

**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA)**  
**Departamento de Engenharia de Alimentos**

**Alcalóides Pirrolizidínicos em Plantas Brasileiras de  
Interesse Alimentar e Medicinal: Identificação e  
Toxicologia**

**CárITAS de Jesus Silva Mendonça**

**Química Industrial (UFMA)**

**Msc Tecnologia de Alimentos (UNICAMP)**

**Orientador: Prof.Dr. Gil Eduardo Serra (DTA-FEA), UNICAMP**

**Co-orientador: Prof.Dr. Lauro Euclides Soares Barata, Instituto de Química-Lab. de Produtos**

**Naturais (Depto. de Orgânica), UNICAMP**

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de  
Campinas para obtenção do título de Doutor em Tecnologia de Alimentos.**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por CárITAS de Jesus Silva Mendonça, aprovada pela Comissão Julgadora em 21 de agosto de 2000.

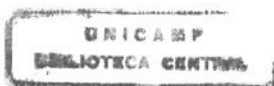
Campinas, 21 de agosto de 2000.

  
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra  
Presidente da Banca

**UNICAMP**

**BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE**

CAMPINAS, SP - julho de 2000



200102377

UNIDADE Bo  
 N.º CHAMADA:  
T/Unicamp  
M523a  
 V. \_\_\_\_\_ Ex. \_\_\_\_\_  
 TOMBO BC/ 43856  
 PROC. 16-392101  
 C ☐ D ☒  
 PREÇO R\$ 11,00  
 DATA 21/02/01  
 N.º CPD \_\_\_\_\_

CM-00153435-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

M523a

Mendonça, Cáritas de Jesus Silva

Alcalóides pirrolizidínicos em plantas de interesse alimentar e medicinal: identificação e toxicologia / Cáritas de Jesus Silva Mendonça. – Campinas, SP: [s.n.], 2000.

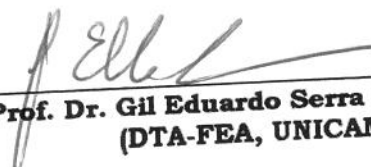
Orientador: Gil Eduardo Serra

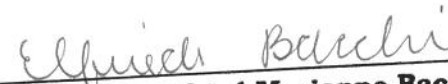
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.  
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Alcalóides. 2. Pirrolizidínicos. 3. Erva. 4. Plantas medicinais. I. Serra, Gil Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.



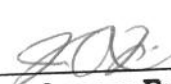
## BANCA EXAMINADORA

  
Prof. Dr. Gil Eduardo Serra (Orientador)  
(DTA-FEA, UNICAMP)

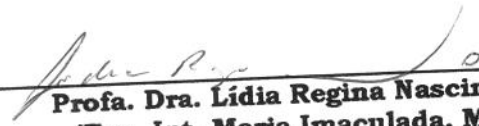
  
Profa. Dra. Elfried Marianne Bacchi (Membro)  
(FBF/DF, USP)

  
Profa. Dra. Raquel Marques Braga (Membro)  
(DO-IQ, UNICAMP)

Profa. Dra. Florinda Osatti Bobbio (Membro)  
(DCA-FEA, UNICAMP)

  
Prof. Dr. Jaime Amaya Farfan (Membro)  
(DEPAN-FEA, UNICAMP)

Profa. Dra. Maria Cecilia Figueiredo Toledo (Suplente)  
(DCA-FEA, UNICAMP)

  
Profa. Dra. Lidia Regina Nascimento (Suplente)  
(Fac. Int. Maria Imaculada, Mogi Guaçu, SP)

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÃO CIRCULANTE

Campinas, 21 de agosto de 2000

*" Poucos Compreendem a Imensa Vantagem que Há em Nunca  
Hesitar e Tudo Ousar."*

*Elogio da Loucura.*

Erasmus Dias.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÃO CIRCULANTE

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

À minha mãe ( pelo exemplo que norteia minha conduta perante a vida )  
e a todos da família.

Dedico este trabalho

À

Alana

Adriana

Claudia

Lucilia

Mara

Marta

M<sup>a</sup> Julia

Myriam

Nádia

Ao Pablo

Patrícia C. Dias

Valéria B. de Lima

Pelo constante incentivo e apoio, pelas críticas e sugestões, pelo auxílio não só na parte acadêmica e material mas principalmente pelo ensinamento e amadurecimento de vida.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Gil Eduardo Serra pela orientação, pela paciência, pelas oportunidades e sobretudo pela amizade.

Ao Prof. Dr. Lauro Soares Euclides Barata pela co-orientação, por ceder o seu Laboratório para que este trabalho fosse desenvolvido, por todo apoio que me foi concedido ao longo desses anos e pelo carinho.

Ao Prof. Dr. José Roberto Trigo pela orientação, por ter me iniciado na técnica de CG-EM, pelas discussões e ensinamento sobre a química dos APs e pela capacidade profissional com que conduziu este trabalho.

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA-UNICAMP), através do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho e sua Equipe de trabalho: Márcia, Ana Possenti, Luciana, Débora, Claudia e Aparecida Erica, pela imensa colaboração quando da realização dos testes toxicológicos, pelo apoio financeiro nas viagens para congressos e simpósios, apoio nos momentos difíceis, nas tomadas de decisões, pelo carinho e amizade com que todos me receberam no Laboratório e pela seriedade profissional.

À Prof. Dra. Sarah Arana, pelos ensinamentos na área de histologia, pela compreensão e dedicação profissional.

À Susana pelo cuidado com as "mamães" ratas e seus filhotes, pela colaboração nos ensaios toxicológicos e pelo carinho ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Lúcia Helena B. Baptistella pelos diálogos gratificantes, pelas sugestões, pelas aulas de orgânica e pela dedicação profissional.

Ao Prof. Dr. Paulo M. Imamura, pela boa receptividade em seu Laboratório, pelos empréstimos de materiais e pela convivência agradável.

Ao Prof. Dr. Pedro Mellilo Magalhães, por ter sugerido o tema desse trabalho e pela doação das plantas.

À Elaine pelo auxílio no manuseio do CG-EM e pela amizade cultivada durante esses anos.

À Rita de Cássia ( nossa "Isaura" ) pelo constante cuidado com as plantas de trabalho, pelo preparo dos extratos, pela "guarda do computador" por sua presença alegre, cativante e pelos cafezinhos diários.

Aos amigos Carlos S., Silvio, Denis, Clécio, Marcelo (pelas discussões e elucubrações sobre a química, nas noites de sexta-feira) Ilza, Raquel, Beto, Soninha (papo-cabeça), Sandra, Maria Helena, Soraya, Gilvandete, Cecília, Vera e Íris, pelas dicas e auxílios no laboratório, pelas sugestões e pelo tratar bem.

À Carol, Valéria H., Valdirene, Giselle, Artur, Sérgio S., Marcelo S., Mário, Suzi e Vera Lúcia A., pela convivência agradável, pelos momentos de descontração e solidariedade.

Ao Paiva, pelas sugestões, apoio e carinho.

À Ray, que pelo pouco tempo de convivência no laboratório, tem se mostrado amiga e solidaria, pelo café das 7h.

Às amigas da FEA Ana Maria, Alice, Ana Lurdes e Marlene pelo apoio e carinho ao longo destes anos.

À Paula e à Sonia pelos espectros de RMN e pela atenção.

Às técnicas (Marta I e Marta II, Cleusa e Telma) do laboratório de Histologia do Depto. de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),  
pela bolsa concedida.

Ao FAEP pela bolsa concedida.

Ao Herbário do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela coleta das  
Inflorescências das espécies de *Senecio* e *Eupatorium*.

Ao Instituto de Química e todos os funcionários, por colocar à nossa  
disposição os aparelhos utilizados nas diversas análises da tese.

À Universidade Federal do Maranhão (onde tudo começou), através da Profa.  
Dra. Maria Célia Pires Costa, pelo incentivo, pela capacidade profissional e por ter  
me acolhido em sua casa, quando da minha vinda para Campinas.

Aos amigos do Maranhão: Paulo, Silvia, Sôfia, Estevão, Reginaldo, Ademar,  
Marialda, Conceição, Nonato ("Índio") e Fátima pelo convívio e carinho durante a  
época de graduação, e por acreditarem no meu crescimento profissional.

A todos do Movimento Gnóstico, pela Força.

Aos professores (as) da Banca Examinadora, pelas críticas e sugestões, que  
foram de grande valia para o fechamento desse trabalho.

## ÍNDICE

## Paginas

|                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO                                                      | iv |
| ABSTRACT                                                    | v  |
| ABREVIACÕES                                                 | vi |
| 1. INTRODUÇÃO                                               | 1  |
| 2. OBJETIVOS                                                | 3  |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA                                    | 4  |
| 3.1 Toxinas Presentes em Plantas                            | 5  |
| As Toxinas Não-Nitrogenadas                                 | 5  |
| As Toxinas Nitrogenadas                                     | 8  |
| 3.2 Alcalóides                                              | 11 |
| 3.3 Ação Farmacológica de Alcalóides                        | 17 |
| 3.4 Alcalóides Pirrolizidínicos                             | 23 |
| 3.5 Distribuição e Classificação de APs em Plantas          | 26 |
| 3.6 Ocorrência de APs em Alimentos                          | 33 |
| 3.7 Toxicidade de APs                                       | 36 |
| Hepatotoxicidade de APs terciários                          | 36 |
| Hepatotoxicidade Aguda                                      | 37 |
| Hepatotoxicidade Crônica                                    | 38 |
| Hepatotoxicidade de APs N-óxidos                            | 39 |
| Toxicidade de APs em Pulmão, Rim e outros Órgãos            | 39 |
| 3.8 Métodos Espectrofotométricos para Identificação de APs  | 42 |
| Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas de APs        | 42 |
| Espectrometria de Massas de Impacto de Elétrons             | 44 |
| Espectrometria de Massas de Impacto de elétrons- Padrões de | 46 |
| Fragmentação de APs                                         | 46 |
| APs Monoésteres 1,2-insaturados                             | 46 |
| APs Monoésteres 1,2-saturados                               | 48 |
| APs Macrocíclicos 1,2-insaturados                           | 48 |
| APs Macrocíclicos 1,2-saturados                             | 49 |
| APs Diésteres                                               | 49 |
| APs macrocíclicos com base otonecina                        | 50 |
| APs com bases Necinas                                       | 50 |
| 3.8 Métodos Espectroscópicos para caracterização de APs     | 50 |



|                                                                                                                                                                                                                                                         |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                                                                                                           | <b>51</b> |
| <b>4.1 Delineamento Experimental</b>                                                                                                                                                                                                                    | <b>51</b> |
| <u><b>Experimento A</b></u>                                                                                                                                                                                                                             | <b>51</b> |
| Identificação de APs de espécies do gênero <i>Senecio</i> e <i>Eupatorium</i><br>(alocados em Herbário)                                                                                                                                                 | <b>51</b> |
| <u><b>Experimento B</b></u>                                                                                                                                                                                                                             | <b>52</b> |
| Identificação de espécies dos gêneros <i>Heliotropium</i> , <i>Ageratum</i> e<br><i>Crotalaria</i>                                                                                                                                                      | <b>52</b> |
| <u><b>Experimento C</b></u>                                                                                                                                                                                                                             | <b>52</b> |
| Isolamento e Caracterização de APs de espécies dos gêneros<br><i>Heliotropium indicum</i> , <i>Ageratum conyzoides</i> , <i>Eupatorium laevigatum</i> ,<br><i>Senecio brasiliensis</i> , <i>Crotalaria spectabilis</i> e <i>Crotalaria lanceolata</i> . | <b>52</b> |
| <u><b>Experimento D</b></u>                                                                                                                                                                                                                             | <b>57</b> |
| <b>Testes Toxicológicos</b>                                                                                                                                                                                                                             | <b>57</b> |
| Testes de Toxicidade Aguda                                                                                                                                                                                                                              | <b>57</b> |
| Testes de Toxicidade crônica                                                                                                                                                                                                                            | <b>58</b> |
| <b>Animais</b>                                                                                                                                                                                                                                          | <b>59</b> |
| <b>Avaliação da Toxicidade</b>                                                                                                                                                                                                                          | <b>59</b> |
| <b>Análise Histopatológica</b>                                                                                                                                                                                                                          | <b>59</b> |
| <b>Documentação Fotográfica</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>61</b> |
| <b>4.2 MÉTODOS</b>                                                                                                                                                                                                                                      | <b>61</b> |
| <b>4.2.1 Extração e fracionamento de APs</b>                                                                                                                                                                                                            | <b>61</b> |
| <b>4.2.2 APs obtidos a partir de transformações químicas</b>                                                                                                                                                                                            | <b>64</b> |
| Hidrólise                                                                                                                                                                                                                                               | <b>64</b> |
| Oxidação                                                                                                                                                                                                                                                | <b>65</b> |
| <b>4.2.3 Métodos Analíticos</b>                                                                                                                                                                                                                         | <b>66</b> |
| Cromatografia em camada delgada analítica                                                                                                                                                                                                               | <b>66</b> |
| Cromatografia de adsorção com coluna Flash                                                                                                                                                                                                              | <b>66</b> |
| Cromatografia em camada delgada preparativa                                                                                                                                                                                                             | <b>68</b> |
| Cromatografia de Partição                                                                                                                                                                                                                               | <b>68</b> |
| Cromatografia gasosa acoplada a Espectrometria de massas                                                                                                                                                                                                | <b>68</b> |
| Método Colorimétrico                                                                                                                                                                                                                                    | <b>70</b> |
| Ressonância Magnética Nuclear                                                                                                                                                                                                                           | <b>70</b> |
| <b>4.3 Análise Estatística</b>                                                                                                                                                                                                                          | <b>71</b> |

|                                                                                        |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>                                                       | <b>72</b>  |
| <b>5.1 Identificação de APs em Plantas Brasileiras</b>                                 | <b>72</b>  |
| 5.1.1 Identificação de APs em espécies de <i>Senecio</i>                               | 77         |
| 5.1.2 Identificação de APs em espécies de <i>Eupatorium</i>                            | 87         |
| 5.1.3 Identificação de APs em <i>Heliotropium indicum</i>                              | 96         |
| 5.1.4 Identificação de APs em <i>Heliotropium transalpinum</i>                         | 97         |
| 5.1.5 Identificação de APs em <i>Ageratum conyzoides</i>                               | 100        |
| 5.1.6 Identificação de APs em espécies de <i>Crotalaria</i>                            | 103        |
| <b>5.2 Isolamento e caracterização de APs para utilização nos Testes Toxicológicos</b> | <b>105</b> |
| <b>Monoésteres Indicina e Licopsamina</b>                                              | <b>105</b> |
| <b>Macrocíclicos (12-membros) Integerrimina e Retrorsina</b>                           | <b>108</b> |
| <b>APs N-óxidos: Indicina, Integerrimina e Retrorsina</b>                              | <b>114</b> |
| <b>Base Retronecina</b>                                                                | <b>123</b> |
| <b>Ácido Integerrinecico</b>                                                           | <b>128</b> |
| <b>5.3 Isolamento e Caracterização de Outros APs</b>                                   | <b>132</b> |
| <b>Equinatina N-óxido</b>                                                              | <b>132</b> |
| <b>Usaramina</b>                                                                       | <b>137</b> |
| <b>Monocrotalina</b>                                                                   | <b>142</b> |
| <b>5.4 Testes Toxicológicos</b>                                                        | <b>148</b> |
| 5.4.1 Teste de Toxicidade Aguda                                                        | 149        |
| 5.4.2 Teste de Toxicidade Crônica-Exame Anatomopatológico                              | 152        |
| 5.4.3 Exame Histopatológico                                                            | 154        |
| 5.4.4 DL <sub>50</sub> e Curva Dose-Resposta                                           | 170        |
| 5.4.5 Teste de Toxicidade Crônica (Extratos)                                           | 176        |
| <b>6. CONCLUSÕES</b>                                                                   | <b>181</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                                   | <b>182</b> |

## RESUMO

### Alcalóides Pirrolizidínicos em Plantas Brasileiras de Interesse Alimentar e Medicinal: Identificação e Toxicologia.

Cáritas de Jesus Silva Mendonça  
Gil Eduardo Serra

Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, C.P 6154,  
Campinas, 13081-970, SP-Brasil

**Palavras-chave:** alcalóides, pirrolizidínicos, hepatotoxicidade

Plantas contendo Alcalóides Pirrolizidínicos (APs) são amplamente consumidas com propósitos medicinais (remédio caseiro) ou alimentícios (saladas, sucos), em alguns países tais como Índia, Afeganistão, Estados Unidos da América e União Soviética. Algumas plantas, dentre as quais *Senecio*, são vendidas como ervas medicinais em lojas de produtos naturais. Durante muitos anos o Confrei (*Symphytum ssp*) foi usado para fins alimentícios (vegetal, bebida) e medicinal. Porém, atualmente estas plantas são conhecidas por sua carcinogenicidade em animais de laboratório. Existem evidências concretas de que os efeitos causados pela exposição a uma única dose de AP pode progredir para uma doença crônica do fígado, e para cirrose.

Os APs são ésteres de 1-metilhidroxilpirrolizidinas, constituídos por um aminoálcool (base necina) e uma parte ácida (ácido necico). Cerca de 200 APs foram identificados em 300 espécies de plantas. Estes compostos ocorrem principalmente nas famílias Boraginaceae (todos os gêneros), Asteraceae (tribos *Senecionae* e *Eupatoriae*) e Leguminosae (gênero *Crotalaria*).

Neste trabalho foi realizada inicialmente a identificação qualitativa por CG-EM, em 28 espécies de *Senecio* e 87 espécies de *Eupatorium*, alocadas no Herbário do Instituto de Biologia desta Universidade.

As análises das espécies de *Senecio* apresentaram basicamente três tipos de APs: macrocíclicos insaturados (**Tipo Senecionina [A1]**), alcalóides macrocíclicos saturados (**Tipo Platifilina [A2]**) e monoésteres saturados (**Tipo Triangularina [B]**)

As espécies de *Eupatorium* revelaram que a composição química dos extratos brutos apresentam grande similaridade, e os APs encontrados com mais abundância e frequência foram dos **Tipos Licopsamina [C1]** e **Supinina [C2]**.

Além dos gêneros citados foram realizadas análises em varias partes das plantas: *Ageratum conizoides*, *Heliotropium indicum*, *H. transalpinum* e três espécies de *Crotalaria* (*Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria lanceolata*).

O extrato bruto do *Ageratum conizoides* revelou a presença majoritária de APs do **Tipo Licopsamina [C1]**.

Os principais APs encontrados no extrato bruto da planta *Heliotropium indicum* foram do **Tipo [C1]** como **Indicina** e **Iso-indicina**.

Nas espécies de *Crotalaria* foram identificados basicamente os APs **Integerrimina**, **Monocrotalina**, **Usaramina** e um AP de estrutura desconhecida.

Os estudos toxicológicos em ratos (toxicidade aguda) realizados com os APs puros (dose única) isolados e caracterizados por RMN em 1D (RMN1H, RMN13C, DEPT) e 2D (HETCOR e COSY) mostraram que os APs macrocíclicos e seus respectivos *N*-óxidos, de um modo geral, causaram alterações hepáticas como hepatócitos megalocíticos, degeneração hidrópica dos hepatócitos e necrose maciça.

Nos testes de toxicidade crônica realizados com os extratos brutos, somente o *Eupatorium laevigatum* e o *Senecio brasiliensis* causaram alterações hepáticas como hepatócitos megalocíticos, células em degeneração e necrose com indícios de hepatotoxicidade.

## ABSTRACT

### **Pyrrolizidine Alkaloids (PAs) in Brazilian Plants with Feed and Medicinal Interest: Identification and Toxicology**

**Cáritas de Jesus Silva Mendonça**  
**Gil Eduardo Serra**

Faculdade de Engenharia de Alimentos (FEA), UNICAMP, C.P 6154,  
 Campinas, 13081-970, SP-Brazil

**Keywords:** Alkaloids, pyrrolizidine, hepatotoxicity

Plants containing pyrrolizidine alkaloids (PA's) are consumed as medicinal herbs or as foods (salads, juices).in India, Afganistan, America, Russia and Brazil.

But nowadays those species are known as carcinogenic for laboratory animals. There are concrete evidence that the effects of a single dose of PA can cause chronic liver disease and cirrhosis.

PA's are esters 1-methylhydroxylpyrrolizines, composed by an aminoalcohol (necine base) and an acid (necic acid). More than 200 structures had been isolated from species of *Senecio* and *Eupatorium* (Asteraceae), *Crotalaria* (Leguminosae) and *Heliotropium* (Boraginaceae).

In this work, preliminary qualitative analysis using GC-MS was performed in 28 *Senecio* species and 87 of *Eupatorium*.

*Senecio* showed three types of PAs saturated monoesters **Triangularine Type**, insaturated macrocycles (**Senecionine Type**) and saturated macrocycle alkaloids (**Platifiline Type**).

The *Eupatorium* species showed similar composition and the most common PA's are **Lycopsamine Type** and **Supinine Type**.

Analysis were also made in different parts of plants of other genus: *Ageratum* (*conyzoides*), *Heliotropium* (*indicum*, *transalpinum*) and *Crotalaria* (*juncea*, *spectabilis* and *lanceolata*). The methanol

extract of *Ageratum conyzoides* showed the presence of two diaster **Lycopsamine Type**. In *Heliotropium indicum* **Indicine** and **Iso-indicine** were found.

Crotalare species showed **Integerrimine**, **Monocrotaline**, **Usaramine** and an **unknown PA**.

Toxicological studies in rats (acute toxic dose) performed with pure PA isolated and characterized by NMR in 1D (NMR1H, NMR13C, DEPT) and 2D (HETCOR e COSY) showed flat macrocyclic PAs and its N-oxides, in a general sense, caused alterations in the liver, where observed megalocytic hepatocytes and necrosis.

Chronic toxicity tests with raw extracts showed that only *Eupatorium laevigatum* and *Senecio* caused liver alterations.

## ABREVIACÕES

- APs: alcalóides pirrolizidínicos  
CCD: Cromatografia em Camada Delgada  
CG: Cromatografia Gasosa  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
EM: Espectrometria de massas  
EM-IE: Espectrometria de massas de Impacto de Elétrons  
COSY: Espectro em 2D que correlaciona prótons a três ligações (Correlation Spectroscopy)  
DEPT: Distortionless Enhancement Polarization Transfer  
HETCOR: Espectro em 2D que correlaciona carbonos e prótons a um ligação (Heteronuclear Correlation)  
IRK: Índice de Retenção de van den Dool  
m: multipletto  
s: singleto  
sl: singleto largo  
d: dubleto  
dl: dubleto largo  
dd: duplo dubleto  
q: quarteto  
sept: septeto  
t: triplete  
CDCl<sub>3</sub>: clorofórmio deuterado  
D<sub>2</sub>O: água deuterada  
DMSO: Dimetil sulfoxido  
TMS: trimetilsilil  
1D: 1 dimensão  
2D: 2 dimensões  
 $\delta$ : deslocamento químico (em ppm)  
Hz: Hertz  
J: constante de acoplamento (em Hertz)

# **1. INTRODUÇÃO**



## 1. INTRODUÇÃO

Desde a mais remota antiguidade, os homens utilizam as plantas como remédio para os seus males. Todas as civilizações valeram-se delas para aliviar o sofrimento e, em muitos casos, para curar doenças. O uso destas plantas, sob várias formas de preparo popular (chá, abafados, garrafadas ou tinturas), é costume bastante arraigado em várias camadas da população brasileira e mundial. Tal hábito parte do pressuposto de que as plantas utilizadas possuem atividades terapêuticas e são desprovidas de efeitos tóxicos. Contudo, não existem dados científicos sobre várias plantas utilizadas em nosso meio que justifiquem o uso terapêutico ou que confirmem a ausência de toxicidade.

Além do aspecto medicinal também é de grande importância a pecuária extensiva em vastas regiões da América do Sul e da América Central, com a ocorrência de enormes prejuízos causados por doenças crônicas provenientes da ingestão de plantas tóxicas, cujo controle e combate demonstram-se difíceis. Isto acarreta um prejuízo econômico além de eventualmente colocar em risco a saúde pública, caso tais animais ou produtos afins sejam utilizados na indústria alimentícia, o que resultaria em uma irreversível entrada de toxinas vegetais na cadeia alimentar do ser humano (HABERMEHL, 1991).

No Brasil algumas plantas tóxicas têm sido usadas na medicina popular e como alimento para animais domesticados. Entretanto, pouca ou nenhuma informação se tem acerca dos seus efeitos toxicológicos e toxicogenéticos. Muitas dessas plantas podem conter substâncias tóxicas e mutagênicas, e o seu uso constante pode constituir um risco potencial para a saúde humana e dos animais. Como exemplo de uma classe que apresenta uma variedade de atividades farmacológicas e que sempre influenciou muito a história

econômica, médica, política e social da humanidade, pode-se citar a classe dos alcalóides e dentre estes, os alcalóides pirrolizidínicos (APs), que assumem um papel muito importante no cenário das plantas usadas para fins medicinais e alimentares pela população brasileira.

Embora exista uma vasta literatura sobre a ocorrência de alcalóides pirrolizidínicos em material vegetal, a presença destas substâncias tóxicas em espécies utilizadas como "medicinais" ou mesmo como alimento pela população brasileira é praticamente nula.

Assim, os fatos aqui apresentados têm motivado numerosas pesquisas que visam identificar a presença de APs em plantas empregadas na medicina popular ou mesmo como alimento, isolá-los e verificar os seus efeitos em condições experimentais, com o propósito de obter dados para melhor orientar a população no uso destas plantas e acrescentar informações sobre o efeito de APs.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

A preocupação no estudo dos alcalóides pirrolizidínicos, evidenciada pela bibliografia e estudos conduzidos em diversos países, e por outro lado, o uso praticamente indiscriminado, no Brasil de plantas (contendo substâncias tóxicas) para o preparo de infusões, chás, bebidas e alimentos, chama a atenção para a lacuna de informações sobre plantas de uso tipicamente nacionais. Assim, este projeto tem como objetivo obter informações sobre a ocorrência de APs em espécies vegetais brasileiras, por meio de pesquisa orientada para:

- Estudo da presença de APs em algumas plantas brasileiras usadas pela população para fins medicinais ou alimentares, através da técnica de cromatografia gasosa espectrometria de massas, visando estabelecer um padrão de ocorrência dos mesmos, a partir da distribuição dos APs identificados nos gêneros e espécies vegetais estudadas.
- Avaliar a toxicidade de extratos aquosos (infusão) preparados a partir de plantas brasileiras de uso popular e verificar também a toxicidade aguda de alguns APs puros (monoésteres versus macrocíclicos), quando administrados por via oral.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Algumas toxinas (detritos bacterianos considerados venenosos para o corpo animal - ROBBERRS et al., 1997) presentes em plantas, como a nicotina, a piretrina e os rotenóides são bem conhecidas. Porém existe uma variedade muito grande de plantas tóxicas, que permanece sem investigação até hoje (HARBORNE, 1997). Segundo o mesmo autor, a toxicidade química é sempre relativa, dependendo da dose tomada em um determinado período de tempo, da idade e do estado de saúde do animal, do mecanismo de ação e absorção e do modo de excreção. Por exemplo, o alcalóide esteroideal Solanina está presente em todas as batatas domésticas, mas a quantidade é tão infinitesimal que raramente torna-se um risco para quem o consome. Além dos alcalóides existem outras toxinas que ocorrem frequentemente em plantas. Os taninos (Casuarinina, Stachiurina, Castalagina e Vescalagina) e as saponinas (5-metoxipodofilotoxina e ácido-medicamentoso) foram isolados das espécies *Thiloa glaucocarpa* e *Polygala klotzchii*, respectivamente (HARBORNE, 1997).

Na medicina popular da América do Sul algumas espécies de *Baccharis* são utilizadas no tratamento de vários sintomas de doenças. Como exemplo podemos citar a *Baccharis trimera*, no Brasil denominada carqueja, utilizada na forma de chá para o tratamento de dores de estômago; na Argentina a *Baccharis crispa* é utilizada no tratamento de feridas e de infecções externas. Através de estudos químicos e farmacológicos em espécies de *Baccharis* (HABERMEHL, 1991) foi possível comprovar a presença de substâncias tóxicas que foram identificadas como *trichotecenas macrocíclicas* (roridinas A e E, miotoxinas A, B, C e D).

Plantas do gênero *Cestrum* (Solanaceae), usadas na medicina popular para aliviar dores, como tranquilizantes e diurético para "catarro da bexiga", também apresentam substâncias tóxicas que até o presente não foram identificadas (HABERMEHL, 1991)

### 3.1 Toxinas Presentes em Plantas

#### As Toxinas Não-Nitrogenadas

Existem muitos compostos tóxicos presentes em plantas que são terpenóides ou até mesmo simples hidrocarbonetos. Por exemplo, muitos dos extratos de plantas usados em flechas de nativos da África continham glicosídeos cardíacos, substâncias altamente tóxicas que levam à morte animais e humanos (HARBORNE, 1997).

A toxina não nitrogenada mais simples presente em plantas é o ácido monofluoroacético ( $\text{CH}_2\text{FCO}_2\text{H}$ ), o qual ocorre em plantas nativas da África do Sul, como a *Dichapetalum cymosum* (Lilaceae). Os efeitos tóxicos desta substância se caracterizam por uma parada respiratória, sendo que a dose letal para o homem está na faixa de 2 a 5 mg/kg. Um outro ácido orgânico tóxico presente em plantas é o ácido oxálico ( $\text{CO}_2\text{H}$ )<sub>2</sub>. Porém este só é realmente tóxico quando associado com os íons sódio e potássio, formando sais solúveis. Apesar da sua estrutura simples a ação deste ácido é pouco entendida. A dose letal para o ácido oxálico é elevada; somente plantas que possuem teores acima de 10% do peso seco são tidas como nocivas para mamíferos (KEELER et al., 1978).

Uma seleção de toxinas não nitrogenadas esta listada na Tabela 1 (HARBORNE, 1997) e algumas de suas estruturas mostradas na Figura 1.

Dentre os terpenóides, dois grupos merecem destaque por serem altamente tóxicos: os glicosídeos cardiotônicos (cardenolidos) e as saponinas (ROBBERRS et al., 1997). Há outras estruturas associadas a estas como por exemplo, as toxinas diterpênicas presentes nas folhas e flores de *Rhododendron*. Também, as lactonas sesquiterpênicas presentes na família Compositae, têm sido tóxicas para insetos (HARBORNE, 1997) e responsáveis por sintomas alérgicos em animais (MITCHELL & ROOCK, 1979). Algumas lactonas sesquiterpênicas (himenovina) presentes na espécie *Hymenoxys odorata*

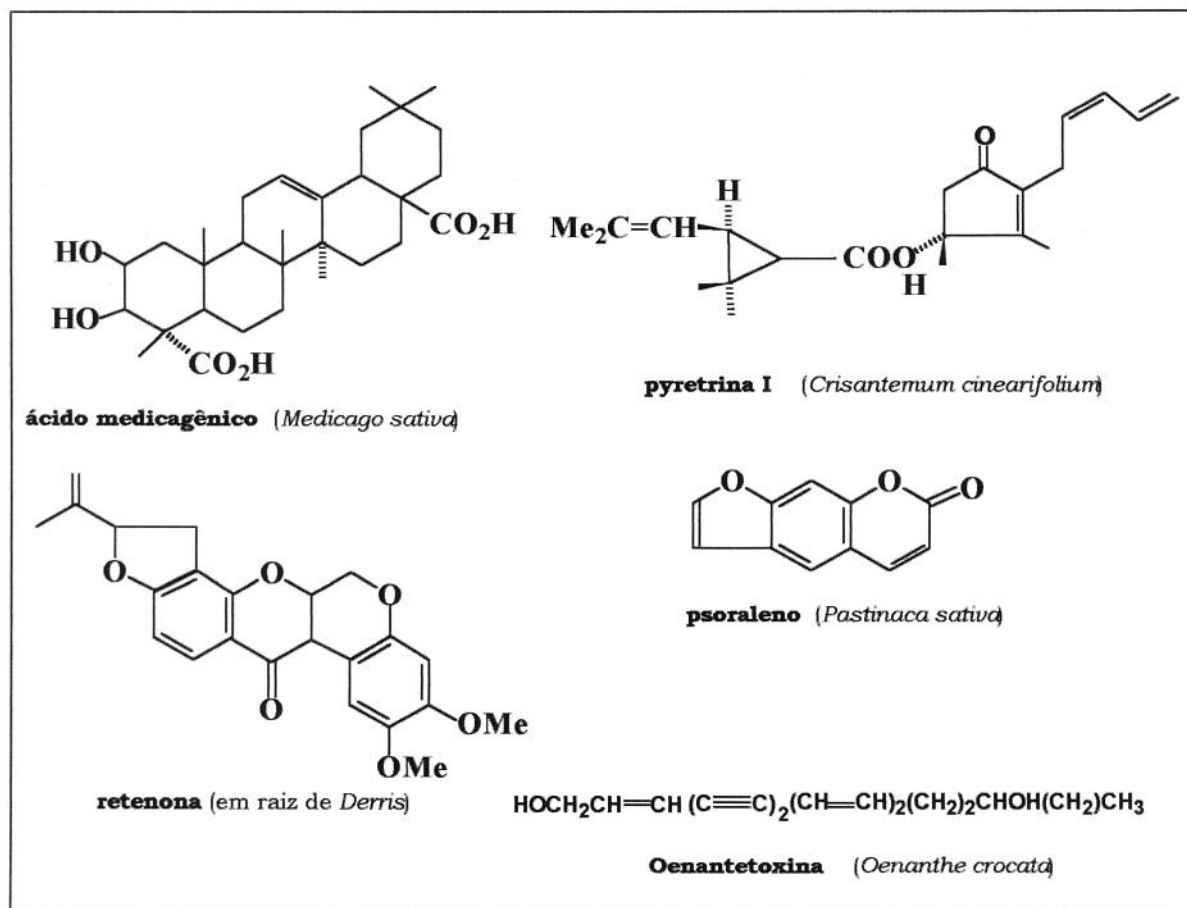
são venenosas para animais de fazenda, enquanto um grande número é citotóxico, tendo ainda atividade anti-tumoral (RODRIGUEZ *et al.*, 1976). As lactonas sesquiterpênicas freqüentemente têm gosto amargo, idêntico a outro grupo de toxinas terpenóides, as lactonas monoterpênicas ou iridóides. Os iridóides ocorrem em plantas tanto na forma livre (neptalactona), quanto na forma de glicosídeos (aucubina), quando a toxina é liberada após hidrólise enzimática.

**Tabela 1. Toxinas Não-Nitrogenadas Presentes em Plantas.**

| Classe de Compostos       | Toxina           | Planta                                  | Toxicidade                         |
|---------------------------|------------------|-----------------------------------------|------------------------------------|
| Iridóides                 | Aucubina         | <i>Aucuba</i>                           | insetos e pássaros                 |
| Lactonas sesquiterpênicas | Himenovina       | <i>Hymenoxys odorata</i>                | gado e insetos                     |
| Glicosídeos cardíacos     | Ouabaina         | <i>Acokanthera ouabaio</i>              | ratos DL <sub>50</sub> = 17,2mg/kg |
| Saponinas                 | Ác. Medicagênico | <i>Medicago sativa</i> (folhas)         | peixes e insetos                   |
| Furanocumarinas           | xantotoxina      | <i>Pastinaca sativa</i>                 | insetos                            |
| Isoflavonóides            | Rotenona         | Derris                                  | insetos e peixes                   |
| Quinonas                  | Hipericina       | <i>Hypericum perforatum</i><br>(folhas) | ovelhas, mamíferos                 |
| Poliacetilenos            | Oenantetoxina    | <i>Oenante crocata</i> (raiz)           | mamíferos                          |

**Fonte: (HARBORNE, 1997)**





**Figura 1. Algumas Toxinas Não-Nitrogenadas presentes em Plantas.**  
**Fonte: HARBORNE, 1997.**

Algumas toxinas não-nitrogenadas presentes em plantas são também notáveis por causarem fotosensibilidade em animais como por exemplo a quinona hipericina de *Hypericum perforatum*, composto fotodinâmico o qual é absorvido pelo animal e entra na circulação. Quando exposto à luz do sol, o animal torna-se susceptível a queimaduras solares e outros danos como necrose da pele. Entre outros compostos fotodinâmicos presentes em plantas estão as furocumarinas, encontradas na espécie *Cymopterus watsonii* (KEELER, 1975). Outras moléculas descobertas por causarem toxicidade em animais através da fotosensibilidade são os poliacetilenos e os tiofenos (TOWERS, 1980) e o grupo das aflatoxinas, sendo a maioria de origem microbiana, produzidas pelo fungo *Aspergillus flavus*, tendo

como maior representante desta classe a aflatoxina B<sub>1</sub>. Este composto puro é carcinogênico para animais tendo como órgão alvo o fígado; a dose letal em patos é de 20 µg, ocorrendo morte após 24 horas e a dose letal em cães e ratos é de 0,5 e 0,9 mg/kg, respectivamente. Segundo SMITH & MOSS (1985) estas toxinas são capazes de contaminar plantas e alimentos. Um outro grupo de substâncias tóxicas originadas de plantas são os rotenóides que ocorrem em raízes de legumes, e as piretrinas presentes nas folhas de *Chrysanthemum cinerifolium* (Asteraceae) ambos com propriedades inseticidas.

Todas as toxinas mencionadas até aqui têm efeitos em formas de vida animal superior; detalhes dos efeitos destas toxinas em animais de fazenda ou domésticos são reportados por KEELER *et al.*, (1978) e KEELER & TU (1983).

### **As Toxinas Nitrogenadas**

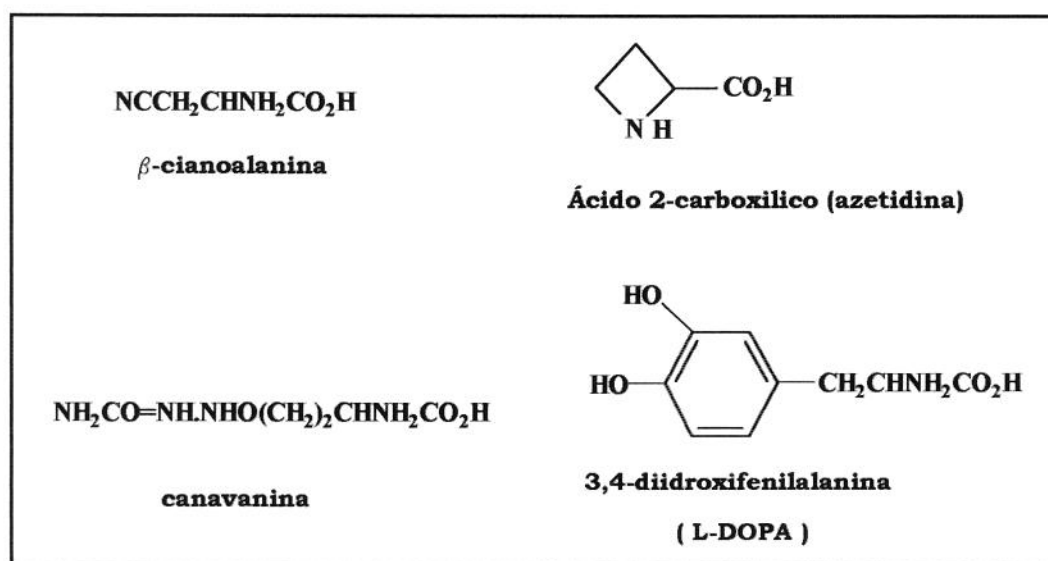
Das várias toxinas nitrogenadas presentes em plantas, as de estrutura mais simples, são os aminoácidos não protéicos (Tabela 2, Figura 2). Estes estão amplamente distribuídos nas plantas e podem ser diretamente tóxicos. Existe cerca de 300 estruturas conhecidas destes aminoácidos isolados de plantas (BELL, 1980; ROSENTHAL, 1982), os quais são particularmente característicos de legumes, encontrados na maioria das vezes nas sementes. Segundo BELL (1972) a toxicidade destas plantas provém de uma variedade de estruturas químicas. Como exemplo, a β-cianoalanina presente em espécies de *Vicia*, muito tóxica para mamíferos, chega a causar convulsões e morte quando injetada em ratos na concentração de 200mg/kg. Uma outra classe de toxinas nitrogenadas presente em plantas, são os glicosídeos cianogênicos. Estes compostos não são tóxicos "per se", somente quando quebrados enzimaticamente formando assim o ácido cianídrico (HCN) e o ácido prússico. Entre estes está a miserotoxina presentes em legumes do gênero *Astragalus*,

conhecida por afetar o gado e causar danos ao sistema nervoso do homem (STERMITZ et al., 1972 ). A ocorrência de glicosídeos cianogênicos em plantas é relevante do ponto de vista tóxico; a síntese destes compostos têm como produto principal o ácido prússico ou por hidrólise deste o ácido cianídrico (HCN). Uma das origens clássicas do ácido cianídrico está nas sementes das amêndoas da *Pronus amygdalus*, a qual contém o glicosídeo amigdalina. Vários casos de intoxicação no gado e morte em humanos são relatados a cada ano devido ao consumo de plantas contendo estas substâncias (JONES, 1972, 1988).

**Tabela 1. 2 - Toxinas Nitrogenadas presentes em Plantas**

| Classe de Compostos       | Toxina                | Planta                    | Toxicidade                                  |
|---------------------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------------------------|
| Aminoácidos Não Protéicos | L- DOPA               | <i>Mucuna</i> (sementes)  | insetos                                     |
| Glicosídeos cianogênicos  | $\beta$ -Cianoalanina | <i>Vicia</i> (sementes)   | DL <sub>50</sub> =200mg/kg para ratos       |
|                           | Linamarina            | <i>Lotus corniculatus</i> | DL <sub>50</sub> =50mg/kg para homem        |
| Glucosinolatos            | Iotaustralina         |                           | -                                           |
|                           | Sinigrina             | <i>Brassica</i>           | gado e insetos                              |
| Alcalóides                | Senecionina           | <i>Senecio jacobaea</i>   | gado e insetos                              |
| Alcalóide                 | Atropina              | <i>Atropa belladonna</i>  | mamíferos, ratos DL <sub>50</sub> =750mg/kg |
| Peptídeos                 | Amanitina             | <i>Amanita pallioides</i> | mamíferos                                   |
|                           | Viscotoxina           | <i>Viscum album</i>       | animais                                     |
|                           | Abrina                | <i>Abrus precatorius</i>  | DL <sub>50</sub> =0,5mg/kg para o homem     |
| Proteínas                 | Fitoheماغلوتينina     | <i>Phaseolus vulgaris</i> | escaravelho                                 |

**Fonte: (HARBORNE, 1997)**



**Figura 2. Alguns Aminoácidos não-protéicos tóxicos, presentes em plantas.**

Os glicosinolatos presentes em espécies de *Brassica* (Cruciferae) podem ser tóxicos para animais quando encontrados em quantidades suficientes nas plantas (HARBORNE, 1997).

A maior classe de toxinas presentes nas diversas famílias de plantas são os alcalóides (Figura 1.3), com mais de 10.000 compostos conhecidos e uma variedade de estruturas. Parte das moléculas dos alcalóides podem ser derivadas da rota sintética de terpenóides e de carboidratos (HARBORNE, 1997).

Uma definição moderna de alcalóides é dada por PELLETIER (1983), que define alcalóide como sendo um composto orgânico cíclico que contem um nitrogênio com estado de oxidação negativo. De acordo com esta definição algumas substâncias como aminas (-3), óxidos de aminas (-1), amidas (-3) e sais de amônia quaternária (-3) podem entrar no grupo dos alcalóides (Figura 1.3). Esta definição tem a vantagem de incluir a maioria dos compostos (piperina, colchinina,  $\beta$ -feniletilamina, recinina, gentianina e os derivados da base purina) que são exceções dentro da definição clássica de alcalóides. Entretanto não inclui os ácidos aristoloquicos que apresentam grupos  $-\text{NO}_2$  (+3).

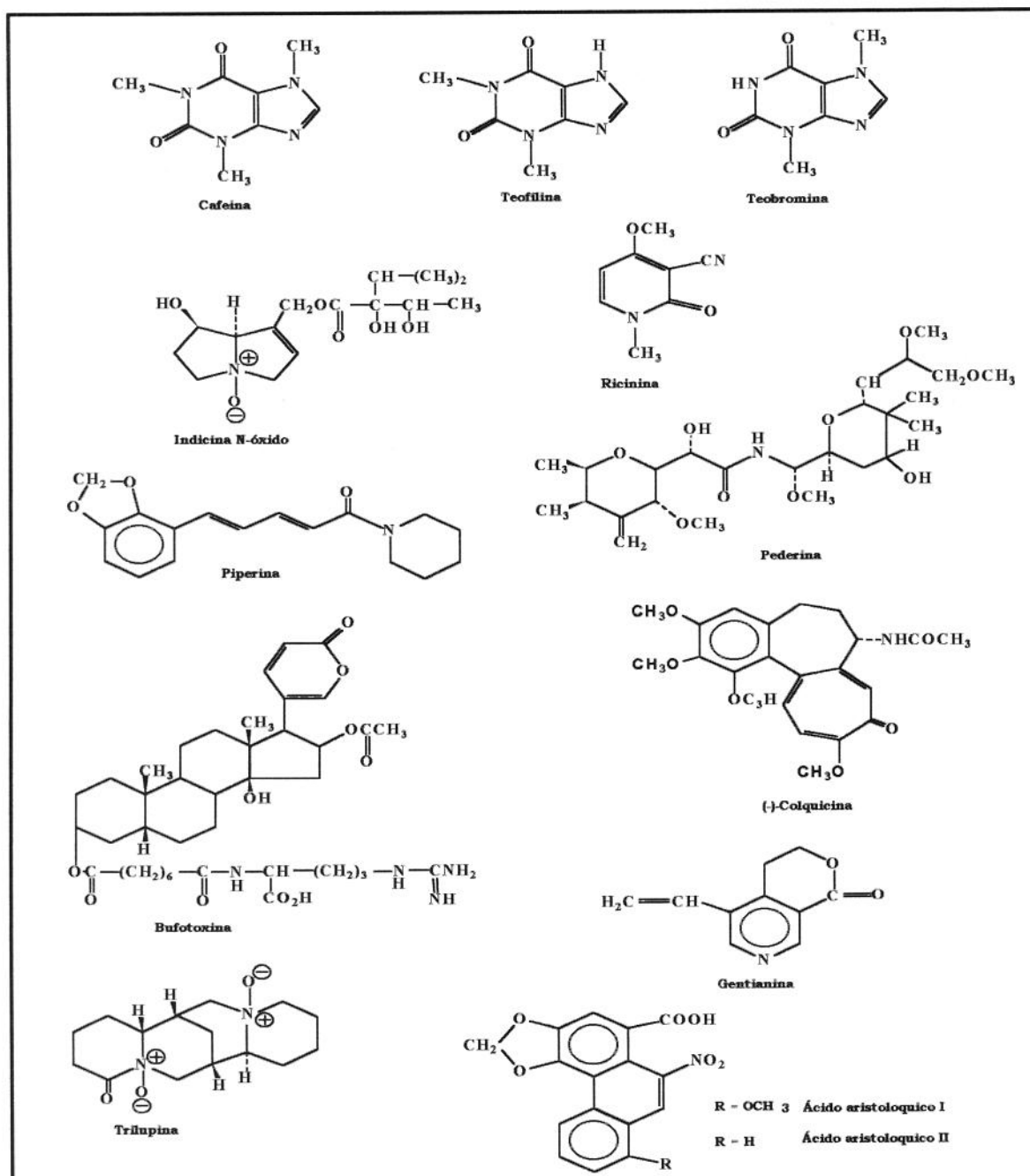


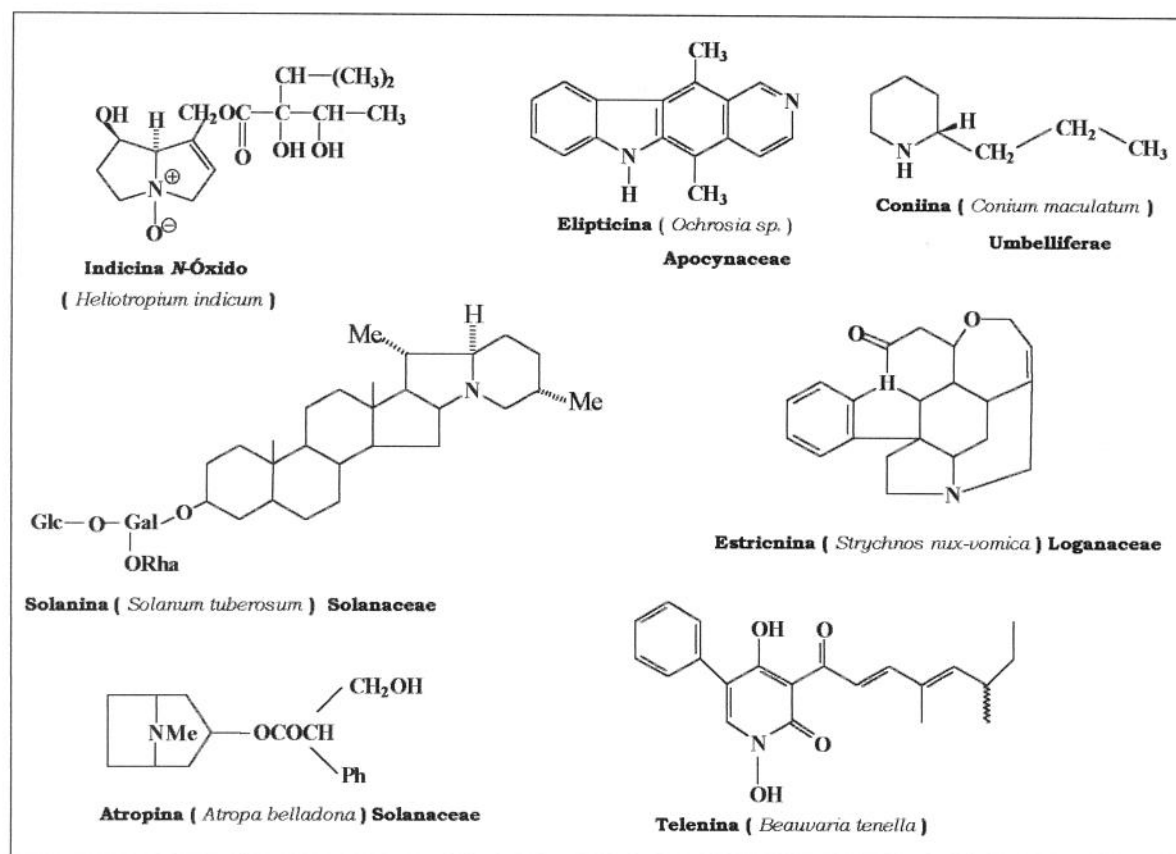
Figura 3. Estrutura de alguns alcalóides, segundo definição de PELLETIER (1983).

### 3.2 Alcalóides

Os alcalóides pertencem a uma extensa classe de metabolitos secundários, que historicamente têm sido definido como substâncias de ocorrência natural não vitais para os organismos que os

produzem. Estas substâncias são de grande interesse devido a sua pronunciada e variada ação farmacológica em animais e humanos (KUTCHAN, 1995). Porém esta visão vem sendo modificada devido a importante função na defesa de plantas contra organismos patológicos e herbívoros.

As plantas sempre foram uma fonte abundante de alcalóides (ROBBERS & TYLER, 1997), e algumas que eram conhecidas por conterem alcalóides foram muito usadas na idade média para execução dos inimigos do império. Dentre estes alcalóides podemos citar a coniina, a atropina e a estricnina (Figura 4).



**Figura 4. Alguns alcalóides encontrados em plantas.**

No reino vegetal, é provável que a distribuição dos alcalóides se restrinja a certas famílias e gêneros (ROBBERS & TYLER., 1997). Dentre as Angiospermas as famílias que mais se destacam na

produção de alcalóides são: Apocinaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae e Berberidaceae. Contudo, afirma-se que as monocotiledôneas não produzem alcalóides. Estudos indicam que as famílias Amarilidaceae e Liliaceae são duas das mais promissoras em termos de produção de alcalóides (ROBBERS & TYLER., 1997). Alguns alcalóides costumam restringir-se a certas famílias botânicas (p.e Hiosciamina em Solanaceae, Colchicina em Liliaceae ). Nas plantas os alcalóides são encontrados em várias partes: sementes (fisostigma), caules subterrâneos (sanguinária), raízes (beladona), rizomas e raízes (ipêcacuanha, hidraste) e casca (cinquina).

Originalmente os alcalóides eram considerados compostos básicos derivados de plantas. Hoje temos conhecimento da presença destas substâncias em diversos organismos como rã, formiga (feromônios), borboletas (defesa), bactérias marinhas, esponjas, fungos, aranhas, escaravelho (defesa) e mamíferos. Entretanto não está claro se a biossíntese destas substâncias ocorre em cada organismo citado (KUTCHAN, 1995).

A Tabela 3 mostra a distribuição dos alcalóides em diversos organismos vivos (animais, insetos e microorganismos) e a Figura 5 mostra algumas estruturas dos alcalóides presentes nestes organismos.

Tabela 3. Distribuição dos alcalóides em organismos vivos.

| Alcalóide                              | Organismo                  | Espécies                                    |
|----------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|
| samandarina                            | salamandra                 | <i>Salamandra maculosa</i>                  |
| samandarona                            | "                          | "                                           |
| samandaridina                          | "                          | "                                           |
| batracotoxina                          | rã                         | <i>Phyllobates aurotaenia</i>               |
| homobatractoxina                       | "                          | "                                           |
| histrionicotoxina                      | "                          | <i>Dendrobates histrionicus</i>             |
| pumiliotoxina C                        | "                          | <i>Dendrobates pumilio</i>                  |
| bufotenina                             | sapo                       | <i>Bufo vulgaris</i>                        |
| O-metilbufotenina                      | "                          | "                                           |
| deidrobufotenina                       | "                          | "                                           |
| (-)-deoxinufaridina                    | canadian beaver            | <i>Castor fiberi.</i>                       |
| (-)-castoramina                        | "                          | "                                           |
| muscopiridina                          | veado almiscareiro         | <i>Moschus moschiferus</i>                  |
| 2,6-dialquilpiperidinas                | formiga                    | <i>Solenopsis invicta</i>                   |
|                                        |                            | <i>Odontomachus hastatus</i>                |
| 2,5-dimetil-3-isopentilpirazina        | "                          | <i>Iridomyrmex humilis</i>                  |
| (E)-2,5-dimetil-3-isopentilpirazina    | "                          | "                                           |
| 4-metilpirrol-2-carboxilato            | "                          | <i>Atta texana</i> e <i>Atta cephalotes</i> |
| quinazolinonas glomerina               | centopeia                  | <i>Glomeris marginata</i>                   |
| homoglomerina                          | "                          | "                                           |
| polizonimina                           | "                          | <i>Polyzonium rosalbum</i>                  |
| cis,trans, cocinelina N-Óxido          | scaravelho (Coccinellidae) | <i>Coccinella septempunctata</i>            |
| precocinelina ( base livre )           | escaravelho (Dytiscidae)   | "                                           |
| metil 8-hidroxiquinolina-2-carboxilato | escaravelho(Staphylinidae) | <i>Ilybius fenestrtus</i>                   |
| pederina                               | "                          | <i>Paederus fuscipes</i>                    |
| pseudopederina                         | "                          | "                                           |
| saxitoxina                             | marisco                    | <i>Saxidomus giganteus</i>                  |
|                                        | molusco                    | <i>Mytilus californicus</i>                 |
|                                        | "                          | <i>Mya arenaria</i>                         |
| lingbiatoxina A                        | algas                      | <i>Lyngbya majuscula</i>                    |
| hielazole                              | "                          | <i>Hyella caespitosa</i>                    |
| 6-clorohielazole                       | "                          | "                                           |
| tetrotoxina                            | peixe                      | <i>Spheroides rubripes</i>                  |
|                                        | "                          | <i>S. vermicularis</i>                      |
| annotinina                             | musgo                      | <i>Lycopodium annotinum.</i>                |
| licopodina                             | "                          | <i>L. complanatum</i>                       |
| cernuina                               | "                          | <i>L. cernuum.</i>                          |
| chanoclavina                           | fungo                      | <i>Claviceps purpurea</i>                   |
| agroclavina                            | "                          | "                                           |
| ergonovina                             | "                          | "                                           |
| climoclavina                           | "                          | <i>Aspergillus fumigatus</i>                |
| gliotoxina                             | "                          | <i>Trichoderma viride</i>                   |
|                                        | "                          | <i>Penicillium terlikowskii</i>             |
|                                        | "                          | <i>Aspergillus fumigatus</i>                |
| verruculotoxina                        | "                          | <i>Penicillium verruculosum</i>             |
| tabtoxina                              | bactéria                   | <i>Pseudomonas tabaci</i>                   |
| pioquianina                            | "                          | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>               |

Fonte : PELLETIER, 1983.



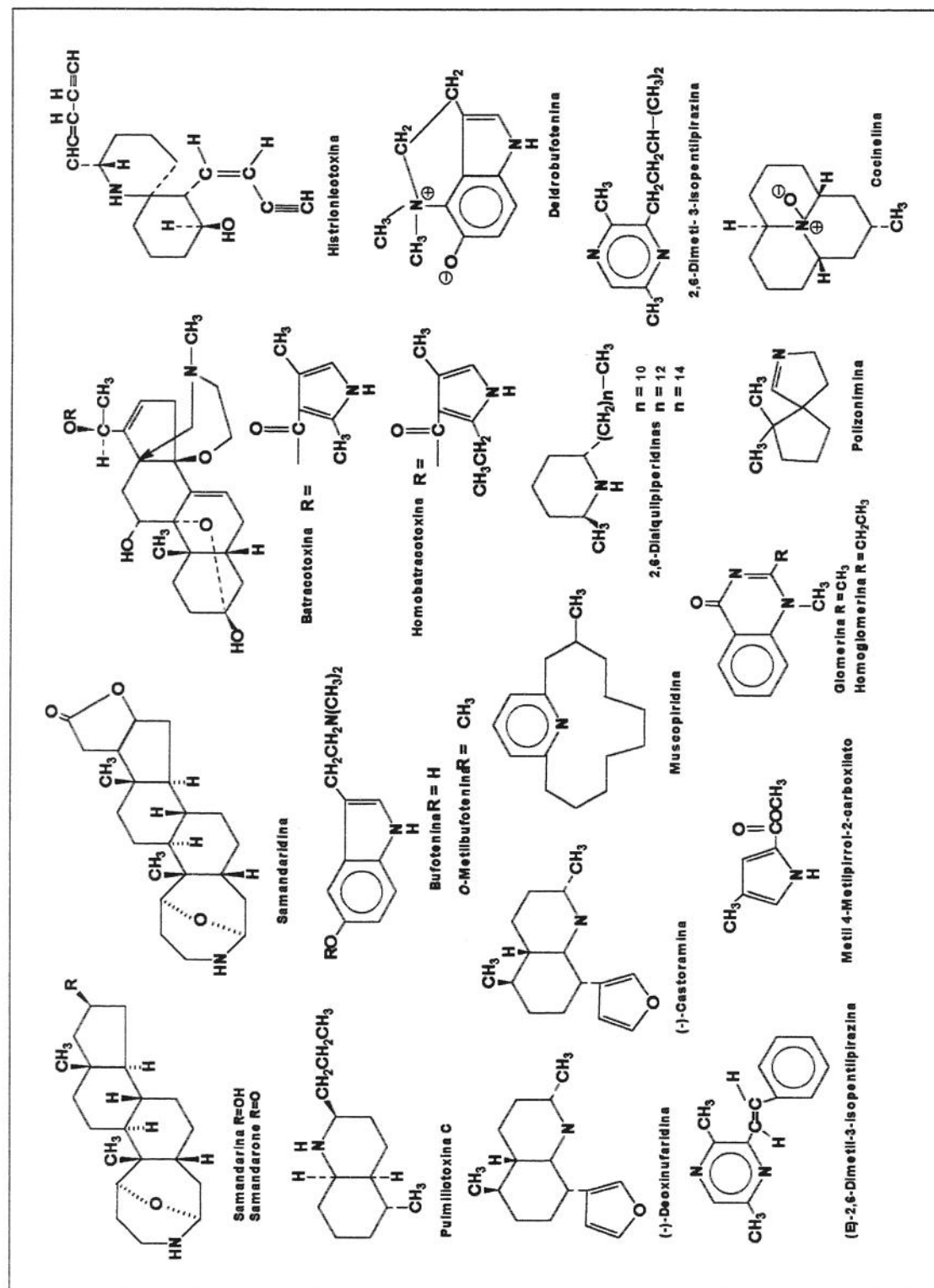


Figura 5. Alcalóides presentes em diferentes organismos. Fonte: PELLETER, 1983.

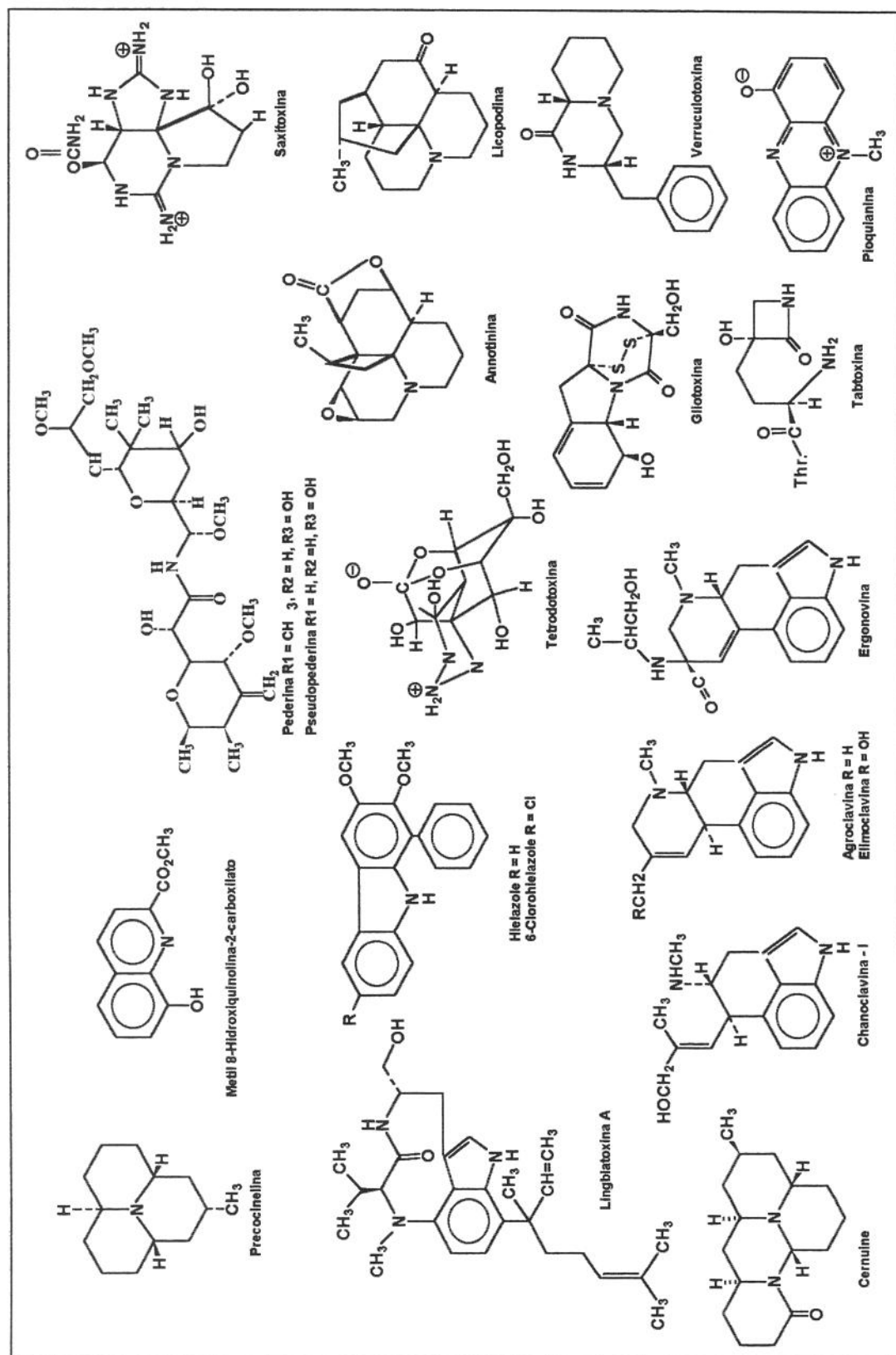


Figura 5. Continuação.

### 3.3 Ação Farmacológica de Alcalóides

Os alcalóides são conhecidos devido às suas propriedades tóxicas em vertebrados, e as plantas que os contêm são na maioria das vezes classificadas pelo homem como plantas tóxicas. Estes compostos, também são conhecidos por exibem efeitos biológicos em animais superiores, especificamente nos seres humanos. Os efeitos farmacológicos dos alcalóides no sistema nervoso central do homem têm sido bastante estudados e utilizados na medicina moderna para uma variedade de propostas (HARTMANN, 1992).

Valores de dose letal (  $DL_{50}$  ) para vários alcalóides (Aconitina, Brucina, Curanina, Ergocornina, Estricnina, Colchicina, Germerina, Veratridina e Nicotina) têm sido determinados, em animais de laboratório especialmente macacos, cães, ratos, coelhos, cobaias e pombos. A toxicidade dos alcalóides está diretamente relacionada com a via de administração; por exemplo, a administração via intravenosa (i.v.), intraperitonal (i.p.) e subcutânea (s.c.) são mais efetivas quando comparadas com a via oral.

Alguns alcalóides (Batracotoxina, Anabasina, Glomerina, Naitotoxina, Palitoxina, Saxitoxina e Tetradoxina, Figura 5) produzidos ou estocados por animais são venenosos para os vertebrados.

Na maioria das vezes os efeitos tóxicos observados em animais têm um efeito citotóxico, o qual tem sido relatado para aproximadamente 180 alcalóides (WINK, 1993). Estes dados foram obtidos pelos ensaios de vários produtos naturais com atividade anticâncer. Um alcalóide que pode matar uma célula cancerígena pode também destruir células normais. Para a maioria destes alcalóides o mecanismo de ação e os efeitos tóxicos já foram elucidados com detalhes. Além disso, o alvo molecular e os processos que são importantes para as células têm sido estudados, tais como a replicação e transcrição de DNA, RNA e síntese de proteínas e hormônios. Devido à presença do N na estrutura, muitos alcalóides

interferem com os componentes essenciais do sistema nervoso, particularmente na ação dos neurotransmissores: acetilcolina, epineprina, o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), dopamina, serotonina (HARTMANN, 1992).

Alguns alcalóides se ligam ao DNA e/ou RNA afetando o processo de replicação ou a transcrição ou causando mutações levando à má formação ou até mesmo ao câncer (WINK, 1993). Como exemplo destes alcalóides podemos citar a 9-metoxilipitina, Dictamina, Elipcitina, Melinona F, Quinina, Berberina, Coralina, Nitidina, Sanguinarina (Figura 6) e alcalóides pirrolizidínicos (Monocrotalina, Senecionina). Essas toxinas usualmente causam uma reação rápida enquanto outras podem levar um tempo maior para causarem um efeito mutagênico ou mesmo carcinogênico. Por outro lado dados recentemente obtidos de testes em *Salmonella* ilustram o potente efeito mutagênico dos alcalóides (WINK, 1993).

Aproximadamente 25% das substâncias usadas na medicina são derivadas de plantas; dos 12 fármacos comerciais mais importantes, derivados de plantas, 10 são alcalóides, por exemplo os analgésicos Morfina e Cadeína (*Papaver somniferum*) e os agentes quimioterápicos Vincristina e Vinblastina (*Catharanthus roseus*). Além das substâncias puras, os chás e extratos de algumas plantas são muito utilizados na medicina caseira (KUTCHAN, 1995). Muitos alcalóides são utilizados como modelo para síntese de fármacos análogos, com efeitos mais específicos por exemplo: Hioscamina, Escopolamina e Atropina (*Atropa belladonna*, *Datura*), que servem de modelo para agentes parasimpatolíticos; a Fisostigmina (*Physostigma venenosum*, fava de calabaz), modelo para síntese de agentes parasimpatomiméticos, a Tubocurarina (*Chondrodendron tomentosum*, curare) usada na síntese de drogas com efeito relaxante; Quinina para síntese da Cloroquinina (*Cinchona officinalis*) e a Cocaína (*Erythroxylon coca*) usada na síntese da Procaína e da Tetracaína, que são anestésicos. Estes compostos também podem ter ação estimulante sobre o sistema nervoso central:

Cafeína (*Coffea arabica*) presente no café e chás e a Nicotina (*Nicotiana tabacum*) presente no cigarro.

Dentre os alcalóides que apresentam atividade antimitótica podemos citar a Colchicina, testada como droga anti-câncer, mas descartada devido à sua alta toxicidade. Um derivado (Colcemide) desta toxina tem sido empregado no tratamento de certos tumores (WINK, 1993).

