

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

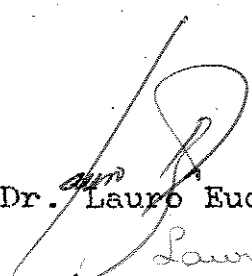
ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS EM
BORBOLETAS ITHOMIINAE.
ALGUNS ASPECTOS EM ECOLOGIA QUÍMICA.


JOSE ROBERTO TRIGO

Tese de Doutorado

*Este exemplar corresponde a Redação Final da
Tese defendida por José Roberto Trigo, e aprovada
pela Comissão Julgadora*

05/03/93

Orientador: Prof. Dr.  Lauro Euclides Soares Barata

Lauro E. S. Barata

1993

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Keith S. Brown Jr. pela iniciação na área de Ecologia Química e pela orientação e amizade durante estes 10 anos de trabalho em conjunto.

Ao Prof. Dr. Lauro E.S. Barata por acreditar que "não químicos" também podem fazer química e me aceitar como seu aluno de doutorado.

Ao Prof. Dr. Thomas Hartmann pelas discussões sobre PAs na interface lepidópteros-planta, além de todo o apoio para a elaboração desta tese.

Aos amigos Pedro, Denis, Andreas, Clécio, Antonio, Claudine, Lourivaldo, Mara, Claudia e Guerreiro que muito me auxiliaram tanto no laboratório quanto na elaboração e discussão desta tese.

Ao Dr. Ludger Witte que me iniciou nas técnicas de CG-EM de PAs e ao Dr. Marcus Eberlin que me auxiliou na interpretação de alguns espectros de EM de PAs.

Ao Dr. Ludger Ernst, Paula e Sonia pelos espectros de RMN de PAs.

Ao Dr. Stephan Schulz pelas discussões sobre a química de desidropirrolizinas e feromônios de PAs.

Ao CAPES, DAAD, DFG, FAPESP e CNPq pelo financiamento desta tese.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas, Instituto Florestal de São Paulo e Prefeitura Municipal de Jundiaí por permitirem o estudo e coleta de organismos em áreas administradas pelos mesmos.

Aos amigos Higino, Manfred, Célio, Delma, Angela, Jörg, Erika Christopher, Barbara, André, Tri, Martinho, Cica, Marici, Claudinho, Alex, Evandro, Ronaldo, Adriana, Dirk, Marquinhos I e II, Tuca e Siani por tudo durante estes cinco longos, mas produtivos anos.

A Andreinha, com um beijo, por aguentar os Ithomiinae x PAs durante quatro anos.

Aos Ithomiinae e aos PAs.

A minha sanidade.

ABREVIATURAS

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CG: Cromatografia Gasosa

CG-EM: Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas

COSY: Correlation Spectroscopy

DEPT: Distortionless Enhancement Polarization Transfer

EM: Espectrometria de Massas

EM-ICP: Espectrometria de Massas de Ionização Química Positiva

EM-IE: Espectrometria de Massas de Impacto de Elétrons

GL: Graus de Liberdade

HETCOR: Heteronuclear Correlation

IRK: Índice de Retenção de Kovats

IV: Infravermelho

m: Multiplete

P: Probabilidade

PA: Alcalóide Pirrolizidínico

q: Quarteto

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

s: Singleto

sept: Septeto

t: Triplete

TMS: Trimetilsilil

$\bar{X} \pm S$: Média mais ou menos Desvio Padrão

ÍNDICE GERAL

Capítulo 1.

INTRODUÇÃO	1
1. Interação química entre insetos e plantas	1
1.2. Constituintes químicos.	5
2. Alcalóides pirrolizidínicos e lepidópteros.	11
2.1. Alcalóides pirrolizidínicos (PAs).	11
2.2. Mediação química de PAs entre lepidópteros e plantas.	21
2.3. PAs em borboletas Ithomiinae.	22
2.3.1. Borboletas da subfamília Ithomiinae.	22
2.3.1.1. Relação entre borboletas Ithomiinae e suas plantas hospedeiras da larva.	24
2.3.2. Mediação química de PAs em borboletas Ithomiinae.	25
2.3.2.1. Evolução e ecologia.	25
2.3.2.2. Comunicação química.	27
2.3.2.3. Defesa química.	29
2.3.2.4. Outros.	29
3. Objetivos.	30

Capítulo 2.

CARACTERIZAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS.	32
1. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas de alcalóides pirrolizidínicos.	33

1.1. Cromatografia gasosa.	33
1.2. Espectrometria de massas. Impacto de elétrons e ionização química.	35
1.2.1. Monoésteres 1,2-insaturados.	53
1.2.1.1. Espectrometria de massas de impacto de elétrons.	53
1.2.1.2. Espectrometria de massas de ionização química positiva.	62
1.2.2. Monoésteres 1,2-saturados.	62
1.2.2.1. Espectrometria de massas de impacto de elétrons.	62
1.2.2.2. Espectrometria de massas de ionização química positiva.	68
1.2.3. Diésteres.	68
1.2.4. Macrocíclicos 1,2-insaturados.	70
1.2.4.1. Espectrometria de massas de impacto de elétrons.	70
1.2.4.2. Espectrometria de massas de ionização química positiva.	73
1.2.5. Macrocíclicos com base otonecina.	74
1.2.6. Macrocíclicos 1,2-saturados.	76
1.2.7. Desidropirrolizinas.	78
1.2.8. Bases necinas.	79
2. Elucidação e identificação estrutural de PAs de fontes naturais.	83
2.1. Caracterização de monoésteres 1,2-insaturados por RMN.	83
2.1.1. ¹ H RMN.	83
2.1.2. ¹³ C RMN.	88

2.2. Rotação ótica em PAs.	92
2.3. Isolamento e identificação de PAs em <i>Eupatorium</i> <i>laevigatum</i>	94
2.3.1. <i>Eupatorium laevigatum</i> de Ouro Preto, MG.	94
2.3.2. <i>Eupatorium laevigatum</i> da Serra do Japi.	104
2.4. Isolamento e identificação de PAs em <i>Trichogonia</i> <i>gardneri</i>	108
2.5. Isolamento e identificação de PAs em <i>Adenostemma</i>	111
3. Semisíntese de PAs.	114
3.1. Semisíntese de bases necinas.	115
3.2. Semisíntese de monoésteres.	117
3.2.1. Semisíntese de 9-O-(±)-2-metil,2-hidroxi- butanoato de (+)-retronecina.	117

Capítulo 3.

PADRÃO QUÍMICO NA INTERFACE PLANTAS/BORBOLETAS ITHOMIINAE. ..	123
1. Padrão químico de PAs em fontes vegetais visitadas por adultos de Ithomiinae.	124
2. Padrão químico de PAs em borboletas Ithomiinae.	135
2.1. Padrão químico em <i>Tithorea harmonia pseudethra</i>	135
2.2. Padrão químico em <i>Aeria olena olena</i>	140
2.3. Padrão químico em <i>Mechanitis polymnia casabranca</i>	142
2.4. PAs em outros Ithomiinae.	146
3. Evolução do padrão químico em borboletas Ithomiinae.	146

Capítulo 4.

INCORPORAÇÃO DE PAs POR BORBOLETAS ITHOMIINAE.	149
1. Incorporação de PAs (monoésteres) por adultos de <i>Mechanitis polymnia</i>	149
1.1. Experimentos com indicina (6a).	151

1.2. Experimentos com intermedina (6b).	151
1.3. Experimentos com licopsamina (6c).	152
1.4. Experimentos com rinderina (6d).	152
1.5. Experimentos com equinatina (6e).	153
1.6. Experimentos com amabilina (13b).	153
1.7. Inversão estereoquímica dos centros assimétricos de hidroxilas secundárias. subsídios para uma nova hipótese para a evolução da aquisição de PAs por lepidópteros.	161
1.8. Inversão estereoquímica do centro assimétrico 3'-OH. Casualidade química.	178
2. Incorporação de PAs marcados radioativamente com ¹⁴ C por <i>Mechanitis polymnia</i>	181
2.1. Incorporação de senecionina marcada com ¹⁴ C.	181
2.1.1. Análise quantitativa.	181
2.1.2. Análise qualitativa - N-oxidação de PAs.	186
2.2. Incorporação de monoésteres marcados com ¹⁴ C.	186
2.2.1. Análise quantitativa.	186
2.2.2. Análise qualitativa - N-oxidação de PAs.	187
2.3. Análise dos padrões encontrados.	188

Capítulo 5.

DEFESA QUÍMICA EM BORBOLETAS ITHOMIINAE CONTRA A ARANHA

<i>Nephila clavipes</i>	195
1. Defesa química em <i>Tithorea harmonia</i>	197
2. Defesa química em <i>Aeria olena</i>	197
3. Defesa química em <i>Mechanitis polymnia</i>	198
4. Padrões de defesa química em adultos de Ithomiinae contra a aranha <i>Nephila clavipes</i>	199

Capítulo 6.

EXPERIMENTAL.	202
1. Coleta dos organismos.	202
2. Isolamento e separação, separação e quantificação de alcalóides pirrolizidínicos.	205
2.1. Fracionamento de plantas.	205
2.2. Fracionamento de insetos.	206
2.3. Cromatografia em camada delgada (CCD).	208
2.3.1. Analítica.	208
2.3.2. Preparativa.	208
2.4. Cromatografia de partição.	209
2.5. Cromatografia de adsorção.	209
2.6. Colorimetria.	209
3. Instrumental.	211
3.1. Cromatografia gasosa.	211
3.2. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas.	211
3.3. Infravermelho.	213
3.4. Ressonância magnética nuclear.	213
3.5. Outros.	214
4. Incorporação de alcalóides pirrolizidínicos por Ithomiinae.	214
4.1. Incorporação de PAs monoésteres por <i>Mechanitis</i> <i>polymnia</i>	214
4.2. Incorporação de PAs marcados com ¹⁴ C por <i>Mechanitis</i> <i>polymnia</i>	215
4.2.1. Incorporação por larvas.	216
4.2.2. Incorporação por adultos.	217

5. Bioensaios para determinação de atividade biológica de PAs.	217
5.1. Bioensaios com a aranha <i>Nephila clavipes</i>	217
6. Caracterização de PAs isolados de fontes vegetais.	220
7. Semisíntese de PAs.	222
APÊNDICE.	226
BIBLIOGRAFIA.	340

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1.

Tabela 1.1. Maiores classes de compostos secundários de plantas envolvidos em interações planta-animal.	10
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 2.

Tabela 2.1. Índices de retenção de Kovats de alguns PAs de configuração relativa e absoluta conhecida.	34
Tabela 2.2. Fragmentação de PAs em EM por impacto de elétrons (IE) e ionização química positiva (ICP) de PAs encontrados em plantas e insetos.	37
Tabela 2.3. Padrões de deslocamento químico (ppm) e $\Delta \delta$ de PAs, ésteres no C-9 de ácidos traquelântico e viridiflórico. .	90
Tabela 2.4. Rotação ótica ($[\alpha]_D$) de PAs 9-O-monoésteres e de suas respectivas bases necinas e ácidos nécicos.	93
Tabela 2.5. Quantificação de PAs em <i>Eupatorium laevigatum</i> coletado em Ouro Preto, utilizando-se diferentes metodologias de análise e separação.	96
Tabela 2.6. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) de PAs de inflorescências de <i>Eupatorium laevigatum</i> coletado em Ouro Preto, MG.	102
Tabela 2.7. ^{13}C RMN (100,6 MHz, CDCl_3) de PAs de inflorescências de <i>Eupatorium laevigatum</i> coletado em Ouro Preto, MG.	103

Tabela 2.8. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de (-)-laevigatina (13c) isolada de inflorescências de <i>Eupatorium laevigatum</i> coletado na Serra do Japi.	107
Tabela 2.9. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (100,6 MHz, CDCl_3) de (+)-licopsamina (13c) isolada de inflorescências de <i>Trichogonia gardneri</i> coletado na Serra do Japi.	110
Tabela 2.10. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de (+)-licopsamina (13c) isolada de inflorescências de <i>Adenostema</i> sp. coletado na Serra do Japi.	113
Tabela 2.11. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de (-)-platinecina (3a).	117
Tabela 2.12. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do ácido 2-acetil,2-metilbutanóico (49).	119
Tabela 2.13. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 40a.	122

Capítulo 3.

Tabela 3.1. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em inflorescências e folhas de algumas plantas utilizadas por Ithomiinae adultos como fontes vegetais para obtenção de PAs.	129
Tabela 3.2. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Tithorea harmonia</i> e em sua planta hospedeira da larva <i>Prestonia acutifolia</i>	138
Tabela 3.3. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Aeria olena</i> e em sua planta hospedeira da larva <i>Prestonia coalita</i>	141

Tabela 3.4	Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em diferentes estágios do ciclo de vida de <i>Mechanitis polymnia</i> .	144
Tabela 3.5	Quantidade de PAs em estágios de Ithomiinae.	145

Capítulo 4.

Tabela 4.1	Configuração do 7OH de PAs monoésteres presentes em algumas espécies de lepidópteros e plantas.	150
Tabela 4.2	Eficiência de conversão para 7R-OH.	160
Tabela 4.3	Derivados de PAs (feromônios) encontrados em estruturas sexuais de machos de borboletas Danainae e Ithomiinae.	174
Tabela 4.4	Porcentagem de assimilação de senecionina marcada com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i> .	182
Tabela 4.5	Arco-seno da porcentagem de assimilação de senecionina marcada com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i> .	183
Tabela 4.6	Análise de variância do arco-seno de porcentagem de incorporação de senecionina N-óxido marcada com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i> .	184
Tabela 4.7	Teste Tuckey para comparações múltiplas entre as médias do arco-seno de porcentagem de incorporação de senecionina N-óxido marcada com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i> .	184
Tabela 4.8	Análise de variância do arco-seno de porcentagem de incorporação de senecionina terciária marcada com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i> .	185
Tabela 4.9	Teste Tuckey para comparações múltiplas entre as médias do arco-seno de porcentagem de incorporação de senecionina terciária marcada com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i> .	185

Tabela 4.10. Percentagem de assimilação de monoésteres marcados com ^{14}C por <i>Mechanitis polymnia</i>	187
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 5.

Tabela 5.1. Quantidade de PAs em borboletas testadas em bioensaios com <i>Nephila clavipes</i> , e a resposta da aranha.	201
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Capítulo 6.

Tabela 6.1. Organismos estudados (plantas).	203
Tabela 6.2. Organismos estudados (insetos).	204

Apêndice.

Tabela 1. Variação qualitativa de PAs em partes de plantas.	336
---------------------------------------------------------------------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1.

Figura 1.1. Relações metabólicas dos maiores grupos de compostos secundários com o metabolismo primário.	5
Figura 1.2. Rota biosintética da senecionina.	17
Figura 1.3. Reação de formação de cor em análise espectrofotométrica de PAs.	19

Capítulo 2.

Figura 2.1. Bases necinas.	41
Figura 2.2. Alguns ácidos nécicos.	42
Figura 2.3. Alcalóides pirrolizidínicos encontrados em borboletas da subfamília Ithomiinae e em fontes vegetais.	43
Figura 2.4. Estereoquímica absoluta de alguns PAs.	49
Figura 2.46. Projeção de Newman de traquelantatos e viridifloratos em torno da ligação C2'-C3'.	95

Capítulo 4.

Figura 4.1. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentados com indicina.	154
Figura 4.2. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentados com intermedina.	155
Figura 4.3. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentados com licopsamina.	156

Figura 4.4. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentados com rinderina.	157
Figura 4.5. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentados com equinata.	158
Figura 4.6. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de <i>Mechanitis polymnia</i> alimentados com amabilina.	159
Figura 4.7. Conformação da senecionina.	167
Figura 4.8. Conformação da heliotridina e proposição das conformações da rinderina e equinata.	171
Figura 4.9. Conformação de cristais de licopsamina e intermedina.	178
Figura 4.10. Detecção de senecionina ¹⁴ C N-óxido incorporada por larvas e adultos de <i>Mechanitis polymnia</i>	191
Figura 4.11. Detecção de senecionina ¹⁴ C terciária incorporada por larvas e adultos de <i>Mechanitis polymnia</i>	192
Figura 4.12. Detecção de monoésteres ¹⁴ C N-óxidos incorporados por larvas e adultos de <i>Mechanitis polymnia</i>	193
Figura 4.11. Detecção de monoésteres ¹⁴ C terciária incorporados por larvas e adultos de <i>Mechanitis polymnia</i>	194

Capítulo 6.

Figura 6.1. Fracionamento de insetos.	207
--------------------------------------------	-----

Apêndice.

Figura 2.5. Espectrometria de massas em IE e ICP de 6.	227
Figura 2.6. Espectrometria de massas em IE e ICP de 8.	228
Figura 2.7. Espectrometria de massas em IE e ICP de 9.	229
Figura 2.8. Espectrometria de massas em IE e ICP de 10.	230
Figura 2.9. Espectrometria de massas em IE e ICP de 11.	231

Figura 2.10.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 12.	232
Figura 2.11.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 5.	233
Figura 2.12.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 40.	234
Figura 2.13.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 13.	235
Figura 2.14.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 14.	236
Figura 2.15.	Espectrometria de massas em IE e ICP de iso-5.	.	237
Figura 2.16.	Espectrometria de massas em IE e ICP de iso-6.	.	238
Figura 2.17.	Espectrometria de massas em IE e ICP de iso-40.		239
Figura 2.18.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 15.	240
Figura 2.19.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 16.	241
Figura 2.20.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 17.	242
Figura 2.21.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 18.	243
Figura 2.22.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 19.	244
Figura 2.23.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 20.	245
Figura 2.24.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 21.	246
Figura 2.25.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 22.	247
Figura 2.26.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 23.	248
Figura 2.27.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 25.	249
Figura 2.28.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 26.	250
Figura 2.29.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 27.	251
Figura 2.30.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 24.	252
Figura 2.31.	Espectrometria de massas em IE e ICP de iso-24.		253
Figura 2.32.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 41.	254
Figura 2.33.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 34.	255
Figura 2.34.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 35.	256
Figura 2.35.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 32.	257
Figura 2.36.	Espectrometria de massas em IE e ICP de 33.	258

Figura 2.37. Espectrometria de massas em IE e ICP de 31.	259
Figura 2.38. Espectrometria de massas em IE e ICP de 30.	260
Figura 2.39. Espectrometria de massas em IE e ICP de 38.	261
Figura 2.40. Espectrometria de massas em IE e ICP de 39.	262
Figura 2.41. Espectrometria de massas em IE e ICP de 28.	241
Figura 2.42. Espectrometria de massas em IE e ICP de 1.	264
Figura 2.43. Espectrometria de massas em IE e ICP de 2.	265
Figura 2.44. Espectrometria de massas em IE e ICP de 4.	266
Figura 2.45. Espectrometria de massas em IE e ICP de 29.	267
Figura 2.47. Infravermelho de 13a.	268
Figura 2.48. RMN ¹³ C de 13a.	269
Figura 2.48a. RMN ¹³ C (DEPT) de 13a.	270
Figura 2.49. RMN ¹ H de 13a.	271
Figura 2.49a. RMN ¹ H (ampliação) de 13a.	272
Figura 2.50. COSY (¹ H- ¹ H) de 13a.	273
Figura 2.51. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 13a.	274
Figura 2.52. Infravermelho de 13b.	275
Figura 2.53. RMN ¹³ C de 13b.	276
Figura 2.53a. RMN ¹³ C (DEPT) de 13b.	277
Figura 2.54. RMN ¹ H de 13b.	278
Figura 2.54a. RMN ¹ H (ampliação) de 13b.	279
Figura 2.55. COSY (¹ H- ¹ H) de 13b.	280
Figura 2.56. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 13b.	281
Figura 2.57. Infravermelho de 6d.	282
Figura 2.58. RMN ¹³ C de 6d.	283
Figura 2.58a. RMN ¹³ C (DEPT) de 6d.	284
Figura 2.59. RMN ¹ H de 6d.	285

Figura 2.59a. RMN ¹ H (ampliação) de 6d.	286
Figura 2.60. COSY (¹ H- ¹ H) de 6d.	287
Figura 2.61. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 6d.	288
Figura 2.62. Infravermelho de 6e.	289
Figura 2.63. RMN ¹³ C de 6e.	290
Figura 2.63a. RMN ¹³ C (DEPT) de 6e.	291
Figura 2.64. RMN ¹ H de 6e.	292
Figura 2.64a. RMN ¹ H (ampliação) de 6e.	293
Figura 2.65. RMN ¹ H de 46.	294
Figura 2.66. COSY (¹ H- ¹ H) de 6e.	295
Figura 2.67. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 6e.	296
Figura 2.68. Infravermelho de 13c.	297
Figura 2.69. RMN ¹³ C de 13c.	298
Figura 2.69a. RMN ¹³ C (DEPT) de 13c.	299
Figura 2.70. RMN ¹ H de 13c.	300
Figura 2.70a. RMN ¹ H (ampliação) de 13c.	301
Figura 2.71. COSY (¹ H- ¹ H) de 13c.	302
Figura 2.72. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 13c.	303
Figura 2.73. Infravermelho de 6c.	304
Figura 2.74. RMN ¹³ C de 6c.	305
Figura 2.74a. RMN ¹³ C (DEPT) de 6c.	306
Figura 2.75. RMN ¹ H de 6c.	307
Figura 2.75a. RMN ¹ H (ampliação) de 6c.	308
Figura 2.76. RMN ¹ H 47.	309
Figura 2.77. COSY (¹ H- ¹ H) de 6c.	310
Figura 2.78. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 6c.	311
Figura 2.79. Infravermelho de 6b.	312

Figura 2.80. RMN ¹³ C de 6b.	313
Figura 2.80a. RMN ¹³ C (DEPT) de 6b.	314
Figura 2.81. RMN ¹ H de 6b.	315
Figura 2.81a. RMN ¹ H (ampliação) de 6b.	316
Figura 2.82. COSY (¹ H- ¹ H) de 6b.	317
Figura 2.83. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 6b.	318
Figura 2.84. Infravermelho de 3a.	319
Figura 2.85. RMN ¹³ C de 3a.	320
Figura 2.85. RMN ¹³ C (DEPT) de 3a.	321
Figura 2.86. RMN ¹ H de 3a.	322
Figura 2.86a. RMN ¹ H (ampliação) de 3a.	323
Figura 2.86b. RMN ¹ H (ampliação) de 3a.	324
Figura 2.87. COSY (¹ H- ¹ H) de 3a.	325
Figura 2.88. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 3a.	326
Figura 2.89. Infravermelho de 49.	327
Figura 2.90. RMN ¹³ C de 49.	328
Figura 2.90a. RMN ¹³ C (DEPT) de 49.	329
Figura 2.91. RMN ¹ H de 49.	330
Figura 2.92. Infravermelho de 40a.	331
Figura 2.93. RMN ¹³ C de 40a.	332
Figura 2.94. RMN ¹ H de 40a.	333
Figura 2.95. COSY (¹ H- ¹ H) de 40a.	334
Figura 2.96. HETCOR (¹ H- ¹³ C) de 40a.	335

RESUMO

Alcalóides pirrolizidínicos (PAs) são ésteres de 1-metilhidroxilpirrolizidinas, sendo o aminoálcool chamado de base necina e a parte ácida de ácidos nécicos. Geralmente ocorrem em forma de monoésteres, diésteres abertos ou cíclicos, podendo apresentar uma insaturação no anel (PAs insaturados) ou não (PAs saturados). Estas substâncias apresentam mais de 200 estruturas isoladas de plantas, ocorrendo principalmente em *Senecio*, *Eupatorium* (Asteraceae), *Crotalaria* (Fabaceae) e *Heliotropium* (Boraginaceae).

PAs apresentam atividade farmacológica (hepatotóxicos, cancerígenos, anti-cancer) e biológica (mediadores químicos de interações planta-herbívoros-predadores). Neste segundo aspecto, o estudo se concentra na aquisição de PAs de fontes vegetais por parte de lepidópteros (Arctiidae, Danainae e Ithomiinae). Estes PAs são adquiridos de plantas hospedeiras da larva, ou de fontes de néctar ou fármacos de adultos destes lepidópteros. Estes insetos sequestram esses alcalóides de fontes vegetais, tornando-se quimicamente protegidos contra predadores, além de muitas vezes utilizarem PAs como precursores de feromônios.

Neste trabalho, foi realizada a análise química por CG-EM de três espécies de borboletas da subfamília Ithomiinae e de suas plantas hospedeiras da larva e fontes de néctar ou fármacos de adultos. As análises mostraram que:

1. *Tithorea harmonia pseudethra* sequestra PAs de sua planta hospedeira *Prestonia acutifolia* (Apocynaceae: Echitoideae), além de machos adquirirem estes alcalóides de fontes vegetais visitadas pelos adultos.

2. *Aeria olena olena* utiliza como planta hospedeira da larva *Prestonia coalita*, na qual não foi constatada a presença de PAs, mas adultos recém emergidos da pupa muitas vezes apresentam PAs. Além disso machos adultos adquirem PAs de fontes vegetais PAs.

3. *Mechanitis polymnia polymnia* utiliza várias espécies de *Solanum* como planta hospedeira da larva, as quais não apresentam PAs. Machos adultos adquirem PAs de fontes vegetais.

Fêmeas das três espécies devem adquirir PAs dos machos por ocasião da cópula.

Tanto indivíduos machos quanto fêmeas das três espécies acima apresentam principalmente dois alcalóides pirrolizidínicos 1,2-insaturados e esterificados no C-9: licopsamina e

intermedina. Estes PAs estão sempre presentes numa proporção que varia de 100% licopsamina até 7:1 de licopsamina. Outros diastereoisômeros destes alcalóides não foram encontrados nos lepidópteros.

A análise química por CG-EM de plantas hospedeiras da larva e fontes vegetais visitadas por adultos mostrou um amplo espectro de PAs (47 estruturas) sendo que os PAs encontrados com mais abundância e frequência eram licopsamina, intermedina, equinatina, rinderina, indicina, supinina e amabilina. Estes PAs foram isolados, e caracterizados por métodos físicos. Além disso um novo alcalóide (levigatina), foi isolado de *Eupatorium laevigatum*.

Além destes PAs foi semisintetizado calimorfina (um PA muitas vezes biossintetizado por mariposas da família Arctiidae) a partir da esterificação do C-9 da base necina retronecina com o *rac*-ácido 1-acetil-metil-butanóico.

Estudos de incorporação de PAs (licopsamina e quatro de seus diastereoisômeros conhecidos - indicina, intermedina, equinatina e rinderina, além de amabilina) por adultos de Ithomiinae, sem acesso a estes, mostraram que:

1. Em machos, as estruturas são transformadas quase que totalmente para licopsamina (80%) e intermedina (20%).

2. Em fêmeas, as estruturas são parcialmente transformadas (por volta de 50%) para licopsamina.

A transformação estereoquímica de PAs por parte de machos deve estar ligada a evolução da aquisição de PAs por parte deste lepidópteros e se reflete na produção de feromônios. Fêmeas devem adquirir os PAs já modificados por ocasião da cópula, pois raramente visitam fontes de PAs.

Experimentos de incorporação de PAs marcados radioativamente com ^{14}C por *Mechanitis polymnia* mostraram que:

1. Indivíduos alimentados como larva incorporam PAs menos eficientemente que aqueles alimentados como adultos, e 2. monoésteres terciários são N-oxidados mais eficientemente que macrocíclicos. Estes resultados refletem a biologia de *M. polymnia*, a qual não se alimenta quando larva de plantas com PAs, além de não visitar, quando adulto, fontes vegetais de PAs macrocíclicos.

Ensaio efetuado com adultos capturados no campo e recém emergidos da pupa comprovam que PAs apresentam atividade de proteção química destes lepidópteros contra a predação por parte da aranha *Nephila clavipes*.

ABSTRACT

Pyrrolizidine alkaloids (PAs) are esters derived from 1-methyl-hydroxyl-pyrrolizidines; the aminoalcohol is called a necine base and the esterified acid a necic acid. PAs occur as monoesters and open or cyclic diesters, the ring being saturated or unsaturated. There are more than 200 structures of PAs isolated from plants, mainly *Senecio*, *Eupatorium* (Asteraceae), *Crotalaria* (Fabaceae) and *Heliotropium* (Boraginaceae).

PAs have shown pharmacological (hepatotoxic, cancerigen, anti-cancer activities) and biological activities (chemical mediators of plant-herbivore-predator interactions). Within this later category this study is concentrated on the acquisition of PAs by butterflies (Danainae and Ithomiinae) and moths (Arctiidae) from plant sources. These alkaloids are sequestered by insects from larval host plants or adult sources. Sequestering these PAs, insects became chemically protected against predators, and also utilized PAs as pheromone precursors.

In this work, PA chemical patterns from 3 Ithomiinae butterflies, their larval host plants and adult sources have been studied by GC-MS. This study showed that:

1. *Tithorea harmonia pseudethra* sequesters PAs from its larval food plant *Prestonia acutifolia* (Apocynaceae: Echitoideae), and also acquires these alkaloids from adult plant sources.

2. *Aeria olena olena* utilizes as larval host plant *Prestonia coalita*. No traces of PAs were verified in this plant, but recently emerged adults some time contain PAs. Wild caught adults acquire PAs from adult vegetal sources.

3. *Mechanitis polymnia polymnia* utilizes several *Solanum* species as larval host plants (not PA plants). Wild caught males acquire PAs from adult plant sources.

Males and females from these three species present mainly two 1,2-unsaturated monoester PAs esterified at C-9: lycopsamine and intermedine. These PAs are present from 100% to 7:1 of lycopsamine. Other distereoisomers are not found in these butterflies.

GC-MS chemical analyses of larval host plants and adult vegetal sources showed a large array of PA structures, the more abundant and frequent PAs being lycopsamine, intermedine, equinatine, rinderine, indicine, supinine and amabiline. These PAs were isolated and characterized by physical methods. A new PA (laevigatine) was isolated from *Eupatorium laevigatum*.

Callimorphine (a biosynthesized insect PA) was

semisynthesized from retronecine esterified at C-9 with the *rac*-1-acetyl-methyl-butanoic acid.

Incorporation of PAs by PA deprived adult butterflies (with lycopsamine and its four known stereoisomers - indicine, intermedine, equinatine and rinderine) showed that:

1. Males isomerize PAs to mainly lycopsamine.
2. Females change only part of these PAs to lycopsamine.

The stereochemistry inversion of 7-OH PAs may be closely related to the evolution of acquisition of PAs by butterflies and moths, reflecting in the biosynthesis of PA derived pheromones. Females may acquire transformed PAs from males by mating, because they rarely visit adult sources of PAs.

Incorporation of labeled ^{14}C PAs by *Mechanitis polymnia* showed that:

1. When PAs are fed to the larvae, *M. polymnia* incorporates less PAs than when it fed to the adult, and 2. free monoesters are more efficiently N-oxidized than free macrocyclics by larvae and adults. These results reflect the biology of *M. polymnia*, which does not feed as larvae on PA plants, and does not visit as adult macrocyclic PAs sources.

Bioassays with wild caught and recently emerged adults showed that PAs have ecological activity of chemical protection against predation by the orb weaving spider *Nephila clavipes*.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTERAÇÃO QUÍMICA ENTRE INSETOS E PLANTAS.

Interações ecológicas entre seres vivos como predação¹, parasitismo², competição³ e mutualismo⁴ envolvem muitas vezes a utilização de substâncias químicas.

Quando se observa o universo de insetos fitófagos⁵, verifica-se que existe uma incapacidade destes insetos utilizarem em grande escala estas plantas (Feeny 1975). Existem duas

1. Predação: Relação alimentar entre organismos de espécies diferentes, benéfica para um deles (predador), à custa da morte e consumo de outros (presas).

2. Parasitismo: Interação na qual um hóspede (parasita) mantém-se temporaria ou permanentemente sobre ou no interior de outro ser vivo (hospedeiro) e a este prejudica.

3. Competição: Uso ou defesa de um recurso por um indivíduo, o qual reduz a utilização desse recurso por outros indivíduos. A ocorrência entre indivíduos da mesma espécie é chamada competição intraespecífica, e entre indivíduos de espécies diferentes é chamada competição interespecífica.

4. Mutualismo: Interação obrigatória ou facultativa entre duas espécies, com benefício mútuo, de tal modo que a aptidão dos indivíduos de ambas espécies tende, em média, a ser maior do que se elas não fizessem parte desta interação.

5. Fitófago: um organismo que consome plantas vivas ou suas partes.

hipóteses para explicar este fenômeno: 1. os fitófagos não são limitados pela quantidade de alimento disponível e sim por outros fatores, tais como clima (Ehrlich & Birch 1967) ou predação e parasitismo (Hairston *et al.* 1960), e 2. nem toda a fitomassa é disponível como alimento para os fitófagos devido a sua composição química (Sinclair 1975).

Stahl, 1888 (*apud* Rhoades 1979) foi o primeiro autor a sugerir que as propriedades químicas das plantas estariam envolvidas na defesa de plantas contra fitófagos. Substâncias do metabolismo secundário de plantas (o termo é de Paech 1950 *apud* Fraenkel 1959) seriam responsáveis pela proteção química das plantas contra fitófagos. Segundo proposição de Fraenkel (1959) esta seria a "razão de ser" destas substâncias em plantas. Segundo esta teoria, estes compostos foram inicialmente selecionados como repelentes contra fitófagos em geral, atuando posteriormente como atraentes para especialistas que conseguiram ultrapassar estas barreiras químicas.

Ehrlich & Raven (1965) propuseram que substâncias secundárias exerceriam um papel fundamental na coevolução⁶ entre borboletas e suas plantas hospedeiras da larva. A produção de substâncias secundárias em plantas em resposta ao ataque de insetos fitófagos, e a resposta evolutiva recíproca destes para

6. Coevolução: Mudança de um caráter nos indivíduos de uma população em resposta à um caráter dos indivíduos de uma outra população, seguida por uma resposta evolutiva dessa população à mudança da primeira. Esta definição, atualmente aceita, foi elaborada por Janzen (1980). O termo empregado por Ehrlich & Raven (1965) foi utilizado para descrever as adaptações e contraadaptações entre plantas e fitófagos.

ultrapassar estas barreiras químicas, seriam os fatores determinantes na evolução das borboletas e outros fitófagos. Entretanto, Futuyma (1983) argumenta que estas substâncias, na grande maioria das Angiospermas, teriam surgido em plantas antes do advento dos insetos fitófagos, devido a pressões seletivas diversas (patógenos, parasitas, competição). Na maioria dos casos, a defesa contra insetos foi um efeito acidental destes compostos, ocorrendo posteriormente adaptações sequenciais dos fitófagos à estas substâncias.

Segundo Robinson (1974) e Seigler & Price (1976), substâncias do metabolismo secundário também poderiam ter origem funcional no metabolismo primário das plantas.

Em um recente artigo, Willians *et al.* (1989) discutem seis hipóteses a respeito da origem das substâncias do metabolismo secundário de plantas. As hipóteses apresentadas são as seguintes:

1. Estas substâncias devem ter se originado através de mutações, e seriam seletivamente neutras (não apresentariam vantagens ou desvantagens seletivas para os organismos que as produzem).

2. "Evolução em progresso", baseada na idéia geral que o metabolismo secundário é "um reservatório de uma variedade não funcional da qual novos processos funcionais podem emergir" em algum tempo devido a seleção natural.

3. Substâncias do metabolismo secundário são resíduos ou produtos de detoxificação.

4. A síntese de enzimas que são designadas para executar os

processos do metabolismo secundário, permitem a rede de enzimas que é operativa no metabolismo primário continuar a funcionar. Nesta hipótese os processos de metabolismos secundário são mais importantes que os produtos.

5. Em algum ponto da história evolutiva dos organismos, as substâncias do metabolismo secundário, as quais já existiam (existem) tiveram (tem) um papel (metabólico) funcional.

6. Substâncias do metabolismo secundário são a medida da aptidão de um organismo a sobrevivência. A habilidade para sintetizar uma gama de metabolitos secundários, os quais atuam em interações ecológicas teriam evoluído como uma faceta da estratégia de sobrevivência deste organismo.

As hipóteses 1 a 3, e 5 são criticadas devido ao alto custo metabólico envolvido (muitas kilobases de DNA) para a produção e manutenção de substâncias do metabolismo secundário através do processo evolutivo para substâncias sem "função". A hipótese 4, também é criticada devido a ausência de um papel funcional para as substâncias do metabolismo secundário, o qual é amplamente conhecido.

A hipótese 6 é defendida, sugerindo-se que as interações ecológicas que deram origem a estas substâncias provavelmente eram entre organismos ancestrais de vegetais inferiores e superiores (p.e. microorganismos). Estas substâncias estão presentes nos organismos atuais, sendo que sua atual função muitas vezes não tem mais relação com a pressão seletiva original que deve ter dado origem a elas, representando casos típicos de

exaptação⁷.

1.2. CONSTITUÍNTES QUÍMICOS.

Substâncias do metabolismo secundário, com poucas exceções, podem ser classificadas através de suas rotas metabólicas em: 1. fenilpropanos, 2. acetogeninas, 3. terpenóides, 4. esteróides, e 5. alcalóides (Figura 1) (Whittaker & Feeny 1971).

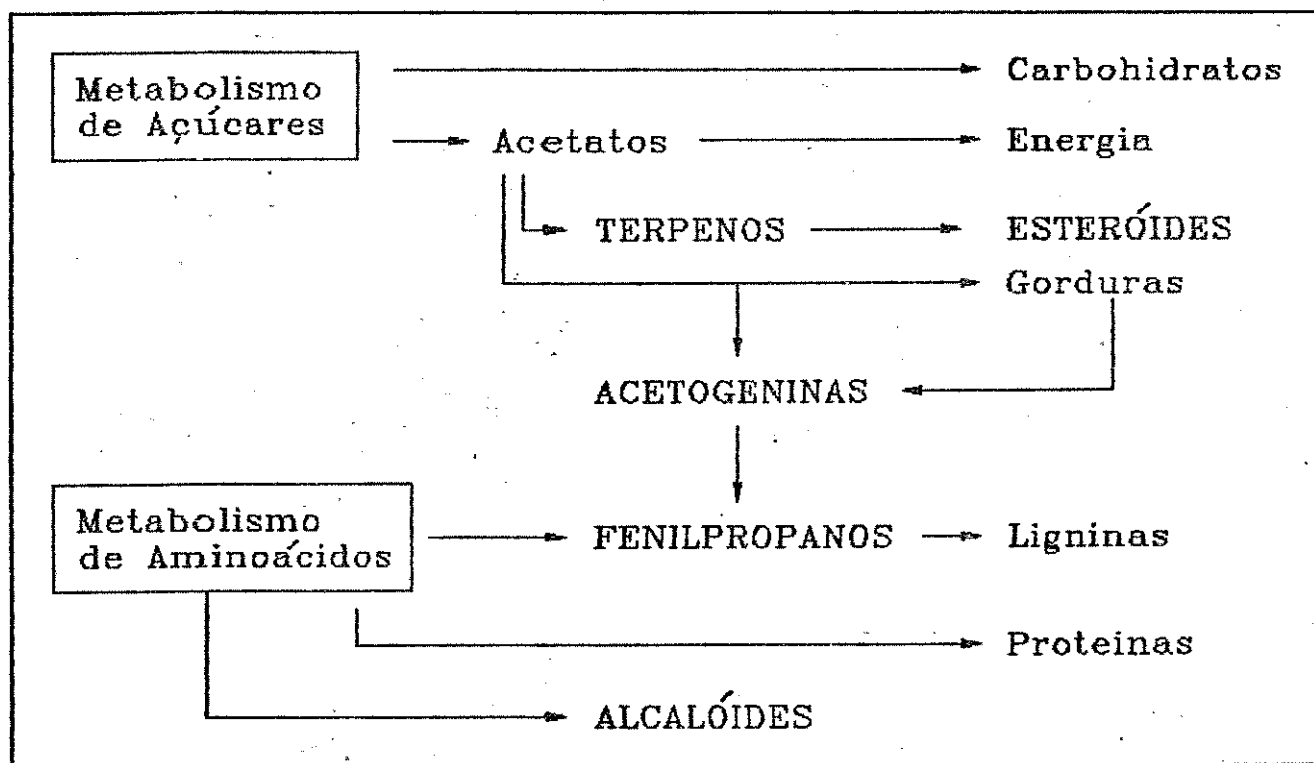


Figura 1.1. Relações metabólicas dos maiores grupos de compostos secundários (em letras capitais) com o metabolismo primário (de Whittaker & Feeny 1971).

Seguindo a abordagem inicial de Fraenkel (1959), Whittaker & Feeny (1971) discutiram mais detalhadamente o papel das

7. Exaptação: Termo que descreve caracteres que proporcionam atualmente vantagens adaptativas a um dado organismo, mas não foram moldados pela seleção natural para a corrente função (Gould & Vrba 1982).

substâncias secundárias na comunicação química intraespecífica (aleloquímicos⁸) e interespecífica (p.e. feromônios⁹).

Interações aleloquímicas entre plantas, fitófagos e seus predadores foram revistas e discutidas por Whitman (1988), mostrando que substâncias aleloquímicas podem atuar diferentemente como 1. alomônios¹⁰, 2. cairomônios¹¹, 3. sinomônios¹², ou 4. antimônios¹³.

Como exemplos de alomônios em interações fitófagos-plantas pode-se citar substâncias repelentes¹⁴ e tóxicas¹⁵ (Feeny

8. Aleloquímicos: Substâncias químicas produzidas e liberadas por um organismo de uma espécie, que afetam o desenvolvimento, comportamento ou a estrutura populacional de organismos de outra espécie.

9. Feromônios: Substância química produzida por um organismo, liberada no meio e utilizada para comunicação intraespecífica.

10. Alomônios: Substâncias químicas produzidas e liberadas no meio por organismos de uma espécie e captada por organismos de outra espécie, resultando em vantagens adaptativas para o organismo emissor, podendo ou não ser desvantajosa para o organismo que a recebe.

11. Cairomônios: Substâncias químicas produzidas e liberadas no meio por um organismo de uma espécie e captada por organismos de outra espécie, resultando em vantagem adaptativa ao receptor e desvantagem ao emissor.

12. Sinomônios: Substâncias que são alomônios e cairomônios ao mesmo tempo, cuja transmissão do emissor ao receptor (de outra espécie) leva a benefícios para ambos (como odor de advertência, ou atraente de polinizador).

13. Antimônios: Substâncias liberadas ocasionalmente por organismos, as quais produzem reações nos organismos receptores, que são desvantajosas do ponto de vista ecológico tanto para o organismo que emitiu, quanto para o organismo que recebeu.

14. Repelentes: Substâncias químicas capazes de, por quimiotaxia, provocar estímulos negativos sobre organismos.

1970, Levin 1976, Blau *et al.* 1978, Tabashnik 1987). A detoxificação enzimática é muitas vezes utilizada por insetos fitófagos para contornar estes tipos de barreiras químicas (Brattsten 1979, Yu 1987).

Como exemplo de caíromônios nestas interações pode-se citar substâncias produzidas por plantas, as quais são utilizadas por fitófagos como estímulos de oviposição (Feeny *et al.* 1983) ou de alimentação (Pliske 1975b, 1975c, Bowers 1983, 1984).

Os casos de sinomônios mais conhecidos são de substâncias que promovem a mediação química entre Angiospermas e seus polinizadores, onde substâncias voláteis de plantas atraem polinizadores (beneficiando a planta) e servem como nutrição e locais de sinalização de cópula (Barth 1985 e Pellmyr & Thein 1986). Substâncias voláteis de plantas podem servir como atraentes para parasitóides e predadores de seus hospedeiros (ver Whitman 1988 e referências contidas).

Existem alguns exemplos descritos na literatura sobre substâncias atuando como antimônio, por exemplo, o caso de plantas que restringem o acesso à suas flores somente a polinizadores especializados devido a adaptações químicas (Whitman 1988). Sendo o néctar ou pólen destas plantas tóxico a visitantes generalistas (ou não especialistas), a ausência espacial ou temporal do polinizador especialista, levaria ao envenenamento de polinizador generalista ocasionais, o que iria

15. Tóxicos: Substâncias que afetam o funcionamento de células, tecido, organismos e sistemas, reduzindo sua eficiência de conservação de energia.

tornar-se desvantajoso para a planta.

Interações que envolvem cairomônios e antimônios são desvantajosas para o organismo produtor, portanto tendem a ser consideradas como maladaptações, tendendo a ser desestabilizadas do ponto de vista da seleção natural (Blum 1974, Pasteels 1982). Entretanto como organismos interagem com muitas espécies, uma substância que apresente efeitos deletérios em uma situação pode apresentar efeitos benéficos em outra e ser evolutivamente favorecida. A múltipla funcionalidade de tais aleloquímicos faz com que seja difícil calcular o valor líquido destes (Whitman 1988).

Como exemplo da situação acima descrita pode-se descrever o caso de alcalóides pirrolizidínicos (PAs) os quais podem atuar como:

1. alomônios em relação (a) à plantas produtoras de PAs contra fitófagos polípagos (Vrieling 1990, Vrieling *et al.* 1991), e (b) à insetos especialistas que sequestram PAs destas plantas e são protegidos quimicamente contra predadores (Brown 1984, 1985, Masters 1990, Eisner & Eisner 1991, Trigo *et al.* 1993).

2. cairomônios em relação a planta produtora e o inseto especialista que a utiliza (Vrieling 1990).

3. sinomônios em relação a planta produtora (no caso de flores e inflorescências) e os insetos especialistas que as visitam, provavelmente polinizando-as (Pliske 1975a, DeVries & Stiles 1990).

A comunicação química intraespecífica mediada por substâncias chamadas feromônios pode apresentar diferentes

funções como: 1. comportamento reprodutivo, 2. regulação e reconhecimento social, 3. controle de diferenciação de castas, 4. alarme e defesa, 5. marcação de territorialidade e trilhas, e 6. localização de alimentos (Whittaker & Feeny 1971).

A Tabela 1.1 apresenta as maiores classes de compostos secundários de plantas, envolvidos em interações planta-animal. Rosenthal & Janzen (1979) e Harborne (1988, 1989) apresentam revisões sobre estes constituintes e suas funções em interações ecológicas.

Tabela 1.1. Maiores classes de compostos secundários de plantas envolvidos em interações planta-animal (modificado de Harborne 1988).

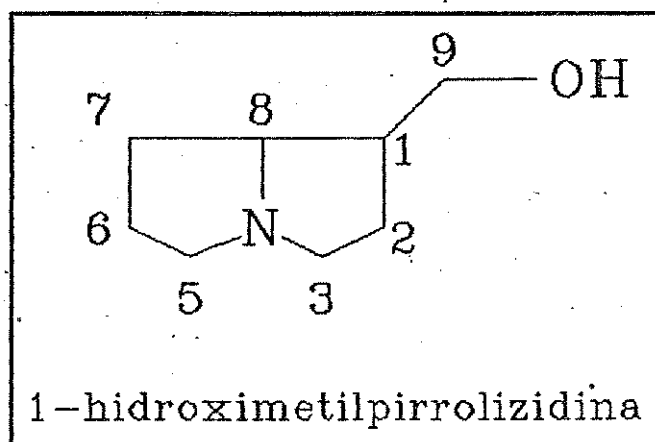
Classe	N°	Distribuição	Atividade
COMPOSTOS NITROGENADOS			
Alcalóides	6500	Angiospermas	Tóxicos, repelentes, atraentes, feromônios
Aminas	100	Angiospermas	Repelentes, atraentes
Aminoácidos não proteicos	400	Sementes de Leguminosae	Tóxicos, atraentes
Glicosídeos cianogênicos	30	Esporádica, especialmente em frutas e folhas	Venenosos
TERPENÓIDES			
Monoterpenos	1000	Ampla, em óleos essenciais	Atraentes
Lactonas sesquiterpênicas	1500	Principalmente em Asteraceae	Tóxicas, repelentes, atraentes
Diterpenóides	2000	Ampla, especialmente em latex e resinas de plantas	Tóxicos, repelentes
Cucurbitacinas	50	Principalmente em Cucurbitaceae	Tóxicas
Cardenolidas	150	Asclepiadaceae, Apocynaceae e Scrophulariaceae	Tóxicas, repelentes, atraentes
FENÓLICOS			
Flavonóides	4000	Angiospermas e Gimnospermas	Atraentes, tóxicos

2. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS E LEPIDÓPTEROS.

2.1. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS (PAs).

Alcalóides pirrolizidínicos (PAs) constituem uma ampla classe de produtos naturais com mais de 200 estruturas isoladas, ocorrendo principalmente em plantas do gênero *Senecio*, *Eupatorium* (Asteraceae), *Crotalaria* (Fabaceae), e *Heliotropium* (Boraginaceae) (Robins 1982, 1991, Mattocks 1986, Rizk 1991). Estima-se que 3% das Angiospermas contém estes alcalóides.

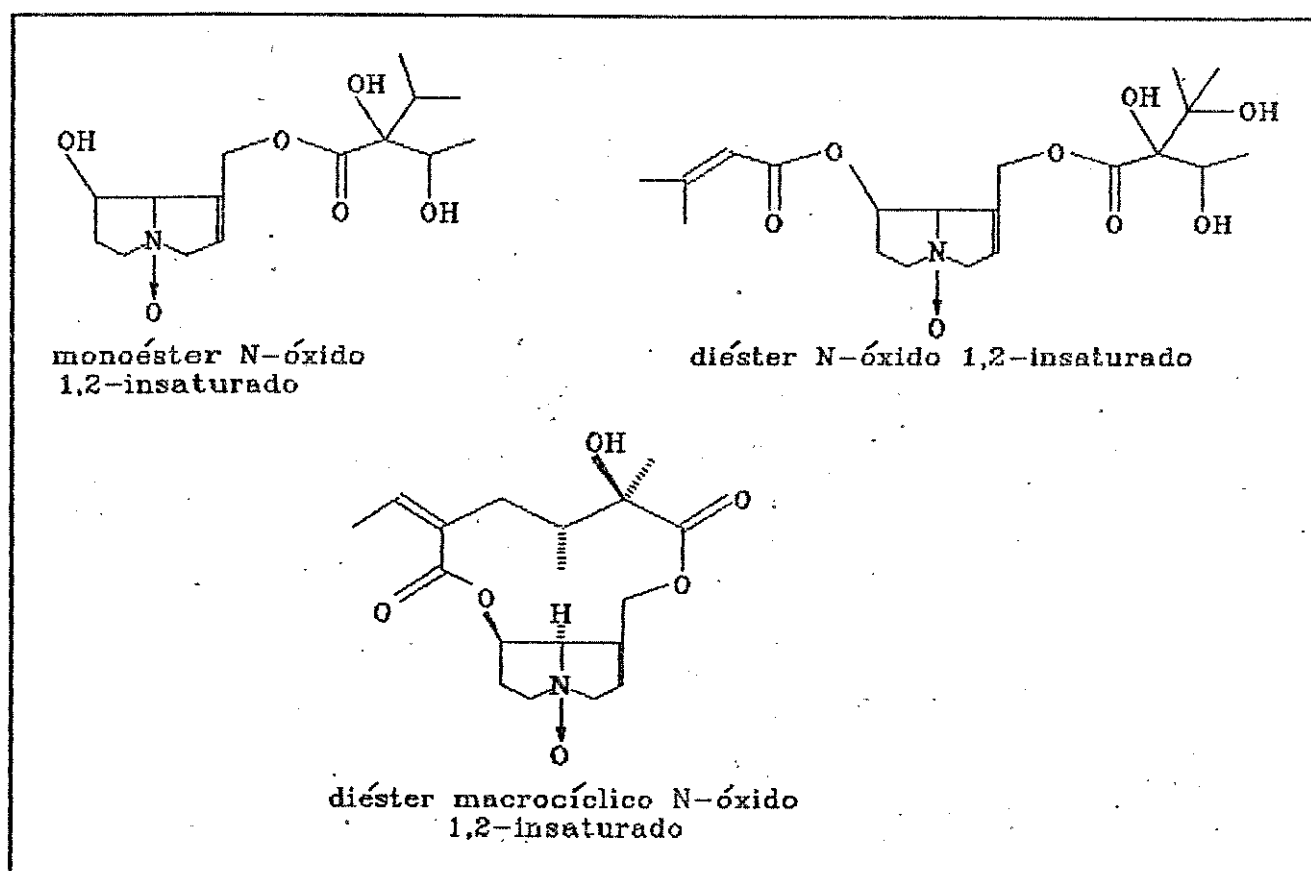
O anel pirrolizidínico é um sistema 1-azabicyclo-[3.3.0]-octano e PAs são usualmente constituídos de uma base necina (1-hidroximetilpirrolizidina [Esquema 1.1], ou derivados desta [ver Figura 2.1, Capítulo 2]).



Esquema 1.1.

Estas bases diferem no grau de hidroxilação, estrutura e estereoquímica dos substituintes e grau de insaturação do anel. Geralmente são esterificadas nos C-9 e/ou C-7 com uma variedade de cadeias ramificadas (geralmente ácidos carboxílicos, também

chamados ácidos nécicos ou ácidos esterificantes), ocorrendo em forma de monoésteres, macrocíclicos, ou diésteres, com a base necina 1,2-insaturada ou não (Esquema 1.2)¹⁶ (Mattocks 1972). Segundo Hartmann (1988) estes alcalóides ocorrem majoritariamente em plantas na forma de N-óxidos.

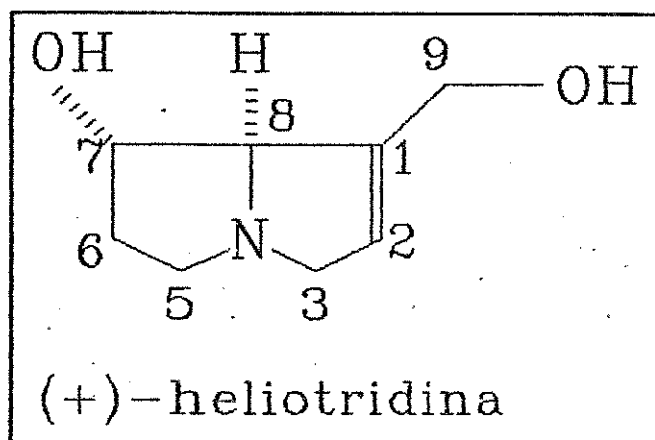


Esquema 1.2.

Em relação a nomenclatura, PAs são geralmente conhecidos pelos seus nomes triviais (usualmente derivados de nomes de suas plantas de origem). A nomenclatura sistemática não é utilizada com frequência. Culvenor *et al.* (1971) comenta a nomenclatura

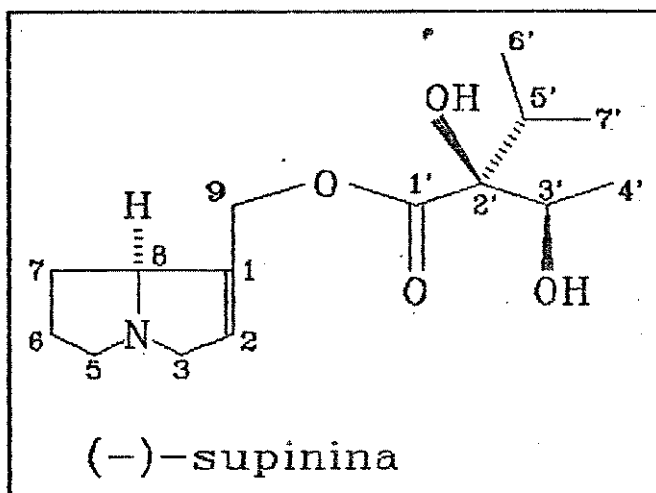
16. Ver mais estruturas de PAs na Figura 2.2, Capítulo 2.

sistemática. As bases necinas são denominadas como derivados de pirrolizidinas (se saturadas) ou pirrolizinas (se insaturadas); então a heliotridina é um 7- α -hidroxi-1-hidroximetil-5,6,7,8 α -tetraidro-3H-pirrolizina (Esquema 1.3a).



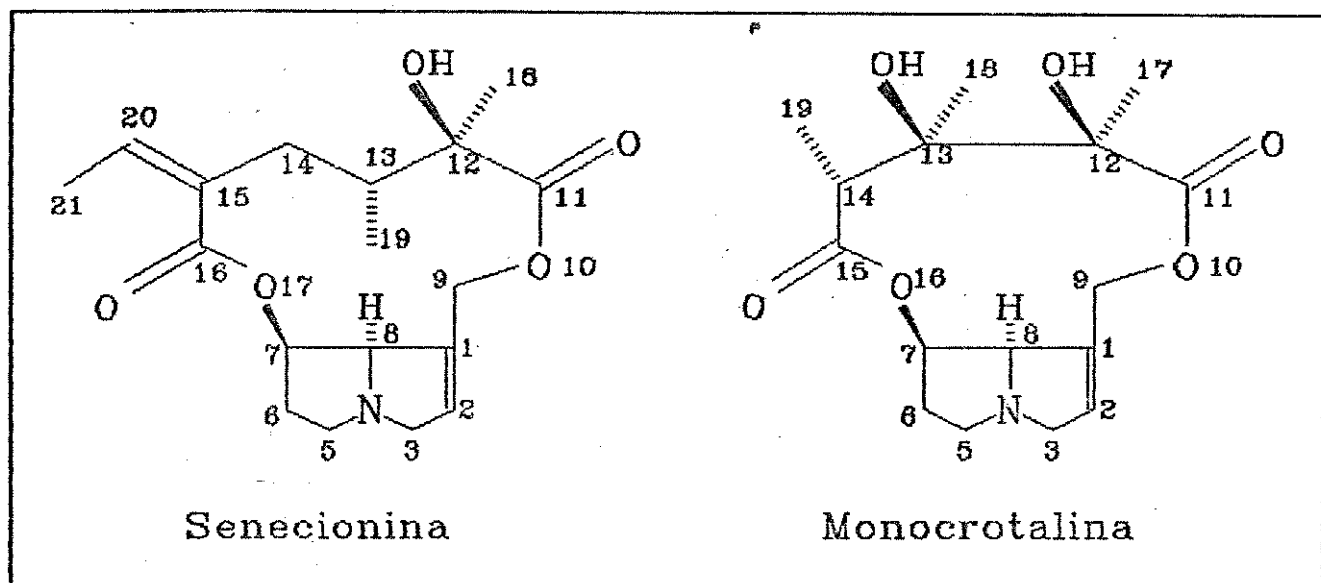
Esquema 1.3a.

Os nomes sistemáticos são adaptados a PAs monoésteres e macrocíclicos. Por exemplo a supinina é (5,6,7,8 α -tetraidro-3H-pirrolizin-1-il)-metil-2',3'-dihidroxi-2'-isopropil-butirato (Esquema 1.3b).



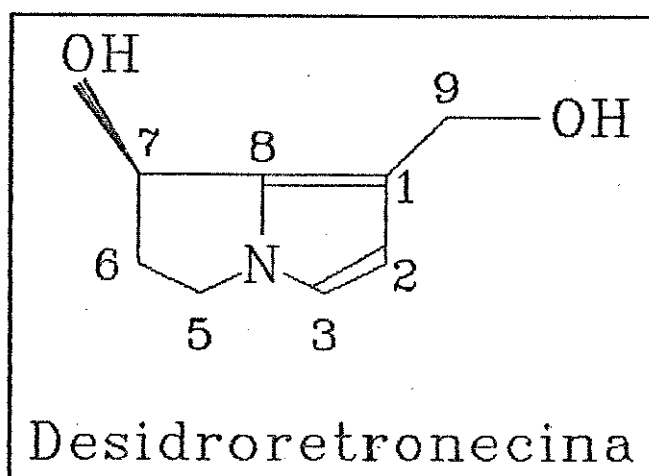
Esquema 1.3b.

Para diésteres macrocíclicos um sistema diferente é utilizado: as raízes "crotalanina" e "senecanina" são usadas para estruturas macrocíclicas de 11- e 12-membros respectivamente (Culvenor *et al.* 1971). Então, monocrotalina é 12 β ,13 β -diidroxil-12 α ,13 α ,14 α -trimetilcrotal-1-enina, e a senecionina é *trans*-15-etilideno-12 β -hidroxil-12 α ,13 β -dimetilsenec-1-enina (Esquema 1.3c).



Esquema 1.3c.

Desidropirrolizinas, que são metabolitos importantes de PAs, são nomeados como 5H-pirrolizinas, e mantêm a mesma numeração dos PAs relacionados. A desidroretronecina é 7β-hidroxi-1-hidroximetil-6,7-diidro-5H-pirrolizina (Esquema 1.3d).



Esquema 1.3d.

Estudos biossintéticos de PAs₂ (ver Hartmann 1988 e Robins 1989a para revisão) mostram que os aminoácidos ornitina e arginina são os precursores das bases necinas, via putrescina e homoespermidina. Os ácidos néricos são derivados de α -aminoácidos (isoleucina, valina, leucina e treonina) (Figura 1.2).

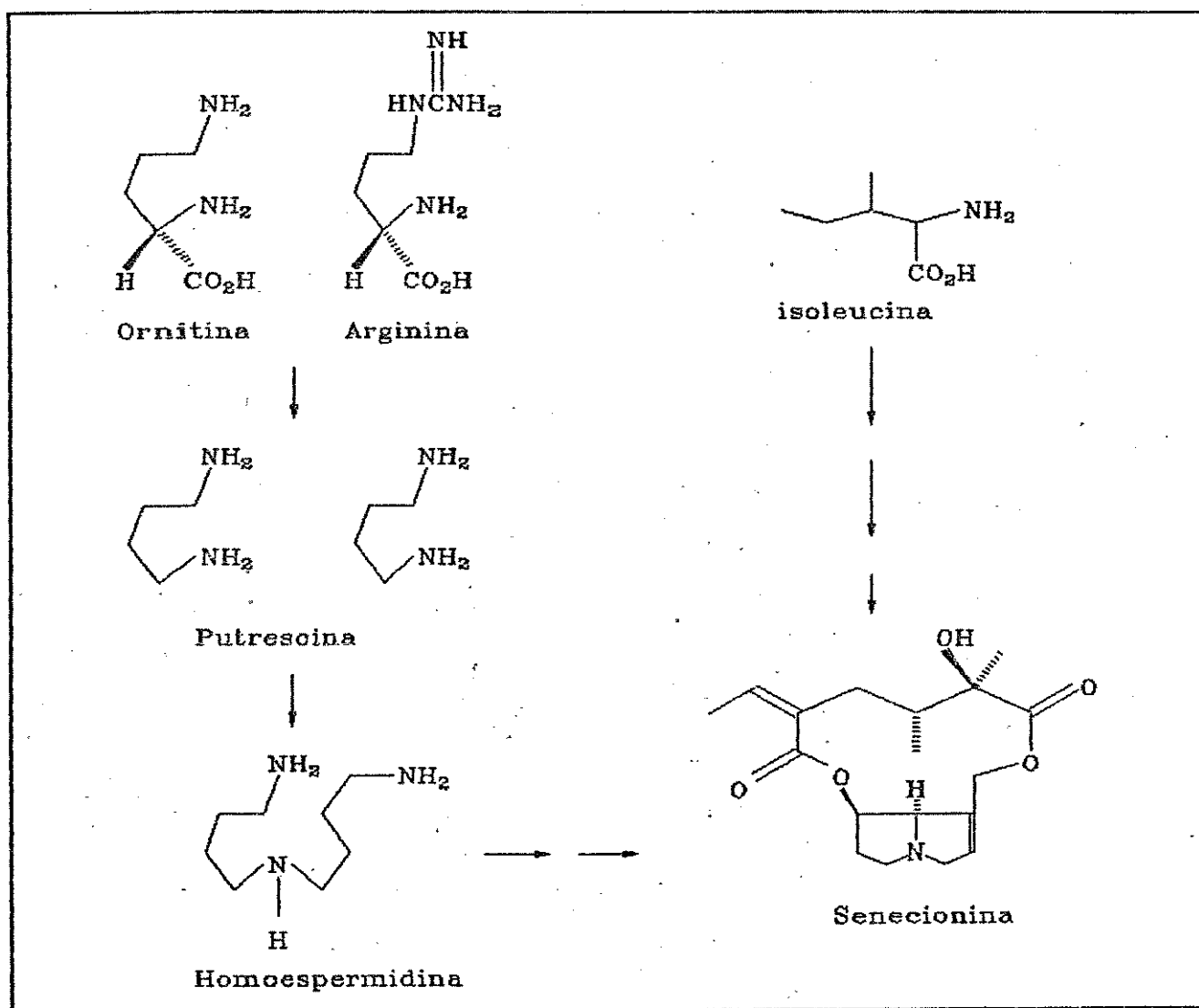


Figura 1.2. Rota biosintética da senecionina. A base necina origina-se da ornitina/arginina via intermediários simétricos putrescina e homoespermedina. Isoleucina é o precursor do ácido necico (Hartmann 1988).

Revisões sobre metodologia de extração, separação, análise e identificação de PAs foram feitas por Mattocks (1986) e Rizk & Hussiney (1991).

O fato de PAs ocorrerem em plantas e animais como N-óxidos, implica na necessidade de uma redução destes alcalóides antes da extração com solventes orgânicos da fase aquosa. Geralmente

utiliza-se Zn em meio ácido, o qual converte rapidamente PAs N-óxidos em seus PAs terciários correspondentes, os quais são extraídos da fase aquosa alcalina com solventes orgânicos (Mattocks 1986). Outros métodos menos usuais podem ser empregados e uma revisão sobre os mesmos encontra-se em Mattocks 1986 e Rizk & Hussiney 1991.

A separação de misturas de PAs se dá por meio de vários processos cromatográficos. Os mais comuns são: 1. coluna cromatográfica de adsorção, com a utilização de diferentes adsorventes como óxido de alumina, sílica gel e sílica gel alcalinizada, eluídos geralmente com um sistema de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ ou $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ em diversas proporções; 2. coluna cromatográfica de partição, com a utilização de Celite 545 como suporte, tampão fosfato ou solução de Borax como fase fixa e CHCl_3 como fase móvel. A técnica de distribuição contracorrente de modo ascendente e descendente também é utilizada (ver Mattocks 1986 e Rizk & Hussiney 1991 para uma revisão de todos os processos cromatográficos de separação de PAs).

Em escala analítica realiza-se geralmente CCD em sílica gel usando-se um sistema de solvente de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ a diversas proporções. A visualização usualmente é feita via vapores de iodo, ou com um teste específico para detecção de PAs desenvolvido por Mattocks (1967a), que envolve a oxidação de PAs para seus N-óxidos com H_2O_2 , o tratamento com anidrido acético para converter os N-óxidos à pirrol e a subsequente reação com reagente de Ehrlich (4-dimetilamino benzaldeído) para dar uma cor purpura-azulada característica (Figura 1.3). Cromatografia

gasosa, cromatografia gasosa capilar (acopladas ou não a um detector de massas), cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese são também utilizados para se identificar PAs em escala analítica (ver revisão em Mattocks 1986 e Rizk & Hussiney 1991).

A quantificação de PAs por método colorimétrico baseada no reagente de Ehrlich (ver Figura 1.3) foi desenvolvida por Mattocks (1967b) e modificada por Mattocks (1968), Bingley (1967), Brown (1984,1985) e Trigo *et al.* (1993).

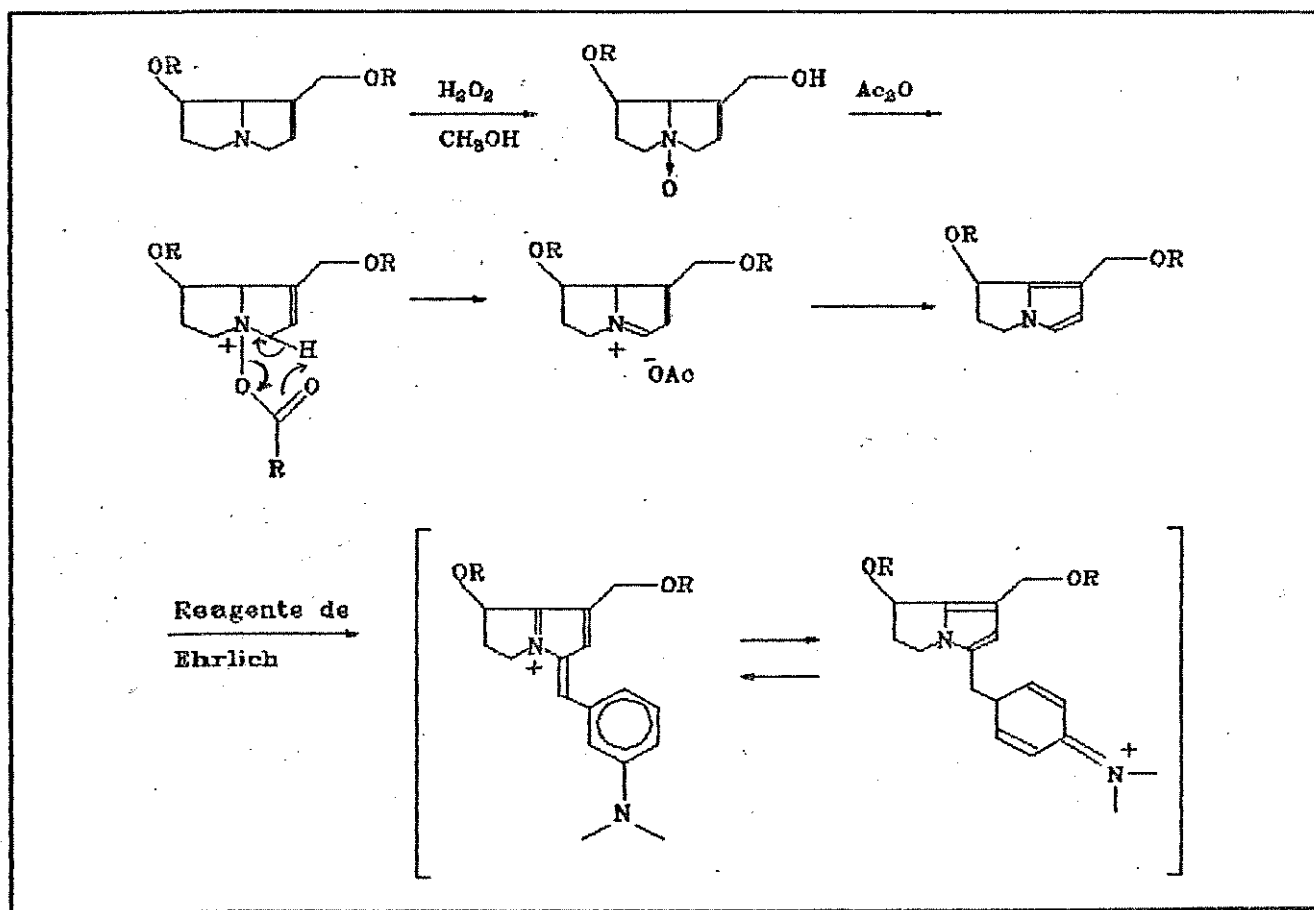


Figura 1.3. Reação de formação de cor em análise espectrofotométrica de PAs.

Em relação a elucidação estrutural de PAs a espectroscopia de UV tem pouco valor. A espectroscopia de IV evidencia a presença de duplas ligações entre 1640 e 1660 cm^{-1} ; ésteres com ácidos α,β -insaturados tem a carbonila conjugada entre 1710 e 1720 cm^{-1} ; carbonilas de ésteres saturados absorvem geralmente entre 1730 a 1740 cm^{-1} (Mattocks 1986).

A RMN de prótons tem grande utilidade na elucidação estrutural de PAs. Culvenor *et al.* (1965) e Culvenor & Woods (1965) fizeram o primeiro estudo sobre o comportamento em ^1H -RMN de bases necinas e PAs. A revisão dada por Rizk & Hussiney (1991) e Roeder (1991) mostram a utilização de técnicas recentes para a elucidação de PAs por RMN (p.e. experimentos de 2D-RMN homo e heteronucleares). ^{13}C -RMN também é muito utilizado na elucidação estrutural de PAs. Molineux *et al.* (1982) e Roeder (1990, 1991) revisaram os espectros de ^{13}C -RMN de PAs.

A espectrometria de massa (impacto de elétrons e ionização química) também é frequentemente utilizada (muitas vezes juntamente com cromatografia gasosa) para a elucidação estrutural de PAs. A EM de impacto de elétrons (ver Bredenkamp 1991 para revisão) fornece dados sobre o padrão de esterificação do ácido nécico (C-7 ou C-9 da base necina) e insaturação ou não da base necina (Bredenkamp 1991). A EM de ionização química negativa produz o ion $[\text{M}-\text{H}]^+$ abundante, e muitas vezes fragmentos de massas intatos da parte do ácido nécico ou base necina; a EM de ionização química positiva produz o ion $[\text{M}+\text{H}]^+$ abundante (Hendriks *et al.* 1991).

Recentes revisões sobre a síntese de PAs foram realizadas

por Wróbel (1985), Robins (1985, 1986, 1987, 1989b, 1989c, 1990, 1991 e 1992), Ikeda *et al.* (1988) e Dai *et al.* (1990).

PAs apresentam uma ampla atividade biológica (ver Mattocks 1986 e Rizk & Kamel 1991 para revisões recentes). PAs macrocíclicos contendo a base necina 1,2 insaturada (p.e., monocrotalina) são hepatotóxicos, entretanto indicina N-óxido apresenta atividade anti-cancerígena.

2.2. MEDIAÇÃO QUÍMICA DE PAs ENTRE LEPIDÓPTEROS E PLANTAS.

Do ponto de vista ecológico, estes alcalóides são importantes mediadores químicos em interações entre lepidópteros (Arctiidae, Danainae e Ithomiinae) e plantas. Lepidópteros sequestram estes alcalóides de fontes vegetais. Estas fontes constituem-se principalmente de : 1. plantas hospedeiras da larva; 2. néctar de flores; 3. plantas secas ou em decomposição. Neste último caso, borboletas assumem um comportamento de farmacofagia, isto é, visitam estas fontes para a aquisição de substâncias químicas necessárias à sua fisiologia, outra que nutricional (Boppré 1984). PAs tornam estes lepidópteros quimicamente protegidos contra predadores, além de muitas vezes serem utilizados como precursores de feromônios sexuais, p.e. hidroxidanaidal (ver completa revisão sobre este tópico em Boppré 1986 e 1990).

Masters (1991) mostrou que a presença de PAs em néctar atua como inibidor para a visita de *Agraulis vanillae* (Nymphalidae: Heliconiinae), um lepidóptero não especialista na aquisição

destes alcalóides. Ele sugere que PAs em néctar devem representar uma adaptação para excluir borboletas. Entretanto Ithomiinae e Danainae, especialistas em PAs, sobrepujaram esta barreira química. Em ambos os casos, plantas com PAs no néctar aumentavam a constância floral (e assim a eficiência de polinização cruzada) pela inibição de visitas de borboletas generalistas e atraindo borboletas especialistas.

2.3. PAs EM BORBOLETAS ITHOMIINAE.

2.3.1. BORBOLETAS DA SUBFAMÍLIA ITHOMIINAE.

Borboletas da subfamília Ithomiinae são miméticas¹⁷, aposemáticas¹⁸, e constituem juntamente com os Heliconiini e Danainae, os modelos de impalatabilidade melhor conhecidos nas proposições originais do Mimetismo Batesiano¹⁹ (Bates 1862) e Mülleriano²⁰ (Müller 1878, 1879).

Fox (1949) e Fox & Real (1971) classificaram o grupo como família, entretanto Ehrlich & Ehrlich (1967) e Scott (1985) o

17. Mimetismo: Semelhança acentuada de um organismo (mímico) a outro (modelo) para enganar ou advertir um terceiro (operador).

18. Aposemático: Caráter visual, auditivo, olfativo e/ou comportamental de um organismo, advertindo seus predadores potenciais sobre sua impalatabilidade ou periculosidade.

19. Mimetismo Batesiano: Fenomeno em que um mímico palatável imita uma espécie impalatável (o modelo), diminuindo assim a probabilidade de ser atacado por predadores.

20. Mimetismo Mülleriano: Convergência em aparência entre organismos desagradáveis, venenosos, perigosos ou impalatáveis (co-modelos), para distribuir o encargo de educação de operadores ingênuos através de várias populações e espécies.

consideram como subfamília dos Nymphalidae.

A subfamília é essencialmente neotropical, com poucas espécies além dos trópicos, tanto no hemisfério norte, quanto no sul (Fox 1967). Apenas as espécies do gênero *Tellervo* ocorrem na Oceania, fora da região neotropical (Ackery 1987).

Drummond & Brown (1987) relacionam aproximadamente 300 espécies em 51 gêneros e 12 tribos. A subfamília Ithomiinae foi a princípio ligado filogeneticamente²¹ com os Satyridae mais primitivos (Fox 1949), entretanto Gilbert & Ehrlich (1970), Ackery & Vane-Wright (1984), Scott (1985) relacionam a subfamília com a subfamília Danainae.

A morfologia, sistemática e taxonomia do grupo foi amplamente estudada por Brown & D'Almeida (1970), Brown *et al.* (1970), Gilbert & Ehrlich (1970), Fox & Real (1971), Lamas (1973), Brown (1977a,b,1980), Mielke & Brown (1979), Fox (ver F. Brown 1968, para a bibliografia completa) e D'Almeida (ver F. Brown 1975, *idem*). Diferentes aspectos da ecologia de borboletas Ithomiinae na região neotropical foram estudados por Young (1972, 1973, 1974a,b,c, 1978a,b), Drummond (1976, 1986), Haber (1978), Vasconcellos-Neto (1980, 1991) e Monteiro (1981). Brown (1977b) utilizou-se da distribuição geográfica de espécies de Ithomiinae e Heliconiini para subsidiar um modelo de evolução em refúgios paleoecológicos quaternários.

21. Filogenética: Relações evolutivas dentro ou entre grupos.

2.3.1.2. RELAÇÃO ENTRE BORBOLETAS ITHOMIINAE E SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS DA LARVA.

Um levantamento das plantas hospedeiras da larva de borboletas da subfamília Ithomiinae foi realizada por Drummond & Brown (1987). Larvas da subfamília Ithomiinae geralmente se alimentam de plantas da família Solanaceae, sendo as exceções conhecidas: 1. as tribos Tellervini e Tithoreini, e o gênero *Aeria* que se alimentam de Echioideae (Apocynaceae), 2. *Hyposcada virginiana* que se alimenta de *Columnnea* spp e *Drymonia* spp (Gesneriaceae). Ainda não se conhece as plantas hospedeiras das larvas de *Roswellia*, *Patricia*, *Athyrtis*, *Paititia*, *Aremfoxia*, *Pagyris* e *Veladyris*.

Brown (1985, 1987) não encontrou correlação entre a filogênia dos gêneros de Ithomiinae e Solanaceae, e sugeriu que ocorreu uma radiação destes fitófagos a partir de Apocynaceae sobre as Solanaceae, posterior à diversificação destas plantas nas regiões neotropicais.

Drummond (1986), Vasconcellos-Neto (1991) sugerem que a especificidade dos Ithomiinae sobre Solanaceae deve resultar provavelmente do comportamento discriminatório de oviposição da fêmea, influenciada por uma constelação de pressões seletivas (predadores, parasitas, competidores), criando uma monofagia mediada ecologicamente. Neste caso, a limitação fisiológica das larvas deve ter tido um papel secundário na especificidade por plantas hospedeiras.

2.3.2. MEDIAÇÃO QUÍMICA DE PAs EM BORBOLETAS ITHOMIINAE.

2.3.2.1. EVOLUÇÃO E ECOLOGIA.

Edgar (1975) e Trigo & Motta (1990) sugeriram que a dependência de Ithomiinae e Danainae por PAs se devia ao fato de seus ancestrais terem ultrapassado a barreira química de plantas hospedeiras da larva contendo o alcalóide, adaptando-se a elas, e obtendo conseqüentemente vantagens adaptativas (ausência de competição por alimento, proteção química contra predadores, utilização de PAs como precursores de substâncias para comunicação química intra e inter específica). Ao colonizarem Solanaceae, essa dependência foi mantida e as borboletas continuaram a adquirir o recurso PA de outras fontes (néctar ou plantas em decomposição que apresentassem PAs). Boppré. (1978) argumenta que a dependência de PAs foi adquirida a partir de borboletas ancestrais que se tornaram aptas à assimilarem o alcalóide de fontes de alimento do adulto. Essa assimilação foi seletivamente vantajosa, pois propiciava proteção química contra predadores.

Pliske (1975c) e Trigo (1988) verificaram que plantas (*Heliotropium* - Boraginaceae, *Ageratum*, *Eupatorium*, *Trichogonia* - Asteraceae) que continham PAs eram intensamente visitadas por machos adultos de Ithomiinae. Segundo Pliske (1975a) e DeVries & Stiles (1990) estes lepidópteros estariam atuando como polinizadores para estas plantas.

Borboletas Ithomiinae apresentam duas síndromes de aquisição de PAs (Trigo & Brown 1990 e Brown *et al.* 1991).

Na primeira, larvas se alimentam de folhas de plantas com PAs (Echitoideae: Apocynaceae), sequestrando os alcalóides e transferindo-os para os adultos recém emergidos através da pupa. Machos adultos visitam continuamente fontes vegetais com PAs e os utilizam na síntese de feromônios, provavelmente transferindo-os também as fêmeas por ocasião da cópula. Fêmeas transferem PAs para os ovos, provavelmente protegendo-os quimicamente. Dessa síndrome fazem parte os Ithomiinae mais primitivos: *Tellervo*, *Tithorea* e *Aeria*.

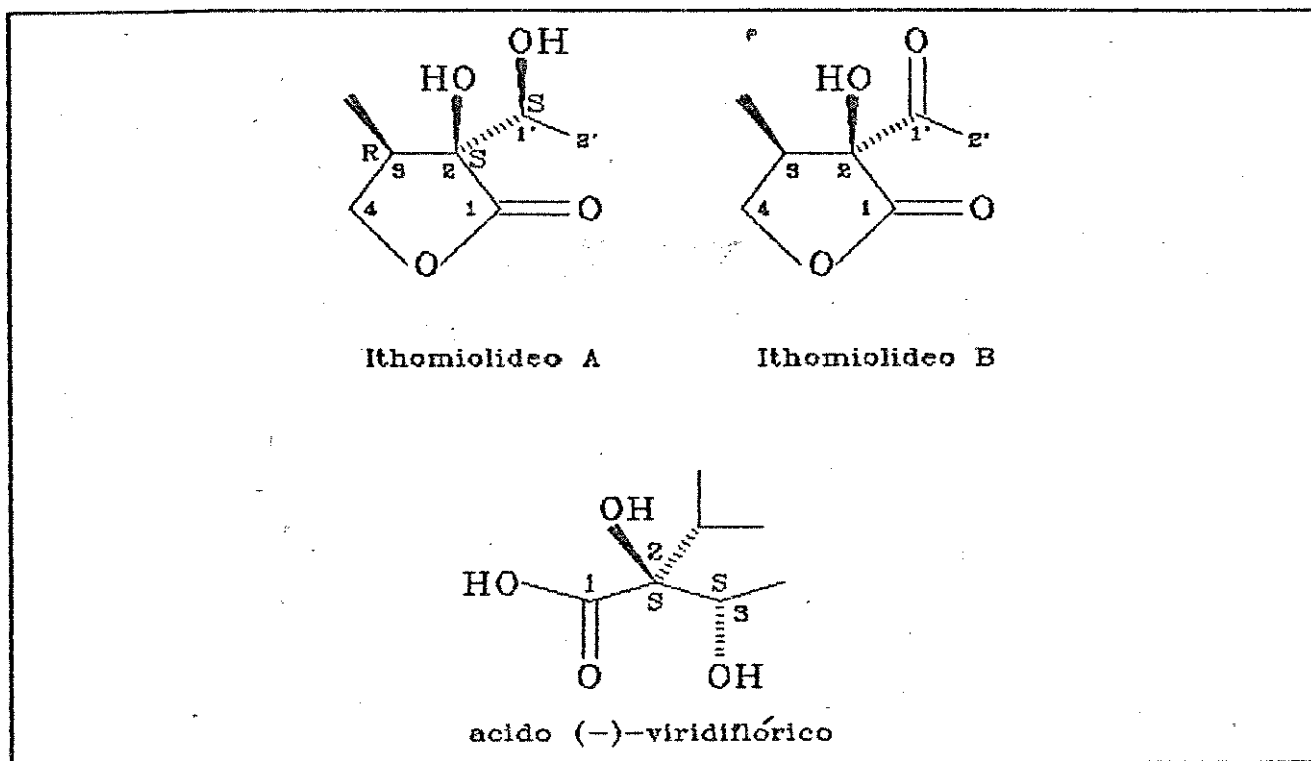
Na segunda síndrome, larvas se alimentam de folhas de Solanaceae (sem PAs), e os adultos (principalmente machos) sequestram PAs de fontes vegetais, utilizando-os de maneira semelhante ao da primeira síndrome. Dessa síndrome fazem parte todos os Ithomiinae cujas larvas se alimentam de Solanaceae.

Brown *et al.* (1991) sugeriram que estas síndromes foram moldadas através do tempo evolutivo através de uma independência química da planta hospedeira por parte de borboletas Ithomiinae. A interação inicial, entre borboletas e plantas hospedeiras da larva com PAs seria desestabilizada devido esta ser desvantajosa para a planta (neste caso PAs atuariam como cairomônios). Com a colonização de Solanaceae (sem PAs), os lepidópteros ainda apresentariam uma dependência de PAs, mas os sequestrariam de fontes vegetais (principalmente flores), ocorrendo uma interação mutualística, a qual seria selecionada favoravelmente (neste caso PAs atuariam como sinomônios, garantindo benefícios para os lepidópteros, enquanto estes atuariam como polinizadores).

2.3.2.2. COMUNICAÇÃO QUÍMICA.

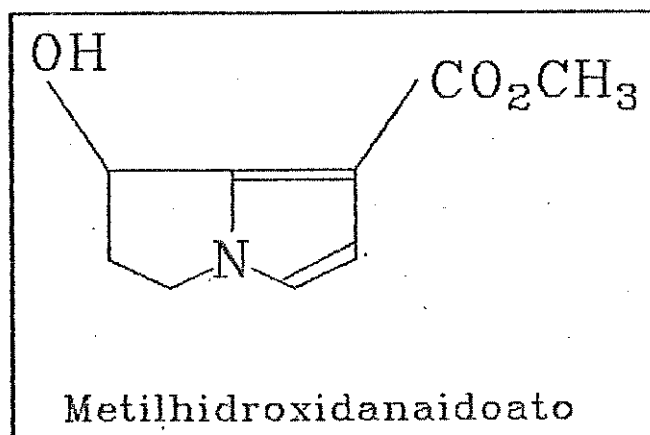
Pliske (1975b), Pliske *et al.* (1976) e Haber (1978) propuseram que os pincéis de pêlos (orgãos androconiais), presentes nas asas posteriores da grande maioria das espécies de machos de Ithomiinae, liberariam substâncias químicas que estariam atuando como feromônios sexuais ou de agregação, ou na comunicação interespecífica.

Edgar *et al.* (1976) isolaram de pincéis de pelos de sete espécies (4 gêneros diferentes) de Ithomiinae a 2-hidroxi-2-(2-hidroxietil)-3-metil- γ -butirolactona provavelmente derivada de ácidos nécicos de PAs (tipo traquelântico ou viridiflórico). Schulz (1987) e Schulz *et al.* (1988) isolaram essa mesma substância de pincéis de pêlos do ithomíneo *Prittwitzia hymenaea*. Schulz (1992) sintetizou esta lactona, demonstrando que a configuração desta presente nos pincéis de pêlos de *P. hymenaea* é 1'S,2S,3R (nomeada de ithomiolideo A), relacionada com a configuração absoluta do ácido (-)-viridiflórico (43a) (ácido esterificante do alcalóide licopsamina, 6c); outra lactona (a cetolactona ithomiolideo B) também foi encontrada no lepidóptero acima em pequena quantidade e sua configuração também relacionada com a do ácido (-)-viridiflórico (Esquema 1.4).



Esquema 1.4.

Além da lactona, a 7-carbometoxi-1,2-desidro-(3H)-pirrolizina-1-ol (metilhidroxidanoato - Esquema 1.5) foi isolada de *P. hymenaea*, *Mechanitis isthmia veritabilis* e *Tithorea harmonia furia*; uma série de outros voláteis provavelmente não derivados de PAs também foram isolados (Schulz 1987, Schulz et al. 1988).



Esquema 1.5.

2.3.2.3. DEFESA QUÍMICA.

Borboletas da subfamília Ithomiinae (Nymphalidae) são protegidas quimicamente contra a aranha *Nephila clavipes* (Brown 1984, 1985, 1987, Masters 1991), pássaros da espécie *Momotus momota* e lagartos da espécie *Scheloporus malachiticus* (Masters comunicação pessoal) devido a ingestão destes alcalóides pelos lepidópteros.

2.3.2.4. OUTROS.

Brown (1984, 1985, 1987) abordaram também a quantificação de PAs em borboletas Ithomiinae. Trigo & Brown (1990) realizaram um estudo da quantificação de PAs em Ithomiinae primitivos, cujas larvas se alimentam de Apocynaceae (*Tithorea harmonia pseudethra* e *Aeria olena olena*), comparando com um Ithomiinae mais derivado, cujas larvas se alimenta de Solanaceae (*Mechanitis polymnia polymnia*). A quantidade de PAs nestes lepidópteros varia em relação a época do ano, sexo e espécies analisadas, mostrando uma

correlação com o padrão de aquisição/incorporação/utilização de PAs por parte destes lepidópteros.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho visou ampliar o conhecimento químico com respeito a PAs na interação entre borboletas Ithomiinae, suas plantas hospedeiras e suas fontes de néctar ou fármacos. Para tanto teve como objetivos:

1. Analisar a composição química de PAs de espécies de borboletas Ithomiinae que apresentam diferentes síndromes de aquisição de PAs, além de suas fontes de alimentação (plantas hospedeiras da larva e fontes de néctar ou fármacos do adulto)²².

2. Isolar e identificar PAs presentes em fontes de néctar e fármacos dos adultos.

3. Semisintetizar PAs, a partir de alcalóides isolados e identificados de fontes naturais²³.

4. Testar a atividade biológica de PAs dentro do sistema biológico do qual fazem parte.

22. Foram estudadas 2 espécies de Ithomiinae primitivos (*Tithorea harmonia* e *Aeria olena*) cujas larvas se alimentam de Apocynaceae (Echitoideae), cujas plantas geralmente contém PAs, comparando-se com 1 espécie mais avançada, em relação as outras duas, (*Mechanitis polymnia*). *Mechanitis* tem como planta hospedeira da larva várias espécies de *Solanum* (Solanaceae), as quais não apresentam PAs.

23. Estes PAs serão utilizados futuramente em experimentos de incorporação e defesa química.

5. Realizar experimentos de incorporação de PAs em borboletas Ithomiinae sem acesso a estes, verificando-se modificações destes alcalóides *in vivo* no sistema.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

A caracterização de alcalóides pirrolizidínicos (PAs) em organismos vivos envolve numerosas técnicas. Neste trabalho utilizou-se fundamentalmente a técnica de cromatografia gasosa capilar-espectrometria de massas (CG-EM) para a separação e caracterização estrutural dos PAs em plantas e insetos. Geralmente estes alcalóides ocorrem em organismos vivos (plantas e insetos) na forma de N-óxidos (Hartmann 1988). No processo de extração e isolamento dos PAs utilizou-se um processo de extração ácida, seguido da redução dos N-óxidos com Zn, e a basificação para a recuperação dos alcalóides em sua forma terciária. Este processo de redução é necessário para a análise dos PAs por CG-EM, devido as limitações de colunas capilares de fase de metil silicone que interagem com substâncias altamente polares como N-óxidos.

O passo seguinte foi o isolamento dos PAs que ocorrem em grande quantidade em plantas, e sua elucidação estrutural por métodos físicos (RMN - ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY e HETCOR, IV, CG-EM, rotação ótica e ponto de fusão).

1. CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS.

1.1. CROMATOGRAFIA GASOSA.

O primeiro artigo sobre cromatografia gasosa de PAs foi publicado por Chalmers *et al.* (1965). Inicialmente foram utilizadas colunas empacotadas, sendo necessária a derivatização dos grupos OH dos PAs por diversos métodos: 1. via derivados de TMS (trimetilsilil) (Deinzer *et al.* 1978); 2. acetilação (Deinzer *et al.* 1978); 3. derivados de metil ou butilboronatos quando os alcalóides apresentavam grupos dióis vicinais (p.e. 6) (Edgar 1982). A utilização de colunas capilares de sílica fundida otimizou a análise de PAs, sendo que a derivatização muitas vezes se tornou dispensável. A quantificação de PAs via CG capilar acoplada a um detetor de ionização de chama, utilizando-se padrões internos foi realizada por diversos autores (ver revisão em Vlietinck & Pieters 1991). PAs N-óxidos também foram analisados via CG (coluna empacotada ou capilar) e CG-EM, derivatizando-se os N-óxidos via TMS (Evans *et al.* 1979, 1980, Ames & Powis 1978).

A coluna capilar de sílica fundida DB-1 (15m x 0,25mm e 30m x 0,32mm), acoplada a detectores de ionização de chama, de fósforo/nitrogênio e de massa, foi utilizada anteriormente por outros autores para análise de PAs de plantas e insetos, obtendo-se uma eficiente separação (Hartmann & Toppel 1987, Hartmann *et al.* 1988, Toppel *et al.* 1988, Ehmke *et al.* 1990, Stelljes & Seiber 1990, Witte *et al.* 1991, Trigo *et al.* 1993).

A Tabela 2.1 mostra o IRK (Índice de Retenção de Kovats) nesta coluna, de alguns PAs utilizados como padrões.

Tabela 2.1. Índices de Retenção de Kovats (IRK) de alguns PAs de configuração relativa e absoluta conhecidos (coluna capilar de sílica fundida DB1, 30m x 0,32mm, Programa de Temperatura: 150-300°C, 6°C/min).

IRK	M+	PAs
1425	155	retronecina (1a,b) ¹
1445	155	heliotridina (1c,d) ¹
1787	237	7-angelil-retronecina (iso-5b) ²
1797	237	9-angelil-retronecina (5a) ²
1815	237	7-senecionil-retronecina (iso-5a) ²
1820	237	9-senecionil-retronecina (5a) ²
1978	283	supinina (13a) ¹
1985	283	amabilina (13b) ¹
2126	299	indicina (6a) ¹
2131	299	intermedina (6b) ¹
2145	299	licopsamina (6c) ¹
2152	299	rinderina (6d) ¹
2172	299	equinatina (6e) ¹
2270	325	monocrotalina (37) ³
2294	335	senecionina (34a) ¹
2303	333	senecifilina (36) ¹
2350	335	integerrimina (34b) ¹

1. isolado de fontes naturais e identificados por métodos físicos; 2. semisintetizados a partir de cloreto do ácido + base necina; 3. comercial.

No presente trabalho observou-se que, em alguns casos, quando as substâncias apresentaram IRK muito próximos ($\Delta < 5$), a separação não foi eficiente. Por exemplo: 1. PAs cuja porção ácida é enantiomérica (p.e. indicina, 6a, e intermedina, 6b); 2. PAs que diferem somente na presença ou ausência da dupla ligação 1,2 (p.e. 6 e 18).

