

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

**CONSTITUINTES DE *Senecio heterotrichius* DC.:  
ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL,  
DERIVATIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA; ESTUDO DOS CONSTITUINTES  
VOLÁTEIS DE OUTRAS ESPÉCIES DE *Senecio***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Leandro Nicolodi Francescato**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**CONSTITUINTES DE *Senecio heterotrichius* DC.:  
ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL,  
DERIVATIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA; ESTUDO DOS CONSTITUINTES  
VOLÁTEIS DE OUTRAS ESPÉCIES DE *Senecio***

**por**

**Leandro Nicolodi Francescato**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Controle e Avaliação de Insumos e Produtos Farmacêuticos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2007**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**CONSTITUINTES DE *Senecio heterotrichius* DC.: ISOLAMENTO,  
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, DERIVATIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA; ESTUDO DOS CONSTITUINTES  
VOLÁTEIS DE OUTRAS ESPÉCIES DE *Senecio***

elaborada por  
**Leandro Nicolodi Francescato**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Farmacêuticas**

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

**Berta Maria Heinzmann, Dr<sup>a</sup>.**  
(Presidente/Orientadora)

**Flávio Henrique Reginatto, Dr. (UPF)**

**Ademir Farias Morel, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, 05 de março de 2007.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Zilda e Alcidor (*in memoriam*), pelo carinho, estímulo, dedicação e empenho para que eu pudesse chegar até aqui.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de oferecer meus sinceros votos de agradecimento:

- À minha querida família, pelo apoio, motivação e suporte dado durante toda a minha vida, sem o qual este trabalho jamais poderia ser realizado. Desculpem-me pelo pouco tempo que foi destinado a vocês;
- À minha namorada Cintia Camera, pelo companheirismo, incentivo, ajuda, paciência e compreensão;
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann, meu agradecimento e admiração, pelo exemplo, orientação, paciência e, principalmente, pela sua contribuição na realização deste trabalho e na minha formação científica;
- Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM, pela realização dos espectros de massas;
- Ao Prof. Dr. Sydney Hartz Alves e sua aluna Patrícia Pozzatti, do Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM, pela ajuda na realização dos testes de atividade antimicrobiana;
- Ao Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher e ao botânico Marcos Sobral, pelo auxílio na coleta e identificação do material vegetal;
- À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através de uma bolsa de estudos;
- Ao Me. Régis Augusto Deuschle, pela ajuda e por me guiar nos meus primeiros passos na área de Produtos Naturais;
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Margareth Linde Athayde, pela amizade, estímulo, exemplo e ajuda;
- Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e atenção;

- Aos colegas de laboratório, Tarcísio de Camargo, Tiane T. Simon, Glória N. da Silva, Chana M. da Silva, Primo Ricardo B. Zanon, Primo Francisco Maikon C. Barros, Danielle F. Pereira, Aline A. Bolzan, Francisco Zanin, Alexandre Schubert, Anelise Murari, Ticiane Boschetti, Mariane dos Santos e novatos que, pela amizade e convívio diário, de uma forma ou outra participaram e contribuíram com este trabalho;

- Aos funcionários e colegas dos Laboratórios do Departamento de Farmácia Industrial, Laboratório de Análises Toxicológicas e Laboratório de Neurotoxicidade pela cooperação, empréstimo de “materiais” e equipamentos, e pelos momentos de descontração;

- Aos meus amigos santoaugustenses, Nari, Mano, Dani e Rafa, por me incentivarem a estudar cada vez mais e pelos raros momentos de descontração;

Finalizando, eu gostaria de agradecer a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que esse sonho se realizasse.

“Imagination is more important than knowledge.  
Knowledge is limited. Imagination encircles the world.”

Albert Einstein

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Universidade Federal de Santa Maria

### **CONSTITUINTES DE *Senecio heterotrichius* DC.: ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, DERIVATIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA; ESTUDO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE OUTRAS ESPÉCIES DE *Senecio***

AUTOR: LEANDRO NICOLodi FRANCESCATO

ORIENTADORA: BERTA MARIA HEINZMANN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 05 de março de 2007.

O gênero *Senecio* (Asteraceae) constitui um grupo de plantas cosmopolitas formado por mais de 2000 espécies. Embora estas tenham toxicidade reconhecida devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos, várias delas são empregadas na medicina popular. Seu uso medicinal pode ser atribuído aos demais metabólitos secundários, entre eles flavonóides e terpenóides, sendo estes últimos, compostos com reconhecida atividade antimicrobiana. Neste estudo é relatada a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EtOH de *S. heterotrichius* DC., o isolamento e caracterização de um constituinte do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, a reação de foto-oxidação deste constituinte obtendo-se um peróxido, bem como a análise química e avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius* DC., *S. ceratophylloides* Griseb., *S. oxyphyllus* DC. e *S. leptolobus* DC. Os extratos das partes aéreas frescas de *S. heterotrichius* foram obtidos por maceração seqüencial à temperatura ambiente em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EtOH, seguido de evaporação sob pressão reduzida. O extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> foi fracionado por CC sobre gel de sílica até o isolamento do germacreno D, identificado por CG-EM, RMN <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H. Este composto, considerado um precursor de vários outros derivados de esqueleto sesquiterpênico, foi submetido a uma reação de foto-oxidação utilizando o corante Rosa de Bengala como agente sensibilizante; o principal peróxido formado foi isolado da mistura reacional por CC sobre gel de sílica, analisado por CG-EM, RMN <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H, e identificado como sendo o germacreno-D-1-hidroperóxido. A avaliação de atividade antimicrobiana dos extratos de *S. heterotrichius* e do germacreno-D-1-hidroperóxido foi realizada através do método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A2/NCCLS para fungos leveduriformes e M7-A4/NCCLS para bactérias aeróbias. A extração dos óleos essenciais das partes aéreas floridas de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. oxyphyllus* e *S. leptolobus* foi realizada pela técnica de hidrodestilação. Os óleos essenciais obtidos foram analisados por CG-EM e seus constituintes foram identificados através da comparação de seus Índices de Kovat's e dos modelos de fragmentação com dados da literatura. Estes óleos também tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada conforme metodologia citada anteriormente. O extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> evidenciou atividade inibitória frente *Candida krusei* (CIM de 0,25 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM de 2,5 mg/mL). Já o extrato EtOH foi inativo frente os microrganismos testados. O germacreno-D-1-hidroperóxido apresentou atividade inibitória frente *S. cerevisiae* (CIM de 2,5 mg/mL) e inibiu parcialmente o crescimento da alga *Prototheca zoopfi* nas concentrações de 5 e 2,5 mg/mL (80 e 50 % de inibição, respectivamente). Os óleos essenciais de *S. ceratophylloides* e *S. leptolobus* apresentaram atividade inibitória e bactericida frente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM e CBM entre 6,6 e 3,3 mg/mL); o óleo de *S. oxyphyllus* apenas inibiu parcialmente o crescimento destes microrganismos (CIM 50% = 6,6 e 1,6 mg/mL, respectivamente); já o óleo de *S. heterotrichius* inibiu parcialmente o crescimento de *S. aureus* com uma CIM 50% = 3,3 mg/mL. Estes óleos são constituídos quase que exclusivamente de mono e sesquiterpenóides, sendo o germacreno D um dos constituintes majoritários presentes em todos os óleos essenciais.

Palavras-chave: *Senecio heterotrichius* DC.; *Senecio ceratophylloides* Griseb.; *Senecio oxyphyllus* DC.; *Senecio leptolobus* DC.; germacreno D; germacreno-D-1-hidroperóxido; óleo essencial; atividade antimicrobiana.



## ABSTRACT

### CONSTITUENTS OF *Senecio heterotrichius* DC.: ISOLATION, STRUCTURAL ELUCIDATION, DERIVATIZATION AND EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY; STUDY OF THE VOLATILE CONSTITUENTS FROM OTHER *Senecio* SPECIES

Author: Leandro Nicolodi Francescato

Advisor: Berta Maria Heinzmann

Genus *Senecio* (Asteraceae) constitutes a group of cosmopolitan plants formed by more than 2000 species. Although these plants have toxicity recognized due to the presence of pyrrolizidine alkaloids, several of them are used in folk medicine. Their medicinal use can be attributed to other secondary metabolites such as flavonoids and terpenoids, being that terpenoids are compounds with recognized antimicrobial activity. In this work, the evaluation of the antimicrobial activity of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and EtOH extracts of *S. heterotrichius* DC., the isolation and characterization of one constituent from CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract, the reaction of photooxidation of this compound in order to obtain a peroxide as well as the chemical analysis and evaluation of the antimicrobial activity of the essential oils from *Senecio heterotrichius* DC., *S. ceratophylloides* Griseb., *S. oxyphyllus* DC. and *S. leptolobus* DC. were studied. Extracts of the fresh aerial parts of *S. heterotrichius* were obtained by sequential maceration at room temperature in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and EtOH, followed by evaporation under reduced pressure. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract was firstly fractionated by CC over silica gel for the isolation of the sesquiterpene germacrene D and then identified by GC-MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR. This compound, considered a precursor of several other sesquiterpene derivatives, was submitted to photooxidation reaction using Bengal rose as sensitizer agent. The main formed peroxide was isolated from the reactional mixture by CC over silica gel, analyzed by GC-MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR, and identified as being germacrene-D-1-hydroperoxide. The evaluation of the antimicrobial activity of the extracts of *S. heterotrichius* and of germacrene-D-1-hydroperoxide was accomplished through the broth microdilution method based on M27-A2/NCCLS documents for yeasts and M7-A4/NCCLS for aerobic bacteria. The extraction of the essential oils of the flowery aerial parts of *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. oxyphyllus* and *S. leptolobus* was accomplished through hydrodistillation. The obtained essential oils were analyzed by GC-MS and their constituents were identified by the comparison of their Kovat's Indexes and their fragmentation patterns with literature data. These oils also had their antimicrobial activity evaluated following the previously mentioned methodology. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract evidenced inhibitory activity against *Candida krusei* (MIC of 0.25 mg/mL) and *Staphylococcus aureus* (MIC of 2.5 mg/mL). The EtOH extract was inactive against the tested microorganisms. The germacrene-D-1-hydroperoxide presented inhibitory activity against *S. cerevisiae* (MIC of 2.5 mg/mL), and inhibited partially the growth of the algae *Prototheca zoopfi* at 5 and 2.5 mg/mL (inhibition of 80 and 50%, respectively). The essential oils of *S. ceratophylloides* and *S. leptolobus* exhibited inhibitory and bactericidal activity against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* (MIC and MBC between 6.6 and 3.3 mg/mL). The oil of *S. oxyphyllus* just inhibited partially the growth of these microorganisms (MIC 50% = 6.6 and 1.6 mg/mL, respectively). The oil of *S. heterotrichius* inhibited partially the growth of *S. aureus* with a MIC 50% = 3.3 mg/mL. These oils are constituted almost exclusively by mono and sesquiterpenoids, being germacrene D one of the main constituents present in all essential oils.

Key words – *Senecio heterotrichius* DC.; *Senecio ceratophylloides* Griseb.; *Senecio oxyphyllus* DC.; *Senecio leptolobus* DC.; germacrene-D; germacrene-D-1-hydroperoxide; essential oil; antimicrobial activity.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| TABELA 1 – Flavonóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....   | 39 |
| TABELA 2 – Monoterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....   | 43 |
| TABELA 3 – Sesquiterpenóides derivados do farnesano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 45 |
| TABELA 4 – Sesquiterpenóides derivados do guaiano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 46 |
| TABELA 5 – Sesquiterpenóides derivados do eudesmano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 46 |
| TABELA 6 – Sesquiterpenóides derivados do eremofilano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 48 |
| TABELA 7 – Sesquiterpenóides derivados do bisabolano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....   | 50 |
| TABELA 8 – Sesquiterpenóides derivados do germacrano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....   | 51 |
| TABELA 9 – Sesquiterpenóides derivados do humulano e do cariofilano descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 52 |
| TABELA 10 – Sesquiterpenóides com grupamento peróxido descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 54 |
| TABELA 11 – Diterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....  | 56 |
| TABELA 12 – Triterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....   | 57 |
| TABELA 13 – Rendimento das frações obtidas da coluna A .....  | 74 |
| TABELA 14 – Rendimento das frações obtidas da coluna B .....  | 75 |
| TABELA 15 – Rendimento das frações obtidas da coluna C .....  | 76 |
| TABELA 16 – Rendimento das frações obtidas da coluna D .....  | 78 |
| TABELA 17 – Rendimento das frações obtidas da coluna E .....  | 79 |
| TABELA 18 – Rendimento das frações obtidas da coluna F .....  | 80 |
| TABELA 19 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH1, em comparação com dados da literatura para o germacreno D ..... | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| TABELA 20 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH1, em comparação com dados da literatura para o germacreno D .....      | 92  |
| TABELA 21 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH2, em comparação com os valores experimentais obtidos para SH1 ..... | 104 |
| TABELA 22 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH2, em comparação com dados da literatura .....                          | 105 |
| TABELA 23 – Rendimento (m/m) dos óleos essenciais das partes aéreas floridas e frescas de <i>Senecio heterotrichius</i> , <i>S. ceratophylloides</i> , <i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i> .....              | 111 |
| TABELA 24 – Composição química qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais de <i>Senecio heterotrichius</i> , <i>S. ceratophylloides</i> , <i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i> .....                      | 112 |
| TABELA 25 – Resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânico e etanólico de <i>Senecio heterotrichius</i> .....  | 114 |
| TABELA 26 – Resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana de SH2 (germacreno-D-1-hidroperóxido) .....  | 114 |
| TABELA 27 – Resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>Senecio heterotrichius</i> , <i>S. ceratophylloides</i> , <i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i> ..... | 116 |
| TABELA 28 – Comparação dos resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana do germacreno-D-1-hidroperóxido e germacreno D (DEUSCHLE, 2003) .....   | 135 |

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| FIGURA 1 – Estrutura básica de uma necina .....   | 34 |
| FIGURA 2 – Rota metabólica responsável pela toxicidade e alta reatividade dos alcalóides pirrolizidínicos. AP: alcalóide pirrolizidínico; Nu: compostos nucleofílicos (HÄNSEL et al., 1999; PRAKASH et al., 1999) .....   | 35 |
| FIGURA 3 – Estruturas dos alcalóides pirrozilidínicos senecionina, senecifilina e retrorsina .....  | 37 |
| FIGURA 4 – Estruturas do $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol .....   | 37 |
| FIGURA 5 – Estruturas da muraxantona, mangiferina e isomangiferina .....  | 40 |
| FIGURA 6 – <i>Senecio heterotrichius</i> DC.: A - ramo florífero; B - flor ligulada do raio; C - flor tubulosa do disco; D - detalhe do aquênio; E - detalhe do estilete; F – Detalhe do involúcro com destaque dos pêlos glandulares; G - detalhe da planta em fase juvenil; H - folha; I - detalhe da parte superior do caule (Fonte: MATZENBACHER, 1998) ..... | 59 |
| FIGURA 7 – <i>Senecio heterotrichius</i> DC. – aspecto geral da planta .....  | 60 |
| FIGURA 8 – <i>Senecio oxyphyllus</i> DC.: A - ramo florífero com detalhe dos pêlos; B - parte inferior do caule; C - folha inferior; D - folha superior com detalhe dos pêlos; E - flor tubulosa do disco; F - flor ligulada do raio; G - aquênio com papo (Fonte: MATZENBACHER, 1998) .....  | 62 |
| FIGURA 9 – <i>Senecio oxyphyllus</i> DC. – aspecto geral da planta .....  | 63 |
| FIGURA 10 – <i>Senecio leptolobus</i> DC.: A - ramo florífero; B - estames; C - flor tubulosa do disco; D - flor ligulada do raio; E - vista do plano superior de um capítulo; F - detalhe do aquênio; G - folha (Fonte: MATZENBACHER, 1998) .....  | 65 |
| FIGURA 11 – <i>Senecio leptolobus</i> DC. – aspecto geral da planta .....   | 65 |
| FIGURA 12 – <i>Senecio ceratophylloides</i> Griseb. – aspecto geral da planta .....   | 67 |
| FIGURA 13 – Locais de coleta das espécies de <i>Senecio</i> utilizadas na pesquisa. ■ <i>Senecio oxyphyllus</i> : Camobi, Santa Maria/RS. ● <i>S. heterotrichius</i> , <i>S. ceratophylloides</i> e <i>S. leptolobus</i> : fazenda São Maximiano, Guaíba/RS. ★ <i>S. heterotrichius</i> : Morro Santana, Porto Alegre/RS .....                                    | 72 |
| FIGURA 14 – Esquema da obtenção de SH1 a partir do extrato diclorometânico de <i>Senecio heterotrichius</i> por cromatografia em coluna .....   | 77 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 15 – Esquema do isolamento de SH2 por cromatografia em coluna após derivatização de SH1 .....  | 81  |
| FIGURA 16 – Espectros de massas por impacto eletrônico do germacreno D (A) (NIST 98) e de SH1 (B) .....   | 87  |
| FIGURA 17 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C de SH1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....  | 88  |
| FIGURA 18 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT 135° de SH1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....  | 89  |
| FIGURA 19 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....   | 90  |
| FIGURA 20 – Ampliações do espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). A: ampliações dos sinais correspondentes ao H-5 (δ= 5,79 ppm), H-6 (δ= 5,26 ppm), H-1 (δ= 5,14 ppm), H-15a (δ= 4,8 ppm) e H-15b (δ= 4,75 ppm); B: ampliação do sinal correspondente ao H-3b (δ= 2,1 ppm) ....  | 90  |
| FIGURA 21 – Proposta de fragmentação para a substância SH1 .....  | 94  |
| FIGURA 22 – Fórmula estrutural do germacreno D (substância SH1) .....   | 97  |
| FIGURA 23 – Análise por CCD do produto obtido através da reação de foto-oxidação em comparação com a substância de partida SH1. Visualização após nebulização com o reagente específico para peróxidos, A; comparação da substância de partida (B2) com o produto obtido através da reação de foto-oxidação (B1) após nebulização com o reagente cromogênico anisaldeído-ácido sulfúrico seguido de tratamento térmico, B; eluente: hexano:acetona (9:1); fase estacionária: gel de sílica F <sub>254</sub> ..... | 98  |
| FIGURA 24 – Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno D (A) (NIST 98) em comparação ao de SH2 (B) .....   | 100 |
| FIGURA 25 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C de SH2 (100MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....   | 101 |
| FIGURA 26 – Espectro de RMN <sup>13</sup> C DEPT 135° de SH2 (100MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....   | 102 |
| FIGURA 27 – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....   | 103 |
| FIGURA 28 – Proposta de fragmentação para a substância SH2 .....  | 106 |
| FIGURA 29 – Fórmula estrutural do germacreno-D-1-hidroperóxido (substância SH2) .....   | 110 |
| FIGURA 30 – Cromatograma resultante da análise por CG-EM do óleo essencial de <i>Senecio heterotrichius</i> . Porcentagem relativa com base nos íons totais (TIC) .....   | 113 |

|   |     |
|---|-----|
| FIGURA 31 – Avaliação da atividade antimicrobiana de SH2 frente <i>C. tropicalis</i> (linhas A-C) e <i>S. cerevisiae</i> (linhas F-H). A coluna 1 apresenta a maior concentração da amostra, a qual vai decrescendo até a coluna 7 (5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,05 e 0,025 mg/mL). As cavidades isoladas à direita são o controle positivo. Na coluna 10 encontram-se duas cavidades de controle negativo ..... | 115 |
| FIGURA 32 – Enantiômeros do germacreno D (Adaptado de STELIOPOULOS et al., 2002) .....  | 120 |
| FIGURA 33 – Esquema mostrando a formação de oxigênio singlete a partir do corante Rosa de Bengala (RB). hv: fótons de luz; cis: cruzamento intersistema; te: transferência de energia (Adaptado de KNOX, DODGE, 1985; BRAUN, OLIVEROS, 1990; MILLER, 2005) .....  | 123 |
| FIGURA 34 – Foto-oxidação do germacreno D através de uma reação do tipo ENE, resultando no germacreno-D-1-hidroperóxido .....   | 124 |
| FIGURA 35 – Possíveis hidroperóxidos formados na reação de foto-oxidação do germacreno D .....  | 125 |

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AcOEt – acetato de etila

AgNO<sub>3</sub> – nitrato de prata

APs – alcalóides pirrolizidínicos

ATCC – (do ingles) “American Type Culture Collection”

BHI – (do ingles) “Brain Heart Infusion”

CBM – concentração bactericida mínima

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> – benzeno deuterado

CDCl<sub>3</sub> – clorofórmio deuterado

CFM – concentração fungicida mínima

CG – cromatografia gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – diclorometano

CIM – concentração inibitória mínima

CIM 50% – concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% dos microrganismos

COSY – (do ingles) “correlation spectroscopy”

d – dublete

DC. – De Candolle

dd – duplo dublete

ddd – duplo dublete de dubletes

DEPT – (do ingles) “distortionless enhancement by polarization transfer”

DMSO – dimetilsulfóxido

ed. – edição

EM – espectrometria de massas

EM-IE - espectro de massas por impacto eletrônico

EtOH – etanol

eV – elétron Volts

F<sub>254</sub> – indicador fluorescente com comprimento de onda de excitação de 254nm

g – grama(s)

GI – grau de insaturação  
Griseb. – Grisebach  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
IK – Índice de Retenção de Kovat's  
J – constante de acoplamento  
m – multiplete  
min. – minutos  
m/m – massa / massa  
MHz – mega Hertz  
m/z – relação massa / carga elétrica  
M<sup>+</sup> – íon molecular  
NCCLS – (do inglês) “National Committee for Clinical Laboratory Standards”,  
atualmente denominado CLSI (“Clinical and Laboratory Standards Institute”)  
NIST – (do inglês) “National Institute of Standards and Technology”  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
pág. – página  
ppm – parte(s) por milhão  
RB – corante rosa de bengala  
R<sub>f</sub> – fator de retenção, do inglês: “retention factor”  
RMN <sup>1</sup>H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio  
RMN <sup>13</sup>C – ressonância magnética nuclear de carbono-13  
RPMI – (do inglês) “Roswell Park Memorial Institute”  
s – singlete  
sl – singlete largo  
sep – septeto  
SiO<sub>2</sub> – gel de sílica  
SNC – sistema nervoso central  
sol. – solução  
subsp. – subespécie  
TIC – íons totais - do inglês: “total ion current”  
TMS – tetrametilsilano  
TR – tempo de retenção  
TWEEN 80 – polisorbato 80  
UFC – unidades formadoras de colônia



UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

UV – ultravioleta

u.m.a. – unidades de massa atômica

var. – variedade

$^1\text{O}_2$  – oxigênio singlete

$^3\text{O}_2$  – oxigênio molecular

$\delta$  – deslocamento químico

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 21 |
| <b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 27 |
| <b>2.1 <i>Senecio</i> sp.</b> .....   | 27 |
| 2.1.1 Usos populares .....  | 29 |
| 2.1.2 Atividades biológicas relatadas .....                                       | 31 |
| 2.1.3 Toxicidade .....  | 33 |
| <b>2.2 Constituintes químicos presentes no gênero <i>Senecio</i></b> .....        | 36 |
| 2.2.1 Alcalóides pirrolizidínicos .....   | 36 |
| 2.2.2 Esteróides .....  | 37 |
| 2.2.3 Flavonóides .....   | 38 |
| 2.2.4 Xantonas .....  | 40 |
| 2.2.5 Terpenóides .....   | 40 |
| 2.2.5.1 Óleos essenciais .....  | 41 |
| 2.2.5.2 Monoterpenóides .....   | 42 |
| 2.2.5.3 Sesquiterpenóides .....   | 44 |
| 2.2.5.3.1 Derivados do farnesano .....  | 45 |
| 2.2.5.3.2 Derivados do guaiano .....  | 45 |
| 2.2.5.3.3 Derivados do eudesmano .....  | 46 |
| 2.2.5.3.4 Derivados do eremofilano .....  | 47 |
| 2.2.5.3.5 Derivados do bisabolano .....   | 49 |
| 2.2.5.3.6 Derivados do germacrano .....   | 50 |
| 2.2.5.3.7 Derivados do humulano e do cariofilano .....                            | 51 |
| 2.2.5.3.8 Sesquiterpenóides com grupamento peróxido .....                         | 53 |
| 2.2.5.4 Diterpenóides .....   | 55 |
| 2.2.5.5 Triterpenóides .....  | 56 |
| <b>2.3 <i>Senecio heterotrichius</i> DC.</b> .....                                | 58 |
| 2.3.1 Descrição botânica .....  | 58 |
| 2.3.2 Dados fenológicos e observações ecológicas .....                            | 60 |
| 2.3.3 Constituintes químicos descritos para <i>Senecio heterotrichius</i> DC. ... | 61 |
| <b>2.4 <i>Senecio oxyphyllus</i> DC.</b> .....                                    | 61 |
| 2.4.1 Descrição botânica .....  | 61 |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.4.2      | Dados fenológicos e observações ecológicas .....   | 63        |
| 2.4.3      | Constituintes químicos descritos para <i>Senecio oxyphyllus</i> DC. ....                             | 63        |
| <b>2.5</b> | <b><i>Senecio leptolobus</i> DC.</b> .....   | <b>64</b> |
| 2.5.1      | Descrição botânica .....   | 64        |
| 2.5.2      | Dados fenológicos e observações ecológicas .....   | 66        |
| 2.5.3      | Constituintes químicos descritos para <i>Senecio leptolobus</i> DC. ....                             | 66        |
| <b>2.6</b> | <b><i>Senecio ceratophylloides</i> Griseb.</b> .....   | <b>66</b> |
| 2.6.1      | Descrição botânica .....   | 66        |
| 2.6.2      | Dados fenológicos e observações ecológicas .....   | 67        |
| 2.6.3      | Constituintes químicos descritos para <i>Senecio ceratophylloides</i><br>Griseb. ....                | 68        |
| <b>3</b>   | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | <b>69</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Procedimentos gerais</b> .....  | <b>69</b> |
| 3.1.1      | Impregnação com nitrato de prata .....   | 70        |
| 3.1.1.1    | Impregnação das cromatofolhas para CCD .....   | 70        |
| 3.1.1.2    | Impregnação do gel de sílica para CC .....   | 71        |
| 3.1.2      | Reagentes de detecção para CCD .....   | 71        |
| 3.1.2.1    | Reagente de detecção para peróxidos (Reagente de<br>Huber e Fröhlke) .....                           | 71        |
| 3.1.2.2    | Anisalaldeído - ácido sulfúrico .....  | 71        |
| <b>3.2</b> | <b>Material vegetal</b> .....  | <b>72</b> |
| <b>3.3</b> | <b>Preparação dos extratos diclorometânico e etanólico de<br/><i>S. heterotrichius</i> DC.</b> ..... | <b>73</b> |
| <b>3.4</b> | <b>Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico</b> .....                                     | <b>73</b> |
| 3.4.1      | Coluna A .....   | 74        |
| 3.4.2      | Coluna B .....   | 75        |
| <b>3.5</b> | <b>Isolamento de SH1</b> .....   | <b>75</b> |
| 3.5.1      | Coluna C .....   | 75        |
| <b>3.6</b> | <b>Derivatização de SH1 pelo processo de foto-oxidação</b> .....                                     | <b>77</b> |
| <b>3.7</b> | <b>Isolamento do produto da foto-oxidação de SH1 (substância SH2)</b> .                              | <b>78</b> |
| 3.7.1      | Coluna D .....   | 78        |
| 3.7.2      | Coluna E .....   | 79        |
| 3.7.3      | Coluna F .....   | 80        |

|  |     |
|--|-----|
| <b>3.8 Extração e análise dos óleos essenciais de <i>Senecio heterotrichius</i>,<br/><i>S. ceratophylloides</i>, <i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i></b> .....       | 81  |
| <b>3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana</b> .....   | 83  |
| 3.9.1 Extratos diclorometânico e etanólico de <i>Senecio heterotrichius</i> .....  | 83  |
| 3.9.2 Substância SH2 .....   | 84  |
| 3.9.3 Óleos essenciais de <i>Senecio heterotrichius</i> , <i>S. ceratophylloides</i> ,<br><i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i> .....                                  | 85  |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....  | 86  |
| <b>4.1 Rendimentos dos extratos e substância isolada de <i>Senecio<br/>heterotrichius</i> DC.</b> .....  | 86  |
| 4.1.1 Rendimento do extrato diclorometânico .....  | 86  |
| 4.1.2 Rendimento do extrato etanólico .....  | 86  |
| 4.1.3 Rendimento de SH1 .....  | 86  |
| <b>4.2 Elucidação estrutural de SH1</b> .....  | 86  |
| 4.2.1 Análise da fragmentação de SH1 por EM-IE .....   | 93  |
| 4.2.2 Análise do espectro de RMN <sup>13</sup> C de SH1 .....  | 94  |
| 4.2.3 Análise do espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH1 .....   | 96  |
| 4.2.4 Estrutura de SH1 .....   | 97  |
| <b>4.3 Derivatização de SH1 pelo processo de foto-oxidação (obtenção<br/>de SH2)</b> .....   | 98  |
| 4.3.1 Rendimento de SH2 .....  | 98  |
| <b>4.4 Elucidação estrutural de SH2</b> .....  | 99  |
| 4.4.1 Análise da fragmentação de SH2 por EM-IE .....   | 105 |
| 4.4.2 Análise do espectro de RMN <sup>13</sup> C de SH2 .....  | 107 |
| 4.4.3 Análise do espectro de RMN <sup>1</sup> H de SH2 .....   | 108 |
| 4.4.4 Estrutura de SH2 .....   | 110 |
| <b>4.5. Rendimento e composição dos óleos essenciais de <i>Senecio<br/>heterotrichius</i>, <i>S. ceratophylloides</i>, <i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i></b> ..... | 111 |
| 4.5.1 Rendimento dos óleos essenciais .....  | 111 |
| 4.5.2 Composição química dos óleos essenciais .....  | 111 |
| <b>4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana</b> .....   | 113 |
| 4.6.1 Extratos diclorometânico e etanólico de <i>Senecio heterotrichius</i> .....  | 113 |
| 4.6.2 Substância isolada SH2 (derivado de SH1) .....   | 114 |

|   |     |
|---|-----|
| 4.6.3 Óleos essenciais de <i>Senecio heterotrichius</i> , <i>S. ceratophylloides</i> ,<br><i>S. leptolobus</i> e <i>S. oxyphyllus</i> ..... | 115 |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....  | 117 |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....  | 139 |
| <b>7 REFERÊNCIAS</b> .....  | 141 |

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm apresentado um importante papel no tratamento e na prevenção de doenças ao longo do desenvolvimento da civilização humana, sendo as plantas terrestres, especialmente as plantas superiores, as mais utilizadas (CAÑIGUERAL et al., 2003; YOUNG-WON et al., 2006). Não existe um número preciso de plantas que são utilizadas para fins medicinais, no entanto, estima-se que este número possa chegar a 40.000 espécies (SOEJARTO, 1996).

Atualmente, os produtos naturais, seus derivados e análogos representam cerca de 50% de todos os fármacos em uso clínico no mundo. Além disso, dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais pela Organização Mundial da Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem vegetal e um número significativo destes são obtidos a partir de precursores naturais (BALANDRIN et al., 1993; RATES, 2001). Além disso, entre 2000 e 2005, 23 novos fármacos derivados de fontes naturais foram lançados no mercado, entre eles a caspofungina, a apomorfina, o tiotropium e a galantamina (YOUNG-WON et al., 2006).

Do ponto de vista comercial, os produtos naturais e seus derivados também ocupam lugar de destaque. Por exemplo, dos 20 fármacos não-protéicos mais vendidos em 1999, 9 eram derivados direta ou indiretamente de produtos naturais, e juntos, tiveram uma venda superior a 16 bilhões de dólares (HARVEY, 2000).

Recentemente, tem crescido o interesse em terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente daqueles derivados de plantas, também chamados de fitoterápicos (RATES, 2001).

Os fitoterápicos possuem margens terapêuticas mais amplas e podem apresentar menos efeitos adversos que os fármacos sintéticos; também são utilizados em patologias de menor gravidade, doenças crônicas e como prática profilática, possuindo eficácia comprovada com o uso adequado, tanto no que se refere às indicações, como na forma de administração e na dose utilizada (CAÑIGUERAL et al., 2003).

Em 1985, era estimado pela OMS que aproximadamente 80% da população mundial contava com medicinas tradicionais em seu sistema primário de saúde, e que cerca de 85% desta medicina envolvia o uso de extratos vegetais ou de seus princípios ativos (FARNSWORTH et al., 1985; FARNSWORTH, 1997). No Brasil, acredita-se que, somente 30% da população utilize medicamentos convencionais,

30% utilize fitoterápicos e o restante não tenha acesso ao sistema nacional de saúde (CAÑIGUERAL et al., 2003).

Os produtos derivados de plantas medicinais são utilizados basicamente como mistura complexa (infusões, óleos essenciais, tinturas, extratos), e em alguns casos como substância pura (HAMBURGER et al., 1991). Em diversos casos os fitoterápicos possuem algumas vantagens sobre o uso de fármacos puros, que atualmente podem justificar seu uso, entre eles: efeitos sinérgicos e associação de mecanismos de ação dos vários compostos presentes nos fitoterápicos, menores riscos de efeitos colaterais e menores custos de pesquisa (YUNES et al., 2001).

A obtenção de substâncias puras ativas envolve várias etapas, tais como: a seleção da planta, a preparação dos extratos, a purificação e identificação dos constituintes químicos e as posteriores modificações estruturais baseadas nas correlações entre estrutura química e atividade biológica (CECHINEL FILHO, YUNES, 1998).

O maior desafio da pesquisa com produtos naturais como fonte de fármacos é mostrar sua competitividade com a química sintética e combinatória, sendo que a desvantagem dos produtos naturais é o tempo necessário para isolar e caracterizar compostos ativos de misturas complexas (YUE-ZHONG, 1998). Entretanto, a maioria destes compostos obtidos a partir de plantas, não são produzidos de forma sintética por ser economicamente inviável (RATES, 2001).

Felizmente, há avanços nos métodos de separação e de análise (HARVEY, 2000), fazendo com que a indústria farmacêutica demonstre um renovado interesse na pesquisa com compostos puros de origem vegetal (HAMBURGER et al., 1991; YUE-ZHONG, 1998).

Os principais objetivos do uso de plantas como fonte de agentes terapêuticos são: isolar compostos bioativos para o uso como fármaco; obter compostos bioativos de estrutura conhecida ou inédita que sirvam de modelo para a semi-síntese, a fim de se produzir moléculas com maior atividade e/ou menor toxicidade que possam ser patenteadas; a sua utilização como ferramenta em pesquisas bioquímicas e farmacológicas; e a utilização da planta inteira ou parte dela como medicamento (FABRICANT, FARNSWORTH, 2001).

Os produtos vegetais mostram-se bons precursores para novos compostos sintéticos, pois apresentam estruturas diversas e frequentemente múltiplos esteriocentros que podem ser alterados sinteticamente. Muitas características

estruturais dos produtos naturais, como, por exemplo, os centros quirais, anéis aromáticos, sistemas de anéis complexos, grau de saturação da molécula e número e razão de heteroátomos, mostram-se altamente relevantes na tentativa de descoberta de novos fármacos e de protótipos que possam ser otimizados pela química medicinal e sintética (CLARDY, WALSH, 2004; BALUNAS, KINGHORN, 2005).

A diversidade molecular existente nas plantas, associada à síntese combinatória e à manipulação de rotas biossintéticas, pode levar à descoberta e ao desenvolvimento de muitos novos fármacos (NEWMAN et al., 2003).

A ampla diversidade taxonômica existente reflete uma grande diversidade de compostos químicos, pois cada espécie vegetal produz um grupo de substâncias diferente das outras, uma capacidade desenvolvida através de milhões de anos de evolução (SOEJARTO, 1996). Isto se deve ao fato de que, cada espécie coexiste com outros organismos em seu ecossistema e a interação entre eles se dá através de várias maneiras, por exemplo, na defesa, simbiose e polinização das plantas. Considerando-se infinito o número de organismos e de interações possíveis entre eles, os metabólitos secundários são, portanto, considerados uma fonte praticamente ilimitada para o desenvolvimento de novos fármacos, sendo relatado, a cada ano, cerca de 4.000 novas estruturas de metabólitos secundários (VERPOORTE, 1998; VERPOORTE, 2000).

Estima-se que somente 5 a 15% das plantas superiores foram sistematicamente investigadas quanto à presença de constituintes biologicamente ativos (BALANDRIN et al., 1993), e que, apenas 1% das espécies tropicais foram estudadas quanto ao seu potencial farmacêutico (GURIB-FAKIM, 2006). Conseqüentemente, as plantas ainda representam uma significativa fonte de material para a descoberta de novos fármacos. Ainda mais porque, grande parte das plantas avaliadas quanto à presença de constituintes biologicamente ativos foram estudadas apenas frente uma ou algumas atividades biológicas, sendo que um único metabólito secundário pode apresentar mais de uma atividade, como acontece com alguns alcalóides e flavonóides, e uma “investigação fitoquímica” poderá revelar apenas um reduzido espectro dos constituintes de uma planta, entre as centenas ou milhares de metabólitos que esta possa conter (HAMBURGER et al., 1991; FABRICANT, FARNSWORTH, 2001).



O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996 apud GUERRA, NODARI, 2003) de um total estimado entre 250.000 e 550.000, quase 1/5 de toda a biodiversidade do planeta (CAÑIGUERAL et al., 2003). Devido a esta grande diversidade de espécies, aumentam-se as chances de isolamento e identificação de novas substâncias com potencial aplicação terapêutica a partir de plantas brasileiras.

Nos últimos anos, devido às mudanças ambientais e à destruição dos ecossistemas causadas pelo homem, vêm ocorrendo uma grande degradação de habitats naturais, levando várias espécies à extinção, principalmente em florestas tropicais, onde a maior biodiversidade mundial é encontrada. Estima-se que entre 20 e 200 espécies, em cada milhão, são extintas por ano, podendo no futuro, este número ficar entre 1.000 e 10.000 (PIMM et al., 1995; SOEJARTO, 1996).

Em uma revisão elaborada por Silva et al. (2001), pode-se verificar que 53 espécies vegetais do Brasil utilizadas como medicinais (por ex. Pau-rosa, Canela-preta e Espinheira-santa), estão citadas em listas oficiais de espécies da flora ameaçadas de extinção, assim como muitas outras não-medicinais.

O conhecimento da diversidade existente e análise fitoquímica de plantas é relativamente recente no país. Ao mesmo tempo, o número de pesquisadores dedicados à pesquisa é muito reduzido se comparado ao número de espécies que ainda necessitam de estudos (GOTTLIEB, BORIN, 1997). Portanto, o campo de atuação nesta área é vastíssimo e o fato do Brasil ser considerado um país detentor de uma megadiversidade em nível mundial, e esta encontrar-se ameaçada, como demonstram os dados do *World Resources Institute*, suscita preocupação (SOULÉ, 1991) e necessidade de implementação de programas de pesquisa.

Adicionalmente, devido ao alarmante aumento na incidência e reemergência de doenças infecciosas, e ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos em atual uso clínico, existe uma contínua e indispensável busca por novos compostos antimicrobianos com diferentes estruturas químicas e mecanismos de ação (ROJAS et al., 2003), levando vários pesquisadores na área da farmácia a estudar e avaliar as atividades de diversas plantas superiores, fontes promissoras de novos agentes antimicrobianos.

O fato do gênero *Senecio* ser de ampla distribuição no sul do Brasil e de existirem várias espécies nativas que não foram estudadas até o momento quanto

aos seus constituintes, além de ser rico em compostos que apresentam as mais diversas atividades farmacológicas, permite evidenciar que estas espécies são promissoras no que se refere ao isolamento de metabólitos secundários de estrutura inédita e potencialmente bioativos.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivos principais:

- Isolamento e elucidação estrutural do principal constituinte presente no extrato diclorometânico das partes aéreas frescas de *S. heterotrichius* DC.;
- Obtenção de peróxidos por semi-síntese, partindo-se de constituintes terpênicos;
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos constituintes isolados e dos compostos obtidos por semi-síntese;
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânico e etanólico das partes aéreas frescas de *Senecio heterotrichius* DC.,
- Extração dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius* DC., *S. ceratophylloides* Griseb., *S. oxyphyllus* DC. e *S. leptolobus* DC. pelo método de hidrodestilação, análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e avaliação de sua atividade antimicrobiana.

Esta dissertação está organizada na forma de capítulos fixos. O capítulo Revisão Bibliográfica apresenta um estudo amplo acerca do gênero *Senecio*, seus principais constituintes químicos, atividades biológicas e usos populares. Em seguida, são apresentadas as espécies estudadas, *Senecio heterotrichius* DC., *S. oxyphyllus* DC., *S. leptolobus* DC. e *S. ceratophylloides* Griseb., suas características botânicas, seus constituintes químicos já relatados e uma pequena revisão sobre óleos essenciais. No capítulo Materiais e Métodos, são apresentados os processos utilizados na obtenção dos extratos de *S. heterotrichius*, no isolamento e elucidação estrutural de um composto do extrato diclorometânico, na reação de semi-síntese realizada a partir deste e na identificação do principal produto obtido. Também são descritos os métodos de análise dos componentes dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. oxyphyllus*, *S. leptolobus* e *S. ceratophylloides*, bem como a avaliação da atividade antimicrobiana destes óleos, dos extratos e da substância obtida por semi-síntese. No capítulo Resultados, são descritos o composto isolado de *S. heterotrichius* e o produto obtido na reação de

semi-síntese, seus rendimentos, espectros e comparações com dados da literatura. Também é contemplada a caracterização dos componentes dos óleos essenciais estudados. Além disso, este capítulo traz o resultado da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, dos extratos de *S. heterotrichius* e do composto obtido na reação de semi-síntese. Na Discussão dos resultados, é apresentada a interpretação dos mesmos, sua relação com dados apresentados na literatura, bem como a importância e significado que esses resultados possuem. A dissertação é então finalizada pelos capítulos de Conclusão e Referências.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica está centrada na descrição do gênero *Senecio*, seu uso popular, atividades biológicas e principais constituintes químicos relatados para estas plantas até o momento. Após, serão descritas as espécies estudadas e as informações encontradas sobre elas.

### 2.1 *Senecio* sp.

A família Asteraceae, à qual o gênero *Senecio* pertence, é a maior do Reino Vegetal, com cerca de 25.000 espécies e 1.400 gêneros, sendo bem representada na maioria dos ecossistemas mundiais. Conhecida como a família das margaridas, devido à estrutura de suas inflorescências, era previamente denominada Compositae (GURIB-FAKIM, 2006). Estima-se que 3.000 espécies desta família pertençam à flora brasileira, cerca de 25% das 12.500 espécies que supostamente ocorrem no Novo Mundo. É uma das famílias mais dominantes nos tipos de vegetação árida, semi-árida e montanhosa, porém ausente ou muito pobremente representada na floresta tropical úmida (HIND, 1993). A maior parte das espécies desta família é formada por plantas de pequeno porte, ou seja, ervas, subarbustos, trepadeiras ou excepcionalmente, árvores (JOLY, 1998).

O gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*, família Asteraceae) constitui um grupo de plantas cosmopolitas, não muito homogêneo (JEFFREY et al., 1977), presente em regiões frias e tropicais, notadamente na África, Américas Central e do Sul, estando ausente em regiões polares e na Amazônia. Possui mais de 2.000 espécies amplamente distribuídas pela superfície terrestre, sendo um dos maiores gêneros da família Asteraceae. No Brasil ocorrem, aproximadamente, 85 espécies de *Senecio*, sendo que 33 dessas são nativas da região Sul e 25 foram identificadas no Rio Grande do Sul (CABRERA, KLEIN, 1975; MATZENBACHER, 1998). No entanto, outros autores relatam a ocorrência de 128 espécies deste gênero em nosso país (MOTIDOME, FERREIRA, 1966 apud GAVA, BARROS, 1997). A Argentina (CABRERA, 1978 apud PÉREZ et al., 1999) e o Chile (CABRERA, 1949, apud URZÚA, ANDRADE, 2001) são os países com o maior número de representantes, contando cada um com mais de 300 espécies catalogadas.

Freqüentemente, devido às semelhanças fisiológicas entre algumas espécies do gênero *Senecio*, torna-se bastante problemática a identificação do material herborizado (MATZENBACHER, 1998) podendo levar a uma identificação errônea da planta, fazendo com que o número de sinonímias apresentadas seja elevado.

