large molecules of biological interest. **Nature**, v. 161, p. 707-709, 1948.

PAVIA, D.L., LAMPMAN, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J. A. **Introduction to Spectroscopy**, 4th ed.; Brooks/Cole: Belmont, CA, p. 447, 2008.

PESSOA, O.D.L., CARVALHO, C.B.M., LIMA, M.C.L., LEMOS, T.L.G., MATOS, F.J.A., MOTTA NETO, R. Antibacterial activity of the essential oil from *Lippia aff. gracilis*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 714-721, 2005.

PETERSON, D.H., MURRAY, H.C., EPPSTEIN, S.H., REINECKE, L.M., WEINTRAUB, A., MEISTER, P.D., LEIGH, H.M. Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. **Journal of the American Chemical Society**, v. 75, p. 5933-5936, 1952.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. **Science**, v. 311, p. 808-811, 2006.

POULOSE, A.J., CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes. Conversion of gamma-terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, p. 307-314, 1978.

PRADO, J., SYLVESTRE, L. *Pteridófitas in* Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000003> Acesso em 11 jun. 2012, 00:42.

RAO, A.R., SRINIVAS, V.V. Regionalization of watersheds by hybrid cluster analysis. **Journal of Hydrology**, v. 318, p. 37-56, 2006.

ROCHA, S.M., COELHO, E., ZROSTLIKOVA, J., DELGADILLO, I., COIMBRA, M.A. Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometry of monoterpenoids as a powerful tool for grape origin traceability. **Journal of Chromatography A**, v. 1161, p. 292-299, 2007.

ROHLF, F.J., FISHER D.L. Test for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Zoology**, Washington, v. 17, p. 407-412. 1968

ROHLF, F.J.; FISHER D.L. Test for hierarchical structure in random data sets. **Systematic Zoology**, Washington, v.17, p.407-412. 1968.

ROMESBURGH, H.C. **Cluster Analysis for Researchers**. Lifetime Learning Publications, Belmont, 1984.

RYNKIEWICZ, M.J., CANE, D.E., CHRISTIANSON, D.W. Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 98, p. 13543–13548, 2001.

SALIMENA, F.R.G. Revisão taxonômica de *Lippia* L.sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). **Tese de Doutorado**. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, 2000.

SANTOS, A.S., ALVES, S.M., FIGUEIREDO, F.J.C., NETO, O.G.R. Descrição de Sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. **Comunicado técnico do ministério da agricultura pecuária e abastecimento**, ISSN 1517-2244, Belém, PA, Novembro, 2004.

SANTOS, A.V., ARRIGONI-BLANK, M.F., BLANK, A.F., TAVARES, F.F., FERNANDES, R.P.M., DE JESUS, H.C.R., ALVES, P.B. Mass multiplication of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth genotypes and increase of essential oil and patchoulol yield. **Industrial Crops and Products (Print)**, v. 32, p. 445-449, 2010.

SÁ-PEREIRA P., DUARTE J.C., ALVES F.C., LACERDA P.S.B. Biocatálise – estratégias de inovação e criação de mercados. In: **Enzimas: Aplicações, Tecnologias e Mercado**, cap 19. Rio de Janeiro, Editora Interciência, 2007.

SARMA, P.C., BARUAH, P., PATHAK, M.G., KANJILAL, P.B. Comparison of the Major Components of the Oils of Eight Selections of *Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. *martinii*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 673-674, 1998.

SERAFINI, M.R., VERGNE, D.M.C., RABELO, T.K., MENEZES, P.P., ROCHA, R.F., MOREIRA, J.C., DA SILVA, F.M., ALVES, P.B., DE JESUS, H.C.R., ARAÚJO, A.A.S., GELAIN, S.P. Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 1-9, 2012.

SHEPHERD, G.J. Plantas terrestres. In. Lewinsohn, T.M. (org.). Avaliação do estado do conhecimento da biodiversidade brasileira. **Série Biodiversidade**, v. 15, p. 145–192, 2005.

SILVA JUNIOR, A.A., VIZZOTO, V.J., GIORGI, E., MACEDO, S.G., MARQUES, L.F. **Plantas medicinais, caracterização e cultivo**. Florianópolis: EPAGRI, p. 71, 1994.

SILVA, W., DORIA, G., MAIA, R., NUNES, R., CARVALHO, G., BLANK, A., ALVES, P.B., MARCAL, R., CAVALCANTI, S.C.H. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3251-3255, 2008.

SILVA-SANTOS, A. Análise Técnica, Econômica e de Tendências da Indústria Brasileira de Óleos Essenciais. **Papel Virtual**: Rio de Janeiro, 2002.

SILVERMAN, R. B. **The organic chemistry of enzyme-catalyzed reactions**. San Diego: Academic Press, p. 717, 2000.

SIMÕES, C. M. O., SHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p. 821, 1999.

SIMON, J.E., MORALES, M.R., PHIPPEN, W.B., VIEIRA, R.F., HAO, Z. **Basil: a source of aroma compounds and a popular culinary and ornamental herb**. In Janick, J. ed, Perspectives on New Crops and New Uses. ASHS Press, Alexandria, VA, p. 499–505, 1999.

SIMON, J.E., REISS-BUBENHEIM, D., JOLY, R.J., CHARLES, D.J. Water stress-induced alterations in essential oil content and composition of sweet basil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, p. 71-75, 1992.

SIQUI, A.C., SAMPAIO, A.L.F., SOUSA, M.C., HENRIQUES, M.G.M.O., RAMOS, M.F.S. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, p. 38-43, 2000.

SKÖLD, M., KARLBERG, A., MATURA, M., BÖRJE, A. The fragrance chemical beta-caryophyllene - air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicolog**, v. 44, p. 538- 545, 2006.

SOKAL, R.R.; ROHLF, F.J. The comparison of dendrograms by objective methods. **Taxon**, Berlin, v. 11, p. 30-40, 1962.

SOUZA, V.C. Gimnospermas in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB0000003> Acesso em 11 jun. 2012, 01:20.

STATISTICA® 9.0. STATSOFT, INC. Sistema de Informática de Análises de Dados, versão 9.0. www.statsoft.com, 2009.

STEELE, C.L., CROCK, J., BOHLMANN, J., CROTEAU, R. Sesquiterpene Synthases from *Grand Fir* (*Abies grandis*). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 2078–2089, 1998.

TADMOR, Y.; FRIDMAN, E.; GUR, A.; LARKOV, O.; LASTOCHKIN, E.; RAVID, U.; ZAMIR, D.; LEWINSOHN, E. Identification of malodorous, a wild species allele affecting tomato aroma that was selected against during domestication. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v. 50, p. 2005-2009, 2002.

TELES, T.V.; BONFIM, R.R.; ALVES, P.B.; BLANK, A.F.; JESUS, H.C.R.; QUINTANS-JUNIOR, L.J.; SERAFINI, L.J.M.R.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S. Composition and evaluation of the lethality of *Lippia gracilis* essential oil to adults of *Biomphalaria glabrata* and larvae of *Artemia salina*. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, p. 8800-8804, 2010.

TERBLANCHÉ, F. C; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of genus *Lippia* (Verbenaceae) A literatura review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, p. 471-484, 1996.

TRABULSI, L.R., ALTERTHUM, F., GOMPERTZ, O. F., CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**, 3ª ed. São Paulo: Ateneu, 1996.

TURNER, G.W., GERSHENZON, J., CROTEAU, R.B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, v. 124, p. 655–663, 2000.

UTSUKIHARA, T.; CHAI, W.; KATO, N.; NAKAMURA, K.; HORIUCHI, C. A. Reduction of (+)- and (-)-camphorquinones by cyanobacteria. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 19-24, 2004.

