

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FRANCIS JOSÉ ZORTÉA MERINO



ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO, FARMACOLÓGICO E BIOLÓGICO  
DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanni* DUSÉN (ASTERACEAE)

CURITIBA

2018

FRANCIS JOSÉ ZORTÉA MERINO

ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO, FARMACOLÓGICO E BIOLÓGICO  
DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii* DUSÉN (ASTERACEAE)

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientador: Profa Dra. Marilis Dallarmi Miguel

CURITIBA

2018

Merino, Francis José Zortéa

Estudo morfoanatômico, fitoquímico, farmacológico, e biológico das partes aéreas de *Senecio westermanii* Dusén (Asteraceae) / Francis José Zortéa Merino – Curitiba, 2018.

199 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdulio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallami Miguel

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Farmacologia. 2. *Aedes aegypti*. 3. Alelopatia. 4. Toxicidade. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallami. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **FRANCIS JOSE ZORTEA MERINO** intitulada: **ESTUDO MORFOANATÔMICO, FITOQUÍMICO, FARMACOLÓGICO E BIOLÓGICO DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii* Dusén - Asteraceae**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 25 de Maio de 2018.

  
OBDULIO GOMES MIGUEL  
Presidente da Banca Examinadora

  
VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA  
Avaliador Externo

  
LORENE AMSTRONG  
Avaliador Externo

  
CLAUDIA ALEXANDRA DE ANDRADE  
Avaliador Externo

  
JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS  
Avaliador Interno

A minha esposa Ariane.

Ao meu lindo filho João Pedro.

Aos meus pais Geraldo e Dilene.

Aos meus irmãos Vinícius, Régis e Denis.

Aos meus sogros João e Ivanete.

À minha avó Lucina.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** pela rara oportunidade que tive, muito obrigado!

À minha linda esposa **Ariane** e maravilhoso filho **João Pedro**, por serem o principal motivo da minha perseverança nos estudos. E por toda força emocional que me deram nessa caminhada.

Aos meus pais, **Dilene e Geraldo**, que nunca deixaram eu desistir de continuar.

Aos meus irmãos **Denis, Régis e Vinícius** que sempre me aconselharam diversas vezes.

Aos meus sogros, **Ivanete e João**, por tudo mesmo.

À **Universidade Federal do Paraná** e ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas** pela oportunidade.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** e coorientadora **Profa. Dra. Marilis Dallarmi Miguel** por me manterem na linha e mostrar do que sou capaz.

Ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pelos espectros de ressonância magnética nuclear. Um abraço em especial ao **Prof. Dr. Andersson Barison** pela ajuda na elucidação estrutural e por manter as portas abertas.

Ao Laboratório de Difratometria de Raios X de Monocristal do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná pela elucidação dos compostos e a **Francielli Sousa Santana** pela paciência e receptividade.

Ao **Complexo de Laboratórios Multiusuários (C-LABMU)** da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelas análises de EDS e MEV.

Ao Laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa pelas análises de morfoanatomia e as **Profs Drs. Rosi Zanoni da Silva e Jane Manfron Budel**.

Ao Laboratório de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa pela análise térmica e ao **Prof. Dr. Egon Schnitzler**.

Às colegas de doutorado **Juliane Nadal Dias Swiech, Daniela Gaspardo Folquitto e Vanessa Barbosa Bobek** por serem fundamentais na análise do estudo morfoanatômico.

À **Cristiane Bezerra da Silva** pelo auxílio nas análises enzimáticas.

À **Samanta Golin** pela ajuda nos testes celulares;

Aos **Profs. Drs. Vitor Alberto Keber, Josiane de Fátima Gaspari Dias e Sandra Maria Warumby Zanin** por compartilharem seus conhecimentos.

Aos **amigos** e **colegas** de Doutorado e Mestrado que fiz durante essa jornada. Em especial a **Ellis Marina Szabo** e **Maislian de Oliveira** com quem convivi diretamente.

Ao técnico **Paulo Sérgio Diniz** pela contribuição para o desenvolvimento deste trabalho e pela grande amizade temos.

Ao secretário **Jean Godoi** por resolver todos as questões burocráticas, além da amizade que fizemos.

E a todos aqueles que eventualmente não estão citados, mas que, com certeza, participaram direta ou indiretamente para a realização e término deste trabalho.

É muito melhor arriscar coisas grandiosas, alcançar triunfos e glórias, mesmo expondo-se a derrota, do que formar fila com os pobres de espírito que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem nessa penumbra cinzenta que não conhecem a vitória e nem a derrota.

Theodore Roosevelt



## RESUMO

A espécie *S. werstermanii* Dusén (Asteraceae) encontra-se exclusivamente no Brasil nos estados do Paraná e São Paulo na Floresta Atlântica. Para o estudo da espécie foi obtido o extrato bruto (EB) e as frações hexano (FH), clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica remanescente (FRE). Foi realizado estudo morfoanatômico da folha e caule em lâminas semipermanentes, permanentes e MEV. A identificação de compostos ocorreu por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DRXM e EDS. Análise da concentração de fenóis totais. Estudo farmacológico de gastroproteção e trânsito gastrointestinal. Avaliação enzimática dos fígados de camundongos para proteína total, ALP, ALT, AST, GST, SOD, CAT e peroxidação lipídica. Na alelopatia foram utilizadas sementes de *Allium cepa* e na alelopatografia sementes de *Lactuca sativa*. Para atividade larvicida utilizou-se larvas de *Aedes aegypti*. Na morfoanatomia as folhas são anfiestomáticas e estômatos anomocítico, com tricomas tectores unisseriados e nervura central com grãos de amido. O caule contém ductos secretores no parênquima fundamental e presença de compostos fenólicos. Foi identificado a isoquercetina na FAE por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . E os sais NaCl e KCl por DRXM na obtenção do EB e o  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  por EDS no mesófilo foliar. Para a concentração de fenóis totais a FAE e FRE apresentaram, respectivamente,  $504,71 \pm 3,80$  e  $245,96 \pm 4,30$  mg de EAG/g. Para o estudo farmacológico (10, 30 e 100 mg/kg do EB) a lesão gástrica aguda induzida por etanol foram estatisticamente semelhante ao omeprazol (40 mg/kg) e no ensaio de trânsito gastrointestinal as amostras apresentaram 73%, 96% e 100%, respectivamente, em comparação a metoclopramida. Na análise de toxicidade do fígado dos camundongos observou alterações pela presença de microvesículas de gorduras. Nos ensaios enzimáticos o teor de proteínas totais foram aumentados com 30 e 100 mg/kg de EB. Nos marcadores de toxicidade do fígado a atividade das enzimas ALP e ALT apresentaram alteradas em 100 mg/kg. As enzimas antioxidantes do fígado GST e SOD sofreram alteração em 100 mg/kg. O teor de MDA foi alterado em 30 e 100 mg/kg. Na alelopatia as amostras retardaram o crescimento da radícula de *A. cepa*. A respiração radicular foi aumentada em todas as concentrações da FCL e FAE. O teor de clorofila total foi reduzido para todas as frações, exceto para FHA. Na alelopatografia para o ensaio enzimático de *Lactuca sativa* a mistura de esteroides e a FAE, respectivamente, foram as amostras com maior atividade: SOD (0,44 e 0,42  $\mu\text{g/proteína}$ ), POD (0,56 e 0,52  $\mu\text{mol.tetraguaiacol/min}$ ), CAT (0,12 e 0,10  $\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ). Para o crescimento da radícula e hipocótilo, respectivamente, houve redução de 62% e 56% (mistura de esteroides) e 53% e 48% (FAE). Na morfologia externa das larvas de *Aedes aegypti* observou o redução das brânquias anais, colapsamento de segmentos abdominais e tórax achatado. Na morfologia interna houve perda de tecido muscular, espessamento da membrana peritrófica e enrugamento do tecido muscular. Apesar da toxicidade ser característica do gênero *Senecio*, a espécie em estudo deve ser considerada para estudos futuros para identificar possíveis metabólitos secundários responsáveis pelos resultados obtidos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Alelopatia. Alelopatografia. Farmacologia. Isoquercetina. Toxicidade.

## ABSTRACT

The species *S. werstermanii* Dusén (Asteraceae) is exclusively in Brazil in the states of Paraná and São Paulo in the Atlantic Forest. The crude extract (EB) and hexane (FH), chloroform (FCL), ethyl acetate (FAE) and remaining hydroalcohol (FRE) fractions were obtained for the study of the species. A morphological study of leaf and stem was carried out on semipermeant, permanent slides and SEM. Identification of compounds by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, DRXM and EDS. Analysis of total phenol concentration. Samples were tested against larvae of *Aedes aegypti*. A morphological study of leaf and stem was carried out through semipermeant and permanent slides and SEM. Pharmacological study of gastroprotection and gastrointestinal transit. Enzymatic evaluation of mice livers for total protein, ALP, ALT, AST, GST, SOD, CAT and lipid peroxidation. In the allelopathy seeds of *Allium cepa* and allelopathography of seeds of *Lactuca sativa* were used. For larvicidal activity larvae of *Aedes aegypti* were used. In the morphoanatomy the leaves are amphistomatic and the anomocytic stomata, with tectonic trichomes unisseria and central vein with starch grains. The stem contains secretory ducts in the fundamental parenchyma and presence of phenolic compounds. Isoquercetin was identified in FAE by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR. And the NaCl and KCl salts by DRXM in obtaining EB and  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  by EDS in leaf mesophyll. For the concentration of total phenols the FAE and FRE presented, respectively,  $504.71 \pm 3.80$  and  $245.96 \pm 4.30$  mg of EAG/g. For the pharmacological study (10, 30 and 100 mg/kg of EB) the acute gastric injury induced by ethanol was statistically similar to omeprazole (40 mg/kg) and in the gastrointestinal transit test the samples presented 73%, 96% and 100%, respectively, compared to metoclopramide. In the analysis of liver toxicity of the mice, it was observed changes in the presence of fat microvesicles. In the enzymatic assays the total protein content was increased with 30 and 100 mg/kg EB. In liver toxicity markers the activity of ALP and ALT enzymes were altered at 100 mg/kg. The antioxidant enzymes of the liver GST and SOD were altered at 100 mg/kg and the MDA content was altered by 30 and 100 mg/kg. In the allelopathy the samples delayed the growth of *A. cepa*. Root respiration was increased at all concentrations of FCL and FAE. Total chlorophyll content was reduced for all fractions, except for FHA. In the allelopathography for the enzymatic assay of *Lactuca sativa* the steroid mixture and the FAE, respectively, were the samples with the highest activity: SOD (0.44 and 0.42  $\mu\text{g}/\text{protein}$ ), POD (0.56 and 0.52  $\mu\text{mol.tetraguaiacol}/\text{min}$ ), CAT (0.12 and 0.10  $\mu\text{mol.H}_2\text{O}_2/\text{min}$ ). For the growth of radicle and hypocotyl, respectively, there was a reduction of 62% and 56% (steroid mixture) and 53% and 48% reduction (FAE). In the external morphology of *Aedes aegypti* larvae, it was observed the reduction of anal gills, collapsing of abdominal segments and flattened thorax. In internal morphology there was loss of muscle tissue, peritrophic membrane thickening and wrinkling of muscle tissue. Although the toxicity is characteristic of the genus *Senecio*, the species under study should be considered for future studies to identify possible secondary metabolites responsible for the results obtained.

Keywords: *Aedes aegypti*. Allelopathy. Allelopathography. Pharmacology. Isoquercetin. Toxicity.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – NÚCLEO FENILCROMANOMA PRESENTE NOS FLAVONOIDES ....	46
FIGURA 2 – PRINCIPAIS SUBGRUPOS DE FLAVONOIDES ENCONTRADOS NAS PLANTAS.....	48
FIGURA 3 – BIOSÍNTESE DOS FLAVONOIDES PELA ROTA DOS FENILPROPANOIDES .....	49
FIGURA 4 – 3-HIDROXIFLAVONA .....	50
FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA QUERCETINA .....	50
FIGURA 6 – ISOQUERCETINA .....	51
FIGURA 7 – ROTA METABÓLICA DE FORMAÇÃO DA ISOQUERCETINA.....	53
FIGURA 8: ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE <i>Senecio westermanii</i> .....	55
FIGURA 9 – EXSICATA DE <i>Senecio westermanii</i> Dusén (ASTERACEAE).....	56
FIGURA 10 – MORFOANATOMIA DA ESPÉCIE <i>Senecio westermanii</i> Dusén .....	82
FIGURA 11 – MORFOLOGIA INTERNA E ESTRUTURAS DAS FOLHAS DE <i>Senecio westermanii</i> Dusén .....	84
FIGURA 12 – NERVURA CENTRAL DAS FOLHAS DE <i>Senecio westermanii</i> Dusén.....	86
FIGURA 13 – CAULE EM CORTE TRANSVERSAL DE <i>Senecio westermanii</i> Dusén.....	88
FIGURA 14 – ESPECTRO DE SOMA DE MAPAS DO $\text{CaC}_2\text{O}_4$ DE <i>Senecio</i> <i>westermanii</i> .....	89
FIGURA 15 – SAL DE $\text{CaC}_2\text{O}_4$ NA REGIÃO PARENQUIMÁTICA DO CAULE DE <i>Senecio westermanii</i> .....	90
FIGURA 16 – RESULTADO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA RAIZ SECA DE <i>Senecio westermanii</i> , REPRESENTANDO A PERDA DE MASSA EM TRÊS FASES DISTINTAS .....	91
FIGURA 17 – RESULTADO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO CAULE SECO DE <i>Senecio westermanii</i> , REPRESENTANDO A PERDA DE MASSA EM TRÊS FASES DISTINTAS .....	91
FIGURA 18 – RESULTADO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA FOLHA SECA DE <i>Senecio westermanii</i> , REPRESENTANDO A PERDA DE MASSA EM TRÊS FASES DISTINTAS .....	92

FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE PERDA DE MASSA NA ATMOSFERA DE N <sub>2</sub> E AR SINTÉTICO DAS RAÍZES SECAS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	96
FIGURA 20 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE PERDA DE MASSA NA ATMOSFERA DE N <sub>2</sub> E AR SINTÉTICO DOS CAULES SECAS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	96
FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE PERDA DE MASSA NA ATMOSFERA DE N <sub>2</sub> E AR SINTÉTICO DAS FOLHAS SECAS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	97
FIGURA 22 – ISOQUERCETINA IDENTIFICADA EM <i>Senecio westermanii</i> .....	98
FIGURA 23 – ISOQUERCETINA IDENTIFICADA EM <i>Senecio westermanii</i> .....	98
FIGURA 24 – ESPECTRO DE <sup>1</sup> H PARA IDENTIFICAÇÃO DA ISOQUERCETINA EM MeOH DEUTERADO .....	100
FIGURA 25 – EXPANSÕES DOS SINAIS DE <sup>1</sup> H PARA OS PRÓTONS DOS ANÉIS A E B DA ISOQUERCETINA .....	101
FIGURA 26 – EXPANSÕES DOS SINAIS DE <sup>1</sup> H DA GLUCOSE DA ISOQUERCETINA.....	102
FIGURA 27 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA A ISOQUERCETINA.....	103
FIGURA 28 – ESPECTRO DE SOMA DE MAPAS DO NaCl ISOLADO DE <i>Senecio westermanii</i> .....	104
FIGURA 29 – MAPA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DO SAL NaCl .....	105
FIGURA 30 – CRISTAIS DE NaCl OBTIDOS POR MEV .....	106
FIGURA 31 – ESPECTRO DE SOMA DE MAPAS DO KCl ISOLADO DE <i>Senecio westermanii</i> .....	107
FIGURA 32 – MAPA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DO SAL KCl.....	107
FIGURA 33 – CRISTAIS DE KCl OBTIDOS POR MEV .....	108
FIGURA 34 – EFEITO NO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DOS CAMUNDONGOS APLICANDO AMOSTRAS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	112

FIGURA 35 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Senecio westermanii</i> (v.o.) SOBRE LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL P.A. EM RATOS WISTAR.....	113
FIGURA 36 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE <i>S. westermanii</i> (i.p.) SOBRE LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL PA EM RATOS WISTAR. ....	114
FIGURA 37 – ESFREGAÇO DE FÍGADO, DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS OCASIONADAS PELAS CONCENTRAÇÕES DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE <i>Senecio westermanii</i> .....	116
FIGURA 38 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	117
FIGURA 39 – ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	119
FIGURA 40 – ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	120
FIGURA 41 – ATIVIDADE DA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	121
FIGURA 42 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i>	122
FIGURA 43 – TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	123
FIGURA 44 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS	

SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	124
FIGURA 45 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i>	125
FIGURA 46 – ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	126
FIGURA 47 – TEOR DE MALONDIALDEÍDO (MDA) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS, SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE <i>Senecio westermanii</i> , COMO INDICATIVO DO AUMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA	127
FIGURA 48 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE <i>Allium cepa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> .....	142
FIGURA 49 – COMPRIMENTO DA RADÍCULA DAS SEMENTES DE <i>Allium cepa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Senecio</i> <i>westermanii</i> .....	145
FIGURA 50 – COMPRIMENTO DO COLEÓPTILO DAS SEMENTES DE <i>Allium</i> <i>cepa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> .....	146
FIGURA 51 – COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DO ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DAS SEMENTES <i>Allium cepa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Senecio</i> <i>westermanii</i> .....	148
FIGURA 52 – COMPARAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE TOTAL DAS PLÂNTULAS DAS SEMENTES <i>Allium cepa</i> TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> .....	150
FIGURA 53 – ASPECTO DAS PLÂNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i> TRATADAS COM NBT, DEMONSTRANDO AS REGIÕES MAIS ESCURAS COM ACÚMULO DE SOD.....	152
FIGURA 54 – ATIVIDADE DA SOD EM TRICOMAS GLANDULARES DE <i>Lactuca</i> <i>sativa</i> .....	153

FIGURA 55 – COMPARAÇÃO ENTRE O TAMANHO DAS PLÂNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i> NO ENSAIO DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO .	158
FIGURA 56 – OXIDAÇÃO DA RADÍCULA DAS PLÂNTULAS DE <i>Lactuca sativa</i> ..	159
FIGURA 57 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Senecio westermanii</i> NA MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	162
FIGURA 58 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Senecio westermanii</i> NA MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	163
FIGURA 59 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Senecio westermanii</i> NA MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	165
FIGURA 60 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Senecio westermanii</i> NA MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> .....	166



## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO DA ESPÉCIE <i>Senecio westermanii</i> Dusén (ASTERACEAE).....	39
TABELA 2 – REPRESENTAÇÃO ELEMENTAR DO SAL $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .....	89
TABELA 3 – FAIXA DE TEMPERATURA NA PERDA DE ÁGUA PELO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO DO CAULE, FOLHA E RAÍZ DE <i>Senecio westermanii</i> .....	92
TABELA 4 – COMPARAÇÃO DA PERDA DE ÁGUA PELOS MÉTODOS GRAVIMÉTRICO E TERMOGRAVIMÉTRICO PARA O CAULE, FOLHA E RAÍZ DE <i>Senecio westermanii</i> .....	93
TABELA 5 – ANÁLISE COMPARATIVA DO TEOR DE CINZAS DETERMINADO ATRAVÉS DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO CONVENCIONAL E DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA CAULES, FOLHAS E RAÍZES DE <i>Senecio westermanii</i> .....	94
TABELA 6 – PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE <i>Senecio westermanii</i> NA ATMOSFERA DE NITROGÊNIO.....	95
TABELA 7 – PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE <i>Senecio westermanii</i> NA ATMOSFERA DE AR SINTÉTICO .....	95
TABELA 8 – DESLOCAMENTO QUÍMICO NO ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ DA ISOQUERCETINA.....	99
TABELA 9 – DADOS DA CÉLULA UNITÁRIA DA ANÁLISE POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X DE MONOCRISTAL DO SAL PÓ (NaCl).....	104
TABELA 10 – REPRESENTAÇÃO ELEMENTAR DO SAL NaCl.....	105
TABELA 11 – DADOS DA CÉLULA UNITÁRIA DA ANÁLISE POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X DE MONOCRISTAL DO SAL GRANULADO (KCl) .....	106
TABELA 12 – REPRESENTAÇÃO ELEMENTAR DO SAL KCl.....	108



TABELA 13 – FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE <i>Senecio westermanii</i> .....	110
TABELA 14 – CITOXICIDADE EM LINHAGEM CELULAR A549-Nuclight Red E DU145-Nuclight Red .....	130
TABELA 15 – TESTE DO NF- $\kappa$ B E STAT3 UTILIZANDO AS SUAS RESPECTIVAS LINHAGENS CELULARES, NIH3T3-kBFLuc E HELA-STAT3Luc, QUANDO SUBMETIDAS ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF .....	132
TABELA 16 – ATIVAÇÃO DO Nrf2 UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR HaCaT-ARE-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF .....	134
TABELA 17 – ATIVAÇÃO DO HIF-1 $\alpha$ UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR NIH3T3-Epo-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF .....	136
TABELA 18 – ATIVAÇÃO DO TRG5 UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR CHO-TGR5-CRE-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF .....	138
TABELA 19 – ATIVAÇÃO DOS PPAR $\alpha$ E PPAR $\gamma$ UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR CHO- HELA-GAL4-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF .....	139
TABELA 20 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI.....	141
TABELA 21 – ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E COLEÓPTILO DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI.....	144
TABELA 22 – ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI.....	147

TABELA 23 – ENSAIO DE FOTOSSÍNTESE DAS PLÂNTULAS DE <i>Allium cepa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI.....	149
TABELA 24 – ENSAIO ENZIMÁTICO DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ISOLADO DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO DE ALELOPATOLOGRAFIA POR MEIO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM CAMADA DELGADA.....	155
TABELA 25 – ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E RESPIRAÇÃO CELULAR DE SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ISOLADO DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO DE ALELOPATOLOGRAFIA POR MEIO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM CAMADA DELGADA.....	156
TABELA 26 – ENSAIO DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DAS SEMENTES DE <i>Lactuca sativa</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ISOLADO DE <i>Senecio westermanii</i> EM ENSAIO DE ALELOPATOLOGRAFIA POR MEIO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM CAMADA DELGADA.....	157
TABELA 27 – ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA SOBRE AS LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i> SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Senecio westermanii</i> .....	160

## LISTA DE SIGLAS

AA	–	ácido ascórbico
ALP	–	fosfatase alcalina
ALT	–	alanina aminotransferase
AST	–	aspartato aminotransferase
BHT	–	butilhidróxidotolueno
CCD	–	cromatografia em camada delgada
CG-EM	–	cromatografia gasosa/espectrometria de massa
CLAE	–	cromatografia líquida de alta eficiência
COX	–	ciclooxigenase
DAD	–	detector de arranjo de diodo
DL <sub>50</sub>	–	dose letal em 50%
DMSO	–	dimetil sulfóxido
DRXM	–	difratometria de raios x de monocristal
EAG	–	equivalente ácido gálico
EB	–	extrato bruto
EC <sub>50</sub>	–	concentração induz 50% efeito máximo
EDS	–	espectroscopia de raios X por dispersão em energia
EQ	–	equivalente quercetina
FAE	–	fração acetate de etila
FCL	–	fração clorifórmio
FH	–	fração hexano
FRE	–	fração remanescente
GSH	–	glutathiona reduzida
GST	–	glutathiona S-transferase
HIF-1 $\alpha$	–	fator induzível por hipóxia 1- $\alpha$
IC <sub>50</sub>	–	concentração inibitória de 50%
IUPAC	–	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LOX	–	lipoxigenase
MDA	–	malonaldeído
MEV	–	microscopia eletrônica de varredura
NBT	–	azul <i>p</i> -nitrotetrazólio

NF- $\kappa$ B	–	fator nuclear kappa B
Nrf2	–	fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2
PBS	–	salina tamponada com fosfato
PMA	–	forbol-12-meristato-13-acetato
POD	–	peroxidase
PPARs	–	receptores ativados por proliferador de peroxissoma
PPAR $\alpha$	–	receptor ativado por proliferador de peroxissoma $\alpha$
PPAR $\gamma$	–	receptor ativado por proliferador de peroxissoma $\gamma$
SDS	–	dodecil sulfato de sódio
SOD	–	superóxido dismutase
STAT3	–	transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3
RMN	–	ressonância magnética nuclear
TG	–	termogravimetria
TGA	–	análise termogravimétrica
TGR5	–	receptor acoplado a proteína G
TMS	–	tetrametilsilano
TTC	–	cloreto de trifenil tetrazolium
UV	–	ultra violeta

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	–	por cento
>	–	maior que
<	–	menor que
µg	–	micrograma
µg/mL	–	micrograma por mililitro
µL	–	microlitro
°C	–	graus Celsius
cm	–	centímetro
g	–	grama
g/L	–	grama por Litro
HCl	–	ácido clorídrico
IC <sub>50</sub>	–	concentração inibitória média
mg	–	miligramas
mg/mL	–	miligrama por mililitro
MHz	–	megahertz
mL	–	mililitro
mm	–	milímetros
M	–	molar
N	–	normal
nm	–	nanômetro
pH	–	potencial hidrogeniônico
W	–	watt
v/v	–	volume/volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	29
2.1 OBJETIVO GERAL.....	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	31
3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE .....	31
3.2 GÊNERO <i>Senecio</i> .....	34
3.3 ESPÉCIE <i>Senecio westermanii</i> DUSÉN .....	38
3.4 TERMOGRAVIMETRIA.....	40
3.5 LINHAGEM CELULAR .....	41
3.5.1 Citotoxicidade .....	42
3.5.2 Inflamação .....	43
3.5.3 Metabolismo .....	44
3.6 ATIVIDADE LARVICIDA EM <i>Aedes aegypti</i> (Culicidae).....	45
3.7 FLAVONOIDES.....	46
3.7.1 Quercetina.....	50
3.7.2 Isoquercetina.....	52
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	55
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	56
4.1.1 Identificação da espécie vegetal .....	56
4.1.2 Material botânico para as atividades biológicas .....	57
4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	57
4.2.1 Lâminas semipermanentes e permanentes.....	58
4.2.2 Testes microquímicos.....	58
4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	59
4.3 ANÁLISE TÉRMICA .....	59
4.4 PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO.....	60
4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS .....	60
4.5.1 Cromatografia líquida em coluna de sílica da fração acetato de etila.....	60
4.5.2 Cromatografia em coluna de Sephadex .....	61
4.5.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	61

4.5.4 Identificação dos constituintes químicos por RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C .....	61
4.5.5 Análise por difratometria de raios X de monocristal (DRXM) .....	62
4.5.6 Substância AE 110-117 (9-11) .....	62
4.6 FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS .....	63
4.6.1 Fenóis totais .....	63
4.6.2 Flavonoides totais.....	63
4.7 ANÁLISES FARMACOLÓGICAS .....	64
4.7.1 Determinação do trânsito gastrointestinal .....	64
4.7.2 Lesão gástrica aguda induzida por etanol .....	64
4.8 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS .....	65
4.8.1 Toxicidade aguda .....	65
4.8.2 Toxicidade do fígado .....	65
4.8.3 Proteínas totais (método de Lowry).....	65
4.8.4 Determinação enzimática de marcadores de toxicidade no fígado .....	66
4.8.4.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP) .....	66
4.8.4.2 Atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST).....	67
4.8.5 Ensaio antioxidante não enzimático em amostras de fígado .....	67
4.8.5.1 Níveis hepáticos de glutathione reduzida (GSH).....	67
4.8.5.2 Teor de ácido ascórbico (AA) .....	68
4.8.6 Atividade das enzimas antioxidantes do fígado.....	68
4.8.6.1 Atividade hepática da glutathione S-transferase (GST).....	68
4.8.6.2 Atividade hepática da superóxido dismutase (SOD) .....	69
4.8.6.3 Atividade hepática da catalase (CAT) .....	70
4.8.7 Avaliação da peroxidação lipídica (PL).....	70
4.9 ANÁLISE CELULAR.....	71
4.9.1 Partição do extrato bruto cetônico .....	71
4.9.2 Citotoxicidade em linhagem de células .....	72
4.9.3 Inflamação .....	72
4.9.3.1 Atividade do NF-κB.....	72
4.9.3.2 Atividade STAT3.....	72
4.9.3.3 Atividade do Nrf2 .....	73
4.9.3.4 Atividade do HIF-1α.....	73

4.9.4 Metabolismo .....	73
4.9.4.1 Atividade de TGR5 .....	74
4.9.4.2 Atividade de PPARs .....	74
4.10 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	74
4.10.1 Germinação .....	75
4.10.2 Crescimento .....	75
4.10.3 Respiração radicular.....	75
4.10.4 Fotossíntese .....	76
4.11 ALELOPATOLOGRAFIA.....	76
4.11.1 Preparo da placa cromatográfica para alelopatografia .....	77
4.11.2 Ensaio alelopatográfico .....	77
4.11.3 Avaliação histoquímica do ânion superóxido.....	78
4.11.4 Germinação e crescimento.....	78
4.11.5 Respiração radicular.....	78
4.11.6 Atividade da catalase .....	78
4.11.7 Atividade da peroxidase (POD) .....	79
4.11.8 Atividade da superóxido dismutase (SOD).....	79
4.11.9 Peroxidação lipídica .....	79
4.12 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> .....	80
4.12.1 Avaliação da mortalidade .....	80
4.12.2 Avaliação da morfologia interna e externa das larvas .....	81
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>82</b>
5.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	82
5.1.1 Estudo da lâmina da folha de <i>Senecio westermanii</i> .....	83
5.1.2 Nervura central da folha de <i>Senecio westermanii</i> .....	86
5.1.3 Caule de <i>Senecio westermanii</i> .....	87
5.1.3.1 Sal $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .....	88
5.2 ANÁLISE TÉRMICA .....	91
5.2.1 Análise termogravimétrica (TGA) e gravimétrica .....	91
5.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS .....	97
5.3.1 Composto AE 110-117 (9-11).....	97
5.3.2 Identificação dos sais NaCl e KCl.....	104
5.3.2.1 Sal NaCl .....	104



5.3.2.2 Sal KCl .....	106
5.4 FENÓIS E FLANVOIDES TOTAIS .....	109
5.5 ANÁLISES FARMACOLÓGICAS .....	111
5.5.1 Determinação do trânsito gastrintestinal .....	111
5.5.2 Lesão gástrica aguda induzida por etanol .....	112
5.6 ANÁLISE DA TOXICIDADE .....	115
5.6.1 Toxicidade aguda .....	115
5.6.2 Toxicidade do fígado .....	116
5.6.3 Proteínas totais.....	117
5.6.4 Determinação enzimática de marcadores de toxicidade no fígado .....	118
5.6.4.1 Atividade da ALP .....	118
5.6.4.2 Atividade da ALT e AST .....	119
5.6.5 Ensaio antioxidantes não enzimáticos em amostras de fígado .....	121
5.6.5.1 GSH e ácido ascórbico.....	121
5.6.6 Atividade das enzimas antioxidantes do fígado.....	124
5.6.6.1 Atividade da GST, SOD e CAT.....	124
5.6.6.2 Avaliação da peroxidação lipídica .....	127
5.7 ANÁLISE EM LINHAGEM CELULAR.....	130
5.7.1 Citotoxicidade em linhagem de células .....	130
5.7.2 Inflamação .....	132
5.7.2.1 Atividade do NF- $\kappa$ B, STAT3, Nrf2 e HIF-1 $\alpha$ .....	132
5.7.3 Metabolismo .....	138
5.7.3.1 Atividade de TGR5 e PPARs.....	138
5.8 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA .....	140
5.8.1 Germinação.....	140
5.8.2 Crescimento .....	143
5.8.3 Respiração da raízes.....	146
5.8.4 Fotossíntese.....	148
5.9 ALELOPATOLOGRAFIA.....	151
5.9.1 Avaliação histoquímica do ânion superóxido.....	151
5.9.2 Atividade enzimática da SOD, POD e CAT .....	154
5.9.3 Peroxidação lipídica e respiração celular .....	155
5.9.4 Germinação e crescimento radicular .....	156

5.10 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE <i>Aedes aegypti</i> .....	159
5.10.1 Toxicidade aguda .....	159
5.10.2 Avaliação da morfologia externa e interna da larvas .....	161
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>167</b>
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>169</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>171</b>
<b>ANEXO I – ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO .....</b>	<b>198</b>
<b>ANEXO II – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL.....</b>	<b>199</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil o Ministério da Saúde regulamentou e aprovou o Decreto 5813/2006 que diz respeito sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, além disso indicando quais as partes das plantas medicinais podem ser utilizadas como opção na terapêutica (BRASIL, 2006). Esse decreto vigora pelo fato das plantas medicinais serem uma alternativa para o tratamento de doenças, ocupando um lugar de destaque na medicina popular brasileira (MATTOS et al., 2015).

Além disso, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente, 80% da população mundial utiliza-se da medicina popular para compensar a ausência de assistência médica privada. Porém o uso incorreto das plantas medicinais podem acarretar em agravos à saúde de quem a utiliza, que pode ocorrer reações alérgicas e efeitos tóxicos lesionando diversos órgãos e levar a óbito (MATTOS et al., 2015).

As plantas são um recurso para o tratamento de doenças por produzirem diversas substâncias que são relevantes na resolução de uma variedade de doenças. Porém a utilização de plantas deve ser restrita as espécies conhecidas e identificadas corretamente, para evitar possíveis intoxicações (CAMPOS et al., 2016).

De acordo com Araújo (2014) as plantas produzem três grandes grupos de metabólitos secundários utilizados na defesa contra o meio abiótico e biótico: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides. Para Nascimento (2016) o precursor dos terpenos foi caracterizado como ácido mevalônico, proveniente da união de unidades de acetil coenzima A. Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico e das pentoses fosfato (ALMEIDA, 2017). Enquanto os alcaloides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano e tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina e lisina) (FERRO; MOURA; GERON, 2016). Para Pereira e Cardoso (2012) a atividade farmacológica de uma espécie específica geralmente está relacionada à presença dessas três grandes classes de metabólitos.

O gênero *Senecio* destaca-se por produzir importantes compostos secundários, sendo os grupos químicos mais frequentes os alcaloides pirrolizidínicos

e os sesquiterpenos do tipo furanoeremofilanos. Diversos autores relatam a identificação desses compostos em diversas espécies do gênero, pode-se citar o *S. nemorensis*, *S. flavus*, *S. auricula*, *S. linifolius*, *S. subumbellatus*, *S. personii*, *S. scandens*, *S. lasiocephalus*, *S. usgorensis*, *S. chiquianensis*; *S. laricifolius* e *S. brasiliensis* (TORRES et al., 1989; JAKUPOVIC et al., 1991; ROEDER, BOURAUUEL; KERSTEN, 1992; TORRES et al., 1998; TORRES et al., 1999; TOMA et al., 2004; ELIAS et al., 2011; VÁSQUEZ et al., 2011; SHI et al., 2013; WANG; HUANG; CHEN, 2013).

Muitas dessas espécies são estudadas quanto à sua farmacologia, ensaios de nocicepção, ação anti-inflamatória, proteção gástrica, motilidade e fertilidade, além dos estudos toxicológicos (TOMA et al., 2004; HARIPRASATH; JEGADEESH; RAAMAN, 2012; WANG; HUANG; CHEN, 2013; LIENOU et al., 2015). Porém de acordo a ANVISA através da RDC 26/2014 que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, a resolução ainda mostra os gêneros de plantas com metabólitos que podem prejudicar a saúde e que são restringidos ou proibidos no uso como produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014). Dentro dos diversos gêneros listados com espécies proibidas para o uso comercial encontra-se o gênero *Senecio*, pelo fato da presença dos alcaloides pirrolizidínicos, que são metabólitos tóxicos devido a sua biotransformação no fígado.

Dessa forma o presente trabalho, que teve início com a dissertação de mestrado, continua e aprofunda os testes realizados, pois através dos estudos biológicos e fitoquímicos realizados mostram que *S. westermanii* apresentou atividade antioxidante e alelopática, ausência de toxicidade preliminar e a presença dos compostos secundários campesterol,  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol. Apesar da espécie pertencer a um gênero tóxico, que vai contra a RDC 26/2014, há importantes propriedades que devem ser exploradas devido a deficiência de estudos, com isso objetivou-se extrapolar os estudos *in vitro* para os ensaios farmacológicos *in vivo*, além de aprofundar testes realizados.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo morfoanatômico, fitoquímico, farmacológico, citotóxico, alelopático e larvicida das partes aéreas da espécie *Senecio westermanii* (Asteraceae).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar o estudo das lâminas semipermanentes e permanentes e os testes microquímicos da folha e caule;
- Avaliar a perda de massa nas atmosferas de ar sintético e nitrogênio da raiz, caule e folha;
- Identificar os constituintes químicos presentes na espécie através de espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DRXM e EDS e dosear os polifenóis e flavonoides totais;
- Verificar a ação do extrato bruto etanólico contra a ulceração gástrica em ratos e o trânsito gastrintestinal em camundongos;
- Analisar a toxicidade do extrato bruto etanólico e dosear proteínas totais em células do fígado de camundongos;
- Avaliar as enzimas ALP, ALT e AST no fígado de camundongos;
- Avaliar os antioxidantes não enzimáticos GSH e ácido ascórbico no fígado de camundongos;
- Avaliar as enzimas antioxidantes GST, SOD e CAT e a peroxidação lipídica em fígado de camundongos;
- Testar a citotoxicidade do extrato bruto nas linhagens celulares A549-Nuclight Red e o DU145-Nuclight Red;
- Avaliar alvos inflamatórios específicos como NF-kB, STAT3, Nrf2 e HIF-1 $\alpha$ ;
- Analisar o metabolismo celular nos alvos TGR5 e PPARs;
- Analisar a atividade alelopática com os ensaios de germinação, crescimento, respiração radicular e fotossíntese do extrato bruto e frações de *S. westermanii* sobre as sementes de *Allium cepa*;

- Avaliar o teor das enzimas CAT, POD e SOD e a peroxidação lipídica, assim como o germinação, crescimento e respiração radicular das plântulas de *Lactuca sativa* quando testas com a mistura dos esteróides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol e o extrato bruto e frações;
- Analisar a toxicidade aguda e a morfologia interna e externa das larvas de *Aedes aegypti* quando submetidas ao extrato bruto etnólico e frações.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 FAMÍLIA ASTERACEAE

Na família Asteraceae as plantas possuem aspectos extremamente variados, incluindo principalmente ervas, arbustos, trepadeiras, terrícolas, rupícolas, epífitas e raramente árvores (HEYWOOD, 1993). De acordo com Kubitzki (2007) a família possui aproximadamente 23000 espécies que estão distribuídas em 1600 gêneros. A família possui ampla distribuição pelo mundo, devido à capacidade de adaptação a diferentes ambientes, considerado um dos grupos que mais obtiveram sucesso entre as plantas com flores, comprovada pela extensa diversidade de *habitat* e forma de vida. Esse sucesso está atrelado a evolução química, permitindo o desenvolvimento de grupos químicos repelentes (BERETTA et al., 2008).

Para Verdi, Brighente e Pizzolatti (2005) as plantas pertencentes a família Asteraceae são constantemente estudadas no que diz respeito à sua composição química, além disso o estudo das atividades biológicas estão presentes na mesma proporção. Czelusniak et al. (2012) comentam devido a imensa quantidade de constituintes químicos presentes nessa família, a pesquisa de novos metabólitos sobrepõe-se à pesquisa referente à morfologia, devido à importância dos metabólitos secundários produzidos pelas espécies. Os compostos fenólicos e os terpenoides são as classes de moléculas mais investigadas por apresentarem potencial farmacológico (ALMEIDA, 2012).

O gênero *Viguiera* responsável por produzir lactulonas sesquiterpênicas e diterpenos, do tipo kaurane e pimarane, que possuem ação anti-inflamatória e antiespasmódica. Além disso, os ácidos kaurenóicos e pimaradienóicos, pertencente as espécies *V. robusta* e *V. arenaria*, respectivamente, foram avaliados na contração muscular lisa e detectou-se que os diterpenos foram capazes de inibir a contractilidade vascular principalmente por bloqueio extracelular do influxo de  $Ca^{2+}$  (AMBROSIO et al., 2006).

O gênero *Lychnophora* possuem espécies com comprovada ação anti-inflamatória e antinociceptiva. De acordo com Guzzo et al. (2008), em estudos com ratos, a *L. ericoides* obteve ação antinociceptiva e *L. pinaster* e *L. trichocarpha* além da mesma ação teve atividade anti-inflamatória. Em estudo realizado por Capelari-

Oliveira et al. (2011), a *L. passerina* foi capaz de inibir a produção de citocinas, TNF- $\alpha$  e NO e aumentou a produção de IL-10.

A *Baccharis genistelloides*, conhecida popularmente por carqueja, utilizada no tratamento hepático, digestivo, inflamações urinárias, hipercolesterolemia e reumatismo. Algumas ações foram comprovadas por diversos modelos *in vivo*, assim como o efeito antiartrítico induzida por colágeno, sendo a atividade atribuída pela presença de flavonoides presentes no extrato. Também foi detectada ação citoprotetora pelo ensaio de úlcera induzida por etanol. Além desse efeito, detectou-se a diminuição da produção de ácido gástrico (RUIZ et al., 2008).

Para Hernández et al. (2009) a espécie *Heliopsis longipes* é utilizada na América Central e do Sul devido à sua ação analgésica, anti-inflamatória e anti-ulcerativa e no México para dor de dente. Além disso, o extrato dessa planta foi capaz de inibir contorções induzidas por ácido acético em murinos, diminuindo a dor desses animais. E em ratos estudaram o efeito anti-inflamatório dessa espécie induzindo edemas em orelhas de rato, em que atribuíram o efeito desejado pela substância afinina (isobutilamida) que inibiu a ação da COX (Ciclooxygenase) e enzimas LOX (Lipo-oxigenase), envolvidas na inflamação.

*Bidens pilosa* conhecida pelos efeitos hepatoprotetor, antiinflamatório e diurético. Porém a espécie foi testada em ratas com câncer de mama induzido, em que foram utilizados flavonoides isolados por cromatografia em camada delgada. Observou-se que o adenocarcinoma mamário começou a reduzir com o tratamento. Dessa forma, as amostras da planta foram capazes de reduzir a progressão do câncer de mama em ratas, isso pode ser explicado porque os flavonoides são capazes de induzir apoptose por ativação da caspase 8 e Bax, que são capazes de inibir a expressão de Bcl-2 e permitem a liberação do citocromo C (ARROYO et al., 2010).

Em estudo com a espécie *Gochnatia polymorpha* ssp. Floccosa, Piornedo et al. (2011) comentam que essa planta é popularmente conhecida no Brasil como cambará e é utilizada em inflamações do trato respiratório e reumatismo. O extrato etanólico, frações e a substância isolada denominada 11,13-dihidrozaluzanina C foram avaliadas e inibiram significativamente o edema de patas induzidos por carragena e inibiram a migração de leucócitos e o extravasamento proteico no modelo bolsão inflamatório. Os autores ainda comentam que o provável efeito



antiinflamatório provocado pelo extrato e frações é provocado, em partes, pela substância isolada.

*Xanthium cavanillesii* Schouw é uma espécie originária da América do Sul e conhecida como carrapicho, considerada uma planta infestante, porém com diversas aplicações farmacológicas, principalmente, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica. Amostras da espécie foram capazes de inibir os mediadores NFκB/DNA vinculativo, MAPK p38, TNFα e a ação da elastase serinoprotease, comprovando o efeito anti-inflamatório e cicatrização, respectivamente. Avaliou-se o efeito antiulcerativo induzido por etanol em ratos, sendo a xantina o composto com a maior proteção. Corroborando com o estudo anterior, analisou-se a ação da xantina em evitar a degranulação de mastócitos induzida pelo composto sintético 48/80 (LANA et al., 2012).

A espécie *Acmella oleracea*, conhecida como jambu, presente no estado do Pará – Brasil, possui as alquilamidas como os compostos mais estudados, devido a sua atividade anestésica e anti-inflamatória. Além disso, foram reportados estudos demonstrando ação analgésica na dor de dente, antipirética e diurética. Ainda o polissacarídeo aminogalacturonano inibiu significativamente as úlceras gástricas induzidas por etanol em ratos (NASCIMENTO et al., 2013). Favoreto e Gilbert (2010) ainda comentam que o extrato aquoso introduzido via oral em ratos, suprimiu o edema de pata induzida por carragenina, além de provocar um efeito analgésico nos modelos de abano de cauda e de contorsão induzidos por ácido acético. Os autores ainda sugerem que o efeito antinociceptivo é causado por um mecanismo que inibi a produção de prostaglandina e o efeito antiinflamatório pela presença do espilantol, considerada a molécula mais ativa. A atividade diurética em ratos foi próxima ao controle furosemida. Além desses ensaios, foi comprovada a atividade afrodisíaca de creme de jambu, utilizando modelo de estudo casais (mulheres e homens), que foi observado o aumento do desejo, excitação e satisfação sexual (FAVORETO; GILBERT, 2010).

As partes aéreas de *Artemisia copa* Phil é comumente utilizada como antitussígena, digestiva e hipertensão. Assim o extrato aquoso foi submetido ao estudo em ratos para detectar o efeito vasorelaxante e hipotensivo, pois foi capaz de relaxar os anéis da aorta, através da inibição do influxo de  $Ca^{2+}$  via canais membranosos de cálcio e reservas intracelulares. Essas ações foram detectadas,

provavelmente, pela presença da luteolina, ácido *p*-cumarínico e crisoeriol presentes na planta. Além da *A. copa* a *A. genus* e *A. ludoviciana* que também foram capazes de obter efeitos similares para os mesmos ensaios (GORZALCZANY; MOSCATELLI; FERRARO, 2013).

A espécie *Bellis perennis* L. conhecida como margarida, utilizada pela sua capacidade anti-hemorrágica, expectorante, anti-reumática e cicatrizante. Em estudo realizado com esta planta em mulheres grávidas, observou-se que houve redução na perda sanguínea durante cirurgias cesarianas e partos normais. Além disso, foi observada a redução da atividade da enzima lipase pancreática, devido à ação das saponinas triterpênicas isoladas (MARQUES et al., 2014).

Observa-se que a família Asteraceae possui muitos gêneros que possuem espécies de interesse farmacológico, devido a quantidade de compostos gerados por elas. Isso pode ser explicado pelos mais variados ambientes que esta família se encontra presente, dessa forma gerando substâncias secundárias para a sobrevivência das espécies no respectivo hábitat.

### 3.2 GÊNERO *Senecio*

De acordo com Matzenbacher (2009) o gênero *Senecio* encontra-se em todo o mundo, exceto nas regiões polares e amazônica, sendo considerado o maior gênero da tribo *Senecioneae*. A América do Sul é a região que mais abriga este gênero com cerca de 500 espécies, sendo 67 espécies presentes no Brasil, aproximadamente.

O gênero possui como um dos principais constituintes os alcaloides pirrolizidínicos, conhecidos por causarem intoxicações fatais em animais herbívoros de grande porte e seres humanos que consumiram alguma espécie do gênero contendo essa classe de composto secundário. Ainda, esses alcaloides são considerados os marcadores quimiossistemáticos para a tribo *Senecioneae*, pois a maioria das espécies possuem os alcaloides com estrutura macrocíclica diéster do tipo senecionina e/ou são mono e diésteres do tipo triangularina (SILVA; BOLZAN; HEINZMANN, 2006).

De acordo com Prakash et al. (1999) a intoxicação dos alcaloides pirrolizidínicos ocorre quando há sua biotransformação no fígado em uma estrutura

pirrólica de alta reatividade (*d*-hidropirrolizidinas), além da formação secundária do álcool pirrol. Santos et al. (2008) comentam que a intoxicação desses metabólitos ocorrem por serem alquilantes e ligando-se ao DNA. Dessa forma, quando ligados ao componente genético, os pirróis causam a megalocitose, necrose e a redução no número de hepatócitos. Este processo ocorre porque a toxina inibe a mitose nos hepatócitos, substituindo o tecido local por tecido conjuntivo fibroso, ocasionando a disfunção hepática com consequente morte.

Muitos estudos farmacológicos e toxicológicos são realizados com espécies do gênero *Senecio* com intuito de comprovar seus efeitos. Green, Segall e Byard (1981) isolaram o alcaloide senecionina de *Senecio vulgaris* e o analisaram em culturas primárias de hepatócitos de ratos para detectar a citotoxicidade e genotoxicidade. De acordo com o estudo, a senecionina provou-se uma potente citotoxina devido à saída da lactato desidrogenase para o meio inoculado e a perda de célula para o substrato de colágeno com doses variando de 1,6 a 128 nmol/10<sup>6</sup> células. Além disso, o alcaloide foi genotóxico pela evidência da ligação covalente e a estimulação de reparo do DNA com a menor dose aplicada, 16 nmol/10<sup>6</sup> células. Lüthy, Heim e Schlatter (1983) com a mesma espécie de planta prepararam biossinteticamente os alcaloides retronicina, senecionina e senecifilina marcados com <sup>3</sup>H a partir da putrescina e isoleucina de *S. vulgaris*. De acordo com os autores, após 3 h da administração das amostras em ratas lactantes observaram a presença de 0,08% de derivados de retronicina radioativa no leite, além de 0,02% de alcaloides inalterados. Ainda os pesquisadores, após 6 h de administração, detectaram elevados níveis dos alcaloides no pulmão e fígado.

Hendricks et al. (1980) com a finalidade de investigar a toxicidade de alcaloides de *S. jacobaea* em trutas arco-íris, inseriram na dieta desses animais, por um período de 12 meses, concentrações de 20 e 100 ppm da mistura dos alcaloides (jacolina (1%), senecionina (2,5%); senecifilina (2,5%), jaczina (3%) e jacobina (91%)). Os autores concluem que ambas as concentrações causaram graves lesões hepáticas, causando doença veno-oclusiva no centrolobular e veias hepáticas, porém não foram encontradas alterações neoplásicas. Ainda, Miranda, Cheeke e Buhler (1980) alimentando ratos com 5% de *S. jacobaea*, durante uma a quatro semanas, e outro grupo com uma mistura de 0,5% de alcaloides, por uma semana. Observou-se para o primeiro grupo aumento de 4 a 5 vezes o aumento da epóxi-

hidrase microsomal (EHM) hepática, aumento significativo da glutathione S-transferase (GST) citosólica e redução da enzima hepática microsomal hidrocarboneto aromático hidroxilase (HAH). E para o segundo grupo houve o aumento em 5 vezes a EHM e em 73% a atividade da GST e redução da HAH. Os autores comentam que a ingestão desses alcaloides influencia na capacidade de metabolização de produtos endógenos e exógenos, além de alterar a biotransformação e toxicidade. Em outro trabalho, Miranda, Henderson e Buhler (1981) com a mesma planta alimentaram ratos durante cinco semanas com uma dieta de 5% de *S. jacobaea*, após o término da pesquisa observou-se que os animais haviam reduzido o peso significativamente, além do aumento dos níveis de aspartato aminotransferase - AST (122%), fosfatase alcalina - ALP (106%) e alanina aminotransferase - ALT (152%).

A espécie *S. latifolius* DC. é componente de alguns remédios tradicionais no sul da África. Amostras de cascas e folhas foram avaliadas em células humanas HuH-7 e como padrão foi utilizado o alcaloide retrorsina. Foi estudado o efeito do extrato sobre o citoesqueleto utilizando a imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais de ratos. Além disso, avaliaram a apoptose por citometria de fluxo e estimaram o conteúdo de DNA pelo mesmo método. Observou-se apoptose nas células e anormalidades no formato. Detectou-se também a alteração de fases no DNA causando a formação de micronúcleos (STEENKAMP et al., 2001).

Para Santos-Mello et al. (2002) o extrato alcaloídico (integerrimina, retrorsina e impurezas) e o alcaloide puro integerrimina de *S. brasiliensis* armazenados por 23 anos sob as mesmas condições variáveis, foram capazes de causar toxicidade aguda em ratos, ocasionando morte de animais em menos de 24 h da administração. Observou-se também a formação de micronúcleos em células da medula óssea e inibição da divisão celular *in vitro*.

Dessa forma, Toma et al. (2004) preparou uma mistura de alcaloides pirrolizidínicos (senecionina, integerrimina, retrorsina, usaramina e senecifilina) extraídos das inflorescências de *S. brasiliensis* e avaliou a ação dos alcaloides na prevenção de úlcera gástrica e duodenal induzida em ratos. Os resultados indicaram que essa mistura ocasionou citoproteção nos órgãos estudados. Elias et al. (2011) analisou os efeitos dessa espécie nos componentes hematológicos e imunológicos aplicando repetidas doses de *N*-óxido de integerremina em ratos. De acordo com os

autores, apesar dos conhecidos alcaloides tóxicos presentes na espécie, a amostra analisada não alterou a atividade dos neutrófilos e também não houve diferença na fenotipagem e na resposta imunológica dos linfócitos.

Carro-Juárez et al. (2009) analisaram o extrato aquoso de *S. cardiophyllus* em ratos e a administração da amostra ocorreu pela veia femoral dos animais. O ensaio analisou a capacidade de ejaculação dos animais através da inserção de fios de platina no bulbo esponjoso genital para detectar a atividade eletromiográfica acoplado a um polígrafo. Os autores concluem que o aumento na capacidade ejaculatória é mediado por um efeito neural controlado a nível vertebral ocasionando um efeito pro-ejaculatório.

O estudo realizado por Tundis et al. (2009) avaliou a citotoxicidade *in vitro* de *S. stabianus* Lacaita em diferentes células cancerígenas humanas. O extrato hexânico apresentou atividade contra o melanoma amelanótico C32, apresentando IC<sub>50</sub> 62,7 µg/mL e 71,1 µg/mL para o ensaio utilizando células de carcinoma hormônio-dependente prostático LNCaP. Desse mesmo extrato os autores identificaram dois compostos denominados β-cariofileno e linalol, que apresentaram atividade contra as células C32 com valores de IC<sub>50</sub> em 20,1 e 23,2 µg/mL, respectivamente. Porém os pesquisadores afirmam que o melhor resultado obtido foi com a substância α-humuleno apresentando valor de 11,2 µg/mL para o IC<sub>50</sub>.

Hariprasath, Jegadeesh e Raaman (2012) avaliaram o efeito gastroprotetor do extrato aquoso das folhas de *S. candicans* DC pelo modelo de indução por metanol e ligadura do piloro utilizando ratos Wistar. Além desses ensaios foi avaliada a toxicidade aguda do extrato, que não teve nenhuma mortalidade em concentrações acima de 2500 mg/kg. Como resultado o extrato obteve similaridade de ação quando comparado ao padrão omeprazol. Os autores ainda comentam que são vários os mecanismos de gastroproteção quando foram analisadas enzimas antioxidantes, conteúdo de ATPase e muco da secreção gástrica e secção histopatológica.

Em trabalho de revisão realizado por Wang, Huang e Chen (2013) com a espécie *S. scandens* Buch.-Ham., além da reunião de dados sobre a fitoquímica e etnofarmacologia, o trabalho também apresenta estudos farmacológico e de toxicidade. A atividade anti-inflamatória foi avaliada com flavonoides extraídos da espécie, estes reduziram o inchaço provocado pela indução com xileno. Isso foi

provado pela redução e liberação do fator PG2 (Prostaglandina-2). Ensaio de analgesia foi realizado com camundongos em placa quente e contorsão induzida por ácido acético, que obtiveram resultados em escala que varia de 122,72 mg/kg a 130,90 mg/kg, além disso foi detectada ausência mutagênica. A espécie foi testada para detectar a hepatoproteção em fígado de ratos e observou que os níveis de ALT e AST sérico foram reduzidos. Para o ensaio de toxicidade foram avaliadas as toxicidade em dose única e de repetição em animais; aguda e crônica em humanos; genotoxicidade e carcinogenotoxicidade.

De acordo com Lienou et al. (2015) *Senecio biafrae* (Oliv. & Hiern) J. Moore é uma espécie presente na Farmacopeia Africana e que tem seu uso para diversas doenças, inclusive para infertilidade e reprodução. Dessa forma os autores analisaram o extrato aquoso em ratas imaturas, em que estudaram os parâmetros de fertilidade. Os resultados mostraram o aumento no nível de estradiol e proteína sérica, além disso foi observado o aumento no peso uterino, porém não foi notado diferença no peso ovariano e no número de folículos. O aumento no nível de estradiol pode ser explicado pelos diversos polifenóis não esteroidais produzidos pelas plantas que podem se ligar aos receptores de estrógenos humanos. Além disso os autores comentam que os principais responsáveis por esse efeito são a apigenina e o eugenol, sendo os polifenóis em maior abundância no extrato.

