

VARIABILIDADE SAZONAL E BIOSÍNTESE DE TERPENÓIDES PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN (VERBENACEAE)

Francisco Maikon Corrêa de Barros, Eduardo de Oliveira Zambarda e Berta Maria Heinzmann*

Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria - RS, Brasil

Carlos Augusto Mallmann

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Campus Universitário, 97105-900 Santa Maria - RS, Brasil

Recebido em 26/2/08; aceito em 22/10/08; publicado na web em 6/3/09

SEASONAL VARIABILITY AND TERPENOID BIOSYNTHESIS OF THE ESSENTIAL OIL OF *Lippia alba* (Mill.) N. E. BROWN (VERBENACEAE). The essential oil of the leaves of *Lippia alba* chemotype linalool-1,8-cineol was extracted by hydrodistillation at different seasons and analyzed by GC/MS. Qualitative and quantitative variations in regard to the period of harvesting have been performed and the results were correlated with meteorological data. The essential oil yield varied from 0.33 to 0.67%. The chemical diversity of the constituents increased throughout the year, being 1,8-cineol and linalool the major components. Possible biosynthetic routes of mono and sesquiterpenoids present in the essential oil are discussed.

Keywords: *Lippia alba*; terpenoids; seasonal variability.

INTRODUÇÃO

Lippia alba (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae) é uma planta medicinal nativa da América do Sul, conhecida popularmente como falsa-melissa.¹ Infusões, banhos e xaropes, preparados com suas folhas ou raízes, são utilizados na medicina popular para o tratamento de distúrbios estomacais, afecções das vias respiratórias, no combate à hipertensão e como sedativo.²

Entre os metabólitos secundários descritos para *L. alba* encontram-se flavonóides, taninos, iridóides, saponinas triterpênicas, resinas, mucilagens e óleo essencial.³

Variações qualitativas e quantitativas dos principais componentes do óleo essencial desta espécie têm levado a sua separação em quimiotipos ou raças químicas: citral,^{4,5} carvona,⁴ linalol – 1,8-cineol,⁶ entre outros. Adicionalmente, a influência de fatores abióticos como luz, temperatura, água, solo e altitude sobre a biossíntese de certos constituintes vegetais, especialmente os terpenóides, foi comprovada em diferentes espécies vegetais.⁷ A variabilidade na composição do óleo essencial das folhas de *L. alba* foi demonstrada anteriormente em função das diferentes regiões do ramo vegetal,⁵ das épocas e horários de coleta,^{5,6,8} bem como da metodologia empregada na sua extração.⁹ No entanto, até o momento, não há trabalhos publicados interligando, por meio de dados meteorológicos, as variações observadas aos fatores abióticos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a variação do teor e da composição química do óleo essencial das folhas de *L. alba*, provenientes de cultivo e coletadas nas diferentes estações do ano, relacionando as variações observadas com dados meteorológicos de temperatura, insolação, umidade relativa e chuva acumulada. As possíveis rotas biossintéticas para os mono e sesquiterpenóides presentes no óleo essencial também são discutidas.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

Para a realização dos experimentos foram utilizadas as folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae), quimiotipo linalol-1,8-cineol, provenientes de cultivo no Horto da Prefeitura Municipal de São Luiz Gonzaga, RS, Brasil. As coletas foram realizadas no período médio de cada estação (janeiro, abril, julho e outubro) durante o ano de 2005. A espécie foi identificada pelo botânico G. D. Zanetti, do Departamento de Farmácia Industrial da UFSM. Material testemunha encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM, sob o registro SMDB nº 10.050.

Extração e análise do óleo essencial

O óleo essencial foi extraído a partir do material vegetal fresco, submetido à hidrodestilação em aparelho clevenger por 2 h, conforme a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira.¹⁰ O rendimento das extrações foi calculado com base na relação entre volume e peso, e expresso em porcentagem (% v/p).

A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em um sistema hifenado Agilent 6890, equipado com um detector seletivo de massas série 5973. Parâmetros de análise: *split inlet* 1:100; gás carreador: He (1 mL/min); coluna capilar de sílica fundida HP5-MS (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxano, 30 m x 0,25 mm, espessura do filme: 0,25 µm); programa de análise: 40 °C (Ti) por 4 min, 40-260 °C, 4 °C/min; temperatura do injetor: 220 °C; temperatura da interface: 250 °C; energia de ionização: 70 eV; banco de dados: NIST, 1998.

Os componentes do óleo essencial foram identificados com base no índice de retenção (IR), determinados através da utilização de uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos (C₈-C₃₂) injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras e nos modelos de fragmentação dos espectros de massas, sendo ambos comparados com dados da literatura.¹¹

*e-mail: berta.heinzmann@gmail.com

A concentração dos constituintes foi calculada através da área integral de seus respectivos picos, relacionada com a área total de todos os constituintes da amostra, obtida pela análise utilizando o cromatógrafo gasoso (Tabela 2).

Levantamento dos dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de temperatura, insolação, umidade relativa do ar e índice pluviométrico foram obtidos a partir dos registros do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), o qual mantém uma estação de observação na cidade de São Luiz Gonzaga. Os dados foram tabulados e utilizados, para fins de comparação, com as variações quantitativas e qualitativas observadas para o óleo essencial de *L. alba*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento do óleo essencial obtido nas diferentes extrações foi de 0,67% em janeiro (verão), 0,60% em abril (outono), 0,33% em julho (inverno) e 0,40% em outubro (primavera) (Figura 1). Os resultados encontram-se de acordo com os dados publicados na literatura, que mostram variações de rendimento para o óleo essencial de *L. alba* na ordem de 0,1-1,0%,¹² bem como a influência das diferentes épocas de coleta sobre os teores.^{5,6,8,13} Dessa forma, no verão ocorrem os maiores teores de óleo essencial, os quais decaem no outono até atingir valores mínimos no inverno. A partir deste ponto, os teores voltam a crescer em direção à primavera e ao verão.

