

Artigo

A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das “Arnica-da-Serra” (*Lychnophora* spp.)

Pavarini, D. P.; Lopes, N. P.

Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (1), 242-261. Data de publicação na Web: 29 de janeiro de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>

Chemical Ecology and Volatile Terpenes Biosynthesis of “Arnica-da-Serra” from Brazil

Abstract: *Lychnophora* (Vernoniae: Asteraceae) is a genus endemic to “campos rupestres”, which are fragile Habitats from Brazilian Savanas, the “Cerrado”. Leaves extracts of *Lychnophora ericoides* (“Arnica-da-serra”) are commonly used as folk medicine and mainly as wound healer when in Hydro-alcoholic handcrafted medicines. The essential oils from its leaves were chemically profiled as rich in sesquiterpenes. Such sesquiterpenes would always be related to three possible carbon skeletons: bisabolene-like, cadinene-like, and caryophyllene-like carbon skeletons. *L. ericoides* leaves essential oils are bioactive against invertebrate Acari. An anti-hypnociceptive ability of its component *orto*-acetoxy bisabolol was also displayed by *in vitro* assays using *Ratus malus* macrophages. Terpenes compounds are valuable in fine chemistry industry, e.g. Taxol® and Acheflan®. Furthermore, terpene synthases (TerpS) behind their biosynthesis are target of researches in plant sciences and biochemistry. Identification of TerpS often led to conclusions with diverse impacts. Fundamental concepts on time-dependent shifts of terpene productions in wild type species as well as the advances towards plant metabolites bioengineering are examples of such impacts. Our brief review tends to provide the reader an overview of phytochemical relevance of *Lychnophora* spp., regard both ecological and pharmaceutical traits. Furthermore, an introduction to dynamics aspect of terpene biosynthesis in Asteraceae is furnished.

Keywords: Arnica-da-serra; bioactive terpenes; biosynthesis; combined “omics”.

Resumo

O gênero *Lychnophora* (Vernoniae: Asteraceae) apresenta plantas endêmicas dos “campos rupestres”, habitat frágil que floresce em meio ao bioma Cerrado, ameaçado pela ação antrópica. Extratos de folhas de *Lychnophora ericoides* (“Arnica-da-serra”) são recorrentemente usados como “fitoterápico” a despeito de registro perante os órgãos competentes. Extratos hidroalcoólicos são utilizados como analgésico e anti-inflamatório. Os óleos essenciais de folhas são ricos em sesquiterpenos com predominância dos derivados com esqueleto carbônicos do tipo bisabolano, cadinano e cariofilano. Dentre as atividades biológicas dos óleos essenciais de *L. ericoides* destacam-se a inibição do desenvolvimento de ácaros e o efeito anti-hipnociceptivo de um constituinte majoritário do óleo, o *orto*-acetoxi bisabolol, em modelos *in vitro* utilizando macrófagos de *Ratus malus*. Esta última atividade corrobora o uso popular. Os terpenos são uma das maiores classes de produtos naturais com valor comercial na indústria farmacêutica e cosmética e, portanto alvo constante de pesquisas. Estes estudos sobre o metabolismo revelam que as terpeno sintases (TerpS), que são as enzimas responsáveis pela sua biossíntese, são alvo de pesquisas na área de *plant science* e bioquímica. A identificação das TerpS resultam frequentemente em conclusões de hipóteses com impactos diversos. Os conceitos fundamentais em fenômenos de variabilidade temporal da produção de terpenos em espécies selvagens, assim como os avanços na direção da produção de metabolitos secundários por técnicas de bioengenharia, são dois exemplos destes impactos. A presente revisão tem de prover ao leitor uma visão geral sobre a fitoquímica da fração volátil de folhas de *Lychnophora* spp., com enfoque em aspectos ecológicos e farmacêuticos. Não obstante, intencionamos oferecer uma introdução aos aspectos dinâmicos da biossíntese destes terpenos em Asteraceae (*syn.* Compositae).

Palavras-chave: Arnica-da-serra; terpenos bioativos; biossíntese; ciências “omics”.

* Universidade de São Paulo, Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, CEP 14040-903, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

✉ danielpetpav@hotmail.com.br; npelopes@fcrp.usp.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20160016](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20160016)

A Ecologia Química e a Biossíntese dos Terpenos Voláteis das “Arnicas-da-Serra” (*Lychnophora* spp.)

Daniel P. Pavarini,^a Norberto P. Lopes^b

^a Universidade Estadual Paulista, Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, CEP 14801-970, Araraquara-SP, Brasil.

^b Universidade de São Paulo, Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais e Sintéticos, Departamento de Física e Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, CEP 14040-903, Ribeirão Preto-SP, Brasil.

* danielpetpav@hotmail.com.br; npelopes@fcrp.usp.br

Recebido em 3 de janeiro de 2016. Aceito para publicação em 3 de janeiro de 2016

1. A família Asteraceae (*syn.* Compositae) e sua quimiodiversidade na Flora Brasileira
2. As “Arnicas-da-Serra” do Brasil
3. Terpenos: Sua relevância e a sua Biossíntese
4. O proteoma e o transcriptoma no estudo da biossíntese de terpenos
5. Perspectivas Futuras

1. A família Asteraceae (*syn.* Compositae) e sua quimiodiversidade na Flora Brasileira

Este item desta revisão visa estabelecer a relação entre diversidade biológica e diversidade química. Para tanto aqui será resumida a sistemática da família Asteraceae (*syn.* Compositae) que é a mais diversa dentro da flora fanerogâmica do globo.

A magnitude da biodiversidade brasileira é tema clássico e recorrente tanto em artigos científicos como na mídia falada e escrita. Um dos mais extensos e notórios trabalhos

de levantamento florístico foi iniciado no Brasil império pelos naturalistas Carl Friedrich Philipp von Martius, August Wilhelm Eichler e Ignatz Urban. Ao início do século XX o trabalho resultou na publicação na imensa obra *Flora Brasiliensis*. Hoje, todo material levantado encontra-se digitalizado (<<http://florabrasiliensis.cria.org.br/>>). Este levantamento, o qual conta com tratamentos taxonômicos de 22.767 espécies, ainda é utilizado por pesquisadores atualmente, o que denota seu caráter perene enquanto obra.

Ademais, esta megabiodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal a sua complexidade. Estima-se entre dois a dez milhões o número de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos no planeta

sendo que, segundo tal estimativa, o Brasil seria detentor de 15 a 20% desta biodiversidade.¹

A despeito deste cenário, recentemente foram somados esforços de entidades de diversos setores como institutos de Ensino e Pesquisa (Universidade de Campinas-SP e O Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro-RJ) e órgãos do Poder Público como o Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora). Estes esforços resultaram na atualização do catálogo da flora brasileira. A base de dados criada sob a designação “Lista de Espécies da Flora do Brasil”, conta com um sistema que abriga a cifra de 45.773 espécies vegetais², sendo 32.682 espécies de Angiospermas. Ainda neste sentido a recente publicação do “Livro Vermelho da Flora Brasileira” aprofunda o debate sobre biodiversidade e conservação do patrimônio genético.³

Do ponto de vista da bioprospecção, constata-se que esta vastidão de organismos convivendo em habitats preservados fornece-nos uma gigantesca fonte de moléculas, a qual muitas vezes é denominada de “quimiodiversidade”.⁴ As propriedades físico-químicas, biológicas e ecológicas de moléculas oriundas do metabolismo secundário dessas plantas devem ser objeto de estudos de forma rápida considerando o recente e crescente aumento dos danos a este patrimônio causados pela ação antrópica.⁵

Uma das maiores famílias de Angiospermae, tanto em números de espécies como em número de gêneros, é Asteraceae (*syn.* Compositae). Esta distribui-se biogeograficamente em todos os continentes exceto a Antártida. Os censos e estimativas de sua grandeza divergem. Funk e colaboradores(2009)⁶ estimam-na da ordem de 24.000 espécies, ou até 10% das angiospermas, distribuídas entre 1.600 e 1.700 gêneros. Entretanto a base de dados The Plant List (www.theplantlist.org)

determina esta grandeza em 32.913 espécies validas e 1.911 gêneros.

No cenário da Flora Brasileira a família Asteraceae (*syn.* Compositae) se destaca como a terceira maior representante entre as angiospermas no Brasil, com 274 gêneros e 2.028 espécies.⁷ Ademais, os autores verificam que 64% espécies são endêmicas da flora Brasileira.

A grande diversidade morfológica e a característica cosmopolita de Asteraceae (*syn.* Compositae) são refletidas em sua peculiar habilidade de biossintetizar uma ampla gama de metabólitos secundários incluindo monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas além de flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos e alcaloides pirolizidínicos (alcaloides restritos as tribos Senecioneae e Eupatorie).⁶ Dada esta grande diversidade de perfis químicos, os estudos fitoquímicos de Asteraceae (*syn.* Compositae) figuram entre alguns dos mais relevantes dados utilizados na sistemática da família. Esta interpretação dos perfis químicos com vista em estudos evolutivos de plantas é denominada quimiotaxonomia.⁸

2. As “Arnica-da-Serra” do Brasil

Lychnophora spp. compõe um gênero com número discutível de espécies o qual está circunscrito na tribo Vernonieae e na subtribo Lychnophorinae.

