UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação multidisciplinar da biossíntese de sesquiterpenos voláteis bioativos de

***Lychnophora ericoides* (Vernonieae: Asteraceae)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas para obtenção do
Título de Doutor em Ciências.
Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Daniel Petinatti Pavarini
Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pavarini, Daniel Petinatti

Investigação multidisciplinar da biossíntese de sesquiterpenos voláteis bioativos de *Lychnophora ericoides*
Ribeirão Preto, 2014.

149 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

(1) Terpenos (2) HS-SPME (3) Antinociceptivos (4) MALDI *imaging* (5) clonagem

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Petinatti Pavarini

Investigação multidisciplinar da biossíntese de sesquiterpenos voláteis bioativos

de *Lychnophora ericoides* (Vernonieae: Asteraceae)

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador(a): Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado aos meus amores:

Natalia, Elenir, Airton e Saulo.

Ao “Som”... etéreo, cósmico e onipresente.

Agradecimentos

Anos de trabalho se passaram. Há pessoas que tornaram não apenas possível mas também produtivo e proveitoso esse enorme aprendizado. A estas pessoas seguem meus sinceros agradecimentos.

Ao Prof. Dr. Norberto P. Lopes (DFQ-FCFRP-USP) pelo aprendizado em Química Orgânica e Espectrometria de Massas, pela liberdade “ímpar” na criação e na condução do trabalho e ainda pelo convívio super-ativo e intelectualmente engrandecedor.

A Dr. Denise Brentan pela cooperação nos trabalhos com MALDI-MS.

A Prof(a). Dr(a). Ana Patrícia Yatsuda Natsui (DACTB-FCFRP-USP) pela abertura na colaboração dos trabalhos que envolveram técnicas de Biologia Molecular. Agradeço ainda aos doutores Leticia Pollo e Luiz Miguel Pereira pela cooperação dos trabalhos no Grupo da Dra. Natsui.

Ao Prof. Dr. Otmar Spring (Botanik institut, Universität Hohenheim) pela oportunidade de trabalho com seu grupo em Hohenheim, Stuttgart, Alemanha o qual foi crucial para minha formação e muito produtivo para conclusão desta tese. Aos doutorandos Katharina Aschenbrenner e Maximillian Frey pela cooperação nos experimentos de Clonagem e Alinhamento de Sequencias de Pares de Bases.

Ao Prof. Dr. Luiz Elideo Gregório UFVJM (Atualmente UNIFESP) pela infraestrutura gentilmente oferecida durante as Expedições ao Campo nos arredores do Município de Diamantina-MG.

Ao Prof. Dr. João Semir (IB- Unicamp) e ao seu orientado no curso de Doutorado M. Sc. Marcelo Monge pelo imenso suporte técnico, intelectual e logístico nas atividades de coleta e identificação do material vegetal.

Aos Colegas de Pós Graduação, em especial aos mais próximos no dia a dia de Laboratório, pelo apoio nos experimentos. Dayana, Leandro, Lucas e Eduardo.

Aos Professores do grupo do NPPNS pelo recorrente apoio financeiro e intelectual em nossas colaborações.

Aos técnicos especialistas em laboratório dos grupos de pesquisa os quais frequentei ao longo do período do doutorado por viabilizar as atividades diárias de pesquisa.

Total: “Todos estão loucos? Porque a cabeça da gente é uma só, e as coisas que há e que estão para haver são demais de muitas, muito maiores diferentes, e a gente tem de necessitar de aumentar a cabeça, para o Total!”

João Guimarães Rosa.
Excerto de *Grande Sertão: Veredas* (1956)

Resumo

PAVARINI, D.P. Investigação multidisciplinar da biossíntese de sesquiterpenos bioativos de *Lychnophora ericoides*. (Vernonieae: Asteraceae) 2011. 149f. Tese de Doutorado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2014.

Lychnophora (Vernonieae: Asteraceae) é um gênero micro-endêmico dos “campus rupestris” do bioma Cerrado. Os extratos foliares de *Lychnophora ericoides* (“Arnica-da-serra”) são usados na terapêutica popular principalmente como analgésico. Seus óleos essenciais são quimicamente ricos em sesquiterpenos. Tais compostos, principalmente os de esqueletos bisabolano e cadinano são produtos biossintéticos do precursor cátion nerolidila. Óleos essenciais de folhas de *L. ericoides* são bioativos frente a invertebrados do Táxon Acari. Um de seus componentes majoritários, o *orto*-acetoxi bisabolol, é antinociceptivo em ensaios *in vitro*. Terpenos são valorizados pela indústria de química fina, haja vista sucessos como Taxol® e Acheflan®. Nossos objetivos em Fitoquímica e Ciências Farmacêuticas se alinham a esse interesse. As terpeno-sintases (TerpS) envolvidas na biossínteses dos compostos são ainda alvo de pesquisas com em Bioquímica. Sua identificação é frequentemente conclusiva em diversos aspectos. Como exemplo, citamos a compreensão dos mecanismos da variabilidade metabólica temporal em espécies nativas e selvagens e os avanços na bioengenharia de Produtos Naturais (PN). Frente a este cenário de fronteira este manuscrito traz um resumo da investigação que objetivou determinar se há diversas isoformas de TerpS operando na produção temporalmente variável de sesquiterpenos bioativos em tecidos foliares de *Lychnophora ericoides* ou se não as há. Acessamos diferentes amostras selvagens de *L. ericoides* *in situ*. Nossos esforços em responder a questão supracitada foram divididos em tarefas, a seguir: (1) Determinação da fração rica em sesquiterpenos inspirada na “Química Analítica Verde”; (2) MALDI *imaging* das proteínas das folhas; (3) Estratégia “omics” combinada na identificação e clonagem das TerpS. Visitamos campos de ocorrência (CampO) georreferenciados bem como desconhecidos. O desenvolvimento de método de quantificação por *Headspace*-SPME permitiu uma comparação rápida e livre de solventes de amostras vegetais mínimas (10 mg). A separação e identificação foi conduzida por *Gas Chromatography-Mass Spectrometry* (GC-MS). As amostras de Diamantina, CampO mais Boreal de todos, apresentam a maior quantidade de derivados bisabolano. A hidrodestilação do material vegetal excedente ao HS-SPME forneceu óleos essenciais para o isolamento de moléculas. Dados espectrais diversos fundamentam a descrição de um derivado cadinano, o 11-dehidro cadinol, entre outros. O MALDI *imaging* determinou como exequível a geração de imagens moleculares em folhas de *L. ericoides*. Foram geradas imagens subepidermais dos íons com m/z que se assemelham a cadinano e bisabolano synthases (CadS and BS). A limitação do emprego da técnica é a determinação previa da massa nominal da proteína nativa. *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (1D-PAGE) gerou mapas de proteínas separadas por tamanho (A, B, C, e D) ($30\text{KDa} > m/z < 80\text{KDa}$). A digestão com tripsina das bandas geraram peptídeos para análise em MS. Íons resultantes alimentaram o algoritmo MASCOT. Uma isoforma de germacrano-sintase foi identificada. Prospecção de genes codificadores com o cDNA (Ubiquitina +) determinou uma BS, de comprimento 1600pb, amplificada com *primers* de design para genes de *Helianthus* spp. A BS de *L. ericoides* foi clonada. Concluindo, destacamos dois pontos. (1) O controle enzimático na produção dos sesquiterpenos poderá enfim ser averiguada a nível do transcriptoma. (2) A busca pela produção biotecnológica de PN sofreu um pequeno incremento. Esperamos ter contribuído humildemente na produção sustentável de PN e por conseguinte na preservação da biodiversidade. **Palavras Chave:** (1) Terpenos (2) HS-SPME (3) Antinociceptivos (4) MALDI *imaging* (5) clonagem

ABSTRACT

PAVARINI, D.P. Multilevel investigation of bioactive sesquiterpene biosynthesis from *Lychnophora ericoides* (Vernonieae: Asteraceae) 2011. 149 p. PhD Thesis-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, "University of São Paulo". Ribeirão Preto, 2014.

Lychnophora (Vernonieae: Asteraceae) is micro endemic to "campus rupestris" from Brazilian "Cerrado". Leaves extracts of *Lychnophora ericoides* ("Arnica-da-serra") are used as folk medicine and mainly as wound healer. Its essential oils were chemically profiled as sesquiterpene-rich. Such sesquiterpenes, both bisabolene-like and cadinane-like carbon skeletons, are derivatives of the nerolidyl cation. *L. ericoides* leaves essential oils are bioactive against invertebrate Acari. An anti-hypernociceptive ability of its component *orto*-acetoxy bisabolol was also displayed *in vitro*. Terpenes are valuable in fine chemistry industry, e.g. Taxol® and Acheflan®. Our phytochemical and pharmaceutical goals are aligned to such an interest. Terpene synthases (TerpS) behind their biosynthesis are target of researches in plant sciences and biochemistry. Identification of TerpS often led to conclusions with diverse impacts. Fundamental concepts on time-dependent shifts of terpene productions in wild type species and advances towards plant metabolites bioengineering are examples. Facing such a frontier field we share here an abstract for the investigation aimed to determine whether there were many isoforms of sesquiterpene synthases operating at leaves tissues in *Lychnophora ericoides* shift-able production of bioactive sesquiterpenes or whether there were not. We have accessed different *in situ* samples of *L. ericoides*. Efforts to answer the above question were sectioned as follows: (1) "Green-Analytical-Chemistry" oriented profiling of sesquiterpene-rich fraction; (2) MALDI imaging of proteins in leaves; (3) Combined "omics" approaches towards identifying TerpS and gene cloning. We visited both known and novel *L. ericoides* sites of occurrence (SoO). The development of a quantitative Headspace-Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME) method enabled a rapid and solvent-free comparison of minimized samples (10mg). Separation and identification were carried out using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Samples harvested in Diamantina, Northern Most SoO, accumulate the highest amount of bisabolene-like derivatives. Hydrodistillation of leftovers material from HS-SPME yield essential oils used to purify unknown compounds. Based on a diverse spectra collection we report a novel cadinane-like derivative, one 11dehydro Cadinol. MALDI imaging has been determined as suitable for imaging proteins in *L. ericoides*. In a prospective fashion we generate sub-epidermal images of ions within the m/z frame comprising reported isoforms of both cadinane and bisabolane synthases (CadS and BS). The limitation to its use is the awareness of molecular weight of targeted native proteins. Polyacrylamide Gel Electrophoresis (1D-PAGE) protein mapping determined broad bands of protein distribution in different mass ranges (A, B, C, and D) ($30\text{KDa} < m/z < 80\text{KDa}$). Bands tryptic digestion, followed by sample clean up, generated peptide pools feasible for MS. The output ions data feed MASCOT algorithm. A germacrane synthase could have been identified. When prospecting encoding genes, viable cDNA (Ubiquitin +) was used. A BS, lengthened 1600bp, was amplified with BS primers designed for *Helianthus* spp. genes. BS presented in *L. ericoides* was successfully cloned. In conclusion we headline two topics. (1) Hypothetical enzymatic control of the sesquiterpenes production can now be further investigated at transcriptome level. (2) The seek of a platform that guarantee natural products production in a controlled system has been moved forward. Future production of valued compounds can slightly rely in our humble contribution to support biodiversity conservation. **Key Words:** (1) Terpenes (2) HS-SPME (3) Anti-nociception (4) MALDI imaging (5) cloning

Lista de Figuras

Figura 1. Sesquiterpenos voláteis majoritários nas folhas de <i>L. ericoides</i> e um derivado volátil da fenilalanina majoritário em folhas de <i>L. pinaster</i>	8
Figura 2. Mono e Sesquiterpenos recentemente descritos para frações voláteis de folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>	10
Figura 3. Ilustração informativa sobre o experimento de Headspace <i>in vivo</i> que sugere uma capacidade de reposta do derivado bisabolano de <i>L. ericoides</i> a agressões mecânicas	12
Figura 4. As 4 etapas fundamentais da biogênese dos terpenos	15
Figura 5. Ilustração em forma de esquema de trabalho para a coleta do material vegetal <i>in situ</i> e posterior retirada de alíquota para análises	32
Figura 6. Ilustração em forma de fluxo de trabalho evidenciando as etapas do desenvolvimento da metodologia de quantificação dos componentes da fração volátil HS-SPME de folhas de <i>L. ericoides</i>	36
Figura 7. Equação de Kovats utilizada no calculo do IRR	38
Figura 8. Esquema ilustrado descrevendo as etapas chaves no processo de geração de imagens moleculares das proteínas distribuídas nas folhas de <i>L. ericoides</i> pelo emprego da técnica de MALDI-IMS	39
Figura 9. Gráfico ilustrando as etapas principais na execução dos experimentos de geração de mapas proteicos por separação em Gel e análise espectrométrica.	41
Figura 10. Comparação dos espectros EI-MS para Vanilina.	53
Figura 11. Comparação dos espectros EI-MS para α -Humuleno	54
Figura 12. Espectros EI-MS para Sesquicineol.	55
Figura 13. Espectro EI-MS para o derivado Bisaboleno de “NPL 382”	55
Figura 14. Comparação dos espectros EI-MS para ar-Curcumeno	57
Figura 15. Espectros EI-MS para orto-acetoxi Bisabolol	58
Figura 16. Ampliação do cromatograma GC-MS na região de eluição dos sesquiterpenos. <i>Lychnophora ericoides</i> “NPL 382”, Maio 2012	58
Figura 17. Ampliação do cromatograma GC-MS na região de eluição dos sesquiterpenos. <i>Lychnophora ericoides</i> “NPL 123”, Maio 2012	59
Figura 18. Mecanismos de fragmentação propostos para descrever a formação dos íons relevantes para a identificação dos analitos observados como majoritários em frações voláteis de <i>Lychnophora ericoides</i>	60
Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas das seis amostragens “medianas”	61
Figura 20. Barras apresentando os valores observados para a média aritmética dos sinais cromatográficos majoritários em “NPL 382”.	63
Figura 21. Barras apresentando os valores observados para a média aritmética dos sinais cromatográficos majoritários em “NPL 123”	64
Figura 22. Barras apresentando os valores observados para quantidades conhecidas de calibrante externo (<i>trans</i> -cariofileno Padrão P.A.) na região “Dispersão”	65
Figura 23. Valores de intensidade de sinal $[f(x)]$ e concentração em ppm $[uL/(10^6 \cdot mg)]$ no eixo x	66
Figura 24. Distribuição dos valores médios das concentrações dos compostos em ppm de volume destes por massa das folhas	67
Figura 25. Sobreposição de cromatogramas obtidos pela injeção de óleos essenciais de folhas de <i>L. ericoides</i> “NPL 382” e “NPL 123” em ordem de aparição de cima pra baixo nesta página	70
Figura 26. CCDA (Diclorometano) comparando o perfil de eluição das 8 frações obtidas da coluna <i>flash</i> .	72

Figura 27. Espectro EI-MS para o derivado bicíclico de “NPL 123”	74
Figura 28. Espectro de massas para o derivado biciclohexânico em ESI no modo scan (ESI-qTOF; modo positivo)	75
Figura 29. Estrutura do derivado biciclohexânico de “NPL 123”	77
Figura 30. Mapa de correlações heteronucleares obtidos para 11-dehidro cadinol de “NPL 123”	80
Figura 31. Comparação dos espectros EI-MS para α -Bisabolol.	82
Figura 32. Mapas proteicos de faixa restrita de peso molecular gerados para os cortes transversais de folhas jovens e recém-coletadas de <i>Lychnophora ericoides</i>	85
Figura 33. Gel Unidimensional 1D-PAGE dos estratos proteicos de 3 espécimens de <i>Lychnophora ericoides</i> (123, 227 e 382) e um espécimen de <i>Lychnophora salicifolia</i> (378)	88
Figura 34. Espectro de massas MALDI-TOF do <i>spot</i> nomeado como 2D	89
Figura 35. Impressão do relatório de buscas por sequências de peptídeos similares gerado pela plataforma MASCOT com identificação de uma Germacrano Sintase	90
Figura 36. cDNA de <i>L. ericoides</i> sondado com <i>primers</i> para bisabolano sintases de girassóis (HaBS)	92
Figura 37. Resultados do PCR de colônias demonstrando a fita de DNA do tamanho esperado para o clone vetorizado.	93
Figura 38. cDNA de <i>L. ericoides</i> sondado com <i>primers</i> para germacrano sintases (GAS) de girassóis (HaGAS)	93
Apêndice 1. Cópia da autorização expedida pelo CNPq sob credenciamento do CGen (Pagina 1 de 2)	114
Apêndice 2. Cópia da autorização expedida pelo CNPq sob credenciamento do CGen (Pagina 2 de 2)	115
Apêndice 3. Cópia da Autorização expedida pelo SISBio, MMA (Pagina 1 de 3)	116
Apêndice 4. Cópia da Autorização expedida pelo SISBio, MMA (Pagina 2 de 3)	117
Apêndice 5. Cópia da Autorização expedida pelo SISBio, MMA (Pagina 3 de 3)	118
Anexo 1. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 11-dehidro cadinol	120
Anexo 2. Espectro de RMN DEPT 135 para o composto 11-dehidro cadinol	120
Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H para o composto 11-dehidro cadinol (região blindada)	121
Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H para o composto 11-dehidro cadinol (região desblindada)	122
Anexo 5. Mapa de Contornos HMQC para 11-dehidro cadinol	123
Anexo 6. Mapa de Contornos HMBC (parte 1 de 3) para 11-dehidro cadinol	124
Anexo 7. Mapa de Contornos HMBC (parte 2 de 3) para 11-dehidro cadinol	125
Anexo 8. Mapa de Contornos HMBC (parte 3 de 3) para 11-dehidro cadinol	126
Anexo 9. Espectros de massas da molécula protonada de m/z 221 referente ao 11-dehidro cadinol (MS 2 ESI-qTOF, modo positivo).	127
Anexo 10. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto α -Bisabolol	128
Anexo 11. Espectro de RMN DEPT 135 para o composto α -Bisabolol	129
Anexo 12. Espectro de RMN de ^1H para o composto α -Bisabolol (Parte 1 de 2)	130
Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H para o composto α -Bisabolol (parte 2 de 2)	131
Anexo 14. Mapa de Contornos HMQC para α -Bisabolol	132
Anexo 15. Mapa de Contornos HMBC (parte 1 de 3) para α -Bisabolol	133
Anexo 16. Mapa de Contornos HMBC (parte 2 de 3) para α -Bisabolol	134

Lista de Tabelas

Tabela 1. Referências das atividades de Campo	30
Tabela 2. Apresentação dos dados referentes aos metabolitos identificados dentro da faixa de eluição de interesse nos cromatogramas (45minutos <Tempo de retenção> 20minutos)	51
Tabela 3. Tempo de retenção de cada um dos <i>n</i> -alcanos utilizados na determinação dos IRRs de cada analito avaliado	52
Tabela 4. Valores para os parâmetros de integração dos sinais cromatográficos pelo software GC-MS LabSolutions®	62
Tabela 5. Compilação dos dados laboratoriais na aquisição de óleos essenciais de folhas de <i>Lychnophora</i> spp.	69
Tabela 6. Grupos 1 a 9, obtidos através de cromatografia em coluna flash de 200 μ L de óleo essencial de <i>Lychnophora ericoides</i> , e suas respectivas massas	71
Tabela 7. Deslocamentos químicos do derivado biciclohexânico em RMN de ^{13}C (125MHz, CDCl_3) e ^1H (500MHz, CDCl_3)	76
Tabela 8. Correlações entre carbonos e hidrogênios observadas no mapa de contornos HMBC do derivado biciclohexânico de <i>L. ericoides</i> “NPL 123” (500MHz, CDCl_3)	78
Tabela 9. RMN ^{13}C para α -Bisabolol segundo PAVARINI, 2014 (125MHz, CDCl_3) e segundo ^{13}C SANTANA-LOURENÇO et al., 2011 (75MHz, CDCl_3)	83
Tabela 10. Nomes dos <i>primers</i> utilizados, metabolitos que seus genes produzem quando transcritos, comprimento dos <i>primers</i> , seqüências de nucleotídeos destes e número de pares de bases [pb]	91

Lista de Abreviaturas na ordem de aparição no texto

(LSTs)	Lactonas Sesquiterpênicas
(CampO)	Campos de ocorrência
(COVs)	Compostos Orgânicos Voláteis
(HS-SPME)	<i>Headspace - Solid Phase Micro Extraction</i>
(TerpS)	Terpeno Sintase
(IPP)	Difosfato de isopentenila
(MVA)	Ácido mevalônico
(MEP)	Fosfato de metil-eritritol
(HPLC)	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
(MALDI-TOF)	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight</i>
(SesS)	sesquiterpeno-sintase
(RNAm)	RNA mensageiro
(MALDI-IMS)	<i>MALDI imaging mass spectrometry</i>
(CCDP)	Cromatografia em camada delgada em escala preparativa
(CCDA)	Cromatografia em camada delgada em escala analítica
(GC-MS)	<i>Gas Chromatography and Mass Spectrometry</i>

(MS)	<i>Mass Spectrometry</i>
(RMN)	Ressonância Magnética Nuclear
(PDMS)	Filme polimérico polidimetilsiloxano
(SN)	ácido sinapínico
(PVP)	polivinilpirrolidona
(SDS)	dodecil sulfato de sódio
(DTT)	Ditiotreitol
(TEMED)	1,2-Bis(dimetilamino)etano
(TFA)	Ácido trifluoroacético
(EI-MS)	Ionização por elétrons
(HMQC)	<i>Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation</i>
(HMBC)	<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>
(MVSV)	Material vegetal sem voláteis
(aU)	intensidade de sinal
(IRR)	Índice de retenção relativa
(Tr)	Tempo de Retenção
(Kda)	Kilo Daltons
(cDNA)	DNA complementar
(gDNA)	DNA genômico
(RT-PCR)	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
(PCR)	<i>Polymerase chain reaction</i>
(EtOH)	Etanol
(CAS)	<i>Chemical Abstract Service</i>
f(X)	função
(HD)	Hidrodestilação
(ESI)	<i>electrospray ionization</i>
(MS/MS)	tandem mass spectrometry
(m)	Multipeto
(ddd)	Duplo duplo dubleto
(sl)	Singleto largo
(BSA)	Albumina
(BS)	bisabolano sintase
(HaBS)	<i>Helianthus annuus</i> bisaboleno sintase
(GAS)	germacrano sintase
(HaGAS)	<i>Helianthus annuus</i> germacrano sintase
(ORF)	<i>Open Reading Frame</i>

Lista de Símbolos em ordem de aparição no texto

(<i>E</i>)	Isômero <i>trans</i>
m/z	Relação massa/carga
(δ)	Deslocamento químico
R^2	Coefficiente de linearidade
(M+X) ⁺	Molécula cationizada

Sumário

PREFÁCIO	1
1. INTRODUÇÃO	4
1.1. <i>Lychnophora ericoides</i> Mart. e a química de terpenos	4
1.2. Terpenos	13
O proteoma e a caracterização de sesquiterpeno-sintases	16
Inserção e Propósitos do presente estudo	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAL e MÉTODOS	24
3.1 Listagem do Material	24
3.2. Amostragens em campo de coleta	29
3.2.1. Amostragem para estudo de quantificação de sesquiterpenos por método HS-SPME e fitoquímica clássica	31
3.2.2. Amostragem para estudos de proteômica dirigida, MALDI <i>imaging</i> e identificação de genes codificadores de sesquiterpeno sintase	33
3.3. Fitoquímica clássica	33
3.4. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de terpenos voláteis em fração volátil de folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>	35
3.5. MALDI <i>imaging</i>	39
3.6. Extratos proteicos, separação de proteínas nativas macromoléculas, análise espectrométrica e quimiointormática	40
3.6.1. Preparo de amostras para obtenção de extrato proteico	42
3.6.2 Separação de Proteínas Nativas em gel	43
3.6.3. Caracterização enzimática utilizando MALDI-ToF e MALDI ToF/ToF	44
3.7. Extração de RNA e subsequente produção de cDNA	45
3.7.1. Purificação dos genes amplificados e clonagem	47
4. RESULTADOS	50
4.1 Identificação dos sinais cromatográficos	50
4.2. <i>Headspace</i> -SPME	59
4.3. Fitoquímica clássica	68
4.3.1. Comparação de métodos cromatográficos na separação de sesquiterpenos	71
4.3.2. Elucidação estrutural de Sesquiterpenos não identificados por HS-SPME	73
4.3.2.1. Derivado Bicíclico de <i>L. ericoides</i> “NPL 123”	73

4.3.2.2. Derivado Bisabolano de <i>L. ericoides</i> “NPL 123”	81
4.4. MALDI <i>imaging</i>	84
4.5. Obtenção de extratos proteicos, separação em Gel e caracterização por MALDI	87
4.6. Extração de RNA, produção de cDNA, clonagem e sequenciamento de genes codificadores de sesquiterpeno sintases	91
5. CONCLUSÕES	96
5.1 Sobre acesso e amostragem ao/do patrimônio Genético	96
5.2. Sobre a caracterização das frações voláteis ricas em Sesquiterpenos e o estudo de Fitoquímica Clássica	97
5.3. Sobre a quantificação de sesquiterpenos	98
5.4. Sobre o mapeamento proteico por MALDI <i>imaging</i>	98
5.5. Sobre o uso da prospecção de genes codificadores de sesquiterpeno sintase	100
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
Apêndice	113
Anexos	119

PREFÁCIO

A comunicação científica tem como missão promover democraticamente as interpretações de cada estudo desenvolvido por pesquisadores e estudantes. Sendo portanto de natureza plural a gama de interpretações, a necessidade de deliberar sobre a forma da expressão é visível.

