

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

**SESQUITERPENÓIDES DE *SENECIO BONARIENSIS*
HOOK. ET ARN.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Chana de Medeiros da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

**SESQUITERPENÓIDES DE *SENECIO BONARIENSIS* HOOK.
ET ARN.**

por

Chana de Medeiros da Silva

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

**Santa Maria, RS, Brasil
2006**

Silva, Chana de Medeiros da, 1978-

S586s

Sesquiterpenóides de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn. / por Chana de Medeiros da Silva ; orientador Berta Maria Heinzmann. - Santa Maria, 2006

134 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2006.

1. *Senecio bonariensis* 2. Sesquiterpenóides 3. Cariofileno
4. Óxido de cariofileno 5. Germacreno-D 6. Atividade antimicrobiana I. Heinzmann, Berta Maria, orient. II. Título

CDU: 615.011

Ficha catalográfica elaborada por
Luiz Marchiotti Fernandes – CRB 10/1160
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Rurais/UFSM

© 2006

Todos os direitos autorais reservados a Chana de Medeiros da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

End. Eletr: chanam@terra.com.br

**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

**SESQUITERPENÓIDES DE *SENECIO BONARIENSIS* HOOK. ET
ARN.**

elaborada por

Chana de Medeiros da Silva

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Berta Maria Heinzmann, Dr^a.
(Presidente/Orientadora)

José Ângelo Zuanazzi, Dr. (UFRGS)

Marco Aurélio Mostardeiro, Dr. (UNIJUI)

Santa Maria, 13 de janeiro de 2006.

Quem espera que a vida
seja feita de ilusões
pode até ficar maluco
ou morrer na solidão
É preciso ter cuidado
pra mais tarde não sofrer
é preciso saber viver...

Titãs

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann, meu agradecimento e admiração, pelo exemplo, orientação, amizade, dedicação e, principalmente, pela sua contribuição em minha formação científica;

Ao Prof. Dr. Carlos Augusto Mallmann, do Laboratório de Análises Micotoxicológicas da UFSM, pela realização dos espectros de massas, bem como pelo apoio, disponibilidade e atenção dedicados;

Ao Prof. Dr. Sydney Alves Hartz e sua aluna Patrícia Pozzatti, do Laboratório de Pesquisas Micológicas da UFSM, pela realização dos testes acerca da atividade antimicrobiana dos compostos isolados e pelo auxílio na interpretação dos resultados;

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela disponibilidade e atenção, pelo saber compartilhado, sendo que, não mediram esforços para que pudéssemos concluir esta jornada;

Ao Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher, pelo auxílio na coleta e identificação do material vegetal, bem como pela sua amizade;

À CAPES, pelo apoio financeiro fornecido através de uma bolsa de estudos;

À Elaine Minatto, pela atenção, apoio, amizade e carinho dedicados, e, pelos abraços bem apertados;

À Aline Abati Bolzan, minha bolsista de Iniciação Científica, agradeço pela amizade, pela convivência alegre e pelo interesse e auxílio, sempre presente, em todas as etapas desta minha jornada;

Aos colegas de laboratório, Ricardo, Daniele, Maikon, Leandro, Glória, Janine, Anelise, Mariane, Ticiane e Aline, que sempre propiciaram um ambiente saudável, descontraído, de intenso trabalho, discussões construtivas e aprendizado, agradeço pelas suas amizades, com todo meu carinho;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, Gabriela, Daniele, Lisiane e Ricardo, pela convivência amigável e carinhosa e pelos momentos de descontração;

Aos colegas e ex-colegas, professores e ex-professores e amigos, que me deram seu apoio e de alguma forma auxiliaram na realização deste trabalho, meu muito obrigado;

Ao meu marido Luciano, agradeço pelo estímulo diário e pelo seu conforto acolhedor; agradeço por acreditar no meu potencial e por me acompanhar e incentivar nesta jornada, pois sempre esteve ao meu lado, todo o tempo. Eu te amo.

Ao meu irmão Marlon, pela profunda amizade, colaboração significativa e presença constante em vários momentos da realização deste trabalho;

Aos meus pais, Fátima e Luiz, por terem alimentado os meus sonhos com muito amor. Obrigado é muito pouco para agradecer tamanha dedicação.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
LISTA DE ANEXOS.....	15
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	22
2.1 <i>Senecio</i> sp.	23
2.1.1 Usos populares.....	24
2.2 Constituintes químicos descritos para o gênero <i>Senecio</i>	26
2.2.1 Alcalóides pirrolizidínicos.....	26
2.2.2 Esteróides.....	29
2.2.3 Flavonóides.....	31
2.2.4 Xantonas.....	34
2.2.5 Terpenóides.....	35
2.2.5.1 Sesquiterpenóides.....	40
2.2.5.1.1 Biossíntese de sesquiterpenóides.....	41
2.2.5.1.2 Derivados do eudesmano.....	43
2.2.5.1.3 Derivados do eremofilano.....	44
2.2.5.1.4 Derivados do bisabolano.....	48
2.2.5.1.5 Derivados do germacrano.....	49
2.2.5.1.6 Derivados do humulano e do cariofilano.....	50
2.2.5.1.7 Sesquiterpenóides com grupamento peróxido.....	51
2.3 <i>Senecio bonariensis</i> Hook. et Arn.....	52
2.3.1 Descrição botânica.....	52
2.3.2 Dados fenológicos e observações ecológicas.....	55
2.3.3 Constituintes químicos descritos para <i>Senecio bonariensis</i> Hook. et Arn.....	55

3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
3.1 Procedimentos gerais.....	58
3.2 Material vegetal.....	59
3.3 Preparação do extrato.....	59
3.4 Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico bruto.....	60
3.4.1 Coluna 1.....	60
3.5 Isolamento dos sesquiterpenóides CS1, CS2 e CS3.....	61
3.5.1 Coluna 2.....	62
3.5.2 Coluna 3.....	62
3.5.3 Coluna 4.....	63
3.5.4 Coluna 5.....	64
3.5.5 Coluna 6.....	65
3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados.....	67
4. RESULTADOS.....	68
4.1 Rendimentos do extrato diclorometânico e das substâncias isoladas de <i>Senecio bonariensis</i> Hook. et Arn.....	69
4.1.1 Rendimento do extrato diclorometânico bruto.....	69
4.1.2 Rendimento de CS1.....	69
4.1.3 Rendimento de CS2.....	69
4.1.4 Rendimento de CS3.....	69
4.2 Análise estrutural das substâncias isoladas.....	70
4.2.1 Elucidação estrutural de CS1.....	70
4.2.1.1 Análise da fragmentação de CS1 por EM-IE.....	77
4.2.1.2 Análise do espectro de RMN ¹³ C de CS1.....	78
4.2.1.3 Análise do espectro de RMN ¹ H de CS1.....	79
4.2.1.4 Análise do espectro no IV de CS1.....	80
4.2.1.5 Estrutura de CS1.....	80
4.2.2 Elucidação estrutural de CS2.....	81
4.2.2.1 Análise da fragmentação de CS2 por EM-IE.....	89
4.2.2.2 Análise do espectro de RMN ¹³ C de CS2.....	91
4.2.2.3 Análise do espectro de RMN ¹ H de CS2.....	91
4.2.2.4 Análise do espectro no IV de CS2.....	93

4.2.2.5 Estrutura de CS2.....	93
4.2.3 Elucidação estrutural de CS3.....	94
4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de CS1 e CS2.....	100
5. DISCUSSÃO.....	101
6. CONCLUSÕES.....	116
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119
8. ANEXOS.....	134

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Estrutura básica de uma necina.....	27
Figura 2:	Representação esquemática da biossíntese dos alcalóides pirrolizidínicos.....	28
Figura 3:	Representação esquemática da biossíntese dos esteróides.....	30
Figura 4:	Núcleo fundamental dos flavonóides.....	31
Figura 5:	Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides.....	32
Figura 6:	Representação esquemática da biossíntese das xantonas.....	34
Figura 7:	Muraxantona, isolada de <i>Senecio mikanioides</i>	34
Figura 8:	Representação esquemática da biossíntese dos terpenóides.....	36
Figura 9:	Representação esquemática da biossíntese de alguns compostos sesquiterpenóides.....	42
Figura 10:	Representação esquemática da biossíntese dos eudesmanos....	43
Figura 11:	Substância precursora da biossíntese dos furanoeremofilanos....	45
Figura 12:	<i>Senecio bonariensis</i> Hook. et Arn. – folhas.....	53
Figura 13:	<i>Senecio bonariensis</i> Hook. et Arn. – aspecto geral da planta.....	54
Figura 14:	Obtenção de CS1, CS2 e CS3 a partir do fracionamento do extrato diclorometânico de <i>Senecio bonariensis</i> sobre gel de sílica.....	66
Figura 15:	Espectro de massas por impacto eletrônico do cariofileno (A) e de CS1 (B).....	71
Figura 16:	Espectro de RMN ¹³ C de CS1 (100 MHz, CDCl ₃).....	72
Figura 17:	Espectro de RMN ¹ H de CS1 (400 MHz, CDCl ₃).....	73
Figura 18:	Espectro de IV de CS1 (HATR).....	74
Figura 19:	Proposta de fragmentação para a substância CS1.....	78
Figura 20:	Fórmula estrutural do β-cariofileno (substância CS1)	80
Figura 21:	Espectro de massas por impacto eletrônico do óxido de cariofileno (A) e de CS2 (B).....	82
Figura 22:	Espectro de RMN ¹³ C de CS2 (100 MHz, CDCl ₃).....	83
Figura 23:	Espectro de RMN ¹ H de CS2 (400 MHz, CDCl ₃).....	84
Figura 24:	Ampliação do espectro de RMN ¹ H de CS2.....	85
Figura 25:	Espectro de IV de CS2 (DRIFTS).....	86

Figura 26: Proposta de fragmentação para a substância CS2.....	90
Figura 27: Fórmula estrutural do óxido de β -cariofileno (substância CS2).....	93
Figura 28: Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno-D (A) e de CS3 (B).....	95
Figura 29: Espectro de RMN ^1H de CS3 (400 MHz, CDCl_3).....	96
Figura 30: Ampliação do espectro de RMN ^1H de CS3.....	97
Figura 31: Espectro de IV de CS3 (HATR).....	98
Figura 32: Fotooxidação do β -cariofileno, formando três hidroperóxidos (a, b e c).....	105
Figura 33: Mecanismo proposto para a formação do óxido de β -cariofileno a partir do hidroperóxido c.....	106
Figura 34: Conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do β -cariofileno.....	107
Figura 35: Espectro de RMN ^1H das conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do β -cariofileno	108
Figura 36: Conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do óxido de β -cariofileno.....	108
Figura 37: Conformações $\beta\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ e $\alpha\alpha$ do β -cariofileno.....	109
Figura 38: Enantiômeros do β -cariofileno.....	109
Figura 39: Diterpenos originados a partir do β -cariofileno.....	112
Figura 40: Enantiômeros do germacreno-D.....	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Exemplos de alcalóides pirrolizidínicos descritos para o gênero <i>Senecio</i>	28
Tabela 2:	Exemplos de flavonóides descritos para o gênero <i>Senecio</i>	33
Tabela 3:	Condensação de unidades de isopreno na formação dos terpenóides.....	35
Tabela 4:	Exemplos de mono, di e triterpenóides descritos para o gênero <i>Senecio</i>	38
Tabela 5:	Exemplos de derivados de núcleo eudesmano descritos para o gênero <i>Senecio</i>	44
Tabela 6:	Exemplos de derivados de núcleo eremofilano descritos para o gênero <i>Senecio</i>	46
Tabela 7:	Exemplos de derivados de núcleo bisabolano descritos para o gênero <i>Senecio</i>	48
Tabela 8:	Exemplos de derivados de núcleo germacrano descritos para o gênero <i>Senecio</i>	49
Tabela 9:	Exemplos de derivados de núcleo humulano e cariofilano descritos para o gênero <i>Senecio</i>	50
Tabela 10:	Exemplos de sesquiterpenóides com grupamento peróxido descritos para o gênero <i>Senecio</i>	52
Tabela 11:	Constituintes químicos descritos para <i>Senecio bonariensis</i> Hook. et Arn.....	56
Tabela 12:	Rendimento das frações obtidas da coluna 1.....	61
Tabela 13:	Rendimento das frações obtidas da coluna 2.....	62
Tabela 14:	Rendimento das frações obtidas da coluna 3.....	63
Tabela 15:	Rendimento das frações obtidas da coluna 4.....	63
Tabela 16:	Rendimento das frações obtidas da coluna 5.....	64
Tabela 17:	Rendimento das frações obtidas da coluna 6.....	65
Tabela 18:	Microorganismos utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de CS1 e CS2.....	67

Tabela 19: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^{13}C para a substância CS1, em comparação com dados da literatura.....	75
Tabela 20: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^1H para a substância CS1, em comparação com dados da literatura.....	76
Tabela 21: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^{13}C para a substância CS2, em comparação com dados da literatura.....	87
Tabela 22: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^1H para a substância CS2, em comparação com dados da literatura.....	88
Tabela 23: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^1H para a substância CS3, em comparação com dados da literatura.....	99

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AgNO₃ – nitrato de prata
APs – alcalóides pirrolizidínicos
ATP – adenosina trifosfato
CC – cromatografia em coluna
CCD – cromatografia em camada delgada
CCMP – cromatografia em coluna de média pressão
CDCl₃ – clorofórmio deuterado
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CH₂Cl₂ – diclorometano
CIM – concentração inibitória mínima
CoA – coenzima A
d – dublete
dd – dublete de dublete
ddd – duplo dublete de dublete
DEPT – distortionless enhancement by polarization transfer
DMAPP – dimetil-alil difosfato
DRIFTS – acessório de refletância difusa com Transformada de Fourier
EC₅₀ – dose efetiva 50%
EM – espectrometria de massas
EM-IE - espectrometria de massas por impacto eletrônico
EtOH – etanol
eV – elétron-Volts
FDA – Food and Drug Administration
FPP – farnesil difosfato
GGPP – geranil – geranil difosfato
GI – grau de insaturação
GPP – geranil difosfato
GST – glutathione-S-transferase
HATR – acessório de refletância total atenuada horizontal
IPP – isopentenil difosfato
IV – Infravermelho

J – constante de acoplamento

m – multiplete

MEP – metileritritol-4-fosfato

MVA – ácido mevalônico

m/z – massa sobre carga

NPP – nerolidil difosfato

OMS – Organização Mundial de Saúde

q - quarteto

RMN ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ^{13}C – ressonância magnética nuclear de carbono-13

s – singleto

t - tripleto

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

UFSM – Universidade Federal de Santa Maria

u.m.a – unidade de massa atômica

UNISC – Universidade de Santa Cruz do Sul

UV – ultravioleta

δ - deslocamento químico

λ - comprimento de ondas

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1:	Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero <i>Senecio</i>	135
----------	--	-----

RESUMO

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

SESQUITERPENÓIDES DE *SENECIO BONARIENSIS* HOOK. ET ARN.

AUTORA: Chana de Medeiros da Silva
ORIENTADORA: Berta Maria Heinzmann
Data e Local da Defesa: Santa Maria, 13 de janeiro de 2006.

Espécies pertencentes à família Asteraceae, são uma importante fonte de terpenóides com várias atividades biológicas já descritas. *Senecio bonariensis* Hook. et Arn., popularmente conhecida como “margarida-do-banhado-de-Buenos Aires” é um arbusto nativo da América do Sul, que pode ser encontrado no sul do Brasil e floresce de outubro a dezembro. Esta planta é conhecida por apresentar furanoeremofilanos, esteróides e alcalóides pirrolizidínicos, com atividades tóxicas. Este trabalho descreve o isolamento e identificação de três constituintes químicos presentes no extrato CH₂Cl₂ das partes aéreas de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn. As folhas de *S. bonariensis* foram coletadas em abril de 2004, no município de Eldorado do Sul – RS. 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 nº SMDB 9519. As folhas frescas de *S. bonariensis* (2,3 kg) foram extraídas por maceração com CH₂Cl₂. O extrato bruto foi evaporado sob pressão reduzida, resultando num resíduo pastoso (13,5 g), com rendimento de 0,64%. O extrato bruto foi fracionado por cromatografia em coluna do tipo flash sobre gel de sílica, usando CH₂Cl₂ e misturas de CH₂Cl₂ : EtOH, em gradiente, nas proporções de 99:1 até 80:20, sendo obtidas 15 frações (1 a 15 col. 1). A fração 1 col. 1 (1g) foi cromatografada sobre gel de sílica impregnado com AgNO₃ (10%), eluída com hexano: acetona (99:1), obtendo-se 13 novas frações (1 a 13 col. 2). A fração 10 col. 2 (253 mg) foi cromatografada sobre gel de sílica impregnado com AgNO₃ (10%), eluída com hexano:éter etílico (95:5), obtendo-se 104 mg de **CS1**(cariofileno) e 16 mg de **CS2** (óxido de cariofileno). A fração 11 col. 2 (83,5 mg) também foi cromatografada sobre gel de sílica impregnado com AgNO₃ (10%), eluída com hexano:éter etílico (98:2) e forneceu 5 mg de **CS3** (germacreno-D). Os compostos isolados foram analisados por CG-EM-IE, IV, RMN ¹H e RMN ¹³C e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura. Além disso, foi determinada a atividade antimicrobiana do cariofileno e do óxido de cariofileno, através do método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A2/NCCLS para fungos e M7-A4/NCCLS para bactérias. Os compostos não apresentaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Palavras-chaves: *Senecio bonariensis*, sesquiterpenóides, cariofileno, óxido de cariofileno, germacreno-D, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

SESQUITERPENOIDS FROM *SENECIO BONARIENSIS* HOOK. ET ARN.

Author: Chana de Medeiros da Silva

Advisor: Prof^a. Dr^a. Berta Maria Heinzmann

Species belonging to the Asteraceae family are an important source of terpenoids with biological activity. *Senecio bonariensis* Hook. et Arn., popularly known as “margarida-do-banhado-de-Buenos Aires” is native from South America and can be found in south Brazil, blooming from October to December. This plant is known for contain furanoterpenes, steroids and pyrrolizidines alkaloids (PAs) with toxic activities. This work describes the isolation and identification of three compounds present in the CH₂Cl₂ extract of the aerial parts of *Senecio bonariensis* Hook et Arn. Leaves of this plant were collected in Eldorado do Sul, RS, Brazil, in April 2004 and identified by Prof. Dr. Nelson Ivo Matzenbacher. Voucher specimen N^o SMDB 9519 is preserved in the Herbarium of the Departamento de Botânica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil. The fresh leaves of *S. bonariensis* (2.3 kg) were extracted by maceration with CH₂Cl₂. The CH₂Cl₂ extract was evaporated under vacuum to yield a viscous residue (13.5 g), which gave a yield of 0.64%. The crude extract was fractionated by flash chromatography over silica-gel, using CH₂Cl₂, and CH₂Cl₂: EtOH mixture of increasing polarity, (stepwise, 99:1 to 80:20) to yield 15 fractions. The fraction 1 col. 1 (1 g) was chromatographed over silica-gel impregnated with AgNO₃ (10%) eluting with hexane-acetone (99:1), to yield 13 new fractions. Fraction 10 col. 2 (253 mg) was chromatographed on silica-gel impregnated with AgNO₃ (10%), eluting with hexane: ethyl ether (95:5) and purified to afford 104 mg of **CS1** (caryophyllene) and 16 mg of **CS2** (caryophyllene oxide). Fraction 11 col. 2 (83.5 mg) was also chromatographed on silica-gel impregnated with AgNO₃ (10%), eluting with hexane: ethyl ether (98:2) and purified to afford 5 mg of **CS3** (germacrene-D). The compounds obtained were analyzed by GC-EI-MS, IR, ¹H and ¹³C NMR. The antimicrobial activity of CS1 and CS2 were evaluated by the microdilution method based on M27-A2 and M7-A4 (NCCLS). Both compounds showed no antimicrobial activity at the tested concentrations.

Key words – *Senecio bonariensis*; sesquiterpenoids; caryophyllene; caryophyllene oxide; germacrene-D; antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, compostos de origem mineral, vegetal e animal foram as principais fonte de drogas para a população (Rates, 2001). Foi a partir de estudos clínicos, farmacológicos e químicos das plantas, baseados na medicina tradicional, que surgiram os primeiros fármacos utilizados pelo homem, como a aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (Butler, 2004).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Embora cerca de 100.000 compostos oriundos de plantas tenham sido identificados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância à terapêutica e à agricultura (Grape, 1999 apud Yunes e Calixto, 2001), uma vez que, apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal e somente para algum efeito específico (Ferreira, 1998).

Até o momento, cerca de 25% de todos os fármacos prescritos mundialmente, foram originários de plantas, sendo que 121 destes compostos continuam em corrente uso. Além disso, das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente originadas de plantas e também existe um número significativo de fármacos que foram obtidos por modificação molecular de produtos naturais ou tem estes como protótipos. Compostos naturais também são passíveis de sofrerem modificações estruturais, possibilitando o planejamento racional de novas moléculas e a obtenção de novas estruturas possivelmente mais eficazes e seguras, ou mesmo com outras propriedades farmacológicas até então não esperadas (Rates, 2001). Uma grande gama das substâncias ativas de origem vegetal ainda não pode ser sintetizada em escala industrial, sendo obtidas a partir de plantas em seu habitat natural ou de cultivares, garantindo uma uniformidade na qualidade do produto.

Apesar de muitos produtos de origem natural serem fontes de uma grande variedade de novas drogas, também há outros métodos utilizados para a obtenção destes ativos, como por exemplo, reações de síntese, biologia molecular e técnicas genéticas, química combinatória e química computacional (Yunes e Cechinel Filho,

apud Yunes e Calixto, 2001). Entretanto, os produtos naturais continuam sendo fontes primárias para obtenção de novas drogas. Para continuar a ser competitiva com outros métodos de obtenção de novos fármacos, a busca dos produtos naturais necessita melhorar a velocidade nos processos de *screening*, isolamento e elucidação estrutural de compostos, assim como, direcionar o estudo dos extratos e de compostos isolados de produtos naturais, de maneira que possam ser fornecidos em larga escala (Butler, 2004).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas (Dias, 1996) de um total estimado entre 350.000 e 550.000. Devido a esta grande diversidade de espécies, aumentam-se as chances de identificação de substâncias do metabolismo vegetal com potenciais atividades farmacológicas e descobrimento de novos alvos biológicos. Portanto, muitas patologias que hoje permanecem sem um tratamento adequado, poderão vir a ser tratadas de forma mais eficiente, a partir de novos e potentes fármacos de origem vegetal.

Nos últimos anos cresceu consideravelmente o interesse pelas terapias alternativas e pelo uso terapêutico de produtos naturais, principalmente daqueles obtidos de plantas (Cechinel Filho e Yunes apud Yunes e Calixto, 2001). Segundo Rates (2001), as motivações desse interesse residem no fato de que a medicina convencional pode ser ineficiente e prejudicial pelos efeitos colaterais e eventual dependência causados pelas drogas sintéticas. Além deste aspecto, uma grande parcela da população não tem acesso ao tratamento convencional, por razões econômicas; e, por outro lado, existe a crença errônea de que produtos naturais são eficazes e não produzem efeitos colaterais .

Tendo em vista o crescente interesse e necessidade pela pesquisa de plantas – especialmente aquelas espécies ainda não estudadas – e a necessidade do desenvolvimento de novos agentes no tratamento das mais diversas doenças, foi objetivo deste trabalho realizar um estudo fitoquímico das partes aéreas de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn., dando enfoque especial aos sesquiterpenóides, uma vez que estes compostos costumam apresentar diversas atividades farmacológicas, bem como avaliar a sua atividade antimicrobiana.

Para esta categoria de metabólitos secundários, são descritas as atividades antimicrobiana (Guanasekera et al., 1990; Pérez et al., 1999), antimalárica

(Woerdenbang et al., 1994), antitumoral (Jurek e Scheuer, 1993), hipoglicemiante (Inmann et al., 1999), antioxidante (Bork et al., 1997), antiinflamatória (Geissberger e Sequin, 1991) e citotóxica (Barrero et al., 1997).

Tendo em vista esta gama de atividades farmacológicas descritas para os derivados terpênicos comumente presentes nos extratos obtidos com solventes pouco polares das espécies do gênero *Senecio*, e o fato das folhas de *Senecio bonariensis* não terem sido estudadas até o momento, esta espécie surge como uma alternativa promissora, no intuito de encontrar-se novos compostos, com potenciais atividades biológicas de interesse.

Esta dissertação está organizada na forma de capítulos fixos. O capítulo Revisão da Literatura inicia-se com um estudo amplo acerca do gênero *Senecio* e seus principais constituintes químicos descritos. 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 bonariensis* Hook. et Arn., suas características botânicas e constituintes químicos relatados.

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

O capítulo 4 apresenta os Resultados dos compostos isolados de *S. bonariensis*, seus rendimentos, seus espectros e comparações com a literatura, confirmando suas estruturas. Também descreve o resultado da atividade antimicrobiana dos compostos testados. Na Discussão (capítulo 5), apresenta-se a interpretação dos resultados, relacionando estrutura-atividade, origem biossintética, além de diferentes conformações dos constituintes químicos isolados no decorrer do trabalho para a espécie estudada.

Em seguida, apresenta-se a conclusão do trabalho no capítulo 6.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A presente revisão bibliográfica está centrada no estudo de constituintes químicos de interesse presentes em espécies do gênero *Senecio* e suas principais atividades biológicas descritas até o momento. Será dado especial enfoque aos sesquiterpenóides, uma vez que estas substâncias estão relacionadas a algumas de suas principais atividades farmacológicas e são o alvo de estudo deste trabalho.

2.1 *Senecio* sp.

O gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*, família *Asteraceae*) constitui um grupo de plantas cosmopolitas, não muito homogêneo (Bohlmann et al., 1981a), presente em regiões frias e tropicais, notadamente na Europa, África, Américas Central e do Sul. Possui mais de 2000 espécies amplamente distribuídas pela superfície terrestre (Cabreira e Klein, 1975), sendo a Argentina (Cabrera, 1978 apud Pérez et al., 1999) e o Chile (Cabrera, 1949, apud Urzúa e Andrade, 2001) os países com o maior número de representantes, contando cada um com mais de 300 espécies catalogadas.

No Brasil, existem aproximadamente 85 espécies de *Senecio*, sendo que 33 são nativas da região sul (Cabrera e Klein, 1975) e 25 foram identificadas no Rio Grande do Sul (Matzenbacher, 1998).

São ervas anuais ou perenes, ocorrendo sob a forma de arbustos ou arvoretas de porte variado. Uma das espécies mais abundantes no sul do Brasil é *Senecio brasiliensis* (Sprengel) Less., conhecida popularmente como “maria-mole”, “tasneirinha” e “flor-das-almas”. 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 hajam condições ambientais favoráveis, como umidade e luz, e as fenofases vegetativas sejam praticamente constantes durante todo o ciclo da planta. Fatores ambientais desfavoráveis como o 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 (Karam et al., 2002).

2.1.1 Usos populares

Espécies pertencentes ao gênero *Senecio* são utilizadas na medicina popular de diversos países, inclusive na América Latina (Garcia et al., 2003; Toma et al., 2004; Bourdy et al., 2004). Entretanto, muitas vezes, são responsáveis por envenenamentos que podem ser fatais (Silva et al., 2006).

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

S. graveolens Wedd. é uma espécie endêmica, encontrada no norte do Chile em altitudes acima de 300 m, conhecida popularmente como “chachacoma”. É muito utilizada pela população local para aliviar a indisposição causada pela altitude (Loyola et al., 1985; Pérez et al., 1999). Associado ao seu uso popular, foi isolado desta planta um derivado da acetofenona, denominado diidroeuvarina, que apresentou atividade hipotensora em ratos (Loyola et al., 1985). Outras espécies endêmicas de *Senecio* da mesma região também são utilizadas para esta finalidade, como é o caso de *S. atacamensis* Phil. (Morales et al., 2000). Segundo Pérez et al. (1999), *S. graveolens* Wedd. também é utilizada como emenagoga, digestiva e supressora da tosse, sendo comercializada para estes fins nas regiões onde cresce.

Da mesma forma, *S. uspallatensis* Hook. et Arn., encontrada na região da Cordilheira dos Andes, também é conhecida como “chachacoma”. No entanto, o seu uso se dá na forma de infusão, em substituição ao mate, pelos habitantes da região (Pestchanker et al., 1985).

Segundo Portillo et al. (2001), a espécie *S. grisebachii* Baker tem sido utilizada no Paraguai para o tratamento de doenças de pele causadas por fungos. Estes pesquisadores realizaram um estudo da atividade antifúngica de 14 espécies de plantas, utilizadas na medicina tradicional para tratar doenças de pele. Dentre outros resultados, foi evidenciado que os extratos diclorometânico, metanólico e aquoso das flores de *S. grisebachii* são ativos contra o fungo *Microsporum gypseum* CECT 2908.

Hammond et al. (1998) registraram o uso popular de algumas espécies de *Senecio* no Peru: o decocto de *S. culcitioides* Schultz Bip. é usado em casos de tosse, bronquite e no tratamento da asma; o infuso de *S. rhizomatosus* Rusby é

utilizado para aumentar a secreção biliar, e o decocto de *S. tephrosioides* Turcz é usado em casos de tosse e bronquite.

Na América do Sul, a espécie *S. pseudotites* Griseb. é muito utilizada na medicina popular como agente diurético, antiasmático e vermífugo (Tommasi et al., 1998). Entretanto, na Espanha, algumas espécies de *Senecio* (*S. minutus* DC. e *S. boissieri* DC.) têm sido utilizadas como emenagogas, antiinflamatórias e vasodilatadoras (Torres et al., 2000).

S. brasiliensis (Sprengel) Less. é uma planta conhecida por sua atividade hepatotóxica, contudo suas folhas e inflorescências são utilizadas na medicina popular de algumas regiões do Brasil para tratar processos inflamatórios e também como reguladora do sangue (Toma et al., 2004). Além disso, esta planta também é usada para aliviar dores no estômago (Serra, 1994 apud Toma et al., 2004).

S. fuchsii Gmel. é uma planta amplamente distribuída na Europa Central. Na idade média ela tinha grande importância como um “remédio milagroso”, sendo que, a partir da década de 70, vem sendo utilizada como antidiabético e em ginecologia (Röder e Wiedenfeld, 1977).

S. argunensis Turcz. é uma planta tradicional da medicina chinesa, muito utilizada para tratar disenteria, conjuntivite e tumefação (Liu e Röder, 1991). De acordo com Nachman (1983), *S. aureus* L. é utilizada como peitoral, emenagoga e para acelerar o trabalho de parto em mulheres de algumas regiões da Índia. Apesar de sua ampla utilização na medicina popular, uma série de furanoeremofilanos tóxicos foram relatados para esta planta e para um grande número de espécies do gênero *Senecio*.

Na África, *S. inornatus* DC. é um remédio tradicional usado pelos povos Zulu, Xhosa e Sotho, por eles denominado de “u(lu)Hlabo”. As partes aéreas e as raízes desta planta são utilizadas para tratar doenças cardíacas e respiratórias (Wiedenfeld et al., 1996). Segundo Steenkamp et al. (2001), na África do Sul, o decocto das raízes de *S. latifolius* DC também é usado pelos Zulus, como emético e no tratamento de doenças venéreas; já os Xhosa utilizam as folhas da mesma espécie no tratamento de lesões e queimaduras.

2.2 Constituintes químicos descritos para o gênero *Senecio*

No gênero *Senecio*, as classes com maior interesse quanto ao seu potencial biológico são alcalóides pirrolizidínicos, esteróides, flavonóides, xantonas e terpenóides. Os últimos apresentam ampla arquitetura molecular, contendo diversos centros esterogênicos e apenas átomos de C, H e O (Barreiro, apud Yunes e Calixto, 2001).

2.2.1 Alcalóides pirrolizidínicos

Os alcalóides pirrolizidínicos (APs) são considerados um importante grupo de constituintes do gênero *Senecio*, além de serem uma das principais categorias de metabólitos secundários responsáveis pela toxicidade destas plantas. Uma das espécies de elevada toxicidade comprovada é *S. oxiphyllus* DC., a qual foi responsável pelas graves intoxicações apresentadas por bezerros que alimentavam-se da mesma, levando-os à morte (Driemeier e Barros, 1992 apud Krebs et al., 1996).

Estes compostos são conhecidos por causarem intoxicações em animais herbívoros de grande porte, como bovinos, ovinos, suínos e eqüinos, levando à perdas consideráveis na pecuária para o sul do Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (Martz e Habermehl, 1986; Habermehl et al., 1988; Krebs et al., 1996; Ilha et al., 2001). A doença ocasionada pela intoxicação por estas espécies é conhecida como seneciose e, no RS, tem sido diagnosticada em áreas invadidas pelas espécies de *S. brasiliensis* (Sprengel) Less., *S. selloi* (Spreng) DC., *S. cisplatinus* Cabrera, *S. heterotricus* DC., *S. leptolobus* DC. e *S. oxyphyllus* DC. (Ilha et al., 2001).

A literatura também relata a ocorrência de intoxicações fatais em seres humanos devido ao consumo de espécies de *Senecio* contendo APs (Fox et al., 1978; Liddell e Logie, 1993; Villarroel et al., 1997).

Além do efeito tóxico agudo, os APs apresentam propriedades carcinogênicas, mutagênicas e teratogênicas (Roeder et al., 1993; Röder, 1995). Por outro lado, suas propriedades citotóxicas os tornam potenciais agentes antitumorais (Liu e Röder, 1991; Grue e Liddell, 1993; Liddell e Logie, 1993).

APs são ésteres de aminoálcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos), que podem ocorrer na forma de monoésteres, diésteres 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 (Villarrol et al., 1997) (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 (Mattocks et al., 1986; Jares e Pomílio, 1989; Villarrol et al., 1997; Suau et al., 2002) . Os APs que possuem a necina saturada não são tóxicos aos mamíferos (Mattocks, 1989 apud Suau et al., 2002).

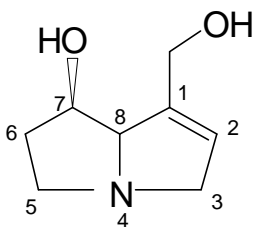


Figura 1: Estrutura básica de uma necina.

Atualmente, já foram isolados 62 APs em 62 das mais de 2000 espécies de *Senecio* distribuídas mundialmente. Uma revisão completa dos APs isolados até o momento para este gênero pode ser encontrada em Silva et al. (2006) (Anexo 1).

Os alcalóides em geral têm sua origem biossintética a partir dos aminoácidos essenciais e, no caso dos APs, a substância precursora é a ornitina e/ou a arginina.

De acordo com Santos (apud Simões et al., 2003), os APs derivam de duas moléculas de ornitina, as quais são transformadas em um intermediário importante, a homospermidina, dando origem à uma necina básica, que será esterificada por ácidos terpenóides estruturalmente complexos, formados de aminoácidos com uma cadeia carbonada ramificada (Figura 2).

Segundo De Luca e Laflamme (2001), a arginina dá origem à putrescina e à espermidina, que sofrem condensação, formando a homospermidina como substância intermediária que, finalmente, origina a necina básica (Figura 2).