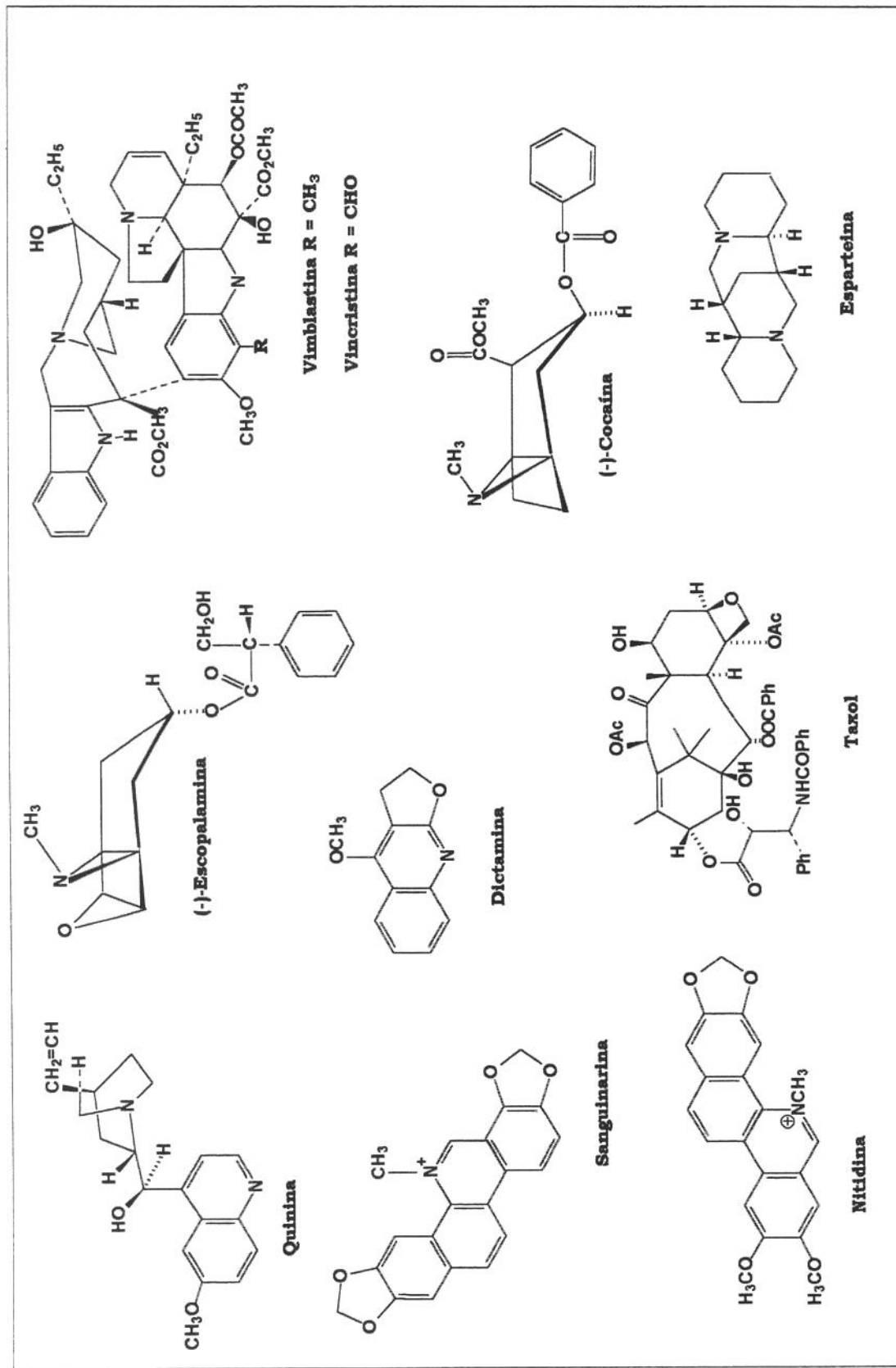


Figura 6. Alguns alcalóides que apresentam atividade farmacológica (Fonte: HARTMANN, 1992; KUTCHAN 1995; ROBBERS *et al.*, 1997)

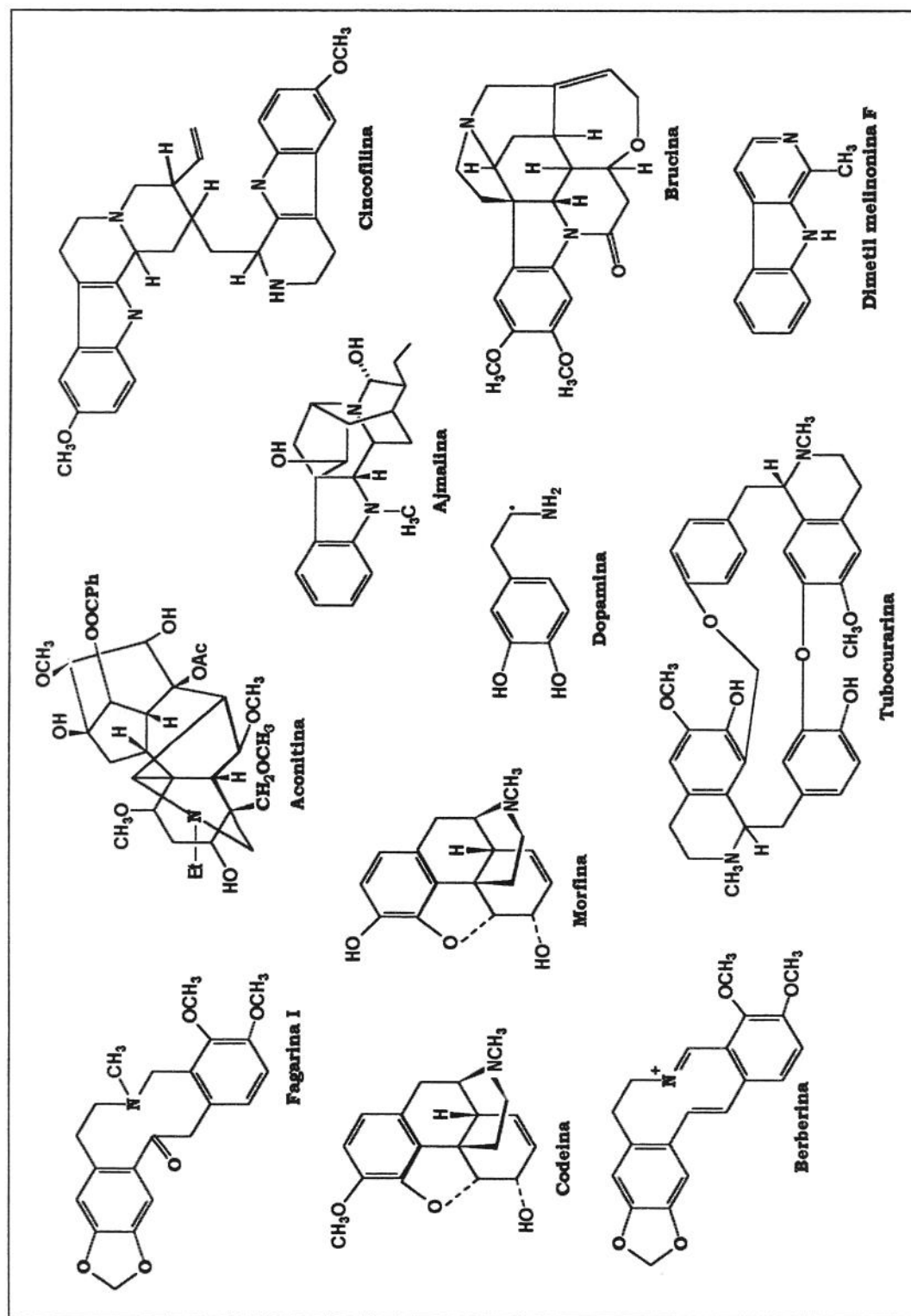


Figura 6. Continuação

Outros alcalóides que possuem atividade antimitótica são a Vinblastina e a Vincristina, os quais tem sido isolados da *Catharanthus roseus* (Apocynaceae). Apesar da sua toxicidade estes alcalóides são usados no tratamento de algumas leucemias. Muitos pesquisadores têm realizado ensaios com vários alcalóides para verificar a atividade antimicrobiana e antifúngica. Geralmente esses estudos são direcionados para aplicações farmacológicas. Na literatura científica são descritos cerca de 183 alcalóides com atividade antibacteriana e um número substancial de 10.000 alcalóides são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas. Os alcalóides derivados do Triptofano e da Fenilalanina/Tirosina são altamente potentes como antibióticos e com atividade antifúngica; dentre estes alcalóides podemos citar a Cincofilina, Dictamina, Fagarina.

Do ponto de vista farmacológico os alcalóides são pouco interessantes como antibióticos devido sua alta toxicidade para vertebrados. A avaliação da atividade antiviral dos alcalóides é relativamente difícil; contudo nos últimos anos foram identificados 45 alcalóides que apresentavam esta propriedade. Outras atividades farmacológicas muito importantes, que podemos citar incluem os efeitos anti-hipertensivos (alcalóides indólicos), antiarrítmico (Quinidina, Ajmalina, Esparteina - Figura 6), anti-malária e agentes anti-câncer (*Catharanthus*). O exemplo mais recente de alcalóide com atividade anti-câncer, extraído de planta é o taxol (*Taxus brevifolia*), Figura 6.

Entre os vários grupos de alcalóides conhecidos por suas atividades tóxicas estão os alcalóides pirrolizidínicos (APs) e os seus N-óxidos os quais estão presentes em várias espécies de plantas.

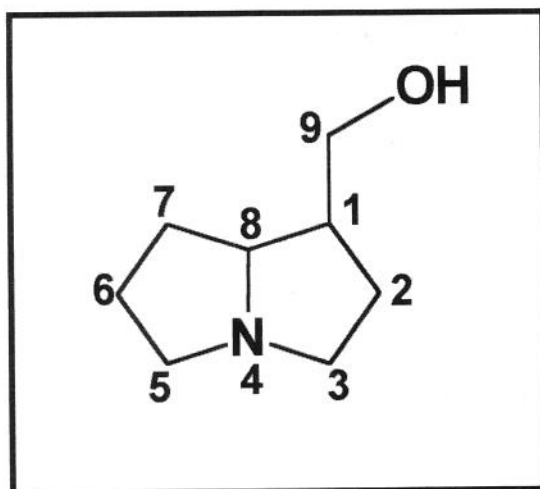


### 3.4 Alcalóides Pirrolizidínicos

Nas duas últimas décadas houve um grande crescimento no interesse por alcalóides pirrolizidínicos no mundo inteiro, motivado pelo aumento do número de mortes de gado atribuídas a plantas contendo estes alcalóides (HABERMEHL, 1991).

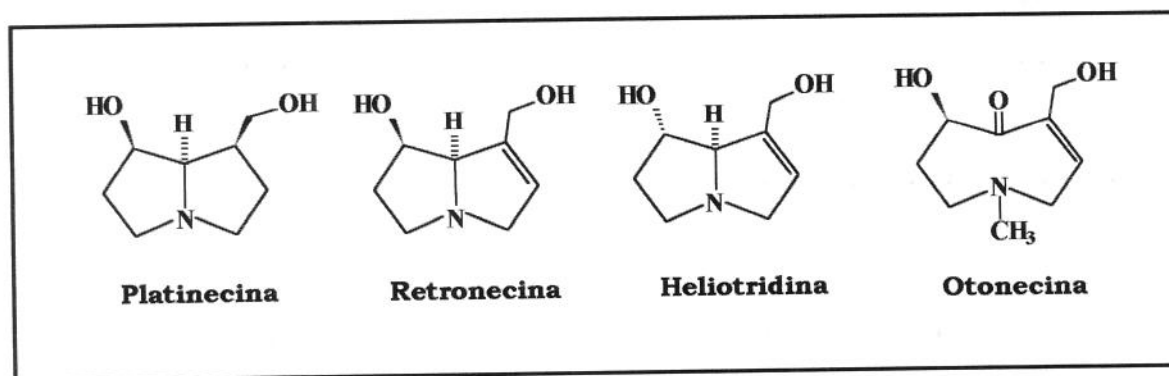
Os APs são conhecidos desde o início do século devido à intoxicação em gado provocada por espécies vegetais produtoras desses alcalóides. Os registros de intoxicação humana datam da década de 30, quando milhares de pessoas foram afetadas devido ao consumo de cereais contaminados com sementes de espécies que produzem APs (WHO, 1988). Esses alcalóides são encontrados freqüentemente em alguns gêneros da família Asteraceae (*Senecio*, *Eupatorium*, *Ageratum*), Boraginaceae (todos os gêneros) e Leguminosae (*Crotalaria*) e muitas destas espécies são utilizadas na medicina popular (ROBINS, 1982, 1991; MATTOCKS, 1986; 1991; PRAKASH, *et al.*, 1999). Estima-se que os APs possam ainda ser encontrados em cerca de 600 espécies vegetais, o que corresponde a cerca de 3% das Angiospermas; cerca de 350 APs isolados são de origem natural (HARTMANN & WITTE, 1995). Além disso os APs são importantes mediadores químicos em interações entre organismos, particularmente entre insetos e plantas (BROWN & TRIGO 1995; HARTMANN & WITTE, 1995).

Em termos estruturais o anel pirrolizidínico é um aminoálcool, possuindo um sistema 1-azabíciclo-[3,3,0]-octano; APs são geralmente constituídos de uma base necina (1-hidroximetilpirrolizina) ou derivados desta (Figura 7).



**Figura 7. Hidroximetilpirrolizina**

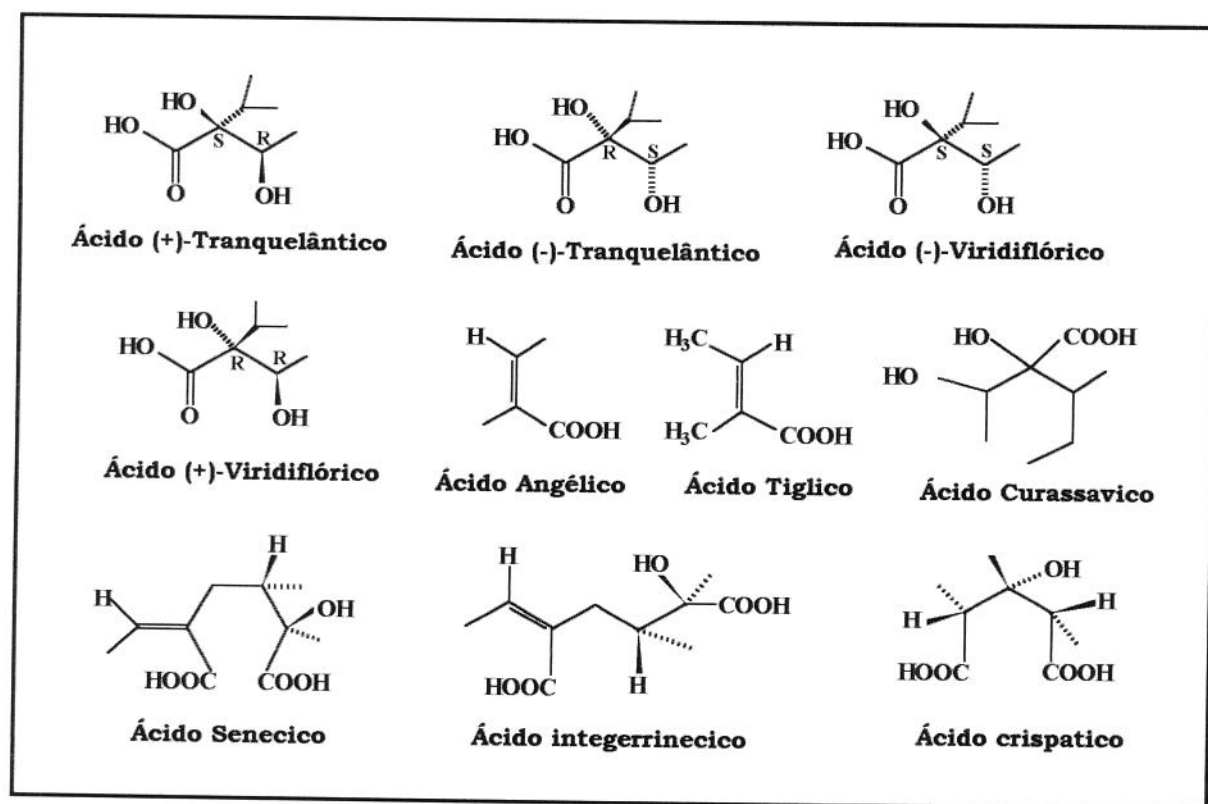
Uma variante desta estrutura é a base otonecina, a qual contém adicionalmente uma função carbonila na posição **8** e um grupo metila na posição **4** (Figura 8).



**Figura 8. Estruturas variantes da base necina.**

Comumente os APs ocorrem como ésteres de uma base necina e um ácido néxico. A base necina geralmente difere quanto à hidroxilação, estrutura, estereoquímica e quanto ao grau de insaturação do anel. A esterificação com ácidos carboxílicos, também chamados ácidos néxicos ou ácidos esterificantes (Figura 9), ocorre geralmente nas hidroxilas dos carbonos **C-9** e/ou **C-7** da base formando monoésteres de cadeia aberta, diésteres de cadeia aberta,

diésteres, ou macrocíclicos com insaturação na base necina nos carbonos **C-1/C-2** (MATTOCKS, 1972; HARTMANN 1988, 1995).



**Figura 9. Estruturas de alguns ácidos nécicos.**

Quimicamente os APs são estáveis, porém os grupos ésteres na molécula podem sofrer hidrólise sob condições alcalinas. Os APs presentes nos extratos de plantas podem decompor-se durante a secagem, enquanto outros são mais estáveis sob condições similares (PEDERSEN & LARSEN, 1970; BULL *et al.*, 1968). Os *N*-óxidos (Figura 10) de APs insaturados, quando secos, podem decompor-se por aquecimento mais facilmente do que os APs na forma livre. Quanto à solubilidade destes, podemos afirmar que alguns têm solubilidade limitada em água quando não neutralizados com ácido; contudo outros como a Indicina e os *N*-óxidos são altamente solúveis. APs macrocíclicos são bases fracas que apresentam baixa solubilidade em água (MATTOCKS, 1986).

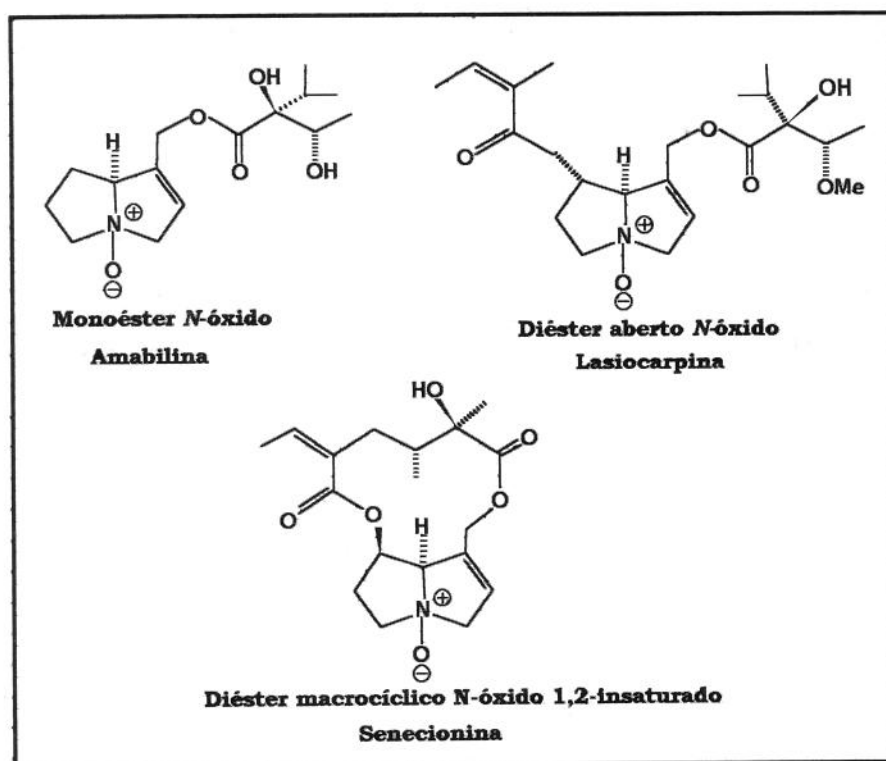


Figura 10. APs N-óxidos encontrados em plantas.

### 3.4 Distribuição e Classificação de APs em Plantas

Estes compostos são encontrados em espécies vegetais de extensa distribuição geográfica. Os APs e seus N-óxidos são encontrados com mais frequência em três famílias (Asteraceae, Leguminosae e Boraginaceae). Entretanto, pesquisas mostram que estas substâncias foram encontrados em outras famílias como mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição de APs em algumas famílias.

| Família          | Número de espécies que apresentam APs |
|------------------|---------------------------------------|
| Asteraceae       | 144                                   |
| Leguminosae      | 60                                    |
| Boraginaceae     | 73                                    |
| Apocynaceae      | 07                                    |
| Celastraceae     | 01                                    |
| Euphorbiaceae    | 02                                    |
| Gramineae        | 03                                    |
| Orchidaceae      | 33                                    |
| Ranunculaceae    | 01                                    |
| Rhizophoraceae   | 02                                    |
| Santalaceae      | 01                                    |
| Sapotaceae       | 03                                    |
| Scrophulariaceae | 01                                    |

Fonte: VRIELING, 1991

CULVENOR (1978) define três classes de APs:

- Ésteres macrocíclicos alifáticos, característicos de Boraginaceae;
- Diésteres macrocíclicos, presentes em Asteraceae (tribo Senecionae) e Leguminosae (gênero *Crotalaria*)
- Aril ésteres e alquil ácidos, típicos das Orquidaceae.

HARTMANN & WITTE (1995) sugeriram uma classificação de APs de acordo com a suas rotas biossintéticas seguindo a classificação anteriormente proposta por CULVENOR (1978), onde os principais tipos são:

**A - Tipo Senecionina** - Principalmente diésteres macrocíclicos de 12 membros derivados da Senecionina [A1], (Figura 11) podendo apresentar insaturação ou não na posição 1,2 (p.e: a Platifilina [A2]). Além disso, podem apresentar a base necina do **Tipo Otonecina** (p.e: a Senquirquina [A3]).

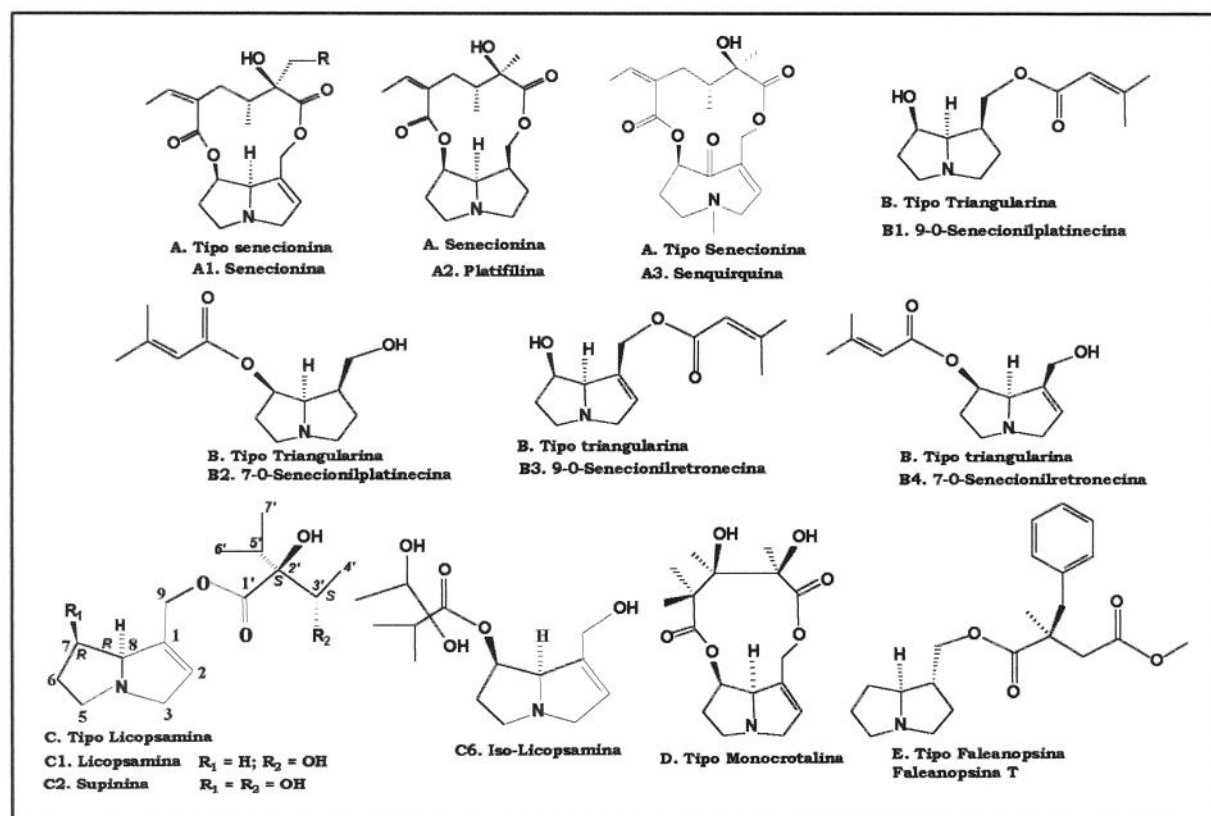
**B - Tipo Triangularina** - Mono ou diésteres abertos, com ácidos em C9, principalmente com os ácidos angelóico, tiglóico ou senecióico, e seus derivados como **9-O-senecionilplatinecina** [B1] 1,2-saturada ou a **9-O-senecionilretronecina** [B3] 1,2-insaturada. Este tipo de alcalóide pode se apresentar, quando monoéster, com a esterificação em C7, como **7-O-senecionilplatinecina** [B2] ou a **7-O-senecionilretronecina** [B4].

**C - Tipo Licopsamina:** Mono ou diésteres abertos contendo como ácido nécico o ácido 2-isopropilbutírico hidroxilado (p.e. Licopsamina [C1]). Estes alcalóides podem ser esterificados somente no C7 (Iso-licopsamina [C6]); Supinina [C2] sem hidroxilação na posição C7, também estão incluídos nesta classe de alcalóide.

**D - Tipo Monocrotalina:** diésteres macrocíclicos de 11 membros, com padrão de substituição variável na parte ácida.

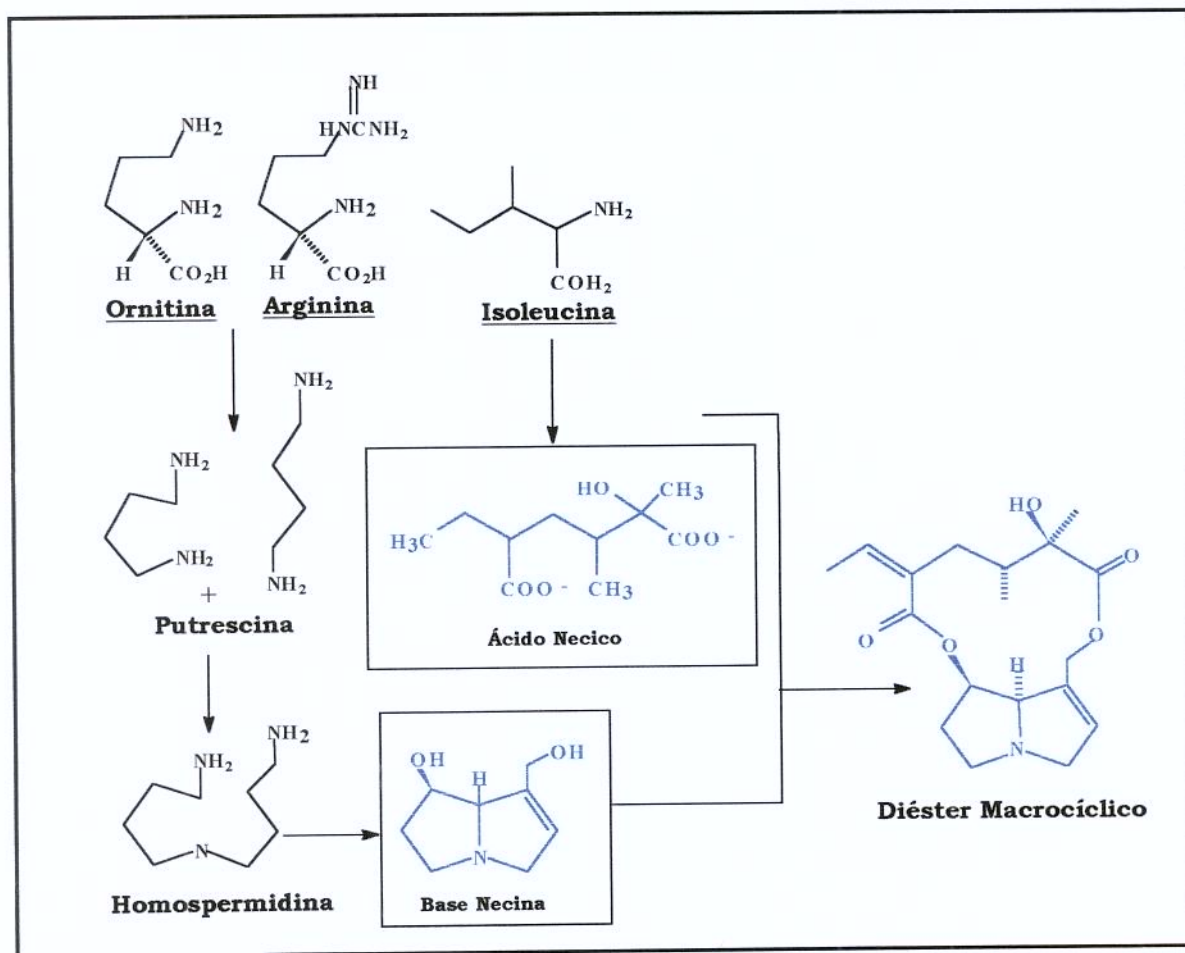
**E - Tipo Faleanopsina:** monoésteres de isômeros de isoretronecanol (uma base necina saturada sem hidroxilação na

posição **C7**) com ácidos arílicos, aralílicos ou raramente alquílicos (Faleanopsina T).



**Figura 11. Alcalóides Pirrolizidínicos: Classificação adaptada de Hartmann & Witte (1995)**

A biossíntese de APs macrocíclicos pode ser dividida na síntese da base necina e do ácido néxico (Figura 12). Estudos realizados por HARTMANN *et al.* (1988) levaram os autores a propor uma rota de biossíntese: Ornitina ---> Arginina ---> Agmatina ---> Putrescina ---> Homospermidina ---> base necina. Esta biossíntese tem sido estudada em culturas de raízes do gênero *Senecio*, onde o ácido néxico deriva de uma ramificação da cadeia dos aminoácidos leucina e isoleucina (HARTMANN, 1992). No *Senecio vulgaris* os *N*-óxidos são produtos primários da biossíntese. Nestas espécies a biossíntese de APs é restrita à raiz (ROBINS, 1989a; HARTMANN & WITTE, 1995).





importante na formação do pirrol, que é um metabólito alquilante altamente reativo.

Os derivados pirrólicos (Figura 13) são fortemente eletrofílicos, e reagem rapidamente com compostos nucleofílicos das células. Como resultado são formadas ligações covalentes com proteínas, DNA e RNA causando consequentemente alterações fisiológicas e morte celular. Devido à sua reatividade os derivados pirrólicos ligam-se rapidamente a macromoléculas no local de sua formação, justificando a atividade predominantemente hepatotóxica (RIZK & KAMEL, 1991; WESTENDORF, 1992).

Os APs após serem absorvidos pelo intestino chegam ao fígado via espaço porta onde são metabolizados por três vias distintas (Figura 13): **1-** Podem sofrer hidrólise em diversos tecidos, dando origem à base necina (aminoálcool), desprovida de ação tóxica; **2-** A N-oxidação hepática dando origem a derivados N-óxidos, muito solúveis e, por isso, excretados rapidamente por via renal; **3-** desidrogenação hepática do núcleo pirrolizidínico, produzida pelas oxidases de função mista, dando origem aos desidroalcalóides conhecidos também como derivados pirrólicos (WHO, 1988; WESTENDORF, 1992).



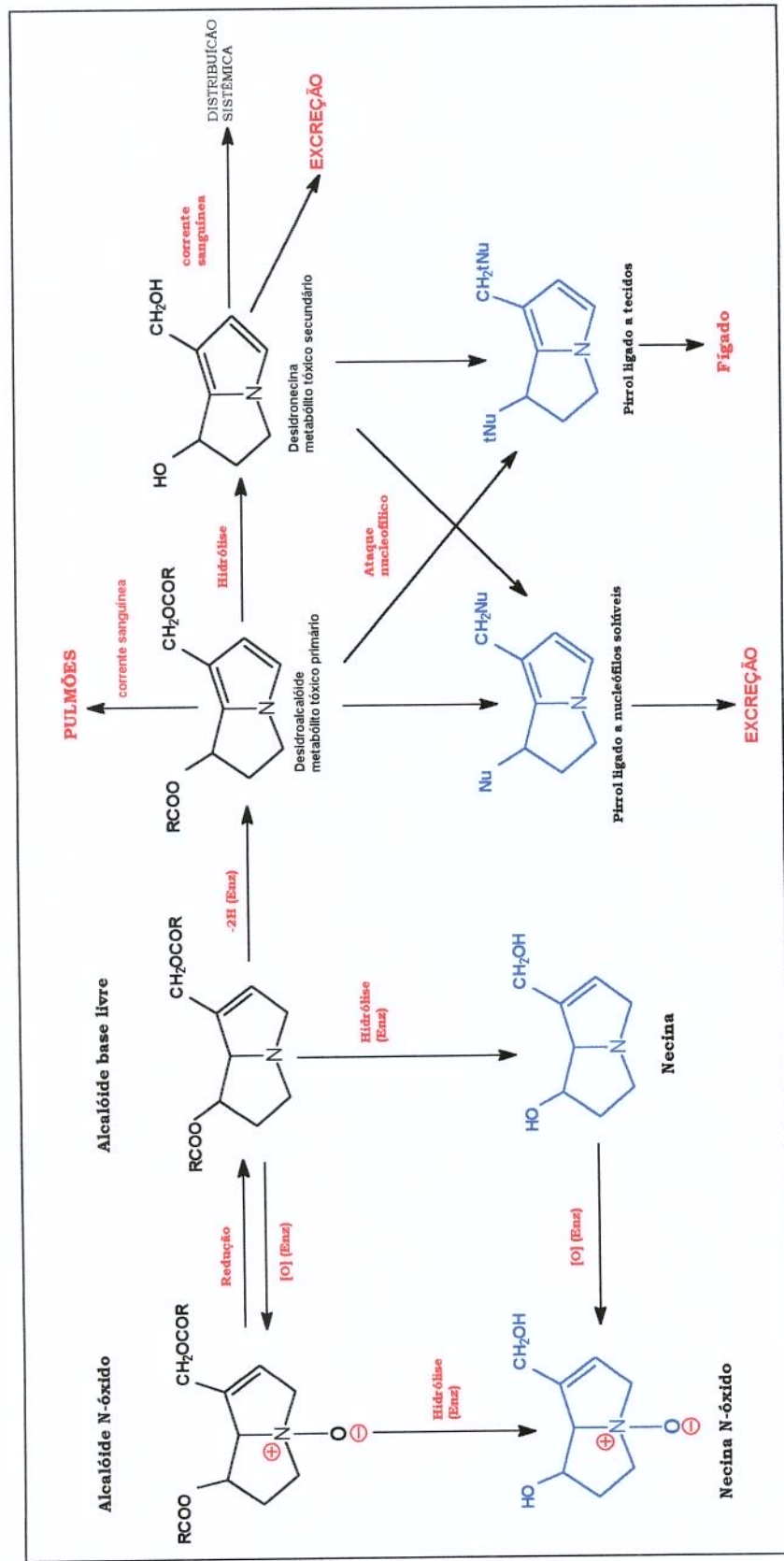


Figura 13. Principais vias metabólicas dos alcalóides pirrolizidínicos (modificado de WHO, 1988).

A ação tóxica dos APs afeta principalmente o fígado, sendo clinicamente diferenciada em três estágios: doença veno-oclusiva (VDO) aguda, subaguda e crônica (WHO, 1988).

Apesar dos riscos comprovados por várias pesquisas, muitas plantas produtoras de APs são utilizadas como "medicamentos" na medicina popular. Segundo, RIZK & KAMEL (1991) esse uso pode ser explicado pelas atividades farmacológicas dos APs: entre as quais: **a**- relaxamento da musculatura lisa e do trato gastrointestinal; **b**- diminuição da força e frequência cardíaca e queda da pressão arterial; **c**- ação cicatrizante e no tratamento de diversos males como asma, bronquite, efizema pulmonar, fraturas, hemorragias, gota e até mesmo câncer. Alguns APs *N*-óxidos têm sido clinicamente testados por apresentarem atividade anti-câncer (MATTOCKS, 1986), como é o caso da Indicina *N*-óxido (Figura 3).

Os APs são encontrados em plantas na forma livre e na forma de seus *N*-óxidos, os quais também são tóxicos quando ingeridos oralmente. Todavia, estas substâncias só adquirem propriedades tóxicas quando são transformadas em uma molécula de pirrol (WHO, 1988). De acordo com MCLEAN (1974) e PRAKASH, *et al.* (1999), para que esta transformação ocorra, a estrutura precisa apresentar três condições essenciais (Figura 14):

- 1 - uma dupla ligação nas posições 1-2 do anel;
- 2 - esterificação dos grupos hidróxilas nas posições dos carbonos **C-9** e **C-7**, do anel;
- 3 - um ou, de preferência dois grupos esterificados e
- 4 - a presença de uma ramificação na cadeia (do lado do ácido) carbônica em ao menos um dos lados ésteres da cadeia lateral.





América do Norte e na Austrália, onde as pessoas consomem como salada (PRAKASH, *et al.* 1999).

As principais ervas daninhas responsáveis por epidemias têm sido espécies do gênero *Senecio* (Asteraceae), *Crotalaria* (Leguminosae) e *Heliotropium* (Boraginaceae) (ROBINS, 1982, 1991; MATTOCKS, 1986; RIZK & KAMEL, 1991).

Amplos surtos de envenenamento têm ocorrido através da contaminação de colheitas de trigo na Índia, Afeganistão e Rússia (TEREKHOV, 1939; DUBROVINSKII, 1946; TANDON *et al.*, 1978). O uso de medicamentos preparados a partir de ervas é comum naqueles países e existe conhecimento insuficiente deste perigo, das condições e do quadro de diagnóstico deste tipo de intoxicação.

Na Jamaica 70% da população ingere infusões feitas com misturas de folhas de espécies silvestres do gênero *Senecio*. Doenças veno-oclusivas foram primeiramente reconhecidas como uma manifestação clínica, resultantes do uso *Crotalaria* spp como erva medicinal. Algumas espécies de *Crotalaria* (*Crotalaria pallida*, *Crotalaria grahamiana*), contendo APs foram responsáveis pela toxicidade diagnosticada em cavalos e gado, na Ilha de Páscoa (ARZT & MOUNT, 1999). Ervas contendo APs têm sido responsáveis por intoxicações humanas, em Barbados, Equador e no Oeste da Índia. São também relatados casos de intoxicação ocorridos na Índia e em Hong Kong, devido a infusões preparadas a partir de *Heliotropium*.

Os APs têm sido encontrados no mel secretado por abelhas e no leite de vacas, quando ambos se utilizam de plantas contendo estes alcalóides (MATTOCKS, 1986; CULVENOR *et al.*, 1981; CULVENOR, 1983; HUXTABLE, 1980). nos quais as ervas usadas não foram botanicamente identificadas (KUMANA *et al.*, 1985; CULVENOR *et al.*, 1986).

Os APs têm sido também encontrados no mel secretado por abelhas e no leite de vacas que se utilizam de plantas contendo estes alcalóides (MATTOCKS, 1986; CULVENOR, 1981, 1983, 1985; HUXTABLE, 1980). APs foram encontrados no leite de vacas e cabras

que consumiram ervas contendo APs (GEORGER *et al.*, 1982). Experimentos realizados em animais de laboratório têm mostrado que alguns desses alcalóides são carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos (DEINZER *et al.*, 1977). As populações em alguns países estão expostas a baixos níveis de APs presentes em alimentos, como o mel (CULVENOR *et al.*, 1981, CULVENOR, 1983, 1985) e confrei (*Symphytum officinale*) usado como erva medicinal e para o preparo de saladas e chás (CULVENOR *et al.*, 1980a). São conhecidos casos de intoxicação de lactantes através de leite materno contaminado por APs (DICKINSON *et al.*, 1976).

Em animais de laboratório, mesmo em doses que não chegaram a produzir efeitos tóxicos na mãe, os APs foram excretados pelo leite, produzindo hepatotoxicidade nos filhotes (WESTENDORF, 1992).

Estudos em laboratório têm mostrado a presença de APs no leite de vaca e de cabra. Muitos destes APs foram excretados na fração solúvel do leite de vaca desnatado, mostrando, que estes podem ser metabólitos solúveis em água (PRAKASH, *et al.*, 1999).

Em geral, o uso de medicamentos preparados a partir de ervas não é questionado na história clínica e os pacientes não dão voluntariamente este tipo de informação. Mesmo quando há métodos disponíveis para sua detecção em tecidos e fluídos biológicos, os APs não são pesquisados, e os sintomas podem levar dias ou meses para se manifestar. Portanto, muitos dos casos, até mesmo epidêmicos, podem ficar sem registro (LANCET, 1984).



### 3.7 Toxicidade de APs

A maioria dos APs quando administrados em largas doses podem causar morte rápida entre poucas horas ou minutos. Este tipo de toxicidade refere-se a um efeito superagudo ou hiperagudo e está associado com as ações farmacológicas dos APs, sendo que a morte pode ser precedida por convulsões ou coma. A toxicidade superaguda é mais freqüentemente observada quando os APs são absorvidos rapidamente, como após injeção pela via i.p. Os APs mais lipofílicos, metabólitos pirrólicos e ésteres semisintéticos, são especialmente responsáveis por causar morte superaguda.

Os diferentes APs e compostos relacionados possuem uma variedade de ações farmacológicas, as quais podem explicar sua toxicidade superaguda.

#### Hepatotoxicidade de APs Terciários

Os alcalóides pirrolizidínicos constituem um grupo de fitotoxinas com vários efeitos tóxicos para os tecidos dos mamíferos, causando danos principalmente ao fígado (BULL *et al.*, 1968; MCLEAN, 1970).

APs com diferentes graus de insaturação podem produzir efeitos hepatotóxicos similares, mas o grau de toxicidade pode sofrer grande variação (MATTOCKS, 1986). O efeito agudo é visto como uma necrose extensiva, enquanto o efeito crônico em ratos se manifesta caracteristicamente pela presença de um grande aumento de células do parênquima (MATTOCKS, 1986).

Estas substâncias também são conhecidas por causarem morte de gado e doenças crônicas no homem devido às suas propriedades hepatotóxicas e carcinogênicas. Os APs ocorrem em plantas de várias regiões do mundo e afetam o homem de muitas maneiras. Segundo CULVENOR (1985), poucos Países podem ignorar os riscos destas

substâncias para animais e humanos. A carcinogenicidade de *Senecio jacobaea* foi descoberta há cerca de 30 anos (HIRONO, 1986).

Muitas das mortes são associadas com necrose hemorrágica do fígado e ocorrem freqüentemente poucos dias após o animal ter recebido uma dose simples do alcalóide. Segundo MATTOCKS (1986) APs com a base necina saturada (platifilina, rosmarinina e cinaustralina), não têm mostrado efeito hepatotóxico.

As ações tóxicas e patológicas de APs no fígado têm sido previamente discutidas por BULL *et al.* (1968), MCLEAN (1970); MOLINNEUX (1988).

### **Hepatotoxicidade Aguda**

A principal ação tóxica de muitos APs em animais ocorre nas células do fígado. Todos os alcalóides hepatotóxicos são ésteres de bases necinas insaturadas tais como a Retronecina, Heliotridina, Crotanecina, Otonecina e Supinidina.

Os APs insaturados podem produzir efeitos hepatotóxicos similares, mas o grau de toxicidade pode variar amplamente. A toxicidade aguda está associada com graves necroses hemorrágicas do fígado, (ocorrendo mais freqüentemente dentro de poucos dias após o animal ter recebido uma dose simples do alcalóide), megalocitose crônica do parênquima e doença veno-oclusiva. Outras alterações em células parenquimais podem ocorrer como: invaginações citoplasmáticas, inclusões globulares no citoplasma, lesões do estroma e freqüentemente se observa fibrose portal (MCLEAN, 1970; HOOPER, 1978; MOUSTAPHA *et al.*, 1994).

A hepatotoxicidade aguda de alguns alcalóides, como a Supinina, não pode ser determinada devido à morte ocorrer em doses baixas, contudo, a hepatotoxicidade subletal é demonstrada em animais que sobrevivem após doses simples ou repetidas de Supinina (CULVENOR *et al.*, 1980; HIRONO 1986). Segundo MATTOCKS (1986), APs administrados pelas vias i.v e i.p reagem no



fígado mais rapidamente do que pela via oral. Os fatores que afetam a hepatotoxicidade têm sido estudados extensivamente por este mesmo autor.

### **Hepatotoxicidade Crônica**

O aparecimento dos efeitos hepatotóxicos crônicos de APs têm sido descritos SCHOENTAL & MAGEE (1957, 1959), e BULL & DICK (1959) e na revisão elaborada por BULL *et al.*, (1968) e MCLEAN (1970). As lesões crônicas no fígado são idênticas às aquelas descritas para hepatotoxicidade aguda. Os animais que recebem uma dose simples de AP podem diminuir o apetite e perder peso por um tempo; isto pode ocorrer no segundo dia após a administração. Progressivamente, o fígado torna-se pequeno, de textura consistente e superfície granular. Um quadro mais grave pode ser o aparecimento de ascite, o fígado pode apresentar-se deformado com alguns lóbulos mais afetados do que outros (MATTOCKS, 1986).

Microscopicamente, após dez dias de teste, há o aparecimento de fibrose necrótica. O principal aspecto que chama atenção na hepatotoxicidade de APs é o aumento do volume progressivo do citoplasma e do núcleo; de 4 a 8 semanas já se observa em abundância um quadro de megalocitose, que tende a ocupar áreas periportais. O desenvolvimento destes hepatócitos "gigantes" demonstra a manifestação da ação antimitótica dos APs. A persistente ação antimitótica no fígado, que permite a formação de células dos hepatócitos "gigantes", pode ser devido aos metabólitos ésteres, como a desidromonocrotalina (HSU *et al.*, 1973) e dos alcoóis pirrólicos, como a desidroheliotridina (MOLINNEUX, 1988).



### **Hepatotoxicidade de APs N-óxidos**

Alguns relatos de literatura têm discutido a respeito da provável falta de toxicidade dos APs N-óxidos quando comparados com APs terciários. Este assunto é de interesse prático porque os APs frequentemente estão presentes na planta na sua forma oxidada e estas plantas podem ser ingeridas pelo gado. Os N-óxidos da Lasiocarpina, Monocrotalina e Fulvina são descritos por apresentarem a mesma toxicidade, que os APs terciários, em ratos (SCHOENTAL & MAGEE, 1959; BARNES *et al.*, 1964). Contudo outros autores relatam que APs N-óxidos administrados pelas vias ip e iv têm apresentado baixa toxicidade em relação aos APs terciários (MATTOCKS, 1971a). Este impasse foi esclarecido uma vez que os APs exercem ação tóxica somente após serem transformados em metabólitos pirrólicos pelas enzimas microsossomais. Os APs também são convertidos para N-óxidos por estas enzimas, mas por via metabólica distinta (MATTOCKS & WHITE, 1971; JAGO *et al.* 1970; CHESNEY & ALLEN, 1973a). Os microsossomas hepáticos não convertem APs N-óxidos em metabólitos pirrólicos (MATTOCKS & WITTE, 1971a; JAGO, 1970); sendo assim os N-óxidos são tidos como produtos de destoxicação (MATTOCKS, 1972b). Segundo MATTOCKS (1971), POWIS *et al.* (1979) e BRAUCHLI *et al.* (1982), em alguns animais os APs N-óxidos podem ser reduzidos para alcalóides básicos no intestino.

De um modo geral, os APs N-óxidos absorvidos via intestinal, provavelmente têm hepatotoxicidade similar aos alcalóides básicos; quando absorvidos por outras rotas são considerados menos tóxicos (WHO, 1988).

### **Toxicidade de APs em Pulmão, Rim e outros órgãos**

Depois do fígado os pulmões são os órgãos mais atingidos pela ação tóxica dos APs. Não são todos os APs que atacam o fígado.

Dentre os APs que comumente atacam o fígado estão os diésteres macrocíclicos de 11 membros como a Fulvina (BARNES *et al.*, 1964) e a Monocrotalina. Este último, isolado recentemente de sementes de *Crotalaria spectabilis*, tem sido extensivamente usado em testes experimentais com animais para avaliar o grau de toxicidade nos pulmões (KAY & HEATH, 1969; LAFRANCONI & HUXTABLE, 1981). Todas as mudanças patológicas causadas pelas sementes de *Crotalaria spectabilis* são também produzidas pela Monocrotalina (LAFRANCONI & HUXTABLE, 1981). A administração do extrato de *Crotalaria* conduz ao aumento na espessura da artéria pulmonar. Ocasionalmente ocorre o desenvolvimento de artérias, seguido da destruição da lâmina elástica externa das mesmas. Portanto, o aumento no peso do ventrículo direito é um bom índice do dano progressivo causado pela hipertensão pulmonar (LAFRANCONI & HUXTABLE, 1981). Além da Monocrotalina, muitos outros APs são capazes de produzir danos crônicos nos pulmões de animais. Por exemplo, a Fulvina administrada em ratos fêmeas resulta em hipertensão pulmonar, levando à deficiência e hipertrofia do coração (KAI *et al.*, 1971). Toxicidade pulmonar causada pela Senecifilina também foi descrita por OHTSUBU *et al.*, 1977). CULVENOR *et al.*, (1976) testaram vários alcalóides para comprovar os danos crônicos provocados nos pulmões de ratos jovens. Esses autores descobriram que as lesões pulmonares são produzidas somente por alguns alcalóides, por uma ou por várias doses de alcalóides.

As lesões pulmonares causadas por APs têm sido extensivamente investigadas, não só em ratos, mas em outros animais, como o cachorro, quando foi administrado 60 mg/kg de Monocrotalina e observadas mudanças estruturais nas células do endotélio e o aparecimento de edemas no intestino. Lesões similares foram observadas no pulmão de ratos tratados com esta mesma dose (PRAKASH, *et al.*, 1999).

Muitos dos efeitos pneumotóxicos causados por APs têm sido descritos por MCLEAN, 1972).



A tototoxicidade de APs em outros órgãos (rim, coração, pâncreas, cérebro e duodeno) foi estudada por MATTOCKS (1986). Na maioria das vezes, os danos crônicos no coração ocorrem como um resultado secundário dos danos nos pulmões. Experimentos realizados com ratos alimentados com uma dieta à base de sementes de *Crotalaria* mostraram dilatação e hipertrofia dos ventrículos. Uma simples administração subcutânea de Monocrotalina pode causar hipertrofia do ventrículo direito (ABDEL, 1991).

Na literatura científica há poucos relatos de danos causados nos rins de animais como consequência da ingestão de APs. RATNOFF & MIRICK (1949) detectaram necrose dos túbulos renais de ratos após a administração de Monocrotalina. PERSAUD *et al.* (1970) relataram os danos ocorridos nos túbulos renais em ratos alimentados com o AP Fulvina. Em porcos alimentados com sementes de *Crotalaria retusa*, as lesões fatais primeiramente ocorreram devido a alterações no rim e em segundo plano, manifestaram lesões hepáticas, o laudo incluía megalocitose nos túbulos renais, atrofia dos glómerulos e necrose dos túbulos (HOOPER & SCANLAN, 1977).

MCGRATH *et al.* (1975) detectaram a presença de lesões renais em porcos, alimentados durante 43 dias com sementes de *Crotalaria spectabilis*.

ROTH *et al.* (1981) encontraram pequenas alterações funcionais nos rins de ratas, após a administração crônica de Monocrotalina.

Toxicidade nas células do pâncreas de ratos alimentados com Fulvina e degeneração do cérebro de ovelhas foram reportados por MATTOCKS (1986). Lesões no estômago e intestino também têm sido reportadas (HOOPER 1978). Degenerações vasculares das artérias do mesentério, pâncreas e coração, foram observadas por SCHOENTAL *et al.* (1959); ALLEN *et al.* (1970) & HOOPER (1978), respectivamente.

### 3.8 Métodos Espectrométricos para Identificação de APs

#### Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas de APs

A caracterização de APs usando coluna empacotada foi descrita pela primeira vez por CHALMERS *et al.* (1965), seguido por WIEDENFELD *et al.* (1981). A grande desvantagem no uso desta técnica reside no fato da substância sofrer decomposição térmica no interior da coluna. Portanto, para análise de APs via CG se faz necessária a derivatização dos grupos OH através da reação com trimetilsilil-TMS ou com acetilação (DEINZER *et al.*, 1978), ou ainda derivados de metil ou butilboronatos quando os APs apresentam grupos dióis vicinais como a Indicina e a Licopsamina (EDGAR, 1982).

CULVENOR *et al.* (1980) e FRANH *et al.* (1980) utilizando a técnica de CG analisaram e separaram uma mistura de APs presentes no confrei (*Symphytum sp*), via derivados metilboronatos. Estas misturas normalmente são muito difíceis de separar.

APs extraídos de mel foram identificados e separados por DEINZER *et al.* (1977), ROTHCHILD *et al.* (1979) e CULVENOR *et al.* (1981) utilizando CG via derivados butilboronatos.

A técnica de CG capilar via derivatização com TMS, foi utilizada por EDGAR (1984) para identificar e separar uma mistura complexa de APs diésteres macrocíclicos de 12 membros (Figura 15), presentes em *Symphytum spp* (Senecionina, Senecifilina, Integerrimina, Platifilina, Spartiodina, Neoplatifilina, Monocrotalina, Retrorsina, Senkirkina, Anacrotina, Higrofilina e Ridelinina).

A utilização de colunas capilares de sílica fundida otimizou a análise de APs, tornando muitas vezes a derivatização dispensável. LUTHY *et al.*, 1981 (em STELLJES *et al.*, 1991), usando coluna capilar identificaram e separam uma mistura de APs (Senecionina, Senecifilina, Integerrimina, Jacobina, Jacozina e Jaconina, Figura 15) presentes no extrato de *Senecio alpinus*.



A quantificação de APs por CG capilar acoplado a um detector de ionização de chama (FID), utilizando padrões internos, foi realizada por vários autores conforme relatam VLIETINCK & PIETERS, 1991).

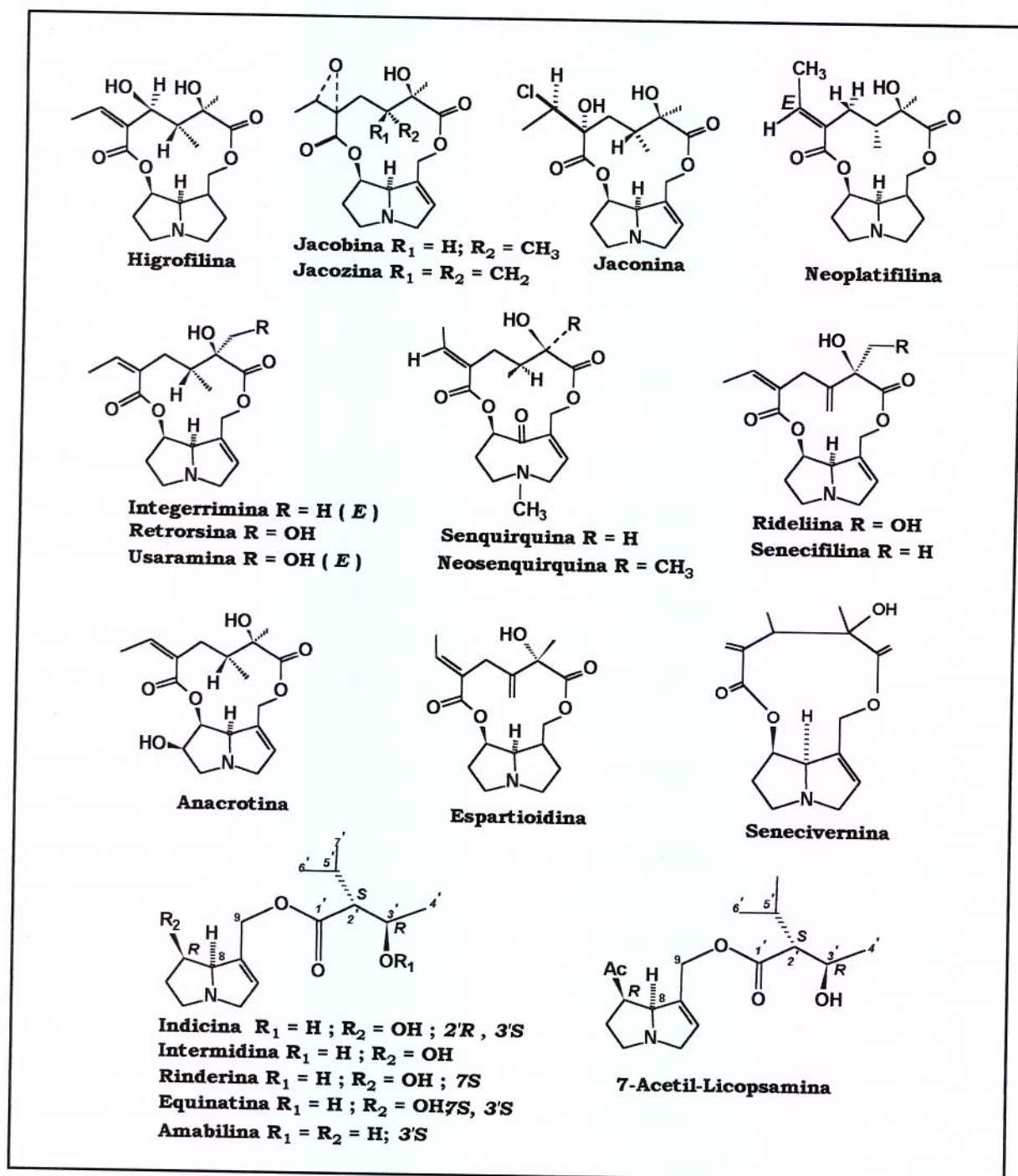


Figura 15. Alcalóides pirrolizidínicos encontrados em plantas e separados por coluna capilar

### **Espectrometria de Massas-Impacto de Elétrons**

A técnica de espectrometria de massas de impacto de elétrons tem um papel importante na identificação e elucidação estrutural dos APs. Várias revisões sobre o uso desta técnica foram realizadas por NEUNER-JEHLE *et al.*, (1965); BULL *et al.* (1968); CROUT (1969); PEDERSEN & LARSEN (1970); RASHKES *et al.* (1978); MATTOCKS (1986) e BREDENKAMP (1991).

A espectrometria de massas de impacto de elétrons fornece as seguintes informações para elucidação estrutural de APs:

- posição da esterificação nos carbonos **C-7** ou **C-9**
- se os alcalóides são saturados ou não na base necina
- se o alcalóide pertence à classe dos monoésteres, diésteres ou macrocíclicos.

A identificação dos APs Senecionina, Senecivernina, Integerrimina e Retrorsina presentes em *Senecio inaequidens* foi realizada através de cromatografia gasosa capilar-espectrometria de massas (BICCHI *et al.*, 1985).

A cromatografia capilar (CG-EM) foi usada por ALLEN *et al.* (1987) para caracterizar APs presentes em *Senecio logilobus* (Senecionina, Integerrimina, Senecifilina e Retrorsina) e *Senecio glabellus* (Senecionina e Integerrimina).

MARK *et al.* (1991) utilizando CG-EM identificaram os APs presentes em quatro espécies de *Senecio*: *S. serra*, *S. hydrophyllus*, *S. mikanioides*, *S. dimorphophyllus*. A análise por CG-EM mostrou a presença dos estereoisômeros Senecionina e Integerrimina, majoritários na espécie *S. dimorphophyllus*, e uma mistura complexa de monoésteres e diésteres nas espécies *S. hydrophyllus* e *S. mikanioides*.

WITTE *et al.* (1993) utilizando a cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) colunas (OV-1, DB-1, DB-5, DB-17, OV-1701), realizaram análises comparativas de APs presentes em várias plantas e insetos. O resultado mostrou que as colunas



recheadas com polidimetilsiloxano fase apolar (OV-1, DB-1) foram eficientes para separação de misturas complexas de APs. Com relação às colunas DB-5, DB-17, OV-1701 de polaridades diferentes, a separação dependia do tipo de APs.

Um estudo dos APs contidos em *Packera candidissima* (*Senecio candidissimus*) planta medicinal muito usada no México no tratamento de úlceras, doenças do rim e com propriedades antisépticas, foi conduzido por MOUSTAPHA *et al.* (1994). A análise por CG-EM mostrou a presença dos APs Senecionina, Integerrimina, Retrorsina e Usaramina (Figura 15) nas suas partes aéreas. Na raiz foi identificado o AP senkirkina como composto majoritário.

WINDENFELD *et al.* (1995) estudando a planta medicinal *Eupatorium portoricense*, especificamente suas inflorescências e folhas, identificaram através de CG-EM os APs Amabilina, Equinatina e O<sup>12</sup> - acetilequinatina.

A identificação e separação de vários APs, como a 7-senecioilretronecina, 9-senecioilretronecina, Licopsamina, 7-acetillicopsamina, 7-senecioilretronecina, 7-(2-metilbutiril)retronecina, 7-(2-metilbutiril)-9-(2,3-dihidroxibutiril)retronecina, 7-(2-metilbutiril)-9-echimidinil retronecina, presentes em pequenas quantidades em *Echium humile* (Boraginaceae) foi realizada por cromatografia gasosa espectrometria de massas (SHAZLY *et al.*, 1996a).

O estudo de cinco espécies do gênero *Senecio* (*S. brasiliensis*, *S. cisplatinus*, *S. heterotrichus*, *S. leptolobus* e *S. selloi*) realizado por CG-EM levou à identificação de vários APs derivados das bases Retronecina e Otonecina (KREBS *et al.*, 1996).



## Espectrometria de massas de impacto de elétrons - Padrões de Fragmentações de APs

### **APs Monoésteres 1,2-insaturados**

Os APs deste grupo (p.e Equinatina) podem ser identificados no espectro de massas (Figura 16) através dos íons  $m/z$  137, 138 (pico base) e 139. Outro íon abundante e característico deste tipo de AP é o  $m/z$  93,  $m/z$  94 de abundância média e o  $m/z$  95 de abundância insignificante. O íon molecular  $m/z$  299 é pouco abundante (1%).

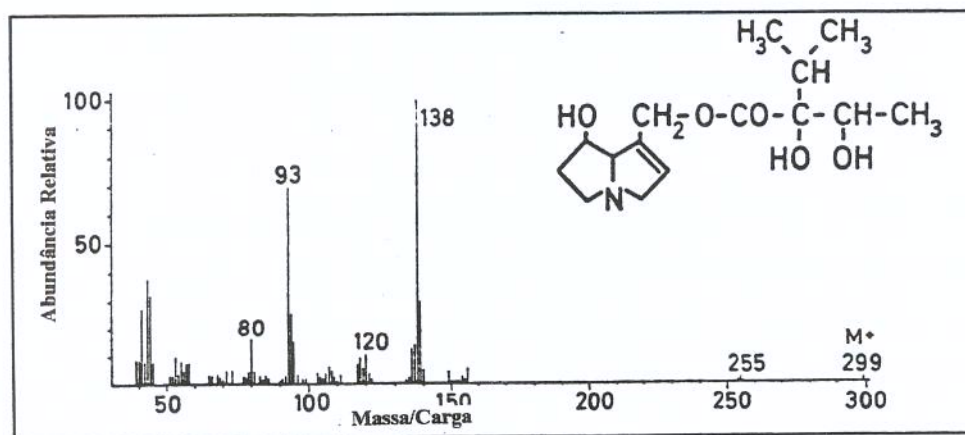


Figura 16. Espectro de massas de Impacto de elétrons (IE) DO AP Equinatina (PDERSEN & LARSEN, 1970).

Os APs esterificados no carbono C-7 (Iso-APs), têm como padrão de fragmentação os íons  $m/z$  137, 106, 154, 111, 94 e 80 (pico base). O mecanismo de fragmentação destes APs foi proposto por PEDERSEN & LARSEN em 1970.

### **APs Monoésteres 1,2-saturados**

O espectro de massas dos APs saturados (p.e Coromandalina, Figura 17) podem ser diferenciados dos APs 1,2-insaturados devido estes apresentarem uma fragmentação com duas unidades de massa

a mais  $m/z$  140-138, 123-121 e 97-95. O pico  $m/z$  124 também é característico destes APs e na maioria das vezes é o pico base (RIZK, 1991).

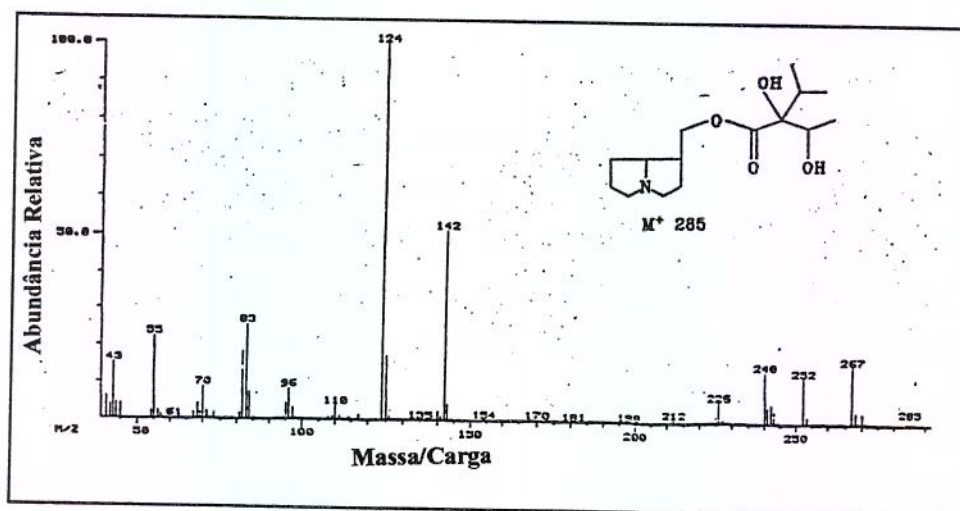


Figura 17. Espectro de massas de IE do AP Coromandalina (Trigo *et al.*, 1993).

Os APs saturados esterificados no carbono C-7 (iso-APs) apresentam uma fragmentação (Figura 18) similar aos iso-APs insaturados, com o acréscimo de duas unidades de massa. Assim, os principais fragmentos são:  $m/z$  239 (íon molecular) 156, 139, 113, 108, 83 e  $m/z$  82 (pico base) RIZK, 1991.

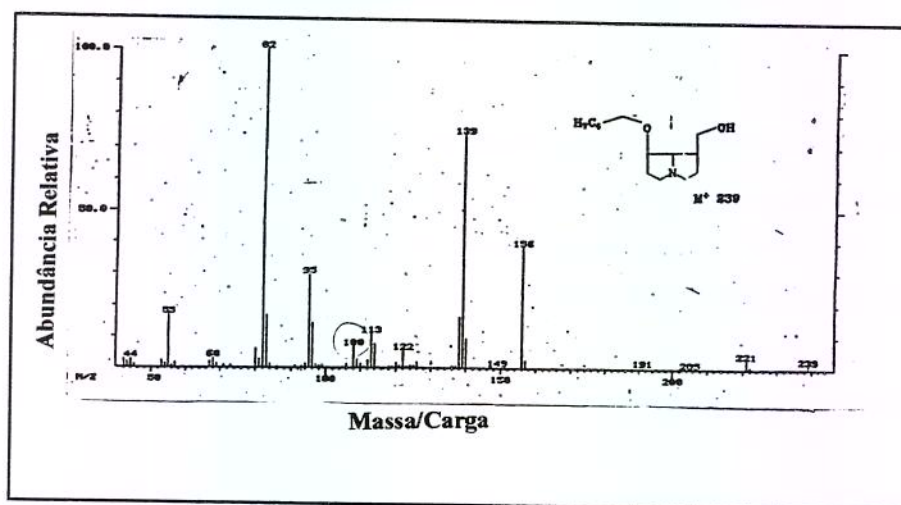


Figura 18. Espectro de massas do AP 7-Angeloliplatinecina (Trigo *et al.*, 1993).

### APs Macrocíclicos 1,2-insaturado

O grupo de APs macrocíclicos (**Tipo Senecionina**), os quais têm a Retronecina como base, podem ser identificados através dos padrões de fragmentação cujos íons no espectro de massas (Figura 19) são  $m/z$  138, 137 e 136; 121, 120 e 119; 93, 94 e 80. O padrão de fragmentação dos APs macrocíclicos de 11 ou 12 membros foi amplamente estudado por BREDENKAMP (1991).

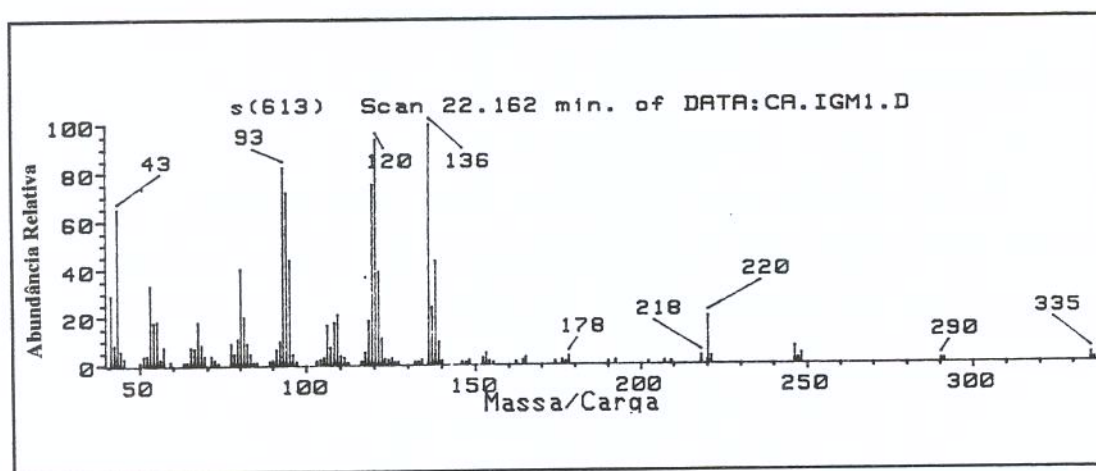


Figura 19. Espectro de massas IE do AP Senecionina.

### APs Macrocíclicos 1,2-saturados

A sequência de fragmentos (Figura 20) apresentando picos  $m/z$  293, 222, 138, 123, 122, 83 e 82 é característica de APs macrocíclicos saturados (p.e Platifilina). O íon molecular pouco abundante. O íon  $m/z$  83, característico de ésteres de bases necinas saturadas, está presente também no espectro de massas dos APs macrocíclicos 1,2-saturados.



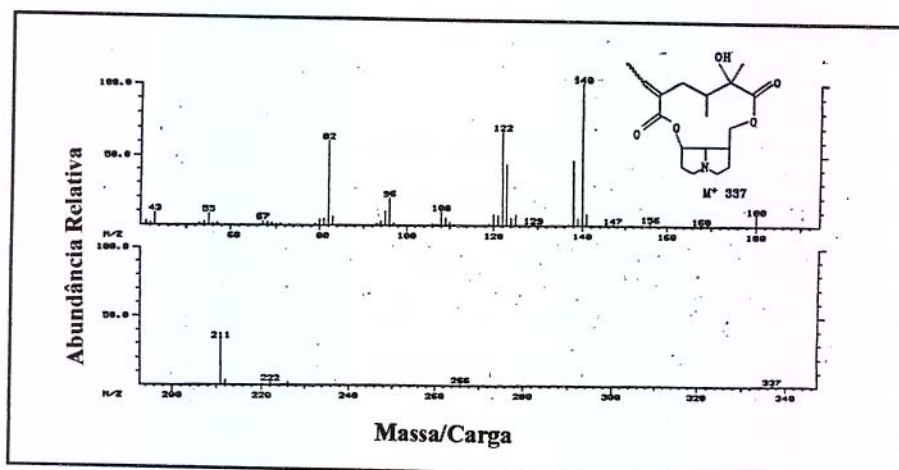


Figura 20. Espectro de massas IE do AP Platifilina (Trigo *et al.*, 1993).