VAN DE BRAAK, S.A.A.J., LEIJTEN, G.C.J.J. Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, **Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries**, Rotterdam, p. 116, 1999.

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, D.J. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 11, p. 463-467, 1963.

VANE, L.M. A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, p. 603-629, 2005.

VEIGA JUNIOR, V.F., PINTO, A.C. MACIEL, M.A.M. *Plantas Medicinais: Cura segura?*. **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

WACKETT, L.P., HERSHBERGER, C.D. **Biocatalysis and Biodegradation: Microbial Transformation of Organic Compounds**. Washington D.C.: ASM Press, p. 22-23, 2001.

WATANABE, S., TAKADA, Y. AND FUKUNAGA, N. Purification and characterization of a cold-adapted isocitrate lyase and a malate synthase from *Colwellia maris*, a psychrophilic bacterium. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 65, p. 1095-1103, 2001.

WEBSTER, J., WEBER, R.W.S. **Introduction to Fungi**. 3ed, New York: Cambridge University Press, 2007.

XU, P., LU, T. Selective Synthesis of Either Enantiomer of α -Amino Acids by Switching the Regiochemistry of the Tricyclic Iminolactones Prepared from a Single Chiral Source. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, p. 658-661, 2002.

ANEXO I

ESPECTROS DE RMN DE FRAÇÕES OBTIDAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA CÂNFORA

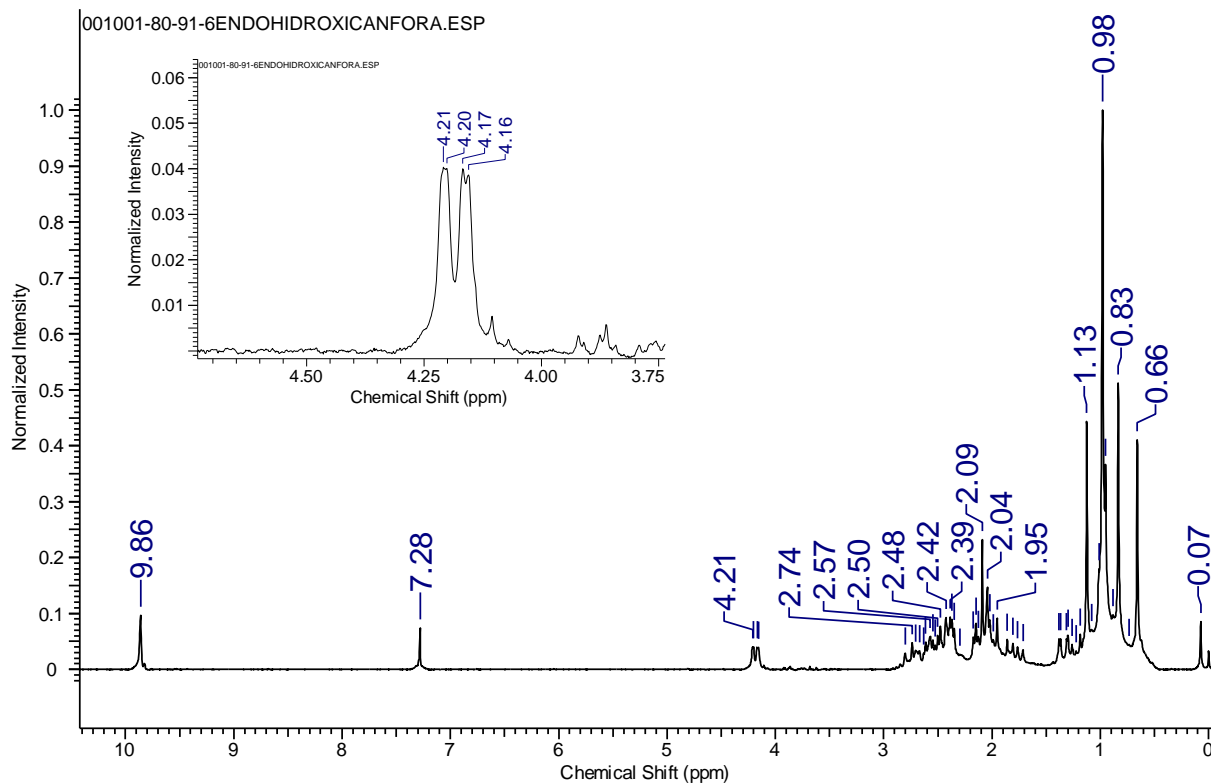
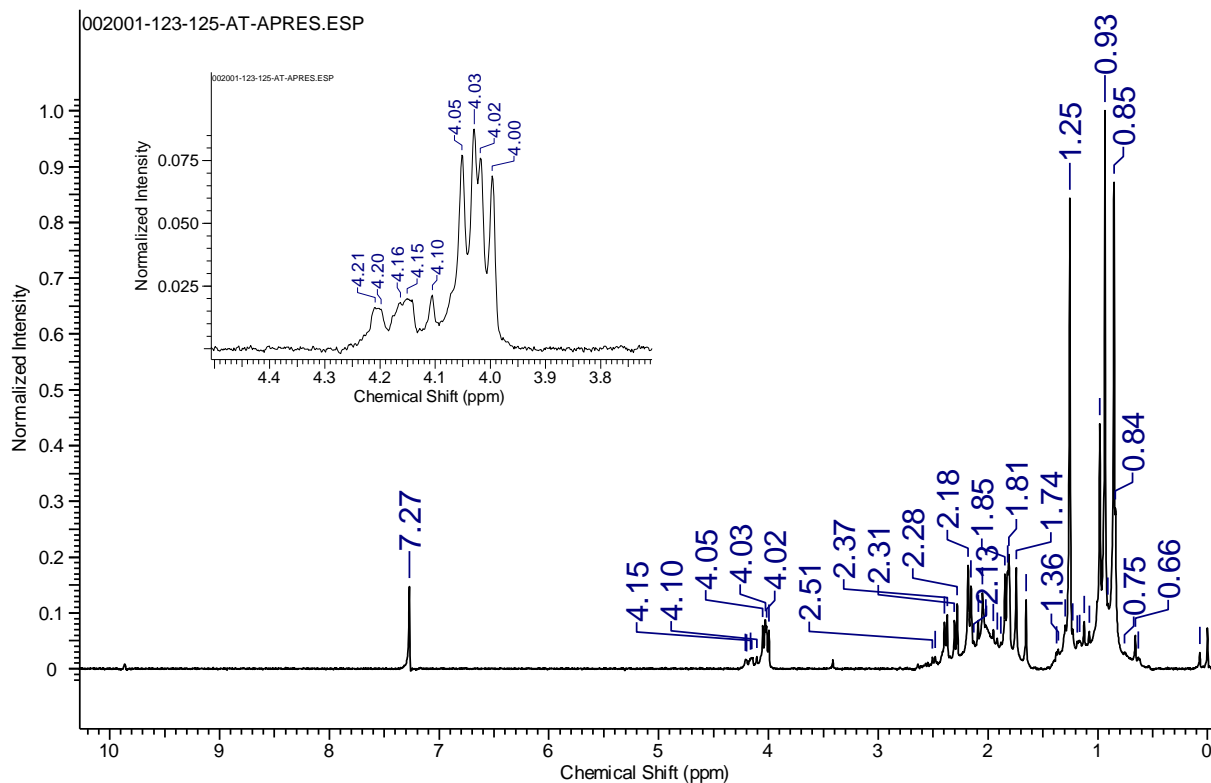
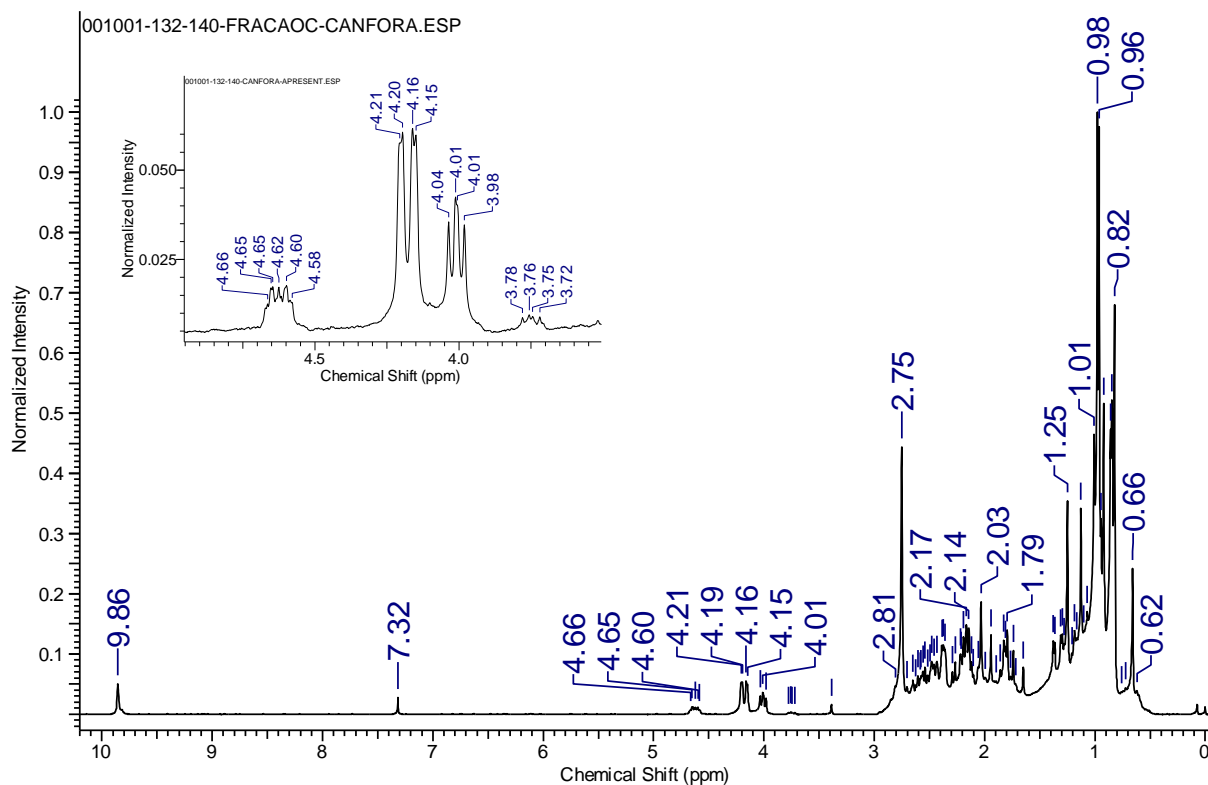
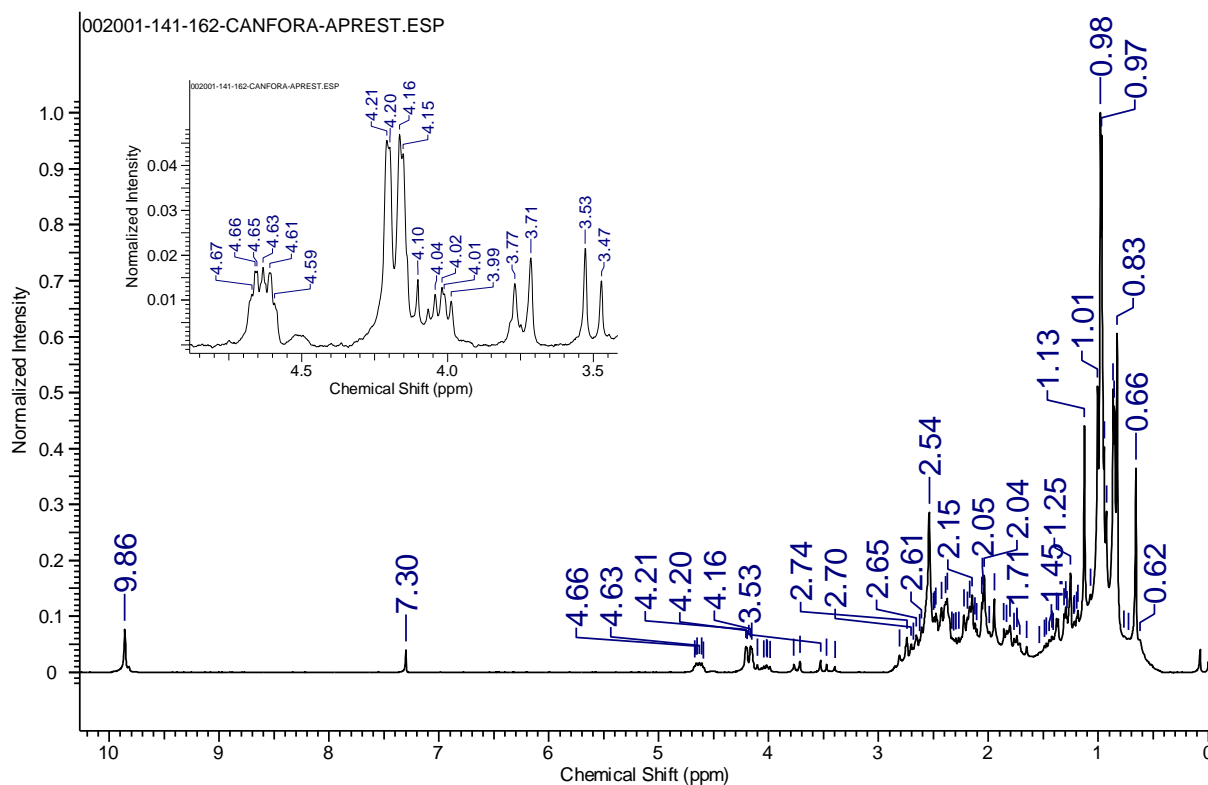
Figura 1. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da fração A**Figura 2.** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da fração B

Figura 3. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da fração C**Figura 4.** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da fração D

