

CYNTHIA MURAKAMI

**Estudo da composição química e atividades biológicas de
óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King &
Rob. em diferentes fases fenológicas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO
2009

CYNTHIA MURAKAMI

**Estudo da composição química e atividades biológicas de
óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King &
Rob. em diferentes fases fenológicas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARIA CLÁUDIA MARX YOUNG

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Biblioteca do Instituto de Botânica

Murakami, Cynthia

M972e Estudo da composição química e atividades biológicas de óleos voláteis de
Chromolaena laevigata (Lam.) King & Rob. em diferentes fases fenológicas /
Cynthia Murakami -- São Paulo, 2009.
95 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio
Ambiente, 2009
Bibliografia.

1. Asteraceae. 2. Fenologia. 3. Laevigatina. I. Título

CDU : 582.998

*Aos meus pais, Helena e Koiti
dedico*

*"Quem conhece os homens é inteligente
Quem conhece a si mesmo é iluminado
Vencer os homens é ter força
Quem vence a si mesmo é forte
Quem sabe contentar-se é rico
Agir fortemente é ter vontade
Quem não perde a sua resistência, perdura
Quem morre mas não perece, eterniza-se"
(Lao Tse)*

AGRADECIMENTOS

Depois de olhar a minha dissertação pronta e respirar aliviada, só tenho a agradecer a todos que colaboraram para que a dissertação e a "aprendiz de mestre" se tornassem realidade! É com imenso prazer e satisfação que eu agradeço a cada um...

Aos meus pais, Koiti e Helena, que acreditaram no meu potencial como bióloga e me deram total apoio para aproveitar a oportunidade de fazer o mestrado, além do suporte financeiro e da tolerância nos meus altos e baixos emocionais desde a qualificação até a defesa... Além da minha irmã aprendiz de designer gráfico, Cris, que me deu várias ajudinhas para deixar minhas figuras e apresentações mais bonitas e apresentáveis!

À minha orientadora Dra. M. Cláudia M. Young pela orientação desde o treinamento técnico e pelo incentivo e compreensão durante todo o mestrado, sempre confiando na minha capacidade! Aprendi bastante com a convivência, tirando dúvidas, resolvendo os contratempos, redigindo resumos e participando de congressos, inclusive o de Fortaleza, além das sempre bem servidas viagens de coleta na Fazenda Campininha! A sua orientação não poderia ter sido mais agradável e produtiva!!!

Ao Dr. Paulo R. H. Moreno pela sua disposição em colaborar para o meu trabalho, como coordenador do projeto temático da FAPESP, além da sempre bem-humorada companhia, inclusive em congressos, e valiosa colaboração intelectual, lembrando-me sempre que a organização e o comprometimento são fundamentais para o bom andamento de um projeto.

Às grandes amigas grandes (risos), MSc. Amanda de Souza e MSc. Ludmila Raggi, que deram o maior suporte ao longo desses dois anos, tiraram dúvidas, ensinaram a desenvolver e a resolver quando parecia que estava dando tudo errado, transmitiram para mim tudo o que puderam sobre óleos voláteis, além de colaborarem para a saúde mental da aprendiz de mestre, dentro e fora do Botânico, na viagem a Fortaleza ou na baladinha, sempre com boas risadas!!!

Aos amigos do coração e técnicos que, assim como eu já fiz a outros alunos (alguns deles ingratos, que jamais reconheceram o meu trabalho no desenvolvimento dos ensaios que realizei – desabafo! risos), fizeram o seu trabalho da melhor maneira possível para que o meu tivesse resultados confiáveis, mas com um carinho especial e recíproco, bem como acompanharam em coletas como Toddyinhos (companheiros de aventuras), Michelle Cristina da Silva, Maura Casari Sartori, Anderson Luís do Nascimento, Fabiano Brumati e Marcos Enoque L. Lima.

Às amigas que acompanharam essa jornada com bom humor, ensinando e aprendendo sempre de bem com a vida, Dra. Rosana Cristina Carneira, Denise Lopes Resende Vido, MSc. Rosilene Kinue Ito e Priscila Pimenta Hoffmann.

Ao meu querido namorado, Nilo Tsuchiya, por tudo... o apoio moral, as soluções práticas para os meus problemas complexos na reta final da elaboração da dissertação, a paciência e compreensão ilimitadas, o carinho de todos os dias, os almoços durante a semana no Botânico, as madrugadas acordado só para me fazer companhia enquanto escrevo até eu ir dormir, a sua doce companhia quando não estou pensando no mestrado e também por não me deixar pensar no mestrado nas horas de lazer... porque eu sei que namorar uma aprendiz de mestre qualificada com os dias contados realmente não tem sido fácil! Obrigada por tudo! Te amo!

À Dra. Elaine Cardoso Lopes pela indispensável colaboração intelectual para o desenvolvimento do ensaio anticolinesterásico, além da agradável companhia e valiosos ensinamentos de vida que tentarei seguir (se possível, casar até os trinta será um deles! risos).

Às coordenadoras da Pós, Dra. Sônia M. C. Dietrich e Dra. Solange C. Mazzoni-Viveiros, que desde o princípio lutaram para tornar possível a criação do nosso Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente e, assim, tornaram possível também o sonho de centenas de alunos e futuros pesquisadores! Agradeço também por tudo que tenho aprendido nas reuniões da PG como representante discente, pois de lá a minha visão do trabalho árduo de vocês por nós fez com que as admirasse ainda mais!

*Ao pessoal da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas que, fazendo cada um a sua parte, foi realmente indispensável para a realização do meu trabalho nos seus mínimos detalhes, como Helena C. Leite (Dona Helena) pela ajuda no cultivo das mudas de *C. laevigata* e pela disposta companhia em viagens de coleta, Ana Alice Martins Cardoso (Ana) pelo trabalho burocrático e agradável companhia tanto no dia-a-dia como na viagem de coleta, Maria Aparecida C. A. Santos (Cida) pelo trabalho burocrático e agradável convivência e Mary Pereira Monteiro (Mary) pelas compras de todos os materiais utilizados para a realização de todos os experimentos (bem que poderiam ser compras no shopping, né? risos) além da amizade e das inúmeras conversas, risadas, choros, revoltas, mais risadas e lições para toda a vida!*

Aos funcionários da Pós-Graduação, Márcia R. Ângelo e Antônio Borges, pelo trabalho indispensável para todos os alunos!

Ao Eng^o. Agr^o. João Del Giudice Neto por fornecer os dados climáticos da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, além do Dr. Marcos Mecca Pinto pela colaboração e dos funcionários da reserva, que sempre nos receberam com um sorriso no rosto e conversas agradáveis, nos proporcionaram uma boa comidinha caseira e a grelha do churrasco, além do mais importante, me ajudaram a encontrar e coletar as plantas de estudo, Samuel Barnuevo, Paulo Barbosa da Silva, Maura Dias Peixoto, Ana Lúcia da Silva Caetano, Elisamara Augusto da Silva Guilherme e Adão Martinho Barbosa.

Ao Dr. José Ivanildo de Souza, da Seção de Micologia, pelos dados climáticos "alternativos" da região de Mogi-Guaçu.

Ao Sérgio T. Salum da Estação Meteorológica do IAG/USP pelos dados climáticos cedidos referentes ao PEFM.

Ao Dr. João H. G. Lago e à Dra. Carmen L. Zuciroga pela disposição, colaboração e sugestões no exame de qualificação.

Ao Dr. José Guilherme Maia por disponibilizar pessoalmente o seu artigo, indispensável para a discussão do meu trabalho.

Aos professores das disciplinas que cursei, Dr. Sérgio Romaniuc Neto, Dra. Rosângela Simão Bianchini (também pela determinação desta espécie), Dr. Eduardo P. C. Gomes, Dra. Luce Brandão Torres, Dr. Marco Aurélio da Silva Tiné, Dr. Emerson da Silva e Dr. Edison Paulo Chu, por acrescentarem conhecimento e vivência sobre o que fazem de melhor profissionalmente.

Aos motoristas do Instituto de Botânica, Luís G. Zangueta Batista, Wilson F. da Silva e Geraldo M. de Souza Filho, pelas sempre agradáveis companhias nas viagens de coleta e churrascos noturnos em Mogi-Guaçu.

Ao CNPq, pela bolsa de mestrado concedida.

À Capes, pela verba PROAP que financiou as minhas inscrições nos congressos.

À FAPESP, pelo financiamento do projeto temático "Flora Aromática da Mata Atlântica do Estado de São Paulo: composição química dos óleos voláteis e análise da atividade biológica", no qual meu projeto está inserido.

E a todos que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

1. Introdução	1
2. Objetivo.....	22
3. Material e Métodos	23
3.1. Material vegetal e delineamento experimental	23
3.2. Condições de cultivo das plantas cultivadas no Instituto de Botânica.....	25
3.3. Obtenção do óleo volátil	25
3.4. Análise química	26
3.5. Identificação dos componentes	26
3.6. Atividades Biológicas	27
3.6.1. Avaliação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia direta.....	27
3.6.1.1. Preparo das amostras.....	27
3.6.1.2. Obtenção dos microrganismos.....	27
3.6.1.3. Ensaio antifúngico	27
3.6.2. Avaliação da atividade antifúngica pelo método de microdiluição	28
3.6.2.1. Preparo das amostras.....	28
3.6.2.2. Obtenção dos microrganismos.....	28
3.6.2.3. Ensaio antifúngico	28
3.6.3. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição.....	29
3.6.3.1. Preparo das amostras.....	29
3.6.3.2. Obtenção dos microrganismos.....	29
3.6.3.3. Ensaio antibacteriano	29
3.7. Medida da atividade da acetilcolinesterase.....	30
3.7.1 Ensaio quantitativo em microplaca.....	30
3.7.1.1. Preparo das amostras.....	30
3.7.1.2 Ensaio anticolinesterásico	30
4. Resultados e Discussão	31
5. Considerações Finais	68
6. Conclusões	69
7. Resumo	70
8. Abstract.....	72
9. Referências Bibliográficas.....	74
10. Anexo.....	87

1. Introdução

As plantas são organismos autotróficos, capazes de converter energia luminosa em energia química, através da síntese de carboidratos a partir de dióxido de carbono e água. Apesar da sua auto-suficiência, elas não são capazes de se locomover para evitar as condições adversas do ambiente, competir com outras plantas por recursos ou para defender-se de seus inimigos potenciais, tais como patógenos e predadores. Por isso, ao longo da evolução, elas desenvolveram outras formas de proteção, de caráter físico e químico. Como defesa mecânica podemos citar a cutícula, camada externa cerosa de partes aéreas de plantas herbáceas, e a periderme, tecido protetor secundário de caules e raízes, que evitam a dessecação e dificultam a invasão de patógenos diretamente pela superfície da planta. Já a proteção química é realizada pelo metabolismo secundário (Taiz & Zeiger 2004).

Até a década de 1950, os metabólitos secundários foram considerados desperdício fisiológico ou produtos de destoxificação, sem uso aparente pelas plantas (Verpoorte 2000a, Hartmann 2007), tendo seus aspectos funcionais negligenciados por fitoquímicos e fisiologistas vegetais. Curiosamente, os entomologistas foram os responsáveis por essa mudança de visão, a partir de estudos de interações planta-herbívoros, enfatizando a função destes metabólitos na defesa química das plantas e relacionando a sua co-evolução com a pressão de seleção dos herbívoros (Hartmann 2007).

Os metabólitos secundários, designados por Gottlieb *et al.* (1996) como “metabólitos especiais”, são compostos orgânicos presentes em células especializadas, sem função direta sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, mas com papel fundamental na sua interação com o meio ambiente (Verpoorte 2000a), como ilustrado na Figura 1 (Hartmann 2002). Esses metabólitos possuem alta plasticidade genética e diversidade química, características que possibilitam às plantas adaptar-se às demandas do ambiente, continuamente variável (Hartmann 2007). Podem atuar como compostos sinalizadores na interação das plantas (Verpoorte 2000a) tanto com seu ambiente abiótico, como os associados às mudanças na temperatura, status hídrico, luminosidade, exposição à radiação UV e nutrientes minerais (Bartley & Scolnik 1995, Briskin 2000, Santos 2004), como com seu ambiente biótico, na alelopatia (Macias *et al.* 2007), na atração de polinizadores, tanto pelo perfume como pela coloração (Bartley & Scolnik 1995), atração de animais dispersores de sementes (Santos 2004) e contra o ataque de patógenos e herbivoria (Kinghorn 1992, Verpoorte 2000a, Villalba *et al.* 2002, Santos 2004).

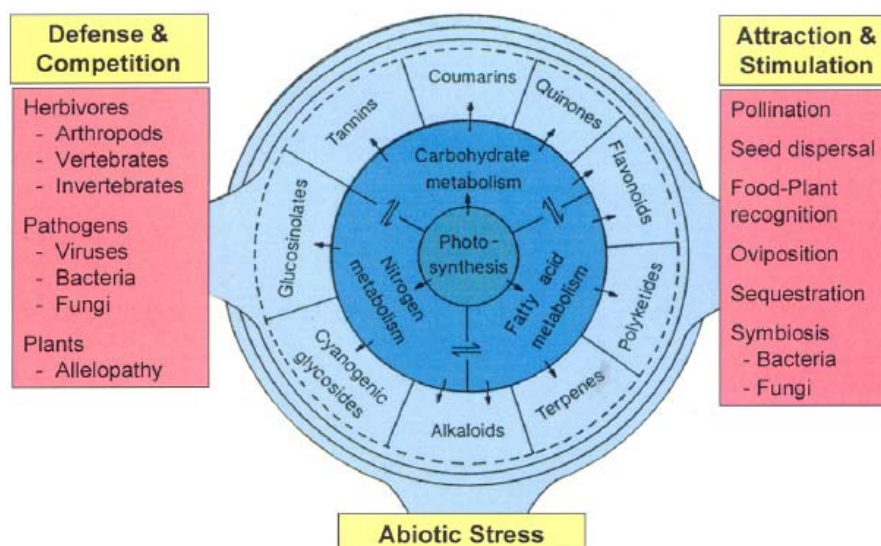


Figura 1. Funções ecológicas do metabolismo secundário vegetal (Hartmann 2007)

Apresentam distribuição restrita em grupos taxonômicos (Verpoorte 2000a), podendo ocorrer caracteristicamente em determinadas espécies ou famílias (Heinrich *et al.* 2004) e ser ativadas durante estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou sob certas condições ecológicas e ambientais (Santos 2004).

De maneira geral, podem ser classificados de acordo com as suas características químicas, origem vegetal ou origem biossintética (Verpoorte 2000a). Estima-se que há, atualmente, mais de 200.000 estruturas definidas de metabólitos secundários de plantas (Hartmann 2007).

O estudo dos compostos químicos produzidos por vegetais, animais e microrganismos, tanto terrestres como marinhos, denominado **Química de Produtos Naturais** (Heinrich *et al.* 2004), surgiu a partir do isolamento da morfina (*"principium somniferum"*) por Friedrich Wilhelm Sertürner, em 1806, que descobriu que um princípio ativo podia ser isolado e atribuído a um único composto químico (Hartmann 2007). A partir daí, desenvolveu-se então a **Farmacognosia**, que é a ciência que estuda os metabólitos secundários com aplicação farmacêutica provenientes desses organismos vivos (Heinrich *et al.* 2004).

A Organização Mundial da Saúde (2004) divulgou que entre as principais causas de mortalidade no mundo, apontadas no ano de 2002, encontram-se: neoplasmas malignos, infecções respiratórias, HIV, diarreia, tuberculose, doenças infantis como sarampo, tétano e difteria e condições neuropsiquiátricas, como o mal de Alzheimer, além das doenças cardiovasculares. Em escala mundial, a incidência de câncer tem superado o aumento da população e nos Estados Unidos, cerca de 1.500 pessoas morrem de câncer por dia, por isso

têm sido desenvolvidas pesquisas para a descoberta de novos agentes quimioterapêuticos baseados em produtos naturais bem como abordagens alternativas, como agentes quimiopreventivos, que previnam ou retardem o processo de carcinogênese a partir da ingestão de alimentos e medicamentos (Kinghorn 2001).

Considerada uma doença neurodegenerativa progressiva, o mal de Alzheimer corresponde a cerca de 50-60% dos casos de demência em idosos e seus principais sintomas envolvem disfunção cognitiva, perda de memória primária, déficits de linguagem, depressão, agitação, distúrbios de humor e psicose. É causada por danos no sistema nervoso central como formação de placas senis e emaranhados de neurofibrilas, processos oxidativos e inflamatórios e distúrbios dos neurotransmissores, além de déficit colinérgico em casos mais severos. Dessa forma, o principal alvo para o tratamento tem sido através de drogas que estimulem os receptores colinérgicos ou prolonguem a disponibilidade da acetilcolina, por meio da inibição da sua hidrólise pela enzima acetilcolinesterase, como é o caso da galantamina, embora o uso de anti-inflamatórios e antioxidantes sejam explorados como meios de retardar a progressão da doença (Howes & Houghton 2003).

Vários fatores têm causado o aumento na incidência de infecções por fungos, tais como o aumento de infecções que causam imunodeficiência, o crescente uso de drogas citotóxicas e imunossupressoras para o tratamento de doenças malignas, além do longo período de tratamento devido à resistência que esses fungos desenvolvem aos tratamentos padrão (Zollo *et al.* 1998, Tullio *et al.* 2006). O mesmo observa-se em relação à emergência de bactérias patogênicas multi-resistentes em hospitais e na comunidade, que representa um problema tanto para os pacientes como para o controle de infecções, como é o caso dos organismos resistentes *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Klebsiellae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia* (Edris 2007). Mesmo a diarreia, causada por *Escherichia coli*, é responsável por altas taxas de mortalidade em crianças recém-nascidas e constitui um problema emergente tanto em países em desenvolvimento como desenvolvidos (Duarte *et al.* 2007). Dessa forma, a constante seleção de microrganismos resistentes às drogas utilizadas nos tratamentos convencionais tem tornado cada vez maior a demanda por novos tratamentos alternativos a partir de produtos naturais.

Alguns exemplos clássicos de metabólitos secundários de origem vegetal utilizados pelo homem para o tratamento de doenças são: morfina, alcalóide extraído dos frutos de *Papaver somniferum* (papoula), amplamente utilizado por sua ação analgésica (Hartmann 2007), inclusive no alívio da dor causada pelo câncer (Hanks *et al.* 2001); paclitaxel ou taxol, um diterpeno extraído das cascas de *Taxus brevifolia* (Macías *et al.* 2007), e vinblastina e vincristina, alcalóides extraídos de *Catharanthus roseus*, aplicados no tratamento antitumoral;

quinina, um alcalóide extraído de *Cinchona officinalis*, e artemisina, um sesquiterpeno extraído de *Artemisia annua*, aplicados no tratamento da malária (Croteau *et al.* 2000).

Apesar da indústria farmacêutica ter evoluído muito nas últimas décadas, sintetizando ou promovendo modificações estruturais em vários compostos de origem vegetal para otimizar a sua atividade (Cechinel Filho & Yunes 1998), os produtos naturais continuam sendo a maior fonte de novos protótipos de drogas, que correspondem aos compostos que podem dar origem a novos medicamentos. Essa busca por novas fontes vegetais pode dar-se de diversas formas, tais como a **bioprospecção**, que explora espécies nativas ainda não estudadas de áreas de alta biodiversidade como as florestas tropicais, a **abordagem etnofarmacológica**, que direciona a busca de novas drogas a partir do conhecimento tradicional de um grupo social no uso de plantas medicinais nativas para o tratamento e prevenção de doenças, a **quimiotaxonomia**, que utiliza o conhecimento da composição de determinados grupos vegetais (família, gênero) para buscar classes de produtos naturais comuns a eles, e a **abordagem aleatória**, em que as plantas, geralmente abundantes em uma área, são coletadas sem considerar conhecimento prévio da sua química ou atividade biológica (Heinrich *et al.* 2004).

Assim, apesar dos avanços alcançados pela medicina, o alto custo para a obtenção de exames e medicamentos e a dificuldade de acesso aos centros de atendimento hospitalares têm representado obstáculos para populações carentes, principalmente em países em desenvolvimento (Veiga Junior *et al.* 2005). Mesmo nos Estados Unidos, a preferência pela medicina alternativa e complementar vem crescendo na última década, não só devido ao crescente custo dos tratamentos, mas também pela insatisfação da população com a medicina convencional (Pagán & Pauly 2005).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2003), a medicina tradicional constitui “práticas de saúde, abordagens, conhecimento e crenças envolvendo medicamentos à base de plantas, animais e minerais, terapias espirituais, técnicas manuais e exercícios, aplicados sozinhos ou combinados para tratar, diagnosticar e prevenir doenças ou manter o bem-estar” e as suas adaptações em países desenvolvidos são denominadas medicina complementar ou alternativa. Também segundo a OMS (2003), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursoras de fármacos semi-sintéticos” (Veiga Junior *et al.* 2005). Fitoterápico, segundo a portaria n.º 6 de 31 de janeiro de 1995, da Secretaria de Vigilância Sanitária, é “todo medicamento tecnicamente obtido e elaborado, empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário. O fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento

da eficácia e dos riscos do seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. O produto final é acabado, embalado e rotulado. Na sua preparação podem ser utilizados adjuvantes farmacêuticos permitidos na legislação vigente. Não podem estar incluídas substâncias ativas de outras origens, não sendo considerado produto fitoterápico quaisquer substâncias ativas, ainda que de origem vegetal, isoladas ou mesmo suas misturas” (Veiga Junior *et al.* 2005).

Sabe-se que, desde os primórdios, o homem tem explorado as plantas medicinais para o tratamento, cura e prevenção de doenças (Veiga Junior *et al.* 2005). O Papiro de Ebers, pertencente à XVIII dinastia do Egito Antigo (1550 a.C.), é um dos tratados médicos mais antigos com registro do uso de plantas medicinais, onde são enumeradas cerca de 100 doenças e descrito um grande número de drogas animais e vegetais (Pinto *et al.* 2002). Outra fonte muito antiga e riquíssima do uso de plantas nativas para o tratamento de doenças é o conhecimento tradicional indígena, que vem sendo transmitido ao longo das gerações (Heinrich *et al.* 2004), bem como diversas fontes de conhecimento tradicional de povos que ao longo da história instalaram-se no país, como os quilombolas, que detêm o seu próprio conhecimento no uso de plantas medicinais nativas, adaptado ao longo do período em que têm vivido aqui (Rodrigues & Carlini 2004), constituindo ferramentas valiosas para os estudos etnofarmacológicos (Heinrich *et al.* 2004). Em 2003, a OMS divulgou que mais de 80% da população do continente africano utilizavam-se da medicina tradicional para os cuidados básicos de saúde, cerca de 30-50% do consumo de medicamentos na China consistiam de preparações tradicionais de ervas e mais da metade da população da Europa e América do Norte já utilizaram medicina complementar ou alternativa pelo menos uma vez na vida, sendo que a Alemanha é responsável por consumir, tanto por auto-medicação como por prescrição médica (70% dos clínicos gerais prescrevem preparações com plantas medicinais), metade dos extratos vegetais comercializados na Europa para o tratamento de bronquite, gripe, resfriados, doenças do trato gastrointestinal, dores de cabeça, nervosismo, insônia, fadiga e exaustão (Veiga Junior *et al.* 2005). No Brasil, o governo federal implantou o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, através do decreto n.º 5813 de 22 de junho de 2006, que estabeleceu linhas de ação prioritárias para o uso desses medicamentos de forma segura e racional, garantindo também a sustentabilidade da biodiversidade e ampliando, dentro da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS, as opções terapêuticas dos seus usuários.

Dentro dessa abordagem fitoterápica, alguns óleos voláteis têm sido estudados por suas propriedades terapêuticas (Bakkali *et al.* 2008, Edris 2007, Lahlou 2004) e explorados comercialmente.

Os óleos voláteis são misturas complexas de substâncias orgânicas voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, obtidas por arraste a vapor d'água ou expressão do pericarpo de frutos cítricos. Possuem caracteristicamente sabor geralmente acre e picante, índice de refração e são instáveis e sujeitos à degradação na presença de luz, calor, oxigênio atmosférico e umidade (Simões & Spitzer 2004, Tisserand & Balacs 1995). Por isso, recomenda-se que a análise da sua composição seja realizada imediatamente após a extração e que estes óleos sejam armazenados em congelador e ao abrigo da luz.

Dentro do reino vegetal, os óleos voláteis são raramente encontrados em gimnospermas, com exceção das coníferas (Simões & Spitzer 2004), como em *Pinus densiflora* e *P. koraiensis* (Hong *et al.* 2004). Nas angiospermas, ocorrem em menor frequência em monocotiledôneas, podendo citar as famílias Poaceae e Zingiberaceae (Simões & Spitzer 2004), como em *Cymbopogon winterianus*, popularmente conhecida como citronela (Duarte *et al.* 2007), e *Zingiber officinale*, o gengibre (Schnitzler *et al.* 2007), respectivamente. Dessa forma, os óleos voláteis são mais abundantes nas angiospermas dicotiledôneas, como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Piperaceae e Rutaceae (Simões & Spitzer 2004).

Os óleos voláteis podem ser sintetizados em todos os órgãos das plantas, como folhas (eucalipto), ramos (alecrim), raízes (vetiver), rizomas (gengibre), flores (rosa), frutos (anis-estrelado), sementes (noz-moscada), madeira (pau-rosa) e casca do caule (canela), e são armazenados em estruturas especializadas (Figura 2) como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae), bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae), canais oleíferos (Apiaceae), células epidérmicas e tricomas glandulares (Lamiaceae) (Bakkali *et al.* 2008, Simões & Spitzer 2004).

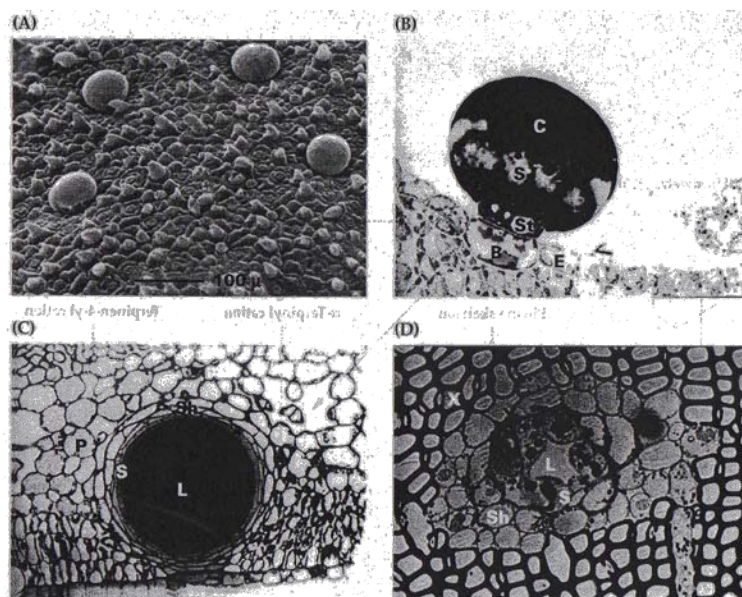


Figura 2. Estruturas especializadas no armazenamento e secreção de óleos voláteis. A. Tricomas glandulares peltados de folha de *Thymus*; B. Tricoma glandular de folha de *Mentha spicata*; C. Cavidade secretora de folha de limão; D. Ducto de resina de caule de *Pinus* (Bakkali *et al.* 2008).

São constituídos em sua maior parte por terpenóides e fenilpropanóides, sendo os primeiros mais freqüentes (Simões & Spitzer 2004). Os fenilpropanóides são formados por um esqueleto carbônico com um anel aromático ligado a uma cadeia de 3 carbonos (Croteau *et al.* 2000, Heinrich *et al.* 2004), enquanto que os terpenóides são formados por unidades de isopreno de 5 carbonos (Figura 3) (Croteau *et al.* 2000).

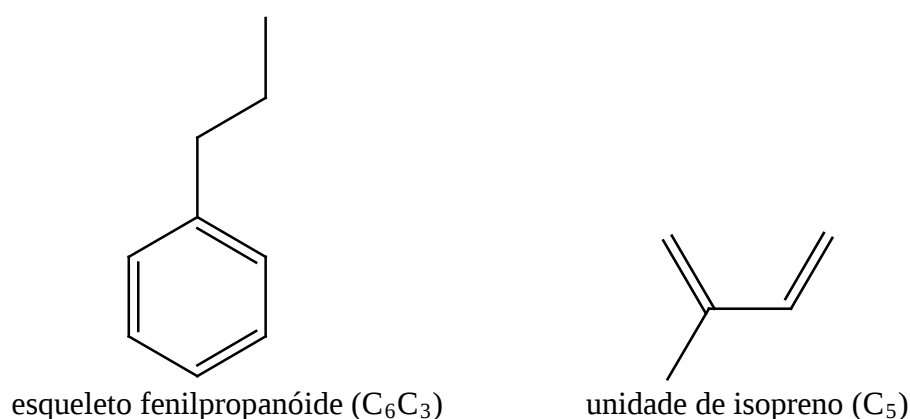


Figura 3. Unidades fundamentais de fenilpropanóides e terpenóides.

Os terpenóides são, possivelmente, a classe de produtos naturais vegetais mais variada estruturalmente (Croteau *et al.* 2000), constituindo mais de um terço de todos os metabólitos secundários conhecidos (Verpoorte 2000a). Classificados de acordo com o número de

unidades de isopreno, os óleos voláteis podem conter: monoterpenos, formados por duas unidades de isopreno (C_{10}), sesquiterpenos, formados por três unidades de isopreno (C_{15}) (Bakkali *et al.* 2008) e diterpenos, formados por quatro unidades de isopreno (C_{20}) que formam moléculas maiores e bem menos voláteis, por isso geralmente são encontrados em óleos voláteis extraídos com solventes orgânicos (Simões & Spitzer 2004).

As vias de biossíntese dos óleos voláteis, bem como de todo o metabolismo secundário, partem do metabolismo da glicose (Figura 4) (Santos 2004).