1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS. IMPACTO DE ELÉTRONS E IONIZAÇÃO QUÍMICA.

Revisões sobre espectrometria de massas de impacto de elétrons em PAs foram realizadas por diversos autores (Aasen *et al.* 1969, Bredenkamp 1991, Crout 1969, Neuner-Jehle *et al.* 1965, Pedersen & Larsen 1970). Espectrometria de ionização química (positiva e negativa) de PAs foram realizadas por Karchesy *et al.* (1984), Huizing *et al.* (1986), Bicchi *et al.* (1989), Hendricks *et al.* (1988), McCoy *et al.* (1983) e Hendricks *et al.* (1991). A espectrometria de massas de impacto de elétrons fornece dados importantes para a elucidação estrutural de PAs: 1. informa sobre a posição da esterificação (C-7 ou C-9), 2. informa se os alcalóides são saturados ou não na base necina, 3. e se os alcalóides pertencem a classe dos monoésteres, diésteres ou macrocíclicos. Aliada a espectrometria de massas de impacto de elétrons, a espectrometria de massas de ionização química fornece dados sobre os íons moleculares, os quais muitas vezes apresentam pouca abundância quando analisados por espectrometria de massas de impacto de elétrons.

O modo de fragmentação de espectrometria de massas de

impacto de elétrons leva à importantes informações sobre a estrutura de PAs, mesmo se sua estereoquímica não possa ser definida por este método. Os alcalóides encontrados no presente estudo foram caracterizados estruturalmente baseando-se nos mecanismos de fragmentação de impacto de elétrons propostos pelos autores acima, sendo estes padrões de fragmentação discutidos abaixo.

A Tabela 2.2 apresenta a fragmentação de espectrometria de massas de impacto de elétrons (EM-IE) e ionização química positiva (ICP) dos PAs encontrados em plantas e insetos. A Figura 2.1 mostra algumas bases necinas com as respectivas estereoquímicas e a Figura 2.2 mostra alguns ácidos nécicos e suas respectivas estereoquímicas. A Figura 2.3 mostra a estrutura de alcalóides encontrados no estudo de GC-EM. A Figura 2.4 mostra a estereoquímica de alguns destes alcalóides.

Tabela 2.2. Fragmentação de PAs em EM por impacto de elétrons e ionização química de PAs encontrados em plantas e insetos (* de Neuner-Jehle et al. (1965),^b utilizado como padrão: 7. Heliotrina). * NA: não analisado.

PAs	m/z (abundância relativa, %)		Figura
	IMPACTO DE ELÉTRONS	IONIZAÇÃO QUÍMICA	
1	[M] ⁺ 155 (18), 111 (52), 94 (16), 80 (100).	[MH] ⁺ 156 (100), 140 (50), 138 (30).	42
2	[M] ⁺ 139 (76), 122 (42), 120 (13), 111 (19), 110 (26), 108 (40), 106(10), 81 (15), 80(100).	NA	43
3	[M] ⁺ 157 (11), 113 (22), 83 (8), 82 (100).	NA	44
iso-5	[M] ⁺ 237 (4), 218 (<1), 154 (4), 138 (2), 137 (24), 136 (15), 124 (23), 111 (33), 106 (38), 94 (20), 83 (23), 80 (100), 68 (8), 55 (16), 53 (9).	[MH] ⁺ 238 (100), 222 (42), 140 (23), 138 (32), 120 (30), 118 (25).	15
5	[M] ⁺ 237 (1), 219 (<1), 193 (3), 155 (9), 154 (9), 139 (1), 138 (16), 137 (21), 136 (12), 126 (8), 120 (2), 108 (4), 94 (22), 93 (100), 92 (4), 83 (18), 80 (16), 67 (6), 55 (12), 53 (8).	[MH] ⁺ 238 (100), 222 (5), 140 (36), 138 (34), 120 (12).	11
iso-6	[M] ⁺ 299 (5), 281 (7), 248 (4), 238 (4), 236 (6), 156 (46), 138 (52), 120 (51), 111 (65), 108 (40), 106 (55), 94 (35), 80 (100), 68 (15), 43 (70).	[MH] ⁺ 300 (69), 254 (10), 156 (20), 140 (100), 138 (69), 120 (32).	15
6	[M] ⁺ 299 (<1), 255 (<1), 254 (<1), 156 (7), 139 (35), 138 (97), 120 (9), 108 (3), 94 (63), 93 (100), 80 (18), 67 (13), 53 (8), 43 (30).	[MH] ⁺ 300 (50), 254 (5), 156 (15), 140 (100), 138 (55), 120 (30).	5
7 ^{a,b}	[M] ⁺ 313 (5), 295 (1), 255 (3), 214 (2), 197 (4), 156 (5), 139 (40), 138 (100), 139 (17), 120 (2), 95 (5), 94 (18), 93 (60), 80 (11), 67 (8), 59 (26), 53 (4).	NA	-
8	[M] ⁺ 341 (20), 326 (1), 298 (10), 255 (25), 254 (15), 181 (6), 156 (3), 139 (18), 138 (100), 137 (11), 136 (12), 120 (10), 108 (3), 99 (7), 93 (81), 80 (12), 67 (10), 53 (5), 43 (38).	[MH] ⁺ 342 (85), 140 (100), 138 (75), 120 (30).	6
9	[M] ⁺ 341 (2), 297 (1), 296 (2), 281 (2), 280 (2), 198 (52), 181 (35), 180 (100), 138 (9), 136 (20), 121 (23), 120 (55), 106 (10), 101 (20), 95 (10), 94 (22), 93 (49), 80 (10), 43 (32).	[MH] ⁺ 342 (43), 198 (10), 182 (75), 140 (100), 138 (45), 120 (50).	7

PAs	m/z (abundância relativa, %)	Figura	
10	[M] ⁺ 393 (<1), 340 (<1), 326 (1), 297 (3), 282 (1), 198 (3), 181 (20), 180 (100), 136 (18), 120 (40), 93 (35), 43 (34).	[MH] ⁺ 384 (62), 182 (100), 140 (6), 138(10), 120(25).	8
11	[M] ⁺ 313 (<1), 269 (<1), 268 (<1), 256 (<1), 240 (<1), 187 (<1), 156 (9), 139 (39), 138 (100), 120 (11), 108 (3), 94 (54), 93 (70), 80 (14), 67 (11), 57 (19), 45 (21)	[MH] ⁺ 314 (100), 140 (35), 138 (37), 120 (35).	9
12	[M] ⁺ 355 (<1), 298 (<1), 269 (1), 268 (1), 240 (1), 207 (1), 198 (1), 181 (3), 156 (3), 138 (100), 120 (12), 94 (25), 93 (80), 80 (13), 67 (12), 57 (10), 43 (20)	[MH] ⁺ 356 (100), 140 (85), 138 (100), 120 (31).	10
13	[M] ⁺ 283 (<1), 268 (<1), 239 (<1), 140 (7), 23 (26), 122 (100), 121 (36), 120 (45), 108 (14), 93 (20), 80 (11), 70 (10), 53 (9), 43 (21).	[MH] ⁺ 284 (20), 140 (14), 124 (100), 122 (35).	13
14	[M] ⁺ 325 (<1), 282 (<1), 239 (3), 140 (3), 123 (20), 122 (100), 121 (40), 120 (48), 108 (12), 93 (20), 80 (9), 70 (8), 53 (6), 43 (25).	[MH] ⁺ 326 (24), 140 (10), 124 (100), 122 (40).	14
15	[M] ⁺ 285 (<1), 267 (3), 252 (2), 241 (1), 240 (3), 226 (1), 142 (51), 124 (100), 83 (26), 70 (9), 55 (23), 43 (16).	[MH] ⁺ 286 (100), 240 (15), 142 (35), 138 (20), 126 (22), 124 (37), 122 (18).	18
16	[M] ⁺ ausente, [M-1] ⁺ 298 (<1), 284 (<1), 281 (<1), 255 (2), 254 (3), 243 (4), 238 (5), 212 (8), 142 (46), 124 (100), 110 (5), 96 (7), 83 (23), 70 (7), 55 (12), 43 (10).	[MH] ⁺ 300 (65), 254 (45), 142 (100), 138 (24), 124 (22), 122 (21).	19
17	[M] ⁺ 297 (M+ <1), 279 (<1), 253 (2), 252 (3), 241 (10), 142 (22), 140 (30), 124 (100), 110 (5), 96 (9), 83 (25), 70 (10), 55 (20).	[MH] ⁺ 298 (100), 252 (21), 142 (95), 138 (60), 124 (20), 122 (20).	20
18	[M] ⁺ 327 (<1), 299 (<1), 284 (1), 268 (<1), 267 (<1), 241 (5), 240 (5), 225 (3), 184 (5), 142 (18), 124 (100), 110 (2), 99 (5), 83 (15), 70 (5), 55 (7), 43 (17).	[MH] ⁺ 328 (100).	21
19	[M] ⁺ 355 (1), 312 (1), 284 (1), 241 (5), 240 (7), 212 (8), 142 (22), 124 (100), 110 (2), 96 (4), 83 (20), 71 (20), 55 (8), 43 (20).	[MH] ⁺ 356 (100).	22

PA _s	m/z (abundância relativa, %)	Figura	
20	[M] ⁺ 369 (1), 354 (1), 326 (2), 284 (2), 241 (5), 240 (5), 142 (24), 124 (100), 110 (2), 96 (4), 85 (14), 83 (14), 71 (14), 57 (12), 55 (8), 43 (5).	[MH] ⁺ 370 (100).	23
21	[M] ⁺ 367 (2), 352 (1), 339 (1), 324 (1), 308 (1), 284 (3), 241 (5), 240 (8), 224 (5), 142 (14), 124 (100), 110 (5), 96 (7), 83 (55), 70 (5), 55 (20), 43 (5).	[MH] ⁺ 368 (100), 268 (22), 252 (38), 240 (18), 224 (7), 199 (20), 142 (45), 124 (25), 122 (20).	24
22	[M] ⁺ 381 (2), 366 (1), 337 (1), 324 (1), 255 (5), 254 (12), 225 (4), 142 (4), 125 (8), 124 (100), 96 (7), 83 (60), 70 (4), 55 (25).	[MH] ⁺ 382 (100), 266 (20), 214 (18), 142 (100), 138 (68), 124 (80), 120 (45).	25
23	[M] ⁺ 301 (ausente), [M] ⁺ -H ₂ O 283 (3), 268 (3), 258 (1), 257 (2), 256 (3), 240 (6), 158 (75), 140 (35), 120 (12), 122 (14), 114 (20), 97 (21), 96 (34), 95 (51), 82 (100), 70 (6), 69 (6), 55 (13).	[MH] ⁺ 302 (55), 256 (7), 158 (13), 140 (100), 124 (13), 122 (12).	26
iso-24	[M] ⁺ 239 (<1), 156 (57), 139 (86), 113 (15), 108 (10), 83 (15), 82 (100), 55 (15).	NA	31
24	[M] ⁺ 239 (5), 221 (10), 156 (2), 140 (10), 122 (11), 96 (40), 95 (100), 83 (10), 82 (90), 55 (20).	[MH] ⁺ 240 (100), 221 (10), 220 (20), 215 (10).	30
25	[M] ⁺ 385 (1), 342 (3), 300 (3), 284 (3), 257 (10), 256 (18), 242 (18), 158 (35), 141 (20), 140 (30), 96 (100), 95 (50), 85 (37), 82 (70), 57 (20), 43 (12).	[MH] ⁺ 386 (100).	27
26	[M] ⁺ 383 (7), 368 (1), 340 (2), 300 (4), 257 (2), 256 (15), 240 (15), 196 (60), 158 (15), 140 (40), 96 (70), 95 (53), 83 (100), 82 (82), 55 (40), 43 (12).	[MH] ⁺ 384 (100), 199 (35), 140 (30).	28
27	[M] ⁺ 397 (5), 382 (1), 310 (3), 271 (7), 270 (18), 241 (18), 240 (15), 196 (50), 158 (12), 141 (19), 140 (32), 122 (15), 96 (62), 95 (50), 83 (100), 82 (70), 55 (35).	NA	29
28	[M] ⁺ 279 (2), 119 (25), 118 (50), 117 (100).	NA	41
29	[M] ⁺ 155 (40), 124 (22), 96 (12), 70 (100), 55 (30)	NA	45
30	[M] ⁺ 337 (<1), 266 (<1), 211 (30), 180 (10), 140 (100), 138 (40), 123 (40), 122 (60), 108 (9), 96 (18), 82 (60).	NA	38

PA5	m/z (abundância relativa, %)		Figura
31	[M] ⁺ 365 (1), 168 (36), 151 (100), 140 (10), 125 (30), 110 (50), 96 (20), 94 (16), 82 (20), 81 (20), 70 (20), 58 (20), 53 (18), 43 (44).	NA	37
32	[M] ⁺ 439 (1), 411 (1), 396 (1), 395 (1), 324 (2), 296 (34), 138 (18), 137 (5), 136 (15), 121 (35), 120 (100), 119 (32), 95 (10), 94 (20), 93 (30).	[MH] ⁺ 440 (40), 140 (12), 138 (10), 120 (100)	35
33	[M] ⁺ 453 (1), 425 (1), 409 (3), 396 (2), 353 (2), 338 (2), 310 (35), 138 (21), 137 (5), 136 (15), 121 (45), 120 (100), 119 (60), 95 (15), 94 (20), 93 (40).	[MH] ⁺ 454 (38), 140 (10), 138 (10), 120 (100)	36
34	[M] ⁺ 335 (ausente), 291 (5), 248 (10), 246 (3), 220 (25), 138 (57), 137 (22), 136 (95), 121 (52), 120 (100), 119 (98), 95 (62), 94 (62), 93 (85), 80 (30), 67 (10), 55 (12), 53 (15), 43 (55).	[MH] ⁺ 336 (100), 200 (10), 138 (55), 120 (98)	33
35	[M] ⁺ 351 (ausente), 246 (8), 220 (20), 138 (30), 137 (18), 136 (98), 121 (30), 120 (100), 119 (84), 95 (38), 94 (58), 93 (70), 80 (20), 67 (10), 55 (12), 53 (15).	[MH] ⁺ 352 (25), 140 (15), 138 (32), 120 (100)	34
38	[M] ⁺ 167 (60), 149 (8), 136 (100), 118 (45), 106 (20), 94 (40), 79 (20).	[M+NH ₄] ⁺ 185 (18), [MH] ⁺ 168 (100).	39
39	[M] ⁺ 151 (100), 134 (24), 123 (60), 122 (35), 105 (23), 95 (80), 94 (75).	[M+NH ₄] ⁺ 169 (28), [MH] ⁺ 152 (100), 136 (98), 134 (69), 113 (20).	40
iso 40	[M] ⁺ 297 (11), 237 (6), 236 (47), 180 (2), 168 (3), 154 (5), 150 (5), 138 (35), 120 (40), 111 (60), 106 (45), 94 (32), 80 (100), 72 (9), 68 (11), 54 (6), 53 (7), 43 (65).	298 (MH ⁺ 60), 140 (50), 138 (100), 120 (65)	12
40	[M] ⁺ 297 (2), 254 (<1), 253 (2), 202 (<1), 201 (3), 200 (<1), 180 (4), 158 (3), 155 (3), 139 (11), 138 (100), 137 (9), 136 (12), 120 (13), 95 (7), 94 (55), 93 (92), 80 (18), 69 (12), 57 (3), 53 (8), 43 (15).	298 (MH ⁺ 50), 140 (50), 138 (100).	16
41	[M] ⁺ 397 (<1), 240 (5), 221 (20), 220 (100), 138 (22), 136 (40), 121 (50), 120 (95), 119 (71), 106 (9), 95 (8), 94 (25), 93 (49), 83 (20), 80 (10), 55 (20)	NA	32

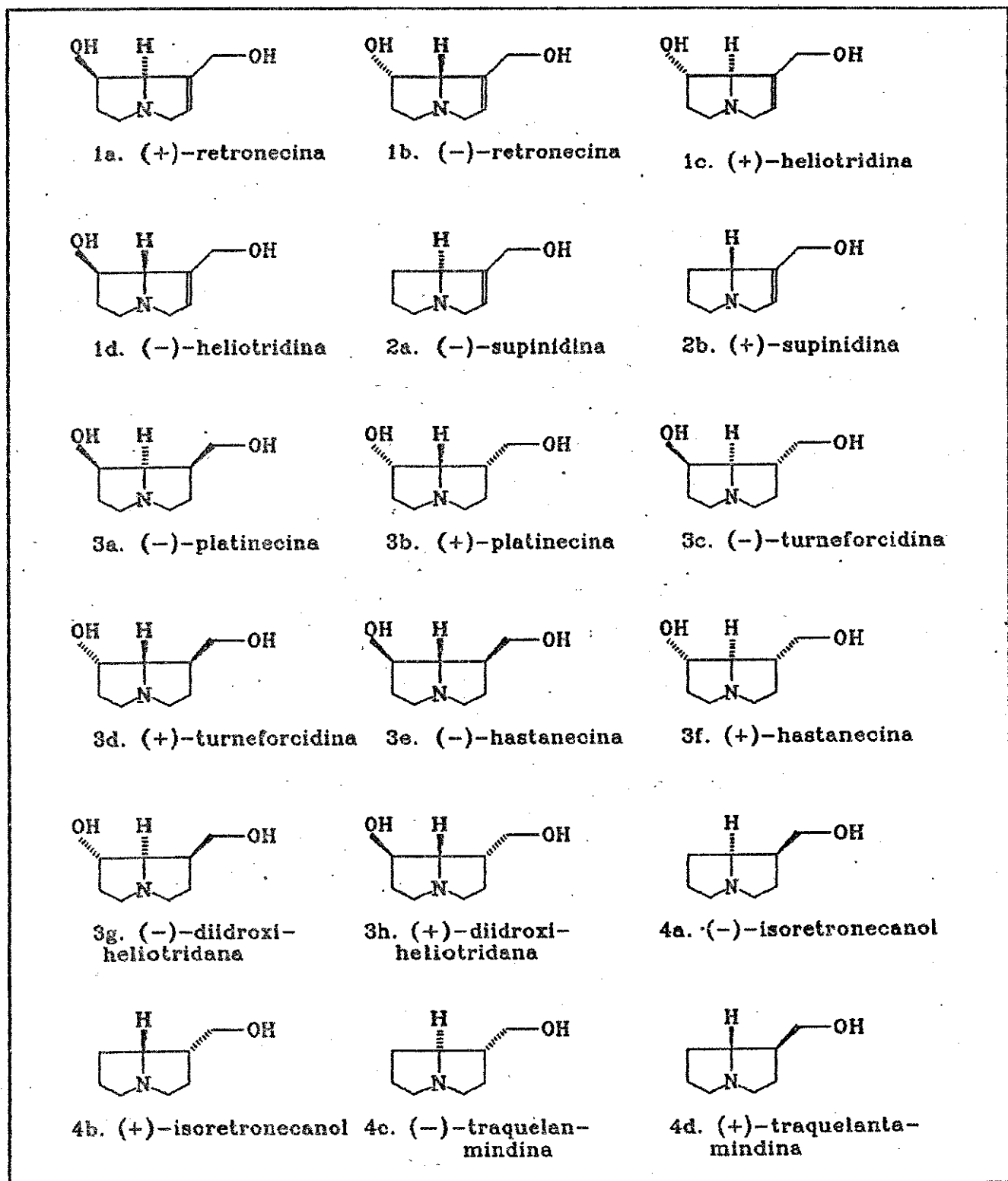


Figura 2.1. Bases necinas.

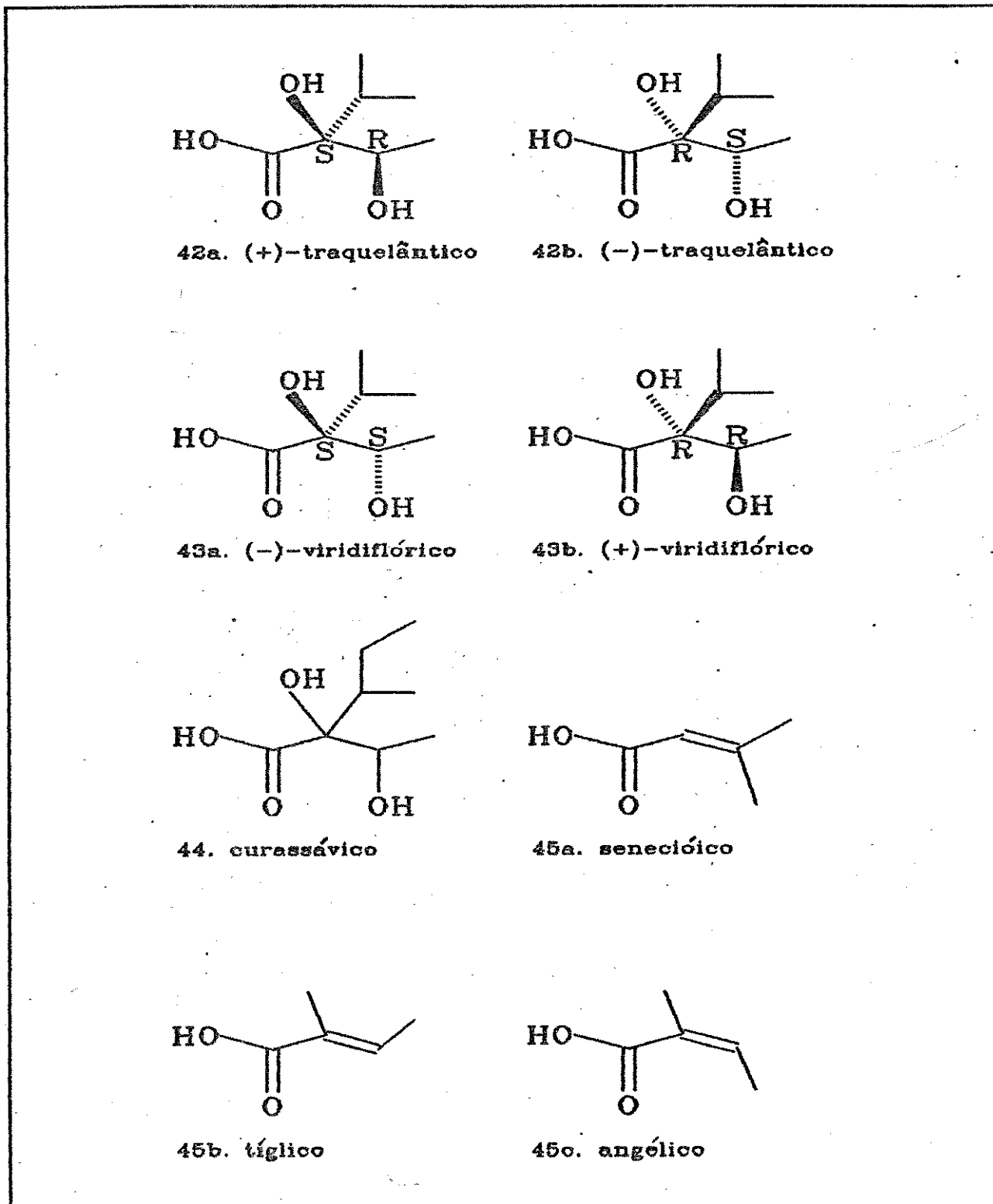


Figura 2.2. Alguns ácidos nécicos.

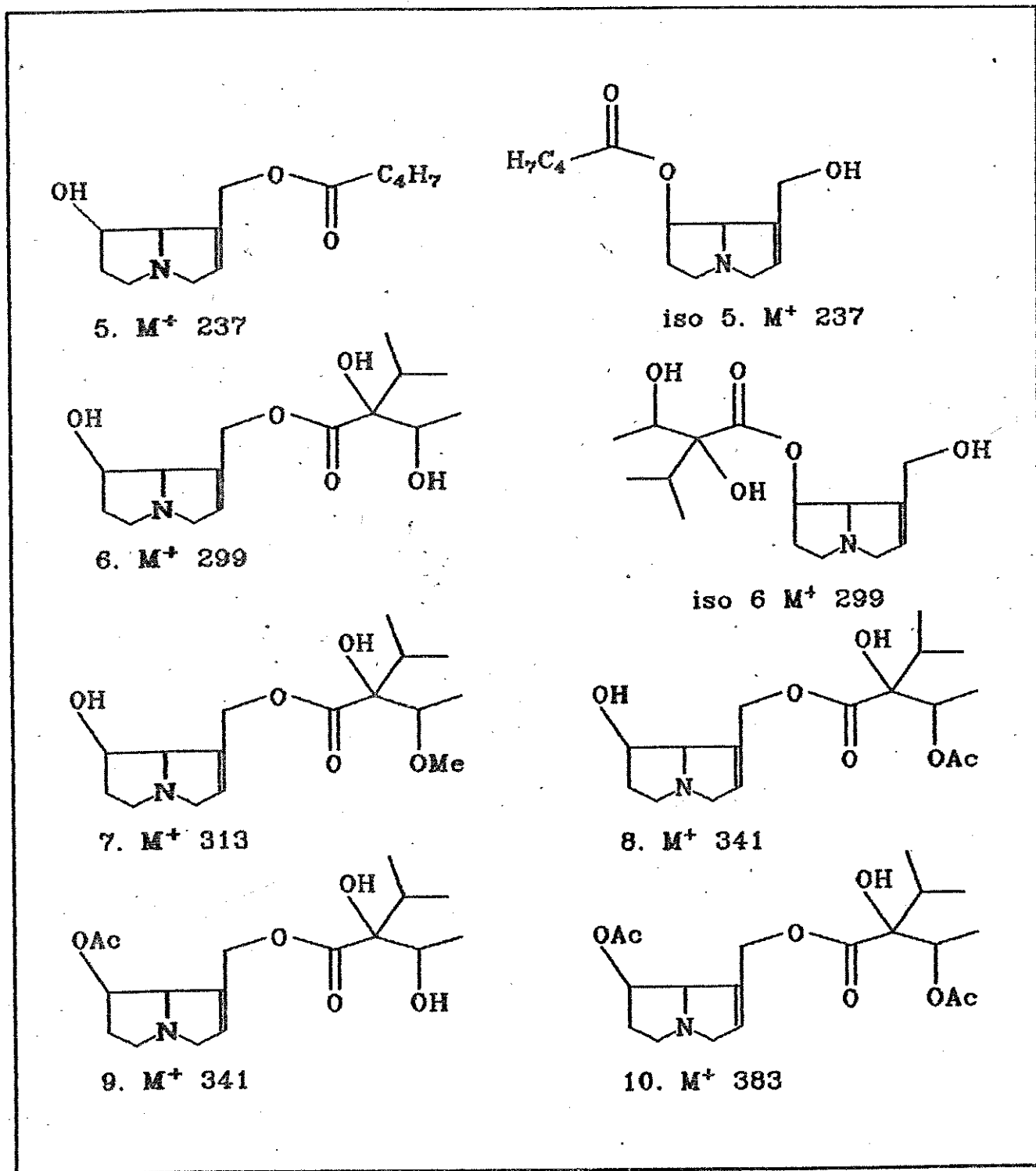


Figura 2.3. Alcalóides pirrolizidínicos encontrados em borboletas da subfamília Ithomiinae e em fontes de alimento.

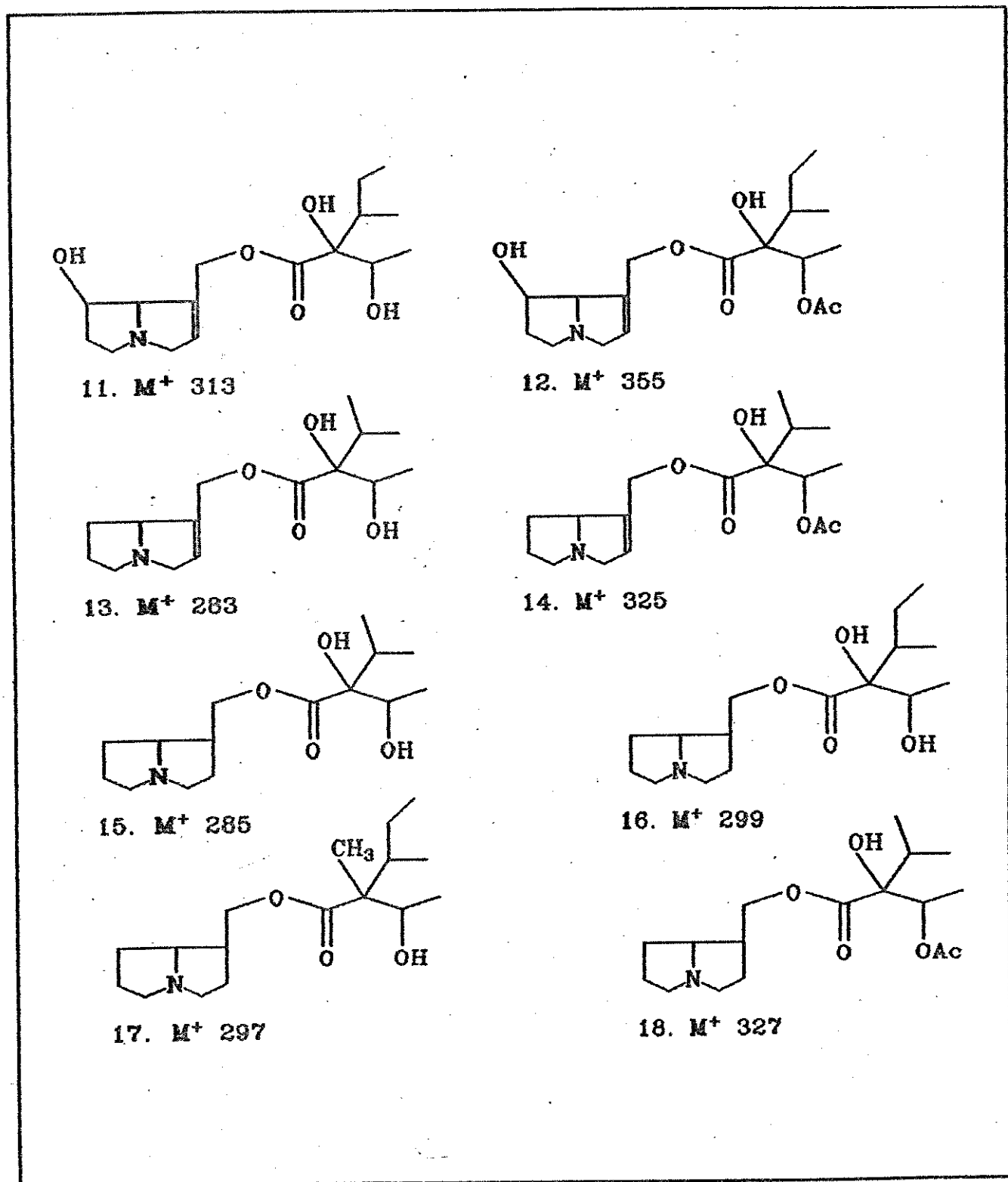


Figura 2.3. cont.

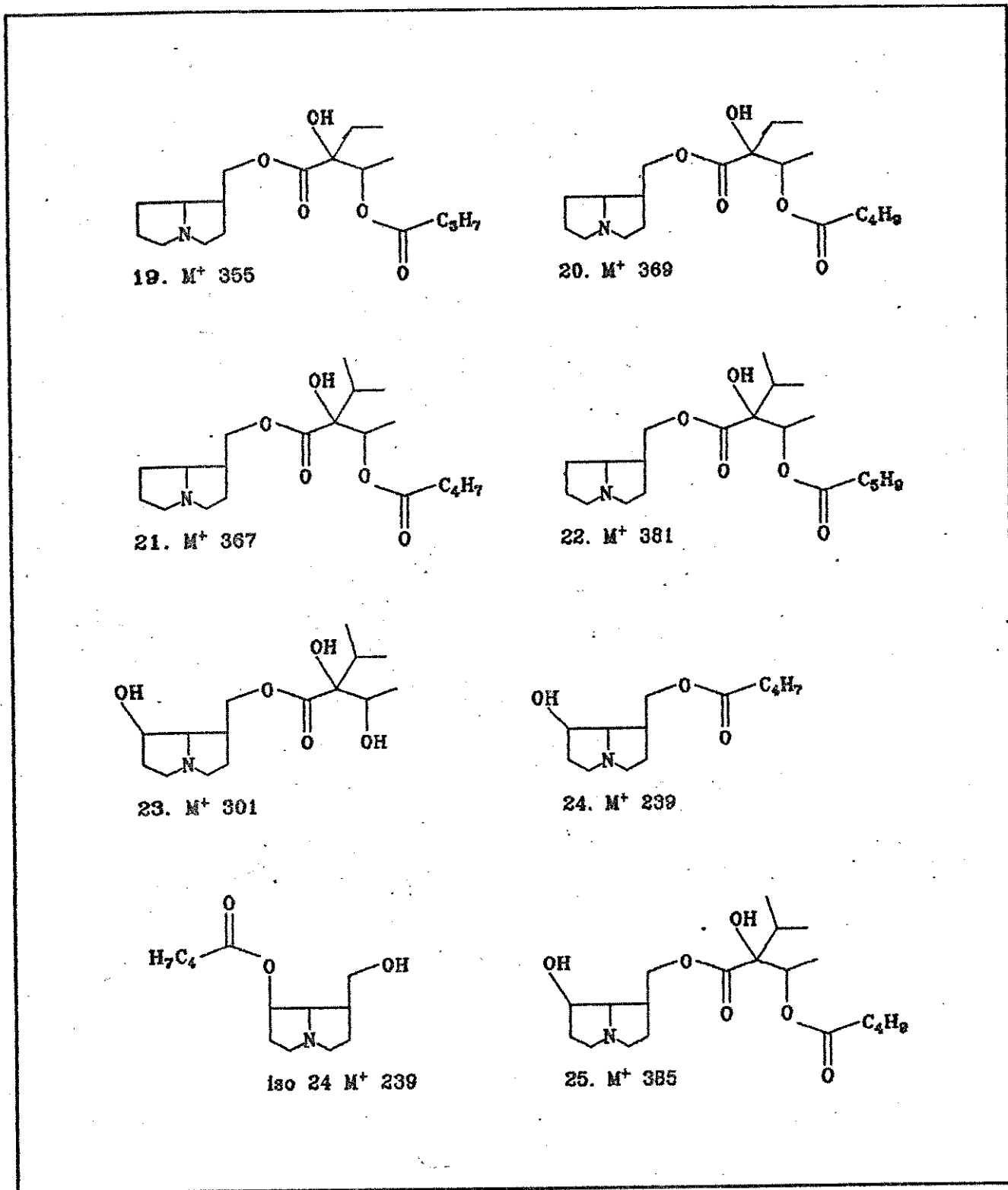


Figura 2.3. cont.

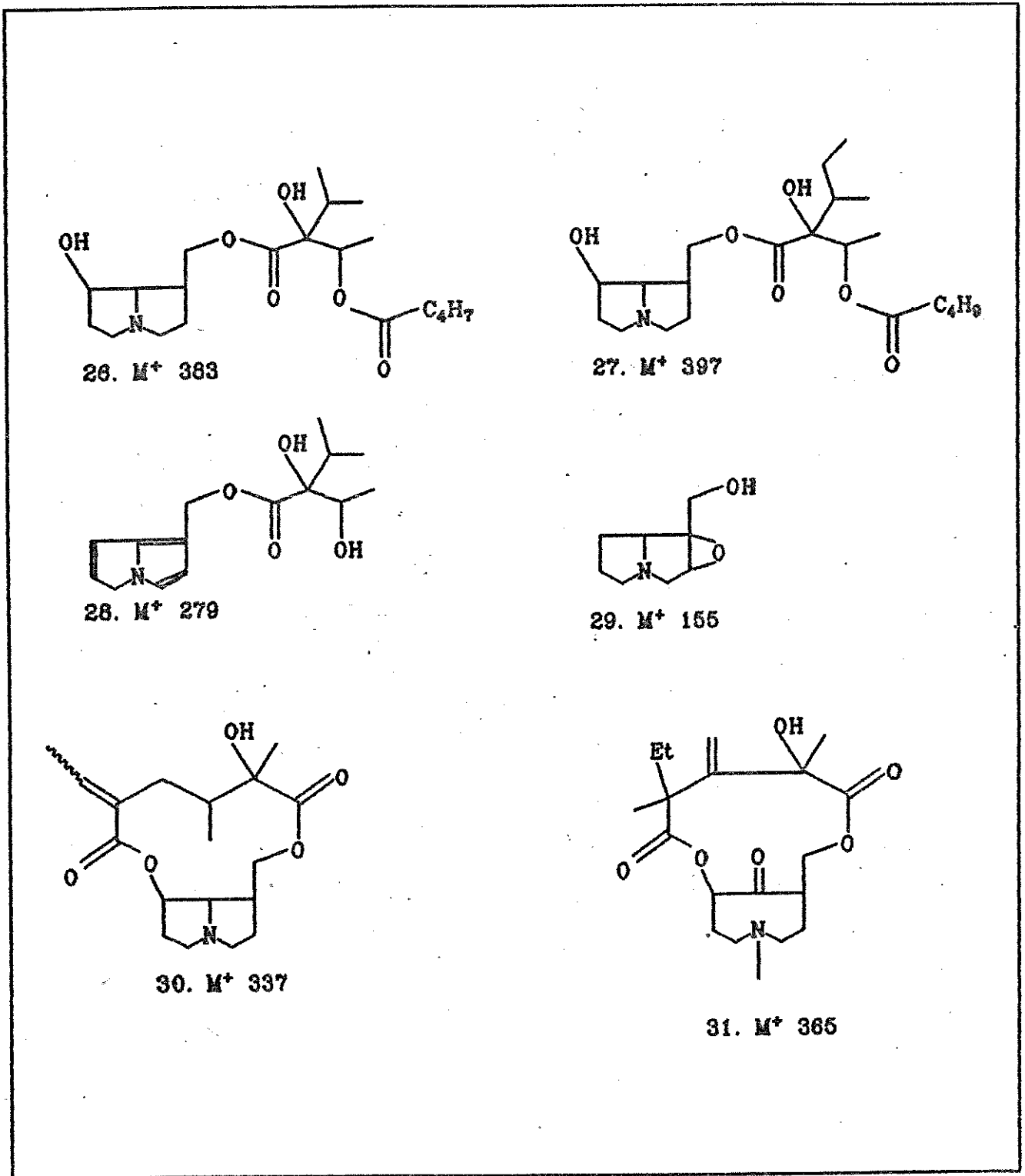
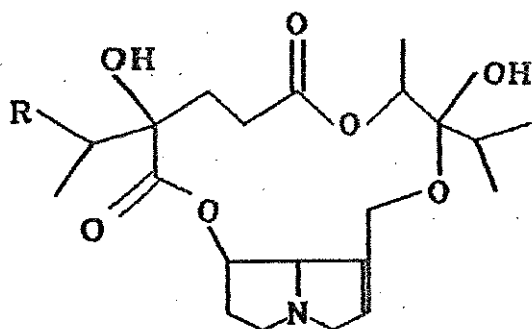
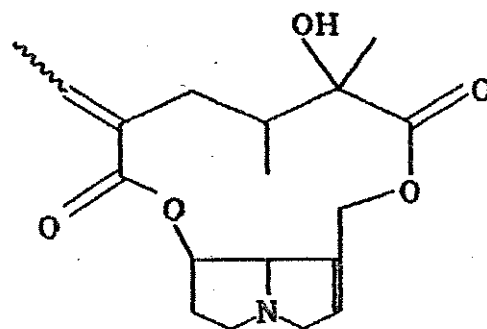


Figura 2.3. cont.

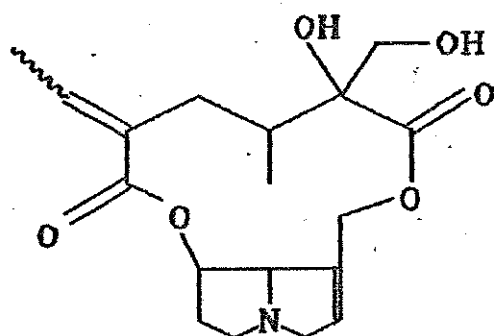


32. R:H - M⁺ 439

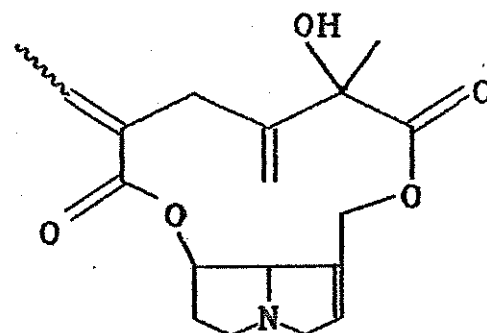
33. R:CH₃ - M⁺ 453



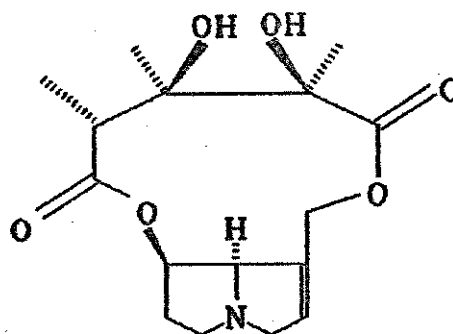
34. M⁺ 335



35. M⁺ 351



36. M⁺ 333



37. M⁺ 327

Figura 2.3. cont.

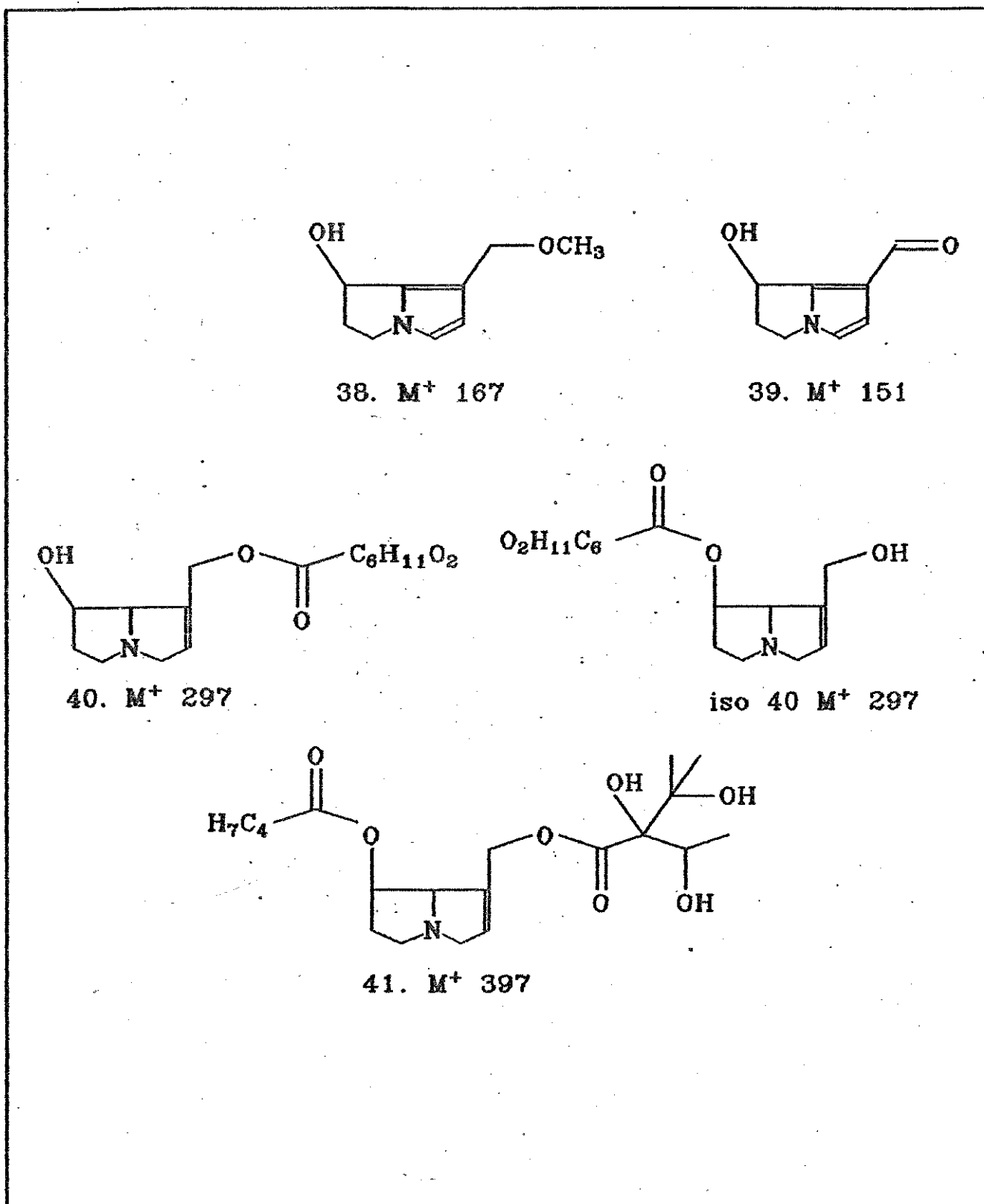


Figura 2.3. cont.

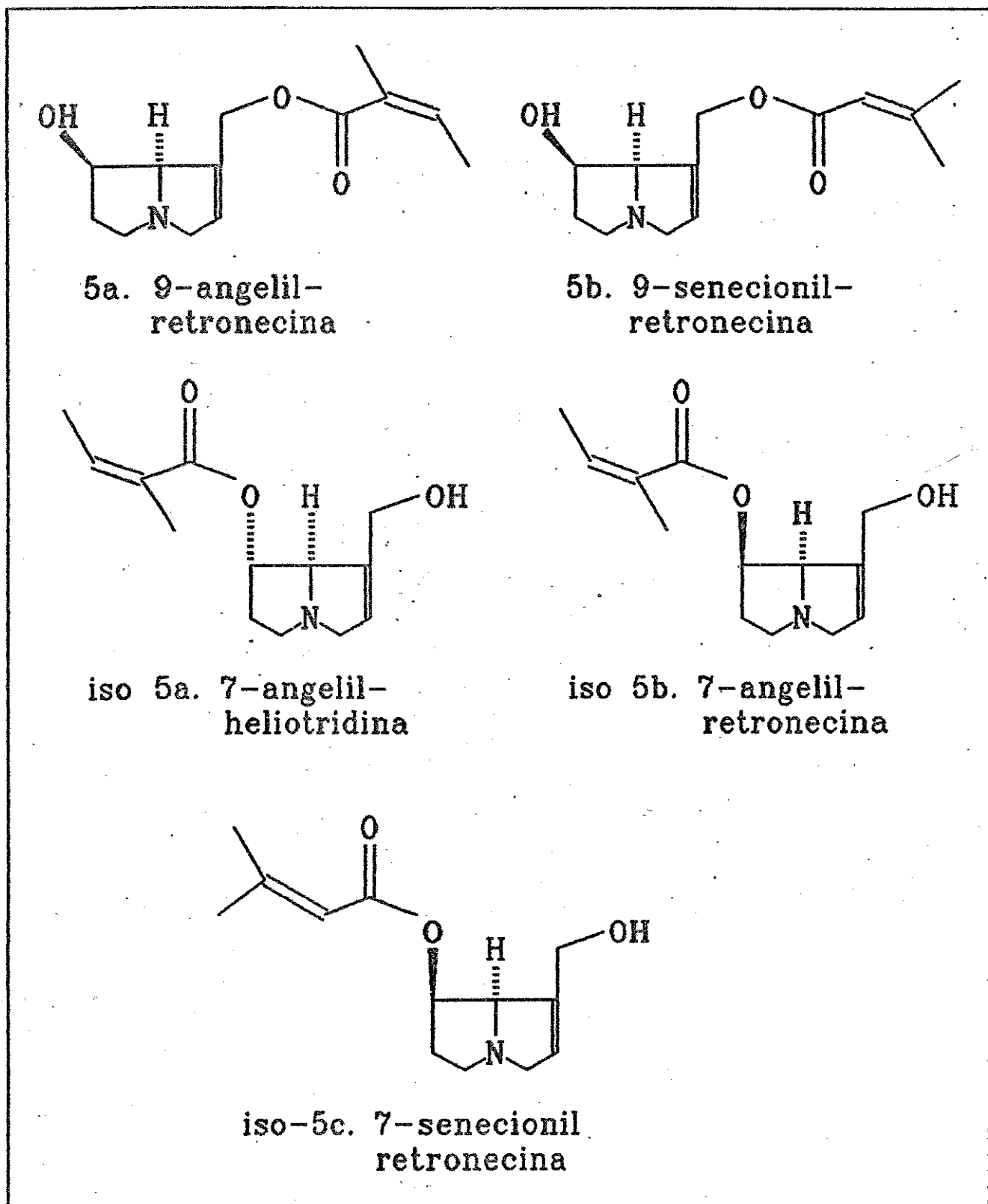
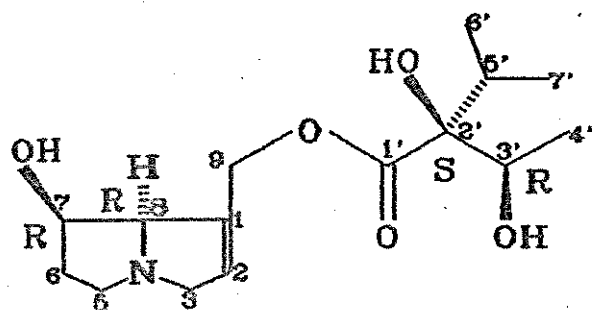
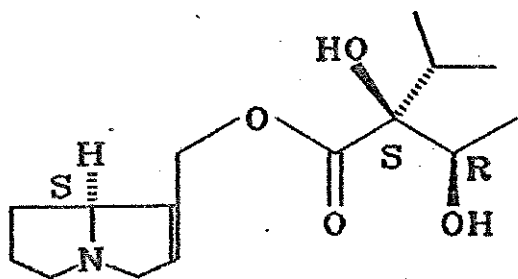


Figura 2.4. Estereoquímica absoluta de alguns PAs.



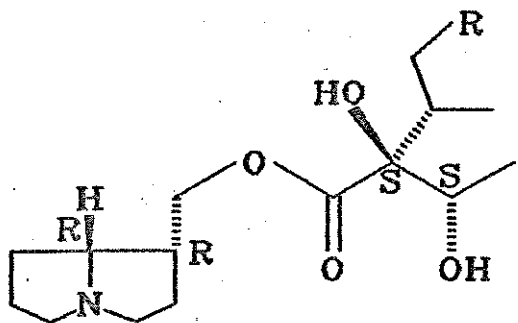
6b. Intermedina

- 6a. Indicina - 2'R, 3'S
- 6c. Licopsamina - 3'S
- 6d. Rinderina - 7S
- 6e. Equinatina - 7S, 3'S
- 6f. 2'R
- 6g. 7S, 2'R
- 6h. 7S, 2'R, 3'S



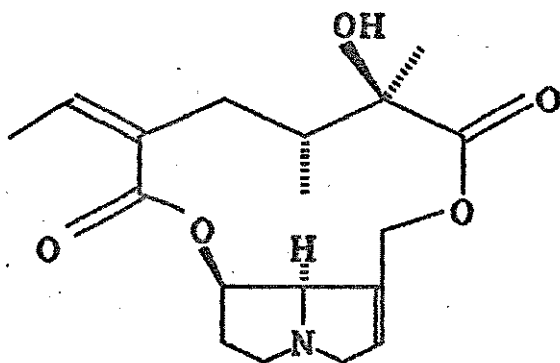
13a. Supinina

- 13b. Amabilina - 3'S
- 13c. Levigatina - 2'R, 3'S
- 13d. Cinaustina - 8R, 3'S

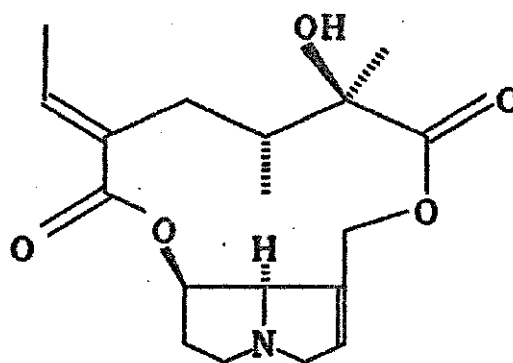


15a. Cinaustralina

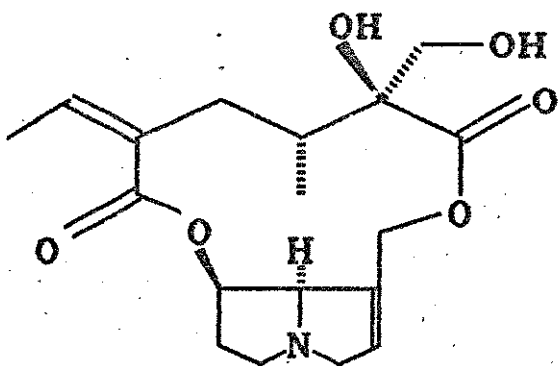
- 15b. Heliocurassavinina
1S, 2'R; R = H
- 15c. Heliocurassavicina
1S, 8S, 2'R; R = H
- 15d. Coromandalina
8S, 2'R, 3'R; R = H
- 15e. Heliovicina
8S, 2'R; R = H
- 16a. Heliocurassavina
1S, 8S; R = CH₃
- 16b. Curassavina
8S; R = CH₃



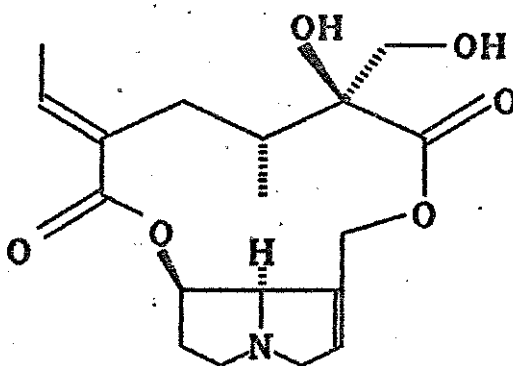
34a. Senecionina



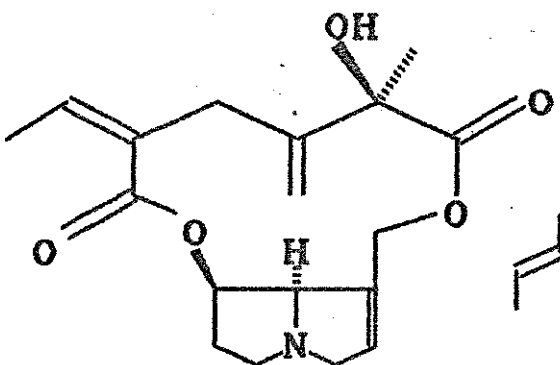
34b. Integerrimina



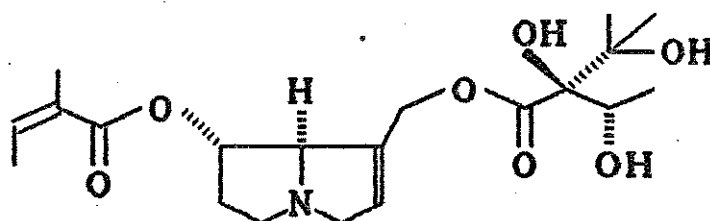
35a. Retrorsina



35b. Usaramina

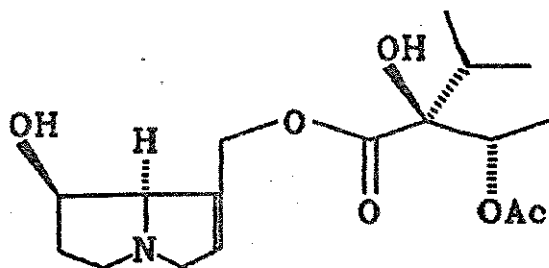


36a. Senecifilina

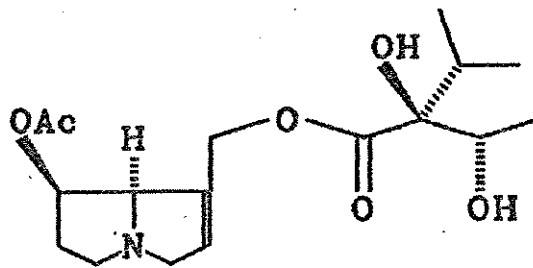


41a. heliosupina

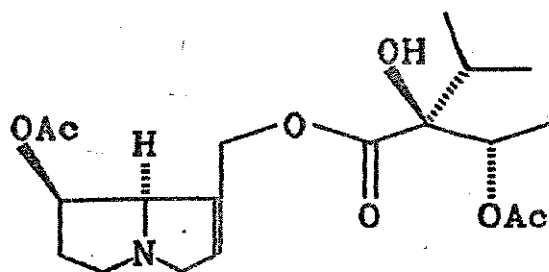
Figura 2.4. cont.



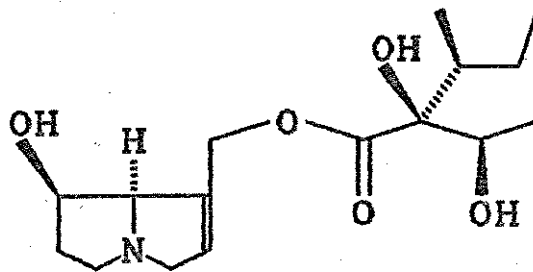
8a. 3'-acetil-licopsamina



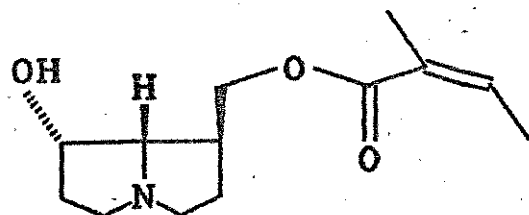
9a. 7-acetil-licopsamina



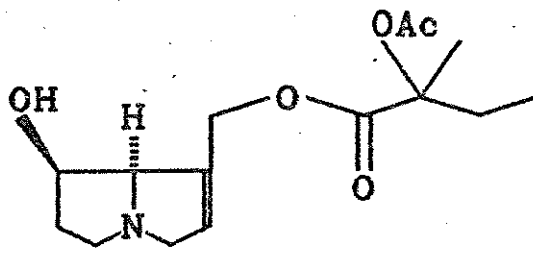
10a. 7,3'-acetil-licopsamina



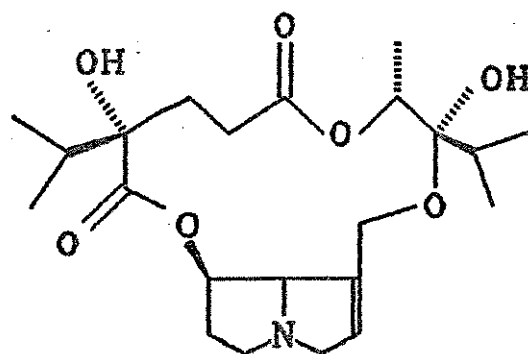
11a. Helioespatina



24a. Racemocina



40a. Calimorfina



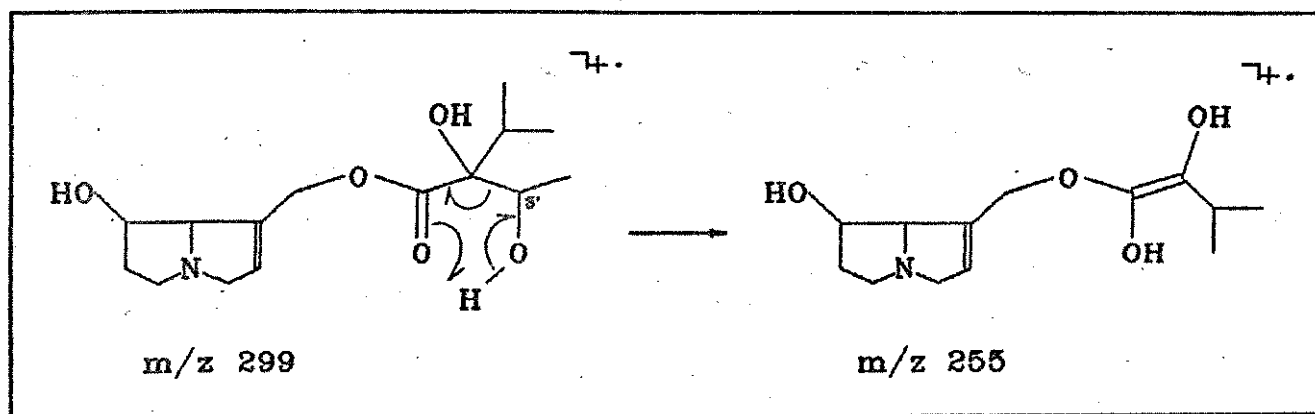
32a. Parsonsina

1.2.1. MONOESTERES 1,2-INSATURADOS

1.2.1.1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS DE IMPACTO DE ELETRONS.

ESTERES EM C-9. A estrutura 6 é a mais comum em borboletas e plantas e a sua fragmentação de espectrometria de massas de impacto de elétrons (Figura 2.5 - Apêndice) foi estudada anteriormente por Pedersen & Larsen (1970) para equinatina (6e).

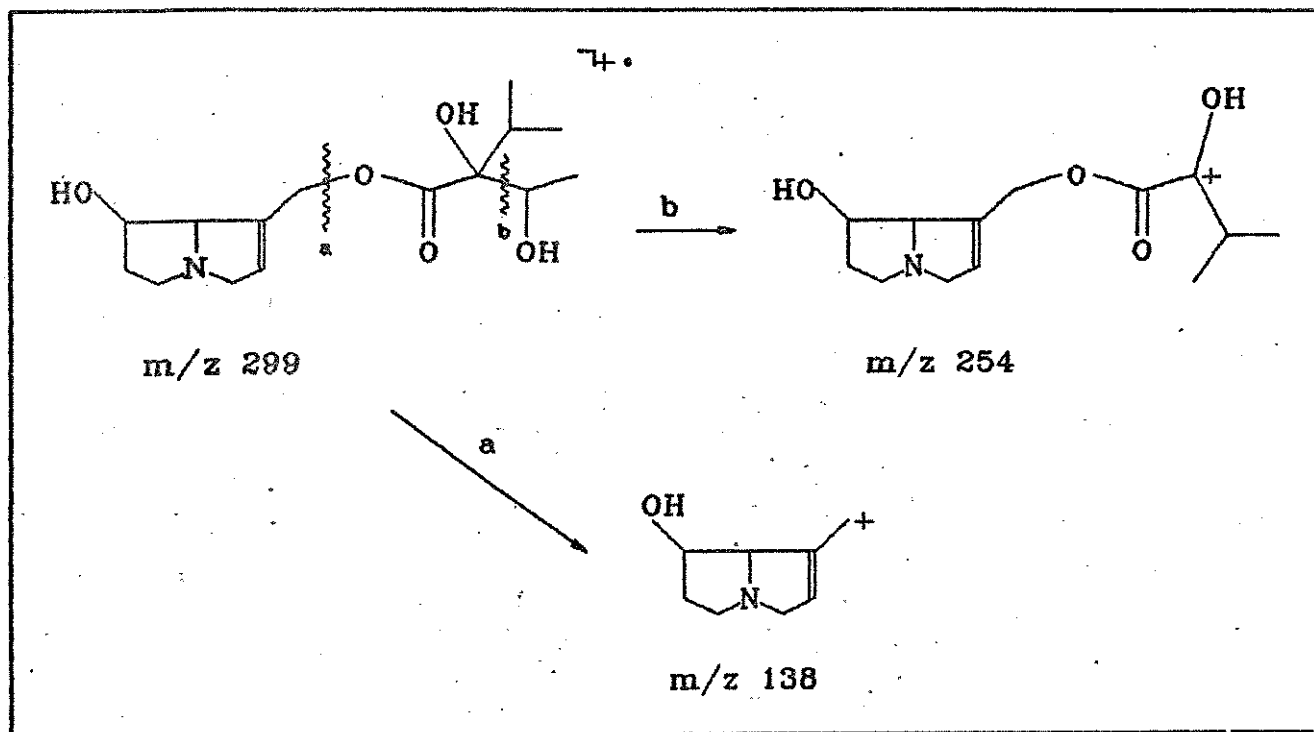
Esses alcalóides são ésteres de uma base necina (retronecina, 1a,b ou heliotridina, 1c,d) com ácidos traquelântico (42) ou viridiflórico (43). O íon molecular à m/z 299 é pouco abundante (1%). O rearranjo de McLafferty, envolvendo a carbonila do éster e a hidroxila secundária (ou a metila) em C-3', ocorre na formação do íon m/z 255 (Esquema 2.1a).



Esquema 2.1a.

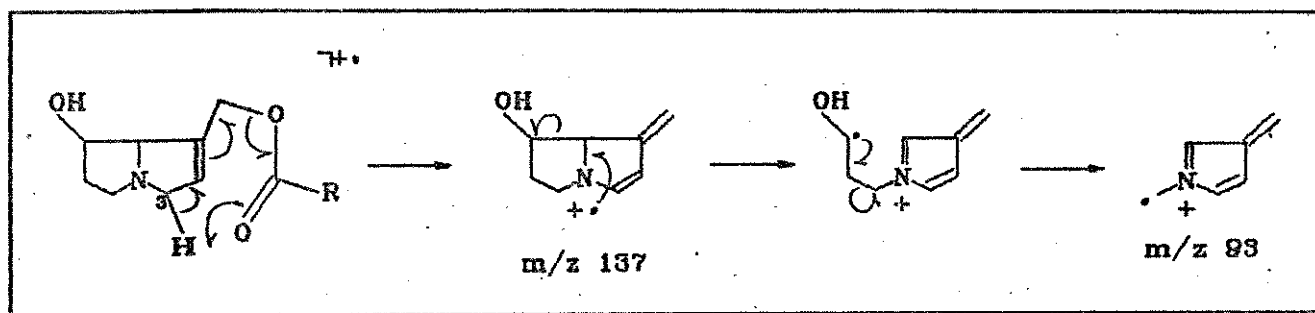
O íon m/z 254 se forma com a perda do grupo C_2H_4OH e o pico base, íon m/z 138, é a porção básica originada pela clivagem da

ligação éster (Esquema 2.1b).



Esquema 2.1b.

Na formação do íon m/z 93 está envolvida uma clivagem homolítica do fragmento a m/z 137, o qual é originado do íon molecular através de um rearranjo de McLafferty entre o hidrogênio do C-3 da base necina e a carbonila do éster (Esquema 2.1c). O íon m/z 156 é a base necina protonada.

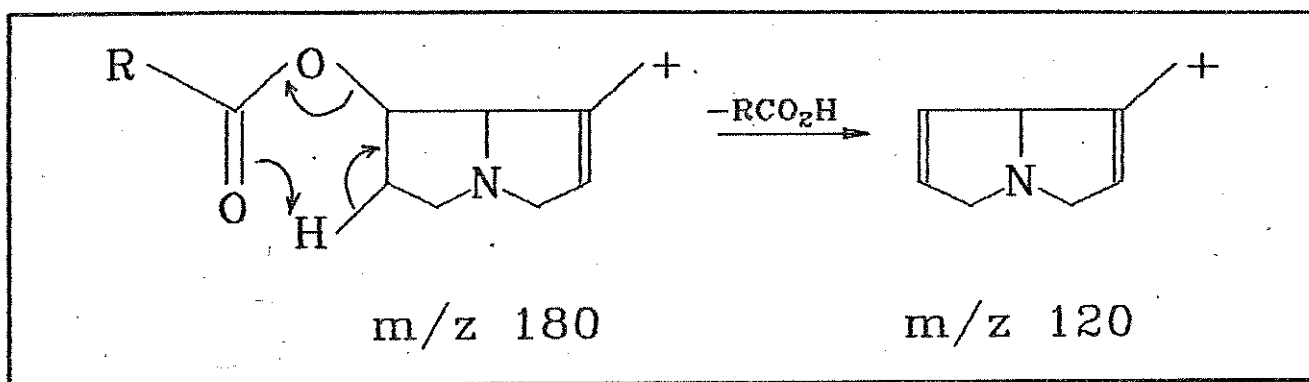


Esquema 2.1c.

Espécies acetiladas na hidroxila do C-3' (8) (Figura 2.6 - Apêndice) apresentam a fragmentação de EM-IE semelhante ao de 6 (Figura 2.5 - Apêndice), com o íon molecular a m/z 341 (20%). O íon a m/z 298 representa $[M-COCH_3]^+$, e o íon a m/z 255 é resultante do rearranjo de McLafferty na porção ácida, idêntico ao que ocorre na fragmentação de 6. O íon m/z 43 $[C_2H_5O]^+$ com abundância entre 30-50% é característico de espécies acetiladas. Esta fragmentação é consistente com aquela obtida por Roitman (1983) para a 3'-acetil-licopsamina (8a).

Espécies acetiladas no 7-OH (9) (Figura 2.7 - Apêndice) apresentam, além da fragmentação acima, dois íons abundantes característicos: 1. o íon m/z 180 (100%) originado da clivagem do éster, e o íon m/z 120 (55%) originado da eliminação de ácido acético do íon cation a m/z 180, via eliminação pirolítica da carbonila do acetato com o *cis*-H-6 da base necina (Esquema 2.2). Este tipo de eliminação com mecanismo Ei é observado em ésteres de ácidos carboxílicos com um *cis*- β -H disponível, ocorrendo à altas temperaturas sem a presença de reagentes (March 1985). O íon a m/z 198 é a base necina acetilada à C-7 e protonada.

Roitman (1983) observou uma fragmentação semelhante para a 7-acetil-licopsamina (9a).



Esquema 2.2.

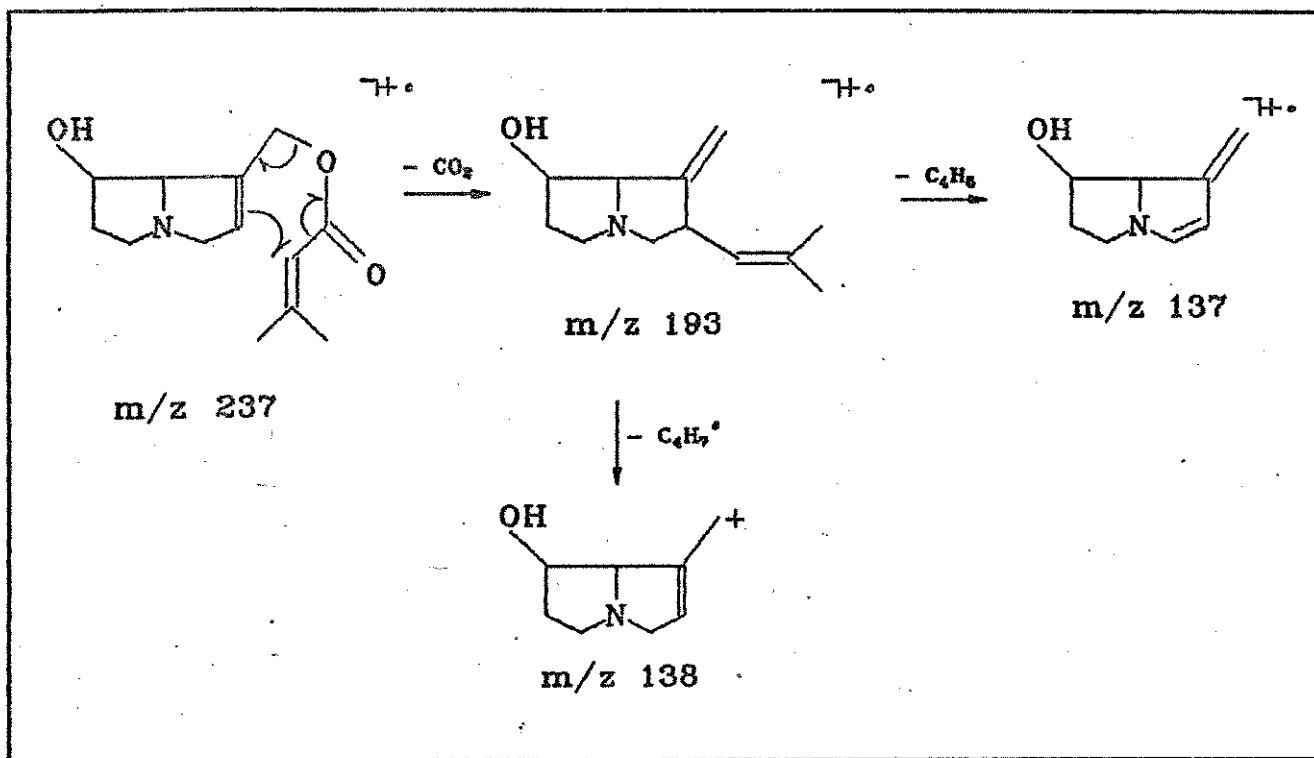
Espécies di-acetiladas (7- e 3'-OAc, 10) apresentam a fragmentação semelhante ao de espécies acetiladas no 7-OH (Figura 2.8 - Apêndice). A 3'-7-acetil-licopsamina (10a), isolada por Roitman (1983), apresenta fragmentação semelhante a do alcalóide 10.

A fragmentação de 11 observada em seu EM-IE (Figura 2.9 - Apêndice) é semelhante ao dos alcalóides 6 (Figura 2.5 - Apêndice). O íon molecular a m/z 313, a presença dos íons m/z 269 e 268 (14 unidades de m/z maiores que os íons m/z 255 e 254 presentes na estrutura 6) são devido ao rearranjo de McLafferty e a perda de C_2H_4OH respectivamente. O íon m/z 256 se deve a perda de C_4H_8 . Esse tipo de fragmentação, encontrado por Roeder *et al.* (1991) para a helioespatina (11a); leva a suposição que este alcalóide seria um éster de retronecina (1a,b) ou heliotridina (1c,d) com um ácido tipo curassavico (44).

A fragmentação do composto 12 (Figura 2.10 - Apêndice) é similar ao do composto 11, mas com o íon molecular a m/z 355 (42 unidades m/z maiores que m/z 313 de 11 - Figura 2.9 - Apêndice), sugerindo que 12 seja o alcalóide 11 acetilado na posição na hidroxila do C-3'.

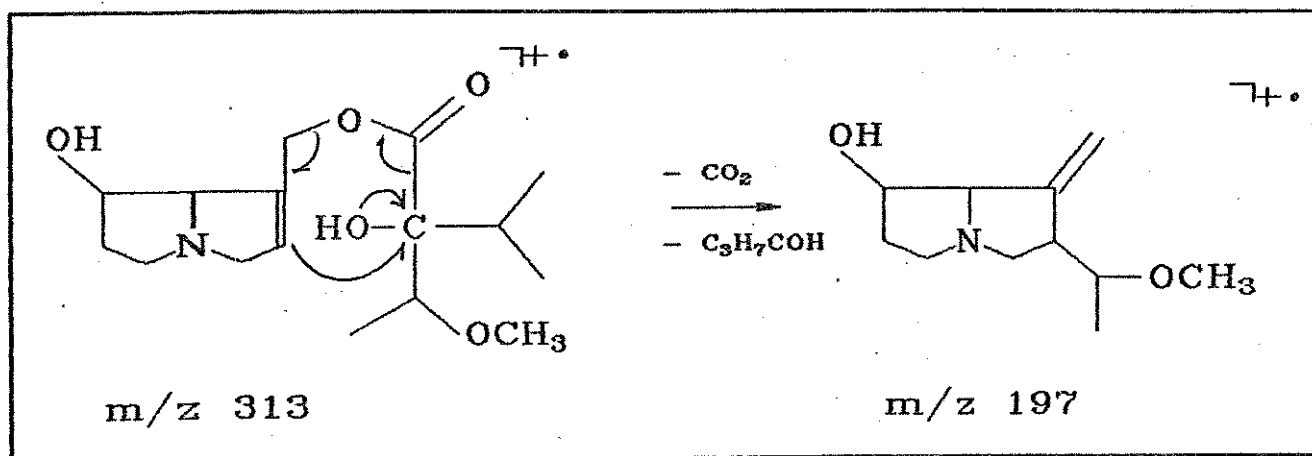
Outros monoésteres 1,2-insaturados abundantes são os alcalóides de estrutura 5: base necina (retronecina, 1a,b ou heliotridina, 1c,d) esterificadas com os ácidos seneciólico (45a), tiglicico (45b) ou angélico (45c). Todos esses apresentam o íon molecular m/z 237 (pouco abundante) e uma fragmentação mais complexa (Figura 2.11 - Apêndice), a qual foi inicialmente estudada por Pedersen & Larsen (1970).

O íon m/z 193 pode ser devido a perda de CO_2 e subsequente migração do grupo C_4H_7 através de um estado de transição de 6 membros (Esquema 2.3). O íon m/z 137 origina-se da perda de C_4H_8 pelo íon m/z 193. O restante da fragmentação é idêntica ao padrão dos monoésteres 1,2-insaturados acima.



Esquema 2.3.

Este rearranjo foi observado em ésteres α,β -insaturados por Brown & Djerassi (1967). Pedersen e Larsen (1970) propuseram este tipo de rearranjo, através de um estado de transição de sete membros, para explicar o íon m/z 197 da heliotridina (7) (Esquema 2.4).



Esquema 2.4. (de Pedersen & Larsen 1970).

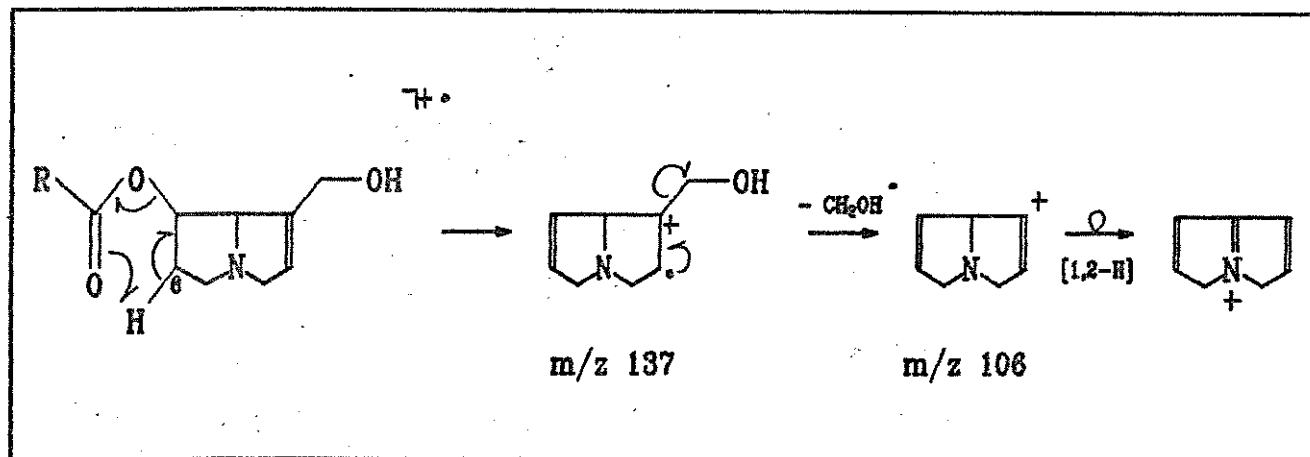
O alcalóide (40) com íon molecular a m/z 297 (Figura 2.12 - Apêndice) provavelmente é um monoéster relacionado com a calimorfina (40a), isolado pela primeira vez por Edgar *et al.* (1980a) da mariposa *Tyria jacobaeae* (Arctiidae). Este alcalóide é biossintetizado parcialmente (a parte ácida é biossintetizada via o aminoácido isoleucina) por *T. jacobaeae* (Ehmke *et al.* 1990, Biller *et al.* 1991). Entretanto somente com base na fragmentação não se tem dados para inferir a estrutura do ácido nécico esterificante.

Monoésteres sem o grupo OH na posição 7 (13) são em sua maioria ésteres de supinidina (2) com ácidos traquelântico (42) ou viridiflórico (43), e apresentam fragmentação semelhante aos PAs de $[M]^+$ 299 (6) discutidos acima, tendo o íon base m/z 122, originado da clivagem do éster (Figura 2.13 - Apêndice). Esta fragmentação é consistente com as estruturas da supinina (13a) e amabilina (13b) isoladas por Liu *et al.* (1992) e Roeder & Bourauel (1992).

Da mesma forma estas espécies, quando acetiladas na

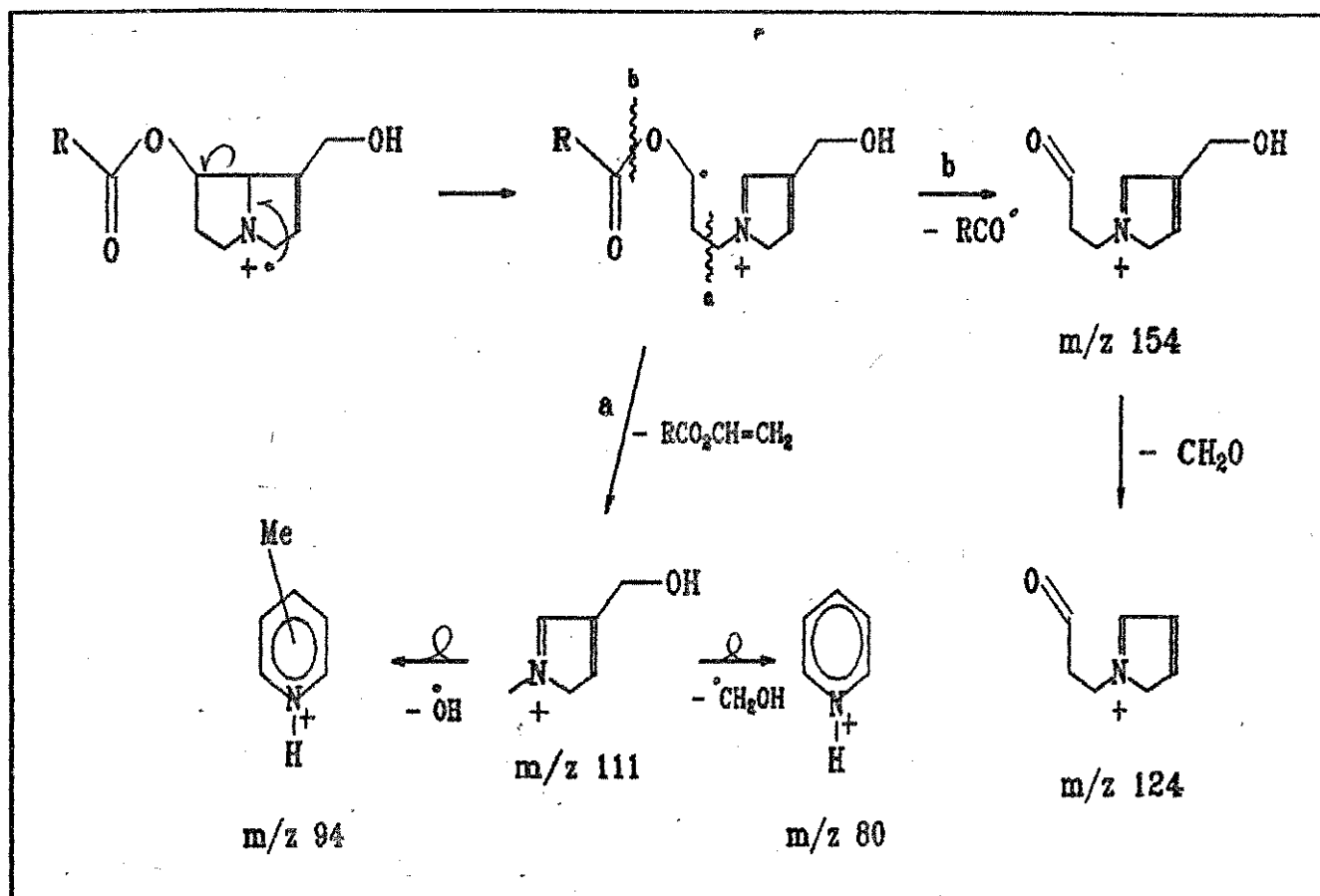
hidroxila do C-3' (14), tem o íon molecular a m/z 325 (Figura 2.14 - Apêndice), apresentando uma fragmentação semelhante aos PAs com $[M]^+$ 341 (8).

ESTERES NO C-7. PAs, cujas bases necinas são esterificadas no 7-OH, são chamados iso-PAs. As estruturas iso-5 e iso-6 e iso-40 apresentam uma fragmentação característica (Figuras 2.15, 2.16 e 2.17, respectivamente - ver Apêndice). O rearranjo de McLafferty da carbonila do éster com o H-6 da base necina leva a formação do íon m/z 137, e a perda de CH_2OH - radicalar, por parte deste, leva ao íon m/z 106 (Esquema 2.5a).



Esquema 2.5a.

A clivagem homolítica da ligação éster origina o íon m/z 154, sendo que os íons m/z 124, 111, 94 e 80 (íon piridínium = pico base) são originados daquele íon (Esquema 2.5b).



Esquema 2.5b.

A estrutura do alcalóide iso-40, provavelmente biosintetizado por lepidópteros (Ehmke *et al.* 1990) não pôde ser esclarecida devido a dúvidas quanto a fragmentação da parte ácida. A semisíntese de 40a (ver item 3. Semisíntese de PAs, neste Capítulo) mostrou a produção de uma pequena proporção de iso 40a, a qual não apresenta o fragmento a m/z 236, presente em iso-40.

O mecanismo de fragmentação de iso-PAs foi proposto por Pedersen & Larsen (1970), baseado na fragmentação da 7-angelil-heliotridina (iso-5a) e 7-angelil-retronecina (iso-5b).

1.2.1.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO QUÍMICA POSITIVA.

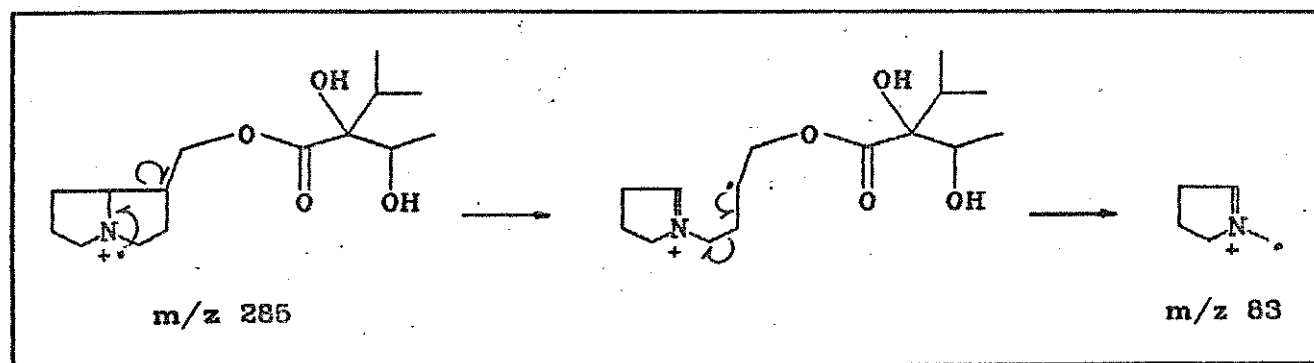
A fragmentação de EM-ICP dos alcalóides monoésteres 1,2 insaturados esterificados no C-7 ou C-9 (Figuras 2.5-2.17 - ver Apêndice) apresentam um padrão semelhante. O íon $[MH]^+$ é abundante e fornece a mais importante informação desta técnica: o íon molecular, o qual é muitas vezes pouco abundante ou ausente em EM-IE. O íon a m/z 156 é a base nécina protonada em PAs com a hidroxila no C-7, ocorrendo a m/z 140 em PAs sem a hidroxila no C-7. O íon a m/z 138 é relativo a perda do ácido nécico por parte de $[MH]^+$ já observada anteriormente para PAs de estrutura similares com a hidroxila no C-7 (Karchesy *et al.* 1984), e a m/z 122 em PAs sem a hidroxila no C-7. O íon a m/z 140 em PAs com a hidroxila no C-7 e o íon a m/z 124 em PAs sem a hidroxila no C-7 não foram anteriormente observados para PAs de estrutura similar, embora sejam os íons base em alguns dos PAs aqui analisados. Propõem-se que nestes dois casos a dupla ligação 1,2 do anel tenha sido hidrogenada.

1.2.2. MONOESTERES 1,2-SATURADOS

1.2.2.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IMPACTO DE ELÉTRONS.

ÉSTERES EM C-9. As estruturas 15-22 são bases necinas do tipo isoretronecanol (4a,b) ou traquelantamida (4c,d) esterificadas em C-9 por uma variedade de ácidos (traquelântico, viridiflórico e outros). A Figura 2.18 (ver Apêndice) apresenta o espectro de massas característico de 15, o qual tem como ácido nécico, ácidos

do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43). O íon molecular pouco abundante ocorre a m/z 285. O rearranjo de McLaffert ocorre na formação do íon m/z 241, e o íon m/z 240 se forma com a perda do grupo C_2H_4OH . O pico base, íon m/z 124, é a porção básica originada pela clivagem da ligação éster. O íon m/z 83, característico de ésteres de bases necinas saturadas, forma-se pela clivagem homolítica da ligação 1,2 (Esquema 2.6). O íon m/z 142 corresponde a base necina protonada. Esta fragmentação foi proposta inicialmente por Mohanraj *et al.* (1982).



Esquema 2.6. (de Mohanraj *et al.* 1982).

A Figura 2.19 (ver Apêndice) apresenta fragmentação semelhante a 15 (Figura 2.18 - Apêndice). O íon molecular a m/z 299, a presença dos íons m/z 255 e 254 (14 unidades de massa maiores que os íons m/z 241 e 240 da estrutura 15), produtos respectivamente de rearranjo de McLafferty e perda de C_2H_4OH , suportaria a hipótese do ácido néxico ser o ácido curassáxico (44). Entretanto os íons m/z 238 $[M-61]^+$ e 212 $[M-87]^+$ permanecem inexplicados levantando dúvidas sobre a estrutura

proposta. A proposta inicial é que este alcalóide apresentaria a estrutura 16, entretanto mais estudos precisam ser realizados.

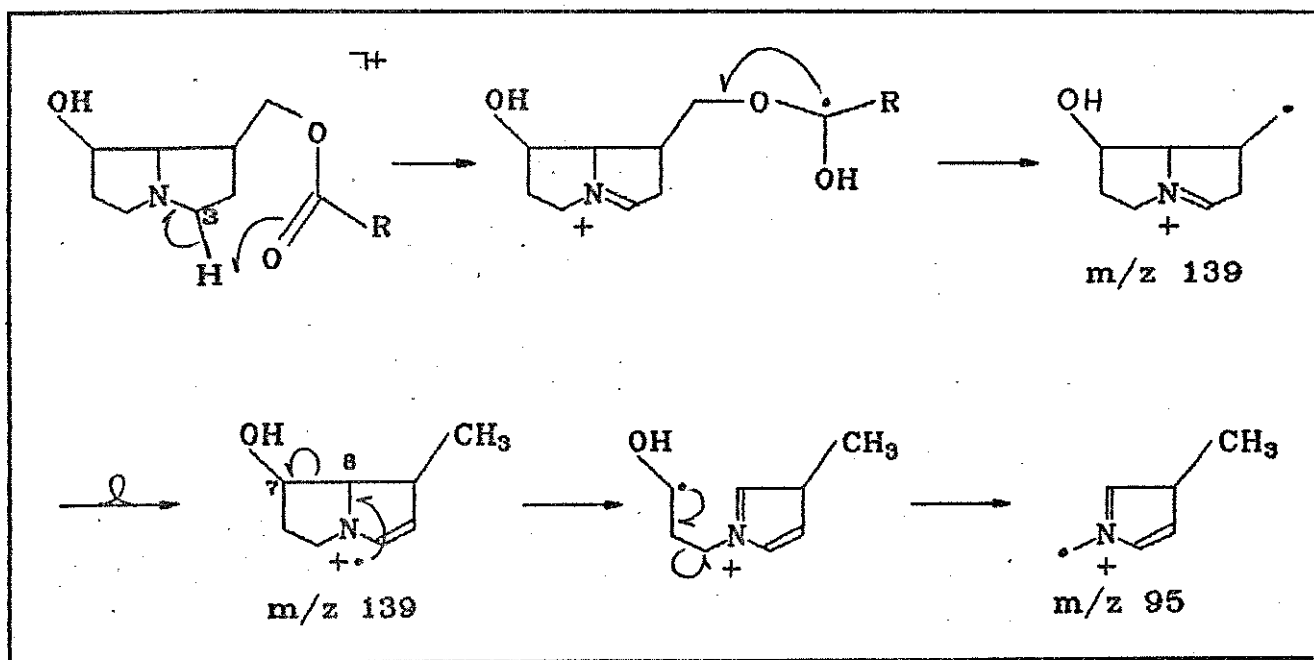
Analisando-se a fragmentação da Figura 2.20 (ver Apêndice) conclui-se que o alcalóide deve apresentar um ácido esterificante de estrutura desconhecida. O íon molecular ocorre a m/z 297. Os íons m/z 253 $[M-44]^+$ e 252 $[M-45]^+$ podem se originar via rearranjo de McLafferty e a perda de C_2H_4OH respectivamente. Entretanto o fragmento m/z 241 permanece inexplicado. Inicialmente propõem-se a estrutura 17, entretanto mais estudos devem ser realizados.

O alcalóide 18 apresenta a fragmentação de 15 (Figura 2.18 - Apêndice) acetilado no C-3' da parte ácida (Figura 2.21 - Apêndice).

A fragmentação dos alcalóides das Figuras 2.22-2.25 (ver Apêndice) são semelhantes aos da estrutura 15 (Figura 2.18 - Apêndice), mas apresentam a hidroxila do C-3' esterificadas com os ácidos $C_3H_7CO_2H$, $C_4H_9CO_2H$, $C_4H_7CO_2H$ e $C_5H_9CO_2H$ respectivamente, propondo-se como estruturas os alcalóides 19-22.

As estruturas 23, 25-27 são base necinas do tipo platinecina (3a,b), turneforcidina (3c,d), hastanecina (3e,f) ou diidroxiheliotridana (3g,h) esterificadas com vários tipos de ácidos (traquelântico, viridiflórico e outros). Os fragmentos dos espectros de massas de PAs saturados apresentam duas unidades de massa maiores que os insaturados. Os picos a m/z 257-256, 158, 140 e 97-95 representam uma sequência de fragmentação idêntica àquela de monoésteres insaturados do tipo 6. A Figura 2.26 (ver Apêndice) apresenta o espectro de massas de 23.