Visando pontuar de forma deliberada os pontos centrais deste documento, no sentido de gerar compreensão e clareza, aqui está apresentado um prefácio que versa da seguinte maneira:

Sobre a apresentação textual: O material disposto neste documento é dividido *grossomodo* em elementos textuais e elementos não textuais. Todos os elementos textuais estão contidos entre o item **Introdução e Referencias Bibliográficas**. Boa parte dos elementos não textuais estão contidos entre os itens **Apêndice** e **Anexos** por serem compreendidos como dispensáveis de apresentação ao longo do texto.

Há abreviações que foram mantidas na forma original da língua em que foram cunhadas por assim serem compreendidas como “universalmente aceitas”. Estas designações estão dispostas em diversos compêndios como, por exemplo, em Vessecchi et al., 2011.

A fim de evitar o uso indiscriminado de numeração dos subitens, ou seções, cada um destes está designado em negrito sendo que apenas os itens principais recebem numeração.

Buscando o emprego da linguagem escrita como registro da linguagem falada há neste documento o uso recorrente de termos inglês como *pool* e *pellets*. Muito embora aos olhos de alguns autores isto soe como anglicismo, entendemos que a tradução destes termos distancia o documento da compreensão pretendida.

Ainda com relação ao emprego de formas de escrita razoavelmente impopulares

ressaltamos aqui o uso da forma ativa dos verbos. Em acordo com a posição de Fiske, 2010, compreendemos o seu uso como enfático do conteúdo abordado e ainda imperativo à promoção dos resultados.

Sobre o conteúdo do documento: Este documento versa sobre o tema “Identificação de sesquiterpenos sintases em tecidos vegetais”. Há neste documento uma revisão da literatura vigente que almeja contextualizar a seguinte questão: “Há envolvimento de Sesquiterpeno Sintases nos níveis flutuantes de metabolitos observados ao longo do tempo em *Lychnophora ericoides*?”. Ademais, a metodologia envolvida no projeto abordou tópicos de diferentes áreas do saber em uma forma multidisciplinar. A fitoquímica clássica, as análises hifenadas de frações voláteis por *Headspace*-SPME, o MALDI *imaging* e a separação por gel de eletroforese na geração de mapas proteicos e ainda a caracterização por meio de clonagem de genes codificadores são os temas centrais.

Embora desafiadora, a tarefa de encontrar respostas em áreas distintas que se aglutinem em uma hipótese para a pergunta foi o que norteou a redação desta Tese de Doutorado. Espera-se como resultado um trabalho que possa dialogar da forma mais simples possível com todas as áreas envolvidas.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Lychnophora ericoides* Mart. e a química de terpenos

Uma das maiores famílias de plantas é Asteraceae. Sua grandeza é estimada na ordem de 24000 espécies, ou até 10% das angiospermas (FUNK et al., 2009). No Brasil apresenta cerca de 2000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008 *apud* NAKAJIMA et al., 2009).

A grande diversidade morfológica e a característica cosmopolita de Asteraceae são refletidas em sua peculiar habilidade de biossintetizar uma ampla gama de metabólitos secundários incluindo monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas (LSTs) além de flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos e alcaloides pirolizidínicos (alcaloides restritos as tribos Senecioneae e Eupatorie) (FUNK et al., 2009). Dada esta grande diversidade de perfis químicos, os estudos fitoquímicos de Asteraceae figuram entre alguns dos mais relevantes dados utilizados na sistemática da família. Esta interpretação dos perfis químicos com vista em estudos evolutivos de plantas é denominada quimiotaxonomia (GOTTlieb, 1982).

Vernonieae é representada por cerca de 40 gêneros e 450 espécies, sendo o Brasil reconhecido como um de seus principais centros de ocorrência. Com uma distribuição tropical, apresenta ainda espécies micro-endêmicas (SEMIR et al., 2011; SEMIR, 1991).

Lychnophorinae, subtribo pertencente à tribo Vernonieae, destaca-se por sua distribuição restrita ao território brasileiro. Os estudos fitoquímicos abordam os terpenos repetidamente, e apontam que esta classe apresenta na subtribo com uma predominância de sesquiterpenos (65,8%) (KELES et al., 2010). É comum o relato de derivados de cariofileno nos estudos com extratos de baixa polaridade e nos poucos estudos sobre óleos essenciais em espécies da tribo Lychnophorinae (KELES et al., 2010) como, por exemplo, em *Eremanthus erythropappus* (SOUSA et al., 2008), *Eremanthus goyazensis* (BALDIN et al.,

2012) e em *Lychnophora ericoides* (VICHENWSKI et al., 1980; BOHLMANN, F. et al., 1980).

A literatura registra uma série de atividades biológicas de espécies de *Lychnophora*, tais como tripanocida [*L.granmogolense*, *L. passerina*, *L. vilosissima* (GRAEL et al., 2000; OLIVEIRA et al., 1996; CHIARI et al., 1996; CHIARI et al., 1991)], analgésica [*L. ericoides* (CERQUEIRA et al., 1987)], antibacteriana [*L. pinaster* (ABREU et al., 2011)], e antifúngica [*L. salicifolia* (MIGUEL et al., 1996)], moluscocida [*L. brunioides* (BAZON et al., 1997)], anti-inflamatório [*L. ericoides* (SANTOS et al., 2010); *L. passerina* (CAPELARI-OLIVEIRA, et al., 2011) *L. salicifolia* (HEBEDA et al., 2011)], anticonvulsivante [*L. rupestris* e *L. staavioides* (CONTINI et al., 2008)], anticarcinogenico [*L. ericoides* (FERNANDES et al., 2011)] e antinociceptiva [*L. ericoides* (PAVARINI et al., 2013)].

A espécie *Lychnophora ericoides* é, dentre as espécies do gênero, a mais utilizada na medicina popular, na forma de extrato hidroalcoólico de suas partes aéreas. *L. ericoides* possui grande polimorfismo (MANSANARES, 2004) podendo ser facilmente confundida com outras do mesmo gênero, principalmente *L. pseudovilosissima*, *L. vilosissima* e *L. salicifolia*, sendo que crescem em locais xéricos, como campos pedregosos a arenosos-gramíneos (SEMIR et al., 2011; SEMIR, 1991).

Lychnophora ericoides consta na lista oficial do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008) como “ameaçada de extinção”. A lista foi elaborada a partir do relatório apresentado ao ministério pelos pesquisadores da fundação Biodiversitas, Belo Horizonte MG. As conclusões da fundação foram apresentadas durante *workshop* realizado na capital mineira em 2005 e enquadravam *L. ericoides* na categoria “Ameaçada”. Entretanto esta categoria possui três níveis e *L. ericoides* foi considerada “vulnerável”, sendo este o nível mais baixo de ameaça. Portanto, é possível afirmar que a espécie está ameaçada principalmente por sua massiva extração por parte dos “erveiros” e “raizeiros” nativos da região de seu habitat (LOPES, 2000; SEMIR et al., 2011). Contudo, a afirmação de que existe alto risco de

extinção destoa da estratificação de riscos traçada pelos taxonomistas. Ademais, a necessidade de preservação da espécie fomenta a propagação *in vitro* dos tecidos bem como a manutenção de embriões em bancos germoplásmicos (PEREIRA et al., 2005). Não obstante, o uso da biotecnologia com o sentido de explorar de forma sustentável o patrimônio genético ameaçado é uma fronteira a ser explorada.

Os primeiros relatos de seu uso como planta medicinal datam do final do século XIX quando da chegada de imigrantes da Europa Mediterrânea que buscavam trabalho nos latifúndios cafeeiros de Minas Gerais (LOPES, 2000; SEMIR et al., 2011; PAVARINI et al., 2013). Dentre estes povos destacava-se os oriundos da atual Itália, os quais supõe-se terem lançado mão de componentes da flora endêmica Brasileira para fins terapêuticos. Ainda dentro desta provável suposição a semelhança de aromas entre *L. ericoides* (Vernonieae: Asteraceae) e *Arnica montana* (Heliantheae: Asteraceae) foi uma inspiração para a seleção desta Vernonieae como sucedânea. Ainda que inadvertidamente estes povos desenvolveram um trabalho de “*Drug Discovery*” (do termo inglês traduzido livremente como “Descobrimiento de Novos Fármacos”). Tal trabalho legou não apenas o nome “Falsa-Arnica” a espécie mas também testes clínicos empíricos com repercussão difusa na população. Esta repercussão é facilmente verificada quando em áreas de Habitat de *Lychnophora ericoides* são encontrados a venda os extratos hidroalcoólicos das folhas sob a indicação doméstica de anti-inflamatório.

Sabe-se hoje que as LSTs como a helenalina de *Arnica montana* são capazes de exercer controle negativo do processo inflamatório a nível genômico (LYSS et al., 1997). Ressalta-se que os primeiros estudos fitoquímicos de *Lychnophora ericoides* revelaram a presença de LSTs bioativas em testes de condições anti-inflamatórias (BORELLA et al., 1998). Ademais, uma nova investigação fitoquímica direcionada de dois espécimens provindos de campos de ocorrência (CampO) distintos revelaram ocorrência comum de

LSTs (SAKAMOTO et al., 2003; GOBBO-NETO et al., 2010).

De forma geral, os estudos fitoquímicos da última metade do século XX envolvendo *L. ericoides* haviam sido restritos praticamente a investigação fitoquímicas incrementais dos componentes não voláteis, ou componentes fixos. Estes estudos revelaram uma composição química majoritária de LSTs e flavonoides em frações de média polaridade de extratos das folhas (SAKAMOTO et al., 2003; BORELLA et al., 1998) enquanto encontram-se em frações polares os ácidos cafeoilquínicos e as di-*C*-glicosilflavonas (GOBBO-NETO et al., 2005; SANTOS et al., 2005). Compostos *C*-glicosilflavonas como vicenina 2 e 6,8-di-*C*- β -glicosil-chrysina são conhecidos pela sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória em ensaios *in vitro* (GOBBO-NETO et al., 2005; SANTOS et al., 2010, GOBBO-NETO et al., 2010). Ainda sobre a fitoquímica há o relato de Borsato e colaboradores (2000) de que as raízes desta espécie apresentam lignanas.

Mais profundamente acerca do tema localização tecidual dos metabolitos secundário em *Lychnophora*, um estudo recente do grupo de pesquisa do Prof. Dr. Lopes rastreou por MALDI imaging os Flavonoides *C*-glicosilados (SILVA et al., 2014). O estudo demonstra que o adensamento destes compostos em tecidos epidérmicos na face adaxial das folhas pode estar relacionado a um mecanismo de proteção ao fator abiótico de estresse radiação UV. Há uma extensa discussão sobre a importância desse fator de estresse disposta em revisões diversas da literatura como (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; PAVARINI et al., 2012).

Dentre os poucos trabalhos publicados sobre os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) das partes aéreas de *Lychnophora ericoides*, destaca-se que são observados sesquiterpenos e monoterpenos em seu óleo essencial (CURADO et al., 2006; COSTA et al., 2008) e em relação ao potencial bioativo, o óleo essencial dos indivíduos de *L. ericoides* que ocorrem no município de São João Batista do Glória – MG apresenta atividade

acaricida (BALDIN, et al., 2010). Dentre os sesquiterpenos majoritários encontram-se α -cadinol, (*E*)-nerolidol, óxido de cariofileno e uma série de compostos que derivam do esqueleto carbônico do tipo bisabolano. Majoritariamente os derivados bisabolano são α -bisabolol, *ar*-diidro-turmerona, *ar*-curcumeno e *ar*-turmerol (**Figura 1**). O mais comumente conhecido destes derivados bisabolano é o α -bisabolol. Foi primeiramente isolado da camomila (*Matricaria chamomilla*) (JAKOVLEV et al., 1979) que também é uma espécie da família Asteraceae. O α -bisabolol tem 2 centros estereogênicos, portanto 4 estereoisômeros possíveis. Esse metabólito consta na literatura dentre os sesquiterpenos com maior número de bioatividades descritas como, por exemplo, anticancerígeno, anti-inflamatório e analgésico (KAMATOU; VILJOEN 2010).

FIGURA 1. Sesquiterpenos voláteis majoritários nas folhas de *L. ericoides* (BALDIN, et al., 20120; CURADO et al., 2006; COSTA et al., 2008) e um derivado volátil da fenilalanina majoritário em folhas de *L. pinaster* (COSTA et al., 2008).

Óleos essenciais de *L. ericoides* que ocorrem no município de São João batista do Glória – MG apresentam atividade acaricida frente à *Tetranychus urticae* (Tetranychidae) em ensaios de efeito fumigante (BALDIN, et al., 2010). A avaliação química desta fração volátil foi recentemente conduzida e levou a identificação dos majoritários da fração volátil em *Headspace* acoplado ao dispositivo de Micro Extração em Fase Sólida [(do inglês HS-SPME

(*Solid Phase Micro Extraction*)]. Sete monoterpenos, dois derivados de bisabolano (sesquicineol e *orto*-acetoxi-bisabolol) e um derivado bicíclico hidroxilado (**Figura 2**) de cadeia lateral 2-metil propenila, o qual apresenta dados espectroscópicos que sugerem um congêner de α -cadinol foram identificados (PAVARINI, 2011). Foi ainda verificado que estes sesquiterpenos estão presentes em preparados hidroalcoólicos, o que instigou a realização de bioensaios do material isolado. A avaliação do potencial anti-hipernociceptivo *in vitro* utilizando-se macrófagos peritoneais, isolados de ratos, em meio de cultura sugeriu um efeito analgésico do *orto*-acetoxi-bisabolol (PAVARINI, 2011; PAVARINI et al., 2013). A redução significativa dos níveis dos mediadores IL-1 β e TNF- α produzidos pelas células isoladas é responsável pelo efeito de anti-hipernocicepção, o que denota efeito físico, e não cognitivo, sobre a dor inflamatória (VERRI et al., 2006). Não obstante, a averiguação de ocorrência de níveis flutuantes destes metabolitos foi verificada ocorrer temporalmente. Este resultado instiga a busca pela compreensão dos mecanismos de regulação deste fenômeno. No tocante as implicações destes achados de variabilidade para o uso terapêutico de *Lychnophora ericoides* corroboram os conceitos de populares de maturação da Droga Vegetal. Os usuários dos preparados afirmam que a “Arnica com cheiro” tem efeitos analgésico e anti-inflamatório máximos. Segundo nossos resultados os metabolitos ocorrem em maior teor nas folhas mais jovens durante o verão chuvoso e ao término deste.

Figura 2. Mono e Sesquiterpenos recentemente descritos para frações voláteis de folhas de *Lychnophora ericoides* (PAVARINI, 2011; PAVARINI et al., 2013)

Derivados do tipo bisabolano são de amplo interesse acadêmico, científico e tecnológico. Um dos exemplos mais atuais dentre as aplicações da classe de terpenos inclui a exploração do potencial de uso do esqueleto carbônico na indústria de bicomcombustíveis através da domesticação biotecnológica das bisaboleno-sintases de *Picea abies* (Pinaceae) e *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) e transfectados em *Escherichia coli* para geração do terpeno bisaboleno e posterior emprego de redução catalítica para geração do bisabolano (McANDREW et al., 2011).

Nos campos da ecologia química e da fisiologia vegetal o estudo das terpeno sintases e das repostas nos níveis de seus produtos, os terpenos voláteis principalmente, têm avançado no sentido de reforçar os papéis semio-químicos destes metabolitos principalmente no nível trófico de comunicação “planta-inseto” implicando, portanto, que há aquisição evolutiva dos organismos que biossintetizam estes compostos (BOHLMANN, J. et al., 1998; CHEN et al., 2011; SCHULTZ, 2002). Em um experimento de campo envolvendo aferição da capacidade de respostas da emissão de derivado do tipo bisabolano das folhas de *L. ericoides* pode-se notar um aumento expressivo no conteúdo do *orto*-acetoxi-bisabolol em *Headspace* de folhas de *L. ericoides* agredidas manualmente, com a finalidade de reproduzir experimentalmente os efeitos da agressão por herbivoria (GOUVEA et al., 2012) (**Figura 3**).

Figura 3. Ilustração informativa sobre o experimento de *Headspace in vivo* que sugere uma capacidade de reposta do derivado bisabolano de *L. ericoides* a agressões mecânicas (GOUVEA et al., 2012)

Ao passo em que as pesquisas sobre a química da fração volátil de *Lychnophora ericoides* sofreram avanço, a maior parte destas contribuiu restritamente ao campo da fitoquímica clássica. Entretanto estas contribuições trazem a luz uma questão de cunho biossintético: a diversidade de derivados bisabolano observada estaria relacionada a um tipo específico de bisabolano sintase como ocorre em outras espécies (DEGENHARDT et al., 2009) que apresenta isoformas com determinado grau de conservação nas populações de *Lychnophora ericoides* do Brasil? Caso estas isoformas sejam as responsáveis pela formação do esqueleto bisabolano seriam os citocromos os responsáveis pela diversidade de funções orgânicas como cetonas, alcoóis e esteres? Haja vista tal diversidade de isoformas foi descrito para derivados germacrano de espécies domesticadas como a alface [*Lactuca sativa* (Asteraceae)] (IKEZAWA et al., 2011), o girassol [*Helianthus annuus* (Asteraceae)]

(GÖPFERT et al., 2009) e a alcachofra [*Cynara cardunculus* (Asteraceae)] (MENIN et al., 2012). Tais questões podem ser respondidas por estudos de proteômica dirigida e comprovados por estudos com RNA e transcrição reversa para geração de genes clonados e consequente sequenciamento dos mesmos.

Fundamentalmente a questão se ampara no conhecimento de que a biossíntese dos terpenos apresenta quatro grandes etapas sendo que as duas últimas são as responsáveis pela enorme diversidade de terpenos. São elas a reação de ciclização do precursor fosfatado catalisada por Terpeno sintases (TerpS) e a funcionalização dos esqueletos carbônicos pelos citocromos P450 (HAMBERGER; BOHLMANN, J., 2006; NELSON; WERCK-REICHHART, 2011).

1.2. Terpenos

A maior parte dos mais de 35.000 terpenos (McMURRY, 2009) já relatados na literatura são produtos do metabolismo secundário. Entre as moléculas de maior interesse para a indústria farmacêutica pode-se citar o monoterpreno, (C₁₀), limoneno que incluído na dieta diária age como anticancerígeno (CROWELL; GOLD, 1994), o sesquiterpreno, (C₁₅), antimalárico artemisinina (VAN GELDRE et al., 1997) e o diterpreno (C₂₀) anticancerígeno taxol (HOLMES et al., 1995; BORNSCHEUER et al., 2012). A indústria brasileira também tem explorado óleos essenciais anti-inflamatórios da erva baleeira [*Cordia verbenaceae* (Boraginaceae)] ricos em cariofileno e humuleno (FERNANDES et al., 2007) os quais são considerados como “ativo” de formulação comercial.

O nome “terpeno” é oriundo do termo alemão “*Turpentin*”, o qual designa a fração volátil da resina produzida nas cutículas dos caules de espécies do gênero *Pinus* (Pinaceae) (COPPEN; HONE, 1995).

Os terpenos, na sua maioria, são oligômeros do difosfato de isopentenila (IPP)

sendo que nas plantas seu principal precursor é sintetizado no citosol pela via do ácido mevalônico (MVA) (QURESHI; PORTER 1981; NEWMAN; CHAPPELL 1999), ou nos cloroplastos pela via do fosfato de metil-eritritol (MEP) (RODRIGUEZ-CONCEPCION; BORONAT, 2002) ou ainda de maneira mista entre as duas vias por intermédio de transportadores celulares, sendo que este fluxo é mais claramente demonstrado como ocorrendo em direção ao citosol (DUDAREVA et al., 2005).

De acordo com Croteau e colaboradores(2002) a biossíntese de ambos mono e sesquiterpenos a partir do mais simples metabólito primário pode ser basicamente dividida em 4 etapas (**Figura 4**): (a) síntese do precursor fundamental IPP; (b) fusões repetitivas de IPP para formação de séries homólogas de prenilas difosfatadas que serão precursores de diferentes classes de terpenos; (c) elaboração destes prenildifosfatos alílicos que formam os esqueletos dos terpenos; e (d) modificações enzimáticas secundárias (majoritariamente reações redox) que fazem surgir as funções orgânicas das moléculas e a quimiodiversidade desta família de produtos naturais.

Figura 4. As 4 etapas fundamentais da biogênese dos terpenos. Etapa (c) ilustra a ciclização das unidades prenilicas difosfatadas em esqueletos ciclohexânicos (mMenS; pMenS), monoterpeneo bicíclico (CamS), bisabolano (BisS) e cariofilano (CyS). Etapa (d) ilustra a funcionalização do campesterol por complexos enzimáticos da família CYP85 gerando brassinolídeos (HAMBERG & BOHLMANN, 2006)

Mecanismos de alocação de precursores de fosfatos de prenila são tópicos estudados atualmente, sendo que hoje é possível afirmar que a via de biossíntese a partir do ácido mevalônico fornece unidades de IPP passíveis de armazenamentos no citosol (DUDAREVA et al., 2005), o que pode estar relacionado com os ritmos infradianos de liberação de sesquiterpenos por partes aéreas de *Arabidopsis thaliana* (AHARONI et al., 2003) bem como *Lychnophora ericoides* (PAVARINI, 2011).