Os fenilpropanóides originam-se a partir da via do ácido chiquímico, em que este origina o aminoácido aromático fenilalanina, que pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) origina o ácido cinâmico, que por meio de reduções enzimáticas dá origem aos alilbenzenos e propenilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanóides (Figura 5) (Simões & Spitzer 2004). São exemplos desta classe de compostos: o eugenol, obtido do óleo volátil dos botões florais de *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry, popularmente conhecido como cravo (Srivastava *et al.* 2004), o trans-anetol e o estragol, presentes no óleo de *Foeniculum vulgare* Mill., popularmente conhecido como funcho (Politeo *et al.* 2006), o metil-eugenol, presente no óleo de *Melaleuca bracteata* F. Muell., e a miristicina, presente no óleo dos frutos de *Myristica fragrans* Houtt. (Adams 2007). Também são comumente encontrados nas famílias Apiaceae, Lamiaceae, Myrtaceae e Rutaceae (Bakkali *et al.* 2008).

Os terpenóides podem ser formados a partir de duas vias de biossíntese: a via clássica, também conhecida como via do mevalonato, responsável pela formação dos sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}), que ocorre no citosol e cujos precursores são piruvato e acetil-coenzima A; e a via alternativa, conhecida como via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tetraterpenos (C_{40}), ocorre nos plastídeos e cujos precursores são piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (Aharoni *et al.* 2006, Croteau *et al.* 2000, Verpoorte 2000a). Em ambas as vias, há a formação do precursor difosfato de isopentenila (IPP), com 5 carbonos, que deve ser convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), através da enzima IPP isomerase, para iniciar a formação dos terpenos. Para a formação dos monoterpenos (C_{10}), uma unidade de IPP é adicionada a uma de DMAPP, através de uma preniltransferase, formando o seu precursor difosfato de geranila (GPP), com 10 carbonos. A adição de uma unidade de IPP ao GPP, através de uma preniltransferase, forma o difosfato de farnesila (FPP), com 15 carbonos, a partir do qual formam-se os sesquiterpenos (C_{15}). A adição de uma unidade de IPP ao FPP, por sua vez, forma o difosfato de geranilgeranila (GGPP), com 20 carbonos, que dá origem aos diterpenos (C_{20}). Os demais terpenos são formados da mesma forma, por adição de uma unidade de IPP aos seus respectivos precursores, de acordo com a Figura 6 (Verpoorte 2000a).

Os monoterpenos são altamente voláteis e são considerados os mais representativos da composição dos óleos (cerca de 90%). Podem ser classificados como hidrocarbonetos, formados apenas por carbono e hidrogênio, como mirceno, sabineno, α - e β -pineno, ou oxigenados com várias funções como linalol, mentol, α -terpineol e borneol (álcoois), geranial e citronelal (aldeídos), mentona, pulegona, cânfora e fenchona (cetonas), acetato de linalila e mentila (ésteres) e 1,8-cineol e mentofurano (éteres). Os sesquiterpenos são caracterizados por uma cadeia carbônica maior, que permite a formação de uma enorme variedade de estruturas, e são menos voláteis que os monoterpenos. Também são classificados como hidrocarbonetos, como azuleno, α - e β -bisaboleno, cadinenos, β -cariofileno, curcumeno, α - e β -elemeno, ou oxigenados com várias funções como cedrol, β -nerolidol, farnesol, viridiflorol (álcoois), germacrona, β -vetivona, turmerona (cetonas) e óxido de cariofileno e epóxido de humuleno (epóxidos) (Bakkali *et al.* 2008).

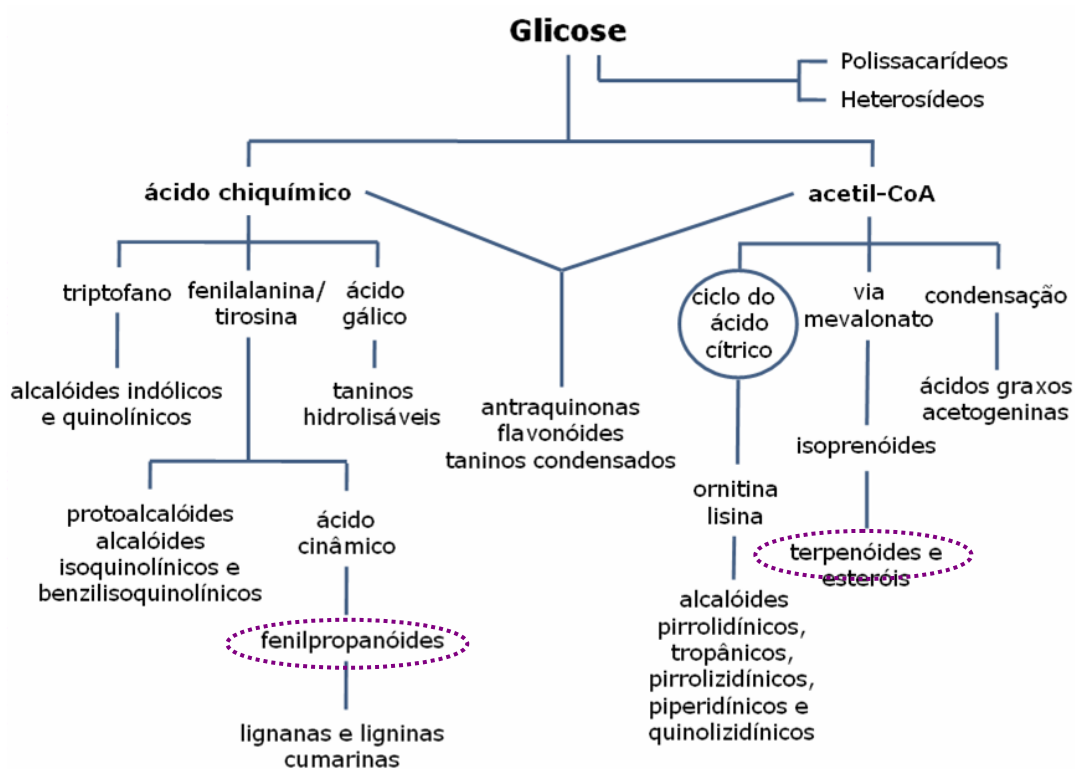


Figura 4. Via de biossíntese dos metabólitos secundários, com ênfase em fenilpropanóides e terpenóides (Santos 2004).

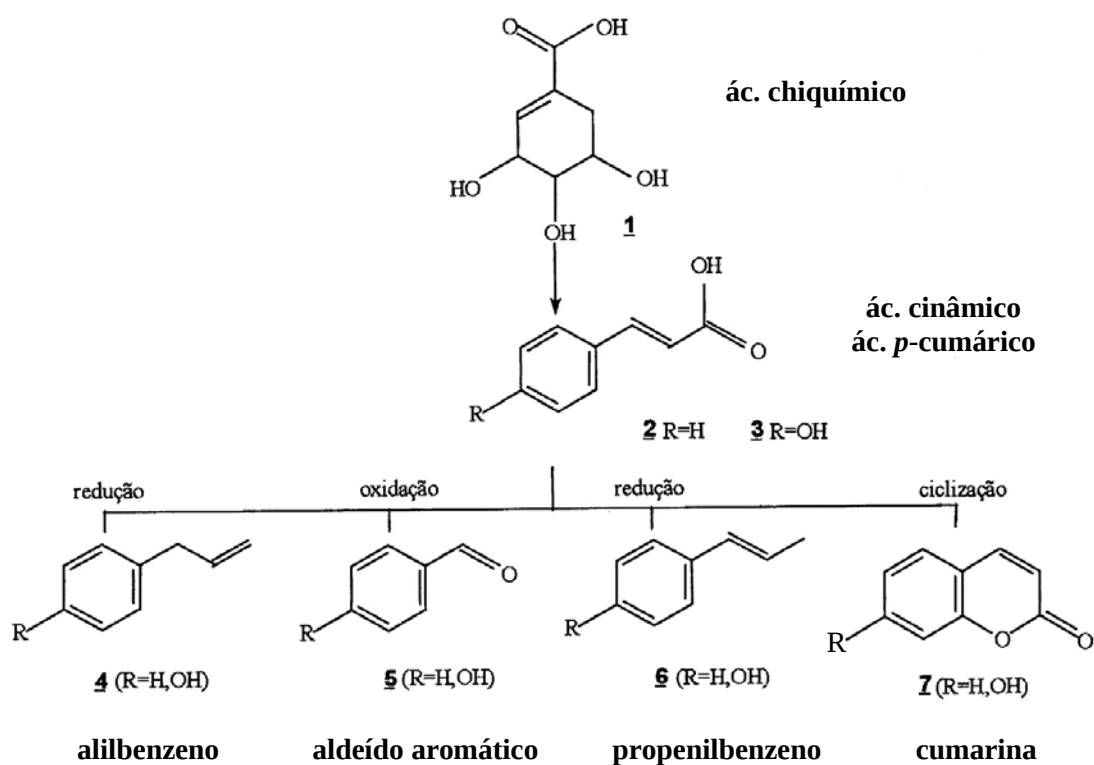


Figura 5. Via de biossíntese dos fenilpropanóides (Simões & Spitzer 2004).

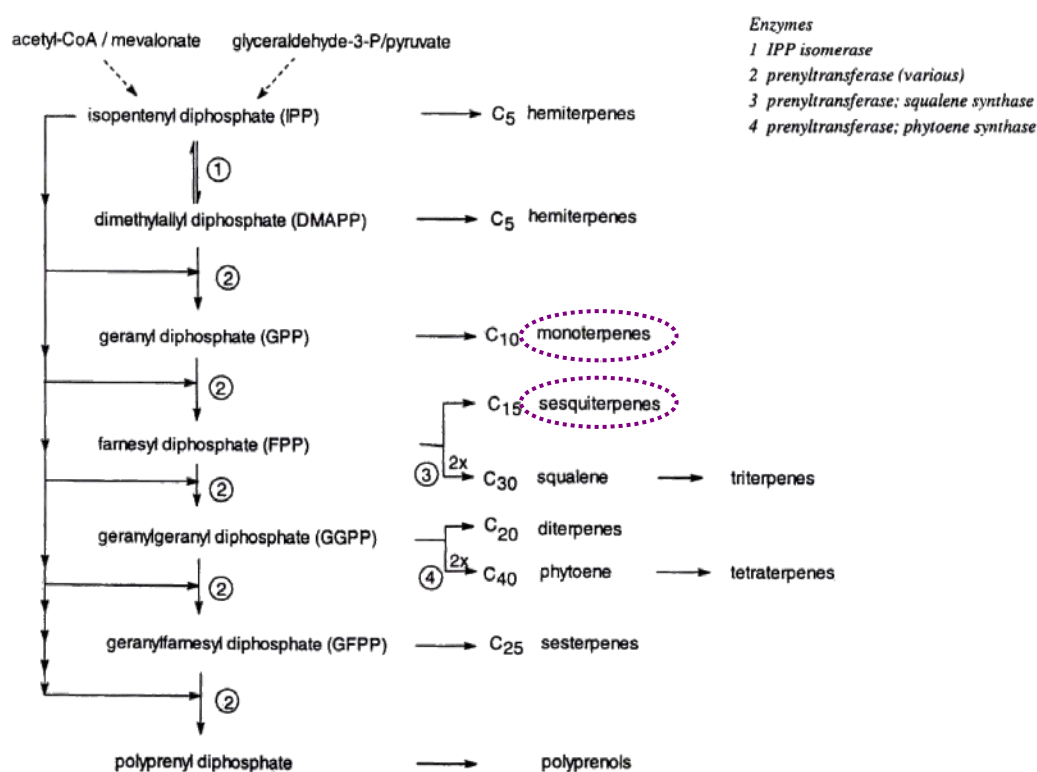


Figura 6. Via de biossíntese dos terpenos, com ênfase em monoterpenos e sesquiterpenos (Verpoorte 2000a).

Os métodos mais comuns para a obtenção de óleos voláteis são:

- **Extração com solventes orgânicos apolares** – geralmente são usados diclorometano, éter ou éter de petróleo, no entanto esses solventes extraem compostos lipofílicos não voláteis, obtendo-se assim um óleo impuro, sem valor comercial (Simões & Spitzer 2004).
- **Espressão de pericarpos de frutos a frio** – geralmente para frutos cítricos, seu pericarpo é prensado e o óleo volátil é separado da emulsão formada com a água através de decantação, centrifugação e destilação fracionada (Simões & Spitzer 2004).
- **Enfloração** – é o método utilizado para obtenção de óleo volátil de uso na perfumaria, obtido geralmente a partir de pétalas de flores que são depositadas sobre uma camada de gordura que, depois de saturada, é tratada com álcool, posteriormente destilado a baixas temperaturas, resultando em um óleo volátil puro e de alto valor comercial (Simões & Spitzer 2004).
- **Arraste por vapor d'água** – empregando-se o aparelho de Clevenger, o óleo é arrastado pelo vapor d'água por ter tensão de vapor mais elevada, formando uma camada de óleo de densidade menor sobre o hidrolato que circula pelo sistema, sendo então separado deste. É o método preconizado pela Farmacopéia Brasileira para extração de óleos voláteis (Simões & Spitzer 2004). No entanto, as altas temperaturas e a própria água podem causar degradação ou modificações químicas dos constituintes dos óleos voláteis (Pellati *et al.* 2005).
- **Headspace (microextração em fase sólida)** – neste método, os analitos são adsorvidos diretamente do material vegetal por uma fibra de sílica fundida recoberta por um polímero e os compostos são então dessorvidos por exposição da fibra ao injetor do equipamento de cromatografia a gás (Pellati *et al.* 2005). Comparado ao arraste a vapor, é uma técnica mais rápida, que demanda menos quantidade de material vegetal, não destrutiva e que não altera os constituintes dos óleos voláteis, que podem ser armazenados na própria fibra para posterior análise. É necessário estabelecer um método que adeque a fibra mais eficiente e as condições de amostragem. E as desvantagens comumente observadas no uso do método são a dificuldade de análise dos componentes traço, a dificuldade de calibrar curvas para análise quantitativa e a produção de artefatos provenientes dos ingredientes da fibra (Belliardo *et al.* 2006).
- **CO₂ supercrítico** – mais de 90% das extrações com fluído supercrítico são realizadas com CO₂, pois este gás tem baixa pressão (74 bar) e temperatura crítica (32°C), é relativamente não-tóxico, não-inflamável e disponível em alta pureza a relativamente baixo custo, além de ser facilmente removido do material. Dessa forma, submetendo-

se o CO₂ a pressão e temperatura acima dos seus valores críticos, este adquire um estado supercrítico com a polaridade comparável à do pentano e melhor afinidade por compostos lipofílicos, que permite extrair os óleos voláteis do material vegetal e retornando às condições iniciais o gás volatiliza, restando apenas o produto da extração. Os parâmetros de extração, no entanto, são fundamentais para determinar a eficiência do método em relação ao rendimento e seleção dos compostos alvo (Pourmortazavi & Harjimirsadeghi 2007).

O próprio método de extração utilizado pode ser considerado um fator de variabilidade em relação à determinação da composição química dos óleos voláteis, pois cada método tem sua particularidade. Contudo, os fatores que afetam a produção natural dos óleos voláteis e a sua composição nas plantas são:

-Localização geográfica – as diferentes características geográficas e edafo-climáticas interferem diretamente sobre o modo como as plantas adaptam-se e desenvolvem-se, influenciando assim na produção dos metabólitos secundários produzidos de acordo com a sua necessidade (Hartmann 2007), como observado por Schwob *et al.* (2004) em que o estudo da composição dos óleos voláteis de *Hypericum perforatum*, comparada com a de outros cinco trabalhos prévios de espécimes coletadas em diferentes localidades como Índia, Sérvia e Turquia, apresentou apenas dois componentes em comum a todos.

-Sazonalidade – a variação climática própria das estações do ano pode influenciar na composição química dos óleos voláteis, como em *Ocimum basilicum* cujo teor de monoterpenos oxigenados é maior no inverno e de sesquiterpenos hidrocarbonetos é maior no verão (Hussain *et al.* 2008).

-Fase fenológica – a composição química dos óleos voláteis pode variar de acordo com a idade da planta e a fase fenológica em que se encontra, como observado em *Guarea macrophylla*, que produz níveis mais altos de sesquiterpenos hidrocarbonetos, considerados mais voláteis, nos meses correspondentes às fases de floração e frutificação, possivelmente para favorecer sua polinização e dispersão (Lago *et al.* 2007), bem como entre espécimes masculinas e femininas de plantas dióicas, devido à maior alocação de energia e nutrientes para a formação e desenvolvimento das estruturas reprodutivas em plantas femininas, como observado em *Baccharis trimera* (Lago *et al.* 2008).

-Biotipo – a composição química dos óleos voláteis de plantas aromáticas da mesma espécie que apresentam biotipos com e sem tricomas glandulares pode variar significativamente, como em *Artemisia annua* em que os monoterpenos ocorrem predominantemente no biotipo glandular (Tellez *et al.* 1999);

-Quimiotipo – a evolução das plantas em resposta às condições ambientais sob as quais viveram ao longo do tempo resultou em grande variabilidade genética, que promove diferenças químicas intraespecíficas nos óleos voláteis de plantas da mesma espécie, morfologicamente idênticas e até mesmo cultivadas nas mesmas condições ambientais (Lahlou 2004). Como exemplo, no estudo de duas populações de *Artemisia pedemontana* coletadas na Espanha foram identificados os quimiotipos “cânfora - 1,8-cineol” e “davanona” (Perez-Alonso *et al.* 2003).

-Condições de cultivo – a disponibilidade limitada de água pode restringir a biossíntese de terpenóides, como por exemplo a seca severa reduz a emissão de compostos orgânicos voláteis (Owen & Peñuelas 2005)

-Interação com o meio ambiente – a taxa de emissão de monoterpenos pode aumentar sob injúria e herbivoria (Owen & Peñuelas 2005)

-Combinação de vários fatores – a atividade da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), que transforma a fenilalanina em ácido cinâmico, precursor dos fenilpropanóides, é regulada por fatores internos e externos, como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e lesões (Santos 2004).

Assim como os metabólitos secundários em geral, os óleos voláteis estão envolvidos em diversas funções ecológicas no ambiente em que as plantas produtoras estão instaladas, como:

-Defesa contra herbivoria (Owen & Peñuelas 2005) – pode ser de várias naturezas: 1) **constitutiva**, quando a planta produz naturalmente o metabólito secundário, como por exemplo a produção do monoterpeno linalol por *Arabidopsis thaliana*, que apresenta atividade repelente sobre o afídio *Myzus persicae* (Gershenzon & Dudareva 2007); 2) **induzida**, quando a planta responde ao ataque por reconhecimento de um eliciador específico do seu herbívoro, o qual estimula uma cascata de sinais que promove a síntese *de novo* de compostos voláteis atuando como fitoalexinas. Assim, em *Nicotiana attenuata* o ataque da larva do fumo *Manduca sexta* é reconhecido por meio de um produto do processo de digestão de suas folhas, que estimula a emissão de altos níveis de cis- α -bergamoteno em resposta (Roda *et al.* 2004); 3) **direta**, quando a planta reage produzindo voláteis diretamente contra o seu herbívoro (Baldwin & Preston 1999), atuando como inibidores ou retardadores de crescimento, causando danos na maturação, reduzindo a capacidade reprodutiva ou levando-os à morte por supressão do apetite ou toxicidade direta (Viegas Junior 2003); e 4) **indireta**, em que a planta atrai os inimigos naturais do seu herbívoro, tais como predadores, parasitóides e patógenos, através da emissão de compostos voláteis, por exemplo a emissão de

mono- e sesquiterpenos pela planta atacada aumenta a eficiência de caça dos inimigos naturais de seu herbívoro (Baldwin & Preston 1999).

-Interações mutualísticas – os terpenos atuam como meios de comunicação entre espécies, pois são moléculas de baixo peso molecular, com alta pressão de vapor à temperatura ambiente e atuam em níveis muito específicos. Por exemplo, na relação planta-inseto, podem atuar como sinalizadores, como no caso do hidrocarboneto acíclico (E)- β -farneseno, um feromônio produzido pelos próprios afídios que sinaliza para que sofram metamorfose e deixem a planta hospedeira. Dessa forma, a própria planta ao emitir (E)- β -farneseno repele esses afídios (Gershenzon & Dudareva 2007).

-Há indícios de que monoterpenos atuam como **termo ou fotoprotetores** (Owen & Peñuelas 2005).

-Defesa contra microrganismos fitopatogênicos – plantas aromáticas podem responder à invasão de fitopatógenos produzindo fitoalexinas de caráter lipofílico, que podem atuar em nível molecular tendo como alvo principal a membrana celular desses microrganismos (Inoue *et al.* 2004), promovendo a perda do controle quimiosmótico (Gershenzon & Dudareva 2007). Um exemplo é o capsidiol, produzido por *Capsidium frutescens* e *Nicotiana tabacum* (Macías *et al.* 2007).

-Atração de polinizadores e dispersores de sementes – por serem sésseis, as plantas produzem compostos voláteis que atraem agentes polinizadores e dispersores, fato evidenciado por estudos que comprovam que terpenos são reconhecidos pelo aparelho olfativo dos insetos como em *Manduca sexta*, que apresenta células receptoras que respondem fortemente a certos monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados como o geraniol, (E)-nerolidol e farnesol (Gershenzon & Dudareva 2007).

As próprias funções ecológicas dos metabólitos secundários sobre as plantas que os produzem sugerem que os mesmos possam atuar similarmente com efeitos medicinais em humanos, de forma que produtos envolvidos na defesa vegetal contra microrganismos patógenos através de mecanismos de citotoxicidade, podem ser úteis como medicamentos antimicrobianos em humanos, assim como as substâncias envolvidas na defesa contra herbivoria através de ação neurotóxica, podem ter efeitos benéficos sobre humanos, atuando como anti-depressivos, sedativos, relaxantes musculares ou anestésicos (Briskin 2000).

Atualmente, estima-se que de 3.000 óleos voláteis conhecidos, 300 são comercialmente importantes na indústria farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária, cosmética e de perfumaria (Briskin 2000), sendo que a sua aplicação na aromaterapia corresponde a menos de 2% do mercado total de óleos voláteis (Burt 2004).

Existem poucos estudos que evidenciem os mecanismos de ação dos óleos voláteis. De um modo geral, a complexidade da composição química da maioria dos óleos voláteis confere-lhes baixa especificidade (Bakkali et al. 2008), pois a atividade biológica não é atribuída a um único mecanismo de ação, uma vez que a grande variedade de grupos químicos presentes permite que haja vários alvos na célula (Burt 2004). O caráter lipofílico permite que os óleos voláteis atravessem a membrana plasmática e a mitocôndria dos microrganismos, desestabilizando essas estruturas e tornando-as mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos celulares. Compostos fenólicos presentes nos óleos voláteis também atuam desestabilizando a membrana plasmática, interrompendo a bomba de prótons, a transferência de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular (Burt 2004).

Quando se estudam as atividades biológicas de óleos voláteis, além de conhecermos a ação dos componentes majoritários isolados, é muito importante considerarmos a ação sinérgica das moléculas que os compõem, pois é possível que a atividade atribuída aos majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo, que atuam na penetração, distribuição celular e fixação destes nas paredes e membranas (Bakkali et al. 2008). Por outro lado, é possível que o efeito do óleo como um todo seja menor do que de um ou mais componentes individualmente, caracterizando um efeito antagonista (Burt 2004).

Vários terpenos têm sido alvo de estudos nas últimas décadas para avaliação da atividade inseticida, podendo mencionar desde monoterpenos simples como o limoneno, o mirceno e a 1,2-epoxi-pulegona até os limonóides ou tetra-*nor*-triterpenos como o nível máximo de proteção natural contra insetos. Os principais mecanismos de ação atribuídos a terpenos superiores envolvem redução da capacidade reprodutiva, inibição ou retardamento do crescimento, danos na maturação e supressão do apetite, levando os insetos à morte por toxicidade direta ou inanição (Viegas Júnior 2003).

Vários estudos têm sido realizados com óleos voláteis de plantas e terpenos isolados, buscando novos tratamentos para o mal de Alzheimer, tendo como alvo principal a inibição da enzima acetilcolinesterase. O óleo volátil de folhas de *Centella asiatica* L., tradicionalmente indicada pela medicina Ayurvedica para restauração da juventude, memória e longevidade, é rico em monoterpenos como acetato de bornila, α -pineno, β -pineno e γ -terpineno, com comprovada atividade anticolinesterásica (Howes & Houghton 2003).

Um estudo realizado por Dorman & Deans (2000) para avaliar a atividade antimicrobiana de seis espécies de plantas aromáticas frente a nove cepas de bactérias gram-positivas e 16 gram-negativas demonstrou que os melhores resultados obtidos foram observados para os óleos voláteis de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare* (Lamiaceae) e *Syzygium aromaticum* (Myrtaceae), além dos compostos isolados timol, carvacrol e α -

terpineol. Botelho *et al.* (2007) também comprovaram forte atividade antimicrobiana de timol e carvacrol frente a patógenos orais, bem como do óleo volátil extraído de *Lippia sidoides*, sugerindo o uso destes para o controle preventivo da cárie.

Os óleos voláteis de sete espécies de plantas aromáticas foram testados contra fungos filamentosos patogênicos através de duas metodologias diferentes. Tullio *et al.* (2007) observaram que os óleos mais ativos foram de *Thymus vulgaris* e *Eugenia caryophyllata* e que o ensaio por contato do vapor de óleo foi mais eficiente, possivelmente devido a uma deposição direta do óleo volátil sobre o micélio dos fungos, juntamente com um efeito indireto via adsorção através do meio de cultura.

Sabe-se que a composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena odorata* L. King & Rob. varia significativamente de acordo com o seu local de cultivo, obtendo-se compostos majoritários variados como α -pineno na Costa do Marfim (Bedi *et al.* 2001), β -cariofileno em Benin, África (Sohounhloue *et al.* 1996) e pregeijereno na Tailândia (Pisutthanan *et al.* 2006). Os óleos voláteis dessa espécie também apresentam atividade larvicida contra *Sitophilus zeamais*, provocando mortalidade total das larvas após 120 horas de exposição, à concentração de 0,5 % (Bouda *et al.* 2001) e atividade antifúngica contra os fungos *Pyricularia grisea*, *Phytophthora nicotianae* e *Fusarium oxysporum* (Ling *et al.* 2003).

Estudos realizados com óleos voláteis de espécimes de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. coletados em diferentes localizações demonstraram que as diferenças ambientais em que se desenvolvem indivíduos da mesma espécie podem influenciar em sua composição química (Oliveira *et al.* 1990; Maia *et al.* 2002). Adicionalmente, estudo realizado com a mesma espécie por Clavin *et al.* (1999) comprovou atividade antifúngica da infusão contra *Mucor miehei* e atividade antibacteriana do extrato diclorometanólico contra *Bacillus brevis*. Além disso, o estudo pré-clínico e clínico com pasta fitoterápica contendo extrato etanólico de folhas desta planta, utilizada popularmente para o tratamento de aftas bucais, demonstrou ações antiinflamatória e analgésica sobre estomatite ulcerada simples (Paulo Filho 2000).

Como apresentado no IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, realizado em Fortaleza/CE no ano de 2007, estudos vêm sendo desenvolvidos com plantas nativas para a viabilização de novos produtos naturais à base de óleos voláteis, como é o caso do óleo volátil de *Lippia sidoides*, pertencente à família Verbenaceae e popularmente conhecida como alecrim-pimenta, que devido às comprovadas atividades bactericida (Botelho *et al.* 2007) e fungicida (Fontenelle *et al.* 2007), atraiu o interesse de uma indústria local, que desenvolveu todo o processo de plantio, domesticação, colheita e extração do óleo para exportação (Craveiro 2007).

Considerado um dos países com maior biodiversidade do mundo, estima-se que o Brasil detém cerca de 10% de toda a biota terrestre (Machado *et al.* 2004). Estima-se que há aproximadamente 250.000 espécies de plantas no mundo, das quais cerca de 6% têm sido estudadas para atividades biológicas e 15% têm sido estudadas fitoquimicamente (Verpoorte 2000b), portanto a biodiversidade vegetal é uma fonte inesgotável de produtos naturais.

O domínio do Cerrado é o mais antigo dos ambientes terrestres, com cerca de 35 milhões de anos, por isso já atingiu o seu clímax evolutivo e encontra-se em declínio, dessa forma não tem mais o mesmo potencial de recuperação de uma floresta. Originalmente, ocupava mais de 2 milhões de km², correspondente a aproximadamente 25% do território brasileiro, como ilustra a Figura 7 (Felippe & Souza 2006), mas após intensa devastação antrópica, sua área remanescente é de apenas 20% da área original, condição esta que inclui o Cerrado entre os 25 “hotspots” de biodiversidade do mundo, tanto por concentração de espécies endêmicas, por exemplo o pequi (*Caryocar brasiliense*), como pelo grau de ameaça do seu habitat (Myers *et al.* 2000). Caracteriza-se por duas estações distintas: uma seca e outra chuvosa. O solo deste domínio é formado por três tipos: latossolos (46%), podzolicos (15%) e areias quartzosas em geral (15%). São solos profundos, oligotróficos, ácidos e aluminotóxicos. A região corresponde ao reservatório hídrico da América do Sul, uma vez que é o berço das maiores bacias hidrográficas do país e abriga três grandes aquíferos: o Guarani, considerado o maior do mundo, Urucuia e Bambuí (Felippe & Souza 2006). Considerada uma “floresta de cabeça para baixo”, a biomassa subterrânea do Cerrado muitas vezes é maior que a aérea, uma vez que o bioma é periodicamente renovado pelo fogo, e as características da vegetação como árvores baixas de troncos tortuosos e cascas grossas, esclerofilia e microfilia, sugerem que sejam resultado de um escleromorfismo oligotrófico, por escassez de nutrientes, ou um xeromorfismo aluminotóxico, por excesso de íons aluminotóxicos (Rizzini 1997). No Estado de São Paulo, estima-se que em 1992 havia cerca de 7% de áreas remanescentes, sendo que apenas 0,51% dessas áreas são protegidas por unidades de conservação (Kronka *et al.* 1998). Dessa forma, a Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, correspondente a uma das áreas de estudo deste trabalho, atua como área de conservação e pesquisa dentro do Estado de SP (Figura 8), e possui área aproximada de 343 ha, clima mesotérmico com inverno seco, temperatura média anual de 27°C e precipitação média anual de 1177 mm (Mantovani 1987).