### APs Diésteres

A fragmentação de diésteres não macrocíclicos têm como padrões principais os íons  $m/z$  297, 219, 220, 136, 120 (pico base) e 93. Este tipo de fragmentação foi estudada por FURUYA & ARAKI (1968) e PEDERSEN & LARSEN (1970).

### APs Macrocíclicos com base otonecina

APs macrocíclicos com a base necina do Tipo otonecina (p.e. Senquirquina) podem ser identificados no espectro de massas (Figura 21) pela presença dos picos intensos em  $m/z$  168, 151, 150, 149, 123, 122, 110, 96 e 94 (CAVA *et al.*, 1968).

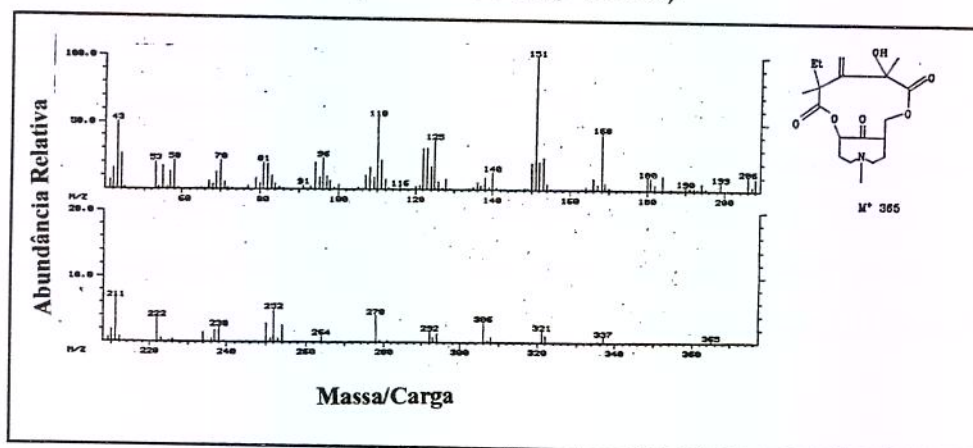


Figura 21. Espectro de massas IE do AP Senquirquina (Trigo *et al.*, 1993).

## APs com Bases Necinas

Os padrões de fragmentações mais comuns da base necina (p.e. Retronecina) foram elucidados por NEUNER-JEHLE *et al.* (1965), cujos fragmentos principais são:  $m/z$  155 (ion molecular), 111, 94 e 80 (pico base).

### 3.9 Métodos Espectroscópicos para Caracterização de APs

O estudo espectroscópico de RMN- $^1\text{H}$  de APs foi realizado inicialmente por CULVENOR *et al.* (1965). Este estudo realizado em 60 MHz (aplicados em 200, 300 e 400 MHz), mostra alguns fatores que governam o padrão de multiplicidade das bases necinas Retronecina : **1-** os multipletos da parte saturada e insaturada do anel pirrolizidínico são independentes, embora o sistema de prótons estejam conectados através do **H-8**; **2-** os prótons metilênicos geminais dos carbonos **C-3** e **C-5** apresentam diferenças bem relevantes no deslocamento químico dentro de cada par, este efeito provavelmente seja devido a influência do par desemparelhado de elétrons sobre o átomo de **N**.

Posteriormente estudos mais detalhadas foram conduzidos por MOLYNEUX *et al.* 1982, MOHANRAJ & HERZ (1982), ZALKOW *et al.* 1985, ASIBAL *et al.* 1989, ROEDER & BOURAUDEL (1992) e LIU *et al.* 1992. Uma revisão aplicada aos estudos de RMN $^1\text{H}$  foi elaborada por LOGIE *et al.* (1994).

Estudos mais detalhados sobre RMN- $^{13}\text{C}$  de APs foram realizados por JONES *et al.* (1982) e MOLYNEAUX *et al.* (1982). Uma revisão aplicada aos estudos RMN- $^{13}\text{C}$  para APs foi elaborada por ROEDER (1990, 1991), ROEDER & BOURAUDEL (1992) e LIU *et al.* 1992.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### Experimento A

#### **Identificação de alcalóides pirrolizidínicos de espécies do gêneros *Senecio* e *Eupatorium* (alocadas em Hérbario)**

As Inflorescências de vinte e oito espécies de *Senecio* (Tabela 5), pertencentes a sete Seções {*Adamantina*, *Hualtatini*, *Corymbosi*, *Cacaliostrum*, *Suffrutecius*, *Paranaia* e *Tomentecio* (HIND, 1993)} e oitenta e sete espécies de *Eupatorium* (Tabela 6) foram coletadas no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia da UNICAMP, Campinas - SP, no ano de 1993.

A escolha de plantas do herbário se fez necessária, uma vez que nosso interesse era traçar o perfil químico desses APs, considerando que poderiam ser amostradas uma grande quantidade de espécies do gêneros selecionados.

Segundo a literatura (HARBORNE, 1984), plantas secas armazenadas em herbários, por muitos anos, não apresentam alterações qualitativas dos seus constituintes químicos, como os flavonóides e os alcalóides. Outro aspecto é quanto a confiabilidade e a segurança na identificação botânica das espécies em estudo.

### **Experimento B**

#### **Identificação de alcalóides de espécies dos gêneros *Heliotropium*, *Ageratum*, *Eupatorium* e *Crotalaria* (coletadas no campo)**

Foram realizadas análises qualitativas com infusões de partes (flor, folhas, caule, raiz e sementes) das espécies *Heliotropium indicum* e *transalpinum*, *Ageratum conyzoides* e *Crotalaria lanceolata*, *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea*. Na Tabela 7 estão apresentados os dados de coleta destas espécies.

### **Experimento C**

#### **Isolamento e Caracterização de alcalóides pirrolizidínicos de espécies dos gêneros *Heliotropium indicum*, *Ageratum conyzoides*, *Eupatorium laevigatum*, *Senecio brasiliensis*, *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria lanceolata*.**

Para os testes de toxicidade, as plantas foram selecionadas em função de sua maior quantidade de APs. A Tabela 8 apresenta os dados (coleta, quantidade, extração) relativos ao material vegetal.

Como havia a disponibilidade de outras plantas, no laboratório, resolvemos realizar o isolamento de alguns APs presentes nestas espécies (Tabela 9).

As plantas foram coletadas e submersas em uma cuba de vidro, com álcool etílico, de modo a inibir processos enzimáticos e transformações bioquímicas.

Tabela 5. Espécies de Senecio coletadas no Herbário do Depto. de Botânica, IB - UNICAMP.

| *Nº | Espécie                    | Local                                  | Número do Herbário | Data de coleta |
|-----|----------------------------|----------------------------------------|--------------------|----------------|
| 01  | <i>S. adamantinum</i>      | Estr. Campos do Jordão, SP             | 15.809             | 21/03/1984     |
| 02  | <i>S. apensis</i>          | Nova Andradina-MG                      | 33.792             | 07/02/1974     |
| 03  | <i>S. argyrotichus</i>     | Estr. Rio de Janeiro - Campos          | 18.188             | 23/05/1985     |
| 04  | <i>S. bentharii</i>        | Horto de Plantas Mediciniais, PR       | 780                | 19/11/1986     |
| 05  | <i>S. brachypodus</i>      | São José dos Pinhais-PR                | 42.768             | 04/03/1980     |
| 06  | <i>S. bradei cabrera</i>   | Serra do Japi-Jundiá-SP                | 17.77              | 28/08/1985     |
| 07  | <i>S. brasiliensis</i>     | Reserva do IF, CJ-SP                   | 3.056              | 29/09/1976     |
| 08  | <i>S. conyzifolius</i>     | Cambará do Sul-RS                      | 3.183              | 31/10/1994     |
| 09  | <i>S. crassiflorus</i>     | Farol, Mun. Imbituba-SC                | 57.891             | 21/08/1992     |
| 10  | <i>S. desiderabilis</i>    | Estr. São Paulo-Campus do Jordão       | 16.523             | 29/09/1984     |
| 11  | <i>S. erisithalifolius</i> | -                                      | -                  | -              |
| 12  | <i>S. glaziovii</i>        | -                                      | -                  | -              |
| 13  | <i>S. grossidens</i>       | -                                      | -                  | -              |
| 14  | <i>S. hemmendorffii</i>    | -                                      | -                  | -              |
| 15  | <i>S. icoclossus</i>       | Mun. Camanducaia-MG                    | -                  | sem data       |
| 16  | <i>S. itatiaia</i>         | Parque Nacional Itatiaia, RJ           | 20.708             | 23/07/1988     |
| 17  | <i>S. jurguensis</i>       | Rio Guamirim, Mun. S. José dos Pinhais | 40.178             | 25/08/1977     |
| 18  | <i>S. leptoschizus</i>     | -                                      | 1.728              | 10/02/1976     |
| 19  | <i>S. macrotis</i>         | -                                      | -                  | -              |
| 20  | <i>S. oleosus</i>          | Serra do Bacaina, Estr. p/Silvestre-SP | 12.817             | 01/08/1980     |
| 21  | <i>S. oxyphyllus</i>       | -                                      | -                  | -              |
| 22  | <i>S. paulensis</i>        | Mun. Camanducaia-MG                    | 1.858              | 15/03/1976     |
| 23  | <i>S. pellucidineruis</i>  | Serra da Bocaina, SP                   | 12.823             | 01/01/1980     |
| 24  | <i>S. platensis</i>        | Mar Grosso, Mun. Laguna, SC            | 29.371             | 31/03/1972     |
| 25  | <i>S. pluricephalus</i>    | Serra do Japi, Jundiá, SP              | 15.509             | 22/09/1983     |
| 26  | <i>S. pulcher</i>          | Rio Pequeno, Mun. S.J.P, PR            | 43.220             | 18/10/1980     |
| 27  | <i>S. stigophlebicus</i>   | Mun. Jaboticatubas, Diamantina, MG     | 3.134              | 21/08/1994     |
| 28  | <i>S. vernoniodes</i>      | Estr. São Paulo-Curitiba               | -                  | 09/09/1984     |



Tabela 6. Espécies de *Eupatorium* coletadas no Herbário do Depto. de Botânica, IB - UNICAMP.

| Nº | Espécies                  | Local                                          | Número do Herbário | Data de coleta |
|----|---------------------------|------------------------------------------------|--------------------|----------------|
| 01 | <i>E. adamantinum</i>     | Campo do Saco?                                 | 217                | 02/10/1980     |
| 02 | <i>E. amigalinum</i>      | Mun. Capitólio-MG                              | 20.963             | 01/09/1988     |
| 03 | <i>E. amphidiotum</i>     | Mun. Golveia                                   | 17.158             | 03/06/1985     |
| 04 | <i>E. angustissimum</i>   | -                                              | -                  | -              |
| 05 | <i>E. ascende</i>         | Morro do Ferro?                                | 1.183              | 22/09/1981     |
| 06 | <i>E. asperum</i>         | Distrito Federal                               | 60.126             | 12/07/1976     |
| 07 | <i>E. barbace</i>         | Mun. Sta. Barbara, SP                          | 356                | 20/03/1989     |
| 08 | <i>E. betoniciforme</i>   | Mun. Indaiá, SP                                | 14.264             | 12/10/1982     |
| 09 | <i>E. bracteatum</i>      | Serra Petrolina, Mun. Rodonopolis, MG          | 34.717             | 25/07/1976     |
| 10 | <i>E. bupleurifolium</i>  | -                                              | -                  | -              |
| 11 | <i>E. calamocephalum</i>  | -                                              | -                  | -              |
| 12 | <i>E. campestre</i>       | Campo Sujo (Lixão), SP                         | 15.461             | 19/10/1993     |
| 13 | <i>E. candleanum</i>      | Sul de Itararé, Km 15, SP                      | 1.718              | 10/02/1976     |
| 14 | <i>E. capillares</i>      | Estr. Diamantina, Km 10, MG                    | 17.438             | 05/06/1985     |
| 15 | <i>E. castatipes</i>      | -                                              | -                  | -              |
| 16 | <i>E. ceracifolium</i>    | Fazenda Corizal ?                              | 12.120             | 21/12/1980     |
| 17 | <i>E. chlorolepis</i>     | Rio Claro (Rod. W.L), SP                       | 1.819              | Sem data       |
| 18 | <i>E. cinero verides</i>  | -                                              | -                  | -              |
| 19 | <i>E. clematideum</i>     | Campinas, SP                                   | 9.385              | 19/02/1979     |
| 20 | <i>E. congestum</i>       | Estr. p / Aldeia Guaianá, São José do Barreiro | 14.395             | 31/01/1982     |
| 21 | <i>E. coriaceum</i>       | Mun. Jaboticatubas (Serra do Cipó), MG         | 18.087             | 06/03/1985     |
| 22 | <i>E. costalipes</i>      | -                                              | -                  | -              |
| 23 | <i>E. crenulatum</i>      | -                                              | -                  | -              |
| 24 | <i>E. decumbens</i>       | -                                              | -                  | -              |
| 25 | <i>E. dendroide</i>       | -                                              | -                  | -              |
| 26 | <i>E. dimorpholepis</i>   | -                                              | -                  | -              |
| 27 | <i>E. erodifolium</i>     | -                                              | -                  | -              |
| 28 | <i>E. ganofillum</i>      | -                                              | -                  | -              |
| 29 | <i>E. gaudichaudianum</i> | -                                              | -                  | -              |
| 30 | <i>E. hectantum</i>       | Cid. Universitária- Barão Geraldo, Campinas    | 16.685             | 30/11/1984     |
| 31 | <i>E. hirsutissimum</i>   | -                                              | -                  | -              |
| 32 | <i>E. hormonoides</i>     | Carrancas, 1100m - MG                          | 19.400             | 02/07/1987     |
| 33 | <i>E. inaeifolium</i>     | Mun. Águas de Sta. Barará-Cerrado, SP          | 565                | 26/04/1990     |
| 34 | <i>E. intermedium</i>     | Morro das Camisinhas, Poços de Calda, MG       | 2002               | 07/03/1983     |
| 35 | <i>E. inulaefolium</i>    | Mun. Jundiá, Serra do Japi, Sítio Sta. Maria   | 13.428             | 29/03/1982     |
| 36 | <i>E. itaiyagense</i>     | Mun. Itati, Osório, RS                         | 3.750              | 01/20/1985     |
| 37 | <i>E. kleinioides</i>     | Mun. Tiradentes, Serra de São José-MG          | 19.037             | 30/06/1987     |
| 38 | <i>E. laeterrens</i>      | -                                              | -                  | -              |
| 39 | <i>E. laetevirens</i>     | -                                              | -                  | -              |
| 40 | <i>E. laevigatum</i>      | Mun. Águas de Sta. Bárbara-Cerrado, SP         | -                  | 22/02/1990     |
| 41 | <i>E. laxum</i>           | Mun de Lavras, Serrinha - MG                   | 15.293             | 07/12/1983     |
| 42 | <i>E. ligulaefolium</i>   | Rio Pequeno, Mun - São José dos Pinhais        | 40.938             | 10/11/1978     |
| 43 | <i>E. lundianum</i>       | Estado da Guanabara, descida para Sumaré       | 107726             | 21/07/1959     |

Tabela 6. Continuação

|    |                            |                                                                                                |                                |                                             |
|----|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------|
| 44 | <i>E. macrocephalum</i>    | Mun de Campo Bonito, SP<br>Bragança Paulista, Estr. de Amparo, SP<br>Serra do Japi, Jundiá, SP | 1.667<br>15.686<br>16.470<br>- | 09/02/1976<br>31/12/1983<br>09/05/1984<br>- |
| 45 | <i>E. macrophyllum</i>     |                                                                                                |                                |                                             |
| 46 | <i>E. maximilianii</i>     |                                                                                                |                                |                                             |
| 47 | <i>E. megacefalum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 48 | <i>E. minasgeraesense</i>  | Horto Florestal, Mogi-Mirim, SP                                                                | 21.933                         | 03/05/1989                                  |
| 49 | <i>E. mollissimum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 50 | <i>E. multifidum</i>       |                                                                                                |                                |                                             |
| 51 | <i>E. myriocephalum</i>    |                                                                                                |                                |                                             |
| 52 | <i>E. myrtilloides</i>     |                                                                                                |                                |                                             |
| 53 | <i>E. nemularia</i>        |                                                                                                |                                |                                             |
| 54 | <i>E. odoratum</i>         |                                                                                                |                                |                                             |
| 55 | <i>E. ostenii</i>          |                                                                                                |                                |                                             |
| 56 | <i>E. oxilepsis</i>        |                                                                                                |                                |                                             |
| 57 | <i>E. palmari</i>          |                                                                                                |                                |                                             |
| 58 | <i>E. paucidentatum</i>    |                                                                                                |                                |                                             |
| 59 | <i>E. paulensis</i>        |                                                                                                |                                |                                             |
| 60 | <i>E. prasiifolium</i>     | Mun de Lavras, Serrinha, MG                                                                    | 15.329                         | 07/12/1983                                  |
| 61 | <i>E. pubeulifolium</i>    |                                                                                                |                                |                                             |
| 62 | <i>E. punctulatum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 63 | <i>E. purpurascense</i>    |                                                                                                |                                |                                             |
| 64 | <i>E. pyriforme</i>        |                                                                                                |                                |                                             |
| 65 | <i>E. refescens</i>        |                                                                                                |                                |                                             |
| 66 | <i>E. riedel</i>           |                                                                                                |                                |                                             |
| 67 | <i>E. riedelii</i>         |                                                                                                |                                |                                             |
| 68 | <i>E. sagittiferum</i>     |                                                                                                |                                |                                             |
| 69 | <i>E. sanctopaulense</i>   |                                                                                                |                                |                                             |
| 70 | <i>E. serratum</i>         |                                                                                                |                                |                                             |
| 71 | <i>E. spathulatum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 72 | <i>E. squalidum</i>        | Serra do Japi, Jundiá, SP                                                                      | 15.512                         | 06/11/1983                                  |
| 73 | <i>E. squarulosum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 74 | <i>E. squarulosum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 75 | <i>E. subalternifolium</i> |                                                                                                |                                |                                             |
| 76 | <i>E. subhastatum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 77 | <i>E. tanacetifolium</i>   |                                                                                                |                                |                                             |
| 78 | <i>E. tectum</i>           |                                                                                                |                                |                                             |
| 79 | <i>E. thysanolepis</i>     |                                                                                                |                                |                                             |
| 80 | <i>E. totiafolium</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 81 | <i>E. trigonum</i>         |                                                                                                |                                |                                             |
| 82 | <i>E. trioides</i>         |                                                                                                |                                |                                             |
| 83 | <i>E. tweedieanum</i>      |                                                                                                |                                |                                             |
| 84 | <i>E. vauthierianum</i>    |                                                                                                |                                |                                             |
| 85 | <i>E. velutinum</i>        |                                                                                                |                                |                                             |
| 86 | <i>E. vernonia</i>         |                                                                                                |                                |                                             |
| 87 | <i>E. vitalbae</i>         |                                                                                                |                                |                                             |



**Tabela 7. Dados de coleta dos gêneros *Heliotropium*, *Ageratum* e *Crotalaria* (Experimento B).**

| Plantas                          | Local                                   | Data               |
|----------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|
| <i>Heliotropium indicum</i>      | Em frente ao IB da Unicamp, Campinas-SP | novembro de 1994   |
| <i>Heliotropium transalpinum</i> | CPQBA (Betel, Paulínia-SP)              | novembro de 1994   |
| <i>Ageratum conyzoides</i>       | CPQBA                                   | fevereiro de 94/95 |
| <i>Crotalaria spectabilis</i>    | Estação experimental de Assis-SP        | janeiro de 1997    |
| <i>Crotalaria juncea</i>         | Serra do Japi, Jundiá, SP               | janeiro de 1995    |
| <i>Crotalaria lanceolata</i>     | Em frente ao IB da Unicamp, Campinas-SP | janeiro de 1995    |

**Tabela 8. Dados de coleta e extração do material vegetal (Experimento C).**

| Plantas                       | Data de coleta | Quantidades | Extrato bruto | Partes estudadas |
|-------------------------------|----------------|-------------|---------------|------------------|
| * <i>Senecio brasiliensis</i> | janeiro/1994   | 2,5 kg      | 1,5 g         | Planta toda      |
| <i>Eupatorium laevigatum</i>  | janeiro/1994   | 5,0 kg      | 79,49 g       | Folhas           |
| * <i>Heliotropium indicum</i> | novembro/1995  | 4,0 kg      | 1,67 g        | Planta toda      |
| * <i>Ageratum conyzoides</i>  | março/1995     | 3,0 kg      | 76,00 g       | Planta toda      |
| <i>Crotalaria lanceolata</i>  | abril/1995     | 1,008 kg    | -             | Sementes         |

\* Destas plantas foram extraídos os APs para os testes Toxicológico

**Tabela 9. Outros APs isolados.**

| Alcalóides         | Fonte                         | Parte    |
|--------------------|-------------------------------|----------|
| Monocrotalina      | <i>Crotalaria spectabilis</i> | sementes |
| Usaramina          | <i>Crotalaria lanceolata</i>  | sementes |
| AP desconhecido    | "                             | sementes |
| Integerrimina      | <i>Crotalaria juncea</i>      | sementes |
| Equinatina N-óxido | <i>Eupatorium laevigatum</i>  | folhas   |

## **EXPERIMENTO D**

### **TESTES TOXICOLÓGICOS**

O procedimento experimental empregado nestes testes foi o mesmo descrito por CULVENOR *et al.* (1976a).

Os testes foram conduzidos no Laboratório de Ensaaios Biológicos, Farmacológicos e Toxicológicos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA), Betel Paulínia-SP, sob a Orientação do Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho.

#### **Teste de Toxicidade Aguda**

Este teste consistiu na administração (via oral) de doses únicas (0,0250; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; \*(0,08, 0,13, 0,16 e 0,6); 0,8; 1,6 e 3,2 MMols/kg) dos APs puros. Após trinta minutos da administração, os ratos, com peso variando entre 20 a 40g, foram recolocados com as respectivas mães e desmamados depois de vinte e um dias.

Os animais foram observados a cada 24 horas para verificação dos sintomas produzidos pela administração dos APs, com especial atenção a sintomas como tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Este período de observação era definido de acordo com os efeitos tóxicos observados, a velocidade de seu aparecimento e de sua duração. As observações complementares (animais em estado crítico) foram efetuadas rotineiramente de modo a reduzir ao mínimo os animais perdidos para o estudo de autópsia; os animais que tiveram morte natural ou que foram sacrificados eram mantidos sob refrigeração (5°C) até a autópsia. Os animais que não morriam durante a primeira semana de administração (Teste de Toxicidade Aguda, 1 a 8 dias), foram sacrificados após quatro semanas, fornecendo resultados para o teste de Toxicidade Crônica.



Durante a autópsia foram registradas alterações macroscópicas gerais e os órgãos (fígado, pulmão e rim) foram retirados e fixados em formol 10%, para análise histopatológica.

\*No caso de alguns alcalóides como a Integerrimina e a Retrorsina *N*-óxido houve a necessidade de introduzir (na escala) doses intermediárias de 0,08, 0,013, 0,016 e 0,6 mmols/kg, para poder caracterizar com maior precisão o valor da **DL<sub>50</sub>**.

### **Teste de Toxicidade Crônica**

Os testes de Toxicidade Crônica foram realizados com infusões a partir de cinco plantas selecionadas em função de seu uso, ocorrência e presença de APs (Tabela 10).

**Tabela 10. Extratos Utilizados no Teste de Toxicidade Crônica.**

| <b>Plantas</b>                   | <b>Partes Usadas</b> |
|----------------------------------|----------------------|
| <i>Ageratum conizoides</i>       | <b>planta toda</b>   |
| <i>Heliotropium indicum</i>      | <b>planta toda</b>   |
| <i>Heliotropium transalpinum</i> | <b>planta toda</b>   |
| <i>Eupatorium laevigatum</i>     | <b>planta toda</b>   |
| <i>Senecio brasiliensis</i>      | <b>folhas</b>        |

Os testes de Toxicidade Crônica (três meses) foram realizados com extratos na forma de infusões (forma de uso da população). As plantas foram coletadas, secas ao sol e reduzidas a pó em moinho. As Infusões foram preparadas colocando-se 250 ml de água quente em 50g da planta moída, cobrindo-se o recipiente com papel de alumínio e deixando-se em repouso por 30 minutos para, em seguida, coar em algodão e evaporar para obter um extrato seco.

Neste teste foram utilizadas duas doses do extrato (0,5 e 1g/kg), de acordo com a disponibilidade da planta. As doses eram preparadas conforme o peso do animal (ratos). Os extratos secos foram diluídos em água destilada e administrados via oral três vezes

por semana, em dez ratos, para cada dose, sendo 5 fêmeas e cinco machos e o grupo controle. Durante o experimento os animais foram mantidos em observação, do mesmo modo que no teste de Toxicidade Aguda.

### **Animais**

Foram usados 10 ratos por grupo, da linhagem Wistar, cinco fêmeas e cinco machos e o grupo controle, com 14 dias de vida pesando de 20 a 40g, tanto para o teste de Toxicidade Aguda, quanto para o teste de Toxicidade Crônica. Estes animais foram aclimatados às condições do Biotério do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agronômicas (CPQBA), Betel Paulínia-SP, durante duas semanas após seu nascimento.

### **Avaliação da Toxicidade**

A avaliação do teste de Toxicidade agudo e crônico foi realizada de acordo com os seguintes critérios (CULVENOR *et al.*, 1976a):

- a** - Toxicidade Superaguda: com morte dentro de 24 horas, após a ingestão.
- b** - Toxicidade Aguda: com morte ocorrendo entre 1 a 8 dias após a administração.

### **Análise Histopatológica**

Os resultados da análise histopatológica são discutidos de acordo com a classe de APs puros (**Grupos**), os extratos de plantas (**Grupos**) e os níveis de doses administradas (**Sub-grupos**), como mostra as Tabelas 11 e 12, respectivamente.

Amostras de fígado do grupo controle e tratado, neste último caso com ou sem lesão aparente, foram fixadas em formol 10% tamponado, por 24 horas, a temperatura ambiente, e depois peças de

tamanho pequeno foram colocadas em etanol 70%, e posteriormente submetidas as técnicas de rotina para inclusão em parafina. Em seguida, foram obtidos cortes de 6  $\mu$ m, os quais foram corados pela técnica de Hematoxilina-Eosina e pelo método Tricrômico Gomori (Gomori, G 1952), submetidos em seguida à análise histopatológica.

**Tabela 11. APs e doses usadas nos testes de Toxicidade aguda.**

| Grupos                              | Sub-Grupos | APs                     | Doses (mg/ Kg) |
|-------------------------------------|------------|-------------------------|----------------|
| <b>A ( Controle )</b>               | -          | -                       | salina         |
| <b>B (Monoésteres)</b>              | B1         | Licopsamina             | 14,95          |
|                                     | B2         | Licopsamina             | 29,90          |
|                                     | B3         | Indicina                | 14,95          |
|                                     | B4         | Indicina                | 29,90          |
|                                     | B5         | Indicina                | 59,80          |
|                                     | B6         | Indicina                | 199,6          |
| <b>C (Diésteres macrocíclicos)</b>  | C1         | Integerrimina           | 26,80          |
|                                     | C2         | Integerrimina           | 33,50          |
|                                     | C3         | Integerrimina           | 44,23          |
|                                     | C4         | Integerrimina           | 55,76          |
|                                     | C5         | Retrorsina              | 8,77           |
|                                     | C6         | Retrorsina              | 17,55          |
|                                     | C7         | Retrorsina              | 35,10          |
|                                     | C8         | Retrorsina              | 70,20          |
|                                     | C9         | Retrorsina              | 140,40         |
|                                     | C10        | Retrorsina              | 280,80         |
| <b>D (N-óxidos monoésteres )</b>    | D1         | Indicina -N-óxido       | 7,87           |
|                                     | D2         | Indicina -N-óxido       | 63,00          |
|                                     | D3         | Indicina -N-óxido       | 252,00         |
| <b>E ( N-óxidos macrocíclicos )</b> | E1         | Integerrimina - N-óxido | 8,76           |
|                                     | E2         | Integerrimina - N-óxido | 35,10          |
|                                     | E3         | integerrimina - N-óxido | 70,20          |
|                                     | E4         | integerrimina - N-óxido | 210,60         |
|                                     | E5         | retrorsina - N-óxido    | 9,16           |
|                                     | E6         | retrorsina - N-óxido    | 18,35          |
|                                     | E7         | retrorsina - N-óxido    | 36,70          |
|                                     | E8         | retrorsina - N-óxido    | 220,20         |
| <b>F (Base retronecina )</b>        | F1         | Retronecina             | 7,75           |
|                                     | F2         | Retronecina             | 15,50          |
|                                     | F3         | Retronecina             | 31,00          |
|                                     | F4         | Retronecina             | 62,00          |
|                                     | F5         | Retronecina             | 124,0          |
|                                     | F6         | Retronecina             | 248,0          |
| <b>G (Ácido)</b>                    | G1         | Ácido integerrinecico   | 36,60          |



Tabela 12. Extratos e doses usadas no Teste de Toxicidade Crônica.

| Grupos                    | Sub-Grupos | Plantas                         | Dose (g/kg) |
|---------------------------|------------|---------------------------------|-------------|
| H (Extrato Bruto- (EBHi)  | <b>H1</b>  | <i>Heliotropim indicum</i>      | <b>0,5</b>  |
| H (Extrato Bruto- (EBHi)  | <b>H2</b>  | <i>Heliotropim indicum</i>      | <b>1,0</b>  |
| I (Extrato Bruto - (EBHt) | <b>I1</b>  | <i>Heliotropim transalpinum</i> | <b>0,5</b>  |
| I (Extrato Bruto - (EBHt) | <b>I2</b>  | <i>Heliotropim transalpinum</i> | <b>1,0</b>  |
| J (Extrato Bruto - (EBAc) | <b>J</b>   | <i>Ageratum conizoides</i>      | <b>1,0</b>  |
| L (Extrato Bruto- (EBSb)  | <b>L</b>   | <i>Senecio brasiliensis</i>     | <b>0,5</b>  |
| K (Extrato Bruto- (EBEl)  | <b>K1</b>  | <i>Eupatorium laevigatum</i>    | <b>0,5</b>  |
| K (Extrato Bruto- (EBEl)  | <b>K2</b>  | <i>Eupatorium laevigatum</i>    | <b>1,0</b>  |

### Documentação fotográfica

A documentação fotográfica dos preparados histológicos dos fígados foi obtida com emprego de um Fotomicroscópio Nikon e filme Kodacolor ASA 100. Posteriormente foram elaboradas pranchas, das quais se obteve cópias "xerox" coloridas de alta resolução.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Extração e Fracionamento de APs

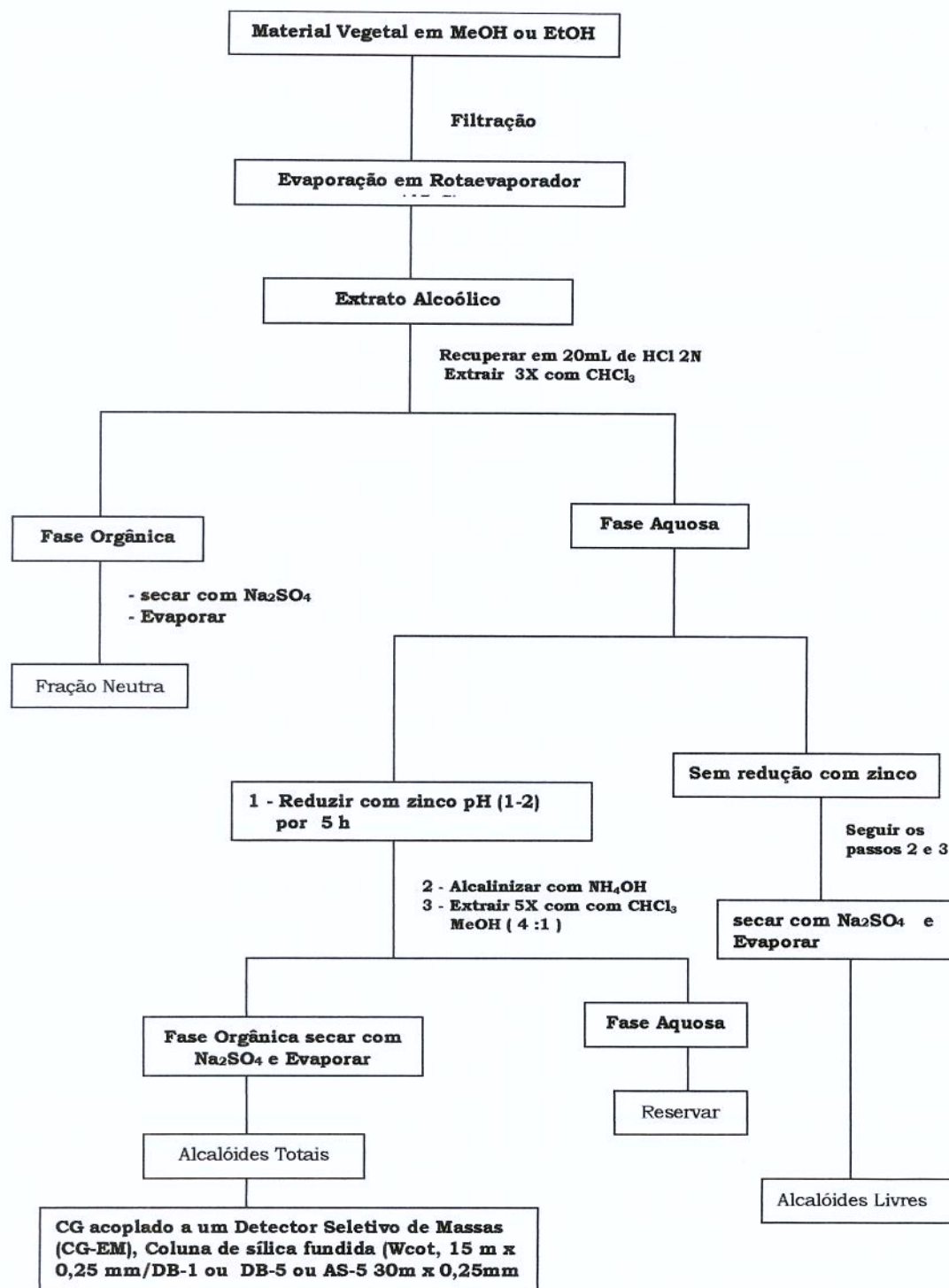
#### **Espécies de *Senecio* e *Eupatorium* (Experimento A)**

As inflorescências (2g) obtidas do herbário, das espécies de *Senecio* e *Eupatorium*, foram maceradas em cadinhos com 5mL de MeOH e o extrato filtrado a vácuo. O filtrado foi totalmente evaporado em rotaevaporador a baixa temperatura (45°C). O resíduo foi recuperado com 15 mL de HCl 2N (APs protonados). O extrato aquoso ácido foi extraído três vezes com CHCl<sub>3</sub>, removendo-se as substâncias não básicas insolúveis em água.

Devido os APs se apresentarem em plantas e animais sob a forma de *N*-óxidos (RIZK, 1991) houve a necessidade de uma redução do extrato aquoso ácido. Assim, a fase aquosa foi reduzida com excesso de Zn por 5h em meio ácido mantendo-se o pH entre 1-2, para converter os APs *N*-óxidos em seus respectivos APs terciários. A fração reduzida foi alcalinizada com hidróxido de amônio (transformando os APs protonados em bases livres) e extraída cinco vezes com 20 mL de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (4:1).

O Esquema 1 mostra o processo de extração e fracionamento dos APs.

Esta metodologia de extração foi aplicada, também para a obtenção dos APs presentes nas espécies citadas nos **Experimentos B e C**.



Esquema 1. Extração e Fracionamento de APs.

#### 4.2.2 APs obtidos a partir de transformações químicas

Para os testes de Toxicidade Aguda foram utilizados APs puros isolados a partir de plantas e APs obtidos a partir de algumas transformações químicas (Tabela 13).

Tabela 13. APs usados nos testes de Toxicidade Aguda.

| APs                                  | Fonte                       |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Monoésteres</b>                   |                             |
| Indicina                             | <i>Heliotropium indicum</i> |
| Licopsamina                          | <i>Ageratum conyzoides</i>  |
| <b>Macrocíclicos 1,2-insaturados</b> |                             |
| Integerrimina                        | <i>Senecio brasiliensis</i> |
| Retrorsina                           | <i>Senecio brasiliensis</i> |
| <b>Derivados N-Óxidos</b>            |                             |
| Integerrimina N-Óxido                | N-oxidação da integerrimina |
| Retrorsina N-Óxido                   | N-oxidação da Retrorsina    |
| Indicina N-Óxido                     | N-oxidação da Indicina      |
| <b>Base-Livre</b>                    |                             |
| Retronecina                          | Hidrólise da integerrimina  |
| <b>Ácido</b>                         |                             |
| Integerrinecico                      | Hidrólise da integerrimina  |

Os APs, **monoésteres** Licopsamina, Indicina e os **macrocíclicos**, Integerrimina e Retrorsina foram obtidos de fontes naturais como mostra a Tabela acima.

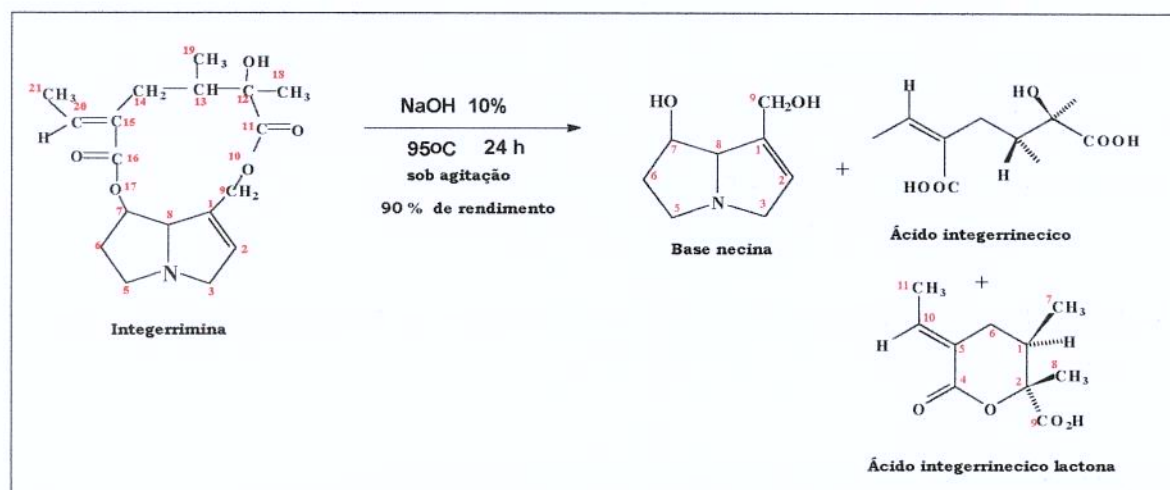
#### Hidrólise

A base Retronecina e o ácido Integerrinecico foram obtidos através de uma hidrólise básica (MOHANRAJ *et al.*, 1982), como mostra o Esquema 2.

**Procedimento:** 70 mg do AP Integerrimina foram dissolvidos em 2 mL de uma solução aquosa de NaOH 10%. Esta mistura foi deixada durante 24 horas sob agitação. Após o tempo de reação, foi realizada uma extração com clorofórmio para obtenção da base Retronecina. A



fase aquosa (água mãe) foi acidificada com HCl 0,2 N e extraída com éter etílico para obtenção do ácido, o solvente foi evaporado e a goma resultante foi cromatografada em sílica gel fase móvel ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ ). Após purificação este foi obtido na forma de um pó branco.



Esquema 2. Hidrólise da Integerrimina (MOHANRAJ *et al.*, 1982; MATTOCKS, 1986)

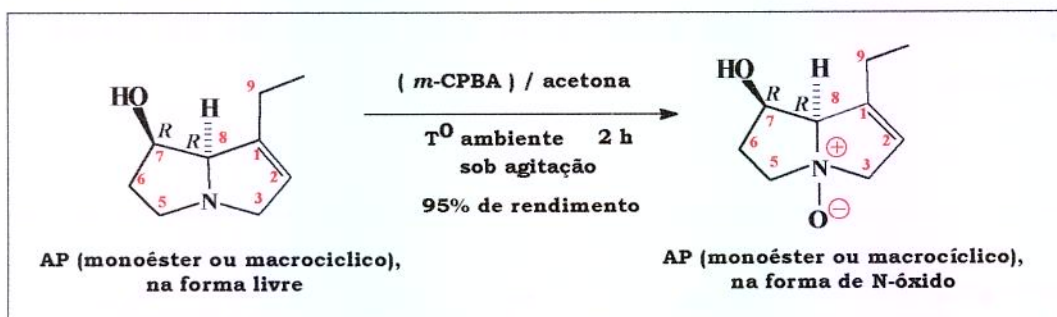
## Oxidação

Os APs na forma de *N*-óxidos: Indicina *N*-óxido, Integerrimina *N*-óxido e Retrorsina *N*-óxido foram obtidos através de uma reação de oxidação com o ácido metacloroperbenzóico (OGAWA *et al.*, 1993), de acordo com o Esquema 3.

**Procedimento:** 52,5 mg dos APs previamente purificados foram dissolvidos em 3,2 ml de acetona ou diclometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) puro e seco, com 41,1 mg de ácido metacloroperbenzóico (m-CPBA). A mistura foi deixada sob agitação a temperatura ambiente por 2 horas, a reação foi acompanhada por CCD. Passado o tempo de reação a mistura foi diretamente submetida a purificação em coluna de adsorção em sílica gel. Os composto isolados foram submetidos



aos métodos de purificação e caracterização descritos posteriormente.



Esquema 3. Oxidação de APs (OGAWA *et al.*, 1993).

#### 4.2.3 Métodos Analíticos para purificação e Caracterização de APs

##### Cromatografia em camada delgada (CCD) analítica

Amostras foram aplicadas em placas de sílica Gel 60/UV<sub>254</sub>, 0,10mm de espessura, usando-se como fase móvel CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (83:14:3). As placas foram secas à temperatura ambiente e reveladas em câmara de iodo por 15-30 min. As manchas, reveladas, apresentaram coloração marrom. Posteriormente o iodo era sublimado a 100°C, com os APs com dupla ligação na posição 1,2 do anel apresentando uma coloração escura permanente (MATTOCKS, 1967a, 1967b).

##### Cromatografia de Adsorção com Coluna Flash

Para separação dos APs Integerrimina e Retrorsina, utilizamos uma coluna flash com placa sinterizada, empacotada com sílica gel 60 Korngröße 0,040-0,063 mm (230-400 mesh ASTM).

Após a redução com zinco, o extrato bruto da planta *Senecio brasiliensis* foi dissolvido em 2 mL de clorofórmio, adicionado no

topo da coluna e eluido, sob pressão, inicialmente com 60 mL de clorofórmio puro seguido do gradiente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ . A separação dos compostos foi acompanhada através da CCD (placas de sílica gel GF<sub>254</sub>), usando como eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (92,5:7:0,5). As placas eram reveladas em câmara de UV (250nm) e vapor de iodo.

### **Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)**

Para purificação de APs ou separação de APs com índices de retenção muito diferentes, como foi o caso dos APs Integerrimina e Retrorsina, aplicava-se a fração desejada em uma placa preparativa de sílica Gel 60/UV<sub>254</sub> 0,25mm (Merck). O sistema de solvente utilizado foi  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (mesma proporção) e a placa revelada com Reagente de Dragendorff que reage com compostos nitrogenados apresentando uma coloração vermelho-alaranjado. As manchas foram raspadas e extraídas com uma solução de carbonato de sódio saturada. A fase aquosa foi extraída 5 vezes com  $\text{CHCl}_3$ , a fase orgânica seca com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , e evaporada a baixa pressão, originando os APs desejados.

### **Cromatografia de Partição**

Para separação de alcalóides (com grupos 1,2 ou 1,3 dióis) diastereoisomeros, utilizamos um método descrito por MOHANRAJ *et al.* (1982); onde ele utilizava cromatografia de adsorção em coluna empacotada com alumina neutra ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). O extrato bruto alcaloídico, contendo uma mistura de diastereoisomeros, era adicionado no topo de uma coluna (1,5 D.I) empacotada com 100g de alumina neutra, iniciando-se a eluição com clorofórmio puro, e aumentando-se gradativamente a polaridade com metanol, de acordo a polaridade do

composto. As frações foram coletadas e analisadas em CCD, de acordo com o método descrito anteriormente.

Na purificação de APs utilizou-se cromatografia de adsorção em coluna (Sílica Gel 60, 70-230 mesh) utilizando como eluente um gradiente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  entre 95:4:1 a 65:25:10, dependendo do alcalóide a ser purificado. As frações eram coletadas e analisadas em CCD conforme metodologia acima.

### **Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas**

Os extratos e os APs puros foram analisados em um Cromatografo a gás Hewlett Packard 5890, série II, equipado com uma coluna de sílica fundida (AS-5 ou equivalente, 30m x 0,25mm) diretamente acoplada a um detector seletivo de massas Hewlett Packard 5970.

#### **Condições de injeção:**

Temperatura do injetor: 250°C

Temperatura do Detector : 280°C

Gás de arraste: He, 1 mL/min

Fluxo : 1mL/min com razão de "split" 1:100

Energia de ionização de 70 eV

Programas de temperatura: 130°C a 300°C (5 min); 4°C/min para os gêneros *Eupatorium*, *Heliotropium*, *Ageratum* e *Crotalaria*

150°C a 300°C, 4°C/min para o gênero *Senecio*

Volume da amostra: 1-2 µL.

A identificação dos APs nos diferentes extratos foi realizada através dos parâmetros de tempo de retenção (IR) calculados de acordo com van den DOOL & KRATZ (1963) e os padrões de fragmentação foram comparados com a literatura.

Para calcular o Índice de Retenção dos alcalóides as amostras foram injetadas juntamente com 1µL de n-alcanos, da série dos



hidrocarbonetos, C<sub>14</sub> - C<sub>36</sub>, (van den DOOL & KRATZDE, 1963) e comparados com os dados da literatura (WITTE *et al.*, 1993; TRIGO *et al.*, 1996).

A abundância dos APs foi calculada em termos da abundância relativa (proporção entre APs na fração de alcalóides totais), a partir da integração dos cromatogramas.

Para o calcular IR (índice de retenção) foi usada a fórmula abaixo:

$$IR = \{(T_s - T_{Cn-1})(C_n - C_{n-1}).100\} / (T_{Cn} - T_{Cn-1}) + \{100.C_{n-1}\}$$

Onde:

**T<sub>s</sub>** = Tempo de retenção da substância analisada

**T<sub>Cn</sub>** = Tempo de retenção dos n-alcanos que eluem após a substância

**T<sub>Cn-1</sub>** = Tempo de retenção dos n-alcanos que eluem antes da substância

**C<sub>n</sub>** = n-alcanos que eluem após a substância

**C<sub>n-1</sub>** = n-alcanos que eluem antes da substância

APs anteriormente isolados de plantas ou sintetizados, e identificados por TRIGO *et al.* (1993), foram utilizados como padrões. A Tabela 14 mostra alguns APs e seus respectivos IR, utilizados nas análises.

**Tabela 14. Índice de Retenção (IR) de van den Dool & Kratz de APs, usados como referência.**

| IR   | M+  | APs           |
|------|-----|---------------|
| 1425 | 155 | Retronecina   |
| 1978 | 283 | Supinina      |
| 1985 | 283 | Amabilina     |
| 2126 | 299 | Indicina      |
| 2131 | 299 | Intermidina   |
| 2145 | 299 | Licopsamina   |
| 2152 | 299 | Rinderina     |
| 2172 | 299 | Equinatina    |
| 2270 | 325 | Monocrotalina |
| 2294 | 335 | Senecionina   |
| 2303 | 333 | Senecifilina  |
| 2350 | 335 | Integerrimina |

**Programa de temperatura: 150-300°C, 6°C/min (coluna capilar de sílica fundida DB-1, 30m x 0,032mm) TRIGO, 1993.**

### Método colorimétrico

Na análise colorimétrica dos extratos de plantas contendo APs, foi empregado o método de MATTOCKS (1967b, 1968), BINGLEY (1968), modificado por BROWN (1985) e TRIGO *et al*, (1993). Do extrato contendo os alcalóides totais (base livre + N-óxidos) foi tirada uma alíquota de 100 µL e adicionada em tubos de ensaio com 0,5 mL do reagente de oxidação (2,5 mg de  $\text{H}_2\text{O}_2:\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  30% diluído em MeOH 1:2) e aquecido por 25 minutos a 100°C. As amostras foram resfriadas a temperatura ambiente e adicionadas de 1 mL de acetato de isoamila + 0,1 mL de anidrido acético, em seguida os tubos de ensaio foram aquecidos por 2 minutos. As amostras foram novamente resfriadas a temperatura ambiente e tratadas com 1 mL do reagente de Ehrlich (8 mL de  $\text{BF}_3$  metanólico 20% + 72 mL de EtOH + 1,4 g de dimetilaminobenzaldeído), preparado na hora. As amostras foram aquecidas a 60°C por 5 minutos, resfriadas a temperatura ambiente e diluídas em 4 mL de acetona. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 561 nm. No caso dos N-óxidos, foi seguido o mesmo procedimento, eliminando a reação de oxidação.

### Ressonância Magnética Nuclear

Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em Espectrometro Varian Gemini 300 (300 MHz)  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz), além de DEPT, COSY e HETCOR. Os solventes utilizados foram  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$  e DMSO. O padrão utilizado para referência interna foi o TMS. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são dados em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz.

As atribuições de  $^{13}\text{C}$ , foram realizadas comparando-se os espectros de  $^{13}\text{C}$  desacoplado e DEPT, onde os sinais positivos, quando aplicava-se um pulso de 90° são atribuídos aos CH e quando aplica-se um pulso de 135° os picos negativos são atribuídos aos  $\text{CH}_2$  e os positivos aos  $\text{CH}_3$  e CH. Os picos de C# não aparecem por não apresentarem acoplamento. O sinal negativo (-) após o valor do



deslocamento, representa a inversão do sinal no espectro de  $^{13}\text{C}$  (DEPT), quando aplica-se um pulso de  $135^\circ$ .

### 4.3 Análise Estatística

Com o objetivo de verificar se a distribuição dos APs nas espécies de *Senecio* e *Eupatorium* apresentavam um perfil de similaridade, o padrão desses APs foi analisado estatisticamente através da Análise por Agrupamento Hierárquico usando como parâmetro a medida de distância (Distância Euclidiana, método de Ward), entre as amostras (PIELON, 1984).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação de APs em Plantas Brasileiras

Em vista da importância das propriedades toxicológicas dos APs e considerando que os mesmos estão presentes nas plantas na forma de misturas complexas de difícil separação, houve uma grande demanda no desenvolvimento de métodos simples que permitissem sua separação completa e rápida, e ainda uma identificação individual e inequívoca de seus componentes. Assim, várias técnicas para identificação e separação de APs em extratos de plantas têm sido descritas na literatura. Dentre as técnicas desenvolvidas a mais usada atualmente para identificação e determinação quantitativa de misturas complexas de APs tem sido baseada na Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

Plantas do gênero *Senecio* (Asteraceae) são comuns em pastagens, terrenos baldios, culturas perenes, ocasionalmente anuais, sendo classificadas como plantas daninhas tóxicas (LORENZI, 1991). Algumas espécies como *Senecio brasiliensis* (Figura 22) conhecida popularmente como "maria-mole", "flor-das-almas" e "cravo-do-campo" são utilizadas na medicina caseira como vermífugo e suas folhas secas são usadas na cicatrização de feridas.



**Figura 22.** *Senecio brasiliensis*  
(LORENZI, 1991).

Algumas espécies de *Eupatorium* (Asteraceae) são usadas na medicina caseira; entre estas podemos destacar a espécie *Eupatorium laevigatum* (Figura 23), conhecida popularmente como "cambará-falso" e "mata-pasto". Essa planta é classificada como daninha e está espalhada em todo o país, infestando principalmente, pastagens e beira de estradas (LORENZI, 1991).





**Figura 23.** *Eupatorium laevigatum*  
(LORENZI, 1991).

As suas folhas são reconhecidamente úteis no tratamento de feridas. O suco da folha cozida ou crua é emoliente, e usado contra febre maligna, intermitente e infecciosa.

*Ageratum conyzoides* (Figura 24) popularmente conhecida como "mentrasto", "picão-roxo", "erva-de-são-João" e "catinga-de-bode" é uma planta largamente disseminada em todas as regiões agrícolas do país, infestando principalmente lavouras anuais e terrenos baldios.

Em alguns países africanos o *Ageratum conyzoides* tem sido indicado pela medicina popular no tratamento de doenças mentais e diversos tipos de infecções.

Testes recentes (placa quente) foram realizados utilizando a fração solúvel em água obtida através do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. conyzoides*, para avaliar a atividade analgésica e antiinflamatória em ratos (MAGALHÃES *et al.*, 1997). Esta atividade já havia sido comprovada, em ratos, pelos pesquisadores MENDONÇA e CARVALHO, 1996 (não publicado) usando extrato bruto etanólico (alcalóides totais) da planta toda.



Figura 24. *Ageratum conyzoides*  
(LORENZI, 1991).

Além das propriedades medicinais citadas acima, o *A. conyzoides* possui ainda os seguintes usos: tônica, anti-reumática, diurética, antidisentérica, antiespasmódica, intestinal, sendo também empregada no tratamento de cólicas flatulentas e uterinas, reumatismo agudo, amenorréia, gonorréia, beribéri, pneumatoses do tubo digestivo e moléstias das vias urinárias. É usada na forma de infusão, alcoolatura (fricção), emplastro e decocto (banho), LORENZI, 1991.

Outro gênero estudado, devido a sua grande aplicação na medicina caseira foi *Heliotropium* (Boraginaceae). Dentre este destaca-se o *Heliotropium indicum* (Figura 25) e o *Heliotropium transalpinum*. O *H.indicum* é uma planta anual conhecida popularmente como "crista-de-galo", "fedegoso" e "borragem-brava", infestante muito comum em pastagens, beira de estradas e terrenos baldios, (LORENZI, 1991). É usada como desobstruente, anti-hemorroidal, diurética, peitoral e também no tratamento de feridas, úlceras, queimaduras, rouquidão, deslocamentos uterinos, dor-de-



cadeira e leucorréia membranosa. O suco da planta é empregado como cicatrizante, sendo útil para aftas, ulcerações da garganta e da faringe, estomatites e furúnculos (LORENZI, 1991).



**Figura 24.** *Heliotropium indicum*  
(LORENZI, 1991).

A planta *Heliotropium transalpinum* é conhecida popularmente como "Bico-de-corvo". O suco ou a infusão de suas folhas são considerados diuréticos, empregados como cicatrizantes e no tratamento de ulcerações.

Do gênero *Crotalaria* (Leguminosae), foram estudadas três espécies: *Crotalaria spectabilis*, *Crotalaria lanceolata* (Figura 26) e *Crotalaria juncea*. As espécies deste gênero são conhecidas popularmente como "guizo-de-cascavel", "chocalho-de-cascavel", "xique-xique" e "feijão de guizos". São plantas daninhas frequentes em pastagens e beira de estrada.



Figura 26. *Crotalaria lanceolata* e *Crotalaria spectabilis* (LORENZI, 1991).

A *Crotalaria lanceolata* é originária da África e foi introduzida no Brasil como adubo verde e hoje se encontra espalhada em quase todas as regiões do país (LORENZI, 1991).

#### 5.1.1 Identificação de APs em espécies de *Senecio*

Os APs encontrados nas espécies analisadas foram agrupados em Tipos ou Subtipos, com adaptação baseada na classificação de HARTMANN & WITTE (1995). As principais estruturas identificadas estão mostradas na Figura 27.

A análise empregando o método de Análise por Agrupamento Hierárquico {(AAH) PIELON, 1984}, foi realizado com base nos dados obtidos (Tabela 15 e 16), da análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas por impacto de elétrons, com o tempo de retenção, massa molecular e abundância relativa, em inflorescências de 23 espécies de *Senecio*.



Com o resultado daquela análise estatística, foi possível relacionar as espécies de *Senecio* mais semelhantes ou idênticas foram agrupadas. Cada espécie foi representada como um ponto no espaço de  $m$  variáveis (APs). O parâmetro usado neste processo foi a medida de distância entre as amostras. Essas distâncias podem ser visualizadas através de um diagrama bidimensional denominado Dendograma (Figura 28), que indica, por proximidade, as espécies mais semelhantes entre si. Isto é, quanto menor a distância entre os pontos, maior será a semelhança entre as mesmas. Para proceder à AAH há várias medidas para a distância entre as amostras, e neste caso, foi utilizada a Distância Euclidiana-Método de Ward. No Dendograma a escala varia de um (amostras idênticas) a zero (amostras sem similaridade).

Os APs, agrupados em **Tipos** e **Subtipos** conforme mostrado na Tabela 15, foram classificados em três grupos: **Tipo Senecionina (A)**, com diésteres macrocíclicos 1,2-insaturados {p.e. **Senecionina [A1]**}; **Tipo Platifilina (A2)** com alcalóides macrocíclicos saturados; **Tipo Triangularina**, com monoésteres saturados **B1** (9-O-Senecionilplatinecina) e **B2** (7-O-Senecionilplatinecina) ou monoésteres 1,2-insaturados **B3** (9-O-Senecionilretronecina) e **B4** (7-O-Senecionilretronecina).

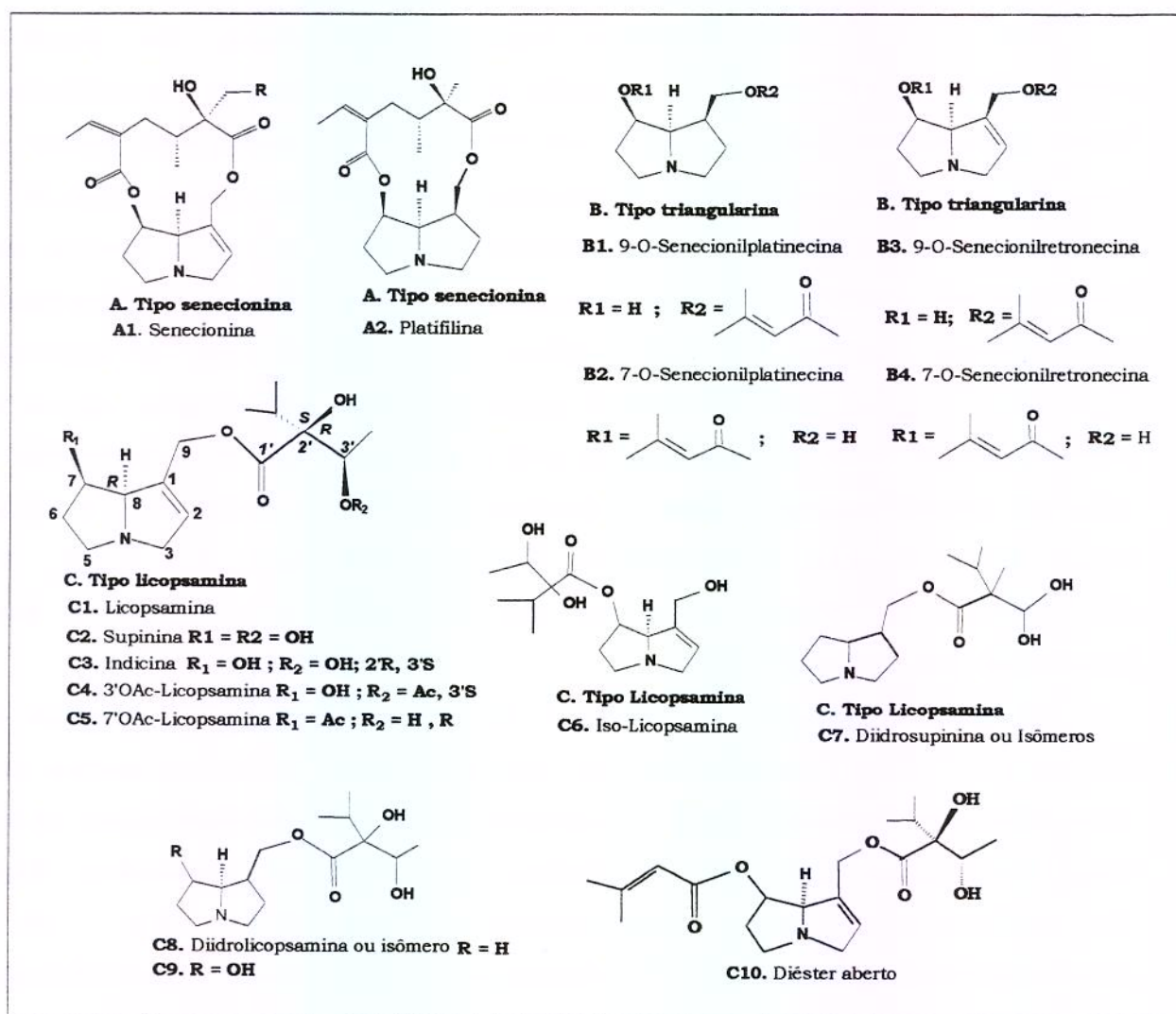


Figura 27. Alcalóides presentes nas espécies estudadas (adaptado da classificação de HARTMANN & WITTE, 1995)

De acordo com o resultado da análise estatística (Gráfico da Figura 28) observamos dois grupos, de espécies de *Senecio*, bem definidos:

No 1º grupo os APs mais comuns foram os macrocíclicos insaturados do **Tipo Senecionina (A1)**, englobando cinco espécies pertencentes a Seção *Corymbosi* (CB), quatro pertencentes a Seção *Hualtatini* (H), duas pertencentes a seção *Adamantina* (A) e uma espécie pertencente a seção *Cacaliastrum* (C).

O 2º grupo englobando as espécies *S.conyzifolius* (Seção CB), *S.leptoschizus* (Seção CB), *S.paulensis* (Seção CB), *S.icoglossus* (Seção

H), *S.juergensii* (Seção H), *S.pulcher* (Seção H) e *S.crassiflorus* (Seção S) apresentaram APs macrocíclicos saturados do **Tipo Platifilina (A2)**, Figura 27.

Na espécie *S.platensis* (Seção CB) foi identificada uma mistura de APs dos **Tipos A1 e A2**, com abundâncias relativas de 52,2 e 47,8%, respectivamente.

A espécie *S.desiderabilis* (Seção S) apresentou uma mistura de APs do **Tipo Triangularina (B)**, **Subtipos B1- Senecionilplatinecina** (base necina saturada) e **B3- Senecionilretronecina** (base necina insaturada) como mostrado na Figura 27.

Podemos observar que a espécie *S.pellucidinervis* (Seção CB) apresentou uma mistura de APs do **Tipo A2, B1 e B3**, sendo que praticamente todos estão na mesma proporção.

As espécies *S.glaziovii* (Seção Tomentecio), *S.grosidens* (Seção Hualtatini), *S.macrotis* (Seção Cacaliastrum) e *S.oxyphyllus* (Seção Corymbosi), apresentaram APs na forma de traços, sendo impossível o cálculo de suas abundâncias relativas, uma vez que suas áreas não foram registradas.

Nas espécies *S.erisithalifolius* (Seção H) e *S.hemmendorffii* (Seção Paranaia), não foi detectado nenhum tipo de AP.

A Seção *Corimbosi* se destacou por apresentar um maior número de espécies (doze) com APs Tipos variados de APs, sendo que seis espécies apresentaram apenas APs do **Tipo Senecionina**.

Na Seção *Hualtatini*, as espécies apresentaram APs dos **Tipos A1 e A2**.

Dentre as espécies de *Senecio* estudadas, a *S.pellucidinervis* (Seção CB) foi a que apresentou uma maior variedade de APs: **Tipo Platifilina (A2)**, **Tipo Supinina (9-Senecionilplatinecina B1 e 9-Senecionilretronecina B3)**.



De acordo com os resultados da análise estatística AAH (Distância Euclidiana, Método de Ward), foi possível verificado que os APs foram relevantes para estabelecer uma diferença e uma similaridade entre as espécies de *Senecio* estudadas, mostrando também que estes APs são consistente como marcadores químicos servindo à proposta da divisão deste gênero em seções (HIND, 1993).



Tabela 15. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de espécies de *Senecio*. Índice de retenção (IR) de VAN DER DOOL & KRATZ, massa molecular (M+) e abundância relativa (%).

| Tipo | Sub-tipo | IR   | M+  | **ada   | ape  | arg  | ben  | brac | brad | bras | com | ora | des  | ico  | ita | jur | lep | ole  | pau   | pel  | pla  | plu | pul  | sti  | ver  |
|------|----------|------|-----|---------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|------|------|-----|-----|-----|------|-------|------|------|-----|------|------|------|
| *B   | *B3      | 1757 | 237 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | 50,7 | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| B    | B3       | 1827 | 237 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | 31,2 | -    | -   | -    | -    | -    |
| B    | B1       | 1852 | 239 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | 30,4 | -    | -   | -    | -    | -    |
| B    | B1       | 1962 | 239 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | 49,3 | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| *A   | *A1      | 2303 | 335 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | 7,2  | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2363 | 335 | ***20,3 | -    | 22,3 | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2367 | 335 | -       | -    | -    | -    | 75,5 | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2380 | 335 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | 67,2 | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2452 | 351 | -       | -    | -    | 13,2 | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | 33,4 | -    |
| A    | A2       | 2480 | 337 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | 100 | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2500 | 351 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A2       | 2502 | 353 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | 29,9  | -    | -    | -   | -    | 66,6 | -    |
| A    | A2       | 2517 | 353 | 19,4    | -    | 15,0 | 17,1 | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | 53,1  | -    | 36,4 | -   | 85,6 | -    | -    |
| A    | A2       | 2521 | 353 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | 38,4 | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A2       | 2528 | 353 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | 100 | -   | -    | -    | -   | 100 | -   | -    | traço | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A2       | 2531 | 353 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | 91,1 | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2536 | 351 | 60,3    | 30,6 | -    | 49,3 | -    | -    | 20,0 | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | 42,1 | 100 | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2542 | ?   | -       | -    | 42,3 | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | 17,0  | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2553 | 351 | -       | -    | -    | -    | -    | 69,3 | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | 79,6 | -     | -    | 11,4 | -   | -    | -    | 87,1 |
| A    | A1       | 2564 | 351 | -       | -    | 13,0 | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | 4,2  |
| A    | A2       | 2570 | 353 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | 8,9  | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | 14,4 | -    | -    |
| A    | A1       | 2582 | 351 | -       | -    | -    | -    | -    | 23,5 | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | 10,1 | -   | -    | -    | -    |
| A    | A2       | 2588 | 353 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | 100 | 20,4 | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2590 | 393 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | 100 | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2596 | 351 | -       | -    | -    | 20,4 | -    | -    | 5,6  | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2599 | 397 | -       | 24,6 | 7,4  | -    | 24,5 | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | 5,4  |
| A    | A1       | 2607 | 351 | -       | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | 3,3  |
| A    | A1       | 2615 | 351 | -       | -    | -    | -    | -    | 7,2  | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| A    | A1       | 2634 | 351 | -       | 44,8 | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -    | -   | -   | -   | -    | -     | -    | -    | -   | -    | -    | -    |
| -    | -        | -    | -   | 100     | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100 | 100 | 100  | 100  | 100 | 100 | 100 | 100  | 100   | 100  | 100  | 100 | 100  | 100  | 100  |

\* - Estruturas mostradas na Figura 27

\*\* - Iniciais dos nomes das Espécies de *Senecio*

\*\*\* - Abundância Relativa

A Tabela abaixo mostra as espécies de Senecio que foram agrupadas de acordo com a classe de APs a que pertenciam, utilizando os dados da Tabela 15.