O proteoma e a caracterização de sequiterpeno-sintases

Análises de proteômas podem ser consideradas como o tipo mais fundamental de estudo para determinação de diferenças entre os organismos vivos. A caracterização genômica dos organismos vivos proporciona a determinação do código genético, o que, notoriamente, não determina *per si* o fenótipo deste organismo. Por exemplo: um único organismo poderá apresentar em resposta a estímulos internos ou externos, a ativação da transcrição de uma série de proteínas o que nos leva a afirmar que um organismo com seu genoma, em situações diferentes, pode apresentar mais que um proteoma (MAGALHÃES, 2008).

As técnicas empregadas nas análises proteômicas incluem as de separação, ou seja, Eletroforese e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência [do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC)], e também incluem as técnicas de caracterização das proteínas, as quais se baseiam na espectrometria de massas (RUAN et al., 2006). Atualmente a Espectrometria de Massas por Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser e detecção por Tempo de Voo [do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight* (MALDI-TOF)] é a técnica espectrométrica mais utilizada nos estudos de caracterização de proteínas. Segundo alguns autores (AEBERSOLD; MANN, 2003) o

papel desta técnica na área da proteômica é, de fato, indispensável. Entretanto sua condição indispensável ainda suscita debate no meio acadêmico.

Uma análise proteômica de qualquer célula compreende nada menos que o levantamento de todas as proteínas que esta célula expressa no momento. Observando o fato de que esta tarefa é difícil de ser executada rapidamente, recentemente os estudos vêm sendo direcionados a uma organela celular ou até mesmo, por vezes, a uma proteína de interesse. Esse tipo de levantamento pode ser denominado como “análise sub-proteômica” ou ainda “análise proteômica dirigida” (KOMATSU et al., 2003; MAGALHÃES, 2008; NEWTON et al., 2004). Estas análises diferenciam-se sumariamente por ser respectivamente uma busca por proteínas a nível subcelular e a outra busca por proteínas específicas. Alguns dados estruturais das proteínas são passíveis de predição através de software de análise de mapas protéicos em géis eletroforéticos bidimensionais. Essa possibilidade viabiliza ainda mais estudos direcionados como os de sub-proteômica e ainda de “proteômica dirigida”.

Todo e qualquer estudos sub-proteômico ou de “proteômica dirigida” é realizado visando demonstrar a ocorrência de uma proteína, seja ela estrutural ou ainda uma enzima envolvida em um evento bioquímico determinado daquela célula, ou organela, em estudo. Entretanto a necessidade da caracterização da função deste alvo é crucial para os estudos de biossíntese de produtos naturais, caso contrário as hipóteses de rotas biossintéticas não podem ser confirmadas/derrubadas por estes estudos. A partir da prospecção de transcritos expressos em tecidos vegetais de interesse de estudo, o transcriptoma se torna matéria prima das pesquisas que visam à caracterização funcional de enzimas (MAGALHÃES, 2008).

Os avanços na pesquisa de sesquiterpeno-sintase (SesS) têm sido através de estudos de clonagem de genes responsáveis pela transcrição destas enzimas, sendo que estes genes

são obtidos geralmente pela transcrição reversa de RNA mensageiro (RNAm). Em 1998 a primeira bisaboleno-sintase foi clonada através da obtenção de cDNAs e subsequente expressão heteróloga em organismos fermentadores (BOHLMANN, J. et al., 1998). Desde então foram descritas, de forma precisa e extensiva, mais cinco isoformas desta terpeno sintase responsável pela etapa determinante na biogênese de derivados bisabolano. Como exemplo de sucesso na caracterização das SesS por essa estratégia podemos citar as bisaboleno-sintases isoladas a partir do caule de *Abies grandis* (BOHLMANN, J. et al., 1998), das raízes de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) (RO et al., 2006) e de plântulas de *Picea abies* (Pinaceae) (MARTIN et al., 2004), e ainda a cadinano sintase isolada de *Eleutherococcus trifolius* (WEN et al., 2012) e de sementes de algodão [*Gossypium* sp. (TOWNSEND et al., 2005)]. Como conveniente aparenta ser, ressalta-se que os derivados do cadinano e do bisabolano são aqueles frequentemente encontrados na fração volátil das folhas de *Lychnophora ericoides* de forma majoritária.

Ao curso de uma determinação de enzimas de rotas biossintéticas definidas de espécies vegetais através da caracterização funcional os procedimentos que sucedem o colecionamento de DNAs complementares, os conhecidos cDNAs, adquiridos a partir dos transcritos, são basicamente a transfecção e expressão heteróloga dos genes. Pode-se definir a transfecção como um procedimento de transgenia que envolve a inserção destes genes de interesse em material genético, geralmente plasmidial, de “organismos hospedeiros” (AJIKUMAR et al., 2008). A conveniência da escolha dos microrganismos hospedeiros dos genes é baseada em viabilidade da inserção dos genes e compatibilidade da via biossintética do hospedeiro com a via de estudo. A ativação genômica do DNA recombinante, após período de incubação, gera a transcrição dos genes que são traduzidos nas enzimas da via de biossíntese, via esta que pode ser utilizada, agora pelo organismo transgênico, na conversão de substrato em produto mediante suplementação adequada dos meios de cultura. O resultado final é a formação dos metabolitos secundários originalmente

encontrados na espécie vegetal estudada. Esta estratégia tem sido utilizada de forma ampla na caracterização funcional de enzimas (AJIKUMAR et al., 2008).

Inserção e Propósitos do presente estudo

Em síntese, pontua-se que os terpenos apresentam-se como protagonistas nas áreas das indústrias que se baseiam em química fina.

Nesse contexto se destaca a gama de Bioatividade dos derivados de bisabolano como, por exemplo, os estereisômeros do α -bisabolol com efeitos anti-inflamatório, analgésico e antibiótico (KAMATOU; VILJOEN, 2010). Considerando a importância que a flora brasileira tem para a bioprospecção de moléculas bioativas a presente tese sintetiza o trabalho de aventar o potencial biossintético de *Lychnophora ericoides* no que diz respeito à biossíntese de sesquiterpenos.

O propósito deste trabalho está fundamentado no potencial que a bioengenharia (BOUWMEESTER, 2006; COSTA et al., 2013) apresenta para a manipulação de organismos geneticamente modificados em favor da produção de moléculas de interesse comercial. Considerando que esta realidade é estreitamente atrelada a estudos na área da Ciência Básica o trabalho se desenvolveu no sentido de estabelecer quais são as entidades enzimáticas que são responsáveis por essa diversidade química restrita a basicamente dois tipos de derivados terpênicos através de técnicas espectrométricas e de biologia molecular. Convergindo os dados obtidos ao longo do período de trabalho sob orientação do Prof. Dr. Lopes (DFQ da FCFRP-USP) e co-Orientação da Prof. Dr. Yatsuda (DACTB da FCFRP-USP) aos dados de clonagem obtidos laboratório do Dr. Spring (Hohenheim, Alemanha) este trabalho inicia os estudos para a compreensão da via biossintética dos terpenos voláteis de *Lychnophora ericoides*.

Destaca-se a importância destas micromoléculas que podem exercer papel na

interação “planta-inseto”, ou ainda “planta-planta”, bem como sua proeminência para a terapêutica e a agroquímica. A possibilidade de domesticação dos genes em favor de produção biotecnológica destas micromoléculas não foi objeto desta proposta, apesar de incitar ainda mais o alcance dos objetivos aqui expostos.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Visando explorar a capacidade biossintética que *Lychnophora ericoides* apresenta para com a classe dos terpenos, este trabalho, teve como objetivo identificar as terpeno sintases de *L. ericoides* que são protagonistas da biossíntese da diversidade de sesquiterpenos que figuram como os majoritários da fração volátil das folhas da espécie.

Enfim assumimos o objetivo de responder a seguinte questão: Quais são as entidades enzimáticas envolvidas na biossíntese desta riqueza de sesquiterpenos bioativos com esqueletos carbônicos em comum? Para alcance pleno deste objetivo foi forjada a necessidade de uma estratégia multidisciplinar a qual veio incluir contato com diversas áreas do saber. Essa necessidade teve o propósito de aprimorar a formação do aluno dentro da área de Química Orgânica.

Pontualmente, os seguintes estudos foram executados visando alcançar os objetivos:

1-Identificação, determinação estrutural e quantificação dos sesquiterpenos majoritários nas frações voláteis das folhas de *L. ericoides* de populações que ocorrem em Minas Gerais utilizando-se de técnicas de *Headspace*-SPME aliadas a fitoquímica clássica.

2-Geração de imagens moleculares dos tecidos vegetais por MALDI *imaging mass spectrometry* (MALDI-IMS) com o intuito rastrear a localização das terpeno sintases das folhas de *L. ericoides*.

3-Identificação das terpeno sintases presentes nas folhas de *L. ericoides* por meio de combinação das técnicas baseadas em análise do proteoma com técnicas baseadas em análise do transcriptoma.

Material e Métodos

3. MATERIAL e MÉTODOS

Neste item serão descritas as metodologias empregadas nas atividades realizadas. Uma **Listagem do Material** utilizado está disponível abaixo. Enumera-se os itens visando disponibilizar a rápida consulta do leitor.

3.1 Listagem do Material

Para coleta de material em habitat da espécie foram utilizados os seguintes materiais:

✦ Banco de dados *in house* com coordenadas geográficas de “CampO” previamente visitados por integrantes do grupo de pesquisas coordenado pelo Dr. Lopes.

✦ Gelo seco e tubos Falcon® com vedação confiável para amostragens durante as coletas no campo. Todas as amostragens foram realizadas com uso de luvas sem talco

✦ Sistema de navegação por GPS Garmin “Etrex”

Para isolamento e elucidação estrutural de sesquiterpenos por cromatografia clássica e RMN foram utilizados os seguintes materiais:

✦ N₂O, gral e Pistilo para trituração a frio do material vegetal

✦ Aparato de Clevenger modificado para hidrodestilação com sistema de refrigeração por “dedo frio” operando a uma temperatura próxima a 0°C

✦ Na₂SO₄(s) anidro (Sigma)

✦ Equipamento (Coluna acoplada a reservatório e válvula de escape de pressão) para cromatografia em coluna *flash* (Aldrich)

✦ Placas de vidro para cromatografia em camada delgada em escala preparativa (CCDP) e analítica (CCDA) recobertas com sílica gel PF254+366

✦ Sílica gel 60H (Sigma)

✦ Reagentes reveladores vanilina e ácido sulfúrico (Sigma) em soluções etanólicas de 1% e 10% respectivamente

† Luz ultravioleta Mineralight® UVGL-25 operando em λ 365/254nm

† Sistema de recuperação de matriz orgânica adsorvida em sílica composto por um funil de placa sinterizada, com saída para uma bomba de pressão negativa, acoplado a um balão volumétrico de boca esmerilhada para acoplamento com evaporador rotativo (Büchi® R124)

† Solventes (Sigma): acetato de etila, hexano e metanol

† Cromatógrafo operando em fase gasosa e acoplado a espectrômetro de massas GCMS QP 2010 Shimadzu [do inglês *Gas Chromatography and Mass Spectrometry* (GC-MS)] operando em ionização por elétrons [do inglês *electron ionization* (EI-MS)]

† Banco de dados espectrais Willey 7, NIST 62 e FFNSC Ver.1.3.

† Série homologa de *n*-alcanos (C₉ a C₂₅) (Alltech)

† Software “LabSolutions® GC-MS” (Shimadzu)

† Solvente deuterado (CDCl₃) (Aldrich) para aquisição de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

† Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear RMN Bruker DRX-500 e DPX300

† Softwares para interpretação dos espectros de RMN: “ACD/NMR Processor”

Academic edition

Para desenvolvimento de metodologia analítica quantitativa de sesquiterpenos das folhas de *L. ericoides* por meio de *Headspace* SPME

† N₂O, Gral e Pistilo para trituração a frio do material vegetal

† Sistema de injeção automatizado operando o experimento HS-SPME Shimadzu AOC 5000

† Frascos de vidro próprios para sistema automatizado de HS-SPME (AOC 5000)

† Fibras para SPME de 100µm de recobrimento de filme polimérico polidimetilsiloxano (PDMS) próprios para sistema automatizado de HS-SPME (AOC 5000)

- ✦ Padrão (Merck) de eucaliptol
- ✦ Padrão (Merck) de *trans*-cariofileno
- ✦ Óleo de soja
- ✦ Pipetadores automáticos
- ✦ Ponteiras de 100 a 1000µl

Para obtenção de imagens moleculares das enzimas e proteínas em cortes transversais de folhas de *L. ericoides* com peso molecular maior ou igual a 30KDa:

- ✦ Micrótomo Leica RM2235 para obtenção de cortes foliares
- ✦ Equipamento ImagePrep® Bruker, para deposição de matriz sobre os cortes vegetais em placa de vidro inerte
- ✦ Espectrômetro de massas com ionização MALDI ultrafleXtreme®, Bruker
- ✦ Matriz SN (ácido sinapínico)
- ✦ Software para MALDI *imaging* – FLEX® (Bruker) fleximaging 2.1; flex analysis 3.3
- ✦ Parafina
- ✦ Estereoscópio Binocular Coleman XTB-2B

Para obtenção de extratos proteicos contendo as enzimas responsáveis pela biogênese dos sesquiterpenos de *Lychnophora ericoides*

- ✦ Para disruptura de tecidos: N₂(l), Gral e Pistilo além de polivinilpirrolidona (PVP) e areia
- ✦ Solventes (Sigma): Acetona, Metanol e solução tamponante TRIS em fase fenólica
- ✦ Sais (Sigma-Aldrich): Ácido cítrico trisodiado, Acetato de amônio, Sucrose, dodecil sulfato de sódio (SDS)
- ✦ Agentes redox Ditioneitol (DTT) (Sigma)
- ✦ Equipamento concentrador rotativo operando a baixa pressão (Digital Series SpeedVac™, ThermoScientific)
- ✦ Consumíveis: tubos Eppendorf® e Falcon®; ponteiras para pipetas automáticas

✦ Solução de Bradford em poços para testes qualitativos de proteínas nos extratos

Para separação de Proteínas em Gel de Eletroforese

✦ Sais para confecção de géis (Sigma): Acrilamida, Bisacrilamida, agente tamponante Tris e 1,2-Bis(dimetilamino)etano (TEMED)

✦ Sistema de eletroforese SE260 (GE Healthcare)

✦ Tampão para eletroforese: Tris 25mM, glicina 192mM e SDS 0,1% (Sais Sigma)

✦ Tampão de corrida: Tris Hcl 187,5mM/pH 6,8, SDS 6%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,03% e DTT 26 mg/mL

✦ Marcadores de peso molecular “Protein MW Marker” (Fermentas)

✦ Para revelação: solução de fixação com $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{aq.})$ (3%) e Etanol (50%); solução de Coomassie com Coomassie G-250 (0,1%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (17%), Metanol (35%), $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{aq.})$ (3%)

✦ Equipamento Image Scanner e software LabScan (GE Healthcare) para digitalização dos géis

Para digestão triptica, excisão e *clean up* de *spots* seguida de análise por MALDI-TOF e TOF-TOF

✦ Laminas cortantes para excisão de *spots*

✦ Solução descolorante para lavagem dos *spots* com NH_4HCO_3 (Sigma), 25mM pH8,0 em Acetonitrila 50% (JT Baker) e solução reidratante aquosa de NH_4HCO_3 (Sigma), 25mM pH8,0

✦ Para redução das pontes de dissulfeto das proteínas excisadas do gel 1D foram utilizadas uma solução de DTT, 6,5mM com NH_4HCO_3 (Sigma), 25mM pH8,0 e subsequentemente Acetonitrila 100%

✦ Para alquilação das cisteínas reduzidas foi utilizada iodoacetamida (54mM) (Sigma) em solução aquosa tamponante com NH_4HCO_3 , 25mM pH8,0

✦ Para a Digestão das proteínas contidas nos *spots* foi utilizada tripsina (Promega) em

solução aquosa tamponante com NH_4HCO_3 , 25mM pH8,0

✦ Solução de extração dos peptídeos solubilizados no digesto com ácido trifluoroacético (TFA) (Sigma) 0,1% em Acetonitrila 50%

✦ Solução aquosa acidificada de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico para ressuspensão dos peptídeos em matriz para MALDI

✦ Ponteiros ZipTip® para dessalinização e limpeza dos digestos

Para obtenção de DNA genômico e complementar e prospecção dos genes codificadores das enzimas responsáveis pela biogênese dos sesquiterpenos de *Lychnophora ericoides*

✦ KIT para extração de RNA a partir de tecidos vegetais (Aurum Total RNA Isolation kit, Bio-Rad)

✦ Moinho agitador (MM20, Retsch) para obter ruptura celular

✦ Perolas de porcelana de 2.8 mm de diâmetro para ruptura de tecidos e células vegetais (Precellys, PeqLab)

✦ KIT para aquisição da fita complementar do mRNA e portanto colecionamento do cDNA “RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits” (Fermentas)

✦ Termociclador PCR *cycler* (Eppendorf) para aquisição da fita complementar de DNA e reações de amplificação dos genes prospectados

✦ Solventes e Sais empregados na extração de DNA genômico (Sigma): Alcool isoamílico, clorofórmio, isopropanol, etanol e acetato de sódio

✦ *Primers* específicos para amplificação de genes codificadores de bisabolenos sintases em *Helianthus annuus* (Heliantieae: Asteraceae) (Fermentas, St.Leon-Rot, Germany)

✦ Enzimas Taq DNA-Polimerase e Phusion DNA-Polimerase (Finnzymes)

✦ Espectrofotômetro para análise da integridade de RNA (Bioanalyzer 2100) equipado com chip RNA 6000 Pico Chip (Agilent)

✦ Sistema horizontal para eletroforese PerfectBlue (PeqLab) operando em 160 V por

35 minutos

✦ Tampão para corrida de eletroforese (Tris e EDTA em pH8,0)

✦ Marcadores moleculares Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas)

✦ Solução de Brometo de Etídeo (Sigma®) em tampão de eletroforese

✦ Luz de ultravioleta operando em $\lambda = 312\text{nm}$ exposta a equipamento fotográfico digitalizado para documentação dos géis revelados

✦ KIT para extração de DNA a partir das bandas reveladas no gel de agarose (Qiagen Gel Extraction Kit, Hilden, Germany)

✦ KIT para clonagem “StratClone PCR Cloning KIT” (Stratagene incorporation)

✦ Módulo sequenciador Seqman do pacote de software DNASTAR (Lasergene)

Divididos na forma de subitens, estão abaixo dispostos os detalhes da condução dos procedimentos realizados.

3.2. Amostragens em campo de coleta

O início das atividades foi determinado em função do tempo demandado para regularização das atividades. Considerando a possibilidade de acesso dos “CampO”, a distância destes em relação ao laboratório, e ainda tendo primado pela autorização de acesso ao patrimônio genético junto ao CNPq (licença nº 010143/2011-4; licença nº 010145/2011-7) e ao IBAMA (licença 26801-4) (cópias dos documentos em **APÊNDICE**), optou-se por uma coleta teste ainda que fora do período da florada (Setembro, 2011). É registrado o aumento no nível relativo de sesquiterpenos voláteis nas folhas de *L. ericoides* em Minas Gerais em períodos de chuva (Novembro a Março) (PAVARINI, 2011). A indisponibilidade de estruturas reprodutivas, capítulos florais e aquênios, durante a estação seca trouxeram à vista a necessidade de efetuar uma segunda

coleta durante o período no qual estas estruturas estão disponíveis (ao termino e após o verão chuvoso, de fevereiro a maio) visando o depósito de excisas com valor taxonômico maximizado. Essa segunda expedição ao campo foi realizada de acordo com tais necessidades em Abril de 2012 e possibilitou o acesso a diversas espécimens do gênero *Lychnophora*, incluindo algumas não preconizadas no projeto (**Tabela 1**). Cabe ressaltar que neste período é relatada a possibilidade de uma expressão máxima das terpeno sintases, as quais são determinantes na síntese *de novo* das micromoléculas que são apresentadas no *Headspace*, ou seja, os derivados sesquiterpênicos do tipo bisabolano (PARÉ; TUMLINSON, 1997).

Tabela 1. Referências das atividades de Campo. Na segunda coluna constam os códigos com os quais os exemplares serão referidos no texto. Estes códigos também são utilizados tanto para o depósito quanto para a posterior consulta do material em herbário

Em Espécie	Cod.	Georreferência	Município	Foto
<i>L. ericoides</i> Mart.	“NPL 227”	S 20°38,316', W 046°15,318'	Furnas	1
<i>L. ericoides</i> Mart.	“NPL 123”	S 20°20,550', W 046°47,638'	Delfinópolis	2
<i>L. ericoides</i> Mart.	“NPL 382”	S 18°20,562', W 043°40,839	Diamantina	3
<i>L. gardnerii</i> Sch.Bip.	“NPL 383”	S 17°55,885', W 043°23,436'	Diaman-Olhos*	4
<i>L. salicifolia</i>	“NPL 378”	S 19°17,422', W 043°36,090'	Santana Riach.#	5
<i>L. salicifolia</i>	“NPL 348”	S 17°27,297', W 043°34,100'	Olhos d'Água	6

A tabela acima compila as entradas realizadas nos bancos de dados. # Santana do Riacho, MG. * Estrada Diamantina – Olhos d'Água. Todo o material coletado habitava campos selvagens.

Abaixo seguem os registros fotográficos das estruturas reprodutivas feitos *in situ*

Por fim, em fevereiro de 2013 foi realizada a última expedição a campo. Nesta oportunidade foram amostradas espécimens de *Lychnophora* spp. com o intuito de fornecer material para os estudos de caracterização de genes codificadores das SesS.

Os exemplares que foram objeto deste estudo tiveram sua identificação confirmada pelo Prof. Dr. João Semir do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia-UNICAMP. As exsicatas avaliadas estão depositadas no herbário da UNICAMP (Herbário UEC).

3.2.1. Amostragem para estudo de quantificação de sesquiterpenos por método HS-SPME e fitoquímica clássica

Para o estudo de quantificação foram escolhidos 10 indivíduos com porte adulto dos quais foram coletados, aleatoriamente, ramos inteiros de botão floral. Os ramos de folhas utilizados em experimentos HS-SPME foram coletados e imediatamente armazenados em vidros vedados e codificados individualmente. As amostras foram mantidas em recipiente contendo gelo seco (**Figura 5**).

Figura 5. Ilustração em forma de esquema de trabalho para a coleta do material vegetal *in situ* e posterior retirada de alíquota para análises

A alíquota para experimentos *Headspace*-SPME (HS-SPME) consiste em um pequeno ramo de folhas, cerca de 10 mg. O material permaneceu sob congelamento a -20°C até a data da análise, a qual foi realizada no menor tempo possível após a coleta.

