

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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Conyza
bonariensis* (L.) Cronquist (ASTERACEAE)**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Miguel Antonio Correa Favila

Santa Maria, RS, Brasil

2006

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
***Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (ASTERACEAE)**

por

Miguel Antonio Correa Favila

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^a. Dra. Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel

Santa Maria, RS, Brasil

2006

**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

**ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO
DE *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (ASTERACEAE)**

elaborado por
Miguel Antonio Correa Favila

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Solange Cristina da Silva Martins Hoelzel (UNIFRA)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Ademir Farias Morel (UFSM)

Prof^a. Dr^a. Melânia Palermo Manfron (UFSM)

Santa Maria, 9 de junho de 2006.

“...AS PLANTAS SÃO PARA A SAÚDE DAS NAÇÕES.”

Apocalipse 22:2

Ao meu pai (in memoriam) e à minha mãe,

Com todo o meu carinho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por permitir culminar este trabalho e estar sempre ao meu lado.

Ao meu pai (*in memoriam*), pelo incansável incentivo; à minha mãe, pelo amor e apoio constante.

A professora Solange C. M. Hoelzel pela orientação e amizade com que conduziu a realização deste trabalho.

A professora Melânia P. Manfron pela co-orientação e amizade.

A professora Thaís S. do Canto Dorow e a Prof^a. Sônia Maria Eisinger, pela identificação botânica da espécie.

Ao Professor Jorge O. Cuéllar Noguera pelo voto de confiança.

As minhas irmãs e sobrinhos pelo apoio e estímulo.

Aos funcionários: Vera, Verinha, João e Elaide pelo coleguismo.

Ao bolsista de iniciação científica Rudinei da Silva Silveira pelo auxílio em todos os experimentos desse estudo, a minha colega Juliane Müller pela amizade e coleguismo, aos amigos Giovanni Pontes Simioni e Elis Regina Quartieri pelo auxílio nas inúmeras coletas.

O meu muito obrigado.

RESUMO

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

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (ASTERACEAE)

AUTOR: MIGUEL ANTONIO CORREA FAVILA

ORIENTADORA: SOLANGE CRISTINA DA SILVA MARTINS HOELZEL

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 9 de junho de 2006.

Conyza bonariensis (L.) é uma planta nativa da América do Sul, facilmente encontrada na região sul. É conhecida popularmente como buva ou margaridinha-do-campo. É utilizada na medicina popular para o reumatismo, gota, cistite, nefrites, dismenorréia, dor de dente, dor de cabeça. Os principais metabólitos secundários presentes na espécie *Conyza bonariensis* (L.) foram flavonóides, saponinas, ácidos orgânicos, cardiotônicos e fenóis. No óleo volátil da var. *bonariensis* identificou-se 2 componentes majoritários, o *cis*-lachnophyllum metil éster (78,69%) e matricaria metil éster (17,67%) presente nas raízes, e os compostos *cis*-lachnophyllum metil éster (44,31%) e o óxido de cariofileno (22,0%) presente nas folhas. Na variedade *microcephala*, o composto majoritário encontrado na raiz foi o *cis*-lachnophyllum metil éster (88,87%), e nas folhas o *trans*-lachnophyllum metil éster (43,05%). Os óleos voláteis da var. *bonariensis* apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* *Saccharomyces cerevisiae*. A planta não demonstrou toxicidade aguda, por via oral, nas concentrações 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg em camundongos. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram boa atividade antioxidante pelo método DPPH e β -caroteno na concentração de 62,5 $\mu\text{g/ml}$. O extrato bruto e a fração butanólica expressaram maior atividade citotóxica com CL_{50} 27,35 $\mu\text{g/ml}$, bem como o óleo volátil das raízes da var. *bonariensis* CL_{50} 0,48 $\mu\text{g/ml}$ frente à *Artemia salina*. Pretendeu-se com o presente trabalho contribuir para os estudos da flora nativa do Rio Grande do Sul.

Palavras-chave: *Conyza bonariensis*, Atividade Antimicrobiana, Atividade Antioxidante, óleos voláteis.