**Tabela 16. Tipos e Subtipos de APs encontrados em espécies de APs Senecio e a abundância relativa ( % )**

| Tipo | Sub-tipo | **ada   | ape | arg  | ben  | brac | brad | bras | con | ora | des  | lco | lta | jur | lep | ole  | pau  | pel  | pla  | plu | pul | sti | ver |
|------|----------|---------|-----|------|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|-----|-----|-----|-----|
| *B   | *B1      | -       | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | 49,3 | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 30,4 | -    | -   | -   | -   | -   |
| B    | B3       | -       | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | 50,7 | -   | -   | -   | -   | -    | -    | 31,2 | -    | -   | -   | -   | -   |
| *A   | *A1      | ***80,6 | 100 | 85,0 | 82,9 | 100  | 100  | 100  | -   | -   | -    | -   | 100 | -   | -   | 79,6 | 17,0 | -    | 52,2 | 100 | -   | 100 | 100 |
| A    | A2       | 19,4    | -   | 15,0 | 17,1 | -    | -    | -    | 100 | 100 | -    | 100 | -   | 100 | 100 | 20,4 | 83,0 | 38,4 | 47,8 | -   | 100 | -   | -   |
| -    | -        | -       | -   | -    | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   | -   | -   | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -   | -   |
| -    | -        | 100     | 100 | 100  | 100  | 100  | 100  | 100  | 100 | 100 | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 | 100  | 100  | 100  | 100  | 100 | 100 | 100 | 100 |

\* - Estruturas mostradas na Figura 27

\*\* - Iniciais dos nomes das Espécies de Senecio

\*\*\* - Abundância relativa

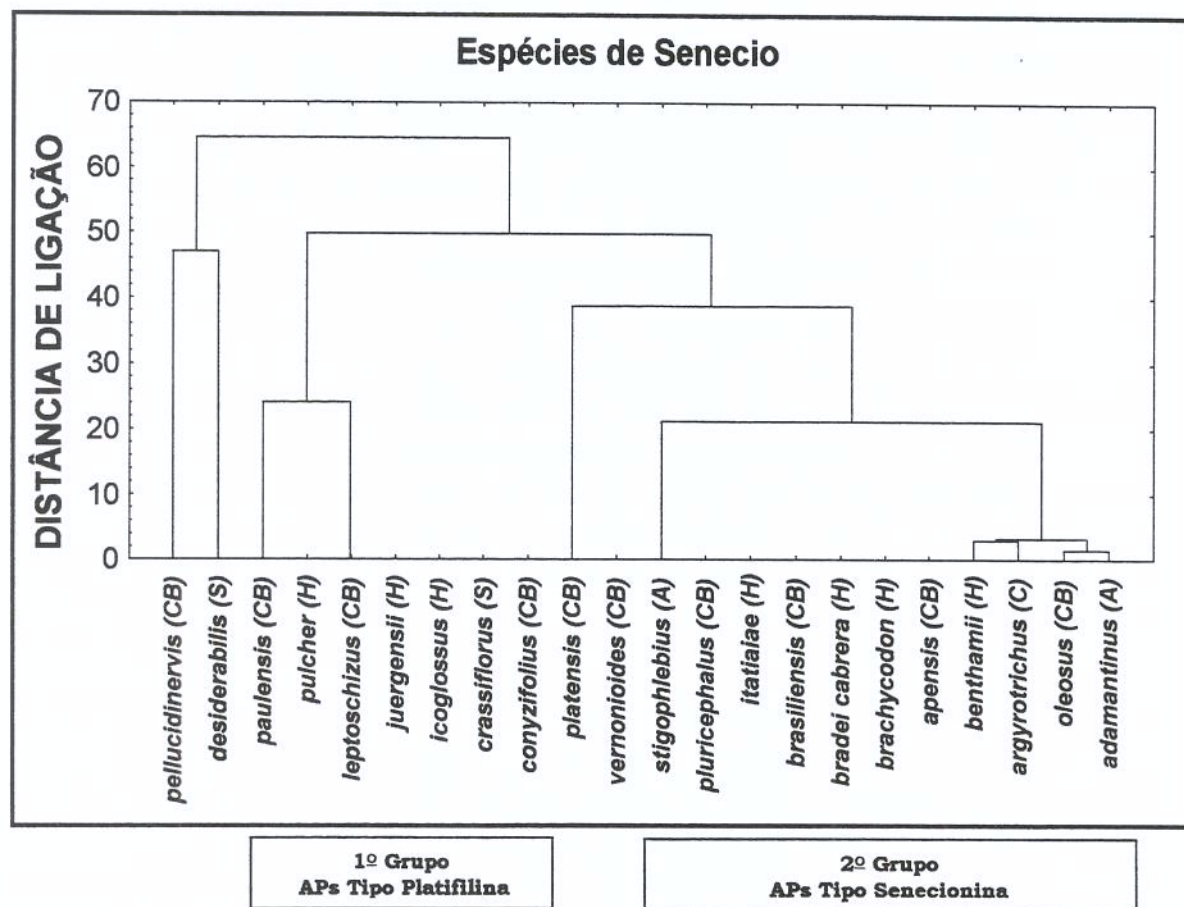


Figura 28. Dendrograma da análise de agrupamento de 22 espécies de *Senecio* e os Tipos APs, encontrados.

A Tabela 17 apresenta os padrões de fragmentação de espectrometria de massas de impacto de elétrons (EM-IE) dos APs encontrados nas espécies do gêneros *Senecio* e *Eupatorium*.

O cromatograma de ions totais (CIT) e os respectivos espectros de massas dos APs presentes nos extratos de duas espécies de *Senecio* estão apresentados, como exemplo, nas Figuras 29 e 30.



**Tabela 17. Fragmentação por impacto de elétrons (EM/IE) dos APs encontrados nas espécies de *Senecio* e *Eupatorium* (TRIGO, 1993 e TRIGO et al. 1996).**

| APs                            | m/z ( abundância relativa, % )                                                                                                                                                                                                           |
|--------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                | Impacto de elétrons                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Retronecina</b>             | [M] <sup>+</sup> 155 (18), 111 (52), 94 (16), 80 (100)                                                                                                                                                                                   |
| <b>Tipo Triangularina (B1)</b> | [M] <sup>+</sup> 237 (40), 218 (<1), 154 (4), 138 (2), 137 (24), 136 (15), 124 (92), 111 (33), 106 (38), 94 (20), 83 (23), 80 (100), 68 (8), 55 (16), 53 (9).                                                                            |
| <b>Tipo Triangularina (B2)</b> | [M] <sup>+</sup> 237 (1), 219 (<1), 193 (3), 155 (9), 154 (90), 139 (1), 138 (16), 137 (21), 136 (12), 126 (8), 120 (2), 108 (4), 94 (22), 93 (100), 92 (4), 83 (18), 80 (16), 67 (6), 55 (12), 53 (3)                                   |
| <b>Tipo Licopsamina (C1)</b>   | [M] <sup>+</sup> 299 (<1), 255 (<1), 254 (<1), 236 (6), 156 (7), 139 (35), 138 (97), 120 (9), 108 (3), 94 (63), 93 (100) 80 (18), 67 (13), 53 (8), 43 (30).                                                                              |
| <b>Iso- Licopsamina (C6)</b>   | [M] <sup>+</sup> 299 (5), 281 (7), 248 (4), 236 (6), 156 (46), 138 (52), 120 (51), 111 (65), 108 (40), 106 (55), 94 (35), 80 (100), 68 (15), 43 (70).                                                                                    |
| <b>Tipo Licopsamina (C4)</b>   | [M] <sup>+</sup> 341 (20), 326 (1), 298 (10), 255 (25), 254 (15), 181 (6), 156 (3), 139 (18), 138 (100), 137 (91), 136 (12), 120 (10), 108 (3), 99 (7), 93 (81), 80 (12), 67 (10), 53 (5), 43 (38).                                      |
| <b>Tipo Supinina (C2)</b>      | [M] <sup>+</sup> 283 (<1), 268 (<1), 239 (<1), 140 (7), 123 (26), 122 (100), 121 (36), 120 (45), 108 (14), 93 (20), 80 (11), 70 (10), 53 (9), 43 (21).                                                                                   |
| <b>Diidrollicopsamina (C8)</b> | [M] <sup>+</sup> 285 (<1), 267 (3), 252 (2), 241 (1), 240 (3), 226 (1), 142 (51), 124 (100), 83 (26), 70 (9), 55 (23), 43 (16).                                                                                                          |
| <b>Monocrotalina</b>           | [M] <sup>+</sup> 325 (<1), 282 (<1), 239 (3), 140 (3), 123 (20), 122 (100), 121 (40), 120 (48), 108 (12), 93 (20), 80 (9), 70 (8), 53 (6), 43 (25).                                                                                      |
| <b>Diidrollicopsamina (C9)</b> | [M] <sup>+</sup> 301 (ausente), [M] <sup>+</sup> -H <sub>2</sub> O 283 (3), 268 (3), 258 (1), 257 (2), 256 (3), 240 (6), 158 (75), 140 (35), 120 (12), 122 (14), 114 (20), 97 (21), 96 (34), 95 (51), 82 (100), 70 (6), 69 (6), 55 (13). |
| <b>Tipo Triangularina (B3)</b> | [M] <sup>+</sup> 239 (<1), 156 (57), 139 (86), 113 (15), 108 (10), 83 (15), 82 (100), 55 (15).                                                                                                                                           |
| <b>Tipo Triangularina (B4)</b> | [M] <sup>+</sup> 239 (5), 221 (10), 156 (2), 140 (10), 122 (11), 96 (40), 95 (100), 83 (10), 82 (90), 55 (20).                                                                                                                           |
| <b>Tipo Platifilina (A2)</b>   | [M] <sup>+</sup> 353 (2), 324 (0,3) 282 (1), 242 (1), 227 (25), 180 (1), 154 (51), 138 (100), 122 (20), 82 (39), 43 (39).                                                                                                                |
| <b>Tipo Senecionina (A1)</b>   | [M] <sup>+</sup> 351 (ausente), 246 (8), 220 (20), 138 (30), 137 (18), 136 (98), 121 (30), 120 (100), 119 (84), 95 (38), 94 (58), 93 (70), 80 (20), 67 (10), 55 (12), 53 (15).                                                           |



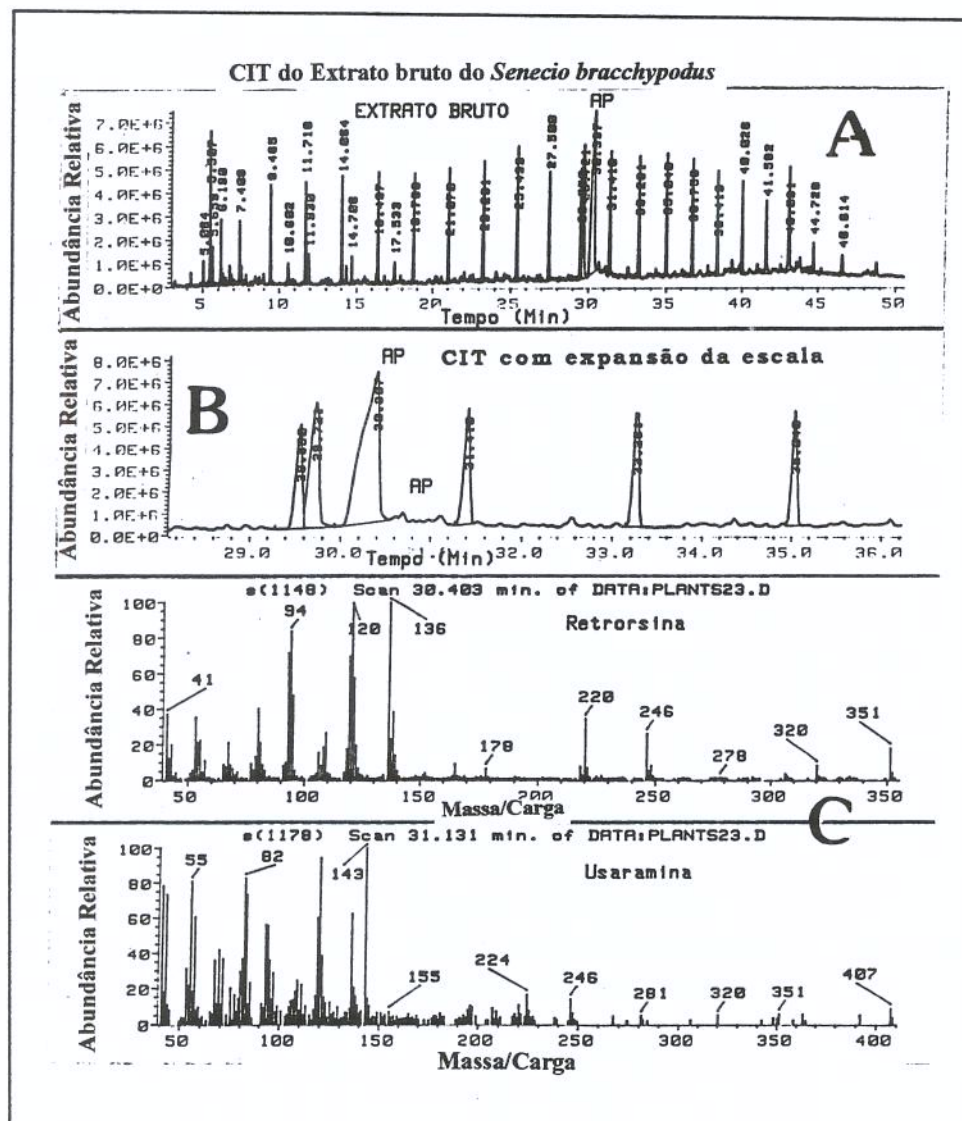


Figura 29. Cromatograma (A) de ions totais (CIT) do extrato bruto metanolico das inflorescências da espécie: *Senecio brachypodus* e EM-IE (\*B e C) dos APs identificados.

\* CIT com expansão da escala

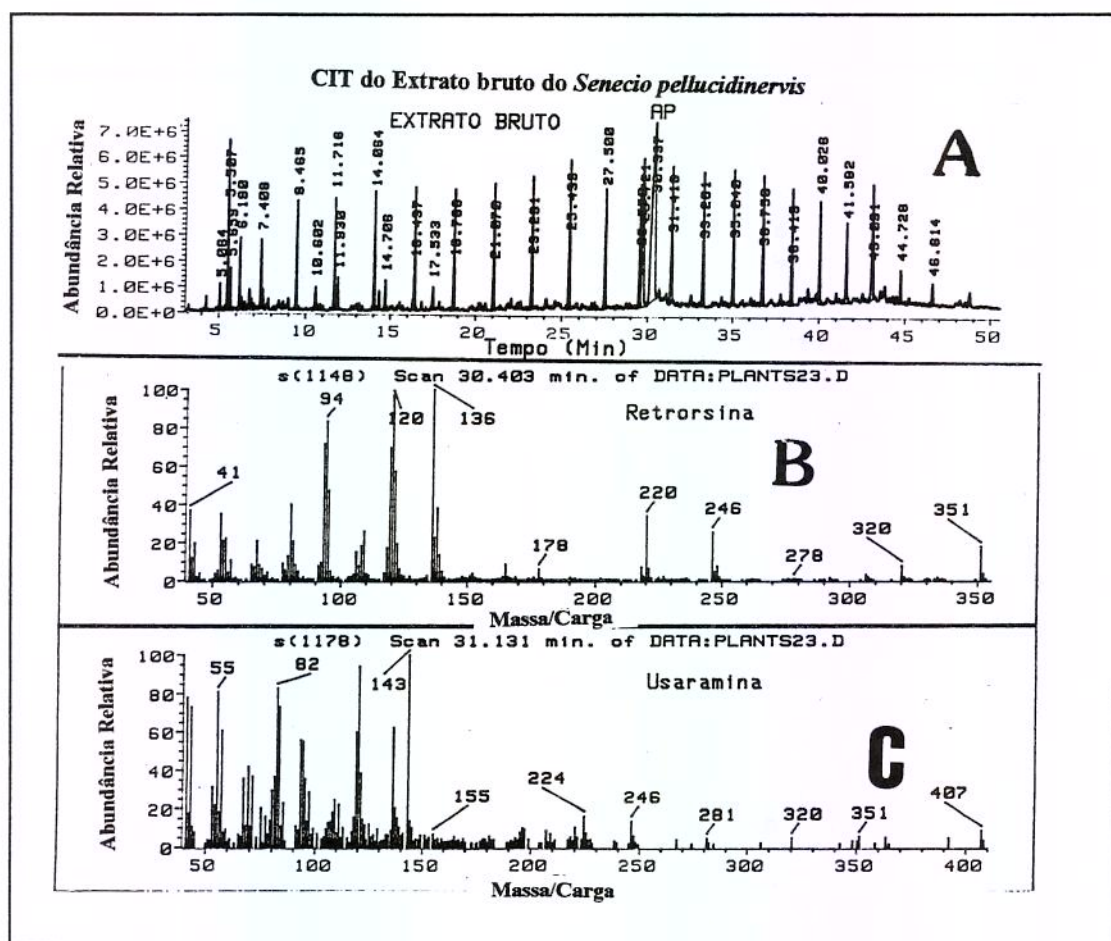


Figura 30. Cromatograma (A) de íons totais (CIT) do extrato bruto metanólico extrato metanólico das inflorescências da espécie: *Senecio pellucidinervis* e EM-IE (B e C) dos APs identificados.

### 5.1.2 Identificação de APs em espécies de *Eupatorium*

Da mesma forma que para o *Senecio*, foram realizadas análises estatísticas AAH (PIELON, 1984) em inflorescências de 87 espécies de *Eupatorium*, a partir dos dados de abundância relativas obtidos nas análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, como mostrado nas Tabelas 18 e 19.







**Tabela 19. Tipos e Subtipos de APs encontrados em espécies de *Eupatorium* e os valores de abundância relativa (%).**

[illegible][illegible]



O Gráfico da Figura 31, mostra os resultados das análises estatísticas, onde podemos observar um **1º grupo** que engloba 32 espécies *Eupatorium* (listadas abaixo), que apresentaram majoritariamente APs do **Tipo Licopsamina (C1)**, Figura 27.

|                         |                        |                          |
|-------------------------|------------------------|--------------------------|
| <i>E.tanacetifolium</i> | <i>E.clemotidium</i>   | <i>E.ganofilum</i>       |
| <i>E.spathulatum</i>    | <i>E.bracteatum</i>    | <i>E.chlorolepis</i>     |
| <i>E.riedel</i>         | <i>E.betoniceforme</i> | <i>E.tweendieanum</i>    |
| <i>E.paucidentatum</i>  | <i>E.amphydium</i>     | <i>E.odorum</i>          |
| <i>E.maximilianii</i>   | <i>E.vauthierianum</i> | <i>E.capilaris</i>       |
| <i>E.laevigatum</i>     | <i>E.itatiayensis</i>  | <i>E.sanctopaulensis</i> |
| <i>E.kleinoides</i>     | <i>E.purpurascense</i> | <i>E.macrocephalum</i>   |
| <i>E.intermedium</i>    | <i>E.myriocephalum</i> | <i>E.macrophyllum</i>    |
| <i>E.erodifolium</i>    | <i>E.lundianum</i>     | <i>E.trixoides</i>       |
| <i>E.coriaceum</i>      | <i>E.inulaefolium</i>  | <i>E.amiglalinum</i>     |
| <i>E.congestum</i>      | <i>E.myrtilloide</i>   |                          |

O **2º grupo**, engloba doze espécies de *Eupatorium* que apresentaram APs dos **Tipos Licopsamina (C1) e Supinina (C2)**.

|                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| <i>E.adamantinum</i>  | <i>E.bupleurifolium</i> |
| <i>E.asperium</i>     | <i>E.campestre</i>      |
| <i>E.thysanolepis</i> | <i>E.barbacense</i>     |
| <i>E.megacefalum</i>  | <i>E.vitalbae</i>       |
| <i>E.velutinum</i>    | <i>E.laeterrens</i>     |
| <i>E.ascende</i>      | <i>E.candleanum</i>     |

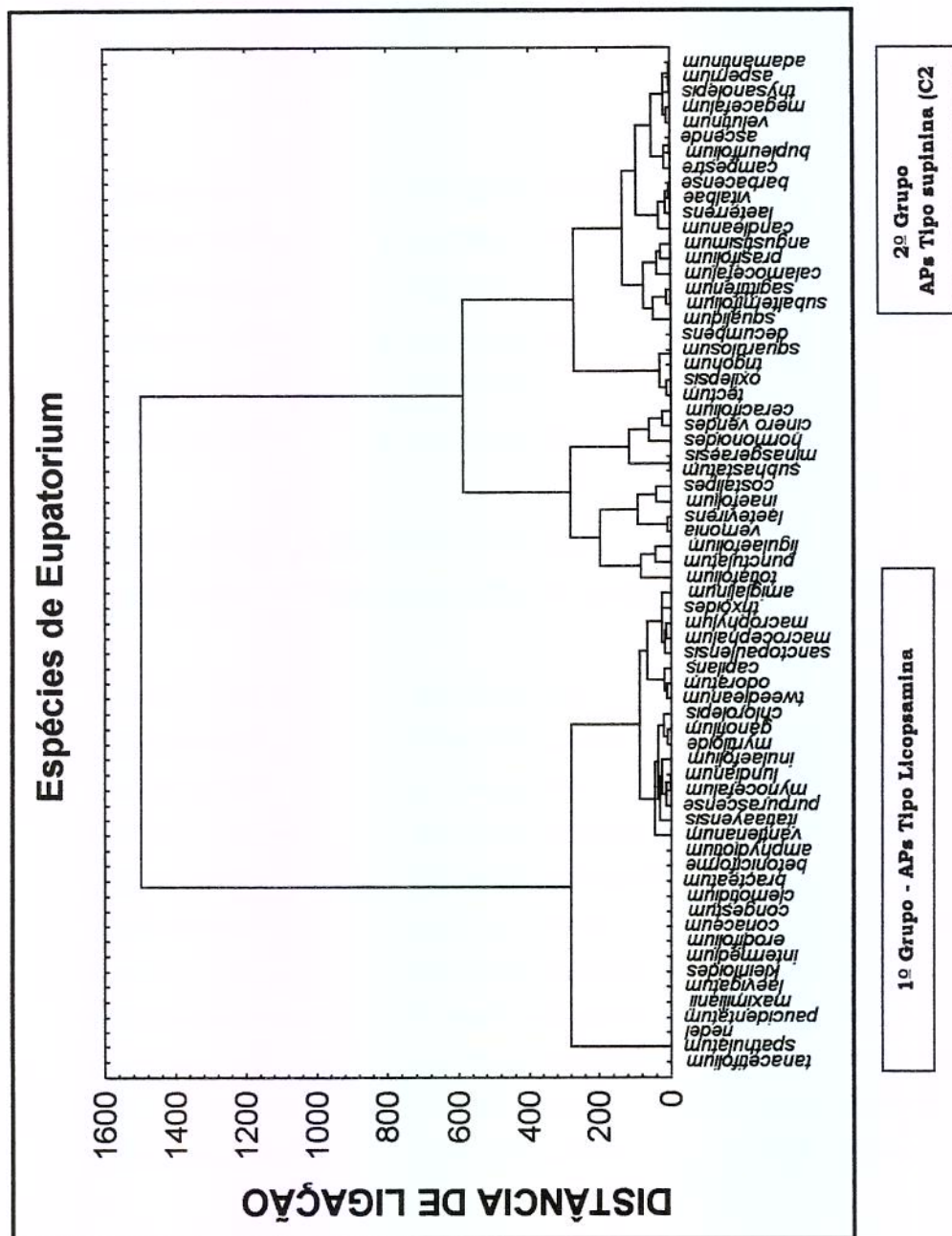


Figura 31. Dendrograma da análise de agrupamento de 67 espécies de *Eupatorium* e os Tipos de APs encontrados

O **3º grupo** engloba as espécies *E.decumbens*, *E.squarulosum*, *E.trigonum*, *E.oxilepsis* e *E.tectum*, onde foram detectados majoritariamente APs do **Tipo Supinina (C2)**, como majoritário.

O **4º grupo**, engloba apenas duas espécies: *E.vernonia* e *E.laetevirens*, apresentou APs do **Tipo Licopsamina (C1) e Subtipo diidrolicopsamina (C8)**.

O **5º grupo**, englobando as espécies: *E.subalternifolium* e *E.sagittiferum*, onde foram identificados misturas de APs dos **Tipos Licopsamina (C1), Supinina (C2) e diidrosupinina (C7)**.

O **6º grupo** engloba as espécies *E.prasifolium* e *E.angustissimum*, também foram identificados mistura de alcalóides de quatro Tipos: **Licopsamina (C1), Supinina (C2) e Triangularina (subtipos B1 e B3)**.

De acordo com a análise estatística podemos observar no gráfico da Figura 31, que doze espécies *Eupatorium* não pertencem a nenhum grupo por apresentarem misturas de vários tipos de APs, como mostrado abaixo:

*E.totiafolium* - **APs Tipos C1, B1, B2 e B3**

*E.punctulatum* - **APs Tipos C1, B1, e B3**

*E.lingulaefolium* - **APs Tipos C1, C2, B1, B3 e B4**

*E.inaefolium* - **APs Tipos C1 e C8**

*E.costalipes* - **AP Tipo C8**

*E.subhastatum* - **APs Tipos C1 e C7**

*E.minasgeraensis* - **APs Tipo C7**

*E.hormonoides* - **APs Tipos C1, C7 e B3**

*E.cinero verides* - **APs Tipos C1, C7 e B3**

*E.ceracifolium* - **APs Tipos C1 e C7**

*E.squalidum* - **APs Tipos C2 e C7**

*E.calamocephalum* - **APs Tipos C1, C2, B2 e B3.**



As análises cromatográficas, por CG-EM, revelaram que a composição química dos APs identificados nas espécies de *Eupatorium* possui um perfil de similaridade, quando o padrão principal foi APs do **Tipo Licopsamina (C1)** monoésteres ou diésteres insaturados e saturados. Entretanto APs do **Tipo Triangularina (B)** com monoésteres ou diésteres saturados (**B1 e B2, M+ 239**) e monoésteres ou diésteres insaturados (**B3 e B4, M+ 237**), **Tipo Supinina e Iso-APs** (Figura 27) também ocorrem em quantidades variáveis.

Dentre as espécies de *Eupatorium*, as que apresentaram uma maior variedades de APs foram:

|                         |                           |
|-------------------------|---------------------------|
| <i>E.angustisimum</i>   | <i>E.santctopaulensis</i> |
| <i>E.calamocephalum</i> | <i>E.tectum</i>           |
| <i>E.campestre</i>      | <i>E.totiafolium</i>      |
| <i>E.chlorolepis</i>    | <i>E.trixoides</i>        |
| <i>E.ligulaefolium</i>  | <i>E.tweedieanum</i>      |
| <i>E.macrocephalum</i>  | <i>E.velutinum</i>        |

Algumas das espécies de *Eupatorium* estudadas, apresentaram APs apenas como traços:

|                          |                        |
|--------------------------|------------------------|
| <i>E.castatipes</i>      | <i>E.hirsutissimum</i> |
| <i>E.publeurifolium</i>  | <i>E.pyrifolium</i>    |
| <i>E.gaudichaudianum</i> | <i>E.squarulosum</i>   |
| <i>E.hecatanthum</i>     |                        |

Das 87 espécies de *Eupatorium* analisadas, 13 espécies (listadas abaixo) não apresentaram nenhum tipo de APs.

|                        |                    |
|------------------------|--------------------|
| <i>E.crenulatum</i>    | <i>E.ostenii</i>   |
| <i>E.dendroide</i>     | <i>E.palmari</i>   |
| <i>E.dimorpholepis</i> | <i>E.paulensis</i> |
| <i>E.laxum</i>         | <i>E.riedelii</i>  |
| <i>E.molissimum</i>    | <i>E.refescens</i> |
| <i>E.multifidum</i>    | <i>E.serratum</i>  |
| <i>E.nemularia</i>     |                    |



Utilizando o padrão de APs foi possível realizar uma análise estatística AAH (Distância Euclidiana, método de Ward), para as espécies de *Eupatorium*, estabelecendo uma distribuição mais consistente e segura entre as mesmas, e também verificar que esta se ajustava com a classificação de HARTAMANN & WITTE (1995).

Nas Figuras 32 e 33, estão apresentados os cromatogramas de ions totais (CIT) e os espectros de massas dos APs presentes no extrato bruto de duas espécies de *Eupatorium*.

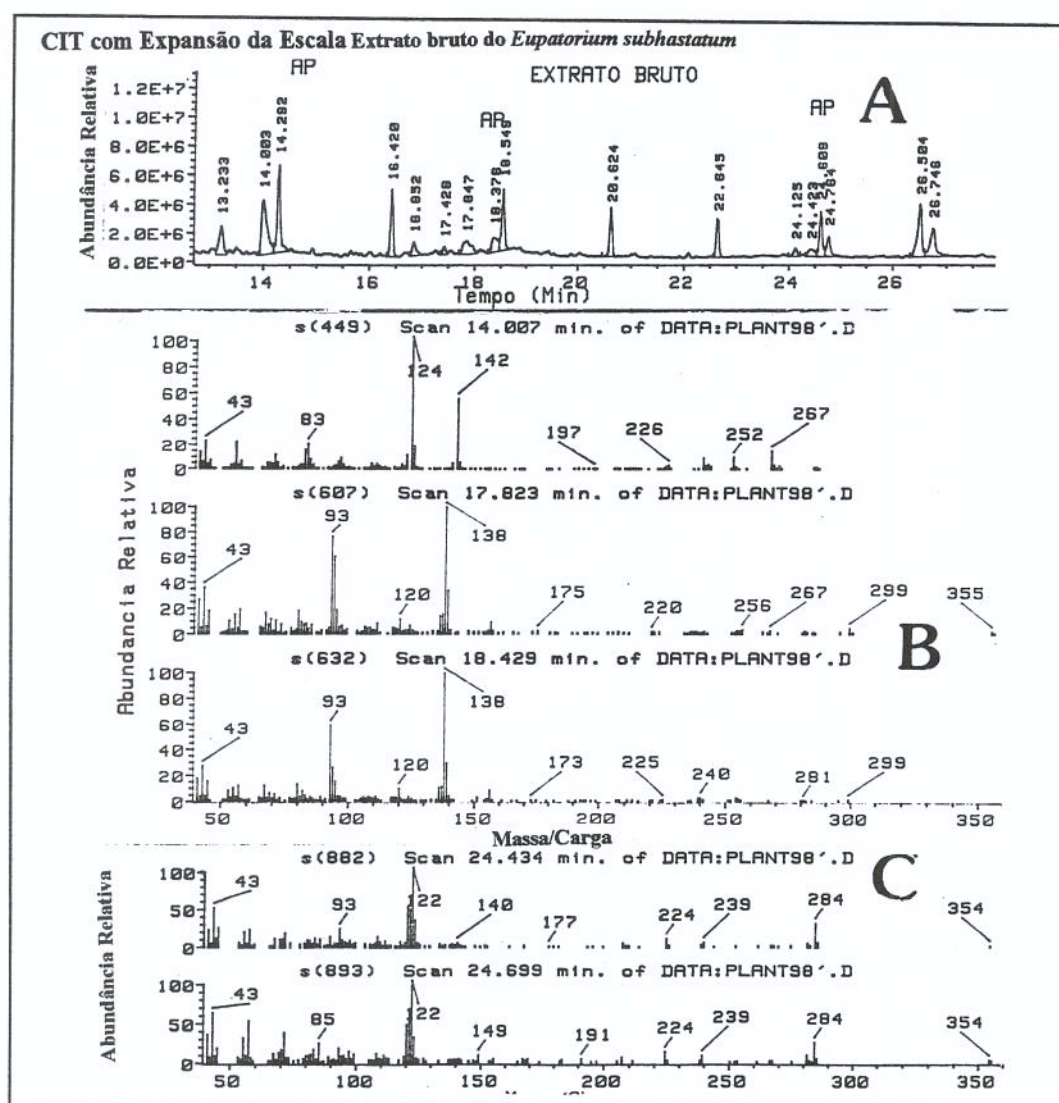
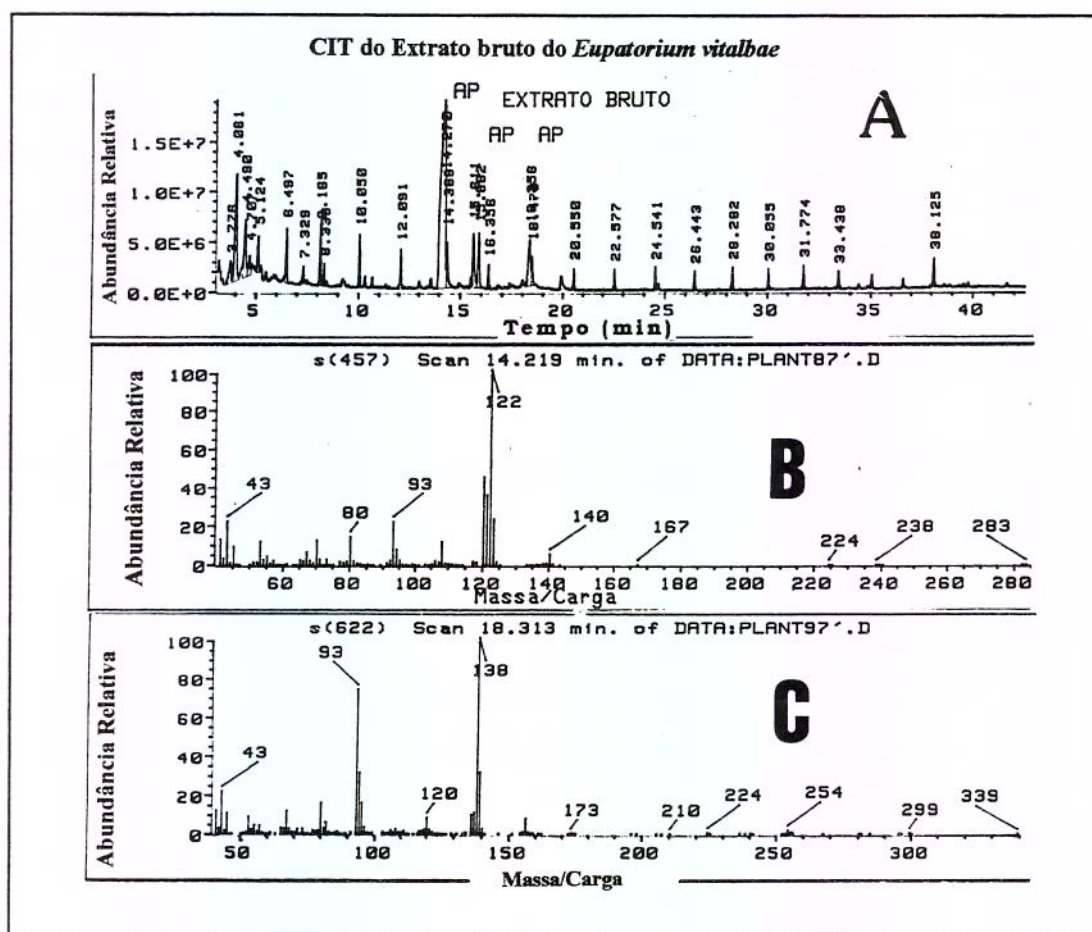


Figura 32. Cromatograma \*(A) de ions totais (CIT) do extrato bruto metanolico das inflorescências da espécie: *Eupatorium subhastatum* e EM-IE (B e C) dos APs identificados.

\* CIT com expansão da escala



**Figura 33. Cromatograma (A) de íons totais (CIT) do extrato metanólico das inflorescências da espécie: *Eupatorium vitalbae* e EM-IE (B e C) dos APs identificados.**

### 5.1.3 Identificação de APs em *Heliotropium indicum*

Infusões da planta toda (mistura de todas as partes da planta), da raiz e das folhas foram preparadas e analisadas qualitativamente quanto a presença de APs.

Na Tabela 20 estão descritos os resultados destas análises.

**Tabela 20. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de APs em *H.indicum*. Índice de retenção (IR) de van den DOOL e KRATZ, massa molecular (M+) e abundância relativa (%).**

| *APs                    | M+  | IR   | Abundância relativa (%) |         |        |
|-------------------------|-----|------|-------------------------|---------|--------|
|                         |     |      | Planta toda             | Raiz    | Folhas |
| <b>Iso-indicina</b>     | 299 | 2114 | **0,50                  | traço   | **1,50 |
| <b>Indicina</b>         | 299 | 2144 | 45,00                   | **51,47 | 75,30  |
| <b>Tipo Licopsamina</b> | 299 | 2153 | 29,50                   | traço   | 6,00   |
| <b>Tipo Licopsamina</b> | 299 | 2162 | 17,00                   | 48,53   | 17,20  |
| <b>Tipo Licopsamina</b> | 299 | 2230 | 8,00                    | traço   | -      |

\*. Estruturas mostradas na Figura 27

\*\*. Abundância Relativa

O extrato bruto aquoso das folhas apresentou majoritariamente APs monoésteres **Tipo Licopsamina**.

No extrato bruto aquoso da raiz foram detectados os APs **Indicina (C3)** e um AP **Tipo Licopsamina (C)** em quantidades relativamente iguais, com abundância relativa de 40 a 50%.

O extrato bruto aquoso da planta toda apresentou, além dos três alcalóides já citados, um outro **Tipo Licopsamina**.

O AP Iso-Indicina foi detectado em quantidades baixas tanto na planta toda quanto na raiz.

O extrato bruto das inflorescências de *Heliotropium indicum*, apresentou majoritariamente o AP Indicina, cujo cromatograma de íons totais (CIT) e o espectro de massas estão apresentados na Figura 34.



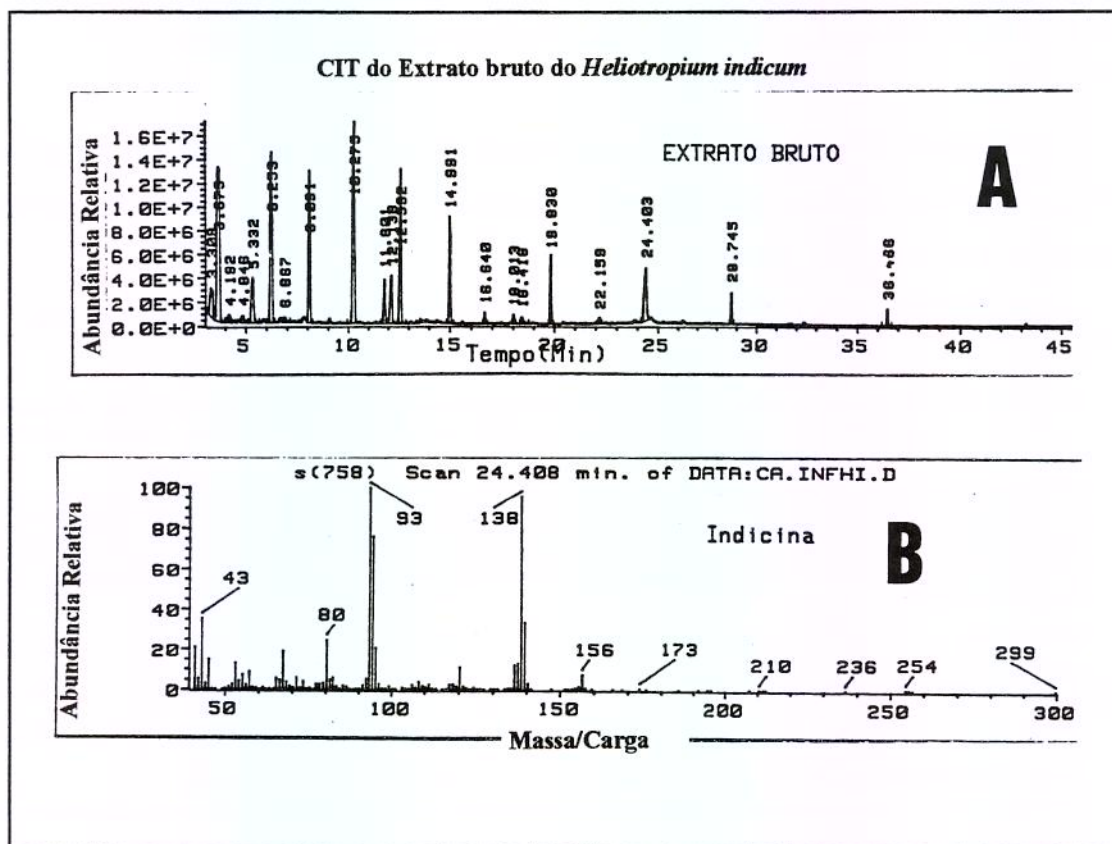


Figura 34. Cromatograma (A) de íons totais (CIT) do extrato bruto metanólico das inflorescências de *Heliotropium indicum* e EM-IE (B) do AP identificado.

#### 5.1.4 Identificação de APs em *Heliotropium transalpinum*

Os resultados das análises realizadas por cromatografia gasosa e espectrometria de massas dos extratos das folhas, sementes e caule estão apresentados na Tabela 21.

O extrato das folhas de *Heliotropium transalpinum* apresentaram um derivado acetilado do AP **Supinina**, seguido de outro do **Tipo Licopsamina**. Também foi identificado um AP monoéster acetilado na posição **C3** com abundância relativa de 40%.

No extrato das sementes foram identificados quatro tipos de alcalóides, um **Tipo Supinina (C2)**, um derivado acetilado **Tipo Supinina (C2)**, um **Tipo Licopsamina** e por fim um derivado



acetilado da Licopsamina, cada um com abundância relativa praticamente equivalentes (20%).

O extrato do caule apresentou seis tipos de alcalóides, sendo que os mais abundante são do **Tipo Supinina**, seguido de um derivado da Supinina acetilado na posição **C3** e de três APs minoritários.

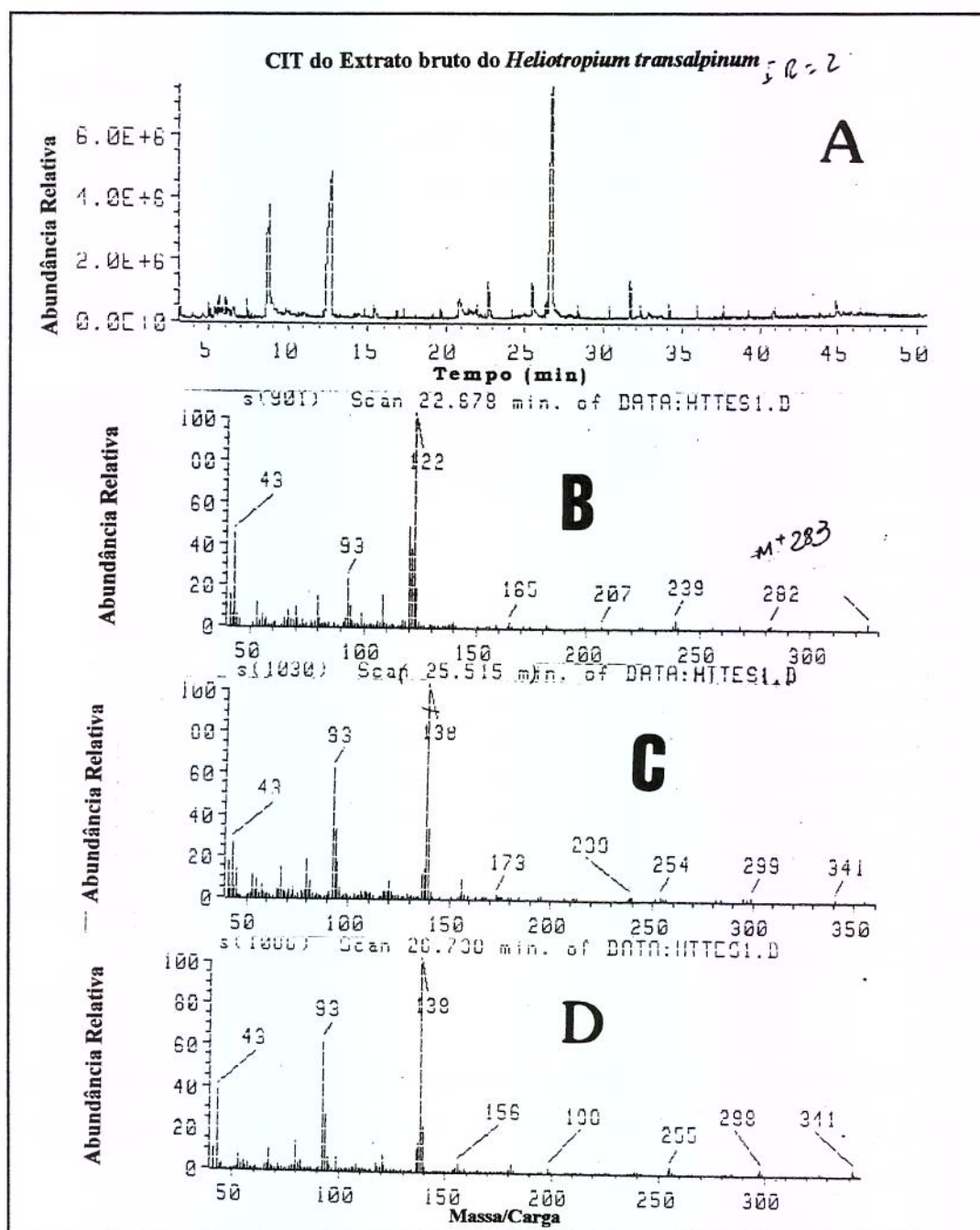
Tabela 21. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de APs em *H. transalpinum*. Massas molecular ( M+), Índice de Retenção (IR) de van den DOOL & KRATZ e abundância relativa (% ).

| *APs                      | M+   | IR   | Abundância relativa (%) |          |         |
|---------------------------|------|------|-------------------------|----------|---------|
|                           |      |      | Folhas                  | Sementes | Caule   |
| Subtipo supinina          | 283? | 2019 | -                       | **23,79  | -       |
| Subtipo supinina          | ?    | 2031 | -                       | -        | **32,30 |
| Subtipo supinina          | ?    | 2038 | -                       | -        | 28,14   |
| Subtipo 3'OAc-supinina    | 325  | 2087 | **32,00                 | -        | -       |
| Subtipo 3'Oac-supinina    | 325  | 2099 | -                       | 28,79    | -       |
| Subtipo 3'Oac-supinina    | 325  | 2115 | -                       | -        | 20,10   |
| Tipo Licopsamina          | 299  | 2198 | -                       | -        | 4,5     |
| Tipo Licopsamina          | 299  | 2214 | 26,20                   | -        | -       |
| Tipo Licopsamina          | 299  | 2224 | -                       | 21,42    | 5,07    |
| Subtipo 7'OAc-Licopsamina | 341  | 2259 | traço                   | -        | -       |
| Subtipo 3'OAc-Licopsamina | 341  | 2272 | 41,80                   | 26,63    | -       |
| Subtipo 3'OAc-Licopsamina | 341  | 2285 | -                       | -        | 9,89    |

\*. Estruturas mostradas na Figura 27

\*\*. Abundância Relativa

O cromatograma do extrato bruto e espectros de massas dos APs detectados nos extratos da planta *Heliotropium transalpinum* estão apresentados nas Figuras 35.



**Figura 35. Cromatograma ions totais-CIT (A) do extrato bruto metanolico e EM-IE (B, C e D) dos APs presentes em *Heliotropium transalpinum*.**

### 5.1.5 Identificação de APs em *Ageratum conyzoides*

O resultado da análise quantitativa, através do método colorimétrico, realizada nos extratos das inflorescências, folhas, caule e em amostra comercial (planta toda moída) de *Ageratum conyzoides* esta descrito na Tabela 22. O extrato das inflorescências apresentou uma maior quantidade de alcalóides totais em relação às outras partes da planta.

Foram realizadas análises qualitativas, por CG-EM nas infusões preparadas a partir das inflorescências, folhas, caule, raiz e da planta toda. Os resultados são mostrados na Tabela 23.

A infusão das inflorescências apresentou cinco tipos de alcalóides: um **Tipo Triangularina**, sugerimos ser o AP **9-O-Senecioilretronecina (B3)**, a **Licopsamina (C1)** e três AP do **Tipo Licopsamina (C)**.

O caule apresentou apenas um tipo de alcalóide, um derivado **acetilado da Licopsamina**.

O extrato da raiz apresentou sete tipos de APs, dentre estes um **diéster aberto (C9)**, como majoritário.

O extrato da planta toda apresentou APs do **Tipo Triangularina (B)** e do **Tipo Licopsamina (C1)**, como majoritário.

Os cromatogramas de íons totais e o espectro de massas dos APs encontrados no extrato da planta *Ageratum conyzoides* estão apresentados nas Figuras 36.

Tabela 22. Análise colorimétrica de APs em *Ageratum conyzoides*.

| Partes da planta  | µg APs /g * |
|-------------------|-------------|
| Inflorescências   | 359         |
| Folhas            | 35          |
| Caule             | <5          |
| Amostra comercial | 1898        |

\* Peso seco da planta



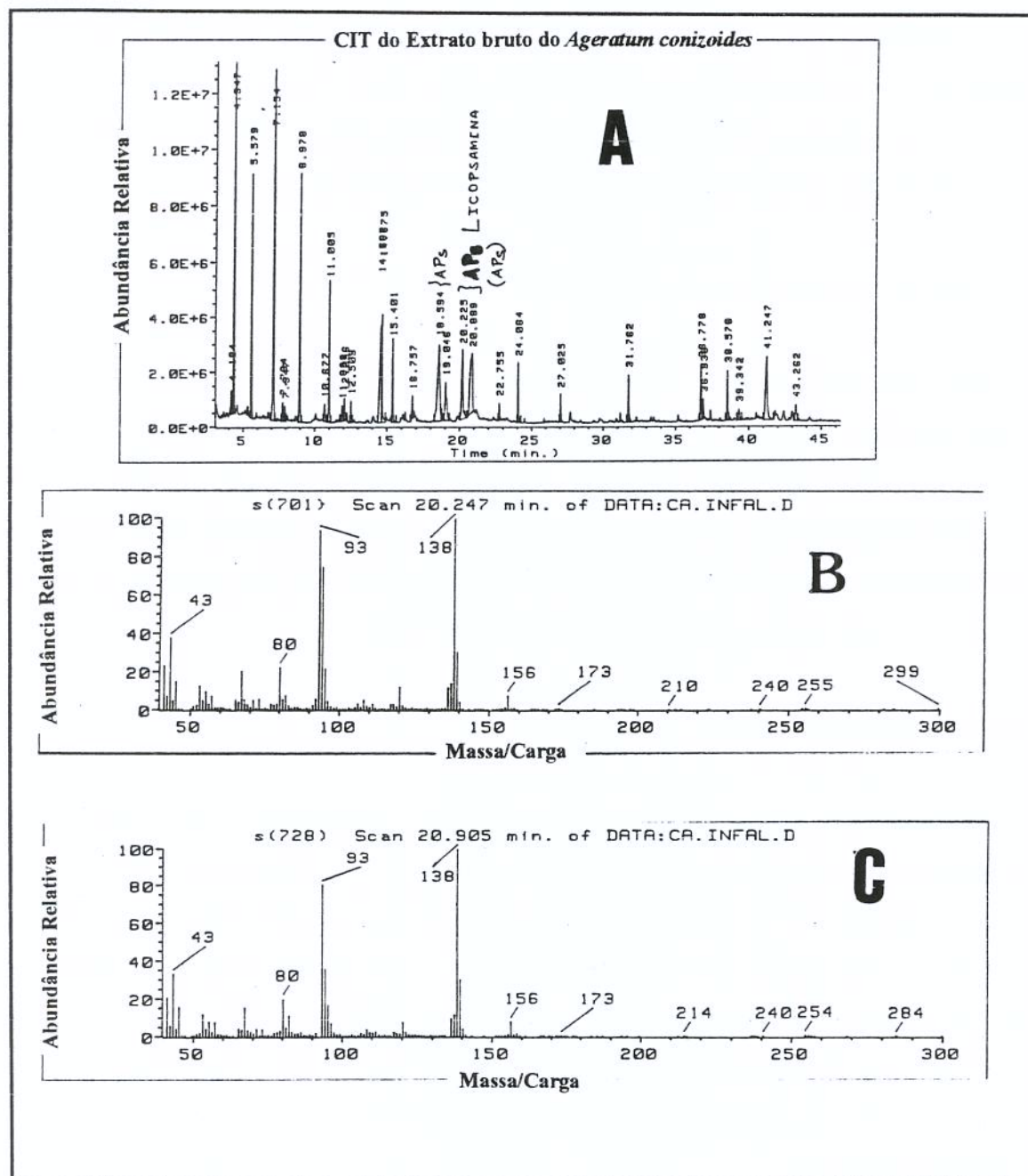
**Tabela 23. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de APs em *Ageratum conyzoides*. Massa molecular (M+), Índice de retenção, e ( IR ) de van den Dool & Kratz e Abundância relativa ( Ab.R % ).**

| *APs                         | M+  | IR   | Abundância relativa (%) |         |          |        |             |
|------------------------------|-----|------|-------------------------|---------|----------|--------|-------------|
|                              |     |      | Inflorescências         | Folhas  | Caule    | Raiz   | Planta toda |
| Tipo Triangularina           | 237 | 1805 | **16,91                 | -       | traço    | **4,63 | -           |
| Tipo Triangularina           | 237 | 1874 | -                       | -       | -        | -      | **27,44     |
| Tipo Lícopsamina?            | 239 | 1925 | 9,49                    | -       | traço    | -      | -           |
| Tipo Lícopsamina?            | 239 | 1952 | 18,15                   | **72,33 | -        | -      | -           |
| Subtipo Supinina             | ?   | 1964 | traço                   | -       | -        | -      | -           |
| Subtipo Supinina             | 283 | 1990 | -                       | -       | -        | 5,69   | -           |
| Subtipo Supinina             | ?   | 2017 | traço                   | -       | -        | traço  | -           |
| Subtipo didrosupinina        | 285 | 2124 | -                       | -       | traço    | -      | -           |
| Tipo Lícopsamina             | 299 | 2162 | 5,62                    | 27,67   | traço    | -      | 18,33       |
| Lícopsamina                  | 299 | 2174 | 49,83                   | -       | -        | -      | -           |
| Tipo Lícopsamina?            | 299 | 2184 | -                       | traço   | traço    | 2,72   | 54,23       |
| Tipo acetil 3'OH-Lícopsamina | 341 | 2278 | -                       | -       | **100,00 | -      | -           |
| Subtipo didrosupinina        | ?   | 2282 | -                       | -       | -        | 7,71   | -           |
| Subtipo didrosupinina        | ?   | 2339 | -                       | -       | -        | traço  | -           |
| Subtipo supinina             | ?   | 2344 | -                       | -       | -        | traço  | -           |
| Subtipo didrosupinina        | ?   | 2373 | -                       | -       | -        | 15,34  | -           |
| Diéster aberto               | ?   | 2483 | -                       | -       | -        | traço  | -           |
| Desconhecido                 | ?   | 2487 | -                       | -       | -        | 9,57   | -           |
| Diéster aberto               | ?   | 2498 | -                       | -       | -        | 34,09  | -           |
| Diéster aberto               | ?   | 2516 | -                       | -       | -        | traço  | -           |

\*. Estruturas mostradas na Figura 27

\*\*. Abundância Relativa





**Figura 36.** Cromatograma de ions totais-CIT (A) do extrato metanolico das inflorescências de *Ageratum conizoides* e EM-IE (B, C) dos APs encontrados.

### 5.1.6 Identificação de APs em espécies de *Crotalaria*

A análise qualitativa por CG-EM dos extratos metanólicos das sementes de *Crotalaria* mostrou APs do **Tipo Senecionina [A]**, do **Tipo Triangularina [B]** e do **Tipo Monocrotalina [D]** de acordo com a classificação adaptada de HARTMANN & WITTE (1995).

#### *Crotalaria lanceolata*

No extrato bruto metanólico das sementes de *Crotalaria lanceolata* foi identificado, através dos padrões de fragmentação um AP monoéster com a base necina saturada (**M+ 213**, IR **1579**), um AP **Tipo Triangularina (M+ 237, IR 1821)** e um alcalóide macrocíclico 1,2-insaturado, **Usaramina (M+ 351, IR 2554)** que posteriormente foi isolado e caracterizado por RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C.

#### *Crotalaria spectabilis*

O extrato bruto metanólico das sementes da *Crotalaria spectabilis* apresentou majoritariamente o AP **Monocrotalina (M+ 325, IR 2266)**. Esse alcalóide foi isolado e a confirmação estrutural foi feita com base em seus espectros de RMN em 1D (RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, DEPT) e 2D (HETCOR e COSY) e comparação com os dados da literatura (RIZK, 1991).

#### *Crotalaria juncea*

A análise por CG-EM do extrato bruto metanólico das sementes de *Crotalaria juncea* mostrou a presença de sete alcalóides: **Usaramina**, **Integerrimina**, **Retronecina**, um **Tipo Senecionina**, um **Tipo Triangularina** e dois APs de estrutura desconhecida. Desta planta foram isolados os APs **Integerrimina** e **Usaramina**. A Figura

37, mostra o cromatograma de íons totais com os respectivos EM-IE dos APs do **Tipo Senecionina** e do **Tipo Triangularina**, identificados nos extratos das espécies de *Crotalaria* estudadas.

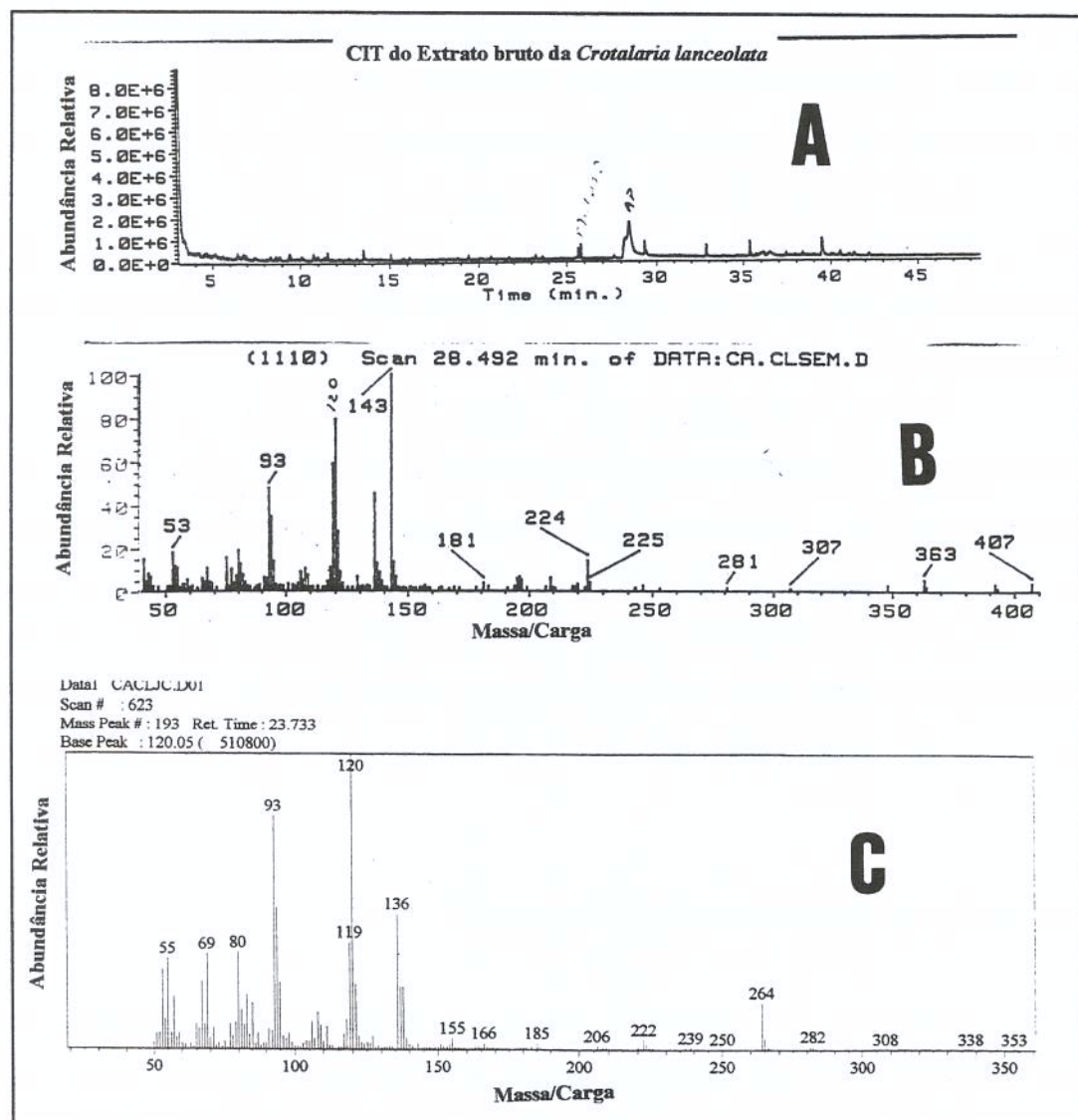


Figura 37. Cromatograma (A) de íons totais (CIT) do extrato bruto metanólico e EM-IE (B e C) dos APs do Tipo Senecionina e do Tipo Triangularina presentes nas espécies de *Crotalaria*.



## 5.2 Isolamento e Caracterização de APs para Utilização nos Testes Toxicológicos.

O isolamento e a caracterização de APs extraídos de plantas envolve numerosas técnicas e metodologias de separação, uma vez que estes compostos existem em extratos de plantas como mistura de diastereoisômeros e isômeros geométricos, requerendo assim técnicas extremamente laboriosas e especiais. Uma ampla revisão bibliográfica sobre metodologias de extração, separação e identificação de APs foi realizada por MATTOCKS (1986); RIZK & HUSSINEY (1991).

A técnica fundamental utilizada neste trabalho, para identificação e caracterização estrutural dos APs, foi a cromatografia gasosa capilar-espectrometria de massas (CG-EM) utilizando-se padrões. Em seguida foi realizado isolamento dos APs que ocorrem em grande quantidade em algumas plantas e sua elucidação estrutural através dos métodos físicos RMN em 1D (RMN<sup>1</sup>H, RMN<sup>13</sup>C, DEPT) e 2D (HETCOR e COSY) comparando-se com os dados da literatura.

### Monoésteres Indicina e Licopsamina

A análise do extrato bruto (planta toda) metanólico do *Heliotropium indicum* por técnicas cromatográficas, TLC e CG-EM, apresentou majoritariamente o AP Indicina (Figura 38).

A Indicina foi isolada e purificada por cromatografia em coluna empacotada com sílica gel impregnada com NaOH 0,1N, conforme descrito por MOHANRAJ *et al.* (1981). O eluente utilizado foi clorofórmio, e posteriormente foram utilizadas quantidades crescentes de metanol. O alcalóide foi obtido como um óleo amarelo, e a análise de seu EM-IE foi consistente com a fragmentação (**m/z**



299, 254, 156, 138 e 93) de APs que possuem esse tipo de estrutura. A estrutura foi confirmada através da comparação dos dados espectrais de RMN<sup>1</sup>H com os dados da literatura (OGAWA *et al.*, 1993) como mostra a (Tabela 24, Figura 39). O espectro de RMN<sup>1</sup>H mostra sinais característicos de um éster da base Retronecina em  $\delta$  5,96 (1H, dl, H-2) e 4,27 (1H, sl, H-7), e de um éster do ácido necico em  $\delta$  4,06 (1H, d, J= 7, H-3'), 1,16 (3H, d, J=6,4; H-4') e  $\delta$  2,13 (1H, sept, H-5').

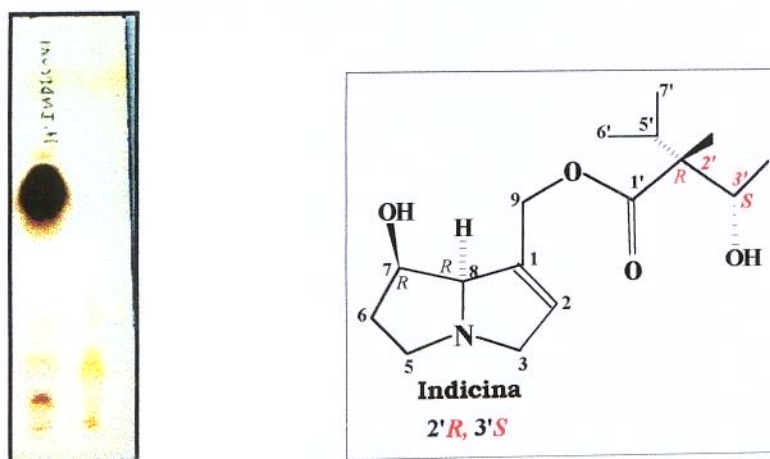
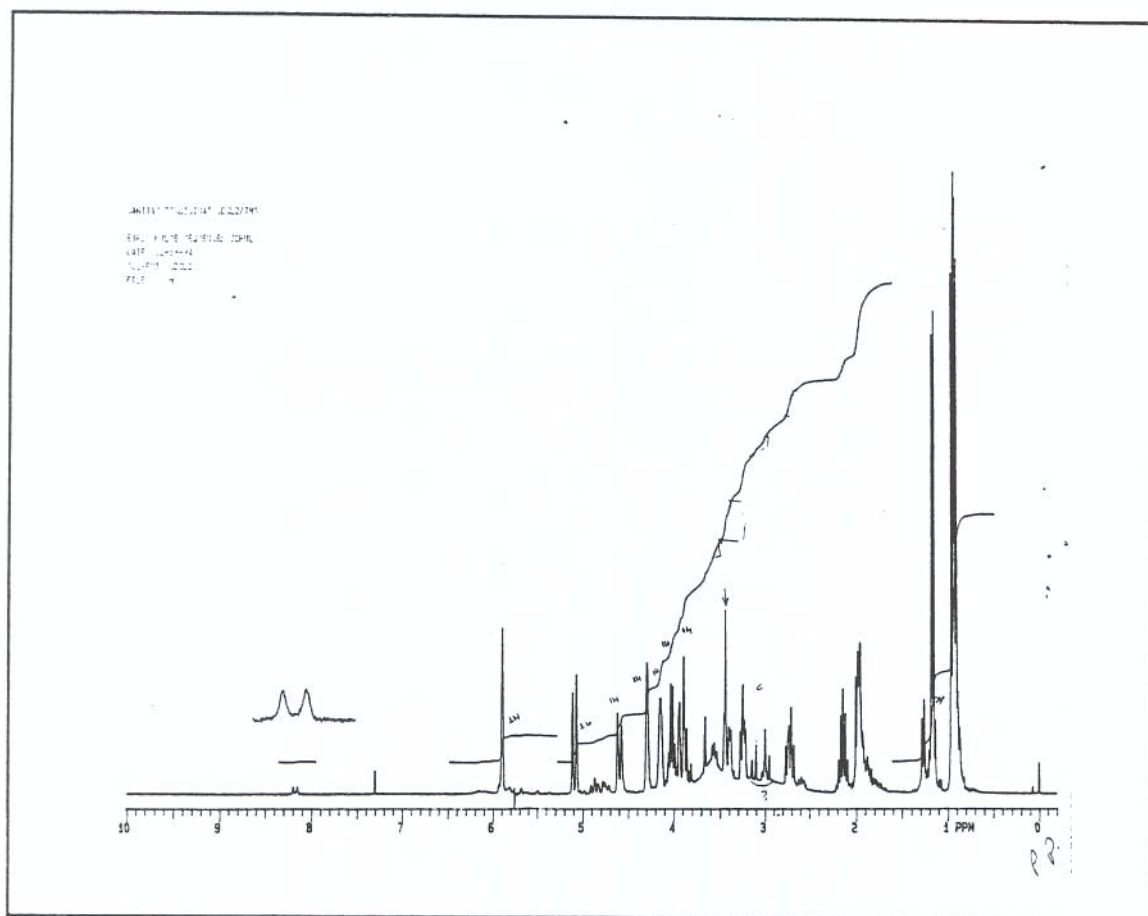


Figura 38. TLC do extrato bruto metanólico (planta toda) do *Heliotropium indicum* e a estrutura da Indicine.

Tabela 24. Deslocamentos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Indicine.

| Formula: C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub><br>Massa: 299 |                                  |           | Dados da Literatura: RMN <sup>1</sup> H (270 HMz, CDCl <sub>3</sub> ). Tetrahedron:49(8),1571-1578,1993. |            |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| Posição                                                                | <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (ppm) | J (Hz)    | <sup>1</sup> H<br>$\delta$ (ppm)                                                                         | J (Hz)     |
| 2                                                                      | 5,90 (dl)                        | -         | 5,94 (sl)                                                                                                | -          |
| 3 $\alpha$                                                             | 3,20-3,40 (dd)                   | 5,8; 13,1 | 3,45 (ddl)                                                                                               | 5,6 ; 15,8 |
| 3 $\beta$                                                              | 3,91 (d)                         | 13,1      | 3,97 (d)                                                                                                 | 15,8       |
| 5 $\alpha$                                                             | 2,67-2,74 (m)                    | -         | 2,75 (m)                                                                                                 | -          |
| 5 $\beta$                                                              | 3,12-3,27 (m)                    | -         | 3,30 (m)                                                                                                 | -          |
| 6 $\alpha$                                                             | 1,90-2,11 (m)                    | -         | 1,90 (d)                                                                                                 | 6,3        |
| 6 $\beta$                                                              | 1,90-2,11 (m)                    | -         | 1,9-2,1 (m)                                                                                              | -          |
| 7                                                                      | 4,27 (sl)                        | -         | 4,30 (s)                                                                                                 | -          |
| 8                                                                      | 4,14 (sl)                        | -         | 4,21 (s)                                                                                                 | -          |
| 9 $\alpha$                                                             | 4,59 (d)                         | 12,5      | 4,60 (d)                                                                                                 | 12,9       |
| 9 $\beta$                                                              | 5,09 (d)                         | 12,5      | 5,12 (d)                                                                                                 | 12,9       |
| 1'                                                                     | -                                | -         | -                                                                                                        | -          |
| 2'                                                                     | -                                | -         | -                                                                                                        | -          |
| 3'                                                                     | 4,06 (d)                         | 6,4       | 4,05 (q)                                                                                                 | 6,3        |
| 4' (CH <sub>3</sub> )                                                  | 1,16 (dd)                        | 6,4       | 1,19 (d)                                                                                                 | 6,3        |
| 5'                                                                     | 2,13 (sept)                      | 7,0       | 2,15 (qq)                                                                                                | 6,9        |
| 6' (CH <sub>3</sub> )                                                  | 0,93 (d)                         | 7,0       | 0,93 (d)                                                                                                 | 6,9        |
| 7' (CH <sub>3</sub> )                                                  | 0,96 (d)                         | 7,0       | 0,96 (d)                                                                                                 | 6,9        |



**Figura 39. RMN<sup>1</sup>H da Indicina.**

O alcalóide Licopsamina foi extraído da planta *Ageratum conizoides* e purificado do mesmo modo que a Indicina.

A identificação deste AP foi realizada somente por CG-EM através da comparação com o padrão de referência, isolado anteriormente por TRIGO, (1993). A análise do EM-IE (Figura 40) mostrou a fragmentação padrão (**m/z 299, 254, 138, 137, 93**) para este tipo de estrutura.

