

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

**CONSTITUINTES DE *Senecio platensis* Arech.  
ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Aline Abati Bolzan**

**Santa Maria, RS, Brasil  
2007**

**CONSTITUINTES DE *Senecio platensis* Arech.:  
ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

**Por**

**Aline Abati Bolzan**

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 a 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**

**CONSTITUENTES DE *Senecio platensis* Arech. ISOLAMENTO,  
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA**

elaborada por  
**Aline Abati Bolzan**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

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

**Leandro Machado Rocha, Dr. (UFF)**

**Ionara Irion Dalcol, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

Santa Maria, 9 de novembro de 2007.

## **DEDICATÓRIA**

Ao Jairo, meu esposo, por todo amor, paciência e compreensão;  
Aos meus pais, Jayme e Ana, pelo exemplo e amor imensurável;  
Ao meu avô Humberto Abati, por suscitar em mim a vontade de aprender.

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço a Deus por ter criado tantas maravilhas e por permitir que desvendemos pouco a pouco este imenso mistério. Agradeço também, Deus, por ter estado comigo, por ter me reanimado quando mais precisei, por acreditar em mim e me amar. Obrigada também por permitir que Sua Santa Mãe e os Anjos da Guarda estivessem sempre comigo;
- Ao meu marido Jairo, agradeço pelo carinho, pela paciência, por acreditar no meu potencial, pelo “financiamento” deste sonho e pela ajuda nos assuntos de informática. Obrigada é pouco, em vista de tamanha dedicação e amor;
- Aos meus pais Jayme e Ana, agradeço por compreender a minha ausência, por serem meus exemplos e por terem me ensinado a ter perseverança e a buscar sempre os meus sonhos. Muito obrigada!
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Berta Maria Heinzmann, meu agradecimento e minha admiração pelo exemplo de excelente orientadora, incansável e determinada. Pelo empenho em minha formação científica e no desenvolvimento deste trabalho;
- Ao Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher pelo auxílio na coleta e identificação do material vegetal;
- Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM, pela realização dos espectros de massas;
- À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner, do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM, pela ajuda na realização dos testes de atividade antibacteriana;
- Ao bolsista Tiago Michelot, pela colaboração com os testes de atividade antibacteriana;
- À Me. Chana de Medeiros Silva, pela amizade, companheirismo e por me guiar nos meus primeiros passos na Fitoquímica;
- Ao Claus pela ajuda na correção do resumo em inglês;
- Aos colegas de laboratório, Chana Medeiros Silva, Ricardo Basso Zanon, Francisco Maikon C. de Barros, Tarcísio de Camargo, Danielle Fontana, Glória N. da Silva, Clarissa Giesel Heldwein, Ticiane Boschetti, Mariane dos Santos, Janaína Mahlke, Viviane de O. Garcia e Lenise de Lima Silva que proporcionaram os momentos de intenso de trabalho em algo mais descontraído e cheio de discussões construtivas;
- À Elaide Minatto pela amizade, atenção e pelas palavras de alento sempre vindas em boa hora;
- À Marisa Basso, do COMUT, pela gentileza de sempre e o empenho para conseguir vários dos artigos citados nesta dissertação;
- Aos meus queridos amigos, Gustavo C. Noronha e Fábio Ferreira, que apesar da distância e de todos esses anos, continuam sendo meus grandes amigos. Obrigada pela amizade sincera;
- À Luciana Benetti, pela amizade e pelas palavras de estímulo ao longo da graduação e do mestrado.
- A você, que tem esta dissertação em suas mãos.

“Dê-me, Senhor, agudeza para entender, capacidade para reter, método e faculdade para aprender, sutileza para interpretar, graça e abundância para falar.

Dê-me, Senhor, acerto ao começar, direção ao progredir e perfeição ao concluir.”

São Tomás de Aquino (1227-1274)

## RESUMO

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

### **CONSTITUENTES DE *Senecio platensis* Arech. ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.**

Autora: Aline Abati Bolzan

Orientadora: Berta Maria Heinzmann

**Data e local da defesa: Santa Maria, 9 de novembro de 2007.**

O gênero *Senecio* (Asteraceae) constitui um grupo de plantas cosmopolitas, formado por mais de 2000 espécies. Embora grande número tenha toxicidade reconhecida devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos, várias delas são empregadas na medicina popular. Seu uso medicinal pode ser atribuído à presença dos demais metabólitos secundários, entre eles os terpenóides, com atividade antibacteriana reconhecida. Este trabalho descreve o isolamento e a identificação de três constituintes presentes no extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  das partes aéreas de *Senecio platensis* Arech., espécie na qual foi detectada a presença de peróxidos em um screening fitoquímico. Adicionalmente, os metabólitos secundários isolados tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada. As partes aéreas de *S. platensis* foram coletadas em abril de 2004, no município de Capão Novo – RS, Brasil. A espécie foi localizada e identificada 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 sob o registro SMDB 9522. As partes aéreas frescas de *S. platensis* (350,0 g) foram extraídas por maceração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , seguido de evaporação do solvente, resultando num resíduo pastoso (6,0 g), com rendimento de 1,71%. O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em coluna flash sobre gel de sílica, usando  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e misturas de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : EtOH, em gradiente, sendo obtidas 29 frações. A partir da fração 1, após duas cromatografias em coluna com gel de sílica impregnado com  $\text{AgNO}_3$  (10%), eluídas com hexano:acetona (95:5) e hexano:éter etílico (99:1), foram obtidos 13,3 mg da substância codificada como **PP1** e posteriormente identificada como germacreno D. A fração 5 da coluna flash também foi fracionada e, após sucessivas cromatografias em coluna sobre gel de sílica impregnado com  $\text{AgNO}_3$  (10%), eluídas com hexano:acetona (9:1), hexano:acetato de etila (95:5) e hexano:acetona (93:7), foram isolados 17,0 mg de **AB1** (deidrofuquinona) e 30,6 mg de **AB2** (espatulenol). Os compostos foram analisados por CG-EM, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  e foram identificados pela comparação de seus dados espectroscópicos com os obtidos da literatura. A fração contendo o germacreno D, considerado precursor de vários outros derivados de esqueleto sesquiterpênico, foi submetida a uma reação de foto-oxidação utilizando o corante Rosa de Bengala como agente sensibilizante. Através desta reação foi possível confirmar a formação do germacreno-D-1-hidroperóxido a partir de seu precursor. A avaliação da atividade antibacteriana das substâncias isoladas foi realizada através do método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M7-A6/CLSI, antigo NCCLS. Em relação ao *Bacillus cereus* ATCC 14579, a deidrofuquinona exibiu uma CIM de 256  $\mu\text{g/mL}$  e CBM de 4096  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que o espatulenol apresentou CIM e CBM de 64  $\mu\text{g/mL}$ . Frente à cepa hospitalar de *B. cereus*, a deidrofuquinona exibiu uma CIM de 256  $\mu\text{g/mL}$  e CBM > 8192  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que o espatulenol apresentou uma CIM 32  $\mu\text{g/mL}$  e CBM > 8192  $\mu\text{g/mL}$ . Tanto a deidrofuquinona quanto o espatulenol não apresentaram atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* até a concentração de 8192  $\mu\text{g/mL}$ .

Palavras-chave: *Senecio platensis* Arech.; sesquiterpenóides; germacreno D; germacreno-D-1-hidroperóxido; deidrofuquinona; espatulenol; atividade antibacteriana.

## ABSTRACT

### CONSTITUENTS OF *Senecio platensis* Arech. ISOLATION, STRUCTURAL ELUCIDATION AND EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL ACTIVITY

Author: Aline Abati Bolzan

Advisor: Berta Maria Heinzmann

The genus *Senecio* (Asteraceae) constitutes a group of cosmopolitan plants formed by more than 2000 species. Although most of these plants are considered to be toxic 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, amongst them the terpenoids, with known antimicrobial activity. This work describes the isolation and identification of three compounds present in the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract of fresh aerial parts of *Senecio platensis* Arech., a species that showed the presence of peroxides in a phytochemical screening. Additionally, the the antibacterial activity of the isolated secondary metabolites has been evaluated. The aerial parts of *Senecio platensis* were collected in Capão Novo – RS, Brasil and identified by Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher. Voucher specimen SMDB 9522 is preserved in the Herbarium of the Departamento de Botânica, UFSM. The fresh aerial parts of *S. platensis* (350.0 g) were extracted by maceration with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. The CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> extract was evaporated to obtain a viscous residue (6.0 g), which approximates a yield of 1.71%. The crude extract was fractionated by flash chromatography over silica gel, using CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH mixtures of increasing polarity to yield 29 fractions. After two cycles of column chromatography (column: silica gel impregnated with AgNO<sub>3</sub> (10%), eluents: hexane:acetone (95:5) and hexane:ethyl ether (99:1) 13.3 mg of **PP1** were isolated from fraction 1 and later identified as germacrene D. After successive column chromatography over silica gel impregnated with AgNO<sub>3</sub> (10%), eluting with hexane:acetone (9:1), hexane:ethyl acetate (95:5) and hexane:acetone (93:7), fraction 5 yielded 17.0 mg of **AB1** (dehydrofukinone) and 30.6 mg of **AB2** (spathulenol). The compounds were analyzed by GC-EI-MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR and were identified by comparison of their spectroscopic data with the literature. The fraction containing germacrene D, which is considered to be a precursor of several other sesquiterpene derivatives, was submitted to photooxidation process using Bengal Rose as sensitizer agent. By this reaction it was possible to confirm the formation of germacrene-D-1-hydroperoxide by its precursor. The antibacterial evaluation of the isolated compounds was accomplished by the broth microdilution method based on M7-A6/CLSI. In relation to *Bacillus cereus* ATCC 14579, dehydrofukinone showed MIC of 256 µg/mL and MBC of 4096 µg/mL. The spathulenol presented MIC and MBC of 64 µg/mL. Against the clinical isolate of *B. cereus*, dehydrofukinone showed MIC of 256 µg/mL and MBC > 8192 µg/mL while spathulenol showed MIC 32 µg/mL and MBC > 8192 µg/mL. Dehydrofukinone and spathulenol are inactive against *Pseudomonas aeruginosa* at the tested concentrations (until 8192 µg/mL).

Key words: *Senecio platensis* Arech.; sesquiterpenoids; germacrene D; germacrene-D-1-hydroperoxide; dehydrofukinone, spathulenol; antibacterial activity.

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Principais espécies de <i>Senecio</i> utilizadas como medicinais em diferentes regiões do mundo.....	22
TABELA 2 - Espécies de <i>Senecio</i> com atividades biológicas comprovadas.....	25
TABELA 3 - Exemplos de monoterpênóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....	33
TABELA 4 - Exemplos de sesquiterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....	35
TABELA 5 - Exemplos de sesquiterpenóides com grupamento peróxido descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....	41
TABELA 6 - Exemplos de diterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....	42
TABELA 7 - Exemplos de triterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....	45
TABELA 8 - Exemplos de flavonóides descritos para o gênero <i>Senecio</i> .....	47
TABELA 9 - Rendimento das frações obtidas da coluna A.....	57
TABELA 10 - Rendimento das frações obtidas da coluna B.....	59
TABELA 11 - Rendimento das frações obtidas da coluna C.....	60
TABELA 12 - Rendimento das frações obtidas da coluna D e D'.....	61
TABELA 13 - Rendimento das frações obtidas da coluna E.....	62
TABELA 14 - Rendimento das frações obtidas da coluna E'.....	63
TABELA 15 - Rendimento das frações obtidas da coluna F.....	64
TABELA 16 - Rendimento das frações obtidas da coluna F'.....	65
TABELA 17 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para a substância PP1, em comparação com dados da literatura.....	79
TABELA 18 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para a substância PP1, em comparação com dados da literatura.....	80
TABELA 19 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB1, em comparação com dados da literatura.....	91
TABELA 20 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB1, em comparação com dados da literatura.....	92
TABELA 21 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB2, em comparação com dados da literatura.....	105
TABELA 22 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN $^1\text{H}$ (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB2, em comparação com dados da literatura.....	106
TABELA 23 - Resultado dos testes de avaliação da atividade antibacteriana das substâncias AB1 e AB2.....	114

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos.....	28
FIGURA 2 - Biossíntese dos terpenóides.....	31
FIGURA 3 - Obtenção dos hidroperóxidos através da foto-oxidação do $\alpha$ -curcumeno.....	40
FIGURA 4 - Ciclização do esqualeno dando origem aos triterpenóides e esteróides.....	44
FIGURA 5 - Estruturas do $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol.....	48
FIGURA 6 - <i>Senecio platensis</i> Arech.: A - ramo florífero; B - aspectos variados de folhas; C - flor ligulada do raio; D - flor tubulosa do disco; E - capítulo destituído de flores; F - capítulo (Fonte: Matzenbacher, 1998).....	50
FIGURA 7 - <i>Senecio platensis</i> Arech. - Aspecto geral da planta.....	51
FIGURA 8 - <i>Senecio platensis</i> Arech. - Nódulos.....	51
FIGURA 9 - Representação esquemática do fracionamento do extrato diclorometânico de <i>S. platensis</i> , com o isolamento de PP1, AB1 e AB2.....	66
FIGURA 10 - Análise de extratos diclorometânicos de espécies de <i>Senecio</i> quanto a presença de peróxidos.....	69
FIGURA 11 - Análise do resultado da foto-oxidação da fração 2 Col. B por CCD.....	70
FIGURA 12 - Análise do resultado da foto-oxidação da fração 2 Col. A por CCD.....	71
FIGURA 13 - Análise da mistura reacional da foto-oxidação das frações 2 Col. A por CCD, após o armazenamento em refrigerador por 20 dias.....	72
FIGURA 14 - Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno D (A) (NIST, 1998) em comparação ao de PP1 (B).....	74
FIGURA 15 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de PP1 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	75
FIGURA 16 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de PP1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	76
FIGURA 17 - Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ de PP1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Ampliações dos sinais correspondentes ao H-5 ( $\delta = 5,78$ ppm), H-6 ( $\delta = 5,25$ ppm), H-1 ( $\delta = 5,14$ ppm), H-15a ( $\delta = 4,79$ ppm), H-15b ( $\delta = 4,74$ ppm).....	77
FIGURA 18 - Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ de PP1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). Ampliações dos sinais correspondentes ao H-12 ( $\delta = 0,86$ ppm) e H-13 ( $\delta = 0,81$ ppm)..	78
FIGURA 19 - Fórmula estrutural do germacreno D (substância PP1).....	81
FIGURA 20 - Espectro de massas por impacto eletrônico da deidrofuquinona (A) (NIST, 1998) em comparação ao de AB1 (B).....	83
FIGURA 21 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AB1 (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	84
FIGURA 22- Espectro de DEPT $135^\circ$ de AB1 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	85
FIGURA 23 - Ampliação do espectro de DEPT $135^\circ$ de AB1 (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	86
FIGURA 24 - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de AB1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	87
FIGURA 25 - Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AB1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	88
FIGURA 26 - Ampliação do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AB1 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	89
FIGURA 27 - Espectro de $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY de AB1 (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	90

FIGURA 28 - Esquematização das correlações encontradas para os prótons de AB1 no espectro de correlação.....	90
FIGURA 29 - Proposta de fragmentação para a substância AB1.....	94
FIGURA 30 - Fórmula estrutural da deidrofuquinona (substância AB1).....	96
FIGURA 31 - Espectro de massas por impacto eletrônico do espatulenol (A) (NIST, 1998) em comparação ao de AB2 (B).....	98
FIGURA 32 - Espectro de RMN <sup>13</sup> C de AB2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	99
FIGURA 33 - Espectro de DEPT 135° de AB2 (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	100
FIGURA 34 - Espectro de RMN <sup>1</sup> H de AB2 (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	101
FIGURA 35 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup> H de AB2 (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) correspondentes ao H-9a (δ = 2,42 ppm), H-6 (δ = 0,46 ppm).....	102
FIGURA 36 - Espectro de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de AB2 (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	103
FIGURA 37 - Esquematização das correlações observadas para os prótons de AB2 no espectro de correlação.....	103
FIGURA 38 - Ampliação do espectro de <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY de AB2 (200 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	104
FIGURA 39 - Proposta de fragmentação para a substância AB2.....	108
FIGURA 40 - Fórmula estrutural do espatulenol (substância AB2).....	111
FIGURA 41 - Avaliação da atividade inibitória mínima da substâncias AB1 e AB2 sobre a espécie <i>B. cereus</i> ATCC 14579.....	112
FIGURA 42 - Avaliação da atividade inibitória mínima das substâncias AB1 e AB2 sobre <i>B. cereus</i> isolado clínico.....	112
FIGURA 43 - A – Avaliação da Atividade Bactericida Mínima da substância AB1 sobre <i>B. cereus</i> ATCC 14579 e B – Avaliação da Atividade Bactericida Mínima da substância AB2 sobre <i>B. cereus</i> ATCC 14579.....	113
FIGURA 44 - Esquema geral para a extração dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.....	116
FIGURA 45 - Enantiômeros do germacreno D.....	118
FIGURA 46 - Estrutura química do corante Rosa de Bengala, utilizado como molécula fotossensibilizadora.....	120
FIGURA 47 - Mecanismos I e II na produção de oxigênio reativo.....	121
FIGURA 48 - Esquema de tratamento de um tumor utilizando a terapia fotodinâmica....	122
FIGURA 49 - Foto-oxidação do germacreno D através de uma reação do tipo ENE, resultando no germacreno-D-1-hidroperóxido.....	122
FIGURA 50 - Proposta de biossíntese de furanoeremofilanos a partir da deidrofuquinona.....	124

## LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Aps – alcalóides pirrolizidínicos

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

CBM – concentração bactericida mínima

CC – cromatografia em coluna

CCD – cromatografia em camada delgada

CG – cromatografia gasosa

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM – concentração inibitória mínima

COSY (do inglês) “correlation spectroscopy”

d – dublete

DC – De Candolle

dd – duplo dublete

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

ed. - edição

EM – espectrometria de massas

EM-IE – espectro de massas por impacto eletrônico

eV – elétron Volts

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

g – grama (s)

GI – grau de insaturação

J – constante de acoplamento

m – multiplete

min. - minutos

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”

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  $^{13}\text{C}$  – ressonância magnética nuclear de carbono 13

s – singlete

sl – singlete largo

sol. - solução

subsp. - subespécie

TMS – tetrametilsilano

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

u.m.a. - unidades de massa atômica

var. - variedade

$^1\text{O}_2$  – oxigênio singlete

$^3\text{O}_2$  – oxigênio molecular

$\delta$  – deslocamento químico

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
<b>2.1 <i>Senecio sp.</i></b> .....	20
2.1.1 Usos populares.....	21
2.1.2 Atividades Biológicas relatadas.....	24
2.1.3 Toxicidade.....	27
<b>2.2 Constituintes químicos presentes no gênero <i>Senecio</i></b> .....	29
2.2.1 Terpenóides.....	29
2.2.1.1 Monoterpenóides.....	32
2.2.1.2 Sesquiterpenóides.....	33
2.2.1.2.1 Sesquiterpenóides com grupamento peróxido.....	38
2.2.1.3 Diterpenóides.....	42
2.2.1.4 Triterpenóides.....	43
2.5. Outras classes de metabólitos secundários.....	46
2.5.1 Esteróides.....	46
2.5.2 Flavonóides.....	47
<b>2.3 <i>Senecio platensis</i> Arech.</b> .....	49
2.3.1 Descrição botânica.....	49
2.3.2 Distribuição geográfica.....	52
2.3.3 Dados fenológicos e observações ecológicas.....	52
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	53
<b>3.1 Procedimentos gerais</b> .....	53
3.1.1 Impregnação com nitrato de prata.....	54
3.1.1.1 Impregnação das cromatofolhas para CCD.....	54
3.1.1.2 Impregnação do gel de sílica para CC.....	54
3.1.2 Reagentes de detecção para CCD.....	55
3.1.2.1 Reagente de detecção para peróxidos (Reagente de Huber e Fröhlke).....	55
3.1.2.2 Anisaldeído-ácido sulfúrico.....	55
<b>3.2 Material vegetal</b> .....	56
<b>3.3 Preparação do extrato diclorometânico de <i>S. platensis</i></b> .....	56
3.3.1 Análise da presença de peróxidos no extrato diclorometânico de <i>S. platensis</i> .....	56
<b>3.4 Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico</b> .....	56
3.4.1 Coluna A.....	57
3.4.1.1 Análise da presença de peróxidos e seus precursores.....	58
<b>3.5 Isolamento dos sesquiterpenóides PP1, AB1 e AB2</b> .....	58

3.5.1 Coluna B.....	58
3.5.2 Coluna C.....	59
3.5.3 Coluna D e D'.....	60
3.5.4 Coluna E.....	62
3.5.4.1 Coluna E'.....	63
3.5.5 Coluna F.....	64
3.5.5.1 Coluna F'.....	64
<b>3.6 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos isolados.....</b>	<b>66</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
<b>4.1 Rendimento do extrato diclorometânico e das substâncias isoladas de <i>S. platensis</i>.....</b>	<b>68</b>
4.1.1 Rendimento do extrato diclorometânico.....	68
4.1.1.2 Rendimento de PP1.....	68
4.1.1.3 Rendimento de AB1.....	68
4.1.1.4 Rendimento de AB2.....	68
<b>4.2 Análise do extrato diclorometânico de <i>S. platensis</i> quanto a presença de peróxidos.....</b>	<b>69</b>
4.2.1 Busca pelos precursores dos peróxidos.....	70
<b>4.3 Análise estrutural das substâncias isoladas.....</b>	<b>73</b>
4.3.1 Elucidação estrutural de PP1.....	73
4.3.1.2 Estrutura de PP1.....	81
4.3.2 Elucidação estrutural de AB1.....	82
4.3.2.1 Análise da fragmentação de AB1 por EM-IE.....	93
4.3.2.2 Análise do espectro de RMN <sup>13</sup> C de AB1.....	95
4.3.2.3 Análise do espectro de RMN <sup>1</sup> H de AB1.....	95
4.3.2.4 Estrutura de AB1.....	96
4.3.3 Elucidação estrutural de AB2.....	97
4.3.3.1 Análise da fragmentação de AB2 por EM-IE.....	107
4.3.3.2 Análise do espectro de RMN <sup>13</sup> C de AB2.....	109
4.3.3.3 Análise do espectro de RMN <sup>1</sup> H de AB2.....	110
4.3.3.4 Estrutura de AB2.....	111
<b>4.5 Avaliação da atividade antibacteriana de AB1 e AB2.....</b>	<b>111</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>115</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>129</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>130</b>
<b>8 ANEXO.....</b>	<b>150</b>
ANEXO A: Artigo: “Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero <i>Senecio</i> .....	150
ANEXO B: Artigo: “Espécies de <i>Senecio</i> na Medicina Popular da América Latina e Toxicidade Relacionada a sua Utilização”.....	150



## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo que se confunde com a história da civilização humana. Por milhares de anos as plantas proveram ao homem de tudo o que ele necessitava, desde a cobertura para suas casas, matéria-prima para confecção de roupas, e ferramentas, combustível para fogo, assim como alimentos e medicamentos. Os mais antigos registros sobre a utilização medicinal de plantas foram encontrados na Mesopotâmia, feitos em placas de argila com escrita cuneiforme, datando cerca 2600 anos antes de Cristo. As plantas sempre foram importantes para o homem ao ponto de serem admiradas e elevadas à categoria de entidades divinas devido ao efeito causado pela ingestão inadvertida de algumas delas (Butler, 2004; Gurib-Fakim, 2006; Lorenzi; Matos, 2002).

O número de espécies realmente conhecidas, e utilizadas como medicamentos é pequeno, frente à biodiversidade vegetal e a devastação causada pelo homem. O Brasil, conta com mais de 55.000 espécies vegetais catalogadas de um total estimado de, aproximadamente, 120.000 espécies sobre um panorama mundial de aproximadamente 350.000. Entretanto, em 2001, estimava-se que menos de 1% dessas espécies medicinais dos diferentes ecossistemas haviam sido quimicamente estudadas (Yunes; Calixto, 2001).

O crescimento do mercado mundial de fitoterápicos é estimado em 10% a 20% ao ano e as principais razões que impulsionaram esse grande crescimento nas últimas décadas foram: a valorização de hábitos mais saudáveis e, conseqüentemente, o consumo de produtos naturais; os evidentes efeitos colaterais dos medicamentos sintéticos; a descoberta de novos princípios ativos nas plantas; a comprovação científica da eficácia dos fitoterápicos; e o preço que, de maneira geral, é mais acessível à população com menor poder aquisitivo. Além disso, o desenvolvimento de um medicamento sintético custa em torno de US\$ 500 milhões, caindo para US\$ 50 milhões no caso de um fitoterápico, que pode chegar ao mercado num tempo dez vezes menor. A estimativa do mercado mundial para medicamentos é de US\$ 300 bilhões/ano, destes, US\$ 20 bilhões são provenientes de derivados ativos de plantas medicinais, sendo a Europa responsável por aproximadamente 50% deste mercado. Já a estimativa do mercado nacional de medicamentos é de aproximadamente US\$ 8 bilhões/ano, com os derivados de plantas medicinais correspondendo a US\$ 1,5 bilhão desse total (Sousa; Miranda, 2007). Fitoterápicos e fitofármacos são responsáveis por 25% do receituário médico nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento (Simões et al., 2003), sendo mais de 13.000 plantas utilizadas mundialmente como fármacos ou fonte de fármacos (Tyler, 1994 apud Simões et al., 2003).

Em 2001 e 2002, aproximadamente um quarto dos fármacos mais vendidos mundialmente eram naturais ou derivados de produtos naturais (Butler, 2004). Além dos fármacos naturais existe um número significativo de fármacos que são obtidos por modificação estrutural de produtos naturais ou possuem estes como protótipos. Essas modificações estruturais possibilitam o planejamento racional de novas moléculas e a obtenção de novas estruturas possivelmente mais eficazes e seguras, ou com propriedades farmacológicas até o momento inesperadas (Rates, 2001). Todos esses fatores têm redobrado o interesse das indústrias farmacêuticas para o aproveitamento da biodiversidade mundial, especialmente para o tratamento de certas enfermidades, para as quais a síntese orgânica não tem mostrado sucesso (Yunes; Calixto, 2001).

Numerosos métodos como o isolamento de substâncias ativas, a síntese química, a química combinatória e a modelagem molecular têm sido utilizados para o descobrimento de novos fármacos (Yunes; Calixto, 2001). Apesar do recente interesse pela modelagem molecular, a síntese química e outras técnicas de síntese, os produtos naturais, e particularmente as plantas medicinais, continuam sendo uma importante fonte de novos medicamentos, especialmente na terapia anticâncer e anti-hipertensiva (Newman et al., 2007; Butler, 2004). Entretanto a busca de novas substâncias naturais deve ser realizada de forma a ser competitiva com outros métodos de obtenção de fármacos, aumentando assim a velocidade dos métodos de *screening*, do isolamento e da elucidação estrutural, possibilitando desta forma o fornecimento de substâncias com alta qualidade e em larga-escala (Butler, 2004).

Tendo em vista o crescente interesse e necessidade pela pesquisa de plantas, especialmente aquelas ainda não estudadas, e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes no tratamento das mais variadas enfermidades, foi o objetivo deste trabalho realizar um estudo fitoquímico das partes aéreas de *Senecio platensis* Arech., dando enfoque especial ao sesquiterpenóides, uma vez que esses compostos costumam apresentar diversas atividades farmacológicas, bem como avaliar a sua atividade antibacteriana.

Para esta classe de metabólitos secundários, são descritas as atividades antimicrobiana (Gunasekera et al., 1990; Pérez et al., 1999), antiinflamatória (Geissberger; Sequin, 1991), antitumoral (Jurek; Scheuer, 1993), antimalárica (Woerdenbag et al., 1994), antioxidante (Bork et al., 1997), citotóxica (Barrero et al., 1997) e hipoglicemiante (Inmann et al., 1999).

Em vista desta gama de atividades farmacológicas descritas para os derivados terpênicos, comumente presentes nos extratos obtidos com solventes pouco polares das

espécies do gênero *Senecio*, e a inexistência de um estudo fitoquímico desta espécie, fazem de *Senecio platensis* Arech. uma alternativa promissora, no intuito de encontrar-se novos compostos com atividades biológicas de interesse farmacêutico.

Esta dissertação está organizada na forma de itens. O item de Revisão Bibliográfica inicia-se com um amplo estudo acerca do gênero *Senecio*, seus principais constituintes químicos descritos, seus usos populares e uma revisão das atividades biológicas para as substâncias isoladas do gênero *Senecio*. Em seguida é dado especial enfoque aos constituintes sesquiterpenóides, uma vez que são o alvo de estudo deste trabalho. Num terceiro momento, apresenta-se a espécie estudada, *Senecio platensis* Arech., e suas características botânicas.

O item Materiais e Métodos apresenta todo o processo realizado para a obtenção dos compostos isolados de *S. platensis*, desde a coleta da planta, até o isolamento e elucidação estrutural dos mesmos, bem como uma avaliação da atividade antibacteriana.

O item 4 apresenta os Resultados dos compostos isolados de *S. platensis*, seus rendimentos, seus espectros e comparações com a literatura, com a elucidação de suas estruturas. Também descreve o resultado da atividade antibacteriana dos compostos testados. Na Discussão (item 5), apresenta-se a interpretação dos resultados, relacionando estrutura-atividade e origem biossintética.

Em seguida, apresentam-se as conclusões do trabalho no item 6.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Senecio* sp.

A família Asteraceae, é a maior família das Angiospermas. Compreende cerca de 1.400 gêneros e 25.000 espécies, distribuídos em quase todos os ecossistemas, exceto na Antártica. A maior parte das espécies são plantas de pequeno porte, como herbáceas e arbustos, possuindo poucas árvores (Robinson, 2001, Gurib-Fakim, 2006).

O gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*), um dos maiores gêneros da família Asteraceae, é muito vasto na natureza, ocorrendo mais de 2000 espécies pela superfície terrestre (Matzenbacher, 1998). Está presente no continente Europeu (Sans et al., 2004), Africano (Steenkamp et al., 2001), Asiático (Huang et al., 2005), no Oriente Médio (Kutiel, 2004), Oceania (Gardner et al., 2006), nas Américas, do Norte (Bai et al., 1996), Central (Lentz et al., 1998) e do Sul (Paiva et al., 2004). Na América do Sul, a Argentina (Cabrera, 1978 apud Pérez et al., 1999) e o Chile (Cabrera, 1949, apud Urzúa; Andrade, 2000) são os países com o maior número de representantes, a Argentina contando com mais de 300 (Pérez et al., 1999) e o Chile com mais de 208 espécies catalogadas (Loyola et al., 1985).

No Brasil, o gênero *Senecio* é bastante diversificado, uma vez que existem 85 espécies (Cabrera; Klein, 1975; Matzenbacher, 1998), sendo que 33 dessas são nativas da região sul e 25 foram identificadas no Rio Grande do Sul (Matzenbacher, 1998). No entanto, outros autores relatam a ocorrência de 128 espécies deste gênero em nosso país (Motidome; Ferreira, 1996 apud Gava; Barros, 1997). A delimitação do gênero têm levado a discussões taxonômicas, uma vez que suas espécies apresentam grande variabilidade morfológica e química (Dupré et al., 1991).

Este gênero tem sido amplamente investigado. Já em 1982, um artigo de Bohlmann et al., (1982) relatava que mais de 100 espécies de *Senecio* haviam sido investigadas fitoquimicamente até aquele ano.

Em geral, são ervas anuais ou perenes, ocorrendo sob 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”. Distribui-se em regiões pequenas, 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, desde que haja condições ambientais favoráveis, como umidade e luz, e que as fenofases vegetativas sejam

praticamente constantes durante todo o ciclo da planta. Fatores ambientais desfavoráveis como déficit hídrico, o manejo do solo e o dano de insetos, associados ou não, podem alterar o ciclo das plantas e serem determinantes para a sua permanência no ambiente. No Brasil, em geral, crescem entre o verão e o outono e florescem entre a primavera e verão (Karam et al., 2002).

### 2. 1.1 Usos populares

Existe na literatura um amplo registro da utilização de plantas do gênero *Senecio* com fins medicinais. A sua utilização pode ser encontrada em quase todos os continentes, por diversas culturas, e apesar destes povos muitas vezes estarem geograficamente e culturalmente muito distantes, alguns usos são muito semelhantes, como no caso da utilização de algumas espécies do gênero para dores de estômago e estimulante da digestão, como na Argentina, com *S. brasiliensis* (Sprengel) Less.; *S. graveolens* Wedd., na Bolívia *S. graveolens* Wedd., no Brasil *S. brasiliensis* (Sprengel) Less., no Chile *S. adenophyllus* Meyen et Walp.; *S. atacamensis* Phil., *S. eriophyton* Remy, *S. nutans* Sch. Bip., *S. papii* Ricardo et Martic.; *S. puchii* Phil. e na Itália *S. vulgaris* L.; e nos casos de afecções cutâneas, como os encontrados na literatura para a Argentina *S. bonariensis* Hook et Arn., Brasil *S. brasiliensis* (Sprengel) Less.; *S. sonchifolius* (L.) Moench, Chile *S. fistulosus* Poepp. Ex Less., Peru *S. rhizomatosus* Rusby, no continente africano com a utilização de *S. deltoidea* Less., *S. latifolius* DC, *S. scandens* Buch.-Ham ex D. Don, nos EUA com *S. aureus* L., na Espanha *S. jacobaea* L., em Portugal *S. jacobaea* L., na Turquia *S. vulgaris* L. e na China com a utilização de *S. scandens* Buch.-Ham ex D. Don (Tabela 1).

É na América Latina onde se encontra a maior parte das referências da utilização do *Senecio* na medicina popular. Em recente revisão, Bolzan et al., (2007), descrevem a utilização de 46 espécies de *Senecio* em 11 países da América Latina, destacando-se o Chile e o México com o maior número de espécies utilizadas, seguidos pela Argentina. No Brasil, existem relatos da utilização de *Senecio brasiliensis* (Sprengel) Less., como emoliente e “resolutiva” e, internamente, como vermífugo (Coimbra, 1958), em processos inflamatórios, dores estomacais e como “regulador sanguíneo” (Toma; Trigo, 2004) e em aplicação tópica em ferimentos na pele (Visbiski, 2003). O Guia de Medicina Homeopática, Cairo, (1965) descreve *Senecio aureus* como tônico uterino e contra náuseas durante a gravidez.

É importante ressaltar que os termos aqui utilizados para designar uma enfermidade são aqueles utilizados pela população em geral, não estando de acordo com os termos científicos apropriados, e podendo, muitas vezes, não estar relacionado à enfermidade em si, mas a alguma sintomatologia.

Tabela 1 - Principais espécies de *Senecio* utilizadas como medicinais em diferentes regiões do mundo

CONTINENTE	PAÍS	ESPÉCIE	PARTE UTILIZADA	UTILIZAÇÃO PRECONIZADA PELA MEDICINA POPULAR	REFERÊNCIA
ÁFRICA	Etiópia	<i>S. myriocephalus</i> Sch. Bip.	folhas	Para o tratamento de problemas oculares	Teklehaymanot et al., 2007
	Ruanda	<i>S. maranguensis</i> O. Hoffm.	folhas	No tratamento de tosse, otites e ulcerações	Cos et al., 2002
	Tanzânia	<i>S. deltoidea</i> Less	toda planta	Nos casos de dermatite	Hamza et al., 2006
	Não especificado	<i>S. serratuloides</i> DC. var. <i>serratuloides</i>	toda planta	No tratamento de infecções, lesões purulentas, “purificador do sangue”, queimaduras e ulcerações	Kelmanson et al., 2000
	Não especificado	<i>S. latifolius</i> DC	folhas	Queimaduras e feridas	Steenkamp et al., 2001
	Não especificado	<i>S. latifolius</i> DC	raízes	Como emético e no tratamento de doenças venéreas	Steenkamp et al., 2001
ÁSIA	China	<i>S. integrifolius</i> (L.) Clairv.	toda planta	Como anticancerígeno	Graham et al., 2000
		<i>S. oryzetorum</i> Diels	toda planta	Como anticancerígeno	Graham et al., 2000
		<i>S. scandens</i> Buch.-Ham ex D. Don	toda planta	Nos casos de prurido, hemorróida, eczema, urticária, ulcerações na pele e inflamação nos olhos	Li et al., 2006
		<i>S. scandens</i> Buch.-Ham ex D. Don	toda planta	Nos casos de “dores de barriga”, sarampo, úlceras e hemorróidas	Chun-Lin; Rong, 2004

<b>AMÉRICA</b>	EUA	<i>S. aureus</i> L.	raízes	No tratamento de ferimentos e para acelerar o trabalho de parto; como como peitoral e emenagogo	Nachman, 1983
<b>EUROPA</b>	Bulgária	<i>S. vulgaris</i> L.	aéreas	Como bloqueador colinérgico e tônico uterino	Leporatti; Ivancheva, 2003
	Espanha	<i>S. spp.</i>	Não especificada	Como emenagogo, antiinflamatório e vasodilatador	Torres et al., 2000
		<i>S. jacobaea</i> L.	aéreas	Como cicatrizante	Blanco et al., 1999
	Itália	<i>S. delphinifolius</i> Vahl	não especificada	Como substituto da camomila	Lentini, 2000
		<i>S. vulgaris</i> L.	aéreas	Nos casos de problemas digestivos; amenorréia; dismenorréia	Leporatti; Ivancheva, 2003
			aéreas	Como antiinflamatório	Pieroni et al., 2004
Portugal	<i>S. jacobaea</i> L.	folhas	No tratamento de ulcerações na pele	Camejo-Rodrigues et al., 2003	
<b>ORIENTE MÉDIO</b>	Turquia	<i>S. vulgaris</i> L.	raízes	No tratamento de eczemas	Uzun et al., 2004

## 2. 1. 2 Atividades biológicas relatadas

Apesar da reconhecida toxicidade atribuída às plantas do gênero *Senecio*, existem na literatura diversas atividades biológicas comprovadas, que em muitos casos explicam, pelo menos em parte, a sua utilização popular.

*S. tephrosioides* Turcz é tradicionalmente utilizado como medicamento para tosse no Peru. Segundo um estudo realizado por Alzamora et al., (2001), o óleo essencial desta planta possui atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

*S. grisebachii* Baker, utilizado no Paraguai para tratar de infecções fúngicas na pele, demonstrou atividade frente a fungos causadores de infecções cutâneas, entre eles *Microsporium gypseum* (Portillo et al., 2001).

*S. maranguensis* O. Hoffm., utilizado em Ruanda para tratar da tosse, otite e ferimentos, apresentou atividade antimicrobiana contra *Epidermophyton floccosum*, *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum*, *Candida albicans* (Cos et al., 2002).

Para *S. ambavilla* Pers., utilizado no tratamento de ferimentos, abscessos, eczema e escabiose, foi encontrada a atividade antiviral contra o vírus da herpes simplex e poliovírus. Segundo os autores do estudo, esta atividade pode ser explicada pela presença de altos níveis de flavonóides e de taninos nesta espécie (Fortin et al., 2002).

Segundo Garcia et al., (2003) *Senecio angulifolius* DC., é utilizado no México contra infecções vaginais. O estudo realizado por Garcia et al., 2003 demonstra que esta espécie possui atividade antifúngica contra as cepas testadas e, segundo os autores, explica o uso desta planta na medicina popular no tratamento de doenças que envolvam infecções fúngicas.

*S. eriophyton* J. Remy, utilizado como estimulante e afrodisíaco na Argentina, demonstrou ter atividade relaxante sobre a musculatura lisa do corpo cavernoso em cobaias (Hnatyszyn et al., 2003).

O extrato de *S. brasiliensis* var. *brasiliensis* (Spreng), utilizado no Brasil em processos inflamatórios, dores estomacais e como “regulador sanguíneo”, apresentou atividade antiulcerogênica em roedores. Este resultado sugere que o extrato, contendo uma mistura de alcalóides pirrolizidínicos como senecionina, integerrimina, retrorsina, usuramina e senecifilina, apresenta um significativo efeito anti-úlceras em roedores. O mecanismo envolvido neste efeito é a citoproteção, causada pelo aumento de muco, prostaglandinas e somatostatina, sendo os alcalóides pirrolizidínicos responsáveis pela atividade farmacológica. No entanto, novos estudos sobre estrutura e atividade são necessários para reduzir a hepatotoxicidade destes constituintes, mantendo o seu efeito gastroprotetor (Toma et al., 2004).

*S. culcitoides* Schultz-Bip, com uso medicinal não especificado na Bolívia, e utilizada no Peru no tratamento da tosse, asma, bronquite e doenças respiratórias, apresentou atividades antifúngica contra *Trychophyton mentagrophytes* e antibacteriana contra *Bacillus subtilis* (Rojas et al., 2003) (Tabela 2).

Algumas substâncias isoladas do gênero *Senecio* também tiveram suas atividades investigadas: o sesquiterpenóide 1,10-epoxifuranoeremofilano, isolado do óleo essencial obtido dos ramos, folhas e raízes de *Senecio aegyptius* var. *discoideus* Boiss., exibiu uma atividade inibitória substancial de bactérias Gram-negativas (El-Shazly, 2002). A di-hidroeuparina, derivada da acetofenona, presente na concentração de aproximadamente 3% em *Senecio graveolens*, apresentou atividade hipotensora em ratos (Loyola et al., 1985) e mostrou ser efetiva como protetor solar (Ortega et al., 2000).

**Tabela 2 - Espécies de *Senecio* com atividades biológicas comprovadas**

<b>Espécie/ Parte utilizada</b>	<b>Forma utilizada</b>	<b>Atividades</b>	<b>Referência</b>
<i>S. mathewsii</i> Wedd./ partes aéreas	Extrato aquoso	Anti-HIV (teste <i>in vitro</i> )	Abdel-Malek et al., 1996
<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less./ partes aéreas	Extrato etanólico	Larvicida contra larvas do mosquito <i>Aedes fluviatilis</i>	Macêdo et al., 1997
<i>S. brasiliensis</i> var. <i>Brasiliensis</i> (Spreng)/ inflorescências	Extrato metanólico	Antiulcerogênica em roedores	Toma et al., 2004
<i>Senecio graveolens</i> Wedd./ folhas	Óleo essencial	Antibacteriana frente <i>M. Luteus</i> e antifúngica contra <i>C. albicans</i> .	Pérez et al., 1999
<i>S. malacitanus</i> Huter/ planta inteira florida	Extrato acetônico	Inseticida	Pascual-Villalobos; Robledo, 1999
<i>S. vulgaris</i> L./ planta inteira florida	Extrato acetônico	Inseticida	Pascual-Villalobos; Robledo, 1999
<i>S. vulgaris</i> L./ não especificada	Extrato metanólico e diclorometânico	Antioxidante, inibição da $\alpha$ -amilase (anti-diabetes) Ausência de citotoxicidade contra células normais	Conforti et al., 2006
<i>S. vulgaris</i> L./ raízes	Extrato de éter de petróleo	Antibacteriana frente <i>Escherichia coli</i>	Uzun et al., 2004
<i>S. scandens</i> Buch-	Não especificado	Antipirética, antioxidante, anti-séptica, diurética	Reid et al., 1987 apud Liu; NG, 2000

Ham./ não especificada	Extrato aquoso	Anti-hemolítica e antioxidante	Liu; NG, 2000
<i>S. scandens</i> Buch-Ham./ não especificada	Não especificado	Anti-HIV	Chang; Yeung, 1988 apud Liu; NG, 2000.
<i>S. scandens</i> Buch-Ham./ toda planta	Extrato etanólico	Antibacteriana moderada contra <i>Helicobacter pylori</i>	Yuan-Chuen; Tung-Liang, 2005
<i>S. tephrosioides</i> Turcz./ não especificada	Óleo essencial	Antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	Alzamora et al., 2001
<i>S. grisebachii</i> Baker/ inflorescências	Extrato aquoso, diclorometânico, metanólico	Antifúngico frente a fungos causadores de infecções cutâneas, entre eles <i>Microsporium gypseum</i>	Portillo et al., 2001
<i>S. maranguensis</i> O. Hoffm./folhas	Extrato etanólico	Antibacteriana contra <i>Epidermophyton floccosum</i> , <i>Microsporium canis</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Candida albicans</i>	Cos et al., 2002
<i>S. ambavilla</i> Pers./ ramos e folhas	Extrato metanólico	Antiviral contra herpes simplex e poliovírus	Fortin et al., 2002
<i>S. aegyptius</i> var. <i>Discoideus</i> Boiss./ flores, ramos e raízes	Óleo essencial	Antifúngica contra <i>Candida albicans</i> e moderada atividade contra Gram positivas e negativas.	El-Shazly et al., 2002
<i>S. angulifolius</i> DC./folhas e ramos	Extrato hexânico e extrato metanólico	Antifúngica contra <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	Navarro García et al., 2003
<i>S. culcitoides</i> Schultz-Bip/partes aéreas	Extrato etanólico	Antifúngica contra <i>Trychophyton mentagrophytes</i> , antibacteriana contra <i>Bacillus subtilis</i>	Rojas et al., 2003
<i>S. eriophyton</i> J. Remy/ partes aéreas	Extrato aquoso, diclorometânico e metanólico	Relaxante sobre a musculatura lisa do corpo cavernoso em cobaias.	Hnatyszyn et al., 2003
<i>S. clivicolus</i> Wedd./ folhas e talos	Extrato etanólico	Anti-leishmaniose ( <i>in vitro</i> )	Fournet et al., 1994 apud Rocha et al., 2005
<i>S. samnitum</i> Huet/ não especificada	Extrato diclorometânico e etanólico	Citotóxica contra células tumorais Caco-2 e COR-L-23	Loizzo et al., 2006

	Extrato n-hexânico	Antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, especialmente <i>Staphylococcus aureus</i>	
	Extratos diclorometânico e etanólico, n-hexânico e metanólico	Antifúngica, especialmente contra <i>Trichophyton tonsurans</i> e <i>Microsporum gypseum</i>	
	Extrato n-hexânico	Antioxidante, citotóxica em linhagens de células tumorais	
<i>S. inaequidens</i> DC./ não especificada	Metanólico e diclorometânico	Ausência de citotoxicidade contra células normais. Inibição da $\alpha$ -amilase (anti-diabetes)	Conforti et al., 2006

### 2. 1. 3 Toxicidade

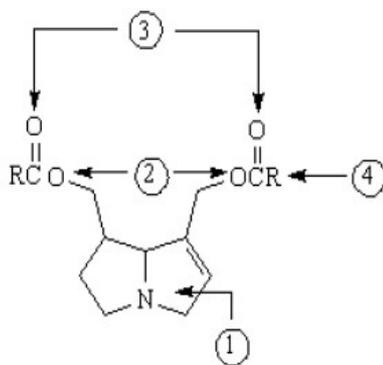
O gênero *Senecio* é conhecido por causar perdas consideráveis na pecuária de países como Paraguai, Brasil, Argentina e Uruguai (Ilha et al., 2001). Os animais alimentam-se de brotos destas plantas, principalmente no inverno, com a falta de pastagens, ou mesmo quando estes animais são alimentados com feno ou silagem contaminados por estas plantas. A intoxicação causada por este gênero resulta em uma doença conhecida por seneciose, sendo as espécies *S. brasiliensis*, *S. cysplatinus*, *S. selloi*, *S. heterotrichius* e *S. tweedii* as principais causadoras de perdas na pecuária (Riet-Correa et al., 1994 apud Gava; Barros, 1997; Ilha et al., 2001, Tokarnia et al., 2002). A literatura também relata a ocorrência de intoxicações fatais em seres humanos devido ao consumo de espécies de *Senecio* contendo alcalóides pirrolizidínicos ou pela ingestão de alimentos contaminados (leite, mel e cereais) (Fox et al., 1978; Liddell; Logie, 1993; Villarroel et al., 1997).

A toxicidade causada por estas espécies têm sido relacionada principalmente à presença de alcalóides pirrolizidínicos, que segundo Trigo et al., (2003), podem ser utilizados como marcadores quimiosistemáticos para a tribo *Senecioneae*.

Mais de 300 alcalóides pirrolizidínicos são conhecidos, tendo sido isolados em mais de 450 plantas de 14 diferentes famílias. A maior parte dos alcalóides pirrolizidínicos encontrados ocorre no gênero *Senecio* (Grue; Liddell, 1993). Na revisão realizada por Silva et al., (2006) sobre alcalóides pirrolizidínicos em espécies de *Senecio*, são citadas 62 diferentes estruturas desta classe de constituintes.

Os alcalóides pirrolizidínicos (Aps) foram isolados pela primeira vez em 1885 por Gradsal; Lasoux (Romero et al., 2001-2002). São ésteres de aminoálcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos) que podem ocorrer na forma de mono, di e didiésteres cíclicos (Silva et al., 2006).