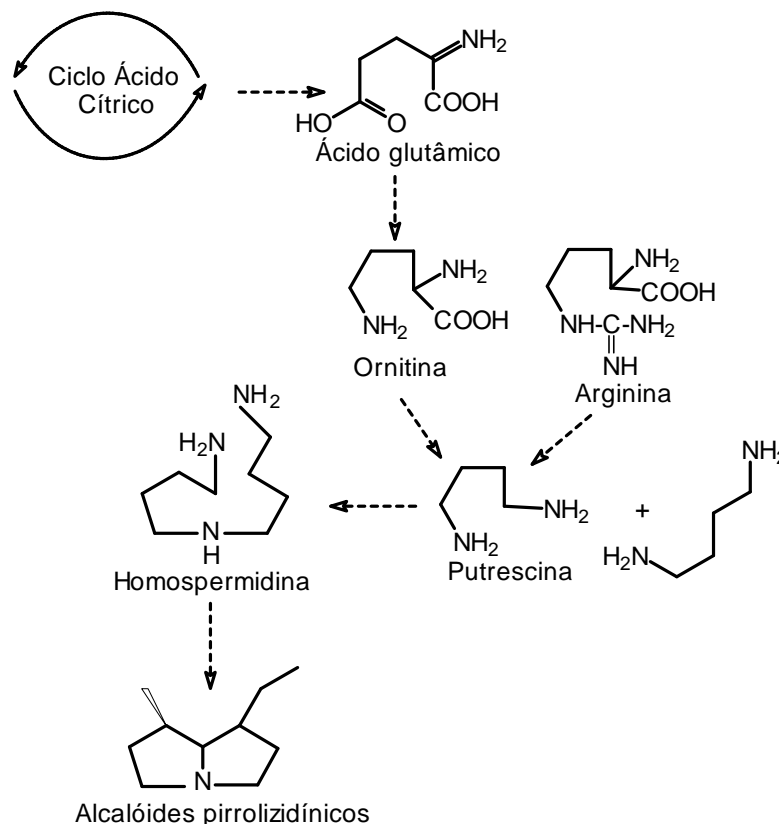
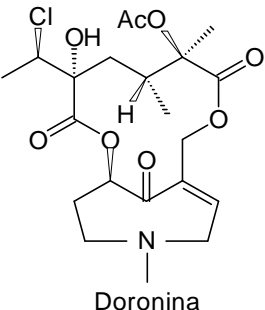
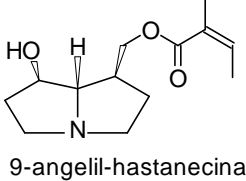
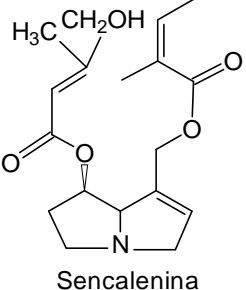


Figura 2: Representação esquemática da biossíntese dos alcalóides pirrolizidínicos. (Adaptado de Wagner, 1993; Hänsel et al., 1999).

Segundo Trigo et al. (2003), 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 e/ou são mono e diésteres do tipo triangularina (Tabela 1).

Tabela 1: Exemplos de alcalóides pirrolizidínicos descritos para o gênero *Senecio*.

Classe de AP	Estrutura	Referência
Alcalóide pirrolizidínico do tipo senecionina	<p>Z-Retrorsina</p>	Suau et al., 2002.

Alcalóide pirrolizidínico do tipo senecionina	 <p style="text-align: center;">Doronina</p>	Krebs et al., 1996.
Alcalóide pirrolizidínico do tipo triangularina (monoéster)	 <p style="text-align: center;">9-angelil-hastanecina</p>	Christov et al., 2002.
Alcalóide pirrolizidínico do tipo triangularina (diéster)	 <p style="text-align: center;">Sencalenina</p>	Roeder et al., 1984.

2.2.2 Esteróides

Nas plantas, os esteróides possuem um importante papel como constituintes de membranas celulares, na formação dos hormônios e como repelente de insetos. Além disso, apresentam importantes atividades biológicas, sendo que alguns são utilizados na medicina (Shimada et al., 2001).

O esqueleto básico esteroidal é formado por quatro anéis fundidos constituídos de átomos de carbono, podendo apresentar até dois grupamentos metilas, localizados nos pontos de junção dos anéis (Shimada et al., 2001). Os esteróides têm sua origem biossintética em unidades de isopreno (C_5H_{10}) que se condensam, formando os triterpenos que, em seguida, reduzem-se a esteróides (Figura 3).

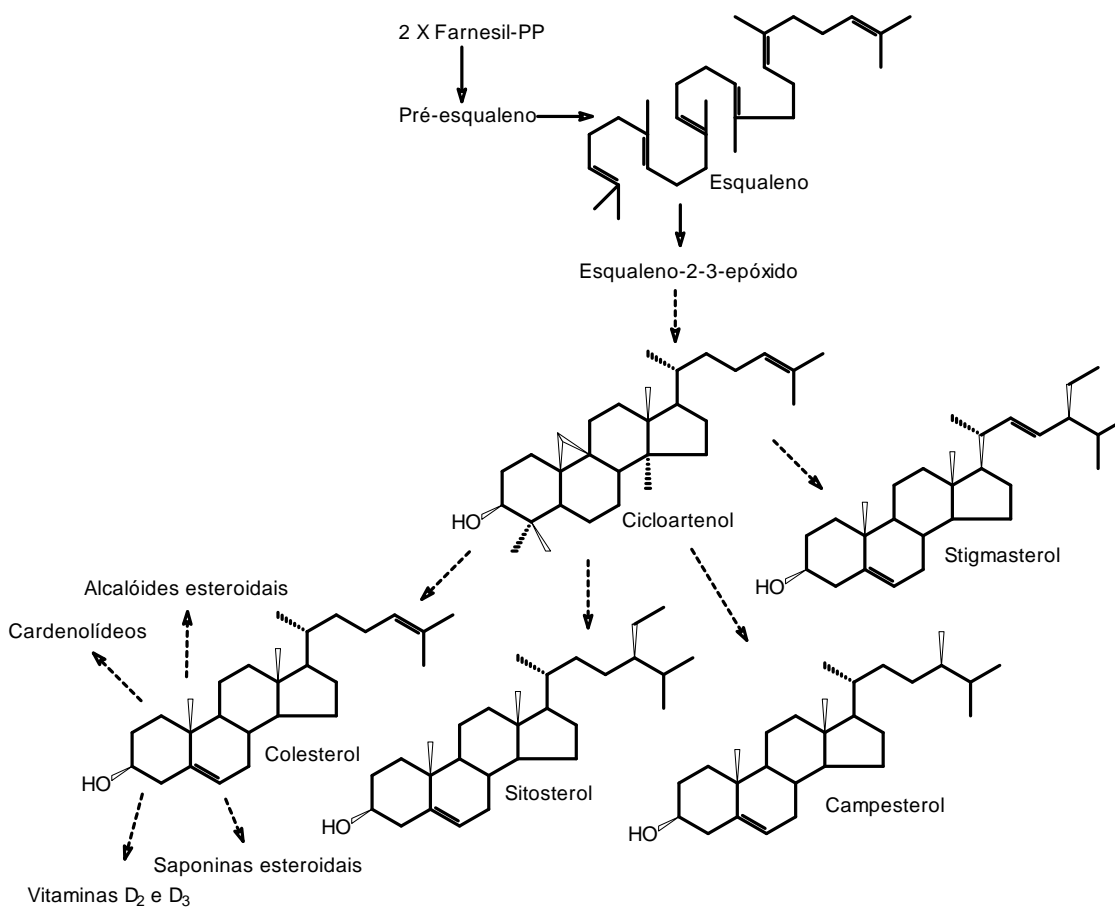


Figura 3: Representação esquemática da biossíntese dos esteróides. (Adaptado de Wagner, 1993).

Dois exemplos de fitoesteróides que estão presentes em altas concentrações nas plantas superiores são β -sitosterol e stigmasterol (De-Eknamkul e Potduang, 2003). Além destes, também aparecem os esteróides colesterol, campesterol, brassicasterol, avenasterol, stigmasterol, campestanol e sitostanol (Dutta e Normén, 1998).

No gênero *Senecio*, sitosterol e stigmasterol 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); as partes aéreas de *S. auricula* Bourg. forneceram apenas sitosterol (Torres et al., 1998).

Atualmente, os fitosteróides têm despertado grande interesse devido a seus efeitos benéficos sobre o metabolismo do colesterol, inibindo a sua absorção. Este fato levou a um aumento significativo no consumo de alguns fitoesteróides na dieta humana (Dutta e Normén, 1998; Grandgirard et al., 2004).

2.2.3 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma importante classe de metabólitos secundários, contando com mais de 6000 diferentes representantes (Shijlen et al., 2004), que ocorrem em todas as partes das plantas, incluindo frutos, pólen, raízes e cascas. Podem apresentar concentrações e estruturas diferenciadas, dependendo do órgão vegetal em que se encontram. Sua presença nos vegetais parece estar relacionada com funções de defesa (proteção contra raios UV, ações antifúngicas e antibacterianas) e de atração de polinizadores (Santos apud Simões et al., 2003).

Possuem um núcleo básico com 15 átomos de carbono, arranjos de modo a formar dois anéis aromáticos **A** e **B**, que encontram-se ligados por três unidades de carbono, que podem ou não formar um terceiro anel **C** (Figura 4) (Zuanazzi apud Simões et al., 2003).

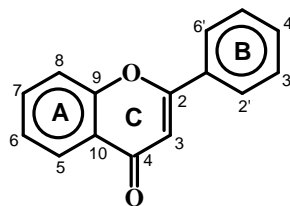


Figura 4: Núcleo fundamental dos flavonóides.

São formados a partir de rotas biossintéticas separadas: a do ácido chiquímico e a do acetato, via ácido mevalônico (MVA). A primeira origina fenilalanina, o precursor do ácido cinâmico, responsável pela formação do anel aromático B e a ponte de três carbonos. A segunda resulta no outro anel aromático (anel A) do esqueleto básico dos flavonóides (Santos apud Simões et al., 2003). O primeiro núcleo flavonoídico formado são as chalconas, que dão origem às demais classes de flavonóides (Figura 5).

Os flavonóis quercetina e canferol, bem como a flavona apigenina e seus heterosídeos (3-O-rutinosídeo; 3-O-glicosídeo, entre outros) já foram relatados em mais de 25 espécies de *Senecio* (Glennie et al., 1973 apud Mansour e Saleh, 1981). Para *S. gallicus* Chaix, Mansour e Saleh (1981), identificaram o flavonol metoxilado isoramnetina e seus derivados, o 3-O-glicosídeo e o 3-O-rutinosídeo, enquanto que em *S. vulgaris* L., além deste, também foram isolados a quercetina 3-O-glicosídeo. Já para *S. hoggariensis* Battand e Trab., foi isolada apenas a última (Tabela 2).

Segundo Mansour e Saleh (1981), a presença de quercetina 3-O-glicosídeo é muito comum neste gênero. Entretanto, devido ao fato de possuir várias espécies com características químicas diferenciadas, espera-se uma grande variabilidade de estruturas flavonoídicas para o mesmo.

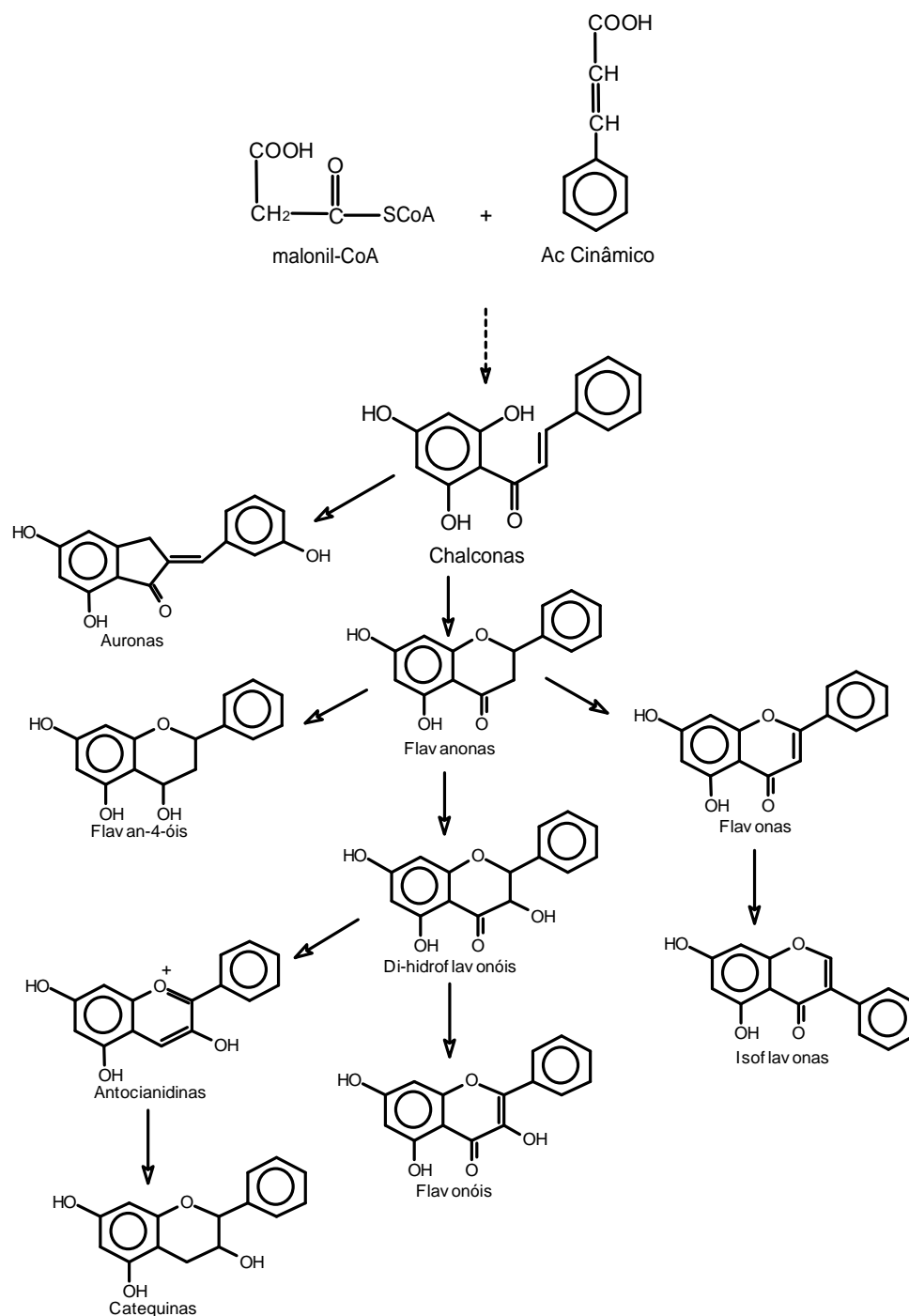
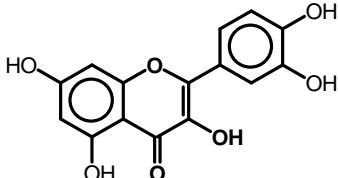
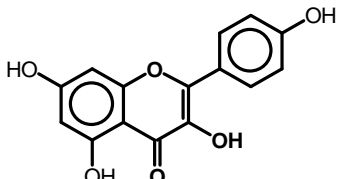
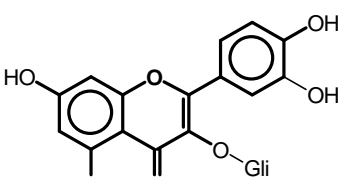
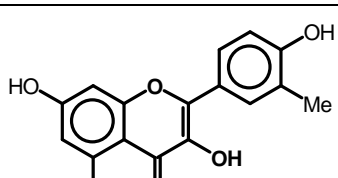
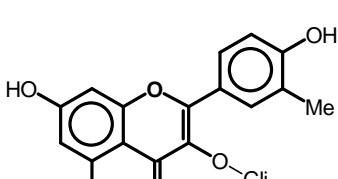
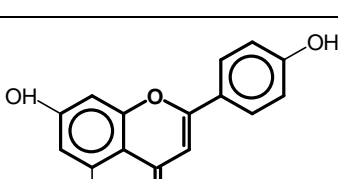


Figura 5: Representação esquemática da biossíntese dos flavonóides. (Adaptado de Wagner, 1993).

Tabela 2: Exemplos de flavonóides descritos para o gênero *Senecio*.

Classe de flavonóide	Estrutura	Referência
Flavonol (agliconas)	 <p>Quercetina</p>	Glennie et al., 1973 apud Mansour e Saleh, 1981.
	 <p>Canferol</p>	
Flavonol (o-heterosídeo)	 <p>Quercetina-3-O-glicosídeo</p>	Mansour e Saleh, 1981.
Flavonol (aglicona e seu O-heterosídeo)	 <p>Isoramnetina</p>	Mansour e Saleh, 1981.
	 <p>Isoramnetina-3-O-glicosídeo</p>	
Flavona (aglicona)	 <p>Apigenina</p>	Mansour e Saleh, 1981.

2.2.4 Xantonas

As xantonas são substâncias relativamente restritas às famílias Guttiferae e Gentianaceae. Possuem a mesma origem biossintética dos flavonóides, formando benzofenonas como intermediário ativo, que depois oxidam originando xantonas (Figura 6).

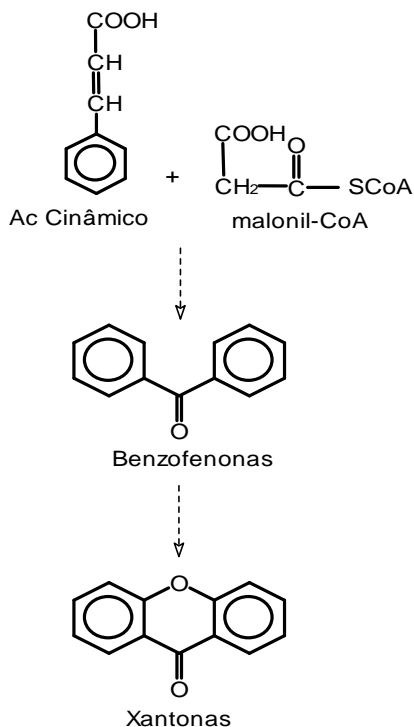


Figura 6: Representação esquemática da biossíntese das xantonas. (Adaptado de Wagner, 1993).

Das folhas de *S. mikanioides* Otto (ex Walpers), Catalano et al. (1996) isolaram uma complexa mistura de xantonas: mangiferina, isomangiferina, mangiferitina, tripterosídeo e uma nova xantona *p*-hidroxibenzoilada, denominada muraxantona (Figura 7).

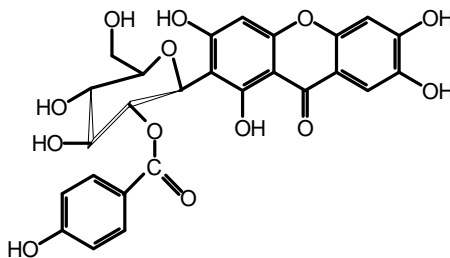
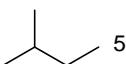
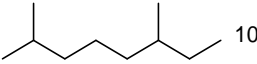
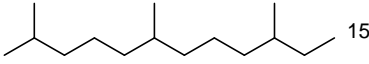
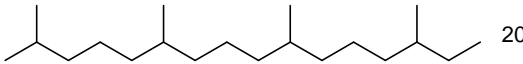
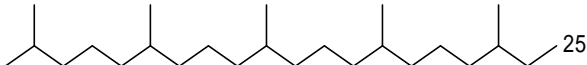
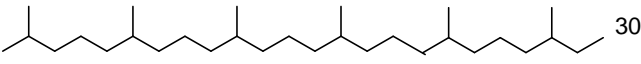
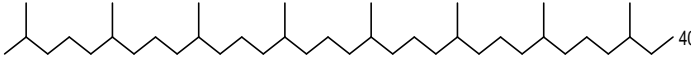


Figura 7: Muraxantona, isolada de *Senecio mikanioides*.

2.2.5 Terpenóides

Os terpenóides constituem uma classe de substâncias formadas a partir da condensação de moléculas de isopreno (C_5H_{10}) e são classificados de acordo com o número destas unidades (Tabela 3). A condensação das unidades de isopreno pode ser do tipo cabeça-cauda; cabeça-dorso; cauda-cauda; cauda-dorso, etc (Simões et al., 2003).

Tabela 3: Condensação de unidades de isopreno na formação dos terpenóides.

Nº de unidades	Nº de átomos de carbono	Nome
1	 5	Isopreno
2	 10	Monoterpenóides
3	 15	Sesquiterpenóides
4	 20	Diterpenóides
5	 25	Sesterpenóides
6	 30	Triterpenóides
8	 40	Tetraterpenóides
N		Poli-isoprenóides

Adaptado de Simões et al., 2003.

Os isoprenóides perfazem um largo grupo de metabólitos secundários, contando com mais de 30.000 compostos conhecidos, incluindo os esteróides (Dictionary of Natural Products, 2000 apud Umlauf et al., 2004). Estas unidades de isopreno derivam do isopentenil difosfato (IPP) e do dimetil-alil difosfato (DMAPP). A biossíntese do IPP/DMAPP pode ocorrer através de duas rotas diferentes. Uma é

oriunda da via do mevalonato (MVA), que se forma a partir do ácido acético. A segunda, que teve a seqüência de reações caracterizada a partir da década de 90, é formada a partir do piruvato e do gliceraldeído-3-fosfato, através da rota do metileritritol-4-fosfato (MEP) (Degenhardt et al., 2003; Umlauf et al., 2004) (Figura 8).

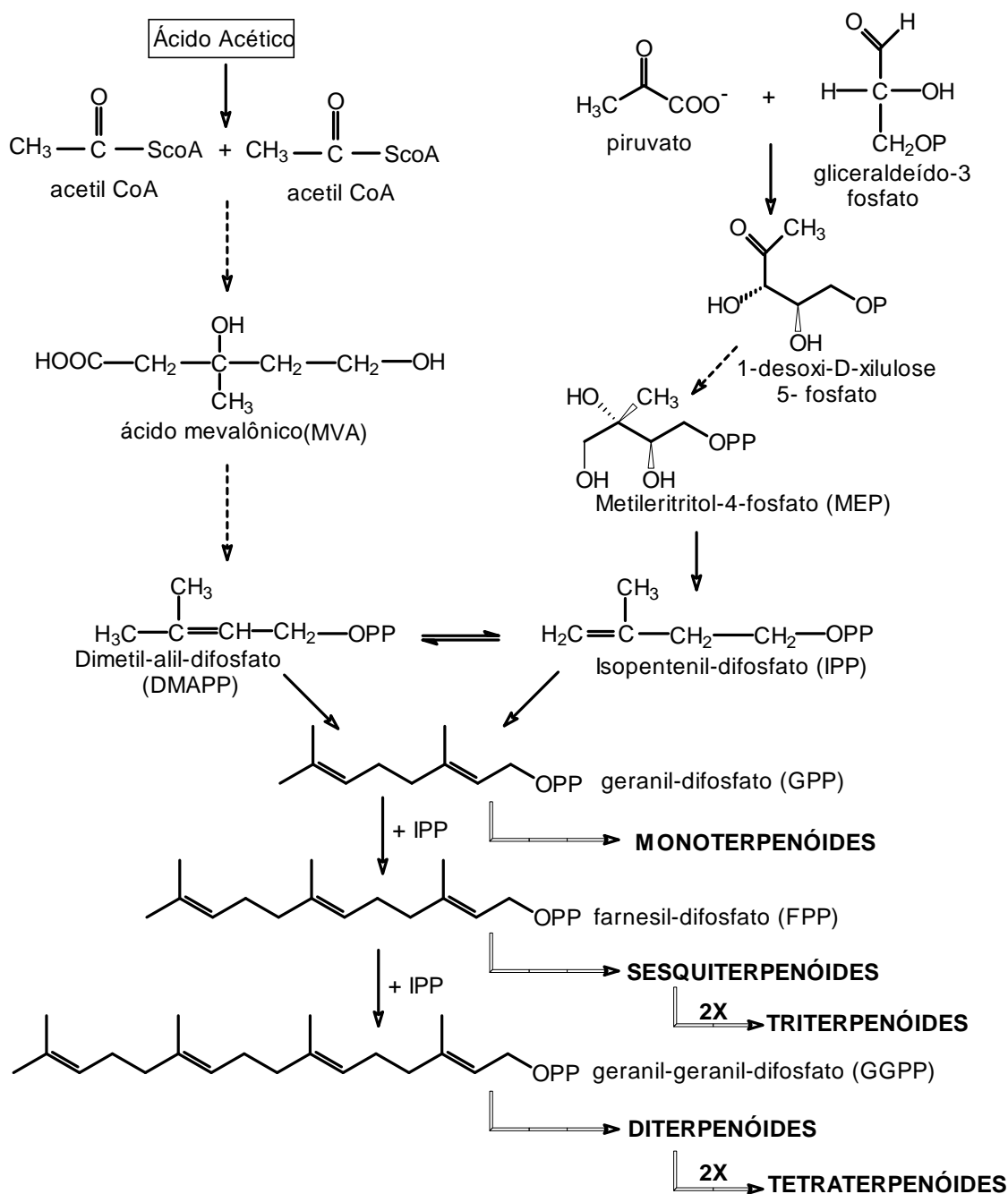


Figura 8: Representação esquemática da biossíntese dos terpenóides. (Adaptado de Wagner, 1993; Hänsel et al., 1999).

Nas plantas, a rota oriunda do metileritritol-4-fosfato (MEP) parece estar geralmente envolvida na formação de hemiterpenóides, monoterpenóides, diterpenóides e carotenóides. Os sesquiterpenóides e triterpenóides, por outro lado, seriam formados pela via do ácido mevalônico (MVA), ou a partir da combinação de ambas as rotas (Umlauf et al., 2004).

Os terpenos e derivados de baixo peso molecular aparecem nas plantas como constituintes principais dos óleos essenciais. São responsáveis pelo odor agradável e característico de muitos vegetais, e suas funções incluem defesa do organismo contra predadores e patógenos, interações alelopáticas, antioxidantes, bio-regulatórias e atração de polinizadores pelo aroma (Simões et al., 2003). Além disso, muitos destes constituintes são pesquisados em relação à sua atividade antimicrobiana. É grande o número de estudos acerca das atividades inibitórias produzidas por óleos essenciais e por constituintes de estrutura terpênica sobre o crescimento de microorganismos (Deuschle, 2003).

Entretanto, o mecanismo de ação dessa classe de constituintes ainda não está bem esclarecido. Em geral, os autores atribuem um mecanismo que envolve a desorganização e rompimento da membrana celular, explicada pelo caráter lipofílico dos terpenos (Cowan, 1999). Alguns estudos sugerem que estes compostos penetram na célula, interferindo no metabolismo. Outros, sugerem que eles afetam a membrana celular e reagem com enzimas ou agem como um carreador de H^+ , diminuindo os níveis de ATP (Guynot et al., 2003).

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

Os monoterpenóides são os compostos mais voláteis presentes nas plantas, devido ao seu baixo peso molecular. Estes compostos, muitas vezes, não estão presentes em grandes quantidades em algumas espécies vegetais, entre elas representantes do gênero *Senecio*. Além disso, de acordo com sua rota biossintética (Figura 8), podem ser transformados em sesquiterpenóides. Entretanto, alguns monoterpenóides foram isolados de *S. halimifolius* L. (Bohlmann e Zdero, 1978); *S. trichopterygius* Muscher (Bohlmann et al., 1980) e *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (Bohlmann e Zdero, 1982a) (Tabela 4). Segundo Bohlmann et al. (1981b), as partes

aéreas de *S. cleavelandii* Greene forneceram, dentre outros constituintes, três lactonas monoterpênicas (Tabela 4).

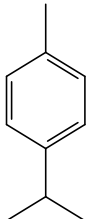
Muitos diterpenóides e seus derivados glicosilados tem sido isolados de plantas da família Asteraceae, mas poucos foram descritos em espécies do gênero *Senecio* (Black e Hargreaves, 1972; Cheng et al., 1993). Cheng et al. (1993) isolaram dois diterpenóides glicosilados do extrato butanólico das partes aéreas de *S. rufus* Hand-Mazz. Estes dois constituintes, de aspecto cristalino, foram denominados de rufusosídeo A e rufusosídeo B (Tabela 4).

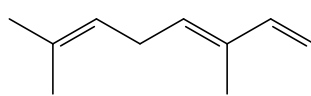
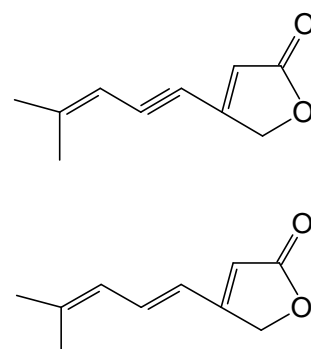
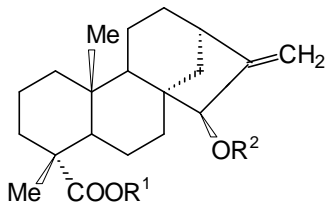
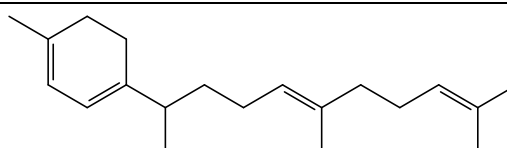
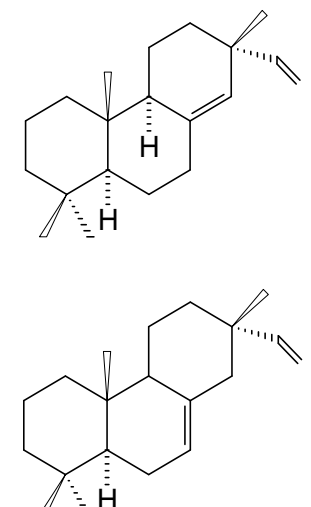
A partir de um estudo das raízes de *S. trichopterygius* Muscher, Bohlmann et al. (1980) isolaram vários terpenóides, dentre eles um diterpeno. Em 1982(a), Bohlmann e Zdero, isolaram dois derivados do tipo sandaracopimareno e seus acetatos das raízes de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (Tabela 4).

Os triterpenóides também são constituintes presentes no gênero *Senecio*. A literatura relata para algumas espécies a presença de compostos triterpenóides freqüentes nos vegetais, como esqualeno, lupenona, friedelina, lupeol, amirina, germaniconona e damaradienona (Bohlmann e Zdero, 1982a; Zdero et al., 1989; Abdo et al., 1992; Torres et al., 2000). Entretanto, também já foram isolados triterpenóides de estrutura inédita, como é o caso dos compostos polihidroxilados, isolados de *S. pseudotites* Griseb. (Tommasi et al., 1998) e dos triterpenóides tetracíclicos com esqueleto 9-epi-cucurbitano, isolados das partes aéreas de *S. selloi* Spreng. DC (Rücker et al., 1999) (Tabela 4).

Os sesquiterpenóides serão tratados no próximo capítulo, a parte, no intuito de fazer uma revisão mais detalhada acerca destes constituintes, uma vez que foram o objeto de estudo deste trabalho.

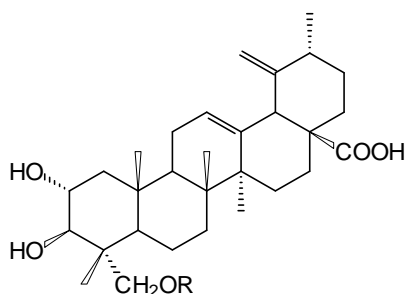
Tabela 4: Exemplos de mono, di e triterpenóides descritos para o gênero *Senecio*.

Classe de terpenóide	Estrutura	Referência
Monoterpenóide		Bohlmann e Zdero, 1978.

Monoterpenóide	 <p>Ocimeno</p>	Bohlmann et al., 1980; Bohlmann e Zdero, 1982a.									
Lactonas monoterpênicas		Bohlmann et al., 1981a.									
Diterpenóides	 <table data-bbox="535 1008 1071 1155"> <thead> <tr> <th></th> <th>R 1</th> <th>R 2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Rufusosideo A</td> <td>H</td> <td>α-L-arabinopiranosil</td> </tr> <tr> <td>Rufusosideo B</td> <td>β-D-glucopiranosil</td> <td>α-L-arabinopiranosil</td> </tr> </tbody> </table>		R 1	R 2	Rufusosideo A	H	α -L-arabinopiranosil	Rufusosideo B	β -D-glucopiranosil	α -L-arabinopiranosil	Cheng et al., 1993.
	R 1	R 2									
Rufusosideo A	H	α -L-arabinopiranosil									
Rufusosideo B	β -D-glucopiranosil	α -L-arabinopiranosil									
Diterpenóide		Bohlmann et al., 1980.									
Diterpenos do tipo sandara- copimareno		Bohlmann e Zdero, 1982a.									

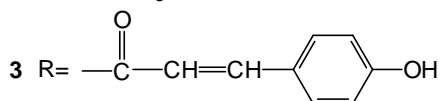
Triterpenóides
pentacíclicos

Tommasi et al.,
1998.



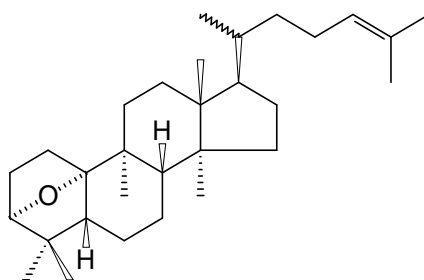
1 R= H

2 R= -COCH₃



Triterpenóides
tetracíclicos

Rücker et al.,
1999.



2.2.5.1 Sesquiterpenóides

Os sesquiterpenóides formam um grande grupo de produtos naturais, que podem ser encontrados em plantas, microorganismos e em alguns organismos marinhos. Nas plantas, estes constituintes possuem uma função ecológica muito importante, agindo na interação com insetos e micróbios. Além disso, são componentes de muitos óleos essenciais, os quais são largamente utilizados na indústria como flavorizantes e aromatizantes (Prosser et al., 2002).

Existem várias classificações possíveis para os sesquiterpenóides. Segundo Barbosa (1998), estas substâncias bem como todos os compostos terpenóides, devem ser classificadas em razão da rota metabólica por meio da qual são formadas e não de acordo com os grupos funcionais que possuem. Optou-se por utilizar esta classificação no capítulo que segue, onde serão abordados alguns derivados

sesquiterpenóides de interesse para o gênero *Senecio*, dando especial enfoque à biossíntese destes constituintes.

2.2.5.1.1 Biossíntese de sesquiterpenóides

Atualmente, são conhecidos mais de 300 esqueletos sesquiterpênicos diferentes, os quais são predominantemente formados a partir de substratos simples: o farnesil difosfato (FPP) ou o nerolidil difosfato (NPP) (Prosser et al., 2002). A partir do FPP, ocorre uma série de reações enzimáticas, promovendo ciclizações, eliminações e subsequentes rearranjos na molécula, originando vários intermediários importantes que serão os responsáveis pela formação dos diferentes esqueletos sesquiterpenóides.

Os intermediários de maior importância, segundo o conhecimento atual, apresentam esqueleto do tipo germacrano (representado na figura 9 como cátion germacrílico). Estes compostos são precursores biogênicos de várias estruturas sesquiterpênicas complexas como, por exemplo, os derivados dos tipos eudesmano e eremofilano (Bülow e König, 2000; Prosser et al., 2002; Steliopoulos et al., 2002; Brown et al., 2003). Os derivados de núcleos guaiano, cadinano e, obviamente, germacrano, também podem ser originados a partir de intermediários com esqueleto germacrano (Bülow e König, 2000).

A partir da ciclização do FPP, também podem formar-se outros compostos sesquiterpênicos, como os derivados de esqueleto bisabolano, humulano e cariofilano (Cai et al., 2002; Prosser et al., 2002) (Figura 9).