### 3.3 ESPÉCIE *Senecio westermanii* DUSÉN

De acordo com o site *The Plant List* (2016) a espécie *Senecio westermanii* Dusén não possui sinonímias, sendo esse o nome aceito no gênero *Senecio*. A espécie *S. westermanii* possui escassos trabalhos publicados relacionados a suas atividades biológicas e composição química. Merino (2014) avaliou as partes aéreas da espécie quanto a composição fitoquímica preliminar das frações, detectou-se a presença de alcaloides na fração clorofórmio por meio dos reativos Mayer, Dragendorff e Bouchardart; flavonoides nas frações clorofórmio, acetato de etila e remanescente, com as análises para as leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos e oxálico bórico; iridoides na fração hexano e esteroides/triterpenos com as reações de Liberman Bouchard e Keller-Kelliani. No trabalho mencionado, foram

identificados por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  os esteroides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol na fração hexano.

Além disso foram realizadas atividades biológicas com o extrato bruto e frações de *S. westermanii*: ensaio de mortalidade com o microcrustáceo *Artemia salina*, com toxicidade preliminar ausente, indo contra ao que a RDC 26/2014 que proíbe todo o gênero em composições fitoterápicas. A atividade alelopática realizada com sementes de *Lactuca sativa* ocasionam alterações na germinação, no crescimento da radícula e hipocótilo e redução da respiração radicular das plântulas. Atividade antibacteriana utilizando os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumonia*, sendo as frações clorofórmio e acetato de etila com atividade igual a 1000  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para todos o microorganismos. Ainda foi realizada análise antioxidante pelos métodos fosfomolibdênio (FCL com 92,5% de atividade em relação ao controle rotina); DPPH (FAE com  $\text{IC}_{50}$  de 26,98  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e TBARS (FHE com 67,8% de atividade em relação ao controle BHT), esses resultados mostram que a espécie possui atividade antioxidante por métodos de atividade antioxidantes distintos (MERINO, 2014).

Essa espécie constitui os seguintes níveis de organização sistemática, conforme (TABELA 1).

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO DA ESPÉCIE *Senecio westermanii* Dusén (ASTERACEAE)

HIERARQUIA	TAXONÔMICA
Espécie	<i>Senecio westermanii</i>
Gênero	<i>Senecio</i>
Família	Asteraceae
Ordem	Asterales
Classe	Magnoliopsida
Filo	Tracheophyta
Reino	Plantae

FONTE: ARCTOS (2014).



### 3.4 TERMOGRAVIMETRIA

De acordo com Haines (1995) nos sistemas termoanalíticos a amostra é submetida a um ambiente onde há controle da temperatura por meio de um dispositivo programador, que produz um sinal elétrico gerado por um transdutor, que demonstra a transformação ocorrida na análise. Os transdutores diferem entre os equipamentos, dessa forma que analisam diferentes propriedades, então gerando as mais variadas técnicas relacionadas a análise térmica, como a termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise térmica diferencial (DTA). Na TG analisa-se a variação da massa da amostra em função do tempo/temperatura. Para que isso seja possível o transdutor utilizado é uma termobalança que faz a pesagem contínua da amostra durante o processo de aquecimento e resfriamento. Assim sendo possível observar a faixa de temperatura na qual ocorre a decomposição e reações de desidratação e oxidação das amostras de acordo com o percentual de perda de massa.

As técnicas termoanalíticas adquiriram importância crescente em todas as áreas de conhecimento na química. A utilização dessa metodologia foi possível pela disponibilidade de instrumentos controlados por microprocessadores, capazes de fornecer informações quanto ao comportamento térmico dos materiais de forma precisa em um tempo relativamente curto (FARIA et al., 2002).

A análise térmica é um conjunto de técnicas que possibilita obter informações a respeito da propriedade da amostra, através da variação de energia e/ou massa. Com essas técnicas é possível obter informações a respeito da variação de massa, estabilidade térmica, grau de hidratação, pureza, temperaturas de sublimação, fusão, ebulição, diagramas de fase e cinética de reação (BANNACH et al., 2011).

Espécies vegetais e seus derivados são alvos constantes da análise termogravimétrica (TGA), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC) como os óleos vegetais (FONSECA; YOSHIDA, 2009; PORTELLA et al., 2014), extratos (SOUZA et al., 2014), produtos e subprodutos (FARINA et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2015) e no controle de qualidade (ARAGÃO et al., 2002).

Para Rampazzo (2015) o uso de métodos analíticos tem-se tornado importante no controle de qualidade, principalmente métodos que se utilizam da



variação da temperatura para análise das amostras. Por meio da caracterização temoanalíticas das amostras, as indústrias têm se utilizado desse conhecimento e aplicado essas técnicas no controle de qualidade de produtos finais , pois com a degradação térmica são observadas diversas alterações como redução do valor nutritivo e aumento do sabor desagradável, que levam a perda da qualidade do produto.

Espécies vegetais são estudadas para conhecer a temperatura de degradação em relação tempo/temperatura para se estabelecer os valores de decomposição e assim serem estabelecidos parâmetros para determinação de controle de qualidade. Além disso, os valores de variação de massa em relação ao aumento de temperatura para cada espécie torna-se específico.

Dessa forma, estudo realizado com a espécie *Passiflora nitida* Kunth (Passifloraceae) foram observados eventos de perda de massa, sendo o primeiro entre (25-150) °C, relacionado a perda de água superficial; (150-400) °C, decomposição térmica dos compostos orgânicos; (400-600) °C, formação do material carbonáceo e acima de 600°C, com a formação de cinzas (RIBEIRO, 2015). Enquanto para a espécie *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) foram observados eventos de perda de massa entre 47,92-84,70 °C, relacionado a desidratação; 200-300 °C, decomposição térmica da amostra em material carbonáceo; 300-450 °C, decomposição térmica do material e entre 450-600 °C e acima de 600°C, com a formação de cinzas (COSTA et al., 2009).

### 3.5 LINHAGEM CELULAR

Estudos realizados a partir de culturas de linhagens celulares *in vitro* são importantes por informar dados relacionados a alvos farmacológicos, assim como a produção de produtos biológicos de uso humano e animal, como vacinas e anticorpos. Além disso, as culturas celulares são capazes de fornecer resultados a respeito da funcionalidade, estrutura molecular e bioquímica dos sítios de ação (FRESHNEY, 2005).

Com isso possibilitam sugerir o entendimento e a descoberta desses alvos farmacológicos, além da aplicação de agentes terapêuticos para células derivadas de patologias em específico e, também, por fornecer sistemas de acesso pronto,

direto e avaliação de tecidos. A utilização da cultura de tecidos celulares orientam estudos relacionados a doenças, que auxiliam no rastreamento e identificação dos mecanismos de toxicidade celular (ALLEN et al., 2005).

A viabilidade celular, a proliferação celular e muitas funções importantes das células vivas, incluindo a apoptose, adesão celular, quimiotexia, resistência a múltiplos fármacos, endocitose, secreção e transdução de sinal, podem ser estimuladas ou monitoradas com vários reagentes químicos e biológicos. Muitos desses processos levam a mudanças em radicais intracelulares, concentrações de íons livres ou potencial de membrana, que podem ser detectados por meio de métodos adequados para cada resposta (JOHNSON; SPENCER, 2005).

Os protocolos de cultura de tecidos desenvolvidos permitem a geração de linhagens celulares que preservam aspectos genéticos e fenotípicos dos tumores de origem. O uso dessas culturas está relacionado para identificar drogas ou combinações de drogas que contribuam para tratamentos específicos (TRUMPI et al., 2015).

### 3.5.1 Citotoxicidade

Estudos com linhagens celulares neoplásicas para o desenvolvimento de abordagens diagnósticas e ação de doenças como o câncer são extensamente realizados para determinar suas causas (BERZOFSKY et al., 2004). O ensaio de citotoxicidade proporciona a oportunidade de avaliar não apenas os efeitos atenuantes positivos de novos agentes, mas também permitem uma avaliação rápida dos perfis de toxicidade nos tecidos analisados. As alterações que ocorrem nas culturas celulares podem mimetizar os efeitos negativo ou positivos no animal ou em seres humanos, dependendo da cultura celular utilizada e o estudo de interesse. Além disso, os tecidos celulares *in vitro* fornecem uma flexibilidade para avaliar drogas que alteram os sistemas alvos que permitem uma triagem e o desenvolvimento de novos fármacos (ALLEN et al., 2005). Ainda, as análises utilizando células servem para detectar compostos que atuam na proliferação celular ou apresentam efeitos citotóxicos diretos que levam à morte celular (RISS et al., 2013).

### 3.5.2 Inflamação

O estudo *in vitro* de respostas inflamatórias permitem o controle sobre condições experimentais que permitem a atribuição de funções precisas à molécula ou célula a ser estudada, que podem ser utilizados para direcionar potenciais mediadores em qualquer processo fisiopatológico (MCKAY; PHILPOTT; PERDUE, 1997).

A resposta inflamatória pode ocasionar danos a tecidos e contribuir para diversas patogêneses. As células desencadeiam uma resposta inflamatória com aumento de sangue na região lesionada, vazamento de proteínas plasmáticas e sinalização para leucócitos para defesa do organismo e reparo tecidual. Porém o efeito exacerbado e contínuo dessa resposta contribuem para a manutenção de diversas doenças (ROCK; KONO, 2008).

A inflamação é a reação do organismo a uma infecção ou lesão dos tecidos, que é uma resposta homeostática de tecidos vascularizados no sentido de remoção de agentes lesivos para seu estado normal. Problemas ou doenças que afetam o sistema nervoso central e/ou periférico podem ocasionar dores neuropáticas que podem modificar a mediação nervosa do processo inflamatório (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JÚNIOR; COHEN, 2016).

Diversos são os alvos moleculares modulados por compostos secundários derivados de plantas, os alvos inflamatórios e os que envolvem a quimioprevenção são extensamente estudados. As plantas constituem metabólitos que são capazes de modular as adesões moleculares (ICAM-1 e VCAM-1), quimiocinas e receptores (CXCL-12), enzimas (INOS, COX-2, MMP, 5-LOX), fatores de crescimento (VEGF), citocinas inflamatórias e os fatores de transcrição (NF- $\kappa$ B, STAT3 e HIF-1). O NF- $\kappa$ B, STAT3 e HIF-1 são importantes alvos para o tratamento e prevenção do câncer induzido pela inflamação crônica, pois são frequentemente ativados em células cancerígenas, por expressarem genes que regulem o fator de transcrição e a proliferação dessas células (LINUS et al., 2017).

### 3.5.3 Metabolismo

A síndrome metabólica é um grupo de fatores de risco interrelacionados que causa alteração nas respostas fisiológicas, bioquímicas e clínicas e contribuem para o desenvolvimento de doenças com origem no metabolismo como doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2 (PENALVA, 2008; KAUR, 2014).

A síndrome metabólica e seus fatores de risco relacionados possuem alvos terapêuticos potenciais que servem para o auxílio e tratamento das doenças relacionadas, assim o TGR5 (receptor acoplado a proteína G) (BAARS et al., 2015) e os PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissoma) (MONSALVE et al., 2013) são essenciais para o auxílio da resolução dessas doenças.

O TGR5 é um receptor de ácido biliar ligado à membrana, conhecido por seus papéis na regulação da homeostase energética e do metabolismo da glicose. A posição cromossômica do gene TGR5 em seres humanos é a 2q35, possuindo 993 pares de bases que codificam 330 aminoácidos. O TGR5 foi detectado em diversos órgãos como pulmão, fígado, intestino delgado, estômago e, principalmente, na placenta e baço. Dessa forma os agonistas do TGR5 podem ser substâncias utilizadas para o tratamento de distúrbios metabólicos, digestivos e inflamatórios (DUBOC; TACHÉ; HOFMANN, 2014; GUO; CHEN; WANG et al., 2016).

Diversos tecidos e linhagens celulares expressam o TGR5: adipócitos marrons, na ativação de iodotirionina deiodinase convertendo o T4 (inativo) em T3 (ativo) para melhorar o metabolismo basal; nas células enteroendócrinas, agindo na fosforilação oxidativa mitocondrial, liberando GLP-1 (peptídeo semelhante ao glucagon) no controle do diabetes; nos monócitos/macrófagos, diminuindo a expressão de genes induzidos por NF- $\kappa$ B com redução de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  com melhora nas doenças inflamatórias e em células de carcinoma do fígado por diminuir a fosforilação da STAT3 e reduzindo o crescimento celular, com proteção contra carcinoma hepatocelular (POLS et al., 2011; DUBOC; TACHÉ; HOFMANN, 2014).

Os receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPARs) são fatores de transcrição pertencentes a superfamília dos receptores hormonais nucleares. A família PPARs de receptores nucleares desempenha um papel regulador importante na homeostase energética e na função metabólica, que

regulam a homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e inflamação (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007; TYAGI et al., 2011; JANANI; KUMARI, 2015).

A família de PPARs é representada pelos PPAR- $\alpha$ , PPAR- $\delta$  e PPAR- $\gamma$ . Todos são essenciais no metabolismo energético, porém cada qual com uma atividade específica. Eles desempenham um papel essencial no metabolismo energético, mas diferem no espectro de atividade: PPAR $\alpha$  tem sua expressão praticamente no fígado, porém sua expressão é detectada nos ossos, músculo e coração; PPAR $\delta$  expressa em todo o corpo regulando o gasto de energia e a PPAR $\gamma$  regula o armazenamento de energia, causando a sensibilização à insulina e melhorando o metabolismo da glicose (TYAGI et al., 2011; JANANI; KUMARI, 2015).

### 3.6 ATIVIDADE LARVICIDA EM *Aedes aegypti* (Culicidae)

A dengue é uma doença viral transmitida por mosquitos do gênero *Aedes* e constitui uma grave ameaça para a saúde pública em todo o mundo (KHAN et al., 2011; FONSECA-GONZÁLEZ et al., 2011; MORA-COVARRUBIAS et al., 2010; WHO, 2009). De acordo com o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, em 2018, no período entre 31/12/2017 e 17/02/2018, a região Sudeste apresentou o maior número de casos prováveis (12939 casos; 40,2%) em relação ao total do país. Seguida das regiões Centro-Oeste (10468 casos; 32,5%), Nordeste (3686 casos; 11,5%), Norte (2983 casos; 9,3%) e Sul (2085 casos; 6,5%) (BRASIL, 2018).

Dessa forma, faz-se a necessidade do controle do vetor primário da dengue, porém a forma de combate a esse vetor provém principalmente de inseticidas químicos. A ampla dispersão da resistência aos inseticidas reduziu a capacidade destes para controlar os mosquitos vetores (FONSECA-GONZÁLEZ et al., 2011; DAVID et al., 2014; BRITO et al., 2013; GRISALES et al., 2013). Assim, a busca por novas estratégias de controle que possam combater a resistência a inseticidas ou reduzir o uso de tais produtos químicos em vetores de insetos são necessárias.

Um dos métodos eficazes para controlar vetores de insetos é a prevenção da criação de mosquitos por meio do uso de inseticidas facilmente biodegradáveis. Os mosquitos se concentraram nos subprodutos de plantas já utilizadas para ganho econômico ou em plantas medicinais já reconhecidas. As plantas geralmente produzem compostos que os protegem de insetos, e estes compostos têm efeito

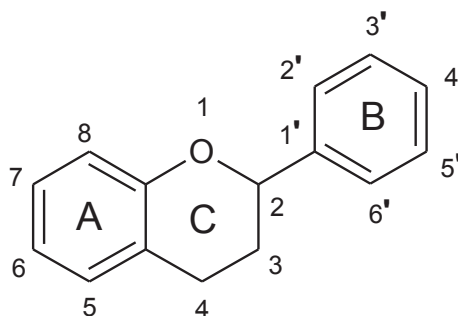
prejudicial sobre o desenvolvimento dos insetos (RUIZ-GUERRERO; RODRÍGUEZ-PÉREZ; NORZAGARAY-CAMPOS, 2015).

### 3.7 FLAVONOIDES

Os flavonoides formam o grupo de metabólitos secundários que possuem uma estrutura básica de três anéis denominada núcleo fenilcromanoma (C6-C3-C6) (FIGURA 1). Dessa forma, os flavonoides são encontrados na forma de agliconas, com ausência de açúcares ligados as suas estruturas, ou na forma de glicosídeos, quando há ao menos uma molécula de açúcar ligado a sua estrutura. Além disso, o núcleo básico permite que ocorra diferentes reações de substituições nos anéis benzênicos, como a glicosilação, metilação, hidroxilação, glicuronidação e sulfatação (PETERSON; DWYER, 1998).

Os flavonoides desempenham diversas funções nos tecidos vegetais. Esses metabólitos secundários são responsáveis pela coloração, fatores que levam a fertilidade do pólen, eliminadores de radicais livres e proteção contra insetos. Além dessas funções bioquímicas, fisiológicas e ecológicas, muitos flavonoides são utilizados na dieta humana para desempenhar um papel de proteção a saúde, por isso essas substâncias fornecem aplicações úteis nas indústrias farmacêuticas e alimentícias (MARTENS et al., 2003).

FIGURA 1 – NÚCLEO FENILCROMANOMA PRESENTE NOS FLAVONOIDES

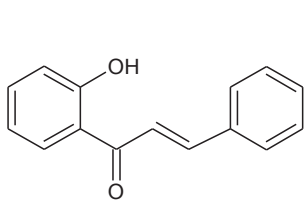


Há mais de 6000 diferentes flavonoides identificados, subdivididos em subgrupos, tais como as chalconas, flavononas, flavonas, flavonóis, proantocianidinas, antocianidinas, flavonodíois, auronas e isoflavonas (FERREYRA; RIUS; CASATI, 2012).

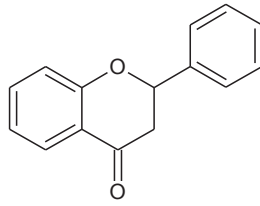
De acordo com Cunha (2013) a biossíntese dos flavonoides é considerada uma via mista, pois para a formação da estrutura básica desses compostos são necessários duas vias: a via do ácido chiquímico e a via do acetato. Sendo que para a formação do anel B utiliza-se a via do ácido chiquímico formando-se o ácido cinâmico e a ponte de três átomos de carbono, enquanto o anel aromático A é originado pela via do acetato.

Como diversas substâncias, os flavonoides provém da rota de formação dos fenilpropanoides, então após a adição de três malonil-CoA ocorre a formação dos flavonoides (FIGURA 3).

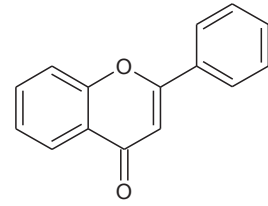
FIGURA 2 – PRINCIPAIS SUBGRUPOS DE FLAVONOIDES ENCONTRADOS NAS PLANTAS



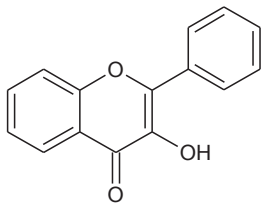
Chalcona



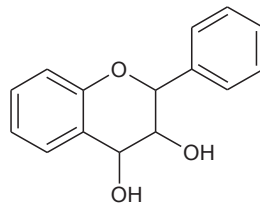
Flavonona



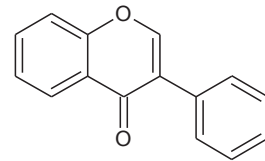
Flavona



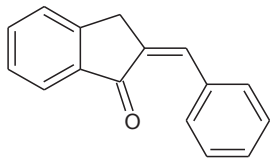
Flavonol



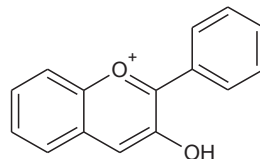
Flavonodiol



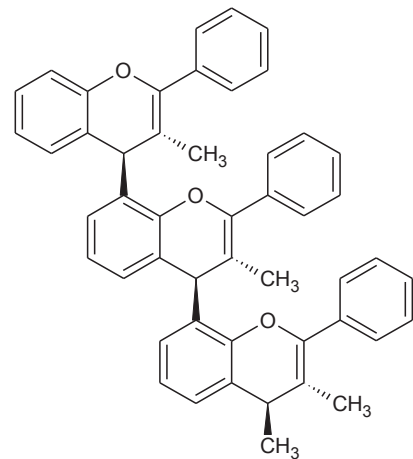
Isoflavona



Aurona



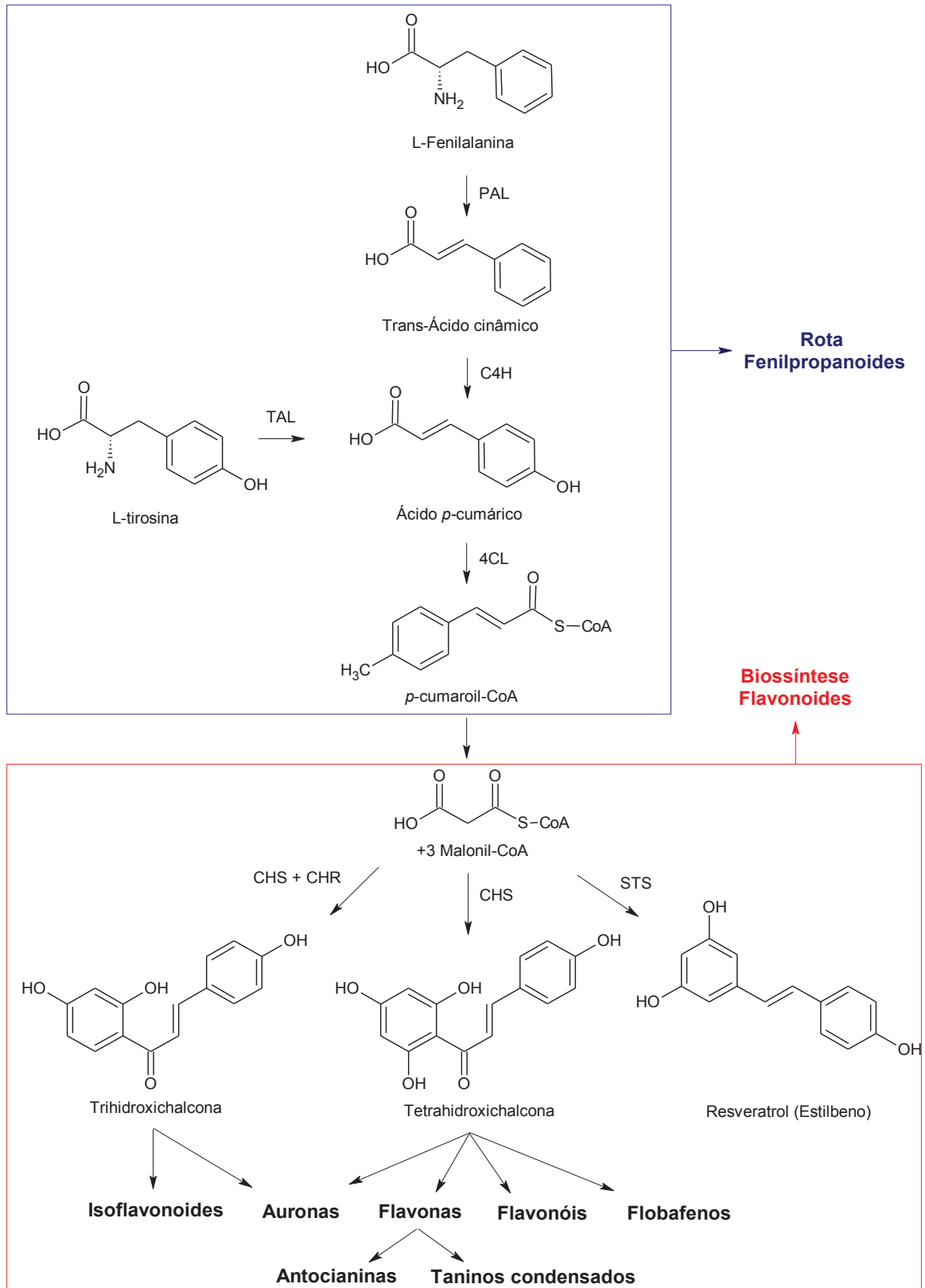
Antocianidina



Proantocianidina



FIGURA 3 – BIOSÍNTESE DOS FLAVONOIDES PELA ROTA DOS FENILPROPANOIDES



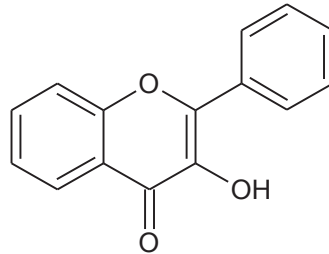
NOTA – PAL, FENILALANINA AMÔNIA LIASE; TAL TIROSINA AMÔNIA LIASE; C4H, CINNAMATO 4-HIDROXILASE; 4CL, 4-CUMARATO CoA LIGASE; CHS, CHALCONA SINTASE; CHR, CHALCONA RESUTASE; STS, ESTILBENO SINTASE.

FONTE: Adaptado de EMILIANI et al. (2009).

### 3.7.1 Quercetina

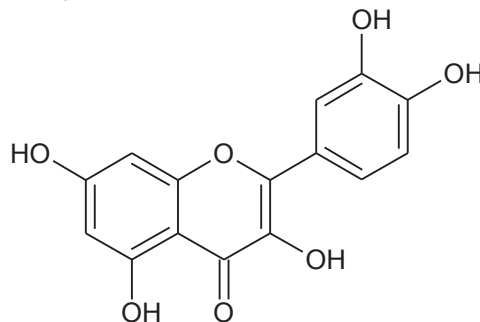
A quercetina é categorizada como um flavonol, uma das seis subclasses de compostos de flavonoides, presentes em uma variedade de espécies vegetais. O que diferencia os mais diversos flavonóis é a posição das hidroxilas e o tipo e local onde estão presentes, principalmente, os açúcares. Todos os flavonóis, incluindo a quercetina, têm em comum um esqueleto de 3 hidroxiflavona (FIGURA 4) (KELLY, 2011).

FIGURA 4 – 3-HIDROXIFLAVONA



A nomenclatura da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) para a quercetina é 3, 3', 4', 5, 7 – pentahidroxiflavonas, isso significa que a quercetina possui um grupo OH anexado nas posições 3, 5, 7, 3' e 4' (FIGURA 5). Por definição, a quercetina é uma aglicona. Um glicósido de quercetina é formado por ligação de um grupo glicosilo (um açúcar, como glicose ou ramnose) como substituto de um dos grupos OH (geralmente na posição 3) (KELLY, 2011).

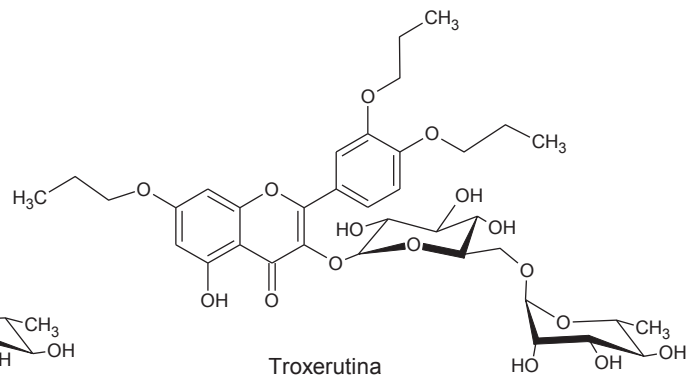
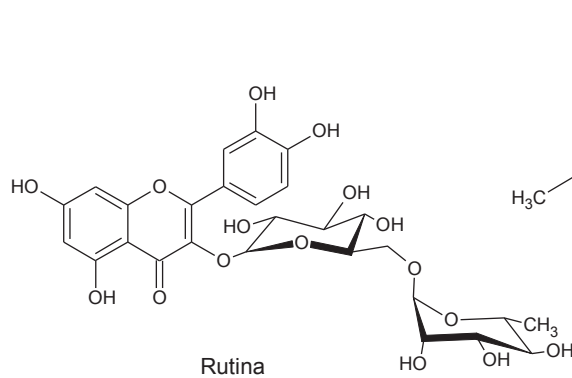
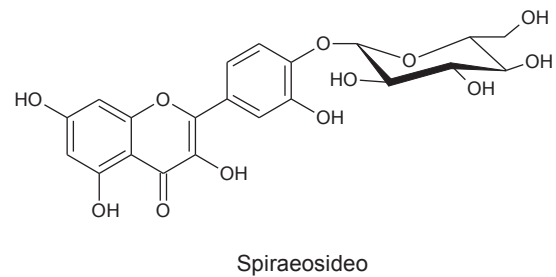
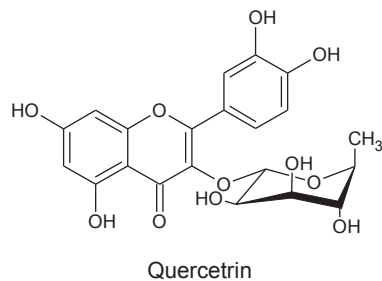
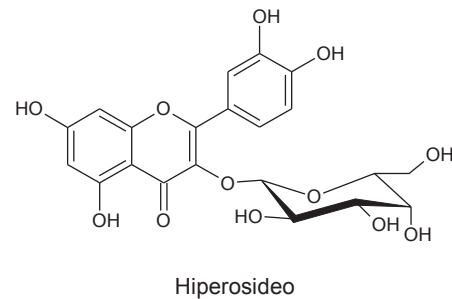
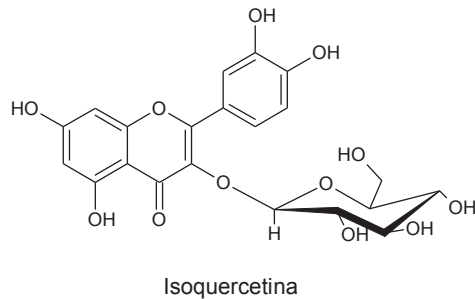
FIGURA 5 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA QUERCETINA



A característica que distingue uma quercetina glicosídica de outra é o tipo de grupo glicosil anexado e a posição a qual está ligado. Dessa forma, existem diversas

estruturas devido a posição do açúcar na molécula, como pode ser observado na (FIGURA 6).

FIGURA 6 – ISOQUERCETINA



A quercetina é considerada o principal flavonoide da dieta humana e diversos estudos *in vitro* e *in vivo* estão relacionados com a atividade desse metabólito secundário. A atividade antioxidante da quercetina é atribuída por inibir as enzimas cicloxigenase e lipoxigenase que estão envolvidas na síntese de eicosanoides a partir do ácido araquidônico. Ao analisar o efeito da quercetina em ratos diabéticos, induzidos pela droga estreptozotocina, observou-se que houve reversão nos níveis de glutathiona oxidada e também na atividade da peroxidase hepática (ALVES et al., 2010).

Além disso foi estudada a displasia com a suplementação de quercetina em ratos e observou-se um aumento no número de células com apoptose, indicando um possível efeito inibitório na carcinogênese do cólon (YANG et al., 2000). Também foi observado que esse flavonoide induziu a apoptose celular de glioblastoma U138MG, além de inibir a viabilidade e a proliferação celular (BRAGANHOL et al., 2006).

Em trabalho de revisão realizado por Fortunato et al. (2012) para comprovar os efeitos da quercetina contra a asma, detectou-se que a microemulsão e a suspensão de quercetina foram capazes de reduzir a produção de IL-4, IL-5, CCL11 e LTB4.

Em estudo 70 pessoas receberam 162 mg/dia de quercetina e observou que no subgrupo de pessoas hipertensas o flavonoide foi capaz de reduzir a pressão arterial sistêmica em 24 h, sugerindo um efeito cardioprotetor desse metabólito (BRÜLL et al., 2015).

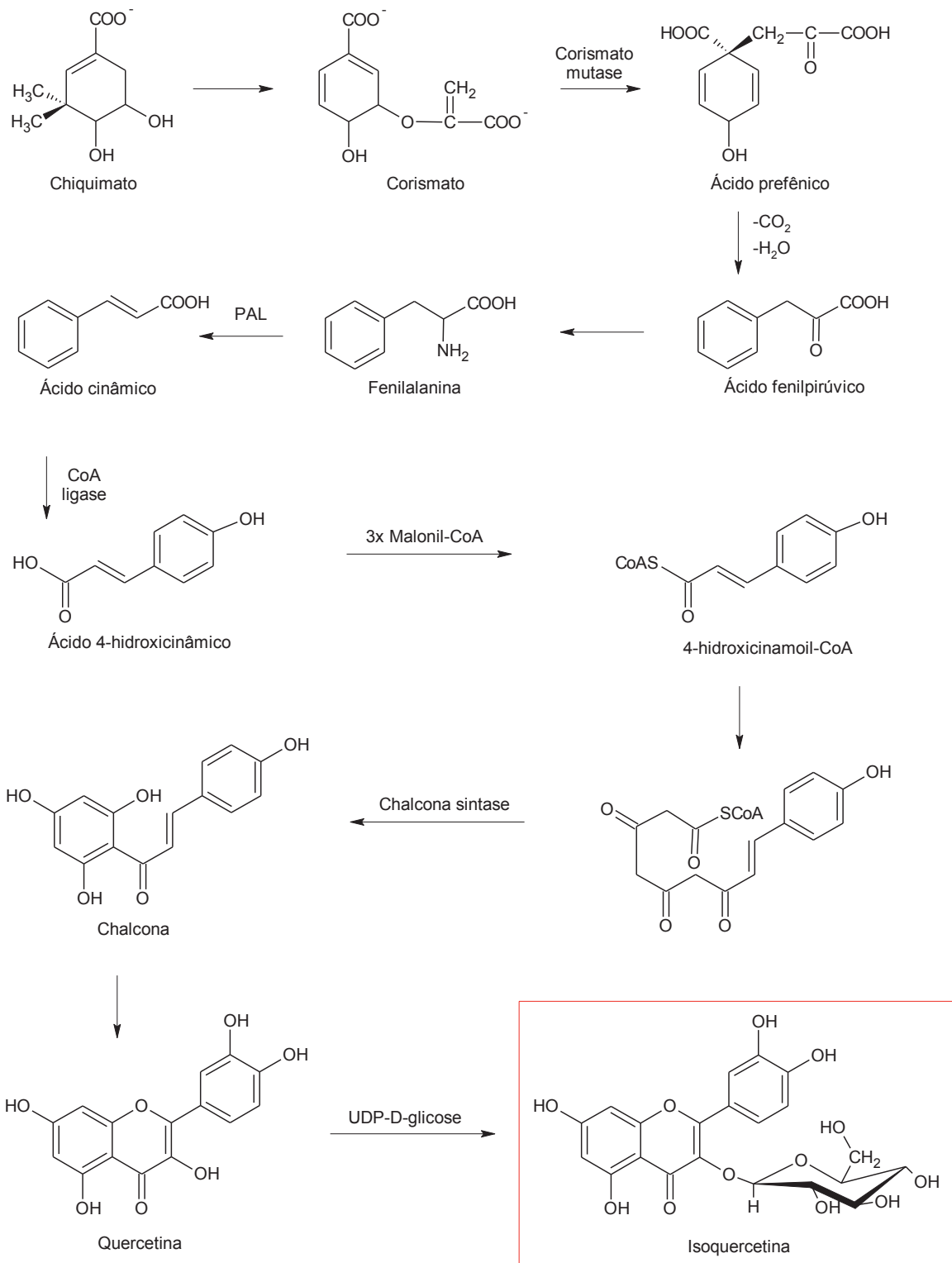
### 3.7.2 Isoquercetina

Em estudo sobre a atividade anti-inflamatória da isoquercitina (FIGURA 7) em asma alérgica em murinos, observou-se que o número de eosinófilos foram menores no líquido de lavagem broncoalveolar, sangue e parênquima alveolar. Além disso, a isoquercetina reduziu o número de neutrófilos no sangue e os níveis de IL-5 no homogeneizado pulmonar em camundongos (ROGÉRIO et al., 2007).

Skopec, Green e Karasov (2010) avaliaram a ação da isoquercetina na absorção da glicose em *Rattus norvegicus* e aves (*Turdus migratorius*) e os autores observaram que a isoquercetina reduziu a absorção da glicose em ratos, porém não obteve efeito nas aves.

Em teste de neurotoxicidade induzido com a 6-hidroxidopamina (6-OHDA) em células de ratos feocromocitoma (PC-12), células que são utilizadas no estudo de doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e Parkinson, a isoquercetina suprimiu a peroxidação lipídica nas células PC-12. Além disso, este flavonoide ativou as enzimas antioxidantes, a catalase, a superóxido dismutase, a glutatona e a glutatona peroxidase (MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; HALEAGRAHARA, 2015).

FIGURA 7 – ROTA METABÓLICA DE FORMAÇÃO DA ISOQUERCETINA



NOTA – UDP-D-GLICOSE: URIDINA DIFOSFATO – D-GLICOSE.

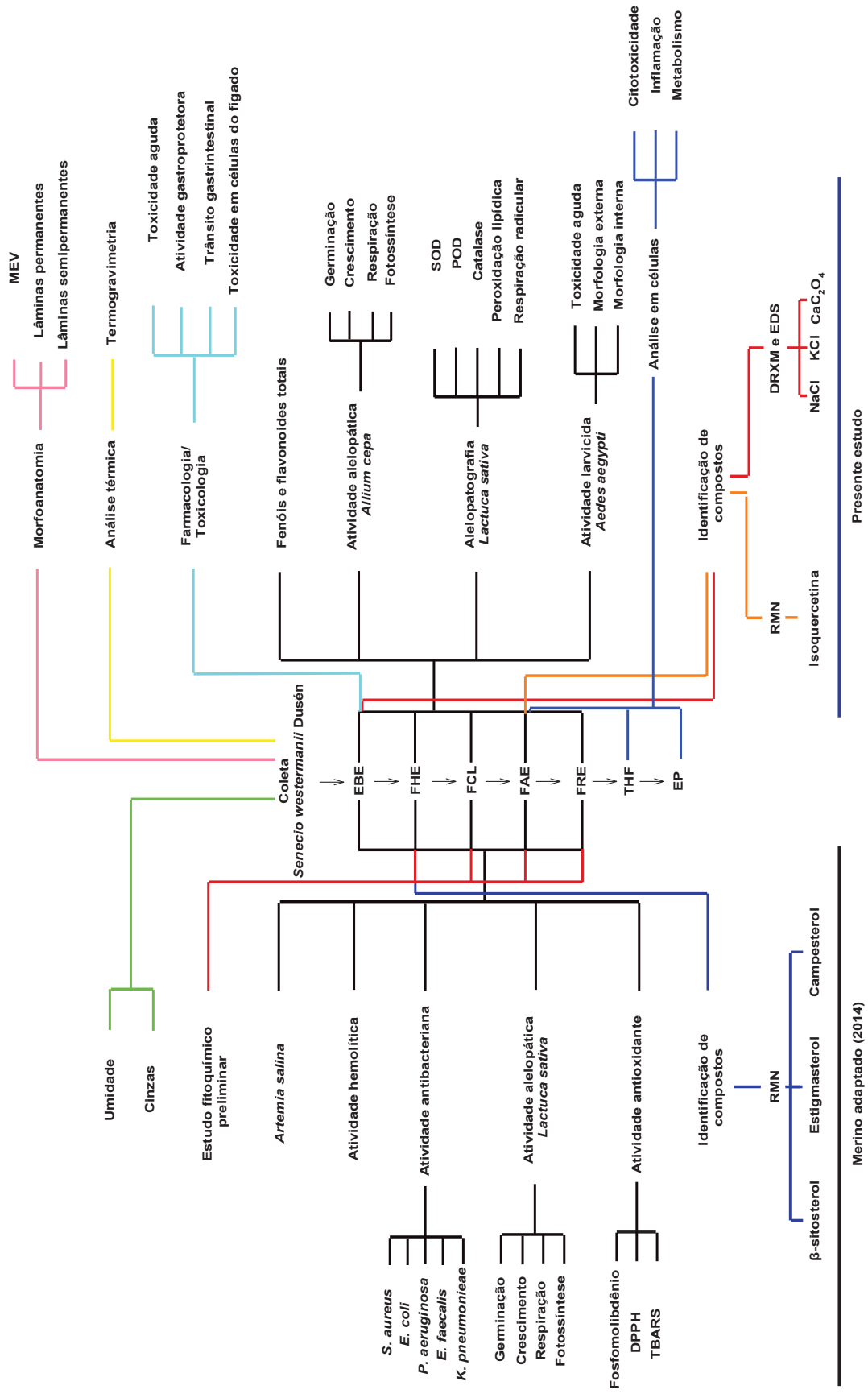
FONTE: Adaptado de PEDRIALI (2005); CUNHA (2013)

De acordo com o trabalho de revisão realizado por Orfali et al. (2016) a isoquercetina demonstrou quimioproteção e comprovada ação no tratamento de diferentes tipos de câncer de próstata, pâncreas, mama, cólon, fígado, cerebral, linfoproliferação e fibrosarcoma.

A espécie *Tropaeolum majus* L. possui como composto majoritário a isoquercetina (67%) e foi observado que foi capaz de reduzir os parâmetros lipídicos tais como colesterol total, TG, LP, LDL, HDL, índice aterogênico e taxa de risco cardíaco por cinco semanas consecutivas (HIFNAWY et al., 2016).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

FIGURA 8: ESTUDOS REALIZADOS COM A ESPÉCIE *Senecio westermanii*



## 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

### 4.1.1 Identificação da espécie vegetal

A identificação da espécie vegetal foi realizada pelo biólogo e curador da Universidade Federal do Paraná Osmar dos Santos Ribas do Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR, onde está depositada a exsicata sob o número 379066 (FIGURA 9). A pesquisa está devidamente autorizada pelo IBAMA sob o número 02001.001165/2013-47 (ANEXO I).

FIGURA 9 – EXSICATA DE *Senecio westermanii* Dusén (ASTERACEAE)



FONTE: MERINO (2014).



#### 4.1.2 Material botânico para as atividades biológicas

Para o estudo do material botânico da espécie *S. westermanii* foram realizadas três coletas na Estrada da Graciosa, localizada no município de Quatro Barras - PR, nas coordenadas 25°18'27"S e 48°56'37"W. A primeira coleta ocorreu no mês de março de 2012 e foi realizada durante o mestrado, procedeu-se para a identificação do metabólito secundário isoquercetina na fração acetato de etila e dos sais NaCl e KCl durante a obtenção do extrato bruto etanólico.

A segunda coleta ocorreu no mês de dezembro de 2014 para a realização dos estudos de doseamento de polifenóis e flavonoides totais, análises farmacológicas e toxicológicas, estudos em células tumorais, alelopatia, alelopatografia e atividade larvicida com *Aedes aegypti*. A terceira coleta ocorreu no mês de abril de 2017 para o estudo morfoanatômico e análise térmica.

As partes coletadas foram caule e folha que foram secas e estabilizadas em estufa a 50 °C com circulação de ar, por um período de 48 h, exceto para o estudo morfoanatômico que procedeu conforme o item 4.2 As partes aéreas foram trituradas com auxílio de um moinho de facas e martelos, para aumentar a superfície de contato do material com o solvente no momento da extração (SONAGLIO et al., 1999).

#### 4.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

As pesquisas referentes aos caracteres anatômicos foram efetuadas com folhas e caules de *S. westermanii*, a partir de 5 cm do ápice da planta. A nomenclatura utilizada para a análise morfológica e as suas características foi proposta por Radford et al. (1974). Parte do material botânico utilizado para estudo estrutural foi mantida fresca para a realização de testes microquímicos e a outra parte foi fixada em solução FAA 70 (formol 5%, ácido acético 5% e etanol 70 °GL 90% v/v) (JOHANSEN, 1940), e estocados em solução de etanol a 70% (v/v) (BERLYN; MIKSCHE, 1976) para a confecção de lâminas semipermanentes e permanentes.

#### 4.2.1 Lâminas semipermanentes e permanentes

O estudo anatômico de folhas e caules de *S. westermanii* foi realizado em secções executadas no sentido transversal e longitudinal dos órgãos vegetais, realizadas à mão livre e obtidas em micrótomo de rotação. Com as secções manuais foram montadas lâminas temporárias e semipermanentes. As secções, após coloração com fucsina básica 0,0125% e azul de astra 1%, foram montadas entre lâmina e lamínula, em água (lâminas temporárias) ou em glicerina a 50%, e lutadas posteriormente, com esmalte incolor (lâminas semipermanentes). As lâminas permanentes foram confeccionadas com as peças botânicas fixadas, já submetidas à desidratação em série alcoólica etílica, incluídas em glicol-metacrilato (historresina Leica®), conforme orientações especificadas no produto, e seccionadas em micrótomo RM-2145. O material botânico foi emblocado em parafina, seccionado em micrótomo de rotação e corado em hematoxilina de Ehrlich e safranina (JOHANSEN, 1940). As secções assim obtidas foram coradas com azul de toluidina (O'BRIEN; FEDER; McCULLY, 1964) com fucsina básica 0,0125% e azul de Astra 1% (ROESER, 1972).

#### 4.2.2 Testes microquímicos

Para a realização dos testes microquímicos de *S. westermanii*, os cortes à mão livre do material fresco foram mantidos sem coloração; e foram submetidos aos seguintes reagentes para a confirmação da natureza dos cristais e das substâncias presentes nos laticíferos: ácido sulfúrico 1% (detecção de cristais de oxalato de cálcio) (OLIVEIRA; AKISUE, 1989); Sudam III (substâncias lipofílicas) (SASS, 1951); lugol (grãos de amido) (BERLYN; MIKSCHE, 1976); floroglucina (elementos lignificados) (FOSTER, 1949); cloreto férrico (compostos fenólicos) (JOHANSEN, 1940). A diafanização de folhas foi realizada seguindo a técnica de Fuchs (1963).

Os resultados foram demonstrados por meio de fotos utilizando microscópio óptico Olympus CX 31, associado à câmera digital C7070, do Laboratório de Farmacognosia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

#### 4.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A caracterização morfológica das superfícies das folhas e caule de *S. westermanii* foi realizada por um microscópio eletrônico de varredura (MEV). Para tal procedimento, as amostras foram fixadas em FAA 70 e desidratadas em série etanólica crescente. As eletromicrografias foram realizadas em alto vácuo e visualizadas no MEV VEGA3 TESCAN (SOUZA, 1998), por meio do procedimento de ponto crítico (Balzers CPD 030), revestido com ouro (Balzers Sputtering SCD 030) e analisadas por um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6360 LV), no laboratório multiusuário (C-LABMU/PROPESP), na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

A espectroscopia de raios-X de energia dispersiva (EDS - *Energy Dispersive X-ray Spectroscopy*) foi realizada de forma aleatória em cristais e em células sem cristais (controle), com um raio-X detector. Foi acoplado ao MEV e operado sob as mesmas condições de funcionamento aplicadas para obter as micrografias eletrônicas. Este procedimento foi realizado no laboratório multiusuário (C-LABMU/PROPESP), na Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

#### 4.3 ANÁLISE TÉRMICA

O estudo termoanalítico de raiz, caule e folha de *S. westermanii* foi realizado por análise termogravimétrica (TGA). As curvas da TGA foram obtidas na faixa de temperatura de 20 a 700 °C, utilizando termobalança modelo TGA 50 da marca Shimadzu, sob atmosfera dinâmica, sob fluxo de ar sintético e/ou nitrogênio (150 mL/min), razão de aquecimento de 15 °C/min, utilizando cadinho de alumínio contendo massa de amostra em torno de 5 mg. A calibração do instrumento foi verificada antes dos ensaios e empregando-se um padrão de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma *The American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1993).

## 4.4 PARTIÇÃO DO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO

### 4.4.1 Estudos fitoquímicos e biológicos

Para o estudo de doseamento de polifenóis e flavonoides totais, análises farmacológicas e toxicológicas, estudos em células tumorais, alelopatia, alelopatografia e atividade larvicida com *Aedes aegypty*, partiu-se de 3,8 kg de planta fresca e estabilizada que foi macerada em aparelho de Soxhlet modificado, sob o número de registro PI 0601703-7 A, por 6 h até exaustiva extração do material por refluxo contínuo, utilizando-se 11 L de etanol absoluto como solvente. Em seguida realizou-se a extração sequencial com solventes de polaridade crescente para a obtenção das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e remanescente, de acordo com metodologia proposta por Carvalho et al. (2009).

### 4.4.2 Identificação da isoquercetina e sais NaCl e KCl

Para a identificação da isoquercetina na fração acetato de etila e dos sais NaCl e KCl obtidos do extrato bruto etanólico por precipitação, utilizou-se as amostras que foram extraídas durante o mestrado, que foram conservadas em local fresco, seco e ao abrigo da luz solar (MERINO, 2014).

## 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

### 4.5.1 Cromatografia líquida em coluna de sílica da fração acetato de etila

A fração acetato de etila foi submetida a coluna de sílica utilizando como fase estacionária sílica gel 60 Merck® (0,063 – 0,200 mm) e fase móvel a mistura dos solventes hexano e acetato de etila, partindo-se inicialmente de hexano 100% e aumentando o gradiente de polaridade de 5% em 5% até acetato de etila 100% em um volume total de 100 mL para cada gradiente. Com a fração acetato de etila foi preparada uma pastilha com sílica gel 60 Merck® a ser cromatografada, na proporção de 5 partes de sílica para uma parte da fração e levada à secura em banho-maria a 50 °C, sob constante homogeneização. Para a coleta do eluato foram

utilizados frascos numerados de aproximadamente 10 mL que permaneceram em temperatura ambiente para a evaporação total do solvente.

#### 4.5.2 Cromatografia em coluna de Sephadex

Os frascos contendo cristais ou amostras de interesse foram dissolvidos em metanol e submetidas a coluna utilizando como fase estacionária o Sephadex. Como eluente foi utilizado metanol:água (70:30) e foram utilizados frascos de aproximadamente 10 mL que permaneceram em temperatura ambiente (25 °C) para a evaporação parcial do solvente e depois submetidos ao banho-maria para eliminação total da água.

#### 4.5.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a caracterização da isoquecetina foi utilizado o cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo Merck Hitachi, com detecção de arranjo de diodos (CLAE-DAD) com varredura entre 220-400 nm. Coluna X-Terra RP-18 (25,0 cm x 4,6 mm x 5,0 µm) e pré-coluna (2,5 cm x 3,0 mm) de mesma fase da coluna. A eluição foi realizada com gradiente de concentração composta por fase A (fase ácida) e fase B (metanol) iniciando com 80% de fase A e 20% da fase B (0 a 35 min) até 100% de fase B isocrático até 45 min com vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado de 20 µL.

#### 4.5.4 Identificação dos constituintes químicos por RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

Para a identificação da isoquercetina obtida foi utilizada a metodologia de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). A amostra foi dissolvida em metanol deuterado e analisada utilizando o aparelho RMN Bruker DPX 200, operando a 4,7 T, observando os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C à 200,13 e 50,62 MHz, respectivamente.

Além do DPX 200 foi utilizado RMN Bruker Avance III operando em 9,4 T, observando o núcleos de hidrogênio e carbono à 400 MHz e 100 MHz, respectivamente. O espectrômetro está equipado com sonda 5 mm de detecção

inversa com gradiente de campo no eixo Z. Os experimentos de correlação direta ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC) e a longa distância ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC) foram otimizados por uma constante de acoplamento média de 140 e 8 Hz, respectivamente. Os deslocamentos químicos para os espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram referenciados com base no padrão de referência interno tetrametilsilano (TMS) em 0,0 ppm e as constantes de acoplamentos ( $J$ ) mensuradas em Hz.

#### 4.5.5 Análise por difratometria de raios X de monocristal (DRXM)

Os dados de difração, para análise de célula unitária, foram coletados empregando um difratômetro Bruker – D8 Venture equipado com detector de área Photon 100 CMOS, duas fontes de radiação monocromática de Mo- $K\alpha$  ( $\lambda=0,7107 \text{ \AA}$ ) e Cu- $K\alpha$  ( $\lambda=1,5418 \text{ \AA}$ ), e dispositivo Kryoflex II, para realização de coletas à baixa temperatura. A análise foi realizada a 200 K utilizando-se a fonte de Cu- $K\alpha$ . Para a realização da análise foi selecionado um fragmento cristalino de uma porção de cristais imersos em óleo mineral, o qual foi transferido cuidadosamente para um *micro-mount* que foi fixado no goniômetro do difratômetro. Os dados foram processados utilizando o programa APEX3 (APEX3, 2015). Os parâmetros de célula unitária encontrados foram comparados com dados da literatura utilizando a base de dados *online* do *Inorganic Crystal Structure Database* (ICSD, 2017).

#### 4.5.6 Substância AE 110-117 (9-11)

A obtenção da substância AE 110-117 (9-11) ocorreu na forma de um líquido amarelo cristalino. Para isso foi realizado a coluna cromatográfica da fração acetato de etila em sílica gel 60 Merck<sup>®</sup> (0,063 – 0,200mm) e durante esse processo foram obtidos um total de 194 frascos com aproximadamente 10 mL de eluato cada. Então no gradiente da mistura entre os solventes hexano (15%) e acetato de etila (85%) foram gerados os frascos de número de 110 a 117.

Em seguida os frascos anteriormente selecionados foram misturados e foram cromatografados em coluna de Sephadex utilizando uma mistura dos solventes metanol (70%) e água destilada (30%), que gerou 24 frascos novos frascos de

aproximadamente 5 mL cada. Dessa coluna foram separados os frascos 9 a 11 que foram misturados e realizada a espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (item 4.5.4).

## 4.6 FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

### 4.6.1 Fenóis totais

O extrato bruto e frações foram diluídas em metanol na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Foram adicionados 2 mL de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) e o volume da amostra completado para 2 mL. Após 3 min de repouso foram adicionados 0,4 mL de carbonato de sódio a 10%. As amostras permaneceram em repouso ao abrigo da luz por 30 min e realizadas as leituras em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV-1601 à 760 nm. Foi utilizado a curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{g/mL}$  como padrão (MINUSSI et al., 2003). O teor de compostos fenólicos totais foram determinados em miligramas equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato bruto, por meio de equação de regressão linear.

### 4.6.2 Flavonoides totais

O extrato bruto e frações foram diluídas em metanol na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Foram adicionados 2 mL de  $\text{AlCl}_3$  2% e o volume da amostra completado para 2 mL. Após 60 min foram realizadas as leituras em espectrofotômetro Shimadzu Modelo UV-1601 à 420 nm utilizando curva de calibração de quercetina nas concentrações de 5, 10, 15, 20, 25 e 30  $\mu\text{g/mL}$  como padrão (CHANG et al., 2002). Os teores de flavonoides totais foram determinados em miligramas equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato bruto, por meio de equação de regressão linear.

## 4.7 ANÁLISES FARMACOLÓGICAS

As análises utilizando-se de *Mus musculus* e *Rattus norvegicus albinus* foram aprovadas segundo a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPR – Centro Politécnico, sob o número de processo 080340/2015-22 (ANEXO II).

### 4.7.1 Determinação do trânsito gastrintestinal

Para a determinação do trânsito gastrintestinal foi utilizada a técnica descrita por Reynell e Spray (1956). Partiu-se de uma solução de vermelho de fenol (0,05% em 1,5% de CMC), como controle utilizou-se escopolamina (2,5 mg/kg) e metoclopramida (20 mg/kg), além do extrato bruto (10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg). Após 30 min administrou-se 0,5 mL do marcador e depois de 30 min sacrificou-se os animais. Para a medida do trânsito intestinal, os intestinos dos animais foram esticados e realizada a marcação do comprimento total, e quanto o marcador andou, sendo o resultado expresso em porcentagem do comprimento total do intestino delgado.

### 4.7.2 Lesão gástrica aguda induzida por etanol

As lesões gástricas induzidas por etanol foram realizadas segundo metodologia descrita por Schmeda-Hirschmann et al. (2005). Ratos Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) foram mantidos em jejum de 24 h com acesso livre à água, separados em diferentes grupos de 5 animais cada, tratados com veículo (água + Tween 80 0,5% - 0,1 mL/100 g, *v.o.*, ou solução salina 0.9% *i.p.*), omeprazol (40 mg/kg, *v.o.*), ou diferentes doses dos extratos. Após 60 min o tratamento *v.o.* e 30 min após o tratamento *i.p.* foi administrada etanol PA (0,5 mL/200 g, *v.o.*), agente necrotizante para indução da lesão gástrica. Após 60 min a administração do agente necrotizante, os animais foram sacrificados e os estômagos removidos, abertos pela curvatura menor e estendidos para a análise das lesões gástricas. A avaliação dessas lesões foram realizadas através do programa ImageTool<sup>®</sup> Versão 3.0, através do qual foi possível mensurar a área total lesionada de cada estômago em mm<sup>2</sup>. Os resultados foram expressos em mm<sup>2</sup> de área lesionada.