Segundo Prakash et al., (1999), o potencial hepatotóxico dos Aps é determinado por quatro características estruturais mínimas: um anel 3-pirrolina (1), um ou dois grupamentos hidroxila ligados ao anel pirrolina (2), um ou dois grupamentos esterificados (3) e a presença de uma cadeia ramificada no resíduo ácido (4) (Figura 1).



**Figura 1 - Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos. Os números correspondem aos itens listados no texto (Bolzan et al., 2007)**

No entanto, apesar de serem considerados metabólitos secundários característicos do gênero, os Aps não são encontrados em todas as suas espécies e também têm sido relatados em outros gêneros, como *Symphytum*, *Crotolaria* e *Heliotropium* (Bolzan et al., 2007).

Contudo, nem todos os alcalóides pirrolizidínicos são tóxicos e não são os únicos constituintes de espécies de *Senecio* a apresentar toxicidade. Os sesquiterpenóides do tipo furanoeremofilano, frequentemente encontrados em espécies do gênero *Senecio*, também tem sido descritos como tóxicos, apresentando uma alta toxicidade in vivo (Jares; Pomilio, 1989; Pomilio; Jares, 1997).

## 2. 2 Constituintes químicos presentes no gênero *Senecio*

Este item da Revisão Bibliográfica descreve os constituintes presentes no gênero *Senecio*, por não existirem dados na literatura quanto a estudos fitoquímicos realizados com a espécie *Senecio platensis*, sendo este, portanto, seu primeiro estudo.

### 2. 2. 1 Terpenóides

O termo terpeno é utilizado para designar todas as substâncias formadas por unidades de isopreno ( $C_5H_{10}$ ). Quando os terpenos são modificados quimicamente, seja por oxidação ou por reorganização do esqueleto carbonado, os compostos resultantes são referidos como terpenóides. No entanto, alguns autores utilizam o termo terpeno ao se referirem a todos os terpenóides (Wikipédia, 2005). Os terpenóides são uma extensa família de compostos que ocorrem tanto em animais quanto em vegetais; atualmente mais de 30.000 compostos desta classe são conhecidos (Boik, 2001).

A origem biossintética dos terpenóides provém de unidades de isopreno, o qual, por sua vez, origina-se a partir da condensação do isopentenil pirofosfato (IPP) e do dimetil-alil pirofosfato (DMAPP). A biossíntese do IPP e do DMAPP pode ocorrer por duas vias diferentes. Uma delas, chamada de via do mevalonato, ocorre através da condensação de uma unidade de acetoacetyl-CoA com uma molécula de acetyl-CoA. Após a condensação aldólica, ocorre uma hidrólise originando a 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA, que é reduzida a mevalonato, em uma reação irreversível. O mevalonato é convertido em IPP e em seu isômero DMAPP, que são condensados para formar o geranyl-pirofosfato (GPP), precursor direto dos monoterpenóides (Costa, 2002 , Simões, 2003)

Os esqueletos dos terpenóides são formados pela condensação de um número variável de unidades de isopreno que segue um padrão chamado “regra do isopreno” (Mann, 1887 e Breitmaier, 1999 apud Simões, 2003) onde geralmente, as unidades isoprênicas ligam-se pelos carbonos das extremidades das cadeias, que na linguagem figurada difundida na literatura científica denomina-se condensação “cabeça-cauda” (Costa, 2002). A ligação do tipo “cabeça-cauda” predomina nos componentes de óleos voláteis, mas além desta, também existem condensações do tipo cabeça-dorso, cauda-cauda, cauda-dorso, entre outras (Simões et al., 2003).

Novas condensações cabeça-cauda entre geranyl-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultarão nos sesquiterpenóides, enquanto que os diterpenóides resultam da adição de uma

molécula de isopentenil-pirofosfato ao farnesil-pirofosfato. Já a ligação cabeça-cabeça entre duas moléculas de farnesil-pirofosfato dará origem ao esqualeno, o precursor da maioria dos triterpenóides e esteróides (Simões et al., 2003) (Figura 2).

Uma segunda via, chamada de via do 4 fosfato de metil-eritritol (MEP), foi descoberta pelo grupo de Rohmer e Arigoni, no fim da década de 90, e ainda não está completamente esclarecida (Rohdich et al., 2001). Sabe-se, até o momento, que a biossíntese do IPP e do DMAPP por esta via ocorre a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato (Degenhardt et al., 2003; Umlauf et al., 2004).

Os terpenóides formados pela condensação de 2 unidades isoprênicas são chamados de monoterpenóides, os quais estão presentes em cerca de 90% dos óleos essenciais. Os sesquiterpenóides são formados por 3 unidades isoprênicas e também são constituintes muito freqüentes em óleos essenciais. É estimado que exista um número superior a 1000 monoterpenóides e sesquiterpenóides descritos como componentes de óleos voláteis. Além destes, encontram-se ainda os diterpenóides, sesterpenóides, triterpenóides, tetraterpenóides e os poli-isoprenóides, formados, respectivamente por 4, 5, 6, 8 e  $n$  unidades de isopreno (Simões, 2003; Cunha, 2003). No entanto, até o momento não foram obtidos da natureza, compostos formados por 7 unidades isoprênicas, correspondentes aos hidrocarbonetos  $C_{35}H_{56}$  (Costa, 2002).

A grande maioria dos óleos voláteis é constituída de derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que os terpenóides preponderam (Cunha, 2003). Os óleos voláteis são responsáveis pelo odor agradável e intenso de várias plantas, sendo, por isso, também chamados de essências. Possuem diversas funções nos vegetais, a defesa contra predadores e patógenos, interações alelopáticas, antioxidantes, bio-regulatórias e atração de polinizadores (Simões, 2003). Várias atividades biológicas são atribuídas aos óleos essenciais, sendo que seus efeitos terapêuticos dependem dos seus compostos predominantes (Cunha, 2003). Existem diversos estudos acerca das propriedades inibitórias produzidas por óleos essenciais e por constituintes de natureza terpênica sobre o crescimento de microrganismos (Deuschle, 2003), entretanto, o mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido.

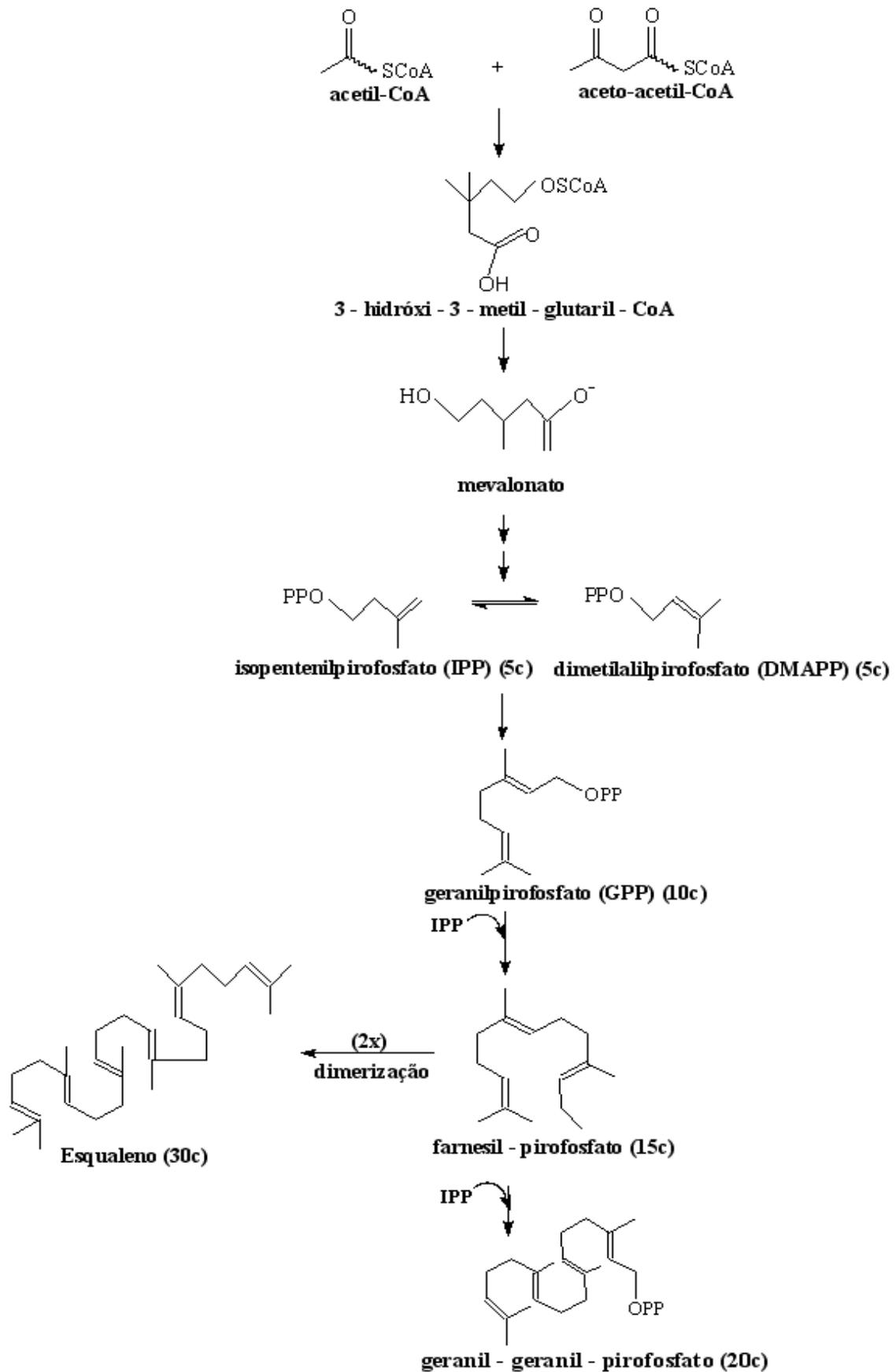


Figura 2 - Biossíntese dos terpenóides (Adaptado de Simões, 2001 e Costa, 2002)

### 2. 2. 1. 1 Monoterpenóides

Os monoterpenóides resultam da união cabeça-cauda de duas unidades isoprênicas, exceto raros terpenóides como, por exemplo o lavandulol (Costa, 2002). Atualmente são conhecidos cerca de 1000 monoterpenóides naturais, a maioria isolada de plantas superiores. Estes compostos desempenham grande quantidade de funções metabólicas nos vegetais, como defesa das plantas contra patógenos, herbívoros e na competição com outras espécies (alelopatia). São os constituintes mais encontrados nos óleos essenciais, e os de maior volatilidade, devido ao seu baixo peso molecular, sendo os principais componentes responsáveis por fragrâncias e aromas nos vegetais (Grodnitzky, 2002).

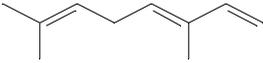
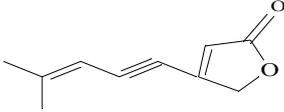
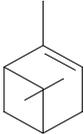
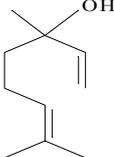
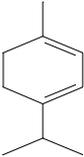
Além de apresentarem uma grande volatilidade, os monoterpenóides apresentam propriedades lipofílicas, que lhes conferem a capacidade de penetrar rapidamente nos insetos, interferindo nas suas funções metabólicas, sendo portanto, substâncias interessantes para o isolamento ou a síntese de inseticidas mais efetivos (Banchio et al., 2007, Grodnitzky, 2002)

Os monoterpenóides apresentam diversas atividades biológicas, como atividade antimicrobiana, anestésica local, anti-séptica (Tyler, 1988), analgésica tópica, antiinflamatória (Juergens et al., 2003), acaricida (Sánchez-Ramos; Castañera, 2001), antileishmaniose (Rocha et al., 2005), antiviral (Armaka et al., 1999) e citostáticas (Boik, 2001). Assim como no caso dos outros terpenóides, os mecanismos de ação não estão bem esclarecidos. Entretanto, há alguns autores que atribuem suas atividades à desorganização e o rompimento da membrana celular, o que pode ser explicado pelo caráter lipofílico dos terpenóides (Cowan, 1999; Banchio et al., 2007). Outros autores sugerem que os terpenóides, de uma maneira geral, afetam a membrana celular e reagem com enzimas ou agem como carreadores de  $H^+$ , diminuindo os níveis de ATP (Guynot et al., 2003).

Alguns monoterpenóides foram isolados no gênero *Senecio*. As partes aéreas de *S. trichopterygius* Muscher forneceram o ocimeno (Bohlmann et al., 1980). Também das partes aéreas de *S. clelandii* Greene foram obtidas 3 lactonas monoterpênicas, sendo uma delas o cleviolido (Bohlmann et al., 1981b). O  $\alpha$ - pineno foi isolado de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. O (Bohlmann; Zdero, 1982b). Em um estudo realizado por Kite; Smith (1997), o linalol e vários outros monoterpenóides foram isolados das inflorescências de *S. articulatus* Sch. Bip. O  $\alpha$ - terpineno foi isolado do exsudato resinoso de *S. viscosissimus* Colla (Úrzua; Andrade, 2001); e o  $\beta$ -mirceno foi identificado no extrato hexânico de *S. grisebachii* Baker (Zeinsteger et al., 2003). Além destes, vários outros monoterpenóides foram isolados de espécies de

*Senecio*, como de *S. halimifolius* L. (Bohlmann; Zdero., 1978), *S. affinis* DC (Bohlmann et al., 1985) e *S. grisebachii* Baker (Teibler et al., 2001).

Tabela 3 - Exemplos de monoterpenóides descritos para o gênero *Senecio*

Monoterpenóides	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
Ocimeno	<i>S. trichopterygius</i> Muscher / partes aéreas		Bohlmann et al., 1980
Cleviolido	<i>S. clevelandii</i> Greene/ partes aéreas		Bohlmann et al., 1981
$\alpha$ -pineno	<i>S. subrubriflorus</i> O. Hoffm./ raízes		Bohlmann et al., 1982
linalol	<i>S. articulatus</i> Sch. Bip/ inflorescências		Kite; Smith, 1997
$\alpha$ -terpineno	<i>S. viscosissimus</i> Colla/ exsudato resinoso		Urzúa, Andrade, 2001

### 2. 2. 1. 2 Sesquiterpenóides

Os sesquiterpenóides são formados a partir da condensação de 3 unidades de isopreno e, apesar de existir um vasto número de esqueletos carbônicos na natureza, mais de 300, todos possuem o farnesil pirofosfato como precursor comum (Tesso, 2005; Prosser et al., 2002). Em sua biossíntese, os sesquiterpenóides sofrem uma série de reações enzimáticas, ciclizações, eliminações e rearranjos na molécula. Estas transformações possibilitam a formação de uma grande variedade de intermediários, os quais originarão as diferentes classes de sesquiterpenóides com características químicas particulares. Entre as diversas classes de

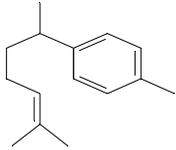
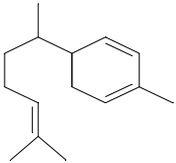
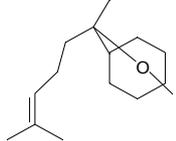
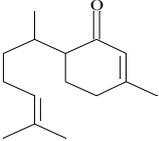
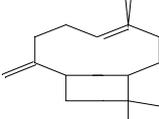
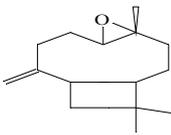
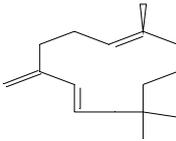
sesquiterpenóides encontram-se os derivados do germacrano, eudesmano, guaiano, eremofilano, bisabolano, cadinano, cariofilano e humulano.

Os sesquiterpenóides podem ser encontrados em alguns organismos marinhos, em microrganismos e em vegetais, mais freqüentemente em plantas superiores (Tesso, 2005; Prosser et al., 2002). Nas plantas estes constituintes desempenham uma função ecológica, agindo na defesa contra insetos e micróbios. Vários estudos tem comprovado as atividades repelente (Cantrell et al., 2005) e antimicrobiana (Barrero et al., 2005), entre outras, para essa classe de substâncias.

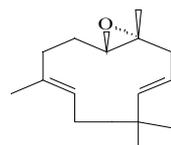
Para as diferentes classes de sesquiterpenóides isolados do gênero *Senecio*, foram descritas as atividades: antimalárica (Rücker et al., 1997), antioxidante, citotóxica (Barreiro et al., 1997), hipoglicemiante (Inman et al., 1999), antimicrobiana (Pérez et al., 1999), antiprotozoária (Villaescusa-Castillo et al., 2000), inseticida (Reina et al., 2001) e antileishmaniose (Rocha et al., 2005).

É elevado o número de sesquiterpenóides isolados e identificados em espécies do gênero *Senecio*, sendo estes pertencentes aos mais variados esqueletos. Os derivados de núcleo eremofilano, principalmente os furanoeremofilanos, são os mais relatados. Na Tabela 4 estão alguns sesquiterpenóides presentes no gênero, de forma a apresentar a maioria dos esqueletos sesquiterpênicos já relatados.

Tabela 4 - Exemplos de sesquiterpenóides descritos para o gênero *Senecio*

Sesquiterpenóides	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
<b>Bisabolanos</b>			
	<i>S. balsapampae</i> Cuatr./ raízes		Bohlmann et al., 1980; Heinzmann, 1996.
	<i>S. seloi</i> (Spreng) DC./ partes aéreas	$\alpha$ -curcumeno	
			
		$\beta$ -zingibereno	
	<i>S. subrubriflorus</i> O. Hoffm./ partes aéreas		Bohlmann; Zdero, 1982b
	<i>S. palmensis</i> Chr. Sm./ não especificada		Reina et al., 2002
		bisabolona	
<b>Cariofilanos/ humulanos</b>			
	<i>S. adenotrichius</i> DC./ exsudato resinoso		Urzúa; Andrade, 2001; Silva, 2006
	<i>S. bonariensis</i> Hook et Arn./ partes aéreas		
	<i>S. palmensis</i> Chr. Sm./ partes aéreas		Bohlmann, Ziesche, 1981; Silva, 2006.
	<i>S. bonariensis</i> Hook et Arn./ partes aéreas		
	<i>S. inaequidens</i> DC./ raízes		Bohlmann et al., 1980
		iso-humuleno	

*S. palmensis* Chr. Sm./  
partes aéreas

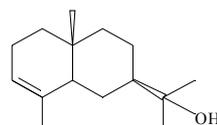


Óxido de humuladieno

Reina et al., 2002

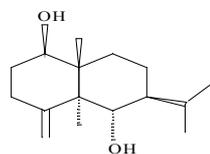
Eremofilanos	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
	<i>S. inaequidens</i> DC./ raízes	 cacalol	Bohlmann et al., 1980
	<i>S. balsapampae</i> Cuatr./ raízes		
	<i>S. smithii</i> DC./ partes aéreas	 eupateno	Bohlmann et al., 1981a
Eudesmanos	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
	<i>S. microglossus</i> DC./ partes aéreas	 Derivado di-hidroxi-eudesmano	Bohlmann et al., 1983
	<i>S. microglossus</i> DC./ partes aéreas	 Derivado angeloil-eudesmano	Bohlmann et al., 1983
	<i>S. adenophyllus</i> Meyen et Walp./ partes aéreas	 Derivados poli-hidrolixados do eudesmano	Dupré et al., 1991

*S. graveolens* Wedd./  
óleo essencial



$\alpha$ -eudesmol

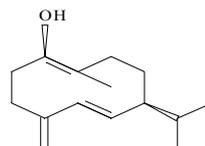
Pérez et al., 1999



$\beta$ -eudesmol

Farnesanos	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
	<i>S. subrubriflorus</i> O. Hoffm. DC. / partes aéreas	 $\alpha$ -farneseno	Bohlmann et al., 1982
	<i>S. conrathii</i> N.E. Br./ raízes	 $\beta$ -farneseno	Bohlmann et al., 1980
	<i>S. subrubriflorus</i> O. Hoffm./ partes aéreas <i>S. ambiguus</i> subsp. <i>ambiguus</i> / partes aéreas	 nerolidol	Bohlmann; Zdero, 1982; Tundis et al., 2005
Germacranos	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
	<i>S. trichopterygius</i> Muscher / raízes <i>S. bonariensis</i> Hook et Arn./ partes aéreas	 Germacreno D	Bohlmann et al., 1980; Silva, 2006
	<i>S. crassissimus</i> Humb./ partes aéreas <i>S. subrubriflorus</i> O. Hoffm./ partes aéreas	 bicyclogermacreno	Bohlmann, Zdero, 1982b
	<i>S. adenophyllus</i> Meyen et Walp./ partes aéreas	 carbinol	Dupré et al., 1991

*S. philippicus* Regel et  
Koern./ partes aéreas



hidroxigermacatrieno

Jakupovic et al., 1991

Guaianos	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
	<i>S. canescens</i> Humb./ partes aéreas	<p>aromadendreno</p>	Bohlmann; Ziesche, 1981
	<i>S. ochoanus</i> Cuatr./ partes aéreas		Bohlmann et al., 1983; Bohlmann et al., 1986; Bohlmann et al., 1990; Dupré et al., 1991; Jakupovic et al., 1991 Abdo et al., 1992
	<i>S. grandifolius</i> Less., <i>S. dolichodoryius</i> Cuatrec., <i>S. variabilis</i> Phil./ partes aéreas		
	<i>S. magnificus</i> F. Muell./ partes aéreas	<p>espatulenol</p>	
	<i>S. dryophyllus</i> / partes aéreas		
	<i>S. subumbellatus</i> Phill./ partes aéreas		
	<i>Senecio canescens</i> Humb./ partes aéreas		
	<i>S. dryophyllus</i> Meyen et Walp./ partes aéreas	<p>virifloreno</p>	Dupré et al., 1991

#### 2. 2. 1. 2. 1 Sesquiterpenóides com grupamento peróxido

Os peróxidos de origem vegetal são formados pela adição de oxigênio singlete à dupla ligação de uma olefina, sofrendo a influência direta da radiação UV (Kiefer, 1993). As olefinas são constituintes comuns dos óleos essenciais de várias espécies, o que possibilita uma grande ocorrência destes constituintes. Um número superior a 284 peróxidos, especialmente aqueles de estrutura terpênica, já foram isolados de fontes naturais (Casteel, 1992).

Os peróxidos podem ser classificados em endoperóxidos, quando os dois átomos de oxigênio localizam-se entre átomos de carbono (C-OO-C); e hidroperóxidos, quando um dos átomos de oxigênio liga-se a um átomo de carbono e o outro a um átomo de hidrogênio (C-OO-H) (Meshnick et al., 1996).

Para os peróxidos existem várias atividades biológicas descritas, como: citostática, citotóxica, antimicrobiana, antitumoral, anti-helmíntica e ictiotóxica (Casteel, 1992; Bennet-Jenkins; Bryant, 1996; Heinzmann, 1996; Tolstikov et al., 1996; Rücker, 1997).

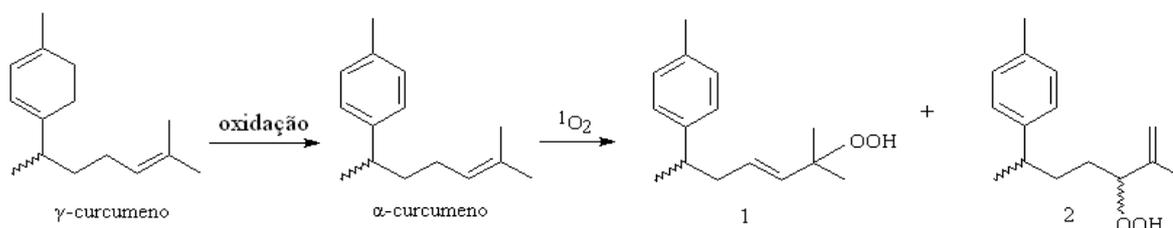
De todas as atividades biológicas descritas para os peróxidos, a atividade antimalárica se destaca. A artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, possui uma ponte do tipo endoperóxido, é obtida das partes aéreas de *Artemisia annua* (Asteraceae), planta utilizada como medicinal pelos chineses desde 168 a.C. Da complexa estrutura da artemisinina a ponte de endoperóxido é indispensável para a atividade antimalárica. Este fato foi comprovado, pois estruturas desprovidas da função endoperóxido, como a deoxo-artemisinina, são inativas. Por outro lado, um grupo de análogos simplificados de trioxanos também exibiram atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*. Estes análogos também possuem o mesmo anel de seis membros com a ponte endoperóxido semelhante àquele existente na artemisinina, porém estes análogos possuem uma estrutura muito mais simples e mais fácil de ser sintetizada (Taranto et al., 2006).

Em geral, os endoperóxidos possuem vantagens em relação às drogas antimaláricas existentes. Primeiro, por existir pouca ou nenhuma resistência cruzada com outros fármacos antimaláricos. Finalmente, a resistência aos endoperóxidos ainda não se desenvolveu, apesar da utilização dessas substâncias na clínica. Entretanto, existem também desvantagens. Os endoperóxidos possuem um período de meia-vida curto (3-5h) e o nível plasmático efetivo é mantido apenas por breves períodos, o que implica em longa duração do tratamento, quando feito na forma de monoterapia. Além disso, muitas dessas drogas possuem baixa biodisponibilidade por via oral (Meshnick et al., 1996). Sendo assim, é interessante utilizar uma associação com outros antimaláricos, a exemplo a sulfadoxina-pirimetamina (Doherty et al., 1999).

A artemisinina tem sido utilizada amplamente contra cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina. O modo de ação da artemisinina e de trioxanos análogos é ainda controversa. Evidências experimentais sugerem que os endoperóxidos possam agir no estágio intraeritrocítico do desenvolvimento do parasita através da alquilação (Meshnick et al., 1996), quando eles podem ser ativados pelo heme ou pelo íon Fe(II), produzindo radicais livres potencialmente citotóxicos e eletrofilicos, que podem reagir com proteínas específicas da

membrana do parasita. Segundo Meshnick et al., (1996), estudos *in vitro* demonstraram que a artemisinina e seus derivados são tóxicos aos parasitas da malária em concentrações nanomolares, enquanto que, em células de mamíferos, esta toxicidade só aparece em concentração micromolar. O motivo para tal afinidade parece estar no fato das células infectadas pelo parasita fazerem uma maior captura da substância, de forma que eritrócitos infectados conseguem reter cerca de 100 vezes mais artemisinina que eritrócitos não infectados. No entanto, até o momento, o mecanismo de ação da artemisinina e seus análogos sobre os gametócitos não foi esclarecido.

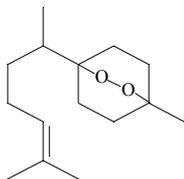
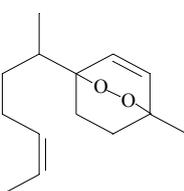
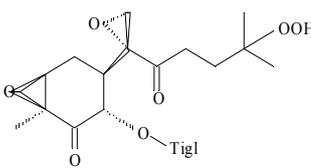
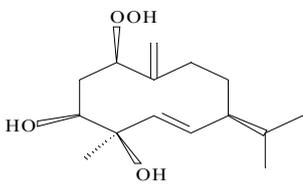
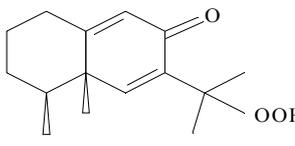
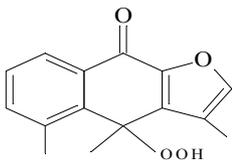
De acordo com a literatura, a atividade antimalárica também pode ser obtida por hidroperóxidos. Rücker et al., (1997) obtiveram dois hidroperóxidos com atividade antimalárica ((E)-1-hidroperoxi-1,1-dimetil-5-(4-metilfenil)-2-hexeno e 2-hidroperoxi-1-(1-metiletenil)-4-(4-metilfenil)-pentano) a partir de uma reação de foto-oxidação do  $\gamma$ -curcumeno, isolado do óleo essencial de *Helichrysum italicum*. Os mesmos hidroperóxidos também foram obtidos através de foto-oxidação do  $\alpha$ -curcumeno, isolado de *Senecio selloi* Spreng. (Figura 3).



**Figura 3 - Obtenção dos hidroperóxidos através da foto-oxidação do  $\alpha$ -curcumeno. (1) (E)-1-hidroperoxi-1,1-dimetil-5-(4-metilfenil)-2-hexeno e (2)- 2-hidroperoxi-1-(1-metiletenil)-4-(4-metilfenil)-pentano (Adaptado de Rücker et al., 1997)**

Para o gênero *Senecio* já foram descritos tanto endoperóxidos quanto hidroperóxidos. Na tabela 5 estão sumarizados os peróxidos isolados de espécies de *Senecio*.

Tabela 5 – Exemplos de sesquiterpenóides com grupamento peróxido descritos para o gênero *Senecio*

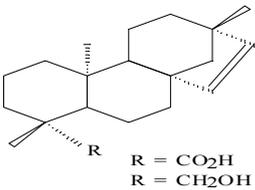
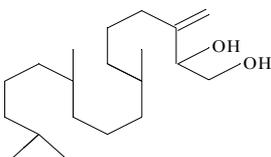
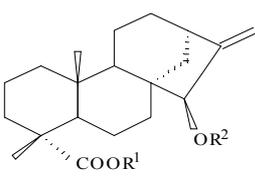
Peróxidos	Espécies/ Parte Utilizada	Estrutura	Referência
Endoperóxido derivado do bisabolano	<i>S. trichopteryius</i> Muscher/ raízes		Bohlmann et al., 1981a
	<i>S. aschenbormanus</i> / partes aéreas		Merikli et al., 1989
	<i>D. desfontainei</i> Druce/ raízes		Metwally, Dawidar, 1986
	<i>S. selloi</i> Spreng DC./ partes aéreas		Heinzmann, 1996
			Rücker, 1996
Endoperóxido derivado do <i>nor</i> -bisabolano	<i>S. paludaffinis</i> Hilliard/ não especificada		Bohlmann et al., 1978
Hidroperóxido derivado do bisabolano	<i>S. pampeanus</i> Cabrera/ não especificada		Bohlmann et al., 1986
Hidroperóxido derivado do germacrano	<i>S. glanduloso-pilosus</i> Volkens & Muschl./ partes aéreas		Dupré et al., 1991
	<i>S. adenophyllus</i> Meyen et Walp/ partes aéreas		Dupré et al., 1991
Hidroperóxido derivado do eremofilano	<i>S. reicheanus</i> Cabr./ partes aéreas		Dupré et al., 1991
	<i>S. canescens</i> Humb./ raízes		Abdo et al., 1992
Hidroperóxido derivado do furanoeremofilano	<i>S. coronatus</i> Thunb./ partes aéreas		Bohlmann, Zdero, 1982
	<i>S. canescens</i> Humb./ raízes		

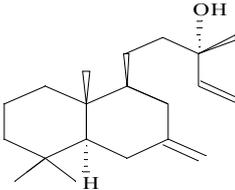
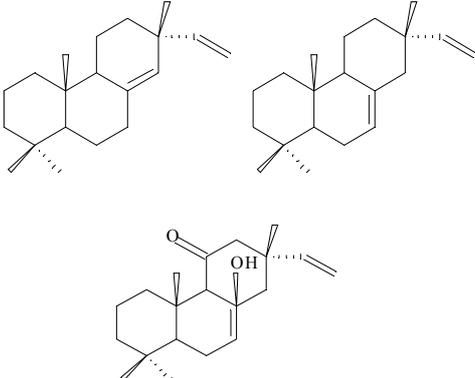
## 2. 2. 1. 3 Diterpenóides

Os diterpenóides são formados pela condensação de 4 unidades de isopreno, tendo o geranyl-geranyl pirofosfato como precursor direto. A aplicação da regra biogenética do isopreno, a qual obedece a maioria dos diterpenóides, permitiu estabelecer diversos tipos de estruturas. As estruturas dos diterpenóides podem ser monocíclicas, bicíclicas, tricíclicas e tetracíclicas (Costa, 2002).

Mais de quinhentos diterpenóides são conhecidos, isolados especialmente de plantas resinosas superiores, atuando na defesa contra insetos e infecções, e funcionando inclusive como hormônio do crescimento vegetal (Costa, 2002). De espécies da família Asteraceae, diversos diterpenóides e seus derivados glicosilados têm sido isolados, entretanto, poucos foram descritos em espécies do gênero *Senecio*. Na Tabela 6 encontram-se os diterpenóides descritos para este gênero.

Tabela 6 – Exemplos de diterpenóides descritos para o gênero *Senecio*

Diterpenóides	Espécie/Parte Utilizada	Estrutura	Referência
Derivados do beireno	<i>S. asperrulus</i> DC/ partes aéreas	 <p>R = CO<sub>2</sub>H R = CH<sub>2</sub>OH</p>	Zdero et al., 1989
2-hidroxi-isofitol	<i>S. gallicus</i> Vill./ partes aéreas		Urones et al., 1987 apud Fraga et al., 1995
Rufusosídeos A e B	<i>S. rufus</i> Hand-Mazz./ partes aéreas	 <p>R<sup>1</sup> R<sup>2</sup></p> <p>Rufusosídeo A H α-L-arabinopiranosil Rufusosídeo B β-D-glicopiranosil α-L-arabinopiranosil</p>	Dong-Liang et al., 1993

manol	<i>S. macrocephalus</i> DC/ partes aéreas		Bohlmann et al., 1985
<hr/> <i>S. erubescens</i> Ait. var. <i>crepidifolius</i> DC/ raízes			
Diterpenóides do tipo sandaro- copimareno	<i>S. subrubriflorus</i> O. Hoffm./ raízes		Bohlmann; Zdero, 1982b

Diversas atividades biológicas tem sido relatadas para os diterpenóides, entre elas está a atividade antiviral (Khan et al., 2005), antileishmaniose (Rocha et al., 2005), antibacteriana (Mendoza et al., 1997 apud Urzúa et al., 2006), antioxidante (Narukawa et al., 2001) e inibidora de diversas linhagens de células neoplásicas (Cerqueira et al., 2004).

#### 2. 2. 1. 4 Triterpenóides

Os triterpenóides são formados por 6 unidades de isopreno. No entanto, não são formados através do acréscimo de unidades de IPP à cadeia já existente, ilustrado na figura 2. Ao invés disso, ocorre a dimerização de duas moléculas de farnesil pirofosfato através de condensação “cauda a cauda” para originar um hidrocarboneto de nome esqualeno, sendo este considerado o precursor quer dos triterpenóides quer dos esteróides (Costa, 2002). A sua ciclização pode ser observada na Figura 4.

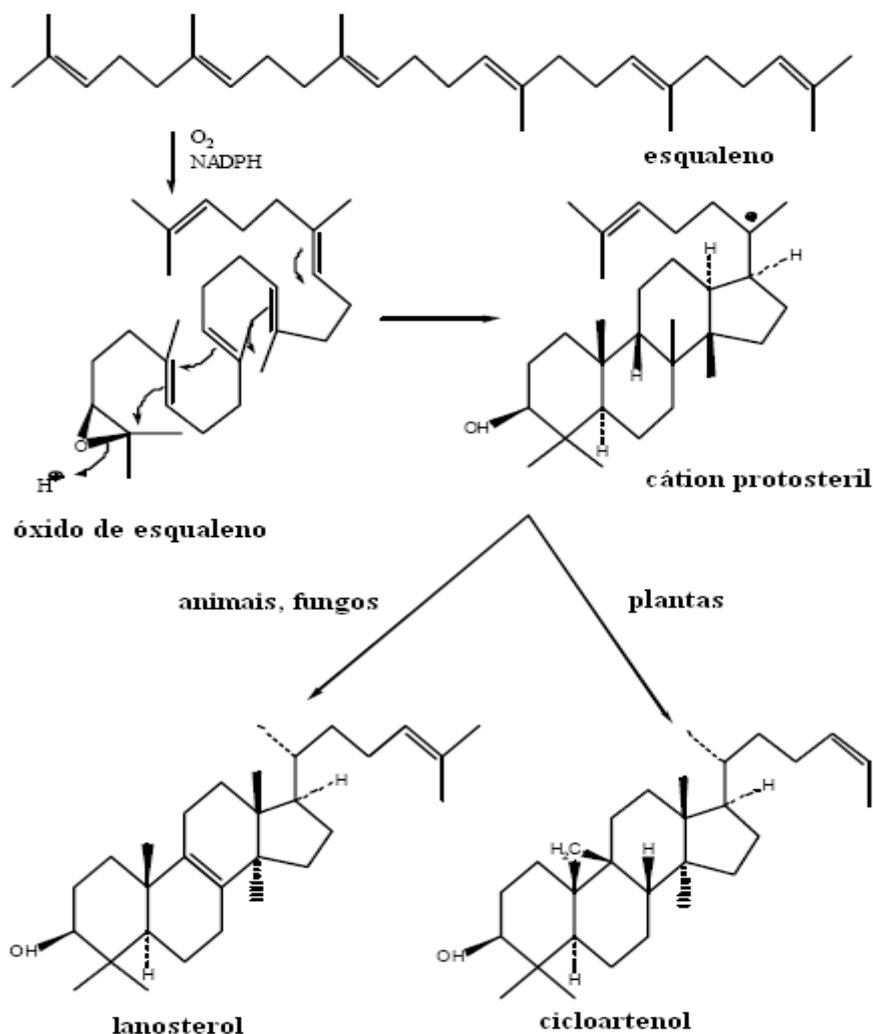
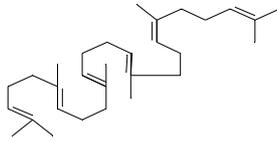
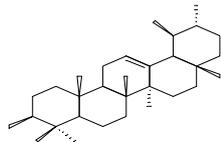
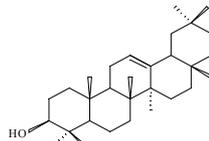
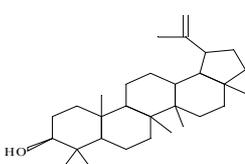
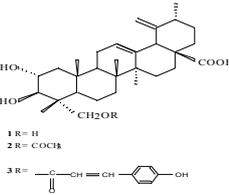
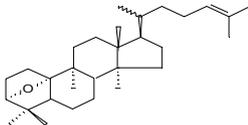
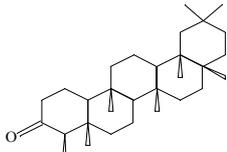


Figura 4 - Ciclização do esqualeno dando origem aos triterpenóides e esteróides ( Adaptado de Lopes et al., 2002 )

Já foram identificadas na natureza, mais de 4000 diferentes estruturas de triterpenóides, com mais de 40 tipos de esqueletos, sendo a maioria facilmente encontrada em muitas plantas. Os triterpenóides podem ser divididos em duas classes principais: os compostos tetracíclicos e os pentacíclicos, sendo os de estrutura pentacíclica aqueles que possuem a maior capacidade anti-carcinogênica (Lopes et al., 2002; Robbers et al., 1997).

No gênero *Senecio*, os triterpenóides estão freqüentemente presentes, sendo alguns deles de estrutura inédita, como os triterpenóides poli-hidroxiados isolados de *S. pseudotites* Griseb. (Tommasi et al., 1998) e os dois triterpenóides tetracíclicos com esqueleto 9-epi-curbitano, obtidos das partes aéreas de *S. selloi* (Spreng) DC. (Rücker et al., 1999). Os triterpenóides isolados do gênero *Senecio* estão sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 – Exemplos de triterpenóides descritos para o gênero *Senecio*

Triterpenóides	Espécie/ Parte Utilizada	Estrutura	Referência
esqualeno	<i>S. pohlii</i> Sch. Bip. Ex Baker/ partes aéreas  <i>S. othonnaeflorus</i> DC/ partes aéreas		Bohlmann et al., 1985 Zdero et al., 1989
$\alpha$ -amirina	<i>S. canescens</i> Humb./ folhas		Abdo et al., 1992
$\beta$ -amirina	<i>S. ochoanus</i> Cuatr./ partes aéreas		Bohlmann et al., 1983
lupeol	<i>S. ochoanus</i> Cuatr./ partes aéreas)  <i>S. canescens</i> Humb./ folhas		Bohlmann et al., 1983 Abdo et al., 1992
Triterpenóides pentacíclicos polihidroxilados	<i>S. pseudotites</i> Griseb./ partes aéreas		Tommasi et al., 1998
Triterpenóides tetracíclicos com esqueleto 9-epi-cucurbitano	<i>S. selloi</i> (Spreng) DC/ partes aéreas		Rücker et al., 1999
fridelina	<i>S. minutus</i> DC/ partes aéreas		Torres et al., 2000

## 2.5 Outras classes de metabólitos secundários

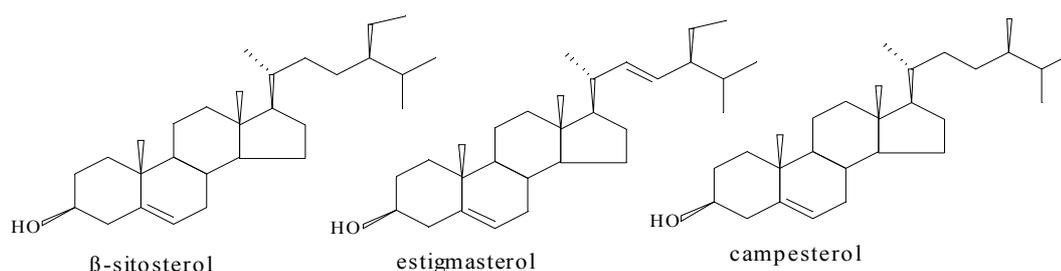
Além da vasta presença dos terpenóides, ainda são encontradas substâncias de importantes atividades biológicas, como no caso dos flavonóides e esteróides. Os alcalóides pirrolizidínicos são considerados um importante grupo de constituintes do gênero *Senecio*. Entretanto, foram tratados nesta dissertação na seção 2. 1. 3, devido a elevada toxicidade atribuída a estas substâncias.

### 2.5.1 Esteróides

Os esteróides também têm sua origem biossintética a partir do esqualeno que, através de uma redução da cadeia origina os esteróides.

Nas plantas, os esteróides possuem um papel importante na constituição de membranas celulares, na produção de hormônios e como repelente de insetos. Além de possuírem importantes funções nos vegetais, também apresentam importantes atividades biológicas, sendo alguns utilizados na medicina (Shimada et al., 2001). Atualmente, os fitoesteróis, nome dado aos esteróides produzidos por vegetais, têm despertado grande interesse por interferir no metabolismo do colesterol, inibindo a sua absorção, fato que tem levado a um aumento significativo do consumo de fitoesteróis na dieta humana (Dutta; Normén, 1998; Grandgirard et al., 2004).

No gênero *Senecio*, o  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol foram isolados de *S. canescens* Humb. (Abdo et al., 1992), *S. ochoanus* Cuatr., *S. microglossus* DC. (Bohlmann et al., 1983) e *S. glutinosus* Thunb. (Zdero et al., 1989), *S. madagascariensis* Poir. (Burgueño-Tapia et al., 2001), *S. ambiguus* (Biv.) DC. subsp. *ambiguus* (Tundis et al., 2005) e de *S. bonariensis* Hook et Arn. Desta última espécie também foi isolado o campesterol (Jares et al., 1990; Tettamanzi et al., 1992). 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., isolou-se apenas o  $\beta$ -sitosterol (Kiprono et al., 2000) (Figura 5).



**Figura 5 - Estruturas do  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol**

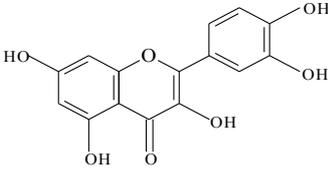
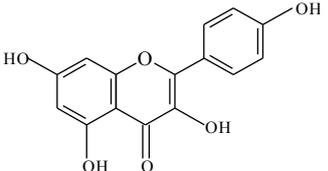
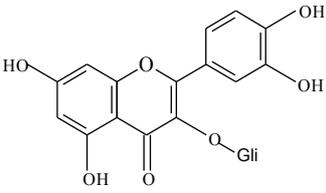
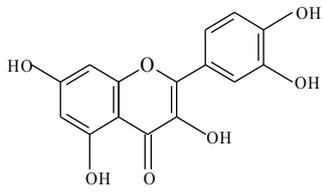
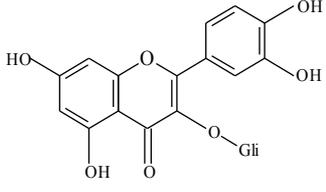
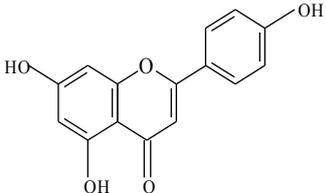
### 2.5.2 Flavonóides

Os flavonóides constituem um importante grupo de constituintes vegetais, tendo sido descritas mais de 6000 estruturas diferentes (Shijlen et al., 2004), sendo cerca de 500 sob forma aglicona. Os flavonóides são constituintes oxigenados e um grande número ocorre conjugado com açúcares, o que lhes confere maior solubilidade em água.

Diversas atividades biológicas já foram descritas para os flavonóides, entre elas estão as atividades antiviral (Hudson, 1990 apud Simões, 2003), antioxidante (Kanakakis et al., 2006), antiinflamatória (Pelzer et al., 1998), antitumoral (Kanadaswami et al., 2005), atividade sobre a permeabilidade capilar (Garg et al., 2001 apud Simões, 2003) e atividade hormonal (Knight; Eden, 1995 apud Simões, 2003).

Embora não existam muitos relatos da presença de flavonóides no gênero *Senecio*, supõe-se que exista uma grande diversidade de estruturas flavonoídicas neste pelo fato da grande variabilidade observada entre as espécies do gênero *Senecio* (Mansour; Saleh, 1981). Na Tabela 8 estão sumarizados os flavonóides descritos para o gênero.

Tabela 8 – Exemplos de flavonóides descritos para o gênero *Senecio*

Flavonóide	Estrutura	Referência
Flavonol (agliconas)	<div data-bbox="699 398 1027 591" style="text-align: center;">  <p>Quercetina</p> </div> <div data-bbox="699 595 1027 797" style="text-align: center;">  <p>Canferol</p> </div>	Glennie et al., 1973 apud Mansour; Saleh, 1981
Flavonol ( <i>O</i> -heterosídeo)	<div data-bbox="708 902 1034 1133" style="text-align: center;">  <p>Quercetina-3-<i>O</i>-glicosídeo</p> </div>	Mansour; Saleh, 1981
Flavonol (aglicona e 3- <i>O</i> -heterosídeo)	<div data-bbox="708 1167 1034 1397" style="text-align: center;">  <p>Isoramnetina</p> </div> <div data-bbox="708 1402 1034 1632" style="text-align: center;">  <p>Isoramnetina-3-<i>O</i>-glicosídeo</p> </div>	Mansour; Saleh, 1981
Flavona (aglicona)	<div data-bbox="708 1655 1034 1886" style="text-align: center;">  <p>Apigenina</p> </div>	Mansour; Saleh, 1981

## 2. 3 *Senecio platensis* Arech.

### 2. 3. 1 Descrição botânica

Subarbusto anual, ramificado na base, com ramos prostrados radicantes, dos quais se desenvolvem ramos ascendentes, que freqüentemente apresentam algumas nodosidades com formato elíptico, densamente folhosos até a inflorescência. Folhas alternas, glabras, profundamente pinatissectas, de contorno elíptico, ráquis linear, canaliculada na face ventral, de 2,0-3,0 cm de comprimento, com 5-8 pares de segmentos lineares, inteiros ou bífidos, ápice agudo, de 0,5-1,0 mm de largura.

Capítulos, 6-14 por ramo florífero, radiados, longo-pedicelados, dispostos em corimbos laxos. Invólucro cilíndrico, caliculado, de 11,0-12,0 mm de altura por 4,5-5,0 mm de diâmetro; bractéolas do cálculo adpressas ao receptáculo, linear-lanceoladas, de 2,0-4,0 mm de comprimento; brácteas involucrais 13-(15), glabras, linear-lanceoladas, agudas, peniciladas no ápice. Flores amarelas, dimorfas: as do raio 8, pistiladas, com tubo de 8,0-8,5 mm de comprimento e a lígula com 14,0-15,0 mm de comprimento por 3,0 mm de largura, tridentada no ápice, tetranervada; flores do disco monoclinas, tubulosas, tubo com 6,0-6,5 mm de comprimento e limbo com 4,5 mm de comprimento, pentalobadas no ápice, lobos com 1 mm de altura. Aquênios cilíndricos de 4,0-4,5 mm de comprimento, estriados, sericeo pubescentes. Papo branco, 10,5-11,0 mm de comprimento (Matzenbacher, 1998) (Figura 6).