A tribo Vernonieae é representada por cerca de 40 gêneros e 450 espécies, sendo o Brasil reconhecido como um de seus principais centros de ocorrência. Com uma distribuição tropical, apresenta ainda espécies endêmicas aos afloramentos rochosos do Cerrado, os “campos rupestres”.^{9,10}



Figura 1. Composição com três registros fotográficos de indivíduos adultos de *Lychnophora* spp. Acima à esquerda o capítulo floral de *Lychnophora ericoides* registrado pelos autores em março de 2009 no município de Furnas, MG. Acima à direita um afloramento de “campos rupestres”, com detalhe para um indivíduo de *L. ericoides* exemplificando o hábito candelabriforme, na mesma localidade anterior registrado em abril de 2012. Abaixo um capítulo floral de *Lychnophora salicifolia* registrado em abril de 2012 no município de Olhos d'água, MG. Fotos por Daniel Petinatti Pavarini

Lychnophorinae, subtribo pertencente à tribo Vernoniae, destaca-se por sua distribuição restrita ao território brasileiro. Os estudos fitoquímicos abordam os terpenos repetidamente, e apontam que esta classe de metabólitos apresenta-se na subtribo com uma predominância de sesquiterpenos (65,8%).¹¹ É comum o relato

de derivados de cariofileno nos estudos com extratos de baixa polaridade e nos poucos estudos sobre óleos essenciais em espécies da tribo Lychnophorinae¹¹ como, por exemplo, em *Eremanthus erythropappus*,¹² *Eremanthus goyzensis*¹³ e em *Lychnophora ericoides*.^{14,15} Estes compostos já foram relacionados a diversos papéis

semioquímicos portanto, são essenciais na comunicação entre os seres vivos. Ademais, estas funções semioquímicas ocorrem em interações multitróficas, ou seja, mediando relações de organismos vivos pertencentes a diferentes níveis hierárquicos na teia alimentar. É possível citar a atração dos predadores de herbívoros por emissão de β -cariofileno em ação sinérgica com a emissão de linalol induzida por ataque.¹⁶ Como agente gerador de uma resposta de defesa por mecanismo indireto é possível citar ainda a ação atrativa que o (*E*)- β -cariofileno produz sobre nematoides entomo patogênicos.¹⁷ O sistema radicular das plantas de milho (*Zea mays*) emite este terpeno na rizosfera em resposta a ação herbívora da Coleoptera *Diabrotica virgifera virgifera*. Como efeito final a planta se beneficia por atrair os patógenos de seu predador. Uma interação tritrófica também mediada por derivados cariofilano e análoga à supracitada ocorre quando as folhas de *Zea mays* são atacadas pela Lepdoptera *Spodoptera littoralis*.¹⁸ A compreensão destes fenômenos a nível molecular é almejada pelo agronegócio como solução para as perdas na produção deste cereal.

As substâncias oriundas do metabolismo secundário são bioativas não somente em relações ecológicas entre organismos vivos mas também frente a células e alvos terapêuticos em estudos controlados. A capacidade de ação em modelos de estudo terapêuticos que envolvem bioensaios *in vivo*, *in vitro* e *in silico* demonstram que vários compostos despertam o interesse da indústria farmacêutica.

O gênero *Lychnophora* compreende um número discutível de espécies endêmicas dos “campos rupestres”, uma fitofisionomia do cerrado.^{9,10} As espécies, geralmente reconhecidas como “Arnicas-da-serra”, são utilizadas na forma de extratos hidroalcoólicos de suas partes aéreas com diversas finalidades terapêuticas.^{19,20} Uma série de atividades biológicas de espécies de *Lychnophora* é registrada na literatura. Destacamos algumas a seguir:

-Efeito tripanocida descrito em ensaios

com lactonas sesquiterpênicas e flavonoides de *Lychnophora granmogolense*,²¹ e extratos de *L. passerina* e *L. vilosissima*^{22,23}

-Comprovada atividade analgésica de extratos aquosos de *Lychnophora ericoides*²⁴.

-Capacidade antibacteriana de triterpenos de *Lychnophora pinaster*.²⁵

-Efeito antifúngico observado para derivados humuleno oriundos de *Lychnophora salicifolia*.²⁶

-Potencial moluscocida de *Lychnophora brunioides*.²⁷

-A atividade anti-inflamatória pela qual as espécies são mais conhecidas popularmente. Averiguado para ácidos cafeoilquínicos e flavonoides de *Lychnophora ericoides*,²⁸ em uso de extratos etanólicos de *L. Passerina*,²⁹ para lactonas sesquiterpênicas de *L. trichocarpha*³⁰ e ácido clorogênico de *L. salicifolia*.³¹

-Capacidade anticonvulsivante de ácido cafeoilquínico de *Lychnophora rupestris* e *L. staavioides*.³²

-Efeito antihipernociceptivo de derivado do bisabolano, em modelo *in vitro*, majoritário na fração volátil de folhas de *Lychnophora ericoides*.²⁰

-Capacidade anti-carcinogênica *Lychnophora ericoides*.³³

A espécie *Lychnophora ericoides* é, dentre as espécies do gênero, a mais utilizada na medicina popular, na forma de extrato hidroalcoólico de suas partes aéreas. *L. ericoides* possui grande polimorfismo³⁴ podendo ser facilmente confundida com outras do mesmo gênero, principalmente *L. pseudovilosissima*, *L. vilosissima* e *L. salicifolia*, sendo que crescem em locais xéricos, como campos pedregosos e arenosos-graminosos.^{9,10}

Lychnophora ericoides consta na lista oficial do Ministério do Meio Ambiente³⁵ como “ameaçada de extinção”. Esta lista foi elaborada a partir do relatório apresentado ao ministério pelos pesquisadores da fundação Biodiversitas, Belo Horizonte MG. As conclusões apresentadas nesse relatório

da fundação foram oriundas do debate de um *workshop* realizado na capital mineira em 2005. Tais conclusões enquadravam *L. ericoides* na categoria “Ameaçada”. Entretanto esta categoria possuía de acordo com os pesquisadores três níveis sendo que *L. ericoides* foi considerada “vulnerável”, ou seja, o nível mais baixo de ameaça. Além do desmatamento, há uma massiva extração por parte dos “erveiros” e “raizeiros” nativos da região de seu habitat.^{9,10} Concluímos que a afirmação de que existe alto risco de extinção destoa da estratificação de riscos traçada pelos taxonomistas no *workshop* mencionado acima.

Complementarmente a necessidade de preservação da espécie fomenta a propagação *in vitro* dos tecidos bem como a manutenção de embriões em bancos germoplásmicos.³⁶ Adicionalmente, o uso da biotecnologia com o sentido de explorar de forma sustentável o patrimônio genético ameaçado é uma fronteira a ser explorada.

Os estudos fitoquímicos da última metade do século XX envolvendo *L. ericoides* haviam sido restritos praticamente a investigação fitoquímica incremental de componentes não voláteis, ou componentes fixos. Estes estudos revelaram uma composição química majoritária de lactonas sesquiterpênicas e flavonoides em frações de média polaridade de extratos de folhas^{37,38} enquanto encontram-se em frações polares os ácidos cafeoilquínicos e as di-C-glicosilflavonas.^{19,39} Compostos C-glicosilflavonas como vicenina 2 e 6,8-di-C-β-glicosil-crisina são conhecidos pela sua capacidade antioxidante e anti-inflamatória em ensaios *in vitro*.^{19,28,40} Ainda sobre a fitoquímica há o relato de Borsato e colaboradores⁴¹ de que as raízes desta espécie apresentam lignanas.

Historicamente houve uma falta de interesse na investigação das frações voláteis de folhas de *Lychnophora* spp. O espaço químico⁴² ocupado pelos derivados sesquiterpênicos voláteis foi ocupado por compostos descritos como componentes apolares da fração dos compostos fixos. Os trabalhos descritivos da fitoquímica de

frações apolares de espécies de *Lychnophora* como *L. uniflora* e *L. Salicifolia*,¹⁵ bem como *L. pinaster*⁴³ apontam a ocorrência de sesquiterpenos funcionalizados a partir das olefinas de cariofileno.

Mais profundamente acerca do tema localização tecidual dos metabolitos secundário em *Lychnophora*, um estudo recente do nosso grupo de pesquisas rastreou por MALDI imaging os flavonoides C-glicosilados.⁴⁴ O estudo demonstra que o adensamento destes compostos em tecidos epidérmicos na face adaxial das folhas pode estar relacionado a um mecanismo de proteção ao fator abiótico de estresse radiação UV. Há uma extensa discussão sobre a importância desse fator de estresse disposta em revisões diversas da literatura.^{45,46}

Este recente estudo resulta em aspecto convergente a outros estudos que envolvem morfologia, anatomia e taxonomia de espécies de Asteraceae (*syn.* Compositae) e que já determinaram a localização dos tricomas glandulares.^{47,48} Dentro da família Asteraceae (*syn.* Compositae), outros tricomas glandulares já foram descritos como compartimentos que concentram terpenos e expressam toda a maquinaria enzimática da via biossintética destes compostos em suas células.^{84,85} Em um horizonte além da família Asteraceae (*syn.* Compositae) pode-se contemplar esta compartimentalização dos metabolitos no exemplo descrito para tomates [*Solanum* spp. (Solanaceae)].⁴⁹

Até recentemente era relatado que em *Lychnophora ericoides* a concentração de metabolitos secundários nos tricomas glandulares de folhas era basicamente de flavonoides.⁵⁰

A compreensão da localização dos tecidos que compartimentalizam a produção de terpenos bioativos é crucial para o desenvolvimento de estudos de bioprospecção.