## 4.8 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

### 4.8.1 Toxicidade aguda

Seguindo as diretrizes da OECD (2001), foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*), fêmeas adultas, pesando entre 29-35 g, distribuídos em 2 grupos (n = 5) que receberam por gavagem o extrato bruto etanólico. As doses foram únicas e administradas nas concentrações 1000 mg/kg e 2000 mg/kg, utilizando-se água destilada para o grupo controle. Os animais foram mantidos em caixas, em sala com ciclo claro-escuro de 12 h e temperatura de 20 °C. Permaneceram em jejum 12 h antes da administração dos extratos. Foram observados nos primeiros 30, 60, 120, 240, 360 min e 24 h, analisando se os seguintes parâmetros: frequência cardíaca e respiratória; número de óbitos; e efeitos colaterais, tais como piloereção, diarreia, sialorréia, hipnose e convulsões.

### 4.8.2 Toxicidade do fígado

Fígados extraídos dos camundongos Swiss (*Mus musculus*) pesando cerca de 35 g, foram congelados em nitrogênio líquido, e no momento da análise, descongelados e lavados com solução de soro fisiológico e solução de tripsina 1,0 M. Para o preparo das lâminas, foi utilizado o método de esfregaço a fresco, realizada a coloração com corante azul de tripan, para verificar a viabilidade do controle. Em seguida, três lâminas do controle e concentrações foram preparadas, coradas com corante giemsa e hematoxilina/eosina, durante 3 min, sendo as lâminas secas em seguida com metanol, e a contagem de células procedeu-se em câmara de Neubauer (JORGE; CASTRO, 2000). As lâminas foram fotografadas para demonstrar alterações provocadas pelo extrato bruto etanólico de *S. westermanii* nas concentrações

### 4.8.3 Proteínas totais (método de Lowry)

Para a avaliação de proteínas totais, pedaços de fígado foram lavados duas vezes e triturados em nitrogênio líquido. Em seguida foram adicionados solução

tampão para lise contendo tampão de NaPP 50 mM (pH 6,8), 5% de SDS, 40 mM DTT, 5 mM de EDTA, 5 mM de EGTA, 15% de glicerina, 0,1%, triton X-100. O homogenato foi centrifugado e o sobrenadante coletado para a determinação das proteínas, de acordo com protocolo desenvolvido por Lowry et al. (1951).

Para calcular a atividade das proteínas, foi utilizado o protocolo estabelecido por Bracht et al. (2003), onde após a leitura do conteúdo de proteínas na amostra, deve-se calcular o fator de calibração parcial:  $FCP1 = Q1/A1$ , onde:

Q: quantidade de proteína adicionada (volume adicionado);

A: absorvância

Fator de Calibração Médio (FCM), onde:

$FCM = \text{m\u00e9dia das FCPs}$ .

A partir destes dados, \u00e9 poss\u00edvel calcular a quantidade de prote\u00ednas, onde:

$ABS * FCM * 100 = \text{mg/mL de prote\u00edna}$

#### 4.8.4 Determina\u00e7\u00e3o enzim\u00e1tica de marcadores de toxicidade no f\u00edgado

Os biomarcadores de hepatotoxicidade avaliados no f\u00edgado foram: fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), sendo que para as dosagens foram utilizados kits comerciais.

##### 4.8.4.1 Atividade da fosfatase alcalina (ALP)

A atividade da ALP foi determinada de acordo com o protocolo Novagen<sup>\u2122</sup>, adaptado de Bracht et al. (2003). Para esta atividade, 500 \u00b5L de tamp\u00e3o Glicina 0,1 M pH 10,2 contendo 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, foram adicionados a 500 \u00b5L do substrato p-nitrofenilfosfato de s\u00f3dio 0,012 M. A mistura foi incubada em banho-maria a 37 \u00b0C durante 5 min, e em seguida, 500 \u00b5L do homogenato de f\u00edgado preparado para a an\u00e1lise de prote\u00ednas totais, foram adicionados \u00e0 amostra e foram novamente incubados em banho maria a 37 \u00b0C durante 30 min. Como controle, mesmo

procedimento foi utilizado, substituindo o homogenato por água destilada. A absorbância foi lida a 410 nm e a atividade foi calculada em  $\mu\text{mol}\cdot\text{min}$ , utilizando-se o coeficiente de extinção molar do p-nitrofenilfosfato de sódio ( $\epsilon = 18,000/\text{M} \times \text{cm}$ ).

#### 4.8.4.2 Atividade da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST)

Para doseamento da ALT e AST foram utilizados os protocolos do kit ALT/GPT Liquiform e AST/GOT Liquiform. Em ambas as atividades, foram utilizados 800  $\mu\text{L}$  de uma solução contendo piridoxal fosfato (1 M), seguido de 100  $\mu\text{L}$  das soluções provenientes das concentrações de fígado homogeneizados, e incubar em banho-maria a 37 °C durante 5 min. Após resfriamento, adicionar 200  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 10 mmol/L, contendo NADH 1320  $\mu\text{mol/L}$ ,  $\alpha$ -cetogluturato 66 mmol/L e azida sódica 0,095%. O procedimento mono-reagente, sem a ativação do piridoxal fosfato também foi realizada para obter de resultados compatíveis com outros métodos de referência encontrados na literatura. A absorbância foi lida em 340 nm. Como branco foram utilizadas soluções contendo os reagentes sem extrato de fígado, com e sem a ativação do piridoxal. As atividades das enzimas foram calculadas por meio das seguintes fórmulas:

$$\Delta A/\text{min} = (A1 - A2) / 2$$

$$\text{Fator} = \text{Atividade do Calibrador} / \Delta A/\text{min do Calibrador}$$

$$\text{ALT ou AST} = \Delta A/\text{min Teste} * \text{fator.}$$

Nos protocolos para ALT e AST, a atividade do calibrador fornecidas são 125 e 109, respectivamente.

#### 4.8.5 Ensaio antioxidantes não enzimáticos em amostras de fígado

##### 4.8.5.1 Níveis hepáticos de glutathiona reduzida (GSH)

Os níveis de GSH nas amostras hepáticas foram determinadas de acordo com o método de Jollow et al. (1974). Nesta metodologia, 200  $\mu\text{L}$  do homogenato de

fígado foi adicionado a 1,8 mL de água destilada, seguido de 3,0 mL de solução de ácido sulfosalicílico a 4%. A mistura de reação repousou por 4 min e, em seguida, foram adicionados 4 mL de tampão fosfato 0,1 M, seguido de 0,5 mL do reagente de Ellman (0,04% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4). A mistura do branco consistiu em 4 mL de tampão fosfato 0,1 M, 1 mL de ácido sulfosalicílico e 0,5 mL do reagente de Ellman. A absorbância foi lida a 412 nm.

#### 4.8.5.2 Teor de ácido ascórbico (AA)

A concentração de ácido ascórbico (AA) no fígado foi determinada conforme método de Jagota e Dani (1982). Neste procedimento, o AA em amostras biológicas reage com o reagente Folin Ciocalteau, um agente oxidante para se obter uma cor azul, que tem a máxima absorbância a 760 nm. A vantagem desta análise consiste no fato de que o ácido ascórbico é o único agente redutor forte o suficiente para reagir com o Folin em condições ácidas, o que elimina possíveis interferências de outras substâncias.

Nesta análise, cerca de 0,5 mL do homogenato de fígado foram adicionados em tubos de ensaio contendo 0,8 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, sendo agitados em vortex e incluídos em banho de gelo durante 5 min, sendo centrifugados a 3000 rpm durante mais 5 min. Em seguida, 2,0 mL de sobrenadante foram adicionados a 0,2 µL do reagente de Folin (diluído 10 vezes em água destilada) e os tubos foram agitados vigorosamente. Após 10 min, a absorbância da cor azul, foi medida utilizando leitor de microplacas a 760 nm. Uma curva padrão foi preparada tomando variação das concentrações de padrão ácido ascórbico em água destilada, variando de de 0,05 a 0,7 µL/mL.

#### 4.8.6 Atividade das enzimas antioxidantes do fígado

##### 4.8.6.1 Atividade hepática da glutathione S-transferase (GST)

A atividade da GST hepática foi determinada pelo método descrito por Habig et al. (1974), usando o reagente 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato. Resumidamente, a mistura de reação (3 mL) foi constituída por 30 µL de GSH

redutase (0,1 M), 150 µL de CDNB (3,37 mg/mL), 2,79 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 6,5) e 50 µL de homogenato de fígado. A mistura de reação permaneceu em repouso durante 3 min e realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas a 340 nm. O branco constituiu-se de todos os reagentes, com exceção do homogenato de fígado. A atividade de GST no fígado homogeneizado foi determinada a partir da seguinte equação:

$$\text{Atividade da GST } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{Abs/min}}{9,6} \times \frac{1}{0,05}$$

Onde:

9,6: coeficiente de extinção molar do CDNB (1/mmol x cm)

0,05: volume homogenato de fígado

#### 4.8.6.2 Atividade hepática da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi determinada conforme o procedimento de Misra e Fridovich (1972), medindo-se a inibição da auto-oxidação de epinefrina em pH 10,2. Neste ensaio, 1,0 mL da amostra de fígado nas diferentes concentrações foram adicionadas a 2,5 mL de tampão carbonato de sódio 0,05 M (pH 10,2), seguido de 0,3 mL de solução de epinefrina a 0,3 mM. Como branco foi utilizada uma mistura contendo 2,5 mL de tampão carbonato de sódio, 0,3 mL de solução de epinefrina, 0,5 mL de adrenalina e 1,0 mL de água destilada. O aumento da absorbância a 480 nm foi controlado no leitor de microplacas a cada 30 seg controlados totalizando 150 seg, para obter uma curva. Atividade de SOD no fígado foi expressa por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Aumento da absorbância da amostra}}{\text{Aumento da absorbância no branco}} \times 100$$

Uma unidade de SOD foi definida como a concentração de SOD necessária para causar 50% de inibição da oxidação da adrenalina no intervalo de um minuto:

Atividade da SOD (U/mg de proteína) = SOD/total de proteína na amostra x fd (fator de diluição)

fd= vol inicial/ vol final

#### 4.8.6.3 Atividade hepática da catalase (CAT)

A atividade da catalase hepática foi determinada pelo método descrito por Singha (1972), com base na redução de dicromato em ácido acético para acetato crômico, quando aquecido na presença de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A mistura de reação consistiu em 4 mL de solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (800 µmol), 5 mL de tampão fosfato de sódio (0,01 M, pH 7,0) e 1 mL do homogenato de fígado, seguidos de 2 mL do reagente dicromato/ácido acético.

O acetato crômico produzido foi monitorado em leitor de microplacas a 570 nm e o valor remanescente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi extrapolada a partir da curva padrão para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A atividade da catalase foi expressa como µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.min.mg.proteína, sendo que para o cálculo foi utilizada a fórmula utilizada por Bracht et al. (2003):

$$\alpha \text{ tg} = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Sendo:  $\Delta A$  = a variação da absorbância e

$\Delta t$  = a variação do tempo (minutos).

Após as leituras das absorbâncias das enzimas, a atividade foi calculada em µmol/min através da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{vol de incubação} \times \alpha \text{ tg (1/min)}}{\text{Coeficiente de extinção molar da enzima } (\epsilon)}$$

#### 4.8.7 Avaliação da peroxidação lipídica (PL)

A PL no homogenato do fígado foi avaliada pelo método de Varshney e Kale (1990). O método envolveu a reação do malondialdeído (MDA) formado como produto da peroxidação lipídica com o ácido tiobarbitúrico para produzir um cromóforo rosa estável com a máxima absorção de 532 nm. Para que ocorresse a reação, 1,6 mL de tampão tris-KCl (1,0 M), 0,4 mL do homogenato nas diferentes

concentrações, 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 30%, 0,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,75% foram levados a banho maria a 95°C, durante uma hora. Em seguida, as amostras foram levadas a banho de gelo até resfriamento e posteriormente centrifugadas a 3.000 rpm. O sobrenadante claro foi recolhido e a absorbância medida contra um branco de referência de água destilada a 532 nm em leitor de microplacas. A Peroxidação lipídica foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$\%MDA = \text{abs} \times \text{vol de reação} / E_{532} \times \text{vol da amostra} \times \text{mg de proteína}$$

Onde:

$E_{532}$  é o coeficiente de extinção molar do MDA=  $1,56 \times 10^5 / M \times \text{cm}$

## 4.9 ANÁLISE CELULAR

### 4.9.1 Partição do extrato bruto cetônico

Para a partição do extrato bruto cetônico foi utilizado a metodologia de Kupchan, Tsou e Sigel (1972) modificada, em que foram utilizados 50 g trituradas das partes aéreas de *S. westermanii* que foram extraídas com acetona (1:10) (p/v) para um volume total de 500 mL. A extração ocorreu por um período de 2 horas e em seguida filtrado em funil sinterizado e o solvente evaporado em balão, dessa forma obteve-se o extrato bruto cetônico (EBC). Após a obtenção do peso do EBC, foi novamente dissolvido em uma quantidade mínima de acetona, e adicionado sílica 1/3 peso EBC/peso SiO<sub>2</sub>. Em seguida foi levado a evaporação completa do solvente, o pó de sílica assim obtido foi colocado em um funil sinterizado e protegido pela camada de celite 1/3, peso EBC/ peso de celite. Após foi realizada a extração sequencial com solventes de polaridade crescente para obter as frações éter de petróleo, acetato de etila e tetraidrofurano (THF) cada um em relação 1/30 p/v.

#### 4.9.2 Citotoxicidade em linhagem de células

Foram utilizados para ensaios de citotoxicidade as linhagens celulares A549-Nuclight Red e o DU145-Nuclight Red de acordo com o protocolo para cada linhagem. As células foram tratadas com as frações de éter de petróleo, acetato de etila e tetrahidrofurano (THF) de *S. westermanii* nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL por um período de 24 h e a toxicidade foi determinada utilizando o sistema de imagem de células vivas IncuCyte®

#### 4.9.3 Inflamação

Para a atividade anti-inflamatória foi utilizado as frações de éter de petróleo, acetato de etila e tetrahidrofurano (THF) de *S. westermanii* utilizando linhagens celulares para avaliar alvos inflamatórios específicos.

##### 4.9.3.1 Atividade do NF-κB

Para avaliar a ativação do NF-κB (fator nuclear kappa B) induzida por TNFα das frações de éter de petróleo, acetato de etila e tetrahidrofurano (THF) de *S. westermanii*, foi utilizado a linhagem celular NIH3T3-KBFLuc que foram incubadas com doses das amostras da espécie vegetal (10 µg/mL e 100 µg/mL) durante 30 min e depois estimulou-se durante 6 h com TNFα (30 ng/mL). A atividade de luciferase foi medida nos lisados celulares (PRETE et al., 2016).

##### 4.9.3.2 Atividade STAT3

A linhagem celular HELA-STAT3Luc foi utilizada para estudar o efeito das frações de éter de petróleo, acetato de etila e tetrahidrofurano (THF) nas concentrações de 10 e 100 µg/mL de *S. westermanii* na atividade de transcrição STAT3 (transdutores de sinal e ativadores de transcrição 3). As células foram incubadas com as doses das amostras da espécie vegetal durante 30 min e depois estimulados por 6 h com IFNγ (50 U/mL). A atividade de luciferase foi medida nos lisados celulares (PRETE et al., 2016).



#### 4.9.3.3 Atividade do Nrf2

O efeito das frações de éter de petróleo, acetato de etila e THF na atividade de transcrição do Nrf2 (fator nuclear eritroide relacionado ao fator 2) foi analisado em células HaCaT-ARE-Luc, que expressam de forma estável elementos de resposta antioxidante (ARE) que são alvos do fator de transcrição Nrf2. Para testar a ativação de Nrf2, as células foram incubadas com as doses das frações (10 µg/mL e 100 µg/mL) de *S. westermanii* durante 6 h utilizando como controle positivo a TBHQ (terc-butilhidroquinona) (10 µM). Para analisar a inibição de Nrf2, as células foram pré-incubadas com os extratos durante 30 min e depois estimuladas por 6 h com TBHQ (10 µM). A atividade de luciferase foi medida nos lisados celulares (PRETE et al., 2016).

#### 4.9.3.4 Atividade do HIF-1α

O efeito das frações de éter de petróleo, acetato de etila e THF de *S. westermanii* foram analisadas sobre a atividade transcricional HIF-1α (fator induzível por hipóxia 1-α) em células NIH3T3-Epo-Luc que expressam de forma estável o promotor do gene eritropoetina que é alvo para o fator de transcrição HIF-1α. Para testar a ativação do HIF-1α, as células foram incubadas com doses das amostras da espécie vegetal (10 µg/mL e 100 µg/mL) durante 6 h, foi utilizado como controle positivo 150 µM de DFX (deferroxamina). Para analisar a inibição de HIF-1α, as células foram pré-incubadas com os extratos durante 30 min e depois estimuladas por 6 h com DFX (150 µM). A atividade da luciferase foi medida nos lisados celulares (PRETE et al., 2016).

#### 4.9.4 Metabolismo

Para analisar alvos de doenças de síndrome metabólica foram utilizados as linhagens celulares CHO-TGR5-CRE-Luc para detectar a TGR5 (receptor acoplado a proteína G) e GAL4-PPARα e GAL4-PPARγ para detectar os PPARs (receptores ativados por proliferador de peroxissomas).

#### 4.9.4.1 Atividade de TGR5

A técnica foi realizada de acordo com Sato et al. (2008) com modificações. O ensaio agonístico de TGR5 foi realizado em células CHO-TGR5-CRE-Luc, que expressam de forma estável o gene TGR5 de receptor de membrana de ácido biliar humano. As células foram estimuladas com concentrações crescentes das frações de éter de petróleo, acetato de etila e THF de *S. westermanii* (10 µg/mL e 100 µg/mL) durante 6 h. Como controle positivo foi utilizado 10 µM de ácido litocólico. A atividade da luciferase foi medida nos lisados celulares.

#### 4.9.4.2 Atividade de PPARs

Células HELA foram co-transfectadas de forma transitória com o vetor de expressão GAL4-PPAR $\alpha$  ou GAL4-PPAR $\gamma$  e o vetor repórter de luciferase GAL4-Luc. Em seguida, as células foram estimuladas com concentrações crescentes das frações de *S. westermanii* (1 µM, 10 µM e 25 µM) durante 6 h e a atividade da luciferase foi medida nos lisados celulares. Como controle positivo foi utilizado o WY 14643 (5 µM) e a rosiglitazone (1 µM) para a atividade de transcrição PPAR $\alpha$  e PPAR $\gamma$ , respectivamente (CALLERI et al., 2014).

### 4.10 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

Em placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1, previamente autoclavados a 120 °C por 20 min, foram colocados 5,0 mL da solução das amostras (extrato e frações), preparadas nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Em seguida, foram semeadas, aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 50 diásporas da espécie alvo (*Allium cepa* - cebola), com quatro repetições para cada solução. Com o controle o mesmo procedimento foi realizado, porém utilizando apenas água destilada. As placas de Petri contendo as diásporas foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), com condições de luz interna constante a 160 W, umidade relativa ( $\pm$  80%) e temperatura de 25 °C, conforme Brasil (2009).

#### 4.10.1 Germinação

Durante a germinação foram realizadas duas leituras diárias, sempre no mesmo horário, abrindo-se as placas em fluxo laminar, durante sete dias. O teste foi realizado em quatro repetições. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento, que pode ocorrer devido à expansão do embrião com a embebição das frações (LABORIAU, 1983).

Calculou-se o índice de velocidade de germinação (IVG) anotando diariamente o número de sementes germinadas e ao final somou-se as sementes germinadas por dia, dividindo-se pelo respectivo número de dias contados a partir da semeadura de acordo com a fórmula:  $IVG = (G1 / N1) + (G2 / N2) + \dots + (Gn / Nn)$ , onde “G” é o número de sementes germinadas e “N” é o número de dias da semeadura à 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>,..., enésima avaliação (LABORIAU, 1983).

As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao Teste Scott-Knott. O gráfico foi construído por meio do GraphPad Prism<sup>®</sup> 6.01.

#### 4.10.2 Crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes et al. (1987) e Macias, Castellano e Molinillo (2000). Após três dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz (radícula) e do hipocótilo (dez plântulas por placa) utilizando papel milimetrado.

Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos ao Teste de Scott-Knott para comparação das médias.

#### 4.10.3 Respiração radicular

O teste de respiração das raízes foi realizado segundo Steponkus e Lanphear (1967). Foram cortadas 10 raízes a 1 cm a partir da coifa e transferidas para tubos de ensaio, e foram adicionados em cada tubo 5 mL de cloridrato de trifetil tetrazólio (TTC) 0,6% (p/v) e 1 mL de tampão fosfato de sódio (mono e dibásico) a 0,05 M (pH 7,0). Em seguida, os tubos foram deixados à 25 °C por 2 h.

Após esse período os tubos foram transferidos para banho-maria a 30 °C por 15 h (ou em estufa a 40 °C).

Ao final desse tempo, a solução dos tubos foi drenada e as raízes lavadas uma vez com água destilada, que em seguida também foram drenadas ao máximo. Posteriormente foi adicionado 7 mL de etanol 95% (v/v) e então os tubos foram levados para o banho-maria com água fervente ( $\pm 100$  °C) durante 15 min, ou até secura. Após esse período os tubos foram resfriados até temperatura ambiente e acrescentado em cada tubo 10 mL de etanol 95% (v/v). Em seguida foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 530 nm. Como branco foi utilizado o etanol 95% (v/v).

#### 4.10.4 Fotossíntese

Foram cortadas 10 folhas primárias inteiras e transferidas para tubos de ensaio, contendo 5,0 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) e então os tubos foram embrulhados em papel alumínio e deixados à temperatura ambiente por 24 h. Após esse período as leituras das absorvâncias da clorofila a (645 nm) e b (663 nm) foram realizadas em espectrofotômetro. Como branco foi utilizado o DMSO.

O teor de clorofila total (mg/L) foi calculado de acordo com a equação de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987):

$$\text{Clorofila total: } 20,2 \times \text{AbsA} + 8,02 \times \text{AbsB}$$

Onde: AbsA = absorvância da clorofila a;

AbsB = absorvância da clorofila b.

#### 4.11 ALELOPATOGRAFIA

A alelopatografia é considerada uma alelopatia direcionada, onde se visualiza algumas substâncias em placas cromatográficas no UV-VIS. Essa técnica tem como objetivo testar com rapidez e eficiência a atividade alelopática de constituintes químicos isolados, e ao se tratar de mistura destes, obter separação para visualização clara da influência alelopática, utilizando como ferramenta a

cromatografia em camada delgada (sílica-gel GF254) (DIAS, 2005).

#### 4.11.1 Preparo da placa cromatográfica para alelopatografia

De acordo com a técnica de Dias (2005) a amostra foi diluída em 50  $\mu\text{L}$  e distribuída uniformemente em 4 cm demarcados a partir de 1 cm de placa com 5 cm de largura e 8 cm de comprimento. Após 6,5 cm de eluição da fase móvel apropriada, a placa foi retirada da cubeta, esperou-se a secagem do solvente e visualizou-se os compostos sob luz visível e ultravioleta (UV) a 365 nm (longo) e 254 nm (curto), demarcou-se o local dos compostos e as placas armazenadas em estufa a 60 °C por 24 h. Preparou-se duas placas para o ensaio alelopatográfico, uma destinada à avaliação da germinação e outra ao crescimento.

Placas controle foram preparadas apenas com aplicação do solvente utilizado na diluição da amostra e eluição na mesma fase móvel com posterior envio a estufa, sob as mesmas condições do ensaio.

#### 4.11.2 Ensaio alelopatográfico

Após 24 h de estufa, as placas cromatográficas foram retiradas e acomodadas em placas de petri com papel filtro (Whatman n.º.6) umedecidos com água destilada e dez sementes de *Lactuca sativa* foram colocadas nas regiões demarcadas. Trabalhando-se com compostos que apresentem solubilidade em água, um novo papel de filtro foi acomodado sobre a placa cromatográfica antes de umedecê-la com água destilada. A utilização do papel de filtro sobre a placa cromatográfica, antes de acomodar as sementes, tem como finalidade evitar que substâncias solúveis em água, presentes nas bandas das placas cromatográficas, misturem-se e comprometam o ensaio. Com a utilização do papel de filtro não ocorre mistura entre substâncias, pois os compostos referenciados são absorvidos pelo papel em presença de água destilada, fato verificado com revelação do papel de filtro utilizado juntamente com a placa cromatográfica ao término do ensaio. As placas de petri foram fechadas com papel alumínio e armazenadas em BOD à 20 °C (DIAS, 2005).

#### 4.11.3 Avaliação histoquímica do ânion superóxido

A formação de ânion superóxido em folhas raízes foi visualizada “*in vivo*” pela incubação de ápices radiculares, de aproximadamente 1 cm, em 2 mL de tampão citrato de potássio 10 mM (pH 6,0) contendo NBT 0,5 mM, a 25°C, sob agitação, por 25 min (FRAHRY; SCHPPER, 2001; LISZKAY et al., 2004). Decorrido este tempo, os ápices radiculares foram removidos e fotografados por meio de câmera digital acoplada a uma lupa. Após este período, folíolos e radículas foram visualizadas com auxílio de microscópio óptico.

#### 4.11.4 Germinação e crescimento

Para a análise da germinação e do crescimento procedeu-se conforme descrito nos itens 4.10.1 e 4.10.2, respectivamente, com modificações: na análise de germinação, os índices de velocidade de germinação não foram submetidos ao Teste de Scott-Knott e na análise de crescimento somente verifica-se o crescimento da radícula, do hipocótilo e formação de folíolo.

Decorridos os sete dias de ensaio e as leituras de germinação e crescimento, as placas retornaram a estufa para secagem e posterior revelação da placa cromatográfica com visualizador indicado para a classe do composto analisado.

#### 4.11.5 Respiração radicular

O ensaio de respiração radicular foi realizado de acordo com o item 4.10.3.

#### 4.11.6 Atividade da catalase

A atividade da catalase foi medida em um meio contendo 67 mM de tampão fosfato de potássio (1 mL; pH 7,0), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mL; 10 mM) , e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático (2 mL). O consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi monitorado a 240 nm ( $\epsilon$ , 0,036/mM x cm) (AEBI, 1984).

#### 4.11.7 Atividade da peroxidase (POD)

A atividade da peroxidase (POD) foi medida em um meio contendo tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM), guaiacol (2,6 mM) e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático. A formação de tetraguaiacol ( $\epsilon$ , 25,5/mM x cm) foi monitorada a 470 nm (PUTTER, 1974).

#### 4.11.8 Atividade da superóxido dismutase (SOD)

Atividade de superóxido dismutase (SOD) foi medida de acordo com Giannopolitis e Ries (1977). O meio continha tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8) e L-metionina 6,5 mM, azul de nitrotetrazólio (NBT) 150  $\mu$ M, riboflavina 4  $\mu$ M e 0,02-0,1 mg de proteína do extrato enzimático. A reação foi iniciada pela ativação de uma luz (20 W) e iluminando o meio durante 20 min a 30°C. Uma unidade de atividade de SOD (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para causar uma inibição de 50% da taxa de fotoredução (NBT) a 560 nm, e os resultados foram expressos como U de SOD/ $\mu$ g de proteína.

#### 4.11.9 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi medida em meio contendo 0,1% de ácido tricloroacético (1,3 mL), 0,5% de ácido tiobarbitúrico (1 mL) e 0,1-0,4 mg de proteína do extrato enzimático (250  $\mu$ L) (GOMES-JÚNIOR et al., 2006). A absorbância foi lida a 534 nm e a atividade expressa como porcentagem do estímulo de peroxidação lipídica.

As atividades das enzimas foram calculadas segundo Bracht et al. (2003). Para todas as enzimas descritas, foram acrescentados 10  $\mu$ L de extrato enzimático, com as soluções reagentes específicos para cada dosagem enzimática. A absorbância dessas amostras foi monitorada durante 0 a 9 min, e em seguida plotado um gráfico para cada dosagem enzimática, para obtenção da variação da tangente, onde:

$$\alpha \text{ tg} = \frac{\Delta A}{\Delta t}$$

Sendo:  $\Delta A$  = a variação da absorbância;

$\Delta t$  = a variação do tempo (minutos)

Após as leituras das absorbâncias das enzimas, a atividade foi calculada em  $\mu\text{mol. min}^{-1}$  através da seguinte fórmula:

$$\text{Atividade } (\mu\text{mol/min}) = \frac{\text{vol de incubação} \times \alpha \text{ tg } (\text{min}^{-1})}{\text{coeficiente de extinção molar da enzima } (\epsilon)}$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os dados foram submetidos a análise de variância e quando os efeitos dos tratamentos foram significativos ( $p < 0,05$ ) em relação a testemunha. As médias foram comparadas pelo teste de Dunnet.

#### 4.12 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*

##### 4.12.1 Avaliação da mortalidade

A atividade larvicida dos extratos e frações de *S. westermanii* sobre *A. aegypti* foi realizada segundo Who (1981 a) com modificações. Os ovos de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Osvaldo Cruz – RJ. Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 mL de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a  $27 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $80 \pm 5\%$ . A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (Aldon Basic, MEP 200 Complex) do período de eclosão até o 3° estágio larval. Soluções de concentração de 1.000  $\mu\text{g/mL}$  dos extratos e frações, foram preparadas e solubilizadas em 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas com água sem cloro nas concentrações de 250, 500 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  para os testes. As amostras foram colocadas em copo de plástico contendo 15 larvas nos 1°, 2°, 3° e 4° estádios e o volume foi completado para 5 mL. Para cada concentração foram usadas 10 larvas em triplicata. Solução aquosa de DMSO 0,5 % foi utilizada em triplicata como controle negativo.



O inseticida utilizado como controle positivo foi o temefós grau técnico 90% lote 005/2011 fabricado por laboratórios “Fersol Mairinque”, São Paulo, e feita a calibração segundo o protocolo recomendado pela Organização Mundial da Saúde descrito em Who (1981 a,b), Lima et al. (2003), Braga et al. (2004) utilizando como concentração diagnóstico (CD) 0,060 mg/mL (duas vezes a concentração letal que causa mortalidade de 99% de uma cepa susceptível, como definido. O protocolo compreende a resposta de mortalidade frente à exposição em concentração diagnóstico (CD) na exposição a um gradiente de concentrações (concentrações múltiplas - CM). A atividade larvicida foi avaliada após 24 h por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas (WHO, 1981a). Os valores da dose letal ( $DL_{50}$ ) em  $\mu\text{g/mL}$  foram determinados utilizando o método de análise Probitos (FINNEY, 1971).

#### 4.12.2 Avaliação da morfologia interna e externa das larvas

Larvas no 4º estágio foram selecionadas para os ensaios, por apresentarem tecidos mais desenvolvidos. As larvas coletadas foram imediatamente fixadas em 2% glutaraldeído, 2% paraformaldeído, 3% sacarose em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, e armazenadas em temperatura ambiente até o momento das análises (ARRUDA; OLIVEIRA; SILVA, 2003). As lâminas contendo as larvas foram preparadas e fotografadas usando uma câmera de vídeo digital (Leica) conectado a um microscópio invertido Zeiss (500  $\mu\text{m}$ ).

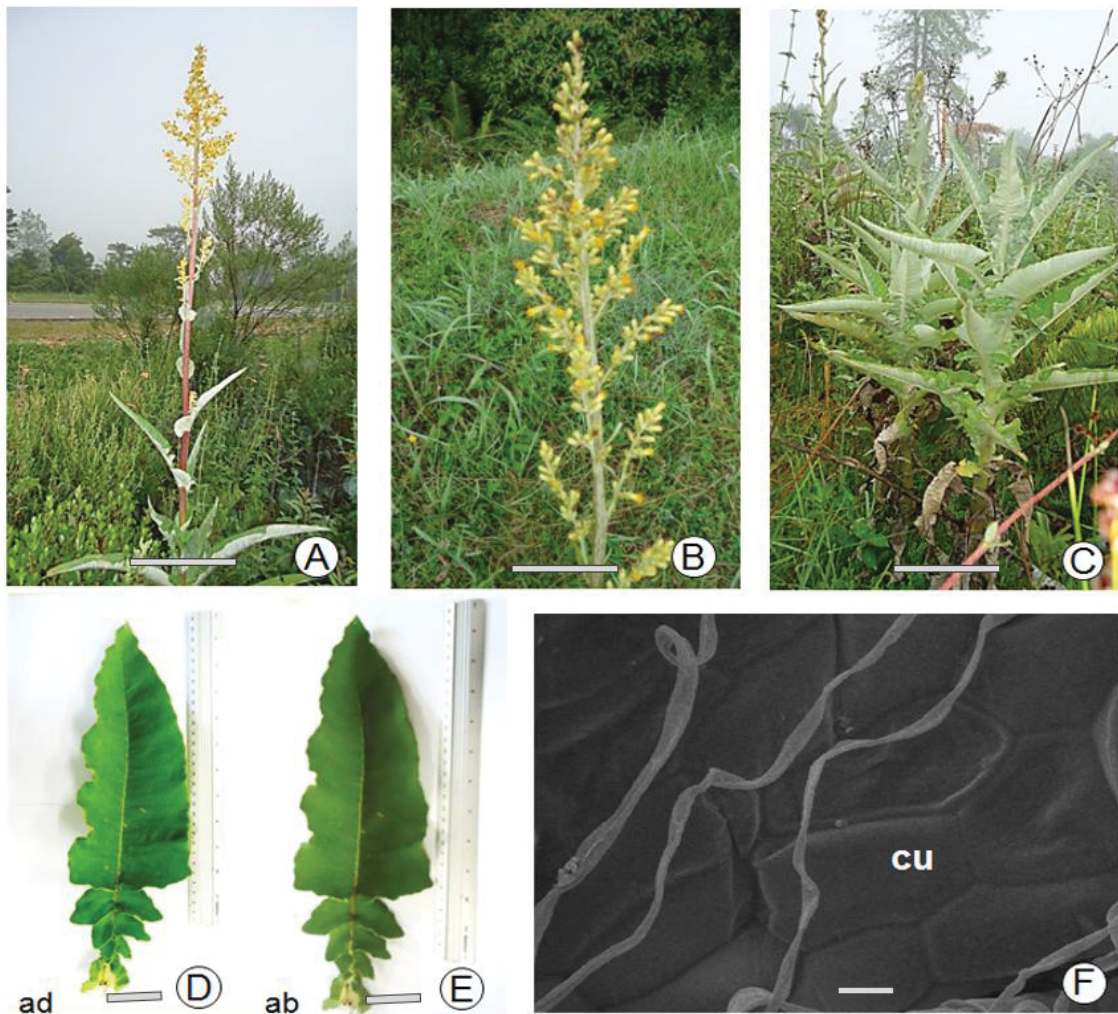
As larvas de *Aedes aegypti* foram avaliadas por comparação de fotos obtidas com câmera Nikon Coolpix AW110, sendo fotografadas larvas do grupo de controle (água) e os grupos tratados com os extratos e frações de *S. westermanii*. Tanto a morfologia interna quanto a externa das larvas foi avaliada, conforme determinado por Fujiwara et al. (2017).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

A morfoanatomia externa da espécie *Senecio westermanii* Dusén está representada na (FIGURA 10A, 10B, 10C, 10D e 10E).

FIGURA 10 – MORFOANATOMIA DA ESPÉCIE *Senecio westermanii* Dusén



NOTA: A, B e C: DETALHE DE *S. westermanii* NO AMBIENTE NATURAL E ASPECTOS DOS ÓRGÃOS VEGETATIVOS E REPRODUTIVOS; D: FOLHA FACE ADAXIAL; E: FOLHA FACE ABAXIAL; F: FACE ADAXIAL EXIBINDO CUTÍCULA LISA; ad: ADAXIAL; ab: ABAXIAL; cu: CUTÍCULA. ESCALA: 10  $\mu$ m (F); 10 cm (D,E); 20 cm (A,B,C).

FONTE: O autor (2018).

O estudo morfoanatômico externo foi realizado por Cabrera (1957), que qualificou a espécie como uma erva perene com caule ereto, simples com cerca de

dois metros de altura. Folhas alternadas, triangular, pontiaguda, sinuada-dentada na margem, com comprimento total da folha de 30-40 cm, por 4-9 cm de largura. Capítulos muito numerosos, discóides, dispostos em panículas onduladas definidas; pedicelos de 4-8 mm, tomentosos, com alguma bractéola linear. Invólucro acampanado, 8-9 mm de altura, cerca de 5 mm de diâmetro; bractéolas do cálculo numerosas, longas lineares; brácteas involucrais em torno de 10, lanceoladas, agudas ou subobtusas no ápice, onde elas carregam uma mancha escura, lanuginosa em corola filiforme e estilo longo exerto; os do disco 8-14, hermafroditas, com corola tubular de 7 mm, pentalobada no ápice: lóbulos lanceolados, de cerca de 2 mm, com veia central. Anteras sagitada na base. Ramos do estilo truncado e logo papiloso no ápice. Aquênio cilíndrico, pentacostado, glabro, 5 mm de comprimento. Pappus branco, 6 mm de comprimento.

Muitas das características encontradas para a espécie *S. westermanii* vão de encontro as diversas espécies do gênero *Senecio* L., porém que podem variar nas características específicas para cada uma das espécies. Em geral, o gênero *Senecio* L. são ervas a arbustos, eretos, anuais ou perenes. Indumento de tricomas tectores nas folhas. Folhas simples e alternas; lâmina inteira, denteada. Capítulos homógamos ou heterógamos, discóides ou radiados, receptáculo alveolado; cálculo com anteras exsertas, base sagitada ou obtusa, apêndice 3-21 brácteas; invólucro campanulado com 6-35 do conectivo deltoide, oblongo ou oblongo-deltoide; brácteas. Capítulos discóides, flores bissexuadas, ramos do estilete divergentes, bífidos com ápices corola tubulosa, 5-lobada. Capítulos radiados, flores truncados e envoltos por uma coroa de tricomas (OLIVEIRA; SILVA; TELES, 2015).

#### 5.1.1 Estudo da lâmina da folha de *Senecio westermanii*

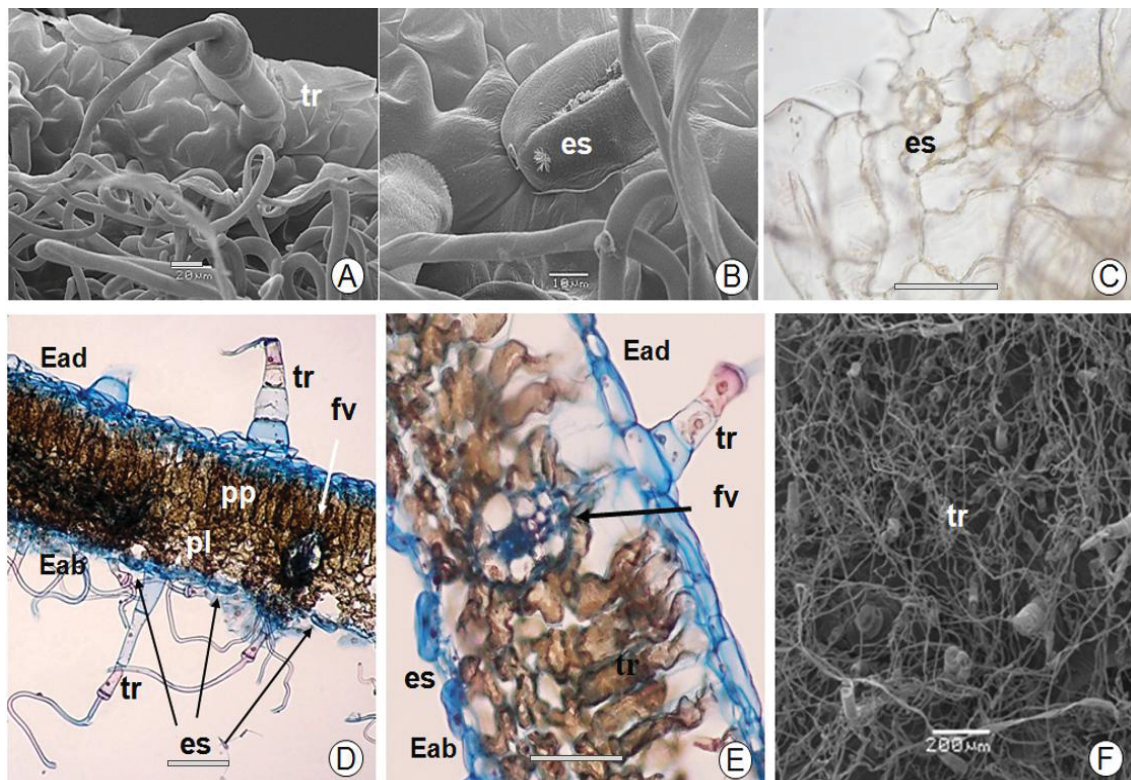
Na análise anatômica da lâmina foliar de *S. westermanii*, em secção transversal, as células epidérmicas da face adaxial são, comparativamente, maiores que as células da face abaxial (FIGURA 11E). Em vista frontal, o revestimento epidérmico apresenta paredes anticlinais onduladas e delgadas, em ambas as faces. A cutícula mostra-se lisa e delgada em ambas as superfícies (FIGURA 10F).

A folha é anfiestomática e os estômatos são do tipo anomocítico (FIGURA 11C) e estão localizados acima do nível das demais células epidérmicas (FIGURA



11B). Pode-se notar também os estômatos estão notavelmente em maior quantidade na face abaxial em relação à face adaxial. A característica anfiestomática da folha é relatada para a família Asteraceae (ARANTES et al., 2005; MILAN; HAYASHI; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, 2006) e diversas espécies do gênero *Senecio* possuem as folhas com essa característica como pode se observar em *S. leptolobus* (MARTINS, 2003), *S. leptoschizus* (MEIRA; MARTINS, 2003), *S. juergensii* (BAGATINI, 2008), *S. albopurpureus*, *S. echaetus*, *S. laetus*, *S. nudicaulis*, *S. ramosus* e *S. raphanifolius* (SHRESTHA; BAJRACHARYA, 2015). Além disso, as espécies *S. juergensii* (BAGATINI, 2008), *S. nudicaulis* e *S. ramosus* apresentaram estômatos anomocítico.

FIGURA 11 – MORFOLOGIA INTERNA E ESTRUTURAS DAS FOLHAS DE *Senecio westermanii* Dusén



NOTA: A e B: EPIDERME DE FOLHA EM VISTA FRONTAL; A: FACE ABAXIAL EXIBINDO TRICOMA TECTOR; B: FACE ABAXIAL EXIBINDO ESTÔMATO E CUTÍCULA LISA; C: EPIDERME ADAXIAL EM VISTA FRONTAL; D e E: LÂMINA FOLIAR REVELANDO MESOFILO DORSIVENTRAL; F: FACE ABAXIAL EXIBINDO TRICOMAS TECTOSES; Ead: EPIDERME ADAXIAL; Eab: EPIDERME ABAXIAL; cu: CUTÍCULA; es: ESTÔMATO; fv: FEIXE VASCULAR; pl: PARÊNQUIMA LACUNOSO; pp: PARÊNQUIMA PALIÇÁDICO; tr: TRICOMA. ESCALA: 10  $\mu\text{m}$  (B); 20  $\mu\text{m}$  (A); 50  $\mu\text{m}$  (C); 100  $\mu\text{m}$  (E); 200  $\mu\text{m}$  (D, F).

FONTE: O autor (2018).

Em relação às outras espécies do gênero *Senecio*, as folhas de *S. acaulis*, *S. herreianus* e *S. crassissimus* apresentaram-se hipoestomáticas (OZEROVA; TIMONIN, 2009), o mesmo ocorreu para a espécie *S. emiloides*, porém para a espécie *S. leptoschizus* as folhas são anfiestomáticas (MEIRA; MARTINS, 2003). Porém não houve semelhança no tipo de estômato encontrado, demonstrando que espécies do mesmo gênero podem apresentar diferenças na composição dos anexos foliares.

Os tricomas estão presentes em ambas as faces (FIGURA 11D) da lâmina foliar e são tectores multicelulares unisseriados. Apresentam-se em grande quantidade na face abaxial (FIGURA 11D e 11F), normalmente com duas a três células e uma estrutura terminal flageliforme muito alongada (FIGURA 11A e 11D). Na face adaxial também são encontrados os tricomas tectores multicelulares unisseriados, com uma a cinco células, estando em menor quantidade que na face abaxial, porém apresentam-se mais espessos que os outros e também com uma terminação flageliforme (FIGURA 11D).

As espécies *S. radicans*, *S. citrifomis*, *S. ficoides* e *S. serpens* (TIMONIN; OZEROVA; REMIZOWA, 2006) apresentaram tricomas semelhantes aos encontrados para *S. westermanii*. Apesar disso, os tricomas são utilizados para auxiliar na identificação, devido as diversas formas existentes. As plantas geralmente apresentam tricomas de um tipo específico, variando de uma espécie a outra mesmo pertencendo ao mesmo gênero (CUTLER; BOTHA; STEVENSON, 2011).

Hidatódios são frequentemente encontrados associados aos dentes marginais das folhas de espécies da família Asteraceae, apesar de serem pouco especializados e muito simples em comparação a outras famílias, porém essas estruturas apresentam-se funcionais (SMILJANIC, 2005). No gênero *Senecio* os hidatódios estão presentes em *S. stigophlebius* (MEIRA; MARTINS, 2003), *S. icoglossus*, *S. pulcher*, *S. pluricephalus*, *S. brasiliensis*, *S. linguei*, *S. polhii*, *S. pseudopolhii*, *S. oleosus*, *S. oxyphyllus*, *S. heterotrichus*, *S. selloi* e *S. aureus* (MARTINS, 2003). Apesar de diversas espécies com a presença de hidatódios, estes não foram visualizados na espécie *S. westermanii*.

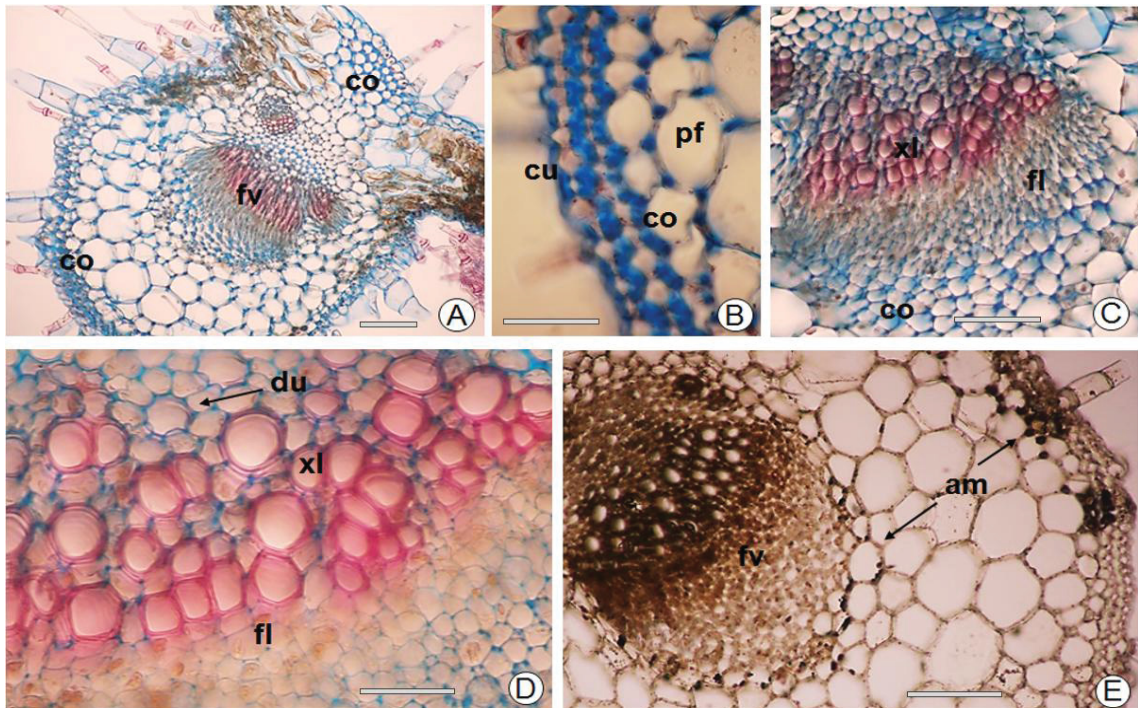
O mesofilo em Asteraceae é variável, sendo na maioria dorsiventral, porém podem ser encontrados os tipos homogêneo em paliçada ou isobilateral (EMPINOTTI; DUARTE, 2006). Na espécie em estudo, o mesofilo é dorsiventral,

sendo constituído por uma camada de parênquima paliçádico e 2 a 4 camadas de parênquima lacunoso, estabelecendo espaços intercelulares. O parênquima lacunoso ocupa cerca de 2/3 do mesofilo. Feixes vasculares de pequeno porte do tipo colateral estão distribuídos na região mediana do mesofilo e são envoltos por bainha parenquimática (FIGURA 11E). Mesofilo dorsiventral também foi encontrado em *S. emilioides*, *S. leptoschizus* (MEIRA; MARTINS, 2003) e *S. juergensii* (BAGATINI, 2008).

### 5.1.2 Nervura central da folha de *Senecio westermanii*

A nervura central, em secção transversal, possui formato praticamente plano-convexo (FIGURA 12A), estabelecendo evidente curvatura junto à face abaxial.

FIGURA 12 – NERVURA CENTRAL DAS FOLHAS DE *Senecio westermanii* Dusén



NOTA: A: NERVURA CENTRAL EM CORTE TRANSVERSAL CORADA COM FUCSINA BÁSICA E AZUL DE ASTRA; B: DETALHE DA CUTÍCULA E COLÊNQUIMA; C: NERVURA CENTRAL EM REAÇÃO COM LUGOL; D: DETALHE DO CILÍNDRIO VASCULAR; E: DETALHE DA FRAÇÃO COM LUGOL EVIDENCIANDO AMIDO; Am: AMIDO; co: COLÊNQUIMA; cu: CUTÍCULA; du: DUCTO SECRETOR; fl: FLOEMA; fv: FEIXE VASCULAR; pf: PARÊNQUIMA FUNDAMENTAL; xl: XILEMA. ESCALA: 50 µm (B,D); 100 µm (E,C); 200 µm (A).

FONTE: O autor (2018).



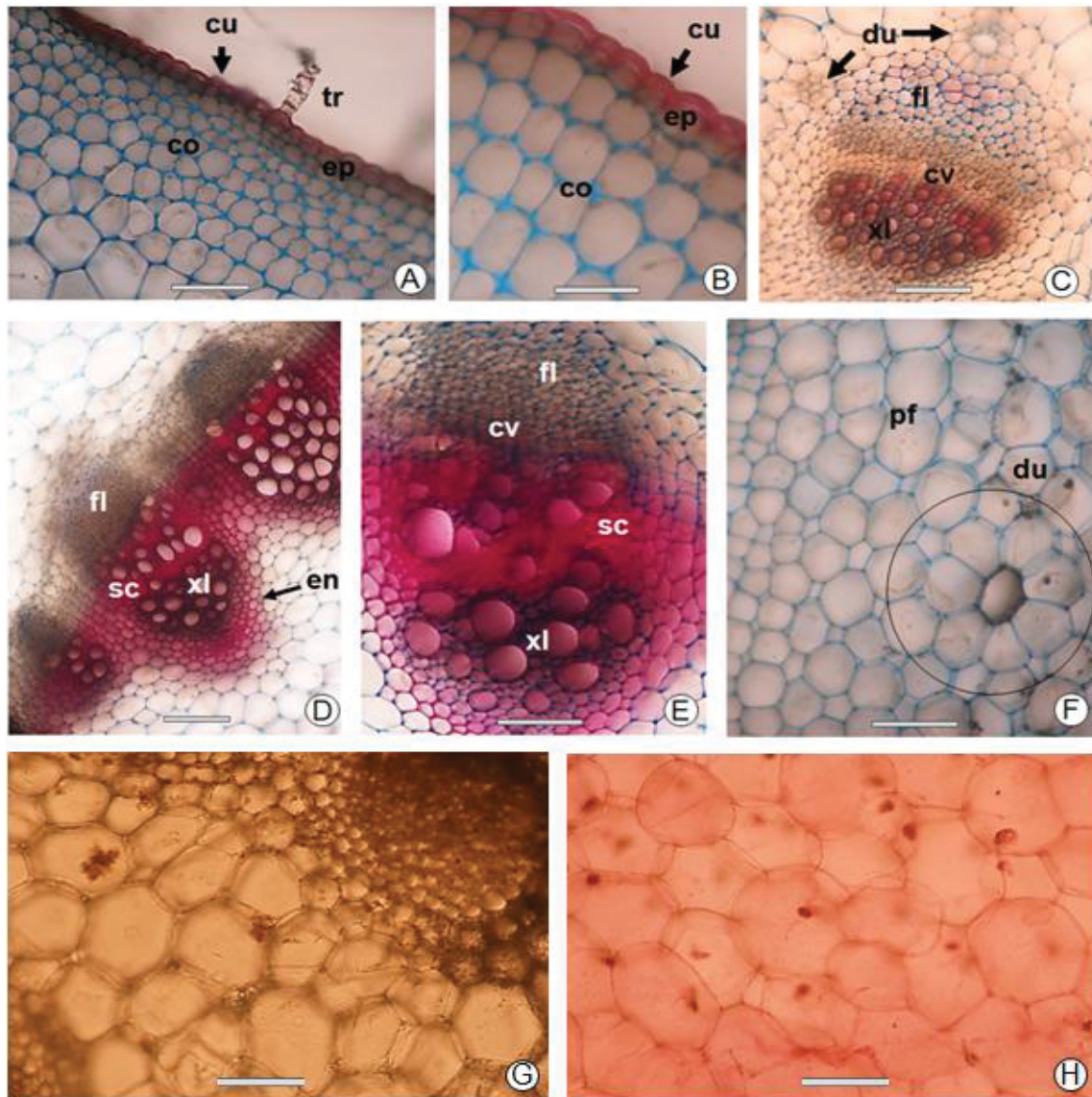
A epiderme uniestratificada é revestida por cutícula lisa e delgada (FIGURA 12B) e são encontradas 2-3 camadas de colênquima angular em ambas as faces (FIGURA 12A). Além disso é possível observar a presença de calotas de colênquima voltadas para o xilema e floema (FIGURA 12C). O feixe vascular é colateral e ductos secretores estão presentes no parênquima fundamental próximo ao xilema e floema (FIGURA 12D). Grãos de amido em pequena quantidade foram observados próximo ao feixe vascular e também na região cortical após reação com lugol 1% (FIGURA 12E).

### 5.1.3 Caule de *Senecio westermanii*

O caule de *S. westermanii* seccionado transversalmente mostrou formato praticamente circular. A epiderme é uniestratificada e a cutícula mostra-se delgada e lisa com presença de poucos tricomas tectores (FIGURA 13A e 13B). Adjacente à epiderme, encontra-se um córtex com cerca de 14 camadas com células arredondadas, colênquima angular em que os espessamentos das paredes celulares ocorrem principalmente nos ângulos resultantes da união de várias células. Ductos secretores são encontrados no parênquima fundamental e próximos ao xilema e floema (FIGURA 13C).

O cilindro vascular é contínuo contendo células parênquimáticas entre os conjuntos de xilema e floema, sendo os mesmos circundados por uma ou duas camadas de endoderme (FIGURA 13D e 13E). Apresenta um câmbio formando o xilema para dentro e o floema para fora. (FIGURA 13E).

O esclerênquima está presente entre os elementos de vaso do xilema. Como esperado a reação com fluoroglucina clorídrica foi positiva evidenciando a presença de lignina nos elementos de vaso e no esclerênquima (FIGURA 13F). A presença de compostos fenólicos é evidenciado pela coloração marrom escuro na (FIGURA 13G) e a (FIGURA 13H) expõe o caule com ausência de compostos lipofílicos.