Todo o material vegetal sobressalente a esse procedimento (**Figura 5.**) foi utilizado na obtenção de óleos essenciais.

3.2.2. Amostragem para estudos de proteômica dirigida, MALDI *imaging* e identificação de genes codificadores de sesquiterpeno sintase

Durante as atividades de 2012 foram coletados tanto o material vegetal para obtenção de óleo essencial por hidrodestilação quanto o material livre de proteoma humano e separado em tubos do tipo Falcon® para realização de experimentos de proteômica dirigida. Todo o material também sofreu congelamento instantâneo em campo e foi mantido a -80°C quando em laboratório.

Por fim, durante a expedição de 2013 foram amostrados ramos jovens de botões florais com a finalidade de serem utilizados na caracterização dos genes codificadores das terpenos sintases

3.3. Fitoquímica clássica

Os materiais para a obtenção de óleo essencial foram mantidos sob congelamento até a data da hidrodestilação. Após maceração a frio este material foi submetido à hidrodestilação por intervalos indeterminados, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado para obtenção dos óleos (**Tabela 5 em RESULTADOS**).

Os óleos foram separados da água por diferença de densidade, submetidos ao contato com Na₂SO_{4(s)} anidro, secados sobre fluxo de N_{2(g)}, e armazenados em frascos selados e protegidos de luminosidade, sob baixa temperatura.

Posteriormente os óleos foram submetidos à análise química procedida dentro do seguinte sistema de operação:

- Separação cromatográfica em GC-MS. Alcançada graças a aplicação de gradiente de eluição por aumento linear de temperatura (60-189°C a 3°C/min).

- Injetor *split* (240° C); hélio como gás de arraste; fluxo de 1,33 mL/min; pressão de 81,5 kPa;

-Coluna DB-5MS (Agilent®);

-Aquisição de espectros em espectrômetro de GC-MS Shimadzu® QP2010 no modo *scan* (integração do *Total Ion Chromatogram* – T.I.C.); 0,50 scan/s dentro de uma faixa de m/z 40 a 500;

-Fonte de Ionização por elétrons (EI-MS) (250° C; 70 eV)

O óleo essencial de folhas de *L. ericoides* “NPL 123” foi utilizado para o re-isolamento do derivado hidroxilado bicíclico. Esse re-isolamento se deu seguindo metodologia descrita anteriormente (PAVARINI, 2011). A título de citação os passos da metodologia de Cromatografia em Camada Delgada em Escala Preparativa (CCDP) estão resumidos abaixo:

-200 µL de óleo essencial foram solubilizados em CHCl₃ e aplicados em frações equitativas em quatro placas de CCDP.

-Eluição com das placas com CHCl₃ em cubas saturadas com o solvente;

-Revelação em UV combinada com revelação parcial por Vanilina/H₂SO₄ + ΔH;

-Recuperação das bandas por raspagem e partição sólido-líquido (acetato de etila/metanol 8:2);

-Concentração a baixa temperatura (< 35°C) e secagem sob fluxo de gás N₂

No intuito de certificar a CCDP como técnica mais apropriada para a separação rápida e eficiente em escala preparativa, procedemos uma comparação. Esta foi feita utilizando a cromatografia em coluna *flash* visando o fracionamento dos sesquiterpenos.

Foi utilizada coluna de vidro com diâmetro 25 mm de raio interno, 73 g de sílica gel 60 para empacotamento, 70-230 mesh, os quais foram posteriormente gelificados com o solvente que seria utilizado como fase móvel. Após carregar a amostra (200 µL de óleo essencial) foi adotado o sistema de eluição por gradiente crescente de polaridade [hexano: acetato de etila (9:1), (8:2), (7:3), (1:1)] e, por fim, lavagem com metanol.

Foram coletadas 62 frações, mais a fração metanólica.

Adianta-se que os resultados, os quais estão apresentados na seção **4.3. Fitoquímica clássica**, confirmaram a CCDP como técnica mais apropriada para alcance do objetivo de isolamento.

Adicionalmente, o óleo essencial de folhas de *L. ericoides* “NPL 382” foi utilizado para o isolamento de um derivado bisabolano. Este processo de isolamento foi conduzido a partir de utilização de técnica de CCDP de forma semelhante ao descrito acima.

As amostras purificadas tiveram a pureza cromatográfica determinada pela injeção de pequenas alíquotas no sistema GC-MS descrito acima. Foram consideradas puras as amostras com sinais cromatográficos apresentando área total sobre o pico maior que 95% da área total do cromatograma em T.I.C.

Em seguida essas amostras foram submetidas à aquisição de espectros de RMN ^1H , ^{13}C , mapas de contornos HMQC (do inglês *Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation*) e HMBC (*Heteronuclear Multiple-Bond Correlation*). Foram utilizados aparelhos com campos de 500 e 300MHz de acordo com conveniência logística da *facility* da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FCLRP-USP). As amostras estiveram sob refrigeração durante o transporte. Os espectros obtidos foram editados, interpretados e os dados foram expressos em tabelas.

3.4. Desenvolvimento de metodologia analítica para quantificação de terpenos voláteis em fração volátil de folhas de *Lychnophora ericoides*

Visando determinar os teores absolutos de terpenos voláteis nas folhas de *L. ericoides* uma metodologia de HS-SPME quantitativo foi proposta.

Alíquotas de folhas foram trituradas a frio com ajuda de nitrogênio líquido, gral e pistilo. Nove alíquotas de 10 mg de material triturado cada, foram alocadas separadamente

em 9 frascos de vidro próprios para o uso automatizado de HS-SPME. Esse material foi exposto ao calor (90°C por 60 minutos), por meio de um banho térmico, até que não houvesse mais nenhum odor exalado. A necessidade de tal procedimento era tal qual a de usar a matriz mais semelhante possível a matriz vegetal para incorporar, no frasco de vidro, os padrões de terpenos para execução do *Headspace*. Esse material foi designado material vegetal sem voláteis (MVSV) (**Figura 6**) e a ausência de componentes voláteis foi confirmada por execução de *Headspace* deste próprio material após o procedimento de volatilização dos componentes.

Figura 6. Ilustração em forma de fluxo de trabalho evidenciando as etapas do desenvolvimento da metodologia de quantificação dos componentes da fração volátil HS-SPME de folhas de *L. ericoides*.

O monoterpeno eucaliptol e o sesquiterpeno *trans*-cariofileno foram utilizados visando obter uma curva de calibração que fornecesse uma função matemática linear. Essa “equação” seria, de acordo com a proposta, usada como uma forma de quantificação por padrão externo, haja vista a condição inexequível de quantificação por uso de padrão interno, o qual competiria pela área de filme polimérico das fibras com os analitos da fração

volátil das folhas. Esta condição de equilíbrio que leva os compostos a competir por espaço de adsorção nas fibras, foi determinante na escolha de solvente a ser utilizado para preparação das soluções de terpenos. O melhor “solvente” lipofílico o suficiente para solubilizar os terpenos, e ainda fixo o suficiente para não volatilizar e assim entrar em contato com os filmes poliméricos, foi o óleo de soja. Portanto, soluções padrão de 10 ppm de terpenos (volume de cada um dos padrões/volume de óleo de soja). As soluções foram diluídas com ajuda de pipetas automáticas e então alíquotas de 300µL foram adicionadas ao MVSV que foi seco nos frascos de vidro.

Alíquotas de 10 mg de ramos de folhas de cada um dos 10 indivíduos alocados em frasco de vidro, a semelhança da maneira a qual foi feito o preparo das amostras para a determinação da curva de calibração com exceção da exposição ao banho termostático.

Todas as amostragens para a elaboração da curva, quanto para as análises das amostragens dos indivíduos foram lacradas com tampa contendo septo de PTFE. Seguidamente, estas amostras foram submetidas ao *Headspace* com acoplamento aos dispositivos de SPME. O tempo de exposição da fibra foi igual ao tempo total de *Headspace*, ou seja, 30 minutos sob a temperatura de 70°C, sendo que estas condições foram otimizadas e determinadas previamente (PAVARINI, 2011). Logo em seguida os analitos foram dessorvidos das fibras ao serem expostos a câmara injetora do cromatógrafo gasoso.

Os valores de T.I.C. de cada um dos padrões de terpenos utilizados na curva de calibração foram utilizados para a confecção das equações matemáticas que expressam intervalos de confiança para a quantificação. Em suma, a média aritmética dos valores aferidos para intensidade de sinal (aU) foi aferida e atribuída dentro do intervalo de erro padrão da média. Todas as funções estão disponíveis pelo software “Calc | LibreOffice” de livre acesso.

A identificação dos sinais apresentados nos cromatogramas foi feita inicialmente por

sobreposição dos picos cromatográficos e dos espectros de cada pico com os dados gerados em análises comparativas prévias (PAVARINI, 2011).

De forma mais aprofundada, foram procedidas as buscas por similaridades em índices de retenção relativa (IRR) e ainda índice de similaridade de espectros de massas. Os IRRs foram calculados de acordo com a equação de Kovats (**Figura 7**) e o segundo por comparação dos espectros gerados em Ionização por Elétrons com os espectros das bibliotecas citadas na listagem de materiais. Ademais a busca em base de dados de livre acesso como a NIST Chemistry Webbook, o ChemSpider e a Pherobase contribuíram para o processo de identificação.

$$IRR = 100n + 100 \cdot \left(\frac{\log t_{R_x} - \log t_{R_z}}{\log t_{R_{(z+1)}} - \log t_{R_z}} \right)$$

Figura 7. Equação de Kovats utilizada no cálculo do IRR. “n” é o número de carbonos do *n*-alcano com o tempo de retenção (t_{R_z}) invariavelmente anterior ao do analito (t_{R_x}), enquanto ($t_{R_{(z+1)}}$) é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído da coluna invariavelmente logo após o analito.

3.5. MALDI *imaging*

A **Figura 8** sintetiza em forma gráfica o fluxo de trabalho no qual pode-se notar os passos tomados. Estes passos serão detalhados a seguir.

Figura 8. Esquema ilustrado descrevendo as etapas chaves no processo de geração de imagens moleculares das proteínas distribuídas nas folhas de *L. ericoides* pelo emprego da técnica de MALDI-IMS

A geração de imagens foi possível a partir da aquisição de cortes transversais das folhas jovens, e recém-coletadas de *Lychnophora ericoides*. Este material foi cortado em micrótomo e em seguida os cortes foram fotografados para gerar a base da imagem. Em seguida o preparo foi feito com ajuda de nebulização de matriz dissolvida em metanol. Após a secagem da matriz os cortes preparados e colados em placas de vidro foram inseridos dentro da câmara de baixa pressão do espectrômetro, onde o processo de ionização dos analitos ocorreu através do disparo do laser sobre toda a superfície do corte. A coleção de espectros gerada foi correlacionada espacialmente e de forma específica com base na fotografia dos cortes. Desta maneira foi possível a geração das imagens com resolução de 30 μm .

Fundamentalmente, a garantia do material botânico livre de interferentes teve como

base a adoção de dois cuidados durante a manipulação e preparo de amostra: (1) uso de luvas nitrílicas isentas de talco e material mineral em geral que dificulte a aquisição dos espectros; (2) uso de massas sólidas de cera de vela para efeito de “reproduzir” os blocos de inserção de tecidos utilizados em procedimentos de corte por uso de Micrótomo sem o ônus da contaminação do material. Este último cuidado visou adquirir cortes transversais com qualidade para gerar espectros com os melhores sinais, ou seja, aqueles que apresentavam abundância e relação sinal/ruído satisfatórias, bem como visou à obtenção da melhor resolução nas imagens.

A geração das imagens foi dada a partir do uso do equipamento MALDI-TOF ultrafleXtreme® adquirindo espectros em uma ampla faixa de massas (70KDa). Essa estratégia foi utilizada para garantir a maior possibilidade de prospecção, uma vez que não havia disposição de dados conclusivos que pudessem restringir de forma efetiva a busca pelos sinais das enzimas de interesse. O Uso do Software ImageFlex® possibilitou a geração das imagens a partir dos espectros colecionados dentro do espaço no qual estavam contidos os cortes.

3.6. Extratos proteicos, separação de proteínas nativas macromoléculas, análise espectrométrica e quimioinformática

Os procedimentos experimentais que envolveram as etapas de preparo de amostra para obtenção de extratos proteicos, geração de mapas proteicos em géis eletroforéticos uni e bidimensionais, digestão de *spots* de interesse contendo proteínas alvo, análise por espectrometria de massas e análise quimioinformática dos resultados (“*MS output*”) foram procedidos conforme metodologia clássica de proteômica. A **Figura 9** sintetiza em forma gráfica o fluxo de trabalho no qual pode-se notar os passos tomados. Estes passos serão detalhados a seguir.

Figura 9. Gráfico ilustrando as etapas principais na execução dos experimentos de geração de mapas proteicos por separação em Gel e análise espectrométrica.

A ilustração compreende as etapas principais do trabalho de caracterização das enzimas chave da rota biossintética dos sesquiterpenos *L. ericoides*. Em suma o fluxo de trabalho inicia-se com o preparo do material vegetal por pulverização a frio com uso de polivinilpirrolidona e subsequente extração com tampões apropriados. Em seguida a separação de fases há a precipitação de fase rica em peptídeos e limpeza. De posse do extrato enzimático ou proteico são procedidas as análises qualitativas de conteúdo proteico. Em seguida procederam-se a re-suspensão e aplicação em gel de 1D-PAGE [do inglês *One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional)]. Posteriormente houve a corrida sob campo elétrico, coloração e digitalização do resultado. Por fim, os *spots* contendo proteínas de interesse foram digeridos com tripsina e os peptídeos foram limpos com auxílio de partição sólido líquido e enfim analisados. Os resultados da espectrometria de massas alimentaram ferramentas

quimioinformáticas (MASCOT principalmente) que geraram os dados comparativos que possibilitam a identificação de proteínas ou de domínios funcionais.

3.6.1. Preparo de amostras para obtenção de extrato proteico

Uma série de testes foi efetuada no laboratório do grupo de pesquisas da Dr. Yatsuda-Natsui. Nesta série estavam inclusas técnicas com sonicação de material vegetal e extração com tampão ureia, por exemplo.

Diante da ineficácia dos métodos optamos por adaptação de metodologia disponível na literatura. Esta metodologia foi desenvolvida com base em uma estratégia publicada em 2009 por Zulak e Colaboradores utilizada com sucesso na prospecção de terpenos-sintases de outros grupos taxonômicos.

Foi utilizado uma alíquota indeterminada de material vegetal e PVP sob a técnica de maceração, com auxílio de grãos de areia previamente limpos e livres de Proteinases. O resultante foi uma massa amorfa de folhas trituradas e apropriadas para extração de proteínas nativas.

A extração dos componentes indesejáveis foi realizada em etapas sendo seguidas cronologicamente conforme descrito abaixo:

- Extração em duplicata com 2 ml de ácido tricarbólico (10%) e 1% DTT em acetona.

- Extração em duplicata com 2 ml de solução 0,1M de acetato de amônio e 1% DTT em 8:2 metanol/água.

- Extração em duplicata com 2 ml de solução de 1% DTT em acetona.

Como resultante, um *pellet* de aspecto viscoso e coloração marrom se apresentou no fundo dos tubos após a centrifugação e secagem a baixa pressão.

Em seguida os componentes proteicos desejáveis foram extraídos usando dois

diferentes tampões: (1) Tampão orgânico Tris diluído em fenol com pH ajustado para 8,0 e (2) tampão aquoso Tris com 30% sucrose, 2% SDS e 2% DTT com pH ajustado para 8,0. Esse material formou duas fases após agitação em vortex. Para separação completa das fases foi utilizada centrifugação (6000RPM/6minutos).

A fase preservada foi a orgânica, a qual foi transferida para outro tubo no qual foi diluído em solução metanólica de acetato de amônio 0,25M, incubado *overnight* a -20°C. No dia seguinte o material foi centrifugado e seco.

O *pellet* resultante foi enfim lavado com metanol e em seguida com acetona/água 8:2. Por fim o material foi seco por centrifugação a baixa pressão e em seguida re-suspenso em SDS 0,3% e aquecidos para tornar as proteínas aptas a migração em gel 1D-PAGE. Uma pequena alíquota do material é utilizada paralelamente em avaliação qualitativa de constituição proteica pelo teste de Bradford. Tons de azul compatíveis com os resultados positivos do banco de dados do laboratório são assumidos como resultados positivos.

3.6.2 Separação de Proteínas Nativas em gel

Foram confeccionados géis para eletroforese unidimensional com 12,5% de acrilamida. As amostras foram diluídas em tampão de corrida e enfim aplicadas nos poços de cada gel ao lado do *pool* de marcadores de peso molecular.

Conforme o gel descansado na cuba eletroforética e embebido em tampão para eletroforese recebeu as amostras e os marcadores a corrida iniciou. Sob voltagem de 120V e amperagem livre a separação ocorreu em poucas horas.

Ao término da corrida cada gel foi incubado em solução de fixação de proteínas por uma hora e depois lavado com água Mili-Q sob agitação.

O corante Coomassie Blues foi enfim adicionado ao gel em agitação e a coloração ocorreu em 3 dias. Em seguida cada gel foi digitalizado.

3.6.3. Caracterização enzimática utilizando MALDI-ToF e MALDI ToF/ToF

Todos os *spots* observados nos géis foram excisados.

Como tratamento prévio a digestão trípica houve a lavagem dos *spots* excisados (3 vezes solução de lavagem).

Foi feito o uso seguinte da solução de reidratação por 2 vezes em cada *spot*. Por fim o uso de acetonitrila desidratou os géis. Esta alternância entre hidratação e desidratação visou aprimorar a capacidade de absorção das soluções utilizadas.

Em seguida a redução das pontes de dissulfeto foi garantida pelo uso da solução de DTT 6,5mM a 60 °C por uma hora. Seguidamente a alquilação uma lavagem previa com acetonitrila preparou o gel para a alquilação das cisteínas reduzidas com iodoacetamida em solução por 25 minutos em ausencia de luz. Por fim um último ciclo hidratação-desidratação garantiu que esses *spots* ficassem na cor branca e prontos para a digestão.

A digestão trípica foi conduzida a partir da adição da solução de tripsina nos tubos, os quais após tal adição foram incubados por 30 minutos. Essa incubação reidratou os *spots*. Em seguida uma quantidade extra de tampão foi adicionada a fim de cobrir o material. A digestão ocorreu dentro de um intervalo de 16 horas sob temperatura de 37°C. Extrações subsequentes incluindo uso de acetonitrila acidificada com TFA e ainda pura foram procedidas em sequência.

Por fim o material seco destas últimas extrações foi re-suspendido em solução de Matriz para MALDI.

Essa é uma solução de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico que é um componente de baixa massa molar que apresenta cromóforos capazes de absorver energia na região do ultravioleta (UV).

Todo o material obtido ao final do tratamento dos digeridos trípicos foi utilizado sob supervisão da Dr. Denise Brentan da Silvana FCFRP-USP em sistema de colaboração

científica. O protocolo de aquisição de espectros de massa e de massa/massa para peptídeos digeridos por tripsina foi executado. Os resultados de espectrometria foram disponibilizados e ainda foram utilizados como *input* na busca por similaridade realizada no MASCOT.

3.7. Extração de RNA e subsequente produção de cDNA

O material vegetal foi coletado e transportado sob condições otimizadas para conservação das condições de integridade das macromoléculas e para manutenção do material livre de contaminação. Para tanto foram utilizados ambientes de conservação congelados com gelo seco (-70°C).

Portanto o do material congelado foram extraídas alíquotas amostras. Estas entraram em contato com nitrogênio líquido e foram pulverizadas a frio com auxílio de gral e pistilo. Em seguida o material entrou em contato com tampão de extração resfriado a 0 °C (Aurum total RNA isolation Kit, Biorad). Para ruptura celular um moinho agitador foi utilizado (16hz, 1min) com pérolas de porcelana dentro do frasco (diâmetro de 2.8 mm). Após a ruptura uma quantidade adicional de 500 µL de tampão de lise foi adicionada. Todas as etapas subsequentes foram conduzidas em acordo com o manual do Kit. A quantidade e integridade do RNA foram verificadas por um espectrofotômetro Bioanalyzer 2100 equipado com um chip RNA 6000 Pico Chip. O DNA complementar (cDNA) foi obtido via RT-PCR [do inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction* (transcrição reversa, e reação em cadeia da polimerase)] usando o Kit RevertAid™ com um *primer* do tipo oligo [(dT)₁₈]. Todas as reações de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foram obtidas pelo uso do termociclador sendo o meio reacional enriquecido com uma enzima *Taq* DNA-Polimerase ou ainda Phusion DNA-Polimerase.

O DNA genômico (gDNA) foi extraído seguindo os passos do protocolo

estabelecido por Rogers e Bendlich (1985) e adaptando os procedimentos de acordo com a própria conveniência. As etapas iniciais de pulverização das folhas, ruptura das células e adição dos tampões foram desenvolvidas conforme descrito previamente para extração de RNA. Em seguida, a adição das enzimas proteinase e RNase colaboraram para garantir a pureza do gDNA por meio da digestão das demais macromoléculas possivelmente extraídas dos tecidos vegetais. O extrato enriquecido de gDNA foi subsequentemente tratado com uma mistura de álcool isoamílico e clorofórmio (1.24⁻¹), centrifugado e a fase líquida (superior) foi preservada. Essa etapa garantiu a retirada de compostos fenólicos que poderiam prejudicar o desempenho das polimerases na reação de PCR. Este procedimento foi repetido uma vez. Em seguida, a adição de acetato de sódio (Na⁺C₂H₃O₂⁻) e isopropanol foi conduzida e este volume, após homogeneização, foi incubado (10 min/-20°C) e centrifugado. Os *pellets* de gDNA estavam visíveis no fundo dos tubos após o cumprimento deste protocolo. Uma etapa final de lavagem com etanol (EtOH) foi realizada e os *pellets* foram secos a 20 °C em período *overnight*. A quantidade e a integridade do material foi aferida conforme descrito para as amostras de RNA.

Os programas utilizados no termociclador para as reações de PCR seguiram intervalos de temperatura estabelecidos previamente no laboratório do Dr. Spring. Estes intervalos oferecem as condições ideais para a ação das enzimas em meio reacional enriquecido com solução de bases nitrogenadas.

A Eletroforese foi utilizada como técnica de rotina para separação e identificação dos produtos das reações de PCR. Uma vez que esses produtos foram obtidos os procedimentos adotados foram: (1) diluição de azul de bromofenol nos volumes e subsequente aplicação ($\leq 15\mu\text{L}$) dentro dos poços dos géis confeccionados com agarose [1% (m.v⁻¹)]; (2) aplicação de uma escala de tamanho de fitas de DNA, a qual consiste de uma mistura de fragmentos de diferentes tamanhos de DNA em concentrações conhecidas;

(3) dentro da cuba de eletroforese uma voltagem total de 160 v foi acumulada por um intervalo de 35 minutos; (4) em seguida o gel entrou em contato por 15 minutos com uma solução de brometo de etídeo diluído em tampão de corrida ($1.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), foi exposto à luz UV ($\lambda=312 \text{ nm}$), foto registrado e os produtos de interesse foram excisados e congelados.