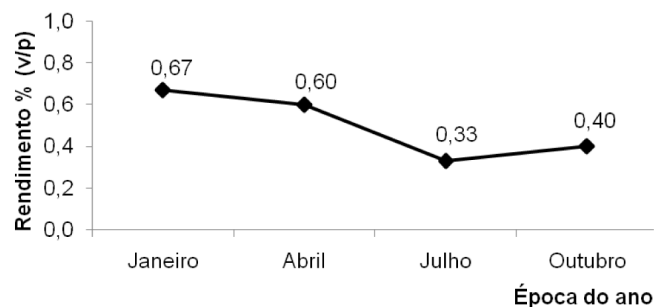


Figura 1. Perfil quantitativo do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown coletada em São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, nas diferentes estações de 2005

A correlação dos resultados apresentados na Figura 1 com os dados meteorológicos (Tabela 1) permite aferir que a combinação de fatores típicos à estação do verão no sul do país (altas temperaturas, longos períodos de insolação, baixos índices de umidade relativa do ar e de precipitação) favorece o aumento da produção de óleo essencial. No inverno, por sua vez, sob condições de baixas temperaturas, curtos períodos de insolação e elevados índices de umidade relativa do ar e de precipitação, ocorre diminuição dos teores. Resultados semelhantes foram obtidos para *L. alba* quimiotipo citral – limoneno coletada no Ceará, porém em épocas distintas, onde uma estação chuvosa, popularmente conhecida como inverno (janeiro – junho), e outra seca, denominada de verão (julho – dezembro), são bem definidas na região.⁸ As estações de transição, outono e primavera (Figura 1), com características mistas entre as duas outras estações do ano (Tabela 1), refletem também teores intermediários de óleo essencial.

Segundo Tavares *et al.*,¹³ os teores de óleo essencial em *L. alba* podem variar em função do seu ciclo fenológico, sendo que para esta espécie a maior produção de óleo ocorre fora do período de floração. Entretanto, as evidências apontam que as condições climáticas também constituem um forte fator de influência. Para *L. alba* coletada em Caxias do Sul - RS, os rendimentos do óleo extraído

Tabela 1. Dados meteorológicos das quatro estações do ano de 2005 em São Luiz Gonzaga

Média	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Temperatura (°C)	25,7	21,3	15,2	19,6
Insolação total (h)	242,7	171,4	152,9	172
Umidade relativa do ar (%)	67	77	77	71
Chuva acumulada (mm)	99,7	235,8	200,3	192,2
Dias com chuva	6	12	11	10

(0,10-0,37%)⁶ ficaram abaixo daqueles encontrados em São Luiz Gonzaga (0,33-0,67%). Caxias do Sul – RS apresenta, reconhecidamente, temperaturas médias mais baixas, quando comparadas àquelas de São Luiz Gonzaga (Tabela 1), sendo este um dos prováveis fatores que corroboram com as diferenças de rendimento observadas.

Os componentes dos óleos essenciais de *L. alba* obtidos das folhas coletadas nas quatro estações do ano de 2005 são apresentados na Tabela 2. Ao todo foram identificados 42 constituintes. Os óleos analisados são compostos basicamente por mono e sesquiterpenóides. Linalol e 1,8-cineol foram os constituintes majoritários em todas as estações do ano, indicando o quimiotipo da espécie na população de plantas estudada. Percentagens semelhantes de linalol (50,0-79,2%) e 1,8-cineol (7,3-14,1%) foram encontradas para os óleos essenciais obtidos das folhas de *L. alba* coletadas em Caxias do Sul.⁶ O terceiro constituinte em maior proporção varia de acordo com a estação da coleta, consistindo do germacreno D (verão e primavera) ou da cânfora (outono e inverno) (Tabela 2).

A porcentagem relativa de monoterpenóides hidrocarbonados variou na faixa de 1,7-4,0%, enquanto que, no caso dos monoterpenóides oxigenados, a variação foi de 68,4-81,0%. Já para os sesquiterpenóides hidrocarbonados, a concentração variou de 3,9-20,8%, enquanto que os sesquiterpenóides oxigenados se apresentaram em porcentagens que variaram de 2,4 a 6,5%.

Os resultados indicam que a sazonalidade afeta de maneira distinta a biossíntese do número de estruturas das duas principais classes de terpenóides presentes no óleo essencial de *L. alba* (Figura 2). Enquanto que, em janeiro, foi observado o predomínio de estruturas sesquiterpenoídicas com relação às monoterpenoídicas, em abril prevaleceram os constituintes de estrutura monoterpenoídica. Já nos meses de julho e outubro o número de sesquiterpenóides voltou a predominar.

Uma projeção gráfica mostra, nas proximidades de fevereiro e junho, pelo menos dois momentos em que o número de mono e sesquiterpenóides seriam provavelmente equivalentes. Os dados demonstram que, ao longo do ano, a diversidade química dos constituintes aumentou gradativamente, sendo 20 em janeiro, 23 em abril, 30 em julho e 35 em outubro (Tabela 2, Figura 2). Este aumento pode ser atribuído à versatilidade catalítica das enzimas terpeno-sintetases, que freqüentemente produzem múltiplos produtos a partir de um único substrato.¹⁴ Coincidentemente, a estação em que ocorre a maior diversidade química no óleo essencial (primavera) também corresponde ao período de maior floração observado para esta espécie (Figura 2).