ABSTRACT

Master Degree
Pos-graduation Program in Pharmaceutical Sciences
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brazil

Chemical and Biological Study of *Conyza bonariensis* (L.) Cronquist (ASTERACEAE)

AUTHOR: MIGUEL ANTONIO CORREA FAVILA

ADVISER: SOLANGE CRISTINA DA SILVA MARTINS HOELZEL

Date and Local of the Defense: Santa Maria, 9 of June in 2006.

Conyza bonariensis (L.) is a native plant of South America, easily found in the south area. It's popular name is buva or margaridinha-do-campo. This plant is very used in folk medicine for rheumatism, gout, cystitis, nephrite, dysmenorrhea, tooth pain, headache. The main secondary metabolites present in the species *Conyza bonariensis* (L.) were flavonoids, saponins, organics acids, cardyotonic and phenols. In the volatile oil of the var. *bonariensis* two major constituents were identified, the ester cis-lachnophyllum methyl (78,69%) and ester matricaria methyl (17,67%) present in the roots, and the components cis-lachnophyllum methyl ester (44,31%) and the caryophyllene oxide (22,0%) present in the leaves. In the var. *microcephala*, the major constituents found in the root were the ester cis-lachnophyllum methyl (88,87%), and in the leaves the ester trans-lachnophyllum methyl (43,05%). The volatile oils of the var. *bonariensis* displayed antimicrobial activity against microorganisms *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* *Saccharomyces cerevisiae*. The plant didn't demonstrate acute oral toxicity, in the concentrations 250,500,1000 and 2000 mg/kg in mice. The ethyl acetate and buthanol fractions exhibited a significative antioxidant activity by DPPH and β -carotene method in the concentration of 62,5 μ g/ml. The crude extract and the buthanol fraction expressed larger cytotoxic activity with CL₅₀ 27,35 μ g/ml, as the volatile oil of the roots of the var. *bonariensis* CL₅₀ 0,48 μ g/ml against *Artemia salina*. Thus, the present work aimed at contributing to the studies of the native herbs of the state of Rio Grande do Sul.

Word-key: *Conyza bonariensis*, Antibacterial Activity, Antioxidant Activity, volatile oil

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1-	Aspectos Gerais de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	17
FIGURA 2-	Biossíntese dos compostos poliacetilênicos.....	23
FIGURA 3-	Via proposta para a biossíntese de poliacetilênicos.....	24
FIGURA 4-	Diterpenos isolados de <i>Conyza stricta</i>	26
FIGURA 5-	Metabólitos isolados de <i>Conyza podocephala</i>	27
FIGURA 6-	Diterpenos e derivados de <i>Conyza stricta</i>	28
FIGURA 7-	Diterpenos acetilxilósídeos de <i>Conyza linearis</i>	29
FIGURA 8-	Metabólitos de <i>Erigeron linifolius</i>	29
FIGURA 9-	Diterpenos isolados de <i>Conyza incana</i>	30
FIGURA 10-	Diterpenos isolados de <i>Conyza incana</i>	31
FIGURA 11-	Metabólitos isolados de <i>Conyza filaginoides</i>	32
FIGURA 12-	Compostos isolados de <i>Erigeron annuus</i>	33
FIGURA 13-	Esfingolipídeos isolados de <i>Conyza canadensis</i>	33
FIGURA 14-	Saponinas triterpênicas de <i>Conyza blinii</i>	34
FIGURA 15-	Butenólídeos isolados de <i>Erigeron acer</i>	35
FIGURA 16-	Metabólitos isolados de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	40
FIGURA 17-	Estruturas dos compostos presentes no óleo volátil de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	41
FIGURA 18-	Glicosídeo denominado bonarosídeo.....	41