FIGURA 13 – CAULE EM CORTE TRANSVERSAL DE *Senecio westermanii* Dusén

NOTA – A e B: MOSTRANDO EPIDERME, CUTÍCULA, TRICOMA E COLÊNQUIMA; C: INDICANDO FEIXE VASCULAR E DUCTOS SECRETORES; D: CILINDRO VASCULAR MOSTRANDO FIBRAS E ENDODERME; E: DETALHE DO XILEMA, FLOEMA ESCLERÊNQUIMA E CÂMBIO VASCULAR; F: DETALHE DO XILEMA E ESCLERÊNQUIMA COM REATIVO DE FLOROGLUCINA CLORÍDRICA; co: COLÊNQUIMA; cu: CUTÍCULA; cv: CÂMBIO VASCULAR; du: DUCTO SECRETOR; en: ENDODERME; ep: EPIDERME; fl: FLOEMA; sc: ESCLERÊNQUIMA; tr: TRICOMA; xl: XILEMA. ESCALA: 50  $\mu\text{m}$  (B,E,F,G,H); 100  $\mu\text{m}$  (A,C,D).

FONTE: O autor (2018).

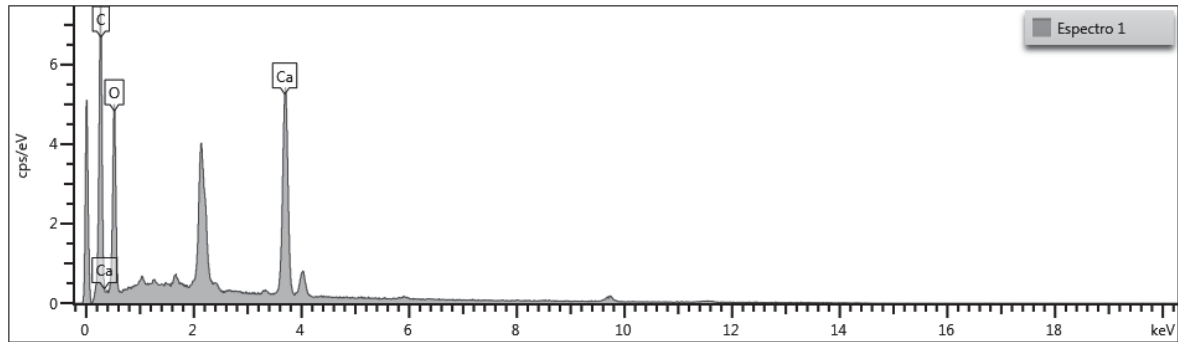
#### 5.1.3.1 Sal $\text{CaC}_2\text{O}_4$

Por espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) foi possível caracterizar a presença do oxalato de cálcio ( $\text{CaC}_2\text{O}_4$ ) na região parenquimática do



caule. O resultado da análise está representado na (FIGURA 14) através do espectro de soma de mapas.

FIGURA 14 – ESPECTRO DE SOMA DE MAPAS DO  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  DE *Senecio westermanii*



FONTE: O autor (2018).

Na (TABELA 2) está a porcentagem da representação elementar para cada íon presente na molécula do  $\text{CaC}_2\text{O}_4$ .

TABELA 2 – REPRESENTAÇÃO ELEMENTAR DO SAL  $\text{CaC}_2\text{O}_4$

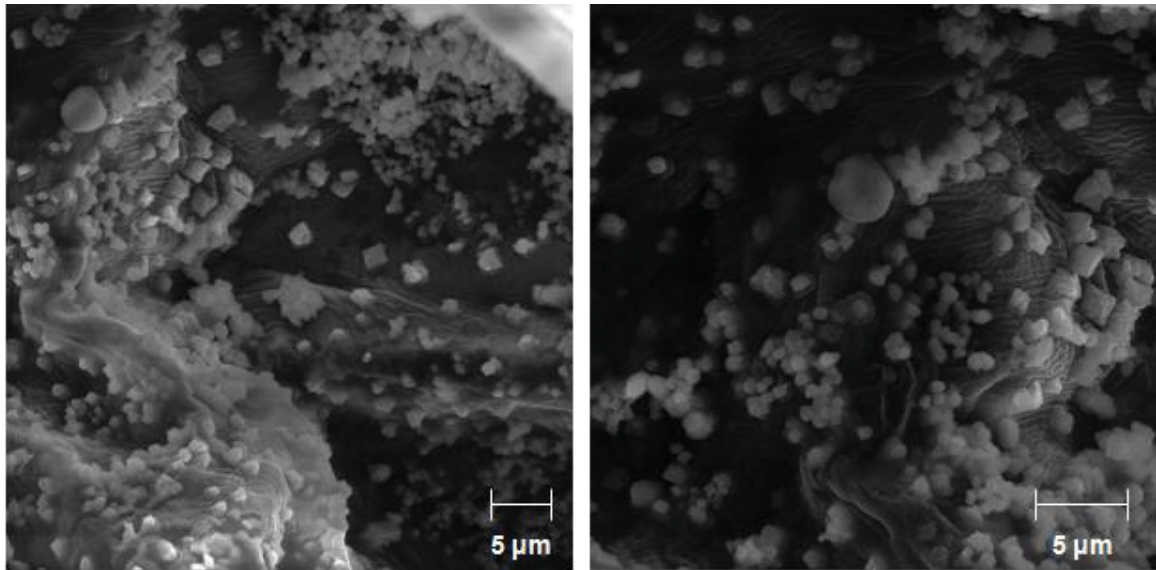
ELEMENTO	Wt%	SIGMA Wt%
C	23,53	0,21
O	66,62	
Ca	9,84	0,08
Total	100,00	

FONTE: O autor (2018).

Swiech et al. (2016) detectou a presença de  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  em *Philodendron meridionale* (Araceae), sendo o gráfico de soma de massas muito semelhante ao encontrado para o presente estudo.

Além disso, a presença do oxalato de cálcio foi detectado através da análise de MEV, onde observou a presença desse sal na região parenquimática do caule de *S westermanii* (FIGURA 15).

FIGURA 15 – SAL DE  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  NA REGIÃO PARENQUIMÁTICA DO CAULE DE *Senecio westermanii*



FONTE: O autor (2018).

O cálcio é considerado um macronutriente essencial para o desenvolvimento e crescimento das plantas (BENITES, 2010). O cálcio é um importante componente da parede celular, auxiliando o crescimento apical nas raízes e partes aéreas, sendo absorvido na forma de  $\text{Ca}^{2+}$  pelas plantas (DEON, 2007). De acordo com Dunisch et al. (1998) o cálcio é essencial para a síntese da parede celular na fase secundária do desenvolvimento e no processo de lignificação. Além disso, a permeabilidade das membranas a compostos hidrofílicos depende consideravelmente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  e de  $\text{H}^+$  no meio (FAQUIN, 2005).

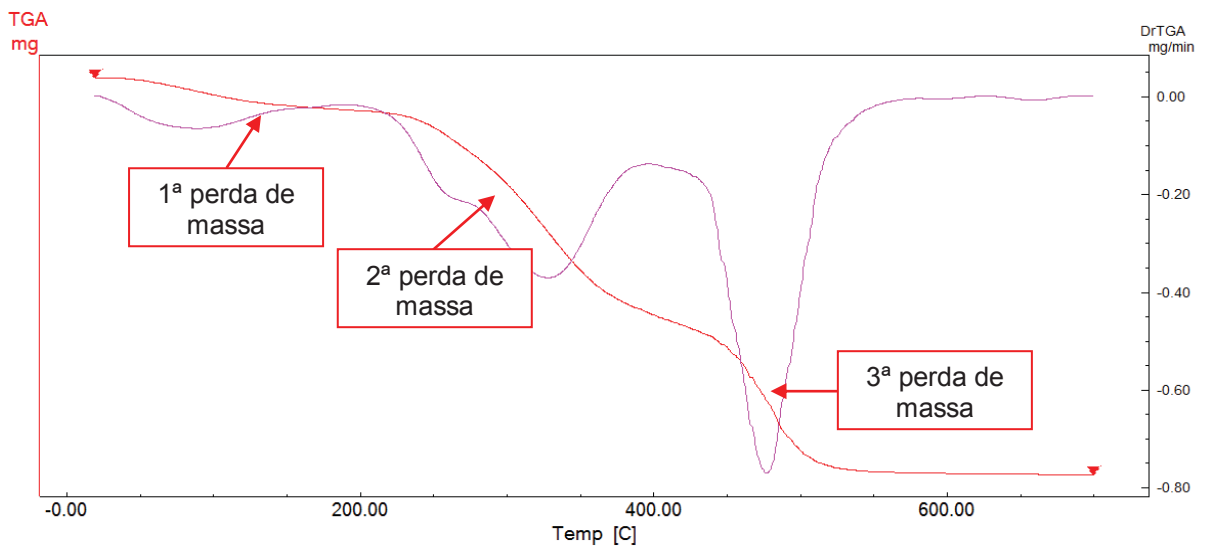
O oxalato de cálcio é conhecido como um produto extremamente tóxico do metabolismo da planta e a formação de cristais de cálcio, a partir do oxalato, poderia servir como forma de eliminação, além disso o oxalato de cálcio é um produto onde os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  são derivados do meio ambiente e os íons de oxalato provém do metabolismo das plantas, sendo que sua presença pode ser benéfica em uma ou mais fases do ciclo de vida dos vegetais. Além disso, a presença do oxalato de cálcio no caule pode estar relacionado com a função de proteção contra herbivoria, balanço iônico e suporte estrutural (NAVARRO et al., 2007).

## 5.2 ANÁLISE TÉRMICA

### 5.2.1 Análise termogravimétrica (TGA) e gravimétrica

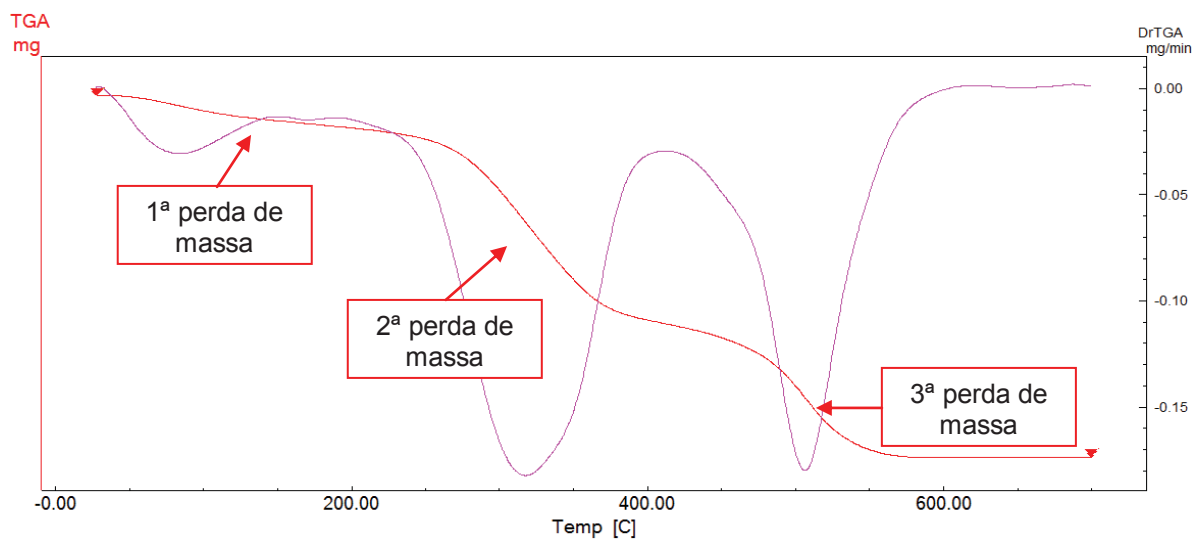
A análise termogravimétrica da raiz, caule e folha secas de *S. westermanii* foram avaliadas através da curva TGA e os resultados para a raiz, caule e folha estão representados nas (FIGURAS 16, 17 e 18), respectivamente.

FIGURA 16 – RESULTADO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA RAIZ SECA DE *Senecio westermanii*, REPRESENTANDO A PERDA DE MASSA EM TRÊS FASES DISTINTAS



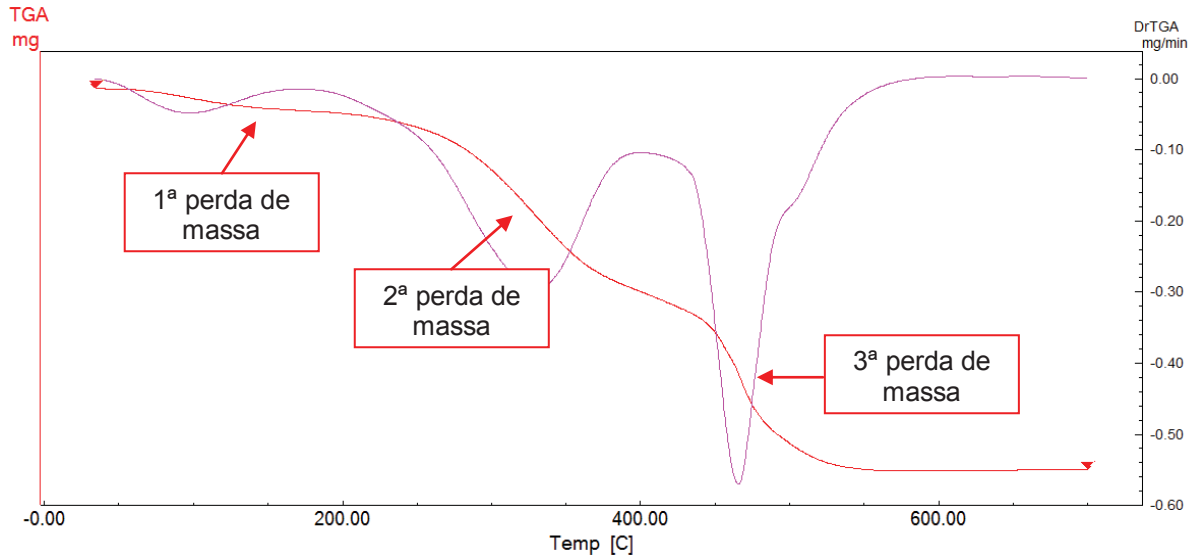
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 17 – RESULTADO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DO CAULE SECO DE *Senecio westermanii*, REPRESENTANDO A PERDA DE MASSA EM TRÊS FASES DISTINTAS



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 18 – RESULTADO DA ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA DA FOLHA SECA DE *Senecio westermanii*, REPRESENTANDO A PERDA DE MASSA EM TRÊS FASES DISTINTAS



FONTE: O autor (2018).

Durante o processo de análise térmica para as amostras de *S. westermanii* observou-se três etapas de perda de massa. A primeira etapa ocorreu na temperatura inicial do experimento em torno de 20 °C até, aproximadamente, 190 °C de acordo com a (TABELA 3). Essa primeira perda massa está relacionada com o processo de desidratação, que constitui a saída da água de adesão presente na parede celular e que necessita de energia para ser retirada do vegetal, sendo esta fase, portanto, endotérmica (PEREIRA et al., 2013).

TABELA 3 – FAIXA DE TEMPERATURA NA PERDA DE ÁGUA PELO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO DO CAULE, FOLHA E RAÍZ DE *Senecio westermanii*

<i>S. westermanii</i>	RAIZ	CAULE	FOLHA
T inicial (°C)	19,63	27,35	33,92
T final (°C)	188,41	186,26	170,22

FONTE: O autor, 2018.

Em comparação com o método gravimétrico, houve diferença nos valores para a perda de água das amostras em relação ao método termogravimétrico conforme (TABELA 4).

TABELA 4 – COMPARAÇÃO DA PERDA DE ÁGUA PELOS MÉTODOS GRAVIMÉTRICO E TERMOGRAVIMÉTRICO PARA O CAULE, FOLHA E RAÍZ DE *Senecio westermanii*

<i>S. westermanii</i>	RAIZ	CAULE	FOLHA
Gravimétrico (%)	13,70	16,21	13,60
Termogravimétrico (%)	7,73	6,97	5,05

FONTE: O autor, 2018.

A perda de água para os métodos gravimétrico e termogravimétrico apresentaram resultados diferentes quando comparados um ao outro (TABELA 4). Isso pode ser justificado pela maior precisão do método termogravimétrico em relação ao método gravimétrico convencional.

Após a desidratação, a curva TGA detectou mais dois eventos térmicos: o primeiro, iniciando em torno de 180 °C até 400 °C com perda de massa de 45,81%, 42,98% e 40,46%, respectivamente, para raiz, caule e folha, revelando o início da decomposição térmica da amostra em material carbonáceo, como carboidratos (ARAÚJO et al., 2006), taninos e flavonoides (SOUZA, 2015) e degradação térmica dos triglicerídeos, principalmente os constituídos por ácidos graxos poli-insaturados (BENÍCIO; QUEIROGA NETO; SOUSA, 2009).

A análise termogravimétrica em uma matriz vegetal é complexa, sendo o comportamento cinético comandado pelas substâncias majoritárias. Nas folhas, caules e nas raízes vegetais existem uma grande quantidade de graxas, metabólitos secundários, resinas, fibras (hemicelulose e celulose) e lignina nas amostras, fazendo com que estas substâncias interfiram no comportamento cinético de reação (ARAGÃO et al., 2002).

O último evento de perda de massa detectado corresponde à queima do material carbonáceo formado na etapa anterior com 37,70%, 28,76% e 40,08%, respectivamente, para raiz, caule e folha. Acima de 600 °C pode-se encontrar o teor de cinzas que corresponde aos sais minerais ou impurezas contidas na amostra, considerando que a análise foi realizada sob fluxo de ar sintético e que podem ser comparados aos valores obtidos através do método gravimétrico convencional através da (TABELA 5).

TABELA 5 – ANÁLISE COMPARATIVA DO TEOR DE CINZAS DETERMINADO ATRAVÉS DO MÉTODO GRAVIMÉTRICO CONVENCIONAL E DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA CAULES, FOLHAS E RAÍZES DE *Senecio westermanii*

<i>S. westermanii</i>	RAIZ	CAULE	FOLHA
Método gravimétrico	7,82	3,38	7,48
Método termogravimétrico	8,74	21,30	14,40

FONTE: O autor (2018).

Sob efeito de comparação entre os métodos utilizados, observou-se uma diferença significativa no teor de cinzas para caules e folhas de *S. westermanii*, sendo equivalente apenas com os resultados obtidos para as raízes. Esse fato demonstra a possibilidade da ocorrência de mais um evento de degradação térmica para caules e folhas, o qual originaria as cinzas, não tendo sido detectado durante a análise termogravimétrica, possivelmente pela faixa de temperatura atingida durante o experimento.

Os dados apresentados são considerados parâmetros de qualidade, e são amplamente utilizados para garantir a confiabilidade dos vegetais utilizados na produção de medicamentos fitoterápicos (ALVES et al., 2007). A partir das análises gravimétricas e termogravimétricas observou-se diferença nos resultados apresentados, mostrando que através da análise das curvas de TGA tem-se uma maior precisão dos resultados em relação a perda de massa das amostras analisadas.

Para as amostras de raiz, caule e folha de *S. westermanii* ainda foram realizadas as comparações de perda de massa quando as amostras foram submetidas às atmosferas de N<sub>2</sub> e ar sintético. Nas (TABELAS 6 e 7) estão expostos os resultados para temperatura inicial e final para cada etapa do processo, porém a quantidade de resíduo gerado para a atmosfera de N<sub>2</sub> é praticamente o dobro em relação à atmosfera de ar sintético. Para a atmosfera de N<sub>2</sub> o resíduo variou de 31,44% a 35,50%, enquanto para a atmosfera de ar sintético variou de 8,74% a 21,30%.

Com a sobreposição das curvas TGA para as atmosferas de N<sub>2</sub> e ar sintético das amostras de raiz (FIGURA 19), caule (FIGURA 20) e folha (FIGURA 21) de *S. westermnii* pode-se observar que há uma menor perda de massa na atmosfera de N<sub>2</sub>.

TABELA 6 – PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *Senecio westermanii* NA ATMOSFERA DE NITROGÊNIO

Etapas		Folha		Caule		Raiz	
		T (°C)	%	T (°C)	%	T (°C)	%
1	T <sub>i</sub>	20	<b>9,02</b>	20	<b>11,31</b>	20	<b>7,76</b>
	T <sub>f</sub>	167		182		179	
2	T <sub>i</sub>	167	<b>42,55</b>	182	<b>41,78</b>	179	<b>46,09</b>
	T <sub>f</sub>	385		373		350	
3	T <sub>i</sub>	390	<b>16,74</b>	373	<b>11,41</b>	350	<b>14,71</b>
	T <sub>f</sub>	600		600		600	
Resíduo			<b>31,69</b>		<b>35,50</b>		<b>31,44</b>

NOTA: T<sub>i</sub>: TEMPERATURA INICIAL DA ETAPA; T<sub>f</sub>: TEMPERATURA FINAL DA ETAPA; %: PERCENTUAL DE MASSA DEGRADADA EM CADA ETAPA

FONTE: O autor (2018).

TABELA 7 – PERDA DE MASSA PERCENTUAL DETERMINADA ATRAVÉS DO MÉTODO TERMOGRAVIMÉTRICO PARA FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE *Senecio westermanii* NA ATMOSFERA DE AR SINTÉTICO

Etapas		Folha		Caule		Raiz	
		T (°C)	%	T (°C)	%	T (°C)	%
1	T <sub>i</sub>	20	<b>5,05</b>	20	<b>6,97</b>	20	<b>7,73</b>
	T <sub>f</sub>	170		186		189	
2	T <sub>i</sub>	170	<b>40,46</b>	186	<b>42,98</b>	189	<b>45,81</b>
	T <sub>f</sub>	398		408		389	
3	T <sub>i</sub>	398	<b>40,08</b>	408	<b>28,76</b>	389	<b>37,70</b>
	T <sub>f</sub>	600		600		600	
Resíduo			<b>14,40</b>		<b>21,30</b>		<b>8,74</b>

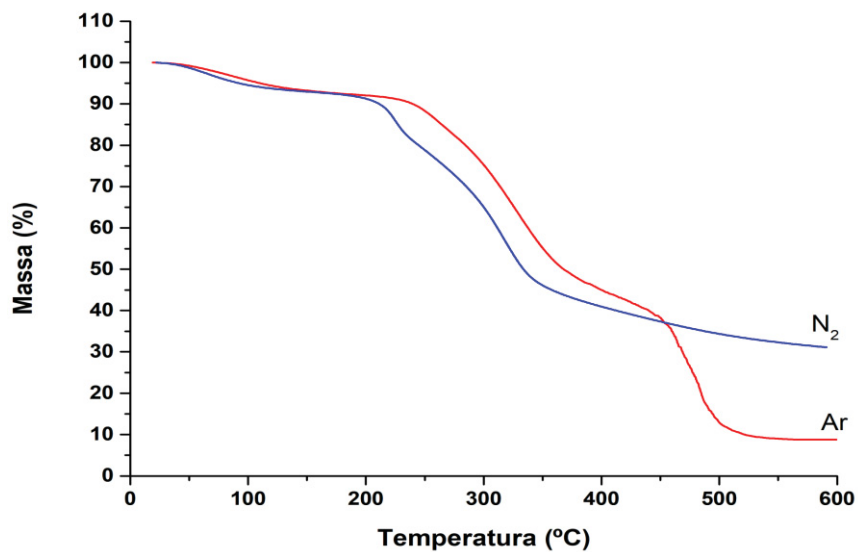
NOTA: T<sub>i</sub>: TEMPERATURA INICIAL DA ETAPA; T<sub>f</sub>: TEMPERATURA FINAL DA ETAPA; %: PERCENTUAL DE MASSA DEGRADADA EM CADA ETAPA

FONTE: O autor (2018).

Apesar da velocidade de decomposição térmica para o N<sub>2</sub> ser maior que a velocidade de decomposição térmica do ar sintético, pelo fato da condutividade

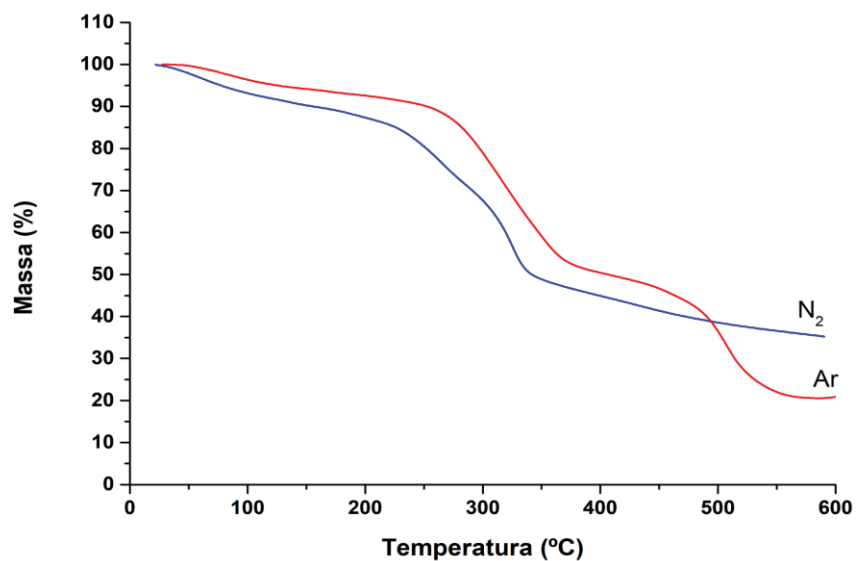
térmica do  $N_2$  ser maior que a do ar sintético (IONASHIRO; GIOLITO, 2005), o oxigênio é oxidante e consegue transformar todas as amostras em cinzas, enquanto o  $N_2$  é um gás inerte conseguindo transformar as amostras em material carbonífero, etapa anterior às cinzas. Por isso há uma menor perda de massa na atmosfera de  $N_2$  em relação a de ar sintético.

FIGURA 19 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE PERDA DE MASSA NA ATMOSFERA DE  $N_2$  E AR SINTÉTICO DAS RAÍZES SECAS DE *Senecio westermanii*



FONTE: O autor (2018).

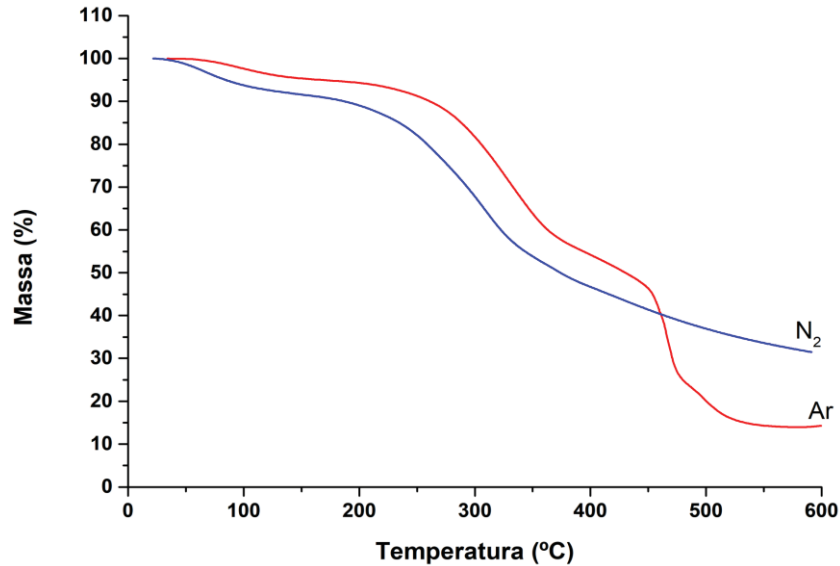
FIGURA 20 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE PERDA DE MASSA NA ATMOSFERA DE  $N_2$  E AR SINTÉTICO DOS CAULES SECAS DE *Senecio westermanii*



FONTE: O autor (2018).



FIGURA 21 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS DE PERDA DE MASSA NA ATMOSFERA DE N<sub>2</sub> E AR SINTÉTICO DAS FOLHAS SECAS DE *Senecio westermanii*



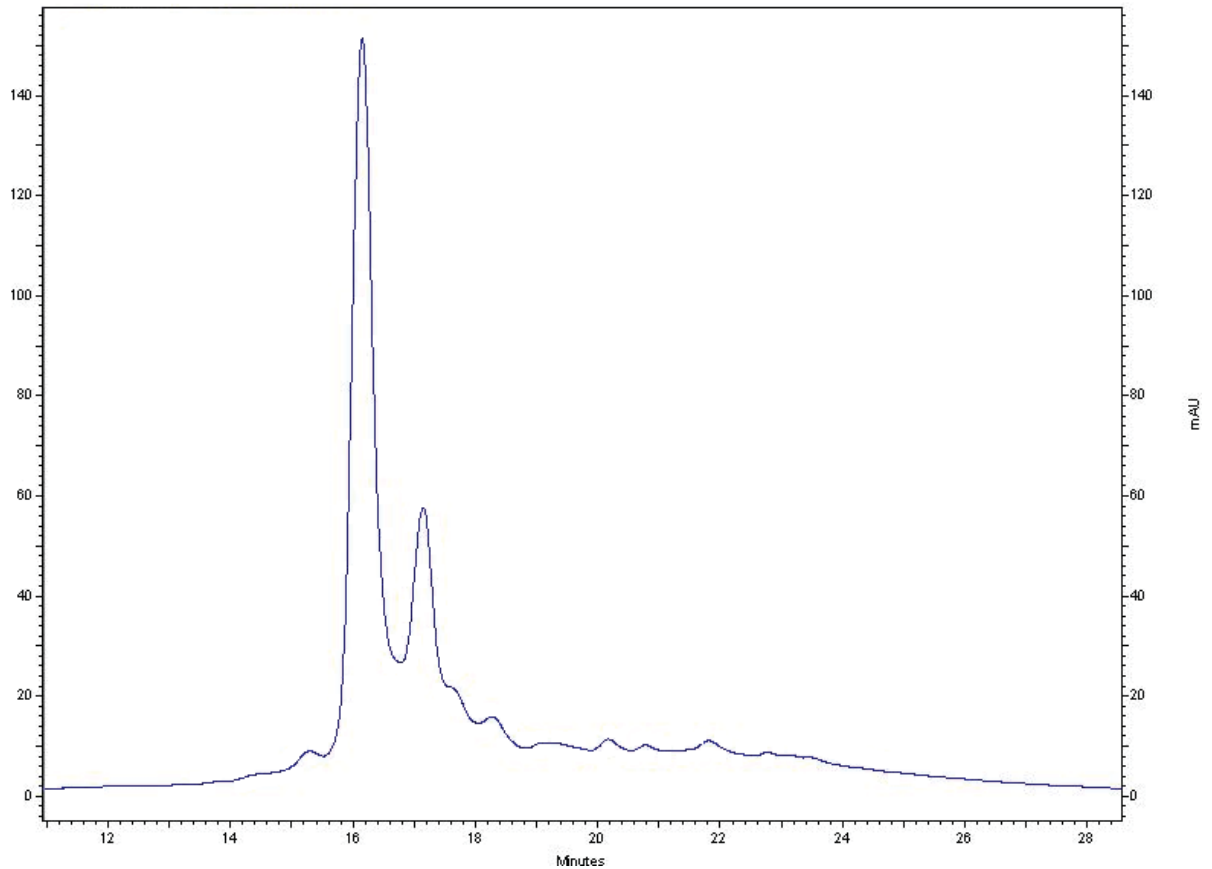
FONTE: O autor (2018).

Os parâmetros para as análises do teor de umidade e cinzas totais para raiz, caule e folha estão sendo determinados pela primeira vez para cada uma das partes da espécie *S. westermanii*. A determinação destas análises é muito importante para o controle de qualidade, uma vez que auxilia na confirmação da identidade botânica e permite a identificação de adulterações e materiais estranhos (impurezas inorgânicas) na matéria-prima vegetal (BRASIL, 2010).

### 5.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

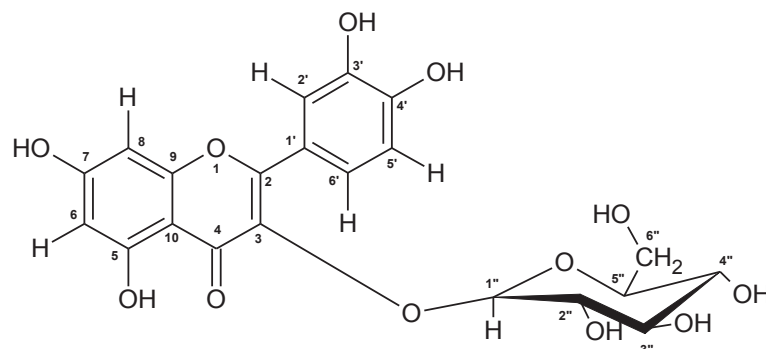
#### 5.3.1 Composto AE 110-117 (9-11)

O composto AE 110-117 (9-11) foi primeiramente detectado no CLAE no tempo de retenção de aproximadamente 16 min, apesar de estar em maior concentração na amostra analisada, porém foi detectado um sinal de menor intensidade no tempo de retenção de aproximadamente 17 min (FIGURA 22).

FIGURA 22 – ISOQUERCETINA IDENTIFICADA EM *Senecio westermanii*

FONTE: O autor (2018).

O composto AE 110-117 (9-11) apresenta-se em mistura com outro flavonoide de estrutura muito semelhante, porém apenas foi identificado a quercetin-3-o- $\beta$ -D-glucosídeo, flavonoide conhecido como isoquercetina (FIGURA 23). Baseado nos dados espectrais de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e por comparação destes com os dados encontrados na literatura (HE et al., 2017) foi possível identificar a isoquercetina (TABELA 8).

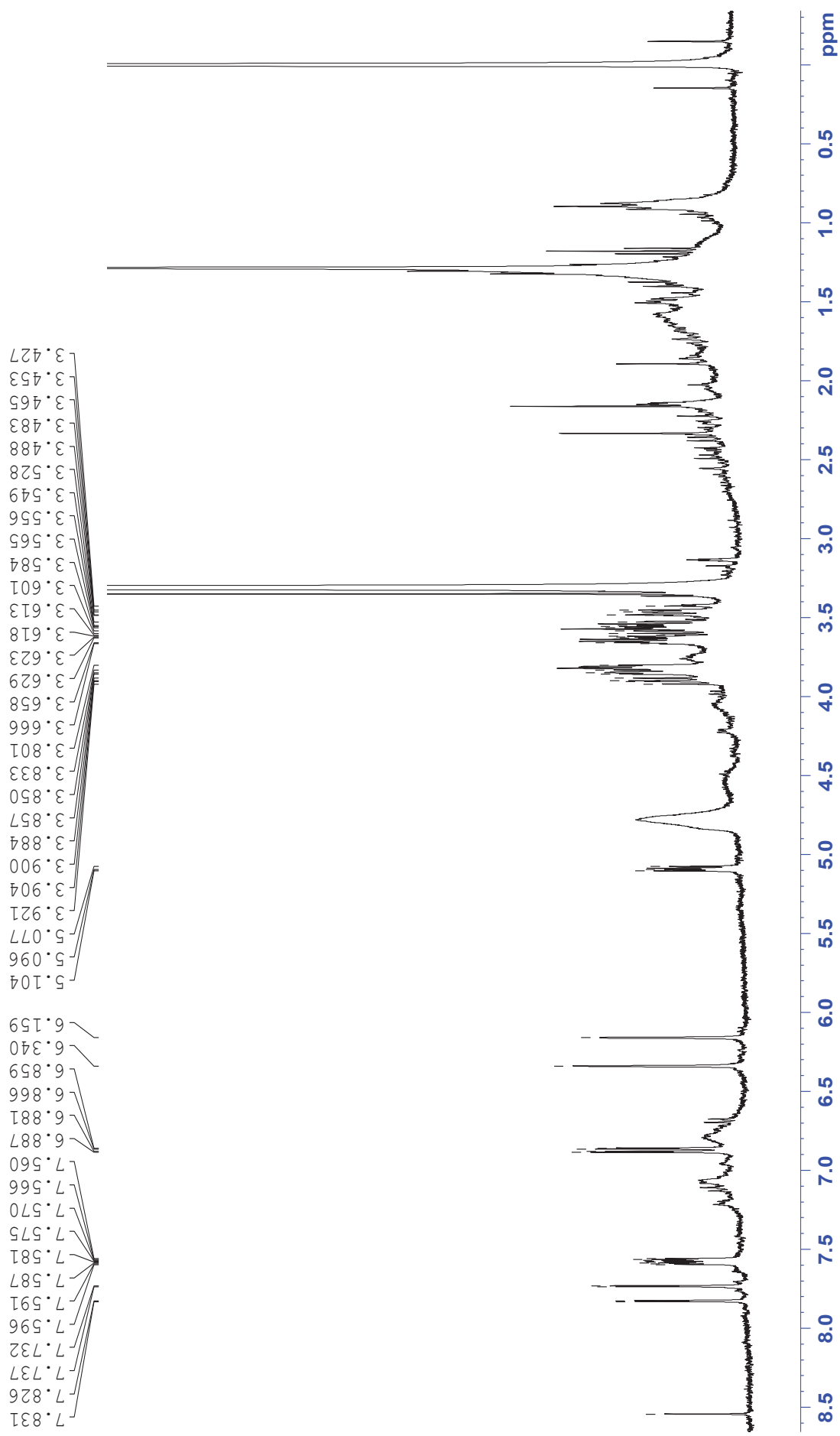
FIGURA 23 – ISOQUERCETINA IDENTIFICADA EM *Senecio westermanii*

Para identificação da isoquercetina foram utilizados aproximadamente 2 mg de material. Dessa forma seguem os seguintes deslocamentos químicos:  $\delta\text{H}$  7,73 ppm ( $J = 2,2$  Hz,  $d$ );  $\delta\text{H}$  7,58 ppm ( $J = 8,5$  e  $2,2$  Hz,  $dd$ ) e  $\delta\text{H}$  6,88 ppm ( $J = 8,5$  Hz,  $d$ ), que representam os hidrogênios presentes no anel B. Além desses sinais observam-se a presença de dois sinais de  $^1\text{H}$  em  $\delta\text{H}$  6,16 ppm ( $J = 1,7$  Hz,  $d$ ) e 6,34 ppm ( $J = 1,7$  Hz,  $d$ ), que representam os dois prótons do anel A da isoquercetina. Além disso, há o sinal de  $^1\text{H}$  em  $\delta\text{H}$  5,10 ppm ( $J = 6,6$  Hz,  $d$ ), que representa a glicose ligada no anel C da isoquercetina. O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do material analisado está representado na (FIGURA 24) e para melhor visualização do espectro obtido as (FIGURAS 25 e 26) representam os sinais ampliados para cada região. Devido a escassa quantidade de material para determinar a substância presente, fez-se correlação direta (HSQC) entre o  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  para identificar os carbonos das referidas posições da estrutura (FIGURA 27).

TABELA 8 – DESLOCAMENTO QUÍMICO NO ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  DA ISOQUERCETINA

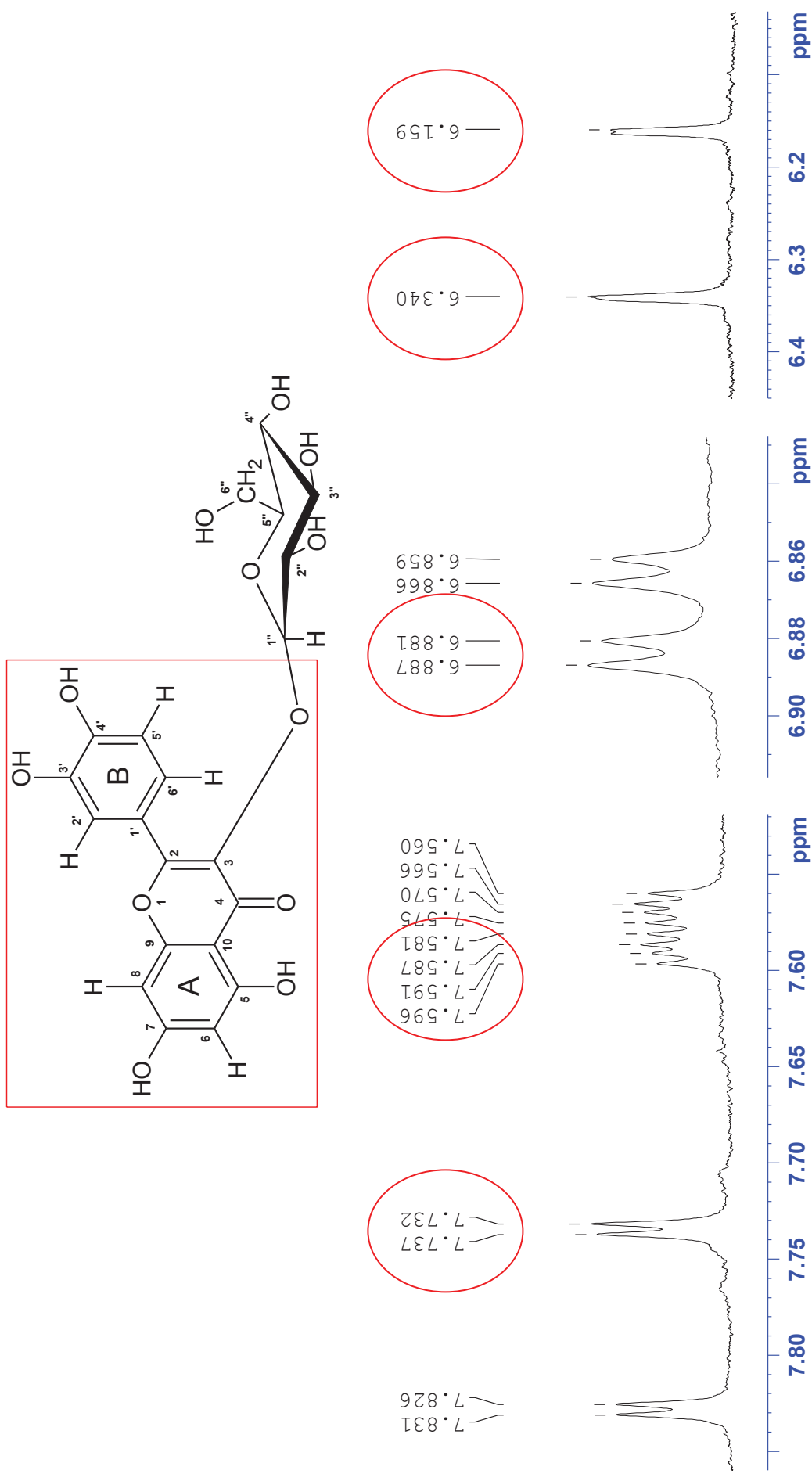
POSIÇÃO	$^{13}\text{C}$		$^1\text{H}$	
	EXPERIMENTAL	LITERATURA (HE et al., 2017)	EXPERIMENTAL	LITERATURA (HE et al., 2017)
1	-	-	-	-
2	-	158,9	-	-
3	135,3	135,6	-	-
4	-	179,4	-	-
5	-	162,9	-	-
6	101,1	99,8	6,16 d (1,7)	6,18 s
7	-	165,9	-	-
8	95,9	94,7	6,34 d (1,7)	6,37 s
9	-	158,3	-	-
10	-	105,6	-	-
1'	122,8	123,0	-	-
2'	117,1	117,6	7,73 d (2,2)	7,73s
3'	145,9	145,8	-	-
4'	149,9	149,8	-	-
5'	116,1	116,0	6,88 d (8,5)	6,88 d (8,2)
6'	122,8	123,2	7,58 dd (8,5; 2,2)	7,58 d (8,2)
1''	104,8	104,4	5,10 d (6,6)	5,25 d (7,1)
2''	-	75,7	-	-
3''	-	78,3	-	-
4''	-	71,1	-	-
5''	-	78,0	-	-
6''	-	62,5	-	3,74 d (11,8)

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 24 – ESPECTRO DE  $^1\text{H}$  PARA IDENTIFICAÇÃO DA ISOQUERCETINA EM MeOH DEUTERADO

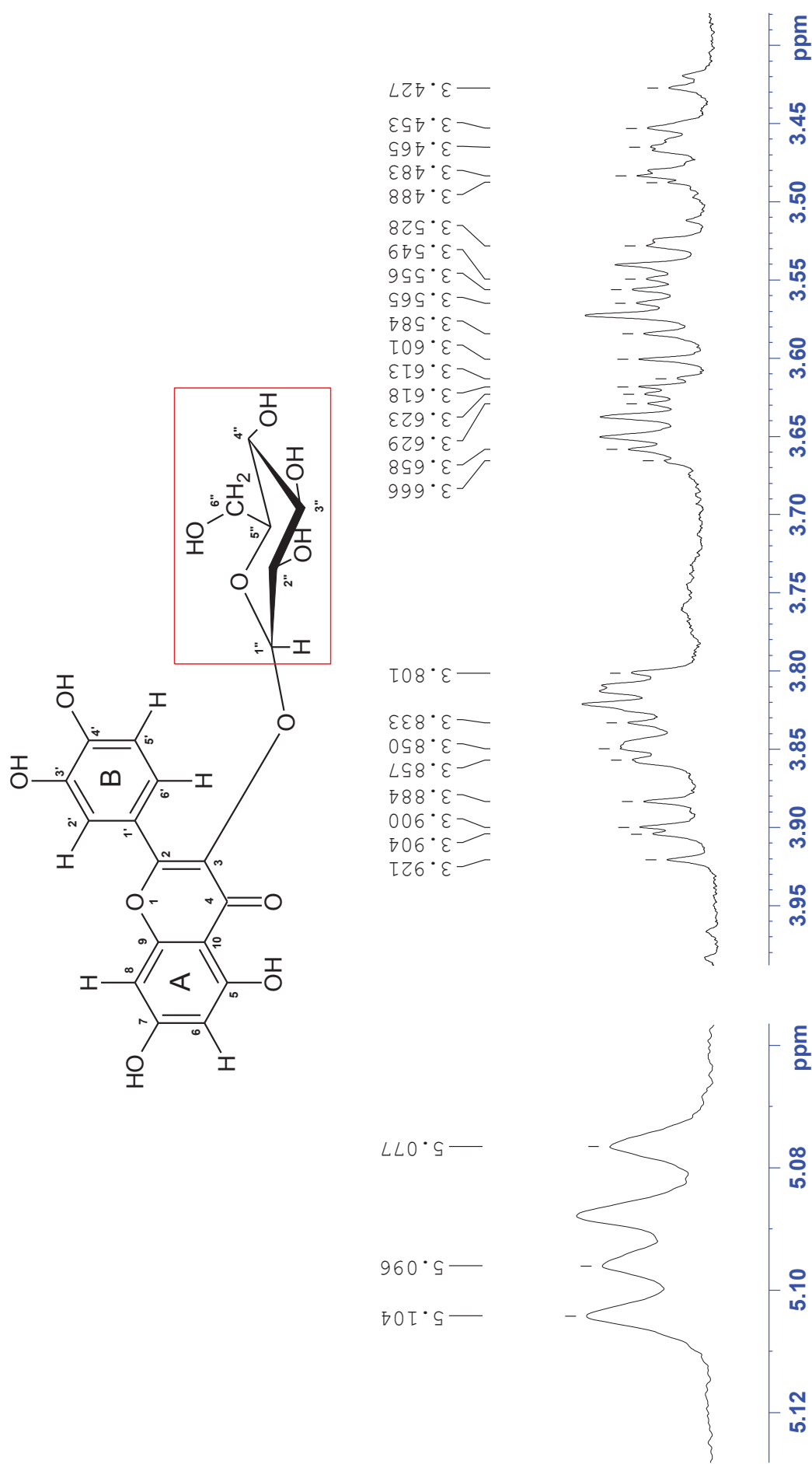
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 25 – EXPANSÕES DOS SINAIS DE <sup>1</sup>H PARA OS PRÓTONS DOS ANÉIS A E B DA ISOQUERCETINA



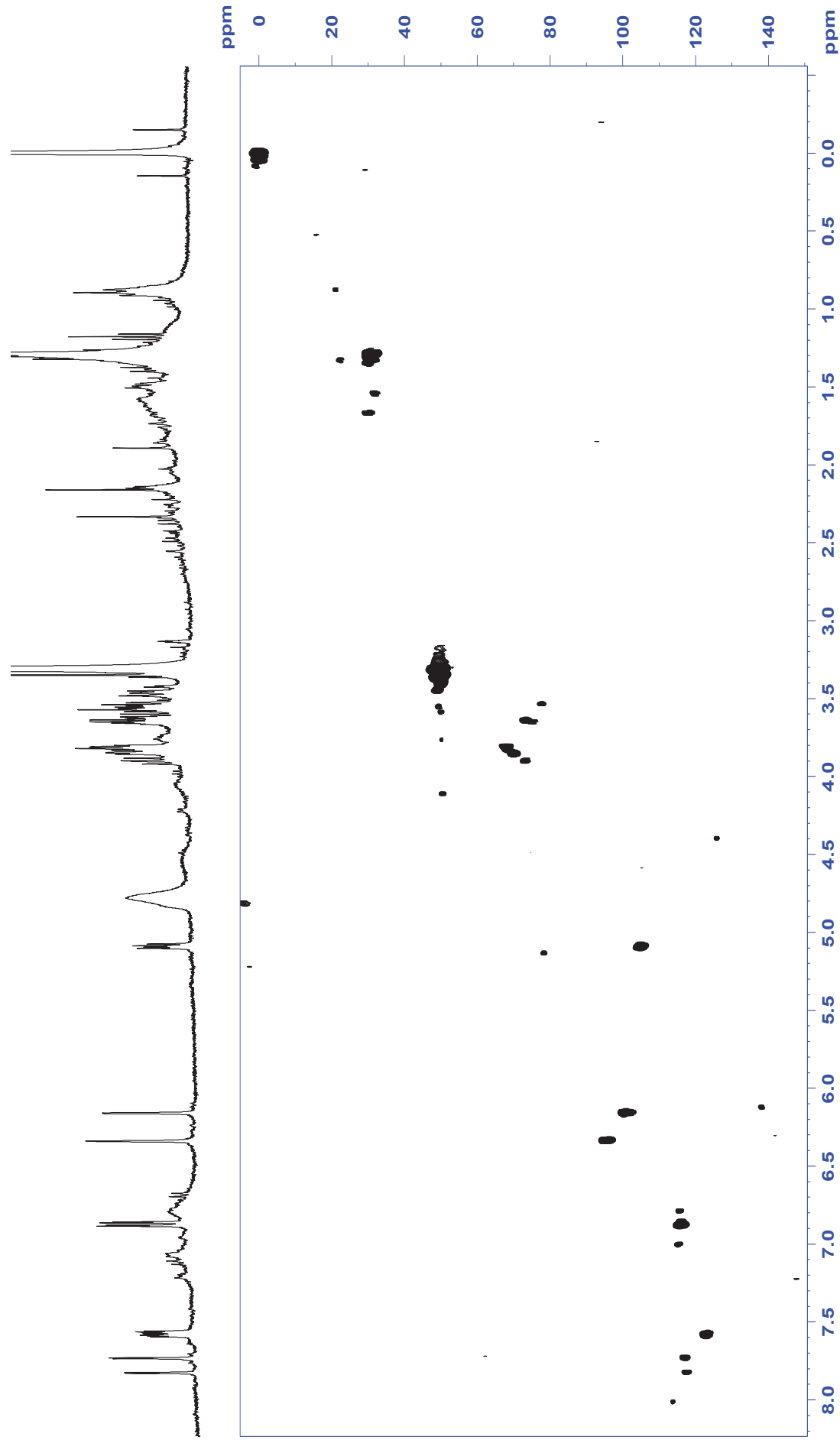
FONTE: O autor (2018).

FIGURA 26 – EXPANSÕES DOS SINAIS DE <sup>1</sup>H DA GLUCOSE DA ISOQUERCETINA



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 27 – MAPA DE CORRELAÇÃO HSQC REGISTRADO PARA A ISOQUERCETINA



FONTE: O autor (2018).

### 5.3.2 Identificação dos sais NaCl e KCl

Durante a extração do extrato bruto etanólico da espécie *S. westermanii* houve precipitação de duas substâncias sólidas cristalinas que foram primeiramente designadas como sal em pó e sal granulado e que através da análise por difratometria de raios X de monocristal (DRXM) e espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) foram identificados, respectivamente, como os sais NaCl e KCl.

#### 5.3.2.1 Sal NaCl

Através da análise por DRXM do sal pó obteve-se a confirmação do NaCl, o resultado da análise está representado na (TABELA 9).

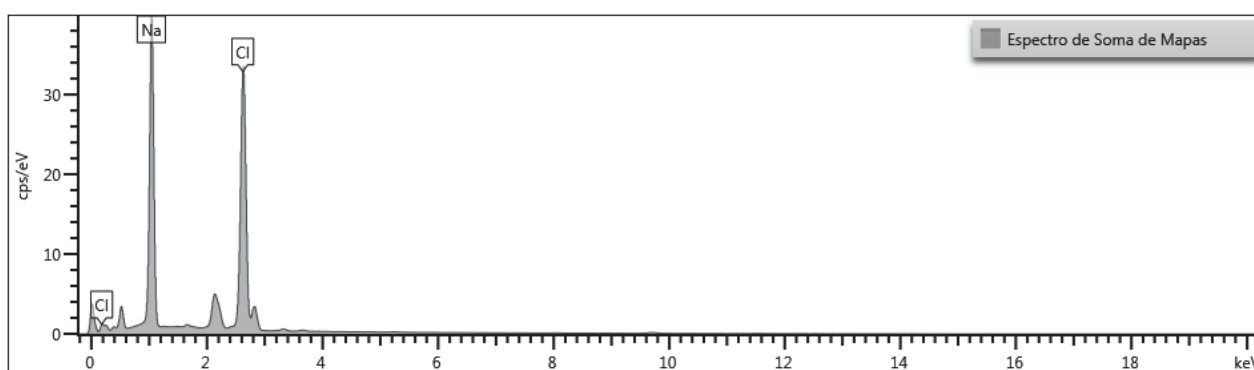
TABELA 9 – DADOS DA CÉLULA UNITÁRIA DA ANÁLISE POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X DE MONOCRISTAL DO SAL PÓ (NaCl)

PARÂMETROS	RESULTADOS
Sistema cristalino/grupo espacial	Cúbico / Fm-3m
a = b = c	5,62 Angstroms
alfa = beta = gama	90 graus
Volume de célula unitária	178 Angstroms <sup>3</sup>
Temperatura de análise	200 K

FONTE: O autor (2018).

Além da análise por DRXM foi realizada a espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) para a caracterização química do NaCl. Sendo a (FIGURA 28) a representação da soma de mapas e a (FIGURA 29) o EDS para o NaCl.

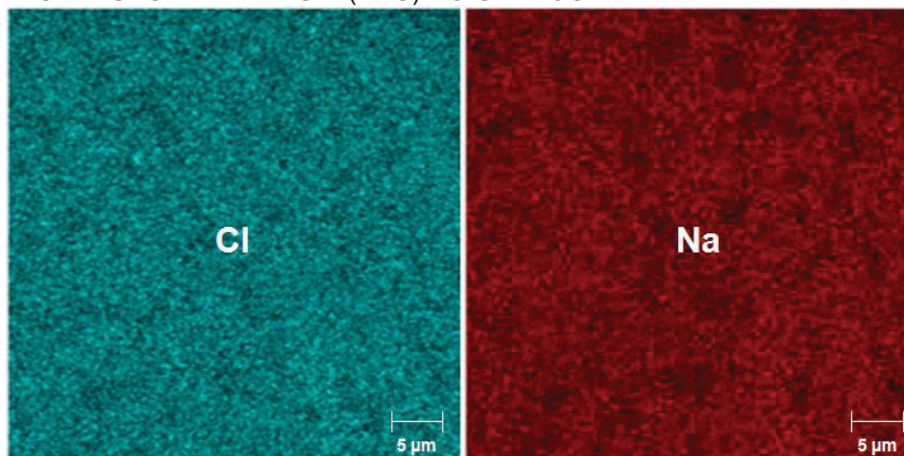
FIGURA 28 – ESPECTRO DE SOMA DE MAPAS DO NaCl ISOLADO DE *Senecio westermanii*



FONTE: O autor (2018).



FIGURA 29 – MAPA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DO SAL NaCl



FONTE: O autor (2018).

Na (TABELA 10) está a porcentagem da representação elementar para cada íon presente na molécula do NaCl. E por meio da microscopia eletrônica de varredura obteve-se a imagem dos cristais de NaCl (FIGURA 30).