Cabe ressaltar que nem sempre o favorecimento na produção de uma determinada classe química, mono ou sesquiterpenóide, vem acompanhada do aumento da porcentagem relativa de seus constituintes individuais. É o caso do linalol, um monoterpenóide que, do verão para o inverno, tem sua porcentagem relativa diminuída (Tabela 2), enquanto que ocorre um aumento do número absoluto dos constituintes de estrutura monoterpenoídica ou este permanece praticamente constante. (Figura 2). Algumas hipóteses poderiam justificar essas observações. Entre elas encontra-se o fato de que

Tabela 2. Constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown nas quatro estações do ano de 2005

Fórmula	Componente	Janeiro (Verão)			Abril (Outono)			Julho (Inverno)			Outubro (Primavera)			
		%	Tr	IRcal	%	Tr	IRcal	%	Tr	IRcal	%	Tr	IRcal	IRref
C ₁₀ H ₁₆	α-Tujona	-	-	-	-	-	-	-	-	-	t	10,49	925	930
C ₁₀ H ₁₆	α-Pineno	-	-	-	0,2	10,75	931	0,3	10,75	931	0,1	10,74	931	939
C ₁₀ H ₁₆	Canfeno	-	-	-	0,3	11,41	947	0,7	11,41	947	t	11,41	947	954
C ₁₀ H ₁₆	Sabineno	1,2	12,40	971	1,7	12,42	972	2,1	12,41	971	1,4	12,41	971	975
C ₁₀ H ₁₆	β-Pineno	-	-	-	-	-	-	0,3	12,57	975	0,1	12,56	975	979
C ₁₀ H ₁₆	Mirceno	0,3	13,17	990	0,4	13,17	990	0,1	13,20	991	-	-	-	991
C ₁₀ H ₁₆	Limoneno	0,2	14,72	1029	0,7	14,73	1029	0,5	14,74	1029	0,1	14,75	1029	1029
C ₁₀ H ₁₈ O	1,8-cineol	7,9	14,86	1032	10,4	14,86	1032	13,0	14,85	1032	8,8	14,86	1032	1031
C ₁₀ H ₁₆	(E)-β-Ocimeno	-	-	-	0,3	15,51	1048	-	-	-	0,1	15,55	1049	1050
C ₁₀ H ₁₈ O	(Z)-Hidrato de sabineno	-	-	-	-	-	-	0,2	16,50	1073	0,1	16,50	1073	1070
C ₁₀ H ₁₈ O ₂	(E)-Óxido de linalol	-	-	-	0,3	16,50	1073	-	-	-	-	-	-	1073
C ₁₀ H ₁₈ O ₂	(Z)-Óxido de linalol	0,2	17,13	1089	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1087
C ₁₀ H ₁₆	Isoterpinoleno	-	-	-	0,2	16,99	1085	-	-	-	-	-	-	1088
C ₁₀ H ₁₈ O	Linalol	65,5	17,79	1106	63,7	17,76	1105	48,7	17,75	1105	58,2	17,79	1106	1097
C ₁₀ H ₁₆ O	Cânfora	-	-	-	4,4	19,42	1149	8,4	19,41	1149	0,4	19,42	1149	1146
C ₁₀ H ₁₄ O	Pinocarvona	-	-	-	0,4	20,00	1164	0,5	20,00	1164	0,1	20,00	1164	1165
C ₁₀ H ₁₈ O	Borneol	-	-	-	0,6	20,41	1175	0,7	20,40	1175	0,1	20,42	1176	1169
C ₁₀ H ₁₈ O	α-Terpineol	-	-	-	0,2	21,33	1200	-	-	-	t	21,34	1200	1189
C ₁₀ H ₁₆ O	(E)-Carveol	1,1	21,84	1214	1,0	21,88	1215	0,1	21,92	1216	0,7	21,86	1215	1217
C ₁₂ H ₂₀ O ₂	Acetato de isobornil	-	-	-	-	-	-	0,3	24,35	1286	-	-	-	1286
C ₁₅ H ₂₄	α-Copaeno	0,1	27,37	1375	-	-	-	0,2	27,38	1375	0,2	27,37	1375	1377
C ₁₅ H ₂₄	β-Burboneno	0,1	27,63	1383	-	-	-	-	-	-	0,1	27,64	1383	1388
C ₁₅ H ₂₄	β-Cubebeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,2	27,78	1387	1388
C ₁₅ H ₂₄	β-Elemeno	-	-	-	-	-	-	0,2	27,84	1389	0,2	27,83	1389	1391
C ₁₅ H ₂₄	(E)-Cariofileno	2,5	28,79	1419	1,0	28,79	1419	3,1	28,79	1419	4,8	28,80	1419	1419
C ₁₅ H ₂₄	β-Copaeno	-	-	-	-	-	-	0,1	29,12	1429	0,2	29,12	1429	1432
C ₁₅ H ₂₄	α-Humuleno	-	-	-	0,1	29,93	1455	0,6	29,93	1455	0,8	29,94	1456	1455
C ₁₅ H ₂₄	(E)-β-Farneseno	0,2	29,86	1453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1457
C ₁₅ H ₂₄	alo-Aromadendreno	0,1	30,05	1459	-	-	-	0,2	30,06	1459	0,2	30,07	1460	1460
C ₁₅ H ₂₄	γ-Muuruleno	t	30,52	1474	-	-	-	-	-	-	0,1	30,55	1475	1480
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno D	3,2	30,74	1481	1,5	30,73	1481	5,1	30,74	1481	7,8	30,74	1481	1485
C ₁₅ H ₂₄	Biciclogermacreno	0,1	31,18	1495	-	-	-	0,1	31,18	1495	0,1	31,17	1495	1500
C ₁₅ H ₂₄	α-Muuruleno	-	-	-	-	-	-	0,5	31,28	1498	0,1	31,26	1498	1500
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno A	0,6	31,54	1507	0,3	31,54	1507	0,9	31,55	1507	1,3	31,55	1506	1509
C ₁₅ H ₂₆ O	Cubebol	-	-	-	0,5	31,85	1517	1,3	31,85	1517	1,2	31,85	1517	1515
C ₁₅ H ₂₄	Germacreno B	1,9	33,08	1559	1,0	33,08	1559	3,8	33,08	1559	4,7	33,09	1559	1561
C ₁₅ H ₂₆ O	(E)-nerolidol	0,3	33,22	1564	-	-	-	-	-	-	0,1	33,26	1565	1563
C ₁₅ H ₂₆ O	Germacreno D-4-ol	0,2	33,67	1579	1,2	33,67	1579	3,5	33,66	1578	0,5	33,64	1577	1576
C ₁₅ H ₂₄ O	Óxido de cariofileno	2,1	33,81	1583	0,8	33,82	1584	0,2	33,81	1583	0,4	33,81	1583	1583
C ₁₅ H ₂₆ O	1,10-Di-epi-cubebol	-	-	-	-	-	-	0,1	34,78	1617	0,1	34,63	1612	1619
C ₁₅ H ₂₆ O	τ-Muurolol	-	-	-	-	-	-	0,6	35,62	1647	-	-	-	1642
C ₁₅ H ₂₆ O	α-Cadinol	-	-	-	-	-	-	0,8	35,94	1658	0,1	35,95	1658	1654
Somatório %		87,8			91,2			97,2			93,4			