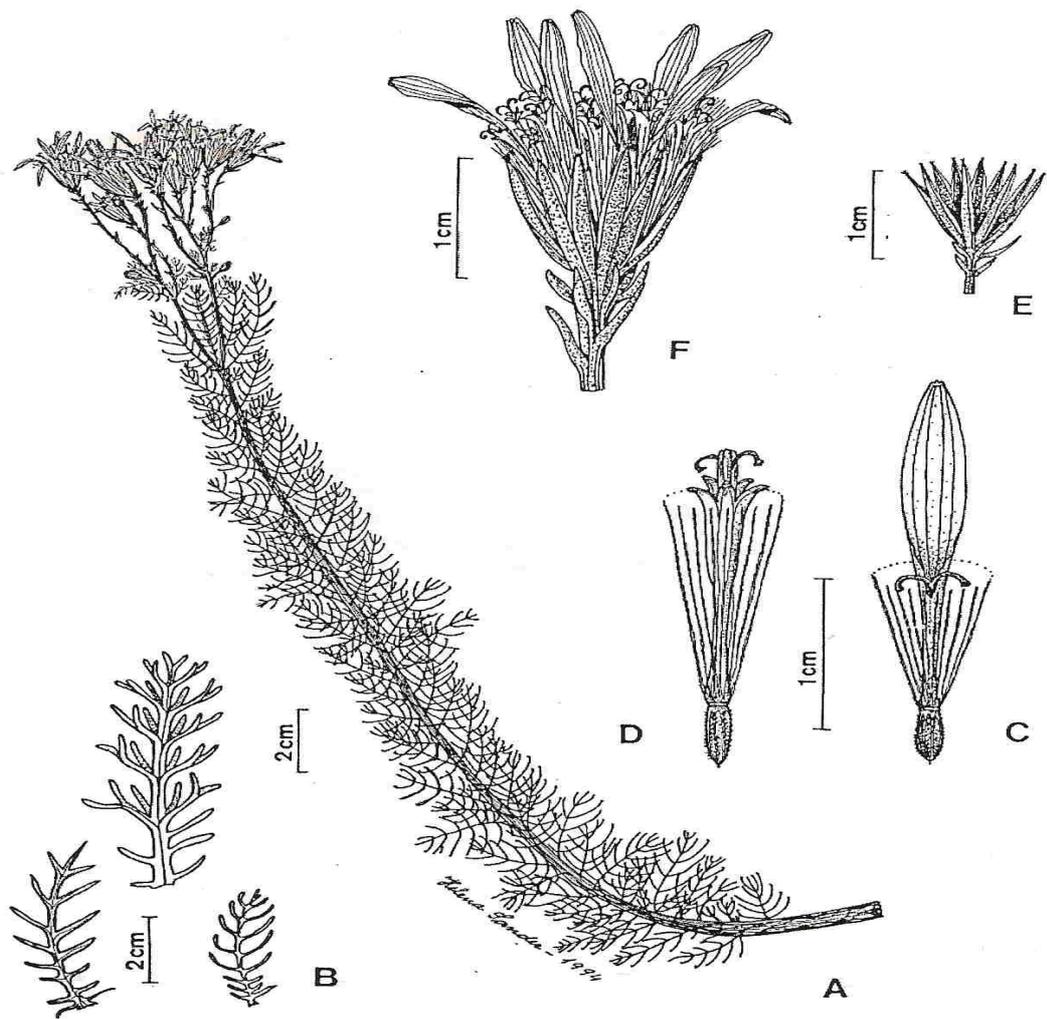


Figura 6 - *Senecio platensis* Arech.: A - ramo florífero; B - aspectos variados de folhas; C - flor ligulada do raio; D - flor tubulosa do disco; E - capítulo destituído de flores; F - capítulo. (Fonte: Matzenbacher, 1998)



Figura 7 - *Senecio platensis* Arech. - Aspecto geral da planta



Figura 8 - *Senecio platensis* Arech. - Nódulos

### 2. 3. 2 Distribuição geográfica

*Senecio platensis* ocorre nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, nas regiões fisiográficas do litoral e depressão central, estendendo-se ao Uruguai (Matzenbacher, 1998).

### 2. 3. 3 Dados fenológicos e observações ecológicas

*Senecio platensis* Arech. floresce e frutifica de novembro a maio, com predominância em abril. Algumas vezes também pode florescer em junho.

É uma espécie endêmica das dunas semifixas litorâneas, afastadas das marés, sendo importante na fixação de dunas.

Ainda segundo Matzenbacher, *S. platensis* é muito semelhante a *S. pinnatus*, do qual difere pelo seu hábito prostrado, com enraizamento dos nós que estão em contato com o solo, bem como pelas folhas que são menores e por vezes apresentam alguns lacínios bifurcados. Também pelo período de floração que, geralmente, se estende de março a maio, difere, assim, de *S. pinnatus* que floresce normalmente de setembro a dezembro. É ainda importante ressaltar que as linhas estigmáticas dos braços do estilete são, na espécie de *S. platensis*, notavelmente separadas.

## 3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes utilizados foram procedentes das empresas Belga, Quimex, Vetec ou Merck, todos com grau de pureza pró-análise. Os solventes e água utilizados nos experimentos e na preparação de reagentes e diluentes foram destilados recentemente antes da sua utilização.

Para as cromatografias em coluna (CC) foi utilizado gel de sílica 60 Merck com tamanhos de partículas 63-200 $\mu$ m. Eventualmente o gel de sílica foi impregnado com solução de nitrato de prata 10% Stahl, (1969).

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas com gel de sílica GF<sub>254</sub> Merck de espessura de 0,2 mm com suporte de alumínio 20 x 20 cm. As análises por CCD foram realizadas em cuba saturada, com migração ascendente. Como fase móvel foram utilizadas misturas de diversos solventes, tais como diclorometano, hexano:acetona, hexano:éter etílico e hexano:acetato de etila em diferentes proporções. Em alguns casos, tanto o gel de sílica como as placas cromatográficas foram impregnados com solução de nitrato de prata 10%, conforme descrito por Stahl, (1969).

A detecção das substâncias sobre CCD se deu pela visualização sob luz ultravioleta (UV) em comprimentos de ondas de 254 e 365 nm, seguida de aspensão da placa com o reagente cromogênico anisaldeído-ácido sulfúrico e aquecimento a 100°C ou reagente para peróxidos (Reagente de Huber e Fröhlke).

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

Os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento do trabalho:

- Balança analítica OHAUS Voyager;
- Balança semi-analítica MARTE AS5500C;
- Banho ultrassom THORNTON Unique USC750;
- Bomba de vácuo PRIMAR modelo;
- Cromatógrafo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM): sistema hifenado AGILENT 6890, equipado com um detector seletivo de massas série 5973; parâmetros da

CG: split inlet 1:100, gás carreador: hélio (1mL/min); coluna capilar de sílica fundida HP5MS (Hewlett Packard, 5% fenilmetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm di, espessura do filme: 0,25 $\mu$ m); programa da análise 40°C (Ti) por 4 min, 40-260°C, 4°C/min; temperatura do injetor e do detector: 220°C; energia de ionização: 70 eV; banco de dados: NIST, 1998;

- Espectrômetro de RMN BRUCKER DPX-400. Para a obtenção dos espectros de RMN (RMN  $^1\text{H}$   $\rightarrow$  400 MHz e 200 MHz e RMN  $^{13}\text{C}$   $\rightarrow$  100 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;
- Evaporador rotatório BÜCHI R – 114, acoplado a um banho de água BÜCHI Waterbath B 480 e a uma trompa d'água;
- Lâmpada de UV CHROMATO UVE;
- Lâmpada de UV BOITTON BOIT-LUB01 (254 e 365 nm)

### **3. 1 Impregnação com nitrato de prata**

#### **3. 1. 1.1 Impregnação das cromatofolhas para CCD**

As cromatofolhas a serem utilizadas foram eluídas (eluição ascendente) em uma cuba contendo solução aquosa de nitrato de prata a 10%. Após a eluição, as cromatofolhas foram retiradas da cuba e então transferidas para uma estufa a 100°C e mantidas por 1h, para que houvesse a secagem e ativação, sendo, posteriormente, mantidas ao abrigo da luz e da umidade, não excedendo o tempo de 24h para a sua utilização.

#### **3. 1. 1. 2 Impregnação do gel de sílica para CC**

A quantidade necessária de gel de sílica foi pesada e transferida para um balão de fundo redondo. Uma solução aquosa de nitrato de prata a 10% foi adicionada até que houvesse o umedecimento completo do gel de sílica. O balão foi envolvido com papel alumínio e acoplado ao evaporador rotatório, com banho a 95°C. Após a evaporação de toda água, o gel de sílica foi transferido para cadinhos de porcelana e mantidos em estufa a 100°C por 1h, para que houvesse a total secagem e ativação, sendo para isso homogeneizado a cada 10 min com bastão de vidro. 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 da amostra.

### 3. 1. 2 Reagentes de detecção para CCD

#### 3. 1. 2. 1 Reagente de detecção para peróxidos (Reagente de Huber e Fröhlke)

$\alpha$ -naftol.....	0,3 g
metanol.....	15 mL
água destilada.....	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 de *Senecio platensis* Arech. foram coletadas em abril de 2004, em Capão Novo, Município de Capão da Canoa. O material vegetal foi identificado pelo botânico Prof.º Dr. Nelson Ivo Matzembacher, do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFRGS. O Material testemunha encontra-se depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM, sendo a exsicata registrada sob o número SMDB 9522.

### 3. 3 Preparação do extrato diclorometânico de *S. platensis*

Devido a possível presença de peróxidos na espécie em estudo, as partes aéreas de *S. platensis*, foram maceradas ainda frescas, pelo fato dos peróxidos serem instáveis em processos de secagem. Para isto, as partes aéreas, exceto nódulos, foram grosseiramente divididas com auxílio de podões e tesouras, obtendo-se 350,0 g. O extrato diclorometânico bruto foi obtido através da maceração deste material vegetal, à temperatura ambiente, em frasco cor âmbar. O macerado foi submetido a agitações manuais diárias, por um período mínimo de oito dias. Ao fim desse período, o conteúdo foi filtrado por algodão, seguindo-se de concentração em evaporador rotatório à temperatura ambiente. O processo foi repetido mais uma vez e o resíduo originado a partir da concentração dos extratos fluidos reunidos teve sua massa determinada em balança semi-analítica para o cálculo do rendimento.

#### 3. 3. 1 Análise da presença de peróxidos no extrato diclorometânico de *Senecio platensis*

A presença de peróxidos no extrato diclorometânico de *S. platensis* foi avaliada durante um *screening* de espécies de *Senecio*. Os extratos diclorometânicos de *S. bonariensis*, *S. crassiflorus* e *S. platensis* foram aplicados sobre CCD, utilizando-se hexano : acetona (8:2) como eluente (Silva et al., 2005). A detecção de peróxidos foi realizada utilizando-se o Reagente de Huber e Fröhlke, o qual evidencia o peróxido através de uma coloração azul.

### 3. 4 Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico

O fracionamento preliminar do extrato bruto iniciou-se através da cromatografia em coluna do tipo Flash (Still et al., 1978). O gel de sílica foi suspenso no eluente (diclorometano) e a suspensão foi transferida para uma coluna de vidro, a qual possui em uma

das extremidades uma torneira e na extremidade oposta uma bomba de ar acoplada. Após a transferência e compactação do adsorvente, a amostra foi ressuspensa em uma pequena quantidade de eluente e então aplicada sobre a coluna. A bomba de ar foi acoplada à coluna em sua parte superior e as frações eluíram com o auxílio da pressão, sendo recolhidas com um volume variável, na dependência da sua coloração, não excedendo o volume de 200 mL.

Os resultados da separação foram monitorados por CCD utilizando-se anisaldeído-ácido sulfúrico como reagente de detecção. As frações obtidas foram reunidas de acordo com as semelhanças de seus constituintes e foram concentradas, tendo seu peso seco determinado.

### 3. 4. 1 Coluna A (Flash)

Coluna: 120 g de gel de sílica 60 para cromatografia em coluna.

Amostra: 6,0 g do extrato CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *S. platensis*.

Eluente: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (frações 1-15) e misturas de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH, em gradiente, nas proporções de 99:1 até 80:20 (frações 16-29).

Foram coletadas 29 frações de volume variável (Tabela 9).

**Tabela 9 - Rendimentos das frações obtidas da coluna A**

Frações	Código	Rendimento (g)
Fração 1	<b>1 Col. A</b>	<b>0,70</b>
Frações 2 e 3	2 Col. A	0,35
Fração 4	3 Col. A	0,32
Frações 5 e 6	4 Col. A	0,22
Frações 7-9	<b>5 Col. A</b>	<b>0,76</b>
Frações 10 e 11	6 Col. A	0,45
Frações 12 e 13	7 Col. A	0,50
Frações 14-20	8 Col. A	0,67
Fração 21	9 Col. A	1,12
Frações 22 e 23	10 Col. A	0,33
Frações 24 e 25	11 Col. A	0,30
Frações 26 e 27	12 Col. A	0,07
Frações 28 e 29	13 Col. A	0,10
TOTAL		5,89

As frações obtidas da coluna A foram analisadas por CCD utilizando-se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EtOH}$  (95:5) como eluente, e foram reunidas de acordo com as semelhanças de seus constituintes. A revelação da CCD com anisaldeído-sulfúrico exibiu manchas características de terpenóides.

#### 3. 4. 1. 1 Análise da presença de peróxidos e seus precursores

A detecção de peróxidos nas frações originadas da coluna A foi realizada como no item 3.3.1, utilizando-se como eluente hexano: acetona (8:2). Pelo fato dos peróxidos serem substâncias instáveis durante o processo de isolamento, optou-se por trabalhar com as frações que continham seus precursores. Mediante a constatação de peróxidos nas frações 3 Col. A e 4 Col. A, foi realizada uma pesquisa para se saber em quais frações continham seus precursores, uma vez que estes possuem um caráter menos polar em relação aos peróxidos. Para tanto, pequenas alíquotas das frações 2 Col. A e 2 Col. B (conforme item 3.5.1) foram dissolvidas em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , utilizando solução metanólica de rosa de bengala a 2%. As misturas foram expostas a luz solar por um período de 1 hora. Os produtos das reações foram comparados por CCD, com a fração 4 Col. A e foi constatado que a fração 2 Col. A continha os precursores dos dois peróxidos, enquanto que 2 Col. B apresentava apenas o precursor do peróxido mais polar. Optou-se por continuar o trabalho com 2 Col. B, pelo fato desta fração ter apresentado um maior rendimento em relação à 2 Col. A.

### 3. 5 Isolamento dos sesquiterpenóides PP1, AB1 e AB2

O isolamento dos constituintes de *Senecio platensis* Arech. foi realizado através de cromatografia em coluna à pressão hidrostática, seguindo-se a mesma técnica descrita no item 3.4, porém sem a utilização de pressão.

#### 3. 5. 1 Coluna B

Coluna: 70,0 g de gel de sílica 60, impregnado com  $\text{AgNO}_3$  (sol. 10%).

Amostra: 0,70 g de 1 Col. A.

Eluente: hexano:acetona (95:5).

Vazão: 40 gotas/minuto.

Foram coletadas 20 frações de 40 mL (Tabela 10).

**Tabela 10 - Rendimento das frações obtidas da coluna B**

Frações	Código	Rendimento (mg)
Fração 1	1 Col.B	71,4
Frações 2-7	<b>2 Col. B</b>	<b>547,1</b>
Frações 8-9	3 Col.B	22,8
Frações 10-11	4 Col.B	5,8
Frações 12-14	5 Col.B	0,2
Frações 15-20	6 Col.B	11,2
TOTAL		658,5

A fração 2 Col. B através da análise por CCD e CG-EM, mostrou ser constituída por uma substância majoritária. Após uma reação de foto-oxidação, conforme descrito no item 3.4.1.1, mostrou conter o precursor de um dos peróxidos presentes na fração 4 Col. A. Por este motivo, optou-se por trabalhar com esta fração.

### 3. 5. 2 Coluna C

Coluna: 12 g de gel de sílica 60 impregnado com  $\text{AgNO}_3$  a 10%.

Amostra: 123,8 mg de 2 Col. B.

Eluente: hexano:éter etílico (99:1).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 192 frações de 10 mL.

**Tabela 11 - Rendimentos das frações obtidas da coluna C**

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 0-92	1 col. C	21,0
Frações 93 e 94	2 col. C	4,7
Frações 95-100	3 col. C	1,9
Frações 101- 114	4 col. C	6,6
Frações 115-120	5 col. C	5,9
Frações 121-166	6 col. C	41,8
Frações 167-174	7 col. C	8,4
Frações 175-192	<b>8 col. C</b>	<b>13,3</b>
TOTAL		103,6

Através do perfil cromatográfico em CCD, 8 Col. C demonstrou tratar-se de uma substância isolada, e foi codificada como PP1. A fração foi submetida à análise por GC-EM, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H.

Substância PP1: Óleo incolor. Rf = 0,19 (gel de sílica GF<sub>254</sub> impregnado com AgNO<sub>3</sub> a 10%; hexano:éter etílico (96:4), 6 migrações; visualização: anisaldeído-ácido-sulfúrico). EM-IE 70 eV, *m/z* 204 [M]<sup>+</sup> (17), 161 (100), 133 (25), 105 (77), 91 (68), 79 (41), 55 (24), 41 (62). 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 17 e 18 e Figuras 14-18.

### 3. 5. 3 Coluna D e D'

A purificação de 5 Col. A foi realizada em duas etapas. Na primeira partiu-se de 400,0 mg de 5 Col. A e através da coluna D, obteve-se 22 frações. Uma segunda coluna (coluna D') foi realizada a partir de 356,2 mg de 5 Col. A, utilizando-se as mesmas condições descritas para a coluna D, obtendo-se outras 22 frações.

Coluna D e D': 40 g de gel de sílica 60.

Amostra: 400,0 mg de 5 Col. A (para coluna D) e 356,2 mg de 5 Col. A (para a coluna D')

Eluente: hexano:acetona (9:1).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 22 frações de 40 mL.

As frações das colunas D e D' foram reunidas de acordo com as semelhanças de seus constituintes e posteriormente quantificadas (Tabela 12).

**Tabela 12 - Rendimentos das frações obtidas das colunas D e D'**

Frações	Código	Rendimento (mg)
1D + 1D'	1 Col. D	14,1
2D + 2D'	2 Col. D	61,6
3D + 3D'	<b>3 Col. D</b>	<b>244,4</b>
4-5D + 4D'	<b>4 Col. D</b>	<b>196,6</b>
6D + 7D'	5 Col. D	12,3
7-8D + 6D'	6 Col. D	22,2
9-10D + 8D'	7 Col. D	17,6
11D + 9D'	8 Col. D	4,2
12-13D	9 Col. D	3,1
14-15D	10 Col. D	5,0
16-22D + 14-20D'	11 Col. D	10,5
5D'	12 Col. D	31,7
10-13D'	13 Col. D	7,1
21-22D'	14 Col. D	2,7
<b>TOTAL</b>		<b>633,1</b>

Pelo perfil cromatográfico em CCD, pôde-se observar que não houve isolamento de nenhuma substância. Entretanto, esta coluna foi importante para reduzir a variedade de compostos presentes no material de partida 5 Col. A.

## 3. 5. 4 Coluna E

Coluna: 22 g de gel de sílica 60.

Amostra: 212 mg de 3 Col. D.

Eluente: hexano:acetato de etila (95:5).

Vazão: 20 gotas/minuto.

Foram coletadas 95 frações de 10 mL.

**Tabela 13 - Rendimentos das frações obtidas da coluna E**

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 1-15	1 Col. E	3,6
Frações 16-18	2 Col. E	22,2
Frações 19 e 20	3 Col. E	69,4
Fração 21	<b>4 Col. E</b>	<b>31,0</b>
Frações 22-26	5 Col. E	54,1
Frações 27-30	6 Col. E	2,7
Frações 31-40	7 Col. E	7,4
Frações 41-45	8 Col. E	2,7
Frações 46-54	9 Col. E	2,1
Frações 55-70	10 Col. E	4,0
Frações 71-95	11 Col. E	7,8
<b>TOTAL</b>		<b>207,0</b>

No intuito de purificar a substância majoritária contida na fração 4 Col. E, foi realizada uma micro-coluna, utilizando-se uma pipeta de Pasteur empacotada com gel de sílica 60 (coluna E').

## 3. 5. 4. 1 Coluna E'

Coluna: 1 g de gel de sílica 60.

Amostra: 31,0 mg de 4 Col. E.

Eluente: hexano:acetato de etila (95:5).

Foram coletadas 30 frações de aproximadamente 0,5 mL.

**Tabela 14 - Rendimentos das frações obtidas da coluna E'**

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 5 e 6	1 Col. E'	4,7
Frações 7 e 8	<b>2 Col. E'</b>	<b>17,0</b>
Frações 9-11	3 Col. E'	4,5
Frações 12-30	4 Col. E'	0,0
TOTAL		26,2

Pelo perfil cromatográfico em CCD, 2 Col. E' demonstrou tratar-se de uma substância isolada e foi codificada como AB1. A mesma foi submetida à análise por CG-EM, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H.

Substância AB1: óleo amarelo-claro.  $R_f = 0,36$  (gel de sílica GF<sub>254</sub>; hexano:acetato de etila (95:5), 3 migrações; visualização: anisaldeído-ácido-sulfúrico). EM-IE 70 eV,  $m/z$  (%) 218 (100), 203 (29), 189 (7), 175 (27), 161 (84), 147 (68), 133 (22) 121 (19), 119 (20), 105 (20), 91 (30), 77 (21), 67 (11), 55 (13), 41 (31), calculado para C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O 218 g (Figura19). 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 19 e 20 e Figuras 19-27.

## 3. 5. 5 Coluna F

Coluna: 16 g de gel de sílica 60.

Dimensões: 26,0 cm x 6,5 cm.

Amostra: 163, 3 mg de 4 Col. D.

Eluente: hexano:acetona (95:5).

Vazão:15 gotas/minuto.

Foram coletadas 29 frações de 10 mL.

**Tabela 15 - Rendimentos das frações obtidas da coluna F**

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 1-6	1 Col. F	6,2
Frações 7-12	2 Col. F	9,7
Frações 13 e 14	3 Col. F	3,5
Frações 15 e 16	<b>4 Col. F</b>	<b>60,5</b>
Frações 17-19	5 Col. F	53,3
Frações 20-23	6 Col. F	18,6
Frações 24-26	7 Col. F	5,9
Frações 27-29	8 Col. F	0,9
TOTAL		158,6

## 3. 5. 5. 1 Coluna F'

Coluna: 6 g de gel de sílica 60.

Amostra: 60 mg de 4 Col. F.

Eluente: hexano:acetona (93:7).

Vazão:10 gotas/minuto.

Foram coletadas 30 frações de 10 mL.

**Tabela 16 - Rendimentos das frações obtidas da coluna F'**

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 1-3	1 Col. F'	1,6
Fração 4	2 Col. F'	1,6
Frações 5-7	3 Col. F'	11,7
Frações 8-9	4 Col. F'	1,3
Fração 10	5 Col.F'	0,5
Frações 11-13	6 Col.F'	6,9
Fração 14	7 Col.F'	3,00
Frações 15-25	<b>8 Col.F'</b>	<b>30,6</b>
TOTAL		57,2

Pelo perfil cromatográfico em CCD, 8 Col. F' demonstrou tratar-se de uma substância isolada e foi codificada como AB2. A mesma foi submetida à análise por CG-EM, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>1</sup>H.

Substância AB2: Óleo incolor. Rf = 0,29 (gel de sílica GF<sub>254</sub>; hexano:acetona (95:5), 3 migrações; visualização: anisaldeído-ácido-sulfúrico). EM-IE 70 eV, *m/z* 220 [M]<sup>+</sup> (2), 205 (52), 202 (13), 187 (20), 177 (12), 162 (19), 159 (40), 147 (32), 133 (14), 131 (22), 119 (56), 107 (32), 105 (49), 95 (21), 93 (42), 91 (66), 79 (58), 67 (32), 55 (29), 43 (100), 41 (78). 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 e Figuras 31-37.

Por meio da seqüência de colunas descritas anteriormente, partindo-se de duas frações obtidas da coluna Flash do extrato diclorometânico de *S. platensis*, foi possível isolar três compostos, que cujos processos de isolamento encontram-se esquematizados na Figura 9.

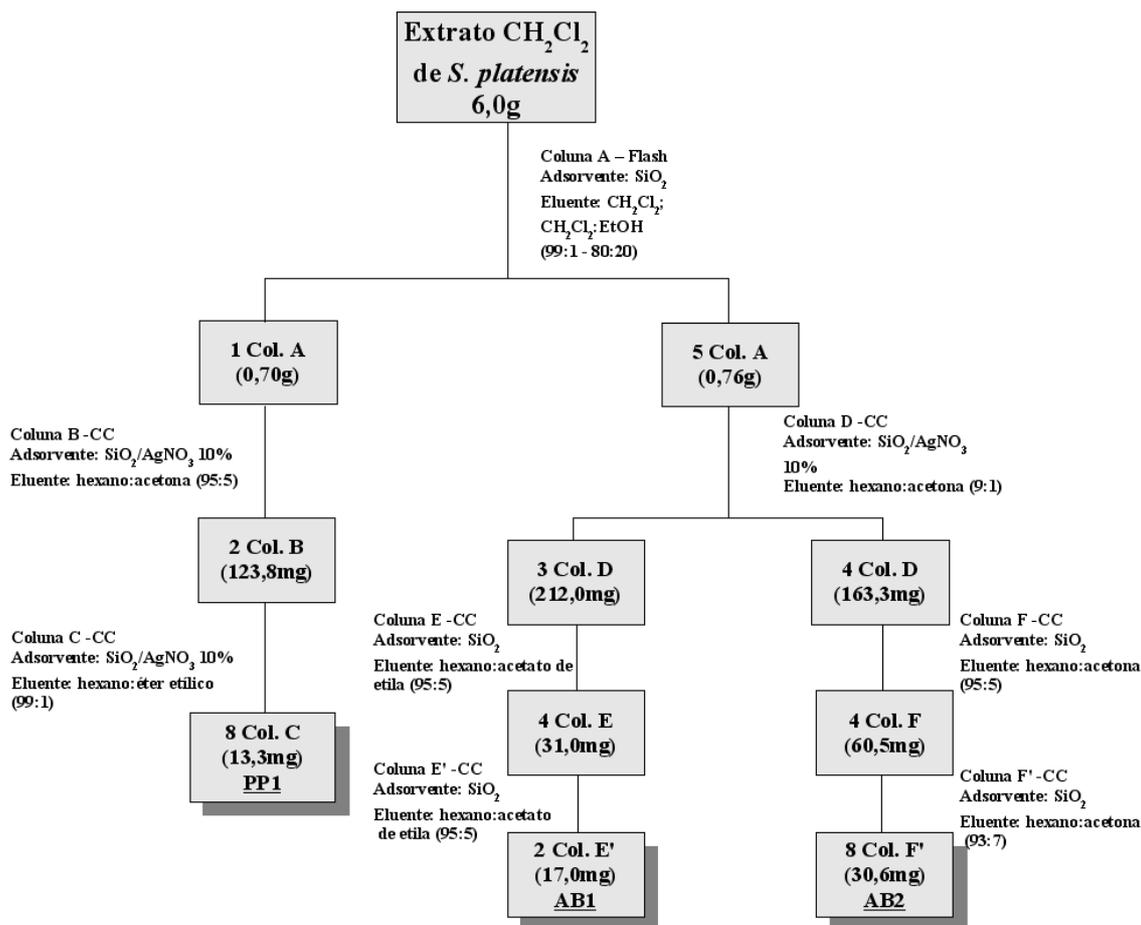


Figura 9 - Representação esquemática do fracionamento do extrato diclorometânico de *Senecio platensis*, com o isolamento dos constituintes PP1, AB1 e AB2.

### 3. 6 Avaliação da atividade antibacteriana dos compostos isolados

Os testes para a avaliação da atividade antibacteriana foram realizados para as substâncias AB1 e AB2. A substância PP1 havia sido anteriormente isolada em nosso grupo de pesquisas e teve a sua atividade antimicrobiana investigada por Deuschle, 2003. Os testes foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), Centro de Ciências da Saúde (CCS), UFSM, com a colaboração da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosmari Hörner. Para tanto utilizou-se o método de microdiluição em Caldo Mueller-Hinton, baseado no documento M7-A6 para bactérias padronizado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS, 2005).

Esta metodologia avalia a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a menor concentração em que o composto impede o crescimento visível do microrganismo

(bacteriostático), e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) definida como a menor concentração do composto capaz de causar a morte do microrganismo (bactericida). As concentrações onde não apresentaram crescimento bacteriano no teste de CIM foram repicadas para subculturas em placas com ágar Mueller-Hinton, as quais foram lidas após 48 horas de incubação e tiveram seus valores de CBM determinados.

Os microrganismos utilizados nos ensaios para a avaliação da atividade antibacteriana foram *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Bacillus cereus* hospitalar (isolado clínico de paciente com endocardite) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. As concentrações de AB1 e AB2 testadas foram de 8192, 4096, 2048, 1024, 512, 256, 128, 64, 32 e 16µg/mL. Como revelador foi utilizado o cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólico, onde o desenvolvimento da coloração vermelha indica a ocorrência de crescimento bacteriano (Gabrielson et al., 2002).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Rendimento do extrato diclorometânico e das substâncias isoladas de *Senecio platensis* Arech.

#### 4. 1. 1 Rendimento do extrato diclorometânico

A partir de 350 g de material vegetal fresco, foram obtidos 6,0 g de extrato diclorometânico bruto, o que corresponde a um rendimento de 1,71%.

#### 4. 1. 1. 2 Rendimento de PP1

Partindo de 0,70 g de 1 Col. A do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , conforme representado na Figura 9, obteve-se 13,3 mg da substância PP1, o que corresponde a um rendimento de 1,9%.

#### 4. 1. 1. 3 Rendimento de AB1

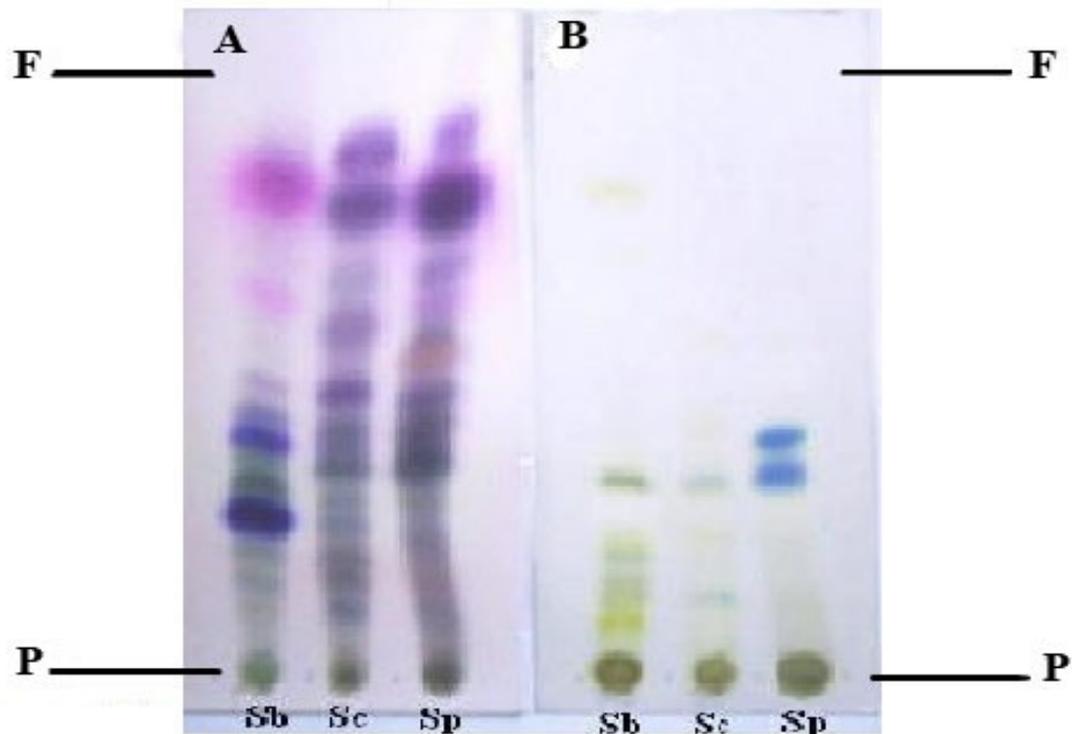
Partindo de 0,76 g de 5 Col. A do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  na Figura 9, foram obtidos 17 mg da substância AB1, o que corresponde a um rendimento de 2,24%.

#### 4. 1. 1. 4 Rendimento de AB2

Partindo novamente de 0,76 g de 5 Col. A do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , conforme representado na Figura 9, foram obtidos 30,6 mg da substância AB2, o que corresponde a um rendimento de 4,08%.

#### 4. 2 Análise do extrato diclorometânico de *S. platensis* quanto a presença de peróxidos

Das três espécies de *Senecio* avaliadas quanto a presença de peróxidos, apenas *Senecio platensis* reagiu positivamente frente ao reagente de Huber e Fröhlke, sendo os compostos em questão evidenciados por uma coloração azul.



**Figura 10 - Análise de extratos  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de espécies de *Senecio* quanto a presença de peróxidos**

**A-** Reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico

**B-** Reagente de detecção para peróxidos (Huber e Fröhlke)

**Eluente:** Hexano:acetona (8:2)

**Adsorvente:** gel de sílica G

**Sb - *S. bonariensis***

**Sc - *S. crassiflorus***

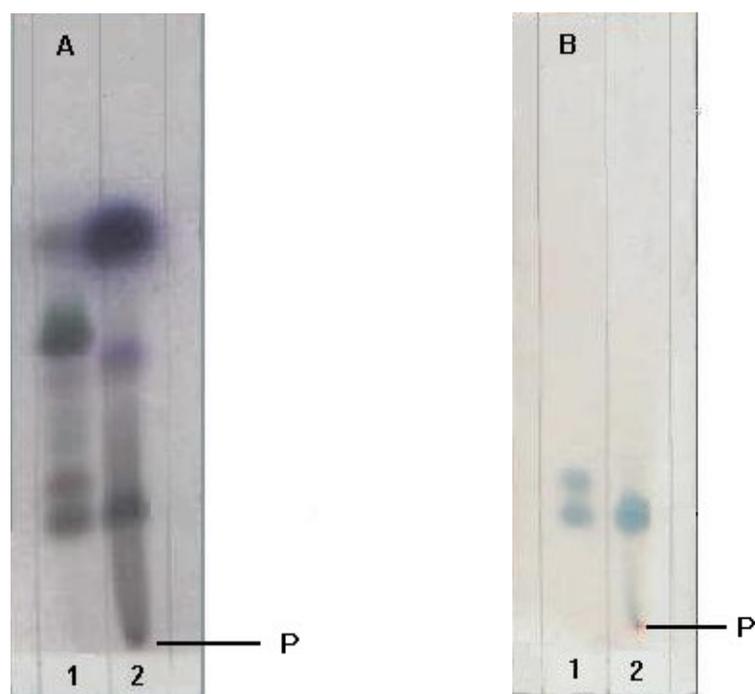
**Sp - *S. platensis***

**P - Ponto de aplicação**

**F - Front**

#### 4. 2. 1 Busca pelos precursores dos peróxidos

Através da reação de foto-oxidação (Rücker et al., 1997) de uma pequena alíquota da fração codificada como 2 Col. B, conforme descrito no item 3. 4. 1. 1 obteve-se um peróxido. O produto da reação foi comparado por meio de CCD com a fração 4 Col. A. Esta análise indicou que apenas um dos dois peróxidos existentes na fração 4 Col. A foi semi-sintetizado, sendo este o peróxido mais polar (Figura 11).



**Figura 11 - Análise do resultado da foto-oxidação da fração 2 Col. B por CCD**

**A-** Reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico

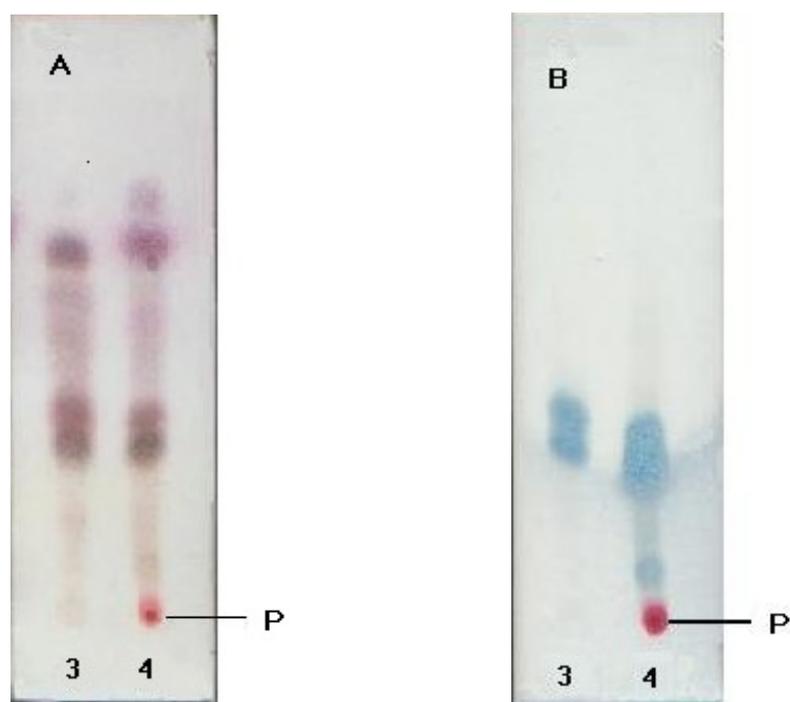
**B-** Reagente de detecção para peróxidos (Huber e Fröhlke)

**Eluente:** Hexano:acetona (8:2)

**1-** Fração: 4 Col. A

**2-** Produto de foto-oxidação da fração 2 Col. B

Devido a ausência do precursor do peróxido menos polar na fração 2 Col. B, supôs-se que este estivesse presente nas frações seguintes da Col. A, ou seja, na fração 2 Col. A. A reação de semi-síntese foi repetida com uma pequena alíquota desta fração e o resultado foi analisado por CCD, comparando-se à mistura reacional com a fração 4 Col. A. O resultado obtido indicou a presença dos precursores dos dois peróxidos, presentes na fração 4 Col. A (Figura 12).

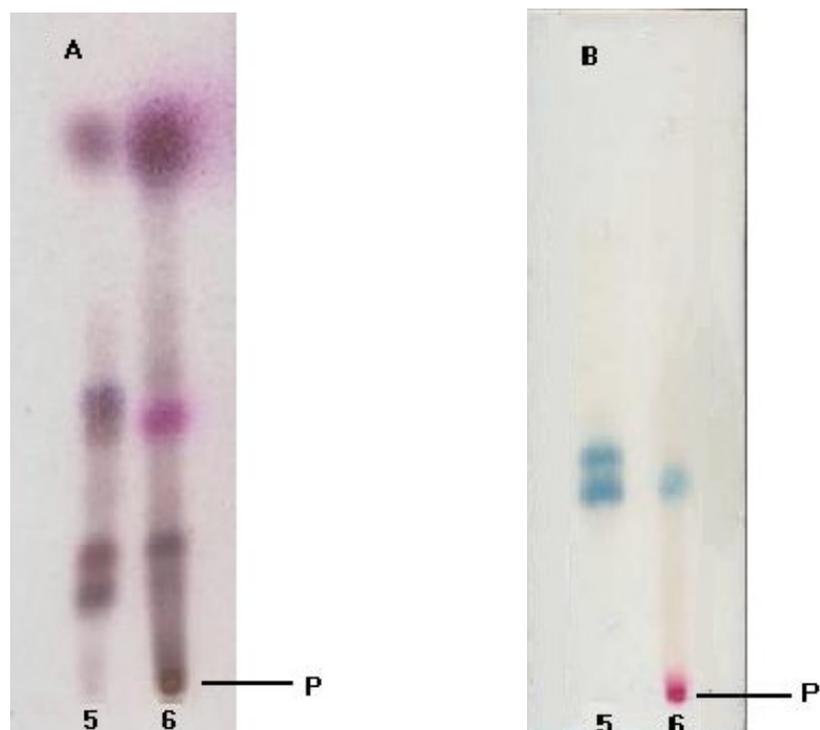


**Figura 12 - Análise do resultado da foto-oxidação da fração 2 Col. A por CCD**

- A-** Reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico  
**B-** Reagente de detecção para peróxidos (Huber e Fröhlke)  
**Eluente:** hexano:acetona (8:2)  
**3-** Fração: 4 Col. A  
**4-** Produto da foto-oxidação das frações 2 Col. A.

Desta forma, pode-se afirmar que os precursores dos dois peróxidos estão presentes na fração 2 Col. A, e apenas o precursor do peróxido mais polar está presente na fração 2 Col. B, da qual se partiu para obter a substância PP1.

Com o passar de vinte dias, foi realizada uma nova CCD para análise do resultado da foto-oxidação da fração 2 Col. A, utilizando o produto reacional que havia sido armazenado em refrigerador (Figura 13). Observou-se que apenas o peróxido mais polar ainda persistia na mistura reacional. Este resultado indicou que houve a degradação do peróxido menos polar, devido a sua instabilidade.



**Figura 13 - Análise da mistura reacional da foto-oxidação das frações 2 Col. A por CCD, após o armazenamento do produto em refrigerador por 20 dias**

**A-** Reagente de detecção anisaldeído-sulfúrico

**B-** Reagente de detecção para peróxidos (Huber e Fröhlke)

**Eluente:** hexano:acetona (8:2)

**5-** Fração: 4 Col. A

**6-** Produto da foto-oxidação das frações 2 Col. A.

A análise por CG-EM da fração 2 Col. A indicou que esta era constituída de duas substâncias, sendo ambas hidrocarbonetos de estrutura terpênica, mais especificamente um monoterpenóide, identificado como isoterpinoleno e um sesquiterpenóide, identificado como germacreno D.

### 4.3 Análise estrutural das substâncias isoladas

#### 4.3.1 Elucidação estrutural de PP1

A substância PP1 foi isolada conforme descrito no item 3.5 e esquematizado na Figura 9. O composto foi analisado por CG-EM, RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  (Figuras 14, 15 e 16; Tabelas 17 e 18) e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura (Murari, 2007; Francescato, 2007; Silva, 2006; Deuschle, 2003; Steliopoulus et al., 2002) e com o banco de dados NIST (1998), no caso do espectro de massas.

Na análise por CG foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 30 minutos. No espectro de massas por impacto eletrônico do composto PP1 (Figura 14), o pico de maior massa encontra-se em  $m/z$  204 u.m.a, sendo este o pico do íon molecular. Este dado permite sugerir para o composto PP1 um peso molecular de 204 u.m.a. e fórmula elementar  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ . Com base no modelo de fragmentação apresentado por PP1, o banco de dados do equipamento sugeriu uma série de substâncias com fragmentações semelhantes às da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o germacreno D apresentou um modelo de fragmentação mais semelhante ao PP1.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  indica a presença de três insaturações, através dos seis sinais na região dos carbonos olefínicos (100-150 ppm) (Figura 15). A fórmula elementar  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$  permitiu calcular o grau de insaturações (GI), igual a 4. Uma vez que os espectros de RMN indicam a presença de três insaturações, conclui-se que a substância apresenta um ciclo em sua estrutura.

Portanto, a massa da substância, 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.

Esta substância foi anteriormente isolada por nosso grupo de pesquisas, e de acordo com as análises realizadas, e comparações dos dados espectroscópicos obtidos com aqueles da mesma substância isolada de outras espécies de *Senecio*, esta foi identificada como sendo o germacreno D. A discussão completa da elucidação estrutural deste composto pode ser encontrada em Deuschle (2003), Silva (2006), Francescato (2007) e Murari (2007).