São ervas anuais ou perenes, ocorrendo sob a forma de arbustos ou arvoretas de porte variado. Uma das espécies mais abundantes no sul do Brasil é *Senecio brasiliensis* (Sprengel) Less., conhecida popularmente como maria-mole, tasneirinha e flor-das-almas, que floresce nos meses de outubro e novembro (CABRERA, KLEIN, 1975). Distribui-se em regiões acidentadas, tanto em áreas nativas como cultivadas, sendo encontrada também no Uruguai e Argentina (HABERMEHL et al., 1988).

A maioria das espécies de *Senecio* emergem durante todo o ano, apresentando as fenofases vegetativas praticamente constantes durante todo o ciclo da planta. A fenologia é determinada pelas condições ambientais, as quais são de grande importância para o estabelecimento e dispersão da planta: a umidade e a luz determinam a emergência e a brotação, e a temperatura determina a floração da planta. Fatores ambientais desfavoráveis como déficit hídrico, manejo do solo, variações na temperatura ambiental e dano causado por insetos, associados ou não, podem alterar o ciclo das plantas e serem determinantes para sua permanência no ambiente. No Brasil, normalmente crescem no outono/inverno e florescem na primavera/verão (KARAM et al., 2002).

Várias espécies do gênero *Senecio* possuem comportamento germinativo similar. Na maioria são fotoblásticas positivas, de germinação lenta, germinando em percentuais mais altos quando a temperatura é em torno de 20°C ou mais baixa. Este comportamento possibilita sua instalação logo após o inverno e seu domínio em muitas paisagens abertas observadas nas regiões semi-temperadas. Estas características podem ser bem observadas em *S. heterotrichus*, *S. oxyphyllus* e *S. selloi* (FERREIRA et al. 2001), caracterizando assim, estas plantas como invasoras (pioneiras) em campos cultivados.

Normalmente, o habitat das espécies do gênero *Senecio* é limitado pelas formações florestais, ocorrendo, normalmente, até a beira das matas. Isto porque os diásporos, aquênios providos de papo com pêlos muito finos, utilizados na propagação destas espécies, transportados pelo vento, encontram na mata uma barreira natural que impede sua dispersão (MATZENBACHER, 1998).

### 2.1.1 Usos populares

A seguir são citados os usos populares de algumas espécies do gênero *Senecio*. Deve-se levar em consideração que, muitas vezes, o termo utilizado para designar uma enfermidade pode não ser o termo científico apropriado, e que frequentemente, a palavra utilizada está relacionada a alguma sintomatologia e não à enfermidade em si. Adicionalmente, é comum a utilização do mesmo nome popular para designar espécies diferentes.

No Brasil, *Senecio brasiliensis* (Sprengel) Less. era comercializada em Farmácias na década de 50, na forma de extrato fluido e tintura, para serem utilizados como emenagogos e sedativos, sendo citado ainda seu uso na medicina popular como emoliente, resolutiva e vermífuga (COIMBRA, 1958). No entanto, mesmo conhecendo-se sua hepatotoxicidade, suas folhas e inflorescências ainda são utilizadas na medicina popular de algumas regiões do Brasil no tratamento de processos inflamatórios e também como “reguladora do sangue” (TOMA et al., 2004). Além disso, é também relatado o seu uso para aliviar “dores no estômago” (SERRA, 1994 apud TOMA et al., 2004).

No norte do Chile, *Senecio graveolens* é utilizada pela população local para aliviar a indisposição causada pela altitude (LOYOLA et al., 1985).

Nos Andes Bolivianos, a infusão (planta inteira) de *Senecio* cf. *canescens* (Bonpl.) Cuatrec., também conhecida como *khea khea*, administrada oralmente, é utilizada no tratamento da tosse. Já as folhas de *S. smithioides* Cabrera, conhecida como *lampazo*, após amassadas e aquecidas com urina, são utilizadas na forma de cataplasma para tratar “dores nas costas”. A infusão das folhas de *Senecio graveolens* Wedd., conhecida como *chachakoma*, é utilizada no tratamento de “dores de estômago” (MACÍA et al., 2005).

Na Argentina, além de *Senecio graveolens* Wedd. ser utilizada para aliviar a indisposição causada pela altitude, é utilizada como emenagoga, digestiva e supressora da tosse, sendo comercializada para estes fins nas regiões onde cresce (PÉREZ et al., 1999). Ainda na Argentina, é relatado o uso do decocto de *S. clivicola* Wedd., na forma de banhos, no tratamento de câimbras musculares (HILGERT, 2001). Já *S. eriophyton* J. Remy é utilizada popularmente como digestiva, emenagoga, estimulante e afrodisíaca (TOURSARKISSIAN, 1980 apud HNATYSZYN et al., 2003).

Segundo Portillo et al. (2001), *Senecio grisebachii* Baker é utilizada na medicina popular do Paraguai no tratamento de infecções da pele causadas por fungos.

É relatado por Hammond et al. (1998) o uso popular de algumas espécies de *Senecio* no Peru: os decoctos das folhas de *S. canescens* var. *canescens* e *S. culcitoides* Schultz Bip. são utilizados no tratamento da tosse, bronquite e asma; o infuso das folhas de *S. rhizomatosus* Rusby é utilizado no tratamento de “feridas internas” e também como colerético; e o decocto das folhas de *S. tephrosioides* Turcz é utilizado nos casos de tosse e bronquite. Alzamora et al. (2001) relata a utilização de *S. tephrosioides* Turcz no tratamento de afecções respiratórias. Ainda nos Andes Peruanos, *S. elatus* HBK. é utilizada em “rituais de purificação” e seu uso deve-se aos efeitos alucinógenos que esta planta produz. Já *S. ericaefolius* Benth. é utilizada como tônica em casos de “fraqueza” e também como cardiotônica (DE FEO, 2003). Já as partes aéreas de *S. culcitoides* Schultz-Bip. e *S. violaefolius* Cabrera são utilizadas popularmente no tratamento de tosses, asma e doenças respiratórias (ROJAS et al., 2003).

No Equador, as partes aéreas de *Senecio canescens* Humb. são utilizadas no tratamento de infecções e reumatismo, sendo que, para o último, é recomendada a aplicação tópica das folhas (ABDO et al., 1992).

As folhas de *Senecio pseudotites* Griseb. tem seu uso na medicina popular da América do Sul como diurético, antiasmático e vermífugo (VALDIZAN, MALDONADO, 1992 apud TOMMASI et al. 1998). Já *S. uspallatensis* Hook. et Arn., encontrada na região da Cordilheira dos Andes, também conhecida como *chachacoma*, é utilizada na forma de infusão, em substituição ao mate, pelos habitantes da região (PESTCHANKER et al., 1985).

No México, *Senecio angulifolius* DC., conhecida por *cachane*, é utilizada no tratamento de infecções vaginais (MONROY, CASTILLO, 2000 apud NAVARRO GARCÍA et al., 2003). Os infusos das raízes de *S. albo-lutescens* Sch. Bip., *S. palmeri* A. Gray e *S. peltiferus* Hemsl., chamadas de *matarique*, são utilizados como agentes hipoglicemiantes no tratamento do diabetes (ANDRADE-CETTO, HEINRICH, 2005).

Na região central de Portugal, as folhas de *Senecio jacobaea* L., também conhecida como erva-da-talasma e seca-ossos, são utilizadas na forma de cataplasma no tratamento de “furúnculos” (CAMEJO-RODRIGUES et al., 2003).

É relatada, na Espanha, a utilização de algumas espécies de *Senecio* como emenagogas, antiinflamatórias e vasodilatadoras (BAUTISTA PERIS et al., 1991 apud TORRES et al., 2000).

No sul da Itália, algumas comunidades utilizam topicamente as partes aéreas trituradas de *Senecio vulgaris* L. como antiinflamatórias (PIERONI et al., 2004).

Na Ruanda, *Senecio maranguensis* O. Hoffm. é utilizada no tratamento de tosses, otites e ulcerações (COS et al., 2002).

Na Turquia, o suco das raízes de *Senecio vulgaris* L. é utilizado popularmente no tratamento de eczemas (UZUN et al., 2004).

Na África, as partes aéreas e as raízes *Senecio inornatus* DC., conhecida como *u(lu)hlabo*, são utilizadas no tratamento de doenças cardíacas e respiratórias pelos povos Zulu, Xhosa e Sotho (WIEDENFELD et al., 1996). Segundo Steenkamp et al. (2001), o decocto das raízes de *S. latifolius* DC. é utilizado pelos Zulus, como emético e no tratamento de complicações peitorais; já os Xhosa utilizam a pasta das folhas no tratamento de lesões e queimaduras. É relatado ainda que os Zulu, na África do Sul, utilizam o infuso das folhas de *S. serratuloides* DC. var. *serratuloides* no tratamento de infecções, enquanto as folhas são aplicadas diretamente sobre lesões purulentas; já o decocto é utilizado como “purificador do sangue” no caso de erupções de pele, sendo as folhas ou raízes moídas aplicadas diretamente sobre queimaduras e ulcerações (KELMANSON et al., 2000).

Nas Ilhas Réunion, no Oceano Índico, as folhas de *Senecio ambavilla* Pers. são utilizadas no tratamento de ulcerações, abscessos, eczemas e escabiose (FORTIN et al., 2002).

É relatado que, na China, *Senecio integrifolius* (L.) Clairv. e *S. oryzetorum* Diels são utilizadas como agentes anti-cancerígenos (GRAHAM et al., 2000). No sul da China, o povo Yao utiliza *S. scandens* Buch.-Ham ex D. Don na forma de banhos medicinais no tratamento de “dores de barriga”, sarampo, úlceras e hemorróidas (CHUN-LIN, RONG, 2004).

### 2.1.2 Atividades biológicas relatadas

As atividades biológicas já comprovadas e descritas para plantas pertencentes ao gênero *Senecio* são as mais variadas, muitas vezes validando seu uso popular.



Para o extrato aquoso das folhas, flores e ramos de *S. mathewsii* Wedd. é relatada atividade anti-HIV em testes *in vitro* (ABDEL-MALEK et al., 1996).

Para o extrato etanólico das partes aéreas de *S. brasiliensis* é relatada atividade larvicida contra as larvas do mosquito *Aedes fluviatilis* (MACÊDO et al., 1997).

Para os extratos acetônicos de *S. malacitanus* e *S. vulgaris* (planta inteira florida) é relatada propriedade inseticida (PASCUAL-VILLALOBOS, ROBLEDO, 1999).

Para *S. scandens* é relatada atividade antipirética, antioxidante e capturadora de radicais livres (REID, 1987 apud LIU, NG, 2000), sendo o extrato aquoso desta planta capaz de inibir a hemólise de eritrócitos, a peroxidação lipídica de homogenatos de rim e cérebro e a geração de radicais superóxido e hidroxil em ensaios *in vitro* (LIU, NG, 2000).

Para o óleo essencial de *Senecio tephrosioides* Turcz é relatada atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* (ALZAMORA et al., 2001).

Para os extratos aquoso, diclorometânico e metanólico das inflorescências de *Senecio grisebachii* Baker é relatada atividade frente fungos causadores de infecções cutâneas, entre eles *Microsporium gypseum* (PORTILLO et al., 2001).

Para a fração polar do extrato etanólico das folhas de *Senecio maranguensis* O. Hoffm. é relatada atividade antibacteriana (COS et al., 2002).

Para o extrato metanólico dos ramos e folhas de *Senecio ambavilla* Pers. é relatada atividade antiviral contra *Herpes simplex* e poliovírus (FORTIN et al., 2002).

Para o óleo essencial de *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss. é descrita atividade antibacteriana e antifúngica (EL-SHAZLY et al., 2002).

Para os extratos hexânico e metanólico das folhas e ramos de *Senecio angulifolius* DC. é relatada atividade antifúngica frente *Trychophyton mentagrophytes* (NAVARRO GARCÍA et al., 2003).

Para o extrato etanólico das partes aéreas de *Senecio culcitioides* Schultz-Bip. é relatada significativa atividade antifúngica (ROJAS et al., 2003).

Para os extratos aquoso, diclorometânico e metanólico das partes aéreas de *Senecio eriophyton* J. Remy é relatada atividade relaxante sobre a musculatura lisa do corpo cavernoso de cobaias (HNATYSZYN et al., 2003).

Para o extrato éter de petróleo das raízes de *Senecio vulgaris* L. é relatada atividade antimicrobiana frente *Escherichia coli* (UZUN et al., 2004).

Para extratos de *Senecio inaequidens* DC. e *S. vulgaris* L. são relatadas as atividades antibacteriana e antifúngica (LOIZZO et al., 2004).

Para o extrato etanólico de *Senecio scandens* Buch-Ham. (planta inteira) é relatada moderada atividade antibacteriana frente *Helicobacter pylori* (YUAN-CHUEN, TUNG-LIANG, 2005).

Para o extrato etanólico das folhas e talos de *Senecio clivicolus* Wedd., originária da Bolívia, é relatada atividade anti-leishmaniose *in vitro* (FOURNET et al., 1994 apud ROCHA et al., 2005).

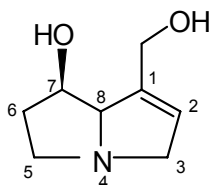
Para os extratos de *Senecio samnitum* Huet foram comprovadas as atividades antifúngica, antibacteriana e citotóxica contra células tumorais humanas *in vitro* (LOIZZO et al., 2006).

A di-hidroeparina, derivada da acetofenona, presente na concentração de aproximadamente 3% em *Senecio graveolens*, mostrou-se efetiva como protetor solar (ORTEGA et al., 2000), além de apresentar atividade hipotensora em ratos (LOYOLA et al., 1985).

Em um estudo de avaliação de atividade anti-ulcerogênica em roedores, pôde-se verificar que uma mistura de alcalóides pirrolizidínicos obtidos das inflorescências de *Senecio brasiliensis* var. *brasiliensis* (Spreng.) apresentou um significativo efeito anti-úlceras. No entanto, são necessários novos estudos sobre estrutura-atividade com a finalidade de reduzir a hepatotoxicidade desses alcalóides, mantendo o seu efeito gastro-protetor (TOMA et al, 2004).

### 2.1.3 Toxicidade

A toxicidade apresentada pelas espécies do gênero *Senecio* é atribuída primeiramente ao seu conteúdo de alcalóides pirrolizidínicos (APs). No entanto, nem todos os APs são tóxicos. A toxicidade destes compostos está condicionada principalmente à presença de uma necina insaturada entre os carbonos 1 e 2 (Figura 1) (MATTOCKS, 1989 apud SUAUI et al., 2002; RÖDER, 1995; PRAKASH et al., 1999; CHOJKIER, 2003; SILVA et al., 2006). Além dos APs, os sesquiterpenóides do tipo furanoeremofilano frequentemente encontrados em espécies de *Senecio*, também tem sido descritos como compostos tóxicos, apresentando uma alta toxicidade *in vivo* (JARES, POMILIO, 1989; POMILIO, JARES, 1997).

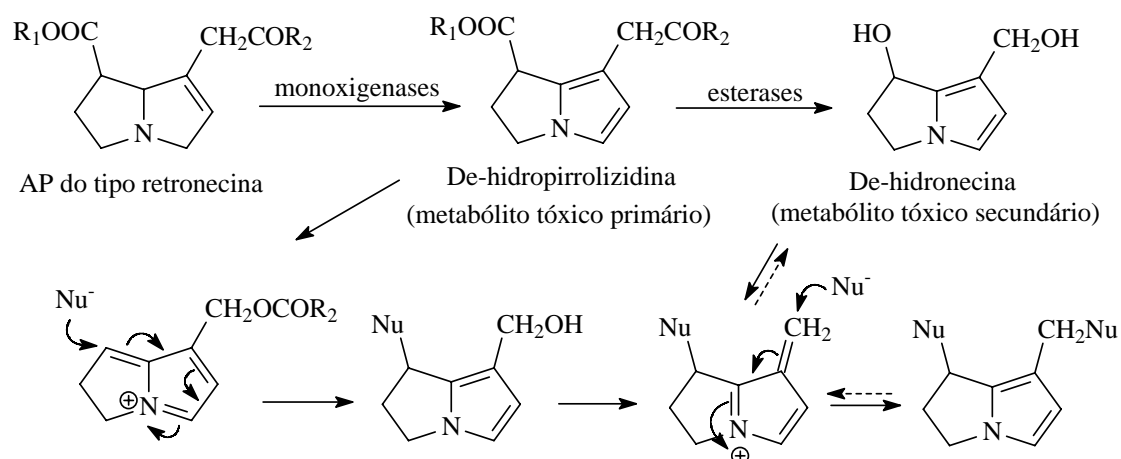


**Figura 1 – Estrutura básica de uma necina**

Além do efeito tóxico agudo (CULVENOR et al., 1976), principalmente hepatotóxico, os APs apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas, teratogênicas (RAMOS, MARQUES, 1978; RÖDER, 1995) e clastogênicas (GIMMLER-LUZ, ERDTMANN, 1997). Por outro lado, as propriedades citotóxicas e antimicóticas apresentadas, os tornam potenciais agentes antitumorais (LIDDELL, LOGIE, 1993; GORDON et al., 2000). Atualmente, existe um maior interesse em suas atividades biológicas (VILLARROEL et al., 1997), pois as características físico-químicas destes alcalóides fazem com que eles possam apresentar as mais variadas aplicações terapêuticas, além de fácil absorção e distribuição pelo organismo humano (WATSON et al., 2001).

Suas atividades biológicas podem ser explicadas pela elevada reatividade de seus metabólitos, responsáveis inclusive por suas propriedades tóxicas (Figura 2).

Numerosas espécies do gênero *Senecio* são conhecidas por causarem intoxicações em herbívoros de grande porte, como bovinos, ovinos e eqüinos, sendo responsáveis por perdas consideráveis na pecuária do Sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (GAVA, BARROS, 1997; HABERMEHL et al., 1988; ILHA et al., 2001). A doença ocasionada pela intoxicação com estas espécies é conhecida como seneciose, sendo que *Senecio brasiliensis*, *S. cysplatinus*, *S. selloi*, *S. heterotrichius* e *S. tweedii* são apontadas como as espécies que causam maiores perdas na pecuária do Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1994 apud GAVA, BARROS, 1997; ILHA et al., 2001). A perda de bovinos tem sido observada principalmente nos meses de inverno, quando os animais estão famintos e, devido à falta de pastagens, alimentam-se dos brotos destas plantas, podendo ocorrer também, quando estes animais são tratados com feno ou silagem contaminados com estas plantas (TOKARNIA et al., 2002).



**Figura 2 – Rota metabólica responsável pela toxicidade e alta reatividade dos alcalóides pirrolizidínicos. AP: alcalóide pirrolizidínico; Nu: compostos nucleofílicos (HÄNSEL et al., 1999; PRAKASH et al., 1999)**

O consumo de plantas do gênero *Senecio* por animais, à longo prazo, pode causar lesões no fígado, pulmões, rins e encéfalo (ILHA et al., 2001; CHOJKIER, 2003). Já em humanos, a exposição aos APs pode causar doença veno-oclusiva hepática e cirrose infantil, não estando associada à carcinogênese (PRAKASH et al., 1999).

Alguns casos de intoxicações fatais em seres humanos foram relatados devido ao consumo de espécies de *Senecio* contendo APs (FOX et al., 1978; LIDDELL, LOGIE, 1993; VILLARROEL et al., 1997). Em humanos essa exposição dá-se normalmente pelo consumo de alimentos contaminados (leite, mel e cereais) ou quando plantas contendo estes alcalóides são utilizadas como medicinais de maneira indiscriminada (RÖDER, 1995; PRAKASH et al., 1999; COULOMBE, 2003).

Sabe-se ainda que os APs mostraram-se estáveis por até 23 anos, conservando dentro deste período suas propriedades toxicológicas. Baseado nessa característica e no fato de que as plantas do gênero *Senecio* são anuais, é possível concluir que uma quantidade razoável de alcalóides pode se acumular no solo a cada ano, após a morte da planta, podendo ser absorvidos por outros organismos de modo direto ou indireto. Desta forma, os APs de espécies de *Senecio* podem representar um fator de seleção para animais e plantas que compartilham do mesmo espaço geográfico (SANTOS-MELLO et al., 2002).

## 2.2 Constituintes químicos presentes no gênero *Senecio*

No gênero *Senecio*, as classes com maior interesse quanto ao seu potencial biológico são alcalóides pirrolizidínicos, esteróides, flavonóides, xantonas e terpenóides, sendo esta última, a maior classe de metabólitos secundários presentes no gênero.

As duas classes de constituintes de maior ocorrência em espécies de *Senecio* são os alcalóides pirrolizidínicos e os sesquiterpenóides do tipo furanoeremofilano, sendo considerados metabólitos característicos do gênero (BOHLMANN et al., 1977).

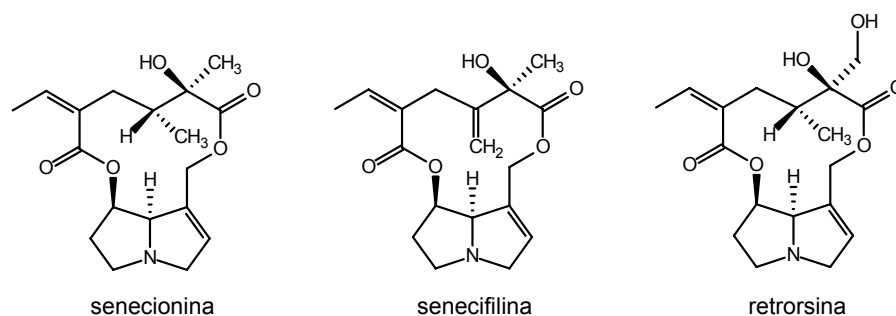
### 2.2.1 Alcalóides pirrolizidínicos

Os alcalóides pirrolizidínicos (APs) estão presentes em aproximadamente 3% de todas as angiospermas, mas apenas em algumas famílias e gêneros vegetais, entre eles o gênero *Senecio* (PRAKASH et al., 1999; CHOJKIER, 2003). Apesar de serem considerados metabólitos secundários característicos do gênero *Senecio*, os APs não estão presentes em todas as suas espécies (SMITH, CULVENOR, 1981).

Além dos APs formarem uma importante classe de metabólitos do gênero, sendo responsáveis pela toxicidade apresentada por estas plantas, eles também podem ser utilizados como marcadores quimiosistemáticos para a tribo *Senecioneae* (TRIGO et al. 2003).

Em estudo de revisão, Smith e Culvenor (1981), encontraram 96 espécies de *Senecio* contendo APs hepatotóxicos e mais 25 espécies contendo APs, que a princípio não apresentam hepatotoxicidade, sendo relatada a presença de 67 APs diferentes no gênero. Em trabalho mais recente, Silva et al. (2006) relatam várias outras espécies de *Senecio* contendo APs.

Entre os APs de ocorrência mais comum em espécies de *Senecio* encontram-se senecionina, senecifilina e retrorsina (Figura 3).

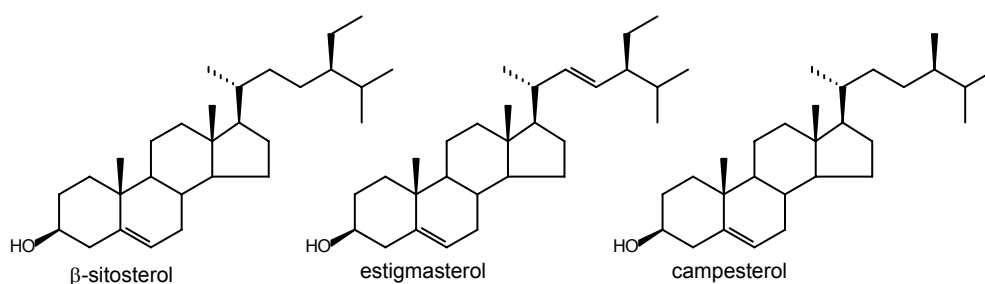


**Figura 3 – Estruturas dos alcalóides pirrozilidínicos senecionina, senecifilina e retrorsina**

### 2.2.2 Esteróides

Nas plantas, os esteróides possuem um importante papel como constituintes de membranas celulares, hormônios de crescimento e como repelentes de insetos. Adicionalmente, apresentam importantes atividades biológicas, sendo alguns deles utilizados como agentes terapêuticos, por ex. a digoxina (ZELEN, 1995 apud SHIMADA et al., 2001).

O  $\beta$ -sitosterol e o stigmasterol são os fitoesteróides mais encontrados nas plantas superiores (Figura 4). Além destes, existem outros esteróides presentes em menores concentrações.



**Figura 4 – Estruturas do  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol e campesterol**

No gênero *Senecio*,  $\beta$ -sitosterol e stigmasterol foram isolados de *Senecio ochoanus* Cuatr., *S. microglossus* DC. (BOHLMANN et al., 1983), *S. glutinosus* Thunb. (ZDERO et al., 1989), *S. canescens* Humb. (ABDO et al., 1992), *S. madagascariensis* Poir. (BURGUEÑO-TAPIA et al., 2001) e *S. ambiguus* (Biv.) DC.

subsp. *ambiguus* (TUNDIS et al., 2005). Das partes aéreas de *S. dryophyllus* Meyen et Walp. (DUPRÉ et al., 1991), *S. auricula* Bourg. var. *major* WK. (TORRES et al., 1998) e de *S. lyratus* DC., no entanto, isolou-se apenas o  $\beta$ -sitosterol, o qual apresentou atividade antifúngica e antibacteriana em ensaios *in vitro* (KIPRONO et al., 2000). O  $\beta$ -sitosterol, o estigmasterol, seus derivados heterosídicos e também o campesterol foram isolados de *S. bonariensis* Hook et Arn. (JARES et al., 1990; TETTAMANZI et al., 1992) (Figura 4).

Tundis et al. (2005) identificaram, através de CG-EM, alguns fitoesteróides em subespécies de *Senecio gibbosus* e *S. ambiguus*. Os fitoesteróides identificados foram o campesterol,  $3\alpha$ -5-ciclo-ergosta-7,22-dien-6-ona, fucosterol, (22R,24S)-22-24-dimetilcolesterol, (24S)-24-metil-26,26-dimetil-27-norcolesta-5,22-dien-3 $\beta$ -ol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasta-5,23-dien-3 $\beta$ -ol e estigmasterol.

### 2.2.3 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de metabólitos secundários, com mais de 6.400 estruturas diferentes descritas até o momento, podendo apresentar concentrações e estruturas diferenciadas dependendo do órgão vegetal em que se encontram. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios UV, insetos, fungos, vírus e bactérias), atração de polinizadores, antioxidantes, controle sobre hormônios vegetais, agentes alelopáticos e inibidores de enzimas (HARBORNE, WILLIAMS, 2000). As atividades farmacológicas apresentadas pelos flavonóides também são muito variadas: atividade antiviral, antioxidante, antiinflamatória, antitumoral, hormonal, entre outras (ZUANAZZI, MONTANHA, 2003).

O primeiro constituinte do grupo relatado para o gênero *Senecio* foi o flavonol rutina, isolado de *S. erraticus* Benth. subsp. *barbareifolius* Koch. (SANTAVY et al., 1957 apud MANSOUR, SALEH, 1981) e de *S. jacobaea* L. (KOWALSKA, 1970 apud MANSOUR, SALEH, 1981).

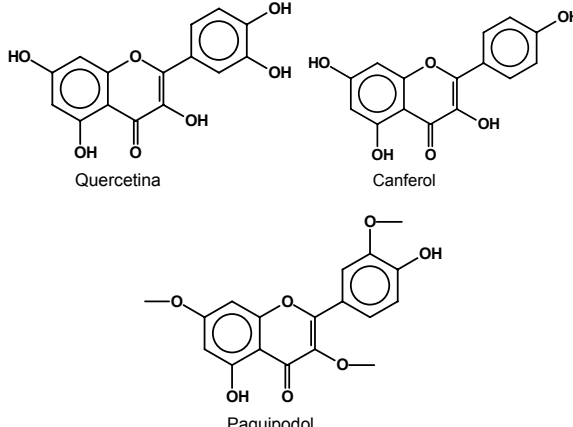
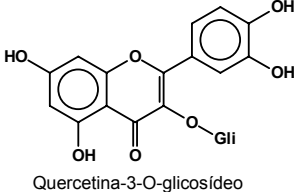
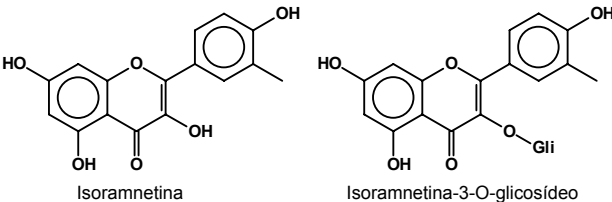
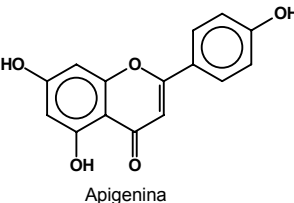
Os flavonóis 3'-O-glicosídeos e 3-O-rutinosídeos do canferol e da quercetina, a 3-metil-quercetina, bem como as flavonas apigenina-7-O-glicosídeo e apigenina-6,8-di-C-ramnosídeo já foram identificados em mais de 25 espécies de *Senecio* (GLENNIE et al., 1971 apud MANSOUR, SALEH, 1981).

Mansour e Saleh (1981) identificaram o flavonol quercetina-3-O-glicosídeo em *Senecio hoggariensis* Battand e Trab. e em *S. vulgaris* L. Já os derivados 3-glicosídeo, 3-rutinosídeo, 3-monosulfato e 3-dissulfato do flavonol isoramnetina foram identificados em *S. gallicus* Chaix e *S. vulgaris* L. (Tabela 1).

Urzúa et al. (2000), isolaram quatro flavonóis de *Senecio viscosissimus* Colla: cumatequina, isocamferídeo, 3-metil-isoramnetina e paquipodol.

Apesar dos poucos relatos da ocorrência de flavonóides no gênero *Senecio*, devido à sua grande variedade de espécies, é esperada uma grande variabilidade estrutural em relação a esta classe de metabólitos secundários no mesmo (MANSOUR, SALEH, 1981).

**Tabela 1 – Flavonóides descritos para o gênero *Senecio***

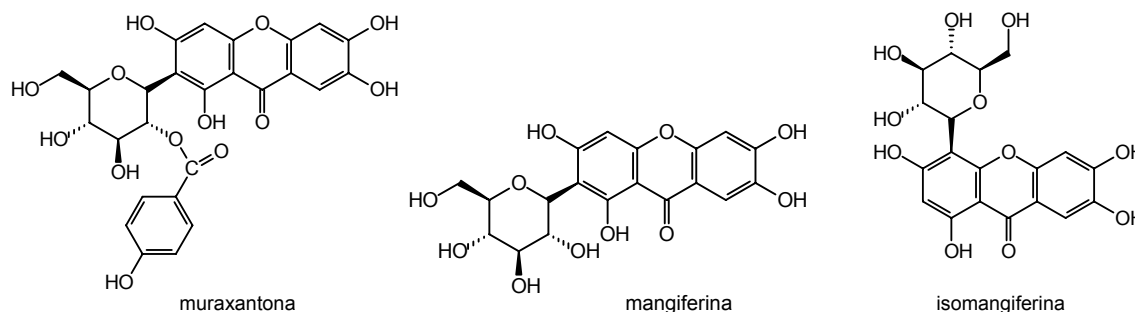
| Flavonóide                                      | Estrutura   | Referência   |
|---|---|--|
| Flavonol<br>(agliconas)                         |  <p>Quercetina</p> <p>Canferol</p> <p>Paquipodol</p>     | GLENNIE et al., 1973<br>apud MANSOUR,<br>SALEH, 1981;<br>MANSOUR, SALEH,<br>1981 |
| Flavonol<br>(o-heterosídeo)                     |  <p>Quercetina-3-O-glicosídeo</p>                        | MANSOUR, SALEH,<br>1981.   |
| Flavonol<br>(aglicona e seu<br>3-O-heterosídeo) |  <p>Isoramnetina</p> <p>Isoramnetina-3-O-glicosídeo</p> | MANSOUR, SALEH,<br>1981.   |
| Flavona<br>(aglicona)                           |  <p>Apigenina</p>  | MANSOUR, SALEH,<br>1981.   |



### 2.2.4 Xantonas

As xantonas são substâncias que apresentam ampla distribuição no reino vegetal, principalmente nas plantas das famílias Guttiferae e Gentianaceae. Estas substâncias são de grande interesse farmacêutico, pois apresentam importantes atividades farmacológicas, como por exemplo, atividade inibitória da enzima monoamino-oxidase (MAO), atividade antidepressiva, antineoplásica, antioxidante, antiinflamatória, antiviral e antimicrobiana, entre outras (PERES et al., 2000; KUSTER, ROCHA, 2003).

Das folhas de *Senecio mikanioides* Otto (ex Walpers), Catalano et al. (1996) isolaram uma complexa mistura de xantonas: mangiferina, isomangiferina, mangiferitina, tripterosídeo e uma nova xantona denominada muraxantona (Figura 5). A presença das xantonas mangiferina e isomangiferina também foram descritas em *S. tamoides* DC. (GLENNIE et al., 1971 apud MANSOUR, SALEH, 1981), sendo relatada para estas substâncias atividade antiviral (ZHENG, LU, 1990) e para a mangiferina, uma potente atividade antioxidante (LEIRO et al., 2003).



**Figura 5 – Estruturas da muraxantona, mangiferina e isomangiferina**

### 2.2.5 Terpenóides

Os terpenóides distribuem-se amplamente na natureza e são encontrados em abundância nas plantas superiores (ROBBERS et al., 1997). Constituem uma classe de substâncias formadas a partir da condensação de moléculas de isopreno ( $C_5H_{10}$ ) e são classificados de acordo com o número destas unidades presentes, sendo por isso, também chamados de isoprenóides (RUZICKA, 1953).

O número de diferentes terpenóides isolados de fontes naturais é superior a 20.000, muito além ao de qualquer outro grupo de metabólito secundário (ROBBERS et al., 1997).

Os terpenos e derivados de baixo peso molecular aparecem nas plantas como principais constituintes dos óleos essenciais. São responsáveis pelo odor agradável e característico de muitos vegetais, e suas funções incluem defesa do organismo contra predadores e patógenos, interações alelopáticas, antioxidantes, bio-regulatórias (hormônios e fitoalexinas), atração de polinizadores e como moléculas de sinalização, estando implicados em quase todas as interações possíveis entre diferentes plantas, entre plantas e animais e entre plantas e microrganismos (ROBBERS et al., 1997; SIMÕES, SPITZER, 2003). Adicionalmente, muitos destes constituintes são pesquisados em relação à sua atividade antimicrobiana, sendo grande o número de estudos acerca das atividades inibitórias produzidas por óleos essenciais e por constituintes de estrutura terpênica sobre o crescimento de microrganismos (DEUSCHLE, 2003).

#### 2.2.5.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, de maneira geral, são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas (SIMÕES, SPITZER, 2003), podendo conter normalmente até 100 compostos, sendo que um, dois ou algumas vezes três destes, dominam em termos de porcentagem (TISSERAND, 1996). Os terpenos e seus derivados de baixo peso molecular aparecem nas plantas como constituintes principais dos óleos essenciais. Os terpenóides mais freqüentes nos óleos essenciais são os monoterpenóides (cerca de 90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenóides (SIMÕES, SPITZER, 2003).

Além de serem responsáveis pelo odor agradável e característico de muitos vegetais, os óleos essenciais apresentam funções biológicas variadas, entre elas, inibição do crescimento de outras espécies (alelopatia), proteção contra predadores e atração de polinizadores (INOUE, 2003; SIMÕES, SPITZER, 2003).

Os óleos essenciais, por apresentarem atividades biológicas variadas e por suas características físicas e organolépticas, são empregados industrialmente em gêneros alimentícios, medicamentos, cosméticos, perfumes e produtos de limpeza,

sendo também empregados na aromaterapia, devido às suas propriedades farmacológicas (PAULI, 2001).

Para os óleos essenciais são relatadas as atividades repelente, inseticida (MENDONÇA et al., 2005; LIU et al., 2006), antimicrobiana (PONCE et al., 2003), antioxidante (HUI et al., 2006), antiviral (KHAN et al., 2005), antileishmaniose (UEDA-NAKAMURA et al., 2006), entre muitas outras.

O amplo espectro antibiótico apresentado pelos óleos essenciais não se dá somente contra vírus, bactérias e fungos, mas também contra protozoários, ácaros, insetos e plantas (INOUYE, 2003).

Existem vários estudos que mostram as atividades inibitórias apresentadas por óleos essenciais e por constituintes de estrutura terpênica sobre o crescimento de microrganismos (PAULI, 2001; BURT, 2004).

Uma ampla revisão acerca da atividade antimicrobiana de espécies vegetais, envolvendo estudos em extratos, óleos essenciais, bem como constituintes terpênicos e outros metabólitos secundários, pode ser encontrada em Deuschle (2003).

Entre as espécies de *Senecio* que tiveram a composição química de seus óleos essenciais estudadas temos: *Senecio vulgaris*, *S. congestus*, *S. jacobaea*, *S. fuchsii* (DOOREN et al., 1981) e *S. graveolens* (PÉREZ et al., 1999).

Para os óleos essenciais de *S. graveolens* (PÉREZ et al., 1999), *S. tephrosioides*, (ALZAMORA et al., 2001) e *S. aegyptius* var. *discoideus* (EL-SHAZLY et al., 2002) é relatada atividade antimicrobiana.

#### 2.2.5.2 Monoterpenóides

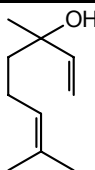
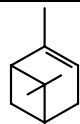
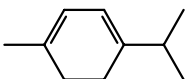
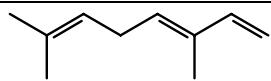
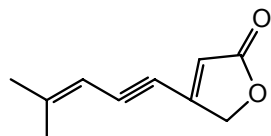
Os monoterpenóides constituem uma grande classe de compostos voláteis, formados a partir da condensação de 2 unidades de isopreno.

Atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenóides naturais, a maioria dos quais isolados de plantas superiores. Devido ao seu baixo peso molecular, os monoterpenóides são os compostos de maior volatilidade presentes nas plantas. São os principais componentes responsáveis por fragrâncias e aromas nos vegetais. Apresentam atividade anestésica local e antimicrobiana, são utilizados como antipruriginosos, expectorantes, carminativos, anti-sépticos e analgésicos tópicos (ROBBERS et al., 1997); também são empregados no tratamento de

bronquite, sinusite e infecções respiratórias (JUERGENS et al., 2003). Para este grupo de substâncias é relatada ainda atividade acaricida (SÁNCHEZ-RAMOS, CASTAÑERA, 2001), antiinflamatória (JUERGENS et al., 2003), antileishmaniose (ROCHA et al., 2005) e antiviral (ARMAKA et al., 1999; KHAN et al., 2005).

Das partes aéreas de *Senecio trichopterygius* Muscher foi isolado o ocimeno (BOHLMANN et al., 1980). Segundo Bohlmann et al. (1981b), as partes aéreas de *S. clevelandii* Greene forneceram, dentre outros constituintes, três lactonas monoterpênicas, entre elas o cleviolido. Já de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. foi isolado o monoterpênóide  $\alpha$ -pineno (BOHLMANN, ZDERO, 1982b). Das inflorescências de *S. articulatus* Sch. Bip. foram isolados vários monoterpênóides, entre eles o linalol (KITE, SMITH, 1997). Do exsudato resinoso de *S. viscosissimus* Colla foi isolado o  $\alpha$ -terpineno (URZÚA, ANDRADE, 2001) (Tabela 2).

**Tabela 2 – Monoterpenóides descritos para o gênero *Senecio***

| Monoterpenóides     | Estrutura   | Referência             |
|---------------------|---|------------------------|
| linalol             |  | KITE, SMITH, 1997      |
| $\alpha$ -pineno    |  | BOHLMANN, ZDERO, 1982b |
| $\alpha$ -terpineno |  | URZÚA, ANDRADE, 2001   |
| ocimeno             |  | BOHLMANN et al., 1980  |
| cleviolido          |  | BOHLMANN et al., 1981b |

Vários monoterpênóides também foram isolados de *S. halimifolius* L. (BOHLMANN, ZDERO, 1978), *S. affinis* DC. (BOHLMANN et al., 1985) e *S. grisebachii* Baker (TEIBLER et al., 2001).

### 2.2.5.3 Sesquiterpenóides

Os sesquiterpenóides representam um grande grupo de produtos naturais formados a partir da condensação de 3 unidades de isopreno. São encontrados em plantas, microrganismos e em alguns organismos marinhos. Nas plantas, estes constituintes possuem uma função ecológica importante na interação com insetos e micróbios e agem como atrativos, deterrentes, inibidores alimentares e fitoalexinas. Adicionalmente, são componentes importantes de muitos óleos essenciais, os quais são largamente utilizados pela indústria como flavorizantes e aromatizantes (PROSSER et al., 2002).

Atualmente, são conhecidos mais de 300 esqueletos sesquiterpênicos diferentes, os quais são formados a partir de substratos simples. Estes sofrem uma série de reações enzimáticas, onde ocorrem ciclizações, eliminações e subsequentes rearranjos nas moléculas, originando vários intermediários importantes que serão os responsáveis pela formação dos diferentes esqueletos sesquiterpenóides (PROSSER et al., 2002). Entre os compostos formados estão os derivados do tipo eudesmano, eremofilano, guaiano, cadinano, germacrano, bisabolano, humulano e cariofilano, sendo que cada um desses esqueletos apresenta características químicas particulares.

O número de sesquiterpenóides isolados e identificados em espécies do gênero *Senecio* é elevado, sendo os derivados de núcleo eremofilano, principalmente os furanoeremofilanos, os mais relatados. No entanto, não é conhecido o número exato desta classe de metabólitos já descritos para o gênero.

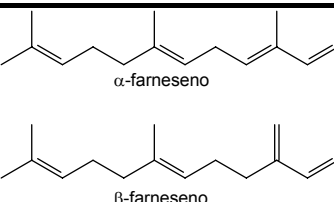
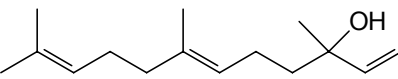
Para as classes de sesquiterpenóides comumente presentes em espécies do gênero *Senecio*, são descritas as atividades antimalárica (THEBTARANONTH et al., 1995), antioxidante, citotóxica (BARRERO et al., 1997), hipoglicemiante (INMAN et al., 1999), antimicrobiana (PÉREZ et al., 1999), antiprotozoária (VILLAESCUSA-CASTILLO et al., 2000), inseticida (REINA et al., 2001) e antileishmaniose (ROCHA et al., 2005), entre outras.

A seguir são citados alguns sesquiterpenóides presentes no gênero, procurando englobar a maioria dos esqueletos sesquiterpênicos relatados.

### 2.2.5.3.1 Derivados do farnesano

São poucos os compostos derivados do farnesano obtidos do gênero *Senecio*. Entre eles podemos citar o  $\alpha$ - e  $\beta$ -farneseno, isolados de *S. inaequidens* DC. (BOHLMANN et al., 1980) e o nerolidol, obtido de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (BOHLMANN, ZDERO, 1982b) e de *S. ambiguus* subsp. *ambiguus* (TUNDIS et al., 2005). O  $\alpha$ -farneseno também foi isolado das partes aéreas de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (BOHLMANN, ZDERO, 1982b), enquanto que o  $\beta$ -farneseno foi obtido das raízes de *S. conrathii* N.E. Br. (BOHLMANN et al., 1983) (Tabela 3).

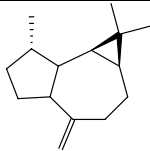
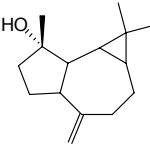
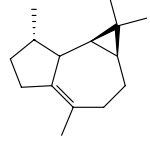
**Tabela 3 – Sesquiterpenóides derivados do farnesano descritos para o gênero *Senecio***

| Farnesanos                                  | Estrutura  | Referência                                     |
|---|--|--|
| $\alpha$ -farneseno e<br>$\beta$ -farneseno |  <p style="text-align: center;"><math>\alpha</math>-farneseno</p> <p style="text-align: center;"><math>\beta</math>-farneseno</p> | BOHLMANN et al., 1980                          |
| nerolidol                                   |    | BOHLMANN, ZDERO, 1982b;<br>TUNDIS et al., 2005 |

### 2.2.5.3.2 Derivados do guaiano

Dos derivados do guaiano, entre os compostos encontrados em espécies de *Senecio*, está o espatulenol, isolado das partes aéreas de *S. ochoanus* Cuatr. (BOHLMANN et al., 1983) e das folhas de *S. canescens* Humb. (ABDO et al., 1992); o aromadendreno, isolado das partes aéreas de *S. crassissimus* Humb. (BOHLMANN, ZIESCHE, 1981); e o viridifloreno, isolado das partes aéreas de *S. dryophyllus* Meyen et Walp. (DUPRÉ et al., 1991) (Tabela 4).