3.7.1. Purificação dos genes amplificados e clonagem

A purificação dos genes clonados dispersos nos géis foi executada em acordo com os protocolo comercial GFX PCR Gel Band Purification Kit e foram realizados com antecedência a cada experimento de clonagem.

A Clonagem dos genes foi conduzida utilizando os genes, previamente tratados, em plasmídeos pSC-A de acordo com as instruções do Kit Comercial StrataClone PCR Cloning Kit. As colônias de *Escherichia coli* que apresentavam o fenótipo positivo para a inserção do gene estavam em cor branca na placa de petri após o período de incubação. Estas colônias foram pinçadas e utilizadas no experimento de PCR de colônia para verificar a capacidade de este gene clonado ser amplificado em meio reacional. Em seguida, as colônias de fenótipo positivo apresentaram produtos com dimensões nos géis que foram compatíveis com o produto alvo foram separadas. Essas colônias selecionadas foram cultivadas em meio líquido durante período *overnight* a fim de aumentar a quantidade de plasmídeo disponível. No dia seguinte a separação do DNA plasmidial foi conduzida utilizando o Kit Comercial para recuperação e purificação de plasmídeo. Fundamentalmente, as etapas são de ruptura celular seguida de adição de tampão de lise, separação de sobrenadante, ligação do DNA plasmidial a uma membrana de sílica, lavagem e eluição.

O sequenciamento das pares de bases dos genes foi efetuado pela empresa GATC (GATC Biotech AG, Constance, Germany) utilizando *primers* T3/T7.

O alinhamento das sequências, bem como o trabalho de tratamento dos dados de sequenciamento foram efetuados com o auxílio de um módulo sequenciador Seqman do pacote de software DNASTAR (Lasergene).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1 Identificação dos sinais cromatográficos

A caracterização fitoquímica da fração volátil das folhas de *L. ericoides* “NPL 227” havia sido procedida previamente (PAVARINI, 2011). Ademais, análises semiquantitativas destes metabolitos durante intervalos infradianos e ultradianos também foram executadas. A partir destes resultados prévios foi procedida a identificação dos sinais dos cromatogramas obtidos para ambas *L. ericoides* “NPL 123” e “NPL 382”. Em suma a sobreposição dos cromatogramas em modo *comparison* no software LabSolutions® GC-MS foi fortemente sugestiva para a identificação dos metabolitos previamente identificados. No caso dos metabolitos que ocorrem não apenas em “NPL 123” mas ainda em outras especimens houve êxito nessa estratégia. Pontualmente cita-se o exemplo do Sesquicineol que havia sido identificado em “NPL 227” e bem como pode ser em “NPL 123” e “NPL 382” (**Tabela 2**) De maneira conclusiva os espectros EI-MS que se mostraram sobreponíveis foram utilizados na identificação. Desta maneira foi racionalizado o fluxo de trabalho com minimização de tempo despendido em re-isolamento de compostos.

O trabalho de identificação contou ainda com o auxílio de base de dados espectrais e cromatográficos disponíveis on-line. Foram preconizadas buscas por estes dados quando obtidos em condições experimentais similares as utilizadas em nossos experimentos. Espectros EI-MS foram dispostos neste documento de acordo com duas situações possíveis:

(1) Espectros disponíveis livremente nas bases de dados, como o EI-MS da Vanilina por exemplo, estão apresentados como figura.

(2) Espectros não disponíveis tiveram os dados de intensidade relativa dos íons tabelados, como para a identificação do dehidro cadinol a partir do α -cadinol.

(3) Todos os IRRs foram calculados alimentando a equação disposta na **Figura 7** com os dados obtidos em GC-MS e tabelados na **Tabela 3**.

Tabela 2. Apresentação dos dados referentes aos metabolitos identificados dentro da faixa de eluição de interesse nos cromatogramas (45minutos <Tempo de retenção> 20minutos)

Tr (min)	IRR* 2012	IRR* 2009	Composto	Estrutura	“NPL 123”	“NPL 382”
24,05	1428	-	Vanilina (derivado não sesquiterpênico) &	A	-	+++
26,50	1485	-	α -Humuleno &	B	+	+++
27,09	1500	1463	Sesquicineol	C	+++	+++
28,53	1533	1498	<i>ar</i> -Curcumeno (C ₁₅ H ₂₂) &	D	+++	+
32,80	1637	1609	Derivado Biciclohexânico @#	E	+++	+
35,62	1716	-	α -Bisabolol @	F	+	+++
43,00	1932	1894	<i>orto</i> -acetoxi Bisabolol	G	+++	-

* Kovats

@ Isolado no estudo de Fitoquímica Clássica

Descrito neste manuscrito pela primeira vez na literatura

& Majoritário apenas em *Headspace*-SPME

“+++”: Composto Majoritário

“+”: Composto Minoritário

Tabela 3. Tempo de retenção de cada um dos *n*-alcanos utilizados na determinação dos IRRs de cada analito avaliado

Tr (Min)	<i>n</i> -alcano
4.38	C ₉ H ₂₀
7.00	C ₁₀ H ₂₂
10.55	C ₁₁ H ₂₄
14.67	C ₁₂ H ₂₆
18.98	C ₁₃ H ₂₈
23.28	C ₁₄ H ₃₀
27.38	C ₁₅ H ₃₂
31.31	C ₁₆ H ₃₄
35.06	C ₁₇ H ₃₆
38.63	C ₁₈ H ₃₈
42.04	C ₁₉ H ₄₀
45.30	C ₂₀ H ₄₂
48.41	C ₂₁ H ₄₄
51.41	C ₂₂ H ₄₆
54.27	C ₂₃ H ₄₈
57.02	C ₂₄ H ₅₀
59.68	C ₂₅ H ₅₂

Abaixo estão apresentados e discutidos os resultados os quais fundamentaram a identificação destes compostos.

Dentre os compostos identificados em “NPL 382” estão

-Com Tempo de retenção Tr 24,05 a Vanilina que apresenta IRR calculado de 1428. O IRR publicado (SCHNERMANN; SCHIEBERLE, 1997) é de 1406, ou seja, >98% similar. Ademais, a vanilina é produto biossintético oriundo dos hidroxicinamatos ou fenilpropanóides. Uma vasta gama de compostos desta via biossintética é descrita em *Lychnophora* spp. (GOBBO-NETO; LOPES, 2008). O espectro EI-MS apresenta pico base de m/z 152 (**Figura 10**).

Figura 10. Comparação dos espectros EI-MS para Vanilina. Acima, espectro com acesso livre pela base de dados Pherobase (www.pherobase.com) e abaixo o espectro adquirido durante as análises HS-SPME de *L. ericoides* "NPL 382"

-Com Tr de 26,50 o α -Humuleno. Por vezes referido na Literatura como (*E*)

-Cariofileno ou α -Cariofileno, esclarecemos aqui que o composto detectado corresponde ao registro no *Chemical Abstract Service* (CAS) de número 6753-98-6. O composto apresentou IRR calculado de 1485. O IRR publicado (MEVY, et al. 2006) é de 1456, ou seja, >98% similar.. Lembramos aqui, conforme referenciado na seção **INTRODUÇÃO**, que não apenas este composto mas também seus derivados oxidados, são comuns a espécie bem como a outras da sub-tribo Lychnophorinae como *Eremanthus* spp.

Figura 11. Comparação dos espectros EI-MS para α -Humuleno. Acima, espectro com acesso livre pela base de dados NIST Chemistry WebBook (webbook.nist.gov) e abaixo o espectro adquirido durante as análises HS-SPME de *L. ericoides* "NPL 382"

-Com Tr de 27,09 o Sesquicineol que foi identificado conforme a estratégia de identificação por comparação utilizando dados obtidos previamente (PAVARINI, 2011). Abaixo na **Figura 12** está disposto o espectro EI-MS obtido.

Figura 12. Espectros EI-MS para Sesquiceneol. Espectro adquirido durante as análises HS-SPME de *L. ericoides* “NPL 382”, “NPL 123” e “NPL 227”

-Com Tr de 35,62 um derivado Bisaboleno de estrutura não estabelecida. É possível notar no espectro a presença dos íons m/z 119 e m/z 69 como mais intensos bem como um íon de m/z 134. Estes sinais são extremamente sugestivos da estrutura cicloexênica substituída pelo hepteno que caracteriza os derivados bisaboleno. Uma discussão mais aprofundada do uso destes sinais no espectro EI-MS está disposta no item **Headspace-SPME** disposto mais afrente neste texto.

Figura 13. Espectro EI-MS para o derivado Bisaboleno de “NPL 382”

Dentre os compostos identificados em “NPL 123” estão:

- Com Tr 27,09 o composto foi identificado conforme a estratégia de identificação por comparação como sendo Sesquicineol. Acima neste texto, exatamente na **Figura 12**, é possível observar o espectro EI-MS que ocorre em “NPL 382” e é idêntico ao que ocorre em “NPL 123”

- Com Tr 28,5 o composto descrito previamente como um sesquiterpeno de fórmula empírica $C_{15}H_{22}$ em (PAVARINI, 2011) e agora identificado com *ar*-Curcumeno. Esclarecemos aqui que o composto detectado corresponde ao registro no *Chemical Abstract Service* (CAS) de número 644-30-4. O composto apresentou IRR calculado de 1533 neste estudo e 1498 no nosso estudo prévio (PAVARINI, 2011). O IRR publicado (ADAMS, 1995) é de 1483, ou seja, >99% similar.. Lembramos aqui, conforme referenciado na seção **INTRODUÇÃO**, que este composto é comum a espécie. A comparação do espectro EI-MS obtido e o disponível on-line (**Figura 14**) denota a semelhança.

Figura 14. Comparação dos espectros EI-MS para *ar*-Curcumen. Acima, espectro com acesso livre pela base de dados Pherobase (www.pherobase.com) e abaixo o espectro adquirido durante as análises HS-SPME de *L. ericoides* "NPL 123"

- Com Tr 32,8 o composto descrito previamente como derivado bicicloexânico e agora identificado como 11-dehidro cadinol. Uma profunda apresentação dos dados que elucidam sua estrutura está provida no item **Derivado Bicíclico de *L. ericoides* "NPL 123"** mais a frente neste texto.

- Com Tr 43,00 o *orto*-acetoxi Bisabolol que foi identificado conforme a estratégia de desreplcação utilizando dados obtidos previamente (PAVARINI, 2011). Abaixo na **Figura 15** está disposto o espectro EI-MS obtido.

Figura 15. Espectros EI-MS para *orto*-acetoxi Bisabolol. Espectro adquirido durante as análises HS-SPME de *L. ericoides* “NPL 123” e “NPL 227”

Por fim apresentam-se a seguir os cromatogramas demonstrando os sinais cromatográficos supracitados. É possível observar estes quatro sinais cromatográficos majoritários em “NPL 382” na **Figura 16** e ainda os quatro sinais cromatográficos majoritários em “NPL 123” na **Figura 17**

Figura 16. Ampliação do cromatograma GC-MS na região de eluição dos sesquiterpenos. *Lychnophora ericoides* “NPL 382”, Maio 2012

Figura 17. Ampliação do cromatograma GC-MS na região de eluição dos sesquiterpenos. *Lychnophora ericoides* “NPL 123”, Maio 2012

4.2. Headspace-SPME

Os espectros de massas gerados nas análises por CG-MS com ionização EI-MS (**Figura 18**) foram interpretados com base nos mecanismos clássicos de fragmentação que suportam a hipótese de formação dos íons mais intensos dos espectros dos analitos. Estes íons são ainda os mais intensos no espectro EI-MS do β -bisaboleno disponível pelo “NIST Chem Webbook”. Aspectos irrefutáveis como a estabilidade do cátion radical alila e a reatividade da espécie radicalar do ciclohexeno foram as características exploradas.

Figura 18. Mecanismos de fragmentação propostos para descrever a formação dos íons relevantes para a identificação dos analitos observados como majoritários em frações voláteis de *Lychnophora ericoides*. Com base na comparação dos íons obtidos nos espectros com os íons apresentados no espectro do β -bisaboleno disponível na plataforma “NIST WebChem Book” foram propostas as seguintes rotas: Em verde, a formação do cátion alílico; em Vermelho: formação de um dieno a partir do mecanismo de retro Dials Alder pelo qual se fragmenta o ciclohexeno, ao que se segue uma desmetilação que é possibilitada pela migração de um hidreto.

Com relação à análise das amostragens dos indivíduos de cada espécime e a ainda sobre o desenvolvimento de metodologia quantitativa por HS-SPME foram obtidos resultados com as amostragens efetuadas dentro do período de grande acúmulo de sesquiterpenos nas folhas da espécie. Foi adotado um valor de corte para os valores de intensidade de sinais observados entre o $n=10$ de amostragens de adultos de *L. ericoides*. Foram considerados apenas os valores singulares do composto que se situava dentro de uma faixa que compreendia um valor igual a media dos dez valores, duas vezes maior ou menor que o valor do desvio padrão da amostragem ($Média \pm erro\ padrão\ da\ média$). Dentro desta faixa que tende a descrever a mediana dos níveis de sesquiterpenos entre indivíduos do mesmo campo de coleta, apenas seis amostragens obtidas junto aos espécimens “NPL227” foram agrupados, sendo as quatro outras descartadas. Este valor de

corte visa minimizar a variabilidade intra-específicas inerente do metabolismo destes organismos. A sobreposição da área dos cromatogramas, destas seis amostragens, relativa aos sinais dos sesquiterpenos está apresentada na **Figura 19**.

Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas das seis amostragens “medianas”. Nota-se a presença de quatro sinais majoritários, os quais foram descritos previamente (PAVARINI, 2011) como sesquiceneol (Tr 27,09), um sesquiterpeno de fórmula empírica $C_{15}H_{22}$ (Tr 28,53), posteriormente identificado como *ar*-curcumeno, um derivado biciclohexânico (Tr 32,80), posteriormente identificado como 11-dehidro cadinol e o *orto*-acetoxi-bisabolol (Tr43,00).

Adicionalmente, as amostragens seguintes com “NPL 123” e “NPL 382” foram desempenhadas em período ótimo de acúmulo de sesquiterpenos nas folhas. Com base em estudos prévios (PAVARINI, 2011) as amostragens em Abril de 2012 foram utilizadas na análise quantitativa conclusiva.

Portanto a partir da observação dos sinais cromatográficos na faixa de eluição acima de Tr 20,00 foi possível determinar a ocorrência dos compostos de interesse. Dentro dessa faixa ocorrem compostos majoritários. Estes compostos apresentam os sinais cromatográficos mais intensos quando sobrepõe-se os cromatogramas obtidos para cada indivíduo. Há ainda compostos de ocorrência minoritária. Por vezes esses minoritários não são detectados extensivamente dentro do “n” amostral, ou seja, não ocorrem em todos indivíduos. Por exemplo cita-se o composto com Tr 35,62 que é majoritário em “NPL 382” e minoritário em “NPL 123”.

Em definição algébrica foi adotado a “*cut off*”, ou faixa de corte, de 5% da área total

do cromatograma em T.I.C. Todos os cromatogramas tiveram seus sinais definidos e conseqüentemente a área total destas foram integradas de acordo com os parâmetros estabelecidos e apresentados na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores para os parâmetros de integração dos sinais cromatográficos pelo software GC-MS LabSolutions ®

<i>Slope</i>	5000/minuto
<i>Width</i>	2/segundo
<i>Drift</i>	0/minuto
T.DBL	1000/minuto

Os dados resultantes dessa integração foram tabelados como dados brutos em valores de unidades

Com relação as análises HS-SPME procedidas com amostragem de “NPL 382” foi observada a presença majoritária de um composto com Tr de 35,62 em todas as amostras. Este composto ainda foi detectado de forma abundante em óleos essenciais obtidos por hidrodestilação do material o qual foram retiradas alíquotas e que ainda excedeu o uso em HS. Estes resultados serão abordados mais afrente neste texto na seção **Fitoquímica Clássica**. Aqui ressaltamos que os níveis detectado para este composto são os maiores de todas as análises deste trabalho.

Figura 20. Barras apresentando os valores observados para a média aritmética dos sinais cromatográficos majoritários em “NPL 382”. Cada barra representa seu composto com o tempo de retenção (Tr) determinado. A distribuição normal é compreendida no intervalo do erro padrão da média. Os valores estão dispostos em unidades de detecção (aU) no eixo Y.

Figura 21. Barras apresentando os valores observados para a média aritmética dos sinais cromatográficos majoritários em “NPL 123”. Cada barra representa seu composto com o tempo de retenção (Tr) determinado. A distribuição normal é compreendida no intervalo do erro padrão da média. Os valores estão dispostos em unidades de detecção (aU) no eixo Y.

Figura 22. Barras apresentando os valores observados para quantidades conhecidas de calibrante externo (*trans*-cariofileno Padrão P.A.) na região “Dispersão”. A título de análise comparativa estão plotados dentro da mesma escala f(X) os valores da média aritmética dos sinais cromatográficos majoritários em “NPL 382” e “NPL 123”. Cada barra representa seu composto com o tempo de retenção (Tr) determinado. A distribuição normal é compreendida no intervalo do erro padrão da média. Os valores estão dispostos em unidades de detecção (aU) no eixo Y.

É possível notar que dentre os valores nominais há uma tendência de que haja erros padrões de intervalos maiores. Este fato traz a luz a realidade de que quanto maior o nível do metabolito numa amostragem populacional, mais heterogenia é a distribuição de valores individuais. Esta tendência no comportamento pode refletir a natureza responsiva da síntese destas substâncias. Conforme discutido na **INTRODUÇÃO** os derivados bisabolanos e cadinanos são mediadores de respostas a interação com o habitat em relações multitróficas. Aumentos abruptos nas suas taxas de emissão são registrados em HS-SPME *in vivo* dentro de intervalos de poucas horas ou minutos (GOUVEA et al., 2012). Esta distribuição normal com limites maximizados dentro de uma amostragem populacional sugere que dentre os indivíduos amostrados apresenta aumentos que justificam esta condição heterogenia da amostragem.

Os valores aferidos para as amostragens populacionais foram portanto expressos nominalmente em valores médios dentro de um intervalo de erro padrão. A fim de

determinar a quantidade em termos de teor de componentes voláteis nas folhas estes valores foram transformados em valores de concentração em partes por milhão (ppm).

Estes valores foram encontradas a partir dos cálculos da equação da reta. Esta reta foi proposta para os valores dentro de um intervalo de confiança entre 3000 e 8000 ppm (Figura 23). Para além do intervalo de confiança, os valores das de intensidade de sinais das amostragens foram ainda utilizados na equação por extrapolação do intervalo.

Figura 23. Valores de intensidade de sinal [f(x)] e concentração em ppm [uL/(10⁶. mg)] no eixo x. Os três valores para concentrações conhecidas de padrão de *trans*-cariofileno foram obtidos dentro de um intervalo de confiança. Este intervalo da curva de calibração externa com R²>0,99 foi extrapolado para ser empregado na quantificação de quantidades além e aquém de seu intervalo original.

Cabe ressaltar que a aquisição dos dados para resposta do detector frente a quantidades conhecidas de padrão de *trans*-cariofileno foi normalizada em todos os parâmetros como tempo, temperatura massa da mostra, ou do “branco”, e assim por diante. Portanto a resposta distinta do detector é única e exclusiva a distinção da quantidade de padrão volatilizada no *Headspace* e consequentemente concentrada na fibra de SPME e injetada em GC-MS. Concluindo, a equação da reta com intervalo de confiança fornece o artifício matemático para a conversão dos valores médios dispostos nas Figuras 20 e 21 em unidades de concentração (uL de padrão/mg de folhas).

A Figura 24 expressão a maneira com a qual esses dados se distribuem.

Figura 24. Distribuição dos valores médios das concentrações dos compostos em ppm de volume destes por massa das folhas. Os sinais cromatográficos, dentro do intervalo do erro padrão, foram convertidos em valores de concentração (ppm) com a ajuda da equação da reta e da extrapolação de seu intervalo de confiança. Nota-se que o composto de Tr 35,62 (“NPL 382”) apresenta valores máximos entre os metabolitos dos diferentes espécimens enquanto o composto Tr 43,00 (“NPL 123”) apresenta os valores mínimos.

Em conclusão, é necessário chamar a atenção para a capacidade de predição de concentrações distintas de metabolitos em tecido vegetal por este metodo de HS-SPME quantitativo. Essa ferramenta desenvolvida se insere na resolução do problema de inferir qual espécimen possui a maior taxa de biossintética com base na determinação da quantidade de seus produtos, os sesquiterpenos bioativos.

4.3. Fitoquímica clássica

Utilizando o aparelho de Clevenger foram obtidos materiais de característica oleosa formando fase orgânica acima da água da bureta da vidraria.

As análises organolépticas não foram aprofundadas entretanto é possível determinar que há em comum entre todos os óleos uma coloração verde-amarelado *sui generis*. O olfato denota nuances adocicados e ainda sugestões de frutas cítricas como limões amarelos e maracujá são marcantes.

Durante a condução de cada hidrodestilação foi acompanhado o ritmo de condensação de óleo essencial na unidade resfriadora do aparelho de Clevenger. Essa verificação apontou para o fato de que havia taxas maiores de condensação por unidade de tempo após certos intervalos. Pontualmente ilustramos que para o óleo essencial obtido a partir de folhas de *L. ericoides* “NPL 382” houve dois máximos: (1) entre 90 minutos e 120 minutos e (2) entre 360 minutos e 420 minutos. Esse comportamento determinou que os produtos de hidrodestilação fossem tomados em alíquotas advindas de baterias de aquecimento distintas. Essa distinção entre as baterias almejou obter produtos com diferenças qualitativas no perfil químico, sendo que isso foi verificado e está disposto mais adiante neste texto (**Figura 25**).

Os resultados de cada hidrodestilação procedida foram obtidos a partir das folhas excedentes ao trabalho de análise quantitativa de sesquiterpenos voláteis (**4.2. Headspace-SPME**). Esta racionalização de recursos vegetais foi preconizada de forma a convergir com uma abordagem “Ecologicamente Correta” do trabalho.

Os resultados de rendimento estão expressos em números e estão dispostos na **Tabela 5**.

Tabela 5. Compilação dos dados laboratoriais na aquisição de óleos essenciais de folhas de *Lychnophora* spp.

spp.	Fo- lhas	Tempo de HD (h)		Volume OE (μL)		Massa (g)		Densidade ^a		Rendimento ^b	
----	Bateria	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°	1°	2°
<u><i>L. ericoides</i></u> “NPL 382”	500g	17,5	6	3.370	310	2,757	0,399	0,82	1,28	0,55%	0,1%
<u><i>L. ericoides</i></u> “NPL 227”	500g	15,5	NE	410	NE	0,400	NE	0,97	NA	0,07%	NA
<u><i>L. ericoides</i></u> “NPL 123”*	500g	8 #	7 #	950	400	0,760	0,337	0,8	0,84	0,15%	0,06%
<i>L. salicifolia</i> “NPL 378”	500g	6	9	875	435	0,707	0,639	0,81	1,47	0,14%	0,13%
Total	2000g	NA	NA	5.605	1.145	4,624	1,375	NA	NA	NA	NA

HD: Hidrodestilação. OE: Óleo essencial. NE: Não existe NA: Não se aplica.