ANEXO II

ESPECTROS DE RMN DE FRAÇÕES OBTIDAS NA BIOTRANSFORMAÇÃO DA FENCHONA

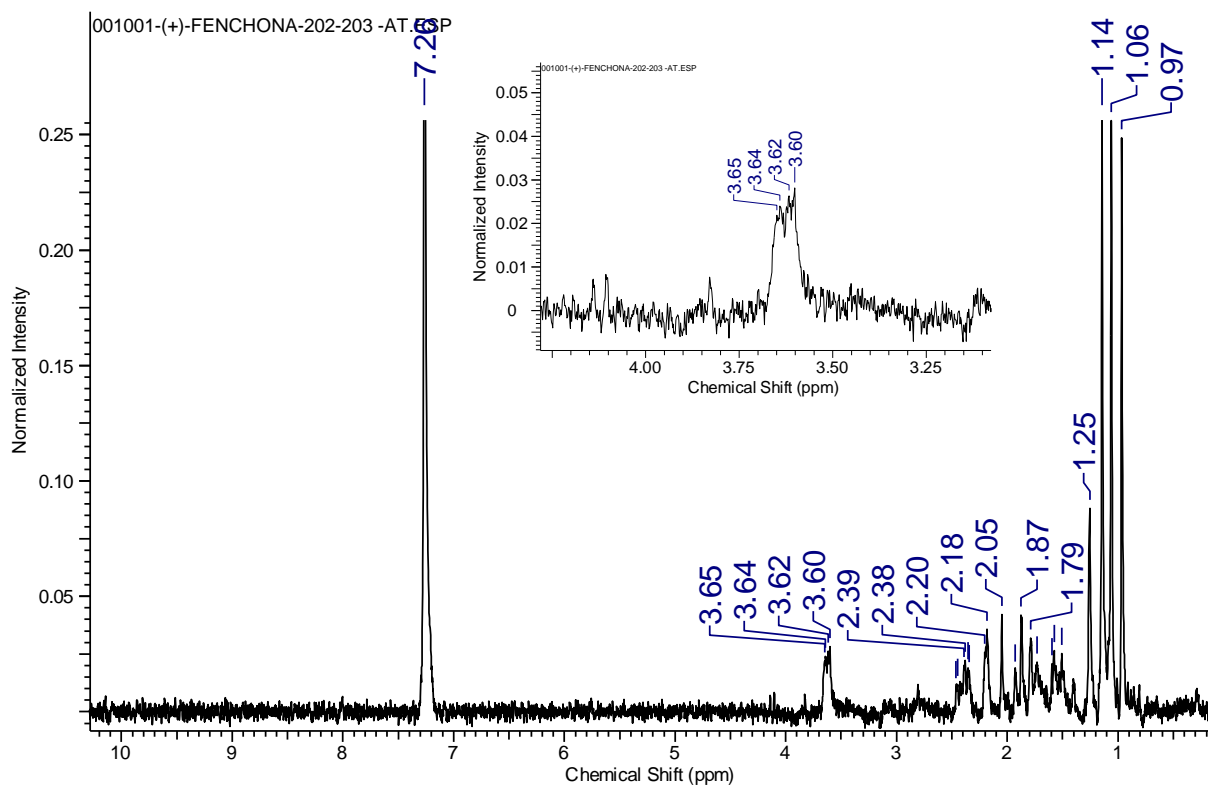
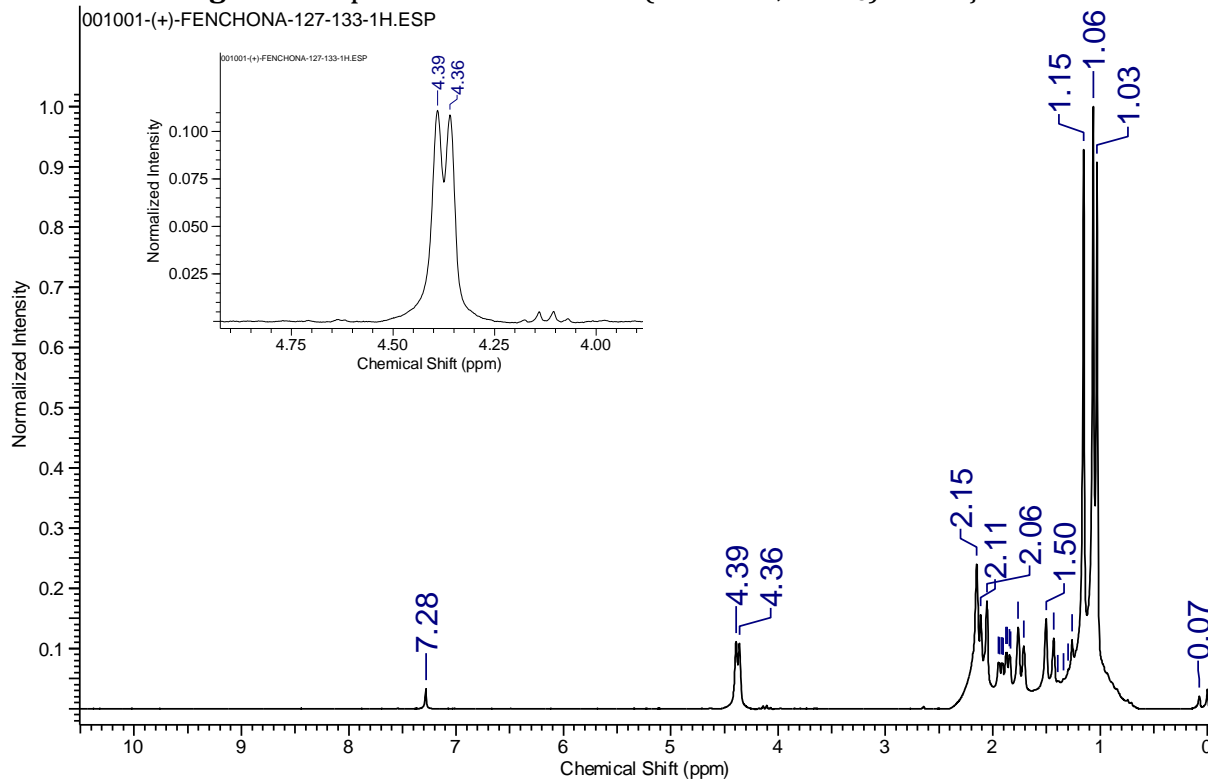
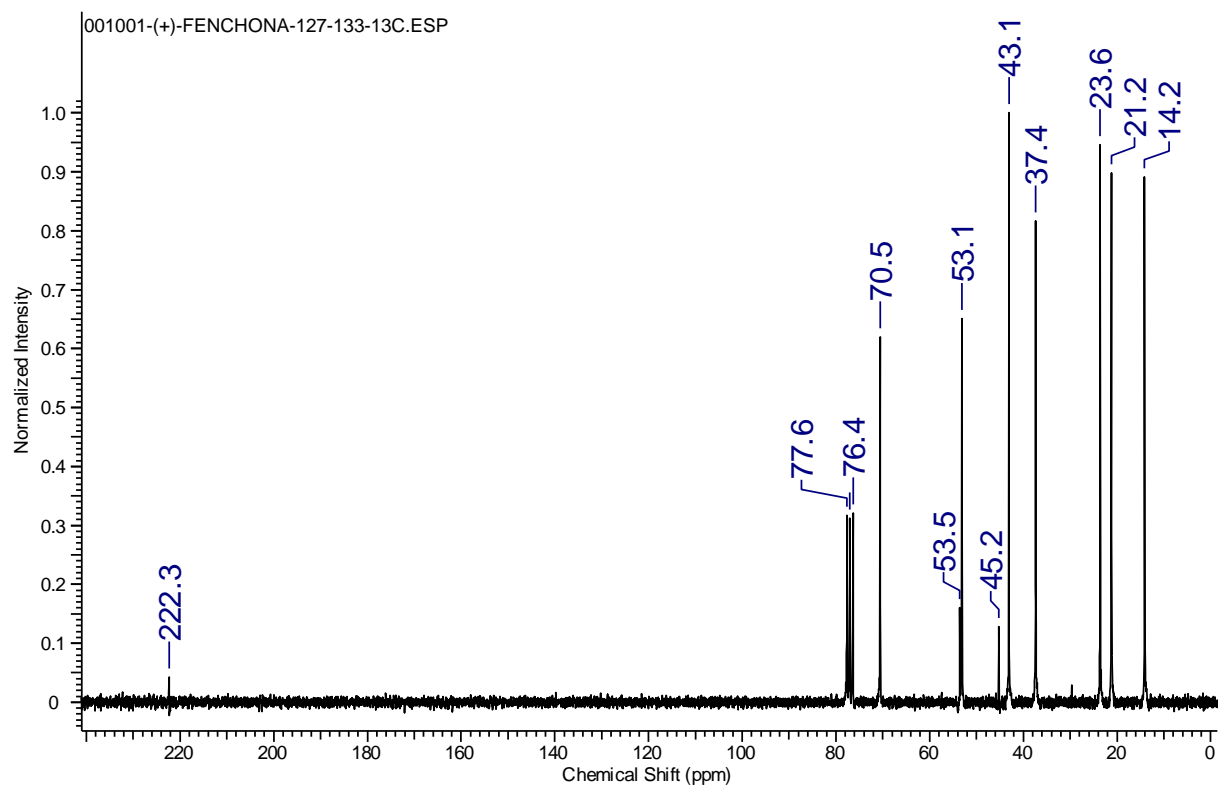
Figura 1. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da fração A**Figura 2.** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) da fração B