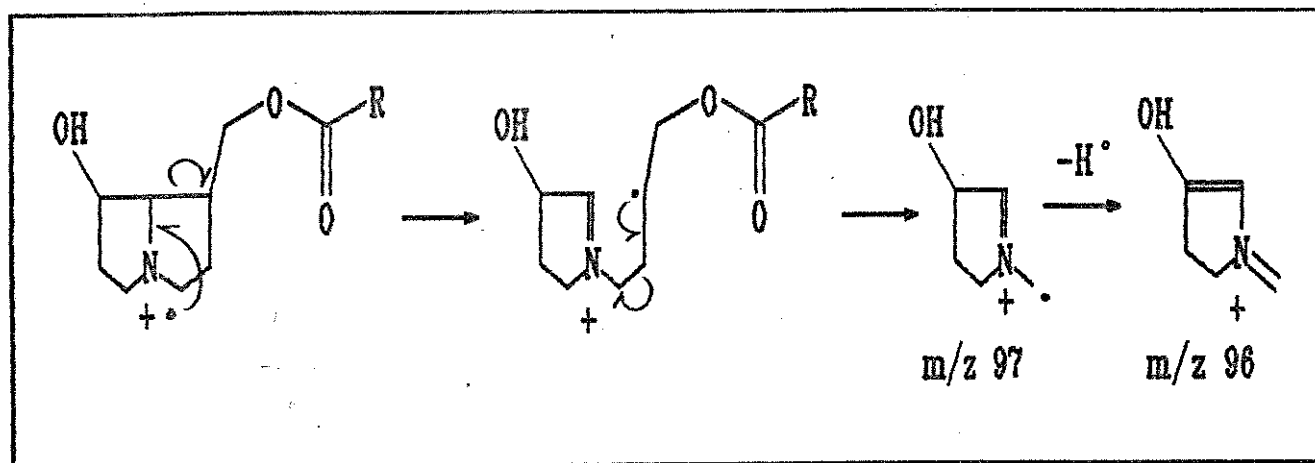
No espectro de 23 o íon molecular m/z 301 está ausente (ver EM-ICP na Figura 2.26 - Apêndice, para a confirmação do íon molecular). O rearranjo de MacLafferty ocorre na formação do íon m/z 257, e o íon m/z 256 se forma com a perda do fragmento C_2H_4OH . O íon m/z 140 corresponde a porção básica originada pela clivagem da ligação éster. O íon m/z 95 é originado da clivagem homolítica entre C-7 e C-8 do íon-fragmento a m/z 139, o qual se origina via rearranjo de MacLafferty entre o hidrogênio do C-3 da base necina e a carbonila do éster (Esquema 2.7a).



Esquema 2.7a.

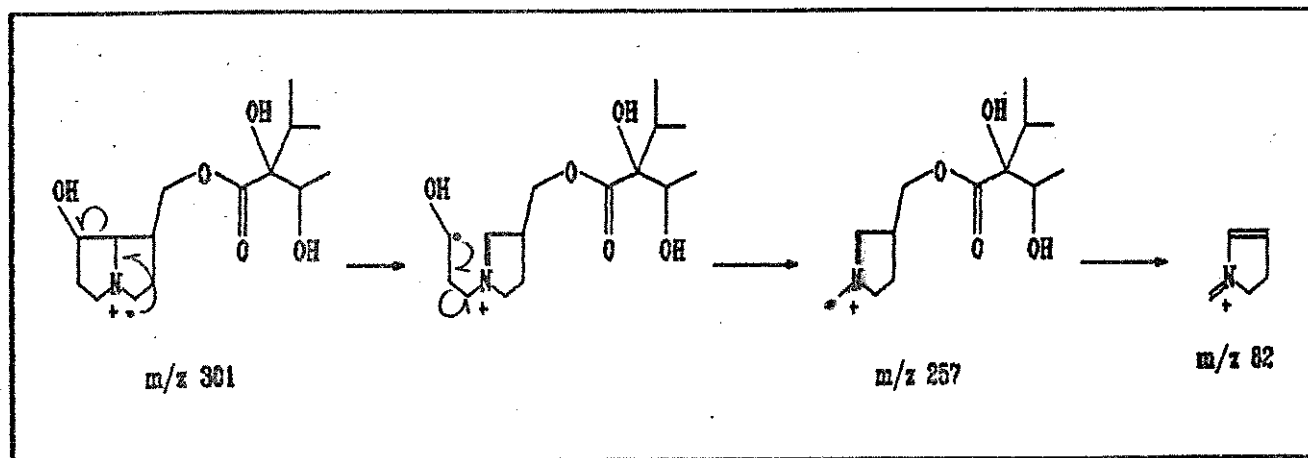
O íon a m/z 97 é originado da clivagem homolítica do íon molecular entre C-1 e C-8 e subsequentemente entre C-2 e C-3. O íon m/z 96 é resultante da perda de H- radicalar pelo íon-fragmento a m/z 97 (Esquema 2.7b). O íon a m/z 158 corresponde a

base necina protonada.



Esquema 2.7b.

O pico base ocorre a m/z 82, originado através da clivagem homolítica do ion molecular entre C-7 e C-8, seguida da clivagem homolítica da ligação C-6,C-7 com a perda de C_2H_5OH que resulta no ion m/z 257, com a subsequente clivagem homolítica do éster (Esquema 2.7c).



Esquema 2.7c.

Os alcalóides 25 e 26 também apresentam a fragmentação semelhante à 23, tendo como ácidos nécicos derivados dos ácidos traquelântico ou viridiflórico (esterificados na hidroxila do C-3' com os ácidos $C_4H_9CO_2H$ e $C_4H_7CO_2H$ (Figuras 2.27 e 2.28 - Apêndice).

O alcalóide 27 apresenta os íons m/z 271 e 270 (rearranjo de McLafferty e perda de C_2H_4OH respectivamente) indicando que o ácido nécico esterificante é um derivado do ácido curassávicico (ácido curassávicico esterificado na hidroxila do C-3' com o ácido $C_4H_9CO_2$) (Figura 2.29 - Apêndice). Entretanto nos alcalóides 26 e 27 os íons a m/z 83 e 196 permanecem inexplicados, sendo que a confirmação das estruturas sugeridas dependem de mais estudos.

O alcalóide 24 apresenta a fragmentação semelhante à 23, embora apresente como ácido nécico esterificante os ácidos seneciólico (45a), tiglicó (45b) ou angélico (45c) (Figura 2.30 - Apêndice). Racemocina (24a) apresenta uma fragmentação similar (Ahmed *et al.* 1991).

ESTERES EM C-7. Da mesma forma que os PAs saturados esterificados em C-9, iso-PAs saturados apresentam uma fragmentação similar aos iso-PAs insaturados, com o acréscimo de duas unidades de massa (u.m.a). Assim a fragmentação de iso-24 (Figura 2.31 - Apêndice) apresenta o íon molecular m/z 239; o rearranjo de McLafferty da carbonila do éster com o hidrogênio do C-6 da base necina leva a formação do íon m/z 139, cuja perda de CH_2OH por parte deste leva ao íon m/z 108. A clivagem homolítica

da ligação éster origina o íon m/z 156, sendo os íons m/z 113 e 82 (pico base) são originados desse último.

1.2.2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO QUÍMICA POSITIVA.

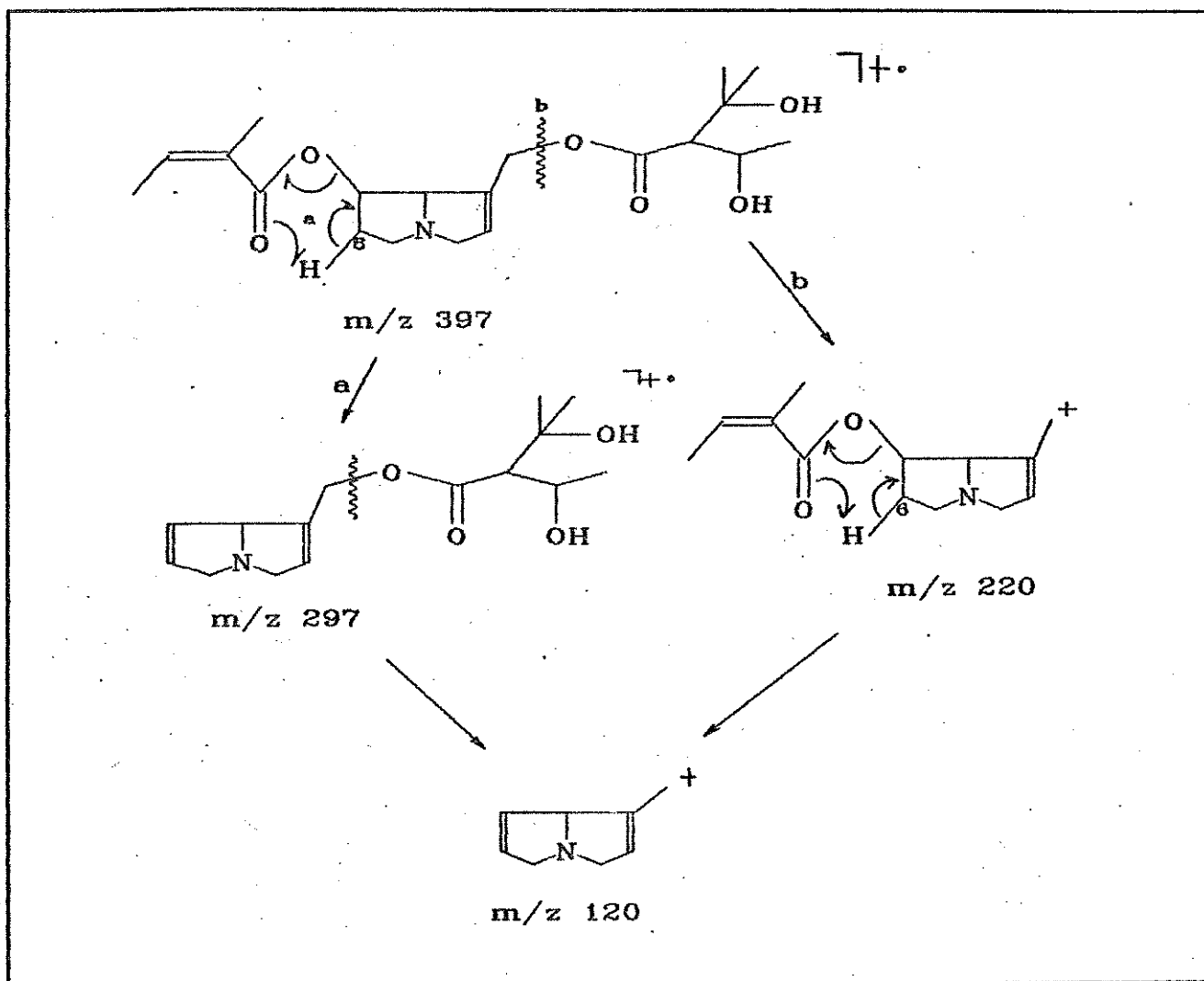
A fragmentação de EM-ICP dos alcalóides monoésteres 1,2 saturados esterificados no C-9, sem hidroxila no C-7 (Figuras 2.18-2.25 - Apêndice) apresentam um padrão semelhante. O íon $[MH]^+$ é abundante, muitas vezes sendo o pico base. O íon a m/z 142 é a base necina protonada. O íon a m/z 124 é relativo a perda do ácido néxico por parte de $[MH]^+$ já observada anteriormente por Karchesy *et al.* (1984) para monoésteres 1,2-insaturados.

A fragmentação de EM-ICP dos alcalóides monoésteres 1,2 saturados esterificados no C-9, com hidroxila no C-7 (Figuras 2.26-2.28 - Apêndice) apresentam também um padrão semelhante entre si, e com os outros alcalóides analisados acima. O íon $[MH]^+$ é abundante, muitas vezes sendo o pico base. O íon a m/z 158 é a base necina protonada. O íon a m/z 140 é relativo a perda do ácido néxico por parte de $[MH]^+$.

1.2.3. DIÉSTERES

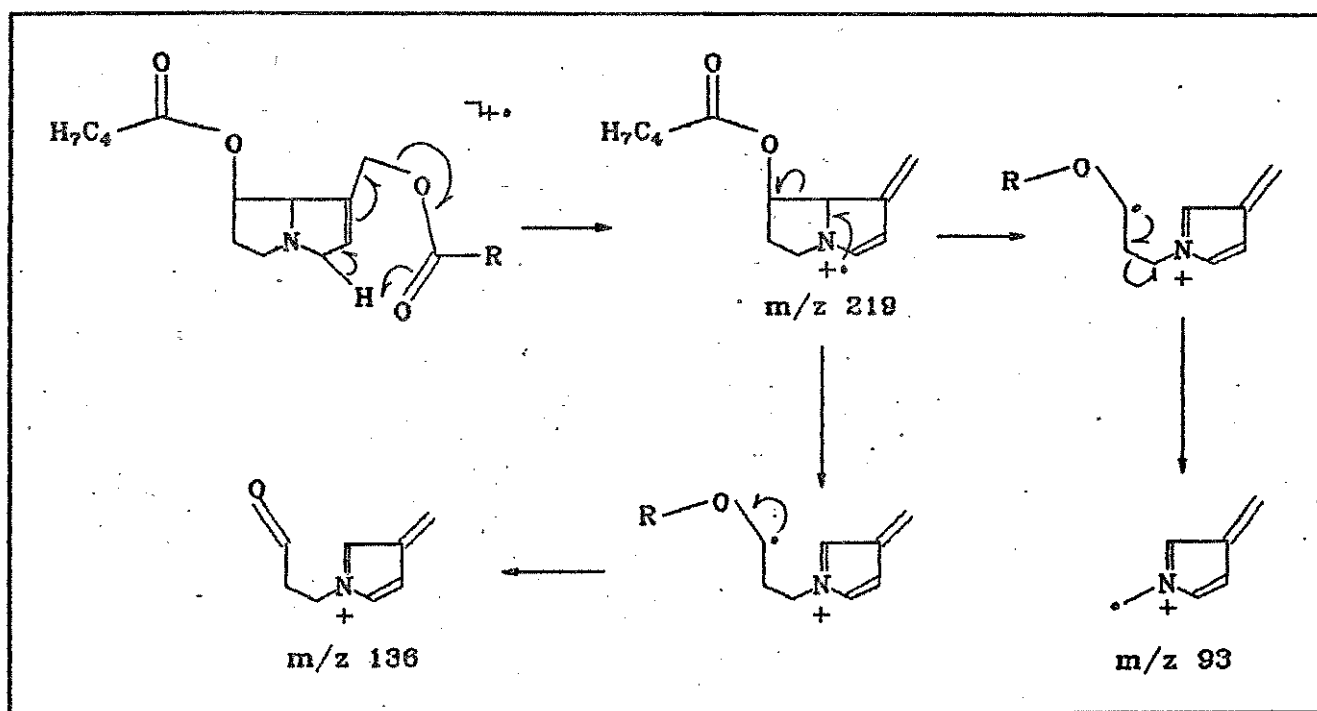
A fragmentação de diésteres foi estudado por Furuya & Araki (1968) e Pedersen & Larsen (1970). A estrutura 41 apresenta o mesmo padrão proposto pelos autores acima (Figura 2.32 - Apêndice), sendo a sua fragmentação idêntica ao da heliosupina (41a).

O íon a m/z molecular 397 é pouco abundante (<1%). O íon a m/z 297 é devido a perda do ácido esterificante no C-7 via eliminação pirolítica do éster no C-7 (ver March 1985) O íon a m/z 220 resulta da clivagem do éster em C-9 e o íon m/z 120 (pico base) se origina da eliminação pirolítica do éster em C-7, a partir do íon fragmento m/z 220 ou da clivagem do íon radical a m/z 297 (Esquema 2.8a).



Esquema 2.8a.

O íon m/z 219 se origina de um rearranjo de McLafferty entre o hidrogênio do C-3 da base necina e a carbonila do éster em C-9. Os íons m/z 136 e 93 resultam da clivagem homolítica do íon m/z 219 na ligação éster e na ligação 5,6 da base necina, respectivamente (Esquema 2.8b).



Esquema 2.8b.

Não foram realizados estudos de EM-ICP desse alcalóide.

1.2.4. MACROCÍCLICOS 1,2-INSATURADOS.

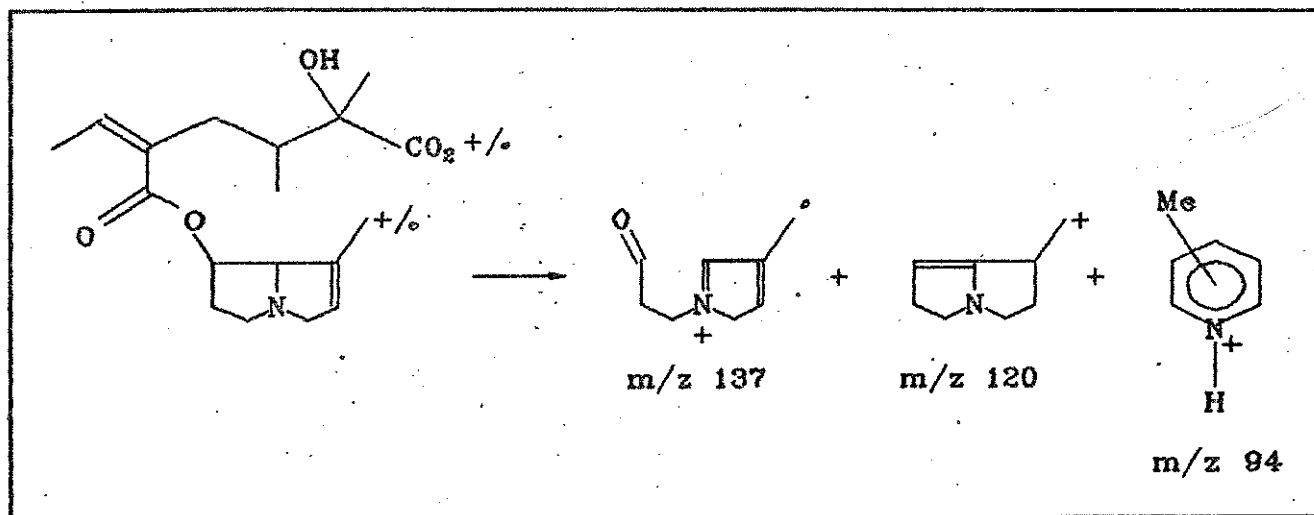
1.2.4.1. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IMPACTO DE ELÉTRONS.

Os alcalóides macrocíclicos de 11 ou 12 membros, os quais geralmente apresentam retronecina (1a,b) como base necina podem ser facilmente caracterizados por seu padrão de fragmentação

característico, o qual foi amplamente estudado, apresentando uma excelente revisão em Bredenkamp (1991).

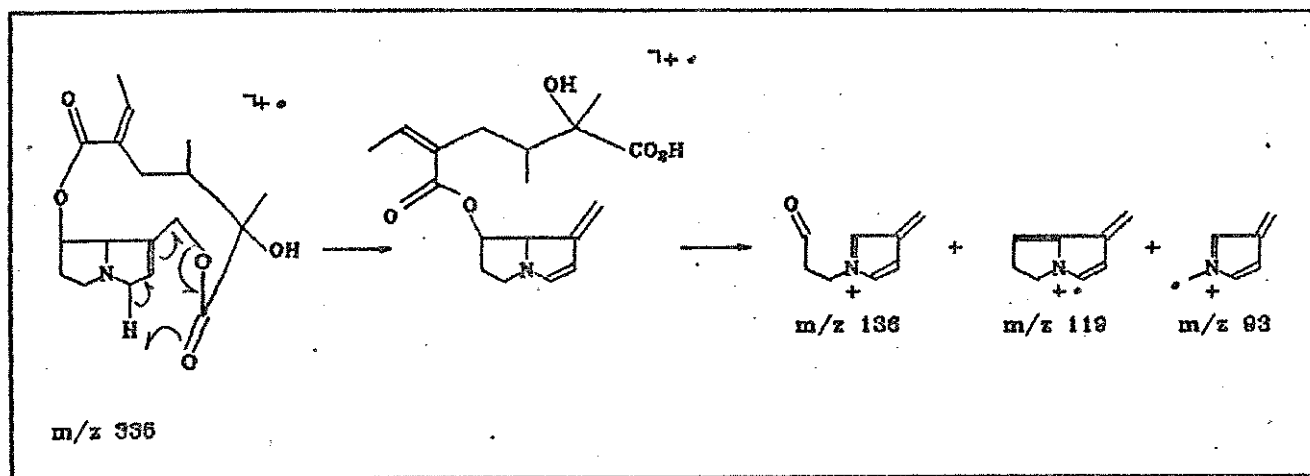
Na fragmentação da senecionina (34a) e integerrimina (34b) (Bredenkamp 1991), verifica-se 3 sequências principais de fragmentação a partir do íon molecular a m/z 335:

1. A quebra da ligação do éster alílico leva aos íons m/z 137, 120 e 94 (Esquema 2.9a).

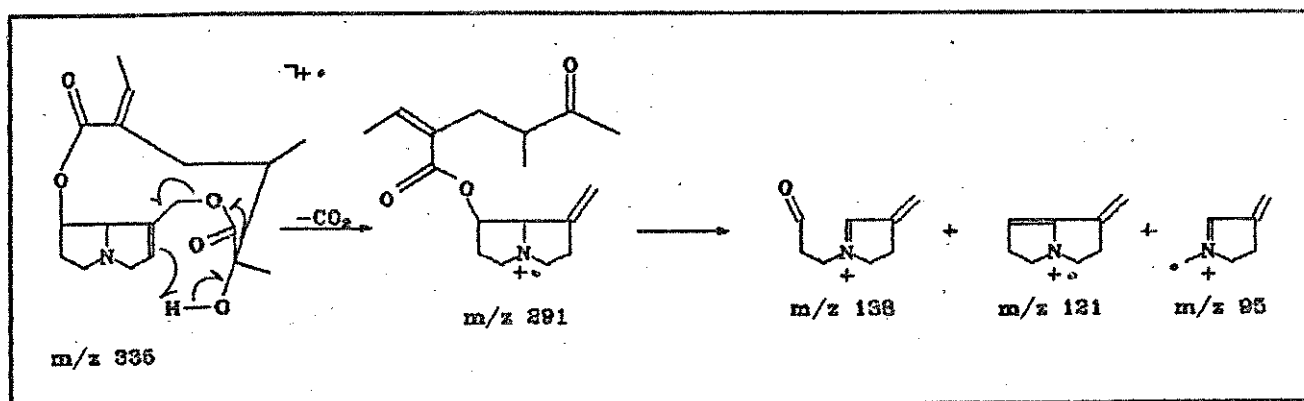


Esquema 2.9a. (de Bradenkamp 1991)

2. Rearranjos de MacLafferty através de estados de transição de 8 membros envolvendo o hidrogênio do C-3 da base com a carbonila do éster, levam aos íons m/z 136, 119 e 93 (Esquema 2.9b).



3. A perda de CO_2 pelo íon molecular 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 (Esquema 2.9c).

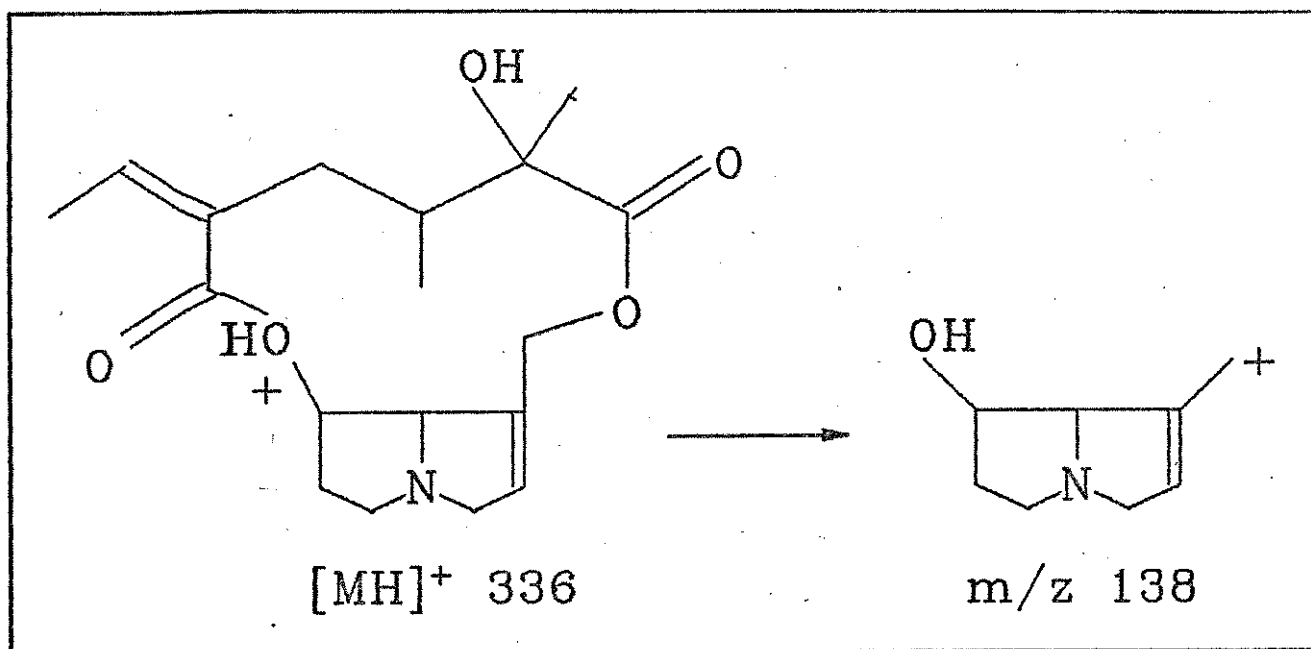


Esta fragmentação é consistente com a fragmentação dos alcalóides 34-35 (Figuras 2.33-2.34 - Apêndice), embora estas não apresentem o íon molecular, o qual é confirmado por EM-ICP (ver abaixo no item 1.1.4.2).

A fragmentação de alcalóides macrocíclicos de 14 membros (32 e 33), apresentam íon característicos a m/z 296 e 310 respectivamente, relacionados com a perda de 143 uma ($C_7H_{11}O_3$) do íon molecular a m/z 439 e 453 (Figuras 2.35 e 2.36 - Apêndice). Este fragmento caracteriza estes macrocíclicos de 14 membros (Edgar *et al.* 1980b, Abe *et al.* 1991). O restante da fragmentação não apresenta grandes modificações em relação aos macrocíclicos de 11 ou 12 membros.

1.2.4.2. ESPECTROMETRIA DE MASSA DE IONIZAÇÃO QUÍMICA POSITIVA.

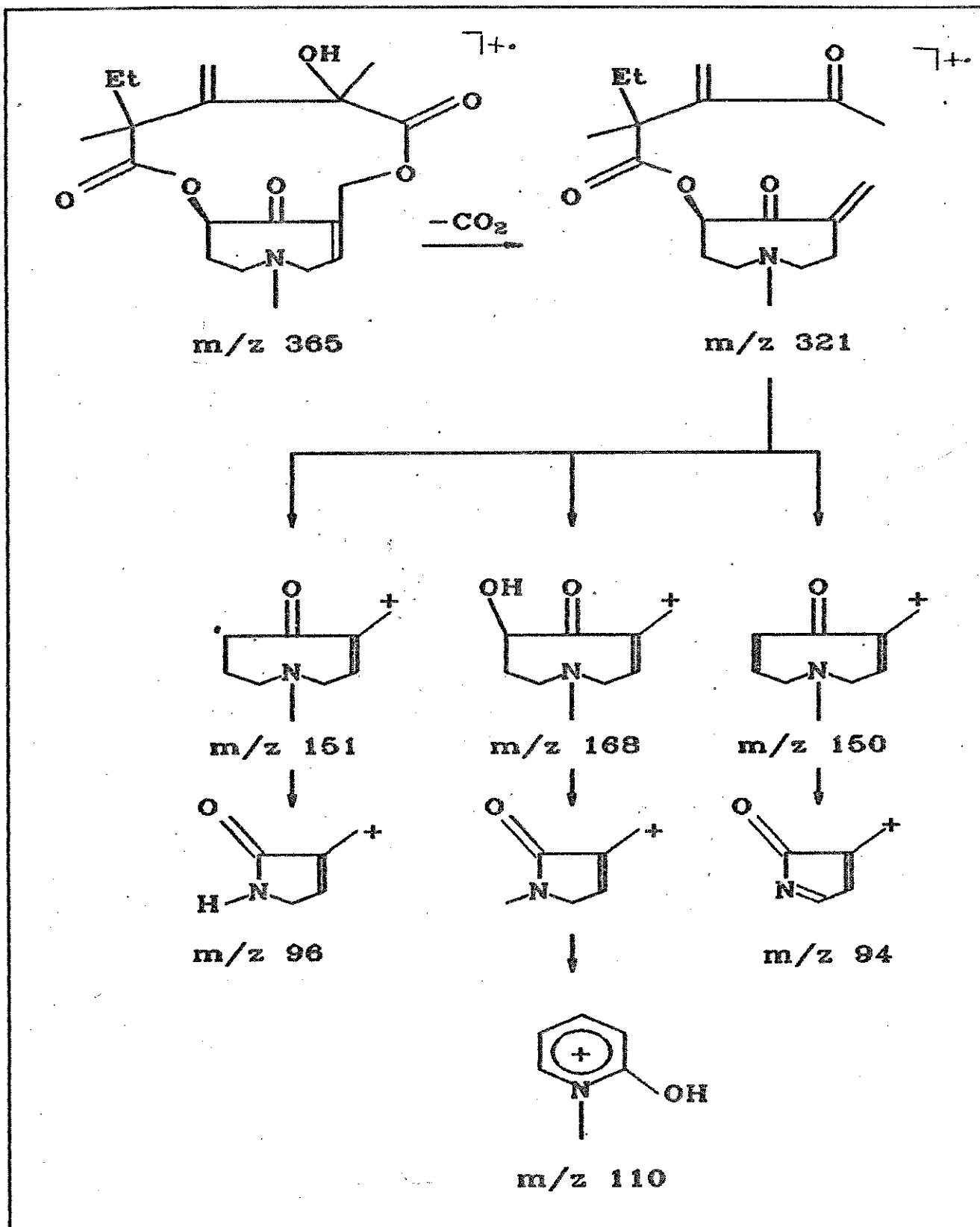
A fragmentação de EM-ICP dos alcalóides macrocíclicos 1,2 insaturados (Figuras 2.33-2.36 - Apêndice) apresentam um padrão semelhante. O íon $[MH]^+$ é abundante, sendo muitas vezes o pico base. A protonação do oxigênio do éster carbonílico a C-7, seguida por um ataque nucleofílico pelo oxigênio do éster alquílico, resulta numa migração de carga para o C-9. Isto leva a formação do íon a m/z 138 (Esquema 2.10); a perda de água pelo íon a m/z 138 leva ao íon a m/z 120 (Hendriks *et al.* 1991).



Esquema 2.10.

1.2.5. MACROCÍCLICOS COM BASE OTONECINA.

Alcalóides macrocíclicos com a base necina do tipo otonecina tiveram seu padrão de fragmentação de massas estudados por Cava *et al.* (1968). Na fragmentação do alcalóide 31 (Figura 2.37 - Apêndice), a perda de CO_2 pelo íon molecular m/z 365 através de um provável estado de transição de 8 membros, semelhante ao do Esquema 2.9c, leva ao íon-fragmento m/z 321, o qual origina os outros diversos fragmentos observados a m/z 168, 150, 151, 110, 96 e 94 (Esquema 2.11).



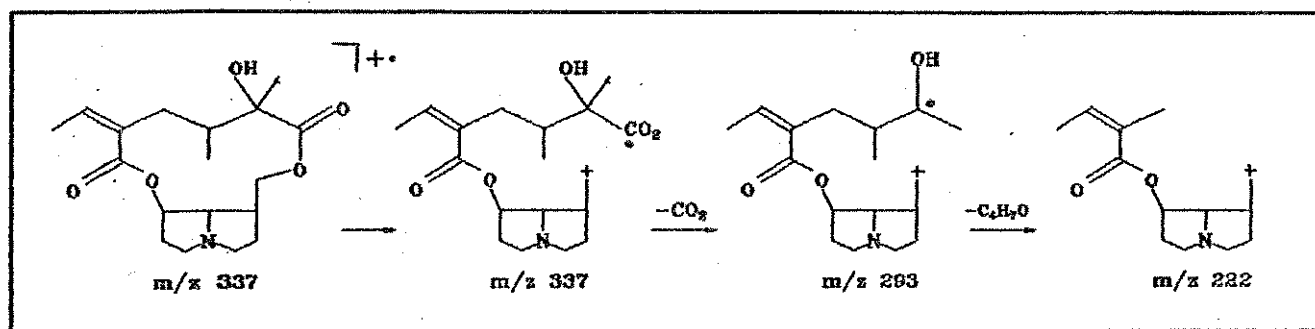
Esquema 2.10. (de Cava et al. 1968)

Não foram realizados estudos de EM-ICP desse alcalóide.

1.2.6. MACROCICLICOS 1,2-SATURADOS.

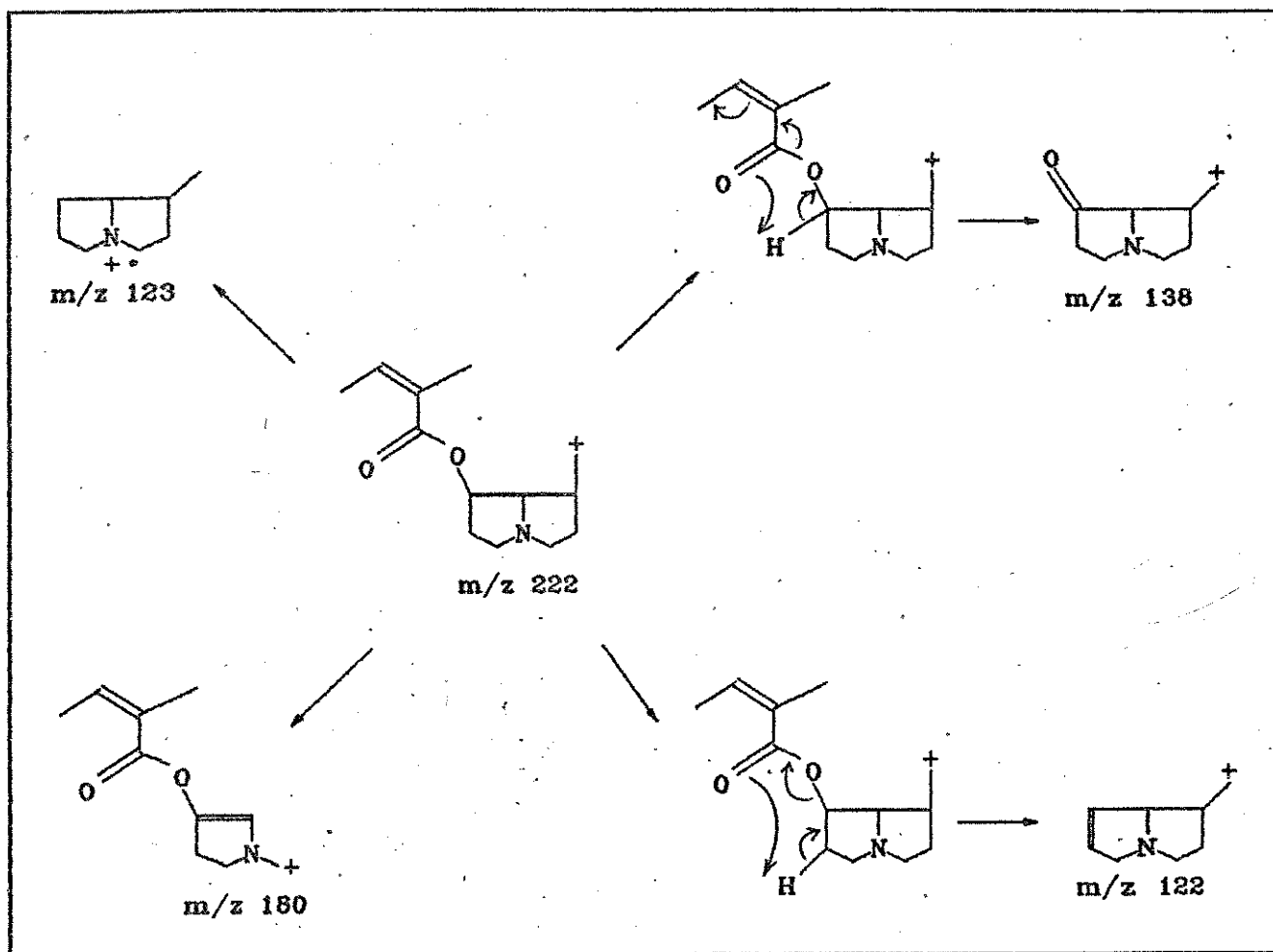
A fragmentação de EM-IE do alcalóide da Figura 2.38 (ver Apêndice), apresentando picos a m/z 123, 122 e 82, é característica de PAs macrocíclicos insaturados, propondo-se a estrutura 30 para este PA. A fragmentação destes PAs foi inicialmente descrita por Culvenor *et al.* (1968) para platifilina (30a), neoplatifilina (30b) e por Nghia *et al.* (1976) para bulgarsenina (30c), um alcalóide macrocíclico raro com ácido nécico de 13 membros.

O íon molecular do PA 30 é pouco abundante. A perda do CO_2 levando ao íon radicalar m/z 293 não é observada, entretanto o íon a m/z 222 deve ser formado via através da perda de $\text{C}_4\text{H}_7\text{O}$ por parte de m/z 293 (Esquema 2.12a).

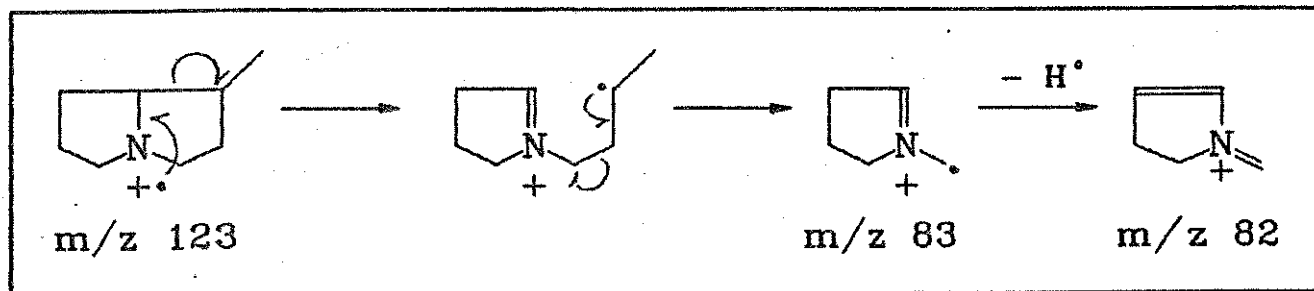


Esquema 2.12a.

O íon a m/z 222 deve ser o precursor dos íons a m/z 180, 138, 122 e do íon radicalar a m/z 123 (Esquema 2.12b). Este último origina o íon a m/z 82 (Esquema 2.12c).



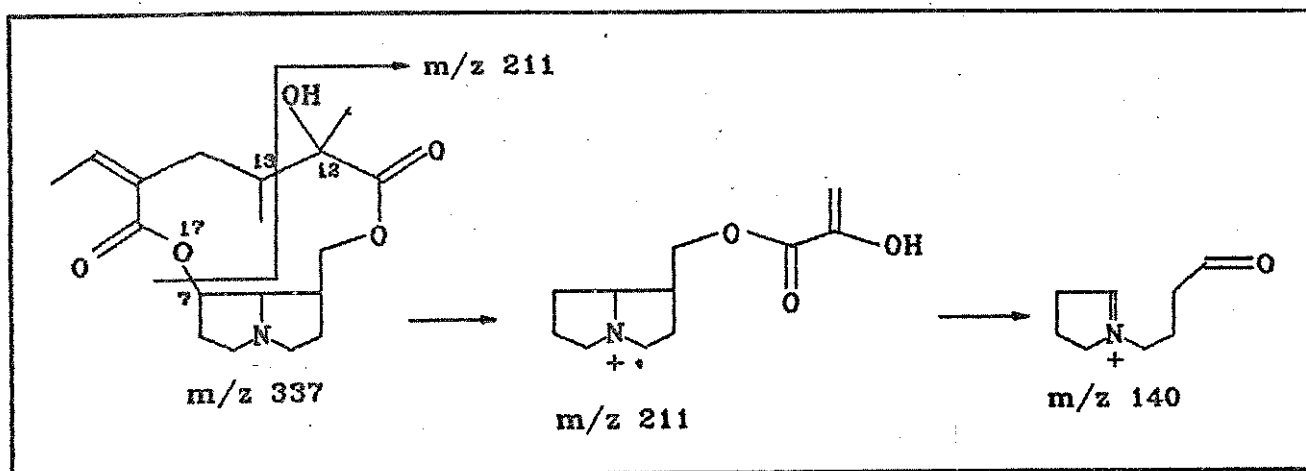
Esquema 2.12b.



Esquema 2.12c.

Outro fragmento importante é o íon a m/z 211 devido a perda de $C_7H_{10}O_2$. A perda de $C_3H_5O_2$ por parte do íon cation a m/z 211

leva ao pico base a m/z 140 (Esquema 2.12d).



Esquema 2.12d.

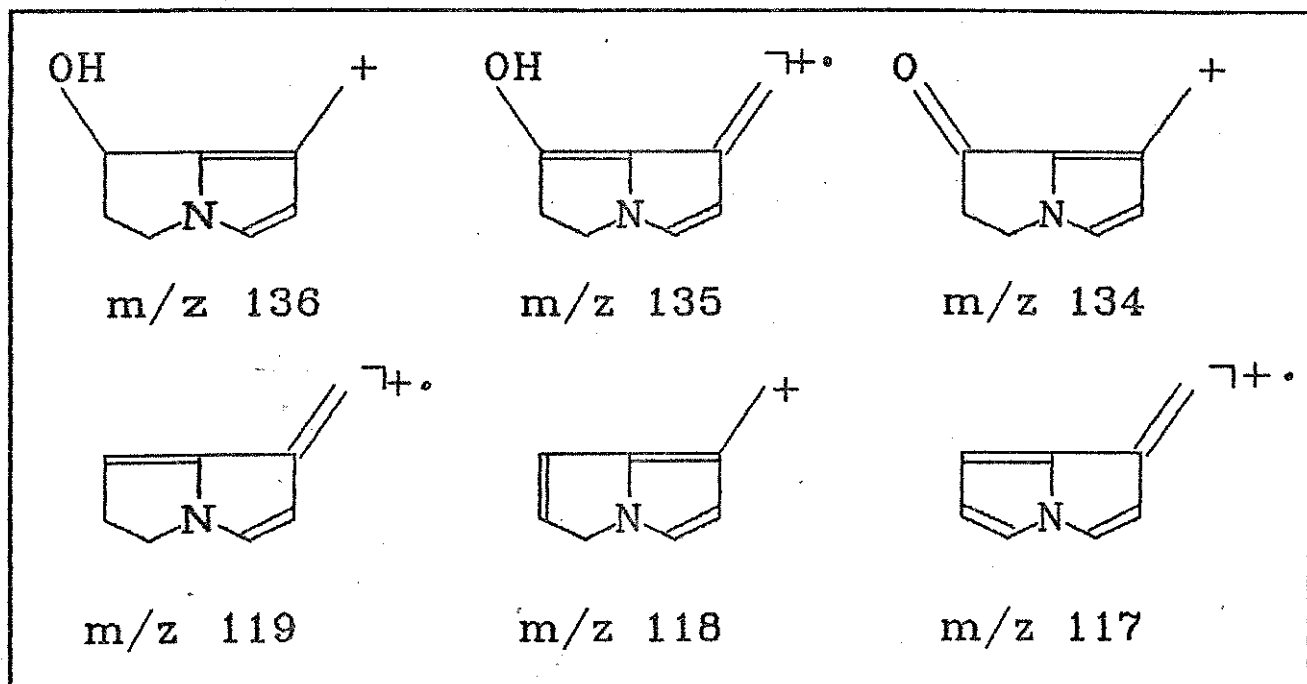
Não foi feito EM-IC desse alcalóide.

1.1.7. DESIDROPIRROLIZINAS.

Desidropirrolizinas foram encontradas em pequenas quantidades neste estudo de GC-EM. Provavelmente o método ácido/básico de fracionamento de PAs levou a destruição destas. Desidropirrolizinas polimerizam na presença de ácidos e reagem facilmente com nucleófilos (Culvenor *et al.* 1969, 1970a,b). As desidropirrolizinas também podem se originar em pequenas quantidades de PAs 1,2-insaturados após longo tempo de exposição a oxigênio atmosférico (Culvenor *et al.* 1970a,b).

Quanto a EM-IE, poucos estudos foram feitos. Mattocks (1969) comenta a fragmentação de 38 (Figura 2.39 - Apêndice), apresentando os íons a m/z 135, 134, 119, 118 e 117 como

característicos deste composto (Esquema 2.13).



Esquema 2.13. (de Mattocks 1969).

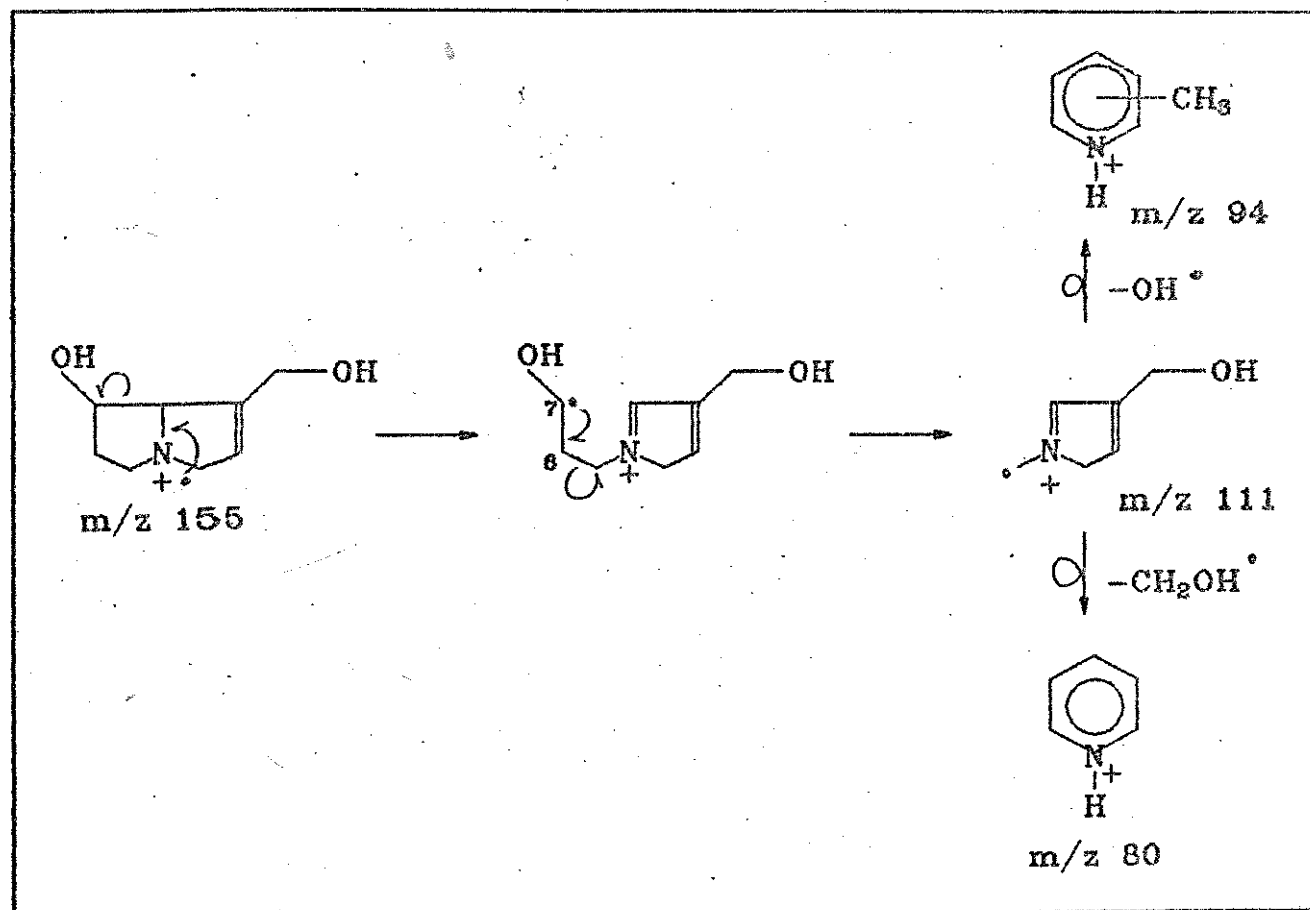
O composto 39 (conhecido por hidroxidanaidal - 1-formil-7-hidroxi-6,7-desidro-5H-pirrolizina) foi caracterizado através de sua fragmentação de EM-IE (Figura 2.40 - Apêndice) comparada com os dados de Culvenor *et al.* (1970). A fragmentação de EM-IE da Figura 2.41 (ver Apêndice), leva a proposição do PA 28, baseando-se somente no íon a m/z 117, entretanto mais estudos devem ser efetuados.

1.1.8. BASES NECINAS.

A fragmentação de EM-IE das bases necinas mais comuns (tipos 1, 2, 3 e 4) foram elucidadas por Neuner-Jehle *et al.* (1965). No presente trabalho estas bases foram encontradas

somente como traços, originando-se provavelmente da hidrólise de PAs por ocasião da extração e fracionamento.

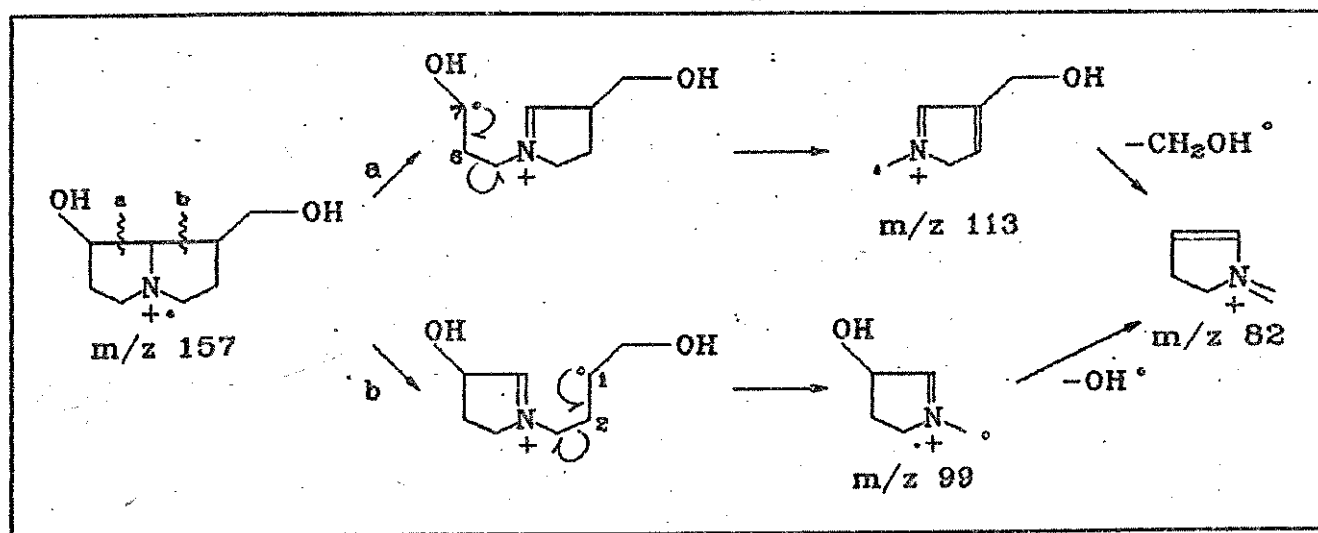
A fragmentação de 1 (retronecina ou heliotridina) é apresentada na Figura 2.42 (ver Apêndice), e o mecanismo de fragmentação no Esquema 2.14a. O íon a m/z 138 é $[M-OH]^+$, e a m/z 124 é $[M-CH_2OH]^+$. A clivagem homolítica do íon molecular (m/z 155) entre C-7 e C-6 leva ao íon a m/z 111. A perda do OH por parte deste leva ao íon a m/z 94 e a perda de CH_2OH leva ao íon a m/z 80 (pico base).



Esquema 2.14a. (de Neuner-Jehle *et al.* 1965)

No caso de bases necinas do tipo 2 (supinina), a fragmentação apresenta 16 unidades de u.m.a a menos no caso dos íons a m/z 139 (íon molecular), 122 ($[M-OH]^+$), 108 ($[M-CH_2OH]^+$); o restante dos íons são iguais aos de 1 (Figura 2.43 - Apêndice).

A fragmentação de 3 (platinecina, hastanecina, turneforcidina e diidroxiheliotridana) é apresentada na Figura 2.44 (ver Apêndice) e o mecanismo de fragmentação no Esquema 2.14b. A clivagem homolítica do íon molecular (m/z 157) entre C-7 e C-6 leva ao íon a m/z 113; a perda de CH_2OH leva ao íon a m/z 82 (pico base). A clivagem homolítica do íon molecular entre C-1 e C-2 leva ao íon a m/z 99; a perda de OH leva ao íon a m/z 82 (pico base).

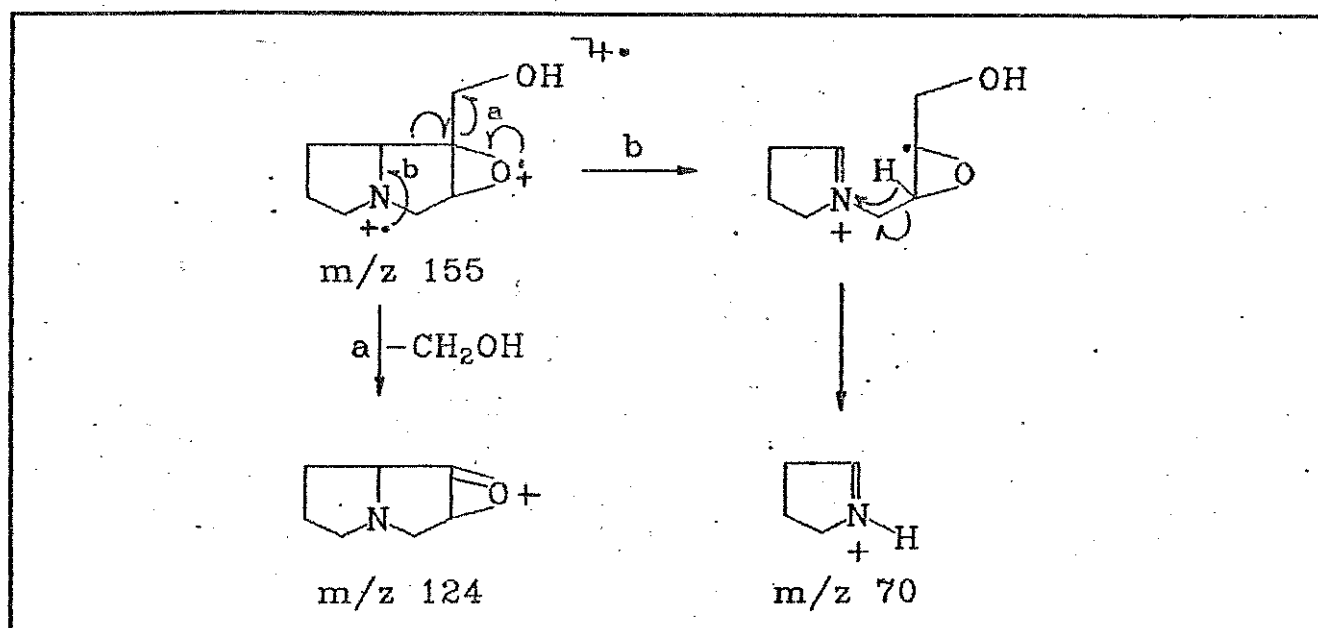


Esquema 2.14b (de Neuner-Jehle *et al.* 1965).

No caso de bases necinas do tipo 4 (isoretronecanol e traquelantamida), a fragmentação apresenta 16 unidades de u.m.a a menos no caso dos íons a m/z 141 (íon molecular), 97

($[[M-CH_2=CHCH_2OH]^+$); o restante dos íons são iguais aos de 3.

A base 29 é um epóxido de 2. Sua fragmentação (Figura 2.45 - Apêndice) e o mecanismo de fragmentação (Esquema 2.15) são similares a um PA, a 1-metoximetil-1,2-epoxipirrolizidina, o qual foi isolado de *Crotalaria trifoliastrum* por Culvenor *et al.* (1962).



Esquema 2.15.

2. ELUCIDAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DE PAs DE FONTES NATURAIS.

Os alcalóides de estrutura 6 e 13 foram os monoésteres 1,2-insaturados isolados e identificados, em fontes vegetais analisadas durante esta pesquisa. Estes alcalóides estavam presentes em maior abundância nas fontes vegetais analisadas. Nestas fontes foram isolados e identificados até o presente momento 4 diastereoisômeros de 6 e 3 diastereoisômeros de 13.

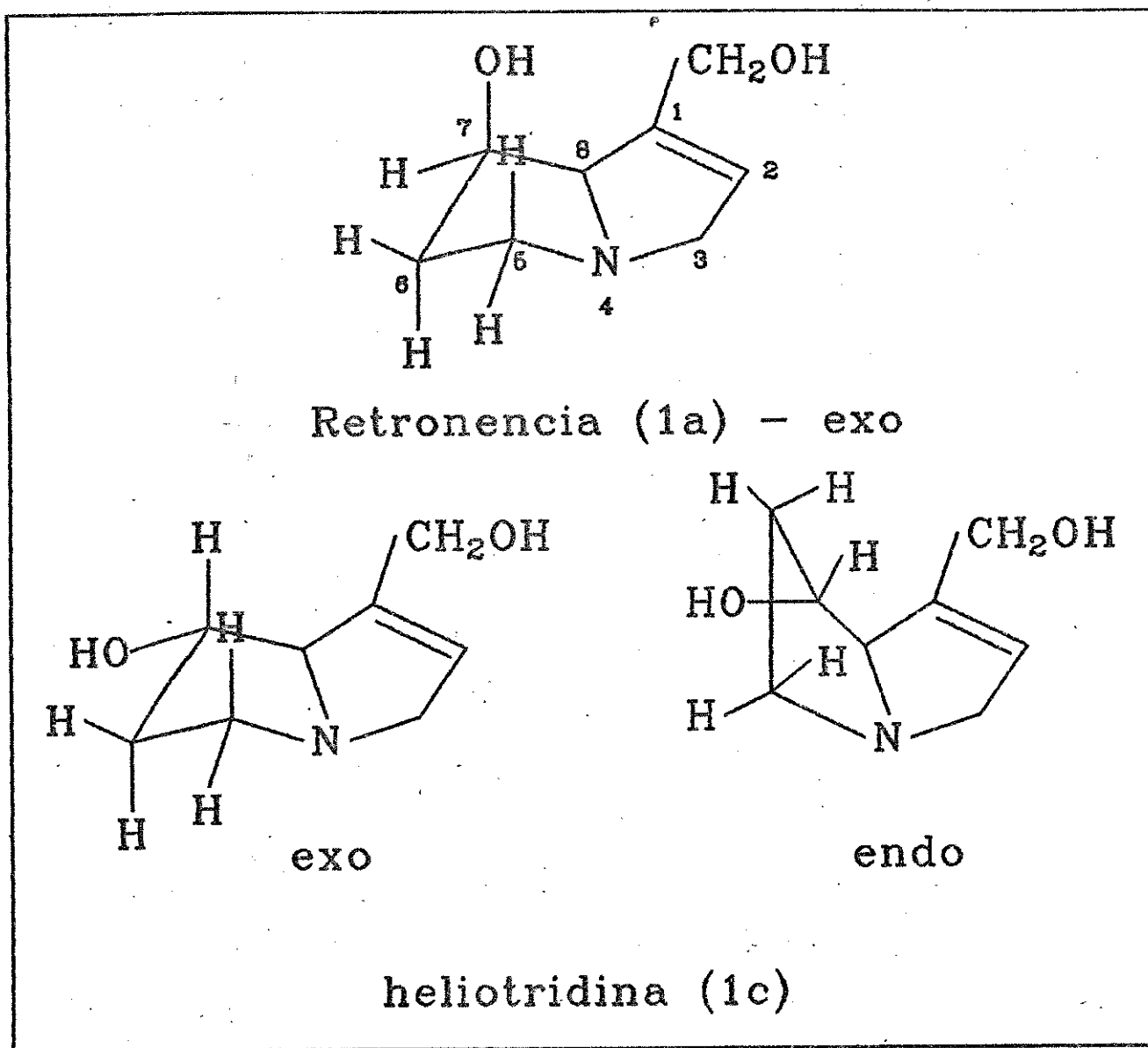
2.1. CARACTERIZAÇÃO DE MONOESTERES 1,2-INSATURADOS POR RMN.

2.1.1. ¹H RMN.

A análise do comportamento espectrométrico de ¹H RMN de PAs foi inicialmente estudada por Culvenor *et al.* (1965). Este estudo realizado em 60MHz, e que ainda são aplicados em estudos em 270, 300 e 400 MHz, mostra alguns fatores que governam o padrão de multiplicidade das bases necinas, retronecina (1a) e heliotridina (1c): 1. os mutipletos da parte saturada e insaturada do anel pirrolizidínico são essencialmente independentes, embora o sistema de prótons sejam conectados através do H-8; 2. os prótons metilênicos geminais em C-3 e C-5 apresentam grandes diferenças no deslocamento químico dentro de cada par; este efeito é provavelmente devido a influência do par desemparelhado de elétrons sobre o átomo de N. A análise dos espectros de RMN dos epímeros retronecina (1a) e heliotridina (1c) também mostrou que 1a e seus derivados ésteres tem uma

conformação dobrada-*exo*¹ (*exo-buckled conformation*), enquanto que *1c* e seus derivados ésteres são geralmente uma mistura de conformeros dobrados-*exo* e *endo*, os quais se interconvertem rapidamente (Esquema 2.16).

1. O sentido do dobramento é definido pela posição relativa do átomo C-6 da parte saturada do anel e dos átomos C-1, C-2, C-3, N-4, C-8 da parte insaturada do anel, com respeito ao plano definido pelos átomos N-4, C-5, C-7. Se eles estão do mesmo lado deste plano, o dobramento é *endo*, e se eles estão do lado oposto, *exo* (Wodak 1975).

Esquema 2.16. (de Culvenor *et al.* 1965)

Outro fator que se pode verificar pela análise de RMN é a posição da esterificação (C-7 ou C-9) em monósteres 1,2-insaturados. O efeito da acilação de um grupo OH, deslocando os sinais de prótons do mesmo carbono para campo mais baixo é um excelente guia para verificar a posição de esterificação de monoésteres (Culvenor & Woods 1965). Por exemplo, em 9-O-(-)-

viridiflorato de (+)-retronecina (licopsamina, 6c, em Roeder & Bourauel 1992), o sinal de H-7 está em 84,27, e é similar ao sinal de H-7 da retronecina (1a). Entretanto o H-9 de 6c em 84,83 e 4,73 está deslocado para campo mais baixo em relação ao H-9 de 1a (84,29 e 4,06). Na 7-0(-)-viridiflorato de (+)-retronecina (iso-licopsamina, iso-6a, em Ravi *et al.* 1990), o sinal H-7 está em 85,56 (campo mais baixo em relação a 1a) e o sinal de H-9 em 84,29 e 4,03 (semelhante a 1a).

Como no presente trabalho foram isolados unicamente 9-0-ésteres de 1, a elucidação estrutural desta série feita a partir da análise dos dados de ^1H RMN é baseada em 4 fatores empíricos:

1. Diferença entre os deslocamentos químicos dos H-9 diastereotópicos geminais (Δ H9).
2. Diferença entre os deslocamentos químicos dos grupos metila do isopropil da parte ácida (Δ H6', H7').
3. Deslocamento químico de H-4' e H-5' da parte ácida.
4. Deslocamento químico de H-2 e H-7 da base necina.

Culvenor & Woods (1965) discutiram inicialmente a não equivalência entre os protons geminais em H-9, os quais mostram um padrão de deslocamento químico AB. Segundo estes autores os volumosos grupos substituintes- α nos ácidos esterificantes restringiriam a rotação sobre a ligação acil $\text{CH}_2\text{-O}$. Como os estudos foram feitos em 60MHz, os protons H-9 da retronecina 1a se apresentavam equivalentes. Atualmente, estudos de 300MHz mostram que estes protons também apresentam um padrão AB.

Sugere-se aqui que a não equivalência dos prótons H-9 pode estar relacionada com pontes de H entre as hidroxilas da parte

ácida e a hidroxila no C-7 da base (ver Wodak 1975, MacKay *et al.* 1983 e Figura 4.9, Capítulo 4) formando uma conformação "pseudo macrocíclica", no caso de 9-O-ésteres. No caso de 1, a não equivalência pode estar relacionada com pontes de H entre os OH dos C-7 e C-9. Entretanto curiosamente, a base 2 também apresenta não equivalência entre os prótons a H-9, sem apresentar a hidroxila no C-7, embora bases do tipo 4, sem OH em C-7 e saturadas, apresentem um $\Delta H_9 = 0$ (Mohanraj & Herz 1982).

Mohanraj & Herz (1982) observaram que traquelantatos e viridifloratos apresentavam uma grande diferença no grau de não equivalência exibida pelos prótons a H-9. Entretanto este padrão é útil somente para distinguir ésteres da base 4 (ver Tabela 2.3). No caso de ésteres de 1, o valor de ΔH_9 é utilizado para distinguir entre ésteres do ácido (+) do (-) traquelântico (Zalkow *et al.* 1985, Asibal *et al.* 1989) (Tabela 2.3). A distinção entre ésteres de ácidos (+) e (-) viridiflóricos não é possível. Entretanto derivados de isopropilidenos destes alcalóides apresentam ΔH_9 diferentes: ésteres de ácido (-) viridiflórico apresentam um ΔH_9 igual ao produto não derivatizado e menor que ésteres do seu (-)-enantiomero derivatizado (Zalkow *et al.* 1985, Asibal *et al.* 1989).

Em relação a diferença entre os deslocamentos químicos dos grupos metila do isopropil da parte ácida ($\Delta H_6', H_7'$), Culvenor & Smith (1966) mostraram que viridifloratos de 1 tendem a apresentar os grupos metila do isopropil magneticamente mais não equivalentes do que traquelantatos (Tabela 2.3). Estes parâmetros podem ser estendidos para viridifloratos e

traquelantatos de 2 (Roeder & Bourauel 1992, Liu *et al.* 1992) e de 4 (Mohanraj & Herz 1982). Ésteres de 3 ainda não foram estudados.

Empiricamente o deslocamento químico de H-4' e H-5' da parte ácida também apresenta diferenças entre viridifloratos e traquelantatos. O deslocamento químico dos prótons metílicos (H-4') é maior em viridifloratos do que em traquelantatos, o mesmo acontecendo com o deslocamento químico de H-5' (Tabela 2.3). Estes parâmetros são utilizados na diferenciação entre viridifloratos e traquelantatos de 1 (Zalkow *et al.* 1985, Asibal *et al.* 1989), 2 (Roeder & Bourauel 1992, Liu *et al.* 1992) e 4 (Mohanraj & Herz 1982). Ésteres de 3 ainda não foram estudados.

O deslocamento químico de H-2 da base necina fornece informações sobre a estereoquímica da base no C-7. Ésteres de 1a, os quais tem 7 β -OH, apresentam um deslocamento químico de H-2 e H-7 em campo mais baixo do que ésteres de 1c, os quais apresentam 7 α -OH (Culvenor & Smith 1966, Zalkow *et al.* 1985, Asibal *et al.* 1989). Ésteres de 2, os quais não apresentam o substituinte OH no C-7, tem o sinal de H-7 deslocado para campo alto, as vezes apresentando não equivalência entre estes prótons geminais (Roeder & Bourauel 1992, Liu *et al.* 1992).

2.1.2. ^{13}C RMN.

Os estudos mais abrangentes sobre ^{13}C de PAs foram realizados por Jones *et al.* (1982) e Molineaux *et al.* (1982), embora revisões sobre espectros de ^{13}C fossem realizadas por Roeder (1990, 1991). Empiricamente observa-se que, para os 9-0-

ésteres de 1, os deslocamentos químicos de ^{13}C só nos fornecem informações sobre a estereoquímica da base necina. Quando o éster possui a base 1a ($7\beta\text{-OH}$), o deslocamento químico em C-1' é $\delta 132$, em C-2 $\delta 130\text{-}131$ e em C-7 $\delta 71$. Quando o éster possui a base heliotridina ($7\alpha\text{-OH}$), o deslocamento químico em C-1 é $\delta 136$, em C-2 $\delta 125\text{-}126$ e em C-7 $\delta 74$ (Roeder & Bourauel 1992, Liu *et al.* 1992).

Informações que permitam diferenciar a estereoquímica do ácido esterificante de ésteres de PAs com a base 1, quando estes pertencem a uma mesma série (p.e. traquelântico e viridiflórico), são fornecidas pelo C-1', C-3' e C-4'. O deslocamento químico de C-1' e C-4' são deslocados para campo mais alto 1,24 ppm e 1,18, respectivamente, em viridifloratos, e o deslocamento químico de C-3' é deslocado para campo mais baixo 2,02 ppm (Jones *et al.* 1982).

Tabela 2.3. Padrões de deslocamento químicos (ppm) e $\Delta \delta$ de PAs, ésteres no C-9 de ácidos traquelântico e viridiflórico (em CDCl_3).

ésteres de (+)-heliotridina (Asibal *et al.* 1989).

	viridiflorato		traquelantato	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Δ H9	0,30	0,22	0,02	0,31
Δ H6',H7'	0,04	0,05	0,01	0,02
H4'	1,24	1,25	1,16	1,17
H5'	2,13	2,13	1,98	1,94

ésteres de (+)-retronecina (Zalkow *et al.* 1985)

	viridiflorato		traquelantato	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Δ H9	0,15	0,11	0,09	0,50
Δ H6',H7'	0,06	0,05	0,01	0,03
H4'	1,25	1,25	1,19	1,15
H5'	2,14	2,16	2,03	2,03

ésteres de supinidina

(^a Mohanraj *et al.* 1982, ^b Roeder & Bourauel 1992, ^c Liu *et al.* 1992).

	viridiflorato		traquelantato	
	(+) ^a	(-) ^b	(+) ^c	(-) ^a
Δ H9	0	0,02	0,04	0
Δ H6',H7'	0,05	0,04	0,03	0,01
H4'	1,25	1,22	1,20	1,25
H5'	2,17	2,14	2,01	2,04

ésteres de traquelantamidina (Mohanraj & Herz 1982)

	(+)-viridiflorato	(-)-traquelantato
Δ H9	0,05	0,59
Δ H6',H7'	0,06	0,02
H4'	1,27	1,19
H5'	2,12	2,09

ésteres de isoretronecanol (Mohanraj & Herz 1982)

	(+)-viridiflorato	(-)-traquelantato
Δ H9	0,07	0,53
Δ H6',H7'	0,06	0,01
H4'	1,27	1,19
H5'	2,16	2,07

2.2. ROTAÇÃO ÓTICA EM PAS.

Observações sobre a rotação ótica de PAS sugerem que o sinal da rotação ótica da base necina seja determinante para o sinal da rotação ótica de 9-O-monoésteres (19 alcalóides verificados, somente 2 exceções encontradas - ver Tabela 2.4), isto é, PAS com bases necinas com $[\alpha]_D$ positivo apresentam o seu $[\alpha]_D$ também positivo, independente da rotação ótica do ácido nécico.

Tabela 2.4. Rotação ótica ($[\alpha]_D$) de PAs (9-O-ésteres) e suas respectivas bases necinas e ácidos nécicos.

PA	$[\alpha]_D$	Base necina	Ácido nécico	Ref.
Indicina (6a)	+22,3	(+)-retronecina	(-)-traquelântico	1
Intermedina (6b)	+4,7	(+)-retronecina	(+)-traquelântico	1
Licopsamina (6c)	+3,3	(+)-retronecina	(-)-viridiflórico	1
Rinderina (6d)	+24,6	(+)-heliotridina	(+)-traquelântico	1
Equinatina (6e)	+12,8	(+)-heliotridina	(-)-viridiflórico	1
6f	+1,6	(+)-retronecina	(+)-viridiflórico	2
6g	+6,7	(+)-heliotridina	(+)-viridiflórico	3
6h	+9,0	(+)-heliotridina	(-)-traquelântico	3
Supinina (13a)	-13,0	(-)-supinidina	(+)-traquelântico	4
Amabilina (13b)	-7,1	(-)-supinidina	(-)-viridiflórico	5
Cinaustina (13d)	+13,2	(+)-supinidina	(-)-viridiflórico	5
Cinaustralina (15a)	+48,0	(+)- isoretronecanol	(-)-viridiflórico	5
Heliocurassavinina (15b)	+0,3	(+)- traquelantamidina	(-)-traquelântico	6
Heliocurassavina (16a)	-14,9	(-)- isoretronecanol	(-)-curassavico	6
Heliocurassavicina (15c)	+0,3	(-)- isoretronecanol	(-)-traquelântico	6
Coromandalina (15d)	-6,9	(-)- traquelantamidina	(+)-viridiflorico	7
Heliovicina (15e)	-2,7	(-)- traquelantamidina	(-)-traquelântico	7
Curassavina (16b)	+0,9	(-)- traquelantamidina	(-)-curassavico	7
Curassavina N-óxido	-6,6	(-)- traquelantamidina	(-)-curassavico	7

1. Culvenor & Smith (1966); 2. Zalkow *et al.* (1985); 3. Asibal *et al.* (1989); 4. Crowley & Culvenor (1959); 5. Culvenor & Smith (1967); 6. Mohanraj *et al.* (1982); 7. Subramanian *et al.* (1980).

2.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PAs EM *Eupatorium laevigatum*.

2.2.1. *Eupatorium laevigatum* de Ouro Preto, MG.

De *Eupatorium laevigatum*, coletado no Morro da Forca em Ouro Preto, MG no mês de fevereiro de 1990, foram isolados 4 alcalóides.

A análise inicial por CG-EM mostrou a presença de dois diastereoisômeros de 13 e dois diastereoisômeros de 6. Com base em seus IRK supôs-se que eram respectivamente traquelantatos e viridifloratos de supinidina (IRK 1974 e 1985 respectivamente) e traquelantatos e viridifloratos de heliotridina (IRK 2154 e 2172 respectivamente) (Tabela 3.1, Capítulo 3).

Baseando-se nos dados acima adaptou-se o método desenvolvido Frahn *et al.* (1980) para separação desta mistura de PAs, através de coluna de partição cromatográfica, utilizando-se Celite 545 impregnada com solução de bórax e eluindo-se com CHCl_3 . Este método baseia-se na complexação dos grupos dióis vicinais de PAs monoésteres com ácidos esterificantes do tipo traquelântico e viridiflórico com a fase fixa da coluna (borax).

Estudando-se a projeção de Newman em torno da ligação $\text{C}2'-\text{C}3'$ de traquelantatos (p.e. intermedina 6b) verifica-se que os grupos hidroxilas eclipsados (uma condição ideal para a formação de um complexo de borato de 5 membros) são desestabilizados devido a uma interação estérica entre os grupos $\text{C}2'$ -isopropil e $\text{C}3'$ -metil (Figura 2.46). O viridiflorato correspondente (p.e. licopsamina 6c) mostra como suas hidroxilas eclipsadas levam a uma conformação mais estável, devido ao grupo $\text{C}2'$ -isopropil

interagir somente com o grupo $C3'-H$ (Figura 2.46). Portanto, o complexo desestabilizado (traquelantato) é eluído inicialmente na coluna de partição e o complexo mais estável (viridiflorato) é retido por mais tempo.

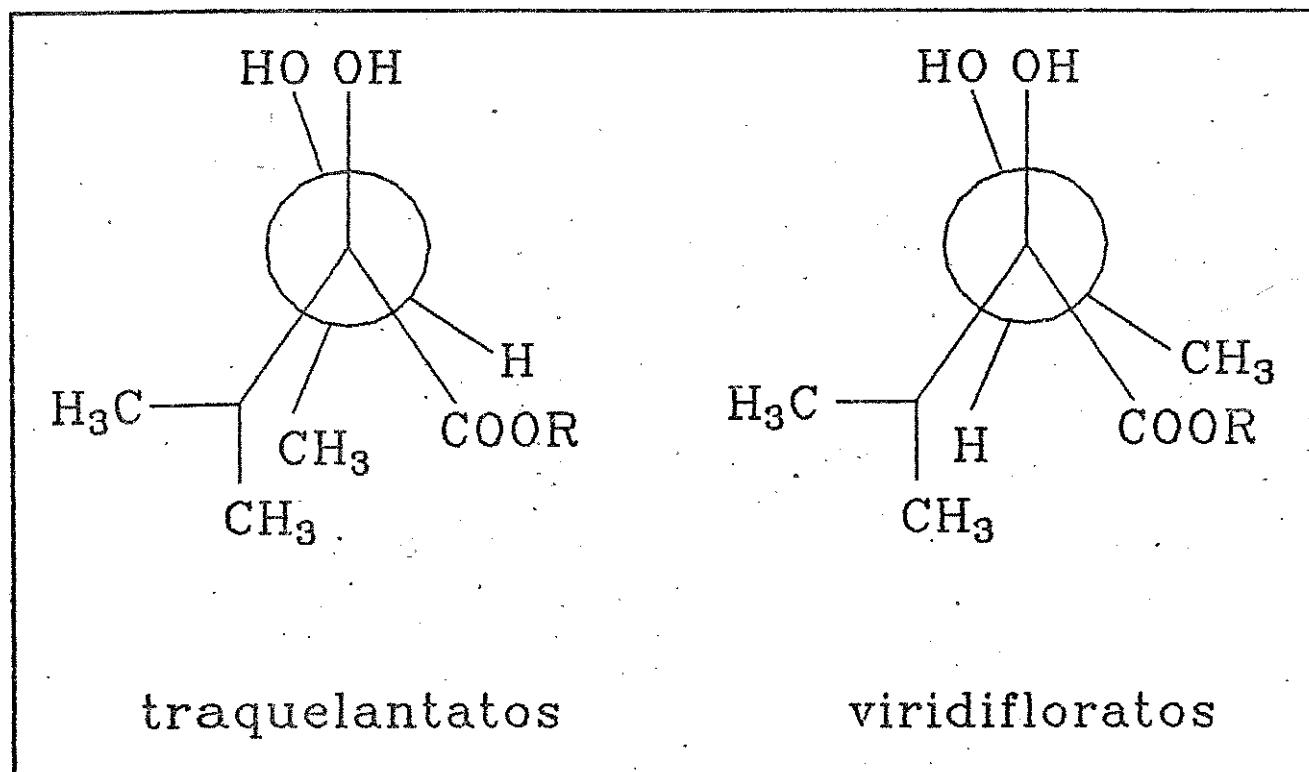


Figura 2.46. Projeção de Newman de traquelantatos e viridifloratos em torno da ligação $C2'-C3'$.

A ausência do grupo 7-OH aumenta a solubilidade dos alcalóides em $CHCl_3$ separando-se também eficientemente os PAs 13 de 6. Portanto a ordem de eluição desta mistura de PAs foi 13a (traquelantato de supinidina), 13b (viridiflorato de supinidina), 6d (traquelantato de heliotridina) e 6e (viridiflorato de heliotridina). Este último alcalóide ficava retido por muito tempo na coluna, sendo necessária uma exaustiva eluição com $CHCl_3$

(4-5 vezes mais solvente orgânico do que o necessário para eluir metade da quantidade de 6d), e ainda assim sua recuperação não correspondia a proporção encontrada nas análises por CG-EM; os alcalóides 13a e 13b também eram recuperados em uma proporção menor a encontrada por CG-EM (Tabela 2.5).

Tabela 2.5. Quantificação de PAs em *Eupatorium laevigatum* coletado em Ouro Preto, utilizando-se diferentes metodologias de análise e separação.

PAs	Porcentagem de PA encontrado por	
	Coluna de Partição impregnada com Borax	CG-EM
13a	5	8
13b	4	10
6d	57	33
6e	34	47

O alcalóide 13a foi obtido como cristal (P.F. 148-149°), apresentando um $[\alpha]_D = -10,2^\circ$, representando uma base necina de $[\alpha]_D$ negativo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 13 (Tabela 2.2, Figura 2.13), sendo este alcalóide um éster de supinidina (2) esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $C_{15}H_{25}NO_4$ ($[M]^+$ 283). O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3333cm^{-1}), éster (1743),

dupla ligação de C (1638cm^{-1}) e amina (1265cm^{-1}) (Figura 2.47). O espectro de ^{13}C (Figura 2.48) mostra sinais a δ 137,7 e 125,7, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2 da base necina. Os sinais a δ 71,5 (C-8), 61,9 (C-3), 56,9 (C-5), 30,2 (C-7) e 26,0 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina supinidina (Tabela 2.7). O espectro de ^1H RMN mostra os sinais característicos de um éster da base necina supinidina a δ 5,70 (1H, m, H-2) e 1,54 (2H, m, H-7), e de um éster de ácido (+) traquelântico a δ 4,07 (1H, q, $J=6,4\text{Hz}$, H-3') e 1,22 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$, H-4'); δ 2,04 (1H, sep, $J=6,9\text{Hz}$, H-5') acoplado com H-6' a δ 2,94 (3H, d, $J=6,9\text{Hz}$) e H-7' a δ 2,96 (3H, d, $J=6,9\text{Hz}$), e $\Delta H_9=0$ (Tabela 2.6, Figura 2.49). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 400 MHz e ^{13}C RMN a 106 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.50 e 2.51 respectivamente). A comparação dos dados espectrais, rotação ótica e ponto de fusão com dados da literatura (Roeder & Bourauel 1992) mostram que o alcalóide 13a é (-)-supinina.

O alcalóide 13b foi obtido como um óleo, apresentando um $[\alpha]_D=-12,5^\circ$, representando uma base necina com $[\alpha]_D$ negativo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 13 (Tabela 2.2, Figura 2.13), sendo este alcalóide um éster de supinidina (2) esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ ($[\text{M}]^+$ 283). O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3409cm^{-1}), éster (1728cm^{-1}), dupla ligação de C (1654cm^{-1}) e amina (1228cm^{-1}) (Figura 2.52). O espectro de ^{13}C

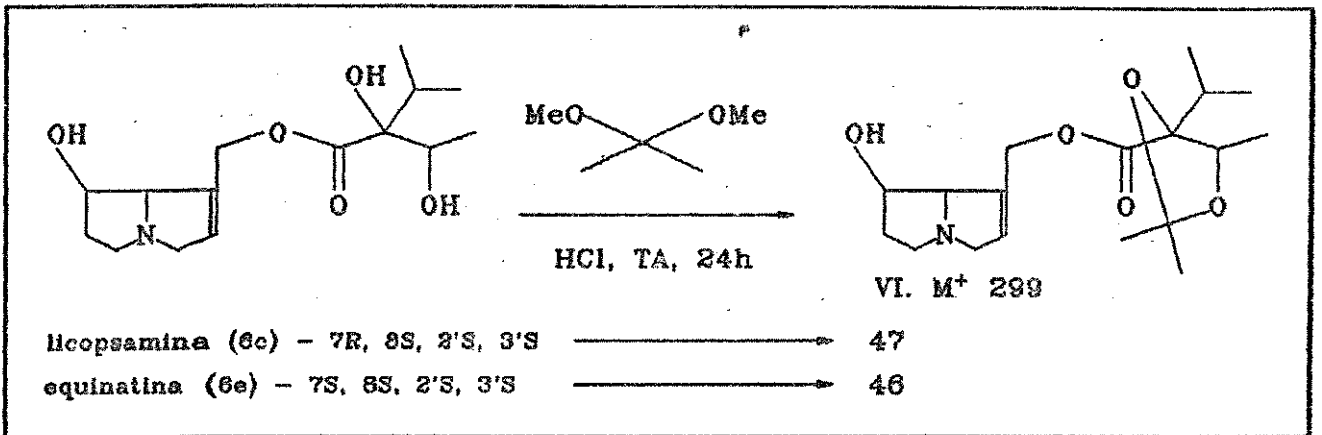
(Figura 2.53) mostra sinais a δ 137,6 e 125,4, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2 da base necina. Os sinais a δ 71,5 (C-8), 61,8 (C-3), 57,3 (C-5), 30,1 (C-7) e 25,9 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina supinidina (Tabela 2.7). O espectro de ^1H RMN (Figura 2.54) mostra os sinais característicos de um éster da base necina supinidina a 55,69 (1H, m, H-2) e 1,55 (2H, m, H-7), e de um éster de ácido viridiflórico a 84,00 (1H, q, $J=6,6\text{Hz}$, H-3') e 1,25 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$, H-4'), e 82,17 (1H, sep, $J=6,8\text{Hz}$, H-5') acoplado com H-6' a 80,94 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$) e H-7' a 80,89 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$) (Tabela 2.6). Estes sinais não são suficientes para diferenciar entre os ésteres de ácidos (+) e (-) viridiflóricos, ao contrário do que ocorre com os ésteres de ácidos traquelânticos (ver item 2.1 neste Capítulo). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 400 MHz e ^{13}C RMN a 106 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.55 e 2.56 respectivamente). A comparação dos dados espectrais com dados da literatura (Liu *et al.* 1992) sugerem que o alcalóide 13b seja (-)-amabilina.

O alcalóide 6d foi obtido como um óleo, apresentando um $[\alpha]_{\text{D}}=+19,0^\circ$, representando uma base necina de $[\alpha]_{\text{D}}$ positivo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 6 (Tabela 2.2, Figura 2.5), sendo este alcalóide um éster de 1 esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ ($[\text{M}]^+$ 299). O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3384cm^{-1}), éster (1732cm^{-1}) e amina (1232cm^{-1}) (Figura 2.57).

O espectro de ^{13}C mostra sinais a δ 136,0 e 126,7, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2 da base necina. Os sinais a δ 79,2 (C-8), 74,8 (C-7), 61,8 (C-3), 54,1 (C-5) e 33,8 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina heliotridina (1c,d) (Tabela 2.7, Figura 2.58). O espectro de ^1H RMN mostra os sinais característicos de um éster da base necina heliotridina a 55,67 (1H, m, H-2) e 4,12 (1H, t, $J=6,0\text{Hz}$, d, $J=4,3\text{Hz}$, H-7), e de um éster de ácido (+) traquelântico a 54,07 (1H, q, $J=6,4\text{Hz}$, H-3') e 1,17 (3H, d, $J=6,4\text{Hz}$, H-4'); 52,01 (1H, sep, $J=6,9\text{Hz}$, H-5') acoplado com H-6' a 50,91 (3H, d, $J=6,9\text{Hz}$) e H-7' a 50,91 (3H, d, $J=6,9\text{Hz}$), e $\Delta H_9=0,05$ (Tabela 2.6, Figura 2.59). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 400 MHz e ^{13}C RMN a 106 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.60 e 2.61 respectivamente). A comparação dos dados espectrais com dados da literatura (Asibal *et al.* 1989, Liu *et al.* 1992) mostram que o alcalóide 6d é (+)-rinderina.

O alcalóide 6e foi obtido como um óleo, apresentando um $[\alpha]_D^{25}=+10,5^\circ$, representando uma base necina com $[\alpha]_D$ positivo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 6 (Tabela 2.2, Figura 2.5), sendo este alcalóide um éster de 1 esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$. O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3394), éster (1728cm^{-1}), dupla ligação de C (1654cm^{-1}) e amina (1228cm^{-1}) (Figura 2.62). O espectro de ^{13}C mostra sinais a δ 136,2 e 125,9, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2

da base necina. Os sinais a δ 79,8 (C-8), 74,4 (C-7), 62,0 (C-3), 54,2 (C-5) e 33,7 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina heliotridina (1c,d) (Tabela 2.7, Figura 2.63). O espectro de ^1H RMN mostra os sinais característicos de um éster da base necina heliotridina a δ 5,64 (1H, m, H-2) e 4,10 (1H, t, $J=5,8\text{Hz}$, d, $J=3,9\text{Hz}$, H-7), e de um éster de ácido viridiflórico a δ 3,93 (1H, q, $J=6,6\text{Hz}$, H-3') e 1,27 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$, H-4'), e δ 2,15 (1H, sep, $J=6,8\text{Hz}$, H-5') acoplado com H-6' a δ 0,89 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$) e H-7' a δ 0,84 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$) (Tabela 2.6, Figura 2.64). Estes sinais não são suficientes para diferenciar entre os ésteres de ácidos (+) e (-) viridiflóricos, ao contrário do que ocorre com os ésteres de ácidos traquelânticos (ver item 2.1 neste Capítulo), entretanto o derivado isopropilideno deste alcalóide (46) (Esquema 2.17) apresentou um $\Delta H_9 = 0,12$, similar ao $\Delta H_9 (=0,20)$ da parte ácida não derivatizada (Figura 2.65), confirmando que o ácido esterificante é o (-)-viridiflórico (Asibal *et al.* 1989). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 400 MHz e ^{13}C RMN a 106 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.66 e 2.67 respectivamente). A comparação dos dados espectrais com dados da literatura (Asibal *et al.* 1989) sugerem que o alcalóide 6e é (+)-equinatina.



Esquema 2.17.

Tabela 2.6. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ)^a de alcalóides pirrolizidínicos de inflorescências de *Eupatorium laevigatum* coletado em Ouro Preto, MG.

^1H	(-)-supinina (13a)	(-)-amabilina (13b)	(+)-rinderina (6d)	(+)- equinata (6e)
2	5,70m	5,69m	5,67m	5,64m
3a	3,37d(15,9),m	3,37d(15,9),m	3,30, d(16,0)	3,29d(16,0),m
3b	3,91d(15,9),m	3,93d(15,9),m	3,87d(16,0),m	3,90d(16,0),m
5a	2,50d(9,8), t(7,2)	2,52d(9,9), t(7,1)	2,58d(10,1), t(7,0)	2,58d(10,7),t (6,2)
5b	3,13d(9,8), t(5,3)	3,16d(9,9), t(5,3)	3,22d(10,5), t(5,9)	3,21d(10,7),t (6,2)
6a	1,78m [2x]	1,79m [2x]	1,80q(6,0), d(13)	1,79q(6,0), d(12)
6b	-	-	1,94q(6,0), d(13)	1,90q(6,0), d(12)
7a	1,54m	1,55m	4,12t(6,0), d(4,3)	4,10t(5,8), d(3,9)
7b	2,00m	2,00m	-	-
8	4,18m	4,21m	3,89m	3,95m
9a	4,80m [2x]	4,76d(13,2)	4,84d(13,1)	4,77d(13,4)
9b	-	4,79d(13,2)	4,89d(13,1)	4,99d(13,4)
3'	4,07q(6,4)	4,00q(6,6)	4,07q(6,4)	3,93q(6,6)
4'	1,22d(6,4)	1,25d(6,6)	1,17d(6,4)	1,27q(6,6)
5'	2,04sep(6,9)	2,17sep(6,8)	2,01sep(6,9)	2,15sep(6,8)
6'	0,94d(7,0)	0,94d(6,8)	0,91d(6,9)*	0,89d(6,8)
7'	0,96d(6,8)	0,89d(6,8)	0,91d(6,9)*	0,84d(6,8)
OH	2,30	3,1	4,3	4,3

^a Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

* Valores interconvertíveis.

Tabela 2.7. ^{13}C RMN (100,6 MHz, CDCl_3 , δ) de alcalóides pirrolizidínicos de inflorescências de *Eupatorium laevigatum* de Ouro Preto.

^{13}C	(-)-supinina (13a)	(-)-amabilina (13b)	(+)-rinderina (6d)	(+)- equinatina (6e)
1	137,7	137,6	136,0	136,2
2	125,7	125,4	126,7	125,9
3	61,9	61,8	61,8	62,0
5	56,9	57,3	54,1	54,2
6	26,0	25,9	33,8	33,7
7	30,2	30,1	74,8	74,4
8	71,5	71,5	79,2	79,8
9	62,5	62,3	62,3	61,9
1'	175,3	174,7	175,3	174,0
2'	83,0	83,5	83,4	84,1
3'	64,9	70,6	69,3	71,6
4'	17,4	17,3	17,1	17,3
5'	33,0	32,3	33,0	32,2
6'	17,0	16,1	17,2	15,8
7'	17,2	17,7	17,0	17,9

2.2.2. *Eupatorium laevigatum* da Serra do Japi.

De *Eupatorium laevigatum*, coletado na Serra do Japi em Jundiaí, SP, no mês de março de 1992, foram encontrados em análise por CG-EM 4 alcalóides principais. Esta análise mostrou a presença de dois diastereoisômeros de 13 e dois diastereoisômeros de 6. Com base em comparação com *E. laevigatum* coletado no Morro da Forca, Ouro Preto, MG (ver item 2.2.1), supôs-se que eram respectivamente traquelantatos e viridifloratos de supinidina, e traquelantatos e viridifloratos de heliotridina (Tabela 3.1, Capítulo 3).

Utilizando-se a mesma metodologia de separação descrita no item 2.2.1. conseguiu-se até o momento isolar 5mg de 13c. Este alcalóide foi obtido como um óleo amarelado, apresentando um $[\alpha]_D = -16,2^\circ$, representando uma base necina de $[\alpha]_D$ negativo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 13 (Tabela 2.2, Figura 2.13), sendo este alcalóide um éster de supinidina (2) esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $C_{15}H_{25}NO_4$ ($[M]^+ 283$). O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3408cm^{-1}), éster (1732cm^{-1}) e amina (1228cm^{-1}) (Figura 2.68). O espectro de ^{13}C mostra sinais a δ 137,0 e 123,5, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2 da base necina. Os sinais a δ 72,2 (C-8), 60,9 (C-3), 56,5 (C-5), 25,4 (C-7) e 29,4 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina supinidina (Tabela 2.8, Figura 2.69). O espectro de ^1H RMN mostra os sinais característicos a 85,75 (1H, m, H-2), e 1,75 e 2,20 (2H, m, H-7), os quais podem ser de um éster da base

supinidina. Entretanto a não equivalência dos protons em C-7 ainda não foi verificada para ésteres deste tipo (Roeder & Bourauel 1992, Liu *et al.* 1992), além disso o deslocamento de H-8 a 84,68 está em campo mais baixo do que o normalmente verificado para este tipo de ésteres (4,14 e 4,15 - Roeder & Bourauel 1992, Liu *et al.* 1992). Os deslocamentos a 84,12 (1H, q, J=6,4Hz, H-3') e 1,22 (3H, d, J=6,4Hz, H-4'); 81,97 (1H, sept, J=7,0Hz, H-5') acoplado com H-6' a 80,98 (3H, d, J=7,0Hz) e H-7' a 80,93 (3H, d, J=7,0Hz), e $\Delta H_9=0,20$ (Tabela 2.8, Figura 2.70) são característicos de um éster do ácido (-)-traquelântico, quando estes esterificam bases do tipo 1 (Zalkow *et al.* 1985, Asibal *et al.* 1989). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 300 MHz e ^{13}C RMN a 75 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.71 e 2.72, respectivamente). Sugere-se inicialmente que este alcalóide seja a base (-)-supinidina esterificada no C-9 com o ácido (-)-traquelântico, e dá-se o nome de laevigatina (13c) para este PA. Para a determinação da configuração absoluta da parte ácida e básica, via rotação ótica, é necessária uma hidrólise básica deste alcalóide. Devido a pequena quantidade de material isolado, esta análise ainda não foi realizada. Anteriormente Mohanraj *et al.* 1982, relataram a presença de uma mistura contendo os alcalóides coromandalina [(-)-supinidina + ácido traquelântico] e heliovinina [(-)-supinidina + ácido viridiflórico], e propuseram que os ácidos esterificantes seriam (-)-traquelântico e (+)-viridiflórico, respectivamente. Entretanto nenhuma análise via rotação ótica destes ácidos foi efetuada para se confirmar essas

proposições. Supõe-se que os PAs relatados como coromandalinina e heliovinina, devido a seus espectros de ^1H -RMN sejam respectivamente supinina (13a) e amabilina (13b).