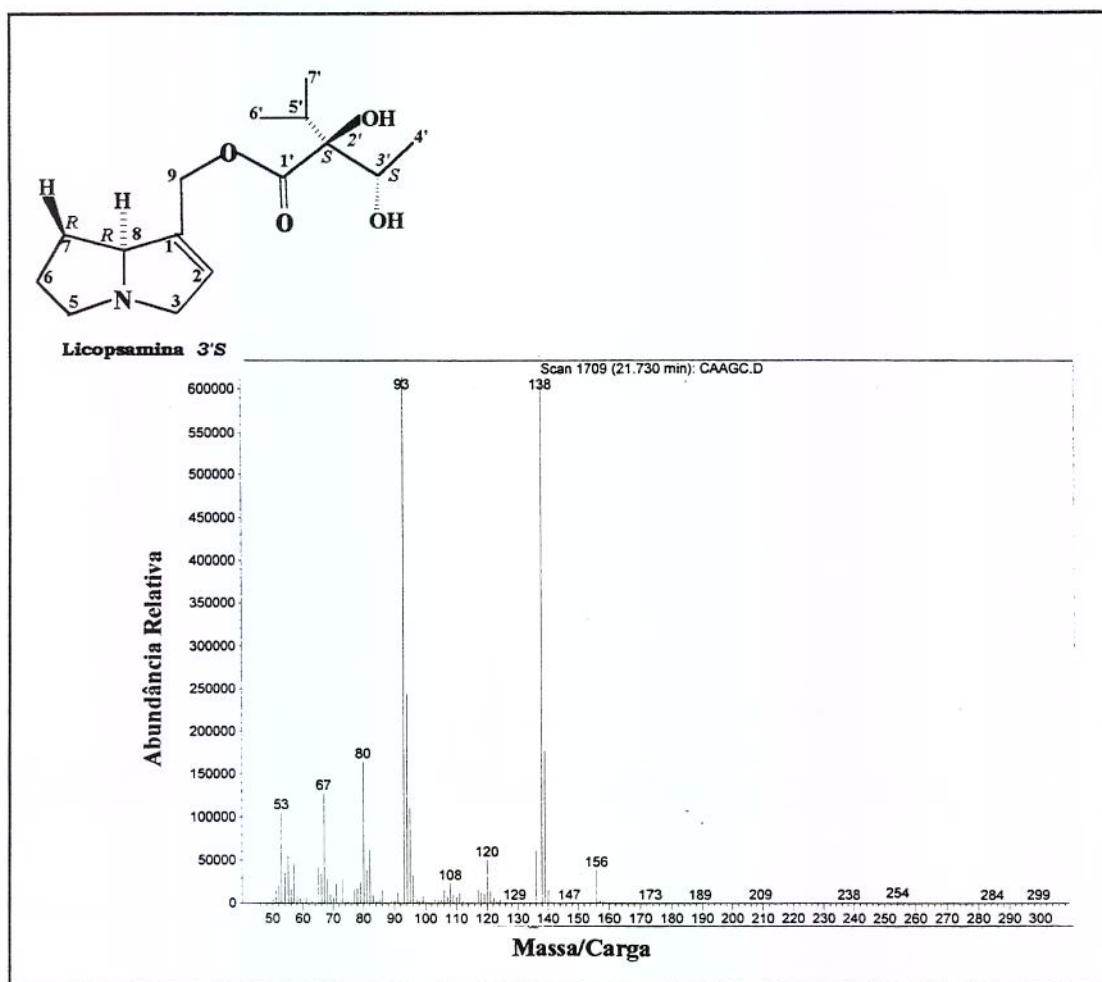
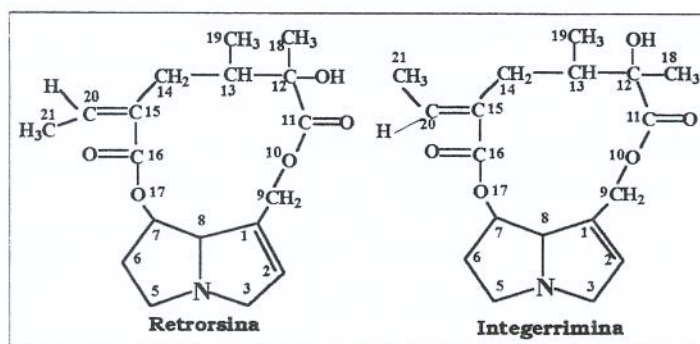


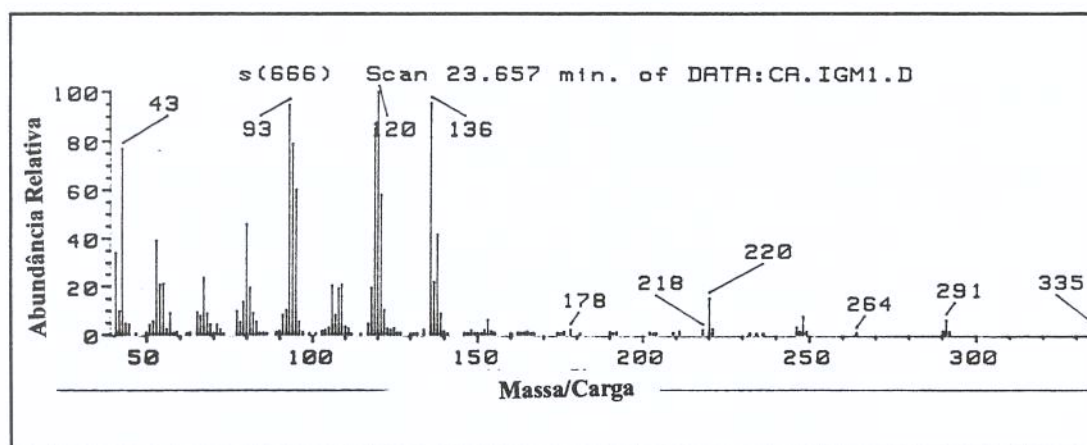
Figura 40. EM de IE da Licopsamina.

### Macrocíclicos (12-membros) Integerrimina e Retrorsina

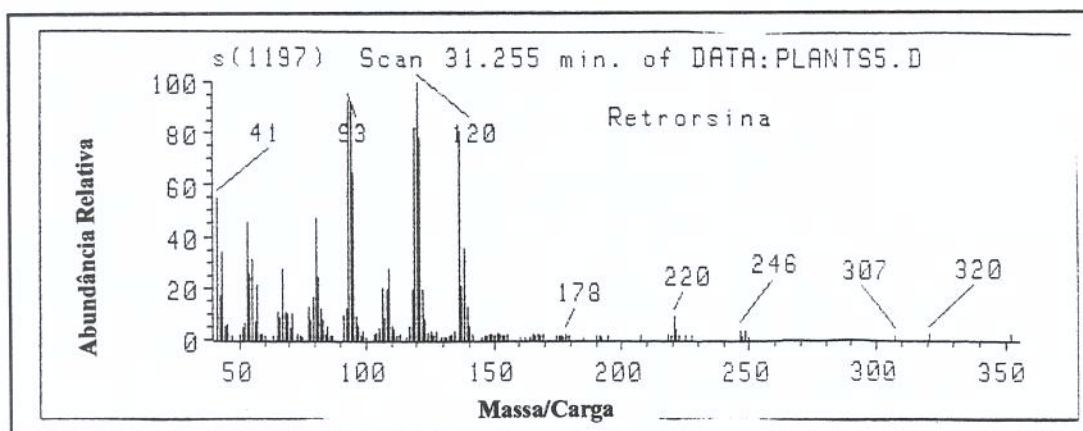
Os APs Integerrimina e Retrorsina (Figura 41) foram isolados da planta *Senecio brasiliensis*. Ambos foram obtidos como cristais e sua análise por CG-EM (Figuras 42 e 43) foi consistente com a fragmentação de APs macrocíclicos do **Tipo Senecionina**.



**Figura 41. Estruturas da Integerrimina e da Retrorsina.**



**Figura 42. EM de IE da Integerrimina.**



**Figura 43. EM de IE da Retrorsina.**

A Retrorsina foi identificada somente por CG-EM, através da comparação com padrão.



A estrutura do AP Integerrimina foi confirmada através dos dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 25 e Figura 44 e 45), comparados com os dados da literatura (WIEDENFELD, *et al.*, 1979; JONE *et al.*, 1982; ROEDER, 1990 & LOGIE *et al.*, 1994). A análise completa dos espectros de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 46, 47 e 48).

Tabela 25. Deslocamentos químicos de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) e <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da integerrimina.

| Formula: C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>5</sub><br>Massa: 335 |           |                 |         | Dados da Literatura:<br>* Phytochemistry 37(1)43-109,1994<br>** Phytochemistry 29(1)11-29,1999 |                 |
|------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| <sup>1</sup> H                                                         |           | <sup>13</sup> C |         | <sup>1</sup> H                                                                                 | <sup>13</sup> C |
| Posição                                                                | δ (ppm)   | J (Hz)          | δ (ppm) | δ (ppm)                                                                                        | δ (ppm)         |
| 1                                                                      | -         | -               | 131,9   | -                                                                                              | 131,8           |
| 2                                                                      | 6,22 (d)  | 1,8             | 137,0   | 6,22                                                                                           | 136,4           |
| 3α                                                                     | 3,40 (dd) | 16,0            | 62,6    | 3,39                                                                                           | 62,2            |
| 3β                                                                     | 3,94 (d)  | 16,0            | -       | 3,93                                                                                           | -               |
| 5α                                                                     | 2,58 (m)  | -               | 53,0    | 2,53                                                                                           | 53,2            |
| 5β                                                                     | 3,26 (t)  | 8,1             | -       | 3,23                                                                                           | -               |
| 6α                                                                     | 2,11 (m)  | -18,0           | 33,6    | 2,08                                                                                           | 33,8            |
| 6β                                                                     | 2,41 (m)  | 4,0             | -       | 2,40                                                                                           | -               |
| 7                                                                      | 5,02 (m)  | 1,8; 4,0-       | 75,5    | 5,01                                                                                           | 75,4            |
| 8                                                                      | 4,31 (m)  | -               | 77,2    | 4,29                                                                                           | 77,4            |
| 9α                                                                     | 4,12 (d)  | 11,7            | 60,8    | 4,12                                                                                           | 60,8            |
| 9β                                                                     | 5,43 (d)  | 11,7            | -       | 5,42                                                                                           | -               |
| 11                                                                     | -         | -               | 178,6   | -                                                                                              | 178,2           |
| 12                                                                     | -         | -               | 76,6    | -                                                                                              | 76,4            |
| 13                                                                     | 1,75 (m)  | -               | 39,3    | 1,75                                                                                           | 39,4            |
| 14α                                                                    | 1,70 (m)  | -               | -       | 1,96                                                                                           | 29,6            |
| 14β                                                                    | 2,21 (dd) | 13,6; 10,0      | 29,4    | 2,20                                                                                           | -               |
| 15                                                                     | -         | -               | 134,1   | -                                                                                              | 134,1           |
| 16 (C-carbonila)                                                       | -         | -               | 169,5   | -                                                                                              | 169,2           |
| 18 (CH <sub>3</sub> )                                                  | 1,33 (s)  | -               | 24,9    | 1,33                                                                                           | 25,2            |
| 19 (CH <sub>3</sub> )                                                  | 0,92 (d)  | 7,0             | 11,5    | 0,92                                                                                           | 11,8            |
| 20 C de dupla                                                          | 6,54 (q)  | 7,0             | 135,6   | 6,52                                                                                           | 135,3           |
| 21 (CH <sub>3</sub> )                                                  | 1,75 (d)  | 7,0             | 13,9    | 1,75                                                                                           | 14,2            |

\*. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

\*\* RMN<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>)

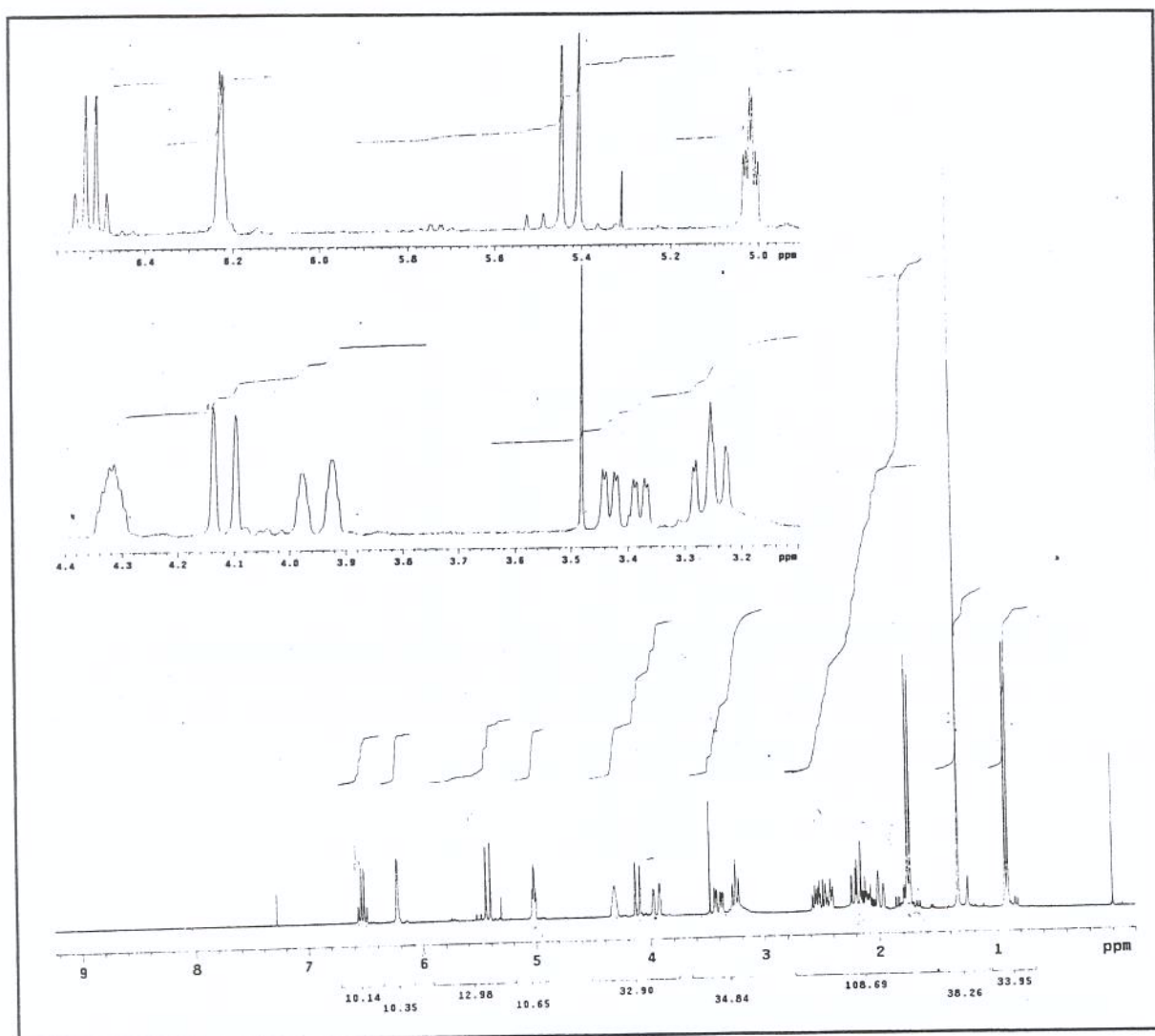


Figura 44. RMN $^1\text{H}$  da Integerrimina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

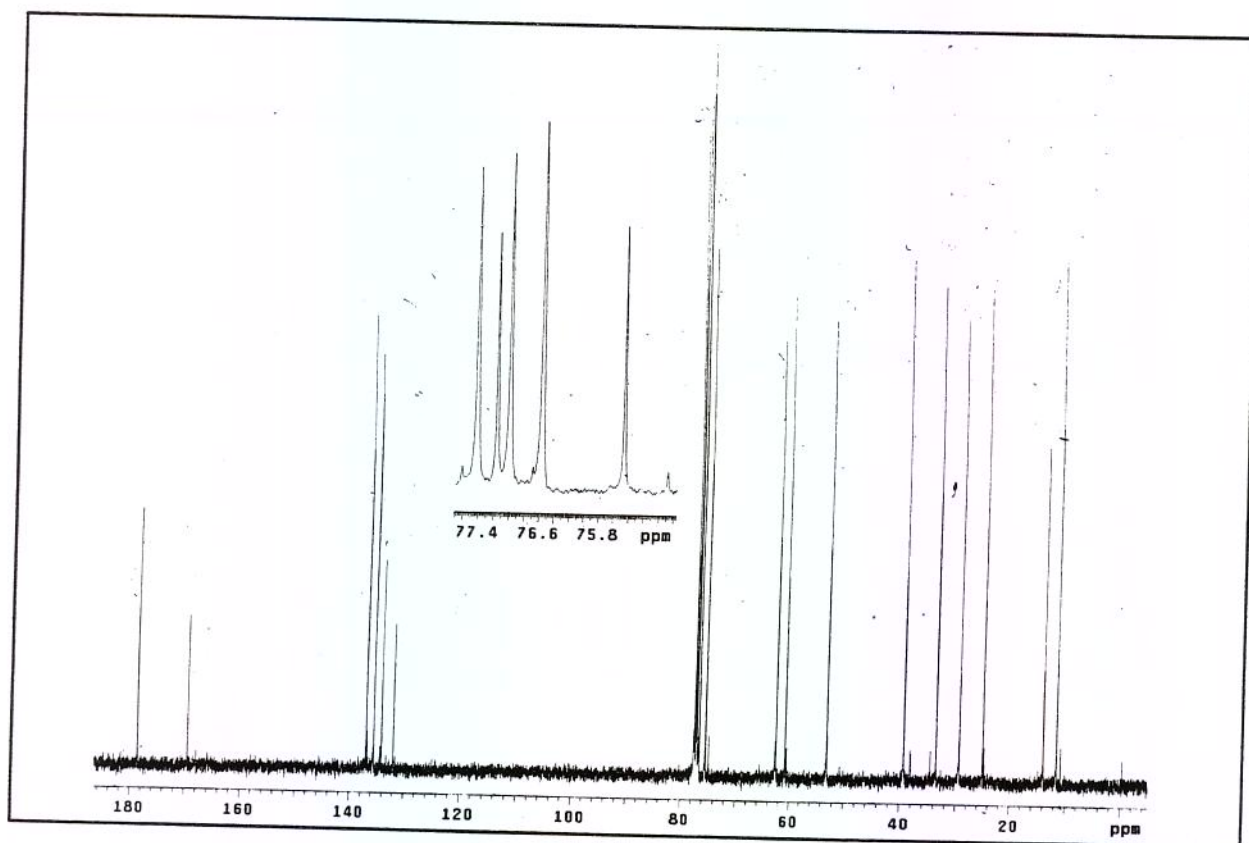


Figura 45.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  da Integerrimina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

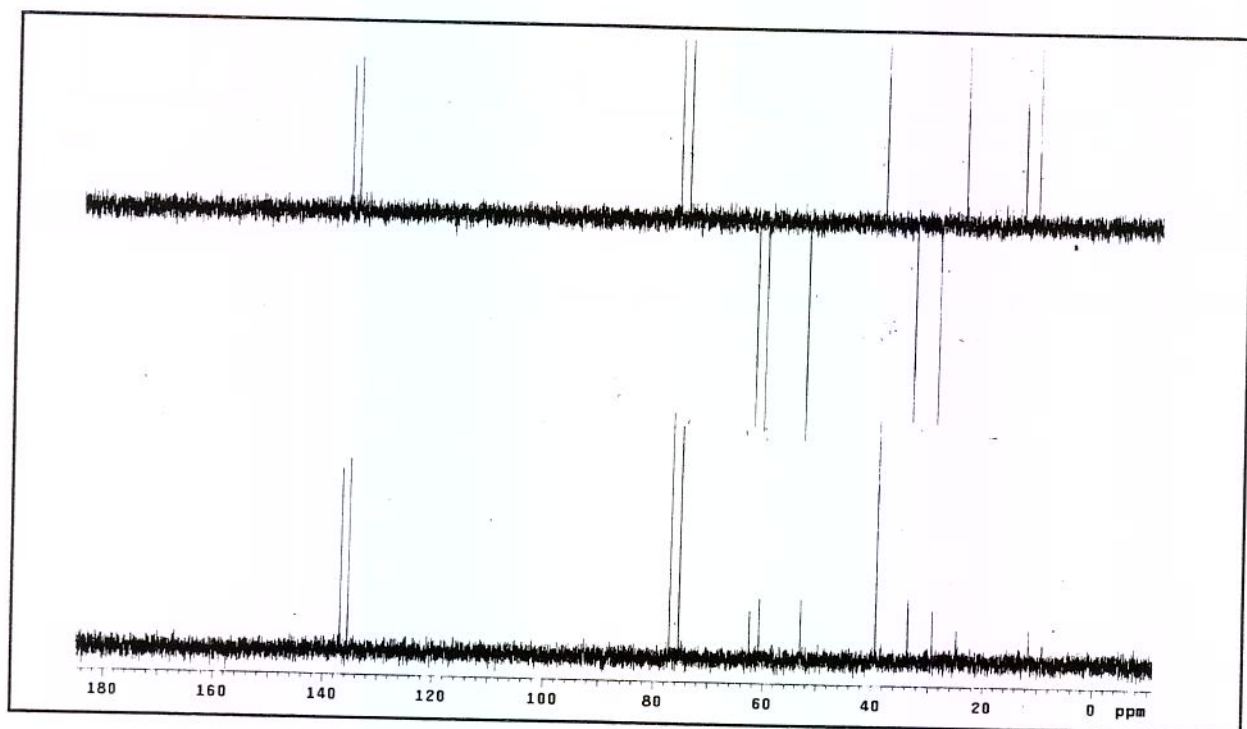


Figura 46.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (DEPT) da Integerrimina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

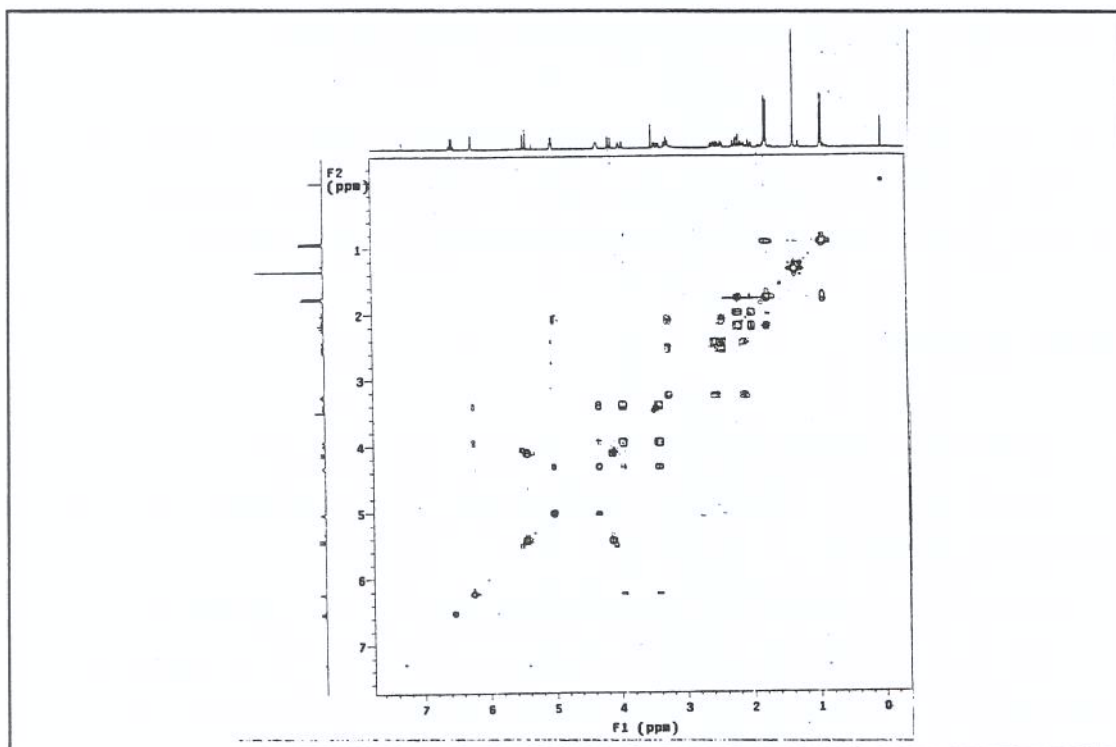


Figura 47. RMN $^{13}\text{C}$  COSY da Integerrimina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

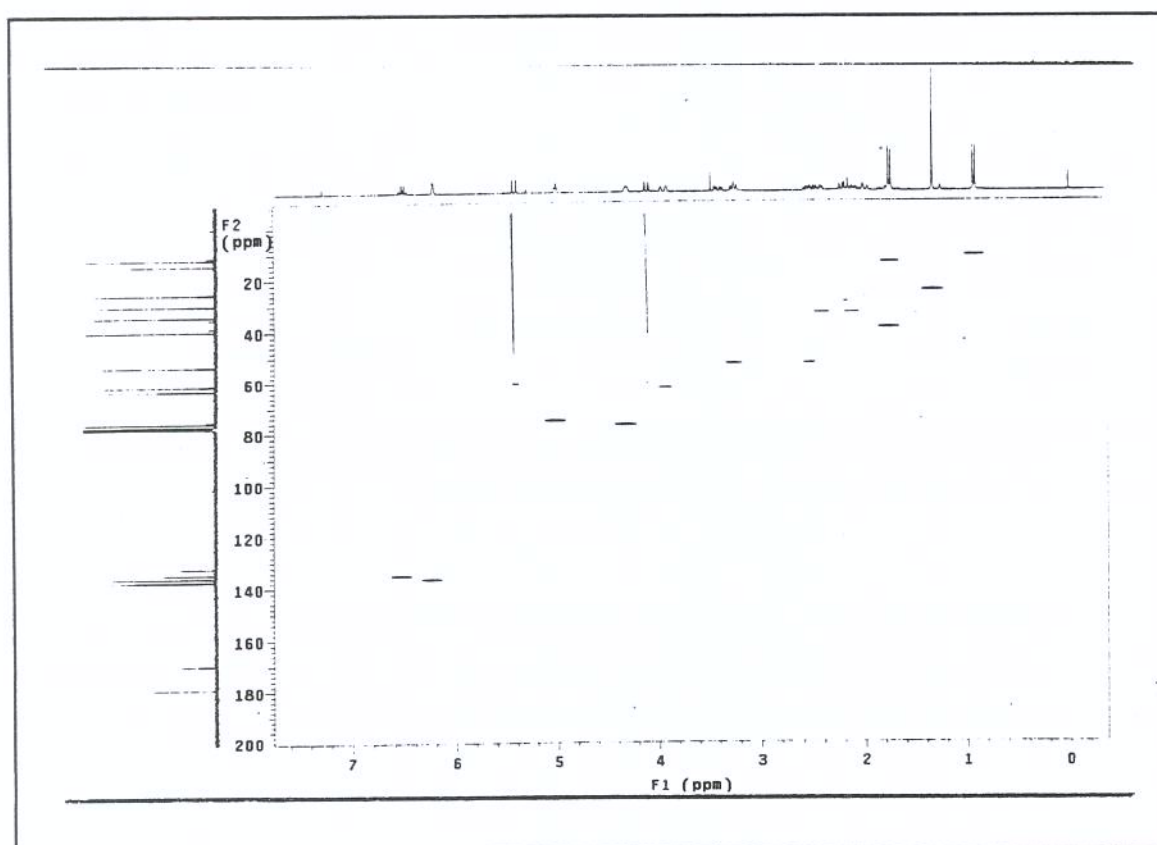


Figura 48. HECTOR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da Integerrimina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.



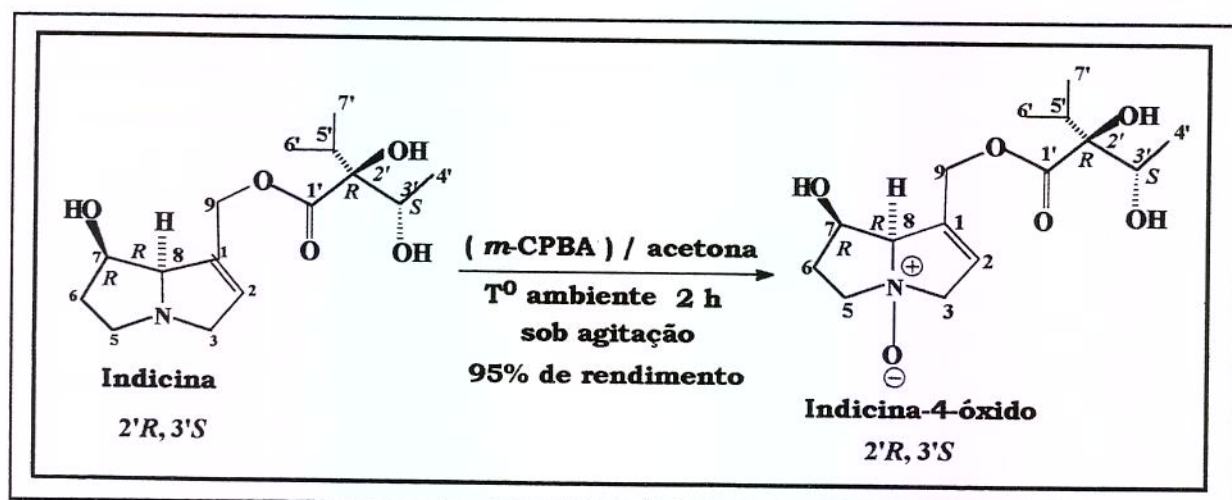
### **APs N-óxidos: Indicina, Integerrimina e Retrorsina**

Os APs Indicina-4-óxido, Integerrimina-4-óxido e Retrorsina-4-óxido foram obtidos através de uma oxidação dos respectivos APs terciários, com o ácido metacloroperbenzóico (Esquema 4).

#### **Indicina N-óxido**

A Indicina-4-óxido foi obtida a partir da oxidação (com 95% de rendimento) do AP Indicina (Esquema 4), isolado da planta *Heliotropium indicum*.

A mistura reacional foi purificada em coluna empacotada com sílica gel, utilizando-se como eluente clorofórmio e quantidades crescentes de metanol. Obteve-se 70mg de um óleo de cor amarela.



**Esquema 4.** Oxidação da Indicina ( OGAWA, et al., 1993).

A comparação dos dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 26; Figuras 49 e 50) com os dados da literatura (OGAWA et al., 1993), confirmou que o composto obtido através da reação foi a Indicina-4-óxido.

Tabela 26. Deslocamentos químico de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) e <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) da Indicina-4-óxido.

| Formula: C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>6</sub><br>Massa: 315 |                           |        |                            | Dados da Literatura:<br>* Tetrahedron:49(8) 1571-1578, 1993<br>** Phytochemistry 29(1)11-29, 1990 |        |                            |
|------------------------------------------------------------------------|---------------------------|--------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------|
| Posição                                                                | <sup>1</sup> H<br>δ (ppm) | J (Hz) | <sup>13</sup> C<br>δ (ppm) | <sup>1</sup> H<br>δ (ppm)                                                                         | J (Hz) | <sup>13</sup> C<br>δ (ppm) |
| 1                                                                      | -                         | -      | 132,5                      | -                                                                                                 | -      | 132,7                      |
| 2                                                                      | 5,84 (s)                  | -      | 122,7                      | 5,85 (sl)                                                                                         | -      | 130,7                      |
| 3α                                                                     | 3,65 (m)                  | -      | 77,0                       | 3,7-3,9 (m)                                                                                       | -      | 63,0                       |
| 3β                                                                     | 3,77 (m)                  | -      | -                          | -                                                                                                 | -      | -                          |
| 5α                                                                     | 2,62 (m)                  | -      | 69,1                       | 2,64 (m)                                                                                          | -      | 53,8                       |
| 5β                                                                     | -                         | -      | -                          | -                                                                                                 | -      | -                          |
| 6α                                                                     | 2,03 (m)                  | -      | 32,0                       | 1,92-203 (m)                                                                                      | -      | 36,3                       |
| 6β                                                                     | -                         | -      | -                          | -                                                                                                 | -      | -                          |
| 7                                                                      | 4,12 (q)                  | 7,0    | 69,7                       | 4,13 (q)                                                                                          | 7,0    | 71,4                       |
| 8                                                                      | 4,45 (sl)                 | -      | 95,8                       | 4,45 (sl)                                                                                         | -      | 78,8                       |
| 9α                                                                     | 4,58-4,88 (m)             | -      | 61,6                       | 4,6-4,8 (m)                                                                                       | -      | 62,1                       |
| 9β                                                                     | 5,10 (d)                  | 13,6   | -                          | 5,13 (d)                                                                                          | 13,2   | -                          |
| 1'                                                                     | -                         | -      | 175,1                      | -                                                                                                 | -      | 175,4                      |
| 2'                                                                     | -                         | -      | 83,9                       | -                                                                                                 | -      | 82,7                       |
| 3'                                                                     | 4,12 (q)                  | 7,0    | 70,0                       | 4,13 (qq)                                                                                         | 6,9    | 69,3                       |
| 4'                                                                     | 1,17 (d)                  | 6,2    | 16,7                       | 1,19 (d)                                                                                          | 6,6    | 16,6                       |
| 5'                                                                     | 1,91 (q)                  | 7,0    | 29,7                       | 1,92 (m)                                                                                          | -      | 32,4                       |
| 6'                                                                     | 0,92 (d)                  | 7,0    | 14,1                       | 0,96 (d)                                                                                          | 6,9    | 17,2                       |
| 7'                                                                     | 0,96 (d)                  | 7,0    | 17,5                       | 0,92 (d)                                                                                          | 6,9    | 17,6                       |

\*. RMN<sup>1</sup>H (270 MHz, CDCl<sub>3</sub>)\*\*. RMN<sup>13</sup>C (67,89 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Os dados de <sup>13</sup>C, da literatura, apresentados na Tabela 26 são para Indicina na forma livre.

O espectro de RMN<sup>13</sup>C da Indicina na forma de N-óxido mostra sinais em δ 132,5 e δ 122,7, os quais indicam a presença de dupla ligação entre os carbonos **C-1** e **C-2**. Os sinais em δ 69,7 (**C-7**), δ 69,1 (**C-5**) e δ 32,0 (**C-6**) indicam a presença de um éster da base necina heliotridina. Observando os espectros de <sup>13</sup>C da Indicina -4-óxido e da Indicina terciária verificamos uma diferença entre os sinais em δ 122,7 (**C-8**) e δ 77,0 (**C-3**), que pode ser explicada pela proximidade do **O**, para o caso dos APs monoésteres. Outra diferença significativa é a presença do sinal em δ 95,8 (**C-8**), característico para APs na forma de N-óxido (ASIBAL *et al.*, 1989; RITZ, 1991).

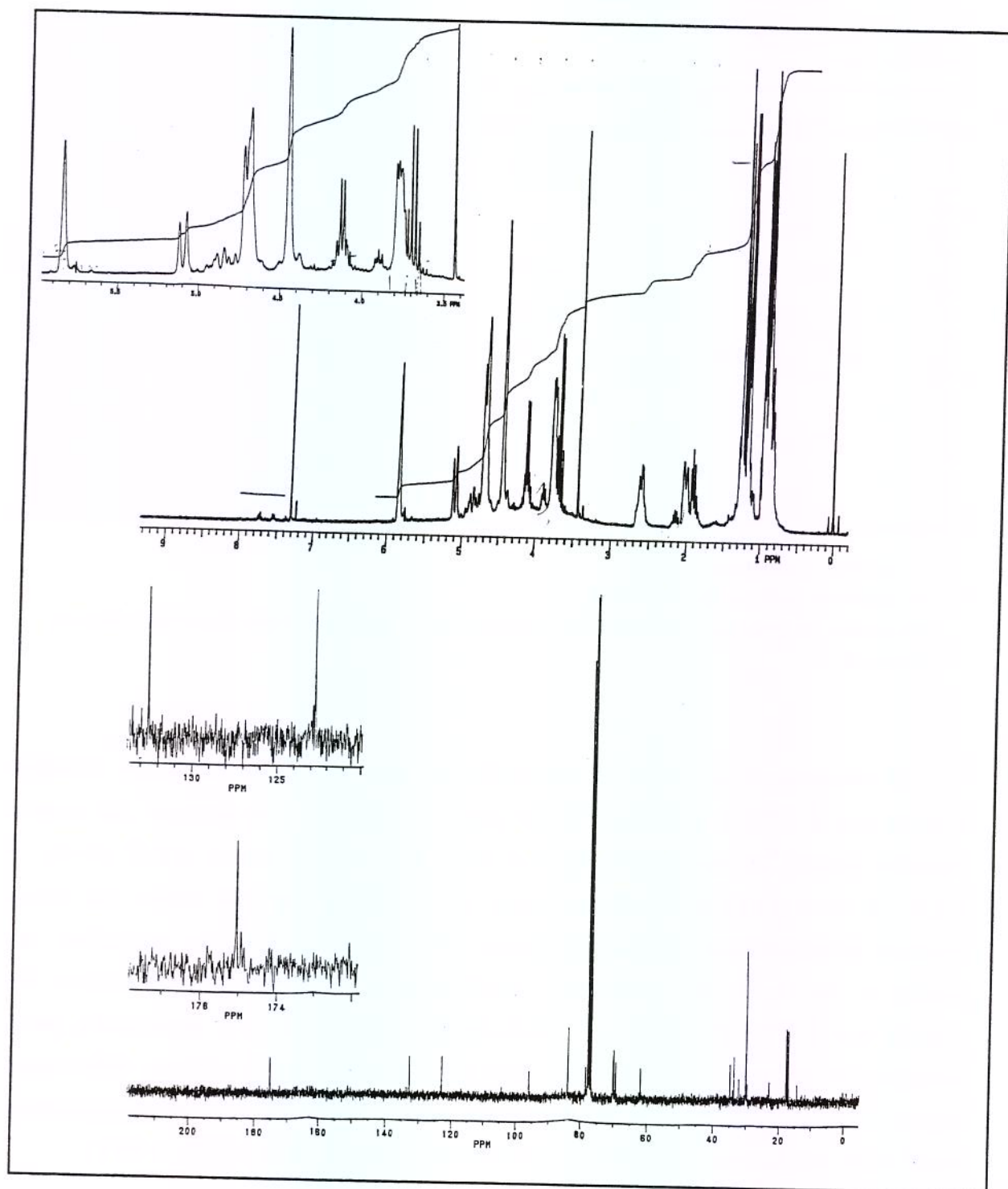


Figura 49. RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da Indicina-4-óxido em CDCl<sub>3</sub> a 300 e 75 MHz, respectivamente.



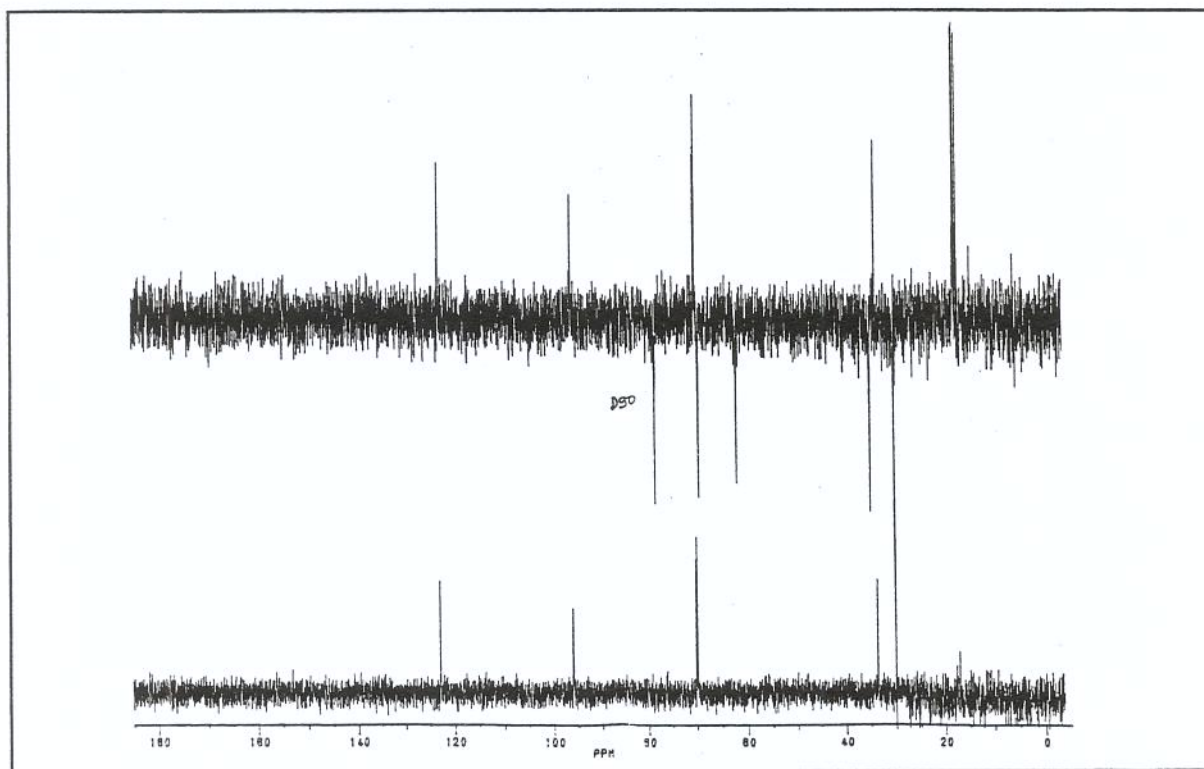


Figura 50. RMN $^{13}\text{C}$  (DEPT) da Indicina-4-óxido em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

### Integerrimina-4-óxido

A Integerrimina-4-óxido foi obtido a partir da oxidação do AP Integerrimina, isolado de *Senecio brasiliensis*, na forma de um óleo, com rendimento de 90%.

Os dados espectrais de RMN $^1\text{H}$  do AP Integerrimina-4-óxido foram comparados com os dados do isômero geométrico Senecionina-**Z** (forma terciária-WIEDENFELD *et al.*, 1979; JONES *et al.*, 1982 e ROEDER, 1990), cujos dados estão apresentados na Tabela 27 e Figura 51.



Tabela 27. Deslocamentos químicos de RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> e <sup>13</sup>C (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Integerrimina N-óxido.

| Formula: C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sub>6</sub><br>Massa: 335 |           |            | * Dados da literatura<br>RIZK, 1991 |                |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------|------------|-------------------------------------|----------------|
| <sup>1</sup> H                                                        |           |            | <sup>1</sup> H                      |                |
| Posição                                                               | δ (ppm)   | J (Hz)     | δ (ppm)                             | J (Hz)         |
| 2                                                                     | 6,26 (s)  | -          | 6,22 (dl)                           | 6,2            |
| 3 <sub>α</sub>                                                        | 4,52 (sl) | -          | 4,62 (d)                            | 6,2; 2,4       |
| 3 <sub>β</sub>                                                        | -         | -          | 4,52 (dd)                           | 10,7; 7,3; 1,9 |
| 5 <sub>α</sub>                                                        | 3,90 (m)  | -          | 3,92 (ddd)                          | -              |
| 5 <sub>β</sub>                                                        | 3,60 (m)  | -          | 3,64 (m)                            | -              |
| 6 <sub>α</sub>                                                        | 2,96 (m)  | -          | 2,96 (m)                            | -              |
| 6 <sub>β</sub>                                                        | 2,40 (m)  | -          | 2,45 (m)                            | -              |
| 7                                                                     | 5,49 (m)  | -          | 5,45 (m)                            | -              |
| 8                                                                     | 4,83 (d)  | 6,2        | 4,83 (d)                            | 4,9            |
| 9 <sub>α</sub>                                                        | 5,45 (d)  | 12,0       | 5,49 (d)                            | 12,2           |
| 9 <sub>β</sub>                                                        | 4,21 (d)  | 12,0       | 4,14 (d)                            | 12,2           |
| 12                                                                    | -         | -          | -                                   | -              |
| 13                                                                    | -         | -          | -                                   | -              |
| 14 <sub>α</sub>                                                       | 2,23 (dd) | 14,0; 10,0 | 2,14 (d)                            | 13,2           |
| 14 <sub>β</sub>                                                       | 1,96 (d)  | 14,0       | 1,78 (m)                            | -              |
| 18-CH <sub>3</sub>                                                    | 1,34 (s)  | -          | 1,30 (s)                            | -              |
| 19-CH <sub>3</sub>                                                    | 0,92 (d)  | 7,0        | 0,88 (d)                            | 6,6            |
| 20 CH <sub>3</sub>                                                    | 6,70 (q)  | 7,0        | 5,81 (q)                            | 7,3            |
| 21                                                                    | 1,78 (d)  | 7,0        | 1,84 (dd)                           | 7,2; 4,1       |

\* Os dados de RMN<sup>1</sup>H (360 MHz, CDCl<sub>3</sub>), apresentados na Tabela acima são do AP Senecionina-4-óxido.

A diferença entre os isômeros geométricos (**Z/E**), na forma terciária, pode ser constatada no espectro de RMN<sup>1</sup>H, através do **H** do carbono **C-20**, onde observa-se um sinal em δ 5,71 para o AP Senecionina e Retrorsina (ambos configuração **Z**) e δ 6,50 para os APs Integerrimina e Usaramina (ambos configuração **E**). Quando esses isômeros estão na forma de seus respectivos N-óxidos os valores aumentam em δ 5,81 para Senecionina-4-óxido, δ 5,83 para Retrorsina-4-óxido e δ 6,70 para Integerrimina-4-óxido (RIZK, 1991; LOGIE, *et al.*, 1994. Outros sinais os quais serviriam para diferenciar as configurações **Z** e **E**, desses isômeros, são menos característicos, devido a sua ocorrência em zonas fortemente sobrepostas.

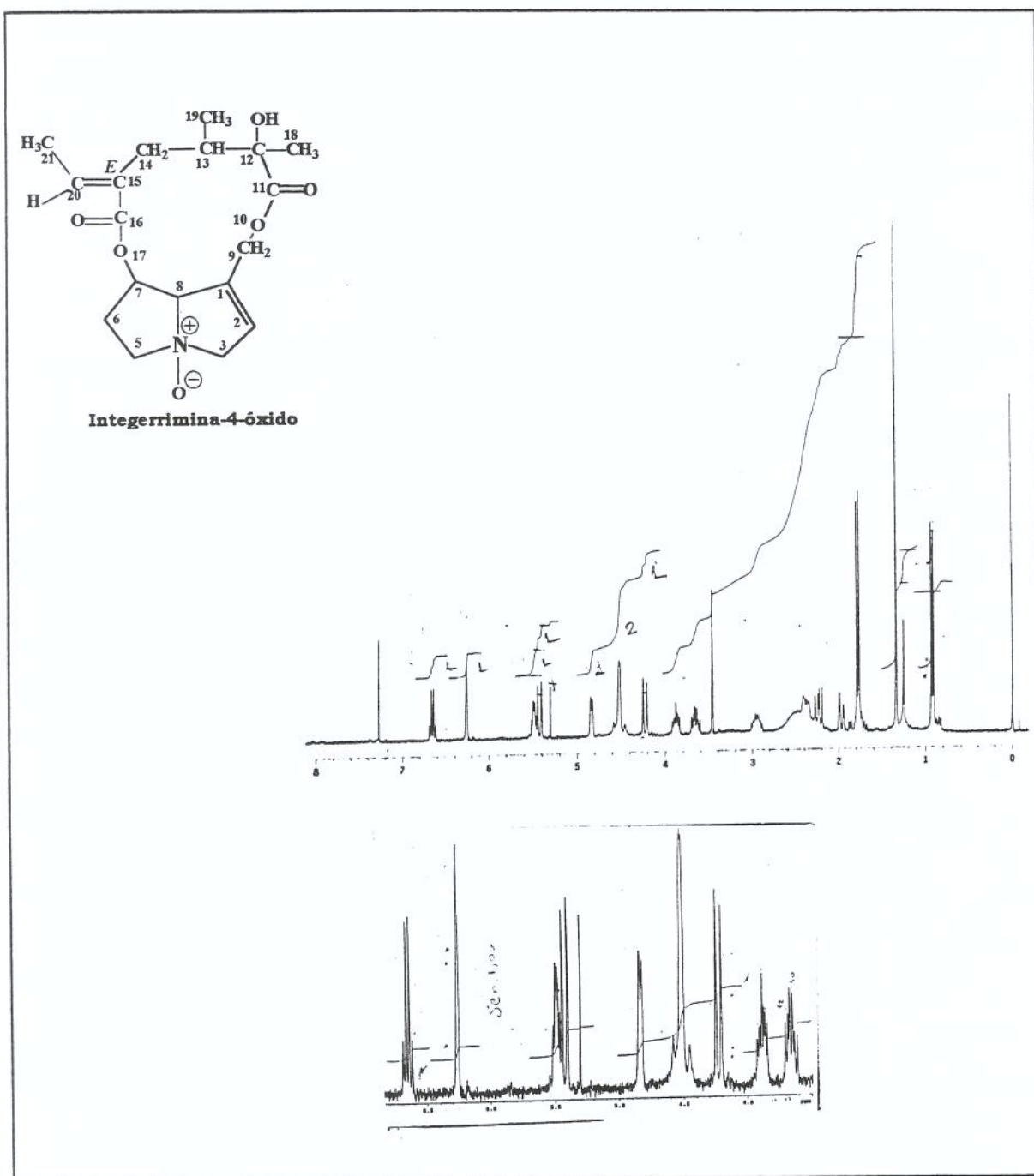


Figura 51. RMN $^1\text{H}$  da Integerrimina-4-óxido em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

### Retrorsina-4-óxido

A estrutura do AP Retrorsina-4-óxido (Figura 52) foi confirmada com base nos seus dados de RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Tabela 28 e Figuras 52 e

53, respectivamente). Estes dados foram comparados com dados da literatura (WIEDENFELD *et al.*, 1979; JONES *et al.*, 1982; ROEDER, 1990 & LOGIE *et al.*, 1994). A análise dos espectros foi acompanhada por uma análise do espectro de  $^{13}\text{C}$  DEPT (Figura 54).

Tabela 28. Deslocamentos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz, MeOD) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz, MeOD) da Retrorsina-4-óxido.

| Fórmula: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_7$<br>Massa :367 |                                |       |                                   | Dados da Literatura<br>* Phytochemistry 37(1)43-109, 1994.<br>** Phytochemistry (29) 1:11-29, 1990. |                                   |
|----------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Posição                                                        | $^1\text{H}$<br>$\delta$ (ppm) | J(Hz) | $^{13}\text{C}$<br>$\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$<br>$\delta$ (ppm)                                                                      | $^{13}\text{C}$<br>$\delta$ (ppm) |
| 1                                                              | -                              | -     | 129,7                             | -                                                                                                   | 133,4                             |
| 2                                                              | 6,12 (sl)                      | -     | 136,4                             | 6,28                                                                                                | 141,1                             |
| 3 $\alpha$                                                     | 4,68 (d)                       | 5,1   | 78,02                             | 4,51                                                                                                | 80,2                              |
| 3 $\beta$                                                      | -                              | -     | -                                 | 4,67                                                                                                | -                                 |
| 5 $\alpha$                                                     | 2,50 (m)                       | -     | 68,7                              | 3,68                                                                                                | 70,9                              |
| 5 $\beta$                                                      | -                              | -     | -                                 | 4,04                                                                                                | -                                 |
| 6 $\alpha$                                                     | 2,12 (dl)                      | 14,0  | 32,4                              | 2,47                                                                                                | 35,3                              |
| 6 $\beta$                                                      | 2,50 (m)                       | -     | -                                 | 2,97                                                                                                | -                                 |
| 7                                                              | -                              | -     | 73,7                              | 5,45                                                                                                | 76,7                              |
| 8                                                              | -                              | -     | 95,8                              | 4,94                                                                                                | 98,0                              |
| 9 $\alpha$                                                     | 4,16 (d)                       | 12,0  | 59,4                              | 4,21                                                                                                | 62,5                              |
| 9 $\beta$                                                      | 5,50 (d)                       | 12,0  | -                                 | 5,51                                                                                                | -                                 |
| 11                                                             | -                              | -     | 175,1                             | -                                                                                                   | 178,0                             |
| 12                                                             | -                              | -     | 81,6                              | -                                                                                                   | 84,8                              |
| 13                                                             | 1,78 (m)                       | -     | 37,5                              | 1,80                                                                                                | 38,5                              |
| 14 $\alpha$                                                    | 1,78 (m)                       | 13,0  | 38,0                              | 1,80                                                                                                | 40,1                              |
| 14 $\beta$                                                     | 2,17 (d)                       | -     | -                                 | 2,18                                                                                                | -                                 |
| 15                                                             | -                              | -     | 132,3                             | -                                                                                                   | 131,2                             |
| 16                                                             | -                              | -     | 167,1                             | -                                                                                                   | 171,1                             |
| 18                                                             | ***                            | -     | 68,6                              | 3,68                                                                                                | 69,1                              |
| -                                                              | -                              | -     | -                                 | 3,74                                                                                                | -                                 |
| 19-CH <sub>3</sub>                                             | 0,71 (d)                       | 7,0   | 11,3                              | 0,84                                                                                                | 13,6                              |
| 20                                                             | 5,83 (q)                       | 7,0   | 131,0                             | 5,84                                                                                                | 134,5                             |
| 21-CH <sub>3</sub>                                             | 1,78 (d)                       | 7,0   | 15,1                              | 1,86                                                                                                | 17,5                              |

\* RMN $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ )

\*\* RMN $^{13}\text{C}$  (67,89 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

\*\*\* O sinal do solvente se sobrepõe aos sinais do composto



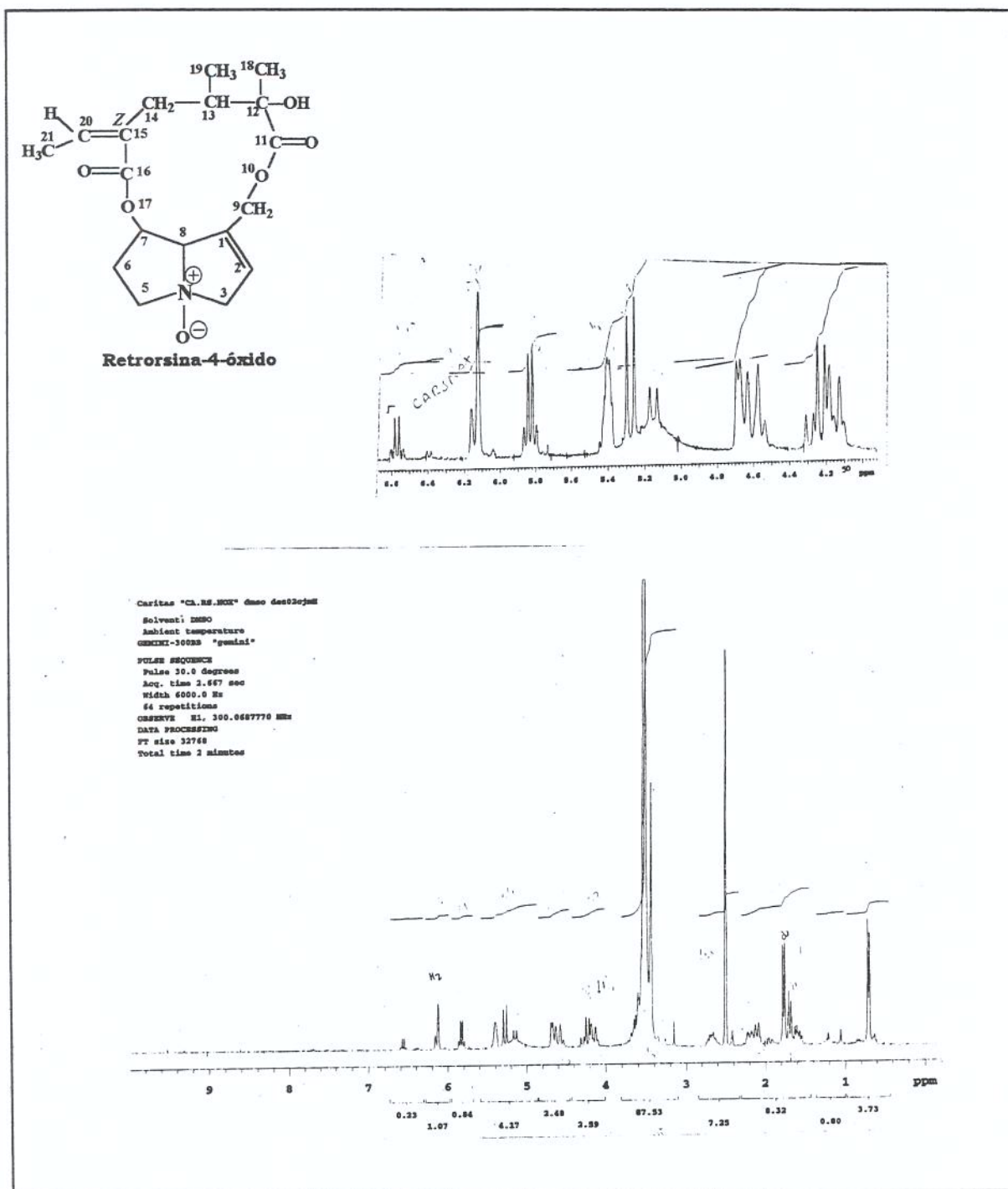


Figura 52. RMN<sup>1</sup>H da Retrorsina-4-óxido em CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz.



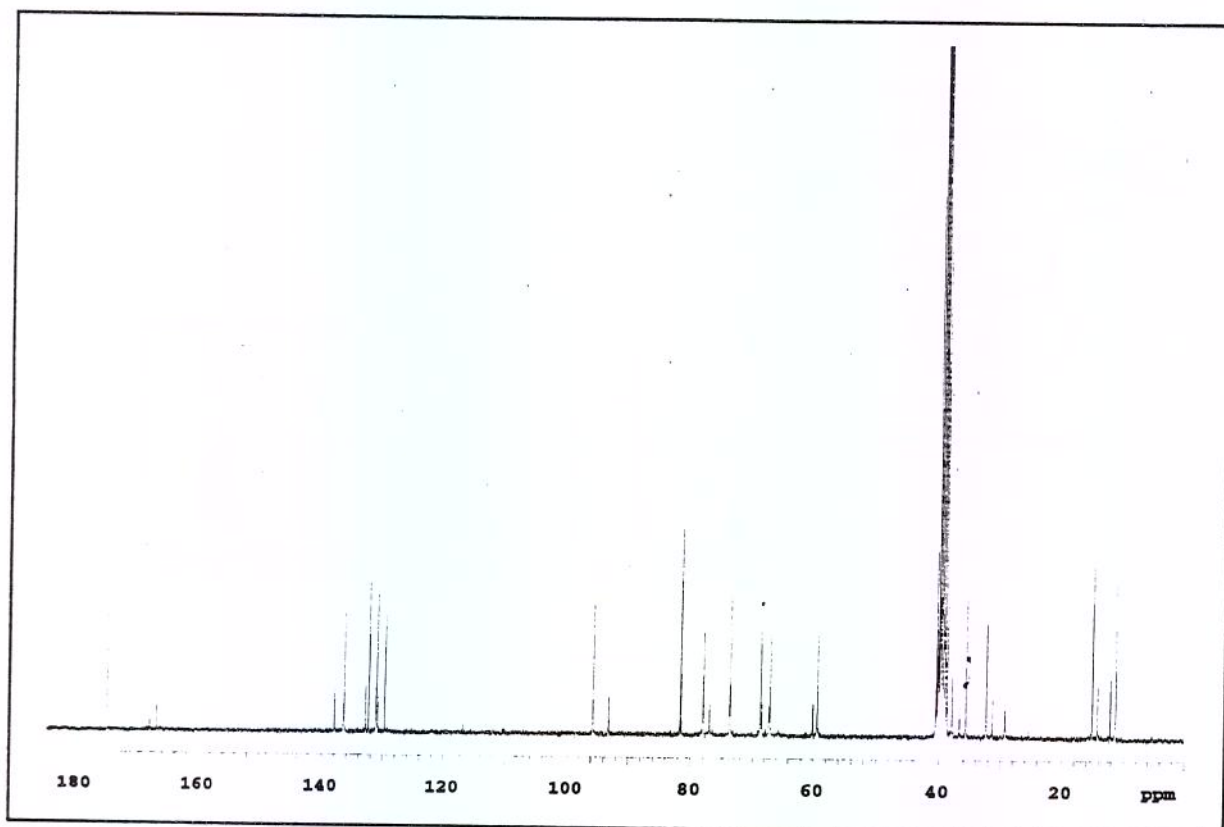


Figura 53.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  da Retrorsina-4-óxido em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

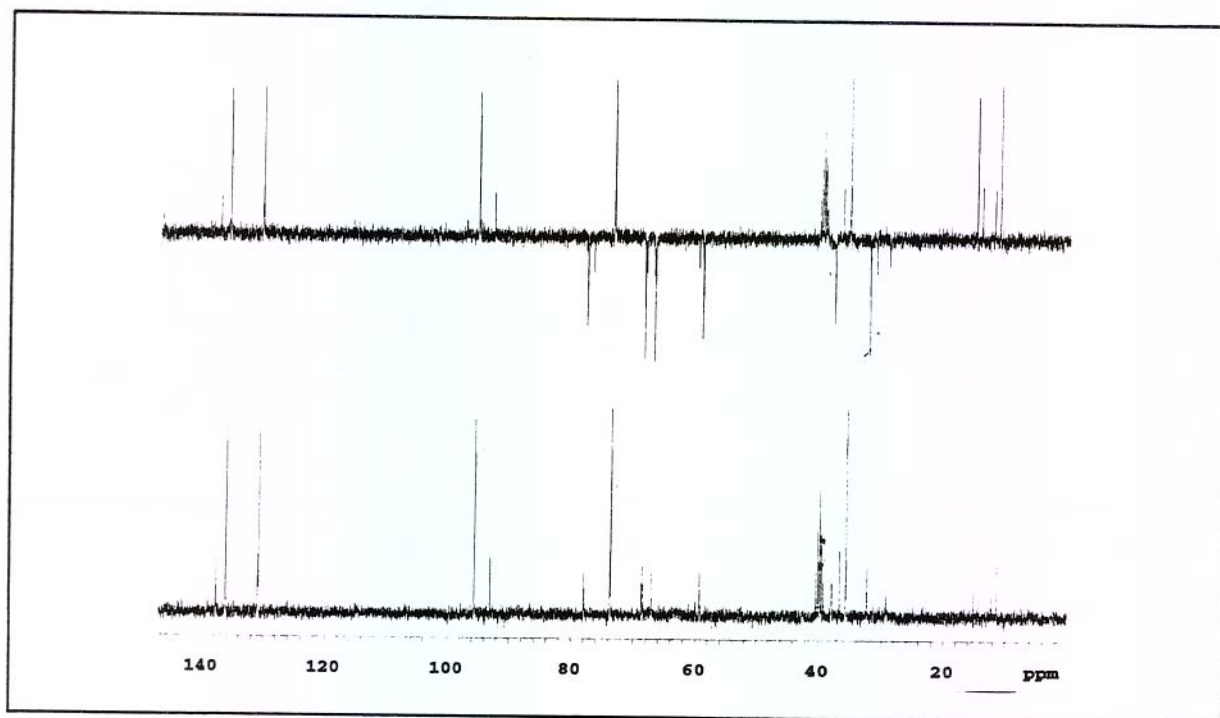


Figura 54.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (DEPT) da Retrorsina-4-óxido em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

### **Base Retronecina**

A Retronecina e o Ácido integerrinecico, foram obtidos a partir do AP Integerrimina, através de uma reação de hidrólise com rendimentos quantitativos (Esquema 5) (MOHANRAJ *et al.*, 1982; MATTOCKS, 1986). Geralmente, esta hidrólise gera como produto final a base retronecina e uma mistura dos Ácidos Integerrinecico lactona e o Integerrinecico.

Após a reação obteve-se uma goma de cor marrom, que foi purificada por cromatografia em coluna de sílica gel, usando como eluente clorofórmio e metanol.

A Retronecina foi obtida como um óleo amarelo. A análise de seu EM (Figura 55) foi consistente com a fragmentação de APs deste tipo.

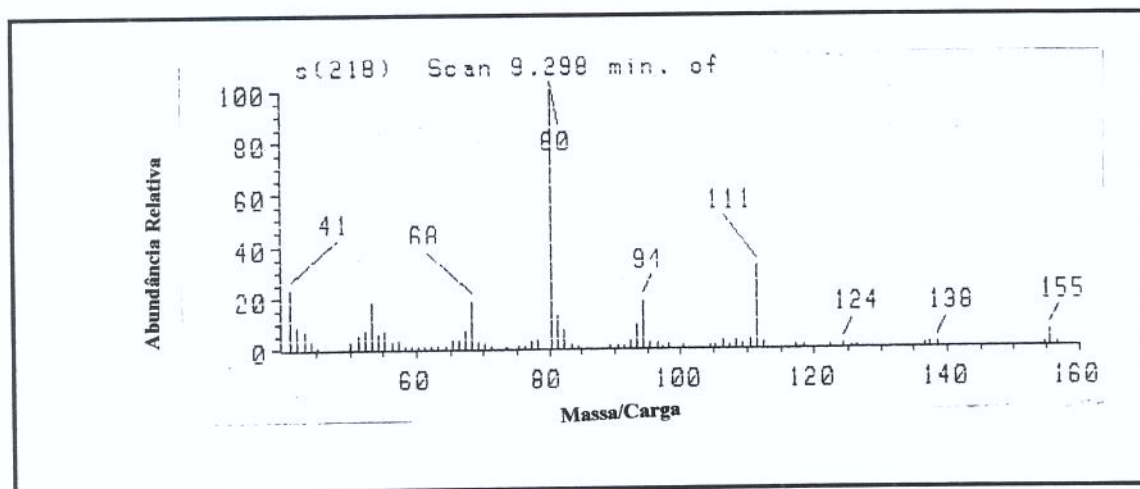
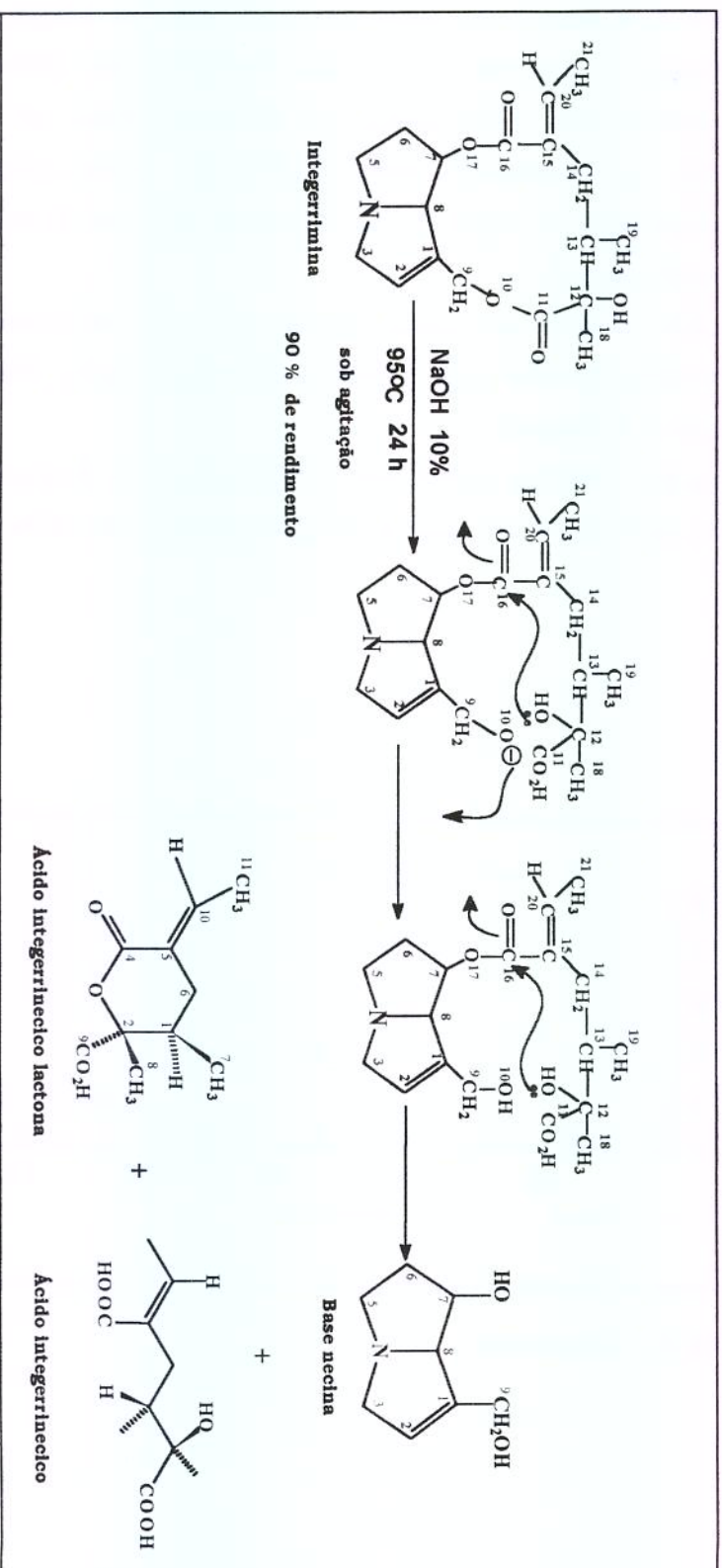
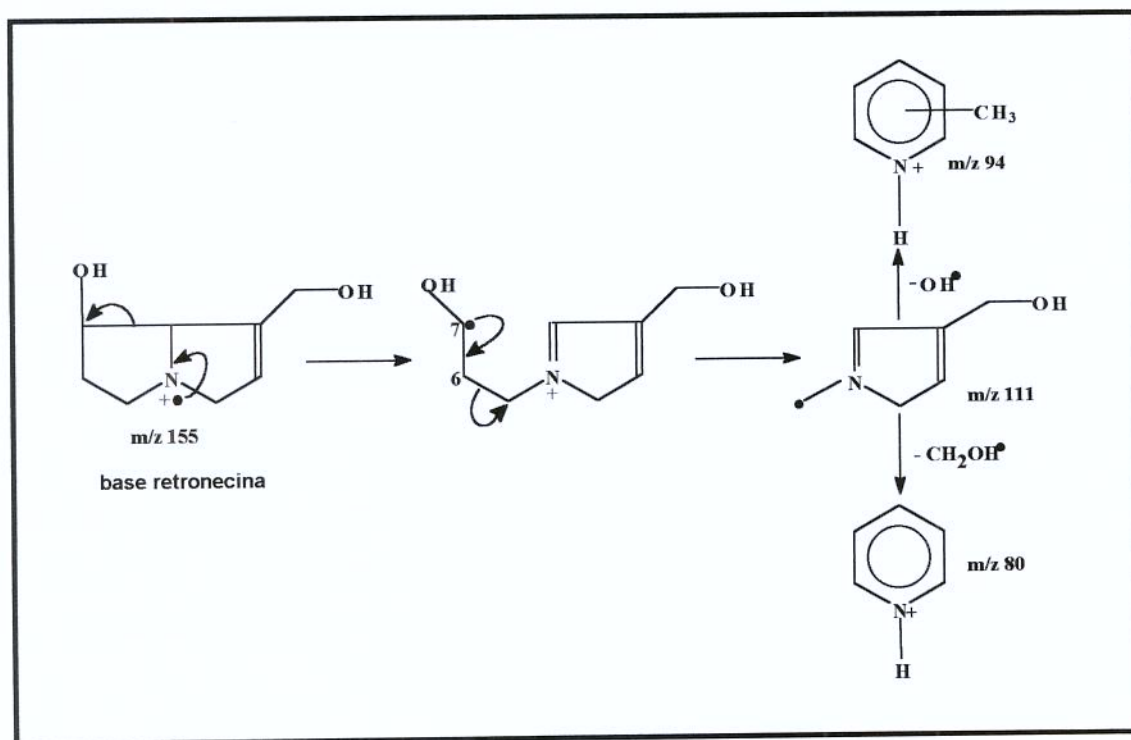


Figura 55. EM-IE da Retronecina.



Esquema 5. Hidrólise da Integerimina (MOHANRAJ et al., MATTOCKS, 1986).

O mecanismo de fragmentação da Retronecina é mostrado no Esquema 6. O íon  $m/z$  138 corresponde a  $[M-OH]^+$ , e o  $m/z$  124 corresponde a  $[M-CH_2OH]^+$ . A clivagem homolítica entre C7 e C6 do íon molecular ( $m/z$  155) leva o íon a  $m/z$  111. A perda de OH leva o íon a  $m/z$  94 e a perda de  $CH_2OH$  leva o íon a  $m/z$  80 (pico base).