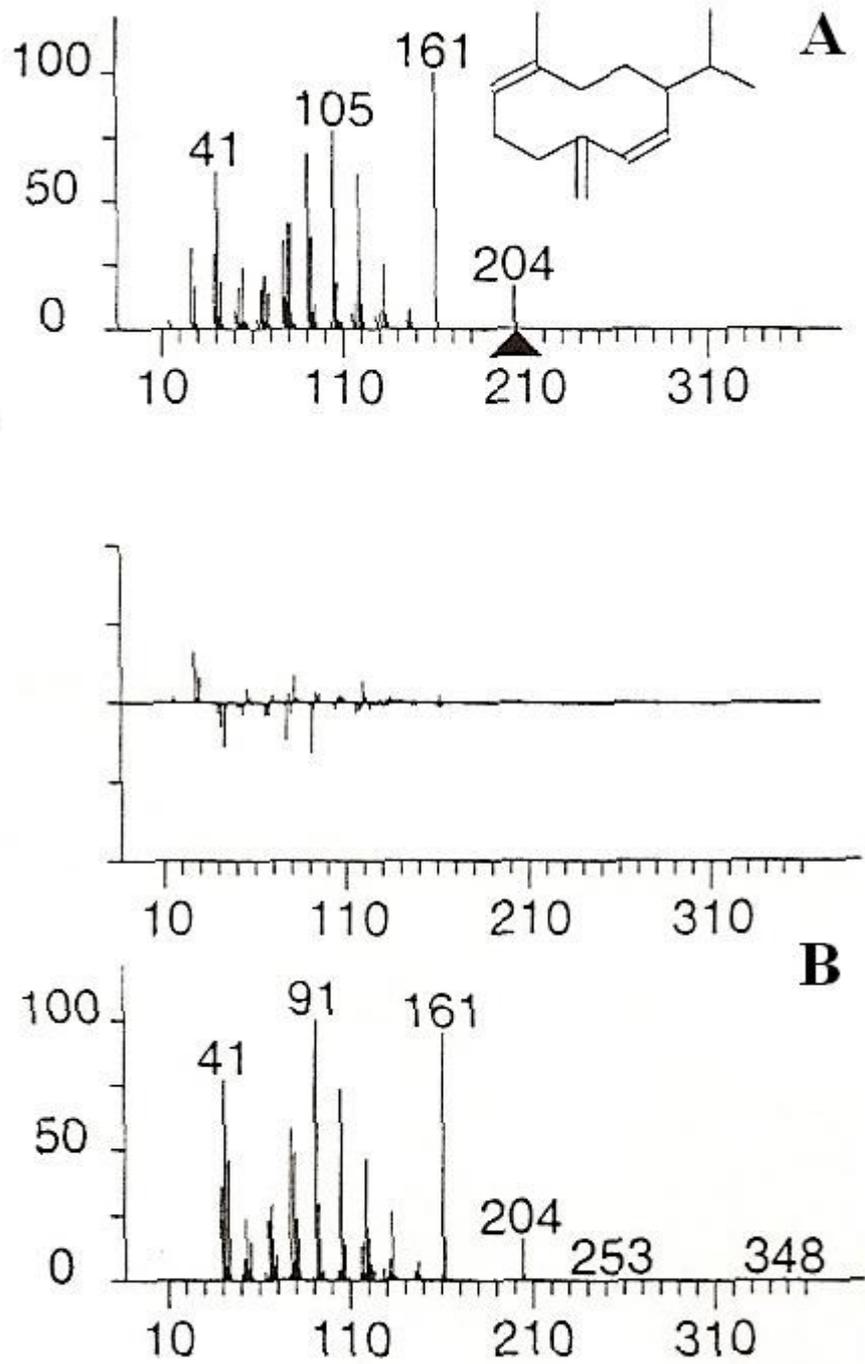


Figura 14 - Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno D (A) (NIST, 1998) em comparação ao de PP1 (B)

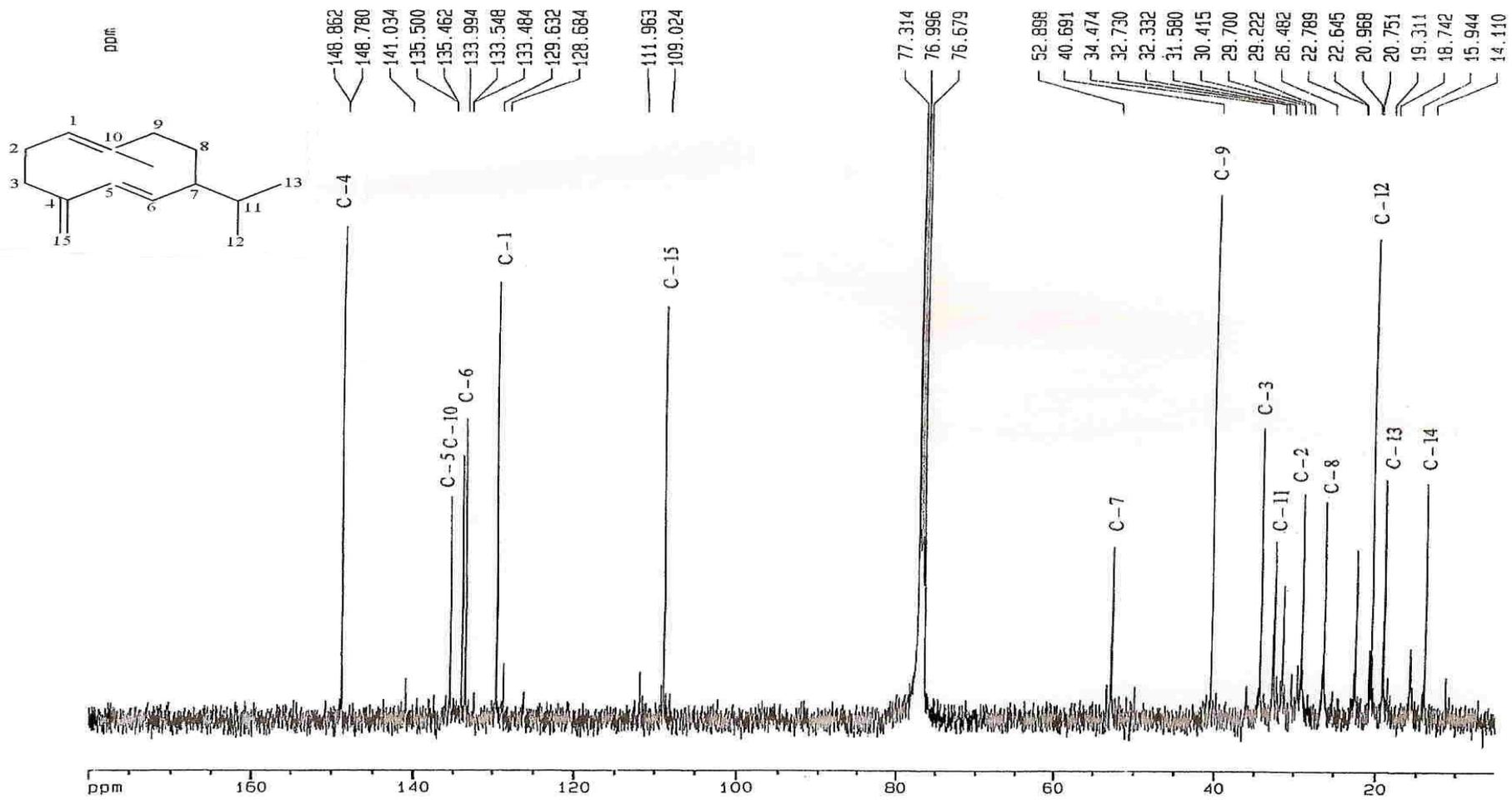


Figura 15 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C de PP1 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

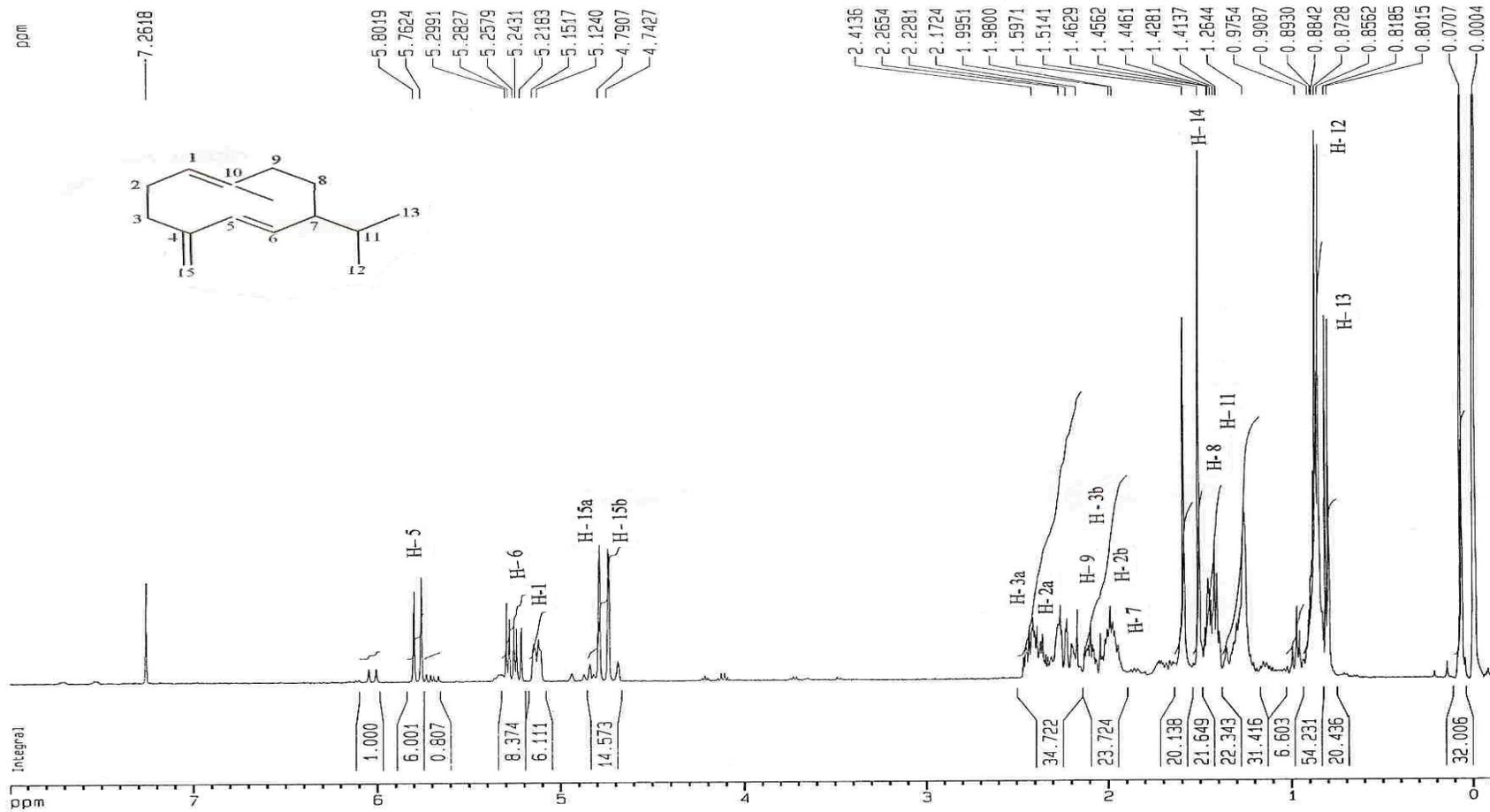


Figura 16 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H de PP1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

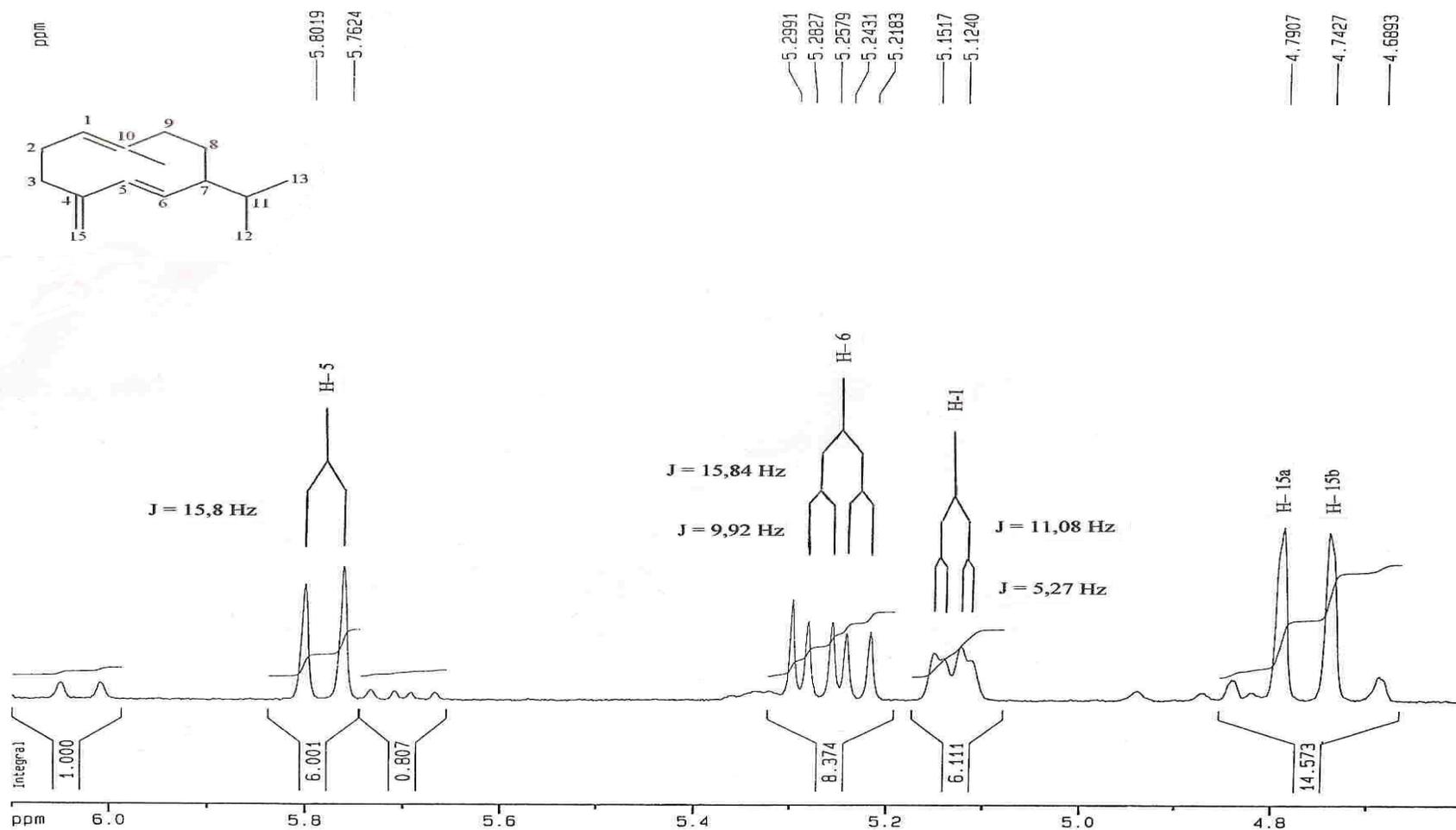


Figura 17 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de PP1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Ampliações dos sinais correspondentes ao H-5 (δ = 5,78 ppm), H-6 (δ = 5,25 ppm), H-1 (δ = 5,14 ppm), H-15a (δ = 4,79 ppm), H-15b (δ = 4,74 ppm)

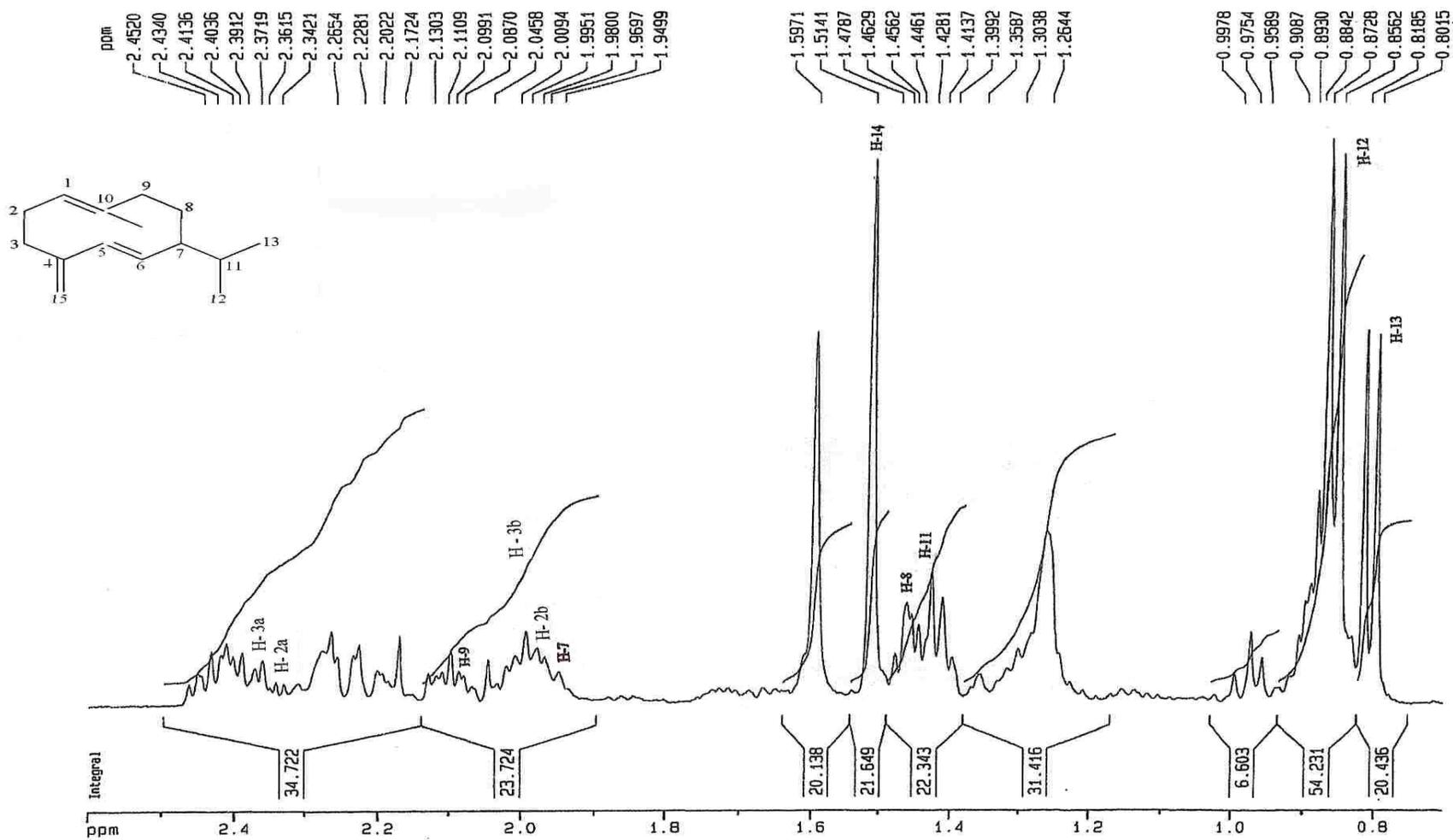


Figura 18 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de PP1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Ampliações dos sinais correspondentes ao H-12 (δ = 0,86 ppm) e H-13 (δ = 0,81 ppm)

Tabela 17 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para a substância PP1, em comparação com dados da literatura

PP1		Germacreno D			
C	Bolzan et al., 2007 <sup>a</sup>	Murari, 2007 <sup>a</sup>	Francescato, 2007 <sup>a</sup>	Deuschle, 2003 <sup>a</sup>	Steliopoulos et al., 2002 <sup>a</sup>
	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	<b>129,6</b>	129,7	129,6	130,0	130,0
2	<b>29,2</b>	29,2	29,2	29,2	29,6
3	<b>34,5</b>	34,5	34,5	34,5	34,9
4	<b>148,8</b>	148,9	148,8	148,8	149,0
5	<b>135,5</b>	135,5	135,5	135,3	136,8
6	<b>133,5</b>	133,5	133,5	133,4	133,2
7	<b>52,9</b>	52,9	52,9	53,0	53,2
8	<b>26,5</b>	26,5	26,5	26,5	26,8
9	<b>40,7</b>	40,7	40,7	40,7	41,0
10	<b>134,0</b>	133,92	134,0	133,7	133,7
11	<b>32,7</b>	32,7	32,7	32,7	33,0
12	<b>20,8</b>	19,3	20,8	20,7	21,0
13	<b>19,3</b>	20,7	19,3	19,3	19,5
14	<b>14,1</b>	15,9	15,9	15,8	16,0
15	<b>109,0</b>	109,0	109,0	109,0	109,4

a: 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ;

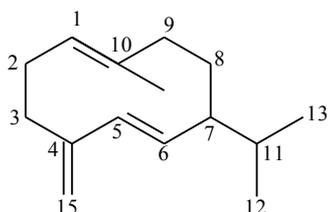
Tabela 18 - Valores de deslocamentos químicos( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para a substância PP1, em comparação com os dados da literatura

PP1				Germacreno D											
H	Bolzan, 2007 <sup>a</sup>			Murari, 2007 <sup>a</sup>			Francescato, 2007 <sup>a</sup>			Silva, 2006 <sup>a</sup>			Deuschle, 2003 <sup>a</sup>		
	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)
H-1	5,14	dd	5,3; 11,1	5,15	dd	4,2; 11,0	5,14	dd	4,8; 11,6	5,13	dd	4,3; 10,1	5,16	dd	4,5; 11,2
H-2a	~2,34	m		2,28	m		~2,35	m		2,29	m		2,34	m	
H-2b	~1,98	m		1,96	m		~2,00	m		1,98	m		1,98	m	
H-3a	~2,36	m		2,40	m		~2,43	m		2,40	m		2,43	m	
H-3b	2,00	m		2,05	m		2,10	ddd	~5,0; ~7,8; ~12,8	2,05	m		2,04	m	
H-5	5,78	d	15,8	5,80	d	15,8	5,79	d	15,6	5,78	d	15,7	5,80	d	15,8
H-6	5,25	dd	9,9; 15,8	5,24	dd	9,9; 15,8	5,26	dd	10,0; 16,0	5,25	dd	10,0; 15,9	5,27	dd	9,9; 15,8
H-7	1,95	m		2,01	m		2,00	m		2,01	m		2,01	m	
H-8	1,46	m		1,47	m		~1,45	m		1,48	m		1,48	m	
H-9	2,10	m		2,11	m		2,25	m		2,22	m		2,11	m	
H-11	1,43	m		1,44	m		~1,44	m		1,43	m		1,43	m	
H-12	0,86	d	6,64	0,89	d	6,7	0,82	d	6,8	0,86	d	6,6	0,90	d	6,72
H-13	0,81	d	6,8	0,83	d	6,8	0,87	d	6,72	0,81	d	6,6	0,84	d	6,8
H-14	1,51	s		1,52	s		1,52	sl		1,59	s		1,54	s	
H-15a	4,79	sl		4,81	d	~1,5	4,80	d	~2,0	4,81	d	2,4	4,82	d	2,24
H-15b	4,74	sl		4,76	d	1,5	4,75	d	2,4	4,72	d	1,7	4,76	d	1,64

a: 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$

#### 4.3.1.2 Estrutura de PP1

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a estrutura do germacreno D para PP1 (Figura 19).



**Figura 19 - Fórmula estrutural do germacreno D (substância PP1)**

#### 4. 3. 2 Elucidação estrutural de AB1

A substância AB1 foi isolada conforme descrito no item 3.5 e esquematizado na Figura 9. Sua identificação foi realizada através da análise por CG-EM, pelos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, por RMN  $^1\text{H}$  e espectros de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figuras 20-27; Tabelas 19 e 20). O modelo de fragmentação do espectro de massas por impacto eletrônico foi comparado à espectroteca NIST, 1998 e com dados da literatura (Schenato et al., 2001; Alkhatlan et al., 2005; Tabelas 19 e 20).

Na análise por CG foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 40 minutos. No espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 20) o pico de maior massa encontra-se em  $m/z$  218 u.m.a., e corresponde ao pico base. Através do modelo de fragmentação apresentado pela substância, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento, uma série de substâncias com fragmentações semelhantes às da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, a deidrofuquinona foi o composto que apresentou um modelo de fragmentação mais semelhante a AB1.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 21-23; Tabela 19) aponta a presença de 15 átomos de carbono, sugerindo tratar-se de um sesquiterpenóide. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  indicam a presença de oxigênio e de três insaturações na molécula.

Baseado nessas evidências é possível propor para a substância AB1 uma fórmula molecular de  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}$ , e portanto, um grau de insaturação (GI) ou índice de deficiência de H igual a 5. Uma vez que os espectros de RMN indicam a presença de três insaturações, conclui-se que a substância apresenta dois ciclos em sua estrutura.

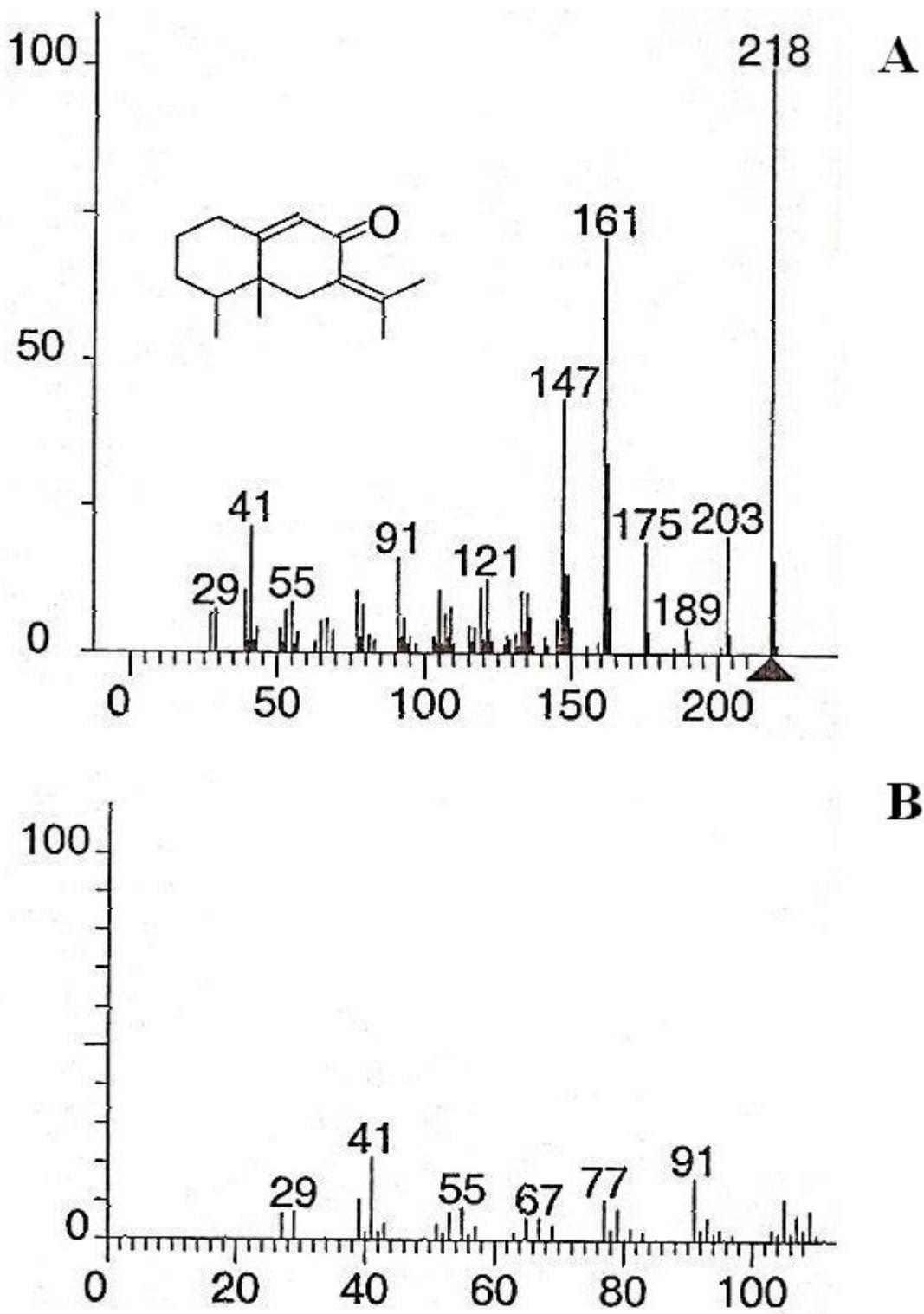


Figura 20 - Espectro de massas por impacto eletrônico da deidrofuquinona (A) (NIST, 1998) em comparação ao de AB1 (B)

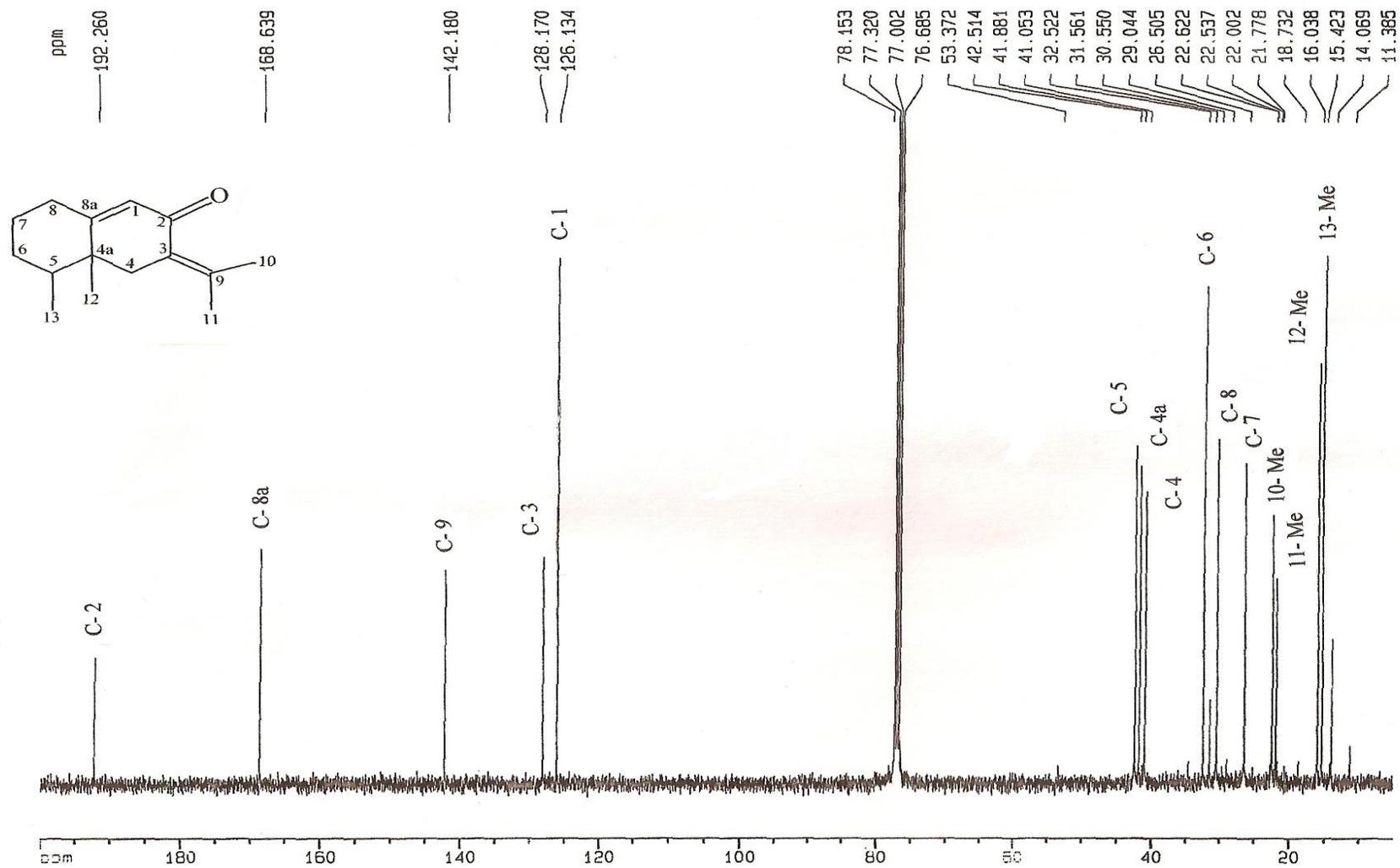


Figura 21 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C de AB1 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

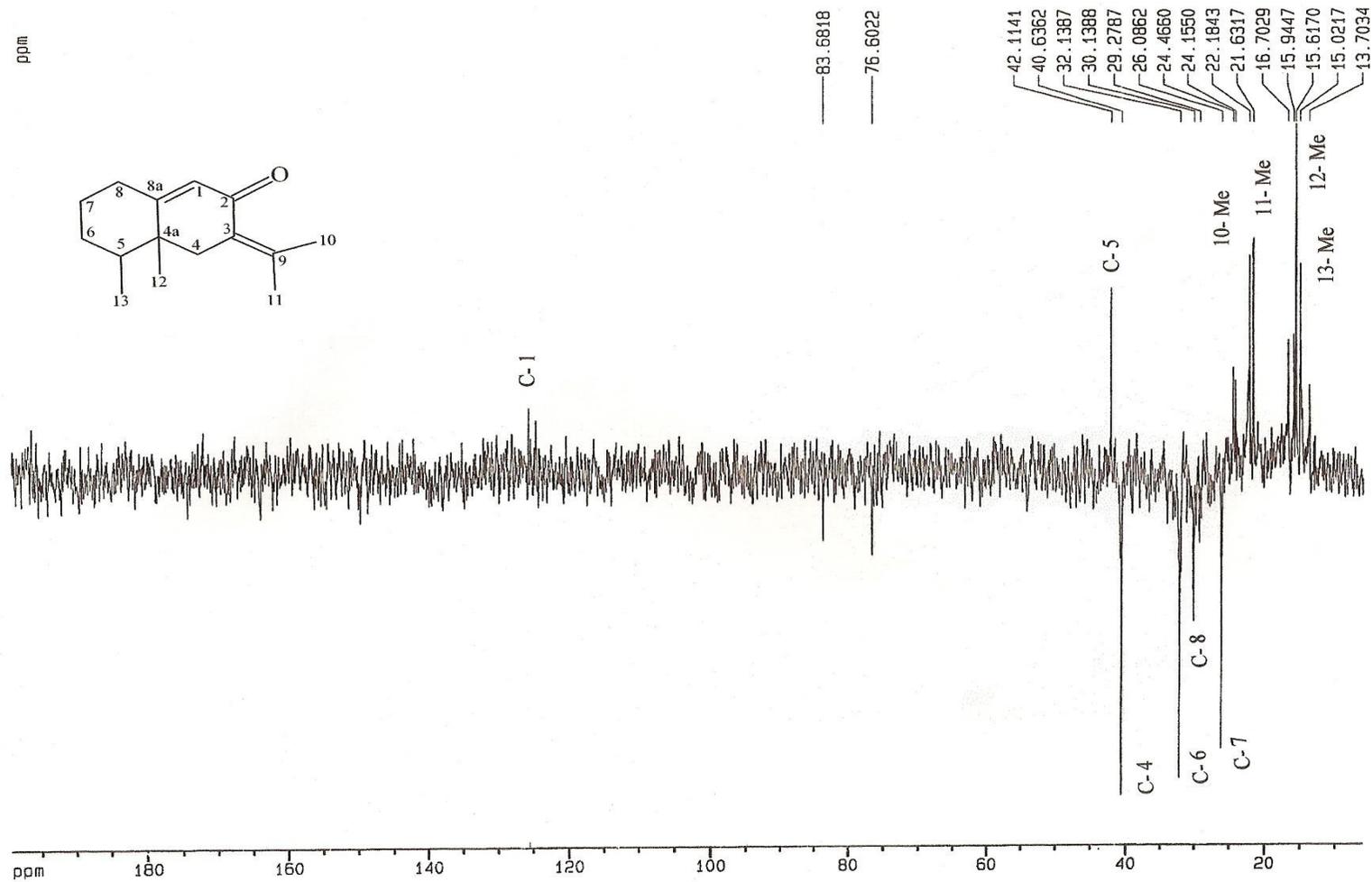


Figura 22 - Espectro de DEPT 135° de AB1 (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

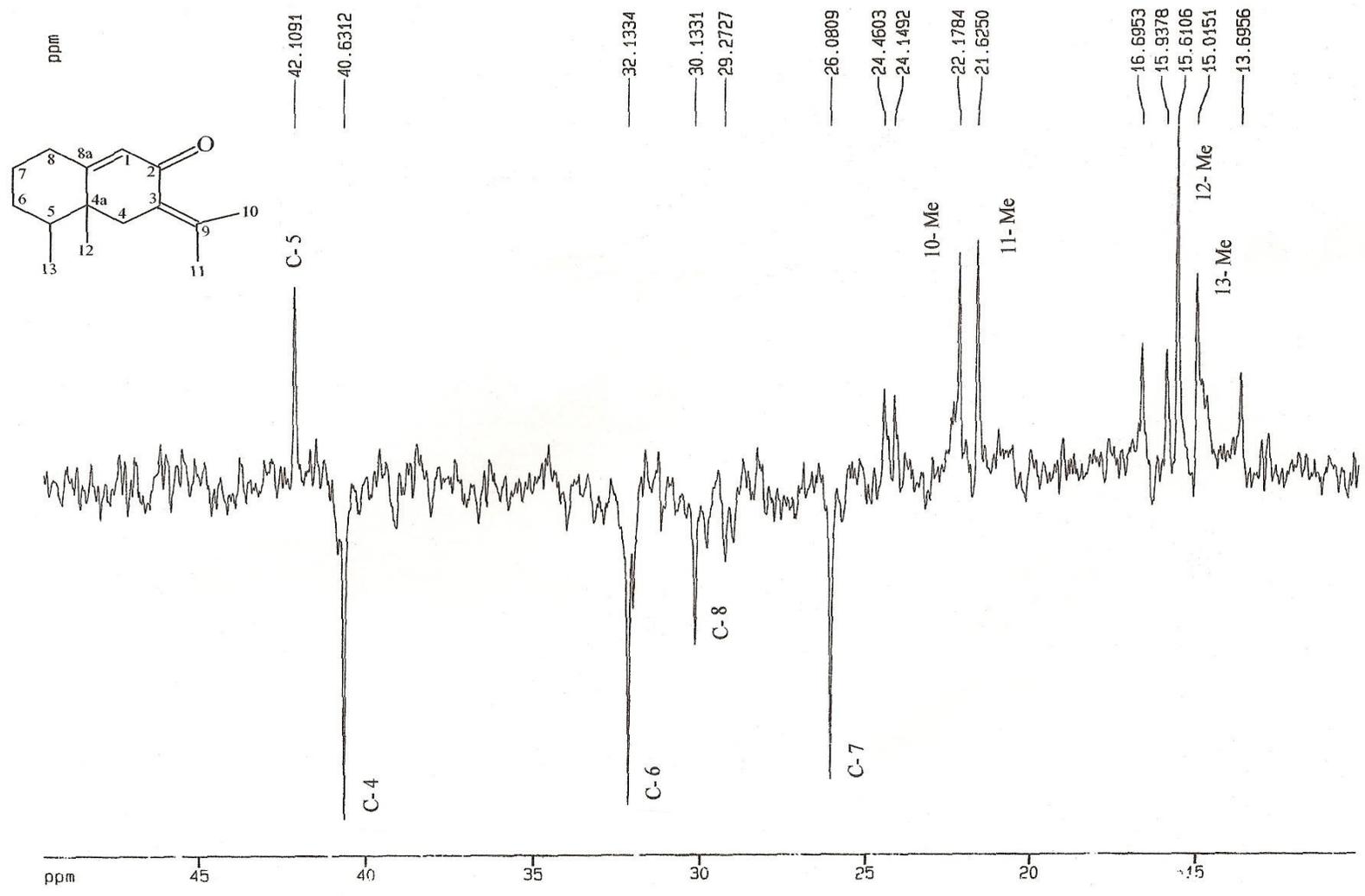


Figura 23 - Ampliação do espectro de DEPT 135° de AB1 (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



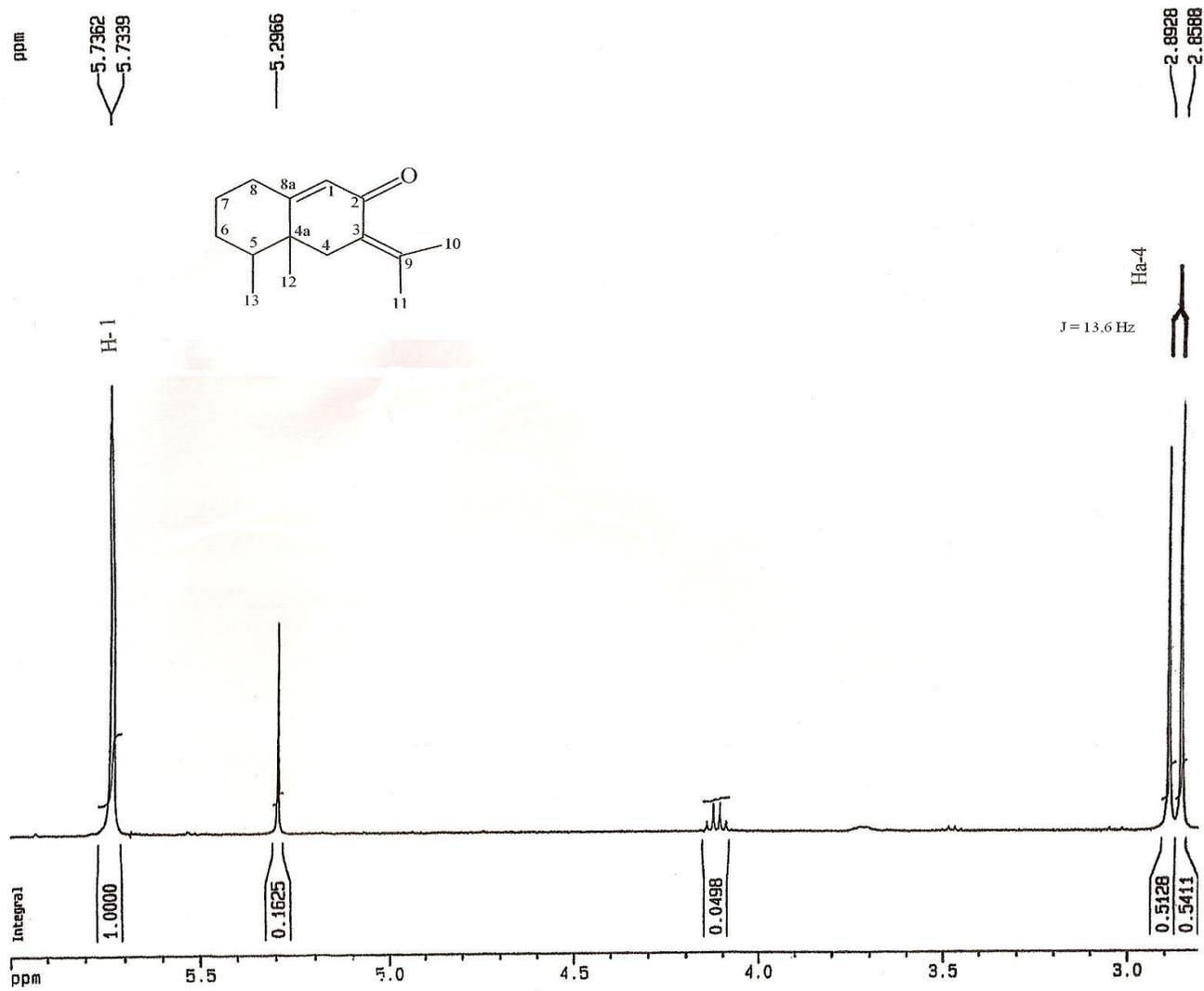


Figura 25 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de AB1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

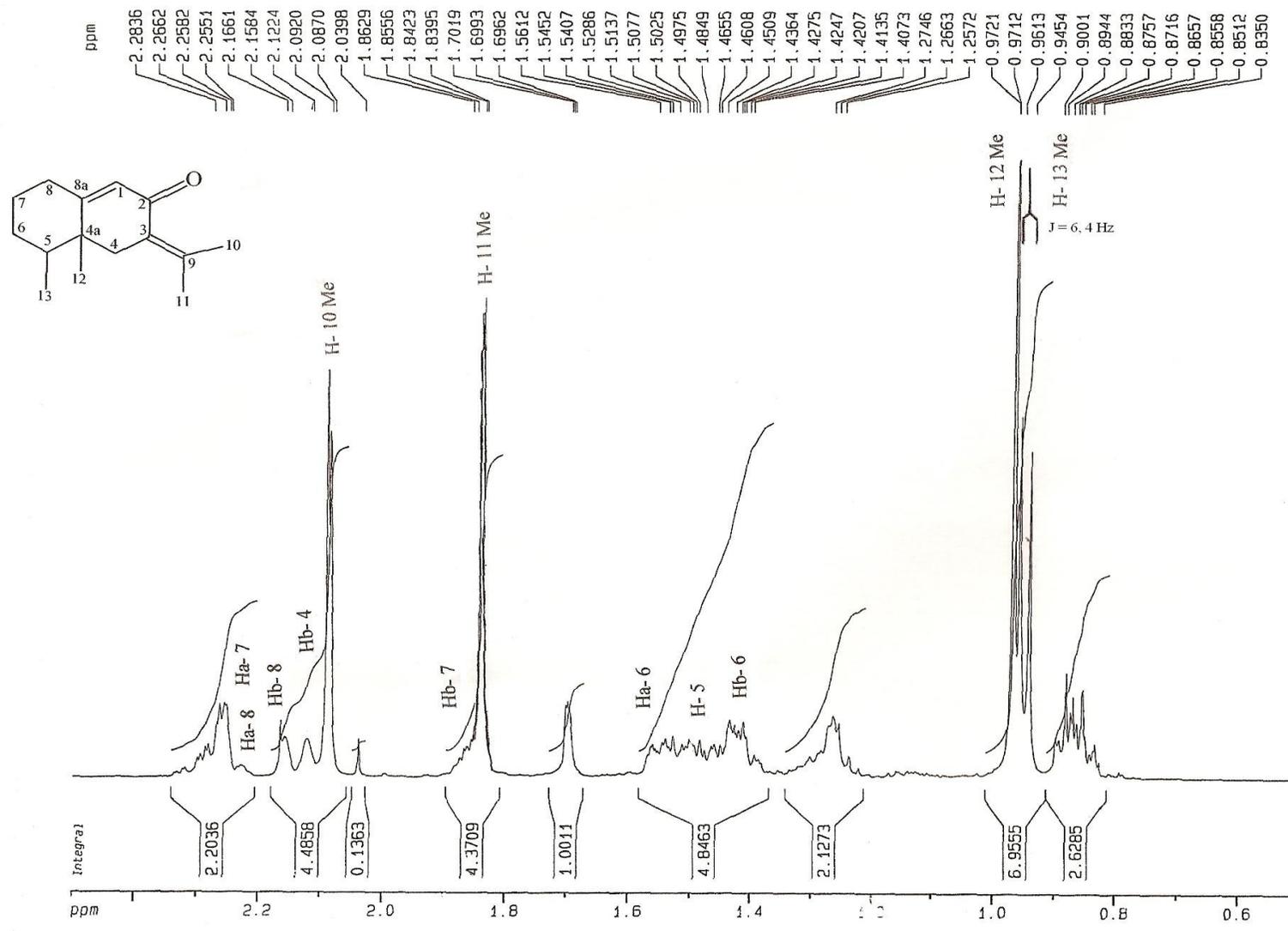


Figura 26 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de AB1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

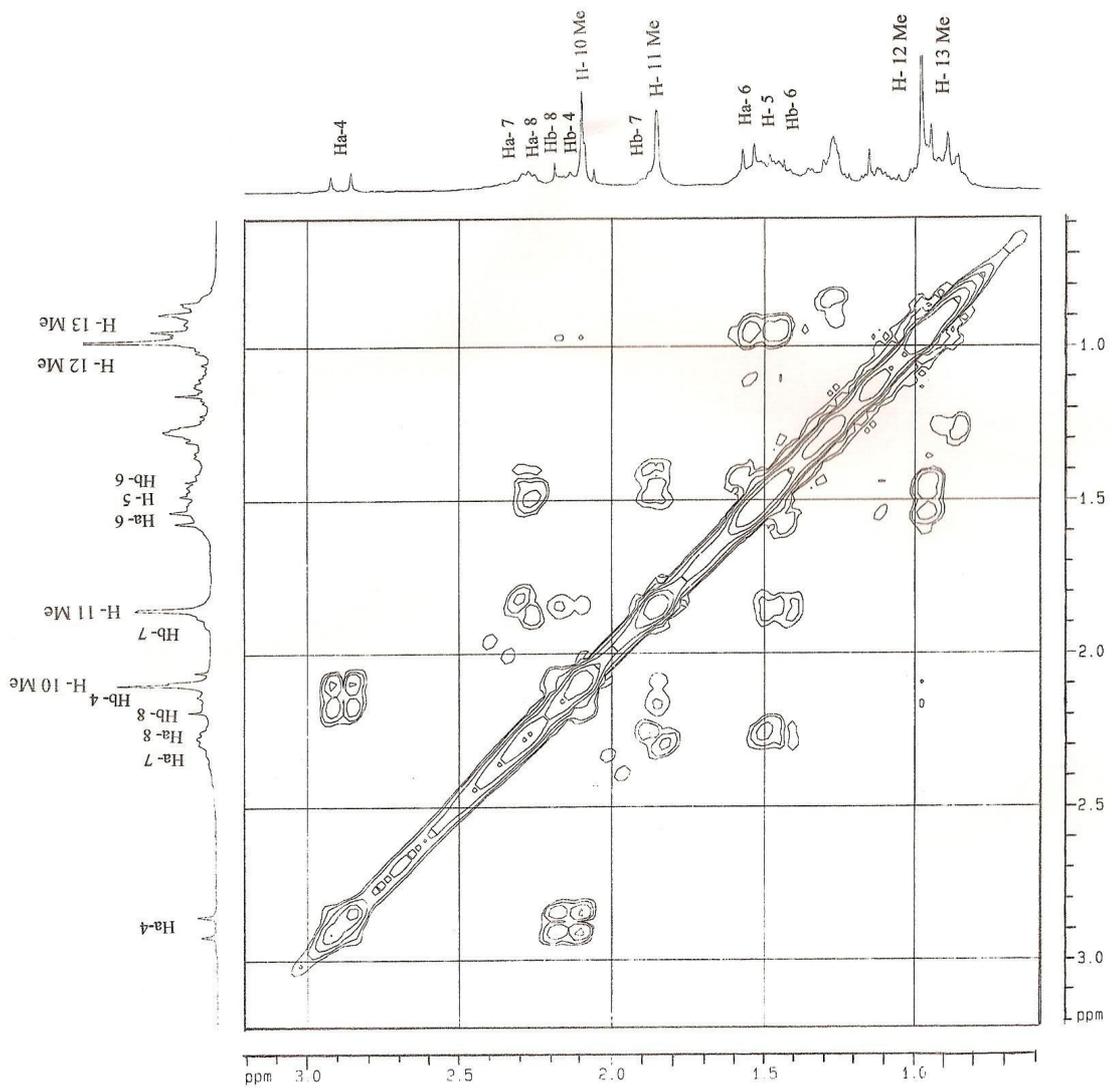


figura 27 - Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de AB1 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

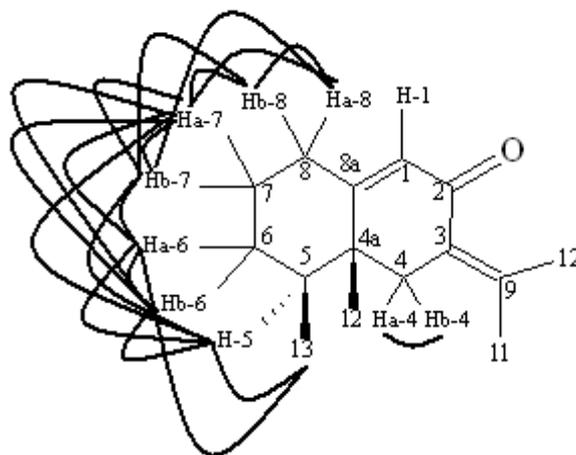


Figura 28 - Esquemática das correlações encontradas para prótons de AB1 no espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

**Tabela 19 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB1, em comparação com dados da literatura**

AB1			deidrofuquinona	
C	Experimental <sup>a</sup>		Alkhathlan, et al., 2005 <sup>b</sup>	Schenato et al., 2001 <sup>c</sup>
	$\delta$ (ppm)	DEPT 135	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
1	126,13	CH	126,20	126,02
2	192,26	C	192,45	192,24
3	128,17	C	128,26	128,12
4	41,05	CH <sub>2</sub>	41,11	41,01
4a	41,88	C	41,97	41,86
5	42,51	CH	42,58	42,48
6	32,52	CH <sub>2</sub>	32,62	32,51
7	26,51	CH <sub>2</sub>	26,56	26,47
8	30,55	CH <sub>2</sub>	30,61	30,51
8a	168,64	C	168,84	168,66
9	142,18	C	142,28	142,14
10	22,54	CH <sub>3</sub>	26,7	22,54
11	22,00	CH <sub>3</sub>	22,11	22,00
12	16,04	CH <sub>3</sub>	16,10	16,01
13	15,42	CH <sub>3</sub>	15,54	15,43

**a:** 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; **b:** potência não informada,  $\text{CDCl}_3$ ; **c:** 50 MHz,  $\text{CDCl}_3$

**Tabela 20 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB1 em comparação com dados da literatura**

AB1					deidrofuquinona					
H	Experimental <sup>a</sup>				Alkathlan et al., 2005 <sup>b</sup>			Schenato et al., 2001 <sup>c</sup>		
	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)
H-C1	5,73	s		–	5,72	s		5,74	s	
Ha-C4	2,88	d	13,6	Hb-C4	2,88	d	13,9	2,88	d	13,2
Hb-C4	2,12	m		Ha-C4	2,12	m	13,9	2,15-2,37	m	
H- C5	~1,48	m		Ha-C7; Hb-C7; Ha-C6; Hb-C6; 13-Me	1,85	m		–	–	–
Ha-C6	~1,58	m		Ha-C7; Hb-C7; H-C5; 13-Me; Hb-C6	1,39-1,55	m		–	–	–
Hb-C6	~1,43	m		H-C5; Ha-C6; Ha-C7; Hb-C7	1,39-1,55	m		–	–	–
Ha-C7	~2,27	m		Ha-C8; Hb-C8; Hb-C7; Hb-C6; Ha-C6; H-C5	1,39-1,55	m		–	–	–
Hb-C7	~1,85	m		Ha-C7; Ha-C6; Hb-C6; Ha-C8; Hb-C8; H-C5	1,39-1,55	m		–	–	–
Ha-C8	~2,25	m		Hb-C8; Ha-C7; Hb-C7	2,24-2,26	m		–	–	–
Hb-C8	~2,13	m		Ha-C8; Hb-C7; Ha-C7	2,24-2,26	m		–	–	–
10-Me	2,09	s		–	2,02	s		2,09	s	
11-Me	1,84	s		–	1,82	s		1,85	s	
12-Me	0,97	s		–	0,96	s		0,97	s	
13-Me	0,95	d	6,36	H-C5; Ha-C6	0,94	d	6,8	0,96	d	6,3

**a:** 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; **b:** potência não informada,  $\text{CDCl}_3$ ; **c:** 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$

#### 4. 3. 2. 1 Análise da fragmentação de AB1 por EM-IE

O composto AB1 apresentou uma massa molecular de 218 u.m.a (Figura 20), evidenciada pelo espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE), com energia do feixe de elétrons em 70 eV. A figura 29 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto AB1, que será descrita a seguir.