FIGURA 19-	Obtenção dos extratos para Avaliação Qualitativa e Toxicidade Aguda.....	48
FIGURA 20-	Obtenção dos extratos e frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.)....	49
FIGURA 21-	Perfil cromatográfico do extrato bruto e das frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) em CCD.....	61
FIGURA 22-	Solubilização de SUDAM III evidenciando óleos essenciais e óleos fixos nas folhas (A) e raízes (B) de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	62
FIGURA 23-	Presença de amido nas raízes (A) e folhas (B), tricomas nas folhas (C), polifenóis nas raízes (D) de <i>Conyza bonariensis</i> (L.)	63
FIGURA 24-	Curva padrão do ácido gálico.....	65
FIGURA 25-	Conteúdo de fenólicos totais no extrato bruto e frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) pelo método Folin-Ciocalteu.....	65
FIGURA 26-	Cromatograma do óleo das raízes de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>bonariensis</i>	67
FIGURA 27-	Cromatograma ampliado do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>bonariensis</i>	67
FIGURA 28-	Espectro de massa do composto 1.....	68
FIGURA 29-	Espectro de massa do composto 2.....	68
FIGURA 30-	Composto acetilênicos isolados de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	69
FIGURA 31-	Cromatograma do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.)..	72
FIGURA 32-	Cromatograma ampliado do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>bonariensis</i>	72
FIGURA 33-	Cromatograma do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>microcephala</i>	77
FIGURA 34-	Cromatograma ampliado do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>microcephala</i>	77
FIGURA 35-	Cromatograma do óleo das raízes de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>microcephala</i>	78
FIGURA 36-	Cromatograma ampliado do óleo das raízes de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>microcephala</i>	79

FIGURA 37-	Espectro de massa do composto <i>trans</i> -lachnophyllum metil éster.....	79
FIGURA 38-	A atividade antioxidante pelo método DPPH expresso em % de inibição do extrato bruto e frações de <i>C. bonariensis</i> (L.).....	83
FIGURA 39-	A atividade antioxidante pelo método DPPH expressos em IC ₅₀ do extrato bruto e frações de <i>C. bonariensis</i> (L.).....	83
FIGURA 40-	Comparação dos compostos fenólicos com atividade Antioxidante pelo método do DPPH	84
FIGURA 41-	Determinação da equação da reta.....	86
FIGURA 42-	Atividade antioxidante pelo método de DPPH dos óleos voláteis de <i>C. bonariensis</i> (L.).....	86
FIGURA 43-	Atividade antioxidante pelo método do β-caroteno do extrato bruto e das frações de <i>C. bonariensis</i> (L.).....	87
FIGURA 44-	Comparação entre os métodos DPPH e β-caroteno.....	88
FIGURA 45-	Atividade Antioxidante pelo método β-caroteno dos óleos voláteis de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	89
FIGURA 46-	Bioautogramas dos óleos essenciais das raízes e folhas de <i>Conyza bonariensis</i> frente à <i>Candida albicans</i> (A) e <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (B).....	93
FIGURA 47-	Bioautogramas dos óleos voláteis das raízes e folhas de <i>Conyza bonariensis</i> frente à <i>Klebsiella pneumoniae</i> (A) e <i>Escherichia coli</i> (B).....	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1-	Microorganismos utilizados no ensaio microbiológico.....	46
TABELA 2-	Análise química qualitativa dos extratos de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) Cronquist.....	58
TABELA 3-	Principais constituintes químicos do óleo das raízes de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	70
TABELA 4-	Principais constituintes químicos do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	73
TABELA 5-	Principais constituintes químicos do óleo das folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>microcephala</i>	76
TABELA 6-	Principais constituintes químicos do óleo das raízes de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) variedade <i>microcephala</i>	78
TABELA 7-	Estudo comparativo dos constituintes químicos das variedades <i>bonariensis</i> e <i>microcephala</i>	81
TABELA 8-	Citotoxicidade frente <i>Artemia salina</i> de <i>C. bonariensis</i> (L.).....	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC: American Type Culture Collection
CCNE: Centro de Ciências Naturais e Exatas
CCS: Centro de Ciências da Saúde
CG-EM : Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa
CL₅₀: Concentração Letal 50
DB5: DB polimetil siloxano
DL₅₀: Dose Letal 50
DMSO: Dimetilsulfóxido
DPPH: 1,1- difenil - 2 - picrilhidrazila
EAG: Equivalente de Ácido Gálico
FDA: Food and Drug Administration
IC₅₀: Concentração Inibitória 50
kPa: Kilo Pascal
[M⁺] : íon molecular
m/z: massa/carga
mg: miligrama
mL: mililitro
mM: miliMol
Na₂SO₄ : Sulfato de Sódio
NAD(P)⁺ : Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido
NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nm: nanômetro
OECD: Organization for Economic Co-operation and Development
OMS: Organização Mundial da Saúde
ppm: partes por milhão
Psi: unidade de pressão
Rfs: Fator de Retenção
SMDB: Santa Maria Departamento de Biologia
TAS: Toxicidade frente à *Artemia salina*
u.m.a: unidade de massa atômica
UFC/ml: unidade formadora de colônia por mililitro
UFSM: Universidade Federal de Santa Maria
USP: The United States Pharmacopeia
V: volume
λ: comprimento de onda
µg: micrograma

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO.