Figura 7. Mapa identificando a área original do Cerrado brasileiro (Felippe & Souza 2006).

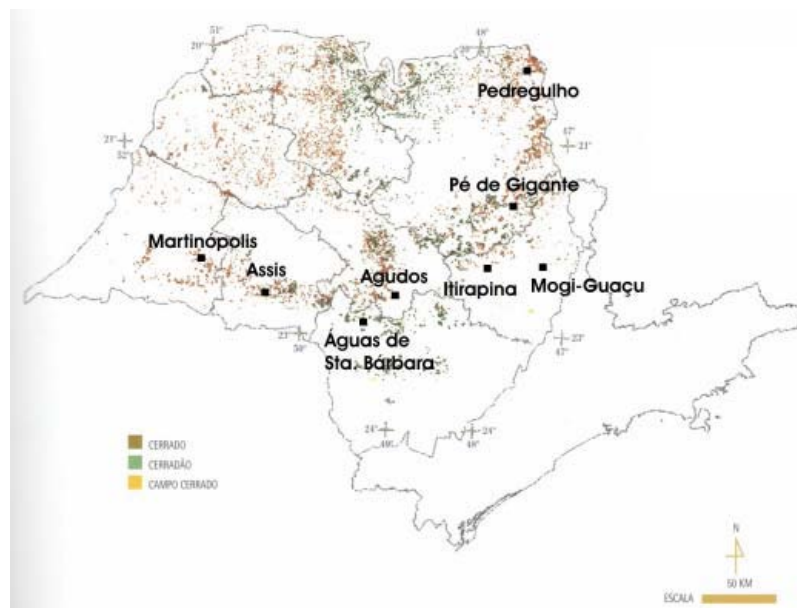


Figura 8. Mapa de algumas unidades de conservação do Cerrado no Estado de São Paulo.

O Domínio da Mata Atlântica corresponde à segunda maior floresta pluvial tropical da América, que no passado cobria mais de 1,5 milhões de km², correspondente a 15% do território nacional (Tabarelli *et al.* 2005), e atualmente estima-se que restam apenas aproximadamente 7% de áreas remanescentes, conforme ilustra a Figura 9 (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2008; Myers *et al.* 2000), classificando este bioma na lista mundial denominada “the hottest hotspots”, que considera o número de endemismos, a razão entre espécies endêmicas por área tanto para vegetais como para animais, e perda de habitat (Myers *et al.* 2000). Um exemplo de espécie endêmica da Mata Atlântica é o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*). No Estado de São Paulo, estima-se que restam aproximadamente 13% de áreas remanescentes (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2008), das quais faz parte o Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, considerado um remanescente florestal inserido na metrópole, com cerca de 526 ha, clima mesotérmico úmido, temperatura média anual de 19°C e precipitação média anual de 1540 mm (Santos & Funari 2002).

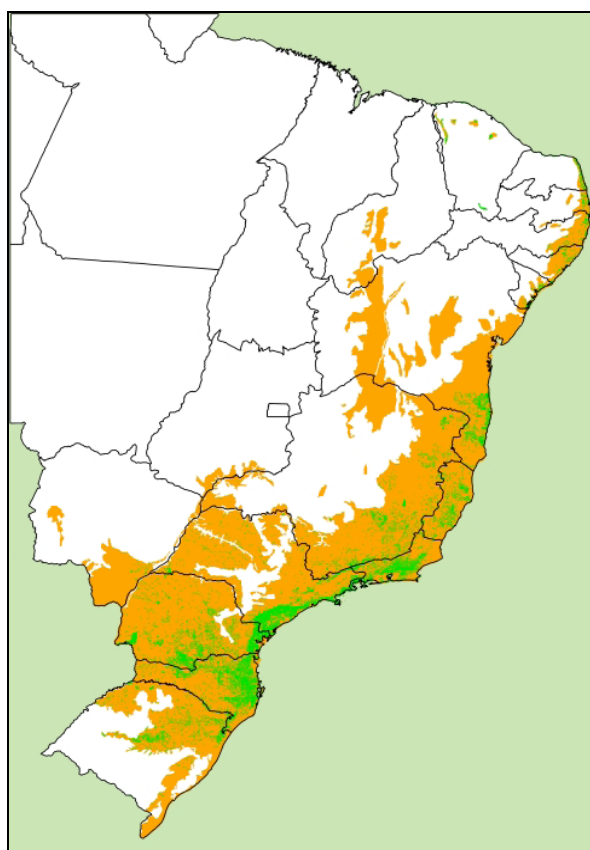


Figura 9. Mapa identificando a área original e os remanescentes florestais da Mata Atlântica no Brasil (Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica 2008).

A família Asteraceae é dividida em três subfamílias e 17 tribos, com aproximadamente 23.000 espécies distribuídas em 1.535 gêneros, constituindo uma das maiores famílias de Angiospermas (Bremer 1994). No Brasil, estima-se que há aproximadamente 180 gêneros e 3.000 espécies (Hind 1993). Os representantes dessa família apresentam distribuição cosmopolita e são encontrados em todos os continentes, com exceção do Antártico (Barroso 1991; Judd *et al.* 1999). O grande sucesso da família, capaz de adaptar-se a várias condições ambientais e ecológicas, é justificado por seus caracteres derivados, tais como: predominância de plantas de pequeno porte (cerca de 98%) e raramente árvores (Barroso 1991); flores reunidas em capítulos, isolados ou agrupados em inflorescências; frutos secos indeiscentes com apenas uma semente e testa aderida ao endocarpo formando cipelas, cujo cálice é altamente modificado em pápus cerdosos, plumosos ou aristados, diretamente relacionados com a dispersão anemocórica ou epizoocórica (Bremer 1994); indumento foliar variável, desde lâmina foliar glabra até a presença de tricomas tectores e glandulares; e produção de grande diversidade de substâncias químicas, como frutanos do tipo inulina em *Vernonia herbacea* (Carvalho *et al.* 1997), alcalóides pirrolizidínicos em espécies de *Senecio* (Silva *et al.* 2006), lactonas sesquiterpênicas em espécies de *Artemisia* (Iranshahi *et al.* 2007) e óleos voláteis em espécies de *Baccharis* (Agostini *et al.* 2005).

A Tribo Eupatorieae Cass., classificada na subfamília Asteroideae (Cass.) Lindl., possui a maioria de seus representantes no Novo Mundo, com predomínio absoluto no hemisfério ocidental. Tem sofrido um processo de fragmentação nas últimas três décadas, com a contribuição de numerosos trabalhos de sistemática e estudos filogenéticos baseados em dados moleculares, principalmente a partir dos sistemas mais recentes de classificação APG I e APG II (King & Robinson 1987; Esteves 2001). Atualmente, esta tribo é composta por 180 gêneros, dentre os quais encontra-se o gênero *Eupatorium*, que inicialmente abrangia quase 1.200 espécies e recentemente foi reestruturado por R.M. King & H. Robinson em aproximadamente 80 gêneros diferentes, dentre eles *Chromolaena* (Esteves 2001).

O gênero *Chromolaena* R.M. King & H. Robinson, do grego *chroma* (= colorido) e *laina* (=manto), tem como característica marcante as brácteas involucrais coloridas. É formado por ervas, subarbustos ou arbustos eretos, com ramos cilíndricos, pubescentes e glanduloso-pontoados, folhas simples, opostas, glabras ou com indumento variado e apresentam capítulos com (4-)5-75 flores. Constitui o segundo maior gênero dentro da tribo Eupatorieae, formado por cerca de 170 espécies distribuídas do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina. No Brasil ocorrem cerca de 80 espécies, com 24 no Estado de São Paulo (Esteves 2001).

Chromolaena laevigata (Lam.) R.M. King & H. Robinson possui a sinonímia de *Eupatorium laevigatum* Lam. e é popularmente conhecida como cambará-falso, cambarazinho, mata-pasto, cambará ou eumatório. É uma planta perene, arbustiva até 2,5m de altura e ramificada. Suas folhas são simples, opostas, trinérveas, com lâmina coriácea, elíptica, glabra nas duas faces, ápice agudo e margem serrada. Suas inflorescências possuem capítulos com 15-18(-25) flores, dispostos em cimas corimbiformes, congestas, terminais. As flores possuem corola lilás, glanduloso-pontuada, formando posteriormente cipselas com tricomas esparsos e pápus alvacentos de cerdas finas (Lorenzi 1991; Esteves 2001). Distribui-se na América tropical e subtropical, desde o México até o norte da Argentina. No Estado de São Paulo, foi coletada em cerrado, bordas de floresta e áreas de vegetação alterada, como invasora de pastos e lavouras e em margens de estradas (Esteves 2001).

Tendo em vista o uso popular desta espécie e a escassez de estudos que comprovem o seu potencial medicinal, este trabalho visou comparar a composição química e as atividades biológicas de óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) Kig & Rob. provenientes de populações de ocorrência natural em áreas de Cerrado e Mata Atlântica no Estado de São Paulo e uma população cultivada no Instituto de Botânica nas diferentes fases fenológicas, durante o período de dois anos, de modo a ampliar o conhecimento sobre a espécie e explorar o seu potencial econômico.

2. Objetivo

Avaliar a composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* (Lam.) R.M. King & H. Rob. de populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu e no Instituto de Botânica e de plantas cultivadas no Instituto de Botânica, em diferentes fases fenológicas, no período de dois anos.

Testar as atividades biológicas dos óleos obtidos através de ensaios antifúngicos, antimicrobianos e anticolinesterásico.

3. Material e Métodos

3.1. Material vegetal e delineamento experimental

O material testemunho foi depositado no Herbário do Instituto de Botânica (SP). Foram realizadas quatro coletas de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. por ano, nos anos de 2007 e 2008, correspondentes às fases vegetativa e reprodutiva, esta última dividida em fase de floração, frutificação e dispersão de sementes (Figura 10), definidas ao longo do desenvolvimento observado em cada população estudada, conforme a Tabela 1. Para tanto, foram analisados de 15 a 30 indivíduos por coleta para cada população, dos quais foram utilizados ramos e folhas secos e inflorescências (capítulos) e infrutescências (cipselas) frescas das populações de ocorrência natural do Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) e da Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e da população cultivada no Instituto de Botânica (PCIB) a partir de sementes coletadas da população local.

Algumas dificuldades foram encontradas ao estudar plantas de um local distante: uma foi acompanhar o desenvolvimento fenológico das plantas, uma vez que cada população tinha o seu ritmo, fato observado mesmo entre as populações de ocorrência natural e cultivada no Instituto de Botânica, outra foi agendar as viagens de coleta, que deviam ser marcadas com data certa até o dia 15 do mês anterior a cada coleta. Dessa forma, mesmo acompanhando o desenvolvimento fenológico das populações localizadas no PEFI, tivemos algumas dificuldades em sincronizar as coletas no Cerrado de Mogi-Guaçu. Na primeira coleta, em janeiro de 2007, correspondente à fase vegetativa, alguns espécimes isolados já apresentavam-se em início de formação de gemas florais no ápice da planta e, na terceira coleta, em maio de 2007, correspondente à fase de frutificação, a maioria dos espécimes já encontravam-se em fase de dispersão de sementes, havendo alguns espécimes ainda com frutos imaturos espalhados pelo campo, os quais foram coletados. Por esse motivo, algumas coletas em Mogi-Guaçu foram adiantadas no ano de 2008, correspondentes às fases vegetativa e de frutificação. A Tabela 1 apresenta as datas das coletas realizadas nos anos de 2007 e 2008, correspondentes às diferentes fases fenológicas das três populações em estudo.

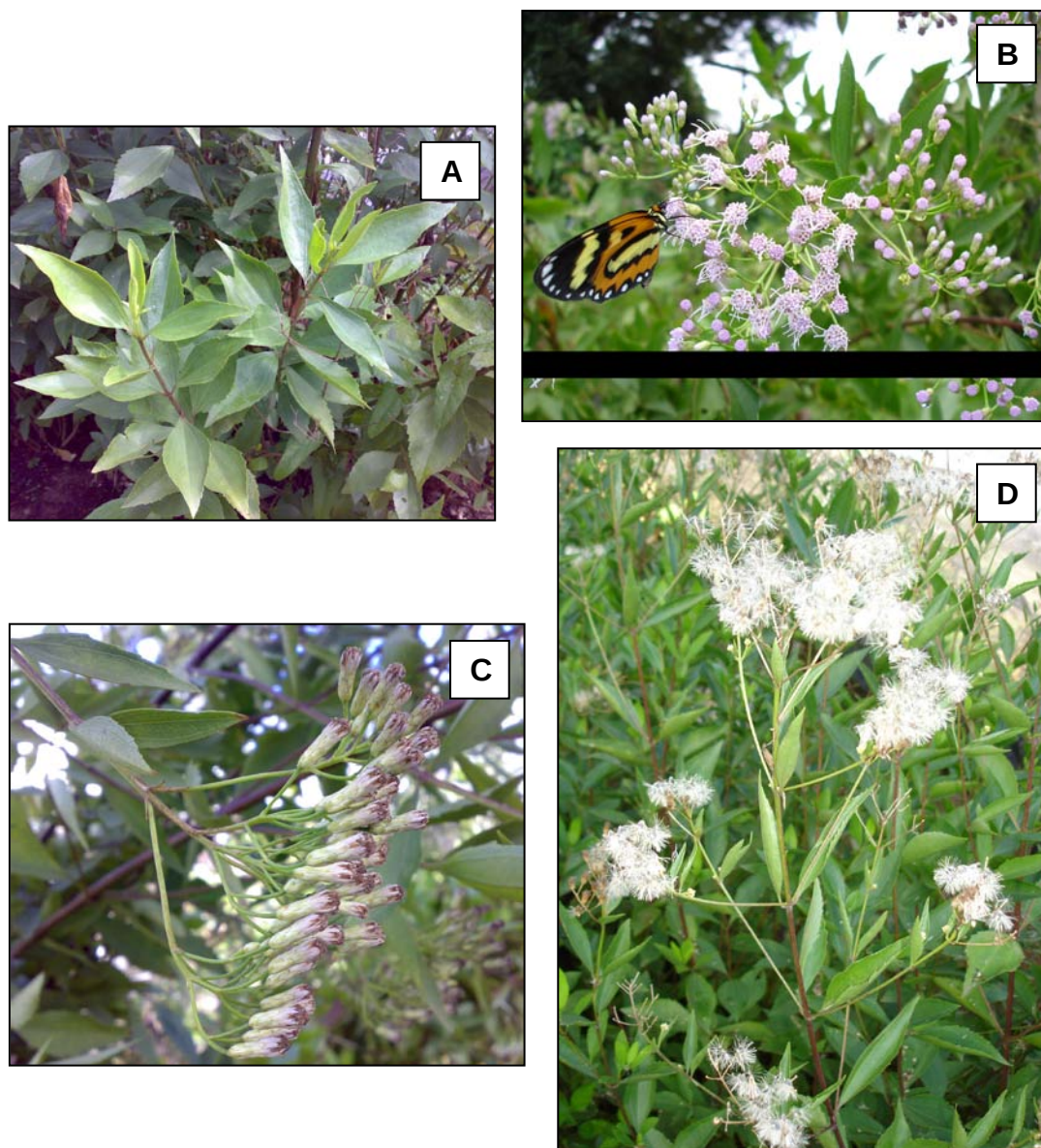


Figura 10. Plantas de *Chromolaena laevigata* nas fases vegetativa (A), de floração (B), de frutificação (C) e de dispersão (D).

Tabela 1. Datas das coletas das populações de *Chromolaena laevigata* de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG), na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB), realizadas nos anos de 2007 e 2008, em diferentes fases fenológicas.

	Fase vegetativa	Fase de floração	Fase de frutificação	Fase de dispersão
PONCMG	19.01.07	04.04.07	09.05.07	09.05.07
	12.12.07	02.04.08	25.04.08	15.05.08
PONMAIB	22.01.07	19.03.07	18.04.07	16.05.07
	17.12.07	24.03.08	17.04.08	26.05.08
PCIB	22.01.07	20.03.07	18.04.07	16.05.07
	17.12.07	12.03.08	31.03.08	28.04.08

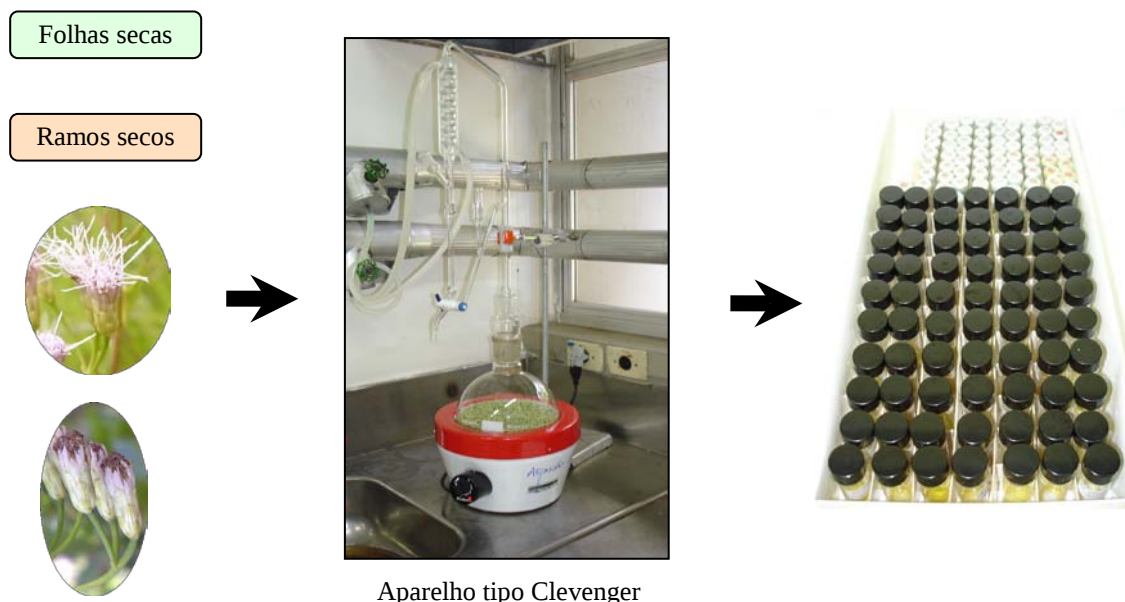
3.2. Condições de cultivo das plantas cultivadas no Instituto de Botânica

As sementes da população de ocorrência natural do Instituto de Botânica foram coletadas durante a fase de dispersão, em maio de 2006, postas para germinar em bandejas contendo substrato da marca Plantmax Café e mantidas em casa de vegetação, na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica, irrigadas periodicamente. Após o período de 3 meses, 54 vasos de 2L de capacidade foram preparados com o mesmo substrato e cascalhos no fundo, nos quais foram transplantadas 3 mudas por vaso, irrigadas diariamente e mantidas na estufa por mais um mês. Após este período, foram transplantadas para canteiros definitivos da Seção e irrigadas diariamente.

3.3. Obtenção do óleo volátil

Ramos e folhas foram secos à sombra, à temperatura ambiente, em casa de vegetação, por cerca de 30 dias. Inflorescências (capítulos) e infrutescências (cipselas) foram utilizadas frescas, sendo estas transportadas em caixa de isopor com gelo e armazenadas em congelador a -22°C quando coletadas em Mogi-Guaçu. Optou-se por extração de ramos e folhas secos por uma questão de padronização em relação ao material coletado em Mogi-Guaçu, uma vez que a quantidade de ramos e folhas era muito grande para ser transportado em caixa de isopor com gelo e por isso, durante o transporte até o Instituto de Botânica, este material desidratava. Este material foi então submetido à hidrodestilação, com a utilização de aparelho tipo Clevenger, pelo período de 3 horas. O óleo volátil obtido foi retirado junto com parte do hidrolato, extraído em pentano e desidratado com sulfato de sódio anidro. O pentano foi retirado com o auxílio de evaporador rotatório e o óleo volátil puro foi armazenado em frascos de vidro com tampa, em congelador à temperatura de -22°C (Farmacopéia brasileira 2001; OMS 1992). Observou-se a formação de cristais em forma de agulha nos óleos obtidos de capítulos das três populações e de cipselas das populações provenientes da Mata Atlântica, no ano de 2007, quando submetidos à refrigeração.

O rendimento de óleo volátil foi calculado com base na massa de óleo volátil obtido em relação à massa de material vegetal utilizado, multiplicado por 100. Os valores foram dados em porcentagem.



Fluxograma 1. Etapas utilizadas para a obtenção dos óleos voláteis.

3.4. Análise química

As amostras de óleos voláteis e do cristal isolado foram diluídas em acetona na razão de 1:100 (V/V para óleos e m/V para o cristal) e analisadas quali- e quantitativamente em cromatografia a gás, em aparelho Agilent (série 6890) Hewlett-Packard, acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector), com energia de ionização de 70eV. A coluna capilar utilizada foi HP 5-MS (30m x 0,25mm de diâmetro interno, com 0,25 em de espessura), nas seguintes condições: injetor (com divisão de fluxo-split/splitless) a 250°C (razão de divisão 1: 20), temperatura de aquecimento da coluna de 40 a 240°C a 3°C min⁻¹, 40°C por 10 min (tempo total de análise 78 min) utilizando Helio como gás de arraste a uma pressão de 80 Kpa e velocidade linear de 1 mL min⁻¹. Nitrogênio, ar sintético e hidrogênio foram utilizados como gases auxiliares, na razão de 1:1:10, respectivamente. O índice de retenção de Kováts (IK) foi calculado em coluna HP 5-MS, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (C₅-C₃₀) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica (Anexo).

3.5. Identificação dos componentes

A identificação dos componentes do óleo foi baseada na comparação dos espectros de massas destes com os das bibliotecas instaladas no equipamento Wiley 275 e Adams 2007, do índice de retenção de Kováts destes, calculados a partir de uma série homóloga de *n*-alcanos de C₅-C₃₀, dados retirados da literatura (Adams 2007) e por comparação com espectros de

massas registrados em bancos de dados como NIST 62 e NIST 12 (National Institute of Standards and Technology), onde são registrados mais de 65.000 compostos.

O índice de retenção de Kováts foi obtido através da seguinte equação:

$$I = \frac{100z + 100(\log t'_{RX} - \log t'_{RZ})}{(\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ})}$$

Onde: z = número de átomos de carbono com menor peso molecular.

t'_{RX} = tempo de retenção do composto x, sendo que t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e t'_{R(Z+1)}.

t'_{RZ} e t'_{R(Z+1)} = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

Os cromatogramas foram reintegrados com pico inicial de 0,70% para os compostos.

3.6. Atividades Biológicas

3.6.1. Avaliação da atividade antifúngica pelo método de bioautografia direta

Os ensaios de atividade antifúngica por bioautografia em placas de sílica gel foram realizados no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

3.6.1.1. Preparo das amostras

Amostras dos óleos (5 µL) e do cristal isolado (2,5 mg) foram pesadas em balança analítica (Ohaus) e diluídas em acetona para obter-se concentrações de 200, 100, 50, 25, 10 e 5 µg em 10 µL.

3.6.1.2. Obtenção dos microrganismos

Cepas dos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, obtidos da micoteca do Instituto de Botânica da São Paulo, foram incubados em meio de cultura BDA (Batata, Dextrose, Agar – Difco) a 22°C por 14 dias. Após esse período foi feita a extração dos esporos com solução de sais e glicose (6:1). A suspensão foi filtrada e armazenada a -18°C para posterior nebulização nas cromatofolhas.

3.6.1.3. Ensaio antifúngico

Amostras contendo 200, 100, 50, 25, 10 e 5 µg dos óleos e do cristal isolado e 1 µg do controle positivo Nistatina foram aplicadas em cromatofolhas de alumínio de sílica gel GF254 Merck®. As placas foram nebulizadas com a suspensão de sais e glicose (6:1) contendo esporos dos fungos (> 2x10⁶ esporos.mL⁻¹) e incubadas em câmara úmida a 27°C, no escuro, por 48 horas (Homans & Fuchs 1970, Rahalison *et al.* 1994). Após o período de incubação,

zonas claras de inibição do crescimento do(s) fungo(s) em contraste com um fundo de coloração escura foram observadas nas amostras que apresentaram atividade.

3.6.2. Avaliação da atividade antifúngica pelo método de microdiluição

O ensaio de atividade antifúngica pelo método de microdiluição foi realizado no laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.6.2.1. Preparo das amostras

Amostras de óleos voláteis e cristais foram diluídas na proporção de 1:4 (v:v) e na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, em Dimetilsulfóxido(DMSO)/Metanol (1:1), de modo que a proporção final no ensaio fosse de $3,125 \mu\text{L de óleo.mL}^{-1}$.

3.6.2.2. Obtenção dos microrganismos

Para cada ensaio, o fungo leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231) foi incubado em tubos inclinados contendo o meio Sabouraud Dextrose Ágar (SDA, Difco) a 25°C , por 24 h. Ao final deste período, os microrganismos foram ressuspensos com solução salina (0,85 %) e submetidos à padronização através de diluição seriada, onde as diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 foram plaqueadas em duplicata, utilizando meio SDA, em seguida incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C (Tortora *et al.* 2000). As suspensões microbianas padronizadas posteriormente foram diluídas com solução salina e inoculadas no meio de cultura líquido SDB (Sabouraud Dextrose Broth), de modo que a concentração final de microrganismos em cada cavidade da microplaca apresentasse um número de 200 a 400 UFC (Unidades Formadoras de Colônia) em $200 \mu\text{L}$.

3.6.2.3. Ensaio antifúngico

A distribuição das substâncias nas microplacas, com 96 cavidades, obedeceu a um padrão pré-estabelecido com a presença de controle do meio ($200 \mu\text{L}$ de meio SDB sem microrganismos), controle de crescimento ($200 \mu\text{L}$ de meio SDB com microrganismos), controle negativo ($190 \mu\text{L}$ de meio SDB inoculado com microrganismos acrescido de $10 \mu\text{L}$ de DMSO: MeOH – 1:1) e controle positivo ($190 \mu\text{L}$ de meio SDB inoculado com microrganismos acrescentando $10 \mu\text{L}$ do antifúngico), em quatro repetições. O antibiótico utilizado foi a Nistatina na concentração de 1mg mL^{-1} . Amostras dos óleos voláteis ($10 \mu\text{L}$) já diluídas em DMSO:MeOH (1:1) foram adicionadas nas cavidades contendo $190 \mu\text{L}$ de meio SDB com microrganismos, em duplicata. Para se obter um controle do número de colônias

por cavidade, 200 μL do meio inoculado foram plaqueados em duplicata. As placas e microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica por 48h na temperatura de 25°C. Após o período de incubação, foram feitas a contagem do número de colônias nas placas e a leitura das microplacas em leitor (SLT Spectra) em $\lambda = 630\text{nm}$ (Salie *et al.* 1996, Willinger *et al.* 2000, Devienne & Raddi 2002).

3.6.3. Avaliação da atividade antibacteriana pelo método de microdiluição

Os ensaios de atividade antibacteriana pelo método de microdiluição foram realizados no laboratório de Controle Microbiológico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

3.6.3.1. Preparo das amostras

Amostras de óleos voláteis e cristais foram diluídas na proporção de 1:4 (v:v) e na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente, em Dimetilsulfóxido(DMSO)/Metanol (1:1), de modo que a proporção final no ensaio fosse de 3,125 μL de óleo. mL^{-1} .

3.6.3.2. Obtenção dos microrganismos

Para cada ensaio, os microrganismos, *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 8538), foram incubados em tubos inclinados contendo o meio Tryptose Soya Agar (TSA, Difco) a 37°C, por 24 h. Ao final deste período, os microrganismos foram ressuspensos com solução salina (0,85 %) e submetidos a padronização através de diluição seriada, onde as diluições 10^4 , 10^5 e 10^6 foram plaqueadas em duplicata, utilizando meio TSA, em seguida incubadas em estufa bacteriológica, por 24h, na temperatura de 35°C (Tortora *et al.* 2000). As suspensões microbianas padronizadas posteriormente foram diluídas com solução salina e inoculadas no meio de cultura líquido TSB (Tryptose Soya broth), de modo que a concentração final dos microrganismos em cada poço da microplaca apresentasse um número de 200 a 400 UFC em 200 μL .

3.6.3.3. Ensaio antibacteriano

A distribuição das substâncias nas microplacas, com 96 cavidades, obedeceu a um padrão pré-estabelecido, com a presença de controle do meio (200 μL de meio TSB sem microrganismos), controle de crescimento (200 μL de meio TSB com microrganismos), controle negativo (190 μL de meio TSB inoculado com microrganismos acrescido de 10 μL de DMSO: MeOH – 1:1) e controle positivo (190 μL de meio TSB inoculado com

microrganismos acrescentando 10 µL do antibiótico), em quatro repetições. Os antibióticos utilizados neste ensaio foram Cloramfenicol (1mg mL⁻¹) para *S. aureus* e *E. coli* e Amicacina (1mg mL⁻¹) para *P. aeruginosa*. Amostras dos óleos voláteis (10 µL) já diluídas em DMSO:MeOH (1:1) foram adicionadas nas cavidades contendo 190 µL de meio TSB com microrganismos, em duplicata. Para se obter um controle do número de colônias por cavidade, 200 µL do meio inoculado foram plaqueados em duplicata. As placas e microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica, por 24h, na temperatura de 35°C. Após o período de incubação, foram feitas a contagem do número de colônias nas placas e a leitura das microplacas em leitor (SLT Spectra) em $\lambda = 630\text{nm}$ (Salie *et al.* 1996, Willinger *et al.* 2000, Devienne & Raddi 2002).

3.7. Medida da atividade da acetilcolinesterase

3.7.1 Ensaio quantitativo em microplaca

Os ensaios de atividade anticolinesterásica foram realizados no Instituto de Botânica de São Paulo – Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

3.7.1.1. Preparo das amostras

Amostras dos óleos (5 µL) foram pesadas em balança analítica (Ohaus) e diluídas em metanol para se obter 300 µg em 5 µL.