O pico base da substância (218 u.m.a.) coincide com o pico do íon molecular  $[M^{+}]$  (218 u.m.a.), indicando ser este um íon de elevada estabilidade.

O sinal em  $m/z$  203 u.m.a. pode ser explicado pela obtenção de quatro íons diferentes. A ordem de abordagem destes nesta dissertação tem apenas o intuito de tornar o texto mais compreensível. A migração da dupla ligação entre C3 e C9 no íon molecular  $[M^{+}]$  218 u.m.a., com subsequente eliminação de um radical metila (15 u.m.a.), conduz ao íon com sinal em  $m/z$  203 u.m.a., que por meio de uma deslocalização de carga, permite a eliminação de uma molécula neutra de massa 136 u.m.a. Desta forma origina-se o íon em  $m/z$  67 u.m.a. que, através da eliminação de CO, origina o pico em  $m/z$  39 u.m.a.. A eliminação de uma metila (15 u.m.a.) diretamente do íon molecular, também leva à um íon em  $m/z$  203 u.m.a. Este, por sua vez, através de um rearranjo e eliminação de uma molécula neutra de massa 82 u.m.a., pode originar o fragmento com  $m/z$  121 u.m.a. Este íon, após a eliminação de uma molécula de H<sub>2</sub>, origina o sinal em  $m/z$  119 u.m.a. Ainda a partir do íon em  $m/z$  203 u.m.a. pode originar-se o sinal em  $m/z$  133 u.m.a. devido a saída de uma molécula neutra (70 u.m.a.); se ocorrer a saída de CO pode resultar no sinal em  $m/z$  175 u.m.a., que também poderá resultar no sinal em  $m/z$  133 u.m.a. pela saída de uma molécula de propeno (42 u.m.a). Ainda a partir do íon em  $m/z$  203 u.m.a. pode originar-se o fragmento em  $m/z$  161 u.m.a pela eliminação de uma molécula de propeno (42 u.m.a.). Um rearranjo no íon em  $m/z$  161 u.m.a. e a saída de uma molécula neutra (70 u.m.a.) origina o fragmento em  $m/z$  91 u.m.a.

O íon responsável pelo sinal em  $m/z$  203 u.m.a., também pode sofrer a eliminação de uma molécula neutra (56 u.m.a.) e resultar no fragmento em  $m/z$  147 u.m.a. A partir deste, são obtidos os fragmentos em  $m/z$  41 u.m.a., pela eliminação de uma molécula neutra (106 u.m.a.); em  $m/z$  105, pela eliminação de uma molécula de propeno (42 u.m.a); e em  $m/z$  119 u.m.a. pela eliminação de uma molécula de monóxido de carbono. Este fragmento, através da eliminação de uma molécula de propeno (42 u.m.a.), resulta no fragmento em  $m/z$  77 u.m.a.

A partir do íon molecular  $[M^{+}]$  com  $m/z$  218 u.m.a. pode ocorrer também a eliminação de um radical hidrogênio e de uma molécula neutra de monóxido de carbono (28 u.m.a.), originando o fragmento com  $m/z$  189 u.m.a.. Este, através da eliminação de uma molécula neutra (70 u.m.a.), forma um fragmento com  $m/z$  119 u.m.a.



#### 4.3.2.2 Análise do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AB1

Os dados de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado (Figura 21) e DEPT  $135^\circ$  (Figuras 22 e 23), juntamente com o espectro de massas (Figura 20), indicam para AB1 a presença de 15 átomos de carbono, sendo destes 4 carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ) 4 metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), 2 metínicos ( $\text{CH}$ ) e 5 átomos de carbono quaternário. Os deslocamentos químicos do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da substância AB1 foram comparados com os dados da literatura para a deidrofuquinona, conforme pode ser evidenciado pela Tabela 19 (Alkathlan, et al., 2005; Schenato et al., 2001).

Através do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  é possível confirmar a existência de duas duplas ligações na molécula, devido à presença de quatro sinais com deslocamentos químicos entre 150 e 100 ppm, região dos carbonos olefínicos. Um quinto sinal em campo baixo, mais desblindado, aparece em  $\delta = 192,26$  ppm, com deslocamento químico característico de carbonila, o que pode ser observado pela baixa intensidade do sinal, e por não ser visualizado no DEPT, o que caracteriza um carbono quaternário. Os deslocamentos químicos em  $\delta = 168,64$ ,  $142,18$ ,  $128,17$  e  $126,13$  ppm correspondem aos carbonos 8a, 9, 3, 1, dos quais apenas um discreto sinal de amplitude positiva proveniente do carbono 1 pode ser visualizado no espectro de DEPT, sendo os demais carbonos quaternários.

Os grupos metilênicos da molécula, apresentando amplitude negativa no espectro de DEPT com deslocamentos químicos  $\delta = 41,05$ ,  $32,52$ ,  $30,55$  e  $26,51$  ppm, correspondem aos carbonos 4, 6, 8 e 7, respectivamente.

O sinal de amplitude positiva no DEPT com deslocamento químico em  $\delta = 42,11$  ppm, corresponde ao carbono metínico 5.

Os sinais restantes em campo alto do espectro, em  $\delta = 22,54$ ,  $22,00$ ,  $16,04$  e  $15,42$  ppm, de amplitude positiva no DEPT, correspondem aos carbonos metílicos 10, 11, 12 e 13 (Figuras 22 e 23; Tabela 19).

#### 4.3.2.3 Análise do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AB1

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear protônica (Figuras 24-28; Tabela 20) foram realizadas com auxílio de dados da literatura (Alkathlan, 2005; Schenato et al., 2001) e através da análise do espectro de RMN  $\text{H}^1$  e bidimensional.

Através da análise da ressonância magnética nuclear protônica de AB1, foi possível visualizar quatro singletes, sendo dois correspondentes às duas metilas 10 e 11, ligadas ao

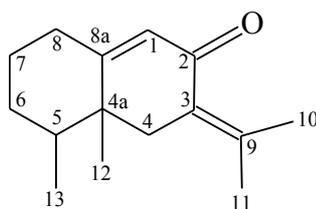
carbono quaternário (C-9), com deslocamentos químicos em  $\delta = 2,09$  e  $\delta = 1,84$  ppm, respectivamente. Os outros dois singletes, foram atribuídos à metila 12, ligada a um carbono quaternário (C-4a), com deslocamento químico de  $\delta = 0,97$  ppm, e ao próton olefínico H-1, com  $\delta = 5,73$  ppm. Este último sofre uma desblindagem maior por estar ligado a um carbono contendo uma dupla ligação endocíclica (C-1) e pela proximidade de um grupamento carbonila (C-2) (Silverstein; Webster, 2000).

A metila 13 ( $\delta = 0,95$  ppm), apresenta como sinal um dublete (d), com constante de acoplamento de  $J = 6,4$  Hz, devido ao acoplamento vicinal com H-5 ( $\delta = 1,48$  ppm) (Figura 26, Tabela 20). Um outro dublete está presente em campo mais baixo, em  $\delta = 2,88$  ppm (Figura 25), e foi atribuído ao H-4a, devido à proximidade de uma dupla ligação em C-3 e ao acoplamento geminal com H-4b, o que pode ser visualizado no espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY. Já o H-4b aparece como um multipeto em  $\delta = 2,12$  ppm.

Aos prótons 8a, 8b, 7a, 7b e 6a e 6b foram atribuídos os multipletos em  $\delta = \sim 2,25$ ;  $\sim 2,13$ ;  $\sim 2,27$ ;  $\sim 1,85$ ;  $\sim 1,58$  e  $\sim 1,43$  respectivamente (Tabela 20)

#### 4. 3. 2. 4 Estrutura de AB1

Os dados espectroscópicos obtidos confirmam a estrutura da deidrofuquinona para AB1 (Figura 30).



**Figura 30 - Fórmula estrutural da deidrofuquinona (substância AB1)**

### 4.3.3 Elucidação estrutural de AB2

A substância AB2 foi isolada conforme descrito no item 3.5 e esquematizado na Figura 9. O composto foi analisado por CG-EM, RMN  $^{13}\text{C}$ , RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (Figuras 31, 36 e 38) e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura (Mattoso, 2005; Ragasa et al, 2003; Ferreira et al, 2001; Iwabuchi et al., 1989; Ulubelen et al., 1994; Krebs et al., 1990; Inagaki et al., 1985 (Tabelas 21 e 22) e com o banco de dados NIST (1998) no caso do espectro de massas.

Na análise por CG foi possível observar um único pico com tempo de retenção de 33 minutos. No espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 31) o pico de maior massa encontra-se em  $m/z$  220 u.m.a., e corresponde ao pico do íon molecular. Com base no modelo de fragmentação apresentado pela substância, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento, uma série de substâncias com fragmentações semelhantes às da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o espatulenol foi aquela que apresentou um modelo de fragmentação mais semelhante ao de AB2.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 32 e 33) aponta a presença de 15 átomos de carbono, sugerindo tratar-se de um sesquiterpenóide. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figuras 31 e 32; Tabela 21) indicam a presença de oxigênio e de uma insaturação.

Baseado nessas evidências é possível propor para a substância AB2 uma fórmula molecular de  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$  e, portanto, um grau de insaturação (GI) ou índice de deficiência de hidrogênios igual a 4. Uma vez que os espectros de RMN indicam a presença de uma insaturação, conclui-se que a substância apresenta 3 ciclos em sua estrutura.

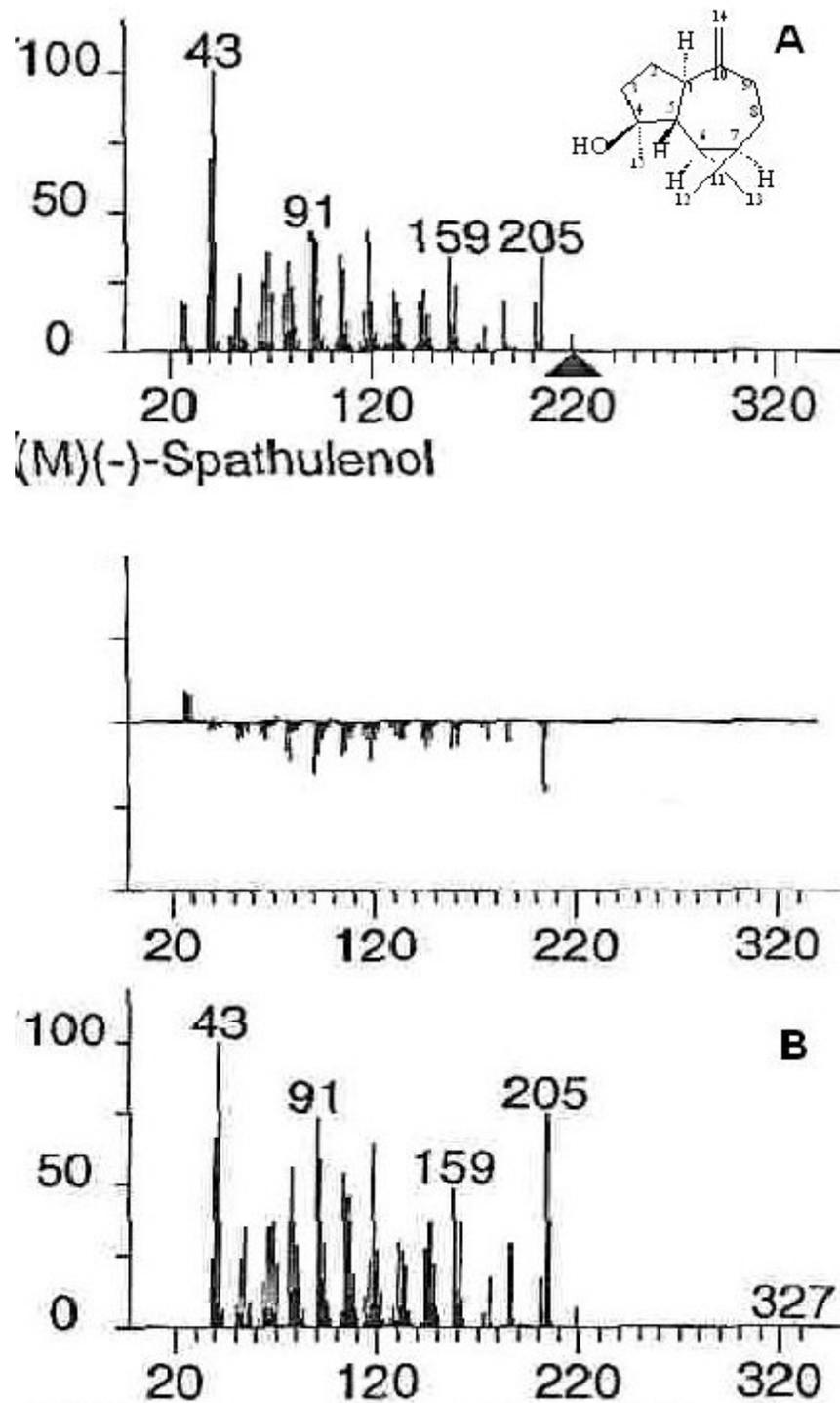


Figura 31 - Espectro de massas por impacto eletrônico do espatulenol (A) (NIST, 1998) em comparação ao de AB2 (B)

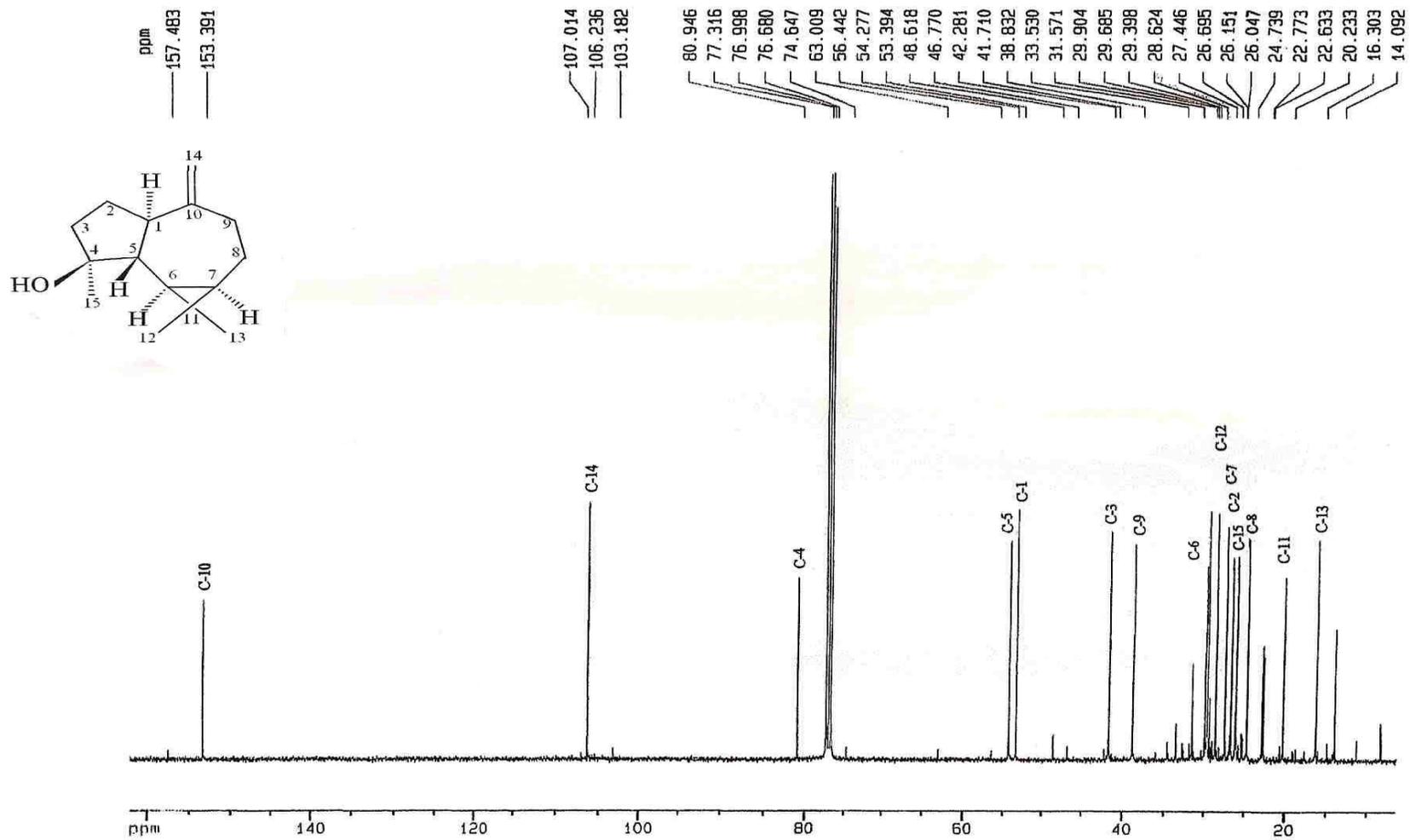


Figura 32 - Espectro de RMN <sup>13</sup>C de AB2 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

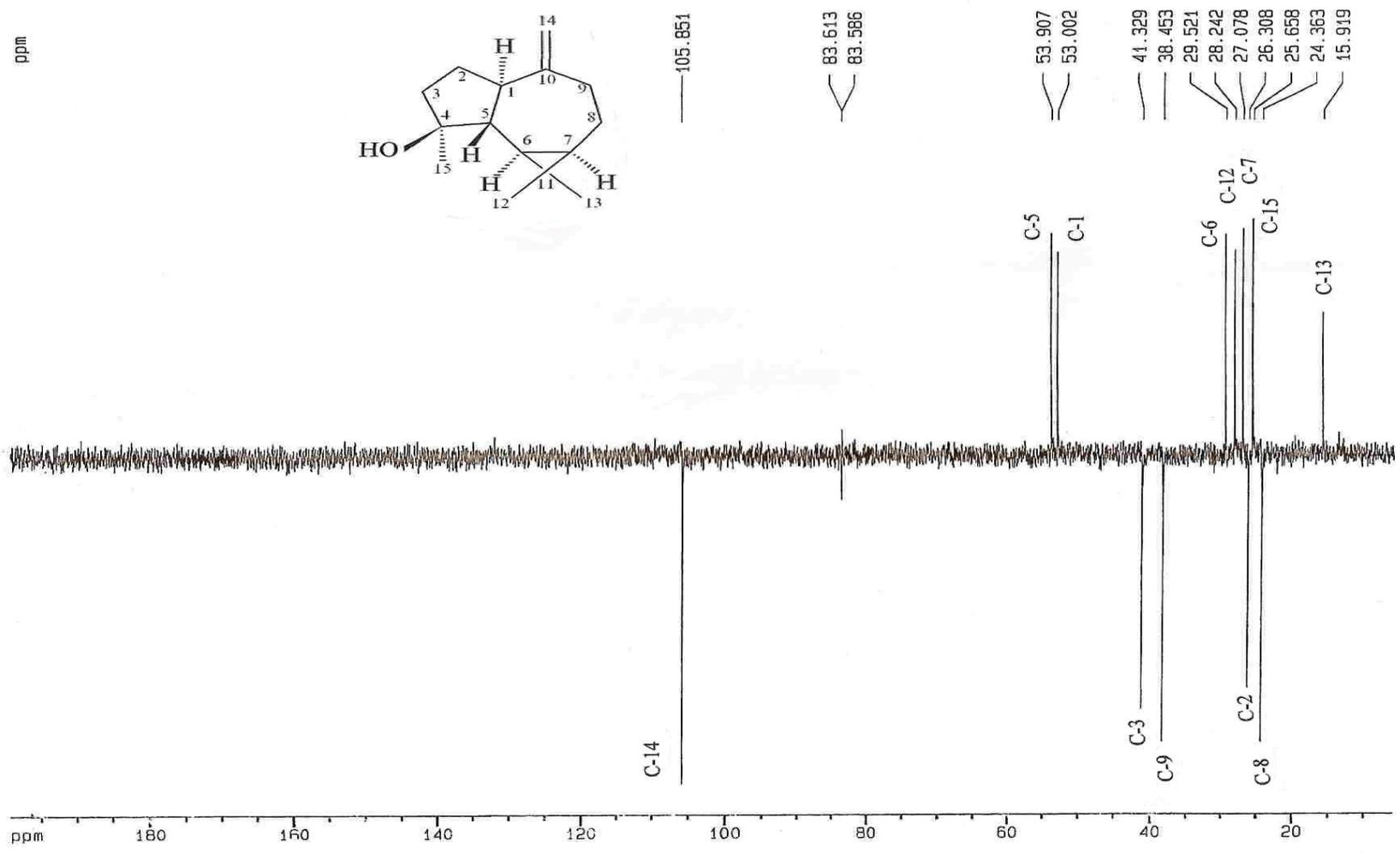


Figura 33 - Espectro de DEPT 135° de AB2 (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

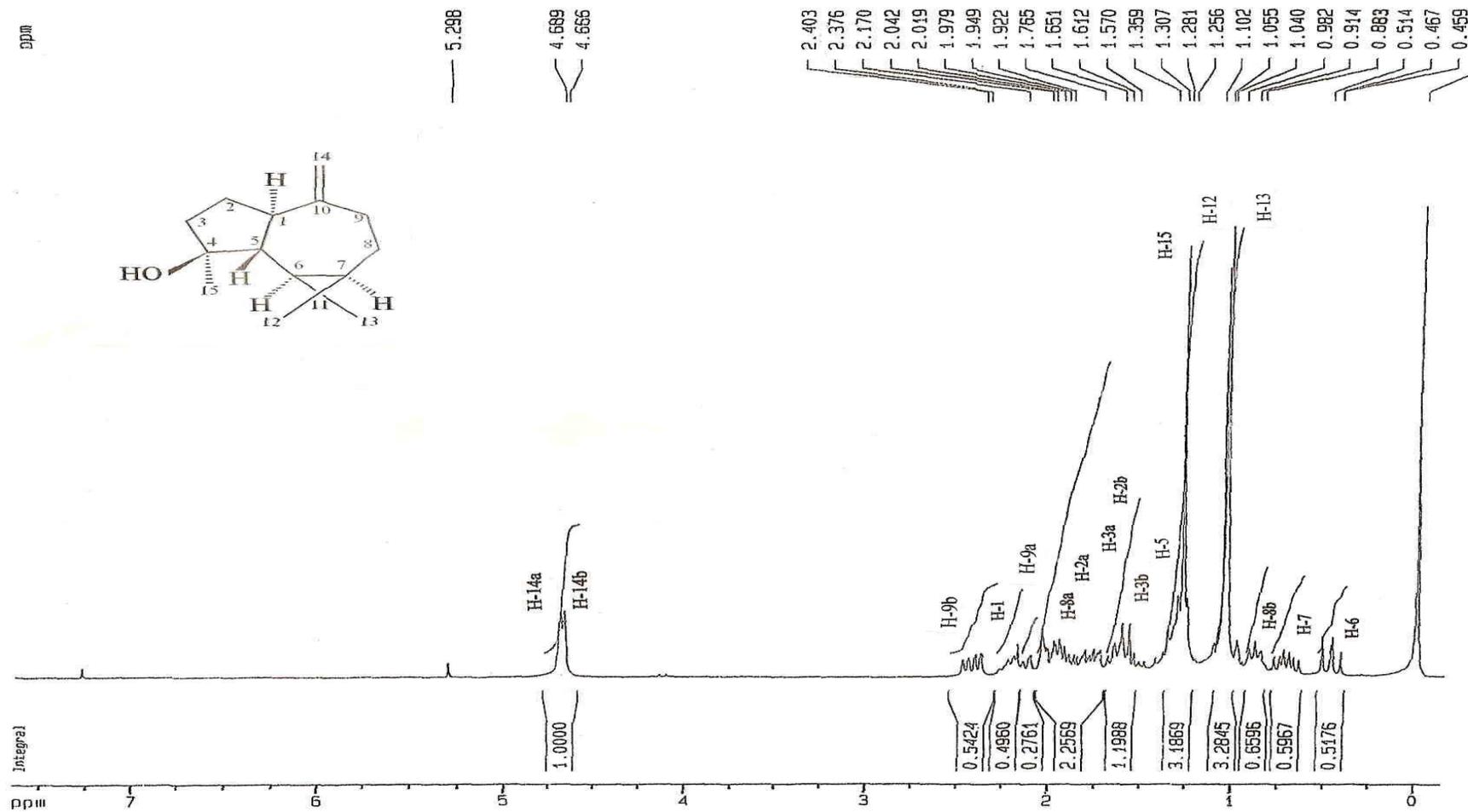


Figura 34 - Espectro de RMN <sup>1</sup>H de AB2 (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

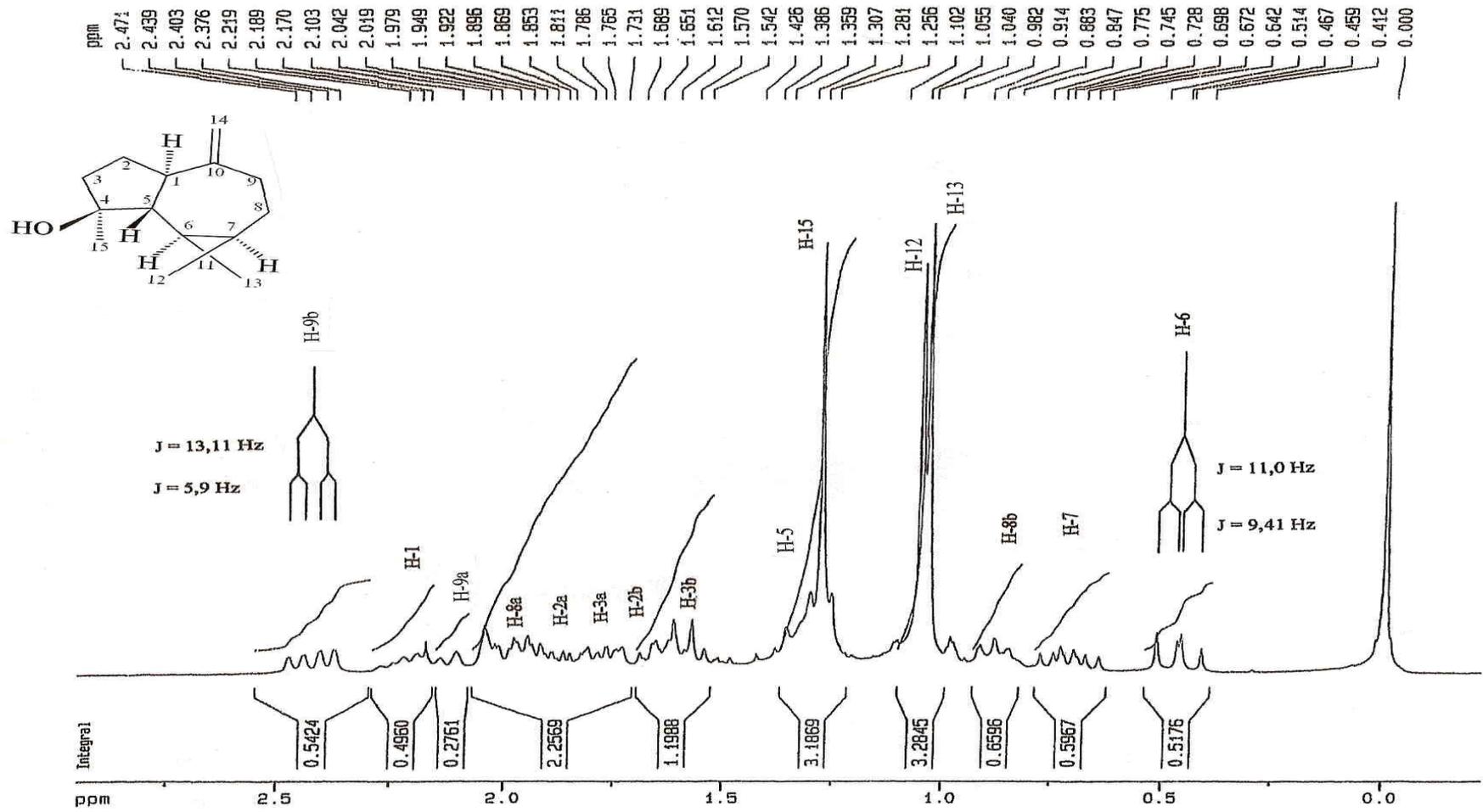


Figura 35 - Ampliação do espectro de RMN <sup>1</sup>H de AB2 (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>). Ampliações dos sinais correspondentes ao H-9a (δ = 2,42 ppm), H-6 (δ = 0,46 ppm)

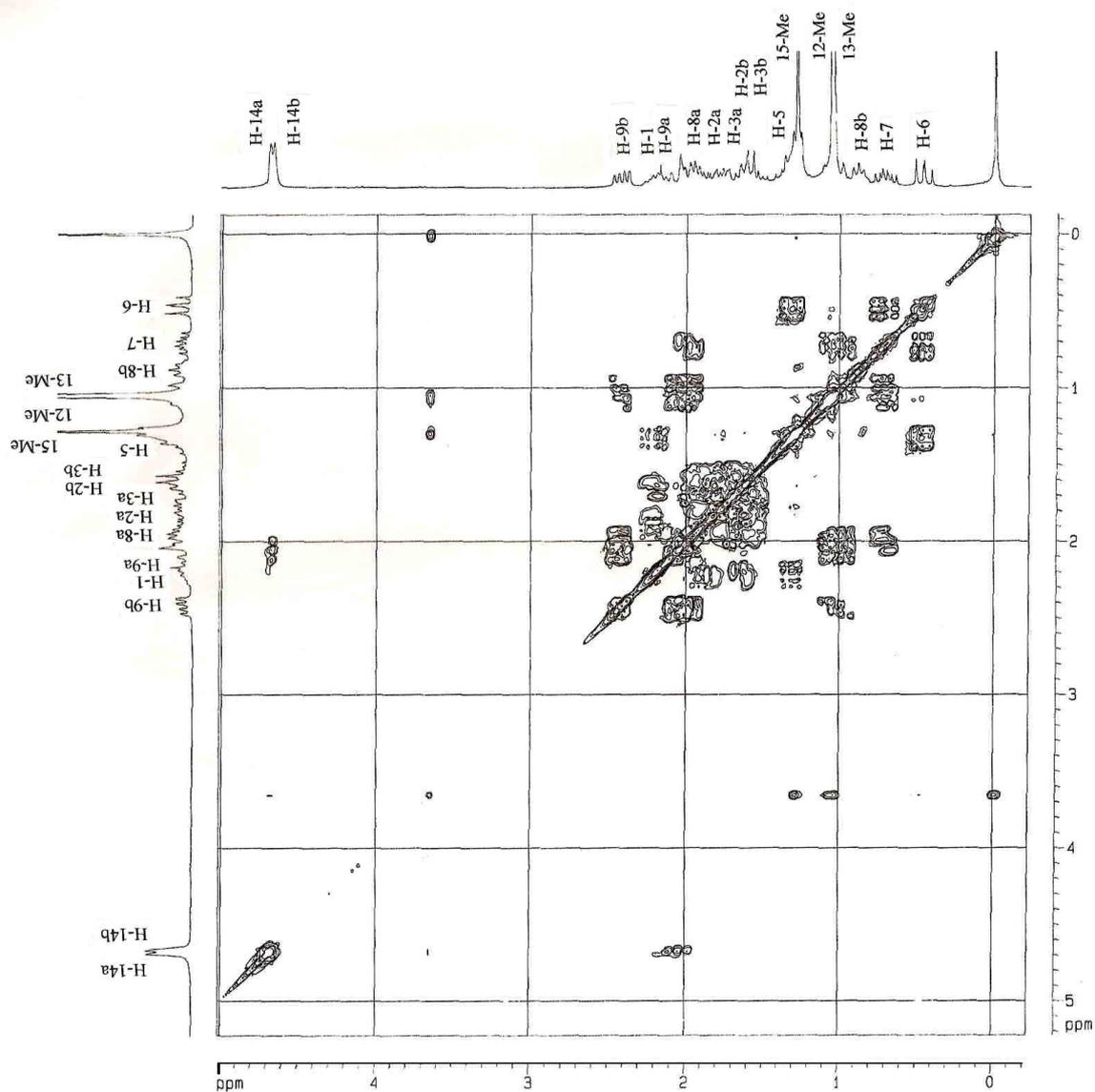


Figura 36 - Espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de AB2 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

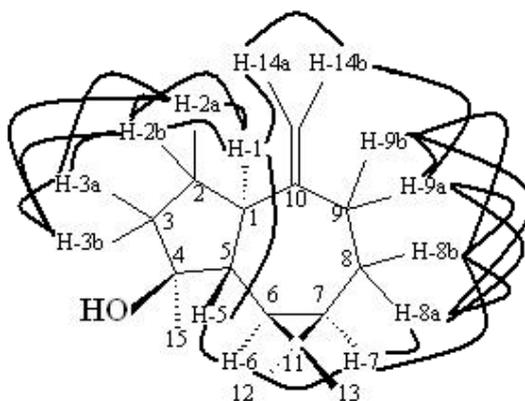


Figura 37 - Esquemática das correlações observadas para os prótons de AB2 no espectro de correlação  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

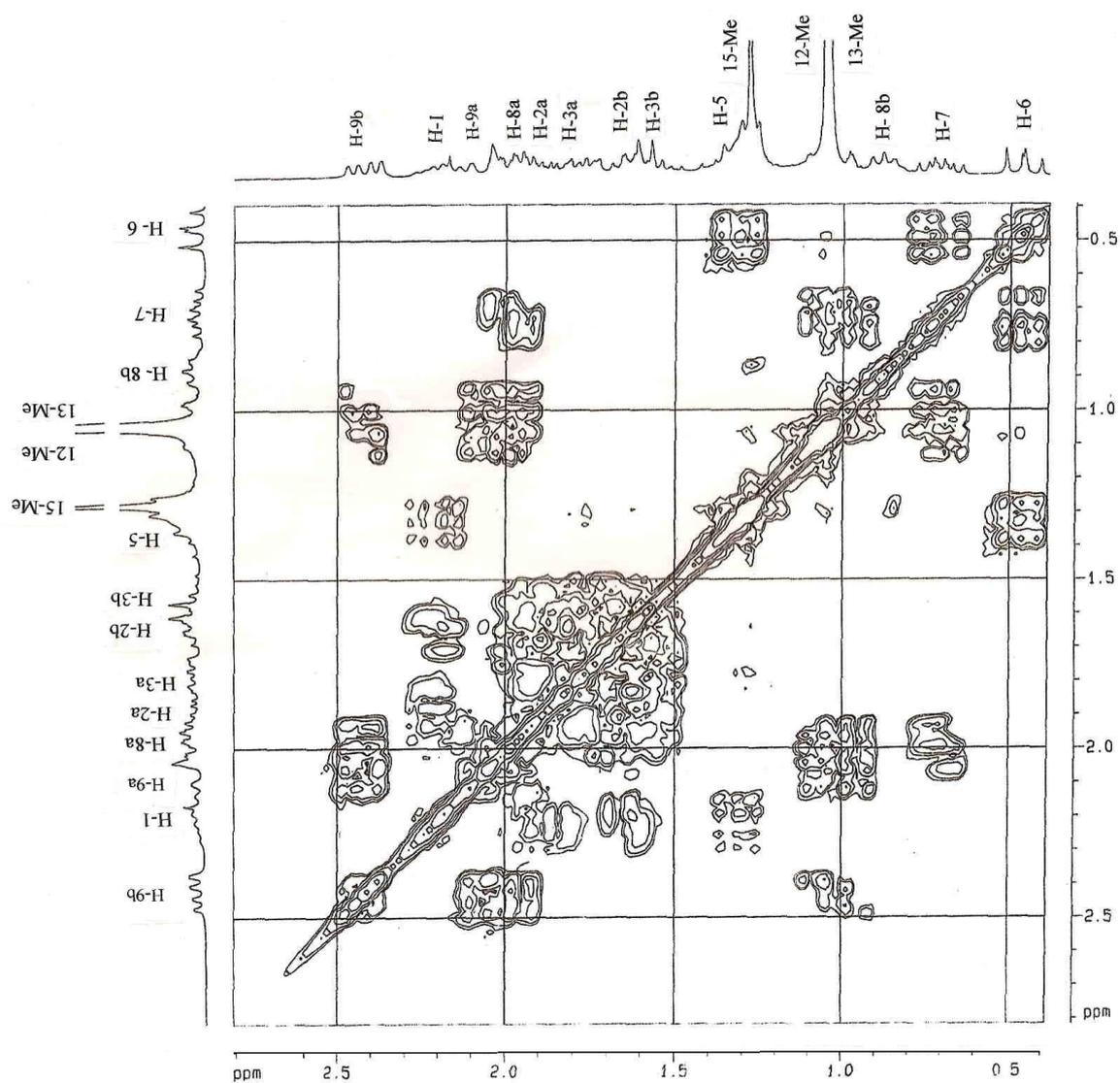


Figura 38 - Ampliação do espectro de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY de AB2 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

Tabela 21 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB2, em comparação com dados da literatura

AB2			Espatuleno				
C	Experimental <sup>a</sup>		Mattoso, 2005 <sup>a</sup>	Ragasa et al., 2003 <sup>a</sup>	Krebs et al., 1990 <sup>b</sup>	Iwabuchi et al., 1989 <sup>b</sup>	Inagaki et al., 1985 <sup>a</sup>
	$\delta$ (ppm)	DEPT 135°	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)	$\delta$ (ppm)
C-1	53,4	CH	53,4	53,4	53,4	54,03	53,4
C-2	26,7	CH <sub>2</sub>	26,7	26,7	26,8	26,7	26,7
C-3	41,7	CH <sub>2</sub>	41,7	41,8	41,8	41,7	41,8
C-4	80,9	C	80,9	81,0	81,0	81,0	80,9
C-5	54,3	CH	54,3	54,4	54,4	53,4	54,3
C-6	29,9	CH	29,9	29,9	30,0	29,9	29,8
C-7	27,4	CH	27,4	27,5	27,6	27,5	27,5
C-8	24,7	CH <sub>2</sub>	24,7	24,8	24,9	24,8	24,8
C-9	38,8	CH <sub>2</sub>	38,8	38,9	38,9	38,8	38,9
C-10	153,4	C	153,4	153,5	153,5	153,4	153,4
C-11	20,3	C	20,2	20,3	20,3	20,2	20,3
C-12	28,6	CH <sub>3</sub>	28,6	28,7	26,1	28,6	28,7
C-13	16,3	CH <sub>3</sub>	16,3	16,3	16,4	16,3	16,3
C-14	106,2	CH <sub>2</sub>	106,2	106,3	106,3	106,2	106,3
C-15	26,0	CH <sub>3</sub>	26,0	26,1	28,7	26,1	26,1

a: 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; b: potência não informada,  $\text{CDCl}_3$

Tabela 22 - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para a substância AB2 em comparação com dados da literatura

AB2					Espatulenol								
H	Experimental <sup>a</sup>				Mattoso. 2005 <sup>b</sup>			Ragasa. et al.. 2003 <sup>c</sup>			Ulubelen et al.. 1994 <sup>a</sup>		
	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	H <sup>1</sup> -H <sup>1</sup> COSY	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)	$\delta$ (ppm)	Multip.	J (Hz)
H - 1	2,19	m		H-5; H-2b; H-2a; H-14a	2,20	ddd	6,0; 10,0; 10,0	2,20	-	-	-	-	-
H - 2a	1,90	m		H-2b; H-3a; H-3b; H-1	1,90	m		1,91	-	-	-	-	-
H - 2b	1,65	m		H-3a; H-2a; H-1; H-3b	1,63	m		1,64	-	-	-	-	-
H - 3a	1,77	m		H-2a; H-2b; H-3b	1,78	ddd	---	1,77	-	-	-	-	-
H - 3b	1,56	m		H-2b; H-3a; H-2a	1,56	m		1,54	-	-	-	-	-
H - 5	1,33	m		H-6; H-1	1,31	dd	10,0; 10,0	1,31	-	-	-	-	-
H - 6	0,46	dd	9,4; 11,0	H-7; H-5	0,47	dd	10,0; 12,0	0,47	dd	11,6; 9,6	0,45	d	9,0
H - 7	0,74	m		H-6; H-8b; H-8a	0,71	m		0,71	-	-	0,47	d	9,0
H - 8a	1,98	m		H-7; H-9a; H-9b; H-8b	1,98	m		1,96	-	-	-	-	-
H - 8b	0,88	m		H-7; H-8a; H-9b; H-9a	0,87	m		1,01	-	-	-	-	-
H - 9a	2,04	m		H-9b; H-8b; H-8a; H-14b	2,04	ft	12,0	2,05	-	-	-	-	-
H - 9b	2,42	dd	5,4; 13,1	H-8b; H-8a; H-9a;	2,42	dd	6,0; 12,0	2,42	dd	13,6; 5,2	-	-	-
12-Me	1,06	s			1,06	s		1,05	-	-	1,04	s	
13-Me	1,04	s			1,04	s		1,04	-	-	1,05	s	
H - 14a	4,69	sl		H-14b; H-1	4,69	sl		4,68	-	-	4,67	d	5,0
H - 14b	4,67	sl		H-9b; H-14a	4,67	d	1,0	4,66	-	-	-	-	-
15- Me	1,28	s			1,29	s		1,28	-	-	1,28	s	

a: 200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; b: 500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ; c: 400 MHz,  $\text{CDCl}_3$

#### 4. 3. 3. 1 Análise da fragmentação de AB2 por EM-IE

O composto AB2 apresentou uma massa molecular de 220 u.m.a (Figura 31) evidenciada pelo espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE), com energia do feixe de elétrons em 70 eV. A Figura 39 apresenta uma proposta de fragmentação para o composto AB2, que será descrita a seguir.

O rompimento das ligações entre os carbonos 6 e 11, e, 7 e 11, do íon molecular  $[M^+]$  220 u.m.a., origina o fragmento em 177 u.m.a., devido a eliminação de um grupamento isopropil na forma de radical (43 u.m.a.). A partir deste fragmento, através da eliminação de uma molécula neutra (72 u.m.a.), origina-se o sinal em  $m/z$  105 u.m.a. O sinal em  $m/z$  43 u.m.a., que correspondente ao pico base, forma-se pela eliminação do fragmento de maior peso molecular (177 u.m.a.) na forma de radical. O sinal em  $m/z$  41 é explicado pela eliminação de hidrogênio molecular do íon em  $m/z$  43 u.m.a.

O íon molecular  $[M^+]$  ( $m/z$  220 u.m.a.), ao sofrer eliminação de um radical metila (15 u.m.a.) origina o fragmento de sinal intenso em  $m/z$  205 u.m.a. A posterior eliminação de uma molécula de água (18 u.m.a) resulta no fragmento com  $m/z$  187 u.m.a.

A eliminação de uma molécula de água (18. u.m.a.) a partir do íon molecular, resulta em um sinal em  $m/z$  202 u.m.a. Este íon, por sua vez, pode-se fragmentar de duas formas distintas. A fragmentação que dá origem ao sinal intenso em 159 u.m.a. é o resultado da eliminação de um radical isopropil (43 u.m.a.) por meio do rompimento entre os carbonos 6 e 11, e, 7 e 11. Já o sinal em 162 u.m.a. é o resultado de uma reação de Retro-Diels-Alder envolvendo os carbonos 2 e 3, e, 4 e 5, com a eliminação de uma molécula neutra de propino (40 u.m.a.). A posterior eliminação de um radical metila (15 u.m.a.) do fragmento em  $m/z$  162 u.m.a. resulta no sinal em  $m/z$  147 u.m.a. A partir deste fragmento, são obtidos os sinais em  $m/z$  95 e  $m/z$  107 devido a eliminação das moléculas neutras de 52 u.m.a. e 40 u.m.a., respectivamente.

A eliminação de um radical isopropila (43 u.m.a.) a partir do fragmento em  $m/z$  162 u.m.a., através do rompimento entre os carbonos 6 e 11, e, 7 e 11 origina o fragmento em  $m/z$  119 u.m.a.. A partir de rearranjos e a eliminação de moléculas neutras deste fragmento, são obtidos os fragmentos em  $m/z$  67 u.m.a.,  $m/z$  79 u.m.a. e  $m/z$  93 u.m.a. que, com a eliminação de hidrogênio molecular, resulta no fragmento em  $m/z$  91 u.m.a. (íon tropílio).

O fragmento em  $m/z$  159 u.m.a. é formado pela eliminação de um radical isopropil (43 u.m.a.) do íon  $m/z$  202 u.m.a. O íon em  $m/z$  159 u.m.a. dá origem ao sinal em  $m/z$  133 u.m.a., através de um rearranjo e rompimento entre os carbonos 5 e 6, e, 7 e 8, com a eliminação de uma molécula neutra de acetileno (26 u.m.a.). A eliminação de hidrogênio molecular a partir

deste fragmento origina o sinal em  $m/z$  131 u.m.a. O fragmento em  $m/z$  133 u.m.a. também pode sofrer o rompimento entre os carbonos 1 e 2, e, 4 e 5, liberando uma molécula neutra (78 u.m.a.) dando origem ao fragmento em  $m/z$  55 u.m.a. Esta proposta de fragmentação está de acordo com a teoria de que as fragmentações ocorrem de maneira a originar, preferencialmente, os fragmentos de estruturas mais estáveis (Figura 39).