% = Porcentagem relativa; **Tr** = Tempo de retenção; **IRcal** = Índice de retenção calculado; **IRref** = Índice de retenção de referência; t = traço (menor que 0,06 %).

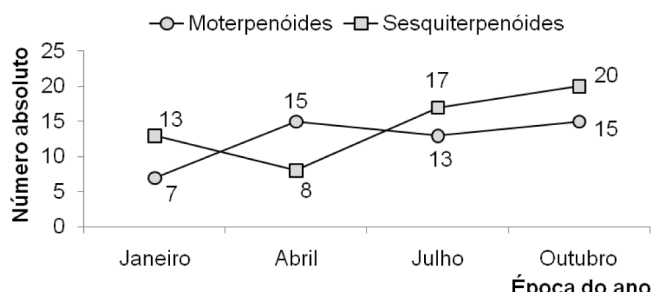


Figura 2. Variabilidade sazonal das principais classes constituintes do óleo essencial das folhas de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown coletadas em São Luiz Gonzaga, RS, Brasil, em 2005

as plantas, através de mecanismos de controle da rota biossintética, favorecem a produção de determinados constituintes, dependendo de suas necessidades.^{15,16}

Os terpenóides, em especial mono e sesquiterpenóides, apresentam diversas funções nos vegetais. As mais conhecidas dizem respeito aos efeitos de proteção contra herbívoros e agentes microbianos, bem como atração de polinizadores. Outras funções, ainda pouco estabelecidas para a maioria dos derivados isoprênicos, envolvem efeitos de termo-proteção, proteção a danos oxidativos, foto-respiração a altas temperaturas e baixas concentrações de O₂, alelopatia e foto-proteção.¹⁷ De acordo com Bouvier *et al.*,¹⁸ o β-ocimeno parece ter um papel chave na defesa contra herbívoros, resistência a patógenos e tolerância a altas temperaturas. Este monoterpenóide foi identificado no óleo essencial obtido das folhas coletadas em abril (outono) e em outubro (primavera) (Tabela 2). Segundo Schnee *et al.*,¹⁹ o (E)-β-farneseno, encontrado no óleo de *L. alba* extraído no verão, também atuaria em processos de defesa ao ataque de herbívoros.

As condições climáticas podem beneficiar a biossíntese de um constituinte terpenoídico por uma espécie vegetal, através do favorecimento de sua atividade enzimática. Para a terpeno-sintetase denominada TPS1, isolada e expressa em *Escherichia coli*, a qual produziu linalol, entre outros constituintes, determinou-se que a temperatura ótima de reação está entre 30 e 37 °C.¹⁹ Portanto, o fato da temperatura ser um fator importante para a atividade enzimática, e esta ser uma variável da sazonalidade, pode justificar o aumento do rendimento de óleo essencial, bem como da produção de certos constituintes, em épocas do ano que apresentem temperaturas mais elevadas.

Há pelo menos duas vias envolvidas na biossíntese dos terpenóides: uma via citosólica ou rota do mevalonato (MVA) e outra plastidial ou rota do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose (DXP). Ambas conduzem à produção de isômeros do isopreno, o difosfato de isopentenila (IPP) e/ou o difosfato de gama, gama-dimetilalila (DMAPP), os quais constituem os monômeros a partir dos quais se originarão os diferentes terpenóides. A partir da condensação de uma molécula de IPP com DMAPP forma-se o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenóides. A condensação de uma nova molécula de IPP e do GPP leva ao precursor dos sesquiterpenóides, difosfato de farnesila (FPP).^{18,20} A possível rota biossintética dos principais mono e sesquiterpenóides encontrados no óleo essencial de *L. alba* é apresentada no Esquema 1, elaborado com base nos dados disponíveis na literatura.^{14,15,19-44} Da mesma forma que ocorre com os produtos intermediários, os compostos finais das rotas biossintéticas são apresentados em estruturas planas, uma vez que a metodologia empregada para a análise do óleo essencial não permite a determinação da configuração absoluta dos constituintes. Entretanto, geralmente ocorre simetria nos mecanismos de reação, o que possibilita a formação dos diferentes enantiômeros por meio de rotas paralelas.¹⁴ A numeração dos carbonos mencionados nesta discussão é relativa ao GPP e FPP.