Figura 3. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) da fração B

ANEXO III

Análise de agrupamento: matrizes geradas

Matrizes obtidas usando o STATISTICA® 9.0 através da análise de agrupamento dos dados de composição química do óleo essencial de sete genótipos de *Lippia gracilis*.

• **Sem estresse (SE)**

Tabela 1. Matriz de similaridade (ms)

	106	107	108	109	110	201	202
106	0,0	69,7	71,0	76,1	74,7	66,8	72,9
107	69,7	0,0	6,6	9,7	9,1	11,1	8,1
108	71,0	6,6	0,0	7,9	6,0	16,1	5,0
109	76,1	9,7	7,9	0,0	5,2	19,9	5,2
110	74,7	9,1	6,0	5,2	0,0	18,4	4,3
201	66,8	11,1	16,1	19,9	18,4	0,0	17,7
202	72,9	8,1	5,0	5,2	4,3	17,7	0,0

Tabela 2. Matriz de correlação cofenética (mc) derivada do dendogramas da Figura 11A.

	106	107	108	109	110	201	202
106	0	116,0	116,0	116,0	116,0	116,0	116,0
107	116,0	0	6,5	10,4	10,4	23,3	10,4
108	116,0	6,5	0	10,4	10,4	23,3	10,4
109	116,0	10,4	10,4	0	5,5	23,3	5,5
110	116,0	10,4	10,4	5,5	0	23,3	4,3
201	116,0	23,3	23,3	23,3	23,3	0	23,3
202	116,0	10,4	10,4	5,5	4,3	23,3	0

Tabela 3. Correlação entre ms e mc

	ms	mc
106x107	69,7	116,0
106x108	71,0	116,0
106x109	76,1	116,0
106x110	74,7	116,0
106x201	66,8	116,0
106x202	72,9	116,0
107x108	6,6	6,5
107x109	9,7	10,4
107x110	9,1	10,4
107x201	11,1	23,3
107x202	8,1	10,4
108x109	7,9	10,4
108x110	6,0	10,4
108x201	16,1	23,3
108x202	5,0	10,4
109x110	5,2	5,5
109x201	19,9	23,3
109x202	5,2	5,5
110x201	18,4	23,3
110x202	4,3	4,3
201x202	17,7	23,3

• **Com estresse (CE)**

Tabela 5. Matriz de similaridade (ms)

	106	107	108	109	110	201	202
106	0,0	69,1	70,2	72,9	71,4	64,9	69,8
107	69,1	0,0	6,9	7,7	6,8	9,9	4,4
108	70,2	6,9	0,0	6,1	4,6	15,1	4,5
109	72,9	7,7	6,1	0,0	4,5	16,9	4,8
110	71,4	6,8	4,6	4,5	0,0	14,9	4,2
201	64,9	9,9	15,1	16,9	14,9	0,0	13,1
202	69,8	4,4	4,5	4,8	4,2	13,1	0,0

Tabela 6. Matriz de correlação cofenética (mc) derivada do dendogramas da Figura 11B.

	106	107	108	109	110	201	202
106	0	113,5	113,5	113,5	113,5	113,5	113,5
107	113,5	0	7,4	7,4	7,4	19,5	7,4
108	113,5	7,4	0	5,5	4,7	19,5	4,7
109	113,5	7,4	5,5	0	5,5	19,5	5,5
110	113,5	7,4	4,7	5,5	0	19,5	3,3
201	113,5	19,5	19,5	19,5	19,5	0	19,5
202	113,5	7,4	4,7	5,5	3,3	19,5	0

Tabela 7. Correlação entre ms e mc

	ms	mc
106x107	69,1	113,5
106x108	70,2	113,5
106x109	72,9	113,5
106x110	71,4	113,5
106x201	64,9	113,5
106x202	69,8	113,5
107x108	6,9	7,4
107x109	7,7	7,4
107x110	6,8	7,4
107x201	9,9	19,5
107x202	4,4	7,4
108x109	6,1	5,5
108x110	4,6	4,7
108x201	15,1	19,5
108x202	4,5	4,7
109x110	4,5	5,5
109x201	16,9	19,5
106x107	4,8	5,5
106x108	14,9	19,5
106x109	4,2	3,3
106x110	13,1	19,5

Cálculo do coeficiente de correlação cofenética:

$$\text{Coeficiente de correlação cofenética (cc)} = \frac{\sum (ms - \overline{ms})(mc - \overline{mc})}{\sqrt{\sum (ms - \overline{ms})^2 \sum (mc - \overline{mc})^2}}$$