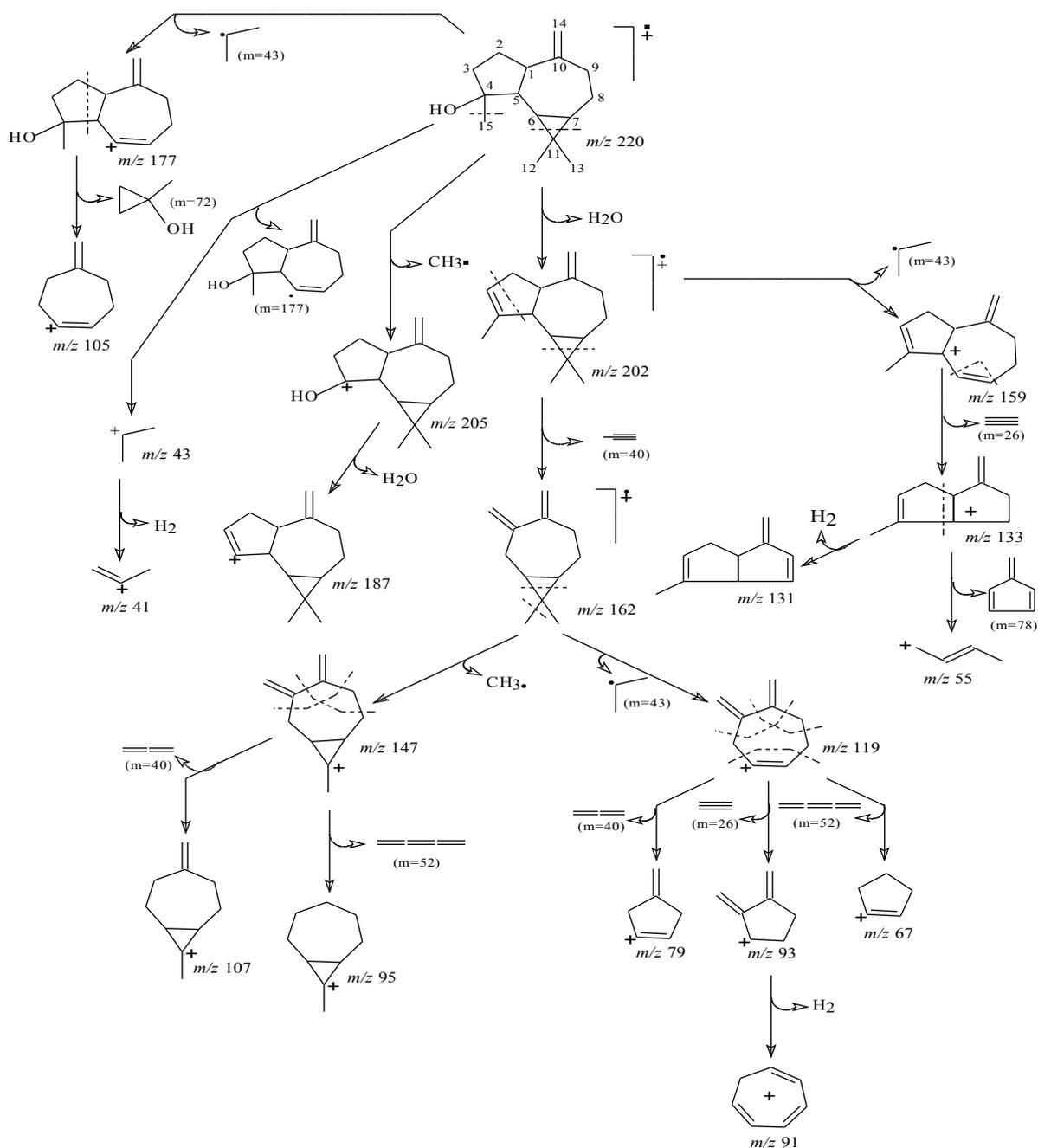


Figura 39 - Proposta de fragmentação para a substância AB2

#### 4. 3. 3. 2 Análise do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de AB2

Os dados de ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (Figura 32) e DEPT  $135^\circ$  (Figura 33), juntamente com o espectro de massas (Figura 31), indicam para AB2 a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes átomos de carbono, 3 são metílicos ( $\text{CH}_3$ ), 5 são metilênicos ( $\text{CH}_2$ ), sendo 1 grupo metilênico exocíclico, 4 são metínicos ( $\text{CH}$ ) e 3 são átomos de carbono quaternários. Os deslocamentos químicos foram comparados com os dados da literatura para o espatulenol (Mattoso, 2005; Ragasa et al., 2003; Ferreira et al, 2001; Ulubelen et al., 1994; Krebs et al., 1990; Inagaki et al., 1985 Tabelas 21 e 22).

Os deslocamentos químicos em  $\delta = 153,4$  e  $106,2$  ppm, na região dos carbonos olefínicos, evidenciam a presença de uma dupla ligação, entre aos carbonos 10 e 14. O pico em  $\delta = 153,4$  ppm corresponde a um carbono quaternário, devido ao fato deste não estar presente no espectro de DEPT  $135^\circ$ . O sinal em  $\delta = 106,2$  ppm corresponde a um carbono metilênico exocíclico, evidenciado por sua posição na região dos carbonos olefínicos e por sua amplitude negativa no espectro de DEPT. O pico em  $\delta = 80,9$  ppm, correspondente ao carbono 4, com deslocamento químico característico de carbono ligado diretamente a um oxigênio.

Os sinais em  $\delta = 54,3$ ,  $53,4$ ,  $29,9$  e  $27,4$  apresentam amplitude positiva no espectro de DEPT  $135^\circ$  e, por sua localização no espectro, são atribuídos aos grupamentos metínicos, os quais correspondem aos carbonos 5, 1, 6 e 7, respectivamente. O pico em  $\delta = 20,3$  ppm foi atribuído ao carbono 11, uma vez que corresponde a um carbono quaternário, por não ser visível do espectro de DEPT  $135^\circ$ .

Os quatro grupos metilênicos restantes da molécula, apresentando amplitude negativa no espectro de DEPT e com os deslocamentos químicos  $41,7$ ,  $38,8$ ,  $26,7$ ,  $24,7$ , correspondem aos carbonos 3, 9, 2 e 8, respectivamente.

Os sinais em campo alto, em  $\delta = 28,6$ ,  $26,0$  e  $16,3$  ppm foram atribuídos aos três grupos metila da molécula e correspondem, respectivamente, aos carbonos 12, 15 e 13 (Figuras 32 e 33; Tabela 21).

#### 4. 3. 3.3 Análise do espectro de RMN $^1\text{H}$ de AB2

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear protônica (Figuras 34-38; Tabela 22) foram realizadas com auxílio dos dados da literatura (Mattoso, 2005; Ragasa et al., 2003; Ulubelen et al., 1994) e através da análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  e  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY. Os dois singletes largos em  $\delta = 4,69$  ppm e  $\delta = 4,67$  ppm, com deslocamentos químicos característicos de hidrogênios olefinicos de um grupamento exometilênico (Rücker et al., 1992 Tabela 22), representam as absorções dos dois hidrogênios geminais H-14a e H-14b. Através da análise do espectro de RMN bidimensional, foi possível constatar o acoplamento à longa distância do tipo homoalílico entre os hidrogênios H-14a ( $\delta = 4,69$  ppm) e H-1 ( $\delta = 2,19$  ppm), e entre H-14b ( $\delta = 4,67$  ppm) e H-9a ( $\delta = 2,04$ ) ppm (Figuras 36 e 38) (Rücker et al., 1992; Inagaki; Abe., 1985).

Os demais sinais encontram-se em campo alto e apresentam deslocamentos químicos abaixo de 2,5 ppm. Os sinais correspondentes aos hidrogênios das metilas 15, 12 e 13 aparecem como singletes em  $\delta = 1,28$ ; 1,06 e 1,04 ppm.

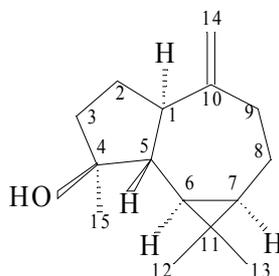
O sinal correspondente ao H-9b, com sinal em  $\delta = 2,42$  ppm acopla com H-8a e H-8b (acoplamento vicinal) e H-9a (acoplamento geminal) apresentando como sinal um duplo-dublete (dd), com constantes de acoplamento de  $J = 5,4$  Hz e 13,1 Hz.

O sinal correspondente ao H-6, em campo mais alto ( $\delta = 0,46$  ppm), característico de hidrogênio ligado a ciclopropano, apresenta como sinal um duplo-dublete, com constantes de acoplamento de  $J = 9,4$  e 11,0 Hz, devido ao acoplamento vicinal com H-7 e H-5. Ao lado do sinal atribuído ao H-6, está o sinal correspondente ao H-7, representado por um multiplete, em  $\delta = 0,74$  ppm.

Os demais sinais apresentam-se como multipletes e aparecem com deslocamentos químicos entre  $\delta = 2,19$  e 0,88 ppm. Seus acoplamentos foram atribuídos por  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ -COSY e encontram-se sumarizados na Tabela 22.

#### 4. 3. 3. 4 Estrutura de AB2.

De acordo com os dados espectroscópicos obtidos, é possível propor para AB2 a estrutura do espatulenol (Figura 40).



**Figura 40 - Fórmula estrutural do espatulenol (substância AB2)**

#### 4. 5 Avaliação da atividade antibacteriana de AB1 e AB2

Nas Figuras 41-42 e na Tabela 23, podem ser observados os resultados dos testes para a avaliação da atividade antibacteriana de AB1 (deidrofuquinona) e AB2 (espatulenol) sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579 e *Bacillus cereus* isolado clínico. A leitura dos resultados para Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi feita visualizando-se a turbidez de coloração vermelha apresentada nas cavidades onde o crescimento bacteriano não foi inibido, ao contrário daquelas cavidades onde ocorreu a inibição. A leitura dos resultados do teste de Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi realizada em subcultura a partir das diluições que não apresentaram crescimento visível (Figura 43; Tabela 23).

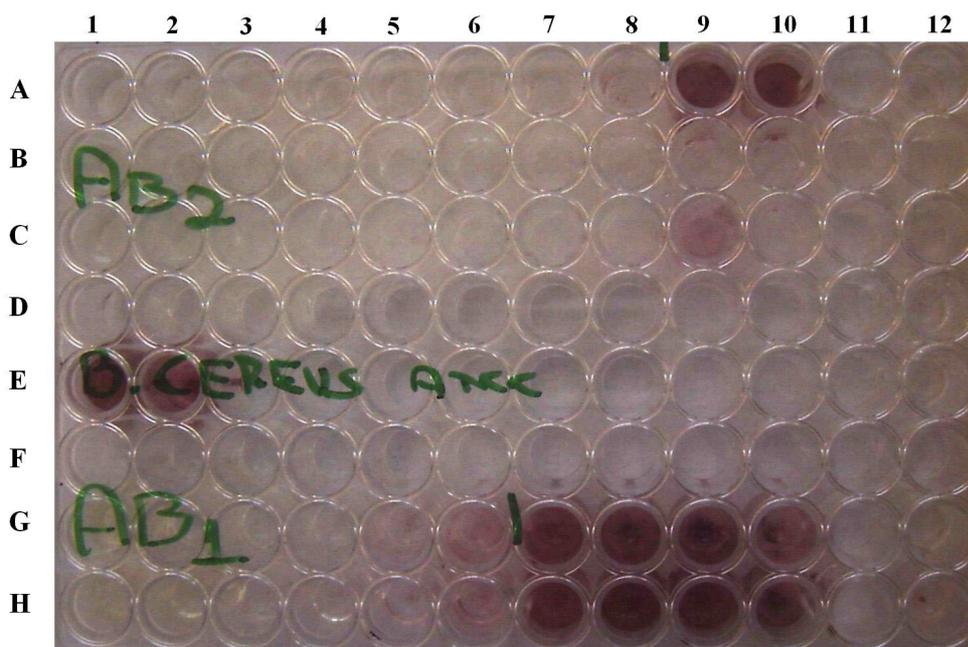


Figura 41 - Avaliação da atividade inibitória mínima das substâncias AB2 (linhas A, B e C) e AB1 (linhas G e H) sobre a espécie *B. cereus* ATCC14579. A coluna 1 apresenta a maior concentração da amostra, a qual vai decrescendo até a coluna 10 (8192; 4096; 2048; 1024; 512; 256; 128; 64; 32 e 16 $\mu$ g/mL. As cavidades isoladas à esquerda são o controle positivo

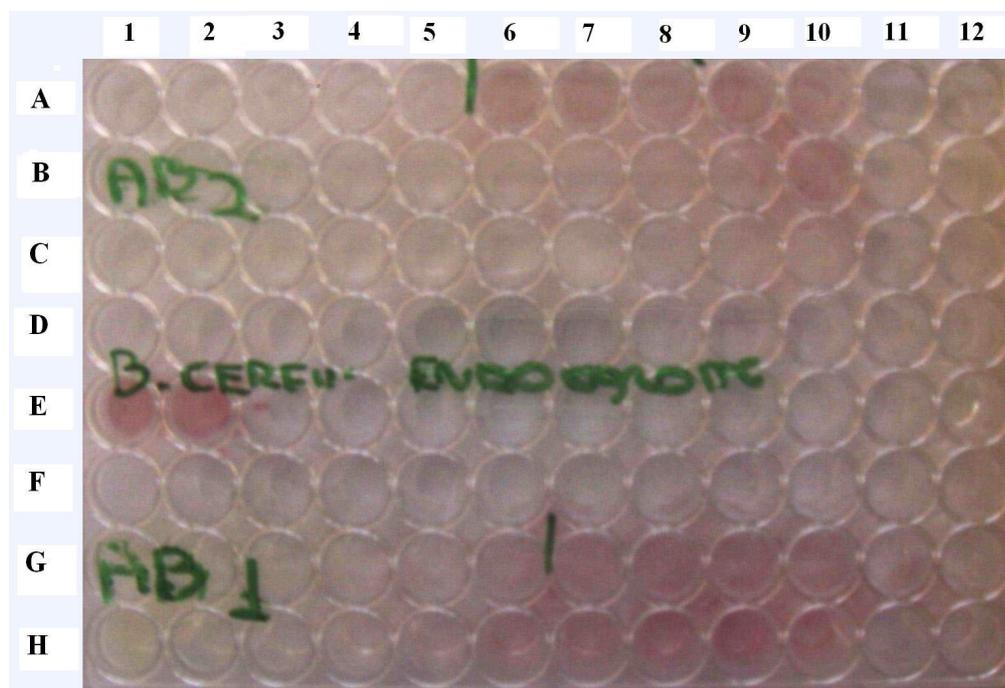


Figura 42 - Avaliação da atividade inibitória mínima das substâncias AB2 (linhas A, B e C) e AB1 (linhas G e H) sobre a espécie *B. cereus* isolado clínico. A coluna 1 apresenta a maior concentração da amostra, a qual vai decrescendo até a coluna 10 (8192; 4096; 2048; 1024; 512; 256; 128; 64; 32 e 16 $\mu$ g/mL. As cavidades isoladas à esquerda na linha E são o controle positivo.

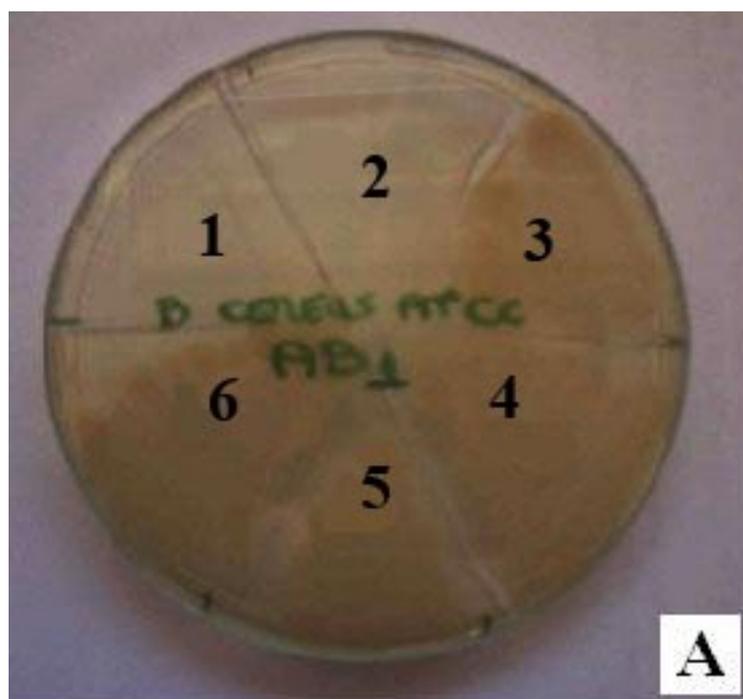


Figura 43 - A- Avaliação da Atividade Bactericida Mínima da substância AB1 sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579. B- Avaliação da Atividade Bactericida Mínima da substância AB2 sobre *Bacillus cereus* ATCC 14579. A concentração 1 representa a maior concentração da amostra, a qual vai decrescendo até 6 (8192; 4096; 2048; 1024; 512; 256  $\mu\text{g/mL}$ ) na figura A e até 8 (8192; 4096; 2048; 1024; 512; 256; 128; 64  $\mu\text{g/mL}$ ), na figura B

Tabela 23 - Avaliação da atividade antibacteriana de AB1 e AB2

Bactéria	AB1		AB2	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )	CBM ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	CIM = 256	CBM = 4096	CIM = 64	CBM = 64
<i>Bacillus cereus</i> endocardite	CIM = 256	CBM > 8192	CIM = 32	CBM > 8192
<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> ATCC 27853	CIM > 8192	-----	CIM > 8192	-----

## 5 DISCUSSÃO

Durante muito tempo os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção vegetal. Atualmente, entretanto, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor ao seu meio. De fato, já foram reconhecidas várias funções para esta classe de metabólitos, como por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (Wink, et al., 1990 apud Simões, 2003), bem como sua participação em alelopatias (Harborne et al., 1988, apud Simões, 2003). Pelo fato dos metabólitos secundários atuarem na defesa, adaptação ou atração de polinizadores para o vegetal, estes diferem-se dos metabólitos primários, apresentando uma vasta variabilidade química e uma grande diversidade de substâncias farmacologicamente importantes (Simões, 2003).

Em um vegetal podem ser encontradas centenas ou milhares de metabólitos secundários, entretanto, apenas os compostos presentes em maior concentração são geralmente isolados e estudados. Os compostos presentes em menores proporções na planta são, freqüentemente, aqueles que apresentam melhores efeitos biológicos (Yunes; Calixto, 2001) e, na maioria dos casos, mais complexa será a rota metabólica para a substância em questão.

Os metabólitos secundários são divididos em grupos, de acordo, principalmente, com a sua rota biossintética e conforme as suas características físico-químicas. A diversidade molecular torna-se um desafio para a escolha da melhor metodologia visando os estudos fitoquímicos. Desta forma, numerosos métodos de extração têm sido sugeridos pela literatura pertinente. A Figura 44 ilustra os métodos de extração mais utilizados, indicando as prováveis classes de compostos que podem ser separados.

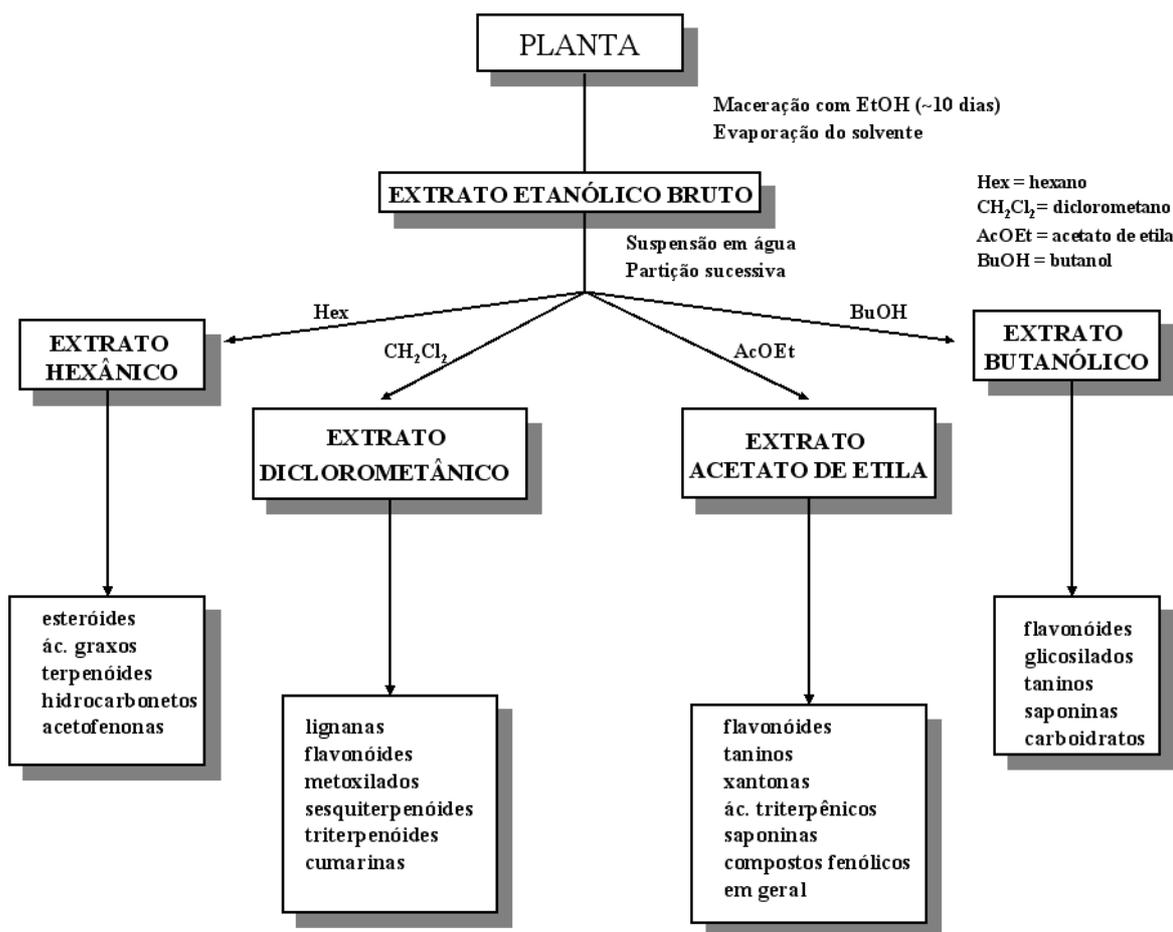


Figura 44 - Esquema geral para a extração dos principais metabólitos secundários presentes em plantas (Adaptado de Yunes; Calixto, 2001)

Em vista do gênero *Senecio* ser rico em terpenóides, e por estes apresentarem uma grande variedade de atividades biológicas, optou-se por trabalhar com esses constituintes, utilizando-se diretamente a maceração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> no preparo do extrato das partes aéreas de *S. platensis*. Os resultados deste trabalho demonstram mais uma vez que os sesquiterpenóides são extraídos com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, sendo sua escolha também justificada pelo fato de ser um solvente relativamente volátil, portanto de fácil eliminação durante o processo de concentração do macerado, bem como por minimizar a formação de artefatos durante o processo extrativo. Além de terpenóides, o perfil cromatográfico do extrato em CCD indicou a presença de pigmentos e de ceras vegetais, sendo as ceras compostos importantes para a espécie, visto que trata-se de uma espécie suscetível à desidratação devido ao seu habitat natural.

No intuito de aumentar a eficiência na separação dos terpenóides presentes em uma fração, o gel de sílica utilizado na cromatografia em coluna e nas placas de CCD foi

impregnado com uma solução aquosa de nitrato de prata a 10% ( $\text{AgNO}_3$ ). Esta técnica foi introduzida em 1962 e a sua eficiência na separação de terpenóides, inclusive de isômeros, tem sido demonstrada em um grande número de trabalhos (Cert; Moreda., 1998).

O método de impregnação com nitrato de prata a 10% baseia-se no princípio da complexação dos íons prata (aceptores de elétrons  $\pi$ ) com os elétrons  $\pi$  de ligações duplas ou triplas (doadores de elétrons). Quanto maior a presença de insaturações (duplas ou triplas) em uma molécula, maior será seu tempo de retenção na fase estacionária, sendo os compostos com menor número de insaturações eluídos primeiramente. A separação é realizada na dependência do número de insaturações, sua localização na molécula e a configuração (cis ou trans) (Cert; Moreda., 1998; Brochini et al., 1998; Williams; Mander, 2001).

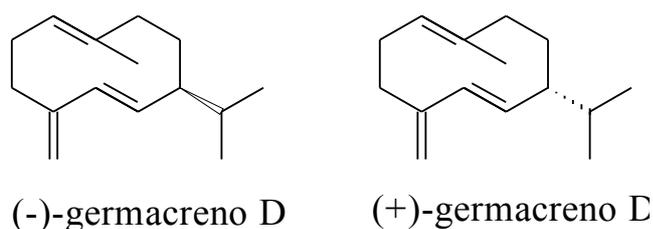
Algumas desvantagens são apresentadas por este método, como a possibilidade de haver perdas, devido a uma adsorção excessiva; a ocorrência de reações de oxidação, redução e esterificação, podendo, deste modo, favorecer a formação de artefatos (Williams; Mander., 2001; Cert; Moreda., 1998).

Os compostos isolados germacreno D, deidrofuquinona e espatulenol, apresentaram rendimentos de 1,9% em relação a 1 Col. A, e 2,24% e 4,08% em relação a 5 Col. A, respectivamente. Optou-se por expressar os rendimentos em relação à fração codificada como 1 Col. A para o germacreno D, e 5 Col. A para a deidrofuquinona e espatulenol, em vez de considerar o extrato bruto, uma vez que as análises por CCD evidenciaram a presença do germacreno D também na fração seguinte, codificada como 2 Col. A. Assim, como trabalhou-se apenas com 1 Col. A no fracionamento e isolamento deste composto, justifica-se este cálculo de rendimento para o germacreno D, no intuito de aproximar ao valor real deste na planta, diminuindo assim o erro. Da mesma forma foi calculado o rendimento para deidrofuquinona e espatulenol, uma vez que foi evidenciada a presença destes constituintes também na fração seguinte, codificada como 6 Col. A.

O germacreno D (7-isopropil-10-metil-4-metileno-ciclodeca-5,10-dieno) é um metabólito secundário de esqueleto sesquiterpênico, com uma estrutura cíclica de 10 átomos de carbono, com 3 duplas ligações, sendo duas pertencentes ao anel e uma dupla ligação exometilênica (Figura 19) (Ogamino et al., 2004). É um constituinte muito freqüente em diversos gêneros, assim como no gênero *Senecio*, estando presente principalmente em óleos essenciais (Umlauf et al., 2004; Duarte et al., 2005). A sua ocorrência freqüente pode ser explicada pelo fato do germacreno D ser o intermediário chave na rota biossintética de vários sesquiterpenóides, principalmente aqueles oxigenados que, por sua vez, dão origem a derivados de estruturas mais complexas (Bülow; König, 2000; Prosser et al., 2004; Minnaard;

Wijnberg; Groot, 1999, Steliopoulos et al., 2002, Yohihara et al., 1969; Steele et al., 1998). No entanto, este constituinte não é adequado como marcador quimiotaxonômico, uma vez que, além de ser pouco abundante em várias espécies do gênero, é de ampla distribuição na natureza, sendo produzido também por fungos, bactérias e invertebrados marinhos (Picaud et al., 2006), além de ser uma substância instável (De Feo et al., 2003).

O germacreno D existe na natureza na forma de dois enantiômeros, (+) e (-) (Figura 45), como ocorre freqüentemente com a maioria dos sesquiterpenóides existentes na natureza. O enantiômero (-) é amplamente distribuído entre as plantas superiores, enquanto que o enantiômero (+) é encontrado em organismos inferiores, como micróbios e organismos marinhos. Entretanto, ambos enantiômeros são descritos para algumas espécies vegetais (Huntington; Kinnel, 2006; Prosser et al., 2004; Koenig, 2001; Bülow; König, 2000). Para o germacreno D obtido de *S. platensis* não foram realizados estudos visando a determinação e/ou quantificação do(s) enantiômero(s).



**Figura 45 - Enantiômeros do germacreno D (Adaptado de Mozuraitis et al., 2002)**

Metade de todos os produtos químicos ativos possuem um centro quiral (Ohloff, 1994 apud Stranden et al., 2002). Considerando que o receptor alvo é, na sua maior parte, de natureza quiral, pode-se entender a importância do estudo da quiralidade de moléculas orgânicas como critério para a atividade biológica (Smith, 1989 apud Silva, 2005). Este fato pode ser evidenciado pelos diferentes efeitos apresentados pelos enantiômeros (-) e (+) do germacreno D no comportamento de insetos.

Estudos realizados por Stranden et al. (2002) demonstraram que a mariposa *Helicoverpa armigera* possui um tipo de receptor neural que apresenta sensibilidade e seletividade ao germacreno D. Os neurônios da mariposa respondem a ambos enantiômeros do germacreno D, sendo que o enantiômero (-) apresentou um efeito estimulante 10 vezes maior que o enantiômero (+).

Para *Heliothis virescens*, uma mariposa que aparece com certa frequência em plantações de tabaco e que alimenta-se deste quando em sua fase larval, foi constatado que o (-)-germacreno D provoca um aumento da atração e da oviposição de fêmeas desta espécie (Mozuraitis et al., 2002).

Segundo Stranden et al. (2003), os principais receptores olfativos neurais das mariposas respondem ao (-)-germacreno D, principalmente em *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera* e *Helicoverpa assulta*. Segundo este autor, a estimulação dos neurônios pelo (-)-germacreno D está relacionada ao seu sistema anelar de 10 membros e às três duplas ligações, que agem como centros ricos em elétrons.

Ainda em relação às larvas, é relatada a atividade inibidora do apetite de larvas da mariposa *Thaumetopoea pityocampa* (Petrakakis et al., 2005), bem como uma ação estimulante da oviposição da mariposa *Diaphania nitidalis* Stoll. (Peterson et al., 1994).

O germacreno D parece estar envolvido no reconhecimento da planta hospedeira pelo besouro do tomate, *Leptinotarsa decemlineata* Say (Weissbecker et al., 1997), e é reconhecido como estimulante sexual de machos de duas espécies de barata, *Periplaneta americana* e *P. japonica* (Kitamura et al., 1976).

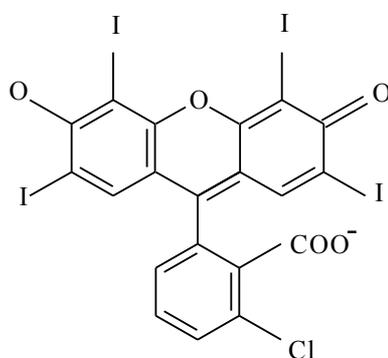
Para o germacreno D são descritas as atividades inibidora da produção de óxido nítrico em macrófagos ativados (Matsuda et al., 1999), tripanossomicida *in vitro* (Biavatti et al., 2001), ausência de citotoxicidade frente a *Artemia salina* (Biavatti et al., 2001) e ausência de atividade antimicrobiana frente diferentes microrganismos (Biavatti et al., 2001; Deuschle, 2003).

Até o momento a presença do germacreno D foi descrita para: *S. 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., 1981); *S. macrotis* Baker (Bohlmann et al., 1981); *S. glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler (Bohlmann; Gupta, 1982); *S. lyndenburgensis* Hutch. et Burt Davy (Bohlmann; Bapuji, 1982), *S. pleistocephalus* S. Moore e *S. coronatus* (Thunb.) Harv. (Bohlmann; Zdero, 1982), *S. microglossus* DC. (Bohlmann et al., 1983), *S. brasiliensis* (Sprengel) Less. e *S. venosus* Harv. (Bohlmann et al., 1985); *S. desfontainei* Druce (Metwally; Dawidar, 1986); *S. discolor* (Sw) DC., *S. richii* A. Gray e *S. variabilis* Sch. Bip (Bohlmann et al., 1986); *S. philippicus* Regel et Koern. e *S. subumbellatus* Phil. (Jakupovic et al., 1991); *S. desiderabilis* Vellozo (Deuschle, 2003); *S. bonariensis* Hook et Arn. (Silva, 2006), *S. heterotrichius* DC (Francescato et al., 2007) e *S. crassiflorus* (Poir) DC var. *crassiflorus* (Murari, 2007).

Grande parte dos peróxidos de origem natural foram isolados de plantas da família Asteraceae, tendo sido vários relatados para o gênero *Senecio* (Tabela 5), sendo em sua maioria derivados de estrutura mono e sesquiterpenóide. Entretanto, apenas um pequeno número teve suas atividades biológicas investigadas (Tolstikov et al., 1996; Rucker, 1997).

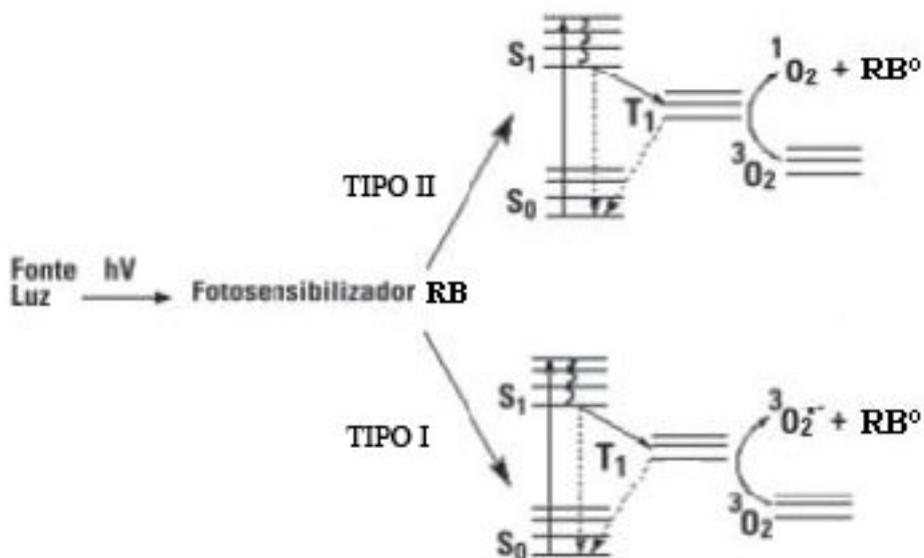
Os peróxidos naturais, em geral, são substâncias altamente reativas, portanto com alta instabilidade e curta vida metabólica, dificultando o seu isolamento e avaliação biológica. Devido a esta instabilidade, alguns peróxidos de origem vegetal podem ser obtidos de maneira indireta, através do isolamento de seu precursor no vegetal, seguido de um processo de semi-síntese, sendo assim possível obtê-lo em quantidade suficiente para uma avaliação das suas atividades biológicas.

O método de semi-síntese de peróxidos utilizado neste trabalho foi a foto-oxidação, que consiste em utilizar uma molécula fotossensibilizadora, Rosa de Bengala ( $C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$ ) (Figura 46) que, ao absorver luz verde na presença de oxigênio, torna-se uma molécula no estado singlete eletronicamente excitada, transferindo sua energia para o oxigênio molecular ( $^3O_2$ ), convertendo-o a oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Este oxigênio singlete realiza a oxidação da substância precursora, originando o peróxido (Affek; Yakir, 2002; Miller, 2005).



**Figura 46 - Estrutura química do corante Rosa de Bengala, utilizado como molécula fotossensibilizadora**

Existem dois mecanismos de produção de oxigênio reativo por foto-oxidação (Figura 47): o fotossensibilizador no estado singlete fundamental ( $S_0$ ) é irradiado com luz visível gerando fotossensibilizador no estado singlete excitado ( $S_1$ ). No mecanismo tipo I,  $S_1$  pode decair para um estado triplete excitado ( $T_1$ ) gerando radical superóxido ( $^3O_2^-$ ). No mecanismo tipo II,  $S_1$  decai para um estado ( $T_1$ ) gerando oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (Ribeiro; Jorge, 2004). O mecanismo segundo o qual foi gerado o oxigênio singlete nos experimentos descritos neste trabalho foi do tipo II.



**Figura 47 - Mecanismos tipo I e II na produção de oxigênio reativo. RB (Rosa de Bengala),  $S_0$  (singleto no estado fundamental),  $S_1$  (singleto no estado excitado),  $T_1$  (tripleto no estado excitado),  $^3O_2^-$  (radical superóxido),  $^1O_2$  oxigênio singleto (Adaptado de Ribeiro; Jorge, 2004)**

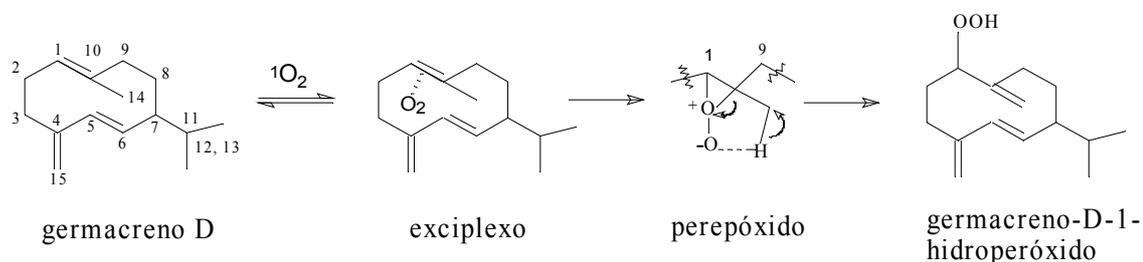
Existem diversas utilidades para as reações de foto-oxidação além da obtenção de compostos com grupamento peróxido por semi-síntese a partir de seu precursor. A foto-oxidação também é utilizada na modificação de compostos isolados de fontes naturais, na tentativa de se obter produtos com maior potencial farmacológico e com menos efeitos adversos e nos processos de degradação de compostos orgânicos de todos os tipos (Braun; Oliveros, 1990). Também é utilizada na terapêutica, mais especificamente na terapia fotodinâmica, por meio da administração de um composto fotossensibilizador (FS) ao paciente, e uma posterior irradiação do tecido tumoral com luz visível (Figura 48). O composto FS, excitado pela luz, reage com o oxigênio presente no meio, produzindo espécies reativas de oxigênio. Tais espécies danificam vários componentes das células cancerígenas como, por exemplo, ácidos nucleicos e proteínas. Isto resulta numa cascata de eventos oxidativos que ocasionam a morte das células tumorais por apoptose e/ou necrose (Ribeiro; Jorge, 2004).



**Figura 48 - Esquema de tratamento de um tumor utilizando a terapia fotodinâmica (fotossensibilizador). FS – Fotossensibilizador ( Adaptado de Ribeiro; Jorge, 2004)**

Através da reação de semi-síntese por foto-oxidação da fração contendo o germacreno D, utilizando o Rosa de Bengala como agente sensibilizante, foi obtido o germacreno-D-1-hidroperóxido como principal produto formado. O germacreno D foi isolado e comparado em CCD com o germacreno-D-1-hidroperóxido, seu produto reacional, sendo as substâncias detectadas com anisaldeído- $H_2SO_4$  e com o reagente específico para peróxidos.

O mecanismo de semi-síntese do germacreno-D-1-hidroperóxido a partir do germacreno D foi estudado por Francescato, 2007. Segundo este autor, ocorre inicialmente a adição de  $^1O_2$  à dupla ligação endocíclica entre C-1 e C-10, produzindo um complexo intermediário (exciplexo) que, em seguida, transforma-se em um perepóxido e abstrai um átomo de hidrogênio em posição alílica do C-14; após um rearranjo, forma-se então o germacreno-D-1-hidroperóxido (Figura 49) (Francescato et al., 2007).



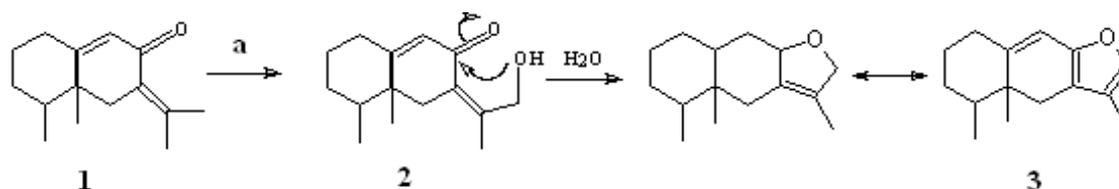
**Figura 49 - Foto-oxidação do germacreno D através de uma reação do tipo ENE, resultando no germacreno-D-1-hidroperóxido (Fonte: Francescato, 2007)**

Segundo Clennan; Pace (2005), existem alguns pontos chave nesta reação, a saber: (1) o oxigênio singlete como componente eletrofílico e o alqueno como 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 alqueno onde há maior número de hidrogênios, fenômeno conhecido como efeito *cis*, e (5) as interações entre o hidrogênio e o oxigênio externo do peróxido podem predizer o produto formado.

O germacreno-D-1-hidroperóxido, derivado do germacreno D, já foi isolado das partes aéreas de *Senecio glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler por Bohlmann; Gupta (1982) e foi semi-sintetizado por Francescato, (2004). Este hidroperóxido apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601, com um CIM de 2,5 mg/mL, e uma 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) (Francescato, 2007).

A deidrofuquinona (4,4a,5,6,7,8-hexa-hidro-3-isopropilideno-4a,5-dimetil-naftalen-2-ona), também denominada de de-hidrocaranona (Schenato et al., 2001; Reich et al., 1986; Alkhatlan et al., 2005; Gaiakwad; Madyastha, 2002), apresenta uma estrutura bicíclica de 15 átomos de carbono, sendo 10 deles distribuídos nos dois ciclos. Possui 3 duplas ligações, uma endocíclica e duas exocíclicas, sendo a dupla do C-8 proveniente de uma carbonila. Pode ser classificada como um sesquiterpenóide de esqueleto do tipo eremofilona, pela presença de um grupo cetônico em uma estrutura do tipo eremofilano (Figura 30) (Schenato et al., 2001).

Estudos realizados por Gaiakwad; Madyastha (2002) propuseram uma provável rota de biossíntese para os furanoeremofilanos de baixo peso molecular em plantas superiores. A deidrofuquinona, pelo fato de coexistir na natureza com a furano-deidrofuquinona, foi incubada com citocromo P-450 na presença de NADPH e O<sub>2</sub> (Figura 50). Uma análise realizada em CG-EM mostrou a presença de dois derivados furânicos na mistura reacional (4,4a,5,6,7,8-hexa-hidro-3-isopropilideno-4a,5-dimetil-naftalen-2-ona (**2**) e 4,4a,5,6,7,8-hexahidro-3,4a,5-trimetilnafto (2,3-b)furano (**3**). Essa reação de hidroxilação da deidrofuquinona conduziu à formação de derivados com um anel furano, e demonstrou que a reação é mediada pela ação do citocromo P-450, o que indica que um mecanismo similar a este pode ser o responsável pela biossíntese de furanoeremofilanos nas plantas. Os furanoeremofilanos são constituintes bastante frequentes no gênero *Senecio*, tendo sido descrita a atividade hipoglicemiante (Inman et al., 1999) para esta classe de compostos.



**Figura 50** - Proposta de biossíntese de furanoeremofilanos a partir da deidrofuquinona. (1) deidrofuquinona; (2) 4,4a,5,6,7,8-hexahidro-3-isopropilideno-4a,5-dimetil-10-hidroxi-naftalen-2-ona; (3) 4,4a,5,6,7,8-hexahidro-3,4a,5-trimetilnafto (2,3-b) furano; e (a) incubação na presença de citocromo P-450, NADPH e O<sub>2</sub> (Adaptado de Gaiakwad; Madyastha, 2002)

Em relação à síntese orgânica da deidrofuquinona, Reich; Eisenhart (1984) através de uma reação de Diels-Alder a partir de uma silil-cetona, obtiveram a deidrofuquinona, com um rendimento de 93%.

Até o momento, a deidrofuquinona foi isolada das raízes de *Senecio aureus* L. (Nachman, 1983), das partes aéreas de *Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius* (Maire Alexander) (De-Pooter et al., 1986) e das partes aéreas de *S. desfontainei* Druce (Ahmed, 1991), *S. humillimus* Sch. Bip. (Bohlmann et al., 1981) e *S. linearifolius* A. Rich. (Zdero et al., 1990). Entretanto, esta substância ainda não havia sido isolada de *Senecio platensis* Arech., uma vez que este é o primeiro estudo fitoquímico da espécie alvo deste trabalho, sendo o mesmo válido para o germacreno D e o espatulenol.

Apesar da deidrofuquinona ter sido reportada pela primeira vez em 1968 (Naya et al., 1968 apud Reich; Eisenhart, 1984), não existia até o momento, registros de atividades biológicas para esta substância. Os resultados relativos aos testes de avaliação da atividade antibacteriana para a deidrofuquinona descritos neste trabalho são, portanto, também inéditos.

Neste estudo, tanto a deidrofuquinona quanto o espatulenol tiveram suas atividades bactericida e bacteriostática testadas contra as cepas *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Bacillus cereus* (isolado clínico de paciente com endocardite) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853).

A deidrofuquinona apresentou um valor de CIM de 256 µg/mL, tanto para *Bacillus cereus* ATCC 14579, quanto para a cepa hospitalar. Entretanto, os valores de CBM foram mais elevados, para esta última (Tabela 23). Estes resultados evidenciam a atividade bacteriostática da deidrofuquinona em relação à sua atividade bactericida, contra as bactérias testadas. A maior resistência do isolado clínico era esperada, uma vez que as cepas hospitalares apresentam freqüentemente uma menor susceptibilidade, inclusive aos antibióticos de utilização terapêutica (Neely; Holder, 1999).

*Bacillus cereus* é uma bactéria Gram-positiva aeróbia ou facultativamente anaeróbia, formadora de esporos. É causadora de intoxicações alimentares por todo o mundo e frequentemente associada ao consumo de arroz mal acondicionado após o cozimento. No organismo, esta bactéria causa uma ação emética e diarréica devido a liberação de toxinas. Esta bactéria também é responsável por complicações mais severas como a endocardite e a cegueira (Drobniewski, 1993).

Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, tanto a deidrofuquinona quanto o espatulenol não apresentaram atividades bacteriostática ou bactericida nas concentrações testadas. Este resultado não surpreende, pois em geral bactérias Gram-negativas são mais resistentes em relação as bactérias Gram-positivas (Rabe, 1997; Vlietinck et al., 1995) e são menos suscetíveis às ações de produtos naturais em comparação com as Gram-positivas (Cosentino et al., 1999, Oyedeji et al., 1999, Deena; Thoppil, 2000). Este fato se dá provavelmente devido a diferenças morfológicas, uma vez que, as bactérias Gram-negativas apresentam parede complexa, constituída por uma membrana dupla, que fornece proteção (Holley; Patel, 2005). Em consequência desta maior resistência, as bactérias Gram-negativas, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, surgem como uma grande ameaça aos pacientes hospitalizados (Holder, 2004).

O espatulenol (11 $\beta$ -hidroxi-1 $\beta$ ,8 $\alpha$ -aromadendreno), isolado pela primeira vez do óleo essencial de *Eucalyptus spathulata* (Bowyer; Jeffries, 1963 apud Orsini et al., 1993), é um constituinte sesquiterpênico oxigenado de esqueleto do tipo aromadendrano (guaiano) (Sarker et al., 1997, Tringali et al., 1995). Possui 15 átomos de carbono, sendo 10 deles distribuídos em seus 3 ciclos. Apresenta apenas uma única dupla ligação, sendo esta exometilênica. Possui ainda uma hidroxila no carbono 4.

No gênero *Senecio*, o espatulenol foi isolado das partes aéreas de *Senecio canescens* Humb. (Abdo et al., 1992), *S. subumbellatus* Phil. (Jakupovic et al., 1991), *S. magnificus* F. Muell. (Zdero et al., 1990), *S. grandifolius* Less., *S. dolichodoryius* Cuatrec., *S. variabilis* Sch. Bip. (Bohlmann et al., 1986), *S. dryophyllus* Meyen et Walp (Dupré et al., 1991) e *S. ochoanus* Cuatr. (Bohlmann et al., 1983).

A síntese orgânica do (+)-espatulenol foi realizada pela primeira vez por Lier et al., (1985). A reação foi conduzida em três etapas a partir do (+)-aromadendrano apresentando um rendimento de 13% (Lier et al., 1985).

Em um estudo realizado por Cantrell et al., (2005) sobre a atividade repelente de mosquitos, foi demonstrado que o espatulenol é altamente efetivo, prevenindo picadas de *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* e, segundo o autor, representa uma boa alternativa aos

repelentes sintéticos existentes no mercado, além de servir como modelo para modificações estruturais e síntese de estruturas análogas, que aperfeiçoem as propriedades repelentes desta substância. A empresa japonesa SUMITOMO CHEMICAL CO patenteou o espatulenol como substância ativa em um inseticida contra *Aedes aegypti* e *Culex pipiens* (JP 2000026210). Além desta, há também a patente norte-americana, protegendo a utilização do (+)-espatulenol e/ou (+)-4a-alloespatulenol, assim como o seu processo de produção, na fabricação de flavorizantes de alimentos e como constituinte de perfumes (US 4783558)

Os dados referentes à toxicidade do espatulenol sobre *Artemia salina* constantes na literatura indicam uma  $CL_{50}$  19,4 $\mu$ M (Pacciaroni et al., 2000) e  $CL_{100}$  50  $\mu$ g /mL (Hellmann et al., 2001). A determinação da toxicidade aguda de uma substância é extremamente importante, principalmente considerando o seu uso indevido pela população. O teste de toxicidade utilizando *Artemia sp* é amplamente conhecido, por ser um bom indicador de toxicidade, sendo de fácil manipulação e de baixo custo (Dias et al., 2002).