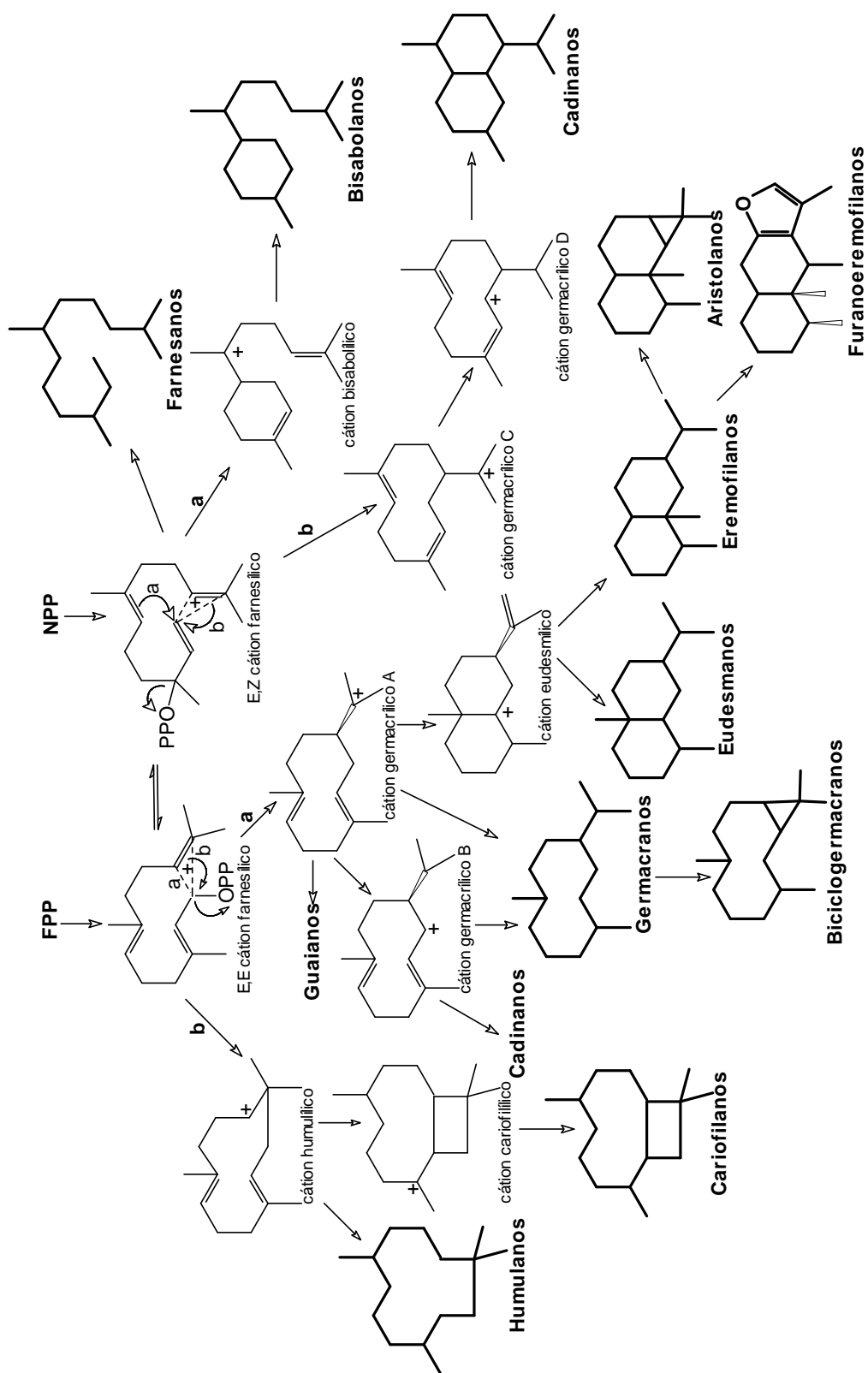


Figura 9: Representação esquemática da biossíntese de alguns compostos sesquiterpenóides. (Adaptado de Fricke, 1999; Bülow e König, 2000; Prosser et al., 2002; Greenhagen, 2003).

2.2.5.1.2 Derivados do eudesmano

Os eudesmanolídeos, constituintes de algumas espécies de *Senecio*, apresentam na sua estrutura algumas características específicas, que determinam a sua estereoquímica. Dentre elas está a presença de um grupamento hidroxila; de um grupamento exometilênico; uma dupla ligação trissubstituída; um grupamento isopropila; um grupamento metila na posição C-10; além da relação *cis* entre o grupamento isopropila em posição 7 com a metila (Brown et al., 2003). Os seus derivados podem, no decorrer das reações de transformação, perder algumas destas características.

Segundo Brown et al. (2003), os eudesmanos são formados a partir dos germacrenos pelo mecanismo de ciclização catiônica. Neste processo, inicialmente ocorre a protonação da dupla exometilênica e, em seguida, a adição da dupla Δ^5 , resultando na ciclização e formação do cátion-eudesmílico como intermediário. A partir deste, os eudesmanos são formados (Figura 10).

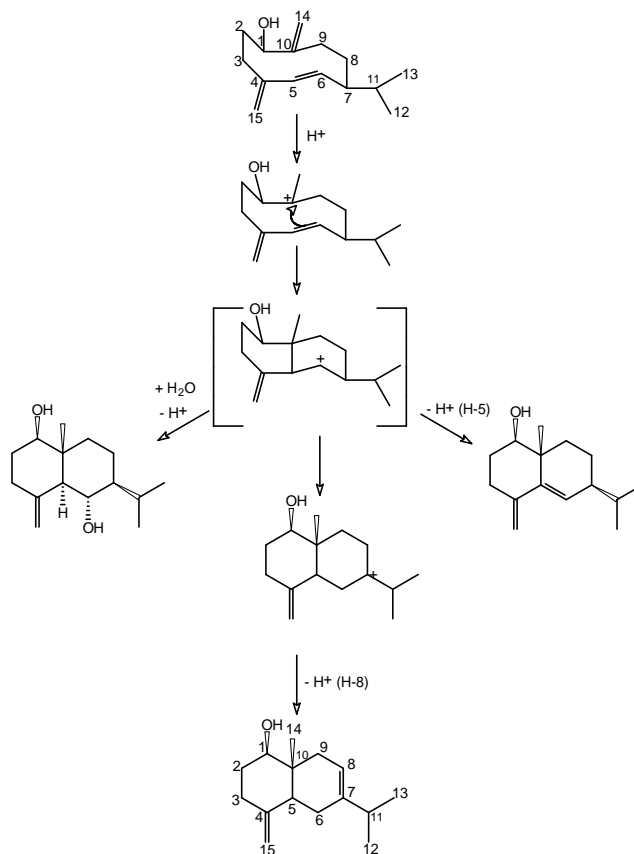
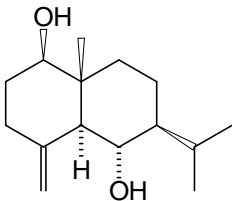
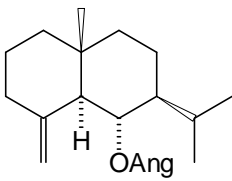
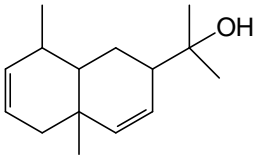


Figura 10: Representação esquemática da biossíntese dos eudesmanos. (Adaptado de Brown et al., 2003).

Na literatura não há muitos relatos de derivados do eudesmano que tenham sido isolados de espécies de *Senecio*. Entretanto, Bohlmann et al. (1983), isolaram alguns sesquiterpenóides do tipo eudesmano das partes aéreas de *S. microglossus* DC. Além disso, Pérez et al. (1999), isolaram o eudesmol do óleo essencial de *S. graveolens* Wedd. (Tabela 5).

Quanto às atividades biológicas, já foram descritas as propriedades antioxidantes e citotóxicas para os eudesmanolídeos (Barrero et al., 1997).

Tabela 5: Exemplos de derivados de núcleo eudesmano descritos para o gênero *Senecio*.

Eudesmanos	Estrutura	Referência
Diidro-eudesmano		Bohlmann et al.,1983.
Angelato do eudesmano		Bohlmann et al.,1983.
Eudesmol		Pérez et al.,1999.

2.2.5.1.3 Derivados do eremofilano

Os derivados de núcleo eremofilano já foram descritos para várias espécies de *Senecio*. A maioria destes compostos encontra-se na forma de furanoeremofilanos e são conhecidos por apresentarem uma alta toxicidade *in vivo* (Jares e Pomílio, 1989). Acredita-se que os mesmos sejam formados devido a presença de sistemas enzimáticos específicos, que possibilitam a transformação dos germacrenos nos eremofilanos, sendo que esta propriedade aparece com freqüência na subtribo Senecioninae, na qual encontra-se classificado o gênero *Senecio* e só

não é apresentada por pequenos subgrupos de espécies de *Senecio* (Bohlmann et al., 1979). Este fato levou os autores a sugerir que, no decorrer da evolução, estas espécies perderam as enzimas correspondentes, enquanto que, na maioria delas, novos sistemas enzimáticos surgiram, possibilitando a formação de furanoeremofilanos altamente substituídos. Estes, ao lado dos APs, provavelmente servem como defesa das espécies de *Senecio* contra mamíferos e insetos.

Entretanto, os estudos até agora realizados indicam que os furanoeremofilanos não estão presentes em todas as espécies de *Senecio*, além de serem relatados em vários outros gêneros (Bohlmann e Zdero, 1978; Bohlmann et al., 1985). Nas espécies que não biossintetizam este tipo de compostos, aparecem frequentemente altas concentrações de triterpenóides, principalmente do tipo lupano, bem como constituintes de esqueleto eudesmano e acilpirróis, que são derivados dos alcalóides pirrolizidínicos (Bohlmann et al., 1979). Estas últimas espécies, além da diferenciação nos constituintes químicos produzidos, também apresentam características morfoanatômicas diversas, uma vez que, geralmente são suculentas.

Nas espécies suculentas, que não sintetizam furanoeremofilanos, podem ser encontrados seus precursores, os eremofilanos, com função oxigenada em C8 (figura 11) (Bohlmann et al., 1986). Estes compostos já foram descritos para *S. erubescens* Ait. e *S. speciosus* Willd. (Bohlmann et al., 1985).

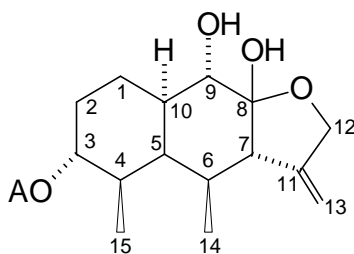
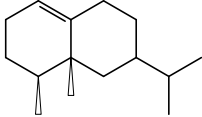
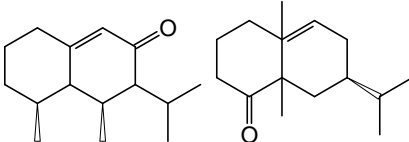
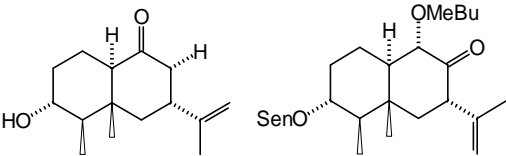
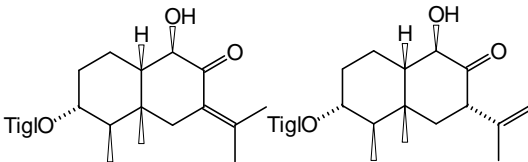
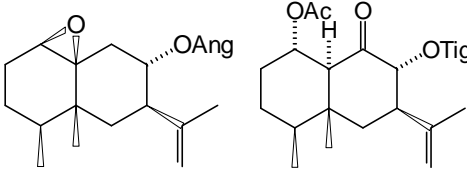
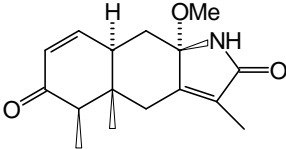
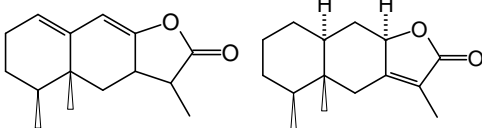
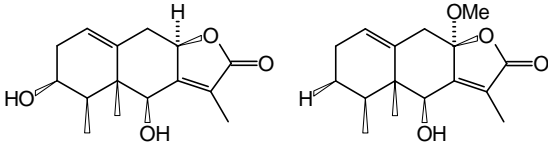
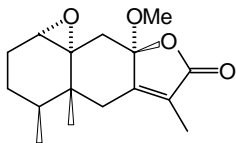
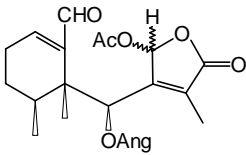
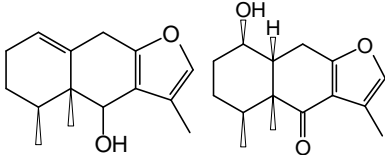
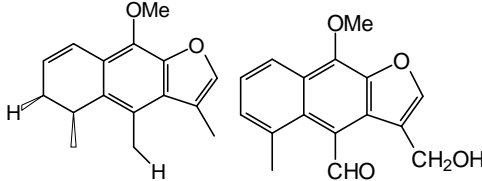
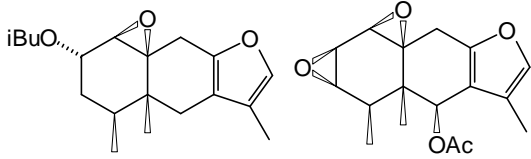
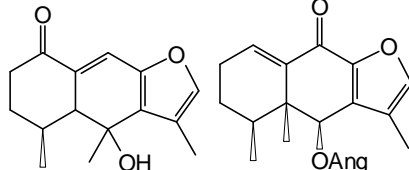
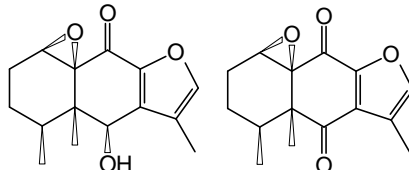
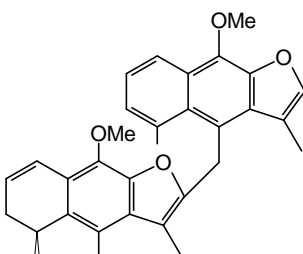


Figura 11: Substância precursora da biossíntese dos furanoeremofilanos.

Para o gênero *Senecio* já foram descritos vários compostos derivados do eremofilano. Dentre eles estão os furanoeremofilanos, presentes na maioria das espécies de *Senecio*, contando com um número variado de estruturas químicas. Os eremofilanos também podem originar as eremofilonas, os eremofilanolídeos, bem como eremofilenonas (Tabela 6).

Tabela 6: Exemplos de derivados de núcleo eremofilano descritos para o gênero *Senecio*.

Eremofilanos	Estrutura	Referência
Eremofileno eupateno		Bohlmann et al., 1981a.
Eremofilonas		Zdero et al., 1990.
Eremofilonas		Bohlmann et al., 1985; Zdero et al., 1989.
Eremofilonas		Bohlmann et al., 1983.
Eremofilenos		Jakupovic et al., 1991.
Lactama eremofilona		Torres et al., 1999.
Eremofilanolídeos		Nachman, 1983.
Eremofilanolídeos		Merikli et al., 1989; Morales et al., 2000.

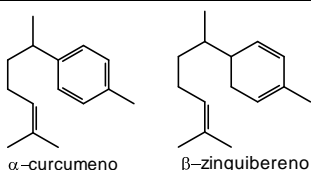
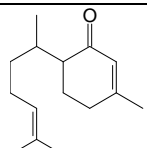
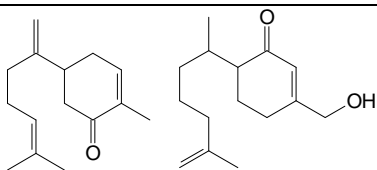
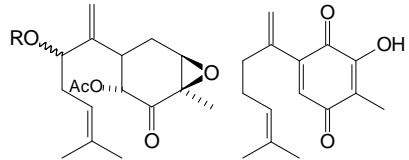
Eremofilanolídeos		Torres et al., 1999.
Seco-eremofilanolídeo		Bohlmann et al., 1981c; Trendafilova et al., 1995.
Furanoeremofilanos		Torres et al., 1998.
Furanoeremofilanos		Bohlmann e Bapuji, 1982.
Furanoeremofilanos		Bohlmann et al., 1986.
Furanoeremofilanos		Bohlmann et al., 1980.
Furanoeremofilanos		Bohlmann et al., 1981a.
Furanoeremofilanos		Abdo et al., 1992.

2.2.5.1.4 Derivados do bisabolano

Das raízes de *Senecio balsapampae* Cuatr. foram isolados os derivados do bisabolano α -curcumeno e β -zingibereno, enquanto que para as raízes de *S. inaequidens* DC., foi descrita apenas a presença do α -curcumeno (Bohlmann et al., 1980). Para *S. selloi* (Spreng) DC, foi descrita a presença de β -zingibereno, γ e α -curcumeno, bem como diversos peróxidos derivados destes hidrocarbonetos (Heinzmann, 1996) (Tabela 7).

Reina et al. (2002) isolaram uma bisabolona de *S. palmensis* Chr. Sm. e testaram este constituinte quanto à sua atividade inibidora do apetite. Neste estudo foi detectada uma atividade contra *Leptinotarsa decemlineata* e *Myzus persicae*. Estes resultados estão de acordo com a teoria de que os derivados do bisabolano possuem um papel importante no comportamento do inseto, agindo como ferormônios sexuais. Bohlmann et al. (1985) isolaram alguns derivados do bisabolano das espécies *S. erubescens* Ait., *S. macroglossus* DC., *S. affinis* DC. e *S. longifolius* L. (Tabela 7).

Tabela 7: Exemplos de derivados de núcleo bisabolano descritos para o gênero *Senecio*.

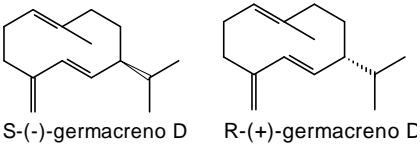
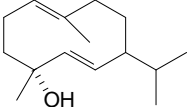
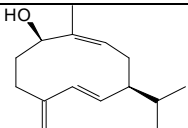
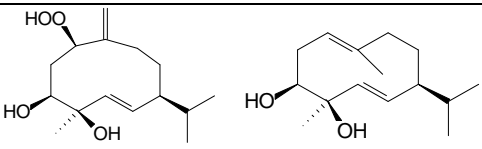
Bisabolanos	Estrutura	Referência
Bisabolenos	 <p>α-curcumeno β-zingibereno</p>	Bohlmann et al., 1980. Heinzmann, 1996.
Bisabolona		Reina et al., 2002.
Bisabolonas		Bohlmann et al., 1985.
Bisabolonas		Bohlmann et al., 1985.

2.2.5.1.5 Derivados do germacrano

Dentre os derivados do germacrano, um dos constituintes mais citados para as diversas espécies de *Senecio* é o germacreno-D (Tabela 8). Ele é um composto intermediário chave na biossíntese de muitos sesquiterpenóides, conforme citado no item 2.2.1 (Figura 8), sendo muito utilizado para formação de novos compostos através de reações enzimáticas. (Bülow e König, 2000). O germacreno-D é encontrado na natureza na forma de seus dois isômeros, S e R; o isômero S ocorre principalmente em plantas superiores, enquanto que o R ocorre em plantas inferiores (Steliopoulos et al., 2002).

Outros derivados do germacrano também têm sido descritos para o gênero *Senecio*. Das partes aéreas de *S. smithii* DC., Bohlmann et al. (1981a) isolaram um álcool derivado do germacrano: o carbinol (Tabela 8). As partes aéreas de *S. philippicus* Regel et Koern. apresentaram, dentre outros constituintes, o germacreno-D e o germacratrieno (Jakupovic et al., 1991). Algumas espécies sul-africanas de *Senecio* possuem derivados do germacrano altamente oxigenados (Dupré et al., 1991) (Tabela 8). Nestas espécies, entretanto, não foram encontrados os derivados do eremofilano, bem como furanoeremofilanos.

Tabela 8: Exemplos de derivados de núcleo germacrano descritos para o gênero *Senecio*.

Germacranos	Estrutura	Referência
Germacreno-D	 <p>S-(-)-germacreno D R-(+)-germacreno D</p>	Bohlmann et al., 1980; Steliopoulos et al., 2002.
Carbinol		Bohlmann et al., 1981a.
Germacratrieno		Jakupovic et al., 1991.
Germacrenos oxigenados		Dupré et al., 1991.

2.2.5.1.6 Derivados do humulano e do cariofilano

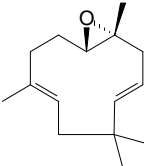
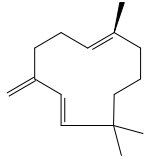
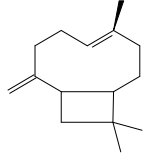
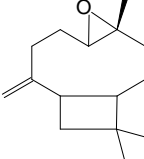
Os derivados do humulano são sesquiterpenóides conhecidos por apresentarem potentes atividades fitotóxicas e citotóxicas. Reina et al. (2002) descreveram uma atividade inibidora do apetite para alguns destes compostos, dentre eles encontra-se o óxido de humuladieno (Tabela 9).

Dentre os derivados do humulano, o isohumuleno foi isolado das raízes de *S. inaequidens* DC. (Bohlmann et al., 1980).

Os derivados do cariofilano, bem como os humulanos, também possuem atividade citotóxica. Além disso, alguns representantes desta classe já foram descritos por apresentarem atividade antimalárica (Reina et al., 2002).

Um dos derivados do cariofilano vastamente encontrado nas plantas, é o β -cariofileno (Tabela 9). Este composto já foi isolado em algumas espécies de *Senecio* e apresenta várias atividades biológicas (Cai et al., 2002). O óxido de cariofileno também aparece freqüentemente nestas espécies e parece ser um artefato produzido a partir do cariofileno (Sköld et al., 2005).

Tabela 9: Exemplos de derivados de núcleo humulano e cariofilano descritos para o gênero *Senecio*.

Humulanos/Cariofilanos	Estrutura	Referência
Óxido de humuladieno		Reina et al., 2002.
Isohumuleno		Bohlmann et al., 1980.
Cariofileno		Cai et al., 2002. Silva et al., 2005.
Óxido de cariofileno		Reina et al., 2002.

2.2.5.1.7 Sesquiterpenóides com grupamento peróxido

Os peróxidos de origem natural são metabólitos secundários com alto grau de oxigenação, que pertencem a diferentes classes de constituintes vegetais. Entretanto, no caso do gênero *Senecio*, a maioria deles apresenta esqueleto sesquiterpenóide.

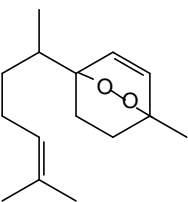
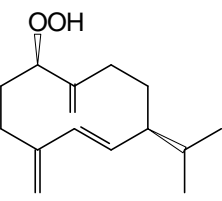
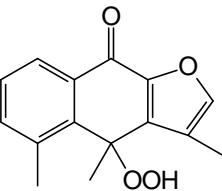
As substâncias precursoras dos peróxidos geralmente são olefinas, muitas vezes, constituintes comuns de óleos essenciais de várias espécies vegetais. Estes são formados através da adição de oxigênio singlete à dupla ligação e sofre a influência direta da radiação UV (Kiefer, 1993).

Para o gênero *Senecio* já foram descritos vários sesquiterpenóides com grupamento peróxido, ocorrendo tanto na forma de endoperóxidos quanto de hidroperóxidos (Tabela 10). Das raízes de *S. trichopterygius* Muscher, Bohlmann et al. (1980) isolaram um endoperóxido derivado do bisabolano; das folhas de *S. canescens* Humb., Abdo et al. (2002) obtiveram um hidroperóxido derivado do eremofilano; e das partes aéreas de *S. glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler, Bohlmann e Gupta (1982) isolaram um hidroperóxido derivado do germacreno-D. Este peróxido foi preparado por semi-síntese a partir de seu precursor, obtido de *S. heterotrichus* DC. e teve a sua atividade antimicrobiana avaliada. A substância apresentou atividade antifúngica contra *Saccharomices cerevisiae* com uma concentração inibitória mínima (CIM) de 2,5 mg/mL (Francescato et al., 2003; Francescato et al., 2005).

Além das espécies já citadas, constituintes com grupamento peróxido foram descritos para *S. paludaffinis* Hilliard, *S. desfontainei* Druce, *S. reicheanus* Cabrera, *S. adenophyllus* Meyen e Walpers e *S. selloi* Spreng DC. (Bohlmann et al., 1978; Metwally e Dawidar, 1986; Dupré et al., 1991; Heinzmann, 1996; Rücker et al., 1996).

Os peróxidos são substâncias potencialmente antimaláricas. O peróxido artemisinina, isolado da Composta *Artemisia annua*, é empregado atualmente com sucesso na China nos casos de malária causados por *Plasmodium vivax* e *P. falciparum*, também apresentando-se ativo nos casos de cepas resistentes à cloroquina e nas formas cerebrais de malária. Estudos da relação estrutura-atividade demonstram que o potencial antimalárico da artemisinina está diretamente relacionado ao grupamento peróxido (Hostettmann et al., 2003).

Tabela 10: Exemplos de sesquiterpenóides com grupamento peróxido descritos para o gênero *Senecio*.

Classe de Peróxido	Estrutura	Referência
Endoperóxido derivado do bisabolano		Bohlmann et al., 1980.
Hidroperóxido derivado do germacrano		Bohlmann e Gupta, 1982.
Hidroperóxido derivado do eremofilano		Abdo et al., 1992.

2.3. *Senecio bonariensis* Hook. et Arn.

2.3.1 Descrição botânica

Senecio bonariensis Hooker et Arnott, popularmente conhecida como “margarida-do-banhado-de-Buenos Aires” é um arbusto perene, rizomatoso, de 1 a 2 metros de altura, lanuginoso-tomentoso nas partes jovens, logo glabro, com talos grossos, fistulosos e simples. A espécie possui folhas semicarnosas, as inferiores longamente pecioladas, com lâmina ovado-deltóidea, aguda no ápice e cordada ou sagitada na base e dentada na margem, de 10 a 35 cm de comprimento por 4 a 20 cm de largura, com pecíolo cilíndrico, fistuloso de 8 a 40 cm de comprimento. As folhas medianas são ovado-lanceoladas, curtamente pecioladas, agudas no ápice e atenuadas na base, com pecíolo largamente auriculado, gradualmente menores. Já as folhas superiores são lanceoladas e sésseis (Cabrera e Klein, 1975; Matzenbacher, 1998) (Figuras 12 e 13).

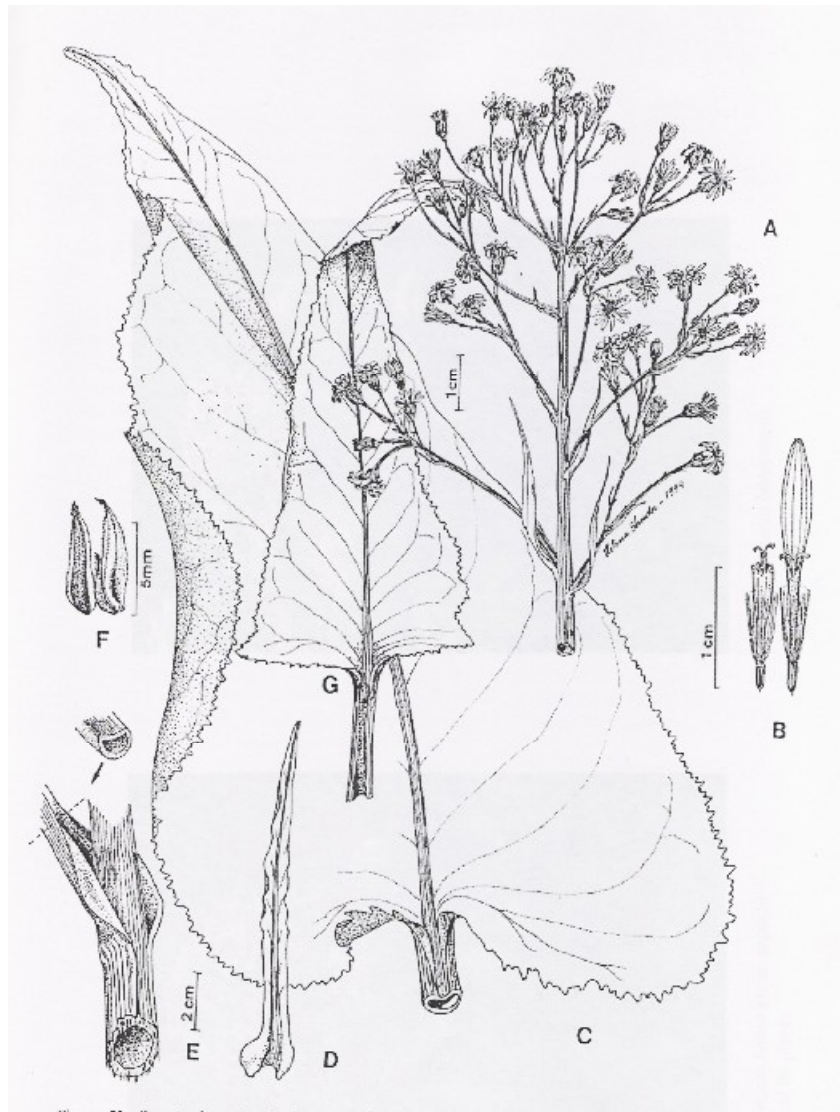


Figura 12: *Senecio bonariensis* Hook. et Arn. – folhas: A- ramo florífero; B- flor tubulosa do disco e flor ligulada do raio, respectivamente; C- folha basal rosulada; D- bráctea da inflorescência; E- detalhes do caule e do pecíolo fistulosos; F- brácteas involucreis; G- folha basal do caule. (FONTE: Matzenbacher, 1998).

Segundo Cabreira e Klein (1975) os capítulos são muito numerosos, radiados, dispostos num amplo corimbo definido denso, com involucre campanulado, curtamente caliculado, de 5 – 7 mm de altura, por 10 mm de diâmetro. As brácteas involucreis são ao redor de 20, oblongo-lineares, agudas e ciliadas no ápice; glabras ou lanuginosas no dorso. Apresenta flores dimorfas: as marginais brancas, femininas, liguladas; as do disco, amarelas, hermafroditas e tubulosas. Aquênios glabros. Pápus branco.

Segundo Matzenbacher (1998), *Senecio bonariensis* Hooker et Arnott apresenta as seguintes sinónimas:

- *Senecio hualtata* Griseb.,
- *Senecio ochroleucus* var. β Hook. et Arn.,
- *Senecio rhodaster* Baker
- *Senecio sagittifolius* Baker, e
- *Senecio sagittarioides* Spegazzini.



Figura 13: *Senecio bonariensis* Hook. et Arn. – aspecto geral da planta. (FONTE: Matzenbacher, 1998).

2.3.2 Dados fenológicos e observações ecológicas

A espécie *S. bonariensis* Hook. et Arn. é encontrada nas regiões úmidas do nordeste e central da Argentina, sendo que também cresce no Uruguai (Jares et al., 1990) e em algumas regiões do sul do Brasil (Cabrera e Klein, 1975; Matzenbacher, 1998), tanto nos banhados do planalto, bem como no litoral. Como é uma espécie exclusiva de banhados, apresenta dispersão vasta, porém, bastante irregular, descontínua e inexpressiva. Entretanto, pode formar, muito raramente, pequenos agrupamentos (Cabrera e Klein, 1975; Matzenbacher, 1998).

É uma espécie heliófita e seletiva higrófito, que floresce na primavera, de outubro a dezembro. Além disso, é uma erva muito semelhante a *S. jürgensii* Matff. e *S. icoglossus* DC.

2.3.3 Constituintes químicos descritos para *Senecio bonariensis* Hook. et Arn.

Para *S. bonariensis* a literatura científica relata um estudo realizado a partir do extrato etanólico de suas raízes, do qual foram isolados dois esteróides derivados do sitosterol, os heterosídeos 3-O- β -D-glicuronopiranosídeo e 3-O- β -D-glicopiranosídeo; também foi isolado o 3-O- β -D-glicopiranosídeo do stigmasterol (Tabela 11). O primeiro heterosídeo teve sua estrutura confirmada por dados espectroscópicos e conversões químicas, porém suas atividades biológicas ainda não foram avaliadas (Jares et al., 1990; Tettamanzi et al., 1992).

A partir de um extrato das raízes de *Senecio bonarienses* também foram isolados e identificados quatro furanoeremofilanos tóxicos: 6 β -isobutiroiloxi-10 α H-9-oxofuranoeremofilano, 1 α ,6 β -diacetoxi-10 β H-9-oxofuranoeremofilano, 1 α -acetoxi-6 β -angeloiloxi-10 α ,H-9-oxofuranoeremofilano e 6 β -angeloiloxi-10 α ,H-9-oxofuranoeremofilano (Pomilio e Jares, 1997) (Tabela 11).

Das partes aéreas de *S. bonariensis*, Paiva e colaboradores (2004) identificaram dois alcalóides pirrolizidínicos: senecionina e platifilina (Tabela 11).

Tabela 11: Constituintes químicos descritos para *Senecio bonariensis* Hook. et Arn.

Classe de Constituinte	Estrutura	Referência
Esteróide derivado do sitosterol	<p>3-O-β-D-glicuronopiranosídeo</p>	Jares et al., 1990.
Sesquiterpenóides do tipo furanoeremofilano		Pomílio e Jares, 1997.
Alcalóides pirrolizidínicos do tipo senecionina	<p>Senecionina Platifilina</p>	Paiva et al., 2004.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Procedimentos gerais

Os solventes e reagentes utilizados foram procedentes das marcas Belga, Quimex, Vetec ou Merck e de grau p.a. Todos os solvente e a água utilizados nos experimentos e na preparação de reagentes e diluentes foram destilados.

Para as cromatografias analíticas em camada delgada (CCD) foram utilizadas cromatofolhas com gel de sílica GF₂₅₄ 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 fases móveis foram utilizados vários eluentes, tais como diclorometano (CH₂Cl₂), hexano:acetona, hexano:acetato de etila e hexano:éter etílico em diferentes proporções. Em alguns casos, o gel de sílica foi impregnado 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.

Para as cromatografias em coluna (CC) foram utilizados gel de sílica 60 Merck com tamanhos de partículas 63-200 µm. Eventualmente o gel de sílica também foi impregnado com solução de nitrato de prata 10% (Stahl, 1969).

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 ¹H e ¹³C (RMN ¹H e RMN ¹³C); e espectroscopia no infravermelho (IV). Os espectros de massas foram obtidos no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) e os de RMN, no Departamento de Química, da UFSM. Os espectros de IV foram obtidos na Central Analítica da UNISC.

Os seguintes equipamentos foram utilizados no desenvolvimento do trabalho:

- Balança analítica OHAUS Voyager;
- Balança semi-analítica MARTE AS5500C;
- Banho de ultrassom THORNTON Unique;
- Bomba de vácuo PRIMAR;
- 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 (1 mL/min); coluna capilar de sílica fundida HP5MS (Hewlett Packard, 5 % fenilmetilsiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm di, espessura do filme: 0,25 μ m); programa da análise: 40°C (Ti) por 4 min, 40-260°C, 4°C/min; temperatura do injetor: 220°C; energia de ionização: 70 eV; banco de dados: NIST, 1998;

- Espectrômetro de IV NICOLET MAGNA 550, com Acessório de Refletância Total Atenuada Horizontal (HATR), para amostras líquidas e oleosas, e, Acessório de Refletância Difusa com Transformada de Fourier (DRIFTS), para amostras sólidas.

- Espectrômetro de RMN BRUCKER DPX. Para a obtenção dos espectros de RMN (RMN ^1H \rightarrow 400 MHz e RMN ^{13}C \rightarrow 100 MHz), as amostras foram solubilizadas em CDCl_3 ;

- 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.

3.2 Material vegetal

As partes aéreas de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn. foram coletadas em abril de 2004, no município de Eldorado do Sul – RS. 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 n° SMDDB 9519.

3.3 Preparação do extrato

A extração do material vegetal fresco foi realizada pelo processo de maceração, utilizando-se diclorometano como solvente. As folhas frescas da planta foram grosseiramente divididas com auxílio de podões, pesadas, colocadas em frasco âmbar e recobertas com o solvente, sendo submetidas a agitação diária (1ª maceração). Após um período de oito dias, o líquido extrativo foi filtrado e

concentrado e o material vegetal foi então recoberto com nova quantidade do mesmo solvente (2ª maceração). Transcorridos mais oito dias, este segundo líquido extrativo foi filtrado e concentrado e os dois extratos resultantes, da primeira e segunda macerações foram reunidos, obtendo-se desta forma, o extrato diclorometânico bruto, que teve seu peso seco determinado para cálculo do rendimento.