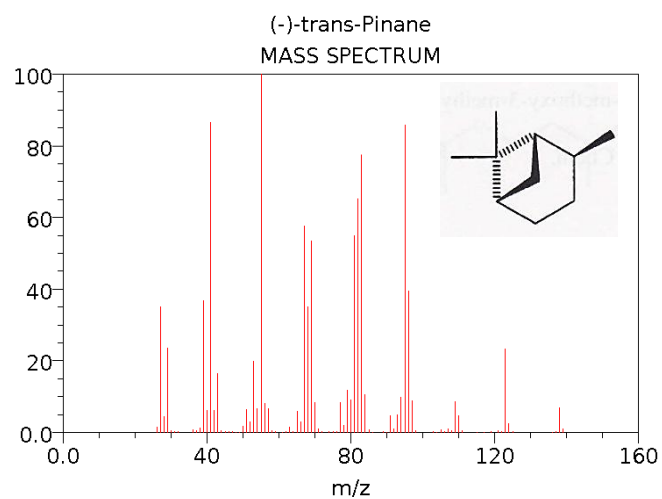
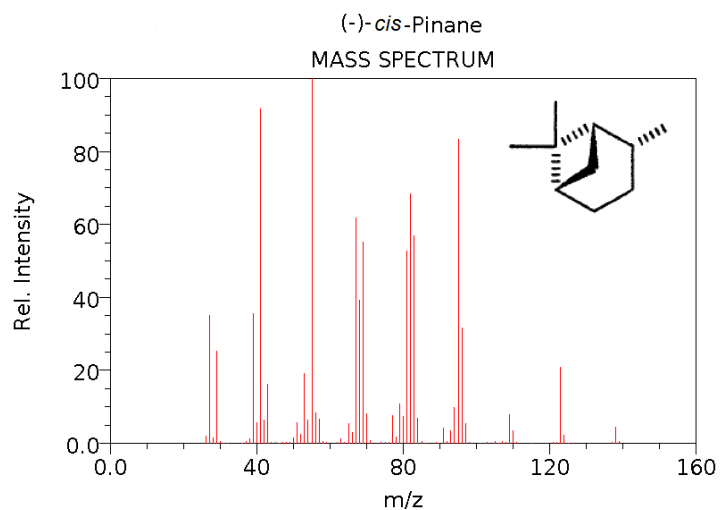
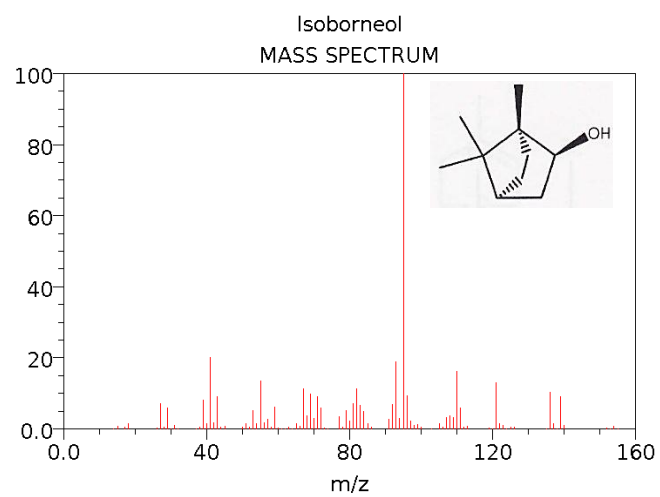
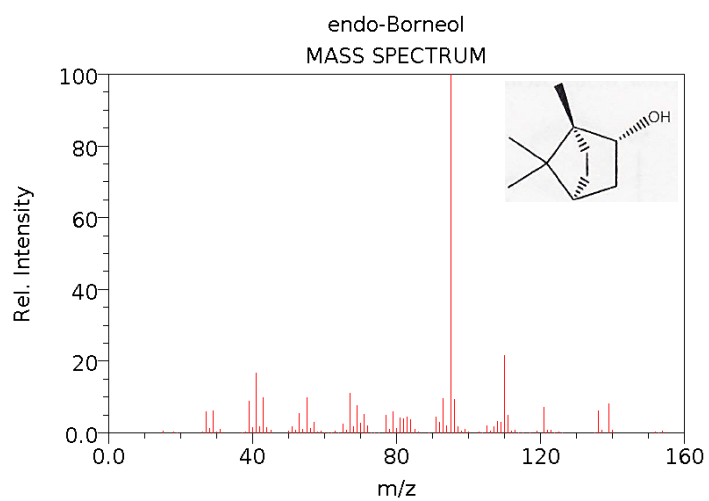
• **SE** → $cc = 0,99629$

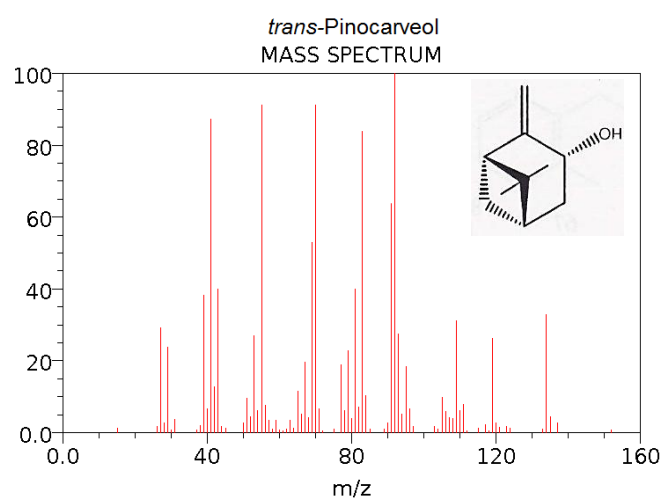
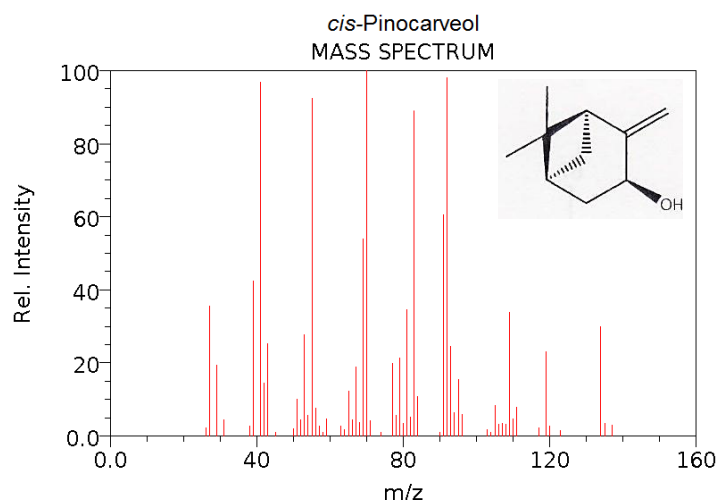
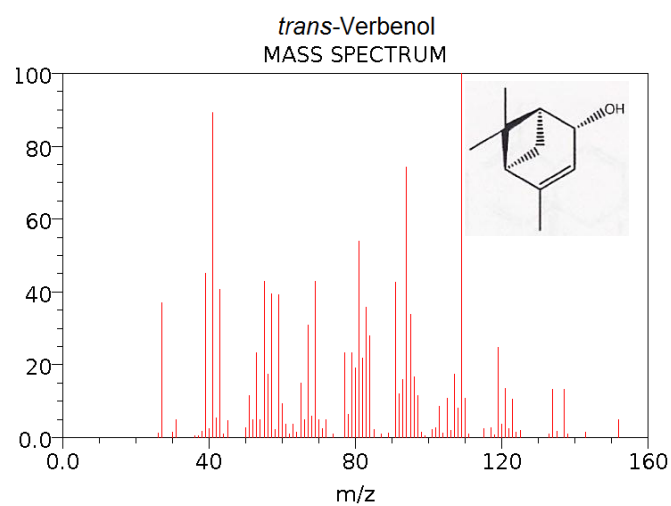
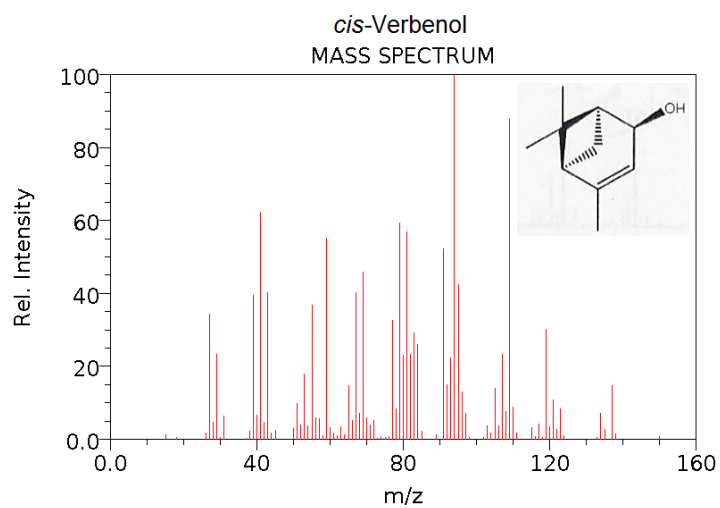
CE → $cc = 0,99783$