TABELA 10 – REPRESENTAÇÃO ELEMENTAR DO SAL NaCl

ELEMENTO	Wt%	SIGMA Wt%
Na	44,34	0,10
Cl	55,66	0,10
Total	100,00	

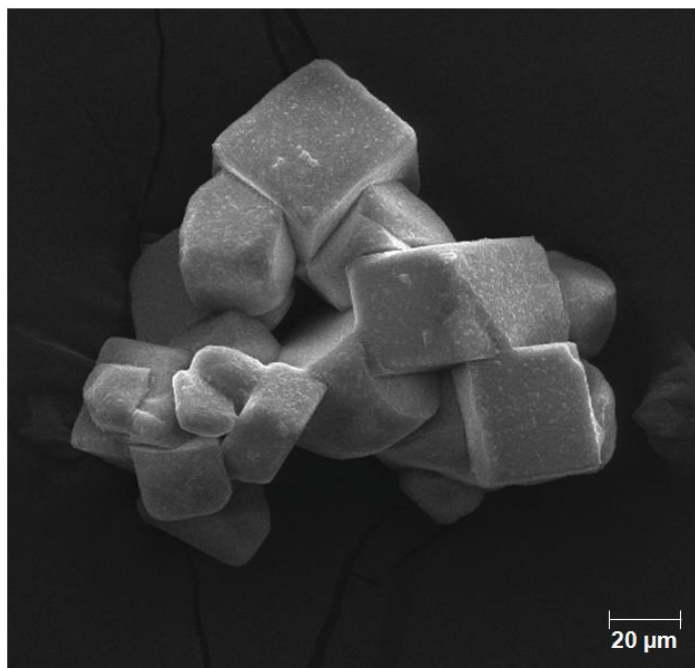
FONTE: O autor (2018).

Apesar dos mecanismos desempenhados pelo sódio nas plantas serem desconhecidos, porém esse elemento pode variar de essencial, como é o caso das espécies halófitas (plantas que vivem próximo ao mar) a tóxico dependendo do nível de sensibilidade de cada espécie vegetal. Na nutrição mineral o sódio pode substituir o potássio nas funções metabólicas e osmóticas, principalmente na transferência de metabólitos entre cloroplastos das células do mesófilo e da bainha vascular das plantas que realizam a fotossíntese através do ciclo C4. Algumas espécies da família Chenopodiaceae como o espinafre e a beterraba possuem efeitos positivos do sódio no crescimento, porém na presença de níveis adequados de potássio (FAQUIN, 2005).

Ainda o sódio está envolvido na substituição parcial pelo potássio atuando na absorção de macronutrientes, permeabilidade das células, na ativação enzimática da ATPase, na abertura e fechamento estomático, osmorregulação, síntese de

carboidratos, na conversão da frutose em glicose, no vigor de plantas e no transporte de gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) para as células das plantas C4 (INOCÊNCIO; CARVALHO; FURTINI NETO, 2014).

FIGURA 30 – CRISTAIS DE NaCl OBTIDOS POR MEV



FONTE: O autor (2018).

### 5.3.2.2 Sal KCl

Através de célula unitária da análise por difratometria de raio X de monocrystal do sal pó obteve-se a confirmação do sal KCl, o resultado da análise está representado na (TABELA 11).

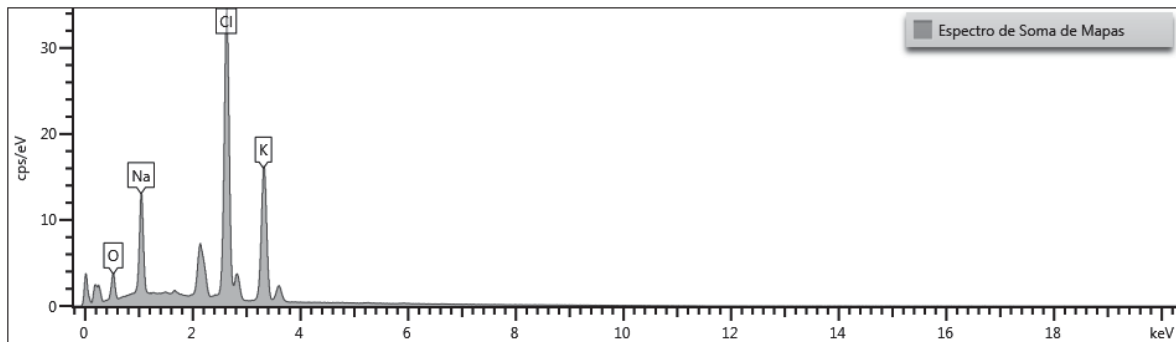
TABELA 11 – DADOS DA CÉLULA UNITÁRIA DA ANÁLISE POR DIFRATOMETRIA DE RAIOS X DE MONOCRISTAL DO SAL GRANULADO (KCl)

PARÂMETROS	RESULTADOS
Sistema cristalino/grupo espacial	Cúbico / Fm-3m
a = b = c	6,2822 Angstroms
alfa = beta = gama	90 graus
Volume de célula unitária	240 Angstroms <sup>3</sup>
Temperatura de análise	300 K

FONTE: O autor (2018).

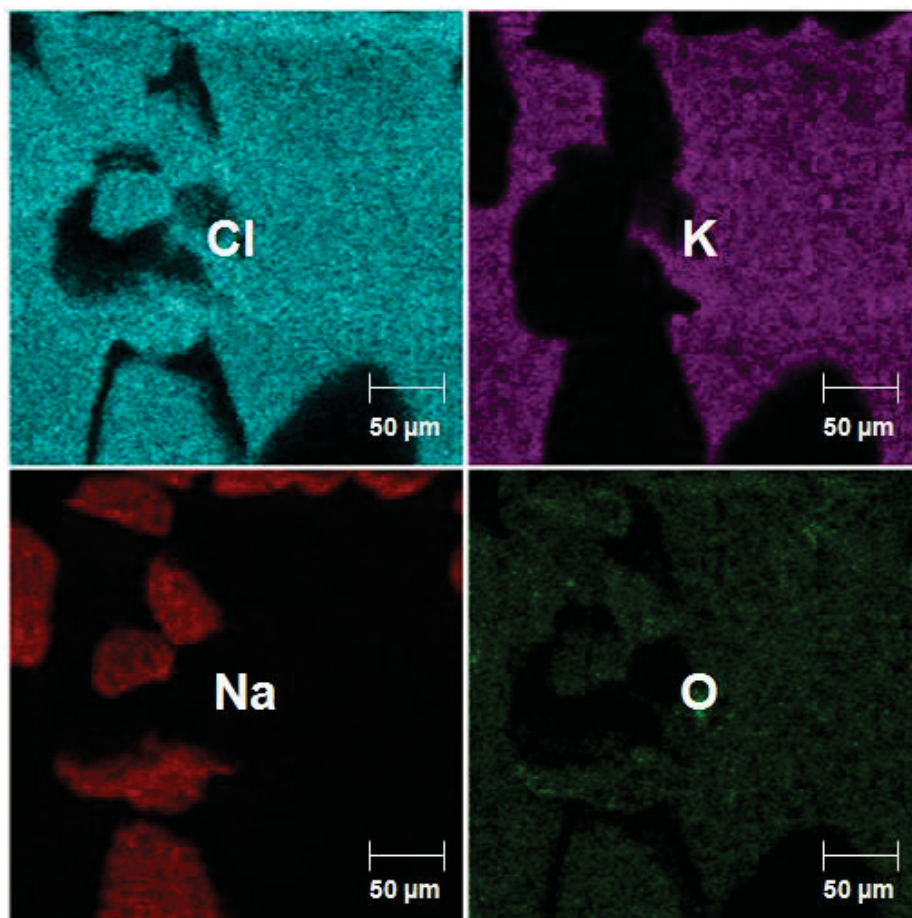
Além da análise por DRXM foi realizada a espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDS) para a caracterização química do NaCl. Sendo a (FIGURA 31) a representação da soma de mapas e a (FIGURA 32) o EDS para o NaCl.

FIGURA 31 – ESPECTRO DE SOMA DE MAPAS DO KCl ISOLADO DE *Senecio westermanii*



FONTE: O autor (2018).

FIGURA 32 – MAPA DE ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS) DO SAL KCl



FONTE: O autor (2018).

Na (TABELA 12) está a porcentagem da representação elementar para cada íon presente na molécula do KCl, apesar que também foi detectado os elementos Na e O, que pode estar relacionado com a presença do NaCl.

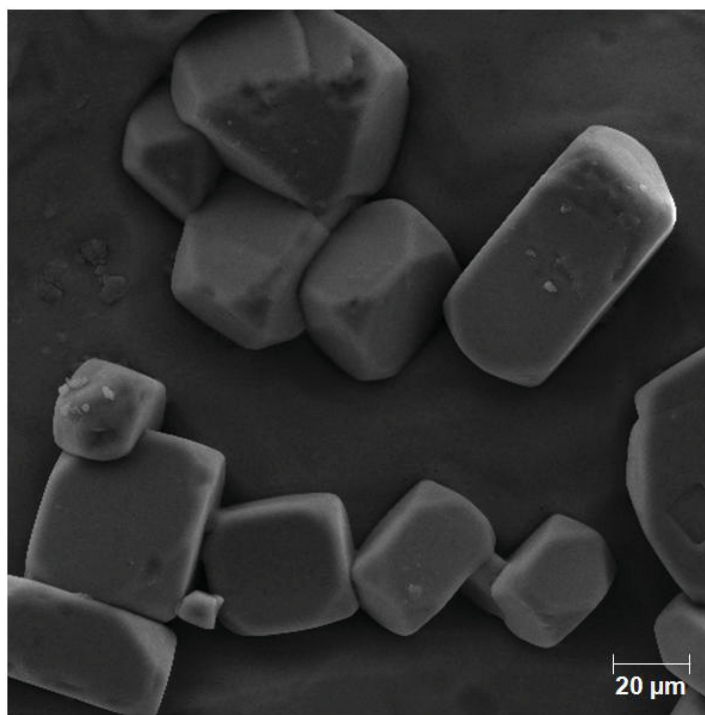
TABELA 12 – REPRESENTAÇÃO ELEMENTAR DO SAL KCl

ELEMENTO	Wt%	SIGMA Wt%
O	28	0,29
Na	16,63	0,11
Cl	32,94	0,15
K	22,43	0,11
Total	100	

FONTE: O autor (2018).

Através da microscopia eletrônica de varredura obteve-se a imagem dos cristais de KCl (FIGURA 33).

FIGURA 33 – CRISTAIS DE KCl OBTIDOS POR MEV



FONTE: O autor (2018).

O potássio é considerado um macronutriente essencial para as plantas, é o segundo nutriente mais absorvido em plantas cultivadas, sendo absorvido pelas raízes e acumulado nas partes aéreas das plantas (BENITES et al., 2010).

De acordo com Pretty (1982) plantas com maior concentração de potássio apresentam parede celular mais espessa pelo fato de ocorrer maior deposição de celulose, fornecendo maior resistência e estabilidade as plantas. Além disso, o potássio está diretamente envolvido na fotossíntese, pois a deficiência desse mineral pode reduzir as reservas de carboidratos nas plantas.

Ainda o potássio está envolvido no controle osmótico das células, no mecanismo de defesa das plantas contra pragas e doenças. Além disso, plantas com maiores concentrações de potássio retêm maior quantidade de água e, por isso, são mais resistentes a secas e geadas (SILVEIRA, 2000).

#### 5.4 FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS

A quantidade de fenóis e flavonoides totais do extrato bruto e frações das partes aéreas de *S. westermanii* foram calculadas por meio de equações de regressão linear e expressos, respectivamente, como mg de equivalente de ácido gálico (mg EAG/g) ( $y=0,0396x-0,054$ ,  $R^2=0,9982$ ) e mg de equivalente de quercetina (mg EQ/g) ( $y=0,0314x-0,0164$ ,  $R^2=0,9996$ ). Os resultados mostram que o extrato bruto etanólico e as frações contém elevada concentração de fenóis totais variando de  $65,57 \pm 1,64$  mg GAE/g para o EB e  $504,71 \pm 3,80$  mg GAE/g para a FAE. Além disso, a FAE apresentou o maior conteúdo de flavonoides totais com  $131,52 \pm 1,30$  mg EQ/g, seguida da FHR com valor de  $122,43 \pm 0,12$  mg EQ/g (TABELA 13). A presença da isoquercetina identificada pode estar relacionada com o elevado resultado para ambas análises, principalmente para a FAE, que obteve as maiores concentrações no ensaio.

De acordo com Chew et al. (2011) a quantidade de fenóis totais das plantas podem ser classificadas em quatro níveis de concentração: alta ( $> 50$  mg EAG/g), média-alta (30-50 mg EAG/g), médio baixa (10-30 mg EAG/g) e baixa ( $<10$  mg EAG/g). Dessa forma, o extrato bruto e frações de *S. westermanii* apresentaram concentrações elevadas de fenóis totais.

TABELA 13 – FENÓIS E FLAVONOIDES TOTAIS DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii*

Amostra	FT (mg de EAG/g do extrato bruto e frações ± DP) mg	FLT (mg de EQ/g do extrato bruto e frações ± DP) mg
EB	95,54 ± 7,58	83,91 ± 1,60
FH	65,57 ± 1,64	-
FCL	104,38 ± 0,96	41,02 ± 0,31
FAE	504,71 ± 3,80	131,52 ± 1,30
FRE	245,96 ± 4,30	122,43 ± 0,12

NOTA – EB: EXTRATO BRUTO; FH: FRAÇÃO HEXANO; FCL: FRAÇÃO CLOROFÓRMIO; FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA; FRE: FRAÇÃO HIDROALCOÓLICA REMANESCENTE; FT: FENÓIS TOTAIS; EAG: EQUIVALENTE ÁCIDO GÁLICO; FLT: FLAVONOIDES TOTAIS; EQ: EQUIVALENTE QUERCETINA; DP: DESVIO PADRÃO

FONTE: O autor (2018).

Porém a quantidade de fenóis totais nas espécies do gênero podem variar de acordo com as espécies estudadas. Albayrak et al. (2008) estudou seis espécies na Turquia (*S. pandurifolius*, *S. trapezuntinus*, *S. integrifolius* subsp. *aucheri*, *S. hypochionaeus* var. *argaeus*, *S. hypochionaeus* var. *ilkasiensis* e *S. lorentii*) com resultados que variaram de 19,54 à 81,78 mg GAE/g.

González, Fajardo e Cuadra (2013) estudando *S. patagonicus* Hook. & Arn. na Patagonia obteve 75,18 ± 4,61 mg GAE/g e 64,53 ± 2,89 mg GAE/g para diferentes ambientes de coleta. Lahlou et al. (2014) em estudo no Marrocos com diferentes métodos de extração para a espécie *S. anteuphorbium* observou que a concentração de fenóis totais variaram de 2,46 ± 0,11 à 21,53 ± 1,03 mg GAE/g. Arab et al. (2014) demonstrou que *S. delphinifolius* coletada na Argélia apresentou resultados de 7,22 ± 0,84 e 7,86 ± 0,25 mg GAE/g para os extratos de acetato de etila e n-butanol, respectivamente.

Albayrak et al. (2014) estudou nove espécies do gênero *Senecio* na Turquia e detectou diferentes resultados de fenóis totais entre as espécies *S. cilicius* (117,45 mg GAE/g), *S. inops* subsp. *karamanicus* (81,62 mg GAE/g), *S. mollis* (113,40 mg GAE/g), *S. olympicus* (46,12 mg GAE/g), *S. othonnae* (94,46 mg GAE/g), *S. salsuginea* (95,82 mg GAE/g), *S. sandrasicus* (87,70 mg GAE/g), *S. tauricolus* (27,86 mg GAE/g) e *S. viscosus* (11,63 mg GAE/g).

Extratos fenólicos de material vegetal são constituídos de diferentes classes de compostos fenólicos, sendo o solvente hidroalcoólico responsável pela maior



extração desses compostos no processo. Porém a extração das substâncias fenólicas podem ser alteradas pelo método de extração, natureza química, tamanho da partícula vegetal, condições de armazenamento, presença de substâncias interferentes e o tempo de extração (SOUZA et al., 2008).

Observa-se que a quantidade de fenóis totais presentes nos diferentes estudos variaram de acordo com o local de coleta, época, método de extração e solvente utilizado. Porém em todas as espécies do gênero *Senecio* demonstrou-se resultados consideráveis na concentração de fenóis totais.

## 5.5 ANÁLISES FARMACOLÓGICAS

### 5.5.1 Determinação do trânsito gastrointestinal

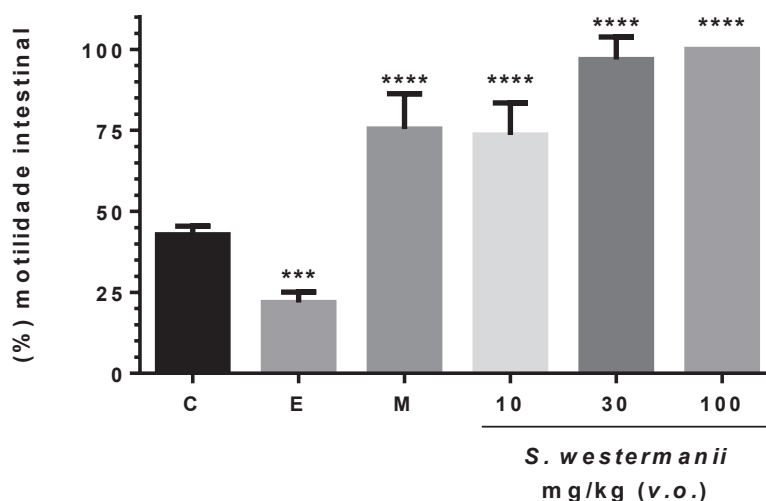
No ensaio de trânsito gastrointestinal o extrato bruto etanólico de *S. westermanii* aumentou a distância percorrida pelo marcador vermelho de fenol quando comparado com os padrões escopolamina e metoclopramida (FIGURA 34). As amostras nas concentrações de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg foram capazes de estimular a motilidade em comparação ao padrão metoclopramida, com destaque para as concentrações 30 mg/kg e 100 mg/kg que estimularam o trânsito gastrointestinal mais que o padrão, porém foram estatisticamente semelhantes.

De acordo com Galvão-Alves (2013) a constipação intestinal afeta aproximadamente 20% da população mundial. No Brasil a maior prevalência ocorre em lactentes, pré-escolares e escolares (17,5% a 36,5%). Diversas são as espécies de plantas que são utilizadas na medicina popular para o tratamento e alívio da constipação intestinal. No Brasil as espécies mais utilizadas são *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada), *Cassia angustifolia* (Sene), *Aloe vera* (Babosa), *Rheum palmatum* (Ruibarbo) e o *Ricinus communis* (Óleo de rícino) (DARROZ et al., 2014).

Os heterosídeos antraquinônicos são os principais metabólitos responsáveis pelos efeitos laxativos e purgativos nas plantas, por ocasionarem irritação ou estímulo no peristaltismo intestinal (DARROZ et al., 2014). Mas de acordo com Merino et al. (2015) a espécie *S. westermanii* não apresentou no *screening* fitoquímico a presença de antraquinonas. Porém em comparação com outra espécie do gênero, os alcaloides de *S. jacobaea* reduziram a motilidade intestinal,

prolongando o tempo de passagem para a digestão em ratos Long-Evans (MOGHADDAM; CHEEKE, 1989).

FIGURA 34 – EFEITO NO TRÂNSITO GASTROINTESTINAL DOS CAMUNDONGOS APLICANDO AMOSTRAS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; E: ESCOPOLAMINA (2,5 mg/kg); M: METOCLOPRAMIDA (20 mg/kg); 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE BONFERRONI.

FONTE: O autor (2018).

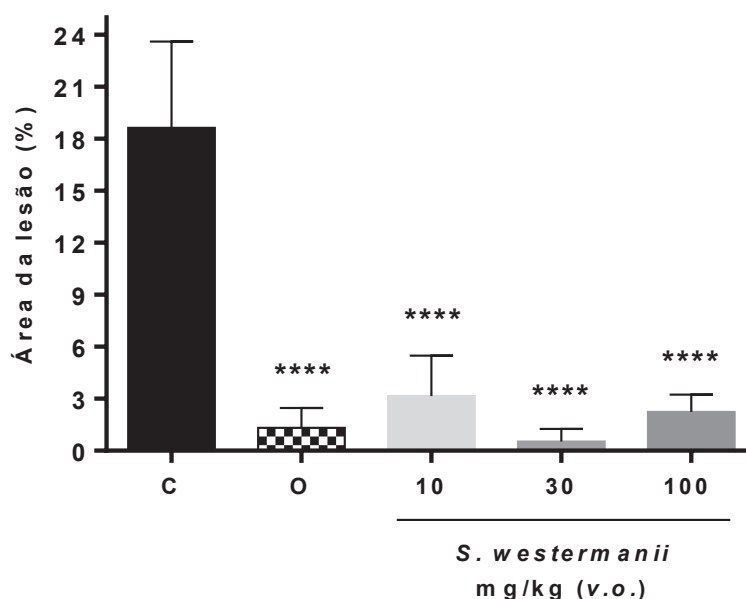
### 5.5.2 Lesão gástrica aguda induzida por etanol

O extrato bruto etanólico da espécie *S. westermanii* foi testado nas concentrações de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg e administradas por gavagem em ratos wistar. Os resultados obtidos mostraram-se estatisticamente semelhantes quando comparados ao controle de proteção Omeprazol (40 mg/kg). O resultado da análise pode observado na (FIGURA 35).

Para descartar possíveis interferências pela via de administração por gavagem, foi realizado a administração por via intraperitoneal da concentração de 30 mg/kg do extrato bruto etanólico de *S. westermanii*, a qual obteve o melhor resultado na análise por gavagem. Dessa forma, na (FIGURA 36) pode-se observar que estatisticamente a concentração testada foi semelhante ao controle de proteção Omeprazol (40 mg/kg).



FIGURA 35 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *Senecio westermanii* (v.o.) SOBRE LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL P.A. EM RATOS WISTAR.



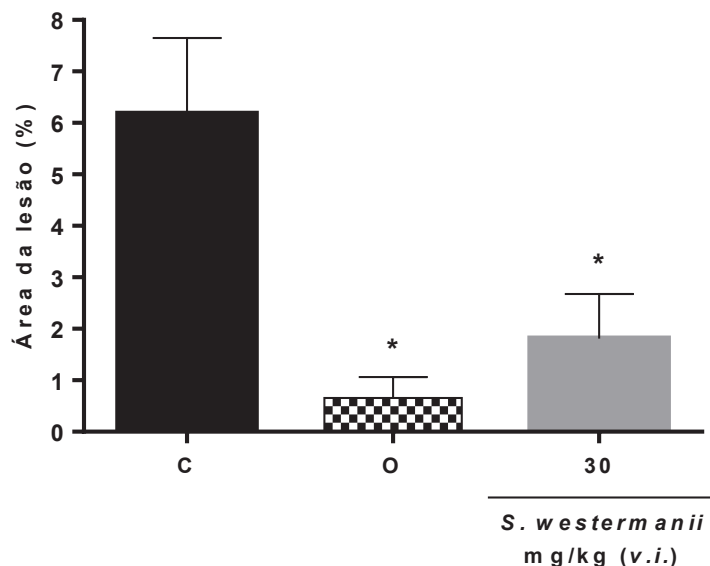
NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o. (VIA ORAL); O: OMEPRAZOL (40 mg/kg); 10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \*\*\*\* $p < 0,0001$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE BONFERRONI.

FONTE: O autor (2018).

Metabólitos secundários como flavonoides e alcaloides possuem comprovada ação gastroprotetora no gênero *Senecio*. Os flavonoides por possuírem atividade antioxidante contra radicais livres, acelerando dessa forma o processo de cicatrização e conseqüentemente o processo de colagenação do tecido afetado, enquanto os alcaloides inibem a atividade da fosfolipase A2, evitando danos no tecido gástrico. Além disso em úlceras crônicas os alcaloides pirrolizidínicos intensificam o fator de crescimento epidérmico na espécie *S. brasiliensis*, que cicatrizam úlceras gástricas (AHMADI-NOORBAKHS et al., 2011).

Em modelo de úlcera induzida por etanol em ratos wistar a *S. candicans* DC inibiu em 66,73% e 83,52% a úlcera gástrica quando os animais foram tratados com o extrato aquoso nas concentrações de 250 e 500 mg/kg, respectivamente (HARIPRASATH; JEGADEESH; RAAMAN, 2012).

FIGURA 36 – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE *S. westermanii* (*i.p.*) SOBRE LESÕES GÁSTRICAS AGUDAS INDUZIDAS POR ETANOL PA EM RATOS WISTAR.



NOTA – C: SOLUÇÃO SALINA 0,9%, 0,1 mL/100 g, *i.p.* (INTRAPERITONIAL); O: OMEPRAZOL (40 mg/kg); 30 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii* SOLUÇÃO SALINA 0.9% *i.p.* . \* $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE BONFERRONI.

FONTE: O autor (2018).

De acordo com Awaad (2013) os flavonoides exercem gastroproteção por evitar e diminuir a formação de úlceras. Os flavonoides naringenina, aromadendrina, apigenina e a 4'-O-metoxi-luteolina-7-O-ramnoglicosídeo isolados de *Euphorbia cuneata* Vahl foram os principais compostos responsáveis pela proteção gástrica em ratos wistar, com proteção de 81,40%; 79,10%; 75,78% e 88,23%, respectivamente, quando comparado com o controle de proteção ranitidina.

Ainda Rodrigues (2008) em análise com o extrato etanólico das folhas de *Byrsonima sericea* DC sugere que a isoquercetina seja um dos compostos responsáveis pela gastoproteção em camundongos Swiss fêmeas.

Os resultados apresentados pelo extrato bruto etanólico de *S. westermanii* podem estar relacionados com a presença do flavonoide isoquercetina identificado para a espécie (FIGURA 23). Esse flavonoide possui reconhecida ação antioxidante que pode ter sido um dos componentes responsáveis pela proteção gástrica nos animais testados.

## 5.6 ANÁLISE DA TOXICIDADE

### 5.6.1 Toxicidade aguda

No ensaio de toxicidade aguda não foram observadas mortes dos animais e nenhuma mudança nos parâmetros analisados em nenhuma das concentrações administradas do extrato bruto etanólico de *Senecio westermanii* nos camundongos. De acordo com Larini (1987) os agentes tóxicos administrados via oral são classificados em extremamente tóxicos ( $DL_{50} \leq 25$  mg/kg), altamente tóxicos ( $DL_{50}$  entre 100 e 500 mg/kg), mediamente tóxicos ( $DL_{50}$  entre 500 e 2.000 mg/kg) e pouco tóxicos ( $DL_{50} > 2.000$  mg/kg). Dessa forma, o extrato bruto etanólico classifica-se como pouco tóxico, por não apresentar sinais de alterações fisiológicas ou comportamentais dos animais em todos o parâmetros analisados.

Esse resultado é semelhante do obtido para a espécie *S. cadicans* DC, que não apresentou mortalidade em ratos wistar em concentrações superiores a 2500 mg/kg (HARIPRASATH; JEGADEESH; RAAMAN, 2012), assim como para a espécie *S. vernalis* que não ocasionou nenhuma alteração na morfologia hepática e sinais de intoxicação em gado alimentado com material seco e fresco (SKAANILD; FRIIS; BRIMER, 2001). Apesar das intoxicações ocasionadas pela *S. brasiliensis*, não foi detectado alteração hematológica e imunológica em ratos expostos por *N*-óxido de integerrimina de resíduo butanólico (ELIAS et al., 2011).

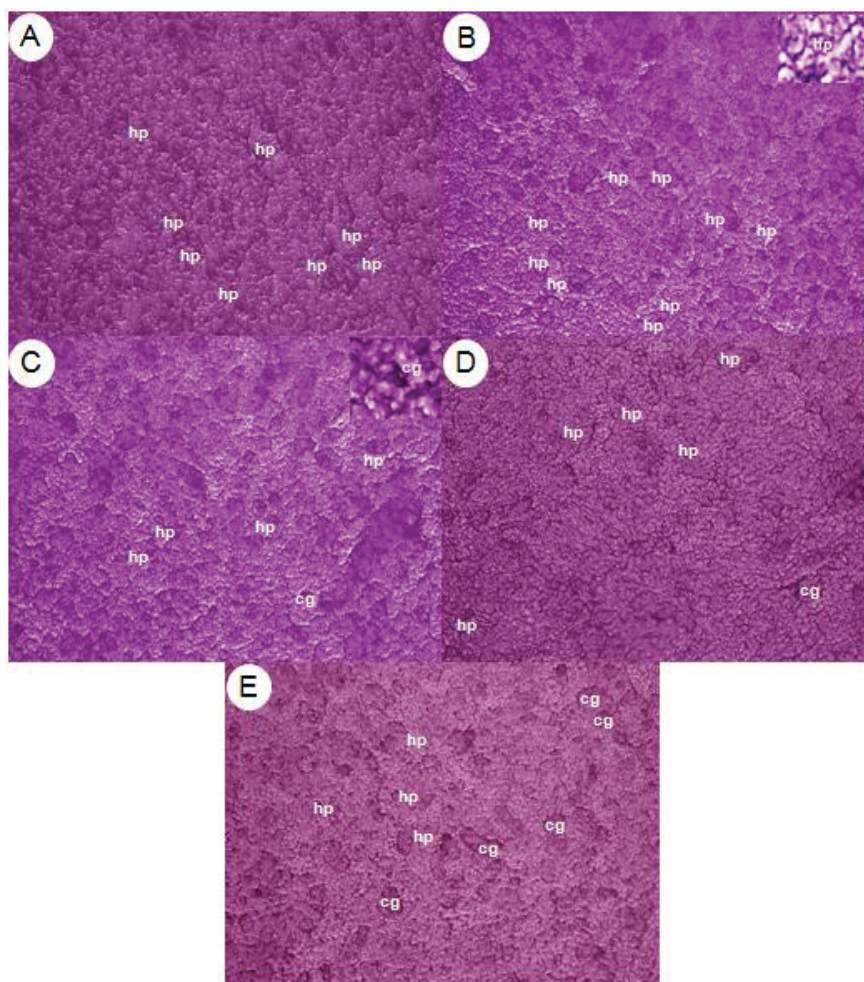
Porém para a espécie *S. inaequidens* DC apresentou-se tóxica para ratos devido a presença dos alcaloides pirrolizidínicos retrorsina e senecionina, por possuírem respectivamente uma  $DL_{50}$  de 38 mg/kg e 85 mg/kg (DIMANDE et al., 2007).

Apesar da toxidade encontrada em algumas espécies de *Senecio* L., os alcaloides pirrolizidínicos são responsáveis por diversas atividades farmacológicas, dentre estas a atividade gástrica. Na espécie *S. brasiliensis* foram extraídos das inflorescências os alcaloides integerrimina, retrorsina, senecionina, usaramina e seneciofilina que apresentaram atividade com concentração de 12,5 mg/kg contra úlcera gástrica crônica e aguda em ratos. Além disso esses alcaloides foram capazes de aumentar a quantidade de prostaglandina na mucosa gástrica e também a concentração de muco livre em camundongos (TOMA et al., 2004).

### 5.6.2 Toxicidade do fígado

A avaliação das lâminas montadas pelo método do esfregaço a fresco demonstrou que as diferentes concentrações de extrato bruto de *S. westermanii* não apresentaram alterações hepatotóxicas significativas. Apesar disso, foram detectadas microvesículas de gordura em todas as concentrações avaliadas do extrato bruto das partes aéreas, sendo que essas microvisículas não foram observadas nas lâminas controles (FIGURA 37).

FIGURA 37 – ESFREGAÇO DE FÍGADO, DEMONSTRANDO A PRESENÇA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS OCASIONADAS PELAS CONCENTRÇÕES DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *Senecio westermanii*



NOTA – A, B - ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%) (CONTROLE); C – 10 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO; 30 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO; 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO; hp - HEPATÓCITOS; cg - CÉLULA COM GORDURA

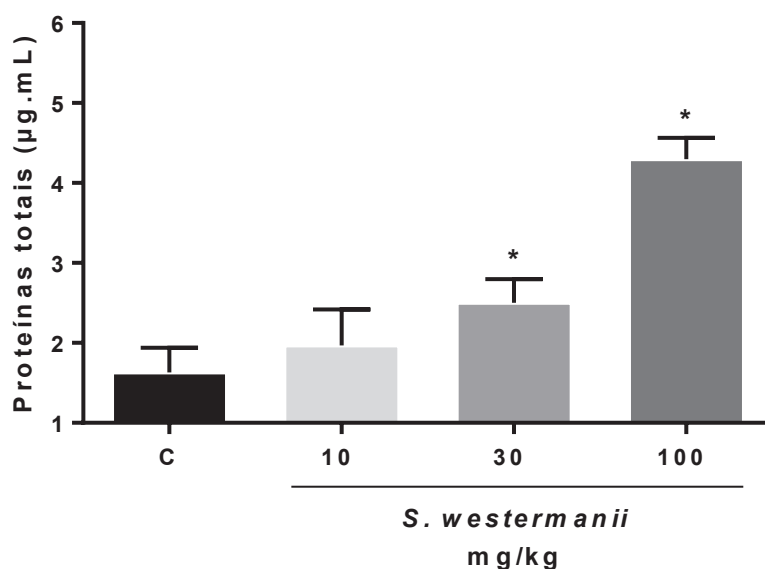
FONTE: O autor (2018).

Em todas as lâminas, foram observados hepatócitos bem delimitados, apresentando a cromatina do núcleo visível e ausência de fibrose. As concentrações de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg das partes aéreas de *S. westermanii* não foram capazes de alterar as bordas citoplasmáticas, que apresentavam formato regular, além disso o núcleo das células permaneciam definidos.

Lakshmanan et al. (2016) em estudo com a espécie *S. candicans* DC. demonstraram que houve infiltração mononuclear leve, núcleo ampliado em torno da veia central e leve perda da estrutura dos hepatócitos em ratos tratados com 750 mg/kg de extrato aquoso, porém não foram encontradas alterações notáveis em hepatócitos e glomérulos nos ratos tratados nas concentrações de 250 mg/kg e 500 mg/kg.

### 5.6.3 Proteínas totais

FIGURA 38 – CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \* $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

O teor de proteínas presentes nas células hepáticas tiveram aumento significativo quando tratadas com as concentrações de 30 mg/kg e 100 mg/kg de extrato bruto das partes aéreas de *S. westermanii* (FIGURA 38).

O fígado é o principal órgão que sintetiza as proteínas sanguíneas, que está diretamente ligado com a funcionalidade hepática e estado nutricional (PAYNE; PAYNE, 1987). De acordo com Ike et al. (2016) o aumento no nível de proteínas totais está relacionado a uma possível manifestação de inflamação crônica do fígado.

#### 5.6.4 Determinação enzimática de marcadores de toxicidade no fígado

O extrato bruto das partes aéreas de *S. westermanii* provocaram alterações principalmente na concentração de 100 mg/kg nas enzimas que atuam como marcadores de hepatotoxicidade.

Diversos são biomarcadores utilizados na triagem básica para detectar desordens hepáticas, pode-se citar a fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), gama-GT (GGT), albumina, bilirrubina e plaquetas (JESUS; SOUSA; BARCELOS, 2014).

##### 5.6.4.1 Atividade da ALP

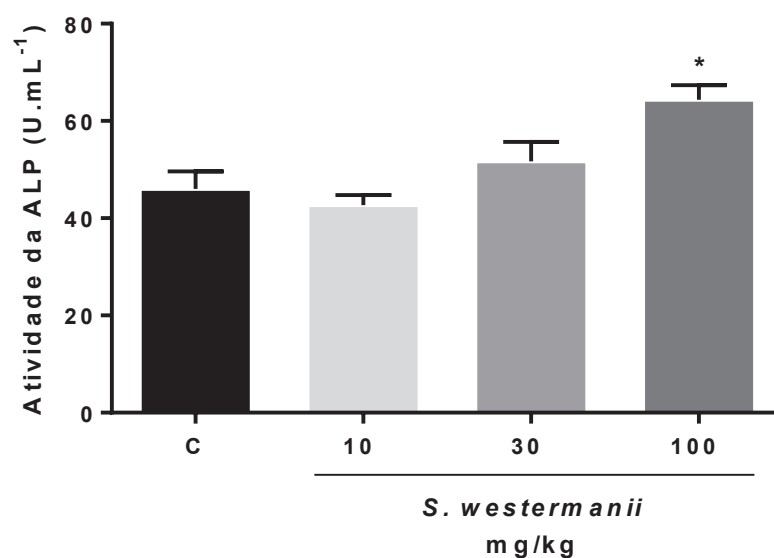
A atividade da fosfatase alcalina (ALP), biomarcadora de danos hepático-biliares aumentou em 64,30 U/mL e apenas para a concentração de 100 mg/kg após o tratamento nos camundongos com o extrato bruto etanólico de *S. westermanii* (FIGURA 39).

Nos mamíferos, a ALP está presente no soro em forma solúvel, mas também é encontrada em muitas membranas celulares em todo o corpo. Nas membranas canaliculares dos hepatócitos e na superfície luminal das células epiteliais biliares, ainda a ALP pode estar envolvida no transporte de colina (FERNANDEZ; KIDNEY, 2007).

O aumento da atividade da ALP é acompanhado por aumentos nas taxas de excreção de colina e fosfatidilcolina na bile, sendo uma das funções da ALP da membrana do fígado hidrolisar a fosforilcolina de modo que a colina possa ser

transportada através da membrana canalicular da bile. O nível da atividade enzimática parece ser controlado pela quantidade de fosforilcolina disponível para excreção na bile (PEKARTHY et al., 1972).

FIGURA 39 – ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA (ALP) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \* $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

Dessa forma, a alteração encontrada para a concentração de 100 mg/kg corrobora com o aumento na quantidade de gordura nos hepatócitos (FIGURA 37), pois provavelmente aumenta os níveis de colina e, conseqüentemente, aumenta a concentração de ALP no fígado.

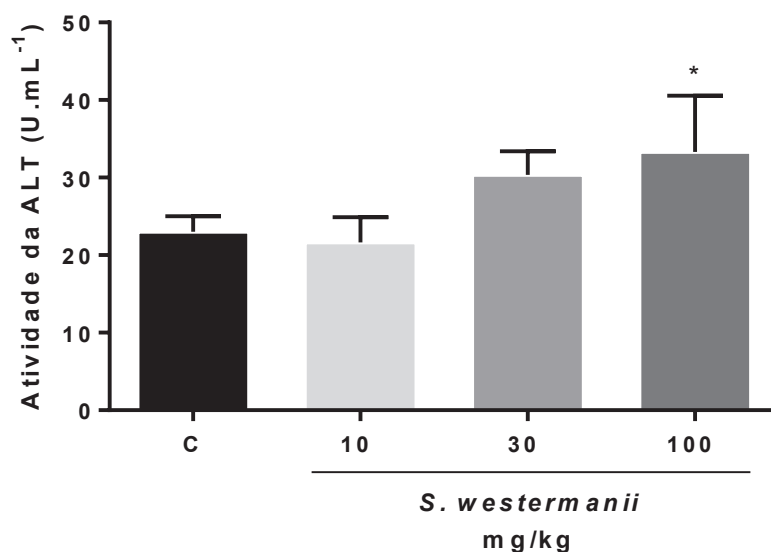
#### 5.6.4.2 Atividade da ALT e AST

Além da ALP o extrato bruto na concentração de 100 mg/kg das partes aéreas também provocou aumento na atividade da ALT em 33,30 U/mL (FIGURA



40). Enquanto a AST não se mostrou alterada para nenhuma das concentrações quando comparada ao controle (FIGURA 41).

FIGURA 40 – ATIVIDADE DA ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \* $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

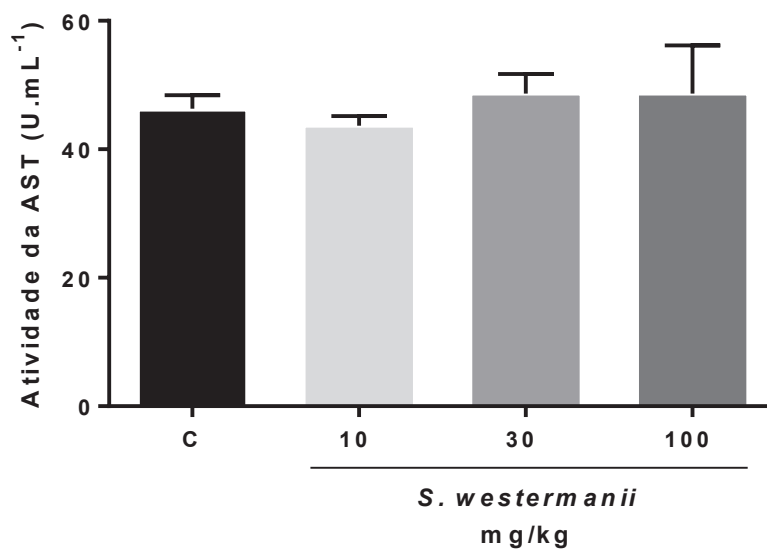
A liberação das enzimas ALT e AST para o sangue está relacionado a gravidade da lesão hepática ocasionada. Em lesões hepáticas mais leves a forma mais predominante é a citoplasmática (ALT) e as mais graves são mitocondriais (AST). Quando a relação ALT>AST a lesão é considerada mais extensa e menos profunda, porém a relação AST>ALT indica uma lesão mais profunda (JESUS; SOUSA; BARCELOS, 2014).

Thapa e Walia (2007) afirmam que níveis mais elevados de ALT é para detectar necrose nos hepatócitos. Essa alteração pode estar relacionada com distúrbios coleostáticos por obstrução intra e extra-hepática para o fluxo biliar. Porém a ALT pode estar aumentada por diversos fatores, até mesmo medicamentos podem alterar os níveis da ALT em pequenos animais (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI,



1999), além de plantas ricas em compostos secundários a base de fenóis e plantas tóxicas são capazes de aumentar os níveis de ALT (OSWEILER, 1998).

FIGURA 41 – ATIVIDADE DA ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. A MÉDIA NÃO DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

Ainda pode-se inferir que os resultados obtidos para as enzimas ALT e AST, sugerem que as lesões ocorridas pelo extrato bruto etanólico é considerada extensa e menos profunda de acordo com Jesus, Sousa e Barcelos (2014).

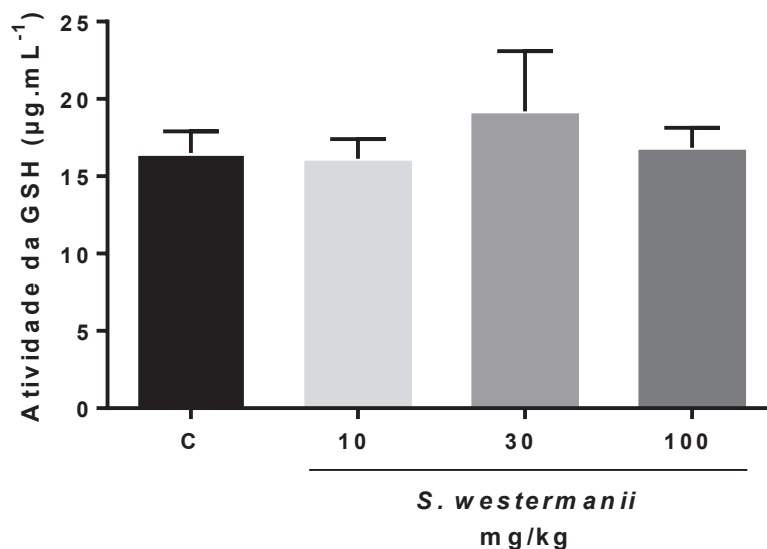
#### 5.6.5 Ensaio antioxidantes não enzimáticos em amostras de fígado

##### 5.6.5.1 GSH e ácido ascórbico

Os níveis de GSH e ácido ascórbico não se mostraram alterados nos fígados tratados com as concentrações de 10 mg/kg, 30 mg/kg e 100 mg/kg de extrato bruto das partes aéreas de *S. westermanii* quando comparado ao controle, dessa forma demonstrando ausência de estresse, uma vez que os níveis desses antioxidantes

mostraram-se normais nos fígados dos animais tratados, como demonstrado nas (FIGURAS 42 e 43), respectivamente, para GSH e ácido ascórbico.

FIGURA 42 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUZIDA (GSH) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. A MÉDIA NÃO DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

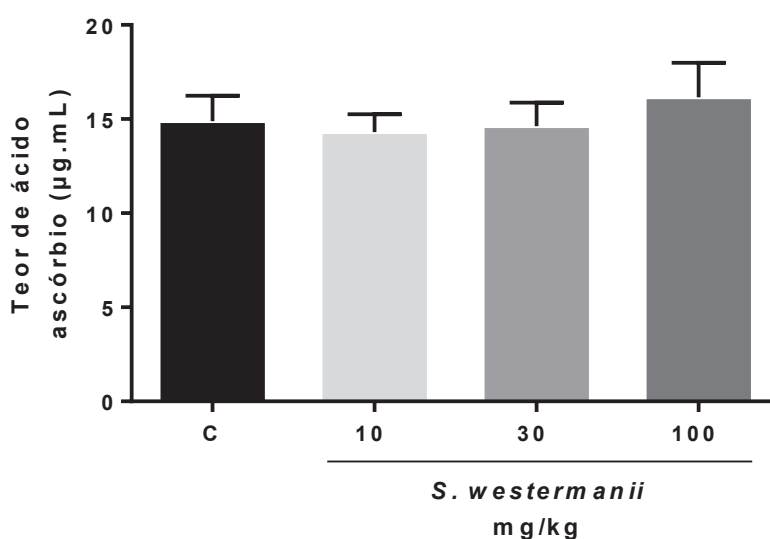
FONTE: O autor (2018).

A GSH é um agente antioxidante de defesa das células, protegendo-as de diversas lesões resultantes da exposição de agentes como oxigênio hiperbárico e íons ferro. Além disso atuam na detoxificação de agentes químicos, eliminação de produtos de lipoperoxidação, na síntese de proteínas, DNA, prostaglandinas e no metabolismo celular (ABREU, 2013).

A GSH é sintetizada naturalmente pelo fígado e atua na proteção celular contra mudanças no quadro oxidativo, porém a ingestão de GSH pode ocorrer sendo absorvida no intestino delgado, aumentando a sua concentração plasmática e sendo transportada e distribuída para diversas células do organismo. A GSH tem sido reportada em baixas concentrações em diversas doenças, consequentemente associadas ao maior risco de estresse oxidativo e das infecções oportunistas. A região da estrutura molecular da GSH envolvida na função antioxidante é o resíduo

de cistenilglicina, que possui a capacidade de reagir com elétrons não pareados de um radical livre para formar o radical GS, que por dimerização forma a glutatona redutase (GSSG) (JORDÃO JR et al., 1998).

FIGURA 43 – TEOR DE ÁCIDO ASCÓRBICO PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. A MÉDIA NÃO DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

O ácido ascórbico distribui-se amplamente em todos os tecidos do organismo, além da glândula suprarrenal, hipófise e retina, encontra-se no fígado em teores que variam de 0,10 mg/g a 1,00 mg/g. Por ser um poderoso antioxidante sua deficiência pode promover estresse oxidativo nas células, principalmente, no fígado (GUILLAND; LEQUEU, 1995). A deficiência em ácido ascórbico pode levar a uma redução hepática do citocromo P450 e afetar a atividade hepática da metabolização enzimática de drogas. Porém com a suplementação de ácido ascórbico o citocromo P450 é estimulado e mantém sua função de proteção aos hepatócitos (UED; WEFFORT, 2013).

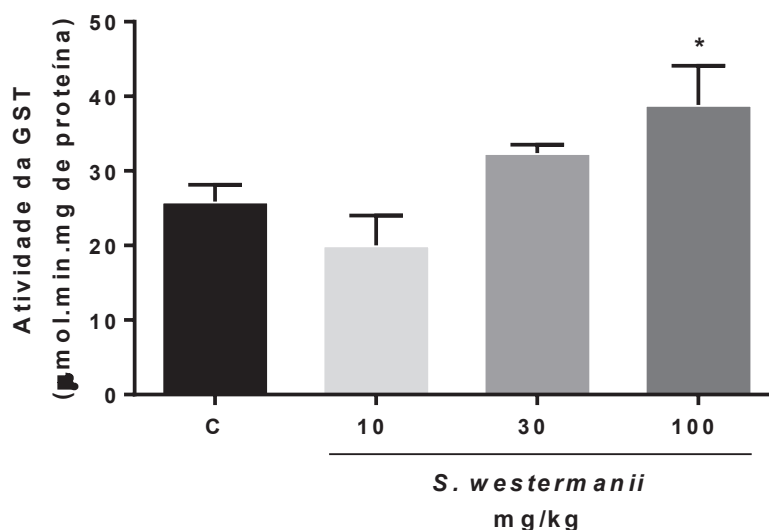
Apesar das alterações relacionadas a gordura acumulada no fígado dos animais (FIGURA 37), os antioxidantes não enzimáticos GSH e ácido ascórbico não mostraram-se alterados com o aumento de gordura hepática.

#### 5.6.6 Atividade das enzimas antioxidantes do fígado

##### 5.6.6.1 Atividade da GST, SOD e CAT

O efeito hepatotóxico das concentrações de *S. westermanii* foi verificado por meio de enzimas biomarcadoras do aumento do estresse oxidativo. A atividade da glutathiona S-transferase (GST) hepática mostrou-se aumentada apenas para a concentração de 100 mg/kg do extrato bruto das partes aéreas de *S. westermanii* quando comparada ao controle, demonstrando uma depleção hepática de 38,90  $\mu\text{mol}/\text{min}.\text{mg}$  de proteína (FIGURA 44).

FIGURA 44 – ATIVIDADE DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE (GST) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



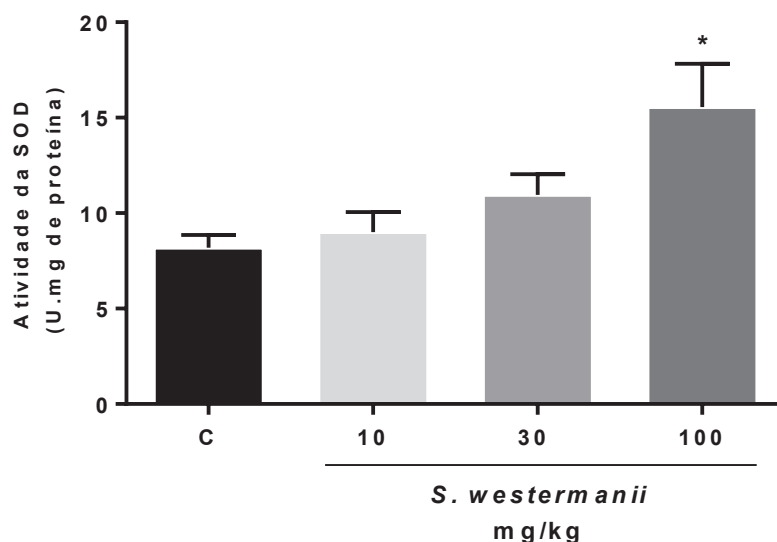
NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \*  $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

Para Pushparajah et al. (2008) a GST é um dos sistemas enzimáticos mais importantes para desintoxicação. As enzimas envolvidas nesse sistema são capazes de catalisar a conjugação de epóxidos e outros intermediários reativos com glutathiona, um tripéptido nucleofílico presente no citosol celular. A indução do sistema GST é considerada uma característica desejável, pois fitoquímicos quimiopreventivos atuam, em parte, estimulando a desintoxicação de intermediários reativos através da conjugação com a glutathiona.

A atividade da SOD hepática mostrou-se aumentada apenas na concentração de 100 mg/mL do extrato bruto das partes aéreas de *S. westermanii* demonstrando ser um indicativo de toxicidade, apresentado um valor de 16,40 U/mg de proteína (FIGURA 45). Entretanto, a atividade da catalase não demonstrou nenhuma alteração em relação ao controle (FIGURA 46).

FIGURA 45 – ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



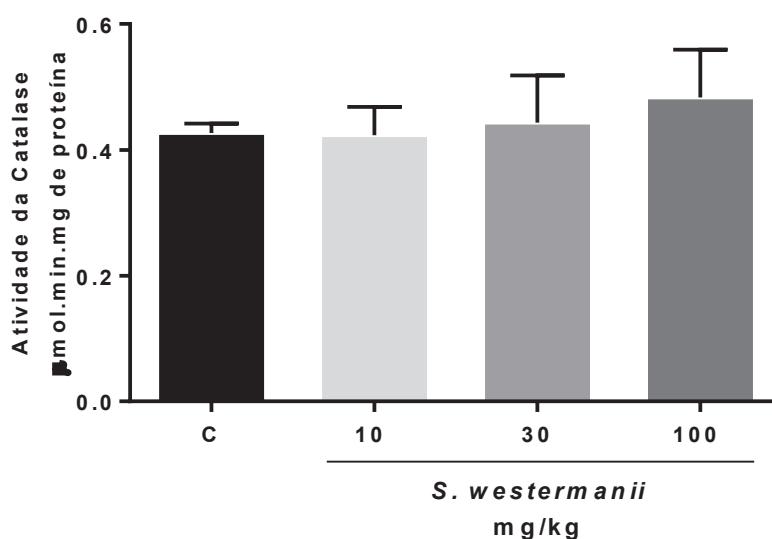
NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \* $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

A SOD é a primeira linha de defesa contra danos celulares, principalmente, contra as espécies reativas de oxigênio (ERO's) (NOGUEIRA, 2004). A SOD é

responsável por catalisar a dismutação do ânion superóxido a peróxido de hidrogênio e oxigênio, através da reação  $2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ . As principais formas da enzima SOD são MnSOD, presente na mitocôndria e a Cu/ZnSOD, presente principalmente no citosol (VASCONCELOS et al., 2007).

FIGURA 46 – ATIVIDADE DA CATALASE (CAT) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS ÀS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. A MÉDIA NÃO DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

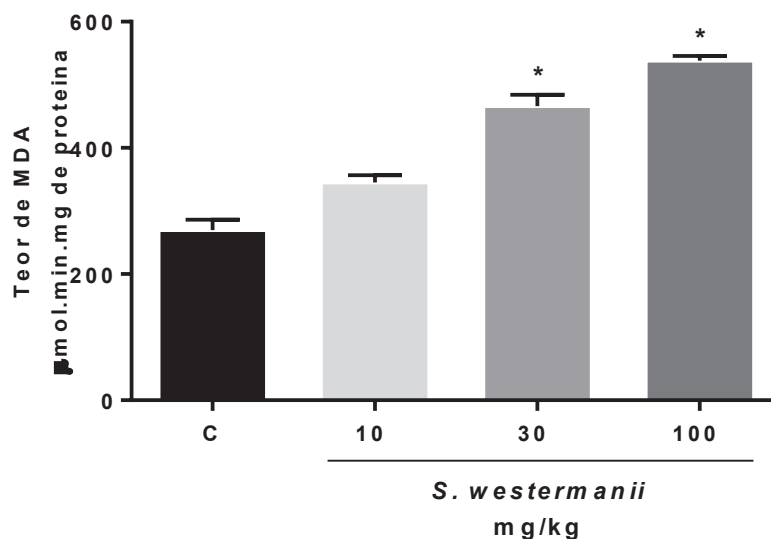
O aumento no depósito de gordura hepática (FIGURA 37) pode estar relacionado com a ERO's, pois desempenham um papel importante no desenvolvimento de esteatose hepática, pois de acordo com Perlemuter et al. (2005) as defesas citosólicas (Cu/Zn-SOD e catalase) foram aumentadas no fígado de pacientes de pacientes não alcoólicos.

O estresse oxidativo no fígado com gordura surge como resultado das ERO's que são produzidas como resultado da oxidação excessiva de ácidos graxos por peroxissomos e mitocôndrias, como resultado da expressão excessiva de enzimas CYP2E1 (MADAN et al., 2006).

### 5.6.6.2 Avaliação da peroxidação lipídica

O teor de MDA mostraram-se aumentados para as concentrações de 30 mg/kg e 100 mg/kg (FIGURA 47), com valores de 466 e 538 mmol x min x mg de proteína, respectivamente, demonstrando alterações na integridade estrutural das células. Estes resultados podem estar relacionados a presença de corpos de gordura nas amostras de fígado avaliadas (FIGURA 37).

FIGURA 47 – TEOR DE MALONDIALDEÍDO (MDA) PRESENTES NOS TECIDOS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS, SUBMETIDOS AS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRATOS DE *Senecio westermanii*, COMO INDICATIVO DO AUMENTO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA



NOTA – C: ÁGUA + TWEEN 80 (0,5%), 0,1 mL/100 g, v.o.; 10 mg/kg, 30 mg/kg, 100 mg/kg DE EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DE *S. westermanii*. \* $p < 0,05$  DIFERE DO CONTROLE PELO TESTE DE DUNNET

FONTE: O autor (2018).