A biossíntese dos monoterpenóides (Esquema 1) tem início com a ionização do difosfato de geranila (GPP) [1]. A desprotonação do C4 do cátion linalílico [2], resultante desta ionização, leva à obtenção do E-β-ocimeno [3]. Sua hidratação, por sua vez, dá origem ao linalol [4].^{14,19,20} Uma proposta para a biossíntese do óxido de linalol [6] consiste na hidroxilação do linalol [4] pela ação das enzimas do citocromo P-450 via intermediário 6,7 epóxido de linalol [5].^{38,39} Além desta, foi demonstrado que a auto-oxidação do linalol [4], pela sua exposição ao oxigênio do ar, também conduz ao óxido de linalol [6].⁴⁰

A isomerização do GPP [1], obtida com a migração do grupo difosfato do C1 para o C3, resulta no difosfato linalílico (LPP) [7]. A subsequente rotação da ligação C2-C3 e ionização resultam no isômero do cátion linalílico [2'], que difere do primeiro por apresentar características espaciais favoráveis à ciclização molecular. Desta forma, além de formar o β-mirceno [8] pela perda de próton no C10,^{14,19,20} a ciclização do isômero do cátion linalílico [2'], entre C1 e C6, conduz ao cátion α-terpinílico [9], um intermediário chave da biossíntese dos monoterpenóides cíclicos^{14,20} (Esquema 1).

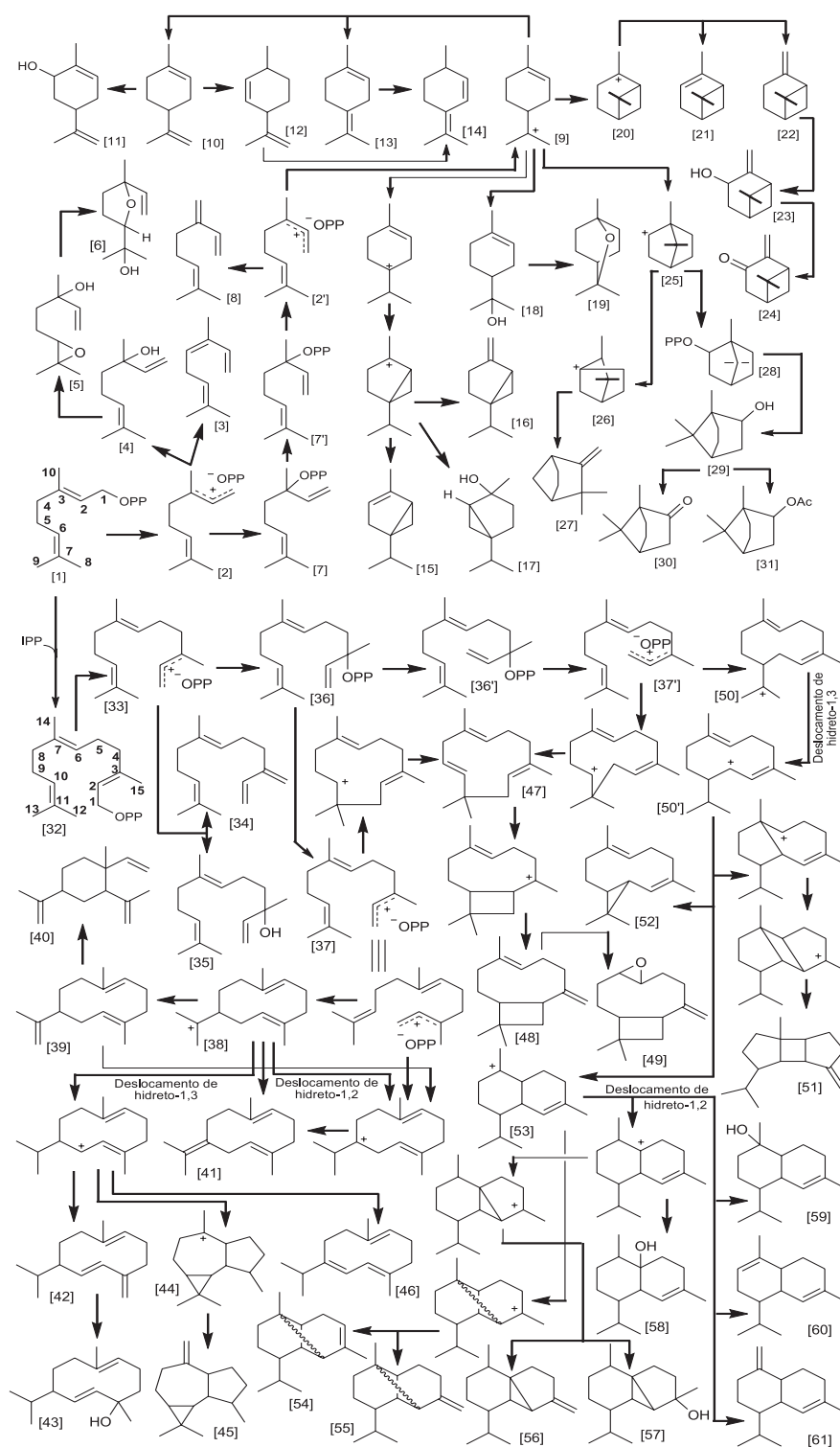
A desprotonação do C8 do cátion α-terpinílico [9] favorece a produção do limoneno [10],^{14,20} cuja hidroxilação por enzimas do citocromo P-450 origina o E-carveol [11].^{15,20,23,24} Quando a saída do próton ocorre no C6, forma-se o terpinoleno [13]¹⁴ que, por isomerização, passaria a isoterpinoleno [14]. Muitos terpenóides são produtos diretos das enzimas terpeno-sintetases, enquanto outros são obtidos após transformações secundárias,¹⁵ o que parece ser o caso do isoterpinoleno [14]. A literatura também descreve sua formação mediante a biotransformação do isolimoneno [12] pela bactéria desnitrificante *Alcaligenes defragans* a qual, entre outros, utiliza limoneno [10] como substrato.³¹ Embora não exista a comprovação desta rota em vegetais, em *L. alba* o limoneno [10] ocorre em maior quantidade no mês de abril, que também é o único mês em que foi identificado o isoterpinoleno [14] (Tabela 2). Entretanto, em função da escassa literatura sobre este aspecto, não se pode descartar a possibilidade do isoterpinoleno [14] ser formado por outra via, como a partir do terpinoleno [13], já demonstrada através de isomerização físico-química⁴⁴ (Esquema 1).