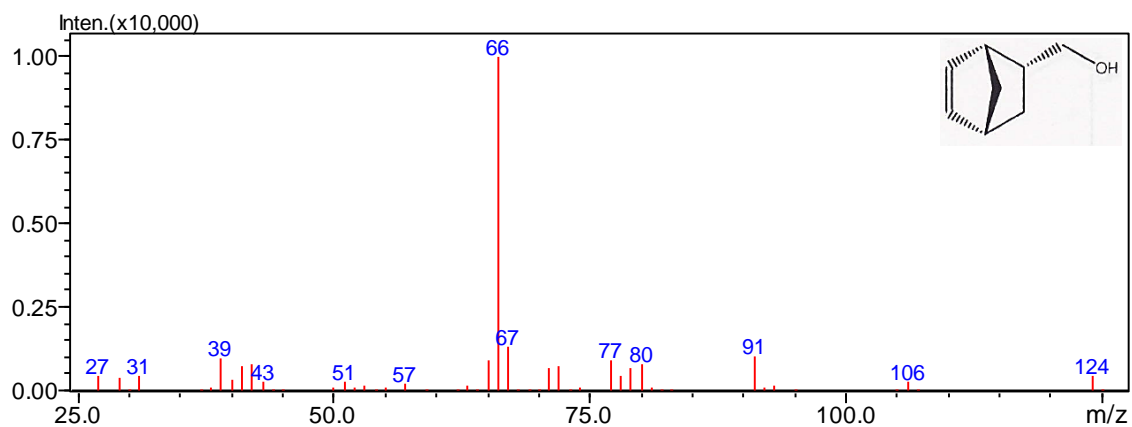
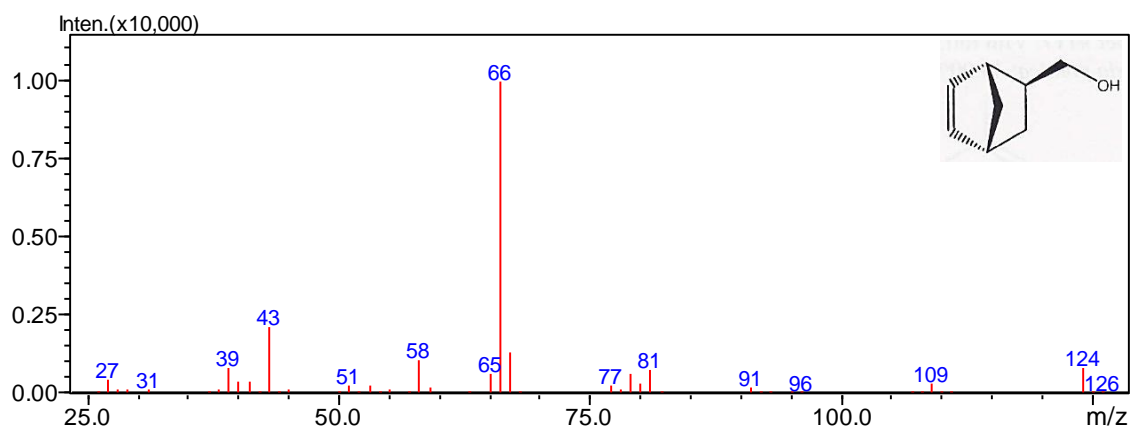
ANEXO IV

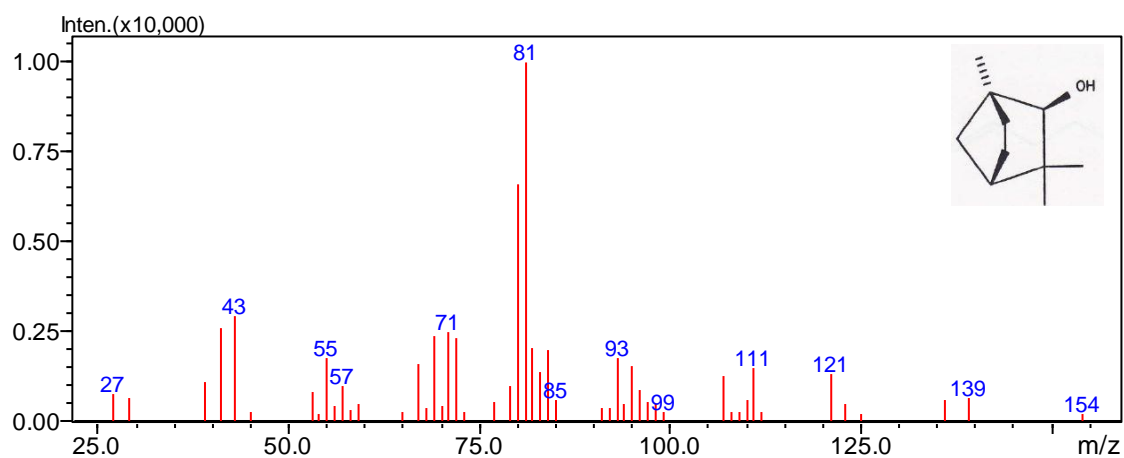
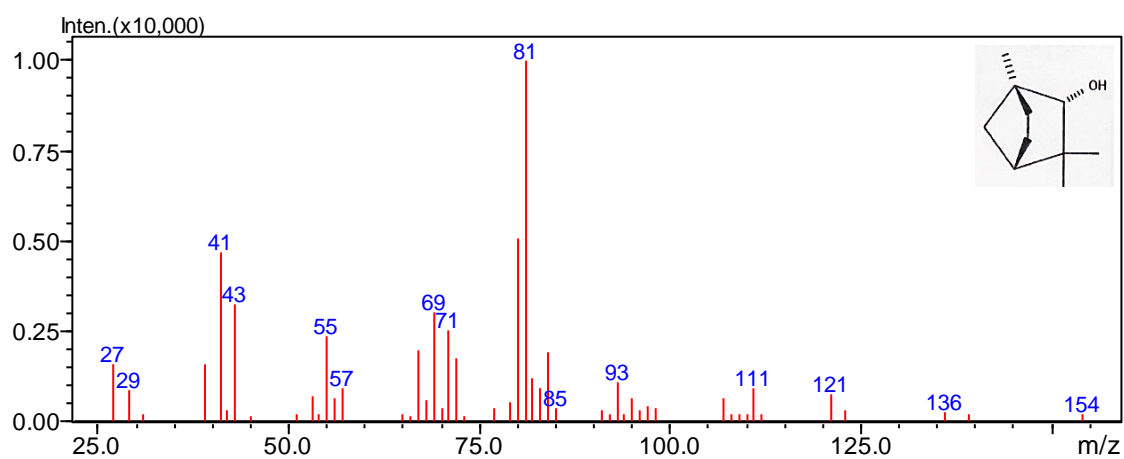
Espectros de massas de diastereoisômeros bicíclicos