3.4. Fracionamento preliminar do extrato diclorometânico bruto

O fracionamento preliminar do extrato iniciou-se através de cromatografia em coluna do tipo flash. Nesta técnica, o gel de sílica foi suspenso no eluente (diclorometano) e a suspensão foi transferida para uma coluna de vidro, a qual possui uma das extremidades afilada e munida de torneira. Após a transferência e compactação do adsorvente, a amostra foi ressuspensa em pequena quantidade de eluente e aplicada sobre a coluna de gel de sílica.

Os constituintes do extrato foram eluídos através da coluna com o auxílio de uma bomba de vácuo acoplada à extremidade superior desta. As frações recolhidas possuíam 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 revelador, sendo que as frações foram reunidas conforme a semelhança de seus constituintes.

3.4.1. Coluna 1

Coluna: 225 g de gel de sílica 60 para cromatografia em coluna.

Amostra: 13,5 g do extrato CH_2Cl_2 de *S. bonariensis*.

Eluente: CH_2Cl_2 (frações 1 - 16) e misturas de CH_2Cl_2 : EtOH, em gradiente, nas proporções de 99:1 até 80:20 (frações 17 – 33).

Foram coletadas 33 frações de volume variável (Tabela 12).

Tabela 12: Rendimento das frações obtidas da coluna 1.

Frações	Código	Rendimento (g)
Fração 1	1 col. 1	1,00
Frações 2 e 3	2 col. 1	0,53
Frações 4 – 6	3 col. 1	0,59
Frações 7 e 8	4 col. 1	0,67
Fração 9	5 col. 1	0,68
Fração 10	6 col. 1	0,78
Frações 11 e 12	7 col. 1	0,97
Frações 13 e 14	8 col. 1	0,64
Frações 15 – 20	9 col. 1	0,62
Frações 21 e 22	10 col. 1	1,47
Frações 23 e 24	11 col. 1	1,40
Fração 25	12 col. 1	1,43
Frações 26 – 28	13 col. 1	2,54
Frações 29 – 31	14 col. 1	0,13
Frações 32 e 33	15 col. 1	0,03
TOTAL		13,48

As frações obtidas da coluna 1 (descrita no item 3.4.1) foram analisadas por CCD, utilizando-se o CH_2Cl_2 como eluente. Após revelação da placa com anisaldeído-ácido sulfúrico, observou-se manchas características de terpenóides em 1 e 2 col. 1. Na sequência, optou-se por trabalhar inicialmente com 1 col.1, devido a mesma apresentar um maior rendimento.

3.5 Isolamento dos sesquiterpenóides CS1, CS2 e CS3

O isolamento dos constituintes de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn., foi realizado através da cromatografia em coluna, seguindo-se a mesma técnica descrita no item 3.4, porém sem a utilização de pressão.

3.5.1 Coluna 2

Coluna: 100 g de gel de sílica 60, impregnado com AgNO_3 (sol. 10%).

Amostra: 1,0 g de 1 col. 1.

Eluente: hexano:acetona (99:1).

Vazão: 30 gotas/minuto.

Foram coletadas 160 frações de 20 mL (Tabela 13).

Tabela 13: Rendimento das frações obtidas da coluna 2.

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 0 – 31	1 col. 2	69,1
Frações 32 – 35	2 col. 2	4,6
Frações 36 – 43	3 col. 2	17,7
Frações 44 – 48	4 col. 2	2,4
Frações 49 – 85	5 col. 2	13,1
Frações 86 – 91	6 col. 2	149,8
Frações 92 – 104	7 col. 2	13,5
Frações 105 – 108	8 col. 2	4,9
Frações 109 – 114	9 col. 2	85,9
Frações 115 – 121	10 col. 2	253,6
Frações 122 – 125	11 col. 2	83,5
Frações 126 – 144	12 col. 2	9,4
Frações 145 – 160	13 col. 2	18
TOTAL		725,5

Através da análise em CCD, observou-se que 9, 10 e 11 col. 2 apresentavam dois compostos terpenóides majoritários e optou-se por trabalhar com estas frações.

3.5.2 Coluna 3

Coluna: 13 g de gel de sílica 60, impregnado com AgNO_3 (sol. 10%).

Amostra: 136 mg de 10 col. 2.

Eluente: hexano:acetona (99:1).

Vazão: 15 gotas/minuto.

Foram coletadas 65 frações de 10 mL (Tabela 14).

Tabela 14: Rendimento das frações obtidas da coluna 3.

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 0 – 27	1 col. 3	5,4
Frações 28 e 29	2 col. 3	11,3
Frações 30 – 35	3 col. 3	70
Frações 36 – 40	4 col. 3	33
Frações 41 – 46	5 col. 3	11,4
Frações 47 – 65	6 col. 3	3,2
TOTAL		134,3

Pelo perfil cromatográfico em CCD, observou-se que este sistema não foi capaz de separar as duas substâncias presentes em maior quantidade em 10 col. 2. Sendo assim, realizou-se nova coluna, modificando-se o sistema.

3.5.3 Coluna 4

Coluna: 12 g de gel de sílica 60, impregnado com AgNO_3 (sol. 10%).

Amostra: 116 mg de 10 col. 2.

Eluente: hexano: éter etílico (95:5).

Vazão: 10 gotas/minuto.

Foram coletadas 8 frações de 10 mL (Tabela 15).

Tabela 15: Rendimento das frações obtidas da coluna 4.

Frações	Código	Rendimento (mg)
Fração 0	1 col. 4	3,3
Frações 1 e 2	2 col. 4	18
Frações 3 - 5	3 col. 4	70
Frações 6 – 8	4 col. 4	15
TOTAL		106,3

Pelo perfil cromatográfico em CCD, 3 col. 4 demonstrou tratar-se de uma substância isolada que recebeu a denominação de CS1. A mesma foi submetida à análise por CG-EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e IV. Como a separação com este sistema foi eficiente, realizou-se nova coluna a partir de 3, 4 e 5 col. 3, no intuito de separar os dois componentes majoritários da mistura.

Substância CS1: Óleo amarelo claro. $R_f = 0,56$ (gel de sílica F_{254} impregnado com AgNO_3 10%; hexano: acetato de etila 97:3, 3 migrações; visualização após nebulização com anisaldeído-ácido sulfúrico). IV ν_{max} 2930, 2850, 1640, 1450, 885 cm^{-1} (Figura 18, p. 74). EM-IE 70 eV, m/z 204 $[\text{M}]^+$ (4), 189 (10), 175 (5), 161 (18), 147 (15), 133 (50), 120 (24), 105 (39), 93 (65), 91 (66), 79 (60), 69 (63), 55 (35), 41 (100), calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ 204 g (Figura 15, p. 71). Para RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) e RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ver Tabelas 19 e 20 (p. 75 e 76) e Figuras 16 e 17 (p. 72 e 73).

3.5.4. Coluna 5

Coluna: 11 g de gel de sílica 60, impregnado com AgNO_3 (sol. 10%).

Amostra: 110 mg de 3, 4 e 5 col. 3.

Eluente: hexano: éter etílico (98:2).

Vazão: 10 gotas/minuto.

Foram coletadas 150 frações de 10 mL (Tabela 16).

Tabela 16: Rendimento das frações obtidas da coluna 5.

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 1 – 45	1 col. 5	4,3
Frações 46 – 64	2 col. 5	16
Frações 65 – 70	3 col. 5	2,7
Frações 71 – 77	4 col. 5	3,2
Frações 78 – 89	5 col. 5	8
Frações 90 – 96	6 col. 5	12
Frações 97 – 135	7 col. 5	34
Frações 136 – 150	8 col. 5	7,8
TOTAL		88

Através desta coluna, foi isolada maior quantidade da substância CS1 (7 col. 5), obtida anteriormente da coluna 4. Entretanto, 2 col. 5 também demonstrou tratar-se de uma substância isolada e foi denominada de CS2, com características físicas diferentes de CS1. A mesma foi submetida à análise por CG-EM, RMN ^{13}C e ^1H e IV.

Substância CS2: Cristais incolores. Rf = 0,67 (gel de sílica F₂₅₄ impregnado com AgNO₃ 10%; hexano: acetato de etila 97:3, 3 migrações; visualização após nebulização com anisalaldeído-ácido sulfúrico). IV ν_{max} 3070, 2950, 2850, 1785, 1620, 1465, 1265, 1050, 870 cm^{-1} (Figura 25, p. 86). EM-IE 70 eV, m/z 220 [M]⁺ (1), 205 (3), 187 (5), 177 (7), 161 (10), 149 (12), 135 (15), 121 (28), 109 (43), 93 (73), 79 (96), 69 (55), 55 (45), 43 (88), 41 (100), calculado para C₁₅H₂₄O 220 g (Figura 21, p. 82). Para RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) e RMN ^1H (400 MHz, CDCl₃) ver Tabelas 21 e 22 (p. 87 e 88) e Figuras 22, 23 e 24 (p. 83 a 85).

3.5.5 Coluna 6

No intuito de obter maior quantidade das substâncias isoladas, foi realizada nova coluna.

Coluna: 10 g de gel de sílica 60, impregnado com AgNO₃ (sol. 10%).

Amostra: 83,5 mg de 11 col. 2

Eluente: hexano: éter etílico (98:2).

Vazão: 10 gotas/minuto.

Foram coletadas 125 frações de 10 mL (Tabela 17).

Tabela 17: Rendimento das frações obtidas da coluna 6.

Frações	Código	Rendimento (mg)
Frações 1 - 50	1 col. 6	3,5
Frações 51 - 75	2 col. 6	1,6
Frações 76 - 83	3 col. 6	18
Frações 84 - 108	4 col. 6	3,2
Frações 109 - 111	5 col. 6	5,0
Frações 112 - 114	6 col. 6	7,7
Frações 114 - 125	7 col. 6	3,4
TOTAL		42,4

Pelo perfil cromatográfico, 2 col. 6 demonstrou ser a substância CS2. Porém, após CG-EM constatou-se que a mesma não estava pura. As frações 109 – 111 (5 col. 6) ao serem analisadas por CCD, também sugeriram tratar-se de uma substância isolada, que foi denominada de CS3. Esta foi submetida à análise por CG-EM, RMN ^1H e IV.

Substância CS3: Óleo incolor. Rf = 0,20 (gel de sílica F_{254} impregnado com AgNO_3 10%; hexano: éter etílico 98:2, 3 migrações; visualização após nebulização com anisaldeído-ácido sulfúrico). IV ν_{max} 2930, 1450, 985, 880 cm^{-1} (Figura 31, p. 98). EM-IE 70 eV, m/z 204 $[\text{M}]^+$ (17), 161 (100), 147 (7), 133 (25), 105 (77), 91 (73), 79 (41), 55 (24), 41 (62), calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ 204 g (Figura 28, p. 95). Para RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) ver Tabela 23 (p. 99) e Figuras 29 e 30 (p. 96 e 97).

A partir da seqüência de colunas descritas anteriormente, foi possível isolar três compostos, partindo-se da primeira fração do extrato diclorometânico de *S. bonariensis*. Uma representação esquemática do isolamento das substâncias CS1, CS2 e CS3 pode ser visualizada na figura 14.

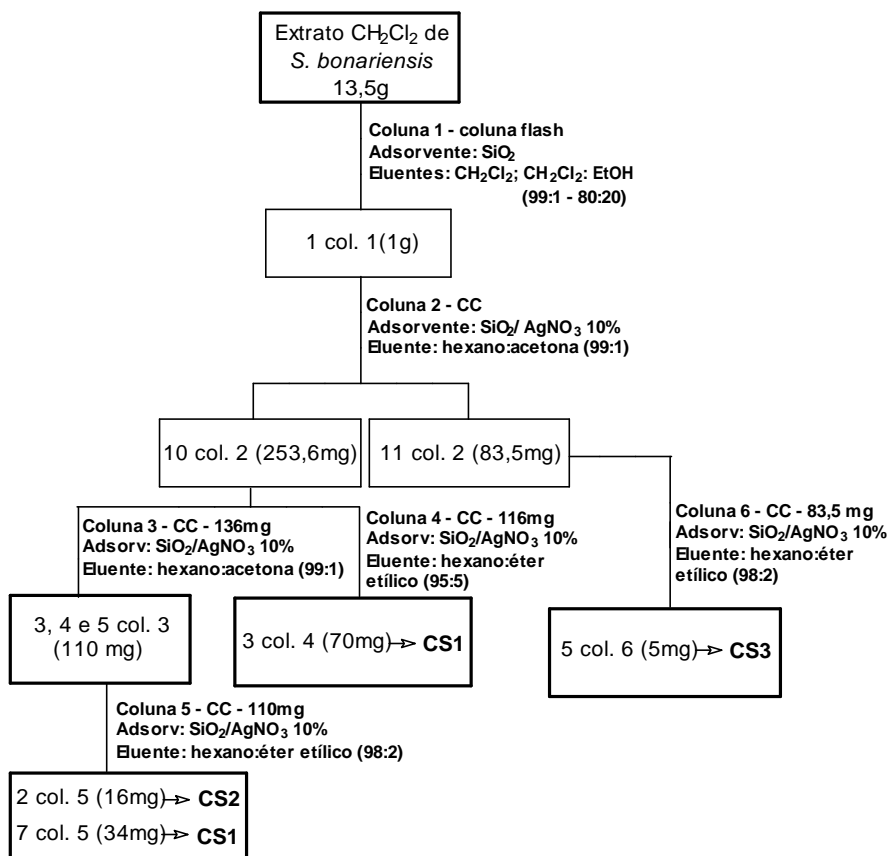


Figura 14: Obtenção de CS1, CS2 e CS3 a partir do fracionamento de extrato diclorometânico de *Senecio bonariensis* sobre gel de sílica.

3.6 Avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos isolados

Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos CS1 e CS2 foram realizados no Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da UFSM, com a colaboração do Prof. Dr. Sydney Hartz Alves. Para tanto, utilizou-se o método de microdiluição em caldo, baseado nos documentos M27-A2 para fungos leveduriformes (NCCLS, 2002) e M7-A4 para bactérias (NCCLS, 1997).

Esta metodologia avalia a Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a mais baixa concentração da substância que inibe completamente o crescimento do microorganismo.

Para CS1 foram testadas concentrações entre 0,025 e 5 mg/mL, enquanto que, no caso de CS2, as concentrações testadas variaram entre 53,62 e 1716 µg/mL. Os microorganismos utilizados nos ensaios para avaliar a atividade antimicrobiana das substâncias encontram-se na tabela 18.

Tabela 18: Microorganismos utilizados para a avaliação da atividade antimicrobiana de CS1 e CS2.

Microorganismos	CS1	CS2
<i>Acinetobacter baumannii</i> (isolado clínico)	X	X
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	X	X
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	X	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922		X
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 10031		X
<i>Prototheca zoopfi</i> (isolado clínico)	X	X
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	X	X
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 2601	X	X
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	X	X

4. RESULTADOS

4.1 Rendimentos do extrato diclorometânico e das substâncias isoladas de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn.

4.1.1 Rendimento do extrato diclorometânico bruto

A partir de 2,1 kg de material vegetal fresco, foram obtidos 13,5 g de extrato diclorometânico bruto, o que corresponde a um rendimento de 0,64%.

4.1.2 Rendimento de CS1

Partindo de 1 g de 1col. 1 do extrato CH_2Cl_2 , conforme representado na Figura 14, obteve-se 104 mg da substância CS1, o que corresponde a um rendimento de 10,4%. Em relação ao total de material vegetal, o rendimento de CS1 foi de 0,005%.

4.1.3. Rendimento de CS2

Partindo igualmente de 1 g de 1 col.1 do extrato CH_2Cl_2 (Figura 14), obteve-se 16 mg da substância CS2, o que corresponde a um rendimento de 1,6%. Já em relação ao material vegetal, o rendimento foi de 0,0008%.

4.1.4 Rendimento de CS3

Partindo novamente de 1 g de 1 col.1 do extrato CH_2Cl_2 , conforme representado na Figura 14, obteve-se 5 mg da substância CS3, o que corresponde a um rendimento de 0,5%. Em relação ao total de material vegetal, o rendimento de CS3 foi de 0,0002%.

4.2 Análise estrutural das substâncias isoladas

4.2.1 Elucidação estrutural de CS1

A substância CS1 foi isolada conforme descrito no item 3.6.3 e esquematizado na Figura 14 (p. 66). O composto foi analisado por CG-EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e IV (Figuras 15, 16, 17 e 18) e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura (Barrero et al., 1995; Tabelas 19 e 20) 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 27,5 minutos. No espectro de massas por impacto eletrônico (Figura 15) o pico de maior massa encontra-se em m/z 204 u.m.a., e corresponde ao pico do íon molecular. Este dado permite sugerir para o composto CS1 uma fórmula elementar de $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$. 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 cariofileno foi o composto que apresentou um modelo de fragmentação mais semelhante ao de CS1.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 16) aponta a presença de 15 átomos de carbono, sugerindo tratar-se de um sesquiterpeno. Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN (Figuras 16 e 17 e Tabelas 19 e 20) indicam a ausência de oxigênio e a presença de duas insaturações na molécula.

Devido à simplicidade das absorções e às frequências características de alcanos e alquenos no espectro de IV (Figura 18), pode-se sugerir que a substância em questão apresenta apenas estas funções químicas.

Baseado nestas evidências é possível propor para a substância CS1 uma fórmula molecular de $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ e, portanto, um grau de insaturação (GI) ou índice de deficiência de hidrogênios igual a quatro. Uma vez que os espectros de RMN indicam a presença de duas insaturações, conclui-se que o composto apresenta 2 ciclos na sua estrutura.

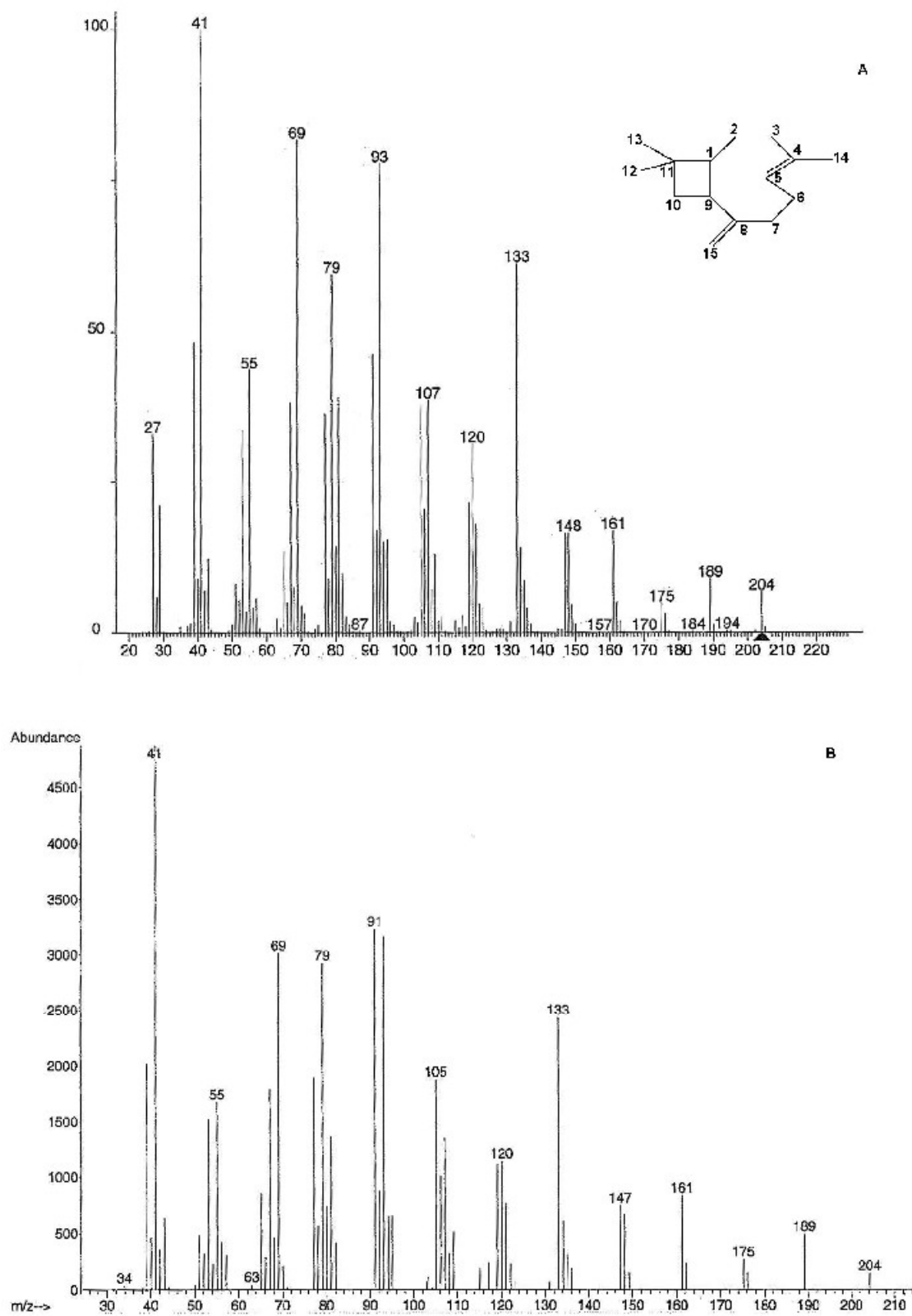


Figura 15: Espectros de massas por impacto eletrônico do cariofileno (A) e de CS1 (B) (NIST, 1998).

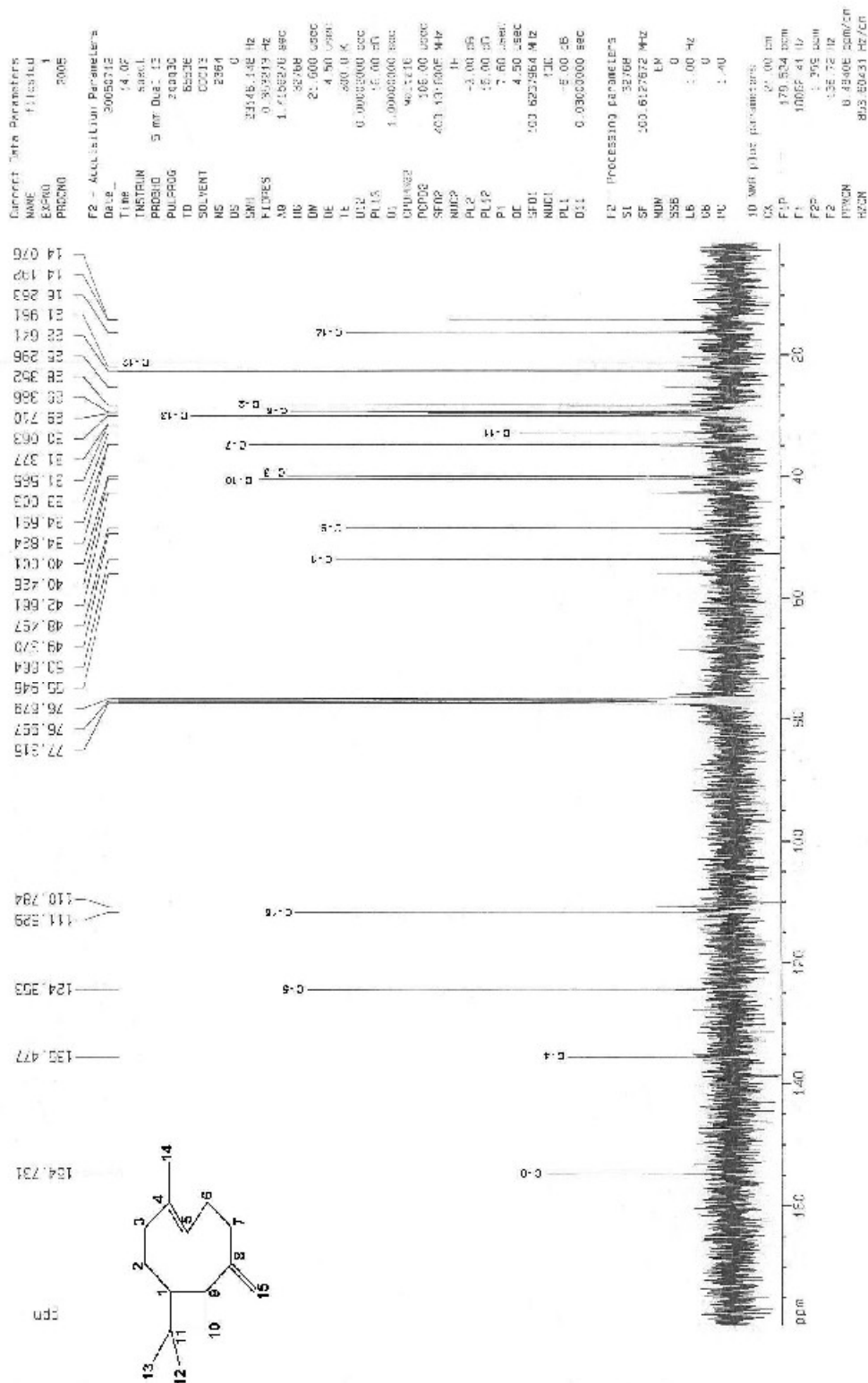


Figura 16: Espectro de RMN ^{13}C de CS1 (100 MHz, CDCl_3).

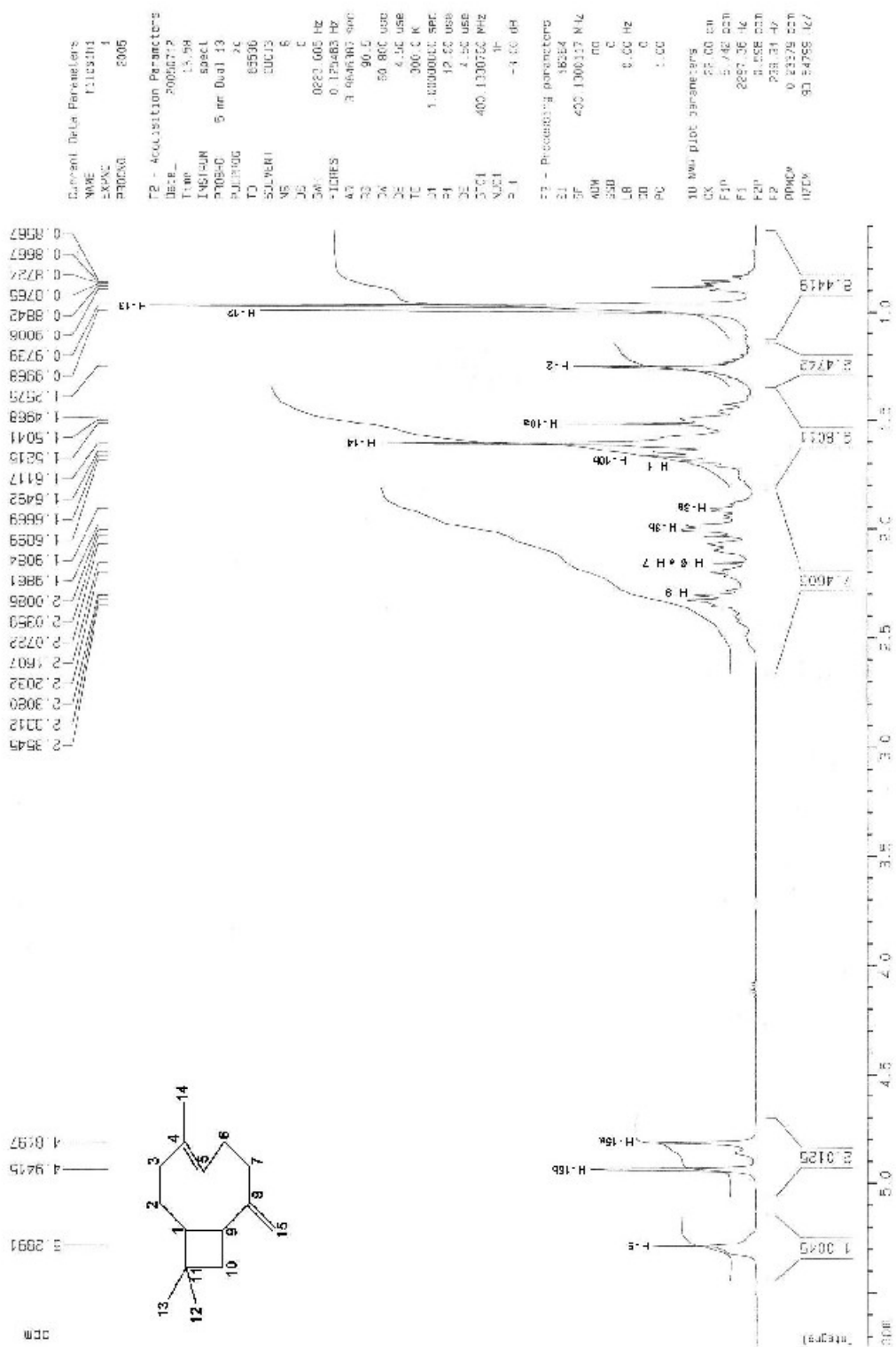


Figura 17: Espectro de RMN ^1H de CS1 (400 MHz, CDCl_3).

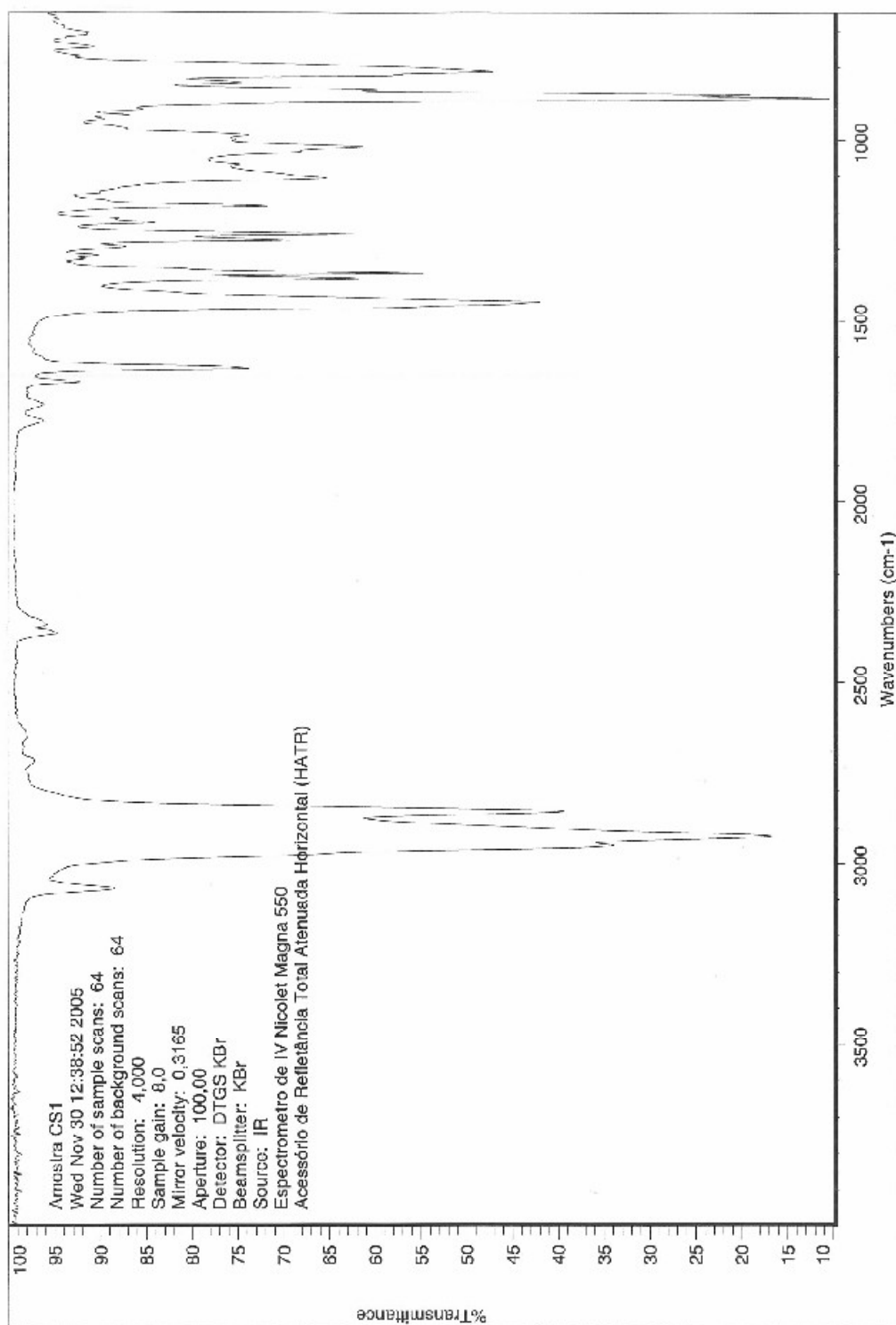


Figura 18: Espectro de IV de CS1 (HATR).

Tabela 19: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^{13}C para a substância CS1, em comparação com dados da literatura.

	CS1	β-Cariofileno		Isocariofileno
Carbono	Silva et al., 2005	Barrero et al., 1995		Barrero et al., 1995
	δ (ppm)	δ (ppm) Isômero $\beta\alpha$	δ (ppm) Isômero $\beta\beta$	δ (ppm)
01	53,7	53,7	56,0	51,9
02	28,4	28,4	29,8	25,7
03	40,0	40,1	34,9	28,8
04	135,5	135,6	135,1	136,3
05	124,4	124,4	124,6	125,0
06	29,4	29,5	31,5	28,5
07	34,8	34,9	39,9	35,6
08	154,7	154,8	155,2	156,7
09	48,5	48,6	49,5	40,2
10	40,4	40,4	42,7	40,5
11	33,0	33,1	33,1	33,2
12	22,6	22,7	22,0	23,1
13	30,1	30,2	29,9	30,0
14	16,3	16,4	16,4	23,3
15	111,6	111,7	110,9	110,4

Tabela 20: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^1H para a substância CS1, em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	CS1				β -cariofileno				Isocariofileno			
	Silva et al., 2005				Barrero et al., 1995				Barrero et al., 1995			
	δ (ppm)	Multip.	J (Hz)		Isômero $\beta\alpha$		Isômero $\beta\beta$					
				δ (ppm)	Multip.	J (Hz)	δ (ppm)	Multip.	J (Hz)	δ (ppm)	Multip.	J (Hz)
H-1	1,69	m								1,85	ddd	11,5; 9,2; 4,7
H-2	1,26	m								1,41 – 1,52	m	
H-3a	1,91	m								2,00	ddd	13,1; 6,7;
H-3b	1,99	m								2,13	ddd	3,9 13,7; 9,8; 4,2
H-5	5,29	m			5,30	dd	10,3; 4,5	5,26	d		t	7,5
H-6	2,00 – 2,20	m								2,14 – 2,26	m	
H-7	2,00 – 2,20	m			1,91	dt	11,9; 5,3			2,14 – 2,26	m	
H-9	2,33	q	9,3							2,52	q	9,1
H-10a	1,52	m								1,54	dd	10,5; 9,6
H-10b	1,67	m								1,72	dd	10,8; 8,6
H-12	1,00	s			1,00	s		0,97	s		s	
H-13	0,97	s			0,97	s		0,96	s		s	
H-14	1,61	s			1,61	d	1,1	1,58	s		s	
H-15a	4,82	s			4,82	d	1,7	4,87	s		d	1,8
H-15b	4,94	s			4,94	d	1,7	4,94	s		d	2,0

4.2.1.1 Análise da fragmentação de CS1 por EM-IE

O composto CS1 apresentou uma massa molecular de 204 u.m.a. (Figura 15), evidenciada pelo espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE), com energia do feixe de elétrons em 70 eV. A Figura 19 apresenta uma proposta de fragmentação inédita para o composto CS1, que será descrita a seguir.

A partir do ion molecular $[M^+]$ 204 u.m.a., ocorre a eliminação de um grupamento metila na forma de radical, originando o fragmento em m/z 189 u.m.a. (fragmentação alquílica, com formação de um carbocátion terciário). A partir deste carbocátion formado, ocorrem novas fragmentações na molécula, seguidas de rearranjos e a eliminação de partículas neutras.