Esquema 6. Fragmentação da base Retronecina ( Neuner Jehle et al; 1965).

Os dados de  $RMN^1H$  e  $^{13}C$  da Retronecina estão descritos na Tabela 29 e mostrados nos espectros das Figuras 56 e 57. A análise dos espectros foi acompanhada por uma análise do espectro de  $^{13}C$  DEPT (Figura 58). Estes dados foram comparados com os dados de WIEDENFELD & RODER (1991), ROEDER *et al.* (1992), MOYNEUX *et al.* (1982); ROEDER (1990).



Tabela 29. Deslocamentos de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  ( 75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Retronecina

| Formula: $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{NO}_2$<br>Massa: 155 |                                |           |                                   | Dados da Literatura<br>*J.Chem.Research (8)330-331, 1980<br>**Phytochemistry, 21(2):439-443, 1982 |                                   |
|-------------------------------------------------------------|--------------------------------|-----------|-----------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Posição                                                     | $^1\text{H}$<br>$\delta$ (ppm) | J (Hz)    | $^{13}\text{C}$<br>$\delta$ (ppm) | $^1\text{H}$<br>$\delta$ (ppm)                                                                    | $^{13}\text{C}$<br>$\delta$ (ppm) |
| 1                                                           | -                              | -         | 137,8                             | -                                                                                                 | 137,8                             |
| 2                                                           | 5,70 (s)                       | -         | 127,5                             | 5,75 (d)                                                                                          | 127,2                             |
| 3 $\alpha$                                                  | 3,43 (dd)                      | 15,4      | 61,8                              | 3,36(dq)                                                                                          | 61,9                              |
| 3 $\beta$                                                   | 3,87 (d)                       | 4,0; 15,4 | -                                 | 3,80(dd)                                                                                          | -                                 |
| 5 $\alpha$                                                  | 2,76 (m)                       | 7,7       | 54,0                              | 2,66(m)                                                                                           | 54,2                              |
| 5 $\beta$                                                   | 3,26 (t)                       | -         | -                                 | 3,17(m)                                                                                           | -                                 |
| 6 $\alpha$                                                  | 1,90-2,03 (m)                  | -         | 35,1                              | 2,00(m)                                                                                           | 35,3                              |
| 6 $\beta$                                                   | -                              | -         | -                                 | -                                                                                                 | -                                 |
| 7                                                           | 4,34 (m)                       | 11,7      | 71,0                              | 4,39 (m)                                                                                          | 71,0                              |
| 8                                                           | 4,11 (m)                       | -         | 79,4                              | 4,14 (m)                                                                                          | 79,4                              |
| 9 $\alpha$                                                  | 4,28 (m)                       | -         | 58,6                              | 4,24 (dl)                                                                                         | 58,6                              |
| 9 $\beta$                                                   | -                              | -         | -                                 | -                                                                                                 | -                                 |

\* RMN $^1\text{H}$  (100 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )

\*\* RMN $^{13}\text{C}$  (25,03 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

O espectro de  $^{13}\text{C}$  mostra sinais em  $\delta$  137,8 e 127,5, os quais indicam uma insaturação entre os carbonos C-1 e C-2, respectivamente. Os sinais em  $\delta$  79,4 (C-8) e 71,0 (C-7) indicam a presença da base necina (MOLYNEUX *et al.*, 1982).

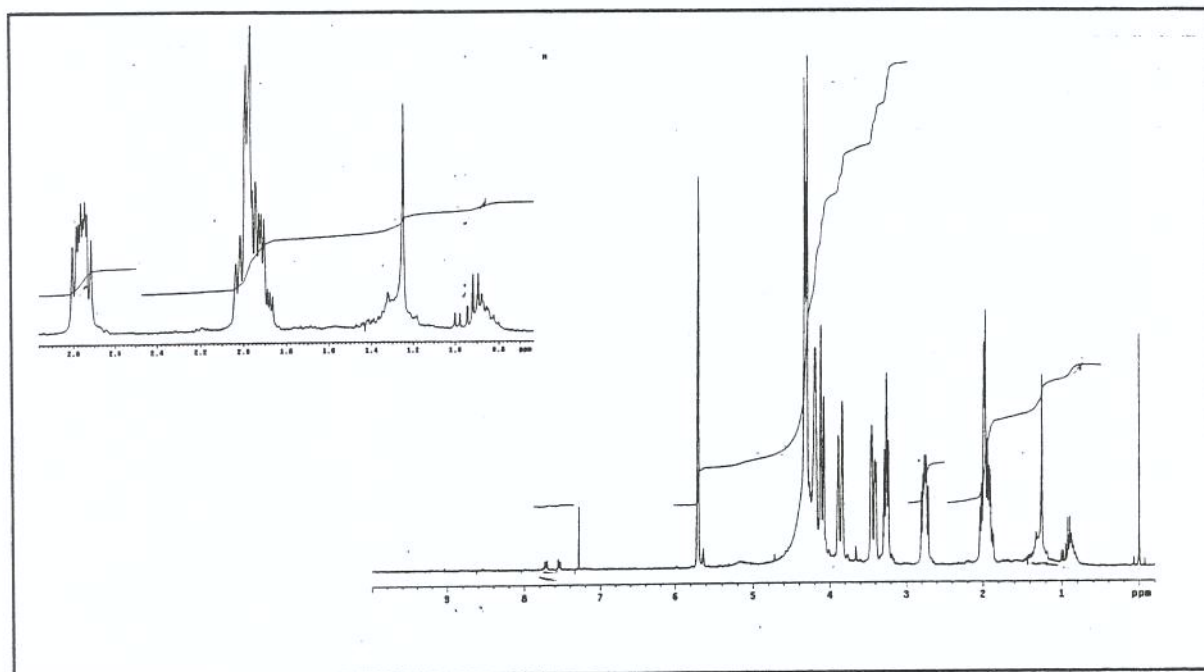


Figura 56.  $\text{RMN}^1\text{H}$  da Retronecina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

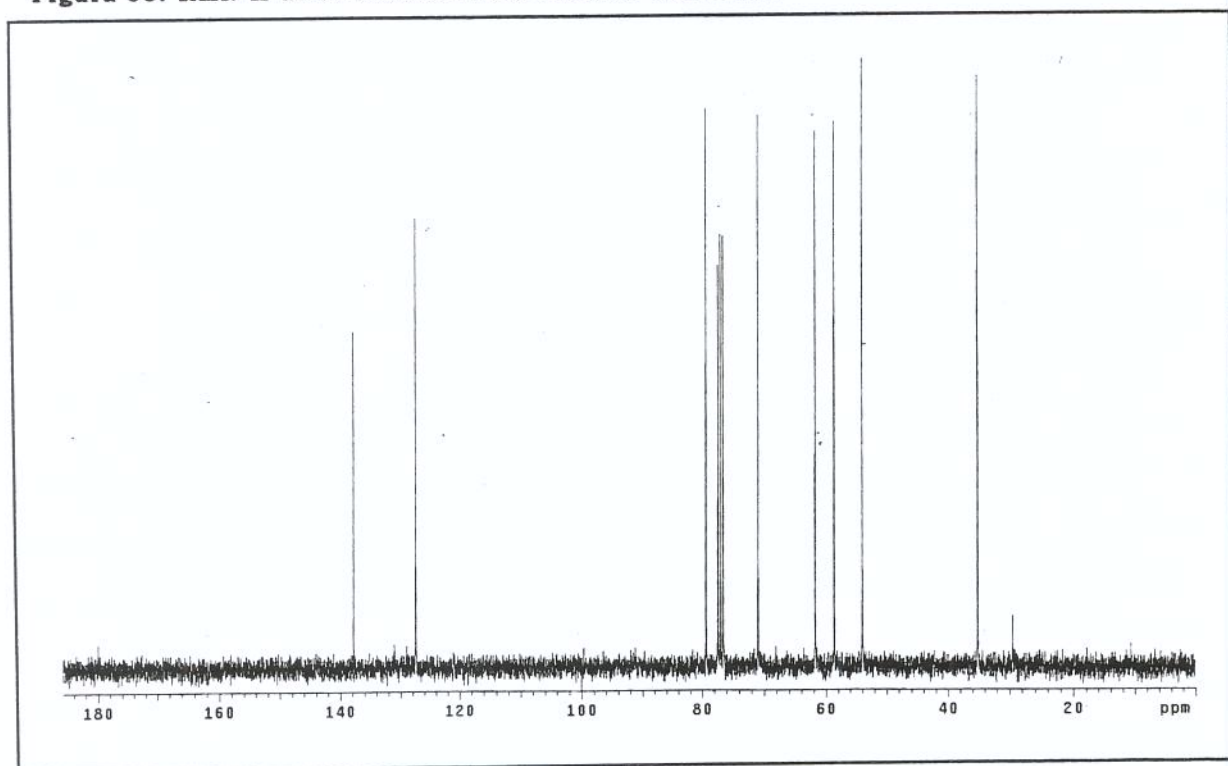


Figura 57.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  da Retronecina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

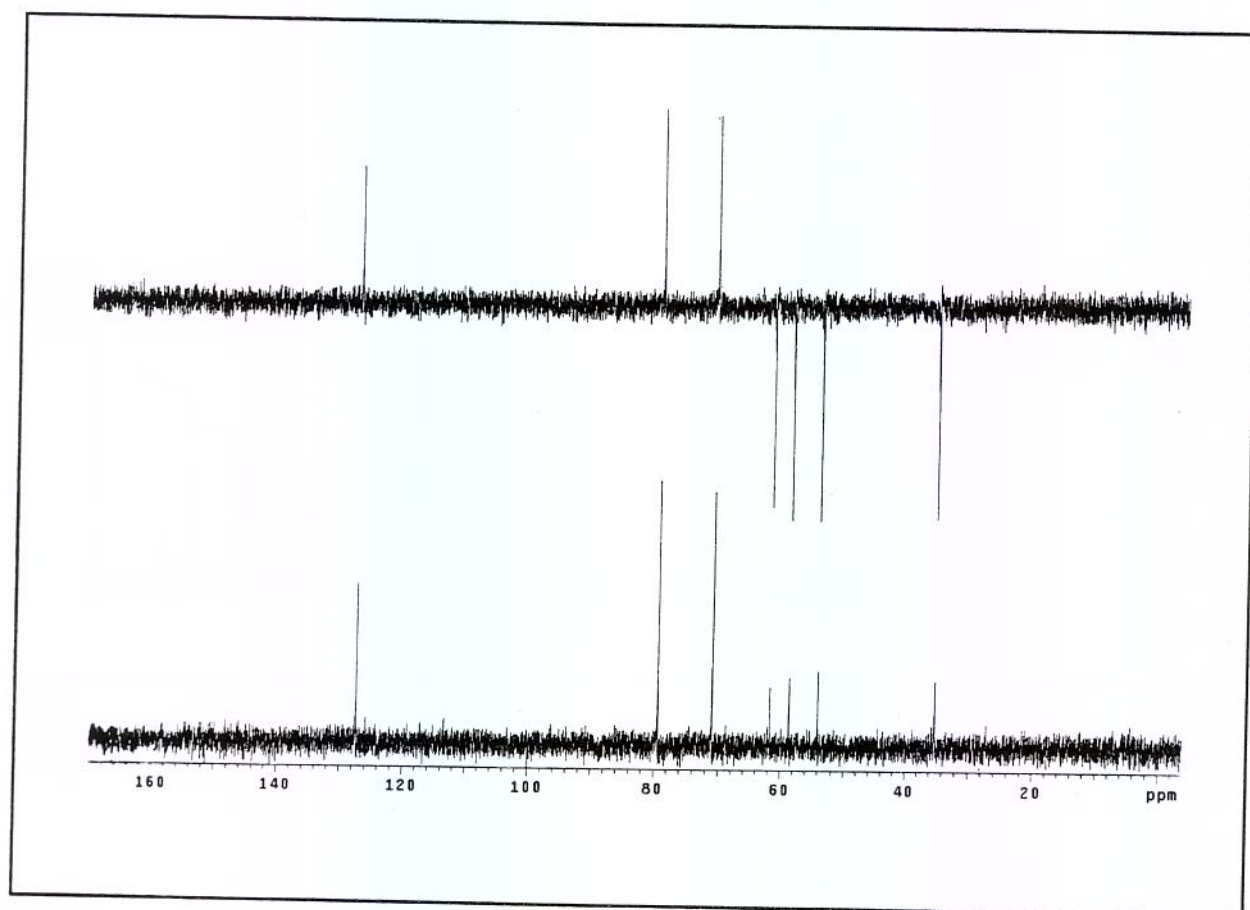


Figura 58. RMN<sup>13</sup>C (DEPT) da Retronecina em CDCl<sub>3</sub> a 75 MHz.

### Ácido Integerrinecico

Após a separação da base Retronecina a fase aquosa resultante da reação de hidrólise foi acidificada com HCl e os ácidos foram extraídos com éter etílico. A purificação da fase etérea, em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel, forneceu 30mg do Ácido Integerrinecico Lactona, que foi caracterizado por EM-IE (Figura 59), RMN<sup>1</sup>H (Figura 60) e <sup>13</sup>C (Figuras 61 e 62), cujos dados estão apresentados na Tabela 30.

As atribuições dos sinais nos espectros RMN<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT foram realizadas com base nos dados de literatura (SILVERSTEIN et al., 1991).

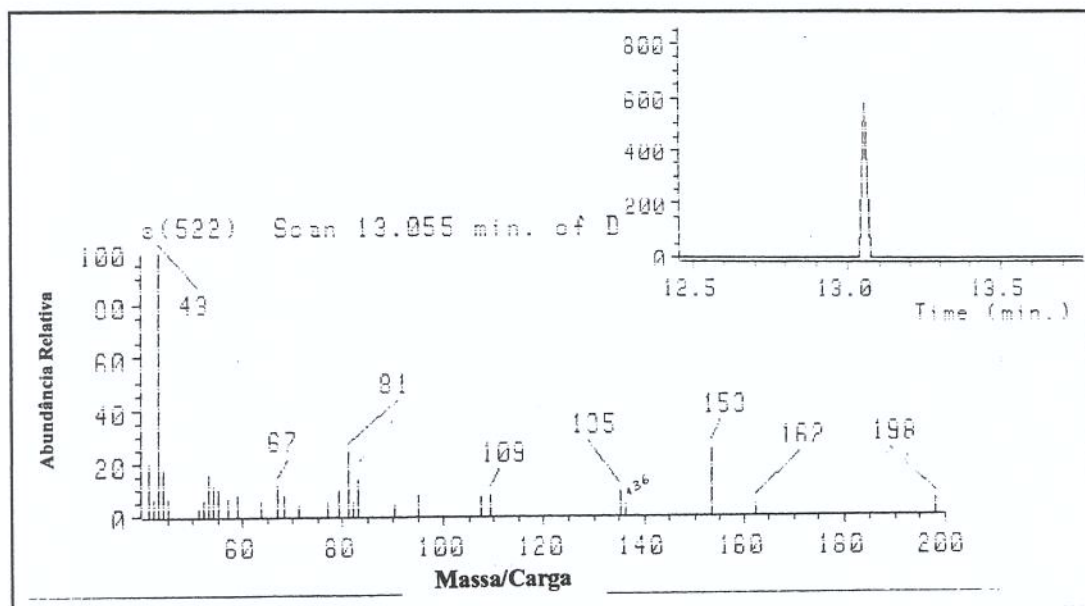


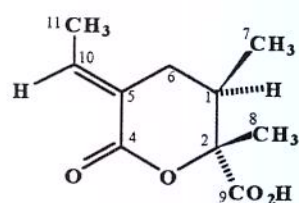
Figura 59 EM de IE do Ácido Integerrineico Lactona.

Tabela 30. Deslocamentos de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do Ácido integerrineico lactona.

| Formula: $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$<br>Massa : 198,21 |                |           |                 |
|-------------------------------------------------------------------|----------------|-----------|-----------------|
| $^1\text{H}$                                                      |                |           | $^{13}\text{C}$ |
| Posição                                                           | $\delta$ (ppm) | J (Hz)    | $\delta$ (ppm)  |
| 1                                                                 | 6,79 (q)       | 7,2; 14,3 | 39,4            |
| 2                                                                 | -              | -         | 77,2            |
| 3                                                                 | -              | -         | -               |
| 4                                                                 | -              | -         | 179,6           |
| 5                                                                 | -              | -         | 141,8           |
| 6                                                                 | 3,15 (s)       | -         | 27,3            |
| 7                                                                 | 2,10 (d)       | 8,3       | 22,7            |
| 8                                                                 | 1,83 (dd)      | 15,0; 8,4 | 13,9            |
| 9                                                                 | 1,62-1,69 (d)  | 7,2       | 171,6           |
| 10                                                                | 1,21 (d)       | 7,2       | 130,4           |
| 11                                                                | 0,66 (d)       | 7,2       | 11,4            |

O espectro de  $^{13}\text{C}$  mostra sinais em  $\delta$  179,5 e 171,6, referentes as carbonilas (**C-4** e **C-9**) e os sinais em  $\delta$  141,8 e 130,4 indicando os carbonos quaternários (**C-5** e **C-10**).





Ácido integerrinecico lactona

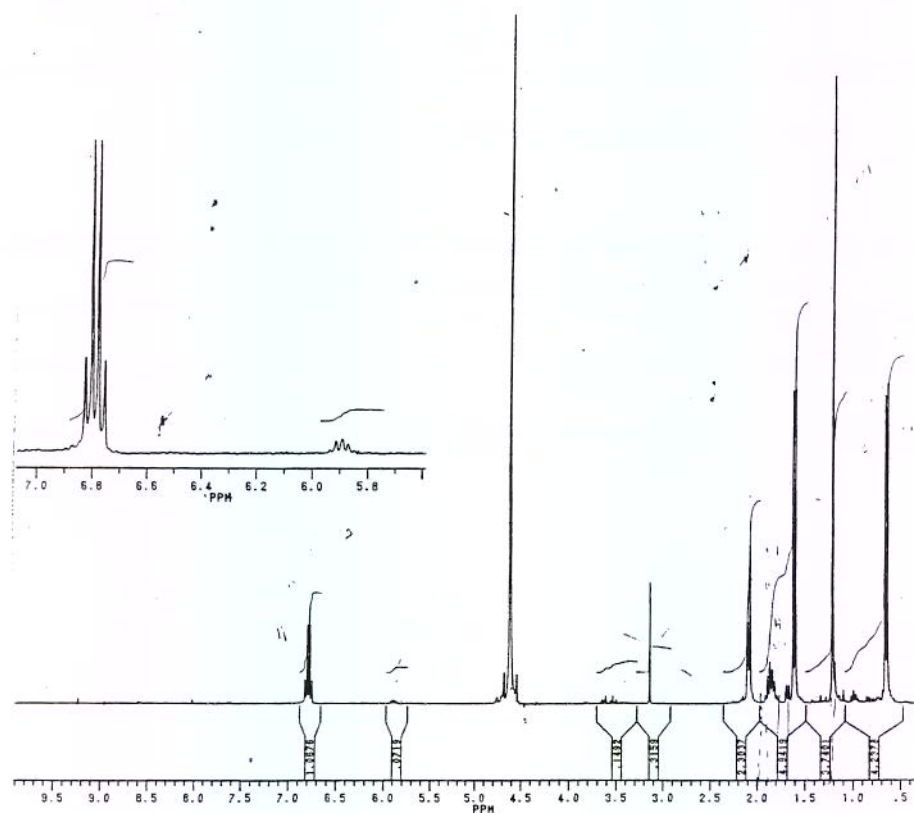


Figura 60. RMN<sup>1</sup>H do Ácido integerrinecico lactona em CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz.

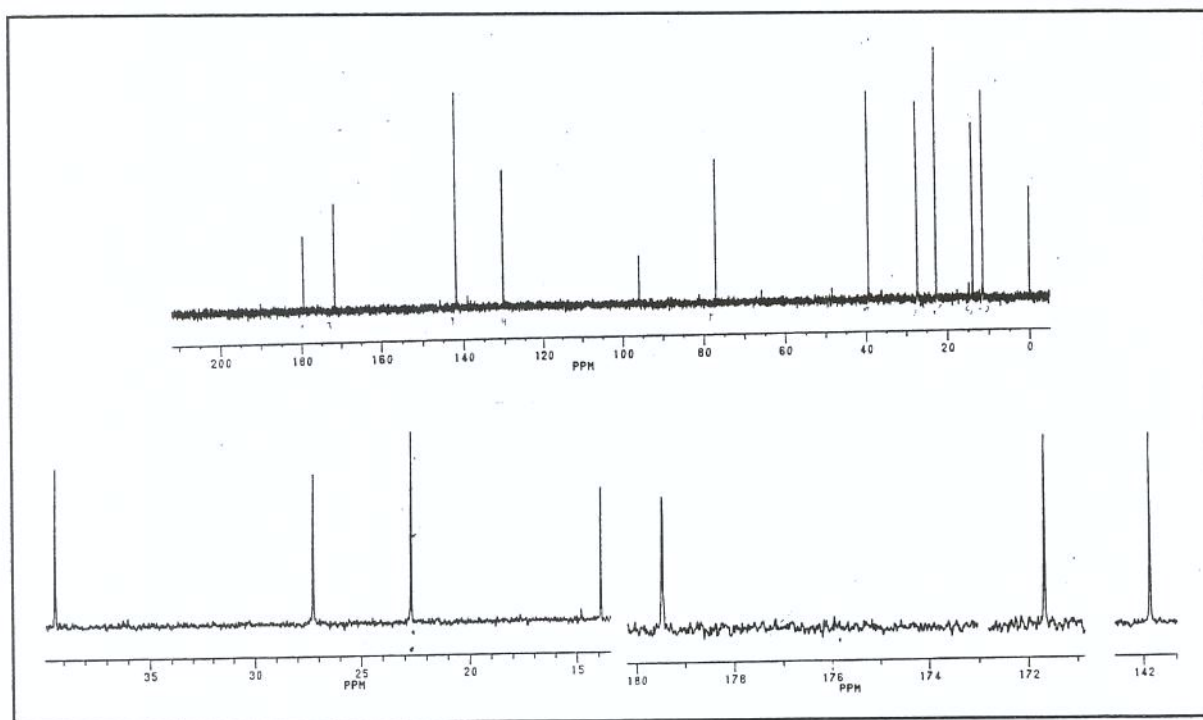


Figura 61. RMN $^{13}\text{C}$  do Ácido integerrinecico lactona em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

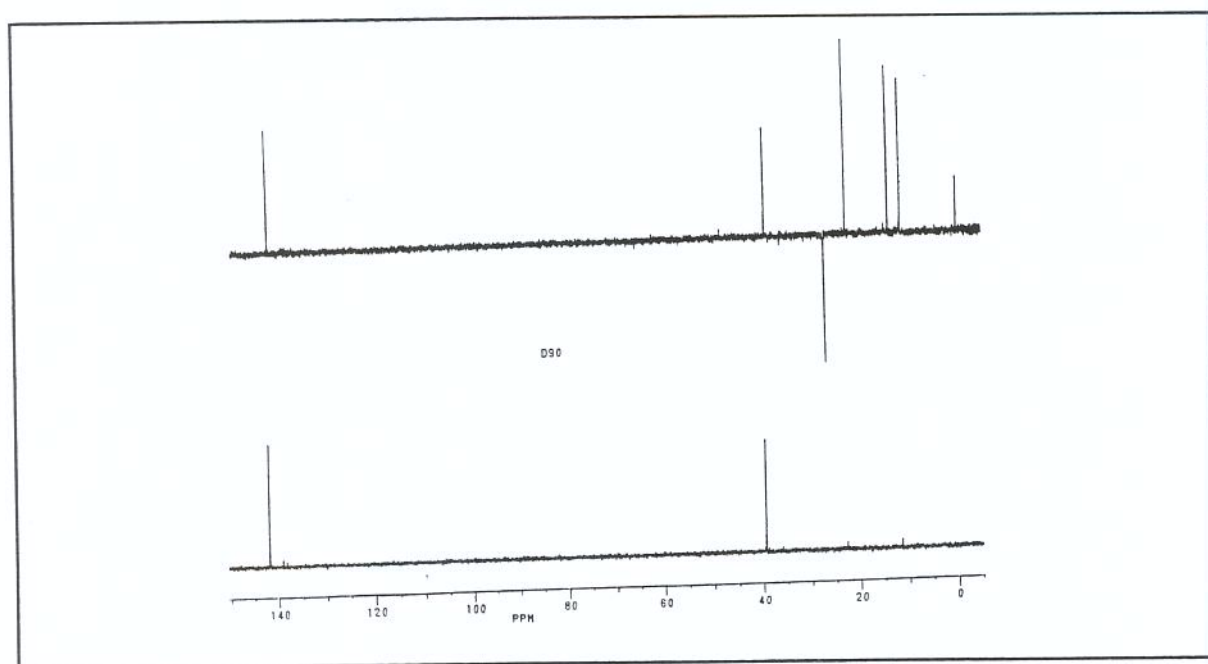


Figura 62. RMN $^{13}\text{C}$  (DEPT) do Ácido integerrinecico lactona 75 MHz.

### 5.3 Isolamento e Caracterização de Outros APs

Além dos APs isolados para os testes toxicológicos, também foram isolados outros APs presentes em algumas espécies.

A cromatografia de camada delgada (Figura 63) e a análise dos dados obtidos por CG-EM (Figura 64) do extrato bruto metanólico (0,5g de alcalóides totais) das folhas de *Eupatorium laevigatum*, revelou a presença de dois pares de diastereoisômeros: **Amabilina**, **Supinina**, **Equinatina** e **Rinderina**. Estes APs já foram isolados anteriormente por TRIGO *et al.*, 1993.

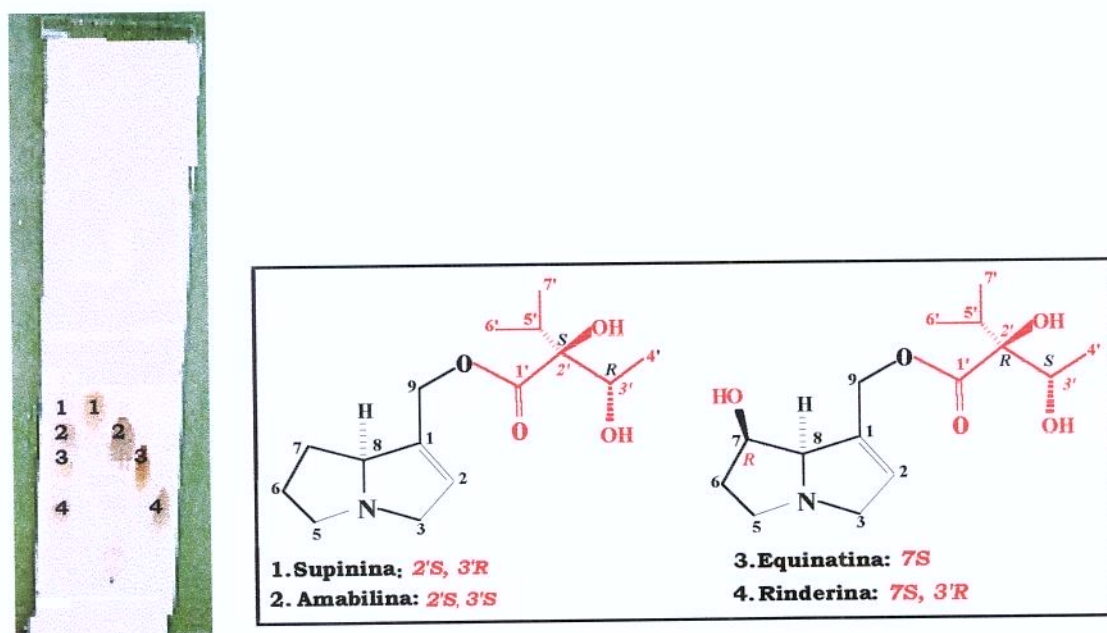


Figura 63. Cromatografia de camada delgada (CCD) do extrato bruto metanólico das folhas de *Eupatorium laevigatum* e os APs identificados por CG-EM.

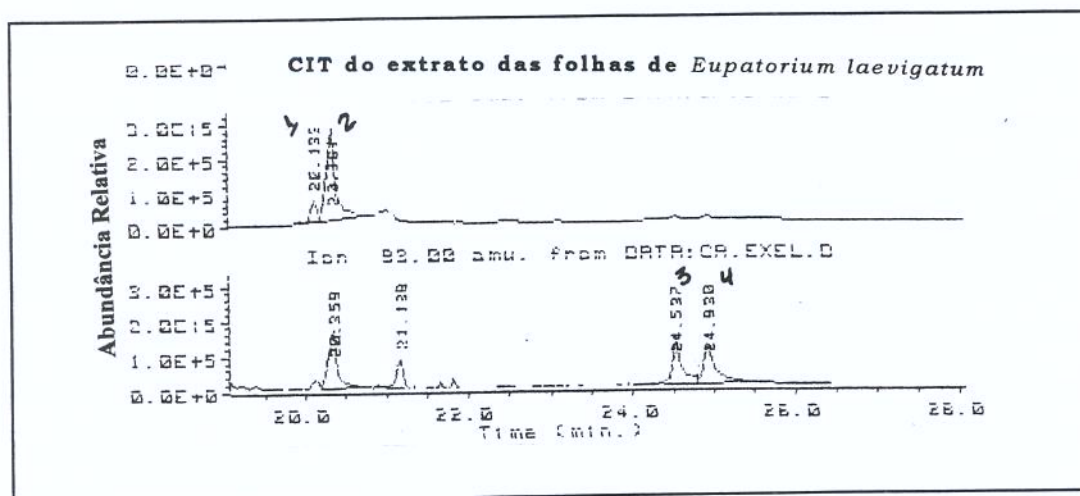


Figura 64. Cromatograma de íons totais do extrato bruto das folhas de *Eupatorium laevigatum*.

Estes compostos foram separados por cromatografia em coluna empacotada com alumina neutra e como eluente foi usado clorofórmio e quantidades crescentes de metanol. Os compostos isolados foram eluídos seguindo a ordem mostrada na Figura 63.

As frações recolhidas foram analisadas por CCD e reunidas em quatro frações principais como mostrado na Tabela 31.

Tabela 31. Frações extraídas do extrato bruto das folhas de *Eupatorium laevigatum*.

| Frações | Massa ( mg ) | Alcalóide          |
|---------|--------------|--------------------|
| FR1     | 64,3         | Supinina           |
| FR2     | 77,7         | Amabilina          |
| FR2     | 147,5        | Rinderina N-óxido  |
| FR4     | 164,0        | Equinatina N-óxido |

Dos quatro compostos isolados somente a Equinatina foi caracterizada. Esse alcalóide foi obtido na forma de N-óxido como um óleo. Sua caracterização foi realizada através da análise dos dados espectrais RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 32) e comparados com os dados da literatura (ASIBAL *et al.*, 1989; RITZ, 1991, LOGIE *et al.*, 1994).



*al.*, 1994). Os espectros de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C da Equinatina-4-óxido estão apresentados nas Figuras 65 e 66, respectivamente.

A presença desse AP na forma de N-óxido, sugere que a redução do extrato bruto, com zinco, para transformar os APs N-óxidos em APs livres foi incompleta.

O espectro de RMN<sup>1</sup>H da Equinatina-4-óxido é similar ao seu correspondente na forma terciária (Equinatina) mostrando uma diferença na região de  $\delta$  2,6-4,6. Quanto ao espectro de RMN<sup>13</sup>C, a diferença fundamental esta no carbono **C-8** com  $\delta$  96,6. Para Equinatina na forma livre esse valor seria em  $\delta$  79,6 (ASIBAL *et al.*, 1989). A análise completa dos espectros de RMN<sup>1</sup>H foi acompanhada por uma análise de DEPT (Figura 67).

Tabela 32. Deslocamentos químicos de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) e <sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO) da Equinatina N-óxido.

| Formula: C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub><br>Massa: 315 |                |                 |                | Dados da literatura<br>* J. Nat. Prod. 52(1):109-118, 1989<br>** Phytochemistry. 37(1):43-109, 1994 |        |                 |
|------------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|
| <sup>1</sup> H                                                         |                | <sup>13</sup> C |                | <sup>1</sup> H                                                                                      |        | <sup>13</sup> C |
| Posição                                                                | $\delta$ (ppm) | J (Hz)          | $\delta$ (ppm) | $\delta$ (ppm)                                                                                      | J (Hz) | $\delta$ (ppm)  |
| 1                                                                      | -              | -               | 135,2          | -                                                                                                   | -      | 133,4           |
| 2                                                                      | 5,67 (sl)      | -               | 120,0          | 5,65 (dl)                                                                                           | -      | 121,3           |
| 3 $\alpha$                                                             | 4,38 (sl)      | -               | 77,0           | 4,32 (d)                                                                                            | 16,0   | 77,0            |
| 3 $\beta$                                                              | -              | -               | -              | 4,61 (d)                                                                                            | 16,0   | -               |
| 5 $\alpha$                                                             | 3,64 (m)       | -               | 69,4           | 3,63 (m)                                                                                            | -      | 67,9            |
| 5 $\beta$                                                              | 4,07 (m)       | -               | -              | 4,04 (m)                                                                                            | -      | -               |
| 6 $\alpha$                                                             | 1,92-2,02 (m)  | -               | 32,5           | 1,94 (m)                                                                                            | -      | 32,5            |
| 6 $\beta$                                                              | -              | -               | -              | 2,31 (m)                                                                                            | -      | -               |
| 7                                                                      | 5,17 (sl)      | -               | 70,5           | 5,19 (dl)                                                                                           | -      | 71,2            |
| 8                                                                      | 5,17 (sl)      | -               | 96,6           | 5,19 (m)                                                                                            | -      | 96,5            |
| 9 $\alpha$                                                             | 4,66 (d)       | 13,9            | 60,0           | 4,62 (d)                                                                                            | 14,0   | 60,0            |
| 9 $\beta$                                                              | 5,08 (dd)      | 13,9            | -              | 5,07 (d)                                                                                            | 14,0   | -               |
| 1'                                                                     | -              | -               | 174,3          | -                                                                                                   | -      | 173,0           |
| 2'                                                                     | -              | -               | 84,9           | -                                                                                                   | -      | 84,0            |
| 3'                                                                     | 3,90 (q)       | 6,6             | 73,4           | 3,90 (d)                                                                                            | 7,0    | 71,7            |
| 4'                                                                     | 1,30 (d)       | 6,6             | 16,6           | 1,27 (d)                                                                                            | 7,0    | 16,7            |
| 5'                                                                     | 2,18 (qd)      | 6,6             | 32,1           | 2,16 (hept)                                                                                         | 7,0    | 31,9            |
| 6'                                                                     | 0,92 (d)       | 6,6             | 17,9           | 0,90 (d)                                                                                            | 7,0    | 17,5            |
| 7'                                                                     | 0,87 (d)       | 6,6             | 15,2           | 0,87 (d)                                                                                            | 7,0    | 15,3            |

\*. RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

\*\*. RMN<sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

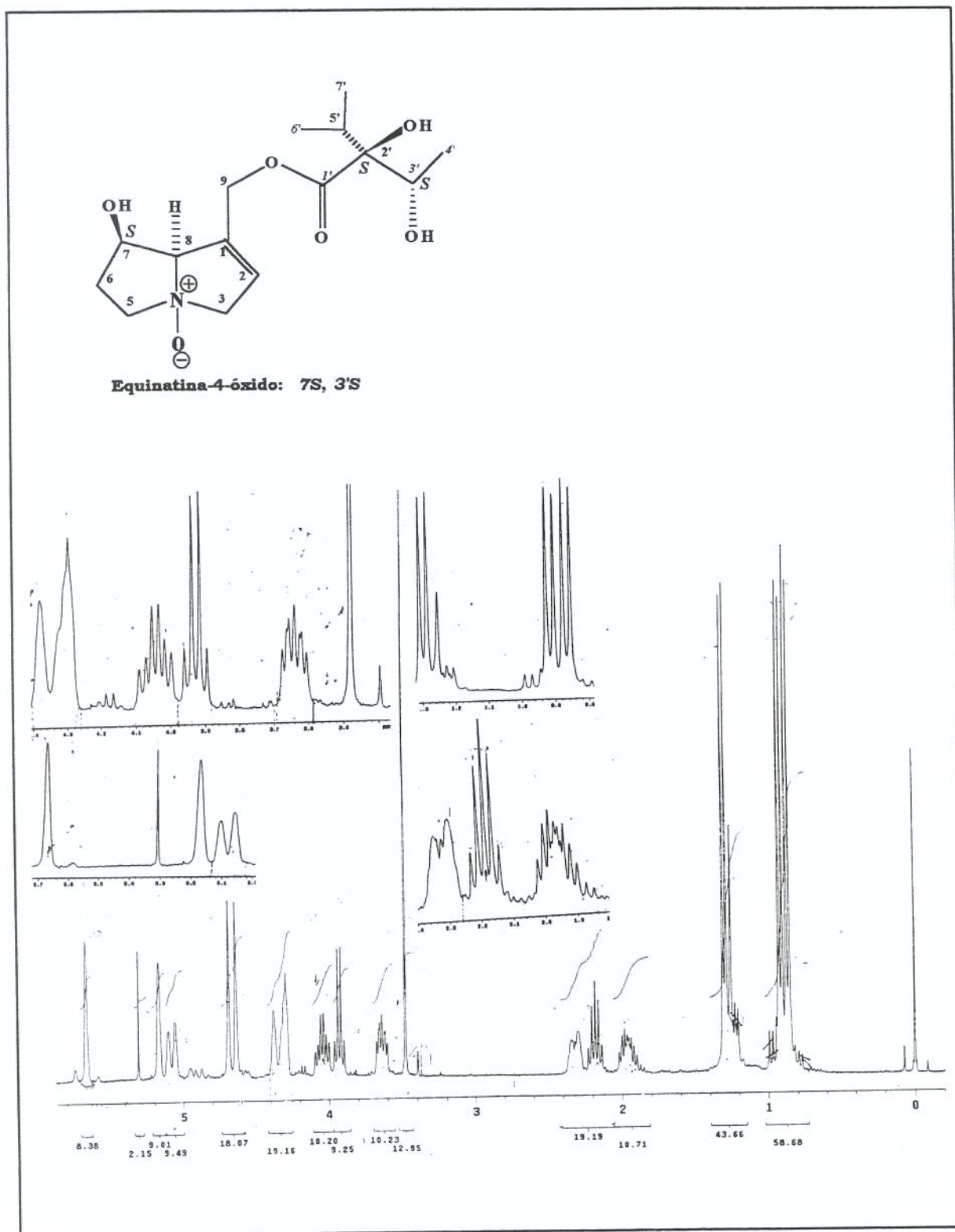


Figura 65. RMN<sup>1</sup>H da Equinatina-4-óxido em CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz.

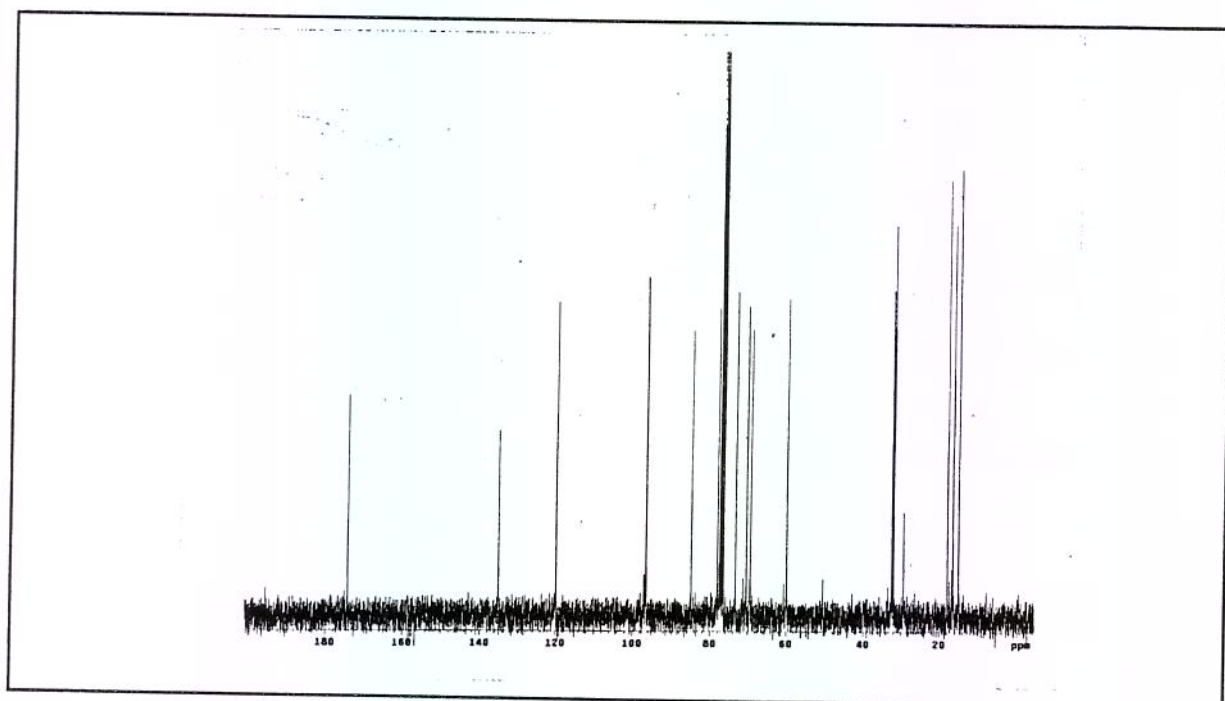


Figura 66.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  da Equinatina-4-óxido em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

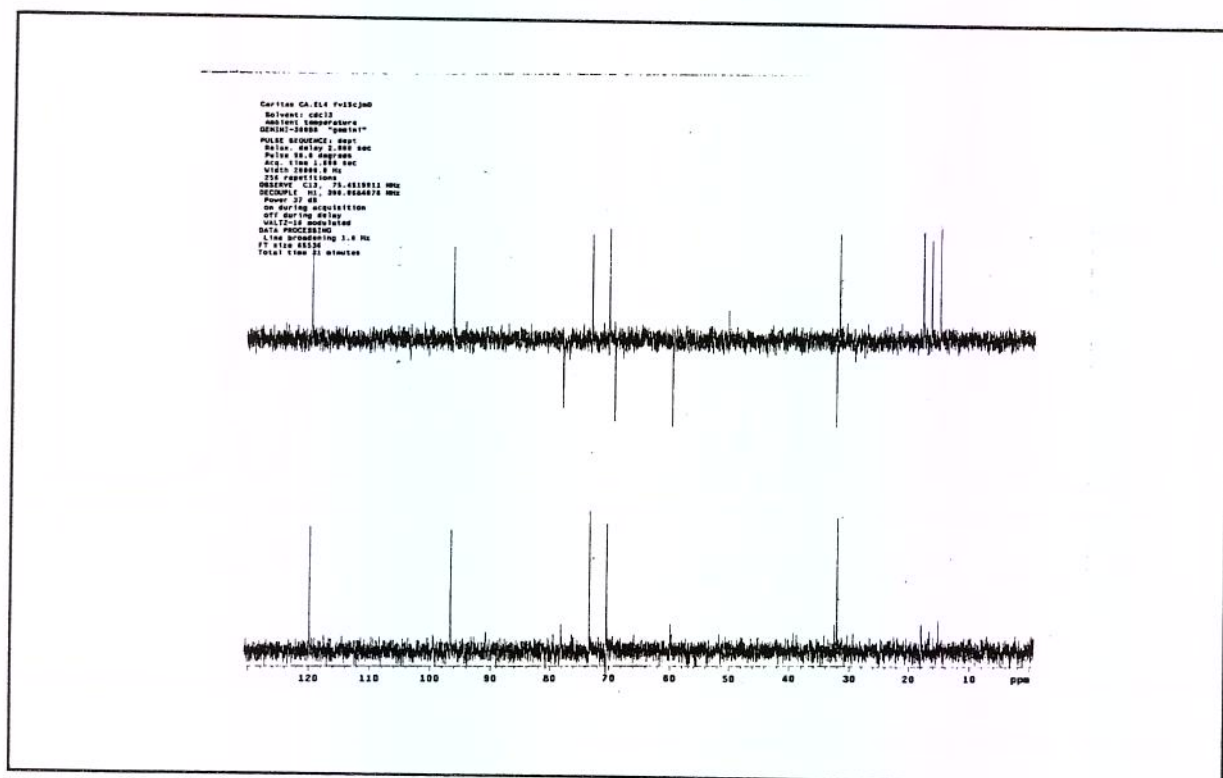


Figura 67.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (DEPT) da Equinatina-4-óxido em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.



## Usaramina

A análise inicial dos extratos brutos metanólicos das sementes de *Crotalaria lanceolata*, *Crotalaria spectabilis* e *Crotalaria juncea* por CG-EM, revelou a presença dos APs Integerrimina, Usaramina, um monoéster saturado de estrutura desconhecida e a Monocrotalina. Estes APs foram isolados, caracterizados e suas estruturas confirmadas de acordo com a comparação com os dados da literatura (MOLYNEUX *et al.*, 1982; RIZK, 1991 & LOGIE *et al.*, 1994).

O AP Usaramina foi isolado das sementes *Crotalaria lanceolata*, através de cromatografia em coluna empacotada com sílica gel, utilizando-se como eluente clorofórmio e metanol. O alcalóide (30mg) foi obtido na forma de cristal e purificado em placa preparativa usando-se como eluente clorofórmio, metanol e hidróxido de amônia (92,5:7:0,5). Após a purificação o AP foi caracterizado por CG-EM (Figura 68), RMN<sup>1</sup>H (Figura 69), RMN<sup>13</sup>C (Figura 70) e DEPT (Figura 71). Os dados (Tabela 33) foram comparados com dados da literatura (MOLYNEUX, 1982; ROEDER, 1990; RIZK, 1991) confirmando assim a estrutura do AP.

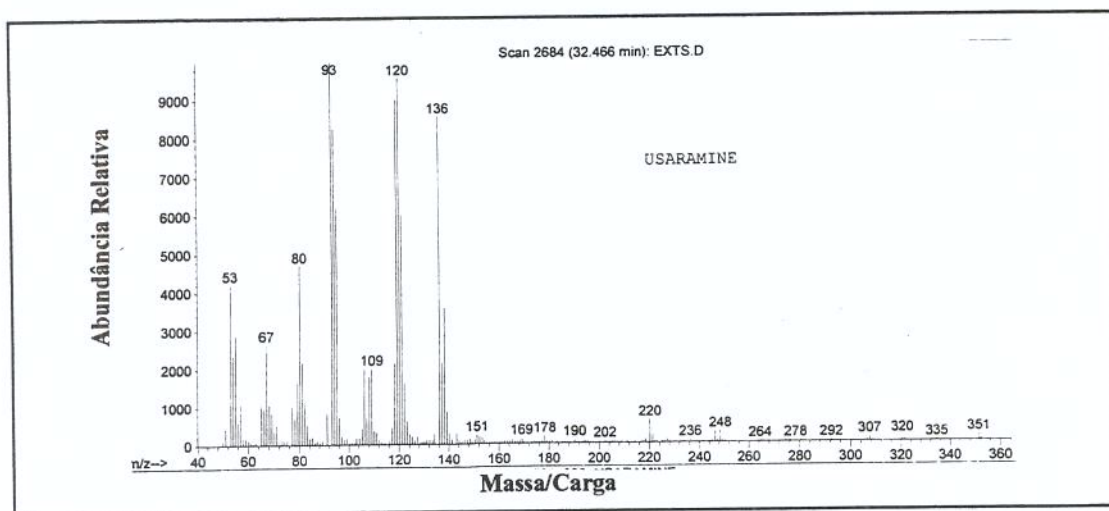


Figura 68. EM-IE do AP Usaramina.



Tabela 33. Deslocamentos químico de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (75 Mz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Usaramina.

| Formula: $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6$<br>Massa: 351 |                |                 |                | Dados da Literatura<br>* <i>Phytochemistry</i> , 37(1):43-109, 1994<br>** <i>Phytochemistry</i> , 29(1):11-29, 1990 |          |                 |
|----------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------|
| $^1\text{H}$                                                   |                | $^{13}\text{C}$ |                | $^1\text{H}$                                                                                                        |          | $^{13}\text{C}$ |
| Posição                                                        | $\delta$ (ppm) | J (Hz)          | $\delta$ (ppm) | $\delta$ (ppm)                                                                                                      | J (Hz)   | $\delta$ (ppm)  |
| 1                                                              | -              | -               | 131,7          | -                                                                                                                   | -        | 131,7           |
| 2                                                              | 6,20 (s)       | -               | 137,3          | 6,21 (d)                                                                                                            | 6,8      | 136,6           |
| 3 $\alpha$                                                     | 3,39 (dd)      | 15,0; 5,0       | 62,5           | 3,33                                                                                                                | -        | 62,5            |
| 3 $\beta$                                                      | 3,94 (d)       | 16,0            | -              | 3,89                                                                                                                | -        | -               |
| 5 $\alpha$                                                     | 2,57 (m)       | -               | 52,9           | 2,48                                                                                                                | -        | 52,9            |
| 5 $\beta$                                                      | 3,24 (t)       | 8,0             | -              | 3,20                                                                                                                | -        | -               |
| 6 $\alpha$                                                     | 2,06-2,14 (m)  | -               | 33,5           | 2,09                                                                                                                | -        | 33,7            |
| 6 $\beta$                                                      | 2,40 (m)       | -               | -              | 2,33                                                                                                                | -        | -               |
| 7                                                              | 4,99-5,03 (m)  | 1,8             | 75,6           | 5,01 (m)                                                                                                            | -        | 75,5            |
| 8                                                              | 4,30 (sl)      | -               | 76,9           | 4,22                                                                                                                | -        | 76,9            |
| 9 $\alpha$                                                     | 4,17 (d)       | 11,7            | 61,3           | 4,09 (d)                                                                                                            | 11,7     | 61,2            |
| 9 $\beta$                                                      | 5,45 (d)       | 11,7            | -              | 5,42 (d)                                                                                                            | 11,7     | -               |
| 11                                                             | -              | -               | 176,0          | -                                                                                                                   | -        | 175,6           |
| 12                                                             | -              | -               | 81,2           | -                                                                                                                   | -        | 81,3            |
| 13                                                             | 1,75 (d)       | 7,0             | 36,6           | 1,64                                                                                                                | -        | 36,8            |
| 14 $\alpha$                                                    | 2,05 (dl)      | 13,0            | 29,5           | 1,71                                                                                                                | -        | 29,3            |
| 14 $\beta$                                                     | 2,20 (dd)      | 13,0; 10,0      | -              | 2,16                                                                                                                | -        | -               |
| 15                                                             | -              | -               | 133,6          | -                                                                                                                   | -        | 133,4           |
| 16                                                             | -              | -               | 169,3          | -                                                                                                                   | -        | 168,9           |
| 18 $\alpha$                                                    | 3,65 (d)       | 11,0            | 66,3           | 3,57                                                                                                                | -        | 67,1            |
| 18 $\beta$                                                     | 3,76 (d)       | 11,0            | -              | 3,68                                                                                                                | -        | -               |
| 19- $\text{CH}_3$                                              | 0,86 (d)       | 7,0             | 12,3           | 0,84 (d)                                                                                                            | 6,5      | 12,3            |
| 20                                                             | 6,54 (q)       | 6,9             | 135,9          | 6,50 (q)                                                                                                            | 6,8      | 135,7           |
| 21- $\text{CH}_3$                                              | 1,85 (d)       | 6,9             | 13,9           | 1,75 (dd)                                                                                                           | 6,8; 0,9 | 14,2            |

\* RMN $^1\text{H}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )\*\* RMN $^{13}\text{C}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

O sinal em  $\delta$  6,54 (C-20), no espectro de RMN $^1\text{H}$  é característico do macrocíclico Usaramina (configuração *E*- LOGIE *et al.*, 1994)).

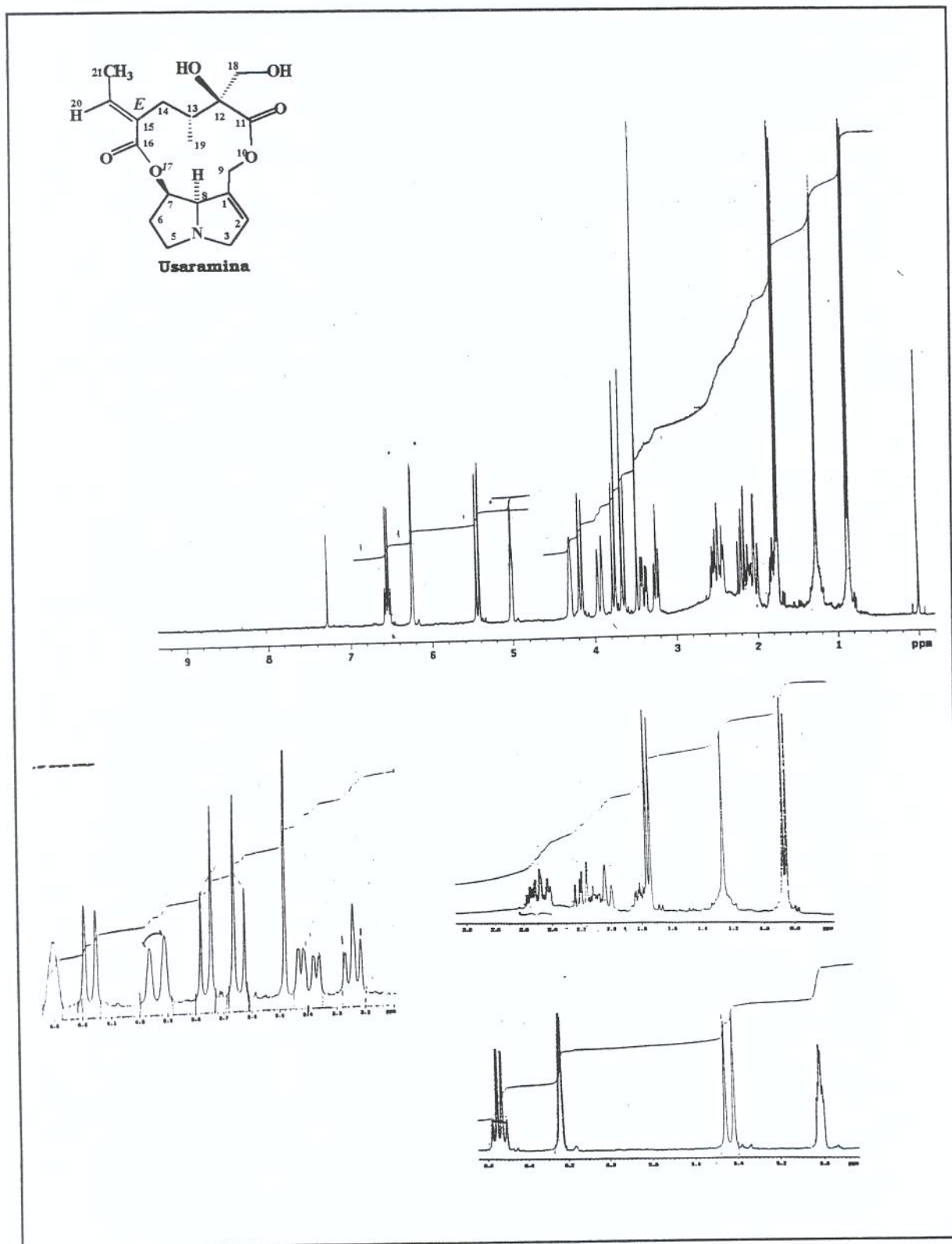


Figura 69. RMN<sup>1</sup>H da Usaramina em CDCl<sub>3</sub> a 300 MHz.

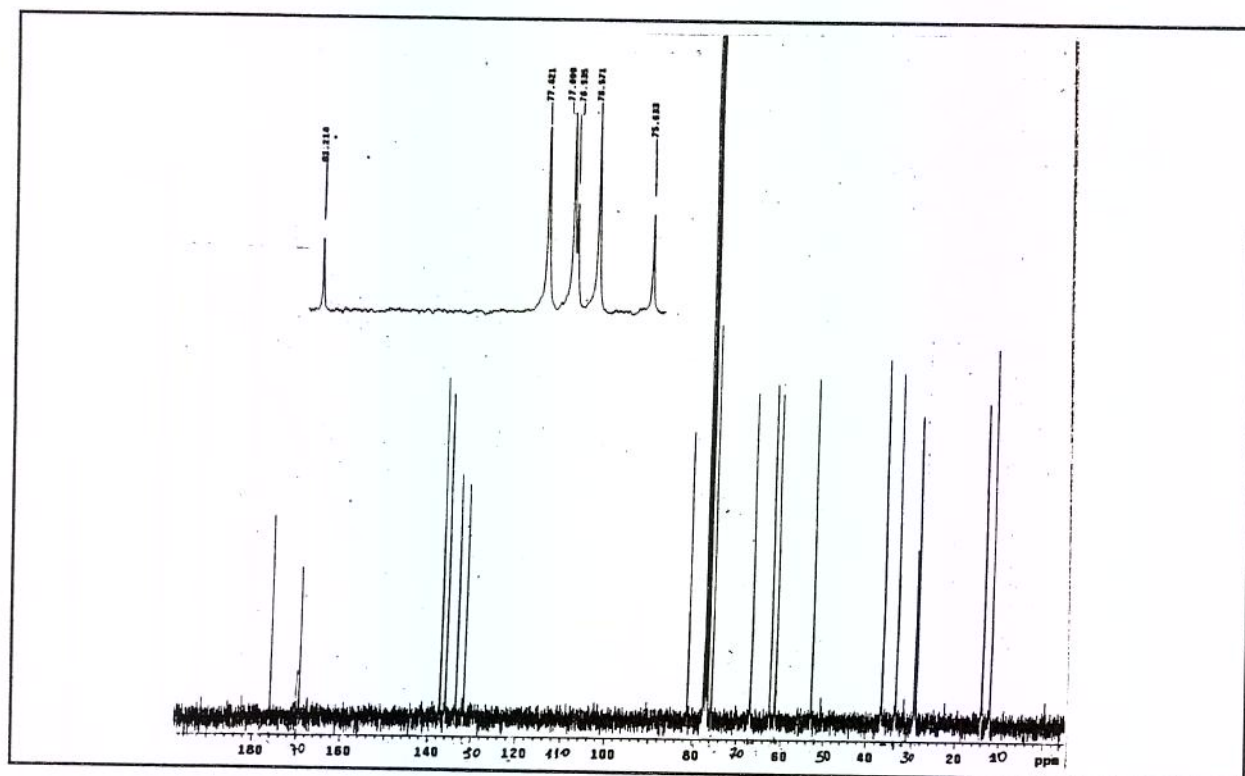


Figura 70.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  da Usaramina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

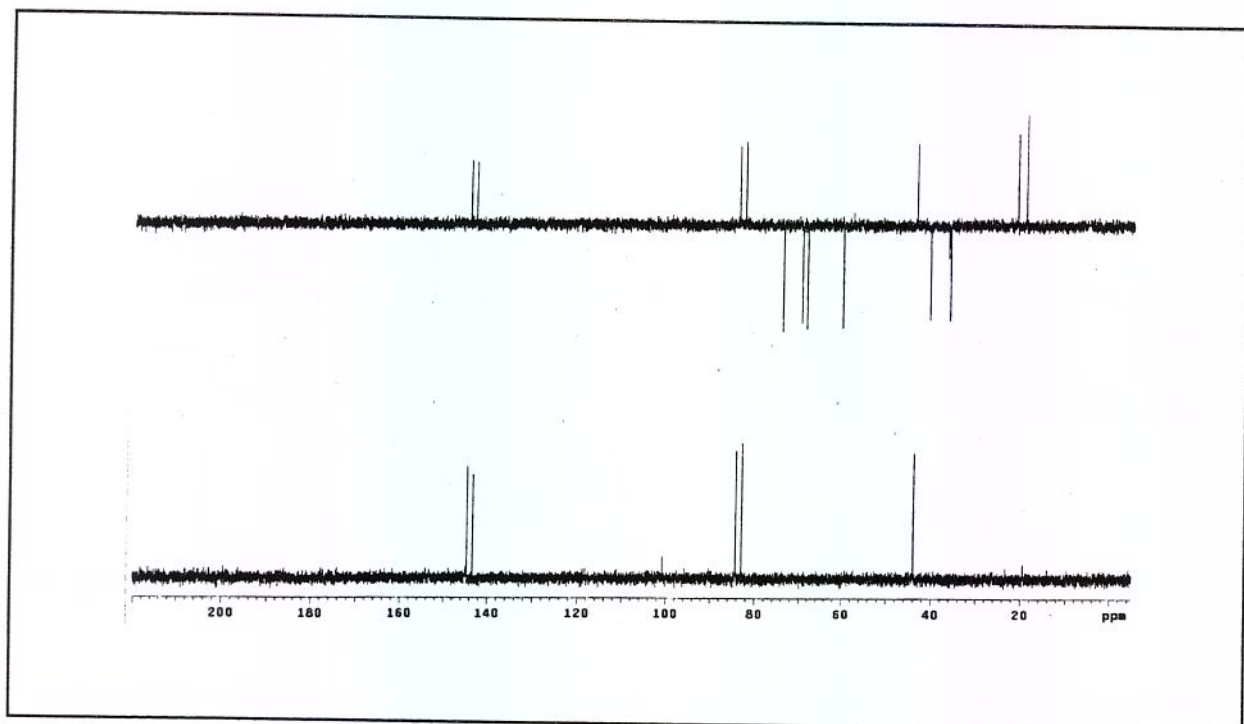


Figura 71.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (DEPT) da Usaramina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

Além do AP Usaramina, a análise do extrato bruto metanólico por CG-EM das sementes *Crotalaria lanceolata* revelou a presença de um AP (mancha marcada com um círculo na CCD, Figura 72), cuja provável estrutura esta mostrada na Figura 72 . Foi obtido 10mg desse composto na forma de uma goma branca, cuja identificação foi feita por GC-EM, Figura 73.

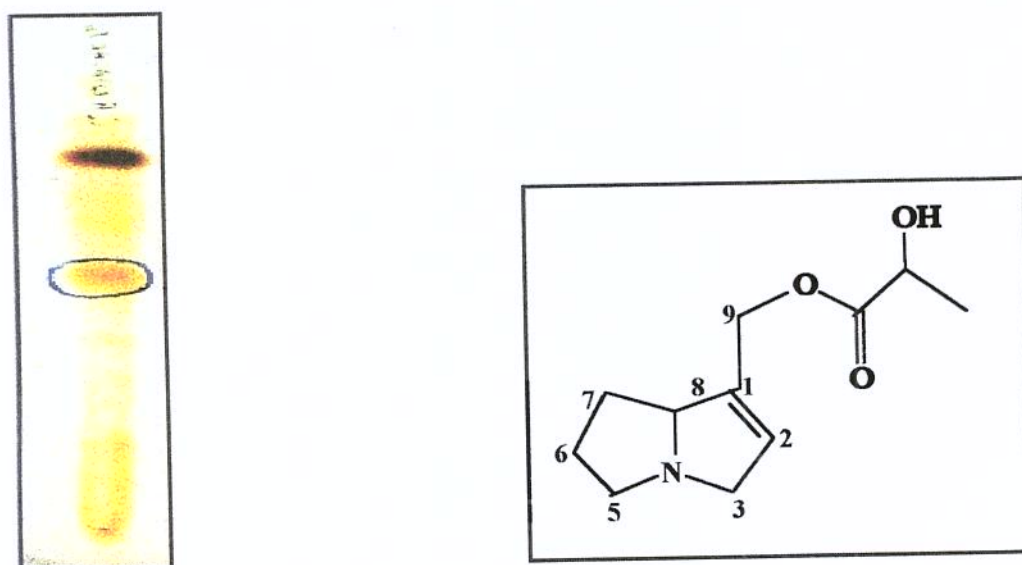


Figura 72. Cromatografia de camada delgada do extrato bruto metanólico da das sementes de *Crotalaria lanceolata* e a provável estrutura do AP isolado deste extrato.

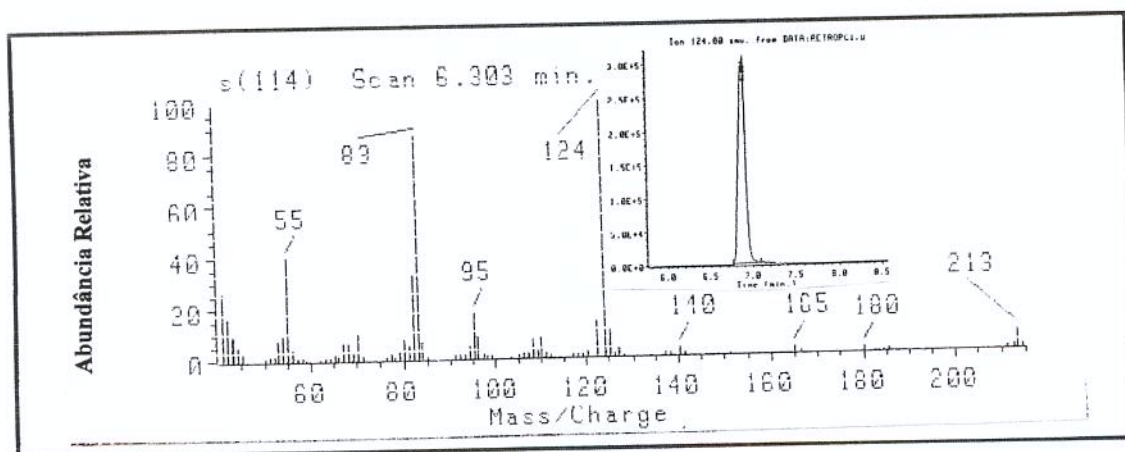


Figura 73. EM-IE do AP de estrutura não definida.

O composto foi enviado para análise de RMN<sup>1</sup>H. Entretanto, não foi possível confirmar com segurança a sua estrutura química. O



espectro mostrou a presença de uma mistura. Os deslocamentos químicos mostravam ser o AP apresentado na figura 72, porém os dados da metade até o fim do espectro mostrava uma outra estrutura. Devido a pouca quantidade do material não foi possível repetir a análise para uma caracterização mais completa, ficando em aberto para estudos posteriores.

### **Monocrotalina**

A análise inicial do extrato bruto metanólico das sementes de *Crotalaria spectabilis* por CG-EM mostrou a presença majoritária do AP Monocrotalina (Figura 74). O isolamento deste AP foi realizado por meio de cromatografia de adsorção em sílica gel, usando-se como fase móvel  $\text{CHCl}_3$  e quantidades crescentes de MeOH.

O alcalóide (80mg) foi obtido como um pó de cor amarela, sendo caracterizado por RMN<sup>1</sup>H (Figura 74), <sup>13</sup>C (Figura 75). A análise completa dos espectros RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foi acompanhada por uma análise de espectros 2D homo e heteronuclear (Figuras 76, 77 e 78, respectivamente).

Os dados de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (Tabela 34) foram comparados com dados da literatura (MOLYNEUX, 1982; ROEDER, 1990; RIZK, 1991 & LOGIE *et al.*, 1994), confirmando assim a estrutura do alcalóide.