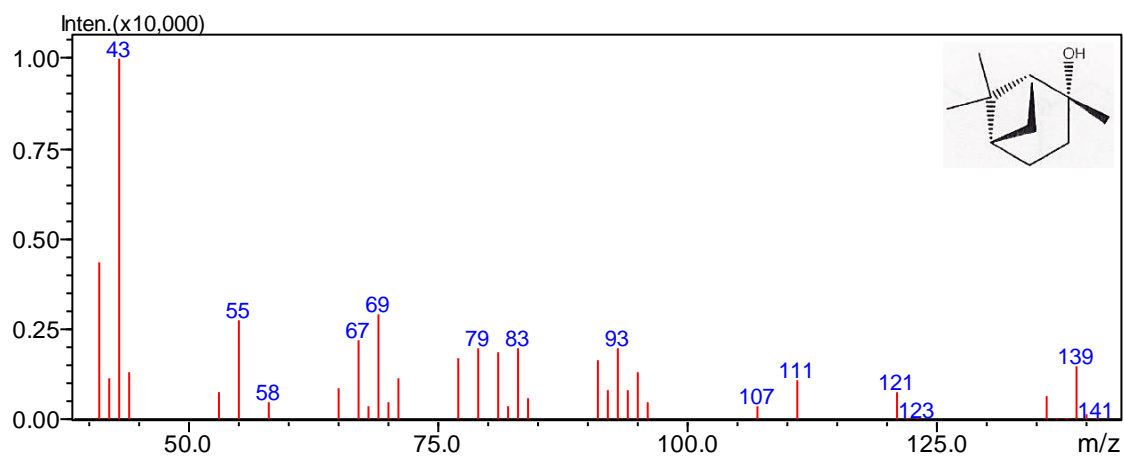
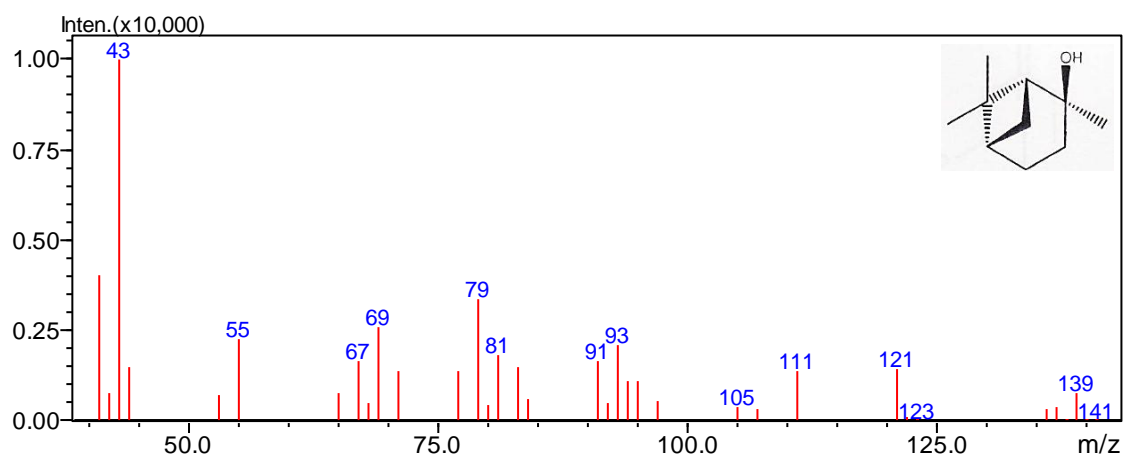
(NIST Mass Spec Data Center - <http://webbook.nist.gov>; WILEY8)

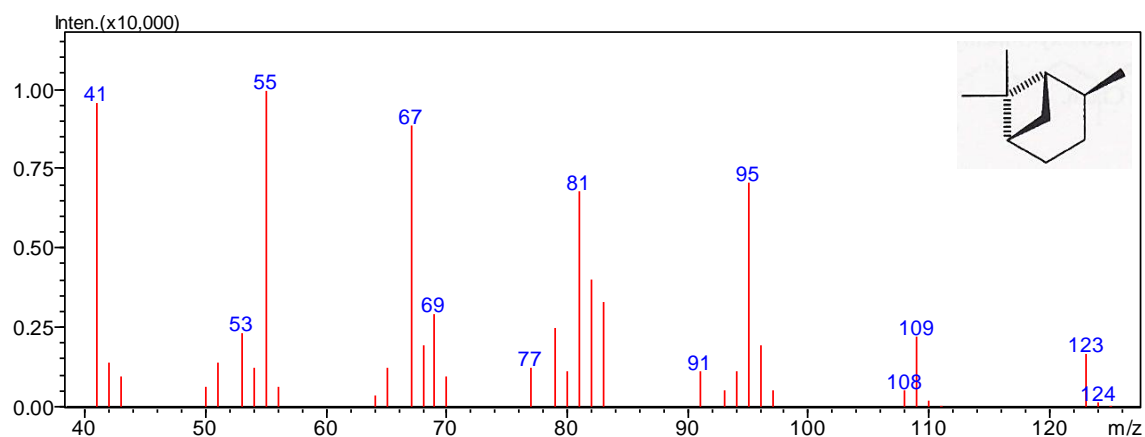
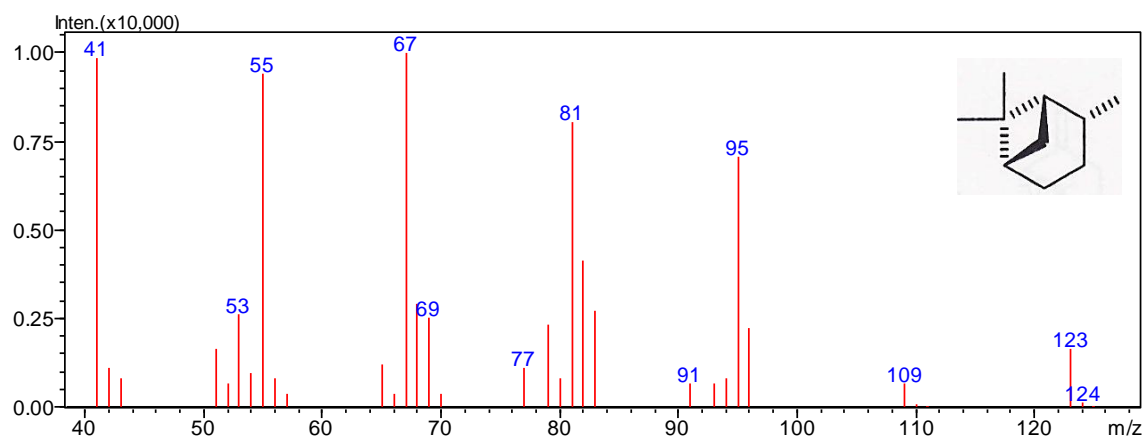


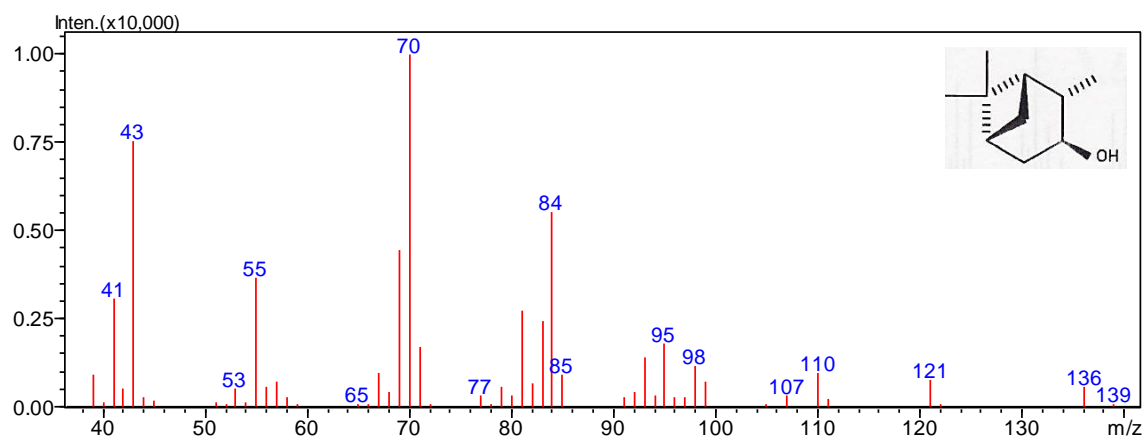


5-endo-2-metanol-Norborneno**5-exo-2-metanol-Norborneno**

endo*-Fenchol**exo*-Fenchol**

trans*-Hidrato de pineno**cis*-Hidrato de pineno**

trans*-Pinano**cis*-Pinano**

***iso*-Pinocanfeol****Pinocanfeol**