Tabela 2.8. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ)^a e ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ)^a de (-)-laevigatina (13d) isolada de inflorescências de *Eupatorium laevigatum* coletado na Serra do Japi.

Posição	^1H	^{13}C
1	-	137,0
2	5,75m	123,5
3a	4,25d(15,2)	61,0
3b	3,52d(15,2)	-
5a	3,49m	56,5
5b	2,71m	-
6a	2,19m	29,4
7a	1,75m	25,4
7b	2,20m	-
8	4,68m	72,2
9a	4,91d(13,5)	60,9
9b	4,71d(13,5)	-
1'	-	175,2
2'	-	83,3
3'	4,12q(6,4)	69,5
4'	1,22d(6,4)	17,1
5'	1,97sept(7,0)	33,0
6'	0,93d(7,0)	17,0
7'	0,98d(7,0)	17,0
OH	2,70	-

^a. Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

2.3. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PAs EM *Trichogonia gardneri*.

De *Trichogonia gardneri*, coletada na Serra do Japi, em Jundiaí, SP no mês de fevereiro de 1990, foi isolado um único PA. A análise inicial por CG-EM mostrou a presença de um PA de estrutura 6. O isolamento deste alcalóide se deu por meio de cromatografia de adsorção em sílica gel, usando como fase móvel uma mistura de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (90:9:1). Com base em seu IRK supôs-se que era um viridiflorato de retronecina (IRK 2145) (Tabela 3.1, Capítulo 3).

O alcalóide 6c foi obtido como um óleo, apresentando um $[\alpha]_D = +4,1^\circ$, representando uma base necina com $[\alpha]_D$ positivo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 6 (Tabela 2.2, Figura 2.5), sendo este alcalóide um éster de 1 esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ ($[\text{M}]^+ 299$). O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3406cm^{-1}), éster (1728cm^{-1}), e amina (1230cm^{-1}) (Figura 2.73). O espectro de ^{13}C mostra sinais a δ 132,8 e 130,1, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2 da base necina. Os sinais a δ 78,3 (C-8), 71,0 (C-7), 62,9 (C-3), 53,8 (C-5) e 36,2 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina retronecina (1a,b) (Tabela 2.9, Figura 2.74). O espectro de ^1H RMN mostra os sinais característicos de um éster da base necina retronecina a δ 5,84 (1H, m, H-2) e 4,22 (1H, m, H-7), e de um éster de ácido viridiflórico a δ 3,92 (1H, q, $J=6,6\text{Hz}$, H-3') e 1,20 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$, H-4'), e δ 2,10 (1H, sep, $J=6,8\text{Hz}$, H-5') acoplado com H-6' a δ 0,82 (3H, d, $J=6,8\text{Hz}$) e H-7' a δ 0,86 (3H,

d, $J=6,8\text{Hz}$) (Tabela 2.9, Figura 2.75). Estes sinais não são suficientes para diferenciar entre os ésteres de ácidos (+) e (-) viridiflóricos, ao contrário do que ocorre com os ésteres de ácidos traquelânticos (ver item 2.1 neste Capítulo), entretanto o derivado isopropilideno deste alcalóide (47) (Esquema 2.17) com $\Delta H_9 = 0,089$ (Figura 2.76) confirma a presença de um ácido esterificante tipo (-)-viridiflórico (Zalkow *et al.* 1985). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 400 MHz e ^{13}C RMN a 106 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.77 e 2.78 respectivamente). A comparação dos dados espectrais com dados da literatura (Zalkow *et al.* 1985) mostram que o alcalóide 6c é (+)-licopsamina.

Tabela 2.9. ^1H RMN (400 MHz, CDCl_3 , δ)^a e ^{13}C RMN (100,6 MHz, CDCl_3 , δ)^a de (+)-licopsamina (6c) isolada de partes aéreas de *Trichogonia gardneri* coletada na Serra do Japi, SP.

Posição	^1H	^{13}C
1	-	132,8
2	5,84m	130,1
3a	3,35d(1,6)d(5,6)d(15,6)	62,9
3b	3,87,d(16,3)	-
5a	2,67m	53,8
5b	3,21m	-
6a	1,83m	36,2
6b	1,95m	-
7	4,22m	71,0
8	4,12m	78,3
9a	4,69d(13,0)	62,6
9b	4,79d(13,0)	-
1'	-	174,4
2'	-	83,7
3'	3,92q(6,6)	71,0
4'	1,20d(6,6)	17,3
5'	2,10sept(6,8)	32,4
6'	0,82d(6,8)	17,7
7'	0,86d(6,8)	16,0
OH	2,80	-

^a. Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

2.4. ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE PAs EM *Adenostemma*.

Em partes aéreas de *Adenostemma*, coletada na Serra do Japi, em Jundiaí, SP no mês de fevereiro de 1990, foi isolado um único PA. A análise inicial por CG-EM mostrou a presença de um PA de estrutura 6. O isolamento deste alcalóide se deu por meio de cromatografia de adsorção em sílica gel, usando como fase móvel uma mistura de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (90:9:1). Com base em seu IRK supôs-se que era um traquelantato de retronecina (IRK 2131) (Tabela 3.1, Capítulo 3).

O alcalóide 6b foi obtido como um óleo, apresentando um $[\alpha]_D^{25} = +6,5^\circ$, representando uma base necina com $[\alpha]_D$ positivo. A análise por CG-EM foi consistente com a fragmentação de PAs de estrutura 6 (Tabela 2.2, Figura 2.5), sendo este alcalóide um éster de 1 esterificado com um ácido do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43), apresentando a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{25}\text{NO}_5$ ($[\text{M}]^+ 299$). O IV mostra bandas de absorção de hidroxilas (3424cm^{-1}), éster (1727cm^{-1}), dupla ligação C=C (1654cm^{-1}) e amina (1232cm^{-1}) (Figura 2.79). O espectro de ^{13}C mostra sinais a δ 132,5 e 131,6, os quais indicam uma dupla ligação entre C-1 e C-2 da base necina. Os sinais a δ 78,7 (C-8), 71,0 (C-7), 63,0 (C-3), 53,8 (C-5) e 36,2 (C-6) indicam a presença de um éster da base necina retronecina (1a,b) (Tabela 2.10, Figura 2.80). O espectro de ^1H RMN mostra os sinais característicos de um éster da base necina retronecina a δ 5,98 (1H, m, H-2) e 4,28 (1H, m, H-7), e de um éster de ácido (+)-traquelântico a δ 4,12 (1H, q, $J=6,6\text{Hz}$, H-3') e 1,22 (3H, d, $J=6,6\text{Hz}$, H-4'), e δ 2,03 (1H, sep, $J=6,8\text{Hz}$, H-5') acoplado com H-6' a δ 6,95 (3H, d,

J=6,8Hz) e H-7' a 80,94 (3H, d, J=6,8Hz), e $\Delta H=0,09$ (Tabela 2.10, Figura 2.81). A análise completa dos espectros de ^1H RMN a 300 MHz e ^{13}C RMN a 75 MHz foi acompanhada por uma análise de espectros 2-D homo e heteronuclear (Figuras 2.82 e 2.83 respectivamente). A comparação dos dados espectrais com dados da literatura (Zalkow *et al.* 1985) sugerem que o alcalóide 6b é (+)-intermedina.

Tabela 2.10. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ)^a e ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ)^a de (+)-intermedina (6b) isolada de partes aéreas de *Adenostemma* sp. da Serra do Japi (em CDCl_3).

Posição	^1H	^{13}C
1	-	132,5
2	5,98m	131,6
3a	3,44d(1,5)d(5,9)d(15,0)	62,9
3b	3,95d(15,0)	-
5a	2,74d(6,3)d(9,0)d(11,4)	53,8
5b	3,28d(1,8)d(7,2)d(9,0)	-
6	1,90-2,10m	36,2
7	4,28m	70,9
8	4,18m	78,7
9a	4,78d(12,6)	62,6
9b	4,87d(12,6)	-
1'	-	174,5
2'	-	83,0
3'	4,12q(6,6)	69,3
4'	1,22d(6,6)	16,8
5'	2,03hept(6,9)	32,9
6'	0,95d(6,8)	17,1
7'	0,94d(6,8)	17,0
OH	2,80	-

a. Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

3. SEMISÍNTESE DE PAs.

O objetivo da semisíntese de PAs é a obtenção de PAs, que foram verificados em pequenas proporções tanto em plantas como em boboletas analisados, para futuros experimentos. Os experimentos a serem realizados são: 1. a incorporação destes alcalóides *in vivo* por borboletas, 2. experimentos para verificação da atividade destes alcalóides na defesa química contra predadores. Neste trabalho apenas iniciou-se a semisíntese destes alcalóides, sendo que esta continua em andamento.

Com o objetivo de se verificar a atividade da insaturação do anel nos experimentos de incorporação e defesa química, planejou-se obter ésteres de 4 com ácidos do tipo traquelântico (42) ou viridiflórico (43). A base necina 4a foi semisintetizada (ver abaixo), entretanto o acoplamento com os ácidos esterificantes ainda não foi realizado. Estes ácidos devem ser isolados *via* hidrólise de PAs de plantas.

Outro tipo de estrutura a ser testada em experimentos de incorporação e defesa química, são PAs encontrados somente em lepidópteros da família Arctiidae (p.e. calimorfina, 40a - cuja configuração absoluta do ácido néxico ainda não foi determinada) (Aplin & Rothschild 1972, Rothschild *et al.* 1979, Edgar *et al.* 1980, Wink *et al.* 1988, L'Empereur *et al.* 1989, Ehmke *et al.* 1990, Hartmann *et al.* 1990, Biller *et al.* 1991, Trigo *et al.* 1993). Este tipo de alcalóide é parcialmente biosintetizado, por estes lepidópteros, a partir da base necina adquirida de fontes vegetais e o ácido néxico originado biosinteticamente de α -aminoácidos (p.e. isoleucina) (Ehmke *et al.* 1990, Biller *et al.*

1991).. A semisíntese da mistura de calimorfina e seu diastereoisomero no C-2' da parte ácida foi realizada (ver abaixo).

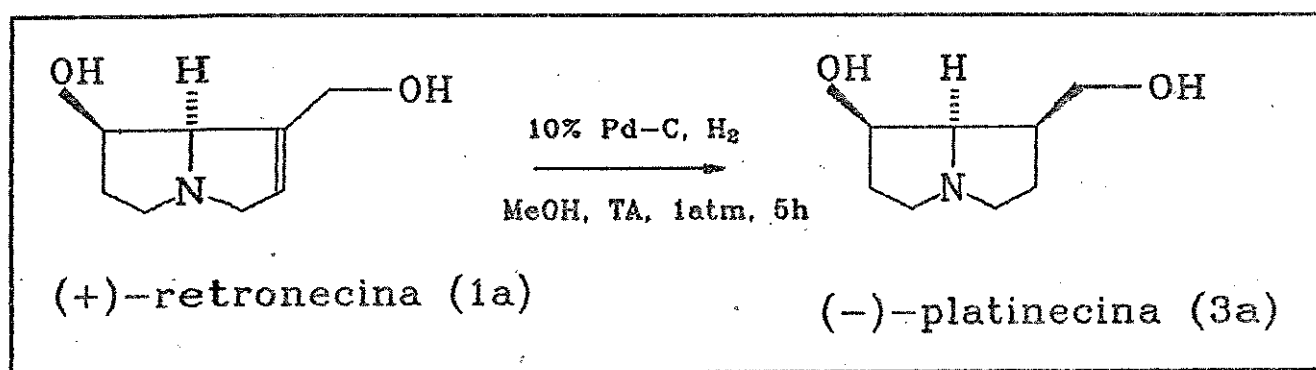
3.1. SEMISÍNTESE DE BASES NECINAS.

O procedimento para a obtenção da (-)-platinecina a partir da (+)-retronecina através de hidrogenação catalítica (Esquema 2.18) foi modificado de Adams & Rogers (1941). Estes autores utilizaram Raney-Ni e pressão. A utilização da catálise de Pd-C à temperatura e pressão ambiente mostrou-se altamente eficiente com rendimentos quantitativos. A reação é estereoseletiva, sendo que a molécula de la complexa com o catalisador somente pela face convexa do anel. A complexação com a catálise pela face concava do anel deve ser impedida estericamente pela hidroxila em β no C-7. Os dados de rotação ótica e ponto de fusão são idênticos aos encontrados na literatura (ver Experimental, Capítulo 7).

Os deslocamentos químicos de ^{13}C RMN (Tabela 2.11 e Figura 2.85) foram comparados com os dados de Mody *et al.* (1979) e Fleet *et al.* (1991). O ^{13}C RMN em Mody *et al.* (1991) foi realizado em D_2O , o que implica que os deslocamentos químicos são média 3ppm deslocados para campo mais baixo quando comparados com os dados da Tabela 2.11. O ^{13}C RMN em Fleet *et al.* (1991) foi realizado em CD_3OD e os deslocamentos químicos estão em média 1,5ppm deslocados para campo mais baixo quando comparados com os dados da Tabela 2.11. Esta diferença com dados de Mody *et al.* e Fleet *et al.* devem estar relacionados com o efeito de desblindagem de solvente nos espectros realizados em D_2O e

CD₃OD. O sinal de H-8 é semelhante nos tres solventes, provavelmente porque em todos eles devem sofrer o efeito de desblindagem do par de elétrons desemparelhado do N.

Os deslocamentos químicos de ¹H RMN (Tabela 2.11 e Figura 2.86) foram comparados os dados de Aasen & Culvenor (1969).



Esquema 2.18.

Tabela 2.11. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3 , δ)^a e ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3 , δ)^a de (-)-platinecina (3a).

Posição	^1H	^{13}C
1	2,34-2,45m	42,6
2a	2,10d(11,6),d(2,7),d(9,0)	26,9
2b	1,62m	-
3a	2,76d(10,5),d(2,7),d(9,0)	55,5
3b	3,10d(10,5),d(7,2),d(9,0)	-
5a	2,85d(17,4),d(11,2),d(10,2)	53,9
5b	3,20d(17,4),d(2,5)	-
6a	1,80-2,00m	36,0
7	4,20m	72,1
8	3,21d(3,0),d(8,0)	72,8
9a	3,85d(11,4),d(4,5)	60,0
9b	3,93d(11,4),d(2,3)	-
OH	5,7	-

^a. Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

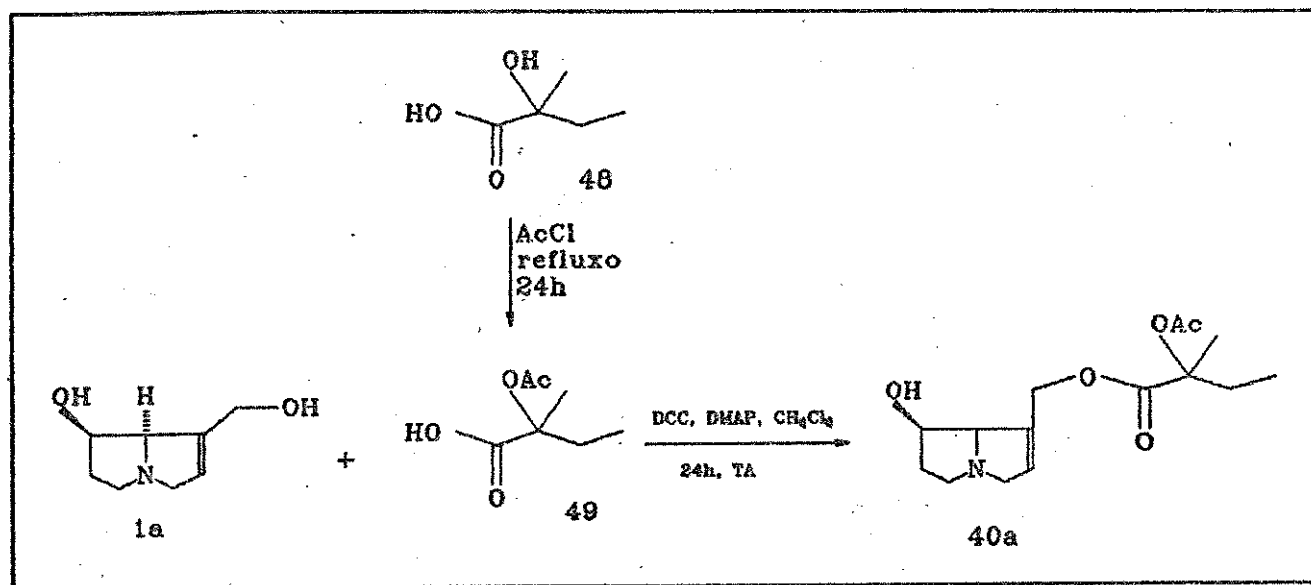
3.2. SEMISÍNTESE DE MONOESTERES.

3.2.1. SEMISÍNTESE DE 9-O-(±)-2-METIL, 2-HIDROXI-BUTANOATO DE (+)-RETRONECINA (40a).

O procedimento sintético para a obtenção de 40a (Esquema 2.19) envolveu o acoplamento do ácido néxico racêmico (49) com a (+)-retronecina (1a), obtida opticamente pura pela hidrólise da (+)-monocrotalina (36). O ácido calimorfinico racemico (49) foi

obtido através da acetilação com AcCl do ácido (\pm)-2-hidroxi, 2-metil butanóico (48) (Esquema 2.19).

Os dados de ^1H e ^{13}C RMN do ácido (\pm) 2-acetil, 2-metil butanóico (ácido calimorfinico, 49) estão na Tabela 2.12 e Figuras 2.91 e 2.90, respectivamente). Duas características interessantes deste composto são: 1. os sinais dos protons no C-3 mostram-se não equivalentes, e 2. o sinal da hidroxila do ácido esta deslocado para campo alto (δ 7,9).



Esquema 2.19.

Tabela 2.12. ^1H RMN (300 MHz em CDCl_3 , δ)^a e ^{13}C RMN (75 MHz em CDCl_3 , δ)^a do ácido 2-acetil,2-metilbutanóico (ácido calimorfinico, 49).

Posição	^1H	^{13}C
1	-	170,52
2	-	60,77
3a	1,96d(15,0),q(7,5)	30,84
3b	1,82d(15,0),q(7,5)	-
4	0,93t(7,5)	7,33
5	1,54s	20,52
6	-	177,52
7	2,05s	20,85
OH	7,9	-

^a- Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

O acoplamento regioespecífico do ácido com a base no C-9 desta foi obtido utilizando-se a metodologia usada anteriormente por Nishimura *et al.* (1987) na síntese de indicina (6a) e intermedina (6b). Estes autores acoplaram regioespecificamente no C-9 da (+)-retronecina, os derivados isopropilídenos dos ácidos (+) e (-) traquelânticos utilizando N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) na presença de 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP) em tolueno, seguida pela hidrólise do acetonídeo.

A única modificação introduzida no presente trabalho, foi a utilização de diclorometano seco ao invés de tolueno como solvente. O rendimento apresentado foi de 40%, enquanto que o rendimento de Nishimura *et al.* (1987) foi de 71%. Entretanto não foram feitas outras tentativas para a otimização desta reação.

Os dados de ^1H e ^{13}C RMN do composto 40a estão na (Tabela 2.13 e Figuras 2.94 e 2.93, respectivamente). A reação de acoplamento produziu dois estereoisômeros no C-2' da parte ácida na proporção 1:1 (análise por GC-MS). A análise de ^1H , ^{13}C , além da análise de RMN 2D COSY (Figura 2.95) e HETCOR (Figura 2.96) não possibilitaram diferenciar com precisão os deslocamentos químicos dos dois estereoisômeros. No RMN de ^1H os únicos deslocamentos distinguíveis são aqueles pertencentes aos prótons geminais distereotópicos H-9a e H-9b. Baseando-se no $\Delta \delta \text{H}_9$, verifica-se que um dos diastereoisômeros apresenta o $\Delta \delta \text{H}_9$ (= 0,11) similar ao $\Delta \delta \text{H}_9$ da calimorfina (= 0,10) isolada do arctídeo *Gnophaela vermiculata* por L'Empereur *et al.* (1989). O RMN de ^{13}C também mostra dois estereoisômeros, os quais foram distinguidos a partir da comparação das intensidades dos sinais

de ambos. Esta comparação foi possível devido ao material enviado para análise de RMN apresentar uma razão de 1,8:1 entre os diastereoisômeros (devido a purificação em coluna cromatográfica em sílica gel). Entretanto através da comparação com os dados de L'Empereur *et al.* (1989) não foi possível se determinar qual dos distereoisômeros é a calimorfina.

Tabela 2.13. ^1H RMN (300 MHz em CDCl_3 , δ)^a e ^{13}C RMN (75 MHz em CDCl_3 , δ)^a de 40a (2 diastereoisômeros em C-2').

Posição	^1H		$^1\text{H}^b$	^{13}C		$^{13}\text{C}^b$
	A	B		A	B	
1	-	-	-	132,68	132,58	132,40
2	5,88m	5,88m	5,88d(1,4)	128,92	129,18	130,25
3a	4,11d(15,0)	4,11d(15,0)	3,88d(15,0)	62,25	62,25	62,18
3b	3,50d(15,0)	3,50d(15,0)	3,44d(15,0)	-	-	-
5a	3,45-3,55m	3,45-3,55m	3,36d(9,2)	53,79	53,74	53,91
5b	2,91-2,87m	2,91-2,87m	2,76d(9,2)	-	-	-
6	1,92-2,06m	1,92-2,06m	1,98-2,04m	35,71	35,71	35,74
7	4,37m	4,37m	4,25s	70,75	70,80	71,03
8	4,37m	4,37m	4,23s	78,48	78,60	78,71
9a	4,79d(13,0)	4,89d(13,0)	4,76d(13,0)	61,86	61,86	62,89
9b	4,68d(13,0)	4,62d(13,0)	4,66d(13,0)	-	-	-
1'	-	-	-	170,38	170,45	170,23
2'	-	-	-	80,97	80,97	80,95
3a'	1,83d(7,2), q(15,0)	1,83d(7,2), q(15,0)	1,80-2,00m	31,00	31,26	30,98
3b'	1,97d(7,2), q(15,0)	1,97d(7,2), q(15,0)	-	-	-	-
4'	0,93t(7,2)	0,93t(7,2)	0,91t(7,5)	7,60	7,60	7,62
5'	1,56s	1,57s	1,54s	20,68	20,68	20,67
6'	-	-	-	172,31	172,19	172,15
7'	2,09s	2,07s	2,07s	21,04	21,04	21,09

^a- Os valores entre parênteses representam as constantes de acoplamento J em Hz.

^b- valores de L'Empereur *et al.* 1989.

CAPÍTULO 3

PADRÃO QUÍMICO NA INTERFACE PLANTAS/BORBOLETAS ITHOMIINAE

A presença de PAs e seus derivados em borboletas da subfamília Ithomiinae não é extensivamente relatada na literatura. Pliske (1975a,b,c) correlacionou as visitas de adultos de Ithomiinae a fontes vegetais com PAs com a aquisição destes compostos por parte dos lepidópteros, sem entretanto realizar uma análise química dos insetos e plantas. Edgar *et al.* (1975) isolaram uma 2-hidroxi-2-(1-hidroetil)-3-metil- γ -butirolactona (ver Esquema 1.4, Capítulo 1), relacionada com ácidos esterificantes de PAs (tipo ácido (-)-viridiflórico (43a)) de pincéis de pêlos de machos adultos de Ithomiinae. O primeiro trabalho evidenciando a presença de PAs em borboletas Ithomiinae e mostrando que estes alcalóides eram sequestrados de fontes vegetais foi de Brown (1984), o qual através de análise colorimétrica confirmou a presença de PAs tanto em fontes vegetais, quanto em borboletas, relacionando-os com a defesa química destes lepidópteros contra a aranha *Nephila clavipes*. Brown (1985) caracterizou, por RMN (60MHz), PAs em várias espécies de Asteraceae e Boraginaceae visitadas por borboletas Ithomiinae, e uma mistura de licopsamina (6c):intermedina (6b) (6:4) em *Mechanitis polymnia casabranca*. Além disso analisou

colorimetricamente 67 espécies (32 gêneros em 11 tribos) de Ithomiinae, quantificando os PAs presentes nestes lepidópteros.

1. PADRÃO QUÍMICO DE PAs EM FONTES VEGETAIS VISITADAS POR ADULTOS DE ITHOMIINAE.

A coleta das plantas para análise de PAs foi baseada na observação de visitas de borboletas Ithomiinae a estes vegetais (Trigo 1988). Geralmente estas visitas eram realizadas por machos (±95%) que visitavam inflorescências, se alimentando de néctar além de adquirir PAs, ou botões, infrutescências e folhas secas ou em decomposição, apresentando nestes casos um comportamento de farmacofagia.

A Tabela 3.1. mostra a análise através de CG-EM de PAs presentes em plantas visitadas por adultos de Ithomiinae.

Todas as espécies pertencentes a tribo Eupatorieae apresentaram PAs monoésteres (principalmente ésteres de 1 - alcalóides do tipo 6).

Partes aéreas¹ de *Adenostemma* sp. coletada na Serra do Japi, Jundiá, SP, no mês de fevereiro de 1990 apresentaram majoritariamente (+)-intermedina (6b) (a estrutura foi confirmada por métodos físicos - ver Capítulo 2).

Inflorescências de *Ageratum conyzoides* coletados na Mata de Santa Genebra em junho de 1986 apresentavam majoritariamente o alcalóide 6, o qual pode ser equinatina (6e) devido ao seu IRK

1. Borboletas Ithomiinae e Danainae foram observadas visitando as inflorescências. Entretanto estas eram diminutas e partes aéreas foram coletadas para se obter uma maior quantidade de PAs.

2172. O alcalóide 5 também estava presente em quantidades significativas. Wiedenfeld & Roeder (1991) isolaram licopsamina (6c) e equinatina (6e) de *A. conyzoides* coletado no Quênia, entretanto não apresentam informações sobre a rotação ótica e proporção destes PAs.

Inflorescências de *Eupatorium laevigatum* foram coletadas em diferentes localidades e datas e apresentavam o padrão abaixo:

1. *E. laevigatum*, coletado no Morro da Forca em Ouro Preto, MG, no mês de fevereiro de 1990, apresentou majoritariamente (+)-rinderina (6d) e (+)-equinatina (6e), além de (-)-supinina e (-)-amabilina em menor proporção (as estruturas foram confirmadas por métodos físicos - ver Capítulo 2). Além destes PAs encontrou-se traços de hidroxidanaidal (39) e do alcalóide 29 na fração de alcalóides livres. Entretanto, como desidropirrolizinas não são detectáveis devido ao método de fracionamento empregado (ver Capítulo 2), mais estudos, utilizando-se de um método de extração e fracionamento alternativo, devem ser realizados para o isolamento e elucidação estrutural destes derivados de PAs.

2. *E. laevigatum*, coletado na Serra do Japi, Jundiaí, SP, no mês de maio de 1992, apresentou o mesmo padrão químico daquele coletado em Ouro Preto, MG. Entretanto, a análise via RMN (ver Capítulo 2) de um dos compostos isolados ($[M]^+$ 283, IRK 1978) mostrou que esta substância não era (-)-supinina (13a) (que também apresenta o mesmo $[M]^+$ e IRK), e sim um alcalóide novo, que foi chamado de (-)-laevigatina (13c). Sugere-se que este alcalóide apresente a base necina (-)-supinidina e como ácido

esterificante o ácido (-)-traquelântico (ver Capítulo 2). O isolamento e caracterização dos outros 3 PAs está em andamento.

3. *E. laevigatum*, coletado na Mata de Costa e Silva, Campinas, SP, em março de 1992, apresentou os alcalóides 6 e 13 sendo o primeiro majoritário. Brown (1985) isolou equinatina (6e) de *E. laevigatum* coletado na região de Campinas, entretanto o IRK do alcalóide 6 aqui encontrado (=2152) não corresponde ao IRK da equinatina (6e) (=2172).

Inflorescências de *Eupatorium maximiliani* coletadas na Mata da Pedra, Mogi Guaçú, SP, em fevereiro de 1990, apresentam majoritariamente um dos diastereoisômeros de 6 com IRK 2152. Brown (1985) isolou rinderina (6d) de inflorescências de *E. maximiliani* da região de Campinas, sendo que este alcalóide apresenta o mesmo IRK de 6 isolado acima.

Inflorescências de *Eupatorium mexiae* coletadas na Mata da Pedra, Mogi Guaçú, SP, em novembro de 1984, apresentaram majoritariamente o diastereoisômero de 6 a IRK 2152, outros 3 diastereoisômeros também estavam presentes em menor quantidade.

Inflorescências de *Eupatorium pauciflorum* coletados na Mata de Costa e Silva (e na UNICAMP), Campinas, SP, apresentam majoritariamente o alcalóide 13 com IRK 1978, seguido do PA 6 com IRK 2152. Análise de folhas e raízes desta espécie também foram realizadas, mostrando que raízes apresentam majoritariamente o diéster 41 (Tabela 1 - Apêndice).

A análise de inflorescências de *Eupatorium punctulatum*, coletado na Serra do Japi, Jundiá, SP, em fevereiro de 1990,

mostrou majoritariamente 2 alcalóides 6 com IRKs 2152 e 2145, além de um PA de estrutura 13.

Inflorescências de *Eupatorium squalidum*, coletado na Serra do Japi, Jundiaí, SP, em março de 1990, mostrou majoritariamente dois alcalóides de estrutura 13 (IRKs 1978 e 1985).

Partes aéreas de *Trichogonia gardneri*, coletada na Serra do Japi, Jundiaí, SP, em março de 1990, apresentou somente (+)-licopsamina (caracterizado por RMN - ver Capítulo 2). Anteriormente, Brown (1985) tinha caracterizado licopsamina em inflorescências de *T. gardneri* da Mata de Amarais, Campinas, SP.

Inflorescências de *Emilia sonchifolia* (Heliantheae)², coletadas na Mata de Costa e Silva, Campinas, SP, em março de 1985, apresentaram majoritariamente PAS 1,2-saturados monoésteres (iso-24, 24) e macrocíclicos (30), além de um PA macrocíclico com a base otonecina, 31.

Folhas e flores de algumas espécies de *Heliotropium* (Boraginaceae) eram visitadas com frequência por machos de Ithomiinae. Estas espécies apresentam geralmente PAS monoésteres.

Folhas de *Heliotropium indicum*, coletadas na Mata da Pedra, Mogi, Guaçú, SP, em novembro de 1984, apresentaram majoritariamente o alcalóide 6 com IRK 2127, provavelmente (+)-indicina (6a). Este alcalóide foi isolado anteriormente desta mesma planta por Mattocks et al. (1961).

2. Inflorescências de *Emilia sonchifolia* raramente são visitadas por adultos de Ithomiinae.

Folhas de *Heliotropium transalpinum* apresentaram uma variação no padrão químico nas duas localidades onde foram coletados.

H. transalpinum, coletado na Serra do Japi, Jundiaí, SP, em março de 1991, apresentou majoritariamente o alcalóide 8 (IRK 2221), seguido do alcalóide 6 (IRK 2152). *H. transalpinum* coletado no Horto Florestal de Rio Claro, Rio Claro, SP, em fevereiro de 1990, apresentou uma grande diversidade de PAs, sendo os majoritários o alcalóide 6 (IRK 2131), 8 (IRK 2198) e 11 (IRK 2215). Folhas desta espécie foram analisadas anteriormente por Trigo *et al.* (1993) e mostraram majoritariamente dois alcalóides de estrutura 8 (IRK 2203 e 2219). Esta espécie é utilizada como planta hospedeira da larva pelos arctídeos *Hyalurga syma* e *Scearctia figulina*, os quais sequestram PAs destas (Trigo *et al.* 1993 e dados não publicados).

Tabela 3.1. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em inflorescências e folhas de algumas plantas utilizadas por Ithomiinae adultos como fontes vegetais para obtenção de PAs. A percentagem (%) é dada em abundância relativa. (Programa de Temperatura: 150-300°C, 6°C/min).

Adenostemma sp. (Serra do Japi) - partes aéreas.

Alcalóide	IRK	M+	%
(+)-intermedina(6b) ¹	2131	299	98
6	2145	299	<1
éster de 2	2215	?	<1

¹- caracterizado por RMN e rotação óptica.

Ageratum conyzoides (Mata de Santa Genebra) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
iso-5	1785	237	<1
5	1793	237	18
éster de 1	1934	?	<1
éster de 4	1966	?	<1
13	1974	283?	<1
13	1983	283?	<1
éster de 4	2023	?	<1
6	2126	299?	<1
6	2145	299?	3
6	2152	299?	<1
23	2153	301?	<1
6	2172	299	66
23	2178	301	5
éster de 1	2187	?	2

Alcalóide	ν IRK	M+	%
éster de 1	2209	?	3
éster de 1	2261	?	<1

Eupatorium laevigatum (Ouro Preto) - inflorescências.

Alcalóide	IRK	M+	%
39 ²	NC	167	<1
(-)-supinina (13a) ¹	1978	283	8
(-)-amabilina (13b) ¹	1985	283	10
28 ²	2047	279	<1
28 ²	2054	279	<1
(+)-rinderina (6d) ¹	2152	299	33
(+)-equinatina (6e) ¹	2172	299	47

1. caracterizado por RMN e rotação óptica.

2. Observados somente na fração de alcalóides livres.

Eupatorium laevigatum (Serra do Japi) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
(-)-levigatina (13c) ¹	1978	283	8
13	1985	283	10
6	2155	299	33
6	2172	299	47

1. caracterizado por RMN e rotação óptica.

Eupatorium laevigatum (Mata de Costa e Silva) - inflorescências³

Alcalóide	IRK	M+	%
13	1978	283	8
6	2155	299	92

Eupatorium maximiliani (Mata da Pedra) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
6	2126	299	<1
6	2152	299	98
6	2172	299	<1

Eupatorium mexiae (Mata da Pedra) - inflorescências

Alcalóides	IRK	M+	%
15	1967	285?	<1
13	1977	283?	2
13	1985	283?	<1
6	2131	299	12
6	2145	299?	4
6	2152	299	76
6	2172	299	5

3. Infrutescências secas, as quais estavam sendo visitadas frequentemente por machos de *Mechanitis polymnia* e *M. lysimnia*, também foram analisadas apresentando o mesmo padrão.

Eupatorium pauciflorum (Mata de Costa e Silva) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
15		2857	8
13	2178	283	60
éster de 1		?	5
éster de 4		?	1
6		2997	2
6	2155	299	35

Eupatorium punctulatum (Serra do Japi) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
13	1985	283	16
6	2130	2997	2
6	2145	299	26
6	2152	2997	<1
6	2172	299	55
éster de 1	2250	?	<1

Eupatorium squalidum (Serra do Japi) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
13	1978	283	30
13	1985	283	58
6	2131	299	7
6	2145	299	5

Trichogonia gardneri (Serra do Japi) - partes aéreas

Alcalóide	IRK	M+	%
6	2131	299	1
(+)-licopsamina (6c) ¹	2145	299	99

¹. caracterizado por RMN e rotação óptica.

Emilia sonchifolia (Mata de Costa e Silva) - inflorescências

Alcalóide	IRK	M+	%
éster de 3	1804	?	<1
iso 24	1820	239	14
24	1854	239	46
iso 24	1858	239?	<1
24	1899	239?	5
30	2345	337	5
30	2373	337	4
31	2393	365	26

Heliotropium indicum (Mata da Pedra) - folhas

Alcalóide	IRK	M+	%
éster de 4	1965	?	<1
13	1983	283	<1
iso 6	2110	299	2
6	2126	299	91
6	2145	299	7
éster de 1	2196	?	<1
éster de 1	2214	?	<1

Heliotropium peruvianum (Monjolinho) - folhas

Alcalóide	IRK	M+	%
rinderina (6d) ¹	2152	299	100

1. identificado em Brown (1985).

Heliotropium transalpinum (Serra do Japi) - folhas

Alcalóide	IRK	M+	%
13	1972	283?	<1
14	2062	325	7
6	2152	299	22
8	2221	341	70

Heliotropium transalpinum (Horto Florestal de Rio Claro) - folhas

Alcalóide	IRK	M+	%
15	1966	285?	2
éster de 2	1973	?	2
13	1978	283?	<1
13	1985	283?	<1
éster de 4	2053	?	1
éster de 4	2062	?	2
éster de 4	2064	?	<1
6	2131	299	31
6	2152	299?	2
8	2198	341	37
11	2215	313	12
8	2222	341	5
éster de 1	2236	?	<1
éster de 1	2272	355	3
éster de 1	2288	?	1
éster de 1	2293	?	<1

2. PADRÃO QUÍMICO DE PAS EM BORBOLETAS ITHOMIINAE.

2.1. PADRÃO QUÍMICO EM *Tithorea harmonia pseudethra* (Tabela 3.2 e 3.5).

Larvas de *Tithorea harmonia pseudethra* se alimentam de folhas de *Prestonia acutifolia* (Apocynaceae: Echitoideae) na Mata da Pedra, Mogi Guaçu, SP.

Folhas⁴ de *P. acutifolia* apresentam majoritariamente alcalóides do tipo 6, sendo estes provavelmente intermedina (6b), licopsamina (6c), rinderina (6d) e equinatina (6e) (comparação de seus IRKs 2131, 2145, 2152 e 2172 respectivamente, com os da Tabela 2.1, Capítulo 2). Outro alcalóide encontrado em abundância em folhas desta planta é 32, um macrocíclico de 14 membros, que poderia ser parsonsina (32a) como mostra seu íon molecular a m/z 439 e a fragmentação em EM-IE (ver Capítulo 2). Este alcalóide, além de outros com estruturas correlatas, foram isolados anteriormente de outras Echitoideae (=Parsonsieae) (Edgar et al. 1980, Abe et al. 1987, Nishida et al. 1991), parecendo serem característicos desta subfamília.

Em larvas de *T. harmonia* foram encontrados somente os alcalóides 6b e 6c e 32. Estes PAS são os mesmos encontrados em suas plantas hospedeiras, entretanto nota-se a ausência de 6d e 6e. Em pupas verifica-se o mesmo padrão, adicionando-se o alcalóide 33, além de um outro macrocíclico em pequena quantidade, que deve ser um derivado de 32. Adultos recém

4. Raízes de *P. acutifolia* também foram analisadas e apresentaram majoritariamente ésteres de 2, 3 e 4 (Tabela 1 - Apêndice).

emergidos apresentam o mesmo padrão das larvas. Os alcalóides 6d e 6e não são observados nos estágios imaturos, nem em adultos recém-emergidos, embora estejam presentes nas planta hospedeira da larva. Este fenômeno deve ter relação com a inversão do centro assimétrico no C-7, 7 α -OH (6d e 6e) para 7 β -OH (6b e 6c). Esta inversão é mostrada experimentalmente em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* e é discutida detalhadamente no Capítulo 4.

Adultos capturados no campo, na Mata da Pedra, no período de março de 1990, apresentam um padrão mais rico de PAs (qualitativamente - Tabela 3.2, e quantitativamente - Tabela 3.5 - ver também Trigo & Brown 1990 para uma análise mais detalhada da variação quantitativa de PAs em Ithomiinae). Tanto machos quanto fêmeas mostraram outros alcalóides, além dos presentes na planta hospedeira da larva, mostrando que machos devem estar visitando, quando adultos⁵, a fontes vegetais contendo PAs, embora Pliske (1975c), Trigo (1988), Trigo & Brown (1990) tivessem observado raras visitas destes lepidópteros a estas fontes. A presença dos macrocíclicos de 12 membros 34 e 35, embora em pequenas quantidades, mostra indiretamente que estes lepidópteros também devem estar visitando fontes vegetais de PAs macrocíclicos (p.e. *Senecio*). A visita de borboletas Ithomiinae a estas fontes não foi diretamente observada.

Os adultos (machos e fêmeas) capturados no campo, na Mata da Pedra no período de Janeiro de 1984 e Julho de 1985, e analisados conjuntamente, mostram um padrão qualitativo de PAs

5. Fêmeas provavelmente obtém PAs de machos por ocasião da cópula (Brown 1985).

muito mais rico, embora os alcalóides majoritários sejam os mesmos dos estágios imaturos e de adultos capturados no campo em março de 1990. Isso provavelmente deva ter relação com a visita a diferentes fontes vegetais com PAs durante este período.

A ausência dos PAs 6d e 6e é novamente verificada, oferecendo mais evidências que a inversão do 7 α -OH destes PAs para 7 β -OH de 6b e 6c deva estar ocorrendo (ver Capítulo 4).

Tabela 3.2. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em diferentes estágios do ciclo de vida de *Tithorea harmonia* e em sua planta hospedeira da larva *Prestonia acutifolia*. (Programa de Temperatura: 150-300°C, 6°C/min).

PAs ^b	IRK	M ⁺ ^c	Abundância relativa (%) ^a						
			Larva	Pupa	Adulto recém emergido	Adulto capturado no campo ^d	Planta da larva		
						A	♂♂	♀♀	
5	1748	237	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
iso5	1807	237	ND	ND	ND	<1	9	ND	ND
5	1817	237	ND	ND	ND	<1	8	3	ND
5	1825	237	ND	ND	<1	<1	ND	ND	ND
5	1837	237	ND	ND	ND	<1	5	19	ND
24	1845	239	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
5	1850	237	ND	ND	ND	ND	ND	4	ND
15	1957	285	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND
15	1976	285	ND	ND	ND	3	ND	ND	ND
iso40	1988	297	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
iso40	2003	297	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
40	2031	297	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
40	2036	297	ND	ND	<1?	<1	ND	ND	ND
iso6	2103	299	ND	ND	ND	3	ND	ND	ND
23	2105	301	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
6b	2132	299	29	44	15	45	22	ND	7
23	2142	301	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
6c	2146	299	27	30	65	22	27	33	45
6d	2152	299	ND	ND	ND	<1	ND	ND	14
23	2165	301	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
6e	2171	299	ND	ND	ND	<1	ND	ND	20
9	2197	341	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND

PAs ^b	IRK	M ^{+c}	Abundância relativa (%) ^a						
			Larva	Pupa	Adulto recém emergido	Adulto capturado no campo ^d			Planta da larva
						A	♂♂	♀♀	
11	2217	313	ND	ND	ND	1	ND	ND	ND
34	2290	335	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
34	2348	335	ND	ND	ND	<1	ND	4	ND
e-1	2465	381	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
d-1	2489	381	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
d-1	2507	381	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
e-1	2540	381	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
35	2570	351	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
32	2815	439	44	14	20	7	25	36	12
33	2905	453	ND	11	ND	ND	4	<1	ND
d-32	2960	485	ND	1	ND	ND	ND	ND	ND

a- Para abundância absoluta ver Tabela 3.6. ND: não detectado.

b- Ver estruturas na Figura 2.3, Capítulo 2. e-1: éster de 1; d-1: diéster de 1. d-32: derivado desconhecido de 32. 6c: coinjeção com padrão.

c- Íons moleculares confirmados por espectrometria de massa de ionização química.

d- A: 291 machos e fêmeas coletados entre Janeiro de 1984 e Julho de 1985 na Mata da Pedra, e fracionados conjuntamente. ♂♂ e ♀♀: 48 machos e 13 fêmeas coletados em Fevereiro de 1990 na Mata da Pedra.

2.2. PADRÃO QUÍMICO EM *Aeria olena olena*. (Tabela 3.3 e 3.5).

Larvas de *Aeria olena olena* se alimentam de folhas de *Prestonia coalita* (Apocynaceae: Echitoideae). Folhas desta planta e larvas de *A. olena* não apresentaram, independente do método de análise empregado (CG-EM, CCD, colorimetria), quaisquer traços de PAs. Quando analisados pelo método colorimétrico, pupas e a maioria dos adultos recém-emergidos (83%) não apresentavam PAs. Entretanto PAs foram caracterizados, via CG-EM, em pupas e nestes adultos recém-emergidos. A diferença deve estar relacionada a diferença na sensibilidade dos métodos empregados (CG-EM - 1ng e colorimetria - 5µg de PAs), além de que, a análise colorimétrica é feita individualmente, enquanto que na análise através de CG-EM uma série de indivíduos foi agrupada.

Em adultos recém-emergidos que apresentavam PAs na análise colorimétrica, os PAs encontrados majoritariamente por CG-EM foram 6b, 6c. Os alcalóides 5 e 6e foram encontrados em pequena quantidade. Nos indivíduos capturados no campo foi encontrado um padrão mais rico de PAs, devido a visita destes adultos a fontes vegetais com os alcalóides. O PA majoritário encontrado, tanto em machos quanto em fêmeas, foi 6c, não se verificando a presença de alcalóides 6 com a configuração 7 α -OH. Isto novamente suporta a hipótese da inversão deste centro assimétrico por borboletas Ithomiinae (ver Capítulo 4).

Tabela 3.3. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em diferentes estágios do ciclo de vida de *Aeria olena* e em sua planta hospedeira da larva *Prestonia coalita*. (Programa de Temperatura: 150-300°C, 6°C/min).

PAs	IRK	M+	Abundância relativa (%) ^a							
			Larva ^b	Pupa ^c	Adulto recém emergido ^d			Adulto capturado no campo ^e		Planta da larva
					A	B	C	♂♂	♀♀	
5	1832	237	ND	ND	ND	ND	3	12	15	ND
iso-5	1814	237	ND	ND	ND	ND	ND	2	3	ND
6b	2131	299	ND	45	30	ND	47	1	5	ND
6c	2145	299	ND	40	30	ND	44	80 ^r	64 ^r	ND
6d	2152	299	ND	15	10	ND	ND	ND	ND	ND
6e	2172	299	ND	ND	30	ND	3	ND	ND	ND
13	1977	283	ND	ND	ND	ND	ND	<1	3	ND
13	1985	283	ND	ND	ND	ND	ND	4	8	ND
15?	1967	285?	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15?	1980	285?	ND	ND	ND	ND	<1	ND	ND	ND
outros			ND	ND	ND	ND	<1	<1	2	ND

^a- Para abundância absoluta ver Tabela 6. ND: não detectado; ^b- 3 indivíduos analisados; ^c- 9 indivíduos analisados; ^d- A e B: Indivíduos que não apresentavam PAs na análise colorimétrica; C: Indivíduos que apresentavam PAs na análise colorimétrica; ^e- Machos e fêmeas capturados na Mata de Costa e Silva. Dois machos capturados na região de Serra Negra, SP, e 15 machos coletados na Serra do Japi, Jundiaí, SP, apresentaram o mesmo padrão de PAs; ^f- coinjeção com licopsamina (6c).

2.3. PADRÃO QUÍMICO EM *Mechanitis polymnia casabranca*. (Tabela 3.4 e 3.5).

Larvas de *Mechanitis polymnia* se alimentam de folhas de várias espécies de *Solanum* (Solanaceae), uma família de plantas que não apresenta PAs. Larva, pupas e adultos recém-emergidos não apresentaram quaisquer traços de PAs (análise por colorimetria e CG-EM). Somente adultos (machos e fêmeas) capturados no campo apresentam PAs, os quais são adquiridos de fontes vegetais. Os PAs encontrados nestes lepidópteros são majoritariamente 6b e 6c. Estes dados novamente suportam a hipótese da inversão do centro assimétrico C-7 por borboletas Ithomiinae (ver Capítulo 4).

Machos de *Mechanitis polymnia* capturados na Serra do Japi ao lado da represa do DAE apresentaram somente intermedina (6b) (84%) e licopsamina (6c) (16%). Nesta região ocorrem duas fontes vegetais que apresentam estes PAs: *Trichogonia gardneri* (100% 6c) e *Adenostemma* sp. (100% 6b), sugerindo que as borboletas capturadas para análise deviam ter visitado majoritariamente *Adenostema* sp, pois experimentalmente licopsamina é incorporada quase sem modificações (Figura 4.3., Capítulo 4) e somente parte (38%) da intermedina é transformada em licopsamina (Figura 4.2, Capítulo 4).

Machos de *Mechanitis polymnia* capturados na Mata da Pedra apresentaram, além de intermedina (6b) (19%) e licopsamina (6c) (74%), um alcalóide macrocíclico de IRK 2797 (7%), cujo ion molecular não foi observado. Este deve ser sequestrado de flores de *Prestonia acutifolia* presentes na região. Embora a análise

destas flores ainda não tenha sido realizada, folhas de *P. acutifolia* apresentam este tipo de PAs macrocíclicos (Tabela 3.2).

Tabela 3.4. Cromatografia gasosa capilar de PAs presentes em diferentes estágios do ciclo de vida de *Mechanitis polymnia*, Ithomiinae cujas plantas hospedeiras da larva pertencem à família Solanaceae. (Programa de Temperatura: 150-300°C, 6°C/min).

PAs	IRK	M ⁺	Abundância relativa (%) ^a					Planta da larva ^c
			Larva	Pupa	Adulto recém emergido	Adulto capturado no campo ^b		
						♂♂	♀♀	
13	1978	283	ND	ND	ND	2	<1	ND
13	1985	283	ND	ND	ND	ND	3	ND
éster de 2	2027	?	ND	ND	ND	ND	<1	ND
iso-éster de 1	2090	?	ND	ND	ND	<1	ND	ND
6	2131	299	ND	ND	ND	23	20	ND
6c	2145	299	ND	ND	ND	74 ^d	76 ^d	ND

a. Para abundância absoluta ver Tabela 6. ND: não detectado.

b. Capturados na Mata de Costa e Silva.

c. Planta analisada: *Solanum paniculatum*.

d. Coinjeção com licopsamina (6c).

Tabela 3.5. Quantidade de PAs (μg de bases totais - $\bar{X} + S (N)$)¹ em estágios de Ithomiinae.

Espécie	Larva	Pupa	Adultos recém emergidos	Adultos capturados no campo
<i>Tithorea harmonia</i>	44 ± 54(5)	52 ± 74(5)	12 ± 8(6)	36 ± 23(17)
<i>Aeria olena</i>	0 ± 0(10)	0 ± 0(10) ²	0 ± 0(45) ² 13 ± 10(9)	51 ± 59(10)
<i>Mechanitis polyminia</i>	0 ± 0(10)	0 ± 0(10)	0 ± 0(10)	369 ± 176 (10)

1. Analisados por colorimetria.

2. Algumas amostras apresentaram traços de PAs em análise de CG-EM.

2.4. PAe EM OUTROS ITHOMIINAE.

Algumas outras espécies de Ithomiinae foram analisados não sistematicamente:

1. Machos de *Mechanitis lysimnia* foram coletados na região da Serra do Japi e apresentaram ambos intermedina (6b) (25%) e lycopsamina (6c) (75%).

2. Machos de *Epityches eupompe* foram coletados na região da Serra do Japi e apresentaram intermedina (6b) (11%), lycopsamina (6c) (84%) e provavelmente integerrimina (34b) (IRK 2343, M+ 335) (5%). Este último, um macrocíclico, que mostra indiretamente que algumas vezes borboletas Ithomiinae também visitam fontes vegetais com estes PAs, embora nenhuma observação no campo tenha sido feita.

3. Machos de *Scada* foram coletados na região da Serra de Carajás, PA e apresentaram: iso-éster de 1 (IRK 1820, M+ 237, <1%), éster de 1 (IRK 1836, M+ 237, 8%), éster de 4 (IRK 1970, M+ ?, <1%), 9 (IRK 1978, M+ 283, 2%), 9 (IRK 1985, M+ 283, 5%), iso-éster de 1 (IRK 2122, M+ 299, <1%), intermedina (6b) (16%), lycopsamina (6c) (67%) e provavelmente equinatina (6e) (<1%).

3. EVOLUÇÃO DO PADRÃO QUÍMICO EM BORBOLETAS ITHOMIINAE.

Brown *et al.* (1991) propõem 3 síndromes em interações mediadas quimicamente entre borboletas e plantas:

1. Na primeira, e mais primitiva do ponto de vista evolutivo, larvas sequestrariam compostos químicos de suas plantas hospedeiras e os transfeririam para os adultos. Esta síndrome tenderia a desestabilização, desde que seria

desvantajosa para a planta produtora dos compostos químicos (um caso típico de cairomônios), a menos que adultos destes lepidópteros também fossem atraídos por estes mesmos compostos e polinizassem as plantas hospedeiras das larvas.

2. Na segunda, adultos sequestrariam compostos químicos de fontes vegetais, com o estágio larval não utilizando os compostos secundários de suas plantas hospedeiras. Esta síndrome seria selecionada favoravelmente, desde que os lepidópteros polinizariam as plantas produtoras dos compostos secundários (um caso típico de sinomônios).

3. Na terceira, e mais derivada, ocorreria a biossíntese *de novo* de compostos secundários. Essa biossíntese poderia ocorrer em todos os estágios de desenvolvimento dos lepidópteros. Neste último caso ocorreria uma total independência das plantas produtoras de compostos químicos; numa otimização desta síndrome esperaria-se que os lepidópteros tornassem-se polifágos não dependentes de mediação química.

Os compostos secundários atuando nestas síndromes poderiam ter variadas funções como defesa química ou precursores de feromônios.

Estas 3 síndromes estão representadas dentro da superfamília Papilionoideae (Brown *et al.* 1991). Borboletas da tribo Troidini (Papilioninae), cujas larvas sequestram ácidos aristolóquicos, alcalóides, terpenos e compostos fenólicos de plantas Aristolochiaceae, e da subfamília Pierinae, cujas larvas sequestram glucosinolatos de Cruciferae e Capparidaceae, representariam a primeira síndrome. Borboletas das subfamílias

Acraeinae e Heliconiini (Nymphalidae), cujas larvas e adultos biosintetizam glicosídeos cianogênicos, representariam a terceira síndrome. Dentro das subfamílias Danainae e Ithomiinae as síndromes 1 e 2 estão representadas, sendo PAs os mediadores químicos.

Nos Ithomiinae, espécies mais primitivas sequestram PAs de suas plantas hospedeiras da larva (Echitoideae, Apocynaceae) (Trigo 1988, Trigo & Brown 1990, Orr *et al.* em preparação, Tabelas 2 e 5) representando a primeira síndrome. Nos ithomíneos cujas larvas se alimentam de Solanaceae, e também nos mais primitivos, machos adultos visitam fontes vegetais de PAs, representando a segunda síndrome. Neste caso Ithomiinae primitivos representariam uma fase de transição entre a primeira e a segunda síndrome.

Entretanto pouco se sabe sobre o papel de compostos químicos presentes em Solanaceae na interface Ithomiinae/Solanaceae. Freitas *et al.* (em preparação) verificaram que larvas de *Placidula euryanassa* sequestram alcalóides tropânicos de sua planta hospedeira, a solanácea *Brugmansia suaveolens*. Estes alcalóides estão presentes em pequenas quantidades nos adultos recém-emergidos e adultos capturados no campo, sendo que os últimos apresentam altas quantidades de PAs. Da mesma forma Trigo *et al.* (em preparação) verificaram que larvas e pupas de *Tithorea harmonia* apresentam um alcalóide tipo piperidina, provavelmente sequestrado (e talvez modificado) de sua planta hospedeira da larva, *Prestonia acutifolia*.

CAPÍTULO 4

INCORPORAÇÃO DE PAS POR BORBOLETAS ITHOMIINAE.

1. INCORPORAÇÃO DE PAS (MONOÉSTERES) POR ADULTOS DE *Mechanitis polymnia*.

O estudo de incorporação de PAS, monoésteres de estrutura 6, por adultos (machos e fêmeas) de *Mechanitis polymnia* teve por objetivo verificar se ocorriam mudanças estruturais ou estereoquímicas nestes alcalóides quando ingeridos pelos lepidópteros.

A análise inicial de PAS, através de CG-EM, em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* coletados no campo apresentou majoritariamente a presença de PAS com configuração 7R-OH: licopsamina (6c) (80%-100%) e intermedina (6b) (0-20%) (ver Tabela 3.4., Capítulo 3). Nenhum traço de rinderina (6d) ou equinatina (6e) foi encontrado, embora os adultos destes lepidópteros se alimentem com frequência de flores de *Eupatorium laevigatum* e *Eupatorium maximiliani*, as quais contêm principalmente estes alcalóides (ver Tabela 3.1., Capítulo 3).

A análise de machos e fêmeas de outras espécies capturadas

no campo (P.e. *Aeria olena*, *Tithorea harmonia*, *Epityches eupompe* - ver Capítulo 3) também mostrou somente a presença de licopsamina (6c) e intermedina (6b) nestes lepidópteros.

A maioria dos relatos na literatura sobre a presença de PAs em lepidópteros mostram a presença dos alcalóides com configuração 7*R*-OH (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Configuração do 7OH de PAs monoésteres presentes em algumas espécies de lepidópteros e plantas.

Lepidóptero	7OH	Fontes vegetais	7OH	Ref
<i>Gnophaela latipennis</i> (Arctiidae)	R	<i>Hackelia floribunda</i> (Boraginaceae)	S	1
<i>Hyalurga syma</i> (Arctiidae)	R	<i>Heliotropium transalpinum</i> (Boraginaceae)	R,S	2
<i>Euploea sylvester</i> (Danainae)	R	desconhecida (talvez <i>Parsonsia</i> , Apocynaceae)	?	3
<i>Euploea tulliolus</i> <i>tulliolus</i>	R	desconhecida (talvez <i>Parsonsia</i> , Apocynaceae)	?	7
<i>Danaus chrysipus</i> (Danainae)	R	desconhecida	?	3
<i>Danaus affinis</i>	R	desconhecida	?	3
<i>Danaus hamatus</i>	R	desconhecida	?	3
<i>Danaus plexippus</i>	R	<i>Senecio mikanioides</i> (Asteraceae)	R	4
<i>Danaus plexippus</i>	R,S	desconhecida	?	5
<i>Idea leuconoe</i> (Danainae)	R	<i>Parsonsia laevigata</i> (Apocynaceae)	R	6

1. L'Empereur *et al.* (1989); 2. Trigo *et al.* (1993); 3. Edgar *et al.* (1979); 4. Stelljes & Seiber (1990); 5. Kelley *et al.* (1987); 6. Nishida *et al.* (1991); 7. Edgar (1975).

A hipótese inicial era que estes lepidópteros deveriam estar invertendo a hidroxila do centro assimétrico C-7S quando ingerissem PAs com a configuração S como em 6d e 6e. Para testar esta hipótese larvas de *Mechanitis polymnia* foram criadas em laboratório, até a pupação, e alimentadas com folhas de sua planta hospedeira *Solanum paniculatum* (uma planta sem PAs). Os adultos recém-emergidos da pupa foram alimentados, em experimentos diferentes, com um só isômero dos alcalóides de estrutura 6, isolados e purificados de fontes vegetais (ver Capítulo 2) : indicina (6a), intermedina (6b), licopsamina (6c), rinderina (6d) e equinatina (6e). Estes alcalóides são encontrados frequentemente em fontes vegetais visitadas por machos de *Mechanitis polymnia* (ver Tabela 3.1, Capítulo 3). Um dia após a ingestão dos PAs, os lepidópteros foram extraídos, fracionados quimicamente e a fração alcaloidal total analisada por CG-EM.

1.1. Experimentos com (+)-indicina (7R-OH, 2'R-OH, 3'S-OH) (6a).

Machos e fêmeas alimentados com indicina pura (7R-OH, 2'R-OH, 3'S-OH) incorporaram 100% deste alcalóide sem modificações (Figura 4.1).

1.2. Experimentos com (+)-intermedina (7R-OH, 2'S-OH, 3'R-OH) (6b) (Figura 4.2).

Machos alimentados com intermedina pura (7R-OH, 2'S-OH, 3'R-OH) (6b) apresentaram 62% do alcalóide não modificado e 38% de inversão da hidroxila do C-3', levando a licopsamina (7R-OH, 3'S-OH) (6c).

Fêmeas alimentadas com 6b puro apresentaram 91% do alcalóide não modificado e 9% de inversão da hidroxila do C-3', levando a licopsamina.

Rinderina (6d) e equinatina (6e) não foram detectados em nenhum dos sexos.

1.3. Experimentos com (+)-licopsamina (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6c). (Figura 4.3). Machos alimentados com licopsamina pura (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6c) incorporaram a maior proporção deste alcalóide sem modificações (86%). A inversão do 3'-OH ocorreu em menor proporção (14%) levando a intermedina (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*R*-OH) (6b). Rinderina (6d) e equinatina (6e) não foram encontrados.

Fêmeas alimentadas com licopsamina pura apresentaram o mesmo padrão de machos, sendo observados somente traços de equinatina e rinderina.

1.4. Experimentos com (+)-rinderina (7*S*-OH, 2'*S*-OH, 3'*R*-OH) (6d). (Figura 4.4). Machos alimentados com rinderina pura (7*S*-OH, 2'*S*-OH, 3'*R*-OH) (6d), inverteram dois centros assimétricos levando a licopsamina (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6c), encontrada numa proporção de 58%. A inversão apenas da hidroxila do C-7 ocorreu em menor proporção (26%) levando a intermedina (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*R*-OH) (6b). Equinatina (7*S*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6e) foi produzida em 16% pela inversão do 3'-OH. Rinderina foi encontrada somente em traços.

Fêmeas alimentadas com rinderina pura inverteram os dois

centros assimétricos numa proporção de 17%, levando à licopsamina; a inversão de 13% do 7-OH levou a intermedina; e a inversão de 13% do 3'-OH levou a equinatina. A maior parte da rinderina (57%) foi incorporada sem modificações.

1.5. Experimentos com (+)-equinatina (7*S*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6e). (Figura 4.5). Machos alimentados com equinatina pura (7*S*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6e), inverteram em maior proporção somente a hidroxila do centro assimétrico C-7; o alcalóide encontrado em maior proporção (80%) foi licopsamina (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (6c). A inversão de dois centros assimétricos ocorreu em menor proporção (10%) levando a intermedina (7*R*-OH, 2'*S*-OH, 3'*R*-OH) (6b). Foram encontrados 10% de equinatina e somente traços de rinderina.

Fêmeas alimentadas com equinatina pura apresentaram o padrão semelhante ao daquelas que se alimentaram de rinderina. Inverteram somente 48% do centro assimétrico 7-OH levando à licopsamina; a inversão de 4% dos centros assimétricos 7-OH e 3'-OH levou a intermedina, e a inversão de menos de 1% do 3'-OH levou a rinderina. Quase a metade da equinatina foi incorporada sem modificações (47%).

1.6. Experimentos com (-)-amabilina (2'*S*-OH, 3'*S*-OH) (13b). Machos alimentados com amabilina pura (2'*S*-OH, 3'*S*-OH) incorporaram 100% deste alcalóide sem modificações (Figura 4.6.).

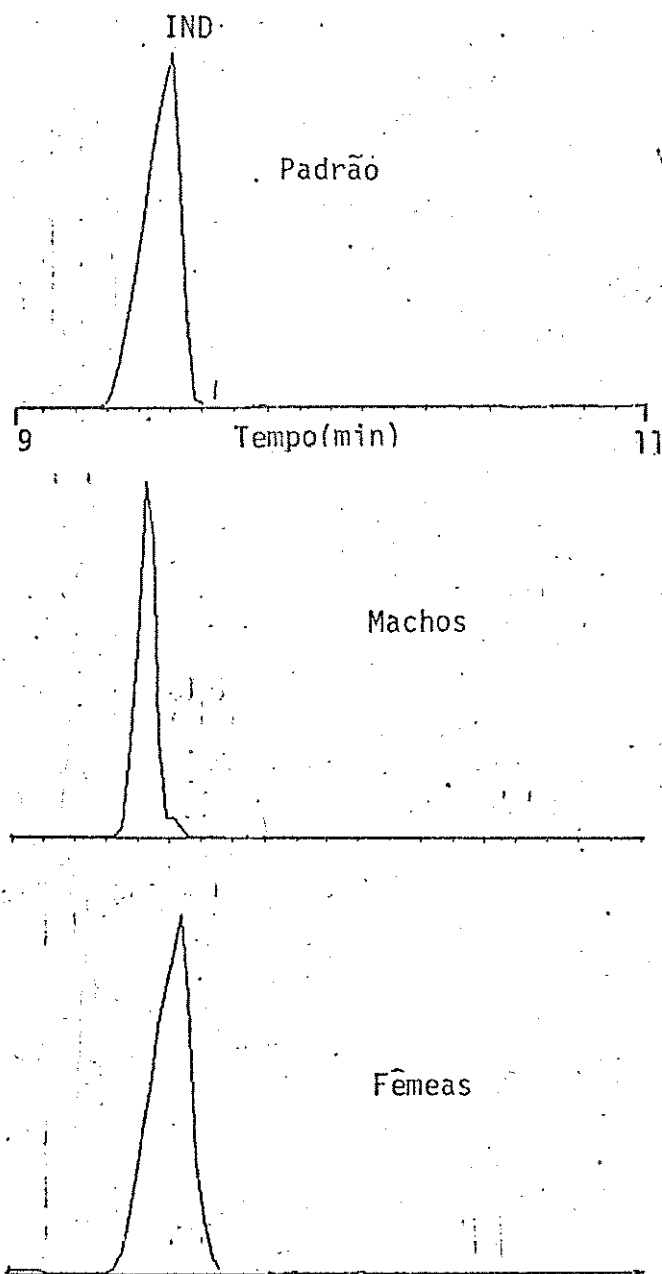


Figura 4.1. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* alimentados com indicina (IND). Somente substâncias com íons a m/z 138 são mostradas.

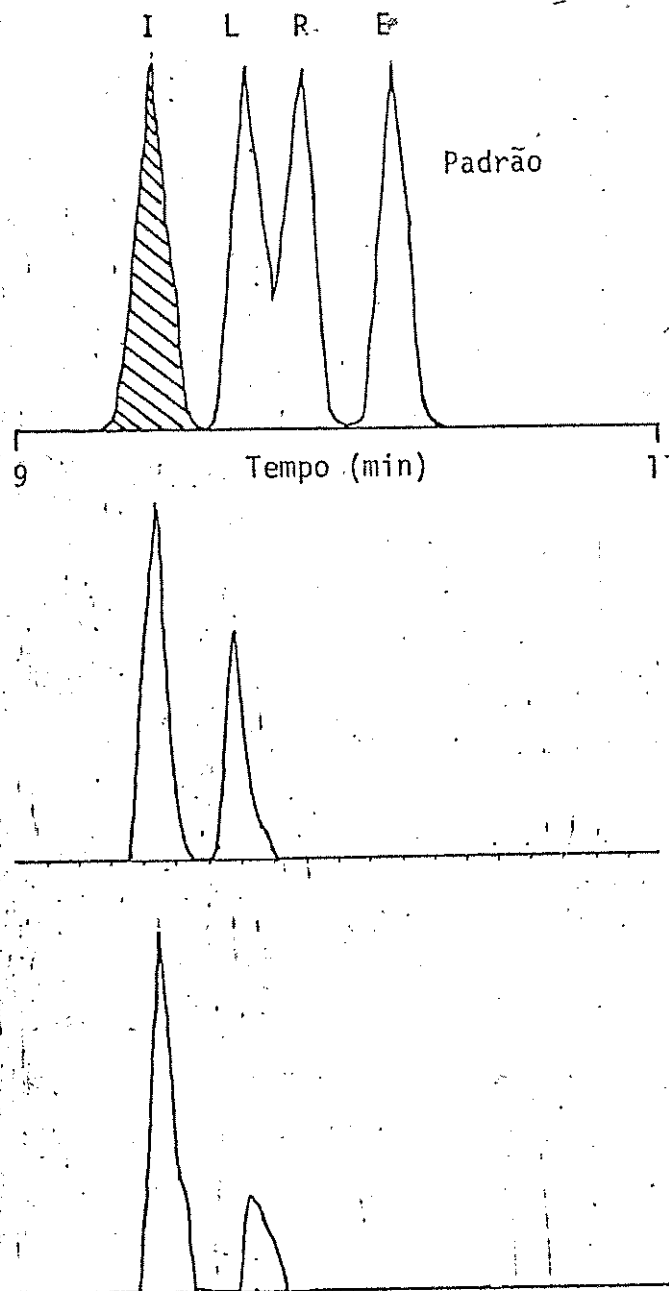


Figura 4.2. CG-EM de PAS em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* alimentados com intermedina (hachurado). L: licopsamina; I: intermedina; R: rinderina; E: equinatina. Somente substâncias com íons a m/z 138 são mostradas.

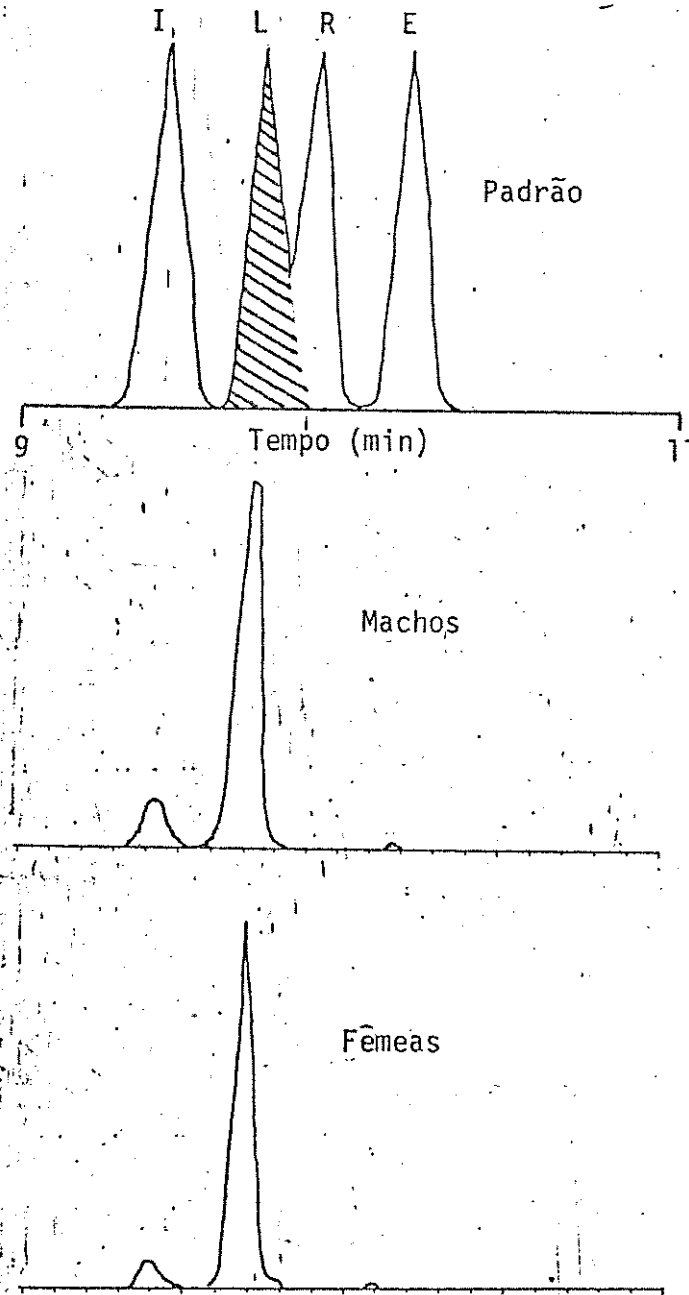


Figura 4.3. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* alimentados com licopsamina (hachurado). L: licopsamina; I: intermedina; R: rinderina; E: equinatina. Somente substâncias com íons a m/z 138 são mostradas.

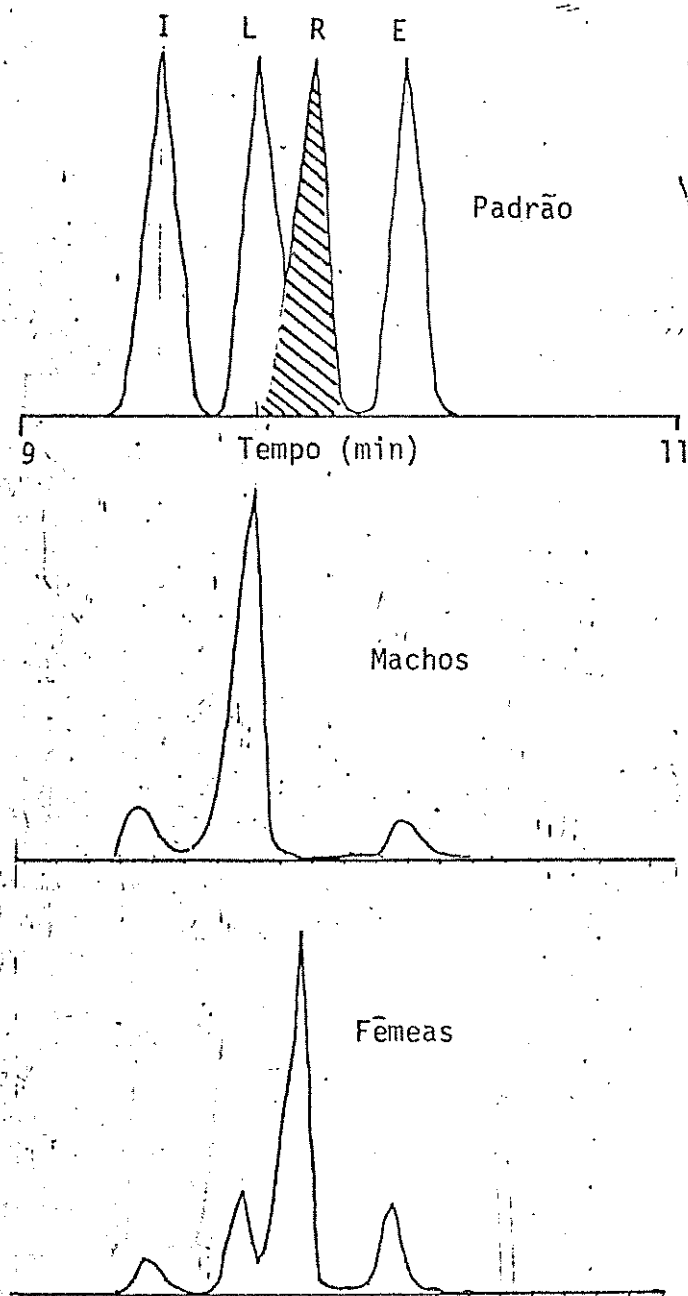


Figura 4.4. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* alimentados com rinderina (hachurado). L: licopsamina; I: intermedina; R: rinderina; E: equinatina. Somente substâncias com íons a m/z 138 são mostradas.

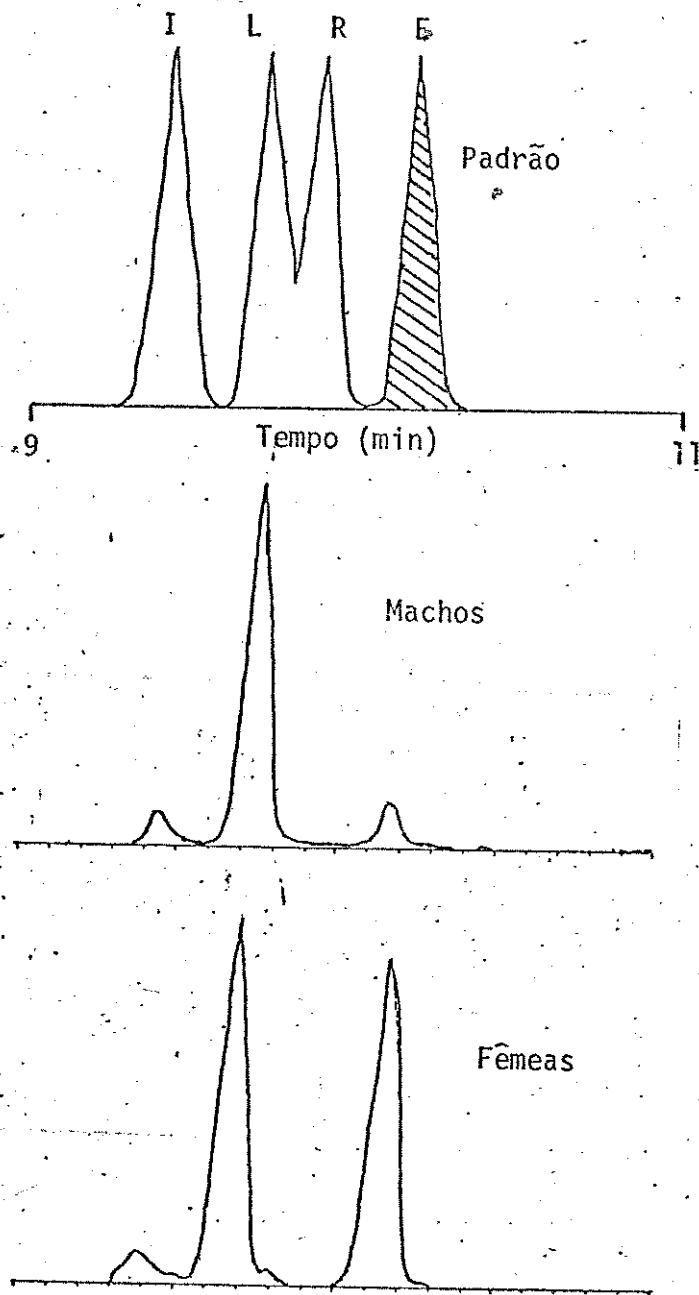


Figura 4.5. CG-EM de PAs em machos e fêmeas de *Mechanitis polymnia* alimentados com equinatina (hachurado). L: licopsamina; I: intermedina; R: rinderina; E: equinatina. Somente substâncias com íons a m/z 138 são mostradas.

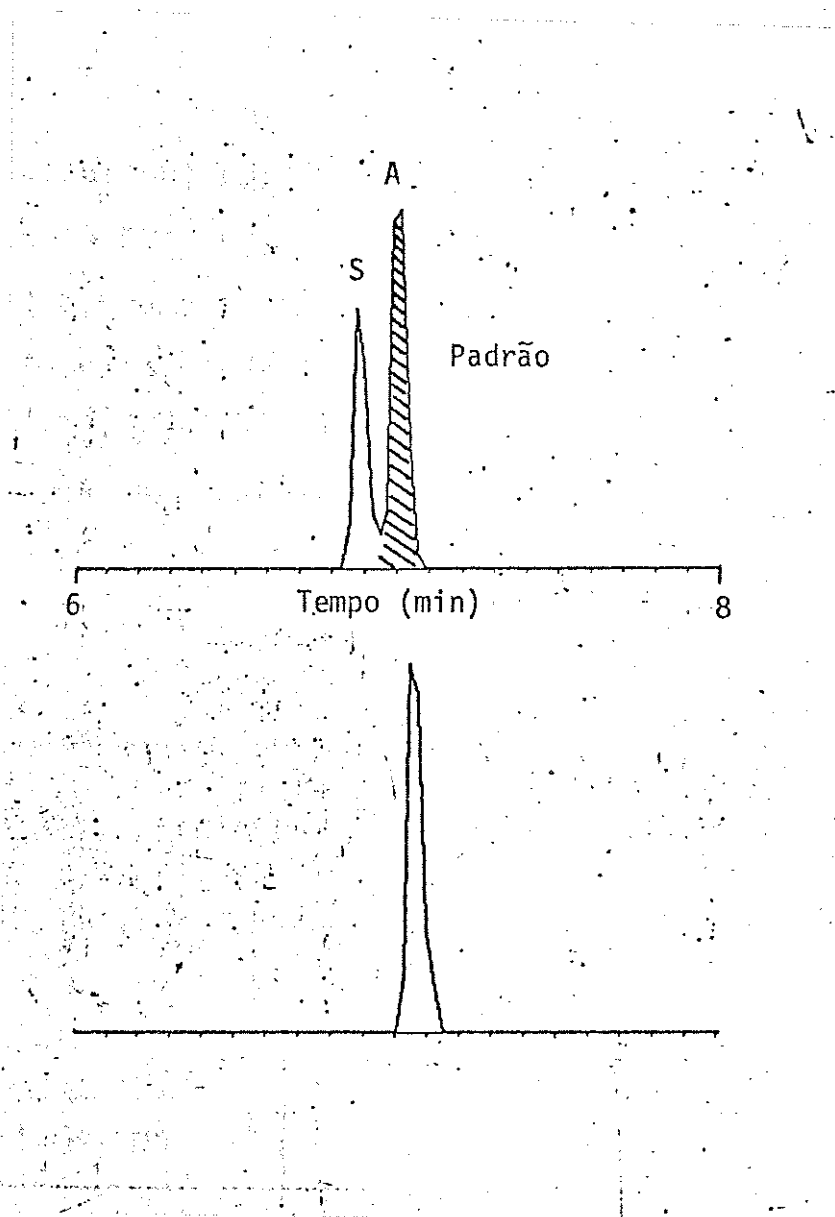


Figura 4.6. CG-EM de PAs em machos *Mechanitis polymnia* alimentados amabilina (hachurado). A: amabilina; S: supinina. Somente substâncias com íons a m/z 122 são mostradas.

Os resultados acima mostram, que machos modificam os alcalóides ingeridos para uma configuração preferencial 7R-OH, enquanto que fêmeas transformam pouco destes PAs em 7R-OH, quando comparadas a machos. A eficiência de conversão de 7S-OH (rinderina e equinatina) para 7R-OH (licopsamina e intermedina) é de aproximadamente 90% nos machos e entre 30 e 53% nas fêmeas (Tabela 4.2). Não ocorreu inversão no centro assimétrico do C-8 do anel. Verificou-se ainda que além de inverter 7S-OH para 7R-OH, *Mechanitis polymnia*, em alguns casos, também inverte o 3'R-OH para 3'S-OH. Não ocorreu inversão no centro assimétrico C-2'. A inversão da estereoquímica do ácido nécico não é registrada anteriormente na literatura.

Tabela 4.2. Eficiência de conversão para 7R-OH.

Dieta	Abundância Relativa (%)	
	♂♂	♀♀
Rinderina	84	30
Equinatina	90	53

A inversão do centro assimétrico C-7 para a configuração R não foi total nos experimentos, como provavelmente ocorre na natureza. Isso pode ter relação com a cinética da

incorporação/inversão de PAs 7S-OH. Talvez o tempo entre a ingestão dos PAs e a extração dos lepidópteros para análise não tenha sido suficiente para que a inversão do centro assimétrico C-7 tenha ocorrido totalmente. Mais estudos usando períodos de "incubação" variáveis podem elucidar melhor esta questão.

1.7. INVERSÃO ESTEREOQUÍMICA DOS CENTROS ASSIMÉTRICOS DE HIDROXILAS SECUNDÁRIAS. SUBSÍDIOS PARA UMA NOVA HIPÓTESE PARA A EVOLUÇÃO DA AQUISIÇÃO DE PAs POR LEPIDÓPTEROS.

Dois cenários (hipóteses) diferentes têm sido sugeridos para explicar a evolução da aquisição de PAs por lepidópteros.

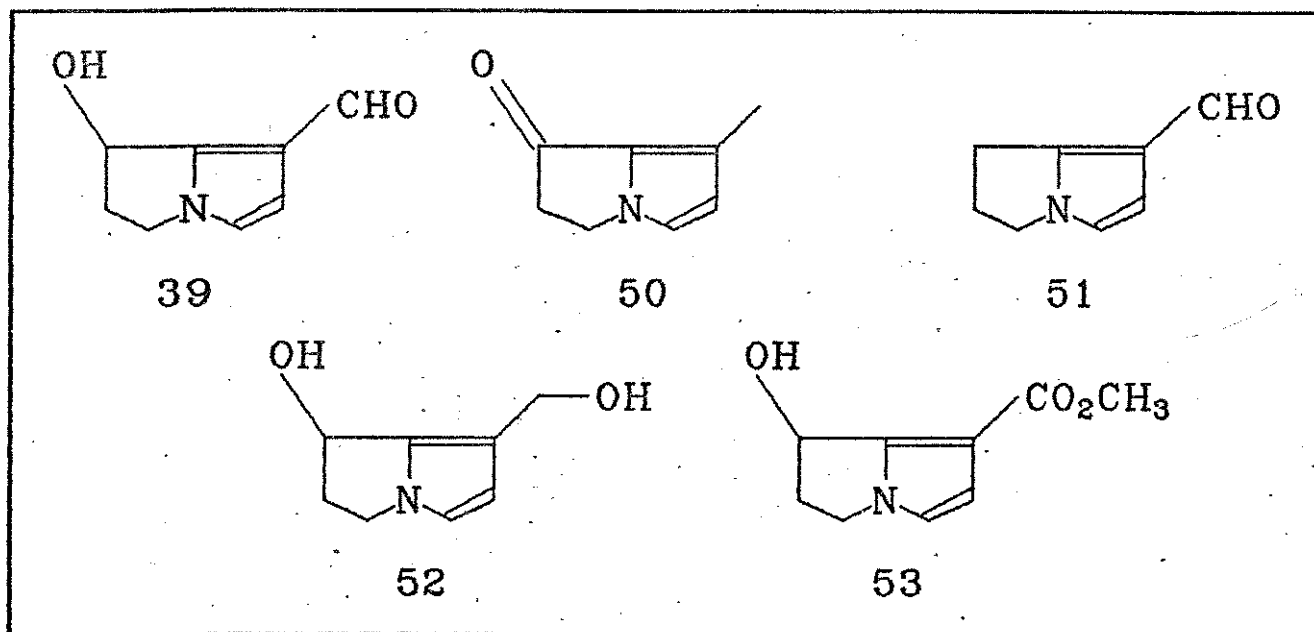
1. Cenário 1 - Hipótese de Edgar *et al.* (1974) (ver também Edgar 1975, 1982):

Borboletas ancestrais do complexo Danainae/Ithomiinae modernos tiveram uma longa associação com plantas contendo PAs (provavelmente 1,2-dehidropirrolizidínicos), durante a qual a dependência que observamos atualmente, se desenvolveu. Subsequente mudanças evolutivas em plantas e insetos modificaram a situação original para aquela que se observa atualmente.

Existiriam 3 zonas de influência química nas plantas hospedeiras ancestrais contendo PAs, que poderiam influenciar o comportamento de borboletas ancestrais que se alimentassem delas.

A primeira seria relacionada a derivados de PAs mais voláteis (por exemplo ácidos néricos - 42, 43) que deveriam atrair machos e fêmeas para a vizinhança da planta hospedeira larval, da mesma forma que esses compostos atualmente atraem machos (e algumas fêmeas) de Danainae e Ithomiinae.

Compostos químicos menos voláteis (p.e. desidropirrolizinas - 39, 50, 51, 52, 53) (Esquema 4.1) deveriam formar uma zona intermediária nas vizinhanças da planta hospedeira da larva. Ali fêmeas tornariam-se receptivas ao machos e a cópula ocorreria.



Esquema 4.1.

Finalmente compostos químicos de baixa volatilidade, sobre ou perto da superfície da planta hospedeira provocaria o comportamento de oviposição das fêmeas.

Machos que desenvolveram a capacidade de produzir e disseminar desidropirrolizinas, as quais induziriam o comportamento reprodutivo das fêmeas, poderiam copular na ausência da planta hospedeira, sendo positivamente selecionados.

Edgar *et al.* (1974) ainda sugerem que a associação de *Danaus* (Danainae) com plantas hospedeiras da larva que apresentam

cardenolidas reflete uma diversificação das plantas ancestrais de Danainae e Ithomiinae, as quais possuíam cardenolidas, além de apresentarem PAs. Essa diversificação em plantas das famílias Solanaceae (sem PAs), Boraginaceae e Asteraceae (com PAs) e Asclepiadaceae (com cardenolidas) originou-se provavelmente de Apocynaceae (com PAs e cardenolidas). Essa diversificação foi acompanhada por uma diversificação no complexo Danainae/Ithomiinae, onde os primeiros e os Ithomiinae mais primitivos (*Tithorea*, *Tellervo*, *Elyzunia*) se mantiveram sobre Asclepiadaceae e Apocynaceae, enquanto que a grande maioria dos Ithomiinae colonizaram Solanaceae, com ambos os grupos se alimentando como adultos de fontes vegetais com PAs (Asteraceae e Boraginaceae).

2. Cenário 2 - Hipótese de Boppré (1978):

Borboletas ancestrais do complexo Danainae/Ithomiinae obtinham nutrição de néctar de várias espécies de plantas. Aqueles indivíduos que podiam tolerar as propriedades tóxicas de PAs presentes no néctar de algumas espécies teriam uma vantagem seletiva devido a proteção química conferida por PAs. Seguida desta postulada aquisição "acidental" de PAs, estes lepidópteros não só desenvolveram uma preferência por plantas contendo PAs, mas também desenvolveram um sistema de incorporação para PAs que permitia obtê-los de fontes vegetais outras que néctar (p.e. plantas secas de *Heliotropium*, uma fonte de PA mais efetiva e com maior quantidade de PAs do que fontes de néctar). Paralelamente, com o desenvolvimento da impalatabilidade devido a PAs, sinais de aposematismo se desenvolveram, seguidos pela evolução do

mimetismo.

O uso de PAs ou derivados destes para comunicação sexual seria um segundo passo. Plantas com PAs deveriam ter atuado como locais de cópula, atraindo os dois sexos e também separando as borboletas ancestrais do complexo *Danainae/Ithomiinae* de seus mimicos. Para evitar a corte ou mesmo o acasalamento com espécies mimicas, fêmeas devem ter sido selecionadas a aceitarem machos somente quando o "odor de PAs" estava presente. Subsequentemente aqueles machos que disseminassem este "odor de PAs", ou derivados de PAs, tiveram uma vantagem seletiva sobre aqueles machos que não produziam estes "odores", porque poderiam persuadir as fêmeas a acasalarem longe dos locais de cópula sem perderem a especificidade.

Questões não respondidas pelas hipóteses acima:

1. Hipótese 1: O que levou as borboletas ancestrais do complexo *Danainae/Ithomiinae* a ultrapassarem uma barreira química e se especializarem sobre plantas com PAs e cardenolidas?

2. Hipótese 2: O que levou as borboletas ancestrais do complexo *Danainae/Ithomiinae* a utilizarem posteriormente plantas hospedeiras da larva com PAs, e subsequentemente (no tempo evolutivo) a abandonar este recurso?

Além destas questões, a pergunta crucial que as duas hipóteses não esclarecem é: como se explicaria a especiação do complexo *Danainae/Ithomiinae* em um amplo conjunto de espécies muitas vezes miméticas e simpátricas e o subsequente isolamento reprodutivo destas, baseando-se somente em feromônios derivados de PAs, os quais apresentam uma baixa diversidade estrutural (com

um único centro quiral (39, 52, 53) e sem centros quirais (50, 51)?

3. Cenário 3 aqui proposto:

Levando-se em conta as hipóteses apresentadas acima, as questões sobre estas que permanecem obscuras, e os dados aqui observados, como: 1. estereoquímica dos PAs, 2. provável utilização de maquinaria enzimática para incorporação (ver discussão abaixo), 3. inversão de hidroxilas secundárias (provavelmente via oxidação e redução - ver Schulz 1991), 4. a baixa eficiência de fêmeas de Ithomiinae em relação a transformação destes alcalóides, além de 5. utilização destes PAs para biossíntese de feromônios (ver referências na Tabela 4.3), e 6. atuação destes alcalóides na proteção química de lepidópteros, sugere-se aqui um outro cenário possível para a evolução da aquisição de PAs por lepidópteros.

1. Larvas de borboletas ancestrais do complexo Danainae/Ithomiinae, cujos adultos já apresentavam um sistema de comunicação química intrasexual já elaborado, começaram a utilizar do recurso alimentar plantas com PAs. Isso se deu, provavelmente, devido à competição interespecífica por alimento, já que este recurso estaria praticamente livre de herbívoros, pois PAs, em plantas, devem ter sido selecionados por estas como defesa química contra um espectro de inimigos entre os quais se encontrariam patógenos e herbívoros generalistas. Estes lepidópteros ultrapassaram então a barreira química que estes alcalóides representariam na proteção química destas plantas.

A capacidade de larvas de Danainae e Ithomiinae, que não se alimentam de plantas com PAs, de sequestrarem artificialmente estes alcalóides, quando aplicados em suas plantas hospedeiras da larva (Rothschild & Edgar 1978, Trigo & Motta 1990) suporta a hipótese de larvas de borboletas ancestrais a estes dois grupos terem se utilizado de plantas contendo PAs (também de acordo com a hipótese 1). Além disso Ithomiinae primitivos (*Tellervo*, *Tithorea*) se alimentam quando larvas, de plantas que apresentam PAs (Echitoideae: Apocynaceae) (Trigo & Brown 1990, Orr *et al.* em preparação).

2. Embora nenhum estudo filogenético e quimiosistemático sobre plantas com PAs tenha sido realizado, sugere-se aqui que plantas com PAs macrocíclicos devem ter sido inicialmente colonizadas pelas borboletas ancestrais. A estereoquímica de alcalóides macrocíclicos, quase exclusivamente com a configuração 7R (Rizk 1991)¹ pode ter selecionado, nos primeiros lepidópteros que se utilizavam de plantas com PAs, a produção de um sistema de incorporação para a absorção destes alcalóides, produzindo uma adaptação fisiológica² a estes PAs. PAs de configuração 7R

1. 104 macrocíclicos com configuração 7R e 1 com configuração 7S.

2. Wink & Schneider (1988, 1990) sugerem que PAs devem ser incorporados através de um sistema carreador enzimático nos intestinos médios de lepidópteros. Hartmann *et al.* (resultados não publicados) sugere que PAs são incorporados passivamente como bases livres através da membrana no intestino médio, posteriormente N-oxidados na hemolinfa do inseto e incorporados nos tecidos.

apresentam uma conformação exo^2 (Figura 4.7), a qual proporcionaria a uma provável enzima uma aproximação pela face convexa do anel pirrolizidínico. Outros lepidópteros especialistas em PAs (p.e. Arctiidae) devem ter percorrido este mesmo caminho evolutivo, pois os PAs encontrados nestes lepidópteros são majoritariamente 7R (Tabela 4.1). Embora a aquisição de PAs por diversos grupos de lepidópteros e outros insetos deva ser polifilética (Boppré 1990), o *modus operandi* da incorporação destes alcalóides deve ser análogo, já que elas foram selecionadas por um único grupo estrutural de alcalóides.