Via cátion α-terpinílico [9], a biossíntese dos constituintes α-tujona [15], sabineno [16] e Z-hidrato de sabineno [17] inicia com a migração de hidreto do C6 para o C7 e segue com o ataque eletrofílico do C6 aos elétrons dupla ligação entre C2-C3, para formar um intermediário bicíclico de carga positiva no C3. A partir deste, a desprotonação do C4 ou C10 leva a formação, respectivamente, de α-tujona [15] e/ou sabineno [16].^{14,20} Já a hidratação explica a formação do Z-hidrato de sabineno [17]^{29,30,37} (Esquema 1).

A hidratação do cátion α-terpinílico [9] gera o α-terpineol [18]^{20,22,43} o qual, por heterociclicação, produz o 1,8-cineol [19]²² (Esquema 1).

A ciclização eletrofílica do cátion α-terpinílico [9] gera os cátions pinílico [20] e bornílico [25]. A desprotonação do cátion pinílico [20] no C4 e/ou C10 conduz, respectivamente, ao α-pineno [21] e/ou β-pineno [22].^{20,21,22,27} As ações das enzimas do citocromo P-450^{15,36} sobre o β-pineno [22], em um processo análogo à biossíntese da carvona,^{20,23,24} formam o pinocarveol [23], cuja desidrogenação oxidativa resulta na pinocarvona [24]³⁶ (Esquema 1).

Um rearranjo do cátion bornílico [25] do tipo Wagner-Meerwein gera o cátion canfílico [26] que, por desprotonação do C10, leva ao canfeno [27].²⁷ Alternativamente, o cátion bornílico [25] pode capturar um grupo difosfato formando o difosfato de bornila [28],^{20,21,22} o qual é convertido em borneol [29]. A oxidação enzimática do borneol [29] origina a cânfora [30].^{26,34} Em contrapartida, a acilação enzimática do borneol [29], em semelhança ao que ocorre com outras substâncias,¹⁵ resultaria no acetato de isobornila [31] (Esquema 1).



Esquema 1. Possíveis rotas biossintéticas dos monoterpênoides e sesquiterpênoides presentes no óleo essencial de *Lippia alba*. Denominação dos constituintes e intermediários: [1] Difosfato de geranila (GPP), [2] Cátion linalílico, [2'] Cátion linalílico/isômero [3] E- β -Ocimeno, [4] Linalol, [5] 6,7 Epóxido de linalol, [6] Óxido de linalol, [7] Difosfato de linalila (LPP), [7'] Difosfato de linalila (LPP)/isômero, [8] β -Mirceno, [9] Cátion α -terpinílico, [10] Limoneno, [11] E-carveol, [12] Isolimonoeno, [13] Terpinoleno, [14] Isoterpinoleno, [15] α -Tujona, [16] Sabineno, [17] Z-Hidrato de sabineno, [18] α -Terpineol, [19] 1,8-Cineol, [20] Cátion pinílico, [21] α -Pinoeno, [22] β -Pinoeno, [23] Pinocarveol, [24] Pinocarvona, [25] Cátion bornílico, [26] Cátion canfílico, [27] Canfeno, [28] Difosfato de bornila, [29] Borneol, [30] Cânfora, [31] Acetato de isobornila, [32] Difosfato de farnesila (FPP), [33] Cátion difosfato farnesílico, [34] E- β -Farneseno, [35] E-Nerolidol, [36] Difosfato de nerolidila (NPP), [36'] Difosfato de nerolidila (NPP)/isômero, [37] Cátion difosfato nerolídico (NPP), [37'] Cátion difosfato nerolídico/isômero, [38] Cátion germacrílico, [39] Germacreno A, [40] β -Elemeno, [41] Germacreno B, [42] Germacreno D, [43] Germacreno-D-4-ol, [44] Cátion alo-aromadendrenílico, [45] Alo-aromadendreno, [46] Germacreno C, [47] α -Humuleno, [48] E- β -Cariofileno, [49] Óxido de cariofileno, [50] Cátion germacradienílico, [51] β -Burboneno, [52] Biciclogermacreno, [53] Cátion cadinílico, [54] α -Copaeno, [55] β -Copaeno, [56] β -Cubebeno, [57] Cubebol, [58] 1,10-Di-epi-cubenol, [59] τ -Murulol ou α -Cadinol, [60] α -Muuruleno, [61] γ -Muuruleno. OPP = Difosfato; Ac = Acetato