- O sinal em m/z 147 u.m.a. origina-se a partir do rompimento de duas ligações entre os carbonos 2 e 3, e, 5 e 6, seguida da eliminação de uma molécula neutra (m/z 42 u.m.a.). O fragmento formado em m/z 147 u.m.a. ainda pode sofrer eliminação de outra molécula neutra (isobuteno, m/z 56 u.m.a.) e originar o fragmento com sinal intenso em m/z 91 u.m.a., que corresponde ao ion tropílio, uma molécula de grande estabilidade.

- O pico em m/z 133 u.m.a. é formado a partir da eliminação de uma molécula de isobuteno (m/z 56 u.m.a.). O fragmento formado pode sofrer novas fragmentações. A primeira, com a eliminação de uma molécula neutra em m/z 42 u.m.a., originando novamente o fragmento de sinal intenso em m/z 91 u.m.a. (íon tropílio). Na segunda possibilidade, ocorre a eliminação de uma molécula de butadieno (m/z 54 u.m.a.) e a formação do fragmento em m/z 79 u.m.a.

- O pico base em m/z 41 u.m.a. pode ser explicado pelo rompimento entre os carbonos 2 e 3, e, 5 e 6, seguido da eliminação do fragmento mais pesado (m/z 148 u.m.a.) na forma de molécula neutra.

Esta proposta de fragmentação ocorre a partir da perda inicial de um grupamento metila e está de acordo com a teoria de que as fragmentações ocorrem de maneira a originar, preferencialmente, os fragmentos de estruturas mais estáveis (Figura 19).

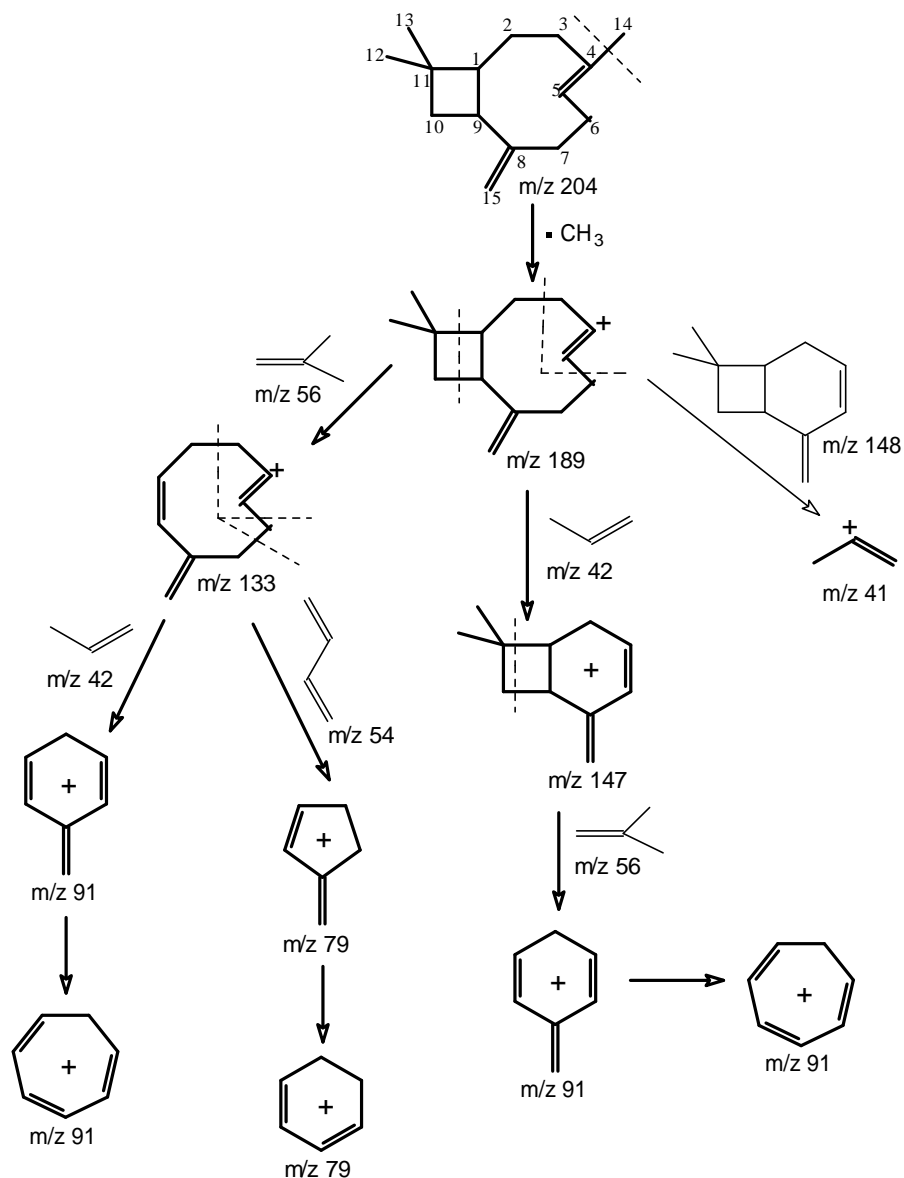


Figura 19: Proposta de fragmentação para a substância CS1.

4.2.1.2 Análise do espectro de RMN ^{13}C de CS1

Os deslocamentos químicos do espectro de RMN ^{13}C da substância CS1 foram comparados com os dados da literatura para o cariofileno, conforme pode ser evidenciado na Tabela 19 (Barrero et al., 1995) e indicam para a substância CS1 a presença de 15 átomos de carbono. Dentre estes, 3 são grupamentos metilas, 6 são grupamentos metilênicos (sendo 1 deles o grupamento metileno exocíclico), 3 são

grupamentos metino e 3 são carbonos quaternários. A ausência de picos entre as regiões de deslocamentos químicos em $\delta = 60 - 90$ ppm indicam a inexistência de oxigênio na molécula.

É possível atribuir a existência de duas duplas ligações à molécula, sendo que, os picos em $\delta = 135,5$ e $124,4$ ppm correspondem aos carbonos C4 e C5 respectivamente, indicando a presença de um grupamento metínico (C5) e um carbono quaternário como parte da dupla ligação (C4). Os picos em $\delta = 154,7$ e $111,6$ ppm correspondem aos deslocamentos químicos dos carbonos C8 e C15, respectivamente, evidenciando a presença da segunda dupla ligação e foram atribuídos ao grupamento exometileno.

Os sinais em $\delta = 53,7$ e $48,5$ ppm foram atribuídos aos carbonos dos grupamentos metínicos C1 e C9. Também pode ser observada a presença de um pico em $\delta = 33,0$ ppm que foi atribuído ao carbono quaternário C11. Os cinco grupamentos metilenos da molécula aparecem com deslocamentos químicos em $\delta = 40,4, 40,0, 34,8, 29,4$ e $28,4$ ppm, os quais correspondem aos carbonos 10, 3, 7, 6 e 2 respectivamente.

Já os sinais em campo alto, que aparecem em $\delta = 30,1, 22,6$ e $16,3$ ppm, foram atribuídos aos três grupos metila da molécula e correspondem, respectivamente, aos carbonos 13, 12 e 14 (Figura 16 e Tabela 19).

4.2.1.3 Análise do espectro de RMN ^1H de CS1

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com auxílio de dados da literatura, que apresentam a análise do β -cariofileno e do isocariofileno, através de técnicas espectroscópicas bidimensionais (Barrero et al., 1995; Tabela 20).

Através da análise de RMN ^1H de CS1 (Figura 17) foi possível evidenciar em campo baixo do espectro a presença de três sinais. O deslocamento químico em $\delta = 5,29$ ppm corresponde ao hidrogênio H5, enquanto que os deslocamentos químicos em $\delta = 4,94$ e $4,82$ ppm, correspondem aos hidrogênios ligados ao carbono exometilênico (C15).

Os demais sinais encontram-se todos em campo alto e apresentam deslocamentos químicos abaixo de 2,5 ppm. Os sinais correspondentes aos hidrogênios das metilas 12 e 13 aparecem em $\delta = 1,0$ e $0,97$ ppm, enquanto que o deslocamento químico dos hidrogênios da metila 14, aparecem em campo mais baixo, em $\delta = 1,61$ ppm, uma vez que esta encontra-se ligada diretamente a uma dupla ligação.

4.2.1.4 Análise do espectro no IV de CS1

As absorções provenientes do espectro de IV indicam a presença dos grupos funcionais alcanos e alquenos. Para os alcanos, a substância CS1 apresentou duas bandas de deformação axial de C-H em 2930 e 2850 cm^{-1} , de intensidades fortes, e duas bandas de deformação angular de C-H em 1450 e 885 cm^{-1} , de intensidades moderada e forte, respectivamente (Figura 18).

Para os alquenos, a deformação axial da ligação C=C, resultou em uma banda de absorção de intensidade moderada a fraca, em 1640 cm^{-1} . A absorção de intensidade fraca em 3075 cm^{-1} pode ser atribuída ao hidrogênio ligado à dupla exocíclica do composto (Figura 18).

4.2.1.5 Estrutura de CS1

A massa do composto, a fórmula molecular, o modelo de fragmentação e os espectros de RMN e de IV confirmam a estrutura do β -cariofileno (Figura 20) para CS1.

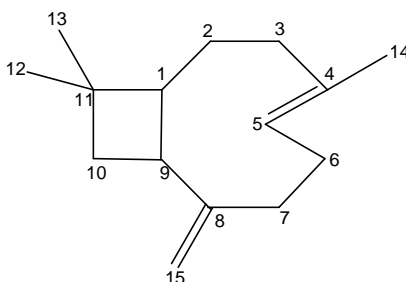


Figura 20: Fórmula estrutural do β -cariofileno (substância CS1).

4.2.2. Elucidação estrutural de CS2

A substância CS2 foi obtida na forma pura, conforme descrito no item 3.6.4 (Figura 14, p. 66). O composto foi analisado por CG-EM, RMN ^{13}C , RMN ^1H e IV (Figuras 21, 22, 23, 24 e 25) e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtidos da literatura (Barrero et al., 1995; Thebtaranonth et al., 1995; Silverstein e Webster, 2000; Chaves e Santos, 2002; Reina et al., 2002; Ahmed et al., 2004; Sköld et al., 2005; 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 32,5 minutos. Com o auxílio da EM, foi evidenciado para a substância em questão (CS2) um peso molecular de 220 g, uma vez que o pico de maior massa encontra-se em m/z 220 u.m.a., correspondendo ao pico do íon molecular (Figura 21). Com base no modelo de fragmentação desenvolvido pela substância e a partir da sua estrutura molecular, foi sugerido pelo banco de dados do equipamento, uma série de substâncias com características semelhantes às da amostra. Dentre as substâncias sugeridas, o óxido de cariofileno foi a estrutura que apresentou maior semelhança, quando comparada à amostra.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 22) indica, através dos picos de maior intensidade, a presença de 15 átomos de carbono, sugerindo tratar-se de um sesquiterpenóide. Os deslocamentos químicos nos espectros confirmam a presença de uma insaturação e de um grupamento oxigenado na molécula.

O espectro de IV (Figura 25) aponta para a substância CS2 a presença dos grupos funcionais alceno, alqueno e éter, devido às absorções apresentadas.

Baseado nas evidências acima descritas é possível propor a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ para a substância CS2, com grau de insaturação (GI) ou índice de deficiência de hidrogênios igual a 4.

Como o GI é de 4, conclui-se que a estrutura possui 3 ciclos, uma vez que possui apenas uma insaturação, de acordo com os espectros de RMN (Figuras 22, 23 e 24). O GI indica a presença de 24 átomos de hidrogênio na molécula e confirma a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$.

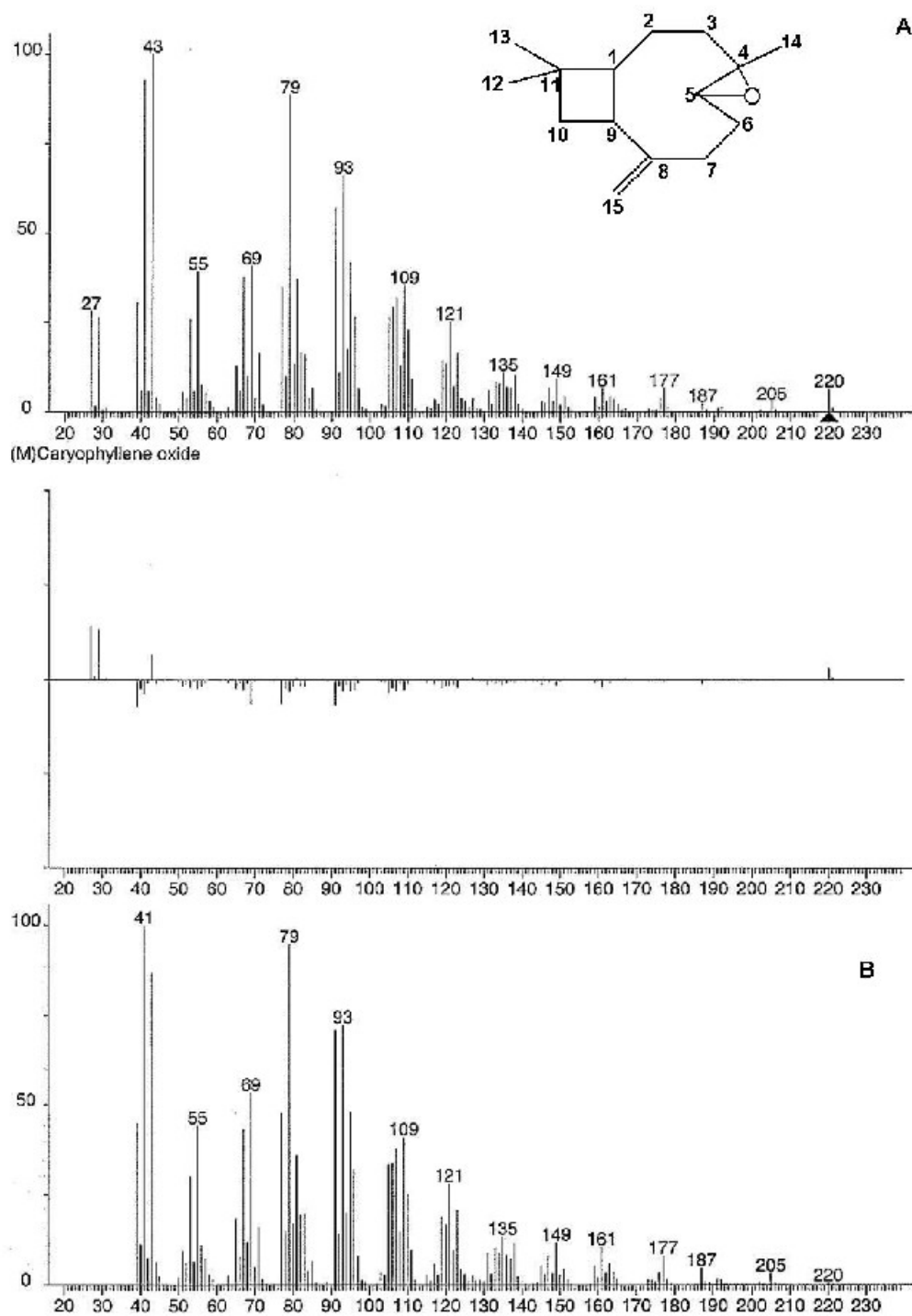


Figura 21: Espectro de massas por impacto eletrônico do óxido de cariophileno (A) e de CS₂ (B) (NIST, 1998).

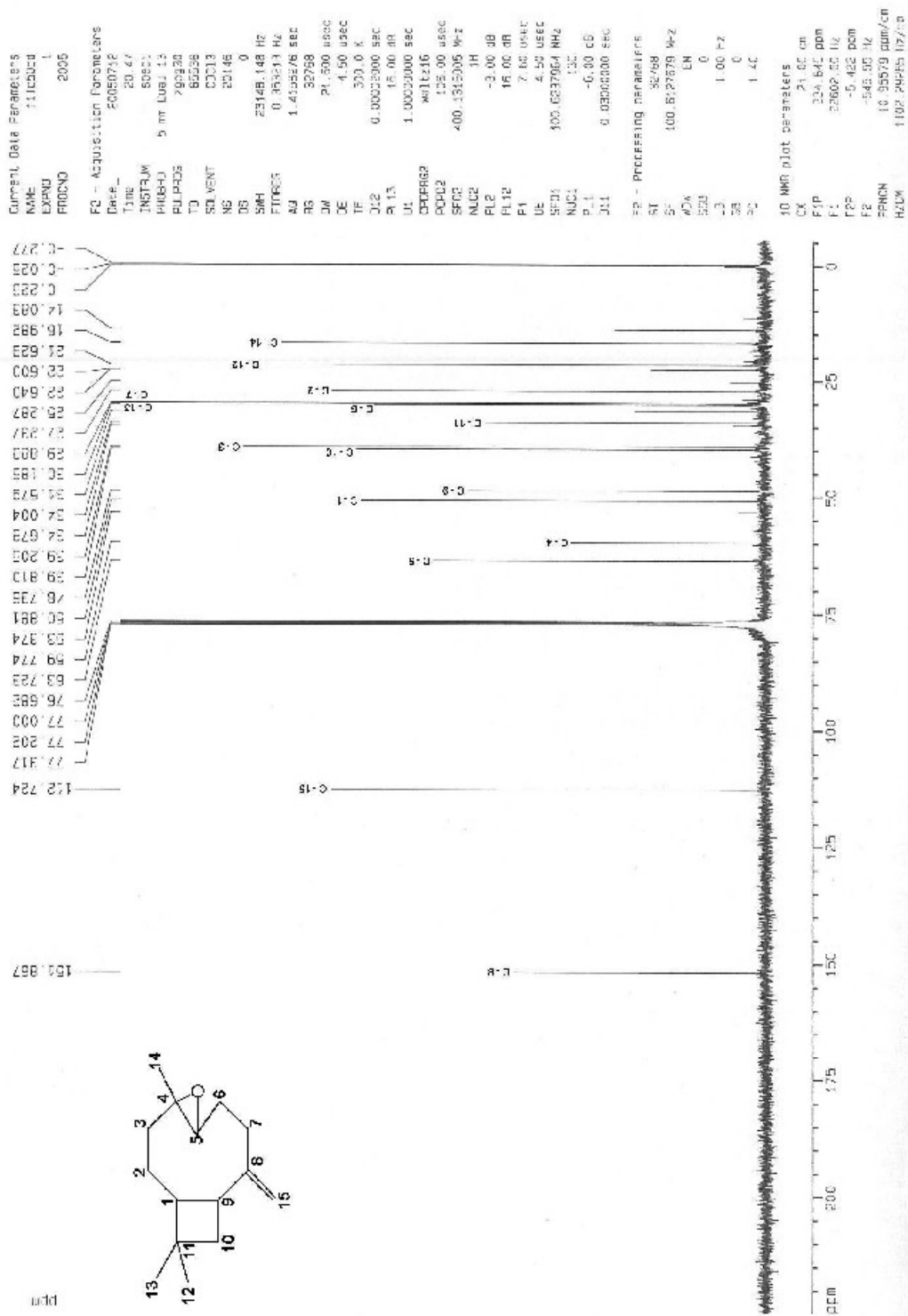


Figura 22: Espectro de RMN ^{13}C de CS_2 (100MHz, CDCl_3).

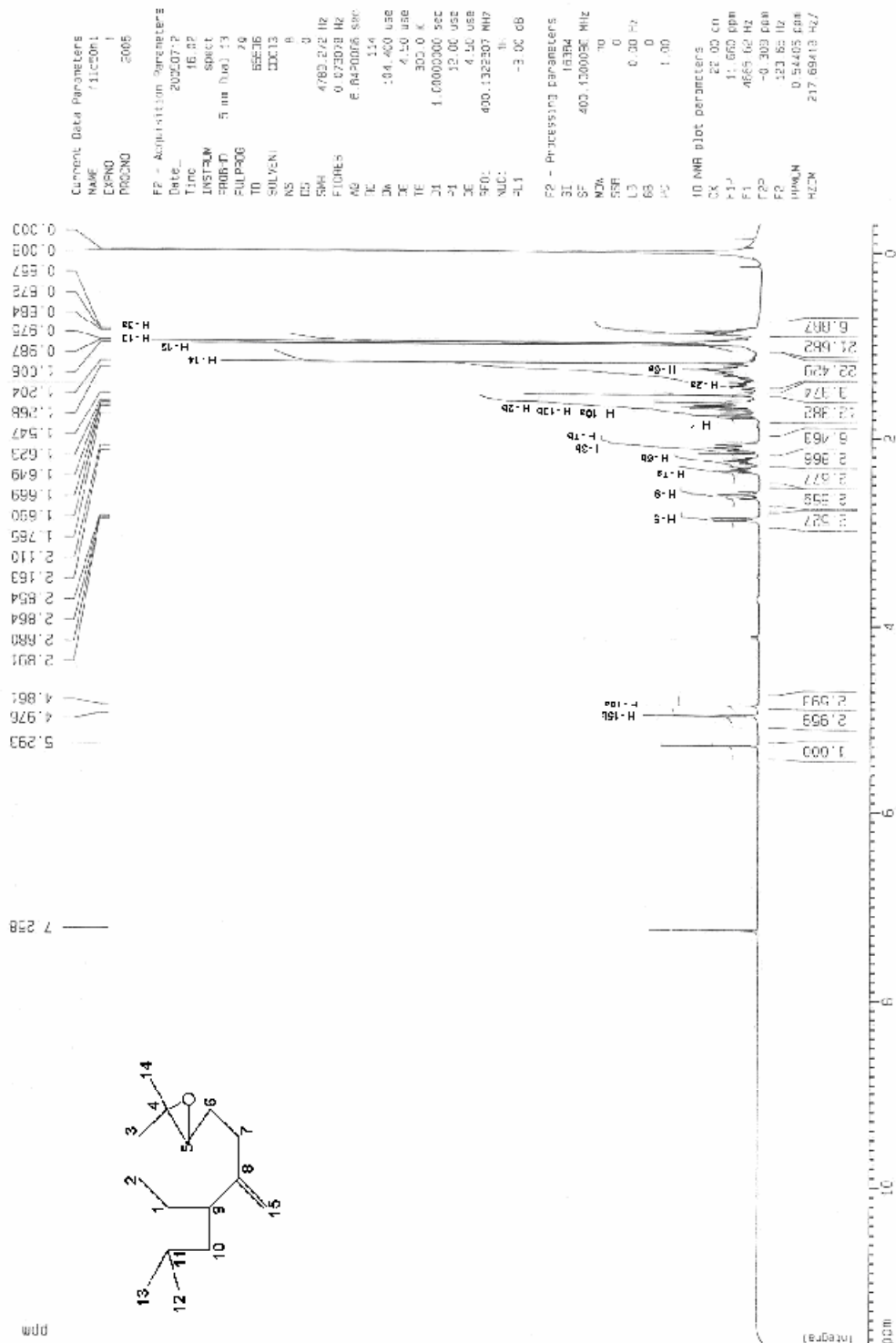


Figura 23: Espectro de RMN ^1H de CS2 (400 MHz, CDCl_3).

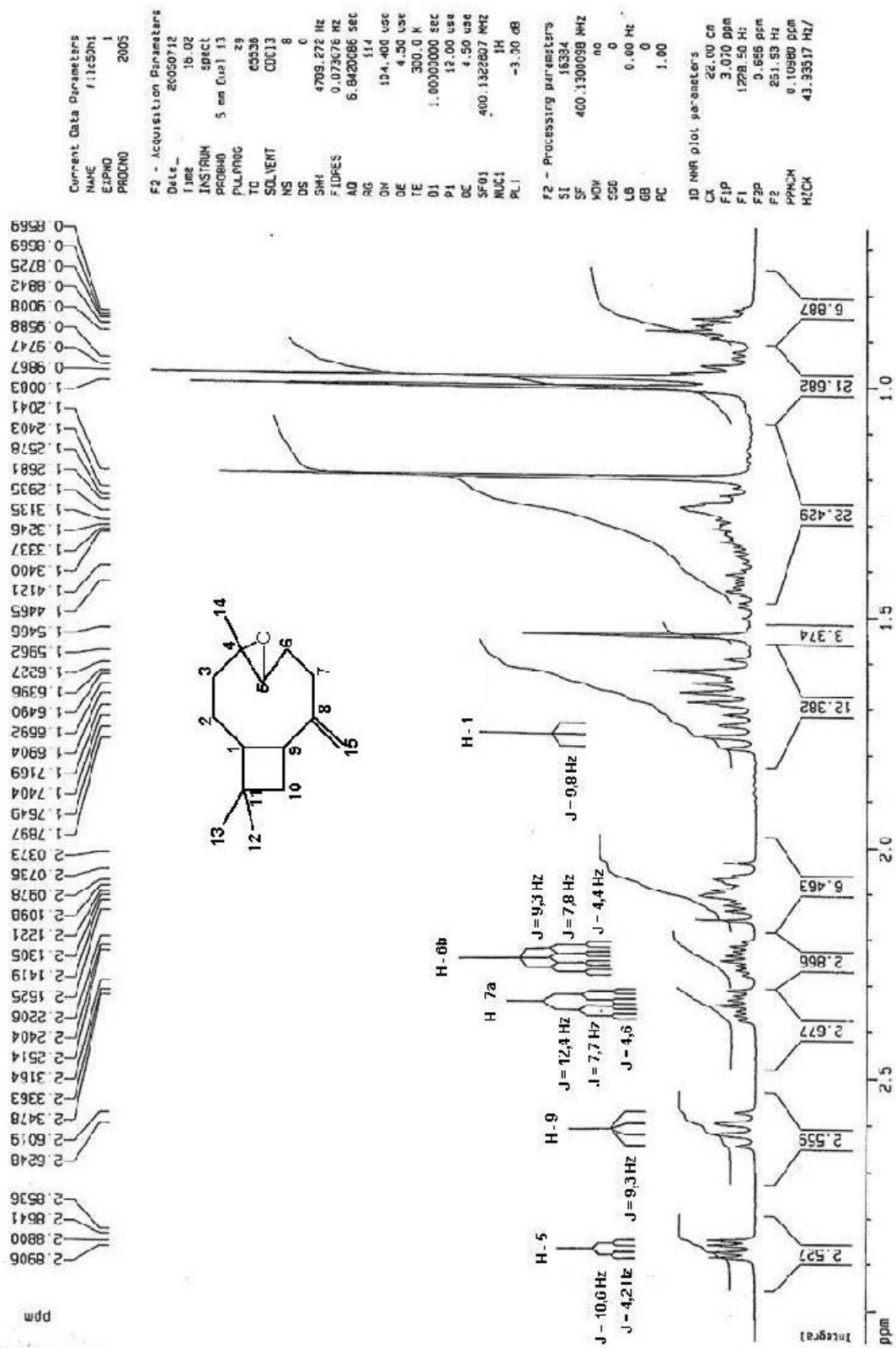


Figura 24: Ampliação do espectro de RMN ^1H de CS_2 (100 MHz, CDCl_3).

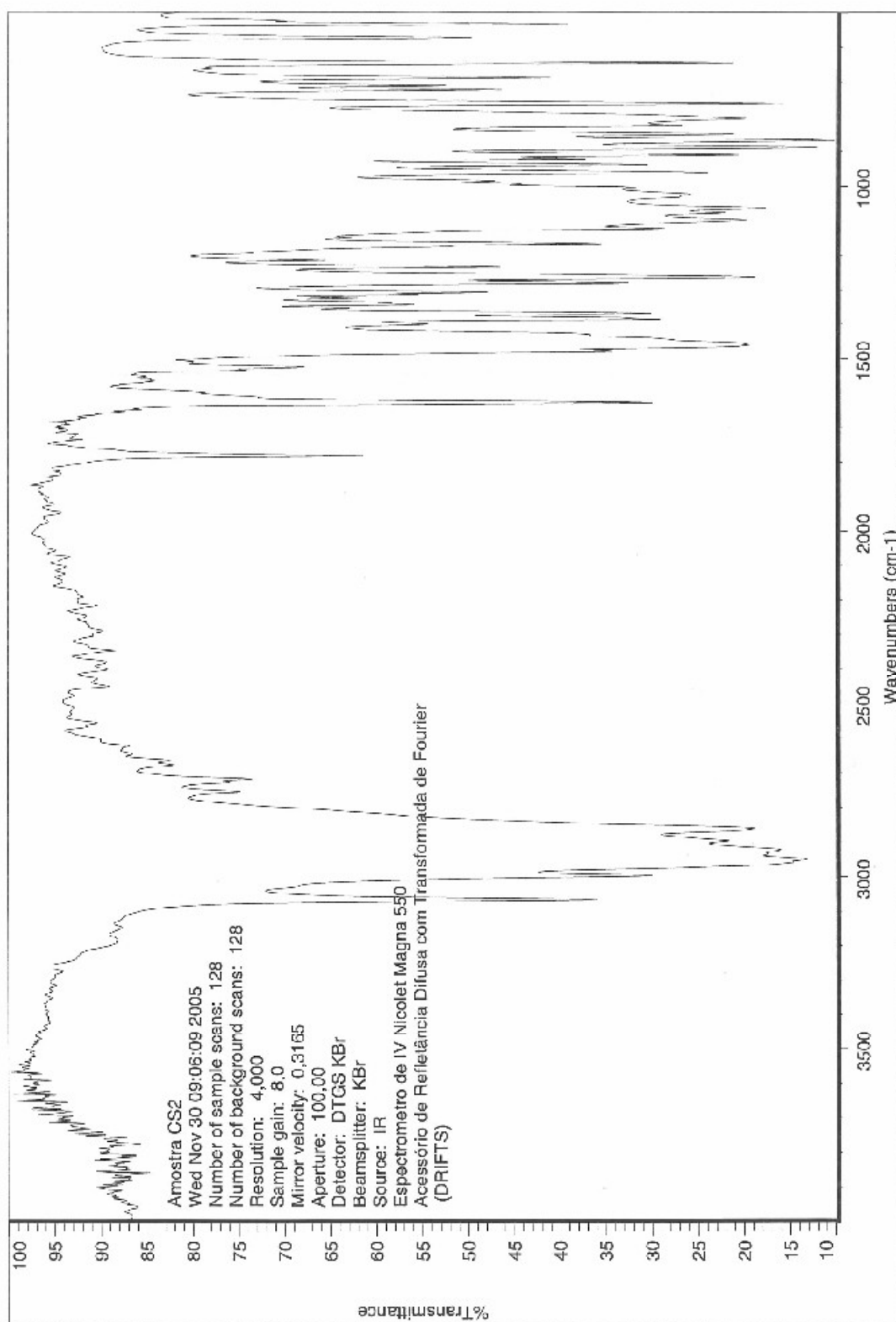


Figura 25: Espectro de IV de CS₂ (DRIFTS).

Tabela 21: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^{13}C para a substância CS2, em comparação com dados da literatura.

Carbono	CS2	Óxido de β -Cariofileno						
	Silva et al., 2005	Silverstein e Webster, 2000	Chaves e Santos, 2002	Sköld et al., 2005	Reina et al., 2002	Thebtaranonth et al., 1995; Ahmed et al., 2004	Barrero et al., 1995	
	δ (ppm)	DEPT 135	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm)	δ (ppm) Isômero $\beta\alpha$	δ (ppm) Isômero $\beta\beta$
01	50,9	CH	50,6	50,7	50,7	50,8	50,8	54,0
02	27,2	CH ₂	27,2	27,2	27,1	27,2	27,3	27,8
03	39,2	CH ₂	39,2	39,1	39,1	39,1	39,3	36,4
04	59,8	C	59,9	59,8	59,8	59,8	59,9	61,0
05	63,7	CH	63,8	63,7	63,7	63,7	63,8	61,1
06	30,2	CH ₂	29,9	30,2	30,1	30,2	30,3	30,3
07	29,9	CH ₂	29,7	29,7	29,7	29,8	29,9	36,7
08	151,9	C	151,9	151,8	151,8	151,8	151,9	152,8
09	48,7	CH	48,8	48,7	48,7	48,7	48,8	47,2
10	39,8	CH ₂	39,8	39,7	39,7	39,8	39,9	42,4
11	34,0	C	34,1	34,0	33,9	34,0	34,1	33,1
12	21,6*	CH ₃	21,7*	21,6*	21,5*	21,6*	21,7	21,7
13	29,9*	CH ₃	29,8*	29,9*	29,8*	29,9*	30,0	30,0
14	17,0	CH ₃	17,0	17,0	16,9	17,0	17,1	22,7
15	112,7	CH ₂	112,8	112,7	112,7	112,7	112,9	112,3

* Atribuições que podem ser invertidas, considerando-se cada coluna.

Tabela 22: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^1H para a substância CS2, em comparação com dados da literatura.

H	CS2						Óxido de β -carotileno					
	Silva et al., 2005			Chaves e Santos, 2002			Reina et al., 2002			Thebtaranonth et al. 1995; Ahmed et al. 2004		
	δ (ppm)	Múltipl.	J (Hz)	δ (ppm)	Múltipl.	J (Hz)	δ (ppm)	Múltipl.	J (Hz)	δ (ppm)	Múltipl.	J (Hz)
H-1	1,76	t	9,8	1,73	t	9,8	1,77	t	9,8	1,76	t	10,0
H-2a	1,43	m		1,38 - 1,41	m		1,45	m		1,32	m	
H-2b	1,65	m		1,58 - 1,61	m		1,67	m		1,55 - 1,72	m	
H-3a	0,98	m		0,95	m		0,97	ddd	13,2; 5; 5	0,95	m	
H-3b	2,11	m		2,04 - 2,11	m		2,10	ddd	13,2; 5; 5	2,10	dt	12,5; 3,5
H-5	2,87	dd	10,6; 4,2	2,85	dd	10,7; 4,2	2,88	dd	10,6; 4,2	2,87	dd	10,6; 4,1
H-6a	1,30	m		1,25 - 1,33	m		1,32	m		1,42	m	
H-6b	2,24	ddd	9,3; 7,8; 4,4	2,20 - 2,24	m		2,24	m		2,25	ddd	16,4; 7,8; 4,1
H-7a	2,33	ddd	12,4; 7,7; 4,6	2,28 - 2,32	m		2,34	m		2,34	ddd	12,4; 8,1; 4,4
H-7b	2,11	m		2,04 - 2,11	m		2,10	m		2,11	t	12,4
H-9	2,61	q	9,3	2,58	q	9,5	2,62	q	9,3	2,61	q	10,0
H-10a	1,65	m		1,58 - 1,61	m		1,65	m		1,55 - 1,72	m	
H-10b	1,65	m		1,62 - 1,67	m		1,69	m		1,55 - 1,72	m	
H-12	1,01*	s		0,97*	s		1,08*	s		1,00*	s	
H-13	0,98*	s		0,95*	s		0,99*	s		0,98*	s	
H-14	1,20	s		1,17	s		1,20	s		1,20	s	
H-15a	4,86	s		4,83	s		4,86	s		4,85	s	
H-15b	4,98	s		4,95	s		4,98	s		4,97	s	

* Atribuições que podem ser invertidas, considerando-se cada coluna.

4.2.2.1. Análise da fragmentação de CS₂ por EM-IE

O composto CS₂ apresentou uma massa molecular de 220 u.m.a (Figura 21), fato que só pôde ser evidenciado pelo espectro de massas por impacto eletrônico (EM-IE) com a energia do feixe de elétrons diminuída, devido sua alta instabilidade quando ionizado. A Figura 26 apresenta uma proposta inédita de fragmentação para o composto CS₂, que será apresentada a seguir.

A partir do íon molecular [M⁺] 220 u.m.a., ocorre a eliminação de um grupamento metila na forma de radical, originando o fragmento em m/z 205 u.m.a. (fragmentação alquílica ou fragmentação β ao heteroátomo, com formação de um carbocátion terciário). Partindo deste carbocátion, ocorrem novas fragmentações na molécula, com eliminação de partículas neutras, seguidas de rearranjos.