* Dividido de forma equitativa em duas HD distintas

Média aritmética dos tempos das hidrodestilações

^a g de OE $\times$ (mL de OE)⁻¹

^b [(mL de OE $\times$ densidade)/g de Folhas] $\times$ 100

Figura 25. Sobreposição de cromatogramas obtidos pela injeção de óleos essenciais de folhas de *L. ericoides* “NPL 382” e “NPL 123” em ordem de aparição de cima pra baixo nesta página. Em vermelho óleo de primeira bateria e em preto óleo de segunda bateria.

Nota-se nos dados de densidade que o material da segunda bateria é mais denso. Quanto ao rendimento esta segunda bateria é mais escassa, ou seja, apresenta menor rendimento. Portanto pelos resultados numéricos é esperado que haja quantidade considerável de monoterpenos compondo principalmente os óleos de primeira bateria.

De posse das análises em GC-MS é possível notar uma clara diferença nas intensidades dos sinais cromatográficos dos monoterpenos entre as frações de diferentes baterias. Esse resultado era esperado haja vista o que foi verificado em análises preliminares

(PAVARINI, 2011) onde quanto maior fosse a exposição a calor na obtenção da fração volátil menor seria o teor de monoterpenos nesta mesma.

Portanto, pelo fato de que os sesquiterpenos se apresentaram em maior teor nas amostras de segunda bateria, estas foram utilizadas na separação de compostos. A CCDP foi o método de escolha para a separação dos metabolitos devido aos resultados apresentados abaixo.

4.3.1. Comparação de métodos cromatográficos na separação de sesquiterpenos

No sentido de comparar técnicas apropriadas para o isolamento dos sesquiterpenos um fracionamento por coluna *flash* foi efetuado. Os resultados deste fracionamento seguem abaixo.

Após aplicação da amostra a eluição seguiu com a retirada do volume morto. Em seguida foram coletadas 9 frações eluidas da coluna, sendo cada uma com um volume determinado (**Tabela 6**). As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada em escala analítica (CCDA) com revelação por H₂SO₄/vanilina (**Figura 26**).

Tabela 6. Grupos 1 a 9, obtidos através de cromatografia em coluna *flash* de 200 µL de óleo essencial de *Lychnophora ericoides*, e suas respectivas massas

Grupo	Volume coletado	Massa (mg)
1	110mL	21,4
2	50mL	19,8
3	50mL	11,2
4	40mL	10,8
5	40mL	5,0
6	80mL	6,0
7	80mL	11,6
8	350mL	22,4
9	120mL	3,0

Os resultados das CCDA (**Figura 26**) confirmam que o fracionamento foi alcançado, sendo que na fração 5 temos enriquecido os níveis de sesquiterpenos de menor massa molecular, já livre de monoterpênos, enquanto que na fração 8 há altos níveis de *orto*-acetoxi bisabolol. A eluição dos componentes de interesse se encerra na fração 8, haja vista a falta de sinais de interesse nas placas de CCDA da fração 9.

Figura 26. CCDA (Diclorometano) comparando o perfil de eluição das 8 frações obtidas da coluna *flash*. Nota-se a diferença entre as frações com base na prova aqui designada “padrão”.

A fim de comparar a eficiência da separação por coluna *flash* com a separação em CCDP foi conduzida a separação em placa.

Após a aplicação de 200 µL de cada óleo, para cada espécime, em placas de CCDP eluídas em diclorometano e parcialmente reveladas em H₂SO₄/Vanilina, foi possível visualizar a resolução de componentes de cada óleo essencial. Não foi possível recuperar todas as bandas cromatográficas, provavelmente pela volatilização de algumas durante o

processo de concentração. Ressaltamos porém que essa concentração foi conduzida sob aquecimento brando (35°C).

Por fim, os resultados apontaram para uma desvantagem na recuperação do material fracionado em *flash* quando comparado com a recuperação do material isolado em bandas da CCDP.

Este resultado se explica, dentre outras razões, pelo fato de que o material volátil requer manuseio rápido a fim de minimizar a exposição a atmosfera e subsequente volatilização. Portanto a CCDP foi adotada como técnica de escolha para a separação dos componentes voláteis dos óleos essenciais de *Lychnophora ericoides*.

4.3.2. Elucidação estrutural de Sesquiterpenos não identificados por HS-SPME

Foi possível o isolamento de três sesquiterpenos. Dentre eles um derivado biciclohexânico (15,3 mg) e ainda o *orto*-acetoxi-bisabolol (21,0 mg), ambas de um mesmo espécime, no caso *Lychnophora ericoides* “NPL 227”. O terceiro composto foi um derivado bisabolano (24,5 mg) do espécime *Lychnophora ericoides* “NPL 382”. Todos os produtos obtidos são oleaginosos e muito voláteis. Ademais eles se apresentaram, quando isolados, com nível de pureza e quantidade adequada à aquisição de espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear).

4.3.2.1. Derivado Bicíclico de *L. ericoides* “NPL 123”

O espectro EI-MS para esta substância (**Figura 27**) apresentou o íon acílio de m/z 43 o qual poderia ser indício da presença de função oxigenada, ou mais restritamente de metil cetonas.

Figura 27. Espectro EI-MS para o derivado bicíclico de “NPL 123”

É possível se observar o íon molecular de m/z 202. Entretanto assim como ocorre com o *orto*-actoxibisabolol (PAVARINI, 2011; PAVARINI et al., 2013), essa substância poderia ser na verdade um álcool que quando ionizado tende a desidratar. Na literatura atual em EI (PAVIA, 2009) é descrito que carbono carbinólicos com várias substituições apresentam acidez em reações de fase gasosa o que normalmente não facilita observar o sinal do íon molecular. Portanto a busca deve ser realizada através do íon-fragmento, que representa o produto desidratado $[X-H_2O]^+$. Essa reação nas condições utilizadas nas análises de EI (energia de ionização de 70eV) é facilitada pela formação de um carbocátion substituído. Tal hipótese foi testada com a aquisição de espectros de massas empregando uma técnica “branda” de ionização, a *electrospray ionization* [do inglês para *electrospray ionization* (ESI)]. Com o uso deste modo de ionização, seria possível observar o íon de m/z 221 da molécula protonada, que corresponderia segundo a hipótese, a nossa substância em sua forma íntegra. O espectro ESI-MS em modo *scan* para o derivado biciclohexânico (**Figura 28**) apresentou o íon de m/z 221.1992, o qual foi sugerido como sendo a molécula protonada $[M+H]^+$ (**Figura 28**). Este íon foi selecionado e fragmentado (dissociado por colisão) para a obtenção de espectros MS/MS (do inglês para *tandem mass spectrometry*), onde foi observada a geração de íons-fragmentos sob diferentes energias de colisão (0, 5, 10, 15 e 20eV) (**Anexo 9**). É possível afirmar que estes resultados apontam para a hipótese que o

derivado biciclohexânico possa se tratar de um sesquiterpeno de fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_1$.

Figura 28. Espectro de massas para o derivado biciclohexânico em ESI no modo scan (ESI-qTOF; modo positivo)

Com os resultados dos espectros de ^{13}C (**Anexo 1**) e DEPT 135° (**Anexo 2**) foram determinados o número de átomos de carbono.

A partir desta avaliação preliminar foi possível determinar que o derivado biciclohexânico possui um IDH=4 sendo que sua estrutura conta com 2 olefinas e dois ciclos. Paralelamente a esta observação, a análise do espectro de RMN de 1H (**Anexos 3 e 4**) em conjunto com a determinação das correlações em mapa de contornos HMQC (em **Anexo**) possibilitaram determinar quais os tipos de prótons estão representados nos espectros e sua conectividade (**Tabela 7**). É importante ressaltar que os espectros de terpenos apresentam, frequentemente, um efeito relevante de segunda ordem o que

dificulta a atribuição dos sinais

Foi proposta a ocorrência de 3 metilas (carbonos **13**, **14** e **15**), 5 carbonos metilênicos CH₂ [**2**, **3**, **8** e **9** de orbitais moleculares com hibridação sp³ e **12** (olefínico)], 4 carbonos metínicos CH₁ [**1**, **6** e **7** de orbitais moleculares com hibridação sp³ e **5** (olefínico)] e três carbonos quaternários [**10** (carbinólico), **4** e **11** (olefínicos)] presentes na estrutura (**Figura 29**).

Tabela 7. Deslocamentos químicos do derivado biciclohexânico em RMN de ¹³C (125MHz, CDCl₃) e ¹H (500MHz, CDCl₃).

¹³ C	δ	¹ H
1	46,1	1,59 (m)
2	34,7	1,56 (m)
3	31,7	1,99 (m)
4*	133,4	-
5	125,3	5,35 (m)
6	35,1	2,35 (m)
7	47,9	2,04 (m)
8	27,0	1,41(ddd; 10,7; 7,0; 3,3)
9	21,3	1.51,<--->1,58 (m)
10*	72,7	-
11*	148,8	-
12	111,0	4,74 (m)
13	20,0	1.77 (sl)
14	29,8	1,23(s)
15	23,5	1,68 ? (s)

*Carbono Quaternário

Figura 29. Estrutura do derivado biciclohexânico de “NPL 123”

Conforme discutido na **INTRODUÇÃO** na literatura há relatos da ocorrência de sesquiterpenos majoritários nos óleos essenciais de *Lychnophora ericoides*. De forma geral afirma-se que os tipos de esqueletos carbônicos comuns a estes sesquiterpenos são bisabolanos e biciclohexânicos. Contando com os dados espectroscópicos, a hipótese de uma estrutura bicíclica e ainda as informações quimiossistemáticas supracitadas foi aventada a hipótese de que o derivado biciclohexânico poderia se tratar do 11-dehidro cadinol.

Com base nos dados de correlação heteronuclear HMBC foi possível montar um mapa de conectividade a longa distância. Esse mapa, construído através de testes empíricos de hipóteses, resultou na elucidação estrutural deste sesquiterpeno.

Tabela 8. Correlações entre carbonos e hidrogênios observadas no mapa de contornos HMBC do derivado biciclohexânico de *L. ericoides* “NPL 123” (500MHz, CDCl₃).

Carbono	δ	¹ H	Correlação
1	46,1	1,59 (m)	-
2	34,7	1,56 (m)	C15; C1
3	31,7	1,99 (m)	C5; C11; C13
4*	133,4	-	-
5	125,3	5,35 (m)	-
6	35,1	2,35 (m)	-
7	47,9	2,04 (m)	C8
8	27,0	1,41(ddd; 10,7; 7,0; 3,3)	C6; C7; C10
9	21,3	1,51,<--->1,58 (m)	C7; C8; C10
10*	72,7	-	-
11*	148,8	-	-
12	111,0	4,74 (m)	-
13	20,0	1,77 (sl)	C7; C11; C12
14	29,8	1,23(s)	C1; C6; C8; C9; C10
15	23,5	1,68 ? (s)	C2; C3; C4; C5

A interpretação (**Tabela 8**) do mapa de contornos HMBC possibilitou identificar conectividades sugestivas a elucidação estrutural. Pontualmente, os prótons com sinais em singlete largo na região de δ 1,68 apresentavam correlações com os carbonos da olefina endocíclica (C4 e C5). Convergente a hipótese do biciclo, foram observadas as correlações entre os sinais dos prótons metilênicos H5 (δ 1,62) com a olefina (C4) e H2 com a metila que substitui a insaturação (C15).

Os carbonos que fundem os dois ciclohexenos (C1 e C6 terciário) do esqueleto carbônico não apresentem correlações com os prótons do ciclo monoinsaturado a não ser por uma interação dos prótons H2 com o C1. Muito embora, é possível observar

correlações dos prótons metilênicos H8 (δ 1,48) com ambos C6. Este hidrogênio interage ainda com o carbono carbinólico em C10 bem como o fazem os prótons metilênicos H2. Por fim, com respeito aos prótons com sinais em singlete largo na região de δ 1,23 é possível determinar a correlação deste com o carbono C10 ao passo que os prótons H1 (δ 1,59) correlacionam com o carbono C2.

É comum a ocorrência de grupos isopropila na posição 7 dos derivados biciclohexânicos de origem natural. Entretanto o sinal negativo em DEPT para o C12, bem como as correlações dos prótons metílicos de C13 com este carbono C12 e ainda com C11 determinaram que no caso de nosso derivado há um grupo 2metil propenila substituindo o carbono C7.

Todas as correlações observadas nos espectros bidimensionais foram cruciais para superar o desafio de determinar a conectividade dos núcleos de carbono. Ressalta-se que esta tarefa foi providencial uma vez que a determinação inequívoca da multiplicidade dos sinais de prótons no espectro de RMN ^1H não foi possível.

Para efeito didático foram traçados representações para todos estas correlações do HMBC em mapa com setas disposto na **Figura 30**.

Figura 30. Mapa de correlações heteronucleares obtidos para 11-dehidro cadinol de “NPL 123”

Ademais, a ocorrência da hidroxila na posição **10** não é somente condizente com a desblindagem do carbono quaternário **C10** (δ 72,7). Esta disposição também explica a desblindagem da metila **C14**. Lembramos ainda que a posição **C10** dos derivados biciclohexânicos de sesquiterpenos em plantas é geralmente um álcool quaternário que não apresenta espectros de massas com íon molecular.

Com relação ao auxílio das bases de dados no processo de elucidação pontuaremos o seguinte:

-(1) a Pherobase (www.pherobase.com) apontou para uma similaridade elevada dos IRRs de nosso derivado biciclohexânico [1637 (análise em 2012) e/ou 1609 (análise em

2009)] com o índice de retenção relativa do α -cadinol (1653) descrito em ADAMS, 1995.

-(2) Uma busca por similaridade calculada por algoritmo da ferramenta SciFinder® da American Chemical Society, EUA, de acesso restrito a instituição de ensino, revelou haver 1 substância descritas com até 99% de similaridade na estrutura do nosso derivado biciclohexânico.

Portanto compreendemos ser ausente o aspecto conclusivo sobre a estrutura química do derivado biciclohexânico, muito embora postula-se que ele seja o 11-dehidro cadinol.

Os carbonos foram renumerados de acordo com a nomenclatura IUPAC com base na teoria da fusão de prenilas por cabeça e cauda.

4.3.2.2. Derivado Bisabolano de *L. ericoides* “NPL 123”

Figura 31. Comparação dos espectros EI-MS para α -Bisabolol. Acima, espectro com acesso livre pela base de dados Pherobase (www.pherobase.com) e abaixo o espectro adquirido durante as análises HS-SPME de *L. ericoides* “NPL 382”

É possível notar no espectro a presença dos íons m/z 119 e m/z 69 como mais intensos bem como um íon de m/z 134.

Após a geração de índices de similaridade altos, gerados para EI-MS pelo software LabSolution® e para os IRRs [1716 (PAVARINI 2014) / 1683 (ADAMS 1995) > 98% similar], entre o analito e o α -Bisabolol os dados de RMN ^{13}C obtidos para o material isolado foram comparados com os dados publicados por SANTANA-LOURENÇO et al., 2011 (Tabela 9).

Tabela 9. RMN ^{13}C para α -Bisabolol segundo PAVARINI, 2014 (125MHz, CDCl_3) e segundo ^{13}C SANTANA-LOURENÇO et al., 2011 (75MHz, CDCl_3)

Carbono	$(\delta)^{13}\text{C}$ PAVARINI, 2014	$(\delta)^{13}\text{C}$ SANTANA- LOURENÇO et al., 2011
1	43,0	43,3
2	27,0	26,1
3	120,6	120,8
4	134,2	133,8
5	31,1	31,1
6	23,4	24,0
7	74,4	74,4
8	40,1	39,3
9	22,1	22,3
10	124,6	124,6
11	131,8	131,7
12	25,8	25,7
13	17,7	17,6
14	23,3	23,9
15	23,2	23,3

Concluimos que o bisaboleno com Tr 35,62, o qual é o componente majoritário de todas as análises é realmente o α -Bisabolol. Este composto já foi descrito em *L. ericoides* conforme discutido no item **INTRODUÇÃO**.

4.4. MALDI *imaging*

Os recentes estudos que envolvem morfologia, anatomia e taxonomia de espécies de Asteraceae demonstram a ocorrência de tricomas glandulares nas folhas de espécies da família, os quais concentram terpenos e expressam toda a maquinaria enzimática da via biossintética destes compostos em suas células (NAGEL et al., 2008; LANGE; TURNER, 2013). Em um horizonte além da família Asteraceae pode-se contemplar esta compartimentalização dos metabolitos no exemplo descrito para tomates [*Solanum* spp. (Solanaceae)] (BESSER et al., 2009). Entretanto, em *Lychnophora ericoides* é sabido que a concentração de metabolitos secundários nos tricomas glandulares das folhas é basicamente de flavonoides (GOBBO-NETO et al., 2008).

Os resultados obtidos com os primeiros experimentos de MALDI-IMS deste projeto de Doutorado apresentaram uma evidente concentração de proteínas na face abaxial das folhas da espécie (**FIGURA 32**). Estes resultados preliminares não são conclusivos sobre a presença e localização das SesS em folhas de *Lychnophora ericoides*, entretanto sugerem de forma veemente uma concentração de proteínas na face abaxial das folhas sendo que nos espectros de massas foram observados os sinais referentes a íons de mesma massa nominal, para as proteínas nativas, que são descritos na literatura com o peso molecular de SesS de espécies vegetais domesticadas (DEGENHARDT et al., 2009).

Figura 32. Mapas proteicos de faixa restrita de peso molecular gerados para os cortes transversais de folhas jovens e recém coletadas de *Lychophora ericoides*. Pode-se notar em (a) os sinais observados no mapa com faixa restrita de peso molecular e intensidade referente à barra de intensidade apresentada em (c). Paralelamente é possível observar, com base na foto do corte transversal da folha de *L. ericoides* em (b), que todo o acúmulo de proteínas é subepidermal, ou seja, na área clara da foto. Acima à esquerda as imagens são geradas por filtros que restringem os sinais relativos à faixa de massa $93,8\text{KDa} \pm 0,1$; acima à direita esta a “janela” entre $64,9\text{KDa} \pm 0,5$; abaixo se apresenta o mapa gerado para uma “janela” muito restrita ($90,071\text{KDa} \pm 0,002$), a qual deve compreender não mais que uma proteína. Conclui-se que as proteínas estão concentradas na face abaxial das folhas que apresentam uma curvatura elíptica. .

Os mapas foram gerados utilizando os cortes de $50\mu\text{m}$ com a deposição de matriz (ácido Sinapínico). Os tiros de laser foram efetuados com o feixe operando em intensidade média e os espectros foram colecionados para adquirir imagens com resolução de até $30\mu\text{m}$.

As imagens geradas representam os mapas proteicos a partir da seguinte premissa: as isoformas das SesS que estão presentes nas folhas de *Lychophora ericoides* deveriam

apresentar um determinado grau de similaridade/homologia que permitisse afirmar que a massa molecular de cada uma equivale às massas moleculares descritas para isoformas que ocorrem nas demais espécies já descritas (CHEN et al., 2011). Portanto o mapa gerado para encontrar a distribuição da bisaboleno-sintase dispõe dados dentro da janela correspondente a massa molecular da isoforma ($93,8\text{KDa} \pm 0,1$) encontrada em *Abies grandis* (BOHLMANN, J. et al., 1998); de forma análoga os mapas gerados para a região de $64,9\text{KDa} \pm 0,5$ estão restringindo os sinais relativos a uma faixa de massa relacionada ao monômero da cadinano sintase de sementes de algodão [*Gossypium* sp. (TOWNSEND et al., 2005)] e *Eleutherococcus trifoliatus* (WEN et al., 2012).

Os espectros obtidos para a geração das imagens demonstraram diversidade de sinais. Entretanto, alguns espectros adquiridos para posições específicas do mapa apresentavam um sinal abundante em detrimento dos demais. Quando isso ocorre é possível observar a intensidade máxima desta “entidade macromolecular” no mapa, como se demonstra no mapa adquirido com faixa restrita de $90,071\text{KDa} \pm 0,002$. De forma sucinta afirma-se que essa “entidade macromolecular” seria, no caso de proteínas e não de lipídeos ou ácidos nucleicos, uma proteína ou uma enzima, as quais podem ser apresentadas na forma de monômeros ou oligômeros.

Quanto ao perfil dos espectros obtidos há que se salientar o fato de que a aquisição possibilitou a observação de íons específicos. Aliando esse fato a premissa de que o uso do modo de aquisição linear é o mais eficiente método para observação de macromoléculas cationizadas e livres de reação de fragmentação temos o seguinte resultado: os íons específicos representam nos mapas gerados pelo software as entidades macromoleculares.

4.5. Obtenção de extratos proteicos, separação em Gel e caracterização por MALDI

Ao término da extração dos componentes macromoleculares foi possível obter um extrato viscoso e de coloração marrom. Etapas adicionais de limpeza por precipitação *overnight* com uso de Acetona foram procedidas e ao final *pellets* foram formados por secagem a vácuo rotacional. A enzima proteinase foi utilizada para preservar a integridade do material.

Após limpeza e re-suspensão em tampão de carregamento, uma alíquota do material foi retirada para testes de Bradford qualitativos para detectar a presença de proteínas antes da execução da separação. Resultados comparados visualmente com padrão positivo de Albumina (BSA) foram observados.

A seguir os extratos enzimáticos foram carregados no gel e após o término da corrida e das etapas preparatórias para ação do agente colorante Coomassie Blue, o gel foi imerso em solução e agitado por 48 h. O resultado está disposto na **Figura 33**.

Figura 33. Gel Unidimensional 1D-PAGE dos estratos proteicos de 3 espécimens de *Lychnophora ericoides* (123, 227 e 382) e um espécimen de *Lychnophora salicifolia* (378)

As Bandas observadas na canaleta “227” e “123” foram determinadas em 4 faixas largas, A B C e D. A disposição das bandas se assemelha ao que foi traçado nesta Figura 33 na canela “123”. Os melhores resultados para as análises de MALDI-TOF e TOF/TOF, que estão apresentados logo a seguir foram obtidos com os *spots* para esse espécimen, a “NPL123”.

A preparação das amostras para a análise em MS foi realizada com ponteiros ZipTip® sendo que o material precipitado nos *targets* do equipamento tinham aspecto visual limpo.

Figura 34. Espectro me massas MALDI-TOF do *spot* nomeado como 2D. Este *spot* corresponde a banda de proteínas distribuídas na faixa de maior peso molecular do gel, estimada entre 40 e 80 Kda.

A geração de dados comparativos com a literatura foi possível através do uso da plataforma *on line* MASCOT. O resultado, ou *output*, é disposto em forma de listagem de *scores*. Os níveis de similaridades plausíveis para detecção identificação de proteínas com domínios conhecidos, ou mesmo a sequência completa de peptídeos é discutível, adotamos valores mínimos de 45% de similaridade.

Mascot Search Results

User : denise
Email : denisebrentan@gmail.com
Search title :
Database : SwissProt 2013_03 (539616 sequences; 191569459 residues)
Taxonomy : Viridiplantae (Green Plants) (33643 sequences)
Timestamp : 25 Mar 2013 at 19:38:09 GMT
Top Score : 47 for **TPGAS_POGCB, Germacrene A synthase OS=Pogostemon cablin PE=1 SV=1**

Mascot Score Histogram

Protein score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
Protein scores greater than 58 are significant ($p < 0.05$).