3.7.1.2 Ensaio anticolinesterásico

Para a realização do ensaio foram preparadas previamente as seguintes soluções: Solução A: Tris/HCl 50 mM, pH=8; Solução B Tris/HCl 50mM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina fração V; e Solução C: Tris/HCl 50mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂ .6H₂O. Para cada cavidade da placa foram adicionados 25µL de iodeto de acetiltiocolina 15 mM, 125µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] 3 mM na solução (C), 50µL da solução (B) e 25µL da amostra do óleo diluída 10 vezes na solução (A). Após esse preparo, foi medida a absorbância a 405 nm em leitor KC4-Biotek a cada 30 segundos por três vezes. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase (0,22 U mL⁻¹) e a absorbância medida novamente a cada 10 minutos por 2 vezes (Ellman *et al.* 1961, Rhee *et al.* 2001). A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10% de MeOH na solução A, atividade total AChE=100%).

4. Resultados e Discussão

A figura 11 mostra os dados de precipitação total, umidade relativa do ar e temperaturas médias máxima e mínima da RBEE de Mogi-Guaçu e do PEFI, correspondentes ao período de dezembro de 2006 a maio de 2008, ilustrando o ciclo entre o mês que antecedeu a primeira até o mês da última coleta para compreendermos melhor as variações climáticas do período. As estrelas coloridas indicam os meses em que as coletas foram realizadas (Tabela 1 – material e métodos), de acordo com as fases fenológicas das plantas de cada população. Os dados relativos à RBEE de Mogi-Guaçu foram obtidos na própria estação meteorológica da reserva, com exceção dos meses de janeiro a março de 2008 quando a mesma passou por reparos e dados alternativos foram cedidos pela empresa produtora de papel e celulose Chamflora Mogi Guaçu Agroflorestal Ltda., localizada na Rodovia SP 340, km 171, em Mogi-Guaçu. Os dados equivalentes em relação ao PEFI foram fornecidos pela Estação Meteorológica do Departamento de Ciências Atmosféricas do Instituto Agrônomo e Geofísico da USP (IAG/USP), localizada no próprio PEFI.

Alguns dados correspondem com dados já publicados, de acordo com os quais o clima do Cerrado de Mogi-Guaçu é classificado como Cwa, de Köppen, mesotérmico de inverno seco, com precipitação média anual de 1177 mm e umidade relativa do ar média anual de 75%, no entanto Mantovani & Martins (1993) definem a temperatura média anual em 27°C e a mesma foi registrada em 21°C durante o período estudado (Figura 11 A e Tabela 2). Santos & Funari (2002), por sua vez, caracterizaram o clima da região do PEFI pela classificação de Köppen como Cwb, mesotérmico úmido sem deficiência de água e com excesso no verão, com temperatura média anual de 19°C, precipitação média anual de 1540 mm e umidade relativa do ar média anual de 81%, semelhante ao observado no período de estudo (Figura 11 B e Tabela 2). Portanto, de um modo geral a Mata Atlântica é caracterizada por maiores índices de precipitação e umidade e temperaturas mais baixas do que no Cerrado, embora as temperaturas registradas no período de estudo tenham se mostrado próximas. No Cerrado foi observada maior amplitude de variação na umidade relativa do ar e uma distribuição de chuvas mais marcante ao longo do ano, caracterizada por verão chuvoso e inverno seco.

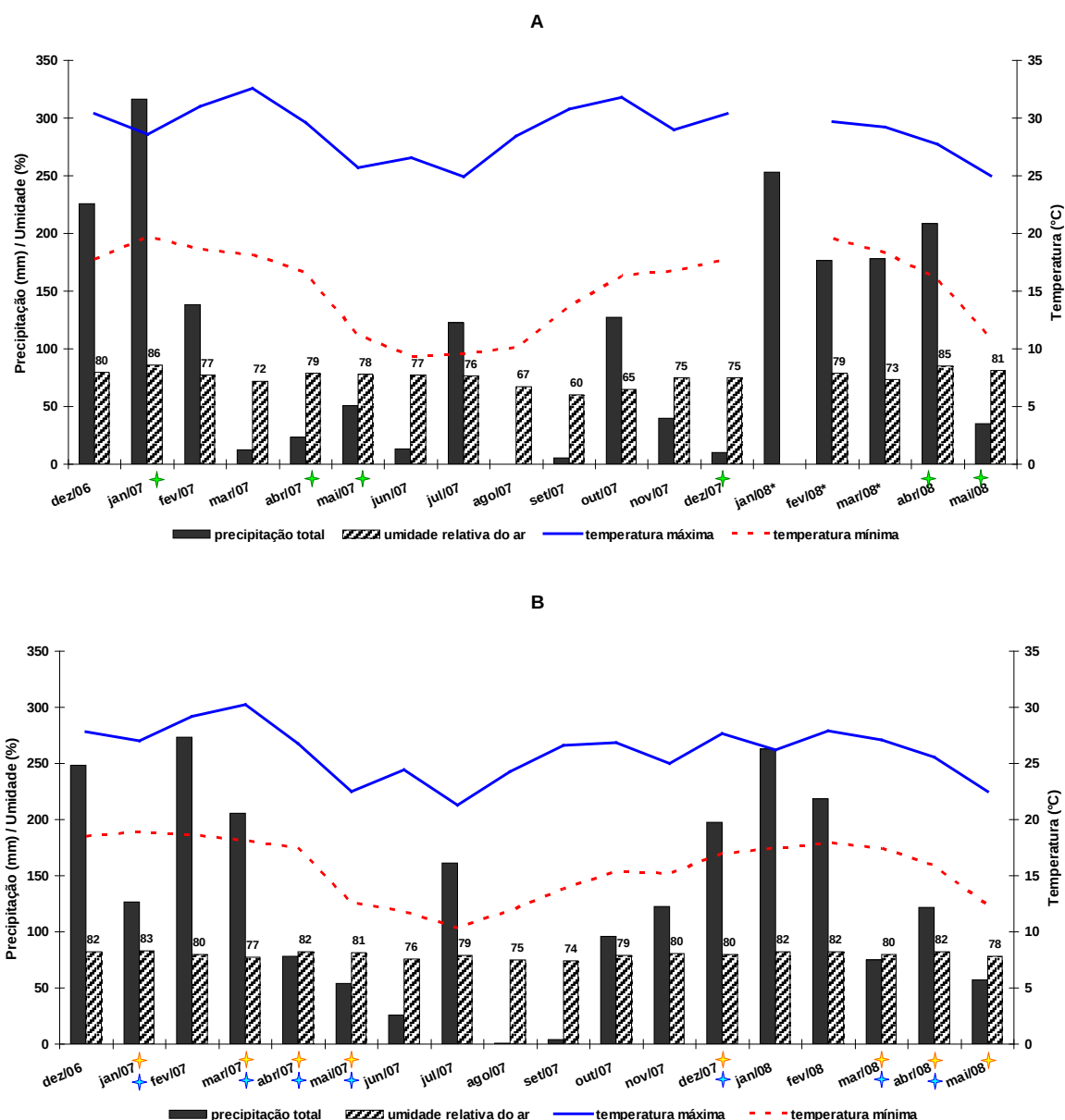


Figura 11. Temperaturas médias máxima e mínima, precipitação total e umidade relativa do ar média mensais registradas pela Estação Meteorológica da RBEE de Mogi-Guaçu, SP e pela Estação Meteorológica da Indústria Chamflora Mogi-Guaçu Agroflorestal Ltda., localizada em Mogi-Guaçu, SP (A; os asteriscos indicam os dados alternativos) e Estação Meteorológica do Departamento de Ciências Atmosféricas do IAG/USP, localizada no PEFI, SP (B), no período de dezembro de 2006 a maio de 2007. As estrelas indicam os meses em que houve coleta nas populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG, verde), na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB, amarelo) e da população cultivada no Instituto de Botânica (PCIB, azul) de *Chromolaena laevigata*.

Tabela 2. Dados médios de precipitação, umidade relativa do ar e temperatura da RBEE de Mogi-Guaçu (Cerrado) e do PEFI (Mata Atlântica). Período de junho de 2006 a maio de 2008.

Dados	RBEE de Mogi-Guaçu (Cerrado)	PEFI (Mata Atlântica)
Precipitação total (mm)	1143	1369
Umidade média (%)	74	79
Temperatura média (°C)	21	19

A Tabela 3 mostra o rendimento dos óleos voláteis extraídos por hidrodestilação de ramos, folhas, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata*, coletada nas três populações estudadas em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008. Os maiores teores de óleo volátil foram obtidos de folhas, em relação a ramos e órgãos reprodutivos, tendo sido em geral maiores no segundo ano de coleta. Observou-se também menor rendimento de óleo volátil nas folhas provenientes do Cerrado, que pode estar relacionado com as maiores temperaturas observadas em relação à Mata Atlântica (Figura 11 e Tabela 2), bem como com a maior espessura dessas folhas, característica marcante da vegetação deste bioma (Marques *et al.* 1999; Rizzini 1997). Como se trata de uma espécie herbáceo-arbustiva, que alcança até 2,5m de altura, folhas e ramos são anatomicamente bastante distintos, o que pode justificar as diferenças observadas.

Tabela 3. Rendimento dos óleos voláteis obtidos por hidrodestilação de ramos, folhas, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* coletadas em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 (cinza) e 2008 (sem preenchimento), das populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG), na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e da população cultivada no Instituto de Botânica (PCIB).

	Fase vegetativa		Fase de floração		Fase de frutificação		Fase de dispersão	
	Ramos (%)	Folhas (%)	Capítulos (%)	Ramos (%)	Folhas (%)	Cipselas (%)	Ramos (%)	Folhas (%)
PONCMG	0,05	0,33	0,16	0,13	0,40	0,12	0,15	0,39
	0,30	0,50	0,19	0,09	0,49	0,15	0,10	0,62
PONMAIB	0,24	0,74	0,23	0,23	0,80	0,21	0,26	0,77
	0,21	1,09	0,31	0,12	0,79	0,21	0,14	0,99
PCIB	0,19	0,79	0,13	0,13	0,77	0,19	0,14	0,59
	0,18	0,86	0,16	0,10	0,64	0,21	0,10	0,89

As Tabelas 4, 5 e 6 mostram a composição química dos óleos voláteis de *C. laevigata* provenientes das populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG), na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB), respectivamente, nos anos de 2007 e 2008, em diferentes fases fenológicas. Os óleos voláteis da primeira apresentaram 63 compostos e os das outras duas 60, tendo sido identificados 47 componentes destes óleos. Entre os compostos encontrados, as populações provenientes da Mata Atlântica apresentaram 52 constituintes em comum e 44 destes foram comuns à população proveniente do Cerrado. Também foi possível observar que os óleos voláteis de folhas das fases de frutificação e dispersão, principalmente no primeiro ano de estudo, apresentaram a maior variação qualitativa nas três populações estudadas, assim como demonstrado por Schwob *et al.* (2004) nos óleos voláteis de *Hypericum perforatum*, cujos óleos da fase de frutificação apresentaram maior número de compostos detectados.

Em todos os óleos voláteis analisados houve predominância de sesquiterpenos. Comparando as classes de compostos das três populações (Figura 12), observou-se que o teor de monoterpenos da população proveniente do Cerrado foi menor que o das populações provenientes da Mata Atlântica, dado semelhante ao observado por Potzernheim *et al.* (2006) nos óleos voláteis de *Piper dilatatum* provenientes de Cerrado e Mata Atlântica, possivelmente devido à maior temperatura e menor umidade e precipitação daquela região (Tabela 2), que desfavorece a manutenção de compostos mais voláteis, como os monoterpenos. Os monoterpenos hidrocarbonetos foram mais representativos que os oxigenados e, de um modo geral, os ramos apresentaram mais monoterpenos que as folhas. No ano de 2007, os óleos voláteis de ramos e folhas das populações provenientes da Mata Atlântica apresentaram redução no teor dessa classe de compostos na fase de floração, que voltou a aumentar nas fases de frutificação e dispersão, no entanto o padrão não se repetiu no ano seguinte, quando os teores não passaram de 12% em ramos e 8% em folhas. Essa flutuação de monoterpenos observada entre os dois anos, principalmente em relação aos teores de α -tujeno e α -pineno, coincidiu com o aumento dos componentes majoritários sesquiterpenos no ano de 2008, período de redução dos mesmos, como pode ser visto nas Tabelas 4, 5 e 6. Terpinen-4-ol foi o monoterpeno oxigenado comum aos óleos dos ramos e cipelas das populações provenientes da Mata Atlântica, ausente nos óleos da PONCMG.

Em relação aos sesquiterpenos, seis hidrocarbonetos [β -elemeno, (E)-cariofileno, (E)- β -farneseno, germacreno D, biciclogermacreno e β -bisaboleno] foram freqüentes em todos os óleos voláteis analisados nos dois anos de coleta, apenas variando o seu teor nas diferentes fases fenológicas, enquanto que os oxigenados tiveram distribuição desigual em relação aos órgãos de origem dos óleos, bem como fases fenológicas e anos de coleta, com exceção de

espatulenol, ausente apenas nos órgãos reprodutivos, e laevigatina e furanocadalenol, presentes em todos os óleos analisados (Tabelas 4, 5 e 6).

Nos óleos voláteis de todas as populações estudadas, houve um balanço entre os compostos majoritários laevigatina e espatulenol (Figura 13), predominando a primeira nos óleos das folhas e partes reprodutivas e o último nos óleos dos ramos, com exceção dos ramos da fase vegetativa das três populações no ano de 2007 e da população proveniente do Cerrado no ano de 2008, cujo composto majoritário foi a laevigatina. Além destes, de um modo geral também destacam-se, com picos acima de 5% de área (Figuras 13 e 14): α -pineno, bicicloelemeno, (*E*)-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, β -bisaboleno, β -copaeno-4- α -ol, muurola-4,10(14)-dieno-1- β -ol e furanocadalenol na PONCMG (Tabela 4); α -tujeno, α -pineno, sabineno, β -elemeno, germacreno D, biciclogermacreno, β -bisaboleno, β -copaeno-4- α -ol, muurola-4,10(14)-dieno-1- β -ol, eudesma-4(15),7-dieno-1- β -ol e furanocadalenol na PONMAIB (Tabela 5); e α -pineno, α -tujeno, sabineno, germacreno D, biciclogermacreno, β -bisaboleno, β -copaeno-4- α -ol, β -atlantol, germacra-4(15),5,10(14)-trieno-1- α -ol e furanocadalenol na PCIB (Tabela 6).

Cinco compostos foram encontrados exclusivamente nos órgãos reprodutivos: verboccidentafurano, dihidroisochromolaenina, NI 18, pirocurzerenona e NI 20. Verboccidentafurano e os compostos NI 18 e NI 20 foram encontrados somente nos óleos dos capítulos obtidos no ano de 2007, o primeiro foi ausente na PONMAIB, o segundo na PONCMG e o último foi encontrado apenas na PONMAIB. Estes compostos serão discutidos posteriormente.

Algumas tendências relacionadas às variações fenológicas puderam ser observadas entre alguns dos compostos majoritários identificados, principalmente entre as populações provenientes da Mata Atlântica (Figura 15). Pobres em α -tujeno, os ramos da PONCMG apresentaram o composto somente na fase de dispersão do segundo ano de coleta, enquanto que as populações provenientes da Mata Atlântica apresentaram altos teores do mesmo nas fases vegetativa e de frutificação com redução na fase de floração no primeiro ano, invertendo o padrão no segundo ano de estudo. O monoterpene hidrocarboneto α -pineno apresentou padrão semelhante nos ramos de todas as populações estudadas no primeiro ano, com redução na fase de floração e aumento nas seguintes, mas no segundo ano de estudo inverteu o padrão nas populações provenientes da Mata Atlântica. Em ramos, o germacreno D apresentou diminuição ao longo das fases fenológicas nos dois anos de estudo de todas as populações, mas em folhas essa variação foi irregular, tanto entre populações de Cerrado e Mata Atlântica como de um ano para o outro, não demonstrando tendência. De um modo geral, tanto em

ramos como em folhas observou-se um balanço entre os teores de espatulenol e laevigatina, em que o aumento de um coincidiu com a redução do outro. Portanto, o teor de espatulenol em ramos da PONCMG aumentou no decorrer do desenvolvimento fenológico nos dois anos, enquanto que nas populações da Mata Atlântica o seu teor aumentou na fase de floração e diminuiu na de frutificação no primeiro ano, variando de forma diferente no ano seguinte. Já em folhas, a laevigatina, apresentou menores teores nas fases de floração e frutificação, que corresponde às fases do desenvolvimento em que o composto é acumulado nos capítulos e nas cipselas, com aumento nas folhas durante a fase de dispersão. Capítulos e cipselas também apresentaram aumento no teor de laevigatina de um ano para o outro, acompanhado de diminuição dos teores de mono- e sesquiterpenos hidrocarbonetos.

O monotерpeno hidrocarboneto (E)- β -ocimeno pode estar relacionado com a reprodução, pois em *Psiadia boivinii* este composto é ausente na fase vegetativa e compõe 10% do óleo volátil das partes aéreas na fase de floração (Gauvin & Smadja 2005) e em *C. laevigata* esteve presente apenas nos óleos dos capítulos e cipselas.

A laevigatina, também conhecida como chromolaenina, foi isolada pela primeira vez do óleo volátil de *Chromolaena laevigata* (Lam.) King & Rob. por Oliveira *et al.* (1978). Estudos anteriores mostraram que a laevigatina é o composto majoritário nos óleos voláteis de todas as populações estudadas desta espécie, de Norte (RR) a Sul (RS), independentemente do seu local de coleta (Maia *et al.* 2002; Oliveira *et al.* 1990; Souza 2007), fazendo deste composto um marcador químico para a espécie em estudo. Também foi identificada em outras espécies de *Eupatorium* (Souza 2007) e em *Baccharis salicifolia* (Malizia *et al.* 2005), entre outros. Sob refrigeração, observou-se a formação de cristais em forma de agulha nos óleos dos capítulos de todas as populações e das cipselas das populações provenientes da Mata Atlântica, no ano de 2007, como previamente descrito por Oliveira *et al.* (1978) e Souza (2007). Não houve, entretanto, a formação de cristais nos óleos extraídos do material vegetal das mesmas populações coletadas em 2008, embora o teor de laevigatina tenha aumentado com relação aos óleos do ano anterior, possivelmente devido a mudanças na sua composição que modificaram a interação entre os compostos. Uma amostra de cristal proveniente do óleo volátil obtido de cipselas da PCIB foi analisada por CG/EM e revelou 100% de laevigatina em sua composição (Figura 16).

Trabalhos prévios têm demonstrado que cadinenos com anel furano, também conhecidos como furanocadinenos, como verboccidentafurano, laevigatina, furanocadaleno, pirocurzerenona e dihidroisochromolaenina, ilustrados na Figura 14, são característicos do gênero (Souza 2007). Uma vez que as bibliotecas do equipamento, Wiley 275 e Adams 2007, não foram capazes de identificar estes compostos, sua identificação foi realizada por

comparação dos seus índices de retenção e dos fragmentos dos seus espectros de massas com dados publicados na literatura (Maia *et al.* 2002; Malizia *et al.* 2005; Souza 2007; Takemoto *et al.* 1976).

Njoroge *et al.* (2003) atribuem o aparecimento de artefatos ao processo de estocagem do material vegetal em temperatura ambiente, propondo que o germacreno D pode converter-se em cadinenos, muurolenos e elemenos, enquanto que o biciclogermacreno converte-se em sesquiterpenos tricíclicos como aromadendreno, alloaromadendreno e viridifloreno, que por oxidação originam espatulenol, globulol, epiglobulol e cadinóis. Estudos demonstraram a atuação de sesquiterpenos do tipo germacreno como intermediários biogénéticos para certos grupos de sesquiterpenos do tipo cadinano, como α - e γ -cadineno, α - e γ -muuroleno, cadina-1,4-dieno, α -copaeno, α - e γ -amorfenos e α -ylangeno (Bülow & König 2000). O mesmo estudo revelou que os selinenos, sesquiterpenos com esqueleto eudesmano (selinano), podem ser produtos do rearranjo de sesquiterpenos do tipo germacreno.

A dihidroisochromolaenina é um sesquiterpeno presente em *Baccharis salicifolia*, com m/z 214 e índice de retenção de cerca de 37 após a laevigatina (Malizia *et al.* 2005). O furanocadaleno é produto da desidrogenação da laevigatina (Oliveira *et al.* 1978). A oxidação do furanocadaleno gera um sesquiterpeno de fórmula C₁₅H₁₄O₂, com m/z 226 (Oliveira *et al.* 1978), o qual supõe-se que corresponda a NI 18, que sai logo após o furanocadaleno e apenas nos óleos provenientes de cipselas das populações de Mata Atlântica coletadas no ano de 2007.

Tabela 4. Composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* coletada na população de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG), em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008.

Composto	IK 2007	IK 2008	Fase vegetativa				Fase de floração				Fase de frutificação				Fase de dispersão				IK ref				
			Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas			Ramos		Folhas	
			2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		2007	2008	2007	2008
α -tujeno	927	924											1,15							2,38			930
α -pineno	938	932	6,22	18,58		0,87		1,22	3,91	3,73			3,41	0,71	8,81		0,94		12,57	13,32	1,47		939
sabineno	973	972											0,94						0,96	1,24			975
mirceno	990												1,02										990
limoneno	1030	1025					0,85	1,25					1,71	0,89			1,84		1,08	1,25	2,41		1029
(E)- β -ocimeno	1053	1048					0,89	1,35					1,30	0,80									1050
α -canfolenal	1123														1,04								1126
(E)-sabinol	1149	1133	1,66	0,87											3,39								1142
(E)-verbenol	1145																		1,83				1144
2-(1Z)-propenyl-fenol	1141	1141								1,80						1,80				0,74			1150
mirtenal	1191															0,95							1195
verbenona	1203															1,23							1205
bicicloelemeno	1339		3,46		3,03		1,42		1,90		3,15		7,35		2,17		4,91		2,59		5,15		1336
β -elemeno	1391	1385	1,45		1,31	0,83			0,76		0,96		2,82		1,54		2,78	0,78	1,44		2,51	1,31	1390
(E)-cariofileno	1419	1410	6,92	4,23	5,72	6,49	3,77	2,36	5,40	2,87	5,91	5,24	5,19	3,00	1,93	2,25	3,11	3,15	2,17	1,54	3,17	3,32	1419
β -copaeno	1423												3,88										1432
α -humuleno	1452		1,27		1,29				1,05		1,17				1,00		1,40		1,11		1,33		1454
(E)- β -farneseno	1461	1453	2,92	2,15	2,04	1,75	2,31	0,86	2,05	0,94	1,94	1,11	1,35	1,10		0,88				0,74	0,79		1456
germacreno D	1482	1475	9,43	5,88	7,34	6,56	5,85	6,81	4,38	2,40	7,13	6,23	11,20	8,84	3,73	2,90	6,04	11,79	3,31	2,70	5,27	11,98	1485
β -selineno	1483	1478		0,83		0,75			0,95														1490
γ -selineno	1485					0,92															0,81		1492
biciclogermacreno	1497	1490	4,95	3,87	4,44	7,20	2,51	4,60	2,98	1,66	4,92	6,69	8,76	4,37	3,10	1,51	6,69	9,15	3,01	2,08	6,80	12,45	1500
β -bisaboleno	1511	1502	5,00	4,20	4,31	3,52	3,48	1,49	3,91	1,97	3,64	2,37	1,58	2,07		1,87		1,05	1,09	1,20	1,20	1,19	1505
β -sesquifelandreno	1525	1518	1,48	0,79	1,93	0,93	1,26		0,91		1,3		1,50	1,01			1,03	0,78			1,01	0,81	1522
(Z)-veltonal + selina-3,7(11)-dieno	1552				1,31										1,08		1,03				0,71		1540 / 1546
α -agarofurano	1560										1,23		0,90				1,08						1550
germacreno B	1564	1558							0,70			0,90									1,00		1561
espatulenol	1584	1573	14,79	15,44	26,47	15,90			26,11	30,30	23,43	30,39	6,56	0,97	29,45	32,24	30,40	26,27	34,31	30,86	28,72	10,48	1578
β -copaen-4- α -ol	1586	1576		3,86		5,27				10,46		8,46		1,21		7,85	2,58	4,62		6,68		2,72	1590
globulol	1591	1584				0,82			0,81		1,47		4,29		2,06		1,25				1,79		1590
salvial-4(14)-en-1-ona		1586														0,88							1594
β -atlantol	1608	1603	2,47	0,98	0,77	0,90			4,80	4,72	3,55	2,34			1,55	4,98	1,12	2,26	1,56	3,21	1,10		1608
junenol	1617		0,97		2,78												0,91						1619
epóxido de β -cedreno / 2-epi- α -cedren-3-ona	1619				0,98																		1622 / 1627
NI 1	1624	1616			1,06					1,17													
NI 2	1624		1,22						1,38		1,27				1,81								
NI 3	1630	1622	1,47	1,14	4,70				1,69	0,86			1,30		4,27	2,11	3,88		4,80	0,99	2,62		
NI 5	1636	1628		0,73					2,06						5,14								
NI 6		1629								2,55						0,88							
muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1636	1631	1,73	1,63		1,57			4,20	2,41	5,89	2,23	3,15			4,02	6,10	3,27	5,22	2,52	6,01	1,69	1631
epi- α -cadinol	1640	1634				2,24						2,20					2,19						1640
epóxido de allo-aromadendreno	1648	1640	1,08		1,02				1,03		1,50				1,57	1,11	1,31	0,82	1,19		0,91		1641
epi- α -muurolol	1654										3,63				5,49		1,02		4,66		3,76		1642

(continuação)																							
Composto	IK 2007	IK 2008	Fase vegetativa				Fase de floração				Fase de frutificação				Fase de dispersão				IK ref				
			Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas			Ramos		Folhas	
			2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		2007	2008	2007	2008
epi- α -muurolol / selina-3,11-dien-6- α -ol	1655		1,60		2,70				2,35								2,95						
selina-3,11-dien-6- α -ol	1657	1646		1,15		0,95				3,24		1,32	3,20			4,39		1,15		1,88			1644
α -muurolol	1658	1648	0,97		2,43	1,35			1,33			0,98		1,06			0,99	1,84				3,94	1646
NI 8	1661								1,03		0,78				0,93		1,02		0,96		0,90		
verboccidentafurano	1666						1,35																1662
NI 10	1667	1658	0,98		1,01										0,97		1,74	0,74			1,16		
NI 11	1669	1662			2,58				1,72	2,61		1,89			3,05	2,31	2,18	1,50	3,07	1,81	1,80		
atractilona	1671	1662		1,52		1,43			1,35		3,16		2,15				1,10		1,12		0,99	1,07	1658
NI 12	1675		1,07		1,14				1,19		0,91				1,47		1,53				0,93		
NI 13	1679			1,88					4,49														
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol		1678								1,16						1,26		2,08		6,79		1,24	1686
eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	1686	1679	1,43							8,26	1,78	0,91			5,27	8,38	1,62		4,10	1,15	1,04		
amorfa-4,9-dien-2-ol	1719														1,03		0,94		0,94		0,81		1700
laevigatina	1747	1733	18,47	21,74	14,79	33,00	64,50	76,11	10,20	7,41	17,87	22,30	20,21	63,84	3,56	8,80	6,51	25,09	4,57	12,02	12,83	44,55	1757
NI 16	1755	1738		1,86						0,76					1,06				0,77				
NI 17		1763														0,82							
dihidroisochromolaenina	1775	1771					4,35	0,83					0,92	1,92									
furanocadalenol	1913	1905	6,98	6,69	4,84	6,75	6,15	1,86	5,36	8,73	3,38	4,44	2,92	6,14	1,35	8,03		1,47	2,34	4,87	1,05	1,69	
NI 19		1981												1,06		0,73						0,77	
pirocuzerenona	1988	1984					1,31	1,28					1,24	1,01									
Monoterpenos																							
Hidrocarbonetos (%)			6,22	18,58	0	0,87	1,74	3,82	3,91	3,73	0	0	9,53	2,4	8,81	0	2,78	0	14,61	18,19	3,88	0	
Oxigenados (%)			1,66	0,87	0	0	0	0	0	1,8	0	0	0	0	6,61	1,8	0	0	1,83	0,74	0	0	
Sesquiterpenos																							
Hidrocarbonetos (%)			36,88	21,95	32,72	28,95	20,60	16,12	24,99	9,84	31,35	22,54	44,53	20,39	14,55	9,41	28,07	26,70	14,72	7,52	29,70	31,85	
Oxigenados (%)			50,49	53,01	56,78	70,18	77,66	80,08	57,54	76,69	65,66	75,57	44,64	76,15	51,33	81,94	58,80	71,06	60,01	69,98	59,01	67,38	
Não identificados (%)			4,74	5,61	10,49	0,00	0,00	0,00	13,56	7,95	2,96	1,89	1,30	1,06	18,70	6,85	10,35	2,24	8,83	3,57	7,41	0,77	
Total de componentes agrupados (%)			99,99	100,02	99,99	100,00	100,00	100,02	100,00	100,01	99,97	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	

IK: índice de retenção de Kováts; IK ref: índice de retenção de Kováts de referência (Adams 2007); NI 1: composto não identificado [m/z (rel int.): 93(100) 79(92) 91(89) 41(10) 81(10)]; NI 2: [m/z (rel int.): 145(100) 91(96) 132(91) 119(87) 187(83)]; NI 3: [m/z (rel int.): 105(100) 91(92) 119 (76) 93(74) 79(67)]; NI 5: [m/z (rel int.): 91(100) 41(81) 136(73) 79(68) 105(64)]; NI 6: [m/z (rel int.) 91(100) 79(64) 105(63) 41(62) 131(56)]; NI 8: [m/z (rel int.): 105(100) 91(94) 120(75) 123(74) 159(73)]; NI 10: [m/z (rel int.): 163(100) 79(64) 93(51) 91(49) 105(48)]; NI 11: [m/z (rel int.): 91(100) 105(90) 107(89) 93(80) 119(68)]; NI 12: [m/z (rel int.): 91(100) 93(90) 105(87) 79(82) 96(73)]; NI 13: [m/z (rel int.): 159(100) 91(45) 157(38) 79(30) 105(30)]; NI 16: [m/z (rel int.): 216(100) 201(52) 159(36) 183(25) 128(23)]; NI 17: [m/z (rel int.): 81(100) 79(71) 105(70) 147(68) 93(67)]; NI 19: [m/z (rel int.): 228(100) 270(71) 195(62) 165(51) 152(50)].