Dentre os poucos trabalhos publicados sobre os Compostos Orgânicos Voláteis (COVs) de partes aéreas de *Lychnophora*

ericoides, destaca-se os sesquiterpenos e monoterpenos que são observados em seu óleo essencial.⁵¹⁻⁵³ Dentre os sesquiterpenos majoritários encontram-se α -cadinol, (*E*)-nerolidol, óxido de cariofileno e uma série de compostos que derivam do esqueleto carbônico do tipo bisabolano. Majoritariamente os derivados do bisabolano

são α -bisabolol, *ar*-diidro-turmerona, *ar*-curcumeno e *ar*-turmerol (**Figura 2**). O mais comumente conhecido destes derivados de bisabolano é o α -bisabolol, que inclusive é descrito em *Lychnophora ericoides*. Este composto é bioativo em ensaios de avaliação de capacidade anti-inflamatória.⁵⁴

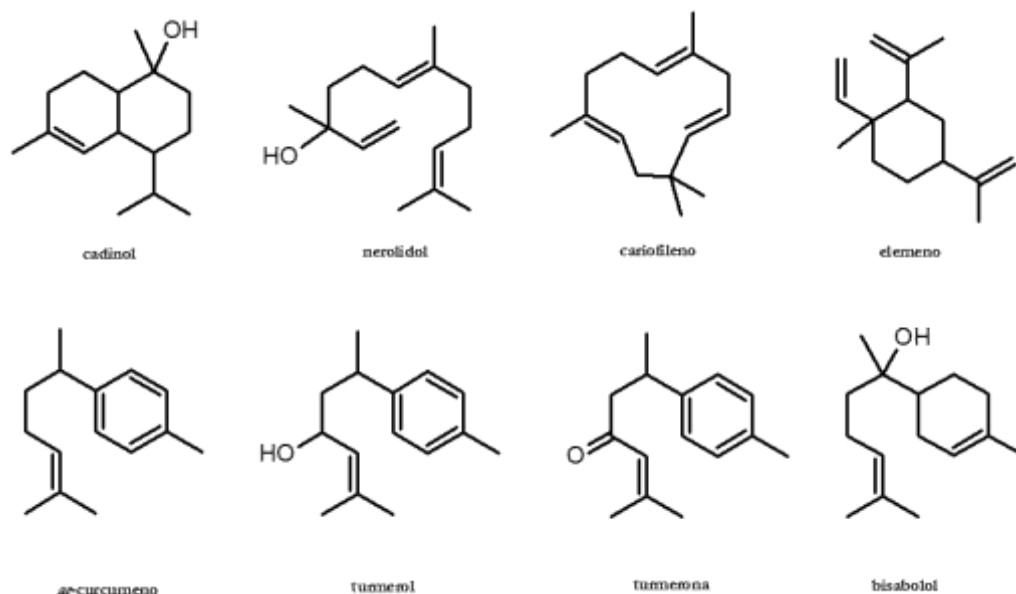


Figura 2. Sesquiterpenos voláteis majoritários identificados em frações voláteis de folhas de *L. ericoides*⁵¹⁻⁵³

Óleos essenciais de *L. ericoides* que ocorrem no município de São João batista do Glória – MG apresentam atividade acaricida frente à *Tetranychus urticae* (Tetranychidae) em ensaios de efeito fumigante.⁵³ A avaliação química desta fração volátil levou a identificação dos majoritários da fração volátil em *Headspace* acoplado ao dispositivo de Micro Extração em Fase Sólida [HS-SPME (*Solid Phase Micro Extraction*)]. Sete monoterpenos e dois derivados de bisabolano (sesquicineol e *orto*-acetoxi-bisabolol) (**Figura 3**) foram identificados.^{20,55} Foi ainda verificado que estes sesquiterpenos

estão presentes em preparados hidroalcoólicos, o que instigou a realização de bioensaios do material isolado. A avaliação do potencial anti-hipernociceptivo *in vitro* utilizando-se macrófagos peritoneais, isolados de ratos, em meio de cultura sugeriu um efeito analgésico do *orto*-acetoxi-bisabolol.^{20,55} A redução significativa dos níveis dos mediadores IL-1 β e TNF- α produzidos pelas células isoladas é responsável pelo efeito de anti-hipernocicepção, o que denota efeito físico, e não cognitivo, sobre a da dor inflamatória.⁵⁶

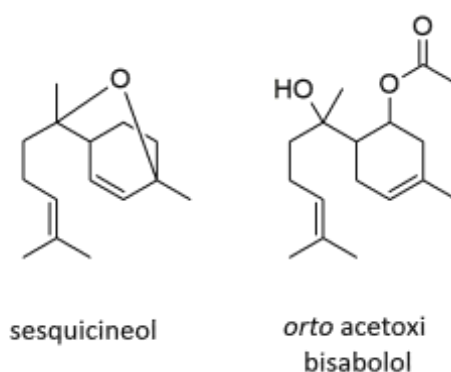


Figura 3. Sesquiterpenos identificados recentemente em frações voláteis de folhas de *Lychnophora ericoides*^{20,55}

Derivados do tipo bisabolano são de amplo interesse acadêmico, científico e tecnológico. Um dos exemplos mais atuais dentre as aplicações da classe de terpenos inclui a exploração do potencial de uso do esqueleto carbônico na indústria de biocombustíveis através da domesticação biotecnológica das bisaboleno-sintases de *Picea abies* (Pinaceae) e *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) e transfectados em *Escherichia coli* para geração do terpeno bisaboleno e posterior emprego de redução catalítica para geração do bisabolano.⁵⁷⁻⁵⁹

Nos campos da ecologia química e da fisiologia vegetal o estudo das terpeno sintases e das repostas nos níveis de seus produtos, os terpenos voláteis principalmente, têm avançado no sentido de reforçar os papéis semio-químicos destes metabolitos principalmente no nível trófico de comunicação “planta-inseto” implicando, portanto, que há aquisição evolutiva dos organismos que biossintetizam estes compostos.⁶⁰⁻⁶² Em um experimento de campo envolvendo aferição da capacidade de repostas da emissão de derivado do tipo bisabolano das folhas de *L. ericoides* pode-se notar um aumento expressivo no conteúdo do orto-acetoxi-bisabolol em *Headspace* de folhas de *L. ericoides* agredidas manualmente, com a finalidade de reproduzir experimentalmente os efeitos da agressão por herbivoria.⁶³

Ao passo em que as pesquisas sobre a

química da fração volátil de *Lychnophora ericoides* sofreram avanço, a maior parte destas contribuiu restritamente ao campo da fitoquímica clássica. Entretanto estas contribuições trazem a luz uma questão de cunho biossintético: a diversidade de derivados do bisabolano observada estaria relacionada a um tipo específico de bisaboleno sintase como ocorre em outras espécies,⁶⁴ que apresenta isoformas com determinado grau de conservação nas populações de *Lychnophora ericoides* do Brasil? Caso estas isoformas sejam as responsáveis pela formação do esqueleto bisabolano, seriam os citocromos os responsáveis pela diversidade de funções orgânicas como cetonas, alcoóis e ésteres? Haja vista tal diversidade de isoformas foi descrita para derivados germacrano de espécies domesticadas como a alface [*Lactuca sativa* (Asteraceae)],⁶⁵ o girassol [*Helianthus annuus* (Asteraceae)]⁶⁶ e a alcachofra [*Cynara cardunculus* (Asteraceae)].⁶⁷ Tais questões podem ser respondidas por estudos de proteômica dirigida e comprovadas por estudos com RNA e transcrição reversa para geração de genes clonados e consequente sequenciamento dos mesmos.

Fundamentalmente a questão se ampara no conhecimento de que a biossíntese dos terpenos apresenta quatro grandes etapas, sendo que as duas últimas são as responsáveis pela enorme diversidade de terpenos. São elas a reação de ciclização do

precursor fosfatado catalisada por Terpeno sintases (TerpS) e a funcionalização dos esqueletos carbônicos pelos citocromos P450.^{65,67-69}

3. Terpenos: Sua relevância e a sua Biossíntese

Derivados do tipo bisabolano são de amplo interesse acadêmico, científico e tecnológico. Um dos exemplos mais atuais dentre as aplicações da classe de terpenos inclui a exploração do potencial de uso do esqueleto carbônico na indústria de biocombustíveis através da domesticação biotecnologia das bisabolano-sintases de *Picia abiens* (Pinaceae) e *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) e transfectados em *Escherichia coli* para geração do terpeno bisabolano e posterior emprego de redução catalítica para geração do bisabolano.⁵⁷⁻⁵⁹

Nos campos da ecologia química e da fisiologia vegetal o estudo das terpeno sintases e das repostas nos níveis de seus produtos, os terpenos voláteis principalmente, têm avançado no sentido de reforçar os papéis semio-químicos destes metabolitos principalmente no nível trófico de comunicação “planta-inseto” implicando, portanto, que há aquisição evolutiva dos organismos que biossintetizam estes compostos.⁶⁰⁻⁶² Em um experimento de campo envolvendo aferição da capacidade de repostas da emissão de derivado do tipo bisabolano das folhas de *L. ericoides* pode-se notar um aumento expressivo no conteúdo do *orto*-acetoxi-bisabolol em *Headspace* de folhas de *L. ericoides* agredidas manualmente, com a finalidade de reproduzir

experimentalmente os efeitos da agressão por herbivoria.⁶³

Ao passo em que as pesquisas sobre a química da fração volátil de *Lychnophora ericoides* sofreram avanço, a maior parte destas contribuiu restritamente ao campo da fitoquímica clássica. Entretanto estas contribuições trazem a luz uma questão de cunho biossintético: a diversidade de derivados do bisabolano observada estaria relacionada a um tipo específico de bisabolano sintase como ocorre em outras espécies,⁶⁴ que apresenta isoformas com determinado grau de conservação nas populações de *Lychnophora ericoides* do Brasil? Caso estas isoformas sejam as responsáveis pela formação do esqueleto bisabolano, seriam os citocromos os responsáveis pela diversidade de funções orgânicas como cetonas, alcoóis e ésteres? Haja vista tal diversidade de isoformas foi descrita para derivados germacrano de espécies domesticadas como a alface [*Lactuca sativa* (Asteraceae)],⁶⁵ o girassol [*Helianthus annuus* (Asteraceae)]⁶⁶ e a alcachofra [*Cynara cardunculus* (Asteraceae)].⁶⁷ Tais questões podem ser respondidas por estudos de proteômica dirigida e comprovadas por estudos com RNA e transcrição reversa para geração de genes clonados e consequente sequenciamento dos mesmos.

Fundamentalmente a questão se ampara no conhecimento de que a biossíntese dos terpenos apresenta quatro grandes etapas, sendo que as duas últimas são as responsáveis pela enorme diversidade de terpenos. São elas a reação de ciclização do precursor fosfatado catalisada por Terpeno sintases (TerpS) e a funcionalização dos esqueletos carbônicos pelos citocromos P450.^{65,67-69}

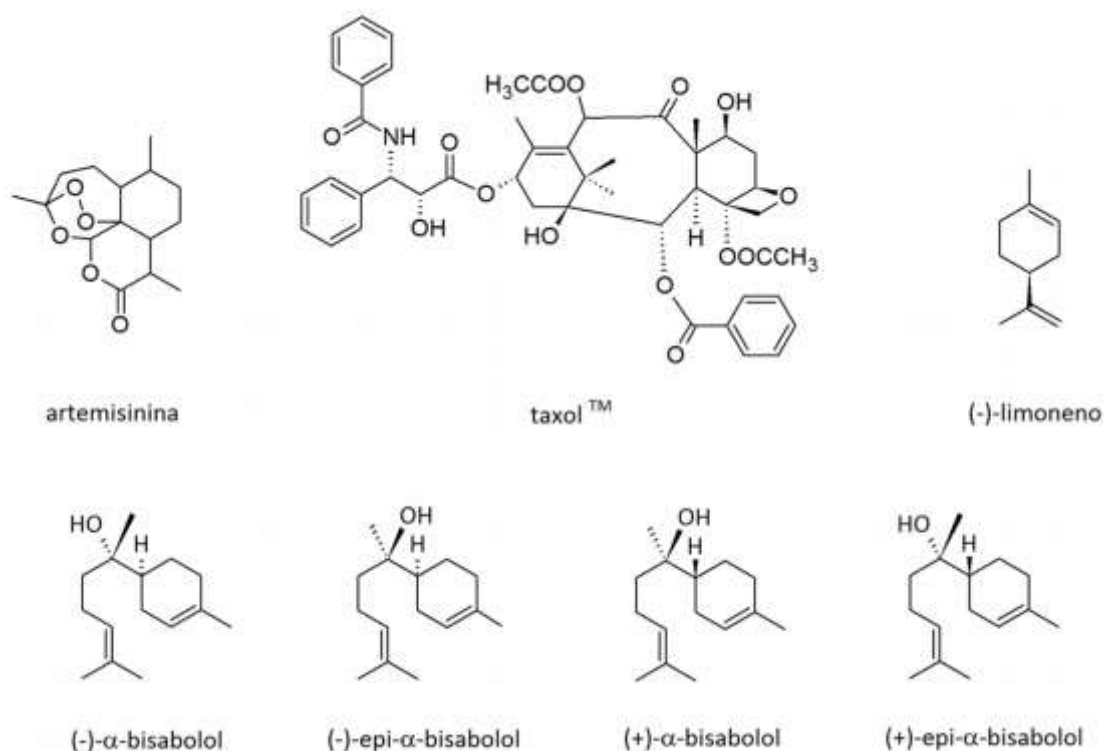


Figura 4. Estrutura química representando uma série de terpenos com valor para a indústria farmacêutica

De acordo com Croteau e colaboradores⁸² a biossíntese dos terpenoides a partir do mais simples metabólito primário pode ser basicamente dividida em 4 etapas (**Figura 5**): **(a)** síntese do precursor fundamental IPP; **(b)** oligomerização das unidades de IPP para formação de séries homólogas de prenilas difosfatadas, por meio de adições eletrofílicas; **(c)** ciclização destes prenildifosfatos alílicos resultando na formação dos esqueletos dos sesquiterpenos e; **(d)** modificações enzimáticas secundárias (majoritariamente reações redox) que fazem surgir as funções orgânicas das moléculas e a quimiodiversidade desta família de produtos naturais.

A seguir, a **Figura 5** ilustra com estruturas de Lewis estas etapas da via biossintética dos

sesquiterpenos de *Lychnophora* spp. Em **(c)** são exemplificados os processos catalisados pelos TerpS para formação dos produtos principais das frações ricas em sesquiterpenos: derivados bisabolano,^{60,63} derivados cadinano,⁸³ derivados cariofilano¹⁸ e derivados germacrano.⁸⁴ Apesar de o laço em comum ser o esqueleto insaturado, os produtos são estereoisômeros dos alenos: bisabolenos, cadinenos, cariofilenos e germacrenos. Em **(d)** são demonstrados os produtos da germacrano A monoxidase (GAO) que foi descrita em diversas espécies de Asteraceae.⁸⁵ Em **(d)** é possível notar que o produto das etapas oxidativas gera um composto esterificado e hidroxilado o qual espontaneamente forma uma lactona.

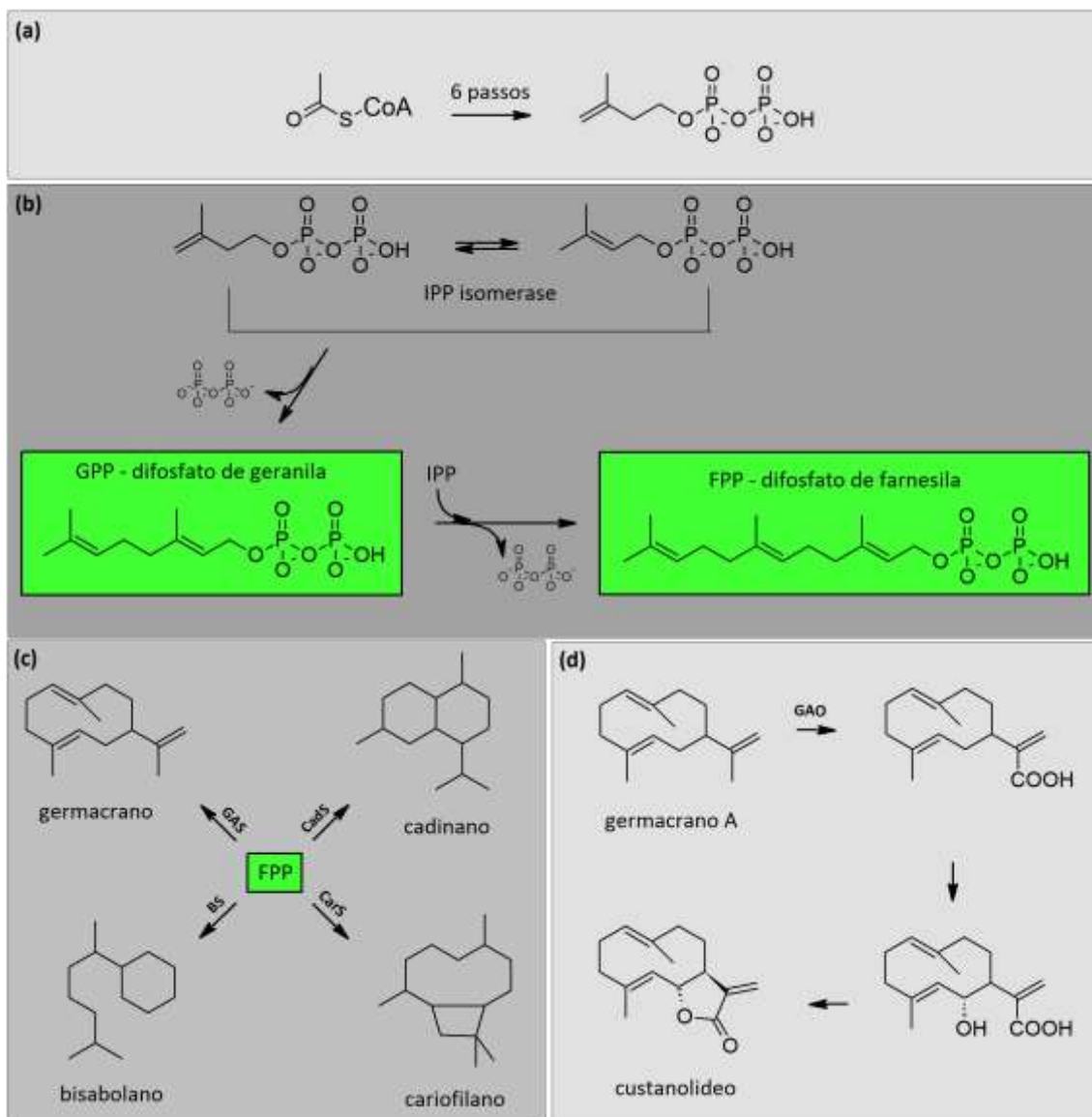


Figura 5. As 4 etapas fundamentais da biogênese dos terpenoides. **(a)** síntese de IPP; **(b)** oligomerização das unidades de IPP; **(c)** ciclização das prenylas alifáticas precursoras dos esqueletos dos principais tipos de sesquiterpenos de *Lychnophora* spp. via catálise enzimática por germacreno sintase (GAS), cadineno sintase (CadS), bisaboleno sintase (BS) e cariofileno sintase (CarS); e **(d)** formação de funções orgânicas oxigenadas no exemplo de formação do custanolídeo a partir de germacreno A envolvendo três etapas de oxidação catalisadas pela germacreno A monoxidase (GAO). Este conjunto de reações gera a quimiodiversidade desta família de produtos naturais

Todo o processo de produção, armazenamento e liberação/volatilização destes sesquiterpenos oferece variáveis múltiplas, as quais estão sujeitas a variabilidade temporal. Este espaço de tempo se encaixa em diferentes intervalos, desde circadianos a ultradianos. Dentre os fatores

que governam a emissão de sesquiterpenos por partes aéreas de plantas, há uma grosseira, porém didática, divisão: fatores bióticos e abióticos.⁸⁶ Dentre os fatores abióticos talvez o mais determinante seja a temperatura. Baseado em aferições a partir de galhos de laranjeiras não adultas, os

autores Hansen e Seufert⁸⁷ construíram uma curva que expressa os níveis de β -cariofileno emitidos pela planta em função da temperatura e puderam encontrar um aumento de 5,6 vezes a partir do aumento de 10 °C na temperatura a qual foi submetida à amostra. Outro exemplo deste controle abiótico é a emissão de sesquiterpenos por folhas de *Pinus taeda*. Os valores apresentam uma forte dependência com a temperatura, sendo que os máximos são observados pela manhã e ao horário do crepúsculo enquanto durante a noite ocorre um declínio.⁸⁸

Os mecanismos de alocação de precursores de fosfatos de prenila são tópicos estudados atualmente, sendo que hoje é possível afirmar que a via de biossíntese a partir do ácido mevalônico fornece unidades de IPP passíveis de armazenamentos no citosol,⁷³ o que pode estar relacionado com os ritmos infradianos de liberação de sesquiterpenos por partes aéreas de *Arabidopsis thaliana*.⁸⁹

4. O proteoma e o transcriptoma no estudo da biossíntese de terpenos

A maior parte do conhecimento relacionado à biossíntese de produtos naturais, incluindo os terpenos das espécies endêmicas que compõe a Flora Brasileira, foi gerada dentro de um modelo experimental. Este modelo é a análise de fluxo metabólico por meio da incorporação de precursores com marcação radioisotópica.⁹⁰

Recentemente, foram tomados esforços relacionados a caracterização estrutural e funcional de enzimas chave das rotas metabólicas a exemplo de Zulak e colaboradores.⁹¹ Este empenho acabou por gerar um nicho para o uso de técnicas de biologia molecular na compreensão do biossíntese de terpenos.

Este novo âmbito da pesquisa de Produtos Naturais bioativos é permeado por estudos

biológicos como a compreensão do Proteoma e do Transcriptoma.

Análises de proteomas podem ser consideradas como o tipo mais fundamental de estudo para determinação de diferenças entre os organismos vivos. A caracterização genômica dos organismos vivos proporciona a determinação do código genético, o que, notoriamente, não determina *per si* o fenótipo deste organismo. Por exemplo: um único organismo poderá apresentar em resposta a estímulos internos ou externos, a ativação da transcrição de uma série de proteínas o que nos leva a afirmar que um organismo com seu genoma, em situações diferentes, pode apresentar mais que um proteoma.⁹²

As técnicas empregadas nas análises proteômicas incluem as de separação, ou seja, Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC), e também incluem as técnicas de caracterização das proteínas, as quais se baseiam na espectrometria de massas.⁹³ Atualmente *Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight* (MALDI-TOF) é a técnica espectrométrica mais utilizada nos estudos de caracterização de proteínas. Segundo alguns autores⁹⁴ o papel desta técnica na área da proteômica é, de fato, indispensável. Entretanto sua condição indispensável ainda suscita debate no meio acadêmico.

Ainda ponto passível de debate é a necessidade prévia de separação das proteínas em mistura. De um lado a separação bidimensional previa de proteínas por PAGE possibilita a geração de mapas de distribuição de proteínas com coordenadas referentes ao seu ponto isoeletrico e seu peso molecular.⁹⁵ De outro lado a técnica de *shot gun* traz a tona a capacidade de identificar as proteínas de interesse sem uma prévia separação das mesmas.⁹⁵ O uso de digestão com tripsina das proteínas em mistura já seria suficiente para a geração dos peptídeos identificáveis.

A análise proteômica de qualquer célula

compreende nada menos que o levantamento de todas as proteínas que esta célula expressa no momento. Observando o fato de que esta tarefa é difícil de ser executada rapidamente, recentemente os estudos vêm sendo direcionados a uma organela celular ou até mesmo, por vezes, a uma proteína de interesse. Esse tipo de levantamento pode ser denominado como “análise sub-proteômica” ou ainda “análise proteômica dirigida”.^{92,96,97} Estas análises diferenciam-se sumariamente por ser respectivamente uma busca por proteínas a nível subcelular e a outra busca por proteínas específicas. Alguns dados estruturais das proteínas são passíveis de predição através de software de análise de mapas proteicos em géis eletroforéticos bidimensionais. Essa possibilidade viabiliza ainda mais estudos direcionados como os de sub-proteômica e ainda de “proteômica dirigida”.

Todo e qualquer estudo sub-proteômico ou de “proteômica dirigida” é realizado visando demonstrar a ocorrência de uma proteína, seja ela estrutural ou ainda uma enzima envolvida em um evento bioquímico determinado daquela célula, ou organela, em estudo. Entretanto a necessidade da caracterização da função deste alvo é crucial para os estudos de biossíntese de produtos naturais, caso contrário às hipóteses de rotas biossintéticas não podem ser confirmadas/derrubadas por estes estudos. A partir da prospecção de transcritos expressos em tecidos vegetais de interesse de estudo, o transcriptoma se torna matéria prima das pesquisas que visam à caracterização funcional de enzimas.⁹²

Os avanços na pesquisa de sesquiterpeno-sintase (SesS) têm sido através de estudos de clonagem de genes responsáveis pela transcrição destas enzimas, sendo que estes genes são obtidos geralmente pela transcrição reversa de RNA mensageiro (RNAm). Em 1998 a primeira bisaboleno-sintase foi clonada através da obtenção de cDNAs e subsequente expressão heteróloga em organismos fermentadores.⁶⁰ Desde então foram descritas, de forma precisa e extensiva, outras isoformas desta terpeno

sintase responsável pela etapa determinante na biogênese de derivados bisabolano.⁶⁴ Como exemplo de sucesso na caracterização das SesS por essa estratégia podemos citar as bisaboleno-sintases isoladas a partir do caule de *Abies grandis*,⁶⁰ das raízes de *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae)⁹⁸ e de plântulas de *Picea abies* (Pinaceae),⁹⁹ e ainda a cadineno sintase isolada de *Eleutherococcus trifolius*¹⁰⁰ e de sementes de algodão (*Gossypium* sp.).⁸³ Entre os derivados que sesquiterpênicos frequentemente encontrados na fração volátil, ou ainda fixa apolar, de folhas de *Lychnophora* spp., de forma majoritária, temos exemplos de sucesso na clonagem de cariofileno sintases e germacreno sintases. Entretanto estes exemplos também se tratam de resultados de pesquisas com espécies domésticas como o milho (*Zea mays*)¹⁸ e a alface [*Lactuca sativa*(Asteraceae)],⁶⁵ respectivamente.

Ao curso de uma determinação de enzimas de rotas biossintéticas definidas de espécies vegetais através da caracterização funcional, os procedimentos que sucedem o colecionamento de DNAs complementares, os conhecidos cDNAs, adquiridos a partir dos transcritos, são basicamente a transfecção e expressão heteróloga dos genes. Pode-se definir a transfecção como um procedimento de transgenia que envolve a inserção destes genes de interesse em material genético, geralmente plasmidial, de “organismos hospedeiros”.¹⁰¹ A conveniência da escolha dos microrganismos hospedeiros dos genes é baseada em viabilidade da inserção dos genes e compatibilidade da via biossintética do hospedeiro com a via de estudo. A grande maior parte de modelos emprega *Escherichia coli* ou *Saccharomyces cerevisiae*.^{66,84} Alternativamente, já foi descrito a capacidade de expressão dos genes clonados em plantas receptoras do vetor como *Nicotiana benthamiana*.¹⁰² A ativação genômica do DNA recombinante, após período de incubação, gera a transcrição dos genes que são traduzidos nas enzimas da via de biossíntese, via esta que pode ser utilizada, agora pelo organismo transgênico, na conversão de substrato em produto mediante suplementação adequada dos

meios de cultura. O resultado final é a formação dos metabolitos secundários originalmente encontrados na espécie vegetal estudada. Esta estratégia tem sido utilizada de forma ampla na caracterização funcional de enzimas.¹⁰²

5. Perspectivas Futuras

Nesse contexto se destaca a gama de Bioatividade dos derivados de bisabolano como, por exemplo, os estereoisômeros do α -bisabolol com efeitos anti-inflamatório, analgésico e antibiótico.⁵⁴

A despeito do caráter raro, os trabalhos que se propõem a determinar a ocorrência de terpeno sintases e enzimas da rota biossintética de terpenos em espécimes selvagens da flora Brasileira deverão ser fundamentados no potencial da bioengenharia.^{103,104} Sabe-se que esta apresenta uma perspectiva inovadora para a manipulação de organismos geneticamente modificados em favor da produção de moléculas de interesse comercial. Considerando que esta realidade é estreitamente atrelada a estudos na área da Pesquisa Fundamental, e não aplicada, estes trabalhos em fase de desenvolvimento devem caminhar no sentido de estabelecer quais são as entidades enzimáticas que são responsáveis pela diversidade química através de técnicas espectrométricas e de biologia molecular.

Destaca-se, mais uma vez, a importância destas micromoléculas que podem exercer papel na interação “planta-inseto”, ou ainda “planta-planta”, bem como sua proeminência para a terapêutica e a agroquímica. A possibilidade de domesticação dos genes em favor de produção biotecnológica destas micromoléculas incita ainda mais o alcance dos objetivos destes trabalhos.

Por fim, cabe aqui ressaltar as implicações terapêuticas que o estudo da fração volátil oriunda de folhas de *Lychnophora ericoides* pode apresentar. Uma série de constituintes

identificados dentro de grupos vegetais próximos a esta espécie é comum à fração volátil de folhas de *Cordia verbenaceae* (Boraginaceae).⁷⁴ O humuleno e cariofileno são considerados “ativos” da formulação comercialmente disponível com nome fantasia de Acheflan®. Ademais a presença de bisabolol nestas frações converge para a habilidade anti-inflamatória conclamada pela população que utiliza o preparado de folhas de *Lychnophora ericoides* como fitoterápico. A fração volátil de *Lychnophora ericoides* foi negligenciada nos estudos fitoquímicos e farmacológicos durante as últimas décadas. Entretanto, os trabalhos recentes fomentam a realização de estudos para além da investigação do potencial bioativo das LSTs e dos flavonoides da espécie.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Prof. Dr. Otmar Spring e a Dr. Katharina Aschenbrenner, Uni-Hoehnheim, Stuttgart – Alemanha, pelas sugestões no campo dos estudos de transcriptoma e proteômica dirigida. Agradecemos o Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro, IQ Unesp, Araraquara pelas sugestões quanto a exemplos de produtos de rotas biossintéticas e a Prof. Simone de Pádua Teixeira (FCFRP-USP) pelas correções acerca de terminologia botânica. Agradecemos ainda a FAPESP e ao CNPq pelo financiamento nas pesquisas originais do grupo, nos intercâmbios realizados e ainda pela concessão de Bolsas de Estudos. Aproveitamos para nos desculpar pelas referências não citadas devido à falta de espaço.

Referências Bibliográficas

¹ CDB (Secretariado da Convenção sobre Diversidade Biológica). *Panorama da Biodiversidade Global 2*, 2006, Montreal, Canadá.

- ² Lista De Espécies Da Flora Do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 10 Outubro 2014
- ³ Martinelli, G.; Moraes, M. D.; *Livro Vermelho da Flora do Brasil*, 1a. ed., Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2013. [Link]
- ⁴ Gershenzon, J.; Dudareva, N. The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, **2007**, *3*, 408. [CrossRef][PubMed]
- ⁵ McChesney, J. D. Venkataraman, S. K.; Henri, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2015. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶ Funk, V. A.; Susana, A.; Stuessy, T. F.; Bayer, R. J.; *Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae*, 1a. ed, International Association for Plant Taxonomy (IAPT): Vienna, 2009. [Link]
- ⁷ Nakajima, J. N.; Dematteis, M.; Louilliet, B.; Teles, A. M.; Heiden, G.; Ritter, M.; Hattori, E. K. O.; Roque, N.; Ferreira, S. C.; Magenta, M. A. G.; Bringel, J. B. A.; Almeida, G.; Saavedra, M. M.; Monge, M.; Soares, P. N.; Mondin, C. A.; Fernandes, A. C. Em *Livro Vermelho da Flora do Brasil*; Martinelli, G.; Moraes, M. A., eds.; Instituto de Pesquisa do Jardim Botânico do Rio de Janeiro: Rio de Janeiro, 2013, Parte II-Asteraceae. [Link]
- ⁸ Gottlieb, O. R.; *Micromolecular evolution, systematics and ecology. An essay into a novel botanical discipline*, 1a. ed, Springer: Heidelberg, 1982.
- ⁹ Semir, J.; Rezende, A. R.; Borges, M.; Lopes, N. P.; *As Arnicas Endêmicas das Serras do Brasil*, 1a. ed, Editora UFOP: Ouro Preto, 2011. [Link]
- ¹⁰ Semir, J.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, 1991. [Link]
- ¹¹ Keles, L. C.; Melo, N. I.; Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A. L.; Carvalho, C. E.; Cunha, W. R.; Crotti, A. E. M.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P. Lychnophorinae (Asteraceae): A survey of its chemical constituents and biological activities. *Química Nova* **2010**, *33*, 2245. [CrossRef]
- ¹² Sousa, O. V.; Dutra, R. C.; Yamamoto, C. H.; Pimenta, D. S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch. *Revista Brasileira de Farmácia* **2008**, *89*, 113. [Link]
- ¹³ Baldin, E. L. L.; Pavarini, D. P.; Souza, E. S.; Silva, J. P. G. F.; Souza, G. H. B.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. Towards new botanical pesticides: the toxic effect of *Eremanthus goyazensis* (Asteraceae) leaves essential oil against *Brevipalpus phoenicis* (Acari: Tenuipalpidae). *Química Nova* **2012**, *35*, 2254. [CrossRef]
- ¹⁴ Vichenwski, W.; Lins A. P.; Herz W.; Muraris R.; Lychnopholic acid and its acetate from *Lychnophora martiana*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 685. [CrossRef]
- ¹⁵ Bohlmann, F.; Zdero, C.; Robinson, H.; King, R. M. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2381. [CrossRef]
- ¹⁶ Xiao, Y.; Wang, Q.; Erb, M.; Turlings, T. C. J.; Ge, L.; Hu, L.; Li, J.; Han, X.; Zhang, T.; Lu, J. H.; Lou, Y. Specific herbivore-induced volatiles defend plants and determine insect community composition in the field. *Ecology Letters* **2012**, *15*, 1130. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁷ Rasmann, S.; Kollner, T. G.; Degenhardt, J.; Hiltbold, I.; Toepfer, S.; Kuhlmann, U.; Gershenzon, J.; Turlings, T. C. J. Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots. *Nature* **2005**, *434*, 732. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁸ Köllner, T. G.; Held, M.; Lenk, C.; Hiltbold, I.; Turlings, T. C. J.; Gershenzon, J.; Degenhardt J. A maize (*E*)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties. *Plant Cell* **2008**, *20*, 482 [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Gobbo-Neto L.; Santos, M. D.; Kanashiro, A.; Almeida, M. C.; Lucisano-Valim, Y. M.; Lopes, J. L. C.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). *Planta Medica* **2005**, *71*, 3. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁰ Pavarini, D. P.; Callejon, D. R.; Soares, D. M.; Nogueira, E. F.; De Souza, G. E. P.; Cunha, F. Q.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. Novel bisabolane derivative from “Arnica-da-Serra” (*Vernoniae*: *Asteraceae*) reduces pro-

- nociceptive cytokines levels in LPS-stimulated rat macrophages. *Journal of Ethnopharmacology* **2013**, *148*, 993. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²¹ Graef, C. F. F.; Vichnewski, W.; Souza, G. E. P.; Lopes, J. L. C.; Albuquerque, S.; Cunha, W. R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. *Phytotherapy Research* **2000**, *14*, 203. [[CrossRef](#)]
- ²² Oliveira, A. B.; Saúde, D. A.; Perry, K. S. P.; Boaventura, M. A. D.; Grandi, T. S. M.; Stehmann, J. R.; Anjos, A. M. G.; Chiari, E. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. *Phytotherapy Research* **1996**, *10*, 636. [[CrossRef](#)]
- ²³ Chiari, E.; Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Mesquita, A. L.; Tavares, K. G. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **1991**, *85*, 372. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Cerqueira, M. B. S.; Souza, J. T.; Amado Júnior, R., R.; Peixoto, A. B. F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e das folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (Arnica). *Ciência e Cultura* **1987**, *39*, 551. [[Link](#)]
- ²⁵ Abreu, V. G. C.; Takahashi, J. A.; Duarte, L. P.; Pilo-Veloso, D.; Junior, P. A. S.; Alves, R. O.; Romanha, A. J.; Alcantara, A. F. C. Evaluation of the bactericidal and trypanocidal activities of triterpenes isolated from the leaves, stems, and flowers of *Lychnophora pinaster*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 615. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Miguel, O. G.; Lima, E. O.; Morais, V. M. F.; Gomes, S. T. A.; Monache, F. D.; Cruz, A. B.; Cruz, R. C. B.; Cechinel Filho, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia*. *Phytotherapy Research* **1996**, *10*, 694. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Bazon, J. N.; Lopes, J. L. C.; Vichnewski, W.; Lopes, J. N. C. Constituents of *Lychnophora brunioides*. *Fitoterapia* **1997**, *68*, 92. [[Link](#)]
- ²⁸ Santos, M. D.; Chen, G.; Almeida, M. C.; Soares, D. M.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P.; Lantz, R. C. Effects of Caffeoylquinic Acid Derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on *in vitro* Inflammatory Mediator Production. *Natural Product Communications* **2010**, *5*, 733. [[PubMed](#)]
- ²⁹ Capelari-Oliveira, P.; Paula, C. A.; Rezende, S. A.; Campos, F. T.; Grabe-Guimarães, A.; Lombardi, J. A.; Saúde-Guimarães, D. A. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian Arnica). *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *135*, 393. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁰ Ferrari, F. C.; Ferreira, L. C.; Souza, M. R.; Grabe-Guimaraes, A.; Paula, C. A.; Rezende, S. A.; Saude-Guimaraes, D. A. Anti-Inflammatory Sesquiterpene Lactones from *Lychnophora trichocarpha* Spreng. (Brazilian Arnica) *Phytotherapy Research* **2013**, *27*, 384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³¹ Hebeda, C. B.; Bolonheis, S. M.; Nakasato, A.; Belinati, K.; Souza, P. D. C.; Gouvea, D. R.; Lopes, N. P.; Farsky, S. H. P. Effects of chlorogenic acid on neutrophil locomotion functions in response to inflammatory stimulus. *Journal of Ethnopharmacology* **2011**, *135*, 261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Contini, S. H. T.; Santos, W. F.; Mortari, M. R.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. Neuropharmacological effects of *Lychnophora species* (Vernonieae, Asteraceae) and anticonvulsant activity of 4,5-di-O-[E]-caffeoylquinic acid isolated from stem of *L. rupestris* and *L. staavioides* on mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2008**, *102*, 281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Fernandes, C. R.; Turatti, A.; Gouvea, D. R.; Gobbo Neto, L.; Diniz, A.; Silva, A. R.; Lopes, N. P.; Garcia, S. B. The Protective Role of *Lychnophora ericoides* Mart. (Brazilian Arnica) in 1,2-Dimethylhydrazine-Induced Experimental Colon Carcinogenesis. *Nutrition and Cancer* **2011**, *63*, 593. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Mansanares, M. E.; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
- ³⁵ MMA. Brasil. Ministério do Meio Ambiente. Lista oficial das espécies da flora Brasileira ameaçadas de extinção. Instrução normativa Nº 6, de 23 de setembro de 2008. [[Link](#)]

- ³⁶ Pereira, A. M. S.; Bertoni, B. W.; Lopes, N. P.; Paron, M. E.; França, S. C.; Amarante, V. S. *In vitro* propagation and germoplasm conservation of *Lychnophora ericoides* Mart: a medicinal species from the Brazilian cerrado. *Revista Fitos (ALANAC)* **2005**, *1*, 69. [\[Link\]](#)
- ³⁷ Sakamoto, H. T.; Flausino, D.; Castellano, E. E.; Stark, C. B. W.; Gates, P. J.; Lopes, N. P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. *Journal of Natural Products* **2003**, *66*, 693. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ³⁸ Borella, J. C.; Lopes, J. L. C.; Vichnewski, W.; Cunha, W. R.; Herz, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovilosissima*. *Biochemical Systematics and Ecology* **1998**, *26*, 671. [\[CrossRef\]](#)
- ³⁹ Santos, M. D.; Gobbo-Neto, L.; Albarella, L.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). *Journal of Ethnopharmacology* **2005**, *96*, 545. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁰ Gobbo-Neto, L.; Guaratini, T.; Pessoa, C.; Moraes, M. O.; Costa-Lotuf, L. V.; Vieira, R. F.; Colepicolo, P.; Lopes, N. P. Differential Metabolic and Biological Profiles of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) from Different Localities in the Brazilian campos rupestres. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2010**, *21*, 750. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴¹ Borsato, M. L. C.; Graef, C. F. F.; Souza, G. E. P.; Lopes, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* **2000**, *55*, 809. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴² Dobson, C. M. Chemical Space and Biology. *Nature* **2004**, *432*, 824. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴³ Oliveira, A. B.; Saúde, D. A.; Perry, K. S. P.; Duarte, D. S.; Raslan, D. S.; Boaventura, M. A. D.; Chiari, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytotherapy Research* **1996**, *10*, 292. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁴ Silva, D. B.; Turati, I. C. C.; Gouveia, D. R.; Ernst, M.; Teixeira, S. P.; Lopes, N. P. Mass Spectrometry of Flavonoid Vicenin-2, Based Sunlight Barriers in *Lychnophora* species. *Scientific Reports* **2014**, *4*, 1. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁵ Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, **2007** *30*, 374. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁶ Pavarini, D. P.; Pavarini, S. P.; Niehues, M.; Lopes, N. P. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology* **2012**, *176*, 5. [\[CrossRef\]](#)
- ⁴⁷ Nagel, J.; Culley, L. K.; Lu, Y.; Liu, E.; Matthews, P. D.; Stevens, J. F.; Page, J. E. EST analysis of hop glandular trichomes identifies an *O*-methyltransferase that catalyzes the biosynthesis of xanthohumol. *The Plant Cell* **2008**, *20*, 186. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁸ Lange, B. M.; Turner, G. W. Terpenoid biosynthesis in trichomes - current status and future opportunities. *Plant Biotechnology Journal* **2013**, *11*, 2. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁴⁹ Besser, K.; Harper, A.; Welsby, N.; Schauvinhold, I.; Slocombe, S.; Li, Y.; Dixon, R. A.; Broun, P. Divergent regulation of terpenoid metabolism in the trichomes of wild and cultivated tomato species. *Plant Physiology* **2009**, *149*, 499. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁵⁰ Gobbo-Neto, L.; Gates, P. J.; Lopes, N. P. Negative ion chip-based nanospray tandem mass spectrometry for the analysis of flavonoids in glandular trichomes of *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae). *Rapid Communications on Mass Spectrometry* **2008**, *22*, 3802. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁵¹ Curado, M. A.; Oliveira, C. B. A.; Jesus, J. G.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2363. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- ⁵² Costa, M. A. C.; Jesus, J. G.; Farias, J. G.; Nogueira, J. C. M.; Oliveira, A. L. R.; Ferri, P. H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnophora ericoides* Mart.). *Revista de Biologia Neotropical* **2008**, *5*, 53. [\[Link\]](#)
- ⁵³ Baldin, E. L. L.; Pogetto, M. H. F. A. D.; Pavarini, D. P.; Lopes, N. P.; Lopes, J. L. C. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de *Lychnophora ericoides* Mart. sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Boletín De Sanidad Vegetal. Plagas* **2010**, *36*, 125. [\[Link\]](#)
- ⁵⁴ Kamatou, G. P. P.; Viljoen, A. M. A Review of the Application and Pharmacological

- Properties of α -bisabolol and α -bisabolol-Rich Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2010**, *87*, 1. [[CrossRef](#)]
- ⁵⁵ Pavarini, D. P.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, 2011. [[Link](#)]
- ⁵⁶ Verri, W. A.; Jr.; Cunha, T. M.; Parada, C. A.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics* **2006**, *112*, 116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁷ Peralta-Yahya, P. P.; Ouellet, M.; Chan, R.; Mukhopadhyay, A.; Keasling, J. D.; Lee, T. S. Identification and microbial production of a terpene-based advanced biofuel. *Nature Communications* **2011**, *2*, 483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁸ Kung, Y.; Runguphan, W.; Keasling, J. D. From Fields to Fuels: Recent Advances in the Microbial Production of Biofuels. *ACS Synthetic Biology* **2012**, *1*, 498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁹ McAndrew, R. P.; Peralta-Yahya, P. P.; Degiovanni, A.; Pereira, J. H.; Hadi, M. Z.; Keasling, J. D.; Adams, P. D. Structure of a Three-Domain Sesquiterpene Synthase: A Prospective Target for Advanced Biofuels Production. *Structure* **2011**, *19*, 1876, 2011. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁰ Bohlmann, J.; Crock, J.; Jetter, R.; Croteau, R. Terpenoid-based defenses in conifers: cDNA cloning, characterization, and functional expression of wound-inducible (*E*)- γ -bisabolene synthase from grand fir (*Abies grandis*). *Proceedings of National Academy of Science USA* **1998**, *95*, 6756. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶¹ Chen, F.; Tholl, D.; Bohlmann, J.; Pichersky, E. The family of terpene synthases in plants: a mid-size family of genes for specialized metabolism that is highly diversified throughout the kingdom. *The Plant Journal* **2011**, *66*, 212. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶² Schultz, J. C. How plants fight dirty. *Nature* **2002**, *416*, 267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶³ Gouvea, D. R.; Pavarini, D. P.; Carollo, C. A.; Lopes, N. P. Em: *Química de Produtos Naturais Novos Fármacos e a Moderna Farmacognosia*; Yunes, R. A.; Cechinel-Filho, V., eds.; Editora Univale: Itajaí, 2012. [[Link](#)]
- ⁶⁴ Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁵ Ikezawa, N.; Göpfert, J.; Nguyen, D.; Kim, S.; O'maille, P.; Spring, O.; Ro, D. Lettuce costunolide synthase (CYP71BL2) and its homolog (CYP71BL1) from sunflower catalyze distinct regio and stereoselective hydroxylations in sesquiterpene lactone metabolism. *Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 21601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁶ Göpfert, J. C.; Macnevin, G.; Ro, D. K.; Spring, O. Identification, functional characterization and developmental regulation of sesquiterpene synthases from sunflower capitates glandular trichomes. *BMC Plant Biology* **2009**, *9*, 86. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁷ Menin, B.; Comino, C.; Protis, E.; Moglia, A.; Cankar, K.; Bouwmeester, H. J.; Lanteri, S.; Beekwilder, J. Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. *Plant Science* **2012**, *190*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁸ Hamberger, B.; Bohlmann, J. Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine. *Biochemical Society Transactions* **2006**, *36*, 1209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶⁹ Nelson, D.; Werck-Reichhart, D. A. P450-centric view of plant evolution. *Plant Journal* **2011**, *66*, 194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷⁰ Coppen, J. J. W.; Hone, G. A. *Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin*. Non-Wood Forest Products - 2, FAO: Rome, 1995. [[Link](#)]
- ⁷¹ Qureshi, N.; Porter, J. W. Em: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, Vol. 1*. Porter, J. W.; Spurgeon, S. L., eds.; John Wiley & Sons: New York, 1981.
- ⁷² Newman, J. D.; Chappell, J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. *Critical*

Reviews in Biochemistry and Molecular Biology **1999**, *34*, 95. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷³ Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A. Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology* **2002**, *130*, 1079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁴ Dudareva, N.; Andersson, S.; Orlova, I.; Gatto, N.; Reichelt, M.; Rhodes, D.; Boland, W.; Gershenzon, J. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **2005**, *102*, 933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁵ McMurry, J.; *Organic Chemistry: With Biological Applications*, 8a. ed., Cengage Learning: Stamford, 2009.

⁷⁶ Crowell, P. L.; Gould, M. N. Chemoprevention and therapy of cancer by *d*-limonene. *Critical Reviews on Oncogenesis* **1994**, *5*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁷ Van Geldre, E.; Vergauwe, A.; Van Den Eeckhout, E. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. *Plant Molecular Biology* **1997**, *33*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁷⁸ Holmes, F. A.; Kudelka, A. P.; Kavanagh, J. J.; Huber, M. H.; Ajani, J. A.; Vlaero, J. A.; Em: *Taxane Anticancer Agents: Basic Science and Current Status*. Georg, G. I.; Chen, T. T.; Ojima, I.; Vyas, D. M. eds. American Chemical Society Symposium Series 583: Washington, 1995. [[Link](#)]

⁷⁹ Bornscheuer, U. T.; Huisman, G. W.; Kazlauskas, R. J.; Lutz, S.; Moore, J. C.; Robins, K. Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, *485*, 185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁸⁰ Fernandes, E. S.; Passos, G. F.; Medeiros, R.; Da Cunha, F. M.; Ferreira, J.; Campos, M. M.; Pianowski, L. F.; Calixto, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. *European Journal of Pharmacology* **2007**, *569*, 228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁸¹ Jakovlev, V.; Isaac, O.; Thiemer, K.; Kunde, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New

investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. *Planta Medica* **1979**, *35*, 125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁸² Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Em: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B.; Gruissem, W.; Jones, R. eds.; American Society of Plant Physiologists: New York, 2002. Cap. 24. [[Link](#)]

⁸³ Townsend, B. J.; Poole, A.; Blake, C. J.; Llewellyn, D. J. Antisense suppression of a (+)- δ -cadinene synthase gene in cotton prevents the induction of this defence response gene during bacterial blight infection but not its constitutive expression. *Plant Physiology* **2005** *138*, 516. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁸⁴ Göpfert, J. C.; Bülow, A. K.; Spring, O. Identification and Functional Characterization of a new Sunflower Germacrene A Synthase (HaGAS3). *Natural Product Communication* **2010**, *5*, 709. [[PubMed](#)]

⁸⁵ Nguyen, D. T.; Göpfert, J. C.; Ikezawa, N.; Macnevin, G.; Kathiresan, M.; Conrad, J.; Spring, O.; Ro, D. K. Biochemical conservation and evolution of germacrene A oxidase in Asteraceae. *Journal of Biological Chemistry* **2010**, *285*, 16588. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁸⁶ Duhl, T. R.; Helmig, D.; Guenther, A. Sesquiterpene emissions from vegetation: a review, *Biogeosciences* **2008**, *5*, 761. [[CrossRef](#)]

⁸⁷ Hansen, U.; Seufert, G. Terpenoid emission from *Citrus sinensis* (L.) OSBECK under drought stress. *Physics and Chemistry of the Earth (B)* **1999**, *24*, 681. [[CrossRef](#)]

⁸⁸ Helmig, D.; Ortega, J.; Guenther, A.; Herrick, J.; Geron, C. Sesquiterpene emissions from Loblolly Pine and their potential contribution to biogenic aerosol formation in the Southeastern US. *Atmospheric Environment* **2006**, *40*, 4150, [[CrossRef](#)]

⁸⁹ Aharoni, A.; Giri, A. P.; Deuerlein, S.; Griepink, F.; De Kogel, W. J.; Verstappen, F. W. A.; Verhoeven, H. A.; Jongsma, M. A.; Schwab, W.; Bouwmeester, H. J. Terpenoid metabolism in wild-type and transgenic *Arabidopsis* plants. *The Plant Cell* **2003**, *15*, 2866. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁹⁰ Kruger, N.; Schawen, A. The oxidative pentose phosphate pathway: structure and

- organisation. *Current Opinion in Plant Biology* **2003**, *6*, 236. [[CrossRef](#)]
- ⁹¹ Zulak, K. G.; Lippert, D. N.; Kuzyk, M. A.; Domanski, D.; Chou, T.; Borchers, C. H.; Bohlmann, J. Targeted proteomics using selected reaction monitoring reveals the induction of specific terpene synthases in a multi-level study of methyl jasmonate-treated Norway spruce (*Picea abies*). *The Plant Journal* **2009**, *60*, 1015.
- ⁹² Magalhães, C. S.; *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, 2008. [[Link](#)]
- ⁹³ Ruan, S. L.; Ma, H. S.; Wan, S. H.; Xin, Y.; Qian, L. H.; Tong, J. X.; Wang, J. Advances in plant proteomics-I. Key techniques of proteome. *Yi Chuan* **2006**, *28*, 1472. [[CrossRef](#)]
- ⁹⁴ Aebersold, R.; Mann, M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹⁵ Abdallah, C.; Dumas-Gaudot, E.; Renaut, J.; Sergeant, K. Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance *International Journal of Plant Genomics* **2012**, *2012*, Article ID 494572. [[CrossRef](#)]
- ⁹⁶ Komatsu, S.; Konishi, H.; Shen, S.; Yang, G. Rice proteomics. A step towards functional analysis of the rice genome. *Molecular and Cellular Proteomics* **2003**, *2*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹⁷ Newton, R. P.; Brenton, A. G.; Smith, C. J.; Dudley, E. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry* **2004**, *65*, 1449. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹⁸ Ro, D. K.; Ehling, J.; Keeling, C. I.; Lin, R.; Mattheus, N.; Bohlmann, J. Microarray expression profiling and functional characterization of *AtTPS* genes: Duplicated *Arabidopsis thaliana* sesquiterpene synthase genes *At4g13280* and *At4g13300* encode root-specific and wound-inducible (Z)- γ -bisabolene synthases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2006**, *448*, 104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹⁹ Martin, D.; Fäldt, J.; Bohlmann, J. Functional characterization of nine Norway spruce *TPS* genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the *TPS-d* subfamily. *Plant Physiology* **2004**, *135*, 1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰⁰ Wen, C. H.; Tseng, Y. H.; Chu, F. H. Identification and functional characterization of a sesquiterpene synthase gene from *Eleutherococcus trifoliatus*. *Holzforschung* **2012**, *66*, 183. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰¹ Ajikumar, P. K.; Tyo, K.; Carlsen, S.; Mucha, O.; Phon, T. H.; Stephanopoulos, G. Terpenoids: opportunities for biosynthesis of natural product drugs using engineered microorganisms. *Molecular Pharmaceuticals* **2008**, *5*, 167. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰² Kanagarajan, S.; Muthusamy, S.; Gliszczyńska, A.; Lundgren, A.; Brodelius, P. Functional expression and characterization of sesquiterpene synthases from *Artemisia annua* L. using transient expression system in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Reports* **2012**, *31*, 1309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰³ Bouwmeester, H. J. Engineering the essence of plants. *Nature Biotechnology* **2006**, *24*, 1359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁰⁴ Costa, M. A.; Marques, J. V.; Dalisay, D. S.; Herman, B.; Bedgar, D. L.; Dawin, L. B.; Lewis, N. Transgenic Hybrid Poplar for Sustainable and Scalable Production of the Commodity/Specialty Chemical, 2-Phenylethanol. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e83169. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]