- O sinal em m/z 149 u.m.a. pode originar-se de duas formas distintas. A primeira, a partir do rompimento de duas ligações entre os carbonos 2 e 3, e, 5 e 6, com eliminação de uma molécula neutra (m/z 56 u.m.a.). O fragmento em m/z 149 u.m.a. ainda pode sofrer eliminação de isobuteno (m/z 56 u.m.a.) e originar o fragmento com sinal intenso em m/z 93 u.m.a., que origina o ion tropílio (m/z 91) após a eliminação de hidrogênio molecular. A segunda possibilidade de fragmentação inicia-se com a eliminação de isobuteno como molécula neutra e formação do fragmento em m/z 149 u.m.a. Este sofre novas fragmentações entre C2 e C3, e, C6 e C7, eliminando um fragmento neutro de massa m/z 70 u.m.a. e originando um fragmento de sinal intenso em m/z 79 u.m.a.

- O pico em m/z 135 u.m.a. origina-se a partir da eliminação de uma molécula neutra com m/z 70 u.m.a., formado a partir do rompimento de duas ligações entre os carbonos 2 e 3, e, 6 e 7. O fragmento em m/z 135 u.m.a. pode sofrer eliminação de uma molécula de isobuteno (m/z 56 u.m.a.) e originar o fragmento com sinal intenso em m/z 79 u.m.a.

- O sinal em m/z 109 u.m.a é formado a partir do rompimento entre os carbonos 1 e 2, e, 7 e 8, eliminando uma molécula neutra com m/z 96 u.m.a. O fragmento formado em m/z 109 u.m.a. pode sofrer eliminação de uma molécula de butadieno (m/z 54 u.m.a.) e originar um fragmento com sinal em m/z 55 u.m.a.

- O pico base em m/z 41 u.m.a (fragmento epóxido) pode ser explicado pelo rompimento de duas ligações entre os carbonos 3 e 4, e, 5 e 6 e eliminação do fragmento mais pesado (m/z 164 u.m.a) na forma de molécula neutra.

Esta proposta de fragmentação ocorre a partir da perda inicial de um grupamento metila e está de acordo com a teoria de que as fragmentações ocorrem de maneira a originar, preferencialmente, os fragmentos de estruturas mais estáveis (Figura 26).

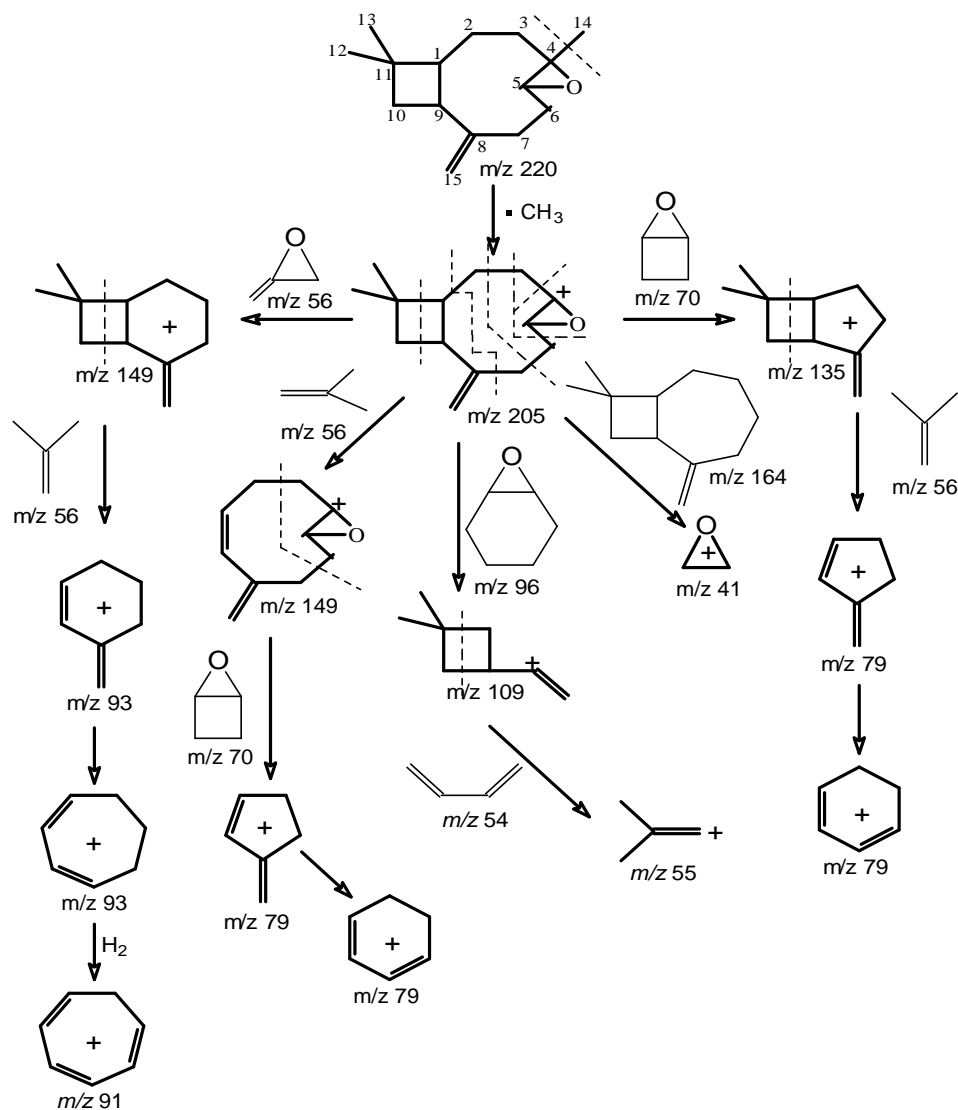


Figura 26: Proposta de fragmentação para a substância CS2.

As diferenças entre o espectro de massas de CS2 e do óxido de cariofileno, como indica a figura 21, sugeridos pelo banco de dados é mínima e se dá nos fragmentos de menor massa, o que pode ser explicado pelos diferentes rearranjos da estrutura enquanto ocorre sua fragmentação e também pelas diferentes conformações que a molécula pode assumir, principalmente a $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ (Barrero et al., 1995).

4.2.2.2 Análise do espectro de RMN ^{13}C de CS₂

Os dados de ressonância magnética nuclear de ^{13}C (Figura 22), juntamente com o espectro de massas (Figura 21), indicam para CS₂ a presença de 15 átomos de carbono. Os deslocamentos químicos do espectro de RMN ^{13}C para a substância CS₂ foram comparados com os dados da literatura para o óxido de cariofileno (Barrero et al., 1995; Thebtaranonth et al., 1995; Silverstein e Webster, 2000; Chaves e Santos, 2002; Reina et al., 2002; Ahmed et al., 2004; Sköld et al., 2005; Tabela 21) e indicam para a substância isolada a presença de 3 grupamentos metilas, 6 grupamentos metileno (sendo 1 deles o grupamento metileno exocíclico), 3 grupamentos metino e 3 carbonos quaternários na molécula.

Os deslocamentos químicos em $\delta=151,9$ e $112,7$ ppm evidenciam a presença de uma dupla ligação, e correspondem aos carbonos 8 e 15, respectivamente. Os picos em $\delta=63,7$ (C5) e $59,8$ ppm (C4) indicam a presença de um oxigênio ligado sob a forma de éter.

Pela sua posição no espectro de RMN ^{13}C , os sinais em $\delta=50,9$ e $48,7$ ppm podem ser atribuídos aos carbonos de grupamentos metínicos C1 e C9. Também pode ser observada a presença de um pico em $\delta=34,0$ ppm que foi atribuído ao carbono quaternário C11. Os cinco grupos metilenos na molécula aparecem com deslocamentos químicos em $\delta= 39,8, 39,2, 31,6, 30,2$ e $27,2$ ppm, os quais correspondem aos carbonos 10, 3, 6, 7 e 2, respectivamente.

Já, os sinais em campo alto, em $\delta= 29,9, 21,6$ e $17,0$ ppm, foram atribuídos aos três grupos metila da molécula e correspondem, respectivamente, aos carbonos 13, 12 e 14 (Figura 22; Tabela 21).

4.2.2.3 Análise do espectro de RMN ^1H de CS₂

As atribuições dos sinais no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio foram realizadas com auxílio dos dados da literatura, que também apresenta a análise do óxido de cariofileno, através de técnicas espectroscópicas bidimensionais (Thebtaranonth et al., 1995; Chaves e Santos, 2002; Reina et al., 2002; Ahmed et al., 2004; Tabela 22).

Através da análise da ressonância magnética nuclear de hidrogênio de CS₂, foi possível evidenciar dois singletes, correspondentes aos hidrogênios ligados ao carbono exometilênico (C15), com deslocamentos químicos em $\delta=4,98$ e $4,86$ ppm, característicos de hidrogênios olefínicos (Figuras 23 e 24; Tabela 22). O H5, com deslocamento químico de $\delta=2,87$ ppm, acopla com os H6a e H6b, apresentando como sinal um dublete de dublete (dd), com constantes de acoplamento (J) diferenciadas, que variam de acordo com o ângulo de torção formado entre os hidrogênios. Já o H9, com sinal em $\delta=2,61$ ppm, acopla com os hidrogênios 1, 10a e 10b, formando um pseudo-quarteto, com constante de acoplamento de $J = 9,3$ Hz.

O H7a ($\delta=2,33$ ppm) aparece como um ddd, acoplando com os H7b (acoplamento geminal) e H6a e H6b (acoplamento vicinal), cada um com constantes de acoplamentos diferenciadas, devido ao ângulo de torção formado entre estes.

O H6b (2,24 ppm) apresenta como sinal um ddt. O acoplamento geminal com o H6a e o acoplamento vicinal com o H5, formam um dd, enquanto que o acoplamento vicinal com os H7a e H7b origina um triplete.

Os hidrogênios 3b e 7b aparecem na mesma região do espectro, apresentando como sinal um multiplete em torno de $\delta= 2,11$ ppm.

O sinal atribuído ao H1 ($\delta=1,76$ ppm) apresenta-se como pseudo-triplete e acopla com os H9 e H2b. A ausência de acoplamento entre o H1 e o H2a pode ser explicada pelo ângulo de torção formado entre eles. De acordo com a Curva de Karplus (Rücker et al., 1992), quando os ângulos de torção formados entre os hidrogênios forem em torno de 90° , os valores de J(Hz) tendem a zero. Em modelo tridimensional da molécula, pode-se observar que o ângulo formado entre H1 e o H2a aproxima-se de 100° .

Em campo mais alto, encontram-se sinais que apresentam-se como multipletes e foram atribuídos aos hidrogênios 10b, 2b, 10a, 2a e 6a (Tabela 22).

Os três singletes, correspondentes aos hidrogênios das metilas 12, 13 e 14, aparecem com deslocamentos em $\delta= 1,01$, $0,98$ e $1,20$ ppm, respectivamente (Figuras 23 e 24; Tabela 22). O H3a aparece com o mesmo deslocamento químico da metila 13, fato que dificulta a visualização de sua multiplicidade e justifica o “pseudo-singlete” de integral 4.

4.2.2.4 Análise do espectro no IV de CS2

As absorções apresentadas pelo espectro de IV indicam para CS2 a presença dos grupos funcionais alcano, alqueno e éter. Para os grupamentos alcanos, foram identificadas as bandas de deformação axial de C-H em 2950 e 2850 cm^{-1} , de intensidade forte, além das bandas de deformação angular de C-H em 1465 e 870 cm^{-1} , também de forte intensidade (Figura 25).

Para os alquenos, a deformação axial da ligação C=C, resultou em uma banda de absorção de intensidade moderada a fraca em 1785 cm^{-1} . Comparando este valor com o da substância CS1 (1640 cm^{-1}), acredita-se que o grupamento epóxido deslocou o comprimento de onda da ligação C=C, tornando-o mais elevado. O sinal de intensidade moderada em 3070 cm^{-1} pode ser atribuído à dupla exocíclica do composto.

O grupamento epóxido apresenta uma banda de intensidade maior do que a de alquenos em 1620 cm^{-1} . Além disso, possui uma absorção bem característica na região de 1300 – 1000 cm^{-1} . Entretanto, a banda intensa em 1265 cm^{-1} é proveniente da deformação axial assimétrica de C-O-C, enquanto que, em 1050 cm^{-1} , é proveniente da deformação axial simétrica de C-O-C (Figura 25).

4.2.2.5 Estrutura de CS2

A massa do composto, a fórmula molecular, o modelo de fragmentação e os espectros de RMN e de IV confirmam a estrutura do óxido de β -cariofileno (Figura 27) para CS2.

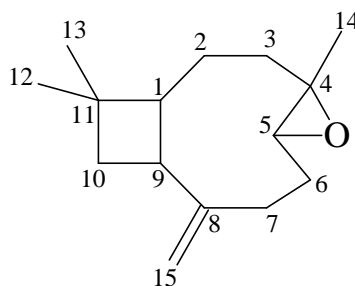


Figura 27: Fórmula estrutural do óxido de β -cariofileno (substância CS2).

4.2.3 Elucidação estrutural de CS3

A substância CS3 foi obtida conforme descrito no item 3.6.5 e esquematizada na Figura 14 (p. 66). O composto foi analisado por CG-EM, RMN ^1H e IV (Figuras 28, 29, 30 e 31) e seus dados espectroscópicos foram comparados com os obtido da literatura (Heinzmann, 2000; Deuschle, 2003) 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 31 minutos. No espectro de massas do composto CS3 (Figura 28), o pico de maior massa encontra-se em m/z 204 u.m.a e corresponde ao íon molecular, sugerindo para a substância um peso molecular de 204 g. 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 germacreno-D foi o composto que apresentou um modelo de fragmentação mais semelhante ao de CS3.

Os deslocamentos químicos no espectro de RMN ^1H indicam a ausência de oxigênio na molécula e a presença de duplas ligações (Figuras 29 e 30; Tabela 23). Devido à simplicidade das absorções e às frequências características, o espectro de IV sugere que a substância em questão apresente apenas alcanos e alquenos como grupos funcionais (Figura 31).

Estes dados permitem sugerir para o composto CS3 uma fórmula elementar de $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$. O cálculo do grau de insaturações (GI) revela que a molécula possui GI igual a 4. Uma vez que o espectro de RMN indica a presença de três insaturações, pode-se concluir que o composto apresenta um ciclo na sua estrutura.

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

Este composto já foi isolado pelo nosso grupo de pesquisas e identificado como o germacreno-D. A elucidação completa deste composto, bem como a avaliação de sua atividade antimicrobiana pode ser encontrada em Deuschle (2003).

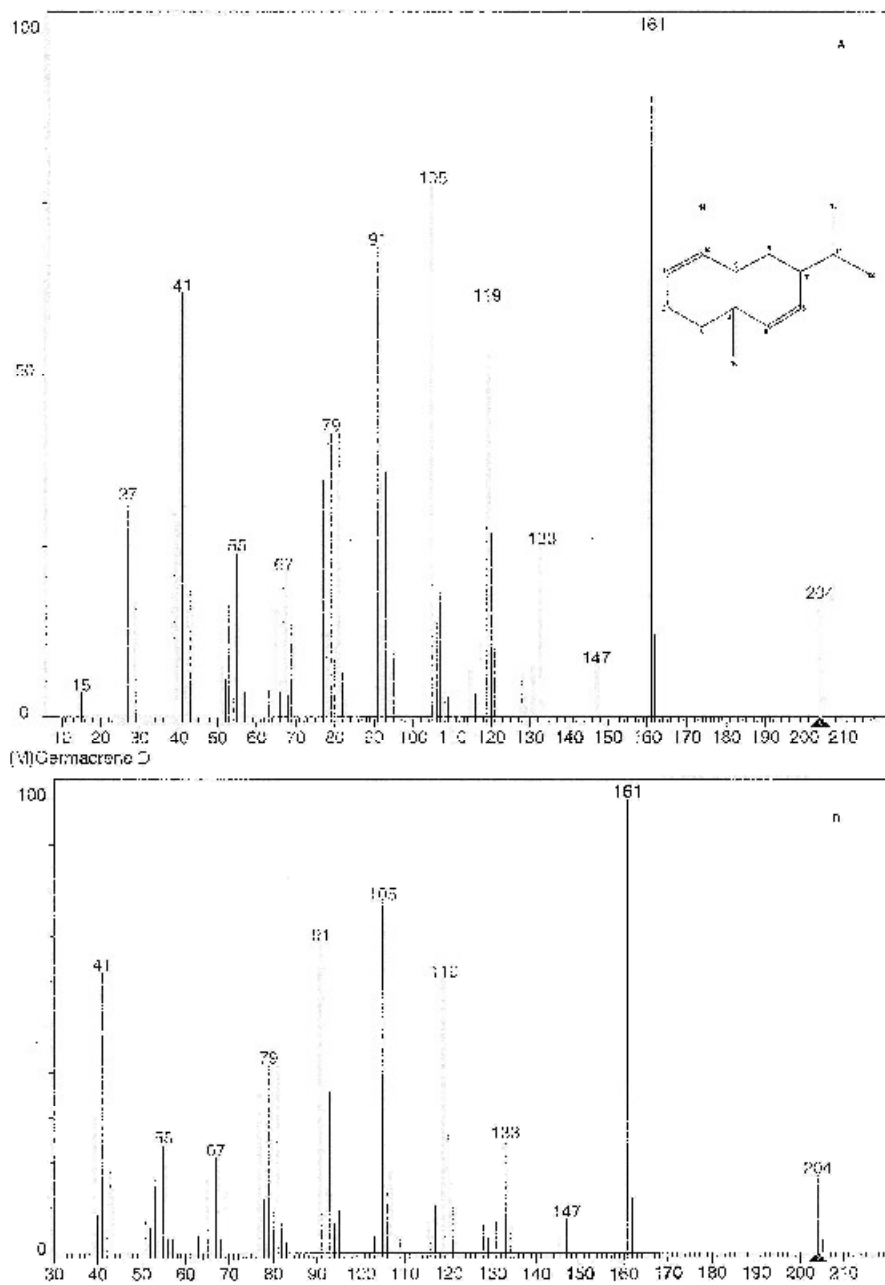


Figura 28: Espectro de massas por impacto eletrônico do germacreno-D (A) e de CS3 (NIST, 1998).

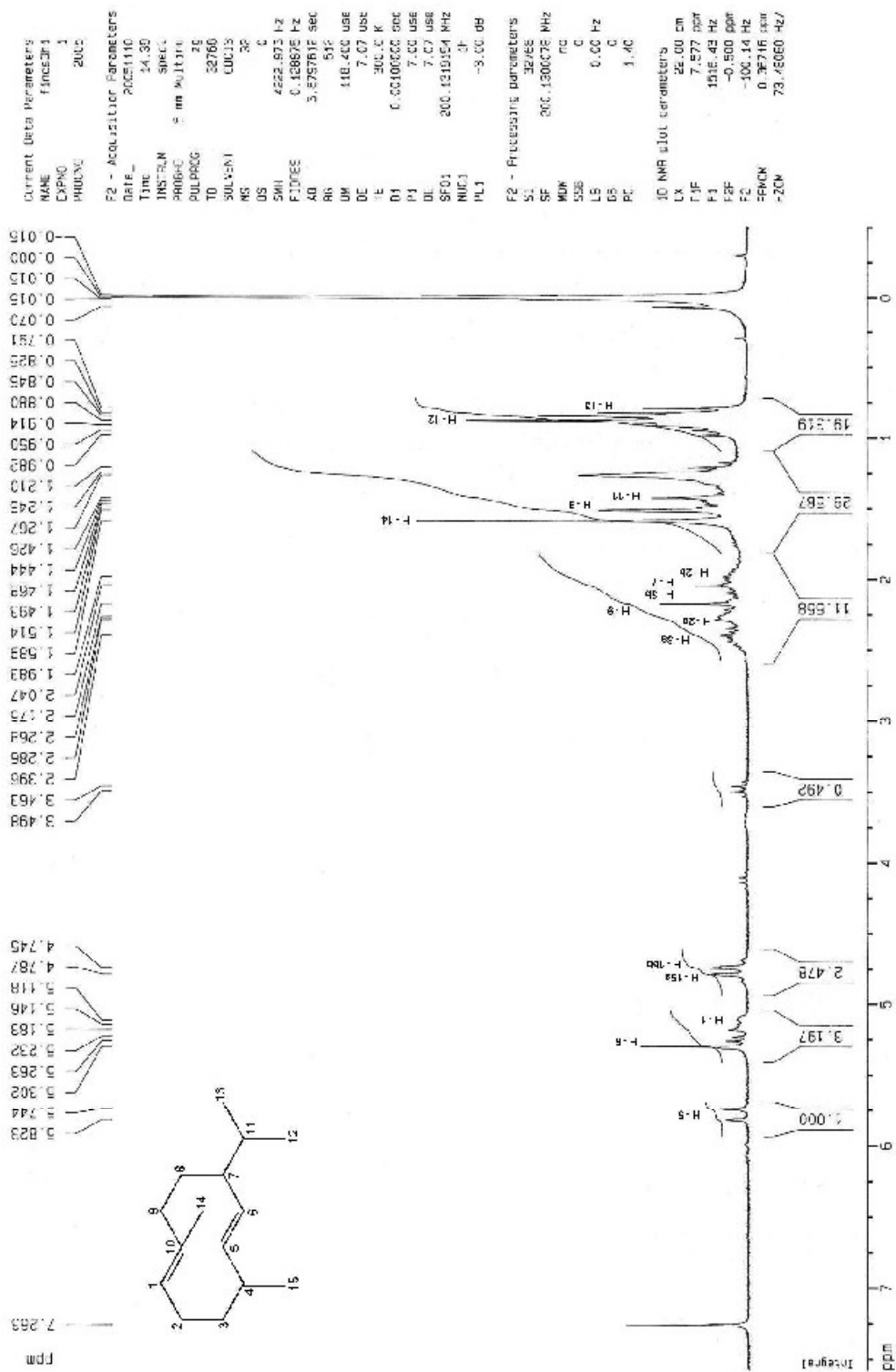


Figura 29: Espectro de RMN ^1H de CS3 (400 MHz, CDCl_3).

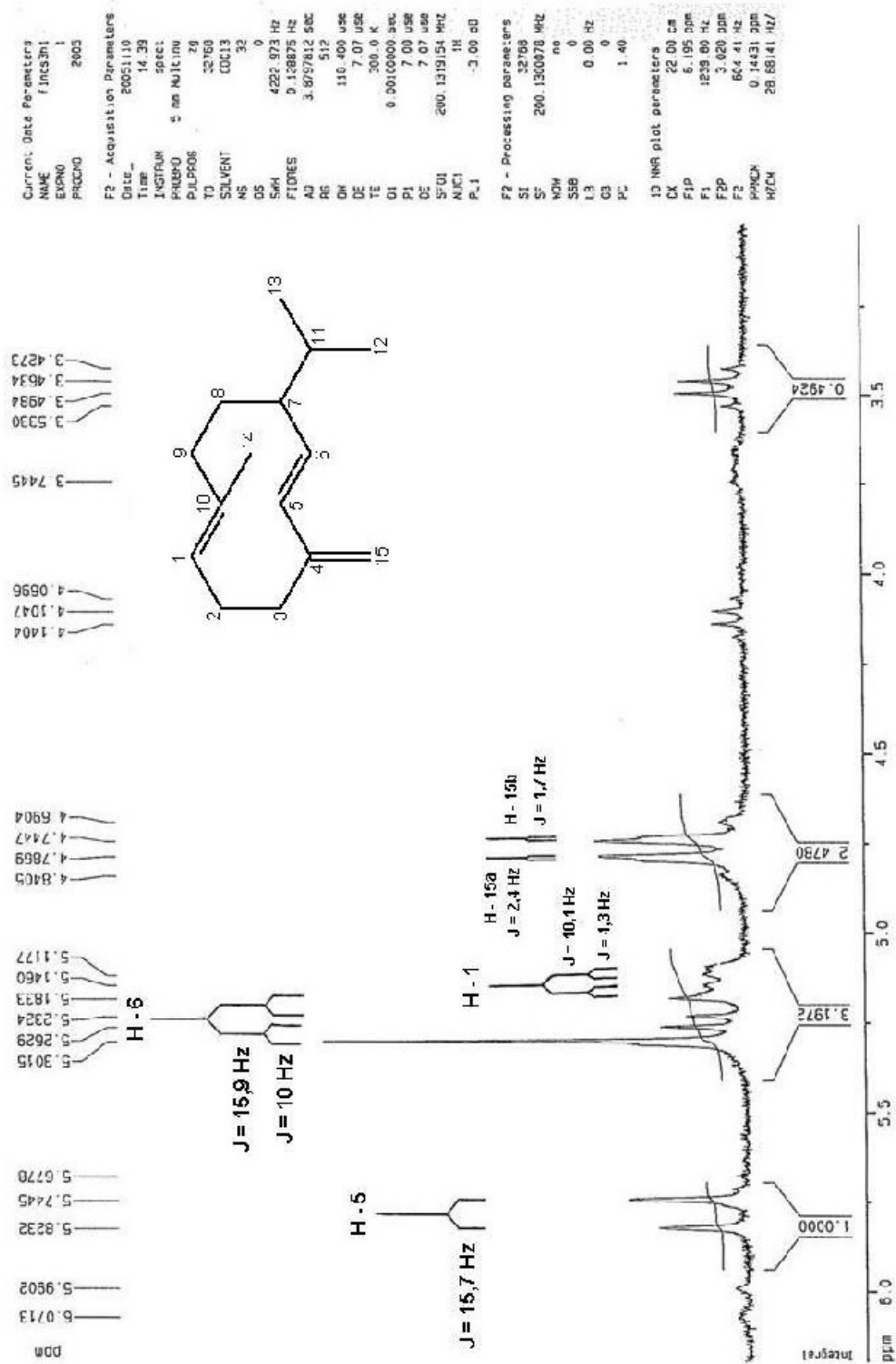


Figura 30: Ampliação do espectro de RMN ^1H de CS3.

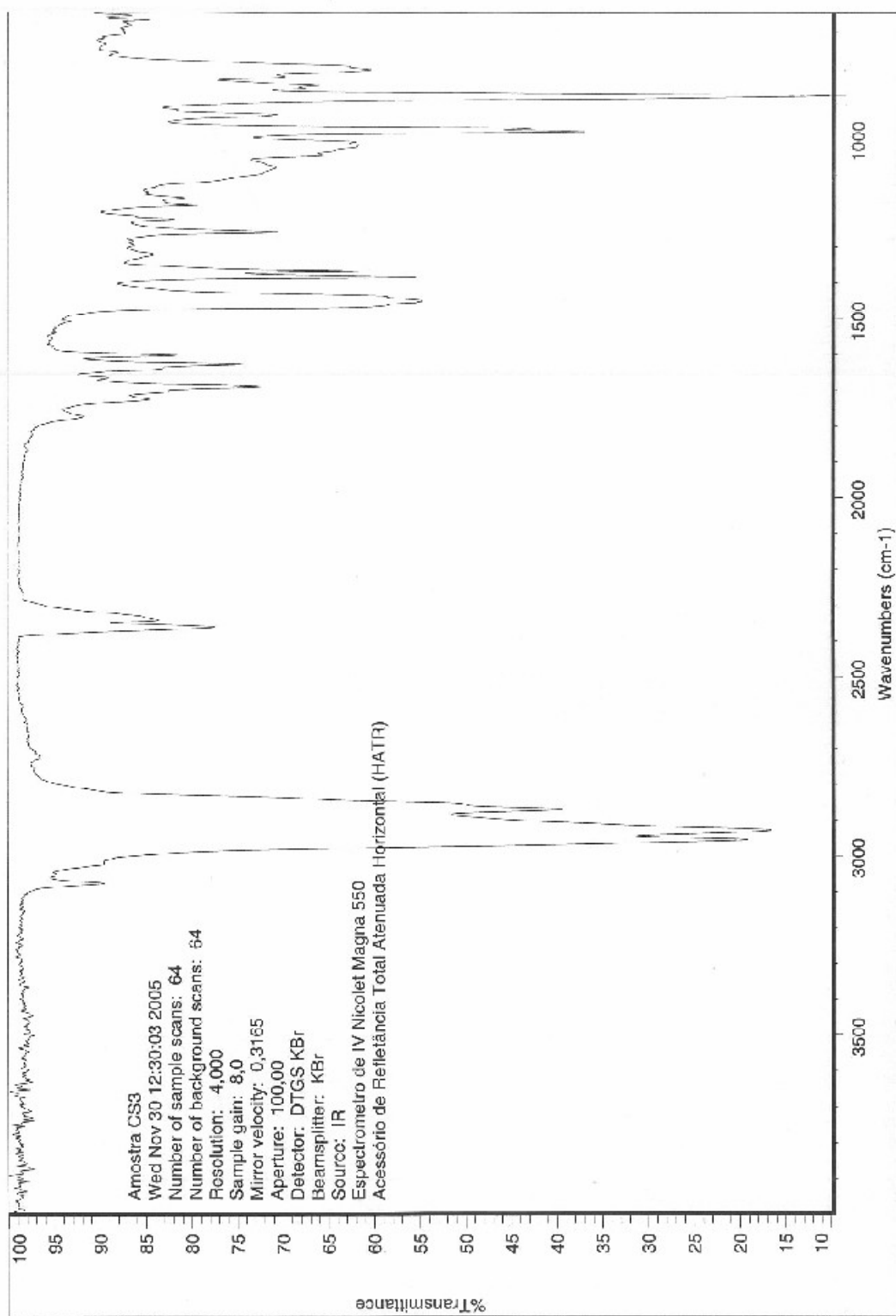


Figura 31: Espectro de IV de CS3 (HATR).

Tabela 23: Valores de deslocamentos químicos (δ) observados no espectro de RMN ^1H para a substância CS3, em comparação com dados da literatura.

Hidrogênio	CS3			Germacreno-D					
	Experimental			Heinzmann, 2000*			Deuschle, 2003		
	δ (ppm)	Multip.	J (Hz)	δ (ppm)	Multip.	J (Hz)	δ (ppm)	Multip.	J (Hz)
H – 1	5,13	dd	10,1; 4,3	5,14	dd	11,2; 4,7	5,16	dd	11,2; 4,5
H – 2a	2,29	m		2,35	m		2,34	m	
H – 2b	1,98	m		1,95	m		1,98	m	
H – 3a	2,40	m		2,43	m		2,43	m	
H – 3b	2,05	m		2,05	m		2,04	m	
H – 5	5,78	d	15,7	5,79	d	15,8	5,80	d	15,8
H – 6	5,25	dd	15,9; 10	5,26	dd	15,8; 9,9	5,27	dd	15,8; 9,9
H – 7	2,01	m		2,0	m		2,01	m	
H – 8	1,48	m		1,45	m		1,48	m	
H – 9	2,22	m		2,27	m		2,11	m	
H – 11	1,43	m		1,44	m		1,43	m	
H – 12	0,86**	d	6,6	0,88**	d		0,90**	d	6,72
H – 13	0,81**	d	6,6	0,82**	d		0,84**	d	6,8
H – 14	1,59	s		1,51	s		1,54	s	
H – 15a	4,81	d	2,4	4,80	d	2,4	4,82	d	2,24
H – 15b	4,72	d	1,7	4,74	d	2,4	4,76	d	1,64

* Dados não publicados

** Atribuições que podem ser invertidas, considerando-se cada coluna.

4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana de CS1 e CS2

Após análise da atividade antimicrobiana de CS1 e CS2, evidenciou-se que estes compostos não apresentaram atividade nas concentrações testadas contra os microorganismos avaliados.

5. DISCUSSÃO

As plantas apresentam uma grande variedade de metabólitos secundários, com características estruturais e atividades biológicas diversas para cada composto. Estes, são os responsáveis pela diferenciação das espécies e sobrevivência das mesmas, proporcionando vantagens ecológicas ao vegetal e servindo como indicadores da evolução. Os metabólitos secundários, por serem fatores de interação entre organismos, freqüentemente apresentam atividades biológicas interessantes (Santos, apud Simões et al., 2003). Assim, o homem se beneficia destas substâncias, testando-as contra as mais diversas doenças existentes. Entretanto, estes compostos são produzidos em pequenas quantidades pelas plantas e sua distribuição vai se tornando cada vez mais restrita, quanto maior e mais complexa for a rota metabólica para a substância em questão.

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

A obtenção dos extratos, suas frações, ou constituintes isolados varia de acordo com as características dos mesmos, sendo que, para a extração, devem ser utilizados solventes adequados às suas características de polaridade. Deste modo, compostos como os derivados terpenóides de baixo peso molecular podem ser obtidos mediante extração com diclorometano (CH_2Cl_2).

Portanto, justifica-se a utilização deste solvente no preparo do extrato das partes aéreas de *S. bonariensis*, em busca dos terpenóides. Os resultados deste trabalho demonstram mais uma vez que os terpenóides de baixa polaridade são extraídos pela maceração com CH_2Cl_2 . O perfil do extrato diclorometânico em CCD sugeriu a presença de terpenóides, além de conter pigmentos e ceras vegetais, compostos que também são extraídos por este solvente, entre outras substâncias.

Para o extrato diclorometânico das partes aéreas de *S. bonariensis* obteve-se um rendimento de 0,64% em relação ao material vegetal fresco. Já os compostos isolados cariofileno, óxido de cariofileno e germacreno-D, apresentaram rendimentos de 10,4, 1,6 e 0,5%, respectivamente, em relação à 1 col. 1. No entanto, em relação ao material vegetal fresco os rendimentos foram de 0,005, 0,0008 e 0,0002% respectivamente. No item 4.1 optou-se por expressar os rendimentos em relação à fração codificada como 1 col. 1, uma vez que análises por CCD evidenciaram a

presença destes constituintes também na fração seguinte. Assim, como trabalhou-se apenas com 1 col. 1 no fracionamento e isolamento dos três compostos, justifica-se este cálculo de rendimento para os mesmos, na tentativa de aproximar os valores à concentração real destes na planta e diminuir o erro.

Além disso, através de CCD, foi possível evidenciar que o cariofileno está presente em maior quantidade na planta do que os outros dois constituintes: óxido de cariofileno e germacreno-D. Isto pode ser explicado pelo fato de que o óxido de cariofileno é um produto secundário da fotooxidação do cariofileno, considerado um artefato, para o qual foi comprovada uma moderada atividade alergênica (Sköld et al., 2005). Já o germacreno-D, por ser um intermediário comum na rota biossintética de vários derivados de estrutura sesquiterpenóide, acaba sendo biotransformado, através de enzimas específicas, em outros sesquiterpenóides, como os furanoeremofilanos, compostos já descritos para *S. bonariensis* por Pomilio e Jares (1997).

Um outro aspecto importante a ser discutido está relacionado à impregnação do gel de sílica com solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3 10%). Quando o gel de sílica é submetido a esta impregnação, ocorre uma inversão da ordem de eluição dos compostos. Uma vez que o óxido de cariofileno apresenta características mais polares do que o cariofileno, este deveria ficar mais retido, interagindo com os grupamentos silanóis do suporte. Entretanto, com a utilização do AgNO_3 , o que ocorre é que os íons prata (aceptores de elétrons π), acabam se complexando com alquenos (doadores de elétrons π), fazendo com que estes compostos fiquem mais retidos, eluindo mais lentamente e, conseqüentemente melhorando sua separação (Williams e Mander, 2001). Assim, a velocidade de migração depende da formação de um complexo entre os íons Ag^+ e os elétrons π de uma ou de várias duplas ou triplas ligações das substâncias a serem separadas e à resistência do complexo formado (Stahl, 1969). Como o cariofileno apresenta duas insaturações e o seu óxido apenas uma, o composto que acaba eluindo primeiro da coluna é o óxido de cariofileno. O germacreno-D, por possuir três insaturações, é o último composto a eluir entre os três.

O cariofileno é um sesquiterpenóide de núcleo cariofilano, que se forma diretamente do FPP, originando o cátion humulílico e, em seguida o cátion cariofilílico. É um constituinte encontrado em várias espécies vegetais,

principalmente nos óleos essenciais, que apresenta estrutura química bem elucidada e conta com várias atividades biológicas já descritas na literatura.