Tabela 5. Composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* coletada na população de ocorrência natural na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB), em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008.

Composto	IK 2007	IK 2008	Fase vegetativa				Fase de floração				Fase de frutificação				Fase de dispersão				IK ref				
			Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas			Ramos		Folhas	
			2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		2007	2008	2007	2008
α -tujeno	927	924	13,59		1,17		4,22	1,21	5,55	1,10		1,13	7,87	0,86	9,55		6,01		8,95	3,79	6,39		930
α -pineno	938	932	7,26		1,69		2,09	0,81	3,75	1,25		1,08	3,79		5,47				5,78	3,55			939
thuja-2,4(10)-dieno	945														1,07				0,94				960
sabineno	973	970	5,59				1,82		2,86	0,83			3,36		4,49		1,67		4,48	0,95	1,73		975
β -pineno		972																		1,59			979
mirceno	990		1,92		0,95		1,07		0,89		0,73		1,86		1,35		1,90		1,09	1,12	1,50		990
α -terpineno	1014														0,93								1017
<i>p</i> -cimeno	1027	1021	1,75							0,77					3,35				4,15	1,83			1024
limoneno	1030	1025	3,16		3,22	1,24	1,48	0,84	3,47	1,30	2,23	2,30	2,49	0,73	2,60		4,43	1,01	1,53	1,71	3,96	0,97	1029
(E)- β -ocimeno	1053	1048											1,08										1050
γ -terpineno	1058												0,95		1,39					0,76			1059
α -tujona	1112																			0,80			1102
(E)-verbenol	1145																			0,78			1144
terpinen-4-ol	1179	1173	1,74						1,58	1,01			0,76		1,81	0,86				1,40			1177
mirtenal	1191																			0,79			1195
bicicloelemeno	1339		3,14		3,58		0,98		1,48		4,60		1,96		1,10		3,01		1,00		2,34		1336
β -elemeno	1391	1385	2,73	2,20	4,53	3,31	2,40	1,19	2,96	1,94	5,91	3,37	1,94	1,22	1,77	1,27	3,72	3,80	1,80	1,16	3,39	3,10	1390
(E)-cariofileno	1419	1410	1,76	1,45	2,65	1,98	2,55	1,45	1,73	1,21	4,21	1,80	2,45	1,85	1,15	0,80	2,25	2,23	1,09	0,80	2,10	1,56	1419
α -humuleno	1452				0,90						0,98						0,81				0,77		1454
(E)- β -farneseno	1461	1453	1,81	2,25	2,36	1,99	3,40	1,62	1,85	1,31	2,92	1,45	2,61	2,48	0,94	1,01	1,47	2,24	1,09	1,20	1,28	1,29	1456
germacreno D	1482	1475	5,02	6,61	7,61	4,87	6,30	4,18	3,59	2,76	9,91	6,79	5,64	3,93	1,81	1,39	6,05	5,33	1,83	2,41	4,9	7,31	1485
β -selineno	1483	1478	0,83	0,99		1,12			1,08	0,88		0,93		1,07		0,86		2,73	0,74	0,88		1,00	1490
γ -selineno	1485													1,14									1492
biciclogermacreno	1497	1490	4,47	4,90	6,15	9,83	2,13	3,34	2,68	2,95	7,35	8,30	3,14	4,63	1,65	1,03	4,44	6,76	1,58	2,27	3,45	8,55	1500
β -bisaboleno	1511	1502	2,90	3,91	3,78	3,56	4,34	2,49	3,34	2,64	4,29	2,58	3,65	4,28	1,97	2,20	2,77	5,07	2,01	2,99	2,7	2,99	1505
β -sesquifelandreno	1525	1518			1,35	1,04	1,37	0,80			1,68	0,81	1,32	1,20			1,10	1,02			0,97	0,79	1522
germacreno B	1564	1558					1,33						0,75										1561
espatulenol	1584	1573	14,83	27,16	17,86	15,40			24,75	31,51	14,82	16,48			15,39	37,72	14,37	19,53	18,80	28,16	18,49	13,36	1578
β -copaen-4- α -ol	1586	1576		3,75		2,79				4,70	2,19	3,31		0,74	1,56	5,48		4,26		4,86		2,19	1590
globulol	1591	1584			1,22						1,32						1,46				1,14		1590
salvial-4(14)-en-1-ona	1593	1586							1,81						1,27				1,16				1594
β -atlantol	1608	1603	0,79	2,68	1,57				3,97	2,32	2,67				2,47	3,36	2,51	1,90	3,62	2,32	3,24		1608
junenol	1617								0,95						1,08								1619
epóxido de β -cedreno / 2-epi- α -cedren-3-ona	1619														0,88				0,81		0,72		1622 / 1627
NI 2	1624														1,61				1,47				
NI 3	1630	1622	1,21	1,92						1,02										1,10			
NI 4	1634														3,10				3,72				
muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol	1636	1631		2,49	3,85	1,27			6,08	3,34	2,30	1,75			1,03	4,13		2,18		3,84	4,41	1,56	1631
epi- α -cadinol	1640	1634				0,93					0,77	1,74	1,06	0,82			4,01				0,95	0,90	1640
epóxido de allo-aromadendreno	1648	1640	2,99	0,89	1,00				0,90	0,92					0,92	2,04	0,72	0,71	0,84				1641
epi- α -muurolol	1654										3,03												1642
epi- α -muurolol / selina-3,11-dien-6- α -ol	1655								4,09						2,13				3,61				1642 / 1644
selina-3,11-dien-6- α -ol	1657	1646	1,79	1,96	2,89	1,99				2,44		2,11		0,83		3,95	3,21	2,88		1,86	3,57	1,54	1644
NI 8	1661	1654		1,00					1,11		0,74				0,93	1,23	1,33		0,82		0,74		
NI 10	1667	1658													0,90				0,87		1,09		

(continuação)																							
Composto	IK 2007	IK 2008	Fase vegetativa				Fase de floração				Fase de frutificação				Fase de dispersão				IK ref				
			Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas			Ramos		Folhas	
			2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		2007	2008	2007	2008
NI 11	1669	1662	0,87	3,19	2,51	1,29			3,79	2,97	2,35	1,30			3,01	3,98	1,91		2,54	2,60	2,82		
atractilona	1671	1662															2,46					1658	
NI 13	1679	1672							1,04	0,80					4,31	1,13	0,68	0,76	4,12		2,22		
eudesma-4(15),7-dien-1-β-ol	1686	1679		4,14	0,71	0,83			3,51	4,17	1,09	1,22			1,08	5,09	1,84	1,85	1,16	2,17	1,19		
NI 14		1682		1,37												1,70		0,82		0,81			
NI 15		1699		0,79												1,14		0,93					
amorfa-4,9-dien-2-ol	1719	1714		1,08	1,10				1,98	1,59		0,81			1,37	2,78	0,83	1,17	2,06	1,13	2,03		
laevigatina	1747	1733	15,55	17,29	23,21	39,49	59,02	75,42	5,43	9,57	20,35	35,20	39,79	57,06	7,46	4,65	20,66	21,57	5,71	12,09	14,58	44,81	
NI 16	1755	1738		0,87											1,28	1,18	1,12	0,91	0,87		0,91		
dihidroisochromolaenina	1775	1771						0,90						0,85									
furanocadalenol	1913	1905	4,31	7,11	4,14	7,07	3,25	2,83	3,76	10,63	2,60	5,31	8,09	15,45	5,83	11,02	3,53	6,84	5,25	12,81	4,05	5,51	
NI 18	1967						1,31																
NI 19	1982	1981										0,91	2,88	1,38			2,20	1,04			2,37	2,57	
pirocurzerenona	1988	1984						2,92						1,15									
NI 20	2127						0,94																
Monoterpenos																							
Hidrocarbonetos (%)			33,27	0,00	7,03	1,24	10,68	2,86	16,52	5,25	2,96	4,51	21,40	1,59	30,20	0,00	14,01	1,01	27,68	14,54	13,58	0,97	
Oxigenados (%)			1,74	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,58	1,01	0,00	0,00	0,76	0,00	1,81	0,86	0,00	0,00	3,77	0,00	0,00	0,00	
Sesquiterpenos																							
Hidrocarbonetos (%)			22,66	22,31	32,91	27,70	24,80	15,07	18,71	13,69	41,85	26,03	23,46	21,80	10,39	8,56	25,62	29,18	10,05	11,71	21,90	26,59	
Oxigenados (%)			40,26	68,55	57,55	69,77	62,27	82,07	57,23	71,96	52,11	67,25	49,55	75,23	42,47	80,22	53,14	65,35	43,02	69,24	54,37	69,87	
Não identificados (%)			2,08	9,14	2,51	1,29	2,25	0,00	5,94	8,09	3,09	2,21	4,82	1,38	15,14	10,36	7,24	4,46	14,41	4,51	10,15	2,57	
Total de componentes agrupados (%)			100,01	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,98	100,00	100,01	100,00	99,99	100,00	100,01	100,00	100,01	100,00	98,93	100,00	100,00	100,00	

Legenda: IK: índice de retenção de Kováts; IK ref: índice de retenção de Kováts de referência (Adams 2007); NI 2: composto não identificado [m/z (rel int.): 145(100) 91(96) 132(91) 119(87) 187(83)]; NI 3: [m/z (rel int.): 105(100) 91(92) 119 (76) 93(74) 79(67)]; NI 4: [m/z (rel int.): 119(100) 162(80) 159(74) 91(68) 105(68)]; NI 8: [m/z (rel int.): 105(100) 91(94) 120(75) 123(74) 159(73)]; NI 10: [m/z (rel int.): 163(100) 79(64) 93(51) 91(49) 105(48)]; NI 11: [m/z (rel int.): 91(100) 105(90) 107(89) 93(80) 119(68)]; NI 13: [m/z (rel int.): 159(100) 91(45) 157(38) 79(30) 105(30)]; NI 14: [m/z (rel int.): 91(100) 159(93) 105(82) 119 (70) 79(64)]; NI 15: [m/z (rel int.): 185(100) 200(93) 157(55) 142(47) 141(45)]; NI 16: [m/z (rel int.): 216(100) 201(52) 159(36) 183(25) 128(23)]; NI 18: [m/z (rel int.): 183(100) 226(65) 211(28) 153(19) 152(19)]; NI 19: [m/z (rel int.): 228(100) 270(71) 195(62) 165(51) 152(50)].

Tabela 6. Composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* coletada na população cultivada no Instituto de Botânica (PCIB), em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008.

Composto	IK 2007	IK 2008	Fase vegetativa				Fase de floração				Fase de frutificação				Fase de dispersão				IK ref				
			Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas			Ramos		Folhas	
			2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		2007	2008	2007	2008
α-tujeno	927	924	14,52		1,43	1,83	0,91	5,92	3,71	3,58		2,50	9,54	5,34	11,71	0,93	4,68	1,70			8,03	1,76	930
α-pineno	938	932	10,71		1,26	1,57		3,82	2,53	4,65	0,97	2,45	4,43	3,56	5,75	1,40	2,59	1,61	9,20			1,51	939
sabineno	973	970	2,45											0,79	5,37								975
β-pineno	974	972	3,08					2,46	2,11	1,57		0,76	3,90	1,31	1,90		1,83		2,54		1,89	0,81	979
mirceno	990		1,65			0,82		1,41					2,06	1,27			1,55				1,38		990
p-cimeno	1027	1021	1,83							1,04					2,85				2,09				1024
limoneno	1030	1025	2,18		1,58	2,25		1,85	2,85	1,41	1,26	1,99	2,67	1,75	3,00		3,73	1,96	1,46	0,97	3,50	2,34	1029
(E)-β-ocimeno	1053	1048						0,82					1,32	0,80									1050
γ-terpineno	1058								1,02				1,05		1,02								1059
terpinoleno	1085												0,80										1088
terpinen-4-ol	1179	1173	1,06	1,07						1,10			0,86		1,93	0,86			1,38	1,27			1177
bicicloelemeno	1339				3,86		1,44		1,89		3,72		1,84		1,57		3,34		1,21		2,78		1336
β-elemeno	1391	1385	1,08	1,81	4,51	3,25	1,97	1,02	2,53	1,33	4,79	3,50	1,72	1,22	1,56	0,97	3,66	3,51	1,56	1,16	3,68	3,85	1390
(E)-cariofileno	1419	1410	1,02	1,32	4,44	1,99	2,64	1,43	2,15	1,00	3,14	2,13	2,45	2,14	1,47		2,36	2,25	1,39	0,79	2,58	2,30	1419
α-humuleno	1452				0,81																0,79		1454
(E)-β-farneseno	1461	1453	1,12	1,30	3,64	1,30	3,21	1,69	2,09	0,84	3,29	1,30	2,45	2,28	1,04		1,63	1,34	1,17		1,70	1,37	1456
germacreno D	1482	1475	4,20	3,25	4,89	5,30	6,32	4,83	3,62	1,60	8,20	4,30	5,12	4,07	2,89	1,06	3,86	4,78	1,93	2,03	5,47	8,23	1485
β-selineno	1483	1478		0,97	1,30	1,06			1,22			1,09		2,10			0,74	1,07				0,89	1490
γ-selineno	1485				1,75												0,92		0,91				1492
biciclogermacreno	1497	1490	5,97	2,30	6,28	9,11	2,68	2,97	3,29	1,45	5,87	5,91	2,82	4,18	2,21	0,89	4,51	6,33	1,95	2,05	4,01	11,16	1500
β-bisaboleno	1511	1502	2,10	3,05	6,65	2,35	4,12	2,46	3,36	1,79	4,97	2,67	3,49	3,85	1,77	1,20	2,74	3,00	2,09	1,35	3,02	2,53	1505
β-sesquifelandreno	1525	1518			1,46	0,80	1,33	0,77	0,91		1,56		1,17	1,04			0,90				1,01	0,82	1522
(E)-γ-bisaboleno	1545				0,83																		1531
germacreno B	1564	1558																			0,75		1561
espatulenol	1584	1573	14,43	37,75	17,02	18,85			25,12	32,46	17,35	29,11			18,03	37,90	13,67	29,01	22,73	37,70	18,87	14,95	1578
β-copaen-4-α-ol	1586	1576	2,15	6,88	1,63	3,18				6,55		4,59				7,08	1,20	4,43		7,29		2,66	1590
globulol	1591	1584															0,71				1,01		1590
salvial-4(14)-en-1-ona	1593	1586			0,88				1,87		1,14				1,53				0,95				1594
β-atlantol	1608	1603		2,02	1,36				4,25	4,52	2,60	0,89			3,01	5,54		1,55	4,27	4,75	2,62		1608
junenol	1617								1,06		0,97												1619
epóxido de β-cedreno / 2-epi-α-cedren-3-ona	1619																		0,89				1622 / 1627
NI 2	1624								1,70						1,33				1,43				
NI 3		1622		2,59						1,85						1,92				1,79			
NI 5	1636	1628	2,64		2,72				4,90		3,65				4,07	1,04	2,07		4,97		3,36		
muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol		1631		3,48		1,62				4,49		2,77				2,97		3,24		4,82		1,67	1631
epi-α-cadinol	1640	1634															0,77						1640
epóxido de allo-aromadendreno	1648	1640		1,77					0,86	2,01						1,02	1,46			2,03	2,70		1641
NI 7	1650														3,87				5,60				
epi-α-muurolol	1654								4,14														1642
epi-α-muurolol / selina-3,11-dien-6-α-ol	1655				1,51						2,82												1642 / 1644
selina-3,11-dien-6-α-ol	1657	1646		2,43						2,77		2,52				4,19		1,52		2,74			1644
α-muurolol		1648				1,95															1,62		1646
NI 8	1661	1654	1,19	0,76					1,22	1,52	0,84					1,37			1,04	0,77			
NI 9	1665														2,22		1,42				2,86		
verboccidentafurano	1666						0,92																1662
NI 10	1667	1658																					

(continuação)																								
Composto	IK 2007	IK 2008	Fase vegetativa				Fase de floração				Fase de frutificação				Fase de dispersão				IK ref					
			Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas			Ramos		Folhas		
			2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008		2007	2008	2007	2008	
NI 11	1669	1662		2,47	0,95	1,32			3,74	3,72	2,56	2,70				0,75			3,16					
atractilona	1671	1662														3,76		1,01		3,91		1,01	1658	
NI 13	1679	1672		0,75					1,04						2,79	1,22			4,89		0,95			
germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol		1678		4,60						3,28		0,92				6,30				6,13		1,04	1686	
eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol	1686	1679			0,70				4,02		1,54								1,01	2,22	0,71		1688	
NI 14		1682		0,91						1,98						2,67								
amorfa-4,9-dien-2-ol	1719	1714		1,33					1,97	1,65	0,77	0,97			1,06	2,52		0,95	2,36	1,66	0,83		1700	
laevigatina	1747	1733	21,64	8,08	23,16	37,58	66,88	65,98	6,44	4,21	24,18	22,21	41,50	56,95	9,25	4,27	32,97	26,23	8,01	6,89	19,72	36,08	1757	
NI 16	1755	1738		0,82											0,91	0,93	1,46		1,25	0,79	0,93			
dihidroisochromolaenina	1775	1771					3,72	0,84					2,78											
furanocadalenol	1913	1905	4,97	8,29	5,38	3,87	2,04	1,73	4,38	7,63	3,81	4,72	6,49	7,35	5,90	7,24	3,95	4,51	8,56	6,89	3,84	2,68		
NI 18	1967						0,74																	
NI 19	1982	1981											1,57				1,30				1,02	0,72		
pirocuzerenona	1988	1984					1,08																	
Monoterpenos																								
Hidrocarbonetos (%)			36,42	0,00	4,27	6,47	0,91	16,28	12,22	12,25	2,23	7,70	25,77	14,82	31,60	2,33	14,38	5,27	15,29	0,97	14,80	6,42		
Oxigenados (%)			1,06	1,07	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,10	0,00	0,00	0,86	0,00	1,93	0,86	0,00	0,00	1,38	1,27	0,00	0,00		
Sesquiterpenos																								
Hidrocarbonetos (%)			15,49	14	40,42	25,16	23,71	15,17	21,06	8,01	35,54	20,9	21,06	20,88	12,51	4,12	24,66	22,28	12,21	7,38	25,79	31,15		
Oxigenados (%)			43,19	76,63	51,64	67,05	74,64	68,55	54,11	69,57	55,18	68,70	50,77	64,30	38,78	82,79	54,73	72,45	48,78	87,03	50,30	61,71		
Não identificados (%)			3,83	8,30	3,67	1,32	0,74	0,00	12,60	9,07	7,05	2,70	1,57	0,00	15,19	9,90	6,25	0,00	22,34	3,35	9,12	0,72		
Total de componentes agrupados (%)			99,99	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	99,99	100,00	100,00	100,00	100,03	100,00	100,01	100,00	100,02	100,00	100,00	100,00	100,01	100,00		

Legenda: IK: índice de retenção de Kováts; IK ref: índice de retenção de Kováts de referência (Adams 2007); NI 2: composto não identificado [m/z (rel int.): 145(100) 91(96) 132(91) 119(87) 187(83)]; NI 3: [m/z (rel int.): 105(100) 91(92) 119 (76) 93(74) 79(67)]; NI 5: [m/z (rel int.): 91(100) 41(81) 136(73) 79(68) 105(64)]; NI 7: [m/z (rel int.): 204(100) 135(81) 161(75) 189(69) 81(69)]; NI 8: [m/z (rel int.): 105(100) 91(94) 120(75) 123(74) 159(73)]; NI 9: [m/z (rel int.): 107(100) 147(92) 105(91) 91(91) 159(85)]; NI 10: [m/z (rel int.): 163(100) 79(64) 93(51) 91(49) 105(48)]; NI 11: [m/z (rel int.): 91(100) 105(90) 107(89) 93(80) 119(68)]; NI 13: [m/z (rel int.): 159(100) 91(45) 157(38) 79(30) 105(30)]; NI 14: [m/z (rel int.): 91(100) 159(93) 105(82) 119 (70) 79(64)]; NI 16: [m/z (rel int.): 216(100) 201(52) 159(36) 183(25) 128(23)]; NI 18: [m/z (rel int.): 183(100) 226(65) 211(28) 153(19) 152(19)]; NI 19: [m/z (rel int.): 228(100) 270(71) 195(62) 165(51) 152(50)].

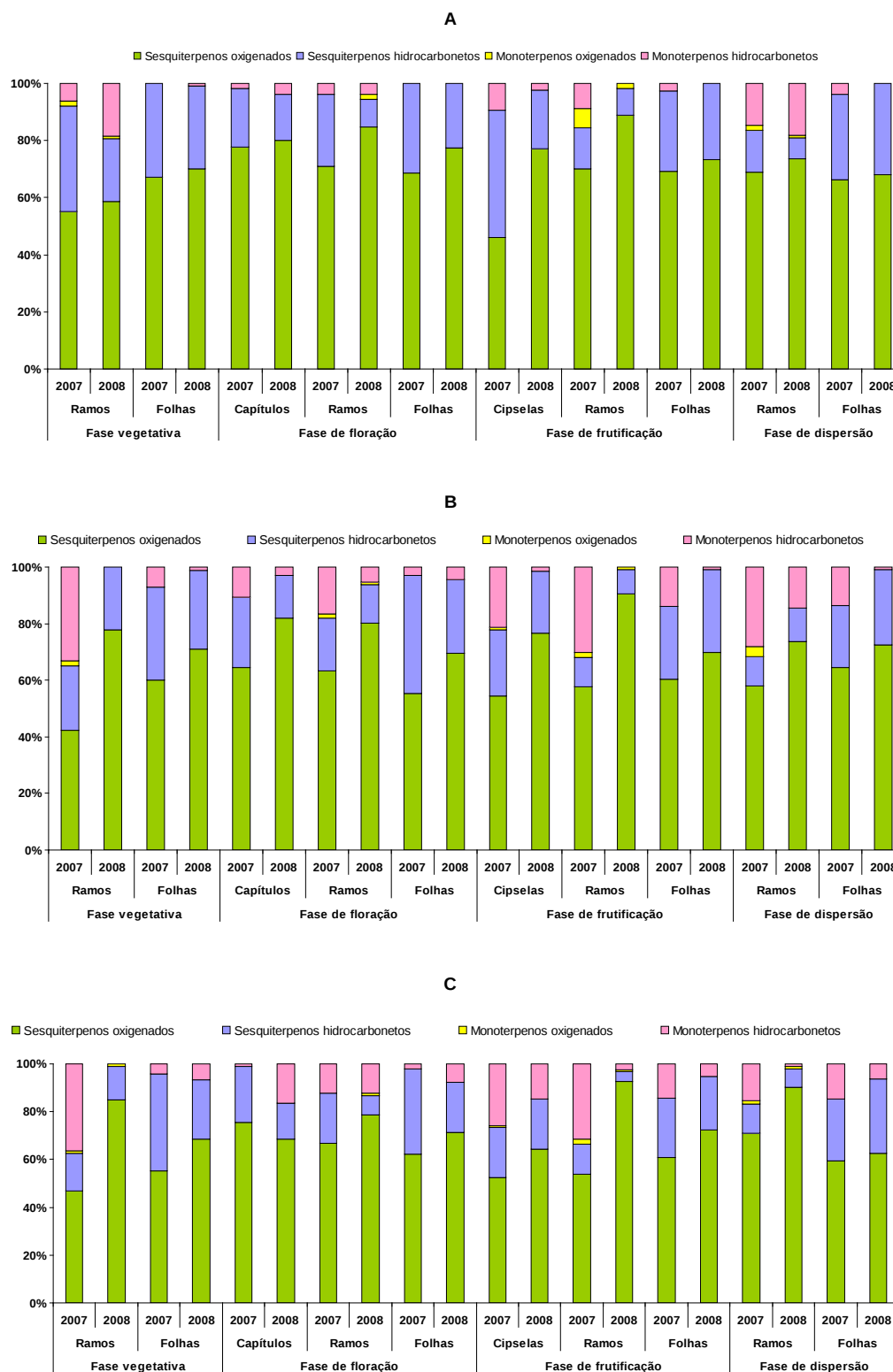


Figura 12. Teores de mono- e sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados presentes nos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* das populações de ocorrência natural do Cerrado de Mogi-Guaçu (A), da Mata Atlântica do Instituto de Botânica (B) e cultivada no Instituto de Botânica (C), em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008.

A

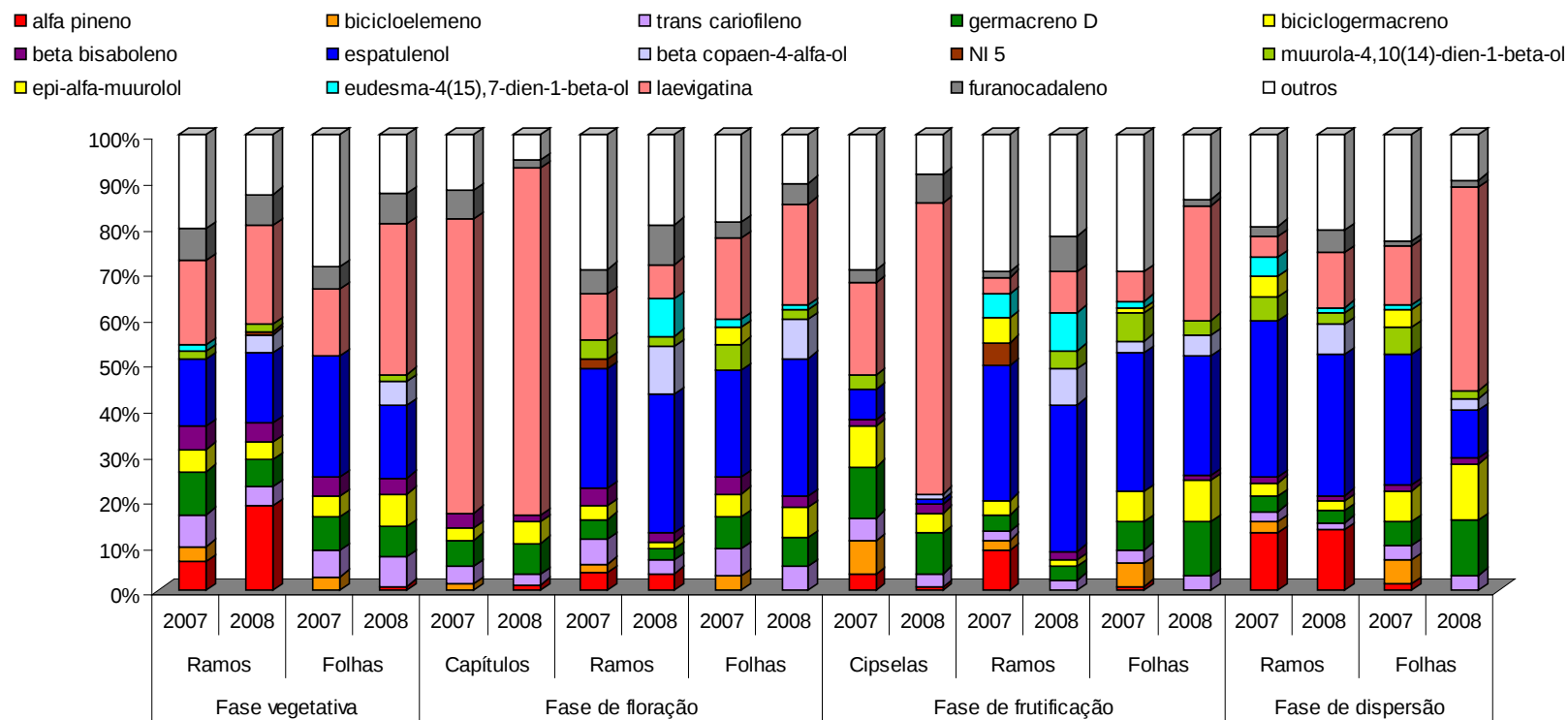


Figura 13A. Compostos com picos acima de 5% de área presentes nos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata*, obtidos da população de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008. NI = não identificado.