Concise Protein Summary Report

Format As [Help](#)

Significance threshold $p <$ Max. number of hits

Preferred taxonomy

1. [TPGAS_POGCB](#) Mass: 64191 Score: 47 Expect: 0.66 Matches: 5
Germacrene A synthase OS=Pogostemon cablin PE=1 SV=1
[CALR_BETVU](#) Mass: 48106 Score: 32 Expect: 20 Matches: 3

Figura 35. Impressão do relatório de buscas por sequências de peptídeos similares gerado pela plataforma MASCOT com identificação de uma Germacrano Sintase. Data in: MALDI-TOF *spot* 2D; Data out: TPGAS_POGCB (Peso Molecular 64.191) (Score 47).

Dentre os resultados houveram índices de similaridade abaixo do limite inferior estabelecido como fundamental para a identificação inequívoca. Dentre estes, houve buscas com *score* <45% para Germacrano Sintases em *spots* distribuídos em faixas de peso molecular menor que aquela do *spot* 2D. Tal achado poderia sugerir a ocorrência de isoformas de peso molecular distintos. Entretanto estes resultados ainda poderiam ser alcançados caso regiões conservadas de duas enzimas distintas se separassem nos géis, o que é plausível. Portanto estes resultados são apenas sugestivos.

Concluindo, a identificação confirmada de uma Germacrano Sintase no *spot* 2D pode explicar a presença dos derivados Cadinano presentes nas frações voláteis de folhas de *Lychnophora ericoides*.

4.6. Extração de RNA, produção de cDNA, clonagem e sequenciamento de genes codificadores de sesquiterpeno sintases

As primeiras tentativas de gerar os produtos relacionados a genes *Housekeeping* na reação de PCR não atingiram o sucesso esperado. Estes produtos, uma vez alcançados, indicam que o DNA está passível de ser utilizado na reação, ou seja, em condições ideais de pureza. Uma etapa extra de limpeza para ambos o gDNA e o cDNA foi adotada no protocolo com o objetivo de garantir a retirada de qualquer composto fenólico.

O cDNA, produzido com essa etapa extra de limpeza de seu precursor RNA, foi dividido em alíquotas em duplicata (amostras 39-1 e 39-2). A qualidade do material foi verificada utilizando meios reacionais de PCR com *primers* de Ubiquitina (gene *Housekeeping*) desenhados para *Helianthus* spp. (**Tabela 10**).

Tabela 10. Nomes dos *primers* utilizados, metabolitos que seus genes produzem quando transcritos, comprimento dos *primers*, sequências de nucleotídeos destes e número de pares de bases [pb]

Nome	Metabolito	Comprimento	Sequência	[pb]
Ubiqu_F	Proteína Ubiquitinizada	20	5'-CAA AAC CCT AAC CGG AAA GA-3'	420
Ubiqu_R	Proteína Ubiquitinizada	18	5'-ACG AAG ACG GAG GAC GAG-3'	420
12_1_ORFcom_F	Derivados Bisabolane	XX	5'ATGTCTATTTCTTCATC TCCTTCAGC-3'	XX
12_1_ORFcom_R	Derivados Bisabolane	XX	5'TTAAACACTTATGGGA GTAACAAGAAG-3'	XX
12_1_K7_F	Derivados Bisabolane	XX	5'AGTTTGAAGAAGGAA GCA-3'	XX
12_1_K7_R	Derivados Bisabolane	XX	5'AGAATTTCTTGATATA TG-3'	XX
GAS1_P1RK	Germacreno	20	3'TGC GTG ACC GAG AC G TCA CG-5'	101
GAS1_P2	Germacreno	22	5'TGG CTC TTC CAT GG C TTC AGC G-3'	101

Os produtos esperados para essa reação foram observados (**Figura 36**). Logo em seguida, reações de PCR em gradiente foram conduzidas usando um conjunto de amostras

replicadas (oito vezes) em diferentes temperaturas de *annealing*. O objetivo deste experimento foi possibilitar que a enzima polimerase trabalhasse em diferentes temperaturas com intuito de gerar diferentes produtos. Desta maneira, utilizando meios reacionais de PCR com *primers* de bisabolano sintase (BS) desenhados para *Helianthus* (HaBS) (**Tabela 10**), obtivemos produtos de amplificação no tamanho de fita esperado (**Figura 37**).

Figura 36. cDNA de *L. ericoides* sondado com *primers* para bisabolano sintases de girassóis (HaBS). Linhas (1) (6) (11): escala de tamanho de fitas de DNA; bandas mais claras em 500, 1500 e 5000 pares de bases (de baixo para cima). Linhas (2) (3): cDNA de *L. ericoides*. Linha (4): controle positivo (cDNA de girassóis); *primers* para genes codificadores de Ubiquitina. Linha (5): controle negativo (H₂O). Linhas (7-10) PCR em gradiente de cDNA de *L. ericoides*. Produtos com cerca de 1600 pares de base (característico para HaBS) são obtidos com temperaturas de *annealing* mais elevadas [(9) (10)].

Figura 37. Resultados do PCR de colônias demonstrando a fita de DNA do tamanho esperado para o clone vetorizado. 1600 pares de base para HaBS mais 200 pares de bases para o vector (Linhas 2-5). Linhas (1) e (6): resultados negativos

Figura 38. cDNA de *L. ericoides* sondado com *primers* para germacrano sintases (GAS) de girassóis (HaGAS). Linhas (1) (8): escala de tamanho de fitas de DNA; bandas mais claras em 500, 1500 e 5000 pares de bases (de baixo para cima). Linhas (2) (3): cDNA e gDNA de *L. ericoides* respectivamente. Linha (4): amostra extra. Linha (5): controle positivo (cDNA de girassóis). Linha 6: poço vazio. Linha 7: controle negativo (H_2O). O produto na linha 1 é de cerca de 190 pares de bases, o que é característico de HaGAS

Estes genes foram então recuperados, purificados e clonados e as sequências apontadas são para a ocorrência de uma bisabolano sintase em *L. ericoides* operante e presente no transcriptoma. Entre os clones houve um exemplar obtido com uso de *primers* específicos para o *Open Reading Frame* [(ORF) do inglês para “intervalo aberto de leitura”] da HaBS o que significa termos um clone 100% idêntico entre as duas espécies.

Paralelamente a investigação direcionada para as BS, um experimento adicional foi conduzido. Sondamos a ocorrência das germacrano sintases (GAS) e ainda as oxiredutases do sistema CYP450 relacionadas à síntese do germacrano e subsequente funcionalização do mesmo em germacranolideo. Os experimentos alcançaram clones de GAS em gDNA e cDNA de *Lychnophora* quando os *primers* para os genes codificadores de GAS em *Helianthus* (HaGAS) (**Tabela 10**) foram empregados na reação. Os resultados do sequenciamento apontaram para ocorrência de ao menos uma região conservada de HaGAS em *Lychnophora*.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

5.1 Sobre acesso e amostragem ao/do patrimônio Genético

Certos autores afirmam que os pesquisadores brasileiros são hoje reféns de um percurso burocrático para acessar o patrimônio genético brasileiro o qual marginaliza e atravanca suas atividades de trabalho (CASTRO, 2011; MARQUES, 2011). As mais recentes discussões convergem para a opinião de que o mecanismo legal vigente é ineficiente e necessita ser equacionado de forma a racionalizar a regularização das atividades dos pesquisadores e alavancar as pesquisas que envolvem a flora brasileira (CASTRO, 2011; MARQUES, 2011). Portanto, concluímos que com relação a regulamentação do acesso ao patrimônio genético há uma anseio. Este anseio é comum aos que trabalham na área de pesquisa de produtos naturais e vislumbra um novo horizonte onde o trabalho dos pesquisadores seja enfim respeitado em vez de cerceado.

A despeito do atraso nas atividades, devido ao tempo necessário para a regularização de acessos ao patrimônio genético (cópias das anuências em **APÊNDICE**), a primeira coleta do material vegetal foi efetuada ao fim do inverno seco do cerrado (Setembro, 2011) e de forma subsequente a segunda coleta (Abril, 2012) e a terceira coleta de material (Fevereiro, 2013) ocorreram no período compreendido na estação chuvoso.

Durante a segunda expedição para coleta em Abril de 2012, foi possível georreferenciar no Município de Diamantina um sítio de ocorrência de *Lychnophora ericoides* (**Tabela 1**) inédito aos dados de posicionamento global do grupo do Dr. Lopes. A última expedição, realizada em Fevereiro de 2013, teve a equipe integrada pelos colaboradores do Instituto de Biologia da Unicamp, M.Sc. Marcelo Monge e Prof. Dr. João Semir. As atividades orientadas pelo Dr. Semir, revisor taxonômico do gênero (SEMIR et al., 2011; SEMIR, 1991), foram influenciadas de forma positiva por sua experiência, o que levou a aperfeiçoamento da seleção do material. Concluímos que a atividade de campo teve sucesso

no fornecimento de amostragem vegetal diversa e confiável do ponto de vista taxonômico.

5.2. Sobre a caracterização das frações voláteis ricas em Sesquiterpenos e o estudo de Fitoquímica Clássica

Foi possível identificar 7 metabolitos dentro da fração de interesse: Vanilina (Tr 24,05); α -Humuleno (Tr 26,50); Sesquicineol (Tr 27,09); *ar*-Curcumeno ($C_{15}H_{22}$) (Tr28,53); um derivado biciclohexânico, provavelmente o 11-dehidro Cadinol (Tr 32,80); α -Bisabolol (Tr35,62); *orto*-acetoxi Bisabolol (Tr 43,00).

A estratégia de uso de bases de dados livres disponíveis *on-line* foi crucial para a caracterização da fração volátil sem necessidade de isolamento, ou seja, utilizando apenas HS-SPME e GC-MS.

Apesar de bem-sucedida, essa estratégia não foi de emprego universal neste trabalho. Foram necessários estudos envolvendo elucidação estrutural por meio Fitoquímica Clássica.

Dentro do estudo fitoquímico clássico foi possível observar uma maior eficiência no emprego da técnica de CCDP para o isolamento dos compostos. Além disso, concluímos que a adoção da hidrodestilação em baterias fornece produtos de constituição química distinta entre eles. Este fato é de boa valia para estudos direcionados ao isolamento de uma classe de compostos voláteis em detrimento de outra. Enfim concluímos ter havido êxito no uso de técnicas clássicas de isolamento e elucidação estrutural de metabolitos secundários voláteis. Por essa estratégia foi possível determinar a ocorrência de um derivado do tipo cadinano e um derivado do tipo bisaboleno em populações distintas de *Lychnophora ericoides*. Especificamente, a estrutura do 11-dehidro cadinol e do α -bisabolol foram elucidadas.

Cabe aqui ressaltar as implicações que esses resultados podem para a terapêutica. Uma série destes constituintes identificados é comum a fração volátil de folhas de *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae) (FERNANDES et al., 2007). O Humuleno desta espécie é

considerado como “ativo” da formulação comercialmente disponível com nome fantasia de Acheflan®. Ademais o α -Bisabol, composto mais abundante de todas as frações estudadas, apresenta habilidades terapêuticas diversas conforme referenciado na **INTRODUÇÃO**. A fração volátil de *Lychnophora ericoides* foi negligenciada nos estudos fitoquímicos e farmacológicos da espécie durante as últimas décadas. Entretanto, nossos resultados fomentam estudos para além da investigação do potencial bioativo das LSTs e dos Flavonoides da espécie.

5.3. Sobre a quantificação de sesquiterpenos

Concluimos que através da utilização de quantidades conhecidas de *trans*-cariofileno, metabolito da mesma classe dos analitos, em HS-SPME foi possível determinar intervalo de confiança para a resposta do detector de massas. Uma reta ($R^2 > 0,99$) foi traçada e seu intervalo de confiança foi extrapolado. Determinamos em níveis de concentração de partes por milhão (ppm) os níveis médios de cada analito dentro de uma distribuição no intervalo de erro padrão.

Cabe ressaltar que esse método de detecção por HS-SPME e GC-MS utiliza apenas 10 mg de amostragem de cada indivíduo estudado para fornecer dados confiáveis de detecção dos derivados de interesse em matrizes vegetais. Tal capacidade de aquisição de dados fortemente sugestivos sobre a ocorrência de metabolitos de interesse de forma rápida e sem a necessidade de aquisição de material vegetal em ampla escala está em perfeita consonância com os conceitos da química verde (ARMENTA et al., 2008)

5.4. Sobre o mapeamento proteico por MALDI *imaging*

Com relação à geração mapas proteicos conclui-se que a busca de proteínas no estudo de proteômica dirigida por meio da utilização de MALDI-IMS é perfeitamente exequível

no que tange os aspectos como viabilidade dos cortes transversais das folhas e aquisição de espectros com intensidade de sinais suficientemente alta para detecção e, por fim, na utilização do software “ImageFlex” para geração de mapas com filtros de m/z restritos ou amplos. Estes resultados foram obtidos a partir da simples busca por íons que ocorrem nos espectros colecionados para os diversos pontos das imagens os quais apresentam valores de m/z semelhantes aos valores esperados para experimentos de massas com as bisabolenosintases descritas na literatura.

Concluimos que este experimento pioneiro de geração de mapas proteicos com espécies micro-endêmicas dentro da flora brasileira não só alcança seu objetivo como propicia estudos futuros que serão relevantes do ponto de vista da química e da biologia.

5.5. Sobre os experimentos de separação de proteicas em Gel

A separação das proteínas presentes nos extratos obtidos por metodologia adaptada foi obtida em 1D-PAGE. A execução dos géis bidimensionais foi infrutífera.

O tratamento dos géis após a coloração gerou material digitalizado e enfim *spots* de interesse para geração de peptídeos digeridos por tripsina. Enfim, o material digesto após sofrer *clean up* foi adequadamente utilizado nos experimentos de MS.

Os espectros de MALDI-TOF geraram detecção de sinais relativos aos peptídeos. Uma vez que as bandas que formavam os *spots* continham um *pool* de proteínas, os espectros MALDI-TOF/TOF foram obtidos para uma mistura complexa que não se adéqua ao uso pela plataforma MASCOT.

Concluimos ter sido bem-sucedido o emprego desta estratégia de proteômica direcionada uma vez que uma isoforma de germacrano sintase foi identificada. Essa identificação pode explicar a nível proteômico o acúmulo de derivados do tipo cadinano na fração volátil dos tecidos foliares de *L. ericoides*.

5.5. Sobre o uso da prospecção de genes codificadores de sesquiterpeno sintase

Os resultados alcançados durante o período de sanduíche do doutorado, em meio ao grupo do Dr. Spring, permitiram a identificação de uma BS em *Lychnophora* e ainda uma possível GAS. A isoforma de BS que foi detectada é codificada por um gene idêntico (100% de semelhança na sequência de pares de bases entre os genes) ao HaBS. A sequência predita de peptídeos que esse gene codifica gerou uma massa exata conhecida para a macromolécula que é objeto de estudo de doutorado aqui debatido. O valor dessa massa é alvo no rastreamento de ocorrência do íon intacto $(M+X)^+$ referente à molécula (~66KDa). A aplicação do *Imaging Mass Spectrometry* [(IMS) do termo inglês para “geração de imagem por espectrometria de massas”) em tecidos de *Lychnophora ericoides* pode ser usada para localiza da BS.

A combinação de conhecimento da área de química com dados de biologia prova que a interdisciplinaridade é fundamental para capacitar a pesquisa a resolver problemas de maneira convergente, conforme podemos verificar (PAVARINI et al., 2013b).

Experimentos futuros MS com material coletado in situ são necessários para o debate da ocorrência de isoformas de terpeno sintase dentro da família Asteraceae. As implicações que os resultados conclusivos e inequívocos trariam são tangentes à esfera da cladística e teriam mais tardiamente relevância evolutiva.

**Referências
Bibliográficas**

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, V.G.C.; TAKAHASHI, J.A.; DUARTE, L.P.; PILO-VELOSO, D.; JUNIOR, P.A.S.; ALVES, R.O.; ROMANHA, A.J.; ALCANTARA, A.F.C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 615, 2011.
- ADAMS, R. P. **Identification Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, USA, 1995.
- AEBERSOLD, R.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v.422, p.198, 2003.
- AHARONI, A.; GIRI, A.P.; DEUERLEIN, S.; GRIEPINK, F.; DE KOGEL, W.J.; VERSTAPPEN, F.W.A.; VERHOEVEN, H.A.; JONGSMA, M.A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. **The Plant Cell**, v.15, p.2866, 2003.
- AJIKUMAR, P.K.; TYO, K.; CARLSEN, S.; MUCHA, O.; PHON, T.H.; STEPHANOPOULOS, G. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. **Molecular Pharmaceuticals**, v.5 p.167, 2008.
- ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; de la GUARDIA, M. Green Analytical Chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v.27, p.497, 2008.
- BALDIN, E.L.L.; POGETTO, M.H.F.A.D. ; PAVARINI, D.P.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de *Lychnophora ericoides* Mart. sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**. v. 36, p. 125, 2010.
- BALDIN, E.L.L.; PAVARINI, D.P.; SOUZA, E.S.; SILVA, J.P.G.F.; SOUZA, G.H.B.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Towards new botanical pesticides: the toxic effect of *Eremanthus goyazensis* (Asteraceae) leaves essential oil against *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). **Química Nova**, v. 35, p. 2254, 2012.
- BAZON, J.N.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J.N.C. Constituents of *Lychnophora brunioides*. **Fitoterapia**, v. 68, p.92, 1997.

- BESSER, K.; HARPER, A.; WELSBY, N.; SCHAUVINHOLD, I.; SLOCOMBE, S.; LI, Y.; DIXON, R.A.; BROUN, P. Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. **Plant Physiology**, v.149, p.499, 2009.
- BOHLMANN, F.; ZDERO C.; KING R. M.; ROBINSON H.; Seven guaianolides from the tribe Vernonieae. **Phytochemistry**, v.19, p.2669, 1980.
- BOHLMANN, J.; CROCK, J.; JETTER, R.; CROTEU, R. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (*E*)- γ -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). **Proceedings of National Academy of Science USA**, v.95, p.6756, 1998.
- BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26, p.671, 1998.
- BORNSCHEUER, U.T.; HUISMAN, G.W.; KAZLAUSKAS, R.J.; LUTZ, S.; MOORE, J.C.; ROBINS, K. Engineering the third wave of biocatalysis. **Nature**, v.485, p.185, 2012.
- BORSATO, M.L.C.; GRAEL, C.F.F.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v.55, p.809, 2000.
- BOUWMEESTER, H.J. Engineering the essence of plants. **Nature Biotechnology**, v.24, p.1359, 2006.
- CAPELARI-OLIVEIRA, P.; PAULA, C.A.; REZENDE, S.A.; CAMPOS, F.T.; GRABE-GUIMARÃES, A.; LOMBARDI, J.A.; SAÚDE-GUIMARÃES, D.A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian Arnica). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 393, 2011.
- CASTRO, F. Avanços Possíveis. **Agência Fapesp**. Visualizado *on-line* em 20/01/2/13 no endereço: <http://agencia.fapesp.br/14317>
- CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T.; AMADO JÚNIOR, R., R.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e das folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (Arnica). **Ciência e Cultura**, v.39, p.551, 1987.
- CHEN, F.; THOLL, D.; BOHLMANN, J.; PICHERSKY, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. **The Plant Journal**, v.66, p.212, 2011.

- CHIARI, E.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; GRANDI, T.S.M.; STEHMANN, J.R.; ANJOS, A.M.G.; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v.10, p.636, 1996.
- CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MESQUITA, A.L.; TAVARES, K.G. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.85, p.372, 1991.
- CONTINI, S.H.T.; SANTOS, W.F.; MORTARI, M.R.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Neuropharmacological effects of *Lychnophora species* (Vernonieae, Asteraceae) and anticonvulsant activity of 4,5-di-O-[E]-caffeoylquinic acid isolated from stem of *L. rupestris* and *L. staavioides* on mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.102, p.281, 2008.
- COPPEN, J.J.W.; HONE, G.A. Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin. **Non-Wood Forest Products - 2**, FAO, Rome, 1995. 71 p.
- COSTA, M.A.; MARQUES, J.V.; DALISAY, D.S.; HERMAN, B.; BEDGAR, D.L.; DAWIN, L.B.; LEWIS, N. Transgenic Hybrid Poplar for Sustainable and Scalable Production of the Commodity/Specialty Chemical, 2-Phenylethanol. **PLoS ONE** v. 8, e83169, 2013.
- COSTA, M. A. C.; JESUS, J.G.; FARIAS, J.G.; NOGUEIRA, J.C.M.; OLIVEIRA, A.L.R.; FERRI, P.H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnophora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v.5, p.53, 2008.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. Chapter 24 In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists. 2002. 1408 p.
- CROWELL, P.L.; GOULD, M.N. Chemoprevention and therapy of cancer by *d*-limonene. **Critical Reviews on Oncogenesis**, v.5, p.1, 1994.
- CURADO, M.A.; OLIVEIRA, C.B.A.; JESUS, J.G.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C.; FERRI, P.H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v.67, p.2363, 2006.

- DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T.G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v.70, p.1621, 2009.
- DUDAREVA, N.; ANDERSSON, S.; ORLOVA, I.; GATTO, N.; REICHEL, M.; RHODES, D.; BOLAND, W.; GERSHENZON, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.102, p.933, 2005.
- FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; MEDEIROS, R.; da CUNHA, F.M.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; PIANOWSKI, L.F.; CALIXTO, J.B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v.569, p.228, 2007.
- FERNANDES, C.R.; TURATTI, A.; GOUVEA, D.R.; GOBBO NETO, L.; DINIZ, A.; SILVA, A.R.; LOPES, N.P.; GARCIA, S.B. The Protective Role of *Lychnophora ericoides* Mart. (Brazilian Arnica) in 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Experimental Colon Carcinogenesis. **Nutrition and Cancer**, v. 63, p. 593, 2011.
- FISKE, P. Speak Up. **Nature**, v. 464, p.312, 2010.
- FUNK, V.A.; SUSANA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R.J. **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. International Association for Plant Taxonomy (IAPT): Vienna, Austria, 2009, 965p.
- GOBBO-NETO, L.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Negative ion chip-based nanospray tandem mass spectrometry for the analysis of flavonoids in glandular trichomes of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). **Rapid Communications on Mass Spectrometry**, v.22, p.3802, 2008.
- GOBBO-NETO, L.; GUARATINI, T.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; VIEIRA, R.F.; COLEPICCOLO, P.; LOPES, N.P. Differential Metabolic and Biological Profiles of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) from Different Localities in the Brazilian campos rupestres. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.750, 2010.
- GOBBO-NETO, L., LOPES, N.P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the Brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.56, p.1193, 2008.