Tabela 34. Deslocamentos químicos de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Monocrotalina.

| Fórmula: $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}_6$<br>Massa: 325 |                |           |                 | Dados da Literatura:<br>* Phytochemistry, 37(1):43-109, 1994<br>** Phytochemistry, 29(1):11-29, 1990 |        |                 |
|----------------------------------------------------------------|----------------|-----------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|-----------------|
| $^1\text{H}$                                                   |                |           | $^{13}\text{C}$ | $^1\text{H}$                                                                                         |        | $^{13}\text{C}$ |
| Posição                                                        | $\delta$ (ppm) | J (Hz)    | $\delta$ (ppm)  | $\delta$ (ppm)                                                                                       | J (Hz) | $\delta$ (ppm)  |
| 1                                                              | -              | -         | 132,7           | -                                                                                                    | -      | 132,3           |
| 2                                                              | 6,04 (s)       | -         | 134,3           | 6,04                                                                                                 | -      | 134,2           |
| 3 $\alpha$                                                     | 3,89 (dl)      | 16,0      | 60,5            | 3,48                                                                                                 | -      | 60,4            |
| 3 $\beta$                                                      | 3,47 (dd)      | 16,0; 5,5 | -               | 3,91                                                                                                 | -      | -               |
| 5 $\alpha$                                                     | 3,17 (dd)      | 9,0; 5,5  | 53,6            | 3,22                                                                                                 | -      | 53,7            |
| 5 $\beta$                                                      | 2,58 (q)       | 9,0       | -               | -                                                                                                    | -      | -               |
| 6 $\alpha$                                                     | 2,05-2,09 (m)  | -         | 33,5            | 2,09                                                                                                 | -      | 33,5            |
| 6 $\beta$                                                      | -              | -         | -               | -                                                                                                    | -      | -               |
| 7                                                              | 5,04 (m)       | -         | 75,1            | 5,06                                                                                                 | -      | 74,6            |
| 8                                                              | 4,40 (m)       | -         | 76,6            | 4,39                                                                                                 | -      | 76,8            |
| 9 $\alpha$                                                     | 4,68 (d)       | 11,9      | 61,3            | 4,69                                                                                                 | -      | 61,3            |
| 9 $\beta$                                                      | 4,89 (d)       | 11,9      | -               | 4,91                                                                                                 | -      | -               |
| 11                                                             | -              | -         | 174,0           | -                                                                                                    | -      | 174,8           |
| 12                                                             | -              | -         | 78,7            | -                                                                                                    | -      | 78,6            |
| 13                                                             | -              | -         | 76,7            | -                                                                                                    | -      | 77,7            |
| 14 $\alpha$                                                    | 2,79 (q)       | -         | 44,3            | 2,80                                                                                                 | -      | 44,2            |
| 14 $\beta$                                                     | -              | -         | -               | -                                                                                                    | -      | -               |
| 15                                                             | -              | -         | 173,5           | -                                                                                                    | -      | 174,3           |
| 16                                                             | -              | -         | -               | -                                                                                                    | -      | -               |
| 17 ( $\text{CH}_3$ )                                           | 1,35 (s)       | -         | 21,9            | 1,35                                                                                                 | -      | 22,4            |
| 18 ( $\text{CH}_3$ )                                           | 1,43 (s)       | -         | 17,6            | 1,45                                                                                                 | -      | 18,2            |
| 19 ( $\text{CH}_3$ )                                           | 1,21 (d)       | 7,1       | 13,6            | 1,22                                                                                                 | -      | 14,3            |

\* RMN $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

\*\* RMN $^{13}\text{C}$  (25,03 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ )

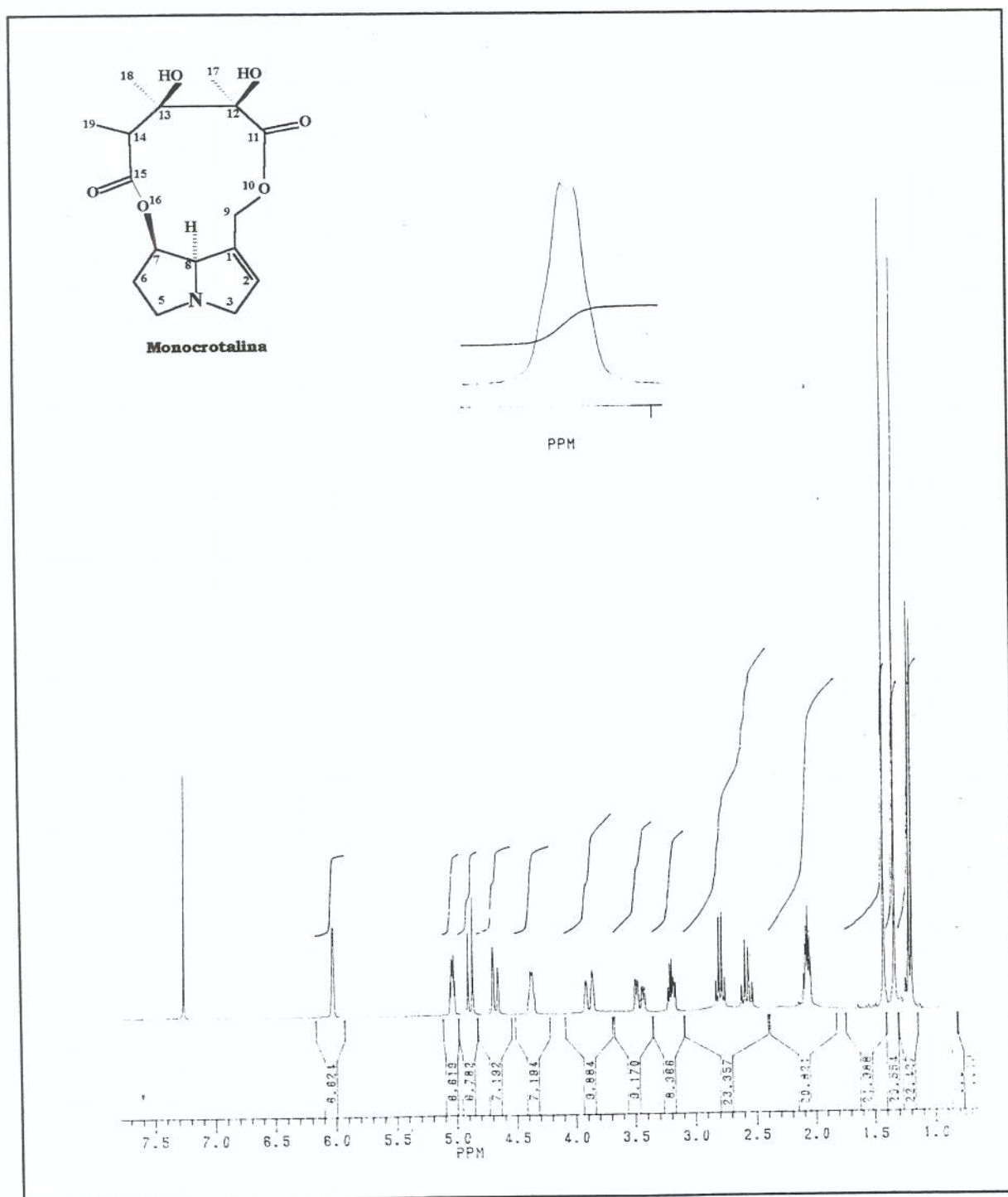


Figura 74.  $\text{RMN}^1\text{H}$  da Monocrotalina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

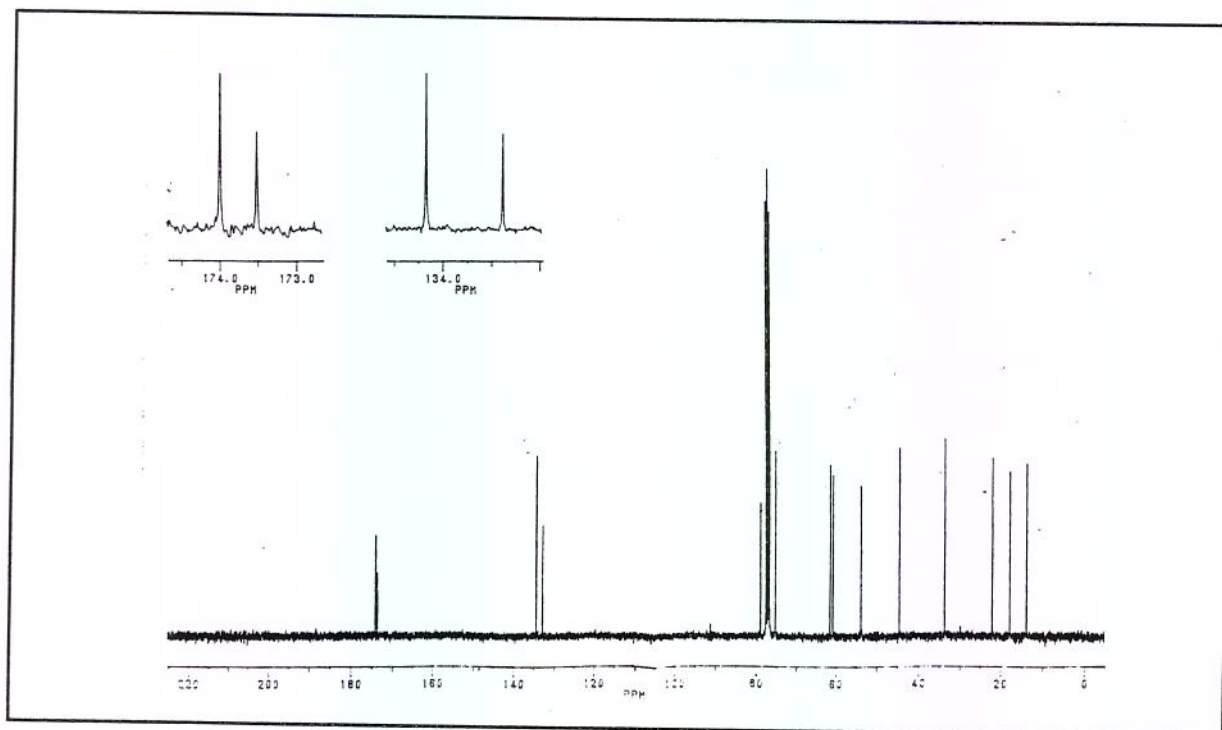


Figura 75.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  da Monocrotalina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

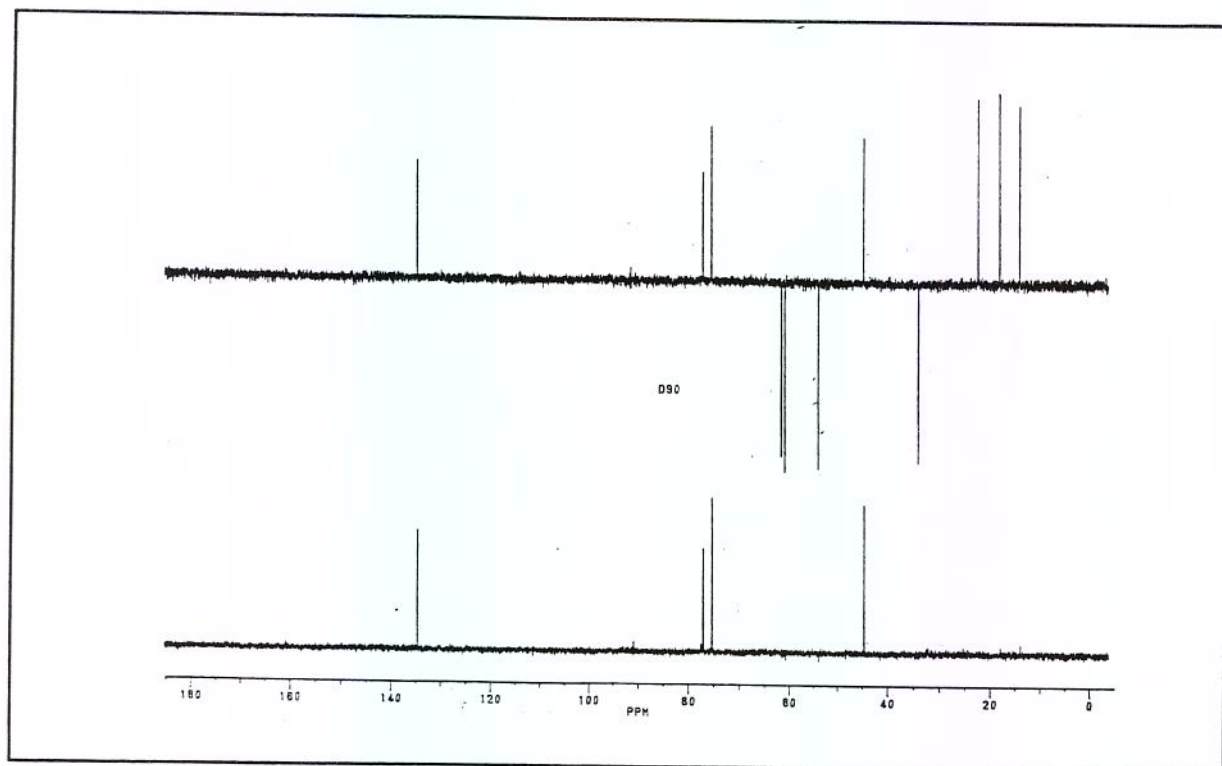


Figura 76.  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (DEPT) da Monocrotalina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.



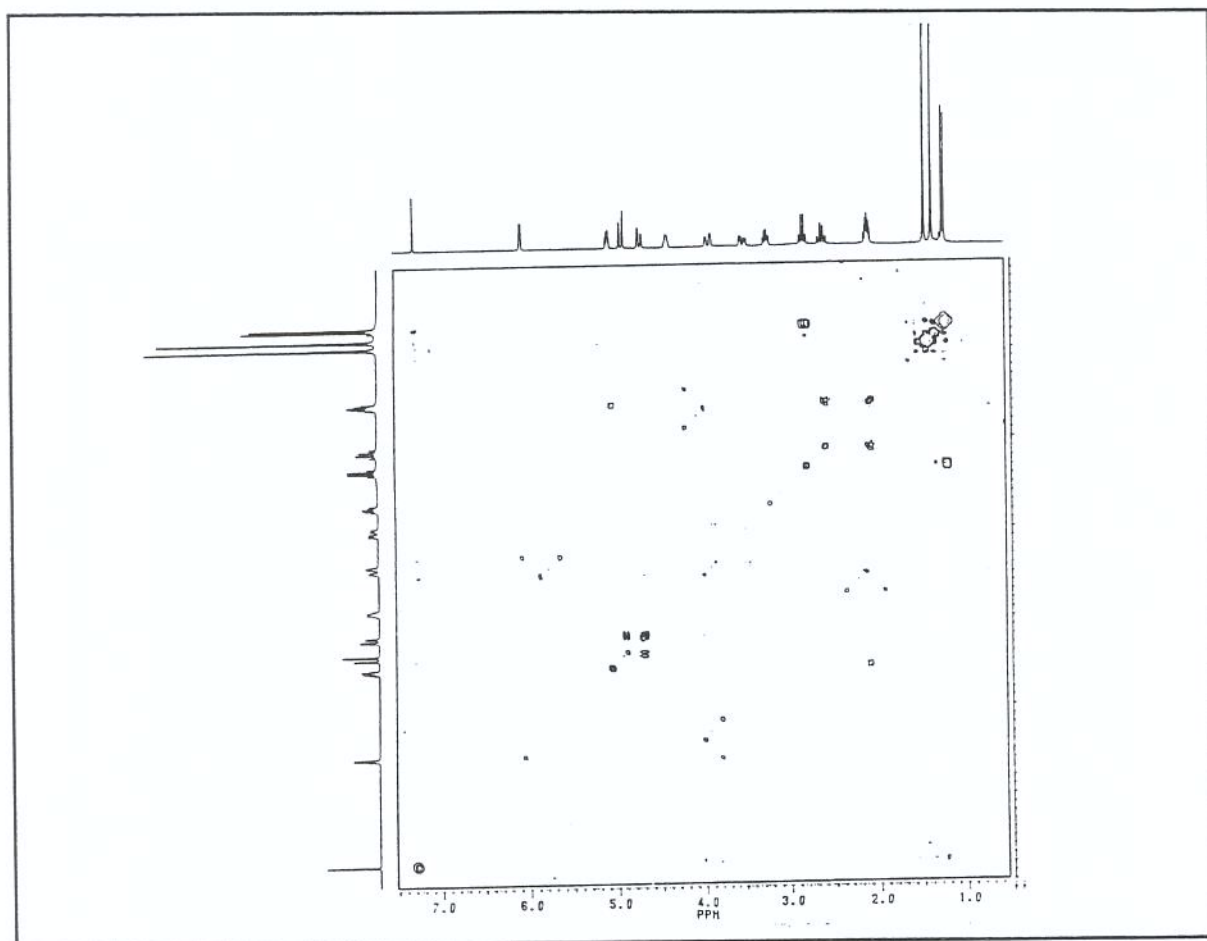


Figura 77. COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) da Monocrotalina em  $\text{CDCl}_3$  a 300 MHz.

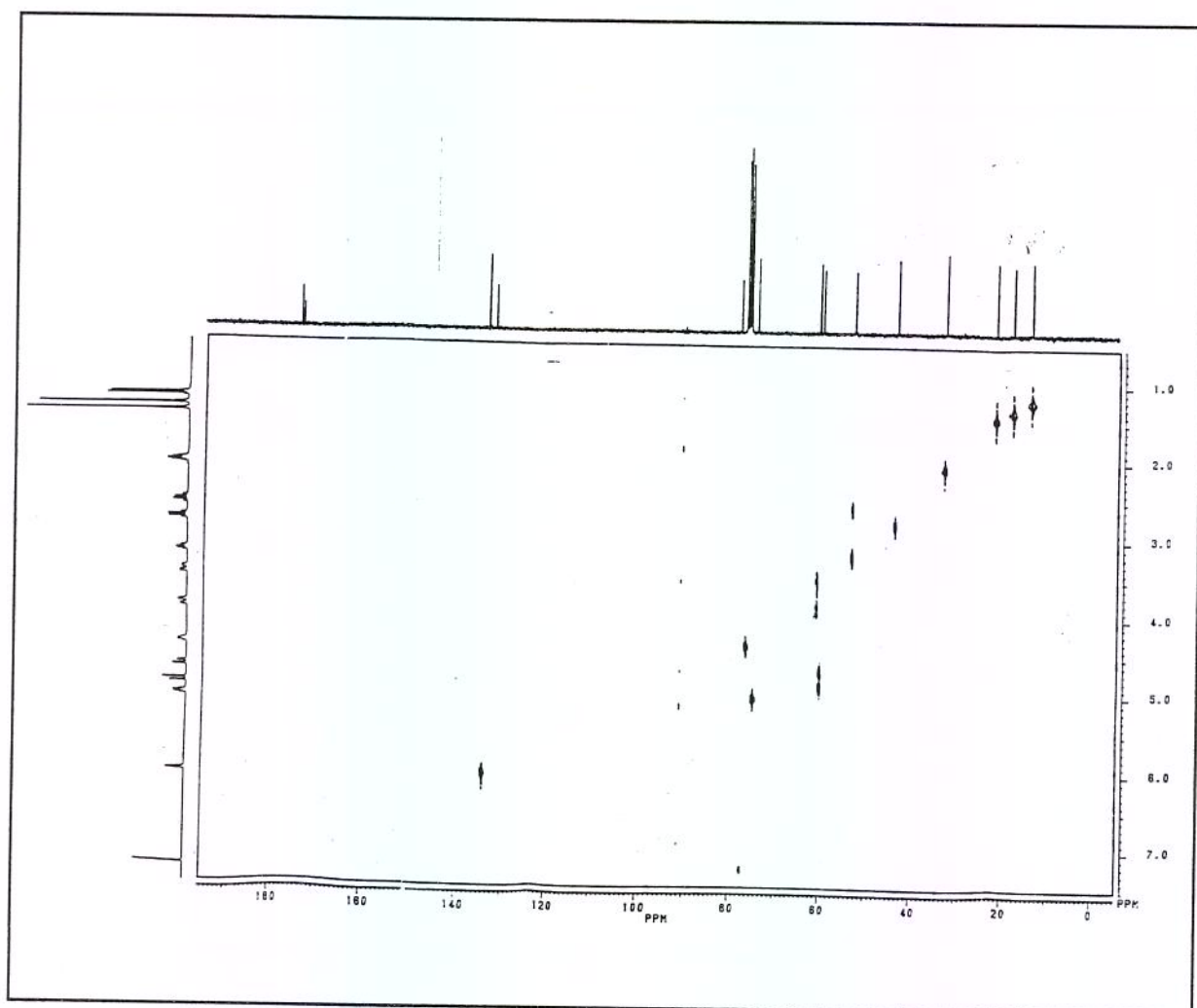


Figura 78. HETCOR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) da Monocrotalina em  $\text{CDCl}_3$  a 75 MHz.

## 5.4 TESTES DE TOXICIDADE

Este estudo compreende a análise dos dados toxicológicos de uma substância química com o objetivo de classificá-la toxicologicamente e, ao mesmo tempo, obter informações a respeito de seus efeitos, da forma concreta de seu emprego e do modo como estes podem ser utilizados sem causarem danos ao ser humano.

Os dados toxicológicos são informações obtidas através da experimentação em animais de laboratório ou através de registros de casos de intoxicações ocorridas em seres humanos.

Os testes de avaliação de toxicidade podem ser divididos em duas categorias. A primeira inclui aqueles testes destinados a avaliar os efeitos gerais da substância sobre os animais de experimentação, e os testes diferem entre si de acordo com a duração e a extensão com que os animais são criticamente avaliados, e são divididos em (BRITO, 1994):

1. Teste de Toxicidade Aguda (dose simples), avalia o efeito danoso que se produz dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única ou de várias doses de uma substância em um período de 24 horas, com observação até 14 dias.

2. Teste de Toxicidade Aguda (doses repetidas), avalia o efeito nocivo de doses repetidas resultante da ação ou do aumento da concentração da substância administrada.

3. Teste de Toxicidade Subcrônica (trinta a noventa dias, após a ingestão da substância), é utilizado para verificar o efeito nocivo que se produz no animal de experimentação, resultante da administração repetida e diária da substância administrada, considerando-se o acúmulo no organismo e consequente aumento de sua concentração; este teste fornece informações acerca dos riscos potenciais para a saúde, resultantes da exposição, de preferência oral, de doses repetidas de uma dada substância em um período limitado de tempo (30 a 90 dias).

4. Teste de Toxicidade Crônica (três meses a um ano, após a ingestão da substância); este estudo fornece informações acerca dos riscos potenciais para a saúde, resultantes de uma exposição oral de doses repetidas de uma dada substância, a curto e a longo prazo, e informações adicionais sobre órgão-alvo, possibilidades de efeitos acumulativos e informações iniciais de segurança concernentes à exposição da substância teste para o homem.

A segunda categoria de testes refere-se àqueles designados para avaliar, com detalhe, tipos específicos de toxicidade. Dentre estes, podemos citar os testes para avaliar a teratogenicidade, mutagenicidade, ensaios para determinar os efeitos sobre a capacidade de reprodução, ensaios para determinar a capacidade dos agentes de provocarem tumores, isto é, ensaios de carcinogenicidade (LOOMIS, 1975).

#### **5.4.1 Teste de Toxicidade Aguda - Exame Anatomopatológico**

##### **Grupo A. Controle**

Os exemplares do grupo controle (**A**) apresentaram, após o experimento, o fígado com a estrutura hepática típica comumente observada para um rato de fígado normal, com coloração vermelho rubro e a superfície lisa (Figura 79, Prancha 1).

**Grupos B (Licopsamina e Indicina), D (Indicina N-óxido), F (Retronecina) e G (Ácido Integerrinecico).**

As observações preliminares macroscópicas do fígado dos exemplares dos **grupos B, D, F, e G** (que receberam alcalóides puros) apresentaram, após o experimento, características macroscópicas idênticas àquelas descritas para o grupo controle **A**.

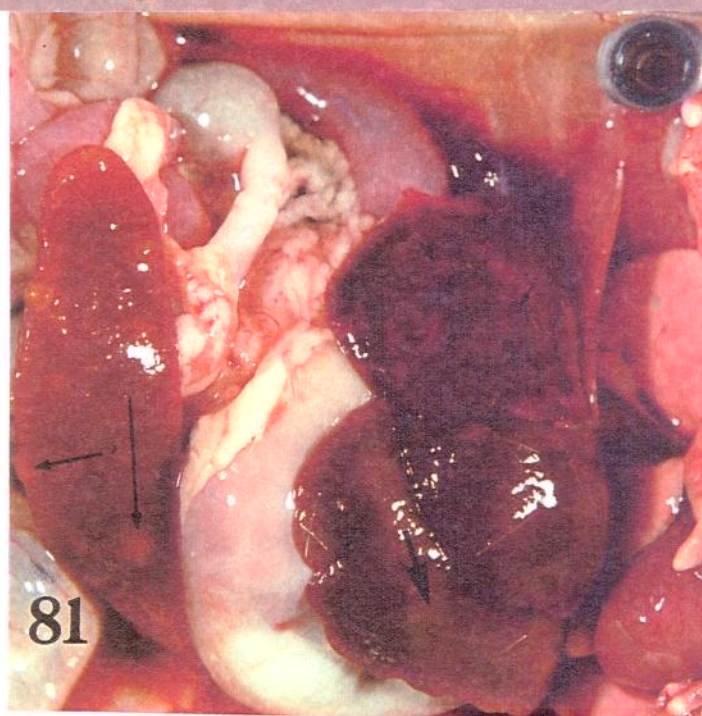
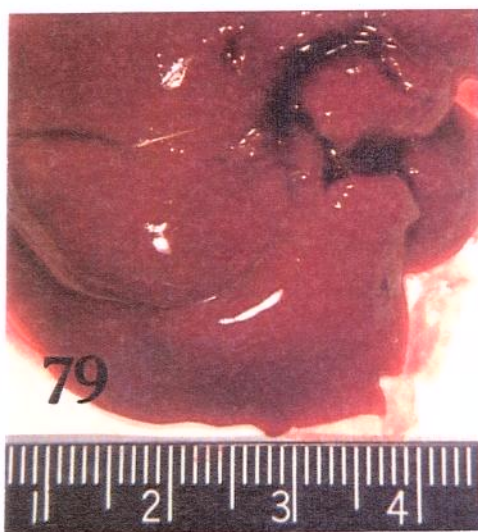


### **Grupo C. APs Diésteres Macroclícos**

Neste grupo, foram detectadas as primeiras alterações macroscópicas a partir dos **sub-grupos C2, C3, C4, C7, C8, C9 e C10**. Alguns fígados se apresentaram congestos, com uma cor escura distribuída por toda superfície do órgão (Figura 80, Prancha 1). Outras alterações foram caracterizadas pela presença de uma coloração esbranquiçada e rugosa nas bordas dos lóbulos, e pontos enegrecidos distribuídos esparçamente por toda a superfície do órgão (Figura 81, Prancha 1).

Podemos observar também, um certo comprometimento do baço, apresentando alguns pontos brancos espalhados na superfície do órgão (Figura 81, Prancha 1).

PRANCHA 1



### Grupo E. N-óxidos Macrocíclicos

As alterações macroscópicas observadas neste grupo, tanto para a Integerrimina quanto para a Retrorsina N-óxido, começaram a ser evidenciadas logo nos primeiros dias da administração. Essas alterações foram caracterizadas pela presença de necrose hemorrágica. Após 28 dias da administração dos alcalóides o fígado apresentou a superfície irregular, idêntica aquela observada para os exemplares do **grupo C** (Figura 81, Prancha 1). Nestes animais também foi observado um quadro de ascite bem evidente.

Os exemplares do **sub-grupo E3** (Integerrimina N-óxido 70 mg/kg) também apresentaram ascite. Os fígados estavam entumecidos e esbranquiçados.

Todos os exemplares do **sub-grupo E4** (Integerrimina N-óxido 210,6 mg/kg) evoluíram a óbito no decorrer do experimento, tornando impossível a coleta de todos os órgãos devido ao canibalismo.

#### 5.4.2 Teste de Toxicidade Crônica - Exame Anatomopatológico

Os resultados das observações dos testes de Toxicidade Crônica realizados com infusões das plantas *Ageratum conyzoides*, *Heliotropium indicum*, *Heliotropium transalpinum*, *Eupatorium laevigatum* e *Senecio brasiliensis*, onde constam observações comportamentais e anatomia patológica, estão descritos abaixo:

### Grupo H

A infusão preparada a partir da planta (toda) *Ageratum conyzoides*, foi usada na dose de 1g/kg.

Neste período não ocorreram mortes e/ou sinais de disfunção orgânica (diarréia, convulsões, salivação) aparente. Convém



ressaltar que os APs presentes nesta planta pertencem à classe dos monoésteres, considerados menos tóxicos quando comparados com APs macrocíclicos e seus N-óxidos (MATTOCKS, 1986).

Provavelmente este teste necessite ser prolongado, para que possa se verificar algum tipo de alteração no fígado.

## **Grupo I**

### **Sub-grupo I1 e I2**

*Heliotropium indicum* (folhas com inflorescências) foi testado na forma de infusão nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg. Na dose de 0,5 g/kg, a avaliação macroscópica não revelou nenhum tipo de alteração no fígado dos exemplares.

Na dose de 1,0 g/kg, os animais apresentaram alguns sinais de disfunção orgânica, como diarreia e perda de peso em virtude da falta de apetite. Macroscopicamente os fígados se apresentavam friáveis, de coloração vermelho intensa. Não houve morte no decorrer do experimento.

## **Grupo J. *Heliotropium transalpinum***

### **Sub-grupo J1 e J2**

*Heliotropium transalpinum* (folhas com caule) foi testado na forma de infusão utilizando-se duas doses (0,5 e 1 g/kg). A avaliação macroscópica do fígado dos exemplares, nas doses citadas acima, não revelou nenhum tipo de alteração.

## **Grupo K. *Senecio* (extrato bruto)**

O extrato na forma de infusão das folhas secas de *Senecio brasiliensis* foi testado na dose de 0,5g/kg. Durante o experimento, quase todos os animais evoluíram a óbito. Neste grupo os animais apresentaram elevada diminuição de peso, uma grande apatia



acompanhada de diarreia. Os exemplares deste **grupo** apresentaram características hepáticas macroscópicas idênticas às descritas para os grupos **C** e **E**, (APs puros) ou seja o fígado se mostrou hemorrágico, congesto e escuro. Um quadro de ascite também foi observado.

### **Grupos L. *Eupatorium laevigatum* (extrato bruto)**

#### **Sub-grupo L1 e L2**

Este teste foi conduzido nas doses de 0,5 e 1,0 g/kg do extrato bruto, quando foram observadas alterações no comportamento dos animais tais como estresse e apatia; outros aspectos observados foram a falta de apetite e o amolecimento das fezes. Apesar do quadro acima nenhum animal foi a óbito durante o experimento.

Quanto ao exame macroscópico o fígado dos exemplares apresentou manchas escuras distribuídas por todos os lóbulos hepáticos.

Entre os extratos das plantas estudadas no teste de toxicidade crônica o que se mostrou mais tóxico e letal para ratos foi o *Senecio brasiliensis*, seguido do *Eupatorium laevigatum*.

As lesões macroscópicas observadas no decorrer dos testes de Toxicidade crônica correspondem àquelas descritas por BARNES *et al.*, (1964) & CULVENOR *et al.* (1976a), quando estes administraram APs puros e extratos de plantas, por via i.p.

#### **5.4.3 Exame Histopatológico**

##### **Grupo A. Controle**

O aspecto microscópico do fígado dos ratos do grupo **(A)** (controle), se apresentou com a típica estrutura histológica observada para um rato normal (Figura 82, Prancha 2).

**Grupo B. APs Monoésteres (Ésteres da Retronecina)****Sub-Grupo B1 e B2. Licopsamina (14,9 e 29,9 mg/kg)**

O monoéster Licopsamina foi testado nas doses 14,9 e 29,9 mg/kg. Todos os exemplares destes sub-grupos apresentaram o fígado com características histológicas idênticas àquelas observadas e comentadas para o grupo controle **(A)**.

**Sub-Grupo B3 e B4. Indicina (14,95 e 29,9 mg/kg)**

Os exemplares que receberam o alcalóide Indicina nas doses de 14,95 e 29,9 mg/kg, não apresentaram alterações hepáticas, tanto de células parenquimatosas quanto do estroma.

Torna-se aparente que os APs monoésteres apresentam toxicidade baixa ou intermediária como é o caso dos APs Licopsamina e Indicina. Portanto há necessidade de testes com doses mais altas por um período mais longo. Os dados apresentados estão de acordo com as observações descritas por CULVENOR *et al.* (1976a) quando da administração por via i.p (dose de 3,2 MMols/kg) do AP monoéster Interimidina, em ratos machos adultos.

**Sub-Grupo B5. Indicina (59,8 mg/kg)**

No fígado dos exemplares deste grupo foi possível detectar, tanto nos machos quanto nas fêmeas, uma sutil diferença dos hepatócitos da zona 1. Estes hepatócitos apresentaram intensa eosinofilia citoplasmática (Figura 83, Prancha 2) e células em degeneração cuja ocorrência foi maior nas zonas 2 e 3.

**Sub-Grupo B6.** Indicina (119,6 mg/kg)

Após um mês em observação constatou-se alterações no limite celular do fígado destes exemplares: núcleos de cromatina e focos de células vacuolizadas. Em alguns exemplares observou-se também desarranjos dos cordões de hepatócitos, células em degeneração acometendo principalmente a zona 1, e por fim perda do limite celular (Figura 84, Prancha 2).

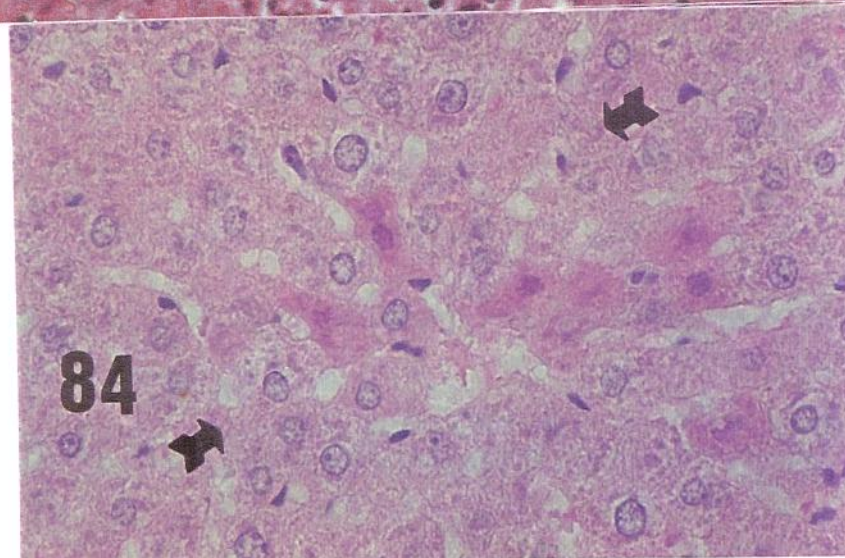
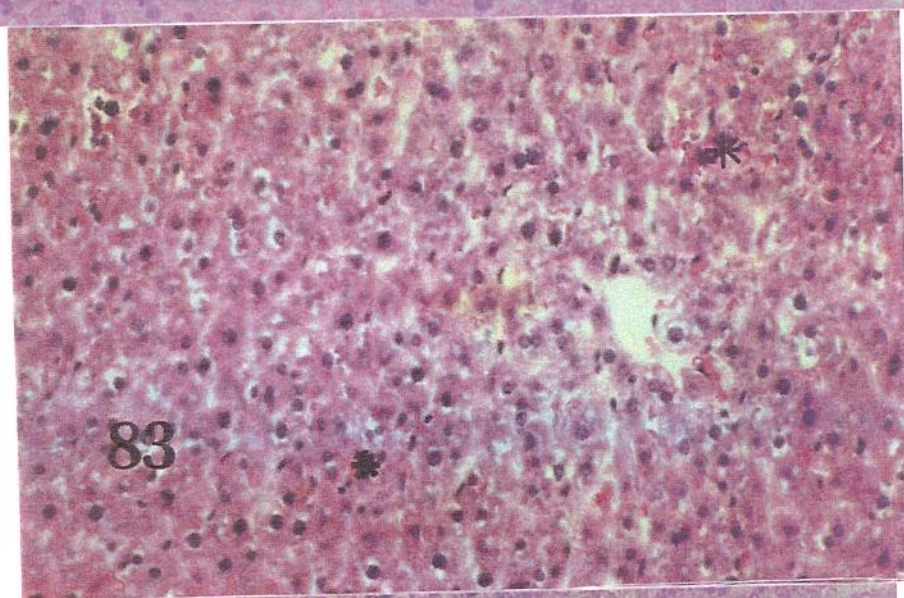
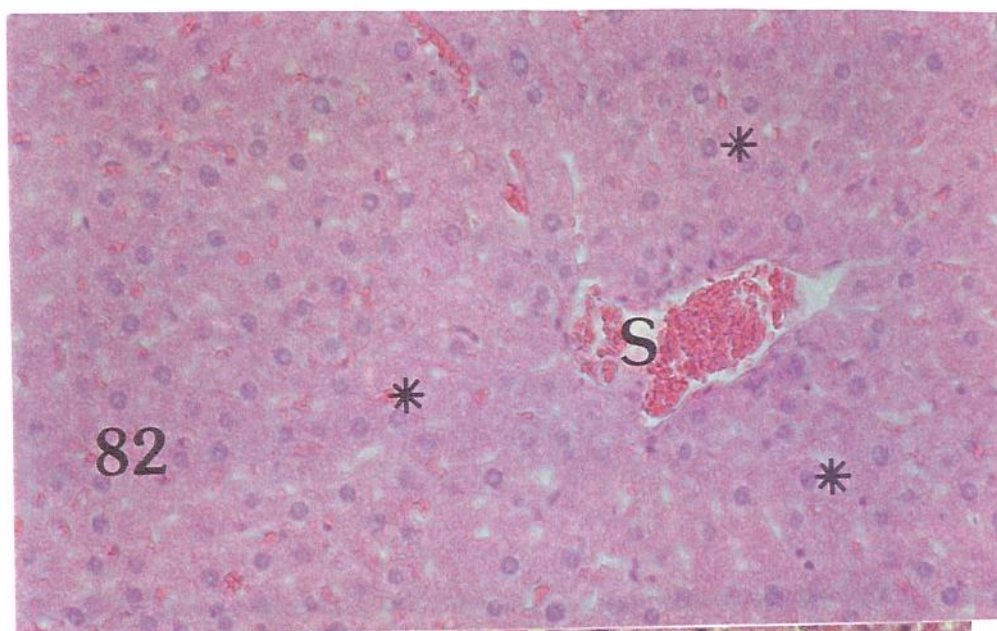
De acordo com MATTOCKS (1981a) um dos fatores que pode influenciar a hepatotoxicidade destes compostos é a solubilidade, uma vez que a passagem das substâncias químicas de natureza protéica e lipidica, através da membrana celular é determinada pela sua maior ou menor lipossolubilidade. Devido a diminuição da lipossolubilidade e conseqüente aumento das propriedades hidrofílicas ou polares, alguns APs como a Indicina e Licopsamina apresentam alta solubilidade em água sendo facilmente excretados, diminuindo assim seu efeito hepatotóxico.

## LEGENDAS PRANCHA 2

- Figura 82.** Fígado de ratos Wistar do grupo controle **A**, onde os hepatócitos apresentam aspecto semelhante nas zonas 1, 2 e 3 (estrela) e sinusoides (**S**) normais. Coloração HE (512x)
- Figura 83.** Fígado de rato Wistar do sub-grupo **B6**, onde é possível observar células com intensa eosinofilia citoplasmática atingindo as zonas 2 e 3 (estrela). Coloração HE (320x).
- Figura 84.** Fígado do mesmo animal (Foto anterior), com células degeneradas entre células normais. Detalhes da zonas 2 e 3 (seta cheia). Coloração HE. (512x).



PRANCHA 2



## **Grupo C. APs Diésteres Macrocíclicos ( ésteres alílicos )**

### **Sub-Grupo C1. Integerrimina (27,86 mg/k)**

O fígado dos exemplares, tanto das fêmeas quanto dos machos, tratados com a Integerrimina naquela dose apresentou megalocitose muito evidente e algumas células em processo de degeneração, dispersas entre células aparentemente normais. Observou-se também uma discreta hemorragia no espaço porta e alguns capilares congestos .

Neste **sub-grupo** o fígado de dois exemplares machos apresentou proliferação ductal (Figura 85, Prancha 3) e hepatócitos megalocíticos de núcleo pleomórfico (Figuras 86, Prancha 3 e 87, Prancha 4). Em algumas áreas observaram-se focos inflamatórios e grande quantidade de células com megalocitose, caracterizando um efeito hepatotóxico mais completo.

### **Sub-Grupo C2. Integerrimina 33,5 mg/kg**

O fígado destes exemplares apresentou edema no espaço porta, hepatócitos com núcleos e citoplasma volumosos, sendo que alguns sinusóides se mostraram congestos, e células perisinusoidais contendo pigmentação enegrecida. Nesta dose observou-se ainda grande quantidade de hepatócitos megalocíticos, raras células anaplásicas, com núcleo pleomórfico e áreas de proliferação ductal.

Em termos gerais não houve diferenças marcantes entre as doses de 27,86 mg/kg e 33,5 mg/kg.

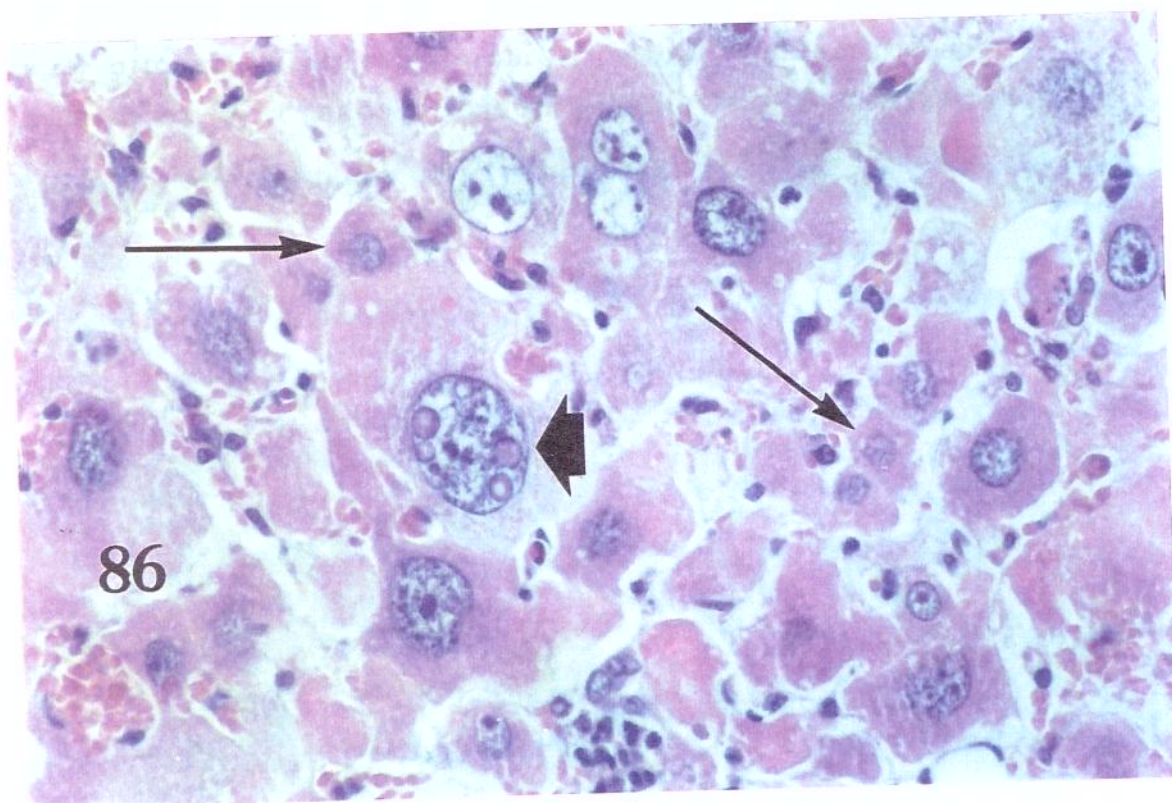
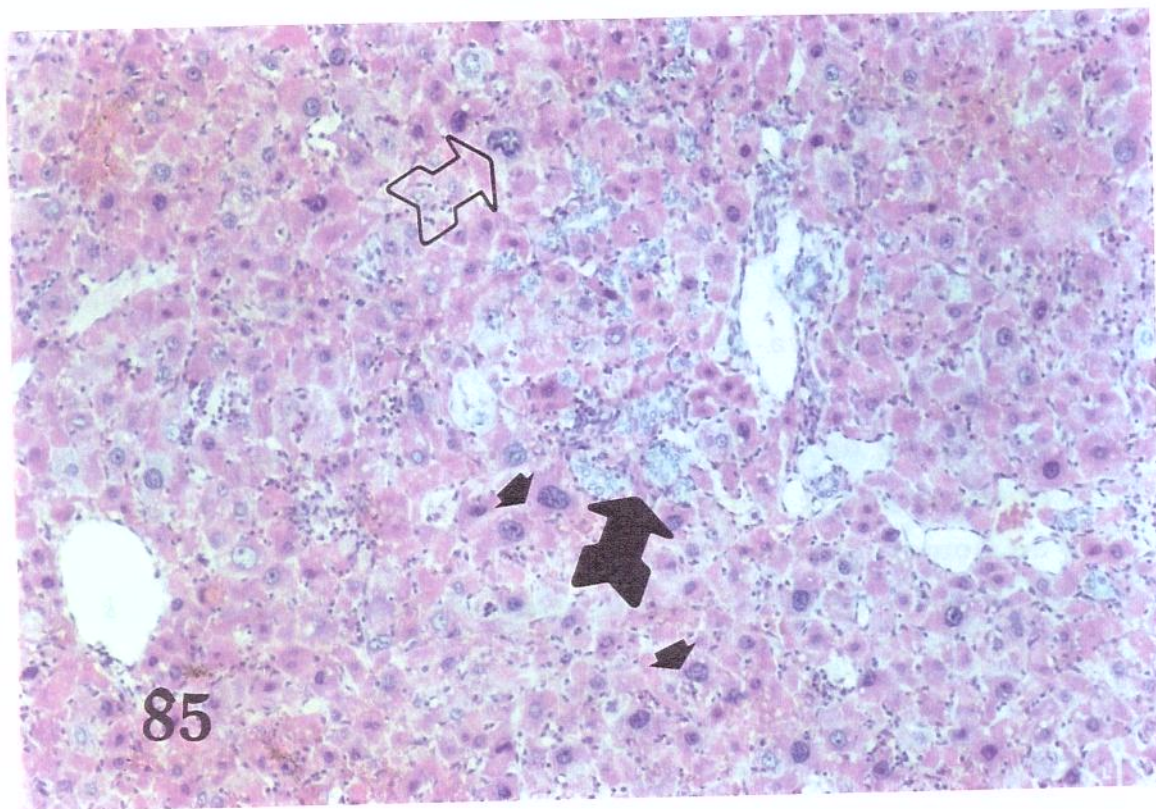


### LEGENDAS PRANCHA 3

**Figura 85.** Fotomicrografia de fígado de rato do **sub-grupo C1** (dose de 0,08 MMols), onde observa-se grande quantidade de hepatócitos megalocíticos (seta curta), raras células anaplásicas (seta vasada) e ainda área de proliferação ductal (seta dupla). Coloração: HE (512x).

**Figura 86.** Detalhe da Figura 85, na qual pode-se comparar a morfologia dos hepatócitos aparentemente normais (cabeça de seta), com os que apresentam megalocitose (seta longa). Coloração: HE (512x).

PRANCHA 3



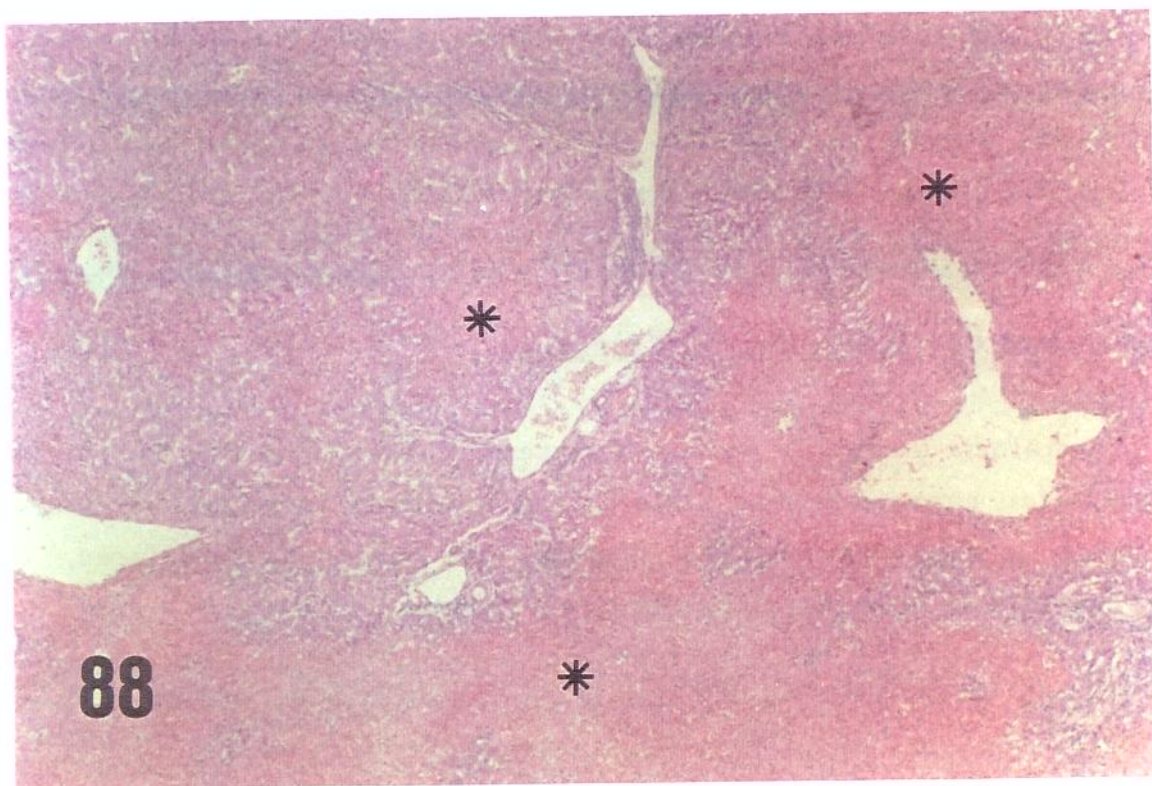
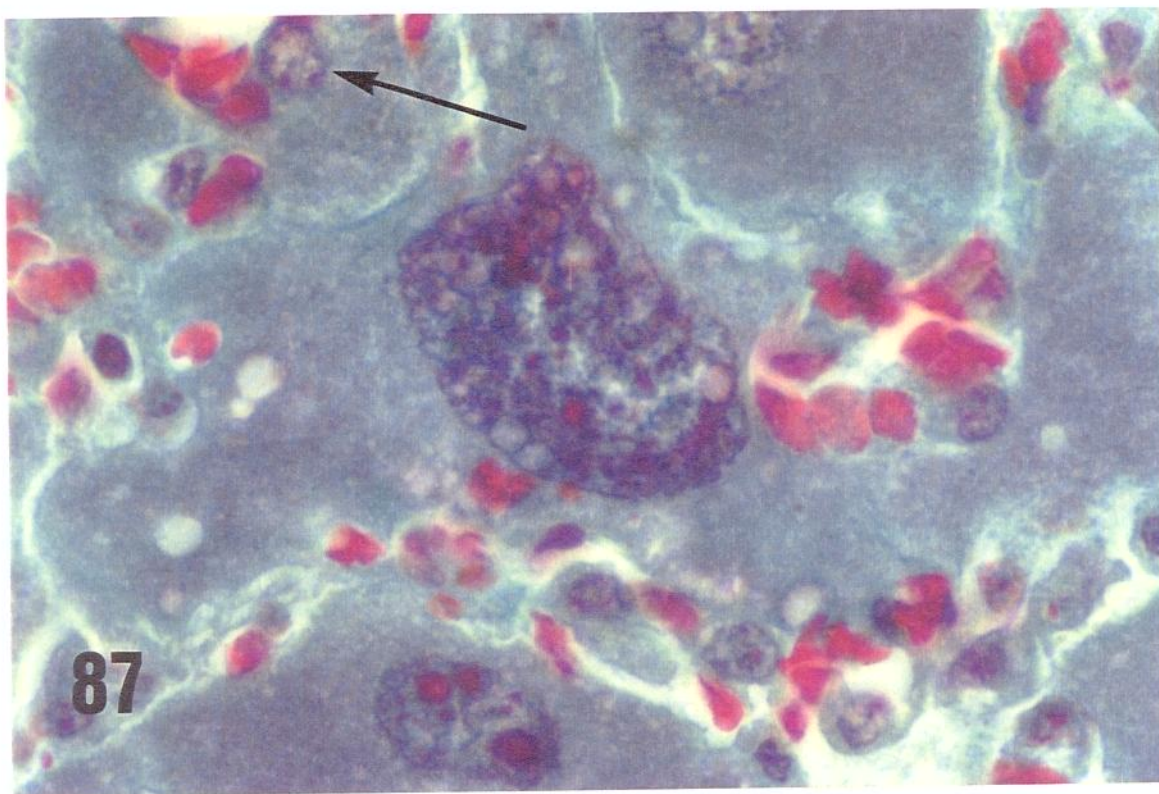


## LEGENDAS PRANCHA 4

**Figura 87.** Fotomicrografia de fígado de rato do **sub-grupo C1**. Nesta figura observa-se células anaplásicas com núcleo Pleomorfico em fígado de ratos tratados com a dose 0,1 MMols/kg de Integerrimina. Comparar com os hepatócitos aparentemente normais (seta longa). Coloração Tricrômico de Gomori (1470x).

**Figura 88.** Fígado de rato do **sub-grupo C3** tratado com a dose 0,8 MMols/kg de Retrorsina, onde foi possível diagnosticar necrose maciça. Notar o maior comprometimento das zonas 2 e 3 (estrelas), embora a zona 1 já se mostre comprometida (estrelas). Coloração HE (1470x).

PRANCHA 4





**Sub-Grupo C3. Integerrimina (44,23 mg/kg)**

Os exemplares deste **sub-grupo**, além das células em degeneração, apresentaram também vasos congestos, e eventualmente edema no espaço porta. Nas áreas mais preservadas os hepatócitos apresentaram microvacuolização citoplasmática, conferindo um aspecto esteatótico ao órgão. Portanto, todo o parênquima foi comprometido, em maior ou menor grau, com o emprego deste alcalóide. Detectou-se ainda raras células anaplásicas. Fechando o quadro, a maioria dos ratos que receberam esta dose exibiram necrose hepática nas zonas 2 e 3 (Figuras 88, Prancha 4 e Figura 89, Prancha 5).

**Sub-Grupo C4. Integerrimina (55,76 mg/kg)**

Com esta dose, o processo necrótico evoluiu, observando-se necrose hepática maciça. Ainda com relação a esta dose, convém ressaltar que 50% dos exemplares evoluíram a óbito antes do término do experimento.

A observação de células anaplásicas e proliferação de células ductais, no caso dos exemplares que receberam pequenas doses deste AP, sugere um possível efeito hepatocarcinogênico. De fato, vários APs, como a Senecionina, por exemplo, têm sido referidos pelos seus efeitos hepatocarcinogênicos (MATTOCKS, 1986).

**Sub-Grupo C5. Retrorsina (8,76 mg/kg)**

A maioria do fígado dos exemplares do **sub-grupo C5**, Retrorsina apresentou características histológicas idênticas àsquelas observadas para o grupo controle (**A**). Porém, em alguns exemplares, os hepatócitos se mostraram bastante volumosos.

**Sub-Grupo C6. Retrorsina (17,55 mg/kg)**

Nesta dose alguns exemplares apresentaram raros hepatócitos com aumento de volume nuclear e algumas células em degeneração.

**Sub-Grupo C7. Retrorsina (35,1 mg/kg)**

Neste **sub-grupo** foi possível detectar necrose hepática, atingindo as zonas 2 e 3, semelhante ao observado no **sub-grupo C3**. Observou-se maior quantidade de hepatócitos com alterações nucleares, micro e macro vacuolização citoplasmática sendo que estes hepatócitos apresentaram pigmentos acastanhados em seu interior.

**Sub-Grupo C8. Retrorsina (70,2 mg/kg)**

Com a administração desta dose os hepatócitos da zona 1 apresentaram degeneração hidrópica, mantendo-se evidente necrose das zonas 2 e 3.

**Sub-Grupo C9. Retrorsina (140,4 mg/kg)**

A partir desta dose os exemplares exibiram um nítido comprometimento dos hepatócitos da zona 1, sendo que o quadro necrótico evoluiu muito, evidenciando-se necrose hepática maciça e intensa hemorragia (Figura 90, Prancha 5)

De forma similar ao ocorrido com os exemplares tratados com elevadas doses de Integerrimina, no **grupo** que recebeu a dose 140,4 mg/kg de Retrorsina, 80% dos exemplares evoluíram a óbito no período de 24 horas, caracterizando um quadro de toxicidade super-aguda.



**Sub-Grupo C10. Retrorsina (280,8 mg/kg)**

Todos os exemplares deste **sub-grupo** apresentaram necrose maciça, com todas as áreas periportais comprometidas, sendo que a maioria dos exemplares evoluiu a óbito antes do término do experimento.

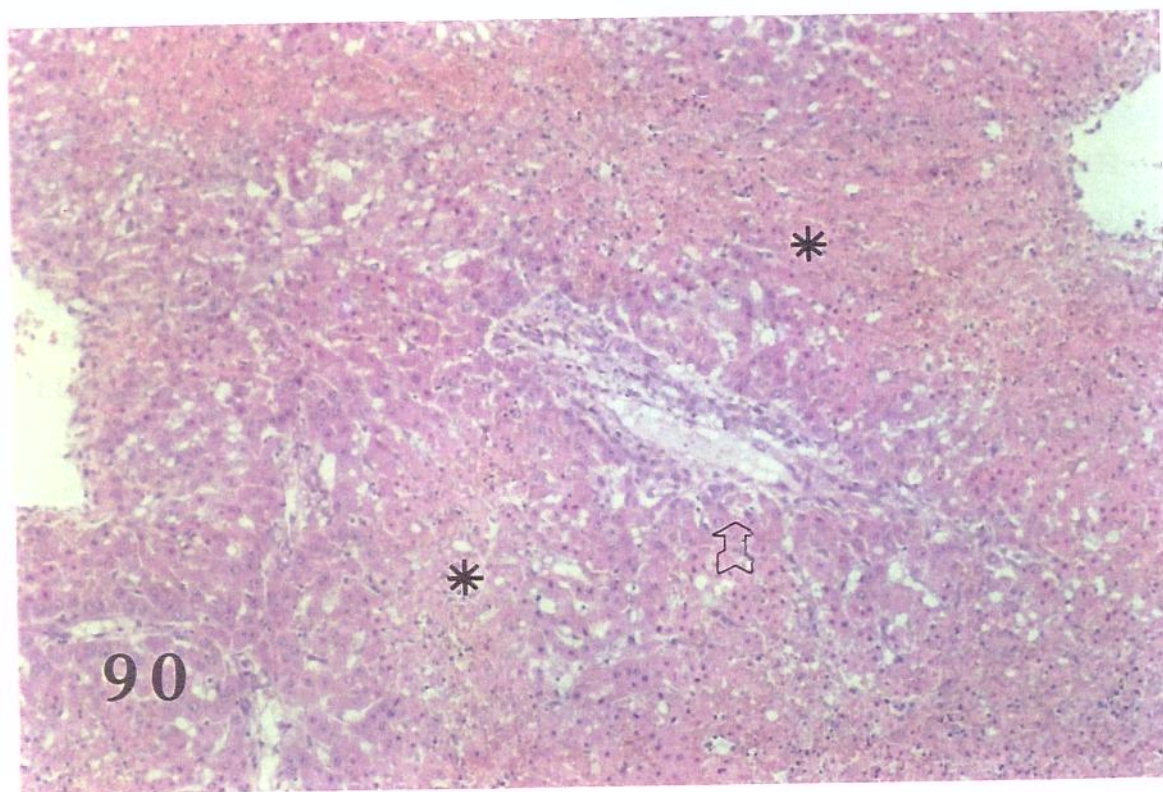
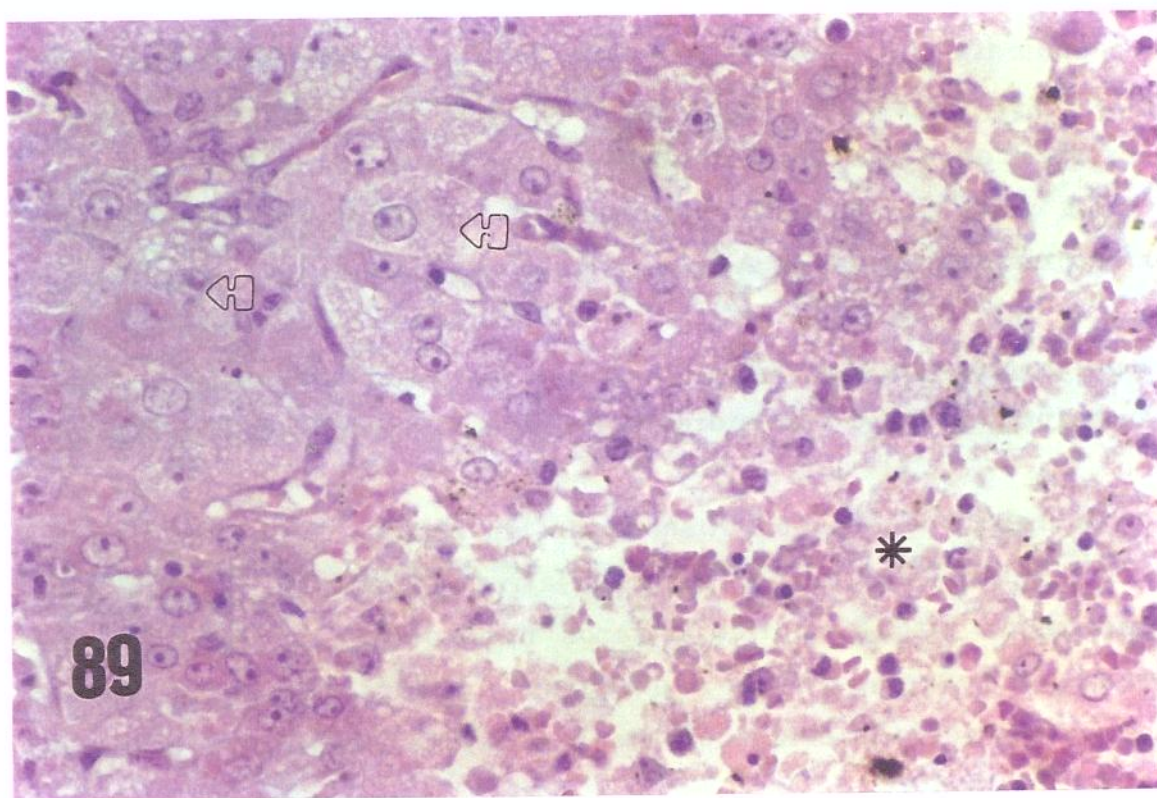
O óbito dos exemplares tratados com doses elevadas destes APs, antes do término dos experimentos foi certamente, decorrente da necrose hepática maciça, onde o fígado não mais apresentava condições de desempenhar suas funções normais.

## LEGENDAS PRANCHA 5

**Figura 89.** Observa-se nesta figura, **sub-grupo C3**, degeneração hidropica dos hepatócitos da zona 1 (seta vazada) e necrose das zonas 2 e 3 (\*), em fígado de ratos tratados com a 0,2 MMols/kg. Coloração: HE (512x).

**Figura 90.** Fígado de rato **sub-grupo C9** tratado com a dose de 0,8 MMols/kg, de Retrorsina, onde foi possível diagnosticar necrose maciça. Notar um maior comprometimento das zonas 2 e 3 (\*), embora a zona 1 já se mostre comprometida (seta vazada). Coloração: HE (512x).

PRANCHA 5





Os esteres da Retronecina por serem solúveis em lipídios (APs lipofílicos), são mais suscetíveis a ativação pelas enzimas microssomais do fígado, formando assim grande quantidade de metabólitos pirrolicós; o que pode conferir alta toxicidade aos APs macrocíclicos (CULVENOR *et al.*, 1976a; MATTOCKS, 1981a).

Em vista destes dados, foi possível confirmar a variabilidade tóxica existente entre os APs.

#### **Grupo D. Monoésteres N-óxidos**

**Sub-grupo D1, D2 e D3.** Indicina N-óxido (7,88; 63,0 e 252 mg/kg)

As únicas alterações observadas em alguns exemplares deste, foram figuras de mitose com relativa freqüência, áreas com vacuolização citoplasmática e raros hepatócitos em degeneração. Com estas, doses os efeitos não chegaram a caracterizar um quadro de hepatotoxicidade e também nenhum animal evoluiu a óbito, no período de 28 dias.

#### **Grupo E. Macrocíclicos N-óxidos**

**Sub-Grupo E1.** Integerrimina N-óxido (8,76 mg/kg)

Nesta dose, os exemplares apresentaram, em alguns lóbulos, células em degeneração entremeadas por hepatócitos aparentemente normais. Estas células em degeneração são mais freqüentes na zona 1. Além das células em degeneração, detectou-se hepatócitos com núcleo vacuolizado, e aumento da basofilia citoplasmática.

**Sub-Grupo E2. Integerrimina N-óxido (70,2 mg/kg)**

Após vinte e oito dias de tratamento detectou-se em alguns exemplares focos de células basófilas, células megalocíticas com algumas áreas do citoplasma vacuolizados. Observou-se também



proliferação ductal em áreas de células megalocíticas, espaços porta mostrando eosinófilos próximos às paredes dos vasos. Alguns animais apresentaram ainda o fígado congesto com proliferação ductal evidente e, em alguns lóbulos, a zona 3 apresentaram necrose.

**Sub-Grupo E3. Integerrimina N-óxido (210,6 mg/kg)**

Neste **sub-grupo**, todos os exemplares evoluíram a óbito no decorrer do experimento, e não foi possível realizar análise histopatológica de nenhum fígado.

**Sub-Grupo E4. Retrorsina N-óxido (9,16 mg/kg)**

Com a administração desta dose foi possível observar grandes hepatócitos megalocíticos, distribuídos principalmente nas zonas 2 e 3. Em alguns exemplares observou-se ainda variado grau de degeneração celular, áreas constituídas de hepatócitos com citoplasma intensamente vacuolizado cujo o núcleo freqüentemente apresentou inclusões (Figura 91 e 92 , Prancha 6)

**Sub-Grupo E5. Retrorsina N-óxido (18,35 mg/kg)**

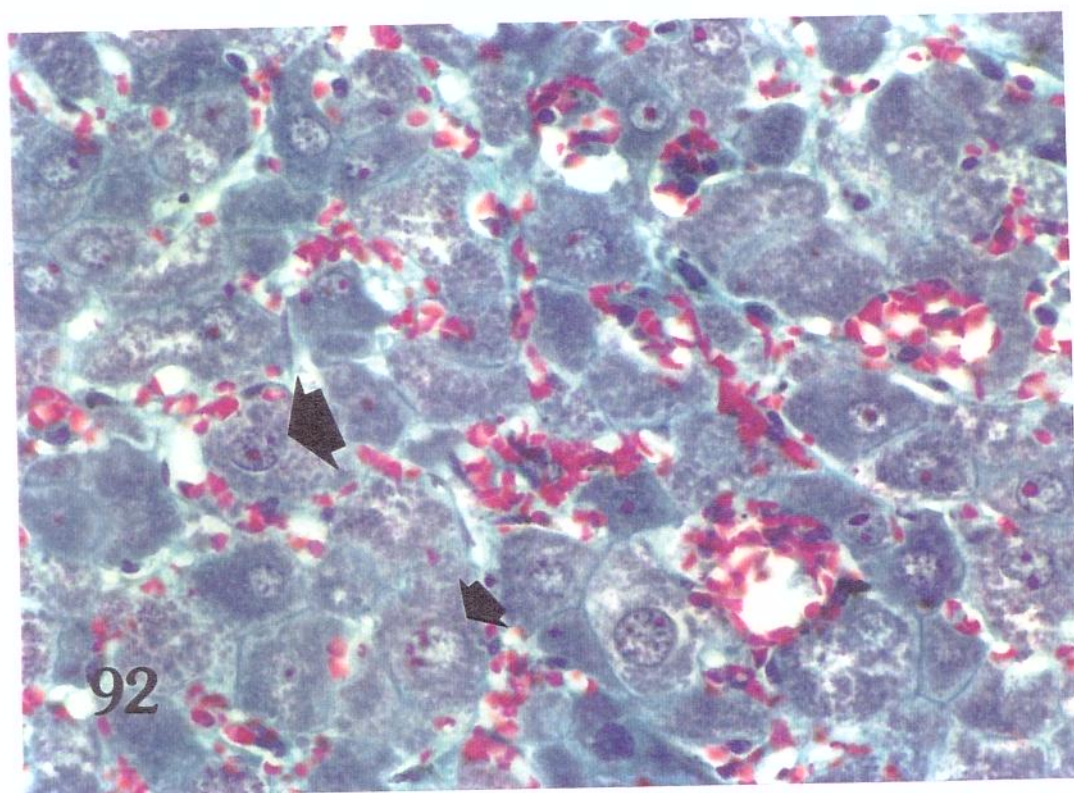
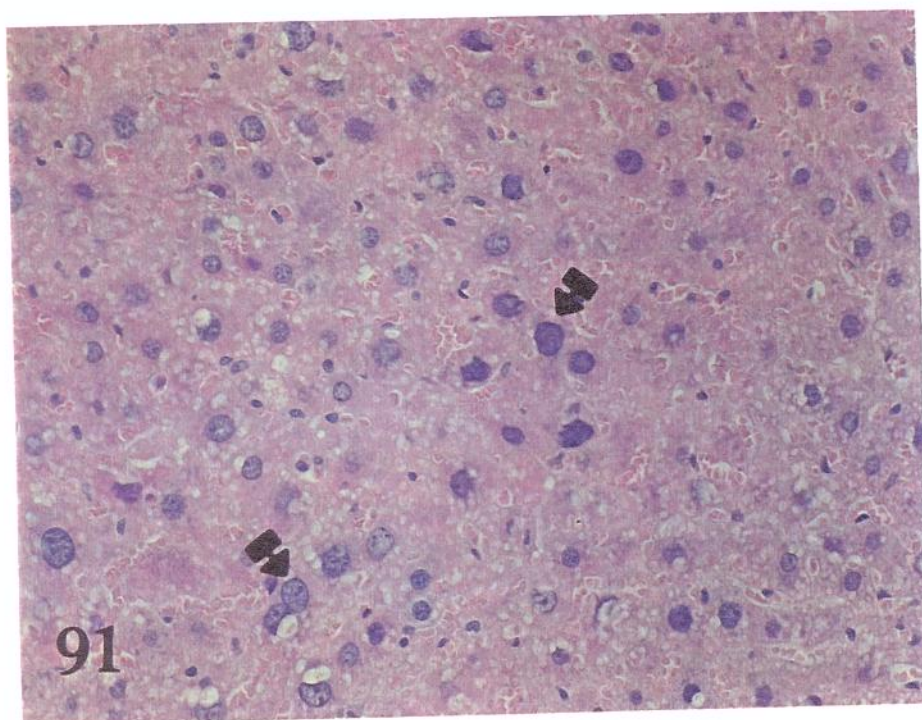
Em relação a esta dose, observou-se variação das células em degeneração de animal para animal, onde alguns apresentaram vacuolização perinuclear, células em degeneração e infiltrado mononuclear entre os hepatócitos. Além deste quadro houve exemplares que se apresentaram com o órgão esteatótico.

## LEGENDAS PRANCHA 6

**Figura 91.** Fígado de rato do **sub-grupo E4**, tratado com a dose de 0,05 MMols/kg de Retrorsina-4-óxido, onde se observa células megalocíticas em degeneração (seta curta). Coloração: HE (512x).

**Figura 92.** Fotomicrografia (mesmo tratamento da Figura acima onde observa-se mais detalhes de células megalocíticas e degeneração hidrópica (cabeça de seta). Coloração: Tricrômico de Gomory (1470x).

PRANCHA 6





**Sub-Grupo E6.** Retrorsina N-óxido (36,7 mg/kg)

O quadro mais freqüente nestes exemplares foi megalocitose. Observou-se também vacuolização citoplasmática, necrose das zonas 2 e 3, sendo que o fígado de alguns exemplares apresentaram células anaplásicas e degeneração celular em alguns lóbulos.

**Sub-Grupo E7.** Retrorsina N-óxido (220,2 mg/kg)

Todos os exemplares deste **sub-grupo** foram a óbito no decorrer do experimento, e não houve a análise histopatológica dos fígados, devido ao canibalismo.

De acordo com os resultados descritos acima, APs macrocíclicos na forma de *N*-óxidos também são tóxicos para ratos. Segundo HARTMANN & WITTE (1995), a toxicidade dos APs *N*-óxidos, advém da facilidade com que estes são reduzidos pelas enzimas do trato gastrointestinal, sendo possivelmente absorvidos como APs terciários. Assim, não existe diferença no potencial tóxico entre APs na forma livre quanto na forma de *N*-óxido, quando administrados por via oral.

**Grupo F.** Base Retronecina**Sub-Grupos F1, F2 e F3** (7,75;15,5 e 31,0 mg/kg)

Aparentemente análise histopatológica do fígado destes exemplares, submetidos ao teste agudo com a base Retronecina nestas doses não revelou alterações hepáticas, mantendo-se o fígado com as mesmas características histológicas correspondentes àquelas comentadas para o **grupo** controle (**A**).