Ainda no estudo de Pacciaroni et al., 2000 foram avaliadas as atividades citotóxica contra células KB (células de carcinoma da epiderme bucal humana), sendo que o espatulenol exibiu uma citotoxicidade moderada ( $CI_{50}$  83,8  $\mu$ M); também apresentou atividade inibitória em 39% da enzima topoisomerase I, principal mecanismo citotóxico de vários agentes quimioterápicos. O espatulenol ainda exerceu uma atividade citotóxica seletiva contra células SKMel-2 (células do melanoma humano).

O efeito citotóxico do espatulenol também foi avaliado *in vitro* em células Hep2 (carcinoma da laringe), tendo exibido uma  $CI_{50}$  de 36,2  $\mu$ g/mL, considerada uma atividade citotóxica de moderada a fraca (Matos et al., 2006).

Matsuda et al., (2000) encontraram para o espatulenol a atividade inibidora da produção de óxido nítrico (NO) em lipo-polissacarídeos ativados de macrófagos em ratos. O óxido nítrico está envolvido em processos fisiológicos e patológicos, como vasodilatação, defesa imune inespecífica, isquemia por reperfusão, inflamação crônica e no processo de apoptose (Estévez et al., 1999). Até 1987 o óxido nítrico era visto exclusivamente como gás tóxico, encontrado na fumaça de cigarros e descarga dos automóveis. Mas no final da década de 80, este composto foi identificado como um dos envolvidos na vasodilatação do endotélio. Hoje é conhecido não apenas por seu efeito vasodilatador, mas também como um gás que desempenha importante papel no relaxamento da musculatura lisa, em geral na inibição plaquetária, na remoção de radicais livres, na lise de células tumorais, na liberação de hormônios e na resposta imune. A produção anormalmente elevada ou reduzida de NO pelo organismo pode produzir efeitos adversos. Níveis elevados de NO endógeno estão associados

ao desenvolvimento de artrite reumatóide e hipotensão causada pela vasodilatação acentuada, enquanto que a produção reduzida de NO endógeno pode resultar no desenvolvimento de hipertensão pulmonar, aterosclerose, espasmo vascular ou angina (Jacobson, 2002; Yunes; Calixto, 2001).

Segundo Pérez-Hernández et al., (2006), o espatulenol exibiu um potente efeito inibidor da contração da musculatura uterina, sendo seu efeito dose-dependente. O estudo mostrou ainda que a atividade inibidora da contração uterina pelo espatulenol não se modificou ao se utilizar L-NAME (nitro-L-arginina-metil-éster, um inibidor não seletivo da óxido-nítrico sintase), e propanolol, o que sugere que este composto atue como bloqueador dos canais de cálcio.

Quanto a atividade antimicrobiana, o espatulenol mostrou-se ativo contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Proteus mirabilis* ATCC 14153, com um CIM de 136,0 µg /mL para ambas as cepas, e inativo contra *Candida albicans* ATCC 10231, *S. epidermis* ATCC 12228, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 1539 e *Escherichia coli* ATCC 8539. No entanto esta ausência de atividade não pode ser analisada, uma vez que as máximas concentrações testadas não são citadas pelo autor (Ulubelen, et al., 1994). Entretanto, o resultado obtido frente a *Pseudomonas aeruginosa* está de acordo o descrito neste trabalho, que comprova que o espatulenol não possui atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* até a concentração de 8192 µg /mL. Neste caso, os resultados dos dois estudos podem ser comparados, uma vez que utilizam a mesma metodologia de avaliação, ou seja, a microdiluição em caldo.

As propriedades antimicrobianas do espatulenol também foram avaliadas por Silva; Rosalen (2004) através de testes de concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) e inibição da aderência celular sobre a superfície de vidro (ADE) contra patógenos orais. Segundo os autores, o espatulenol não apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *S. mutans* UA 159, *S. sobrinus* 6715 e 2 cepas clínicas isoladas destes microrganismos, bem como contra *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Actinomyces naeslundii* ATCC 19246.

Neste estudo o espatulenol apresentou uma atividade bacteriostática igual a atividade bactericida, possuindo CIM e CBM de 64 µg/mL para a cepa de *Bacillus cereus* ATCC 14579. Para a cepa hospitalar de *B. cereus*, o espatulenol mostrou uma atividade bacteriostática superior à apresentada frente cepa ATCC, sendo a CIM de 32 µg/mL. Neste caso, entretanto, sua ação bactericida foi inferior, com um CBM superior a concentração de

8192 µg/mL. Segundo a literatura, os alcoóis possuem atividade bactericida agindo como agentes desnaturantes de proteínas, como solventes ou como agentes desidratantes (Dorman; Deans, 2000). Segundo Griffin et al (1999), os constituintes dos óleos essenciais contendo um grupamento fenólico ou alcoólico, seguidos pelos aldeídos e cetonas, exibem efeitos inibitórios mais pronunciados sobre o crescimento microbiano. Os resultados deste estudo concordam com os existentes na literatura, visto que o espatulenol possui uma função álcool em sua estrutura e apresentou uma CIM menor em relação à deidrofuquinona. Mesmo com esqueletos diferentes, ambos os constituintes isolados derivam do farnesil-pirofosfato sendo, portanto, sesquiterpenóides. Como era esperado, o espatulenol apresentou uma atividade bactericida superior àquela exercida pela deidrofuquinona, a qual possui uma função cetona em sua estrutura.

O mecanismo de ação dos compostos terpênicos não está totalmente elucidado. Alguns estudos indicam que a atividade antibacteriana pode ser conferida pela lipofilia dos hidrocarbonetos de estrutura terpênica, característica que permitiria a partição destes compostos nos lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, aumentando sua permeabilidade e levando ao extravasamento do conteúdo celular (Cowan, 1999). No entanto, este não parece ser o único mecanismo envolvido na atividade antimicrobiana dos terpenóides, uma vez que o germacreno D, por ser um hidrocarboneto, apresenta características lipofílicas acentuadas e não exibiu crescimento microbiano até a concentração de 5000 µg/mL (Deuschle et al., 2007).

Os resultados dos testes para avaliação da atividade antimicrobiana do espatulenol e da deidrofuquinona frente ao *B. cereus* apresentados neste trabalho são considerados animadores, por tratar-se de uma bactéria esporulada e, portanto, portadora de forma especial de resistência.

## 6 CONCLUSÕES

Após o estudo do extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  das partes aéreas de *Senecio platensis* Arech. pode-se concluir que:

- O extrato  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  da espécie em questão apresentou dois constituintes com grupamento peróxido;
- Foi possível isolar o germacreno D, um intermediário chave na biossíntese de vários compostos sesquiterpenóides, entre eles a deidrofuquinona e o espatulenol. O rendimento deste composto foi de 1,9% em relação a 1 Col. A.
- Através de uma reação de foto-oxidação do germacreno D, foi possível obter o germacreno-D-1-hidroperóxido, sendo este o peróxido mais polar dos dois constituintes com este grupamento presentes no extrato.
- Foi isolada a deidrofuquinona, um sesquiterpenóide de esqueleto do tipo eremofilano, sendo esta uma provável substância chave na biossíntese da furano-deidrofuquinona nas plantas. O rendimento deste composto em relação a fração 5 Col. A foi de 2,24%.
- Também foi possível isolar o espatulenol, um sesquiterpenóide de esqueleto do tipo aromadendrano (guaiano). O rendimento deste composto em relação a fração 5 Col. A foi de 4,08%.
- A deidrofuquinona apresentou CIM de 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e CBM de 4096  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *Bacillus cereus* ATCC 14579; e CIM de 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e CBM > 8192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra a cepa hospitalar de *Bacillus cereus* testada. Este composto não inibiu o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 até a concentração de 8192  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .
- O espatulenol apresentou CIM e CBM de 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra *Bacillus cereus* ATCC 14579; e CIM de 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e CBM > 8192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra o isolado clínico de *Bacillus cereus* utilizado no testes. Frente à *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 não foi possível detectar atividade até a concentração de 8192  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

## 7 REFERÊNCIAS

ABDEL-MALEK, S. et al. Drug leads from the Kallaway 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. Furanoremorphilanes and other constituents from *Senecio canescens*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3937-3941, 1992.

AFFEK, H. P.; YAKIR, D. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. **Plant Physiology**, v. 129, n. 1, p. 269-277, 2002.

AHMED, 1991. Eremophilanes from *Senecio desfontainei*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 1, p. 271-272, 1991.

ALKHATHLAN, H. Z. et al. Three 2-(2-phenylethyl) chromones and two terpenes from agarwood. **Natural Products Research**, v. 19, n. 4, p. 367-372, 2005.

ALZAMORA, L. et al. Medicina tradicional em 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.

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.

BAI, Y. BENN, M., MAJAK. Pyrrolizidine alkaloids of three species of *Senecio* in British Columbia. **Planta Medica**, v. 62, n.1, p. 71-72, 1996.

BANCHIO, E. et al. Changes in composition of essential oils and volatile emissions of *Minthostachys mollis*, induced by leaf punctures of *Liriomyza huidobrensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 2, p. 68-74, 2007.

BARRERO, A. F. et al. Biomimetic cyclization of enicin to malacitanolide, a cytotoxic eudesmanolide from *Centaurea malacitana*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 10, p.1034-1035, 1997.

BARRERO, A. F. et al. Antimicrobial activity of sesquiterpenes from the essential oil of *Juniperus thurifera*. **Planta Medica**, v. 71, n. 1, p. 67-71, 2005.

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.

BLANCO, E; MACÍA, M. J.; MORALES, R. Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, northwest Spain). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 65, n. 2, p. 113–124, 1999.

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.; 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. 19, n. 12, p. 2681-2684, 1981

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, 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 *Klenia* 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. A norsesquiterpene from *Senecio humillimus*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 7, p. 1739-1740, 1981.

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.

BOIK, J. **Natural compounds in cancer therapy**. 1<sup>a</sup> ed. Minnesota, EUA, Oregon Medical Press, 2001. 541 p.

BOLZAN, A. A. et al. A peroxide precursor from *Senecio platensis* Arech. In: **II Simpósio Brasil – Alemanha**. 2005, Santa Maria, II Simpósio Brasil-Alemanha, 2005, v.1, p.121

BOLZAN, A. A. et al. Espécies de *Senecio* na medicina popular da América Latina e toxicidade relacionada a sua utilização. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 26, n. 4, p. 619-25, 2007.

BORK, P.M. et al. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor. **FEBS Letters**, v. 402, n.1, p. 85-90, 1997.

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.

BROCHINI, A. B. et al. Two new cneorubin related diterpenes from the leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 361-364, 2000.

BULOW, N.; KONIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in the 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.

BUTLER, M. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2001.

CAIRO, N. Guia de Medicina Homeopática. In: **Guia homeopático de matéria médica clínica**. 19<sup>o</sup> ed. São Paulo, SP: Livraria Teixeira, 1965. p. 571-572.

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.

CANTRELL, C. L. et al. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of american (*Callicarpa americana*) and japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 5948-5953, 2005.

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

CERQUEIRA, F. et al. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 217-223, 2004.

CERT, A.; MOREDA, W. New method of stationary phase preparation for silver ion column chromatography: Application to the isolation of steroidal hydrocarbons in vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 823, n. 1, p. 291-297, 1998.

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

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

**CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI – 2005)** “Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbio: Norma Aprovada” – M7-A6 Sexta Edição – Tradução permitida ANVISA (antigo National Committee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS).

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.

CONFORTI, F. et al. Biological properties of different extracts of two *Senecio* species. **International Journal of Food Sciences & Nutrition**. v. 57, n. 1/2, p. 1-8, 2006.

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

COSENTINO, S. et al. The effect of filters on aseptic pipetting lifetime of mechanical and electronic pipettors and carryover during pipetting. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.

COSTA, A. F. **Farmacognosia Vol. I**. 6ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. 1031p.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. Plantas e produtos vegetais em fitoterapia. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 701p.

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

DEENA, M.J.; THOPPIL, J. E. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 453-455, 2000.

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.

DEGENHARDT, J. et al. Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 169-176, 2003.

DE-POOTER, H. L. The volatile fraction of *Senecio glaucus* subsp. *coronopifolius*. **Flavour and Fragrance Journal**, v.1, n.4/5, p.159-163, 2006.

DEUSCLHLE, 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 Farmacêutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 356-359, 2006.

DIAS, A. et al. Testes de toxicidade em *Artemia salina*: contaminante  $K_2CrO_7$  e efluentes químicos (tratado e não tratado). **Universidade do Algarve, Faculdade de Ciências do Mar e do ambiente**, 2002.

DOHERTY, J. F. et al. A randomized safety and tolerability trial of artesunate plus sulfadoxinepyrimethamine versus sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated malaria in Gambian children. **Transactions of the Royal Society of the Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 543-546, 1999.

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, 1999.

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

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, 2005.

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

DUTTA, P. C.; NORMÉN, L. Capillary column gas-liquid chromatographic separation of 5-unsaturated and saturated phytosterols. **Journal of Chromatography A**, v. 816, n. 2, p. 177-184, 1998.

DROBNIIEWSKI, F. A. *Bacillus cereus* and related species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 324-338, 1993.

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

ESTÉVEZ, A. G. et al. Induction of nitric oxide - Dependent apoptosis in motor neurons by zinc-deficient superoxide dismutase. **Science**, v. 286. n. 5449, p. 2498 – 2500, 1999.

FERREIRA, M. J. P. et al. Computer-aided method for identification of components in essential oils by <sup>13</sup>C NMR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 447, n.1/2, p. 125–134, 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. et al. Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye syndrome. **Journal of Pediatrics**, v. 93, n. 3, p. 980-982, 1978.

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

FRANCESCATO, L. N. et al. Germacreno-D-1-hidroperóxido: Semi-síntese e Atividade Antimicrobiana. In: **XII Jornada de Jovens Pesquisadores da Associação de Universidades do Grupo Montevidéo**, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil, 2004. 1 CD-ROM, ND7004UFSM.

FRANCESCATO, L. N. **Constituintes de *Senecio heterotrichius* DC.: Isolamento, elucidação estrutural, derivatização e avaliação da atividade antimicrobiana; estudo dos constituintes voláteis de outras espécies de *Senecio***. 2007.158f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 1, p. 63-73, 2002.

GAIKWAD, N. W.; MADYASTHA, K. M. Biosynthesis of *b*-substituted furan skeleton in the lower furanoterpenoids: A model study. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 589–594, 2002.

GARCÍA, V. M. N. VMN.; GONZALEZ, A.; FUENTES, M. et al. Antifungal activities of nine traditional Mexican meridional plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 1, p. 85-88, 2003

GARDNER, D. et al. Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio madagascariensis* from Australia and Hawaii and assessment of possible livestock poisoning. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, n. 10, p. 736-744, 2006.

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.

GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? **Acta Tropica**, v. 48, n. 4, p. 251-261, 1991.

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.

GRANDGIRARD, A. et al. Gas chromatographic separation and mass spectrometric identification of mixtures of oxyphytosterol and oxysterol derivatives application to a phytosterol-enriched food. **Journal of Chromatography A**, v. 1040, n. 2, p. 239-250, 2004.

GRIFFIN, S. G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 14, p. 322–332, 1999.

GUNASEKERA, S. P. et al. Two new bioactive cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. **Journal Natural Products**, v. 53, n. 3, p. 669-674, 1990.

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

GRODNITZKY, J. A.; COATS, J. R. QSAR evaluation of monoterpenoids insecticidal activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, n. 16, p. 4576-4580, 2002.

GRUE, R. M.; LIDDEL, J. R. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio chrysocoma*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 6, p. 1517-1519, 1993.

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 *Senecio* plant. **Toxicon**, v. 26, n. 3, p. 275-286, 1988.

HAMZA, O. et al. Antifungal activity of some Tanzanian plants used traditionally for the treatment of fungal infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 124-132, 2006.

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

HELLMANN, A.; CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M. Toxicidade frente A *Artemia salina* do extrato hexânico de *Duguetia furfuracea* – Annonaceae. In: **V Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**, Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu, SP, Brasil, 2001, Anais da Jornada, p. 35, 2001.

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.

HOLDER, I. A. *Pseudomonas* immunotherapy: a historical overview. **Vaccine**, v. 22, n.7, p. 831-839, 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.

HUANG, J. F. et al. Molecular characterization of a new begomovirus infecting *Senecio scandens* in China. **Acta virologica**, v. 49, n. 3, p. 211-215, 2005.

HUNTINGTON, S.; KINNEL, R. Germacrene D: variation of enantiomers in Aster leaves and oviposition 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: 12 dez. 2006.**

ILHA, M. R. S. et al. Intoxicação espontânea por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em ovinos no Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 3, p. 123-138, 2001.

INAGAKI, F.; ABE, A. Analysis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance spectra of spathulenol by two-dimensional methods. **Journal of Chemistry Society Perkin Transactions II**, n.11, p. 1773-1778, 1985.

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

IWABUCHI, H. YOSHIKURA, M.; KAMISAKO, W. Studies on the sesquiterpenoids of *Panax ginseng* C.A. Meyer. III. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 2, p. 509-510, 1989.

JAKOBSON, J. Óxido nítrico: propriedades protetoras das plaquetas durante a circulação extracorpórea/ECMO. **Journal of Extra Corporeal Technology**, v. 34, p. 144-147, 2002.

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

SUMITOMO CHEMICAL CO. Watanabe, K., Ishiwatari, T. Insecticide containing spathulenol as active ingredient. JP 2000026210 . **Patent Abstracts of Japan**, Japão, 2000. **Disponível em:** <http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP2000026210&F=0>. **Acesso em: jun. 2007.**

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.

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

JUREK, J., SCHEUER, P. J. Sesquiterpenoids and norsesquiterpenoids from the soft coral *Lemnalia africana* Jaroslaw. **Journal of Natural Products**, v. 56, n.4, p. 508-513, 1993.

KANADASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KANAKIS, C. D. et al. Antioxidant flavonoids bind human serum albumin. **Journal of Molecular Structure**, v. 798, n. 1, p. 69-74, 2006.

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.; JAGER, A. K.; VAN STANDEN, 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, n. 2, 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 fur 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.

KREBS, H. C.; RAKOTOARIMANGA, J. V.; HABERMEHL, G. G. Isolation of spathulenol and (-)-caryophyllene oxide from *Vernonia molissima* Don and  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  Reassignment by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 28, p. 124-128, 1990.

KUTIEL, P. et al. Vegetation establishment on the southern Israeli coastal sand dunes between the years 1965 and 1999. **Landscape and Urban Planning**, v. 67, n. 1, p. 141–156, 2004.

LENTINI, F. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 83-88, 2000.

LENTZ, D. L. et al. Antimicrobial properties of Honduran medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 63, n. 3, p. 253–263, 1998.

LEPORATTI, M. L.; IVANCHEVA, S. Preliminary comparative analysis of medicinal plants used in the traditional medicine of Bulgaria and Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, n. 2, p.123–142, 2003.

LI, S. et al. Herbs for medicinal baths among the traditional Yao communities of China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 1, p. 59–67, 2006.

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

LIER, F. P. et al. First preparation of (+)-spathulenol. Regio- and stereoselective oxidation of (+)-aromadendrene with ozone. **Tetrahedron Letters**, v. 26, n. 17, p. 2109-2110, 1985.

LIU, F.; NG, T. B. Antioxidative and free radical scavenging activities of selected medicinal herbs. **Life Sciences**, v. 66, n. 8, p. 1303-1305, 2000.

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

LOPES, W, B. et al. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais. **Horizonte Científico, Revista da PROPP**. v. 1, n.1. Disponível em: <http://www.propp.ufu.br/revistaeletronica/edicao2002/B/Desenvolvimento.PDF>. Acesso em: abril 2007

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas Medicinais no Brasil**. Nativas e exóticas. Nova Odessa, SP. Plantarum, 2002. 512 p.

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

MACÊDO, M. E. et al. Screening of Asteraceae (Compositae) plants 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 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.

MATSUDA, H. et al. Inhibitory effects of sesquiterpenes from bay leaf on nitric oxide production in lipopolysaccharide-activated macrophages: structure requirement and role of heat shock protein induction. **Life Sciences**, v. 66, n. 22, p. 2151-2157, 2000.

MATOS, M. F. C. et al. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*, **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 227-229, 2006.

MATTOSO, E. Estudos de fragrâncias amadeiradas da amazônia. 2005. 148f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

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

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

MESHNICK, S. R. et al. Artemisinin and the antimalarial endoperoxides: from herbal remedy to targeted chemotherapy. **Microbiological Reviews**, v. 60, n. 2, p. 301-315, 1996.

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, p. 412-422, 2005.

MINNAARD, A. J.; WIJNBERG, J. B. A.; GROOT, A. The synthesis of germacrene sesquiterpenes and related compounds. **Tetrahedron**, v. 55, n. 8, p. 2115-2146, 1999.

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. **Constituintes voláteis e atividade antimicrobiana de *Senecio crassiflorus* (Poir.) DC. Var. *crassiflorus***. 2007. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

NACHMAN, R. J. Tetrahydroligularenolide and related eremophilanes from *Senecio aureus*. **Phytochemistry**, v. 22, n. 3, p. 780-782, 1983.

NARUKAWA, Y. et al. Two new diterpenoids from *Plectranthus nummularius* Briq. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 49, n. 9, p. 1182-1184, 2001.

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.

NEELY, A. N.; HOLDER, I., A. Antimicrobial resistance. **Burns**, v. 25, p. 17-24, 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, J. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-77, 2007.

OGAMINO, T. et al. Electrochemical bromination of germacrene D. **Electrochimica**, v. 49, n.27, p. 4865-4869, 2004.

ORSINI, F.; PELIZZONI, F.; VEROTTA, L. Application of molecular modelling to natural products: a biogenetic study of (+)-spathulenol and (+)-allospathulenol. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 284, n. 1/2, p. 67-74, 1993.

ORTEGA, P. A. et al. Dihydroeuparin as sunscreen. **Buletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, n. 4, p. 629-636, 2000.

PACCIARONI, A. V. et al. Bioactive Constituents of *Conyza albida*. **Planta Medica**, v. 66, n. 8, p. 720-723, 2000.

OYEDEJI, A.O. et al. Antimicrobial activity of the essential oils of five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v. 70, n. 5, p. 526-528, 1999.

PAIVA, J. A.; BARATA, L. E. S.; TRIGO, J. R. Pyrrolizidine alkaloids in three *Senecio* species from southern Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n.12, p. 1219–1222, 2004.

PASCUAL-VILLALOBOS, M. J.; ROBLEDO, A. Screening for anti-insect activity in Mediterranean plants. **Industrial Crops and Products**, v. 8, n. 3, p. 183-194, 1998.

PELZER, L. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **II Farmaco**, v. 53, n. 6, p. 421-424, 1998.

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.

PÉREZ-HERNANDEZ, N.; PONCE MONTER, H.; JOSEPH-NATHAN, P. Efecto utero relajante del espatulenol obtenido del extracto hexánico de *Lepechinia caulescens*. **Revista de Fitoterapia**, 6, p. 113, 2006. Disponível em: [www.fitoterapia.net](http://www.fitoterapia.net). **Acesso em: 14 jun. 2007**

PETERSON, J. K.; HORVAT, R. J.; ELSEY, K. D. Squash leaf glandular trichome volatiles: identification and influence on the 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, in land southern Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2/3, p. 373-384, 2004.

POMILIO, A. B.; JARES, E. A. Toxic furanoeremophilanes from *Senecio bonariensis*. **International Journal of Pharmacognosy**, v. 35, n. 3, p. 207-211, 1997.

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.

PROSSER, I. et al. Enantiospecific (+) and (-) - Germacrene-D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, n. 2, p. 136-144, 2004.

RABE, T.; VAN STANDEN, J. Antibacterial activity of South African plants used for medicinal purposes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, n. 1, p. 81-87, 1997.

RAGASA, C. Y. et al. A new furanoid diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 10, p. 1208-1210, 2003.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REICH, H. J.; EISENHART, E. K. Silyl ketone chemistry. Preparation of eremophilane and eudesmane sesquiterpenes by vinylallene cycloaddition. **Journal of Organic Chemistry**, v. 49, n. 26, p. 5282-5283, 1984.

REICH, H. J. et al. Silyl ketone chemistry. Preparation and reactions of silyl allenol ethers. Diels-Alder Reaction of siloxy vinylallenes leading to sesquiterpenes. **Journal of American Chemical Society**, v. 108, n. 24, p. 7791, 1986.

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 silphinene sesquiterpenes from *Senecio palmensis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 4, p. 448-453, 2002.

RIBEIRO, J.; JORGE, R. A. Análise das propriedades anticancerígenas de meso-tetramesitilporfirina empregando métodos espectroscópicos. **Revista Analytica**, n. 10, 2004. Disponível em: [http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed\\_antteriores/10/analise%20propriedades.pdf](http://www.revistaanalytica.com.br/analytica/ed_antteriores/10/analise%20propriedades.pdf). Acesso em: 27 jun. 2007.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. 1. ed. São Paulo: Editorial Premier, 1997. 372 p.

ROBINSON, R. **Plant Science**. Nova Iorque, Macmillan Reference, 2001. vol. 4, p.108.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytochemistry**, v. 12, n. 6/7, p. 514-535, 2005.

ROHDICH, F. et al. Biosynthesis of terpenoids 2 C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate synthase (IspF) from *Plasmodium falciparum*. **European Journal of Biochemistry/ FEBS**, v. 268, n. 11, p.3190-3197, 2001 .

ROJAS, R. et al. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, n. 2/3, p. 199-204, 2003.

ROMERO, A. et al. Lesiones hepáticas inducidas por componentes volátiles de *Senecio grisebachii* em ratones. **Revista Veterinária**, v.1, n. 12/13, p. 15-18. 2001-2002.

RÜCKER, G. et al. Sesquiterpene peroxides from *Senecio selloi* and *Eupatorium rufescens*. **Planta Medica**, v. 62, n. 6, p. 565-566, 1996.

RÜCKER, G. et al. Antimalarial activity of 1,4-epidioxy-bisabol-2,12-diene derivatives. **Archiv der Pharmazie - Pharmaceutical Medicinal Chemistry**, v. 330, n. 1/2, 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.

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.

SANS, F. X.; GARCIA-SERRANO, H.; AFÁN, I. Life-history traits of alien and native *Senecio* species in the Mediterranean region. **Acta Oecologica**, v. 26, n. 3, p. 167-178, 2004.

SARKER, S, D; ARMSTRONG, J. A.; WATERMAN, P.G. (+) Spathulenol from *Asterolasia drummondii* and *Asterolasia squamuligera*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, n. 2, p. 183-184,1997.

SCHENATO, R. A. et al. A practical and efficient preparation of (-)-(4aS,5R)- 4,4a,5,6,7,8-hexahydro-4a,5-dimethyl-2(3H)-naphthalenone: a key intermediate in the synthesis of (-)-dehydrofukinone. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 12, n. 4, p. 579-584, 2001.

SHIJLEN, E. G. W. M. et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v. 65, n.19, p. 2631-2648, 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, C. M.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. Peróxidos em espécies do gênero *Senecio* (II) In: **V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**, 2005, Recife. Resumos do V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2005, p. 1- 017.

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.

SILVA, F.; ROSALEN, P. L. Efeito antimicrobiano in vitro dos compostos isolados da *Mikania glomerata* sobre os patógenos orais. In: **XII Congresso interno de iniciação científica da UNICAMP**, 2004, Campinas. Resumos do XII Congresso interno de iniciação científica da UNICAMP, 2004, B197.

SILVA, J. A. A. Importância dos estereoisômeros na terapêutica. **Boletim do Centro de Informação do Medicamento**, setembro/outubro, p. 1-4, 2005. Disponível em: [http://www.ordemfarmaceuticos.pt/ordemfarmaFiles/files/ofFileS1\\_1361.pdf](http://www.ordemfarmaceuticos.pt/ordemfarmaFiles/files/ofFileS1_1361.pdf). **Acesso em 25 jun. 2007.**

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 460p, 1998.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre/ Florianópolis: ed. da UFRGS/ ed. da UFSC, 2003. 1102 p.

SOUSA, J. A.; MIRANDA, E. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos: alternativas viáveis**. Disponível em: <<http://www.cpafac.embrapa.br/chefias/cna/artigos/planmed.htm>>. **Acesso em: 18 abril 2007.**

STAHL, E. **Thin-layer chromatographic** – 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.

STELIOPOULUS, 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.

STILL, W. C.; KAHN, N.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal of Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 2923-2925, 1978.

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.

SUMITOMO CHEMICAL CO. Watanabe Keisuke; Ishiwatari Takao. **Insecticide containing spathulenol as active ingredient. Disponível em:** <<http://v3.espacenet.com/textdoc?DB=EPODOC&IDX=JP2000026210&F=0>>. **Acesso em: 2 dez. 2006.**

TARANTO, A. G. et al. DFT study of the reductive decomposition of artemisinin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 1546-1557, 2006.

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.

TEKLEHAYMANOT, T. et al. Knowledge and use of medicinal plants by people around Debre Libanos monastery in Ethiopia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 271-283, 2007.

TESSO, H. **Isolation and structure elucidation of natural products from plants**. 2005. 146f. Tese (Doctorate at the Institute of Organic Chemistry) - Universidade of Hamburg, Hamburg, 2005.

TETTAMANZI, M. C.; JARES, E. A.; POMILIO, A. B. Constituents of *Senecio bonariensis* roots. **Fitoterapia**, v. 63, n. 6, p. 551-552, 1992.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, 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. Secondary metabolites from *Senecio minutus* an *Senecio boissieri*: a new jacaranone derivative. **Fitoterapia**, v. 71, n. 1, p. 91-93, 2000.

TRINGALI, C.; PIATTELLI, M.; SPATAFORA. Sesquiterpenes and geranylgeranylglycerol from the brown algae *Taonia lacheana* and *Taonia atomaria* f. *ciliata*: their chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 40, n. 3, p. 827- 831, 1995

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.

ULUBELEN, A. et al. Terpenoids from *Salvia sclarea*. **Phytochemistry**, v. 36, n. 4, p. 971-974, 1994.

UMLAUF, D. et al. Biosynthesis of the irregular monoterpene artemisia ketone, the sesquiterpene germacrene D and the other isoprenoids in the *Tanacetum vulgare* L. (Asteraceae). **Phytochemistry**, v. 65, n. 17, p. 2463-2470, 2004.

NAARDEN INTERNATIONAL N.V. Van der Linde, L. M. et al. 4783558. **Flavoring and perfume compositions, flavored foodstuffs and luxury consumables and perfumed products which contain one or more spathulenols as the base material, a spathulenol derivative and a process for the preparation of spathulenols**. United States Patent and Trademark Office Granted Patent. 1988. Disponível em: <<http://www.freepatentsonline.com/4783558.html>>. **Acesso em: 2 dez. 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. et al. A new antibacterial clerodane diterpenoid from the resinous exudate of *Haplopappus uncinatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 2, p. 297-301, 2006.

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.

VILLAESCUSA-CASTILLO, L. et al. Antiprotozoal activity of sesquiterpenes from *Jasonia glutinosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 3, p. 176-180, 2000.

VILLARROEL, L. et al. Secondary metabolites from genus *Senecio* and *Heliotropium*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 25, n. 3, p. 109-116, 1997.

VISBISKI, V. N.; NETO, H. W.; SANTOS, A. L. Uso popular das plantas das plantas medicinais Guanabara, Imbaú-PR. **Publicação da Universidade Federal de Ponta Grossa do Dept. de Ciências Exatas da Terra**, v. 9, n. 1, p. 13-20, 2003. Disponível em: <<http://www.uepg.br/proresp/publicatio/exa/2003/02.pdf>> **Acesso em: 10 jan. 2006.**

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.

YOHIHARA, K. et al. Germacrene D, a key intermediate of cadinene group compounds and bourbonenes. **Tetrahedron letters**, v. 10, n. 27, p. 2263-2264, 1969.

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.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais**. Sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó, SC, 1984. 523 p.

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.

WIKIPEDIA. In: Terpenoides. Disponível em: <http://es.wikipedia.org/wiki/Terpenoides>. **Acesso em maio de 2007.**

WIEDENFELD, H.; ROEDER, E.; LUCK, W. O<sup>7</sup>-angeloyretrocine, 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.

WOERDENBAG, H. J.; LUGT, C. B.; PRAS, N. *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific edition**. v.12, n. 5, p.169, 1990.

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.

ZDERO, C. et al. Co-occurrence of pyrrolizidine alkaloids and acylpyrrols in *Senecio magnificus* and constituents of other australian *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 29, n. 2, p. 509-511, 1990.

ZEINSTEGER, P. et al. Toxicity of volatile compounds of *Senecio grisebachii* BAKER (margarita) flowers, in mice. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 32, n. 2, p. 125-136, 2003.

## 8 ANEXO

**ANEXO A: Artigo: “Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*”**

**ANEXO B: Artigo: “Espécies de *Senecio* na Medicina Popular da América Latina e Toxicidade Relacionada a sua Utilização”**

## ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Senecio*

Chana de Medeiros da Silva, Aline Abati Bolzan e Berta Maria Heinzmann\*

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

Recebido em 20/7/05; aceito em 14/10/05; publicado na web em 5/5/06

PYRROLIZIDINE ALKALOIDS FROM *Senecio* SPECIES. *Senecio* species contain a large variety of secondary metabolites and many of these plants afford pyrrolizidine alkaloids. This paper is a review of the literature, describing 62 pyrrolizidine alkaloids already isolated in 62 of more than 2000 species of *Senecio*, distributed worldwide. The structure-activity relationships involving their toxicity are also discussed, since some *Senecio* species used for medicinal purposes are responsible for causing serious adverse effects.

Keywords: *Senecio*; pyrrolizidine alkaloids; hepatotoxicity.

### INTRODUÇÃO

O gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*, Asteraceae) é constituído por mais de 2000 espécies de ampla distribuição mundial<sup>1</sup>. No Brasil, foram catalogadas cerca de 85 espécies pertencentes ao gênero, dentre as quais 33 são nativas da região sul<sup>1</sup> e 25 foram identificadas no Rio Grande do Sul<sup>2</sup>.

Os alcalóides pirrolizidínicos (APs) são considerados um importante grupo de constituintes do gênero *Senecio*. São conhecidos por causarem intoxicações em animais herbívoros de grande porte, como bovinos, ovinos, suínos e eqüinos, levando a perdas consideráveis na pecuária para o sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai<sup>3-5</sup>. A literatura também relata a ocorrência de intoxicações fatais em seres humanos devido ao consumo de espécies de *Senecio* contendo Aps<sup>6-8</sup>, que têm sido empregadas na medicina popular de diversos países, inclusive na América Latina<sup>9-11</sup>.

### TIPOS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS ENCONTRADOS EM ESPÉCIES DE *Senecio*

APs são ésteres de aminoalcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nélicos), que podem ocorrer na forma de mono, di e diésteres cíclicos. As necinas caracterizam-se por apresentar um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como “cabeça de ponte”, um grupamento hidroximetila em C1 e uma hidroxila em C7<sup>8</sup> (Figura 1). Os APs podem apresentar a necina insaturada entre os carbonos C1 e C2, sendo esta característica um pré-requisito para a sua toxicidade aguda e crônica<sup>8,12,13</sup>. Os APs que possuem a necina saturada não são tóxicos aos mamíferos<sup>14</sup>.

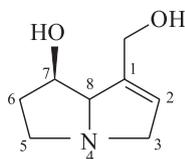


Figura 1. Estrutura básica de uma necina

Segundo Trigo<sup>15</sup>, por serem muito comuns ao gênero, os APs podem ser utilizados como marcadores quimiosistemáticos para a tribo *Senecioneae*, uma vez que a maioria apresenta uma estrutura macrocíclica diéster do tipo senecionina (Tabela 1) e/ou são mono e diésteres do tipo triangularina (Tabela 2).

Embora os alcalóides pirrolizidínicos sejam considerados metabólitos secundários característicos do gênero *Senecio*, eles não estão presentes em todas as espécies e também têm sido relatados em gêneros vizinhos<sup>53</sup>. Além da variabilidade inter-específica na composição de APs, pode ocorrer variação intra-específica na concentração dos mesmos, conforme a época e o local da coleta, a parte da planta e seu quimiotipo<sup>24</sup>.

A biossíntese dos APs tem início nas raízes de *Senecio*, onde são produzidos primeiramente N-óxidos da senecionina. Estes são transportados para os órgãos superiores da planta, onde sofrem alterações estruturais, originando os diferentes APs<sup>24</sup>. Entretanto, somente se tornam tóxicos quando metabolizados pelo fígado a uma forma pirrólica altamente reativa, conhecida como deidroalcalóide<sup>8</sup>.

O efeito hepatotóxico destes alcalóides, devido à atuação de seus metabólitos como agentes alquilantes, está bem estabelecido. Primeiramente ocorre uma oxidação (desidrogenação) no carbono- $\alpha$  ao N, catalisada por monooxigenases do citocromo P-450<sup>54</sup>. Os derivados pirrólicos assim originados são reativos e sofrem conversão espontânea, originando agentes eletrofílicos, que reagem com substâncias celulares de caráter nucleofílico através de uma adição de Michael. A glutatona reduzida apresenta caráter nucleofílico e, devido a esta característica, protege o organismo, uma vez que captura os derivados pirrólicos tóxicos, sendo esta a principal rota de detoxificação utilizada pelo organismo. No entanto, outros nucleofílicos das células, como ácidos nucleicos e proteínas vitais, também reagem com os derivados pirrólicos, formando adutos<sup>55</sup>. A alteração na estrutura de moléculas vitais leva à alteração de sua função, o que explica as diversas manifestações patológicas ocasionadas pelos APs.

As diferentes espécies animais apresentam suscetibilidades variáveis frente aos APs, na dependência do tipo de metabolismo enzimático destes no microsoma hepático. A produção do núcleo pirrólico em baixas quantidades e as altas taxas de conjugação com a glutatona parecem ser as razões para a maior resistência de ovelhas e hamsters à toxicidade destes alcalóides<sup>54</sup>. A ingestão crônica

\*e-mail: hberta@ccs.ufsm.br

**Tabela 1.** Principais alcalóides pirrolizidínicos do tipo senecionina presentes em espécies do gênero *Senecio*

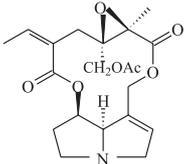
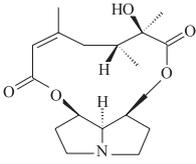
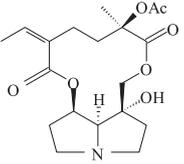
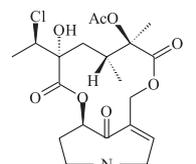
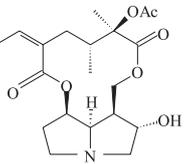
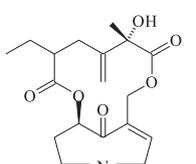
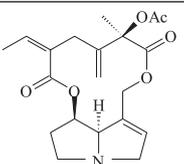
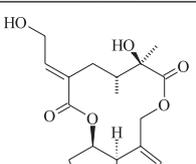
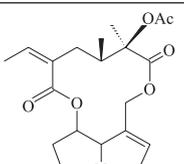
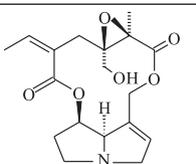
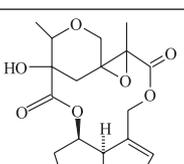
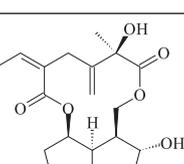
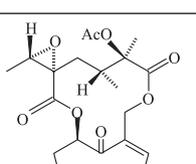
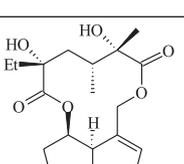
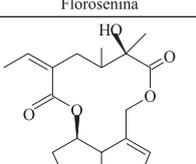
Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.	Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.
 Acetilerucifolina	<i>S. jacobaea</i> L.	16	 Bulgarsenina	<i>S. cacaliaster</i> Lam.	23
 12-O-acetil-hadiensina	<i>S. hadiensis</i> Forsk.	17	 Doronina	<i>S. leptolobus</i> DC.	4
 12-O-acetilrosmarinina	<i>S. hadiensis</i> Forsk. <i>S. syringifolius</i> O. Hoffm.	17 17	 Emilina	<i>S. microphyllus</i> Phil.	8
 Acetilseneciofilina	<i>S. pterophorus</i> DC.	7	 Eruciflorina	<i>S. erucifolius</i> L. <i>S. jacobaea</i> L.	16 16,24
 Acetilsenecionina	<i>S. lautus</i> Forster f. ex Willd. <i>S. magnificus</i> F. Muell. <i>S. quadridentatus</i> Labill.	18 19 19	 Erucifolina	<i>S. aquaticus</i> Hill. <i>S. argunensis</i> Turcz. <i>S. erraticus</i> Bertol. <i>S. erucifolius</i> L. <i>S. jacobaea</i> L. <i>S. personii</i> De Not.	25 26 8 16 16,24 27
 Adonifolina	<i>S. adonidifolius</i> Loisel.	20	N-óxido de Erucifolina	<i>S. personii</i> De Not.	27
 Angularina	<i>S. syringifolius</i> O. Hoffm.	17	 Florosenina	<i>S. adonidifolius</i> Loisel. <i>S. erraticus</i> Bertol. <i>S. glaber</i> Less. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. quebradensis</i> Greenm.	20,28 8 8 3,4 29
 Bislina	<i>S. ruwenzoriensis</i> S. Moore.	21,22	 Fuchsisenecionina	<i>S. nemorensis</i> L.	30

Tabela 1. continuação

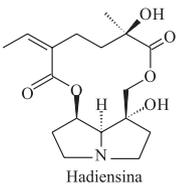
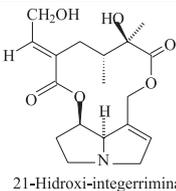
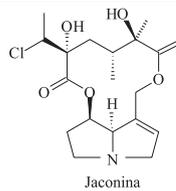
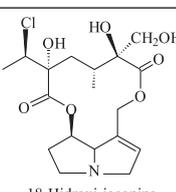
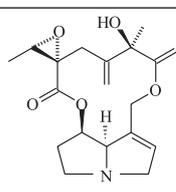
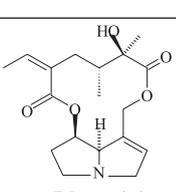
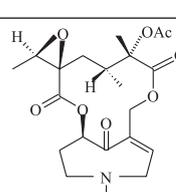
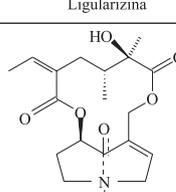
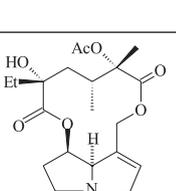
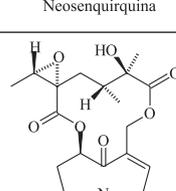
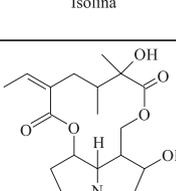
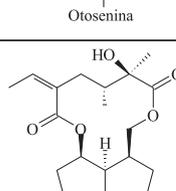
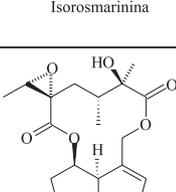
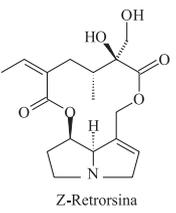
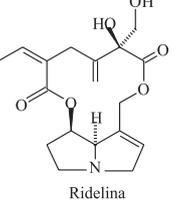
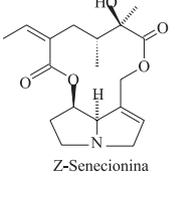
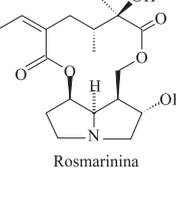
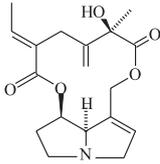
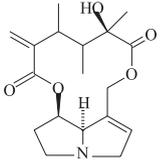
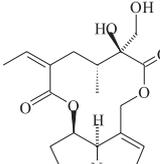
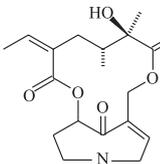
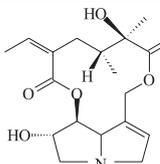
Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.	Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.
 Hadiensina	<i>S. hadiensis</i> Forsk.	17	 Jacolina	<i>S. jacobaea</i> L.	24,33
 21-Hidroxi-integerrimina	<i>S. argunensis</i> Turcz.	26	 Jacolina	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33
 18-Hidroxi-jaconina	<i>S. selloi</i> (Spreng) DC.	4	 Jacozina	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33
 E-Integerrimina	<i>S. argunensis</i> Turcz. <i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less. <i>S. erucifolius</i> L. <i>S. glabellus</i> Poir. <i>S. heterotrichus</i> DC. <i>S. jacobaea</i> L. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. longilobus</i> Benth. <i>S. malacitanus</i> L. <i>S. murorum</i> Remy	26 4,10,15,31 16 32 3,4 16,24,33 3,4 32 34 8	 Ligularizina	<i>S. gallicus</i> Vill. <i>S. microphyllus</i> Phil.	28 8
 Neosenquirquina	<i>S. grandifolius</i> Less. <i>S. leptolobus</i> DC.	29 3,4,35	 Neosenquirquina		
 Isolina	<i>S. ruwenzoriensis</i> S. Moore.	21,22	 Otosenina	<i>S. argunensis</i> Turcz. <i>S. erraticus</i> Bertol. <i>S. glaber</i> Less. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. lorenthii</i> Hochst.	26 8 8 4 36
 Isorosmarina	<i>S. pterophorus</i> DC.	7	 Platifilina	<i>S. bonariensis</i> Hook. et Arn. <i>S. granatensis</i> Boiss. <i>S. jacalensis</i> Greenm. <i>S. madrensis</i> A. Gray <i>S. polypodioides</i> Greene	37 34 38 39 39
 Jacobina	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33	N-óxido de platifilina	<i>S. granatensis</i> Boiss. <i>S. madrensis</i> A. Gray <i>S. polypodioides</i> Greene	34 39 39

Tabela 1. continuação

Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.	Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.
 <p>Z-Retrorsina</p>	<i>S. bonariensis</i> Hook. et Arn.	40	 <p>Z-Seneciofilina</p>	<i>S. aquaticus</i> Hill.	25
	<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less.	4,10,15,31		<i>S. argunensis</i> Turcz.	26
	<i>S. cisplatinus</i> Cabrera	3,4		<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less.	10
	<i>S. conyzifolius</i> Baker	37		<i>S. crassiflorus</i> (Poir.) DC.	45
	<i>S. cymbalorioides</i> Nutt.	41		<i>S. erraticus</i> Bertol.	8
	<i>S. gilliesianus</i> Hieron.	42		<i>S. erucifolius</i> L.	16
	<i>S. heterotrichus</i> DC.	3,4		<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33
	<i>S. jacobaea</i> L.	16		<i>S. laricifolius</i> H.B.K.	29
	<i>S. leptolobus</i> DC.	4		<i>S. longilobus</i> Benth.	32
	<i>S. longilobus</i> Benth.	32		<i>S. lorenthii</i> Hochst.	36
	<i>S. malacitanus</i> L.	34		<i>S. microphyllus</i> Phil.	8
	<i>S. microphyllus</i> Phil.	8		<i>S. multivenius</i> Benth. in Oerst.	29
	<i>S. oleosus</i> Vell.	37		<i>S. oxiphyllus</i> DC.	4
	<i>S. othonnaeflorus</i> DC.	43		<i>S. patagonicus</i> Phil.	8
	<i>S. oxiphyllus</i> DC.	4		<i>S. persoonii</i> De Not.	27
	<i>S. prionoapterus</i> B. L. Rob. e Greenm.	39		<i>S. pterophorus</i> DC.	7
	<i>S. pseud aureus</i> Rydb.	41			
	<i>S. selloi</i> (Spreng) DC.	3,4			
	<i>S. streptanthifolios</i> Greene	41			
	<i>S. uspallatensis</i> Hook et Arn.	44			
N-óxido de Retrosina (Isatidina)	<i>S. othonnaeflorus</i> DC.	43	N-óxido de Seneciofilina	<i>S. crassiflorus</i> (Poir.) DC.	45
				<i>S. persoonii</i> De Not.	27
 <p>Ridelina</p>	<i>S. cisplatinus</i> Cabrera	4	 <p>Z-Senecionina</p>	<i>S. argunensis</i> Turcz.	26
	<i>S. oxiphyllus</i> DC.	4		<i>S. bonariensis</i> Hook. et Arn.	37,40
				<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less.	4,10,15
 <p>Rosmarinina</p>	<i>S. cisplatinus</i> Cabrera	3	<i>S. cisplatinus</i> Cabrera	45	
	<i>S. oxiphyllus</i> DC.	41	<i>S. cymbalorioides</i> Nutt.	8	
			<i>S. erraticus</i> Bertol.	16	
			<i>S. erucifolius</i> L.	28	
			<i>S. gallicus</i> Vill.	42	
			<i>S. gilliesianus</i> Hieron.	32	
		<i>S. glabellus</i> Poir.	4		
		<i>S. heterotrichus</i> DC.	38		
		<i>S. jacalensis</i> Geenm.	16,24,33		
		<i>S. jacobaea</i> L.	29		
		<i>S. laricifolius</i> H.B.K.	4		
		<i>S. leptolobus</i> DC.	32		
		<i>S. longilobus</i> Benth.	39		
		<i>S. madrensis</i> A. Gray	34		
		<i>S. malacitanus</i> L.	8		
		<i>S. microphyllus</i> Phil.	29		
		<i>S. multivenius</i> Benth. in Oerst.	30		
		<i>S. nemorensis</i> L.	37		
		<i>S. oleosus</i> Vell.	8		
		<i>S. patagonicus</i> Phil.	39		
		<i>S. prionoapterus</i> B. L. Rob. e Greenm.	41		
		<i>S. pseud aureus</i> Rydb.	7		
		<i>S. pterophorus</i> DC.	3,4		
		<i>S. selloi</i> (Spreng) DC.	41		
		<i>S. streptanthifolios</i> Greene	41		
		<i>S. triangularis</i> Hook.	41		
N-óxido de Rosmarinina	<i>S. runcinatus</i> Less.	39			

**Tabela 1.** continuação

Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.	Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.
N-óxido de Senecionina	<i>S. crassiflorus</i> (Poir.) DC. <i>S. gallicus</i> Vill.	45 28	 E-Spartioidina	<i>S. pterophorus</i> DC.	7
 Senecivernina	<i>S. jacobaea</i> L. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. seloi</i> (Spreng) DC.	24 4 4	 E-Usaramina	<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less. <i>S. cisplatinus</i> Cabrera <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. malacitanus</i> L. <i>S. murorum</i> Remy. <i>S. oxiphyllus</i> DC. <i>S. seloi</i> (Spreng) DC.	4,10,15 4 4 34 8 4 4
 Senquirquina	<i>S. gallicus</i> Vill. <i>S. grandifolius</i> Less. <i>S. laricifolius</i> H.B.K. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. quebradensis</i> Grenm.	28 29 29 4 29	 Uspalatina	<i>S. patagonicus</i> Phil. <i>S. uspallatensis</i> Hook et Arn.	8 44

**Tabela 2.** Principais alcalóides pirrolizidínicos do tipo triangularina presentes em espécies do gênero *Senecio*

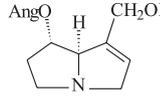
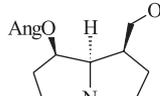
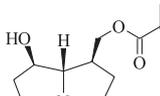
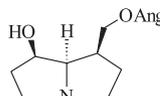
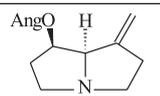
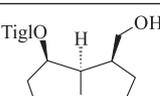
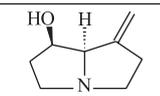
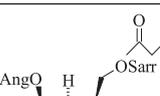
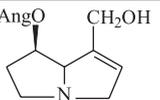
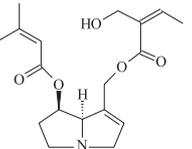
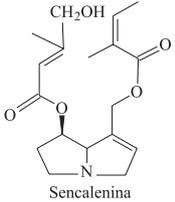
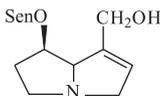
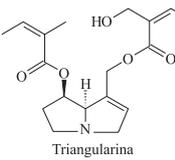
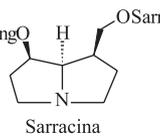
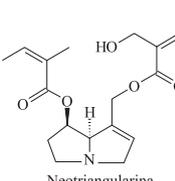
Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.	Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.
 7-Angelil-eliotridina	<i>S. elodes</i> Boiss. ex DC.	34	 7-Angelil-platinecina	<i>S. chrysocoma</i> Meerb. <i>S. racemosus</i> (Bieb.) DC.	49 50
 9-Angelil-hastancina	<i>S. aquaticus</i> Hill.	25	 9-Angelil-platinecina	<i>S. chrysocoma</i> Meerb. <i>S. konzatti</i> Greenm.	49 47
 7β-Angelil-1-metileno 8α-pirrolizidina	<i>S. chrysocoma</i> Meerb. <i>S. doratophyllus</i> Benth.	46 47	 7-Tigilil-platinecina	<i>S. konzatti</i> Greenm.	47
 7-Hidroxi-1-metileno pirrolizidina	<i>S. schweinfurthii</i> O. Hoffm.	48	 Racemodina	<i>S. racemosus</i> (Bieb.) DC.	50

Tabela 2. continuação

Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.	Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref.
 7-Angelil-retronecina	<i>S. inornatus</i> DC.	51	 Neosarracina	<i>S. chrysocoma</i> Meerb. <i>S. conzatti</i> Greenm. <i>S. doratophyllus</i> Benth. <i>S. kaschkarovii</i> C. Winke.	49 47 47 52
 7-Senecioil-9-sarracinoil retronecina	<i>S. cacaliaster</i> Lam. <i>S. kaschkarovii</i> C. Winke	23 52	 Sencalenina	<i>S. cacaliaster</i> Lam.	23
 7-Senecioil-retronecina	<i>S. cacaliaster</i> Lam.	23	 Triangularina	<i>S. kaschkarovii</i> C. Winke.	52
 Sarracina	<i>S. chrysocoma</i> Meerb. <i>S. conzatti</i> Greenm. <i>S. doratophyllus</i> Benth.	49 47 47	 Neotriangularina	<i>S. kaschkarovii</i> C. Winke.	52
N-óxido de Sarracina	<i>S. deformis</i> Klatt.	47			

de plantas contendo APs, por animais de laboratório, levou ao desenvolvimento de câncer e, paralelamente, metabólitos de alguns APs mostraram atividade mutagênica *in vitro*<sup>56</sup>. No entanto, até o momento, não foi encontrada nenhuma correlação entre a exposição de humanos aos APs e o desenvolvimento de câncer. A análise de vários relatos da literatura sobre a exposição de seres humanos aos APs levou Parkash<sup>55</sup> e colaboradores à conclusão de que estes compostos não são carcinogênicos aos seres humanos; entretanto, a exposição a estas substâncias pode causar doenças veno-oclusivas e cirrose infantil, responsáveis por vários casos de óbito.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e à CAPES.