O fígado é um importante órgão responsável por diversos processos metabólicos de desintoxicação do organismo devido a um complexo sistema enzimático que regula as funções hepáticas antioxidantes (SANMUGAPRIYA; VENKATARAMAN, 2006; RANAWAT; BHATT; PATEL, 2010). Lesões hepáticas frequentemente reduzem a função de defesa antioxidante desse órgão e aumentam a susceptibilidade do organismo durante a exposição a xenobióticos (JANAKAT; AL

MEIRE, 2002; LEE et al., 2003). Inúmeras substâncias químicas, usadas industrial e farmacologicamente, provocam aumento constante do risco de lesões do fígado, existindo um espectro elevado de efeitos hepatotóxicos produzidos por essas substâncias (BISSEL et al., 2001; ROOME et al., 2008). Grande parte das desordens do fígado ocorre devido à exposição a compostos químicos que podem induzir ao estresse oxidativo, com elevação da produção de compostos radicalares reativos. Esses compostos podem causar danos oxidativos às biomoléculas presentes em membranas celulares como proteínas e lipídios, culminando em perda parcial ou total da função celular (DHULEY; NAIK, 1997; FAREMI et al., 2008).

Atualmente, existe considerável interesse da medicina na busca de produtos naturais extraídos de plantas, principalmente daquelas usadas na medicina tradicional, que possam ser utilizados para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversas doenças, inclusive de desordens hepáticas induzidas por agentes tóxicos (SHEN et al., 2009; YE et al., 2009).

Embora a presença de células alteradas não tenha sido observada neste estudo, o aumento da enzima ALT, que corrobora com os dados encontrados para a peroxidação lipídica sugere degradação na membrana das células hepáticas, provocadas pelas doses dos extratos.

Padrões de hepatotoxicidade pode ser caracterizada, pelo nível elevado das enzimas conhecidas como transaminases, bem como a inibição ou aumento da síntese de proteínas e acúmulo de lipídios no interior da célula. Dessa forma estudar os efeitos de *S. westermanii* sobre alguns parâmetros bioquímicos e patológicos podem correlacionar positivamente a presença ou ausência de hepatotoxicidade, como demonstrado por Farombi (2000) e Tyson, Story e Stephens (2004). As enzimas transaminases, catalisam a conversão dos aminoácidos alanina e aspartato em piruvato e oxalacetato, respectivamente, não sendo consideradas organo-específicas (OZER et al., 2008).

No contexto bioquímico, devido à alteração da permeabilidade da membrana e morte celular desencadeada pela peroxidação lipídica e por mediadores inflamatórios, há um aumento nos níveis de enzimas hepáticas no soro. Níveis elevados de enzimas como ALT, AST, ALP e GGT são indicadores da perda de integridade funcional da membrana celular dos hepatócitos e de lesões hepáticas (OZER et al., 2008; RANAWAT; BHATT; PATEL, 2010). Além disso, a avaliação da



bilirrubinemia constitui método complementar na investigação de lesões hepáticas, uma vez que essa hepatotoxina é capaz de elevar os níveis séricos de bilirrubina devido a indução de necrose hepatocelular e colestase (SANMUGAPRIYA; VENKATARAMAN, 2006; KUMAR; KUMAR; MOHAN, 2009).

As espécies reativas de oxigênio são formadas no interior da célula em condições fisiológicas, não só pela cadeia transportadora de elétrons, mas também nos processos de oxidação celulares catalisados pelas oxidases citoplasmáticas, nos peroxissomos e nos sistemas de defesa do organismo. Os sistemas de defesa que protegem o corpo de lesões causadas por radicais livres incluem as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona-peroxidase (GPO). Seu papel como enzimas protetoras é bem conhecido e tem sido investigado extensivamente em modelos *in vivo* (GIANNI et al., 2004).

A SOD existe em três formas: as que contêm ou Cu e Zn que são citossólicas e as que contêm Mn que são mitocondriais. Esta enzima tem a função de captar o superóxido ( $O_2^-$ ) na presença de água e produzir  $H_2O_2$  de forma muito mais acelerada do que a conversão espontânea (SALVEMINI et al., 2001). A CAT é uma enzima tetramérica do grupo heme que catalisa a reação  $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$ . A catálise da  $H_2O_2$  é importante, pois na presença de ferro leva à formação do radical hidroxil (OH) altamente reativo e danoso às células (MUKHERJEE, 2003). Lesões graves em hepatócitos podem levar a quedas bruscas na quantidade destas enzimas devido à exaustão enzimática como resultado do estresse (DANG et al., 2008).

Os alcaloides pirrolizidínicos são substâncias presentes nas espécies do gênero *Senecio* e são conhecidos pelos efeitos hepatotóxicos (VEIGA JÚNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Esses metabólitos secundários são quimicamente estáveis e tornam-se ativos (tóxicos) no fígado pelas enzimas monooxigenases de função mista, metabolizando-se em ésteres pirrólicos, que são capazes de inibir a mitose ocasionando morte celular. Pelo fato desses alcaloides alterarem a estrutura de moléculas vitais isso desencadeia diversas alterações patológicas (SILVA; BOLZAN; HEINZMANN, 2006). A intoxicação crônica por *Senecio* sp. foi descrita em bovinos, equinos, ovinos e búfalos, sendo as espécies envolvidas a *S. brasiliensis*, *S. madagascariensis*, *S. oxyphyllus*, *S. cisplatinus*, *S. tweediei*, *S. selloi* e *S. heterotrichius* (LUCENA et al., 2010).

De acordo com o *screening* fitoquímico realizado por Merino (2014) a espécie *S. westermanii* detectou a presença de alcaloides. Dessa forma, sugere-se que as alterações nos resultados enzimáticos ocasionadas pelo extrato bruto etanólico para os valores de proteínas totais, ALP, ALT, GST, SOD e MDA podem estar relacionadas com a presença dos alcaloides.

## 5.7 ANÁLISE EM LINHAGEM CELULAR

### 5.7.1 Citotoxicidade em linhagem de células

Para as linhagens celulares testadas a espécie *S. westermanii* não se mostrou tóxica para as células com  $IC_{50}$  superior a 100  $\mu\text{g/mL}$  para ambas as linhagens (TABELA 14).

TABELA 14 – CITOXICIDADE EM LINHAGEM CELULAR A549-Nuclight Red E DU145-Nuclight Red

FRAÇÃO	LINHAGEM CELULAR ( $IC_{50}$ $\mu\text{g/mL}$ )	
	A549-Nuclight Red	DU145-Nuclight Red
Éter de petróleo	> 100	> 100
Acetato de etila	> 100	> 100
THF	> 100	> 100

NOTA: INIBIÇÃO:  $IC_{50} < 10$   $\mu\text{g/mL}$  (+++);  $10$   $\mu\text{g/mL} \leq IC_{50} \leq 100$   $\mu\text{g/mL}$  (++);  $IC_{50} = 100$   $\mu\text{g/mL}$  (+);  $IC_{50} > 100$   $\mu\text{g/mL}$  (-); THF (TETRAHIDROFURANO).

FONTE: O autor (2018).

Diversos estudos são focados em compostos secundários de plantas com atividade antioxidante e que possuem comprovada ação anticancerígena. Inúmeras drogas utilizadas na quimioterapia foram isoladas ou derivadas de espécies de plantas como vinblastina, vincristina, taxanos, etopósido e tenipósido e os derivados semi-sintéticos de epipodofilotoxina, camptotecina, irinotecano e topotecano. Pelo menos 50% das drogas utilizadas em ensaios clínicos para atividade anticancerígena foram isoladas de fontes naturais (KHALIGHI-SIGAROODI et al., 2012).

O gênero *Senecio* apresenta diversos compostos secundários que apresentaram atividade citotóxica em diversas linhagens celulares como o linalol,  $\beta$ -cariofileno e o  $\alpha$ -humuleno de *S. stebianus* Lacaita (TUNDIS et al. 2009), jacaranona de *S. ambiguus* subsp. (Biv.) DC. (LOIZZO et al., 2007) e *S. leucanthemifolius* Poiret (LOIZZO et al., 2005).

Apesar dos compostos ativos do gênero *Senecio*, diversas espécies destacaram-se pela bioatividade dos extratos e frações. O extrato bruto etanólico da espécie *S. graveolens* apresentou atividade citotóxica contra a linhagem celular de câncer MCF-7, que incluiu autofagia, apoptose e necrose celular. Apesar do composto 4-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) acetofenona ser o composto mais abundante na espécie, porém quando testado não apresentou atividade significativa (ECHIBURÚ-CHAU et al., 2014). As partes aéreas de *S. samnitum* Huet. apresentou efeito citotóxico *in vitro* contra quatro linhagens celulares de câncer (COR-L23, Caco-2, C32, HepG-2) na qual o extrato diclorometano (IC<sub>50</sub>: 22,89  $\mu$ g/mL) e acetato de etila (IC<sub>50</sub>: 11,91  $\mu$ g/mL) apresentam os melhores resultados contra as linhagens Caco-2 e COR-L23 (LOIZZO et al., 2006).

O extrato e frações das partes aéreas de *S. gibbosus* subsp. *gibbosus* (GUSS) DC foram avaliadas contra as linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7), câncer de próstata (LNCaP) e células normais (CHO). O extrato bruto metanólico apresentou atividade contra MCF-7 (IC<sub>50</sub>: 64,00  $\mu$ g/mL) e LNCaP (IC<sub>50</sub>: 63,00  $\mu$ g/mL), porém melhores resultados foram apresentados pelas frações diclorometano para as linhagens MCF-7 (IC<sub>50</sub>: 22,00  $\mu$ g/mL) e LNCaP (IC<sub>50</sub>: 19,00  $\mu$ g/mL) e acetato de etila MCF-7 (IC<sub>50</sub>: 30,00  $\mu$ g/mL) e LNCaP (IC<sub>50</sub>: 14,00  $\mu$ g/mL), com ausência de atividade sobre as células CHO (CONFORTI et al., 2006).

Para *S. leucanthemifolius* Poiret os extratos de diclorometano (IC<sub>50</sub>: 20,10  $\mu$ g/mL), acetato de etila (IC<sub>50</sub>: 5,00  $\mu$ g/mL) e butanol (IC<sub>50</sub>: 6,40  $\mu$ g/mL) ocasionaram citotoxicidade nas células de carcinoma COR-L23 (LOIZZO et al., 2005). Enquanto para *S. ambiguus* subsp. *ambiguus* (Biv.) DC. o extrato metanólico inibiu *in vitro* a célula de adenocarcinoma renal (ACHN) (IC<sub>50</sub>: 5,51  $\mu$ g/mL) e LNCap (IC<sub>50</sub>: 38,95  $\mu$ g/mL) e o extrato diclorometano as células LNCaP (IC<sub>50</sub>: 5,34  $\mu$ g/mL) (LOIZZO et al., 2007).

Para a linhagem humana de carcinoma hepatocelular BEL7402 os compostos isolados e identificados como 1 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-9-oxo-10 $\beta$ -hidroxil-

furanoeremofilano e 9-oxo-1 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,10 $\beta$ -trihidroxi-furanoeremofilano de *S. nemorensis* na concentração de 25  $\mu$ M apresentaram citotoxicidade de 25,12% e 26,19%, respectivamente (SHI et al., 2013).

## 5.7.2 Inflamação

### 5.7.2.1 Atividade do NF- $\kappa$ B, STAT3, Nrf2 e HIF-1 $\alpha$

Para a ativação do fator NF- $\kappa$ B a linhagem celular NIH3T3-KBFLuc não foi ativada em nenhuma das frações de *S. westermanii*, com IC<sub>50</sub> superior a 100  $\mu$ g/mL, mostrando-se negativo para ativação desse fator. Porém para a proteína STAT3 a espécie *S. westermanii* foi ativa em todas as frações com a linhagem celular HELA-STAT3Luc, sendo as frações acetato de etila e a tetrahydrofurano (THF) com IC<sub>50</sub> entre 10  $\mu$ g/mL e 100  $\mu$ g/mL (TABELA 15).

TABELA 15 – TESTE DO NF- $\kappa$ B E STAT3 UTILIZANDO AS SUAS RESPECTIVAS LINHAGENS CELULARES, NIH3T3-KBFLuc E HELA-STAT3Luc, QUANDO SUBMETIDAS ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF

FRAÇÃO	NF- $\kappa$ B	STAT3
	LINHAGEM CELULAR (IC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL)	
	NIH3T3-KBFLuc	HELA-STAT3Luc
	INIBIÇÃO	INIBIÇÃO
Éter de petróleo	> 100	= 100
Acetato de etila	> 100	10 $\leq$ IC <sub>50</sub> $\leq$ 100
THF	> 100	10 $\leq$ IC <sub>50</sub> $\leq$ 100

NOTA: INIBIÇÃO: IC<sub>50</sub> < 10  $\mu$ g/mL (+++); 10  $\leq$  IC<sub>50</sub>  $\leq$  100  $\mu$ g/mL (++); IC<sub>50</sub> = 100  $\mu$ g/mL (+); IC<sub>50</sub> > 100  $\mu$ g/mL (-); THF (TETRAHIDROFURANO).

FONTE: O autor (2018).

O NF- $\kappa$ B é um complexo protéico que controla a transcrição do DNA, induzindo a transcrição de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , o que aumenta o nível desses mediadores pró-inflamatórios (SOUZA et al., 2015). Porém o fator NF- $\kappa$ B tem sua ligação em diversos genes como das citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, TNF e quimiocinas), enzimas inflamatórias (5-LOX e COX-2), moléculas de adesão, proteínas virais, da

angiogênese (VEGF) e anti-apoptóticas e telomerase (SERASANAMBATI; CHILAKAPATI, 2016).

O NF- $\kappa$ B é um regulador chave da inflamação, porém sua contínua ativação está relacionado a diversas doenças, como as que causam inflamação intestinal (ZEUNER et al., 2017). A inibição do NF- $\kappa$ B é aplicado no tratamento de diversas doenças como o câncer, HIV e diversas doenças inflamatórias, sendo conhecido o seu mecanismo de desativação, com isso as abordagens moleculares e farmacológicas são utilizadas para inibir a atividade exagerada do NF- $\kappa$ B em resposta a citocinas inflamatórias (AGGARWAL et al., 2004). Mas o NF- $\kappa$ B é indispensável no desenvolvimento dos sistemas imunológico, esquelético e nervoso central, assim como para o desenvolvimento do epitélio (ZEUNER et al., 2017).

O extrato bruto, as frações aceto de etila e alcaloídica, e os compostos isolados senecionina e interregemina e a mistura de ácidos dicafeoilquínicos da espécie *S. brasiliensis* (Spreng) Less possui propriedades anti-inflamatórias pela inibição do NF- $\kappa$ B e, conseqüentemente, pela inibição da migração celular e mediadores pró-inflamatórios (SOUZA et al., 2015).

Os sesquiterpenos do tipo eremofilanos de *S. culcitioides* Sch. Bip identificados como culcitolides C e D (20  $\mu$ M) foram capazes de inibir, respectivamente, em 97% e 100% a atividade do NF- $\kappa$ B (NOZAKI et al., 2012).

Na espécie *S. nemorensis* dois compostos isolados e identificados como 1 $\alpha$ ,6 $\alpha$ -epoxi-9-oxo-10 $\beta$ -hidroxil-furanoeremofilano e 9-oxo-1 $\alpha$ ,6 $\beta$ ,10 $\beta$ -trihidroxifuranoeremofilano apresentaram atividade inibitória do fator NF- $\kappa$ B de 19,93 e 12,86%, respectivamente, ambas na concentração de 25  $\mu$ M (SHI et al., 2013).

A STAT3 no estado ativado tem a capacidade de regular a expressão de genes anti-apoptóticos, pró-proliferativos e resposta imune. A ativação da STAT3 ocorre quando os resíduos de tirosina 705 e serina 727 são fosforilados, controlando a sobrevivência e proliferação celular (GKOUVERIS; NIKITAKIS; SAUK, 2015).

Porém com a ativação inadequada da STAT3, o resíduo de tirosina permanece fosforilado contribuindo para a oncogênese e promovendo fenótipos malignos. No câncer a STAT3 transfere sinais de citocinas e fatores de crescimento e estimula genes alvos específicos como CDC25A, Fos, Pim1, Cyclin-D e c-Myc que induzem proliferação celular reprimindo genes apoptóticos (Fas) e regulam os genes

antiapoptóticos, incluindo BCL2, Beta2-Macroglobulina e BCLXL (GKOUVERIS; NIKITAKIS; SAUK, 2015).

Na inflamação a IL-10 é a principal citocina que sinaliza a STAT3 para antagonizar os sinais pró-inflamatórios que ativam a resposta imune inata, a STAT3 funciona indiretamente, induzindo a expressão de novos genes que são responsáveis pela execução da resposta inflamatória. Dessa forma a IL-10 bloqueia seletivamente a expressão de genes envolvidos direta ou indiretamente nas vias inflamatórias (KASMI et al., 2006).

Porém a ativação inapropriada da STAT3 pode causar diversos danos ao organismo, com isso essa ativação fora dos padrões normais está relacionada a diversas doenças como o câncer, doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, colite, asma, endometriose, diabetes, depressão, lúpus eritematoso, fibrose renal e nas doenças de Alzheimer e Huntington (GKOUVERIS; NIKITAKIS; SAUK, 2015).

Para o fator de transcrição Nrf2 as frações de *S. westermanii* não apresentou ativação ou inibição celular, com EC<sub>50</sub> inferior a 2 e IC<sub>50</sub> superior a 100 µg/mL, respectivamente (TABELA 16).

TABELA 16 – ATIVAÇÃO DO Nrf2 UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR HaCaT-ARE-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF

FRAÇÃO	Nrf2	
	LINHAGEM CELULAR (EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> µg/mL)	
	HaCaT-ARE-Luc	
	ATIVAÇÃO	INIBIÇÃO
Éter de petróleo	< 2	> 100
Acetato de etila	< 2	> 100
THF	< 2	> 100

NOTA: ATIVAÇÃO: EC<sub>50</sub> < 2 (-); EC<sub>50</sub> = 2 (+); 2 < EC<sub>50</sub> ≤ 5 (++); EC<sub>50</sub> > 5 (+++); INIBIÇÃO: IC<sub>50</sub> < 10 µg/mL (+++); 10 µg/mL ≤ IC<sub>50</sub> ≤ 100 µg/mL (++); IC<sub>50</sub> = 100 µg/mL (+); IC<sub>50</sub> > 100 µg/mL (-); THF (TETRAHIDROFURANO).

FONTE: O autor (2018).

O Nrf2 é formado por 605 aminoácidos que estão subdivididos no domínios Neh1, Neh2, Neh3, Neh4, Neh5 e Neh6, sendo a região Neh2 ligado ao complexo

repressor KEAP-1 (*Kelchlike ECH-associated protein 1*), pelas cisteínas C273 e C288, o qual promove ubiquitinação e degradação do Nrf2 no proteasoma em condições basais. Enquanto o domínio Neh3 liga-se a proteína CHD6 que ativa genes codificantes de proteínas antioxidantes quando há intenso estresse oxidativo/eletrofilico, dissociando-se do KEAP-1 e translocando-se para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta antioxidante, ativando a transcrição de enzimas antioxidantes, o que inibe a expressão de mediadores pró-inflamatórios por meio da regulação de enzimas anti-inflamatórias (NIOI et al, 2005; SÉFORA-SOUSA; de ANGELIS-PEREIRA, 2013; ALENCAR, 2014).

O fator Nrf2 apresenta-se em níveis elevados onde as reações de desintoxicação são acentuadas e permanentes como o intestino, rins, fígado e pulmões. As enzimas envolvidas nesse processo são provenientes da Fase II do processo de biotransformação e desintoxicação, que atuam na redução do estresse oxidativo, por catalisar as substâncias tóxicas tornando-as inativas e/ou excretáveis (NIOI et al., 2005; ALENCAR, 2014).

Além disso o aumento da sinalização do fator Nrf2 pode estar relacionado a ausência de ganho de peso em dietas hiperlipídicas, além da proteção contra a resistência a insulina e o não desenvolvimento de *Diabetes mellitus* e obesidade. Com isso a ativação do Nrf2 através da dieta está relacionada a proteção nefropática desenvolvida pela *D. mellitus*, prevenção a retinopatia e proteção do sistema cardiovascular (HAHN; OLIVEIRA; BOCK, 2017).

Apesar do Nrf2 ser ativado em resposta ao desequilíbrio redox ocasionado pelo estresse oxidativo/eletrofilico, sua resposta adaptativa pode ser saturada rapidamente, sendo necessário a formação de proteínas citoprotetoras de forma mais sustentada. As plantas possuem metabólitos que são indutores da Fase II e antioxidantes que permitem a proteção celular a longo prazo. Além disso a modulação por substâncias provenientes da dieta são importantes na ativação na fosforilação de Nrf2 em resíduos específicos de serina e/ou tirosina, sendo a ativação da sinalização de Nrf2-ARE (elementos de resposta antioxidante) induzidas por ingestão de metabólitos que fortalecem a defesa celular contra os estresses oxidativos, eletrofilicos e inflamatórios (SURH; KUNDU; NA, 2008).

De acordo com Surh; Kundu; Na (2008) diversas são as classes de metabólitos secundários que são capazes de ativar o fator Nrf2, principalmente



aqueles provenientes dos alimentos, como o suforafano (brócolis), curcumina (açafrão-da-terra), epigallocatequina-3-galato (chá-verde), resveratrol (uva), sulfetos de alilo (alho), licopeno (tomate) e zerumbone (gingibre).

No gênero *Senecio* a espécie *S. brasiliensis* (Spreng) Less. apesar de ser uma erva daninha e causar intoxicações em animais devido a presença dos alcaloides pirrolidizínicos, o extrato hidroalcoólico das folhas foram testados em em larvas de *Drosophila melanogaster* e observou-se que houve um estímulo na expressão de RNAm de Nrf2 em 1,56 vezes quando aplicados 0,10 mg/mL do extrato (MACEDO et al., 2017).

Para o fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  para todas as frações de *S. westermanii* não ocorreu inibição celular, com IC<sub>50</sub> superior a 100  $\mu$ g/mL. Enquanto para a ativação de HIF-1 $\alpha$  a fração THF foi a única capaz de ativar o fator, com EC<sub>50</sub> igual a 2 (TABELA 17).

TABELA 17 – ATIVAÇÃO DO HIF-1 $\alpha$  UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR NIH3T3-Epo-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF

FRAÇÃO	HIF-1 $\alpha$	
	LINHAGEM CELULAR (EC <sub>50</sub> /IC <sub>50</sub> $\mu$ g/mL)	
	NIH3T3-Epo-Luc	
	ATIVAÇÃO	INIBIÇÃO
Éter de petróleo	< 2	> 100
Acetato de etila	< 2	> 100
THF	= 2	> 100

NOTA: ATIVAÇÃO: EC<sub>50</sub> < 2 (-); EC<sub>50</sub> = 2 (+); 2 < EC<sub>50</sub>  $\leq$  5 (++) ; EC<sub>50</sub> > 5 (+++); INIBIÇÃO: IC<sub>50</sub> < 10  $\mu$ g/mL (+++); 10  $\mu$ g/mL  $\leq$  IC<sub>50</sub>  $\leq$  100  $\mu$ g/mL (++) ; IC<sub>50</sub> = 100  $\mu$ g/mL (+); IC<sub>50</sub> > 100  $\mu$ g/mL (-); THF (TETRAHIDROFURANO).

FONTE: O autor (2018).

O fator HIF-1 adapta-se a mudanças de oxigenação nos tecidos, esse fator é constituído de duas subunidades a HIF-1 $\alpha$  e HIF-1 $\beta$ , sendo a primeira subunidade altamente regulada e sua expressão é determinada de acordo com as taxas de síntese (reguladas por mecanismos independentes de O<sub>2</sub>) e degradação (reguladas por mecanismos dependentes de O<sub>2</sub>) protéica (SEMENZA, 2003).



Em estado de normoxia, a proteína HIF-1 $\alpha$  é ligeiramente degradada. Porém em estado de hipóxia HIF-1 $\alpha$  torna-se estável e transloca-se do citoplasma para o núcleo, onde se dimeriza com a HIF-1 $\beta$  tornando o complexo HIF transcricionalmente ativo. Após a ativação o HIF liga-se ao elemento de resposta a hipóxia nas regiões reguladoras dos genes alvo e coativadores transcricionais para induzir a expressão gênica. A regulação da estabilidade e subsequente função transativacional do HIF-1 $\alpha$  é controlada principalmente por modificações pós-tradução, como hidroxilação, ubiquitinação, acetilação e fosforilação (KE; COSTA, 2006).

Em geral, o fator primário que medeia a hipóxia é o HIF-1 que está envolvido nos fatores determinantes para o desenvolvimento do câncer, como a indução transcricional de uma série de genes que participam da sobrevivência, invasão celular, angiogênese e no metabolismo da glicose e ferro. Alterações genéticas e hipóxia intratumoral podem levar a uma superexpressão de HIF-1 $\alpha$ , que está relacionado a diversos tipos de câncer e no aumento da mortalidade dos portadores (SEMENZA, 2003).

No gênero *Senecio* a espécie *S. graveolens* apesar de não ser testada especificamente para o fator HIF-1 $\alpha$ , porém o extrato bruto etanólico foi capaz de causar hipóxia em células de câncer de mama, esse fato pode ser explicado pelo fato do extrato induzir a autofagia, apoptose e necrose celular (ECHIBURÚ-CHAU et al., 2014).

Apesar da escassez de estudos para espécies do gênero *Senecio*, porém diversos compostos isolados e identificados de plantas são capazes de alterar o fator HIF-1 $\alpha$ . De acordo com Nagle; Zhou (2006) uma mistura de iridoides glicosilados das raízes da espécie de *Picrorhiza kurrooa*, sendo os principais compostos identificados dessa mistura o picrosídeo I e kutkosídeo foram os responsáveis pela redução dos níveis de HIF- $\alpha$  e o fator de crescimento endotelial vacular. Ainda a apeginina encontrada em diversas espécies vegetais inibiu a hipóxia induzida e a proteína de transição HIF-1 $\alpha$  em células Hep3B, além disso desestabilizam a proteína HIF-1 $\alpha$  interrompendo a interação entre a proteína e a hsp90. O resveratrol, presente na uva e amendoim, inibe a expressão da proteína HIF-1 $\alpha$  em pelo menos dois mecanismos diferentes: inibe a síntese da proteína HIF-1 $\alpha$  e facilita a degradação da proteína HIF-1 $\alpha$  mediada pelo proteossoma.

### 5.7.3 Metabolismo

#### 5.7.3.1 Atividade de TGR5 e PPARs

Na análise de ativação do fator TGR5 as frações éter de petróleo e acetato de etila de *S. westermanii* foram capazes de ativar o TGR5 com valor de EC<sub>50</sub> igual a 2 e EC<sub>50</sub> entre 2 e/ou igual a 5, respectivamente (TABELA 18).

TABELA 18 – ATIVAÇÃO DO TRG5 UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR CHO-TGR5-CRE-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF

FRAÇÃO	TGR5
	LINHAGEM CELULAR (EC <sub>50</sub> µg/mL)
	<b>CHO-TGR5-CRE-Luc</b>
	<b>ATIVAÇÃO</b>
Éter de petróleo	= 2
Acetato de etila	2 < Fold ≤ 5
THF	< 2

NOTA: ATIVAÇÃO: EC<sub>50</sub> < 2 (-); EC<sub>50</sub> = 2 (+); 2 < EC<sub>50</sub> ≤ 5 (++); EC<sub>50</sub> > 5 (+++); THF (TETRAHIDROFURANO).

FONTE: O autor (2018).

Como uma das principais funções do TGR5 é a regulação da glicose, dessa forma a família Asteraceae contém espécies que possuem comprovada atividade antidiabética por diminuírem a concentração de açúcar no sangue como a *Artemisia dracuncululus* L. (antihiperlicêmica); *Bidens pilosa* (secreção de insulina estimulada através de ilhotas pancreáticas); *Chamaemelum nobile* (hipoglicemia significativa sem afetar as concentrações basais de insulina plasmática); *Elephantopus scaber* (atividade antidiabética ao reduzir os níveis elevados de glicose no sangue e restaurar os níveis de insulina em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina); *Helianthus tuberosus* L. (hipoglicemiante); *Helichrysum plicatum* ssp. *plicatum* (antihiperlicêmica e antioxidante); *Inula viscosa* (hipoglicemiante) e *Vernonia anthelmintica* (antidiabética e antihiperlipidêmica) (RANJAN; VATS, 2017).

Para analisar a ativação dos receptores PPAR's nenhuma das frações de *S. westermanii* foram capazes de ativar os receptores, com valor de  $EC_{50}$  inferior a 2 (TABELA 19).

TABELA 19 – ATIVAÇÃO DOS PPAR $\alpha$  E PPAR $\gamma$  UTILIZANDO A LINHAGEM CELULAR CHO- HELA-GAL4-Luc, QUANDO SUBMETIDA ÀS FRAÇÕES ÉTER DE PETRÓLEO, ACETATO DE ETILA E THF

FRAÇÃO	PPAR $\alpha$	PPAR $\gamma$
	LINHAGEM CELULAR ( $EC_{50}$ $\mu$ g/mL)	
	HELA-GAL4-Luc	
	ATIVAÇÃO	ATIVAÇÃO
Éter de petróleo	< 2	< 2
Acetato de etila	< 2	< 2
THF	< 2	< 2

NOTA: ATIVAÇÃO:  $EC_{50} < 2$  (-);  $EC_{50} = 2$  (+);  $2 < EC_{50} \leq 5$  (++);  $EC_{50} > 5$  (+++); THF (TETRAHIDROFURANO).

FONTE: O autor (2018).

A expressão de PPAR $\alpha$  ocorre principalmente em tecidos onde há alta taxa de catabolismo, como o fígado. Os ácidos graxos presentes no fígado são biotransformados em lipoproteínas de baixa densidade (VLDL) através dos ativadores de PPAR $\alpha$ . Esse processo ocorre através da ativação de ésteres de acil CoA e a degradação por  $\beta$ -oxidação peroxisomal e mitocondrial. Dessa forma o papel fisiológico do receptor PPAR $\alpha$  é detectar o fluxo total de ácidos gordurosos na dieta em tecidos específicos. A expressão de é importante para o tratamento de diversas doenças como os problemas de dislipidemias, aterosclerose, obesidade e a diabetes (SINGH et al., 2011).

O gene do PPAR $\gamma$  foi mapeado no cromossomo 3 na região 3p25 (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007). A isoforma PPAR $\gamma$  é subdividida em quatro isoformas: PPAR $\gamma$ 1 (expresso em praticamente todos os tecidos); PPAR $\gamma$ 2 (expressa no tecido adiposo); PPAR $\gamma$ 3 (expresso em macrófagos, intestino grosso e tecido adiposo branco); PPAR $\gamma$ 4 (expresso em células endoteliais) (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007; TYAGI et al., 2011).

Porém os co-ativadores da PPAR $\gamma$  são os alvos para o tratamento da diabetes tipo 2, pois estão envolvidos no aumento da oxidação de ácidos graxos. A

perda de PPAR $\gamma$  muscular pode produzir um efeito na utilização dos ácidos graxos pelo músculo esquelético, contribuindo para a resistência à insulina, com o desenvolvimento da diabetes tipo 2. Com isso a rosiglitazona é um agonista PPAR sintético e agora é amplamente utilizada para tratar pacientes com diabetes tipo 2 através do aumento da sensibilidade à insulina (SINGH et al., 2011; JANANI; KUMARI, 2015).

Dessa forma metabólitos identificados no gênero *Senecio* são capazes de ativar a PPAR $\gamma$ . Ahmed et al. (2017) isolaram dois novos sesquiterpenos alcoólicos das partes aéreas de *S. hadiensis* Forssk. denominados de presilphiperfolan-2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -triol e presilphiperfolan-2 $\alpha$ ,5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -tetraol. A atividade da PPAR- $\alpha$  e PPAR- $\gamma$  foram testadas com ambos os compostos, o primeiro ativou em 17% e 18%, enquanto o segundo em 10% e 24%, para os respectivos receptores. Enquanto *S. fuchsii* C.C. Gmel. não apresentou nenhuma atividade para o receptor PPAR- $\gamma$  (RAU et al., 2006).

## 5.8 ESTUDO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

### 5.8.1 Germinação

Para o índice de velocidade de germinação (IVG) das sementes de *A. cepa* observou-se que não houve diferença estatística entre o controle e o extrato bruto e frações de *S. westermanii*. Dessa forma nenhuma das amostras mostrou-se influente na germinação da espécie alvo. O resultado do ensaio pode ser visto na (TABELA 20) e de forma objetiva a (FIGURA 48) expõe o resultado.

Porém com sementes de *L. sativa* as frações hexano e clorofórmio nas concentrações de 500  $\mu\text{g/mL}$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, de *S. westermanii* influenciaram negativamente o IVG dessa espécie alvo. No ensaio de *screening* fitoquímico realizado com as frações de *S. westermanii*, detectou-se a presença de esteroides e alcaloides nas frações hexano e clorofórmio, respectivamente. Possivelmente essas substâncias foram capazes de alterar a germinação de *L. sativa* por afetarem a parede celular da semente e, assim, influenciar no IVG das sementes que foram expostas as frações (MERINO, 2014).

TABELA 20 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	IVG (ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*
EXTRATO BRUTO	250	16,74 ± 0,76	a1
	500	15,28 ± 1,13	a1
	1000	16,17 ± 0,92	a1
FRAÇÃO HEXANO	250	15,53 ± 0,14	a1
	500	20,33 ± 1,16	a1
	1000	16,86 ± 1,41	a1
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	250	15,94 ± 1,58	a1
	500	14,29 ± 1,57	a1
	1000	21,47 ± 1,57	a1
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	250	15,06 ± 0,66	a1
	500	16,41 ± 1,80	a1
	1000	18,61 ± 1,57	a1
FRAÇÃO REMANESCENTE	250	13,54 ± 1,95	a1
	500	15,24 ± 0,82	a1
	1000	16,68 ± 1,26	a1
CONTROLE	-	17,45 ± 0,73	a1

NOTA – AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.

FONTE: O autor (2018).

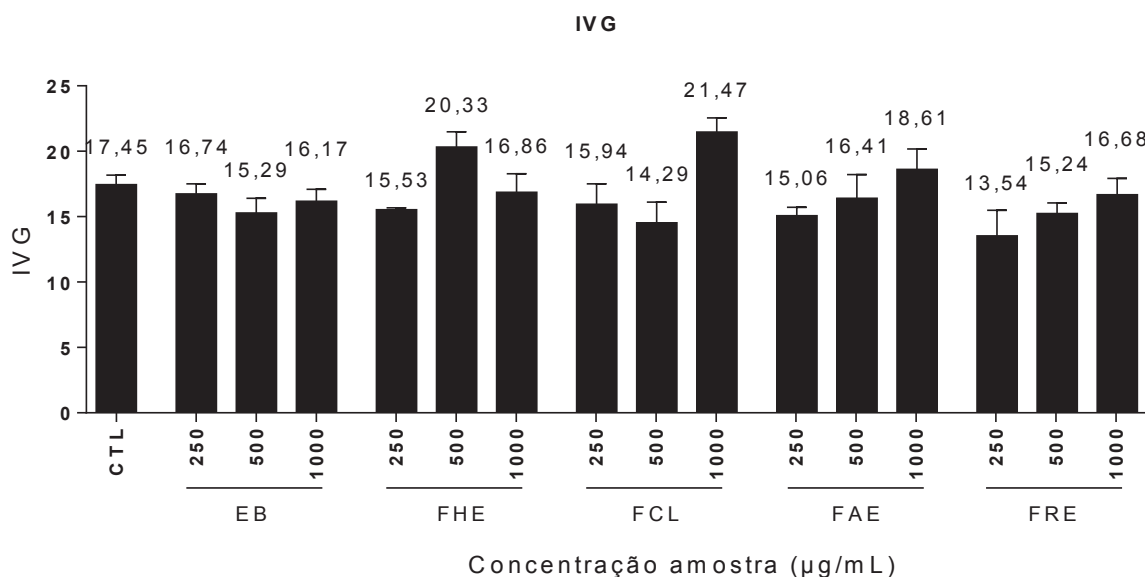
Silva et al. (2011) explicam que é complexo estabelecer onde o processo inicia e termina de germinação, desta forma o critério adotado é macroscópico, em que se vê a protusão da raiz primária. O processo de germinação é menos sensível aos componentes presentes nos extratos quando comparado ao crescimento da plântula, tornando desta forma a quantificação mais simples, sendo um fenômeno discreto para cada semente.

Para Carmo, Lima e Borges e Takaki (2007) apesar da porcentagem de germinação final não ser afetada, o padrão de germinação pode apresentar alteração, ocasionando diferença na velocidade e sincronia de germinação nas

sementes submetidas aos aleloquímicos presentes nos extratos. Além disso, o IVG é utilizado para detectar o vigor (parâmetro para o potencial fisiológico da semente, indicando maior ou menor probabilidade de sucesso após a semeadura) da semente, com a diminuição deste ocorre a perda progressiva na capacidade produtiva, com conseqüente redução na uniformidade de germinação (SILVA et al., 2011).

Mas para a semente de *A. cepa* a mesma característica não ocorreu quando comparado ao estudo realizado por Belinelo et al. (2008) com sementes de *Sorghum bicolor* L. (sorgo), planta pertencente a família Asteraceae que também é do grupo das monocotiledôneas, observou-se que não houve diferença estatística entre a inibição das frações hexano e diclorometano quando comparado ao controle água. Segundo os pesquisadores, esse fato tenha ocorrido porque a maior atividade ocorre nas frações com maior polaridade, aquelas que possuem grupamentos carbonila e hidroxilas, e não em substâncias com menor polaridade, como as frações hexano e diclorometano.

FIGURA 48 – ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DAS SEMENTES DE *Allium cepa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii*



NOTA – CTL (CONTROLE); EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA) E FRE (FRAÇÃO REMANESCENTE). BARRAS COM O MESMO DESENHO NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2018).

Apesar da espécie *S. westeramanii* não alterar o IVG das sementes de *A. cepa*, porém no gênero *Senecio* diversas espécies foram capazes de alterar o padrão de germinação das espécies alvos. As espécies *S. madagascariensis* e *S. barba-johannis* apresentaram uma inibição superior a 50% em um período de 24 h para as sementes de *L. sativa* (BURGUEÑO-TAPIA et al., 2007). Enquanto *S. candidans* e *S. magellanicus* reduziram em 25% a germinação de *L. sativa* (REINA et al., 2012). E para *S. salignus* a inibição ocorreu contra as sementes de *Physalis ixocarpa* quando as amostras foram testadas na concentração de 150 µg/mL (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2012).

### 5.8.2 Crescimento

No crescimento radicular, envolvendo a radícula e o coleóptilo, apenas algumas frações foram semelhantes ao controle. As frações clorofórmio (1000 µg/mL) e acetato de etila (500 µg/mL e 1000 µg/mL) não influenciaram o crescimento da radícula nas sementes de *A. cepa*, pois não diferenciaram estatisticamente do controle. Dessa forma, a maioria das frações e concentrações testadas foram capazes de influenciar negativamente no crescimento da radícula, atrasando o desenvolvimento em função da diminuição da radícula, observa-se uma redução no crescimento de 30% a 60%. Para o coleóptilo, apenas as frações hexano (250 µg/mL) e clorofórmio (250 µg/mL) diferenciaram-se do controle, porém houve uma redução de 25% e 55%, respectivamente, no desenvolvimento. Na (TABELA 21) estão representados os resultados do ensaio. Para uma melhor visualização as (FIGURAS 49 e 50) expõe os resultados do comprimento da radícula e coleóptilo, respectivamente.

Para Merino (2014) o crescimento da radícula de *L. sativa* apresentou um resultado semelhante ao padrão de crescimento quando comparado ao resultado obtido nesse trabalho com as sementes de *A. cepa*. Observa-se que a maioria das amostras foram inibitórias quando comparado ao controle. Porém para o coleóptilo de *A. cepa* obteve-se o resultado contrário quando comparado ao hipocótilo das sementes de *L. sativa*.

TABELA 21 – ENSAIO DE CRESCIMENTO DA RADÍCULA E COLEÓTILO DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	CRESCIMENTO	
		RADÍCULA (mm)	COLEÓTILO (mm)
EXTRATO BRUTO	250	2,50 ± 0,49 a1	8,47 ± 0,63 a2
	500	2,92 ± 0,55 a1	9,90 ± 0,59 a2
	1000	2,70 ± 0,46 a1	9,10 ± 0,64 a2
FRAÇÃO HEXANO	250	2,42 ± 0,46 a1	6,27 ± 0,59 a1
	500	3,05 ± 0,46 a1	9,20 ± 0,61 a2
	1000	3,72 ± 0,50 a1	11,52 ± 0,63 a2
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	250	1,77 ± 0,45 a1	4,65 ± 0,58 a1
	500	3,22 ± 0,42 a1	8,77 ± 0,49 a2
	1000	4,67 ± 0,46 a2	10,57 ± 0,65 a2
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	250	3,37 ± 0,40 a1	9,32 ± 0,63 a2
	500	5,02 ± 0,47 a2	10,02 ± 0,61 a2
	1000	5,30 ± 0,50 a2	9,00 ± 0,54 a2
FRAÇÃO REMANESCENTE	250	2,35 ± 0,48 a1	7,90 ± 0,55 a2
	500	3,30 ± 0,41 a1	8,82 ± 0,66 a2
	1000	2,70 ± 0,48 a1	9,50 ± 0,57 a2
CONTROLE	-	4,83 ± 0,49 a2	8,43 ± 0,43 a2

NOTA – AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.

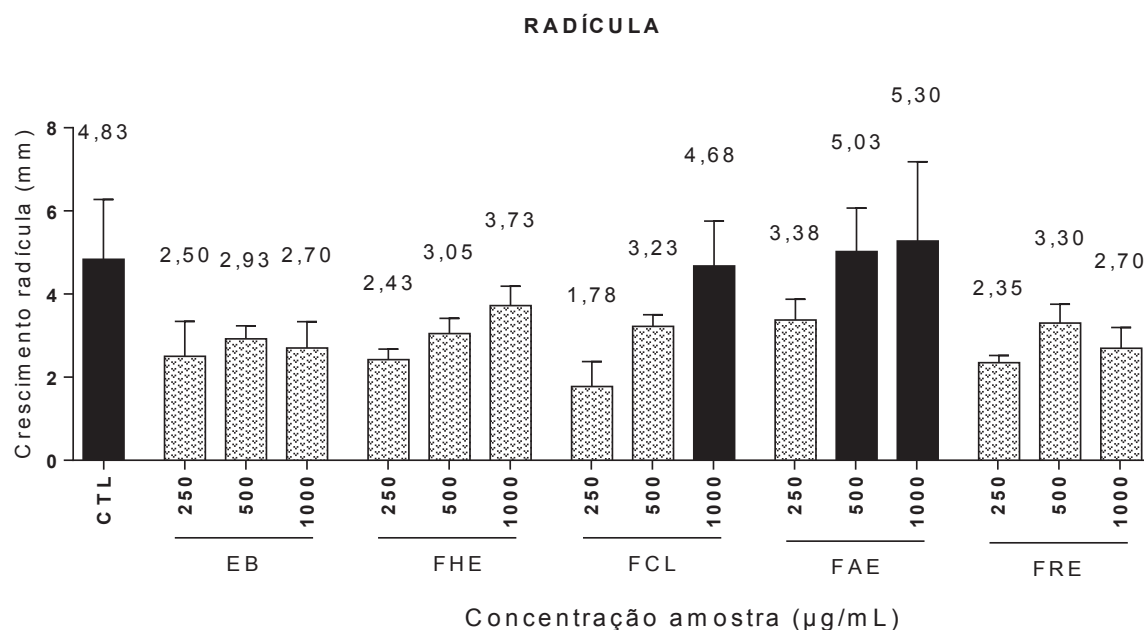
FONTE: O autor (2018).

De acordo com Oliveira et al. (2011) as sementes de *Sorghum bicolor* L. (monocotiledônea) quando tratadas com extrato etanólico de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) em 100 mg/L apresentou uma menor taxa de crescimento da radícula, com inibição radicular de 49,7% no comprimento. Para Cândido et al. (2010) ao se comparar o efeito nas partes aéreas das plântulas com as raízes, os efeitos fitotóxicos são mais acentuados na região radicular devido ao contato direto das raízes com as frações, aumentando a probabilidade de influência das toxinas nessa região. Carmo, Lima e Borges e Takaki (2007) comentam que além do



contato direto das amostras com a parte radicular, prejudicando o desenvolvimento dessa região, tem-se o acelerado metabolismo e, principalmente no estágio inicial do desenvolvimento, a região fica sensibilizada ao estresse ambiental. Os pesquisadores ainda relatam que a presença de ácidos fenólicos provoca o aumento da atividade de enzimas oxidativas, contribuindo para a redução do alongamento radicular, por modificarem a permeabilidade da membrana e aumentarem a formação de lignina.

FIGURA 49 – COMPRIMENTO DA RADÍCULA DAS SEMENTES DE *Allium cepa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii*



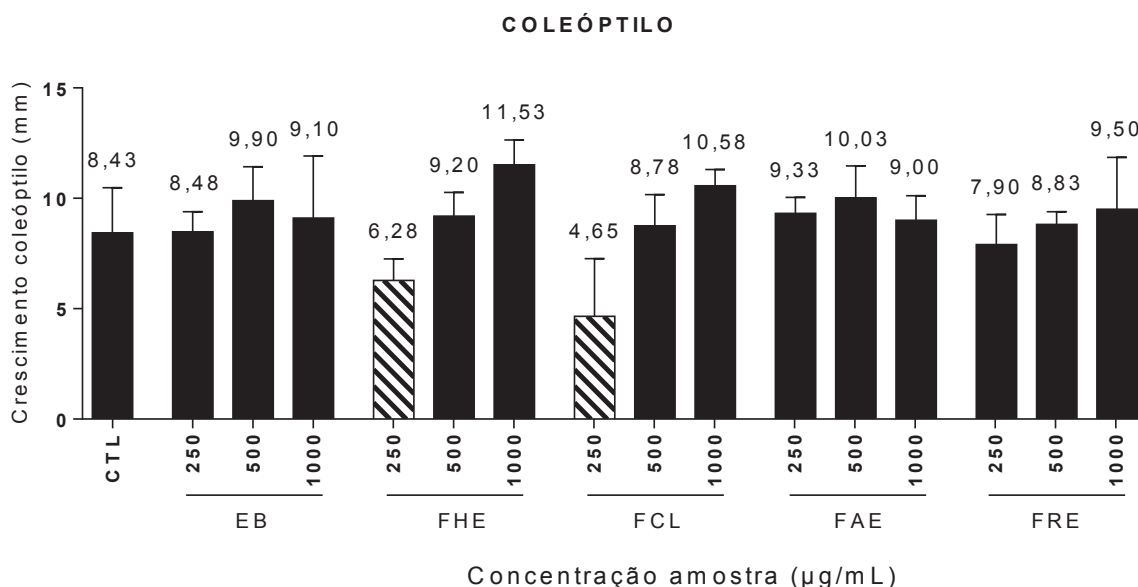
NOTA – CTL (CONTROLE); EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA) E FRE (FRAÇÃO REMANESCENTE). BARRAS COM O MESMO DESENHO NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2018).

Diversos estudos comprovam a interferência de compostos secundários do gênero *Senecio* no crescimento das raízes das espécies-alvos. Para *S. madagascariensis*, *S. barba-johannis* e *S. toluccanus* houve inibição superior a 50% (BURGUEÑO-TAPIA et al., 2007), *S. candidans* e *S. magellanicus* (REINA et al., 2012) e *S. macrotis* e *S. asperulus* (PORTERO et al., 2013) também foram capazes de inibir o alongamento radicular de *L. sativa*. Enquanto *S. salignus* inibiu em até

30% o comprimento da raiz de *Echinochloa crus-galli* e até 53% do crescimento radicular de *P. ixocarpa* (SÁNCHEZ-MUÑOZ et al., 2012).

FIGURA 50 – COMPRIMENTO DO COLEÓPTILO DAS SEMENTES DE *Allium cepa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii*



NOTA – CTL (CONTROLE); EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA) E FRE (FRAÇÃO REMANESCENTE). BARRAS COM O MESMO DESENHO NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2018).

A alteração no crescimento radicular de *A. cepa* pode estar relacionada com a presença de alcaloides, flavonoides e esteroides/triterpenos nas frações de *S. westermanii* (MERINO et al., 2015). Como estabelecido, a ação alelopática das plantas é devido as diferentes classes de metabólitos químicos como os terpenos, alcaloides, polifenóis, ácidos graxos e poliacetilenos (EINHELLIG, 2002).

### 5.8.3 Respiração da raízes

Na respiração das raízes as frações clorofórmio e acetato de etila em todas as concentrações (250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL) foram estatisticamente diferentes do controle, pois os valores das absorbâncias diferenciaram estatisticamente da absorbância do controle. Observa-se que essas frações foram capazes de aumentar a respiração celular em 80% a 150%. Porém as outras frações

e o extrato bruto apresentaram valores de absorvância estatisticamente iguais ao controle. Na (TABELA 22) estão representados os resultados do ensaio.

TABELA 22 – ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	ABSORVÂNCIA (530 nm)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*		
EXTRATO BRUTO	250	0,10 ± 0,03	a1		
	500	0,11 ± 0,02	a1		
	1000	0,10 ± 0,02	a1		
FRAÇÃO HEXANO	250	0,07 ± 0,01	a1		
	500	0,10 ± 0,02	a1		
	1000	0,13 ± 0,02	a1		
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	250	0,20 ± 0,02		a2	
	500	0,23 ± 0,04			a3
	1000	0,25 ± 0,05			a3
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	250	0,20 ± 0,01		a2	
	500	0,18 ± 0,03		a2	
	1000	0,26 ± 0,02			a3
FRAÇÃO REMANESCENTE	250	0,10 ± 0,03	a1		
	500	0,07 ± 0,04	a1		
	1000	0,09 ± 0,03	a1		
CONTROLE	-	0,10 ± 0,02	a1		

NOTA – AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT.

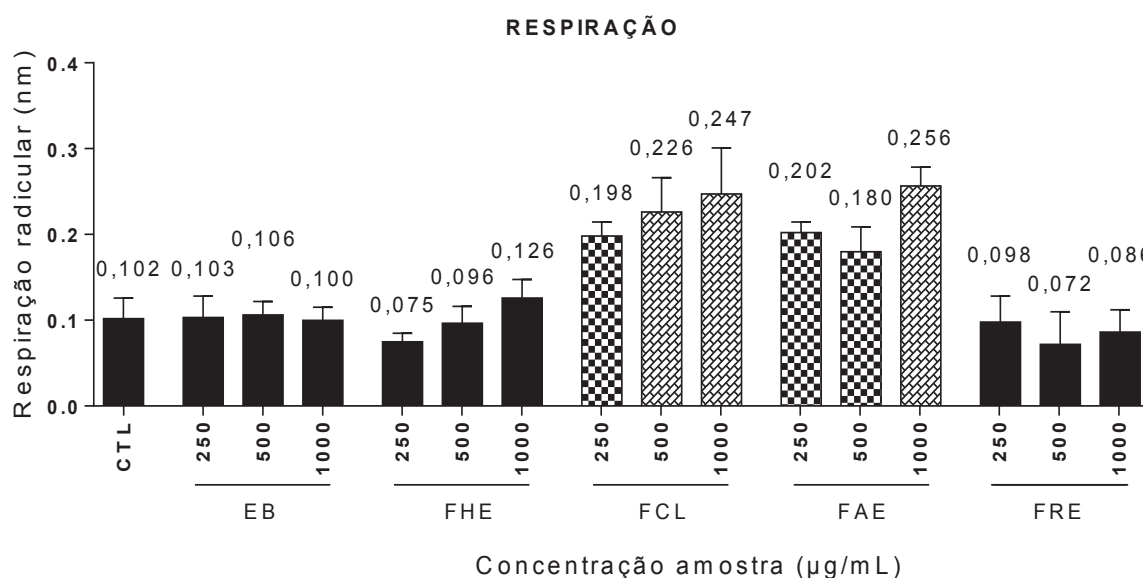
FONTE: O autor (2018).

No ensaio realizado por Merino (2014) a respiração das raízes de *L. sativa* tiveram a taxa de respiração radicular diminuída com a presença do extrato bruto e frações de *S. westermanii*. Porém para a respiração das raízes de *A. cepa* observou-se o contrário, com aumento na taxa de respiração radicular. Para Carmo, Lima e Borges e Takaki (2007) a alteração na respiração celular das plantas submetidas a

extratos vegetais está ligado a modificação da permeabilidade das membranas celulares ocasionado pelos compostos secundários presentes nas amostras.

Na (FIGURA 51) pode-se observar o resultado dos valores das absorbâncias para a respiração das raízes.

FIGURA 51 – COMPARAÇÃO DAS ABSORBÂNCIAS DO ENSAIO DE RESPIRAÇÃO DAS RAÍZES DAS SEMENTES *Allium cepa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii*



NOTA – CTL (CONTROLE); EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA) E FRE (FRAÇÃO REMANESCENTE). BARRAS COM O MESMO DESENHO NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2018).

#### 5.8.4 Fotossíntese

No ensaio de fotossíntese as frações hexano (1000 µg/mL) e clorofórmio (1000 µg/mL) obtiveram a maior influência sobre a clorofila total, sendo estatisticamente mais distinta do controle. Essas duas frações nessa concentração reduziram, aproximadamente, 70% da capacidade fotossintética das folhas de *A. cepa*. Além disso, para as outras amostras com atividade, observou-se que a redução na fotossíntese foi de 30% a 50% em relação ao controle. Apenas a fração remanescente não alterou a fotossíntese das sementes de acordo com a estatística. Os valores referentes ao ensaio estão representados na (TABELA 23).

TABELA 23 – ENSAIO DE FOTOSÍNTESE DAS PLÂNTULAS DE *Allium cepa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO ALELOPÁTICO POR MEIO DE PLACAS DE PETRI

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO DA AMOSTRA (µg/mL)	CLOROFILA TOTAL (mg/L)	CLASSIFICAÇÃO DO TESTE DE SCOTT KNOTT*			
EXTRATO BRUTO	250	7,39 ± 0,97		a2		
	500	8,33 ± 0,92		a2		
	1000	10,07 ± 0,96			a3	
FRAÇÃO HEXANO	250	4,79 ± 0,70	a1			
	500	9,57 ± 0,90			a3	
	1000	12,64 ± 0,72				a4
FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	250	4,87 ± 0,43	a1			
	500	10,77 ± 0,85			a3	
	1000	13,29 ± 0,89				a4
FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	250	10,23 ± 0,54			a3	
	500	9,78 ± 0,62			a3	
	1000	12,96 ± 0,96				a4
FRAÇÃO REMANESCENTE	250	12,42 ± 0,98				a4
	500	12,70 ± 1,03				a4
	1000	13,99 ± 0,92				a4
CONTROLE	-	14,82 ± 0,71				a4

NOTA – AMOSTRAS CLASSIFICADAS NO MESMO GRUPO NÃO DIFEREM ESTATISTICAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT. **CLOROFILA TOTAL:** (ABSORBÂNCIA DA CLOROFILA A X 20,2) + (ABSORBÂNCIA DA CLOROFILA B X 8,02).

FONTE: O autor (2018).