ABSTRACT

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	20
	2.1 Objetivos Específicos.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
	3.1 Aspectos Gerais da Família Asteraceae.....	21
	3.2 Constituintes Químicos do Gênero <i>Conyza</i>	25
	3.3 Atividades Biológicas do Gênero <i>Conyza</i>	36
	3.4 A <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
	4.1 Equipamentos e Acessórios.....	43
	4.2 Solventes e Reagentes.....	43
	4.3 Substâncias de Referências.....	44
	4.4 Meios de Cultura.....	44
	4.4.1 Ágar Müller-Hinton.....	44
	4.4.2 Meio Sabouroud.....	45
	4.4.3 Modo de Preparação dos Meios de Cultura para Atividade Antimicrobiana por Bioautografia	45
	4.4.4 Caldo de Caseína-Soja.....	45

4.4.5	Modo de Preparação do meio para o inóculo.....	45
4.5	Microorganismos.....	46
4.6	Animais.....	46
4.7	Preparação dos Padrões.....	46
4.8	Material Vegetal.....	47
4.8.1	Obtenção dos Extratos.....	47
4.8.2	Fracionamento.....	48
4.8.3	Extração dos Óleos Voláteis de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	49
4.8.3.1	Análise Cromatográfica por CG/EM.....	50
4.8.3.2	Cálculo para determinação do índice de Kovats.....	50
4.8.4	Análise Cromatográfica por Cromatografia em Camada Delgada - CCD.....	51
4.8.5	Análise Histoquímica.....	51
4.8.6	Determinação do Total de Fenólicos.....	52
4.9	Determinação das Atividades Biológicas.....	52
4.9.1	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Métodos de DPPH do Extrato Bruto e Frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	52
4.9.2	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método do β -Caroteno.....	53
4.9.3	Determinação da Atividade Antimicrobiana.....	54
4.9.4	Determinação da Atividade Citotóxica.....	54
4.9.5	Determinação da Toxicidade Aguda.....	55
4.10	Análise Estatística.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1	Rendimento dos extratos de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	57
5.2	Análise Qualitativa de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	57

5.3	Perfil Cromatográfico.....	60
5.4	Análise Histoquímica de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	61
5.5	Determinação do Teor de Fenólicos Totais.....	63
5.6	Constituintes Químicos do Óleo Volátil de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	65
	5.6.1 Constituintes Voláteis de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) var. <i>bonariensis</i>	66
	5.6.1.1 Rendimento do Óleo Volátil das Raízes e Folhas de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) var. <i>bonariensis</i>	66
	5.6.1.2 Análise Cromatográfica por CG/EM da var. <i>bonariensis</i>	66
	5.6.2 Constituintes Voláteis de <i>Conyza bonariensis</i> (L.) var. <i>microcephala</i>	75
5.7	Determinação da Atividade Antioxidante de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	82
	5.7.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH do Extrato Bruto e das frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	82
	5.7.2 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH dos óleos voláteis de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	85
	5.7.3 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método β -caroteno do extrato bruto e das frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.)..	86
	5.7.4 Determinação da Atividade Antioxidante pelo método β -caroteno dos óleos voláteis de <i>Conyza bonariensis</i> (L.)	88
5.8	Determinação da Atividade Citotóxica.....	89
5.9	Avaliação da Atividade Antimicrobiana por Bioautografia.....	91
	5.9.1 Avaliação da Atividade Antimicrobiana do extrato bruto e das frações de <i>Conyza bonariensis</i> (L.).....	91
	5.9.2 Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos óleos voláteis das raízes e folhas.....	91
5.10	Determinação da Toxicidade Aguda.....	94
6	CONCLUSÕES.....	95
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