No gênero *Senecio*, o cariofileno já foi isolado das partes aéreas de *Senecio clevelandii* Greene (Bohlmann et al., 1981b); das raízes de *S. subrubriflorus* O. Hoffm. (Bohlmann e Zdero, 1982a); das partes aéreas de *S. dolichodoryius* Cuatr. (Bohlmann et al., 1986); de *S. sundbergii* Turner (Merikli et al., 1989) e de *S. zapahuirensis* Martic. et Quez. (Jakupovic et al., 1991). As inflorescências de *S. articulatus* Sch. Bip. também forneceram o cariofileno (Kite e Smith, 1997); este também foi identificado no exsudato resinoso de *S. adenotrichius* DC (Urzúa e Andrade, 2001).

Entretanto, o cariofileno ainda não tinha sido identificado e isolado de *S. bonariensis* Hook. et Arn., assim como o seu óxido (óxido de cariofileno) e o germacreno-D. Este é o primeiro relato a respeito do isolamento destes compostos para esta espécie de *Senecio*.

Para o cariofileno, Ghelardini et al., (2001) descrevem uma forte atividade anestésica local *in vivo*. No experimento, esta atividade foi observada iniciando 5 minutos após a administração tópica na bolsa conjuntival de coelhos, e foi diminuindo, desaparecendo após 15 minutos. Segundo os autores, a atividade anestésica local do cariofileno parece estar estritamente relacionada à sua estrutura química, uma vez que sua atividade foi comparada à do seu derivado oxidado (óxido de cariofileno), o qual não demonstrou nenhuma ação.

O cariofileno, juntamente com o α -pineno e o limoneno, são produzidos pelo algodoeiro e atraem os machos de bicudo-do-algodoeiro (*Anthonomus grandis*). Estes insetos alimentam-se das folhas e, provavelmente, metabolizam estes terpenóides para a produção de feromônios de agregação, os quais atraem machos e fêmeas da mesma espécie (Barbosa, 1998).

Para o cariofileno também foram descritas as atividades antiinflamatória (Tambe et al., 1996); anticarcinogênica, atuando como indutor da enzima detoxificante glutationa-S-transferase (GST) (Zheng et al., 1992), e citotóxica contra várias linhagens de células tumorais (Kubo et al., 1996).

O cariofileno é um composto muito utilizado na indústria de beleza e cosmética como aromatizante químico desde a década de 30 (Sköld et al., 2005). Seu aroma é descrito como amadeirado e picante. Em estudos realizados, esta substância foi encontrada em 33% de 300 produtos cosméticos analisados de uma

marca na década de 90 (Groot et al., 1994 apud Sköld et al., 2005). Também foi encontrado em 45% de 71 desodorantes de uma marca europeia (Rastogi et al., 1998 apud Sköld et al., 2005).

Entretanto, quando exposto ao ar, esta substância pode se autooxidar, produzindo compostos como os peróxidos e epóxidos e, com isto, provocar um aumento da atividade alergênica, que pode causar dermatite de contato aos usuários dos produtos. Sköld et al. (2005) realizaram um estudo para investigar a autooxidação do β -cariofileno à temperatura ambiente, para identificar os compostos formados quando em exposição ao ar, visando investigar o efeito da autooxidação na capacidade sensibilizante. No processo de autooxidação do β -cariofileno, hidroperóxidos são formados como produtos primários de oxidação, que são decompostos rapidamente em produtos secundários, como por exemplo, álcoois, epóxidos, cetonas, aldeídos e compostos poliméricos (Figuras 32 e 33). A autooxidação do cariofileno levou a um moderado aumento da atividade alergênica. Isto ocorreu porque os produtos da oxidação primária do cariofileno, os hidroperóxidos, com elevada atividade alergênica, são rapidamente convertidos a um produto de oxidação mais estável e menos reativo, o óxido de cariofileno, com menor atividade alergênica quando comparados aos primeiros produtos da reação (Figuras 32 e 33).

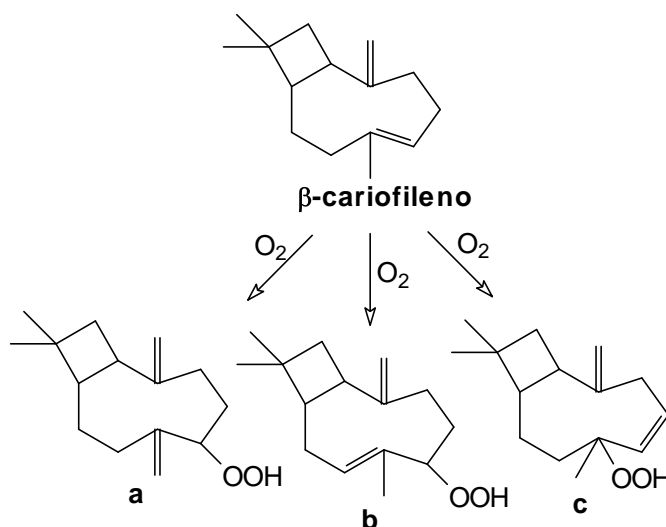


Figura 32: Fotooxidação do β -cariofileno, formando três hidroperóxidos (a, b e c). (Adaptado de Sköld et al., 2005).

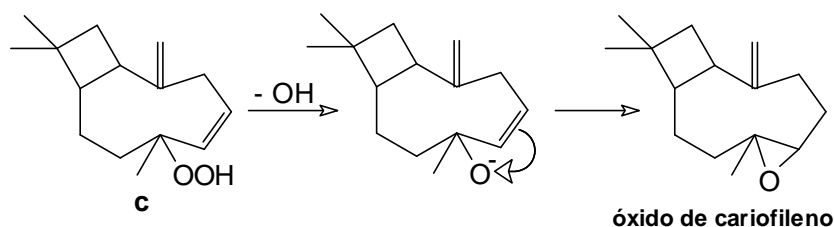


Figura 33: Mecanismo proposto para a formação do óxido de β -cariofileno a partir do hidroperóxido c. (Adaptado de Sköld et al., 2005).

A literatura descreve o gênero *Senecio* como sendo rico em derivados de estrutura terpenóide. Para esta classe de constituintes foram descritas várias atividades, entre elas destacam-se as atividades antimicrobiana (Guanasekera et al., 1990), antimalárica (Woerdenbang et al., 1994), antitumoral (Jurek e Scheuer, 1993), hipoglicemiante (Inmann et al., 1999), antioxidante (Bork et al., 1997), antiinflamatória (Geissberger e Sequin, 1991) e citotóxica (Barrero et al., 1997).

A atividade antimicrobiana já foi comprovada para a fração terpênica das partes aéreas de *S. desiderabilis* Vellozo (Deuschle, 2003); para o óleo essencial de *S. graveolens* Wedd. (Pérez et al., 1999); para o extrato de *S. maranguensis* O. Hoffm. (Cos et al., 2002), entre outras espécies de *Senecio*.

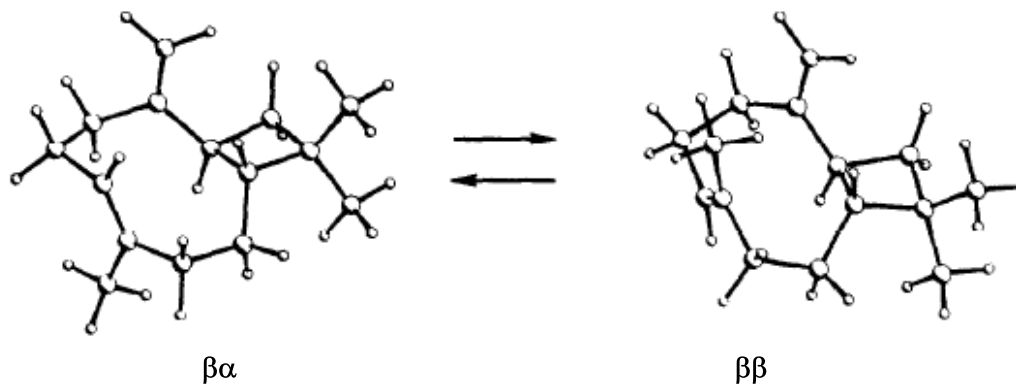
É difícil comparar dados da literatura a respeito da atividade antimicrobiana de produtos naturais, pelas diferentes cepas e metodologias utilizadas em cada trabalho, uma vez que estas não são comparáveis. Entretanto, de maneira geral, pode-se concluir que as bactérias Gram-positivas geralmente se mostram mais sensíveis à atividade de produtos naturais do que as Gram-negativas, provavelmente devido a diferenças morfológicas, uma vez que, as bactérias Gram-negativas apresentam parede complexa, constituída por uma membrana dupla, que fornece proteção (Holley e Patel, 2005). Também pode-se inferir que fungos leveduriformes como *Cândida sp.* e *Cryptococcus neoformans* são bastante sensíveis aos constituintes terpênicos. Os dermatófitos em geral também apresentam algum grau de sensibilidade (Deuschle, 2003).

Vários artigos relatam a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, atribuindo-a principalmente às características lipofílicas de seus constituintes. Entretanto, o cariofileno não demonstrou atividade antimicrobiana frente aos microorganismos testados até a concentração de 5 mg/mL, contrariando a expectativa, uma vez que apresenta características lipofílicas. Neste caso, o

resultado sugere que há outros aspectos envolvidos no mecanismo de ação destes constituintes além da lipofilia, que explicam a atividade antimicrobiana dos terpenóides (Deuschle, 2003).

A estereoquímica dos derivados do cariofileno tem apresentado um desafio aos químicos orgânicos por muitos anos. Mesmo com sua configuração conhecida, estes compostos apresentam uma estereoquímica complicada devido a vários aspectos conformacionais.

Em 1973, Warnhoff e Serinivasan (apud Barrero et al., 1995) propuseram a existência de dois isômeros conformacionais para o β -cariofileno à temperatura ambiente. Mais tarde, Shirahama et al. (1981, apud Barrero et al., 1995) estenderam a análise deste composto, usando RMN ^{13}C e um programa de cálculo (MM1). Os autores também encontraram duas conformações predominantes à temperatura ambiente, denominadas $\beta\alpha$ e $\beta\beta$, que são determinadas de acordo com a direção dos grupamentos exometilênico e metil-alílico, aparecendo numa proporção de 82% e 18%, respectivamente (Figura 34).



**Figura 34: Conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do β -cariofileno.
Fonte: Barrero et al., 1995.**

Barrero et al. (1995) realizaram um novo estudo das conformações do β -cariofileno por RMN ^1H e de ^{13}C . Na região olefínica do espectro de RMN ^1H , puderam ser visualizados os sinais das duas conformações: $\beta\alpha$ e $\beta\beta$. Observou-se que os prótons do grupamento metilênico exocíclico são mais blindados na conformação $\beta\alpha$ do que na $\beta\beta$; enquanto que o próton H5 é mais desblindado na conformação $\beta\alpha$ do que na $\beta\beta$ (Figura 35). No espectro de RMN ^{13}C , os sinais correspondentes à conformação $\beta\alpha$ foram notavelmente mais intensos.



Figura 35: Espectro de RMN ^1H das conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do β -cariofileno.
Fonte: Barrero et al., 1995.

A comparação do espectro de RMN ^1H do cariofileno (Figura 17), isolado de *Senecio bonariensis*, com a Figura 35, sugere que este apresente predominância da conformação $\beta\alpha$.

A partir do β -cariofileno, Barrero et al. (1995) prepararam o óxido de cariofileno, seu derivado epoxidado. O produto formado apresentou uma mistura de dois diastereoisômeros, onde, novamente a conformação $\beta\alpha$ foi predominante (81%) sobre a $\beta\beta$ (Figura 36).

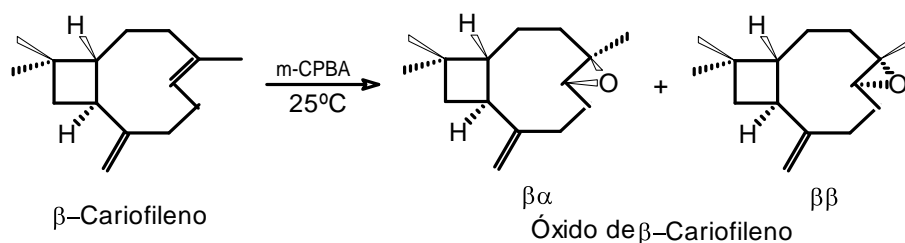


Figura 36: Conformações $\beta\alpha$ e $\beta\beta$ do óxido de β -cariofileno.
Fonte: Barrero et al., 1995.

Assim, a oxidação da conformação $\beta\alpha$ gerou o epóxido $\beta\alpha$ e a conformação $\beta\beta$ originou o epóxido $\beta\beta$. As concentrações dos produtos gerados são diretamente proporcionais às conformações do material de partida (Barrero et al., 1995).

Clericuzio et al. (2000) apresentam 4 conformações para a molécula de β -cariofileno, devido a flexibilidade do anel de 9 membros (Figura 37). Estas conformações $\beta\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ e $\alpha\alpha$ também são denominadas de acordo com as orientações dos grupamentos exometilênico (C8-C15) e metil-alílico (C5-C4-C14).

Do ponto de vista experimental, os autores sugeriram que, pelo menos duas conformações estão em equilíbrio à temperatura ambiente: $\beta\alpha$ e $\beta\beta$.

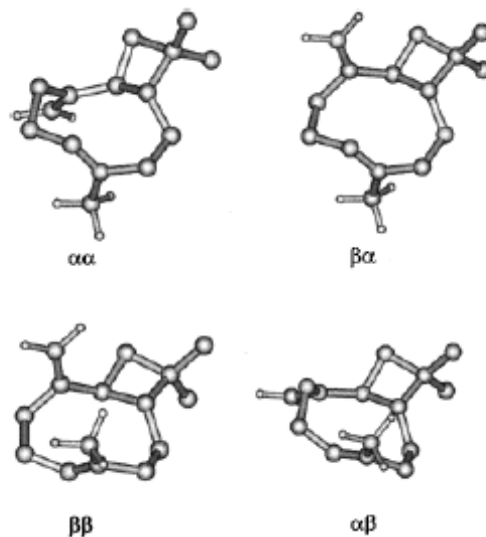


Figura 37: Conformações $\beta\alpha$, $\beta\beta$, $\alpha\beta$ e $\alpha\alpha$ do β -cariofileno.
Fonte: Clericuzio et al., 2000.

A comparação dos dados experimentais para a avaliação das conformações do β -cariofileno, levou à suposição de que a conformação $\beta\alpha$ deva ser a mais estável, uma vez que está representada com 93%, seguida pela $\beta\beta$ (6%) e $\alpha\alpha$ (1%). A conformação $\alpha\beta$ foi a menos estável em todos os testes realizados.

Fricke et al. (1995), investigaram a composição enantiomérica apresentada pelo β -cariofileno em uma série de óleos essenciais de várias espécies presentes na natureza (Figura 38). Os autores concluíram que, na maioria das espécies, os dois isômeros aparecem como mistura, entretanto, o enantiômero (-)- β -cariofileno apresenta-se em maior concentração. Em algumas espécies, este isômero aparece na forma pura.

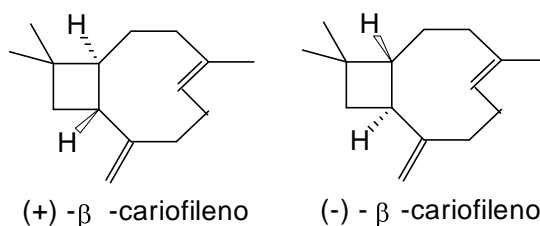


Figura 38: Enantiômeros do β -cariofileno.
(Adaptado de Fricke et al., 1995; Saritas et al., 1998).

Um estudo realizado por Saritas et al. (1998), comprovou que o β -cariofileno estava presente no óleo de *Dumortiera hirsuta*, como uma mistura enantiomérica. Porém, neste caso, o enantiômero (+)- β -cariofileno, normalmente mais raro, estava presente em maior quantidade (95%).

O óxido de cariofileno, também denominado epóxido de cariofileno, é formado a partir do cariofileno, através de uma reação de oxidação, conforme apresentado nas Figuras 32 e 33. Também apresenta estrutura e estereoquímica bem definidas (Barrero et al., 1995).

No gênero *Senecio*, o óxido de cariofileno foi isolado de *Senecio variabilis* Sch. Bip., *S. caudatus* DC. (Bohlmann et al., 1986), *S. zapahuirensis* Martic. et Quez. (Jakupovic et al., 1991) e de *S. palmensis* Chr. Sm. (Reina et al., 2002).

O óxido de cariofileno foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) como um conservante de alimentos e cosméticos. Também foi incluído na lista de substâncias aromatizantes pelo Conselho Europeu, uma vez que este composto (de origem natural ou sintética) apresenta-se tolerável, seguro e livre de toxinas.

Segundo Sibanda et al. (2004), o óxido de cariofileno não possui atividade antimicrobiana frente aos seguintes microorganismos: *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Aspergillus niger* (ATCC 16401). Estes resultados estão de acordo com o experimento descrito neste trabalho, que comprova que o óxido de cariofileno não possui atividade antimicrobiana contra os microorganismos descritos anteriormente, bem como para *Saccharomices cerevisiae* (ATCC 2601), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Acinetobacter baumannii* e *Prototheca zoopfi* (isolados clínicos) até a concentração de 1716 $\mu\text{g/mL}$. Neste caso, os resultados dos dois estudos podem ser comparados uma vez que utilizam a mesma metodologia de avaliação: microdiluição em caldo.

Entretanto, o óxido de cariofileno demonstrou notável atividade citotóxica em uma série de linhagem de células tumorais humanas (Kubo et al., 1996; Sibanda et al., 2004). Esta atividade pode ser responsável pela leve atividade citotóxica observada para o óleo essencial das folhas de *Heteropyxis dehniae*, muito utilizada pelos Zulu como perfume, já que o óxido de cariofileno é um dos constituintes deste

óleo (Sibanda et al., 2004). Este estudo contraria o de Legault et al. (2003), que descrevem o óxido de cariofileno como agente não citotóxico.

Reina et al. (2002) também descrevem a atividade citotóxica do óxido de carifileno. Além disso, segundo os autores, este composto também age como um ferormônio de alarme, inibindo o ataque de pulgas, besouros e joaninhas.

Um estudo realizado por Thebtaranonth et al. (1995) aponta para o óxido de cariofileno uma moderada atividade antimalárica, sendo o mesmo, ativo contra *Plasmodium falciparum* apresentando uma EC_{50} $3,45 \times 10^{-4}$ M.

Também já foram descritas para o óxido de cariofileno as atividades anticarcinogênica, atuando como indutor da enzima detoxificante glutationa-S-transferase (GST) (Zheng et al., 1992); inibidora da agregação plaquetária (Lin et al., 2003); repelente do mosquito *Anopheles gambiae* (Omolo et al., 2004); além de antifúngica (Yang et al., 2000). Para este experimento, os autores realizaram um estudo *in vitro* contra os fungos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* e *T.rubrum*. A atividade antifúngica do óxido de cariofileno foi comparada à ciclopiroxolamina e sulconazol, fármacos comumente usados no tratamento de onicomicoses.

No intuito de se descobrirem novos compostos ativos, com maior potencial farmacológico e com menos efeitos adversos, muitos pesquisadores investem em transformações químicas, modificando os compostos isolados de fontes naturais. Collado et al. (1996), realizaram a alcólise do óxido de cariofileno sob condições brandas, usando tetracianoetileno como catalisador. Os autores verificaram a formação de vários compostos a partir do óxido de cariofileno, entre eles 5α -hidroxicariofila-3,8(15) dieno, 4β -metoxicariofileno- 5α -ol e cariofil-15-eno-5,8-epóxido.

Hinkley et al. (2005) também realizaram um estudo buscando sintetizar novos compostos a partir do (-)- β -cariofileno. Através de várias etapas reacionais, o β -cariofileno foi convertido a uma mistura de 3 diterpenos isômeros, nas proporções de 1:1:1 (Figura 39).

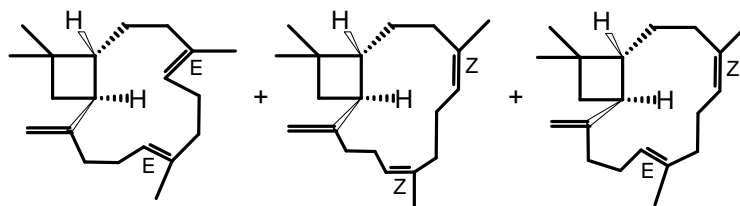


Figura 39: Diterpenos originados a partir do β -cariofileno.
Fonte: Hinkley et al., 2005.

O germacreno-D é um constituinte sesquiterpênico muito frequente nos vegetais. Este fato não surpreende, uma vez que o mesmo é um intermediário chave na rota biossintética dos sesquiterpenóides (Bülow e König, 2000; Steliopoulos et al., 2002; Ogamino et al., 2004), compostos com importantes atividades biológicas e medicinais (Prosser et al., 2004). O germacreno-D apresenta uma estrutura cíclica, com 10 átomos de carbono, com 3 duplas ligações, sendo duas pertencentes ao anel e uma dupla ligação exometilênica (Figura 40) (Ogamino et al., 2004).

Até o momento, o germacreno-D foi isolado de *Senecio vitalis* N. E. Br. (Bohlmann e Ziesche, 1980); *S. trichopterygius* Muscher (Bohlmann et al., 1980); *S. jacobaea* L. (Dooren et al., 1981); *S. implexus* Bally (Bohlmann et al., 1981d); *S. macrotis* Baker (Bohlmann et al., 1981c); *S. glanduloso-pilosus* Volkens et Muschler (Bohlmann e Gupta, 1982); *S. lydenburgensis* Hutch. et Burt Davy (Bohlmann e Bapuji, 1982); *S. pleistocephalus* S. Moore e *S. coronatus* (Thunb.) Harv. (Bohlmann e Zdero, 1982b); *S. microglossus* DC. (Bohlmann et al., 1983); *S. brasiliensis* (Sprengel) Less. e *S. venosus* Harv. (Bohlmann et al., 1985); *S. desfontainei* Druce (Metwally e 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. heterotrichius* DC. (Francescato et al., 2003) e *S. platensis* Arech (Bolzan et al., 2005).

Existem dois enantiômeros possíveis para o germacreno-D que ocorrem na natureza (Figura 40). Na maioria das plantas superiores, está presente o enantiômero (-), enquanto que o enantiômero (+) está presente em organismos inferiores; entretanto, em algumas espécies ambos os enantiômeros são descritos (Bülow e König, 2000; Steliopoulos et al., 2002; Prosser et al., 2002). Além disso, a

composição enantiomérica também pode variar de acordo com a parte da planta avaliada (Bülow e König, 2000).

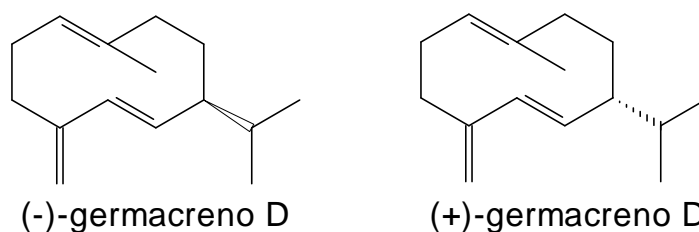


Figura 40: Enantiômeros do germacreno-D.
(Adaptado de Bülow e König, 2000; Steliopoulos et al., 2002)

Para o germacreno-D isolado de *S. bonariensis* não foram realizados estudos visando a determinação do enantiômero presente nesta espécie.

As plantas liberam centenas de compostos voláteis que são importantes na interação com insetos ou outros organismos. A atração de insetos, mediada pelos compostos voláteis pode ser, em alguns casos, vantajoso para a planta, como no caso da polinização. Mas também pode ser perigoso, uma vez que, servem de alimento para várias larvas fitófagas. Entretanto, o conhecimento é limitado no que se refere à detecção destes compostos pelos receptores neuronais do sistema olfativo dos insetos (Rostelien et al., 2000).

Estudos realizados por Mozuraitis et al. (2002), evidenciaram que o germacreno-D provoca um aumento da atração e da oviposição de *Heliothis virescens*, uma mariposa que aparece em cultivos de tabaco, deposita seus ovos e, ao nascerem, as larvas permanecem como hospedeiras da planta, causando severos danos à mesma.

Os receptores olfativos neuronais de *H. virescens* localizam-se nas antenas, onde são estimulados em contato com substâncias específicas. Estes receptores mostram um certo grau de especialização, correspondente aqueles receptores neuronais dos ferormônios (Rostelien et al., 2000).

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

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

Outra atividade descrita para o germacreno-D, é citada por Steliopoulos et al. (2002). Estes pesquisadores observaram que esta substância é reconhecida pelos machos de uma espécie de barata americana (*Periplaneta americana* L.) como estimulante sexual. Além disso, o germacreno-D já foi testado quanto ao seu potencial antimicrobiano, sendo que o mesmo não demonstrou atividade frente aos microorganismos e concentrações testados por Deuschle (2003).

Para as plantas do gênero *Senecio*, é possível identificar várias classes de constituintes, com estruturas químicas e atividades biológicas diversas. A grande variabilidade nas características morfoanatômicas observada entre as espécies de *Senecio*, podem estar correlacionadas à presença de diferentes classes de metabólitos secundários. Devido a este fato, alguns pesquisadores sugeriram o agrupamento das diferentes espécies deste gênero, de acordo com os seus constituintes (Bohlmann et al., 1980; Bohlmann et al., 1981; Bohlmann et al., 1985; Dupré et al., 1991), redimensionando a classificação taxonômica existente.

Entre os constituintes químicos mais frequentemente encontrados no gênero *Senecio*, estão os APs e os sesquiterpenóides com esqueleto do tipo furanoeremofilano (Torres et al., 1998). Embora ambas as classes de metabólitos secundários sejam de ocorrência comum no gênero, várias espécies não contêm estes compostos, os quais também ocorrem em gêneros correlatos, tornando a classificação quimiotaxonômica de espécies no gênero imprecisa (Bohlmann et al., 1985). Em alguns casos, os furanoeremofilanos são substituídos por seus precursores biossintéticos, como por exemplo, os eremofilanos, ou ainda, por lactonas de esqueleto eremofilano. Em outros grupos de espécies, principalmente as de aspecto suculento, ocorre a predominância de outros tipos de sesquiterpenóides, não ocorrendo furanoeremofilanos (Bohlmann et al., 1986).

As espécies suculentas parecem apresentar um conteúdo maior de sesquiterpenóides altamente oxigenados, entre os quais encontram-se os peróxidos

(Bohlmann et al., 1981d,e). Estes compostos apresentam atividade antimalárica comprovada, conforme descrito na revisão da literatura. Neste sentido, vários esforços têm sido feitos na busca de novas substâncias de ocorrência natural ou semi-sintética, que apresentem grupamentos peróxidos (Thebtaranonth et al., 1995).

As informações quimiotaxonômicas descritas até o momento, demonstram que o gênero *Senecio*, composto por um grande número de espécies, não é muito homogêneo, tanto no que se refere aos seus caracteres químicos, quanto morfológicos (Dupré et al., 1991).

No estudo do extrato diclorometânico de *Senecio bonariensis* Hook. et Arn., os furanoeremofilanos não puderam ser detectados, uma vez que, normalmente são constituintes de frações mais polares e ocorrem nas raízes, que não foram objeto de análise deste trabalho. No entanto, estes compostos, bem como os alcalóides pirrolizidínicos já foram isolados de extratos etanólicos desta espécie, como descrito anteriormente (item 2.3.3). Sendo assim, a espécie *S. bonariensis* apresenta como constituintes químicos já identificados os APs senecionina e platifilina (Paiva et al., 2004); os furanoeremofilanos 6 β -isobutiroiloxi-10 α ,H-9-oxofuranoeremofilano, 1 α ,6 β -diacetoxi-10 β ,H-9-oxofuranoeremofilano, 1 α -acetoxi-6 β -angeloiloxi-10 α ,H-9-oxofuranoeremofilano e 6 β -angeloiloxi-10 α ,H-9-oxofuranoeremofilano (Pomílio e Jares, 1997); e pela primeira vez descritos para esta espécie, os sesquiterpenóides de núcleo cariofilano, β -cariofileno e óxido de β -cariofileno, bem como o germacreno-D, derivado de esqueleto germacrano.

Dentre as três substâncias isoladas, pode-se afirmar que as mesmas apresentam uma interessante correlação biossintética. Portanto, o cátion germacrílico, que origina o germacreno-D, também é precursor do β -cariofileno, que por sua vez origina o óxido de β -cariofileno, por um processo de autooxidação e degradação, seguida de ciclização e epoxidação.

6. CONCLUSÕES

Após o estudo do extrato CH_2Cl_2 das partes aéreas de *Senecio bonariensis* Hooker et Arnott pode-se concluir que:

- Foi possível isolar o β -cariofileno, um sesquiterpeno derivado do cariofilano, com rendimento de 0,005% em relação ao material vegetal fresco. A partir da comparação dos dados espectroscópicos com a literatura, pôde-se concluir que o composto apresenta as duas conformações majoritárias, $\beta\alpha$ e $\beta\beta$, com predominância da conformação $\beta\alpha$.
- Foi isolado o óxido de β -cariofileno, um sesquiterpenóide com grupamento epóxido, derivado do cariofilano, com rendimento de 0,0008%. Sugere-se que este composto, assim como o β -cariofileno, apresente as duas principais conformações possíveis, $\beta\alpha$ e $\beta\beta$, com predominância da conformação $\beta\alpha$. O óxido de β -cariofileno é originado a partir da autooxidação do β -cariofileno, quando exposto a luz.
- Também foi possível isolar o germacreno-D, um intermediário chave na biossíntese de vários compostos sesquiterpenóides, entre eles o β -cariofileno. O rendimento deste composto em relação ao material vegetal foi de 0,0002%.
- O β -carifileno não demonstrou atividade antimicrobiana nas concentrações entre 0,025 e 5 mg/mL frente aos seguintes microorganismos: *Acinetobacter baumannii* (isolado clínico); *Candida albicans* ATCC 90028; *C. tropicalis* ATCC 750; *Prototheca zoopfi* (isolado clínico); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853; *Saccharomices cerevisiae* ATCC 2601; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- O óxido de β -carifileno também não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações entre 53,62 e 1716 $\mu\text{g/mL}$ frente aos seguintes microorganismos: *Acinetobacter baumannii* (isolado clínico); *Candida albicans* ATCC 90028; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031; *Prototheca zoopfi* (isolado clínico); *Pseudomonas aeruginosa* ATCC

27853; *Saccharomices cerevisiae* ATCC 2601; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDO, S. et al. Furanoeremophilanes and other constituents from *Senecio canescens*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 11, p. 3937-3941, 1992.

AHMED, A. F. et al. New β -Caryophyllene-Derived terpenoids from the soft coral *Sinularia nanolobata*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 4, p. 592-597, 2004.

BARBOSA, L. C. A. **Química Orgânica** – Uma introdução para as ciências agrárias e biológicas. Viçosa: UFV, 1998. p. 101-103.

BARRERO, A. F. et al. Stereochemistry of 14-Hydroxy- β -caryophyllene and related compounds. **Tetrahedron** v. 51, n. 13, p. 3813-3822, 1995.

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

BLACK, M. G.; HARGREAVES, K. R. Rhizome constituents of *Tussilago farfara*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 6, p. 2115-2116, 1972.

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

BOHLMANN, F. et al. Neue furanoeremophilane und weitere inhaltsstoffe aus Südafrikanischen *Senecio*-arten. **Phytochemistry**, v. 18, p. 79-93, 1979.

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J. New sesquiterpenes from *Senecio species*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 1851-1853, 1980.

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

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

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

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

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

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

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

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

BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J.; GUPTA, R. K. Two tricyclic sesquiterpenes from *Senecio anteuphorbium* and *Ursinia nana*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 6, p. 1331-1334, 1982.

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

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

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

BOLZAN, A. A. et al. A peroxide precursor from *Senecio platensis* Arech. In: 2^o Simpósio Brasil-Alemanha, Santa Maria, RS, p. 121, 2005.

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

BOURDY, G.; CHAVEZ De MICHEL, L. R.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 189-208, 2004.

BROWN, G. D., LIANG, G. Y., SY, L. K. Terpenoids from the seeds of *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 303-323, 2003.

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

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 2141-2153, 2004.

CABRERA, A. L.; KLEIN, R. M. Compostas. IN: Reitz, P. R. **Flora Ilustrada Catarinense**. Itajai: Herbário Barbosa Rodrigues, 222 pp., 1975.

CAI, Y. et al. A cDNA clone for β -caryophyllene synthase from *Artemisia annua*. **Phytochemistry**, v. 61, p. 523-529, 2002.

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

CHAVES, M. C. O.; SANTOS, B. V. O. Constituents from *Piper marginatum* fruits. **Fitoterapia**. v. 73, p. 547-549, 2002.

CHENG D. L. et al. Diterpene glycosides from *Senecio rufus*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 151-153, 1993.

CHRISTOV, V. S.; MIKHOVA, B. P.; EVSTATIEVA, L. N. Alkaloids from *Senecio aquaticus*. **Fitoterapia**. v. 73, p. 171-173, 2002.

CLERICUZIO, M. et al. Ab initio and density functional evaluations of the molecular conformations of β -caryophyllene and 6-hydroxycaryophyllene. **J. Org. Chem.**, v. 65, p. 6910-6916, 2000.

COLLADO, I. G.; HANSON, J. R.; MACÍAS-SÁNCHEZ, A. J. The cleavage of caryophyllene oxide catalysed by tetracyanoethylene. **Tetrahedron**, v. 52, n. 23, p. 7961-7972, 1996.

COS, P. et al. Further evaluation of Rwandan medicinal plant extracts for their antimicrobial and antiviral activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p. 229-237, 2002.

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

DE-EKNAMKUL, W.; POTDUANG, B. Biosynthesis of β -sitosterol and stigmasterol in *Croton sublyratus* proceeds via a mixed origin of isoprene units. **Phytochemistry**, v. 62, p. 389-398, 2003.

DE-LUCA, V.; LAFLAMME, P. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. **Current opinion in plant biology**, v. 4, p. 225-233, 2001.

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, p. 169-176, 2003.

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

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades**. Campinas: André Tosello, 10 pp, 1996.

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.

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 Δ^5 -unsaturated and saturated phytosterols. **Journal of Chromatography A**, v. 816, p. 177-184, 1998.

FERREIRA, S. H. (Org). **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1998.

FOOD DRUG ADMINISTRATION. Washington, DC, USA. Rules and Regulations: title 21 – Food and drugs, food additives, synthetic flavoring substances and adjuvants. Fed Regist (17 May), v. 95 (38), p. 12913-12914, 1973.

FOX, D. O. D. W. et al. Pyrrolizidine (*Senecio*) intoxication mimicking Reye síndrome. **The Journal of Pediatrics**, v. 93, n. 6, 1978.

FRANCESCATO, L. N. et al. Partial synthesis of Germacrene-d-1-hydroperoxide. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, supl. 2, p. 226, 2003.

FRANCESCATO, L. N. et al. Antimicrobial activity of Germacrene-d-1-hydroperoxide. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, supl. 1, p. 338, 2005.

FRICKE, C. et al. Identification of (+) – β -caryophyllene in essential oils of liverworts by enantioselective gas chromatography. **Phytochemistry**, v. 39, p. 1119-1121, 1995.

FRICKE, C. **Terpenoide Inhaltsstoffe von Lebermoosen un Heilpflanzen**. 124f. Tese Doutorado (Faculdad de Chimie), Universität Hamburg, 1999.

GARCIA, V. M. N. et al. Antifungal activities of nine traditional Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 85-88, 2003.

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.

GHELARDINI, C. et al. Local anaesthetic activity of β -Caryophyllene. **IL Farmaco**, v. 56, p. 387-389, 2001.

GREENHAGEM, B. T. **Origins of isoprenoid diversity: a study of structure-function relationships in sesquiterpene synthesis**. Tese Doutorado (Departament of Agriculture at the University of Kentucky), Lexington, Ky, 2003.