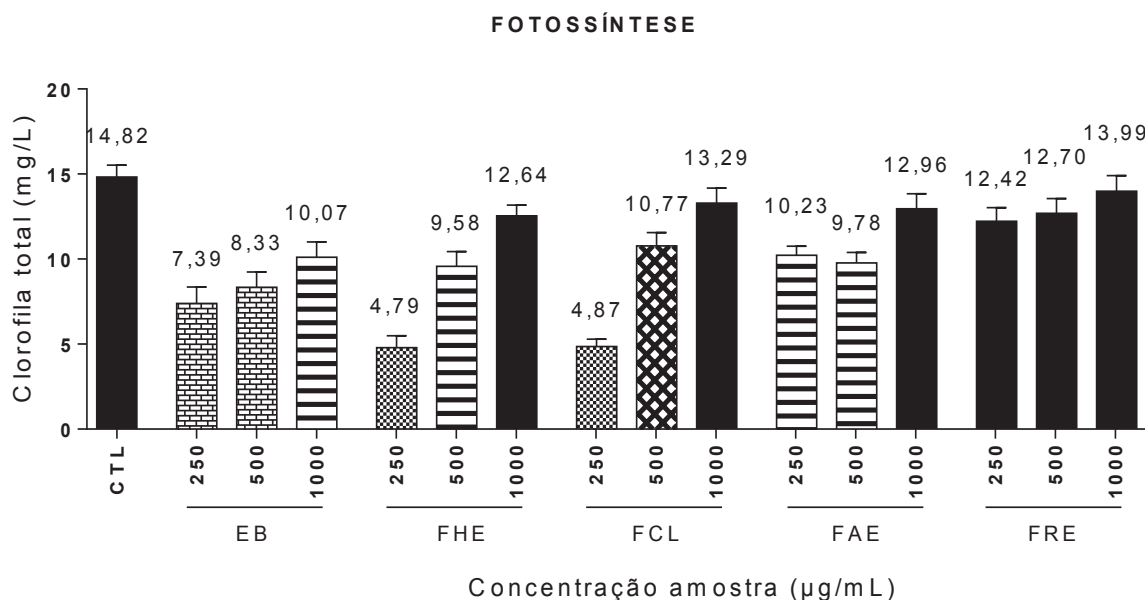
De acordo com Gulzar, Siddiqui e Bi (2014) além das substâncias presentes no extrato que diminuem diretamente a biossíntese de clorofila, elas podem indiretamente estimular outras substâncias que alteram o padrão de fotossíntese. Os pesquisadores ainda afirmam que a redução de água nas folhas das espécies leva ao fechamento dos estômatos diminuindo a obtenção de CO<sub>2</sub> para as células do mesófilo, reduzindo a fotossíntese com consequente diminuição da clorofila. Outro mecanismo dos aleloquímicos é a interação das substâncias com os componentes do fotossistema II, acarretando em diminuição da fotossíntese e o transporte do oxigênio.

Os resultados podem ser diferentes quando trabalha-se com espécies alvos distintas, como é o caso do resultado apresentado por Merino (2014), que mostrou que o extrato bruto e frações de *S. westermanii* não foram capazes de alterar o padrão fotossintético de *L. sativa*. Porém para o presente estudo com as sementes de *A. cepa* não ocorreu o mesmo, pois os efeitos causados pelos aleloquímicos podem impedir a formação da ligação Mg-porfirinas, inibindo assim a fotossíntese por alteração do conteúdo de clorofila na planta alvo (CARMO; LIMA E BORGES; TAKAKI, 2007).

A espécie *S. salignus* alterou o padrão fotossintético de *P. ixocarpa* em 72 h de análise, observou-se que o transporte de elétrons por seção transversal e o rendimento quântico máximo de fotoquímica primária diminuíram 50% e a captura e o transporte de elétrons diminuíram cerca de 50% (Sánchez-Muñoz et al., 2012).

A (FIGURA 52) apresenta os valores referentes a fotossíntese total das plântulas.

FIGURA 52 – COMPARAÇÃO DA FOTOSSÍNTESE TOTAL DAS PLÂNTULAS DAS SEMENTES *Allium cepa* TESTADAS COM O EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii*



NOTA – CTL (CONTROLE); EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA) E FRE (FRAÇÃO REMANESCENTE). BARRAS COM O MESMO DESENHO NÃO SE DIFEREM SIGNIFICATIVAMENTE PELO TESTE DE SCOTT-KNOTT ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2018).

Paula et al. (2014) dizem que os principais aleloquímicos responsáveis pela alteração no padrão de fotossíntese nas plantas são os flavonoides, ácidos fenólicos, cumarinas e os polifenóis, pois alteram o transporte de elétrons e a fosforilação nos fotossistemas. Dessa forma, os resultados encontrados para o extrato e frações de *S. westermanii* sobre sementes de *A. cepa* corroboram com os estudos preliminares de Merino (2014).

## 5.9 ALELOPATOLOGRAFIA

### 5.9.1 Avaliação histoquímica do ânion superóxido

Dessa forma, pode-se observar que o controle (FIGURA 53A) da espécie alvo de *L. sativa* não teve uma atividade significativa da SOD, porém quando a espécie alvo é submetida às amostras de *S. westermanii*, têm-se a atividade da SOD aumentada (FIGURAS 53B, 53C, 53D, 53E e 53F), isso pode ser verificado pelas regiões mais escuras, que são acúmulos de SOD nos folíolos e região radicular.

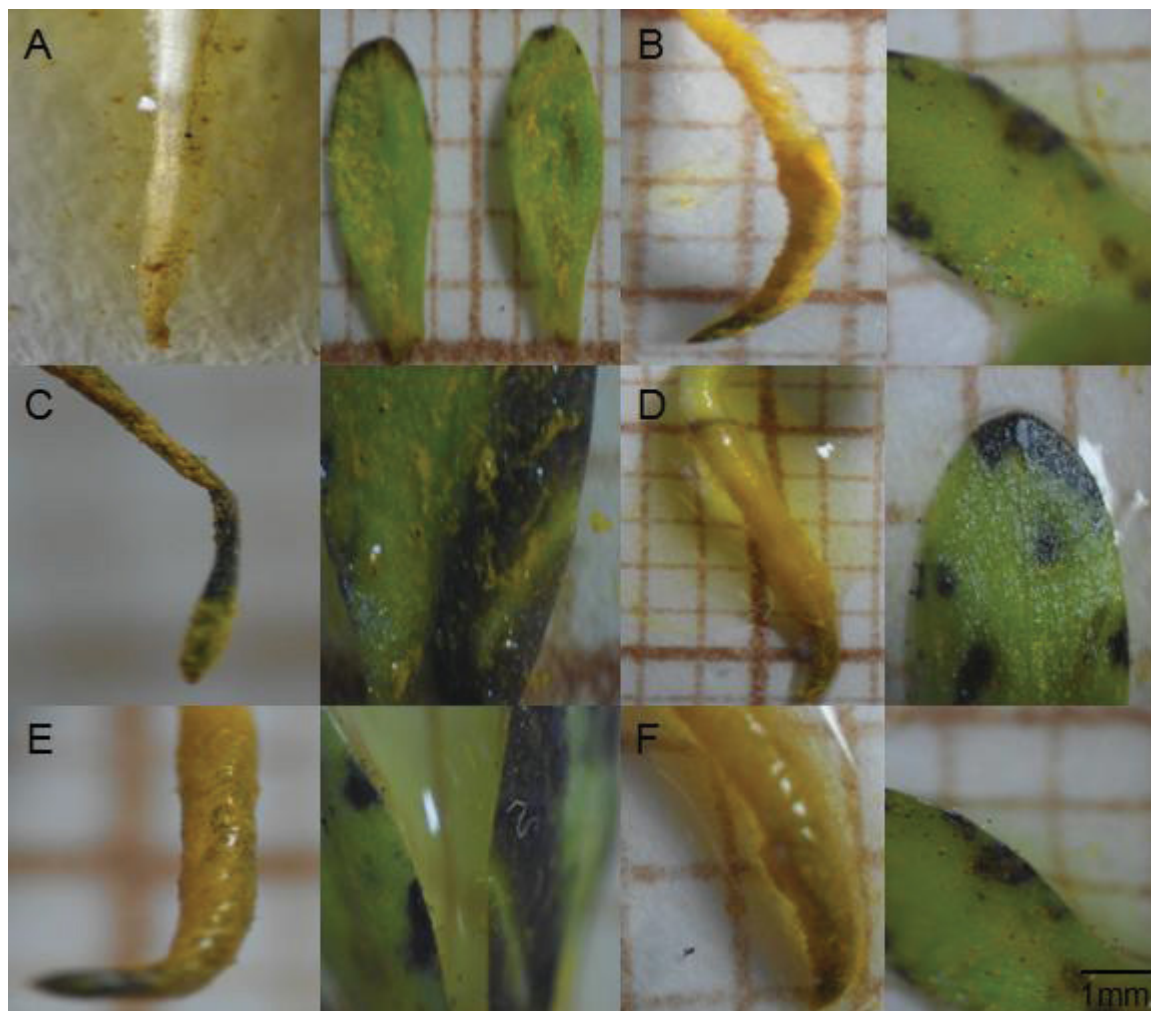
Além disso, os tricomas da espécie de *L. sativa* também possuem sua atividade alterada pelas amostras de *S. westermanii* (FIGURA 54B, 54C, 54D, 54E e 54F) com aspecto escuro devido ao depósito da SOD nesses apêndices da epiderme. Observa-se que o tricoma do controle (FIGURA 54A) apresenta-se transparente, aparentemente sem atividade da SOD.

De acordo com Gill e Tuteja (2010) a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) em plantas são altamente reativas e tóxicas, causando danos a carboidratos, lipídios, proteínas e DNA, resultando no estresse oxidativo. As ERO's englobam os radicais livres como  $O_2^{\cdot-}$  (radicais superóxidos);  $OH^{\cdot}$  (hidroxila radicalar);  $HO_2^{\cdot}$  (radical perhidroxila) e  $RO^{\cdot}$  (radicais alcóxi). E radicais não radicalares como  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio) e  $^1O_2$  (oxigênio singlete). Como forma de defesa contra o estresse oxidativo as plantas possuem um mecanismo de defesa que trabalham em conjunto para controlar a oxidação exacerbada por eliminação das ERO's. Dessa forma, existe a atividade antioxidante enzimática como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD). E o sistemas antioxidantes não enzimáticos como ácido ascórbico, alcaloides, glutathiona



(GSH) e  $\alpha$ -tocoferol.

FIGURA 53 – ASPECTO DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* TRATADAS COM NBT, DEMONSTRANDO AS REGIÕES MAIS ESCURAS COM ACÚMULO DE SOD

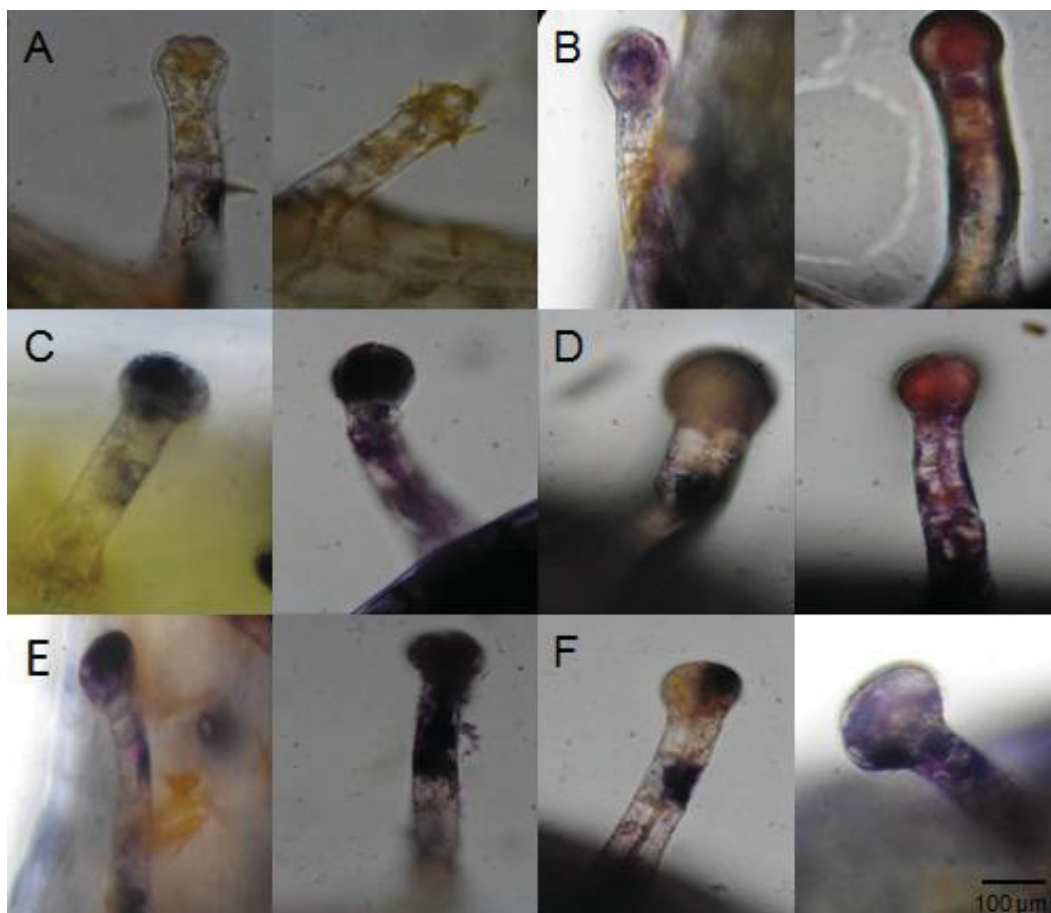


NOTA – A (CONTROLE); B (EXTRATO BRUTO); C (FRAÇÃO HEXANO); D (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); E (ESTEROIDES) E F (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA); # MISTURA DE ESTEROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL).

FONTE: O autor (2018).

A ação de patógenos produz injúrias no tecido vegetal que desencadeia uma resposta de defesa resultando em uma reação de hipersensibilidade. A explosão oxidativa da célula, reponsáveis pela geração de  $O_2^-$ , participa de um sistema integrado e amplificado de sinalização no disparo dos mecanismos de defesa, inicialmente desencadeado pela presença de espécies ativas de oxigênio, promovendo o estabelecimento gradual da resistência sistêmica (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).



FIGURA 54 – ATIVIDADE DA SOD EM TRICOMAS GLANDULARES DE *Lactuca sativa*

NOTA – A (CONTROLE); B (EXTRATO BRUTO); C (FRAÇÃO HEXANO); D (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); E (ESTEROIDES<sup>#</sup>) E F (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA); <sup>#</sup> MISTURA DE ESTEROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL).

FONTE: O autor (2018).

Além dos patógenos, fatores abióticos tais como poluentes, temperaturas extremas, UVB (280 a 320 nm), estresse osmótico e mecânico, podem aumentar a produção de ERO's. Porém, os elicitores (substâncias de ocorrência natural ou sintética que estimulam a resposta da planta quando, por exemplo, infectadas por algum patógeno) mais efetivos são macromoléculas derivadas do patógeno que se ligam a receptores na superfície da célula vegetal (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

Para Alscher, Erturk e Heath (2002) e León et al. (2002) a SOD é catalisadora da dismutação do  $O_2^-$  e  $HO_2^+$  a  $H_2O_2$ , responsável pela primeira linha de defesa ocasionados pelas ERO's, fazendo parte do mecanismo central de defesa dos organismos, evitando a formação do radical  $\bullet OH$ .

Para Resende, Salgado e Chaves (2003) as SOD's são enzimas normalmente ligadas a um metal (Cu/Zn, Mn e Fe). As plantas, geralmente, possuem no citosol Cu/Zn-SOD, no cloroplasto Cu/Zn e/ou Fe-SOD e na mitocôndria Mn-SOD. As SOD's são consideradas importantes agentes antioxidantes porém, nas células animais e bacterianas, em elevadas concentrações induzem disfunções e morte celular. Dessa forma, a regulação da SOD está relacionada ao combate do estresse oxidativo causado por sistemas bióticos e abióticos, com papel crítico na sobrevivência das plantas no ambiente. Segundo Gill e Tuteja (2010) o aumento significativo na atividade da SOD tem sido observado em várias plantas, com aumento nas atividades de isoenzimas Cu/Zn-SOD e Mn-SOD sob estresse salino.

#### 5.9.2 Atividade enzimática da SOD, POD e CAT

A atividade das enzimas SOD, POD e CAT produzidas pelas sementes de *L. sativa* submetidas às amostras de *S. westermanii* estão presentes na (TABELA 24). Observa-se que a atividade de todas as enzimas são superiores ao controle, além disso, são estatisticamente diferentes dele, exceto para o extrato bruto na atividade da POD. Isso atesta que as substâncias presentes nessas amostras são capazes de provocar um estresse na sua espécie alvo ativando o sistema de defesa antioxidante. Ainda a mistura dos esteroides ( $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol) de *S. westermanii* foi a amostra que mais ocasionou estresse e ativou o sistema de defesa da planta em todas as enzimas estudadas. Além dela a fração acetato de etila teve uma atividade muito semelhante, com os níveis dessas enzimas também elevados em relação ao controle. Porém como comentado por Gill e Tuteja (2010), essa atividade exacerbada torna-se tóxico para a planta, ocasionando a sua morte.

Para a substância isolada, na atividade de catalase teve-se um aumento de 100% na sua atividade em relação ao controle. A produção dessa enzima tem como principal função converter o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ . Essa enzima possui isoformas que estão presentes nos peroxissomas e glioxissomas, que são as principais enzimas responsáveis pela detoxificação, fazendo dismutação do  $H_2O_2$  ou oxidação de substratos (RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003).

TABELA 24 – ENSAIO ENZIMÁTICO DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ISOLADO DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO DE ALELOPATOLOGRAFIA POR MEIO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM CAMADA DELGADA

AMOSTRA	SOD (U/ $\mu$ g de proteína)	POD ( $\mu$ mol/min)	CAT ( $\mu$ mol/min)
EB	0,31 $\pm$ 0,02*	0,38 $\pm$ 0,06 <sup>ns</sup>	0,07 $\pm$ 0,004*
FHE	0,38 $\pm$ 0,03*	0,44 $\pm$ 0,02*	0,09 $\pm$ 0,006*
FCL	0,35 $\pm$ 0,04*	0,41 $\pm$ 0,01*	0,09 $\pm$ 0,005*
FAE	0,42 $\pm$ 0,05*	0,52 $\pm$ 0,04*	0,10 $\pm$ 0,015*
ESTEROIDES <sup>#</sup>	0,44 $\pm$ 0,08*	0,56 $\pm$ 0,07*	0,12 $\pm$ 0,023*
CONTROLE	0,23 $\pm$ 0,01	0,35 $\pm$ 0,07	0,07 $\pm$ 0,001

NOTA – DADOS EXPRESSOS EM MÉDIA  $\pm$  DESVIO PADRÃO. \* A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $p < 0.05$ ) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE (TESTE DE DUNNETT). NS: NÃO SIGNIFICATIVO. EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA). <sup>#</sup> MISTURA DE ESTÉROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL). SOD – SUPERÓXIDO DISMUTASE; POD – PEROXIDASE; CAT – CATALASE

FONTE: O autor (2018).

### 5.9.3 Peroxidação lipídica e respiração celular

No ensaio de peroxidação lipídica e respiração celular das sementes de *L. sativa* todas as amostras foram capazes de alterar significativamente a atividade da semente nos dois ensaios estudados. Os resultados apresentados na (TABELA 25) expõe que todas as amostras foram estatisticamente diferentes do controle quando submetidas as amostras de *S. westermanii*. Da mesma forma, a substância isolada e a fração acetato de etila foram as amostras com a maior atividade em relação as demais.

De acordo com Silva (2014) acredita-se que o aumento da peroxidação lipídica como resposta imediata às mudanças na estrutura da membrana celular tenha sido induzido pelo excesso de produção de espécies reativas de oxigênio. A peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados leva à diminuição de fluidez das membranas, aumento de perda do conteúdo celular ou da organela, além de causar danos secundários às proteínas de membranas.

Silva (2014) ainda comenta que a peroxidação lipídica ocorre juntamente com a respiração durante a germinação de sementes, levando à ativação da lipoxigenase como uma resposta imediata às mudanças na estrutura da membrana

celular induzida pelo excesso de produção de ERO's.

TABELA 25 – ENSAIO DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E RESPIRAÇÃO CELULAR DE SEMENTES DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ISOLADO DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO DE ALELOPATOLOGIA POR MEIO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM CAMADA DELGADA

AMOSTRA	PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA (%)	RESPIRAÇÃO RADICULAR (nm)
EB	23,67 ± 1,98*	0,33 ± 2,18 <sup>ns</sup>
FHE	45,28 ± 2,12*	0,28 ± 3,21*
FCL	41,33 ± 2,18*	0,22 ± 2,76*
FAE	49,80 ± 1,33*	0,17 ± 2,17*
ESTEROIDES <sup>#</sup>	56,40 ± 1,55*	0,17 ± 3,77*
CONTROLE	12,76 ± 1,26	0,37 ± 3,33

NOTA – DADOS EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \* A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $p < 0.05$ ) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE (TESTE DE DUNNETT). NS: NÃO SIGNIFICATIVO. EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA). <sup>#</sup> MISTURA DE ESTEROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL).

FONTE: O autor (2018).

#### 5.9.4 Germinação e crescimento radicular

A germinação e o crescimento radicular (radícula e hipocótilo) de *L. sativa* foram afetadas negativamente em todas as amostras e estatisticamente diferente do controle, exceto para a radícula e hipocótilo das sementes tratadas com o extrato bruto. Dessa forma os resultados apresentados na (TABELA 25) corroboram com os apresentados na (TABELA 26) e com Silva (2014), em que se tem o aumento da atividade das enzimas ocasionado pelas ERO's. Ainda pode-se observar que as amostras que mais afetaram a germinação e o crescimento de *L. sativa* são as que mais ativaram o sistema de proteção antioxidante da semente.

TABELA 26 – ENSAIO DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DAS SEMENTES DE *Lactuca sativa* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO, FRAÇÕES E ISOLADO DE *Senecio westermanii* EM ENSAIO DE ALELOPATOGRAFIA POR MEIO DE PLACAS CROMATOGRÁFICAS EM CAMADA DELGADA

AMOSTRA	GERMINAÇÃO (%)	RADÍCULA (mm)	HIPOCÓTILO (mm)
EB	74,60 ± 1,29*	21,29 ± 1,12 <sup>ns</sup>	11,20 ± 2,90 <sup>ns</sup>
FHE	76,00 ± 2,17*	12,50 ± 1,34*	6,70 ± 1,80*
FCL	77,81 ± 1,55*	13,20 ± 1,27*	6,40 ± 1,30*
FAE	79,60 ± 2,13*	11,20 ± 1,56*	5,70 ± 1,80*
ESTEROIDES <sup>#</sup>	58,33 ± 2,37*	9,20 ± 1,33*	4,80 ± 1,20*
CONTROLE	98,0 ± 1,33	23,90 ± 1,76	10,90 ± 2,33

NOTA: DADOS EXPRESSOS EM MÉDIA ± DESVIO PADRÃO. \* A MÉDIA DO TRATAMENTO DIFERE SIGNIFICATIVAMENTE ( $p < 0.05$ ) EM COMPARAÇÃO COM A MÉDIA DO CONTROLE (TESTE DE DUNNETT). NS: NÃO SIGNIFICATIVO. EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA). <sup>#</sup> MISTURA DE ESTÉROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL).

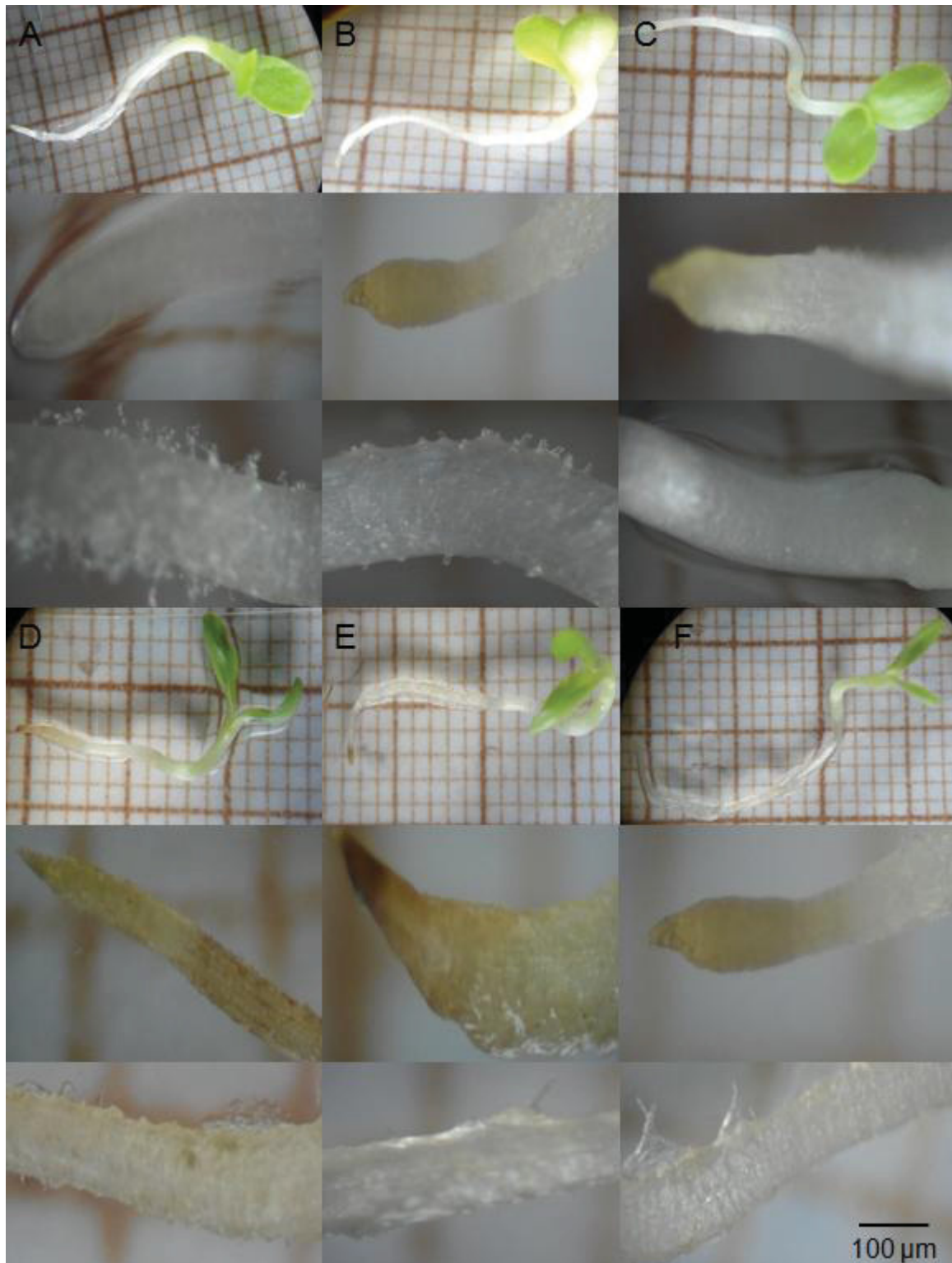
FONTE: O autor (2018).

Observa-se que além do crescimento das amostras ser menor que em relação controle, têm-se o efeito das amostras na radícula, onde no controle a membrana apresenta-se brilhante, uniforme e lisa. Já para as amostras a radícula mostra-se opaca, desuniforme e rugosa (FIGURAS 55B, 55C, 55D, 55E e 55F).

Porém para o hipocótilo, no controle têm uma estrutura uniforme e com formação glandulares. Em relação às amostras essa uniformidade não ocorre e na maioria ocorre a diminuição ou ausência das estruturas glandulares.

A oxidação da radícula influencia diretamente no crescimento da plântula (FIGURA 56), dessa forma as sementes tratadas com as frações de *S. westermanii* ocasionaram um efeito retardante na radícula de *L. sativa* em relação a amostra tratada com o controle água.

FIGURA 55 – COMPARAÇÃO ENTRE O TAMANHO DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa* NO ENSAIO DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO



NOTA – A (CONTROLE); B (EXTRATO BRUTO); C (FRAÇÃO HEXANO); D (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); E (ESTEROIDES) E F (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA); # MISTURA DE ESTEROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL).

FONTE: O autor (2018).



FIGURA 56 – OXIDAÇÃO DA RADÍCULA DAS PLÂNTULAS DE *Lactuca sativa*



NOTA – A (CONTROLE ÁGUA); B (FRAÇÃO HEXANO); C (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO) E D (ESTEROIDES); # MISTURA DE ESTEROIDES ( $\beta$ -SITOSTEROL, ESTIGMASTEROL E CAMPESTEROL).

FONTE: O autor (2018).

## 5.10 ATIVIDADE LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*

### 5.10.1 Toxicidade aguda

De acordo com a avaliação realizada com amostras de *S. westermanii* sobre larvas de *Aedes aegypti* foi possível observar que as amostras não foram capazes de causar mortalidade sobre as larvas. Dessa forma, a  $CL_{50}$  para todas as amostras foi superior a 1000  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao controle Temefós 75. Os resultados referente ao ensaio pode ser observado na (TABELA 27).

De acordo com Macoris (2002) a espécie *A. aegypti* da linhagem Rockefeller é conhecida pela suscetibilidade aos inseticidas. O Temefós é um inseticida organofosforado utilizado no controle de pragas na agropecuária, sendo utilizado como estratégia de controle das larvas do mosquito *A. aegypti*, porém diversos estudos mostram que as larvas tornaram-se resistentes ao Temefós, com

necessidade de aumentar a concentração para desempenhar o mesmo resultado (CRIVELENTI et al., 2011).

TABELA 27 – ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA SOBRE AS LARVAS DE *Aedes aegypti* SUBMETIDAS AO EXTRATO BRUTO ETANÓLICO E FRAÇÕES DE *Senecio westermanii*

AMOSTRA	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO (µg/mL)			CL <sub>50</sub> (µg/mL)	INTERVALO DE CONFIANÇA DE 95% (µg/mL)
	250	500	1000		
EB	1	1	0	>1000	-
FHE	3	0	2	>1000	-
FCL	0	1	0	>1000	-
FAE	0	0	3	>1000	-
FRE	0	0	0	>1000	-
TEMEFÓS 75	30	30	30	89,41	44,06 - 181,46

NOTA – EB (EXTRATO BRUTO); FHE (FRAÇÃO HEXANO); FCL (FRAÇÃO CLOROFÓRMIO); FAE (FRAÇÃO ACETATO DE ETILA); FRE (FRAÇÃO REMANESCENTE)

FONTE: O autor (2018).

O uso cada vez maior do Temefós no meio urbano é devido ao aumento do número de casos de pessoas com dengue, em contrapartida os inseticidas sintéticos não são seletivos ocasionando efeitos tóxicos agudos e crônicos sobre invertebrados e vertebrados, ocasionando efeitos mutagênicos, imunotóxicos, miotóxicos e neurotóxicos em mamíferos (MÉLO, 2009).

Porém essa toxicidade pode estar ligada ao aumento da concentração do Temefós, fazendo com que diversas intoxicações de animais e humanos sejam registradas, resultando em insuficiência cardiorrespiratória e comprometimento do sistema nervoso autônomo por meio da inibição de algumas enzimas, principalmente a acetilcolinesterase, exacerbando os efeitos do neurotransmissor acetilcolina (CRIVELENTI et al., 2011).

A busca e o desenvolvimento de substâncias derivadas de plantas para controle de mosquitos é uma alternativa para o controle de diversas pragas, principalmente contra o *A. aegypti*. Os compostos originários de plantas têm recebido especial atenção por serem alternativas ecologicamente corretas e dentre outros fatores favoráveis por apresentarem aspectos seletivos, biodegradáveis, baixo impacto ambiental e por trazerem maior segurança à população (CARVALHO, 2011).



Em revisão Macedo et al. (2017) relataram que a presença de extratos de *S. brasiliensis* diminui a oviposição de *Bemisia tabaci* e causou efeito larvicida em *Aedes fluviatilis*. Além disso, *S. miser* apresentou efeitos tóxicos em insetos quando alimentam-se dessa espécie. Ainda *S. salignus* apresentou atividade inseticida em *Spodoptera frugiperda* e *S. pterophorus* atividade larvicida em *Culex quinquefascitus*. Em estudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. brasiliensis*, Macedo et al. (2017) demonstraram que o extrato prejudica a taxa de eclosão e induz a morte celular apoptótica em larvas de *Drosophila melanogaster*.

#### 5.10.2 Avaliação da morfologia externa e interna da larvas

As larvas tratadas com o extrato bruto e frações de *S. westermanii* apresentaram algumas alterações que não são observadas nas larvas controle, tratadas com água e DMSO 0,1%. Neste trabalho, o grupo controle apresentou corpo bem desenvolvido, com cabeça, tórax e segmentos bem diferenciados, e compatíveis com larvas do 3º instar (FIGURA 57A). À medida que as concentrações do extrato bruto (EB) e frações hexano (FH), clorofórmio (FCL), acetato de etila (FAE) e remanescente (FR) foram testadas, diversas diferenças na morfologia foram ser observadas. Entre elas podem ser citadas colapsamento dos segmentos do corpo da larva (FIGURAS 57B e 57C), redução das papilas anais e sifão respiratório (FIGURAS 57D, 57F, 57H, 57K e 57L), anelamento dos segmentos, dando a larva um aspecto espiralado (FIGURA 57E), colapsamento e escurecimento da região da cabeça e segmentos próximo ao mesentero posterior (FIGURA 57G), alongamento dos segmentos (FIGURAS 57J, 57M, 57N e 57O) e alongamento da região que separa a cabeça e o tórax, bem como a redução das papilas anais (FIGURA 57P).

As larvas expostas ao extrato bruto e frações das partes aéreas de *S. westermanii* também apresentaram alterações como a redução das brânquias anais (FIGURA 58B, 58E e 58H), ou o alongamento da mesma (FIGURA 58C e 58G), colapsamento dos segmentos abdominais, tornando seu aspecto mais liso (FIGURAS 58D, 58M, 58O e 58P), tórax com aspecto achatado (FIGURA 58F), alongamento da região entre a cabeça e o tórax (FIGURAS 58I, 58J, 58K, 58L e 58N) e colapsamento do segmento anal e sifão respiratório, não sendo possível a sua identificação (FIGURAS 58K e 58N).

FIGURA 57 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii* NA MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*



NOTA – A - CONTROLE; B - EB 1000; C - EB 500; D - EB 250; E - FH 1000; F - FH 500; G - FH 250; H - FCL 1000; I - FCL 500; J - FCL 250; K - FAE 1000; L - FAE 500; M - FAE 250; N - FR 1000; O - FR 500; P - FR 250. CONCENTRAÇÕES EM µg/mL.

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 58 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii* NA MORFOLOGIA EXTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*



NOTA – A - CONTROLE; B - EB 1000; C - EB 500; D - EB 250; E - FH 1000; F - FH 500; G - FH 250; H - FCL 1000; I - FCL 500; J - FCL 250; K - FAE 1000; L - FAE 500; M - FAE 250; N - FR 1000; O - FR 500; P - FR 250. CONCENTRAÇÕES EM  $\mu\text{g/mL}$ .

FONTE: O autor (2018).

Internamente, as larvas tratadas com o extrato e frações das partes aéreas de *S. westermanii* apresentaram alterações no intestino médio, como perda da gordura corporal, tecido muscular e espessamento da membrana peritrófica (FIGURAS 59B, 59C e 59D). A perda da gordura corporal foi um aspecto observado para todas as larvas. Outras alterações como enrugamento do tecido muscular do segmento foi observado apenas para as larvas tratadas com a FH (FIGURAS 59E, 59F e 59G) e concentração de 500 µg/mL da FAE (FIGURA 59L). O espessamento da membrana que envolve a musculatura das larvas também foi observado (FIGURA 59H, 59I, 59J, 59M e 59O), bem como extrusão parcial do intestino pelo sifão anal e redução das brânquias (FIGURA 59K). O tecido muscular que dá mobilidade às larvas se mostraram mais finos nas larvas tratadas com as concentrações de 250 mg/mL e 1000 mg/mL da FR (FIGURAS 59N e 59P).

Ainda as larvas tratadas com o extrato bruto e frações das partes aéreas apresentaram extrusão do intestino pelo sifão respiratório (FIGURA 60B), inibição das brânquias anais (FIGURA 60F, 60J e 60O), espessamento da membrana peritrófica (FIGURAS 60C, 60D e 60E), perda de tecido muscular (FIGURAS 60G, 60K e 60M) e tecido muscular com aspecto enrugado (FIGURAS 60H, 60I, 60L, 60N e 60P).

Fitolarvicidas podem impedir que as larvas passem para a próxima fase do seu ciclo de vida, e a avaliação de alterações morfológicas em larvas expostas a eles podem explicar o seu mecanismo de toxicidade para *A. aegypti* (CHAITHONG et al., 2006, DALARMI et al., 2015). De acordo com Corbet et al. (2000) fitolarvicidas podem afetar as larvas por inundação física do sistema traqueal, por toxicidade química, por interferência com a superfície, ou por ações combinadas. A eliminação parcial ou total do conteúdo de do intestino encerrado na matriz peritrófica exibida para algumas larvas tem sido relatada como o primeiro mecanismo de defesa na tentativa de eliminar substâncias tóxicas (CHAITHONG et al., 2006; ZHANG et al., 2012; PROCÓPIO et al., 2015). O escurecimento do intestino médio observado nas larvas tratadas pode ser resultado de danos nas células epiteliais ou alterações na matriz peritrófica, que pode indicar que a atividade larvicida provavelmente foi causada por danos em no intestino das larvas (EDWARDS; JACOBS-LORENA, 2000; SHAO et al., 2012; PROCÓPIO et al., 2015).



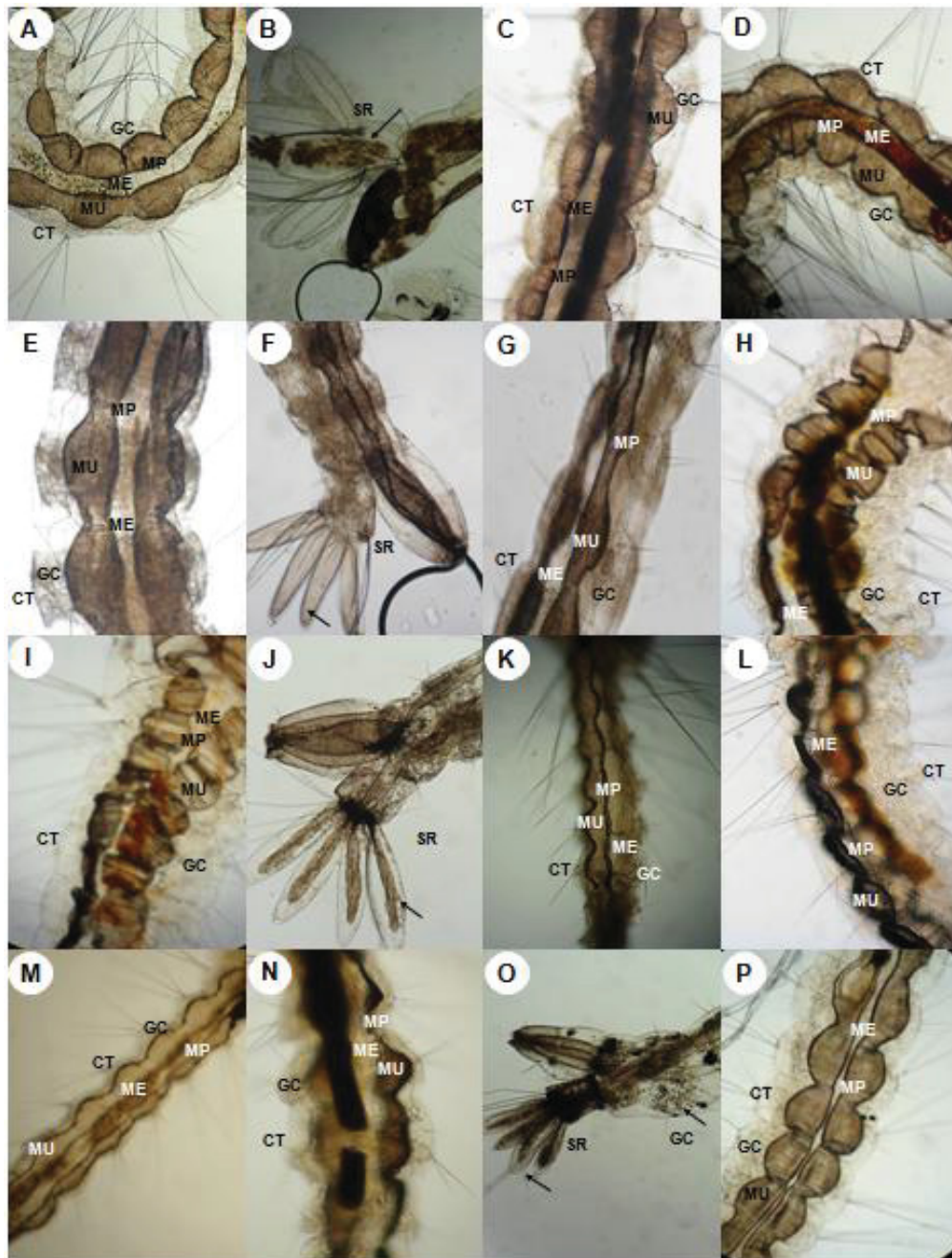
FIGURA 59 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii* NA MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*



NOTA – A - CONTROLE; B - EB 1000; C - EB 500; D - EB 250; E - FH 1000; F - FH 500; G - FH 250; H - FCL 1000; I - FCL 500; J - FCL 250; K - FAE 1000; L - FAE 500; M - FAE 250; N - FR 1000; O - FR 500; P - FR 250. CONCENTRAÇÕES EM  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; CT - CUTÍCULA; GC - GORDURA CORPORAL; ME - MESÊNTERO; MP - MEMBRANA PERITRÓFICA; MU- MUSCULATURA.

FONTE: O autor (2018).

FIGURA 60 – EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO E FRAÇÕES DAS PARTES AÉREAS DE *Senecio westermanii* NA MORFOLOGIA INTERNA DAS LARVAS DE *Aedes aegypti*



NOTA – A - CONTROLE; B - EB 1000; C - EB 500; D - EB 250; E - FH 1000; F - FH 500; G - FH 250; H - FCL 1000; I - FCL 500; J - FCL 250; K - FAE 1000; L - FAE 500; M - FAE 250; N - FR 1000; O - FR 500; P - FR 250. CONCENTRAÇÕES EM  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; CT - CUTÍCULA; GC - GORDURA CORPORAL; ME - MESÊNTERO; MP - MEMBRANA PERITRÓFICA; MU - MUSCULATURA; SR - SIFÃO RESPIRATÓRIO.

FONTE: O autor (2018).

## 6 CONCLUSÃO

Nos testes morfoanatômicos por meio de microscopia eletrônica de varredura e testes microquímicos foi observado que as folhas de *S. westermanii* são anfiestomáticas e os estômatos do tipo anomocítico, que estão em maior quantidade na face abaxial. Ainda os tricomas tectores unisseriados estão presentes em ambas as faces, porém em maior número na face abaxial. Na nervura central das folhas grãos de amidos estão presentes próximo ao feixe vascular. E no caule ductos secretores são encontrados no parênquima fundamental e próximos ao xilema e floema.

Para análise termogravimétrica da raiz, caule e folha observou que a perda de massa para as três partes da planta são muito semelhantes, ocorrendo três etapas de perda para cada uma delas.

Para a espécie *S. westermanii* foi identificado por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  o flavonoide isoquacetina na fração acetato de etila. Além disso, também foram identificados os sais NaCl e KCl por DRXM e EDS e o  $\text{CaC}_2\text{O}_4$  por EDS.

A concentração de fenóis e flavonoides totais foram elevadas em todas as frações, porém as frações acetato de etila ( $504,71 \pm 3,80$ ;  $131,52 \pm 1,30$ ) e hidroalcoólica remanescente ( $245,96 \pm 4,30$ ;  $122,43 \pm 0,12$ ) apresentaram os maiores teores para os respectivos testes.

No ensaio de toxicidade aguda em camundongos não foi observada nenhuma morte e alteração de comportamento dos animais. Na atividade de trânsito gastrointestinal em camundongos o EB apresentou atividade superior ao controle metoclopramida, sendo que as concentrações de 30 e 100 mg/kg foram de 96 e 100%, contra 75% do controle.

Para o ensaio de lesão gástrica aguda induzida por etanol em ratos wistar as concentrações de 10, 30 e 100 mg/kg de EB foram estatisticamente semelhantes ao controle Omeprazol (40mg/kg).

Na análise da toxicidade em células do fígado foram detectadas microvesículas de gorduras nas lâminas de esfregaço nas concentrações de 10, 30 e 100 mg/kg do EB.

Nas análises enzimáticas das células do fígado o teor de proteínas totais mostrou-se aumentado para as concentrações de 30 e 100 mg/kg de EB.

Na determinação enzimática de marcadores de toxicidade do fígado a ALP e ALT mostraram-se aumentadas quando foi utilizado dose de 100 mg/kg. Enquanto a atividade da AST não foi alterada por nenhuma concentração. O mesmo ocorreu para os ensaios antioxidantes não enzimáticos das enzimas GSH e ácido ascórbico, as quais não se alteraram.

Para o ensaio das enzimas antioxidantes a GST e SOD aumentaram para 100 mg/kg, enquanto a CAT mostrou-se inalterada. Enquanto para a peroxidação lipídica o teor de MDA mostrou-se alterado para as concentrações de 30 e 100 mg/kg.

Para os testes em linhagem celular as frações testadas foram capazes de inibir a STAT3 que está envolvida nos processos inflamatórios e ativar a TGR5 que está relacionada a processos metabólicos.

O EB e frações apresentaram atividade alelopática em sementes de *Allium cepa*, alterando principalmente o crescimento radicular, atividade enzimática e fotossíntese.

No estudo alelopatográfico, o extrato bruto, frações e a mistura de esteroide de *S. westermanii* foram capazes de aumentar a atividade enzimática da SOD, POD e catalase, alterar a germinação, crescimento e peroxidação lipídica de *Lactuca sativa*.

No ensaio de toxicidade aguda contra larvas de *Aedes aegypti* o EB e frações de *S. westermanii* obtiveram valores de CL<sub>50</sub> superiores a 1000 µg/mL. Porém na análise morfológica as amostras analisadas foram capazes de alterar interna e externamente as larvas.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados neste trabalho e juntamente com o que foi realizado no mestrado confirmam que a espécie *Senecio westermanii* Dusén (Asteraceae) possui diversas atividades de interesse à sociedade.

A espécie apresentou proeminente efeito no trato gastrointestinal, com elevada proteção gástrica nas diversas doses aplicadas, ainda observou o aumento no trânsito intestinal, sendo superior ao controle utilizado. Apesar da identificação da isoquercetina na fração acetato de etila, estudos futuros devem ser realizados para identificar a substância que estaria ocasionando esses efeitos no trato gastrointestinal. Além disso, a isoquercetina e os esteroides (campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol) identificados para a espécie devem ser testados para identificar o possível envolvimento desses metabólitos no trato gastrointestinal.

Apesar dos resultados farmacológicos terem sido proeminentes, seu uso como fitoterápico deve ser ponderado já que nas atividades toxicológicas os resultados apresentaram alterações nas enzimas do fígado dos camundongos. Além do mais a RDC 26/2014 (ANVISA) alerta a população para o não uso das espécies do gênero *Senecio* em composições fitoterápicas, porém no teste de toxicidade aguda com os camundongos não houve nenhuma mudança de comportamento dos animais ou morte, dessa forma estudos mais aprofundados devem ser realizados para confirmar tais resultados.

Ainda a espécie apresentou atividade alelopática e alelopatográfica, fazendo da espécie um possível biopesticida. Porém a espécie deve ser testada em espécies daninhas e elucidar o mecanismo de ação para entender como ocorre o processo de ação em outras espécies vegetais. E a espécie *S. westermanii* apresentou atividade larvicida contra o *Aedes aegypti*, ocasionando diversos efeitos internos e externos a essas larvas no quarto estágio de desenvolvimento, dessa forma dificultando o processo de maturação até o estágio adulto. Com isso pode-se inferir que a espécie *S. westermanii* tem influência em outros sistemas biológicos, com desenvolvimento em potencial de um produto para o controle de ervas daninha e larvicida.

De acordo com os resultados apresentados neste trabalho através das análises realizadas para as partes aéreas de *Senecio westermanii* Dusén, futuras investigações das análises toxicológicas devem ser realizadas para elucidar os

efeitos hepáticos ocasionados, assim quais são os mecanismos de ação para os efeitos do trato gastrointestinal.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, I. C. M. E. **Caracterização histológica da esteatose hepática em ratas hipercolesterolêmicas e o envolvimento do estresse oxidativo**. 2013, p. 62. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Nutrição. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto.
- AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymology**, v. 105, n. 2, p. 121-126, 1984.
- AGGARWAL, B. B.; TAKADA, Y.; SHISHODIA, S.; GUTIERREZ, A. M.; OOMMEN, O. V.; ICHIKAWA, H.; BABA, Y.; KUMAR, A. Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, p. 341-353, 2004.
- AHMADI-NOORBAKHS, S.; SARRAFZADEH-REZAEI, F.; MAHAM, M.; DALIR-NAGHADEH, B. Simple evaluation of the wound healing effect of topical ointments made from *Senecio vernalis* (Asterales: Asteraceae) plant extract in rats. **Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy**, v. 55, p. 117-120, 2011.
- AHMED, S.; AHMAD, M. S.; YOUSAF, M.; NUR-E-ALAM, M.; AL-REHAILY, A. J. Two new sesquiterpene alcohols isolated from *Senecio hadiensis* Forssk. grown in Saudi Arabia. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, n. 9, p. 1-14, 2017.
- ALBAYRAK, S.; AKSOY, A.; YURTSEVEN, L.; YAS, A. A comparative study on phenolic components and biological activity of some *Senecio* species in Turkey. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, p. 1631-1640, 2014.
- ALBAYRAK, S.; AKSOY, A.; HAMZAOGLU, E.; EKICI, L.; BUDAK, U. Antimicrobial and antioxidant activities of *Senecio* species growing in the Black Sea region, Turkey. **Acta Botanica Gallica**, v. 155, p. 447-456, 2008.
- ALENCAR, L. L. **Estudo dos polimorfismos Pro198Leu no gene da glutathione peroxidase 1 e -617C/A no gene do fator de transcrição Nrf2 com relação ao estresse oxidativo e ao estudo nutricional relativo ao selênio de pacientes com diabetes mellitus tipo 1**. 2014, p. 129. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- ALLEN, D. D.; CAVIEDES, R.; CÁRDENAS, A. M.; SHIMAHARA, T.; SEGURA-AGUILAR, J.; CAVIEDES, P. A. Cell lines as *in vitro* models for drug screening and toxicity studies. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 31, p. 757-768, 2005.
- ALMEIDA, V. G. **Efeito citotóxico e potencial anti-inflamatório de *Pseudobrickellia brasiliensis* (Spreng) R. M. King & H. Rob (arnica-do-campo) em células mononucleares do sangue periférico humano, *in vitro***. 2012, p. 74. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina.

ALMEIDA, D. F. L. S. **Estudo das vias metabólicas das plantas na síntese de pigmentos naturais**. 2017, p. 61. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Fernando Pessoa. Porto.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

ALVES, S. F.; OLIVEIRA, G. F. L.; JORGE, C. A.; BARROS, G. C.; SILVA, E. M.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Prospecção fitoquímica e ensaios de pureza de sete plantas medicinais usadas na fitoterapia ayurvédica. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 4, n. 2, p. 118-120, 2007.

ALVES, A. M. P.; ALVES E. P. B.; BUTTOW, N. C.; PERLES, J. V. C. M.; ZANONI, J. N.; STABILLE, S. R. Aspectos gerais e abordagem terapêutica da quercetina sobre as complicações do diabetes causadas pelo estresse oxidativo. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 14, n. 2, p. 179-186, 2010.

AMBROSIO, S. R.; TIRAPELLI, C. R.; COSTA, F. B.; OLIVEIRA, A. M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v. 79, n. 10, p. 925-933, 2006.

APEX3. **Madison**, WI Bruker AXS Inc. 2015

ARAB, Y.; ZELLAGUI, A.; BOUTELLAA, S.; MESBAH, K.; GHERRAF, N. Total phenolic and flavonoids content, and in vitro antioxidant and antimicrobial activity of ethyl acetate and butanol extract from *Senecio delphinifolius* Vahl. **Der Pharmacia Lettre**, v. 6, p. 522-525, 2014.

ARANTES, M. C. B.; SIMON, F. P.; RIBEIRO, P. A. M.; REZENDE, M. H.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Caracterização farmacognóstica de *Eclipta alba* (L.) Hassk, Asteraceae (Agridão do Brejo). **Revista Eletrônica de Farmácia**, suplemento, v. 2, n. 2, p. 21-24, 2005.

ARAÚJO, A. A. DE S.; MERCURI, L. P.; SEIXAS, S. R. S.; STORPIRTIS, S.; MATOS, J. R. Determinação dos teores de umidade e cinzas de amostras comerciais de guaraná utilizando métodos convencionais e análise térmica. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 2, p. 269-276, 2006.

ARAÚJO, L. L. N. **Características morfofisiológicas, produção e composição de óleo essencial em folhas de *Tetradenia riparia* (Hochst) Codd- Lamiaceae cultivada em diferentes níveis de sombreamento**. 2014, p. 81. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal. Universidade Federal do Goiás. Goiânia.

ARCTOS - **Multi-Institution, Multi-Collection and Museum Database**. Disponível em: [http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm?full\\_taxon\\_name=Senecio+westermanii](http://arctos.database.museum/TaxonomyResults.cfm?full_taxon_name=Senecio+westermanii). Acessado em: 10/05/2014.

ARAGÃO, C. F. S.; SOUZA, F. S.; BARROS, A. C. S.; VERAS, J. W. E.; BARBOSA FILHO, J. M.; MACEDO, R.O. Aplicação da termogravimetria (TG) no controle de qualidade da milona (*Cissampelos sympodialis* Eichl.) Menispermaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 60-61, 2002.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, n. 1, 1949.

ARROYO, J.; BONILLA, P.; RÁEZ, E.; BARREDA, A.; HUAMÁN, O. Efecto quimioprotector de *Bidens pilosa* en el cáncer de mama inducido en ratas. **Anales de la Facultad de Medicina**, v. 71, n. 3, p. 153-9, 2010.

ARRUDA W.; OLIVEIRA G. M. C.; SILVA I. G. Toxicidade do extrato etanólico de *Magonia pubescens* sobre larvas de *Aedes aegypti*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36; n. 1, p. 17-25, 2003.

ASTM - American Society for Testing and Materials. **Annual Book of ASTM Standards: Metals Test Methods and Analytical Procedures**, v. 3 (03)(02), 1993.

AWAAD, A. S.; AL-JABER, N. A.; MOSES, J. E.; EL-MELIGY, R. M.; ZAIN, M. E. Antiulcerogenic activities of the extracts and isolated flavonoids of *Euphorbia cuneata* Vahl. **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 126-130, 2013.

BAARS, A.; OOSTING, A.; KNOL, J.; GARSSSEN, J.; VAN BERGENHENEGOUWEN, J. The gut microbiota as a therapeutic target in IBD and metabolic disease: a role for the bile acid receptors FXR and TGR5. **Microorganisms**, v. 3, p. 641-666, 2015.

BAGATINI, K. P. **Ontogênese e anatomia da raiz, anatomia do rizoma e folhas de *Senecio juergensii* Mattf. (Asteraceae) (margaridinha do banhado) dos ambientes lêntico graminoso e lótico, e variações morfoanatômicas dos estádios vegetativo e reprodutivo destes órgãos nos dois ambientes**. 2008, p. 106. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

BANNACH, G., PERPÉTUO, G. L., CAVALHEIRO, E. T. G., CAVALHEIRO, C. C. S., ROCHA, R. R. Efeitos da história térmica nas propriedades do polímero pet: um experimento para ensino de análise térmica. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1825-1829, 2011.

BARNES, J. P.; PUTNAM, A. R.; BURKE, B. A.; AASEN, A. J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v. 26 n. 5, p. 1385-1390, 1987.

BENÍCIO, D. A.; QUEIROGA NETO, V.; SOUSA, J. G. Avaliação das propriedades físico-químicas e da composição química parcial do óleo de sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. juss), cultivado no município de Patos - Paraíba. **Anais eletrônicos do VI congresso de iniciação científica da Universidade Federal de Campina Grande**. Paraíba, 2009.

BENITES, V. M.; CARVALHO, M. C. S.; RESENDE, A. V.; POLIDORO, J. C.; BERNARDI, A. C. C.; OLIVEIRA, F. A. **O potássio, o cálcio e o magnésio na agricultura brasileira**. In: Boas práticas para uso eficiente de fertilizantes. IPNI – International Plant Nutrition Institute, v. 3, 2010

BERETTA, M. E. et al. A família Asteraceae no Parque Estadual de Itapuã, Viamão, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 6, n. 3, p. 189-216, 2008.

BERLYN, G. P.; MIKSCHE, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Ames: Iowa State University, 1976.

BERZOFSKY, J. A.; TERABE, M.; OH, S.; BELYAKOV, I. M.; AHLERS, J. D.; JANIK, J. E.; MORRIS, J. C. Progression new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 11, p. 1515-1525, 2004.