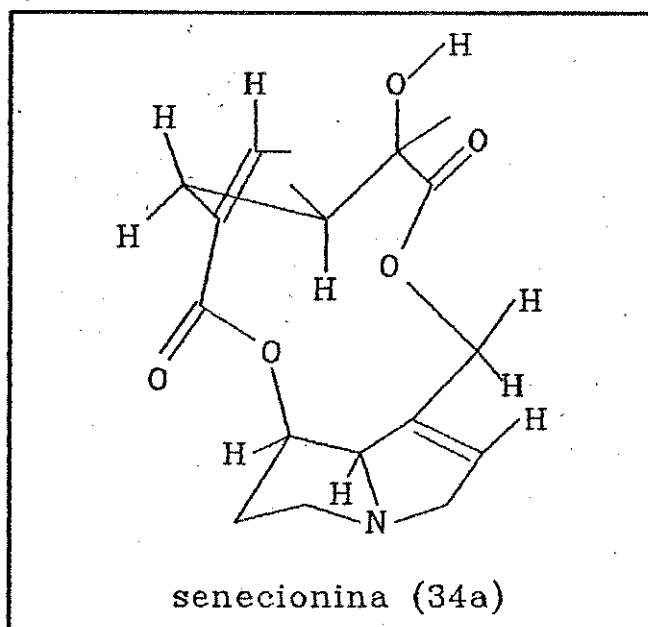


Figura 4.7. Conformação da senecionina (34a) proposta por Culvenor (1966).

3. O sentido de dobramento é definido pela posição relativa do átomo C-6 e dos átomos do anel insaturado C-1, C-2, C-3, N-4, C-8, com respeito ao plano definido pelos átomos N-4, C-5, C-7. Se eles estão do mesmo lado deste plano, o dobramento é *endo*, e se eles estão do lado oposto, *exo*.

3. Lepidópteros que incorporavam PAs (sempre de configuração 7R) tornaram-se protegidos quimicamente contra predadores aumentando assim sua aptidão. PAs devem atuar contra um amplo espectro de predadores (ver Capítulo 5), provavelmente independente da configuração no centro assimétrico C-7.

4. A proteção química contra predadores adicionou um novo componente neste cenário. Lepidópteros que acumulassem uma maior quantidade de PAs seriam selecionados favoravelmente. Portanto machos que apresentassem uma maior quantidade de PAs para passar para fêmeas durante o acasalamento seriam selecionados favoravelmente por fêmeas, por ocasião do acasalamento. Como PAs (macrocíclicos, diésteres e monoésteres) não são voláteis, machos que desenvolvessem um sistema de comunicação sexual que assinalasse as fêmeas que eles possuíam uma grande quantidade de PAs seriam selecionados favoravelmente. Desidropirrolizinas voláteis seriam sinais químicos ideais, pois são necessariamente derivados de PAs. Em *Utetheisa ornatix* (Arctiidae) sugere-se que desidropirrolizinas estariam sendo utilizadas como a medida da capacidade de machos incorporarem PAs. Estes PAs, por sua vez, representariam uma medida da capacidade potencial de defesa química (Conner *et al.* 1981), ou da quantidade potencial de PAs que seriam transferidos dos machos para fêmeas por ocasião da cópula, e que estas poderiam usar para sua própria defesa ou defesa de seus descendentes (neste caso proteção química dos ovos) (Dussourd *et al.* 1988).

Portanto, não seria necessário uma grande variedade estrutural de desidropirrolizinas, desde que eles funcionariam

somente como uma medida da capacidade de machos incorporarem PAs. Dados experimentais mostram que a variedade estrutural de desidropirrolizinas não é grande, quando comparada com o número de espécies de borboletas das subfamílias Ithomiinae e Danainae (Tabela 4.3), sendo que independente das relações filogenéticas dentro de cada subfamília, as desidropirrolizinas encontradas são quase sempre as mesmas. Em outra família de lepidópteros, Arctiidae (pertencentes a subordem Heterocera)⁴, a espécie *Phragmatobia fuliginosa* produz quantidades diferenciais de 39 e 50, quando alimentadas de fontes de PAs diferentes (p.e. macrocíclicos e monoésteres 1,2-insaturados) (Krasnoff & Roelofs 1989); o mesmo fenômeno é encontrado pelos mesmos autores no arctídeo *Pyrrharctia isabella*. Além disso, Culvenor & Edgar (1972) encontraram uma variação na quantidade de 39 e 50 em indivíduos do arctídeo *Utetheisa lotrix* capturados no campo. Os dados da Tabela 4.3 mostram também que existe uma diferenciação estrutural de derivados de PAs somente à nível de subfamílias. Danainae apresentam geralmente desidropirrolizinas de estruturas 39, 50 e 51, enquanto que Ithomiinae apresentam geralmente a estrutura 53, além dos Ithomiinae mais avançados (*sensu* Drummond & Brown 1987) apresentarem a lactona (ver Esquema 1.4, Capítulo 1) derivada do ácido nécico (-)-viridiflórico (43a) (Schulz 1992) (Tabela 4.3).

Feromônios responsáveis pelo reconhecimento intersexual, e que promoveriam o isolamento reprodutivo das espécies, seriam

4. Subordem Heterocera: mariposas; subordem Rhopalocera: borboletas.

outros voláteis, não necessariamente derivados de PAs. Estes voláteis poderiam ser biossintetizados pelos lepidópteros via outros precursores presentes nas planta hospedeiras da larva ou em fontes de néctar dos adultos. Edgar (1975), Schulz (1987), Schulz *et al.* (1988a,b) e Francke *et al.* (1989) verificaram que as estruturas sexuais de machos de Danainae e Ithomiinae possuem um amplo espéctro de substâncias voláteis não relacionadas com PAs, sendo que esse espectro apresenta uma variação interespecífica (Schulz 1987).

5. Posteriormente duas alternativas seriam possíveis:

5.1. Estes insetos exploraram outras plantas hospedeiras da larva, as quais apresentavam PAs monoésteres de configuração 7R e 7S. Alcalóides com a configuração 7S-OR apresentavam um impedimento estérico para se complexarem com a enzima pré-existente específica para PAs com configuração 7R, pois possuem uma conformação dobrada-*endo* (ver Figura 4.8 e Culvenor & Woods 1965, Wodak 1975), o que dificultaria a aproximação da enzima pela face convexa do anel pirrolizidínico.

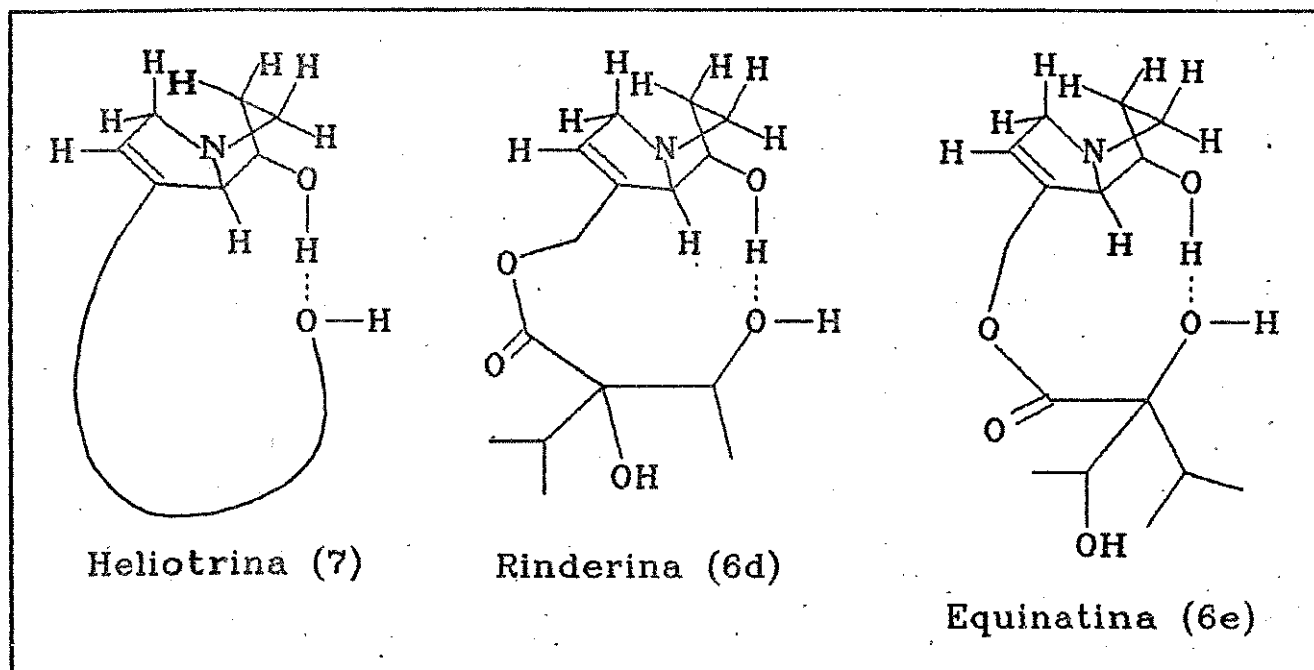


Figura 4.8. Conformação da heliotridina (7) segundo Wodak (1975). As conformações da rinderina (6d) e equinatina (6e) foram propostas baseadas nas conformações de 6b e 6c respectivamente (ver Figura 4.9).

5.2. Devido a competição, lepidópteros colonizaram outros grupos de plantas sem PAs. No caso de Dananinae, plantas das famílias Asclepiadaceae, Moraceae, e outras em menor escala, e no caso dos Ithomiinae, Solanaceae. Entretanto estas duas subfamílias mantiveram sua dependência de PAs, tanto em relação a defesa química, quanto que em relação a comunicação química. A manutenção desta dependência levou a estes lepidópteros a procurarem estes alcalóides, como adultos, em outras fontes vegetais, as quais muitas vezes apresentavam PAs (monoésteres e diésteres não macrocíclicos de configuração 7*S*), os quais não seriam eficientemente incorporados.

6. Indivíduos que desenvolveram um processo enzimático de

oxi-redução para a inversão do centro assimétrico 7S-OH, obtiveram vantagem adaptativa devido ao aumento da capacidade de exploração de recursos vegetais com configuração 7R e 7S⁵.

O fenômeno da inversão do centro assimétrico 7S-OH para 7R-OH foi observado inicialmente em mariposas da espécie *Cretonotos transiens* (Arctiidae) alimentadas com 7S-heliotrina (Bell et al. 1984, Bell & Meinwald 1986, e Wink et al. 1988). Wink et al. (1988) mostraram que machos invertiam 7S-heliotrina para 7R-heliotrina mais que fêmeas. Os autores acima relacionaram a inversão da estereoquímica do 7-OH com a produção de feromônios por parte de machos, já que a configuração do hidroxidanaidal encontrado na coremata destes arctiídeos é 7R-OH.

Entretanto o cenário evolutivo até aqui descrito sugere que a produção de desidropirrolizinas com configuração 7R-OH por lepidópteros é consequência e não causa da inversão do centro assimétrico C-7.

A rota biosintética que leva à inversão dos centros assimétricos das hidroxilas secundários em *Mechanitis polymnia* (experimentos aqui realizados) deve iniciar com a oxidação enzimática do C-7 e/ou C-3', seguida pela sua redução assimétrica. Schulz (1991) mostrou que o caminho biossintético para a produção do 7R-hidroxidanaidal por machos de *Cretonotos transiens* alimentados com 7S-heliotrina seguia-se via um processo de oxi-redução, iniciando-se pela desidrogenação do anel

5. Hartmann (comunicação pessoal) sugere alternativamente que 7R PAs podem ser mais estáveis que 7S, portanto a inversão deveria ter sido selecionada pela "estabilidade bioquímica" da forma 7R.

pirrolizidínico produzindo um alcalóide instável tipo pirrol; a subsequente hidrólise da função éster, e a oxidação final do OH primário produzindo o hidroxidanaidal (39) (Esquema 4.1).

7. Fêmeas perderiam paulatinamente a capacidade de inversão de 7S PAs, e provavelmente também de incorporação de PAs⁶, já que obtinham estes alcalóides via cópula, a qual deve ocorrer em um curto tempo após a emergência da pupa. Esta aquisição, via cópula, minimizaria os riscos de predação por ocasião da visita de fêmeas sem PAs à fontes vegetais destes alcalóides.

A menor capacidade de fêmeas em converter o 7S-OH em 7R-OH coaduna com evidências e observações de que fêmeas de Ithomiinae raramente visitam fontes de PAs (Pliske 1975a,c, Trigo 1988) e obtém estes alcalóides através dos machos por ocasião da cópula (Brown 1985).

6. Experimentos para se verificar se fêmeas apresentam uma capacidade menor de incorporação de PAs do que machos estão sendo realizados.

Tabela 4.3. Derivados de PAS (feromonios) encontrados em estruturas sexuais de machos de borboletas Danainae e Ithomiinae.

Espécies	Substâncias						Referências
	50	39	51	52	53	L*	
DANAINAE							
Amaurina							
<i>Amauris ochlea</i>	+	-	-	-	-	-	5
<i>A. albinaculata</i>	-	-	-	-	-	-	5
<i>A. echeria</i>	+	+	-	-	-	-	5
<i>A. hecate</i>	+	-	-	-	-	-	5
<i>A. niavius</i>	+	-	-	-	-	-	5
<i>A. tartarea</i>	-	-	-	-	-	-	5
<i>Parantica aglea</i>	+	+	-	-	-	-	5
<i>Ideopsis juvena</i>	-	+	-	-	-	-	5
Danaina							
<i>Tirumala petiverana</i>	+	-	-	-	-	-	5
<i>T. linnae</i>	+	+	-	-	-	-	5
<i>T. septentrionis</i>	+	+	+	-	-	-	5
<i>T. formosa</i>	-	-	-	-	-	-	5
<i>Danaus hamatus hamatus</i>	+	+	-	-	-	-	1
<i>D. h. moderatus</i>	+	+	-	-	-	-	1
<i>D. affinis affinis</i>	+	-	+	-	-	-	1,2
<i>D. a. albistriga</i>	+	-	+	-	-	-	1
<i>D. punilus hebridesius</i>	-	+	-	-	-	-	1
<i>D. chrysippus petilea</i>	+	-	-	-	-	-	1
<i>D. c. dorippus</i>	+	-	-	-	-	-	1
<i>D. plexippus</i>	-	-	-	-	-	-	1,5
<i>D. gillyppus berenice</i>	+	-	-	-	-	-	1
<i>D. g. strigosus</i>	+	-	-	-	-	-	1
<i>D. formosa mercedonia</i>	-	-	-	-	-	-	1
<i>D. linnae petiverana</i>	+	-	-	-	-	-	1

Espécies	Substâncias						Referências
	50	39	51	52	53	L*	
<i>D. philene decipiens</i>	+	-	+	-	-	-	2
<i>D. plexippus erippus</i>	-	-	-	-	-	-	5
<i>D. genutia</i>	+	+	+	-	-	-	5
<i>D. eyesinus</i>	-	-	-	-	-	-	5
<i>D. plexaure</i>	+	-	-	-	-	-	5
Euploeina							
<i>Euploea nemertes</i>	-	+	-	-	-	-	1
<i>E. n. polywela</i>	-	+	+	-	-	-	2
<i>E. tulliolus tulliolus</i>	-	+	-	+	-	-	1
<i>E. sylvester sylvester</i>	+	+	-	-	-	-	1,5,7
<i>E. klugii</i>	-	+	-	-	-	-	5
<i>E. vulciber</i>	+	+	-	-	-	-	5
<i>E. core corina</i>	-	+	-	-	-	-	1,5
<i>E. treitschkei jessica</i>	-	+	-	-	-	-	1
<i>E. t. aenea</i>	-	-	-	-	-	-	2
<i>E. boisduvalii</i>	-	-	-	-	-	-	1
<i>E. b. fraudulenta</i>	-	-	-	+	-	-	2
<i>E. lewinii lilybaea</i>	-	+	-	-	-	-	1
<i>Idea iasonia</i>	+	+	-	-	-	-	5
Itunina							
<i>Lycorea ilione</i>	+	-	-	-	-	-	5
ITHOMIINAE							
Tithoreini							
<i>Tithorea harmonia furia</i>	-	-	-	-	+	-	7
<i>T. h. pseudethra</i>	-	-	-	-	+	-	6
Mechanitini							
<i>Mechanitis lysinnia</i>	-	-	-	-	-	-	5
<i>M. l. lysinnia</i>	apresenta desidropirrolizinas					-	6

Espécies	Substâncias						Referências
	50	39	51	52	53	L*	
<i>M. polyamia casabranca</i>	apresenta desidropirrolizinas					-	6
<i>M. isthmia veritabilis</i>	-	-	-	-	+	-	7
Oleriini							
<i>Oleria phenoxe</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					-	3
<i>O. makrena</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					-	3
Napeogenini							
<i>Hyaliris cana</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					-	3
Ithomiini							
<i>Ithomia iphianassa</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					-	3
Dircennini							
<i>Callithovia hezia hezia</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	4
<i>Dircenna dero</i>	-	-	-	-	-	-	5
Nova Tribo							
<i>Prittwitzia hymenaea</i>	-	-	-	-	+	+	4,6
<i>Pteronyzia beebel</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	3
<i>P. nubivaga</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	3
<i>P. veia</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	3
Godyridini							

Espécies	Substâncias						Referências
	50	39	51	52	53	L*	
<i>Godyris kedema</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	3
<i>Greta dercetis</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	3
<i>G. andronica</i>	não analisado qualitativamente para desidropirrolizinas					+	3

a. L: 2-hidroxi-2-(1-hidroetil)-3-metil- γ -butirolactona (ver Esquema 1.4, Capítulo 1).

1. Edgar (1975); 2. Edgar (1982); 3. Edgar *et al.* (1976); 4. Schulz (1992); 5. Schulz (1989a); 6. Schulz (comunicação pessoal); 7. Schulz *et al.* (1988).

1.8. INVERSÃO ESTEREOQUÍMICA DO CENTRO ASSIMÉTRICO 3'-OH: CASUALIDADE QUÍMICA?

A hipótese acima envolve um novo cenário para a evolução de aquisição de PAs em lepidópteros, explicando também a inversão no centro assimétrico C-7, observado neste experimento. Entretanto essa hipótese não esclarece o porque da inversão do 3'-OH, também aqui observada, quando *Mechanitis polymnia* é alimentada com rinderina (6d) e intermedina (6b), e a não inversão quando é alimentada com indicina (6a), licopsamina (6c) e equinatina (6e).

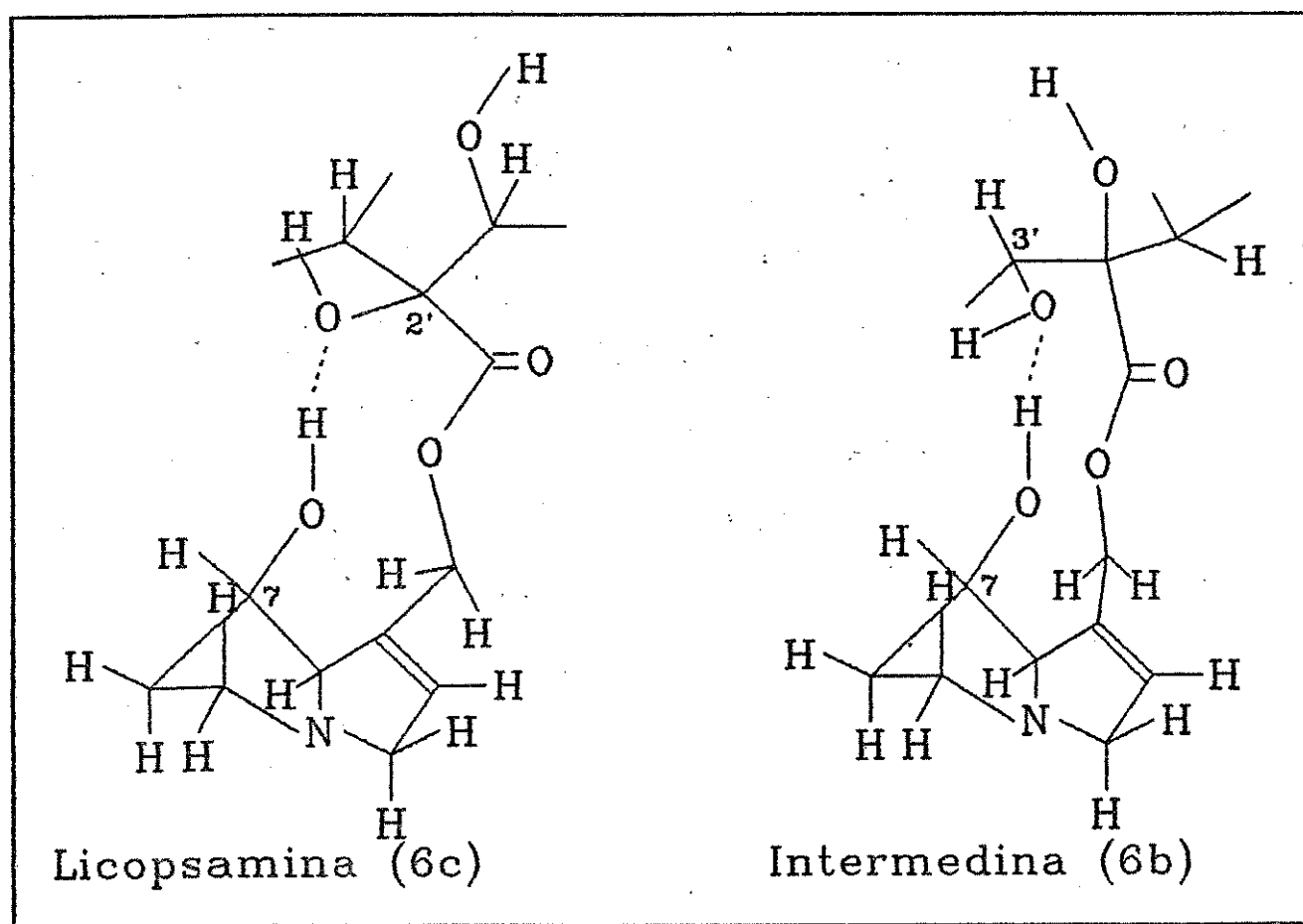


Figura 4.9. Conformação de cristais de licopsamina (6c) e intermedina (6b) (de MacKay et al. 1983).

A inversão deve estar relacionada com a conformação assumida pelos diastereoisômeros utilizados. Cristais de licopsamina (6c) e intermedina (6b) (ambos 7R-OH) apresentam uma ponte de H intramolecular entre o grupo hidroxila no C-7 do núcleo pirrolizínico e os grupos hidroxila do ácido esterificado. Na licopsamina a interação envolve o 2'OH (terciário) e na intermedina o 3'OH (secundário) (Figura 4.9) (MacKay *et al.* 1983). Essa conformação é assumida também em meio líquido (comparação com estudos de RMN em CDCl₃ - MacKay *et al.* 1983). Não existem estudos conformacionais de cristalografia, ou de RMN de rinderina (6d) e equinatina (6e) (ambos 7S-OH), entretanto rinderina apresenta o mesmo ácido néico da intermedina, o ácido (+)-traquelântico (42a), e a equinatina apresenta o ácido (-)-viridiflórico (43a), o mesmo ácido néico da licopsamina. Portanto supõe-se que rinderina apresente uma ponte de H entre o 3'OH (secundário) e o 7OH, e equinatina apresente uma ponte de H entre o 2'OH (terciário) e o 7OH (Figura 4.8). A minimização energética da molécula de heliotrina (7), um monoéster com a configuração 7S mostra que existe uma ponte de H entre o 2'OH e o 7'OH, levando a uma conformação dobrada *endo* (Wodak 1975) (Figura 4.8). Com base nestes dados sugere-se também a conformação dobrada-*endo* para a rinderina e equinatina (Figura 4.8)

Sugere-se que a ação da enzima de oxi-redução no caso da rinderina (6d) também atacaria o 3'OH (secundário) devido a sua proximidade do sítio ativo da enzima de oxi-redução (Figura 4.8). No caso da equinatina a ponte de H do 7-OH se forma com o 2'OH (terciário), o qual não pode ser oxidado. A distância entre o

3'OH da equinatina e o sítio ativo da enzima não favoreceria a inversão deste centro.

A não modificação de C-3' em PAs sem 7-OH (amabilina, 13b) (Figura 4.6) se deve provavelmente a parte ácida da molécula girar livremente em torno da ligação C-9. Em supinina (13a), outro PA sem a hidroxila no C-7, verifica-se através de estudos cristalograficos (MacKay *et al.* 1985) que esse alcalóide não assume a conformação "pseudo macrocíclica" semelhante aos monoésteres 6b e 6c em MacKay *et al.* (1983).

Entretanto a explicação para a inversão de parte do C-3' da intermedina permanece obscura.

A aquisição de indicina (6a) sem nenhuma modificação em ambos os sexos não é discutida aqui, desde que nenhum estudo conformacional deste alcalóide, ou de seus análogos com o ácido (-)-traquelântico, foi realizado.

Embora a parte ácida dos PAs incorporados não apresentem nenhuma estrutura relacionada nas estruturas sexuais de machos de *Mechanitis polymnia*, os ithomiolideos A (1'S,2S,3R)-2-hidroxi-2-(1-hidroxi-etil)-3-metil- γ -butirolactona e B (2S,3R)-2-acetil-2-hidroxi-3-metil- γ -butirolactona foram encontrados em estruturas sexuais de *Prittwitzia hymaenea* (Schulz 1992, ver Esquema 1.4, Capítulo 1). Esta estrutura foi primeiramente identificada por Edgar *et al.* (1975), sem que sua configuração absoluta fosse determinada. A configuração absoluta desta lactona está relacionada com aquela do ácido (-)-viridiflórico (43a), o ácido néxico na licopsamina (6c). Portanto, espera-se que outros Ithomiinae que se utilizem da lactona derivada da parte ácida na

comunicação química apresentem a mesma configuração absoluta desta lactona identificada acima.

2. INCORPORAÇÃO DE PAs MARCADOS RADIOATIVAMENTE COM [¹⁴C] POR *Mechanitis polymnia*.

2.1. INCORPORAÇÃO DE SENEACIONINA MARCADA COM [¹⁴C].

2.1.1. ANÁLISE QUANTITATIVA.

Larvas de *Mechanitis polymnia* alimentadas com senecionina [¹⁴C] (terciária [34a] e N-óxido) foram analisadas via cintilador, para a determinação da percentagem de assimilação de PAs, em 2 de seus estágios: 1. 48 horas após a ingestão, 2. adultos recém-emergidos da pupa, os quais serão chamados aqui de adultos I. Adultos recém emergidos da pupa de *M. polymnia* também foram alimentados com os mesmos alcalóides, sendo analisados 24 horas após a ingestão do alcalóide; estes adultos serão aqui chamados de adultos II.

Os resultados da Tabela 4.4. mostram a percentagem de assimilação destes alcalóides nos experimentos acima. A Tabela 4.5 mostra o arco-seno da percentagem de assimilação destes alcalóides. Essa transformação é necessária para a normalização das percentagens para análise estatística, desde que percentagens e proporções apresentam uma distribuição binomial ao invés de uma distribuição normal (Zar 1984).

A comparação entre os experimentos com senecionina terciária e senecionina N-óxido mostra que em larvas e adultos II a quantidade de senecionina N-óxido assimilada é

significativamente maior que a quantidade de senecionina terciária. Adultos I não apresentaram diferenças significativas entre a assimilação de N-óxidos e bases terciárias (Tabela 4.5).

A comparação entre os estágios no experimento de assimilação de senecionina N-óxido mostra que larvas e adultos I assimilam significativamente menos PAs que adultos II (Tabela 4.6 e 4.7). Da mesma forma essas diferenças significativas se repetem nos experimentos com senecionina terciária (Tabela 4.8 e 4.9).

Tabela 4.4. Percentagem de assimilação de Senecionina (34) marcada com [^{14}C] por *Mechanitis polymnia*^a.

	Alimentado como larva		Alimentado como adulto
	Larva	Adulto	Adulto
SN	10±5(7)	7±6(4)	52±21(6)
ST	3±1(6)	4±3(5)	23±20(10)

SN: Senecionina N-óxido

ST: Senecionina terciária

^a. Os números nas colunas representam $\bar{X} \pm S(N)$.

Tabela 4.5. Arco-seno^a da percentagem de assimilação de Senecionina (34) marcada com [¹⁴C] por *Mechanitis polymnia*^b.

	Alimentado como larva		Alimentado como adulto
	Larva ^c	Adulto ^d	Adulto ^e
SN	18±5(7)	14±7(4)	46±13(6)
ST	10±2(6)	11±5(5)	26±14(10)

SN: Senecionina N-óxido

ST: Senecionina terciária

a. ver Zar (1984, p.239).

b. Os números nas colunas representam $\bar{X} \pm S(N)$.

c. Teste t: entre Larvas SN e ST: $t = 3,5381$, $gl = 11$, $P < 0,01$

d. Teste t: entre adultos SN e ST: $t = 0,8435$, $gl = 7$, $P = NS$

e. Teste t: entre adultos SN e ST: $t = 2,7818$, $gl = 14$, $P < 0,01$

Tabela 4.6. Análise de variância do arco-seno de percentagem de incorporação de Senecionina N-óxido.

Fonte	Soma dos Quadrados	GL	Média dos Quadrados	F	P
Entre	3437,517	2	1718,759	21,668	<0,01
Dentro	1110,528	14	79,323		
Total	4548,045	16			

Tabela 4.7. Teste Tuckey para comparações múltiplas entre as médias dos arco-seno da percentagem de incorporação de Senecionina N-óxido.

	Larva	Adulto ^a	Adulto ^b
Larva	-	NS	<0,01
Adulto ^a	<0,01	-	
Adulto ^b	-		-

a. Alimentados como larvas.

b. Alimentados como adultos.

Tabela 4.8. Análise de variância do \arcsin de percentagem de incorporação de Senecionina terciário.

Fonte	Soma dos Quadrados	GL	Média dos Quadrados	F	P
Entre	1328,146	2	664,073	6,162	<0,01
Dentro	1939,897	18	107,772		
Total	3268,043	20			

Tabela 4.9. Teste Tuckey para comparações múltiplas entre as médias dos \arcsin da percentagem de incorporação de Senecionina terciária.

	Larva	Adulto ^a	Adulto ^b
Larva	-	NS	<0,01
Adulto ^a	<0,05	-	
Adulto ^b	-		-

^a. Alimentados como larvas.

^b. Alimentados como adultos.

2.1.2. ANÁLISE QUALITATIVA - N-OXIDAÇÃO DE PAS.

Os extratos metanólicos dos estágios tratados como acima (item 4.2.1.1.) foram cromatografados em CCD e analisados via Radioscan. Todos os estágios alimentados com senecionina N-óxido reduziram em maior ou menor grau estes alcalóides para a forma terciária (Figura 4.10). Similarmente todos os estágios alimentados com senecionina terciária N-oxidaram somente parte do alcalóide (Figura 4.11). Em muitos casos, em ambos os experimentos, parte do alcalóide marcado se concentrou perto do ponto de aplicação da placa de CCD. Supõe-se que estas substâncias sejam a base necina, ou seus derivados, que são originadas pela hidrólise do alcalóide ingerido pelos lepidópteros.

2.2. INCORPORAÇÃO DE MONOESTERES MARCADOS COM [¹⁴C].

2.2.1. ANÁLISE QUANTITATIVA.

Alguns experimentos com uma mistura de PAS [¹⁴C] monoésteres, extraídos de cultura de raízes de *Eupatorium cannabinum* também foram realizados como acima (Tabela 4.10). Entretanto devido ao baixo número de indivíduos em alguns experimentos nenhuma análise estatística foi realizada, sendo necessário um aumento da amostragem para efeitos comparativos.

Tabela 4.10. Percentagem de assimilação de monoésteres marcados com [^{14}C] por indivíduos de *Mechanitis polymnia*^a.

	Alimentado como larva		Alimentado como adulto
	Larva	Adulto	Adulto
MN	13, 16, 22, (13, 2, 14, 3) ^b	11, 9, 14	20, 25, 39
MT	24, (41, 36, 17) ^b	25	59, 47, 60

MN: Monoéster N-óxido.

MT: Monoéster terciário.

^a. Os números nas colunas representam a percentagem em cada indivíduo analisado. Não foram calculadas as médias e desvios padrão para cada experimento.

^b. Os números entre parenteses representam larvas que morreram antes que decorressem 48 horas após a ingestão do PA marcado.

2.2.2. ANÁLISE QUALITATIVA - N-OXIDAÇÃO DE PAs.

Larvas, pupas e adultos I alimentados com monoésteres N-óxido apresentam somente N-óxidos em seus tecidos (Figura 4.12). Adultos II apresentam N-óxidos e mais três componentes desconhecidos, os quais por comparação com os padrões poderiam

ser bases terciárias, como também outros derivados de PAs (Figura 4.12). Todos os estágios alimentados com monoésteres terciários parecem ter N-oxidado quase que totalmente estes alcalóides (Figura 4.13).

2.3. ANÁLISE DOS PADRÕES ENCONTRADOS.

Embora os experimentos estejam incompletos, e sugestões para a finalização destes experimentos sejam dadas abaixo, algumas conclusões baseadas nos dados aqui apresentados podem ser feitas.

Larvas de *Mechanitis polymnia* tem como planta hospedeira diversas espécies de *Solanum*, as quais não apresentam PAs. Os machos obtêm estes alcalóides através de visitas a fontes vegetais com PAs. Fêmeas provavelmente recebem estes alcalóides de machos por ocasião da cópula, desde que não são encontradas visitando fontes vegetais com PAs. Portanto, o fato de larvas incorporarem menos PAs que adultos⁷ deve ser explicado pela perda da capacidade fisiológica das larvas assimilarem PAs. Wink & Schneider (1990) verificaram que as mariposas *Syntomeida epilais* (Cnetuchidae) e *Cretonotos transiens* (Arctiidae), fitófagos especialistas em glicosídeos cardíacos e PAs, respectivamente, não assimilavam eficientemente outros alcalóides oferecidos em dieta artificial.

A comparação entre a percentagem de assimilação de

7. Significativa nos experimentos com senecionina e provavelmente também nos experimentos com monoésteres, embora nenhuma análise estatística tenha sido realizada neste caso.

macrocíclicos e monoésteres não foi possível devido: 1. ao baixo número de amostragem dos monoésteres, 2. a mistura dos monoésteres (majoritariamente 13 e 15) aplicados na dieta não representam os principais alcalóides encontrados nas fontes vegetais visitadas por estes lepidópteros, e nos lepidópteros. Este segundo item poderia levar a erros, desde que a incorporação de PAs não é passiva, e sim mediada enzimaticamente, e não se tem dados sobre percentagem de incorporação *versus* estrutura dos PAs.

Entretanto uma importante verificação é feita quando observamos os padrões qualitativos de estágios alimentados com macrocíclicos e monoésteres: macrocíclicos não são eficientemente N-oxidados, enquanto que monoésteres o são. Provavelmente, devido a biologia de *Mechanitis polymnia*, espera-se que monoésteres sejam metabolizados e incorporados mais eficientemente que macrocíclicos, desde que raramente se verificam casos de visitas destes lepidópteros a fontes vegetais com PAs macrocíclicos, além de não se verificarem a presença destes macrocíclicos em tecidos destes lepidópteros. A N-oxidação de PAs macrocíclicos é realizada eficientemente por larvas *Tyria jacobaeae*, um arctíideo especialista em *Senecio*, uma planta que apresenta PAs macrocíclicos (Ehmke *et al.* 1990).

Os experimentos aqui estão incompletos e para uma melhor definição do quadro apresentado acima serão necessários:

1. Aumento da amostragem em cada experimento.
2. Análise diferencial entre machos e fêmeas em cada experimento.
3. Síntese de um único PA monoéster, preferivelmente do

tipo 6, o qual é ingerido na natureza por *M. polymnia*, para a realização dos experimentos de incorporação com N-óxidos.

4. Incorporação de PAs não marcados (idênticos aos marcados) para uma análise posterior via CG-EM, desde que a comparação através de CCD é insuficiente quando se depara com uma substância de RF desconhecido. Mesmo as substâncias de mesmo RF do padrão podem apresentar diferentes estruturas ou estereoquímica daquela originalmente ingerida pelos lepidópteros.

5. Experimentos sobre a percentagem de incorporação x estrutura de PAs monoésteres (por exemplo: monoésteres 1,2-insaturados x monoésteres 1,2-saturados).

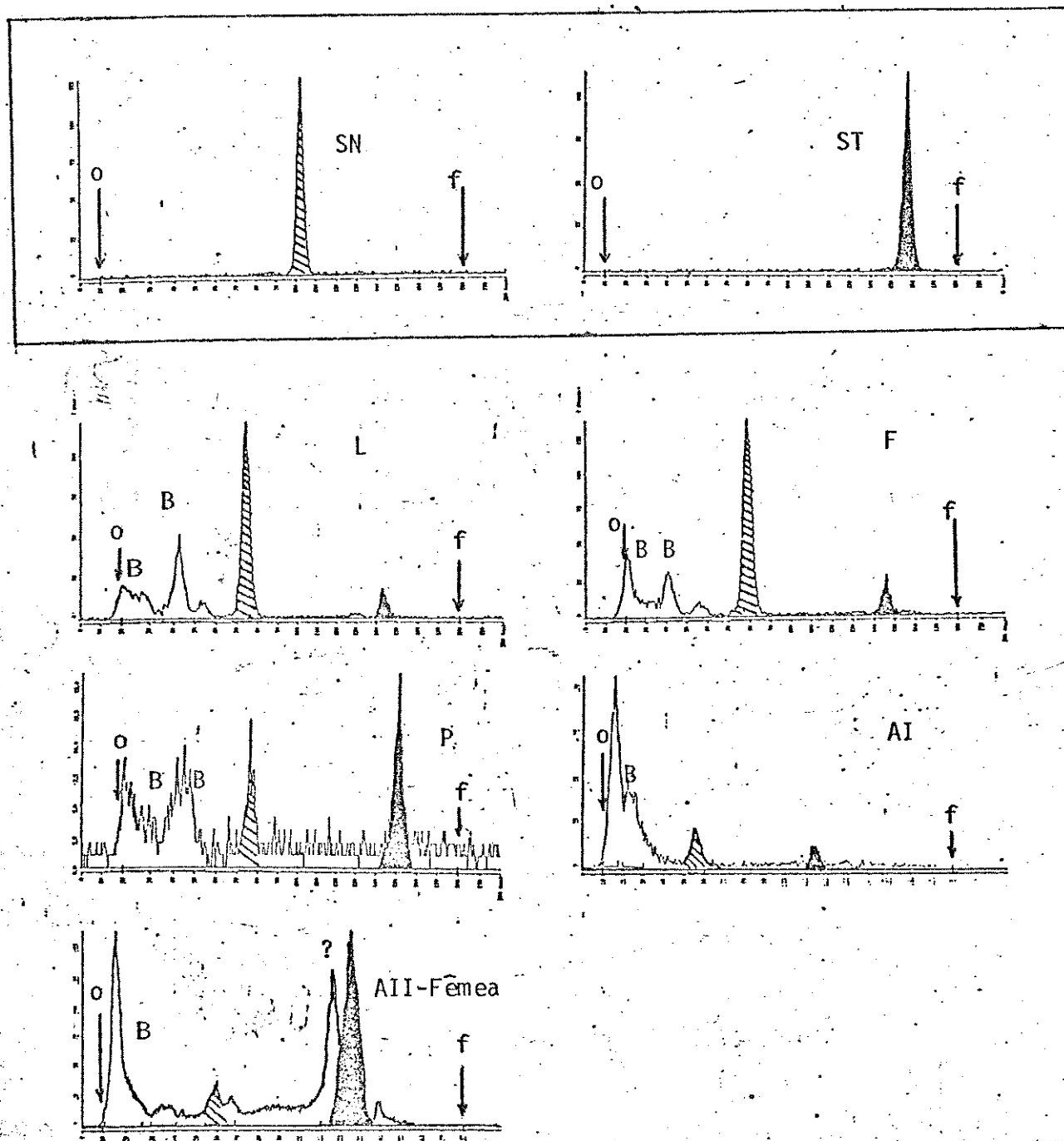


Figura 4.10. Detecção de senecionina [^{14}C] N-óxido incorporada por larvas e adultos II de *Mechanitis polymnia* via CCD revelada por Radioscan . SN: senecionina N-óxido, ST: senecionina terciária, B: base necina ou derivados desta, ?: desconhecido, L: larva, F: fezes, P: pupa, AI: adulto I, AII: adulto II, O: origem, F: frente.

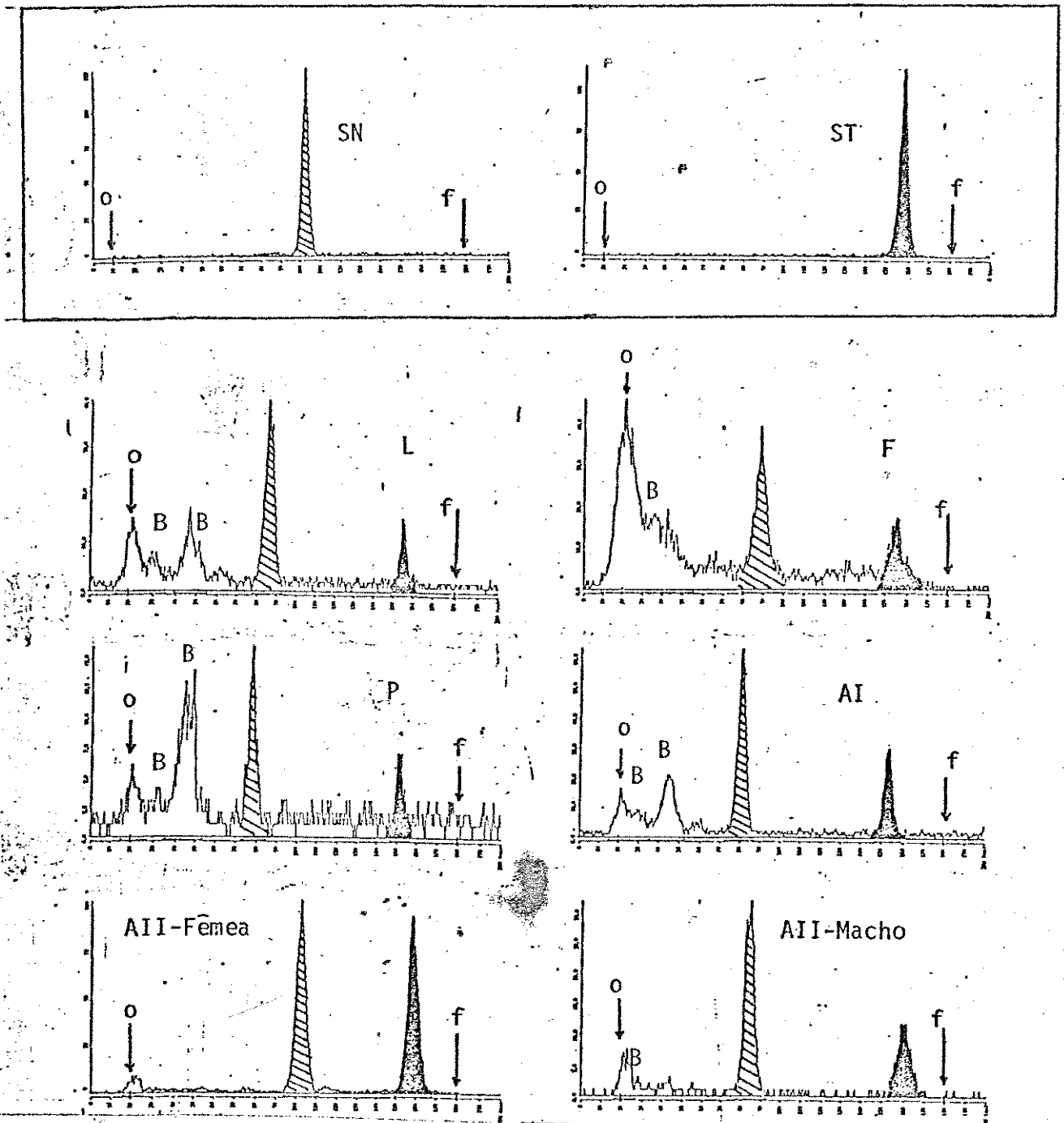


Figura 4.11. Detecção de senecionina [^{14}C] terciária incorporada por larvas e adultos II de *Mechanitis polymnia* via CCD revelada por Radioscan . SN: senecionina N-óxido, ST: senecionina terciária, B: base necina ou derivados desta, ?: desconhecido, L: larva, F: fezes, P: pupa, AI: adulto I, AII: adulto II, O: origem, f: frente.

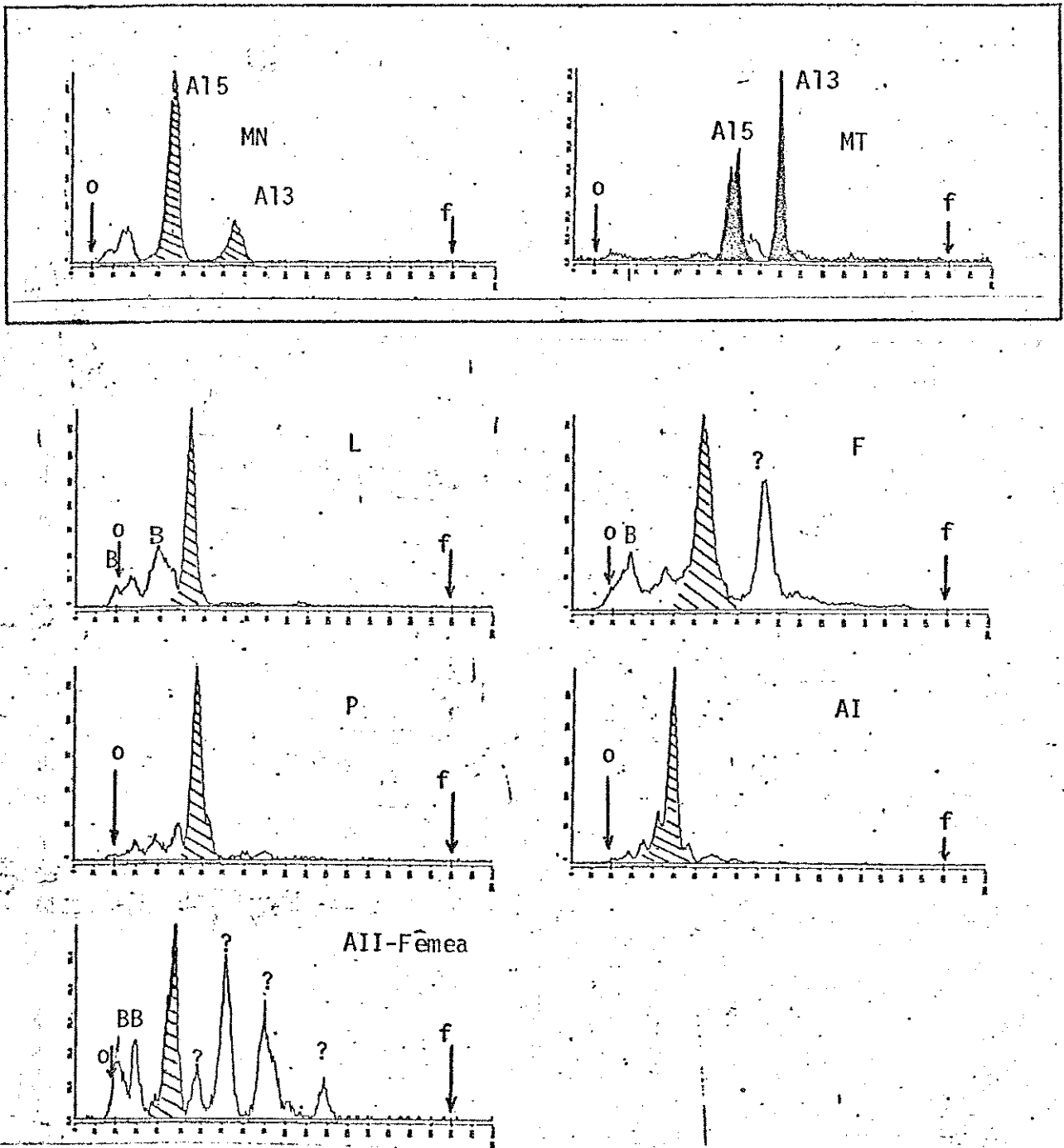
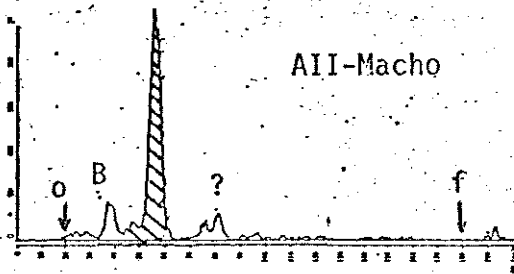
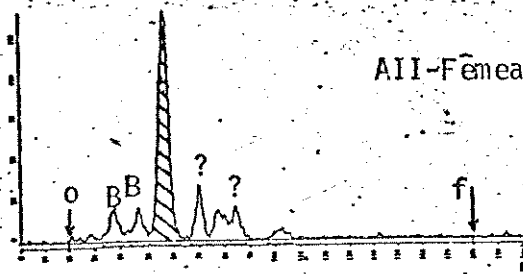
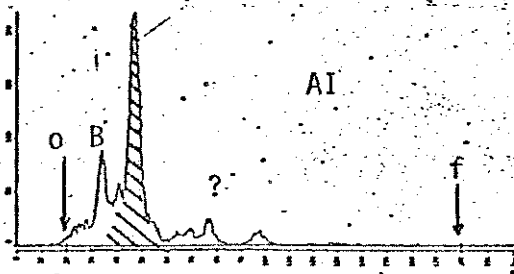
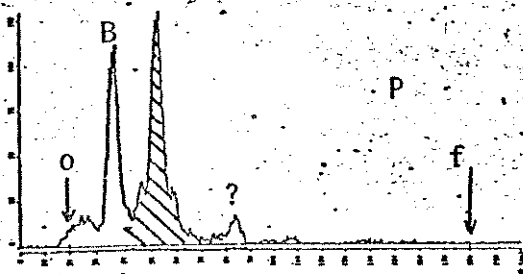
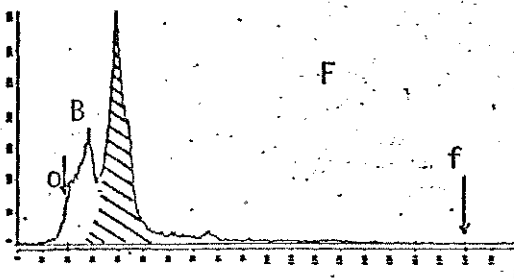
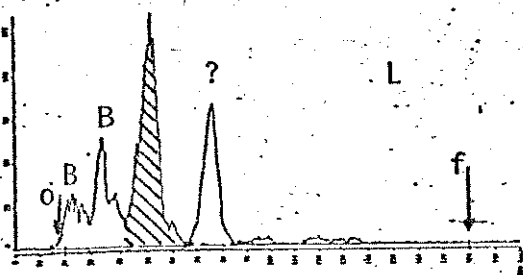
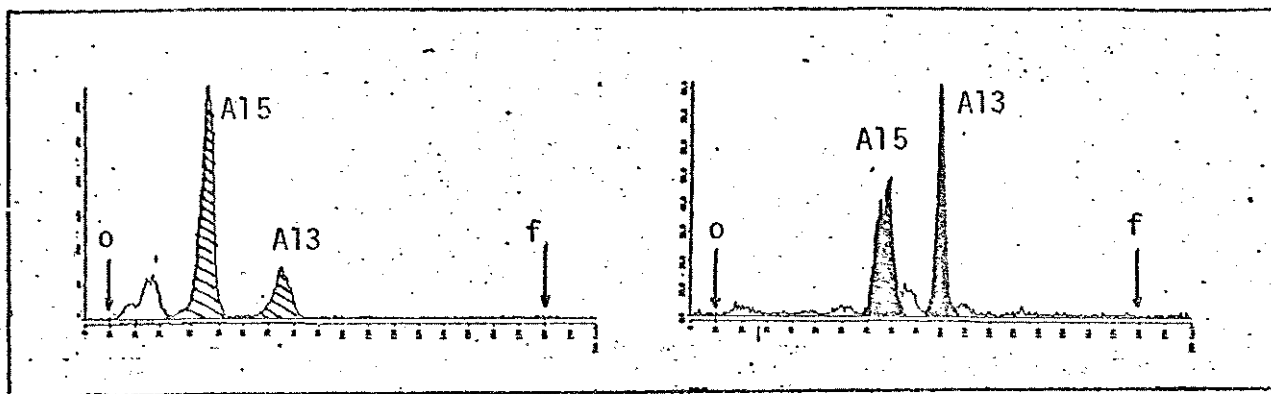


Figura 4.12. Detecção de monoésteres $[^{14}\text{C}]$ N-óxidos incorporada por larvas e adultos II de *Mechanitis polymnia* via CCD revelada por Radioscan. MN: monoésteres N-óxidos, MT: monoésteres terciários, A13: alcalóide 13, A15: alcalóide 15, B: base necina ou derivados desta, ?: desconhecido, L: larva, F: fezes, P: pupa, AI: adulto I, AII: adulto II, O: origem, F: frente.



incorporada por larvas e adultos II de *Mechanitis polymnia* via CCD revelada por Radioscan . MN: monoésteres N-óxidos, MT: monoésteres terciários, A13: alcalóide 13, A15: alcalóide 15, B: base necina ou derivados desta, ?: desconhecido, L: larva, F: fezes, P: pupa, AI: adulto I, AII: adulto II, O: origem, F: frente.

CAPÍTULO 5

DEFESA QUÍMICA EM BORBOLETAS ITHOMIINAE CONTRA A ARANHA

Nephila clavipes.

Defesa química em insetos devido à aquisição de compostos químicos de plantas é um fenômeno amplamente estudado (ver Brower 1984 e referências ali contidas), o qual foi comprovado pela primeira vez por Brower *et al.* (1967). Estes autores verificaram que larvas da borboleta *Danaus plexippus* (Nymphalidae, Danainae) se alimentavam de folhas de *Asclepias curassavica* (Asclepiadaceae), sequestravam glicosídeos cardíacos destas, e transferiam estas substâncias para adultos recém emergidos da pupa, os quais eram protegidos quimicamente contra pássaros.

Somente em 1982, PAs foram correlacionados experimentalmente com a proteção química de insetos.

Eisner (1982) descreveu a liberação ileso do arctíideo *Utetheisa ornatrix* da teia da aranha *Nephila clavipes* e demonstrou experimentalmente que a liberação se devia a PAs incorporados pela larva da mariposa de sua planta hospedeira *Crotalaria* (Leguminosae). Trigo *et al.* (1993) verificaram experimentalmente que *N. clavipes* liberava adultos da mariposa *Hyalurga syma* (Arctiidae: Pericopinae); estes lepidópteros

sequestravam PAS de sua planta hospedeira da larva, *Heliotropium transalpinum* (Boraginaceae).

Vasconcellos-Neto & Lewinsohn (1984) mostraram que *N. clavipes* discrimina adultos de Ithomiinae e Danainae, liberando-os ilesos de sua teia. Borboletas Heliconiini, Nymphalinae, Acraeinae, Pieridae e Papilionidae eram geralmente predados, embora façam parte de anéis miméticos mülleriano e batesiano aos quais pertencem os Ithomiinae e Danainae. Estes autores concluíram que a coloração de advertência e o mimetismo das borboletas predadas não influenciou a resposta da aranha.

Brown (1984, 1985, 1987), Trigo (1988) e Masters (1990) mostraram que PAS são responsáveis pela liberação de Ithomiinae por *N. clavipes*. Estes autores mostraram que adultos recém-emergidos, os quais não apresentavam PAS, pois suas larvas se alimentavam de Solanaceae (sem PAS), eram predados pela aranha. Indivíduos recém-emergidos após consumirem PAS eram liberados.

Outros predadores também liberam borboletas Ithomiinae, provavelmente devido à presença de PAS nos tecidos destas. *Ithomia pellucida* foi rejeitada na maioria das vezes (85%) quando oferecida para gralhas azuis (*Cyanocitta cristata bromia*) (Brower & Brower 1964). Harber (1978) verificou, em laboratório, que 9 espécies de pássaros rejeitaram significativamente adultos de Ithomiinae. Saguis da espécie *Leontopithecus rosalia* rejeitavam *Ithomia drymo* e *Methona themisto* (Coimbra-Filho 1981).

Existem também relatos de predação de adultos de Ithomiinae por pássaros. Brown & Vasconcellos-Neto (1976) verificaram indivíduos de três espécies de Ithomiinae sendo predados pelo

pássaro *Piipraeidea melanonota*. Harber (1978) observou um tiranídeo comendo um ithomíneo transparente.

Experimentos realizados no presente trabalho com três espécies de Ithomiinae, mostraram que uma mesma substância química pode estar sendo utilizada diferencialmente, por estas três espécies, na proteção química contra um mesmo predador.

1. DEFESA QUÍMICA EM *Tithorea harmonia*.

Larvas de *Tithorea harmonia* sequestram PAs de sua planta hospedeira, *Prestonia acutifolia*, transferido-os para os adultos recém-emergidos através da pupa, enquanto que adultos capturados no campo apresentam um padrão de PAs muitas vezes semelhante ao de indivíduos recém-emergidos (Tabela 3.2, Capítulo 3).

Apesar de apresentarem PAs ($12 \pm 8 \mu\text{g}$), adultos de *Tithorea harmonia* recém-emergidos da pupa foram significativamente predados por *N. clavipes*; entretanto, indivíduos capturados no campo, os quais também apresentam PAs ($36 \pm 24 \mu\text{g}$), foram significativamente liberados (Tabela 5.1), embora um indivíduo apresentando $38 \mu\text{g}$ de PAs fosse predado. A quantidade de PAs nos indivíduos testados parece ter relação com a resposta da aranha neste caso.

2. DEFESA QUÍMICA EM *Aeria olena*.

A defesa química contra *N. clavipes* é um fenômeno complexo em borboletas da espécie *A. olena*. Larvas se alimentam de folhas de plantas de *Prestonia coalita*, nas quais não foram encontrados PAs, entretanto pupas e alguns indivíduos recém-emergidos da

pupa apresentam estes alcalóides (Tabela 5.1, Tabelas 3.3, 3.5, Capítulo 3).

Adultos recém-emergidos e adultos capturados no campo de *Aeria olena* foram significativamente liberados por *N. clavipes*, embora os primeiros muitas vezes apresentassem somente traços de PAs (Tabela 5.1 - ver também Tabela 3.5 no Capítulo 3).

3. DEFESA QUÍMICA EM *Mechanitis polymnia*.

A defesa química em adultos de *Mechanitis polymnia* contra a aranha *N. clavipes* apresenta o padrão encontrado por Brown (1984, 1985 e 1987) e Masters (1990) para adultos de Ithomiinae em geral. Indivíduos recém-emergidos da pupa, sem PAs, devido a sua planta hospedeira (plantas do gênero *Solanum*) não conterem PAs, são em sua totalidade predados pela aranha. Indivíduos capturados no campo, apresentando PAs, são significativamente liberados pela aranha (Tabela 5.1), embora dois indivíduos com aproximadamente 300 µg de PAs (a mesma quantidade encontrada em indivíduos liberados) fossem predados.

4. PADRÕES DE DEFESA QUÍMICA EM ADULTOS DE ITHOMIINAE CONTRA A ARANHA *Nephila clavipes*.

Como observa-se nos experimentos acima, defesa química proporcionada pelos PAs contra a aranha *N. clavipes* não é um simples caso "possuir PAs = ser protegido". Fatores como 1. concentração de PAs nos tecidos, 2. limiar de fome do predador (no caso *Nephila*), e talvez 3. composição química da mistura de PAs devem estar envolvidos na defesa química destes lepidópteros,

entretanto nenhum estudo sistemático foi realizado para que se possa teorizar sobre estes fatores.

Outra suposição baseada nos experimentos acima, é que não somente monoésteres 1,2-insaturados (como as estruturas identificadas nas três espécies em estudo) podem estar envolvidos na proteção química destes lepidópteros. Por exemplo, indivíduos recém-emergidos de *A. olena* são liberados, embora muitas vezes não apresentem quaisquer traços de PAs.

Além disso, experimentos com outros predadores (vertebrados e invertebrados) são necessários. *Nephila clavipes* é um predador orientado quimicamente em relação a presas impalatáveis, não diferenciando visualmente suas presas (Vasconcellos-Neto & Lewinsohn 1984) e portanto não deve ser uma pressão seletiva relevante para a aquisição e manutenção de PAs neste grupo de lepidópteros, devido a ocorrência de coloração de advertência e anéis miméticos nestas borboletas. A atividade de PAs contra *N. clavipes* deve ser fortuita, um caso de exaptação (ver Gould & Vrba 1984), e talvez tenha ocorrido depois da seleção para aquisição de PAs por estes lepidópteros. O comportamento de tanatose¹, característico de Ithomiinae que caem (ou são jogados na teia de *Nephila*) poderia ter sido selecionado em resposta a aranha ou a outros predadores, desde que Ithomiinae manipulados por humanos também mostram semelhante comportamento.

1. Tanatose: Diversas espécies de Ithomiinae que caem na teia de *N. clavipes* apresentam um comportamento conspicuo. Elas se mantêm imóveis até a aranha libera-las da teia. Com este comportamento as borboletas minimizam a probabilidade de danos, desde que a aranha é estimulada por movimentos.

Os diferentes padrões químicos de defesa observados nas tres espécies acima poderima refletir linhagens filogenéticas com diferentes padrões de incorporação de PAs (ver Capítulo 3), melhor que adaptações de uma espécie contra predação.

Tabela 5.1. Quantidade de PAs (μg de bases totais - $\bar{X} \pm S$ (N))^a em borboletas testadas em bioensaios com *Nephila clavipes*, e a resposta da aranha.

Espécie	PREDADA $\bar{X} \pm S$ (N)	LIBERADA $\bar{X} \pm S$ (N)	TESTE-T ^b	TESTE X ² ^c
<i>Tithorea harmonia</i>				
a. RECEM EMERGIDO	12 \pm 8 (6)	- (0)	-	P<0,01
b. CAPTURADO NO CAMPO	38 (1)	36 \pm 24 (16)	-	P<0,01
<i>Aeria olena</i>				
a. RECEM EMERGIDO	0 \pm 0 (2) ^d	0 \pm 0 (16) ^d	NS	P<0,01
	- (0)	13 \pm 10 (9)	P<0,01	P<0,01
b. CAPTURADO NO CAMPO		51 \pm 59 (7)	-	P<0,01
<i>Mechanitis polymnia</i>				
a. RECEM EMERGIDO	0 \pm 0 (10)	- (0)	-	P<0,01
b. CAPTURADO NO CAMPO	315 \pm 344 (2)	382 \pm 149 (8)	NS ^e	P<0,01

- a. Analisados por colorimetria; b. Teste-t para comparação entre a quantidade de PAs; c. Teste X² para comparação entre o número de indivíduos predados e liberados; d. Traços de PAs em alguns indivíduos - análise de CG-EM (ver Tabela 3.x no Capítulo 3); e. Teste Wilcoxon.

CAPÍTULO 6

EXPERIMENTAL

1. COLETA DOS ORGANISMOS.

A descrição detalhada da localidade em que cada organismo foi coletado, além de sua classificação botânica ou zoológica são dadas nas Tabelas 6.1 e 6.2. Exsicatas de plantas foram depositadas no Herbário do Departamento de Botânica, Instituto de Biologia, UNICAMP, e exemplares dos insetos foram depositados no Museu de História Natural do Instituto de Biologia, UNICAMP.

Tabela 6.1. Organismos estudados (Plantas).

Plantas ^a	Função ^b	Local ^c
APOCYNACEAE: ECHITOIDEAE		
<i>Prestonia acutifolia</i> (Benth) K.Schum	PHL/TH	MP
<i>P. coalita</i> (Vell.) Woods	PHL/TH	CS, HFRC
SOLANACEAE		
<i>Solanum paniculatum</i> L.	PHL/MP	CS
<i>Solanum jatrophiifolium</i> Donal	PHL/ML	CS
ASTERACEAE: KUPATORIEAE		
<i>Adenostema</i> sp. ¹	VA	SJ
<i>Ageratum conyzoides</i> L.	VA	FSG
<i>E. laevigatum</i> Lam.	VA	SJ, OP
<i>E. maximiliani</i> Scharad. ex DC.	VA	SJ
<i>E. mexiae</i>	RVA	MP
<i>E. pauciflorum</i> H.B.& K.	RVA	CS, UNICAMP
<i>E. punctulatum</i> DC.	RVA	SJ
<i>E. squalidum</i> DC.	RVA	SJ
<i>Trichogonia gardneri</i> A. Gray	VA	SJ
ASTERACEAE: HELIANTHEAE		
<i>Emilia sonchifolia</i> DC.	RVA	CS
BORAGINACEAE		
<i>Heliotropim indicum</i> L.	VA	MP
<i>H. transalpinum</i> Vell.	VA	CS, UNICAMP, HFRC
<i>H. peruvianum</i> L.	VA	MJ

1. Está sendo identificada pelo Prof. Dr. Hermógenes de Freitas Leitão do Departamento de Botânica, IB, UNICAMP.

a. Inflorescências foram coletadas quando se tratava de fontes visitadas por adultos, e folhas quando se tratava de plantas hospedeiras da larva; b. PHL/TH: Planta hospedeira da larva de *Tithorea harmonia*; PHL/AO: Planta hospedeira da larva de *Aeria olena*; PHL/MP: Planta hospedeira da larva de *Mechanitis polymnia*; PHL/ML: Planta hospedeira da larva de *Mechanitis lysimina*; VA: Visitada freqüentemente por adultos; RVA: Nunca ou raramente visitada por adultos, embora apresentem PAs e ocorram simpatricamente² com os lepidópteros; c. MP: Mata da Pedra, Mogi Guaçu, SP; CS: Mata de Costa e Silva, Campinas, SP; HFRC: Horto Florestal de Rio Claro, Rio Claro, SP; FSG: Fazenda Santa Genebra, Campinas, SP; SJ: Serra do Japi, Jundiaí, SP; OP: Morro da Forca, Ouro Preto, MG; MJ: Arboreto de Monjolinho, Campinas, SP.

Tabela 6.2. Organismos estudados (Insetos).

INSETOS	LOCAL ^a
LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE: ITHOMIINAE	
<i>Tithorea harmonia pseudethra</i> Butler	MP
<i>Aeria olena olena</i> Weymer	CS SJ
<i>M. polymnia casabranca</i> Hunsch.	CS SJ

a. Ver legendas na Tabela 6.1.

2. Simpátrico: ocorrência no mesmo lugar, usualmente referindo-se a áreas de sobreposição em distribuição de espécies.

2. ISOLAMENTO, SEPARAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS.

2.1. FRAÇIONAMENTO DE PLANTAS.

Plantas foram coletadas e mantidas a -15°C até a extração e fracionamento, para os quais foram utilizados dois procedimentos diferentes:

1. plantas frescas ou liofilizadas foram extraídas a frio duas vezes, com 10 vezes o volume do solvente (MeOH) em relação ao peso seco da planta. O extrato foi evaporado em rotavapor a baixa pressão ($<40^{\circ}\text{C}$) e recuperado em um sistema $1\text{N H}_2\text{SO}_4:\text{CHCl}_3$. A fase aquosa foi extraída mais 3 vezes com igual volume de CHCl_3 . A fase orgânica foi reunida, seca em Na_2SO_4 , e evaporada a baixa pressão como acima, originando uma Fração Neutra. O extrato aquoso ácido foi separado em duas aliquotas. A primeira aliquota foi alcalinizada a pH 12 com NH_3 25%, aplicada no topo de uma coluna de Extralut (Merck) (1,4g/ml) e eluída com 10 vezes o volume de CHCl_3 . O eluato orgânico foi tratado como acima, originando uma fração de Alcalóides livres (ou terciários). A segunda aliquota foi reduzida com excesso de Zn por 5 horas, mantendo-se o pH sempre por volta de 1-2, posteriormente alcalinizada com excesso de NH_3 25% e tratada como acima, originando uma fração de Alcalóides Totais (alcalóides terciários + N-óxidos).

2. extração à quente com Soxlet durante 24 horas, utilizando-se MeOH ou EtOH como solvente. O extrato foi

evaporado em rotavapor e processado como acima para a obtenção de alcalóides totais.

2.2. FRACIONAMENTO DE INSETOS. (Figura 6.1).

Insetos foram coletados ou criados em laboratório e acondicionados individualmente em frascos com 2 ml de MeOH. No caso de larvas, estas eram extraídas após 6 horas sem alimentação, para a eliminação de restos das fezes.

Posteriormente os insetos eram homogenizados em tubos de centrifugação com areia do mar purificada (Merck), e centrifugados à 4000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante recuperado. Este procedimento era repetido por 3 vezes. Quando se desejava uma análise quantitativa de PAS pelo método colorimétrico (ver abaixo), o sobrenadante foi seco em corrente de ar ou N₂, recuperado em 2 ml de MeOH e duas aliquotas de 100 µl cada retiradas (análise de N-óxidos e alcalóides totais respectivamente). O sobrenadante foi então novamente seco em corrente de ar ou N₂, diluído em 4 ml de 1N H₂SO₄, e o mesmo procedimento adotado para plantas foi efetuado, originando-se frações neutra (NT), alcaloidal livre (AL) e alcaloidal total (AT).

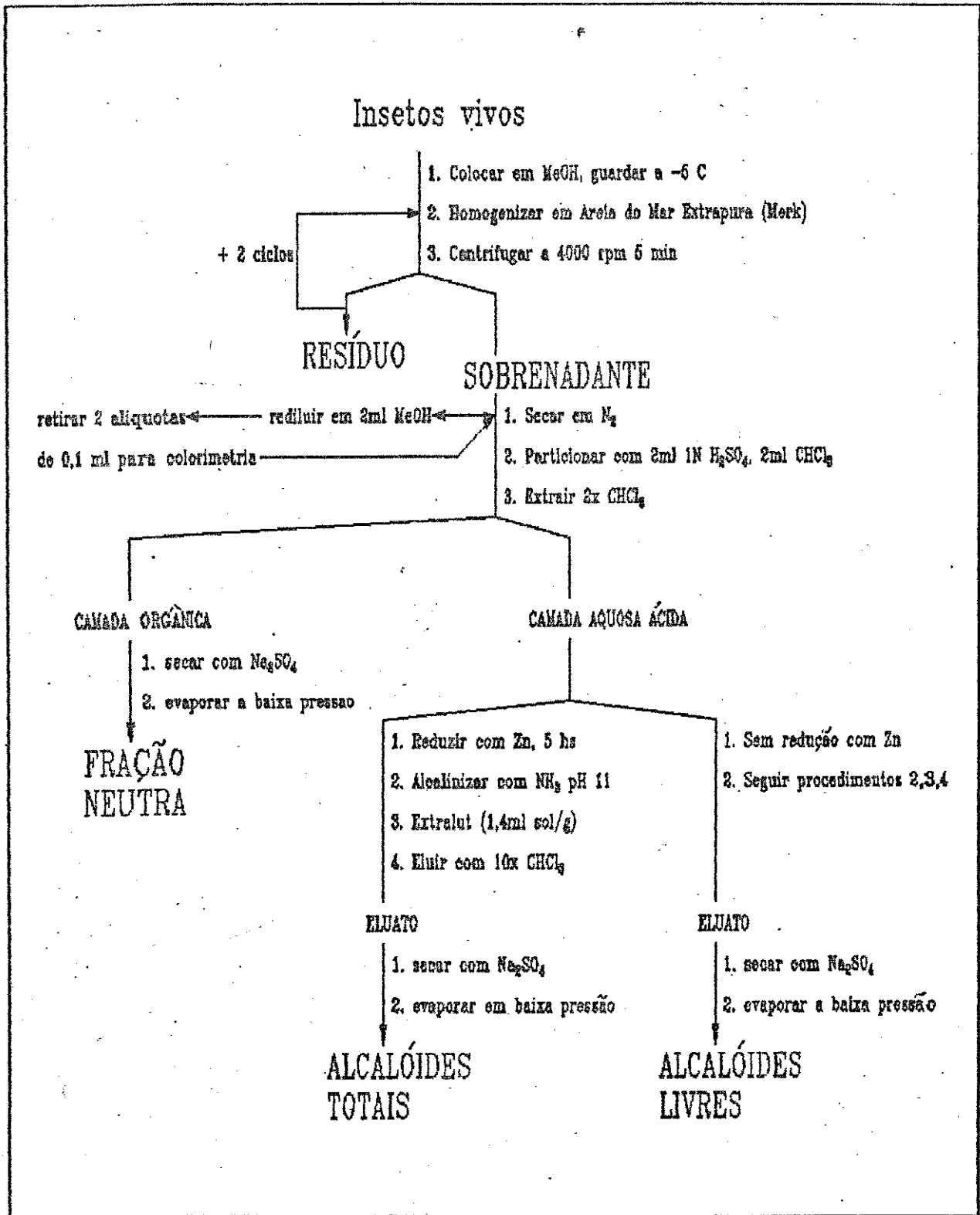


Figura 6.1. Fracionamento de insetos.

2.3. CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).

2.3.1. ANALÍTICA.

Amostras foram aplicadas em placas pré-preparadas de Silica Gel 60/UV₂₅₄, 0,10mm de espessura, usando-se como fase móvel CHCl₃:MeOH:NH₃ 25% 83:14:3. As placas foram secas a temperatura ambiente e reveladas em câmara de iôdo por 15-30 min. A maioria das substâncias orgânicas presentes eram reveladas, apresentando coloração marron. Posteriormente o iôdo era sublimado à 100°C. Com este procedimento os alcalóides 1,2-dehidropirrolizidínicos eram transformados em desidropirrolizinas. As placas eram então reveladas com Reagente de Ehrlich (1% 2,4-dimetilaminobenzaldeído em HCl concentrado, diluído em acetona 1:4), o qual forma coloração azulada, violeta ou roxa quando se complexa com desidropirrolizinas (ver Figura 1.3 no Capítulo 1). Este método só é sensível à alcalóides 1,2-dehidropirrolizidínicos, PAs saturados não podem ser determinados por essa metodologia (Mattocks 1967).

2.3.2. PREPARATIVA.

Para purificação de PAs ou separação de PAs com índices de retenção muito diferentes aplicava-se a fração desejada em uma placa preparativa de Silica Gel 60/UV₂₅₄, 0,25mm (Merck). O sistema de solvente acima foi utilizado e a placa revelada com Reagente de Dragendorff que reage com compostos nitrogenados apresentando uma coloração vermelho-alaranjado.

As manchas eram recuperadas, e extraídas com uma solução de carbonato de sódio saturada. A fase aquosa foi extraída 5 vezes com CHCl_3 , a fase orgânica seca com Na_2SO_4 , e evaporada a baixa pressão, originando os PAs purificados desejados.

2.4. CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO.

Para separação de PAs com grupos 1,2 ou 1,3 diois, utilizou-se cromatografia de partição modificada de Fhran *et al.* (1980). Celite 545 (100 g) tratada com uma solução 5% borax (73 ml) foi empacotada em uma coluna 1,0 m comprimento x 2,0 cm diâmetro, utilizando-se CHCl_3 como fase móvel. Aproximadamente 500 mg da fração alcaloidal era diluída em CHCl_3 , adsorvidas em Celite 545, seca à temperatura ambiente, aplicada no topo da coluna e eluída com CHCl_3 . Frações de 5-10 ml eram coletadas e analisadas em CCD, conforme metodologia acima. Quando se necessitava uma posterior purificação dos PAs, utilizava-se cromatografia de adsorção e cromatografia preparativa.

2.5. CROMATOGRAFIA DE ADSORÇÃO.

Para purificação de PAs utilizou-se cromatografia de adsorção em coluna (Silica Gel 60, 70-230 mesh), usando-se como eluente um gradiente CHCl_3 , CHCl_3 :MeOH: NH_4OH entre 95:4:1 à 65:25:10, dependendo do alcalóide a ser purificado. As frações eram coletadas e analisadas em CCD conforme metodologia acima.

2.6. COLORIMETRIA.

Na análise colorimétrica de PAs dos organismos estudados empregou-se o método de Mattocks (1967, 1968), Bingley (1968), modificado por Brown (1985) (Ver Figura 1.3, Capítulo 1).

Alcalóides totais (base livres + N-óxidos) e N-óxidos foram quantificados. Para alcalóides totais, uma alíquota de 1/20 dos organismos previamente extraídos (ver acima) foi oxidada em tubos de ensaios abertos com 0,5 ml de reagente de oxidação (uma solução de 30% $H_2O_2:Na_4P_2O_7$ 0,5 ml:2,5mg, diluída em MeOH 1:200) por 25 minutos à 100°C. As amostras eram resfriadas à temperatura ambiente, os traços de água foram eliminados com corrente de N_2 . Acetato de isoamila (1 ml) + anidrido acético (0,1 ml) foram adicionados, e as amostras aquecidas à 100°C por 2 minutos em tubos de ensaio fechados para se evitar a contaminação por água. As amostras foram novamente resfriadas à temperatura ambiente e tratadas com 1 ml de Reagente de Ehrlich modificado preparado na hora (8 ml de BF₃ metanólico 20% + 72 ml de EtOH + 1,4g de dimetilaminobenzaldeído). As amostras foram aquecidas à 60°C por 5 minutos como acima, novamente esfriadas à temperatura ambiente, diluídas em um volume de 4 ml com acetona. A absorbância foi lida à 561 nm. Para N-óxidos, o mesmo procedimento foi seguido, sem a reação de oxidação. Cada micrograma de PAs equivale à absorbância de 0,05 nm (segundo Brown 1987, utilizando equinatina como substância de referência).

3. INSTRUMENTAL.

3.1. CROMATOGRAFIA GASOSA.

Amostras das frações alcaloidais eram diluídas em MeOH e analisadas por cromatografia gasosa capilar em um equipamento CG Hewlett Packard 5890, série II com integrador HP 3396, série II, equipado com uma coluna de sílica fundida (WCOT, 15m x 0.25mm, DB-1, J&W Scientific CA), e detetores de ionização de chama e de nitrogênio/fósforo. Condições: temperatura de injeção: 250°C; programas de temperatura: 150-300°C, 6°C/min; razão de split 1:20; gás de arraste He 0,5 bar, 2ml/min; volume da amostra 1-2 µl.

3.2. CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTROSCOPIA DE MASSA.

Amostras acima, após cromatografia gasosa foram analisadas por CG-EM em dois aparelhos:

1. Cromatógrafo gasoso Carlo Erba Mega 5160 equipado com uma coluna de sílica fundida (WCOT, 30m x 0,32mm, DB-1, J&W Scientific CA) diretamente acoplado com um espectrometro de massa Finnigan MAT 4515. Condições: mesmas acima, com energia de ionização de 70 eV. No caso de análise de espectrometria de massas de ionização química positiva foi utilizado como gás reagente NH₃.

2. Cromatógrafo gasoso Hewlett Packard-5988, série II, equipado com uma coluna de sílica fundida (WCOT, 15m x 0,25mm,

DB-1, J&W Scientific CA) diretamente acoplado a um detector seletivo de massa Hewlett Packard 5970. Condições: temperatura de injeção: 250°C; programas de temperatura: 150-300°C, 6°C/min e 4°C/min; razão de split 1:25; gás de arraste He 0,5 bar, 1ml/min; volume da amostra 1-2 µl, energia de ionização de 70 eV.

Os índices de retenção (IRK) foram calculados segundo modificação de Kovats (1958):

$$\text{IRK} = \{(T_s - T_{C_{n-1}})[(C_n - C_{n-1}) \cdot 100] / T_{C_n} - T_{C_{n-1}}\} \cdot 100 \cdot C_{n-1}$$

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.

Substâncias anteriormente isoladas e identificadas de plantas ou sintetizadas foram utilizadas como referência.

A quantidade de PAs foi calculada somente em termos de abundância relativa³ a partir da integração obtida nos cromatogramas detectados em ionização de chama. A área obtida nestes cromatogramas foi multiplicada por um fator de correção F.

$$F = PM/C_n.12$$

onde:

F: fator de correção para a área de cada substância analisada.

PM: peso molecular da substância analisada.

C_n: número de carbonos da substância analisada.

3.3. INFRAVERMELHO.

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados em filme por um espectrofotômetro dispersivo Perkin-Elmer, modelo 1430 e espectrômetro Perkin-Elmer, modelo 1600 com transformada de Fourier.

3.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Espectros de ¹H e ¹³C foram medidos em dois aparelhos:

1. Espectrometro Brucker AM 400 (400,1 e 100,6 MHz respectivamente).

2. Espectrometro Varian Gemini 300 (300 e 75,1 MHz

3. Proporção entre PAs na fração de alcalóides totais.

respectivamente).

Os solventes utilizados foram CCl_4 e CDCl_3 . TMS e CHCl_3 foram usados como referências internas. Os deslocamentos químicos (δ) são indicados em ppm, e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

3.5. OUTROS.

1. Ponto de fusão (PF) foram determinados em um aparelho Kofler com microscópio e placa de aquecimento, e não foram corrigidos.

2. Os valores de rotação ótica $[\alpha]_D$ foram determinados num polarímetro Polamat-A, Carl Zeiss com lâmpada de mercúrio.

3. Os solventes utilizados nas semisíntese e extrações e outros experimentos foram tratados conforme as exigências dos experimentos.

4. INCORPORAÇÃO DE ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS POR *ITHOMIINAE*.

4.1. INCORPORAÇÃO DE PAS MONOESTERES POR *Mechanitis polymnia*.

Ovos e larvas de *Mechanitis polymnia* foram coletados na região de Campinas e criados em laboratório sobre folhas de uma das suas plantas hospedeiras da larva (*Solanum paniculatum*) até a pupação. Adultos recém emergidos da pupa foram deixados 24 horas sem alimentação e posteriormente alimentados com ± 100 μg de PAS monoésteres terciários

diluíduos em 3 µl de solução aquosa saturada açucarada. Foram utilizados os seguintes PAs: indicina (6a), intermedina (6b), licopsamina (6c), rinderina (6d), equinatina (6d) e amabilina (13b). Um dia após a ingestão da dieta os lepidópteros foram separados por sexo, colocados à -15°C e posteriormente extraídos com MeOH, procedendo-se o fracionamento padrão para bases totais de PAs, omitindo-se a análise colorimétrica (ver item 2.2). As frações alcalóidais totais foram analisadas por CG-EM. Os PAs acima foram utilizados como padrões para coinjeção.

4.2. INCORPORAÇÃO DE PAs MARCADOS COM ¹⁴C POR *Mechanitis polymnia*.

Ovos e larvas de *Mechanitis polymnia* coletados em Campinas foram criados em laboratório sobre folhas de *Solanum paniculatum* e *Lycopersicum* sp.

Larvas de 4º estágio e adultos recém emergidos da pupa foram alimentadas com PAs marcados radioativamente com ¹⁴C em experimentos descritos abaixo.

PAs macrocíclicos e monoésteres foram utilizados em suas formas bases terciárias e N-óxidos nestes experimentos de incorporação. Como PA macrocíclico utilizou-se senecionina-¹⁴C obtido de cultura de raízes de *Senecio vulgaris* L. (Hartmann *et al.* 1988), e como monoésteres, uma mistura de PAs de cultura de raízes de *Eupatorium cannabinum* L., a qual apresentava principalmente os alcalóides 13 e 15 (Hartmann e

Hülsmeier, em preparação).

4.2.1. INCORPORAÇÃO POR LARVAS.

Larvas foram alimentadas até o 4° estágio com folhas de *Solanum paniculatum* ou *Licopersicum* sp. No 1° dia do 4° estágio, PAs radioativos (220.000 cpm de macrocíclicos ou monoésteres) foram diluídos em MeOH (5µl) e aplicados na superfície de 1 cm² de folha. Após o MeOH evaporar as folhas eram oferecidas às larvas. Após o consumo total da folha tratada, as larvas eram novamente alimentadas com folhas normais. Fezes foram coletadas e fixadas em MeOH. Indivíduos (em cada tratamento) foram extraídos em MeOH: como 1. larvas (48 horas após a ingestão da dieta), 2. pupas, e 3. adultos recém-emergidos. Todas as amostras foram homogenizadas individualmente em MeOH/areia do mar super pura (Merck) com o auxílio de um almofariz e pistilo. O homogenizado foi centrifugado, o sobrenadante recuperado e seco em corrente de ar. O extrato foi recuperado em 5 ml de MeOH e aliquotas de 100µl foram coletadas, diluídas em aproximadamente 2 ml de Rialuma (Merck) e a atividade radioativa medida em cintilador. O restante (ou o equivalente a ± 20.000 cpm) foi aplicado em placa de camada delgada Sílica Gel 60/UV₂₅₄, 0,10mm de espessura, utilizando-se como fase móvel CHCl₃:MeOH:NH₃ 25% 83:14:3. As placas foram analisadas em um aparelho de rastreamento de radioatividade Radio TLC-system, Raytest-Rita

3200 para esquadrinhar os alcalóides marcados radiativamente.

4.2.2. INCORPORAÇÃO POR ADULTOS.

Adultos recém-emergidos da pupa foram alimentados com PAs radioativos (220.000 cpm, macrocíclicos ou monoésteres) diluídos em 3µl de solução aquosa saturada açucarada. Vinte e quatro horas após a alimentação os indivíduos foram tratados como acima.

5. BIOENSAIOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PAs.

5.1. BIOENSAIOS COM A ARANHA *Nephila clavipes*.

Os bioensaios com a aranha *Nephila clavipes* foram realizados nas áreas da Mata de Costa e Silva, arboreto de Monjolinho, Mata de Amarais e na Serra do Japi, durante os meses de fevereiro à maio, época na qual as aranhas eram abundantes. Todos os bioensaios foram realizados entre 9:00 e 16:00. Aranhas fêmeas foram utilizadas nos bioensaios, verificando-se se as mesmas eram saudáveis, i.e., se a teia era nova e se a fêmea respondia imediatamente quando uma presa qualquer era lançada na teia.

O comportamento típico de fêmeas desta espécie, quando uma presa cai ou é lançada em sua teia, é se deslocar da posição mediano superior da teia, na região de convergência dos raios, em direção ao local onde a presa caiu na teia. A presa então é tocada com as quilicieras, pedipalpos e o

primeiro par de patas, sendo então paralisada pelo veneno inoculado pelas quilíceras. Depois de enrolar a presa com o auxílio das fiandeiras e dos pares de patas traseiros, a aranha leva a presa à porção mediano superior da teia, onde continua a picá-la com as quilíceras, regurgitando um suco digestivo na presa, passando então à sugá-la. Esta operação de embeber a presa em suco digestivo e sugá-la dura em média 15 a 20 minutos. Os restos de alimentos (quitina das presas) são desprezados e dependurados na teia em separado (Vianna 1972).

Aranhas que já estavam se alimentando não foram utilizadas nos bioensaios. Não foi feito controle de saciação nas aranhas. Cada aranha era utilizada, na maioria das vezes, uma única vez no mesmo dia. Caso contrário, o próximo bioensaio com a mesma aranha era realizado somente uma hora após o primeiro bioensaio.

Adultos capturados no campo e indivíduos recém emergidos da pupa eram lançados individualmente na teia da aranha, observando-se a resposta da mesma:

1. Predação: resposta descrita acima. Considerou-se predação mesmo se a aranha após começar a sugar a presa, a descartava posteriormente. Esta resposta é considerada como rejeição por Vasconcellos-Neto & Levinsohn (1984).

2. Liberação: a aranha ao tocar na borboleta com os pedipalpos, quelíceras ou primeiro par de patas não consumava o ataque, cortando a teia em volta do lepidóptero, liberando-o

ilesos.

Em ambos os casos os lepidópteros eram recoletados e acondicionados em MeOH, para posterior análise química.

6. CARACTERIZAÇÃO DE PAs ISOLADOS DE FONTES VEGETAIS.

Os alcalóides aqui descritos foram obtidos conforme metodologia descrita no item 7.2.1. deste capítulo.

(-)-Supinina (13a), P.F. 149-150°C, lit.⁴ 148-149°C.

$[\alpha]_D = -10,2^\circ$ (EtOH; c 1,0), lit.⁵ $[\alpha]_D = -12^\circ$ (EtOH; c 2,0).
IV ν_{max} cm^{-1} : 3333 (OH), 2930-2855 (CH_{alquill}), 1743 (C=O), 1638 (C=C), 1265 (C-N) (Figura 2.47 - Apêndice). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2.2, Capítulo 2). ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver Tabelas 2.6 e 2.7 (Capítulo 2).

(-)-Amabilina (13b), óleo, $[\alpha]_D = -12,5^\circ$ (EtOH; c 1,2), lit.^{6,7} $[\alpha]_D = -7,1^\circ$ (c 2,02, EtOH), $[\alpha]_D = -9,5^\circ$ (c 1,2 EtOH). IV ν_{max} cm^{-1} : 3409 (OH), 2968-2877 (CH_{alquill}), 1728 (C=O), 1654 (C=C), 1228 (C-N) (Figura 2.52 - Apêndice). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2.2, Capítulo 2). ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver Tabelas 2.6 e 2.7 (Capítulo 2).

-
4. Liu *et al.* (1992).
 5. Crowley & Culvenor (1959).
 6. Culvenor & Smith (1967).
 7. Roeder & Bourauel (1992).

(-)-Levigatina (13d) (composto novo), óleo amarelado, $[\alpha]_D = -16,2^\circ$ (CHCl₃; c 1,0). IV ν_{\max} cm⁻¹: 3408 (OH), 2955-2855 (CH₂aliquil), 1732 (C=O), 1228 (C-N) (Figura 2.68 - Apêndice). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2.2, Capítulo 2). ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver Tabela 2.8 (Capítulo 2).

(+)-Intermedina (6b), óleo, $[\alpha]_D = +6,5^\circ$ (EtOH; c 1,3), lit.⁸ $[\alpha]_D = +4,8^\circ$ (EtOH; c 2,39). IV ν_{\max} cm⁻¹: 3424 (OH), 2966-2855 (CH₂aliquil), 1732 (C=O), 1654 (C=C), 1232 (C-N) (Figura 2.79 - Apêndice). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2.2, Capítulo 2). ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver Tabela 2.10 (Capítulo 2).

(+)-Licopsamina (6c), óleo, $[\alpha]_D = +4,1^\circ$ (EtOH; c 1,9) lit.⁶ $[\alpha]_D = +3,1^\circ$ (EtOH; c 5,98). IV ν_{\max} cm⁻¹: 3406 (OH), 3055-2866 (CH₂aliquil), 1728 (C=O), 1230 (C-N) (Figura xx). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2.2, Capítulo 2). ¹H e ¹³C (CDCl₃) ver Tabela 2.9 (Capítulo 2).

(+)-Rinderina (6d), óleo, $[\alpha]_D = +19,0^\circ$ (EtOH; c 2,6), lit.^{8,9} $[\alpha]_D = +24,6^\circ$, $[\alpha]_D = +18,3^\circ$ (EtOH, c 1,32). IV ν_{\max} cm⁻¹: 3384 (OH), 2967 (CH₂aliquil), 1732 (C=O), 1231 (C-N)

8. Culvenor & Smith (1966).

9. Asibal *et al.* (1989).

(Figura 2.57 - Apêndice). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2.2, Capítulo 2). ^1H e ^{13}C (CDCl_3) nas Tabelas 2.6 e 2.7 (Cap. 2).

(+)-Equinatina (6e), óleo, $[\alpha]_D = +10,5^\circ$ (EtOH; c 1,2), lit.^{6,7} $[\alpha]_D = +12,8^\circ$, $[\alpha]_D = +9,8^\circ$ (EtOH; c 1,17). IV ν_{max} cm^{-1} : 3394 (OH), 2970-2888 ($\text{CH}_{\text{aliquil}}$), 1728 (C=O), 1654 (C=C), 1228 (C-N) (Figura 2.62 - Apêndice). EM-IE e EM-IC (ver Tabela 2, Capítulo 2). ^1H e ^{13}C (CDCl_3) nas Tabelas 2.6 e 2.7 (capítulo 2).

7. SEMISÍNTESE DE PAs.

Derivado isopropilideno de 6c (47). 11 mg de (+)-licopsamina (6c) foram diluídos em 5 ml de 2,2-dimetoxipropano destilado na hora; a esta solução foi adicionado 20 μl de HCl concentrado e a mistura foi deixada descansando por 24 horas. A reação foi esfriada a 0°C e tratada com 60 μl de NH_4OH . Os solventes foram evaporados em baixa pressão (a $<40^\circ\text{C}$), obtendo-se uma goma amarelada, que apresentava uma única mancha em CCD (ver metodologia de CCD no item 6.2.3.1). EM-IE m/z (abundância relativa): $[\text{M}]^+$ 339 (<1), 324 (7), 295 (3), 254 (2), 158 (2), 157 (18), 156 (2), 140 (2), 139 (12), 138 (100), 137 (17), 136 (21), 109 (3), 108 (3), 106 (2), 101 (11), 100 (2), 95 (5), 94 (47), 93 (84), 80 (15), 71 (11), 67 (12), 59 (12), 53 (9), 43 (83), 41 (19); ^1H RMN (CDCl_3) δ 1,00 (d, $J=6,5\text{Hz}$, H_6^*), 1,02 (d, $J=6,5\text{Hz}$, H_7^*), 1,30 (d, $J=6,0\text{Hz}$,

H4'), 1,39 (s, OCH₃), 1,50 (s, OCH₃), 4,26 (q, J=6,0Hz, H3'), 4,70 (d, J=12,9Hz, H9a), 4,79 (d, J=12,9Hz, H9b), 5,91 (m, H2); * valores interconvertíveis.

Derivado isopropilideno de 6e (46). 7 mg de (+)-equinatina (6c) foram diluídos em 5 ml de 2,2-dimetoxipropano destilado na hora; a esta solução foi adicionado 20 µl de HCl concentrado e a mistura foi deixada descansando por 24 horas. A reação foi esfriada a 0°C e tratada com 60 µl de NH₄OH. Os solventes foram evaporados em baixa pressão (a <40°C), obtendo-se uma goma amarelada, que apresentava uma única mancha em CCF (ver metodologia de CCF no item 6.2.3.1). EM-IE m/z (abundância relativa): [M]⁺ 339 (<1), 324 (7), 295 (3), 254 (2), 158 (2), 157 (18), 156 (2), 140 (2), 139 (12), 138 (100), 137 (17), 136 (21), 109 (3), 108 (3), 106 (2), 101 (11), 100 (2), 95 (5), 94 (47), 93 (84), 80 (15), 71 (11), 67 (12), 59 (12), 53 (9), 43 (83), 41 (19); ¹H RMN (CDCl₃) δ 0,97 (d, J=6,6Hz, H6'*), 1,00 (d, J=6,6Hz, H7'*), 1,26 (d, J=6,3Hz, H4'), 1,38 (s, OCH₃), 1,54 (s, OCH₃), 4,26 (q, J=6,3Hz, H3'), 4,77 (d, J=14,4Hz, H9a), 4,88 (d, J=14,4Hz, H9b), 5,75 (m, H2); * valores interconvertíveis.

(-)-Platinecina (3a). 116 mg de (+)-retronecina em 5 ml de MeOH foram hidrogenadas cataliticamente com 12 mg de 10% Pd-C (forma óxida) à temperatura e pressão ambiente por 5 hs. A catálise foi filtrada sob Celite 545, o filtrado foi

evaporado, obtendo-se uma goma que foi cristalizada em acetona, obtendo-se 115 mg de cristais de (-)-platinecina (98%). PF: 148-149°C (lit.¹⁰ 148-149°C). $[\alpha]_D = -57,3^\circ$ (EtOH; c 0,35) lit.¹⁰ $[\alpha]_D = -65,5^\circ$ (CHCl₃; c 1,00) IV ν_{\max} cm⁻¹: 3422 (OH), 3052-2866 (CH_{aliquil}), 1265 (C-N) (Figura 2.84). EM-IE (ver Tabela 2, Capítulo 2). ¹H e ¹³C se encontram na Tabela 2.11.

Ácido (±)-2-acetil, 2-metil butanóico (49). 1,0815 g do ácido (±)-2-hidroxi, 2-metil butanóico foi refluxado em cloreto de acila por 12 horas. O cloreto de acila foi evaporado sob baixa pressão e um óleo viscoso, 1,1427g (78%) foi obtido, observando-se uma única mancha em CCF (silica gel H, fase móvel Benzeno:MeOH:AcOH 74:14:7). IV ν_{\max} cm⁻¹: 3458 (OH-ácido), 2983-2944 (CH_{aliquil}), 1741, 1727 (C=O). ¹H e ¹³C (CDCl₃) na Tabela 2.12 (Capítulo 2).

9-O-*RS*-2-acetil, 2-metil butanoato de (+)-retronecina (40b). A uma solução, em 5 ml de CH₂Cl₂ seco, de 30 mg de (+)-retronecina (1a) (0,1935 mmol) e 100 mg do ácido (±)-2-hidroxi, 2-metil butanóico (49) (0,6250 mmol) foram adicionados uma solução, em 5 ml de CH₂Cl₂ seco, de 278 mg de DCC e quantidade catalítica de DMAP. A reação foi deixada agitando 24 horas à temperatura ambiente. Após este período o

10. Fleet et al. (1991).

solvente foi evaporado e a goma resultante cromatografada em sílica gel H (fase móvel $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ 90:10:1), obtendo-se 22 mg (0,0741 mmol, 38%) de 40b como uma goma amarelada.

EM-IE (ver Tabela 2.2, capítulo 2). IV ν_{max} cm^{-1} : 3415 (OH), 2966-2938 ($\text{CH}_{\text{aliquil}}$), 1639 (C=C), 1261 (C-N). ^1H e ^{13}C (CDCl_3) na Tabela 2.13 (Capítulo 2).

APÊNDICE

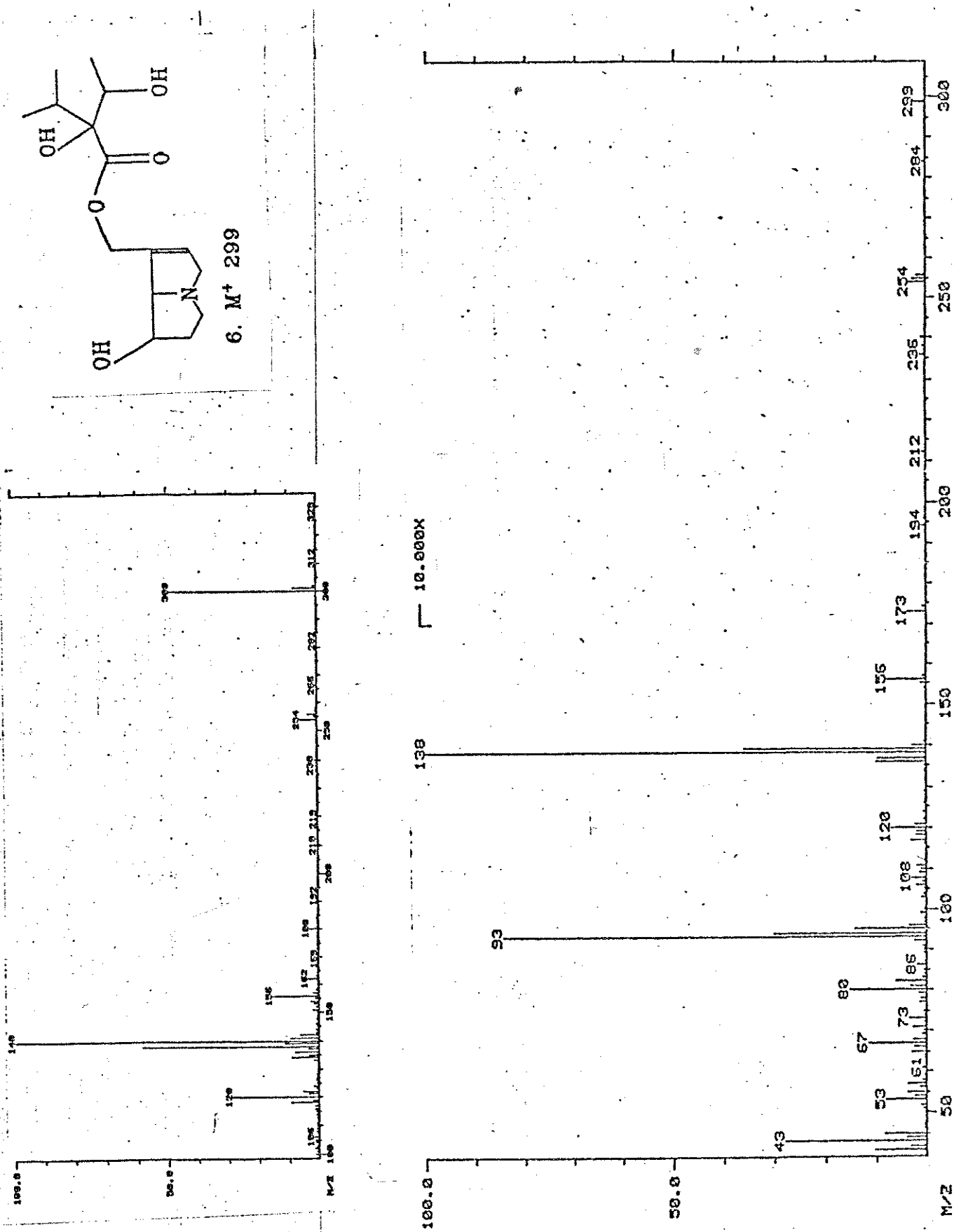
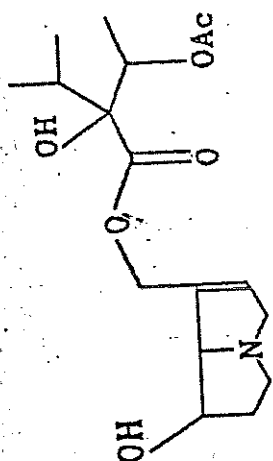


Figura 2.5. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 6.



8. M⁺ 341

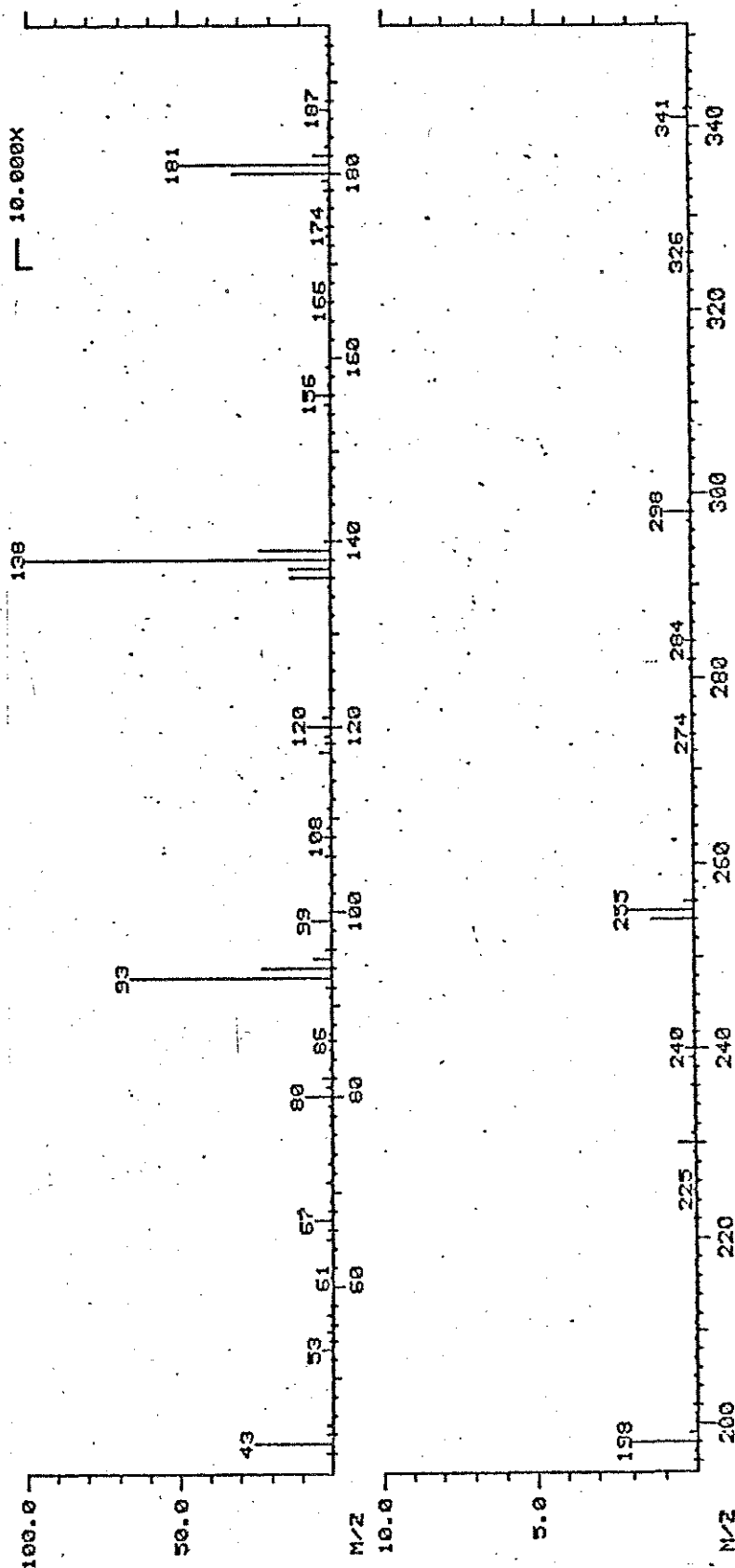
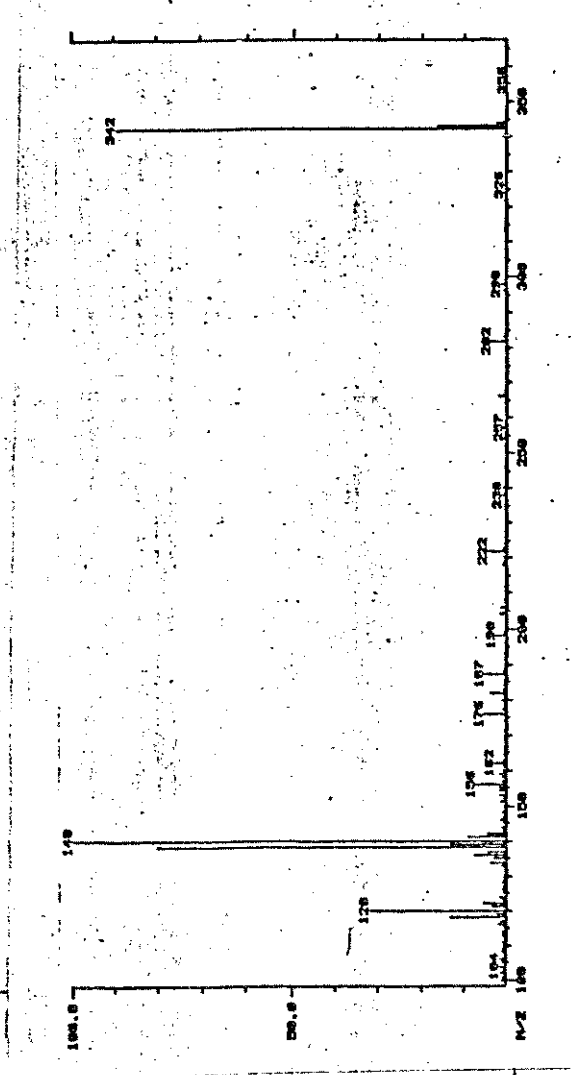
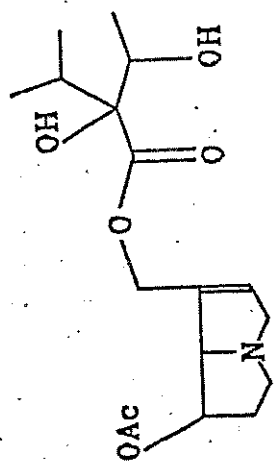


Figura 2.6. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 8.



9. M⁺ 341

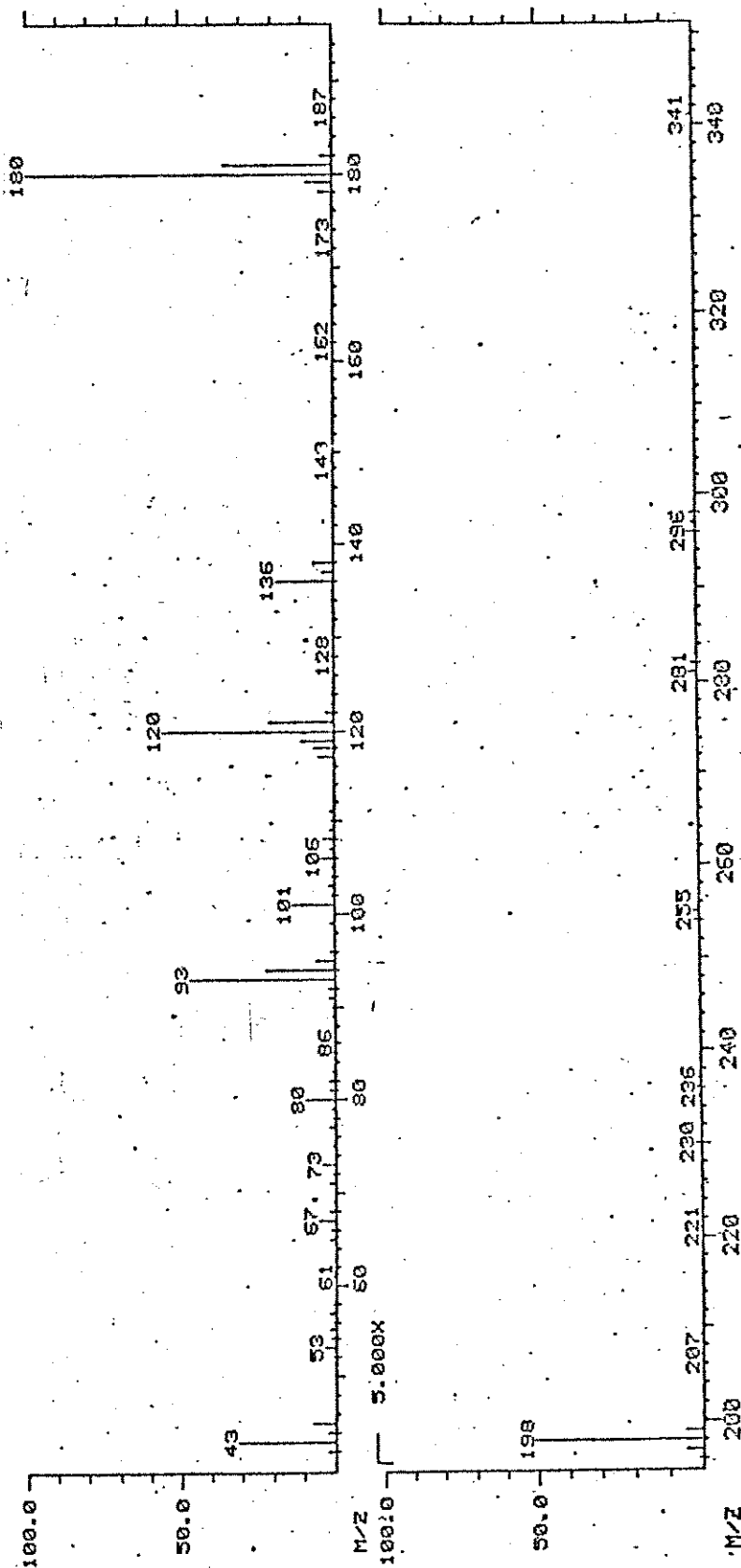
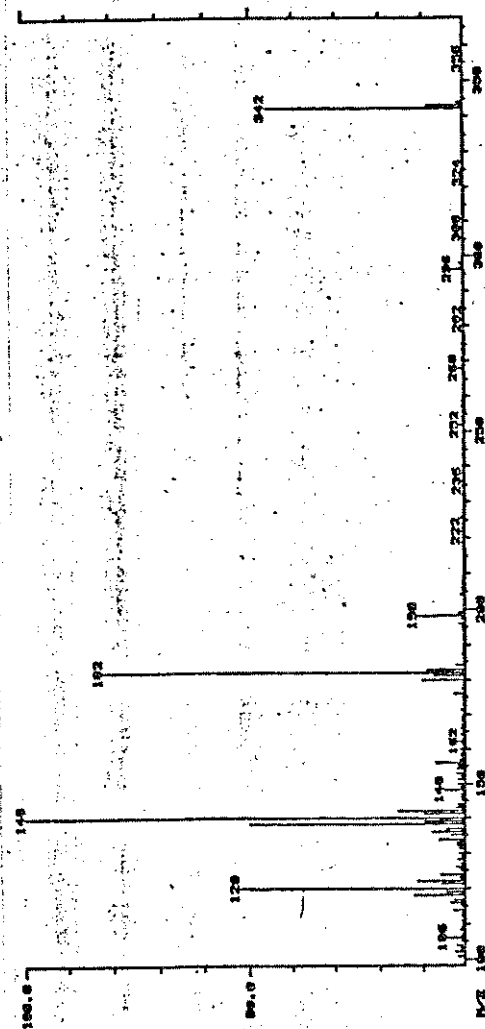


Figura 2.7. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 9.

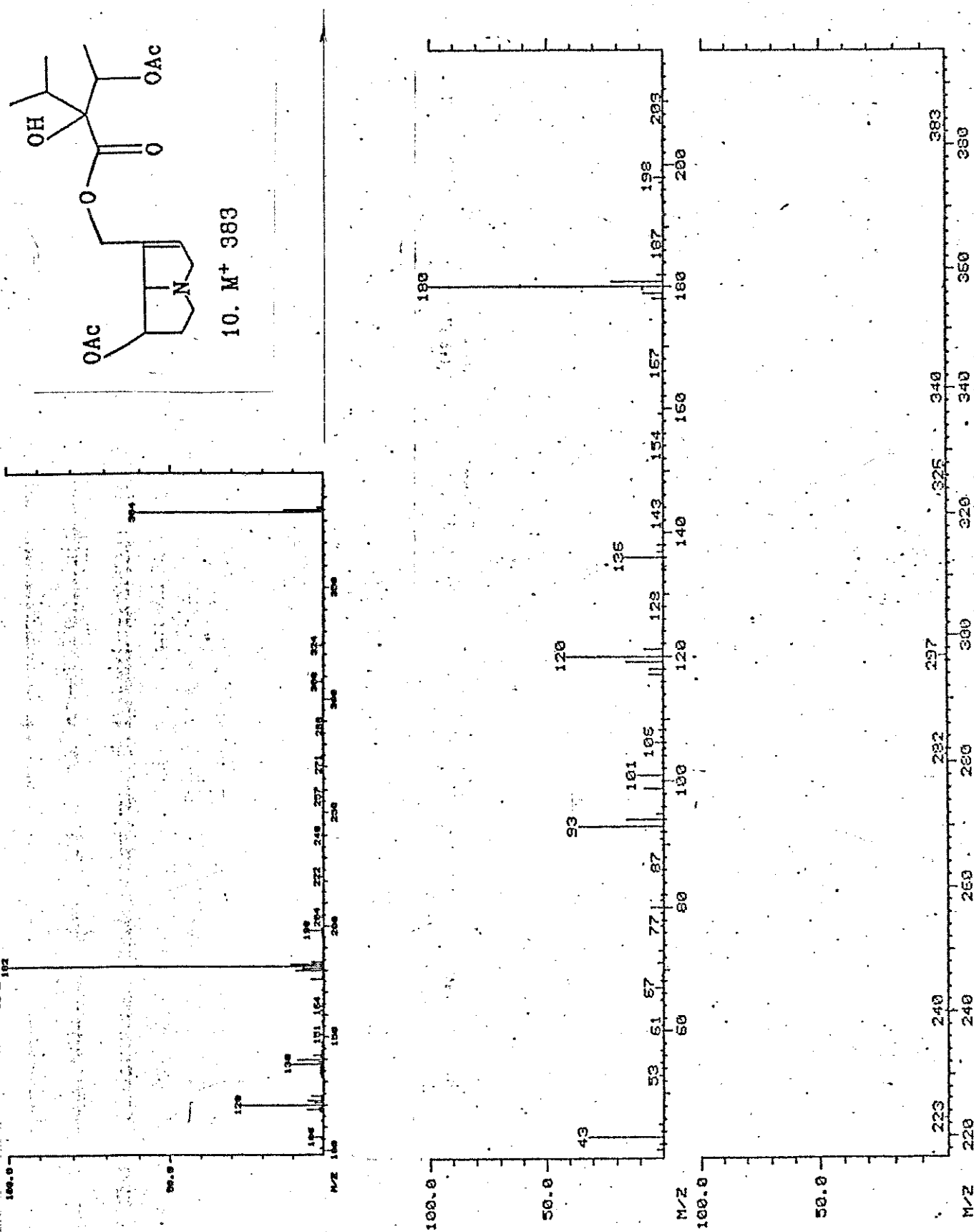


Figura 2.8. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 10.

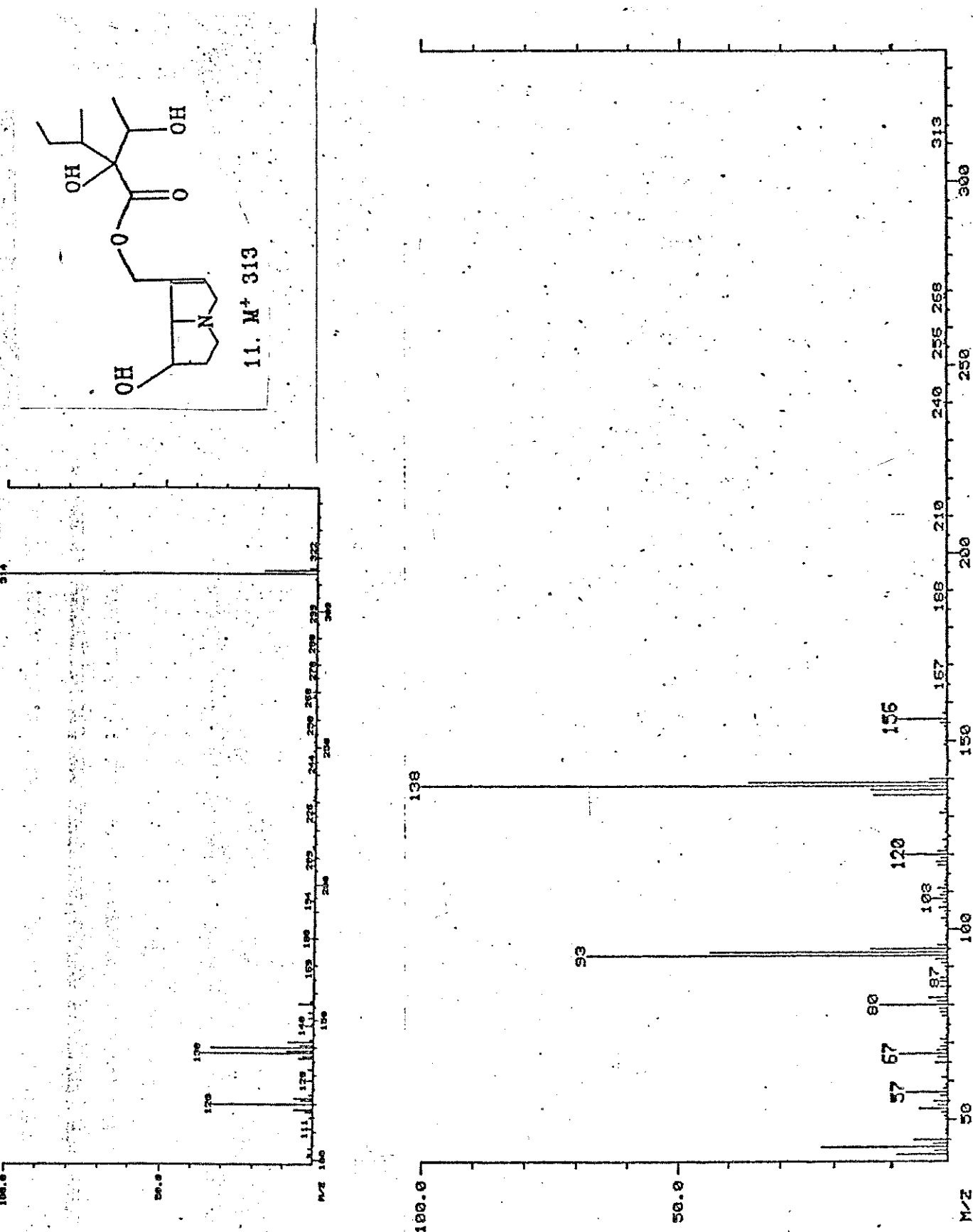


Figura 2.9. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 11.

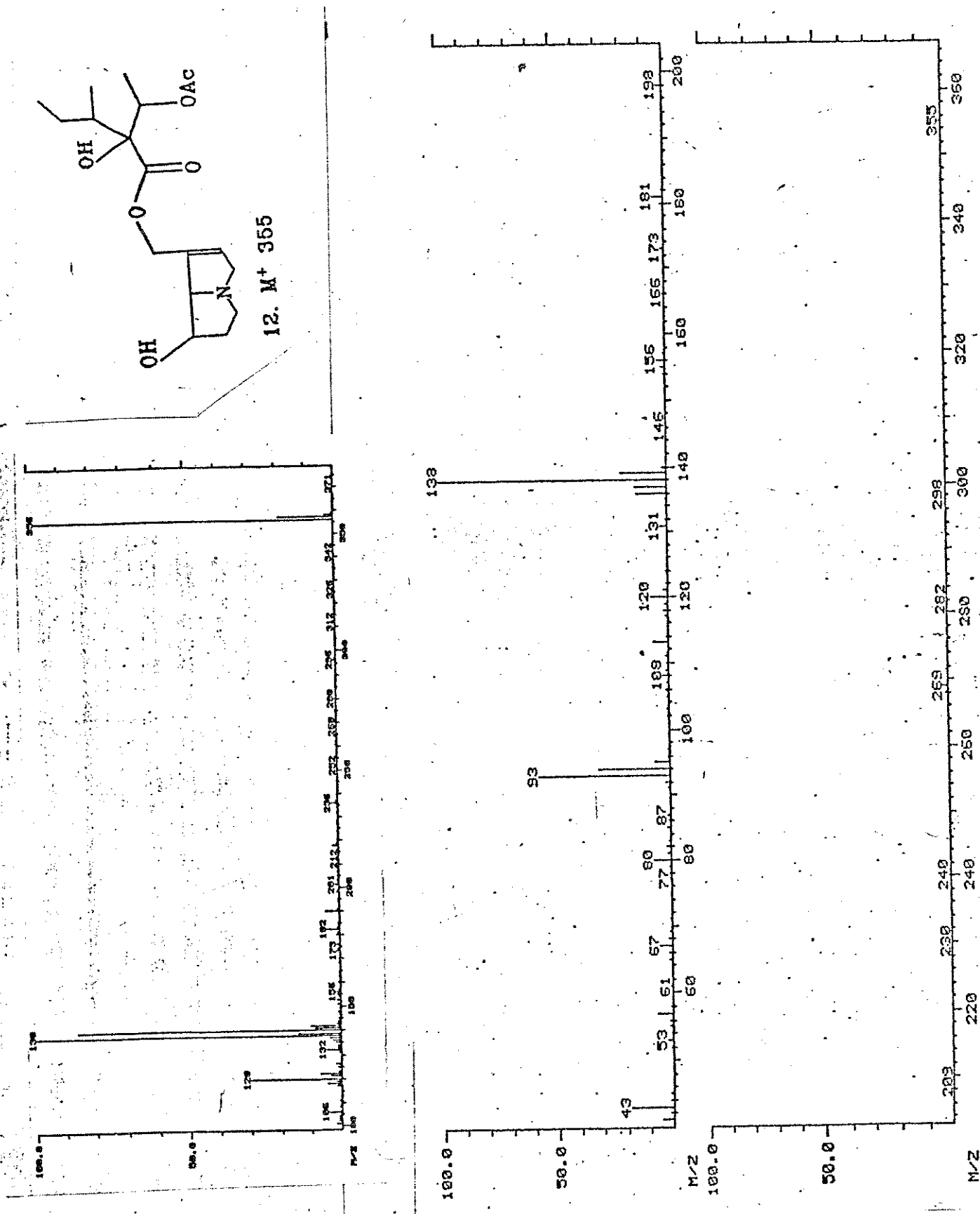


Figura 2.10. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 12.

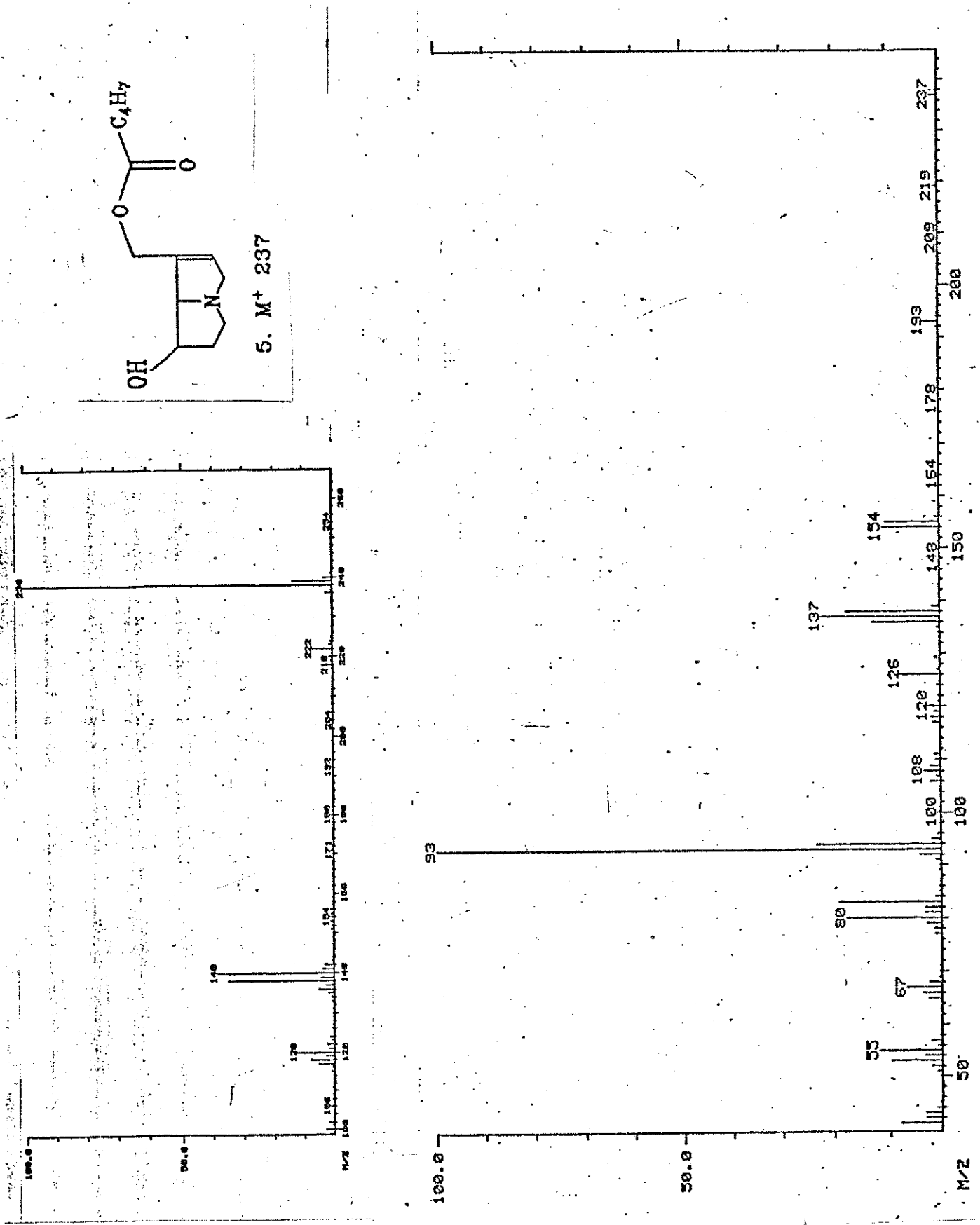


Figura 2.11. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 5.

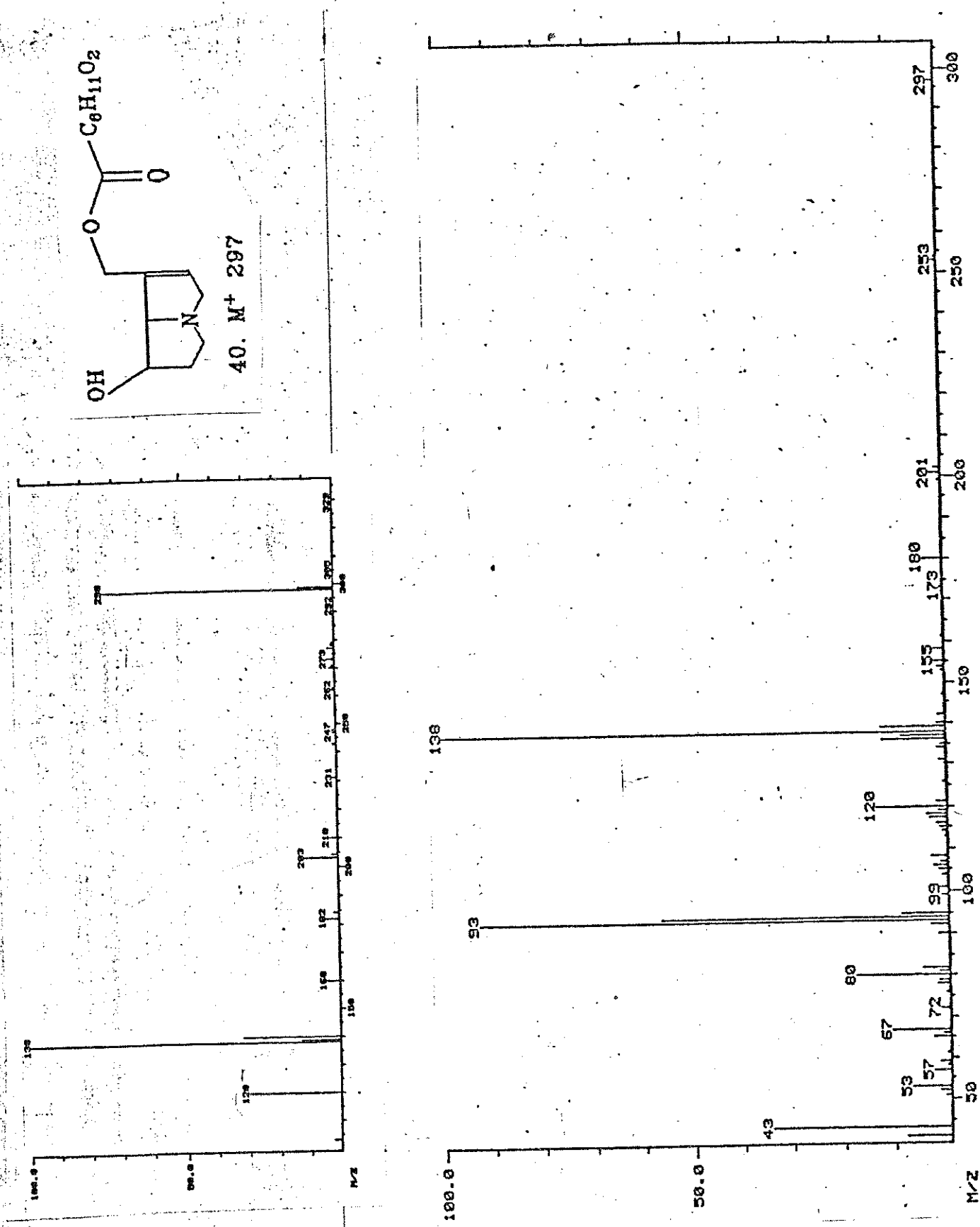


Figura 2.12. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 40.

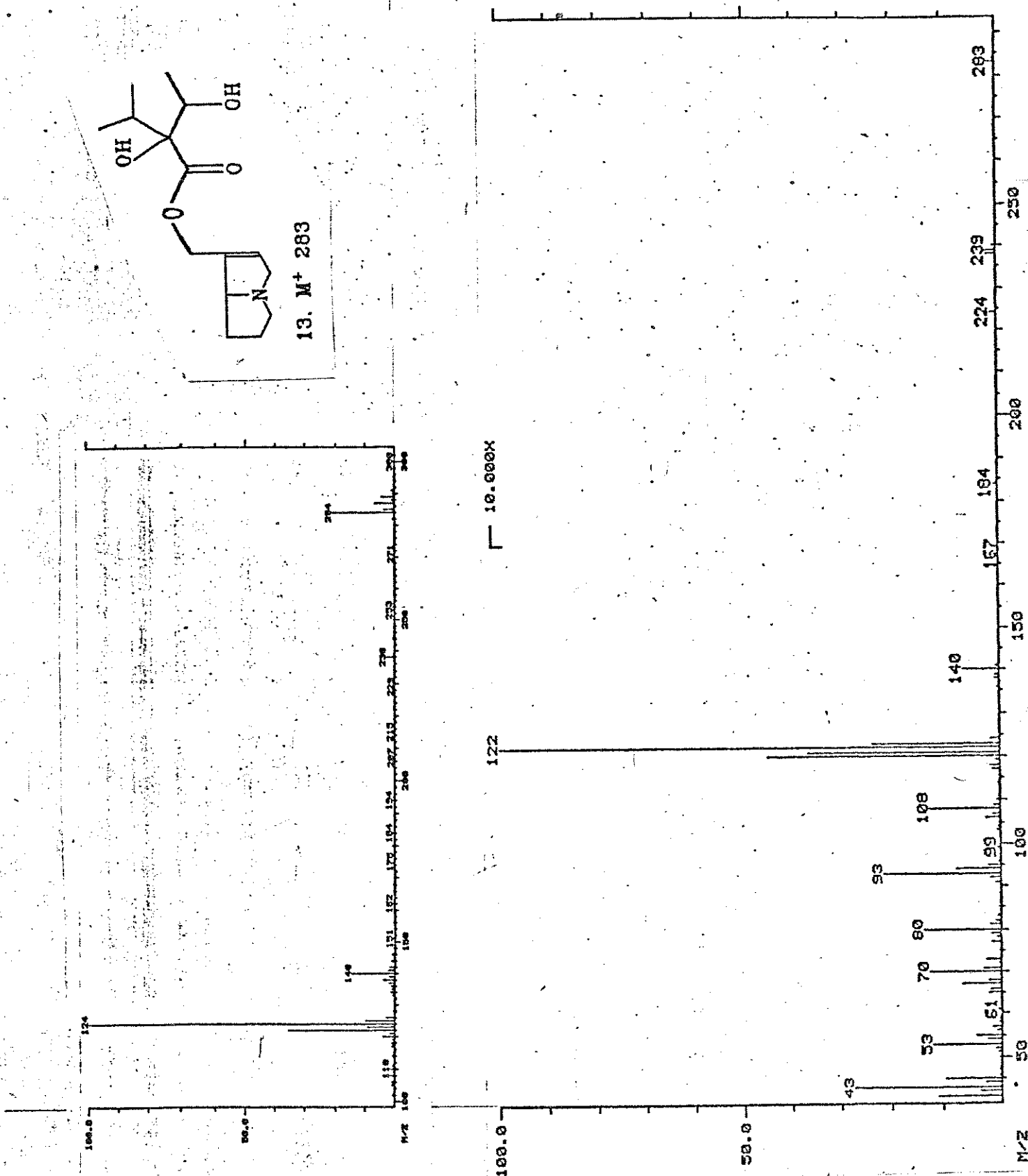


Figura 2.13. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 13.



Figura 2.14. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 14.

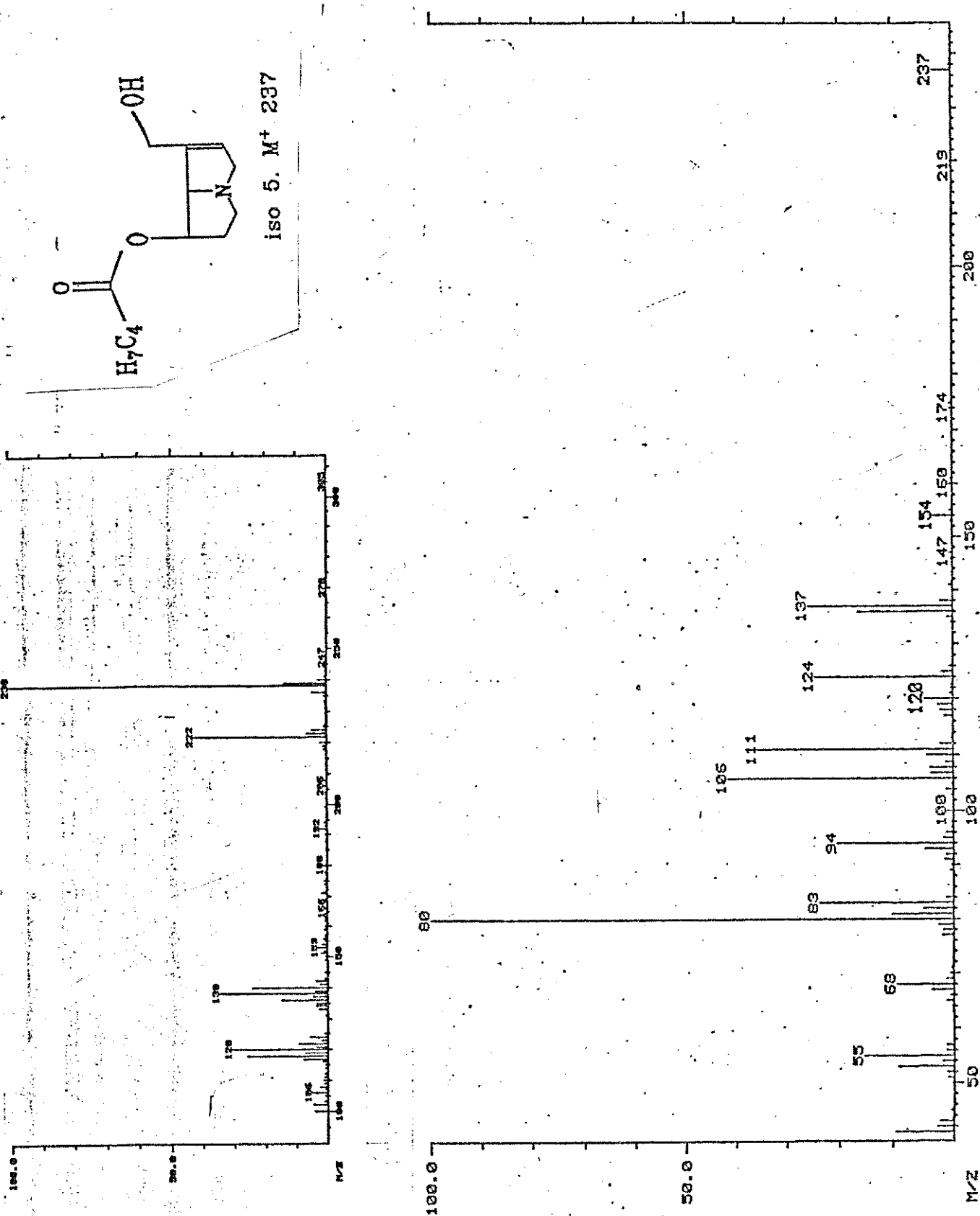


Figura 2.15. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de iso-5.

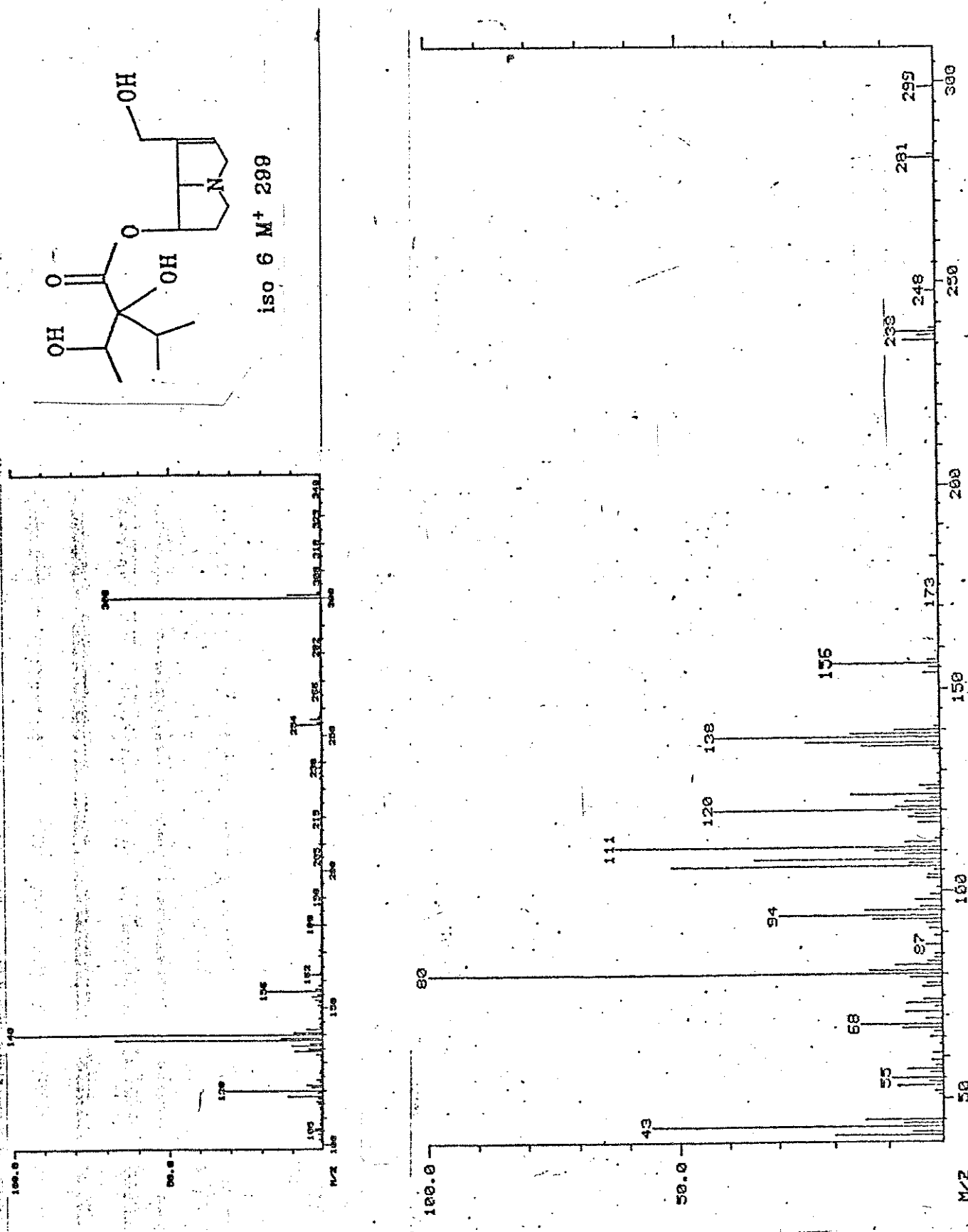


Figura 2.16. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de iso-6.

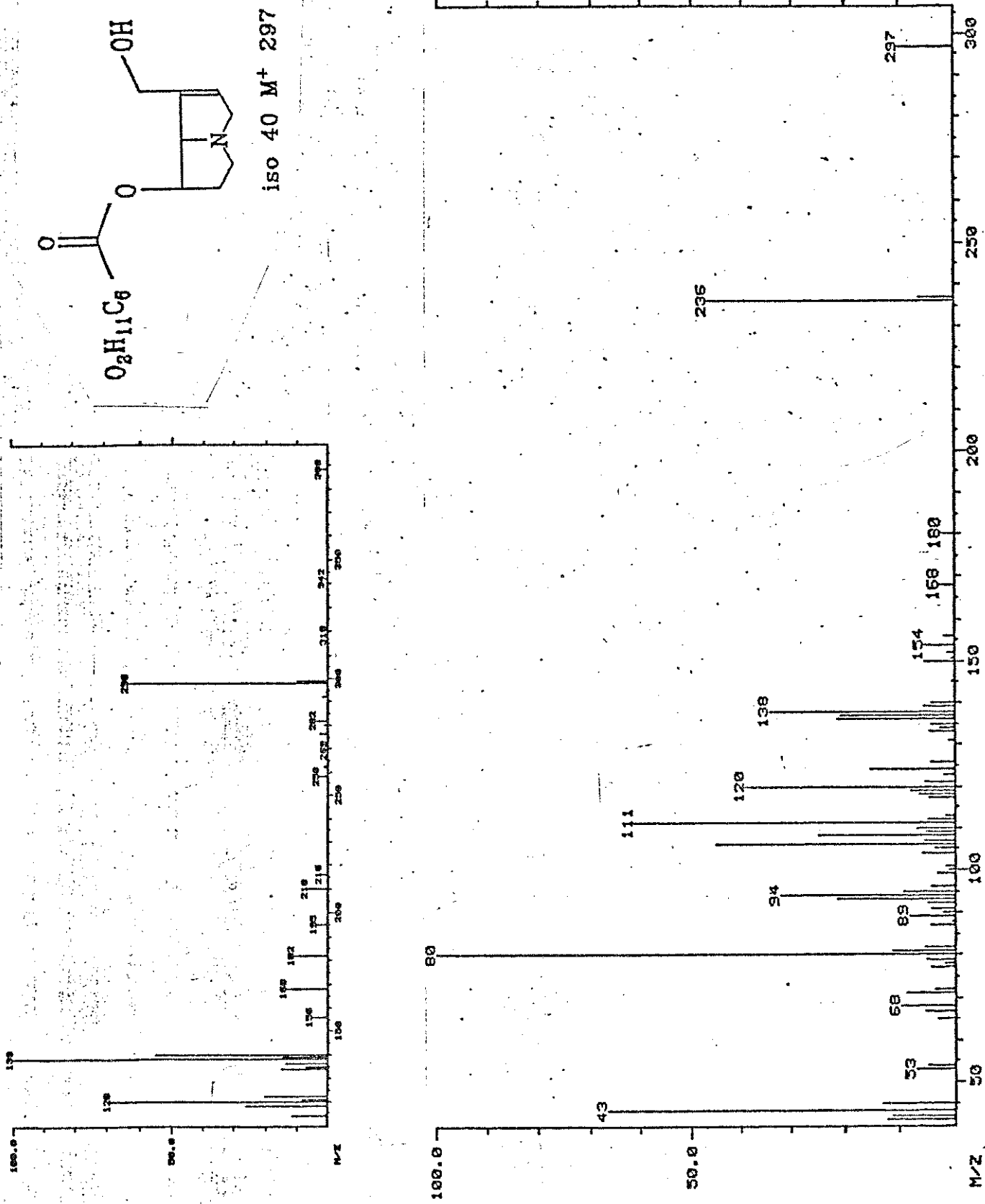


Figura 2.17. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de iso-40.

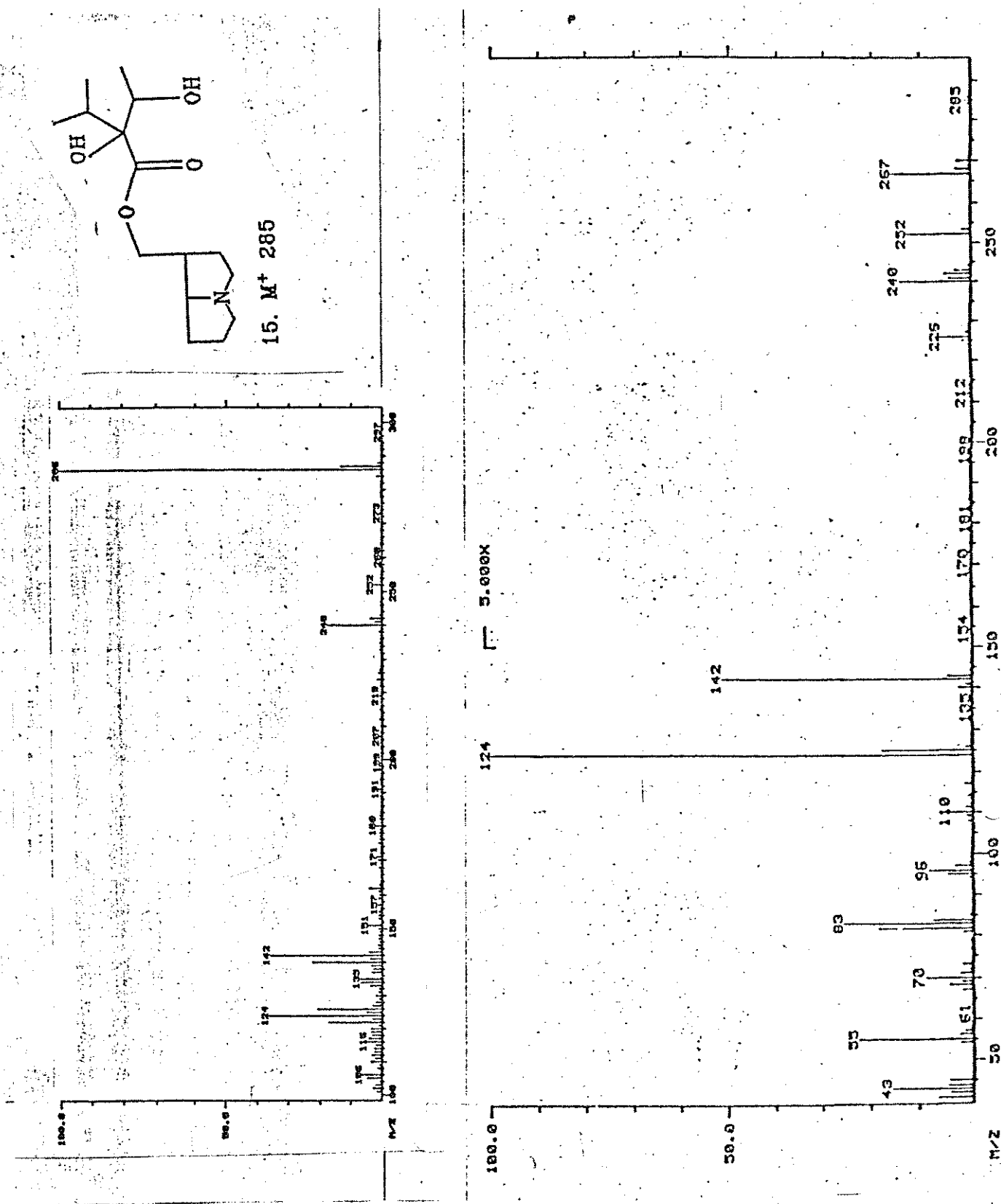


Figura 2.18. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 15.

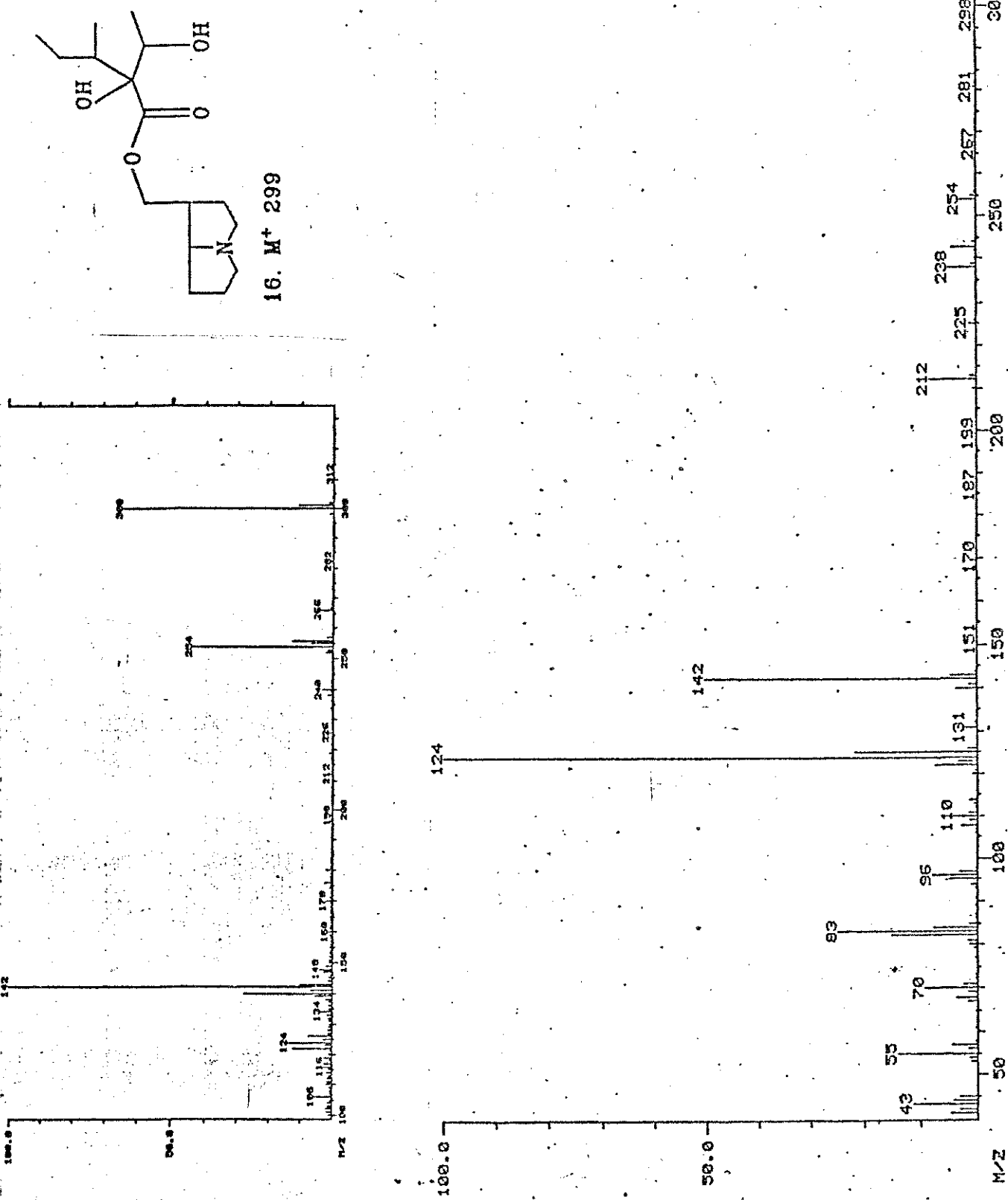


Figura 2.19. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 16.

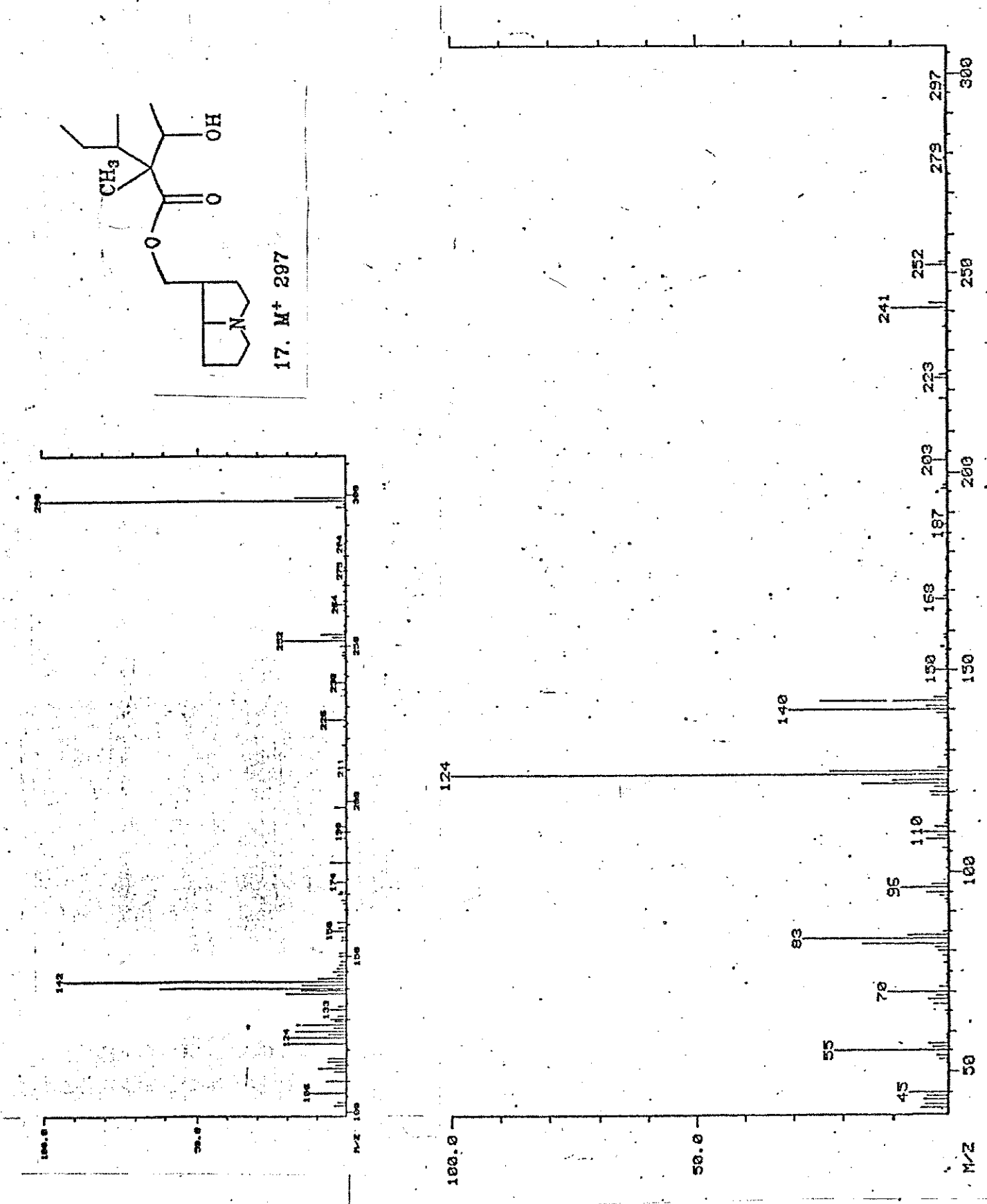
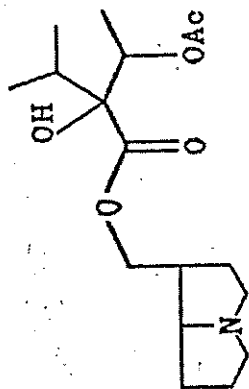


Figura 2.20. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 17.



18. M⁺ 327

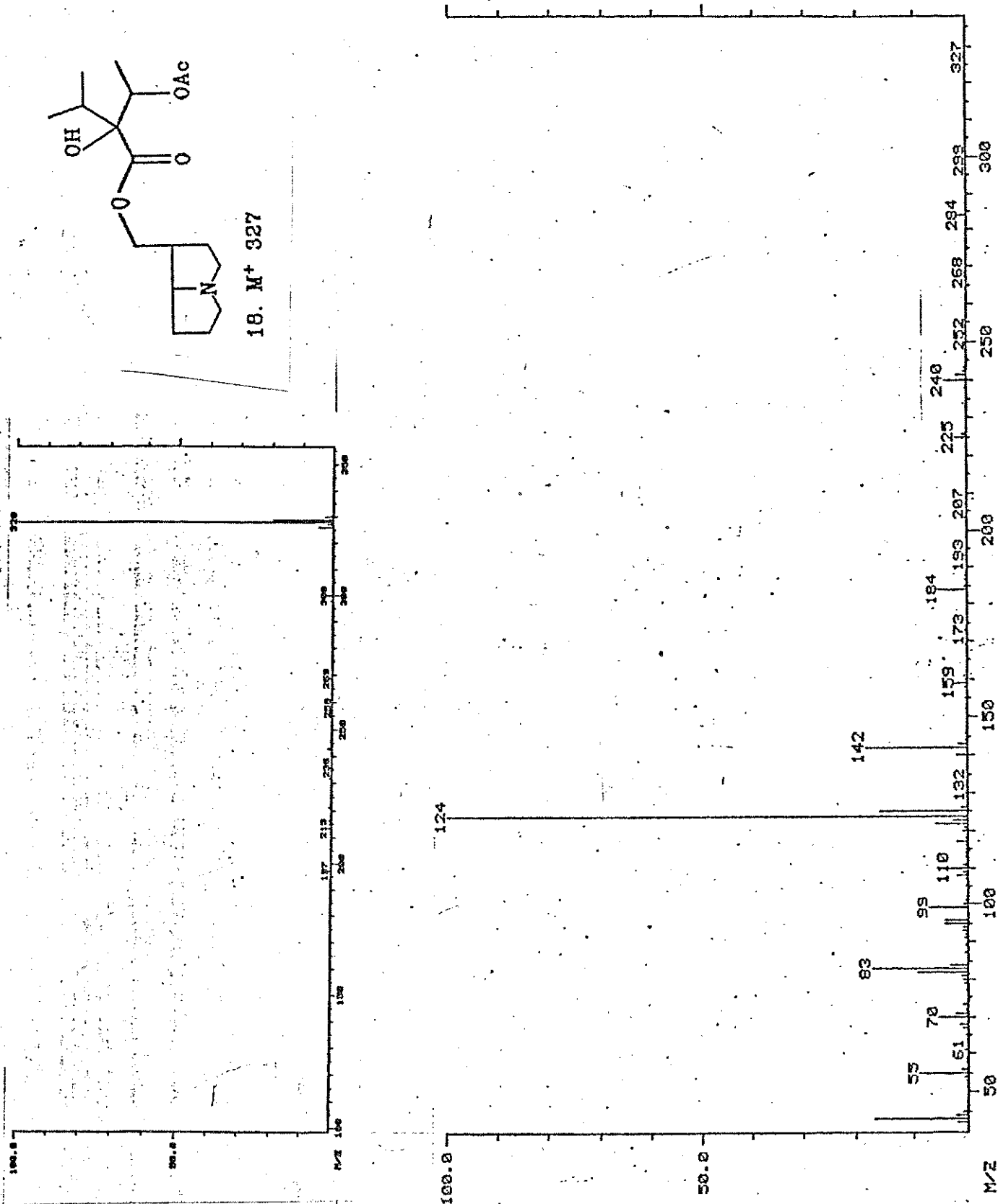


Figura 2.21. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 18.

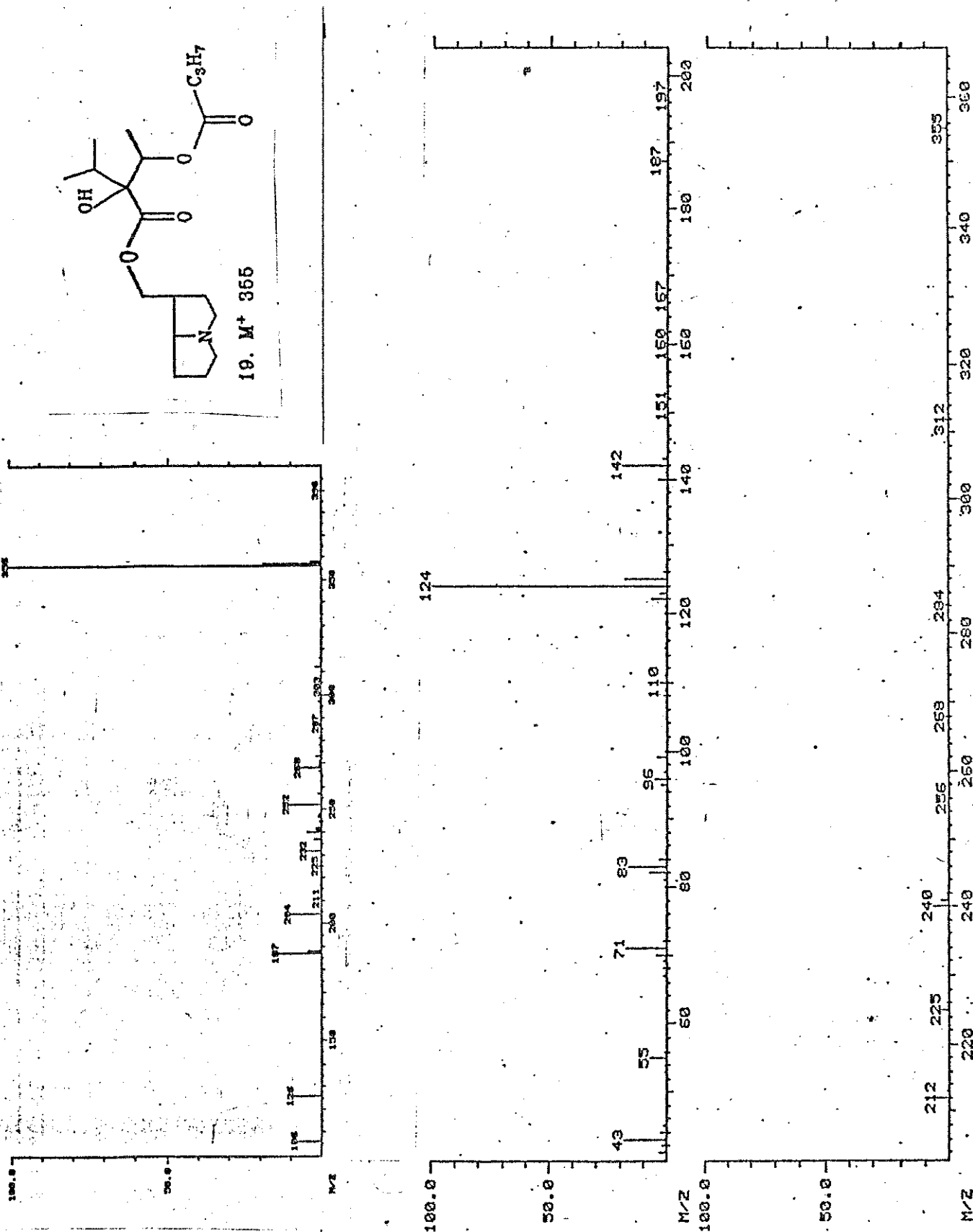


Figura 2.22. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 19.

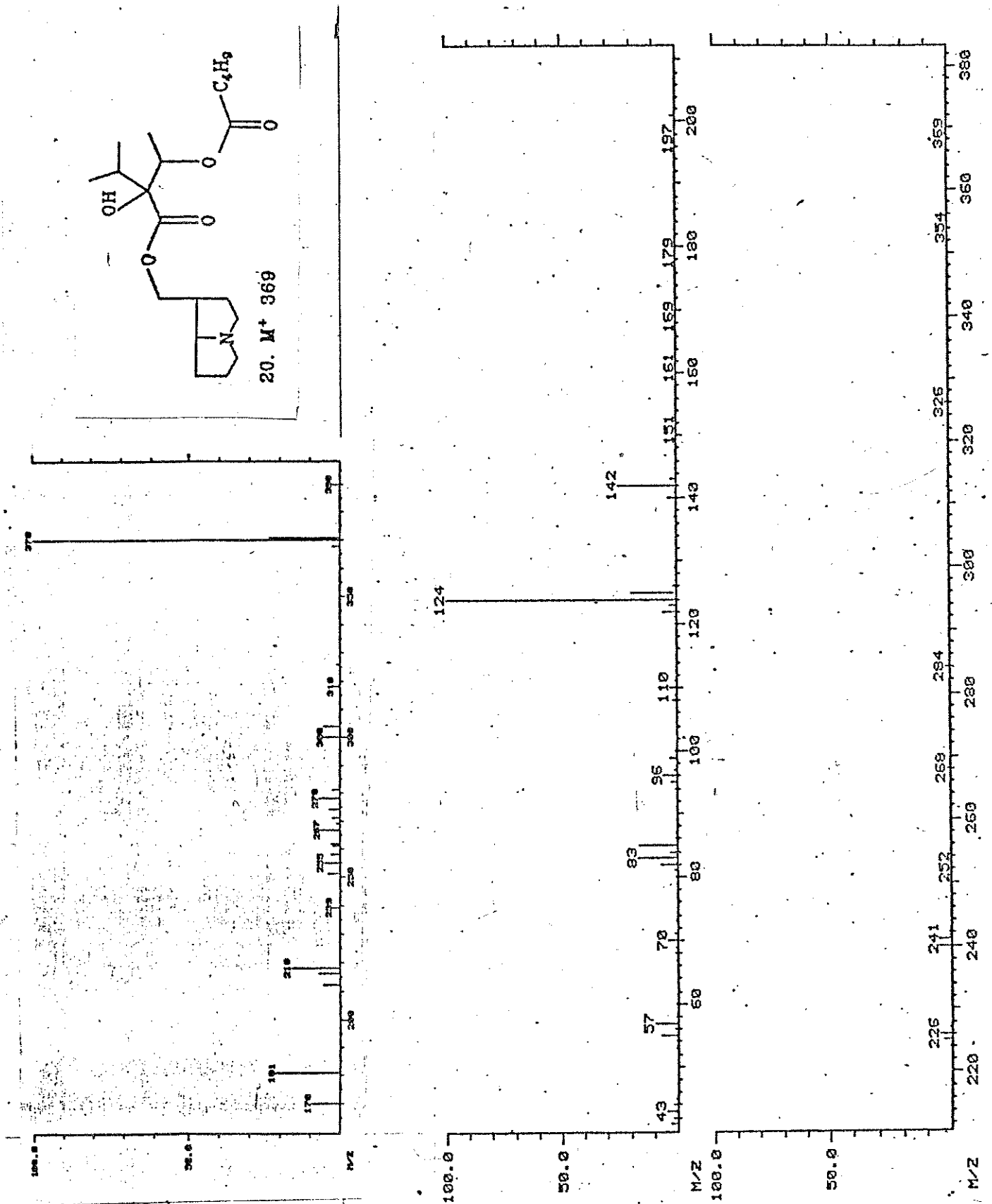


Figura 2.23. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 20.

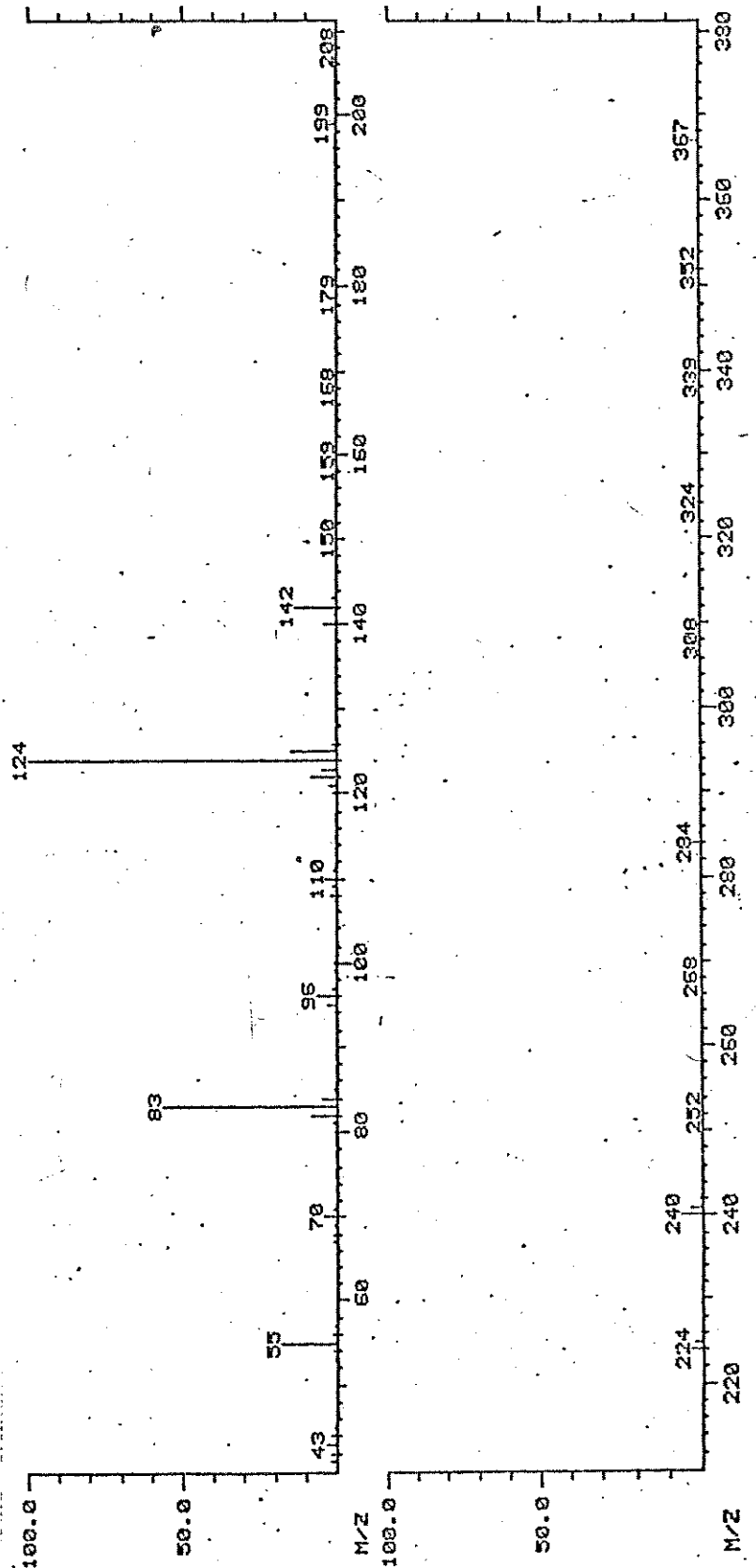
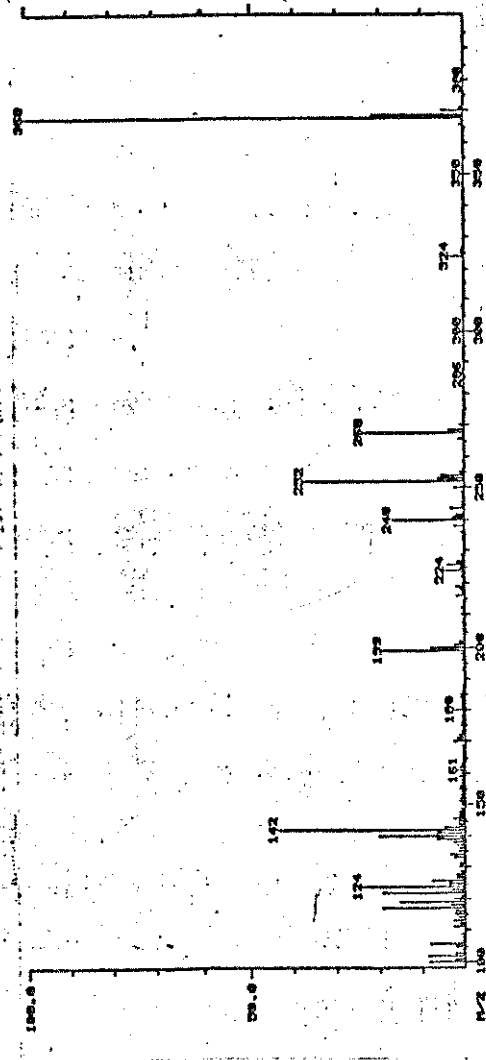
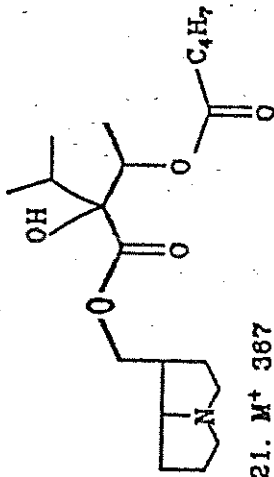


Figura 2.24. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 21.

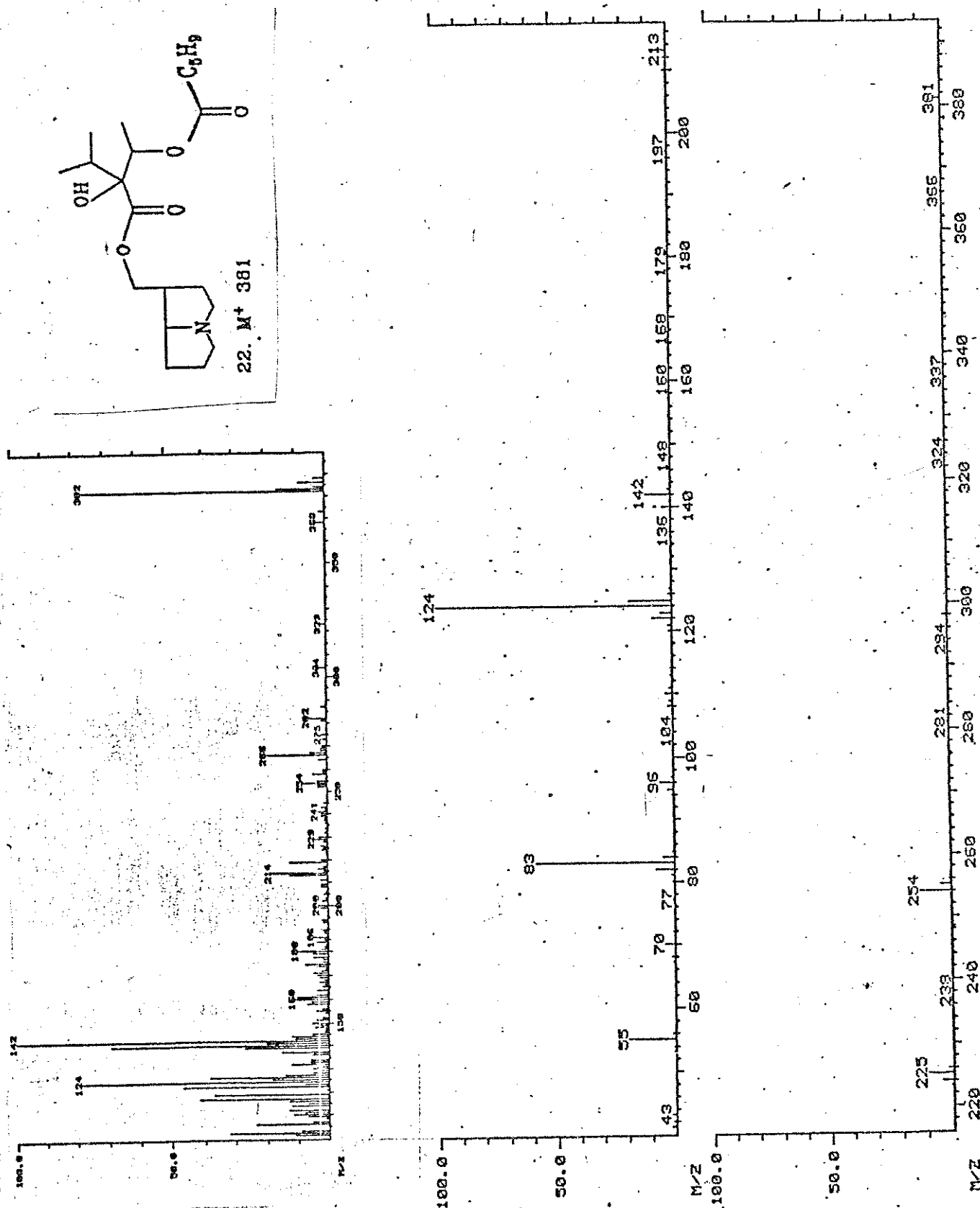


Figura 2.25. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 22.

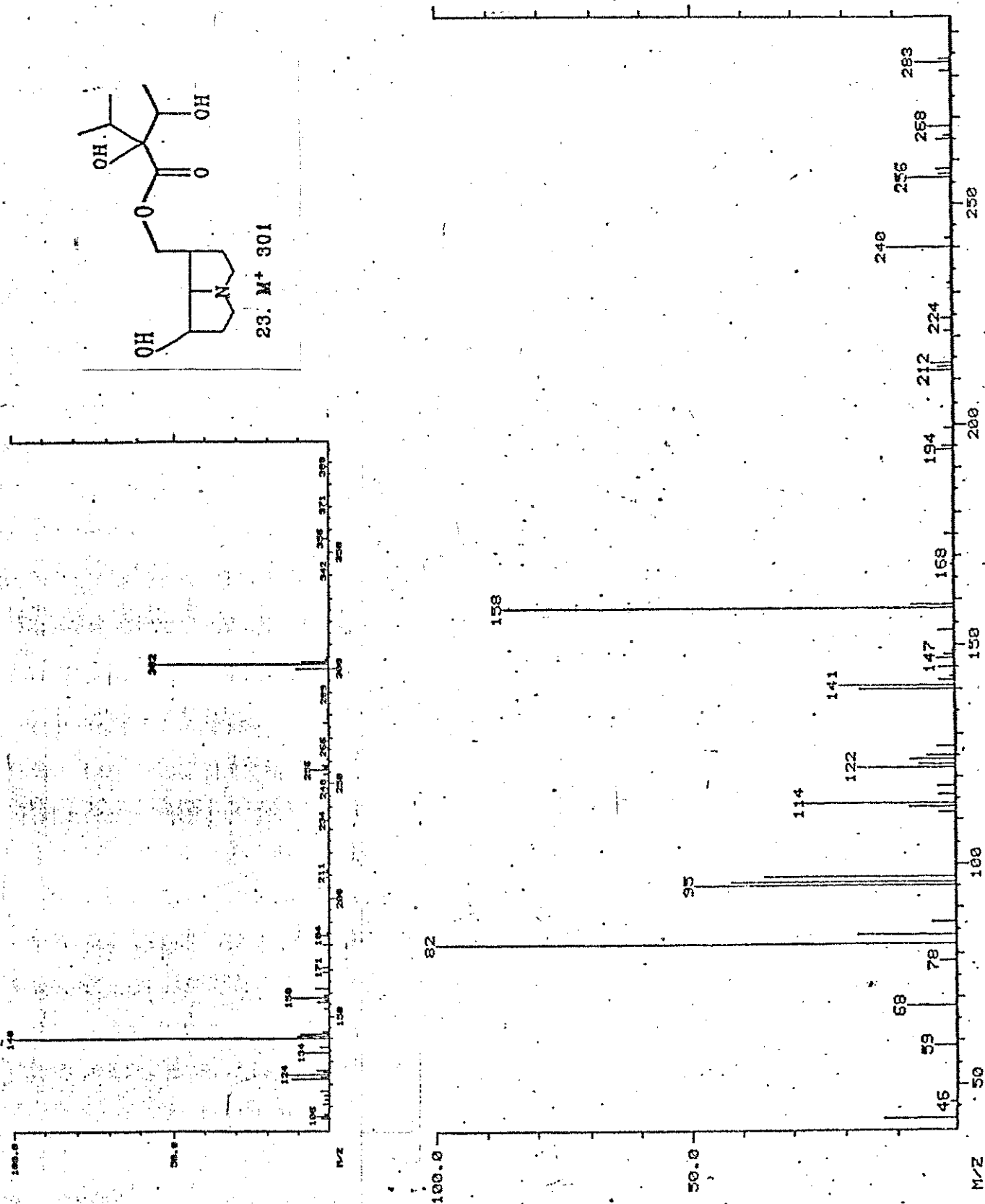


Figura 2.26. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 23.

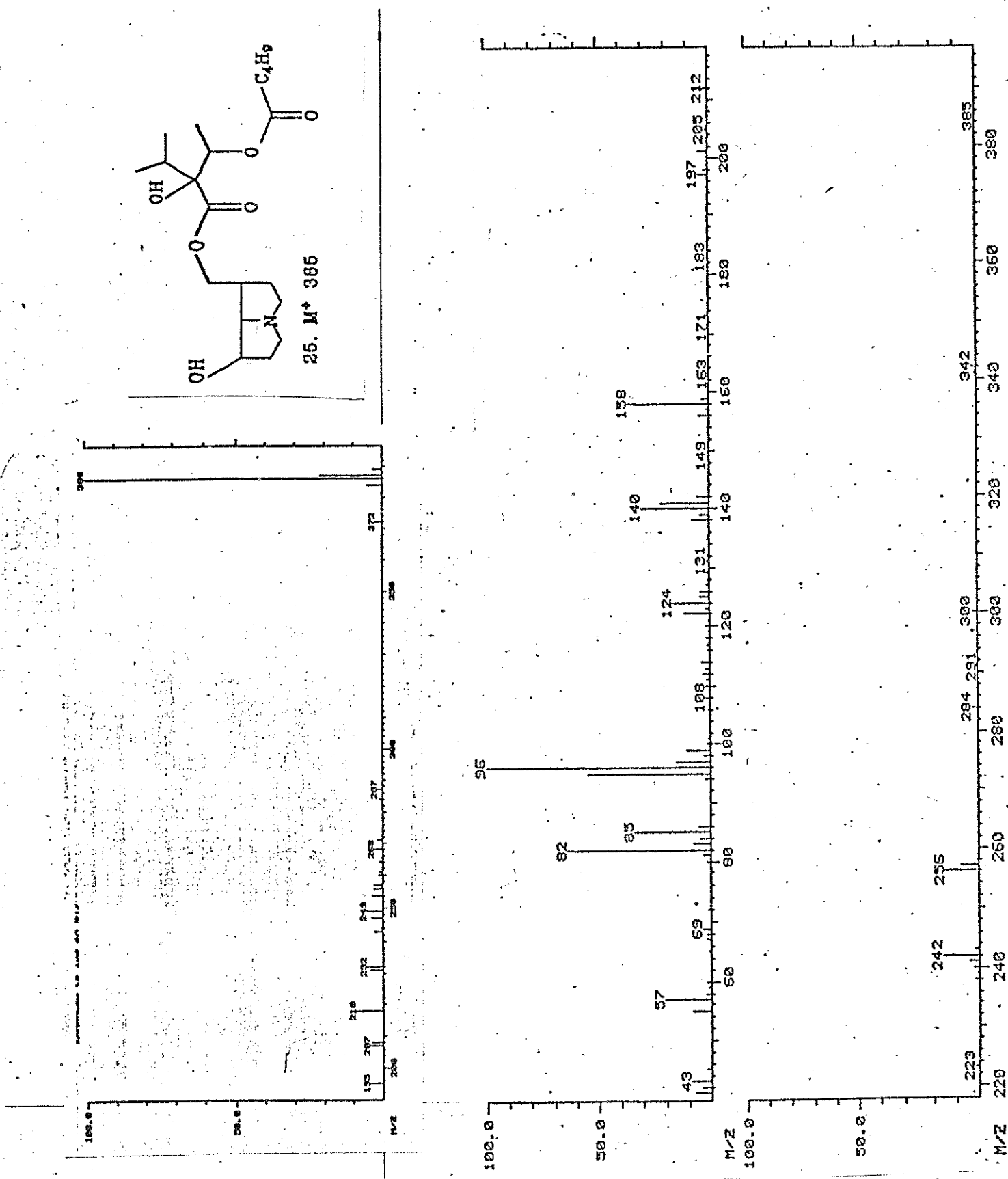


Figura 2.27. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 25.

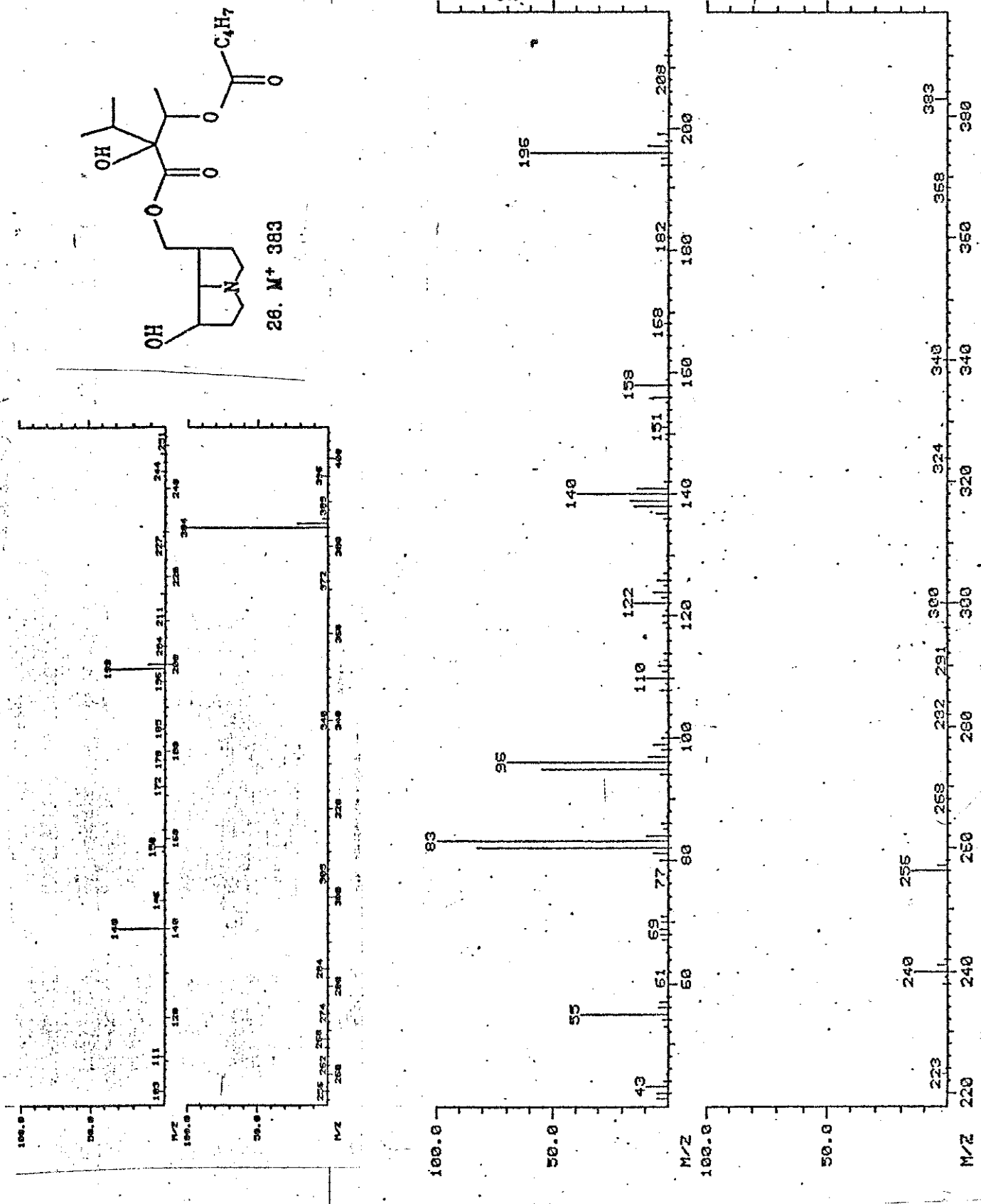


Figura 2.28. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 26.

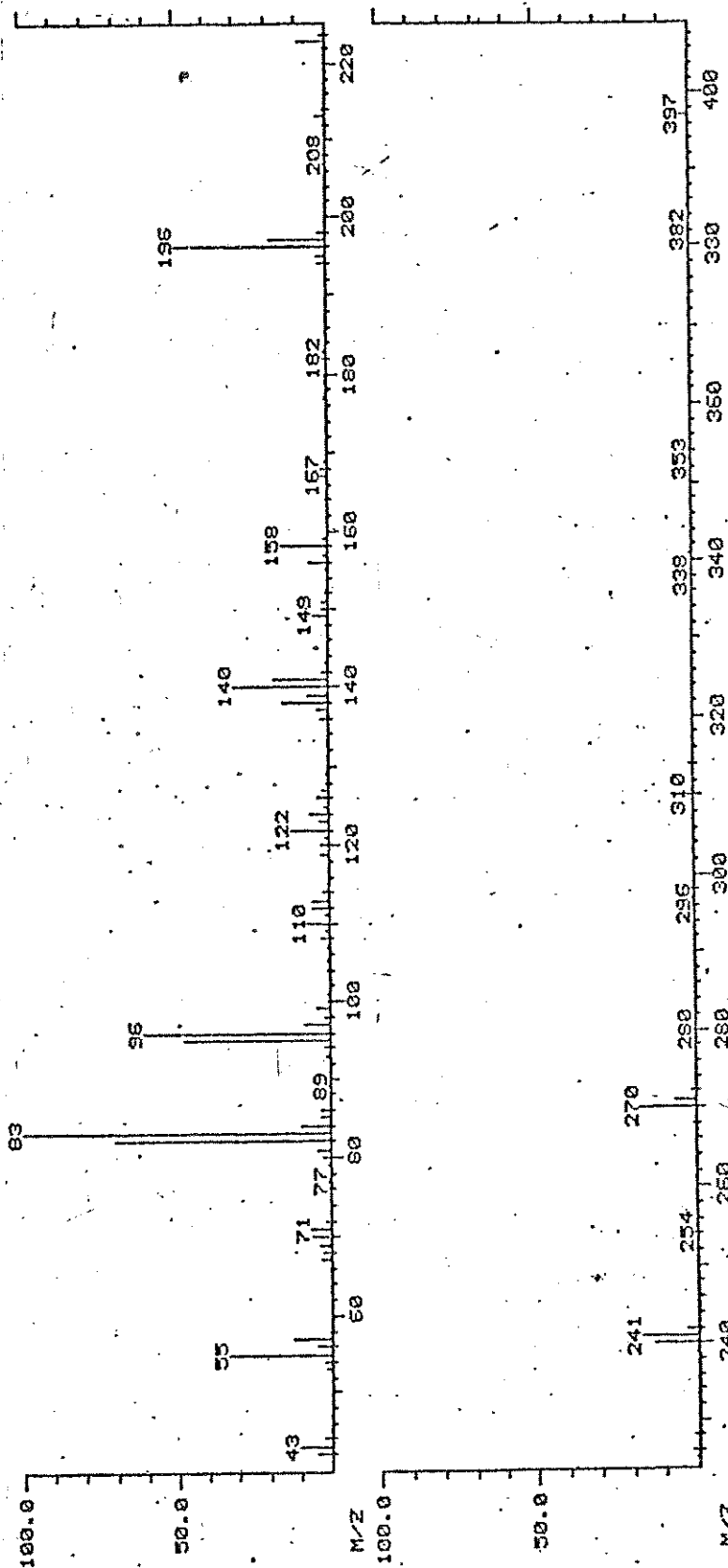
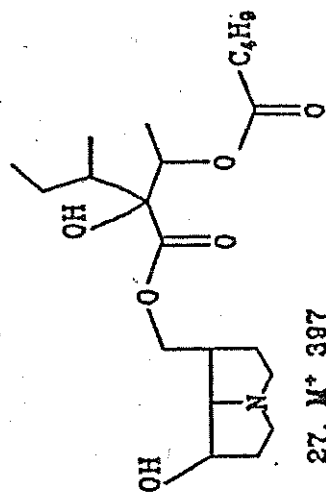


Figura 2.29. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 27.



24. M⁺ 239

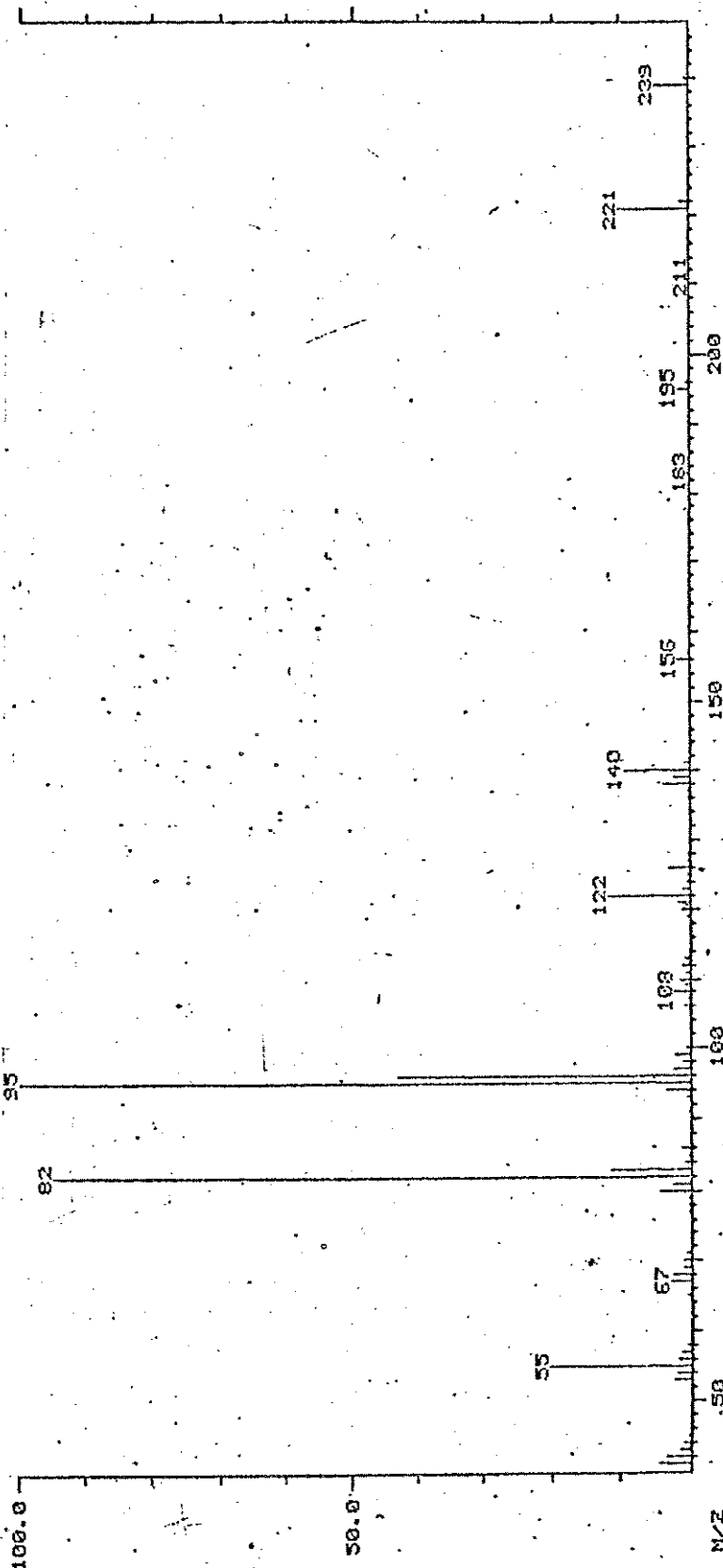
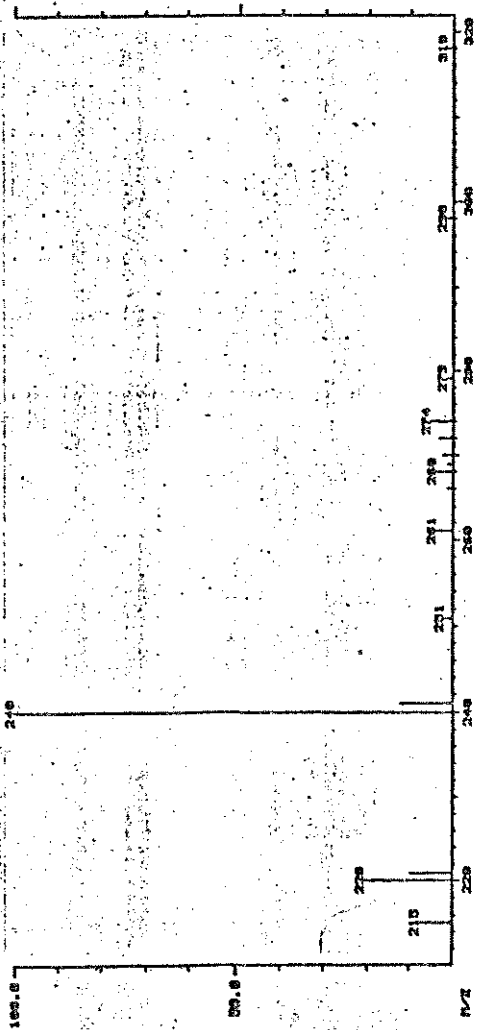


Figura 2.30. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 24.

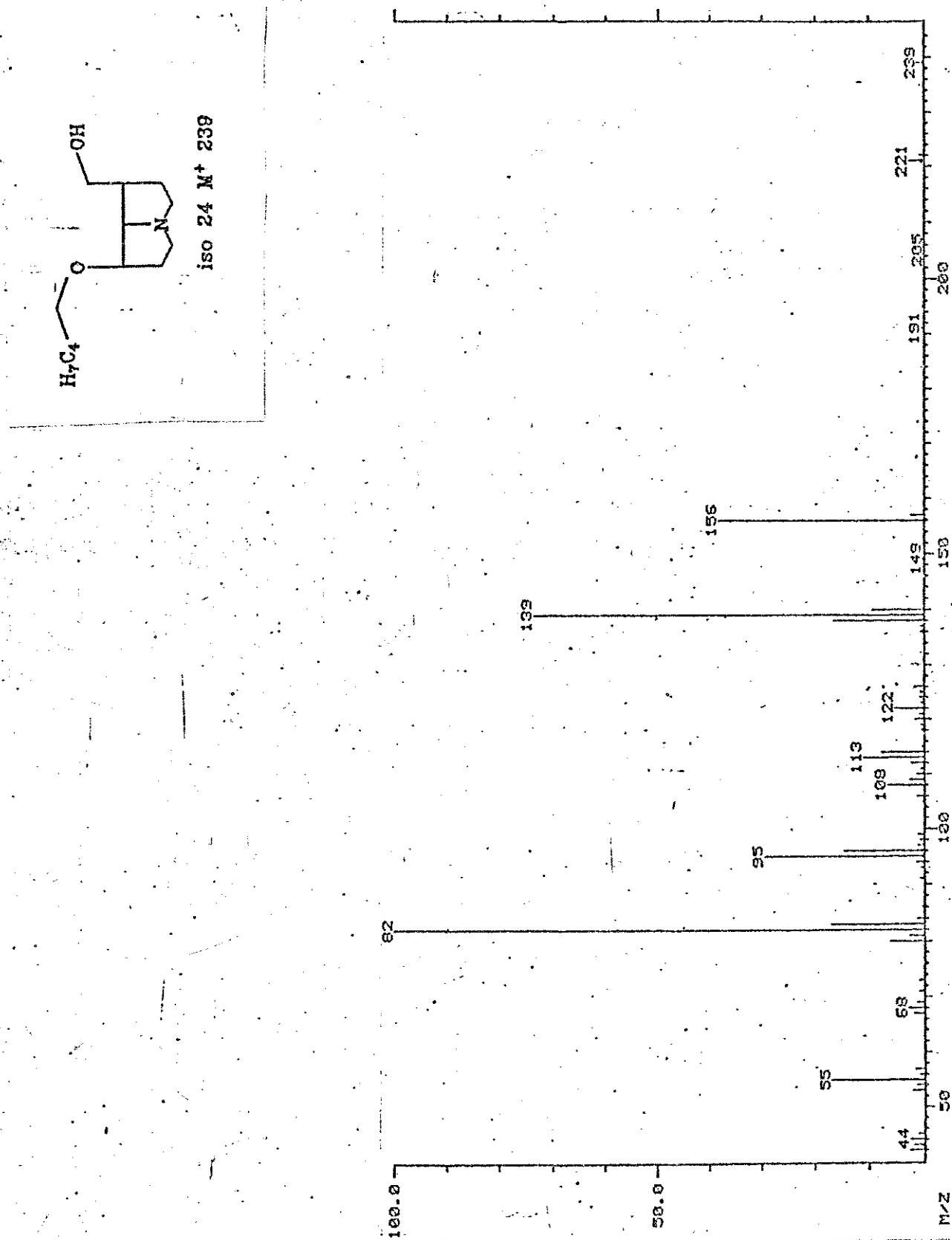


Figura 2.31. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de iso-24.

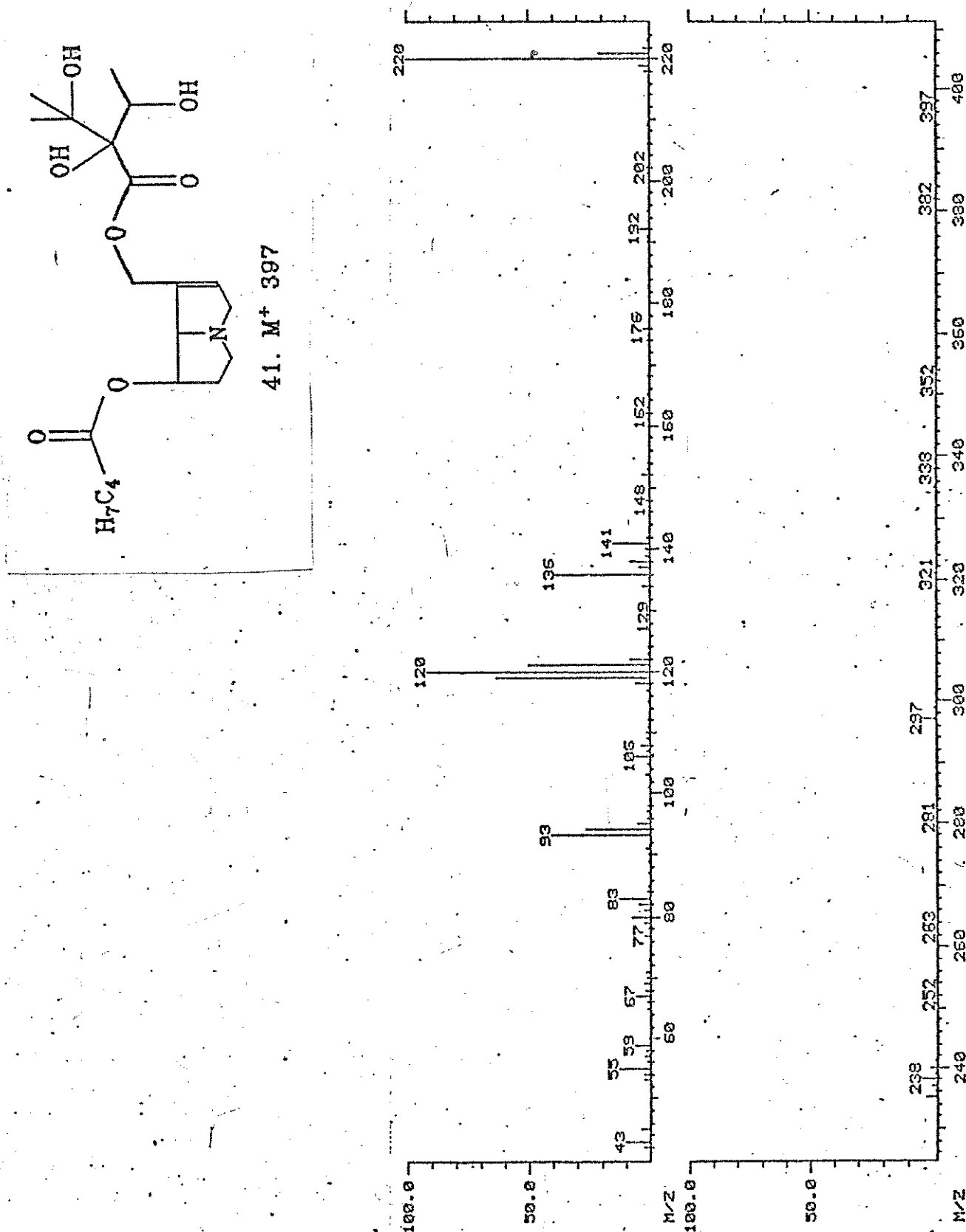


Figura 2.32. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 41.

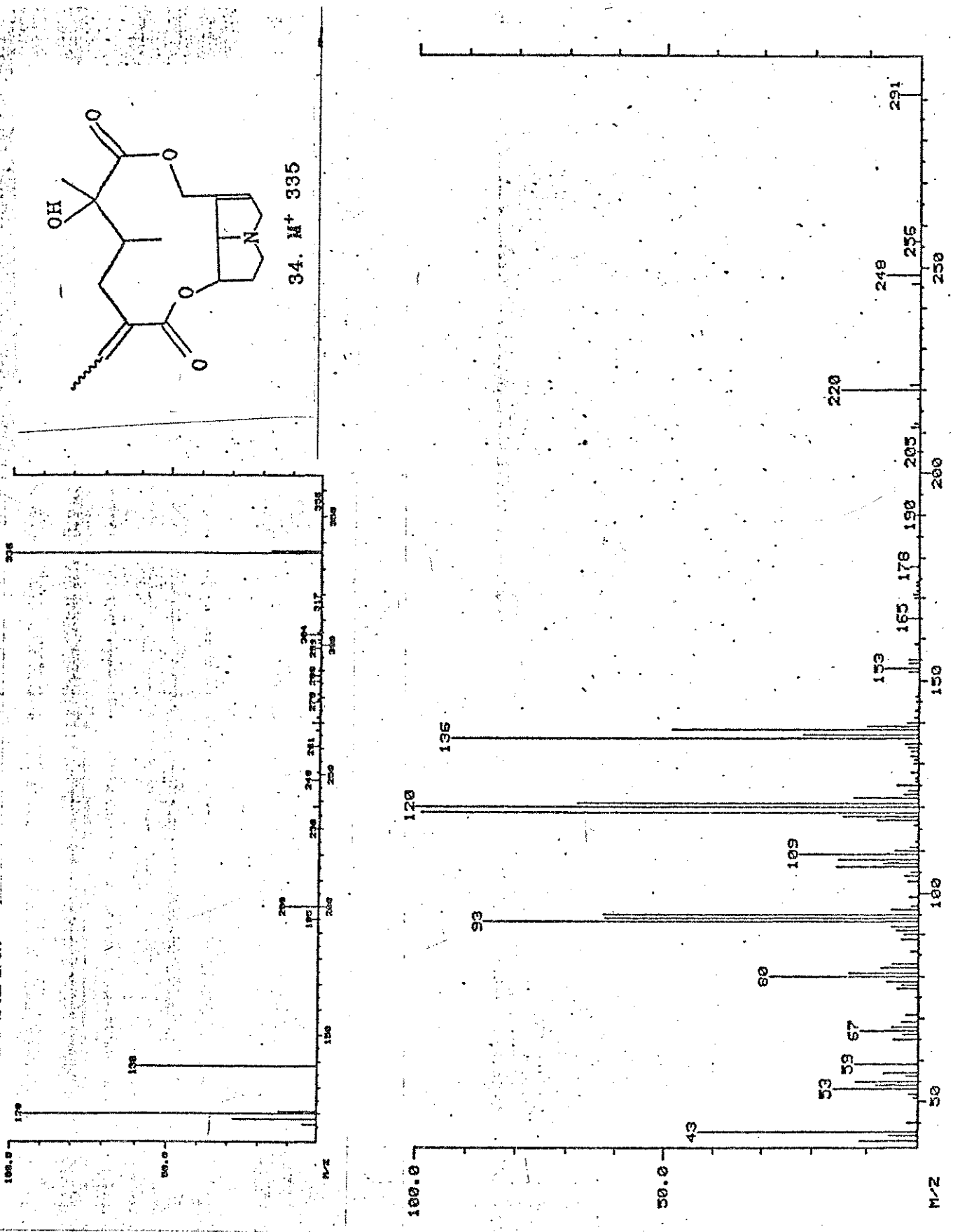


Figura 2.33. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 34.

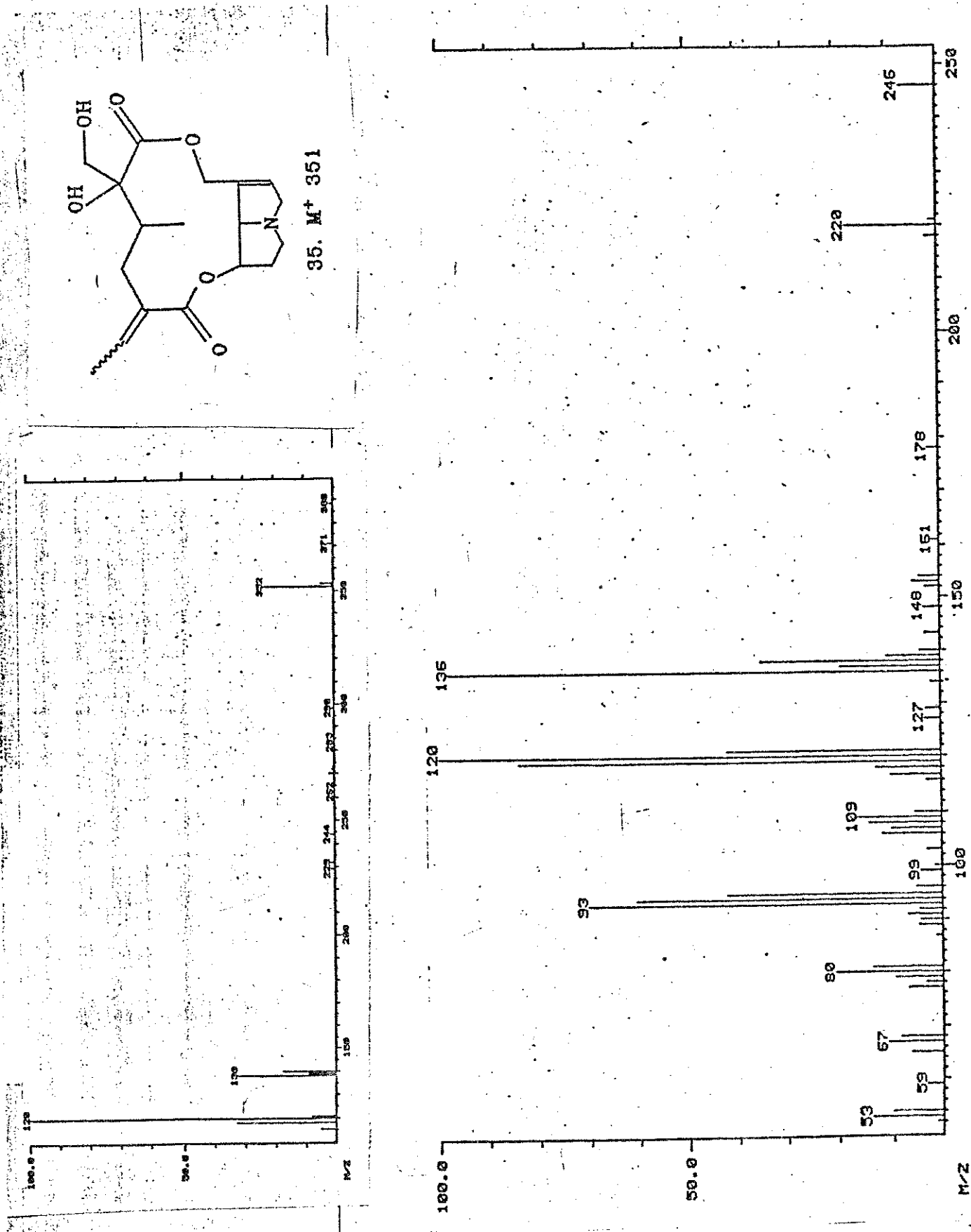


Figura 2.34. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 35.

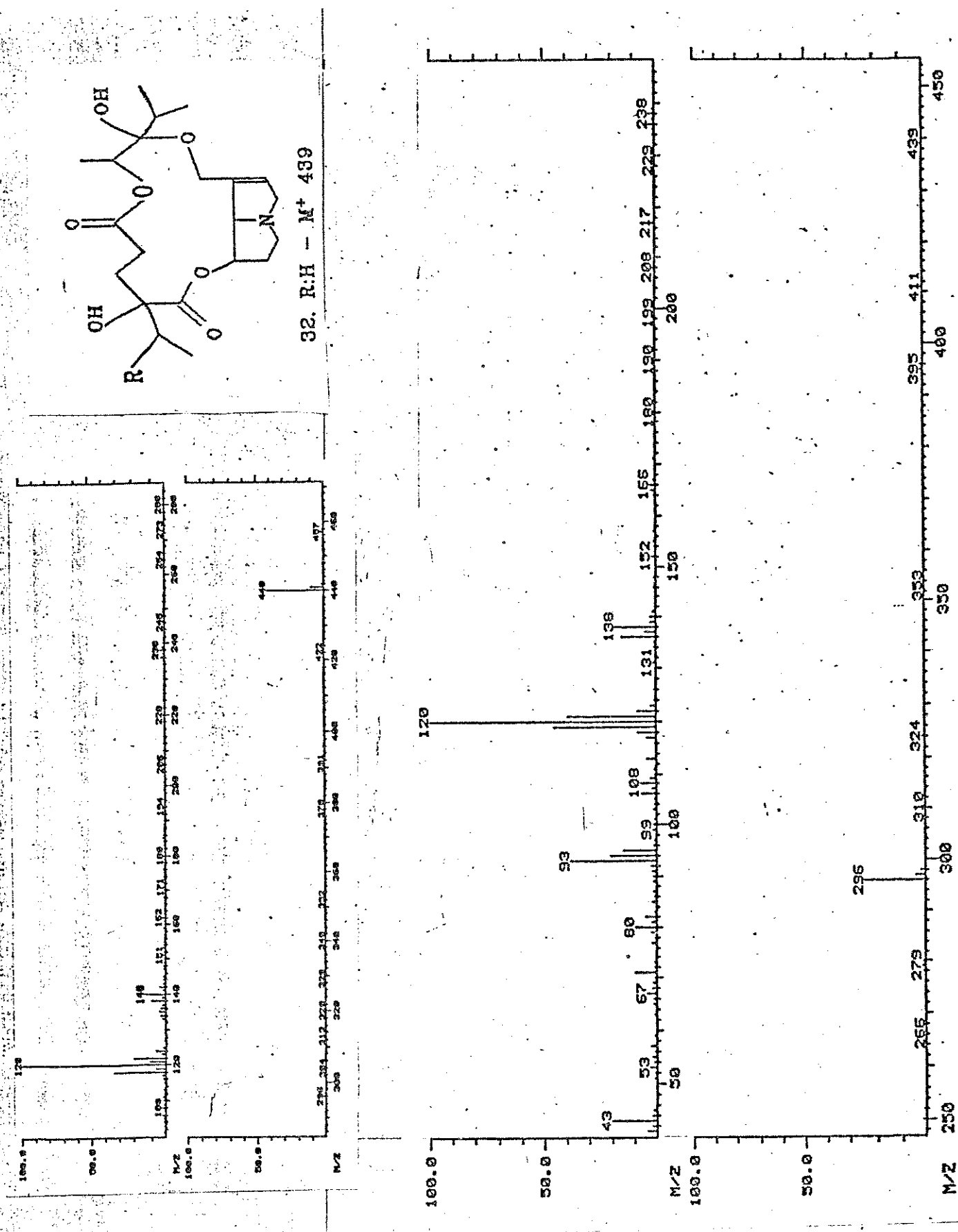
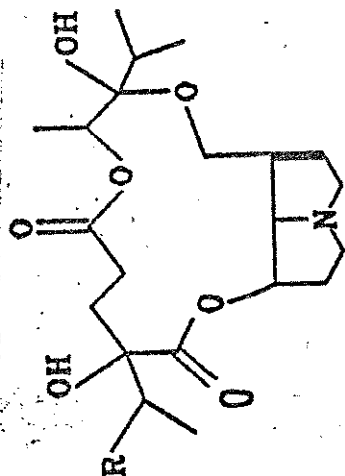


Figura 2.35. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 32.



33. R:CH₃ - M⁺ 453

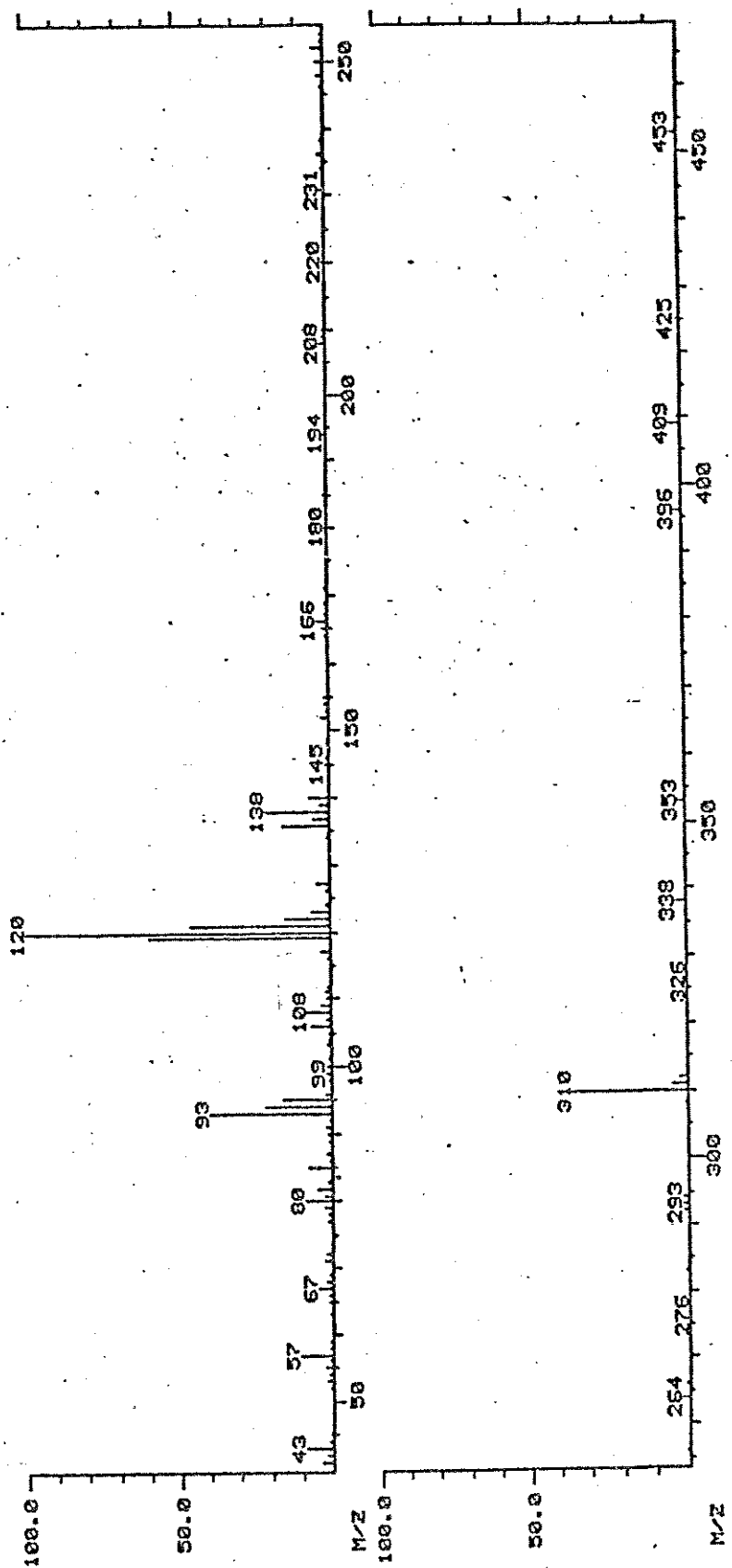
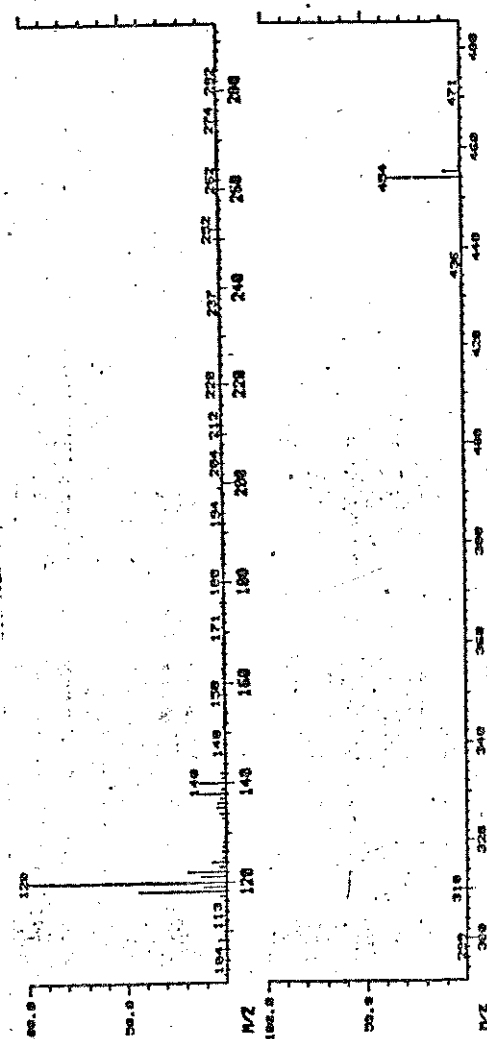
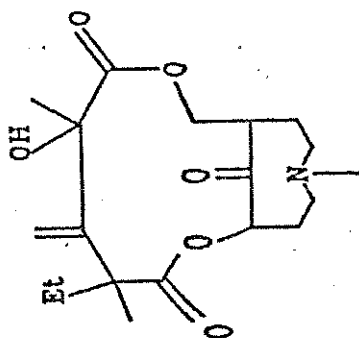


Figura 2.36. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 33.



31. M⁺ 385

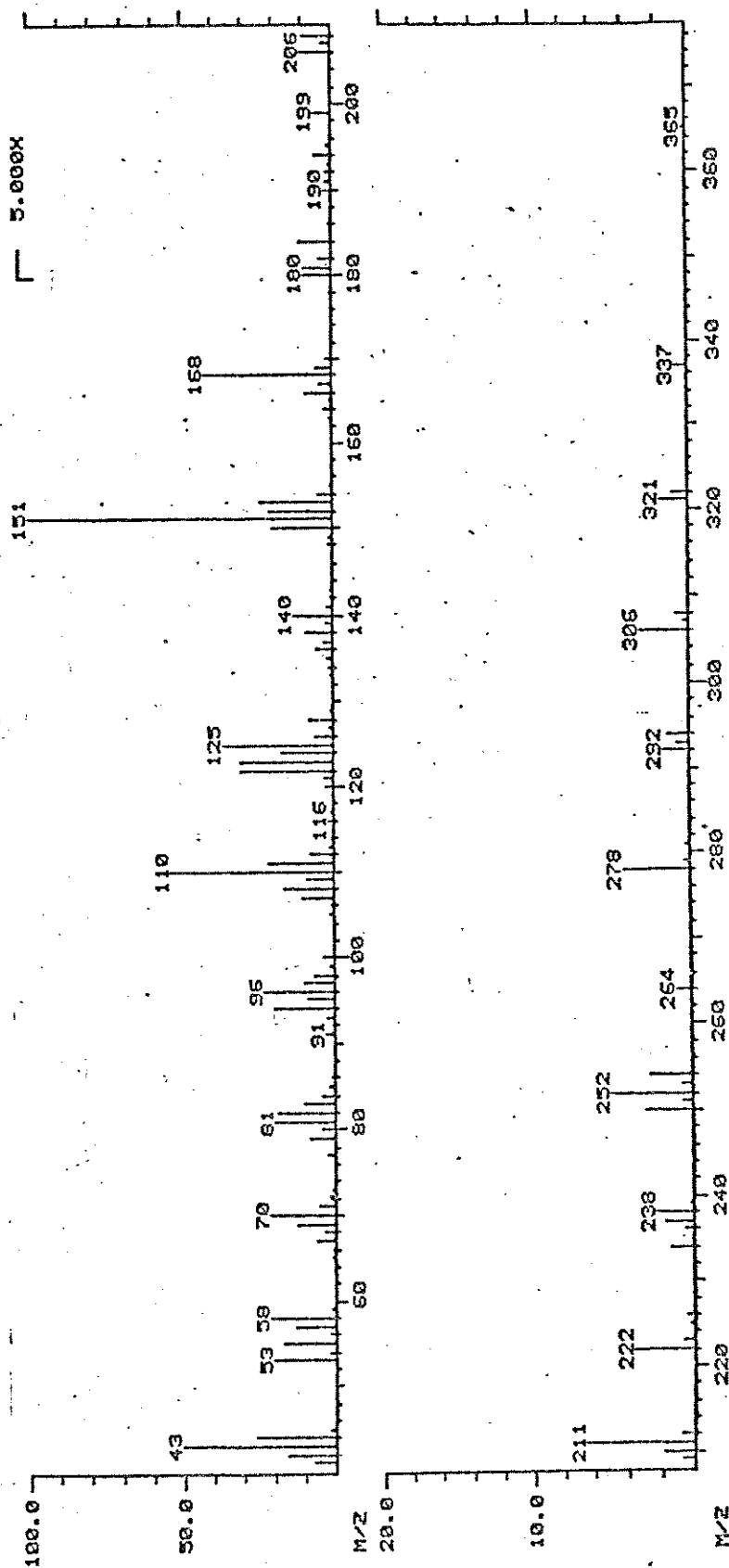
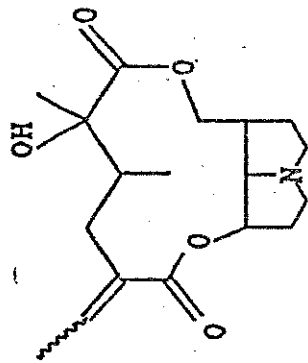


Figura 2.37. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 31.



30. M⁺ 337

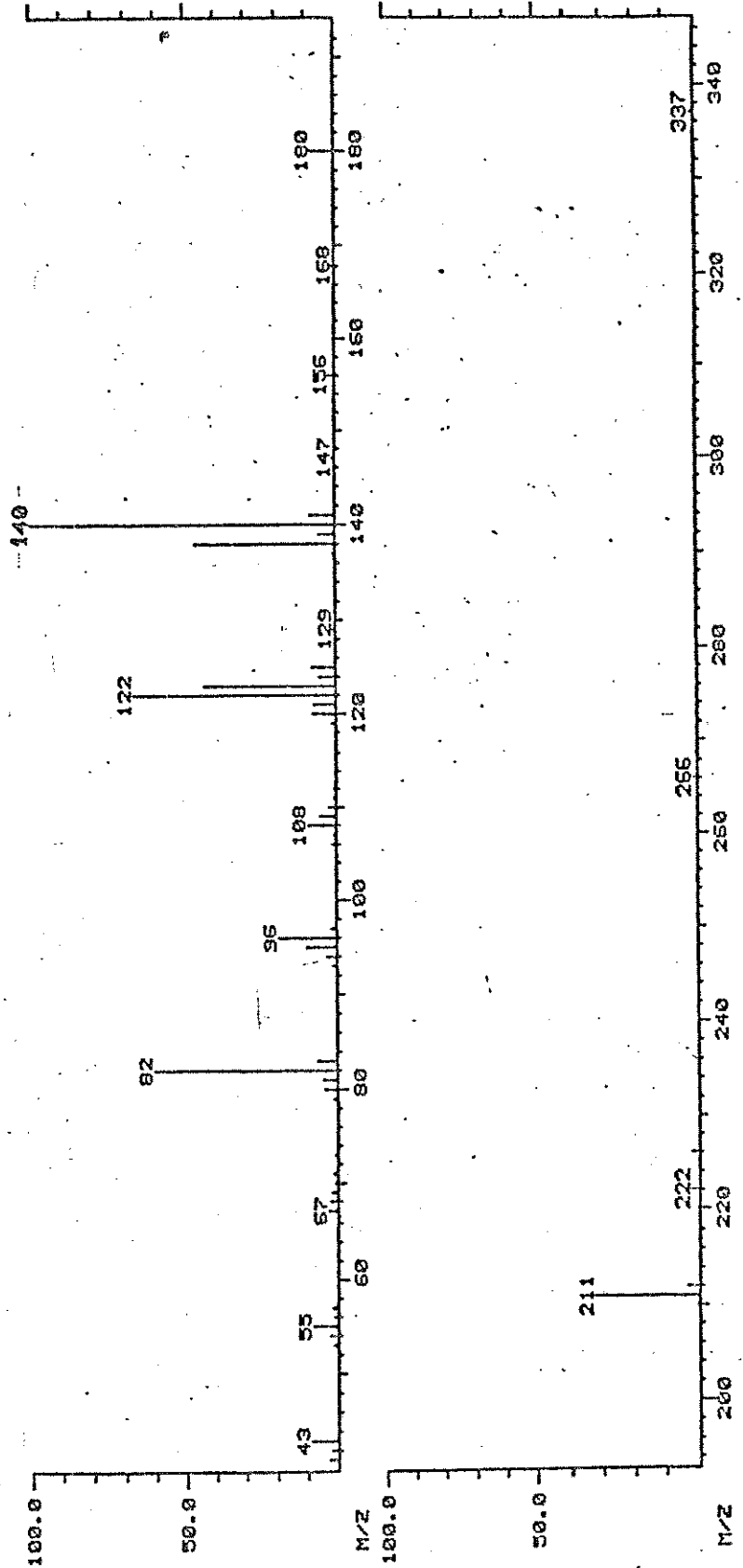


Figura 2.38. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 30.

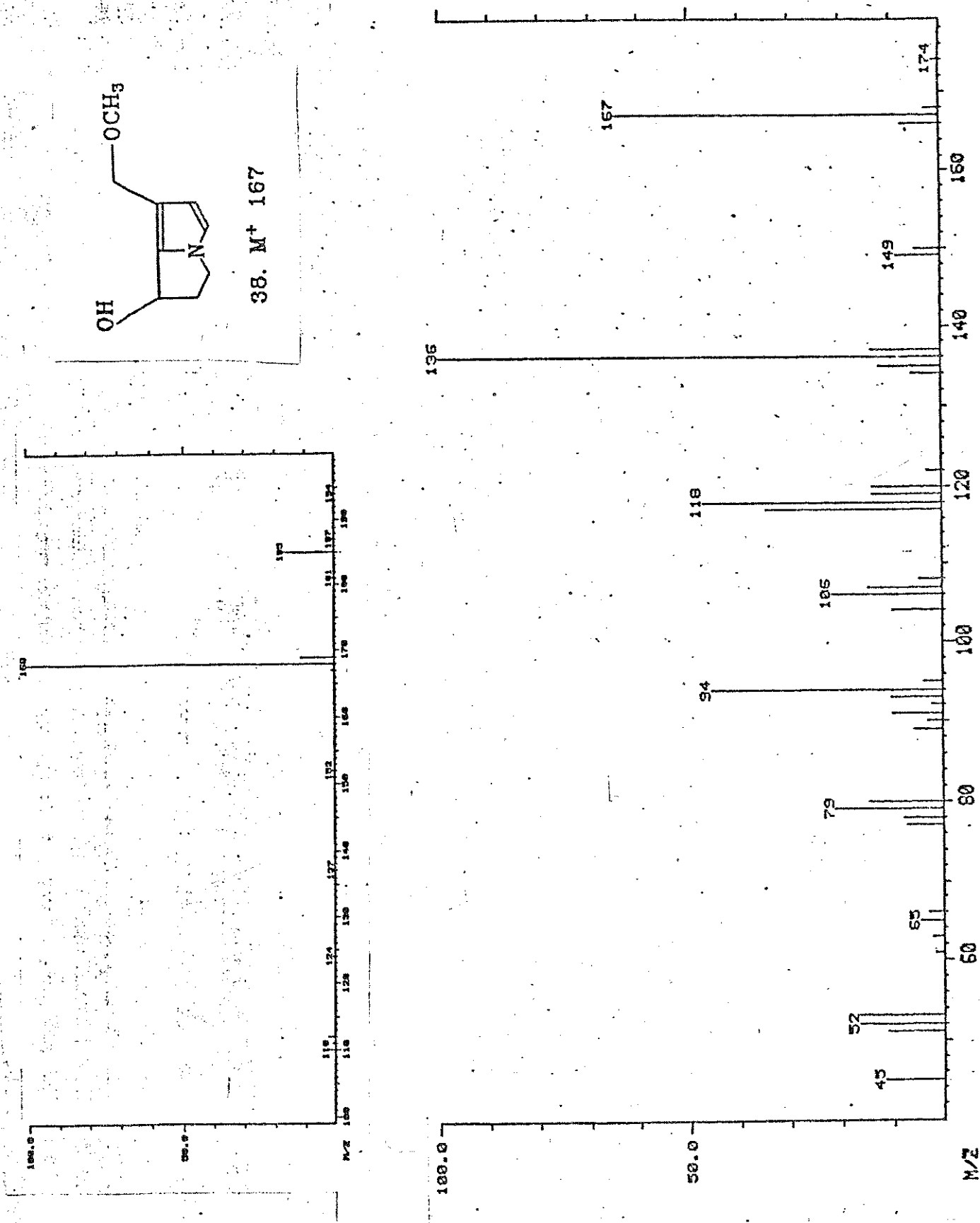


Figura 2.39. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 38.

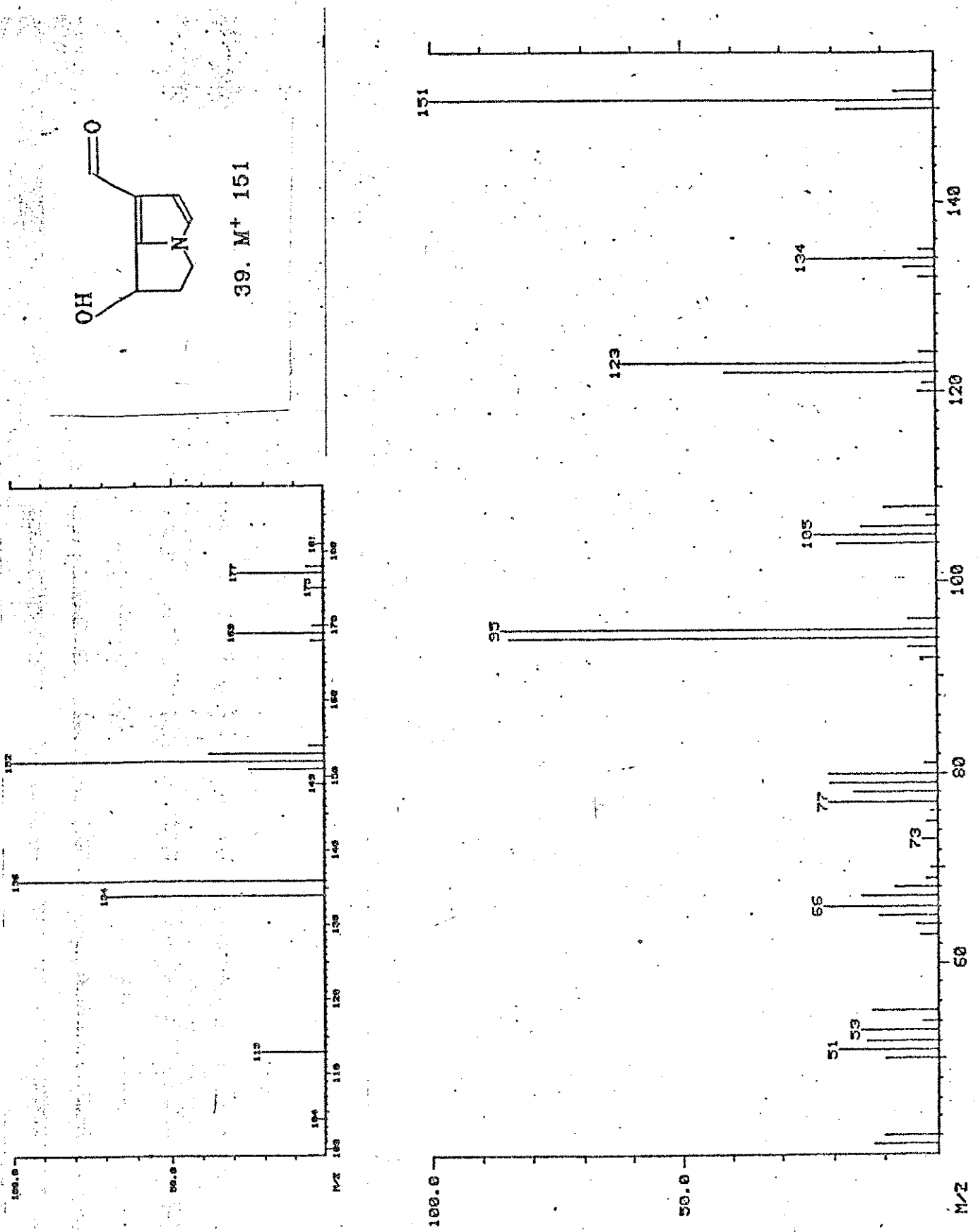


Figura 2.40. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 39.

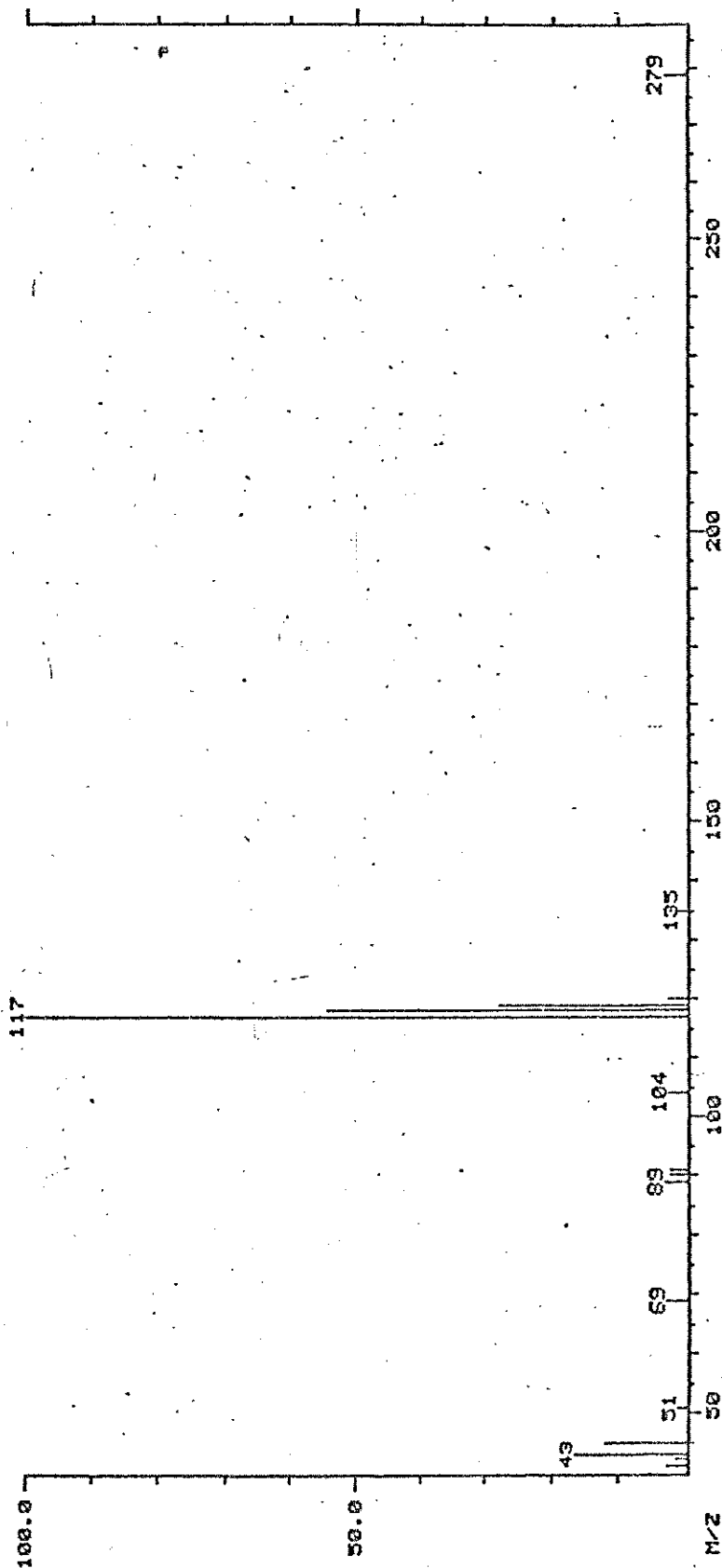
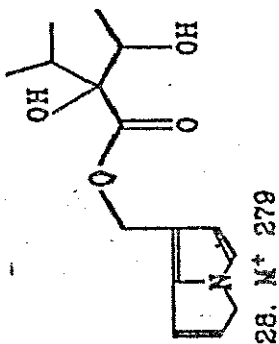


Figura 2.41. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 2B.

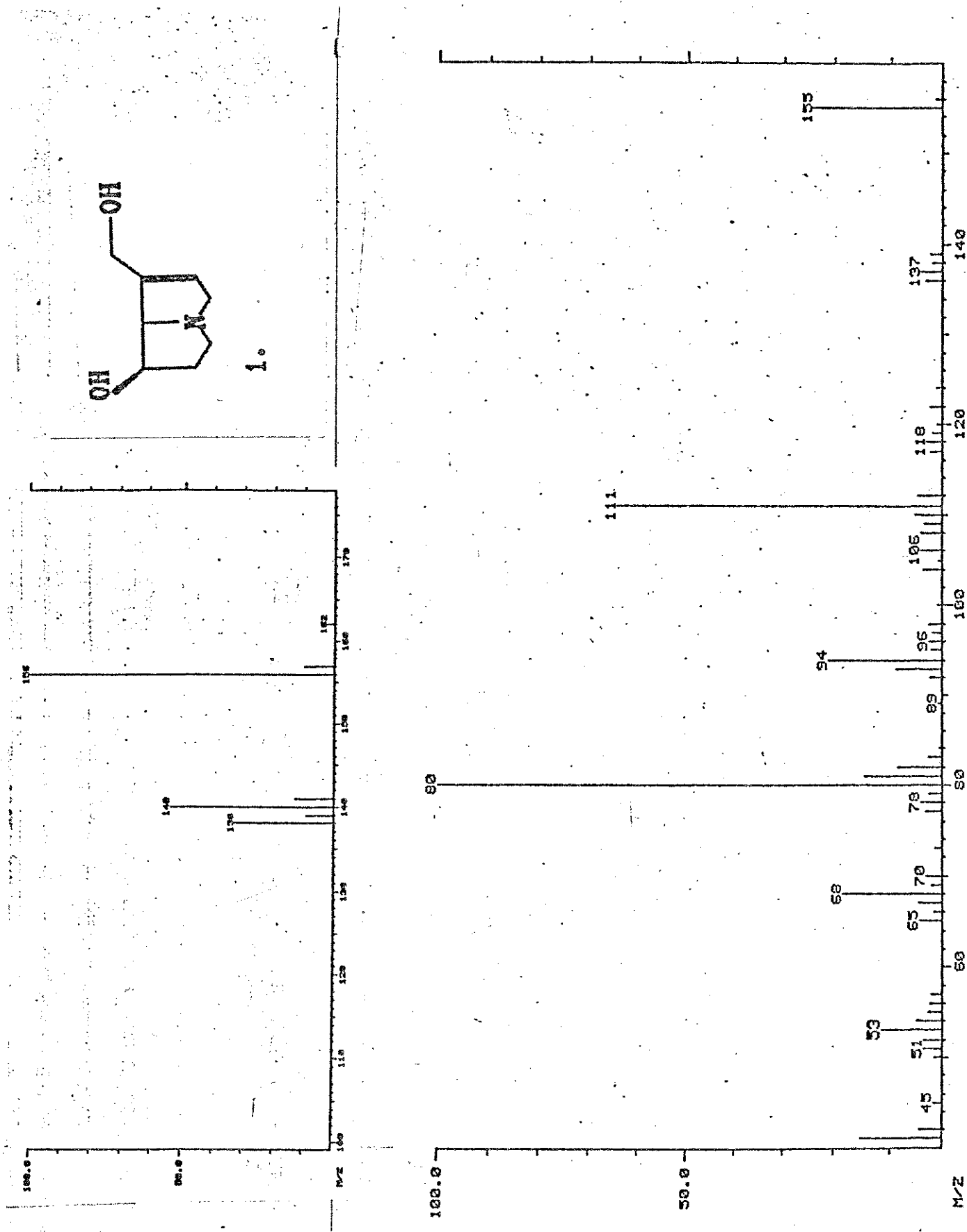
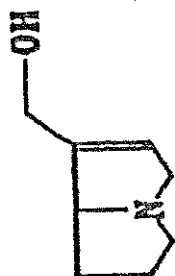


Figura 2.42. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 1.



2.

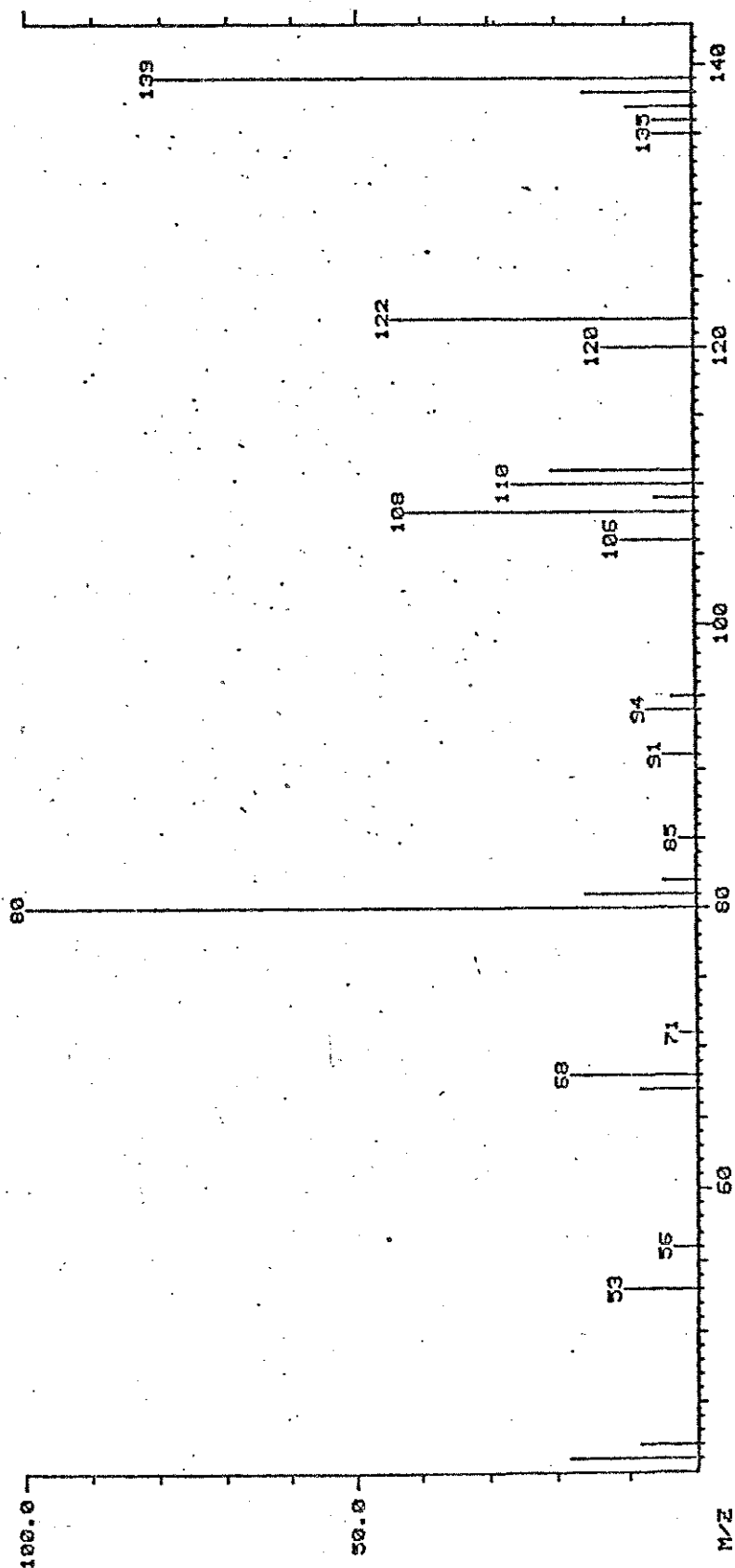


Figura 2.43. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 2.

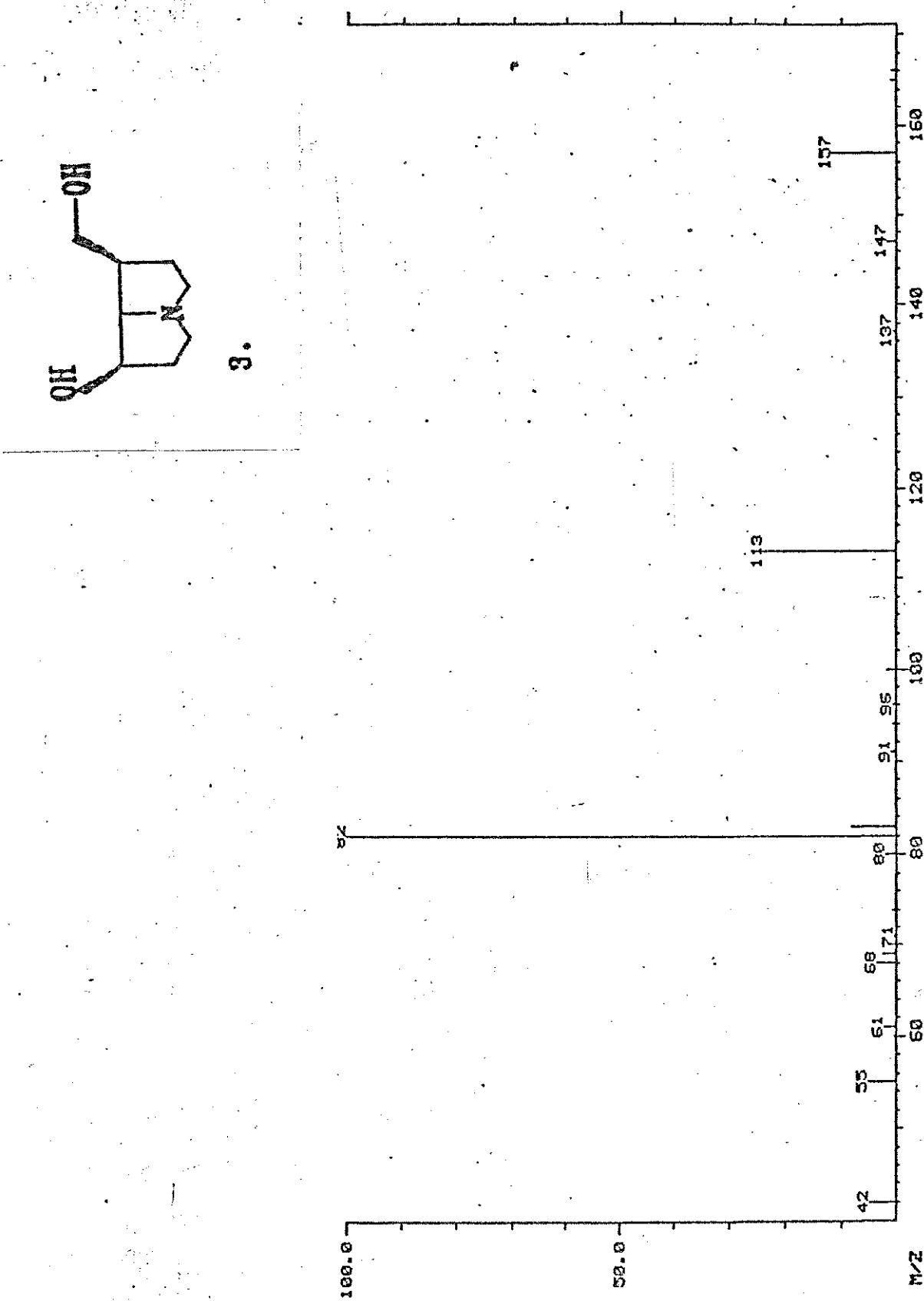


Figura 2.44. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 3.

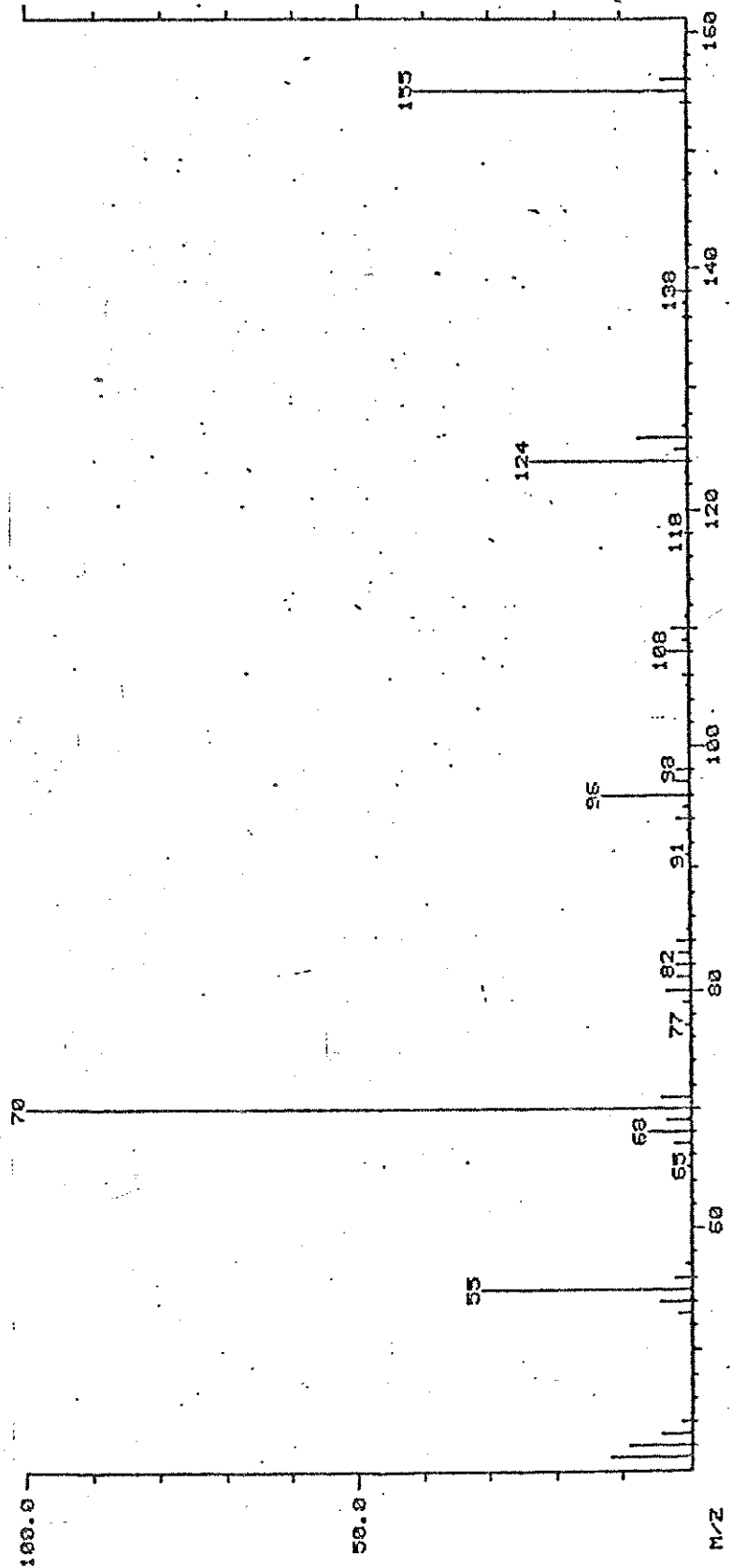
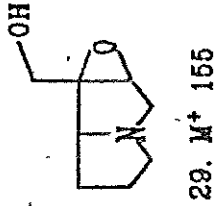


Figura 2.45. Espectrometria de massas de impacto de elétrons (IE) e de ionização química positiva (ICP) de 29.

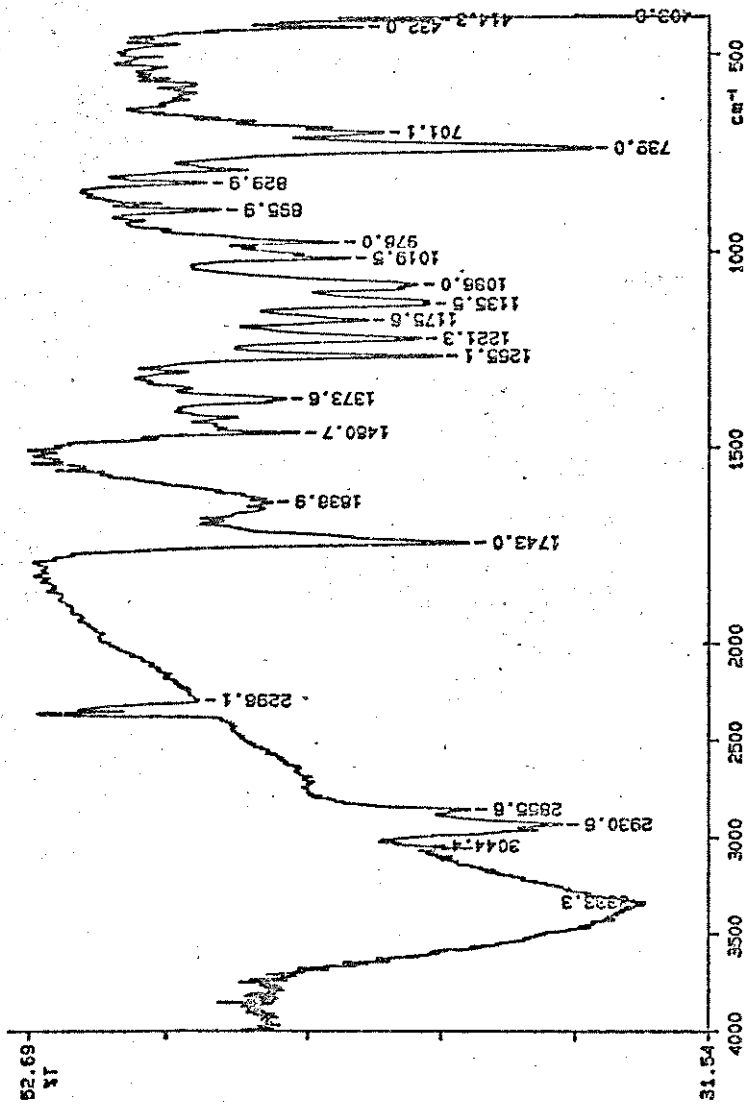


Figura 2.47. Infravermelho de 13a em filme.

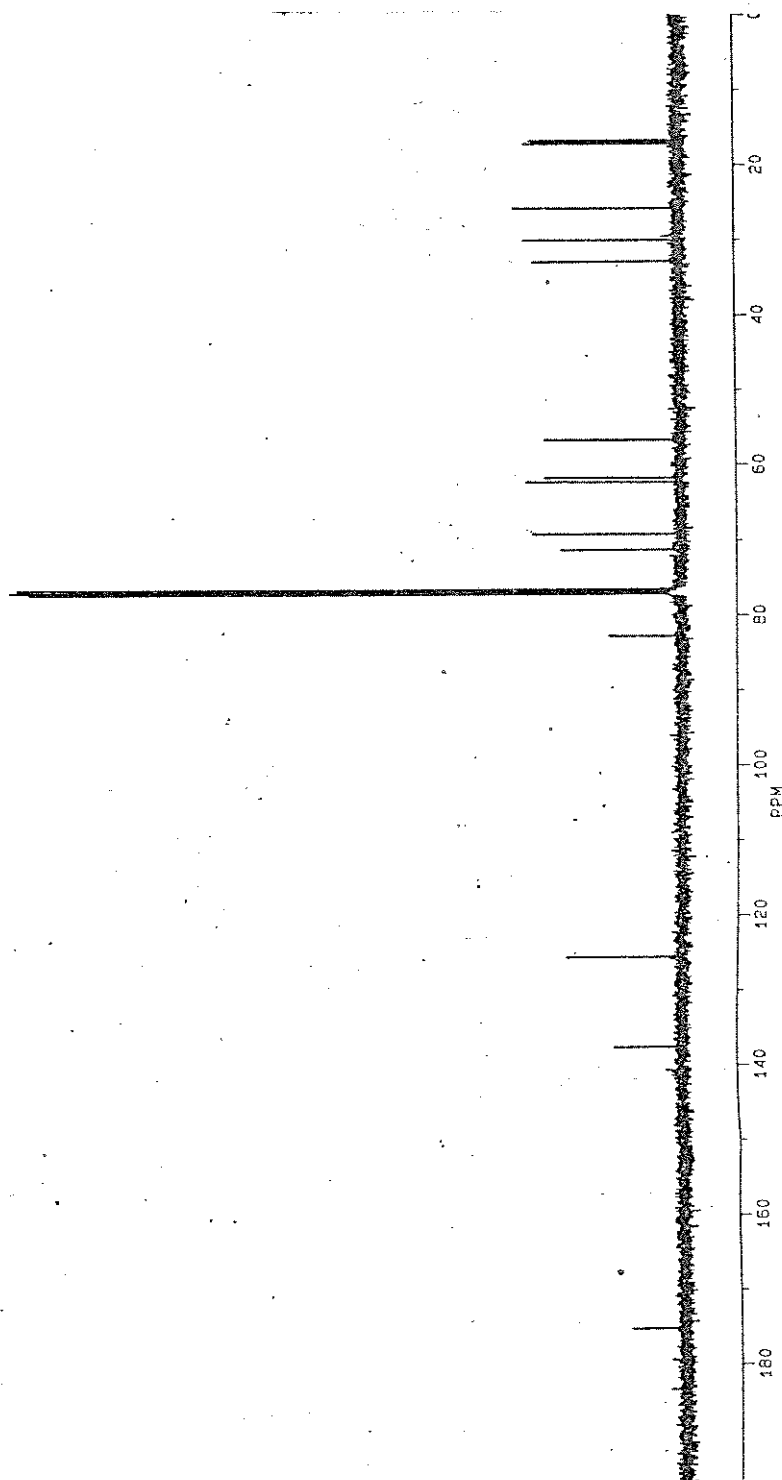


Figura 2.48. RMN^{13}C de 13a em CDCl_3 a 100,6 MHz.

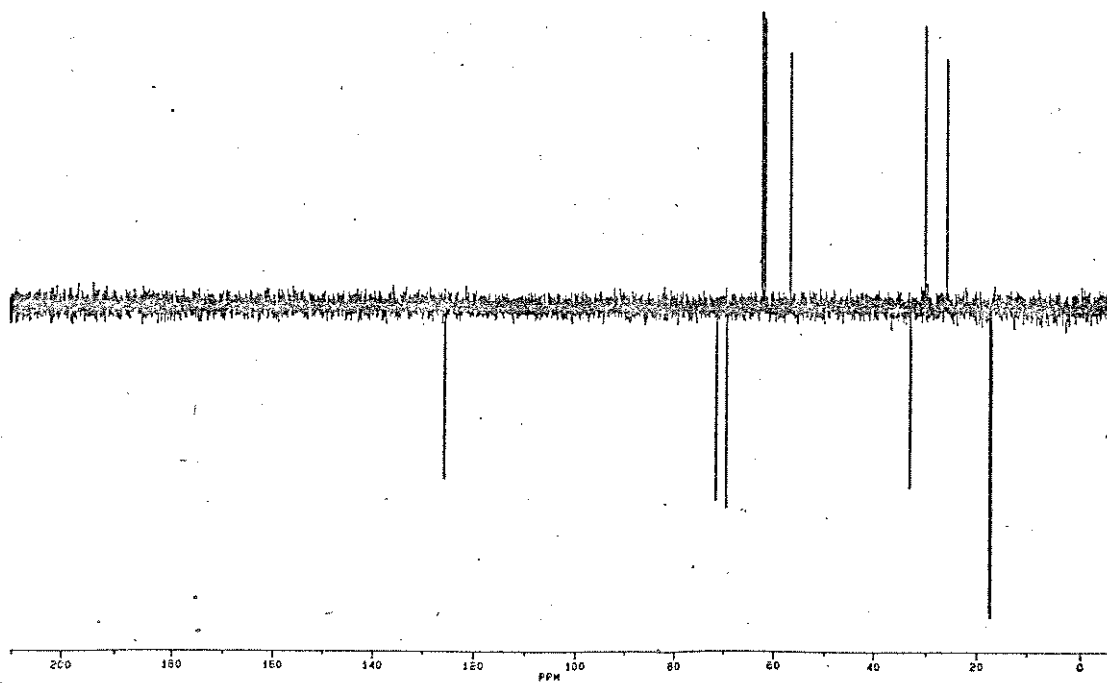


Figura 2.48a. RMN ^{13}C (DEPT) de 13a em CDCl_3 a 100,6 MHz.

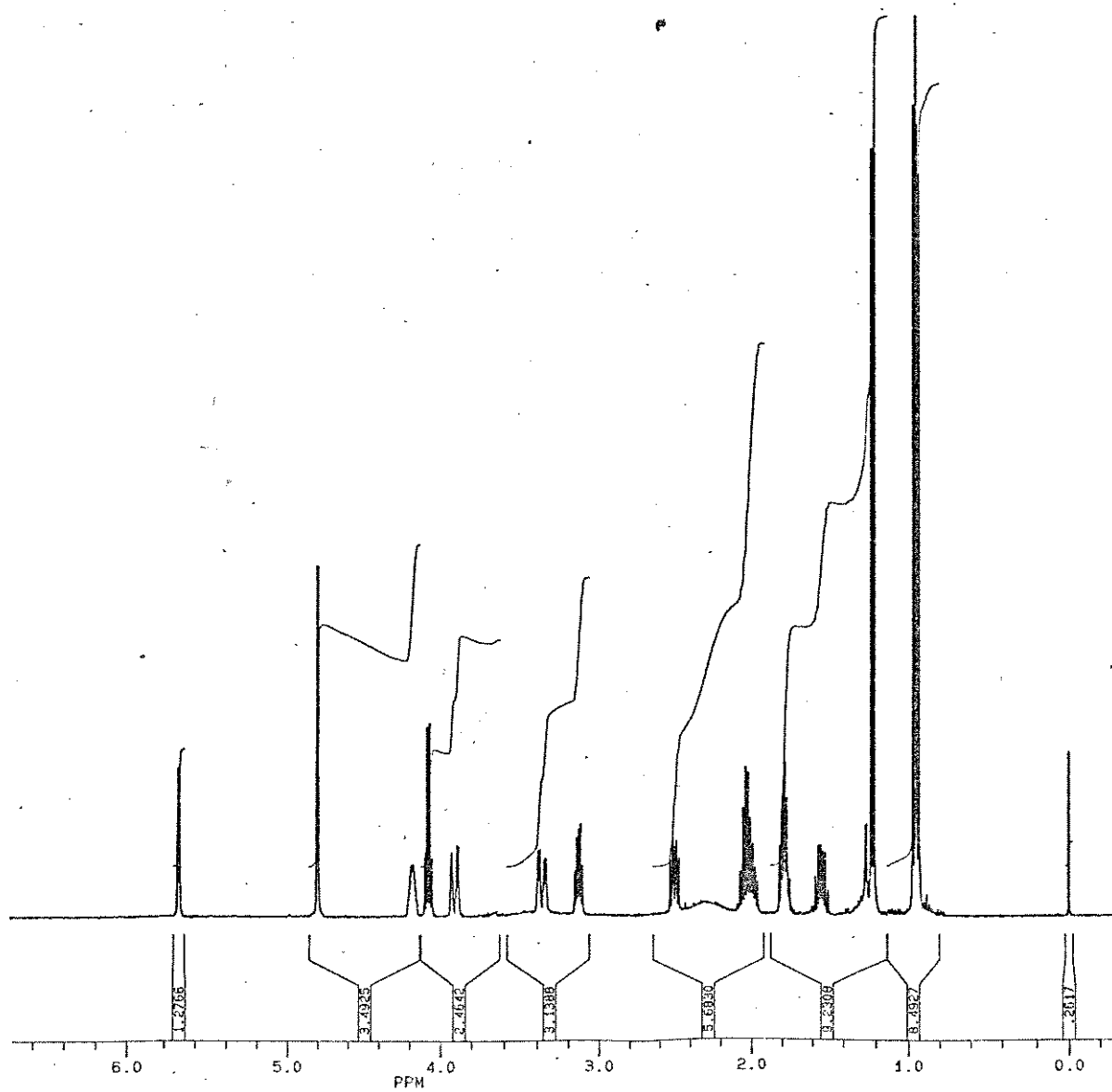


Figura 2.49. RMN^1H de 13a em CDCl_3 a 400 MHz.

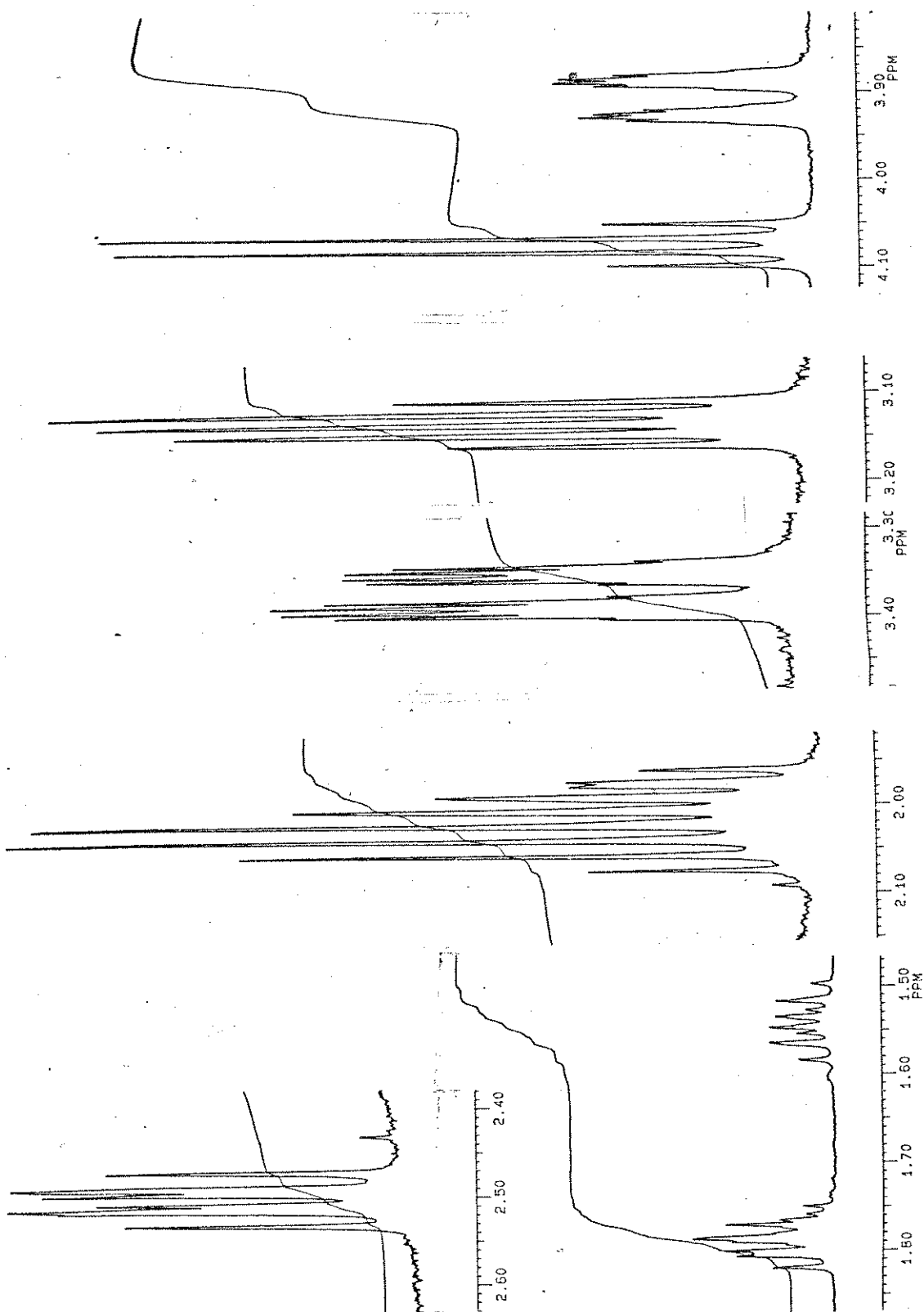


Figura 2.49a. RMN^1H (ampliação) de 13a em CDCl_3 a 400 MHz.

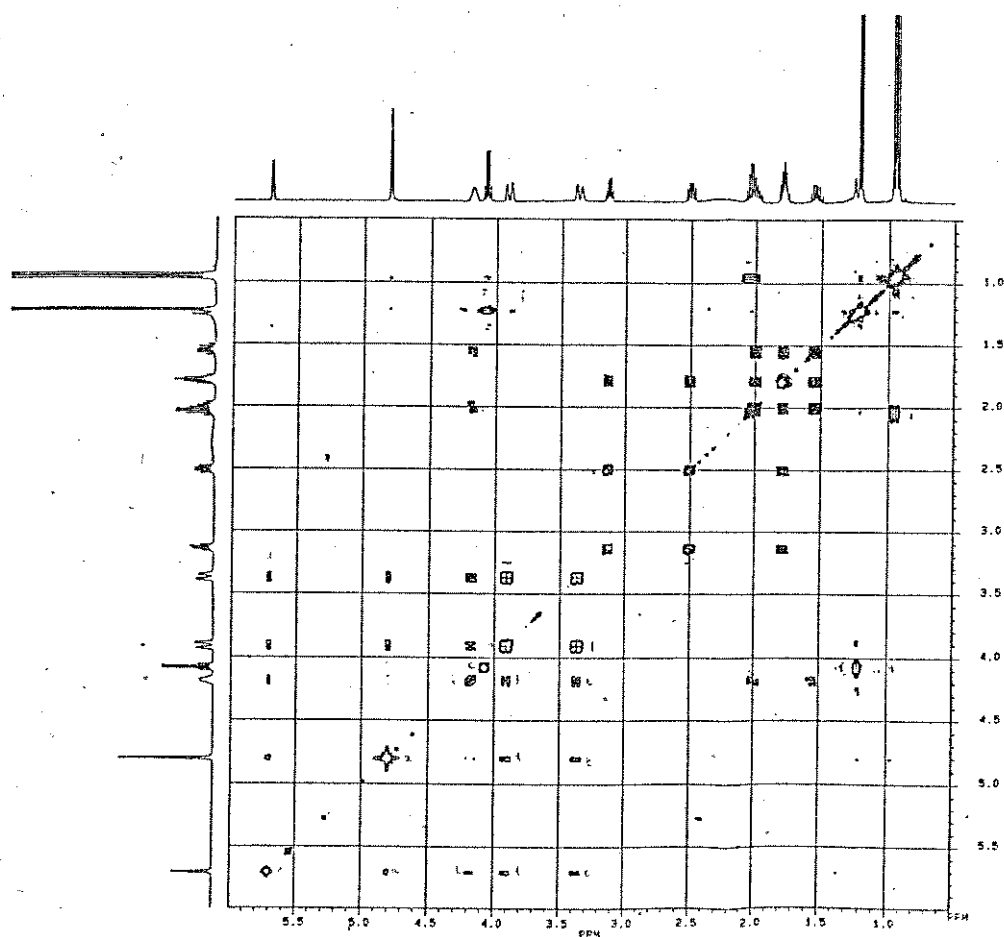


Figura 2.50. COSY (¹H-¹H) de 13a em CDCl₃ a 400 MHz.

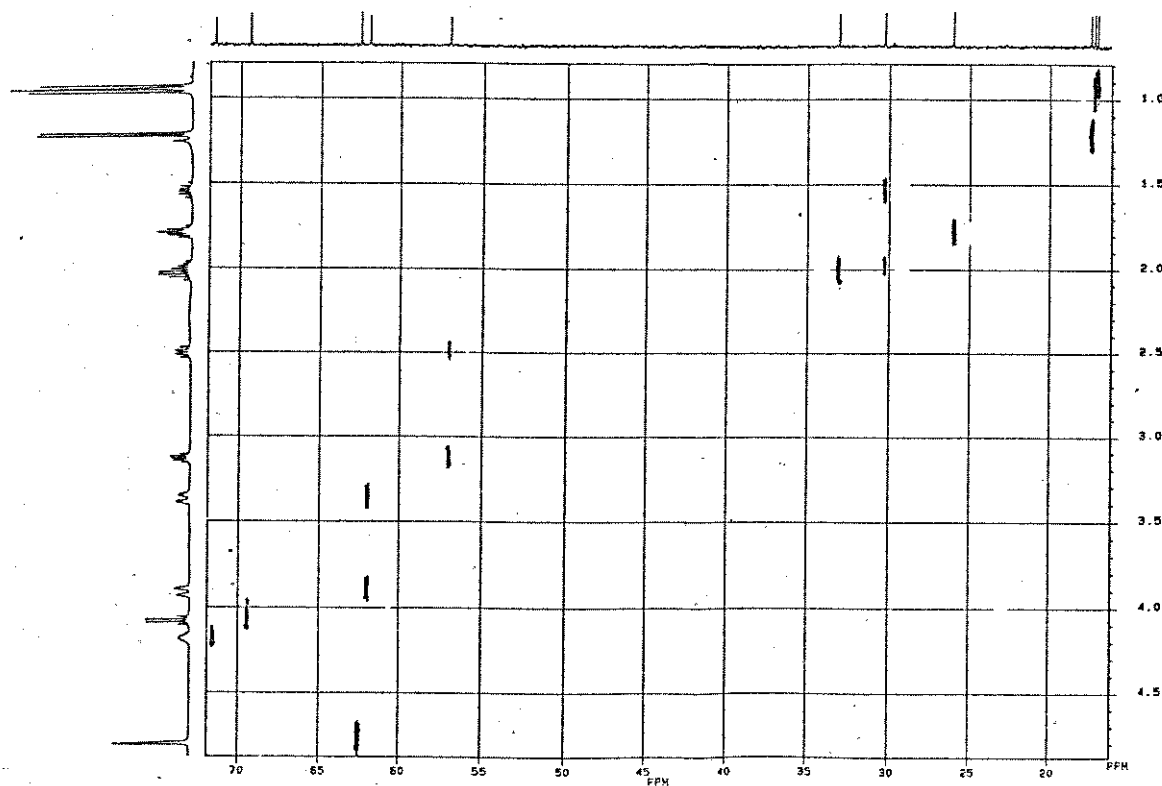


Figura 2.51. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 13a em CDCl_3 a 100,6 MHz.

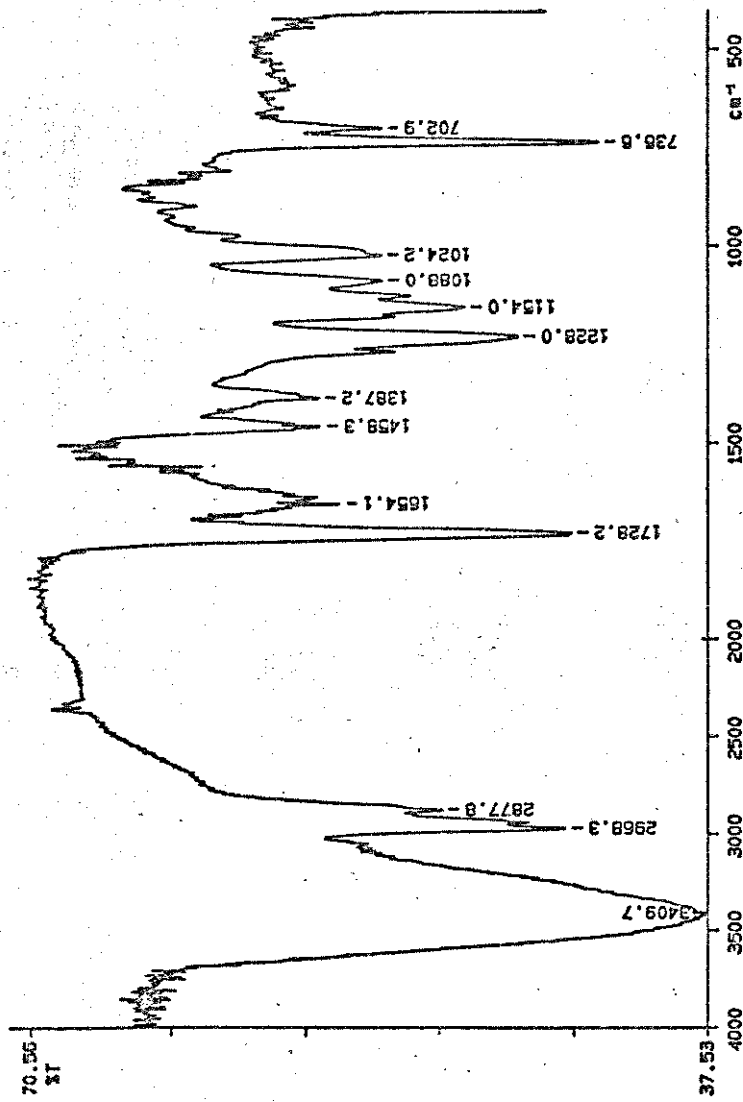


Figura 2.52. Infravermelho de 13b em filme.