## REFERÊNCIAS

- Cabrera, A. L.; Klein, R. M. Em *Flora Ilustrada Catarinense*; Reitz, P. R., ed; Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, 1975.
- Matzenbacher, N. I.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 1998.
- Habermehl, G. G.; Martz, W.; Tokarnia, C. H.; Dobereiner, J.; Mendez, M. C.; *Toxicol* **1988**, *26*, 275.
- Krebs, H. C.; Carl, T.; Habermehl, G. G.; *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1227.
- Ilha, M. R. S.; Loretto, A. P.; Barros, S. S.; Barros, C. S. L.; *Pesq. Veter. Brasil* **2001**, *21*, 123.
- Fox, D. W.; Hart, M. C.; Bergeson, P. S.; Jarret, P. B.; Stillman, A. E.; Huxtable, R. J.; *J. Pediatr.* **1978**, *93*, 980.
- Liddell, J. R.; Logie, C. G.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1629.
- Villarroel, L. V.; Torres, R. G.; Urzúa, A.; Modak, B.; Henriquez, J.; Salgado, I.; *Rev. Latinamer. Quim.* **1997**, *25*, 109.
- García, V. M. N.; Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Rios, M. Y.; Zepeda, G.; Rojas, M. G.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, *87*, 85.
- Toma, W.; Trigo, J. R.; De Paula, A. C. B.; Brito, A. R. M. S.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *95*, 345.
- Bourdy, G.; Chavez de Michel, L. R.; Roca-Coulthard, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, *91*, 189.
- Mattocks, A. R.; Driver, H. E.; Barbour, R. H.; *Chem. Biol. Interact.* **1986**, *58*, 95.
- Jares, E. A.; Pomílio, A. B.; *J. High Resol. Chromat.* **1989**, *12*, 565.
- Mattocks, A. R.; apud *Biochem. Syst. Ecol.* **1989**, *30*, 981.
- Trigo, J. R.; Leal, I. R.; Matzenbacher, N. I.; Lewinsohn, T. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, *31*, 1011.
- Witte, L.; Ernst, L.; Adam, H.; Hartmann, T.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 559.
- Were, O.; Benn, M.; Munavu, R. M.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1595.
- Bohlmann, F.; Ziesche, J.; King, R. M.; Robinson, H.; *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2675.
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Haegi, L.; *Phytochemistry* **1990**, *29*, 509.
- Witte, L.; Ernst, L.; Wray, V.; Hartmann, T.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 1027.
- Benn, M.; Were, O.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3295.
- Susag, L.; Parvez, M.; Mathenge, S.; Benn, M. H.; *Phytochemistry* **2000**, *54*, 933.
- Roeder, E.; Wiedenfeld, H.; Kirstgen, R. B.; *Phytochemistry* **1984**, *23*, 1761.
- Macel, M.; Vrieling, K.; Klinkhamer, P. G. L.; *Phytochemistry* **2004**, *65*, 865.
- Christov, V. S.; Mikhova, B. P.; Evstatieva, L. N.; *Fitoterapia* **2002**, *73*, 171.
- Liu, K.; Roder, E.; *Phytochemistry* **1991**, *30*, 1303.
- Roeder, E.; Bourauel, T.; Kersten, R.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 1051.
- Urones, J. G.; Barcala, P. B.; Marcos, I. S.; Moro, R. F.; Esteban, M. L.; Rodriguez, A. F.; *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1507.
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; Jakupovic, J.; Grenz, M.; Castro, V.; King, R. M.; Robinson, H.; Vincent, L. P. D.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1151.
- Wiedenfeld, H.; Röder, E.; *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1083.
- Santos-Mello, R.; Deimling L. I.; Lauer Júnior, C. M.; Almeida, A.; *Mutat. Res.* **2002**, *516*, 23.
- Ray, A. C.; Williams, H. J.; Reagor, J. C.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2431.
- Vrieling, K.; Derridj, S.; *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1223.
- Suau, R.; Cabezedo, B.; Rico, R.; Nájera, F.; López-Romero, J. M.; García, A.I.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, *30*, 981.

35. Martz, W.; Habermehl, G. G.; *Planta Med.* **1986**, *52*, 503.
36. Noorwala, M.; Mohammad, F. V.; Ahmad, V. U.; Sener, B.; Ergun, F.; Deliorman, D.; *Fitoterapia* **2000**, *71*, 618.
37. Paiva, J. A.; Barata, L. E. S.; Trigo, J. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, *32*, 1219.
38. Romo de Vivar, A.; Pérez, A. L.; Vidales, P.; Nieto, D. A.; Villaseñor, J. L.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1996**, *24*, 175.
39. Pérez-Castorena, A. L.; Arciniegas, A.; Martinez, F.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, *28*, 279.
40. Tettamanzi, M. C.; Jares, E. A.; Pomilio, A. B.; *Fitoterapia* **1992**, *LXIII*, 551.
41. Bai, Y.; Benn, M.; Majak, W.; *Planta Med.* **1996**, *62*, 71.
42. Guidugli, F. H.; Pestchanker, M. J.; De Salmeron, M. S. A.; Giordano, O. S.; *Phytochemistry* **1986**, *25*, 1923.
43. Zdero, C.; Bohlmann, F.; Liddell, J. R.; *Phytochemistry* **1989**, *28*, 3532.
44. Pestchanker, M. J.; Ascheri, M. S.; Giordano, O. S.; *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1622.
45. Tettamanzi, M. C.; Jares, E. A.; Iannone, L. M.; Pomilio, A. B.; *Fitoterapia* **1994**, *LXV*, 468.
46. Liddell, J. R.; Logie, C. G.; *Phytochemistry* **1993**, *34*, 1198.
47. Pérez-Castorena, A. L.; Arciniegas, A.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, *27*, 835.
48. Benn, M. H.; Mathenge, S.; Munavu, R. M.; Were, S. O.; *Phytochemistry* **1995**, *40*, 1327.
49. Grue, M. R.; Liddell, J. R.; *Phytochemistry* **1993**, *33*, 1517.
50. Ahmed, W.; Khan, A. Q.; Malik, A.; Ergun, F.; Sener, B.; *Phytochemistry* **1993**, *32*, 224.
51. Wiedenfeld, H.; Roeder, E.; Luck, W.; *Planta Med.* **1996**, *62*, 483.
52. Cheng, D. L.; Niu, J. K.; Roeder, E.; *Phytochemistry* **1992**, *31*, 3671.
53. Bohlmann, F.; Zdero, C.; Jakupovic, J.; Misra, L. N.; Banerjee, S.; Singh, P.; Baruah, R. N.; Metwally, M. A.; Hirschmann, G. S.; Vincent, L. P. D.; King, R. M.; Robinson, H.; *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1249.
54. Huan, J. Y.; Miranda, C. L.; Buhler, D. R.; Cheeke, P. R.; *Toxicol. Lett.* **1998**, *99*, 127.
55. Parkash, A. S.; Pereira, T. N.; Reilly, P. E. B.; Seawright, A. A.; *Mutat. Res.* **1999**, *443*, 53.
56. Chojkier, M.; *J. Hepatol.* **2003**, *39*, 437.



## Espécies de *Senecio* na Medicina Popular da América Latina e Toxicidade Relacionada a sua Utilização

Aline A. BOLZAN, Chana M. SILVA, Leandro N. FRANCESCATO, Anelise L. MURARI,  
Glória N.S. SILVA, Clarissa G. HELDWEIN & Berta HEINZMANN \*

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde,  
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM),  
Faixa de Camobi, Km 9, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil

**RESUMO.** Este trabalho apresenta uma revisão sobre as espécies de *Senecio* utilizadas na medicina popular na América Latina. São citadas 46 plantas, com as indicações de uso e o respectivo país. Também são apresentados os aspectos envolvidos na toxicidade destas espécies, de responsabilidade dos alcalóides pirrolizidínicos. São relatados os casos de intoxicação em humanos, sendo discutidas estratégias para preveni-las.

**SUMMARY.** "Senecio Species used as Medicinal in Latin America and Toxicity Associated to their Utilization". This work shows a review of the *Senecio* species used in the folk medicine of Latin America. 46 plants are mentioned with their medicinal uses and their corresponding countries. The aspects involved in the toxicity of these plants caused by the presence of pyrrolizidine alkaloids, are also presented. Cases of human toxicity are reported, and strategies to avoid them are discussed.

O gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*, *Asteraceae*) é constituído por mais de 3000 espécies de ampla distribuição mundial <sup>1</sup> presentes em regiões frias e tropicais, principalmente na Europa, África, Américas Central e do Sul, sendo a Argentina <sup>2</sup> e o Chile <sup>3</sup> os países com o maior número de representantes, contando cada um com mais de 300 espécies catalogadas. São ervas anuais ou perenes, ocorrendo sob a forma de arbustos ou arvoretas de porte variado <sup>4</sup>.

Tradicionalmente conhecido por causar intoxicações em animais de grande porte e acarretar perdas consideráveis na pecuária de países como a Argentina, Brasil, Uruguai e Paraguai, entre outros <sup>5-7</sup>, devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos, o gênero *Senecio* também é motivo de preocupação na área de saúde pública, uma vez que várias espécies do gênero são utilizadas como medicinais em diferentes países da América Latina (Tabela 1).

A utilização destas plantas na medicina popular permite supor que, além de substâncias potencialmente nocivas, estas espécies contenham

constituintes com propriedades terapêuticas. De fato, segundo a literatura, alguns metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas potenciais foram isolados de espécies de *Senecio* <sup>8-10</sup>, sendo que várias atividades biológicas e farmacológicas foram descritas para extratos brutos obtidos a partir de plantas do gênero <sup>11-14</sup>.

Os alcalóides pirrolizidínicos formam uma classe de metabólitos bastante presente em espécies de *Senecio* <sup>15</sup> e, segundo Trigo *et al.* <sup>16</sup>, podem ser utilizados como marcadores químicos-sistemáticos para a tribo *Senecioneae*. Em recente revisão sobre os alcalóides pirrolizidínicos em espécies de *Senecio* é relatada a presença de 62 diferentes estruturas desta classe de constituintes no gênero <sup>15</sup>. No entanto, embora sejam considerados metabólitos secundários característicos do gênero *Senecio*, os alcalóides pirrolizidínicos não estão presentes em todas as espécies e também têm sido relatados em outros gêneros, como *Symphytum*, *Crotalaria* e *Heliotropium* <sup>17-19</sup>. Além disso, a presença destes consti-

**PALAVRAS CHAVE:** América Latina, Alcalóides pirrolizidínicos, *Senecio* sp., Seneciose, Toxicidade.

**KEY WORDS:** Latin America, Pyrrolizidine alkaloids, Seneciosis, *Senecio* sp., Toxicity.

\* Autor para o qual a correspondência deverá ser enviada. E-mail: berta@smail.ufsm.br

País	Espécie	Utilização preconizada na medicina popular
<b>Argentina</b>	<i>S. bonariensis</i> Hook. et Arn.	Afecções cutâneas <sup>48</sup> Doenças dermatológicas, respiratórias e osteoarticulares <sup>49</sup>
	<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less.	Sudorífero, tranqüilizante e tonificante nervoso <sup>50</sup>
	<i>S. clivicola</i> Wedd.	Cãibras musculares <sup>51</sup>
	<i>S. eriophyton</i> Remy	Digestivo, emenagogo, estimulante e afrodisíaco <sup>13</sup>
	<i>S. graveolens</i> Wedd.	Nos casos de indisposição causada pela altitude, supressor da tosse, digestivo, emenagogo <sup>2</sup>
	<i>S. nutans</i> Sch. Bip.	Doenças respiratórias <sup>49</sup>
	<i>S. pinnatus</i> Poir. var. <i>pinnatus</i> <i>S. uspallatensis</i> Hook. et Arn.	Como antioidídico e nos casos de dores de cabeça <sup>52</sup> Indisposição causada pela altitude, na forma de infusão substituindo o mate <sup>41</sup>
<b>Bolívia</b>	<i>S. cf. canescens</i> (Bonpl.) Cuatrec.	Tosse <sup>53</sup>
	<i>S. culcitoides</i> Wedd.	Não especificado <sup>54</sup>
	<i>S. deferens</i> Griseb.	Dores reumáticas <sup>55</sup>
	<i>S. graveolens</i> Wedd.	Dor de estômago <sup>53</sup>
	<i>S. matthewsii</i> Wedd.	Doenças pulmonares <sup>54</sup>
	<i>S. rhizomatus</i> Rusby <i>S. smithioides</i> Cabrera	Não especificado <sup>54</sup> Dores nas costas <sup>53</sup>
<b>Brasil</b>	<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less.	Externamente como emoliente e “resolutiva”, e internamente, como vermífugo <sup>56</sup> Ferimentos da pele (aplicação tópica) <sup>57</sup> Propriedades revulsivas <sup>48</sup> Processos inflamatórios, dores estomacais e como “regulador sanguíneo” <sup>42</sup>
	<i>S. sonchifolius</i> (L.) Moench	Febrífugo, diurético, antiasmático; contra gripe, faringite, amigdalite e afecções das vias urinárias; nos casos de ferimentos, eczemas e pruridos (aplicação tópica) <sup>58</sup>
<b>Chile</b>	<i>S. adenophyllus</i> Meyen et Walp.	Dor de estômago <sup>59</sup>
	<i>S. atacamensis</i> Phil.	Para aliviar a indisposição causada pela altitude <sup>60</sup> No tratamento de dor de cabeça, dor de estômago e vômito, nos casos de indisposição causada pela altitude, como estimulante da digestão <sup>59</sup>
	<i>S. chionophilus</i> Phil.	Resfriados <sup>9</sup>
	<i>S. eriophyton</i> Remy	Balsâmico, estimulante, estomáquico e nos casos de indisposição causada pela altitude <sup>59</sup>
	<i>S. fistulosus</i> Poepp. ex Less.	Emoliente, purgativo, cardiotônico, diurético, tratamento de tumores, feridas, úlceras e dores de ouvido <sup>61</sup>
	<i>S. graveolens</i> Wedd.	Para aliviar a indisposição causada pela altitude <sup>2,62</sup> Emenagogo, digestivo e supressor da tosse <sup>2</sup>
	<i>S. nutans</i> Sch. Bip.	Digestivo, emagrecedor, para tosse e resfriado; “para a pressão” e nos casos de dores estomacais <sup>59</sup>
	<i>S. otites</i> Kunza ex DC	Auxiliar da circulação <sup>61</sup>
	<i>S. papii</i> Ricardo et Martic.	Dor no estômago <sup>59</sup>
	<i>S. puchii</i> Phil.	Dor de estômago e “para a pressão” <sup>59</sup>
<b>Colombia</b>	<i>S. formosus</i> Kunth	Não especificado <sup>63</sup>
<b>Equador</b>	<i>S. canescens</i> Humb.	Infecções e reumatismo <sup>64</sup>
	<i>S. reflexus</i> (Kunth) Cuatrec.	Inflamações de ovário, próstata e vaginite <sup>65</sup>
	<i>S. superandinus</i> Cuatrec.	Inflamações de ovário, próstata e vaginite <sup>65</sup>
<b>Guatemala</b>	<i>S. cobanensis</i> Coulter.	Reumatismo, contusões, tosse e cãibras <sup>66</sup>
<b>Honduras</b>	<i>S. chenopodioides</i> HBK.	Dores agudas e crônicas <sup>67</sup>
<b>México</b>	<i>Senecio</i> sp.	Contra piolhos e no tratamento do couro cabeludo ressecado <sup>68</sup>
	<i>S. albo-lutescens</i> Sch. Bip.	Hipoglicemiante <sup>69,70</sup>
	<i>S. angulifolius</i> DC.	Infecções vaginais <sup>71</sup>
	<i>S. aschenbornianus</i> Schauer	Varizes <sup>68</sup>

	<i>S. bellidifolius</i> Kunth. (sin. <i>S. vulneraria</i> DC.)	Doenças renais, ulcerações e vaginites <sup>72</sup>
	<i>S. candidissimus</i> Greene	Doenças renais e como anti-séptico <sup>73</sup>
	<i>S. palmeri</i> A. Gray	Hipoglicemiante <sup>69,70</sup>
	<i>S. peltiferus</i> Hemsl.	Hipoglicemiante <sup>69,70</sup>
	<i>S. roseus</i> Sch-Bip.	Para "limpar os rins" e abrir o apetite <sup>74</sup>
	<i>S. salignus</i> DC.	Febres e reumatismo <sup>75</sup> Anti-inflamatório, na prevenção do reumatismo, enxaquecas, nos casos de doenças hepáticas e renais <sup>76</sup>
<b>Paraguai</b>	<i>S. grisebachii</i> Baker	Infecções fúngicas da pele <sup>14</sup>
<b>Peru</b>	<i>S. calvus</i> Cuatr.	Tosse <sup>77</sup>
	<i>S. canescens</i> var. <i>canescens</i>	Tosse, bronquite, asma e febre <sup>78</sup>
	<i>S. culcitoides</i> Schultz-Bip	Tosse, asma, bronquite e doenças respiratórias <sup>78,79</sup>
	<i>S. elatus</i> Kunth	Em "rituais de purificação" <sup>44</sup>
	<i>S. ericaefolius</i> Benth	Tônico geral e cardiotônico <sup>44</sup>
	<i>S. rhizomatosus</i> Rusby	Depurativo da pele e colerético, no tratamento de feridas e pneumonia <sup>78</sup>
	<i>S. rudbeckiifolius</i> Meyen & Walp	"Febre intestinal", diarreia e disenteria, hematomas e dores musculares <sup>80</sup>
	<i>S. serratifolius</i> (Meyen et Walp.) Cuatrec.	Peitoral, no tratamento de asma e outras afecções <sup>81</sup>
	<i>S. tephrosioides</i> Turcz	Tosse e bronquite <sup>78</sup> Afecções respiratórias <sup>82</sup>
	<i>S. violaefolius</i> Cabrera	Tosse, asma e doenças respiratórias <sup>79</sup>

**Tabela 1.** Principais espécies de *Senecio* utilizadas na medicina popular na América Latina e indicações de usos.

tuintes tóxicos em uma espécie pode variar de acordo com as condições sazonais <sup>5</sup>, como também ser dependente das agressões por patógenos e/ou herbívoros que esta planta venha a sofrer, uma vez que sua produção e concentração pode aumentar nos tecidos da planta em resposta à agressões externas e estresse sofridos <sup>20</sup>.

Os alcalóides pirrolizidínicos foram isolados pela primeira vez em 1885 por Gradsal & La-soux <sup>21</sup> e a seneciose, doença ocasionada por estes compostos, foi descrita primeiramente na África do Sul <sup>22</sup>. São ésteres de aminoálcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos) que podem ocorrer na forma de mono, di e diésteres cíclicos <sup>15</sup>.

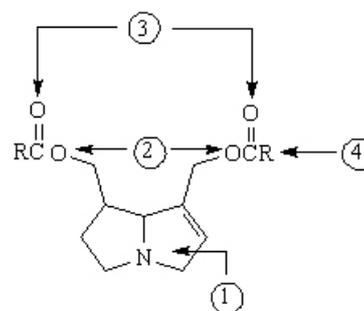
A doença veno-oclusiva hepática é a manifestação mais freqüente resultante da intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos em humanos <sup>18</sup>. A evidência de que os alcalóides pirrolizidínicos são os agentes tóxicos responsáveis pela doença, provém de numerosos estudos em animais, nos quais o consumo crônico de alcalóides pirrolizidínicos purificados causou as clássicas alterações patológicas associadas a ela <sup>19</sup>.

As relações entre a estrutura e a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos já foi elucidada, sendo a hepatotoxicidade maior no caso dos diésteres macrocíclicos <sup>23</sup>.

Segundo Prakash *et al.* <sup>18</sup>, o potencial hepa-

totóxico dos alcalóides pirrolizidínicos é determinado por quatro características estruturais mínimas (Fig. 1): um anel 3-pirrolina (1), um ou dois grupamentos hidroxila ligados ao anel pirrolina (2), um ou dois grupamentos esterificados (3) e a presença de uma cadeia ramificada no resíduo ácido(4).

A ativação da toxicidade requer a desidrogenação dos alcalóides pirrolizidínicos, catalisada pelas monoxigenases do citocromo P450 <sup>24</sup>, originando de-hidropirrolizidinas, que são considerados os metabólitos tóxicos primários <sup>18</sup>. Estas tem caráter eletrofílico e reagem com componentes teciduais nucleofílicos, como ácidos nucleicos e proteínas <sup>15,25</sup>, através de uma adição



**Figura 1.** Características estruturais essenciais para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos <sup>18,31</sup>. Os números correspondem aos itens listados no texto.

de Michael. As de-hidropirrolizidinas também podem sofrer hidrólise, com a formação dos álcoois correspondentes, que são considerados os metabólitos tóxicos secundários e que apresentam uma meia-vida maior que os primeiros, conseqüência de sua menor reatividade (Fig. 2).

Uma vez que o fígado é o órgão responsável pelo metabolismo de xenobióticos, entre eles os alcalóides pirrolizidínicos, ele é o primeiro alvo da patologia relacionada a estes compostos.

Os metabólitos tóxicos primários de muitos alcalóides pirrolizidínicos são suficientemente estáveis e migram do hepatócito para o lumen sinusoidal <sup>26</sup>, onde atacam as células endoteliais de revestimento e também podem se ligar às hemácias da circulação sanguínea. Os efeitos relativos imediatos dos metabólitos tóxicos primários são considerados os responsáveis pela lesão dos hepatócitos e das células endoteliais associadas aos vasos sinusoidais e às paredes das veias hepáticas de pequeno calibre, levando à doença veno-oclusiva hepática. As manifestações clínicas em humanos incluem dor epigástrica, distensão abdominal devido à ascite, hepatomegalia e elevação dos níveis séricos da transaminase <sup>27,28</sup>.

Metabólitos de estrutura pirrólica com uma meia-vida especialmente longa também podem chegar aos pulmões e ao coração, onde causam lesões às macromoléculas destes órgãos. As mudanças iniciais aparecem na vascularização pulmonar, incluindo trombos em vasos, inflamação aguda e espessamento da parede, levando à oclusão. Estes efeitos, juntamente com a fibrose do septo intra-alveolar levam à hipertensão pulmonar. O resultado do fluxo sanguíneo pulmonar comprometido é o aumento do trabalho do ventrículo direito, causando a sua hipertrofia e,

eventualmente, levando à insuficiência cardíaca congestiva <sup>18</sup>.

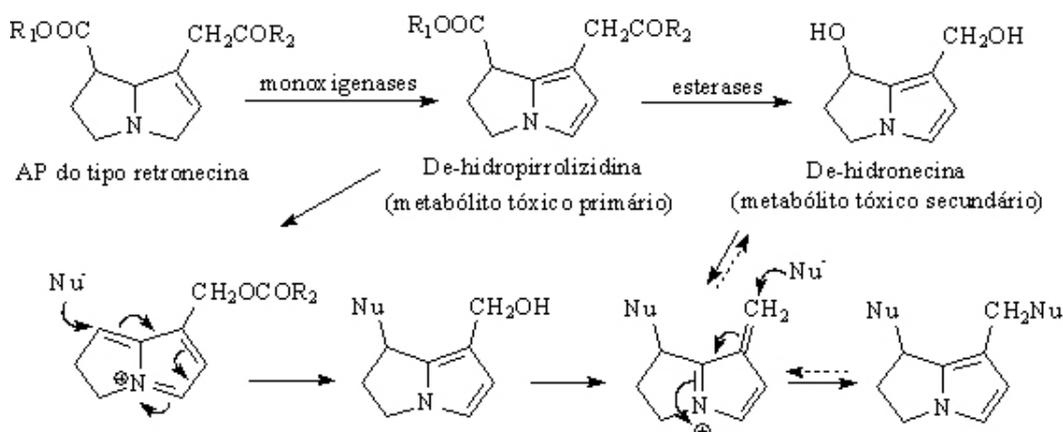
Um dos aspectos relevantes relacionados à intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos, é o aumento da sua toxicidade, provocado por substâncias indutoras de enzimas do citocromo P450, como por exemplo o fenobarbital <sup>29</sup>. Também foi constatado que dietas pobres em proteínas aumentam os efeitos tóxicos dos alcalóides pirrolizidínicos <sup>30</sup>. Por outro lado, a formação de metabólitos tóxicos é atenuada pela administração concomitante de aminoácidos contendo enxofre, como metionina e cisteína <sup>23</sup>.

Quanto à carcinogenicidade dos alcalóides pirrolizidínicos para seres humanos, não há consenso na literatura. Para Prakash *et al.* <sup>18</sup> existem indícios de que os hepatócitos humanos sejam resistentes à ação potencialmente genotóxica dos alcalóides pirrolizidínicos nas doses em que estes podem causar lesões nos animais. No entanto, Hänsel *et al.* <sup>31</sup> citam a ocorrência endêmica de câncer hepático entre os bantos na África, em decorrência do consumo de plantas medicinais contendo esta classe de constituintes.

A literatura também traz evidências da ação teratogênica dos alcalóides pirrolizidínicos em seres humanos, uma vez que relata um caso de doença veno-oclusiva em recém-nascido cuja mãe consumia chá de uma planta contendo estes compostos <sup>32</sup>.

Alguns casos de intoxicações fatais em seres humanos foram relatados na literatura devido ao consumo de espécies de *Senecio* contendo alcalóides pirrolizidínicos <sup>33,34</sup>. Também foram encontrados vários casos de doença veno-oclusiva hepática, relacionados ao consumo de espécies de *Senecio*, que não levaram ao óbito <sup>35-38</sup>.

A doença veno-oclusiva hepática foi endêmi-



**Figura 2.** Rota metabólica responsável pela toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos <sup>18,31</sup>. (AP = alcalóide pirrolizidínico; Nu = compostos nucleofílicos).

ca em regiões da América do Sul durante parte do século passado <sup>39</sup>, mas os casos tem diminuído com a melhoria na educação e a identificação adequada das espécies vegetais. No entanto, casos esporádicos ainda são relatados <sup>18</sup>.

Com a ocorrência de intoxicações agudas por alcalóides pirrolizidínicos em humanos, estima-se que cerca de 20% dos indivíduos cheguem ao óbito e que cerca de 50% recuperem-se completamente dentro de poucas semanas. Dos indivíduos restantes, cerca de 20% parecem estar clinicamente recuperados, mas podem desenvolver doença veno-oclusiva hepática crônica e cirrose após alguns anos. Outros desenvolvem doença veno-oclusiva sub-aguda, que pode regredir ou progredir, levando inclusive à cirrose <sup>18,27</sup>.

Para seis das quarenta e seis espécies de *Senecio* citadas na Tabela 1 já foi descrita a presença de alcalóides pirrolizidínicos: *Senecio bonariensis* <sup>40</sup>, *S. uspallatensis* <sup>41</sup>, *S. brasiliensis* <sup>42</sup>, *S. grisebacchi* <sup>43</sup>, *S. elatus* <sup>44</sup> e *S. tephrosioides* <sup>19</sup>. Para duas destas espécies, *S. brasiliensis* e *S. tephrosioides*, existem relatos de doença veno-oclusiva hepática em humanos. No caso de *Senecio brasiliensis* é relatado um caso da doença em paciente de 2 anos e 5 meses de idade, causada pelo uso crônico de chás das folhas desta espécie na profilaxia da gripe <sup>28</sup>. Já para *Senecio tephrosioides*, é relatada a doença em uma mulher de 38 anos de idade, provocada pelo consumo ocasional das folhas desta espécie em infusão, durante alguns anos, no tratamento da tosse <sup>19</sup>.

Os casos de doença veno-oclusiva hepática associados à ingestão de plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos forneceram evidências de que doenças subjacentes, estado nutricional do paciente e o uso concomitante de fármacos hepatotóxicos aumentam a probabilidade do desenvolvimento desta patologia <sup>23</sup>.

Como o acesso às plantas medicinais é irrisório e barato, e uma vez que a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos está bem documentada, estes compostos caracterizam um sério risco à saúde de populações humanas, que são expostas a intoxicações quando plantas que os contêm são consumidas por via oral. Esta constatação levou diferentes países, entre eles o Canadá, a Alemanha, os Estados Unidos, a Grã-Bretanha e o Brasil, a restringirem o uso do confrei (*Symphytum officinale* L.), outra espécie medicinal contendo alcalóides pirrolizidínicos <sup>23,45,46</sup>.

A literatura relata que, entre outros fatores, a via de administração pode afetar enormemente a resposta à toxicidade <sup>23</sup>. Desta forma, o uso externo destas plantas é bem mais seguro que seu uso interno; no entanto, a absorção de alcalóides pirrolizidínicos pela pele pode ocorrer, principalmente se esta estiver lesionada ou inflamada <sup>47</sup>, podendo representar um risco para a saúde, ainda mais se o uso for prolongado e/ou a quantidade utilizada for significativa.

Através da análise das 46 espécies de *Senecio* utilizadas como medicinais na América Latina (Tabela 1), foi constatado que apenas 5 são preconizadas exclusivamente para uso externo enquanto que, para outras 9, são citados os usos interno e externo.

Devido aos efeitos nocivos potenciais de plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos, entre elas as espécies de *Senecio*, é necessária a atenção dos órgãos de vigilância sanitária dos diferentes países, visando proibir a utilização destas plantas para uso interno. Também se faz necessário um trabalho continuado de divulgação das informações pertinentes junto aos profissionais da saúde, líderes de comunidades e à população em geral, com o objetivo de prevenir novos casos de intoxicação.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Matzenbacher, N.I. (1998) "O Complexo "Senecionioide" (Asteraceae - Senecionae) no Rio Grande do Sul Brasil". Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Botânica, UFRGS, Tese.
2. Pérez, C., A.M. Agnese & J.L. Cabrera (1999) *J. Ethnopharmacol.* **66**: 91-6.
3. Urzúa, A. & L. Andrade (2001) *Biochem. Syst. Ecol.* **29**: 865-7.
4. Cabrera, A.L. & R.M. Klein (1975) "Compostas" em "Flora Ilustrada Catarinense" (P.R., Reitz), Herbário Barbosa Rodrigues, Itajaí, pág. 136.
5. Habermehl, G.G., W. Martz, C.H. Tokarnia, J. Döbereiner & M.C. Mendez (1988) *Toxicon* **26**: 275-86.
6. Krebs, H.C., T. Carl & G.G. Habermehl (1996) *Phytochemistry* **43**: 1227-9
7. Ilha, M.R.S., A.P. Loretti, S.S. Barros & C.S.L. Barros (2001) *Pesq. Veter. Brasil.* **21**: 123-38.
8. Loyola, L.A., S. Pedreros & G. Morales (1985) *Phytochemistry* **24**: 1600-2.
9. Gu, J.Q., Y. Wang, S.G. Franzblau, G. Montenegro & B.N. Timmermann (2004) *J. Nat. Prod.* **67**: 1483-7.

10. Reina, M., M. Nold, O. Santana, J.C. Orihuela & A. González-Coloma (2002) *J. Nat. Prod.* **65**: 448-53.
11. Pascual-Villalobos, M.J. & A. Robledo (1999) *Biochem. Syst. Ecol.* **27**: 1-10.
12. Liu, F. & T.B. Ng (2000) *Life Sci.* **66**: 725-35.
13. Hnatyszyn, O., V. Moscatelli, J. Garcia, R. Rondina, M. Costa, C. Arranz, A. Balaszczuk, G. erraro & J.D. Coussio (2003) *Phytomedicine* **10**: 669-74.
14. Portillo, A., R. Vila, B. Freixa, T. Adzet & S. Cañigueral (2001) *J. Ethnopharmacol.* **76**: 93-8.
15. Silva, C.M., A.A. Bolzan & B.M. Heinzmann (2006) *Quím. Nova* **29**: 1047-53.
16. Trigo, J.R., I.R. Leal, N.I. Matzenbacher & T.M. Lewinsohn (2003) *Biochem. Syst. Ecol.* **31**: 1011-22.
17. Smith, L.W. & C.C.J. Culvenor (1981) *J. Nat. Prod.* **44**: 129-52.
18. Prakash, A.S., T.N. Pereira, P.E.B. Reilly & A.A. Seawright (1999) *Mutat. Res.* **443**: 53-67.
19. Tomioka, M., F. Calvo, A. Siguas, L. Sánchez, E. Nava, U. García, M. Valdivia & E. Reátegui (1995) *Rev. Gastroenterol. Peru* **15**: 299-302.
20. Gera Hol, W.H., M. Macel, J.A. Van Veen & E. Van Der Meijden (2004) *Basic Appl. Ecol.* **5**: 253-60.
21. Romero, A., P. Zeinsteger, P. Teibler, M. Montenegro, R.R. De Torrent, E. Rios & O.A. De Pérez (2001-2002) *Rev. Vet.* **12/13**: 15-8.
22. Wilmont, F.C. & G.W. Robertson (1920) *Lancet* **1**: 48-9.
23. Rode, D. (2002) *Trends Pharmacol. Sci.* **23**: 497-9.
24. Castagnoli Jr. N., J.M. Rimoldi, J. Bloomquist & K.P. Castagnoli (1997) *Chem. Res. Toxicol.* **10**: 924-40.
25. Grasse, L.D., M.W. Lamé & H.J. Segall (1985) *Toxicol. Letters* **29**: 43-9.
26. Mattocks, A.R. & R. Jukes (1990) *Chem- Biol. Interac.* **76**: 19-30.
27. Larrey, D. (1994) *Presse Med.* **23**: 691-3.
28. Magnabosco, E.M., M.L. Rivera, I.R. Prolla, Y.M. De Verney & E.S. De Mello (1997) *J. Pediatr.* **73**: 115-8.
29. Stickel, F., E. Patsenker & D. Schuppan (2005) *J. Hepatol.* **43**: 901-10.
30. Schoental, R. (1968) *Cancer Res.* **28**: 2237-46.
31. Hänsel, R., O. Sticher & E. Steinegger (1999) *"Pharmakognosie- Phytopharmazie"*. 6 Aufl. Berlin, Springer, págs. 960-4.
32. Roulet, M., R. Laurini, L. Rivier & A. Calame (1988) *J. Pediatr.* **112**: 433-6.
33. Fox, D.W., M.C. Hart, P.S. Bergeson, P.B. Jarrett, A.E. Stillman & R.J. Huxtable (1978) *J. Pediatr.* **93**: 980-2.
34. Liddell, J.R. & Logie, C.G. (1993) *Phytochem.* **34**: 1629-31.
35. González, G.T., E. Rojas Villamil & G. Arango Uribe (1997) *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exact. Fís. Nats.* **21**: 35-56.
36. Stillman, A.S., R. Huxtable, P. Consroe, P. Kohnen & S. Smith (1977) *Gastroenterol.* **73**: 349-52.
37. Ortiz, C.A., E.C. Valades, P.M. Blanco, J.S. Santamaría, J.M.G. Campillejo & T.R. Tellez (1995) *Gastroenterol. Hepatol.* **18**: 413-6.
38. Ridker, P.M., S. Ohkuma, W.V. McDermott, C. Trey & R.J. Huxtable (1985) *Gastroenterol.* **88**: 1050-4.
39. Brás, G., D.B. Jelliffe & K.L. Stuart (1954) *Arch. Pathol.* **57**: 285-300.
40. Paiva, J.A., L.E.S. Barata & J.R. Trigo (2004) *Biochem. Syst. Ecol.* **32**: 1219-22.
41. Pestchanker, M.J., M.S. Ascheri & O.S. Giordano (1985) *Phytochem.* **24**: 1622-4.
42. Toma, W., J.R. Trigo, A.C.B. De Paula & A.R.M.S. Brito (2004) *J. Ethnopharmacol.* **95**: 345-51.
43. Hirschmann, G.S. & C. Céspedes (1986) *J. Ethnopharmacol.* **17**: 195-6.
44. De Feo, V. (2003) *J. Ethnopharmacol.* **85**: 243-256.
45. Brasil (1992) Ministério da Saúde, Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria SNVS nº 19 de 30.1.1992, Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno. In: "Boletim do Sobravime", Vol. 5, pág. 2, nov./dez. 1991 e jan. 1992.
46. Rates, S.M.K. (2001) *Toxicol.* **39**: 603-13.
47. Chojkier, M. (2003) *J. Hepatol.* **39**: 437-46.
48. Zeinsteger, P., A. Romero, P. Teibler, M. Montenegro, E. Rios, E.M. Ciotti, O. Acosta De Perez & N. Jorge (2003) *Rev. Invest. Agropec.* **32**: 125-36.
49. Martinez, M.R. & M.L. Pochettino (2004) *Zonas Áridas* **8**: 19-32.
50. Manfred, L. (1947) *"Siete mil recetas botánicas a base de mil trescientas plantas medicinales"* Editora Kier, Buenos Aires, Vol. 1, pág. 697.
51. Hilgert, N.I. (2001) *J. Ethnopharmacol.* **76**: 11-34.
52. Carrizo, E.V., M.O. Palácio & L.D. Roic (2002) *Dominguezia* **18**: 26-35.
53. Macía, M.J., E. García & P.J. Vidaurre (2005) *J. Ethnopharmacol.* **97**: 337-50.
54. Abdel-Malek, S., J.W. Bastien, W.F. Mahler, Q. Jia, M.G. Reinecke, W.E. Robinson Jr, Y. Shu & J. Zalles-Asin (1996) *J. Ethnopharmacol.* **50**: 157-66.
55. Bourdy, G., L.R. Chavez De Michel & A. Roca-Coulthard (2004) *J. Ethnopharmacol.* **91**: 189-208.
56. Coimbra, R. (1958) *"Notas de Fitoterapia: Catálogo dos dados principais sobre plantas utilizadas em Medicina e Farmácia"* (E.D. da Silva, rev.), L.C.S.A., Rio de Janeiro, 2 ed., pág. 349.

57. Visbiski, V.N., P.H. Weirich Neto & A.L. Santos (2003) *Publ. UEPG Ci. Exatas Terra* **9**: 13-20.
58. Lorenzi, H. & F.J. A. Matos (2002) "Plantas Mediciniais no Brasil Nativas e Exóticas", Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, pág. 161.
59. Villagrán, C., M. Romo & V. Castro (2003) *Chungara: Rev. Antropol. Chil.* **35**: 73-124.
60. Morales, G., P. Sierra, L.A. Loyola & J. Borquez (2000) *Bol. Soc. Chil. Quím.* **45**: 601-4.
61. Sánchez, M.R. (2001) "Folklore médico de Chile", Ediciones del Orfebre, Santiago, Vol. 1, pág. 24.
62. Loyola, L.A., S. Pedreros & G. Morales (1985) *Phytochemistry* **24**: 1600-2 .
63. Caro, S.A. (2004) *Lyonia* **7**(2): 89-104.
64. Abdo, S., M. De Bernardi, G. Marinoni, G. Mellerio, S. Samaniego, G. Vidari & P.V. Finzi (1992) *Phytochemistry* **31**: 3937-41.
65. Buitrón, X. (1999) "Ecuador: Uso y comercio de plantas medicinales, situación actual y aspectos importantes para su conservación", Anexo 1, TRAFFIC International, disponível em <http://www.traffic.org/ecuador/>.
66. Thillet, B. (2003) "Tierras municipales en Guatemala: un desafío para el desarrollo local sostenible" Editora FLACSO, Guatemala, pág. 296.
67. Lentz, D.L., A.M. Clark, C.D. Hufford, B. Meurer-Grimes, C.M. Passreiter, J. Cordero, O. Ibrahimy & A.L. Okunade (1998) *J. Ethnopharmacol.* **63**: 253-63.
68. Nava, R.F. & D.R. Zamora (2001) *Polibotánica* **12**: 1-40.
69. Andrade-Cetto, A. & M. Heinrich (2005) *J. Ethnopharmacol.* **99**: 325-348.
70. Hernandez-Galicia, E, A. Aguilar-Contreras, L. Aguilar-Santamaria, R. Roman-Ramos, A.A. Chavez-Miranda, L.M. Garcia-Vega, J.L. Flores-Saenz & F.J. Alarcon-Aguilar (2002) *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **45**: 118-24.
71. Navarro García, V.M., A. Gonzalez, M. Fuentes, M. Aviles, M.Y. Rios, G. Zepeda & M.G. Rojas (2003) *J. Ethnopharmacol.* **87**: 85-8.
72. Heinrich, M., M. Robles, J.E. West, B.R.O. Montellano & E. Rodriguez (1998) *Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**: 539-65.
73. Bah, M., R. Bye & R. Pereda-Miranda (1994) *J. Ethnopharmacol.* **43**: 19-30.
74. Pérez, L.C.N. & S.A. Reyes (2002) *Polibotánica* **14**: 67-84.
75. Usher, G. (1974) "A Dictionary of plants used by man", Tinling Press, Londres, pág. 534.
76. Domínguez, M., A. Nieto, J.C. Marin, A. Keck, E. Jeffery & C.L. Céspedes (2005) *J. Agric. Food Chem.* **53**: 5889-95.
77. Angeles, C.T., D.I. Fukusaki & P.M. Díaz (2001) "Pruebas fitoquímicas y biológicas de algunas especies de Senecio del Parque Nacional Huascarán (Ancash-Peru)" em "Anales Científicos UNALM" (H.V. Cadima, ed.), Editorial Agraria, Lima, nº 47, págs. 37-47. Disponível em: <http://tumi.lamolina.edu.pe/anales.htm>.
78. Hammond, G.B., I.D. Fernández, L.F. Villegas & A.J. Vaisberg (1998) *J. Ethnopharmacol.* **61**: 17-30.
79. Rojas, R., B. Bustamante, J. Bauer, I. Fernández, J. Albán & O. Lock (2003) *J. Ethnopharmacol.* **88**: 199-204.
80. López-Giraldo, J.D., C. Cárdenas, N.M. Chávez, I. Salcedo & Y. Torreblanca (2000) "An experience for learning Andean biodiversity contents included on the elementary school curriculum". Procedente do Simpósio Internacional "BioEd 2000: The Challenge of the Next Century", Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Paris, França. Disponível em: [http://www.iubs.org/cbe/cbe\\_paper\\_index.html](http://www.iubs.org/cbe/cbe_paper_index.html).
81. Rivera, P.E.B. (2004) *Boletín CSI (Lima)* **51**: 7-8.
82. Alzamora, L., L. Morales, L. Armas & G. Fernández (2001) *An. Fac. Med. (Lima)* **62**: 156-61.