BELINELO, V. J.; Czepak, M. P.; VIEIRA FILHO, S. A.; MENEZES, L. F. T.; JAMAL, C. M. Alelopatia de *Arctium minus* Bernh (Asteraceae) na germinação e crescimento radicular de sorgo e pepino. **Caatinga**, v. 21, n. 4, p. 12-16, 2008.

BISSEL, D. M.; GORES, G. J.; LASKIN, D. L.; HOORHAGLE, J. H. Drug-induced liver injury: mechanisms and test systems. **Hepatology**, v. 33, p. 1009-1013, 2001.

BRACHT, A.; SUZUKI-KEMMELMEIER, F.; SALGUEIRO-PAGADIGORRIA, C. L.; CONSTANTINI, J.; YAMAMOTO, N. S.; ISHII- IWAMOTO, E. L. Enzimas. In: BRACHT, A.; ISHII- IWAMOTO, E. L. **Métodos de laboratório em Bioquímica**, v. 1, Manole, 2003.

BRAGA, I. A.; LIMA, J. B. P.; SOARES, S. S.; VALLE, D. *Aedes aegypti* resistance to temephos during 2001 in several municipalities in the states of Rio de Janeiro, Sergipe and Alagoas, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 199-203, 2004.

BRAGANHOL, E.; ZAMIN, L. L.; CANEDO, A. D.; HORN, F.; TAMAJUSUKU, A. S. K.; WINK, M. R.; SALBEGO, C.; BATTASTINI, A. M. O. Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. **Anti-Cancer Drugs**, v. 17, n. 6, p. 663-671, 2006.

BRASIL, Presidência da República. **Decreto 5813 de 22 de junho de 2006** – Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Brasil, 2006

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a Análise de Sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1, 5ª ed. Brasília, 2010.

BRASIL. **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Disponível em: [http://saudelegis/anvisa/2014/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf](http://saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf). Acesso em: 02 de maio de 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**, v. 49, março de 2018.

BRITO, L. P.; LINSS, J. G.; LIMA-CAMARA, T. N.; BELINATO, T. A.; PEIXOTO, A. A.; LIMA, J. B.; et al. Assessing the effects of *Aedes aegypti* kdr mutations on pyrethroid resistance and its fitness cost. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60878, 2013.

BRÜLL, V.; BURAK, C.; STOFFEL-WAGNER, B.; WOLFFRAM, S.; NICKENIG, G.; MÜLLER, C.; LANGGUTH, P.; ALTEHELD, B.; FIMMERS, R.; NAAF, S.; ZIMMERMANN, B. F.; STEHLE, P.; EGERT, S. Effects of a quercetin-rich onion skin extract on 24 h ambulatory blood pressure and endothelial function in overweight-to-obese patients with (pre-) hypertension: a randomised double-blinded placebo-controlled cross-over trial. **British Journal of Nutrition**, doi:10.1017/S0007114515002950, 2015.

BURGUEÑO-TAPIA, E.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; MARTÍN-BENITO, D.; JOSEPH-NATHAN, P. Antifeedant and phytotoxic activity of cacalolides and eremophilanolides. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 62, p. 362-366, 2007.

CABRERA, A. L. El género *Senecio* (Compositae) en Brasil, Paraguay y Uruguay. **Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. v. 15, p. 192. Rio de Janeiro, 1957.

CALLERI, E.; POCHETTI, G.; DOSSOU, K.S.S.; LAGHEZZA, A.; MONTANARI, R.; CAPELLI, D.; PRADA, E.; LOIODICE, F.; MASSOLINI, G.; BERNIER, M.; MOADDEL, R. Resveratrol and its metabolites bind to PPARs. **Chembiochem**, v. 15, n. 8, p. 1154-1160, 2014.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, supl. I, p. 373-382, 2016.

CÂNDIDO, A. C. S.; SCHMIDT, V.; LAURA, V. A.; FACCENDA, O.; HESS, S. C.; SIMIONATTO, E.; PERES, M. T. L. P. Potencial alelopático da parte aérea de *Senna occidentalis* (L.) Link (Fabaceae, Caesalpinioideae): bioensaios em laboratório. **Acta Botanica Brasilica**, v. 24, n. 1, p. 235-242, 2010.

CAPELARI-OLIVEIRA, P. et al. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian “Arnica”). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 393-398, 2011.

CARMO, F. M. S.; LIMA E GORGES, E. E. L.; TAKAKI, M. Alelopatia de extratos aquosos de canela-sassafrás (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer). **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 3, p. 697-705, 2007.



CARRO-JUÁREZ, M.; ALCAZAR, C.; BALLESTEROS-POLVO, E.; VILLALOBOS-PEÑALOSA, P. Increase of ejaculatory capacity by systemic administration of the oquichpatli (*Senecio cardiophyllus*) aqueous crude extract in male rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 506-511, 2009.

CARVALHO, J. L. S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, p. 1031-1035, 2009.

CARVALHO, G. H. F. **Atividade inseticida do extrato bruto etanólico de *Persea americana* (Lauraceae) sobre larvas e pupas de *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae)**. 2011, p. 54. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública. Universidade Federal de Goiás. Goiás.

CHAITHONG, U.; CHOOCHOTE, W.; KAMSUK, K.; JITPAKDI, A.; TIPPAWANGKOSOL, P.; CHAIYASIT, D.; CHAMPAKAEW, D.; TUETUN, B.; PITASAWAT, B. Larvicidal effect of pepper plants on *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae). **Journal of Vector Ecology**, v. 31, n. 1, p. 138-144, 2006.

CHANG, C. C.; YANG, M. H.; WEN, H. M.; CHERN, J. C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178-182, 2002.

CHEW, Y. L.; CHAN, E. W. L.; TAN, P. L.; LIM, Y. Y.; STANSLAS, J.; GOH, J. K. Assessment of phytochemical content, polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities of Leguminosae medicinal plants in Peninsular Malaysia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, n. 12, 2011.

CONFORTI, F.; MARRELLI, M.; STATTI, G.; MENICHINI, F. Antioxidant and cytotoxic activities of methanolic extract and fractions from *Senecio gibbosus* subsp. *gibbosus* (GUSS) DC. **Natural Product Research**, v. 20, n. 9, p. 805-812, 2006.

CORBET, S. A.; TILEY, C.; MOORHOUSE, T.; GIAM, C.; PURSGLOVE, S.; RABY, J.; RICH, M. Surface films as mosquito larvicides: partitioning the mode of action. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 94, n. 3, p. 295-307, 2000.

COSTA, R. S.; OZELA, E. F.; BARBOSA, W. R. L.; PEREIRA, N. L.; JÚNIOR, J. O. C. S. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 169-174, 2009.

CRIVELENTI, L. Z.; GUILHERME, L. C.; MORELLI, S.; BORIN, S. Toxicidade do inseticida organofosforado Abate<sup>®</sup> em alevinos de *Poecilia reticulata*. **Journal of Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 6, n. 1, p. 65-68, 2011.

CUNHA, C. P. **Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides**. 2013, p. 147. Dissertação de Mestrado.



Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.

CUTLER, D. F.; BOTHA, T.; STEVENSON, D. W. **Anatomia vegetal: uma abordagem aplicada**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 2, p. 400-409, 2012.

DALARMI, L.; SILVA, C. B. DA; OCAMPOS, F. M. M.; BURCI, L. M.; NASCIMENTO, K. F. DO; JESUS, C. DE; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; ZANIN, S. M. W. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 35, p. 881-885, 2015.

DANG, S. S.; ZHANG, X.; JIA, X. L.; CHENG, Y. A.; SONG, P.; LIU, E. Q.; HE, Q.; LI, Z. F. Protective effects of emodin and astragalus polysaccharides on chronic hepatic injury in rats. **Chinese Medical Journal**, v. 121, p. 1010-1014, 2008.

DARROZ, J. V.; FUSO, L. C.; BORGES, N. M.; GOMES, A. J. P. S. Utilização de fitoterápicos no tratamento de constipação intestinal. **Arquivos de Ciências da Saúde UNIPAR**, v. 18, n. 2, p. 113-119, 2014.

DAVID, J. P.; FAUCON, F.; CHANDOR-PROUST, A.; POUPARDIN, R.; RIAZ, M. A.; BONIN, A. et al. Comparative analysis of response to selection with three insecticides in the dengue mosquito *Aedes aegypti* using mRNA sequencing BMC. **Genomics**, v. 15, p. 174, 2014.

DEON, M. D. **Crescimento e nutrição mineral da soja submetida a excesso de P, S, K, Ca, e Mg em solução nutritiva**. 2007, p. 72. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

DHULEY, J. N.; NAIK, S. R. Protective effect of Rhinax, an herbal formulation, against CCl<sub>4</sub> - induced liver injury and survival in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 56, p. 159-164, 1997.

DIMANDE, A. F. P.; BOTHA, C. J.; PROZESKY, L.; BEKKE, L.; RÖSEMANN, G. M.; LABUSCHAGNE, L.; RETIE, F. E. The toxicity of *Senecio inaequidens* DC. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 78, n. 3, p. 121-129, 2007.

DIAS, J. F. G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Wild**. 2005, 116 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

DUBOC, H.; TACHÉ, Y.; HOFMANN, A. F. The bile acid TGR5 membrane receptor: From basic research to clinical application. **Digestive and Liver Disease**, v. 46, p. 302-312, 2014.

DUNISCH, O.; BAUCH, J.; MULLER, M. GREIS, O. Subcellular quantitative determination of K and Ca in phloem, cambium, and xylem cells of spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) during earlywood and latewood formation. **Holzforschung**, v. 52, n. 6, p. 582-588. 1998.

ECHIBURÚ-CHAU, C.; ALFARO-LIRA, S.; BROWN, N.; SALAS, C. O.; CUELLAR, M.; SANTANDER, J.; OGALDE, J. P.; ROTHHAMMER, F. The selective cytotoxicity elicited by phytochemical extract from *Senecio graveolens* (Asteraceae) on breast cancer cells is enhanced by hypoxia. **International Journal of Oncology**, v. 44, p. 1357-1364, 2014.

EDWARDS, M. J.; JACOBS-LORENA, M. Permeability and disruption of the peritrophic matrix and caecal membrane from *Aedes aegypti* and *Anopheles gambiae* mosquito larvae. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 9, p. 1313-1320, 2000.

EINHELLIG, F. A. The physiology of allelochemical action: Clues and Views. In: REIGOSA, M. & PEDROL, N. (eds.). **Allelopathy from Molecules to Ecosystems**, p. 1-23, 2002.

ELIAS, F.; LATORRE, A. O.; PÍPOLE, F.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S. L.; HUEZA, I. M. Haematological and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from *Senecio brasiliensis*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 2313-2319, 2011.

EMILIANI, G.; FONDI, M.; FANI, R.; GRIBALDO, S. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. **Biology Direct**, v. 4, n. 7, p. 1-12, 2009.

EMPINOTTI, C. B.; DUARTE, M. R. Caracteres anatômicos de arnica-do-campo: *Chaptalia nutans*. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, n. 3, p. 333-338, 2006.

FAQUIN, V. **Nutrição mineral de plantas**. Lavras: UFLA/FAEPE, 183p, 2005.

FAREMI, T. Y.; SURU, S. M.; FAFUNSO, M. A.; OBIOHA U. E. Hepatoprotective potentials of *Phyllanthus amarus* against ethanol-induced oxidative stress in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2658-2664, 2008.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v. 27, p. 00-00, 2002.

FARINA, M. Z.; SOARES, T. E.; CHILOMER, S. K.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K. Análise da aplicação de resíduos do corte de palmito pupunha (*Bactris gasipaes* H.B.K.) em compósitos de matriz poliéster com diferentes proporções. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 7, n. 2, p. 131-138, 2012.

FAROMBI, E. O. Mechanisms for the hepatoprotective action of Kolaviron. Studies on hepatic enzymes, microsomal lipids and lipids peroxidation in carbon tetrachloride treated rats. **Pharmacological Research**, v. 42, p. 75-80, 2000.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – Jambu. **Revista Fitos**, v. 5, n. 1, p. 83-91, 2010.

FERNANDEZ, N. J.; KIDNEY, B. A. Alkaline phosphatase: beyond the liver. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 36, n. 3, p. 223-233, 2007.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. **Frontiers in Plant Science**, v. 3, 2012.

FERRO, M. M.; MOURA, D. C.; GERON, L. J. V. Óleos essenciais em dietas para bovinos. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 14, n. 2, 2016.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge University Press, 3rd Edition, 1971.

FISKE, C. H.; SUBBAROW, Y. The colorimetric determination of phosphorus. **Journal of Biology Chemistry**, v. 66, p. 375-400, 1925.

FONSECA, M. M., YOSHIDA, M. I. Thermal analysis of raw and aged linseed oil. **Vértices**, v. 11, n. 1/3, p. 61-75, 2009.

FONSECA-GONZÁLEZ, I.; QUIÑONES, M.L.; LENHART, A.; BROGDON, W.G. Insecticide resistance status of *Aedes aegypti* (L.) from Colombia. **Pest Management Science**, v. 67, p. 430-437, 2011.

FORTUNATO, L. R.; ALVES, C. F.; TEIXEIRA, M. M.; ROGERIO, A. P. Quercetin: a flavonoid with the potential to treat asthma. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4, p. 589-598, 2012.

FOSTER, A. S. **Practical plant anatomy**. Princeton, ed: D. Van Nostrand, pp.218, 1949.

FRAHRY, G.; SCHOPFER, P. NADH- stimulated, cyanide- resistant superoxide production in maize coleoptiles analyzed a tetrazolium- based assay. **Planta**, v. 212, p. 175-183, 2000.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. 5<sup>o</sup>ed. New York. Wiley-Liss, 2005.

FUCHS, C.H. Fuchsin staining with NaOH clearing for lignified elements of whole plants or plants organs. **Stain Technology**, v. 38, n. 3, p. 141-144, 1963.

FUJIWARA, G. M.; ANNIES, V.; OLIVEIRA, C. F. DE; LARA, R. A.; GABRIEL, M. M.; BETIM, F. C.; NADAL, J. M.; FARAGO, P. V.; DIAS, J. F.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D.; MARQUES, F.; ZANIN, S. M. Evaluation of larvicidal activity and ecotoxicity of linalool, methyl cinnamate and methyl cinnamate/linalool in combination against *Aedes aegypti*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 139, p. 238-244, 2017.

GALVÃO-ALVES, J. Constipação intestinal. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 101, n. 2, 2013.

GIANNI, O.; JAN, K. J.; DOUGLAS, M. J.; STUART, P. M.; TARNOPOLSKY, M. A. Oxidative stress and the mitochondrial theory of aging human skeletal muscle. **Experimental Gerontology**, v. 39, n. 9, p. 1391-1400, 2004.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

GKOUVERIS, I.; NIKITAKIS, N.; SAUK, J. STAT3 Signaling in Cancer. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, p. 709-726, 2015.

GOMES-JÚNIOR, R. A.; MOLDES, C. A.; DELITE, F. S.; POMPEU, G. B.; GRATÃO, P. L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Antioxidant metabolism of coffee cell suspension cultures in response to cadmium. **Chemosphere**, v. 65, p. 1330-1337, 2006.

GONZÁLEZ, P.S.; FAJARDO, V.; CUADRA, P. Adaptive variation of Patagonian *Senecio patagonicus* Hook. & Arn., *Adesmia boronioides* Hook.F. and *Lepidophyllum cupressiforme* (Lam.) Cass. as a plant response to environmental stress. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, p. 365- 371, 2013.

GORZALCZANY, S.; MOSCATELLI, V.; FERRARO, G. *Artemisia copa* aqueous extractas vasorelaxant and hypotensive agent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 56-61, 2013.

GREEN, C. E.; SEGALL, H. J.; BYARD, J. L. Metabolism, Cytotoxicity, and Genotoxicity of the Pyrrolizidine Alkaloid Senecionine in Primary Cultures of Rat Hepatocytes. **Toxicology And Applied Pharmacology**, v. 60, p. 176-185, 1981.

GRISALES, N.; POUPARDIN, R.; GOMEZ, S.; FONSECA-GONZALEZ, I.; RANSON, H.; LENHART, A. Temephos resistance in *Aedes aegypti* in Colombia compromises dengue vector control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. e2438, 2013.

GUILLAND, J. C.; LEQUEU, B. **As vitaminas do nutriente ao medicamento**. São Paulo: Santos, 1995.

GUIZAR, A.; SIDDIQUI, M. B.; BI, S. Assessment of allelopathic potential of *Cassia sophera* L. on seedling growth and physiological basis of weed plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 9, p. 1037-1046, 2014.

GUO, C.; CHEN, W-D.; WANG, Y-D. TGR5, not only a metabolic regulator. **Frontiers in Physiology**, v. 7, p. 1-9, 2016.

GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; SILVA, A. C.; LOMBARDI, J. A.; GUIMARÃES, H. N.; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 120-124, 2008.

HABIG, W. A.; PABST, M. J.; JACOBY, W. B. Glutathione transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HAHN, G. F.; OLIVEIRA, J. R.; BOCK, P. M. O papel do fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2) no *Diabetes mellitus*. **Clinical and Biomedical Research**, v. 37, n. 3, p. 203-213, 2017.

HAINES, P. J. **Thermal Methods of Analysis**. New York, p.286, 1995.

HARIPRASATH, L.; JEGADEESH, R.; RAAMAN, N. Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 145-150, 2012.

HE, Z.; LIAN, W.; LIU, J.; ZHENG, R.; XU, H.; DU, G.; LIU, A. Isolation, structural characterization and neuraminidase inhibitory activities of polyphenolic constituents from *Flos caryophylli*. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 160-167, 2017.

HENDRICKS, J. D.; SINNHUBER, R. O.; HENDERSON, M. C.; BUHLER, D. R. Liver and kidney pathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) exposed to dietary pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Experimental And Molecular Pathology**, v. 35, p. 170-183, 1981.

HERNÁNDEZ, I.; MÁRQUEZ, L.; MARTÍNEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE, C.; PRIETO, S.; MOLINA-TORRES, J.; GARRIDO, G. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 649-652, 2009.

HEYWOOD, V. H. **Flowering plants of the world**. Oxford University. Press: New York, 1993.

HIFNAWY, M. S.; KASSEM, H. A.; EID, H. H.; AF, T.; NAGGAR, M. B. E.; SALEH, D. O.; YOUNIS, I. Y. Study of the hypolipidemic activity of Egyptian *Tropaeolum majus* L. (garden nasturtium) as a promising therapeutic plant for treatment of cardiac diseases. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, n. 6, p. 314-322, 2016.

**ICSD - Inorganic Crystal Structure Database**. FIZ Karlsruhe – Leibniz-Institut für Informationsinfrastruktur GmbH Hermann-von-Helmholtz-Platz 1: Germany, 2017.

IKE, C.; AROME, O.; AFFIONG, E.; OGECHUKWU, A.; CHIMERE, U. Liver enzymes and total protein levels as index of hepatotoxicity of naphthalene. **Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 11, n. 2, p. 28-31, 2016.

INOCÊNCIO, M. F.; CARVALHO, J. G.; FURTINI NETO, A. E. Potássio, sódio e crescimento inicial de espécies florestais sob substituição de potássio por sódio. **Revista Árvore**, v. 38, n. 1, p. 113-123, 2014.

IONASHIRO, M.; GIOLITO, I. **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial, calorimetria exploratória diferencial**. 1ª ed. São Paulo: Giz Editorial e Livraria Ltda, 2005.

JAGOTA, S. K.; DANI, H. M. A new colorimetric technique for the estimation of vitamin C using Folin phenol reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 127, p. 178-182, 1982.

JAKUPOVIC, J.; GRENZ, M.; BOHLMANN, F.; NIEMEYER, H. M. Furoeremophilanes and other constituents from Chilean *Senecio* species. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2691-2693, 1991.

JANAKAT, S.; AL-MEIRE, H. Optimization of the dose and route of injection, and characterization of the time course of carbon-tetracloride-induced hepatotoxicity in the rat. **Journal of Pharmacology and Toxicological Methods**, v. 48, p. 41-44, 2002.

JANANI, C.; KUMARI, B. D. R. PPAR gamma gene – a review. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**, 2014.

JESUS, G. C.; SOUSA, H. H. B. A.; BARCELOS, R. S. S. Principais patologias e biomarcadores das alterações hepáticas. **Estudos**, v. 41, n. 3, p. 525-537, 2014

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: Mc Graw Hill Book, pp.523, 1940.

JOHNSON, I.; SPENCE, M. T. Z. **Molecular probes handbook, a guide to fluorescent probes and labeling technologies**, 11ª ed. Chapter 15: Assays for cell viability, proliferation and function, 2010.

JOLLOW, D. J.; MITCHELL, J. R.; ZAMPAGHONE, N.; GILLETE, J. R. Bromobenzene induced liver necrosis, protective role of glutathione and evidence for 3,4-bromobenzene oxide as the hepatotoxic metabolite. **Pharmacology**, v. 11, p. 151-169, 1974.

JORDÃO JR, A. A.; CHIARELLO, P. G, BERNARDES, M. S. M., VANNUCCHI, H. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutathiona reduzida e da vitamina E. **Medicina**, v. 31, p. 434-449, 1998.

JORGE, T. C. A.; CASTRO, S. L. **Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85- 85676-75-2. Available from SciELO Books.



KASMI, K. C. E.; HOLST, J.; COFFRE, M.; MIELKE, L.; PAUW, A. General nature of the STAT3-activated anti-inflammatory response. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 7880-7888, 2006.

KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology Research and Practice**, 2014.

KE, Q.; COSTA, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1). **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 5, p. 1469-1480, 2006.

KELLY, G. S. Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 2, p. 172-194, 2011.

KHALIGHI-SIGAROOD, F.; AHVAZI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; TAGHIZADEH, M.; YAZDANI, D.; KHALIGHI-SIGAROODI, S.; BIDEI, S. Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 11, n. 1, p. 295-302, 2012.

KHAN, H. A. A.; AKRAM, W.; SHEHZAD, K.; SHAALAN, E. A. First report of field evolved resistance to agrochemicals in dengue mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), from Pakistan. **Parasit Vectors**, v. 4, n. 146, p. 1-11, 2011.

KUBITZKI, K. *Compositae*. The Families and Genera of Vascular Plants, Flowering Plants. **Eudicots Asterales**, v. 8, p. 61-588, 2007.

KUMAR, S. S.; KUMAR, B. R.; MOHAN, G. K. Hepatoprotective effect of *Trichosanthes cucumerina* Var *cucumerina* L. on carbon tetrachloride induced liver damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 2, p. 347-350, 2009.

KUPCHAN, S. M.; TSOU, G.; SIGEL, C. W. Datiscacin, a novel cytotoxic cucurbitacin 20-acetate from *Datisca glomerata*. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 38, n. 7, p. 1420-1421, 1973.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, p. 170, 1983.

LAHLOU, F.A., HMIMID, F., LOUFI, M., BOURHIM, N. Antioxidant Activity Phenolics Flavonoids and Proanthocyanidins Content of *Senecio anteuphorbium*. **International Journal of Biochemistry Research e Review**, v. 4, p. 550-558, 2014.

LANA, D. F. D.; NECCHI, R. M. M.; CASOTI, R.; MANFRON, M. P. Uma revisão sobre as propriedades farmacológicas, morfoanatomia e toxicidade de *Xanthium cavanillesii* Schouw (ASTERACEAE). **Saúde (Santa Maria)**, v. 38, n. 1, p. 5770, 2012.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Manole, 1987.

LEE, C. H.; PARK, S. W.; KIM, Y. S.; KANG, S. S.; KIM, J. A.; LEE, S. H. Protective mechanism of glycyrrhizin on acute live injury induced by carbon tetrachloride in mice. **Biological and Pharmacological Bulletin**, v. 30, p. 1898-1904, 2007.

LEÓN, A. M., PALMA, J.M.; CORPAS, F. J.; ROMERO-PUERTAS, M. C.; CHATTERJEE, D.; MATEOS, R. M.; RÍO, L. A. D.; SANDALIO, L. M. Antioxidative enzymes in cultivars of peppers plants with different sensitivity to cadmium. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, p. 813-820, 2002.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigment of photosynthetic biomembranes. In: S.P. Colowick & N.O. Kaplan (eds.). *Methods in enzymology*. v. 148, pp. 350-382. **Academic Press**, New York, 1987.

LIENOU, L. L.; TELEFO, P. B.; NJIMOU, J. R.; NANGUE, C.; BAYALA, B. R.; GOKA, S. C.; BIAPA, P.; YEMELE, M. D.; DONFACK, N. J.; MBEMYA, J. T.; TAGNE, S. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of the aqueous extract of *Senecio bialfræ* (Oliv.& Hiern) J. Moore on some fertility parameters inimmature female rat. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 156-162, 2015.

LIMA, J. B.; PEREIRA DA CUNHA, M.; CARNEIRO DA SILVA, R.; GALARDO, A. K. R.; SOARES, S. S.; BRAGA, I. A.; RAMOS, R. P.; VALLE, D. Resistance of *Aedes aegypti* to organophosphates in several municipalities in the state of Rio de Janeiro and Espirito Santo, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, p. 329-33, 2003.

LINUS, L. O.; HANSON, C.; ALOLGA, R. N.; ZHOU, W.; QI, L. Targeting the key factors of inflammation in cancer: plant intervention. **International Journal Of Clinical and Experimental Medicine**, v. 10, n. 12, p. 15834-15865, 2017.

LISZKAY, A.; ZALM, E.; SCHOPFER, P. Production of reactive oxygen intermediates ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  and  $OH$ ) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. **Plant Physiology**, v. 136, p. 3114-3123, 2004.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Jacaranone: A cytotoxic constituent from *Senecio ambiguus* subsp. *ambiguus* (Biv.) DC. against renal adenocarcinoma ACHN and prostate carcinoma LNCaP cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 30, p. 701-707, 2007.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; STATTI, G. A.; MILJKOVIC-BRAKE, A.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. J. Bioactive extracts from *Senecio samnitum* Huet. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 20, n. 3, p. 265-269, 2006.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F.; HOUGHTON, P. J. *In vitro* antiproliferative effects on human tumor cell lines of extracts and jacaranone from *Senecio leucanthemifolius* Poiret. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 57, p. 897-902, 2005.

LOWRY, O. H.; NIRA, J.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCENA, R. B.; RISSI D. R., MAIA L. A.; FLORES M. M.; DANTAS, A. F. M.; NOBRE, V. M. T.; RIET-CORREA, F.; BARROS, C. S. L. Intoxicação por alcaloides



pirrolizidínicos em ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 447-452, 2010.

LÜTHY, J.; HEIM, T.; SCHLATTER, C. Transfer of [<sup>3</sup>H] pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris* L. and metabolites into rat milk and tissues. **Toxicology Letters**, v. 17, p. 283-288, 1983.

MACEDO, G. E.; GOMES, K. K.; RODRIGUES, N. R.; et al. *Senecio brasiliensis* impairs eclosion rate and induces apoptotic cell death in larvae of *Drosophila melanogaster*. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 198, p. 45-57., 2017.

MACIAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard target species. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACORIS, M. L. G. **Avaliação do nível de suscetibilidade de linhagens de *Aedes aegypti* (Díptera: Culicidae) aos inseticidas utilizados para seu controle.** 2002, p. 75. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista. Botucatu.

MADAN, K.; BHARDWAJ, P.; THAREJA, S.; GUPTA, S. D.; SARAYA, A. Oxidant stress and antioxidant status among patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 10, 2006.

MAGALINGAM, K. B.; RADHAKRISHNAN, A.; HALEAGRAHARA, N. Protective effects of quercetin glycosides, rutin, and isoquercetrin against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity in rat pheochromocytoma (PC-12) cells. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 29, n. 1, p. 30-39, 2016.

MARQUES, T. H. C.; ALMEIDA, A. A. C.; SANTOS, P. S.; MELO, C. H. S.; FREITAS, R. M. Estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, fitoquímicos, toxicológicos e farmacológicos de *Bellis perennis* L. (margarida). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 1, p. 85-100, 2014.

MARTENS, S.; KNOTT, J.; SEITZ, C. A.; JANVARI, L.; YU, S. N.; FORKMANN, G. Impact of biochemical pre-studies on specific metabolic engineering strategies of flavonoid biosynthesis in plant tissues. **Biochemical Engineering Journal**, v. 14, p. 227-235, 2003.

MARTINS, F. M. **Estruturas secretoras da lâmina foliar de espécies de *Senecio Tourn. ex L.*** 2003, p. 60. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal do Viçosa. Viçosa.

MATTOS, A. A.; MORAIS, R. B.; SAMPAIO, J. B.; LACERDA, G. A.; RAMOS, D. M. B.; CARREIRO, D. L. Levantamento de plantas medicinais comercializadas por raizeiros do mercado municipal central de Montes Claros – MG. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, v. 2, n. 1, p. 11-17, 2015.

MATZENBACHER, N. I. Uma nova espécie do gênero *Senecio* L. (Asteraceae – *Senecioneae*) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia Série Botânica**, v. 64, n. 1, p. 109-113, 2009.

MCKAY, D. M.; PHILPOTT, D. J.; PERDUE, M. H. Review article: *In vitro* models in inflammatory bowel disease research - a critical review. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.11 (Suppl. 3), p. 70-80, 1997.

MEIRA, R. M. S. A.; MARTINS, F. M. Inclusão de material herborizado em metacrilato para estudos de anatomia vegetal. **Revista Árvore**, v. 27, n. 1, p. 109-112, 2003.

MÉLO, M. E. B. **Investigação da genotoxicidade de larvicidas biológicos e sintéticos utilizados para o controle de *Aedes aegypti***. 2009, p.129. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Pernambuco. Recife.

MERINO, F. J. Z. **Estudos fitoquímico, toxicológico in vitro, antibacteriano, alelopático e antioxidante da espécie vegetal *Senecio westermanii* Dusén, Asteraceae**. 2014, p. 102. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 17, n. 4, supl. III, p. 1031-1040, 2015.

MILAN, P.; HAYASHI, A. H.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Comparative leaf morphology and anatomy of three Asteraceae species. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, n.1, p. 135-144, 2006.

MINUSSI, R.C., ROSSI, M., BOLOGNA, L., CORDI, L., ROTILIO, D., PASTORE, G.M., DURÁN, N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, p. 409-416, 2003.

MIRANDA, C. L.; CHEEKE, P. R.; BUHLER, D. R. Effect of pyrrolizidine alkaloids from tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) on hepatic drugmetabolizing enzymes in male rats. **Biochemical Pharmacology**, v. 29, p. 2645-2649, 1980.

MIRANDA, C. L.; HENDERSON, M. C.; BUHLER, D. R. Dietary copper enhances the hepatotoxicity of *Senecio jacobaea* in rats. **Toxicology and applied Pharmacology**, v. 60, p. 418-423, 1981.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 247, p. 170-175, 1972.

MOGHADDAM, M. F., CHEEKE, P. R. Effects of dietary pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids on vitamin A metabolism in rats. **Toxicology Letters**, v. 45, p. 149-156, 1989.

MONSALVE, F. A.; PYARASANI, R. D.; DELGADO-LOPEZ, F.; MOORE-CARRASCO, R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. **Mediators of Inflammation**, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/549627>, 2013.

MORA-COVARRUBIAS, A. de la; JIMÉNEZ-VEGA, F.; TREVIÑO-AGUILAR S. M. Geospatial distribution and detection of dengue virus in mosquitoes *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* in Ciudad Juarez, Chihuahua, Mexico. **Salud Pública de México**, v. 52, p. 127-133, 2010.

MUKHERJEE, P. K. **Plant products with hypocholesterolemic potentials**. In: Taylor, Steve L. (Ed), *Advanced in Food and Nutrition Research*, Elsevier Science, v. 47, p. 277-338, 2003.

NAGLE, D. G.; ZHOU, Y. D. Natural product-based inhibitors of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). **Current Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 355-369, 2006.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NASCIMENTO, C. A. **Caracterização funcional de terpeno sintases de citros**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical. Instituto Agrônomo. Campinas, 2014.

NAVARRO, L. A.; DUARTE, L.; KLEIN, R. C.; HEUSER, E. D. Caracterização dos cristais de oxalato de cálcio nas partes reprodutivas e vegetativas aéreas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (Aquifoliaceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 1, p. 762-764, 2007.

NIOI, P.; NGUYEN, T.; SHERRATT, P. J.; PICKETT, C. B. The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 24, p. 10895-10906, 2005.

NOGUEIRA, F. N. **Sistema antioxidante e peroxidação lipídica em gândulas salivares de ratos diabéticos**. 2004, p. 74. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Universidade de São Paulo. São Paulo.

NOZAKI, H.; HAYASHI, K.; KAWAI, M.; MITSUI, T.; KIDO, M.; TANI, H.; TAKAOKA, D.; UNO, H.; OHIRA, S.; KUBOKI, A.; MATSUURA, N. Culcitolides A-D, four new eremophilane-type sesquiterpene derivatives from *Senecio culcitioides*. **Natural Product Communications**, v. 7, n. 4, p. 427-430, 2012.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. **Protoplasma**, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guidelines for testing of chemicals: Acute oral toxicity - Acute toxic class method**, adopted. Paris, 2001.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O.; PORTELLA JÚNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. **Revista Dor**, v. 17(Suppl 1), p. S35-42, 2016.

OLIVEIRA, A. M. A.; SANTOS, V. L. P.; FRANCO, C. R. C.; FARAGO, P. V.; DUARTE, M. R.; BUDEL, J. M. Comparative morpho-anatomical study of *Baccharis curitybensis* Heering ex Malme and *Baccharis spicata* (Lam.) Baill. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 30, p. 1560-1566, 2011.

OLIVEIRA, C. C.; SILVA, M. J.; TELES, A. M. *Senecio* L. (Asteraceae, Senecioneae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 4, p. 703-724, 2015

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Rio de Janeiro: Atheneu. 1989.

OLIVEIRA, L. G. A.; BELINELO, V. J.; ALMEIDA, M. S.; AGUILAR, E. B.; VIEIRA FILHO, S. A. Alelopatia de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae) na germinação e crescimento inicial de sorgo, pepino e picão preto. **Centro Científico Conhecer**, v. 7, n. 12, p. 1-10, 2011.

ORFALI, G. D. C.; DUARTE, A. C.; BONADIO, V.; MARTINEZ, N. P.; ARAÚJO, M. E. M. B.; PRIVIERO, F. B. M.; CARVALHO, P. O.; PRIOLLI, D. G. Review of anticancer mechanisms of isoquercitin. **World Journal Clinical Oncology**, v. 7, n. 2, p. 189-199, 2016.

OSWEILER, G. D. **Toxicologia Veterinária**. Porto Alegre: ArtMed, 1998.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAW, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, p. 194-205, 2008.

OZEROVA, L. V.; TIMONIN, A. C. On the evidence of subunifacial and unifacial leaves: developmental studies in leaf-succulent *Senecio* L. species (Asteraceae). **Wulfenia**, v. 16, p. 61-77, 2009.

PAULA, C.S.; CANTELI, V. C. D.; VERDAM, M. C. S.; KALEGARI, M.; CAMPOS, R.; HIROTA, B. C. K.; MIGUEL, O. G. M.; MIGUEL, M. D. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 189-195, 2014.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. **The Metabolic Profile Test**. Oxford University Press, 1987.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes**. 2005, p. 127. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo.

PEKARTHY, J. M.; SHORT, J.; LANSING, A. I.; LIEBERMAN, I. Function and control of liver alkaline phosphatase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 6, p. 1767-1774, 1972.

PENALVA, D. Q. F. Síndrome metabólica: diagnóstico e tratamento. **Revista de Medicina (USP)**, v. 87, n. 4, p. 245-250, 2008.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, B. L. C.; CARNEIRO, A. C. O., CARVALHO, A. M. M. L.; TRUGILHO, P. F.; MELO, I. C. N. A.; OLIVEIRA, A. C. Estudo da degradação térmica da madeira de *Eucalyptus* através de termogravimetria e calorimetria. **Revista Árvore**, v. 37, n. 3, p. 567-576, 2013.

PERLEMUTER, G.; DAVIT-SPRAUL, A.; COSSON, C.; CONTI, M.; BIGORGNE, A.; PARADIS, V.; CORRE, M. P.; PRAT, L.; KUOCH, V.; BASDEVANT, A.; PELLETIER, G.; OPPERT, J. M.; BUFFET, C. Increase in liver antioxidant enzyme activities in non-alcoholic fatty liver disease. **Liver International**, v. 25, p. 946-953, 2005.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995-2018, 1998.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10, 2004.

PIORNEDO, R. R., SOUZA, P.; STEFANELLO, M. É.; STRAPASSON, R. L.; ZAMPONIO, A. R.; KASSUYA, C. A. Anti-inflammatory activity of extracts and 11,13-dihydrozaluzanin C from *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* trunk bark in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 1077-1084, 2011.

POLS, T. W. H.; NORIEGA, L. G.; NOMURA, M.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. The bile acid membrane receptor TGR5 as an emerging target in metabolism and inflammation. **Journal of Hepatology**, v. 54, n. 6, p. 1263-1272, 2011.

PORTELLA, A. C. F., MUNARO, M., ASCÊNCIO, S. D., SIQUEIRA, C. A., FERREIRA, T. P. S., AGUIAR, R. W. S. Caracterização físico-química do óleo essencial da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, v. 37, n. 5, p. 844-849, 2014.

PORTERO, A. G.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; REINA, M.; DÍAZ, C. E. Plant-defensive sesquiterpenoids from *Senecio* species with biopesticide potential. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, p. 391-403, 2012.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; REILLY, P. E. B.; SEAWRIGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1-2, p. 53-67, 1999.

PRETE, D. D.; MILLÁN, E.; POLLASTRO, F.; CHIANESE, G.; LUCIANO, P.; COLLADO, J. A.; MUNOZ, E.; APPENDINO, G.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. Turmeric sesquiterpenoids: expeditious resolution, comparative bioactivity, and a new bicyclic turmeronoid. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 267-273, 2016.

PRETTY, K. M. **O potássio na qualidade dos produtos agrícolas**. In: YAMADA, T.; IGUE, K.; MUZILLI, O.; USHERWOOD, N. R. Potássio na agricultura brasileira, p.177-194. Piracicaba: Instituto da Potassa e Fosfato (EUA), 1982.

PROCÓPIO, T. F.; FERNANDES, K. M.; PONTUAL, E. V.; XIMENES, R. M.; OLIVEIRA, A. R. DE; SOUZA, C. de S.; MELO, A. M. M. de A.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAIVA, P. M. G.; MARTINS, G. F.; NAPOLEÃO, T. H. *Schinus terebinthifolius* leaf extract causes midgut damage, interfering with survival and development of *Aedes aegypti* larvae. **Plos One**, v. 10, n. 5, p. e0126612, 2015.

PUSHPARAJAH, D. S.; UMACHANDRAN, M.; PLANT, K. E.; PLANT, N.; IOANNIDES, C. Up-regulation of the glutathione S-transferase system in human liver by polycyclic aromatic hydrocarbons; comparison with rat liver and lung. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 299-308, 2008.

PUTTER, J. Peroxidase. In: BERGMAYER, H. U. (ed.). **Methods of Enzymatic Analysis**. Verlag Chemie: Weinhan, 1974.

RADFORD, A. E.; DICKISON, W. C.; MASSEY, J. R.; BELL, C. R. **Vascular Plant Systematics**. Harper & Row Publishers, New York. 891pp, 1974.

RAMPAZZO, V. **Avaliação da degradação térmica de óleos vegetais por termogravimetria, cromatografia gasosa e espectroscopia de infravermelho médio**. 2015, p. 94. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

RANAWAT, L.; BHATT, J.; PATEL, J. Hepatoprotective activity of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl<sub>4</sub> induced hepatic damage in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 777-780, 2010.

RANJAN, V.; VATS, M. A comprehensive review on antidiabetic potential of medicinal plants. **International Journal Ayurveda and Pharmaceutical Chemistry**, v. 7, n. 3, 2017.

RAU, O.; WURGLICS, M.; DINGERMANN, T. H.; ABDEL-TAWAB, M.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M. Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor. **Pharmazie**, v. 61, n. 11, 2006.

REINA, M.; SANTANA, O.; DOMÍNGUEZ, D. M.; VILLARROEL, L.; FAJARDO, V.; RODRÍGUEZ, M. L.; GONZÁLEZ-COLOMA, A. Defensive sesquiterpenes from *Senecio candidans* and *S. magellanicus*, and their structure-activity relationships. **Chemistry and Biodiversity**, v. 9, p. 625-643, 2012.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.

REYNELL, P. C.; SPRAY, G. H. The simultaneous measurement of absorption and transit in the gastrointestinal tract of the rat. **Journal of Physiotherapy**, n. 131, p. 452-462, 1956.



RIBEIRO, P. T. **Desenvolvimento de emulsões utilizando extrato seco de *Passiflora nitida* Kunth**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2015.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell Viability Assays**. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; BRIMACOMBE K., et al. **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

RODRIGUES, P. A. **Atividade gastroprotetora e antioxidante de extratos e constituintes químicos de *Byrsonima sericea* DC. e *Plectranthus grandis cramer* (Willensem)**. 2008, p. 147. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza.

ROEDER, E.; BOURAUUEL, T.; KERSTEN, R. Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio personii*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 4, p. 1051.-1053, 1993.

ROESER, K. R. Die nadel der schwarzkiefer massenproduckt und kunstwerk der natur. **Mikrokosmos**, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.

ROGERIO, A. P.; KANASHIRO, A.; FONTANARI<sup>1</sup>, C.; SILVA, E. V. G.; LUCISANO-VALIM, Y. M.; SOARES, E. G.; FACCIOLI, L. H. Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. **Inflammation Research**, v. 56, p. 402-408, 2007.

ROOME, T.; DAR, A.; ALI, S.; NAQVI, S.; CHOUDHARY, M. I. A study on antioxidant, free radical scavenging, anti-inflammatory and hepatoprotective actions of *Aegiceras corniculatum* (stem) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 514-521, 2008.

RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S; CARVALHO, J. E. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 295-300, 2008.

RUIZ-GUERRERO, R.; RODRÍGUEZ-PÉREZ, M. A.; NORZAGARAY-CAMPOS, M. Toxicity of Mexican native plant extracts against larvae of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 4, p. 287-291, 2015.

SALVEMINI, D.; MAZZON, E.; DUGO, L.; RILEY, D. P.; SERRAINO I.; CAPUTI, A.P.; CUZZOCREA, S. Pharmacological manipulation of the inflammatory cascade by the superoxide dismutase mimetic, M40403. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, p. 815-827, 2001.

SÁNCHEZ-MUÑOZ, B. A.; AGUILAR, M. I.; KING-DÍAZ, B.; RIVERO, J. F.; LOTINA-HENNSEN, B. The sesquiterpenes  $\beta$ -caryophyllene and caryophyllene oxide isolated



from *Senecio salignus* act as phyto-growth and photosynthesis inhibitors. **Molecules**, v. 17, p. 1437-1447, 2012.

SANMUGAPRIYA, E.; VENKATARAMAN, S. Studies on hepatoprotective and antioxidant actions of *Strychnos potatorum* Linn. seeds on CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic injury in experimental rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 154-160, 2006.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 1-14, 2008.

SANTOS-MELLO, R.; DEIMLING, L. I.; JÚNIOR, C. M. L. ALMEIDA, A. Induction of micronuclei by alkaloids extracted from *Senecio brasiliensis* and stored for 23 years. **Mutation Research**, v. 516, p. 23-28, 2002.

SASS, J. E. **Botanical microtechnique**. 2. ed. Ames: Iowa State College, 1951.

SATO, H.; MACCHIARULO, A.; THOMAS, C.; GIOIELLO, A.; UNE, M.; HOFMANN, A. F.; SALADIN, R.; SCHOONJANS, K.; PELLICCIARI, R.; AUWERX, J. Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 1831-1841, 2008.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; FERESIN, G.; TAPIA, A.; HILGERT, N.; THEODULOZ, C. Proximate composition and free radical scavenging activity of edible fruits from the Argentina Yungas. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 8, p. 1357-1364, 2005.

SÉFORA-SOUSA, M.; DE ANGELIS-PEREIRA, M. C. Mecanismos moleculares de ação anti-inflamatória e antioxidante de polifenóis de uvas e vinho tinto na aterosclerose. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 617-626, 2013.

SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews**, v. 3, p. 721-732, 2003.

SERASANAMBATI, M.; CHILAKAPATI, S. R. Function of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) in human diseases-A Review. **South Indian Journal of Biological Sciences**, v. 2, n. 4, p. 368-387, 2016.

SHAO, Q.; YANG, B.; XU, Q.; LI, X.; LU, Z.; WANG, C.; HUANG, Y.; SÖDERHÄLL, K.; LING, E. Hindgut innate immunity and regulation of fecal microbiota through melanization in insects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 17, p. 14270-14279, 2012.

SHRESTHA, S. J.; BAJRACHARYA, D. M. Taxonomic significance of micromorphology in *Senecio* Linnaeus (Senecioneae: Asteraceae). **Pleione**, v. 9, n. 2, p. 401-408, 2015.

SHEN, X.; TANG, Y.; YANG, R.; YU, L.; FANG, T.; DUAN, J. The protective effect of *Zizyphus jujube* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by antioxidative activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 122, p. 555-560, 2009.

SHI, B.; SHI, J.; JIANG, H.; CHOU, G.; WANG, Z. A novel furanoeremophilane with an unusual oxygen bridge from *Senecio nemorensis*. **Fitoterapia**, v. 84, p. 11-14, 2013.

SMILJANIC, K. B. A. **Anatomia foliar de especies de Asteraceae de um afloramento rochoso no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (MG)**. 2005, p.92. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Botânica. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

SILVA, CRISTIANE BEZERRA DA. **Asemeia extraaxillaris (Chodat) J.F.B. Pastore & J.R. Abbott (Polygalaceae) e Microlobius foetidus (subsp. paraguensis (benth.) M. Sousa et G. Andrade) (Fabaceae-Mimosoideae) : contribuição ao estudo fitoquímico e investigação das atividades biológicas (alelopática, antiploriferativa, antineoplásica, antimicrobiana, antioxidante, tóxica e larvicida)**. 2014, p. 318. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

SILVA, V. S.; CÂNDIDO, A. C. S.; MULLER, C.; LAURA, V. A.; FACCEANDA, O.; SIMIONATTO, E.; HESS, S. C.; PERES, M. T. L. P. Potencial fitotóxico de *Dicranopteris flexuosa* (Schrad.) Underw. (Gleicheniaceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 1, p. 95-104, 2011.

SILVA, C. M.; BOLZAN, A. L.; HEINZMANN, B. M. Alcalóides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1047-1053, 2006.

SILVEIRA, R. L. V. A. **Efeito do potássio no crescimento, nas concentrações dos nutrientes e nas características da madeira juvenil de progênies de *Eucalyptus grandis* W. Hill ex Maiden cultivadas em solução nutritiva**. 2000, p. 182. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo. Piracicaba.

SINGH, M. P.; PATHAK, D.; SHARMA, G. K.; SHARMA, C. S. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARS): a target with a broad therapeutic potential for human diseases: an overview. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 58-89, 2011.

SINGHA, A. K. Colorimetric assay of catalase. **Analytical Biochemistry**, v. 47, p. 389-394, 1972.

SIQUEIRA, G. L. A.; BET, C. D.; CORDOBA, L. P.; LAZZAROTTO, M.; SCHNITZLER, E. Caracterização térmica de amido e bagaço de *Amaranthus cruentus*. **VII SiAT – Simpósio de Análise Térmica**, p. 189-192, 2015.

SKAANILD, M. T.; FRIIS, C.; BRIMER, L. Interplant alkaloid variation and *Senecio vernalis* toxicity in cattle. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, n. 3, p. 147-51, 2001.

SKOPEC, M. M.; GREEN, A. K.; KARASOV, W. H. Flavonoids have differential effects on glucose absorption in rats (*Rattus norvegicus*) and american robins (*Turdus migratorius*). **Journal of Chemical Ecology**, v. 36, p. 236-243, 2010.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre e Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LOIR, A.; REES, J. F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE, Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v. 106, p. 331-339, 2008.

SOUZA, E. A.; SANTANA, C. P.; FERNANDES, F. H. A.; SILVA, P. C. D.; JÚNIOR, I. D. B.; SIMÕES, M. O. S.; MEDEIROS, F. D.; MEDEIROS, A. C. D. Caracterização térmica de extrato de *Croton blanchetianus* Baill. **IX Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria**, 2014.

SOUZA, P. H. S. **Potencial de extratos da *Schinopsis brasiliensis* Engl. para desenvolvimento de produtos odontológicos**. 2015, p.137. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande.

SOUZA, R. R.; BRETANHA, L. C.; DALMARCO, E. M.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, T. S. Modulatory effect of *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.032>, 2015.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999.

STEENKAMP, V.; STEWART, M. J.; MERWE, S. van der; ZUCKERMAN, M.; CROWTHER, N. J. The effect of *Senecio latifolius* a plant used as a South African traditional medicine, on a human hepatoma cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, p. 51-58, 2001.

STEPONKUS, P. L.; LANPHEAR, F. O. Refinement of the triphenyl tetrazolium chloride method of determining cold injury. **Journal of Plant Physiology**, v. 42, p. 1423-26, 1967.

SURH, Y. J.; KUNDU, J. K.; NA, H. K. Nrf2 as a master redox switch in turning on the cellular signaling involved in the induction of cytoprotective genes by some chemopreventive phytochemicals. **Planta Medica**, v. 74, p. 1526-1539, 2008.

SWIECH, J. N. D.; BOBEK, V. B.; FOLQUITTO, D. G.; SILVA, R. Z.; BUDEL, J. M.; FARAGO, P. V.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Morpho-anatomy of the vegetative

organs of *Philodendron meridionale* (Araceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 35, n. 10, p. 2142-2148, 2016.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR $\gamma$ ): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 4, 2007.

THAPA, B. R.; WALIA, A. Liver function tests and their interpretation. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, p. 663-671, 2007.

THE PLANT LIST. **A working list of all plant species**. Disponível em:<<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/gcc-133925>>. Acessado em: 18/03/2016.

TIMONIM, A. C.; OZEROVA, L. V.; REMIZOWA, M. V. Development of unifacial leaves in *Senecio* L. s. lat. (Asteraceae). **Wulfenia**, v. 13, p. 217-227, 2006.

TOMA, W.; TRIGO, J. R.; PAULA, A. C. B.; BRITO, A. R. M. S. 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.

TORRES, P.; CHINCHILLA, R.; ASENSI, M. C.; GRANDE, M. Furanoeremophilanes from *Senecio linifolius*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 11, p. 3093-3095, 1989.

TORRES, P.; AYALA, J.; GRANDE, C.; MACIAS, M. J.; GRANDE, M. Furanoeremophilanes and a bakkenolide from *Senecio auricula* var. Major. **Phytochemistry**, v. 47, n. 1, p. 57-61, 1998.

TORRES, P.; AYALA, J.; GRANDE, C.; ANAYA, J.; GRANDE, M. Furanoeremophilane derivatives from *Senecio flavus*. **Phytochemistry**, v. 52, p. 1507-1513, 1999.

TRUMPI, K.; EGAN, D. A.; VELLINGA, T. T.; RINKES, I. H. M. B.; KRANENBURG, O. Paired image- and FACS-based toxicity assays for high content screening of spheroid-type tumor cell cultures. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 85-90, 2015.

TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; BONESI, M.; MENICHINI, F.; DODARO, D.; PASSALACQUA, N. G.; STATTI, G.; MENICHINI, F. In vitro cytotoxic effects of *Senecio stibianus* Lacaita (Asteraceae) on human cancer cell lines. **Natural Products Research**, v. 23, n. 18, p. 1707-18, 2009.

TYAGI, S.; GUPTA, P.; SAINI, A. S.; KAUSHAL, C.; SHARMA, S. The peroxisome proliferator-activated receptor: a family of nuclear receptors role in various diseases. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology and Research**, v. 2, n. 4, 2011.

TYSON, C. A., STORY, D. L., STEPHENS, R. J. Ultrastructural changes in isolated rat hepatocytes exposed to different CCl<sub>4</sub> concentrations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 114, p. 511-517, 2004.

UED, F. V.; WEFFORT, V. R. S. Vitaminas antioxidantes no contexto da doença hepática gordurosa não alcoólica em crianças e adolescentes obesos. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 31, n. 4, p. 523-30, 2013.

VARSHNEY, R.; KALE, R. K. Effect of calmodulin antagonist on radiation induced lipid peroxidation in microsomes. **International Journal Radiation Biology**, v. 58, p. 733-743, 1990.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VÁSQUEZ, L. R.; ARTILES, M. R.; COLOMA, A. G.; PÉREZ, R. C.; MESIA, L. R. Pyrrolizidine alkaloids of *Senecio* sp from Peru. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 992-995, 2011.

VEIGA JÚNIOR, F. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n. 1, 2005.

WANG, D.; HUANG, L.; CHEN, S. *Senecio scandens* Buch.-Ham.: A review on its ethnopharmacology, phytochemistry, pharmacology, and toxicity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, p. 1-23, 2013.

WHO. **Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides**. Geneva, 1981a.

WHO. **Criteria and Meaning of Tests for Determining the Susceptibility or Resistance of Insects to Insecticides**. Geneva, 1981b.

WHO. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. World Health Organization, Geneva. Disponível em: [http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue\\_9789241547871/en/](http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue_9789241547871/en/), 2009.

YANG, K., LAMPRECHT, S. A., LIU, Y., SHINOZAKI, H., FAN, K., LEUNG, D., NEWMARK, H., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., LIPKIN, M. Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 9, p. 1655-1660, 2000.

YE, X.; FENG, Y.; TONG, Y.; NG, K. M.; TSAO, S.; LAU, G. K.; SZE, C.; ZHANG, Y.; TANG, J.; SHEN, J.; KOBAYASHI, S. Hepatoprotective effects of *Coptidis rhizoma* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced acute liver hepatotoxicity in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 130-136, 2009.

ZEUNER, M.-T.; VALLANCE, T.; VAIYAPURI, S.; COTTRELL, G. S.; WIDERA, D. Development and characterisation of a novel NF- $\kappa$ B reporter cell line for investigation of neuroinflammation. **Mediators of Inflammation**, <https://doi.org/10.1155/2017/6209865>, 2017.

ZHANG, Y. E.; MA, H. J.; FENG, D. D.; LAI, X. F.; CHEN, Z. M.; XU, M. Y.; YU, Q. Y.; ZHANG, Z. Induction of detoxification enzymes by quercetin in the silkworm. **Journal of Economic Entomology**, v. 105, n. 3, p. 1034-1042, 2012.



## ANEXO I – ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
 MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE  
 INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

**AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO  
 GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº35,  
 DE 27 DE ABRIL DE 2011  
 Nº 03/2014**

**O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS**, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, **as atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akel Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa “*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*”.

**Objetivo da Autorização:** Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

**Período das atividades: 2000 a 2019.**

**Validade da Autorização: Cinco anos**, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº **02001.001165/2013-47**.

Volney Zanardi Junior  
 Presidente

Brasília, 17 de março de 2014.



## ANEXO II – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comissão de Ética no Uso de Animais  
(CEUA)



Nº 917

### CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

### STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22<sup>nd</sup> 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

**PROCESSO/PROCESS:** 23075.080340/2015-22

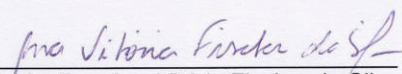
**APROVADO/APPROVAL:** 27/10/2015 – R.O. 11/2015

**TÍTULO:** Avaliação da atividade gastroprotetora e cicatrizante de: *Artocarpus integrifolia*, *Croton argenteus*, *Croton monanthogynus*, *Croton sp.*, *Polygala extraaxillaris*, *Temnadenia stellaris*, *Bauhinia curvula*, *Senecio westermanii*.

**TITLE:** Gastroprotective and healing activity: *Artocarpus integrifolia*, *Argentus croton*, *Croton monanthogynus*, *Croton sp.*, *Polygala extraaxillaris*, *Temnadenia stellaris*, *Bauhinia curvula*, *Senecio westermanii*.

**AUTORES/AUTHORS:** Lígia Moura burci, Cristiane Bezerra da Silva, Maislijan Oliveira, Luciane Dallarmi, Francis José Zortéa Merino.

**DEPARTAMENTO/DEPARTMENT:** Ciências Farmacêuticas

  
Profa. Dra. Ana Vitória Fischer da Silva  
Coordenadora da CEUA