**Sub-Grupo F4 e Sub-Grupo F5. Retronecina (62,0 e 248, 0 mg/kg)**

A maioria dos exemplares destes **sub-grupos** apresentou fígado cujas características histológicas corresponderam àquelas descritas anteriormente para o **grupo** controle (**A**). Porém, em alguns exemplares, foram detectadas raras células em degeneração e aparente acúmulo de pigmentos acastanhados em células de Kupffer.

**Grupo G. Ácido Integerriminico (39,6 mg/kg)**

O fígado dos exemplares deste **grupo** apresentou o mesmo aspecto microscópico descrito para o **grupo** controle (**A**), exceto para dois exemplares fêmeas, onde foram detectadas algumas células em degeneração com aumento da acidofilia citoplásmatica, sendo que a estrutura hepática estava preservada. Apenas um animal do sexo masculino apresentou fígado com algumas células em degeneração.

**5.4.4 DL<sub>50</sub> e Curva Dose-Resposta**

A curva dose-resposta representa a forma de se obter a dose letal para 50% dos animais de experimentação. Esta dose, conhecida como **DL<sub>50</sub>** é aquela dose da substância que produz a morte de 50% dos animais. Este valor é obtido estatisticamente (LOOMIS, S/DATA).

Com os testes de Toxicidade Aguda (dose única) descritos anteriormente foi possível determinar a **DL<sub>50</sub>** (Tabela 3) e traçar também a Curva **Dose-Resposta** (mortalidade x concentra) para os APs Integerrimina (Figura 93), Retrorsina (Figura 94), Integerrimina N-óxido (Figura 95) e Retronecina (Figura 96) a partir da administração por via oral de uma única dose destes APs.

**Tabela 35. DL<sub>50</sub> de Alguns APs administrados por via oral em ratos Wistar (macho e fêmea)**

| <b>APs</b>                   | <b>DL<sub>50</sub><br/>(mg/kg/pc)</b> | <b>DL<sub>50</sub><br/>(mmols/kg)</b> | <b>Tempo de observação<br/>(Dias)</b> |
|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>Retrorsina</b>            | <b>33,43</b>                          | <b>0,01</b>                           | <b>1-5</b>                            |
| <b>Integerrimina</b>         | <b>46,98</b>                          | <b>0,14</b>                           | <b>1-5</b>                            |
| <b>Integerrimina N-Óxido</b> | <b>66,81</b>                          | <b>0,19</b>                           | <b>1-7</b>                            |
| <b>Retronecina</b>           | <b>209,5</b>                          | <b>1,40</b>                           | <b>1-20</b>                           |

Conforme os valores da **DL<sub>50</sub>** listados na Tabela acima e gráfico da curva dose resposta (Figura 93), podemos verificar que o AP Retrorsina, mostrou-se tóxico logo nos primeiros dias da sua administração.

A Integerrimina administrada nas doses de 0,16 e 0,2 MMols/kg não apresentou uma diferença significativa, uma vez que a taxa de mortalidade foi a mesma para as duas doses (Figura 94 **B**) mortalidade. No caso da Integerrimina-4-óxido, quase todos os animais foram a óbito com administração da dose de 0,6 MMoles/kg (Figura 95 **B**). Os exemplares que receberam doses da base Retronecina apresentaram mortalidade, a partir da dose de 0,8 MMols/kg (Figura 96 **B**).

De um modo geral foi observada uma variação de toxicidade entre os APs, em função da sua estrutura química, sendo mais tóxicos os diésteres macrocíclicos da Retrorsina e os menos tóxicos, os monoésteres da Retronecina (MATTOCKS, 1986). Outros fatores que podem influenciar a hepatotoxicidade de alguns APs é a idade do animal e o sexo. Segundo dados de literatura (WHO 1988), ratos machos foram mais susceptíveis a toxicidade aguda do que ratos fêmeas, quando receberam doses de Monocrotalina.

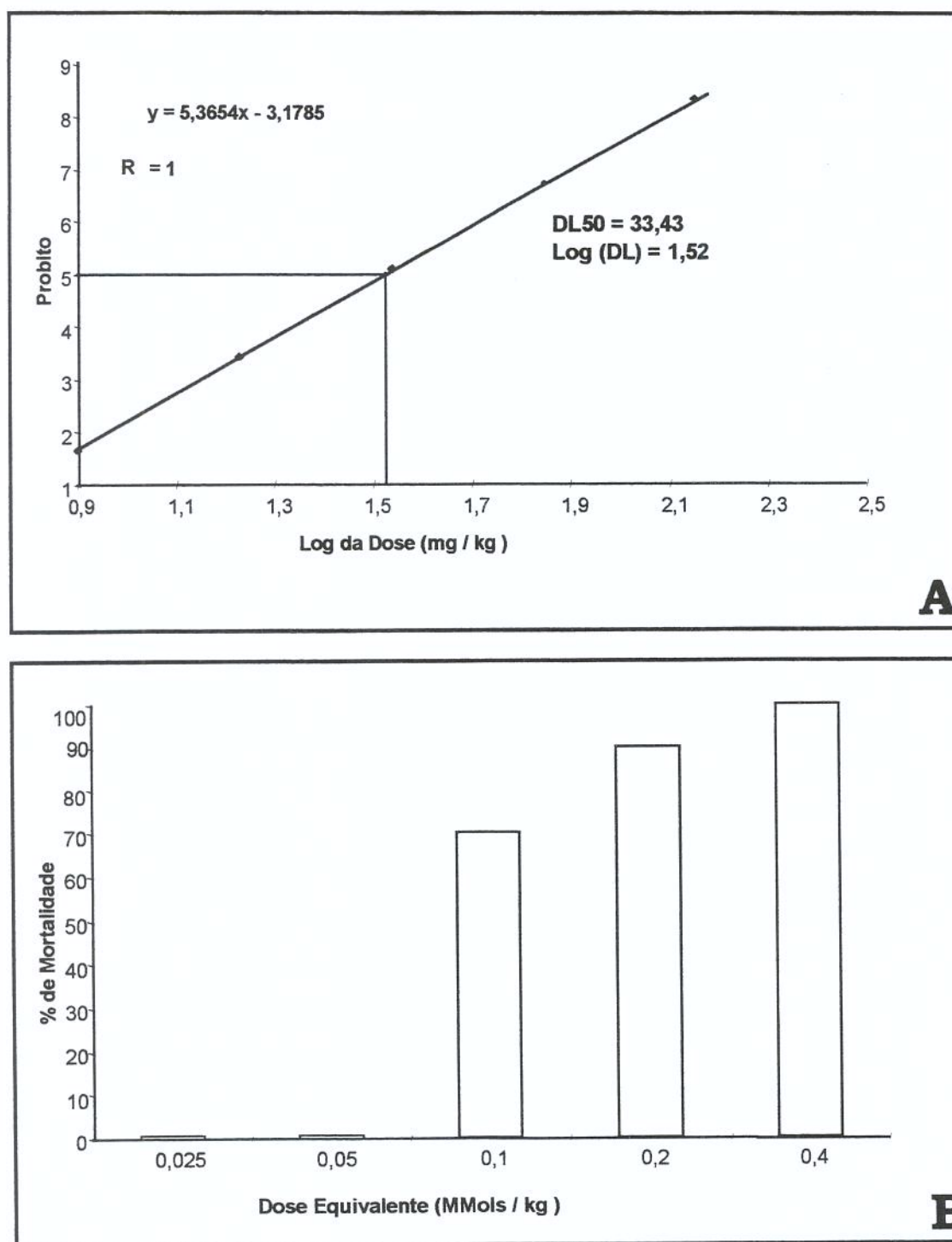


Figura 93. (A) Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub> - Probit vs. Log da dose) e (B) Curva Dose-Resposta, para Retrorsina.

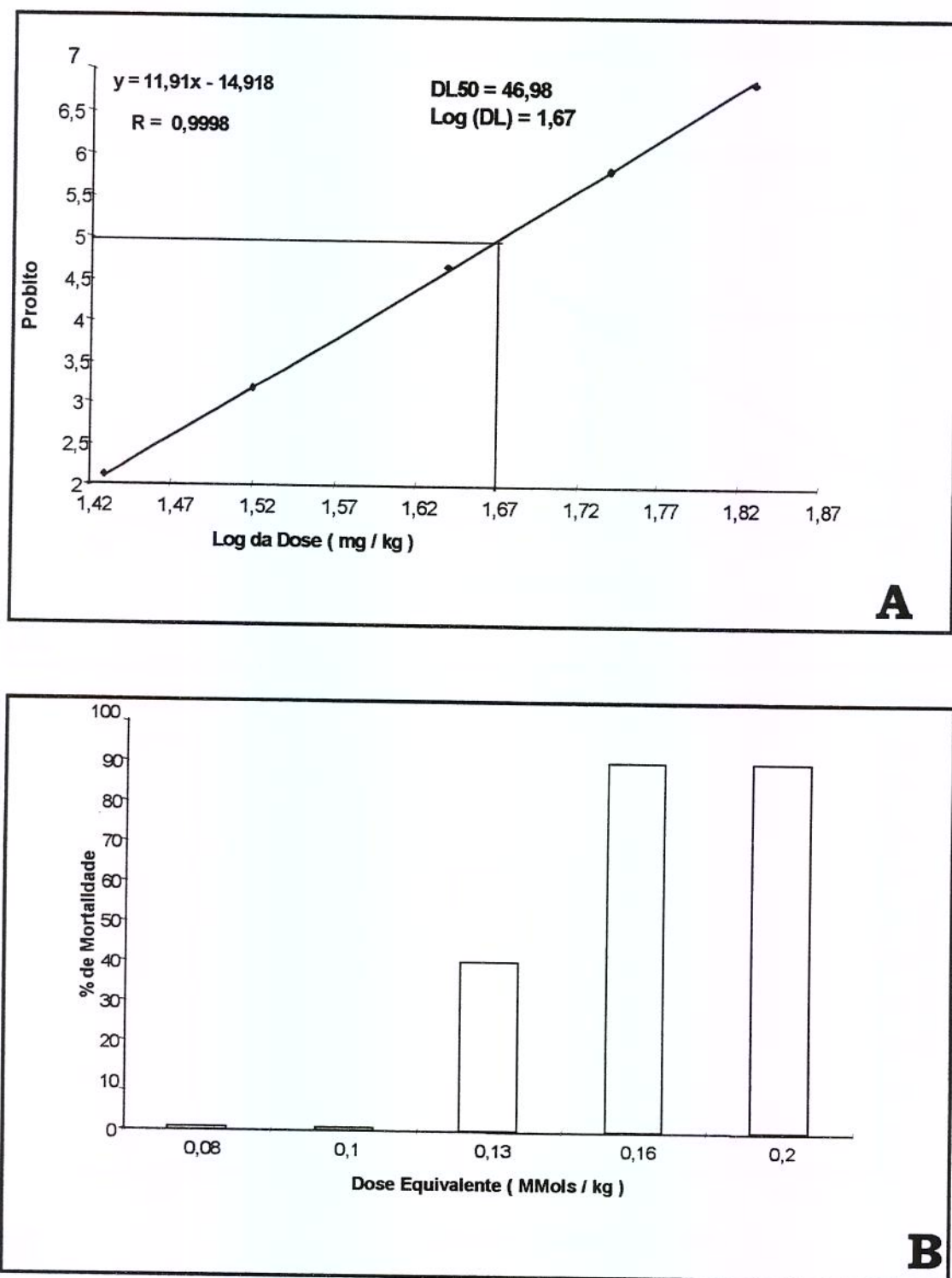


Figura 94. (A) Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub> - Probit vs. Log da Dose) e (B). Curva Dose-Resposta para Integerrimina.



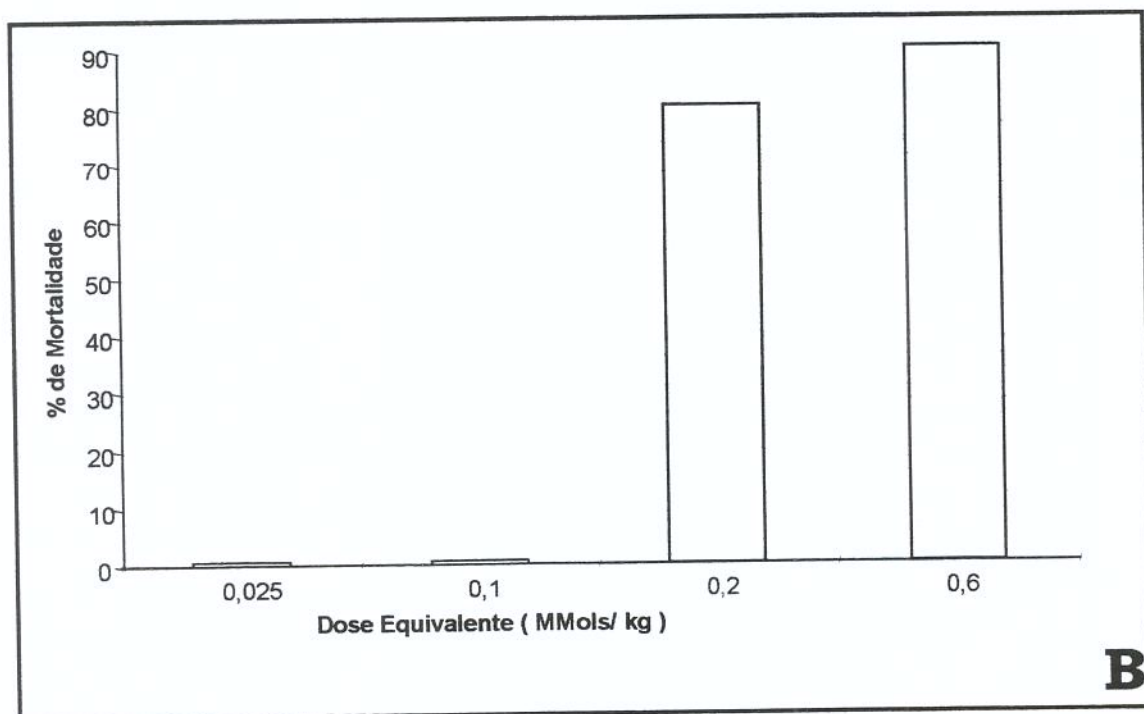
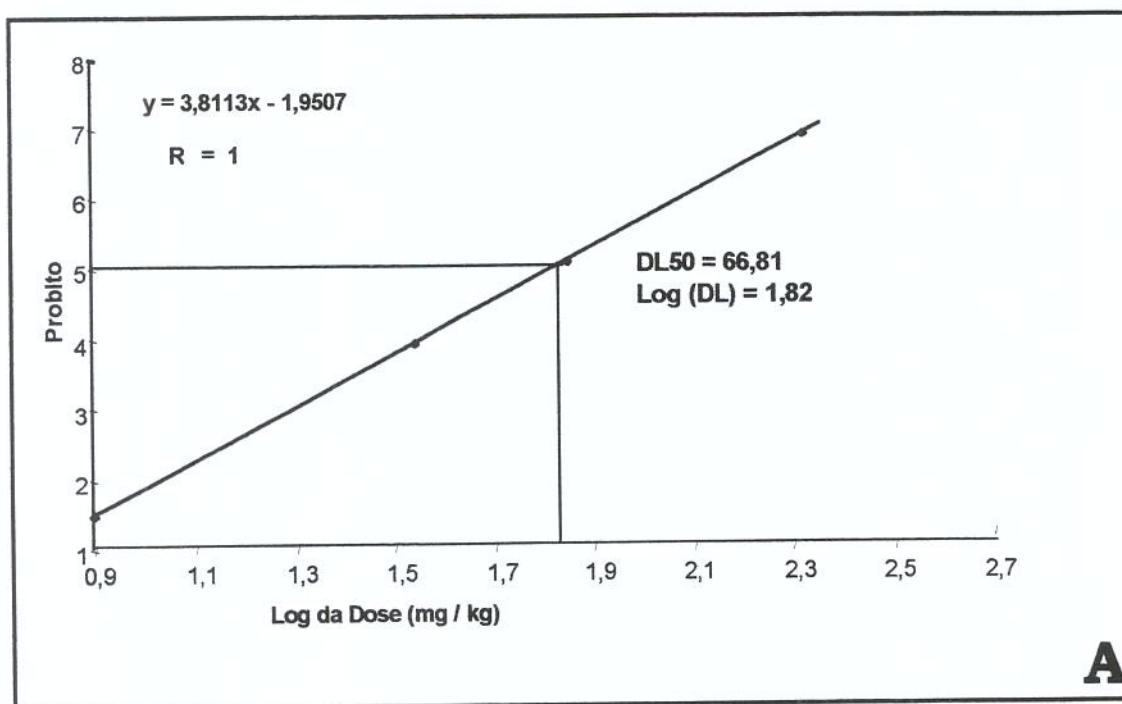


Figura 95. (A) Determinação da Dose Letal 50% (DL<sub>50</sub>-Probit vs Log da Dose) e (B) Dose-Resposta para Integerrimina N-óxido.

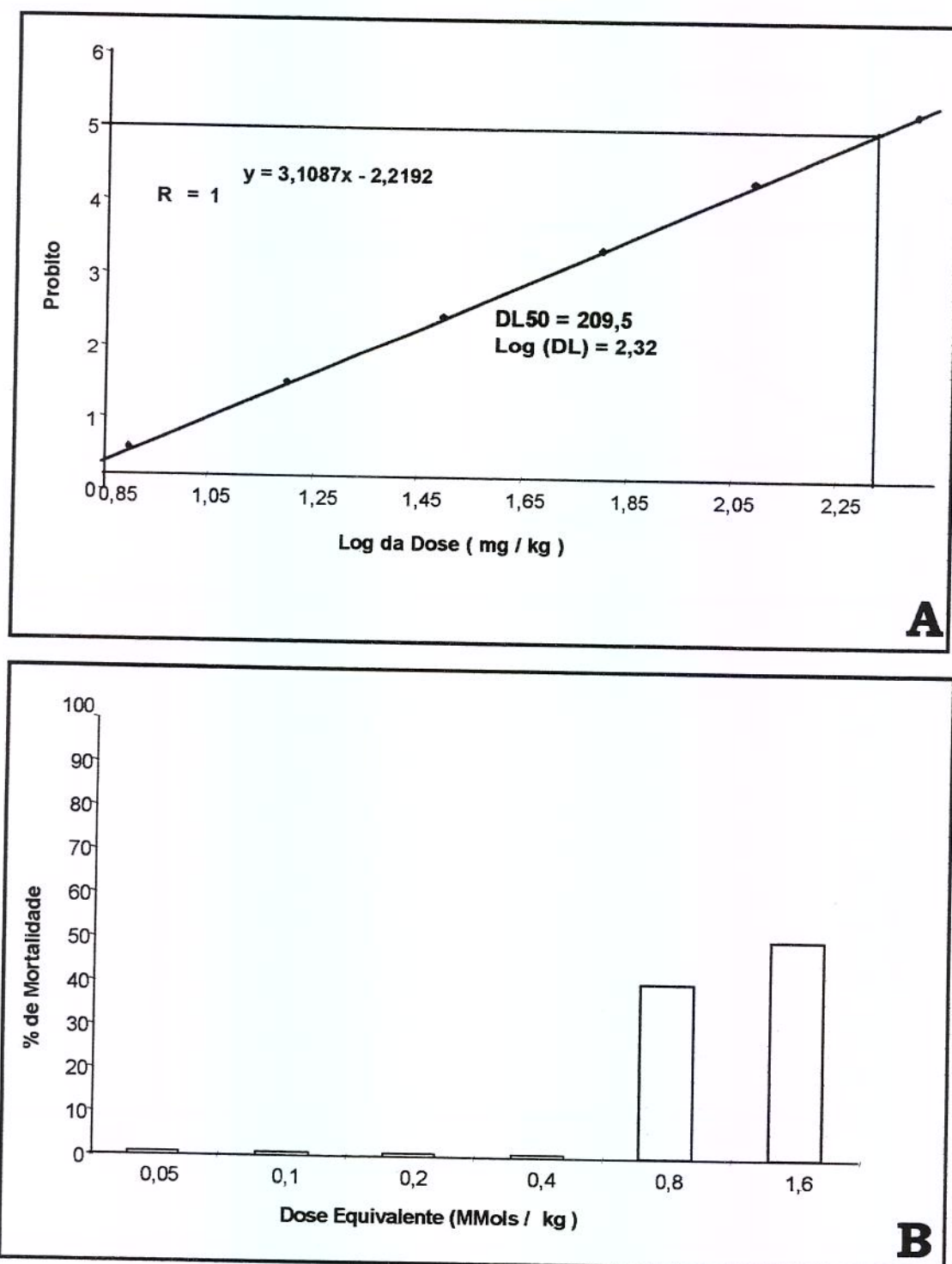


Figura 96. (A) Determinação da Dose Letal 50% ( DL<sub>50</sub> - Probit vs Log da Dose) e (B) Curva Dose-Resposta, para Retronecina.

#### 5.4.5 Teste de Toxicidade Crônica (Extratos)

##### **Grupo H. *Heliotropium indicum* (extrato bruto)**

##### **Sub-Grupo H1 e H2** (dose 0,5 e 1 g/kg, respectivamente)

Os exemplares destes **sub-grupos** apresentaram fígados cujas características histológicas corresponderam àquelas comentadas para o grupo controle (**A**). Macro e microscopicamente, os fígados se apresentaram normais.

##### **Grupo I. *Heliotropium transalpinum* (extrato bruto)**

##### **Sub-Grupo I1 e I2** (dose 0,5 e 1,0 g/kg, respectivamente)

Quanto ao fígado dos exemplares destes **sub-grupos**, nestas doses, não foi possível detectar nenhum tipo de alteração histológica. Macro e microscopicamente, os fígados se apresentaram normais. Como foi observado acima, as infusões das plantas *Ageratum conyzoides*, *Heliotropium indicum* e *Heliotropium transalpinum*, não se mostraram hepatotóxicas aos animais, nas doses testadas. (MATTOCKS, 1986). Além disso, a concentração dos APs detectada nos respectivos extratos foi relativamente baixa, o que nos leva a supor que a combinação destes dois fatores diminui a probabilidade de algum tipo de lesão no fígado do animal no período de tempo utilizado. Assim, não podemos afirmar com certeza que estes extratos, quando consumidos a longo prazo, não sejam tóxicos para o animal ou mesmo para humanos.

##### **Grupo J. *Ageratum conyzoides* (extrato bruto, dose 1g/kg)**

Neste **grupo** apenas alguns exemplares mostraram raros hepatócitos megalocíticos na zona 1 (Figura 97, Prancha 7) porém não se observou alterações hepáticas sugestivas de toxicidade na maioria dos exemplares analisados. Paredes dos vasos integras. O

núcleos volumosos e nucleólos evidentes. Porém, este extrato não se mostrou hepatotóxico na dose testada.

**Grupo K. *Senecio brasiliensis* (extrato bruto, dose 0,5 g/kg)**

A partir do primeiro mês de tratamento já foi possível detectar células megalocíticas esparsas por todo o parênquima, entremeadas por células em degeneração. Ainda nesse período foi possível evidenciar células necróticas espalhadas, com indícios de hepatotoxicidade (Figura 98; Prancha 7).

Alguns exemplares foram a óbito no decorrer do experimento.

A reação dos animais a este extrato foi a mesma apresentada pelos APs puros Integerrimina e Retrorsina.

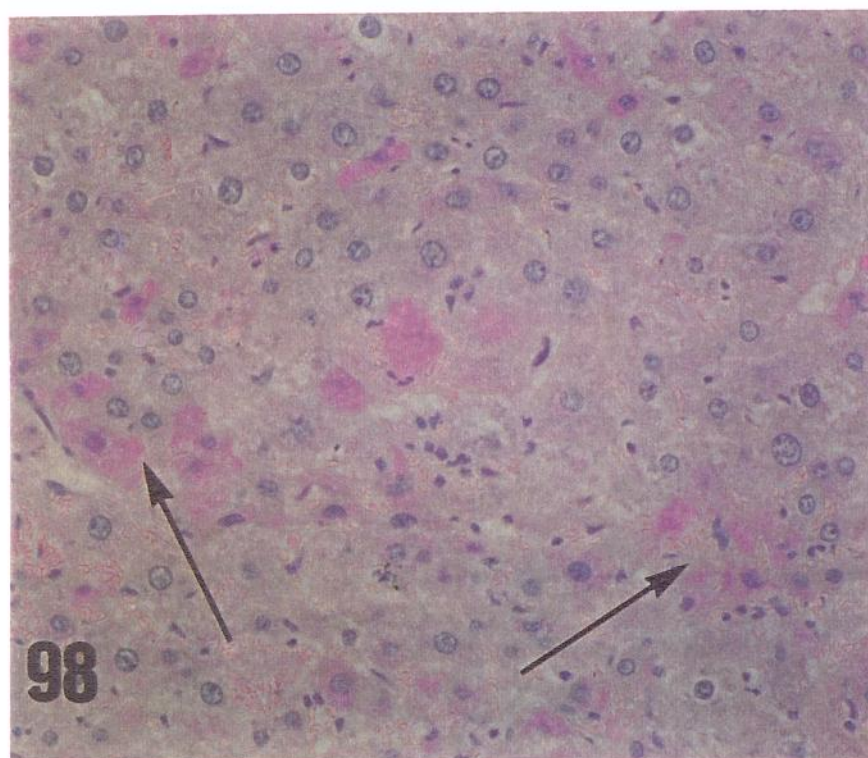
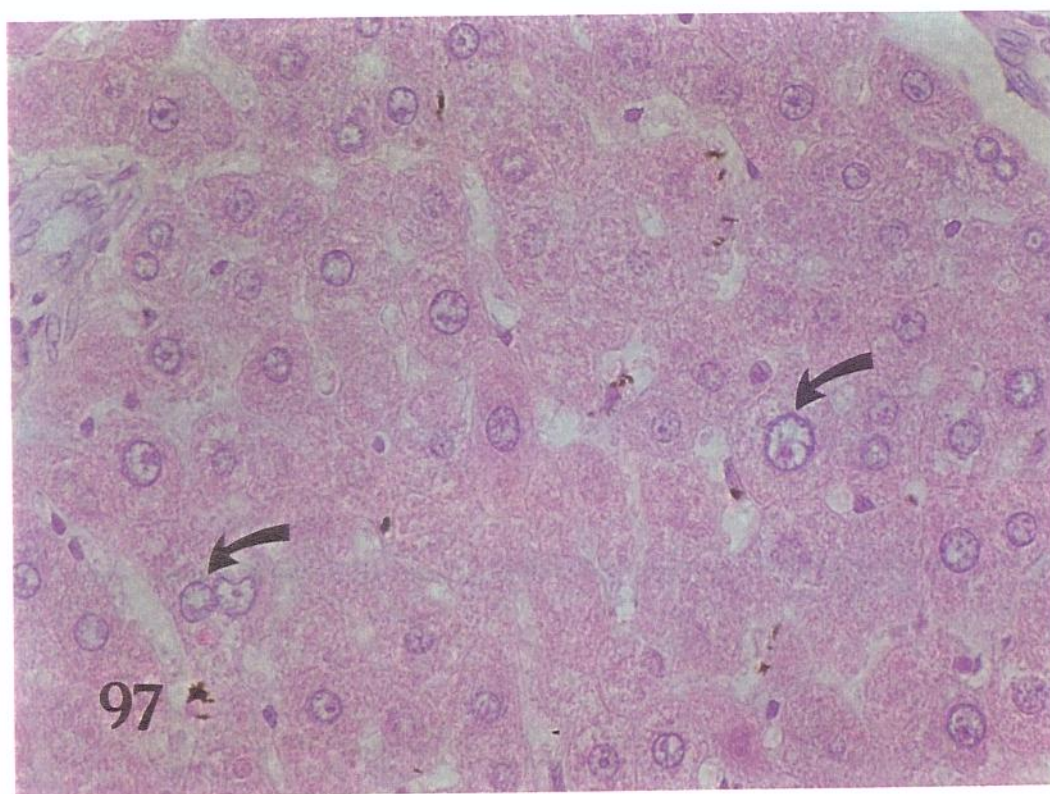


## LEGENDAS PRANCHA 7

**Figura 97.** Fígado de rato do grupo J, tratados com extrato bruto aquoso de *Ageratum conizóide* (dose de 1g/kg). Nesta figura podemos visualizar células de núcleos volumosos e nucleólos evidentes (setas). Coloração: HE (512x).

**Figura 98.** Nesta figura nota-se a presença de células em degeneração (seta longa), dispersas pelo parênquima hepático de exemplar do grupo quando foi administrado o extrato da planta de *Senecio brasiliensis* (dose de 1g/kg), onde visualizam-se figuras de mitose no centro do campo. Coloração: HE (512x).

PRANCHA 7



**Grupo L. *Eupatorium laevigatum* (extrato bruto aquoso)****Sub-Grupo L1** (dose, 0,5 mg/kg)

Alguns exemplares deste **sub-grupo** apresentaram alterações nucleares, células em degeneração, além de células em diferentes fases de mitose, distribuídas em todo órgão. Observou-se também que algumas áreas do órgão apresentaram vacuolização citoplasmática e algumas áreas de núcleo volumoso (Figuras, 99, 100 e 101; Prancha 8).

**Sub-Grupo L2** (dose, 1g/kg)

Nos exemplares deste **sub-grupo** foram detectados hepatócitos com núcleos pleomórficos e sinusóides dilatados. Detectou-se, ainda, vários hepatócitos megalocíticos espalhados por todo o parênquima, com células volumosas e raras células em degeneração, sendo que frequentemente estas correspondiam a células megalocíticas. No caso das células com núcleos volumosos observou-se uma distribuição irregular da cromatina e alguns núcleos apresentaram mais de um nucléolo, os quais se mostraram bastante evidentes.



### LEGENDAS PRANCHA 8

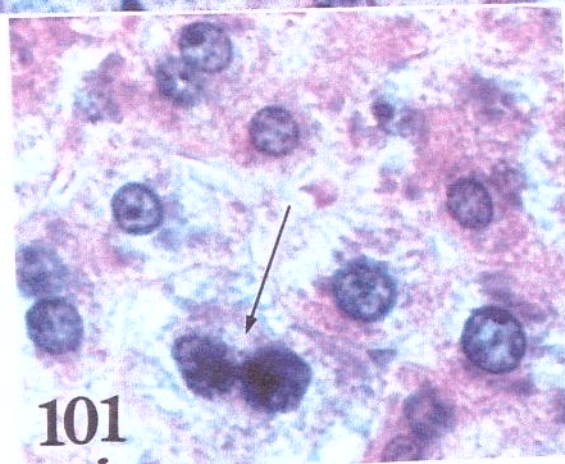
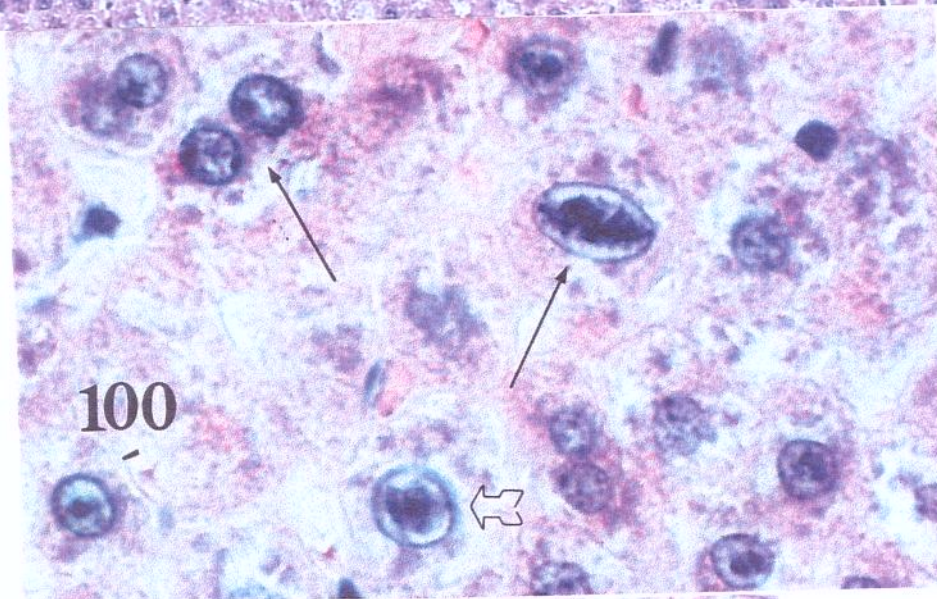
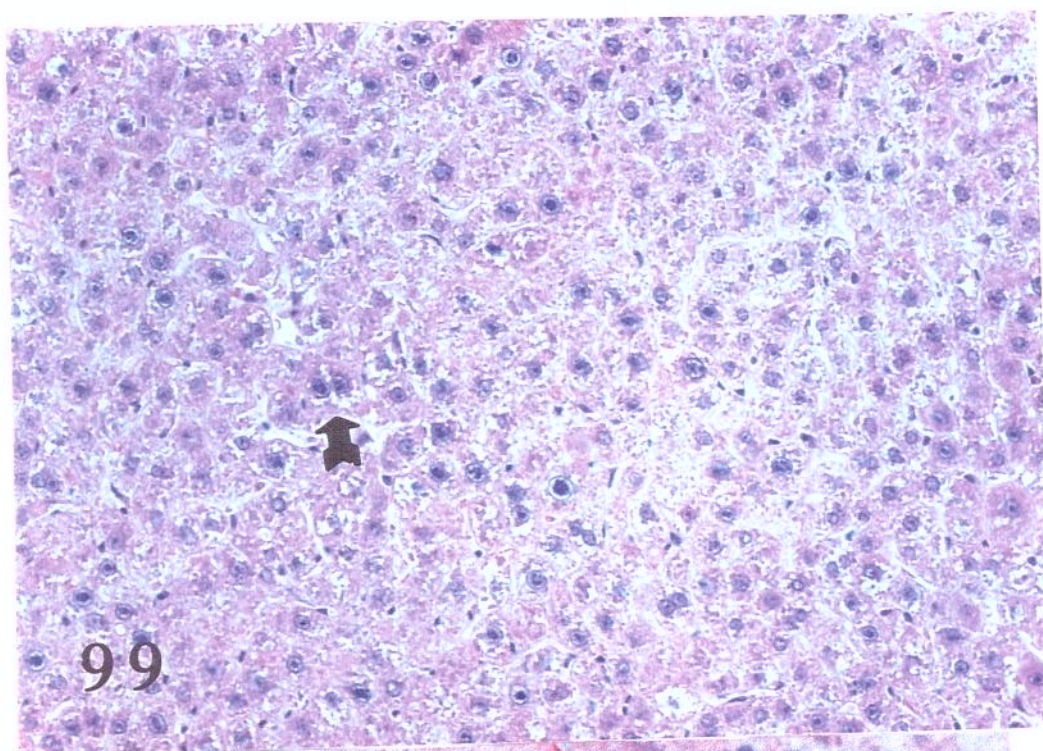
**Figura 99.** Panorâmica de fígado de rato do **grupo K**, após 6 meses de tratamento com extrato bruto de *Eupatorium laevigatum*. Visualiza-se nesta figura alterações nucleares com algumas células volumosas em fase de mitose atípica (seta cheia). Coloração: HE (220x)

**Figura 100.** Detalhe da foto anterior onde observa-se células em diferentes fases de mitose (seta longa) e células com núcleos volumosos (seta vazada). Coloração: HE (1020x).

**Figura 110.** Fotomicrografia com detalhes de células em final de divisão (seta longa). Coloração: HE (512x).



PRANCHA 8



## **6. CONCLUSÕES**



## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram estudadas 28 espécies de *Senecio*, 87 espécies de *Eupatorium*, 2 espécies de *Heliotropium*, 1 espécie de *Ageratum* e 3 espécies de *Crotalaria*.

As 28 espécies de *Senecio* apresentaram majoritariamente APs macrocíclicos, como a Senecionina, enquanto as 87 espécies de *Eupatorium* apresentaram APs monoésteres do Tipo Licopsamina. Devido ao fato de ter sido estudado um grande número de espécies destes dois gêneros, foi possível agrupar e traçar o perfil químico destas espécies.

As espécies *Heliotropium indicum*, *Heliotropium transalpinum* e *Ageratum conyzoides*, apresentaram APs monoésteres, como a Licopsamina. As espécies de *Crotalaria* são constituídas basicamente de APs macrocíclicos do Tipo Monocrotalina.

- A análise por CG-EM dos extratos brutos das espécies estudadas revelou as seguintes características:
- Espécies do gênero *Senecio* apresentaram padrões de alcalóides Macroiclicos 1,2-Insaturados e Saturados (12 membros) do Tipo Senecionina
- Espécies do gênero *Eupatorium* têm como perfil cromatografico APs Monoésteres do Tipo Licopsamina
- As espécies de *Heliotropium* e de *Ageratum conyzoides* APs Monoésteres do Tipo Licopsamina e do Tipo Supinina e
- As espécies de *Crotalaria* com APs Macroiclicos de 11 membros do Tipo Monocrotalina.

Os resultados dos testes toxicidade (agudo e crônico) realizados, mostraram que:

- APs Monoésteres só apresentam efeito tóxico quando administrados em doses alta e por um longo período de tempo.

- APs Monoéster na forma de N-óxido (Indicina-N-Óxido) apresentam toxicidade mais alta do que o seu correspondente na forma livre.
- APs Macroclícos 1,2-Insaturados, apresentam um efeito tóxico moderado nas doses baixas e um efeito altamente hepatotóxico nas doses altas.
- Este quadro foi verificado também, para os APs na forma N-Óxido. Mostrando assim, que estes são tão hepatotóxicos quantos os seus correspondentes na forma livre.
- Quanto a Base Retronecina, os efeitos tóxicos só aparecem em doses elevadas.
- Que os extratos que apresentam em sua composição química APs do Tipo Macroclícos (*Senecio brasiliensis*), são altamente hepatotóxicos para animais e conseqüentemente para o homem, também.
- Os extratos da planta *Eupatorium laevigatum* também mostrou, um elevado grau de hepatotoxicidade, provavelmente em função da grande abundância de APs nesta espécie.
- Embora os extratos das plantas do gênero *Heliotropium* não tenham apresentado, naquelas doses testadas, nenhum efeito hepatotóxico não podemos afirmar que estas plantas possam ser usadas sem riscos para saúde humana. Havendo, assim a necessidade de um estudo crônico mais prolongado, para espécies deste gênero.

Diante dos resultados obtidos com os testes de toxicidade, podemos concluir que a utilização de plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos são tóxicas para os animais. Mesmo os extratos que não causaram toxicidade, como foi o caso do extrato de *Ageratum conyzoides*, não deveriam ser consumidos, já que também possuem APs.

Considerando que o objetivo inicial deste trabalho foi o estudo de plantas contendo APs utilizadas popularmente na forma de chás, infusões e alimentos, os resultados obtidos nos permitem sugerir que estas plantas não devem ser consumidas de nenhuma forma devido ao grande potencial tóxico, comprovado, dos APs.

É importante salientar que embora este tipo de trabalho já tenha sido realizado, na década de 80 na Alemanha, no Brasil não havia nenhum trabalho



de pesquisa com plantas tipicamente brasileiras que são utilizadas pela população e que contêm estes APs.

Daremos continuidade a este trabalho estudando os aspectos relacionados abaixo:

Desenvolvimento de uma metodologia que defina os níveis de alcalóides nos chás, preparados a partir de produtos farmacêuticos e homeopáticos usando plantas medicinais contendo APs tóxicos.

Outro aspecto que consideramos de grande importância, é conhecer a concentração exata dos APs presentes nos extratos aquosos (chás), uma vez que é desta forma que a população utiliza com mais frequência as plantas. É necessário verificar também, a concentração destes alcalóides nas formulações comerciais vendidas em farmácias alopáticas e homeopáticas.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, E.R. **Plantas Medicinais Brasileiras**. Conhecimentos populares e científicos. Ed. Hemus Ltda; São Paulo, Brasil. 340 p. 1993.
- ALLEN, J.R. & CARSTENS, L.A. Pulmonary vascular occlusions initiated by endothelial lysis in monocrotaline-intoxicated rats. *Exp. Mol. Pathol*, 13:159-171, 1970.
- ALLEN, J.R.; HSU, I.C. & CARSTENS, L.A. Dehydroretronecine-induced rhabdomyosarcomas in rats. **Cancer Res**, 35:997-1002, 1975.
- ARZT, J. & MOUNT, M.E. Hepatotoxicity associated with pyrrolizidine alkaloid (*Crotalaria spp*) ingestion in a horse on Easter Island. **Veterinary and Human Toxicology**, vol.41, 96-99, 1999.
- ASIBAL, C.F.; GLINSKI, J.A; GELBAUM, L.T & ZALKOW, L.H. Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum creticum*. Synthesis of the pyrrolizidine alkaloids echinatina, rinderine, and analogues. **J. Nat. Prod**, 52:109-118, 1989.
- BAH, M.; BYE, R. & MIRANDA, R.P. Hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in the Mexican medicinal plant *Packera candidissima* (Asteraceae: Senecioneae). **Journal of Ethnopharmacology**, 43:19-30, 1994.
- BARNES, J.M.; MAGEE, P.N & SCHOENTAL, R. Lesions in the lungs and livers of rats poisoned with the pyrrolizidine alkaloids fulvene and its N-oxide. **J. Pathol**, 88:521-531, 1964.
- BELL, E.A. Toxic amino acids in the Leguminosae. In: HARBORNE, J.B. **Phytochemical Ecology**, 163-178. Academic Press, London, 1972.
- BICCHI, C.; D'AMATO, A. & CAPPELLETTI, E. Determination of Pyrrolizidine alkaloids in *Senecio inaequidens* D.C. by Capillary Gas Chromatography. **J. Chromatogr**, 349:23-29, 1985.
- BINGLEY, J.B. Solvent and temperature effects in the determination of pyrrolizidine alkaloids with 4-dimethylaminobenzaldehyde. **Anal. Chem**, 40:166-1167, 1968.



- BORAUEL, T.; KARSTEN.; ROEDER, E. Alkaloids Pyrrolizidínicos. **Sci. Pharm**, **63**(2):33-127. German 1995.
- BORSTEL, v.K.; WITTE, L. & HARTMANN. Pyrrolizidine alkaloid patterns in populations of *Senecio vulgaris*, *S. vernalis* and their hybrids. **Phytochemistry**, **28**:1635-1638, 1989.
- BRAUCHLI, J.; LÜTHY, J.; ZWEIFEL, U & SCHLATTER, CH. Pyrrolizidine alkaloids from *Symphytum officinale* L. and their percutaneous absorption in rats. **Experientia**, **38**:1085-1087, 1982.
- BREDENKAMP, M.W. The mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids. Ed. A.M. RIS, **CRC Press**, Florida. pp. 147-167, 1991.
- BRITO, A.S. **Manual de Ensaios Toxicológicos in vivo**. Coleção Ciências Médicas. Ed. da Unicamp, Campinas, SP, Brasil. 122p, 1994.
- BROWN, K.S. JR. Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend ithomiine butterflies against a spider predator. **Nature**, **307**: 707-709, 1984.
- BROWN, K.S. JR. Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). **Rev. Bras. Biol**, **44**: 435-460, 1985.
- BROWN, K.S. JR & TRIGO, J.R. The ecological activity of alkaloids. In: Cordell GA, ed. **The alkaloids**, vol.47, 227-356. **Academic Press**, 1995.
- BULL, L.B & DICK, A.T. The chronic pathological effects on the liver of the rat of the pyrrolizidine alkaloid, heliotrine, lasiocarpine and their N-oxides. **J. Pathol. Bacteriol**, **78**:483-502, 1959.
- BULL, L.B.; CULVENOR, C. C & DICK, A.T. **The Pyrrolizidine alkaloids**, North-Holland Publishing, Amsterdam, pp. 115-132, 1968.
- CAVA, M.P.; RAO, K.V; WEISBACH, J.A; RAFFAUF, R.F & DOUGLAS, B. **The alkaloids of *Cacalia floridiana***. J. Org. Chem., 33:3570-3573, 1968.
- CHALMERS, A.H.; CULVENOR, C.C.J & SMITH, L.W. Alkaloids of *Amsinckia* species. *A.intermedia*, *A.hispida* and *A.lycopsioids*. **J.Chromatogr**. **20**:270, 1965.



- CHESNEY, C.F & ALLEN, J.R. Resistance of the guinea pig to pyrrolizidine alkaloids intoxication. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, **26**:385-392, 1973a.
- CULVENOR, C.C.J & WOODS, W.G. Nuclear magnetic resonance spectro de pyrrolizidine alkaloids. The spectro of retronecine and heliotridine. **Aust. J. Chem**, **18**:1625-1636, 1965.
- CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A.; JAGO, M.V.; OUTERRIDGES, A.; PETERSON, J.E & SMITH, L.W. Hepato and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. **Chem. Biol. Interact**, **12**: 299-324, 1976a.
- CULVENOR, C.C.J. Pyrrolizidine alkaloids: occurrence and systematic importance in angiosperms. **Bot. Notiser**, **131**:473-486, 1978.
- CULVENOR, C.C.J. Alkaloids and human disease In: Smith, R.L Bababunmi, E.A. ed, **Toxicology in the Tropics**, London. Taylor & Francis Ltda, **24**-141, 1980.
- CULVENOR, C.C.J.; CLARKE, M.; EDGAR, J.A.; FRAHN, J.L.; JAGO, M.V.; PETERSON, J.E & SMITH, L.W. Structure and toxicity of the alkaloids of Russia comfrey (*Symphytum x Uplandicum ny man*). A Medicinal herb and of human diet. **Experientia**, **30**: 337-389, 1980a.
- CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A.; FRAHN, J.L. & SMITH, L.W - The alkaloids of *Symphytum x uplandicum* (Russian comfrey). **Aust. J. Chem**, **33**:1105-1113, 1980b.
- CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A. & SMITH, L.W. Pyrrolizidine alkaloids in honey from *Echium plantagineum* L. **J. Agric.Food Chem**, **29**:958, 1981.
- CULVENOR, C.C.J. Estimated intakes of pyrrolizidine alkaloids by humans. A comparison with dose rates causing tumours in rats. **J. Toxicol. Environ. Health**, **11**: 625-635, 1983.
- CULVENOR, C.C.J. Pyrrolizidine alkaloids: some aspects of the Australian involvement. **Trends Pharmacol. Sci**, **6**: 18-22, 1985.
- DEINZER, M.L.; THOMSON, P.A.; BURGETT, D.M & ISAACSON, D.L. Pyrrolizidine alkaloids their occurrence in honey from Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea*). **Science**, **195**: 497-499, 1977.

- DEINZER, M.L.; THOMSON, P.A.; GRIFFIN, D. & DICKISON, E.A. Sensitive analytical method for pyrrolizidine alkaloids. The mass spectro of retronecine derivatives. **Biomed. Mass Spectrum**, **5**: 175-179, 1978.
- DEINZER, M.L.; ARBOGAST, B.L.; BUHLER, D.R. & CHEEKE, P.R. Gas chromatographic determination of pyrrolizidine alkaloids in goat's milk. **Anal. Chem.** **54**:1811, 1982.
- DUBROVINSKII, S.B. About the alimentary toxicosis caused by *Heliotrope*. **J. Sov. Prot. Health**, **6**:17-21 (in Russian), 1946.
- DICKINSON, J.º; COOKE, M.P.; KING, R.R & MOHAMED, P.A. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. **J. Am. Vet. Med. Assoc**, **169**(11): 1192-1196, 1976.
- EDGAR, J.A. Parsonsieae: Ancestral Larval Foodplants of the Danainae and Ithomiinae. In " The Biology of Butterflies." Eds. ACKERY, P. A. & VANE-WRIGHT, R.I. **Academic Press**, pp. 91-96, 1984.
- EDGAR, J.A. Pyrrolizidine Alkaloids Sequestered by Solomon Island Danainae Butterflies. The Feeding Preferences of the Danainae and Ithomiinae. **J. Zool. Lond**, **196**:385-399, 1982.
- EHMKE, A.; WITTE, L.; BILLER, A. & HARTMANN, T. Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae*. **L. Z. Naturforsch**, **45c**:1185-1192, 1990.
- EVANS, J.V.; PENG, A & NIELSEN, C.J. The gas chromatographic mass spectrometric analysis of the new antitumor drug indicine N-oxide utilizing a novel reaction accompanying trimethylsilylation. **Biomed. Mass Spectrum**, **6**:38-43, 1979.
- EVANS, J.V.; DALEY, S.K.; McCLUSKY, G.A. & NIELSEN, C.J. Direct quantitative analysis of indicine N-oxide in cancer patient samples by gas chromatography using the internal standard heliotrine N-oxide including a mass spectral comparison of their trimethylsilyl derivatives. **Biomed. Mass Spectrum**, **7**:65-73, 1980.
- FRAHN, J.; CULVENOR, C.C.J. & MILLS, J.A. Preparative separation of the pyrrolizidine alkaloids, intermedine and lycopsamine, as their borate complexes. **J. Chromatogr**, **195**:379-383, 1980.



- FURUYA, T. & ARAKI, K. Studies on constituents of crude drugs. I. Alkaloids of *Symphytum officinale* Linn. **Chem. Phar. Bull**, **16**:2512-2516, 1968.
- GEORGER, D.E.; CHEEKE, P.R.; SCHMITZ, J. A & BUHLER, D.R. Effect of feeding milk from goats fed tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to rats and calves. **Am. J. Vet. Res.** **43**:1631, 1982.
- GOMORI, G. **Microscopic histochemistry: principles and practice**. University of Chicago Press, 1952.
- HABERMEHL, G.G.; MARTZ, W.; TOKARNIA, C.H.; DÖBEREINER, J and MENDEZ, M. C. "Livestock poisoning in south America by species of the *Senecio* plant". **Toxicon**, **26**: 275-286, 1988.
- HABERMEHL, G.G. Plantas Tóxicas e Fitotóxicas no Brasil. **Vinte anos de Cooperação Científica e Tecnológica Brasil - República Federal da Alemanha**, pp.178-184, 1991.
- HARBORNE, J.B. Phytochemical Methods. **A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis**. 2 ed. 288pp, 1984, Hong Kong.
- HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4<sup>th</sup> Ed, University of Reading, UK, pp. 67-103, Academic Press, 1997.
- HARTMANN, T. **Quinolizidines and pyrrolizidine**. In "**Cell culture and somatic cell genetics of plants**." Vol. 5. Eds. F. Constabel & I.K. Vasil. Academic Press. San Diego. CA. pp. 277-288, 1988.
- HARTMANN, T. & G. TOPPEL. Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. **Phytochemistry**, **26**:1639-1643, 1987.
- HARTMANN, T.; SANDER, H.; ADOLPH, R. & TOPPEL, G. Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. **Planta**, **175**:82-90, 1988.
- HARTMANN, T. Alkaloids. In **Herbivores: Their interactions with secondary plant metabolites**, 2 ed, vol.1, 79-121, Academic Press, 1992.
- HARTMANN, T. & WITTE L. Chemistry, biology and chemoeology of the pyrrolizidine alkaloids. In **Alkaloids: Chemical and**

**Biological Perspectives**, v.9 (PELLETIER, S.W., ed), pp. 155-233. Pergamon Press, Oxford, 1995.

- HERZ, W.; KULANTHAIVEL, P. S.; SUBRAMANIAN, P. S.; CULVENOR, C. C. J & EDGAR, J. A. Alkaloids of *Conoclinium coelestinum* (L.). DC., *Eupatorium compositifolium* Walt and *E. allisimum* L. Isolation of crystalline intermidine from *C. coelestinum*, **Experientia**, **37**:683, 1981.
- HIND, D.J.N. A checklist of the Brazilian *Senecioneae* (Compositae). In: **Kew Bulletin**, vol.**48** (2):279-295, 1993.
- HIRONO, I. Carcinogenic of plant constituents: pyrrolizidine alkaloids, flavonoids, bracken fern. **Genet. Toxic. Diet**, **45**, 1986.
- HOOPER, P.T. Pyrrolizidine alkaloids poisoning-pathology with particular reference to differences in animal and plant species. In effects of poisonous plants on livestock, KEELER, R.F.; VAN KAMPEN, K.R & JAMES, L.F. Eds. **Academic Press**, New York, **161**, 1978.
- HOOPER, P.T & SCANLAN, W.A. Crotalaria retusa poisoning of pigs and poultry. **Aust.Vet.J**, **53**:109-114, 1977.
- HSU, I.C.; ALLEN, J.R & CHESNEY, C.F. Identification and toxicological effects of dehydroretronecine, a metabolite of monocrotaline. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** **144**: 834-838, 1973.
- HUXTABLE, R.J. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. **Perspect. Biol. Med**, **24**: 1-14, 1980.
- JAGO, M.V. Method for the assessment of the chronic hepatotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci**, **48**:93, 1970.
- JOHNSON, A.E.; MOLYNEUX, R.J & STUART, L.D. Toxicity of Riddel's groundsel (*Senecio riddelli*) to cattle. **Am. J. Vet. Res**, **40**: 577-582, 1985.
- JOHNSON, A.E.; MOLYNEUX, R.J. & RALPHS, M.H. *Senecio*: A dangerous plant for man and beast. **Reprinted from Ranglands**, **11**:261-264, 1989.
- JONES, D.A. Cyanogenic glycosides and their function. In: HARBORNE, J. B. **Introduction to Ecological Biochemistry**, 4<sup>o</sup> Ed, University of Reading, UK, pp. 67-103, Academic Press, 1997.



- JONES, A.J.; CULVENOR, C.C.J & SMITH, L.W. Pyrrolizidine alkaloids- Carbon-13 nmr. **Study. Aust. J. Chem**, **35**:1173-1184, 1982.
- KAY, J. M.; HELATH, D.; SMITH, P.; BRAS, G & SUMMERELL, J. Fulvine and pulmonary circulation. **Thorax**, **26**:249, 1971a.
- KEELER, R.F. Toxins and Teratogens of higher plants. **Lloydia**, **38**: 56-86, 1975.
- KEELER, R.F.; VAN KAMPEN, K.R & JAMES , L.F. Effects of Poisonous Plants on Livestock, 600pp. **Academic Press**, New York, 1978.
- KEELER, R.F & TU, A.T. Plant and Fungal Toxins. **Handbook of Natural Toxins**, vol.1. Marcel Dekker, New York1,983.
- KREBS, H.C. **Progr. Chem. Org. Nat. Prod** **49**, 151-363, 1986
- KREBS, H.C.; CARL, T.; HABERMEHL, G.G. Pyrrolizidine Alkaloid Composition in six Brazilian *Senecio* species. **Phytochemistry** **43**(6): 1227-1229, 1996.
- KUMANA, C.R, NG, M.; LIN, H.J.; KO, W.; WU, P.C & TODD, D. Herbal tea induced hepatic veno-occlusive disease: quantification of toxic alkaloid exposure in adults. **Gut**, **26**(1):101-104, 1985.
- KUTCHAN, T.M. Alkaloid Biosynthesis-The Basis For Metabolic Engineering of Medicinal Plants. **The Plant Cell**, **7**(6): 1059-1070, 1995.
- LAFRANCONI, M & HUXTABLE, R. J. Pyrrolizidine and the pulmonary vasculature. **Rev. Drug Metab. Drug Interact**, **3**:271, 1981
- LANCET. Pyrrolizidine alkaloids (editorial). **Lancet**, **1**: 201-202, 1984.
- LITCHFIELD, J. T., & WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, **96**:99-115, 1949.
- LIU, K.; ROEDER, E.; CHEN, H.L & XIU, X.J. Pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium fortunei*. **Phytochemistry**, **31**:2573-2574, 1992.

- LOGIE, C.G.; GRUE, M.R. & LIDDELL, J.R. Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. Review article No.93. **Phytochemistry**, **37**:43-109, 1994.
- LOOMIS, T.A. Acute and Prolonged Toxicity Test. **J. Assoc. Official Analytical Chem**, v.**58**:645-705, 1975.
- LOOMIS, T.A. **Fundamentos de Toxicologia**. Ed. Acribia, Zaragoza (Espanha), sem data.
- LORENZI, H. **Plantas Daninhas** (terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais) **do Brasil**, 2ª Edição. Editora Plantarum Ltda. 440p, 1991.
- MAGALHÃES, J.F.G.; VIANA, C.F.G.; JUNIOR, A.G.M.A.; MORAIS, V.G.; RIBEIRO, R.A. & VALE, M.R. Analgesic and Antiinflammatory activities of *Ageratum conyzoides* in rats. **Phytherapy Research**, vol. **11**:183-188, 1997.
- MARIE, A. Pharmacological and Toxicological Studies of some *Heliotropium* alkaloids in Experimental Animals, Ph.D (Tese), **Fac.Med.** Cairo University, Egyto, 1983.
- MCGRATH, J.P.M.; DUNCAN, J.R & MUNNELL, J.F. *Crotalaria spectabilis* toxicity in swine: characterization of the renal glomerular lesion. **J. Comp. Pathol.** **85**(2): 185-194, 1975.
- MCLEAN, E.K. *Senecio* and other plants as liver poisons. **Isr. J. Med. Sci**, **10**:436-440, 1974.
- MCLEAN, E.K. The toxic actions of pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **Pharmacol. Rev**, **22**:249, 1970.
- MATTOCKS, A.R. Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. **Anal. Chem**, **39**: 443-447, 1967a.
- MATTOCKS, A.R. Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. **J. Chromatogr**, **27**: 505-508, 1967b.
- MATTOCKS, A.R. Spectrophotometric determination of pyrrolizidine alkaloids: some improvements. **Anal. Chem**, **40**:1749, 1968.
- MATTOCKS, A.R & WHITE, I.N.H. Estimation of metabolites of pyrrolizidine alkaloids in animal tissues. **Anal. Biochem**, **38**:529-535, 1970.
- MATTOCKS, A.R & WHITE, I.N.H. The conversion of pyrrolizidine alkaloids to dihydropyrrolizidine derivatives by rat-liver



- microsomes in vitro. **Chem. Biol. Interact**, **3**:383-396, 1971a.
- MATTOCKS, A.R. Synthetic compounds with toxic properties similar to those of pyrrolizidine alkaloids and their pyrrolic metabolites. **Nature**, **232**:476, 1971a.
- MATTOCKS, A.R. The occurrence and analysis of pyrrolizidine alkaloid N-oxides. *Xenobiotica*, 1:451-453, 1971b.
- MATTOCKS, A.R. Acute hepatotoxicity and pyrrolic metabolites in rats dosed with pyrrolizidine alkaloids. **Chem. Biol. Interact**, **5**:227-242, 1972b.
- MATTOCKS, A.R. Liver cell enlargement in rats given hydroxymethyl pyrroles analogous to pyrrolizidine alkaloid metabolites, followed later by the hepatotoxin dimethylnitrosamine. *Toxicol. Lett*, 8:201-205, 1981a.
- MATTOCKS, A.R. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. **Academic Press**, New York, London, 1986.
- MILLER, L. C. & TAINTER, M. L. Estimation of ED<sub>50</sub> and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med**, **57**:261-264, 1944.
- MITCHELL, J and ROOCK, A. **Botanical Dermatology**, 787pp, 1979. Greenglass, Vancouver.
- MOHANRAJ, S., SUBRAMANIAN, P. S. & HERZ, W. Minor Alkaloids of *Heliotropium Curssavicum*. **Phytochemistry**, v 21, **7**:1775-1779, 1982.
- MOHANRAJ, S., HERZ, W. & SUBRAMANIAN, P. Separation of diastereomeric pyrrolizidine alkaloids by chromatography on alkalisilica gel. **J.Chromatogr**, **238**: 530-533, 1982.
- MOLINNEUX, R.J.; ROITMAN, J.N.; BENSON, M & LUNDIN, R.E - <sup>13</sup>C nmr spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, **21**: 439, 1982.
- MOLINNEUX, R.J.; JOHNSON, A.E & STUART, L.D. Delayed Manifestation of Senecio-Induced pyrrolizidine alkaloids in cattle: Case Reports. **Vet. Hum. Toxicol**, **30**:201-205, 1988.
- NEUNER-JEHLE, N.; NESVADBA, H. & SPITELLER, G. Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt.: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. **Monatsch. Chem.**; **96**:320-338, 1965.

- OGAWA, T; NIWA, H & YAMADA, K. An Efficient Enantioselective Synthesis of Indicine N-Oxide, an Antitumor Pyrrolizidine Alkaloid. **Tetraehdron**, v 49, **8**: 1571-1578, 1993.
- OHTSUBU, K.; ITO, Y.; SAITO, M.; FURUYA, A. T & KIHICHI, M. Hypertrophy of pulmonary arteries and arterioles with cor pulmonale in rats induced by seneciphylline, a pyrrolizidine alkaloid. **Experientia**, **33**:498, 1977.
- PELLETIER, S.W. **The Nature and Definition of an Alkaloid**. Institute for Natural Products Research and Department of Chemistry The University of Georgia. **Chap I**. pp 25-27, 1983.
- PIELON, E.C. **The interpretation of ecological data a primer on classification and ordination**. 263p, New York, J. Wiley, 1984.
- PEDERSEN, E. & LARSEN, E. Mass spectrometry of some pyrrolizidine alkaloids. **Org. Mass Spectr**, **4**:249-256, 1970.
- POWIS, G.; AMES, M. M & KOVACH, J. S. Metabolic conversion of indicine-N-oxide to indicine in rabbits and humans. **Cancer Res**, **39**:3564-3570, 1979.
- 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**, vol. **443**, 53-67, 1999.
- RATNOFF, O. D & MIRICK, G. S. Influence of sex upon the lethal effects of a hepatotoxic alkaloid, monocrotaline. **Bull. Johns Hopkins Hosp**, **84**:507-25, 1949.
- RIBEIRO, L. R., BAUTISTA, A.R.P.L; SILVA, A.R; SALES, L.A; SALVADOR, D.M.F, & MAIA, P.C. Toxicological and toxicogenetic effects of plants used in popular medicine and in cattle food. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. **86**, Supl.II., 89-91, 1991.
- RIZK, A.F.M & KAMEL, A. Toxicity, carcinogenicity, pharmacology and other biological activities of pyrrolizidine alkaloids. In: Naturally Occurring Pyrrolizidine Alkaloids. Ed. A.M. Rizk. **CRC Press**, pp. 211-226, 1991.
- ROBBERS, M. K. S & TYLER, E.V. **Farmacognosia Biotecnologia**. Editorial Premier. **Cap. 9**, pp.163-208, 1997.
- ROBINS, D.J. Pyrrolizidine Alkaloids. **Fortschritte Ch. N. S**, **41**:115-203, 1982.



- ROBINS, D.J. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. **Chem.Soc.Rer**, **18**:375-408, 1989a.
- ROBINS, D.J. Pyrrolizidine Alkaloids. **Nat. Prod. Rep**, **6**:577-589, 1991.
- RODRIGUEZ, E.; TOWERS, G.H.N & MITCHELL, J.C. Biological activities of sesquiterpene lactones. **Phytochemistry** **15**: 1573-1580, 1976.
- ROEDER, E. Carbon-13 nmr spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, **29**:11-29, 1990.
- ROEDER, E. Carbon-13 nmr spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids." Ed. A.M. RIZK. **CRC PRESS**, pp.111-146, 1991.
- ROEDER, E. Carbon-13 nmr spectrscopy of pyrrolizidine alkaloids. In: Naturally Occurring Pyrrolizidine Alkaloids. Ed, A.M. Rizk. **CRC Press**, Florida, 1991, pp. 111-146.
- ROEDER, E. Carbon -13 nmr spectroscopy pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, **29**: 11-29, 1990.
- ROEDER, E & BOURAUUEL, T. Pyrrolizidine Alkaloids from *Neatostema apulum*. **Phytochemistry**, **31**:3613-3615, 1992.
- ROITMAN, J.N. Comfrey and liver damage. **Lancet**, **1**:944, 1981.
- ROITMAN, J.N. The pyrrolizidine alkaloids of *Amsinckia menziesii*. **Aust. J. Chem**, **36**: 769-778, 1983.
- ROSENTHAL, G.A. Plant Nonprotein Amino and Imino Acids, 273pp, 1982. **Academic Press**, New York.
- ROTH, R. A.; DOTZLAF, L. A.; BARANYI, B & HOOK, J.B. Effects of monocrotaline ingestion on liver, kidney and lung of rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol**, **60**:193-203, 1981.
- ROTHSCHILD, M.; APLIN, R.T; COCKRUM, P.A; EDGAR, J.A.; FAIRWETHER, P. & LEES, R. Pyrrolizidine alkaloids in arctiid moths with a discussion on host plant relationships and the role of these secondary plant substances in the Arctiidae. **Biol. J. Linn. Soc.** **12**:305-326, 1979.
- SHAZLY, EL.A.; SARG, T.; ATEYA, A.; AZIZ, A.; DAHMY, EL.S.; WITTE, L. & WINK, M. Pyrrolizidine alkaloids from *Echium setosum* and *Echium vulgare*. **J. Nat. Prod**, **59**:310-313, 1996.

- SHAZLY, EL.A.; SARG, T.; ATEYA, A.; AZIZ, A.; DAHMY, EL.S.; WITTE, L. & WINK, M. Pyrrolizidine and Tetrahydroisoquinoline alkaloids from *Echium humile*. **Phytochemistry**, **42**:225-230, 1996.
- SHOENTAL, R & MAGEE, P.N. Chronic liver changes in rats after a single dose of lasiocarpine a pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids. **J. Pathol. Bacteriol**, **74**:305-319, 1957.
- SHOENTAL, R & MAGEE, P.N. Further observations on the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of various pyrrolizidine *Senecio* alkaloids. **J. Pathol. Bacteriol**, **78**:471-482, 1959.
- SHOENTAL, R. Liver lesions in young rats suckled by mothers treated with the pyrrolizidine (*Senecio*) alkaloids, lasiocarpine and retrorsine. **J. Pathol. Bacteriol**. **77**:485-504, 1959.
- SIMÕES, C. M. O., MENTZ, L. A., SCHENKEL, E. P., IRGANG, B. E., STEHMANN, J. R. **Plantas da Medicina Popular no Rio Grande do Sul**. 4, Porto Alegre: Ed. da Universidade UFRGS. 174 p. 1995.
- SMITH, L. and CULVENOR, C.C.J. Pant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. **J.Nat.Prod**, **44**:129-143, 1981.
- SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. & MORRILL, T.C. Spectrometric identification of organic compounds. 5 ed, pp. 165-263, 1991.
- STELLJES, M.E.; KELLEY, R.B.; MOLYNEUX, R.J. & SEIBER, J.N. GC-MS Determination of pyrrolizidine alkaloids in four *Senecio* species. **Journal of Natural Products**, **54**:759-773, 1991.
- TANDON, H.D., TANDON, B.N & MATTOCKS, A.R. An Epidemic of veno-occlusive of the liver in Afghanistan. **Am. J. Gastroenterol**, **72**: 607-613, 1978.
- TEREKHOV, G.N - Pathomorphology of toxic hepatitis with ascites. In: Mirochnik, M.F., ed. **Functional Diagnostic and Pathological changes of Toxic Hepatitis with Ascites**. Tashkents, State Publishing House of Science Technology and Socio-Economic Literature of Uzbekistan, pp. 145-200, 1939 (in Russian).
- TOPPEL, G.; WITTE, L. & HARTMANN, T. N-Oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. **Phytochemistry**, **27**:3757-3760, 1988.



- TOWERS, G.H.N. Photosensitizers from plants and their photodynamic action. **Prog. Phytochemistry**, **6**: 183-202, 1980.
- TRIGO, J.R.; WITTE, L.; BROWN, K.S. JR.; HARTMANN, T & BARATA, L.E.S. Pyrrolizidine alkaloids in the Arctiid Moth *Hyalurga Syma*. **J. Chem. Ecol**, **19**: 669-679, 1993.
- TRIGO, J.R.; BROWN, K.S. Jr.; WITTE, LUDGER.; HARTMANN, T.; ERNST, L & BARATA, L.E.S. Pyrrolizidine Alkaloids in some Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine (Lepidoptera: Nymphalidae). **Biological J. Lin. Soc.** **58**:99-123, 1996.
- WESTENDORF, J. Pyrrolizidine alkaloids. General Discussion. In: Smet, P.A.G.M.; Keller, K.; Hansel, R & Chandler, R.F. ed - **Adverse Effects of Herbal Drugs 1**. Berlin, Springer, Verlag, Berlin Heidelberg, 1992.
- WIEDENFELD, H. & ROEDER, E. **Phytochemistry**, **18**:1083-1084, 1975
- WIEDENFELD, H. & ROEDER, E. Pyrrolizidine alkaloids from *Ageratum conyzoides*. **Planta Med**, **57**:578-579, 1991.
- WIEDENFELD, H.; GUERREIRO, R. & ROEDER, E. Pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium portoricense*. **Planta Med**, **61**:380-381, 1995.
- WILLIAMS, M.C.; MOLYNEUX, R.S. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in crotalaria seeds. *Sci*, 35(4):476-481, 1987.
- WINK, M. Allelochemical properties or the raison D'être of alkaloids In: **The Alkaloids**, vol.41, 118pp. Academic Press, 1993.
- WITTE, L.; ERNEST, L.; ADAM, H. & HARTMANN, T. Chemotypes of two pyrrolizidine alkaloids-containing *Senecio* species. **Phytochemistry**, **31**:559-565, 1992.
- WITTE, L.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C. & HARTMANN, T. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-Mass spectrometry. **Phytochemistry**, **32**:187-196, 1993.
- VALLMER, J.J.; STEINER, N.C.; LARSEN, G.Y.; MUIRHEAD, K.M & MOLYNEUX, R.J. Pyrrolizidine Alkaloids: Testing for Toxic

- Constituents of Comfrey. **J. of Chem. Education**, **64**(12):1027-1030, 1987.
- WHO. **International Program of Chemical Societ (IPCS):** Criteria 80, Pyrrolizidine alkaloids, World Health Organization. Geneva, 1988.
- VAN DEN DOOL, H & KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature Programmed gas-liquid partition. **J. Chromatogr**, **11**:463-471, 1963.
- VLIETINCK, A. J & PIETERS, L. A.C. Quantitative determinations of pyrrolizidine alkaloids. In **"Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids"**. ED. A.M RIKK, **CRC Press**, Florida. pp. 191-210, 1991.
- VRIELING, K. Costs and benefitis of alkaloids of *Senecio jacobaea* L. **PhD Thesis**. Department of Populational Biology, Research Group. Ecology of Plants and Herbivores, University of Leiden, Holanda, 1991.
- ZALKOW, L.H.; GLINSKI, J.A.; GELBAUM, L.; FLEISCHMANN, T.J.; MCGOWAN, L.S & GORDON, M.M. Synthesis of the pyrrolizidine alkaloids indicine, intermidine, lycopsamine and analogues and their N-oxides. Potential antitumor agents. **J. Med. Chem**, **28**:687-694, 1985.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE