



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Instituto de Biologia

Karina Lucas da Silva

**Alcalóides Pirrolizidínicos utilizados por insetos na defesa
química contra predadores vertebrados e invertebrados**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato a)
Karina Lucas da Silva
e aprovada pela Comissão Julgadora
29/11/2000 José Roberto Trigo

Tese apresentada ao curso de Pós-graduação em Ecologia da Universidade Estadual de Campinas como requisito para obtenção do título de Mestre em Ecologia.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Trigo

Campinas, Novembro de 2000.



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	Si38a
V.	Ex.
TOMBO BC/	43748
PROC.	13/392/01
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 11,00
DATA	13/02/01
N.º CPD	

CM-00153253-5

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Si38a**Silva, Karina Lucas da**

Alcalóides pirrolizidínicos utilizados por insetos na defesa química contra predadores vertebrados e invertebrados/Karina Lucas da Silva. -- Campinas-SP. [s.n.], 2000.
188f: ilus.

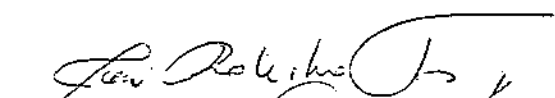
Orientador: José Roberto Trigo

Dissertação (mestrado) -- Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Alcalóides. 2. Pirrolizidínicos. 3. Defesa química. 4. Estrutura-atividade. I. Trigo, José Roberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título

Data da defesa: 24/11/2000

Banca Examinadora


Prof. Dr. José Roberto Trigo (Orientador)


Prof. Dr. Dennis Russowski


Dr. Márcio Zikán Cardoso

Prof. Dr. João Vasconcellos-Neto

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

Aos meus pais e ao Má, que sempre deram todo o amor e todo o incentivo que eu precisei para continuar sonhando.

AGRADECIMENTOS

Obrigada a “vó” Rosa e ao “vô” Zé pela casa, comida, carinho e paciência que me ofereceram no começo deste trabalho. Sem vocês este trabalho nem teria começado.

Obrigada ao Marcelo por toda a ajuda durante todo o tempo, sem reclamar nunca. Obrigada pela enorme paciência e pelo amor que você sempre tem com as minhas coisas e pelo Fusca, que nunca me deixou na mão. Obrigada também pela ajuda “técnica” no computador, nos meus relatórios e nas minhas apresentações.

Obrigada à minha mãe, meu pai, a Vanessa e o Neto pela injeção de ânimo quando eu sempre precisava e corria pra casa...

Obrigada ao Prof Dr. José Roberto Trigo pela orientação e pela Ecologia Química.

Obrigada aos meus tios e tias pelas piadas de Domingo, e a Jú pelas longas horas de bate-papo.

Obrigada a todo o pessoal do laboratório de Ecologia Química (Augusto, Chris, Eduardo, Flávia, Hipólito, Luciana, Lucila, Márcio, Nice, Paiva, Paulo, Tati, Vivi, Zeca), pela força amiga e profissional de todo dia. Obrigada ao Augusto pelas idas ao campo, pelas fotos e pela amizade, e por ter me “salvado” sempre que possível. Ao Edu, pelas fotos e pelas dicas sempre bem vindas. E obrigada ao Paiva pela imprescindível ajuda na parte química deste trabalho.

Obrigada a todos os amigos do curso de Ecologia da UNICAMP, com um beijo enorme para todos, em especial à Adrianinha e à Márcia.

Obrigada ao Prof. Dr. João Vasconcellos-Neto, ao Prof. Dr. Woodruff Benson (Depto. de Zoologia, UNICAMP) e ao Prof. Carlos Alfredo Joly (Depto. de Botânica, UNICAMP) pelas dicas sobre o trabalho durante a qualificação. Obrigada ao Dr. Márcio Zikán Cardoso, Prof. Dr. Carlos Roque Duarte Correia (IQ, UNICAMP) e Prof. Dr. Woodruff Benson pela análise da dissertação durante a pré-banca. E obrigada ao Prof. Dr. Dennis Russowski e Dr. Márcio Zikán Cardoso pela presença na Banca Examinadora e pela leitura criteriosa da versão final da tese.

Obrigada ao Prof. Dr. Carlos Lenz César (Depto. de Física, UNICAMP) e ao Prof. Dr. Aquiles Piedrabuena (Depto. de Genética e Evolução, UNICAMP) pela ajuda com as análises estatísticas deste trabalho.

Obrigada à Luciana pela ajuda indispensável com os pintinhos.

Obrigada à Maria e ao pessoal técnico do Depto. de Parasitologia pelas larvas de dípteros. Obrigada à Tânia da Agrogenética de Campinas pelos pintinhos.

Obrigada aos motoristas do IB (Joaquim e Élcio) e do Depto. de Zoologia (Toninho). Obrigada a todos os funcionários do Depto. de Zoologia (Aderval, Eliana, Leonor, Luís, Maria Antônia, Ricardo, Sandra, Sueli) e Rejane pela pronta ajuda de todo dia.

Obrigada ao pessoal da Base da Serra do Japi, Sr. Lauro, D. Ozaira, Suzete, e aos guardas do P11 pela hospitalidade e pelas conversas durante minhas esperas.

Obrigada a todos que ajudaram de uma forma ou de outra, às vezes sem nem saber, valeu!!

Obrigada à Fapesp pelo financiamento deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS.....	xv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xx
RESUMO	xxii
ABSTRACT	xxiv
INTRODUÇÃO.....	1
1. Alcalóides Pirrolizidínicos	3
2. Alcalóides Pirrolizidínicos e insetos.....	9
2.1. O papel de APs na seleção sexual de insetos	11
2.2. APs como compostos de defesa para lepidópteros	11
OBJETIVOS	14
Objetivo geral	14
Objetivos Específicos	14
MATERIAIS E MÉTODOS	15
I. OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS (APs).....	15
1. Coleta dos organismos	15
2. Isolamento, separação e purificação de alcalóides pirrolizidínicos	15
2.1. Fracionamento de plantas	15
2.2. Fracionamento de insetos	16
2.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	17
2.4. Cromatografia de Adsorção em Coluna	17
2.5. Cromatografia de Troca Iônica.....	18
2.6. Colorimetria.....	18
3. Semi-síntese de alcalóides pirrolizidínicos.....	19
3.1. Obtenção da retronecina (<u>3</u>) e dos ácidos néricos respectivos (<u>6</u> e <u>7</u>)	19
3.2. Síntese da 9-O-senecioiretronecina (<u>14</u>)	20
3.3. Síntese da (±)-calimorfina (<u>22</u>)	20
3.3.1. Síntese do ácido (±)-2-acetóxi-2-metil-butanóico (<u>8</u>)	20

3.3.2. Síntese do 9-O-RS-2-acetil, 2-metil butanoato de (+)- retronecina-(±) - calimorfina (22)	21
3.4. N-oxidação de APs	21
4. Instrumental	22
4.1. Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de Massa (CG-EM)	22
4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	22
II. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE APs	24
1. Bioensaios com a aranha <i>Nephila clavipes</i>	24
1.1. Bioensaios com aplicação tópica em organismos palatáveis	24
1.2. Tempo de metabolização e atividade de APs - alimentação de adultos recém emergidos de <i>Mechanitis polymnia</i>	27
1.3. Bioensaios com borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> capturadas no campo	30
2. Bioensaios com pintinhos <i>Gallus gallus</i>	30
2.1. Bioensaios com aplicação tópica em organismos palatáveis	31
2.1.1. Experimentos com um único oferecimento	31
2.1.2. Experimentos com oferecimentos seqüenciais	32
3. Análises estatísticas	34
3.1. Comparação da efetividade de APs de estruturas diferentes	34
3.2. Efeito da concentração sobre a resposta	35
3.3. Comparação das respostas de <i>Nephila clavipes</i> a borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> alimentadas com diferentes tipos de APs e oferecidas após diferentes tempos	36
3.3.1. Entre diferentes APs	36
3.3.2. Entre os tempos decorridos depois da ingestão de cada AP	37
3.4. Comparação da concentração e quantidade de APs em borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> capturadas no campo	37
RESULTADOS	39
1. Obtenção de Alcalóides Pirrolizidínicos (APs)	39
1.1. Integerrimina:senecionina base livre e N-óxido	39
1.2. Retronecina base livre e N-óxido, e ácidos nécicos respectivos	40

1.3. 9-O-senecioilretronecina base livre e N-óxido.....	41
1.4. Calimorfina base livre	42
2. Bioensaios com a aranha <i>Nephila clavipes</i>	52
2.1. Bioensaios com aplicação tópica de APs em organismos palatáveis.....	52
2.2. Tempo de metabolização e atividade de APs - alimentação de adultos recém emergidos de <i>Mechanitis polymnia</i>	61
2.2.1. Respostas de <i>Nephila clavipes</i> em relação a cada AP dentro de cada tempo após sua ingestão	61
2.2.2. Respostas de <i>Nephila</i> em relação a diferentes tempos após a ingestão de cada AP.....	61
2.3. Bioensaios com borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> capturadas no campo	64
2.4. Determinação de APs em borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> capturadas no campo.....	64
3. Bioensaios com pintinhos <i>Gallus gallus</i>	66
3.1. Bioensaios com aplicação tópica de APs em organismos palatáveis.....	66
3.1.1. Experimentos com um único oferecimento.....	66
3.1.2. Experimentos com oferecimentos seqüenciais	69
DISCUSSÃO.....	73
1. Estrutura de APs vs atividade anti-predação.....	73
Base livre vs N-óxido	73
Macrocíclicos com base necina retronecina (3) vs macrocíclicos com otonecina (5)	76
Monoésteres vs macrocíclicos.....	77
Base Necina	78
2. Concentração vs atividade anti-predação de APs.....	79
3. Os modelos de predadores invertebrados e vertebrados	82
CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
APÊNDICES	99
Apêndice 1.....	99
Apêndice 2.....	101

Apêndice 3.....	103
Apêndice 4.....	104
Apêndice 5.....	166
Apêndice 6.....	169

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Algumas características dos alcalóides pirrolizidínicos obtidos para utilização nos bioensaios com predadores vertebrados e invertebrados	43
Tabela 2. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para integerrimina:senecionina base livre (10 e 11).....	45
Tabela 3. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para integerrimina:senecionina N-óxido .	46
Tabela 4. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para retronecina base livre (3).....	47
Tabela 5. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para retronecina N-óxido	48
Tabela 6. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para o ácido integerrimínico:senécico (6 e 7).....	49
Tabela 7. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para a 9-O-senecioilretronecina base livre (14).....	50
Tabela 8. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para a 9-O-senecioilretronecina N-óxido	51
Tabela 9. Dose de Liberação 50 (DLib ₅₀) onde 50% das presas oferecidas à <i>Nephila clavipes</i> são liberadas ilesas	58
Tabela 10. ANCOVA aplicada para comparar a efetividade dos diferentes APs contra a predação por aranhas <i>Nephila clavipes</i> , com um teste <i>a posteriori</i> de Tukey	59
Tabela 11. Regressão logística para determinação do efeito da concentração de APs sobre a resposta de aranhas <i>Nephila clavipes</i>	60
Tabela 12. Quantidade (μg de APs totais/indivíduo), concentração (μg de APs/mg de peso seco corpóreo) e porcentagem em relação ao peso seco de alcalóides pirrolizidínicos em borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> capturadas no Complexo Botânico Monjolinho nos meses de abril e maio de 1999.....	65
Tabela 13. Regressão logística para determinação do efeito da concentração de APs nas presas sobre a resposta de pintinhos <i>Gallus gallus</i>	68
Tabela 14. Equações da reta e r^2 da curva de calibração dos APs utilizados na alimentação de borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> em laboratório utilizadas para a determinação da concentração de APs em cada indivíduo	100

Tabela 15. Quantidade inicial de APs (μg) oferecida a borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> e quantidade média de APs (μg), determinada por colorimetria, nos indivíduos alimentados em laboratório e congelados após diferentes períodos de tempo, e nos capilares utilizados na sua alimentação	100
Tabela 16. Concentração e quantidade total de APs em borboletas Ithomiinae capturadas no campo - determinadas por Brown (1987).....	169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alcalóides Pirrolizidínicos e seus derivados.....	6
Figura 2. Bioensaios com <i>Nephila clavipes</i> utilizando-se aplicação tópica de APs em presas palatáveis (abelhas)	26
Figura 3. Alimentação de um indivíduo macho de <i>Mechanitis polymnia</i> com APs	28
Figura 4. Bioensaios com <i>Nephila clavipes</i> utilizando-se borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> alimentadas com APs	29
Figura 5. Bioensaios com <i>Gallus gallus</i> utilizando-se aplicação tópica de APs em presas palatáveis (larvas do díptero <i>Chrysomya putoria</i>).....	33
Figura 6. Atividade anti-predação contra <i>Nephila clavipes</i> vs dose de APs macrocíclicos (μ moles/mg) aplicados topicamente em abelhas e oferecidos às aranhas.....	53
Figura 7. Linearização da atividade anti-predação contra <i>Nephila clavipes</i> vs dose de APs macrocíclicos (μ moles/mg).....	54
Figura 8. Atividade anti-predação contra <i>Nephila clavipes</i> vs dose de APs monoésteres (μ moles/mg) aplicados topicamente em abelhas e oferecidos às aranhas.....	55
Figura 9. Linearização da atividade anti-predação contra <i>Nephila clavipes</i> vs dose de APs monoésteres (μ moles/mg).....	56
Figura 10. Atividade anti-predação contra <i>Nephila clavipes</i> vs dose dos APs calimorfina e retronecina (μ moles/mg) aplicados topicamente em abelhas e oferecidos às aranhas	57
Figura 11. Atividade anti-predação contra <i>Nephila clavipes</i> vs dose de APs (μ g de APs/mg do peso seco corpóreo) em borboletas <i>Mechanitis polymnia</i> alimentadas em laboratório e oferecidas após diferentes períodos de tempo às aranhas.....	63
Figura 12. Atividade anti-predação contra pintinhos <i>Gallus gallus</i> vs dose dos APs aplicados topicamente em larvas de <i>Chrysomya putoria</i> e oferecidos aos pintinhos	67

Figura 13. Respostas de pintinhos <i>Gallus gallus</i> a presas pinceladas com integerrimina:senecionina base livre (10 e 11) oferecidas seqüencialmente.....	70
Figura 14. Respostas de pintinhos <i>Gallus gallus</i> a presas pinceladas com integerrimina:senecionina N-óxido oferecidas seqüencialmente.....	71
Figura 15. Espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11).....	104
Figura 16. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11) (Figura 15).....	105
Figura 17. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11) (Figura 15).....	106
Figura 18. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11) (Figura 15).....	107
Figura 19. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11).....	108
Figura 20. Amplificações do espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11) (Figura 19).....	109
Figura 21. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11).....	110
Figura 22. Espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido	111
Figura 23. Amplificações do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 22).....	112
Figura 24. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 22).....	113
Figura 25. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido	114
Figura 26. Amplificações do espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 25).....	115
Figura 27. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido	116
Figura 28. Espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido	117

Figura 29. Amplificações do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 28).....	118
Figura 30. Espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido	119
Figura 31. Amplificações do espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 30).....	120
Figura 32. Espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina base livre (3)	121
Figura 33. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 32)	122
Figura 34. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 32)	123
Figura 35. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina base livre (3)	124
Figura 36. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 35)	125
Figura 37. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da retronecina base livre (3).....	126
Figura 38. Espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da retronecina base livre (3).....	127
Figura 39. Amplificação do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 38)	128
Figura 40. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da retronecina base livre (3).....	129
Figura 41. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 40)	130
Figura 42. Espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido	131
Figura 43. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 42).....	132
Figura 44. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 42).....	133
Figura 45. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 42).....	134
Figura 46. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina N-óxido.....	135

Figura 47. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 46).....	136
Figura 48. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da retronecina N-óxido.....	137
Figura 49. Espectro do ^1H da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (<u>6</u> e <u>7</u>).....	138
Figura 50. Amplificações do espectro do ^1H da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (<u>6</u> e <u>7</u>) (Figura 49).....	139
Figura 51. Espectro do ^{13}C da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (<u>6</u> e <u>7</u>).....	140
Figura 52. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (<u>6</u> e <u>7</u>).....	141
Figura 53. Espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>).....	142
Figura 54. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>) (Figura 53).....	143
Figura 55. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>) (Figura 53).....	144
Figura 56. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>) (Figura 53).....	145
Figura 57. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>).....	146
Figura 58. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>) (Figura 57).....	147
Figura 59. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>).....	148
Figura 60. Espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>).....	149
Figura 61. Amplificação do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>) (Figura 60).....	150
Figura 62. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (<u>14</u>).....	151

Figura 63. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioilretronecina base livre (14) (Figura 62).....	152
Figura 64. Espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido	153
Figura 65. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 64).....	154
Figura 66. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 64).....	155
Figura 67. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido	156
Figura 68. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 67).....	157
Figura 69. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 67).....	158
Figura 70. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido	159
Figura 71. Espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido	160
Figura 72. Amplificação do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 71).....	161
Figura 73. Espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido	162
Figura 74. Amplificação do espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 73).....	163
Figura 75. Amplificação do espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 73).....	164
Figura 76. Amplificação do espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioilretronecina N-óxido (Figura 73).....	165

LISTA DE ABREVIATURAS

δ = Deslocamento químico

^{13}C = Carbono 13

^1H = Hidrogênio

AcOH = Ácido acético

ANCOVA = Análise de Covariância

ANOVA = Análise de Variância

APs = Alcalóides Pirrolizidínicos

Ba(OH) $_2$.8H $_2$ O = Hidróxido de bário

BF $_3$ = Trifluoreto de boro

C = Carbono

CCD = Cromatografia em camada delgada

CDCl $_3$ = Clorofórmio deuterado

CG-EM = Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa

CHCl $_3$ = Clorofórmio

CO $_2$ = Dióxido de carbono

d = dubleto

D $_2$ O = Água deuterada

DCC = Diciclohexilcarbodiimida

DHU = Diciclohexilureia

Dlib $_{50}$ = Dose de Liberação 50

DMAP = Dimetilaminopiridina

EtOH = Álcool etílico

H $_2$ O $_2$ = Peróxido de hidrogênio

HCl = Ácido clorídrico

IAC = Instituto Agrônomo de Campinas

IR = Índice de Retenção

J = Constante de acoplamento

LL = Logaritmo da verossimilhança

m = multiplete

MeOH = Álcool metílico

N₂ = Nitrogênio

Na₂SO₄ = Sulfato de sódio

Na₄P₂O₇ = Tetra-sódio pirofosfato

NH₄OH = Hidróxido de amônia

PM = Peso molecular

RMN = Ressonância magnética nuclear

s = singleto

sl = singleto largo

SMS = Substâncias do metabolismo secundário

t = tripleto

TMS = Tetrametilsilano

Zn = Zinco

RESUMO

Os Alcalóides Pirrolizidínicos (APs) representam uma classe de compostos secundários da planta com um papel único nas interações entre plantas, insetos herbívoros e seus inimigos naturais. A defesa química em mariposas da família Arctiidae e borboletas das sub-famílias Danainae e Ithomiinae (Nymphalidae), devido a APs, é conhecida contra diferentes predadores vertebrados e invertebrados. A aranha *Nephila clavipes* L. (Araneae, Tetragnathidae) é um predador invertebrado muito utilizado em bioensaios com APs, sendo que estas aranhas discriminam adultos de Ithomiinae e Danainae, liberando-os ilesos de sua teia. Neste trabalho, se testou a relação entre diferentes estruturas de APs (macrocíclicos e monoésteres, nas formas base livre e N-óxido, além da base necina, ácidos nécicos e de um AP exclusivo de insetos), em diferentes concentrações, com sua ação anti-predação. Pintinhos *Gallus gallus* e aranhas *Nephila clavipes* foram usados como modelos de predadores em testes com presas palatáveis pinceladas com APs e de alimentação de adultos de Ithomiinae recém emergidos (*Mechanitis polymnia*) oferecidos em diferentes períodos de tempo após a alimentação com APs. Nos bioensaios com presas pinceladas com APs, a mistura dos macrocíclicos integerrimina:senecionina foi mais efetiva contra aranhas na forma N-óxido. Para o AP monoéster seneciollretronecina, aranhas *Nephila clavipes* responderam de forma similar às presas pinceladas com a base livre ou o N-óxido. A calimorfina, um AP exclusivo de insetos, foi mais efetiva contra predação por *Nephila clavipes* do que sua base necina retronecina, corroborando a idéia de que estes APs são produzidos para maximizar a defesa contra predadores. Para todos os APs testados, houve uma clara relação entre a concentração e a efetividade da resposta anti-predação de *Nephila clavipes*, sendo que as concentrações mais altas provocaram uma maior taxa de liberação das presas pinceladas com APs. Não foram encontradas diferenças nas respostas de predadores vertebrados às formas base livre e N-óxido de APs macrocíclicos e monoésteres. Mais uma vez, a retronecina não foi eficiente contra predação. As concentrações destes APs testadas contra estes predadores não chegaram a provocar respostas efetivas contra predação e, de fato, pintinhos são menos sensíveis a baixas concentrações de APs do que aranhas *Nephila clavipes*. Nos ensaios com borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas em laboratório, aquelas

ABSTRACT

Pyrrolizidine Alkaloids (PAs) are secondary plant compounds with a unique role in the interaction between plants, herbivorous insects, and their natural enemies relationships. The chemical defense due to PAs in Arctiidae moths and butterflies of sub-families Danainae and Ithomiinae (Nymphalidae) has been investigated with regards to vertebrate and invertebrate predators. One of the most used model for PAs bioassay is the spider *Nephila clavipes* L. (Aranae, Tetragnathidae) which rejects adult Ithomiinae and Danainae, releasing them unharmed from the web. This work tested the role of PAs chemical structure (macrocyclics and monoesters, free base and N-oxide, necine base, necic acids and an insect-PA) and concentration in anti-predator activity. Domestic chicks *Gallus gallus* and spiders *Nephila clavipes* were used as models in assays with palatable prey treated with PAs. The macrocyclic PAs integerrimine:senecionine N-oxide were more effective against spiders than its free base. For the monoester senecioldretronecine, no differential response from the spider was found between free base and N-oxide. Callimorphine, an exclusive insect-PA, was more effective against *Nephila clavipes* predation than its necine base retronecine, supporting the hypothesis that insect-PAs are produced to optimize the insect chemical defense. For all PAs tested there was a clear correlation between dosage and predator negative response in *Nephila clavipes*; higher concentrations generated higher prey release. In the vertebrate predator bioassays no differences were found between free base and N-oxide macrocyclics and monoesters PAs. As with the spider, the retronecine was not effective against predation. The tested PAs dosages did not trigger an effective negative response by the chicks. Domestic chicks were less sensitive to lower PAs dosages than *Nephila clavipes*. In another set of experiments, recently emerged adults of *Mechanitis polymnia* (Ithomiinae) were fed PAs and tested at various time intervals after ingestion with the spider predation. Freshly emerged *Mechanitis polymnia* those fed senecioldretronecine and integerrimine:senecionine were more released by *Nephila clavipes* than those fed retronecine. The different responses from vertebrate and invertebrate predators tested in this work, in relation to different PAs structures, demonstrates the importance of PAs mixture to obtain an effective chemical

alimentadas com senecioilretronecina e integerrimina:senecionina foram mais liberadas por *Nephila clavipes* do que aquelas alimentadas com a retronecina. As diferentes respostas de predadores vertebrados e invertebrados testados neste trabalho, em relação às diferentes estruturas de APs, demonstram a importância da mistura de APs na obtenção de uma defesa química eficiente contra diferentes tipos de predadores potenciais. Além disto, a proteção das presas aumenta de acordo com a concentração de APs em seus tecidos.

defense against different potential predators. And the prey protection rises in accordance with the PA concentration in their tissues.

INTRODUÇÃO

Interações ecológicas entre plantas e insetos herbívoros são mediadas, em grande parte, por substâncias químicas da planta, conhecidas como substâncias do metabolismo secundário (SMS) (Whittaker e Feeny 1971). Estas podem ser agrupadas, de acordo com sua rota biossintética, em derivados do ácido chiquímico (compostos fenólicos, como por exemplo, flavonóides, antocianinas, flavonas e coumarinas), derivados do ácido mevalônico (p.ex.: mono-, sesqui- di-, e triterpenos e cardenolidas), derivados de aminoácidos aromáticos e alifáticos (compostos nitrogenados, como por exemplo, alcalóides e glicosídeos cianogênicos), além de ácidos orgânicos e lipídeos. Estas substâncias são caracterizadas pelo baixo peso molecular (normalmente <3000 daltons), grande variedade estrutural (Williams *et al.* 1989) e variação intraespecífica (Hartmann e Dierich 1998).

SMS de plantas podem ser definidas como “compostos da planta que não são universalmente encontrados em plantas superiores, ou ocorrem em certas taxa em concentrações maiores do que em outros, e não são de significância nutricional para insetos” (Schoonhoven *et al.* 1998). No passado, esses compostos foram considerados produtos de lixo metabólico provenientes do metabolismo primário, e sem função essencial para a planta, uma vez que não seriam usados para a formação de novas células. Fraenkel (1959) argumentou que as substâncias secundárias da planta apresentam um papel adaptativo, enfatizando o uso discriminatório de certas plantas por insetos e sugerindo que esta discriminação seria devida a presença destes produtos. Estas substâncias agiriam, assim, como uma defesa química da planta contra insetos fitófagos em geral.

A visão contemporânea do metabolismo secundário de plantas é determinada pelos exemplos bem documentados de interações planta-patógeno e planta-herbívoro, ou associações mutualísticas de plantas com outros organismos onde o metabolismo secundário de plantas está envolvido. Devido a este seu papel ecológico, substâncias secundárias foram classificadas como “infoquímicos” por Dicke e Sabelis (1988) em uma revisão sobre a terminologia aplicada às SMS dentro deste contexto. Segundo estes autores, infoquímicos são substâncias que mediam uma interação entre dois indivíduos, provocando uma resposta comportamental ou fisiológica no organismo que

as recebem (receptor), que pode ser adaptativa para este ou para ambos os indivíduos incluídos na interação. Se o infoquímico media uma interação entre indivíduos de mesma espécie, ele é chamado feromônio; por outro lado, o infoquímico é chamado aleloquímico se ele media uma interação entre organismos de espécies diferentes. Aleloquímicos, por sua vez, são diferenciados em alomônios (um aleloquímico que é adaptativamente favorável ao organismo emissor mas não ao organismo receptor), kairomônios (aleloquímicos que são adaptativamente favoráveis ao organismo receptor, mas não ao organismo emissor em uma interação) e sinomônios (um aleloquímico adaptativamente favorável a ambos os indivíduos envolvidos em uma interação).

As interações tri-tróficas entre plantas, insetos herbívoros e seus inimigos naturais são exemplos de interações mediadas por alomônios, uma vez que insetos herbívoros adaptados podem seqüestrar SMS de determinadas plantas, utilizando-as para sua própria proteção química. Lepidópteros, por exemplo, estão envolvidos em diversas interações tri-tróficas deste tipo (Brower 1984 e referências ali citadas).

Ehrlich e Raven (1964) discutiram a estreita relação entre lepidópteros e as substâncias químicas secundárias presentes nas plantas que estes utilizam como alimento e sugeriram um possível cenário evolutivo baseado na fitoquímica. Angiospermas, inicialmente, através de recombinações ou mutações ocasionais, devem ter desenvolvido a capacidade de produzir uma série de compostos não essenciais ao seu metabolismo básico, ou seja, SMS. Estas substâncias teriam tornado a planta tóxica e impalatável para insetos fitófagos generalistas e, desta forma, um recurso disponível para aqueles insetos que, por mutação ou recombinação, vieram a ser capazes de se alimentar de grupos de plantas anteriormente protegidas. Livres da competição com outros insetos fitófagos generalistas, estes insetos que ultrapassaram a barreira química das plantas puderam se diversificar amplamente. SMS podem ter passado a agir como atrativos para insetos herbívoros especializados, ou, pelo menos, como uma fonte de reconhecimento e localização de espécies de plantas particulares. Uma vez adaptados, insetos herbívoros podem ter ganho uma vantagem extra, passando a seqüestrar as SMS da planta, utilizando-as para sua própria defesa contra inimigos naturais.

A defesa química em insetos devido às SMS obtidas de plantas é um fenômeno bastante estudado (Brower 1984). Brower *et al.* (1967) mostraram que as larvas de

Danaus plexippus (Danainae), que se alimentam de *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae), transferem para o adulto os glicosídeos cardíacos (cardenolidas) seqüestrados de sua planta hospedeira. Bioensaios com os adultos de *Danaus plexippus* cujas larvas foram alimentadas com *Asclepias curassavica*, mostraram que eles são quimicamente protegidos contra predação pelas aves omnívoras *Cyanocitta cristata* (Corvidae). Posteriormente, Brower *et al.* (1968) mostraram experimentalmente que a resposta destas aves às borboletas é condicionada pela concentração de cardenolidas nos tecidos destas.

Borboletas do gênero *Euphydryas* (Nymphalidae) também seqüestram SMS de suas plantas hospedeiras e as utilizam para sua própria proteção química. Estas borboletas são especializadas em plantas contendo um grupo particular de SMS, os glicosídeos iridóides, que são compostos monoterpênóides encontrados em diversas famílias de plantas, como Scrophulariaceae, Plantaginaceae, Caprifoliaceae e Oleaceae (Bowers 1983). O seqüestro de glicosídeos iridóides pode proteger os insetos que os contêm de uma variedade de predadores vertebrados (Bowers 1981, Bowers e Farley 1990) e invertebrados (Stamp 1992).

1. Alcalóides Pirrolizidínicos

Os Alcalóides Pirrolizidínicos (APs) representam uma classe de compostos secundários da planta com um papel único nas interações entre plantas, insetos herbívoros e seus inimigos naturais. Eles formam um grupo diverso de aproximadamente 360 estruturas, com ocorrência restrita a certos taxa de plantas superiores (Hartmann 1996; para uma revisão de APs, Mattocks 1986 e Hartmann e Witte 1995).

O risco de saúde para humanos e animais domésticos e o papel ímpar nas relações inseto-planta são duas características importantes de APs que estimularam freqüentes estudos. Além disto, estes alcalóides representam um importante papel na defesa química de plantas, sendo tóxicos para vertebrados (Mattocks 1986 e Culvenor *et al.* 1976) e impalatáveis para insetos herbívoros generalistas (Van Dam *et al.* 1995).

APs são normalmente encontrados em plantas das famílias Asteraceae (*Eupatorium* e *Senecio*), Boraginaceae (*Heliotropium*), Fabaceae (principalmente *Crotalaria*) e Orchidaceae. Podem também ser encontrados em famílias adicionais, tais

como em Apocynaceae (4 gêneros), Celastaceae (1), Rhizophoraceae (1), Ranunculaceae (1), Santalaceae (1), Sapotaceae (2) e Convolvulaceae (1) (Hartmann e Witte 1995). Em geral, estas plantas possuem vários tipos de APs, geralmente dentro de um mesmo grupo estrutural, e a quantidade pode variar grandemente entre e dentre plantas individuais da mesma espécie, dependendo do seu estado fisiológico (Boppré 1986).

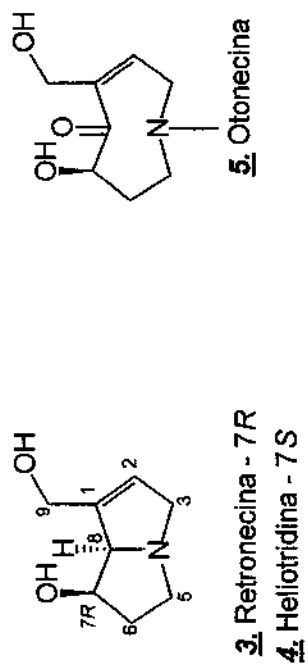
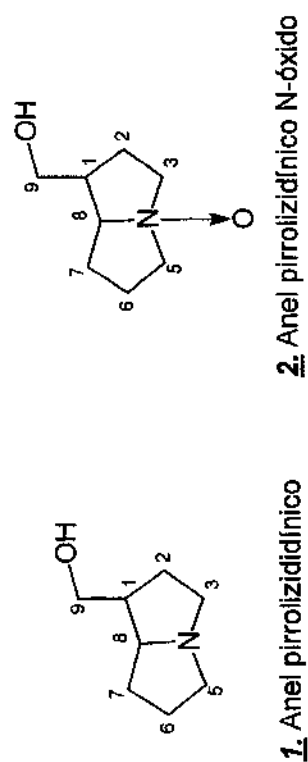
Os APs são caracterizados pela presença de um anel pirrolizidínico (1), um sistema 1-azabicyclo-[3.3.0] octano, e ocorrem geralmente como ésteres, compostos de uma base necina e um ácido néxico, que podem formar monoésteres, diésteres ou triésteres de cadeias abertas e diésteres macrocíclicos – sendo que a base necina pode apresentar ou não insaturação na posição 1,2 (Mattocks 1986) (Figura 1). Os APs mais freqüentemente encontrados consistem normalmente de bases necinas retronecina (3) e heliotridina (4), sendo que a retronecina (3) aparece como o aminoálcool mais comum em APs (Boppré 1990). Pela modificação da base necina e do ácido néxico, uma grande variedade de estruturas podem ser formadas.

Culvenor (1978) definiu três tipos de APs, analisando as implicações taxonômicas e filogenéticas de sua ocorrência: a) ésteres monocarboxílicos alifáticos, característicos de Boraginaceae; b) diésteres macrocíclicos, comuns em Senecioneae (Asteraceae) e no gênero *Crotalaria* (Fabaceae); c) ésteres aril e aralkil, típicos de Orchidaceae. Foi adotada neste trabalho a classificação de Hartmann e Witte (1995), que sugeriram seis categorias de APs baseadas em implicações taxonômicas e biogenéticas (Figura 1). Os Tipo Senecionina (p. ex. 10) (83 estruturas) são APs diésteres macrocíclicos com 12 membros, derivados de ou estruturalmente próximos da senecionina (11). São característicos principalmente da tribo Senecioneae (Asteraceae) e são bem representados em Fabaceae e Boraginaceae. Os Tipo Triangularina (p. ex. 14) (56 estruturas) são APs monoésteres ou diésteres com ácidos com 5C (resíduos de angeloil, tigloil ou senecioil) e seus derivados hidroxilados. São encontrados em Asteraceae, Boraginaceae e Fabaceae. Os Tipo Licopsamina (p. ex. 15) (109 estruturas) são monoésteres ou diésteres contendo como ácido néxico um ácido 2-isopropilbutírico hidroxilado. Este ácido C7 é o único encontrado em APs. Estes APs são dominantes na tribo Eupatorieae (Asteraceae) e em Boraginaceae, sendo também encontrados em algumas espécies de Apocynaceae. Os Tipo

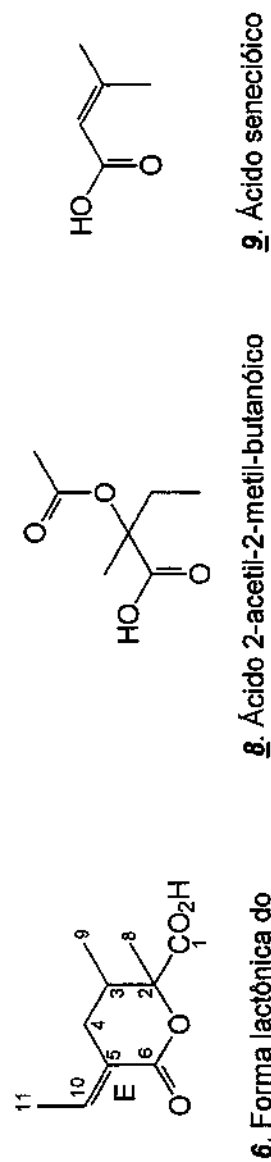
Monocrotalina (p. ex. 19) (33 estruturas) são APs diésteres macrocíclicos com 11 membros, com retronecina (3) como base necina e um padrão de substituição variável no ácido nécico. São encontrados principalmente em Fabaceae (*Crotalaria*) e em Senecionae e Boraginaceae. Os Tipo Faleopsina (p. ex. 20) (21 estruturas) são monoésteres de (-)-isoretronecanol, lindelofidina, laburnina ou (-)-traquelantanidina, com aril ou araquil, raramente alquil. São encontrados principalmente em Orchidaceae, com registros em Boraginaceae e Apocynaceae. Os Tipo Lolina (p. ex. 21) (11 estruturas) são derivados de APs 1-aminopirrolizidina, encontrados em alguns gêneros de Fabaceae e Poaceae.

APs são sintetizados nas raízes, folhas ou caules, dependendo da família da planta. Em Asteraceae, por exemplo, as raízes são os principais sítios de biossíntese, sendo que espécies de *Senecio* sintetizam APs nas raízes, mas os armazenam preferencialmente nas inflorescências (Hartmann *et al.* 1989). Em contraste, em *Heliotropium* (Boraginaceae) as folhas são o principal sítio de síntese de APs (Birecka e Catalmo 1982).

Em todos os estudos onde se identificou a forma genuína dos APs nas plantas, o N-óxido (2) foi identificado como dominante, ou exclusivo, ao menos nas partes vegetativas (Hartmann e Witte 1995). Em espécies de *Senecio*, os APs são sintetizados exclusivamente como N-óxidos (Hartmann e Toppel 1987), que é a forma molecular específica para translocação a longa distância, transporte dentro do vacúolo celular e armazenamento dentro do vacúolo. Insetos como besouros (Pasteels *et al.* 1988, Ehmke *et al.* 1991, Hartmann *et al.* 1997, 1999), ortópteros (Biller *et al.* 1994) e lepidópteros (Ehmke *et al.* 1990, Hartmann *et al.* 1990, Trigo *et al.* 1993, 1996a, Brückmann *et al.* 2000) também incorporam APs preferencialmente como N-óxidos.

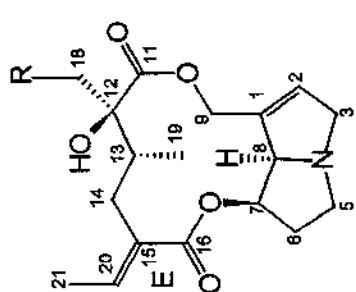


BASES NECINAS

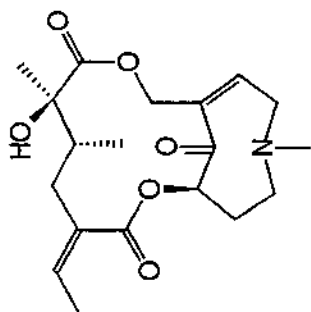


ÁCIDOS NÉCICOS

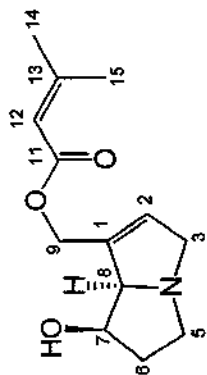
Figura 1. Alcalóides Pirrolizidínicos e seus derivados.



10. Integerrimina - E; R=H
11. Senecionina - Z; R=H
12. Retrorsina - Z; R=OH

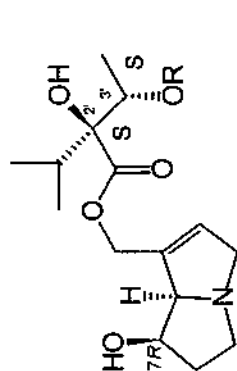


13. Senquirquina



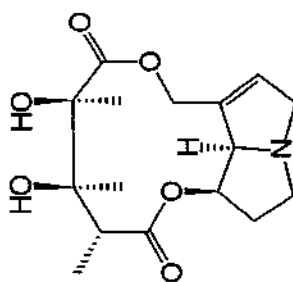
14. 9-O-Senecioldretonecina

TIPO SENECONINA



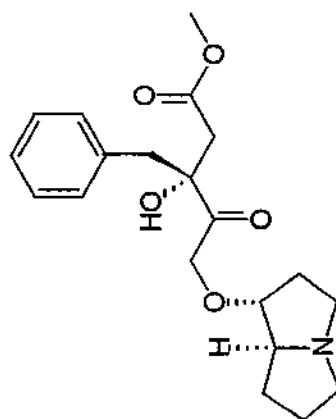
15. Licopsamina - R = H
16. Intermedina - R = H; 3'R
17. Indicina - R = H; 2'R
18. Heliotrina - R = CH₃; 7S; 3'R

TIPO LICOPSAMINA



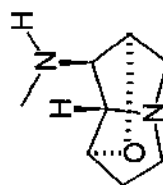
19. Monocrotalina

TIPO MONOCROTALINA



20. Faleopsina T

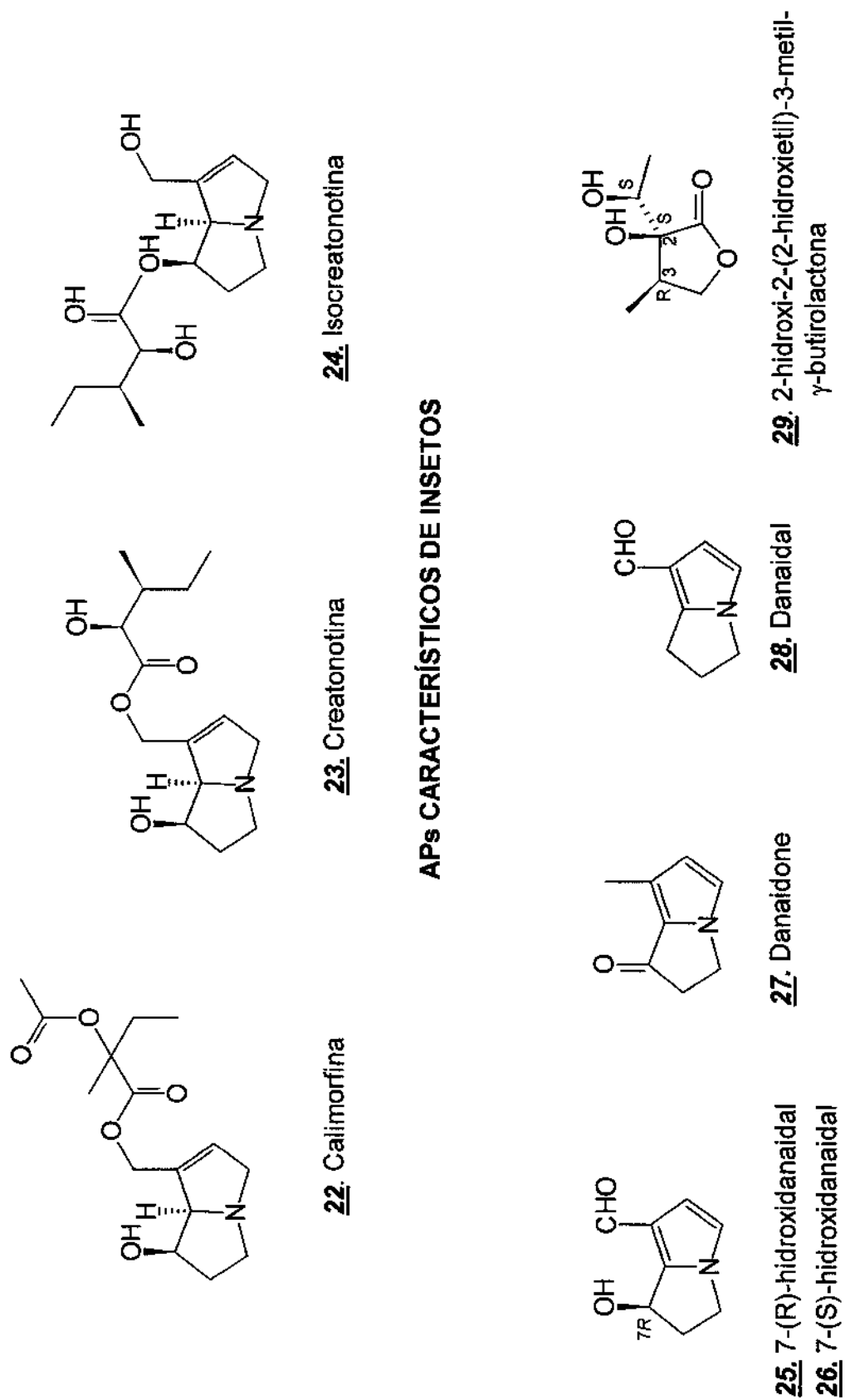
TIPO FALEOPSINA



21. Lolina

TIPO LOLINA

Figura 1. Continuação.



FEROMÔNIOS DERIVADOS DE APs

Figura 1. Continuação.

2. Alcalóides Pirrolizidínicos e insetos

Devido a sua grande atratividade para insetos especialistas, APs são únicos entre os milhares de alcalóides de plantas conhecidos (Hartmann e Witte 1995). Insetos de diversas ordens (Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Hemiptera, Homoptera e Diptera) seqüestram APs de plantas e os utilizam em diversas funções ecológicas (Boppré 1986, Brown e Trigo 1995, Hartmann e Witte 1995, Klitzke e Trigo 2000).

Dentre os lepidópteros, mariposas da família Arctiidae e borboletas das subfamílias Danainae e Ithomiinae (Nymphalidae) ingerem e estocam os APs de suas plantas de alimentação (Aplin *et al.* 1968, Rothschild *et al.* 1979, Boppré 1990, Brown 1984, 1985, 1987, Trigo *et al.* 1993, 1996a,b). APs podem ser adquiridos pela larva, como em muitos Arctiidae, ou por adultos, como em Arctiidae, Danainae e Ithomiinae. Em Ithomiinae e Danainae, os visitantes de plantas com APs são quase sempre machos (Pliske 1975a, b, Pliske *et al.* 1976, Trigo *et al.* 1996a). Estes indivíduos embebem APs de folhas mortas ou danificadas (Pliske 1975a, b) ou raspam, com a probóscide, folhas murchas, troncos, raízes ou sementes destas plantas (Boppré 1983). Este comportamento de aquisição de certas substâncias secundárias independente do comportamento de alimentação é denominado farmacofagia (Boppré 1984, 1986 e 1990).

APs de plantas do gênero *Senecio* foram identificados primeiro em *Tyria jacobaea* por Aplin *et al.* (1968) e em *Arctia caja* por Aplin e Rothschild (1972). Larvas do arctíideo *Utetheisa ornatrix* também utilizam plantas que são fontes de APs (*Crotalaria*), comendo preferencialmente as sementes, que possuem as maiores concentrações, e retendo-os nos estágios de pupa e adulto (Culvenor e Edgar 1972). Outros arctídeos, como adultos do gênero *Cretonotos* e larvas de *Hyalurga syma*, visitam fontes vegetais ricas em APs, seqüestrando e acumulando estes alcalóides (Rothschild *et al.* 1979, Trigo *et al.* 1993).

Borboletas Danainae, que se alimentam em Asclepiadaceae e contêm glicosídeos cardíacos e vários outros compostos secundários, tais como pregnenos e ácidos gimnênicos (Rothschild e Marsh 1978), também visitam fontes vegetais que contêm APs (Edgar *et al.* 1976b, Boppré 1986). Em Ithomiinae, os gêneros mais derivados se alimentam, como larvas, em folhas de Solanaceae (sem APs), e machos

adultos adquirem APs de plantas mortas de Asteraceae (*Eupatorium*, *Trichogonia*, *Ageratum*) ou Boraginaceae (*Heliotropium*) (Brown 1984, 1985, 1987). Klitzke e Trigo (2000) também observaram borboletas Ithomiinae visitando inflorescências de *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. (Asteraceae, Senecioneae) no sudeste do Brasil. As fêmeas de Ithomiinae provavelmente obtêm APs de machos durante o acasalamento, e os transferem para os ovos (Brown 1985, 1987).

Estes insetos especializados na incorporação de APs, além de serem capazes de transformar APs terciários na sua forma N-óxido (Ehmke *et al.* 1990, von Nickisch-Rosenegk e Wink 1993, Hartmann *et al.* 1999, Brückmann *et al.* 2000), também podem hidrolisar os APs ingeridos de suas plantas hospedeiras. Algumas mariposas Arctiidae podem produzir seus próprios APs, que não são normalmente encontrados em nenhuma fonte vegetal conhecida, por "biossíntese parcial" (Hartmann e Witte 1995). Em *Cretonotos transiens*, dois novos APs exclusivos de insetos foram isolados por Hartmann *et al.* (1990), cretonotina (**23**) e isocretonotina (**24**). Aplin *et al.* (1968), anteriormente, isolaram da pupa de *Tyria jacobaea* um "metabólito de AP" que mais tarde foi identificado como calimorfina (**22**) por Edgar *et al.* (1980). Sugeriu-se que a calimorfina (**22**), que ocorre em várias mariposas Arctiidae, inclusive em pequenas quantidades em *Cretonotos*, seria formada pela re-esterificação da retronecina (**3**) da planta e, desta forma, arctídeos seriam capazes de sintetizar seus próprios APs a partir de uma base necina, originada da planta, e de um ácido, sintetizado da isoleucina do seu próprio metabolismo. Biller e Hartmann (1992) levantam duas hipóteses para a produção de calimorfina (**22**) por *Tyria jacobaea*: 1. calimorfina (**22**) seria produzida como uma necessidade fisiológica para transformar retronecina (**3**) livre em um éster melhor adequado para armazenamento seguro na pupa, e 2. calimorfina (**22**) seria produzida como uma necessidade ecológica para reciclar retronecina (**3**) em um composto com qualidades mais eficazes na defesa química.

Embora estas mariposas e borboletas utilizem diversas fontes de APs com estruturas diferentes, a principal significância de seu seqüestro é a defesa química contra inimigos naturais. Uma outra função importante é a produção de feromônios sexuais em machos.

2.1. O papel dos APs na seleção sexual de insetos

Machos de algumas espécies de lepidópteros utilizam APs como precursores de feromônios (Boppré 1986, 1990 e Schulz 1998). APs de dieta, como a heliotrina (**18**), servem como precursores do feromônio 7-(R)-hidroxidanaidal (**25**) em espécies do gênero *Cretonotos* (Schneider *et al.* 1982, Boppré e Schneider 1985, Schulz *et al.* 1993). Nestas mariposas, a quantidade de APs consumida pela larva não somente determina a quantidade de feromônio no macho mas também o tamanho da coremata, que é um órgão abdominal androconial eversível que é peculiar com respeito a seu uso e papel no comportamento sexual (Boppré e Schneider 1985). Experimentos de alimentação com APs revelaram que o tamanho da coremata está relacionado diretamente com a quantidade de APs ingerida pela larva (Schneider *et al.* 1982, Boppré e Schneider 1985, 1989).

Os machos de borboletas Danainae também convertem os APs adquiridos durante a alimentação (APs 1,2-insaturados) em feromônios sexuais. Desidropirrolizinas, como danaidona (**27**), danaidal (**28**) e hidroxidanaidal (**25** e **26**), são disseminadas por suas glândulas nos pincéis de pêlos, durante o voo de corte, para eliciar receptividade na fêmea (Edgar 1975, Boppré 1986). Machos de Ithomiinae também são conhecidos por converter o ácido néxico dos APs em desidropirrolizinas e em uma lactona, a 2-hidroxi-2-(2-hidroxietil)-3-metil- γ -butirolactona (**29**) isolada por Edgar *et al.* (1976a). Esta última parece atuar como um feromônio de agregação (Boppré 1986) ou, aparentemente, como um feromônio territorial e de reconhecimento de machos (Pliske 1975a).

APs também podem desempenhar o papel de “presente nupcial”. Machos de *Utetheisa ornatrix* transferem APs para as fêmeas durante o acasalamento para uma eventual incorporação nos ovos (Dussourd *et al.* 1988, Eisner e Meinwald 1995) e para utilização em defesa da própria fêmea (González *et al.* 1999).

2.2. APs como compostos de defesa para lepidópteros

Insetos herbívoros de taxa diversos desenvolveram adaptações que permitem não somente ultrapassar a barreira defensiva proporcionada por APs, mas também seqüestrar e utilizar APs para sua própria defesa. A maioria dos insetos envolvidos com plantas contendo APs é colorida aposematicamente, muitos são modelos de

mímicos e vários são conhecidos por serem evitados por predadores potenciais (Boppré 1986).

Lepidópteros (principalmente adultos) foram extensivamente estudados quanto à proteção química adquirida pelo seqüestro de APs (Brower 1984). Mariposas *Utetheisa ornatrix*, por exemplo, são protegidas contra predação por APs que a larva seqüestra de suas plantas hospedeiras. Os APs seqüestrados protegem os ovos desta mariposa (Dussourd 1988, Hare e Eisner 1993, Eisner *et al.* 2000) (a fêmea transfere parte de seus APs para os ovos), bem como suas larvas e adultos (Eisner 1982, Eisner e Eisner 1991).

Edgar *et al.* (1976b) demonstraram que a borboleta *Danainae* Monarca (*Danaus*), além de utilizar APs como precursores de feromônios, têm a habilidade de estocar e acumular APs. Isto parece indicar que Monarcas ganham alguma vantagem em usar APs, que as tornam impalatáveis, e têm o provável papel de deter predadores também nestas borboletas (Stelljes e Seiber 1990).

Outros modelos bastante utilizados nos estudos de proteção química de APs são borboletas da sub-família Ithomiinae, representadas por mais de 300 espécies em 51 gêneros e 13 tribos (Drummond e Brown 1987). Estas borboletas são aposemáticas e constituem um modelo neotropical de borboletas impalatáveis para anéis miméticos mullerianos e batesianos, sendo protegidas quimicamente por APs e normalmente rejeitadas por predadores vertebrados e invertebrados (ver Brown e Trigo 1995 e Hartmann e Witte 1995 para revisões).

A defesa química nestas mariposas e borboletas, devido a APs, é conhecida contra diferentes predadores, incluindo predadores invertebrados, tais como várias aranhas (Eisner 1982, Brown 1984, 1985, Masters 1990, Eisner e Eisner 1991, Trigo *et al.* 1993, Trigo *et al.* 1996a, Trigo e Chemin 1996, Orr *et al.* 1996, González 1999) e formigas (Dussourd *et al.* 1988, Hare e Eisner 1993), e predadores vertebrados, como lagartos (McLain e Shure 1985, Masters 1992) e pássaros (Cardoso 1991, 1997, Masters 1992).

Um predador invertebrado muito utilizado em bioensaios com APs é a aranha *Nephila clavipes* (Aranae, Tetragnathidae). *Nephila clavipes* é uma aranha neotropical comum e amplamente distribuída, encontrada em clareiras e corredores na floresta, que são rota de vôo para insetos. Ela normalmente preda abelhas, vespas e pequenas

mariposas e borboletas (Vasconcellos-Neto e Lewinsohn 1984), mas rejeita adultos de Ithomiinae e Danainae, liberando-os ilesos de sua teia (Belt 1874, Vasconcellos-Neto e Lewinsohn 1984). Vasconcellos-Neto e Lewinsohn (1984) sugeriram que a discriminação era devida a substâncias químicas presentes nestes insetos e Brown (1984, 1985, 1987), Trigo (1988) e Masters (1992) mostraram que APs são responsáveis pela liberação de Ithomiinae por *Nephila clavipes*. Adultos recém emergidos (sem APs) eram predados por *Nephila clavipes*, enquanto que aqueles que consumiam APs eram liberados ilesos pelas aranhas.

Segundo Trigo (1993) e Trigo *et al.* (1996a) a defesa química contra *Nephila clavipes* não é um simples caso “possuir APs = estar protegido”. A concentração de APs nos tecidos, o limiar de fome do predador e talvez a composição química da mistura de APs devem estar envolvidos na defesa química desses lepidópteros. O mesmo poderia ser observado em relação a outros predadores, pois nem todas as borboletas na natureza são igualmente protegidas por APs, devido provavelmente à variação na quantidade de APs disponível para serem seqüestrados (Trigo e Brown 1990). Além disto, borboletas e mariposas seqüestram e acumulam APs de estruturas diferentes, de acordo com a planta que visitam, o que pode determinar a efetividade da defesa devido a potenciais de deterência e toxicidade diferentes em cada estrutura. Outro fator que também poderia influir na defesa química destes lepidópteros é a metabolização diferencial de APs com estruturas distintas, talvez refletindo a utilização preferencial de um tipo de AP (Brückmann *et al.* 2000). Entretanto, ainda não foi desenvolvido nenhum trabalho no sentido de testar essas hipóteses e melhor entender a interação tri-trófica existente entre estes insetos que seqüestram APs de plantas e seus predadores.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Como existem poucos trabalhos testando o papel de APs isolados na resposta anti-predação, este trabalho teve como objetivo geral examinar a relação entre a estrutura e a concentração de alcalóides pirrolizidínicos e sua atividade anti-predação contra predadores invertebrados e vertebrados.

Objetivos Específicos

1. Realizar bioensaios utilizando a aplicação tópica de diferentes APs, em diferentes concentrações, em um organismo palatável, oferecendo-o a predadores vertebrados e invertebrados;
2. Testar a atividade e o tempo de metabolização de APs realizando-se experimentos de alimentação com adultos recém emergidos de *Mechanitis polymnia* com diferentes estruturas de APs, oferecendo estas, após diferentes períodos de tempo, a predadores invertebrados.

Estes APs foram escolhidos para o estudo por representarem bem os diferentes tipos de APs sequestrados ou biossintetizados por lepidópteros em condições naturais e devido a sua relativa facilidade de obtenção, seja por extração direta da planta seja por semi-síntese de rota simples em laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

I. OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS (APs)

1. Coleta dos organismos

Folhas e inflorescências de *Senecio brasiliensis* foram coletadas na Serra do Japí, Jundiaí, São Paulo (23°15'S, 46°52'W) em outubro de 1996, e armazenadas a aproximadamente -15°C para posterior extração de APs.

Adultos da borboleta *Mechanitis polymnia casabranca* Haensch (Nymphalidae, Ithomiinae) foram capturados no Complexo Botânico Monjolinho (Fazenda Santa Eliza, Instituto Agrônomo de Campinas - IAC), Campinas, São Paulo (22°49'S, 47°17'W) nos meses de abril e maio de 1999. Ovos e larvas destas borboletas foram coletados na Serra do Japí, na Mata Costa e Silva (Fazenda Santa Eliza, IAC) e nas proximidades da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, de fevereiro a maio de 1999 e 2000, em folhas de *Solanum tabacifolium* Dunnal, *S. mauritianum* Scop., *S. concinnum* Schott ex Sendtner e *S. robustum* Wendl (Solanaceae).

2. Isolamento, separação e purificação de alcalóides pirrolizidínicos

2.1. Fracionamento de plantas

APs macrocíclicos 1,2-insaturados foram extraídos de *Senecio brasiliensis* [senecionina (**11**), integerrimina (**10**) e retrorsina (**12**) – ver Klitzke e Trigo 2000]. Folhas e inflorescências foram homogeneizadas em liquidificador com MeOH ou EtOH, na proporção de 10ml de solvente:1g do peso fresco da planta. O homogeneizado foi filtrado a vácuo, e o resíduo restante extraído mais duas vezes como acima. As soluções metanólicas foram reunidas e evaporadas em rotavapor em pressão reduzida à temperatura de 40°C. O resíduo metanólico resultante foi recuperado em um sistema de HCl aquoso 1N:CHCl₃. A fase aquosa ácida foi lavada mais três vezes com igual volume de CHCl₃ em funil de separação, para extração de clorofila e outras substâncias mais apolares. A fase orgânica foi reunida, seca com Na₂SO₄ anidro, e evaporada à baixa pressão como acima, originando uma fração neutra, que foi descartada. Como os APs estão presentes principalmente como N-óxidos em plantas e insetos (Hartmann e

Witte 1995), a fase aquosa ácida foi reduzida com excesso de Zn em pó por três horas, mantendo-se o pH da reação próximo a 1, transformando assim os N-óxidos em suas respectivas bases livres. Esta fase foi filtrada em gravidade para eliminar o excesso de Zn, alcalinizada com um excesso de NH_4OH (25%) para pH 13-14 e extraída três vezes com $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 80:20 em funil de separação. As camadas orgânicas foram reunidas, secas com Na_2SO_4 anidro e evaporadas à pressão reduzida como acima, originando uma fração de alcalóides totais (alcalóides terciários + N-óxidos).

O AP macrocíclico senquirquina (**13**) foi fornecido pelo Prof. Dr. T. Hartmann (Institut für Pharmazeutische Biologie, T.U. Braunschweig, Alemanha). Esse alcalóide foi isolado de *Senecio inaequidens* DC pelo mesmo procedimento acima.

2.2. Fracionamento de insetos

Os adultos de borboletas *Mechanitis polymnia* capturados no campo, ou criados em laboratório (detalhes da criação no item 1.2 de DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE APs), foram acondicionados individualmente em frascos com 2ml de MeOH. Cada indivíduo foi macerado em MeOH, utilizando-se um homogeneizador de tecidos (Politron). O homogeneizado foi centrifugado por 10 minutos a 3000 rpm, e o sobrenadante retirado. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, e todo o sobrenadante resultante foi agrupado e seco em corrente de ar. O resíduo restante foi colocado por 48 horas em estufa, a aproximadamente 60°C, para obtenção do peso seco de cada borboleta.

Para a realização de análises quantitativas de APs pelo método colorimétrico (item 2.6) o sobrenadante seco em corrente de ar foi recuperado em 2ml de MeOH. Para os indivíduos capturados no campo, três alíquotas de 100µl cada (1/20 de cada indivíduo) foram usadas, enquanto que para os indivíduos alimentados em laboratório foi utilizada uma alíquota com metade do volume total, pois a concentração de APs individual era muito baixa e a alíquota de 100µl não era suficiente para detecção de APs. O sobrenadante foi novamente seco em corrente de ar e o resíduo resultante recuperado em 5ml de HCl aquoso 1N. Esta solução ácida foi tratada como acima (item 2.1.) para obtenção de uma fração de alcalóides totais.

2.3. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Para a caracterização dos APs e seus derivados por análise de CCD, as frações alcaloidais foram aplicadas em placas de alumínio de sílica gel F₂₅₄ (Merck), de 0,10 mm de espessura (10x5 cm), usando-se como eluente três sistemas diferentes. Para APs foram utilizados como fase móvel os sistemas A) CHCl₃:MeOH:NH₄OH 83:14:3 e B) CHCl₃:MeOH:NH₄OH 50:40:10. Para a detecção dos ácidos néricos foi empregado o sistema C) benzeno:MeOH:AcOH 73:20:7. Quando se empregou os sistemas A) e B), as placas foram secas à temperatura ambiente e os alcalóides visualizados inicialmente em luz UV₂₅₄ e em seguida revelados em câmara de iodo por 10-20 minutos. A maioria das substâncias orgânicas presentes, ao ser revelada, apresentou coloração marrom. Posteriormente, o iodo foi sublimado à 100°C. Com este procedimento os APs 1,2-insaturados são transformados em desidropirrolizinas, apresentando uma coloração roxa escura (Mattocks 1967). Para APs, o Reagente de Dragendorff também pode ser empregado na revelação. CCD feitas no sistema C) foram borrifadas com verde de bromocresol para visualização dos ácidos.

2.4. Cromatografia de Adsorção em Coluna

Para o isolamento e purificação de APs utilizou-se cromatografia de adsorção em coluna. Para a mistura de APs obtida da extração de *Senecio brasiliensis*, utilizou-se coluna de sílica gel 60 (0,063-0,2 mm) (Merck) e um gradiente de CHCl₃ (100%) até CHCl₃:MeOH 94:6 como eluente. Para a purificação de APs obtidos por semi-síntese em laboratório (item 3) utilizou-se como eluente um gradiente de CHCl₃ (100%) até CHCl₃:MeOH:NH₄OH entre 83:15:2 e 78:20:2. As coletas de frações das colunas foram acompanhadas por CCD, conforme metodologia acima.

Em alguns casos utilizou-se alumina neutra (ICN Pharmaceuticals GmbH & Co.) para a purificação de APs separados inicialmente em colunas de sílica gel. O eluente utilizado obedeceu a um gradiente semelhante àquele utilizado nas separações por sílica gel.

Para a separação da base necina do ácido nérico respectivo, resultantes da hidrólise de APs (item 3.1), utilizou-se coluna de alumina básica (ICN Pharmaceuticals GmbH & Co.). Por este método, o ácido nérico fica preso à coluna e a eluição com uma solução de CHCl₃:MeOH 30:1 resulta na base necina praticamente pura.

2.5. Cromatografia de Troca Iônica

Para a separação dos ácidos néricos e da base necina resultantes da hidrólise de APs (item 3.1), empregou-se também a cromatografia de troca iônica. Uma coluna de vidro (1,5 cm ID x 16,0 cm altura) foi preenchida com resina de troca iônica fortemente ácida Dowex-50WX8 (Fluka) até 8 cm de altura. Para limpar impurezas da resina de troca iônica, a coluna foi lavada seqüencialmente com 200ml de água destilada, HCl aquoso 1N, água destilada, NH₄OH aquoso 2N, água destilada e HCl aquoso 1N. A amostra foi aplicada na coluna dissolvida em MeOH. A coluna foi eluída primeiramente com MeOH, obtendo-se os ácidos, e em seguida com NH₄OH metanólico 2N, obtendo-se a base necina. As frações foram secas em rotavapor à baixa pressão à temperatura de 40°C.

2.6. Colorimetria

Para a análise quantitativa de APs totais das borboletas *Mechanitis polymnia* coletadas no campo ou alimentadas em laboratório, utilizou-se o procedimento colorimétrico descrito por Brown (1984, 1985), Trigo (1993) e Trigo *et al.* (1993), modificado de Mattocks (1967, 1968) e Bingley (1968). Uma alíquota dos organismos extraídos como acima (três réplicas no caso das borboletas coletadas no campo e uma para os indivíduos alimentados em laboratório) foi oxidada em tubos de ensaios abertos com 0,5ml de reagente de oxidação (uma solução de 30% de H₂O₂:Na₄P₂O₇ 0,5ml:2,5mg, diluída em MeOH 1:200) por 25 minutos à 100°C. As amostras foram resfriadas à temperatura ambiente e os traços de água eliminados em corrente de ar. Foram adicionados 1ml de acetato de isoamila e 100µl de anidrido acético, e as amostras foram aquecidas à 100°C por dois minutos, com os tubos de ensaio fechados para se evitar a contaminação por água. As amostras foram novamente resfriadas à temperatura ambiente e tratadas com 1ml de reagente de Ehrlich modificado, preparado na hora (8ml de BF₃ metanólico 20% + 72ml de EtOH + 1,4 g de dimetilaminobenzaldeído). As amostras foram aquecidas a 60°C por 5 minutos como acima, resfriadas à temperatura ambiente e diluídas em 4ml de EtOH. A absorbância das amostras foi lida em 561 nm em um espectrofotômetro (Spectronic Genesys 5 – Milton Roy). Para a análise colorimétrica de APs presentes nos capilares utilizados na alimentação dos adultos de *Mechanitis polymnia* (item 1.2 de DETERMINAÇÃO DA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE APs) foi seguido o mesmo procedimento, utilizando-se o volume total de solvente.

A concentração de APs das borboletas capturadas no campo foi determinada por uma curva padrão baseada na mistura integerrimina:senecionina (**10** e **11**), embora essas borboletas apresentassem na sua totalidade uma mistura de licopsamina:intermedina (**15** e **16**) (Brown 1984, 1985, Trigo 1993). A mistura integerrimina:senecionina (**10** e **11**) foi utilizada para a montagem da curva de calibração devido à impossibilidade de se obter a mesma mistura dos APs presentes nos lepidópteros. Para borboletas alimentadas em laboratório, utilizou-se curvas padrões baseadas em cada AP específico [integerrimina:senecionina (**10** e **11**), 9-O-senecioldretronecina (**14**) e retronecina (**3**)].

3. Semi-síntese de alcalóides pirrolizidínicos

3.1. Obtenção da retronecina (**3**) e dos ácidos nécicos respectivos (**6** e **7**)

A base necina e os ácidos nécicos utilizados nos bioensaios com predadores foram obtidos pela hidrólise da fração alcaloidal de *Senecio brasiliensis* contendo a mistura de integerrimina:senecionina (**10** e **11**) (item 2.1). Um equivalente desta fração foi hidrolisado em solução aquosa de 1,2 equivalentes de hidróxido de bário [$\approx 15\text{mg}$ de amostra)/ $18\text{mg Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$] e a solução mantida em refluxo por duas horas (Nishida *et al.* 1991). O hidróxido de bário foi precipitado com CO_2 e a solução resultante foi filtrada e evaporada em pressão reduzida à temperatura de 80°C . A hidrólise foi acompanhada por CCD [item 2.3 - fase móvel B)]. Para isolar a base necina dos ácidos nécicos respectivos foi utilizado o método de cromatografia de adsorção em coluna de alumina básica (item 2.4), descartando-se os ácidos nécicos, ou de cromatografia de troca iônica (item 2.5), obtendo-se também os respectivos ácidos. A base necina foi recolunada separadamente em coluna cromatográfica de alumina neutra para retirada de todas as impurezas da amostra. A retronecina (**3**) e a mistura dos ácidos integerrimínico (**6**) e senécico (**7**) foram cristalizados, separadamente, em éter etílico. Os ácidos integerrimínico e senécico (**6** e **7**) foram esterificados com um excesso de diazometano para análise posterior por CG-EM (item 4.1).

3.2. Síntese da 9-O-senecioilretronecina (**14**)

Para a síntese da 9-O-senecioilretronecina (**14**), a uma amostra de 1,0 equivalente de retronecina (**3**) mais uma quantidade catalítica de DMAP (dimetilaminopiridina) dissolvidos em CHCl_3 anidro, foi adicionada outra solução de 2,0 equivalentes de ácido seneciólico (**9**) mais 1,5 equivalentes de DCC (diciclohexilcarbodiimida), também dissolvidos em CHCl_3 anidro. A solução resultante foi deixada em agitação à temperatura ambiente, sob fluxo contínuo de N_2 , por 48 horas. A reação foi acompanhada por análise de CCD [fase móvel A)]. Após esse tempo toda a retronecina (**3**) foi consumida, e a reação foi parada acrescentando-se HCl aquoso 1N à solução, que foi extraída três vezes com CHCl_3 . O derivado de DCC (DHU – diciclohexilureia) ficou todo retido na fase clorofórmica. A fase aquosa ácida foi alcalinizada com NH_4OH (25%) e extraída cinco vezes com CHCl_3 . A fase clorofórmica foi seca com Na_2SO_4 anidro e o solvente evaporado sob baixa pressão para obtenção da 9-O-senecioilretronecina (**14**). Para a purificação da 9-O-senecioilretronecina (**14**) foi empregada, primeiramente, uma coluna de adsorção de sílica gel (item 2.4) e, em seguida, uma coluna de adsorção de média pressão (utilizando-se como fase estacionária sílica de placa – sílica gel P F_{254} 5-40 μM da Merck). Como ainda restavam alguns contaminantes na amostra de 9-O-senecioilretronecina (**14**), esta foi passada por uma coluna de alumina básica. O AP começou a sair puro da coluna quando o eluente estava na proporção de 30:1 CHCl_3 :MeOH. A eluição foi acompanhada por placas de CCD no sistema de solvente A).

3.3. Síntese da calimorfina (**22**)

3.3.1. Síntese do ácido ($\pm$)-2-acetóxi-2-metil butanóico (**8**)

O ácido ($\pm$)-2-hidroxi-2-metil butanóico (Aldrich) foi refluxado em cloreto de acetila por 12 horas (aproximadamente 1 g de ácido:5ml de cloreto de acetila). A acetilação foi acompanhada por placa de CCD com fase móvel C) (item 2.3). Após o refluxo, foi acrescentada água destilada vagarosamente e a solução foi extraída três vezes com CHCl_3 . A solução clorofórmica final foi seca com Na_2SO_4 anidro e posteriormente evaporada sob baixa pressão para a obtenção do ácido ($\pm$)-2-acetóxi-2-metil butanóico (**8**) (ácido calimorfinico) (metodologia segundo Trigo 1993).

3.3.2. Síntese do 9-O-RS-2-acetil, 2-metil butanoato de retronecina – calimorfina (22)

Para a síntese da calimorfina (22) foi empregada a mesma metodologia do item 3.2, utilizando-se 1,5 equivalentes do ácido ($\pm$)-2-acetóxi-2-metil butanóico (8). Para retirar impurezas da amostra de calimorfina (22) foi feita uma coluna de alumina neutra (item 2.4). O AP começa a sair desta coluna com o eluente na proporção 80:20 de CHCl_3 :MeOH.

3.4. N-oxidação de APs

Para o processo de N-oxidação de APs e seus derivados, foi utilizado 1,0 equivalente do alcalóide e 1,2 equivalentes de ácido metacloroperbenzóico diluídos em CHCl_3 e mantidos em banho de gelo. A solução foi colocada em agitação por três horas, deixando que atingisse a temperatura ambiente (Zalkow *et al.* 1985). Para confirmar a N-oxidação total dos APs foram feitas análises de CCD no sistema A) (item 2.3). Para purificar os APs N-óxidos foi feita uma coluna cromatográfica em alumina básica (item 2.4). Com esse método, o resíduo ácido fica retido na coluna e a eluição com CHCl_3 :MeOH, em proporções cada vez maiores de MeOH, elui o alcalóide da coluna. As frações foram recuperadas e secas em rotavapor sob pressão reduzida à temperatura de 40°C.

4. Instrumental

4.1. Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massa (CG-EM)

As amostras das frações alcaloidais foram diluídas em MeOH e analisadas por cromatografia gasosa-espectrometria de massas em um Cromatógrafo Gasoso GC Hewlett Packard Série 6890 acoplado a um Detector de Massa Hewlett Packard Série 5973, equipado com uma coluna de sílica fundida capilar (HP-5MS 5%-fenil 95%-metilsiloxano, 30mx250µmx0,25µ). Condições do GC-EM: temperatura de injeção: 250°C; programas de temperatura: 70-300°C, 4°C/min ou 150-300°C, 4°C/min; temperatura da linha de transferência: 280°C; fluxo do gás de arraste (He): 1ml/min; tipos de injeção: "split", "splitless" ou "pulsed splitless", utilizados segundo a concentração da amostra a ser injetada.

A caracterização dos APs foi feita através dos seus padrões de fragmentação de massa (Trigo 1993) e dos Índices de Retenção (IRs) (Witte *et al.* 1993 para uma discussão sobre esse tipo de caracterização). Os IRs foram calculados através da co-injeção com *n*-alcanos (van den Dool e Kratz 1963), seguindo a seguinte fórmula:

$$IR = \{(T_s - T_{C_{n-1}})[(C_n - C_{n-1}) \cdot 100] / T_{C_n} - T_{C_{n-1}}\} + 100. C_{n-1}, \text{ onde:}$$

T_s : Tempo de retenção da substância analisada

T_{C_n} : Tempo de retenção do *n*-alcano que elui após a substância analisada

$T_{C_{n-1}}$: Tempo de retenção do *n*-alcano que elui antes da substância analisada

C_n : *n*-alcano que elui após a substância analisada

C_{n-1} : *n*-alcano que elui antes da substância analisada.

4.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os APs foram analisados por RMN para confirmação de sua estrutura e pureza. Foram feitas espectroscopias unidimensionais de ^1H e ^{13}C , nos espectrômetros Bruker AM 300, Gemini-300BB e INOVA500, além de espectroscopia bidimensional de

COSY¹, DEPT², HETCOR³, e HSQC⁴ (detalhes dos métodos em Silverstein *et al.* 1994 e Homans 1995). Os solventes utilizados foram o CDCl₃ e D₂O, conforme o AP a ser analisado, e TMS foi usado como referencial. Os deslocamentos químicos (δ) foram indicados em ppm e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

¹ COSY = Espectroscopia de Correlação. Fornece um espectro 2-D a partir do qual todas as correlações ¹H-¹H podem ser determinadas;

² DEPT = Intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização. Fornece o número de átomos de ¹H diretamente ligados a cada átomo de ¹³C em um espectro de ¹³C;

³ HETCOR = Correlação de deslocamento químico heteronuclear (Heteronuclear shift correlation spectroscopy). Correlaciona os deslocamentos químicos de um espectro de um núcleo sensível (¹H) com os deslocamentos de um espectro de um núcleo insensível (¹³C). Neste caso, mostra os ¹H que estão indiretamente ligados a cada ¹³C;

⁴ HSQC = Correlação heteronuclear inversa (Heteronuclear single-quantum coherence) com detecção de ¹H, X, neste caso, X=¹³C.

II. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE APs

1. Bioensaios com a aranha *Nephila clavipes*

Os bioensaios com a aranha *Nephila clavipes* foram realizados no Complexo Botânico Monjolinho e na Serra do Japí, entre os meses de fevereiro e maio de 1998, 1999 e 2000, época em que as aranhas eram abundantes e apresentavam um tamanho apropriado para os ensaios. Todos os ensaios foram realizados no período entre 09h00 e 16h00. Aranhas fêmeas saudáveis, com teias em bom estado, foram utilizadas nos bioensaios. Aranhas que já estavam se alimentando não foram utilizadas, e cada indivíduo foi testado uma única vez no mesmo dia. Não foi feito controle de saciação nas aranhas testadas, ou seja, não se ofereceu anteriormente uma presa controle para que se pudesse determinar quanto e há quanto tempo cada aranha teria comido. O risco de uma aranha desprezar uma presa com AP por estar saciada foi controlado pelo oferecimento de uma segunda presa palatável controle.

O comportamento de predação em *Nephila clavipes* é bastante conspícuo. Quando uma presa cai na teia, a aranha se desloca rapidamente do ponto de descanso no centro desta para próximo da presa, passando a tocá-la com os primeiros pares de patas, quelíceras e pedipalpos. Se a presa é palatável, a aranha injeta veneno para paralisá-la, envolve-a com fios de seda e a carrega para o centro da teia, onde começa a sugá-la (Robinson e Mirick 1971). Se após a inspeção inicial com as patas e os pedipalpos a aranha recusa a presa, a teia ao redor desta é cortada e a presa geralmente é liberada ilesa (Vasconcellos-Neto e Lewinsohn 1984).

As respostas de *Nephila clavipes* às presas oferecidas nos ensaios foram categorizadas em predação e liberação [segundo Robinson e Mirick (1971) e Vasconcellos-Neto e Lewinsohn (1984)]. Considerou-se também como predação o comportamento da aranha de injetar veneno na presa, mesmo se após este primeiro contato a aranha a desprezasse, uma resposta definida como “rejeição” por Vasconcellos-Neto e Lewinsohn (1984). Bioensaios em que a resposta da aranha diferiu da predação ou liberação da presa não foram considerados.

1.1. Bioensaios com aplicação tópica em organismos palatáveis

Os APs a serem testados foram aplicados topicamente em presas palatáveis,

abelhas *Apis mellifera* L. (Hymenoptera, Apidae), coletadas na região de Betel, Paulínia, São Paulo, e nas proximidades de Campinas. A palatabilidade das abelhas é confirmada pelo fato de que estes insetos são aceitos pelas aranhas sem qualquer reação negativa em condições naturais. As abelhas foram mortas por congelamento (-15°C) e, no dia anterior aos ensaios, retiradas do congelador e suas asas cortadas.

Os APs senquirquina (**13**), uma mistura de integerrimina:senecionina (**10** e **11**), nas formas base livre e N-óxido, retronecina (**3**), 9-O-senecioilretronecina (**14**), ambos nas formas base livre e N-óxido, uma mistura dos ácidos integerrimínico (**6**) e senécico (**7**) e calimorfina base livre (**22**) foram utilizados no ensaios. Estes APs foram testados em sete concentrações diferentes: $6,50 \times 10^{-4}$, $2,61 \times 10^{-3}$, $1,04 \times 10^{-2}$, $4,18 \times 10^{-2}$, $1,67 \times 10^{-1}$, $6,68 \times 10^{-1}$ e $2,67 \mu\text{moles/abelha}$ (equivalentes a $3,82 \times 10^{-5}$, $1,54 \times 10^{-4}$, $6,14 \times 10^{-4}$, $2,46 \times 10^{-3}$, $9,82 \times 10^{-3}$, $3,93 \times 10^{-2}$ e $1,57 \times 10^{-1} \mu\text{moles/mg}$ do peso seco das abelhas) (Apêndice 1) dissolvidos em 10 μl de MeOH. Estas concentrações foram baseadas em Trigo e Chemin (1996) que consideraram a quantidade média de licopsamina (**15**) presente em *Mechanitis polymnia*, aproximadamente 200 μg (que equivale a $6,68 \times 10^{-1} \mu\text{moles}$ deste AP), como a quantidade média de APs a ser aplicada em presas palatáveis. As demais quantidades foram calculadas em escala geométrica de razão 4. O peso seco médio das abelhas foi estimado para o cálculo das concentrações de $\mu\text{moles/mg}$ (aproximadamente 17 mg, n=30).

A solução metanólica de APs foi aplicada na superfície das abelhas, e o solvente seco em corrente de ar. Uma abelha tratada topicamente com alcalóide foi oferecida à *Nephila clavipes* e a resposta da aranha (predar ou liberar) foi anotada. Neste caso, quando uma aranha predava uma abelha tratada com alcalóide, o teste estava concluído. Se a aranha liberasse esta abelha, outra abelha tratada com 10 μl de MeOH puro, seco em corrente de ar, era imediatamente oferecida, e o experimento era considerado válido se a aranha predasse essa segunda abelha controle (Figura 2).

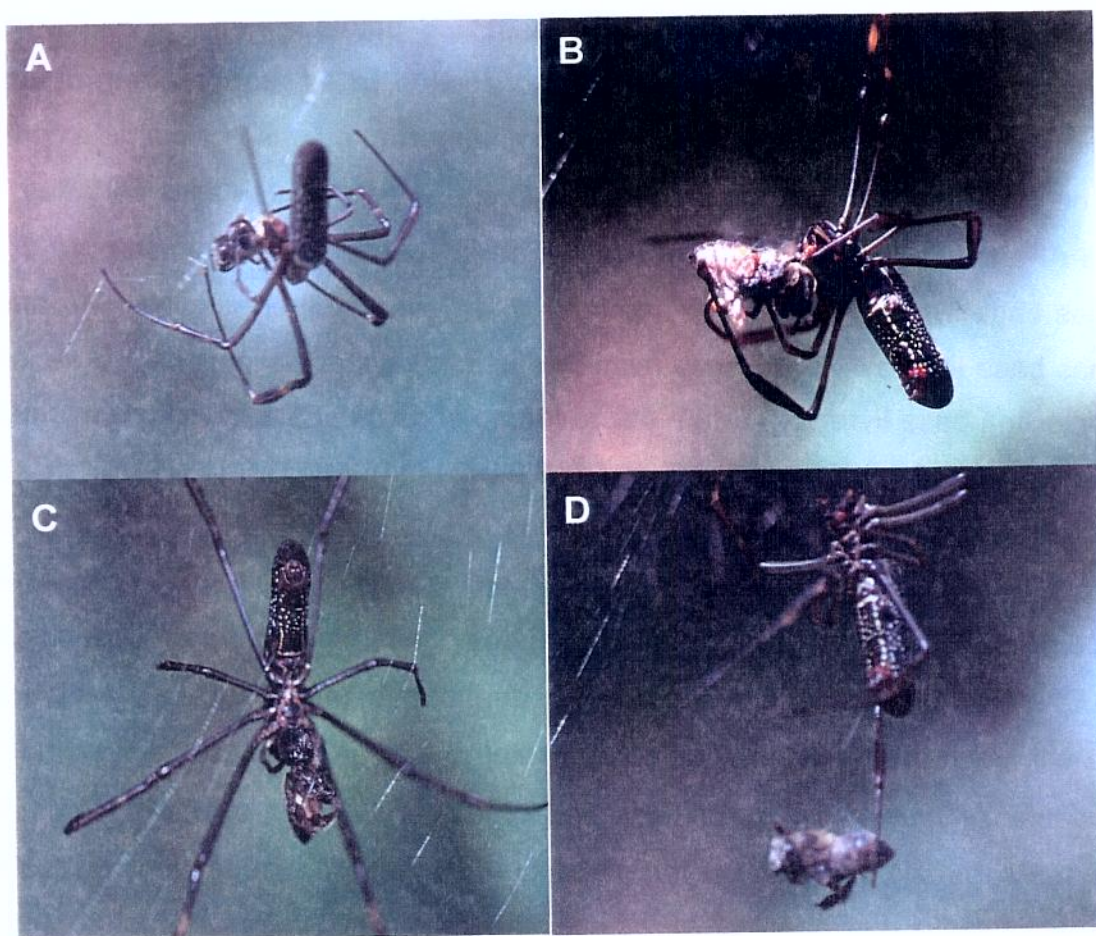


Figura 2. Bioensaios com *Nephila clavipes* utilizando-se aplicação tópica de APs em presas palatáveis (abelhas). **A.** quando se joga a presa na teia de *Nephila clavipes*, a aranha toca a mesma com os primeiros pares de patas, com o pedipalpo e as quelíceras; **B.** se a presa é palatável, a aranha injeta veneno e passa a enrolá-la; **C.** depois come a presa, sugando-a; **D.** se a presa é desagradável, a teia é cortada ao redor da presa e a mesma é descartada.

1.2. Tempo de metabolização e atividade de APs - alimentação de adultos recém emergidos de *Mechanitis polymnia*

Desovas e larvas de *Mechanitis polymnia* coletadas nas áreas descritas anteriormente foram colocadas separadamente em potes de criação e armazenados em câmaras de criação com 12 horas de luz a 27°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) e 12 horas de escuro a 18°C ($\pm 1^\circ\text{C}$), com umidade controlada aproximada de 70% ($\pm 10\%$). Os potes, limpos diariamente, foram providos com folhas frescas de *Solanum tabacifolium* coletadas nas vizinhanças da UNICAMP até a formação da pupa, aproximadamente 20 dias após a eclosão dos ovos.

Machos recém emergidos da pupa (sem APs, dado que a família Solanaceae não possui esse tipo de alcalóide – Brown 1984) foram alimentados com os alcalóides integerrimina:senecionina (**10** e **11**), 9-O-senecioilretronecina (**14**) e retronecina (**3**), todos na forma base livre, nas concentrações de $2,61 \times 10^{-3}$, $4,18 \times 10^{-2}$, $6,68 \times 10^{-1}$ $\mu\text{moles}/3\mu\text{l}$ de MeOH. Estas concentrações foram as mesmas utilizadas no ensaios com presas palatáveis, em $\mu\text{moles}/\text{presa}$. A solução metanólica foi colocada em um microcapilar fechado em uma das extremidades, e o solvente seco em corrente de ar. Cinco microlitros de uma solução de 50% de sacarose foram acrescentados no capilar e cada borboleta foi alimentada individualmente (Figura 3). Todos os capilares foram armazenados, individualmente, em 2ml de MeOH para serem submetidos à análise colorimétrica para a determinação da quantidade de AP que restava do oferecido às borboletas. Cada um dos machos de *Mechanitis polymnia* foi individualizado com um código único com caneta Pilot na asa anterior. Nos tempos 0, 6, e 24 horas após a ingestão total da solução de APs, as borboletas foram congeladas à -15°C para serem testadas posteriormente com *Nephila clavipes*. Ensaios preliminares com estas aranhas, utilizando-se borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no campo e mantidas em congelador por 10 dias ($n=10$), confirmaram que o comportamento predatório da aranha não é alterado pelo congelamento das presas.

Os bioensaios com *Nephila clavipes* foram realizados como apresentado no item 1.1 (Figura 4). Borboletas recém emergidas, sem APs, alimentadas somente com a solução de sacarose, e mortas por congelamento, foram utilizadas como controle. Tanto as borboletas predadas como as liberadas foram coletadas imediatamente após os bioensaios e armazenadas em 2ml de MeOH para análises químicas posteriores.

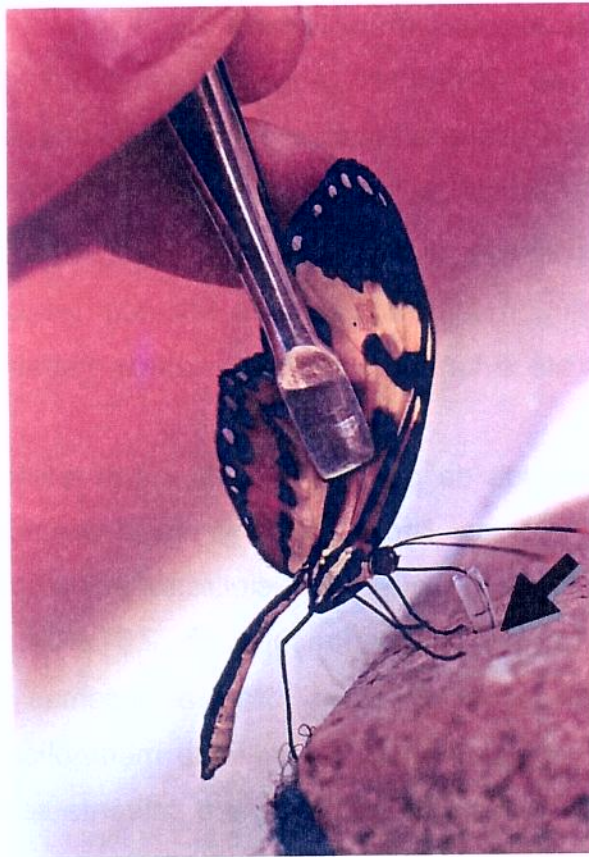


Figura 3. Alimentação de um indivíduo macho de *Mechanitis polymnia* com APs. No detalhe, o capilar utilizado na alimentação das borboletas.

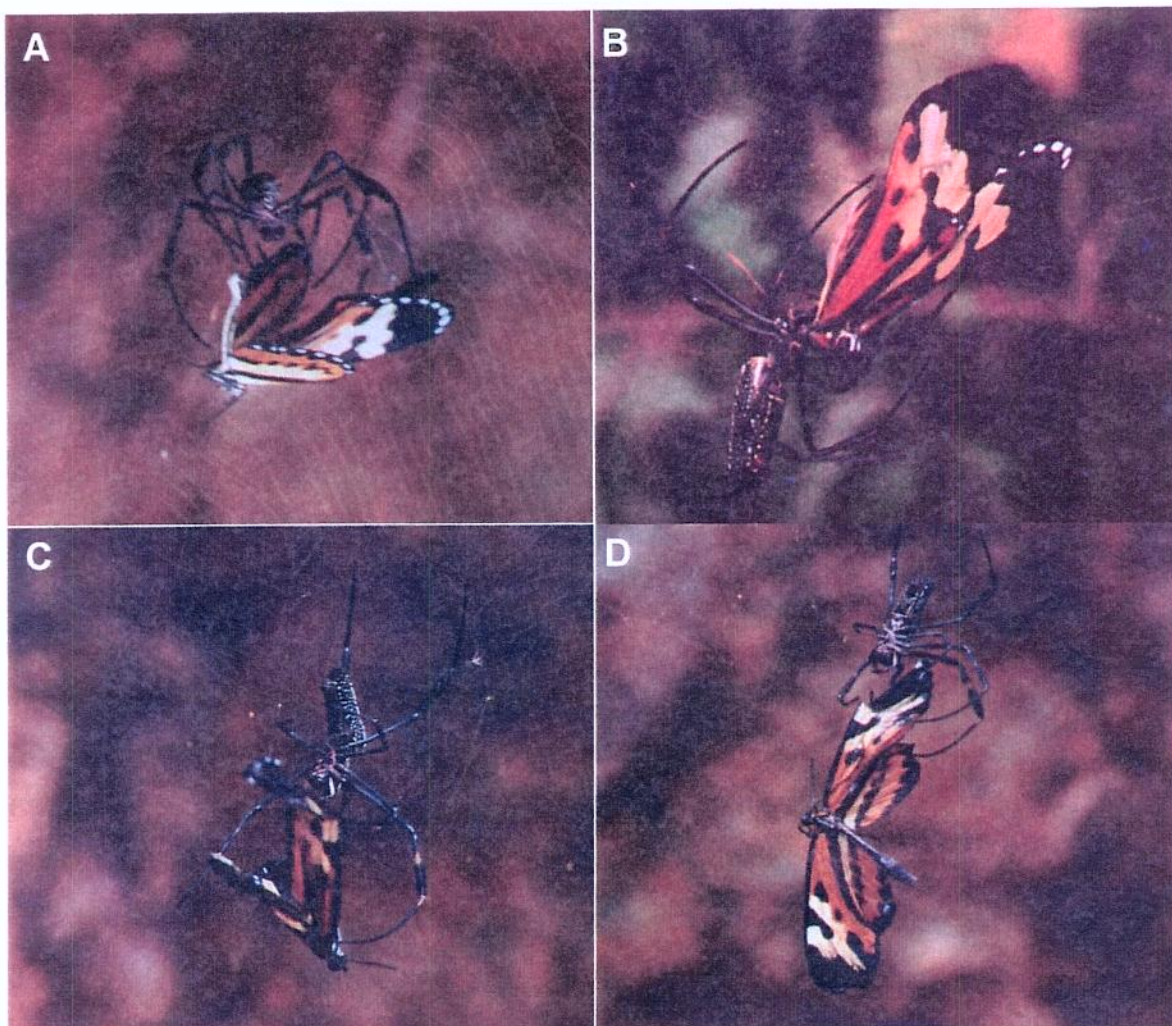


Figura 4. Bioensaios com *Nephila clavipes* utilizando-se borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas com APs. **A.** Quando uma borboleta cai na teia, a aranha imediatamente se desloca do centro desta em direção a presa, tocando-a com os pedipalpos e os primeiros pares de patas; **B.** se a aranha aceita a presa, ela injeta o veneno, a carrega para o centro da teia e passa a enrolá-la com as patas traseiras; **C.** se a presa é rejeitada, ela é cortada da teia pela aranha e **D.** jogada para fora.

1.3. Bioensaios com borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no campo

Para a determinação da resposta de aranhas *Nephila clavipes* em relação à quantidade de APs presentes em *Mechanitis polymnia* capturadas no campo, adultos desta borboleta foram capturados na mesma área dos bioensaios e separados em machos (n=20) e fêmeas (n=20). Nos ensaios, uma borboleta foi oferecida a *Nephila clavipes* e a resposta da aranha (predar ou liberar) foi anotada. Se uma aranha predava esta borboleta, o teste estava concluído. Se a aranha liberasse a borboleta, outra *Mechanitis polymnia* sem alcalóides, criada em laboratório (item 1.2.), era imediatamente oferecida, e o experimento era considerado válido se a aranha predasse essa segunda borboleta. Todas as borboletas foram recapturadas após os ensaios e armazenadas em frascos com 2ml de MeOH para análises químicas posteriores.

2. Bioensaios com pintinhos *Gallus gallus*

Pintinhos machos *Gallus gallus* L. (Galiformes, Phasianidae), variedade comercial "Hy line", de uma a duas semanas de vida, foram utilizados nos experimentos com predadores vertebrados. Estes pintinhos foram fornecidos pela granja Agrogenética de Campinas, e trazidos para o laboratório com algumas horas de vida. Os indivíduos foram criados até a idade dos ensaios em uma gaiola coletiva (80x80x80 cm) forrada com jornal, quando então eram transferidos para gaiolas individuais de 25x25x30 cm, onde foram realizados os ensaios. As gaiolas encontravam-se em uma sala isolada, com iluminação natural e temperatura ambiente, e foram separadas entre si com folhas de jornal para evitar contato visual entre as aves. A alimentação constou de água e ração de farelo de milho, que eram trocados diariamente, bem como o jornal que revestia o chão de cada gaiola. Uma hora antes do início de cada sessão experimental, todo o alimento disponível era retirado e o chão da gaiola limpo.

Como modelos de presas palatáveis, utilizaram-se larvas de terceiro estágio de *Chrysomya putoria* Wiedemann (Diptera: Calliphoridae) obtidas no Departamento de Parasitologia (IB, UNICAMP). Abelhas não foram utilizadas como presas palatáveis nestes bioensaios porque os pintinhos não conseguiram comê-las nos ensaios preliminares. Larvas de dípteros foram escolhidas por sua disponibilidade e por terem sido bem aceitas pelos pintinhos. Para que estes se acostumassem com organismos vivos, foram oferecidas larvas de *Chrysomya putoria* nos dois dias anteriores aos

ensaios, da mesma forma em que as presas seriam oferecidas durante os experimentos. Os ensaios foram realizados sempre no período da tarde, das 12h00 às 16h00. Cada pintinho foi testado no máximo duas vezes, com pelo menos três dias de intervalo entre os ensaios, e com alcalóides de estruturas diferentes.

As respostas dos pintinhos nos ensaios seguiram a mesma classificação determinada para os ensaios com *Nephila clavipes*, ou seja, predação ou liberação das presas oferecidas. Se o pintinho engolissem a presa inteira, esta era considerada predada. Se este bica a presa uma ou várias vezes, sem no entanto engolir-la, esta era considerada liberada. Neste caso, os pintinhos apresentaram muitas vezes um comportamento de limpar os bicos, o que foi considerado mais um sinal de rejeição às presas (Figura 5).

2.1. Bioensaios com aplicação tópica em organismos palatáveis

2.1.1. Experimentos com um único oferecimento

Os alcalóides foram aplicados topicamente nas larvas vivas de *Chrysomya putoria*. Concentrações conhecidas da mistura dos APs integerrimina:senecionina (**10** e **11**), do AP 9-O-senecioldretronecina (**14**) e da retronecina (**3**), todos nas formas base livre e N-óxido ($8,35 \times 10^{-2}$, $3,30 \times 10^{-1}$ e $1,32 \mu\text{moles/larva}$ ou $9,82 \times 10^{-3}$, $3,39 \times 10^{-2}$ e $1,55 \times 10^{-1} \mu\text{moles/mg}$ do peso seco corpóreo da larva), foram dissolvidos em $5 \mu\text{l}$ de MeOH e aplicadas na superfície das larvas e o solvente imediatamente seco em corrente de ar. Estas concentrações foram as mesmas utilizadas nos ensaios com *Nephila clavipes* em $\mu\text{g/mg}$ do peso seco da presa, considerando-se o peso seco médio das larvas de *Chrysomya putoria* para o cálculo desta concentração (aproximadamente 8,5 mg, n=30).

Os ensaios seguiram o seguinte procedimento (baseado em Begossi 1984): foi oferecida inicialmente uma larva controle tratada com $5 \mu\text{l}$ de MeOH, seco em corrente de ar, em um recipiente de fundo branco, com o menor contato possível com os indivíduos a serem testados. Cada oferecimento durava no máximo 5 minutos, terminando antes se a ave ingerisse a presa; as observações foram feitas a uma distância média de 1 m. Se o pintinho comesse esta larva controle, após aproximadamente 5 minutos era oferecida uma larva tratada com o alcalóide a ser testado e a resposta do pintinho anotada. Em seguida, era oferecida uma segunda

larva controle tratada com 5 μ l de MeOH. O experimento era considerado válido se o indivíduo comesse este segundo controle. Cada concentração foi testada 20 vezes.

2.1.2. Experimentos com oferecimentos sequenciais

Para testar se pintinhos passariam a evitar presas tratadas com APs após contatos anteriores com o alcalóide, foram realizados experimentos de oferecimento sequencial de presas controles e presas tratadas com APs. As respostas dos pintinhos foram divididas em quatro categorias (Figura 5): 1. comeu (C), quando o indivíduo engolia a presa inteira, mesmo após várias tentativas; 2. bicou e soltou morta (BM), quando o indivíduo fazia várias tentativas de engolir a presa, matando-a, mas rejeitando-a ao final; 3. bicou e soltou viva (BS), quando o indivíduo bicava várias vezes a presa na tentativa de engoli-la, e após algum tempo deixava-a de lado, viva; 4. não tocou (NT), quando após 5 minutos de observação o indivíduo não tocava a presa oferecida. Larvas de *Chrysomya putoria* foram utilizadas como modelos de presas palatáveis, e os APs utilizados foram os mesmos testados nos bioensaios anteriores, todos oferecidos na maior concentração, 1,32 μ moles/presa ($1,55 \times 10^{-1}$ μ moles/mg do peso seco corpóreo da larva). Os pintinhos utilizados nestes experimentos contavam com três semanas de vida.

O experimento seguiu o seguinte procedimento: inicialmente, foi oferecida uma presa controle, tratada com 5 μ l de MeOH seco em corrente de ar, e a resposta do pintinho, após 5 minutos de observação, anotada. Na sequência, foi oferecida uma presa tratada com 5 μ l da solução metanólica do AP a ser testado, e mais uma vez, após 5 minutos, a resposta do indivíduo anotada. No total, foram oferecidos um máximo de seis presas controle e cinco presas tratadas com APs, intercaladamente, e a resposta a cada presa individual anotada. Se o pintinho parava de tocar as presas oferecidas, inclusive o controle, o experimento era encerrado. Pintinhos que apresentaram um comportamento diferente de Comeu (C), em relação às presas controles, não foram considerados nos oferecimentos seguintes.

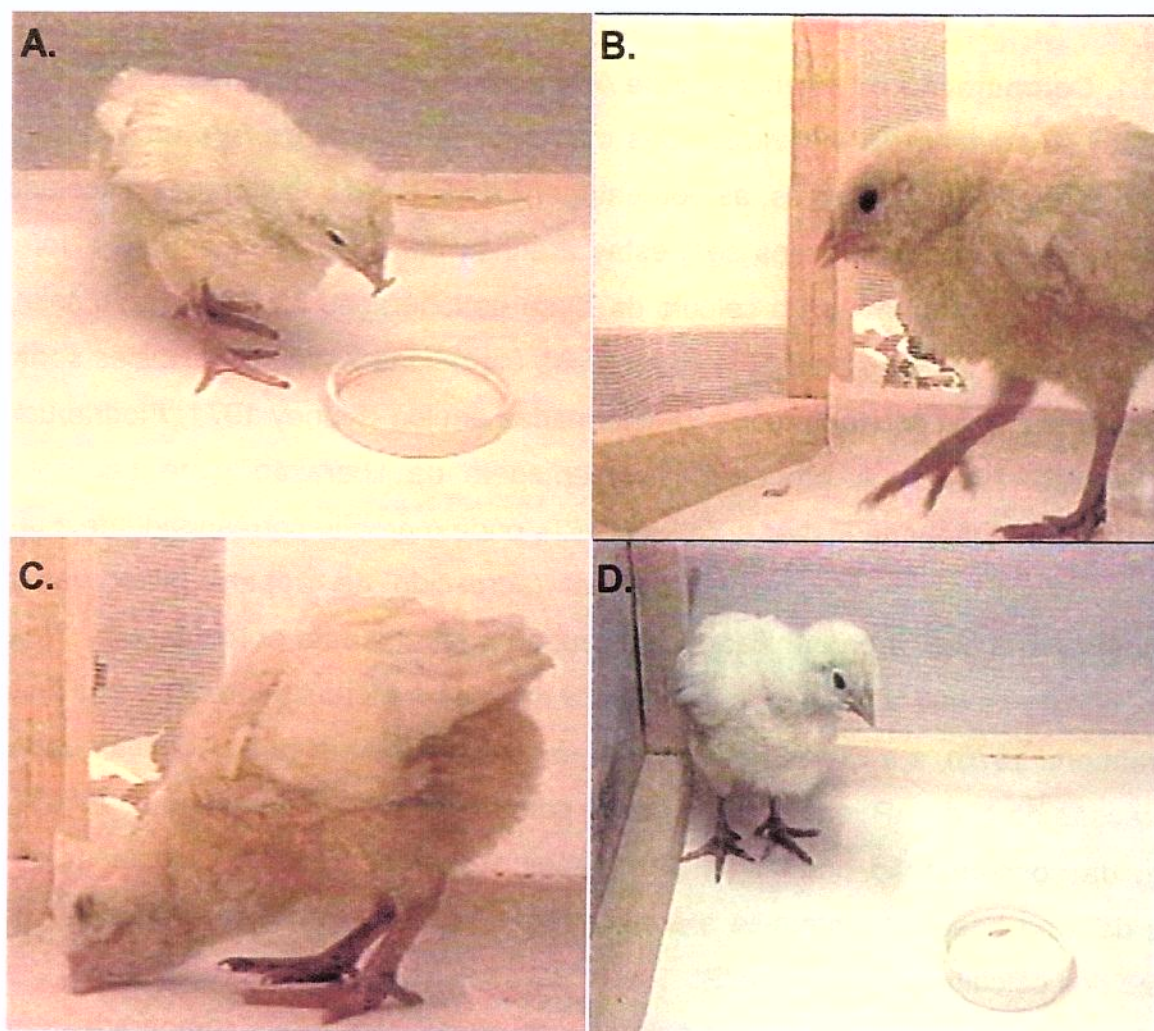


Figura 5. Bioensaios com *Gallus gallus* utilizando-se aplicação tópica de APs em presas palatáveis (larvas do díptero *Chrysomya putoria*). **A.** Quando se oferece a presa para o pintinho, ele imediatamente ataca a larva de *Chrysomya putoria* – resposta: comeu; **B.** se a larva é desagradável, o pintinho solta a presa após o primeiro contato. Este comportamento pode se repetir diversas vezes até que o indivíduo coma a presa (comeu), ou deixe-a de lado (bicou e soltou morta ou bicou e soltou viva); **C.** muitas vezes, os pintinhos limpam o bico após o contato com uma presa tratada com AP; **D.** após alguns contatos com larvas de *Chrysomya putoria* tratadas com AP, o indivíduo não toca mais as presas oferecidas.

3. Análises estatísticas

3.1. Comparação da efetividade de APs de estruturas diferentes

Para se comparar a efetividade das diferentes estruturas de APs na ação anti-predação contra *Nephila clavipes*, as porcentagens de liberação das presas pinceladas com APs, obtidas nos bioensaios com estas aranhas para cada concentração, foram transformadas em probite para o cálculo da Dose de Liberação 50 (DLib₅₀), ou seja, a dose de AP onde teoricamente 50% das presas oferecidas à *Nephila clavipes* seriam liberadas ilesas, e as concentrações transformadas em log (Finney 1971, Piedrabuena 1975, Haddad 1986). A probite da porcentagem de liberação pode ser obtida manualmente na tabela de Fisher e Yates (1963), onde o probite correspondente a uma dada porcentagem é o afastamento normal (acrescido de 5 para evitar valores negativos) para o qual a probabilidade (unicaudal) é igual a esta porcentagem. Neste método, admite-se que a regressão logarítmica da dose e efeito em probites seja linear (Piedrabuena 1975), e a DLib₅₀ pode, então, ser calculada através da equação da reta de regressão de cada AP, onde $y=5$, ou seja, porcentagem de liberação igual a 50%, e x o log da concentração onde 50% das presas seriam liberadas. Calculando-se o antilog de x na base 10, obtém-se a concentração em $\mu\text{moles/mg}$ para cada AP (ver detalhes dos cálculos no Apêndice 2).

As retas de regressão obtidas pela análise de probites foram comparadas entre si por Análise de Covariância (ANCOVA) (Sokal e Rohlf 1995). Uma premissa da ANCOVA é a linearidade da resposta em relação à variável independente, uma vez que a ANCOVA é baseada em um modelo linear. No caso da análise de probite, a regressão é obtida pelo melhor ajuste ao modelo linear, já que este é um pré-requisito do cálculo da DLib₅₀. Desta forma, não foi preciso testar a linearidade das respostas aos diferentes APs. Uma das propostas da ANCOVA é revelar relações causais e o seu principal teste de significância é um teste de homogeneidade dos interceptos de y , a_i , para todos os grupos. Por este motivo, a ANCOVA requer que as retas de regressão de todos os tratamentos tenham a mesma inclinação, o que pode ser testado por uma Análise de Variância (ANOVA). Neste teste, o resultado de interesse é o valor de p para o tratamento (tipo de AP) vs x (concentração). Se este valor é não significativo, as retas apresentam a mesma inclinação (são paralelas), e pode-se empregar a ANCOVA

para testar diferenças entre os tratamentos. O valor de interesse na ANCOVA é o p do tratamento (tipo de AP). Se este for igual ou menor do que 0,05, há diferenças entre as médias de cada reta e um efeito significativo do tratamento. Para determinar diferenças par a par entre os APs foi aplicado um teste *a posteriori* de Tukey (Sokal e Rohlf 1995).

Para se comparar a efetividade da base livre e do N-óxido do AP macrocíclico integerrimina:senecionina (**10** e **11**) contra *Gallus gallus* foi aplicado um Teste de Independência G. Este teste foi utilizado somente na maior concentração, uma vez que as demais concentrações apresentaram números idênticos de liberação e predação. A hipótese nula assumida nesse teste foi que a proporção de liberação e predação é independente da forma do AP testada.

3.2. Efeito da concentração sobre a resposta

Para se testar o efeito da concentração de APs sobre a resposta das aranhas e dos pintinhos às presas empregou-se uma análise de regressão logística (Hosmer e Lemeshow 1989). Esta análise não compara as respostas em diferentes concentrações, mas fornece uma evidência de que o modelo de uma determinada variável x explica uma variável y . Diferente da regressão linear, na regressão logística a variável de resposta é binária ou dicotômica e, neste caso, a resposta foi categorizada em predação ou liberação.

A estimativa dos parâmetros da regressão logística é feita pelo método da máxima verossimilhança (maximum likelihood). De forma geral, este método estima valores para os parâmetros que maximizam a probabilidade de obter-se o conjunto de dados observados. Desta forma, os resultados estimados são aqueles que mais concordam com os dados observados e são calculados matematicamente pela maximização do logaritmo natural, ou seja, o logaritmo da verossimilhança (LL). Na regressão logística o teste de significância do modelo em relação aos dados observados é feito através do Teste de Independência G. Para o caso de uma única variável independente, o teste G segue uma distribuição de Chi-quadrado com um grau de liberdade. Valores de p menores do que 0,05 indicam que o x é uma variável significativa para prever y .

O valor de ρ^2 (Rho-quadrado de McFaddens) obtido na regressão logística é uma transformação do valor de G. Este valor tem papel semelhante ao r^2 da regressão

linear, e está sempre entre 0 e 1. Um alto valor de ρ^2 corresponde a um resultado mais significativo, embora o rho-quadrado tenda a ser muito menor do que o r^2 . Um número baixo não implica necessariamente em um ajuste fraco, e valores entre 0,2 e 0,4 são considerados muito satisfatórios (Steinberg e Colla 1991).

3.3. Comparação das respostas de *Nephila clavipes* a borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas com diferentes tipos de APs e oferecidas após diferentes tempos

Inicialmente, para as análises das respostas de *Nephila clavipes* em relação a adultos de *Mechanitis polymnia* recém emergidos alimentados com diferentes APs, e testados em diferentes tempos após a ingestão, dividiu-se as borboletas em classes, de acordo com as concentrações de APs em seus tecidos, desde que se alimentou as mesmas com diferentes quantidades dos alcalóides (item 1.2. de DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE APs). Entretanto, quando se analisou, após os bioensaios com *Nephila*, a quantidade de APs nos tecidos dessas borboletas, verificou-se que ocorria uma grande variação nas concentrações, com algumas classes apresentando muitas borboletas, enquanto em outras o número amostral foi igual a um. Portanto, para a realização dos testes estatísticos, as borboletas foram agrupadas pelo tempo decorrido desde a ingestão dos APs, independente da concentração destes alcalóides em seus tecidos. Os resultados das análises colorimétricas das borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas em laboratório e dos capilares utilizados para sua alimentação, bem como as equações de regressão das curvas de calibração obtidas para cada AP, estão apresentadas no Apêndice 3.

3.3.1. Entre diferentes APs

Para se testar diferenças nas respostas de *Nephila clavipes* em relação ao AP ingerido pelas borboletas *Mechanitis polymnia*, utilizou-se o Teste de Independência G (Sokal e Rohlf 1995) par a par em cada tempo decorrido desde sua ingestão. A hipótese nula assumida foi que para cada tempo a proporção de liberação:predação é independente do tipo de AP ingerido pelas borboletas.

3.3.2. Entre os tempos decorridos depois da ingestão de cada AP

O mesmo Teste de Independência G foi aplicado para se testar o efeito do tempo de aquisição de cada AP sobre sua ação anti-predação contra *Nephila clavipes*. A hipótese nula assumida foi que a proporção liberação:predação das borboletas é independente do tempo decorrido desde a ingestão do AP.

3.4. Comparação da concentração e quantidade de APs em borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no campo

Para se verificar se as médias da concentração e da quantidade de APs em borboletas *Mechanitis polymnia* machos e fêmeas eram diferentes foi feita inicialmente a comparação entre as variâncias amostrais. Para a comparação da variância entre os dois grupos dividiu-se a variância maior pela menor, o que forneceu um número maior do que 1. O resultado foi comparado com o F crítico com um nível de significância estimado em 2,5% (Beiguelman 1996). Se o valor de F obtido for menor do que o F crítico ao nível de 5%, aceita-se que as variâncias não diferem significativamente. Se as variâncias diferem significativamente, não há necessidade de se comparar as médias para se concluir que elas são diferentes. No entanto, aplicou-se um Teste t admitindo-se variâncias diferentes. Se elas não diferem significativamente, pode-se empregar o Teste t admitindo-se variâncias iguais para a comparação das médias (Beiguelman 1996). Nos dois tipos de Teste t aplicados, a hipótese nula admitia que as médias das duas amostras não diferiam significativamente. A hipótese alternativa nesse caso foi bicaudal, ou seja, que as médias diferiam significativamente entre si.

RESULTADOS

1. Obtenção de Alcalóides Pirrolizidínicos (APs)

1.1. Integerrimina:senecionina base livre e N-óxido

A extração dos APs de *Senecio brasiliensis* originou uma fração alcaloidal total dos alcalóides integerrimina (**10**), senecionina (**11**) e retrorsina (**12**) (Tabela 1). O emprego da cromatografia de adsorção em coluna para a purificação destes APs resultou em uma mistura dos APs integerrimina:senecionina (**10** e **11**), na proporção de 89:11 (estes APs são isômeros geométricos, não sendo separáveis por este método), mais a retrorsina (**12**), que não foi utilizada nos ensaios. O padrão de fragmentação destes APs foi característico dos alcalóides macrocíclicos que têm a retronecina (**3**) como base necina, com três conjuntos de picos em seu espectro, 138, 137 e 136; 121, 120 e 119; e 95, 94 e 93 (Tabela 1). Estes arranjos representam as três seqüências principais de fragmentação a partir do íon molecular a m/z 335 (revisão em Trigo 1993). A quebra da ligação do éster alílico leva aos íons m/z 137, 120 e 94. Os rearranjos de MacLafferty através de estados de transição de oito membros envolvendo o hidrogênio do C3 da base com a carbonila, levam aos íons 136, 119 e 93. E a perda de CO_2 pelo íon m/z 335 leva ao íon-radical m/z 291, o qual por sua vez é fragmentado nos íons m/z 138, 121 e 95.

Os resultados da RMN de ^1H e ^{13}C da integerrimina:senecionina (**10** e **11**) também foram consistentes com os dados da literatura (revisão de RMN de ^1H em Logie *et al.* 1994 e de ^{13}C em Rizk 1991) (Tabela 2 – os espectros da RMN estão representados no Apêndice 4). O hidrogênio H2, presente no anel básico dos APs, por exemplo, está centrado como um multiplete ao redor de 6,2 ppm, como é esperado para os APs diésteres macrocíclicos quando o espectro é analisado em CDCl_3 (Rizk 1991). Os hidrogênios H9 apareceram como um dubleto não-equivalente neste AP, com ΔH -9 de 1,31 ppm, um valor diagnóstico para macrocíclicos com 12 membros (Logie *et al.* 1994). O deslocamento químico do hidrogênio H20 de 6,51 ppm é característico dos APs macrocíclicos com configuração em E (Logie *et al.* 1994).

A N-oxidação da mistura dos APs integerrimina:senecionina (**10** e **11**) apresentou um bom rendimento (Tabela 1). No espectro de RMN, os carbonos nas posições 3, 5 e

8 (Figura 1) apareceram mais desprotegidos na forma N-óxido da integerrimina:senecionina (**10** e **11**) em relação a sua base livre (Tabelas 2 e 3), provavelmente devido à presença do oxigênio ligado ao nitrogênio na posição 4. Pelo mesmo motivo, os hidrogênios H3 e H5 apresentaram um sinal deslocado para campo mais baixo no N-óxido. O hidrogênio H13 deste AP foi detectado somente pela análise de HETCOR, uma vez que este é mascarado pelos hidrogênios metilados do H21 (Apêndice 4). A possível formação de um epóxido na dupla ligação C15-C20 devido à reação com o ácido metacloroperbenzóico pode ser desconsiderada, desde que se esse produto tivesse sido formado, ambos os carbonos sofreriam uma proteção, com o C15 em 64,1 ppm e o C20 em 56,0 ppm (dados para a jacobina – um epóxido em C15-C20, Risk 1991). No caso da formação e abertura do epóxido, com a conseqüente formação de um diol, os carbonos também sofreriam uma proteção em relação à dupla ligação (C15 = 81,7 ppm e C20 = 72,6 ppm - dados para jacolina, Risk 1991).

1.2. Retronecina base livre e N-óxido, e ácidos nécicos respectivos

A hidrólise da mistura dos APs integerrimina:senecionina (**10** e **11**) resultou na formação da base necina retronecina (**3**) e da mistura dos ácidos nécicos integerrimínico (**6**) e senécico (**7**) (Tabelas 1, 4, 5 e 6). O padrão de fragmentação da retronecina (**3**) concordou com os resultados de Trigo (1993), com pequenas variações na abundância relativa de cada pico (Tabela 1). A clivagem homolítica do íon molecular (m/z 155) entre os carbonos C7 e C6 levou ao íon a m/z 111. A perda do CH por parte deste levou ao íon a m/z 94 e a perda de CH_2OH levou ao íon a m/z 80 (pico base) (revisão em Trigo 1993).

Os resultados de RMN foram consistentes com os encontrados na literatura (Molineux *et al.* 1982) (Tabela 4). Para a mistura dos ácidos integerrimínico (**6**) e senécico (**7**) esterificados, os picos mais característicos foram 212, 153 e 43 (Tabela 1). A caracterização por CG-EM e RMN da mistura destes ácidos concordou com os dados da literatura (Niwa *et al.* 1992).

O rendimento da N-oxidação da retronecina (**3**) foi bastante baixo, e a caracterização da forma N-óxido só foi possível pelo padrão de análise de CCD, uma vez que não se pode determinar o ponto de fusão desta forma, porque acima de 200°C o N-óxido da retronecina se decompõe. Pela RMN, determinou-se que os carbonos nas

posições 3 e 5 apresentaram um sinal deslocado para campo mais baixo na retronecina (**3**) N-oxidada do que na sua base livre (Tabelas 4 e 5), provavelmente devido à oxidação no nitrogênio da posição 4. Da mesma forma, os hidrogênios H3, H5 e H6 apareceram mais desprotegidos no N-óxido.

1.3. 9-O-senecioilretronecina base livre e N-óxido

As várias tentativas empregadas para a purificação da 9-O-senecioilretronecina (**14**) semi-sintetizada em laboratório a partir da retronecina (**3**) resultaram em um baixo rendimento final do AP (Tabela 1). Pelo padrão de fragmentação deste AP, percebe-se a presença do íon molecular 237 (pouco abundante) e do conjunto de picos 139, 138 e 137 característicos de APs monoésteres com base necina retronecina (**3**) esterificada na posição C9 (Rizk 1991). O íon m/z 138 do conjunto é a porção básica originada pela clivagem da ligação éster e o fragmento m/z 137 origina-se da perda de C_4H_8 pelo íon m/z 193. O conjunto de picos 119, 120 e 121 apareceu insignificante para estes APs, enquanto que na menor tríade, 95, 94 e 93, o pico 93 apareceu caracteristicamente mais forte, o pico 94 foi médio e o 95 insignificante (Tabela 1). Esse íon 93 é formado pela clivagem homolítica do íon m/z 137 (revisão em Trigo 1993).

Na RMN do 1H , o hidrogênio H2 apareceu como um multipeto com deslocamento ao redor de 5,8 ppm, característico de APs monoésteres quando o espectro é analisado em solução de $CDCl_3$ (Tabela 7). Os dois hidrogênios H9 apareceram como um singeto, e portanto equivalentes, ao contrário dos macrocíclicos.

A N-oxidação da 9-O-senecioilretronecina (**14**) apresentou um bom rendimento (Tabela 1). Na análise de RMN, os carbonos nas posições 3, 5 e 8 apareceram mais desprotegidos no N-óxido deste AP em relação à sua base livre (Tabelas 7 e 8) e, da mesma forma, os hidrogênios H3, H5, H6, H7 e H8 apresentaram um sinal deslocado para campo mais baixo no N-óxido. Estas diferenças, como no AP macrocíclico integerrimina:senecionina (**10** e **11**) e na retronecina (**3**), são provavelmente devidas à oxidação do nitrogênio na posição 4.

1.4. Calimorfina base livre

A acetilação do ácido ($\pm$)-2-hidroxi-2-metil butanóico com cloreto de acetila resultou no ácido ($\pm$)-2-acetóxi-2-metil-butanóico (**8**), um óleo viscoso. A esterificação deste ácido com a retronecina (**3**) resultou em uma goma viscosa que apresentava diversas substâncias, incluindo a calimorfina (**22**) (Tabela 1), e o rendimento final deste AP foi extremamente baixo. Por este motivo, a semi-síntese da calimorfina (**22**) não foi repetida. A presença de um íon 138 proeminente (Tabela 1), resultante da fissão da ligação do carbono da posição 9, é uma característica do espectro de alcalóides 1,2-desidropirrolizidínicos esterificados na posição 9 e com uma hidroxila livre na posição 7 (Edgar *et al.* 1980).

Tabela 1. Algumas características dos alcalóides pirrolizidínicos obtidos para utilização nos bioensaios com predadores vertebrados e invertebrados.

Alcalóides pirrolizidínicos	IR	Padrão de fragmentação de massas	Rendimento da reação (%)
Ácido integerrimínico esterificado (6) ²	1626	[M ⁺] 212 (5), 153 (58), 125 (10), 81 (25), 53 (16), 43 (100)	32
Ácido senécico esterificado (7) ²			
Calimorfina base livre (22) ³	2012	[M ⁺] 297 (2), 253 (1), 155 (7), 154 (11), 139 (6), 138 (53), 137 (11), 136 (10), 120 (3), 95 (3), 94 (28), 93 (100), 80 (12), 69 (1), 57 (2), 53 (5), 43 (23)	25
Integerrimina base livre (10) ¹	2417	[M ⁺] 335 (5), 291 (11), 248 (15), 246 (5), 220 (27), 138 (47), 137 (22), 136 (100), 121 (64), 120 (97), 119 (87), 95 (53), 94 (64), 93 (74), 80 (32), 67 (15), 55 (10), 53 (19), 43 (31)	35,5
Integerrimina:senecionina N-óxido ⁴	-	-	95
Indicina (17) ⁵	2225	[M ⁺] 299 (<1), 255 (<1), 254 (1), 156 (8), 139 (32), -	-
Intermedina (16) ⁵	2208	138 (100), 120 (9), 108 (3), 94 (49), 93 (74), -	-
Licopsamina (15) ⁵	2192	80(14), 67 (8), 53 (10)	-
Retronecina base livre (3) ²	1560	[M ⁺] 155 (22), 111 (55), 94 (17), 80 (100)	30
Retronecina N-óxido ⁴	-	-	35

Continua

Alcalóides pirrolizidínicos	IR	Padrão de fragmentação de massas	Rendimento da reação (%)
Retrorsina (<u>12</u>) ¹	2600	[M ⁺] 351 (1), 246 (7), 220 (12), 138 (45), 137 (23), 136 (100), 121 (38), 120 (94), 119 (74), 95 (36), 94 (52), 93 (66), 80 (24), 67 (12), 55 (26), 53 (32)	24
Senecionina base livre (<u>11</u>) ¹	2353	[M ⁺] 335 (5), 291 (11), 248 (15), 246 (5), 220 (27), 138 (47), 137 (22), 136 (100), 121 (64), 120 (97), 119 (87), 95 (53), 94 (64), 93 (74), 80 (32), 67 (15), 55 (10), 53 (19), 43 (31)	35,5
Senecioilretronecina base livre (<u>14</u>) ³	1506	[M ⁺] 237 (2), 219 (1), 193 (4), 155 (17), 154 (17), 139 (2), 138 (24), 137 (33), 136 (19), 126 (12), 120 (3), 108 (4), 94 (26), 93 (100), 92 (5), 83 (16), 80 (15), 67 (5), 55 (14), 53 (14)	40
Senecioilretronecina N-óxido ⁴	—	—	50

¹Extraído de folhas e inflorescências de *Senecio brasiliensis*; ²Obtido pela hidrólise dos APs de *Senecio brasiliensis*; ³Semi-sintetizado em laboratório; ⁴Obtido pela N-oxidação da forma terciária deste AP em laboratório; ⁵Extraído de borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no Complexo Botânico Monjolinho.

Tabela 2. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para integerrimina:seneconina base livre (**10** e **11**). Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)*	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	131,68	—	—	—
2	136,82 (136,61)*	2	6,21 m (6,19) (1H)	—
3	62,67 (60,92)	3 α	3,39 dd (1H)	$J_{3\alpha,3\beta}=16,0$; $J_{3\alpha,5\alpha}=5,6$
—	—	3 β	3,93 d (1H)	$J_{3\beta,3\alpha}=16,0$
5	53,09	5 α	2,52 ddd (1H)	$J_{5\alpha,5\beta}=8,5$; $J_{5\alpha,3\alpha}=5,5$; $J_{5\alpha,6\alpha}=11,0$
—	—	5 β	3,23 t (1H)	$J_{5\beta,5\alpha}=8,0$
6	33,78 (34,77)	6 α	2,09 m (1H)	—
—	—	6 β	2,42 dd (1H)	$J_{6\beta,6\alpha}=13,5$; $J_{6\beta,7}=6,0$
7	75,51	7	5,0 m (1H)	—
8	77,14	8	4,29 m (1H)	—
9	60,93	9 α	4,11 d (4,05) (1H)	$J_{9\alpha,9\beta}=12,0$
—	—	9 β	5,42 d (5,72) (1H)	$J_{9\beta,9\alpha}=12,0$
11	178,24	—	—	—
12	76,75	—	—	—
13	39,46 (38,33)	13	1,74** (1H)	—
14	29,53 (38,2)	14 α	1,98 d (1H)	$J_{14\alpha,14\beta}=13,5$
—	—	14 β	2,19 dd (1H)	$J_{14\beta,14\alpha}=13,0$; $J_{14\beta,13}=10,0$
15	133,93	—	—	—
16	169,14	—	—	—
18	25,14	18	1,33 s (3H)	—
19	11,77	19	0,91 d (3H)	$J_{19,13}=7,0$
20	135,29	20	6,51 q (1H)	$J_{20,21}=7,0$
21	14,18 (15,01)	21	1,74 d (3H)	$J_{21,20}=7,0$

* Entre parênteses, deslocamentos determinados para a seneconina (**11**).

** O H13 aparece sobreposto com os hidrogênios metilados do H21.

Tabela 3. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para integerrimina:senecionina N-óxido. Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	129,83	—	—	—
2	131,07	2	6,24 m (1H)	—
3	78,07	3 α +3 β	4,49 m (2H)	—
5	68,85	5 α	3,64 ddd (1H)	J _{5α,5β} =15,0; J _{5α,6α} =15,0; J _{5α,6β} =10,0
—	—	5 β	3,86 m (1H)	—
6	32,33	6 α	2,36 m (1H)	—
—	—	6 β	2,93 dddd (1H)	J _{6β,6α} =15,0; J _{6β,5β} =15,0; J _{6β,5α} =10,0; J _{6β,7} =5,0
7	73,57	7	5,47 q (1H)	J _{7,6β} =5,0
8	95,35	8	4,80 m (1H)	—
9	60,56	9 α	4,20 d (1H)	J _{9α,9β} =20,0
—	—	9 β	5,42 d (1H)	J _{9β,9α} =20,0
11	177,98	—	—	—
12	76,58	—	—	—
13	39,46	13	1,76* (1H)	—
14	29,37	14 α	1,96 d (1H)	J _{14α,14β} =20,0
—	—	14 β	2,22 dd (1H)	J _{14β,14α} =20,0; J _{14β,21} =15,0
15	132,46	—	—	—
16	168,03	—	—	—
18	25,08	18	1,32 s (3H)	—
19	11,73	19	0,90 d (3H)	J _{19,13} =10,0
20	137,98	20	6,63 q (1H)	J _{20,21} =10,0
21	14,37	21	1,76 d (3H)	J _{21,20} =10,0

* O H13 aparece sobreposto com os hidrogênios metilados do H21.

Tabela 4. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para retronecina base livre (**3**). Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	137,56	—	—	—
2	127,44	2	5,69 m (1H)	—
3	61,88	3 α	3,4 dd (1H)	$J_{3\alpha,3\beta}=15,5$; $J_{3\alpha,2}=5$
—	—	3 β	3,83 dd (1H)	$J_{3\beta,3\alpha}=15,5$; $J_{3\beta,2}=1,8$
5	54,11	5 α	2,73 ddd (1H)	$J_{5\alpha,5\beta}=12,0$; $J_{5\alpha,6\alpha}=8,5$; $J_{5\alpha,6\beta}=5,5$
—	—	5 β	3,22 dd (1H)	$J_{5\beta,5\alpha}=12,0$
6	35,28	6 α	1,91 m (1H)	—
—	—	6 β	1,98 dd (1H)	$J_{6\beta,6\alpha}=13,5$; $J_{6\beta,5\alpha}=6,0$
7	71,01	7	4,29 d (1H)	$J_{7,6\alpha}=4,0$
8	79,41	8	4,15 m (1H)	—
9	58,72	9 α	4,08 d (1H)	$J_{9\alpha,9\beta}=11,7$
—	—	9 β	4,30 d (1H)	$J_{9\beta,9\alpha}=12$

Tabela 5. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para retronecina N-óxido. Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	135,55	—	—	—
2	119,71	2	5,61 m (1H)	—
3	77,74	$3\alpha+3\beta$	4,39 m (2H)	—
5	67,99	5α	3,52 m (1H)	—
—	—	5β	3,65 ddd (1H)	$J_{5\beta,5\alpha}=12,0;$ $J_{5\beta,6\alpha}=12,0;$ $J_{5\beta,6\beta}=6,0$
6	33,56	6α	1,93 m (1H)	—
—	—	6β	2,39 m (1H)	—
7	69,23	7	4,61 m (1H)	—
8	94,78	8	4,58 m (1H)	—
9	57,79	$9\alpha+9\beta$	4,1 m (2H)	—

Tabela 6. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para o ácido integerrimínico:senécico (**6** e **7**). Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	176,96	—	—	—
2	83,83	—	—	—
3	31,91	3	2,45 q (1H)	$J_{3,9}=11,0$
4	28,49	4	2,33-2,50 m (2H)	—
5	122,95	—	—	—
6	165,42	—	—	—
8	14,21	8	1,56 s (3H)	—
9	13,82	9	1,05 d (3H)	$J_{9,3}=11,0$
10	143,64	10	7,26 q (1H)	$J_{10,11}=12,0$
11	21,38	11	1,78 d (3H)	$J_{11,10}=12,5$
—	—	OH	8,38 s (1H)	—

Tabela 7. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para 9-O-senecioldretronecina base livre (**14**). Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	133,38	—	—	—
2	129,24	2	5,77 m (1H)	—
3	63,13	3 α	3,34 dd (1H)	$J_{3\alpha,3\beta}=10,0$; $J_{3\alpha,2}=5,0$
—	—	3 β	3,85 d (1H)	$J_{3\beta,3\alpha}=10,0$
5	53,96	5 α	2,67 ddd (1H)	$J_{5\alpha,5\beta}=10,0$; $J_{5\alpha,6\alpha}=10,0$; $J_{5\alpha,6\beta}=5,0$
—	—	5 β	3,19 t (1H)	$J_{5\beta,5\alpha}=10,0$
6	35,71	6 α	1,88 m (1H)	—
—	—	6 β	1,95 dd (1H)	$J_{6\beta,6\alpha}=10,0$; $J_{6\beta,5\alpha}=5,0$
7	71,13	7	4,19 t (1H)	$J_{7,6\alpha}=5,0$
8	78,70	8	4,07 m (1H)	—
9	60,50	9 α +9 β	4,64 s (2H)	—
11	166,10	—	—	—
12	114,92	12	5,62 s (1H)	—
13	158,96	—	—	—
14	27,44	14	1,85 s (3H)	—
15	20,31	15	2,11 s (3H)	—

Tabela 8. Dados da RMN de ^1H e ^{13}C para 9-O-senecioldretronecina N-óxido. Os espectros das análises de RMN deste AP estão representados no Apêndice 4.

^{13}C	Deslocamento (ppm)	^1H	Deslocamento (ppm)	J (Hz)
1	132,91	—	—	—
2	122,52	2	5,77 m (1H)	—
3	79,50	$3\alpha+3\beta$	4,48 m (2H)	—
5	70,53	$5\alpha+5\beta$	3,81 dd (2H)	$J_{5\alpha,6\alpha}=12,0$; $J_{5\alpha,6\beta}=3,0$
6	34,81	6α	2,12 m (1H)	—
—	—	6β	2,68 m (1H)	—
7	70,39	7	4,69 m (1H)	—
8	97,68	8	4,64 m (1H)	—
9	60,39	$9\alpha+9\beta$	4,75 sl (2H)	—
11	166,64	—	—	—
12	115,21	12	5,69 s (1H)	—
13	160,10	—	—	—
14	28,00	14	2,18 s (3H)	—
15	20,88	15	1,93 s (3H)	—

2. Bioensaios com a aranha *Nephila clavipes*

2.1. Bioensaios com aplicação tópica de APs em organismos palatáveis

Seis dos oito APs testados [a mistura integerrimina:senecionina (**10** e **11**), a senecioilretronecina (**14**), seus respectivos N-óxidos, a senquirquina (**13**) e a calimorfina (**22**)] foram efetivos contra predação por *Nephila clavipes* (Figuras 6 a 10). Em relação à DLib₅₀ (µg/presa), verificou-se que o N-óxido da mistura de **10** e **11** foi o mais ativo, seguido pela base livre da senecioilretronecina (**14**) (Tabela 9).

O N-óxido e a base livre da retronecina não apresentaram atividade antipredação mesmo nas concentrações mais elevadas (Figura 10), e por este motivo a DLib₅₀, além de outras análises estatísticas, não foram calculadas. Embora a calimorfina (**22**) tenha apresentado uma atividade antipredação de mais de 78% na concentração $2,46 \times 10^{-3}$ µmoles/mg (Figura 10), os resultados foram considerados insuficientes para o cálculo da DLib₅₀.

Pela ANCOVA vê-se que as retas obtidas pela linearização da atividade antipredação contra *Nephila clavipes* vs dose de APs (Figuras 7 e 9) não apresentaram diferenças significativas em suas inclinações (Tabela 10). Entretanto, seus interceptos diferiram significativamente em alguns casos (Tabela 10). Por esta análise, pode-se determinar que o N-óxido da integerrimina:senecionina (**10** e **11**) é significativamente diferente dos outros APs, a base livre da mesma mistura difere da senquirquina (**13**) e o N-óxido da senecioilretronecina não difere significativamente de sua base livre (Tabela 10).

A inspeção visual das Figuras 6 a 10 indica que o aumento da concentração dos APs provoca um aumento da sua atividade anti-predação e os resultados da regressão logística confirmaram estatisticamente esta relação (Tabela 11).

A mistura dos ácidos néricos integerrimínico (**6**) e senécico (**7**) não protegeu as presas contra predação por *Nephila clavipes*. Na maior concentração testada ($3,93 \times 10^{-2}$ µmoles/mg) apenas uma presa oferecida à *Nephila* foi liberada (n=12). Devido a sua baixa ação anti-predação, não foi dada continuidade aos testes utilizando esta mistura de ácidos néricos.

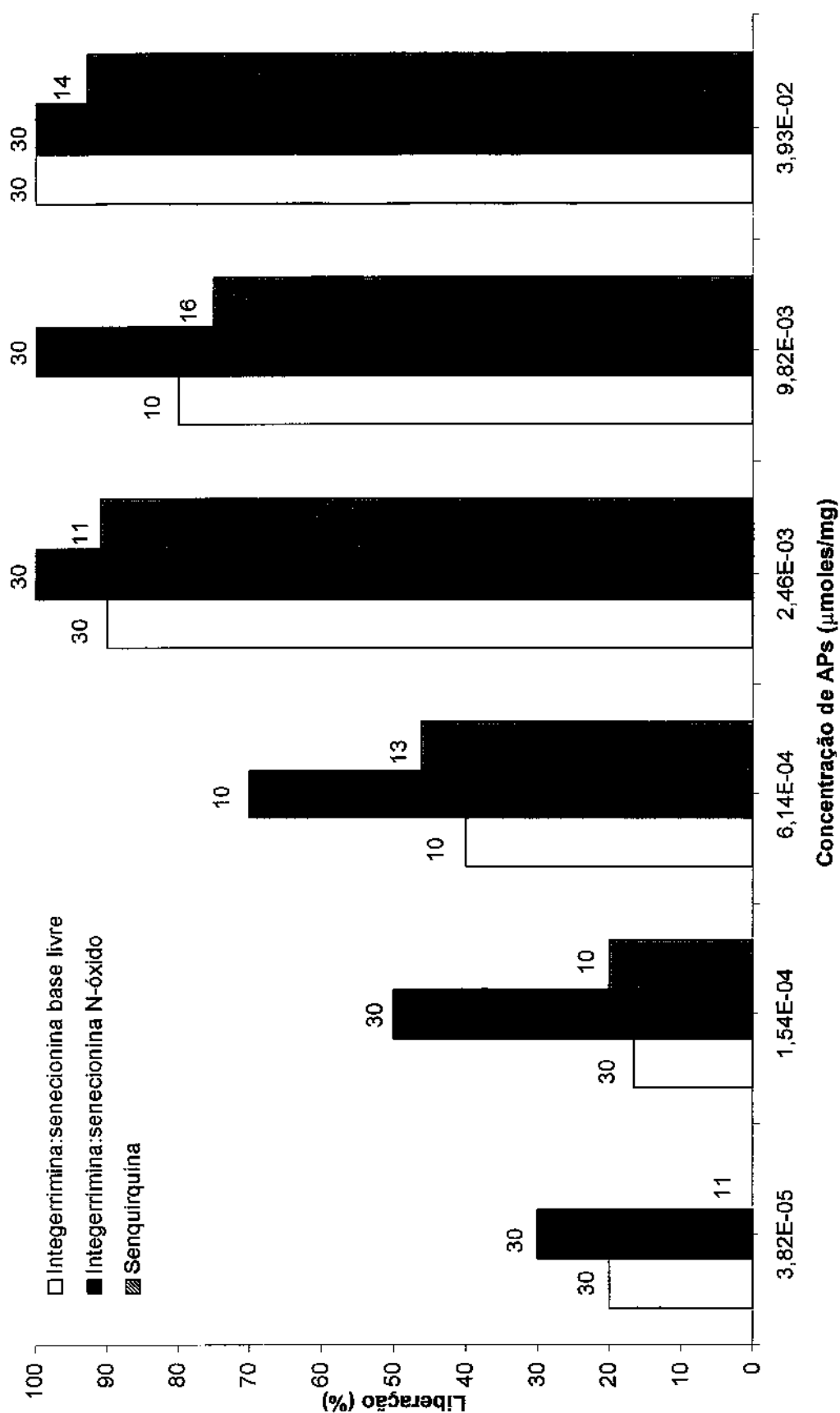


Figura 6. Atividade anti-predação contra *Nephila clavipes* vs dose de APs macrocíclicos ($\mu\text{moles/mg}$) aplicados topicamente em abelhas e oferecidos às aranhas. Os números acima das barras indicam o número de bioensaios realizados com cada concentração de APs.

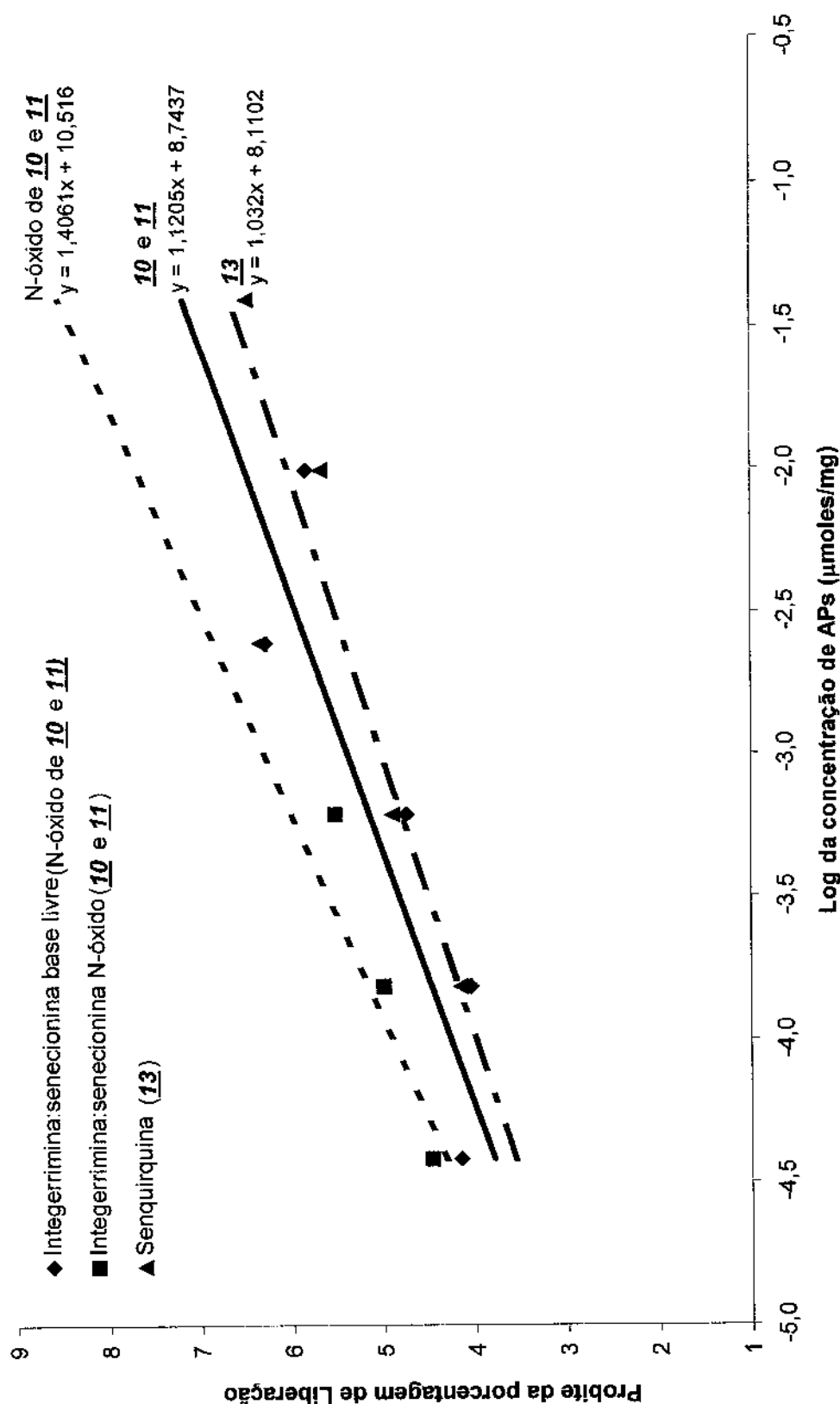


Figura 7. Linearização da atividade anti-predação contra *Nephtila clavipes* vs dose de APs macrocíclicos (µmoles/mg). Os pontos do gráfico representam as probites empíricas (Ye) obtidas pela transformação direta das porcentagens de liberação; as retas representam o ajuste da Ye para o cálculo da DLib₅₀ de cada AP, baseado nas respectivas equações da reta (ver Apêndice 2). Ver Figura 6 para os dados não transformados.

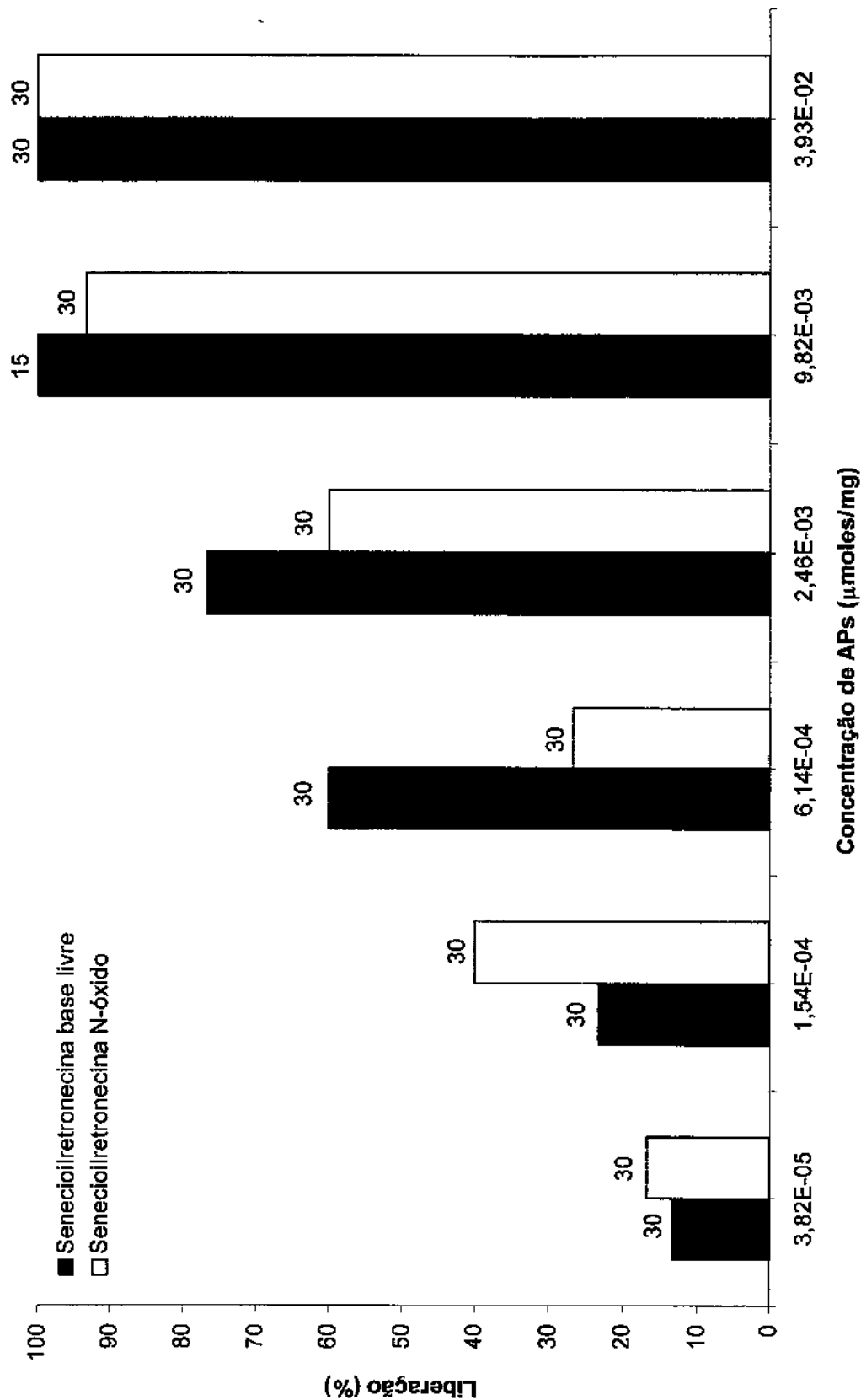


Figura 8. Atividade anti-predação contra *Nephila clavipes* vs dose de APs monoésteres ($\mu\text{moles/mg}$) aplicados topicamente em abelhas e oferecidos às aranhas. Os números acima das barras indicam o número de bioensaios realizados com cada concentração de APs.

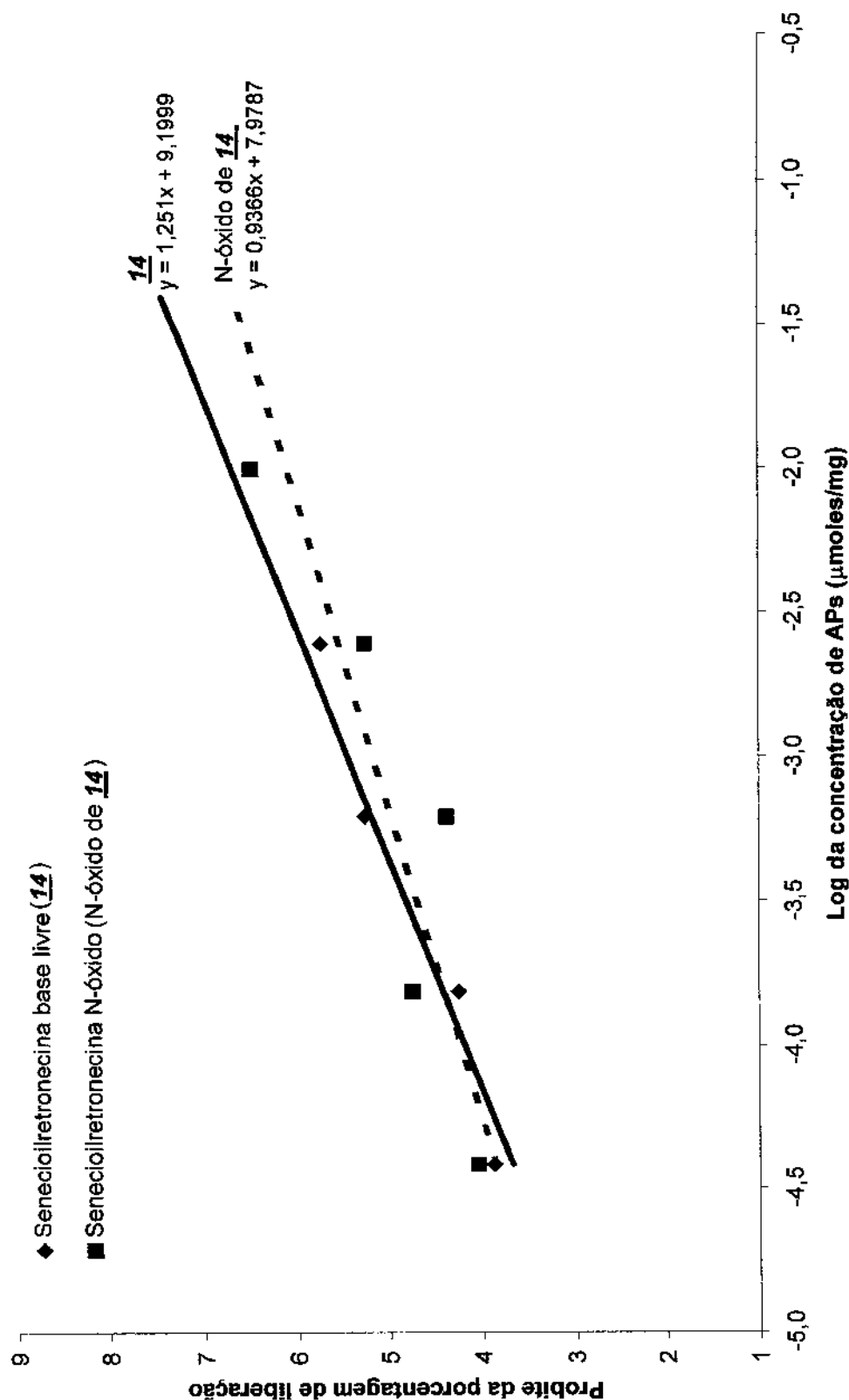


Figura 9. Linearização da atividade anti-predação contra *Nephtila clavipes* vs dose de APs monoésteres (µmoles/mg). Os pontos do gráfico representam as probites empíricas (Ye) obtidas pela transformação direta das porcentagens de liberação; as retas representam o ajuste da Ye para o cálculo da DLib₅₀ de cada AP, baseado nas respectivas equações da reta (ver Apêndice 2). Ver Figura 8 para os dados não transformados.

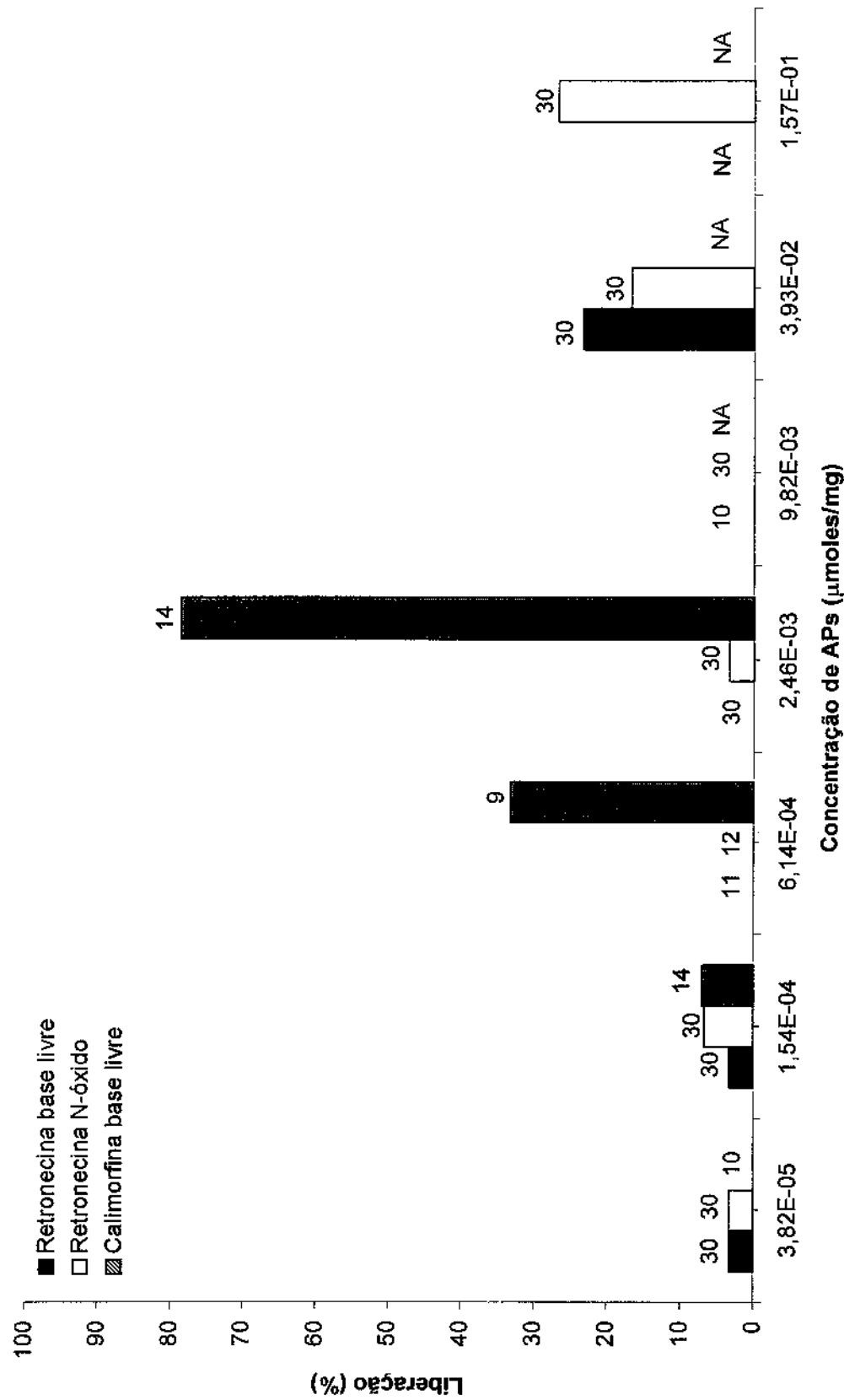


Figura 10. Atividade anti-predação contra *Nephila clavipes* vs dose dos APs calimorfina e retronecina (μmoles/mg) aplicados topicamente em abelhas e oferecidos às aranhas. Os números acima das barras indicam o número de bioensaios realizados com cada concentração de APs. NA=não foram realizados ensaios nesta concentração com este AP.

Tabela 9. Dose de Liberação 50 (DLib₅₀) onde 50% das presas oferecidas a *Nephila clavipes* são liberadas ilesas (ver Figuras 7 e 9). Detalhes dos cálculos no Apêndice 2.

Alcalóides pirrolizidínicos	DLib ₅₀ (µg/presa)	DLib ₅₀ (µg/mg de peso seco da presa)	DLib ₅₀ (% de peso seco da presa)
Integerrimina:senecionina base livre (<u>10</u> e <u>11</u>)	2,60	0,153	0,015
Integerrimina:senecionina N-óxido	0,71	0,042	0,004
Senquirquina (<u>13</u>)	6,00	0,353	0,035
Senecioilretronecina base livre (<u>14</u>)	1,77	0,104	0,010
Senecioilretronecina N-óxido	2,83	0,166	0,016

Tabela 10. ANCOVA aplicada para comparar a efetividade dos diferentes APs contra a predação por aranhas *Nephila clavipes*, com um teste *a posteriori* de Tukey.

ANOVA				
	Graus de liberdade	F	P	
Concentração	1	-7,69x10 ⁻¹⁶	NS	
APs	4	-1,28x10 ⁻¹⁵	NS	
Concentração vs APs	4	-3,96x10 ⁻¹⁴	NS	
ANCOVA				
	Graus de liberdade	F	P	
APs	4	43,80	<0,001	
Concentração	1	1,16x10 ³	<0,001	

Teste a posteriori de Tukey				
	<u>10 e 11</u>	N-óxido de <u>10 e 11</u>	<u>14</u>	<u>13</u>
<u>10 e 11</u>	-			
N-óxido de <u>10 e 11</u>	<0,001	-		
<u>14</u>	0,955	<0,001	-	
<u>13</u>	0,017	<0,001	0,003	-
N-óxido de <u>14</u>	0,254	<0,001	0,069	0,672

Tabela 11. Regressão logística para determinação do efeito da concentração de APs nas presas sobre a resposta de aranhas *Nephila clavipes*.

Alcalóides pirrolizidínicos	ρ^2	LL	G	Graus de liberdade	P
Integerrimina:senecionina base livre (10 e 11)	0,34	-95,61	65,84	1	<0,001
Integerrimina:senecionina N-óxido	0,48	-88,86	86,15	1	<0,001
Senquirquina (13)	0,17	-51,78	17,66	1	<0,001
Senecioilretronecina base livre (14)	0,38	-111,81	85,44	1	<0,001
Senecioilretronecina N-óxido	0,34	-123,42	83,97	1	<0,001
Calimorfina (22)	0,38	-29,43	22,62	1	<0,001

2.2. Tempo de metabolização e atividade de APs - alimentação de adultos recém emergidos de *Mechanitis polymnia*

2.2.1. Respostas de *Nephila clavipes* em relação a cada AP dentro de cada tempo após sua ingestão

Imediatamente após a ingestão dos APs (tempo 0), somente 24% dos machos alimentados com a senecioilretronecina (**14**) foram liberados pelas aranhas (Figura 11). O Teste de Independência G mostrou que **14** apresentou uma maior porcentagem de liberação neste tempo do que a integerrimina:senecionina (**10** e **11**) e a retronecina (**3**) ($G_1=5,96$; $p=0,015$ e $G_1=5,65$; $p=0,017$, respectivamente). Os APs integerrimina:senecionina (**10** e **11**) e retronecina (**3**) não apresentaram diferenças significativas em relação à porcentagem de liberação neste tempo (Apêndice 5).

Seis horas após a ingestão dos APs, nenhum macho alimentado com retronecina (**3**) foi liberado (Figura 11), enquanto que machos alimentados com integerrimina:senecionina (**10** e **11**) e senecioilretronecina (**14**) foram significativamente mais liberados ($G_1=7,61$; $p=0,006$ e $G_1=5,41$; $p=0,02$). Estes dois últimos APs não apresentaram diferenças significativas em relação à porcentagem de liberação neste tempo ($G_1=0,99$; $p=0,319$).

Vinte e quatro horas após a ingestão dos APs, borboletas alimentadas com integerrimina:senecionina (**10** e **11**) e senecioilretronecina (**14**) foram igualmente liberadas pelas aranhas *Nephila clavipes* ($G_1=0,14$; $p=0,71$), e significativamente mais liberadas do que aquelas borboletas alimentadas com retronecina (**3**) ($G_1=11,68$; $p<0,001$ e $G_1=13,70$; $p<0,001$, respectivamente) (Figura 11).

2.2.2. Respostas de *Nephila* em relação a diferentes tempos após a ingestão de cada AP

Pelo Teste de Independência G par a par para integerrimina:senecionina (**10** e **11**), observa-se que as borboletas foram significativamente mais predadas imediatamente após a ingestão do alcalóide (tempo 0) do que quando testadas 6 e 24 horas após a sua ingestão ($G_1=6,63$; $p=0,010$ e $G_1=15,61$; $p<0,001$, respectivamente). Para a senecioilretronecina (**14**), borboletas testadas 24 horas após a sua ingestão foram significativamente mais liberadas do que as testadas 0 e 6 horas após ($G_1=4,65$;

$p=0,031$ e $G_1=8,86$; $p=0,003$, respectivamente). Os resultados para borboletas testadas após a ingestão de retronecina (3) não apresentaram resultados significativos entre os tempos após a ingestão.

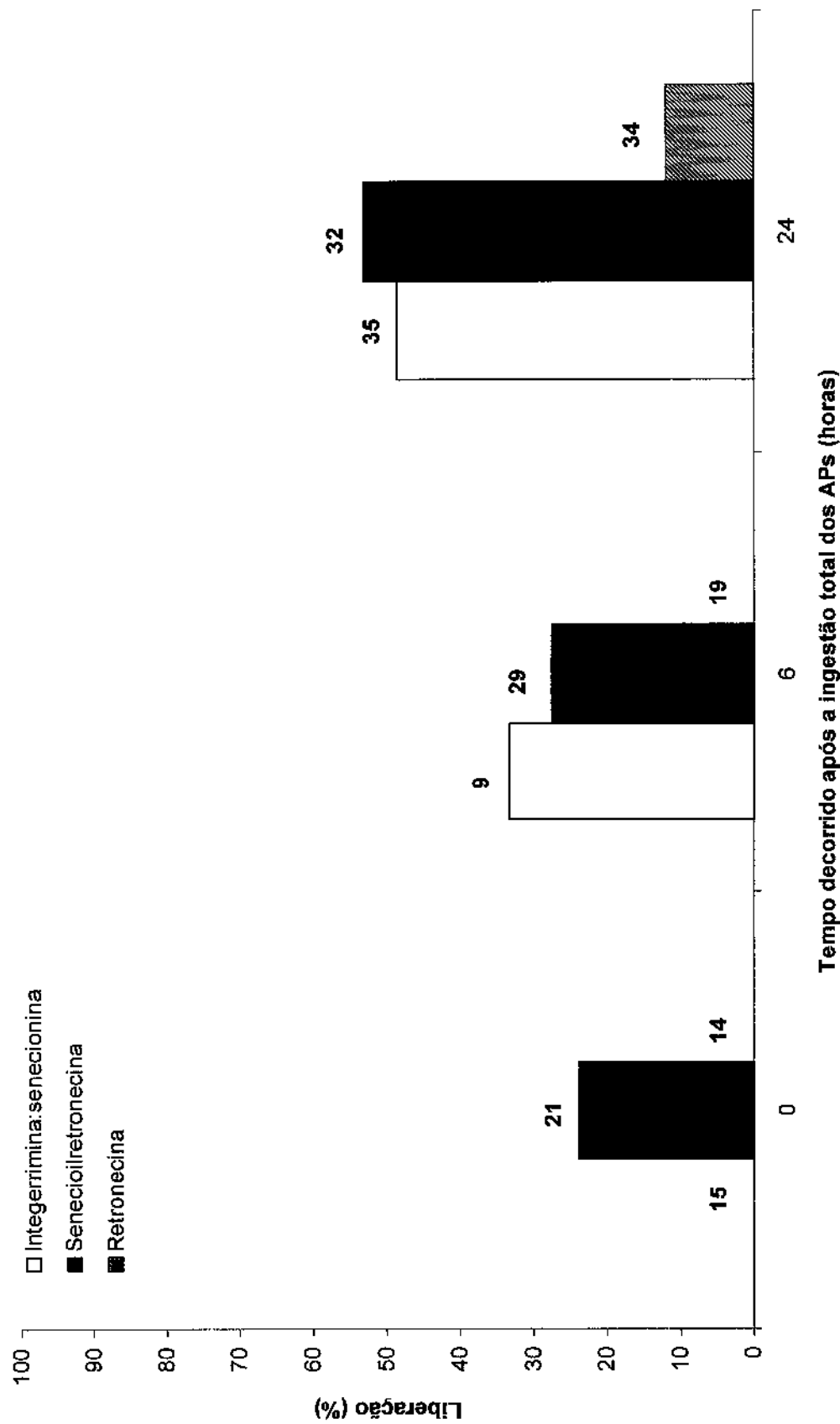


Figura 11. Atividade anti-predação contra *Nephila clavipes* vs dose de APs (μg de APs/mg do peso seco corpóreo) em borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas em laboratório e oferecidas após diferentes períodos de tempo às aranhas. Os números acima das barras correspondem ao número amostral de cada experimento.

2.3. Bioensaios com borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no campo

Todos os indivíduos de *Mechanitis polymnia* capturados no Complexo Botânico Monjolinho e testados em bioensaios com *Nephila clavipes*, tanto machos quanto fêmeas, foram liberados ilesos pelas aranhas.

2.4. Determinação de APs em borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no campo

Pela análise por CG-EM, verificou-se a presença majoritária de dois tipos de APs nas borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no Complexo Botânico Monjolinho, licopsamina (**15**) e intermedina (**16**) (Tabela 1). Em machos, a proporção entre os dois alcalóides foi 4:1 licopsamina:intermedina, e nas fêmeas esta proporção foi de 2,96:1, aproximadamente. O AP indicina (**17**) foi encontrado em uma única fêmea capturada no campo.

A análise colorimétrica das borboletas *Mechanitis polymnia* capturadas no campo mostrou que machos apresentaram uma quantidade média de APs totais significativamente maior do que as fêmeas capturadas no mesmo período e na mesma localidade (Tabela 12). A concentração de APs totais em machos também foi significativamente maior do que em fêmeas (Tabela 12).

3. Bioensaios com pintinhos *Gallus gallus*

3.1. Bioensaios com aplicação tópica de APs em organismos palatáveis

3.1.1. Experimentos com um único oferecimento

Todas as presas tratadas com a concentração mais baixa da base livre e do N-óxido da integerrimina:senecionina ($9,94 \times 10^{-4}$ μ moles/mg) foram predadas pelos pintinhos (Figura 12). Esta concentração é equivalente à oferecida a *Nephila clavipes* onde 80% das presas tratadas com integerrimina:senecionina base livre (**10** e **11**) e 100% daquelas tratadas com integerrimina:senecionina N-óxido foram liberadas. Nas demais concentrações, poucas presas foram liberadas (Figura 12) e a diferença no número de presas liberadas com as formas base livre e N-óxido da integerrimina:senecionina não foi significativa ($G_1=2,53$; $p=0,111$). Houve um aumento significativo na liberação das presas pelos pintinhos conforme se aumentou a concentração de APs (Tabela 13).

A base livre do monoéster seneciolretronecina (**14**) foi muito pouco efetiva contra predação por *Gallus gallus*, mas também este AP apresentou uma relação significativa entre a concentração e a resposta anti-predação contra pintinhos (Tabela 13). O N-óxido da seneciolretronecina não provocou a liberação de nenhuma das presas oferecidas aos pintinhos, seja em quaisquer das concentrações testadas (Figura 12).

A retronecina base livre (**3**) também foi pouco efetiva contra predação por *Gallus gallus*. Apenas 35% das presas tratadas com a concentração mais alta do alcalóide foram liberadas (Figura 12). Também com a retronecina houve um efeito significativo do aumento da concentração sobre a resposta dos pintinhos (Tabela 13). O N-óxido da retronecina foi totalmente ineficaz contra predação por *Gallus gallus*.

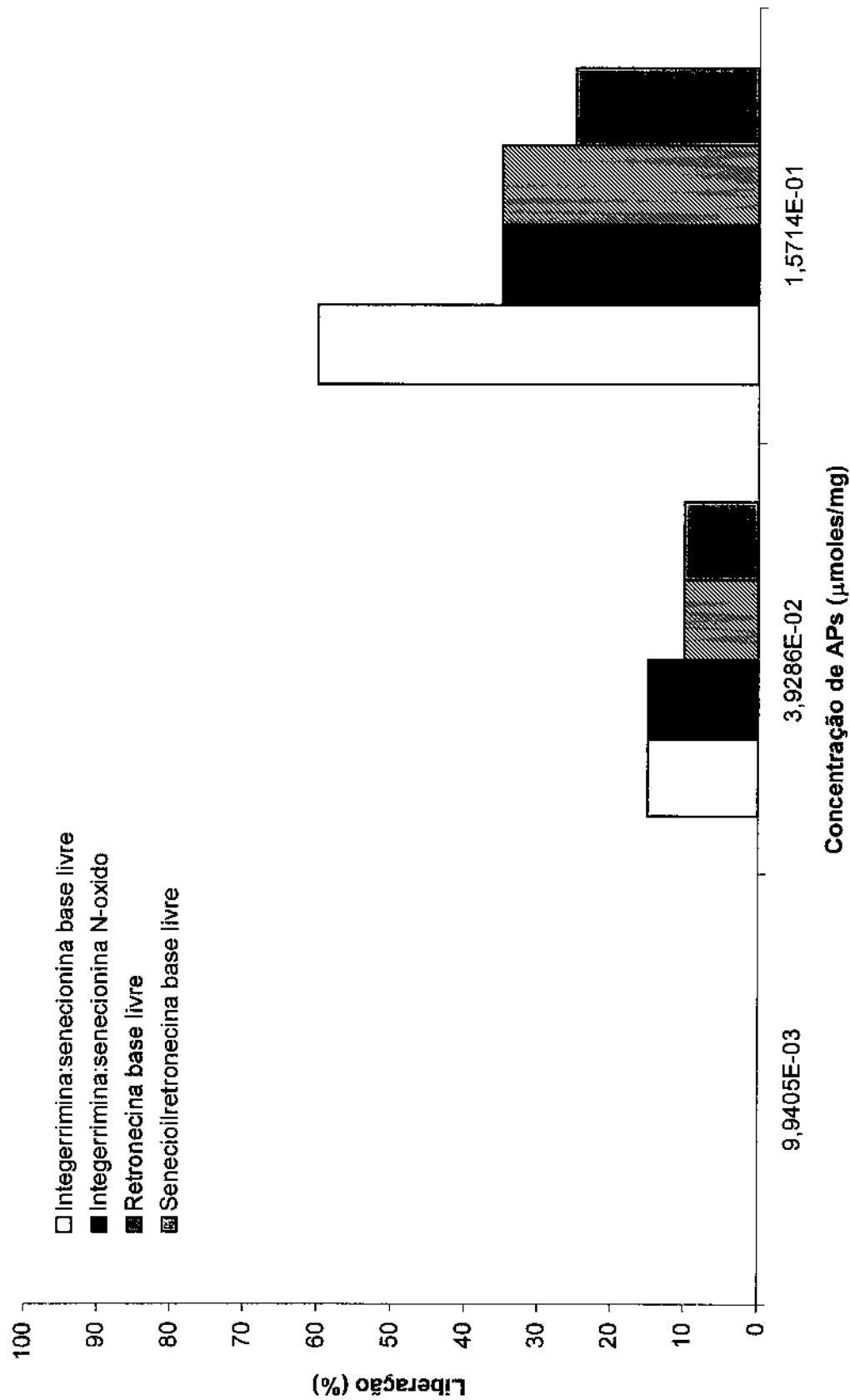


Figura 12. Atividade anti-predação contra pintinhos *Gallus gallus* vs dose de APs aplicados topicamente em larvas de *Chrysomya putoria* e oferecidos aos pintinhos. n=20 para cada concentração.

Tabela 13. Regressão logística para determinação do efeito da concentração de APs nas presas sobre a resposta de pintinhos *Gallus gallus*.

Alcalóides pirrolizidínicos	ρ^2	LL	G	Graus de liberdade	p
Integerrimina:senecionina base livre (10 e 11)	0,31	-33,74	20,96	1	<0,001
Integerrimina:senecionina N-óxido	0,15	-27,03	8,05	1	0,004
Senecioilretronecina base livre (14)	0,13	-21,61	5,62	1	0,018
Retronecina base livre (3)	0,19	-25,36	9,88	1	0,001

3.2. Experimentos com oferecimentos seqüenciais

Os pintinhos reduziram a predação das presas tratadas com integerrimina:senecionina base livre (**10** e **11**) ao longo do experimento de oferecimentos seqüenciais (Figura 13). Quando oferecida a primeira larva com o AP, 40% dos pintinhos liberaram as presas (como definido para os bioensaios de aplicação tópica de APs em presas palatáveis). Com o N-óxido o comportamento dos pintinhos foi similar (Figura 14). Em ambos os experimentos a porcentagem de liberação aumentou e 100% das larvas foram liberadas na 4ª apresentação, sendo que aproximadamente 30% destas nem foram tocadas.

Os pintinhos continuaram predando as larvas tratadas com o AP senecioilretronecina base livre (**14**) ao longo de todo o experimento, com exceção de um indivíduo que bicou e soltou viva (BS) as duas últimas presas tratadas com o AP. As larvas tratadas com a forma N-óxido da senecioilretronecina foram predadas ao longo de todo o experimento de aprendizado.

A retronecina base livre (**3**) provocou a mesma resposta da senecioilretronecina base livre (**14**). A maior porcentagem de liberação foi de 20% em relação à 3ª larva apresentada. Com o N-óxido, nenhuma das larvas tratadas foram liberadas ao longo do experimento.

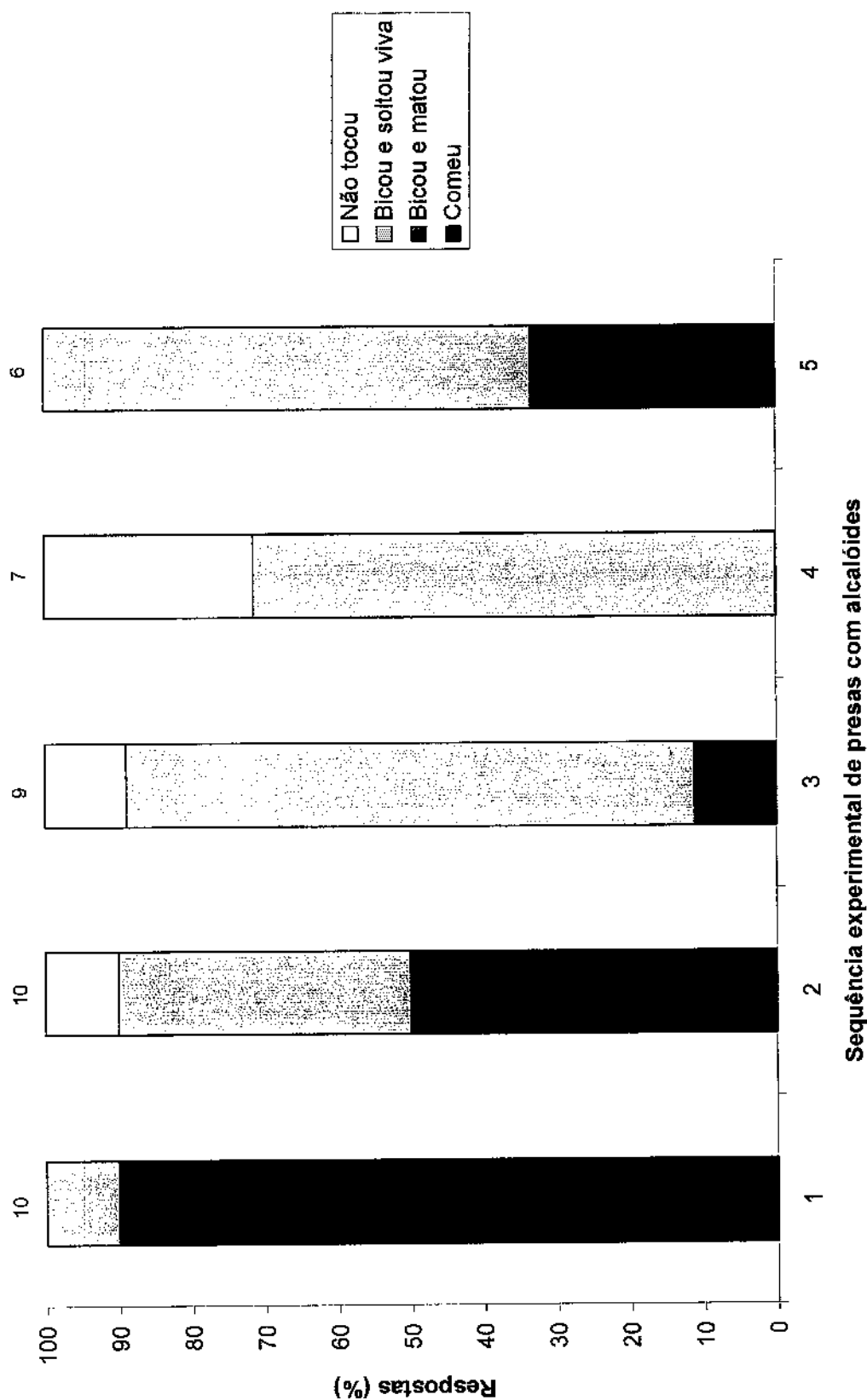


Figura 13. Respostas dos pintinhos *Gallus gallus* a presas tratadas com integrerrimina: senecionina base livre (10 e 11) oferecidas sequencialmente. Números acima das barras indicam o número de indivíduos testados.

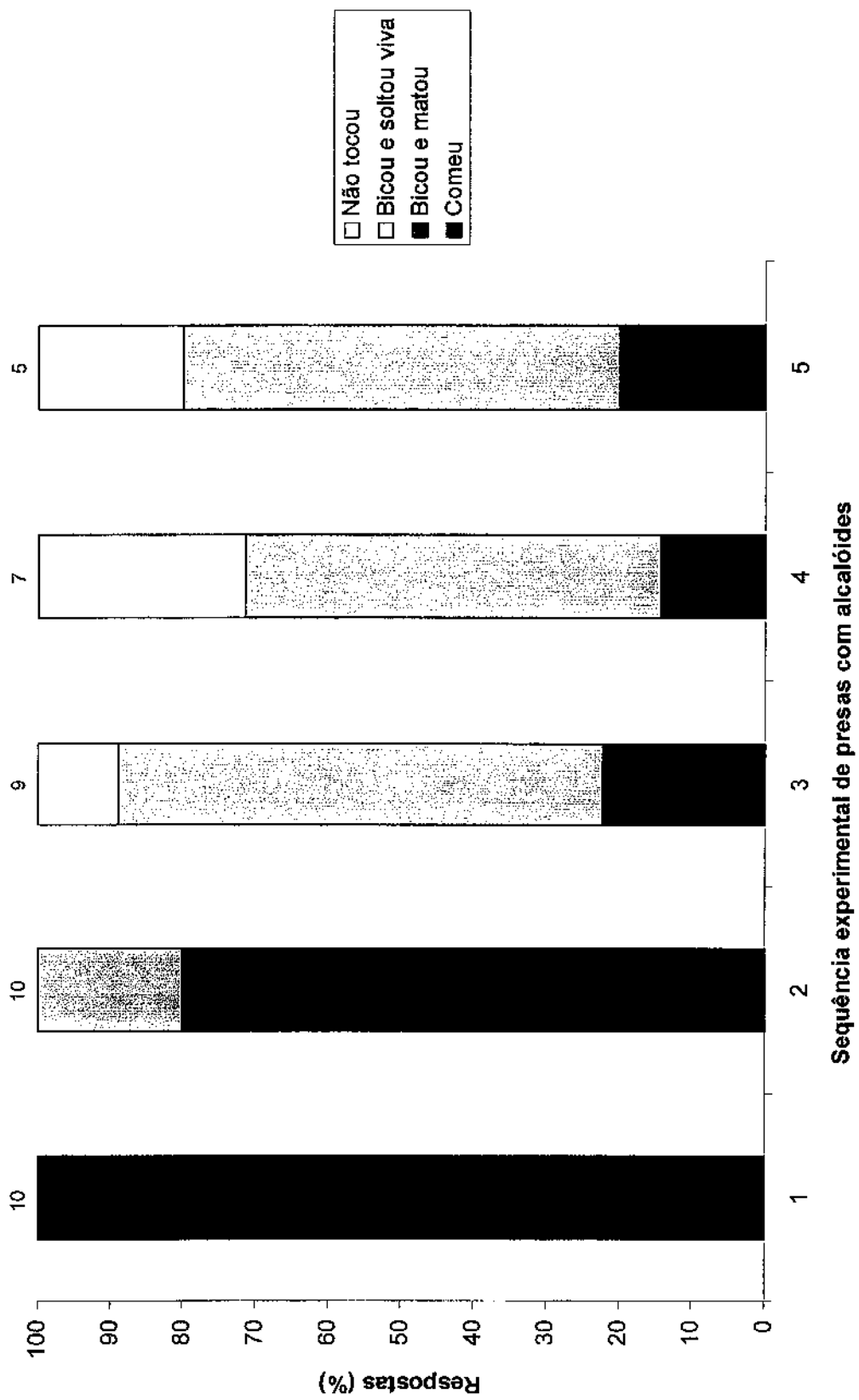


Figura 14. Respostas dos pintinhos *Gallus gallus* a presas tratadas com integerrimina:seneconina N-óxido oferecidas sequencialmente. Números acima das barras indicam o número de indivíduos testados.

DISCUSSÃO

1. Estrutura de APs vs atividade anti-predação

Base livre vs N-óxido

Os resultados mostrando que o N-óxido da mistura do macrocíclico integerrimina:senecionina (**10** e **11**) é mais efetivo na ação anti-predação contra *Nephila clavipes* do que sua respectiva base livre foram consistentes com aqueles obtidos por Trigo e Chemin (1996). A maior atividade do N-óxido dos APs também foi demonstrada em outros trabalhos. Dreyer *et al.* (1985) encontraram que o N-óxido da senecionina (**11**) aplicado na dieta é 1,7 vezes mais deterrente do que a respectiva base livre contra os afídeos *Acyrtosiphon pisum*, enquanto que a monocrotalina (**19**) provocou uma resposta inversa. Dussourd *et al.* (1988), por sua vez, testaram a base livre e o N-óxido do AP monocrotalina (**19**), pincelando-o em ovos de *Utetheisa ornatrix* e oferecendo estes a besouros *Coleomegilla maculata* (Coccinellidae). Esses autores encontraram que ambas as formas detêm a predação pelo coleóptero, no entanto, o N-óxido é mais ativo. Hare e Eisner (1993), num estudo com os mesmos APs, obtiveram resultados semelhantes contra as formigas *Leptothorax longispinosus*. Além disto, formigas que tiveram um contato prévio com ovos tratados com o N-óxido da monocrotalina (**19**) predaram menos ovos sem APs, em testes subseqüentes, do que aquelas formigas que não tiveram contato com esta substância.

Com base nestes resultados, pode-se sugerir dois cenários: 1. que o N-óxido dos APs pode ter sido selecionado por pressões relacionadas à proteção contra predadores ou 2. que os predadores evoluíram características que lhes conferem uma maior sensibilidade a APs N-óxidos, que é a forma que ocorre mais freqüentemente na natureza (Hartmann e Witte 1995).

Ehmke *et al.* (1991) fornecem uma possível evidência da seleção do N-óxido por pressões de predação. Eles encontraram que o AP senecionina N-óxido substituiu completamente a produção de outras toxinas, como cardenolidas, nas secreções defensivas do crisomelídeo *Oreina cacaliae*. Além disto, os APs N-óxidos oferecem a

estes besouros uma melhor proteção do que as cardenolidas contra predação por *Agelaus phoeniceus* (Icteridae) (Rowell-Rahier *et al.* 1995).

A presença dos APs como N-óxidos em plantas (Hartmann e Witte 1995) e insetos, como mariposas Arctiidae (Ehmke *et al.* 1990, Hartmann *et al.* 1990, Trigo *et al.* 1993), borboletas Ithomiinae (Trigo *et al.* 1996, Brückmann *et al.* 2000), Orthoptera (Biller *et al.* 1994) e besouros Chrysomelidae (Pasteels *et al.* 1988, Ehmke *et al.* 1991, Hartmann *et al.* 1997, 1999) pode ser uma evidência do segundo cenário sugerido. A presença preferencial desta forma é devida principalmente ao seu papel fisiológico.

Tanto a base livre quanto o N-óxido dos APs são tóxicos para vertebrados (Culvenor *et al.* 1976) e genotóxicos para insetos como *Drosophila melanogaster* (Frei *et al.* 1992). No entanto, a base livre se mostrou mais hepatotóxica e genotóxica do que a forma N-oxidada correspondente dos APs, devido aos seus produtos pirrólicos intermediários (desidropirrolizinas) serem altamente tóxicos, embora a metodologia aplicada nestes trabalhos não considere a redução dos APs no trato gastro-intestinal. Mattocks (1971) encontrou que a toxicidade do N-óxido é da mesma ordem que a toxicidade provocada pela base livre quando as duas formas são oferecidas oralmente a ratos, como uma consequência da redução do alcalóide. Hartmann (1999) sugere que, para animais vertebrados, a N-oxidação parece ser um mecanismo de desintoxicação pelo qual o AP terciário potencialmente tóxico é convertido em um derivado menos tóxico. Por exemplo, porquinhos da índia possuem uma enzima multisubstrato microsomal flavina oxigenase (FMO) que catalisa eficientemente a conversão dos APs ingeridos em seus N-óxidos, os quais seriam excretados e não transformados no pirrol tóxico, o que explicaria a alta resistência destes animais ao envenenamento por APs (Miranda *et al.* 1991). Da mesma forma, para os insetos especializados no seqüestro de APs, a N-oxidação parece ser uma adaptação para transformar os APs em um estado metabólico seguro e não-tóxico, que poderia ser eficientemente acumulado em vacúolos sem se transformarem em desidropirrolizinas. Entretanto, nada se sabe sobre os mecanismos de toxicidade de APs em insetos e é interessante notar que desidropirrolizinas são biossintetizadas em Lepidópteros especialistas, a partir de APs 1,2 insaturados, e funcionam como feromônios sexuais (Schulz 1998).

Lindigkeit *et al.* (1997) e Hartmann (1999) discutem que o papel único de APs na proteção química de insetos pode ser devido justamente ao fato de que eles coexistem em duas formas “intermutáveis” – base livre e N-óxido. O N-óxido é facilmente reduzido no intestino de insetos não adaptados ao seqüestro de APs, de forma que a N-oxidação não é apenas um mecanismo eficiente de desintoxicação, mas também oferece ao organismo que seqüestra APs um metabólito seguro para ele, e uma toxina eficiente contra organismos não adaptados ao seqüestro.

Desta forma, a forma N-óxido dos APs pode ter evoluído unicamente por pressões fisiológicas de desintoxicação, e por este motivo é a forma mais encontrada em insetos. Predadores em geral estão, assim, mais sujeitos a encontrar insetos com a forma N-óxido dos APs em seus tecidos. Predadores envolvidos com insetos com APs podem realmente ter evoluído receptores no sentido de melhor evitar estas presas.

A proteção química não é de qualquer forma absoluta, e depende tanto da dose quanto do predador em questão. Diferente do encontrado nos ensaios com *Nephila clavipes*, pintinhos não apresentaram diferenças significativas em suas respostas às formas base livre e N-óxido da integerrimina:senecionina (**10** e **11**) (Figura 13). Glendinning *et al.* (1990) obtiveram resultados similares com o AP monocrotalina (**19**) testando-o contra três espécies de pequenos roedores no México (*Peromyscus melanotis*, *P. aztecus* e *Reithrodontomys sumichrasti*). Além de não encontrarem diferenças entre a base livre e o N-óxido, o AP foi pouco efetivo contra predação. No entanto, Glendinning *et al.* (1990) mostraram que a forma base livre da monocrotalina (**19**) tem um impacto negativo, dose-dependente, sobre o crescimento de *P. aztecus*.

A reduzida eficácia da integerrimina:senecionina (**10** e **11**) na proteção das presas contra pintinhos inexperientes se alterou com o oferecimento seqüencial de presas (Figuras 14 e 15). As duas formas deste AP não foram tão efetivas contra predação por *Gallus gallus* na primeira experiência de encontro, como o foram contra *Nephila clavipes*, mas se tornaram mais efetivas em encontros subseqüentes. Desta forma, pode-se inferir que o aprendizado pode tornar os APs muito mais eficientes na proteção de presas facilmente reconhecíveis.

Este tipo de característica dos APs está relacionado ao fato de que insetos os seqüestram geralmente apresentam coloração aposemática e estão envolvidos em complexos miméticos (Boppré 1986). Além disto, pode ser considerada uma evidência

da evolução destes caracteres por pressões de predadores visualmente orientados, embora pintinhos não tenham exercido pressões neste sistema.

Diferente do AP macrocíclico, a base livre e o N-óxido da senecioldretronecina (**14**) apresentaram atividade similar contra predação por *Nephila clavipes*. Contra pintinhos, a base livre foi visivelmente mais efetiva. A estrutura dos APs pode ser a responsável pelas diferenças entre bases livres e N-óxidos em APs macrocíclicos e monoésteres. A presença do oxigênio ligado ao nitrogênio na posição 4 pode estar conferindo à molécula de ambos os tipos de APs uma maior liberdade para novos estados conformacionais, além de um maior número de novos elétrons livres. Isto parece conferir uma vantagem para os APs macrocíclicos, como a integerrimina:senecionina (**10** e **11**), pois a forma N-óxido foi mais efetiva contra predação do que a forma base livre, porém, para os monoésteres, a N-oxidação pode não estar influenciando na conformação da molécula, não alternando sua atividade em relação à base livre.

Macrocíclicos com base necina retronecina (3**) vs macrocíclicos com otonecina (**5**)**

Nada se sabe sobre a incorporação da senquirquina (**13**) por insetos, um AP macrocíclico que não forma N-óxido e apresenta como base necina a otonecina (**5**) com um grupo N-metil ao invés da retronecina (**3**) (Hartmann e Witte 1995). Seu papel na defesa de insetos ainda é incerto, e nos ensaios desenvolvidos neste trabalho, a senquirquina (**13**) foi menos efetiva em deter *Nephila clavipes* do que a base livre e o N-óxido da integerrimina:senecionina (**10** e **11**). No entanto, Frei *et al.* (1992) em ensaios com *Drosophila melanogaster*, mostraram que a senquirquina (**13**) é um genotóxico mais forte do que a senecionina (**10**). Hartmann e Dierich (1998) sugerem que a diversidade de estruturas formadas a partir da senecionina N-óxido, como é o caso da senquirquina (**13**), possivelmente aumenta o sucesso em escapar de herbivoria local através da geração de conjuntos de APs mais deterrentes ou impalatáveis. Em mamíferos, por exemplo, os APs com base otonecina (**5**) N-metilada podem ser demetilados e então convertidos nos mesmos metabólitos pirrólicos dos APs com retronecina como base necina (Frei *et al.* 1992). Além disto, a senquirquina (**13**), com estrutura parecida aos macrocíclicos integerrimina:senecionina (**10** e **11**), pode

apresentar uma polaridade e atividade similares. Seriam necessários ensaios adicionais com este AP para testar sua toxicidade e impalatabilidade contra predadores vertebrados e invertebrados e melhor entender seu papel na defesa química de insetos em relação ao AP a partir do qual ele é biossintetizado em plantas.

Monoésteres vs macrocíclicos

A base livre do monoéster senecioldretronecina (**14**) foi tão efetiva quanto o seu N-óxido em relação a atividade antipredação por *Nephila clavipes* e *Gallus gallus*, ao contrário da atividade observada para N-óxido e base livre do macrocíclico integerrimina:senecionina (**10** e **11**). Além disto, os monoésteres apresentaram uma menor atividade que o N-óxido da integerrimina:senecionina. Culvenor *et al.* (1976) e Frei *et al.* (1992) demonstraram que os APs macrocíclicos são mais hepatotóxicos e genotóxicos do que os APs monoésteres. Estas diferenças entre macrocíclicos e monoésteres podem ser entendidas através das características das suas estruturas (Figura 1). Diésteres macrocíclicos apresentam duas funções ésteres em anel na sua estrutura, enquanto que APs monoésteres apresentam apenas uma função éster em uma estrutura aberta. A presença de duas funções ésteres aumenta o número de sítios oxigenados que poderiam se coordenar a receptores específicos de reconhecimento de APs. Além disto, a conformação dos macrocíclicos apresentaria um menor grau de liberdade do que a conformação de monoésteres. Essa característica também poderia estar favorecendo uma maior especificidade desses alcalóides em relação a receptores de reconhecimento de APs.

Os APs monoéster e macrocíclico apresentaram a mesma atividade contra *Nephila clavipes* quando oferecidos a borboletas *Mechanitis polymnia*, embora a senecioldretronecina (**14**) tenha apresentado atividade imediatamente após ser ingerido pelas borboletas. Além disto, as borboletas foram significativamente mais liberadas quando congeladas 24 após a ingestão dos APs do que aquelas borboletas alimentadas com retronecina (**3**). A atividade semelhante dos dois tipos de APs contraria a hipótese de que a melhor eficiência destas borboletas na metabolização de APs monoésteres poderia influenciar na sua proteção química (Brückmann *et al.* 2000). Brückmann *et al.* (2000) verificaram que adultos capturados no campo de *Mechanitis polymnia* alimentados com [¹⁴C]-senecionina base livre (**11**), após 24 horas

transformam parte do AP em N-óxido e parte em metabólitos mais polares desconhecidos. Quando alimentados com [^3H]-9-O-senecioldretronecina base livre (14) transformam este alcalóide principalmente nos metabólitos mais polares desconhecidos. Estes metabólitos mais polares foram encontrados em *Oreina cacaliae* e identificados como um glicosídeo de APs por Hartmann *et al.* (1999), que consideraram tais compostos produtos de desintoxicação. Uma outra hipótese é que estes metabólitos mais polares poderiam estar depositados no integumento dos insetos, aumentando sua proteção contra predadores. Uma forma de avaliar o papel da metabolização dos APs na defesa química de insetos seria purificar os metabólitos e testá-los individualmente contra predadores vertebrados e invertebrados.

Base necina

As duas formas da retronecina (3) foram pouco efetivas contra predação por *Nephila clavipes* e *Gallus gallus*, sendo que o N-óxido foi totalmente ineficaz contra a predação por pintinhos (Figura 13). Além disto, borboletas *Mechanitis polymnia* foram mais predadas por *Nephila clavipes* quando alimentadas com a retronecina (3). Dreyer *et al.* (1985) encontraram que a retronecina (3) também é inefetiva na deterrência de afídeos e sugerem que o ácido nécico esterificante seria necessário para a atividade biológica do AP. A ação anti-predação pode ser, na verdade, devida à função éster do ácido associada à dupla ligação do anel pirrolizidínico da base necina. Uma evidência sobre a possível importância desta associação é que o ácido integerrimínico:senécico (6 e 7) não apresentou atividade quando testado sozinho contra *Nephila clavipes* neste trabalho. Além disto, lepidópteros especializados no seqüestro de APs têm a capacidade de produzir seus próprios APs específicos pela ligação entre a base necina proveniente da planta (provavelmente formada pela hidrólise dos alcalóides esterificados nos insetos) e um ácido biossintetizado pelo próprio inseto, que possui a função éster. Uma hipótese para explicar a biossíntese de alcalóides específicos seria a otimização do uso de APs na defesa química contra predadores (Biller e Hartmann 1992, Trigo e Chemin 1996). Assim, o custo metabólico envolvido na obtenção da retronecina (3), que tem uma ação anti-predação pouco efetiva, poderia ser compensada pela síntese de APs específicos, como a calimorfina (22), que efetivamente protegeria o inseto contra predação. Nos ensaios desenvolvidos neste

trabalho, a calimorfina (**22**) apresentou uma maior atividade contra *Nephila clavipes* do que a base necina (Figura 11). Seria importante testar a forma N-óxido deste AP, pois os APs de insetos são encontrados exclusivamente como N-óxidos (Hartmann e Witte 1995).

2. Concentração vs atividade anti-predação de APs

Para todos os APs testados neste trabalho houve uma relação significativa entre a concentração e a atividade anti-predação, de tal forma que as concentrações mais altas provocaram uma maior porcentagem de liberação das presas pelas aranhas e pelos pintinhos.

Sabe-se que dentro de qualquer população ou espécie de insetos impalatáveis, pode haver uma variação no grau de palatabilidade (Brower *et al.* 1968, Bowers 1981). Para aqueles insetos que seqüestram compostos de defesa da planta hospedeira, o conteúdo de compostos da planta em que o inseto se alimenta pode ser um determinante crítico do grau de proteção alcançado (Ritland 1994). Por exemplo, assim como se encontrou neste estudo, Trigo e Brown (1990) determinaram que borboletas *Mechanitis polymnia* apresentam uma grande variação na quantidade de APs. Esta grande variação se deve, provavelmente, a utilização de fontes quimicamente diversificadas de alcalóides pelas borboletas. Um outro fato que pode afetar a concentração de APs é a idade do indivíduo, que não foi considerada nas análises realizadas neste estudo. Indivíduos mais velhos poderiam ter visitado um maior número de fontes de APs do que aqueles mais jovens, resultando em maiores quantidades de APs. Trigo e Brown (1990) sugerem que a dinâmica aquisição/utilização pode ser a responsável por esta variação. Machos apresentariam um aumento de APs conforme se aumentassem as fontes de APs disponíveis. Desta forma, machos podem estocar e utilizar APs nos períodos de aumento de fontes de alcalóides, mantendo um balanço positivo, e somente utilizá-los nos períodos de declínio, com um balanço negativo. Isto porque principalmente os machos de *Mechanitis polymnia*, como na maioria dos Ithomiíneos, visitam plantas fontes de APs e praticamente todo o AP das fêmeas é obtido dos machos durante o acasalamento (Pliske 1975a, b, Pliske *et al.* 1976). Embora não se tenham dados sobre *Mechanitis polymnia*, em *Utetheisa ornatrix* sabe-se que as fêmeas, na natureza, freqüentemente se acasalam repetidamente (Pease

1968), podendo desta forma obter mais APs (Dussourd *et al.* 1988). Da mesma forma, fêmeas do ithomiíneo *Ithomia drymo* podem acasalar repetidas vezes. Ehrlich e Ehrlich (1978) encontraram até oito espermatóforos nas fêmeas desta espécie. Se assim for com *Mechanitis polymnia*, os APs nas fêmeas podem ser provenientes de vários machos, podendo aumentar com a quantidade de encontros.

Esta variação química produz dentro de uma população de insetos impalatáveis um espectro de palatabilidade (Brower *et al.* 1968). Quando existem indivíduos realmente palatáveis, pode existir automimetismo (Brower *et al.* 1967), em que insetos mais palatáveis são mímicos batesianos perfeitos dos membros mais impalatáveis de sua própria espécie. Isto resulta num tipo de altruísmo em que os indivíduos palatáveis se beneficiam da associação com os mais impalatáveis do espectro.

Nephila clavipes, assim como outros predadores, pode experimentar várias presas individuais potenciais e rejeitar as menos palatáveis. Nestes casos, a variação na quantidade dos químicos de defesa pode determinar que indivíduos serão mortos e comidos e quais serão liberados ilesos. Estes predadores podem, então, agir como agentes seletivos da variação química individual. Os resultados obtidos neste trabalho, por exemplo, mostraram que as presas com menor quantidade de APs foram relativamente mais predadas do que aquelas tratadas com as concentrações mais altas.

Brown (1987) determinou a quantidade e a concentração de APs em 41 espécies de borboletas Ithomiinae no campo (Apêndice 6). Destas, 36 apresentaram uma quantidade média de APs maior do que a necessária para incitar 100% de liberação das presas por *Nephila clavipes*. As quantidades dos APs integerrimina:senecionina base livre (**10** e **11**) e N-óxido que tornaram as presas totalmente impalatáveis para *Nephila clavipes* equivale a 224 e 234,5 µg de AP/presa, ou 13,17 e 13,79 µg/mg, respectivamente. Além disto, praticamente todas as borboletas estudadas apresentaram uma concentração de APs maior do que a DLib₅₀ determinada para estes APs (Tabela 9). Desta forma, pode-se inferir que quase todas as borboletas Ithomiinae no campo estão protegidas contra predação por *Nephila clavipes*, embora em sua totalidade estas borboletas apresentem uma mistura de APs de estrutura diferente da integerrimina:senecionina (**10** e **11**), geralmente uma mistura de intermedina (**16**) e licopsamina (**15**) (Trigo *et al.* 1996a). Os dados de Vasconcellos-Neto e Lewinsohn (1984) mostram claramente que borboletas Ithomiinae encontradas no campo são

rejeitadas por estas aranhas. Se, como foi discutido acima, *Nephila clavipes* podem agir como agentes seletivos do conteúdo individual de químicos de defesa em borboletas, pode-se considerar que aquelas borboletas que são predadas estão no limite inferior da palatabilidade daquela espécie.

Além disto, a quantidade de APs necessária para incitar 100% de liberação em *Nephila clavipes* corresponde a aproximadamente 30% do conteúdo de APs totais determinado em *Mechanitis polymnia* capturadas no campo (Tabela 13). Estes dados devem ser interpretados com cautela, já que os APs testados contra *Nephila clavipes* estavam todos concentrados na cutícula das abelhas, enquanto que nas borboletas, em condições naturais, os APs estão distribuídos internamente, em várias partes do corpo. Por exemplo, a maior concentração de APs em borboletas Ithomiinae se encontra na cutícula do abdômen e do tórax, bem como nos pincéis de pêlo (Brown 1984). Brower e Glazier (1975) e Brower *et al.* (1988) encontraram que a concentração de cardenolidas em borboletas Monarca é maior nas asas, intermediária no abdômen e menor no tórax.

Por outro lado, os dados sugerem que a quantidade de APs necessária para escapar da predação por *Nephila clavipes* é bastante baixa. O excesso de APs encontrado em borboletas no campo (ver Brown 1984, 1985 e 1987) estaria relacionado a outras funções, tais como síntese de feromônios e doação para a fêmea durante o acasalamento, em machos, e transferência para os ovos, em fêmeas (Trigo e Brown 1990). Além disto, APs poderiam servir como uma reserva de nitrogênio para borboletas no campo, embora nada se saiba sobre o papel nutricional de APs. Ainda, os APs poderiam proporcionar defesa contra predadores vertebrados, pois, como foi observado neste trabalho, a quantidade de APs necessária para estimular rejeição em pintinhos é extremamente alta em relação à *Nephila clavipes*.

A maior concentração de APs utilizada neste trabalho contra pintinhos, 1,32 μ moles, equivale a aproximadamente 442 μ g/presa de integerrimina:senecionina base livre (10 e 11). Este valor corresponde a pouco menos da metade da concentração de monocrotalina (19) usada por Cardoso (1997) em bioensaios com o pássaro *Coryphospingus pileatus* (Fringillidae). Este pássaro rejeitou mais que 84% das presas pinceladas com esta concentração de monocrotalina (19), bem superior às porcentagens de liberação por *Gallus gallus* encontradas neste trabalho. No entanto,

pintinhos não são aves insetívoras especializadas na captura de borboletas, e são muito menos sensíveis a substâncias químicas impalatáveis.

O comportamento de predação em pintinhos pode ser responsável pela menor sensibilidade a concentrações bastante baixas de APs. Eles tocam as presas unicamente com os bicos, que aparentemente têm uma sensibilidade limitada, enquanto que aranhas *Nephila clavipes* tocam a presa detalhadamente com os pedipalpos e os primeiros pares de patas antes de ingeri-la. De acordo com Kassarov (1999), um químico deterrente só poderá provocar rejeição nas aves se alcançar seus botões gustativos na mucosa epitelial não-cornificada, ausentes na ponta do bico. Neste caso, a quantidade de APs presente na superfície dos modelos de presas palatáveis utilizados (larvas de *Chrysomya putoria*) seria insuficiente para estimular os poucos botões gustativos presentes nos bicos dos pintinhos, de forma que sua primeira opção seria engolir a presa inteira. No entanto, após contatos anteriores com presas tratadas com APs, estes botões gustativos poderiam ser estimulados, e presas oferecidas na sequência seriam, desta forma, evitadas, como foi observado nos ensaios com oferecimento sequencial de presas com APs.

3. Os modelos de predadores invertebrados e vertebrados

Trabalhos cuja proposta é demonstrar o papel de compostos químicos na defesa contra predação normalmente utilizam predadores vertebrados como modelos, tais como aves e lagartos, já que estes, por serem visualmente orientados, são considerados os principais agentes seletivos da coloração de advertência e impalatabilidade em insetos. Pintinhos, embora não sejam predadores naturais de borboletas, são predadores generalistas de fácil manipulação e que podem ser mantidos em grande número em laboratório. Este talvez seja o principal motivo de terem sido usados em vários trabalhos sobre aposematismo e aprendizado (Gamberale e Sillén-Tullberg 1996, Gittleman *et al.* 1980, Roper 1994, Roper e Wistow 1986, Roper e Redston 1987, Roper e Cook 1989, Roper e Marples 1997, Schuler e Hesse 1985). Neste trabalho, por exemplo, se pôde testar os APs anteriormente experimentados contra *Nephila clavipes* com rapidez, obtendo-se resultados bastante interessantes sobre a eficiência destes químicos contra um predador vertebrado. Ainda não havia

nenhum trabalho que tivesse testado sistematicamente a estrutura e a concentração de APs na resposta anti-predação contra este tipo de predador.

Por outro lado, predadores invertebrados, tais como mantídeos, são capazes de distinguir espécies de presas impalatáveis (Berenbaum e Miluczky 1984). Outros predadores invertebrados já serviram como modelos para avaliar defesas químicas. Formigas, por exemplo, foram utilizadas como modelos para testar a ação anti-predação de APs em ovos e adultos de *Utetheisa ornatrix* (Hare e Eisner 1993, González *et al.* 1999) e para testar os extratos de larvas de borboletas *Dione juno* e *Abanante lylome* (Nymphalidae) (Osborn e Jaffe 1998). Coleópteros e neurópteros também foram utilizados como modelos para testar a ação de APs em ovos de *Utetheisa ornatrix* (Dussourd *et al.* 1988, Eisner *et al.* 2000). Aranhas *Lycosa ceratiola*, por sua vez, foram usadas para testar a impalatabilidade conferida por APs a larvas e adultos de *Utetheisa ornatrix* (Eisner e Eisner 1991).

Outros trabalhos já demonstraram que a aranha *Nephila clavipes* é bastante apropriada como modelo de predador invertebrado nos testes de palatabilidade de lepidópteros e de seus extratos químicos (Brown 1984, 1985, 1987, Vasconcellos-Neto e Lewinsohn 1984, Master 1990, Trigo 1993, Trigo e Chemin 1996). Brown (1984) afirma que *Nephila clavipes*, por estar entre os predadores potenciais de insetos voadores mais abundantes, efetivos e vorazes em Campinas e através de boa parte dos trópicos, pode ser considerada de muita importância na evolução de mecanismos de defesa em Ithomiinae. Normalmente, se encontram restos de borboletas nas teias de *Nephila clavipes* nos meses em que estas ocorrem, o que confirma que estas aranhas podem ter exercido alguma pressão seletiva para a evolução da proteção por APs, já que, como se determinou neste trabalho, *Nephila clavipes* são extremamente sensíveis até a baixas doses de APs presentes nos tecidos. Trigo *et al.* (1996a), no entanto, afirmam que há poucas evidências de que *Nephila clavipes* tenha exercido uma pressão seletiva importante ou única para a aquisição inicial de APs por insetos. Isto porque aranhas não são predadores visualmente orientados – a discriminação de borboletas Ithomiinae, por exemplo, não tem qualquer componente visual (Vasconcellos-Neto e Lewinsohn 1984). Desta forma, a evolução do aposematismo em borboletas Ithomiinae e Danainae não deve ter acontecido unicamente por pressões seletivas destas aranhas, mas por pressões de predação de outros predadores

visualmente orientados. Aves, por exemplo, são capazes de discriminar borboletas *Ithomiinae* como impalatáveis (Brower e Brower 1964, Chai 1986). Além disto, Trigo *et al.* (1996a) sugerem que em alguns lugares, borboletas podem não ser significantes na dieta de *Nephila*. Assim, aranhas *Nephila clavipes* podem exercer um papel relativamente importante na manutenção de APs em locais onde existem muitas aranhas e muitas borboletas, no entanto, outros predadores vertebrados e invertebrados podem exercer uma pressão efetiva em muitas espécies de borboletas. No entanto, aranhas (*Nephila* e outras) podem ter promovido a sobrevivência de indivíduos que apresentam maiores concentrações de APs em partes superficiais do corpo.

CONCLUSÃO

Alcalóides pirrolizidínicos de estruturas diferentes apresentam uma atividade anti-predação diferente contra predadores vertebrados e invertebrados e o nível de proteção aumenta de acordo com a concentração destes alcalóides nas presas. As diferentes respostas dos predadores, um invertebrado e um vertebrado, usados neste trabalho, vêm corroborar a idéia de que nenhuma química de defesa é ótima, e que varia dependendo do predador em questão. De fato, as diferenças nas respostas apontam a importância da mistura de APs encontrada em insetos e plantas. Como borboletas, em situações naturais, podem estar sujeitas à predação tanto de predadores vertebrados quanto de invertebrados, uma mistura de APs pode otimizar a defesa química destes insetos contra variados tipos de predadores.

REFERÊNCIAS CITADAS

- Aplin, R.T., M.H. Benn e M. Rothschild. 1968. Poisonous alkaloids in the body tissues of the cinnabar moth (*Callimorpha jacobaeae* L.). *Nature*, 219:747-748.
- Aplin, R.T. e M. Rothschild. 1972. Poisonous alkaloids in the body tissues of the garden tiger moth (*Arctia caja* L.) and the cinnabar moth (*Tyria* (= *Callimorpha*) *jacobaeae* L.) (Lepidoptera). In: A. de Vries e K. Kochva (Eds.). *Toxins of animal and plant origin*. Gordon & Breach, London. pp. 579-595.
- Begossi, A. 1984. Hábitos alimentares e coloração de advertência em alguns alticídeos (Coleoptera:Chrysomelidae). Tese de Mestrado, IB, UNICAMP, Campinas, SP.
- Beiguelman, B. 1996. *Curso prático de bioestatística*. Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, SP. 242 p.
- Belt, T. 1874. *The naturalist in Nicaragua*. Univ. of Chicago Press, London. 403 p.
- Berenbaum, M.R. e E. Miliczky. 1984. Mantids and milkweed bugs: efficacy of aposematic coloration against invertebrate predators. *The American Midland Naturalist*, 111:64-68.
- Biller, A. e T. Hartmann. 1992. Conversion of plant-derived pyrrolizidine alkaloids into insect alkaloids. *Proceedings of 8th International Symposium of insect-plant relationship*, pp. 83-85.
- Biller, A., M. Boppré, L. Witte e T. Hartmann. 1994. Pyrrolizidine alkaloids in *Chromolaena odorata*. Chemical and chemoecological aspects. *Phytochemistry*, 35:615-619.
- Bingley, J.B. 1968. Solvent and temperature effects in the determination of pyrrolizidine alkaloids with 4-dimethylaminobenzaldehyde. *Analytical Chemistry*, 40:1166-1167.
- Birecka, H. e J.L. Catalmo. 1982. Incorporation of assimilated carbon into aminoalcohols of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry*, 21:2645-2651.
- Boppré, M. 1983. Leaf-scratching – a specialized behaviour of danaine butterflies (Lepidoptera) for gathering secondary plant substances. *Oecologia*, 59:414-416.
- Boppré, M. 1984. Redefining “pharmacophagy”. *Journal of Chemical Ecology*, 10:1151-1156.
- Boppré, M. 1986. Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften*, 73:17-26.

- Boppré, M. 1990. Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids. Exemplification of complexity in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 16:165-185.
- Boppré, M. e D. Schneider. 1985. Pyrrolizidine alkaloids quantitatively regulate both scent organ morphogenesis and pheromone biosynthesis in male *Cretonotos* moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Comparative Physiology A*, 157:569-577.
- Boppré, M. e D. Schneider. 1989. The biology of *Cretonotos* (Lepidoptera: Arctiidae) with special reference to the androconial system. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 96:339-356.
- Bowers, M.D. 1981. Unpalatability as a defense strategy of western checkerspot butterflies (*Euphydryas* Scudder, Nymphalidae). *Evolution*, 35:367-375.
- Bowers, M.D. 1983. The role of iridoid glycosides in host-plant specificity of checkerspot butterflies. *Journal of Chemical Ecology*, 9:475-493.
- Bowers, M.D. e S. Farley. 1990. The behaviour of grey jays, *Perisoreus canadensis*, towards palatable and unpalatable Lepidoptera. *Animal Behaviour*, 39:699-705.
- Brower, L.P. 1984. Chemical defense in butterflies. In: R.I. Vane-Wright e P.R. Ackery (Eds.). *The biology of butterflies*. Academic Press, NY. pp. 109-134.
- Brower, L.P. e J.V.Z. Brower. 1964. Birds, butterflies, and plant poisons: a study in ecological chemistry. *Zoologica*, 49:137-159.
- Brower, L.P., J.V.Z. Brower e J.M. Corvino. 1967. Plant poisons in a terrestrial food chain. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 57:893-898.
- Brower, L.P., W.N. Ryerson, L.L. Copping e S.C. Glazier. 1968. Ecological chemistry and the palatability spectrum. *Science*, 161:1349-1351.
- Brower, L.P. e S.C. Glazier. 1975. Localization of heart poisons in the monarch butterfly. *Science*, 188:19-25.
- Brower, L.P., C.J. Nelson, J.N. Seiber, L.S. Fink e C. Bond. 1988. Exaptation as an alternative to coevolution in the cardenolide-based chemical defense of monarch butterflies (*Danaus plexippus* L.) against avian predators. In: K.C. Spencer (ed.). *Chemical mediation of coevolution*. Academic Press, Inc., New York. pp. 447-475.
- Brown, K.S., Jr. 1984. Adult-obtained pyrrolizidine alkaloids defend Ithomiinae butterflies against a spider predator. *Nature*, 307:707-709.
- Brown, K.S., Jr. 1985. Chemical ecology of dehydropyrrolizidine alkaloids in adult Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 44:435-460.

- Brown, K.S., Jr. 1987. Chemistry at the Solanaceae/Ithomiinae interface. *Annals of Missouri Botanical Gardens*, 74:359-397.
- Brown, K.S. Jr. e J.R. Trigo. 1995. Ecological activities of the alkaloids. In: G. Cordell (Ed.). *The Alkaloids*. vol. 47, Academic Press, N.Y. pp. 227-356.
- Brückmann, M., J.R. Trigo, M.A. Foglio e T. Hartmann. 2000. Storage and metabolism of radioactively labeled pyrrolizidine alkaloids by butterflies and larvae of *Mechanitis polymnia* (Lepidoptera: Nymphalidae, Ithomiinae). *Chemoecology*, 10:25-32.
- Cardoso, M.Z. 1991. Defesa química por alcalóides pirrolizidínicos (PAs) em Lepidoptera: testes com um predador vertebrado. Tese de Mestrado, IB, UNICAMP, Campinas, SP.
- Cardoso, M. Z. 1997. Testing chemical defence based on pyrrolizidine alkaloids. *Animal Behaviour*, 54:985-991.
- Chai, P. 1986. Field observations and feeding experiments on the responses of rufous-tailed jacamars (*Galbula rufficauda*) to free-flying butterflies in tropical rainforest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 29:161-189.
- Culvenor, C.C.J. 1978. Pyrrolizidine alkaloids – occurrence and systematic importance in angiosperms. *Botaniska Notiser*, 131:473-486.
- Culvenor, C.C.J. e J.A. Edgar. 1972. Dihydropyrrolizidine secretions associated with coremata of *Utetheisa* moths (Family Arctiidae). *Experientia*, 28:627-628.
- Culvenor, C.C.J., J.A. Edgar, M.V. Jago, A. Outteridge, J.E. Peterson e L.W. Smith. 1976. Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chemical and Biological Interactions*, 12:299-324.
- Dicke, M. e M.W. Sabelis. 1988. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2:131-139.
- van den Dool, H. e P.D. Kratz. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, 11:463-471.
- Dussourd; D.E.; K. Ubik; S. Harvis, J. Resch; J. Meinland e T. Eisner. 1988. Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatrix*. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 85:5992-5996.
- Dreyer, D.L., K.C. Jones e R.J. Molyneux. 1985. Feeding deterrence of some pyrrolizidine, indolizidine, and quinolizidine alkaloids towards pea aphid

- (*Acyrtosiphon pisum*) and evidence for phloem transport of indolizidine alkaloid swainsonine. *Journal of Chemical Ecology*, 11:1045-1051.
- Drummond, B.A. e K.S. Brown, Jr. 1987. Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae): summary of known larval food plants. *Annals of Missouri Botanical Gardens*, 74:341-358.
- Edgar, J.A. 1975. Danainae (Lep.) and 1,2-dehidropyrrolizidine alkaloid-containing plants – with reference to observations made in the New Hebrides. *Philosophical Transactions of Royal Society of London B*, 272:467-476.
- Edgar, J.A., C.C.J. Culvenor e T. E. Pliske. 1976a. Isolation of a lactone, structurally related to the esterifying acids of pyrrolizidine alkaloids, from the costal fringes of male ithomiinae. *Journal of Chemical Ecology*, 2:263-270.
- Edgar, J.A., P.A. Cockrum e J.L. Frahn. 1976b. Pyrrolizidine alkaloids in *Danaus plexippus* L. and *Danaus chrysippus* L.. *Experientia*, 32:1535-1537.
- Edgar, J.A., C.C.J. Culvenor, P.A. Cockrum, L.W. Smith e M. Rothschild. 1980. Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth "metabolite". *Tetrahedron Letters*, 21:1383-1384.
- Ehmke, A., L. Witte, A. Biller e T. Hartmann. 1990. Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the Arctiidae *Tyria jacobaeae* L. *Z. Naturforsch*, 45c:1185-1192.
- Ehmke, A., M. Rowell-Rahier, J.M. Pasteels e T. Hartmann. 1991. Sequestration of ingested [¹⁴C]Senecionine N-oxide in the exocrine defensive secretions of chrysomelid beetles. *Journal of Chemical Ecology*, 17:2367-2379.
- Ehrlich, P.R. e P.H. Raven. 1964. Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18: 586-608.
- Ehrlich, A.H. e Ehrlich, P.R. 1978. Reproductive strategies in the butterflies: I. mating frequency, plugging, and egg number. *Journal of Kansas Entomology Society*, 51:666-697.
- Eisner, T. 1982. For love of nature: exploration and discovery at biological field stations. *Bioscience*, 32:321-326.
- Eisner, T. e M. Eisner. 1991. Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid-containing moth *Utetheisa ornatrix*, and its larva, to wolf spiders. *Psyche*, 98:111-118.

- Eisner, T. e J. Meinwald. 1995. The chemistry of sexual selection. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 92:50-55.
- Eisner, T., M. Eisner, C. Rossini, V.K. Iyengar, B.L. Roach, E. Benedikt e J. Meinwald. 2000. Chemical defense against predation in an insect egg. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 97:1634-1639.
- Finney, D.J. 1971. *Probit analysis*. 3ª ed. Cambridge University Press, London. 333 p.
- Fisher, R.A. e F. Yates. 1963. *Statistical tables for biological, agricultural and medical research*. 6ª ed. Oliver and Boyd, London. 146 p.
- Fraenkel, G.S. 1959. The raison d'être of secondary substances. *Science*, 129:1466-1470.
- Frei, H., J. Lüthy, J. Brauchli, U. Zweifel, F.E. Würzler e C. Schlatter. 1992. Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemical and Biological Interactions*, 83:1-22.
- Gamberale, G. e B. Sillén-Tullberg. 1996. Evidence for a more effective signal in aggregated aposematic prey. *Animal Behaviour*, 52:597-601.
- Gittleman, J.P.; P.H. Harvey e P.J. Greenwood. 1980. The evolution of conspicuous coloration: some experiments in bad taste. *Animal Behaviour*, 28:897-899.
- Glendinning, J.I., L.P. Brower e C.A. Montgomery. 1990. Responses of three mouse species to deterrent chemicals in the monarch butterfly. I. Taste and toxicity testes using artificial diets laced with digitoxin and monocrotaline. *Chemoecology*, 1:114-123.
- González, A., C. Rossini, M. Eisner e T. Eisner. 1999. Sexually transmitted chemical defense in a moth (*Utetheisa ornatrix*). *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 96:5570-5574.
- Haddad, M.L. 1986. Análise de Probites. In: S.B. Alves (Coord.). *Controle microbiano de insetos*. Ed. Marole, São Paulo. pp. 374-383.
- Hare, J. e T. Eisner. 1993. Pyrrolizidine alkaloid deters ant predators of *Utetheisa ornatrix* eggs: effects of alkaloid concentration, oxidation state, and prior exposure of ants to alkaloid-laden pray. *Oecologia*, 96:9-18.
- Hartmann, T. 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 80:177-188.

- Hartmann, T. 1999. Chemical ecology of pyrrolizidine alkaloids. *Planta*, 207:483-495.
- Hartmann, T. e G. Toppel. 1987. Senecionine N-oxide, the primary product of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Phytochemistry*, 26:1639-1643.
- Hartmann, T., A. Ehmke, U. Eilert, K. von Borstel e C. Theuring. 1989. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloid N-oxides in *Senecio vulgaris* L. *Planta*, 177:98-107.
- Hartmann T., A. Biller, L. Witte, L. Ernst e M. Boppré. 1990. Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by Arctiidae moths (Lepidoptera). *Biochemical and Systematic Ecology*, 18:549-554.
- Hartmann, T. e L. Witte. 1995. Chemistry, biology and chemoeccology of the pyrrolizidine alkaloids. In: S.W. Pelletier (Ed.). *Alkaloids - Chemical and biological perspectives* 9. Pergamon Press, Oxford. pp. 155-233.
- Hartmann, T., L. Witte, A. Ehmke, C. Theuring, M. Rowell-Rahier e J.M. Pasteels. 1997. Selective sequestration and metabolism of plant derived pyrrolizidine alkaloids by chrysomelid leaf beetles. *Phytochemistry*, 45:489-497.
- Hartmann, T. e B. Dierich. 1998. Chemical diversity and variation of pyrrolizidine alkaloids of the senecionine type: biological need or coincidence? *Planta*, 206:443-451.
- Hartmann, T., C. Theuring, J. Schmidt, M. Rahier e J. M. Pasteels. 1999. Biochemical strategy of sequestration of pyrrolizidine alkaloids by adults and larvae of chrysomelid leaf beetles. *Journal of Insect Physiology*, 45:1085-1095.
- Homans, S.W. 1995. *A dictionary of concepts in NMR*. Oxford Univ. Press Inc., New York. 372 p.
- Hosmer, D.W. e S. Lemeshow. 1989. *Applied logistic regression*. John Wiley & Sons, Inc. USA. 306 p.
- Kassarov, L. 1999. Are birds able to taste and reject butterflies based on "beak mark tasting"? A different point of view. *Behaviour*, 136:965-981.
- Klitzke, C.F. e J.R. Trigo. 2000. New records of pyrrolizidine alkaloid-feeding insects. Hemiptera and Coleoptera on *Senecio brasiliensis*. *Biochemical and Systematic Ecology*, 28:313-318.

- Lindigkeit, R., A. Biller, M. Buch, H-M. Schiebel, M. Boppré e T. Hartmann. 1997. The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *European Journal of Biochemistry*, 245:626-636.
- Logie, C.G., M. Ruth e R. Liddell. 1994. Proton NMR spectroscopy of Pyrrolizidine Alkaloids (Review Article). *Phytochemistry*, 37:43-109.
- Masters, A.R. 1990. Pyrrolizidine alkaloids in artificial nectar protect adult ithomiine butterflies from spider predator. *Biotropica*, 22:298-304.
- Masters, A.R. 1992. Chemical defense in Ithomiinae butterflies (Nymphalidae: Ithomiinae). PhD thesis. University of Florida, Gainesville, FL.
- Mattocks, A.R. 1967. Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Analytical Chemistry*, 39:443-447.
- Mattocks, A.R. 1968. Spectrophotometric determination of pyrrolizidine alkaloids-some improvements. *Analytical Chemistry*, 40:1749-1750.
- Mattocks, A.R. 1971. Hepatotoxic effects due to Pyrrolizidine alkaloid N-oxides. *Xenobiotica*, 1:563-565 *apud* Culvenor, C.C.J., J.A. Edgar, M.V. Jago, A. Outteridge, J.E. Peterson e L.W. Smith. 1976. Hepato- and pneumotoxicity of pyrrolizidine alkaloids and derivatives in relation to molecular structure. *Chemical and Biological Interactions*, 12:299-324.
- Mattocks, A.R. 1986. *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. Academic Press, London. 393 p.
- McLain, D.K., D.J. Shure. 1985. Host plant toxins and *unpalatability* of *Neacoryphus bicruris* (Hemiptera: Lygaeidae). *Ecological Entomology*, 10:291-298.
- Miranda, C.L., W. Chung, R.E. Reed, X. Zhao, M.C. Henderson, J. Wang, D.E. Williams e D.R. Buhler. 1991. Flavin-containing monooxygenase: a major detoxifying enzyme for the pyrrolizidine alkaloid senecionine in guinea pig tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 178:546-552.
- Molineux, R.J., J.N. Roitman, M. Benson e R.E. Lundin. 1982. ¹³C NMR of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 21:439-443.
- von Nickisch-Rosenegk, E. e M. Wink. 1993. Sequestration of pyrrolizidine alkaloids in several arctiidae moths (Lepidoptera: Arctiidae). *Journal of Chemical Ecology*, 19:1889-1903.

- Nishida R., C. Kim, H. Fukami e R. Irie. 1991. Ideamine N-oxides: pyrrolizidine alkaloids sequestered by the danaine butterfly, *Idea leuconoe*. *Agricultural and Biological Chemistry Journal*, 55:1787-1792.
- Niwa, H., Y. Miyachi, O. Okamoto, Y. Uosaki, A. Kuroda, H. Ishiwata e K. Yamada. 1992. Total synthesis of optically active integerrimina, a twelve-membered dilactonic pyrrolizidine alkaloid of retronecine type. *Tetrahedron*, 48:393-412.
- Osborn, F. e K. Jaffe. 1998. Chemical ecology of the defense of two nymphalid butterfly larvae against ants. *Journal of Chemical Ecology*, 24:1173-1186.
- Orr, A.G., J.R. Trigo, L. Witte e T. Hartmann. 1996. Sequestration of pyrrolizidine alkaloids by larvae of *Tellervo zoilus* (Lepidoptera: Ithomiinae) and their role in the chemical protection of adults of the spider *Nephila maculata* (Araneidae). *Chemoecology*, 7:68-73.
- Pasteels, J.M., M. Rowell-Rahier, T. Randoux, J.C. Braekman e D. Daloze. 1988. Pyrrolizidine alkaloids of probable host-plant origin in the protonal and elytral secretion of the beetle *Oreina cacaliae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 49:55-58.
- Pease, R.W., Jr. 1968. The evolutionary and biological significance of multiple pairing in Lepidoptera. *Journal of the Lepidopterists' Society*, 22:197-209.
- Piedrabuena, A.E. 1975. Contribuição ao estudo das doses letais. Tese de Doutorado, IB, UNICAMP, Campinas, SP. 89 p.
- Pliske, T.E. 1975a. Attraction of lepidoptera to plants containing pyrrolizidine alkaloids. *Environmental Entomology*, 4: 455-473.
- Pliske, T.E. 1975b. Pollination of pyrrolizidine alkaloid-containing plants by male lepidoptera. *Environmental Entomology*, 4: 474-479.
- Pliske, T.E., J. A. Edgar e C. C.J. Culvenor, 1976. The chemical basis of attraction of ithomiine butterflies to plants containing pyrrolizidine alkaloids. *Journal of Chemical Ecology*, 2:255-262.
- Ritland, D.B. 1994. Variation in palatability of queen butterflies (*Danaus gilippus*) and implications regarding mimicry. *Ecology*, 75:732-746.
- Rizk, A.-F. M. (ed.). 1991. *Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids*. CRC Press, Flórida. 234 p.

- Robinson, M.H. e H. Mirick. 1971. The predation behavior of the golden-web spider *Nephila clavipes* (Aranae: Araneidae). *Psyche*, 78:123-139.
- Roper, T.J. 1994. Conspicuousness of prey retards reversal of learned avoidance. *Oikos*, 69: 115-118.
- Roper, T.J. e R. Wistow. 1986. Aposematic colouration and avoidance learning in chicks. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 38B:141-149.
- Roper, T.J. e S. Redston. 1987. Conspicuousness of distasteful prey affects the strength and durability of one-trial avoidance learning. *Animal Behaviour*, 35:739-747.
- Roper, T.J. e S.E. Cook. 1989. Responses of chicks to brightly coloured insect prey. *Behaviour*, 110: 276-293.
- Roper, T.J. e N.M. Marple. 1997. Odour and colour as cues for taste-avoidance learning in domestic chicks. *Animal Behaviour*, 53:1241-1250.
- Rothschild, M. e N. Marsh. 1978. Some peculiar aspects of danaid/plant relationships. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 24:437-450.
- Rothschild, M., R.T. Aplin, P.A. Cockrum, J.A. Edgar, P. Fairweather e R. Lees. 1979. Pyrrolizidine alkaloids in arctiid moths (Lep.) with a discussion on host relationships and the role of these secondary plant substances in the Arctiidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, 12:305-326.
- Rowell-Rahier, M., J. M. Pasteels, A. Alonso-Mejia e L.P. Brower. 1995. Relative unpalatability of leaf beetles with either biosynthesized or sequestered chemical defence. *Animal Behaviour*, 49:709-714.
- Schneider, D., M. Boppré, J. Zweig, S.B. Horsley, T.W. Bell, J. Meinwald, K. Hansen e E.W. Diehl. 1982. Scent organ development in *Cretonotos* moths: regulation by pyrrolizidine alkaloids. *Science*, 215:1264-1265.
- Schoonhoven, L.M., T. Jermy e J.J.A. van Loon. 1998. *Insect-plant biology – from physiology to evolution*. Chapman & Hall, London. 409 p.
- Schuler, W. e E. Hesse. 1985. On the function of warning coloration: a black and yellow pattern inhibits prey-attack by naive domestic chicks. *Behavioral and Ecological Sociobiology*, 16:249-255.
- Schulz, S. 1998. Insect-plant interactions – metabolism of plant compounds to pheromones and allomones by lepidoptera and leaf beetles. *European Journal of Organic Chemistry*, 13-20.

- Schulz, S., W. Francke, M. Boppré, T. Eisner e J. Meinwald. 1993. Insect pheromone biosynthesis: Stereochemical pathway of hydroxydanaidal production from alkaloidal precursors in *Cretonotos transiens* (Lepidoptera, Arctiidae). *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, 90:6834-6838.
- Silverstein, R.M., G.C. Bassler e T.C. Morrill. 1994. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 5ª ed. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 387 p.
- Sokal, R.R. e F.J. Rohlf. 1995. *Biometry*. W.H. Freeman and Company, USA. 887 p.
- Stamp, N.E. 1992. Relative susceptibility to predation of two species of caterpillar on plantain. *Oecologia*, 92:124-129.
- Steinberg, D. e P. Colla. 1991. *Logit: a complementary module for SYSTAT*. Evanston, IL: SYSTAT Inc.
- Stelljes, M.E. e J.N. Seiber. 1990. Pyrrolizidine alkaloids in an overwintering population of Monarch butterflies (*Danaus plexippus*) in California. *Journal of Chemical Ecology*, 16:1459-1470.
- Trigo, J.R. 1988. Ecologia química na interação Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae)/Echitoideae (Angiospermae: Apocynaceae). Tese de Mestrado, IB, UNICAMP, Campinas, SP.
- Trigo, J.R. 1993. Alcalóides pirrolizidínicos em borboletas Ithomiinae. Alguns aspectos em ecologia química. Tese de Doutorado, IQ, UNICAMP, Campinas, SP.
- Trigo, J.R. e K.S. Brown, Jr. 1990. Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: a comparative study between species feeding on Apocynaceae and Solanaceae. *Chemoecology*, 1:22-29.
- Trigo, J.R.; L. Witte; K.S. Brown, Jr.; T. Hartmann e L.E.S. Barata. 1993. Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *Journal of Chemical Ecology*, 19:669-679.
- Trigo, J.R.; K.S. Brown, Jr.; L. Witte; T. Hartmann; L. Ernst e L.E.S. Barata. 1996a. Pyrrolizidine alkaloids: different acquisition and use patterns in Apocynaceae and Solanaceae feeding ithomiine butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 58:99-123.
- Trigo, J.R.; K.S. Brown, Jr.; S.A. Henriques e L.E.S. Barata. 1996b. Qualitative pattern of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae butterflies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 24:181-188.

- Trigo, J.R. e N. Chemin. 1996. Pyrrolizidine alkaloids in chemical protection against a spider predator. I. Preliminary studies on free bases and N-oxides. In H. Niemeier (Ed.). *Techniques in plant-insect interactions and biopesticides*, International Foundation of Science, Stockholm, Suécia. pp. 158-161.
- Van Dam, N.M., L.W.M. Vuister, C. Bergshoeff, H. De Vos e E. van der Meijden. 1995. The "raison d'être" of pyrrolizidine alkaloids in *Cyanoglossum officinale*: deterrent effects against generalist herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 21:507-523.
- Vasconcellos-Neto, J. e T.M. Lewinsohn. 1984. Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. *Ecological Entomology*, 9:337-344.
- Whittaker, R.H. e P.P. Feeny. 1971. Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171:757-770.
- Williams, D.H., M.J. Stone, P.R. Hauck e S. K. Rahman. 1989. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products*, 52:1189-1208.
- Witte, L., P. Rubiolo, C. Bacchi e T. Hartmann. 1993. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemistry*, 32:187-196.
- Zalkow, L.H., J.A. Glinski, L. Gelbaum, T.J. Fleischmann, L.S. McGowan, e M.M. Gordon. 1985. Synthesis of pyrrolizidine alkaloids indicine, intermedine, lycopsamine, and analogues and their N-oxides. Potential antitumor agents. *Journal of Medical Chemistry*, 28:687-694.

APÊNDICES

Apêndice 1

Cálculos das dosagens de APs utilizadas nos ensaios de aplicação tópica em presas palatáveis, utilizando-se aranhas *Nephila clavipes* como modelo de predador invertebrado. Concentrações baseadas em Trigo e Chemin (1996).

μmoles	$\mu\text{moles/mg}$	$\log \mu\text{moles/mg}$	μg	$\mu\text{g/mg}$
Integerrimina:senecionina base livre (10 e 11)				
(PM=335)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,218	0,013
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,874	0,051
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	3,497	0,206
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	13,986	0,823
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	55,945	3,291
0,668	$3,93 \times 10^{-2}$	-1,406	223,780	13,164
Integerrimina:senecionina N-óxido				
(PM=351)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,228	0,013
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,916	0,054
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	3,664	0,216
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	14,654	0,862
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	58,617	3,448
0,668	$3,93 \times 10^{-2}$	-1,406	234,468	13,792
Senquirquina (13)				
(PM=365)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,237	0,014
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,953	0,056
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	3,811	0,224
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	15,239	0,896
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	60,955	3,586
0,668	$3,93 \times 10^{-3}$	-1,406	243,820	14,342
Retronecina base livre (3)				
(PM=155)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,101	0,006
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,405	0,024
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	1,618	0,095
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	6,471	0,381
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	25,885	1,523
0,668	$3,93 \times 10^{-3}$	-1,406	103,540	6,091

Continua

μmoles	$\mu\text{moles/mg}$	$\text{Log } \mu\text{moles/mg}$	μg	$\mu\text{g/mg}$
Retronecina N-óxido (PM=171)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,111	0,007
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,446	0,026
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	1,785	0,105
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	7,139	0,420
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	28,557	1,680
0,668	$3,93 \times 10^{-3}$	-1,406	114,228	6,719
2,672	$1,57 \times 10^{-1}$	-0,804	456,912	26,877
Calimorfina base livre (22) (PM=297)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,193	0,011
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,775	0,046
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	3,101	0,182
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	12,400	0,729
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	49,599	2,918
0,668	$3,93 \times 10^{-3}$	-1,406	198,396	11,670
Seneciolretronecina base livre (14) (PM=137)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,154	0,009
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,619	0,036
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	2,474	0,146
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	9,895	0,582
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	39,579	2,328
0,668	$3,93 \times 10^{-3}$	-1,406	158,316	9,313
Seneciolretronecina N-óxido (PM=253)				
0,00065	$3,82 \times 10^{-5}$	-4,418	0,164	0,010
0,00261	$1,54 \times 10^{-4}$	-3,814	0,660	0,039
0,01044	$6,14 \times 10^{-4}$	-3,212	2,641	0,155
0,04175	$2,46 \times 10^{-3}$	-2,610	10,563	0,621
0,167	$9,82 \times 10^{-3}$	-2,008	42,251	2,485
0,668	$3,93 \times 10^{-3}$	-1,406	169,004	9,941

Apêndice 2

Cálculos utilizados para transformação das porcentagens de liberação em probite e para determinação da Dose de Liberação 50 (DLib₅₀) (segundo Piedrabuena 1975) (discussão de análises de probite em Finney 1971).

1. Transformação da concentração de APs (μmoles/mg da presa) em log da concentração ($\log_{10}$) (x);
2. Determinação das probites empíricas (Ye) correspondentes às proporções de liberação observadas, utilizando-se a Tabela IX de Fisher e Yates (1963);
3. Determinação da probite provisória (Yp) por extrapolação da equação da reta determinada através da Ye;
4. Determinação da probite de trabalho (Yw), entrando-se com o Yp na Tabela IX de Fisher e Yates (1963):

$$Yw = (Y - P/Z) - (I/Z).p, \text{ onde:}$$

$$Y - P/Z = \text{probite mínima operacional}$$

$$I/Z = \text{intervalo}$$

$$p = \text{proporção de liberados;}$$

5. Determinação do coeficiente de ponderação (W) entrando-se com o Yp na Tabela IX de Fisher e Yates (1963);
6. Determinação de NW = número de indivíduos em cada concentração x coeficiente de ponderação;
7. Cálculos de $x.NW$; $x^2.NW$; $Yw.NW$; $Yw^2.NW$ e $x.Yw.NW$;
8. Determinação de $\bar{x}$, $\overline{Yw}$, $\sum x^2$, $\sum Yw^2$, $\sum xYw$, $\chi^2_{(n-2)}$, b^1 e a^1 , onde:

$$\bar{x} = \sum x.NW / \sum NW$$

$$\overline{Yw} = \sum Yw.NW / \sum NW$$

$$\sum x^2 = \sum x^2.NW - [(\sum x.NW)^2 / \sum NW]$$

$$\sum Yw^2 = \sum Yw^2.NW - [(\sum Yw.NW)^2 / \sum NW]$$

$$\sum xYw = \sum x.Yw.NW - [(\sum x.NW. \sum Yw.NW) / \sum NW]$$

$$\chi^2_{(n-2)} = \sum Yw^2 - [(\sum xYw)^2 / \sum x^2]$$

$$b^1 = \sum xYw / \sum x^2$$

$$a^1 = \overline{Y_w} - b^1 \cdot \bar{x};$$

9. Determinação da equação da reta de regressão, de tal forma que $Y = b^1 x + a^1$ (I);

10. Cálculo para testar a necessidade de um novo ciclo de convergência:

$$\left| \frac{b^1 - b}{b^1} \right| < 0,005$$

Caso essa condição não ocorra, começa-se um novo ciclo, partindo de que a equação (I) seria a dos probites provisórios (Y_p). Repete-se, então, todos os passos, de 3 a 10. Repetem-se quantos ciclos forem necessários até que se atinja a condição do item 10.

11. Determinação da $DLib_{50}$ a partir da equação da reta final, onde $Y=5$. Pelo cálculo do antilog de 10, chega-se a $DLib_{50}$ em $\mu\text{moles/mg}$.

Apêndice 3

1. Curvas de calibração utilizadas na determinação da concentração de APs, por análise colorimétrica, em borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas em laboratório.

Tabela 14. Equações da reta e r^2 da curva de calibração dos APs utilizados na alimentação de borboletas *Mechanitis polymnia* em laboratório utilizadas para a determinação da concentração de APs em cada indivíduo.

Alcalóides pirrolizidínicos	Equação da reta	r^2
integerrimina:senecionina (10 e 11)	$y=0,0244x$	0,99
senecioilretronecina (14)	$y=0,0176x$	0,963
retronecina (3)	$y=0,0181x$	0,823

2. Quantidade de APs, determinada por análise colorimétrica, em borboletas *Mechanitis polymnia* alimentadas em laboratório e nos capilares utilizados na sua alimentação.

Tabela 15. Quantidade inicial de APs (μg) oferecida a borboletas *Mechanitis polymnia* e quantidade média de APs (μg), determinada por colorimetria, nos indivíduos alimentados em laboratório e congelados após diferentes períodos de tempo, e nos capilares utilizados na sua alimentação. N= número de indivíduos alimentados em laboratório.

Alcalóides pirrolizidínicos	Quantidade inicial (μg)	Após 0 h. N	Após 6 h. N	Após 24 h. N	Capilares
Integerrimina:senecionina base livre (10 e 11)	0,87	3,21 8	3,42 10	5,04 4	0,15
	13,99	4,93 11	3,28 4	7,7 7	0,53
	223,78	5,66 4	4,74 5	4,17 28	32,69
Senecioilretronecina base livre (14)	0,62	3,43 7	2,8 3	- 0	0,2
	9,89	4,06 7	3,91 7	4,02 9	4,7
	158,32	20,29 14	11,66 22	5,38 23	5,07
Retronecina base livre (3)	0,4	2,29 10	2,91 9	4,01 8	0,4
	6,47	3,76 7	4,68 8	3,44 9	0,26
	103,54	6,9 7	7,42 11	8,77 25	7,27

Apêndice 4

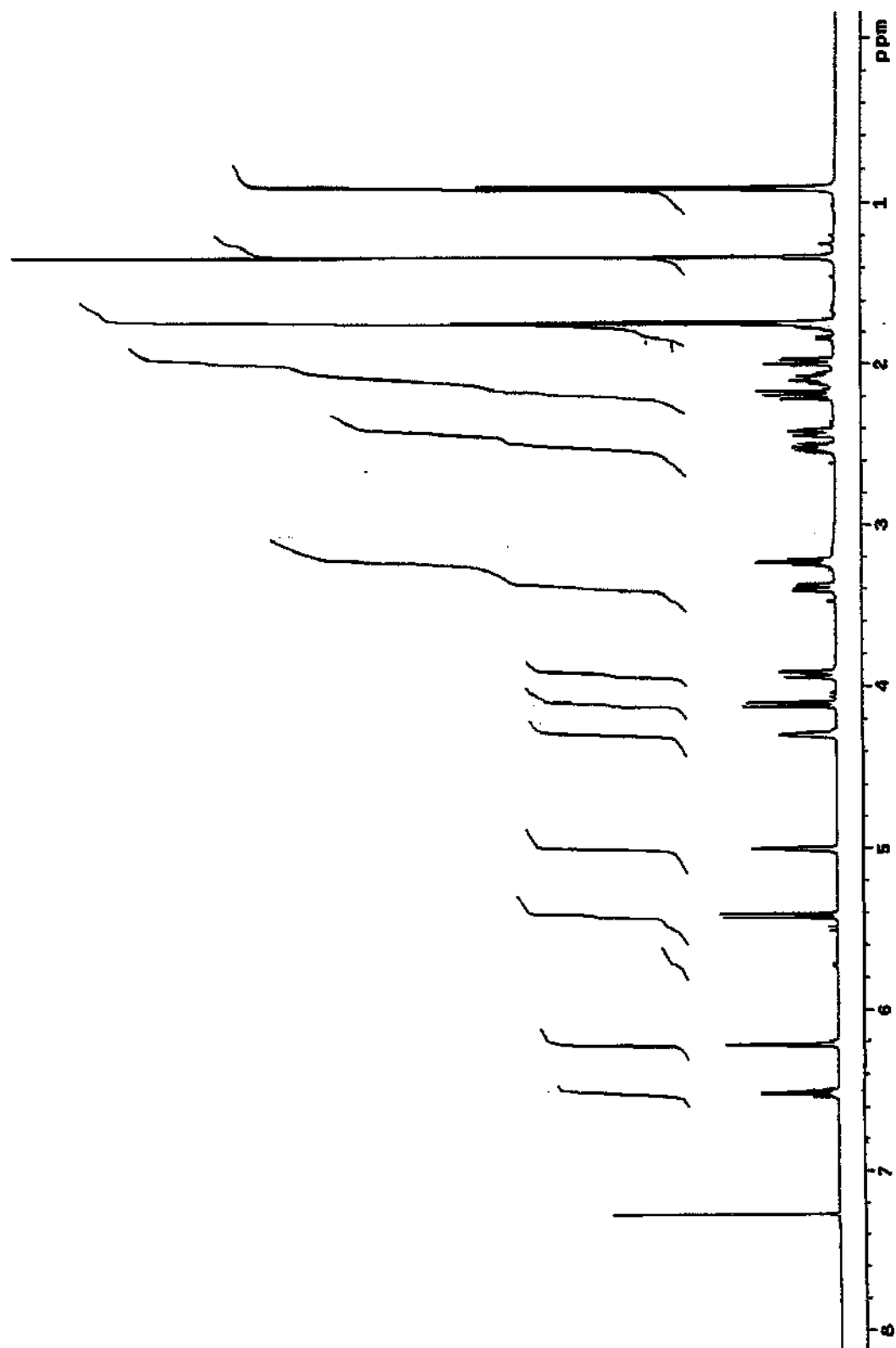


Figura 15. Espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (**10** e **11**). Espectrômetro INOVA500.

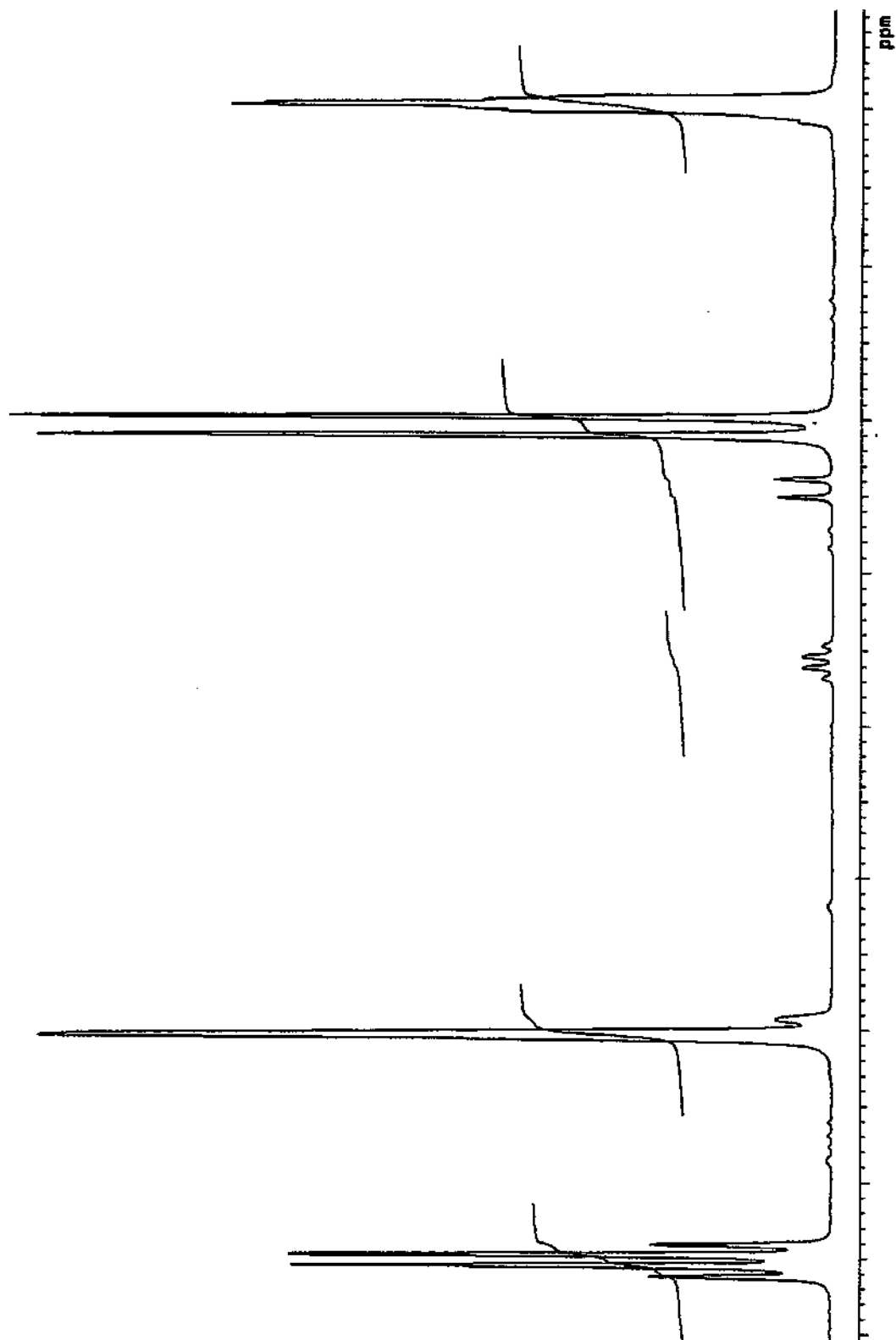


Figura 16. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senechonina base livre (10 e 11) (Figura 15).

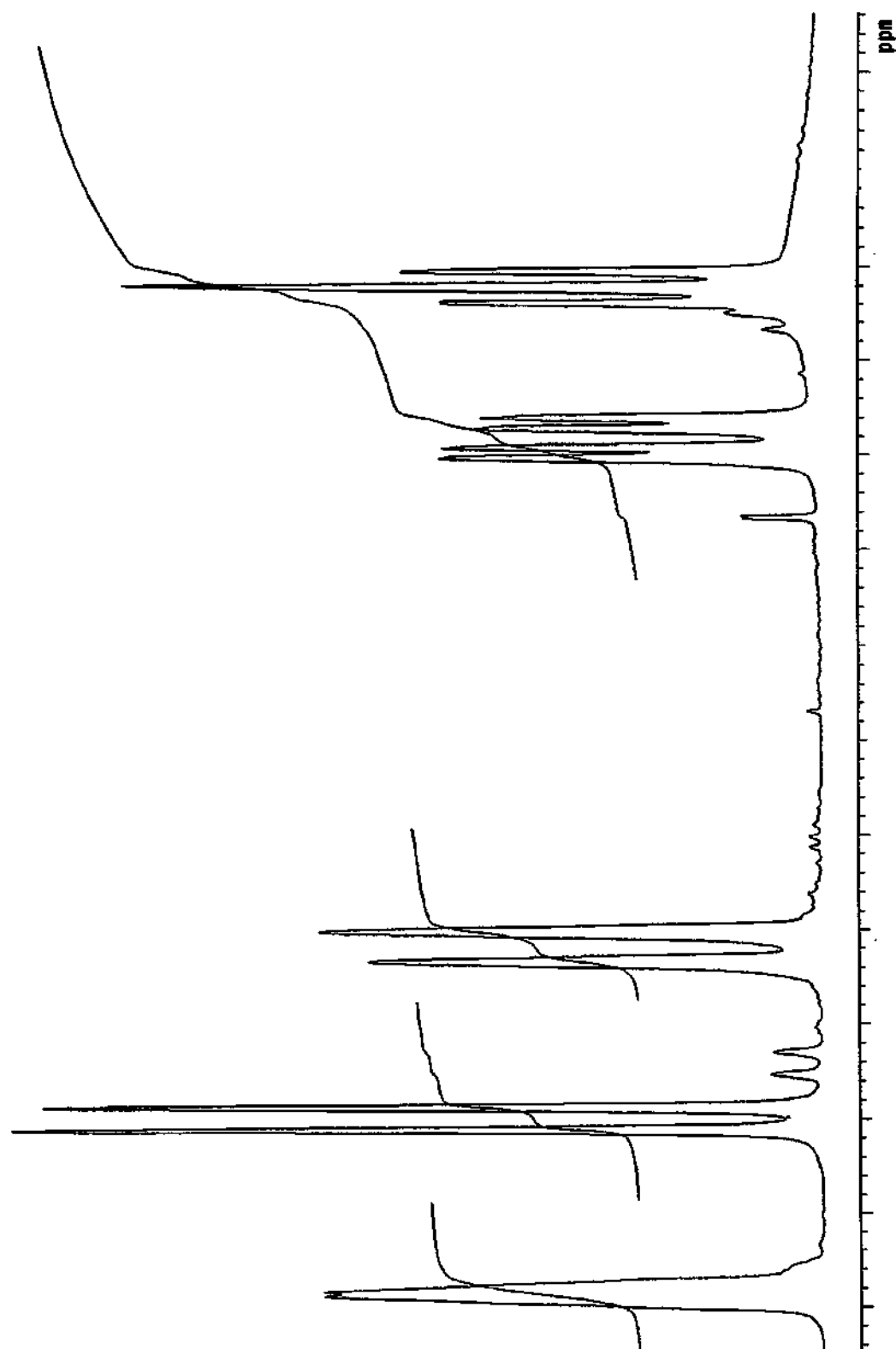


Figura 17. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integrerrimina:senecionina base livre (**10** e **11**) (Figura 15).

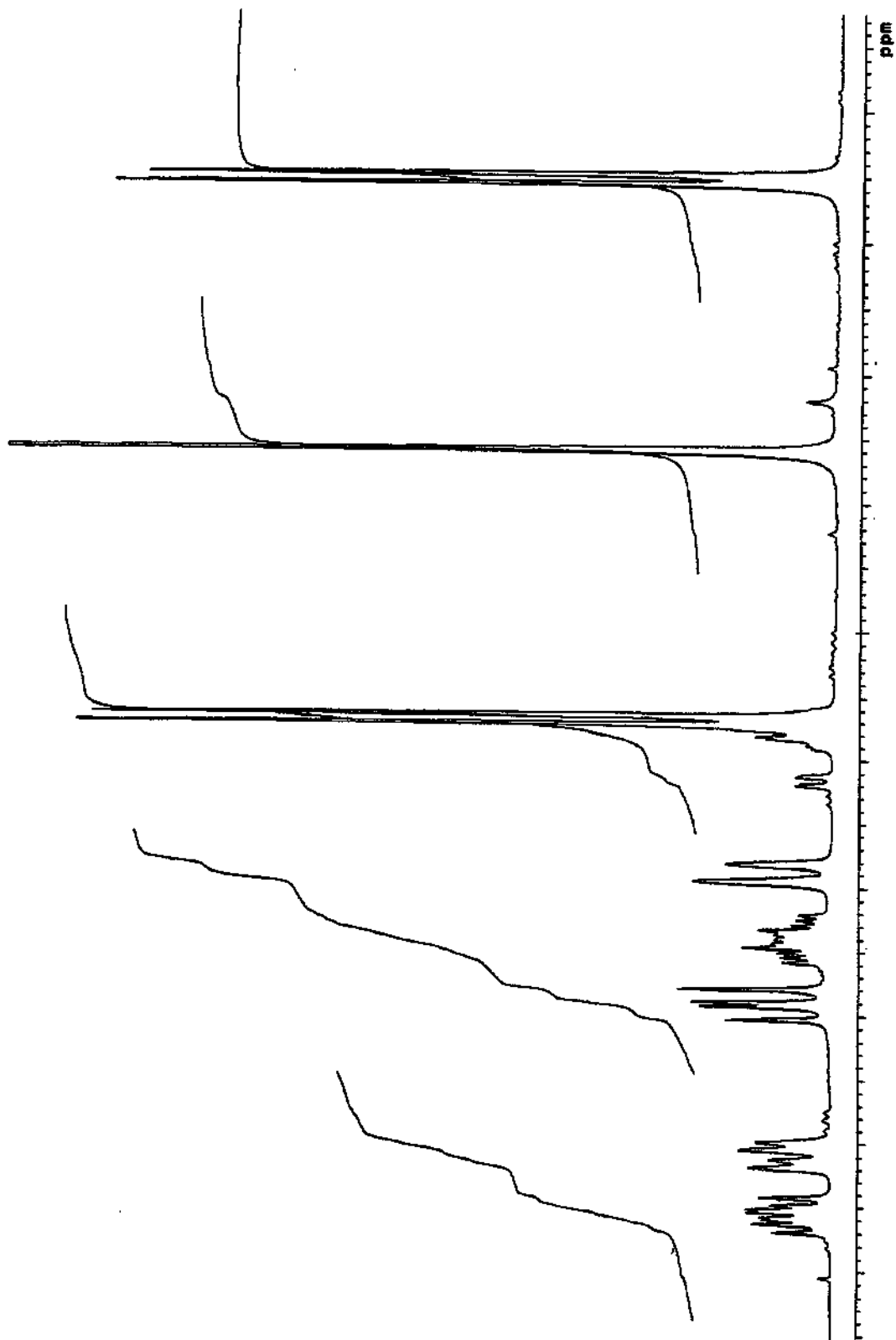


Figura 18. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (**10** e **11**) (Figura 15).

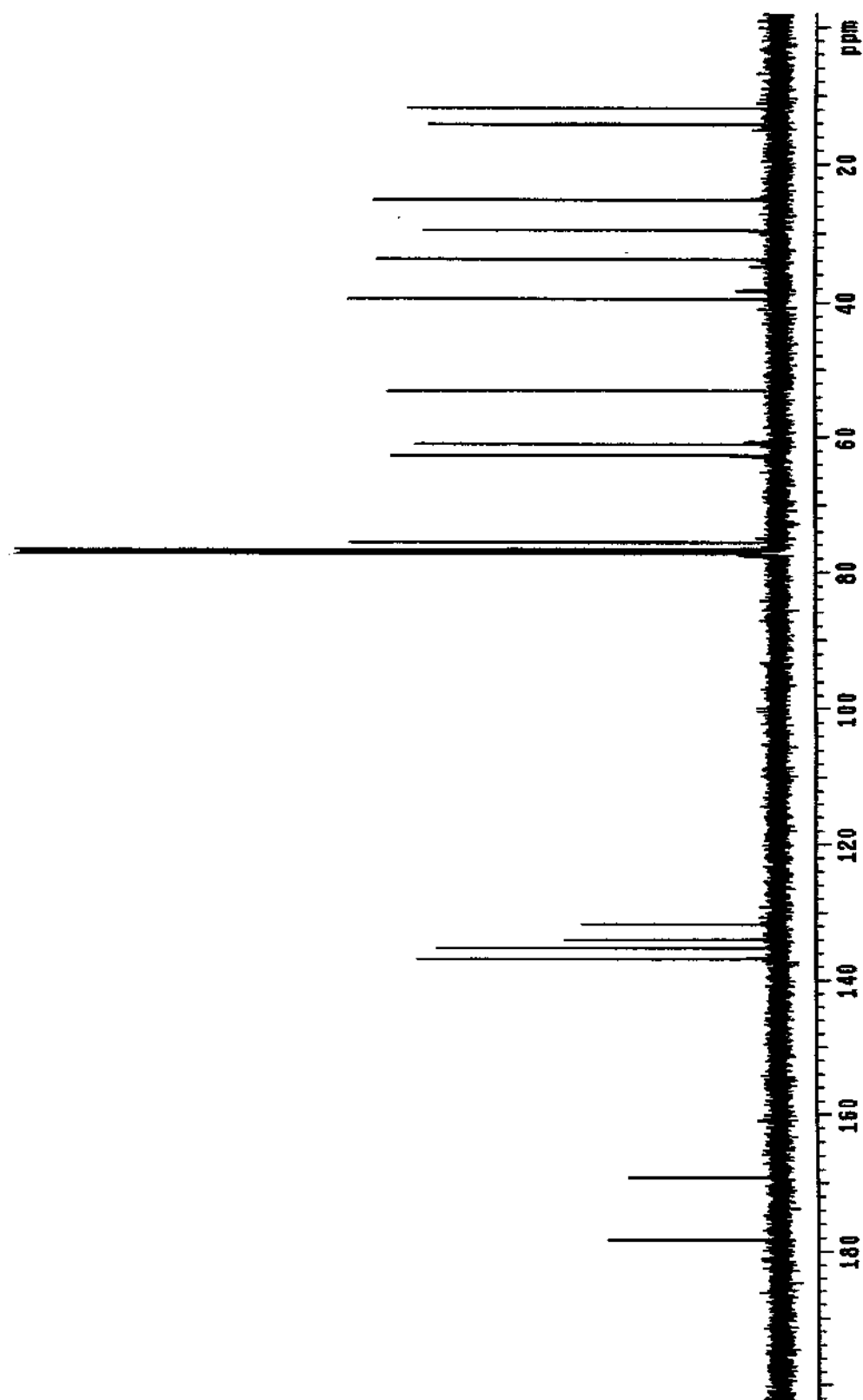
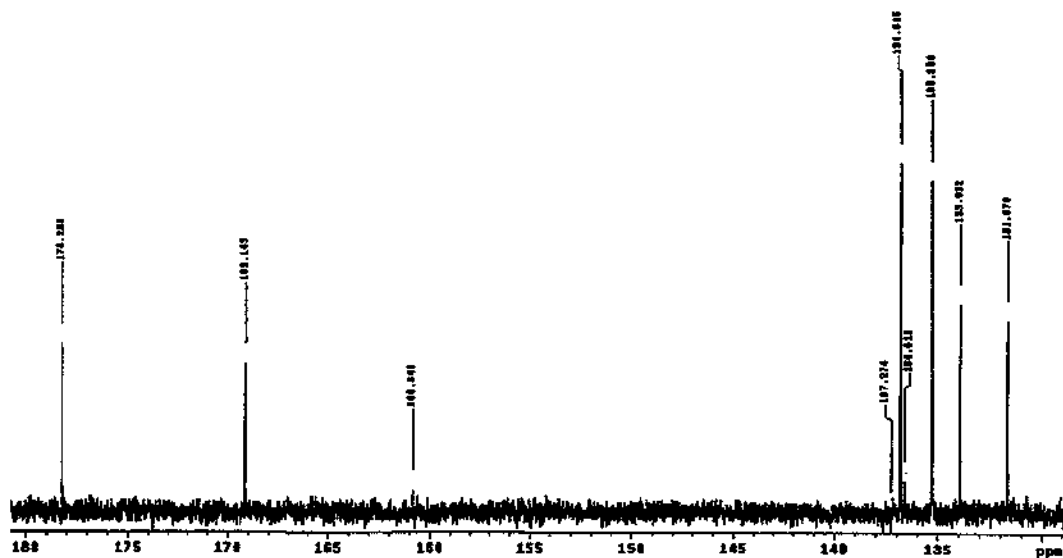
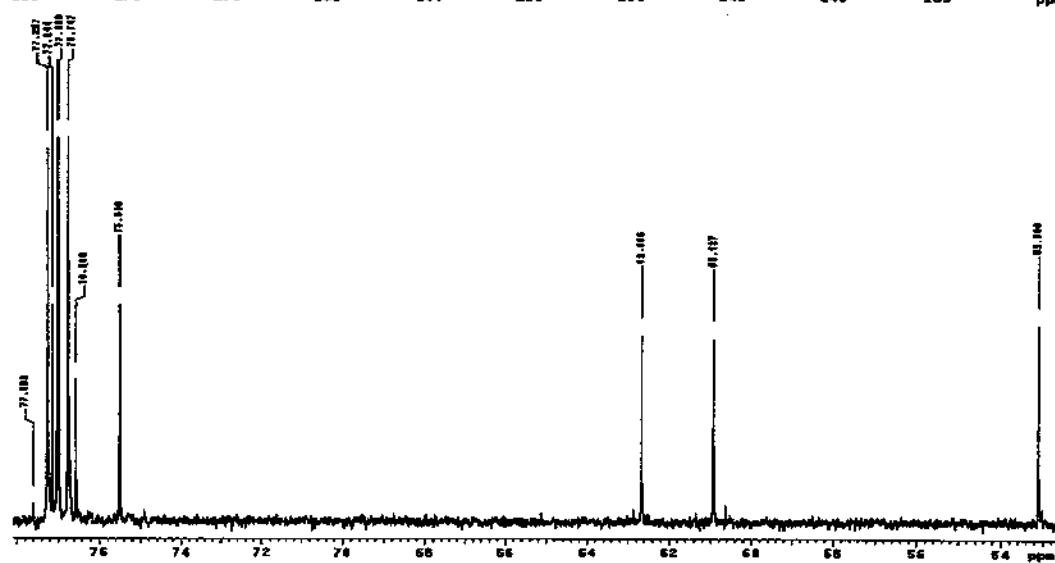


Figura 19. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11). Espectrômetro INOVA500.

A.



B.



C.

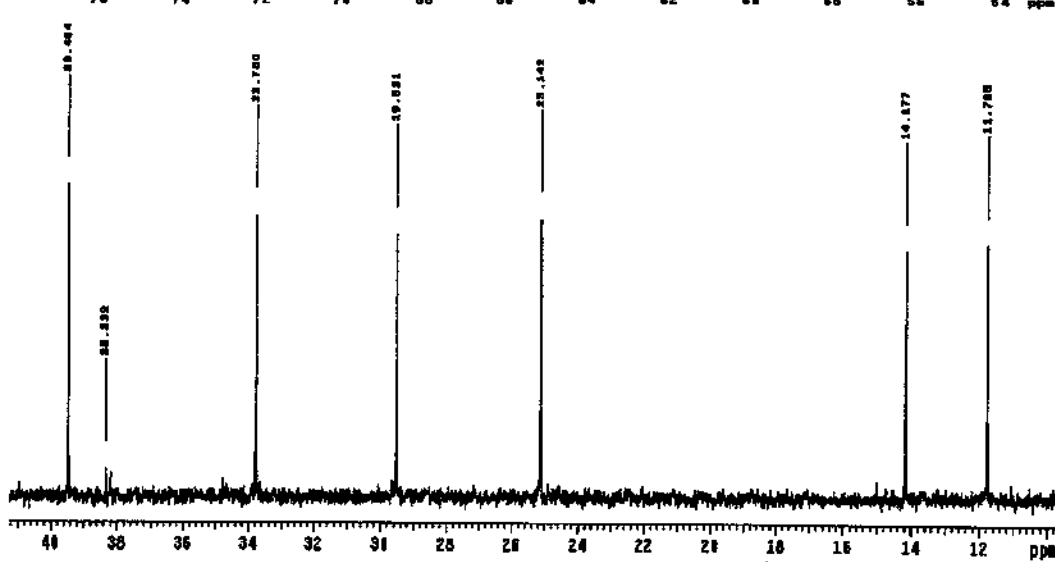


Figura 20. A., B. e C. Amplificações do espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:seneccionina base livre (10 e 11) (Figura 19).

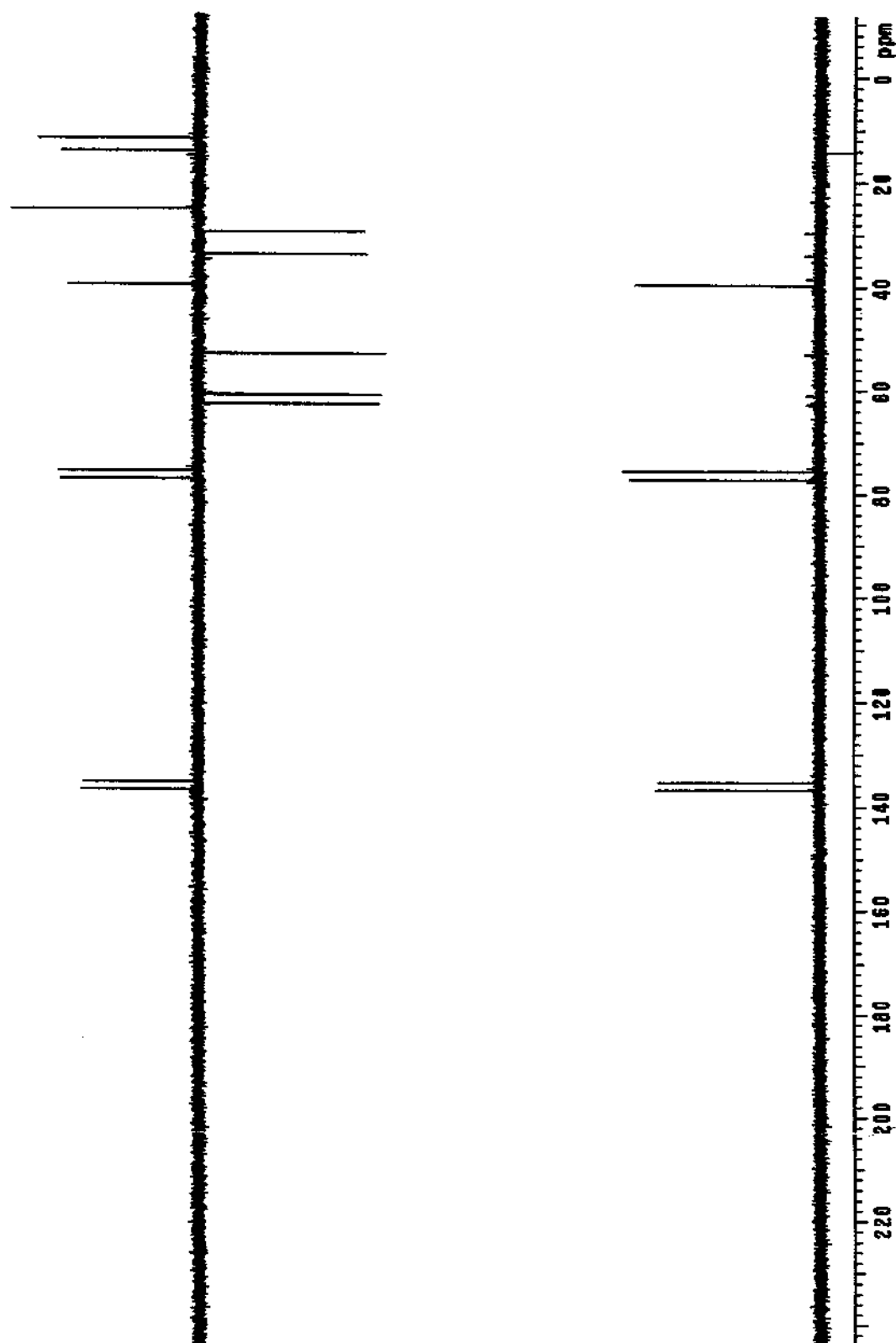


Figura 21. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da integerrimina:senecionina base livre (10 e 11). Espectrômetro INOVA500.

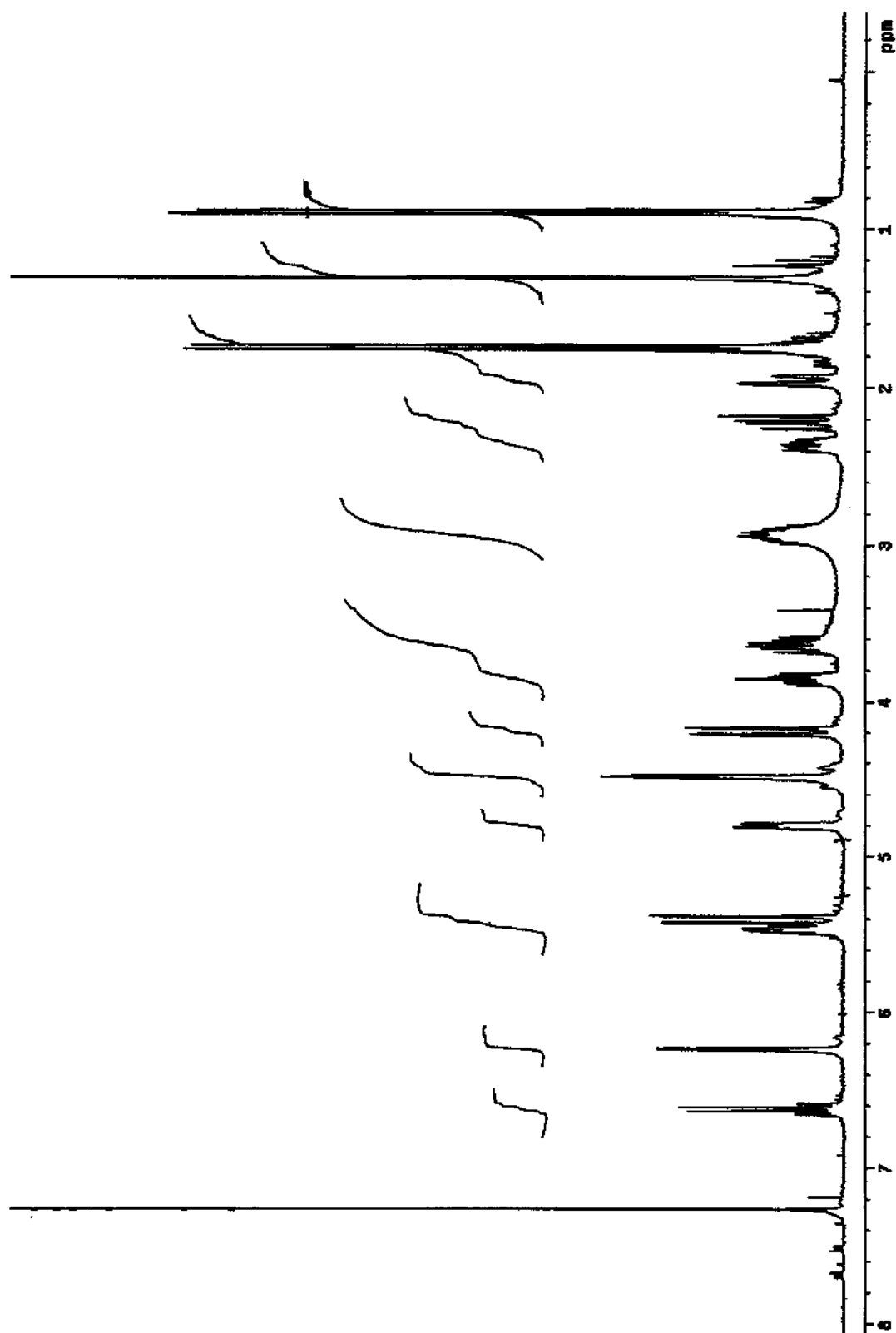


Figura 22. Espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido. Espectrômetro INOVA500.

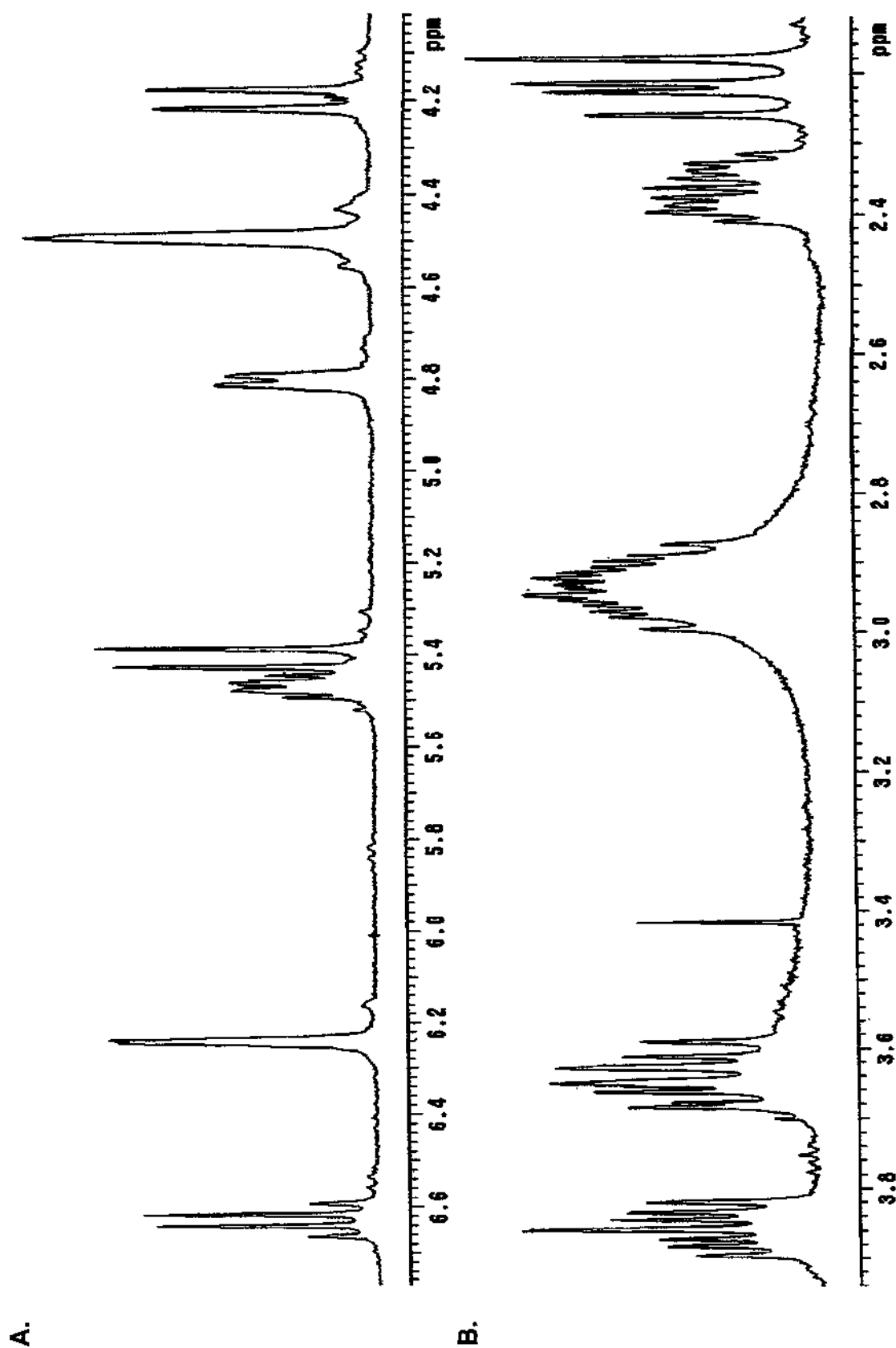


Figura 23. A e B. Amplificações do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 22).

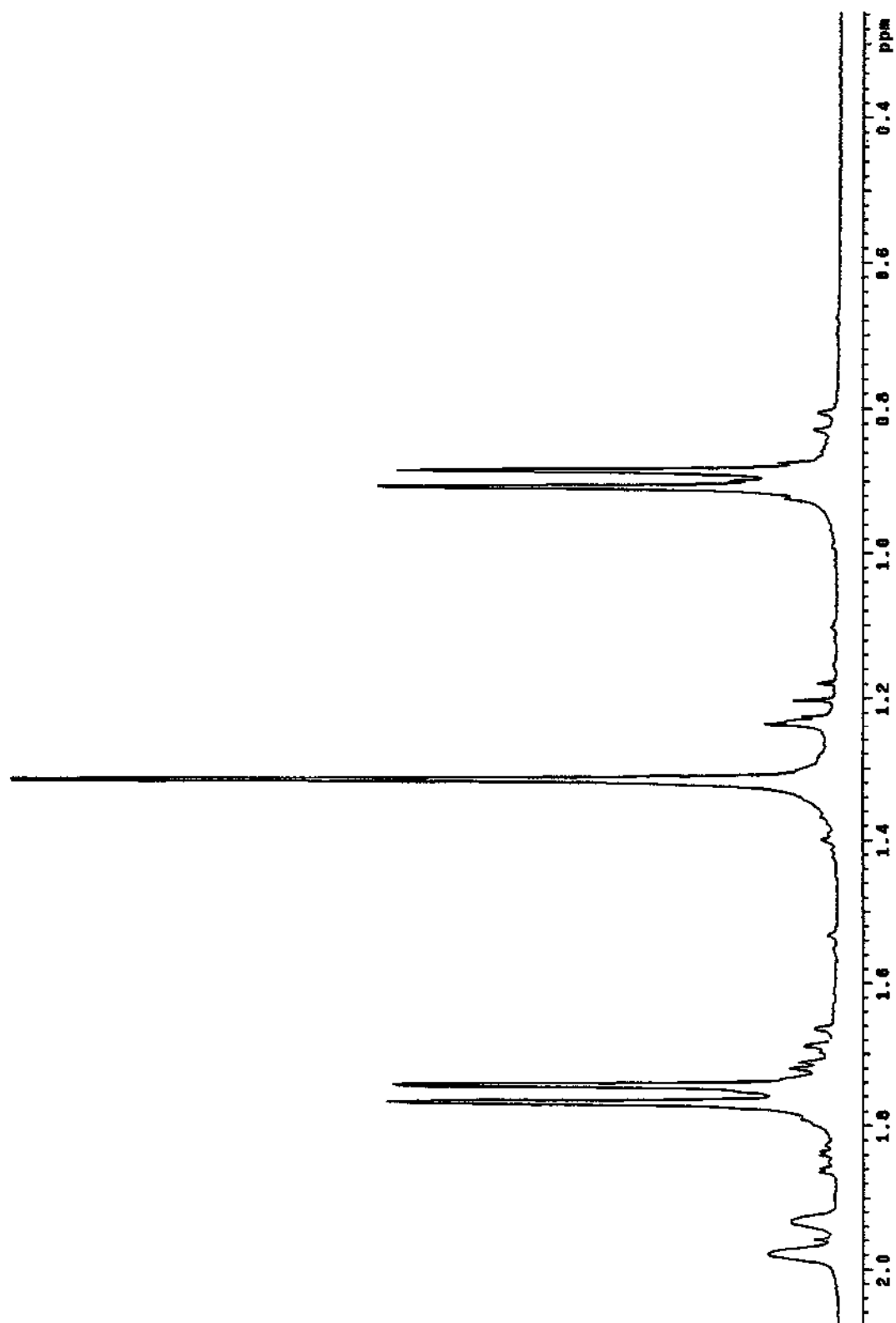


Figura 24. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 22).

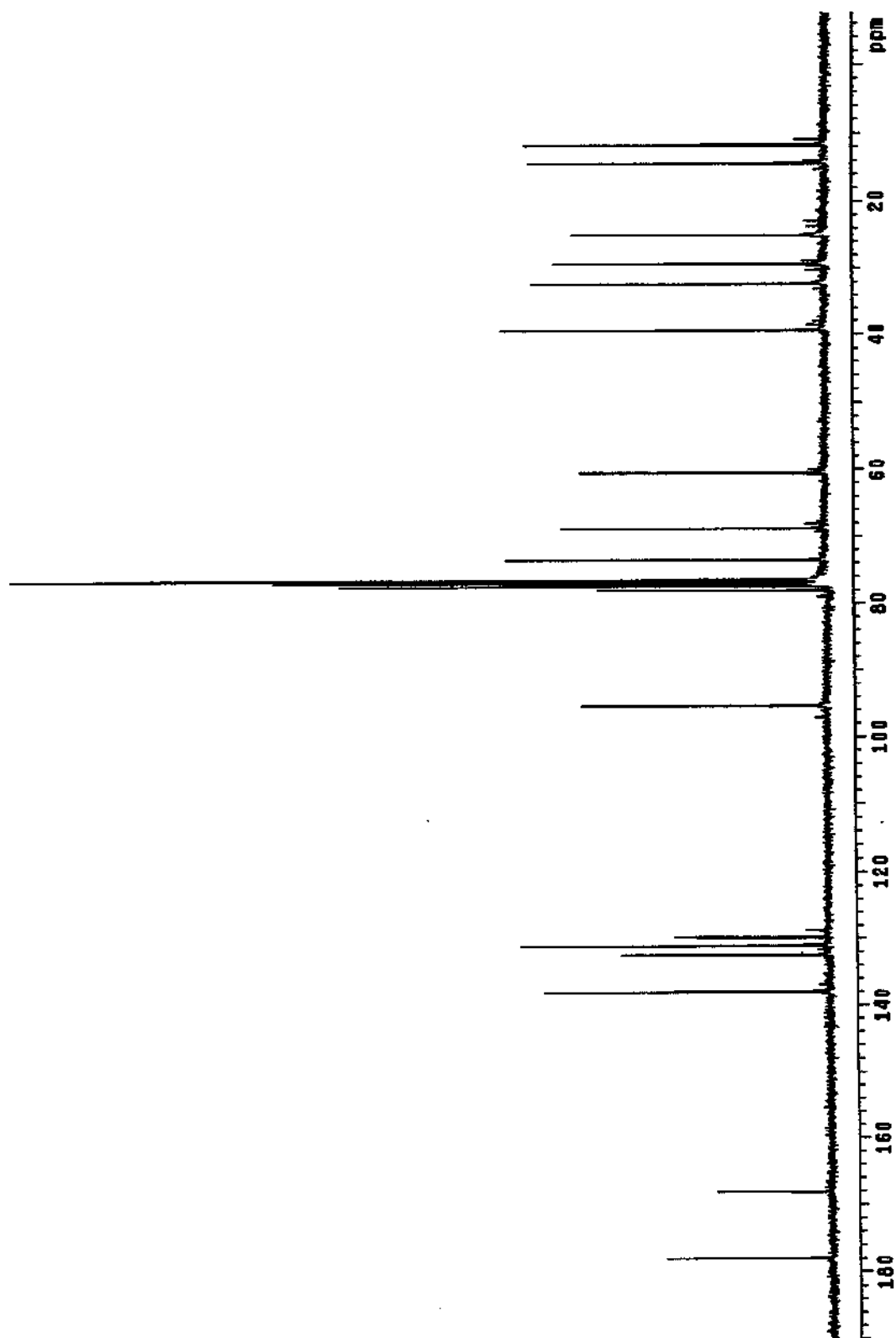
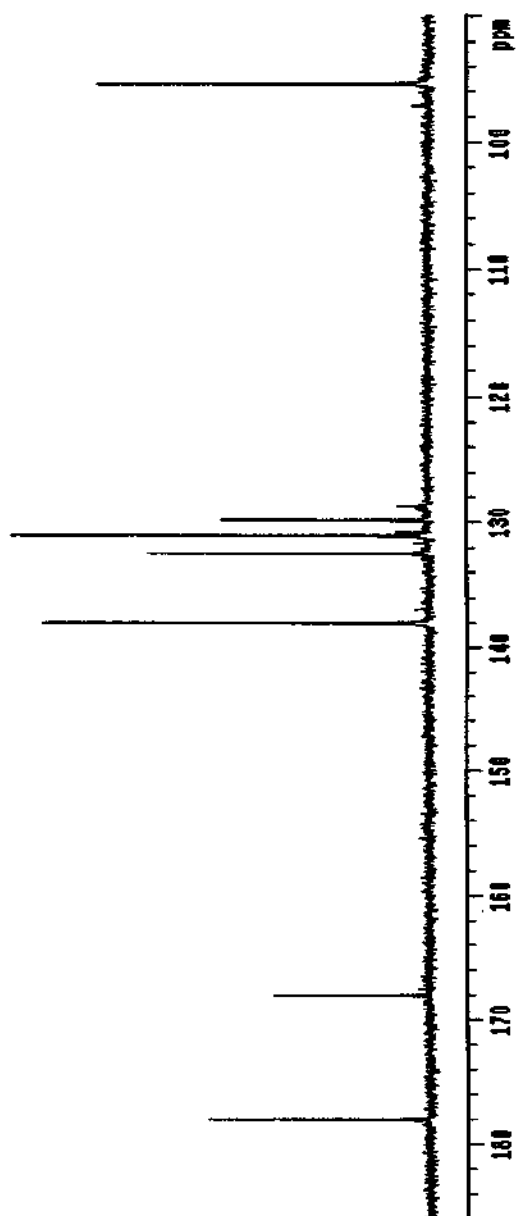


Figura 25. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina N-óxido. Espectrômetro INOVA500.

A.



B.

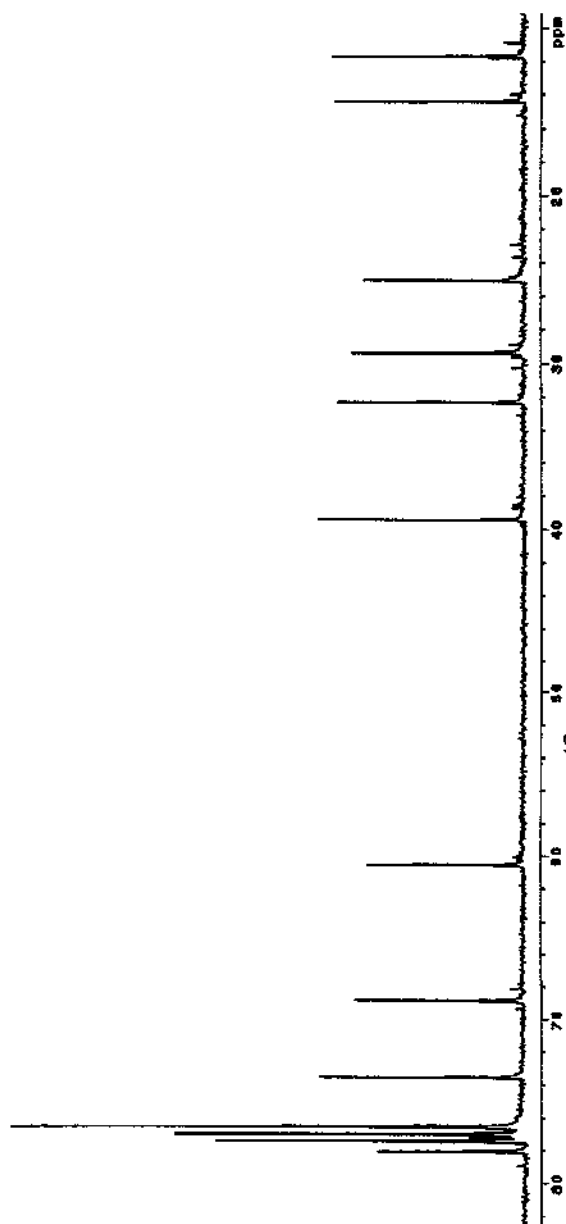


Figura 26. A. e B. Amplificações do espectro do ^{13}C da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido (Figura 25).

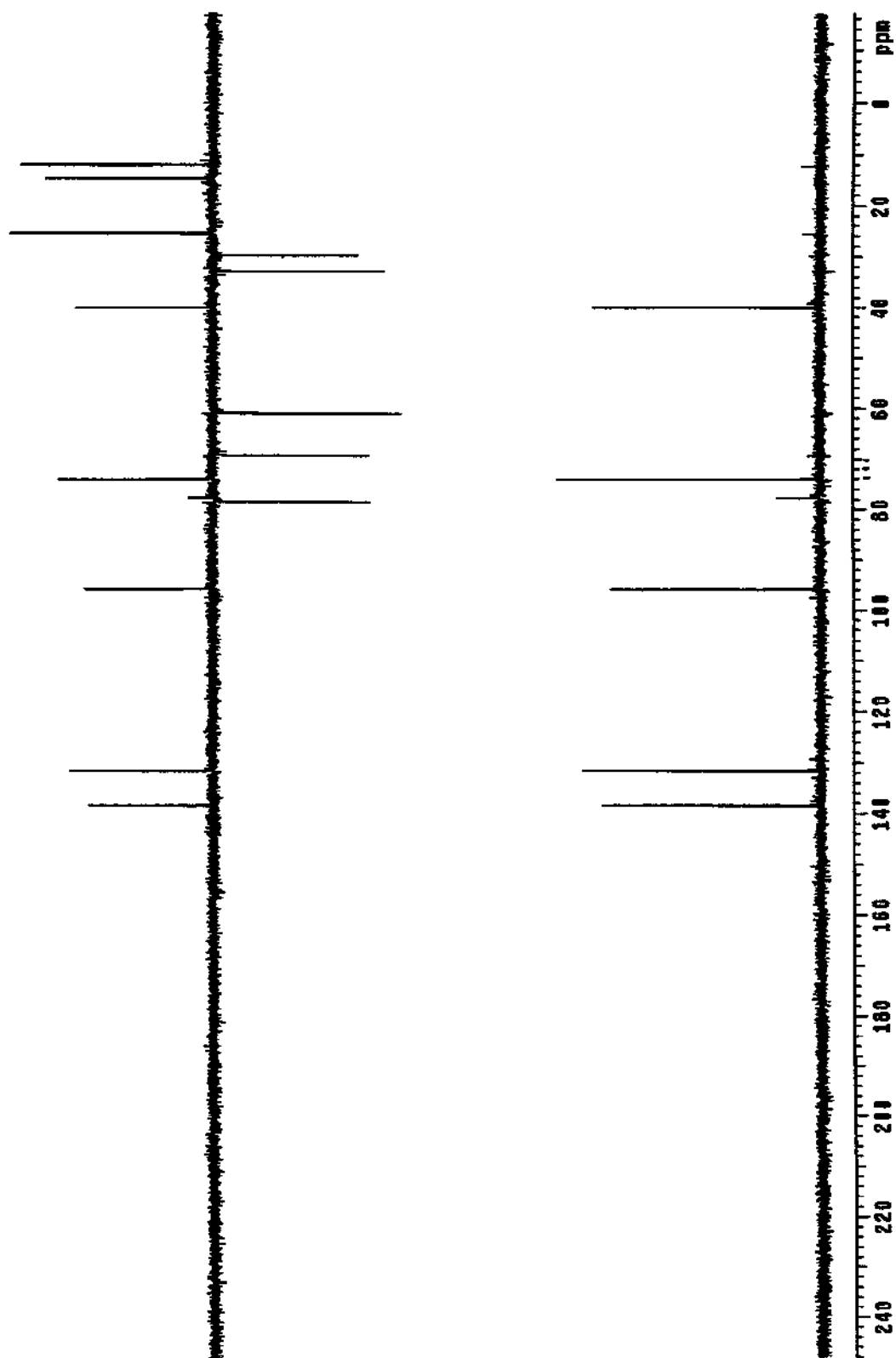


Figura 27. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da integerrimina:seneccionina N-óxido. Espectrômetro INOVA500.

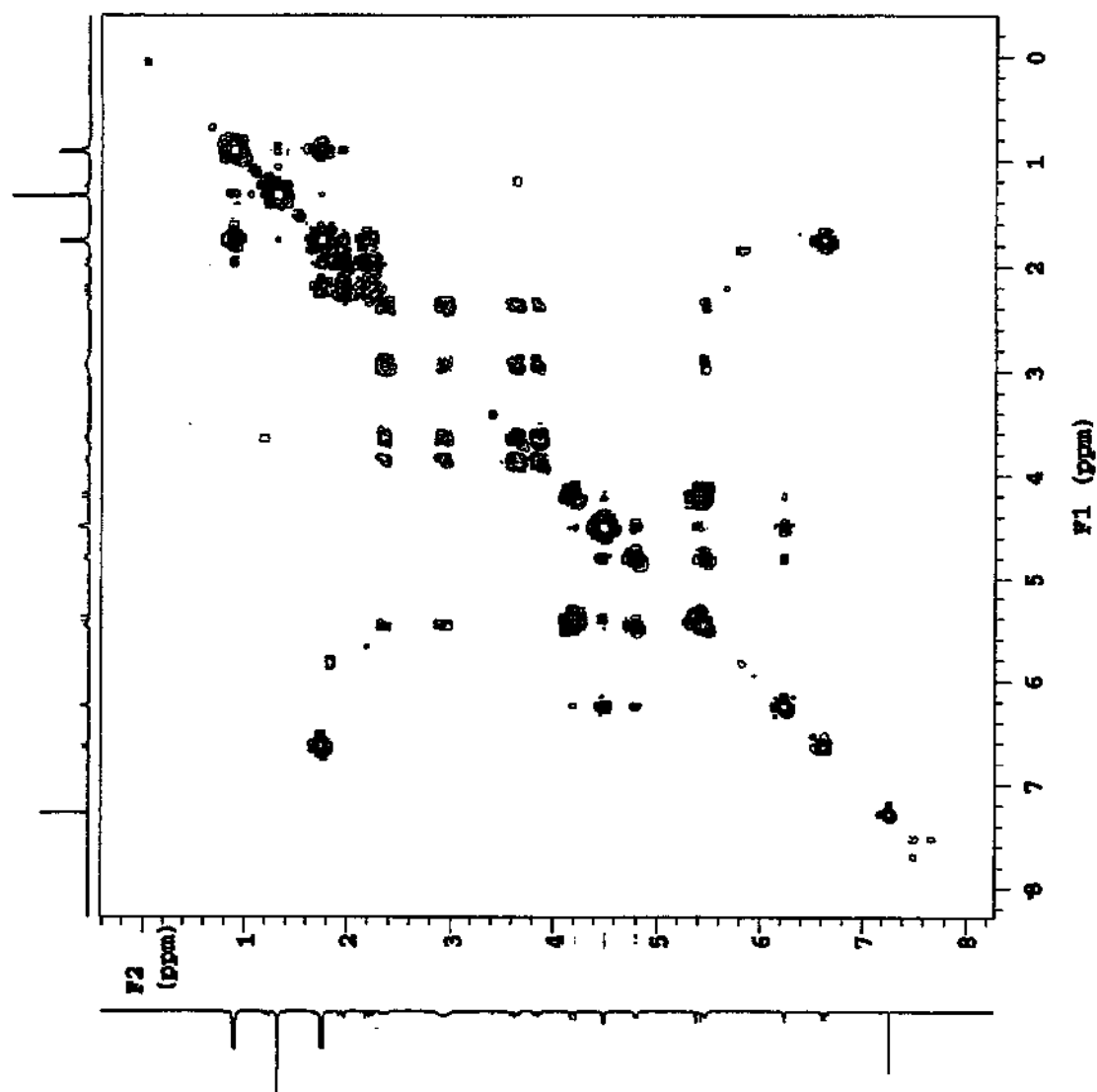
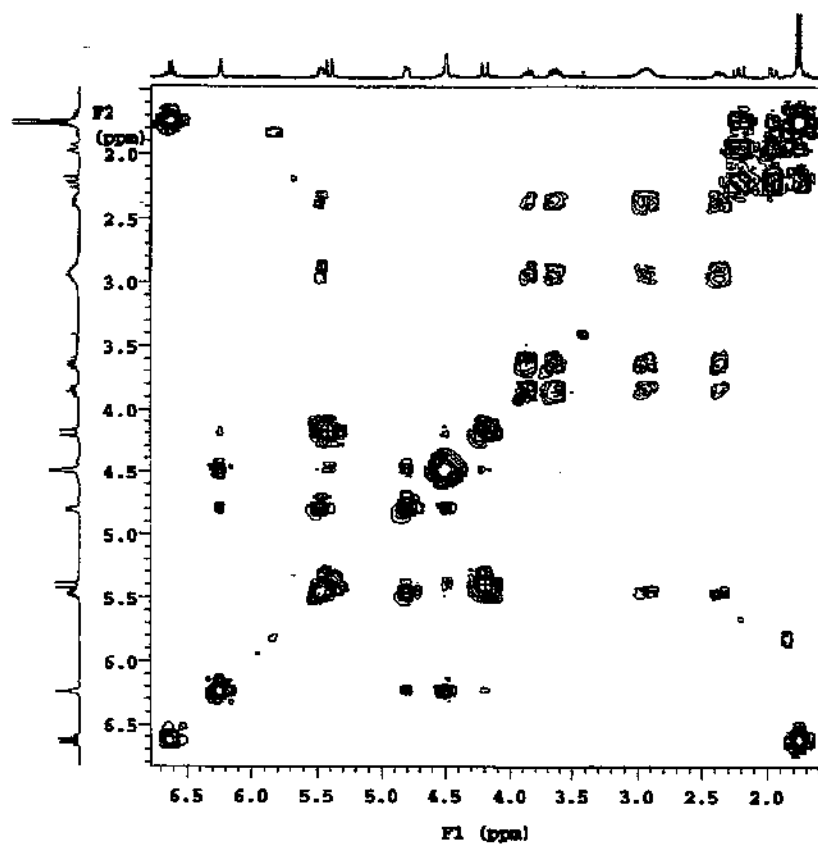


Figura 28. Espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido. Espectrômetro INOVA500.

A.



B.

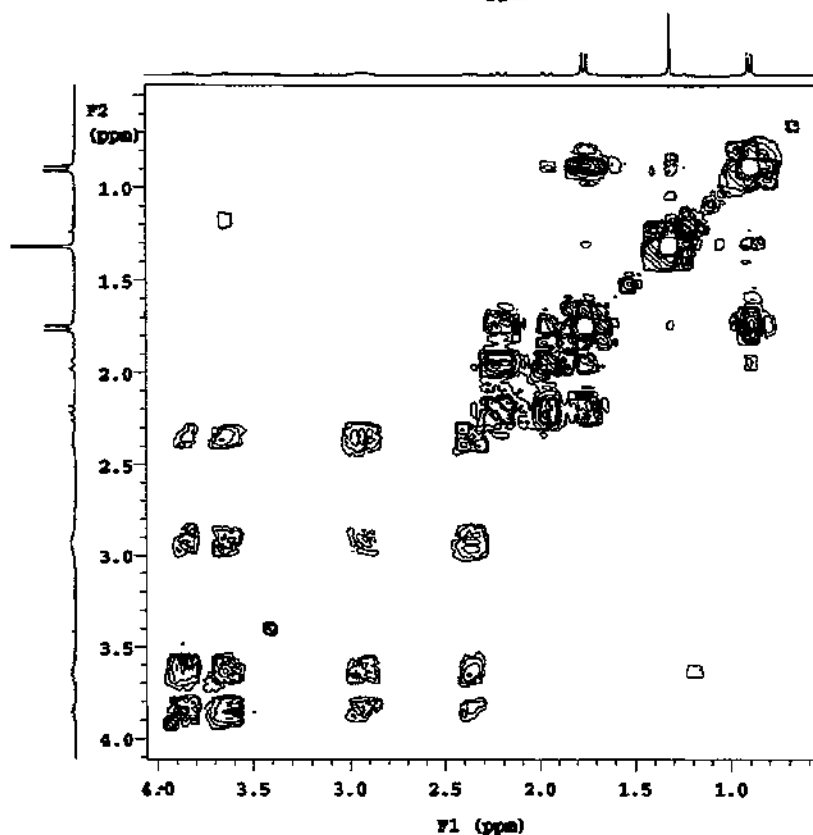


Figura 29. A. e B. Amplificações do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da integerrimina:seneccionina N-óxido (Figura 28).

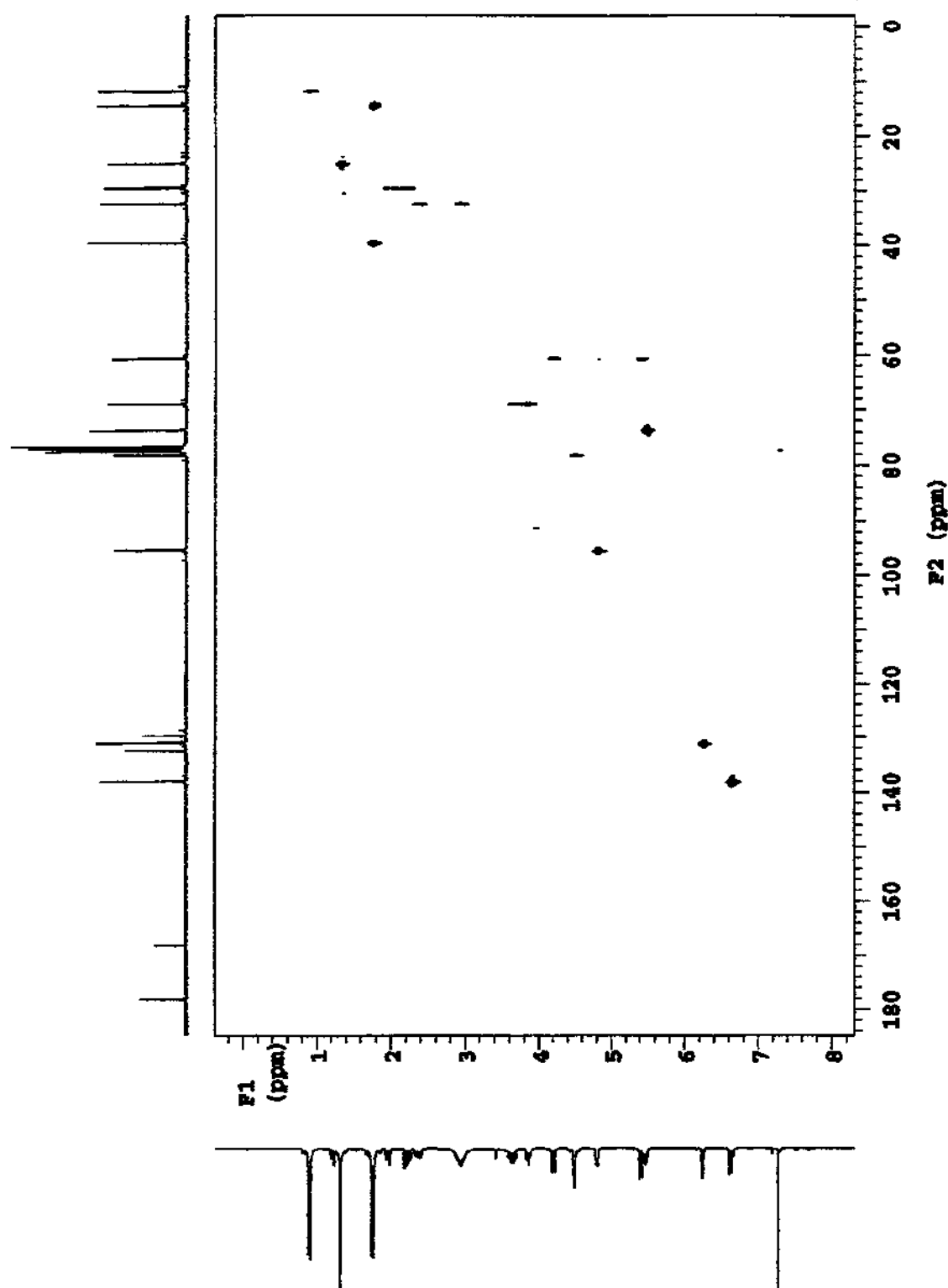
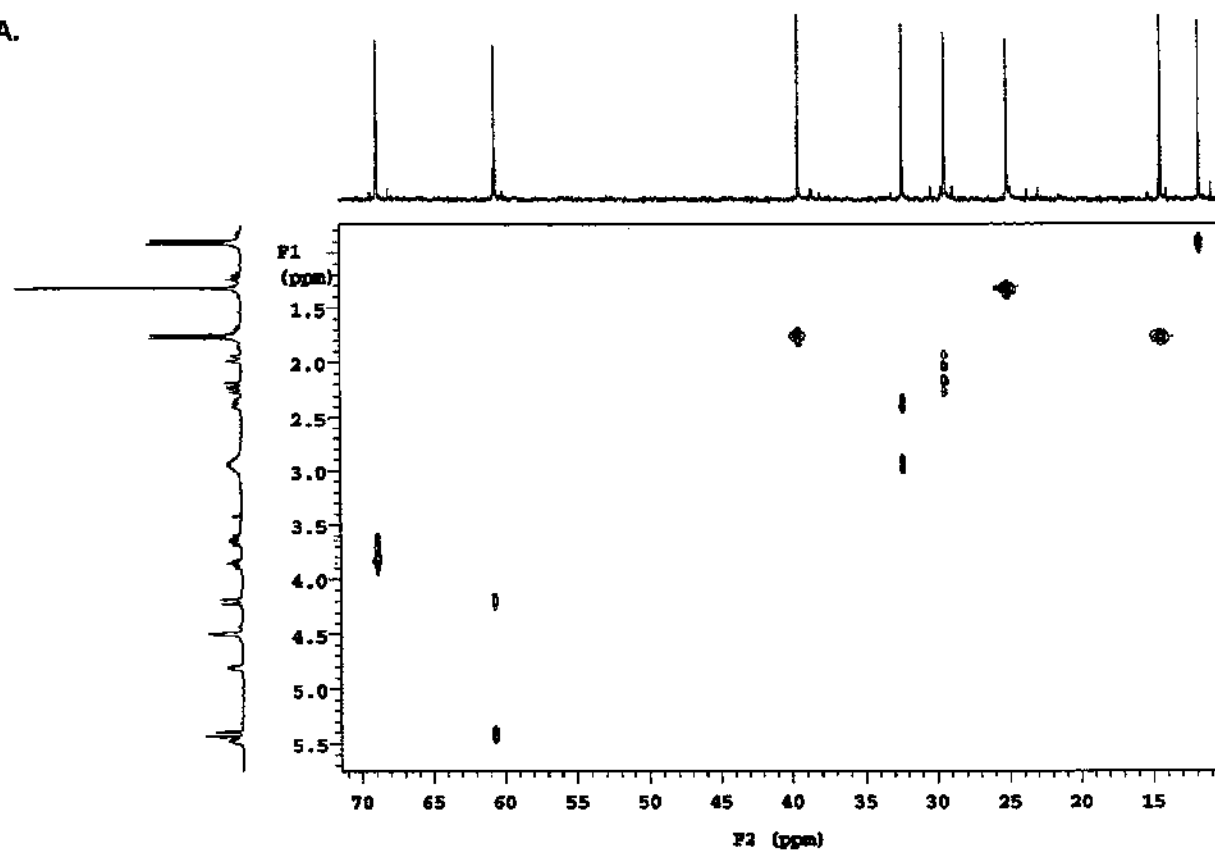


Figura 30. Espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da integerrimina:senecionina N-óxido. Espectrômetro INOVA500.

A.



B.

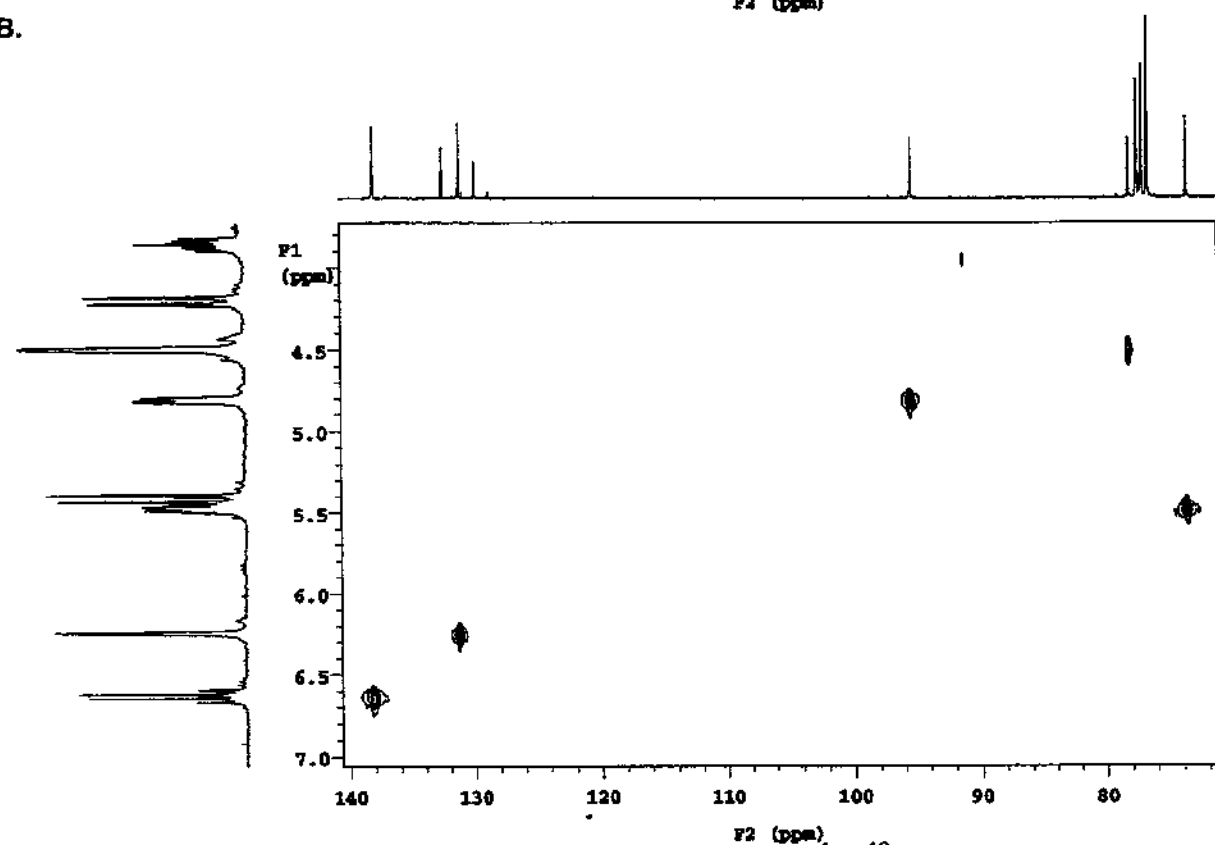


Figura 31. A e B. Amplificações do espectro HETCOR (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da integerrimina:seneccionina N-óxido (Figura 30).

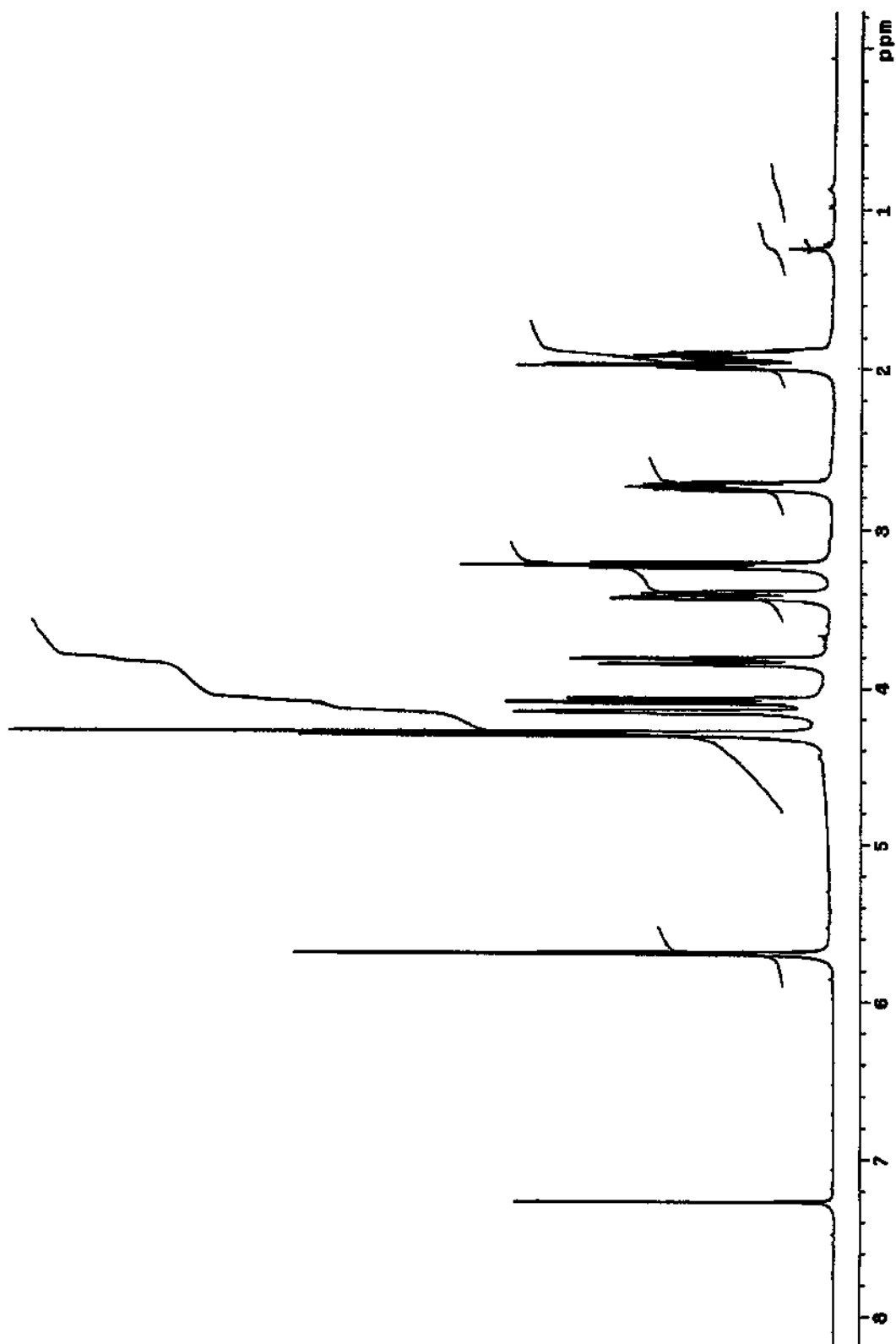


Figura 32. Espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina base livre (3). Espectrômetro INOVA500.

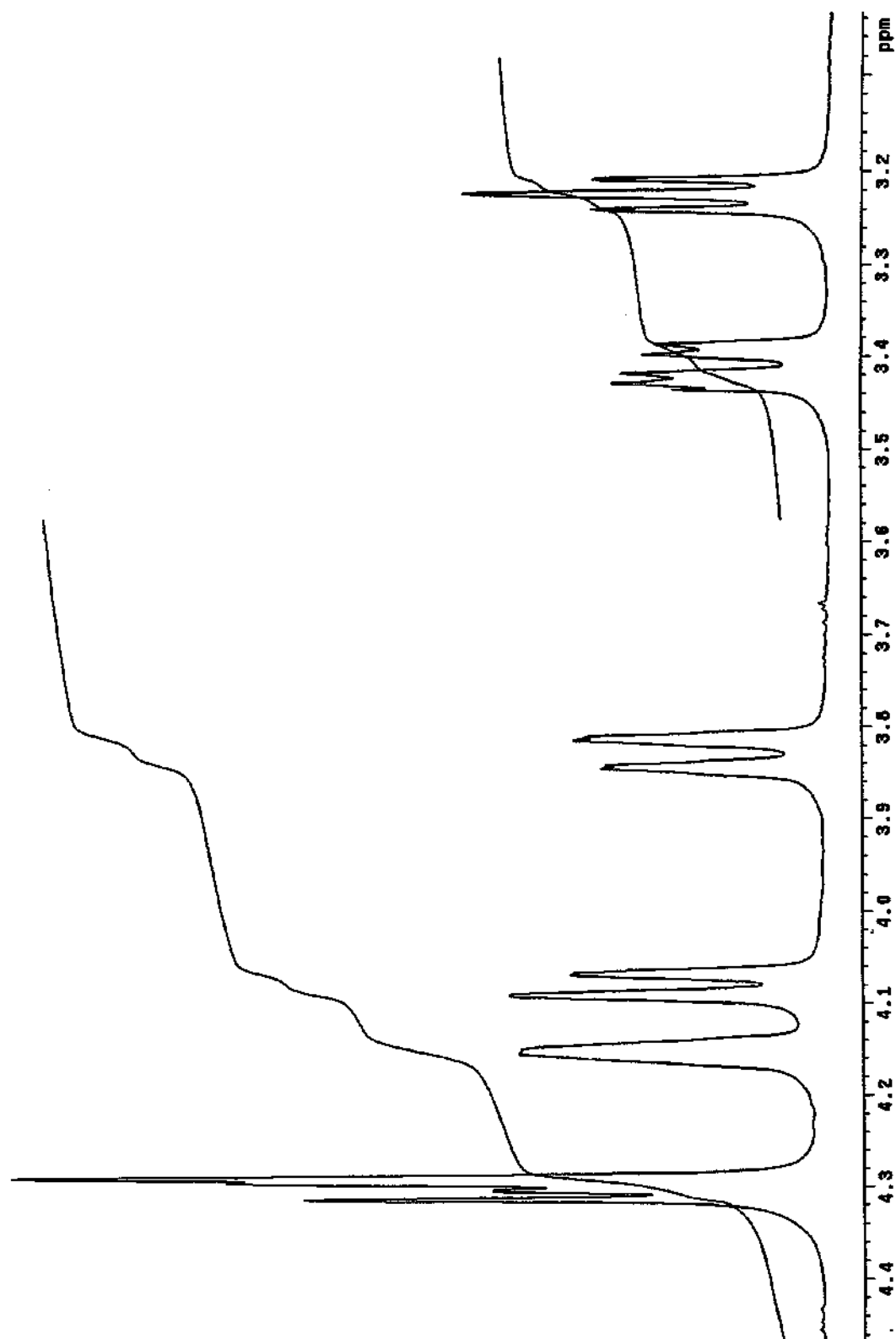


Figura 33. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina base livre (**3**) (Figura 32).

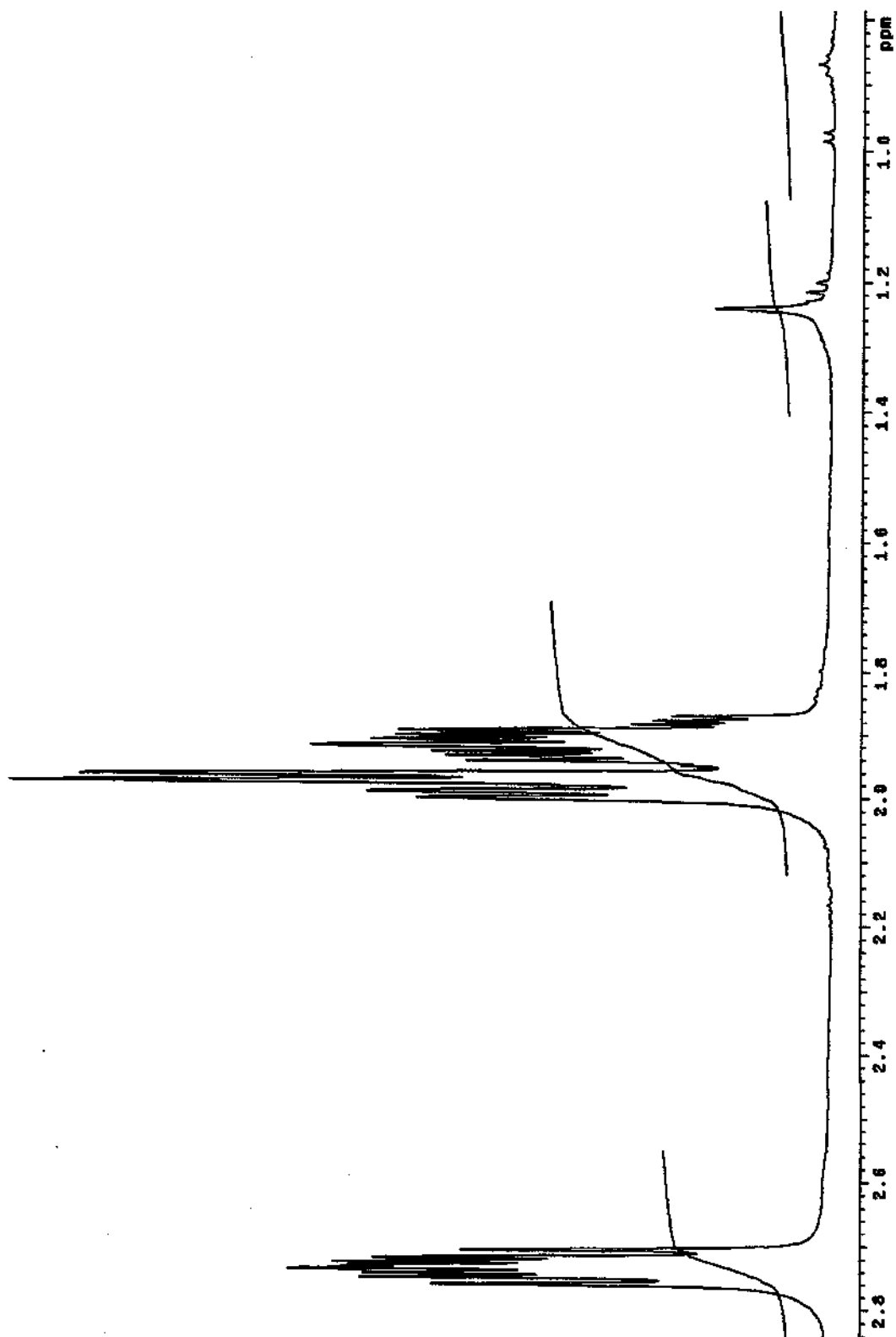


Figura 34. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 32).

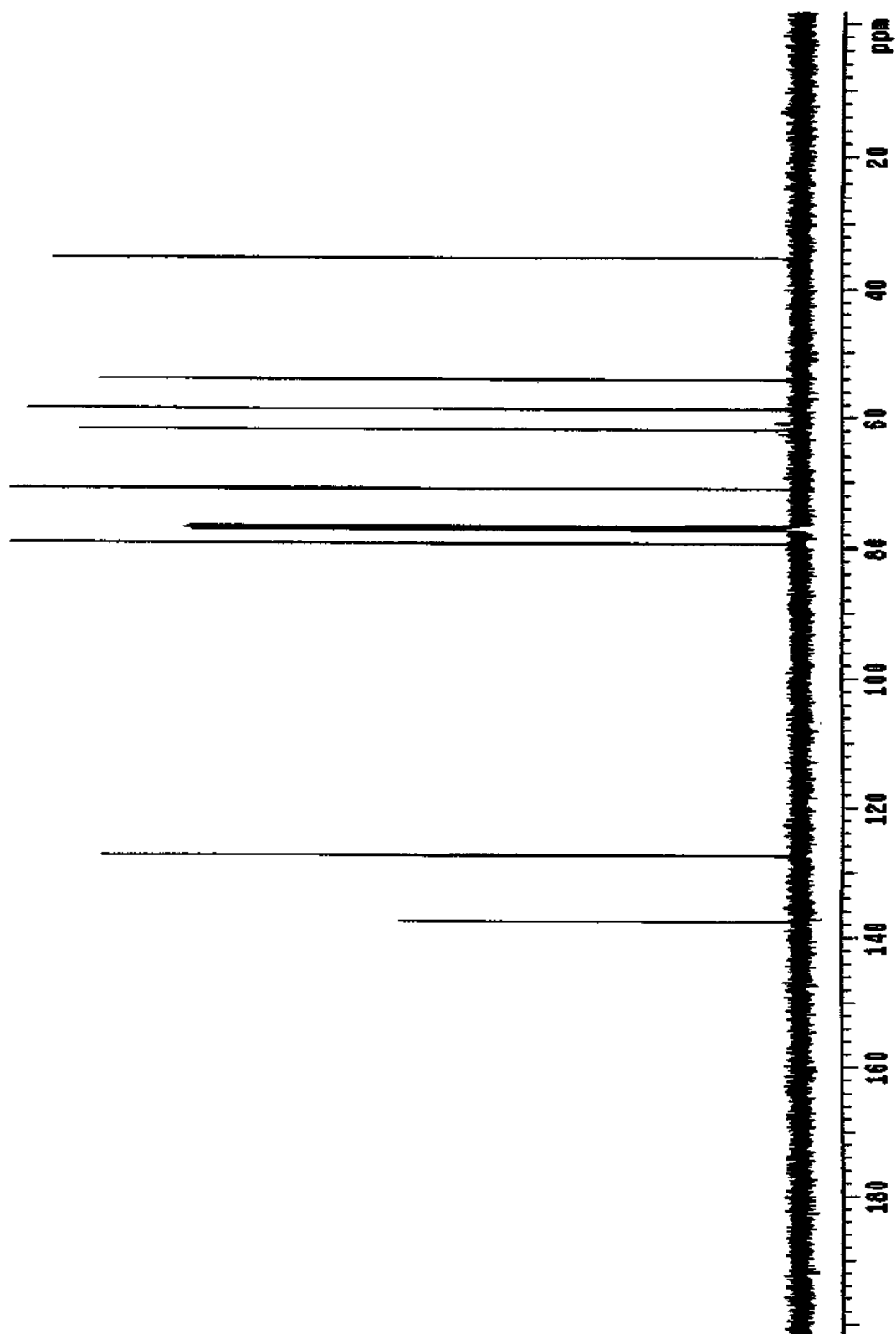


Figura 35. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina base livre (**3**). Espectrômetro INOVA500.

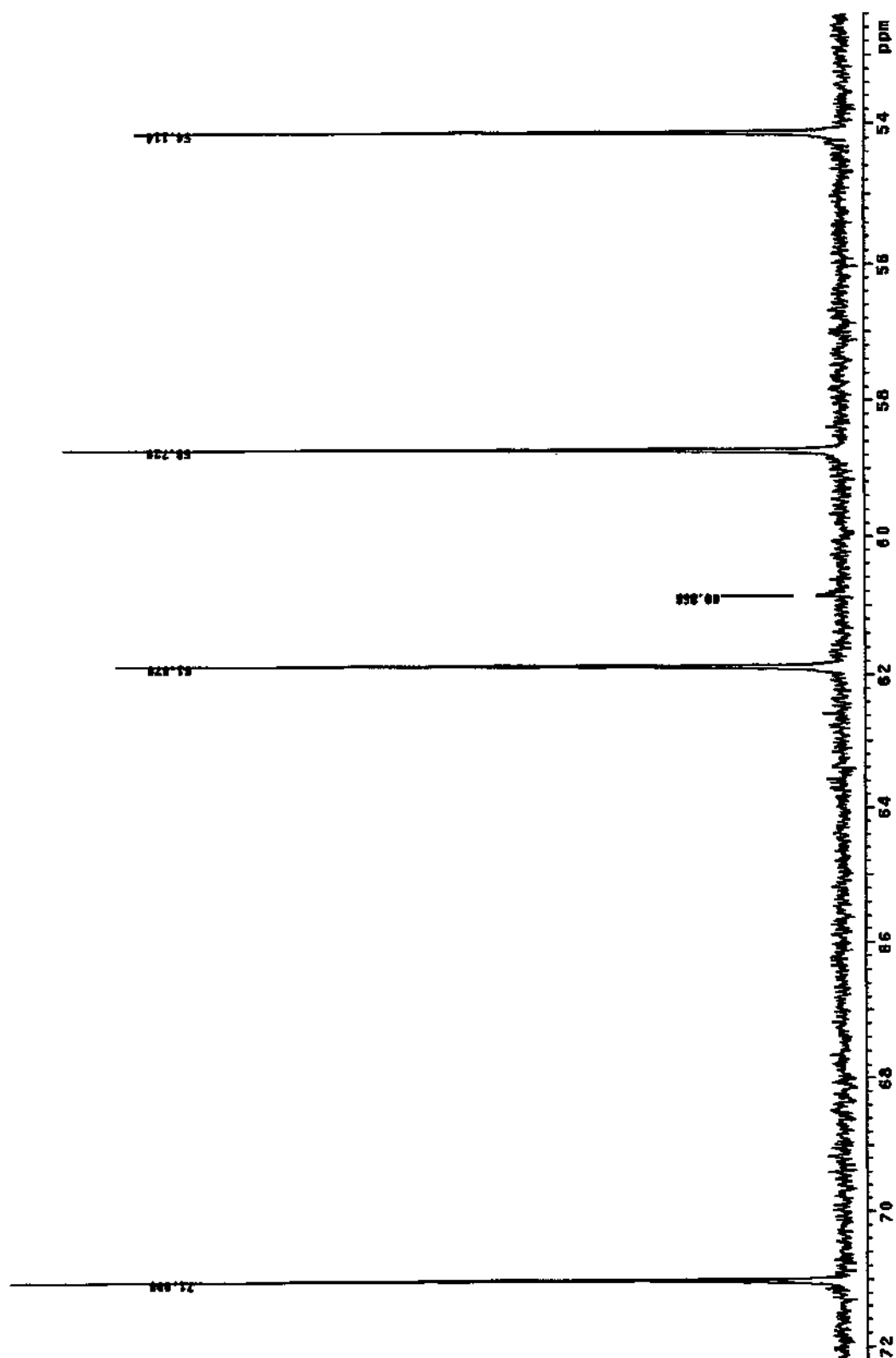


Figura 36. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 35).

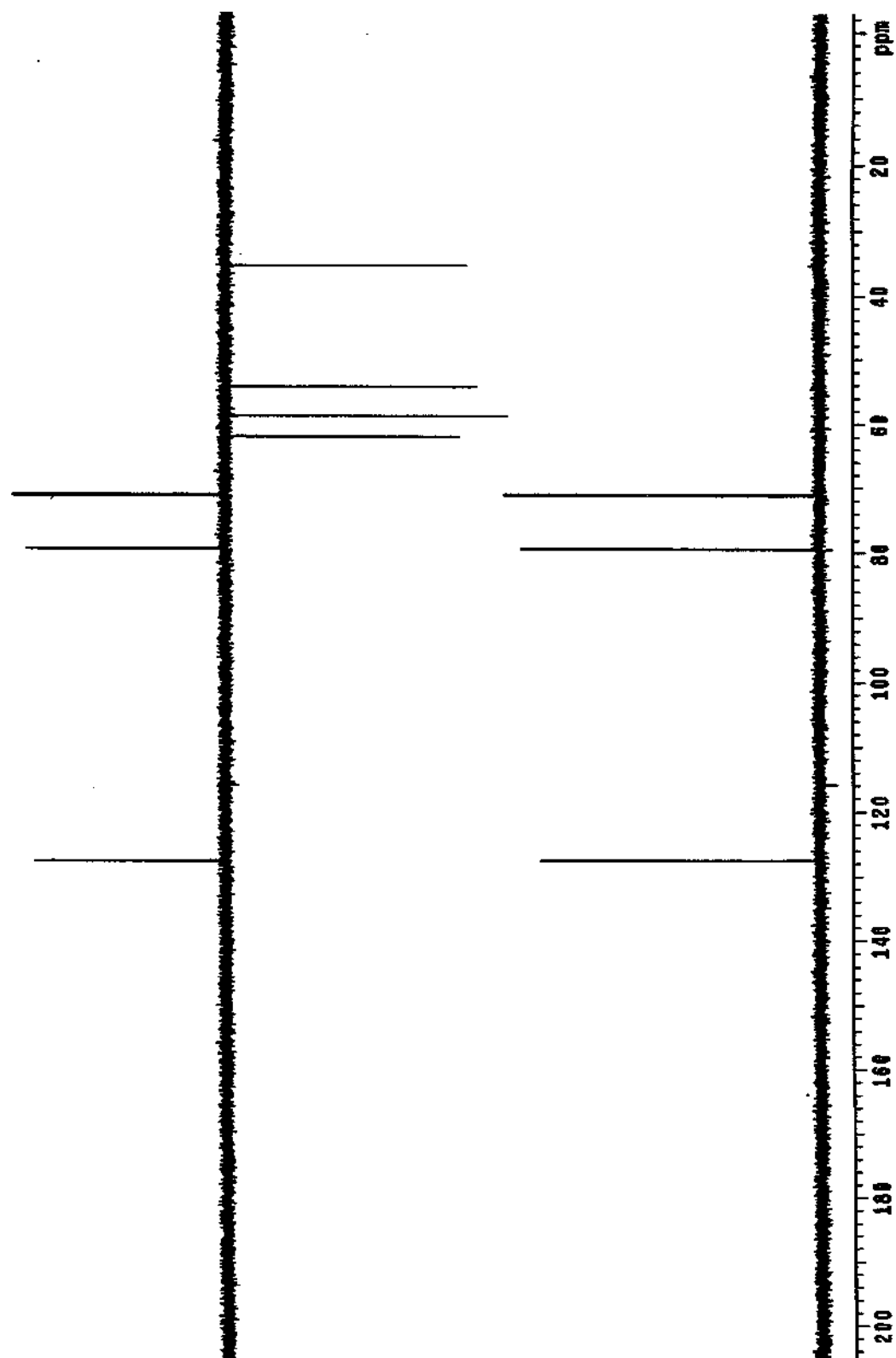


Figura 37. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da retronectina base livre (3). Espectrômetro INOVA500.

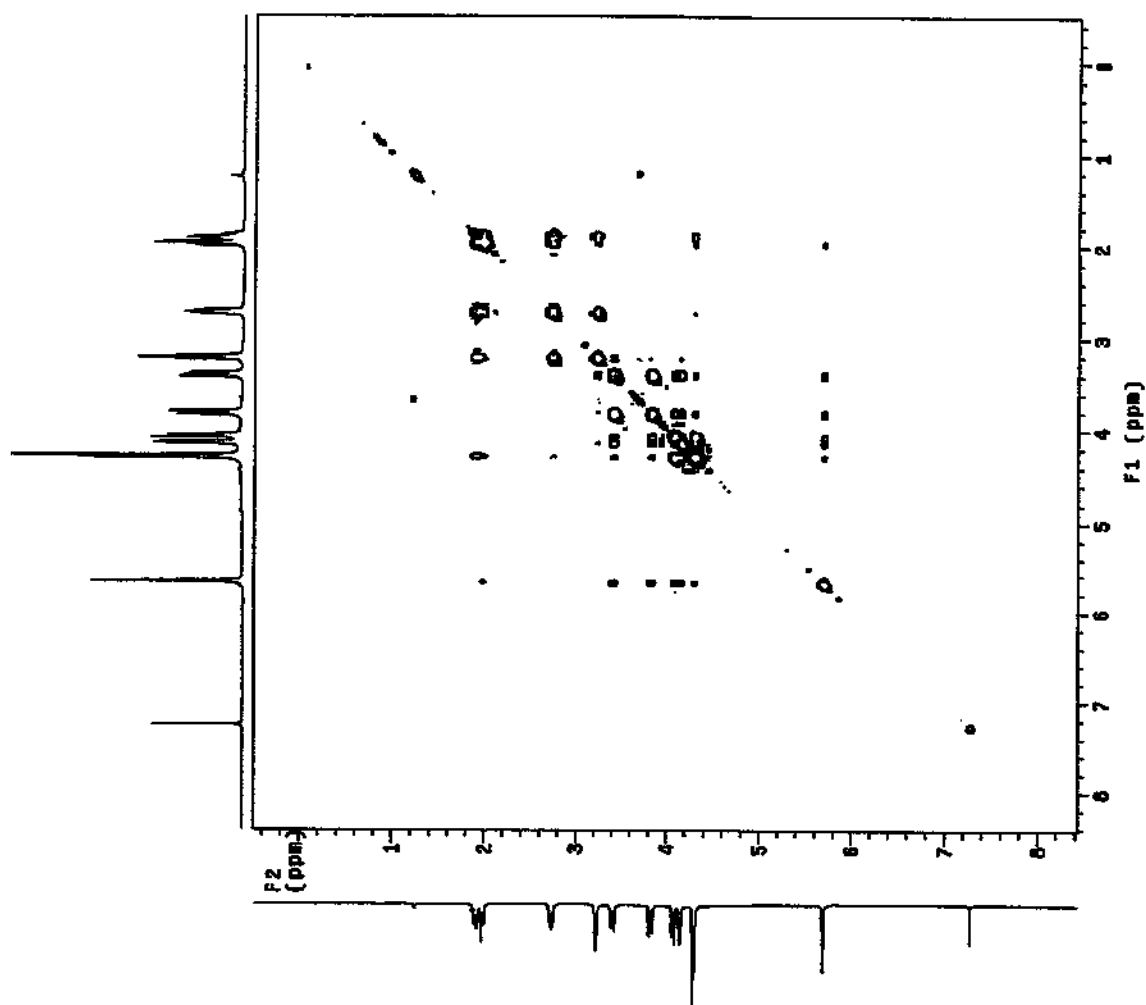


Figura 38. Espectro COSY (¹H-¹H) da análise de RMN da retronectina base livre (3). Espectrômetro INOVA500.

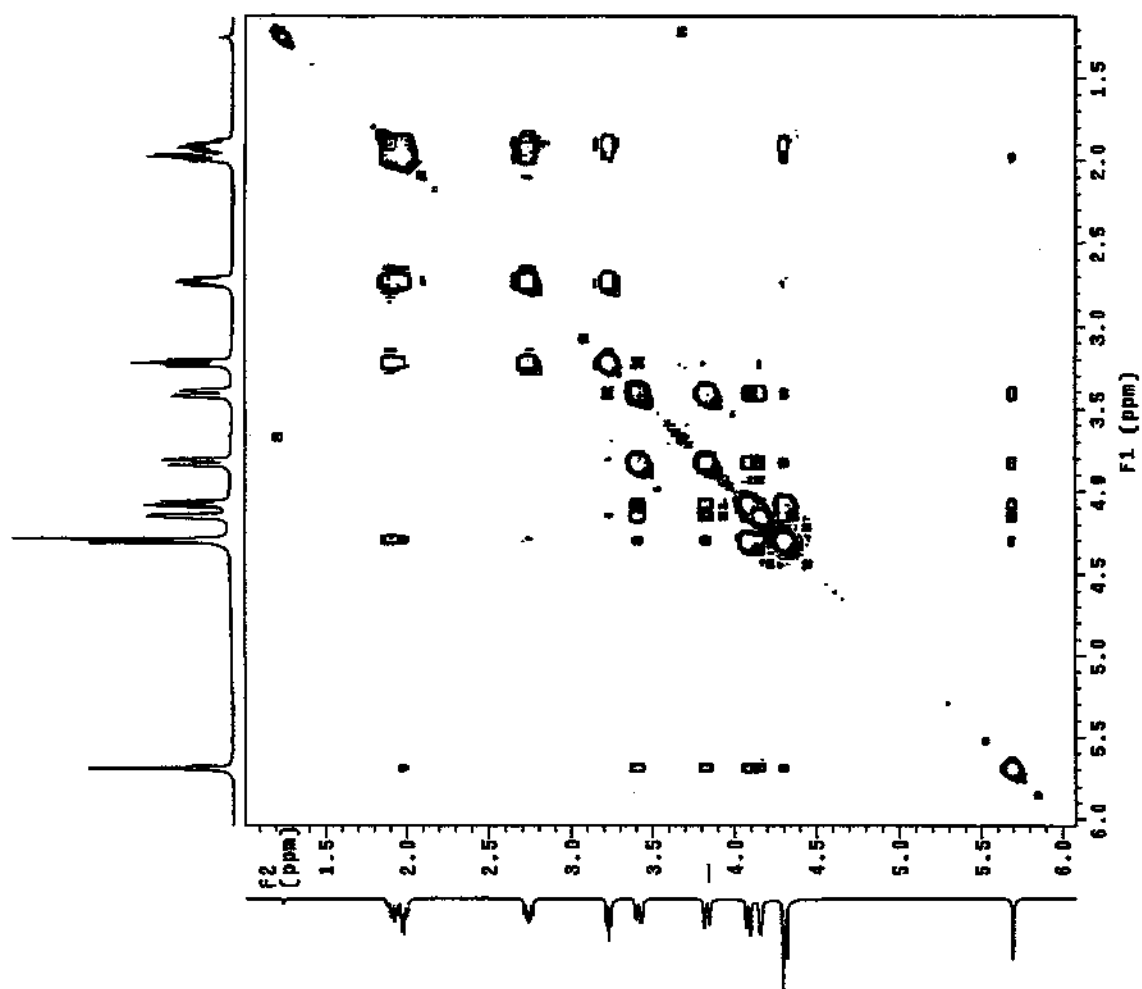


Figura 39. Amplificação do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da retronecina base livre (**3**) (Figura 38).

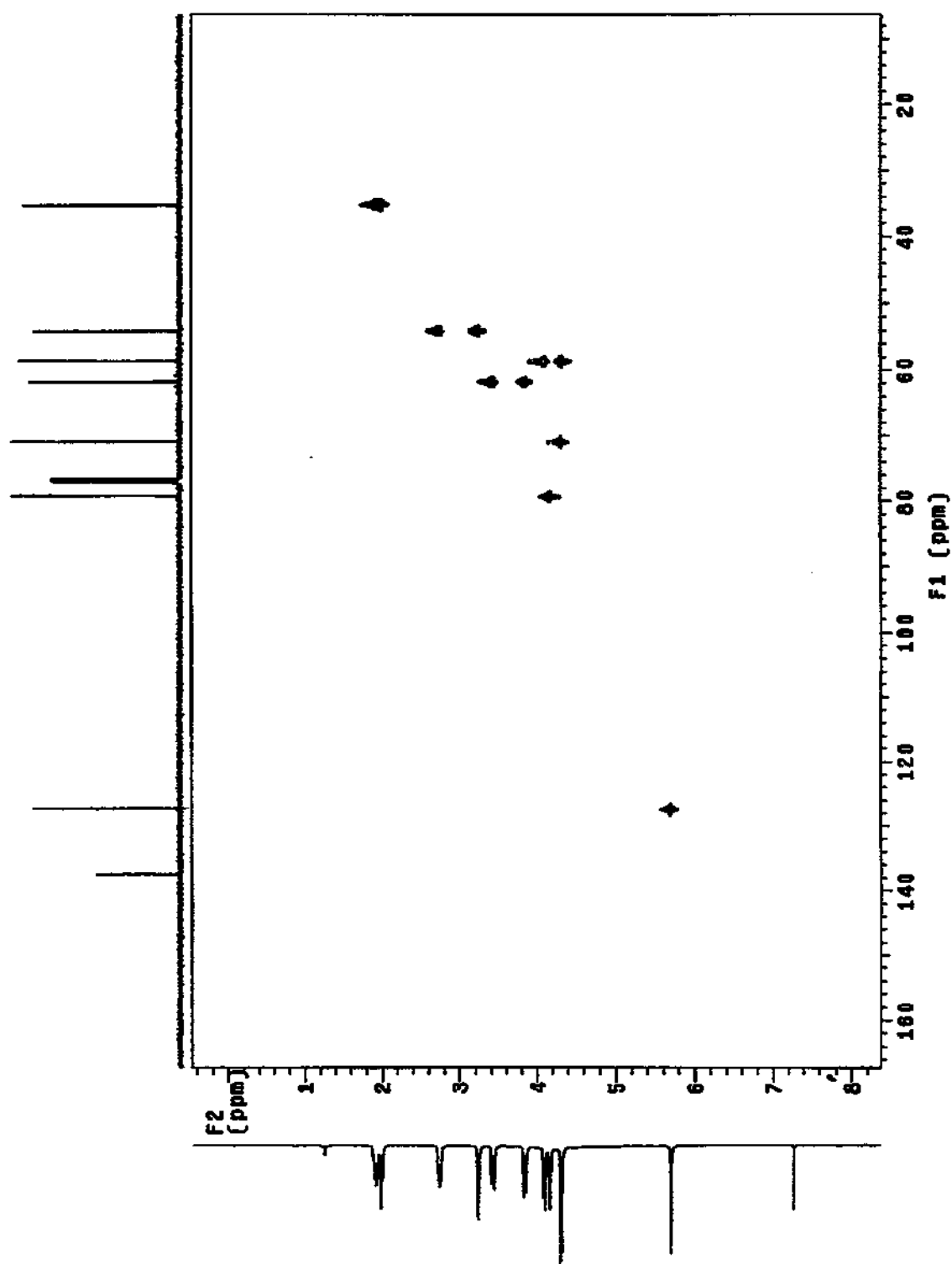


Figura 40. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da retronecina base livre (**3**). Espectrômetro INOVA500.

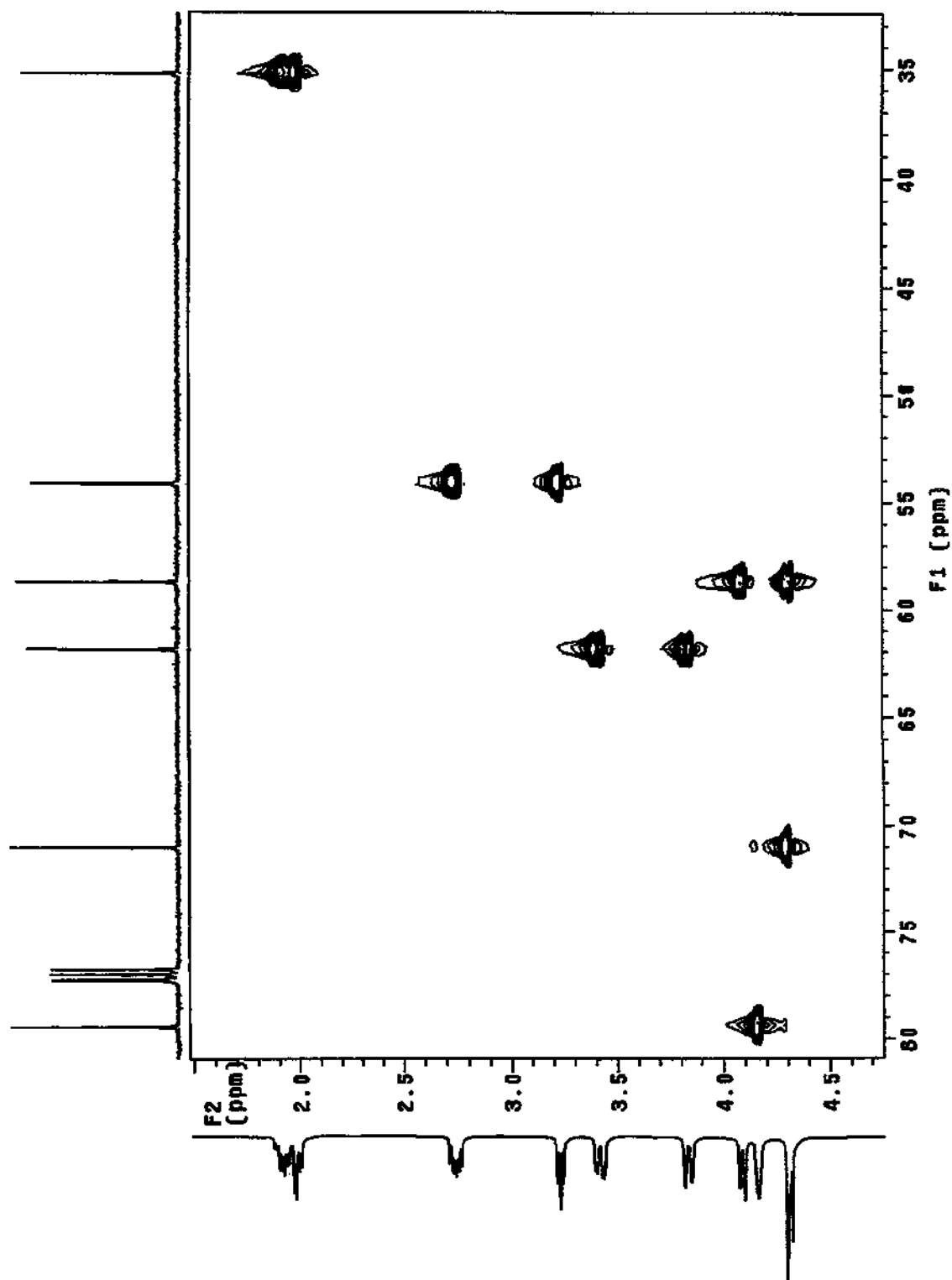


Figura 41. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da retronecina base livre (3) (Figura 40).

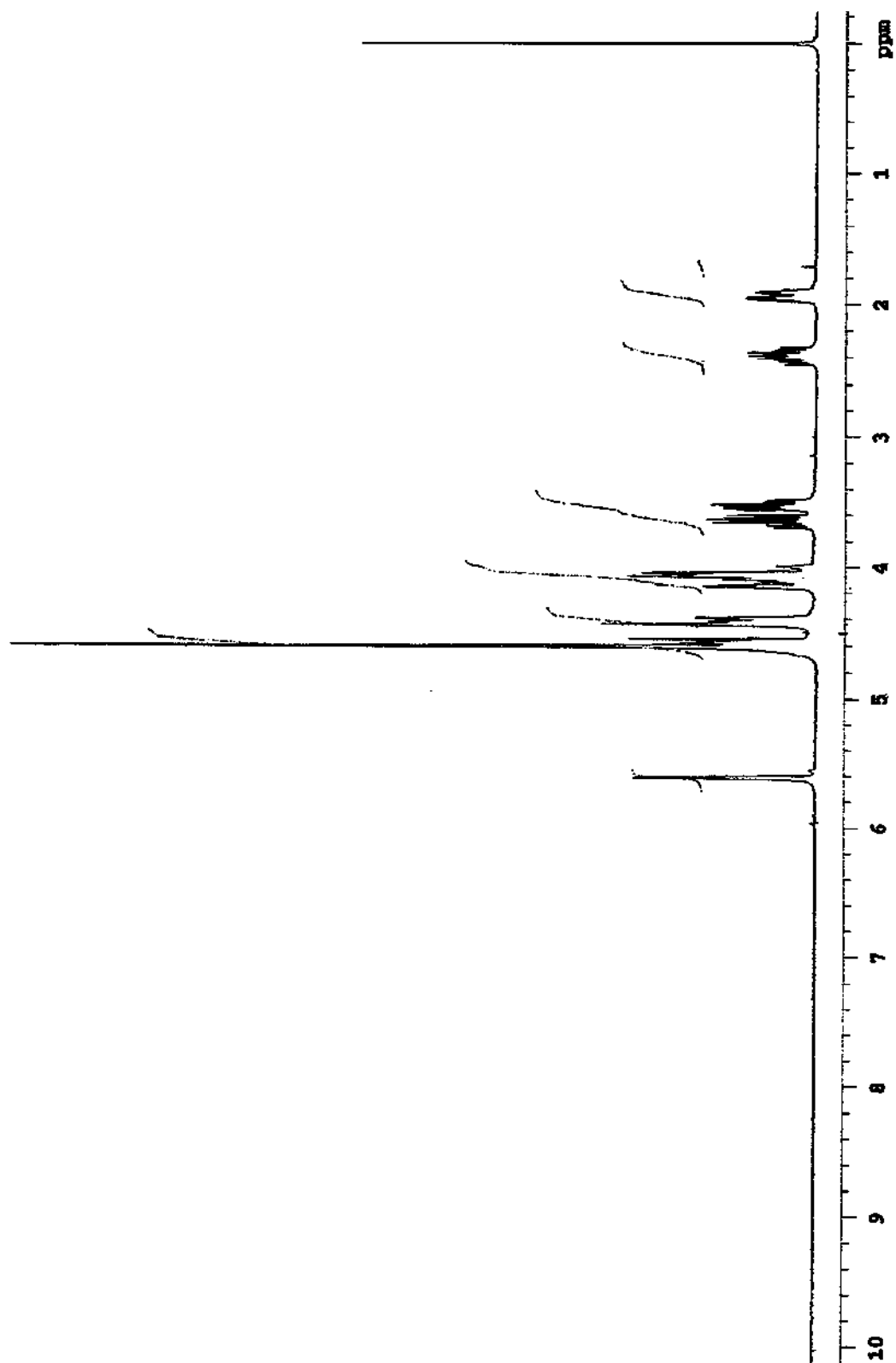


Figura 42. Espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

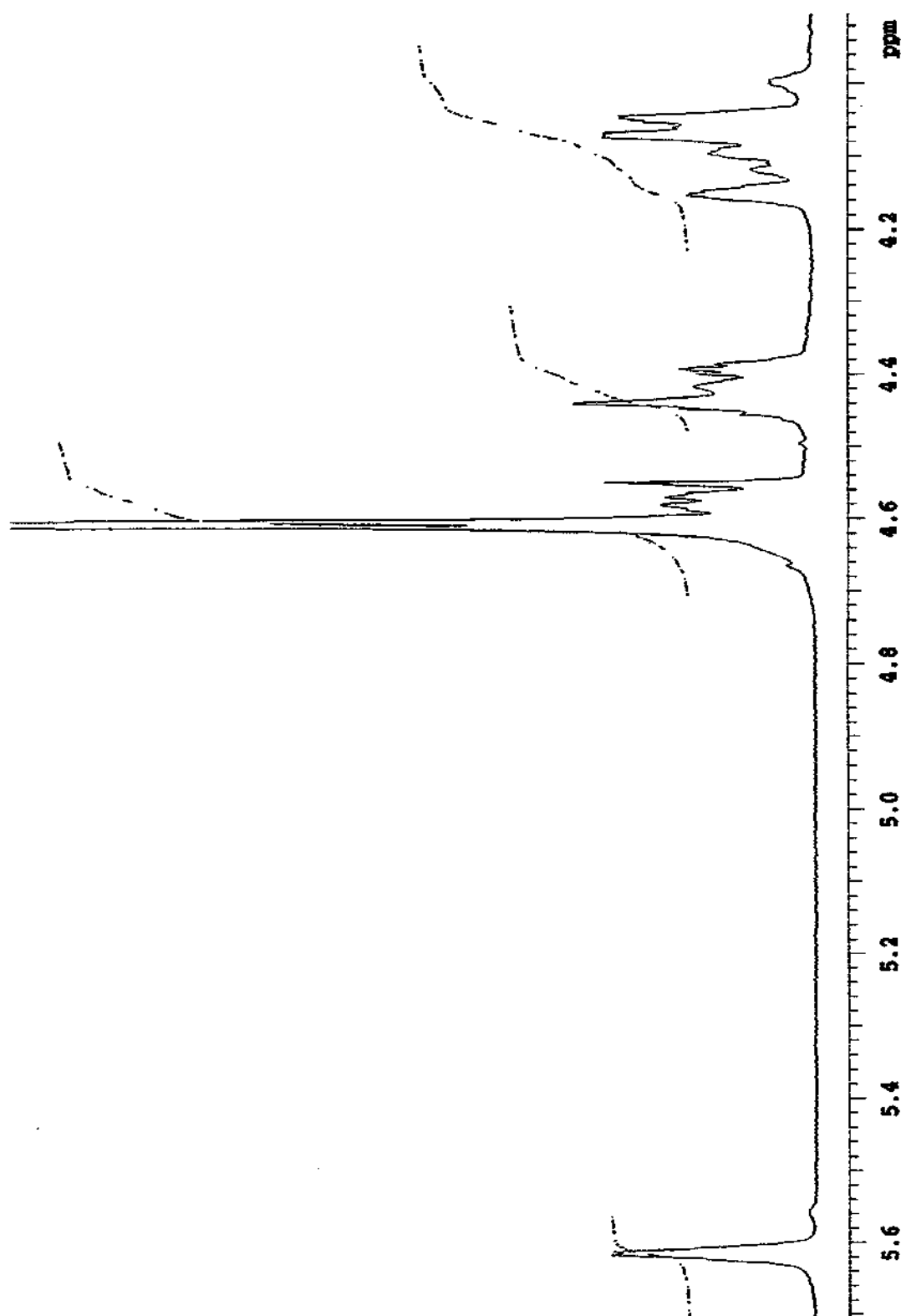


Figura 43. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 42).

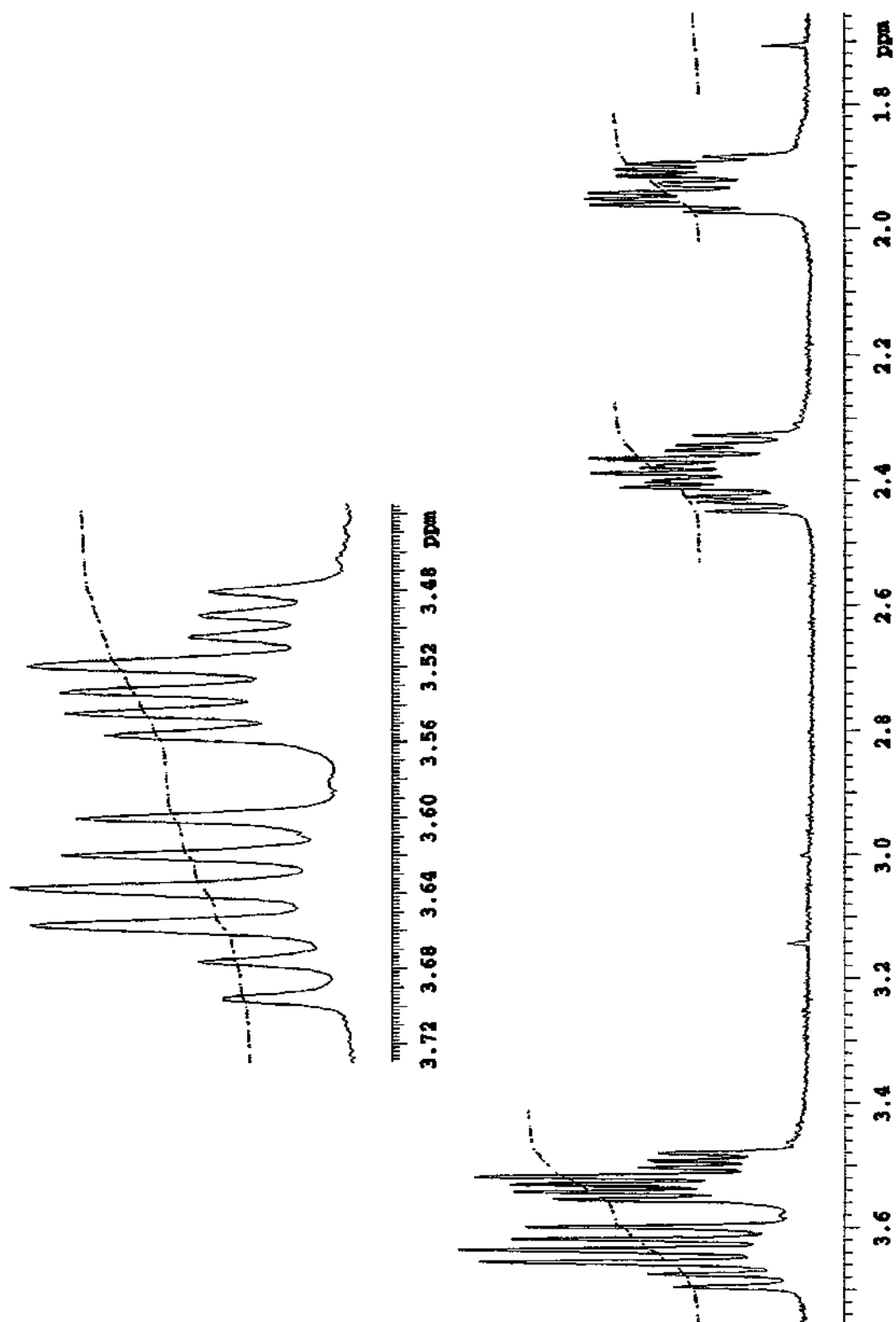


Figura 44. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 42).

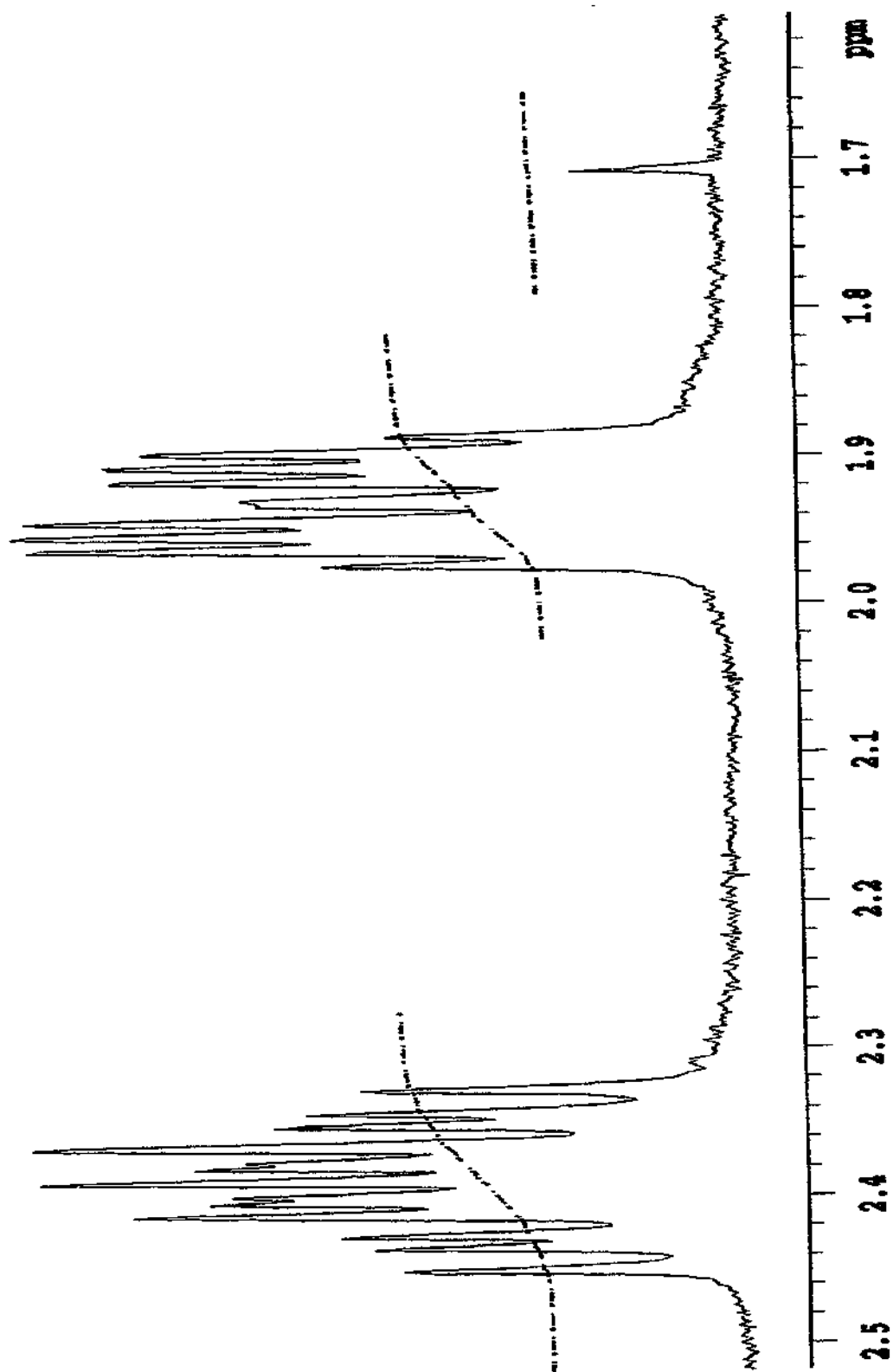


Figura 45. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 42).

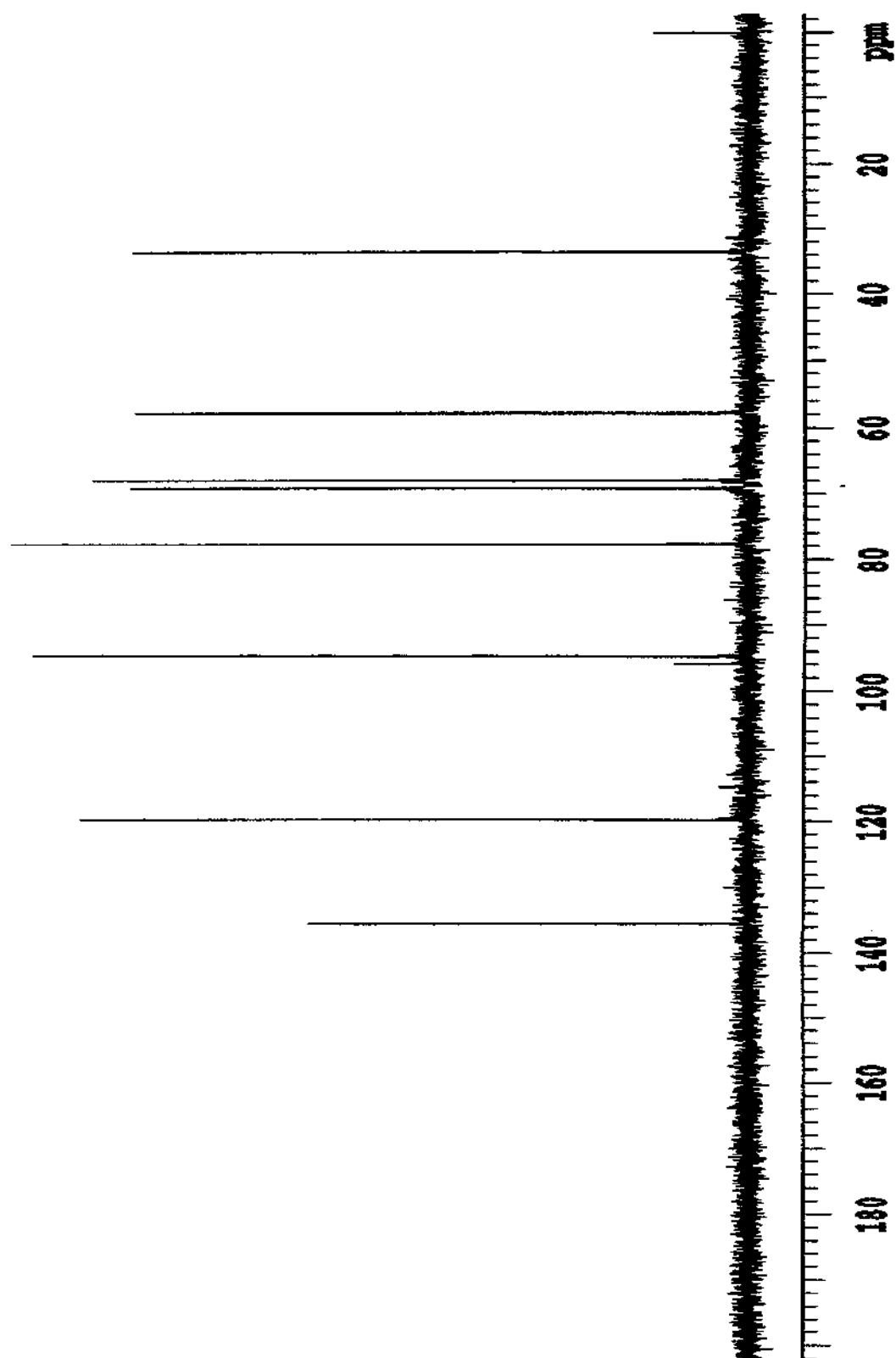


Figura 46. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

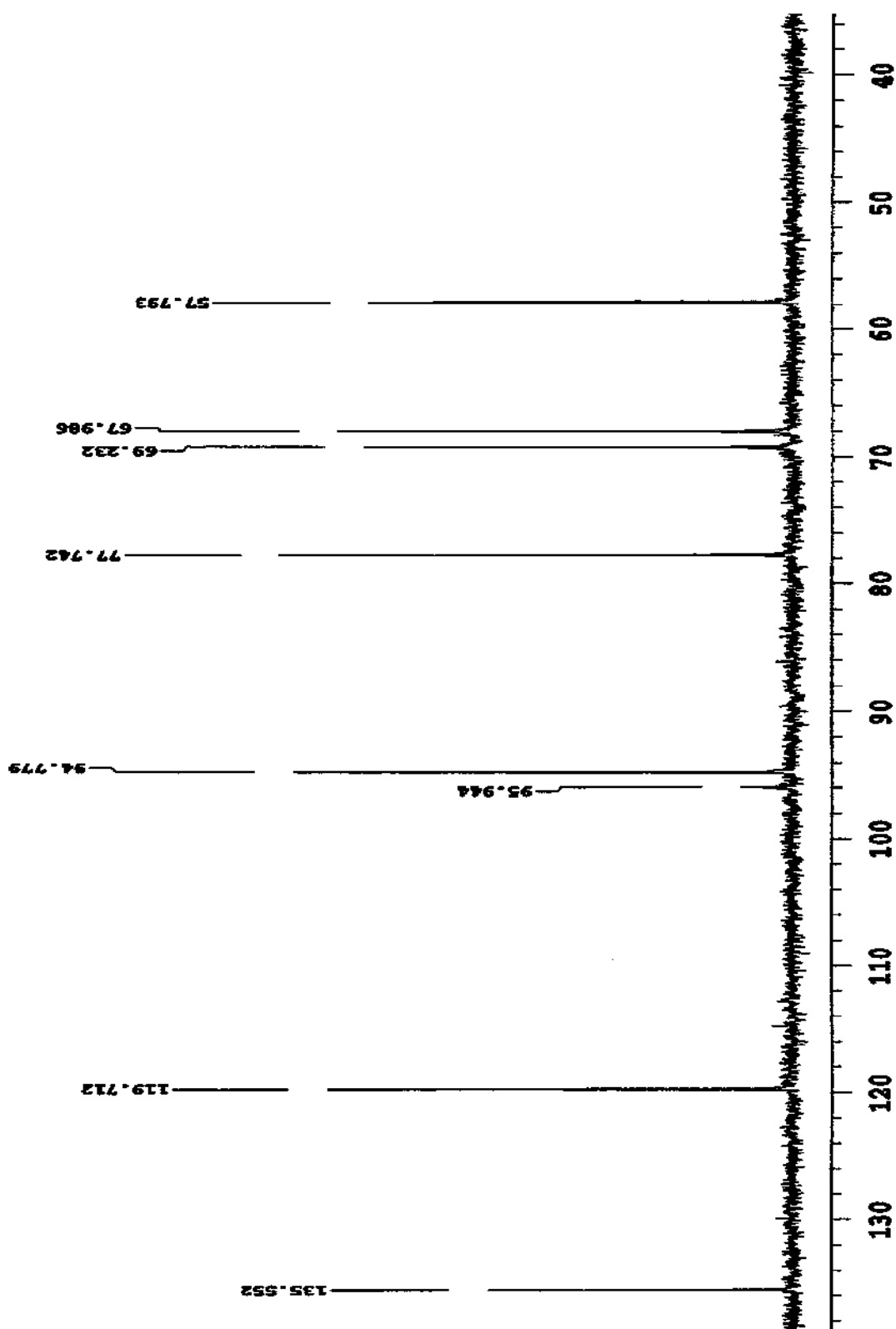


Figura 47. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da retronecina N-óxido (Figura 46).

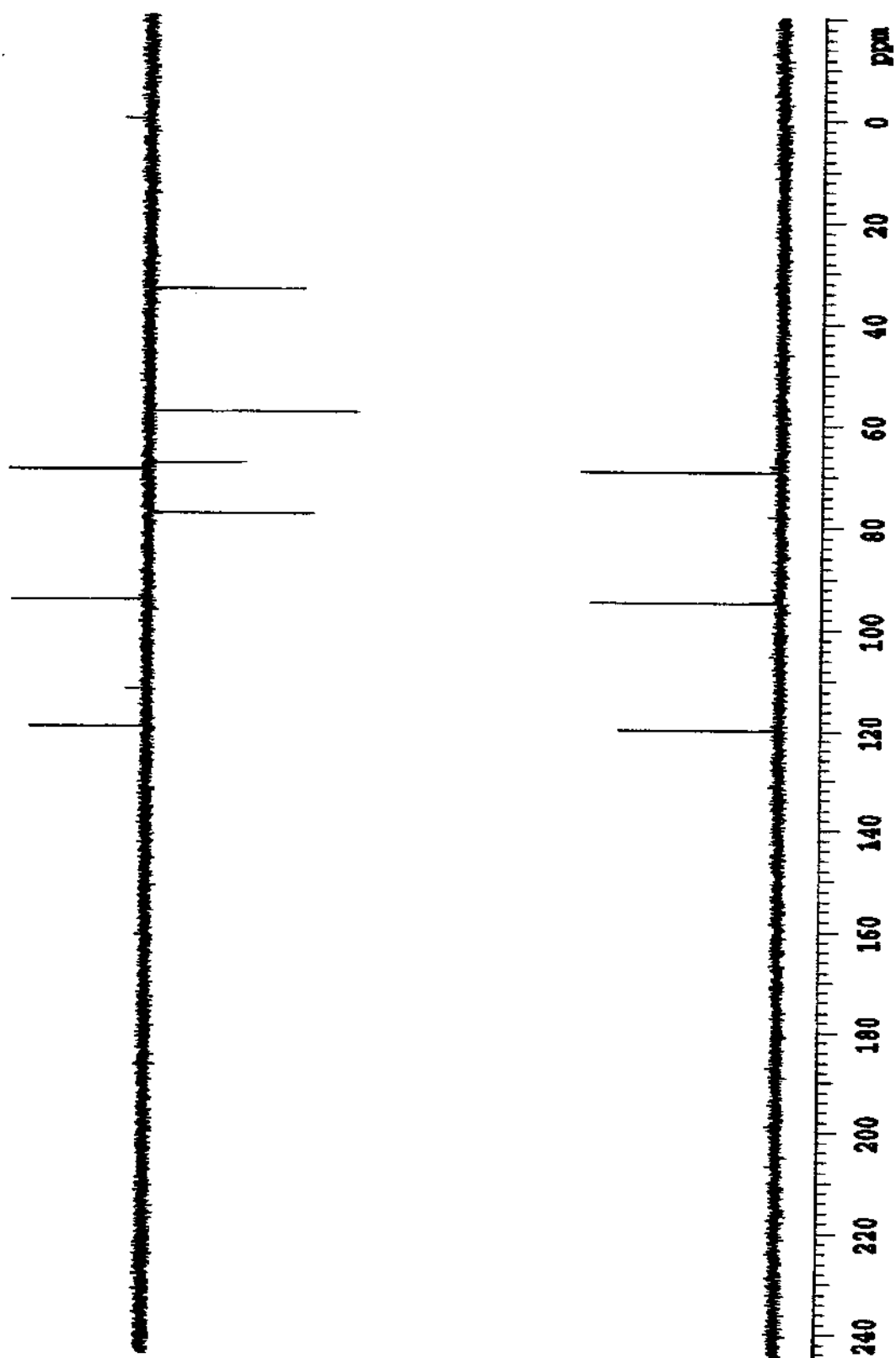


Figura 48 Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da retronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

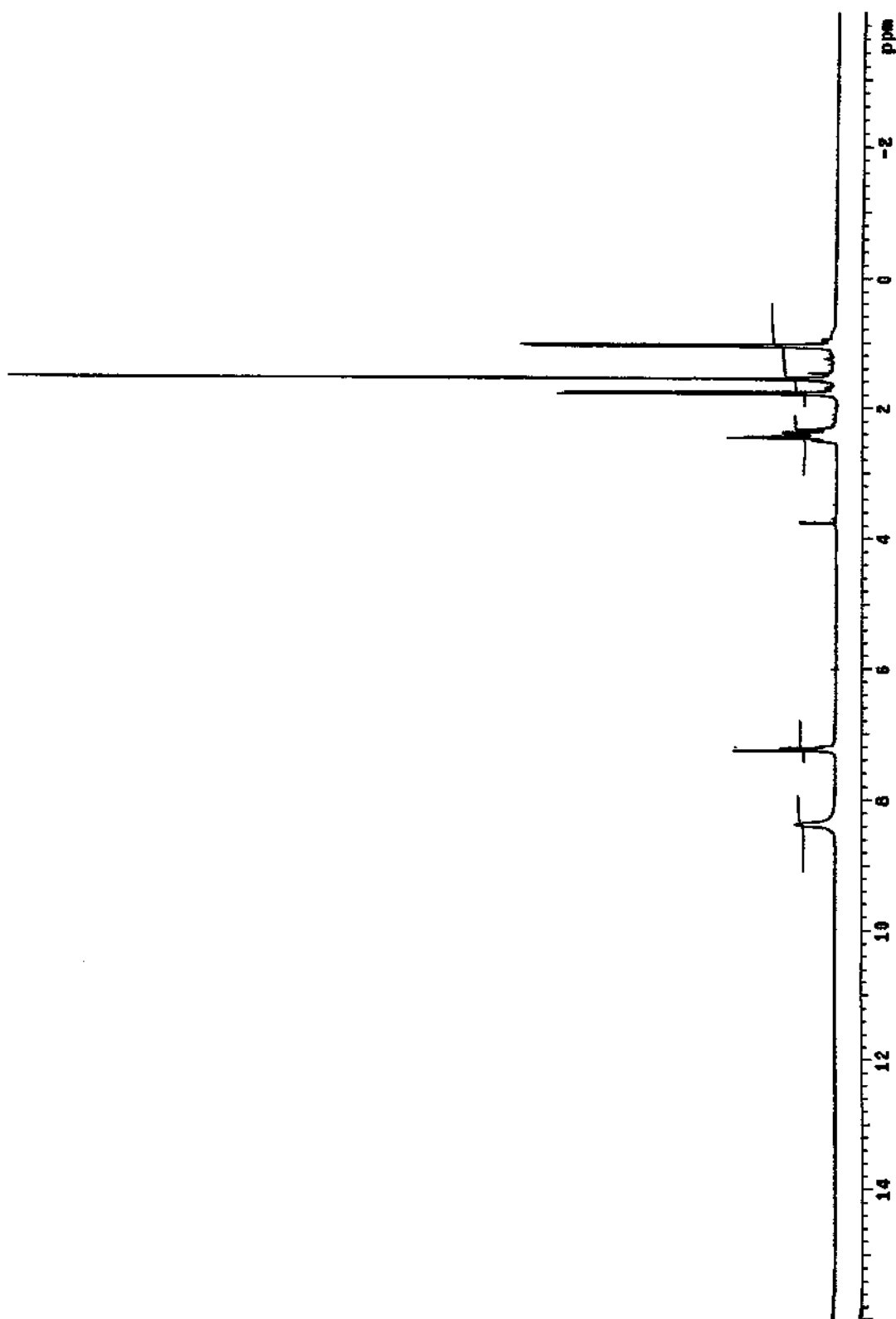
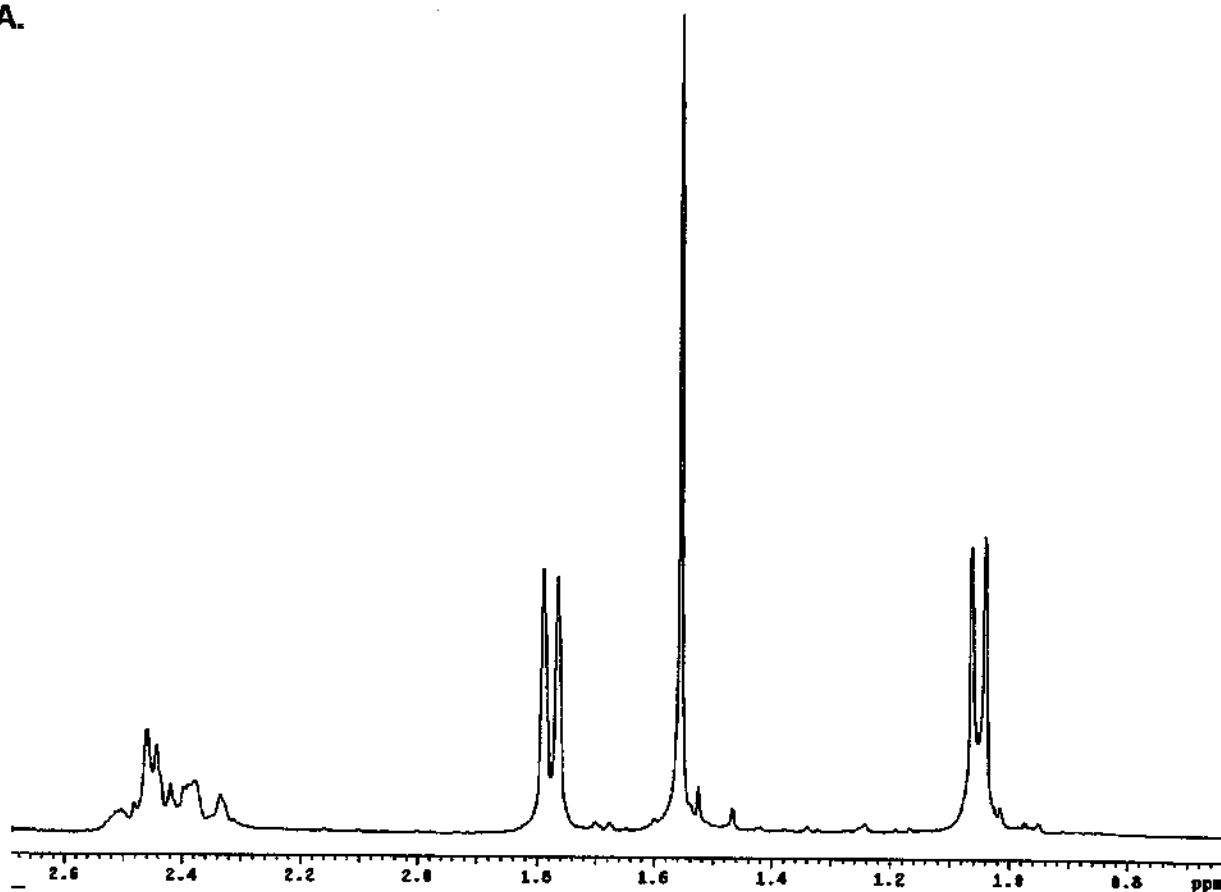


Figura 49 Espectro do ^1H da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (6 e 7). Espectrômetro INOVA500.

A.



B.

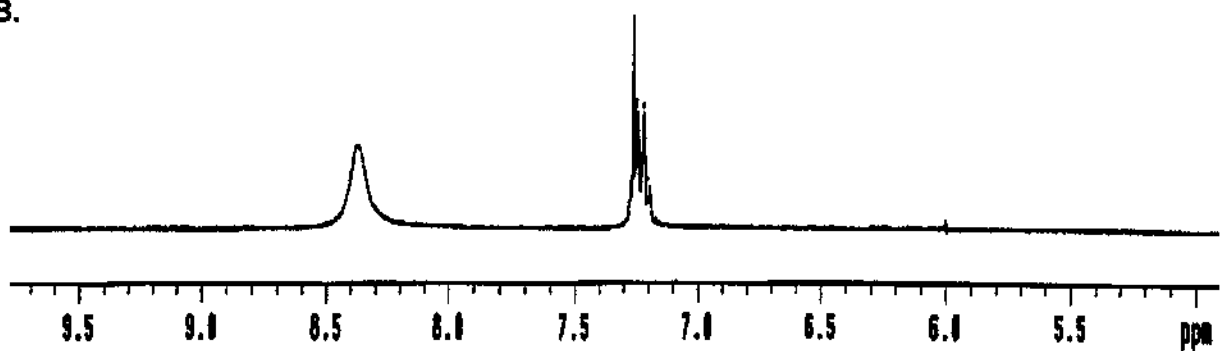


Figura 50 A. e B. Amplificações do espectro do ^1H da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (**6** e **7**) (Figura 49).

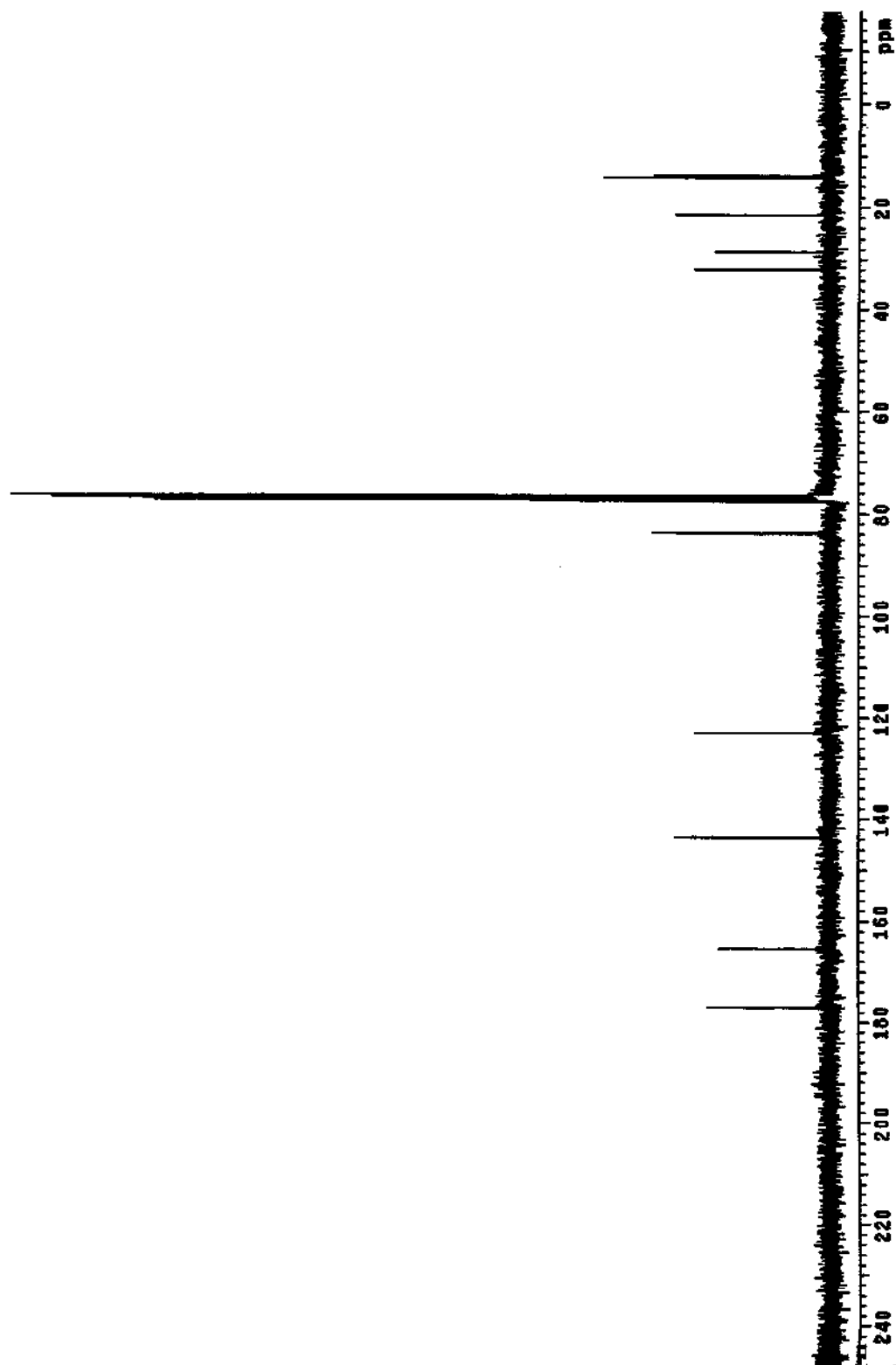


Figura 51 Espectro do ^{13}C da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (6 e 7). Espectrômetro INOVA500.

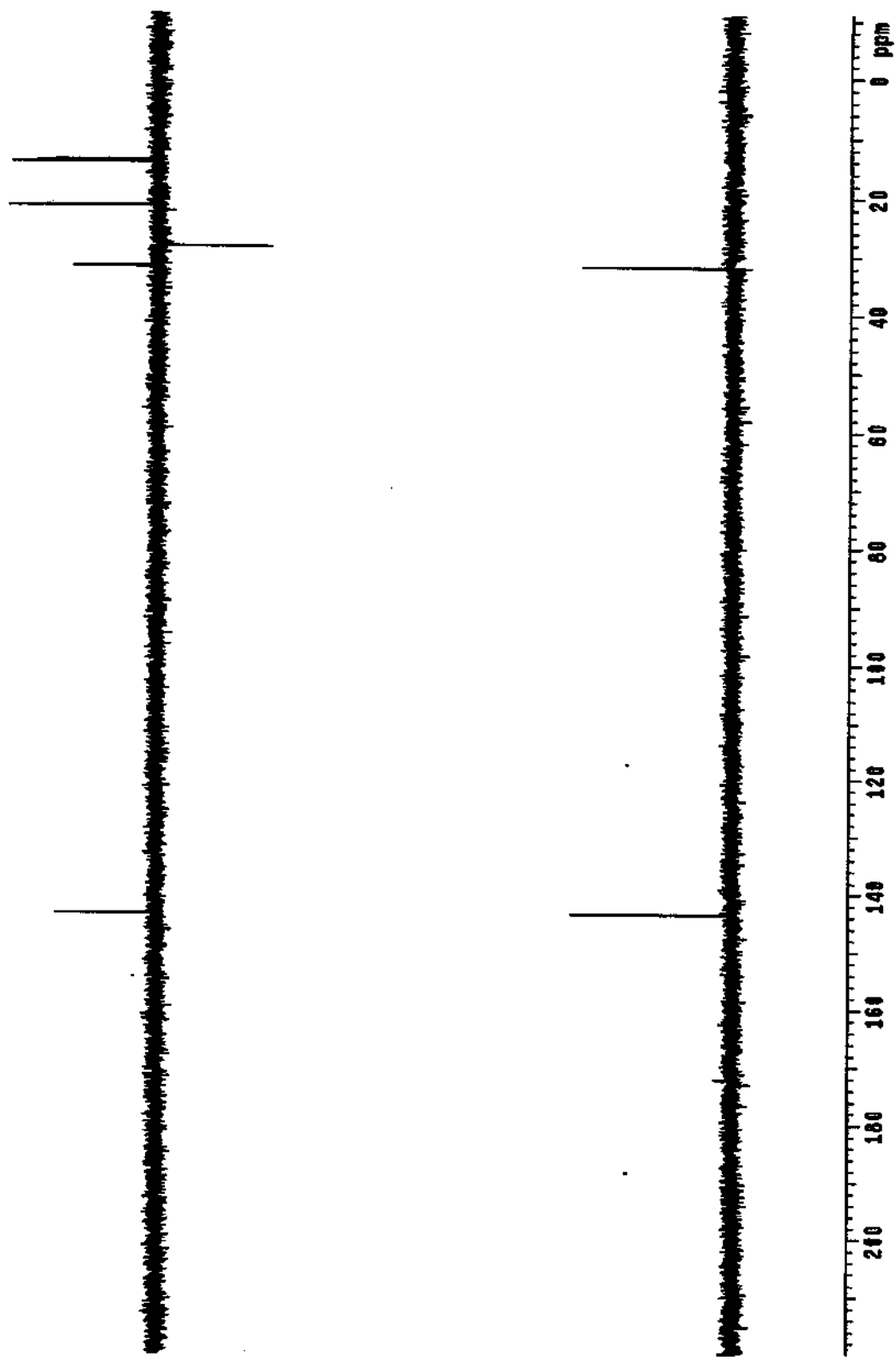


Figura 52 Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN do ácido integerrimínico:senécico (6 e 7). Espectrômetro INOVA500.

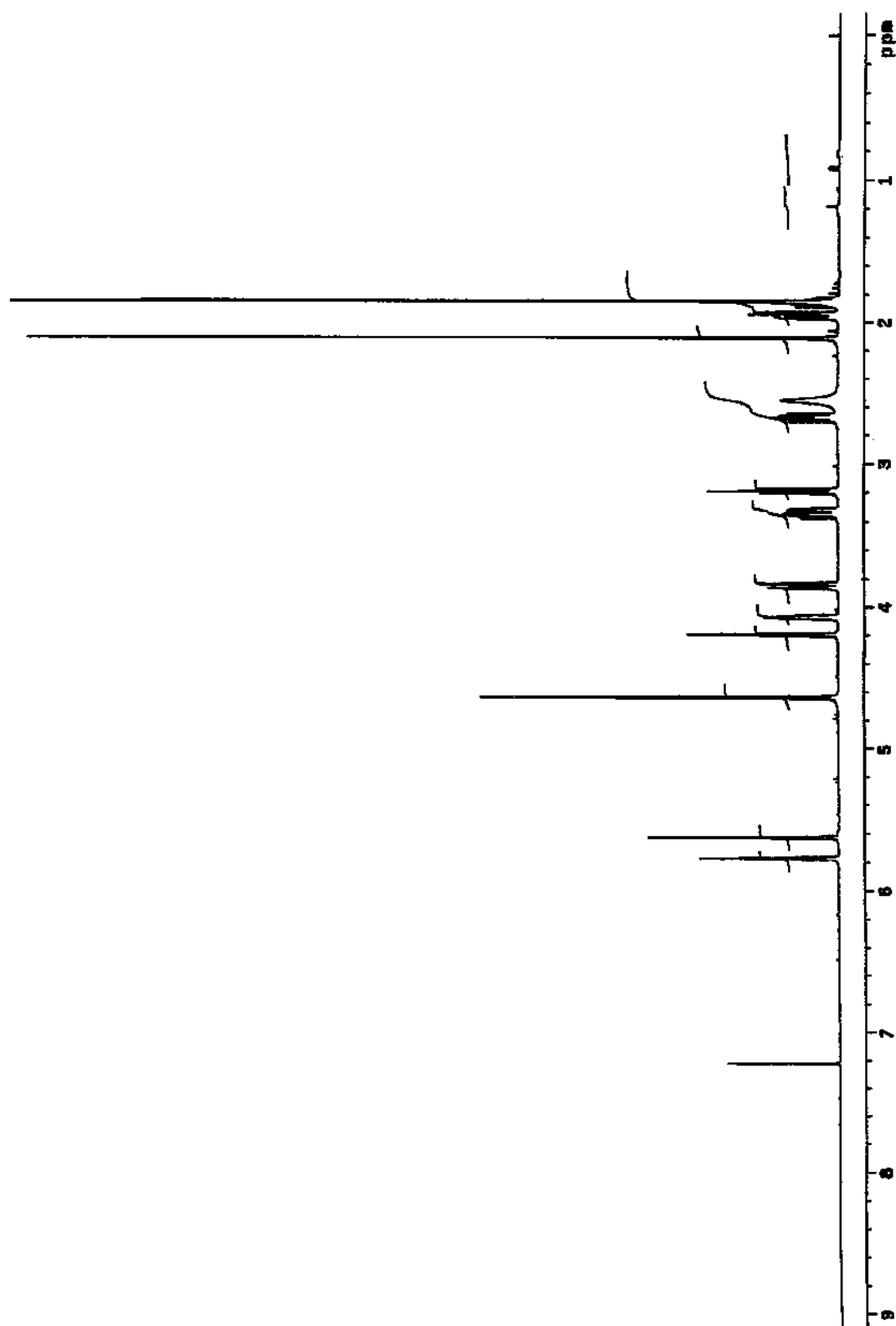


Figura 53 Espectro do ^1H da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**). Espectrômetro INOVA500.

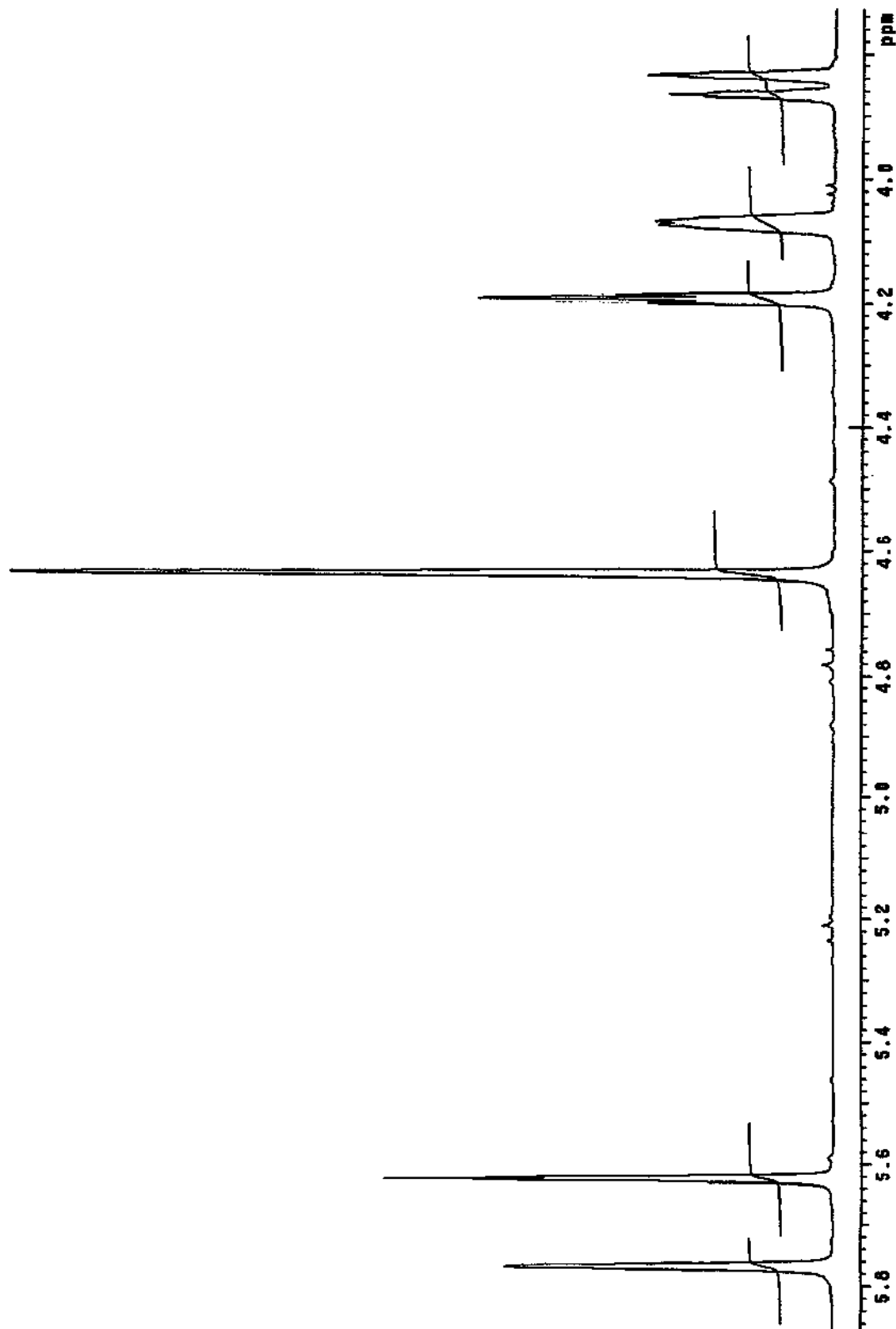


Figura 54. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**) (Figura 53).

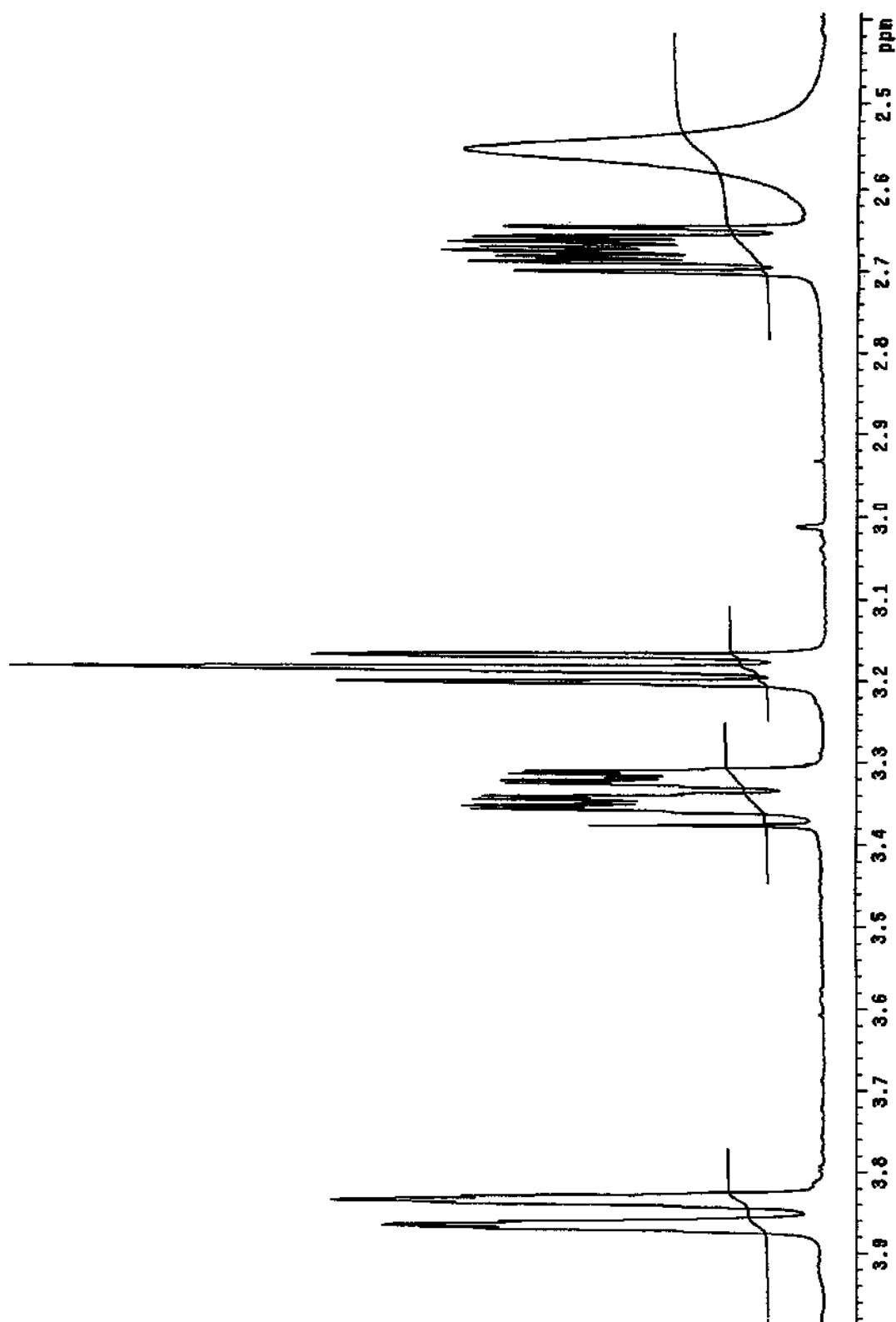


Figura 55. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**) (Figura 53).

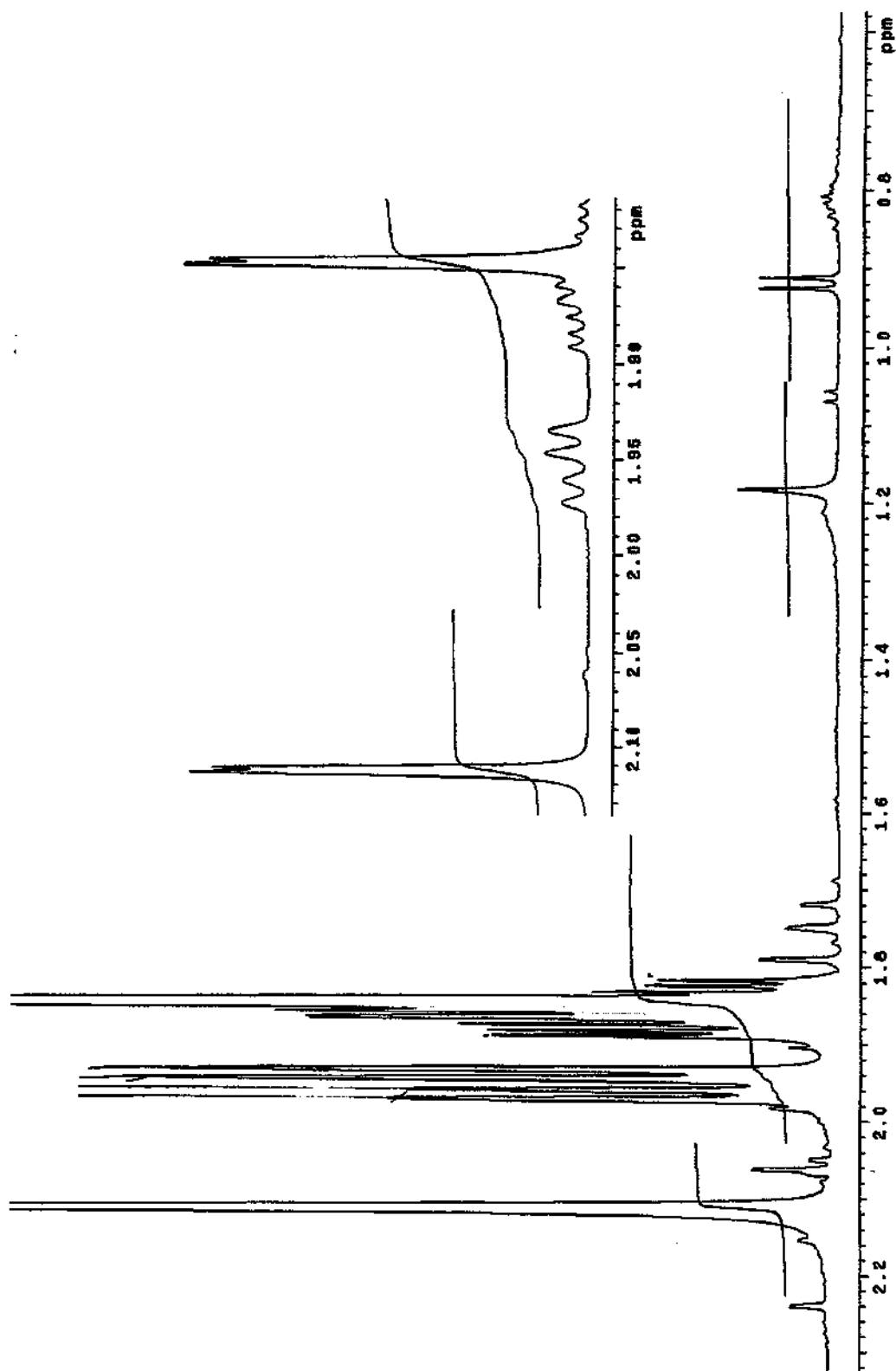


Figura 56. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioidretrocina base livre (**14**) (Figura 53).

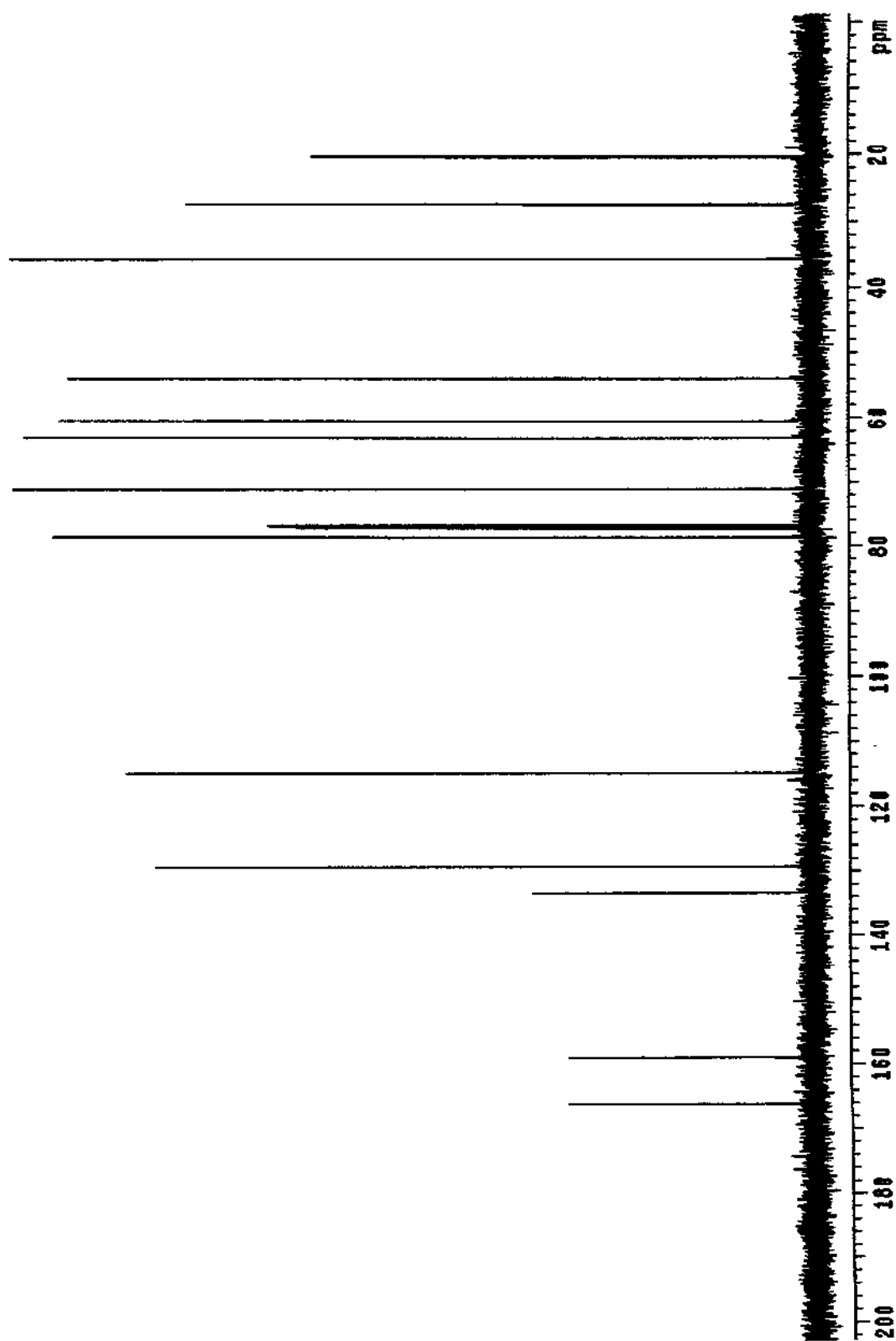


Figura 57. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**). Espectrômetro INOVA500.

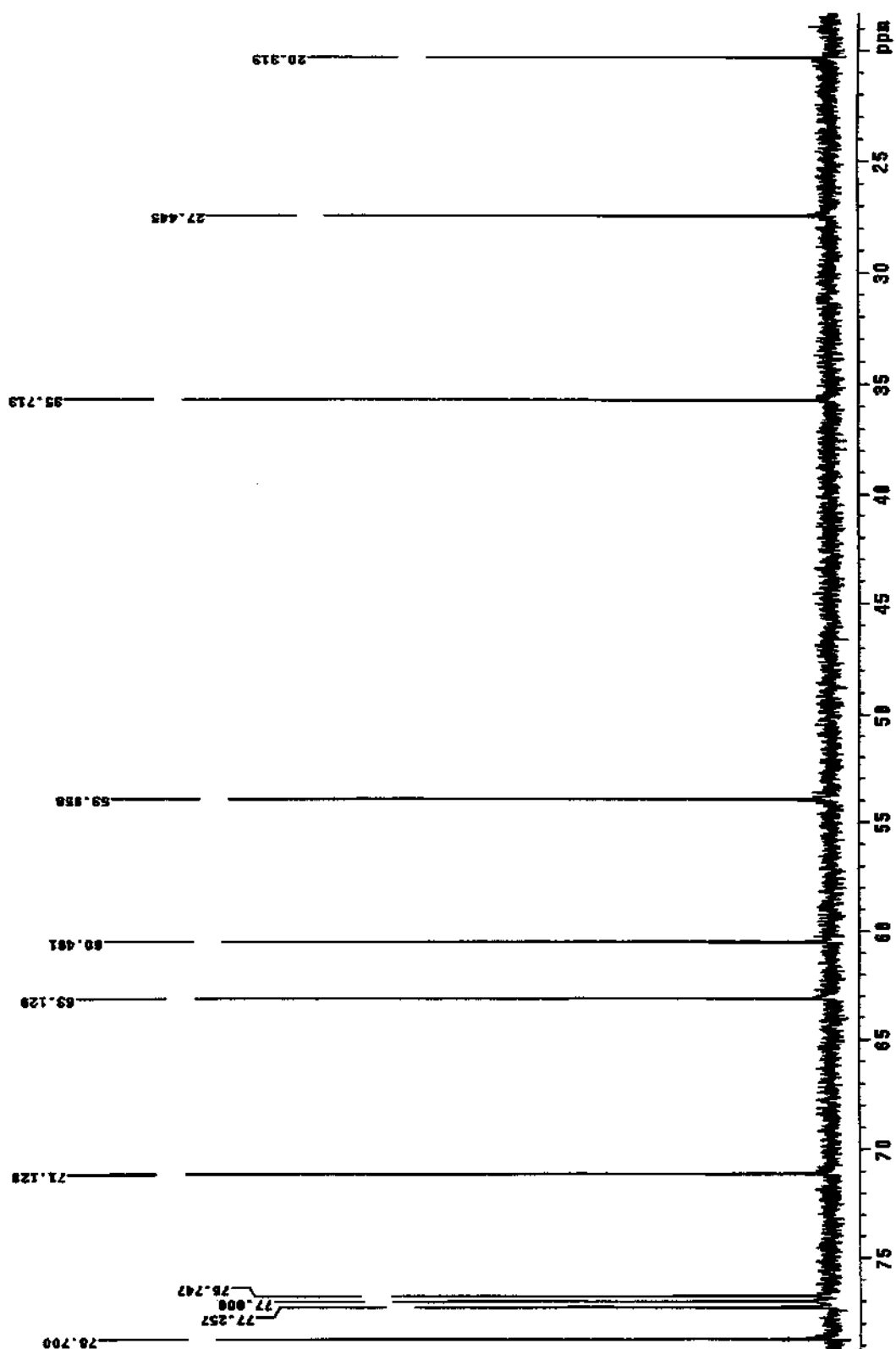


Figura 58. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioidretrocina base livre (**14**) (Figura 57).

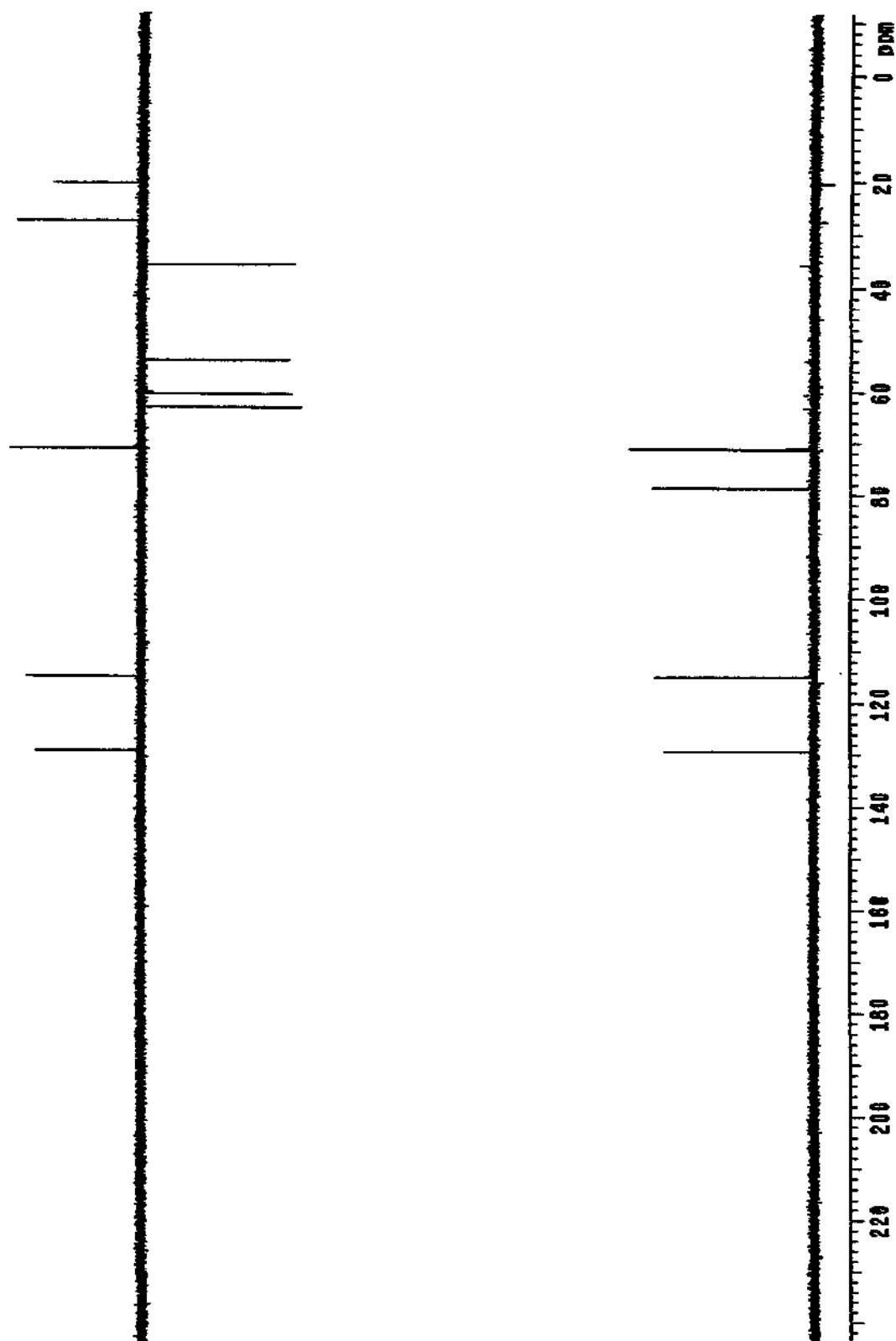


Figura 59. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (14). Espectrômetro INOVA500.

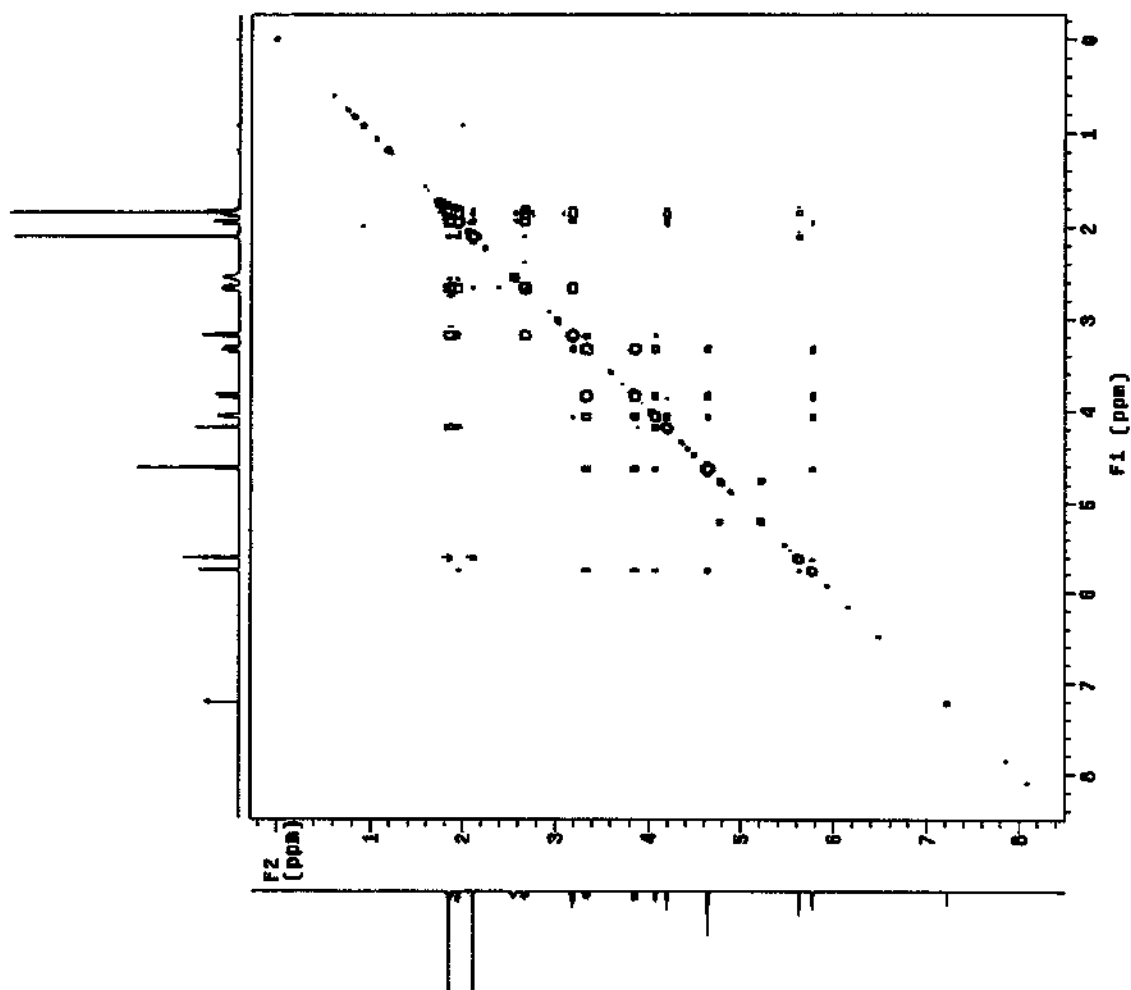


Figura 60. Espectro COSY (¹H-¹H) da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**). Espectrômetro INOVA500.

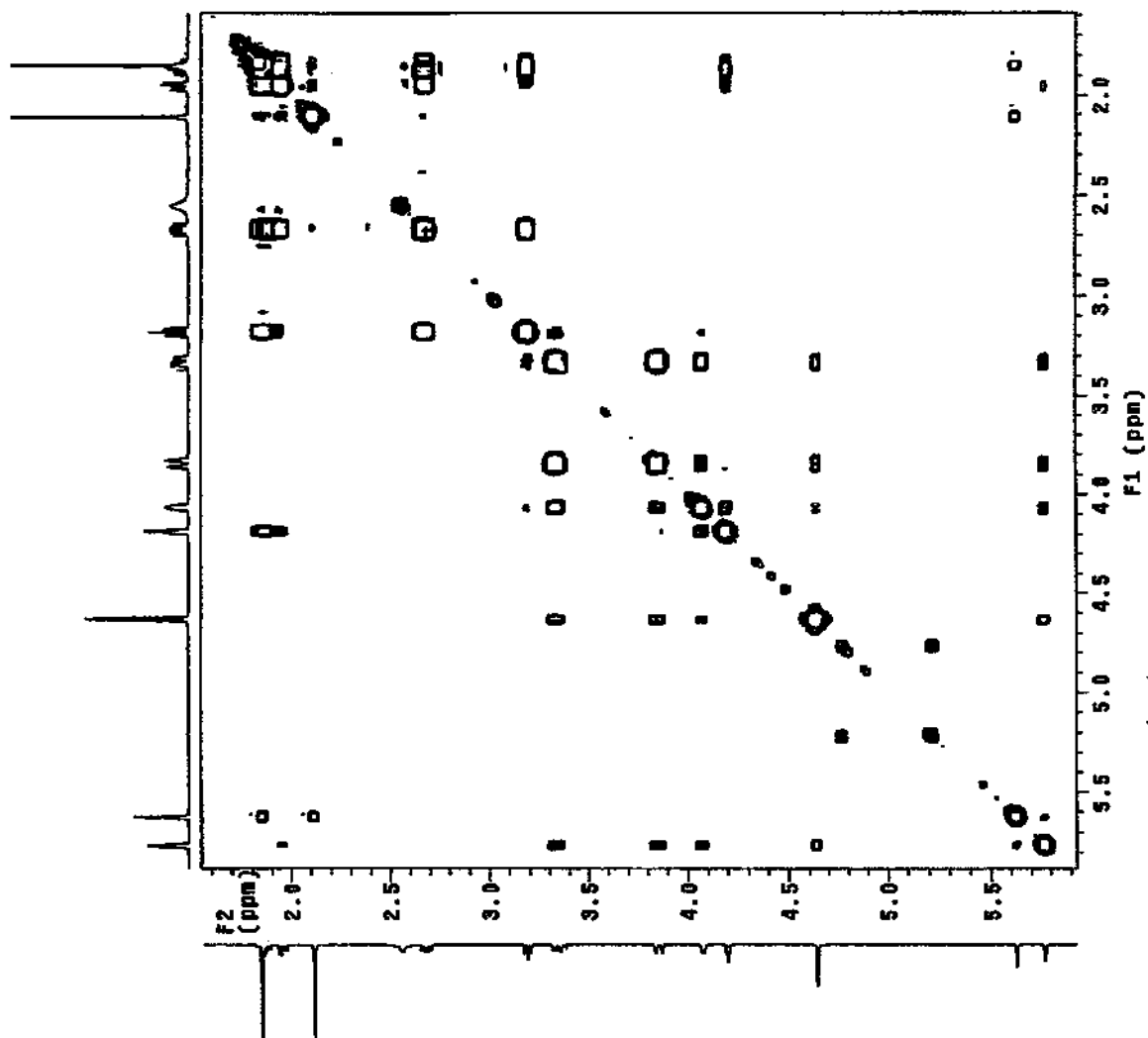


Figura 61. Amplificação do espectro COSY (^1H - ^1H) da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**) (Figura 60).

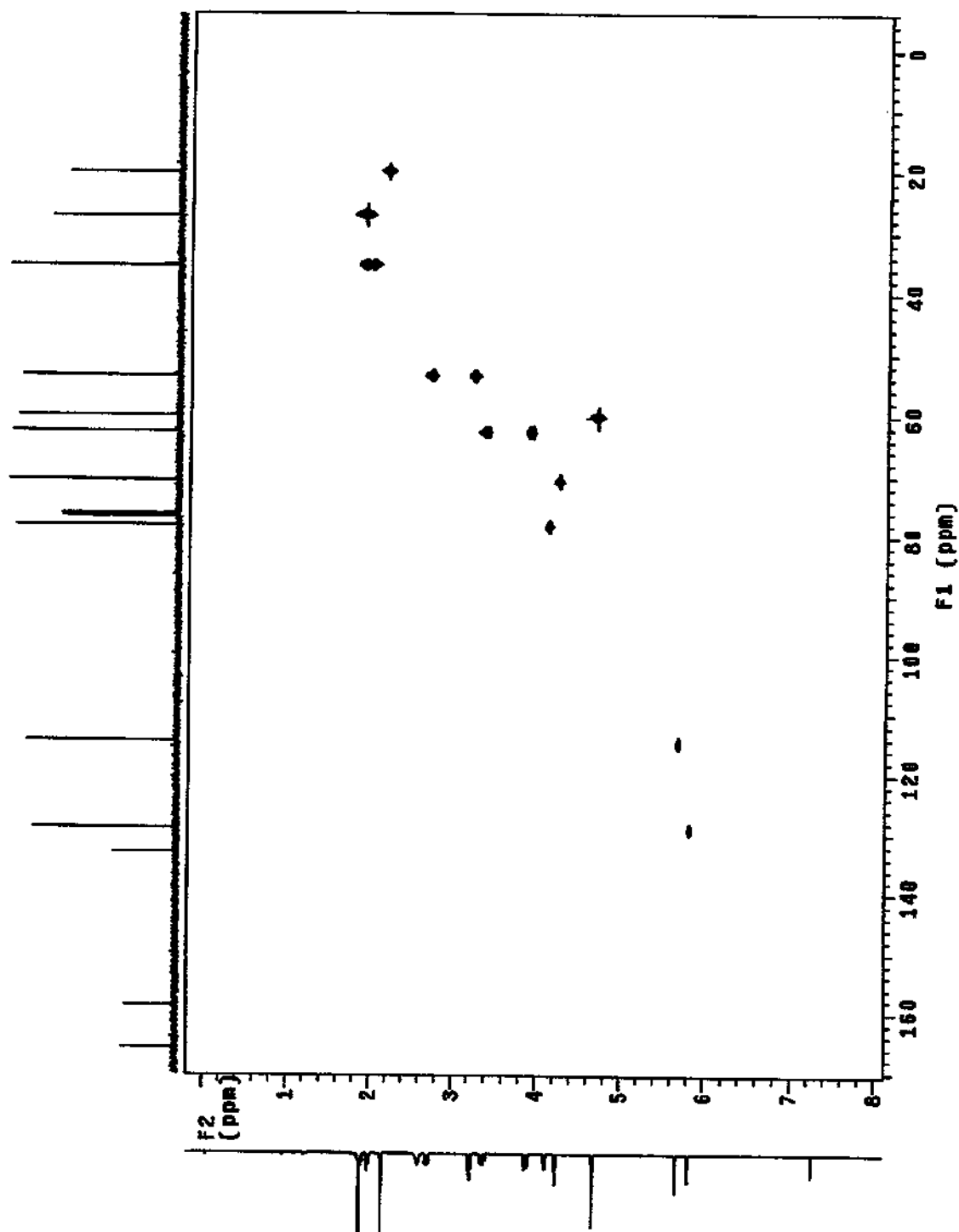


Figura 62. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (14). Espectrômetro INOVA500.

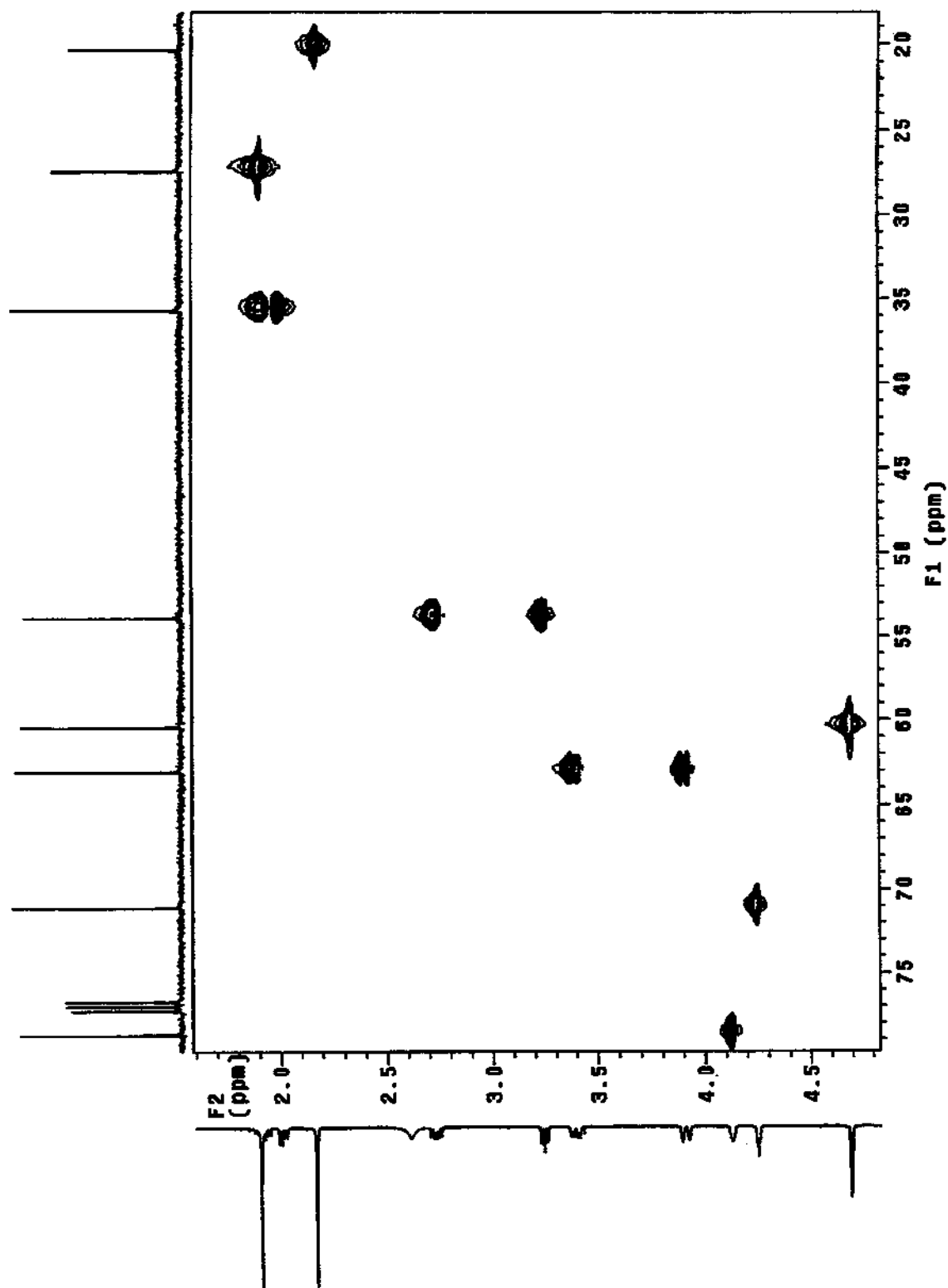


Figura 63. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioliretronecina base livre (**14**) (Figura 62).

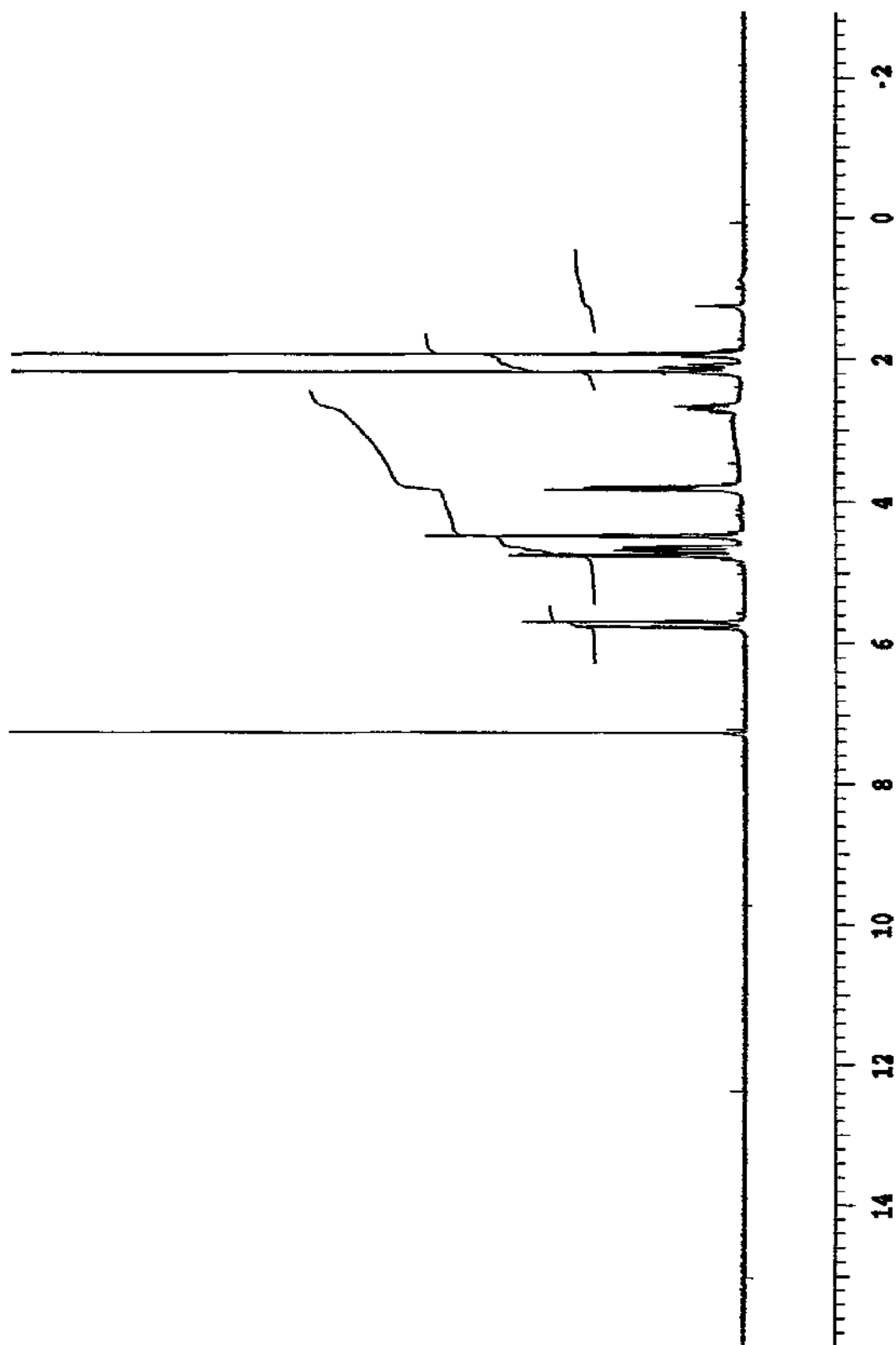


Figura 64. Espectro do ^1H da análise de RMN da seneciollretronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

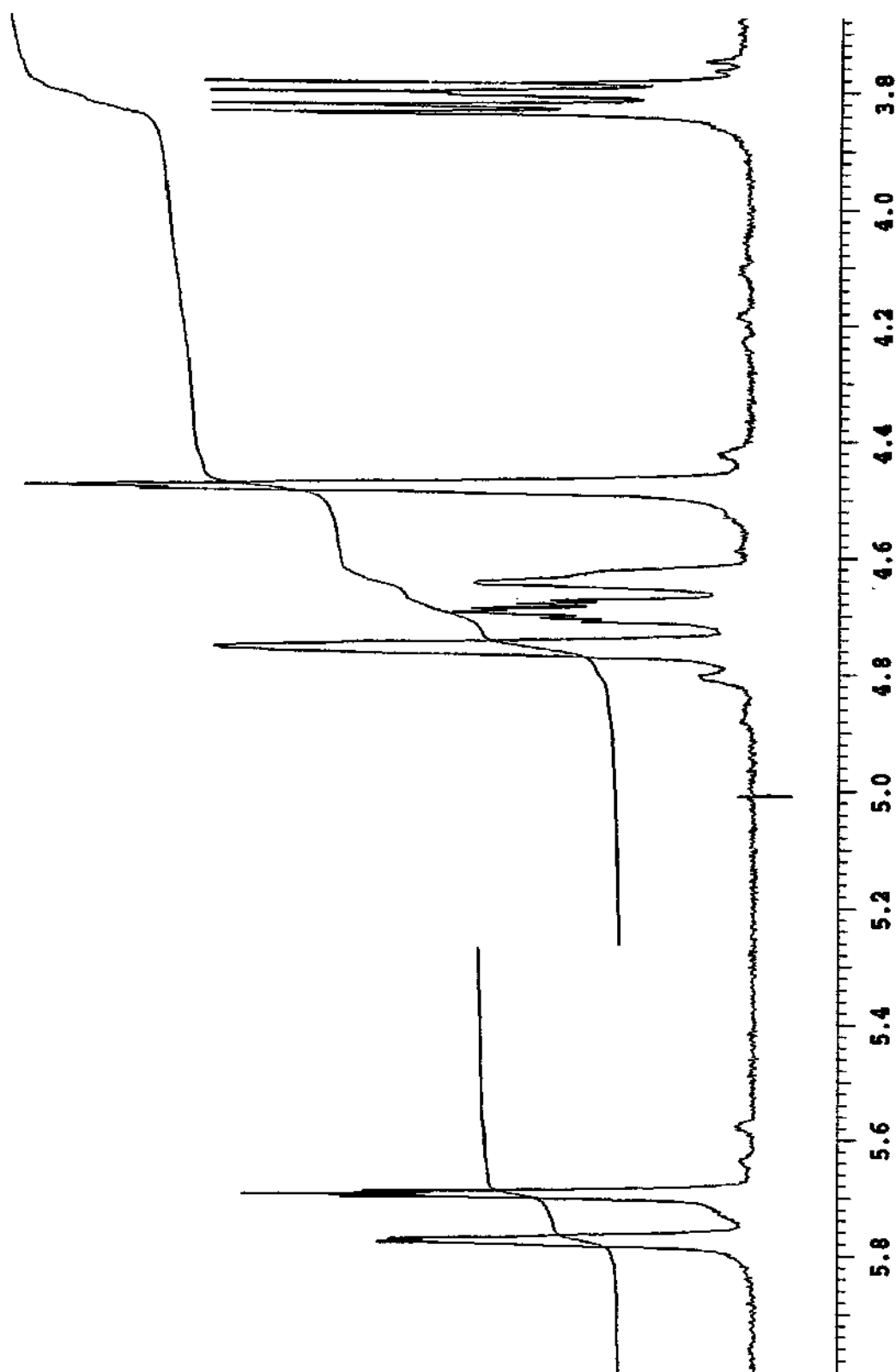


Figura 65. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioliretronecina N-óxido (Figura 64).

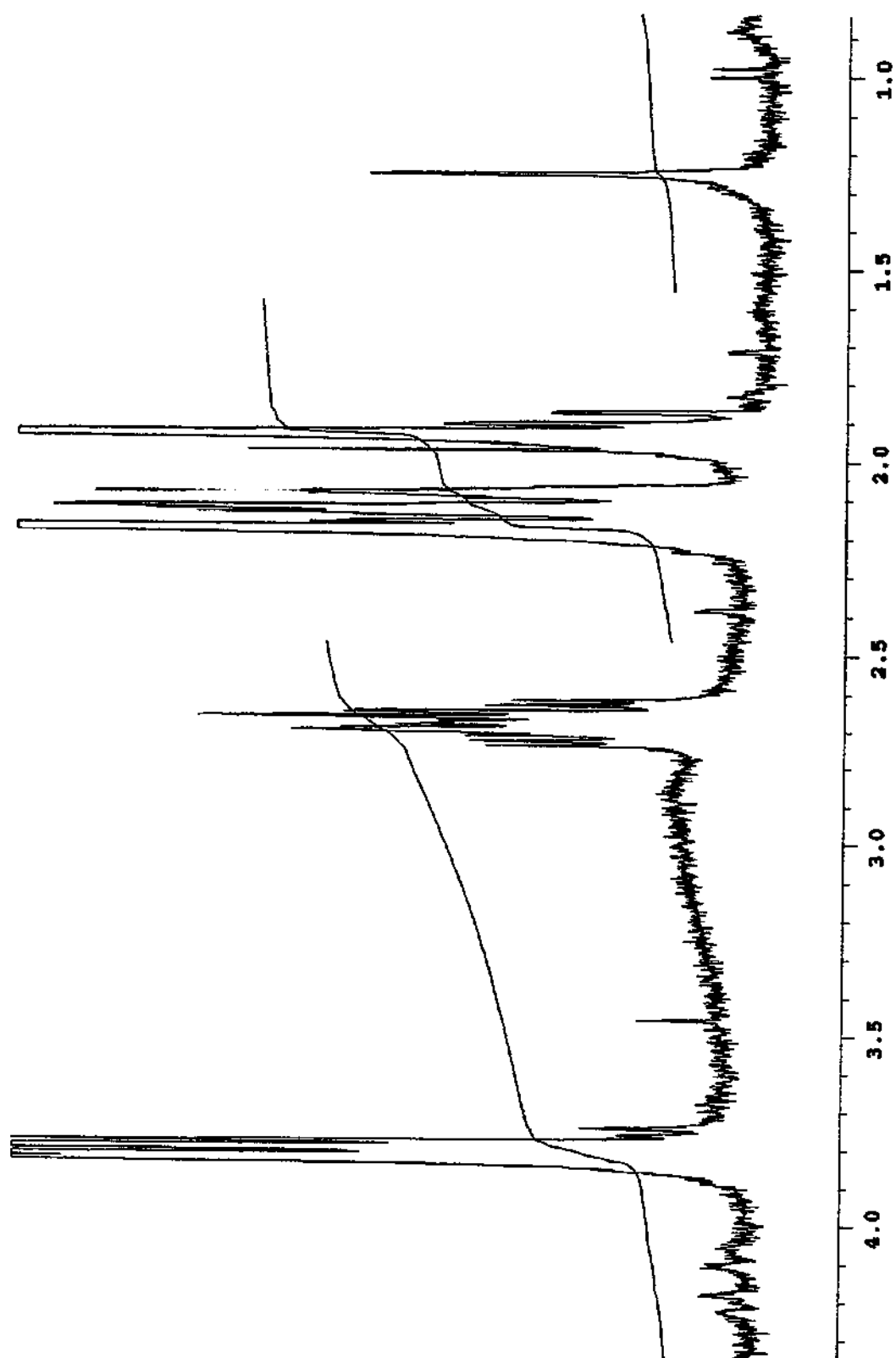


Figura 66. Amplificação do espectro do ^1H da análise de RMN da senecioliretronecina N-óxido (Figura 64).

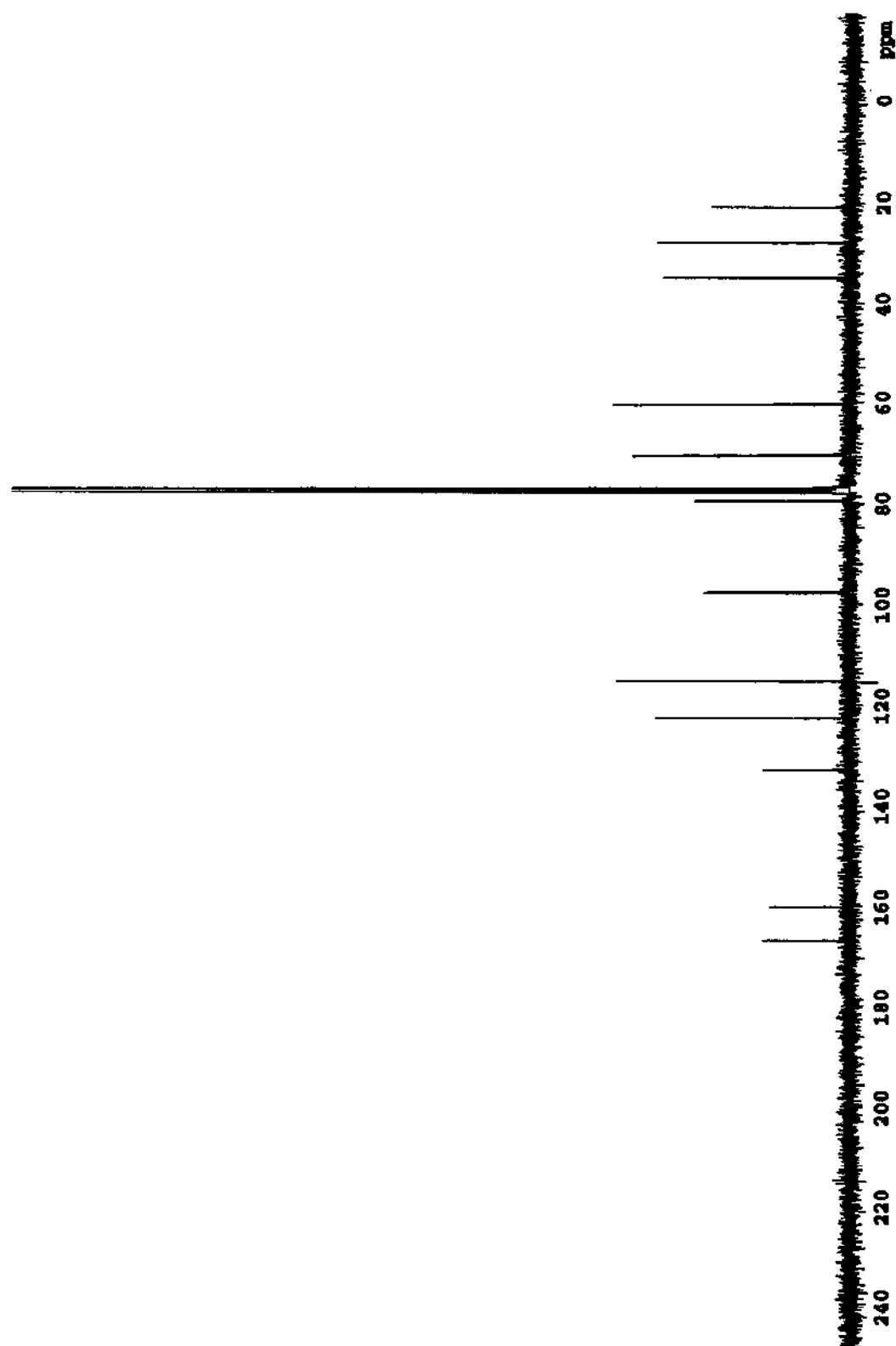


Figura 67. Espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioliretronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

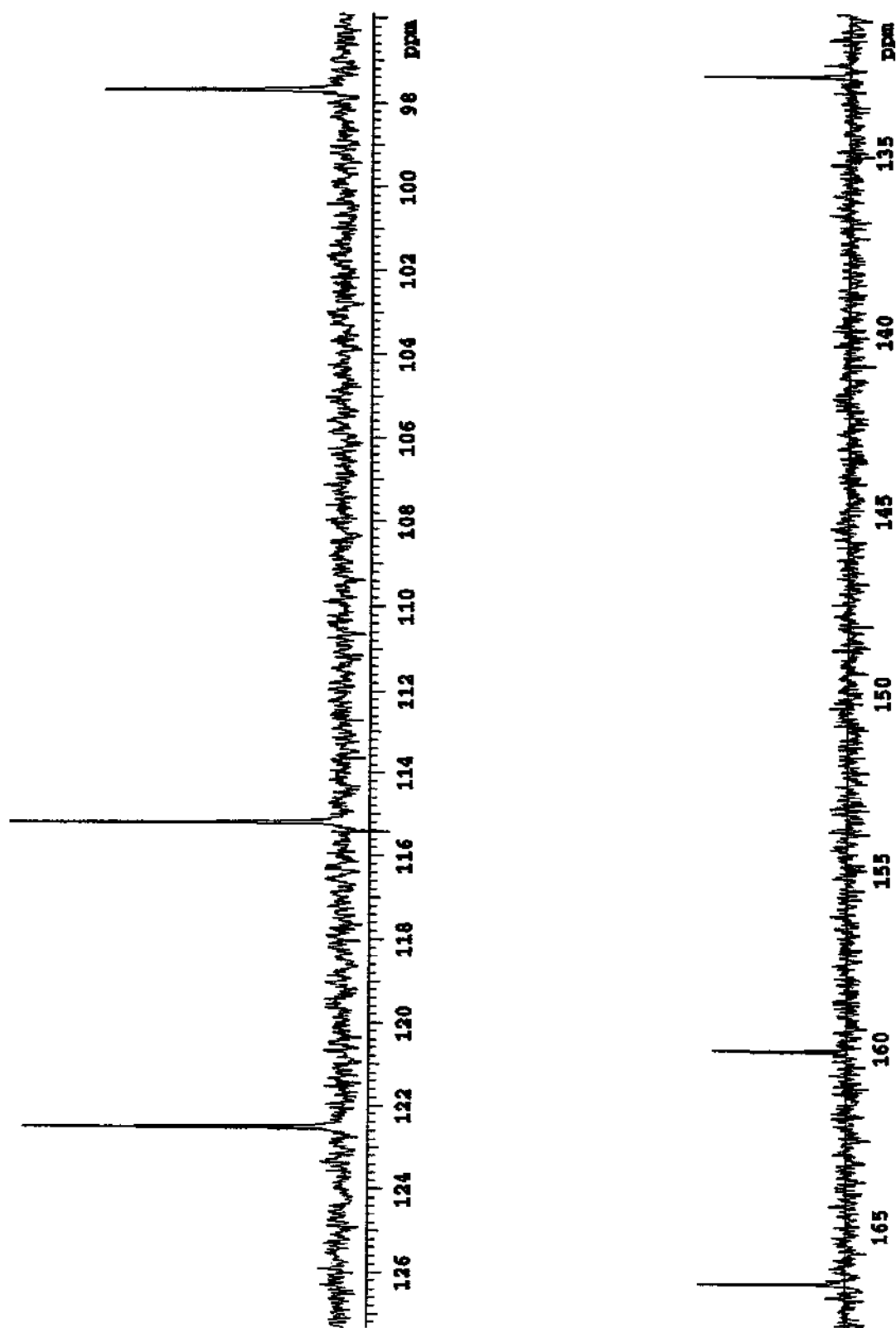


Figura 68. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da senecioliretronecina N-óxido (Figura 67).

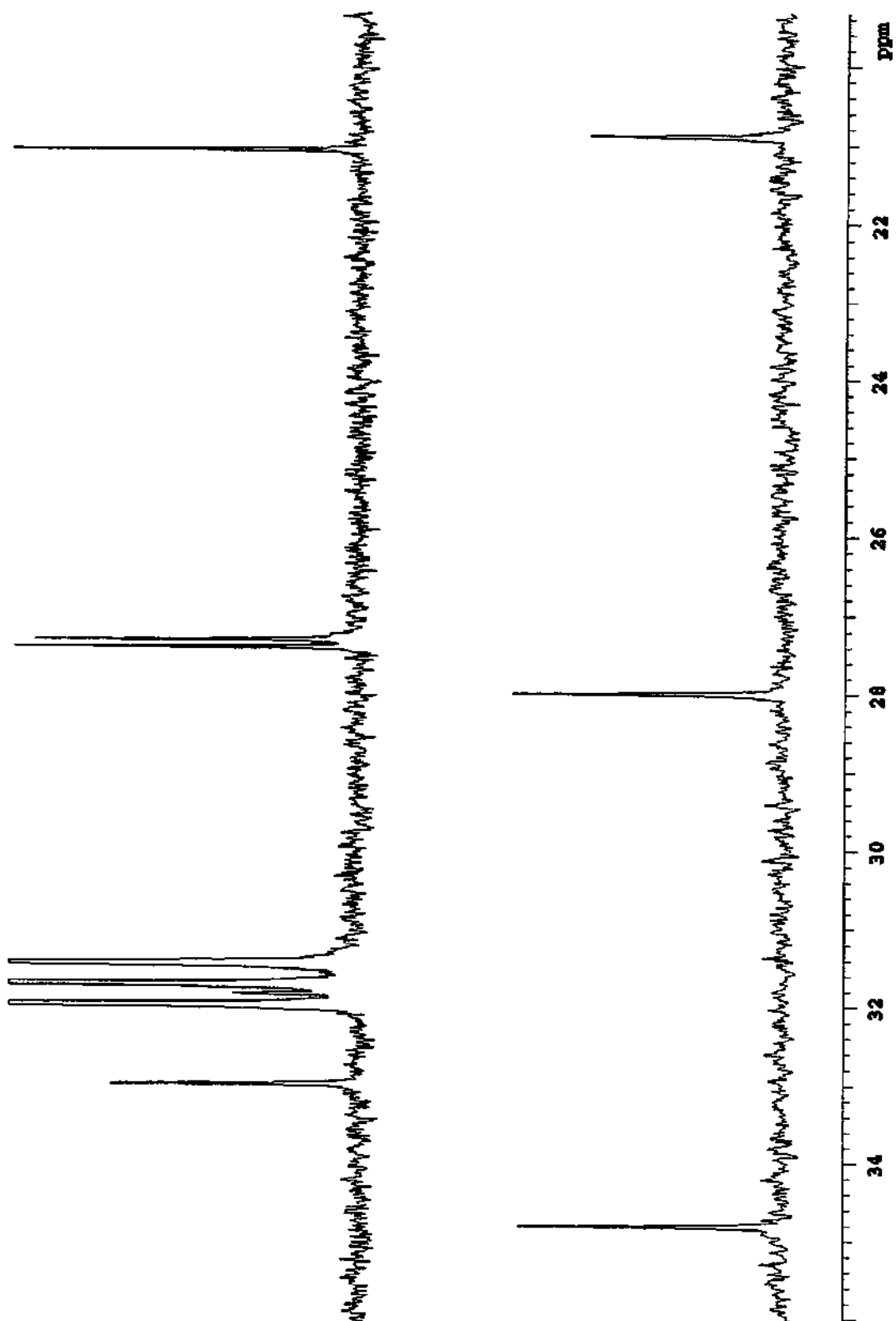


Figura 69. Amplificação do espectro do ^{13}C da análise de RMN da seneciolretronecina N-óxido (Figura 67).

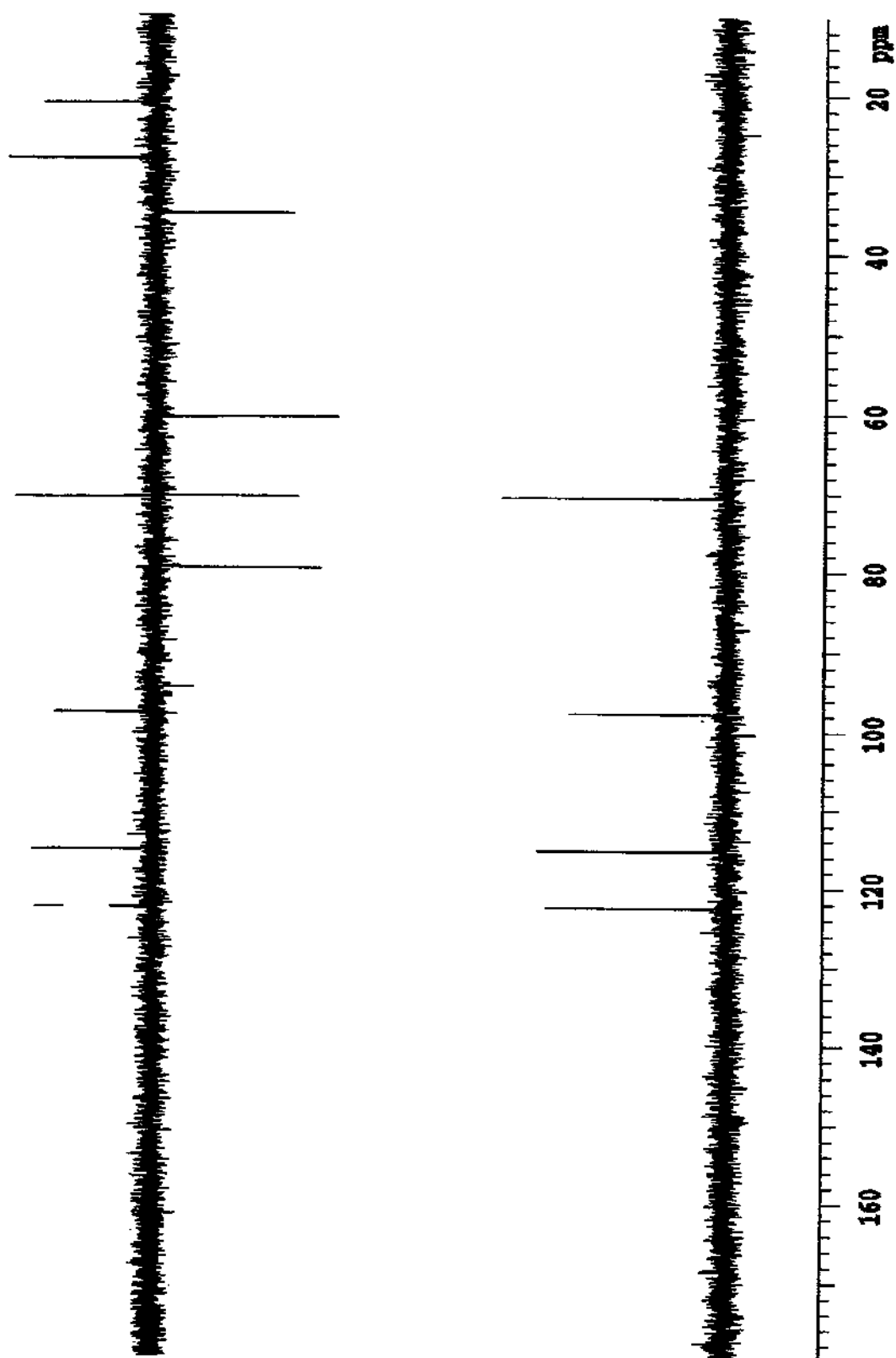


Figura 70. Espectro do ^{13}C (DEPT) da análise de RMN da seneciolretronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

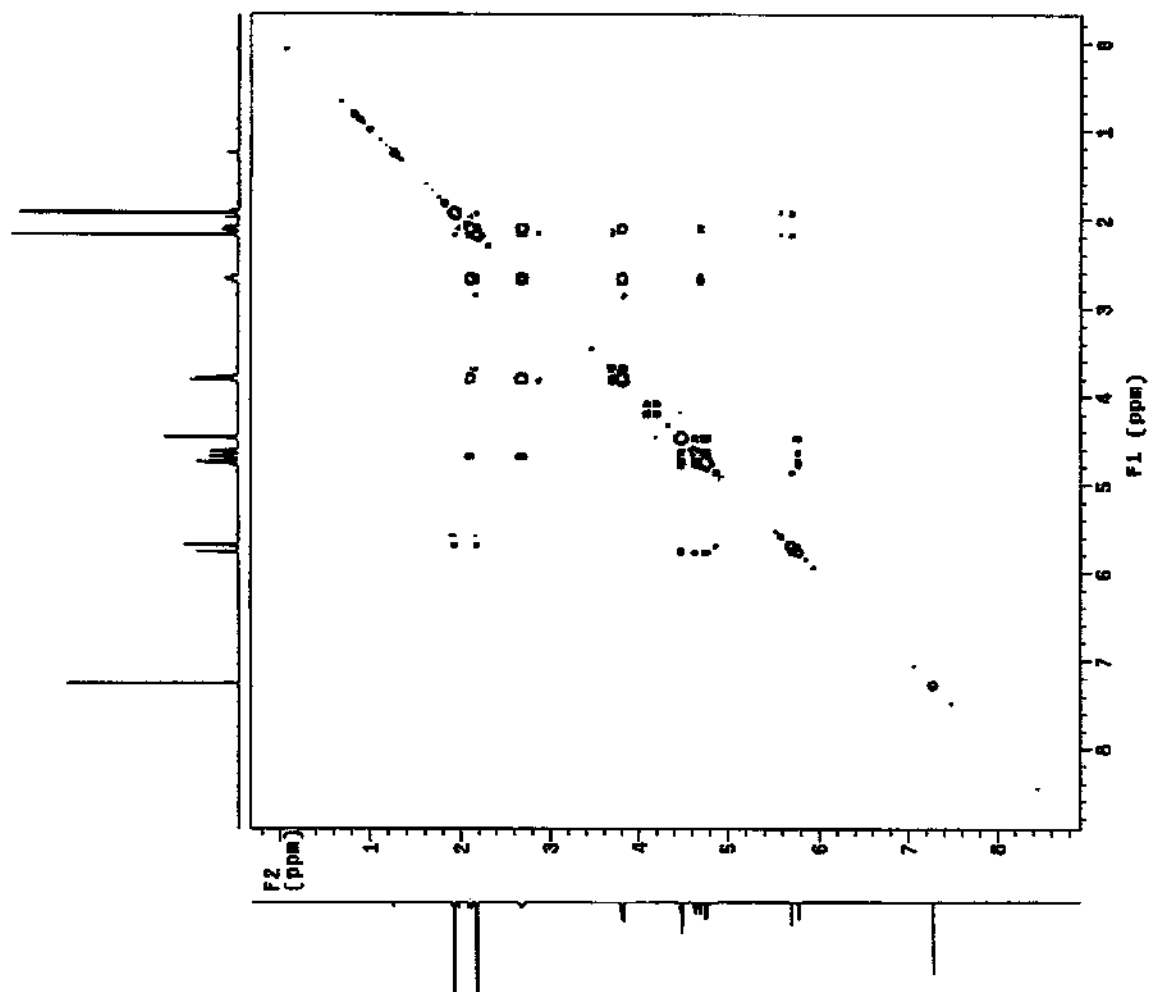


Figura 71. Espectro COSY (¹H-¹H) da análise de RMN da senecioliretronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

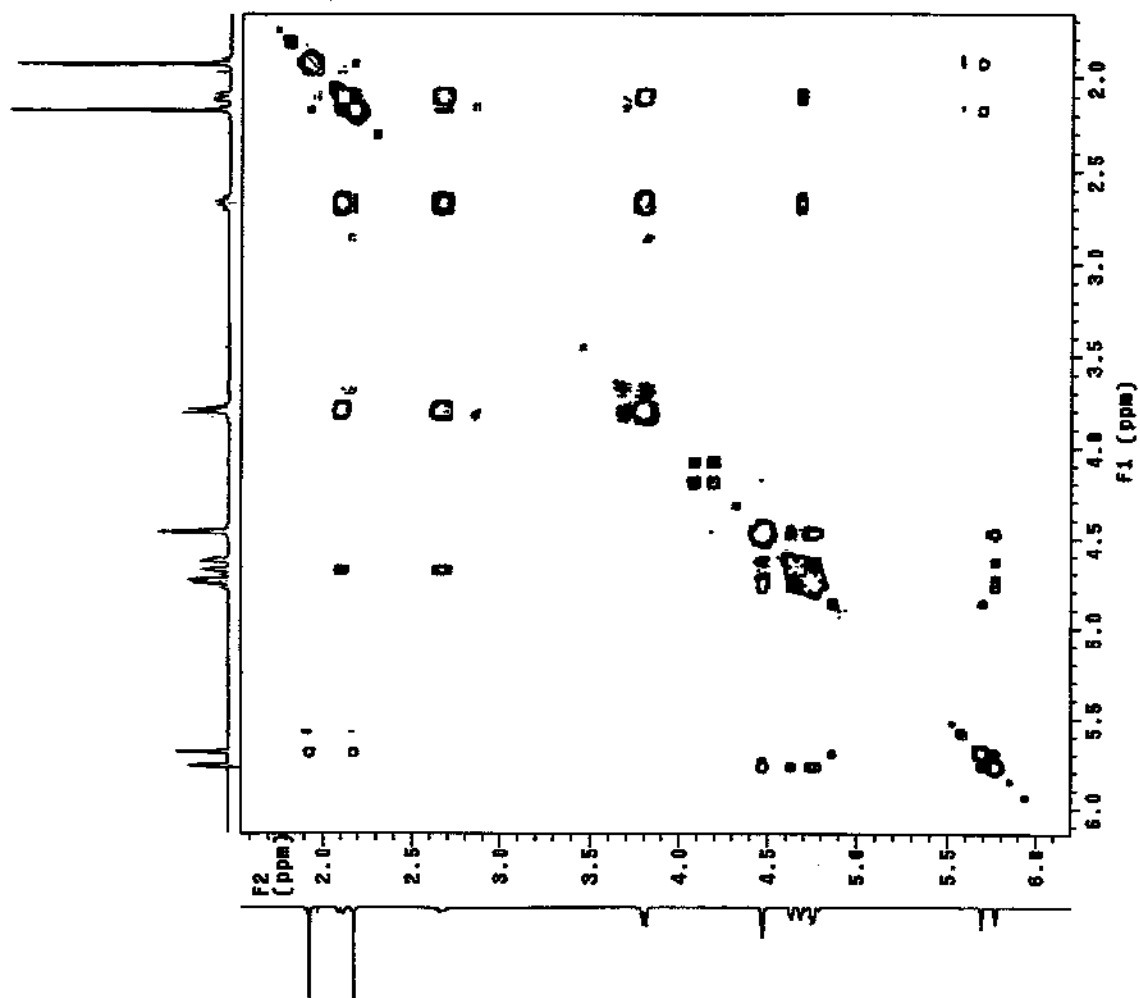


Figura 72. Amplificação do espectro COSY (¹H-¹H) da análise de RMN da seneciollretronecina N-óxido (Figura 71).

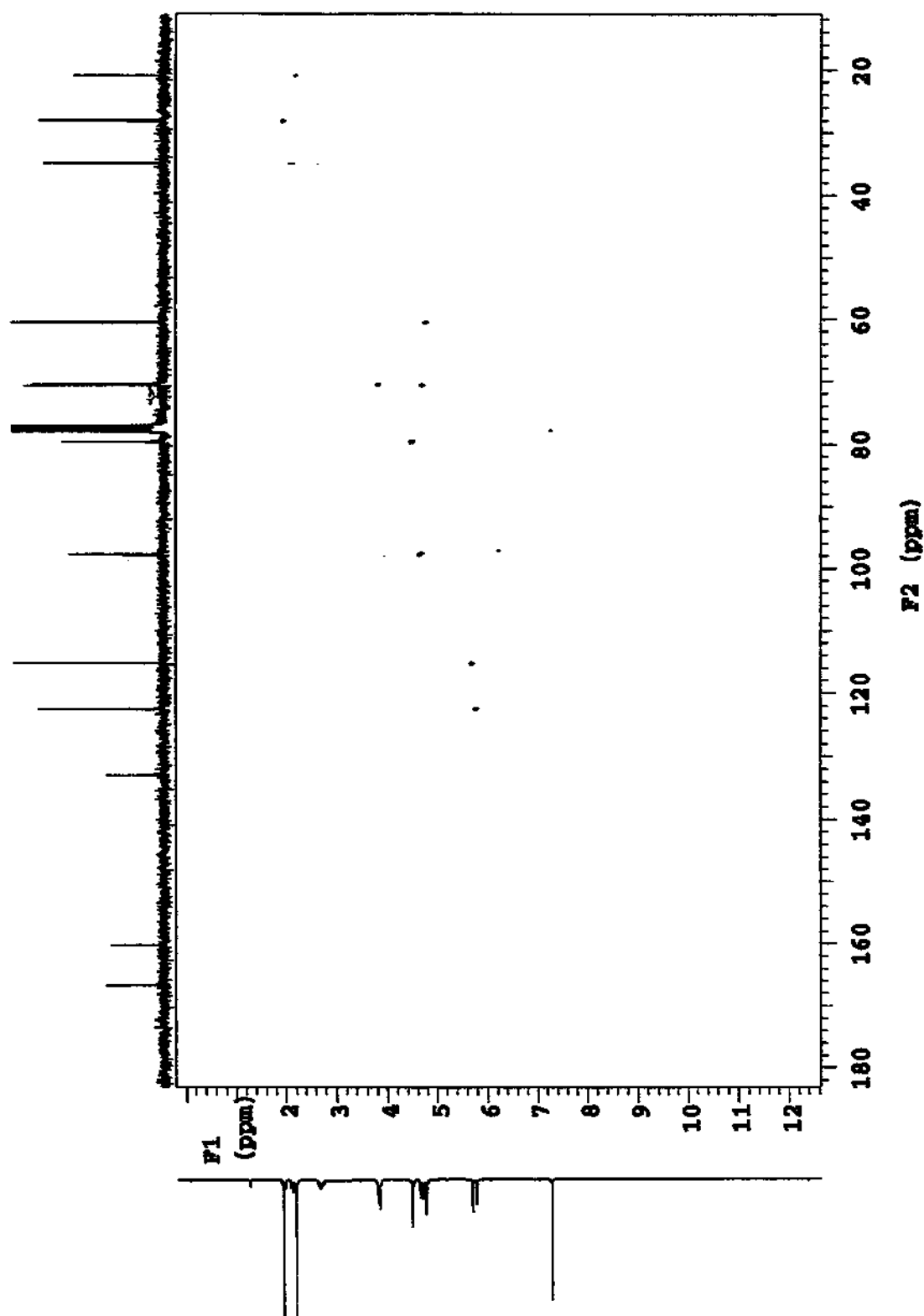


Figura 73. Espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioliretronecina N-óxido. Espectrômetro GEMINI 300-BB.

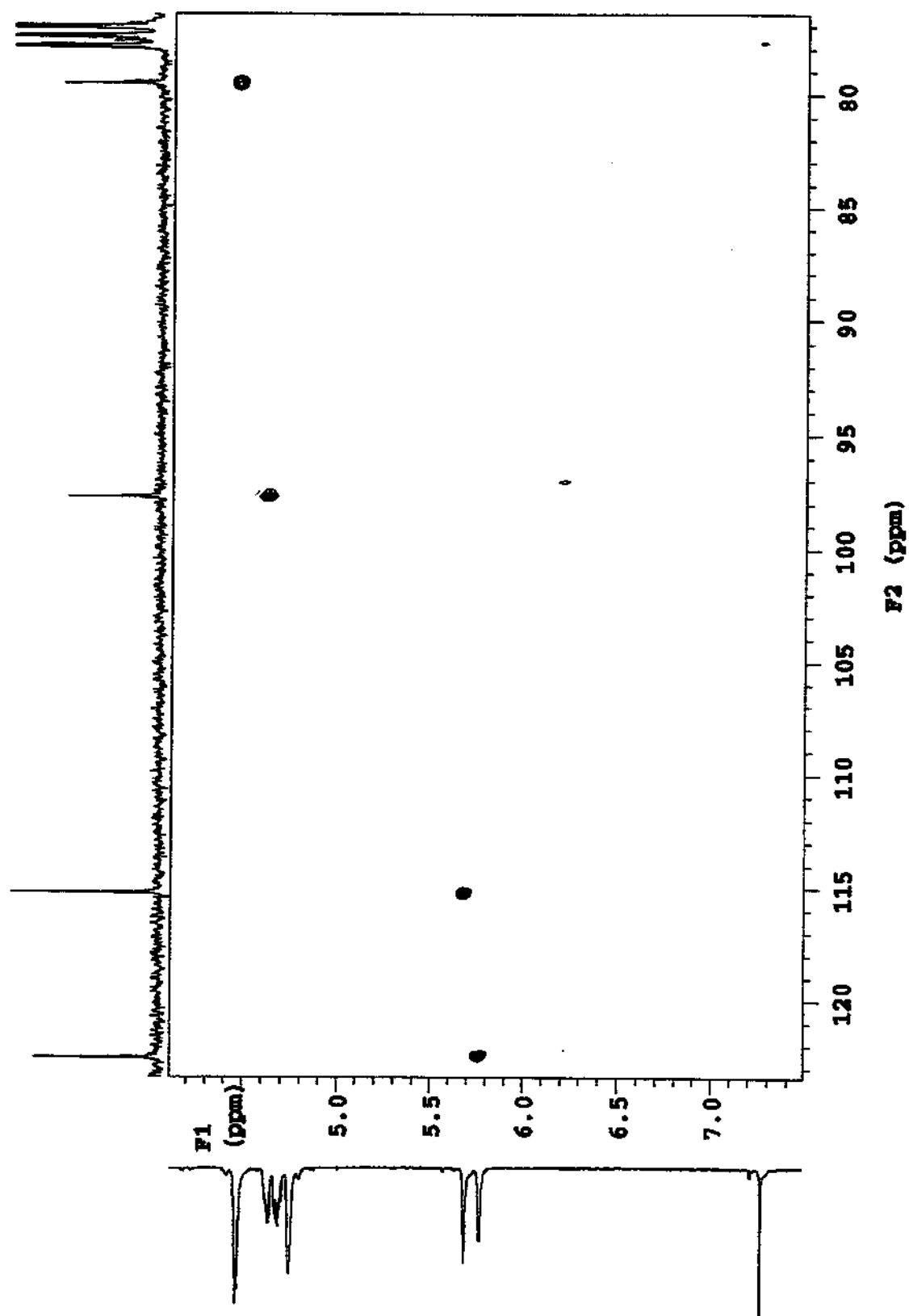


Figura 74. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da seneciollretronecina N-óxido (Figura 73).

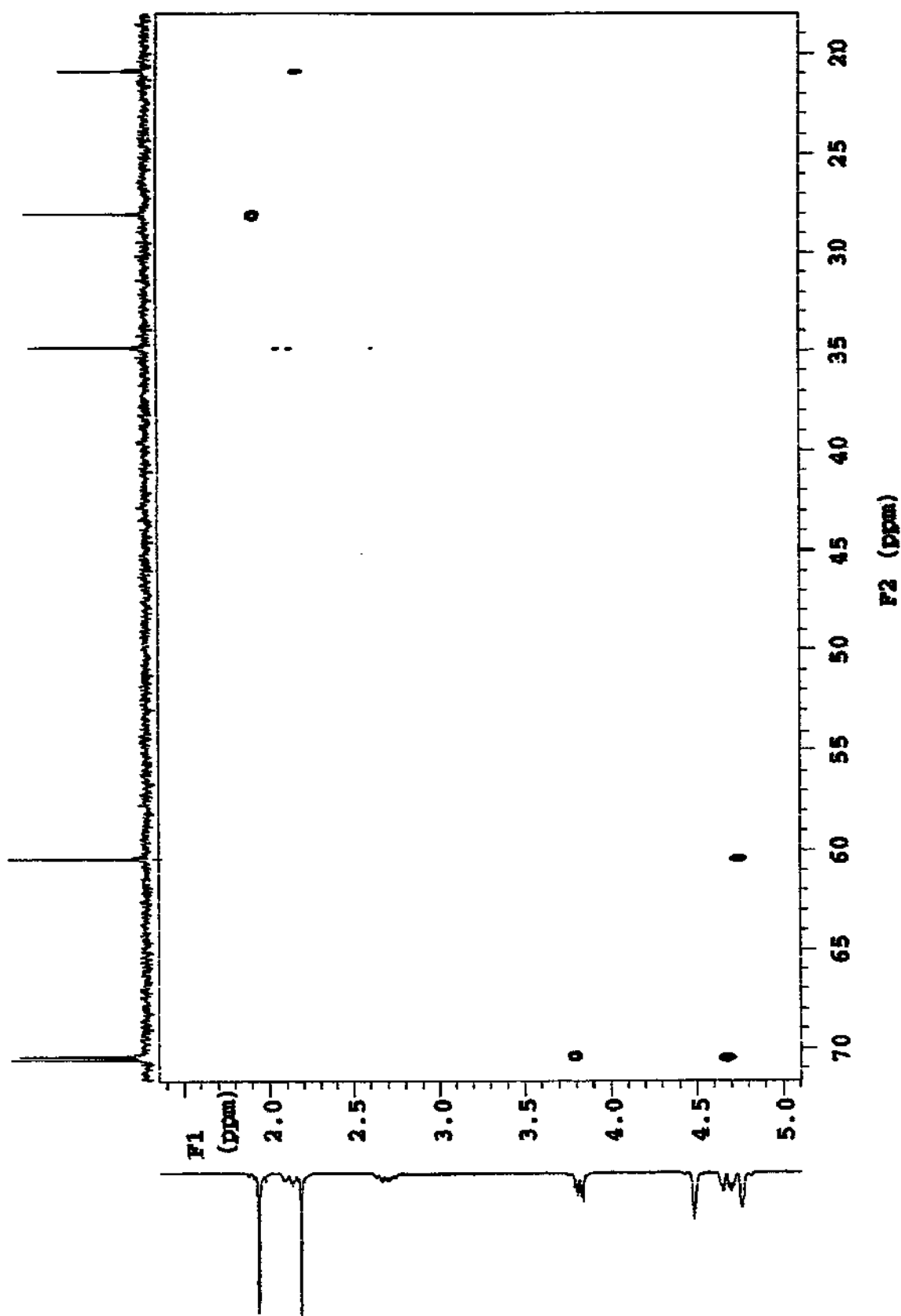


Figura 75. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da senecioidretonecina N-óxido (Figura 73).

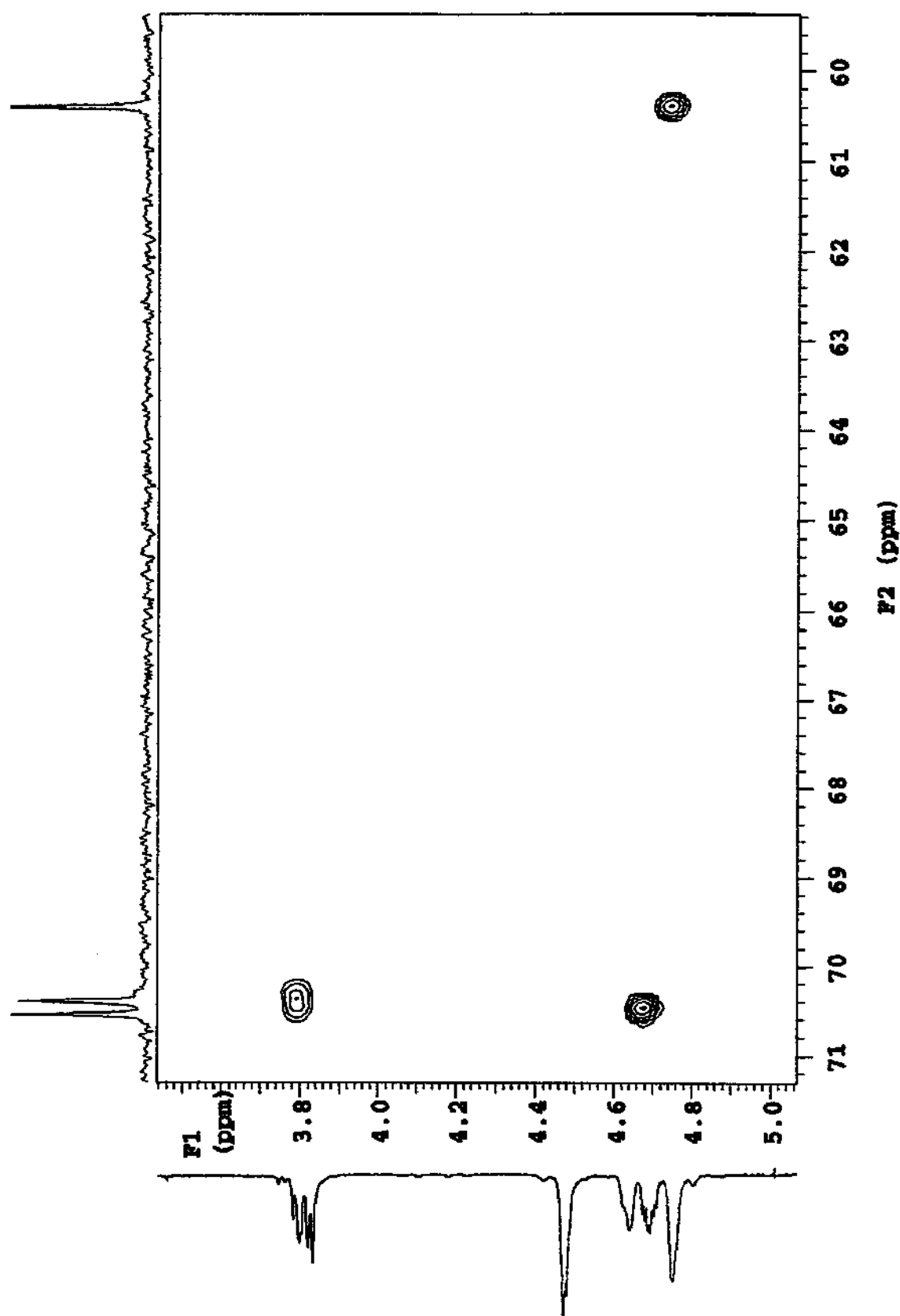


Figura 76. Amplificação do espectro HSQC (^1H - ^{13}C) da análise de RMN da seneciollretronecina N-óxido (Figura 73).

Apêndice 5

1. Testes de Independência G para testar diferenças na porcentagem de liberação:predação entre os diferentes tipos de APs oferecidos a borboletas *Mechanitis polymnia* testadas contra *Nephila clavipes* após diferentes tempos decorridos desde a sua ingestão.

1.1. 0 horas após a ingestão de APs

	Predou	Liberou
<u>10 e 11</u>	15	0
<u>14</u>	16	5

$$G_1=5,96; p=0,015$$

	Predou	Liberou
<u>10 e 11</u>	15	0
<u>3</u>	14	0

G_1 =Não pode ser calculado devido ao excesso de células com valores iguais a zero.

	Predou	Liberou
<u>14</u>	16	5
<u>3</u>	14	0

$$G_1=3,89; p=0,049$$

1.2. 6 horas após a ingestão de APs

	Predou	Liberou
<u>10 e 11</u>	6	3
<u>14</u>	24	5

$$G_1=0,99; p=0,319$$

	Predou	Liberou
<u>10 e 11</u>	6	3
<u>3</u>	19	0

$$G_1=7,61; p=0,006$$

	Predou	Liberou
<u>14</u>	24	5
<u>3</u>	19	0

$$G_1=5,42, p = 0,02$$

1.3. 24 horas após a ingestão de APs

	Predou	Liberou
<u>10 e 11</u>	18	17
<u>14</u>	15	17

$$G_1=0,14; p=0,71$$

	Predou	Liberou
<u>10 e 11</u>	18	17
<u>3</u>	30	4

$$G_1=11,68; p<0,001$$

	Predou	Liberou
<u>14</u>	15	17
<u>3</u>	30	4

$$G_1=13,7; p<0,001$$

2. Testes de independência G para testar diferenças na porcentagem de liberação:predação entre os diferentes tempos decorridos desde a ingestão de cada AP.

2.1. Integerrimina:senecionina (10 e 11)

	Predou	Liberou
0 horas	15	0
6 horas	6	3

$$G_1=6,63; p=0,010$$

	Predou	Liberou
0 horas	15	0
24 horas	18	17

$$G_1=15,61; p<0,001$$

	Predou	Liberou
6 horas	6	3
24 horas	18	17

$$G_1=0,68; p=0,408$$

2.2. Senecioilretronecina (14)

	Predou	Liberou
0 horas	16	15
6 horas	24	5

$$G_1=0,32; p=0,568$$

	Predou	Liberou
0 horas	16	15
24 horas	15	17

$$G_1=4,65; p=0,031$$

	Predou	Liberou
6 horas	24	5
24 horas	15	17

$$G_1=8,86; p=0,003$$

2.3. Retronecina (3)

	Predou	Liberou
0 horas	14	0
6 horas	19	0

G_1 = Não pode ser calculado devido ao excesso de células com valores iguais a zero.

	Predou	Liberou
0 horas	14	0
24 horas	30	4

$$G_1=2,91; p=0,088$$

	Predou	Liberou
6 horas	19	0
24 horas	30	4

$$G_1=3,73; p=0,053$$

Apêndice 6

Tabela 16. Concentração e quantidade total de APs em borboletas Ithomiinae capturadas no campo - determinadas por Brown (1987). Em negrito, espécies com quantidade total de APs igual ou superior à quantidade de integerrimina:seneccionina base livre (**10** e **11**) ou N-óxido necessária para incitar 100% de liberação por *Nephila clavipes*.

Espécies de Ithomiinae	Concentração de APs (µg/mg) em machos	Concentração de APs (µg/mg) em fêmeas	Total de APs em machos (µg)	Total de APs em fêmeas (µg)
<i>Aeria elara</i>	13	11	117	143
<i>Aeria olena</i>	25	16	225	208
<i>Callithomia lenea xantho</i>	5	4	120	112
<i>Ceratinia neso</i>	20	10	300	170
<i>Ceratiscaa doto</i>	11	5	154	75
<i>Dircenna dero</i>	17	9	680	405
<i>Episcada carcina</i>	16	20	272	360
<i>Episcada clausina</i>	57	53	912	901
<i>Epityches eupompe</i>	69	32	1656	832
<i>Garsauritis xanthostola</i>	9	10	180	230
<i>Godyrus zavaleta</i>	15	14	495	462
<i>Greta andromica</i>	72	50	1080	850
<i>Heterosais giulia</i>	27	8	540	192
<i>Heterosais nephele</i>	16	6	336	156
<i>Hyalenna pascua</i>	11	20	198	400
<i>Hypoleria arzalia</i>	11	5	154	75
<i>Hyposcada egra</i>	7	2	140	44
<i>Hypothyris euclea</i>	22	15	484	375
<i>Hypothyris ninonia daeta</i>	33	28	825	756
<i>Ithomia agnosia</i>	54	20	756	320
<i>Mcclungia salonina</i>	17	11	272	187
<i>Mechanitis lysimnia</i>	38	18	950	630
<i>Mechanitis polymnia</i>	18	24	594	1080
<i>Melinaea ludovica</i>	6	13	330	780
<i>Melinaea menophilus</i>	36	13	1980	780
<i>Melinaea mneme</i>	63	12	3465	720
<i>Methona themisto</i>	6	10	600	1200
<i>Napeogenes cyrianassa</i>	77	35	1386	700
<i>Napeogenes inachia</i>	54	36	702	504
<i>Oleria astrea</i>	20	19	260	285
<i>Olyras crathis</i>	12	3	1320	330
<i>Placidula euryanassa</i>	20	20	1080	1300
<i>Prittwitzia hymenaea</i>	28	17	392	272
<i>Pseudoscada erruca</i>	49	27	735	459
<i>Pteronymia carlia</i>	78	36	1092	612
<i>Rhodusa cantobrica</i>	31	33	558	660
<i>Saia rosalia</i>	36	16	900	432
<i>Scada karschina</i>	131	67	1048	603
<i>Scada reckia</i>	97	32	582	224
<i>Thyridia psiddi</i>	27	22	1728	1540
<i>Tithorea harmonia</i>	3	3	180	225