- GOBBO-NETO L.; SANTOS, M. D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M. C.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; LOPES, J. L. C.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v.71, p.3, 2005.
- GOTTLIEB, O.R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology. An essay into a novel botanical discipline**. Springer: Heidelberg, Alemanha, 1982, 170p.
- GÖPFERT, J.C.; MACNEVIN, G.; RO, D.K.; SPRING, O. Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitates glandular trichomes. **BMC Plant Biology**, v.9, p.86, 2009.
- GOUVEA, D.R.; PAVARINI, D.P.; CAROLLO, C.A.; LOPES, N.P. **Variações do Metabolismo Secundário Vegetal Exemplos com Plantas Nativas do Brasil**. In: YUNES, R. A.; CECHINEL-FILHO, V. (Org). **Química de Produtos Naturais Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia**. Editora Univale: Itajaí, Brasil, 2012, pp.331-354.
- GRAEL, C.F.F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W.R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora graminifolia* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytotherapy Research**, v.14, p.203, 2000.
- HAMBERGER, B.; BOHLMANN, J. Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine. **Biochemical Society Transactions**, v.36, p.1209, 2006.
- HEBEDA, C.B.; BOLONHEIS, S.M.; NAKASATO, A.; BELINATI, K.; SOUZA, P.D.C.; GOUVEA, D.R.; LOPES, N.P.; FARSKY, S.H. P. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p.261, 2011.
- HOLMES, F.A.; KUDELKA, A.P.; KAVANAGH, J.J.; HUBER, M. H.; AJANI, J.A.; VLAERO, J.A.; **Current status of clinical trials with paclitaxel and docetaxel**, p. 31–57 In **Taxane Anticancer Agents: Basic Science and Current Status**, edited by GEORG, G.I.; CHEN, T.T.; OJIMA, I.; VYAS, D.M. American Chemical Society Symposium Series 583, Washington, DC, 1995.

- IKEZAWA, N.; GOPFERT, J.; NGUYEN, D.; KIM, S.; O'MAILLE, P.; SPRING, O.; RO, D. Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p.21601, 2011.
- JAKOVLEV, V.; ISAAC, O.; THIEMER, K.; KUNDE, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. **Planta Medica**, v.35, p.125, 1979.
- KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -bisabolol and α -bisabolol-Rich Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.87, p.1, 2010.
- KELES, L.C.; MELO, N.I.; AGUIAR, G.P.; WAKABAYASHI, K.A.L.; CARVALHO, C.E.; CUNHA, W.R.; CROTTI, A.E.M.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Lychnophorinae (Asteraceae): A survey of its chemical constituents and biological activities. **Química Nova**, v. 33, p. 2245, 2010.
- KOMATSU, S.; KONISHI, H.; SHEN, S.; YANG, G. Rice proteomics. A step towards functional analysis of the rice genome, **Molecular and Cellular Proteomics**, v.2, p.2, 2003.
- KUNG,Y.; RUNGUPHAN, W.; KEASLING, J.D. From Fields to Fuels: Recent Advances in the Microbial Production of Biofuels. **ACS Synthetic Biology**, v.1, p. 498, 2012.
- LANGE, B.M.; TURNER, G.W. Terpenoid biosynthesis in trichomes—current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**, v.11, p.2, 2013.
- LOPES, N. P. A essência da arnica. **FAPESP - Pesquisa**, São Paulo-SP, v. 64, p. 42, 2000.
- LYSS, G.; SCHMIDT, T.J.; MERFORT, I.; PAHL, H.L. Helenalin, an anti-inflammatory sesquiterpene lactone from *Arnica*, selectively inhibits transcription factor NF-KB. **Biological Chemistry**, v. 378, p.951, 1997.
- MAGALHÃES, C.S. **Avaliação comparativa de procedimentos de extração de proteínas em plantas medicinais e fitoterápicos e quantificação de metais associados a essas proteínas**. 151f., Tese de doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2008.
- MANSANARES, M.E. **Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernoniaceae: Lychnophorinae)**. 148 f., Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2004.

- MARQUES, F. Emaranhado Burocrático. **FAPESP - Pesquisa**, versão *on-line*, v. 179. Visualizado *on-line* em 20/01/2/13 no endereço: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2011/01/30/emaranhado-burocratico/>
- MARTIN, D.; FÄLDT, J.; BOHLMANN, J. Functional characterization of nine Norway spruce *TPS* genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the *TPS-d* subfamily. **Plant Physiology**, v. 135, p.1908, 2004.
- McANDREW, R.P.; PERALTA-YAHYA, P.P.; DEGIOVANNI, A.; PEREIRA, J.H.; HADI, M.Z.; KEASLING, J.D.; ADAMS, P.D. Structure of a Three-Domain Sesquiterpene Synthase: A Prospective Target for Advanced Biofuels Production. **Structure**, v.19, p.1876, 2011.
- McMURRY, J. **Organic Chemistry: With Biological Applications**. Cengage Learning, Stamford, 8th ed.: Connecticut, U.S.A., 2009, p.546.
- MENIN, B.; COMINO, C.; PROTIS, E.; MOGLIA, A.; CANKAR, K.; BOUWMEESTER, H. J.; LANTERI, S.; BEEKWILDER, J. Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. **Plant Science**, v.190, p.1, 2012.
- MEVY, J.P.; BOUSQUET-MELOU, A.; GREFF, S.; MILLOGO, J.; FERNANDEZ, C. Chemical composition of the volatile oil of *Lagdera aurita* Schulz from Burkina-Faso, **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34, p.815, 2006.
- MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; CRUZ, R.C.B.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia*. **Phytotherapy Research**, v.10, p.694, 1996.
- MMA. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Lista oficial das espécies da flora Brasileira ameaçadas de extinção**. Instrução normativa N° 6, de 23 de setembro de 2008.
- NAGEL, J.; CULLEY, L.K.; LU, Y.; LIU, E.; MATTHEWS, P.D.; STEVENS, J.F.; PAGE, J.E. EST analysis of hop glandular trichomes identifies an O-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. **The Plant Cell**, v.20, p.186, 2008.

- NAKAJIMA, J.N.; TELES, A.M.; RITTER, M.; MONDIN, C.A.; DEMATTEIS, M.; HEIDEN, G.; BORGES, R.A.X.; RIVERA, V.L. **Asteraceae**, *In*: GIULIETTI, A.M.; da SILVA, J.M.C.; RAPINI, A.; de QUEIROZ, L.P.; de ANDRADE, M.J.G. (Org). **Plantas Raras do Brasil. Catálogo de Espécies Raras do Brasil**. Editora da UEFS: Feira de Santana, Brasil, 2009, pp.76-89.
- NELSON, D. AND WERCK-REICHHART, D. A P450-centric view of plant evolution. **Plant Journal**, v.66, p.194, 2011.
- NEWMAN, J.D.; CHAPPELL, J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.95, 1999.
- NEWTON, R.P.; BRENTON, A.G.; SMITH, C.J.; DUDLEY, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. **Phytochemistry**, v.65, p.1449, 2004.
- OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v.10, p.292, 1996.
- PARÉ, P.W.; TUMLINSON, J.H. *De Novo* Biosynthesis of Volatiles induced by Insect Herbivory in Cotton Plants. **Plant Physiology**, v.114, p.1161, 1997.
- PAVARINI, D.P. **Variabilidade temporal e intraespecífica dos constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart.** 126f., **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.
- PAVARINI, D.P.; CALLEJON, D.R.; SOARES, D.M.; NOGUEIRA, E.F.; De SOUZA, G.E.P.; CUNHA, F.Q.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Novel bisabolane derivative from “Arnica-da-Serra” (*Vernonieae: Asteraceae*) reduces pro-nociceptive cytokines levels in LPS-stimulated rat macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, submetido em janeiro de 2013.
- PAVARINI, D.P.; SILVA, D.B.; CAROLLO, C.A.; PORTELLA, A.P.F.; LATANSIO-AIDAR, S.R.; CAVALIN, P.O.; OLIVEIRA, V.C.; ROSADO, B.H.P.; AIDAR, M.P.M.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; JOLY, C.A. Application of MALDI-MS analysis of Rainforest chemodiversity: a keystone for biodiversity conservation and sustainable use. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 47, p. 1482, 2012.

- PAVARINI, D.P.; SILVA, D.B.; LOPES, N.P. First steps on MALDI-IMS images generation of protein maps on Arnica-da-Serra leaf cuts. *In: International Conference on Natural Products Research - ASP*, 2012, New York. **Planta Medica**, v. 78, p.1027, 2012.
- PAVARINI, D.P.; PAVARINI, S.P.; NIEHUES, M.; LOPES, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. **Animal Feed Science and Technology**, v. 176, p. 5, 2012.
- PAVARINI, D. P. ; POLLO, L. ; PEREIRA, L. M. ; YATSUDA, A. P. ; SPRING, O. ; LOPES, N. P. . Combining transcriptomics-based and proteomics-based approaches for functional characterization of terpene synthases of Arnica da Serra (Asteraceae). *In: 61 GA 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA Conference)*, 2013b, Münster. *Planta Medica- Book of Abstracts 61st International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research*, 2013b. v. 79.
- PERALTA-YAHYA, P.P.; OUELLET, M.; CHAN, R.; MUKHOPADHYAY, A.; KEASLING, J.D.; LEE, T.S. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. **Nature Communications**, v.2, p.483, 2011.
- PEREIRA, A.M.S.; BERTONI, B.W.; LOPES, N.P.; PARON, M.E.; FRANÇA, S.C.; AMARANTE, V.S. *In vitro* propagation and germoplasm conservation of *Lychnophora ericoides* Mart: a medicinal species from the Brazilian cerrado. **Revista Fitos (ALANAC)**, v.1, p.69, 2005.
- QURESHI, N.; PORTER, J.W. **Conversion of acetyl-Coenzyme A to isopentenyl pyrophosphate**. *In: PORTER, J. W.; SPURGEON, S.L (edt). Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1*. John Wiley & Sons, New York, USA, 1981., pp. 47–94.
- RO, D.K.; EHLTING, J.; KEELING, C.I.; LIN, R.; MATTHEUS, N.; BOHLMANN, J. Microarray expression profiling and functional characterization of *AtTPS* genes: Duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes *At4g13280* and *At4g13300* encode root-specific and wound-inducible (Z)- γ -bisabolene synthases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.448, p.104, 2006.

- RODRIGUEZ-CONCEPCION, M.; BORONAT, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. **Plant Physiology**, v.130, p.1079, 2002.
- ROGERS, S.O.; BENDICH, A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. **Plant Molecular Biology**, v.5, p.69-76, 1985.
- RUAN, S.L.; MA, H.S.; WAN, S.H.; XIN, Y.; QIAN, L.H.; TONG, J.X.; [WANG, J.](#) Advances in plant proteomics-I. Key techniques of proteome. **Yi Chuan**, v.28, p.1472, 2006.
- SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.693, 2003.
- SANTANA-LOURENÇO L.B.; SILVA CINARA V.; ALMEIDA LAFAIETE C.; COSTA TADEU A. C.; VELOZO EUDES S. Extraction with supercritical fluid and comparison of chemical composition from adults and young leaves of *Zanthoxylum tingoassuiba*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21,p. 564, 2011.
- SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.545, 2005.
- SANTOS, M.D.; CHEN, G.; ALMEIDA, M.C.; SOARES, D.M.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P.; LANTZ, R.C. Effects of Caffeoylquinic Acid Derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on *in vitro* Inflammatory Mediator Production. **Natural Product Communications**, v.5, p.733, 2010.
- SCHNERMANN, P.; AND SCHIEBERLE, P. Evaluation of key odorants in milk chocolate and cocoa cass by aroma extract dilution analyses. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 45: p. 867, 1997.
- SCHULTZ, J.C. How plants fight dirty. **Nature**, v. 416, p. 267, 2002.
- SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernonieae, Compositae)**. 515f., **Tese de Doutorado**, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 1991.
- SEMIR, J.; REZENDE, A.R.; BORGES, M.; LOPES, N.P. **As Arnicas Endêmicas das Serras do Brasil**. Editora UFOP, 1ª ed: Ouro Preto/MG, Brasil, 2011, p.211.

- SILVA, D. B. ; TURATI, I. C. C. ; GOUVEIA, D. R. ; ERNST, M. ; TEIXEIRA, S. P. ; LOPES, N. P. . Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. **Scientific Reports**, v. 4, p. 1, 2014.
- SOUSA, O.V.; DUTRA, R.C.; YAMAMOTO, C.H.; PIMENTA, D.S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, p.113, 2008.
- TOWNSEND, B.J.; POOLE, A.; BLAKE, C.J.; LLEWELLYN, D.J. Antisense suppression of a (+)- δ -cadinene synthase gene in cotton prevents the induction of this defence response gene during bacterial blight infection but not its constitutive expression. **Plant Physiology**, v.138, p.516, 2005.
- VAN GELDRE, E.; VERGAUWE, A.; VAN DEN EECKHOUT, E. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. **Plant Molecular Biology**, v.33, p.199, 1997.
- VERRI, W.A.; JR.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116, 2006.
- VESSECCHI, R.; LOPES, N.P.; GOZZO, F.C.; DORR, F.A.; MURGU, M.; LEBRE, D.T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O.V.; RIVEROS, J.M. Nomenclaturas de Espectrometria de Massas em Língua Portuguesa. **Química Nova**, v. 34, p. 1875, 2011.
- VICHENWSKI, W.; LINS A. P.; HERZ W.; MURARIS R.; Lychnopholic acid and its acetate from *Lychnophora martiana*. **Phytochemistry**, v.19,p.685, 1980.WEN, C.H.; TSENG, Y.H.; CHU, F.H. Identification and functional characterization of a sesquiterpene synthase gene from *Eleutherococcus trifolius*. **Holzforschung**, v.66, p.183, 2012.
- ZULAK, K.G.; LIPPERT, D.N.; KUZYK, M.A.; DOMANSKI, D.; CHOU, T.; BORCHERS, C.H.; BOHLMANN, J. Targeted proteomics using selected reaction monitoring reveals the induction of specific terpene synthases in a multi-level study of methyl jasmonate-treated Norway spruce (*Picea abies*). **The Plant Journal**, v.60, p.1015–1030, 2009.

Apêndice

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO nº 010143/2011-4

O CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - CNPq, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 246, de 27 de agosto de 2009, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, neste ato representado pelo seu Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde, nos termos da Portaria CNPq nº 161/2010, autoriza a instituição abaixo qualificada a acessar e remeter amostras de componentes do patrimônio genético.

Instituição: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO - USP

CNPJ: 630.255.300/0001-04

Representante Legal: MARCO ANTONIO ZAGO

Cargo/Função: Pró-Reitor de Pesquisa

CPF: 348.967.088-49 **RG:** 3579713

Projeto: Ecologia Química de Lychnophorinae (Asteraceae). Uma abordagem Metabolômica e Proteômica para programas de conservação e compreensão de seus usos

Coordenador do Projeto: Norberto Peporine Lopes

CPF: 099.034.918-75 **RG:** 173554180 - SSP / SP

Finalidade do projeto: Pretende-se estudar ecologia química de Lychnophorinae (Asteraceae) através dos seus ritmos biológicos e a expressão dos parâmetros metabolômicos e proteômicos para fornecer informações de seu uso e importância, o permitirá auxiliar em programas de conservação e preservação das espécies da subtribo.

Amostras a serem acessadas:

Espécie(s): *Eremanthus arboreus* (Gardner) MacLeish [= *Vanillosmopsis arborea* (Gardner) Baker], *Eremanthus argenteus* MacLeish & H. Schumacher, *Eremanthus bicolor* (DC.) Baker, *Eremanthus brasiliensis* (Gardner) MacLeish [= *Vanillosmopsis brasiliensis* (Gardner) Sch. Bip.], *Eremanthus cinctus* Baker, *Eremanthus crotonoides* (DC.) Sch. Bip., *Eremanthus elaeagnus* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., *Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish, [*Vanillosmopsis erythropappa* (DC.) Sch. Bip.], *Eremanthus eriopus* Sch. Bip. ex Baker, *Eremanthus glomerulatus* Less., *Eremanthus goyazensis* (Gardner) Sch. Bip., *Eremanthus incanus* (Less.) Less., *Eremanthus mattogrossensis* Kuntze, *Eremanthus mollis* Sch. Bip., *Eremanthus polhii* (Baker) MacLeish, [*Vanillosmopsis pohlii* Baker], *Eremanthus seidelii* MacLeish & H. Schumacher, *Eremanthus uniflorus* MacLeish & H. Schumacher, *Eremanthus veadeiroensis* H. Rob., *Lychnophora affinis* Gardner, *Lychnophora antillana* Urb., *Lychnophora bahiensis* Mattf., *Lychnophora blanchetti* Sch. Bip., *Lychnophora bruniioides* Mart., *Lychnophora columnaris* Mattf., *Lychnophora crispa* Mattf., *Lychnophora diamantinana* Coile & S. B. Jones, *Lychnophora ericoides* Mart., *Lychnophora granmogolensis* (Duarte) D. J. N. Hind, *Lychnophora hakeaefolia* Mart., *Lychnophora markgravi* Gardner, *Lychnophora martiana* Gardner, *Lychnophora passerina* (Mart. ex DC.) Gardner, *Lychnophora phyllocaefolia* DC., *Lychnophora pinaster* Mart., *Lychnophora pohlii* Sch. Bip., *Lychnophora pseudovillosissima* Semir & Leitão, *Lychnophora reticulata* Gardner, *Lychnophora rupestris* Semir & Leitão, *Lychnophora salicifolia* Mart., *Lychnophora sellowii* Sch. Bip., *Lychnophora staavioides* Mart., *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng., *Lychnophora uniflora* Sch. Bip., *Lychnophora villosissima* Mart., *Lychnophoriopsis candelabrum* (Sch. Bip.) H. Rob., *Minasia alpestris* (Gardner) H. Robinson, *Piptolepis ericoides* (Less.) Sch. Bip., *Piptolepis leptospermoides* (Mart. ex DC.) Sch. Bip., *Proteopsis argentea* Mart. & Zucc. ex Sch. Bip., *Proteopsis furnensis*, *Eremanthus arboreus*, *Eremanthus elaeagnus*.

Tipo de material/quantidade de amostras: Em torno de 100mg ou um ramo

Local de depósito de subamostra: DEPARTAMENTO DE BOTANICA

Equipe do projeto: NORBERTO PEPORINE LOPES / CPF 099.034.918-75

JOAO LUIS CALLEGARI LOPES / CPF 242.694.688-15

LEONARDO GOBBO NETO / CPF 260.985.118-96

JOAO SEMIR / CPF 416.569.038-49

DAYANA RUBIO GOUVEA / CPF 326.851.028-09

LEANDRO DE SANTIS FERREIRA / CPF 219.953.308-50

DANIEL PETINATTI PAVARINI / CPF 310.488.568-01
MARCELO MONGE EGEA / CPF 318.566.378-08

Validade da Autorização: 05/04/2011 a 30/03/2015

A instituição acima qualificada deverá enviar ao CNPq, por meio da Plataforma Carlos Chagas, relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto nº. 4.946/2003.

Esta autorização está vinculada às informações, declarações e termos de compromisso firmados pelo coordenador do projeto e pelo representante legal, constantes do Processo nº 010143/2011-4. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico não estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, a instituição beneficiada se compromete a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material (TTM) ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético (TRM). Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, por meio de formulário específico e mediante a apresentação de TTM ou TRTM, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Brasília, 05 de Abril de 2011

Paulo Sergio Lacerda Beirao
Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde

Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página <http://servicosweb.cnpq.br/visualizador/> e informar o número do protocolo 4111772291784985 para recuperá-la do banco de dados do CNPq, ou poderá selecionar o arquivo salvo em seu computador (em formato PKCS7). V.Sa. pode também usar outro aplicativo disponível no mercado capaz de reconhecer arquivos no padrão PKCS7 para fazer a visualização e extração do documento.

Página 2 de 2

Apêndice 2. Cópia da autorização expedida pelo CNPq sob credenciamento do CGen (Pagina 2 de 2)

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26801-4	Data da Emissão: 10/09/2012 09:49	Data para Revalidação*: 10/10/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Daniel Petinatti Pavarini	CPF: 310.488.568-01
Título do Projeto: Técnicas analíticas hifenadas empregadas nas avaliações de variações rítmicas e espaciais da composição química de óleos essenciais e emissão de voláteis de partes aéreas de <i>Lychnophora ericoides</i> Mart.	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coletas periódicas (cada 3 meses)	02/2011	02/2013
2	Validação da metodologia a início das análises	02/2011	03/2013

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	O pesquisador está autorizado a coletar amostras de folhas de <i>Lychnophora ericoides</i> (espécie ameaçada de extinção) para estudos fotoquímicos. As coletas serão mensais e parcimoniosas não causando danos à população. Haverá também a gravação de imagem e/ou som possíveis polinizadores. Favor atentar para a ressalva padrão de número 6 que trata sobre o conhecimento associado ao patrimônio genético.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Norberto Pepporine Lopes	Coordenador	099.034.918-75	17.355.418-0 SSP-SP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	SAO JOAO BATISTA DO GLORIA	MG	Paraíso Perdido	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47257879

Página 1/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26801-4	Data da Emissão: 10/09/2012 09:49	Data para Revalidação*: 10/10/2013
-----------------	-----------------------------------	------------------------------------

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: Daniel Petinatti Pavarini	CPF: 310.488.568-01
Título do Projeto: Técnicas analíticas hifenadas empregadas nas avaliações de variações rítmicas e espaciais da composição química de óleos essenciais e emissão de voláteis de partes aéreas de <i>Lychnophora ericoides</i> Mart.	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

2

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Lychnophora

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Plantas)	Folhas
---	-------------------------------	--------

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	Banco de amostras temporário do NPPNS-FCFRP

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47257879

Página 2/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 26801-4	Data da Emissão: 10/09/2012 09:49	Data para Revalidação*: 10/10/2013
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Daniel Petinatti Pavarini	CPF: 310.488.568-01
Título do Projeto: Técnicas analíticas hifenadas empregadas nas avaliações de variações rítmicas e espaciais da composição química de óleos essenciais e emissão de voláteis de partes aéreas de <i>Lychnophora ericoides</i> Mart.	
Nome da Instituição : REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 47257879

Página 3/3

Anexos

Anexo 1. Espectro de RMN de ^{13}C para o composto 11-dehidro cadinol

Anexo 2. Espectro de RMN DEPT 135 para o composto 11-dehidro cadinol

Anexo 3. Espectro de RMN de ^1H para o composto 11-dehidro cadinol (região blindada)

Anexo 4. Espectro de RMN de ^1H para o composto 11-dehidro cadinol (região desblindada)

Anexo 5. Mapa de Contornos HMQC para 11-dehidro cadinol

Anexo 6. Mapa de Contornos HMBC (parte 1 de 3) para 11-dehidro cadinol

Anexo 7. Mapa de Contornos HMBC (parte 2 de 3) para 11-dehidro cadinol

Anexo 8. Mapa de Contornos HMBC (parte 3 de 3) para 11-dehidro cadinol

Anexo 9. Espectros de massas da molécula protonada de m/z 221 referente ao 11-dehidro cadinol (MS 2 ESI-qTOF, modo positivo).

Anexo 11. Espectro de RMN DEPT 135 para o composto α -Bisabolol

Anexo 12. Espectro de RMN de ^1H para o composto α -Bisabolol (Parte 1 de 2)

Anexo 13. Espectro de RMN de ^1H para o composto α -Bisabolol(parte 2 de 2)

Anexo 14. Mapa de Contornos HMQC para α -Bisabolol

Anexo 15. Mapa de Contornos HMBC (parte 1 de 3) para α -Bisabolol

Anexo 16. Mapa de Contornos HMBC (parte 2 de 3) para α -Bisabolol

Anexo 17. Mapa de Contornos HMBC (parte 3 de 3) para α -Bisabolol