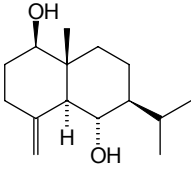
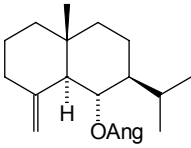
**Tabela 4 – Sesquiterpenóides derivados do guaiano descritos para o gênero *Senecio***

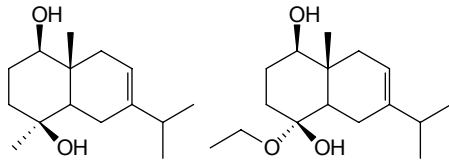
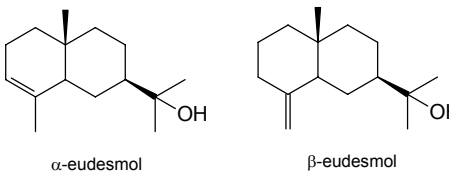
| Guaianos      | Estrutura   | Referência                                     |
|---------------|---|--|
| aromadendreno |  | BOHLMANN,<br>ZIESCHE, 1981                     |
| espatulenol   |  | BOHLMANN et<br>al., 1983; ABDO<br>et al., 1992 |
| viridifloreno |  | DUPRÉ et al.,<br>1991                          |

#### 2.2.5.3.3 Derivados do eudesmano

Na literatura não há muitos relatos de derivados do eudesmano que tenham sido isolados de espécies de *Senecio*. Entretanto, alguns sesquiterpenóides com este esqueleto foram isolados das partes aéreas de *S. microglossus* DC. (BOHLMANN et al., 1983) e *S. adenophyllus* Meyen et Walp. (DUPRÉ et al., 1991). Além disso, Pérez et al. (1999), identificaram o  $\alpha$ - e  $\beta$ -eudesmol no óleo essencial de *S. graveolens* Wedd. (Tabela 5).

**Tabela 5 – Sesquiterpenóides derivados do eudesmano descritos para o gênero *Senecio***

| Eudesmanos                        | Estrutura   | Referência            |
|-----------------------------------|---|-----------------------|
| derivado di-hidroxi-<br>eudesmano |  | BOHLMANN et al., 1983 |
| derivado angeloil-<br>eudesmano   |  | BOHLMANN et al., 1983 |

|   |   |                    |
|---|---|--------------------|
| derivados poli-hidroxiados do eudesmano |   | DUPRÉ et al., 1991 |
| $\alpha$ - e $\beta$ -eudesmol          |  <p style="text-align: center;"><math>\alpha</math>-eudesmol                      <math>\beta</math>-eudesmol</p> | PÉREZ et al., 1999 |

#### 2.2.5.3.4 Derivados do eremofilano

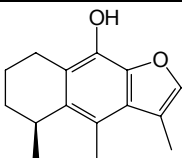
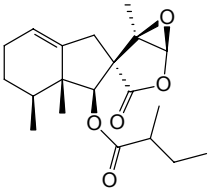
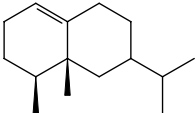
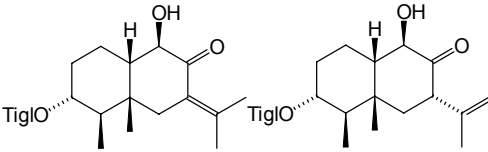
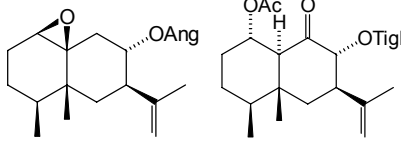
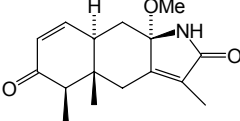
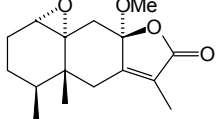
Entre os furanoeremofilanos isolados de espécies de *Senecio*, o cacalol e seus derivados são as substâncias mais representativas. Das raízes de *S. inaequidens* DC. e *S. balsapampae* Cuatr., Bohlmann et al. (1980) isolaram o cacalol e outros derivados seus. Já de *S. trichopterygius* Muscher foram obtidos apenas derivados do cacalol (BOHLMANN et al., 1980). Além de vários furanoeremofilanos, o eupateno foi obtido das partes aéreas de *S. smithii* DC. (BOHLMANN et al., 1981a). Das raízes de *S. glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler. foram isolados dois furanoeremofilanos, entre outros sesquiterpenóides (BOHLMANN, GUPTA, 1982). Das partes aéreas de *S. ochoanus* Cuatr., Bohlmann et al. (1983) isolaram duas eremofilonas. Jakupovic et al. (1991) obtiveram vários eremofilanos de algumas espécies de *Senecio*, entre elas *S. portalesianus* Remy. Das folhas de *S. macedonicus* Griseb. foram obtidos quatro sesquiterpenóides de esqueleto seco-eremofilano (TRENDAFILOVA et al., 1995). Das raízes de *S. auricula* Bourg. var. *major* WK. foram isolados quatro novos derivados do eremofilano, entre eles um baquenolídeo denominado senauricolídeo (TORRES et al., 1998). Das partes aéreas e rizomas de *S. flavus* foram isolados quatro furanoeremofilanos conhecidos, cinco furanoeremofilanos de estrutura inédita, um eremofilanolídeo e uma lactama eremofilonona (TORRES et al., 1999) (Tabela 6).

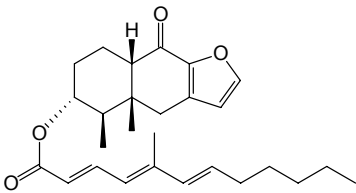
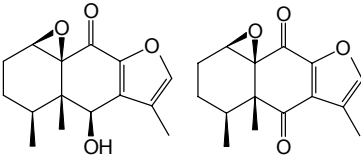
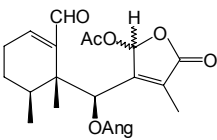
Derivados do eremofilano, entre eles alguns de estrutura inédita, também foram isolados de *S. madagascariensis* Poir. (BURGUEÑO-TAPIA et al., 2001), *S. miser* Hook (REINA et al., 2001), *S. chionophilus* Phil. (JIAN-QIAO et al., 2004), *S. aegyptius* L. (MOHAMED, AHMED, 2005), *S. atratus* Greenm., *S. bellidifolius* HBK,



*S. coronatus* Thunb. (Harv.), *S. heliopsis* Hilliard et Burt., *S. inequidens* DC., *S. isatideus* DC., *S. iydenburgensis* Hutch. et Burt., *S. macrocephalus* DC., *S. madagascariensis* Poiret, *S. minesnius* Cuatr., entre outras espécies (BOHLMANN et al., 1985).

**Tabela 6 – Sesquiterpenóides derivados do eremofilano descritos para o gênero *Senecio***

| Eremofilanos          | Estrutura  | Referência             |
|-----------------------|--|------------------------|
| cacalol               |     | BOHLMANN et al., 1980  |
| senaucolídeo          |    | TORRES et al., 1998    |
| eupateno              |   | BOHLMANN et al., 1981a |
| eremofilenonas        |  | BOHLMANN et al., 1983  |
| eremofilenos          |  | JAKUPOVIC et al., 1991 |
| lactama eremofilenona |   | TORRES et al., 1999    |
| furanoeremofilano     |   | TORRES et al., 1999    |

|                    |  |                             |
|--------------------|--|-----------------------------|
| furanoeremofilano  |  | BOHLMANN,<br>GUPTA, 1982    |
| furanoeremofilanos |  | BOHLMANN et<br>al., 1981a   |
| seco-eremofilano   |   | TREDAFILOVA<br>et al., 1995 |

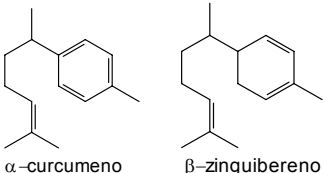
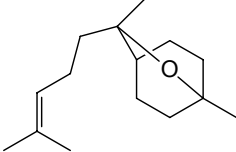
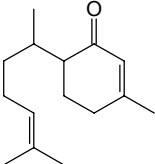
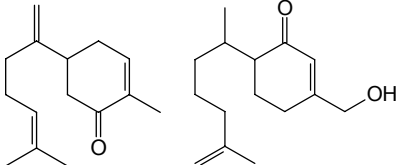
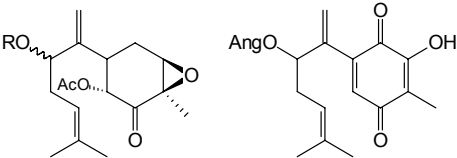
#### 2.2.5.3.5 Derivados do bisabolano

A presença de derivados do bisabolano não é muito freqüente em espécies de *Senecio*, sendo relatados poucos compostos desse grupo no gênero.

Das raízes de *Senecio balsapampae* Cuatr. foram isolados o  $\alpha$ -curcumeno e  $\beta$ -zingibereno, enquanto que para as raízes de *S. inaequidens* DC. foi descrita apenas a presença do  $\alpha$ -curcumeno (BOHLMANN et al., 1980). Das raízes de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. foi isolado o bisaboleno, já das partes aéreas, o óxido de bisaboleno (BOHLMANN, ZDERO, 1982b). Para *S. selloi* (Spreng) DC., foi descrita a presença de  $\beta$ -zingibereno,  $\gamma$ - e  $\alpha$ -curcumeno, bem como diversos peróxidos derivados destes hidrocarbonetos (HEINZMANN, 1996) (Tabelas 7 e 10, pág. 54).

Reina et al. (2002) isolaram uma bisabolona de *S. palmensis* Chr. Sm., a qual apresentou atividade inibidora do apetite para vários insetos. Derivados do bisabolano também foram isolados de *S. nebrodensis* L. (BOHLMANN, ZIESCHE, 1981), *S. erubescens* Ait. var. *crepidifolius* DC., *S. macroglossus* DC., *S. affinis* DC. e *S. longifolius* L. (BOHLMANN et al., 1985) (Tabela 7).

**Tabela 7 – Sesquiterpenóides derivados do bisabolano descritos para o gênero *Senecio***

| Bisabolanos                                | Estrutura  | Referência                                |
|--|--|---|
| $\alpha$ -curcumeno e $\beta$ -zingibereno |  <p><math>\alpha</math>-curcumeno      <math>\beta</math>-zingibereno</p> | BOHLMANN et al., 1980;<br>HEINZMANN, 1996 |
| óxido de bisaboleno                        |   | BOHLMANN, ZDERO, 1982b                    |
| bisabolona                                 |   | REINA et al., 2002                        |
| bisabolonas                                |    | BOHLMANN et al., 1985                     |
| bisabolonas                                |   | BOHLMANN et al., 1985                     |

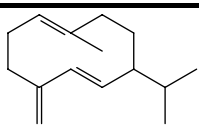
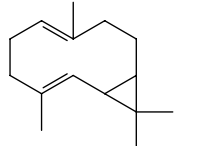
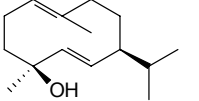
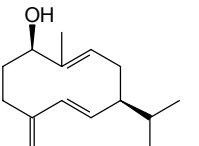
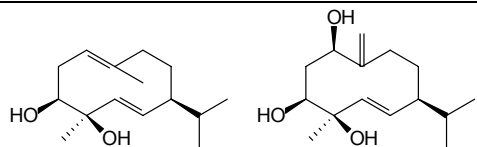
#### 2.2.5.3.6 Derivados do germacrano

Dentre os derivados do germacrano, o germacreno D é um dos constituintes mais encontrados em espécies de *Senecio* (Tabela 8). Este composto foi isolado das raízes de *S. trichopterygius* Muscher (BOHLMANN et al., 1980), das partes aéreas de *S. microglossus* DC. (BOHLMANN et al., 1983), *S. brasiliensis* (Spreng.) Less e *S. venosus* Harv. (BOHLMANN et al., 1985), e também das raízes de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (BOHLMANN, ZDERO, 1982b), além de várias outras espécies.

Além do germacreno D, outros derivados do germacrano também têm sido descritos para o gênero *Senecio*. Das partes aéreas de *S. adenophyllus* Meyen et Walp. foram isolados alguns derivados oxigenados, entre eles um álcool derivado do

germacreno D, o carbinol (DUPRÉ et al., 1991). Este composto também foi obtido das partes aéreas de *S. smithii* DC. (BOHLMANN et al., 1981a). As partes aéreas de *S. philippicus* Regel et Koern. apresentaram, dentre outros constituintes, o germacreno D e um hidroxigermacratrieno (JAKUPOVIC et al., 1991). Já das partes aéreas de *S. crassissimus* Humb. (BOHLMANN, ZIESCHE, 1981) e *S. subrubriflorus* O. Hoffm. foi isolado o biciclogermacreno (BOHLMANN, ZDERO, 1982b) (Tabela 8).

**Tabela 8 – Sesquiterpenóides derivados do germacrano descritos para o gênero *Senecio***

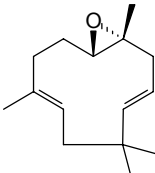
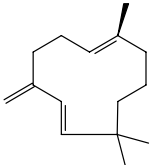
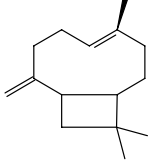
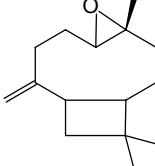
| Germacrano                         | Estrutura  | Referência                            |
|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| germacreno D                       |     | BOHLMANN et al., 1980; DEUSCHLE, 2003 |
| biciclogermacreno                  |    | BOHLMANN, ZDERO, 1982b                |
| carbinol                           |   | DUPRÉ et al., 1991                    |
| hidroxigermacratrieno              |   | JAKUPOVIC et al., 1991                |
| derivados oxigenados do germacrano |  | DUPRÉ et al., 1991                    |

#### 2.2.5.3.7 Derivados do humulano e do cariofilano

Entre os derivados do humulano temos o iso-humuleno, isolado das raízes de *Senecio inaequidens* DC. (BOHLMANN et al., 1980). O  $\alpha$ -humuleno já foi obtido das partes aéreas de *S. murii* L. Bol. (BOHLMANN et al., 1985), *S. asperulus* DC. (ZDERO et al., 1989) e *S. ambiguus* (Biv.) DC. subsp. *ambiguus* (TUNDIS et al., 2005). Já o óxido de humuladieno foi isolado, por Reina et al. (2002), das partes aéreas de *S. palmensis* Chr. Sm. (Tabela 9).

Um dos derivados do cariofilano vastamente encontrado nas plantas é o cariofileno, presente também em algumas espécies de *Senecio*, entre elas *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (BOHLMANN, ZDERO, 1982b), *S. reicheanus* Cabr. (DUPRÉ et al., 1991), *S. adenotrichius* DC. (URZÚA, ANDRADE, 2001) e *S. bonariensis* Hook. Et Arn. (SILVA, 2006). Já entre os compostos isolados de *S. crassissimus* Humb. (BOHLMANN, ZIESCHE, 1981) e *S. palmensis* Chr. Sm. (REINA et al., 2002) está o óxido de cariofileno, outro derivado do cariofilano (Tabela 9).

**Tabela 9 – Sesquiterpenóides derivados do humulano e do cariofilano descritos para o gênero *Senecio***

| Humulanos/Cariofilanos | Estrutura   | Referência   |
|------------------------|---|--|
| óxido de humuladieno   |   | REINA et al., 2002.  |
| isohumuleno            |  | BOHLMANN et al., 1980  |
| cariofileno            |  | DUPRÉ et al., 1991;<br>URZÚA, ANDRADE,<br>2001; SILVA, 2006    |
| óxido de cariofileno   |  | BOHLMANN, ZIESCHE,<br>1981; REINA et al., 2002;<br>SILVA, 2006 |

Além dos sesquiterpenóides apresentados anteriormente, compostos com outros esqueletos sesquiterpênicos também são encontrados no gênero *Senecio*, como é o caso do cadineno e do  $\beta$ -cubebeno identificados em *S. gibbosus* (Biv.) DC. subsp. *cinerária*, e do epi-biciclosesquifelandreno identificado em *S. ambiguus* (Biv.) DC. subsp. *ambiguus* (TUNDIS et al., 2005). Já o  $\gamma$ - e  $\delta$ -cadineno foram identificados em *S. microglossus* DC. (BOHLMANN et al., 1983), *S. adenophyllus* Meyen et Walp.

e *S. nutans* Sch. Bip. (DUPRÉ et al., 1991), enquanto o  $\alpha$ -zingibereno e o curcumeno foram obtidos de *S. nebrodensis* L. (BOHLMANN, ZIESCHE, 1981) e *S. dryophyllus* Meyen et Walp. (DUPRÉ et al., 1991). De *S. palmensis* Chr. Sm. foram isolados alguns silfinenos (REINA et al., 2002).

#### 2.2.5.3.8 Sesquiterpenóides com grupamento peróxido

Entre os constituintes altamente oxigenados presentes em algumas espécies do gênero *Senecio* encontram-se os peróxidos, substâncias que têm despertado interesse crescente nos últimos anos, uma vez que a função peróxido, altamente reativa, possibilita um largo espectro de atividades biológicas.

Os peróxidos de origem natural são metabólitos secundários com alto grau de oxigenação, que pertencem a diferentes classes de constituintes vegetais. Um número superior a 284 peróxidos, principalmente de estrutura sesquiterpênica, já foram isolados de fontes naturais (CASTEEL, 1992). No caso do gênero *Senecio*, a maioria deles também apresenta esqueleto sesquiterpenóide (Tabela 10).

As substâncias precursoras dos peróxidos geralmente são olefinas, muitas vezes, constituintes comuns de óleos essenciais de várias espécies vegetais. Estes são formados através da adição de oxigênio singlete à dupla ligação, sofrendo a influência direta da radiação UV (KIEFER, 1993).

Os peróxidos são substâncias potencialmente antimaláricas. O endoperóxido artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, obtida das partes aéreas de *Artemisia annua* (Asteraceae), é utilizado com êxito no tratamento da malária, inclusive contra cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, sendo que o grupamento peróxido parece ser indispensável para sua atividade (DHINGRA et al., 1999).

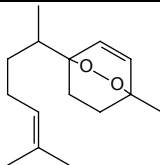
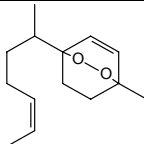
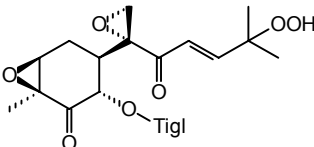
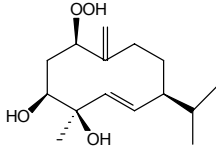
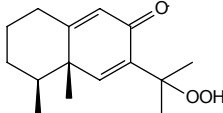
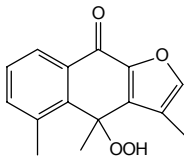
Além da atividade antimalárica, os peróxidos apresentam as atividades citotóxica, citostática, antimicrobiana, indutiva de tremor, alergênica, hepatoprotetora, antitumoral, antihelmíntica e ictiotóxica, além de atividade sobre o SNC (CASTEEL, 1992; BENNET-JENKINS, BRYANT, 1996; HEINZMANN, 1996; TOLSTIKOV et al., 1996; RÜCKER, 1997).

Para o gênero *Senecio* já foram descritos tanto endoperóxidos quanto hidroperóxidos (Tabela 10).

Um hidroperóxido do cacalonol, derivado do eremofilano, foi isolado das partes aéreas de *S. coronatus* (Thunb.) Harv. (BOHLMANN, ZDERO, 1982a) e das

folhas de *S. canescens* Humb. (ABDO et al., 1992). Das partes aéreas de *S. adenophyllus* Meyen et Walp. foi obtido um hidroperóxido derivado do germacrano. Já das partes aéreas de *S. reicheanus* Cabr. foi isolado um hidroperóxido derivado do eremofilano (DUPRÉ et al., 1991). O bisaboleno-1,4-endoperóxido, derivado do bisabolano, para o qual é relatada significativa atividade antimalárica *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* (RÜCKER et al., 1991 apud RÜCKER et al., 1996a), foi obtido das partes aéreas de *S. aschenbormanus* (MERICLI et al., 1989) e *S. selloi* (HEINZMANN, 1996), e das raízes de *S. trichopterygius* Muscher (BOHLMANN et al., 1980) e *S. desfontainei* Druce (METWALLY, DAWIDAR, 1986) (Tabela 10).

**Tabela 10 – Sesquiterpenóides com grupamento peróxido descritos para o gênero *Senecio***

| Peróxidos                                       | Estrutura   | Referência   |
|---|---|--|
| Endoperóxido derivado do bisabolano             |   | BOHLMANN et al., 1981a; METWALLY, DAWIDAR, 1986; MERICLI et al., 1989; HEINZMANN, 1996 |
| Endoperóxido derivado do <i>nor</i> -bisabolano |  | BOHLMANN et al., 1978  |
| Hidroperóxido derivado do bisabolano            |  | BOHLMANN et al., 1986 apud CASTEEL, 1992   |
| Hidroperóxido derivado do germacrano            |  | DUPRÉ et al., 1991   |
| Hidroperóxido derivado do eremofilano           |  | DUPRÉ et al., 1991   |
| Hidroperóxido derivado do furanoeremofilano     |  | ABDO et al., 1992  |

Além das espécies já citadas, constituintes com grupamento peróxido foram encontrados em *S. paludaffinis* Hilliard (BOHLMANN et al., 1978), *S. glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler (BOHLMANN, GUPTA, 1982), *S. pampeanus* Cabrera (BOHLMANN et al., 1986 apud CASTEEL, 1992) e *S. selloi* Spreng DC. (HEINZMANN, 1996; RÜCKER et al., 1996b).

#### 2.2.5.4 Diterpenóides

Os diterpenóides constituem uma grande classe de compostos não voláteis, formados a partir da condensação de 4 unidades de isopreno, sendo a grande maioria deles compostos policíclicos contendo até 5 anéis.

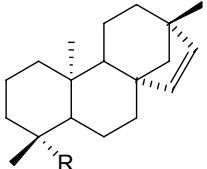
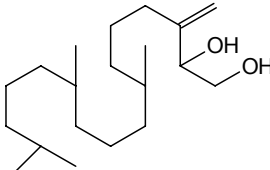
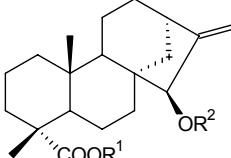
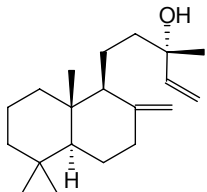
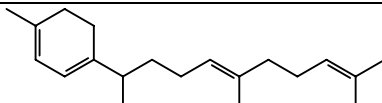
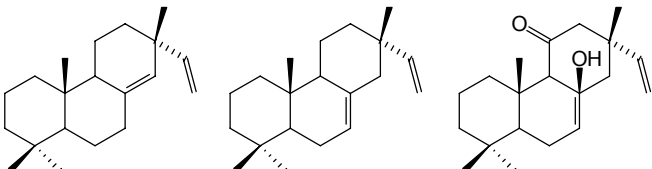
Estes compostos apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, e estão presentes em grandes quantidades nas resinas vegetais. Nas plantas, atuam na proteção contra infecções e insetos, além de funcionarem como hormônios (ROBBERS et al., 1997). Para essa classe de compostos é relatada atividade antiviral (KHAN et al., 2005), antileishmaniose (ROCHA et al., 2005) e antimicrobiana (DREWES et al., 2006), entre outras.

Vários diterpenóides e seus derivados glicosilados tem sido isolados de plantas da família Asteraceae. No entanto, poucos foram descritos em espécies do gênero *Senecio* (DONG-LIANG et al., 1993). Dong-Liang et al. (1993) isolaram dois diterpenóides glicosilados do extrato butanólico das partes aéreas de *S. rufus* Hand-Mazz. Estes dois constituintes, de aspecto cristalino, foram denominados de rufusosídeo A e rufusosídeo B (Tabela 11).

Das raízes de *S. trichopterygius* Muscher, Bohlmann et al. (1980) obtiveram vários terpenóides, dentre eles um diterpeno. Bohlmann e Zdero (1982b) isolaram três derivados do tipo sandarocopimareno e seus acetatos das raízes de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. Das partes aéreas de *S. macrocephalus* DC. e das raízes de *S. erubescens* Ait. var. *crepidifolius* DC. foi isolado o manol (BOHLMANN et al., 1985). Já das partes aéreas de *S. asperrulus* DC. foram obtidos dois diterpenóides derivados do beiereno (ZDERO et al., 1989). De *Senecio gallicus* foi isolado o diterpenóide 2-hidroxi-isofitol (URONES et al., 1987 apud FRAGA et al., 1995) (Tabela 11).



Tabela 11 – Diterpenóides descritos para o gênero *Senecio*

| Diterpenóides                        | Estrutura   | Referência  |
|--------------------------------------|---|---|
| derivados do beiereno                |  <p>R = CO<sub>2</sub>H<br/>R = CH<sub>2</sub>OH</p>   | ZDERO et al., 1989                                    |
| 2-hidroxi-isofitol                   |    | URONES et al., 1987<br><i>apud</i> FRAGA et al., 1995 |
| rufusosídeos A e B                   |  <p>R<sup>1</sup> H<br/>R<sup>2</sup> α-L-arabinopiranosil</p> <p>rufusosídeo A<br/>rufusosídeo B β-D-glicopiranosil</p> | DONG-LIANG et al., 1993                               |
| manol                                |    | BOHLMANN et al., 1985                                 |
| diterpenóide monocíclico             |   | BOHLMANN et al., 1980.                                |
| diterpenos do tipo sandarocopimareno |   | BOHLMANN, ZDERO, 1982b.                               |

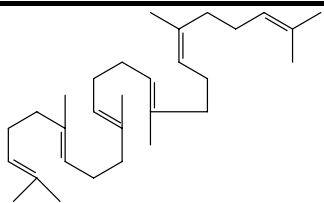
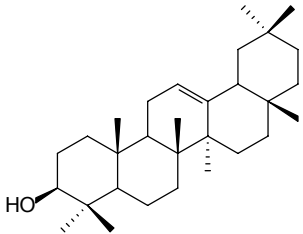
### 2.2.5.5 Triterpenóides

Os triterpenóides são formados a partir da condensação de 6 unidades de isopreno. São conhecidas mais de 4.000 estruturas diferentes e identificados mais de 40 tipos diferentes de esqueletos, os quais podem ser divididos em duas classes principais: os compostos tetracíclicos e os pentacíclicos (ROBBERS et al., 1997).

Os triterpenóides também são constituintes presentes no gênero *Senecio*, sendo relatados principalmente derivados que freqüentemente aparecem em outros gêneros vegetais, entre eles, os triterpenóides  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, 3-ceto-urs-12-eno e urs-12-eno, identificados em frações apolares de subespécies de *Senecio gibbosus* (Guss.) DC. e *S. ambiguus* (Biv.) DC. (TUNDIS et al., 2005). Das partes aéreas de *S. ochoanus* Cuatr. foram isolados o lupeol e a  $\beta$ -amirina (BOHLMANN et al., 1983). Das partes aéreas de *S. pohlii* Sch. Bip. ex Baker (BOHLMANN et al., 1985) e *S. othonnaeflorus* DC. (ZDERO et al., 1989) foi isolado o esqualeno. Já das folhas de *S. canescens* Humb. foram obtidos o lupeol e a  $\alpha$ -amirina (ABDO et al., 1992). Ésteres da  $\beta$ -amirina e do 20(29)-lupeno-3 $\beta$ ,16 $\beta$ -diol foram identificados em *S. auricula* Bourg. var. *major* WK. (TORRES et al., 1998). Das partes aéreas de *S. minutus* DC. foram obtidos a fridelina, o 3-epifridelinol e ésteres alifáticos do faradiol, maniladiol e arnidiol (TORRES et al., 2000) (Tabela 12).

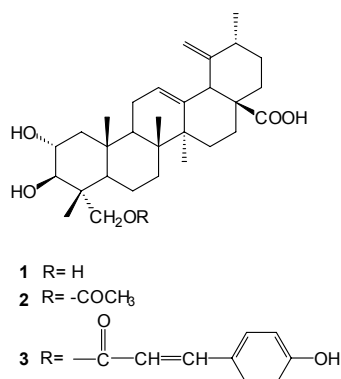
Entretanto, também já foram obtidos triterpenóides de estrutura inédita, como é o caso dos triterpenóides polihidroxilados isolados de *S. pseudotites* Griseb. (TOMMASI et al., 1998), e dos dois triterpenóides tetracíclicos com esqueleto 9-epi-cucurbitano obtidos das partes aéreas de *S. selloi* (Spreng.) DC. (RÜCKER et al., 1999), estes últimos de esqueleto inédito (Tabela 12).

**Tabela 12 – Triterpenóides descritos para o gênero *Senecio***

| Triterpenóides   | Estrutura   | Referência                                  |
|------------------|---|---|
| esqualeno        |  | BOHLMANN et al.,<br>1985                    |
| $\beta$ -amirina |  | TORRES et al., 1998;<br>TUNDIS et al., 2005 |

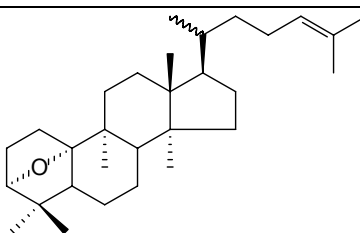
triterpenóides  
pentacíclicos  
polihidroxilados

TOMMASI et al., 1998



triterpenóides  
tetracíclicos com  
esqueleto 9-epi-  
cucurbitano

RÜCKER et al., 1999



Triterpenóides também foram encontrados em *S. ochoanus* Cuatr., *S. balbinifolius* DC. (BOHLMANN et al., 1983), *S. macroglossus* DC. e *S. murii* L. Bol. (BOHLMANN et al., 1985), entre outras espécies.

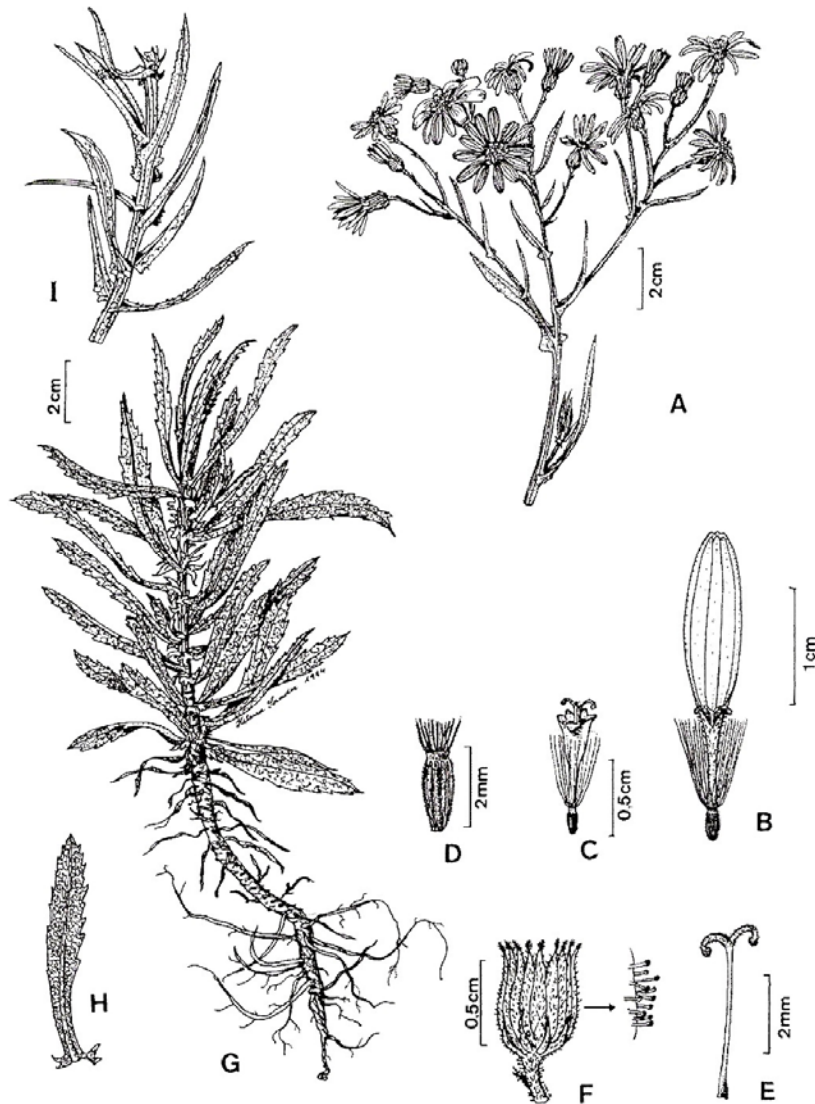
## 2.3 *Senecio heterotrichius* DC.

### 2.3.1 Descrição botânica

*Senecio heterotrichius* DC. (De Candolle) (Figuras 6 e 7), popularmente conhecido como “catião-melado”, é uma erva perene, de 30-50 cm de altura, com talos eretos, ramosos na parte superior, foliosos, tomentosos na parte inferior e densamente pubescente-glandulosos na parte superior. As folhas inferiores são oblanceoladas, agudas ou subobtusas no ápice, atenuadas na parte inferior e dilatadas e auriculadas na base, dentadas na margem, densamente albo-tomentosas em ambas as faces, de 30-100 mm de comprimento por 5-20 mm de largura. As folhas superiores são linear-lanceoladas, agudas, sésseis e auriculadas na base, inteiras ou pouco dentadas, pubescente-glandulosas em ambas as faces, menores que as inferiores.

Os capítulos são radiados, numerosos, dispostos em cimeiras corimbiformes no extremo dos talos. Invólucro campulado, calculado, de 7 mm de altura por 6-8 mm de diâmetro; brácteas ao redor de 20, densamente glanduloso-pubescentes no dorso. As flores são dimorfas, amarelas: as marginais liguladas, as do disco tubulosas. Os aquênios são sericeo-pubescentes. Os pápus são brancos. (CABRERA, KLEIN, 1975).

Segundo Matzenbacher (1998), *Senecio heterotrichius* DC. apresenta como sinonímia *Senecio maldonadensis* Baker.



**Figura 6 – *Senecio heterotrichius* DC.:** A - ramo florífero; B - flor ligulada do raio; C - flor tubulosa do disco; D - detalhe do aquênio; E - detalhe do estilete; F - Detalhe do involucre com destaque dos pêlos glandulares; G - detalhe da planta em fase juvenil; H - folha; I - detalhe da parte superior do caule (Fonte: MATZENBACHER, 1998)



**Figura 7 – *Senecio heterotrichius* DC. – aspecto geral da planta**

### 2.3.2 Dados fenológicos e observações ecológicas

A espécie *Senecio heterotrichius* DC. floresce durante os meses de outubro e novembro, sendo a floração mais intensa entre 15 de setembro e 15 de outubro. É uma erva presente nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, Uruguai e nordeste da Argentina. Ocorre principalmente nos campos sujos situados em solos secos ou rochosos de coxilha; mais raramente também pode ser encontrada sobre solos rochosos existentes às margens dos rios e regatos do planalto, entre vegetação arbustiva secundária (CABRERA, KLEIN, 1975; MATZENBACHER, 1998).

Quando se desenvolve em formações densas, *S. heterotrichius* apresenta pronunciada autopatia. Também é tida como planta pioneira em culturas e pastagens, porém é de grande valor apícola, sendo muito procurada por *Apis mellifera* durante as floradas intensas (MATZENBACHER, 1998).

Ainda segundo Matzenbacher (1998) esta espécie tem semelhança com *S. oxyphyllus*, da qual se diferencia pela base das folhas inferiores que apresentam aurículas maiores e reflexas, além de estarem mais próximas umas das outras. Este caráter, no entanto, resulta numa diferenciação bastante difícil, pois estas folhas se tornam decíduas na fase adulta da planta, quando o elemento mais seguro para sua

identificação são os aquênios, que apresentam pilosidade, ao contrário de *S. oxyphyllus*, que apresenta aquênios glabros. A semelhança entre as duas espécies gera muita confusão na determinação das mesmas.

### 2.3.3 Constituintes químicos descritos para *Senecio heterotrichius* DC.

Para *S. heterotrichius*, os dados encontrados na literatura relatam apenas estudos sobre alcalóides pirrolizidínicos, não sendo abordados outros grupos de metabólitos secundários.

Os principais alcalóides pirrolizidínicos descritos por Trigo et al. (2003) para *S. heterotrichius* foram senecivernina, senecionina e integerrimina. Já Krebs et al. (1996) identificaram os alcalóides senecionina, integerrimina e retrorsina nesta planta, obtidos com rendimento de 0,92% em relação às partes aéreas secas. A concentração destes constituintes na mesma espécie pode variar, e ser dependente das condições sazonais, das condições locais (HABERMEHL et al., 1988) e das agressões que esta planta venha a sofrer, já que esta pode aumentar as concentrações de alcalóides pirrolizidínicos nos seus tecidos em resposta a agressões externas (HOL et al., 2004). Outros pesquisadores também encontraram os mesmos alcalóides citados anteriormente para esta espécie (HABERMEHL et al., 1988; TOKARNIA et al., 2002).

## 2.4 *Senecio oxyphyllus* DC.

### 2.4.1 Descrição botânica

*Senecio oxyphyllus* DC. (Figuras 8 e 9) é uma erva anual, de 40-60 cm de altura. Caule ramificado na base, ramos laxamente albotomentosos na parte inferior e glanduloso-pubescentes na parte superior da planta, densamente folhosos na parte inferior e folhas distanciando-se, gradativamente, na parte superior. Folhas inferiores com até 13 cm de comprimento e 1-2 cm de largura, membranáceas, laxamente albo-tomentosas no epifilo e densamente albo-tomentosas no hipofilo, bordos serrados, peninérveas, com nervura primária saliente, lanceoladas a obovaladas, ápice agudo e base alargada com aurículas patentes 1-2 denteadas; folhas superiores linear-lanceoladas, longamente atenuadas no ápice, dilatadas e auriculadas na base, serradas e revolutas na margem, griseo-tomentosas a glanduloso-pilosas em ambas as faces, gradualmente menores.

Capítulos numerosos, radiados, dispostos em cimeiras de corimbo laxos; pedicelos glanduloso-pubescentes, de 2-10 cm de comprimento. Invólucro campanulado, calculado, de 8-10 mm de altura por 8-9 mm de diâmetro,

bractéolas do cálculo lanceoladas; brácteas involucrais, 19-20, lineares, atenuadas e peniciladas no ápice, curtamente glanduloso-pubescentes no dorso. Flores amarelas dimorfas: as do raio, 13, pistiladas, liguladas, com tubo de 7-7,5 mm de comprimento e lígula de 12-13 mm de comprimento por 3,5 mm de largura, tetranervadas e tridenteada no ápice; flores do disco numerosas, monoclinas, corola tubulosa pentadenteada no ápice, com tubo de 6-6,5 mm de comprimento, limbo 2,8 mm de comprimento e lobos com 0,7 mm de altura. Aquênios glabros, estriados, de 3-3,5 mm de comprimento, quando maduros. Papo branco, 8-9 mm de comprimento (MATZENBACHER, 1998).

Para *Senecio oxyphyllus* DC. não foi encontrada nenhuma sinonímia.



**Figura 8 – *Senecio oxyphyllus* DC.: A - ramo florífero com detalhe dos pêlos; B - parte inferior do caule; C - folha inferior; D - folha superior com detalhe dos pêlos; E - flor tubulosa do disco; F - flor ligulada do raio; G - aquênio com papo (Fonte: MATZENBACHER, 1998)**



**Figura 9 – *Senecio oxyphyllus* DC. – aspecto geral da planta**

#### 2.4.2 Dados fenológicos e observações ecológicas

A espécie *S. oxyphyllus* DC. floresce de setembro a novembro, sendo a floração mais intensa em outubro. É uma erva presente no estado do Rio Grande do Sul e na Argentina. Ocorre principalmente nos campos secos ou úmidos de várzeas (MATZENBACHER, 1998).

Como foi citado anteriormente, esta espécie tem semelhança com *S. heterotrichius*, da qual se diferencia, praticamente, pelos aquênios que são glabros (MATZENBACHER, 1998).

#### 2.4.3 Constituintes químicos descritos para *Senecio oxyphyllus* DC.

Para *S. oxyphyllus*, análises fitoquímicas encontradas na literatura relatam apenas estudos sobre alcalóides pirrolizidínicos, não sendo abordados outros grupos de metabólitos secundários.

Os principais alcalóides pirrolizidínicos descritos para *S. oxyphyllus*, com rendimento de 0,4% em relação à planta seca, foram retrorsina em maior



quantidade, e ligularizina em menor quantidade (LIDDELL et al., 1992; TOKARNIA et al., 2002). Já Krebs et al. (1996) relatam a presença de retrorsina, ridelina, usaramina e senecifillina nesta espécie, representando aproximadamente 0,2% das partes aéreas secas.

## 2.5 *Senecio leptolobus* DC.

### 2.5.1 Descrição botânica

*Senecio leptolobus* DC. (Figuras 10 e 11), tem a origem do seu nome do grego leptos (fino, pequeno) e do latim lobus (lobo), que quer dizer de lobos finos, sendo popularmente conhecida como “catião” (CABRERA, KLEIN, 1975).

É um subarbusto de 50-80 cm de altura, ramificado na base, caules cilíndricos, estriados, glabros, densamente folhosos até a inflorescência. Folhas alternas, sésseis, glabras, profundamente pinatissectas, com ráquis estreita, linear, canaliculada na face ventral, de 40-60 mm de comprimento por 0,5-1 mm de largura; 6-10 pares de segmentos lineares, inteiros, ápice agudo, alternos a opostos, de 10-30 mm de comprimento por 0,5-0,7 mm de largura, canaliculados na face ventral.

Capítulos radiados, numerosos, formando um corimbo laxo na parte superior dos ramos caulinares; pedicelos de 30-60 mm de comprimento com 2-4 bractéolas linear-lanceoladas inconspícuas. Invólucro campanulado, caliculado, de 7-8 mm de altura por 8-9 mm de diâmetro; bractéolas do cálculo 18-20, curtas, linear-lanceoladas; brácteas involucrais, 20-22, linear-lanceoladas, agudas e peniciladas no ápice, glabras no dorso. Flores amarelas dimorfas: as do raio 13, pistiladas, liguladas, lígulas tridenteadas no ápice, com 15-16 mm de comprimento por 3,3-3,5 mm de largura, tetranervadas, tubo com 5-5,5 mm de comprimento; flores do disco numerosas, monoclinas, com corola tubulosa de 8-8,5 mm de comprimento, pentalobada no ápice com lobos triangulares, agudos de 0,5-0,7 mm de comprimento, com nervura central. Aquênios cilíndricos, estriados, seríceo-pubescentes (papilosos), de 4,5-5 mm de comprimento. Papo branco, 7-8mm de comprimento (MATZENBACHER, 1998).

Segundo Matzenbacher (1998), *Senecio leptolobus* DC. apresenta como sinónímias:

- *Cineraria megapotamica* Spreng.;
- *Senecio pinnatus* Poir. var. *leptolobus* (DC.) Baker e;
- *Senecio uruguayensis* Cabr.

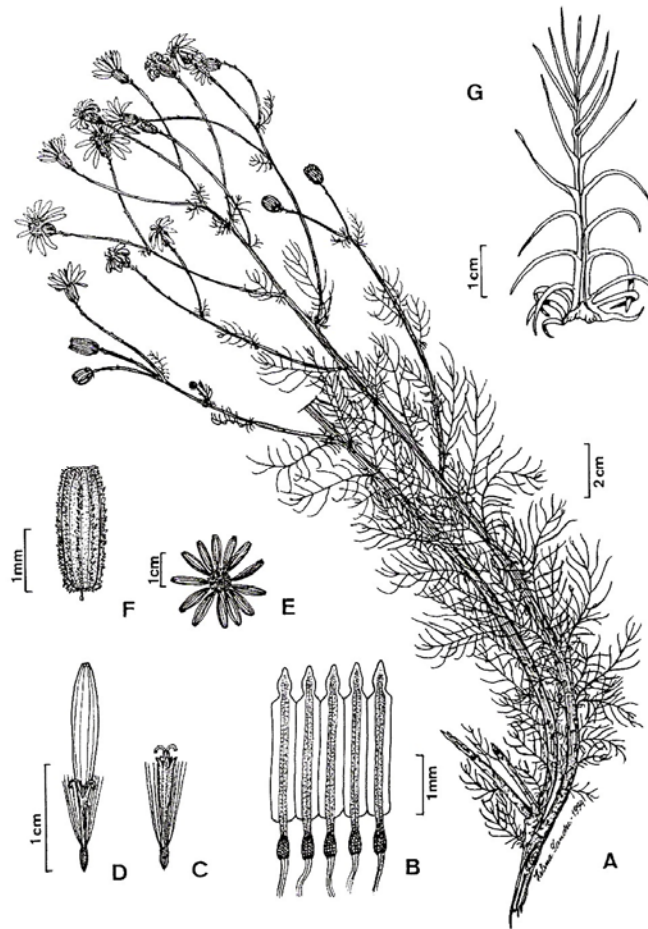


Figura 10 – *Senecio leptolobus* DC.: A - ramo florífero; B - estames; C - flor tubulosa do disco; D - flor ligulada do raio; E - vista do plano superior de um capítulo; F - detalhe do aquênio; G - folha (Fonte: MATZENBACHER, 1998)



Figura 11 – *Senecio leptolobus* DC. – aspecto geral da planta

### 2.5.2 Dados fenológicos e observações ecológicas

A espécie *S. leptolobus* DC. floresce de outubro à abril, predominantemente nos meses de outubro e novembro. É uma erva presente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no Uruguai e na Argentina.

Espécie heliófila e seletiva xerófila ou mesófila. Possui hábitat campestre, ocorrendo em campos argilo-arenosos, e também em solos graníticos e basálticos, podendo também ser encontrada em campos arenosos do litoral (CABRERA, KLEIN, 1975; MATZENBACHER, 1998).

### 2.5.3 Constituintes químicos descritos para *Senecio leptolobus* DC.

Para *S. leptolobus*, os dados encontrados na literatura relatam apenas estudos sobre alcalóides pirrolizidínicos, não sendo abordados outros grupos de metabólitos secundários.

Os principais alcalóides pirrolizidínicos descritos por Habermehl et al. (1988) para *S. leptolobus* foram integerrimina, neosenquirquina e floresenina. Já Krebs et al. (1996) relatam a presença de senecionina, integerrimina, retrorsina, usaramina, senecivernina, senquirquina, neosenquirquina, otosenina, floresenina e doronina, representando 0,19% das partes aéreas secas.

## 2.6 *Senecio ceratophylloides* Griseb.

### 2.6.1 Descrição botânica

*Senecio ceratophylloides* Griseb. (Grisebach) (Figura 12) é uma erva perene, ramificada na base, com caules estoloníferos ascendentes no escarpo floral, denso a laxamente albo-tomentosos. Folhas espatuladas, inteiras ou tridentadas no ápice, com dentes agudos, 2-3,2 cm de comprimento por 0,3-0,5 cm de largura na posição mediana e até 1 cm de largura na altura dos dentes apicais; denso laxamente albo-tomentosas em ambas as faces. Capítulos em longos pedúnculos bracteolados, unicéfalos, ascendentes, 9-9,5 cm de comprimento; involúcro calculado, 14-16 mm de altura por 10-12 mm de diâmetro, densamente albo-tomentoso; brácteas involucrais linear-lanceoladas com ápice agudo e penicílio avermelhado; cálculo com 12 filárias linear-lanceoladas, com 3-4 mm de comprimento. Flores do raio liguladas, 21-22, em duas séries, amarelo-ouro, lígula com 20-22 mm de comprimento por 3-4 mm de largura. Aquênios densamente seríceo-pubescentes, 4,5-5 mm de comprimento. Papo branco com fios muito finos e sedosos (MATZENBACHER, 1998).

Segundo Matzenbacher (1998), *Senecio ceratophylloides* Griseb. apresenta como sinónimas:

- *Senecio ceratophyllus* Don ex Hook. & Arn.;
- *Senecio ceratophyllus* var. *major* Don ex Hook. & Arn.;
- *Senecio chilensis* var. *ceratophyllus* (Hook. & Arn.) Baker;
- *Senecio chilensis* var. *macrodon* Baker;
- *Senecio cuspidatus* var. *ceratophyllus* (Hook. & Arn.) O. Kuntze;
- *Senecio cuspidatus* var. *ceratophylloides* (Griseb.) O. Kuntze;
- *Senecio cuspidatus* var. *macrodon* (Baker) O. Kuntze;
- *Senecio ceratophyllus* var *macrodon* (Baker) Malme e;
- *Senecio crassiflorus* var. *subceratophyllus* Cabrera.



**Figura 12 – *Senecio ceratophylloides* Griseb. – aspecto geral da planta**

#### 2.6.2 Dados fenológicos e observações ecológicas

A espécie *S. ceratophylloides* floresce e frutifica de setembro a novembro. É uma erva presente nos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, no Uruguai e na Argentina. Ocorre em campos arenosos e rochosos, às vezes associado com gramíneas.

*S. ceratophylloides* apresenta sensíveis variações morfológicas, principalmente um acentuado polimorfismo foliar, que pode ser observado numa mesma população e, às vezes, até num mesmo indivíduo, o que deve ser a razão e a causa do grande número de variações nomenclaturais de ordem taxonômica apresentadas por diversos autores (MATZENBACHER, 1998).

### 2.6.3 Constituintes químicos descritos para *Senecio ceratophylloides* Griseb.

Para *S. ceratophylloides* foi encontrado na literatura apenas um estudo fitoquímico sobre alcalóides pirrolizidínicos, não sendo abordados os outros grupos de metabólitos secundários.

Os alcalóides pirrolizidínicos descritos para esta espécie foram: senecivernina, senecionina, integerrimina, senquirquina, platifilina, retrorsina e usaramina (TRIGO et al., 2003).

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes utilizados foram procedentes das empresas Belga, Merck, Sigma, Nuclear, Quimex, Synth ou Vetec, apresentando grau de pureza pró-análise. Todos os solventes e a água utilizados nos procedimentos cromatográficos, experimentos e na preparação de reagentes foram destilados.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas com gel de sílica F<sub>254</sub> Merck de espessura de 0,2 mm, e suporte de alumínio. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente. Em alguns casos, o gel de sílica foi impregnado com solução de nitrato de prata 10%, conforme descrito no item 3.1.1.1.

A detecção das substâncias em CCD deu-se pela visualização sob luz ultravioleta (UV) em comprimentos de onda de 254 e 365 nm, seguida de nebulização da placa pelo revelador adequado: reagente anisaldeído-ácido sulfúrico, seguido de aquecimento a 100°C por cerca de 10 minutos, ou reagente para detecção de peróxidos (Reagente de Huber e Fröhlike).

Para cromatografia em coluna (CC) foi utilizado como fase estacionária gel de sílica 60 Merck, com tamanhos de partícula de 63 a 200 µm (70-230 mesh ASTM). Eventualmente o gel de sílica também foi impregnado com solução de nitrato de prata a 10%, conforme descrito no item 3.1.1.2. Algumas colunas cromatográficas foram realizadas sob pressão (coluna do tipo flash) e maiores especificações são encontradas no item 3.4.

As misturas de solventes utilizados nas cromatografias em camada delgada e em coluna estão indicadas na proporção volume/volume (v/v), sendo que as variações são indicadas nos textos correspondentes.

Para a elucidação estrutural das substâncias isoladas, foram utilizadas as seguintes técnicas espectrais: espectrometria de massas por impacto eletrônico (EM-IE) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H (RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H). Os espectros de massas foram obtidos no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) e os de RMN, no Departamento de Química, ambos da UFSM.

Além dos materiais e vidraria presentes em um laboratório de fitoquímica, os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento do trabalho:

- Balança analítica OHAUS Voyager;
- Balança semi-analítica MARTE AS5500C;
- Banho de Ultra-Som THORNTON Unique USC750;
- Compressor PRIMAR modelo 141;
- Cromatógrafo gasoso AGILENT 6890 equipado com um detector seletivo de massas AGILENT 5973 e um injetor automático; parâmetros da CG: split inlet 1:100; gás carreador: hélio (1 mL/min); coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (Hewlett Packard, (5 % fenil)-metilpolisiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm d.i., espessura do filme: 0,25  $\mu$ m); programa de análise: 40°C (Ti) por 4 min, 40-260°C, 4°C/min; temperatura do injetor: 220°C; energia de ionização: 70 eV; banco de dados: NIST 98. Para diluição das amostras utilizou-se hexano grau pesticida. A porcentagem das áreas dos picos é realizada com base nos íons totais (TIC).
- Destilador de água FABBE modelo 106;
- Espectrômetro de RMN BRUCKER DPX-400. Para a obtenção dos espectros de RMN (RMN  $^{13}\text{C}$   $\rightarrow$  100 MHz e RMN  $^1\text{H}$   $\rightarrow$  400 MHz), as amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em "ppm", em relação ao TMS ( $\delta = 0,00$ );
- Estufa BIOMATIC 301;
- Evaporador rotatório BÜCHI R-114, acoplado a um banho de água BÜCHI B-480 e a uma trompa d'água;
- Câmara de UV CHROMATO-VUE;
- Câmara de UV BOITTON BOIT-LUB01 (254 e 365 nm).

### 3.1.1 Impregnação com nitrato de prata

#### 3.1.1.1 Impregnação das cromatofolhas para CCD

As cromatofolhas foram recortadas nas dimensões desejadas e, posteriormente, colocadas para migrar (desenvolvimento ascendente) em uma cuba contendo solução aquosa de nitrato de prata a 10%. Após a migração, as cromatofolhas foram retiradas da cuba e então transferidas para uma estufa e

mantidas a 100°C por 1h, para secagem e ativação, sendo, posteriormente, mantidas ao abrigo da luz e em local seco até o momento de sua utilização.

### 3.1.1.2 Impregnação do gel de sílica para CC

O gel de sílica foi pesado e então transferido para um balão de fundo redondo. Adicionou-se ao gel de sílica solução de nitrato de prata a 10%, até o umedecimento completo deste. O balão foi envolvido com papel alumínio e acoplado ao evaporador rotatório, com banho a 95°C. Após a evaporação do solvente, o gel de sílica foi transferido para cadinho de porcelana e mantido em estufa a 100°C por 1 h, para secagem e ativação, sendo homogeneizado a cada 10 min. Após o resfriamento, procedeu-se o empacotamento da coluna cromatográfica, a qual foi envolvida com papel alumínio a fim de evitar a oxidação da fase estacionária e amostra.

### 3.1.2 Reagentes de detecção para CCD

#### 3.1.2.1 Reagente de detecção para peróxidos (Reagente de Huber e Fröhlike)

|   |        |
|---|--------|
| $\alpha$ -Naftol .....                        | 0,3 g  |
| Metanol .....                                 | 15 mL  |
| Água .....                                    | 135 mL |
| Metabissulfito de potássio .....              | 0,5 g  |
| Ácido acético glacial .....                   | 2 mL   |
| Sulfato de ferro (II).7H <sub>2</sub> O ..... | 0,5 g  |
| Corante 3 .....                               | 0,22 g |

Corante 3: sesquissulfato de N-[2-[N-etil-N-(4-amino-3-metilfenil)-amino]-etil]-metanosulfonamida monohidratado.

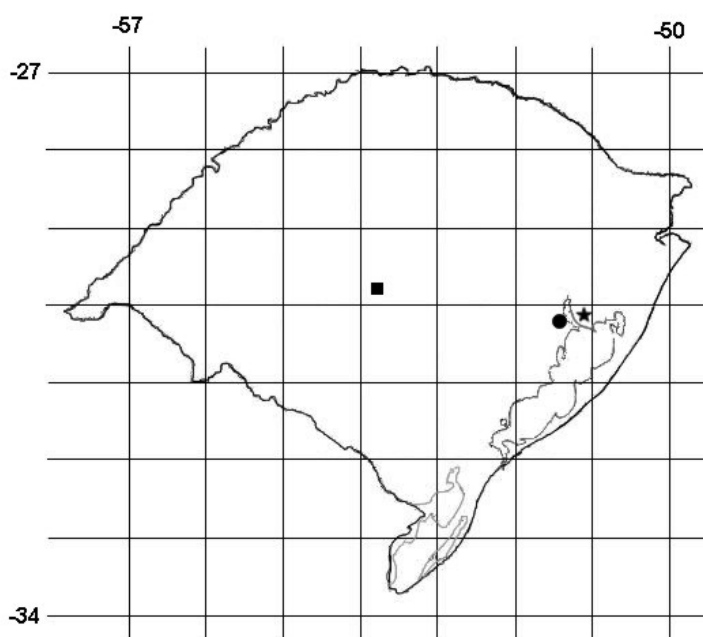
#### 3.1.2.2 Anisaldeído - ácido sulfúrico

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Anisaldeído .....                 | 0,5 mL |
| Ácido acético glacial .....       | 25 mL  |
| Etanol .....                      | 25 mL  |
| Ácido sulfúrico concentrado ..... | 1,0 mL |



### 3.2 Material vegetal

As partes aéreas (ramos e folhas) de *Senecio heterotrichus* DC. utilizadas na obtenção dos extratos, foram coletadas em abril de 2002 no Morro Santana, Porto Alegre-RS (30°03' S, 51°07' W). O material vegetal foi identificado pelo botânico Marcos Sobral, da Faculdade de Farmácia da UFMG, e material testemunha encontra-se depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM, registrado sob o número SMDB 8935.



**Figura 13 – Locais de coleta das espécies de *Senecio* utilizadas na pesquisa. ■ *Senecio oxyphyllus*: Camobi, Santa Maria/RS. ● *S. heterotrichus*, *S. ceratophylloides* e *S. leptolobus*: fazenda São Maximiano, Guaíba/RS. ★ *S. heterotrichus*: Morro Santana, Porto Alegre/RS**

Para a extração de óleo essencial utilizou-se as partes aéreas floridas (ramos, folhas e inflorescências) de *Senecio heterotrichus* DC., *S. ceratophylloides* Griseb., *S. leptolobus* DC. e *S. oxyphyllus* DC. Estas foram coletadas em novembro de 2005 na fazenda São Maximiano, BR-116, km 308, no município de Guaíba-RS (30°10' S, 51°23' W), com exceção de *S. oxyphyllus*, que foi coletada no mesmo período em Camobi, Santa Maria-RS (29° 42' S, 53° 46' W). O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher, do Programa de Pós Graduação em Botânica da UFRGS. Material testemunha encontra-se depositado no herbário do

Departamento de Biologia da UFSM, registrado sob o número SMDB 10102 para *Senecio heterotrichius* DC., SMDB 10104, para *S. ceratophylloides* Griseb., SMDB 10101, para *S. leptolobus* DC. e SMDB 10103, para *S. oxyphyllus* DC.

Os locais das coletas podem ser visualizados na Figura 13.

### **3.3 Preparação dos extratos diclorometânico e etanólico de *S. heterotrichius* DC.**

A extração do material vegetal fresco foi realizada pelo processo de maceração, utilizando-se diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e etanol 95% como líquidos extratores.

Para obtenção do extrato diclorometânico, 1193,5 g das partes aéreas frescas da planta, foram grosseiramente divididas, com auxílio de podões e tesouras, acondicionadas em frasco âmbar e recobertas com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Submeteu-se o conjunto a agitações manuais diárias por um período de oito dias, ao fim dos quais o conteúdo foi filtrado por algodão (1ª maceração). O procedimento descrito foi repetido uma vez mais (2ª maceração), sendo reunidos os líquidos extrativos, seguindo-se evaporação do solvente em evaporador rotatório, a uma temperatura inferior a 25°C. O resíduo obtido, denominado extrato diclorometânico ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), teve sua massa quantificada para cálculo do rendimento.

O material vegetal foi novamente submetido à maceração, sob temperatura ambiente, após a obtenção do extrato diclorometânico, utilizando-se etanol 95% como solvente. O procedimento realizado foi o mesmo descrito para obtenção do extrato diclorometânico, sendo a temperatura de evaporação do solvente inferior a 40°C. O resíduo obtido, denominado extrato etanólico (EtOH), também teve sua massa quantificada para cálculo do rendimento.

### **3.4 Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico**

O fracionamento preliminar do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  iniciou-se através de cromatografia em coluna do tipo flash. Nesta técnica, o gel de sílica foi suspenso no eluente ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) e transferido para uma coluna cromatográfica de vidro. Após a

transferência e compactação do adsorvente, a amostra foi ressuspensa em pequena quantidade de eluente e então aplicada sobre a coluna.

Os constituintes do extrato foram eluídos através da coluna com o auxílio de um compressor acoplado à extremidade superior desta. As frações recolhidas possuíam volume variável, na dependência da sua coloração, não excedendo o volume de 250 mL.

Os resultados da separação foram monitorados por CCD utilizando-se anisaldeído-ácido sulfúrico como revelador, sendo que as frações foram reunidas conforme a semelhança de seus constituintes.

A seguir (item 3.4.1 e 3.4.2), é apresentada a metodologia utilizada no fracionamento do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ .

#### 3.4.1 Coluna A

Coluna do tipo flash para fracionamento do extrato diclorometânico de *S. heterotrichus*.

Coluna: 350 g de gel de sílica 60 para cromatografia em coluna; dimensões de 60 x 4 cm.

Amostra: 11,7 g do extrato diclorometânico de *S. heterotrichus*.

Eluente:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (frações 1-12) e misturas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EtOH, em gradiente, nas proporções de 9:1 até 8:2 (frações 13-17).

Foram coletadas 17 frações de aproximadamente 200 mL (Tabela 13).

**Tabela 13 – Rendimento das frações obtidas da coluna A**

| Frações              | Rendimento (g) |
|----------------------|----------------|
| <b>Frações 2 - 3</b> | <b>4,68</b>    |
| Fração 4             | 0,12           |
| Frações 5 - 7        | 0,27           |
| Frações 8 - 13       | 0,77           |
| Frações 14 - 15      | 3,92           |
| TOTAL                | 9,76           |

As frações obtidas da coluna A foram analisadas por CCD, utilizando-se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  como fase móvel. Após revelação da placa com anisaldeído-ácido sulfúrico, observou-se manchas características de terpenóides nas frações 2-3, as quais foram submetidas a novo processo de fracionamento.

### 3.4.2 Coluna B

Coluna: 300 g de gel de sílica 60; dimensões de 49,5 x 4 cm.

Amostra: 4,68 g das frações 2-3 obtidas da coluna A.

Eluente: hexano (frações 1-17), hexano:acetona (9:1) (frações 17-27).

Foram recolhidas 27 frações de aproximadamente 100 mL (Tabela 14).

**Tabela 14 – Rendimento das frações obtidas da coluna B**

| Frações               | Rendimento (g)   |
|-----------------------|------------------|
| <b>Frações 2 - 11</b> | <b>3,0293</b>    |
| Frações 12 - 17       | não quantificado |
| Frações 18 - 21       | 0,0196           |
| Frações 22 - 24       | 1,0283           |
| Frações 25 - 27       | 0,1445           |
| TOTAL                 | 4,2217           |

Através da análise por CCD, foi observado que as frações 2-11 eram ricas em terpenóides e optou-se por trabalhar com estas frações.

### 3.5 Isolamento de SH1

O isolamento do constituinte do extrato diclorometânico de *Senecio heterotrichius* DC. foi realizado através de cromatografia em coluna, seguindo-se a mesma técnica descrita no item 3.4, porém sem a utilização de pressão.

#### 3.5.1 Coluna C

Coluna: 315 g de gel de sílica 60, impregnada com  $\text{AgNO}_3$  (sol. à 10%); dimensões de 52,5 x 4 cm.

Amostra: 3,029 g das frações 2-11 obtidas da coluna B.

Eluente: hexano:AcOEt (98:2).

Vazão: 30 gotas/minuto.

Foram recolhidas, em sequência, 5 frações de aproximadamente 50 mL, 348 frações de aproximadamente 20 mL e 7 frações de 100 mL (Tabela 15).

**Tabela 15 – Rendimento das frações obtidas da coluna C**

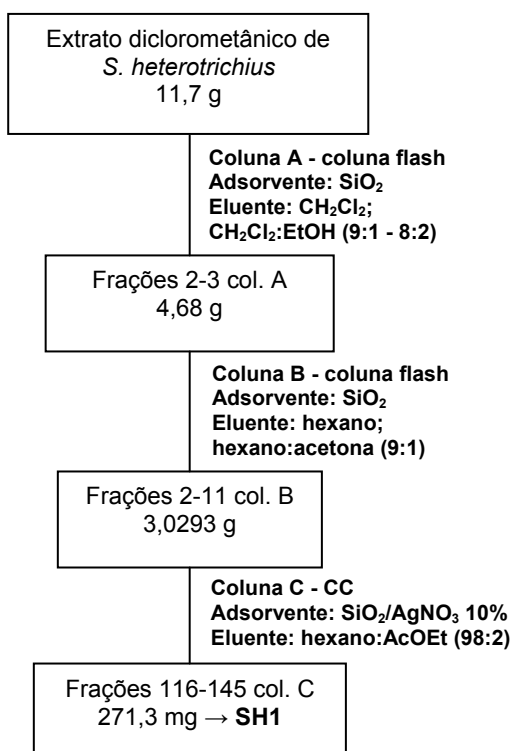
| <b>Frações</b>           | <b>Rendimento (mg)</b> |
|--------------------------|------------------------|
| Frações 1 - 19           | 1537,2                 |
| Frações 20 - 25          | 32,5                   |
| Frações 26 - 33          | 92,2                   |
| Frações 34 - 45          | 10,5                   |
| Frações 46 - 67          | 42,2                   |
| Frações 68 - 87          | não quantificado       |
| Frações 88 - 110         | 41,6                   |
| Frações 111 - 115        | 36,0                   |
| <b>Frações 116 - 145</b> | <b>271,3</b>           |
| Frações 146 - 186        | 51,3                   |
| Frações 187 - 268        | 13,5                   |
| Frações 269 - 317        | 25,1                   |
| Frações 318 - 342        | 58,9                   |
| Frações 343 - 360        | 668,8                  |
| <b>TOTAL</b>             | <b>2881,1</b>          |

Pelo perfil cromatográfico observado em CCD, as frações 116-145 demonstraram serem constituídas de uma única substância que recebeu a denominação de SH1. A mesma foi submetida à análise por CG-EM, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H.

Substância SH1: Óleo amarelo claro.  $R_f = 0,24$  (gel de sílica  $F_{254}$  impregnado com sol. de  $AgNO_3$  à 10%; hexano:acetona (98:2), 3 migrações; visualização após nebulização com anisaldeído-ácido sulfúrico). EM (IE, 70 eV)  $m/z$  (%): 204 ( $M^+$ , 12), 161 (100), 147 (6), 133 (21), 119 (42), 105 (66), 93 (27), 91 (66), 79 (40), 77 (38), 67

(20), 55 (22), 41 (59) (Figura 16, pág. 87). Para RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ver Tabelas 19 e 20 (pág. 91 e 92) e Figuras 17 e 19 (pág. 88 e 90), respectivamente.

Uma representação esquemática do isolamento da substância SH1 pode ser visualizada na Figura 14.



**Figura 14 – Esquema da obtenção de SH1 a partir do extrato diclorometânico de *Senecio heterotrichius* por cromatografia em coluna**

### 3.6 Derivatização de SH1 pelo processo de foto-oxidação

203 mg de SH1, foram solubilizados em 3,6 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e transferidos para um balão de fundo redondo de 25 mL. A esta solução foram adicionados 3,6 mL de solução de rosa de bengala em metanol a 2%, juntando-se maior quantidade de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e solução de rosa de bengala quando necessário, devido ao consumo do corante durante a reação. A mistura reacional foi exposta à luz solar, sob agitação e temperatura ambiente, durante 3 horas. O resultado foi monitorado por CCD em

intervalos de 30 minutos para determinação do tempo de reação adequado, do número dos possíveis produtos e do seu rendimento aproximado. A visualização foi realizada através de nebulização das placas com anisaldeído-ácido sulfúrico e com o reagente para detecção de peróxidos. Após o término da reação, o solvente contido no balão foi evaporado em evaporador rotatório à pressão reduzida. O principal produto obtido apresentou reação positiva frente ao reagente para detecção de peróxidos, e foi isolado por cromatografia em coluna, conforme descrito a seguir (item 3.7).

### 3.7 Isolamento do produto da foto-oxidação de SH1 (substância SH2)

O isolamento do principal produto da reação de foto-oxidação foi realizado através de cromatografia em coluna, seguindo-se a mesma técnica descrita no item 3.4, porém sem a utilização de pressão.

#### 3.7.1 Coluna D

Coluna: 25 g de gel de sílica 60; dimensões de 26 x 1,6 cm.

Amostra: mistura reacional da reação de foto-oxidação (material não quantificado).

Eluente: hexano:acetona (9:1)

Vazão: 24 gotas/minuto.

Foram recolhidas 40 frações de aproximadamente 4 mL (Tabela 16).

**Tabela 16 – Rendimento das frações obtidas da coluna D**

| <b>Frações</b>         | <b>Rendimento (mg)</b> |
|------------------------|------------------------|
| Frações 4 - 6          | 67,0                   |
| Frações 7 - 17         | 18,0                   |
| <b>Frações 18 - 19</b> | <b>12,9</b>            |
| <b>Frações 20 - 22</b> | <b>82,3</b>            |
| <b>Frações 23 - 24</b> | <b>32,1</b>            |
| <b>Frações 25 - 33</b> | <b>18,2</b>            |
| TOTAL                  | 230,5                  |

Através de análise por CCD, pôde-se perceber que o principal produto da reação de derivatização estava presente nas frações 18-33, sendo que este era a substância majoritária nas frações 20-22, as quais foram escolhidas para o prosseguimento no processo de fracionamento.

### 3.7.2 Coluna E

Coluna das frações 20-22, obtidas da coluna D. Isolamento do principal produto da reação de foto-oxidação.

Coluna: 10 g de gel de sílica 60; dimensões de 24,5 x 1,1 cm.

Amostra: 82,3 mg das frações 20-22 da coluna D.

Eluente: éter de petróleo:AcOEt (9:1).

Vazão: 12 gotas/minuto.

Foram recolhidas 33 frações de aproximadamente 2 mL (Tabela 17).

**Tabela 17 – Rendimento das frações obtidas da coluna E**

| <b>Frações</b>         | <b>Rendimento (mg)</b> |
|------------------------|------------------------|
| Frações 4 - 13         | não quantificado       |
| Fração 14              | não quantificado       |
| Frações 15 - 17        | não quantificado       |
| Frações 18 - 20        | 13,1                   |
| <b>Frações 21 - 26</b> | <b>31,9</b>            |
| Frações 27 - 33        | 0,9                    |
| <b>TOTAL</b>           | <b>45,9</b>            |

Pelo perfil cromatográfico, as frações 21-26 demonstraram serem constituídas de uma única substância, a qual recebeu a denominação de SH2. Como a quantidade obtida foi pequena, optou-se por realizar nova coluna a partir das frações 18-19, 23-24 e 25-33 da coluna D, no intuito de separar maior quantidade de SH2.



### 3.7.3 Coluna F

Re-isolamento de SH2.

Coluna: 10 g de gel de sílica 60, dimensões de 24,5 x 1,1 cm.

Amostra: aproximadamente 63 mg, constituída das frações 18-19, 23-24 e 25-33 da coluna D.

Eluente: éter de petróleo:AcOEt (9:1).

Vazão: 12 gotas/minuto.

Foram recolhidas 28 frações de aproximadamente 2 mL (Tabela 18).

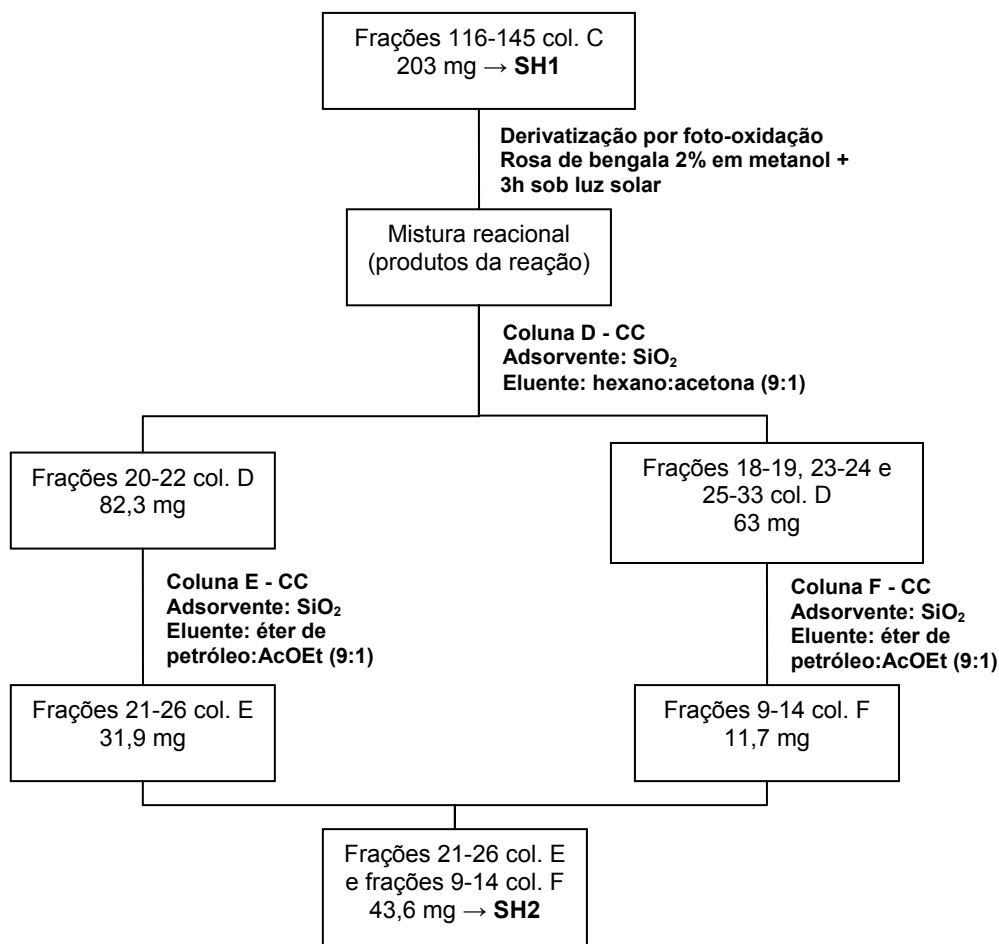
**Tabela 18 – Rendimento das frações obtidas da coluna F**

| <b>Frações</b>        | <b>Rendimento (mg)</b> |
|-----------------------|------------------------|
| Fração 3              | não quantificado       |
| Frações 4 - 7         | não quantificado       |
| Fração 8              | não quantificado       |
| <b>Frações 9 - 14</b> | <b>11,7</b>            |
| Frações 15 - 28       | não quantificado       |

As frações 9-14 foram comparadas através de CCD com as frações 21-26 recolhidas da coluna E. Como eram constituídas da mesma substância (SH2), estas frações foram reunidas e quantificadas, resultando em 43,6 mg. A substância, codificada como SH2 foi submetida então à análise por CG-EM, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H.

Substância SH2: Óleo amarelo claro.  $R_f = 0,32$  (gel de sílica F<sub>254</sub>; éter de petróleo:acetato de etila (9:1), 2 migrações; visualização após nebulização com anisaldeído-ácido sulfúrico). EM (IE, 70 eV)  $m/z$  (%): 202 (7), 177 (14), 175 (7), 159 (33), 147 (20), 145 (18), 135 (24), 131 (28), 121 (29), 119 (43), 109 (62), 107 (50), 105 (51), 93 (57), 91 (100), 79 (69), 77 (53), 67 (39), 55 (43) (Figura 24, pág. 100). Para RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ver Tabelas 21 e 22 (pág. 104 e 105) e Figuras 25 e 27 (pág. 101 e 103), respectivamente.

Uma representação esquemática da obtenção e isolamento da substância SH2 pode ser visualizada na Figura 15.



**Figura 15 – Esquema do isolamento de SH2 por cromatografia em coluna após derivatização de SH1**

### **3.8 Extração e análise dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus***

A extração dos óleos essenciais foi realizada pela técnica de hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado, conforme técnica descrita pela Farmacopéia Brasileira 4<sup>a</sup> ed. (2000).

As partes aéreas floridas e frescas das espécies em estudo foram grosseiramente divididas com auxílio de tesouras e podões, sendo obtidos 1132,58 g de material vegetal de *S. heterotrichius*, 1480,53 g de *S. ceratophylloides*, 1147,03 g de *S. leptolobus* e 3360,27 g de *S. oxyphyllus*. Após acondicionar quantidade de material vegetal adequada em um balão de fundo redondo de 5000 mL e recobri-lo com água destilada, o balão foi acoplado ao Clevenger, e seu conteúdo submetido à

ebulição por 2 horas. Decorrido este período de tempo, o óleo essencial foi retirado do aparelho e quantificado para determinação do teor em relação à massa de planta fresca.

Os óleos essenciais foram armazenados em frascos âmbar de 10 mL, hermeticamente fechados com tampa de silicone vedada com parafilme, e estocados em freezer à -40°C.

A análise dos componentes dos óleos essenciais foi realizada por CG-EM, utilizando os parâmetros descritos no item 3.1 (Procedimento gerais). As amostras foram preparadas utilizando-se alíquotas de aproximadamente 10 µL do óleo, dissolvidos em 500 µL de hexano grau pesticida, e armazenadas à -18°C até o momento da análise.

A identificação dos componentes dos óleos foi feita pela comparação de seus Índices de Retenção de Kovat's (IK), calculados em relação a uma série homóloga de *n*-alcanos entre C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub> (Sigma), e do modelo de fragmentação de cada composto em comparação com a espectroteca NIST 98 e com dados da literatura (ADAMS, 2001).

A equação utilizada para o cálculo do Índice de Retenção de Kovat's (YILIANG et al., 1993) é mostrada abaixo:

$$I = 100 \left[ \frac{t_{Ri} - t_{Rz}}{t_{R(z+1)} - t_{Rz}} + z \right]$$

onde:  $I$  = Índice de Retenção de Kovat's

$t_{Ri}$  = tempo de retenção do pico da amostra

$t_{Rz}$  = tempo de retenção do pico do *n*-alcano que elui imediatamente antes do pico da amostra

$t_{R(z+1)}$  = tempo de retenção do pico do *n*-alcano que elui imediatamente depois do pico da amostra

$z$  = número de carbonos do pico do *n*-alcano que elui imediatamente antes do pico da amostra

### 3.9 Avaliação da atividade antimicrobiana

#### 3.9.1 Extratos diclorometânico e etanólico de *Senecio heterotrichius*

Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e EtOH de *S. heterotrichius* foram realizados no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da UFSM, com a colaboração do Prof. Dr. Sydney Hartz Alves, utilizando os microrganismos pertencentes à micoteca e bacterioteca deste laboratório. Para tanto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A4 para bactérias aeróbias (NCCLS, 1997), seguindo a metodologia utilizada por Deuschle et al. (2006).

Esta metodologia avalia a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração da substância que impede o crescimento visível de um microrganismo.

Previamente aos testes, os cultivos bacterianos foram ativados através de subcultivos em ágar Mueller-Hinton durante 24 h a 35°C, enquanto que os fungos foram subcultivados em ágar Sabouraud dextrose 35°C/48 h.

Após a ativação, padronizou-se o inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana em salina, ajustando-se a turvação em espectrofotômetro a 90% de transmitância ( $\lambda = 530\text{nm}$ ). Esta turvação é equivalente ao tubo 0,5 da Escala MacFarland, e corresponde a aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC/mL. A seguir, esta suspensão foi diluída a 1:10 ( $1 \times 10^7$  UFC/mL) em salina estéril, e volumes de 10  $\mu\text{L}$  foram então transferidos para as cavidades de uma microplaca estéril, contendo 200  $\mu\text{L}$  de caldo BHI acrescido das diferentes concentrações finais do extrato à ser testado, resultando num inóculo final de aproximadamente  $5 \times 10^5$  UFC/mL. As placas com patógenos bacterianos foram incubadas a 37°C/24 h. A suspensão de microrganismos leveduriformes foi preparada de modo similar. Após a padronização da turvação (equivalente ao tubo 0,5 da escala Mac Farland), foram preparadas diluições sucessivas de 1:50 e 1:20 em caldo RPMI 1640 tamponado; volumes de 100  $\mu\text{L}$  foram transferidos para as cavidades de uma microplaca estéril, contendo 100  $\mu\text{L}$  do caldo RPMI acrescido das diferentes concentrações intermediárias do composto à ser testado. As placas foram incubadas a 35°C/48 h.

Para a preparação da solução estoque do extrato etanólico, este foi solubilizado em uma mistura de DMSO:TWEEN 80 0,5% (1:4), a fim de obter-se uma solução na concentração de 25 mg/mL.

Para a preparação da solução estoque do extrato diclorometânico, o TWEEN 80 0,5% foi substituído por TWEEN 80 10%.

As concentrações intermediárias dos extratos foram preparadas diluindo-se a solução estoque no meio apropriado, caldo BHI para bactérias e caldo RPMI 1640 para fungos.

As concentrações finais testadas foram de 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5 mg/mL, sendo os testes executados em triplicata.

Os microrganismos utilizados nos ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos incluem isolados clínicos e cultivos padrões de bactérias e fungos patogênicos: *Candida albicans* ATCC 44373, *C. dubliniensis* (isolado clínico), *C. lusitanae* (isolado clínico), *C. krusei* (isolado clínico), *C. parapsilosis* (isolado clínico), *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 3.9.2 Substância SH2

A técnica utilizada para avaliação da atividade antimicrobiana da substância SH2 foi a mesma descrita para os extratos de *S. heterotrichius* (item 3.9.1).

Para a preparação da solução mãe, a substância foi dissolvida em uma mistura de TWEEN 80:meio de cultura (1:20).

As concentrações testadas foram de 0,025; 0,05; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 5 mg/mL.

A metodologia utilizada para a avaliação da atividade sobre a alga *Prototheca zopfii* foi a mesma utilizada para leveduras.

Os microrganismos utilizados neste ensaio foram os seguintes: *Candida tropicalis* (isolado clínico), *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27850, *Prototheca zopfii* (isolado clínico), *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

### 3.9.3 Óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*

Os óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus* foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana seguindo a técnica descrita para os extratos de *S. heterotrichius* (item 3.9.1).

A solução mãe foi obtida pela dissolução de uma alíquota de cada óleo essencial em metanol (2:1). A seguir, esta solução foi diluída no meio de cultura adequado (1:100), a fim de diluir o metanol, eliminando sua interferência nos resultados, e obter a concentração final à ser testada frente bactérias e a concentração intermediária à ser testada frente leveduras e alga.

A partir da solução de maior concentração, realizou-se nas placas, diluições seriadas a 1:2 no meio de cultura adequado, sendo posteriormente adicionados os inóculos. As concentrações dos óleos testadas foram de 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,3 e 6,6 mg/mL para bactérias e de 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 e 3,3 mg/mL para fungos e alga.

A metodologia utilizada para a avaliação da alga *Prototheca zopfii* foi a mesma utilizada para leveduras.

Para os óleos essenciais, além da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada também a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Para a determinação da CFM, alíquotas dos poços onde não foi evidenciado crescimento fúngico foram repicadas em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose, sendo estas incubadas a 35°C durante 48h. A menor concentração de óleo essencial cujo subcultivo não gerou crescimento no meio de cultura foi considerada como CFM. Já na determinação da CBM, as placas continham ágar Mueller-Hinton e foram incubadas a 37°C durante 24h.

As cepas testadas foram *Candida albicans* ATCC 28367, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, *Prototheca zopfii* ATCC 461, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25792 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Rendimentos dos extratos e substância isolada de *Senecio heterotrichius* DC.

#### 4.1.1 Rendimento do extrato diclorometânico

A partir de 1193,5 g de material vegetal fresco foram obtidos 12,054 g de extrato diclorometânico ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), o que corresponde a um rendimento de 1,01%.

#### 4.1.2 Rendimento do extrato etanólico

A partir de 1181,45 g de material vegetal foram obtidos 43,3 g de extrato etanólico, o que corresponde a um rendimento de 3,66%.

#### 4.1.3 Rendimento de SH1

Partindo de 11,7 g do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *S. heterotrichius*, obteve-se 271,3 mg da substância SH1, o que corresponde a um rendimento de 2,3% em relação ao extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Em relação ao material vegetal fresco, o rendimento de SH1 foi de 0,0234%.

Esta substância também pôde ser detectada por CCD no extrato EtOH, mas não sendo quantificada.

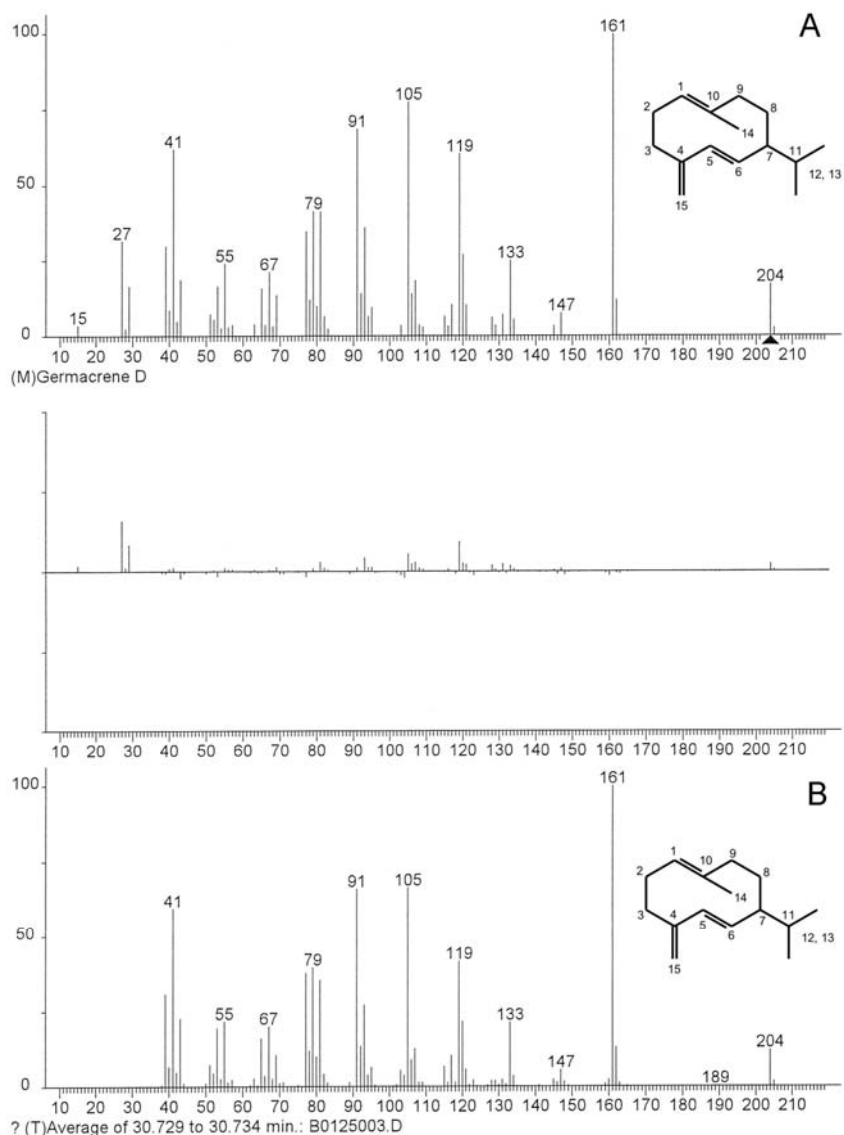
### 4.2 Elucidação estrutural de SH1

A substância SH1 foi isolada conforme descrito nos itens 3.4 e 3.5, de acordo com o esquema da Figura 14 (pág. 77).

O composto SH1 foi analisado por CG-EM, RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e DEPT 135°, bem como por RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 16, 17, 18, 19 e 20, Tabelas 19 e 20). Os dados espectroscópicos de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  de SH1 foram comparados com dados da literatura (MORI et al., 1990; BÜLOW, KÖNIG, 2000; B. M. HEINZMANN, dados não publicados; STELIOPOULOS et al., 2002; DEUSCHLE, 2003; SILVA,

2006) sendo apresentados nas Tabelas 19 e 20. Já seu espectro de massas foi comparado com o banco de dados NIST 98 e também com dados da literatura (ADAMS, 2001; STELIOPOULOS et al., 2002; PICAUD et al., 2006).

Na análise por CG foi possível observar a presença de uma substância majoritária na amostra, sendo esta constituída em 95% de SH1, a qual apresentou tempo de retenção de 30,7 minutos. No espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 16), o pico de maior massa encontra-se em  $m/z$  204 u.m.a., e corresponde ao pico do íon molecular.



**Figura 16 – Espectros de massas por impacto eletrônico do germacreno D (A) (NIST 98) e de SH1 (B)**



O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 17) aponta a presença de 15 átomos de carbono, sugerindo tratar-se de um sesquiterpeno. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 17, 18 e 19, Tabelas 19 e 20) indicam a ausência de oxigênio e a presença de três insaturações na molécula.

Baseado nestas evidências é possível propor para a substância SH1 uma fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  e, portanto, um grau de insaturação (GI) ou índice de deficiência de hidrogênios igual a quatro. Uma vez que os espectros de RMN indicam a presença de três duplas ligações, conclui-se que o composto é constituído de uma estrutura anelar (anel macrocíclico).

Portanto, a massa do composto, a fórmula molecular, o modelo de fragmentação e os espectros de RMN indicam a estrutura de um hidrocarboneto sesquiterpênico com três duplas ligações e um anel.

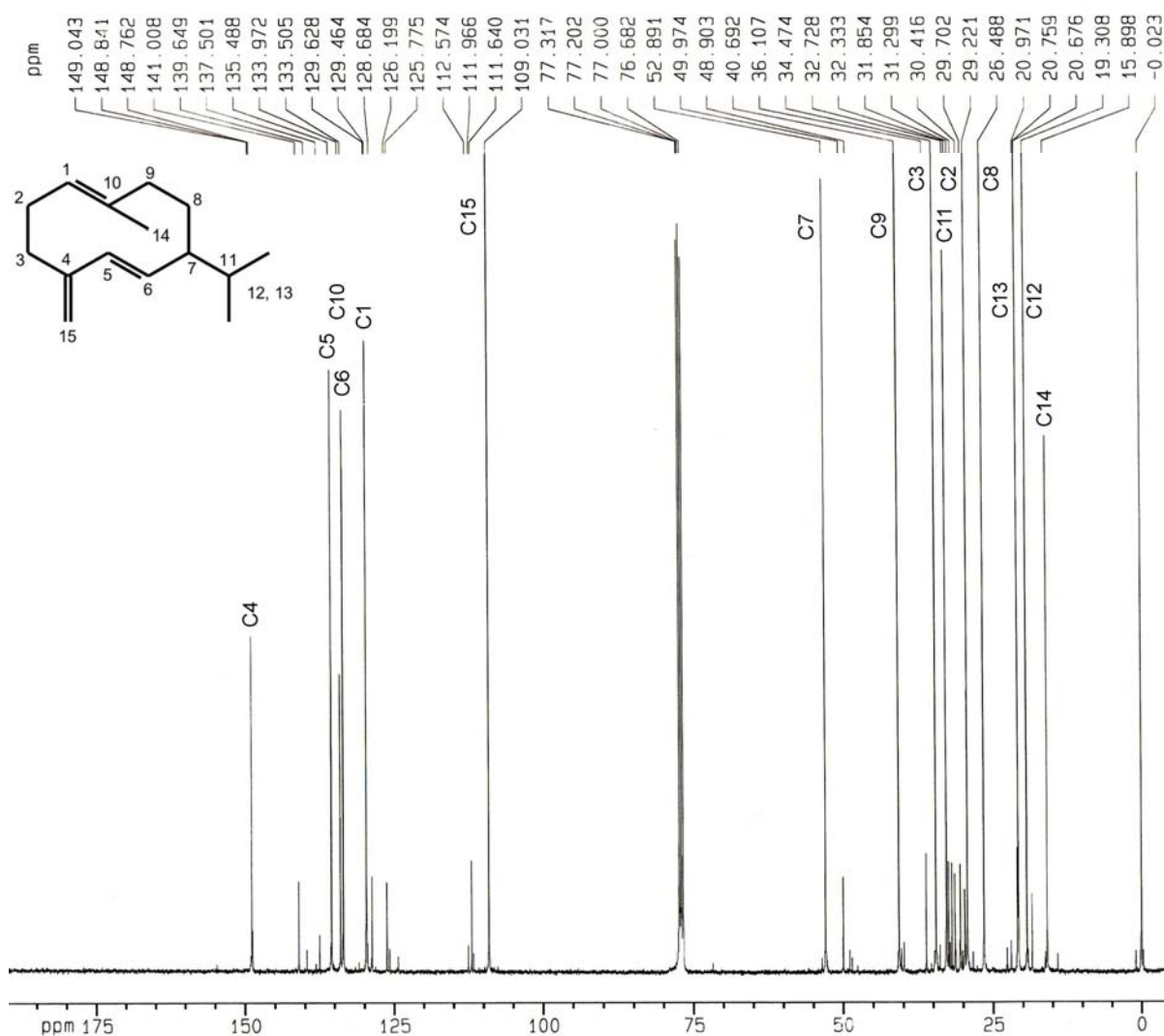


Figura 17 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de SH1 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

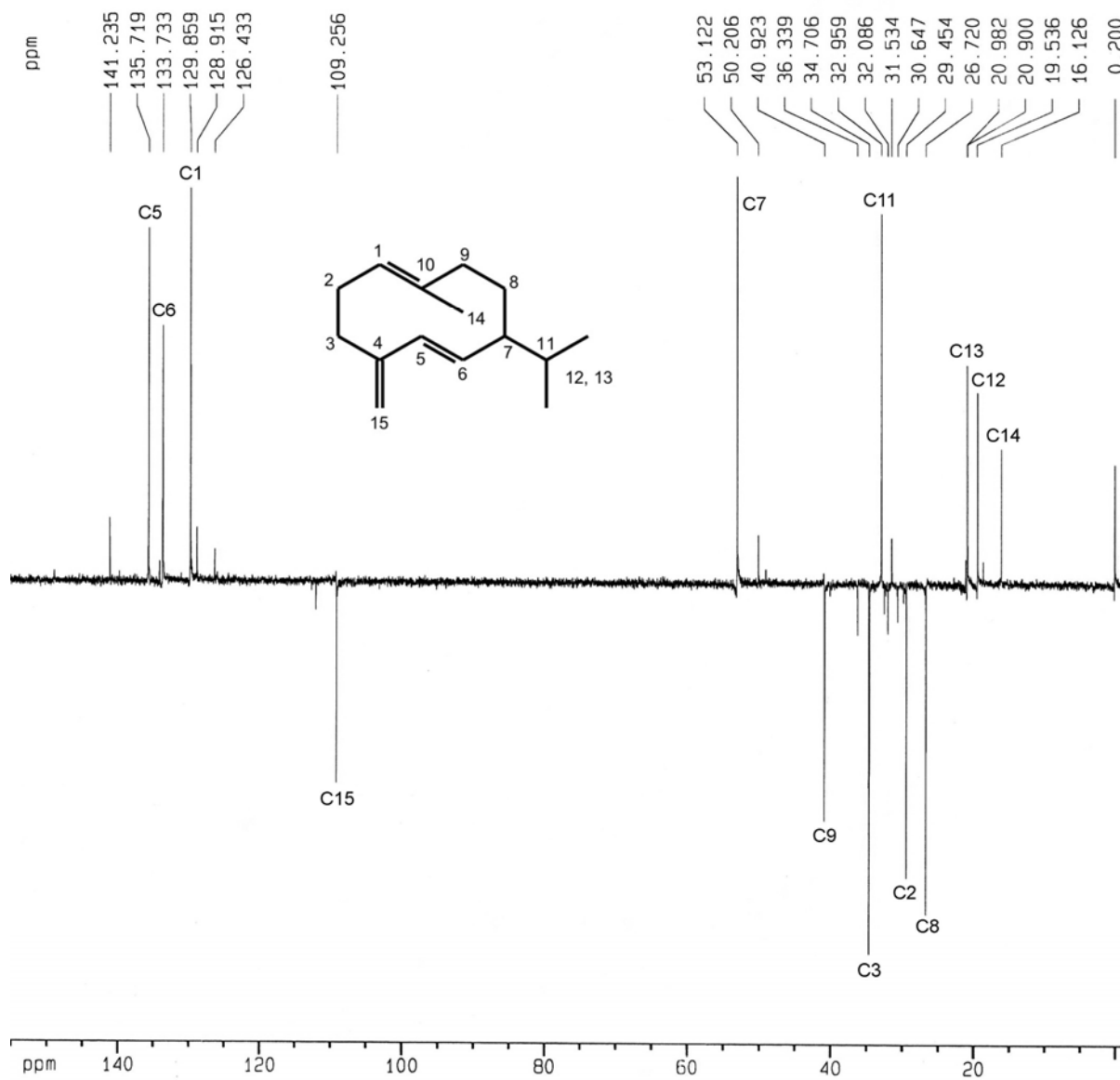


Figura 18 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° de SH1 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

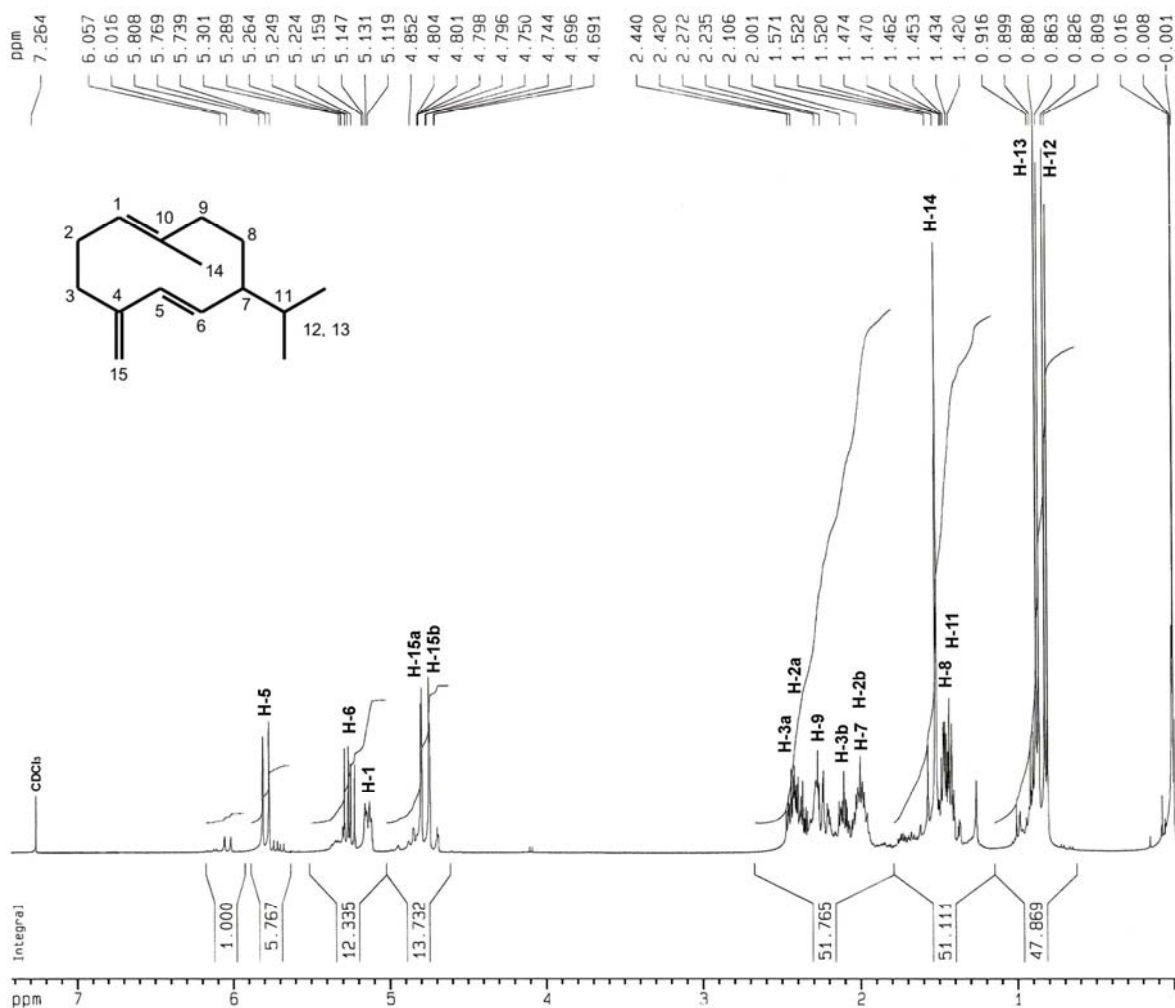


Figura 19 – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

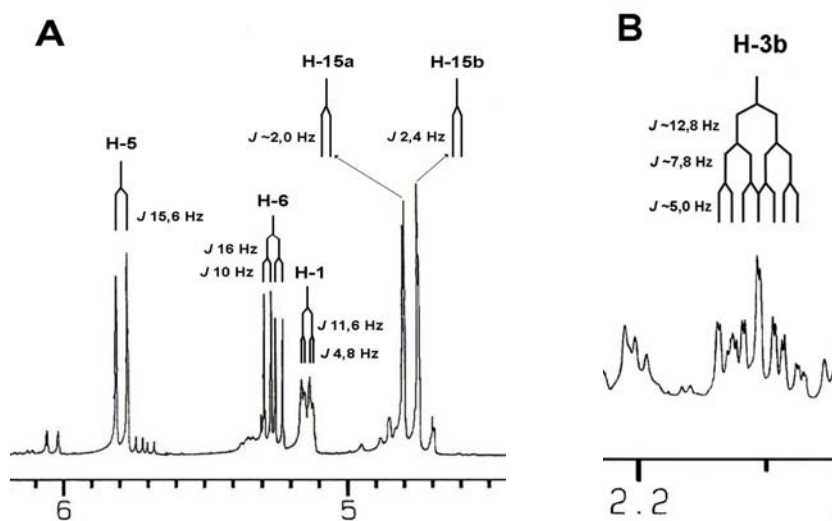


Figura 20 – Ampliações do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ). A: ampliações dos sinais correspondentes ao H-5 ( $\delta = 5,79$  ppm), H-6 ( $\delta = 5,26$  ppm), H-1 ( $\delta = 5,14$  ppm), H-15a ( $\delta = 4,8$  ppm) e H-15b ( $\delta = 4,75$  ppm); B: ampliação do sinal correspondente ao H-3b ( $\delta = 2,1$  ppm)

**Tabela 19 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH1, em comparação com dados da literatura para o germacreno D**

| Carbono | SH1                       |                | Germacreno D                |   |   |                                    |
|---------|---------------------------|----------------|-----------------------------|---|---|------------------------------------|
|         | Experimental <sup>a</sup> |                | DEUSCHLE, 2003 <sup>a</sup> | B. M. HEINZMANN,<br>dados não publicados <sup>a</sup> | STELIOPOULOS<br>et al., 2002 <sup>b</sup> | BÜLOW, KÖNIG,<br>2000 <sup>b</sup> |
|         | DEPT 135°                 | $\delta$ (ppm) | $\delta$ (ppm)              | $\delta$ (ppm)  | $\delta$ (ppm)                            | $\delta$ (ppm)                     |
| 1       | CH                        | 129,6          | 130,0                       | 129,5   | 130,0                                     | 130,1                              |
| 2       | CH <sub>2</sub>           | 29,2           | 29,2                        | 29,5  | 29,6                                      | 29,9                               |
| 3       | CH <sub>2</sub>           | 34,5           | 34,5                        | 34,7  | 34,9                                      | 35,1                               |
| 4       | C                         | 148,8          | 148,8                       | 149,8   | 149,0                                     | 149,2                              |
| 5       | CH                        | 135,5          | 135,3                       | 135,5   | 136,8                                     | 136,6                              |
| 6       | CH                        | 133,5          | 133,4                       | 133,5   | 133,2                                     | 133,4                              |
| 7       | CH                        | 52,9           | 53,0                        | 53,1  | 53,2                                      | 53,8                               |
| 8       | CH <sub>2</sub>           | 26,5           | 26,5                        | 26,7  | 26,8                                      | 27,0                               |
| 9       | CH <sub>2</sub>           | 40,7           | 40,7                        | 40,9  | 41,0                                      | 41,2                               |
| 10      | C                         | 134,0          | 133,7                       | 134,0   | 133,7                                     | 133,9                              |
| 11      | CH                        | 32,7           | 32,7                        | 33,0  | 33,0                                      | 33,2                               |
| 12, 13  | CH <sub>3</sub>           | 20,8           | 20,7                        | 20,9  | 21,0                                      | 21,2                               |
|         | CH <sub>3</sub>           | 19,3           | 19,3                        | 19,5  | 19,5                                      | 19,7                               |
| 14      | CH <sub>3</sub>           | 15,9           | 15,8                        | 16,1  | 16,0                                      | 16,2                               |
| 15      | CH <sub>2</sub>           | 109,0          | 109,0                       | 109,0   | 109,4                                     | 109,6                              |

**a:** 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; **b:** 125,8 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ .

**Tabela 20 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH1, em comparação com dados da literatura para o germacreno D**

| H      | Germacreno D      |                    |                      |                          |       |            |                                |       |           |                             |       |           |                                |                 |           |
|--------|-------------------|--------------------|----------------------|--------------------------|-------|------------|--------------------------------|-------|-----------|-----------------------------|-------|-----------|--------------------------------|-----------------|-----------|
|        | SH1               |                    |                      | SILVA, 2006 <sup>a</sup> |       |            | B. M. HEINZMANN <sup>a,c</sup> |       |           | DEUSCHLE, 2003 <sup>a</sup> |       |           | MORI et al., 1990 <sup>b</sup> |                 |           |
|        | $\delta$ (ppm)    | Mult. <sup>d</sup> | J (Hz)               | $\delta$ (ppm)           | Mult. | J (Hz)     | $\delta$ (ppm)                 | Mult. | J (Hz)    | $\delta$ (ppm)              | Mult. | J (Hz)    | $\delta$ (ppm)                 | Mult.           | J (Hz)    |
| H-C1   | 5,14              | dd                 | 4,8; 11,6            | 5,13                     | dd    | 4,3; 10,1  | 5,14                           | dd    | 4,7; 11,2 | 5,16                        | dd    | 4,5; 11,2 | 5,17                           | m               |           |
| Ha-C2  | ~2,35             | m                  |                      | 2,29                     | m     |            | 2,35                           | m     |           | 2,34                        | m     |           | ~2,30                          | m               |           |
| Hb-C2  | ~2,00             | m                  |                      | 1,98                     | m     |            | 1,95                           | m     |           | 1,98                        | m     |           | ~2,00                          | m               |           |
| Ha-C3  | ~2,43             | m                  |                      | 2,4                      | m     |            | 2,43                           | m     |           | 2,43                        | m     |           |                                |                 |           |
| Hb-C3  | 2,10              | ddd                | ~5,0; ~7,8;<br>~12,8 | 2,05                     | m     |            | 2,05                           | m     |           | 2,04                        | m     |           |                                |                 |           |
| H-C5   | 5,79              | d                  | 15,6                 | 5,78                     | d     | 15,7       | 5,79                           | d     | 15,8      | 5,8                         | d     | 15,8      | 5,75                           | d               | 15,8      |
| H-C6   | 5,26              | dd                 | 10,0; 16,0           | 5,25                     | dd    | 10,0; 15,9 | 5,26                           | dd    | 9,9; 15,8 | 5,27                        | dd    | 9,9; 15,8 | 5,25                           | dd              | 9,9; 15,8 |
| H-C7   | 2,00              | m                  |                      | 2,01                     | m     |            | 2,00                           | m     |           | 2,01                        | m     |           | ~1,90                          | m               |           |
| H-C8   | ~1,45             | m                  |                      | 1,48                     | m     |            | 1,45                           | m     |           | 1,48                        | m     |           | ~1,25                          | m               |           |
| H-C9   | 2,25              | m                  |                      | 2,22                     | m     |            | 2,27                           | m     |           | 2,11                        | m     |           | ~2,20                          | m               |           |
| H-C11  | ~1,44             | m                  |                      | 1,43                     | m     |            | 1,44                           | m     |           | 1,43                        | m     |           | ~1,30                          | m               |           |
| H-C12  | 0,82 <sup>e</sup> | d                  | 6,8                  | 0,86 <sup>e</sup>        | d     | 6,6        | 0,88 <sup>e</sup>              | d     |           | 0,90 <sup>e</sup>           | d     | 6,72      | 0,88 <sup>e</sup>              | d               | 6,7       |
| H-C13  | 0,87 <sup>e</sup> | d                  | 6,72                 | 0,81 <sup>e</sup>        | d     | 6,6        | 0,82 <sup>e</sup>              | d     |           | 0,84 <sup>e</sup>           | d     | 6,8       | 0,84 <sup>e</sup>              | d               | 6,8       |
| H-C14  | 1,52              | sl <sup>f</sup>    |                      | 1,59                     | s     |            | 1,51                           | s     |           | 1,54                        | s     |           | 1,45                           | sl <sup>f</sup> |           |
| Ha-C15 | 4,80              | d                  | ~2,0                 | 4,81                     | d     | 2,4        | 4,8                            | d     | 2,4       | 4,82                        | d     | 2,24      | 4,93                           | sl <sup>f</sup> |           |
| Hb-C15 | 4,75              | d                  | 2,4                  | 4,72                     | d     | 1,7        | 4,74                           | d     | 2,4       | 4,76                        | d     | 1,64      | 4,79                           | sl <sup>f</sup> |           |

a: 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; b: 500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ; c: dados não publicados; d: Mult. = multiplicidade; e: atribuições que podem ser invertidas, considerando-se cada coluna; f: sl = singlete largo.

#### 4.2.1 Análise da fragmentação de SH1 por EM-IE

O composto SH1 apresentou uma massa molecular de 204 u.m.a., evidenciada pelo espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE), com energia do feixe de elétrons em 70 eV (Figura 16). A Figura 21 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto SH1, a qual é descrita a seguir.

O íon molecular  $[M^+]$  com  $m/z$  204 u.m.a., quando sofre a eliminação de um radical isopropila (43 u.m.a.), origina o fragmento com sinal em  $m/z$  161 u.m.a., correspondente ao pico base.

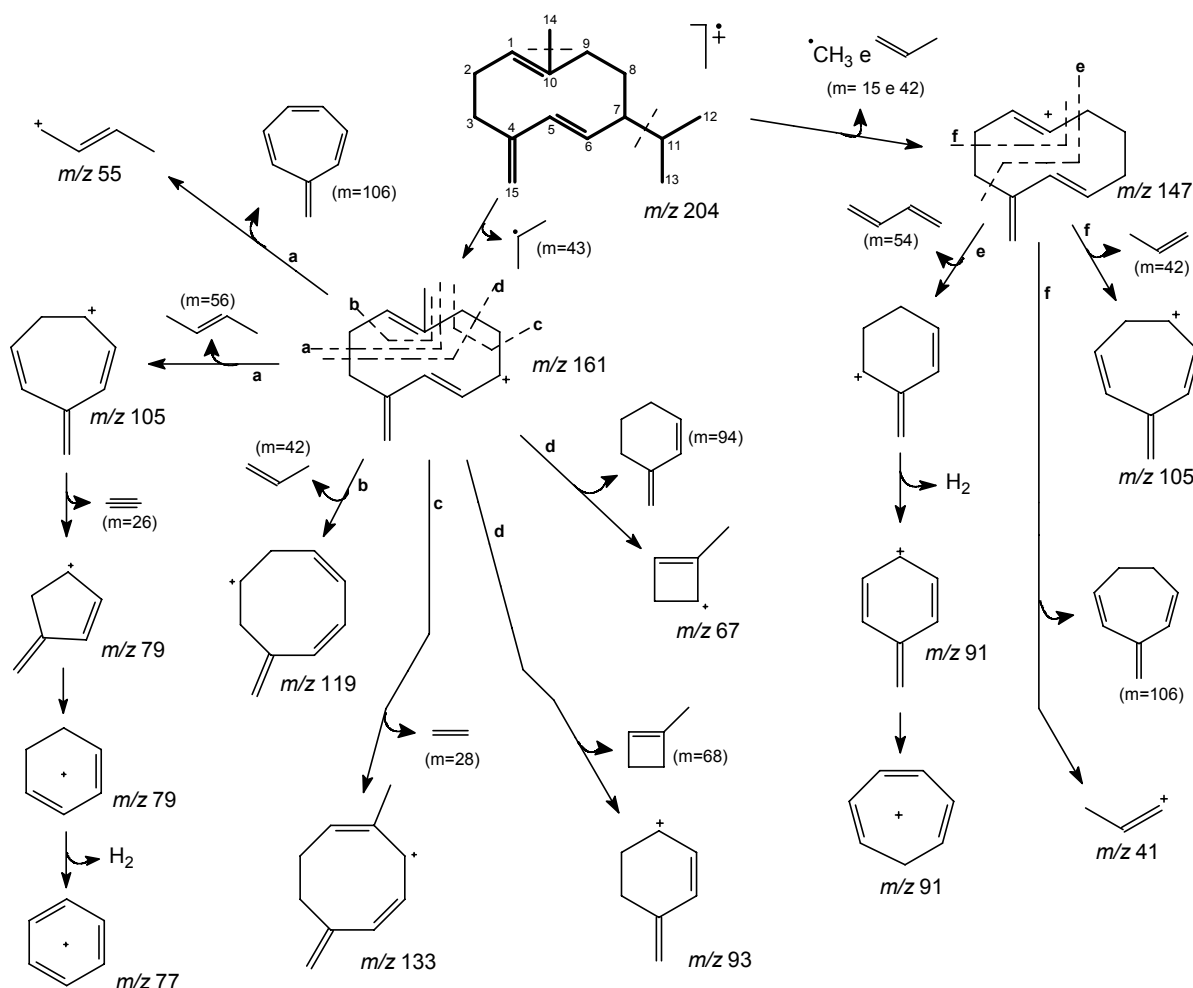
A partir do fragmento com  $m/z$  161 u.m.a. são formados outros fragmentos, entre eles o fragmento com  $m/z$  119 u.m.a., o qual origina-se pelo rompimento de duas ligações, entre os carbonos 1 e 2, e, 9 e 10, com eliminação de uma molécula neutra de propeno (42 u.m.a.). O fragmento com  $m/z$  133 u.m.a. é formado a partir do rompimento de duas ligações, entre os carbonos 7 e 8, e, 9 e 10, com eliminação de uma molécula neutra de etileno (28 u.m.a.). O pico em  $m/z$  55 u.m.a. pode ser explicado pelo rompimento das ligações entre os carbonos 2 e 3, e, 9 e 10, seguido da eliminação do fragmento mais pesado (106 u.m.a.) na forma de molécula neutra. Quando ocorre a eliminação do fragmento de menor massa (56 u.m.a.) na forma de molécula neutra, o íon formado apresenta  $m/z$  105 u.m.a. A partir de novas fragmentações deste íon, seguidas de rearranjos e eliminação de partículas neutras, originam-se os fragmentos com  $m/z$  79 u.m.a. e  $m/z$  77 u.m.a.

O rompimento das ligações entre os carbonos 2 e 3, e 8 e 9, do íon com  $m/z$  161 u.m.a. forma os fragmentos com  $m/z$  67 u.m.a. e  $m/z$  93 u.m.a.

O íon molecular  $[M^{++}]$  ( $m/z$  204 u.m.a.), ao sofrer eliminação de um radical metila (15 u.m.a.) e de uma molécula neutra de propeno (42 u.m.a.) origina o fragmento com  $m/z$  147 u.m.a. A partir de novas fragmentações deste íon, seguidas de rearranjos e eliminação de partículas neutras formam-se os fragmentos com  $m/z$  91 u.m.a. (íon tropílio) e  $m/z$  41 u.m.a.

Com base no modelo de fragmentação apresentado pela substância, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento, uma série de substâncias com modelos de fragmentações semelhantes às da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o germacreno D foi o composto que apresentou um modelo de fragmentação mais próximo ao de SH1, como indica a Figura 16. As diferenças apresentadas nos fragmentos de menor massa devem-se ao fato do aparelho

utilizado na obtenção dos espectros de SH1 ter sido programado para não detectar sinais com massas inferiores a 39 u.m.a. O espectro de massas da substância isolada também está de acordo com os dados descritos na literatura para o germacreno D (ADAMS, 2001; STELIOPOULOS et al., 2002; PICAUD et al., 2006).



**Figura 21 – Proposta de fragmentação para a substância SH1**

#### 4.2.2 Análise do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de SH1

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 17) mostra claramente, através dos sinais de maior intensidade, a presença de 15 átomos de carbono. A ausência de sinais entre as regiões de deslocamentos químicos de 50 a 90 ppm e acima de 150 ppm sugere a inexistência de oxigênio na molécula.

Comparando-se o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° (Figura 18) com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 17) pode-se verificar que, dentre estes átomos de carbono, 3 são metílicos ( $\text{CH}_3$ ), 5 são metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), sendo 1 desses exocíclico, 5 são metínicos ( $\text{CH}$ ) e 2 são átomos de carbono quaternários.

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e DEPT (Figuras 17 e 18), permitem concluir sobre a existência de três duplas ligações na molécula devido à presença de seis sinais com deslocamento químico entre 150 e 100 ppm, que corresponde à região olefínica do espectro, característica de átomos de carbono de alquenos ligados apenas a grupos alquila. A presença de 2 carbonos quaternários, 3 grupamentos metínicos e 1 grupamento metilênico na região olefínica do espectro indica a presença de uma dupla ligação exocíclica e de duas duplas ligações endocíclicas. Os sinais em  $\delta = 135,5$  e  $133,5$  ppm correspondem aos carbonos 5 e 6, respectivamente e, por apresentarem amplitude positiva no espectro DEPT, tratam-se de dois grupamentos metínicos. O sinal em  $\delta = 129,6$  ppm corresponde ao carbono 1. Já o sinal em  $\delta = 109,0$  ppm mostra claramente a existência de um grupamento exometilênico, que é confirmado pela amplitude negativa deste sinal no DEPT, referindo-se ao carbono 15. Os outros dois sinais de menor intensidade, localizados na região de campo baixo do espectro, em  $\delta = 148,8$  e  $134,0$  ppm, os quais não podem ser visualizados no DEPT, correspondem a dois átomos de carbono quaternários, e foram atribuídos aos carbonos 4 e 10, respectivamente.

Os sinais em campo alto do espectro em  $\delta = 20,8$ ;  $19,3$  e  $15,9$  ppm, de amplitude positiva no DEPT, foram atribuídos respectivamente aos carbonos metílicos 14, 13 e 12.

Os sinais de amplitude positiva restantes, em  $\delta = 52,9$  e  $32,7$  ppm, pela sua posição no espectro DEPT, foram atribuídos aos demais carbonos metínicos, e correspondem respectivamente aos carbonos 7 e 11.

Os quatro sinais restantes no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , apresentando amplitude negativa no DEPT, em  $\delta = 40,7$ ;  $34,5$ ;  $29,2$  e  $26,5$  ppm, correspondem aos carbonos 9, 3, 2 e 8, respectivamente (Figuras 17 e 18, Tabela 19).

Os deslocamentos químicos do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado da substância SH1 foram comparados com dados da literatura para o germacreno D (BÜLOW, KÖNIG, 2000; B. M. HEINZMANN, dados não publicados;



STELIOPOULOS et al., 2002; DEUSCHLE, 2003), conforme pode ser evidenciado na Tabela 19, e confirmam a estrutura proposta.

#### 4.2.3 Análise do espectro de RMN $^1\text{H}$ de SH1

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH1 pode ser visualizado nas Figuras 19 e 20. A Tabela 20 mostra os valores de deslocamento químico de cada hidrogênio e a sua comparação com dados da literatura.

As atribuições dos sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH1 foram realizadas com auxílio de dados da literatura que apresentam a análise do germacreno D, inclusive através de técnicas espectroscópicas bidimensionais (MORI *et al.*, 1990; B. M. HEINZMANN, dados não publicados; DEUSCHLE, 2003; SILVA, 2006) (Tabela 20).

Através da análise de RMN  $^1\text{H}$  de SH1 (Figura 19) foi possível evidenciar em campo baixo do espectro a presença de quatro sinais com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios olefínicos.

Os sinais em  $\delta = 5,79$  ppm (d,  $J$  15,6 Hz) e  $\delta = 5,26$  ppm (dd,  $J$  10,0 e 16,0 Hz), característicos de hidrogênios olefínicos, correspondem aos hidrogênios 5 e 6, respectivamente. A constante de acoplamento de aproximadamente 16 Hz, indica a configuração relativa *trans* entre H-5 e H-6. O sinal de H-6 aparece na forma de duplo dublete (dd) devido ao acoplamento deste com H-5 ( $J$  16 Hz) e H-7 ( $J$  10 Hz), enquanto que H-5 aparece como dublete devido ao seu acoplamento apenas com H-6.

O sinal em  $\delta = 5,14$  ppm (dd,  $J$  4,8 e 11,6 Hz) foi atribuído ao H-1; além do seu deslocamento químico ser indicativo de hidrogênio olefínico, a multiplicidade e as constantes de acoplamento indicam a vizinhança de um grupamento metilênico. O sinal na forma de duplo dublete com constantes de acoplamento ( $J$ ) diferenciadas pode ser explicado pelo ângulo diedro formado entre H-1 e H-2a e entre H-1 e H-2b, que é em torno de  $180^\circ$  e  $45^\circ$ , com  $J$  de 11,6 e 4,8 Hz, respectivamente.

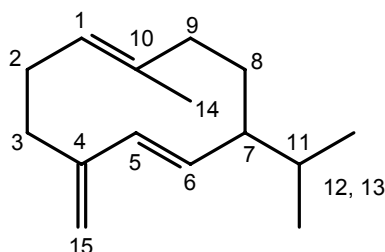
Os dois dubletes em  $\delta = 4,80$  ( $J$  2,0 Hz) e  $\delta = 4,75$  ppm ( $J$  2,4 Hz), característicos de grupamento exometilênico, foram atribuídos aos hidrogênios H-15a e H-15b.

Os sinais na forma de multipletes que encontram-se na região entre  $\delta = 1,4$  e  $2,5$  ppm, deslocamentos químicos característicos de hidrogênios localizados em regiões alifáticas e saturadas de moléculas orgânicas, foram atribuídos aos hidrogênios H-3a, H-2a, H-9, H-7, H-2b, H-8 e H-11 (Tabela 20). O sinal em  $\delta = 2,1$  ppm (ddd,  $J \sim 5,0$ ;  $\sim 7,8$  e  $12,8$  Hz) foi atribuído ao H-3b. Os sinais de H-7 e H-2b aparecem na mesma região do espectro, apresentando como sinal um multiplete em torno de  $\delta = 2,0$  ppm. A atribuição destes sinais foi feita com o auxílio de espectros bidimensionais  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (B. M. HEINZMANN, dados não publicados).

Pode ser verificada também a presença de três sinais intensos em campo alto do espectro. Os dois dubletes em  $\delta = 0,82$  ppm ( $J$  6,8 Hz) e  $\delta = 0,87$  ppm ( $J$  6,72 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios das metilas diastereotópicas 12 e 13. Essas metilas não são equivalentes devido à ligação do fragmento isopropila a um carbono quiral (C7), levando assim à formação de dois dubletes. O outro sinal de grande intensidade aparece em  $\delta = 1,52$  ppm como um singlete largo e corresponde aos hidrogênios da metila 14; o deslocamento químico em campo mais alto em comparação com os outros grupamentos metila, pode ser explicado pela sua ligação direta em um carbono envolvido em dupla ligação.

#### 4.2.4 Estrutura de SH1

A correlação entre os dados obtidos nas análises de CG-EM, RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e DEPT  $135^\circ$ , e RMN  $^1\text{H}$ , além da comparação destes dados com a literatura, permite concluir que a substância SH1 se trata do germacreno D (germacra-1(10),4(15),5-trieno) (Figura 22).



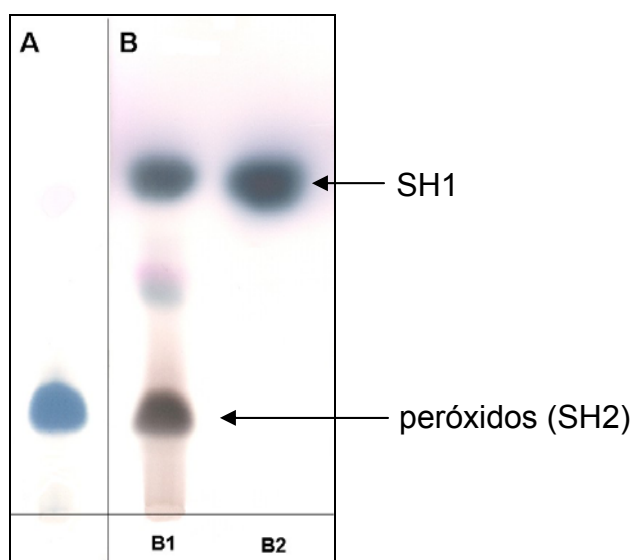
**Figura 22 – Fórmula estrutural do germacreno D (substância SH1)**

### 4.3 Derivatização de SH1 pelo processo de foto-oxidação (obtenção de SH2)

Após a reação de derivatização de SH1 por foto-oxidação, a mistura reacional foi analisada em comparação com SH1 através de CCD (Figura 23), e foi possível visualizar o surgimento de 3 novas manchas principais, como produtos da reação.

O grupo de produtos formados em maior quantidade, apresentou reação positiva frente ao reagente específico para peróxidos, e foi fracionado por cromatografia em coluna (CC), conforme descrito no item 3.7, sendo assim possível isolar o peróxido majoritário, composto este denominado SH2.

Os outros produtos da reação de foto-oxidação foram obtidos em pequenas quantidades e não foram isolados, não sendo possível identificá-los.



**Figura 23 – Análise por CCD do produto obtido através da reação de foto-oxidação em comparação com a substância de partida SH1. Visualização após nebulização com o reagente específico para peróxidos, A; comparação da substância de partida (B2) com o produto obtido através da reação de foto-oxidação (B1) após nebulização com o reagente cromogênico anisaldeído-ácido sulfúrico seguido de tratamento térmico, B; eluente: hexano:acetona (9:1); fase estacionária: gel de sílica F<sub>254</sub>**

#### 4.3.1 Rendimento de SH2

Partindo-se de 203 mg de SH1, foram isolados 43,6 mg da substância denominada SH2, o que corresponde a um rendimento de 21,5%.

#### 4.4 Elucidação estrutural de SH2

A substância SH2 foi isolada conforme descrito no item 3.7 (Figura 15, pág. 81). O composto foi analisado por CG-EM, RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e DEPT 135°, bem como por RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 24, 25, 26 e 27). A elucidação estrutural de SH2 foi baseada na comparação de seus dados espectroscópicos com a literatura (BOHLMANN, GUPTA, 1982) e com os dados obtidos para SH1, já que na reação de foto-oxidação de SH1 é esperada apenas a inserção de um grupamento peróxido na molécula, com poucas alterações estruturais.

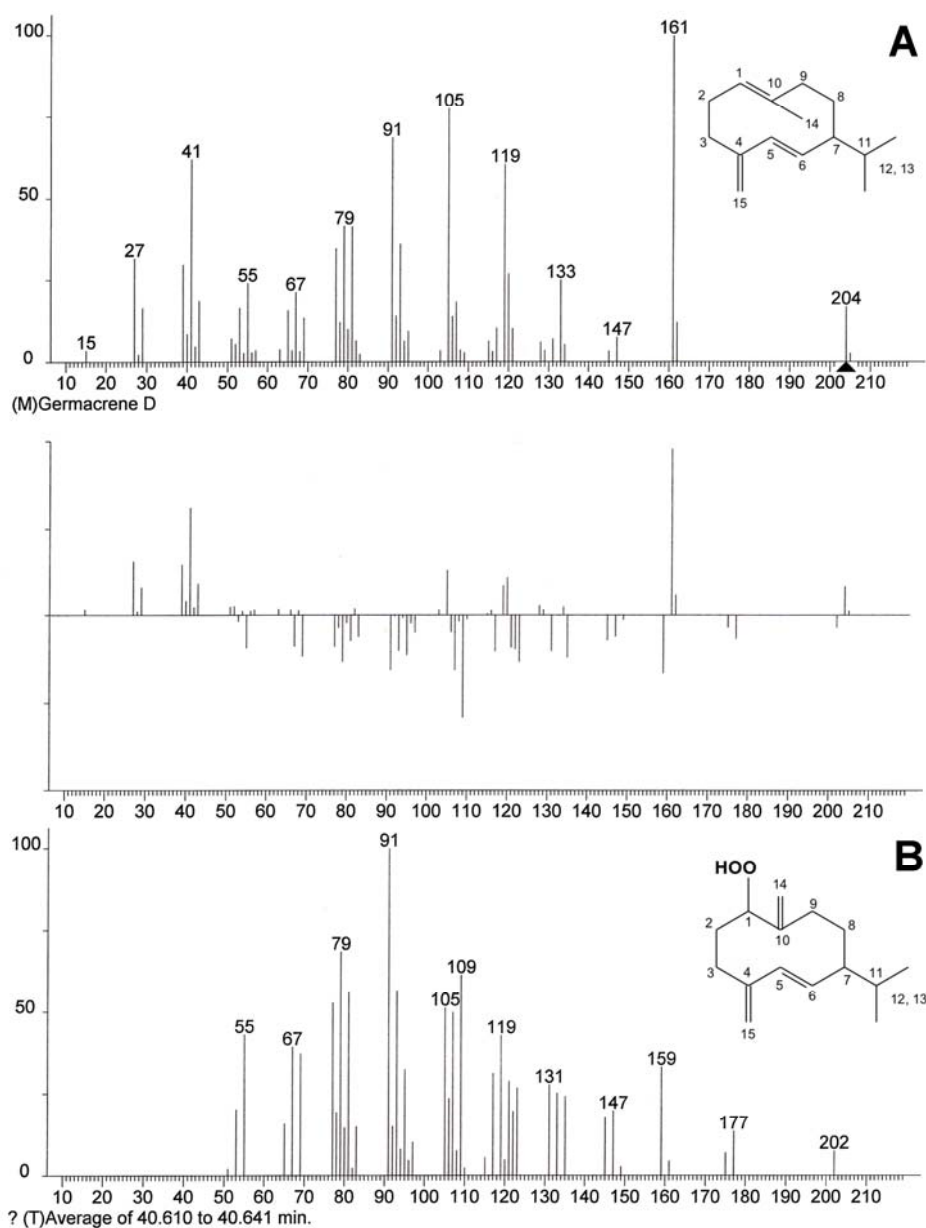
Na análise por CG foi possível observar a presença de dois picos com tempo de retenção de 39,2 e 40,5 minutos, caracterizando uma mistura constituída de 90,2% de SH2 e 9,2% de outra substância. No espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE) do composto SH2 (Figura 24) o pico de maior massa apresenta  $m/z$  202 u.m.a. Como este composto é derivado de SH1, de massa molecular 204 u.m.a., e apresenta reação positiva frente ao reagente específico para peróxidos, é esperado um incremento na massa molecular de aproximadamente 32 u.m.a., correspondente aos dois oxigênios do grupamento peróxido. Uma vez que a literatura descreve a perda freqüente de  $\text{H}_2\text{O}_2$  no caso da fragmentação de hidroperóxidos na espectrometria de massas, o pico em  $m/z$  202 u.m.a. pode ser explicado pela perda desta molécula neutra de baixa energia a partir do íon molecular, de massa molecular 236 u.m.a., devido à instabilidade do grupamento hidroperóxido.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 25) indica, através dos picos de maior intensidade, a presença de 15 átomos de carbono, sugerindo tratar-se de um sesquiterpenóide. Os deslocamentos químicos nos espectros confirmam a presença de três insaturações e de um grupamento oxigenado na molécula.

Nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de SH2 (Figuras 25 e 26) destacam-se principalmente dois sinais, que não estavam presentes no espectro correspondente à substância precursora SH1: o sinal atribuído ao carbono ligado diretamente a um oxigênio em  $\delta = 89,9$  ppm, e o sinal correspondente a um carbono envolvido em dupla ligação em  $\delta = 114,5$  ppm, correspondente a um grupamento exometileno adicional. Estes dados fornecem uma evidência da presença de um grupamento hidroperóxido no composto SH2.

Baseado nos dados acima descritos é possível propor a fórmula molecular  $C_{15}H_{24}O_2$  para o composto SH2, com grau de insaturação (GI) ou índice de deficiência de hidrogênios igual a quatro.

Como o GI é de 4, conclui-se que a estrutura possui um ciclo, uma vez que pode ser evidenciada a presença de três insaturações nos espectros de RMN (Figuras 25, 26 e 27).



**Figura 24 – Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno D (A) (NIST 98) em comparação ao de SH2 (B)**

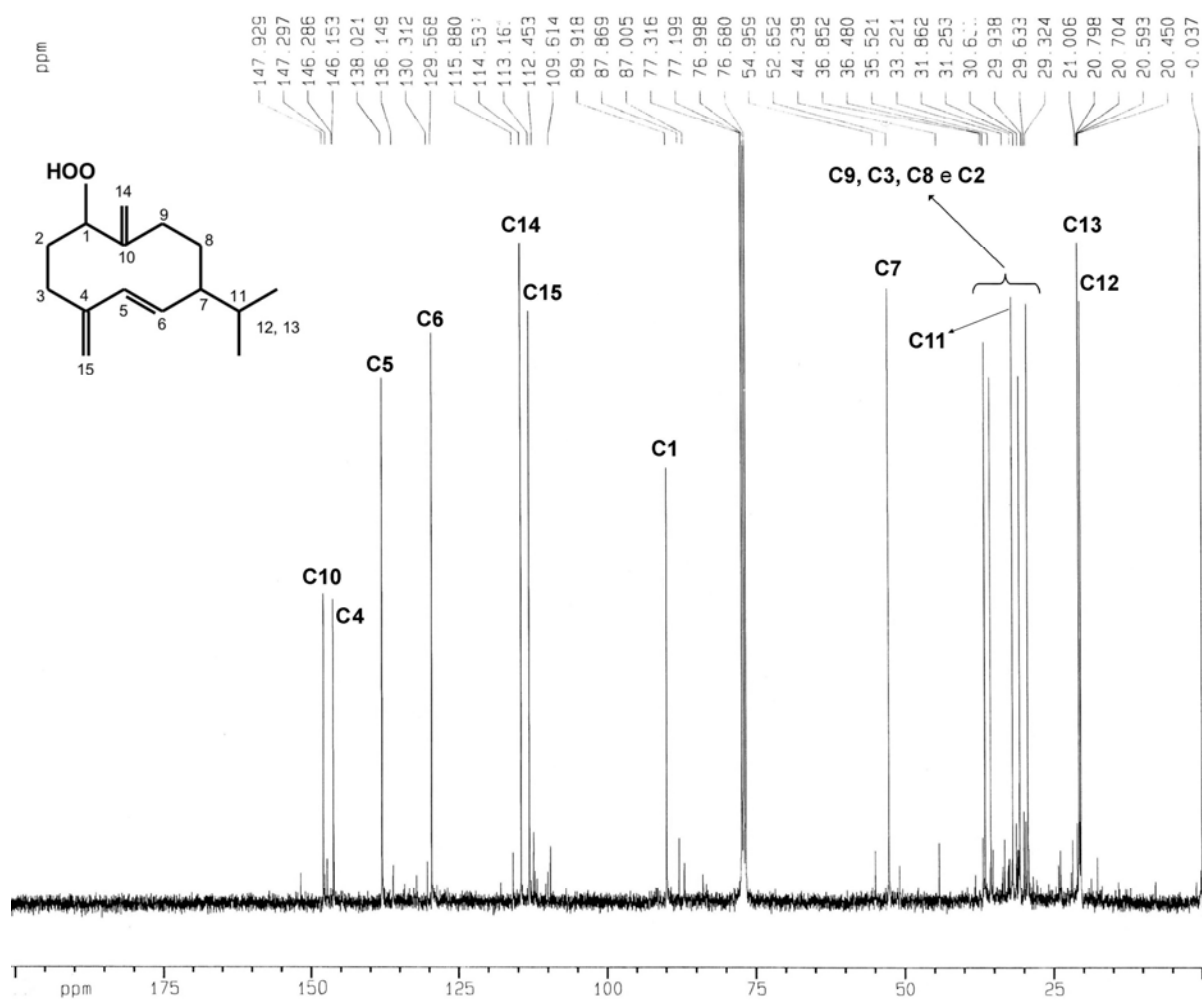


Figura 25 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de SH2 (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



Figura 26 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135° de SH2 (100MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

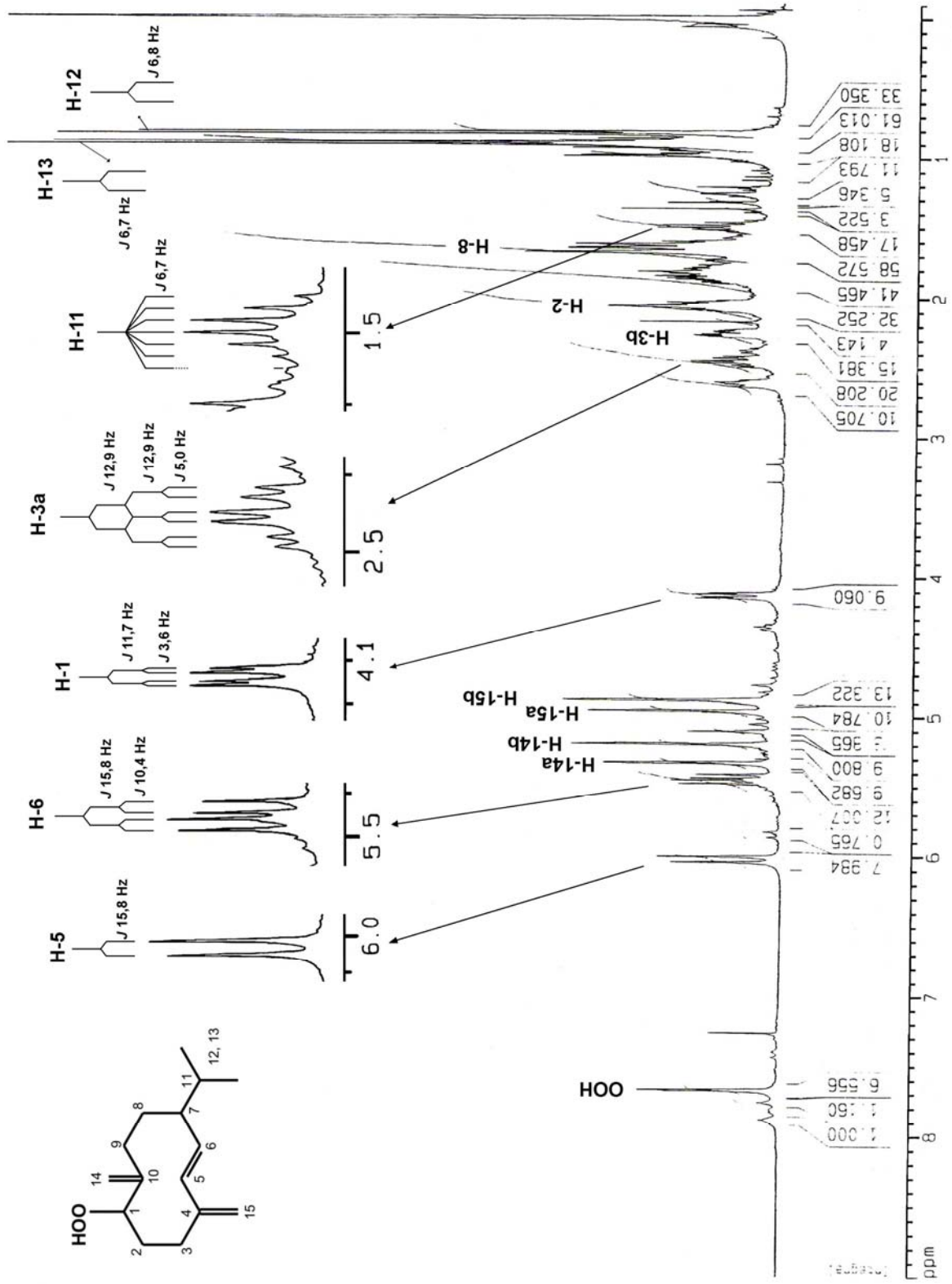


Figura 27 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H de SH2 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Tabela 21 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH2, em comparação com os valores experimentais obtidos para SH1**

| Carbono | SH2             |                | SH1             |                |
|---------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|
|         | Experimental    |                | Experimental    |                |
|         | DEPT 135°       | $\delta$ (ppm) | DEPT 135°       | $\delta$ (ppm) |
| 1       | CH              | 89,9           | CH              | 129,6          |
| 2       | CH <sub>2</sub> | 36,5*          | CH <sub>2</sub> | 29,2           |
| 3       | CH <sub>2</sub> | 30,6*          | CH <sub>2</sub> | 34,5           |
| 4       | C               | 146,3          | C               | 148,8          |
| 5       | CH              | 138,0          | CH              | 135,5          |
| 6       | CH              | 129,6          | CH              | 133,5          |
| 7       | CH              | 52,7           | CH              | 52,9           |
| 8       | CH <sub>2</sub> | 29,3*          | CH <sub>2</sub> | 26,5           |
| 9       | CH <sub>2</sub> | 35,5*          | CH <sub>2</sub> | 40,7           |
| 10      | C               | 147,9          | C               | 134,0          |
| 11      | CH              | 31,9           | CH              | 32,8           |
| 12, 13  | CH <sub>3</sub> | 20,7           | CH <sub>3</sub> | 20,8           |
|         | CH <sub>3</sub> | 20,4           | CH <sub>3</sub> | 19,3           |
| 14      | CH <sub>2</sub> | 114,5          | CH <sub>3</sub> | 15,9           |
| 15      | CH <sub>2</sub> | 113,2          | CH <sub>2</sub> | 109,0          |

\* Atribuições que podem ser intercambiáveis, pois não foi possível identificar o deslocamento químico respectivo a cada carbono, sendo esta atribuição apenas uma sugestão.

**Tabela 22 – Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ) para a substância SH2, em comparação com dados da literatura**

| H     | SH2               |                 |                 | 1 $\beta$ -peroxigermacra-4(15),5,10(14)-trieno |                 |                     |
|-------|-------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|---------------------|
|       | Experimental      |                 |                 | BOHLMANN, GUPTA, 1982                           |                 |                     |
|       | $\delta$ (ppm)    | Multip.         | J (Hz)          | $\delta$ (ppm)                                  | Multip.         | J (Hz)              |
| H-1   | 4,13              | dd              | 3,6; 11,7       | 4,12  | dd              | 3,5; 11,5           |
| H-2   | 2,06 <sup>a</sup> | m               |                 | 2,04  | m               |                     |
| H-3a  | 2,45 <sup>a</sup> | ddd             | 5,0; 12,9; 12,9 | 2,45  | ddd             | 5,0; 12,0; 12,0     |
| H-3b  | 2,25 <sup>a</sup> | m               |                 | 2,28  | dddd            | 1,5; 3,0; 4,5; 12,0 |
| H-5   | 6,02              | d               | 15,8            | 6,02  | d               | 16,0                |
| H-6   | 5,44              | dd              | 10,4; 15,8      | 5,44  | dd              | 10,5; 16,0          |
| H-8   | ~1,65             |                 |                 |   |                 |                     |
| H-11  | 1,50              | sep             | 6,7             |   |                 |                     |
| H-12  | 0,82 <sup>b</sup> | d               | 6,8             | 0,84 <sup>*</sup>                               | d               | 7,0                 |
| H-13  | 0,90 <sup>b</sup> | d               | 6,7             | 0,92 <sup>*</sup>                               | d               | 7,0                 |
| H-14a | 5,32              | sl <sup>c</sup> |                 | 5,33  | sl <sup>c</sup> |                     |
| H-14b | 5,19              | sl <sup>c</sup> |                 | 5,20  | sl <sup>c</sup> |                     |
| H-15a | 4,95              | sl <sup>c</sup> |                 | 4,96  | sl <sup>c</sup> |                     |
| H-15b | 4,87              | sl <sup>c</sup> |                 | 4,88  | sl <sup>c</sup> |                     |
| -OOH  | 7,67              | s               |                 | 7,51  | s               |                     |

a: atribuições realizadas com base nos dados apresentados por Bohlmann e Gupta (1982); b: atribuições que podem ser invertidas, considerando-se cada coluna; c: singlete largo

#### 4.4.1 Análise da fragmentação de SH2 por EM-IE

A Figura 28 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto SH2.

O EM-IE de SH2, obtido com energia do feixe de elétrons de 70 eV (Figura 24), apresenta o pico de maior massa em  $m/z$  202 u.m.a. Este sinal corresponde ao fragmento originado a partir da eliminação de uma molécula de  $\text{H}_2\text{O}_2$  do íon molecular de  $m/z$  236 u.m.a., conforme descrito no item 4.4.

A partir do íon molecular [ $\text{M}^{+\cdot}$ ] com  $m/z$  236 u.m.a. pode ocorrer também a eliminação de um radical hidroxila e de uma molécula neutra com 42 u.m.a., originando o fragmento com  $m/z$  177 u.m.a. Este, através da eliminação de uma molécula de água (18 u.m.a.), forma o fragmento com  $m/z$  159 u.m.a., que também pode ser formado pela eliminação de um radical isopropila (43 u.m.a.) partindo-se do fragmento com  $m/z$  202 u.m.a. A partir deste carbocátion formado ( $m/z$  159 u.m.a.),

ocorrem novas fragmentações na molécula, com eliminação de partículas neutras, seguidas de rearranjos, formando outros fragmentos importantes.

A partir do fragmento com  $m/z$  159 u.m.a., através da eliminação de uma molécula neutra de 66 u.m.a., é originado um cátion com  $m/z$  93 u.m.a. que, pela perda de uma molécula de  $H_2$ , origina o pico base em  $m/z$  91 u.m.a (íon tropílio).

Uma explicação para o surgimento dos outros fragmentos presentes no espectro de massas de SH2 pode ser visualizada na Figura 28.

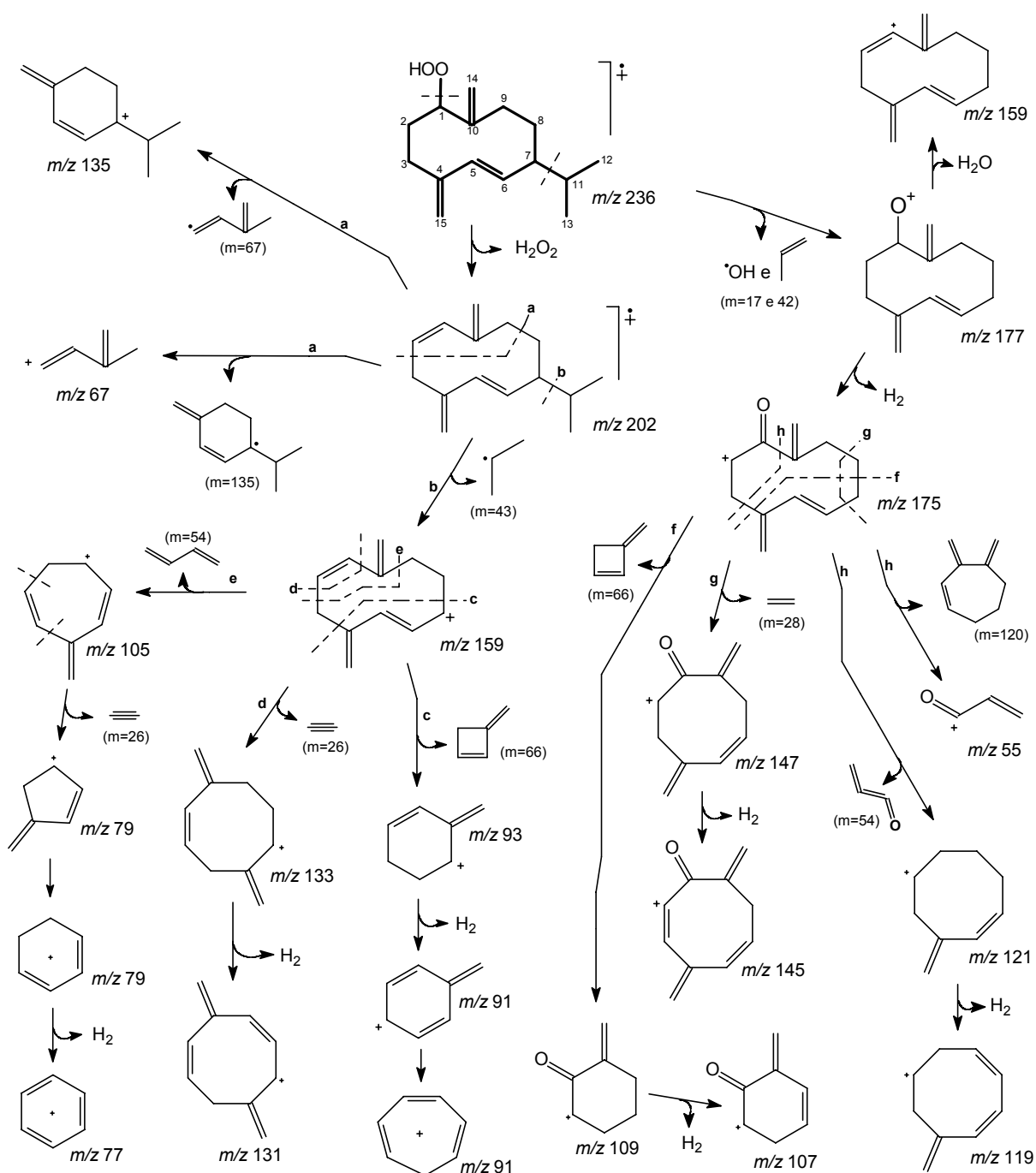


Figura 28 – Proposta de fragmentação para a substância SH2

#### 4.4.2 Análise dos espectros de RMN $^{13}\text{C}$ de SH2

A atribuição dos sinais nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de SH2 foi baseada na comparação com os espectros de SH1, seu precursor, levando-se em consideração possíveis alterações estruturais que possam ter ocorrido no processo de derivatização.

O derivado SH2, obtido por foto-oxidação do composto SH1, mostra algumas diferenças marcantes nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 25 e 26, pág. 101 e 102) quando comparados aos espectros de seu precursor SH1 (Figuras 17 e 18, pág. 88 e 89, Tabela 21, pág. 104). Destacam-se dois sinais que não estavam presentes no espectro correspondente à substância precursora SH1: o sinal em  $\delta = 89,9$  ppm, indicando um carbono ligado diretamente a um oxigênio, e o sinal em  $\delta = 114,5$  ppm, correspondente a um grupamento exometileno adicional. Além destes, o sinal da metila correspondente ao carbono 14, em  $\delta = 15,9$  ppm, presente no espectro de SH1, não pode ser observado no espectro de SH2.

No espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado de SH2 (Figura 25) observa-se, através dos sinais de maior intensidade, a presença de 15 átomos de carbono. Sua comparação com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT  $135^\circ$  (Figura 26) permite concluir que, dentre estes átomos de carbono, 2 são metílicos ( $\text{CH}_3$ ), 6 são metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), dos quais 2 pertencem a grupamentos metilênicos exocíclicos, 5 são metínicos ( $\text{CH}$ ) e 2 são átomos de carbono quaternários.

Através dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado e DEPT, é possível atribuir a existência de três duplas ligações à molécula, devido a presença de seis sinais com deslocamento químico entre 150 e 100 ppm, região olefínica do espectro, característica de átomos de carbono de alquenos ligados apenas a grupos alquila. A presença de 2 carbonos quaternários, 2 grupamentos metínicos e 2 grupamentos metilênicos na região olefínica do espectro, indica que dentre as três duplas ligações, uma dupla ligação é endocíclica e duas duplas ligações são exocíclicas.

Os dois sinais de menor intensidade, localizados na região de campo mais baixo do espectro, em  $\delta = 147,9$  e  $146,3$  ppm, não visualizados no DEPT, correspondem a átomos de carbono quaternários, e por serem os dois sinais mais desblindados do espectro, foram atribuídos aos carbonos ligados aos grupamentos

exometilênicos, carbonos 10 e 4, respectivamente. Os sinais em  $\delta = 138,0$  e  $129,6$  ppm, com amplitude positiva no espectro DEPT, indicando tratar-se de carbonos metínicos, correspondem aos carbonos 5 e 6, respectivamente. Os sinais em  $\delta = 114,5$  e  $113,2$  ppm, com amplitude negativa no DEPT, são característicos de carbonos metilênicos com hibridização  $sp^2$  e correspondem aos carbonos 14 e 15, respectivamente. O sinal em  $\delta = 89,9$  ppm, presente em uma das regiões do espectro onde aparecem os sinais de carbonos ligados diretamente a oxigênio, corresponde ao carbono 1. A presença de apenas um sinal nessa região indica um grupamento hidroperóxido, pois um endoperóxido seria caracterizado pela presença de dois sinais nessa região.

Os sinais em campo mais alto do espectro, em  $\delta = 20,7$  e  $20,4$  ppm, de amplitude positiva no DEPT, correspondem aos carbonos metílicos 13 e 12.

Os sinais de amplitude positiva restantes, em  $\delta = 52,7$  e  $31,9$  ppm, pela sua posição no espectro DEPT, foram atribuídos aos carbonos metínicos 7 e 11, respectivamente.

Os quatro grupos metilênicos restantes da molécula, apresentando amplitude negativa no espectro DEPT e com deslocamentos químicos em  $\delta = 36,5$ ;  $35,5$ ;  $30,6$  e  $29,3$  ppm, correspondem aos carbonos 2, 9, 3 e 8. Uma vez que ensaios espectrométricos bidimensionais não foram realizados, e também não foram encontrados dados referentes à RMN  $^{13}C$  desta substância na literatura para comparação, não foi possível realizar a atribuição destes sinais (Figuras 25 e 26, Tabela 21).

O fato do desaparecimento do sinal em  $\delta = 15,9$  ppm correspondente à metila 14 no espectro de RMN  $^{13}C$  de SH1, juntamente com o surgimento de uma sinal correspondente a um grupo metilênico adicional em  $\delta = 114,5$  ppm no espectro de RMN  $^{13}C$  de SH2, evidencia a adição do grupamento hidroperóxido no carbono 1.

#### 4.4.3 Análise do espectro de RMN $^1H$ de SH2

O espectro de RMN  $^1H$  de SH2 pode ser visualizado na Figura 27 (pág. 103). A Tabela 22 (pág. 105) mostra os valores de deslocamento químico de cada hidrogênio e a sua comparação com dados da literatura para o composto 1 $\beta$ -peroxigermacra-4(15),5,10(14)-trieno (BOHLMANN, GUPTA, 1982).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH2 apresenta algumas diferenças significativas quando comparado ao espectro de RMN  $^1\text{H}$  de SH1, seu precursor, as quais evidenciam a presença de um grupamento hidroperóxido: em  $\delta = 4,13$  ppm (dd,  $J$  3,6 e 11,7 Hz), aparece um sinal característico de hidrogênio ligado a carbono vizinho a um oxigênio, atribuído ao H-1, correspondendo à estrutura parcial  $\text{HOO}-\text{C}-\text{H}$ . Além deste hidrogênio sofrer blindagem pela presença do grupamento  $-\text{OOH}$ , a multiplicidade e as constantes de acoplamento indicam a vizinhança de um grupamento metileno. O sinal na forma de duplo dublete com constantes de acoplamento ( $J$ ) diferenciadas é devido ao ângulo diedro formado entre H-1 e H-2a e entre H-1 e H-2b, que é em torno de  $180^\circ$  e  $45^\circ$ , com  $J$  11,7 e 3,6 Hz, respectivamente. Outra característica de um hidroperóxido é o singlete em  $\delta = 7,67$  ppm, correspondente ao hidrogênio do grupamento  $-\text{OOH}$ . Também pode-se constatar a presença de um grupamento exometilênico adicional, cujos hidrogênios aparecem com deslocamentos químicos em  $\delta = 5,32$  e  $5,19$  ppm, e em campo mais baixo, observa-se a ausência da absorção em  $\delta = 1,52$  ppm, que no caso de SH1 correspondia aos hidrogênios da metila 14.

Na análise de RMN  $^1\text{H}$  de SH2 (Figura 27) pode-se verificar, em campo baixo do espectro, a presença de seis sinais com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios olefínicos, e pela característica dos sinais, confirmam a presença de uma dupla ligação endocíclica e duas exocíclicas.

Os sinais em  $\delta = 6,02$  ppm (d,  $J$  15,8 Hz) e  $\delta = 5,44$  ppm (dd,  $J$  10,4 e 15,8 Hz) correspondem aos deslocamentos químicos dos hidrogênios 5 e 6, respectivamente; a maior desblindagem desses sinais indica que estão ligados aos carbonos de uma dupla ligação endocíclica. A constante de acoplamento de 15,8 Hz indica a configuração relativa *trans* entre H-5 e H-6.

Os dois singletes largos em  $\delta = 5,32$  ppm e  $\delta = 5,19$  ppm, característicos de hidrogênios olefínicos de um grupamento exometilênico, representam as absorções dos dois hidrogênios geminais H-14a e H-14b, respectivamente.

Os sinais que aparecem como singletes largos em  $\delta = 4,95$  ppm e  $\delta = 4,87$  ppm representam, respectivamente, as absorções dos dois hidrogênios olefínicos geminais H-15a e H-15b do segundo grupamento exometilênico da molécula.

Além das absorções já descritas, o espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto SH2 apresenta dois sinais intensos em campo alto do espectro. Os dois dubletes em  $\delta =$

0,90 ppm ( $J$  6,7 Hz) e  $\delta$ = 0,82 ppm ( $J$  6,8 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios das metilas diastereotópicas 13 e 12. Essas metilas não são equivalentes devido à ligação do fragmento isopropila ao carbono quiral (C7), levando assim à formação de dois sinais com deslocamentos químicos diferentes.

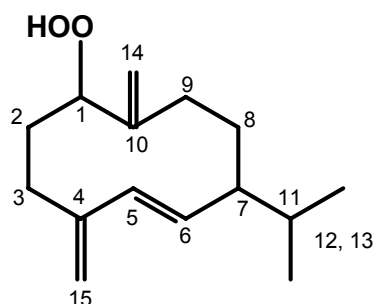
Os sinais correspondentes aos demais hidrogênios situam-se na região entre  $\delta$ = 1,4 ppm e  $\delta$ = 2,7 ppm, sendo os deslocamentos químicos característicos de hidrogênios localizados em regiões alifáticas e saturadas de moléculas orgânicas.

Os sinais dos hidrogênios H-8 ( $\delta$   $\cong$  1,65 ppm, multiplete) e H-11 ( $\delta$ = 1,50 ppm, septeto,  $J$  6,7 Hz) foram atribuídos considerando-se os sinais de integração e as semelhanças destes sinais, em comparação com os sinais correspondentes no espectro RMN  $^1\text{H}$  de SH1.

O sinal em  $\delta$ = 2,45 ppm (ddd,  $J$  5,0; 12,9 e 12,9 Hz) foi atribuído ao H-3a, por apresentar as mesmas características do sinal atribuído a um dos hidrogênios do carbono 3 por Bohlmann e Gupta (1982). Os multipletes em  $\delta$ = 2,25 ppm e  $\delta$ = 2,06 ppm foram atribuídos à H-3b e H-2 também com base nos dados apresentados por Bohlmann e Gupta (1982). Os sinais correspondentes aos hidrogênios H-7 e H-9 não puderam ser atribuídos, pois ensaios espectrométricos bidimensionais não foram realizados.

#### 4.4.4 Estrutura de SH2

O espectro de massas e de RMN confirmam a estrutura do germacreno-D-1-hidroperóxido (1 $\beta$ -peroxigermacra-4(15),5,10(14)-trieno) (Figura 29), com a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$ , para SH2.



**Figura 29 – Fórmula estrutural do germacreno-D-1-hidroperóxido (substância SH2)**

#### 4.5 Rendimento e composição dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*

##### 4.5.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os óleos essenciais obtidos não puderam ter seu volume determinado devido ao baixo rendimento e à pequena quantidade obtida. Desta forma o rendimento foi calculado relacionando a massa de óleo obtido com a massa vegetal fresca (m/m).

O rendimento dos óleos essenciais é apresentado na Tabela 23.

**Tabela 23 – Rendimento (m/m) dos óleos essenciais das partes aéreas floridas e frescas de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus***

| Espécie                       | Material vegetal fresco (g) | Quantidade de óleo essencial obtido (g) | Rendimento (%) |
|-------------------------------|-----------------------------|---|----------------|
| <i>Senecio heterotrichius</i> | 1132,58                     | 0,6066                                  | 0,054          |
| <i>S. ceratophylloides</i>    | 1480,53                     | 0,5339                                  | 0,036          |
| <i>S. leptolobus</i>          | 1147,03                     | 0,5017                                  | 0,044          |
| <i>S. oxyphyllus</i>          | 3360,27                     | 0,3763                                  | 0,011          |

##### 4.5.2 Composição química dos óleos essenciais

Os componentes dos óleos essenciais foram caracterizados após análise por CG-EM, sendo obtido o Índice de Kovat's e o padrão de fragmentação para cada substância, os quais foram comparados com dados da literatura (ADAMS, 2001) e com a espectroteca NIST 98, respectivamente.

A composição qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais pode ser visualizada na Tabela 24.

O cromatograma resultante da análise do óleo essencial do *Senecio heterotrichius* por CG-EM é mostrado na Figura 30. A porcentagem relativa com base nos íons totais (TIC) é apresentada na Tabela 24.



**Tabela 24 – Composição química qualitativa e quantitativa dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichus*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus***

| TR <sup>a</sup><br>(min) | Compostos <sup>b</sup>                         | IK <sub>calc.</sub> <sup>c</sup> | IK <sub>lit.</sub> <sup>d</sup> | % (área relativa) <sup>e</sup> |             |             |             |
|--------------------------|--|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                          |  |                                  |                                 | S. h. <sup>f</sup>             | S. c.       | S. l.       | S. o.       |
| 9,13                     | 1-noneno                                       | 891                              |                                 | 3,6                            | -           | -           | 2,4         |
| 10,73                    | α-pineno                                       | 931                              | 939                             | -                              | 1,1         | -           | 3,2         |
| 12,40                    | sabineno                                       | 971                              | 975                             | -                              | -           | 0,9         | -           |
| 12,55                    | β-pineno                                       | 975                              | 979                             | <b>8,3</b>                     | 1,3         | -           | <b>5,8</b>  |
| 13,16                    | mirceno  | 990                              | 991                             | <b>9,7</b>                     | 1,6         | -           | 2,0         |
| 13,78                    | α-felandreno                                   | 1005                             | 1003                            | -                              | -           | <b>3,2</b>  | 0,8         |
| 14,56                    | p-cimeno                                       | 1025                             | 1025                            | -                              | -           | 0,8         | -           |
| 14,76                    | β-felandreno                                   | 1030                             | 1030                            | 2,6                            | 1,3         | -           | 1,8         |
| 15,06                    | (Z)-β-ocimeno                                  | 1037                             | 1037                            | 4,2                            | -           | -           | -           |
| 15,48                    | (E)-β-ocimeno                                  | 1048                             | 1050                            | 7,2                            | <b>6,6</b>  | <b>3,7</b>  | 4,1         |
| 26,01                    | δ-elemeno                                      | 1334                             | 1338                            | -                              | 0,3         | -           | -           |
| 26,49                    | α-longipineno                                  | 1349                             | 1353                            | -                              | -           | -           | 1,2         |
| 27,36                    | α-copaeno                                      | 1375                             | 1377                            | -                              | -           | -           | 2,5         |
| 27,82                    | β-elemeno                                      | 1389                             | 1391                            | -                              | -           | 0,7         | 3,8         |
| 28,78                    | β-cariofileno                                  | 1419                             | 1419                            | <b>8,7</b>                     | 3,5         | <b>7,2</b>  | <b>10,7</b> |
| 29,92                    | α-humuleno                                     | 1455                             | 1455                            | 1,5                            | 1,7         | 2,4         | 2,0         |
| 30,54                    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 1475                             |                                 | 0,5                            | -           | -           | -           |
| 30,64                    | γ-curcumeno                                    | 1478                             | 1483                            | -                              | 2,5         | -           | 1,5         |
| 30,75                    | germacreno D                                   | 1481                             | 1485                            | <b>21,7</b>                    | <b>24,6</b> | <b>56,7</b> | <b>31,4</b> |
| 30,92                    | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub>                | 1487                             |                                 | -                              | -           | -           | 2,5         |
| 31,17                    | biciclogermacreno                              | 1495                             | 1500                            | <b>22,4</b>                    | 2,5         | <b>16</b>   | <b>11,9</b> |
| 31,26                    | α-muuroleno                                    | 1498                             | 1500                            | -                              | 1,9         | -           | 2,7         |
| 31,53                    | germacreno A                                   | 1507                             | 1509                            | -                              | -           | 0,7         | <b>6,1</b>  |
| 31,71                    | γ-cadineno                                     | 1513                             | 1514                            | -                              | 1,1         | -           | -           |
| 31,85                    | δ-cadineno                                     | 1518                             | 1523                            | 1,8                            | <b>8,7</b>  | 1,2         | 2,7         |
| 32,42                    | α-cadineno                                     | 1537                             | 1539                            | -                              | 2,3         | -           | -           |
| 33,07                    | germacreno B                                   | 1559                             | 1561                            | -                              | 4,9         | -           | -           |
| 33,65                    | germacreno D-4-ol                              | 1578                             | 1576                            | -                              | 4,6         | -           | -           |
| 33,66                    | espatulenol                                    | 1579                             | 1578                            | 1,9                            | -           | 2,5         | -           |
| 33,79                    | óxido de cariofileno                           | 1583                             | 1583                            | 0,6                            | -           | -           | -           |
| 33,93                    | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 1588                             |                                 | 0,9                            | -           | -           | -           |
| 34,18                    | viridiflorol                                   | 1596                             | 1593                            | 1,2                            | 0,5         | -           | -           |
| 34,46                    | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 1606                             |                                 | -                              | 2,1         | -           | -           |
| 34,95                    | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 1623                             |                                 | -                              | 0,5         | -           | -           |
| 35,12                    | 1-epi-cubenol                                  | 1629                             | 1629                            | -                              | 0,7         | -           | -           |
| 35,60                    | epi-α-muurolol                                 | 1646                             | 1642                            | -                              | <b>10,6</b> | -           | -           |
| 35,59                    | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> O              | 1646                             |                                 | 1,4                            | -           | -           | -           |
| 35,93                    | α-cadinol                                      | 1658                             | 1654                            | 1,8                            | <b>15,1</b> | 1,3         | -           |
| 40,94                    | C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O              | 1845                             |                                 | -                              | -           | 1,8         | -           |
| 41,71                    | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub> | 1876                             |                                 | -                              | -           | 0,9         | -           |
| 51,46                    | n-tricosano                                    | 2300                             | 2300                            | -                              | -           | -           | 0,9         |

|                              |             |             |             |             |
|------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Monoterpenos                 | 32,0        | 11,9        | 8,6         | 17,7        |
| Monoterpenóides oxigenados   | 0,0         | 0,0         | 0,0         | 0,0         |
| Sesquiterpenos               | 56,6        | 54,0        | 84,9        | 79,0        |
| Sesquiterpenóides oxigenados | 7,8         | 34,1        | 6,5         | 0,0         |
| Outros                       | 3,6         | 0,0         | 0,0         | 3,3         |
| Total identificado           | <b>97,2</b> | <b>97,4</b> | <b>97,3</b> | <b>97,5</b> |

<sup>a</sup> Tempo de retenção na coluna HP-5MS utilizando os parâmetros descritos no item 3.1

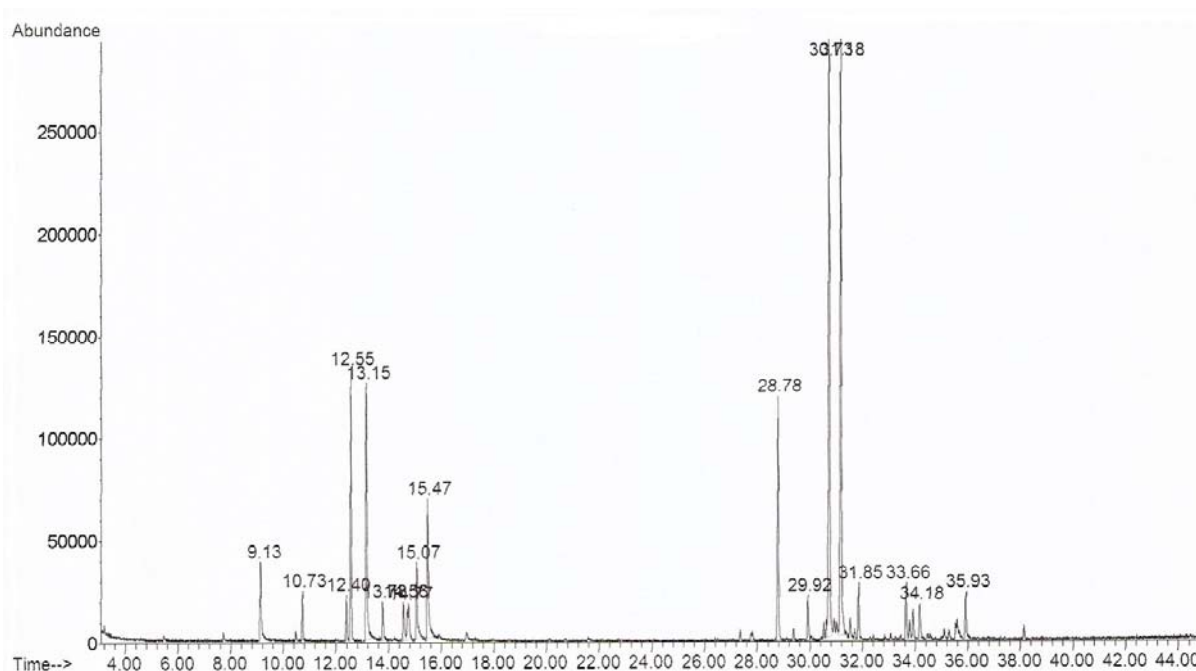
<sup>b</sup> Compostos listados em ordem de eluição

<sup>c</sup>  $IK_{calc.}$ : Índice de Kovat's calculado para a coluna HP-5MS

<sup>d</sup>  $IK_{lit.}$ : Índice de Kovat's da literatura para coluna DB-5 (ADAMS, 2001)

<sup>e</sup> Porcentagem relativa com base nos íons totais (TIC); depende da característica do composto, não sendo uma quantificação verdadeira.

<sup>f</sup> **S. h.:** *Senecio heterotrichius*; **S. c.:** *Senecio ceratophylloides*; **S. l.:** *Senecio leptolobus*; **S. o.:** *Senecio oxyphyllus*



**Figura 30 – Cromatograma resultante da análise por CG-EM do óleo essencial de *Senecio heterotrichius*. Porcentagem relativa com base nos íons totais (TIC)**

## 4.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

### 4.6.1 Extratos diclorometânico e etanólico de *Senecio heterotrichius*

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânico e etanólico de *Senecio heterotrichius* são mostrados na Tabela 25.

**Tabela 25 – Resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânico e etanólico de *Senecio heterotrichius***

| Microrganismos                             | Extrato diclorometânico<br>CIM (mg/mL) | Extrato etanólico<br>CIM (mg/mL) |
|--|--|----------------------------------|
| <i>Candida albicans</i><br>ATCC 44373      | > 5                                    | > 5                              |
| <i>C. dubliniensis</i> *                   | > 5                                    | > 5                              |
| <i>C. lusitanae</i> *                      | > 5                                    | > 5                              |
| <i>C. krusei</i> *                         | <b>0,25</b>                            | > 5                              |
| <i>C. parapsilosis</i> *                   | > 5                                    | > 5                              |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922      | > 5                                    | > 5                              |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923 | <b>2,5</b>                             | > 5                              |

\* isolado clínico

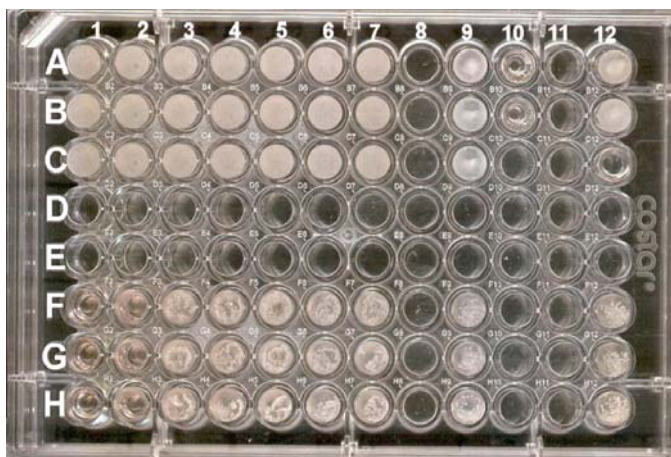
#### 4.6.2 Substância isolada SH2 (derivado de SH1)

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana de SH2 (germacreno-D-1-hidroperóxido) são mostrados na Tabela 26, e a atividade frente *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida tropicalis* pode ser conferida na Figura 31.

**Tabela 26 – Resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana de SH2 (germacreno-D-1-hidroperóxido)**

| Microrganismos                               | SH2<br>CIM (mg/mL)   |
|--|--|
| <i>Candida tropicalis</i> *                  | > 5  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>ATCC 2601 | <b>2,5</b>   |
| <i>Prototheca zopfii</i> *                   | <b>5 (inibição parcial de 80%)<br/>2,5 (inibição parcial de 50%)</b> |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922        | > 5  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27850  | > 5  |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923   | > 5  |

\* isolado clínico



**Figura 31 – Avaliação da atividade antimicrobiana de SH2 frente *C. tropicalis* (linhas A-C) e *S. cerevisiae* (linhas F-H). A coluna 1 apresenta a maior concentração da amostra, a qual vai decrescendo até a coluna 7 (5; 2,5; 1; 0,5; 0,25; 0,05 e 0,025 mg/mL). As cavidades isoladas à direita são o controle positivo. Na coluna 10 encontram-se duas cavidades de controle negativo**

#### 4.6.3 Óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos 4 óleos essenciais testados são apresentados na Tabela 27.

**Tabela 27 – Resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus***

| Microorganismos                              | Concentração dos óleos essenciais (mg/mL) |                      |                      |                            |            |            |                      |            |            |                      |            |         |
|--|---|----------------------|----------------------|----------------------------|------------|------------|----------------------|------------|------------|----------------------|------------|---------|
|  | <i>Senecio heterotrichius</i>             |                      |                      | <i>S. ceratophylloides</i> |            |            | <i>S. leptolobus</i> |            |            | <i>S. oxyphyllus</i> |            |         |
|  | CIM <sup>a</sup>                          | CIM 50% <sup>b</sup> | CBM/CFM <sup>c</sup> | CIM                        | CIM 50%    | CBM/CFM    | CIM                  | CIM 50%    | CBM/CFM    | CIM                  | CIM 50%    | CBM/CFM |
| <i>Candida albicans</i><br>ATCC 28367        | > 6,6                                     | no <sup>d</sup>      | nr <sup>e</sup>      | > 6,6                      | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr      |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>ATCC 2601 | > 6,6                                     | no                   | nr                   | > 6,6                      | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr      |
| <i>Prototheca zopfii</i><br>ATCC 461         | > 6,6                                     | no                   | nr                   | > 6,6                      | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr      |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923   | > 6,6                                     | <b>3,3</b>           | nr                   | <b>6,6</b>                 | <b>0,8</b> | <b>6,6</b> | <b>6,6</b>           | <b>3,3</b> | <b>6,6</b> | > 6,6                | <b>6,6</b> | nr      |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25792        | > 6,6                                     | no                   | nr                   | > 6,6                      | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr         | > 6,6                | no         | nr      |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27853  | > 6,6                                     | no                   | nr                   | <b>3,3</b>                 | <b>0,2</b> | <b>3,3</b> | <b>6,6</b>           | <b>3,3</b> | <b>6,6</b> | > 6,6                | <b>1,6</b> | nr      |

**a:** CIM = concentração inibitória mínima; **b:** CIM 50% = concentração inibitória mínima de 50%, capaz de inibir parcialmente 50% do crescimento microbiano; **c:** CBM = concentração bactericida mínima, CFM = concentração fungicida mínima; **d:** no = não-observado; **e:** nr = não-realizado.

## 5 DISCUSSÃO

As plantas apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários com características estruturais e atividades biológicas diversas, possuindo um importante papel na interação das plantas com o ambiente (VERPOORTE, 1998), proporcionando vantagens ecológicas ao vegetal e servindo como indicadores da evolução. Estes também podem ser utilizados para diferenciar espécies e gêneros, pois normalmente uma espécie ou um grupo de espécies apresentam metabólitos secundários característicos.

Dentre a diversidade de constituintes presentes em cada planta, há diferentes grupos de substâncias, que são classificadas conforme suas características físicas e químicas e, principalmente, pela sua origem biossintética. Estas classes de constituintes são obtidas das plantas de acordo com a metodologia empregada e o tipo de extração ao qual a mesma é submetida.

Como a composição química das plantas é extremamente complexa, muito frequentemente ocorre a extração concomitante de vários grupos de substâncias, biologicamente ativas ou não, desejadas ou não. Por exemplo, o diclorometano extrai preferencialmente bases livres de alcalóides, antraquinonas livres, óleos essenciais, glicosídeos cardiotônicos, entre outros; já o etanol extrai preferencialmente heterosídeos em geral (FALKENBERG et al., 2003).