B

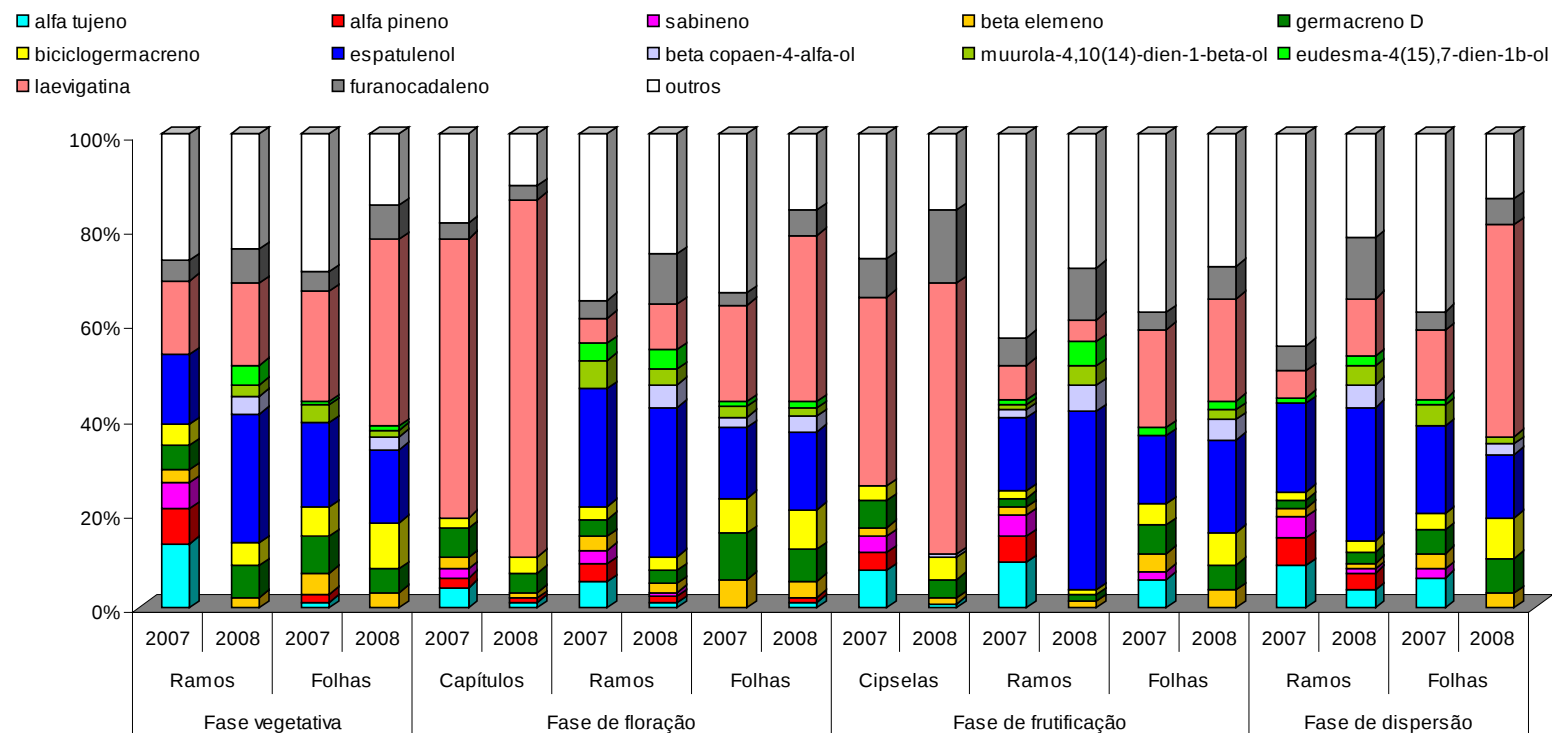


Figura 13B. Compostos com picos acima de 5% de área presentes nos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata*, obtidos da população de ocorrência natural na Mata Atlântica do Instituto de Botânica em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008.

C

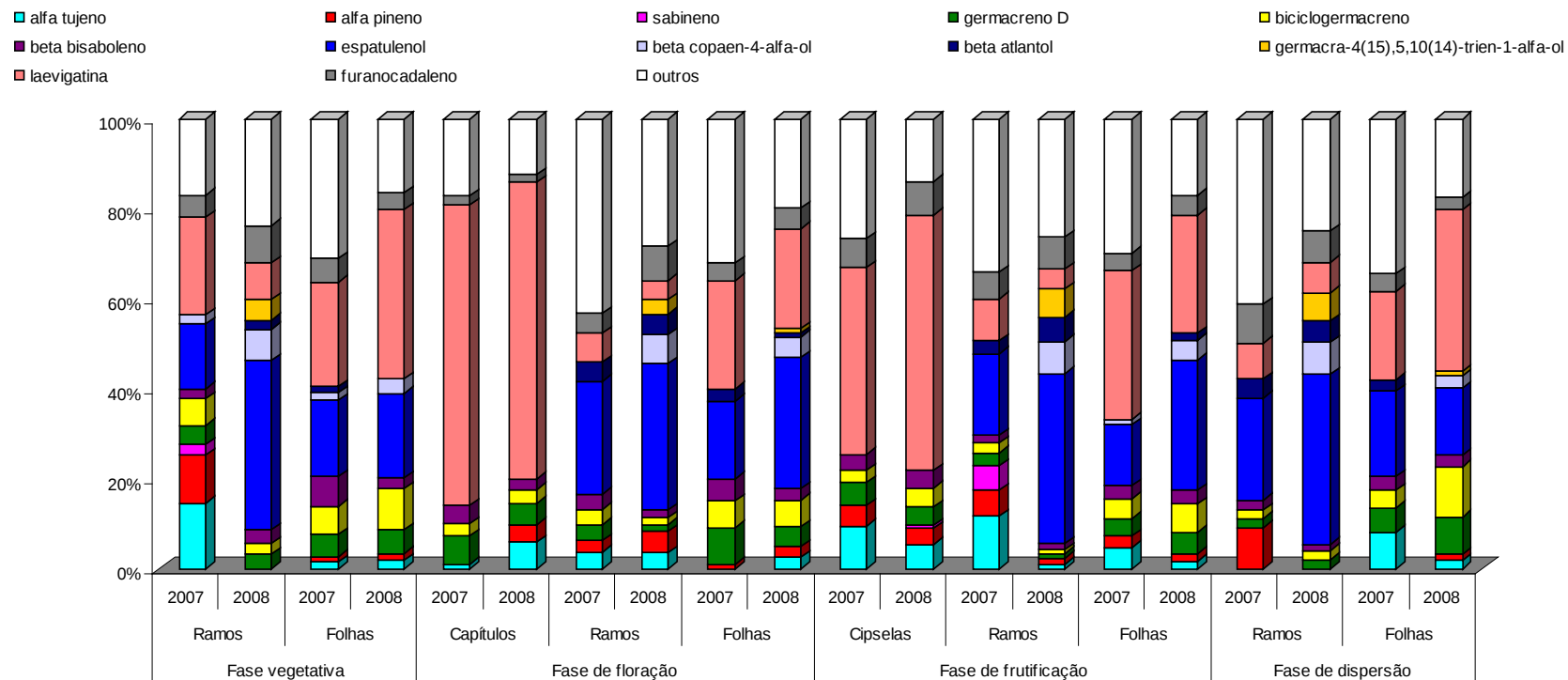


Figura 13C. Compostos com picos acima de 5% de área presentes nos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata*, obtidos da população cultivada no Instituto de Botânica em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 e 2008.

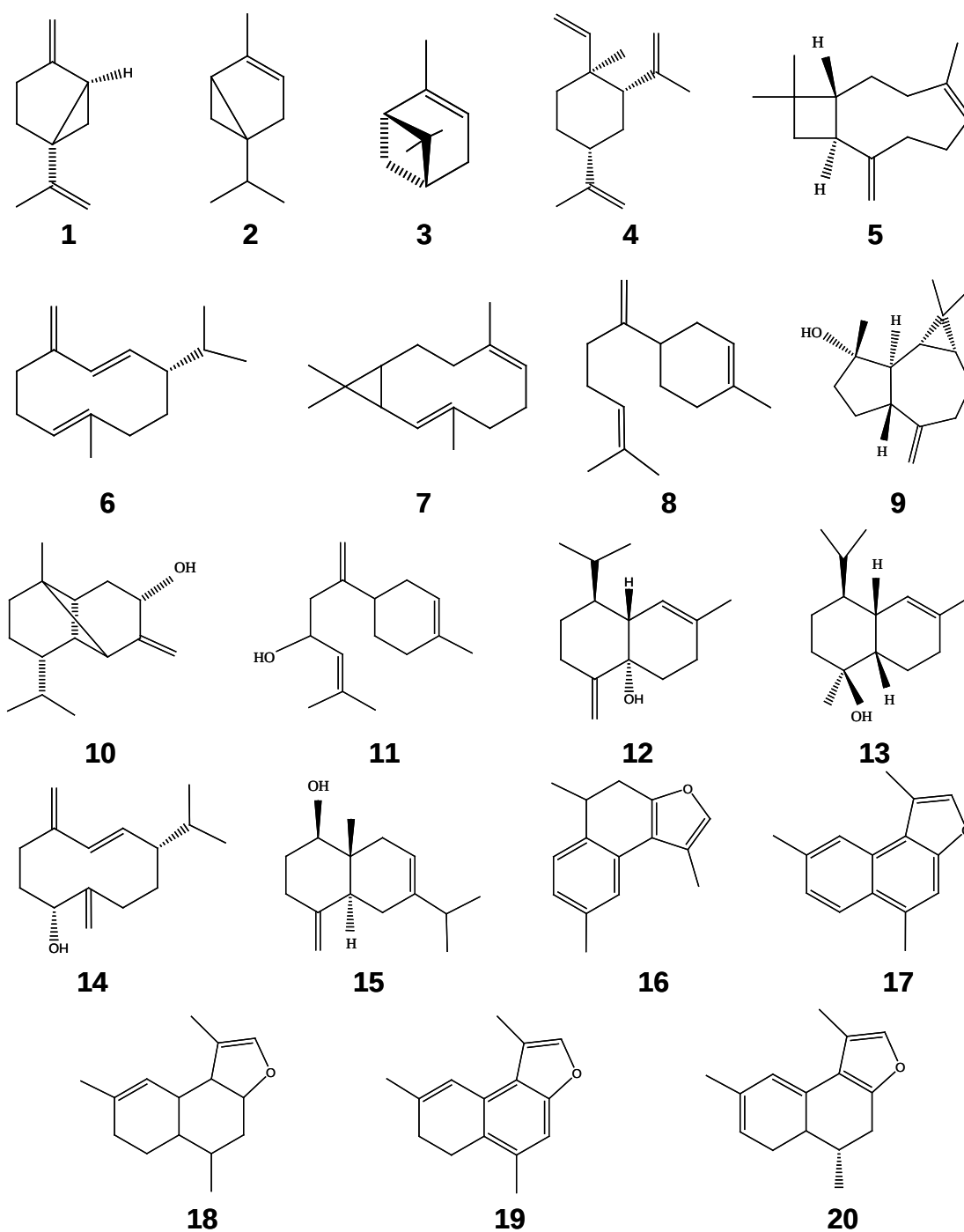
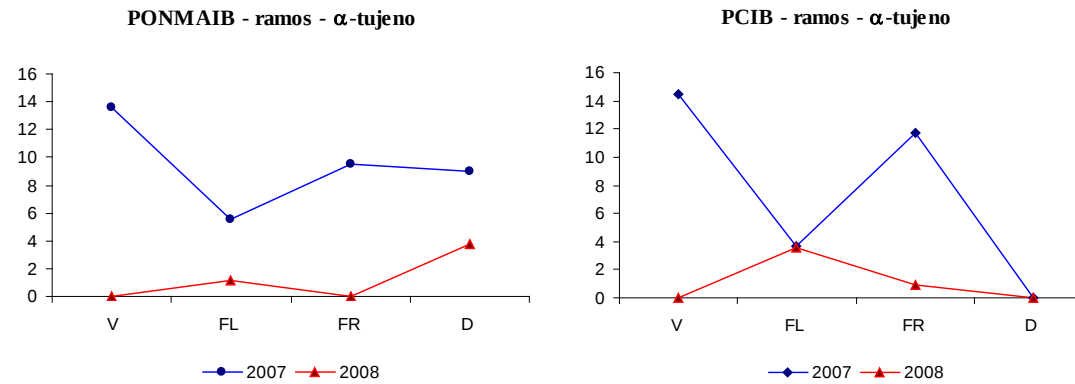


Figura 14. Estruturas químicas dos compostos majoritários com teores acima de 5% de área e dos furanocadinenos: 1) sabineno; 2) α -tujeno; 3) α -pineno; 4) β -elemeno; 5) (E)-cariofileno; 6) germacreno D; 7) biciclogermacreno; 8) β -bisaboleno; 9) espatulenol; 10) β -copaen-4- α -ol; 11) β -atlantol; 12) muurola-4,10(14)-dien-1- β -ol; 13) epi- α -muurolol; 14) germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- α -ol; 15) eudesma-4(15),7-dien-1- β -ol; 16) laevigatina; 17) furanocadalenol; 18) verboccidentafurano; 19) pirocurzerenona; 20) dihidroisochromolaenina.

A



B

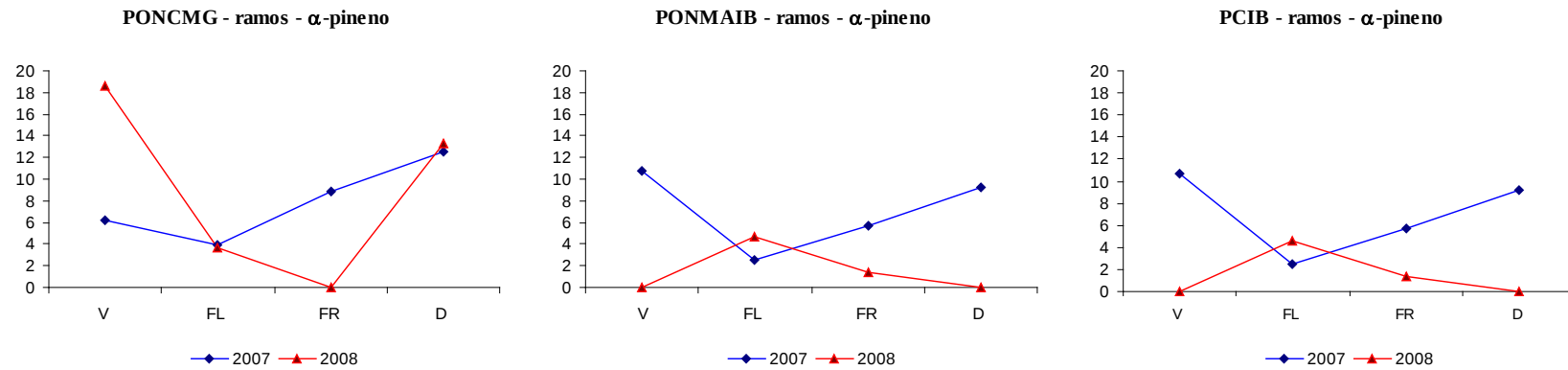
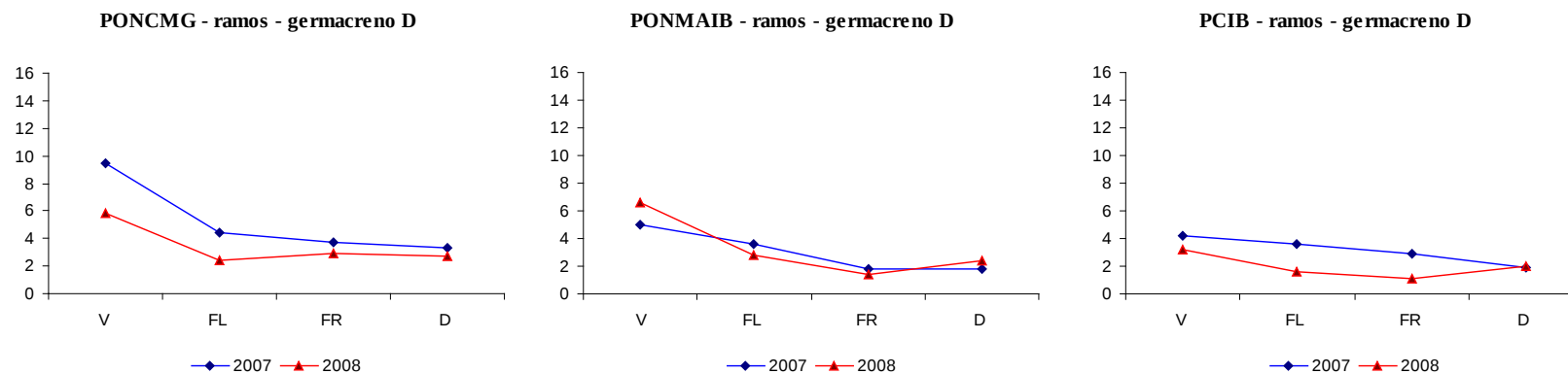


Figura 15A e B. Tendências relacionadas às variações fenológicas observadas nas populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) e na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB) para α -tujeno de ramos (A), α -pineno de ramos (B).

C



D

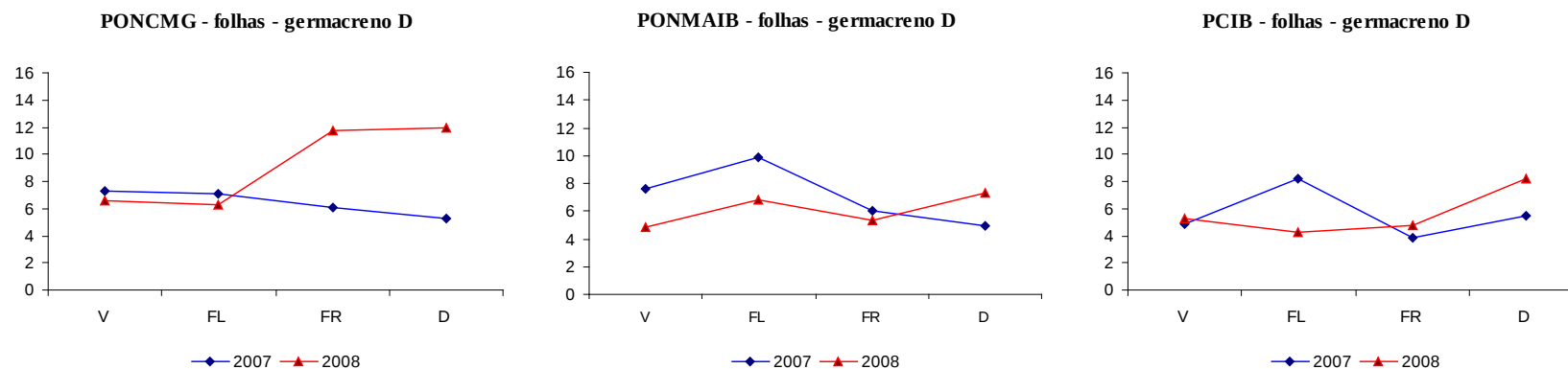
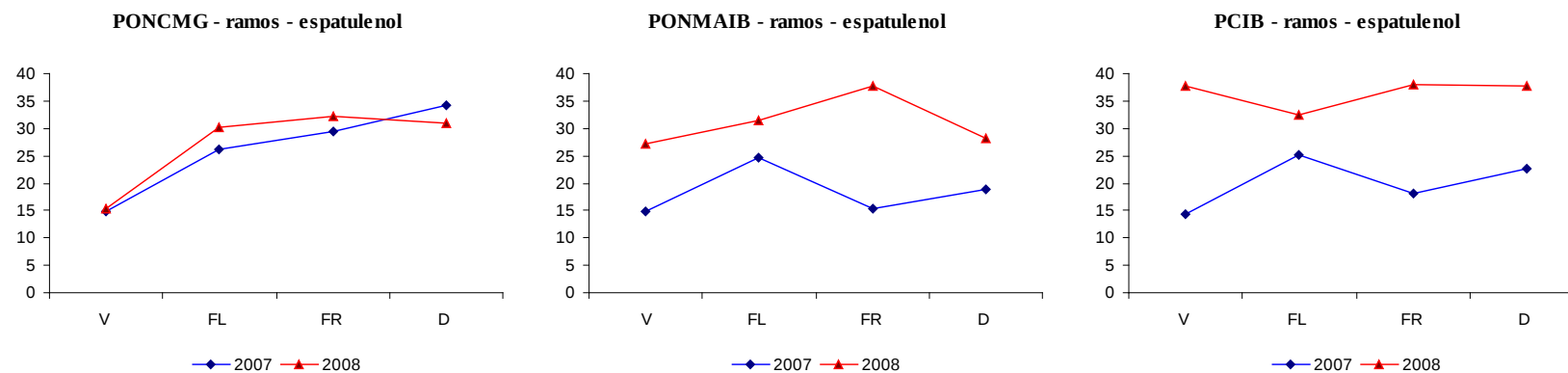


Figura 15C e D. Tendências relacionadas às variações fenológicas observadas nas populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) e na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB) para germacrene D de ramos (C) e folhas (D).

E



F

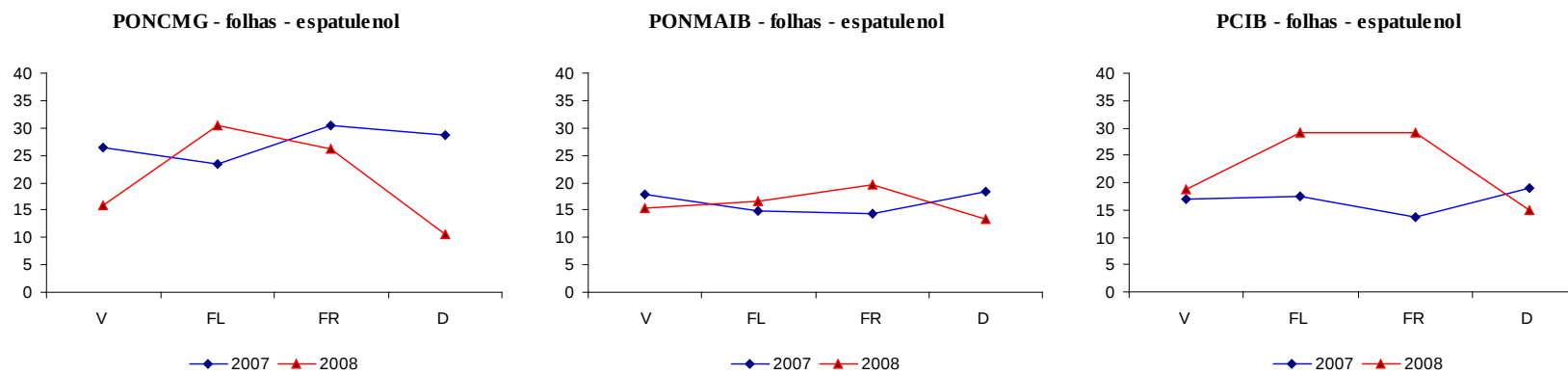
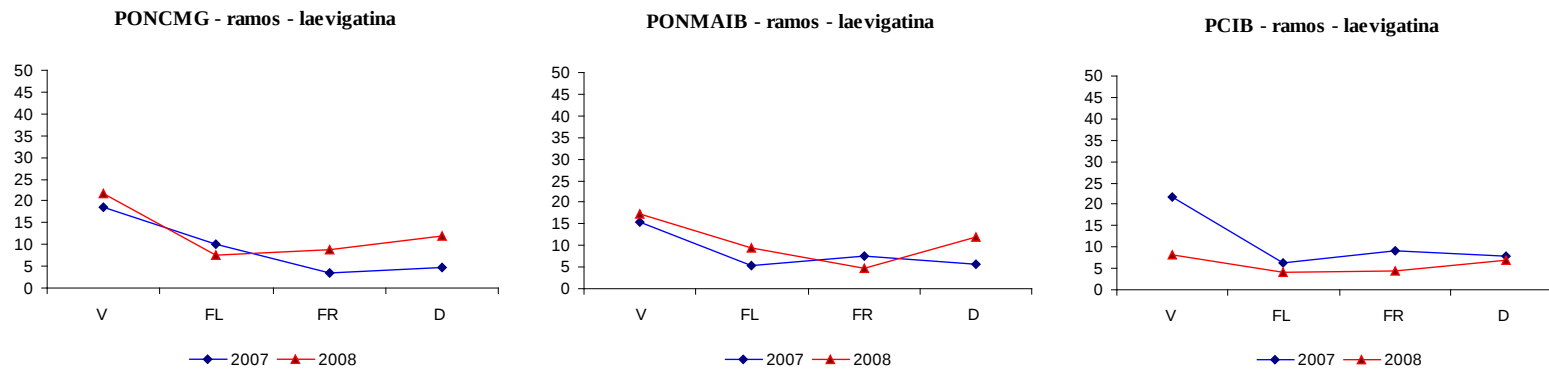


Figura 15E e F. Tendências relacionadas às variações fenológicas observadas nas populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) e na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB) para escatulenol de ramos (E) e folhas (F).

G



H

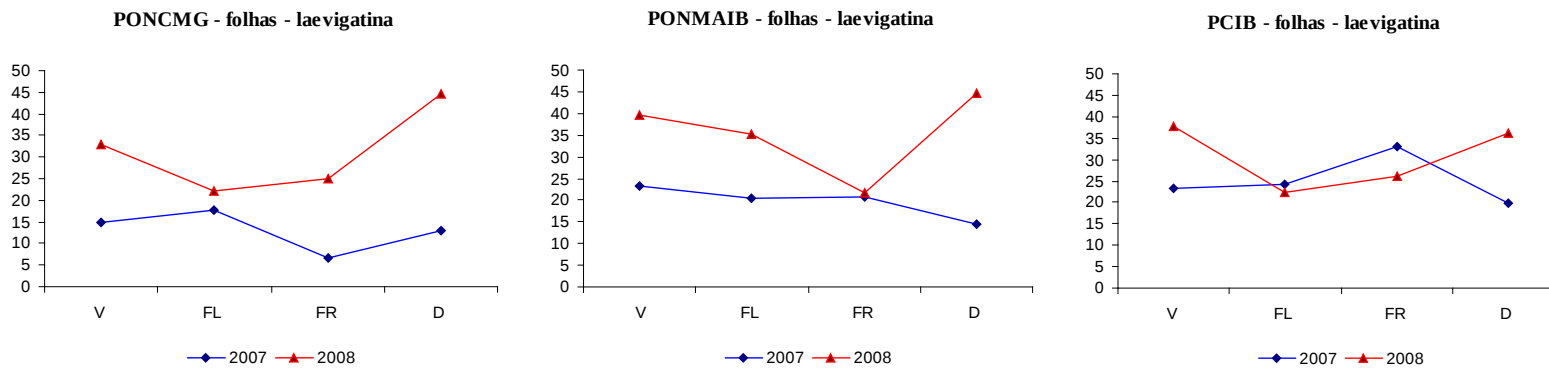


Figura 15G e H. Tendências relacionadas às variações fenológicas observadas nas populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) e na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB) para laevigatina de ramos (G) e folhas (H).

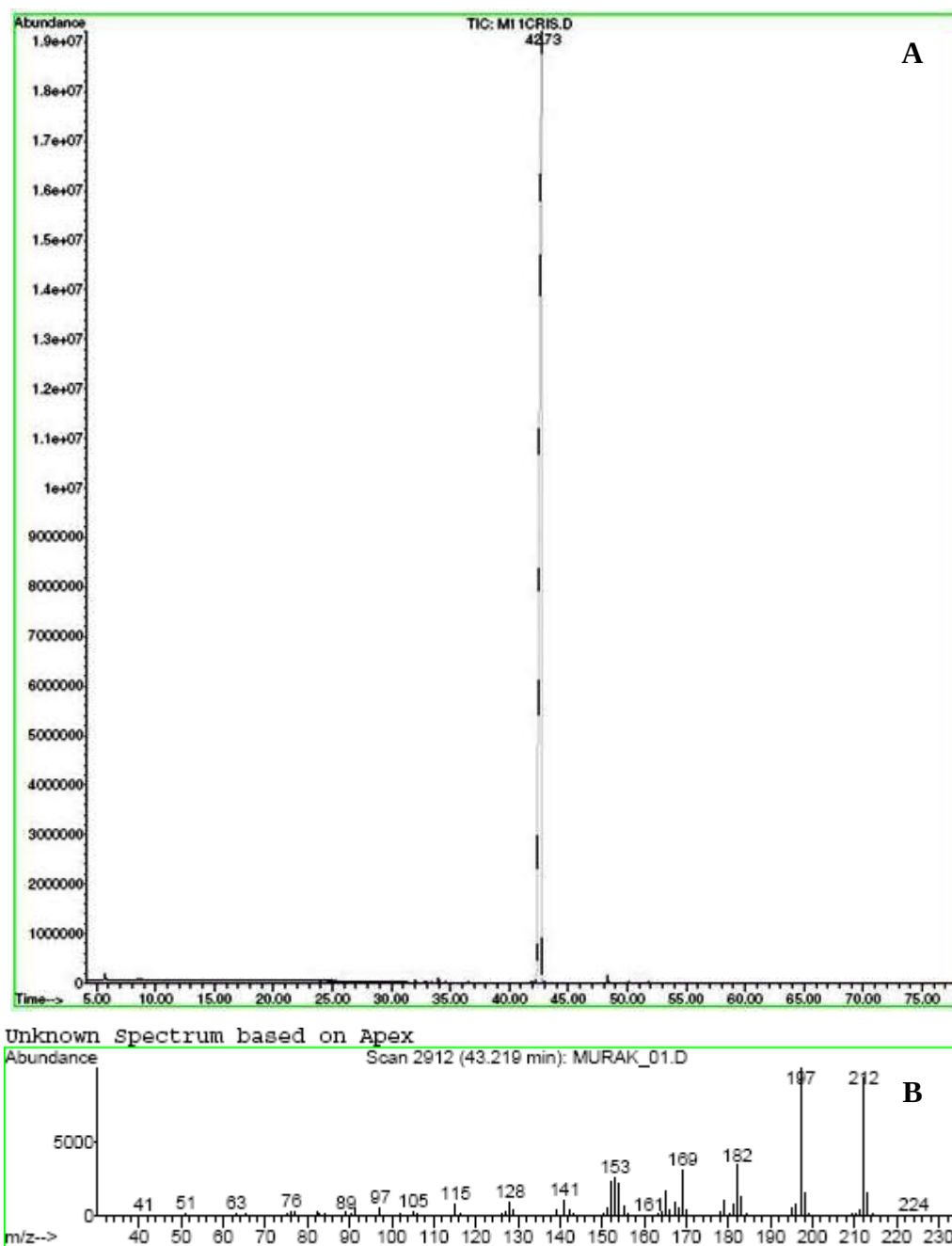


Figura 16. Cromatograma do cristal isolado obtido do óleo volátil de capítulos da PONCMG no ano de 2007 (A) e espectro de massas do mesmo (B), tentativamente identificado como laevigatina por comparação dos padrões de fragmentação com literatura consultada: m/z 212[M⁺](100), 197(96), 169(41), 152(39), 182(38), 141(22), 91(38) (Malizia *et al.* 2005).

O sesquiterpeno oxigenado laevigatina é produzido majoritariamente em folhas e capítulos. Nestes últimos, a atração de agentes polinizadores como borboletas, mariposas, vespas, besouros, joaninhas e abelhas chamou a atenção, uma vez que estes causaram danos às plantas cultivadas dentro da casa de vegetação próxima à população cultivada, pondo ovos que deram origem a lagartas, que as predaram. Gershenzon & Dudareva (2007) afirmam que os compostos voláteis presentes em flores e frutos parecem servir como atrativo para agentes polinizadores e dispersores pois, em estudos prévios com a larva do tabaco, *Manduca sexta*, comprovou-se, por combinação de cromatografia a gás e eletroantenograma, que um grupo de células receptoras do sistema olfativo deste inseto responde fortemente a certos mono- e sesquiterpenos oxigenados, como geraniol, (*E*)-nerolidol e farnesol, o que sugere que a laevigatina pode ter função ecológica de atração de polinizadores em *C. laevigata*, embora ainda não haja estudos que o comprovem.

A função ecológica dos óleos voláteis nos frutos de *C. laevigata* ainda não está definida. Nesta espécie, a dispersão das sementes é anemocórica, ou seja, através do vento (Frenedo 2004), portanto não há necessidade de atração de dispersores para os frutos, como ocorre em frutos cujas sementes dependem da predação de animais para a sua dispersão, como sugerido por Vallilo *et al.* 2006 para *Campomanesia adamantium* cujos frutos, ricos em óleos voláteis, são bastante predados na natureza por aves e mamíferos. Por outro lado, já que as cipselas apresentaram a maior variação qualitativa entre as partes vegetais estudadas, pode haver função inseticida agregada como forma de defesa dos diásporos (unidades de dispersão) contra herbivoria, uma vez que após a fase de floração pôde ser observado, na população cultivada, que as folhas das plantas são intensamente predadas por lagartas provenientes dos ovos postos pelos polinizadores, mas os frutos permaneceram até a dispersão. Alguns componentes reconhecidamente repelentes ou inseticidas, como o hidrocarboneto sesquiterpênico (*E*)- β -farneseno (Gershenzon & Dudareva 2007) e os monoterpenos limoneno e mirceno (Viegas Júnior 2003), respectivamente, estiveram presentes nos óleos das três populações estudadas, mas em baixos teores. Enquanto (*E*)- β -farneseno apresentou queda tendencial em ramos e folhas das fases vegetativa e de floração para as de frutificação e dispersão, limoneno e mirceno não demonstraram tendência na variação ao longo das fases fenológicas e estiveram presentes até mesmo em capítulos, sugerindo que, nos teores observados, não interferiram na atração de polinizadores.

Os limites de detecção dos óleos voláteis de *C. laevigata* testados contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum* revelaram potencial antifúngico, variando entre as populações, partes vegetais e fases fenológicas. De maneira geral, *C. cladosporioides* foi mais sensível a todos os óleos testados.

De acordo com a Tabela 7, observou-se que, contra *C. cladosporioides*, a atividade antifúngica dos óleos obtidos na PONCMG em 2007 foi mais fraca, exceto pelos ramos e folhas da fase de floração, que apresentaram limite de detecção com atividade forte até 25 µg. Contra *C. sphaerospermum*, os óleos obtidos em 2008 foram menos ativos, com exceção de folhas da fase vegetativa, ramos e folhas da fase de floração e ramos da fase de frutificação, com uma redução no potencial antifúngico dos óleos nas últimas fases fenológicas, os quais apresentaram apenas atividades médias com 200 µg de óleo. Os óleos de capítulos e cipselas não se destacaram nesta população. Tanto em 2007 como em 2008, as atividades antifúngicas observadas nos ramos e folhas da fase de floração foram as mais fortes, no entanto os monoterpenos estiveram ausentes em folhas e corresponderam a cerca de 4-5% em ramos, sugerindo que nesse caso a atividade não dependeu dessa classe de compostos, como afirmam diversos autores (Bakkali *et al.* 2008). Além disso, a composição química dos óleos cuja atividade antifúngica foi média na maior concentração testada e dos óleos mais bioativos desta população apresentou-se muito semelhante, impossibilitando fazer uma correlação entre essa atividade biológica e a composição química desses óleos.

Na Tabela 8 é possível notar que, de um modo geral, a atividade antifúngica obtida pelos óleos da PONMAIB foi mais forte em folhas do que em ramos e os óleos de 2008 foram mais fungitóxicos em relação ao ano anterior. Contra *C. cladosporioides*, os óleos de folhas obtidos em 2008 apresentaram as atividades mais fortes, com limite de detecção com atividade forte até 25 µg (Figura 17), bem como os óleos de capítulos obtidos nos dois anos de estudo. Contra *C. sphaerospermum*, o óleo de capítulos obtido em 2007 foi o mais bioativo, com limite de detecção com atividade forte até 25 µg, seguido dos óleos de cipselas obtido em 2007 e ramos e folhas obtidos em 2008.

A atividade dos óleos da população cultivada foi mais fraca que a da população de ocorrência natural na Mata Atlântica, pois na Tabela 9 podem-se observar atividades fortes até no máximo 100 µg de óleo, com exceção do óleo de capítulos do ano de 2007 contra *C. sphaerospermum*, cujo limite de detecção alcançou forte atividade em 50 µg de óleo. Folhas da fase vegetativa do ano de 2008 e capítulos do ano de 2007, que apresentaram as atividades fungitóxicas mais fortes nesta população, também não apresentaram monoterpenos oxigenados, classe de compostos à qual muitos autores atribuem o potencial antifúngico de óleos voláteis, como os fenólicos timol, carvacrol e eugenol (Tullio *et al.* 2007). Dessa forma, a atividade observada nesses óleos pode ser atribuída aos sesquiterpenos.

O limite de detecção do cristal isolado de laevigatina (Tabela 10) revelou fraca atividade deste composto, o que indica que a atividade antifúngica dos óleos voláteis de *C.*

laevigata não se deve apenas à alta concentração de laevigatina, mas a uma ação sinérgica dos compostos presentes nos óleos testados.

Entre as três populações testadas pelo método de bioautografia, a PONCMG apresentou os resultados mais fracos, principalmente contra *C. sphaerospermum*, quando as maiores concentrações deram atividade média nas fases de frutificação e dispersão. A partir daí, a PONMAIB apresentou os melhores resultados, sugerindo que mais estudos com ela sejam realizados para que possa ser explorada pelo seu interesse farmacêutico.

Não foi possível associar as variações observadas na atividade antifúngica contra estes fungos, no que se refere à composição, uma vez que muitos dos estudos com óleos voláteis dão ênfase aos monoterpenos, existindo ainda pouca informação sobre a atividade fungitóxica de sesquiterpenos (Bakkali *et al.* 2008).

Bakkali *et al.* (2008) enumeram alguns monoterpenos fungitóxicos como linalol, 1,8-cineol, cânfora, timol e carvacrol. No estudo de Chang *et al.* (2008), o óleo volátil de folhas de *Calocedrus macrolepis* mostrou forte inibição do crescimento micelial de *Pestalotiopsis funerea* e *Fusarium solani* e os sesquiterpenos isolados T-muurolol e α -cadinol exibiram forte atividade contra *Rhizoctonia solani* e *F. oxysporum*.

Os óleos voláteis de *C. laevigata* apresentaram variação na atividade antifúngica pelo método de microdiluição contra *C. albicans*, o fungo prevalente em candidíase (Cruz *et al.* 2007), considerando ativos os óleos que apresentaram porcentagem de inibição acima de 50%. Entre as populações estudadas, a PONCMG (Tabela 11) apresentou óleos ativos concentrados nas fases de frutificação e dispersão. Na PONMAIB (Tabela 12), observou-se que o óleo de folhas da fase de dispersão e os óleos de ramos obtidos no ano de 2007 foram ativos e que a inibição aumentou no decorrer das fases fenológicas sendo, portanto, a população com menor potencial antifúngico. A PCIB (Tabela 13) revelou ser a mais potencialmente ativa contra essa levedura patogênica, com exceção dos cristais de capítulos e cipselas e de alguns ramos e folhas das fases vegetativa e de floração, o que demonstrou que nos dois anos, os óleos de ramos e folhas foram mais ativos nas fases de frutificação e dispersão. Nas três populações, cristais e óleos de capítulos não apresentaram bioatividade, sugerindo que a laevigatina, composto predominante nesses óleos, não é responsável pela manutenção da atividade antifúngica dos demais óleos.

Segundo estudos realizados por Giordani *et al.* (2004), o teor de alcoóis fenólicos, não encontrados nos óleos estudados neste trabalho, costuma ser responsável pela atividade antifúngica de alguns óleos voláteis, uma vez que os óleos de *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*, com 63% de timol e 82% de carvacrol, respectivamente, foram fortemente ativos

contra *Candida albicans* e o mesmo óleo de *T. vulgaris* potencializou a ação da anfotericina B e inibiu completamente o crescimento do fungo em 0,3µL/mL.

Pauli 2006 enumera vários compostos voláteis com comprovada atividade anticandida, avaliados por diferentes métodos. Dentre eles, α -pineno, limoneno, terpinen-4-ol, p-cimeno e γ -terpineno, os quais foram também encontrados nos óleos de *C. laevigata*.

Como mostram as tabelas 11, 12 e 13, considerando ativos os óleos que apresentaram porcentagem de inibição a partir de 50%, todos os óleos voláteis de *C. laevigata* mostraram-se inativos contra as bactérias gram-negativas *P. aeruginosa* e *E. coli*, mas alcançaram até 100% de inibição contra a gram-positiva *S. aureus*, com exceção dos cristais, inativos contra esse microrganismo, o que sugere que a laevigatina, composto predominante nos cristais, não é responsável pela atividade observada nos demais óleos.

Estes resultados corroboram com os obtidos por Oyedeji & Afolayan (2005), cujo estudo demonstrou que o óleo de *Centella asiatica*, de composição muito semelhante à de *C. laevigata*, é menos ativo contra bactérias gram-negativas, consideradas mais resistentes aos extratos vegetais.

Em estudos *in vitro*, *S. aureus* costuma mostrar-se mais sensível a óleos voláteis que outras bactérias (Hussain *et al.* 2008), assim como foi observado neste trabalho. Em geral, a atividade antimicrobiana dos óleos voláteis se dá pela presença de fenóis, aldeídos e alcoóis (Bakkali *et al.* 2008). Encontrado nos óleos da espécie em estudo, terpinen-4-ol parece ser responsável pela atividade antimicrobiana de óleos voláteis de *Melaleuca alternifolia* frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Edris 2007). Já o (E)-cariofileno, presente em baixos teores nos óleos de *C. laevigata*, é considerado inativo frente a *E. coli* (Duarte *et al.* 2007). O óleo volátil de *Phlomis russeliana*, cujos compostos majoritários são β -cariofileno, germacreno D e óxido de cariofileno, revelou atividade antimicrobiana de fraca a moderada quando testado contra várias bactérias (Demirci *et al.* 2008), o que sugere que β -cariofileno e germacreno D, presentes nos óleos de *C. laevigata*, podem ser parcialmente responsáveis pelas atividades observadas neste estudo, atuando por sinergismo com outros compostos bioativos cujo potencial ainda é desconhecido, uma vez que a interação sinérgica e antagonística entre os compostos voláteis presentes nos óleos influenciam na sua atividade antimicrobiana, como comprovado por Hussain *et al.* (2008), que observaram que o monoterpeno oxigenado linalol tem atividade antimicrobiana mais forte que o óleo bruto de *Ocimum basilicum*, do qual foi isolado.

Souza 2007 testou os óleos voláteis de populações de *Eupatorium laevigatum* (*C. laevigata*) provenientes de diferentes localidades no Rio Grande do Sul quanto à inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo método qualitativo de bioautografia em camada delgada, e

observou que o óleo oriundo de Caraá, cujo teor do monoterpeno α -pineno (6,5%) foi maior, apresentou maior inibição da enzima em relação ao óleo de Canela, cujo teor do mesmo foi equivalente a 0,1%. No mesmo estudo, a laevigatina isolada foi testada pelo mesmo ensaio e revelou-se fracamente ativa, o que corrobora com o resultado obtido no presente trabalho em relação ao cristal isolado (Tabela 14). Isso sugeriu que a atividade exercida pelo óleo volátil de *C. laevigata* oriundo do RS não pode ser atribuída à presença desse composto isoladamente. Como mostra a Tabela 14, no presente estudo não foi detectada atividade anticolinesterásica acima de 50% para os óleos de *C. laevigata* pelo método quantitativo em microplaca.

Registros na literatura (Miyazawa *et al.* 1997, Savelev *et al.* 2003, Barbosa Filho *et al.* 2006) atribuem com maior frequência a atividade anticolinesterásica a monoterpenos, como carvacrol, (+) e (-)-carvona, 1,8-cineol, (+) e (-)-mentol, (-)-mentona, iso-mentona, α - e β -pineno, acetato de bornila e (+)-pulegona, e com menor frequência a sesquiterpenos, como óxido de cariofileno, α - e β -ionona, nootkatona, suberogorgina e terreulactona A, pela escassez de estudos envolvendo essa classe de terpenóides.

Estudos sugerem que os compostos voláteis de um óleo essencial interagem entre si de forma sinérgica ou antagônica, potencializando ou reduzindo o potencial de acordo com as proporções dos compostos presentes. Seguindo essa linha, Savelev *et al.* (2003), em seu estudo com o óleo volátil de *Salvia lavandulaefolia* e seus compostos terpênicos isolados, demonstraram que as atividades anticolinesterásicas dos compostos majoritários testados isoladamente nas concentrações encontradas no óleo não foram tão fortes como a proporcionada pelo óleo bruto. Por isso, também é importante ressaltar aqueles compostos cuja ausência de atividade foi comprovada, o que pode auxiliar na compreensão das relações antagonísticas entre os compostos presentes nos óleos voláteis. Barbosa Filho *et al.* (2006) enumeram uma série de compostos já testados quanto ao seu potencial anticolinesterásico, entre os quais os terpenos cânfora, geraniol, linalol, γ -terpineno e terpineol mostraram-se inativos.

Savelev *et al.* (2003) sugerem ainda, em seu estudo, que a diluição entre os compostos pode reduzir a inibição da enzima acetilcolinesterase por bloqueio da entrada do substrato no sítio de ligação da enzima e que o período de incubação pode reduzir a atividade de inibidores reversíveis, como com o óleo volátil de *Salvia lavandulaefolia* e 1,8-cineol puro, que reduziram em 40% a atividade, sob incubação por 30 minutos a 30 °C.

Tabela 7. Limite de detecção da atividade antifúngica dos óleos voláteis de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* proveniente da população de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) em diferentes fases fenológicas, no período de 2 anos, pelo método de bioautografia direta contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

	Fase vegetativa				Fase de Floração				Fase de Frutificação				Fase de Dispersão							
	Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas		Ramos		Folhas	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
<i>C. cladosporioides</i>																				
200 µg	**	***	***	***	*	***	***	***	***	***	**	***	***	***	**	***	**	***	**	***
100 µg	**	***	***	***	*	***	***	***	***	***	**	***	***	***	**	***	**	***	**	***
50 µg	*	***	**	**	*	**	***	**	***	**	*	**	**	**	*	**	**	**	**	**
25 µg	*	**	*	**	*	**	***	**	***	**	*	**	*	**	i	**	*	**	*	**
10 µg	i	*	*	*	i	i	**	*	**	*	i	*	i	*	i	*	i	*	i	*
5 µg	i	*	i	i	i	i	*	i	*	*	i	*	i	*	i	*	i	i	i	i
Controle	***																			
<i>C. sphaerospermum</i>																				
200 µg	**	***	***	***	***	***	***	**	***	**	**	***	***	**	**	**	**	**	**	**
100 µg	**	**	***	**	***	***	***	**	***	**	**	***	***	**	**	**	**	**	**	**
50 µg	**	*	**	*	**	**	**	*	**	*	*	**	**	*	**	*	**	*	*	*
25 µg	*	*	**	*	*	*	**	*	**	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
10 µg	*	i	*	i	*	i	**	i	**	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
5 µg	i	i	*	i	*	i	*	i	*	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
Controle	***																			

Legenda: *** = atividade forte; ** = média; * = fraca; i = inativo; controle = nistatina (1 µg).

Tabela 8. Limite de detecção da atividade antifúngica dos óleos voláteis de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* proveniente da população de ocorrência natural na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) em diferentes fases fenológicas, no período de 2 anos, pelo método de bioautografia direta contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

	Fase vegetativa				Fase de Floração				Fase de Frutificação				Fase de Dispersão							
	Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas		Ramos		Folhas	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
<i>C. cladosporioides</i>																				
200 µg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
100 µg	**	***	**	***	***	***	**	***	**	***	***	***	**	***	***	***	**	***	***	***
50 µg	**	***	**	***	***	***	*	***	**	***	**	**	**	***	***	***	*	***	**	***
25 µg	*	***	**	***	***	***	i	***	*	***	*	**	*	***	**	***	i	***	*	***
10 µg	*	**	*	**	**	**	i	*	*	**	*	**	i	*	*	**	i	*	i	**
5 µg	i	*	*	**	*	*	i	*	i	**	i	*	i	*	i	*	i	i	i	*
Controle											***									
<i>C. sphaerospermum</i>																				
200 µg	**	***	**	***	***	***	**	***	**	***	***	**	**	***	**	***	**	***	**	***
100 µg	**	***	**	***	***	***	**	***	**	***	***	**	*	***	**	***	*	***	**	***
50 µg	**	***	**	***	***	**	*	***	**	***	**	*	*	**	**	**	*	**	**	**
25 µg	*	**	**	**	***	*	*	**	*	**	**	*	*	**	**	**	i	*	*	*
10 µg	i	*	i	*	**	i	i	*	*	*	*	i	i	*	*	*	i	i	i	i
5 µg	i	*	i	*	*	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	*	i	i	i	i
Controle											***									

Legenda: *** = atividade forte; ** = média; * = fraca; i = inativo; controle = nistatina (1 µg).

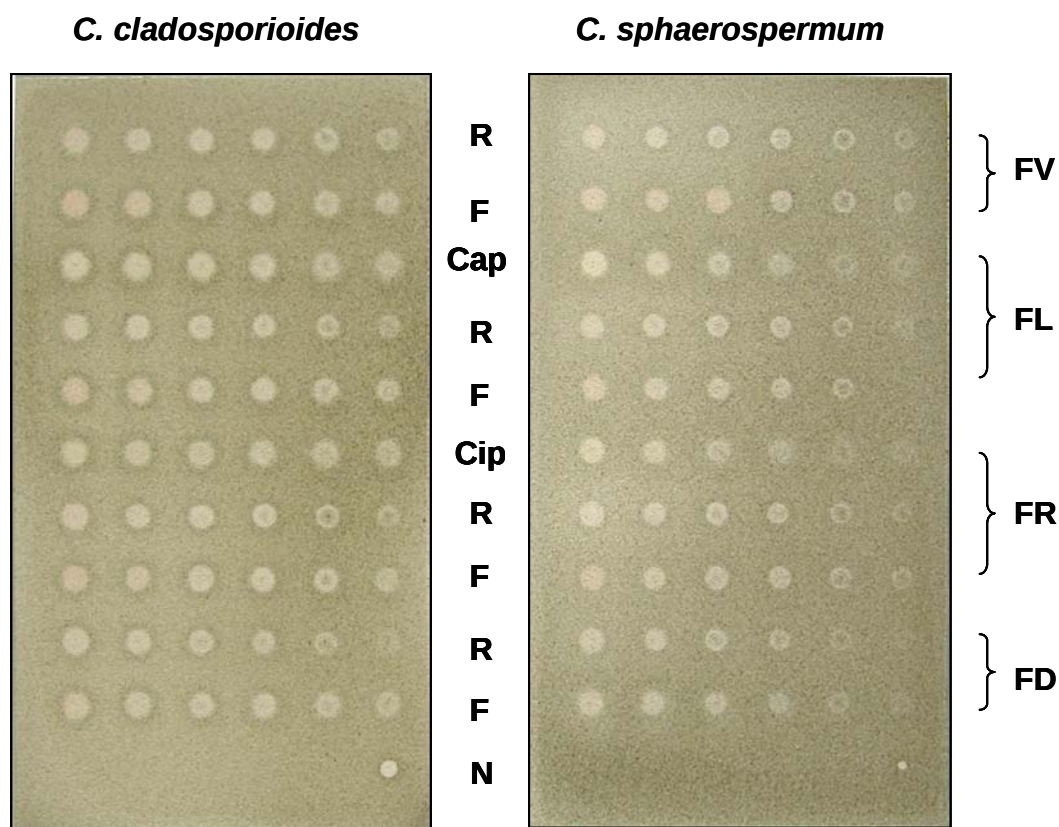


Figura 17. Limite de detecção da atividade antifúngica dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* obtidos de ramos, folhas, capítulos e cipselas da população de ocorrência natural na Mata Atlântica do Instituto de Botânica, em diferentes fases fenológicas, no ano de 2008, contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Legenda: R – ramos; F – folhas; Cap – capítulos; Cip – cipselas; N – nistatina; FV – fase vegetativa; FL – fase de floração; FR – fase de frutificação; FD – fase de dispersão.

Tabela 9. Limite de detecção da atividade antifúngica dos óleos voláteis de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* proveniente da população cultivada no Instituto de Botânica (PCIB) em diferentes fases fenológicas, no período de 2 anos, pelo método de bioautografia direta contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

	Fase vegetativa				Fase de Floração				Fase de Frutificação				Fase de Dispersão							
	Ramos		Folhas		Capítulos		Ramos		Folhas		Cipselas		Ramos		Folhas		Ramos		Folhas	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
<i>C. cladosporioides</i>																				
200 µg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	**	***	***	***	**	***	***	***	***
100 µg	***	***	***	***	***	***	***	***	***	**	***	**	***	***	***	**	***	***	**	***
50 µg	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
25 µg	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	*	*	**	*	**	*	**	*	**
10 µg	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	i	i	i	*	i	*	i	*	i	*
5 µg	i	*	*	*	i	*	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
Controle											***									
<i>C. sphaerospermum</i>																				
200 µg	***	***	***	***	***	***	*	***	**	***	***	**	*	***	***	***	***	**	***	***
100 µg	***	**	***	**	***	**	*	**	**	**	***	**	*	**	**	**	**	**	***	**
50 µg	**	**	**	**	***	*	*	*	**	*	**	*	*	*	**	*	**	*	**	*
25 µg	*	**	**	*	**	i	*	*	*	*	**	i	*	*	*	*	*	*	*	*
10 µg	*	*	*	i	*	i	i	i	*	i	*	i	i	i	*	i	i	i	i	i
5 µg	i	i	i	i	*	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i	i
Controle											***									

Legenda: *** = atividade forte; ** = média; * = fraca; i = inativo; controle = nistatina (1 µg).

Tabela 10. Limite de detecção da atividade antifúngica do cristal de laevigatina isolado dos capítulos de *Chromolaena laevigata* provenientes da população de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG) pelo método de bioautografia direta contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*.

Laevigatina	
<i>C. cladosporioides</i>	
200 µg	*
100 µg	*
50 µg	*
25 µg	*
10 µg	i
5 µg	i
Controle	***
<i>C. sphaerospermum</i>	
200 µg	**
100 µg	*
50 µg	*
25 µg	*
10 µg	i
5 µg	i
Controle	***

Tabela 11. Atividades antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) de óleos voláteis e cristais de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* coletada em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 (cinza) e 2008 (sem preenchimento), proveniente da população de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu.

			% de inibição			
			<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Fase vegetativa	Ramos		34,8	93,4	23,9	22,9
			87,8	95,3	34,2	5,7
	Folhas		0,0	90,7	41,8	18,6
			0,0	96,7	36,5	0,0
Fase de floração	Capítulos	cristal	24,4	42,1	0,0	0,0
		óleo	0,0	70,1	2,3	0,0
		integral	17,2	3,5	0,0	0,0
	Ramos		83,0	98,4	39,7	13,8
			-	-	-	-
	Folhas		6,3	98,1	50,4	12,4
		14,3	100,0	21,3	0,0	
Fase de frutificação	Cipselas	integral	57,4	68,3	0,0	0,0
		integral	93,3	53,1	0,0	0,0
	Ramos		80,4	96,0	48,7	28,3
			-	-	-	-
	Folhas		75,9	96,6	28,1	0,0
			12,4	96,3	38,2	0,0
Fase de dispersão	Ramos		91,4	97,1	41,1	48,8
			90,0	96,0	38,9	0,0
	Folhas		80,1	96,5	49,2	15,0
			28,0	90,9	32,6	0,0
		Controle		96,2	100,0	100,0

Legenda: -: não realizado.

Tabela 12. Atividades antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) de óleos voláteis e cristais de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* coletada em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 (cinza) e 2008 (sem preenchimento), proveniente da população de ocorrência natural na Mata Atlântica do Instituto de Botânica.

		% de inibição			
		<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Fase vegetativa	Ramos	66,2	95,2	32,5	27,5
		-	-	-	-
	Folhas	13,0	90,5	43,7	11,7
Fase de floração	Capítulos	0,0	93,3	26,8	0,0
	cristal + óleo integral	0,0	0,0	0,0	0,0
		-	-	-	-
	Ramos	70,0	87,3	47,9	17,3
		-	-	-	-
	Folhas	5,9	94,8	46,7	5,1
Fase de frutificação		0,0	96,4	32,6	0,0
	Cipselas	43,5	64,5	1,5	0,0
	óleo integral	-	-	-	-
		-	-	-	-
	Ramos	74,3	90,7	37,3	24,8
		-	-	-	-
Fase de dispersão	Folhas	10,3	97,7	41,6	8,4
		17,0	94,1	40,0	0,0
	Ramos	90,7	88,7	43,3	3,4
		-	-	-	-
	Folhas	93,0	93,5	53,7	0,8
Controle		4,7	94,9	38,4	0,0
		96,2	100,0	100,0	100,0

Legenda: -: não realizado.

Tabela 13. Atividades antifúngica (*Candida albicans*) e antibacteriana (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*) de óleos voláteis e cristais de folhas, ramos, capítulos e cipselas de *Chromolaena laevigata* coletada em diferentes fases fenológicas, nos anos de 2007 (cinza) e 2008 (sem preenchimento), proveniente da população cultivada no Instituto de Botânica.

			% de inibição			
			<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Fase vegetativa	Ramos		86,0	87,9	43,6	27,0
			94,3	98,2	32,4	8,8
	Folhas		1,1	87,6	32,5	9,5
			51,5	93,6	21,9	1,4
Fase de floração	Capítulos	cristal + óleo	0,0	0,0	0,0	0,0
		integral	62,2	71,0	4,0	0,0
	Ramos		75,5	89,1	43,3	23,8
			0,0	98,9	40,4	7,3
	Folhas		0,0	94,4	43,1	9,6
			64,9	97,9	44,6	0,0
Fase de frutificação	Cipselas	cristal	25,2	80,5	0,0	0,0
		óleo	51,0	77,3	0,0	0,0
		integral	65,8	76,0	0,0	0,0
	Ramos		90,7	96,9	41,5	21,5
			96,7	98,7	34,2	5,4
	Folhas		71,6	96,1	43,8	5,5
		57,6	94,8	41,2	0,0	
Fase de dispersão	Ramos		87,8	91,8	37,5	9,7
			88,7	95,1	33,3	0,0
	Folhas		86,3	91,6	33,8	0,0
			85,0	93,9	28,1	0,0
	Controle			96,2	100,0	100,0

Legenda: -: não realizado.

Tabela 14. Atividade anticolinesterásica (% de inibição; média $\pm$ erro padrão) dos óleos voláteis de folhas, ramos, capítulos e cipselas e laevigatina isolada de *Chromolaena laevigata* proveniente das populações de ocorrência natural no Cerrado de Mogi-Guaçu (PONCMG), na Mata Atlântica do Instituto de Botânica (PONMAIB) e cultivada no Instituto de Botânica (PCIB), em diferentes fases fenológicas, no período de dois anos.

		PONCMG		PONMAIB		PCIB	
		2007	2008	2007	2008	2007	2008
Fase vegetativa	Ramos	8,57 $\pm$ 2,50	26,79 $\pm$ 1,06	20,34 $\pm$ 1,76	16,62 $\pm$ 0,81	26,79 $\pm$ 1,06	6,87 $\pm$ 0,34
	Folhas	15,74 $\pm$ 2,62	13,08 $\pm$ 3,34	14,99 $\pm$ 2,11	14,62 $\pm$ 2,49	13,08 $\pm$ 3,34	11,04 $\pm$,013
	Capítulos	14,69 $\pm$ 3,03	36,31 $\pm$ 2,12	42,65 $\pm$ 1,01	23,94 $\pm$ 1,53	36,31 $\pm$ 2,12	18,08 $\pm$ 0,59
Fase de floração	Ramos	14,36 $\pm$ 1,82	30,13 $\pm$ 1,07	14,22 $\pm$ 2,38	23,43 $\pm$ 1,66	30,13 $\pm$ 1,07	17,18 $\pm$ 1,49
	Folhas	16,11 $\pm$ 1,53	21,29 $\pm$ 1,01	5,75 $\pm$ 3,40	22,38 $\pm$ 1,32	21,29 $\pm$ 1,01	13,72 $\pm$ 3,68
	Cipselas	8,26 $\pm$ 2,56	16,58 $\pm$ 3,28	13,91 $\pm$ 1,69	7,97 $\pm$ 1,28	16,58 $\pm$ 3,28	15,58 $\pm$ 0,17
Fase de frutificação	Ramos	22,67 $\pm$ 0,52	20,79 $\pm$ 3,34	24,22 $\pm$ 0,67	18,96 $\pm$ 0,94	20,79 $\pm$ 3,34	18,96 $\pm$ 0,96
	Folhas	17,76 $\pm$ 1,57	14,60 $\pm$ 1,39	12,59 $\pm$ 0,95	16,39 $\pm$ 0,65	14,6 $\pm$ 1,39	13,54 $\pm$ 2,17
Fase de dispersão	Ramos	20,85 $\pm$ 1,21	27,08 $\pm$ 1,99	21,85 $\pm$ 0,51	20,91 $\pm$ 2,12	27,08 $\pm$ 1,99	18,74 $\pm$ 1,68
	Folhas	15,70 $\pm$ 0,59	13,52 $\pm$ 2,74	15,54 $\pm$ 0,93	12,54 $\pm$ 1,26	13,52 $\pm$ 2,74	12,9 $\pm$ 1,04
Laevigatina				18,92 $\pm$ 1,01			
Galantamina				81,23 $\pm$ 0,42			

5. Considerações Finais

Os menores rendimentos de óleos voláteis obtidos de folhas de *Chromolaena laevigata* da população proveniente do Cerrado, bem como o menor teor de monoterpenos desta, em relação às populações provenientes da Mata Atlântica, podem estar relacionados com a maior temperatura e menor umidade e precipitação daquela região, o que desfavorece a manutenção de compostos mais voláteis, como os monoterpenos. Mas de um modo geral, as variações observadas na composição química dos óleos voláteis de *Chromolaena laevigata* não puderam ser diretamente relacionadas com as variáveis ambientais medidas, o que sugere que outros fatores ambientais não avaliados podem estar envolvidos, bem como o fator genético de cada população.

A composição química das três populações foi semelhante, com predominância de sesquiterpenos e os mesmos compostos majoritários, com um balanço entre espatulenol em ramos e laevigatina em folhas e órgãos reprodutivos.

As atividades biológicas observadas neste estudo se devem à ação sinérgica dos compostos voláteis que compõem os óleos testados, uma vez que a laevigatina, o constituinte majoritário nos óleos de folhas e partes reprodutivas da espécie estudada, não apresentou atividade nos ensaios utilizados.

A escassez de trabalhos publicados sobre a bioatividade da maioria dos compostos identificados nestes óleos sugere que mais estudos sejam realizados, principalmente no que se refere aos sesquiterpenos.

Os óleos voláteis apresentaram bons resultados contra os fungos filamentosos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, principalmente na população de ocorrência natural na Mata Atlântica, mas em concentrações muito maiores que a do controle Nistatina.

Para o fungo leveduriforme *Candida albicans*, os óleos obtidos da população cultivada mostraram-se mais ativos, com aproximadamente o triplo da concentração do controle positivo.

Exceto pelos cristais isolados, todos os óleos voláteis testados revelaram bons resultados contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Estudos posteriores deverão ser realizados para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) desses óleos frente a este microrganismo.

Os óleos testados não apresentaram potencial anticolinesterásico.

6. Conclusões

- Foram encontrados cerca de 60 compostos nos óleos de *Chromolaena laevigata* das populações da Mata Atlântica e do Cerrado, dos quais 47 foram identificados.
- A laevigatina pode ser considerada um marcador taxonômico para esta espécie.
- Observou-se um balanço entre laevigatina e espatulenol, compostos encontrados majoritariamente em folhas e partes reprodutivas e em ramos, respectivamente.
- Os compostos verboccidentafurano, dihidroisochromolaenina e pirocurzerenona foram encontrados exclusivamente nos órgãos reprodutivos.
- Apesar da literatura definir os monoterpenos como a classe de compostos predominante nos óleos voláteis, os óleos de *C. laevigata* apresentam teores bem maiores de sesquiterpenos em sua composição.
- O período de dois anos não foi suficiente para observar uma tendência na produção e composição dos óleos voláteis nessa espécie. Talvez seja necessário um período de análise mais longo para encontrar um padrão.
- Este foi o primeiro estudo com esta espécie envolvendo a análise de diferentes partes vegetais e nas diferentes fases fenológicas, buscando compreender, no período de dois anos, a dinâmica de produção de óleo volátil ao longo do seu ciclo de vida, em diferentes populações.
- Apesar da espécie apresentar bom rendimento de óleo volátil, as atividades biológicas detectadas nas concentrações preliminares, quando comparadas à concentração dos padrões, não justificam a exploração desses óleos para fins farmacêuticos.

7. Resumo

Chromolaena laevigata (Lam.) King & Rob., pertencente à família Asteraceae, é uma planta perene, arbustiva, proveniente das Américas e encontrada em cerrado, bordas de floresta e áreas de vegetação alterada. Trabalhos anteriores demonstraram que apesar da composição química dos óleos desta espécie variar em função do seu local de coleta, a laevigatina é a substância majoritária, considerada marcador químico da espécie. Ensaios com extratos da espécie revelaram atividades antifúngica e antibacteriana. O objetivo deste estudo foi analisar a composição química e as atividades biológicas dos óleos voláteis de *C. laevigata*, em diferentes fases fenológicas, no período de dois anos, de populações de ocorrência natural do Cerrado de Mogi-Guaçu e do Instituto de Botânica e de plantas cultivadas no Instituto de Botânica. Para tanto, ramos e folhas secos e capítulos e cipselas frescos foram extraídos por hidrodestilação (3 horas) e analisados por CG/EM. A atividade antifúngica pelo método de bioautografia direta utilizou como fungos reveladores *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Para o ensaio por microdiluição foram utilizados os microrganismos *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A atividade anticolinesterásica foi avaliada por ensaio colorimétrico em microplaca. Os maiores rendimentos de óleo volátil foram obtidos de folhas, em relação a ramos e órgãos reprodutivos, e em geral maiores no segundo ano de coleta. As folhas das plantas provenientes do Cerrado apresentaram menor rendimento que as da Mata Atlântica. Foram encontrados cerca de 60 compostos voláteis, dos quais 47 foram identificados, com predomínio de sesquiterpenos. Os maiores teores de monoterpenos foram obtidos nos óleos oriundos das populações de Mata Atlântica e no segundo ano de estudo notou-se, em geral, uma redução dessa classe de compostos nos óleos. Observou-se um balanço entre os majoritários espatulenol e laevigatina, em que o aumento de um coincidiu com a redução do outro, sendo que o primeiro predominou em ramos e o segundo em folhas, capítulos e cipselas. Cristais de laevigatina formaram-se nos óleos de capítulos e cipselas coletados em 2007, o que não se repetiu em 2008. O limite de detecção do ensaio de bioautografia direta revelou que, de um modo geral, os óleos de *C. laevigata* possuem potencial antifúngico contra *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*, não atribuído à presença de laevigatina, com destaque para a população de ocorrência natural na Mata Atlântica, com atividade forte em até 25 µg de óleo. A população cultivada foi mais ativa que as demais contra *Candida albicans*. Todos os óleos testados foram ativos contra *Staphylococcus aureus* com até 100% de inibição, com exceção dos cristais de capítulos, mas inativos contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Não foi detectada atividade anticolinesterásica para os óleos testados. Os resultados permitem concluir que os óleos de *C.*

laevigata sofrem variações de acordo com o ambiente em que se desenvolvem as plantas, bem como de um ano para o outro e sob as diferentes fases fenológicas, resultando em variações nas atividades biológicas por eles promovidas, com destaque para o seu potencial antifúngico.

8. Abstract

Chromolaena laevigata (Lam.) King & Rob., belonging to the Asteraceae family, is a perennial shrub from the Americas and found in Cerrado, forest edges and areas of altered vegetation. Previous studies have shown that despite the chemical composition of the oils of this species varies according to their place of collection, laevigatin is the majority compound, considered the chemical marker of the species. Bioassay with extracts of this species showed antibacterial and antifungal activities. The aim of this study was to analyze the chemical composition and biological activities of the volatile oils of *C. laevigata* in different phenological phases, during the period of two years, of natural occurrence populations from the Mogi-Guaçu Cerrado and the Instituto de Botânica and plants cultivated in the Instituto de Botânica. Dried stems and leaves and fresh capitula and cypselas were extracted by hydrodistillation (3 hours) and analyzed by GC/MS. *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum* were used in antifungal activity by the method of direct bioautography. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* were used for the antimicrobial test by microdilution. The anticholinesterase activity was evaluated by colorimetric assay in microplate. The best yields of volatile oil were obtained from leaves, instead of stems and reproductive organs, and generally higher in the second year of collection. Leaves of the plants from Cerrado had lower yields than those from the Atlantic Forest. Sixty volatile compounds were found and 47 of them were identified, with predominance of sesquiterpenes. The highest levels of monoterpenes were obtained in oils from the populations of Atlantic Forest and, in general, in the second year of study a reduction of this class of compound was noticed. There was a balance between the major compounds spathulenol and laevigatin, when the increase of one coincided with the reduction of the other, with the first in stems and the second in leaves, capitula and cypselas. Laevigatin crystal was formed in oils of capitula and cypselas collected in 2007, what didn't repeat in 2008. The detection limit of the direct bioautography test showed that, in general, the oils of *C. laevigata* have antifungal potential against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*, which cannot be attributed to the presence of laevigatin, with emphasis on the population of natural occurrence in the Atlantic Forest, which showed the strongest activities up to 25 µg of oil. The cultivated population was the most active against *Candida albicans*. All oils tested were active against *Staphylococcus aureus* with up to 100% of inhibition, except for the crystals of capitula, but inactive against *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Anticholinesterase activity was not detected for the oils tested. The results show that the oils of *C. laevigata* suffer variations according to the environment in which plants are developed

as well as from one year to another and under the different phenological phases, resulting in changes in their biological activities, with emphasis on its antifungal potential.

9. Referências Bibliográficas

- Adams, R.P.** 2007. Identification of essential oil components by gás chromatography/ mass spectrometry. Allured Publishing Corporation. Carol Stream. 804 p.
- Agostini, F., Santos, A.C.A., Rossato, M., Pansera, M.R., Zattera, F., Wasum, R. & Serafini, L.A.** 2005. Estudo do óleo essencial de algumas espécies do gênero *Baccharis* (Asteraceae) do sul do Brasil. *Revista brasileira de farmacognosia* 15, 215-220.
- Aharoni, A., Jongsma, M.A., Kim, T.-Y., Ri, M.-B., Giri, A.P., Verstappen, F.W.A., Schwab, W. & Bouwmeester, H.J.** 2006. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. *Phytochemistry reviews* 5: 49-58.
- Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica – período de 2000 a 2005.** 2008. Fundação SOS Mata Atlântica & Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São Paulo.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. & Idaomar, M.** 2008. Biological effects of essential oils – a review. *Food and chemical toxicology* 46: 446-475.
- Baldwin, I.T. & Preston, C.A.** 1999. The eco-physiological complexity of plant responses to insect herbivores. *Planta* 208: 137-145.
- Barbosa Filho, J.M., Medeiros, K.C.P., Diniz, M.F.F.M., Batista, L.M., Athayde-Filho, P.F., Silva, M.S., da-Cunha, E.V.L., Almeida, J.R.G.S. & Quintans-Júnior, L.J.** 2006. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 16(2): 258-285.
- Barroso, G.M.** 1991. Sistemática de angiospermas do Brasil. Viçosa: UFV Imprensa universitária. 326p.

- Bartley, G.E. & Scolnik, P.A.** 1995. Plant carotenoids: pigments for photoprotection, visual attraction and human health. *The plant cell* 7: 1027-1038.
- Bedi, G., Tonzibo, Z.F., Chalchat, J.C. & N'Guessan, T.Y.** 2001. Chemical composition of *Chromolaena odorata* L. King Robinson (Asteraceae) essential oils from Abidjan, Ivory coast. *Journal de la Societe Quest-Africaine de Chimie* 7: 29-37.
- Belliardo, F., Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Rubiolo, P. & Sgorbini, B.** 2006. Headspace-solid-phase microextraction in the analysis of the volatile fraction of aromatic and medicinal plants. *Journal of chromatography science* 44: 416-429.
- Botelho, M.A., Nogueira, N.A.P., Bastos, G.M., Fonseca, S.G.C., Lemos, T.L.G., Matos, F.J.A., Montenegro, D., Heukelbach, J., Rao, V.S. & Brito, G.A.C.** 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian journal of medical and biological research* 40: 349-356.
- Bouda, H., Tapondjou, L.A., Fontem, D.A. & Gumedzoe, M.Y.D.** 2001. Effect of essential oils from leaves of *Ageratum conyzoides*, *Lantana camara* and *Chromolaena odorata* on the mortality of *Sitophilus zeamais* (Coleoptera, Curculionidae). *Journal of Stored Products Research* 37: 103-109.
- Bremer, K.** 1994. Cladistics and classification. Portland, Oregon: Timber press. 727 p.
- Briskin, D.** 2000. Medicinal plants and phytomedicines – Linking plant biochemistry and physiology to human health. *Plant physiology* 124: 507-514.
- Bülow, N. & König, W.A.** 2000. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis investigations of acid catalysed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55: 141-168.
- Burt, S.** 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International journal of food microbiology* 94: 223-253.

- Carvalho, M.A.M., Zaidan, L.B.P. & Dietrich, S.M.C.** 1997. Growth and fructan content of plants of *Vernonia herbacea* (Asteraceae) regenerated from rhizophores. *New phytologist* 136,153-161.
- Cechinel Filho, V. & Yunes, R.A.** 1998. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais – Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química nova* 21(1): 99-105.
- Chang, H.-T., Cheng, Y.-H., Wu, C.-L., Chang, S.-T., Chang, T.-T. & Su, Y.-C.** 2008. Antifungal activity of essential oil and its constituents from *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* Florin leaf against plant pathogenic fungi. *Bioresource technology* 99: 6266-6270.
- Clavin, M., Lorenzen, K., Mayer, A., Martino, V. & Anke, T.** 1999. Biological activities in medicinal species of *Eupatorium*. *Acta Horticulturae* 501: 277-282.
- Craveiro, A.A.** 2007. Do laboratório ao mercado – 34 anos de P & D em óleos essenciais no nordeste. In: IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Fortaleza. Disponível em: <http://www.ivsboe.padetec.ufc.br/palestras/afranio.pdf> Acesso em: 16.11.2008.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In: B. Buchanan, W. Gruissem & R. Jones (eds.). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, 1367 p.
- Cruz, M.C.S., Santos, P.O., Barbosa Junior, A.M., de Melo, D.L.F.M., Alviano, C.S., Antonioli, D.S. & Trindade, R.C.** 2007. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *Journal of ethnopharmacology* 111: 409-412.
- Demirci, F., Guven, K., Demirci, B., Dadandi, M.Y. & Baser, K.H.C.** 2008. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food control* 19(12): 1159-1164.

- Devienne, K.F. & Raddi, M.S.G.** 2002. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology* 33: 166-168.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S.G.** 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology* 88: 308-316.
- Duarte, M.C., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M. & Sartoratto, A.** 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *Journal of ethnopharmacology* 111: 197-202.
- Edris, A.E.** 2007. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytotherapy research* 21: 308-323.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V.Jr., Featherstone, R.M.,** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7: 88-95.
- Esteves, R.L.** 2001. O gênero *Eupatorium* s.l. (Compositae – Eupatorieae) no Estado de São Paulo – Brasil. Tese de Doutorado. Unicamp.
- Farmacopéia brasileira IV** 2001. 4ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- Felippe, M.F. & Souza, T.A.R.** 2006. A biogeografia do Cerrado em concomitância com sua história econômica e suas perspectivas para o futuro. *Enciclopédia biosfera* 01: 1-33.
- Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Kerntopf, M.R., Brillhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Tomé, A.R., Queiroz, M.G.R., Nascimento, N.R.F., Sidrin, J.J.C. & Rocha, M.F.G.** 2007. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.. *Journal of antimicrobial chemotherapy* 59: 934-940.
- Frenedozo, R.C.** 2004. Plant reproductive phenology and dispersal patterns after natural regeneration in a limestone mining spoil banks. *Brazilian archives of biology and technology* 47(2): 261-271.

- Gauvin, A. & Smadja, J.** 2005. Essential oil composition of four *Psiadia* species from Reunion Island: a chemotaxonomic study. *Biochemical systematics and ecology* 33: 705-714.
- Gershenzon, J. & Dudareva, N.** 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature chemical biology* 3(7): 408-414.
- Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L. & Portugal, H.** 2004. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy research* 18: 990-995.
- Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C. & Borin, M.R. de M.B.** 1996. Biodiversidade, um enfoque químico-biológico 1ed. Rio de Janeiro: UFRJ.
- Hanks, G.W., De Conno, F., Cherny, N., Hanna, M., Kalso, E., McQuay, H.J., Mercadante, S., Meynadier, J., Poulain, P., Ripamonti, C., Radbruch, L., Roca, I., Casas, J., Sawe, J., Twycross, R.G. & Ventafridda, V.** 2001. Morphine and alternative opioids in cancer pain: the EAPC recommendations. *British journal of cancer* 84(5): 587-593.
- Hartmann, T.** 2007. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 68: 2831-2846.
- Heinrich, M., Barnes, J., Gibbons, S. & Williamson, E.M.** 2004. Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy, 1ed. London: Churchill Livingstone.
- Hind, D.J.N.** 1993. Notes on the Compositae of Bahia, Brazil. *Kew Bulletin* 48:245-277.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* 51: 327-329.

- Hong, E.J., Na, K.J., Choi, I.G., Choi, K.C. & Jeung, E.B.** 2004. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. *Biological and pharmaceutical bulletin* 27: 863-866.
- Howes, M.-J.R. & Houghton, P.J.** 2003. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, biochemistry and behavior* 75: 513-527.
- Hussain, A.I., Anwar, F., Sherazi, S.T.H. & Przybylski, R.** 2008. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. *Food chemistry* 108: 986-995.
- Inoue, Y., Sgiraishi, A., Hada, T., Hirose, K., Hamashima, H. & Shimada, J.** 2004. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. *FEMS microbiology letters* 237: 325-331.
- Iranshahi, M., Emami, S.A. & Mahmoud-Soutani, M.** 2007. Detection of Sesquiterpene Lactones in Ten *Artemisia* Species Population of Khorasan Provinces. *Iranian journal of basic medical sciences* 10, 183-188.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Steves, P.F.** 1999. *Plants systematics – a phylogenetic approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. 464p.
- King, R.M. & Robinson, H.** 1987. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Monographs in systematic botany from the Missouri botanical garden 22. St. Louis. Missouri botanical garden.
- Kinghorn, A.D.** 1992. Plants as sources of medicinally and pharmaceutically important compounds. In: H.N. Nigg. & D. Seigler (eds.). *Phytochemical resources for medicine and agriculture*. New York and London: Plenum Press, p. 75-95.
- Kinghorn, A.D.** 2001. Pharmacognosy in the 21st century. *Journal of pharmacy and pharmacology*. 53: 135-148.

- Kronka, F.J.N., Nalon, M.A., Matsukuma, C.K., Pavão, M., Guillaumon, J.R., Cavalli, A.C., Giannotti, E., Iwane, M.S.S., Lima, L.M.P.R., Montes, J., Del Cali, I.H. & Haack, P.G.** 1998. Áreas de domínio do cerrado no Estado de São Paulo. Secretaria de Estado do Meio Ambiente, Instituto Florestal, São Paulo.
- Lago, J.H.G., Romoff, P., Fávero, O.A., Souza, F.O., Soares, M.G., Baraldi, P.T. & Corrêa, A.G.** 2008. Chemical composition of male and female *Baccharis trimera* (Less.) DC. (Asteraceae) essential oils. *Biochemical systematics and ecology* 36: 737-740.
- Lago, J.H.G., Romoff, P., Pirani, J.R. & Roque, N.F.** 2007. Essential oil from *Guarea macrophylla* Vahl var. *tuberculata* vellozo (Meliaceae) leaves – variation in the chemical component proportions. *Journal of essential oil research* 19: 338-341.
- Lahlou, M.** 2004. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour and fragrance journal* 19: 159-165.
- Ling, B., Zhang, M. & Pang, X.** 2003. Biological activities of the volatile oil from *Chromolaena odorata* on fungi and insects and its chemical constituent. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 15: 183-187.
- Lorenzi, H.** 1991. Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais. Ed. Plantarum. São Paulo. 440 p.
- Machado, R.B., Ramos Neto, M.B., Pereira, P.G.P., Caldas, E., Gonçalves, D.A., Santos, N.S., Tabor, K. & Steininger, M.** 2004. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação internacional, Brasília, DF.
- Macias, F.A., Galindo, J.L.G. & Galindo, J.C.G.** 2007. Evolution and current status of ecological phytochemistry. *Phytochemistry* 68: 2917-2936.
- Maia, J.G.S., Zoghbi, M.G.B., Andrade, E.H.A., Silva, M.H.L., Luz, A.I.R. & Silva, J.D.** 2002. Essential oils composition of *Eupatorium* species growing wild in the Amazon. *Biochemical Systematics and Ecology* 30: 1071-1077.

- Malizia, R.A., Cardell, D.A., Molli, J.S., González, S., Guerra, P.E. & Grau, R.** 2005. Volatile constituents of leaf oils from the genus *Baccharis*. Part II: *Baccharis obovata* Hooker et Arnott and *B. salicifolia* (Ruiz et Pav.) Pers. species from Argentina. *Journal of essential oil research* 17: 194-197.
- Mantovani, W. & Martins, F.R.** 1993. Florística do Cerrado na Reserva Biológica de Mogi-Guaçu, SP. *Acta botanica brasílica* 7: 33-60.
- Miyazawa, M., Watanabe, H. & Kameoka, H.** 1997. Inhibition of acetylcholinesterase activity by monoterpenoids with a *p*-menthane skeleton. *Journal of agriculture and food chemistry* 45: 677-679.
- Myers, N., Mittermeyer, R.A., Mittermeyer, C.G., Fonseca, G.A.B. & Kent, J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Njoroge, S.M., Ukeda, H. & Sawamura, M.** 2003. Changes of the volatile profile and artifact formation in daidai (*Citrus aurantium*) cold-pressed peel oil on storage. *Journal of agriculture and food chemistry* 51(14): 4029-4035.
- Oliveira, A.B., Carazza, F., Ramos, L.S. & Maia, J.G.S.** 1990. The essential oil of *Eupatorium laevigatum*. *Journal of Essential Oil Research* 2: 49-50.
- Oliveira, A.B., Oliveira, G.G., Carazza, F., Braz Filho, R., Bacha, C.T.M., Bauer, L., Silva, G.A.A.B., Siqueira, N.C.S.** 1978. Laevigatin, a sesquiterpenoid furan from *Eupatorium laevigatum* Lam.. *Tetrahedron letters* 30: 2653-2654.
- Organização Mundial da Saúde (OMS)** 2003. Traditional medicine. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/> (acesso em 05.11.2008).
- Organização Mundial da Saúde (OMS)** 2004. Causes of death. <http://www.who.int/healthinfo/statistics/bodgbddeathdalyestimates.xls> (acesso em 05.11.2008).

- Owen, S.M. & Peñuelas, J.** 2005. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. Trends in plant science 10 (9): 420-426.
- Oyedeji, O.A. & Afolayan, A.J.** 2005. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Centella asiatica* growing in South Africa. Pharmaceutical biology 43(3): 249-252.
- Pagán, J.A. & Pauly, M.V.** 2005. Access to conventional medical care and the use of complementary and alternative medicine. Health affairs 24(1): 255-262.
- Pauli, A.** 2006. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. Medicinal research reviews 26(2): 223-268.
- Paulo Filho, W.** 2000. Estudo pré-clínico e clínico das ações antiinflamatória e analgésica de *Eupatorium laevigatum*, em abordagem fitoterápica, no tratamento da estomatite ulcerada simples, a partir da medicina tradicional do Cerrado brasileiro. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Brasília. 153 p.
- Pellati, F., Benvenuti, S., Yoshizaki, F., Bertelli, D. & Rossi, M.C.** 2005. Headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of the volatile compounds of *Evodia* species fruits. Journal of chromatography A 1087: 265-273.
- Perez-Alonso, M.J., Velasco-Negueruela, A., Pala-Paúl, J. & Sanz, J.** 2003. Variations in the essential oil composition of *Artemisia pedemontana* gathered in Spain: chemotype camphor-1,8-cineole and chemotype davanone. Biochemical systematics and ecology 31: 77-84.
- Pinto, A.C., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Lopes, N.P. & Epifanio, R.A.** 2002. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. Química nova 25(1): 45-61.
- Pisutthanan, N., Liawruangrath, B., Liawruangrath, S., Baramée, A., Apisariyakul, A., Korth, J. & Bremner, J.B.** 2006. Constituents of the essential oil from aerial parts

of *Chromolaena odorata* from Thailand. Natural Product Research, Part A: Structure and Synthesis 20: 636-640.

Politeo, O., Juki, M. & Milo, M. 2006. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of twelve spice plants. Croatica chemical acta 79(4): 545-552.

Potzernheim, M.C.L., Bizzo, H.R. & Vieira, R.F. 2006. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). Revista brasileira de farmacognosia 16(2): 246-251.

Pourmortazavi, S.M. & Harjimirsadeghi, S.S. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. Journal of chromatography A 1166: 2-24.

Rahalison, L., Hamburger, M., Monod, M., Frenk, E. & Hostettmann, K. 1994. Antifungal tests in phytochemical investigations comparison of bioautographic methods using phytopatogenic and human pathogenic fungi. Planta Medica 60: 41-44.

Rhee, I.K., Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R. 2001. Screening for acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin layer chromatography in combination with bioactivity staining. Journal of chromatography 915 : 217-223.

Rizzini, C.T. 1997. Tratado de fitogeografia do Brasil. Âmbito cultural edições ltda., Rio de Janeiro. 2º edição. 747 p.

Roda, A., Halitschke, R., Steppuhn, A. & Baldwin, I.T. 2004. Individual variability in herbivore-specific elicitors from the plant's perspective. Molecular ecology 13: 2421-2433.

Rodrigues, E. & Carlini, E.A. 2004. Plants used by a quilombola group in Brazil with potential central nervous system effects. Phytotherapy research 18: 748-753.

- Salie, F., Eagles, P.F.K., Leng, H.M.J.** 1996. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. *Journal of Ethnopharmacology* 52: 27-33.
- Santos, P. & Funari, F.L.** 2002. Clima local. In: D.C. Bicudo, M.C. Forti & C.E.M. Bicudo (Eds.). *Parque Estadual das Fontes do Ipiranga: uma reserva biológica na cidade de São Paulo*, São Paulo: SMA do Estado de São Paulo, SP, p. 29-48.
- Santos, R.I.** 2004. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petronick (eds.). *Farmacognosia - da planta ao medicamento*, 5ed. Florianópolis: Editora da UFSC & Editora da UFRS, p. 403-434.
- Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. & Perry, E.K.** 2003. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenóides in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. *Pharmacology, biochemistry and behavior* 75: 661-668.
- Schnitzler, P., Koch, C. & Reichling, J.** 2007. Susceptibility of drug-resistant clinical HSV-1 strains to essential oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 1859-1862.
- Schwob, I., Bessiere, J.-M., Masotti, V. & Viano, J.** 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. *Biochemical systematics and ecology* 32: 735-745.
- Silva, C.M., Bolzan, A.A. & Heinzmann, B.M.** 2006. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. *Química nova* 29, 1047-1053.
- Simões, C.M.O. & Spitzer, V.** 2004. Óleos voláteis. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. de Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick eds. *Farmacognosia da planta ao medicamento*, 5ed. Florianópolis: Editora da UFSC, p. 397-425.
- Sohounhloue, K.D., Dangou, J., Djossou, L.G., Gnonhossou, B. & Sagbo, A.U.** 1996. Chemical composition of the essential oil of *Chromolaena odorata* L. King Robinson collected in Houin (Benin). *Journal de la Societe Quest-Africaine de Chimie* 1: 75-82.

- Souza, T.J.T.** 2007. Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Srivastava, A.K., Srivastava, S.K. & Syamsundar, K.V.** 2004. Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. Flavour and fragrance journal 20(1): 51-53.
- Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M. & Bedê, L.C.** 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade 1: 132-138.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. Fisiologia vegetal, 3ed. Porto Alegre: Artmed, p. 309-338.
- Takemoto, T., Uchida, M. & Kusano, G.** 1976. Studies on the constituents of *Chloranthus* spp. II. The sesquiterpenos from *Chloranthus serratus*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 24(3): 531-533.
- Tellez, M.R., Canel, C., Rimando, A.M. & Duke, S.O.** 1999. Differential accumulation of isoprenoids in glanded and glandless *Artemisia annua* L. Phytochemistry 52: 1035-1040.
- Tisserand, R. & Balacs, T.** 1995. Essential oil safety: a guide for health care professionals. Bell and Bain Ltd., Glasgow.
- Tortora, G.J., Funke, B.R. & Case, C.L.** 2000 Microbiologia. Artes Medicas Sul, Porto Alegre.
- Tullio, V., Nostro, A., Mandras, N., Dugo, P., Banche, G., Cannatelli, M.A., Cuffini, A.M., Alonzo, V. & Carlone, N.A.** 2006. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. Journal of applied microbiology 102: 1544-1550.

- Vallilo, M.I., Lamardo, L.C.A., Gaberlotti, M.L., Oliveira, E. & Moreno, P.R.H.** 2006. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O.Berg. *Ciência e tecnologia de alimentos* 26(4): 805-810.
- Veiga Junior, V.F., Pinto, A.C. & Maciel, M.A.M.** 2005. Plantas medicinais: cura segura? *Química nova* 28(3): 519-528.
- Verpoorte, R.** 2000a. Secondary metabolism. *In*: R. Verpoorte & A.W. Alfermann (eds.). *Metabolic engineering of plant secondary metabolism*, 1ed. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, p. 1-29.
- Verpoorte, R.** 2000b. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. *Journal of pharmacy and pharmacology* 52: 253-262.
- Viegas Júnior, C.** 2003. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química nova* 26(3): 390-400.
- Villalba, J.J., Provenza, F.D. & Bryant, J.P.** 2002. Consequences of the interaction between nutrients and plant secondary metabolites on herbivore selectivity: benefits or detriments for plants? *Oikos* 97: 282-292.
- Willinger, B., Apfalper, P., Hirschl, A.M., Makristathis, A., Rotter, M., Seibold, M.** 2000. Suceptibility testing of *Candida* species: comparison of NCCLS microdilution method with Fungitesth. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease* 38: 11-15.
- Zollo, P.H.A., Biyiti, L., Tchoumboungang, F., Menut, C., Lamaty, G. & Bouchet, P.** 1998. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameron. *Flavour and fragrance journal* 13: 107-114.

10. Anexo

Tabela 15. Tempos de retenção da série homóloga de *n*-alcanos (C₅-C₃₀) utilizada para o cálculo do índice de Kováts.

C	Tempo de Retenção
5	4,80
6	6,82
9	7,73
10	11,84
11	16,39
12	21,06
13	25,59
14	29,92
15	33,99
16	37,84
17	41,53
18	44,64
19	48,06
21	54,29
22	57,14
23	59,92
25	65,17
26	73,27
30	76,40