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

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

GUANASEKERA, S. P. et al. Two new bioactive cyclic peroxides from the marine sponge *Plakortis angulospiculatus*. **Journal of Natural Products**, v. 53, p. 669, 1990.

GUYNOT, M. E. et al. Antifungal activity of volatile compounds generated by essential oils against fungi commonly causing deterioration of bakery products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 893-899, 2003.

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

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

HÄNSEL, R.; STICHER, O.; STEINEGGER, E. **Pharmakognosie – Phytopharmazie**. 6. Aufl. Berlin: Springer, 1403 pp., 1999.

HEINZMANN, B.M. **Inhaltsstoffe aus *Senecio selloi* Spreng. DC.** Tese de Doutorado, Universität Bonn, Alemanha, 149 p, 1996.

HINKLEY, S. F. R.; PERRY, N. B.; WEAVERS, R. T. Synthesis of a caryophyllene isoprenologue, a potential diterpene natural product. **Tetrahedron** v. 61, p. 3671-3680, 2005.

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, p. 273-292, 2005.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: EdUFSCar, 152 pp., 2003.

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, 2001.

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

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

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

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

JUREK, J.; SCHEUER, P. J. Sesquiterpenoids and Norsesquiterpenoids from the Soft Coral Lemnalia Africana Jaroslaw. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 508-513, 1993.

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, p. 33-39, 2002.

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

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

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

KUBO, I. et al. Cytotoxic and oxidative sesquiterpenoids from *Heterotheca inuloides*. **Planta Medica**, v. 62, p. 427-430, 1996.

LEGAULT, J. et al. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by α -humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, p. 402-407, 2003.

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

LIN, W. Y. et al. Anti-platelet aggregation and chemical constituents from the rhizome of *Gynura japonica*. **Planta Medica**, v. 69, p. 757-764, 2003.

LIU, K.; RÖDER, E. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio argunensis*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1303-1305, 1991.

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

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

MARTZ, W.; HABERMEHL, G. G. Neosenkirkine from *Senecio leptolobus*. **Planta Medica**, v. 52, p. 503, 1986.

MATTOCKS, A. R.; DRIVER, H. E.; BARBOUR, R. H. Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. **Chemical biological interactions**, v. 58, p. 95-108, 1986.

MATZENBACHER, N. I. **O complexo "Senecionóide" (Asteraceae-Senecioneae) no Rio Grande do Sul Brasil**. 1998. 273f. Tese (Doutorado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

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

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

MORALES, G. et al. A new eremophilanolide from *Senecio atacamensis*. **Boletín de la Sociedad Chilena de Química**, v. 45, n. 4, 2000.

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

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

NATIONAL COMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – Reference method for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard document M7-A4. 2004.

NATIONAL COMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) – Reference method for dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard document M27-A2. 2004.

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

OMOLO, M. O. et al. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2797-2802, 2004.

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, p. 1219-1222, 2004.

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, p. 91-96, 1999.

PESTCHANKER, M. J.; ASCHERI, M. S.; GIORDANO, O. S. Uspallatine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio uspallatensis*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 7, p. 1622-1624, 1985.

POMILIO A. B.; JARES, E. A. Toxic furanoeremophilanes from *Senecio bonariensis*. **Internacional 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, p. 93-98, 2001.

PROSSER, I. et al. (+) – (10*R*) – Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. **Phytochemistry**, v. 60, 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, p. 136-144, 2004.

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

RÖDER, E.; WIEDENFELD, H. Isolierung und strukturaufklärung des alkaloids fuchsisenecionin aus *Senecio fuchsii*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1462-1463, 1977.

ROEDER, E.; WIEDENFELD, H.; KIRSTGEN, R. B. Pyrrolizidine alkaloid from *Senecio cacaliaster*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1761-1763, 1984.

ROEDER, E.; BOURAUDEL, T.; KERSTEN, R. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio personii*. **Phytochemistry**, v. 32, p. 1051-1053, 1993.

RÖDER, E. Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids. **Pharmazie**, v. 50, p. 83-98, 1995.

ROSTELIEN, T. et al. The plant sesquiterpene germacrene D specifically activates a major type of antennal receptor neuron of the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*. **Chem. Senses**, v. 25, p. 141-148, 2000.

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

RÜCKER, G. et al. Triterpenes with a new 9-epi-cucurbitan skeleton from *Senecio selloi*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1587-1591, 1999.

SARITAS, Y. et al. Sesquiterpene hydrocarbons in the liverwort *Dumortiera hirsuta*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1019-1023, 1998.

SHIJLEN, N. E. G. W. M. et al. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. **Phytochemistry**, v. 65, 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, p. 141-172, 2001.

SIBANDA, S. et al. Composition and bioactivity of the leaf essential oil of *Heteropyxis dehniae* from Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 107-111, 2004.

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

SILVA, C. M. et al. Antimicrobial evaluation of caryophyllene, a constituent of *Senecio bonariensis* Hook et Arn. In: 2º Simpósio Brasil-Alemanha, Santa Maria, RS, p. 295, 2005.

SILVA, C. M.; BOLZAN, A. A.; HEINZMANN, B. M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, 2006 (no prelo).

SILVESRTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª edição, Rio de Janeiro: LTC, 460 pp., 2000.

SKÖLD M. et al. The fragrance chemical β -caryophyllene—air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, 2005 (no prelo).

STAHL, E. Thin-layer chromatography – a laboratory handbook. 2ª ed. Translated by M. R. F. Ashworth. Ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1041 pp., p. 49, 211, 227-228, 1969.

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.

STELIOPOULOS, P. et al. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ^{13}C and ^2H labeling studies. **Phytochemistry**, v. 60, p. 13-20, 2002.

STRANDEN, M.; BORG-KARLSON, A. K.; MUSTAPARTA, H. Receptor neuron discrimination of the germacrene D enantiomers in the moth *Helicoverpa armigera*. **Chem. Senses**, v. 27, p. 143-152, 2002.

STRANDEN, M. et al. (-)-Germacrene D receptor neurons in three species of heliothine moths: structure-activity relationships. **J. Comp. Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol**, v. 189 (7), p. 563-577, 2003.

SUAU, R. et al. Pyrrolizidine alkaloids from three Spanish *Senecio* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 981-984, 2002.

TAMBE, Y. et al. Gastric cytoprotection of the non-steroidal anti-inflammatory sesquiterpene, β -caryophyllene. **Planta Medica**, v. 62, p. 469-470, 1996.

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

THEBTARANONTH, C. et al. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10,12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 125-128, 1995.

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, p. 345-351, 2004.

TOMMASI, N. et al. Polyhydroxylated triterpenes from *Senecio pseudotites*. **Phytochemistry**, v. 49, n. 4, p. 1123-1125, 1998.

TORRES, P. et al. Furanoeremophilanes and a bakkenolide from *Senecio auricula* var. *major*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 57-61, 1998.

TORRES, P. et al. Furanoeremophilane derivatives from *Senecio flavus*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1507-1513, 1999.

TORRES, P. et al. Secondary metabolites from *Senecio minutus* and *Senecio boissieri*: a new jacaranone derivative. **Fitoterapia**, v. 71, p. 91-93, 2000.

TRENDAFILOVA, A. B.; TSANKOVA, E. T.; EVSTATIEVA, L. N. Seco-eremophilanolides from *Senecio macedonicus*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 329-330, 1995.

TRIGO, J. R. et al. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 1011-1022, 2003.

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

URZÚA, A.; ANDRADE, L. Comparative chemical composition of the resinous exudates from *Senecio adenotrichius* and *S. viscosissimus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 865-867, 2001.

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

WAGNER, H. **Pharmazeutische Biologie**. 5. Auflage, New York: Gustav Fischer Verlag, 522pp., 1993.

WIENDENFELD, H.; ROEDER, E.; LUCK, W. O⁷-Angeloylretronecine, a pyrrolizidine alkaloid from *Senecio inornatus*. **Planta Medica**, v. 62, p. 483, 1996.

WILLIAMS, C. M.; MANDER, L. N. Chromatography with silver nitrate. **Tetrahedron**, v. 57, p. 425-447, 2001.

WOERDENBANG, H. J. et al. Progress in the research of artemisinin-related antimalarals: an update. **Pharmaceutical World Science**, v. 16, p. 169, 1994.

YANG et al. Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 148, p. 79-82, 2000.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Organizadores). **Plantas medicinais – sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 500 pp, 2001.

ZDERO, C.; BOHLMANN, F.; LIDDELL, J. R. Seco-eremophilanes and other constituents from South African *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 28, n. 12, p. 3532-3534, 1989.

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

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Sesquiterpenes from clove (*Eugenia caryophyllata*) as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 7, p. 999-1003, 1992.

8. ANEXOS

Anexo 1:**ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *SENECIO*****Chana de Medeiros da Silva, Aline Abati Bolzan e Berta Maria Heinzmann***

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia Industrial, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Prédio 26, Campus Universitário, CEP 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract: “PYRROLIZIDINE ALKALOIDS FROM *SENECIO* SPECIES”.

Senecio species contain a large variety of secondary metabolites and many of these plants afford pyrrolizidine alkaloids. This paper shows 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.

Key words: *Senecio*, pyrrolizidine alkaloids; hepatotoxicity.

* E-mail: hberta@ccs.ufsm.br, Tel. + 55-55-32209366.

INTRODUÇÃO

O gênero *Senecio* (tribo *Senecioneae*, Asteraceae) é constituído por mais de 2000 espécies de ampla distribuição mundial¹. No Brasil, foram catalogadas cerca de 85 espécies pertencentes ao gênero, dentre as quais 33 são nativas da região sul¹ e 25 foram identificadas no Rio Grande do Sul².

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 Uruguai³⁻⁵. A literatura também relata a ocorrência de intoxicações fatais em seres humanos devido ao consumo de espécies de *Senecio* contendo Aps⁶⁻⁸, que tem sido empregadas na medicina popular de diversos países, inclusive na América Latina⁹⁻¹¹.

TIPOS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS ENCONTRADOS EM ESPÉCIES DE *SENECIO*.

APs são ésteres de aminoálcoois com um núcleo pirrolizidínico (necina) e ácidos alifáticos (ácidos nécicos), que podem ocorrer na forma de monoésteres, diésteres 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 C7⁸ (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^{8,12,13}. Os APs que possuem a necina saturada não são tóxicos aos mamíferos¹⁴.

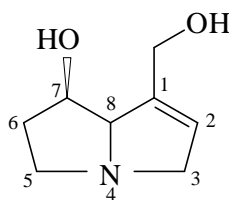
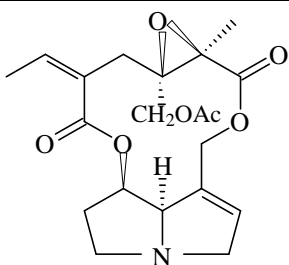
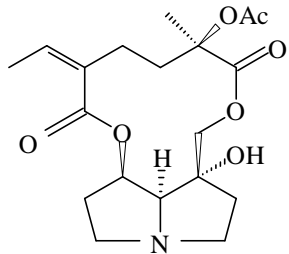
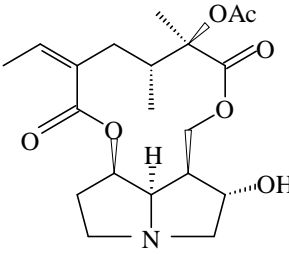
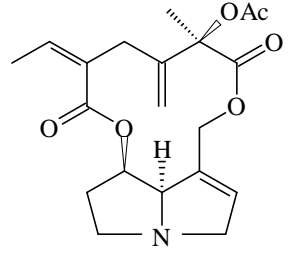


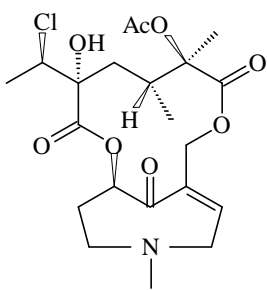
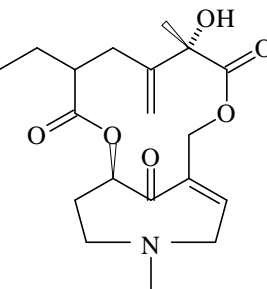
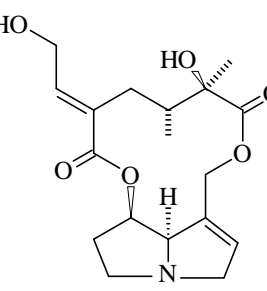
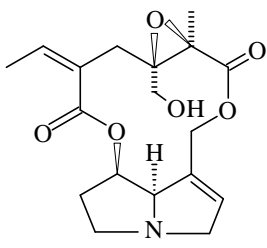
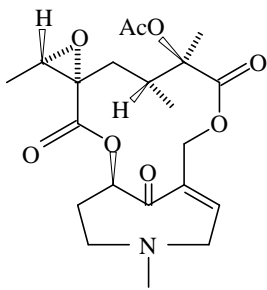
Figura 1: Estrutura básica de uma necina

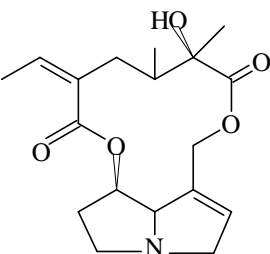
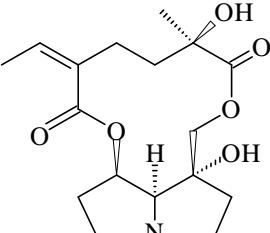
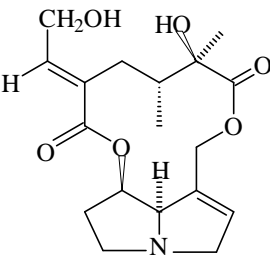
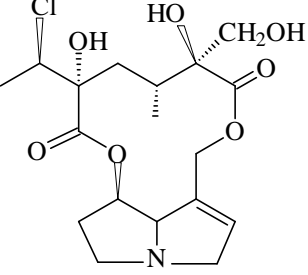
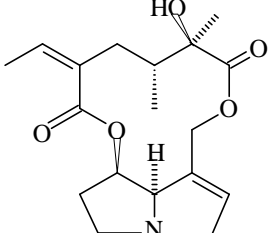
Segundo Trigo¹⁵, por serem muito comuns ao gênero, os APs podem ser utilizados como marcadores quimiosistemáticos para a tribo *Senecioneae*, uma vez que a maioria apresenta uma estrutura macrocíclica diéster do tipo senecionina (Tabela 1) e/ou são mono e diésteres do tipo triangularina (Tabela 2).

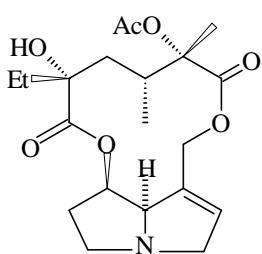
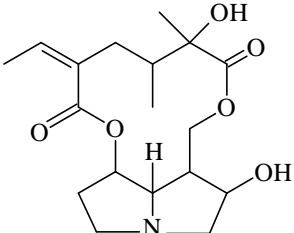
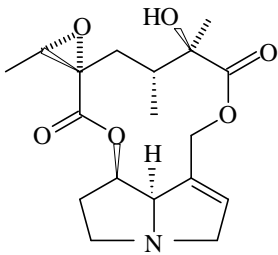
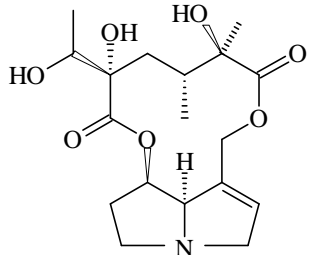
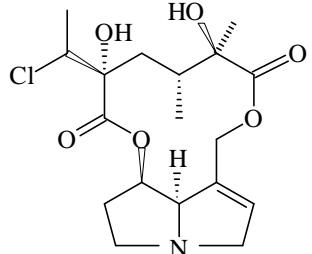
Tabela 1: Principais alcalóides pirrolizidínicos do tipo senecionina presentes em espécies do gênero *Senecio*.

Alcalóides Pirrolizidínicos	Espécies de <i>Senecio</i>	Ref
 <p>Acetilerucifolina</p>	<i>S. jacobaea</i> L.	16
 <p>12-O-acetil-hadiensina</p>	<i>S. hadiensis</i> Forsk.	17
 <p>12-O-acetilrosmarinina</p>	<i>S. hadiensis</i> Forsk. <i>S. syringifolius</i> O. Hoffm.	17 17
 <p>Acetilseneciofilina</p>	<i>S. pterophorus</i> DC.	7

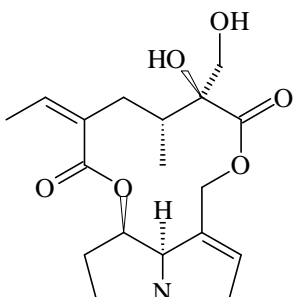
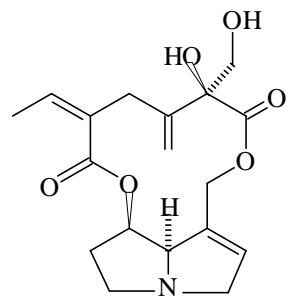
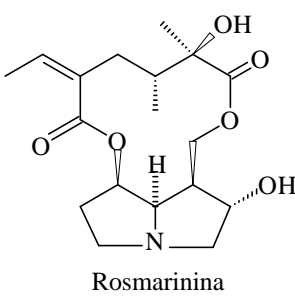
	<i>S. lautus</i> Forster f. ex Willd. <i>S. magnificus</i> F. Muell. <i>S. quadridentatus</i> Labill.	18 19 19
Acetilsenecionina		
	<i>S. adonidifolius</i> Loisel.	20
Adonifolina		
	<i>S. syringifolius</i> O. Hoffm.	17
Angularina		
	<i>S. ruwenzoriensis</i> S. Moore.	21,22
Bislina		
	<i>S. cacaliaster</i> Lam.	23
Bulgarsenina		

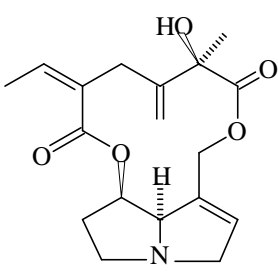
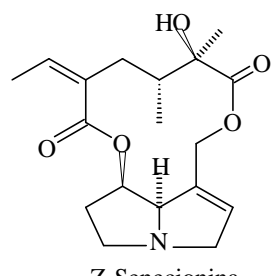
 <p>Doronina</p>	<i>S. leptolobus</i> DC.	4
 <p>Emilina</p>	<i>S. microphyllus</i> Phil.	8
 <p>Eruciflorina</p>	<i>S. erucifolius</i> L. <i>S. jacobaea</i> L.	16 16,24
 <p>Erucifolina</p>	<i>S. aquaticus</i> Hill. <i>S. argunensis</i> Turcz. <i>S. erraticus</i> Bertol. <i>S. erucifolius</i> L. <i>S. jacobaea</i> L. <i>S. persoonii</i> De Not.	25 26 8 16 16,24 27
N-óxido de Erucifolina	<i>S. persoonii</i> De Not.	27
 <p>Florosenina</p>	<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

	<i>S. nemorensis</i> L.	30
Fuchsisenecionina		
	<i>S. hadiensis</i> Forsk.	17
Hadiensina		
	<i>S. argunensis</i> Turcz.	26
21-Hidroxi-integerrimina		
	<i>S. selloi</i> (Spreng) DC.	4
18-Hidroxi-jaconina		
	<i>S. argunensis</i> Turcz.	26
E-Integerrimina	<i>S. brasiliensis</i> (Sprengel) Less.	4,10,15,31
	<i>S. erucifolius</i> L.	16
	<i>S. glabellus</i> Poir.	32
	<i>S. heterotrichus</i> DC.	3,4
	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33
	<i>S. leptolobus</i> DC.	3,4
	<i>S. longilobus</i> Benth.	32
	<i>S. malacitanus</i> L.	34
	<i>S. murorum</i> Remy	8

 <p>The structure of Isolina is a complex alkaloid. It features a central piperidine ring system with a nitrogen atom. Attached to this system are two five-membered rings, one of which is a pyrrolidine ring. The molecule is highly substituted with various functional groups: an acetoxy group (AcO) and a hydroxyl group (HO) on the left side, an ethyl group (Et) on the right side, and a methyl group (CH₃) on the top. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<i>S. ruwenzoriensis</i> S. Moore.	21,22
 <p>The structure of Isorosmarinina is a complex alkaloid. It features a central piperidine ring system with a nitrogen atom. Attached to this system are two five-membered rings, one of which is a pyrrolidine ring. The molecule is highly substituted with various functional groups: a hydroxyl group (OH) on the top, a methyl group (CH₃) on the left, and another hydroxyl group (OH) on the right. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<i>S. pterophorus</i> DC.	7
 <p>The structure of Jacobina is a complex alkaloid. It features a central piperidine ring system with a nitrogen atom. Attached to this system are two five-membered rings, one of which is a pyrrolidine ring. The molecule is highly substituted with various functional groups: a methyl group (CH₃) on the top, a hydroxyl group (HO) on the left, and another hydroxyl group (HO) on the right. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33
 <p>The structure of Jacolina is a complex alkaloid. It features a central piperidine ring system with a nitrogen atom. Attached to this system are two five-membered rings, one of which is a pyrrolidine ring. The molecule is highly substituted with various functional groups: a hydroxyl group (HO) on the top, a methyl group (CH₃) on the left, and another hydroxyl group (HO) on the right. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<i>S. jacobaea</i> L.	24,33
 <p>The structure of Jaonina is a complex alkaloid. It features a central piperidine ring system with a nitrogen atom. Attached to this system are two five-membered rings, one of which is a pyrrolidine ring. The molecule is highly substituted with various functional groups: a chlorine atom (Cl) on the top, a hydroxyl group (HO) on the left, and another hydroxyl group (HO) on the right. The stereochemistry is indicated with wedges and dashes.</p>	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33

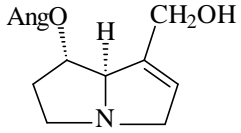
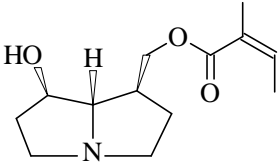
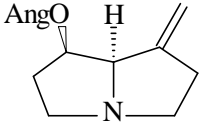
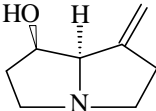
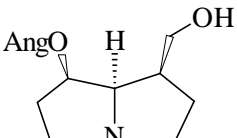
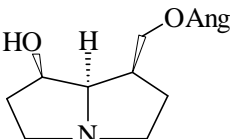
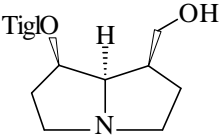
	<i>S. jacobaea</i> L.	16,24,33
Jacozina		
	<i>S. gallicus</i> Vill. <i>S. microphyllus</i> Phil.	28 8
Ligularizina		
	<i>S. grandifolius</i> Less. <i>S. leptolobus</i> DC.	29 3,4,35
Neosenquirquina		
	<i>S. argunensis</i> Turcz. <i>S. erraticus</i> Bertol. <i>S. glaber</i> Less. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. lorenthii</i> Hochst.	26 8 8 4 36
Otosenina		
	<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
Platifilina		

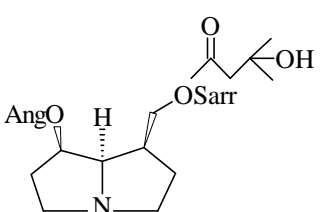
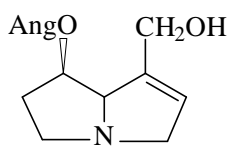
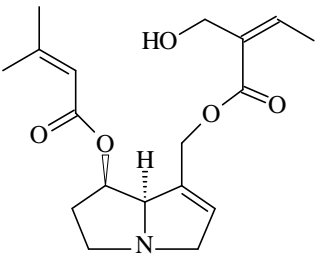
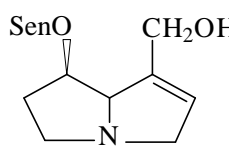
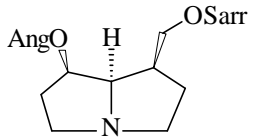
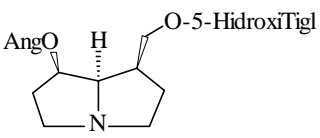
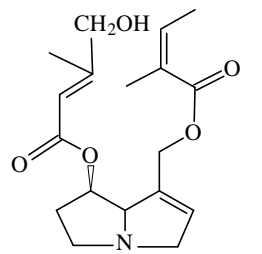
N-óxido de Platifilina	<i>S. granatensis</i> Boiss.	34
	<i>S. madrensis</i> A. Gray	39
	<i>S. polypodioides</i> Greene	39
 <p>Z-Retrorsina</p>	<i>S. bonariensis</i> Hook. et Arn.	40
	<i>S. brasiliens</i> (Sprengel) Less.	4,10,15,31
	<i>S. cisplatinus</i> Cabrera	3,4
	<i>S. conyzifolius</i> Baker	37
	<i>S. cymbalorioides</i> Nutt.	41
	<i>S. gilliesianus</i> Hieron.	42
	<i>S. heterotrichus</i> DC.	3,4
	<i>S. jacobaea</i> L.	16
	<i>S. leptolobus</i> DC.	4
	<i>S. longilobus</i> Benth.	32
	<i>S. malacitanus</i> L.	34
	<i>S. microphyllus</i> Phil.	8
	<i>S. oleosus</i> Vell.	37
	<i>S. othonnaeflorus</i> DC.	43
	<i>S. oxiphyllus</i> DC.	4
	<i>S. prionoapterus</i> B. L. Rob. e Greenm.	39
	<i>S. pseud aureus</i> Rydb.	41
	<i>S. seloi</i> (Spreng) DC.	3,4
	<i>S. streptanthifolios</i> Greene	41
<i>S. uspallatensis</i> Hook et Arn.	44	
N-óxido de Retrorsina (Isatidina)	<i>S. othonnaeflorus</i> DC.	43
 <p>Ridelina</p>	<i>S. cisplatinus</i> Cabrera	4
	<i>S. oxiphyllus</i> DC.	4
 <p>Rosmarinina</p>	<i>S. callosus</i> Sch. Bip.	38
	<i>S. hadiensis</i> Forsk.	17
	<i>S. pterophorus</i> DC.	7
	<i>S. runcinatus</i> Less.	39
	<i>S. syringifolius</i> O. Hoffm.	17
N-óxido de Rosmarinina	<i>S. runcinatus</i> Less.	39

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

	<i>S. jacobaea</i> L. <i>S. leptolobus</i> DC. <i>S. seloi</i> (Spreng) DC.	24 4 4
Senecivernina		
	<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
Senquirquina		
	<i>S. pterophorus</i> DC.	7
E-Spartioidina		
	<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
E-Usaramina		
	<i>S. patagonicus</i> Phil. <i>S. uspallatensis</i> Hook et Arn.	8 44
Uspalatina		

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

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

 <p>Racemodina</p>	<i>S. racemosus</i> (Bieb.) DC.	50
 <p>7-Angelil-retronecina</p>	<i>S. inornatus</i> DC.	51
 <p>7-Senecioil-9-sarracinoil retronecina</p>	<i>S. cacaliaster</i> Lam. <i>S. kaschkarovii</i> C. Winke	23 52
 <p>7-Senecioil-retronecina</p>	<i>S. cacaliaster</i> Lam.	23
 <p>Sarracina</p>	<i>S. chrysocoma</i> Meerb. <i>S. conzatti</i> Greenm. <i>S. doratophyllus</i> Benth.	49 47 47
N-óxido de Sarracina	<i>S. deformis</i> Klatt.	47
 <p>Neosarracina</p>	<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
 <p>Sencalenina</p>	<i>S. cacaliaster</i> Lam.	23

	<i>S. kaschkarovii</i> C. Winke.	52
Triangularina		
	<i>S. kaschkarovii</i> C. Winke.	52
Neotriangularina		

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 vizinhos⁵³. 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 quimiotipo²⁴.

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 Aps²⁴. Entretanto, somente tornam-se tóxicos quando metabolizados pelo fígado a uma forma pirrólica altamente reativa, conhecida como dehidroalcalóide⁸.

O efeito hepatotóxico destes alcalóides, devido à atuação de seus metabólitos como agentes alquilantes, está bem estabelecido. Primeiramente ocorre uma oxidação (desidrogenação) no carbono- α ao N, catalisada por monooxigenases do citocromo P-450⁵⁴. 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 adutos⁵⁵. 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 glutathione parecem ser as razões para a maior resistência de ovelhas e hamsters à toxicidade destes alcalóides⁵⁴. A ingestão crônica de plantas contendo APs, por animais de laboratório, levou ao desenvolvimento de câncer e, paralelamente, metabólitos de alguns APs mostraram atividade mutagênica *in vitro*⁵⁶. 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 Parkash⁵⁵ 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.

APOIO FINANCEIRO – CNPq, CAPES

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cabrera, A. L.; Klein, R. M. Compostas. Em: *Flora Ilustrada Catarinense*; Reitz, P. R. Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, 1975.
2. Matzenbacher, N. I.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 1998.
3. Habermehl, G. G.; Martz, W.; Tokarnia, C. H.; Dobereiner, J.; Mendez, M. C.; *Toxicon* **1988**, 26, 275-286.
4. Krebs, H. C.; Carl, T.; Habermehl, G. G.; *Phytochemistry* **1996**, 43, 1227-1229.
5. Ilha, M. R. S.; Loretto, A. P.; Barros, S. S.; Barros, C. S. L.; *Pesq. Veter. Brasil.* **2001**, 21, 123-138.
6. Fox, D. W.; Hart, M. C.; Bergeson, P. S.; Jarret, P. B.; Stillman, A. E.; Huxtable, R. J.; *J. Pediatr.* **1978**, 93, 980-982.
7. Liddell, J. R.; Logie, C. G.; *Phytochemistry* **1993**, 34, 1629-1631.
8. Villarroel, L. V.; Torres, R. G.; Urzúa, A.; Modak, B.; Henriquez, J.; Salgado, I.; *Rev. Latinamer. Quim.* **1997**, 25, 109-116.
9. Garcia, VMN.; Gonzalez, A.; Fuentes, M.; Aviles, M.; Rios, M. Y.; Zepeda, G.; Rojas, M. G.; *J. Ethnopharmacol.* **2003**, 87, 85-88.
10. Toma, W.; Trigo, J. R.; De Paula, A. C. B.; Brito, ARMS.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 95, 345-351.
11. Bourdy, G.; Chavez de Michel, L. R.; Roca-Coulthard, A.; *J. Ethnopharmacol.* **2004**, 91, 189-208.
12. Mattocks, A. R.; Driver, H. E.; Barbour, R. H.; *Chem. Biol. Interact.* **1986**, 58, 95-108.
13. Jares, E. A.; Pomílio, A. B.; *J. High Resol. Chromat.* **1989**, 12, 565 – 568.
14. Mattocks, A. R.; Academic Press, New York, apud *Biochem. Syst. Ecol.* **1989**, 30, 981-982.

15. Trigo, J. R.; Leal, I. R.; Matzenbacher, N. I.; Lewinsohn, T. M.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2003**, 31, 1011–1022.
16. Witte, L.; Ernst, L.; Adam, H.; Hartmann, T.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 559-565.
17. Were, O.; Benn, M.; Munavu, R. M.; *Phytochemistry* **1993**, 32, 1595-1602.
18. Bohlmann, F.; Ziesche, J.; King, R.M.; Robinson, H.; *Phytochemistry* **1980**, 19, 2675-2679.
19. Zdero, C.; Bohlmann, F.; King, R. M.; Haegi, L.; *Phytochemistry* **1990**, 29, 509–511.
20. Witte, L.; Ernst, L.; Wray, V.; Hartmann, T.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 1027–1028.
21. Benn, M.; Were, O.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 3295-3296.
22. Susag, L.; Parvez, M.; Mathenge, S.; Benn, M. H.; *Phytochemistry* **2000**, 54, 933–935.
23. Roeder, E.; Wiedenfeld, H.; Kirstgen, R. B.; *Phytochemistry* **1984**, 23, 1761-1763.
24. Macel, M.; Vrieling, K.; Klinkhamer, P. G. L.; *Phytochemistry* **2004**, 65, 865–873.
25. Christov, V. S.; Mikhova, B. P.; Evstatieva, L. N.; *Fitoterapia* **2002**, 73, 171–173.
26. Liu, K.; Roder, E.; *Phytochemistry* **1991**, 30, 1303-1305.
27. Roeder, E.; Bourauel, T.; Kersten, R.; *Phytochemistry* **1993**, 32, 1051-1053.
28. Urones, J. G.; Barcala, P. B.; Marcos, I. S.; Moro, R. F.; Esteban, M. L.; Rodriguez, A. F.; *Phytochemistry* **1988**, 27, 1507-1510.
29. Bohlmann, F.; Zdero, C.; Jakupovic, J.; Grenz, M.; Castro, V.; King, R. M.; Robinson, H.; Vincent, L. P. D.; *Phytochemistry* **1986**, 25, 1151-1159.
30. Wiedenfeld, H.; Röder, E.; *Phytochemistry* **1979**, 18, 1083-1084.
31. Santos-Mello, R.; Deimling L. I.; Lauer Júnior, C. M.; Almeida, A.; *Mutat. Res.* **2002**, 516, 23–28.
32. Ray, A. C.; Williams, J.; Reagor, J.; *Phytochemistry* **1987**, 26, 2431-2433.
33. Vrieling, K.; Derridj, S.; *Phytochemistry* **2003**, 64, 1223–1228.

34. Suau, R.; Cabezudo, B.; Rico, R.; Nájera, F.; López-Romero, J. M.; García, A.I.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2002**, 30, 981–984.
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, 618–620.
37. Paiva, J. A.; Barata, L. E. S.; Trigo, J. R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2004**, 32, 1219–1222.
38. Romo de Vivar, A.; Pérez, A.L.; Vidales, P.; Nieto, D. A.; Villaseñor, J. L.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1996**, 24, 175–176.
39. Pérez-Castorena, A.L.; Arciniegas, A.; Martínez, F.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2000**, 28, 279–282.
40. Tettamanzi, M. C.; Jares, E. A.; Pomilio, A.B.; *Fitoterapia* **1992**, LXIII, 551–552.
41. Bai, Y.; Benn, M.; Majak, W.; *Planta Med.* **1996**, 62, 71-72.
42. Guidugli, F. H.; Pestchanker, M. J.; De Salmeron, M. S. A.; Giordano, O.S.; *Phytochemistry* **1986**, 25, 1923–19126.
43. Zdero, C.; Bohlmann, F.; Liddell, J. R.; *Phytochemistry* **1989**, 28, 3532–3534.
44. Pestchanker, M. J.; Ascheri, M. S.; Giordano, O.S.; *Phytochemistry* **1985**, 24, 1622-1624.
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, 1198-1199.
47. Pérez-Castorena, A.L.; Arciniegas, A.; Villaseñor, J. L.; Romo de Vivar, A.; *Biochem. Syst. Ecol.* **1999**, 27, 835–837.
48. Benn, M. H.; Mathenge, S.; Munavu, R. M.; Were, S. O.; *Phytochemistry* **1995**, 40, 1327-1329.
49. Grue, M. R.; Liddell, J. R.; *Phytochemistry* **1993**, 33, 1517-1519.

50. Ahmed, W.; Khan, A.Q.; Malik, A.; Ergun, F.; Sener, B.; *Phytochemistry* **1993**, 32, 224-226.
51. Wiedenfeld, H.; Roeder, E.; Luck, W.; *Planta Med.* **1996**, 62, 483.
52. Cheng, D. L.; Niu, J. K.; Roeder, E.; *Phytochemistry* **1992**, 31, 3671-3672.
53. Bohlmann, F.; Zdero, C.; Jakupovic, J.; Misra, L. M.; 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, 1249-1261.
54. Huan, J. Y, Miranda, C. L.; Buhler, D. R.; Cheeke, P. R.; *Toxicol. Lett.* **1998**, 99, 127-137.
55. Parkash, A.S.; Pereira, T. N.; Reilly, P. E. B.; Seawright, A.; *Mutat. Res.* **1999**, 443, 53-67.
56. Chojkier, M.; *J. Hepatol.* **2003**, 39, 437-446.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.daneprairie.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.