A obtenção dos extratos, suas frações ou constituintes isolados varia de acordo com as características dos mesmos, sendo que, para a extração, devem ser utilizados solventes adequados às suas características de polaridade. Deste modo, compostos como os terpenóides de baixo peso molecular podem ser obtidos mediante extração com diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

Portanto, justifica-se a utilização deste solvente no preparo do extrato das partes aéreas de *S. heterotrichius*, na busca por terpenóides. Os resultados deste trabalho comprovam que os terpenóides de baixa polaridade são extraídos pela maceração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . O perfil do extrato diclorometânico ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) em CCD indica a presença desta classe de constituintes, além de pigmentos e ceras vegetais, compostos que também são extraídos por este solvente, entre outras substâncias.

No processo de extração por maceração procurou-se utilizar solventes relativamente inertes e voláteis ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e EtOH), a fim de minimizar a formação de

artefatos durante o processo extrativo e facilitar a eliminação do solvente durante a concentração dos macerados.

A utilização de cromatografia em coluna sobre gel de sílica impregnado com solução aquosa de nitrato de prata a 10% ( $\text{AgNO}_3$ ), teve por objetivo aumentar a eficiência de separação das substâncias no fracionamento de frações de menor polaridade, as quais são normalmente constituídas por hidrocarbonetos terpênicos contendo uma ou mais ligações duplas. Um grande número de trabalhos mostra a eficiência desta metodologia na separação de vários terpenos, inclusive de isômeros (STAHL, 1969; RÜCKER et al., 1999; WILLIAMS, MANDER, 2001).

O método tem por base a complexação dos íons prata (aceptores de elétrons  $\pi$ ) com ligações duplas e triplas de alquenos e alquinos (doadores de elétrons  $\pi$ ). A maior ou menor disponibilidade dos elétrons dessas ligações fará com que os terpenos sejam diferencialmente retidos pelo  $\text{AgNO}_3$ , e portanto, eluídos separadamente. Aqueles compostos com maior número de ligações duplas ficarão mais retidos na fase estacionária, sendo os compostos com menor número de ligações duplas eluídos por primeiro. Além do número de ligações duplas, a velocidade de eluição também é influenciada pela posição destas ligações (STAHL, 1969; BROCHINI et al., 1999; WILLIAMS, MANDER, 2001).

A utilização de gel de sílica impregnado com  $\text{AgNO}_3$  mostrou-se eficiente no isolamento do germacreno D a partir de uma fração contendo vários outros terpenóides, principalmente sesquiterpenóides, sendo de fundamental importância a presença de três insaturações na molécula para o êxito no processo de fracionamento utilizando esta técnica.

O inconveniente deste método, é que muitas vezes, reações de oxidação, redução, esterificação, entre outras, podem ser ativadas em sistemas utilizando gel de sílica impregnado com  $\text{AgNO}_3$ , levando à formação de artefatos (WILLIAMS, MANDER, 2001). Uma reação inesperada que pode acontecer é a conversão de hidroperóxidos em cetonas (RÜCKER et al., 1997). Este fato justifica a não utilização desta fase estacionária no isolamento dos peróxidos, entre eles, os hidroperóxidos obtidos na reação de derivatização do germacreno D.

O germacreno D, isolado do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *S. heterotrichius*, é um constituinte sesquiterpênico muito freqüente nos vegetais, principalmente em óleos essenciais, sendo produzido também por fungos, bactérias e invertebrados marinhos (PICAUD et al., 2006). Este composto apresenta uma estrutura cíclica com 15

átomos de carbono e 3 duplas ligações, sendo duas pertencentes ao anel e uma dupla ligação exometilênica (Figura 22, pág. 97).

Comparando-se o extrato EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *S. heterotrichius* através de CCD, pôde-se verificar que o germacreno D também estava presente no primeiro extrato, sendo sua quantidade bem inferior àquela presente no extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Uma possível explicação para este fato, seria a ineficiência do processo de maceração inicial em diclorometano de extrair totalmente o germacreno D do material vegetal, associada à capacidade do etanol 95% em extrair este composto.

Para o germacreno D é relatada atividade inibidora do apetite de larvas da mariposa *Thaumetopoea pityocampa* (PETRAKIS et al., 2005), inibidora da produção de óxido nítrico em macrófagos ativados (MATSUDA et al., 1999) e tripanossomicida *in vitro* (BIAVATTI et al., 2001). Também é descrita a ausência de citotoxicidade frente *Artemia salina* (BIAVATTI et al., 2001) e ausência de atividade antimicrobiana frente diferentes microrganismos (BIAVATTI et al., 2001; DEUSCHLE, 2003; DEUSCHLE et al., no prelo).

O germacreno D também é reconhecido como um estimulante sexual de machos de duas espécies de barata (*Periplaneta americana* e *P. japonica*) (KITAMURA et al., 1976), estimulante da ovoposição da mariposa *Diaphania nitidalis* Stoll. (PETERSON et al., 1994) e parece estar envolvido no reconhecimento da planta hospedeira pelo besouro do tomate (*Leptinotarsa decemlineata* Say) (WEISSBECKER et al., 1997).

Este sesquiterpeno já foi isolado de várias espécies de *Senecio*, principalmente de partes aéreas, mas até o momento sua presença não havia sido descrita em *S. heterotrichius*, sendo este o primeiro relato a respeito do isolamento do germacreno D para esta espécie de *Senecio*.

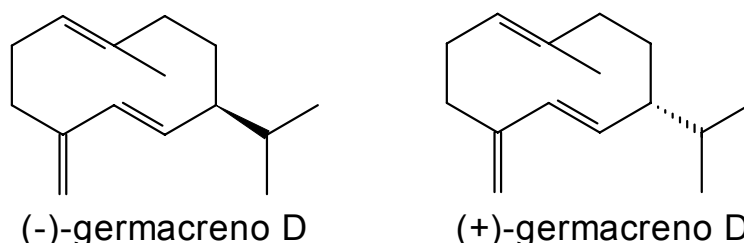
Até o momento, foram encontrados relatos da presença de germacreno D em *Senecio vitalis* N. E. Br. (BOHLMANN, ZIESCHE, 1980), *S. trichopterygius* Muscher (BOHLMANN et al., 1980), *S. jacobaea* L. (DOOREN et al., 1981), *S. implexus* Bally (BOHLMANN et al., 1981d), *S. macrotis* Baker (BOHLMANN et al., 1981c), *S. glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler (BOHLMANN, GUPTA, 1982), *S. lydenburgensis* Hutch. et Burt Davy (BOHLMANN, BAPUJI, 1982), *S. pleistocephalus* S. Moore, *S. coronatus* (Thunb.) Harv. (BOHLMANN, ZDERO, 1982a), *S. microglossus* DC. (BOHLMANN et al., 1983), *S. brasiliensis* (Spreng.) Less., *S. venosus* Harv. (BOHLMANN et al., 1985), *S. desfontainei* Druce



(METWALLY, DAWIDAR, 1986), *S. discolor* (Sw.) DC., *S. richii* A. Gray, *S. variabilis* Sch. Bip. (BOHLMANN et al., 1986), *S. philippicus* Regel et Koern., *S. subumbellatus* Phil. (JAKUPOVIC et al., 1991), *S. desiderabilis* Vellozo (DEUSCHLE, 2003), *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (BOHLMANN, ZDERO, 1982b), *S. platensis* Arech (BOLZAN et al., 2005), *S. bonariensis* Hook. et Arn. (SILVA, 2006) e *S. crassiflorus* (Poir.) DC. var. *crassiflorus* (MURARI et al., 2006).

A ocorrência freqüente do germacreno D no gênero *Senecio* pode ser explicada pelo fato deste composto ser um intermediário comum na biossíntese de outros hidrocarbonetos sesquiterpênicos, que por sua vez, dão origem a derivados de estruturas mais complexas (YOSHIHARA et al., 1969; STEELE et al., 1998; BÜLLOW, KÖNIG, 2000).

Como a maioria dos sesquiterpenóides existentes na natureza, o germacreno D é uma molécula quiral, existindo na forma de dois enantiômeros, (+) e (-) (KOENIG, 2001) (Figura 32). Na maioria das plantas superiores, está presente o enantiômero (-), enquanto que o enantiômero (+) é encontrado em organismos inferiores; entretanto, em algumas espécies ambos os enantiômeros são descritos (BÜLOW, KÖNIG, 2000; PROSSER et al., 2002; STELIOPOULOS et al., 2002). Este composto é biossintetizado a partir do precursor difosfato de farnesila, através da catálise por sesquiterpeno-sintases (ciclases). Cada enantiômero é biossintetizado por uma rota metabólica diferente, que requer diferentes enzimas enantioespecíficas (SCHMIDT et al., 1999; HUNTINGTON, KINNEL, 2006). Segundo Bülow e König (2000), a composição enantiomérica também pode variar de acordo com a parte da planta avaliada e o local de coleta.



**Figura 32 – Enantiômeros do germacreno D (Adaptado de STELIOPOULOS et al., 2002)**

Estudos visando a determinação e/ou quantificação do enantiômero do germacreno D isolado de *S. heterotrichius*, não foram realizados.

O estudo da quiralidade de moléculas orgânicas é um dos critérios mais importantes da atividade biológica, pois metade de todos os produtos químicos ativos possuem um centro quiral (OHLOFF, 1994 *apud* STRANDEN et al., 2002). Este fato pode ser evidenciado pelos diferentes efeitos apresentados pelos enantiômeros (-) e (+) do germacreno D no comportamento de insetos.

Estudos realizados por Mozuraitis et al. (2002) evidenciaram que o (-)-germacreno D provoca um aumento da atração e da oviposição de fêmeas de *Heliothis virescens*, uma mariposa que aparece em cultivos de tabaco e que, na forma larval, alimenta-se deste.

Para as mariposas de *Helicoverpa armigera*, foi identificado um tipo de receptor neuronal, sendo que o mesmo demonstrou alta sensibilidade e seletividade ao germacreno D. Neste caso, os neurônios responderam a ambos os enantiômeros, porém o enantiômero (-), mais freqüente nos vegetais superiores, apresentou um efeito estimulante 10 vezes maior que o enantiômero (+) (STRANDEN et al., 2002).

Stranden et al. (2003) concluíram que os principais receptores olfativos neuronais das mariposas respondem ao (-)-germacreno D, principalmente em *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa assulta*. As importantes propriedades deste composto na estimulação dos neurônios estão relacionadas ao seu sistema anelar de 10 membros e às três duplas ligações, que agem como centros ricos em elétrons. Somado a isto, há o grupamento isopropil, responsável pelos diferentes efeitos dos dois enantiômeros.

A importância dos compostos voláteis liberados pelas plantas na interação com insetos e outros organismos é evidente, sendo que a atração de insetos, mediada por estes constituintes pode ser, em alguns casos, vantajoso para a planta, como por exemplo na polinização; mas também pode ser perigoso, uma vez que pode atrair insetos fitófagos.

Até o presente, a maioria dos peróxidos de origem natural conhecidos foram isolados de plantas da família Asteraceae, sendo que somente um pequeno número destes teve suas atividades biológicas investigadas (TOLSTIKOV et al., 1996; RÜCKER, 1997).

Os peróxidos naturais, em geral, possuem alta instabilidade e curta vida metabólica, o que dificulta seu isolamento e avaliação de atividade biológica. No

entanto, alguns peróxidos são bastante estáveis, como por exemplo, o ascaridol e a artemisinina (TOLSTIKOV et al., 1996).

Devido à instabilidade de alguns peróxidos durante processos cromatográficos, estes podem ser obtidos de maneira indireta, através do isolamento de seu precursor no vegetal, seguido por um processo de semi-síntese. Desta maneira os peróxidos podem ser obtidos em quantidade suficiente, sendo assim possível avaliar suas atividades biológicas.

Através da reação de derivatização por foto-oxidação do germacreno D, utilizando o corante Rosa de Bengala como agente sensibilizante, foi obtido o germacreno-D-1-hidroperóxido como principal produto formado, apresentando um rendimento de 21,5%. Este composto foi caracterizado espectroscopicamente e posteriormente avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana.

Como os peróxidos de origem natural, entre eles os encontrados no gênero *Senecio*, são em sua maior parte mono e sesquiterpenóides, e as substâncias precursoras de peróxidos são olefinas, constituintes comuns de óleos essenciais (CASTEEL, 1992; TOLSTIKOV et al., 1996), espera-se que o germacreno-D-1-hidroperóxido possa ser naturalmente produzido por *S. heterotrichius*, mesmo que em baixas concentrações.

Este hidroperóxido, derivado do germacreno D, já foi isolado das partes aéreas de *Senecio glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler por Bohlmann e Gupta (1982). No entanto, nenhum relato de atividade biológica foi encontrado na literatura. Assim, a semi-síntese deste composto em maiores quantidades permitiu avaliar sua atividade antimicrobiana.

Um dos métodos utilizados na semi-síntese de peróxidos envolve a oxidação do precursor por oxigênio singlete através de uma reação de foto-oxidação (TOLSTIKOV et al., 1996). Este tipo de reação também é utilizado na modificação de compostos isolados de fontes naturais, no intuito de se descobrir novos compostos ativos, com maior potencial farmacológico e com menos efeitos adversos.

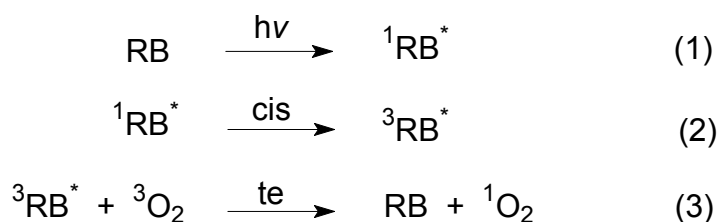
Nas reações de foto-oxidação, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) é produzido por sensibilização, isto é, por transferência de energia de uma molécula sensibilizadora eletronicamente excitada para o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ). Estas reações estão entre os principais processos envolvidos na degradação de materiais orgânicos de todos os tipos, sendo realizadas sob a ação combinada de luz e oxigênio (BRAUN, OLIVEROS, 1990).

Embora existam muitas fontes de  $^1\text{O}_2$ , sua formação por fotossensibilização utilizando corantes, continua sendo o método de escolha em aplicações relacionadas à síntese e mecanismos de reação (MEMARIAN et al., 2006). Nos vegetais, o  $^1\text{O}_2$  é produzido nas folhas pela interação do oxigênio molecular com a clorofila em seu estado triplete, a qual é formada sob condições de excessiva excitação, fato que ocorre sob alta intensidade de luz solar (AFFEK, YAKIR, 2002).

O corante Rosa de Bengala, utilizado neste trabalho, é um fotossensibilizador que produz  $^1\text{O}_2$  ao absorver a luz verde na presença de oxigênio (AFFEK, YAKIR, 2002; MILLER, 2005), caracterizando uma reação de fotossensibilização do Tipo II. A desvantagem do uso de corantes é a sua baixa estabilidade (autodegradação durante a irradiação) e a dificuldade em removê-los da mistura reacional após a reação (GUTIERREZ, GARCIA, 1998; MILLER, 2005).

Na Figura 33 pode ser visualizada uma representação esquemática dos passos reacionais envolvidos na formação de oxigênio singlete tendo o corante Rosa de Bengala como agente sensibilizante.

A absorção de fótons de luz pelo corante Rosa de Bengala (RB) resulta na sua excitação até seu estado singlete, o qual possui um tempo de vida muito curto ( $10^{-6}$ - $10^{-8}$  segundos) (reação 1). O RB em seu estado singlete excitado, através de um cruzamento intersistema envolvendo a inversão de spin, passa para o estado triplete excitado com maior tempo de vida (cerca de  $10^{-3}$  segundos) (reação 2). Este transfere sua energia para o oxigênio molecular ( $^3\text{O}_2$ ), resultando na formação de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) e na regeneração do estado fundamental do RB (reação 3) (KNOX, DODGE, 1985; BRAUN, OLIVEROS, 1990; MILLER, 2005) (Figura 33).

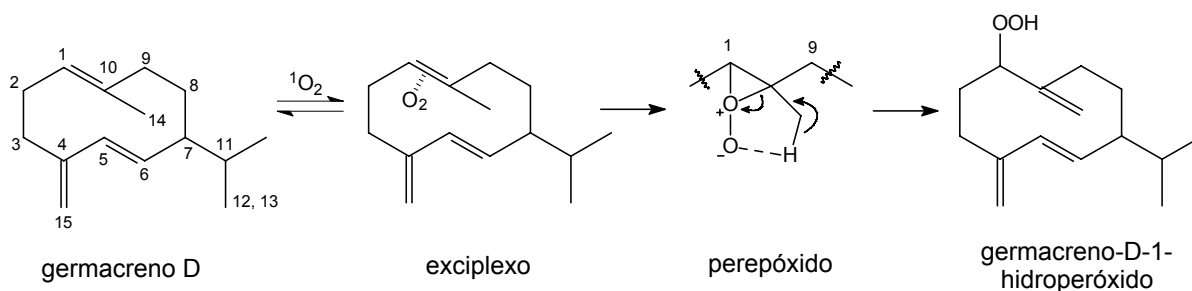


**Figura 33 – Esquema mostrando a formação de oxigênio singlete a partir do corante Rosa de Bengala (RB). hv: fótons de luz; cis: cruzamento intersistema; te: transferência de energia (Adaptado de KNOX, DODGE, 1985; BRAUN, OLIVEROS, 1990; MILLER, 2005)**

A natureza eletrofílica do  $^1\text{O}_2$  resulta em reações com compostos contendo duplas ligações substituídas ou ricos em elétrons (FOOTE, 1976 *apud* KNOX, DODGE, 1985). Desta maneira, o  $^1\text{O}_2$  altamente reativo formado pelo corante Rosa de Bengala eletronicamente excitado, conforme reação apresentada anteriormente, reage com o alqueno germacreno D, através de uma reação do tipo ENE, formando assim o germacreno-D-1-hidroperóxido.

O mecanismo da reação de foto-oxidação para o germacreno D é apresentado na Figura 34, e foi baseado nos dados apresentados por Clennan e Pace (2005).

Inicialmente ocorre a adição de  $^1\text{O}_2$  à dupla ligação endocíclica entre C1 e C10 produzindo um complexo intermediário (exciplexo) que, em seguida, transforma-se em um perepóxido e abstrai um átomo de hidrogênio em posição alílica do C14; após um rearranjo, forma-se então o germacreno-D-1-hidroperóxido, um hidroperóxido  $\alpha,\beta$ -insaturado (alílico).

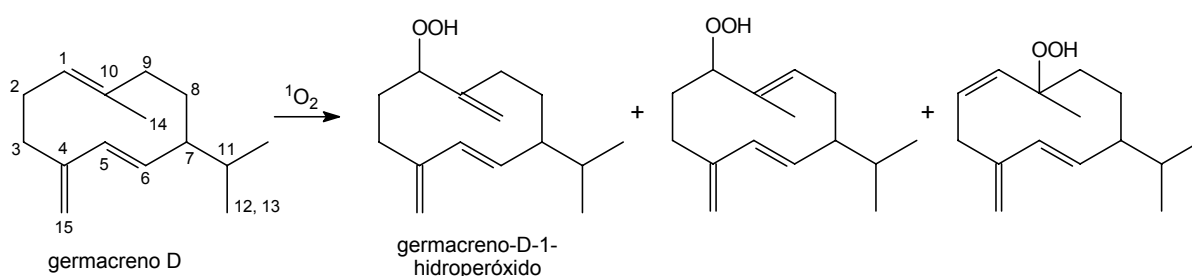


**Figura 34 – Foto-oxidação do germacreno D através de uma reação do tipo ENE, resultando no germacreno-D-1-hidroperóxido**

Segundo Clennan e Pace (2005), os pontos chaves da reação incluem: (1) o oxigênio singlete como o componente eletrofílico e o alqueno como o componente nucleofílico da reação, (2) um processo suprafacial envolvendo a adição de oxigênio e a remoção de hidrogênio da mesma face do alqueno, (3) somente os hidrogênios com orientação espacial adequada são submetidos à abstração, (4) a abstração do hidrogênio ocorre preferencialmente no lado do alqueno onde há maior número de hidrogênios, fenômeno conhecido como efeito *cis*, e (5) as interações entre o hidrogênio e o oxigênio externo do perepóxido podem prever o produto formado.

Conforme os resultados apresentados na literatura para reações de foto-oxidação (CLENNAN, 2000; SKÖLD et al., 2006), é esperada na reação de derivatização do germacreno D a formação de outros hidroperóxidos alílicos além do germacreno-D-1-hidroperóxido. Este fato pôde ser evidenciado durante o acompanhamento do processo de isolamento do germacreno-D-1-hidroperóxido da mistura reacional, onde, através de CCD, foi possível verificar a presença de outros hidroperóxidos em menor quantidade. O baixo rendimento destes hidroperóxidos na reação não permitiu sua identificação.

Uma sugestão de estrutura para os outros possíveis hidroperóxidos formados podem ser visualizada na Figura 35.



**Figura 35 – Possíveis hidroperóxidos formados na reação de foto-oxidação do germacreno D**

Através da Figura 35, pode-se observar que a reação de peroxidação ocorre sempre na dupla ligação entre os carbonos 1 e 10, caracterizando uma reação regioseletiva. Isto ocorre, provavelmente, devido ao efeito indutivo positivo da metila ligada ao carbono 10, aumentando assim a nucleofilicidade desta dupla ligação.

Uma vez que na reação de foto-oxidação ocorre a adição de oxigênio singlete e a abstração de um hidrogênio do carbono 14 num processo suprafacial (Figura 34), é esperado para o grupamento hidroperóxido uma orientação espacial mais próxima possível do grupamento metilênico ligado ao carbono 10.

Possíveis explicações para o fato do germacreno-D-1-hidroperóxido ser o produto formado em maior quantidade na reação de foto-oxidação, é o alinhamento espacial do hidrogênio do carbono 14 do germacreno D em relação ao oxigênio externo do peróxido, o efeito de posição *cis* e a disponibilidade de um maior número de hidrogênios ligados a esse carbono, o que facilita a sua abstração. A

abstração dos hidrogênios dos carbonos 2 e 9 também pode ocorrer, mas este processo é menos favorecido, ocorrendo em menor proporção durante a reação.

Além dos hidroperóxidos formados, pôde-se também verificar através da análise por CCD da mistura reacional (Figura 23, pág. 98), a presença de duas manchas adicionais além daquelas características do germacreno D e dos hidroperóxidos formados, caracterizando a formação de subprodutos durante a reação. Estes podem ser também produtos de degradação dos hidroperóxidos, como álcoois, epóxidos, cetonas e/ou aldeídos (SKÖLD et al., 2006), pois estes compostos não apresentaram reação positiva frente ao reagente específico para peróxidos e o  $R_f$  apresentado por eles é intermediário aos  $R_f$ 's apresentados pelo germacreno D e os hidroperóxidos formados, mostrando que possuem uma polaridade intermediária.

Apesar do gênero *Senecio* possuir mais de 2000 espécies (CABRERA, KLEIN, 1975), são poucos os estudos que procuram verificar a composição e a atividade biológica dos óleos essenciais das plantas deste gênero.

Em relação à análise qualitativa, foi possível identificar aproximadamente 97% dos constituintes dos óleos essenciais de *S. heterotichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*, através da análise por CG-EM, determinação do Índice de Kovat's e comparação destes com dados da literatura.

Algumas diferenças qualitativas e quantitativas podem ser observadas na composição dos óleos essenciais destas quatro espécies de *Senecio*. De maneira geral, estes óleos caracterizam-se pela presença de mono e sesquiterpenóides, sendo estes últimos da série cíclica; por apresentarem sesquiterpenóides como constituintes majoritários e; por não apresentarem monoterpenóides oxigenados em sua constituição (Tabela 24, pág. 112).

Estes dados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, onde é relatada a presença de monoterpenóides, entre eles  $\alpha$  e  $\beta$ -pineno, e sesquiterpenóides, entre eles o germacreno D, como compostos característicos de óleos essenciais de Asteraceas (ALVAREZ-CASTELLANOS, PASCUAL-VILLALOBOS, 2003).

O óleo essencial de *S. heterotichius*, constituído por 18 compostos (Tabela 24, pág. 112), apresenta como principais constituintes: biciclogermacreno (22,4%), germacreno D (21,7%), mirceno (9,7%),  $\beta$ -cariofileno (8,7%) e  $\beta$ -pineno (8,3%). Para o óleo essencial de *S. ceratophylloides*, constituído por 23 compostos, os principais

constituintes encontrados foram: germacreno D (24,6%),  $\alpha$ -cadinol (15,1%), epi- $\alpha$ -muurolol (10,6%),  $\delta$ -cadineno (8,7%) e (*E*)- $\beta$ -ocimeno (6,6%). Em relação aos sesquiterpenóides, esta é a espécie que apresenta maior quantidade de derivados oxigenados (34,1%). Para o óleo essencial de *S. leptolobus*, constituído por 15 compostos, os principais constituintes encontrados foram: germacreno D (56,7%), bibiclogermacreno (16%),  $\beta$ -cariofileno (7,2%), (*E*)- $\beta$ -ocimeno (3,7%) e  $\alpha$ -felandreno (3,2%). Entre as quatro espécies estudadas, esta última é a que apresenta a maior quantidade de sesquiterpenóides na composição de seu óleo essencial (91,4%). Já para o óleo essencial de *S. oxyphyllus*, constituído por 20 compostos, os principais constituintes encontrados foram: germacreno D (31,4%), bibiclogermacreno (11,9%),  $\beta$ -cariofileno (10,7%), germacreno A (6,1%) e  $\beta$ -pineno (5,8%). Este foi o único óleo que não apresentou sesquiterpenóides oxigenados em sua constituição.

A presença de sesquiterpenóides oxigenados no óleo essencial extraído por hidrodestilação é uma característica que poderia ser utilizada para diferenciar a espécie *S. heterotrichus* de *S. oxyphyllus*, já que apenas a primeira apresentou este grupo de compostos. Esta é uma constatação importante, pois considerando apenas as características morfoanatómicas, a diferenciação destas espécies é problemática e confusa, podendo levar a uma identificação errônea da planta.

No entanto, deve ser levado em consideração que as duas espécies não foram coletadas no mesmo local e, por este motivo, não é possível afirmar com certeza que a presença de sesquiterpenóides oxigenados no óleo essencial possa ser utilizada para diferenciá-las, já que vários trabalhos comprovam a influência dos fatores ambientais ou abióticos (solo, luz, temperatura, umidade, etc.) na composição de óleos essenciais (LIMA et al., 2003).

Em relação aos monoterpenóides, os óleos essenciais de *S. heterotrichus* e *S. ceratophylloides* caracterizaram-se quantitativamente pela presença de compostos da série acíclica, enquanto que os óleos de *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*, pela presença de compostos da série cíclica.

Todos os óleos apresentaram sesquiterpenóides como principais constituintes, e entre eles, o germacreno D aparece como um dos presentes em maior proporção. Mas sabe-se que, a quantidade de germacreno D pode variar nas plantas de acordo com condições sazonais e parte da planta analisada (KITAMURA et al., 1976). Este composto já foi isolado de muitas outras espécies de *Senecio*,



mas a sua presença foi relatada apenas no óleo essencial de *S. jacobea*, *S. vulgaris* e *S. squalidus* (DOOREN et al., 1981; CHALCHAT et al., 2004).

O germacreno D é um importante constituinte de muitos óleos essenciais. Além disso, é um intermediário chave na rota biossintética dos compostos de esqueleto cadinano. Possivelmente, os  $\gamma$ -isômeros do cadineno, muuroleno e amorfeno, e o  $\alpha$  e  $\beta$ -bourboneno são originados unicamente a partir do germacreno D nos vegetais (YOSHIHARA et al., 1969).

Devido à instabilidade dos germacrenos A, B, C e D (KRAKER et al., 1998), o aquecimento durante o processo de extração dos óleos essenciais e durante a análise por CG, pode levar à degradação destes compostos, assim como de muitos outros compostos instáveis presentes nos óleos. Sabe-se ainda que, durante o processo de destilação, a água, a acidez e a temperatura podem provocar a hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações, racemizações e oxidações de compostos (SIMÕES, SPITZER, 2003). Desta maneira, a constituição dos óleos essenciais obtidos por arraste de vapor d'água, pode ser diferente daquela inicialmente presente nos órgãos secretores do vegetal.

Um exemplo disso, seria a subestimação da real quantidade de germacreno A nos óleos essenciais de *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*, pois o germacreno A, ao ser aquecido, sofre um rearranjo de Cope transformando-se em  $\beta$ -elemeno (KRAKER et al., 1998; PROSSER et al., 2002). Devido à alta temperatura utilizada no injetor do cromatógrafo gasoso, parte do germacreno A pode ter sido transformado em  $\beta$ -elemeno, fato este que justificaria a presença deste composto apenas nos óleos essenciais onde o germacreno A está presente. Desta maneira o  $\beta$ -elemeno seria um artefato. No entanto, a possibilidade deste composto ser um constituinte do óleo essencial de *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus* não pode ser descartada.

O alceno *n*-tricosano, encontrado apenas no óleo essencial de *S. oxyphyllus*, é um constituinte de ceras vegetais, e sua alta lipofilia serve de barreira primária para evitar a dessecação por evaporação da água nos tecidos dos vegetais (MOYNA, HEINZEN, 2003). A ocorrência de hidrocarbonetos de cadeia longa, como tricosano, pentacosano e henicossano, é comum em óleos essenciais (STEFANELLO et al., 2006).

Sabe-se que a quantidade e a constituição do óleo essencial pode variar de acordo com o genótipo, as condições ambientais, saúde do vegetal, idade e parte do

vegetal utilizada. É comum ocorrer nas partes jovens de vegetais uma maior produção de terpenóides, já que estas possuem uma maior capacidade fotossintética, e conseqüentemente, uma maior atividade metabólica (VERPOORTE, 1998).

Entre os trabalhos descrevendo a análise de óleos essenciais de *Senecio*, pode-se citar o trabalho de Dooren et al. (1981), onde os principais constituintes encontrados no óleo essencial de *S. vulgaris* foram identificados como sendo o  $\beta$ -cariofileno, mirceno,  $\alpha$ -copaeno, germacreno D e óxido de  $\beta$ -cariofileno. No óleo essencial de *S. congestus* os principais constituintes encontrados foram 1-trideceno, ácido láurico e anidro-oplopanona. Para o óleo essencial de *S. jacobaea*, os principais contituintes identificados foram germacreno D, (*E*)- $\beta$ -ocimeno, 1-undeceno, 1-noneno, mirceno e  $\beta$ -cariofileno. Já no óleo essencial de *S. fuchsii*, anidro-oplopanona,  $\alpha$ -bisabolol,  $\beta$ -cariofileno, óxido de  $\beta$ -cariofileno e outros sesquiterpenos não identificados foram os principais constituintes encontrados.

No óleo essencial de *S. graveolens* Wedd. foram encontrados principalmente hidrocarbonetos, álcoois, cetonas e um aldeído, sendo o  $\alpha$ -terpineno e o *p*-cimeno os compostos majoritários (PÉREZ et al., 1999). Os principais constituintes identificados no óleo essencial de *S. aegyptius* var. *discoideus* Boiss. foram: 1-nonano, mirceno e 1,10-epoxifuranoeremofilano (EL-SHAZLY et al., 2002). No óleo essencial de *S. tephrosioides* Turcz, os principais constituintes identificados foram: sabineno, 4-terpineol,  $\alpha$ -cadinol e  $\tau$ -muurolol, além de outros compostos não identificados (FERNÁNDEZ-ZÚÑIGA et al., 1996). Já no óleo essencial de *S. squalidus* L., os principais compostos encontrados foram: *p*-cimeno,  $\alpha$ -felandreno,  $\alpha$ -pineno e uma mistura de (*Z*)- $\beta$ -ocimeno e  $\gamma$ -terpineno (CHALCHAT et al., 2004).

Através da comparação da constituição dos óleos essenciais de *S. heterotichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus* com os das outras espécies de *Senecio* citadas anteriormente (DOOREN et al., 1981; FERNÁNDEZ-ZÚÑIGA et al., 1996; PÉREZ et al., 1999; EL-SHAZLY et al., 2002; CHALCHAT et al., 2004), é possível verificar que a constituição dos óleos essenciais de plantas deste gênero é muito variada, possuindo apenas alguns constituintes em comum, sendo os compostos majoritários, característicos para cada espécie. Adicionalmente, pode-se verificar que, em relação aos monoterpenóides, os óleos essenciais das espécies de *Senecio* relatados na literatura apresentam pelo menos um

monoterpenóide oxigenado, com exceção de *S. squalidus*, o que não pode ser evidenciado nos óleos analisados neste trabalho. Assim, estes dados confirmam a falta de homogeneidade química no gênero *Senecio*.

O aparecimento de infecções causadas por cepas multirresistentes constitui atualmente, uma séria ameaça para a saúde pública. O fenômeno é agravado por fatores demográficos (por exemplo, crescimento da população e urbanização), os quais geram condições favoráveis para a transmissão de infecções. O problema de resistência aos antibióticos em infecções bacterianas adquiridas em hospitais (nosocomial) e na comunidade, faz com que muitos antibióticos tenham uma vida útil curta, tornando-os inefetivos em pouco tempo. Para combater o problema de resistência microbiana aos antibióticos é vital que estratégias de pesquisa sejam direcionadas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Além disso, uma troca de paradigma no tratamento de doenças infecciosas, com a racionalização no uso dos antibióticos, é necessária para prevenir que estes tornem-se obsoletos (CARSON, RILEY, 2003; SHAHIDI BONJAR, 2004).

Portanto, existe uma contínua e urgente necessidade de se descobrirem novos compostos antimicrobianos, com diferentes estruturas químicas e novos mecanismos de ação, devido ao alarmante aumento na incidência e re-emergência de doenças infecciosas. Outra grande preocupação é o desenvolvimento de resistência aos antibióticos em atual uso clínico (ROJAS et al., 2003).

Na busca por novos agentes antimicrobianos, vários pesquisadores na área da farmácia têm estudado e avaliado as atividades antimicrobianas de produtos naturais, e como visto anteriormente, as plantas superiores, com sua infinidade de metabólitos secundários, mostram-se fontes promissoras de novos agentes antimicrobianos. Este interesse pode ser confirmado pelos diferentes estudos de atividade antimicrobiana de extratos vegetais e de compostos oriundos de plantas relatados na literatura. Além do que, a rápida taxa de extinção de muitas espécies vegetais, estaria acarretando a provável perda definitiva de muitas estruturas promissoras no tratamento de infecções.

Apesar dos microrganismos estarem envolvidos na etiologia de muitas doenças, eles também estão envolvidos na deterioração de alimentos e em casos de infecções e intoxicações alimentares. Como existem restrições quanto ao uso de conservantes em alimentos, há também um aumento de interesse por fontes alternativas e naturais de compostos que apresentam atividade antimicrobiana e

antioxidante sobre os alimentos, em substituição aos conservantes sintéticos atuais. Neste contexto, os óleos essenciais têm demonstrado possuir uma atividade inibitória sobre vários microrganismos que participam da deterioração de alimentos, podendo vir a ser no futuro, utilizados como conservantes alternativos (PAULI, 2001; BURT, 2004; GUYNOT et al., 2005).

A metodologia utilizada para avaliar a atividade antimicrobiana de constituintes terpênicos é um fator crucial para o teste. Alguns fatores devem ser levados em consideração em relação a esse aspecto: o método de ensaio, o inóculo, o meio de crescimento, o tempo de leitura do teste e os microrganismos utilizados (ESPINEL-INGROFF, PFALLER, 1995).

De maneira geral, os métodos de diluição em caldo são mais adequados para testar constituintes terpênicos do que os métodos de difusão em disco ou em cavidades no ágar. Como a maioria dos derivados terpênicos de baixo peso molecular são voláteis, existe a possibilidade da concentração de terpenos aplicada ao disco reduzir, principalmente se forem incubados por um grande período de tempo. Sendo lipofílicos, apresentam ainda a possibilidade de não difundir nos meios sólidos, que são polares (CHAND et al., 1994).

Desta maneira o método de microdiluição em caldo mostrou-se o mais indicado para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos EtOH e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *S. heterotrichius*, do germacreno-D-1-hidroperóxido e dos óleos essenciais de *S. heterotrichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*.

Em relação à atividade antimicrobiana dos extratos, foi possível verificar que o extrato EtOH de *S. heterotrichius* não possui atividade antimicrobiana frente *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. lusitanae*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nas concentrações entre 0,025 e 5 mg/mL.

Já o extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *S. heterotrichius* apresentou atividade antifúngica frente *Candida krusei* (CIM de 0,25 mg/mL) e atividade antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* (CIM de 2,5 mg/mL), não apresentando atividade frente *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. lusitanae*, *C. parapsilosis* e *E. coli*.

A atividade do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> sobre um microrganismo Gram-positivo (*S. aureus*) e ausência de atividade frente ao Gram-negativo testado (*E. coli*), estão de acordo com as informações contidas na literatura, que relatam maior suscetibilidade dos microrganismos Gram-positivos frente aos metabólitos vegetais (VLIETINCK et al., 1995; RABE, VAN STADEN, 1997; KELMANSON et al., 2000; BURT, 2004).

Segundo Holley e Patel (2005), a membrana dual presente nas bactérias Gram-negativas forma um envelope complexo, sendo responsável pela menor suscetibilidade destes microrganismos frente extratos vegetais.

Os dados da literatura permitem concluir que, num primeiro momento, não é possível atribuir atividade antimicrobiana a um extrato apenas pelas suas características de polaridade; diferentes plantas possuem diferentes classes de constituintes, e tanto compostos polares como apolares, podem exibir atividade antimicrobiana. Adicionalmente, como cada extrato contém uma mistura de substâncias, há ainda a possibilidade de ocorrer sinergismo ou antagonismo entre os constituintes (ELOFF, 1998; DEUSCHLE, 2003).

A atividade inibitória apresentada pelo extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> frente *C. krusei* e *S. aureus* poderia ser atribuída à presença de terpenóides, principais compostos do gênero que estão presentes neste extrato, como pôde-se verificar através de CCD, e que possuem atividade antimicrobiana já comprovada e descrita na literatura, conforme apresentado no capítulo de revisão. Esta atividade também poderia ser justificada pela presença de alcalóides pirrolizidínicos (APs), constituintes comuns no gênero *Senecio*, e já descritos para *S. heterotrichius* (KREBS et al., 1996; TRIGO et al., 2003). A atividade antimicrobiana já foi comprovada para esta classe de constituintes (REINA et al., 1995; VILLARROEL et al., 1997; SINGH et al., 2002), podendo ser consequente de sua capacidade em reagir com componentes nucleofílicos celulares como ácidos nucleicos (DNA) e proteínas, após sofrer desidrogenação catalisada por mono-oxigenases do sistema citocromo P450, assim, interrompendo o ciclo celular do microrganismo (PRAKASH et al., 1999).

Atividade antimicrobiana também já foi comprovada para extratos de *Senecio maranguensis* O. Hoffm. (COS et al., 2002), *S. angulifolius* DC. (NAVARRO GARCÍA et al., 2003), *S. culcitoides* Schultz-Bip. (ROJAS et al., 2003), *S. scandens* Buch-Ham. (YUAN-CHUEN, TUNG-LIANG, 2005), *S. vulgaris* L. (LOIZZO et al., 2004; UZUN et al., 2004), *S. grisebachii* Baker (PORTILLO et al., 2001), *S. inaequidens* DC. (LOIZZO et al., 2004), *S. samnitum* Huet (LOIZZO et al., 2006) e *S. desiderabilis* Vellozo (DEUSCHLE, 2003). Estes trabalhos mostram que há perspectivas para o gênero no que se refere à obtenção de substâncias com atividade antimicrobiana.

Uma vez que a literatura descreve o gênero *Senecio* como sendo rico em terpenóides, compostos que freqüentemente apresentam atividade antimicrobiana, e o extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> mostrou-se ativo contra dois dos microrganismos testados, partiu-

se para o seu fracionamento, visando isolar a(s) substância(s) ativa(s) e verificar a possibilidade de estar ocorrendo antagonismo ou sinergismo entre as substâncias presentes no extrato bruto.

O germacreno D, principal constituinte isolado do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *Senecio heterotrichius*, já havia sido isolado de *S. desiderabilis* Vellozo pelo nosso grupo de pesquisa, e avaliado quanto à sua atividade antimicrobiana (DEUSCHLE, 2003; DEUSCHLE et al., no prelo). Desta maneira, uma nova avaliação da atividade antimicrobiana é dispensável.

Na literatura há relatos da avaliação da atividade antimicrobiana do germacreno D, frente patógenos humanos, por dois métodos distintos: difusão em ágar frente *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Micrococcus roseus* (BIAVATTI et al., 2001), e microdiluição em caldo frente *Candida albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, e *Saccharomyces cerevisiae* (DEUSCHLE, 2003; DEUSCHLE et al., no prelo), sendo que em ambos os casos, o germacreno D mostrou-se inativo nas concentrações testadas.

Estes resultados indicam que o composto isolado não é por si só, o responsável pela atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *S. heterotrichius*. No entanto, o germacreno D é um dos constituintes majoritários de óleos essenciais com atividade antimicrobiana comprovada, extraídos de diferentes espécies vegetais (JUTEAU et al., 2002; GONZAGA et al., 2003; IACOBELLIS et al., 2005; CHAVAN et al., 2006) e desta forma, poderia estar contribuindo para a atividade antimicrobiana do(s) constituinte(s) ativo(s) do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Segundo Cowan (1999), a lipofilia de hidrocarbonetos de estrutura terpênica permite a sua partição nos lipídeos da membrana celular, aumentando a sua permeabilidade. Esta propriedade pode facilitar a penetração de agentes antimicrobianos no interior celular e assim facilitar a sua ação e é uma explicação plausível para as interações positivas de constituintes de natureza sesquiterpenóide com antibióticos de uso convencional (BREHM-STECHER, JOHNSON, 2003; RÍOS, RECIO, 2005), e reforça a teoria de que efeitos de sinergismo ou antagonismo ocorram em extratos e frações.

Em relação à avaliação da atividade antimicrobiana do germacreno-D-1-hidroperóxido, os resultados sugerem ausência de atividade antibacteriana para esta substância, uma vez que o composto não apresentou-se ativo frente *E. coli*, *P.*

*aeruginosa* e *S. aureus* nas concentrações testadas (até 5 mg/mL). Entretanto, pode ser evidenciada uma atividade antifúngica seletiva, pela inibição do crescimento de *S. cerevisiae* (CIM de 2,5 mg/mL) e ausência de atividade frente *C. tropicalis*. O composto também inibiu parcialmente o crescimento da alga *P. zoopfi*, com uma inibição parcial de 80% na concentração de 5 mg/mL e inibição parcial de 50% na concentração de 2,5 mg/mL.

A atividade antimicrobiana de peróxidos já foi relatada, sendo os endoperóxidos a classe que apresenta maior atividade, mostrando-se algumas vezes, mais efetivos que antibióticos convencionais (CASTEEL, 1992; TOLSTIKOV et al., 1996; RÜCKER, 1997), sendo a atividade antifúngica frente *S. cerevisiae*, relatada apenas para peróxidos isolados de esponjas marinhas (CASTEEL, 1992).

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana do germacreno-D-1-hidroperóxido foram comparados com os resultados apresentados pelo seu precursor, o germacreno D (DEUSCHLE, 2003), e mostraram que a incorporação de um grupamento hidroperóxido na estrutura possibilitou o surgimento de atividade inibitória frente *S. cerevisiae*. Para *E. coli* não foi evidenciada nenhuma alteração na atividade inibitória (Tabela 28). Desta maneira pode-se verificar que a introdução do grupamento hidroperóxido na molécula do germacreno D promoveu um incremento na atividade antifúngica, não tendo afetado sua atividade antibacteriana.

Existem vários estudos que mostram as atividades inibitórias apresentadas por óleos essenciais e por constituintes de estrutura terpênica sobre o crescimento de microrganismos (PAULI, 2001; BURT, 2004).

Em relação à atividade antimicrobiana dos óleos essenciais testados, foi possível verificar para os óleos de *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus* atividade antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* com valores de CIM superiores à 3,3 mg/mL. Já o óleo essencial de *S. heterotrichius* apenas inibiu parcialmente o crescimento de *S. aureus* (CIM 50% de 3,3 mg/mL), não apresentando atividade frente *P. aeruginosa*. Nenhum dos quatro óleos essenciais testados apresentou atividade inibitória frente à alga *Prototheca zopfii*, às leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* e à bactéria Gram-negativa *Escherichia coli*.