Como pode ser notado no Esquema 1, o linalol [4] é um dos primeiros constituintes a ser biossintetizado. O fato de sua biossíntese envolver poucas etapas pode contribuir para sua presença em altas concentrações no óleo essencial de *L. alba*. Comparando as porcentagens relativas de alguns monoterpênóides (Tabela 2), observa-se que a do linalol diminui no inverno, enquanto que as de outros compostos como o α -pineno, canfeno, sabineno, 1,8-cineol, cânfora, pinocarvona e borneol aumentam. Associadas aos efeitos de uma maior ou menor atividade enzimática, estas observações também levam a supor que exista algum mecanismo de controle da rota biossintética.¹⁵ É possível que, em épocas de temperatura elevada (Tabela 1), uma maior taxa de volatilização do linalol direcione sua biossíntese na elaboração de maior quantidade do produto. Já em períodos de baixas temperaturas ocorreria o contrário, restando assim mais substrato (GPP) para ser transformado nos demais monoterpênóides citados.

A formação dos sesquiterpenóides tem início (Esquema 1) com ionização do difosfato de farnesila (FPP) [32]. O cátion resultante [33] pode ser desprotonado no C15 para formar *E*- β -farneseno [34] ou pode sofrer hidratação para formar *E*-nerolidol [35].^{14,19} A migração do grupamento difosfato de C1 para C3 em [33] resulta no difosfato de nerolidila (NPP) [36].^{14,42} A partir deste ponto, a biossíntese dos demais sesquiterpenóides desenvolve-se via ionização direta e/ou rotação da ligação entre C2 e C3 e posterior ionização do isômero NPP [36*].

A ionização direta do NPP [36] e sua subsequente ciclização entre C10-C1 leva à formação do cátion germacrílico [38]. A saída de um próton, por vezes associada a um deslocamento intramolecular de hidreto, conduz à formação dos germacrenos A [39], B [41], D [42] e C [46].^{20,42} A nova protonação destes constituintes no C6 conduz à obtenção de estruturas do tipo eudesmano, enquanto que a protonação no C3 leva aos derivados do tipo azulano ou guaiano,^{33,42} como o aloaromadendreno [45].²⁰ Outro constituinte também obtido pela via dos germacrenos é o germacreno-D-4-ol [43], obtido provavelmente pela hidratação do germacreno D (Esquema 1).

O β -elemeno [40] pode ser considerado um subproduto originado durante o processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação e análise por cromatografia gasosa, pois, sob condições ligeiramente ácidas ou de aquecimento, este constituinte é facilmente obtido a partir do germacreno A através do rearranjo de Cope³³ (Esquema 1).

A ciclização do cátion NPP [37] entre C11-C1, associado à desprotonação do C9, leva à formação do α -humuleno [47]. Quando esta ciclização vem acompanhada da formação de uma ligação adicional entre C2-C10, além da desprotonação do C15 forma-se o *E*- β -cariofileno [48].⁴² A via do isômero do NPP [37*] também pode ser utilizada para a formação deste constituinte, bem como do *E*- β -farneseno [34] apresentado anteriormente.⁴² O óxido de cariofileno [49], por sua vez, mostrou ser um subproduto da auto-oxidação do *E*- β -cariofileno [48] pela sua exposição ao oxigênio do ar⁴¹ (Esquema 1).

A ciclização do isômero do NPP [37*] entre C10-C1 conduz à formação do cátion germacradienílico ou (*E*, *Z*)-germacrílico [50]. Adotando como ponto de partida este cátion [50], a seqüência de reações envolvendo deslocamento intramolecular de hidreto,^{20,42} ciclização entre C7-C1, ciclização entre C6-C2 e desprotonação do C15 levaria à formação do β -bourboneno [51] (Esquema 1).

O isômero do cátion germacradienílico [50*], obtido após o deslocamento de hidreto, pode ciclizar entre C6-C1, formando o cátion cadinílico [53]^{20,42} ou, através da saída de um próton e adicional ciclização entre C1 e C11, originar o biciclogermacreno [52]^{28,35} (Esquema 1).

A partir do cátion cadinílico [53], por meio de uma ligação entre C2-C7, forma-se um intermediário tricíclico que, desprotonado, leva aos constituintes α -copaeno [54] e/ou β -copaeno [55].⁴² Através da migração de hidreto-1,2 do carbocátion cadinílico [53] e ciclização

entre C2-C6, origina-se outro intermediário tricíclico capaz de formar, por desprotonação do C-15, o β -cubebeno [56]³⁵ e, provavelmente, pela reação com água, o cubebol [57]. Alternativamente, o mesmo cátion cadinílico [53], por deslocamento de um hidreto, seguido da adição de água, forma o 1,10-di-epi-cubenol [58].²⁰ Cane e Ke²⁵ demonstraram experimentalmente que o átomo de oxigênio do grupo hidroxila do epicubenol, um isômero do 1,10-di-epi-cubenol [58], deriva exclusivamente da água. Segundo estes autores, a reação do cátion cadinílico [53] com a água levaria à formação dos isômeros do cadinol,³² como τ -murulol e/ou α -cadinol [59]. Em contrapartida, de maneira análoga ao que ocorre quando da formação de outros derivados de esqueleto cadinano,⁴² a saída de um próton do cátion cadinílico [53] conduziria à biossíntese do α -muuruleno [60] e/ou γ -muuruleno [61] (Esquema 1).

AGRADECIMENTOS

À Farmacopéia Brasileira pelo apoio e ao Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) – Distrito de Porto Alegre pelo fornecimento dos dados meteorológicos. Apoio financeiro: CAPES e CNPq.

REFERÊNCIAS

- Biasi, L. A.; Costa, G.; *Cienc. Rural* **2003**, *33*, 455.
- Stasi, L. C.; Oliveira, G. P.; Carvalhaes, M. A.; Queiroz-Junior, M.; Tien, O. S.; Kakinami, S. H.; Reis, M. S.; *Fitoterapia* **2002**, *73*, 69.
- Pascual, M. E.; Slowing, K.; Carretero, E.; Mata, D. S.; Villar, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2001**, *76*, 201.
- Matos, F. J. A.; Machado, M. I. L.; Craveiro, A. A.; Alencar, J. W.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 695.
- Castro, D. M.; Ming, L. C.; Marques, M. O. M.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2002**, *4*, 75.
- Atti-Serafini, L.; Pansera, M. R.; Atti-Santos, A. C.; Rossato, M.; Pauletti, G. F.; Rota, L. D.; Paroul, N.; Moyna, P.; *Rev. Bras. Pl. Med.* **2002**, *4*, 72.
- Lima, H. R. P.; Kaplan, M. A. C.; Cruz, A. V. M. C.; *Floresta Ambient.* **2003**, *10*, 71.
- Nagao, E. O.; Innecco, R.; Mattos, S. H.; Medeiros Filho, S.; Marco, C. A.; *Rev. Ciên. Agron.* **2004**, *35*, 355.
- Stashenko, E. E.; Jaramillo, B. E.; Martinez, J. R.; *J. Chromatogr. A* **2004**, *1025*, 93.
- Farmacopéia Brasileira*, 4ª ed., Atheneu: São Paulo, 2000.
- Adams, R. P.; *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*, Allured Publishing Corporation: Illinois, 2001.
- Terblanché, F. C.; Kornelius, G.; *J. Essent. Oil Res.* **1996**, *8*, 471.
- Tavares, E. S.; Julião, L. S.; Lopes, D.; Bizzo, H. R.; Lage, C. L. S.; Leitão, S. G.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2005**, *15*, 1.
- Köllner, T. G.; Schnee, C.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J.; *Plant Cell* **2004**, *16*, 1115.
- Dudareva, N.; Pichersky, E.; Gershenzon, J.; *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 1893.
- Cheng, A.; Lou, Y.; Mao, Y.; Lu, S.; Wang, L.; Chen, X.; *J. Integr. Plant Biol.* **2007**, *49*, 179.
- Owen, S. M.; Peñuelas, J.; *Trends Plant Sci.* **2005**, *10*, 420.
- Bouvier, F.; Rahier, A.; Câmara, B.; *Prog. Lipid Res.* **2005**, *44*, 357.
- Schnee, C.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J.; *Plant Physiol.* **2002**, *130*, 2049.
- Dewick, P. M.; *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181.
- Bohlmann, J.; Steele, C. L.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 21784.
- Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 4126.

23. Bouwmeester, H. J.; Gershenzon, J.; Konings, M. C. J. M.; Croteau, R.; *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 901.
24. Bouwmeester, H. J.; Konings, M. C. J. M.; Gershenzon, J.; Karp, F.; Croteau, R.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 243.
25. Cane, D. E.; Ke, N.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2000**, *10*, 105.
26. Croteau, R.; Felton, M.; Karp, F.; Kjonaas, R.; *Plant Physiol.* **1981**, *67*, 820.
27. Croteau, R.; Satterwhite, D. M.; Cane, D. E.; Changn, C. C.; *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10063.
28. Hackl, T.; König, W. A.; Muhle, H.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 2261.
29. Hallahan, T. W.; Croteau, R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1988**, *264*, 618.
30. Hallahan, T. W.; Croteau, R.; *Arch. Biochem. Biophys.* **1989**, *269*, 313.
31. Heyen, U.; Harder, J.; *FEMS Microbiol. Lett.* **1998**, *169*, 67.
32. Isaksson, D.; Doctoral Thesis, Mid Sweden University, Sweden, 2006.
33. Kraker, J.; Franssen, M. C. R.; Groot, A.; König, W. A.; Bouwmeestr, H. J.; *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 1381.
34. Lamarti, A.; Badoc, A.; Deffieux, G.; Carde, J. -P.; *Bull. Soc. Pharm. Bordeaux* **1994**, *133*, 100.
35. Little, D. B.; Croteau, R. B.; *Arch. Biochem. Biophys.* **2002**, *402*, 120.
36. Mau, C. J. D.; Croteau, R.; *Phytochem. Rev.* **2006**, *5*, 373.
37. Novak, J.; Bitsch, C.; Pank, F.; Langbehn, J.; Franz, C. M.; *Euphytica* **2002**, *127*, 69.
38. Pichersky, E.; Raguso, R. A.; Lewinsohn, E.; Croteau, R.; *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 1533.
39. Raguso, R. A.; Pichersky, E.; *Plant Species Biol.* **1999**, *14*, 95.
40. Sköld, M.; Borje, A.; Harambasic, E.; Karlberg, A.; *Chem. Res. Toxicol.* **2004**, *17*, 1697.
41. Sköld, M.; Karlberg, A.; Matura, M.; Börje, A.; *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 538.
42. Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2078.
43. Wise, M. L.; Savage, T. J.; Katahira, E.; Croteau, R.; *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 14891.
44. Yadav, M. K.; Chudasama, C. D.; Jasra, R. V.; *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2004**, *216*, 51.