**Tabela 28 – Comparação dos resultados dos testes para a avaliação da atividade antimicrobiana do germacreno-D-1-hidroperóxido e germacreno D (DEUSCHLE, 2003)**

| <b>Microrganismos</b>                        | <b>germacreno D<br/>CIM (mg/mL)</b> | <b>germacreno-D-1-hidroperóxido<br/>CIM (mg/mL)</b>                  |
|--|-------------------------------------|--|
| <i>Candida tropicalis</i> *                  | n.r.                                | > 5  |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>ATCC 2601 | > 5                                 | <b>2,5</b>   |
| <i>Prototheca zoopfi</i> *                   | n.r.                                | <b>5 (inibição parcial de 80%)<br/>2,5 (inibição parcial de 50%)</b> |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC 25922        | > 5                                 | > 5  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i><br>ATCC 27850  | n.r.                                | > 5  |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC 25923   | n.r.                                | > 5  |

\*: isolado clínico; n.r.: teste não realizado para o microrganismo correspondente.

Atividade bactericida foi apresentada apenas pelos óleos de *S. ceratophylloides* e *S. leptolobus* frente *S. aureus* (CBM de 6,6 mg/mL para os dois óleos) e *P. aeruginosa* (CBM de 3,3 mg/mL para o primeiro e de 6,6 mg/mL para o segundo).

Pôde-se verificar que os óleos essenciais de *S. heterotrichius* e *S. oxyphyllus* foram menos ativos que os óleos de *S. ceratophylloides* e *S. leptolobus*, pois estes promoveram inibição de 100% no crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, o que não ocorreu com os primeiros.

Os óleos essenciais de *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus* foram ativos frente bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, mostrando que não há seletividade quanto à atividade antibacteriana.

Até o momento, não é conhecido o composto ou mistura de compostos presentes nos óleos essenciais que são responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada. Diversos autores acreditam que compostos aromáticos, contendo um grupo funcional polar, sejam os responsáveis por essa atividade. A literatura traz informações contraditórias sobre este tema, ainda não estando claro o mecanismo de ação dos óleos essenciais. Mas sabe-se que a alta lipofilicidade e baixo peso



molecular de seus componentes, faz com que estes sejam facilmente absorvidos e distribuídos em organismos lipofílicos (INOUE, 2003).

Além disso, a variação na constituição do óleo essencial pode modificar sua atividade biológica. Os componentes majoritários tendem a dominar a atividade apresentada pelo óleo, sendo menos comum encontrar componentes minoritários desempenhando um importante papel, embora alguns possuam papel crítico na atividade antibacteriana, possivelmente por produzir efeito sinérgico (TISSERAND, 1996; BURT, 2004).

A atividade apresentada pelo óleo essencial de *S. ceratophylloides* pode estar relacionada à presença de uma maior quantidade de sesquiterpenóides oxigenados neste, entre eles álcoois, compostos que apresentam atividade bactericida conhecida frente células vegetativas, agindo como agentes desnaturantes de proteínas, solventes ou agentes desidratantes (DORMAN, DEANS, 2000).

Atividade antimicrobiana já foi relatada para o óleo essencial de outras espécies de *Senecio*. O óleo essencial de *S. graveolens* Wedd. apresentou atividade antibacteriana frente *Micrococcus luteus* e cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes e sensíveis à oxilina, e atividade antifúngica frente *Candida albicans* (PÉREZ et al., 1999). Para o óleo essencial de *S. aegyptius* var. *discoideus* Boiss. é relatada moderada atividade antimicrobiana frente *E. coli*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*, sendo que o 1,10-epoxifuranoeremofilano, principal constituinte do óleo, apresentou atividade inibitória frente *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *B. subtilis*, *C. albicans* e *Aspergillus flavus* (EL-SHAZLY et al., 2002). Já para o óleo essencial de *S. tephrosioides* Turcz é relatada atividade antimicrobiana frente *S. aureus*, *Salmonella typhi* e *Vibrio cholerae* (ALZAMORA et al., 2001).

A atividade antimicrobiana apresentada pelos óleos essenciais das quatro espécies de *Senecio* aqui estudadas apresentou menor espectro de ação que a de outras espécies citadas na literatura. Entretanto, deve-se levar em conta que as cepas microbianas e as metodologias utilizadas nos outros trabalhos (macrodiluição em caldo, difusão em disco e em cavidades no ágar) são diferentes da utilizada no estudo em questão (microdiluição em caldo), o que dificulta a comparação dos resultados. Apesar disso, pode-se observar que todos os óleos essenciais, tanto os avaliados neste estudo quanto os da literatura, apresentaram atividade antibacteriana frente *S. aureus*, já a atividade inibitória frente *P. aeruginosa* foi apresentada apenas pelos óleos de *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S.*

*oxyphyllus*.

Para as plantas do gênero *Senecio*, é possível identificar várias classes de constituintes, com estruturas químicas e atividades biológicas diversas. A grande variabilidade nas características morfoanatômicas observadas entre as espécies de *Senecio*, podem estar correlacionadas à presença de diferentes classes de metabólitos secundários. Devido a este fato, alguns pesquisadores sugerem o agrupamento das diferentes espécies deste gênero de acordo com os seus constituintes (BOHLMANN et al., 1980; BOHLMANN et al., 1985; DUPRÉ et al., 1991), redimensionando assim, a classificação taxonômica existente.

As informações quimiotaxonômicas descritas até o momento, demonstram que o gênero *Senecio* não é muito homogêneo, tanto no que se refere aos seus caracteres químicos, quanto morfológicos (BOHLMANN et al., 1985; DUPRÉ et al., 1991; TRENDAFILOVA et al., 1995). Esta falta de homogeneidade também pode ser verificada na constituição dos óleos essenciais de *S. heterotichius*, *S. ceratophylloides*, *S. leptolobus* e *S. oxyphyllus*.

Entre os constituintes químicos mais frequentemente encontrados no gênero *Senecio* estão os alcalóides pirrolizidínicos e os sesquiterpenóides com esqueleto do tipo furanoeremofilano (BOHLMANN et al., 1977; TORRES et al., 1998). Embora ambos grupos de metabólitos secundários sejam de ocorrência comum no gênero e em gêneros correlatos, várias espécies não contêm estes compostos, tornando a classificação quimiotaxonômica de espécies no gênero imprecisa. Em alguns casos, os furanoeremofilanos são substituídos por seus precursores biossintéticos, como por exemplo, os eremofilanos, ou ainda, por suas correspondentes lactonas (BOHLMANN et al., 1985; DUPRÉ et al., 1991). Em outros grupos de espécies, principalmente as de aspecto suculento, ocorre predominância de outros tipos de sesquiterpenóides, não ocorrendo furanoeremofilanos (BOHLMANN et al., 1986). Isto ocorre em algumas espécies sul-africanas de *Senecio*, as quais contêm derivados do germacrano altamente oxigenados, não apresentando furanoeremofilanos e eremofilanos (DUPRÉ et al., 1991; BOHLMANN, ZDERO, 1982a). Também em *S. selloi* (Spreng.) DC., espécie suculenta nativa do sul do Brasil, predominam os derivados altamente oxigenados do bisabolano (HEINZMANN, 1996). Já a presença restrita de ésteres do ácido chiquímico em espécies de *Senecio* parece desempenhar um importante papel quimiotaxonômico (DUPRÉ et al., 1991).

A substituição de eremofilanos por outros sesquiterpenos e triterpenos, alguns deles altamente oxigenados em algumas espécies de *Senecio*, gera discussões quanto à classificação taxonômica destas espécies, sendo que alguns autores sugerem a inclusão das espécies de *Senecio* que se caracterizam pela ausência de eremofilanos no gênero *Kleinia* (BOHLMANN et al., 1981d; BOHLMANN et al., 1981e).

Investigações de um maior número de espécies seria necessário para obter uma descrição clara do ponto de vista químico e taxonômico do gênero (BOHLMANN et al., 1985), já que o número de espécies quimicamente estudadas ainda é pequeno, sendo até 1982, apenas um pouco mais de 100 espécies (BOHLMANN, ZDERO, 1982b). Os estudos relatados a partir de então, só confirmam a grande variabilidade química entre as espécies do gênero, sendo que o número de espécies de *Senecio* ainda não estudadas é desconhecido.

Este foi o primeiro trabalho a relatar a análise química e a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *S. heterotrichius*, *S. oxyphyllus*, *S. ceratophylloides* e *S. leptolobus*, sendo também pela primeira vez descrito o isolamento do sesquiterpeno germacreno D de *S. heterotrichius*, da qual só se conheciam até então, os alcalóides pirrozilidínicos senecivernina, senecionina, integerrimina e retrorsina (KREBS et al. 1996; TRIGO et al., 2003). Adicionalmente, é descrita a obtenção do germacreno-D-1-hidroperóxido por processo de foto-oxidação a partir do germacreno D pela primeira vez na literatura.

## 6 CONCLUSÃO

O fracionamento do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de *S. heterotrichius* permitiu o isolamento do germacreno D com um rendimento de 0,0234% em relação ao material vegetal fresco. Partindo-se deste composto, através de uma reação de foto-oxidação, pode-se obter o germacreno-D-1-hidroperóxido, com um rendimento de 21,5%.

O germacreno-D-1-hidroperóxido apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601 com uma CIM de 2,5 mg/mL. Também foi observada atividade antimicrobiana frente à alga *Prototheca zopfii* (isolado clínico), que teve seu crescimento parcialmente inibido nas concentrações de 5 e 2,5 mg/mL (80 e 50% de inibição, respectivamente).

A comparação da atividade antimicrobiana do germacreno D (DEUSCHLE, 2003) com a do germacreno-D-1-hidroperóxido, demonstrou que a introdução do grupamento hidroperóxido na molécula de germacreno D promove um incremento na sua atividade antifúngica, não afetando sua atividade antibacteriana.

A análise da atividade antimicrobiana dos extratos diclorometânico e etanólico de *Senecio heterotrichius* DC., indicou que apenas o extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  apresenta atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Candida krusei* (isolado clínico) (CIM de 0,25 mg/mL) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (CIM de 2,5 mg/mL), não sendo evidenciada nenhuma atividade para o extrato EtOH.

A análise química dos óleos essenciais de *Senecio heterotrichius* DC., *S. ceratophylloides* Griseb., *S. oxyphyllus* DC. e *S. leptolobus* DC. por CG-EM, indicou que estes são constituídos quase que exclusivamente por mono e sesquiterpenóides, em sua maioria hidrocarbonetos, sendo em todos eles o conteúdo de sesquiterpenóides superior ao de monoterpenóides. O estudo de sua composição permitiu constatar que o germacreno D é um dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das quatro espécies analisadas.

O óleo essencial de *S. oxyphyllus* é o único, entre as quatro espécies analisadas, que não apresentou sesquiterpenóides oxigenados, sendo esta uma característica que poderia ser utilizada para diferenciar esta espécie de *S. heterotrichius*. No entanto, estudos considerando variáveis ambientais e a análise de um maior número de exemplares ainda precisam ser realizados.

Os óleos essenciais das quatro espécies estudadas apresentaram atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 com CIM > 3,3 mg/mL, enquanto que o óleo de *S. heterotrichius* mostrou-se ativo apenas frente *S. aureus*. Nenhuma atividade antifúngica foi detectada para estes óleos nas concentrações testadas frente os microrganismos utilizados.

## 7 REFERÊNCIAS

- ABDEL-MALEK, S. et al. Drug leads from the Kallawaya herbalists of Bolivia. 1. Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 50, n. 3, p. 157-166, 1996.
- ABDO, S. et al. Furanoeremophilanes and other constituents from *Senecio canescens*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3937-3941, 1992.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured, 2001.
- AFFEK, H. P.; YAKIR, D. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 269-277, 2002.
- ALVAREZ-CASTELLANOS, P. P.; PASCUAL-VILLALOBOS, M. J. Effect of fertilizer on yield and composition of flowerhead essential oil of *Chrysanthemum coronarium* (Asteraceae) cultivated in Spain. **Industrial Crops and Products**, v. 17, n. 2, p. 77-81, 2003.
- ALZAMORA, L. et al. Medicina tradicional en el Perú: actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales extraídos de algunas plantas aromáticas. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 62, n. 2, p. 156-161, 2001.
- ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 325-348, 2005.
- ARMAKA, M. et al. Antiviral properties of isoborneol, a potent inhibitor of herpes simplex virus type 1. **Antiviral Research**, v. 43, n. 2, p. 79-92, 1999.
- BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant-derived natural products in drug discovery and development. In: **Human Medicinal Agents from Plants**. KINGHORN, A. D., BALANDRIN, M. F. (Ed.). ACS Symposium Series 534. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1993. p. 2-12.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- BARRERO, A. F. et al. Biomimetic cyclization of cnicin to malacitanolide, a cytotoxic eudesmanolide from *Centaurea malacitana*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 10, p. 1034-1035, 1997.
- BENNET-JENKINS, E.; BRYANT, C. Novel sources of anthelmintics. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 8/9, p. 937-947, 1996.
- BIAVATTI, M. W. et al. Chemistry and bioactivity of *Raulinoa echinata* Cowan, an endemic Brazilian Rutaceae species. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 121-124, 2001.

BOHLMANN, F.; BAPUJI, M. Cacalol derivatives from *Senecio lydenburgensis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 3, p. 681-683, 1982.

BOHLMANN, F.; GUPTA, R. K. Eremophilene and germacrene derivatives from *Senecio glanduloso-pilosus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2595-2597, 1982.

BOHLMANN, F.; JAKUPOVIC, J.; ZDERO, C. Neue norsesquiterpene aus *Rudbeckia laciniata* und *Senecio paludaffinis*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 11, p. 2034-2036, 1978.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. New furanoeremophilanes from South African *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 17, n. 7, p. 1161-1164, 1978.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Germacrene derivatives and other sesquiterpenes from *Senecio* species and *Lordhowea insularis*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 10, p. 2537-2541, 1982a.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C. Sandaracopimarene derivatives from *Senecio subrubriflorus*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 7, p. 1697-1700, 1982b.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. Eremophilane derivatives from *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2681-2684, 1980.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. Sesquiterpenes from three *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 3, p. 469-472, 1981.

BOHLMANN, F. et al. Terpen-derivate aus *Senecio*-arten. **Phytochemistry**, v. 16, n. 7, p. 965-985, 1977.

BOHLMANN, F. et al. Seven furanoeremophilanes from three *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 12, p. 2675-2679, 1980.

BOHLMANN, F. et al. Furanoeremophilanes from *Senecio smithii*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 10, p. 2389-2391, 1981a.

BOHLMANN, F. et al. The first acetylenic monoterpene and other constituents from *Senecio clevelandii*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 10, p. 2425-2427, 1981b.

BOHLMANN, F. et al. Seco-eremophilanolides from *Senecio macrotis*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1155-1157, 1981c.

BOHLMANN, F. et al. Sesquiterpenes from *Kleinia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 2, p. 251-256, 1981d.

BOHLMANN, F. et al. Notonipetrone-like sesquiterpenes from *Senecio kleinia*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 8, p. 2024-2026, 1981e.

BOHLMANN, F. et al. Two sesquiterpenes from *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 22, n. 7, p. 1675-1677, 1983.

BOHLMANN, F. et al. Eremophilane derivatives and other constituents from *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1249-1261, 1985.

BOHLMANN, F. et al. Further pyrrolizidine alkaloids and furoeremophilanes from *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 25, n. 5, p. 1151-1159, 1986.

BOLZAN, A. A. et al. A peroxide precursor from *Senecio platensis* Arech. In: SIMPÓSIO BRASIL-ALEMANHA, 2., 2005, Santa Maria/Santa Cruz do Sul. **Anais do 2º Simpósio Brasil-Alemanha: o uso racional da ciência e da tecnologia para o desenvolvimento sustentável**. Santa Maria/Santa Cruz do Sul, 2005. p. 121.

BRAUN, A. M.; OLIVEROS, E. Applications of singlet oxygen reactions: mechanistic and kinetic investigations. **Pure and Applied Chemistry**, v. 62, n. 8, p. 1467-1476, 1990.

BREHM-STECHER, B. F., JOHNSON, E. A. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol, farnesol, bisabolol and apritone. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3357-3360, 2003.

BROCHINI, C. B. et al. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 37-40, 1999.

BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, n. 2, p. 141-168, 2000.

BURGUEÑO-TAPIA, E. et al. Cacalolides from *Senecio madagascariensis*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 4, p. 518-521, 2001.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. Compostas. In: REITZ, P. P. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1975.

CAMEJO-RODRIGUES, J. et al. An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2/3, p. 199-209, 2003.

CAÑIGUERAL, S.; DELLACASSA, E.; BANDONI, A. L. Plantas medicinales y fitoterapia: ¿Indicadores de dependência o factores de desarrollo? **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 22, n. 3, p. 265-278, 2003.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. **Communicable Diseases Intelligence**, v. 27 (suplementar), p. S143-S146, 2003.



CASTEEL, D. A. Peroxy natural products. **Natural Products Reports**, v. 9, n. 4, p. 289-312, 1992.

CATALANO, S. et al. A xanthone from *Senecio mikanioides* leaves. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1605-1607, 1996.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHALCHAT, J.-C. et al. Essential oil of *Senecio squalidus* L., Asteraceae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 3, p. 227-228, 2004.

CHAND, S. et al. Rapid screening of the antimicrobial activity of extracts and natural products. **The Journal of Antibiotics**, v. 47, n. 11, p. 1295-1304, 1994.

CHAVAN, M. J.; SHINDE, D. B.; NIRMAL, S. A. Major volatile constituents of *Annona squamosa*. **Natural Product Research**, v. 20, n. 8, p. 754-757, 2006.

CHOJKIER, M. Hepatic sinusoidal-obstruction syndrome: toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Hepatology**, v. 39, n. 3, p. 437-446, 2003.

CHUN-LIN, L.; RONG, L. Ethnobotanical studies on medicinal plants used by the red-headed yao people in Jinping, Yunnan Province, China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 2/3, p. 389-395, 2004.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

CLENNAN, E. L. New mechanistic and synthetic aspects of singlet oxygen chemistry. **Tetrahedron**, v. 56, n. 47, p. 9151-9179, 2000.

CLENNAN, E. L.; PACE, A. Advances in singlet oxygen chemistry. **Tetrahedron**, v. 61, n. 28, p. 6665-6691, 2005.

COIMBRA, R. **Notas de Fitoterapia**: Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia. Parcialmente revisada e ampliada por DA SILVA, E. D. 2. ed. Rio de Janeiro: L.C.S.A., 1958. p. 349.

COS, P. et al. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 2, p. 155-163, 2002.

COULOMBE, R. A. Jr. Pyrrolizidine alkaloids in foods. **Advances in Food Nutrition Research**, v. 45, p. 61-99, 2003.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CULVENOR, C. C. J. et al. Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. **Chemico-Biological Interactions**, v. 12, n. 3/4, p. 299-324, 1976.

DE FEO, V. Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2/3, p. 243-256, 2003.

DEUSCHLE, R. A. N. **Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica de *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae)**. 2003. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

DEUSCHLE, R. A. N. et al. Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 356-359, 2006.

DEUSCHLE, R. A. N. et al. Fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio desiderabilis* Vellozo e avaliação da atividade antimicrobiana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, 2007. No prelo.

DHINGRA, V.; RAO, K. V.; NARASU, M. L. Artemisinin: present status and perspective. **Biochemical Education**, v. 27, n. 2, p. 105-109, 1999.

DONG-LIANG, C. et al. Diterpene glycosides from *Senecio rufus*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 151-153, 1993.

DOOREN, B.; BOS, R.; TATTJE, D. H. E. Composition of essential oils of some *Senecio* species. **Planta Medica**, v. 42, n. 4, p. 385-389, 1981.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DREWES, S. E. et al. Antimicrobial monomeric and dimeric diterpenes from the leaves of *Helichrysum tenax* var *tenax*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 7, p. 716-722, 2006.

DUPRÉ, S. et al. Eremophilane, germacrane and shikimic acid derivatives from Chilean *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1211-1220, 1991.

EL-SHAZLY, A.; DORAI, G.; WINK, M. Chemical composition and biological activity of the essential oils of *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, n.5/6. p. 434-439, 2002.

ELOFF, J. N. Wich extractant should be used for the screening and isolation of antimicrobial components from plants? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 1-8, 1998.

ESPINEL-INGROFF, A.; PFALLER, M. A. Antifungal agents and susceptibility testing. In: MURRAY, P. R. et al. **Manual of clinical microbiology**. 6. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1995. p. 1405

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 229-245.

**FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARNSWORTH, N. R. Testando plantas para novos remédios. In: WILSON, E. O. (org.). **Biodiversidade**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1997. p. 116.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.

FERNÁNDEZ-ZÚÑIGA, G.; FERNÁNDEZ-VALDERRAMA, I.; HAMMOND, G. B. Investigation of the essential oils of *Senecio tephrosioides* and *Salvia oppositiflora*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 25, n. 1, p. 14-16, 1996.

FERREIRA, A. G. et al. Germinação de sementes de Asteraceae nativas no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 2, p. 231-242, 2001.

FORTIN, H. et al. In vitro antiviral activity of thirty-six plants from La Réunion Island. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 346-350, 2002.

FOX, D. W. et al. Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye syndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 93, n. 6, p. 980-982, 1978.

FRAGA, B. M. et al. A chemotaxonomical study of *Sideritis massoniana* taxa. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 23, n. 7/8, p. 835-842, 1995.

GAVA, A.; BARROS, C. S. L. *Senecio* spp. poisoning of horses in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 36-40, 1997.

GIMMLER-LUZ, M. C.; ERDTMANN, B. Clastogenic activity of integerrimine determined in mouse micronucleus assays. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 3, p. 405-409, 1997.

GONZAGA, W. A. et al. Composition and antibacterial activity of the essential oils from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n. 8, p. 773-775, 2003.

GORDON, G. J.; COLEMAN, W. B.; GRISHAM, J. W. Induction of cytochrome P450 enzymes in the livers of rats treated with the pyrrolizidine alkaloid retrorsine. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 69, n. 1, p. 17-26, 2000.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Natural products research in Brazil. **Ciência e Cultura**, v. 49, n. 5/6, p. 315-320, 1997.

GRAHAM, J. G. et al. Plants used against cancer – an extension of the work of Jonathan Hartwell. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, n. 3, p. 347-377, 2000.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 14.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

GUTIERREZ, M. I., GARCIA, N. A. Dark and photoinduced interactions between xanthene dyes quinones. **Dyes and Pigments**, v. 38, n. 4, p. 195-209, 1998.

GUYNOT, M. E. et al. Screening for antifungal activity of some essential oils against common spoilage fungi of bakery products. **Food Science and Technology International**, v. 11, n. 1, p. 25-32, 2005.

HABERMEHL, G. G. et al. Livestock poisoning in South America by species of the *Senecio* plant. **Toxicon**, v. 26, n. 3, p. 275-286, 1988.

HAMBURGER, M.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Search for new drugs of plant origin. In: TESTA, B. (editor). **Advances in Drug Research**. Vol. 20. New York: Academic Press, 1991. p. 167-215.

HAMMOND, G. B. et al. A survey of traditional medicinal plants from the Callejón de Huaylas, Department of Ancash, Perú. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-30, 1998.

HÄNSEL, R., STICHER, O., STEINEGGER, E. **Pharmakognosie - Phytopharmazie**. 6. ed. Berlin: Springer Verlag, 1999. p. 960-964.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 481-504, 2000.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 7, p. 294-300, 2000.

HEINZMANN, B. M. **Inhaltsstoffe aus *Senecio selloi* Spreng. DC.** 1996. 149 p. Tese (Doutorado em Ciências Naturais e Exatas - Química Farmacêutica) - Universität Bonn, Alemanha, 1996.

HILGERT, N. I. Plants used in home medicine in the Zenta River basin, Northwest Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 11-34, 2001.

HIND, D. J. N. A checklist of Brazilian Senecioneae (Compositae). **Kew Bulletin**, v. 48, n. 2, p. 279-295, 1993.

HNATYSZYN, O. et al. Argentinian plant extracts with relaxant effect on the smooth muscle of the *corpus cavernosum* of guinea pig. **Phytomedicine**, v. 10, n. 8, p. 669-674, 2003.

HOL, W. H. G. et al. Root damage and aboveground herbivory change concentration and composition of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea*. **Basic and Applied Ecology**, v. 5, n. 3, p. 253-260, 2004.

HOLLEY, R. A.; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiology**, v. 22, n. 4, p. 273-292, 2005.

HUI, Z. et al. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, v. 39, n. 8, p. 833-839, 2006.

HUNTINGTON, S., KINNEL, R. Germacrene D: variation of enantiomers in *Aster* leaves and ovoposition in the pearl crescent butterfly. Disponível em: <[http://www.chem.hamilton.edu/~rkinnel/summer\\_research\\_2004.html](http://www.chem.hamilton.edu/~rkinnel/summer_research_2004.html)>. Acesso em: 09 nov. 2006.

IACOBELLIS, N. S. et al. Antibacterial activity of *Cuminum cyminum* L. and *Carum carvi* L. essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 1, p. 57-61, 2005.

ILHA, M. R. S.; LORETTI, A. P.; BARROS, S. S.; BARROS, C. S. L. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 123-138, 2001.

INMAN, W. D. et al. Antihyperglycemic sesquiterpenes from *Psacalium decompositum*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 8, p. 1088-1092, 1999.

INOUYE, S. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 2). **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, p. 173-184, 2003.

JAKUPOVIC, J. et al. Furoeremophilanes and other constituents from Chilean *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2691-2693, 1991.

JARES, E. A.; POMILIO, A. B. Isolation of sesquiterpenes from *Senecio crassiflorus* by combined dry column and high performance liquid chromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 12, n. 8, p. 565-568, 1989.

JARES, E. A.; TETTAMANZI, M. C.; POMILIO, A. B. Sitosterol 3-O- $\beta$ -D-glucuronopyranoside from *Senecio bonariensis*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 1, p. 340-341, 1990.

JEFFREY, C.; HALLIDAY, P.; WILMOT-DEAR, M.; JONES, S. W. Generic and sectional limits in *Senecio* (Compositae), I: Progress report. **Kew Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 47-67, 1977.

JIAN-QIAO, G. et al. Constituents of *Senecio chionophilus* with potential antitubercular activity. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 9, p. 1483-1487, 2004.

JOLY, A. B. **Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 628-636.

JUERGENS, U. R. et al. Anti-inflammatory activity of 1.8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial. **Respiratory Medicine**, v. 97, n. 3, p. 250-256, 2003.

JUTEAU, F. et al. Antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia annua* essential oil. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 532-535, 2002.

KARAM, F. S. C. et al. Fenologia de quatro espécies tóxicas de *Senecio* (Asteraceae) na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 22, n. 1, p. 33-39, 2002.

KELMANSON, J. E.; JÄGER, A. K.; VAN STADEN, J. Zulu medicinal plants with antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 241-246, 2000.

KHAN, M. T. H. et al. Extracts and molecules from medicinal plants against *herpes simplex* viruses. **Antiviral Research**, v. 67, p. 107-119, 2005.

KIEFER, A. **Untersuchung zur quantitativen Bestimmung von Peroxiden am Beispiel der Schafgarbe**. 1993. 136f. Tese de Doutorado – Universidade de Bonn, Alemanha, 1993.

KIPRONO, P. C. et al. The in vitro antifungal and anti-bacterial activities of  $\beta$ -sitosterol from *Senecio lyratus* (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforsch C**, v. 55, n. 5/6, p. 485-488, 2000.

KITAMURA, C. et al. A sex stimulant to the male American cockroach in plants. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 1965-1969, 1976.

KITE, G. C.; SMITH, S. A. L. Inflorescence odour of *Senecio alticulatus*: temporal variation in isovaleric acid levels. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1135-1138, 1997.

KOENIG, W. A. Enantioselective gas chromatography in stereochemical studies of natural compounds. **Albany Molecular Research, Inc. - Technical Reports**, v. 6, n. 52, p. 2, 2001. Disponível em: < <http://www.albmolecular.com/chemlinks/reviews/vol06/no52/v06n52.pdf>>. Acesso em: 06 nov. 2006.

KONX, J. P.; DODGE, A. D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 889-86, 1985.

KRAKER, J.-W. et al. (+)-Germacrene A Biosynthesis. **Plant Physiology**, v. 117, n. 4, p. 1381-1392, 1998.

KREBS, H. C.; CARL, T.; HABERMEH, G. G. Pyrrolizidine alkaloid composition in six Brazilian *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 43, n. 6, p. 1227-1229, 1996.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 537-556.

LEIRO, J. M. et al. In vitro effects of mangiferin on superoxide concentrations and expression of the inducible nitric oxide synthase, tumour necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  genes. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 1361-1371, 2003.

LIDDELL, J. R.; LOGIE, C. G. A re-investigation of the alkaloids of *Senecio pterophorus*. **Phytochemistry**, v. 34, n. 6, p. 1629-1631, 1993.

LIDDELL, J. R.; STERMITZ, F. R.; BARROS, C. S. L. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio oxyphyllus*, a Brazilian poisonous plant. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, n. 4, p. 393, 1992.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LIU, C. H. et al. Repellent and insecticidal activities of essential oils from *Artemisia princeps* and *Cinnamomum camphora* and their effect on seed germination of wheat and broad bean. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 15, p. 1969-1973, 2006.

LIU, F.; NG, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 725-735, 2000.

LOIZZO, M. R. et al. Antibacterial and antifungal activity of *Senecio inaequidens* DC. and *Senecio vulgaris* L. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 777-779, 2004.

LOIZZO, M. R. et al. Bioactive extracts from *Senecio samnitum* Huet. **Natural Product Research**, v. 20, n. 3, p. 265-269, 2006.

LOYOLA, L. A.; PEDREROS, S.; MORALES, G. *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Senecio graveolens*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1600-1602, 1985.

MACÍA, M. J.; GARCÍA, E.; VIDAURRE, P. J. An ethnobotanical survey of medicinal plants commercialized in the markets of La Paz and El Alto, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 337-350, 2005.

MACÊDO, M. E. et al. Screening of Asteraceae (Compositae) plant extracts for larvicidal activity against *Aedes fluviatilis* (Diptera: Culicidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 565-570, 1997.

MANSOUR R. M. A.; SALEH, N. A. M. Flavonoids of three local *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1180-1181, 1981.

MATSUDA, H. et al. Effects of sesquiterpenes and triterpenes from the rhizome of *Alisma orientale* on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: absolute stereostructures of alismaketones-B 23-acetate and -C 23-acetate. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 9, n. 21, p. 3081-3086, 1999.

MATZENBACHER, N. I. **O complexo “Senecionoide” (Asteraceae-Senecioneae) no Rio Grande do Sul Brasil**. 1998. 274p. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

MEMARIAN, H. R.; ABDOLI-SENEJANI, M.; TANGESTANINEJAD, S. Photosensitized oxidation of unsymmetrical 1,4-dihydropyridines. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 3, n. 3, p. 285-292, 2006.

MENDONÇA, F. A. C. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 7/8, p. 629-636, 2005.

MERICLI, A. H. et al. Eremophilane derivatives and other constituents from Mexican *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 4, p. 1149-1153, 1989.

METWALLY, M. A.; DAWIDAR, A. Constituents of *Senecio desfontainei*. **Pharmazie**, v. 41, n. 7, p. 522-523, 1986.

MILLER, J. S. Rose bengal-sensitized photooxidation of 2-chlorophenol in water using solar simulated light. **Water Research**, v. 39, n. 2/3, p. 412-422, 2005.

MOHAMED, A. E. H.; AHMED, A. A. Eremophilane-type sesquiterpene derivatives from *Senecio aegyptius* var. *discoideus*. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 3, p. 439-442, 2005.

MORI, M. et al. X-ray crystallographic and NOE studies on the conformation of periplanones and their analogues. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 7, p. 1769-1777, 1990.

MOYNA, P.; HEINZEN, H. Lípidios: química y productos naturales que los contienen. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 463.

MOZURAITIS, R. et al. (-)-Germacrene D increases attraction and oviposition by the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*. **Chemical Senses**, v. 27, n. 6, p. 505-509, 2002.

MURARI, A. L. et al. Sesquiterpeno das partes aéreas de *Senecio crassiflorus* (Poir.) DC. var. *crassiflorus*. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2006, Florianópolis. **Anais da 58ª Reunião Anual da SBPC**. Florianópolis, 2006.

NAVARRO GARCÍA, V. M. et al. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 85-88, 2003.



NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard M7-A4. Pensilvânia: NCCLS, 1997. NCCLS document M7-A4.

NCCLS (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**; Approved Standard - Second Edition. Pensilvânia: NCCLS, 2002. NCCLS document M27-A2.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

ORTEGA, P. A. et al. Dihydroeuparin as sunscreen. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, n. 4, p. 629-636, 2000.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; ROBLEDO, A. Anti-insect activity of plant extracts from the wild flora in southeastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 1, p. 1-10, 1999.

PAULI, A. Antimicrobial properties of essential oil constituents. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 11, n. 3, p. 126-133, 2001.

PERES, V.; NAGEM, T. J.; OLIVEIRA, F. F. Tetraoxygenated naturally occurring xanthenes. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 683-710, 2000.

PÉREZ, C.; AGNESE, A. M.; CABRERA, J. L. The essential oil of *Senecio graveolens* (*Compositae*): chemical composition and antimicrobial activity tests. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, n. 1, p. 91-96, 1999.

PESTCHANKER, M. J.; ASCHERI, M. S.; GIORDANO, O. S. Uspallatine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio uspallatensis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1622-1624, 1985.

PETERSON, J. K.; HORVAT, R. J.; ELSEY, K. D. Squash leaf glandular trichome volatiles: identification and influence on behavior of female pickleworm moth. **Journal of Chemical Ecology**, v. 20, n. 8, p. 2099-2109, 1994.

PETRAKIS, P. V. et al. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. **Behavioural Processes**, v. 69, n. 3, p. 303-322, 2005.

PICAUD, S. et al. Cloning, expression, purification and characterization of recombinant (+)-germacrene D synthase from *Zingiber officinale*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 452, n. 1, p. 17-28, 2006.

PIERONI, A.; QUAVE, C. L.; SANTORO, R. F. Folk pharmaceutical knowledge in the territory of the Dolomiti Lucane, inland southern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2/3, p. 373-384, 2004.

- PIMM, S. L. et al. The future of biodiversity. **Science**, v. 269, n. 5222, p. 347-350, 1995.
- POMILIO, A. B.; JARES, E. A. Toxic furanoterpenes from *Senecio bonariensis*. **Internacional Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 3, p. 207-211, 1997.
- PONCE, A. G. et al. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. **Lebensmittel-Wissenschaft -Technologie**, v. 36, n. 7, p. 679-684, 2003.
- PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 93-98, 2001.
- PRAKASH, A. S. et al. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research**, v. 443, n. 1/2, p. 53-67, 1999.
- PROSSER, I. et al. (+)-(10*R*)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 691-702, 2002.
- RABE, T.; VAN STADEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 1, p. 81-87, 1997.
- RAMOS, A. L. L. P.; MARQUES, E. K. Mutagenic action of integerrimine, an alkaloid present in *Senecio brasiliensis* (Sprengel) Less., in *Drosophila*. **Revista Brasileira de Genética**, v. 1, n. 3, p. 279-287, 1978.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- REINA, M. et al. Pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium bovei*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 2, p. 355-358, 1995.
- REINA, M. et al. Defensive chemistry of *Senecio miser*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 6-11, 2001.
- REINA, M. et al. C-5-Substituted antifeedant sesquiterpenes from *Senecio palmensis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 448-453, 2002.
- RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1/2, p. 80-84, 2005.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.
- ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, n. 6/7, p. 514-535, 2005.
- RÖDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, n. 2, p. 83-98, 1995.

ROJAS, R. et al. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2/3, p. 199-204, 2003.

RÜCKER, G. et al. Peroxides and other constituents from *Heterothalamus alienus*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 297-300, 1996a.

RÜCKER G. et al. Sesquiterpene peroxides from *Senecio selloi* and *Eupatorium rufescens*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 565-566, 1996b.

RÜCKER, G. Peroxides as constituents of medicinal plants. **Caderno de Farmácia**, v. 13, n. 2, p. 79-83, 1997.

RÜCKER, G. et al. Antimalarial activity of 1,4-epoxy-bisabola-2,12-diene derivatives. **Archiv der Pharmazie – Pharmaceutical and Medicinal Chemistry**, v. 330, n. 1, p. 12-16, 1997.

RÜCKER, G. et al. Triterpenes with a new 9-epi-cucurbitan skeleton from *Senecio selloi*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1587-1591, 1999.

RUZICKA, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, v. 9, n. 10, p. 357-367, 1953.

SÁNCHEZ-RAMOS, I.; CASTAÑERA, P. Acaricidal activity of natural monoterpenes on *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank), a mite of stored food. **Journal of Stored Products Research**, v. 37, n. 1, p. 93-101, 2001.

SANTOS-MELLO, R. et al. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. **Mutation Research**, v. 516, n. 1/2, p. 23-28, 2002.

SCHMIDT, C. O. et al. Mechanism of the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*. **Chirality**, v. 11, n. 5/6, p. 353-362, 1999.

SHAHIDI BONJAR, G. H. Evaluation of antibacterial properties of Iranian medicinal-plants against *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae* and *Bordetella bronchoseptica*. **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 3, n. 1, p. 82-86, 2004.

SHIMADA, K.; MITAMURA, K.; HIGASHI, T. Gas chromatography and high-performance liquid chromatography of natural steroids. **Journal of Chromatography A**, v. 935, n. 1, p. 141-172, 2001.

SILVA, S. R. et al. **Plantas medicinais do Brasil: aspectos gerais sobre legislação e comércio**. Quito/Equador: TRAFFIC – América do Sul – IBAMA, 2001. 57 p. Disponível em: <[www.traffic.org/content/439.pdf](http://www.traffic.org/content/439.pdf)>. Acesso em: 21 out. 2006.

SILVA, C. M. **Sesquiterpenóides de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn.** 2006. 153f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

SILVA, C. M.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1047-1053, 2006.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 537-556.

SINGH, B.; SAHU, P. M.; SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 153-155, 2002.

SKÖLD, M. et al. The fragrance chemical  $\beta$ -caryophyllene - air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 4, p. 538-545, 2006.

SMITH, L. W.; CULVENOR, C. C. J. Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 2, p. 129-152, 1981.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 51, n. 1/2/3, p. 1-15, 1996.

SOULÉ, M. E. Conservation: tactics for a constant crisis. **Science**, v. 253, n. 5021, p. 744-750, 1991.

STAHL, E. **Thin-layer chromatography** - a laboratory handbook. 2. ed. Traduzido por ASHWORTH, M. R. F. Berlin: Springer-Verlag, 1969. 1041 p.

STEELE, C. L. et al. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2078-2089, 1998.

STEENKAMP, V. et al. The effect of *Senecio latifolius* a plant used as South African traditional medicine, on a human hepatoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 1, p. 51-58, 2001.

STEFANELLO, M. É. A. et al. Óleo essencial de *Gochnatia polymorpha* (Less) Cabr. ssp *floccosa* Cabr. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 999-1002, 2006.

STELIOPOULOS, P. et al. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*:  $^{13}\text{C}$  and  $^2\text{H}$  labeling studies. **Phytochemistry**, v. 60, n. 1, p. 13-20, 2002.

STRANDEN, M.; BORG-KARLSON, A. K.; MUSTAPARTA, H. Receptor neuron discrimination of the germacrene D enantiomers in the moth *Helicoverpa armigera*. **Chemical Senses**, v. 27, n. 2, p. 143-152, 2002.

- STRANDEN, M. et al. (-)-Germacrene D receptor neurons in three species of heliothine moths: structure-activity relationships. **Journal of Comparative Physiology A - Sensory Neural and Behavioral Physiology**, v. 189, n. 7, p. 563-577, 2003.
- SUAU, R. et al. Pyrrolizidine alkaloids from three Spanish *Senecio* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, n. 10, p. 981-984, 2002.
- TEIBLER, P. G. et al. Estudios de toxicidad del *Senecio grisebachii* en ratones e identificación de componentes volátiles potencialmente tóxicos. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 9, n. 2, p. 86-91, 2001.
- TETTAMANZI, M. C.; JARES, E. A.; POMILIO, A. B. Constituents of *Senecio bonariensis* roots. **Fitoterapia**, v. 63, n. 6, p. 551-552, 1992.
- THEBTARANONTH, C. et al. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10,12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 1995.
- TISSERAND, R. Essential oil safety I. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 7, n. 3, p. 28-32, 1996.
- TOKARNIA, C. H.; DÖBEREINER, J.; PEIXOTO, P. V. Poisonous plants affecting livestock in Brazil. **Toxicon**, v. 40, n. 12, p. 1635-1660, 2002.
- TOLSTIKOV, G. A.; TOLSTIKOV, A. G.; TOLSTIKOVA, O. V. Natural peroxides. Chemistry and biological activity. **Russian Chemical Reviews**, v. 65, n. 9, p. 769-783, 1996.
- TOMA, W. et al. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2/3, p. 345-351, 2004.
- TOMMASI, N. et al. Polyhydroxylated triterpenes from *Senecio pseudotites*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1123-1125, 1998.
- TORRES, P. et al. Furanoeremophilanes and a bakkenolide from *Senecio auricula* var. *major*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 57-61, 1998.
- TORRES, P. et al. Furanoeremophilane derivatives from *Senecio flavus*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1507-1513, 1999.
- TORRES, P. et al. Secondary metabolites from *Senecio minutus* and *Senecio boissieri*: a new jacaranone derivative. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 91-93, 2000.
- TRENDAFILOVA, A. B.; TSANKOVA, E. T.; EVSTATIEVA, L. N. Secoeremophilanolides from *Senecio macedonicus*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 329-330, 1995.

TRIGO, J. R., et al. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1011-1022, 2003.

TUNDIS, R. et al. Comparative chemical variability of the non-polar extracts from *Senecio cineraria* group (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 10, p. 1071-1076, 2005.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99-105, 2006.

URZÚA, A. et al. Comparative leaf surface chemistry from *Senecio cerberoanus* and *Senecio viscosissimus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 4, p. 399-401, 2000.

URZÚA, A; ANDRADE, L. Comparative chemical composition of the resinous exudates from *Senecio adenotrichius* and *S. viscosissimus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 8, p. 865-867, 2001.

UZUN, E. et al. Traditional medicine in Sakarya province (Turkey) and antimicrobial activities of selected species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2/3, p. 287-296, 2004.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

VERPOORTE, R. Pharmacognosy in the new millennium: leadfinding and biotechnology. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, n. 3, p. 253-262, 2000.

VILLAESCUSA-CASTILLO, L. et al. Antiprotozoal activity of sesquiterpenes from *Jasonia glutinosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 3, p. 176-180, 2000.

VILLARROEL, L. V. et al. Secondary metabolites from genus *Senecio* and *Heliotropium*. **Revista Latinoamericana de Quimica**, v. 25, n. 3, p. 109-116, 1997.

VLIETINCK, A. J. et al. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 1, p. 31-47, 1995.

YILIANG, S.; RUIYAN, Z.; QINGQING, W. B. X. Programmed-temperature gas chromatographic retention index. **Journal of Chromatography A**, v. 657, n. 1, p. 1-15, 1993.

YOSHIHARA, K. et al. Germacrene D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes. **Tetrahedron Letters**, v. 10, n. 27, p. 2263-2264, 1969.

YOUNG-WON, C. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

YUAN-CHUEN, W.; TUNG-LIANG, H. Screening of anti-*Helicobacter pylori* herbs deriving from Taiwanese folk medicinal plants. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 295-300, 2005.

YUE-ZHONG, S. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, 1998.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

WATSON, A. A. et al. Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications. **Phytochemistry**, v. 56, n. 3, p. 265-295, 2001.

WEISSBECKER, B. et al. Analysis of volatiles emitted by potato plants by means of a Colorado beetle electroantennographic detector. **Talanta**, v. 44, n. 12, p. 2217-2224, 1997.

WIEDENFELD, H.; ROEDER, E.; LUCK, W. O<sup>7</sup>-Angeloylretronecine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio inornatus*. **Planta Medica**, v. 62, n. 5, p. 483, 1996.

WILLIAMS, C. M.; MANDER, L. N. Chromatography with silver nitrate. **Tetrahedron**, v. 57, n. 3, p. 425-447, 2001.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; LIDDELL, J. R. Seco-eremophilanes and other constituents from South African *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 12, p. 3532-3534, 1989.

ZHENG, M. S.; LU, Z. Y. Antiviral effect of mangiferin and isomangiferin on herpes simplex virus. **Chinese Medical Journal**, v. 103, n. 2, p. 160-165, 1990.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (org.) **Farmacognosia – da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2003. p. 577-614.