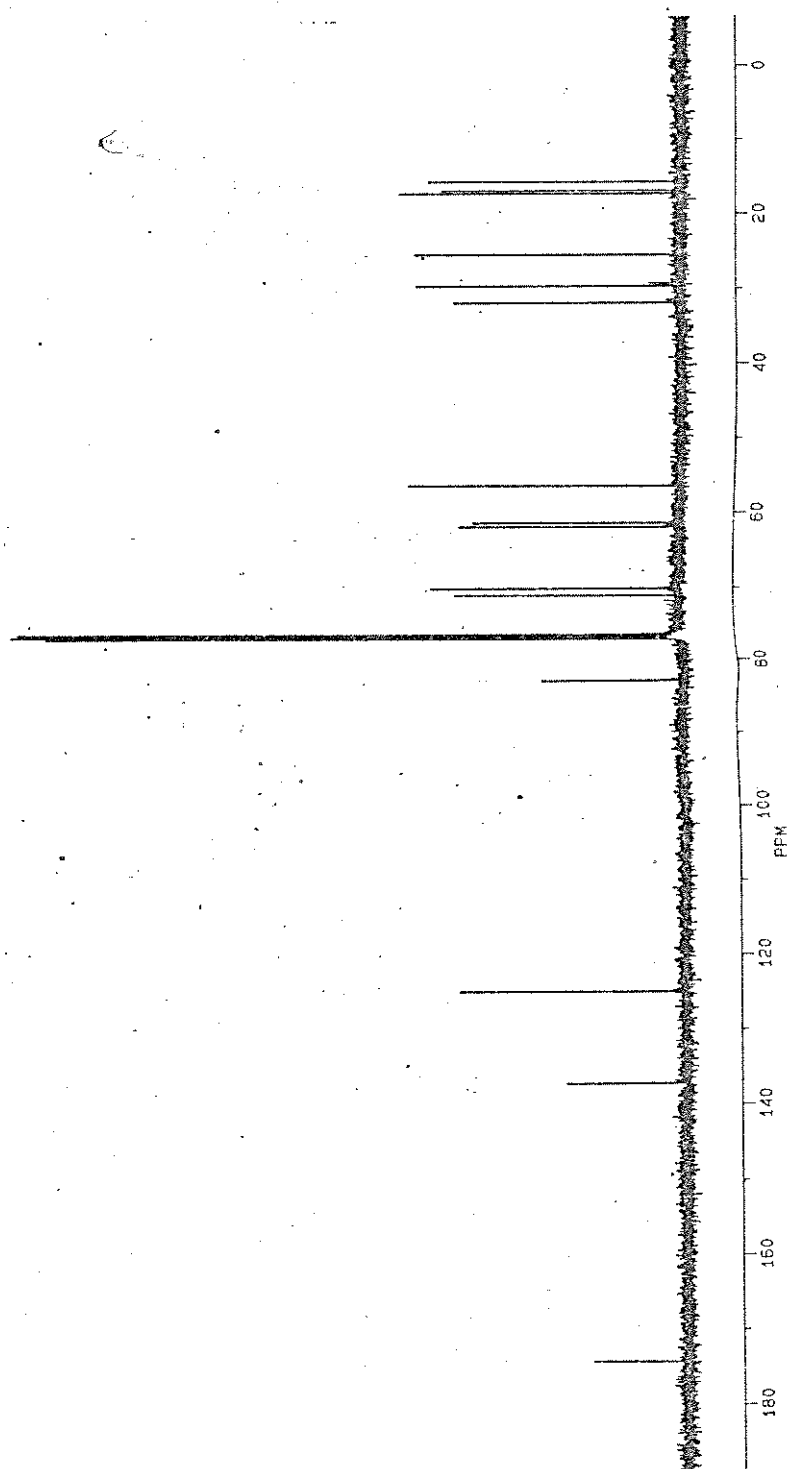


Figura 2.53. RMN ^{13}C de 13b em CDCl_3 a 100,6 MHz.

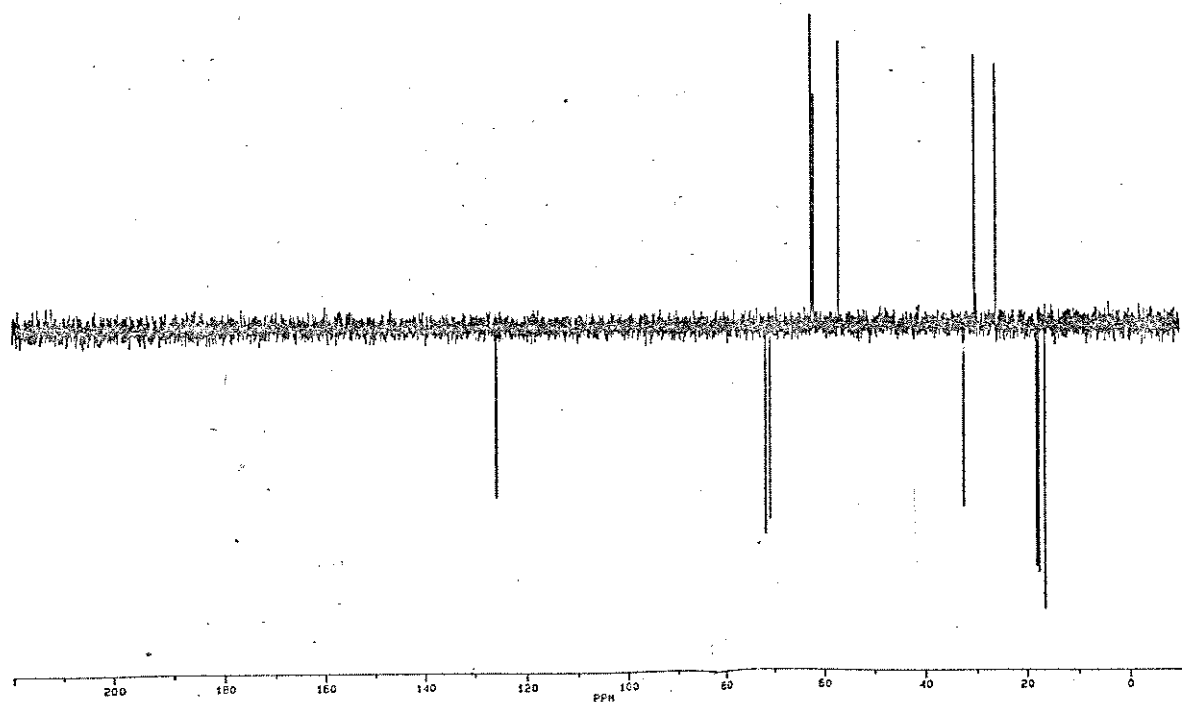


Figura 2.53a. RMN ^{13}C (DEPT) de 13b em CDCl_3 a 100,6 MHz.

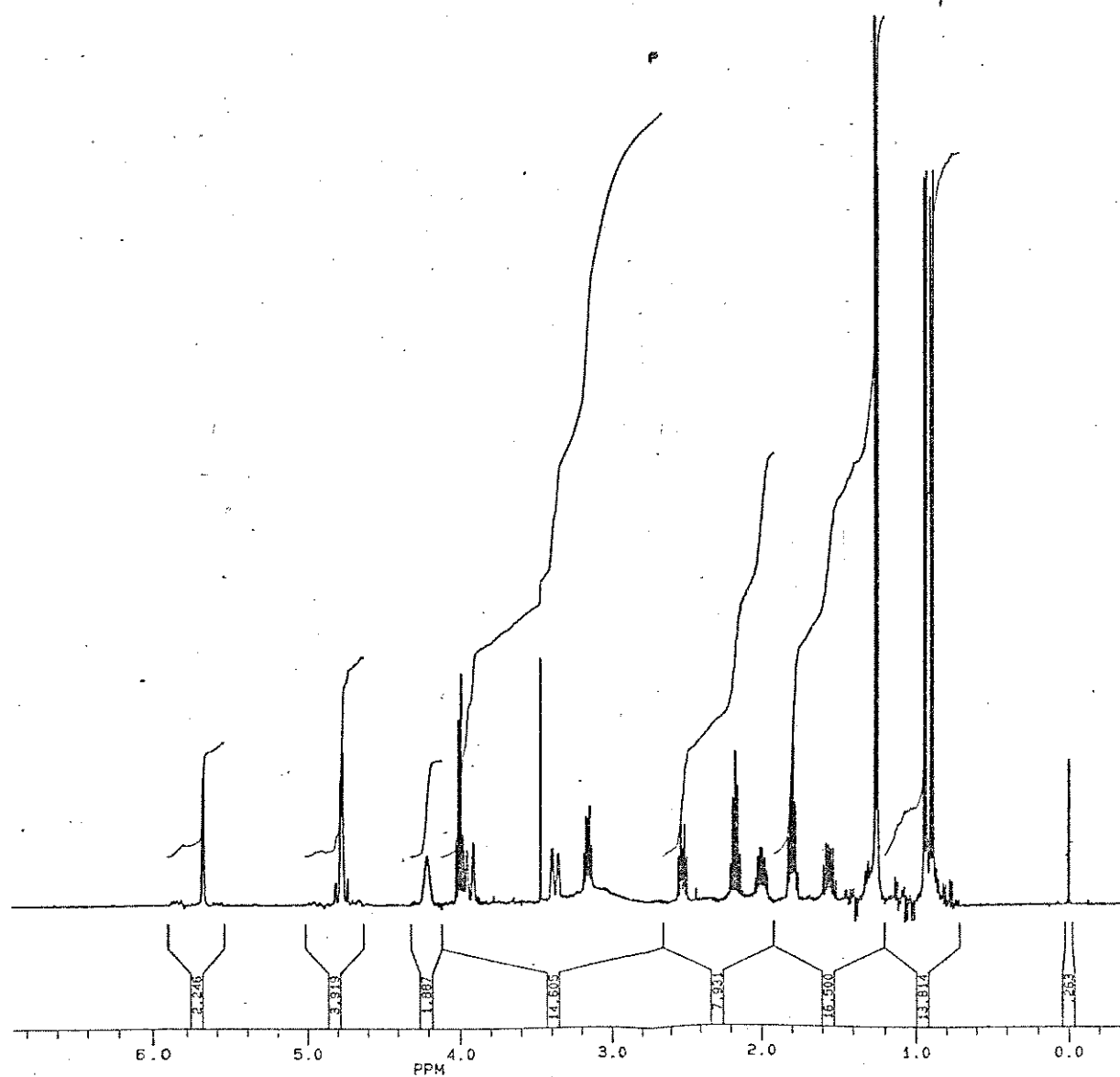


Figura 2.54. RMN ^1H de 13b em CDCl_3 a 400 MHz.

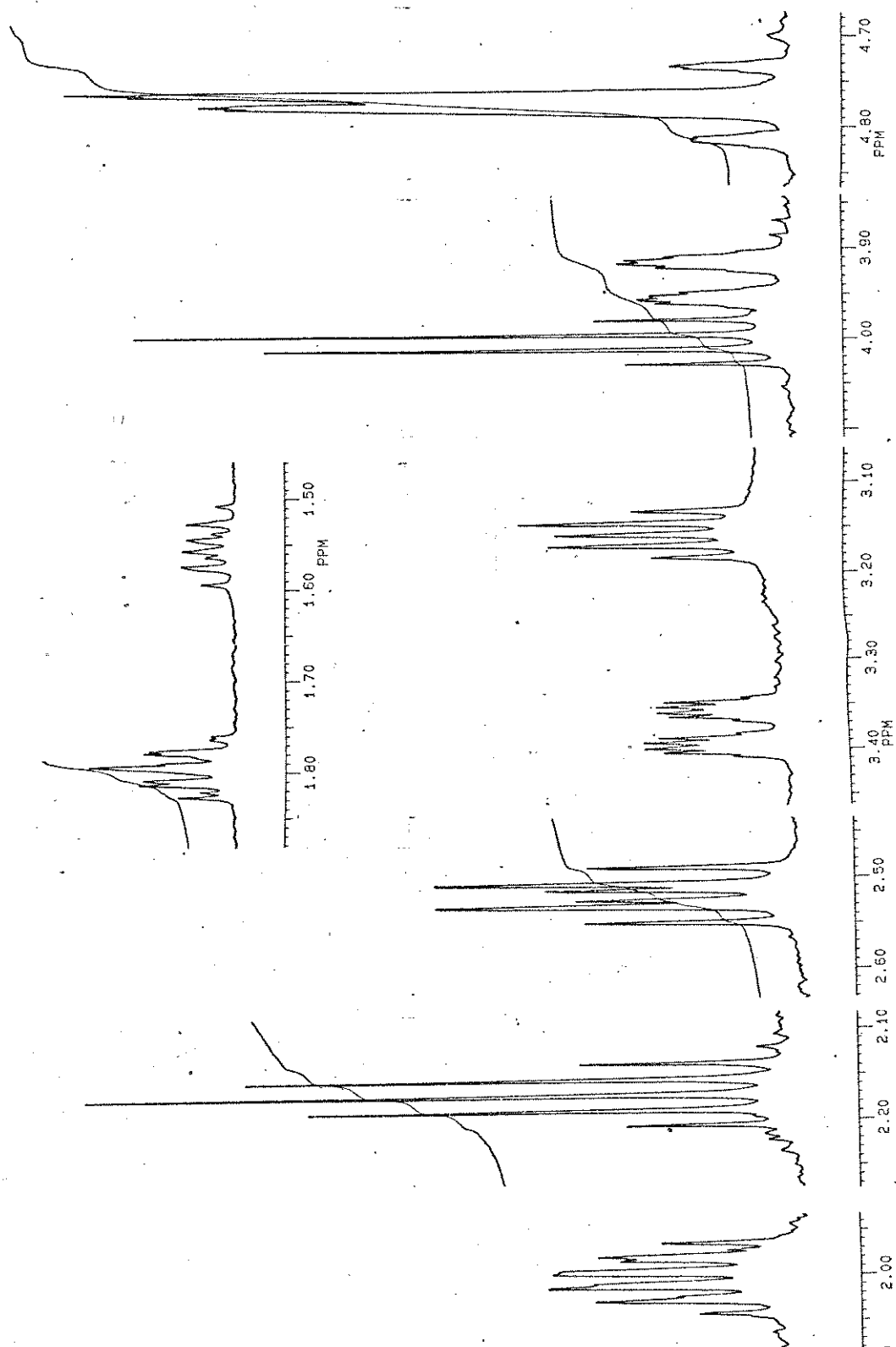


Figura 2.54a. RMN^1H (ampliação) de 13b em CDCl_3 a 400 MHz.

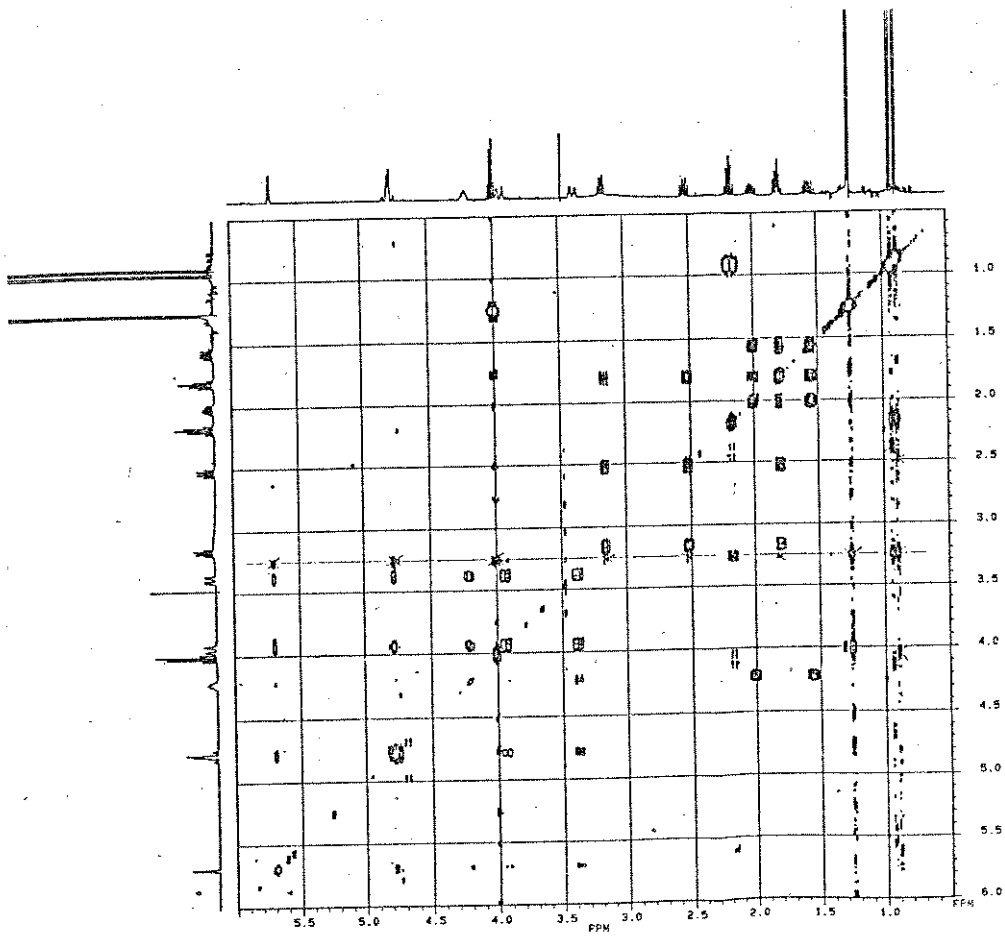


Figura 2.55. COSY (^1H - ^1H) de 13b em CDCl_3 a 400 MHz.

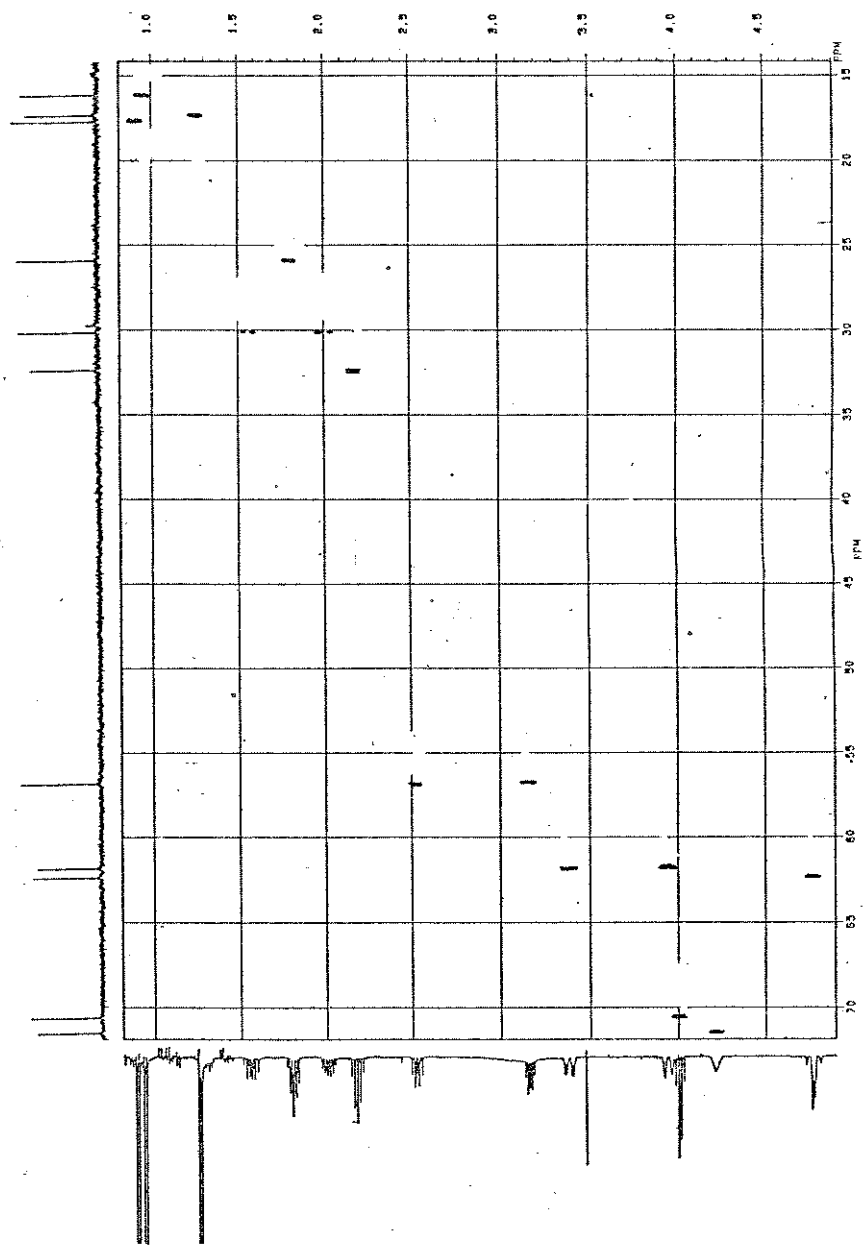


Figura 2.56. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 13b em CDCl_3 a 100,6 MHz.

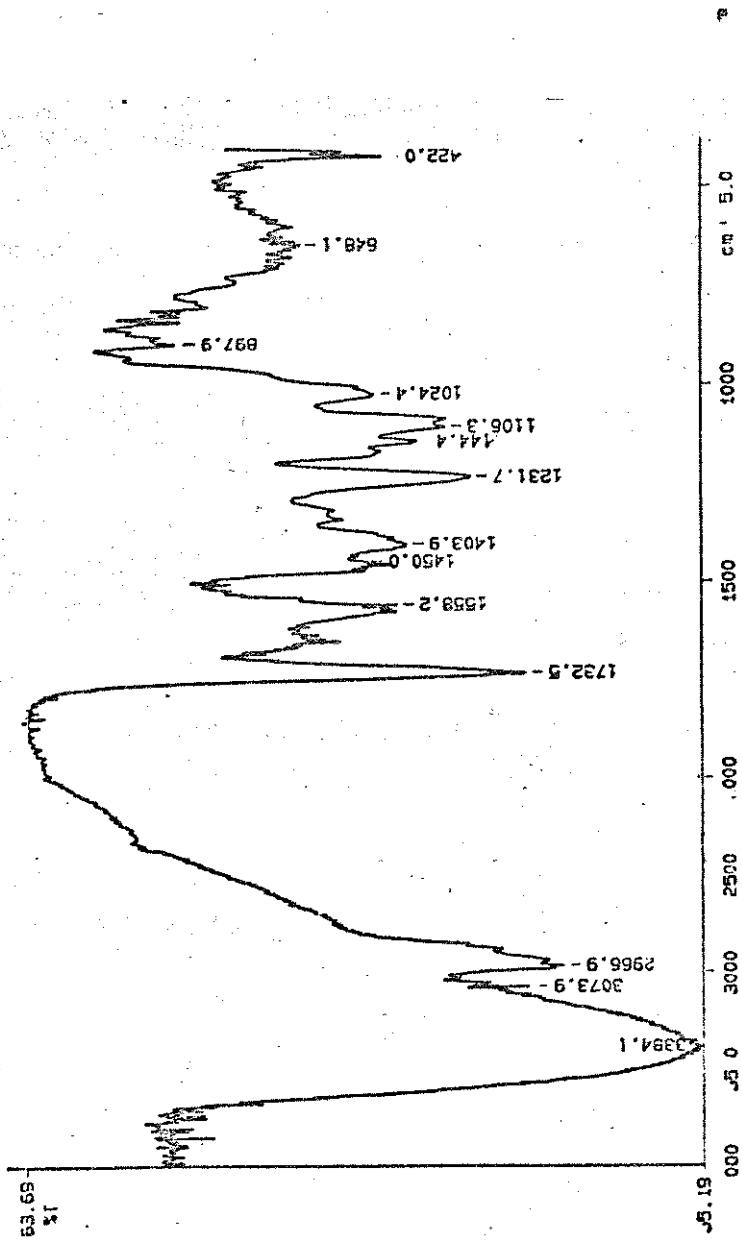


Figura 2.57. Infravermelho de 6d em filme.

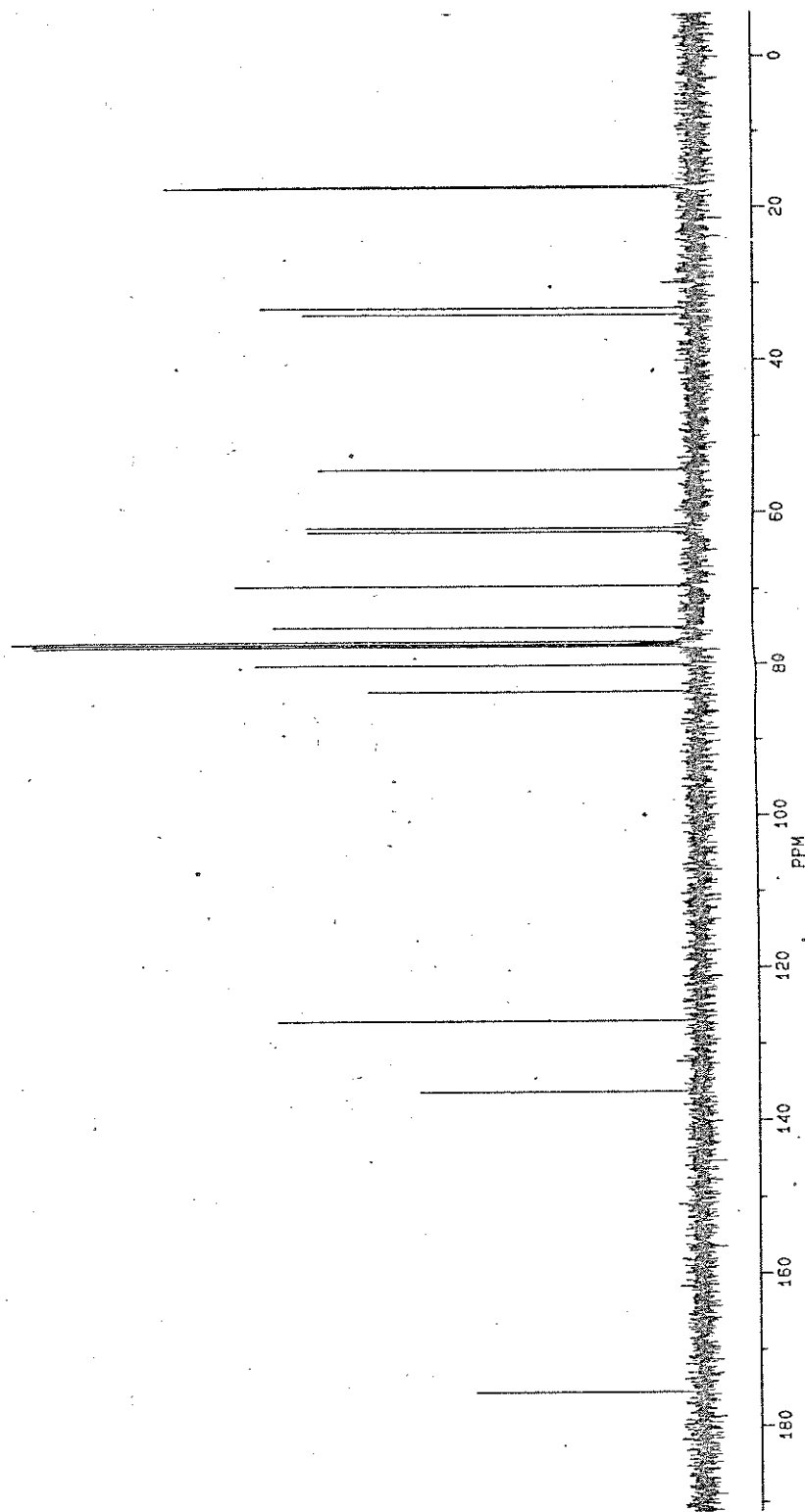


Figura 2.58. RMN¹³C de 6d em CDCl₃ a 100,6 MHz.

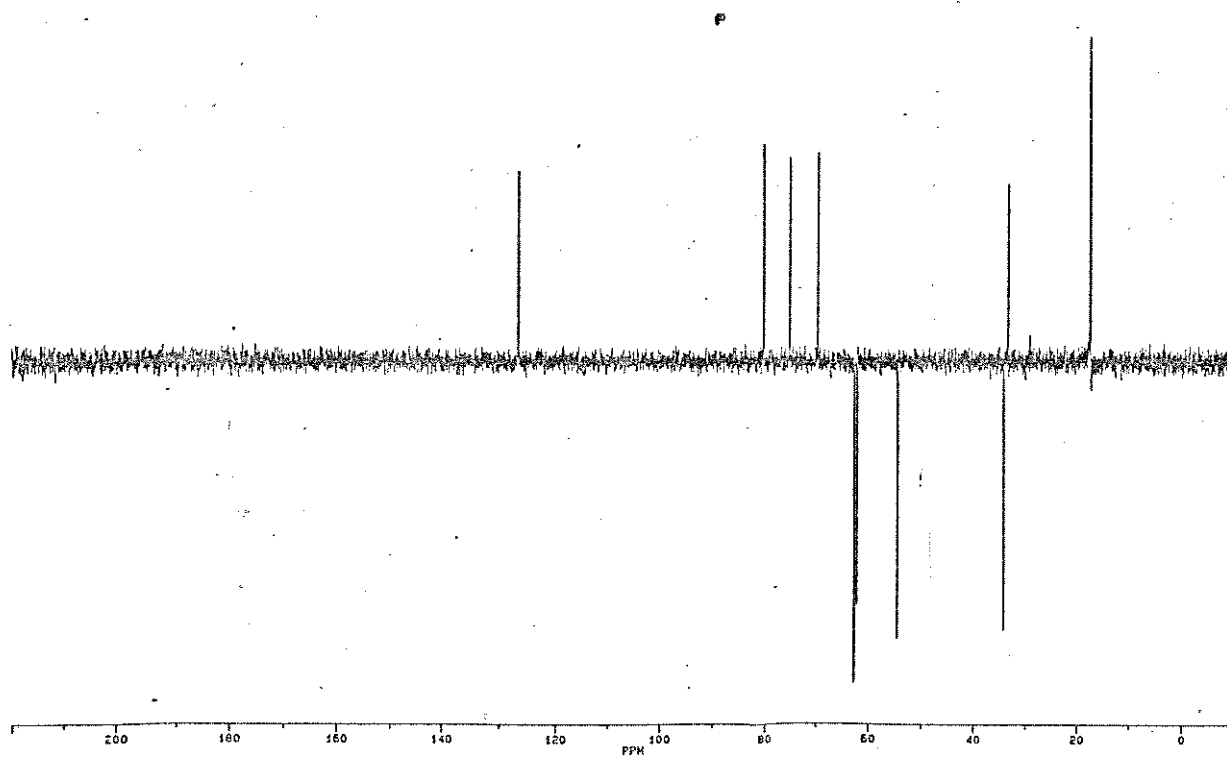


Figura 2.58a. RMN ^{13}C (DEPT) de 6d em CDCl_3 a 100,6 MHz.

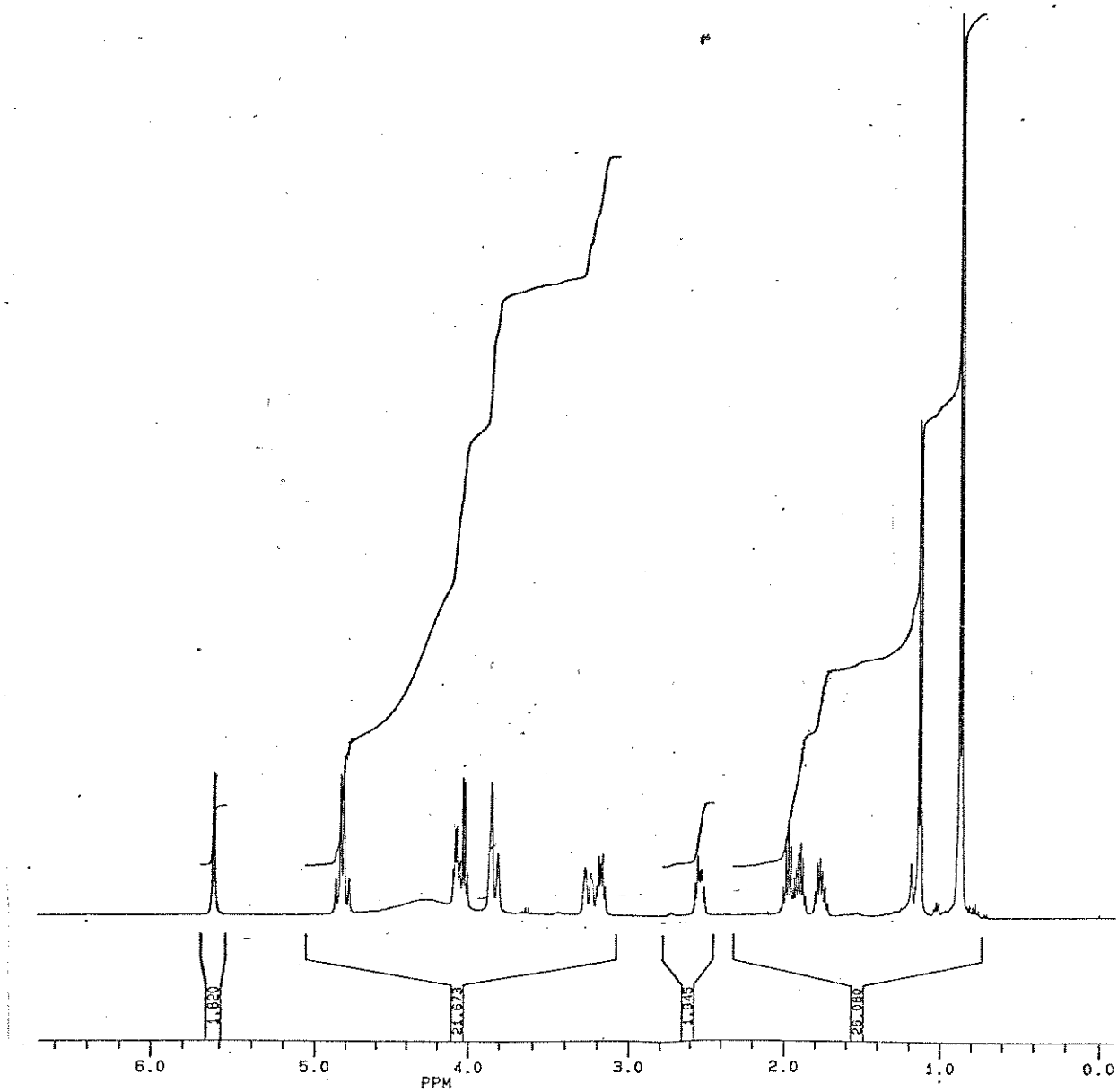


Figura 2.59. RMN^1H de 6d em CDCl_3 a 400 MHz.

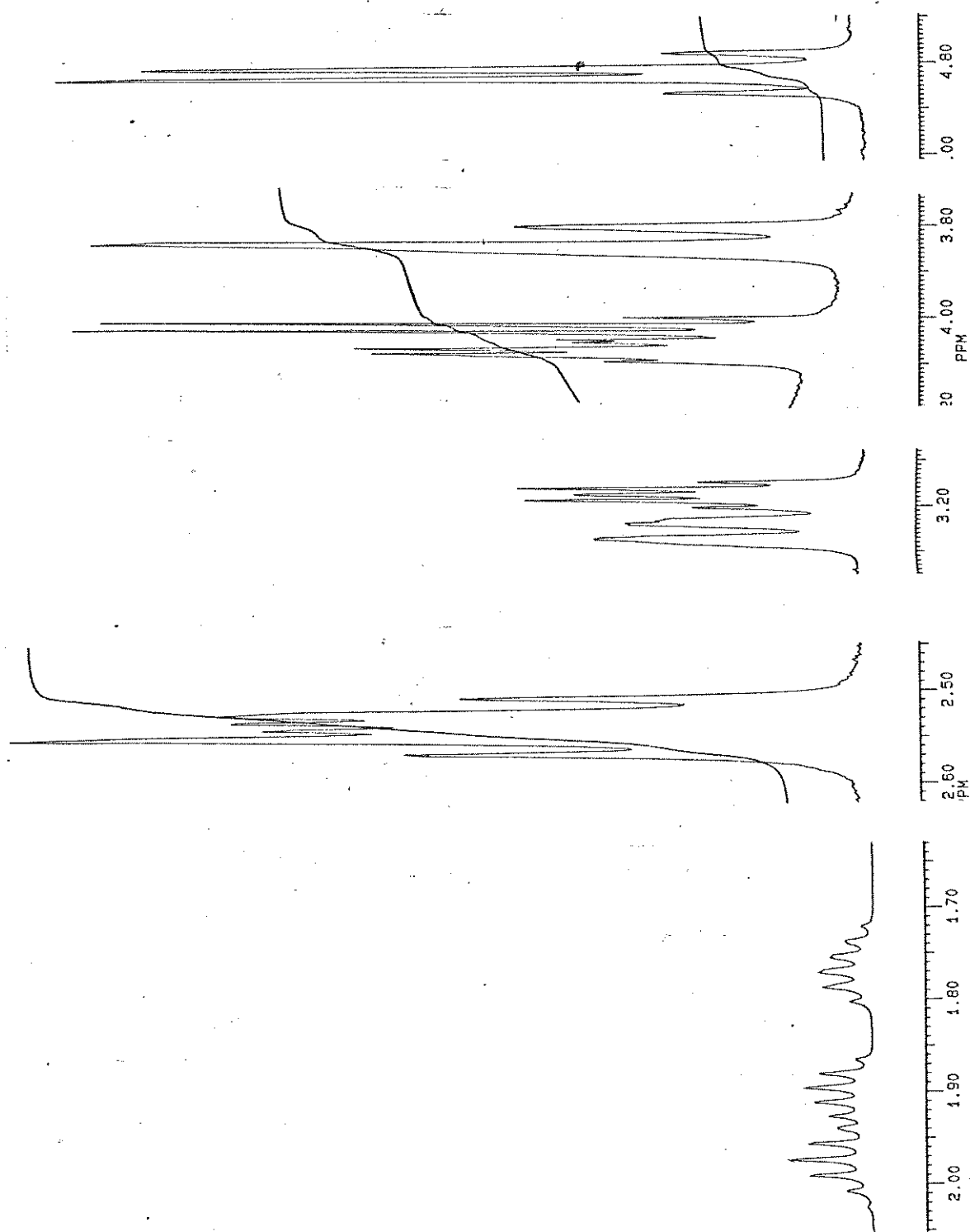


Figura 2.59a. RMN^1H (ampliação) de 6d em CDCl_3 a 400 MHz.

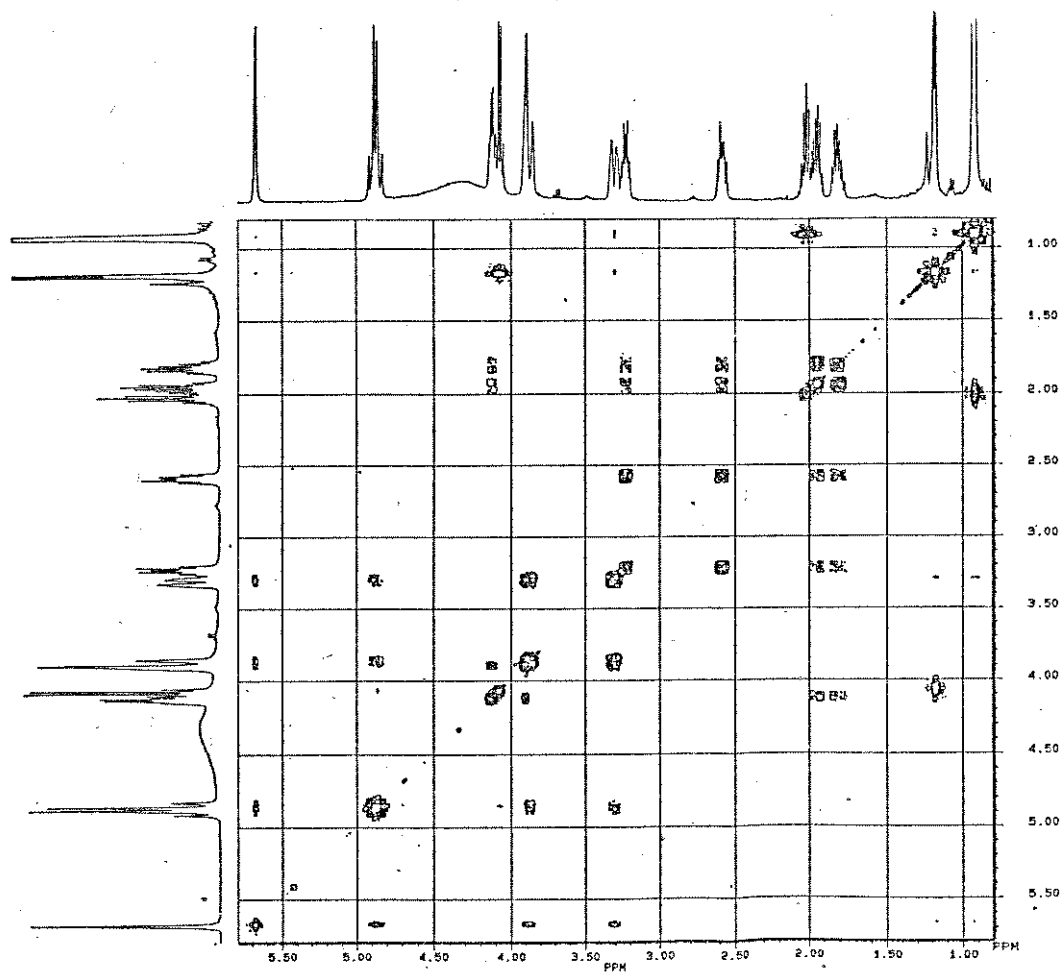


Figura 2.60. COSY (^1H - ^1H) de 6d em CDCl_3 a 400 MHz.

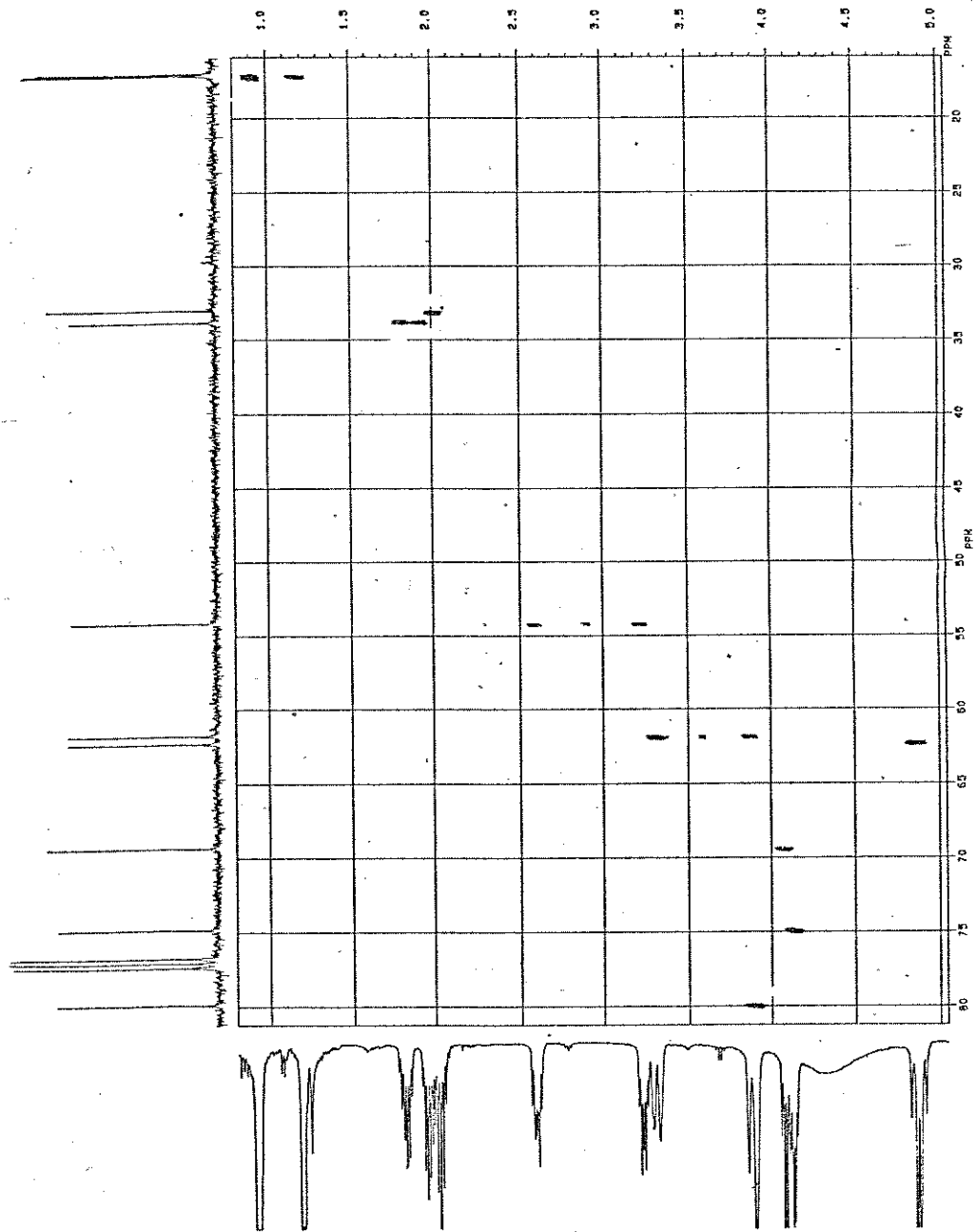


Figura 2.61. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 6d em CDCl_3 a 100,6 MHz.

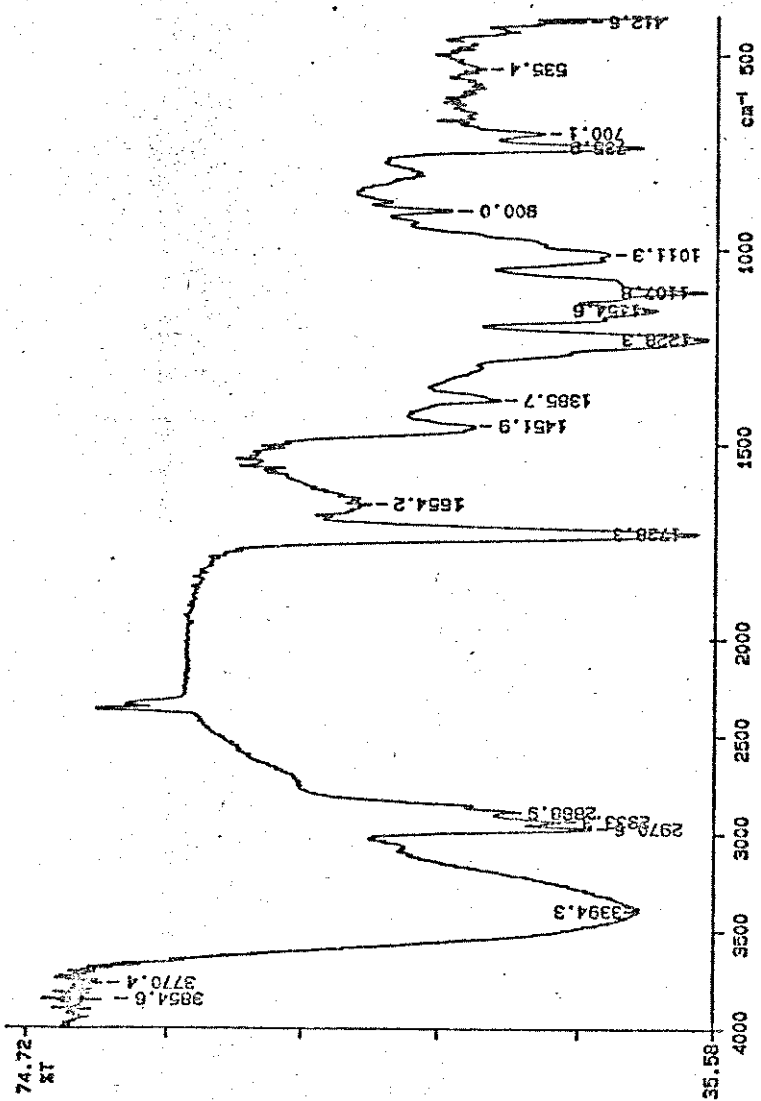


Figura 2.62. Infravermelho de Ge em filme.

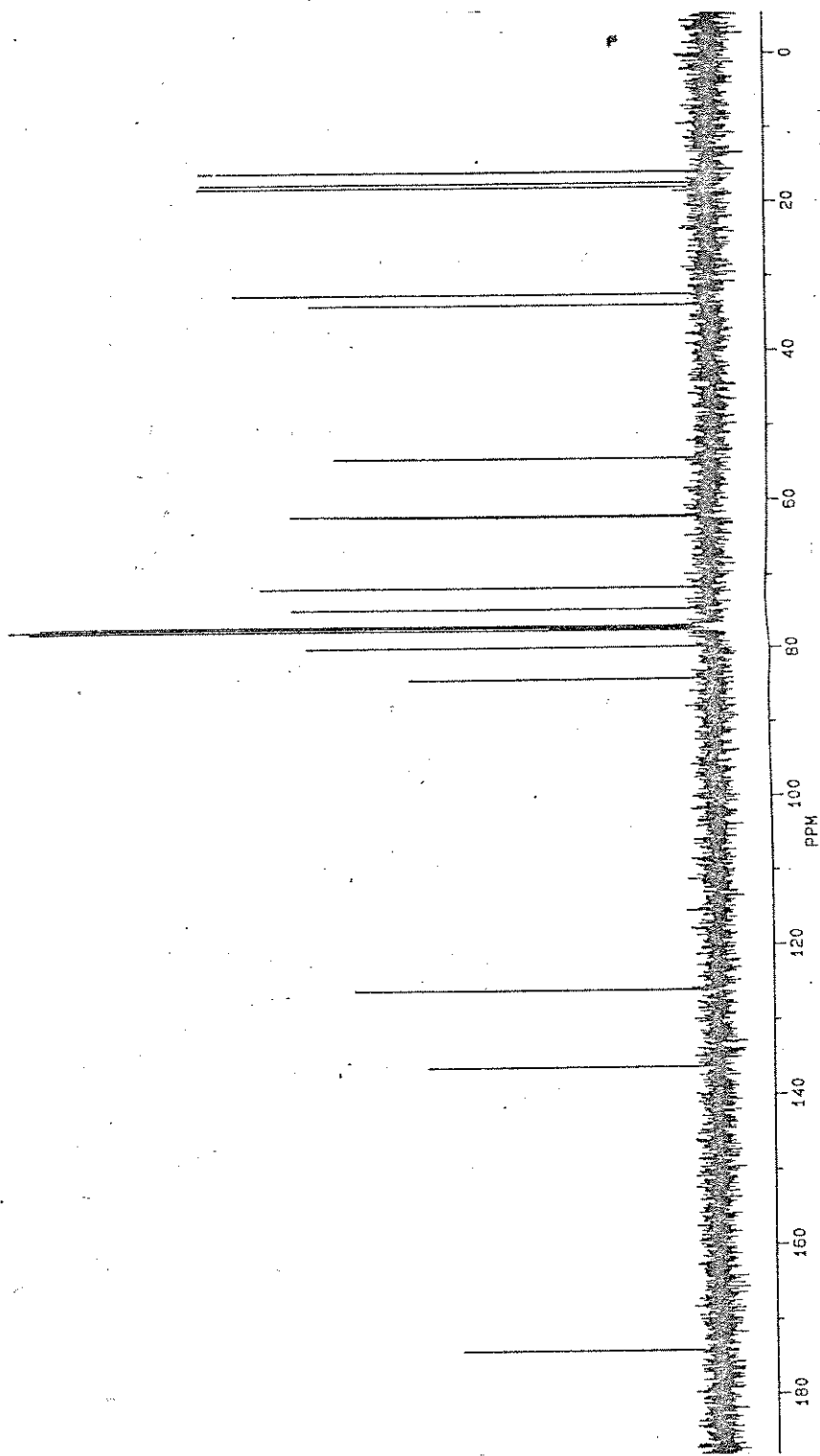


Figura 2.63. RMN¹³C de 6e em CDCl₃ a 100,6 MHz.

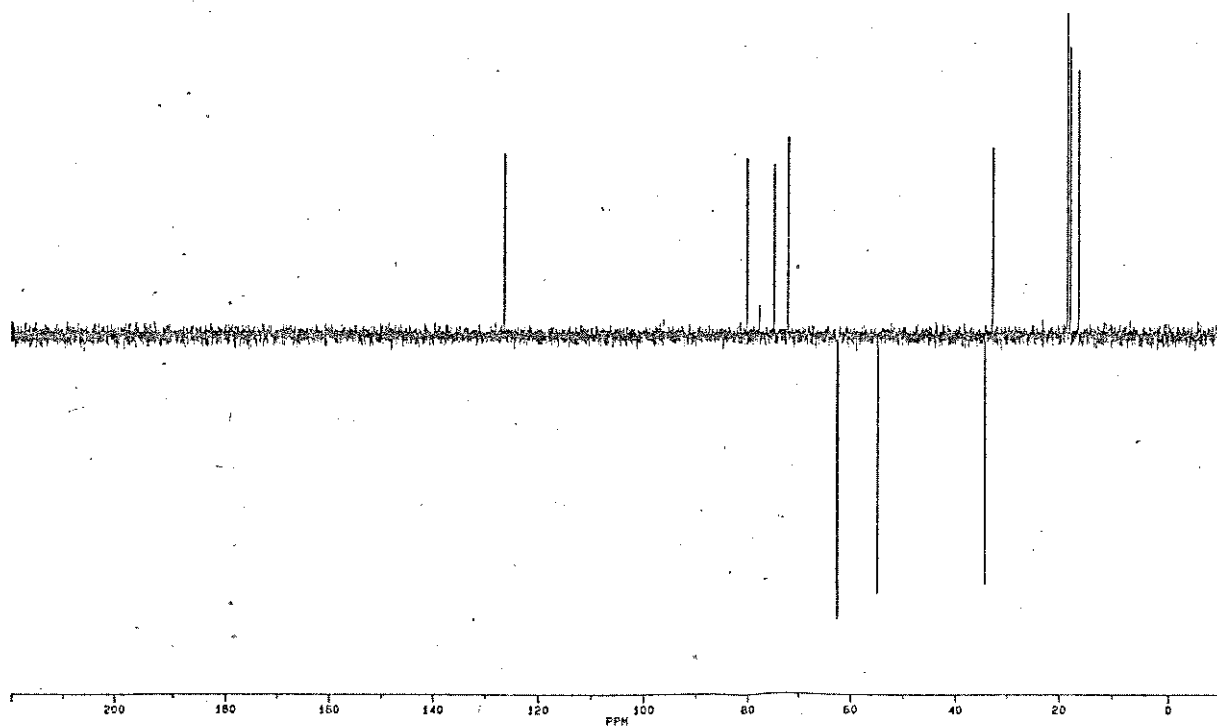


Figura 2.63a. RMN ^{13}C (DEPT) de 6e em CDCl_3 a 100,6 MHz.

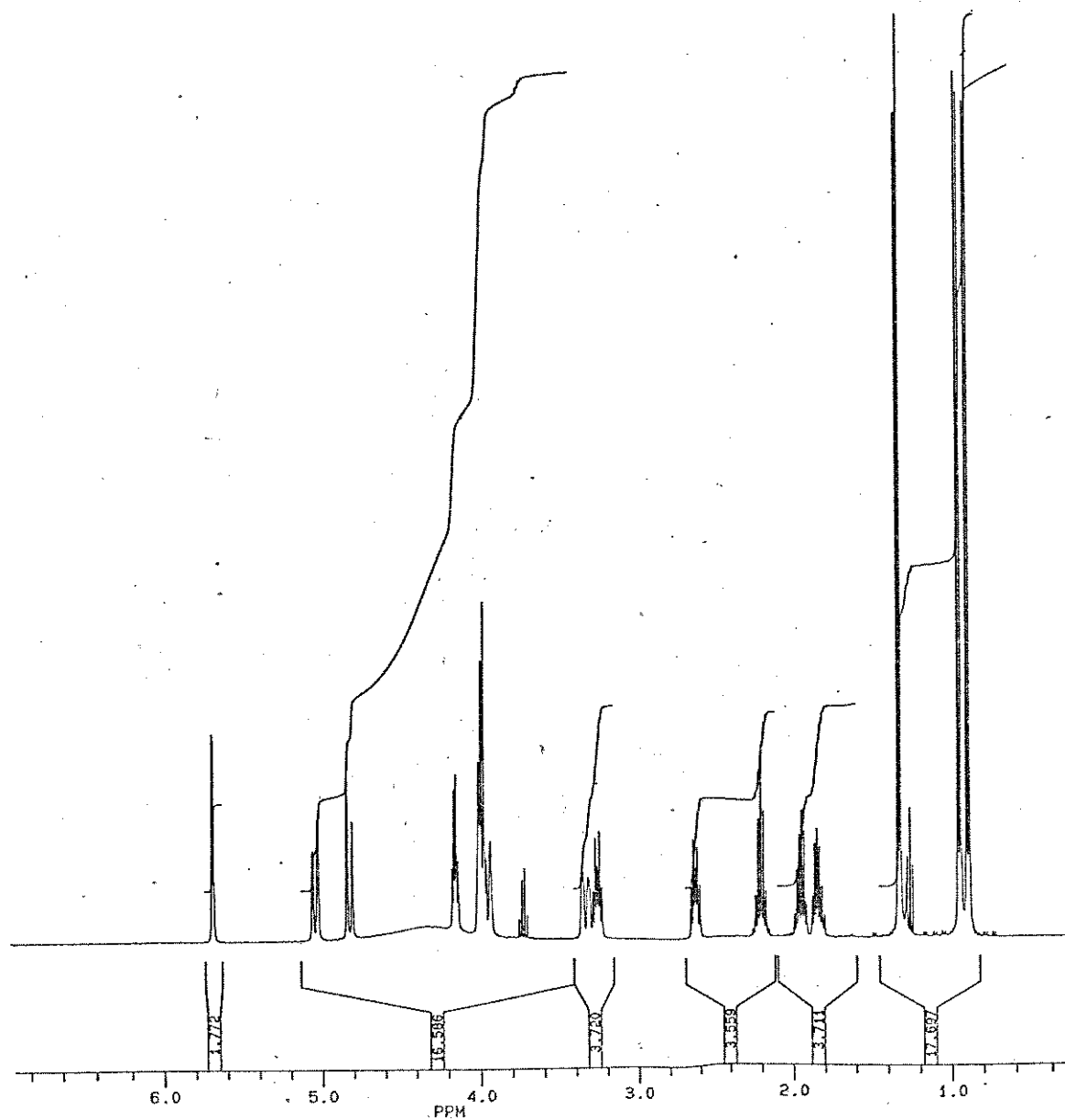


Figura 2.64. RMN^1H de 6e em CDCl_3 a 400 MHz.

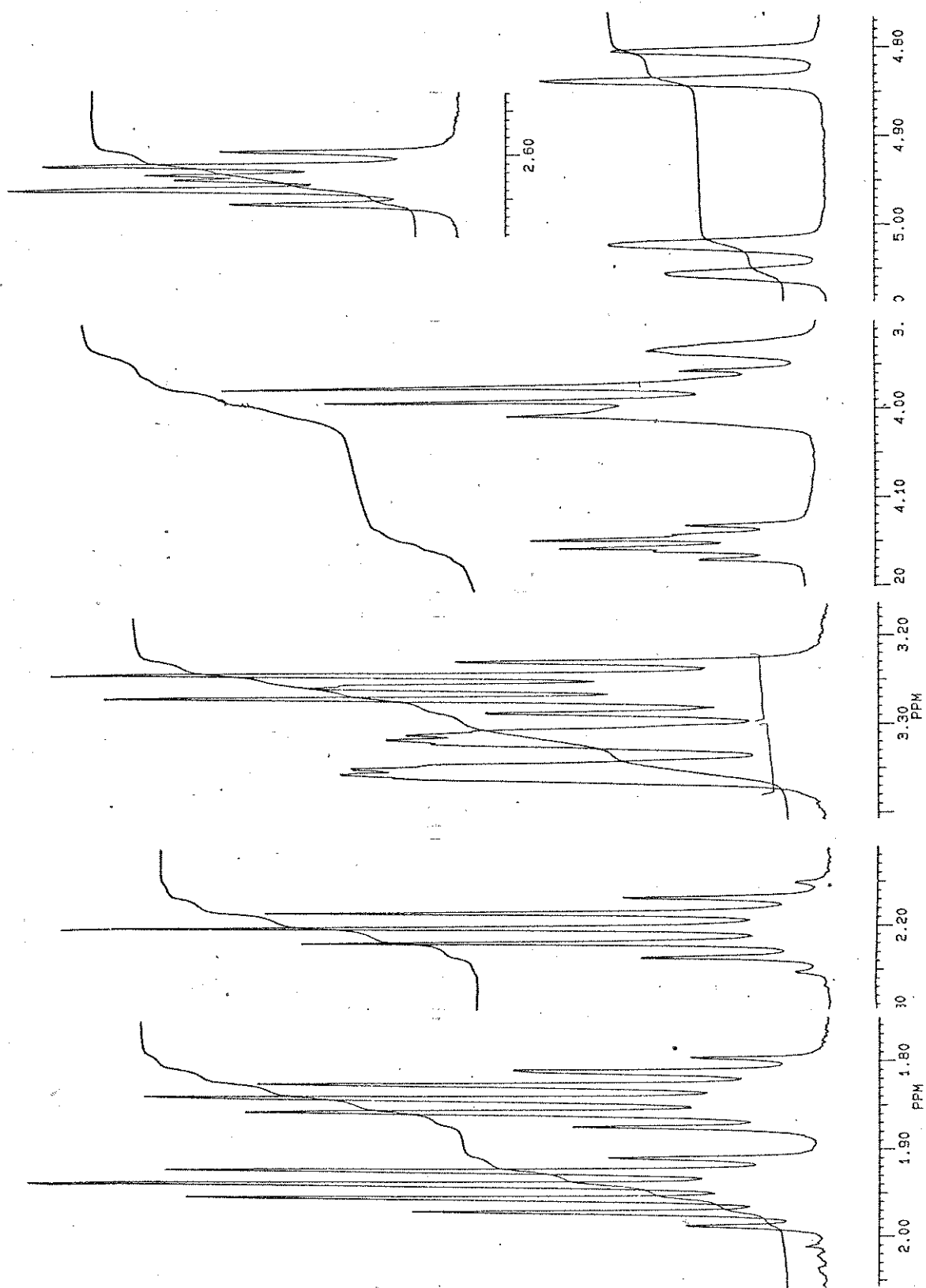


Figura 2.64a. RMN^1H (ampliação) de 6e em CDCl_3 a 400 MHz.

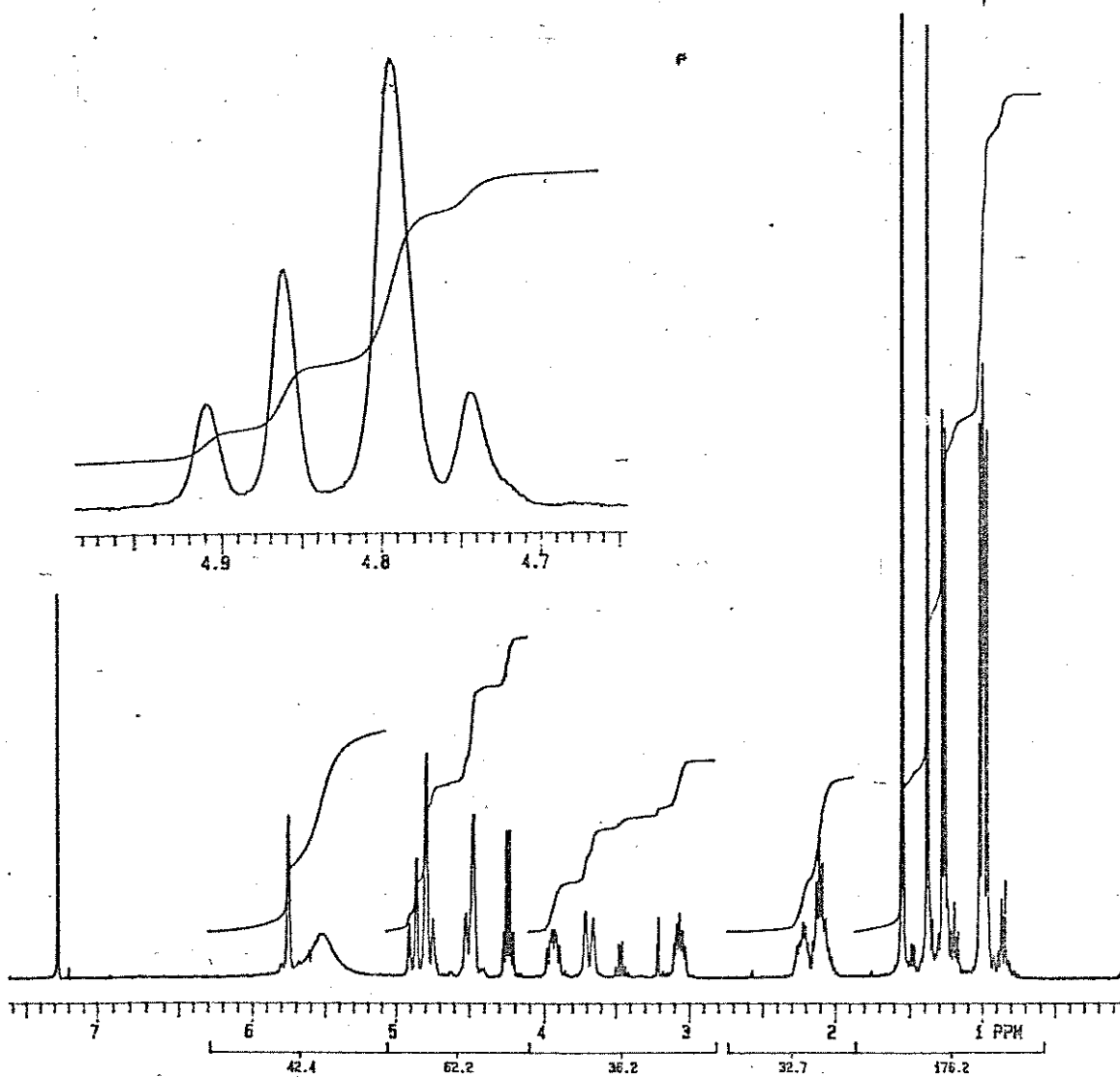


Figura 2.65. RMN^1H de 46 em CDCl_3 a 300 MHz.

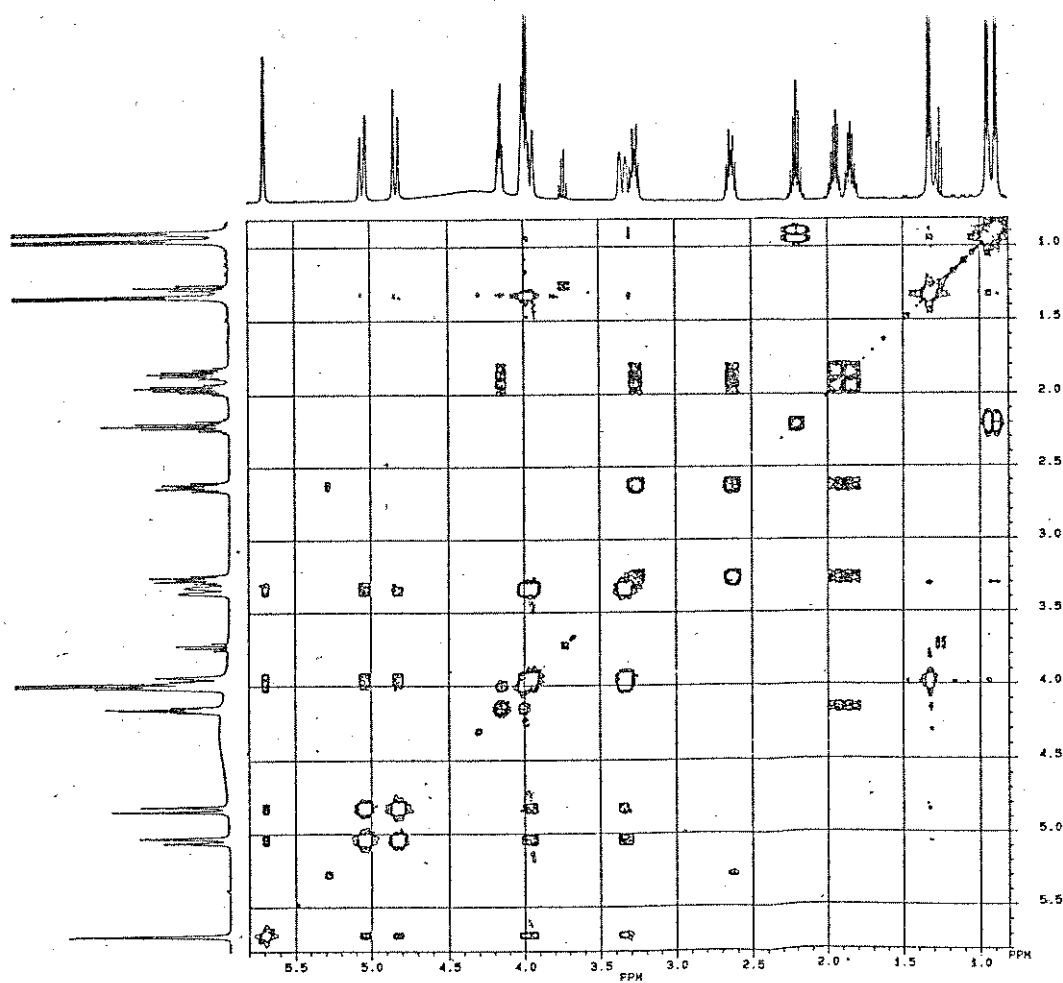


Figura 2.66. COSY (^1H - ^1H) de 6e em CDCl_3 a 400 MHz.

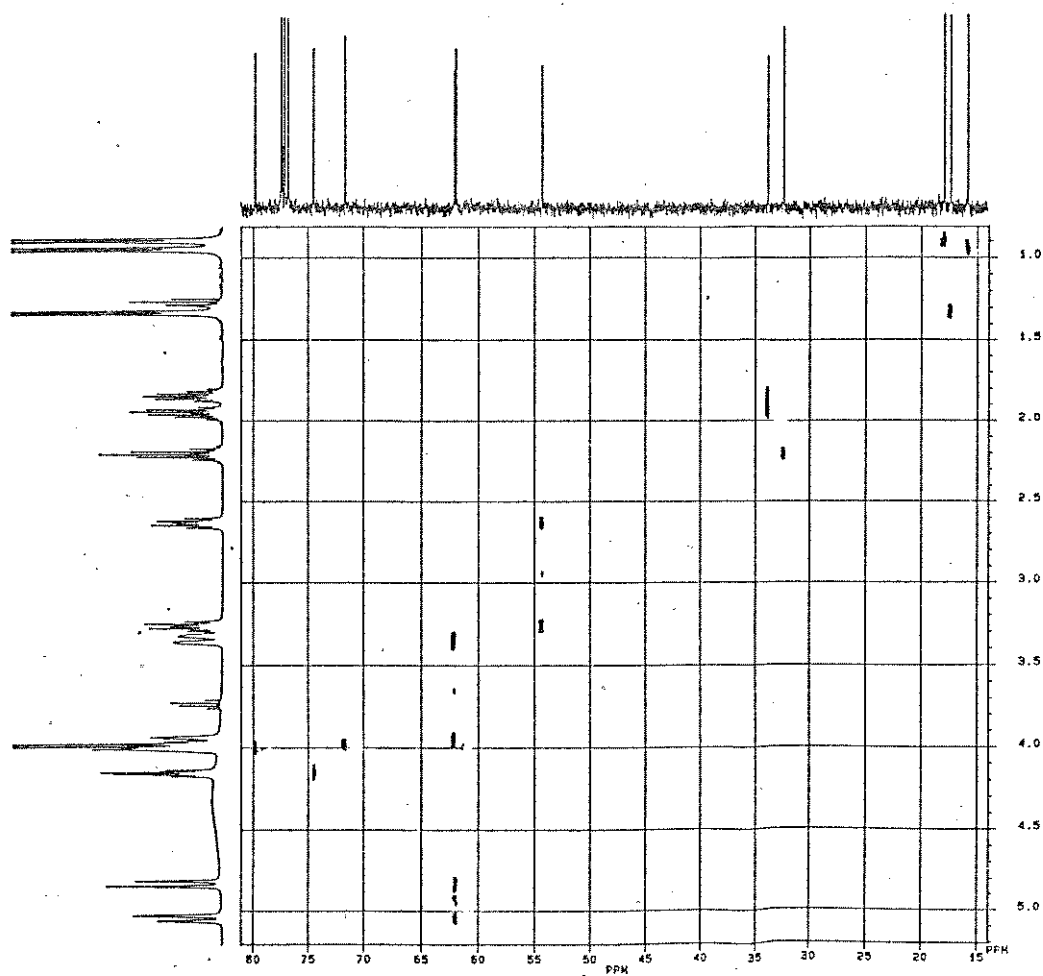


Figura 2.67. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 6e em CDCl_3 a 100,6 MHz.

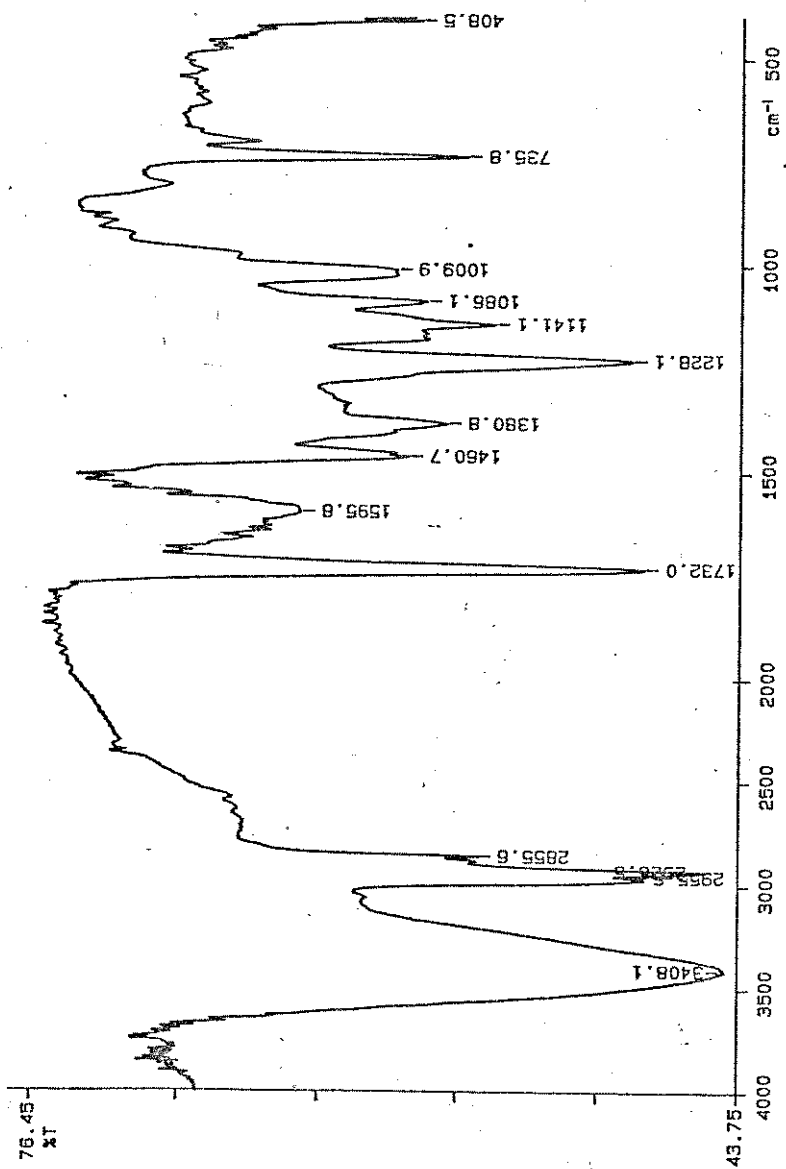


Figura 2.68. Infravermelho de 13c em filme.

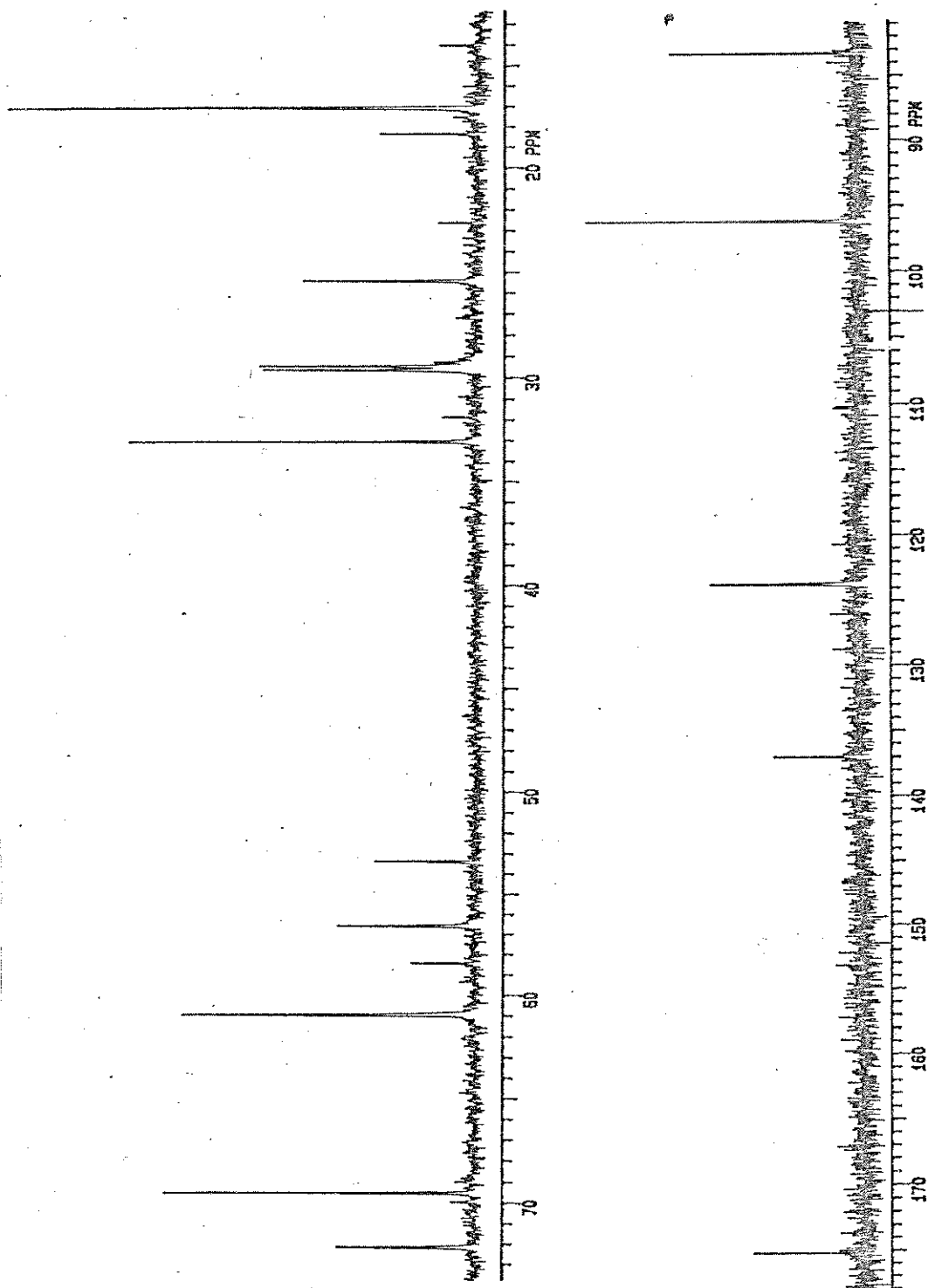


Figura 2.69. RMN¹³C de 13c em CDCl₃ a 75 MHz.

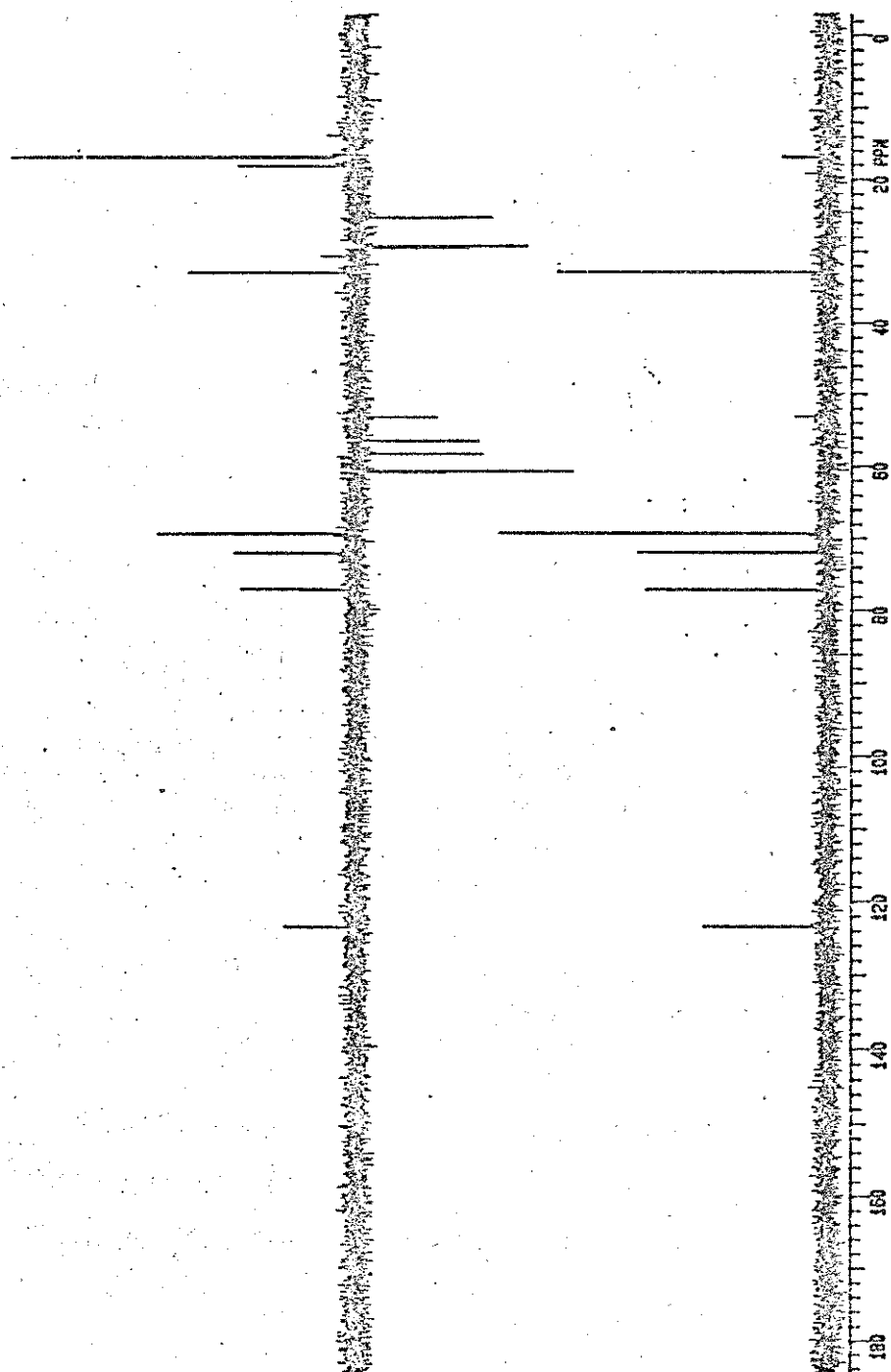


Figura 2.69a. RMN ^{13}C (DEPT) de 13c em CDCl_3 a 75 MHz.

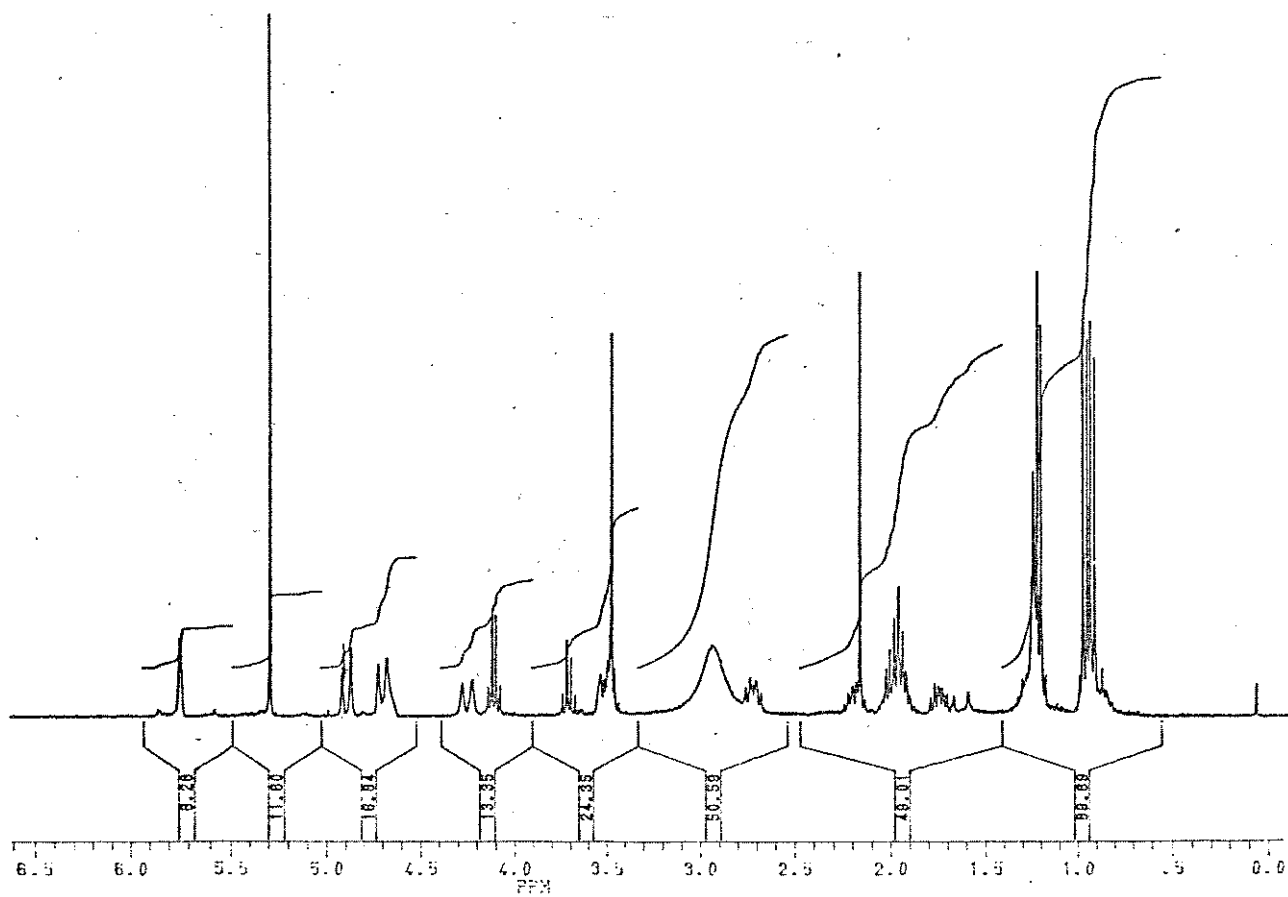


Figura 2.70. RMN ^1H de 13c em CDCl_3 a 300 MHz.

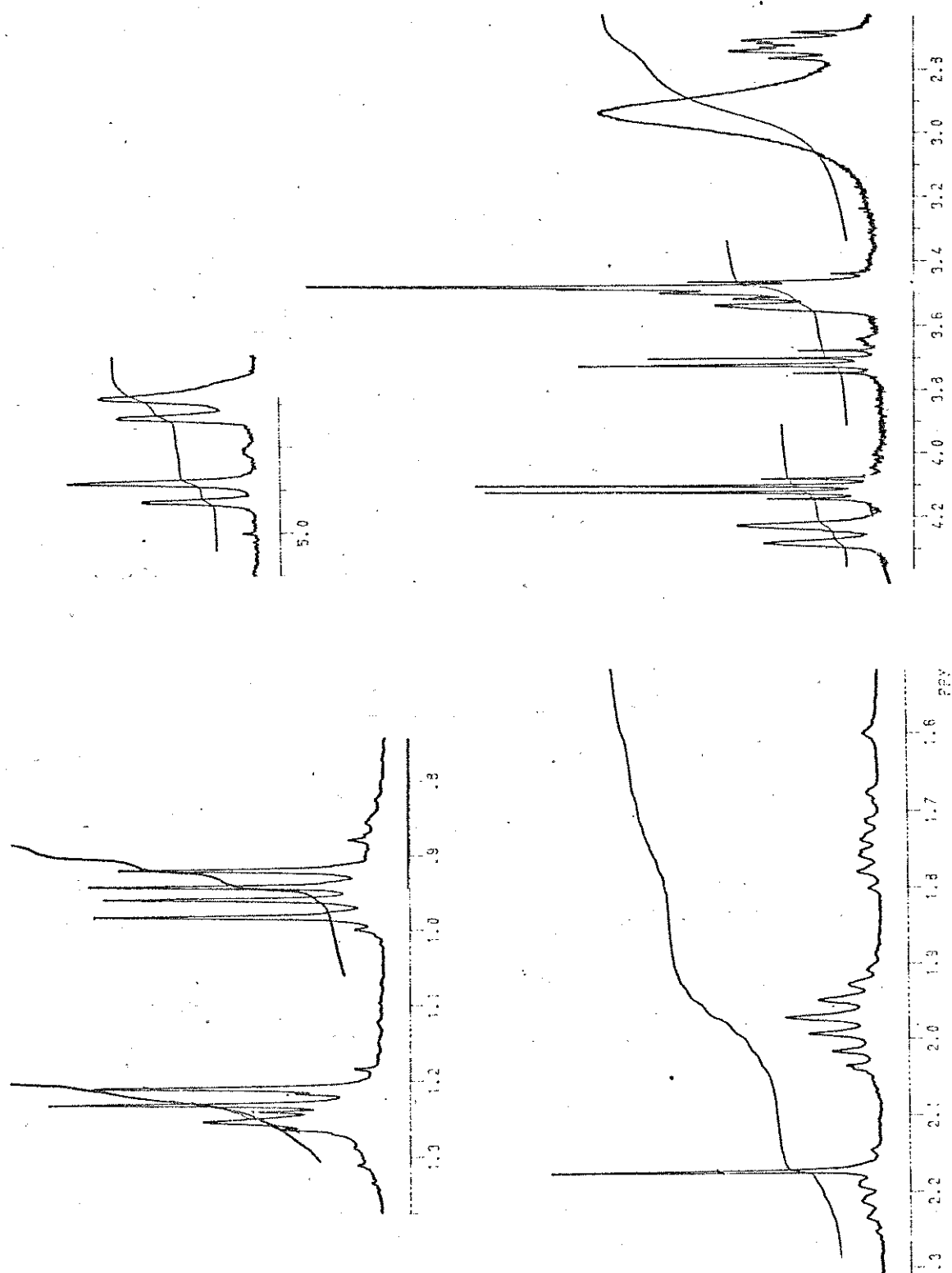


Figura 2.70a. RMN^1H de (ampliação) 13c em CDCl_3 a 300 MHz.

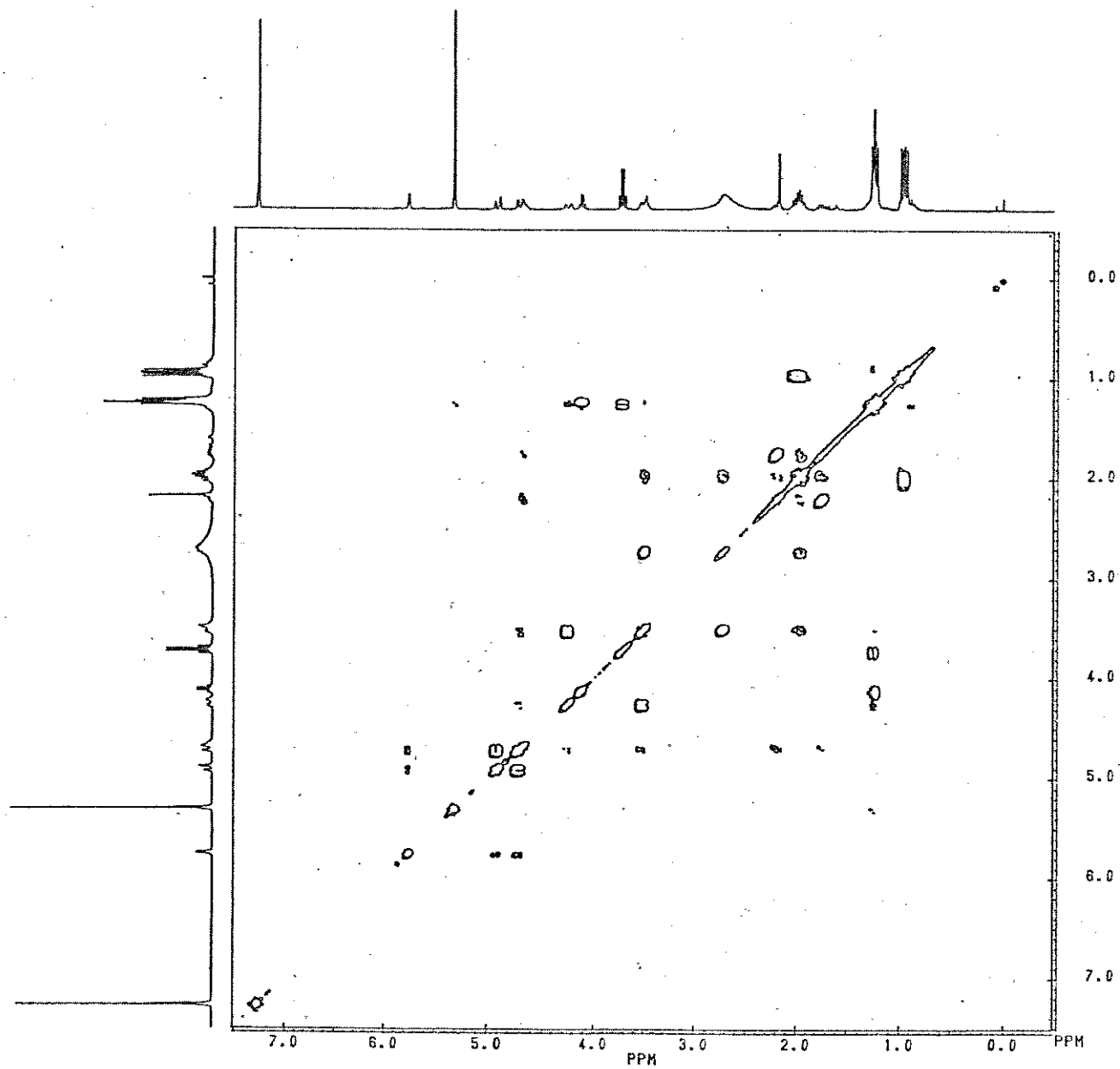


Figura 2.71. COSY (^1H - ^1H) de 13c em CDCl_3 a 300 MHz.

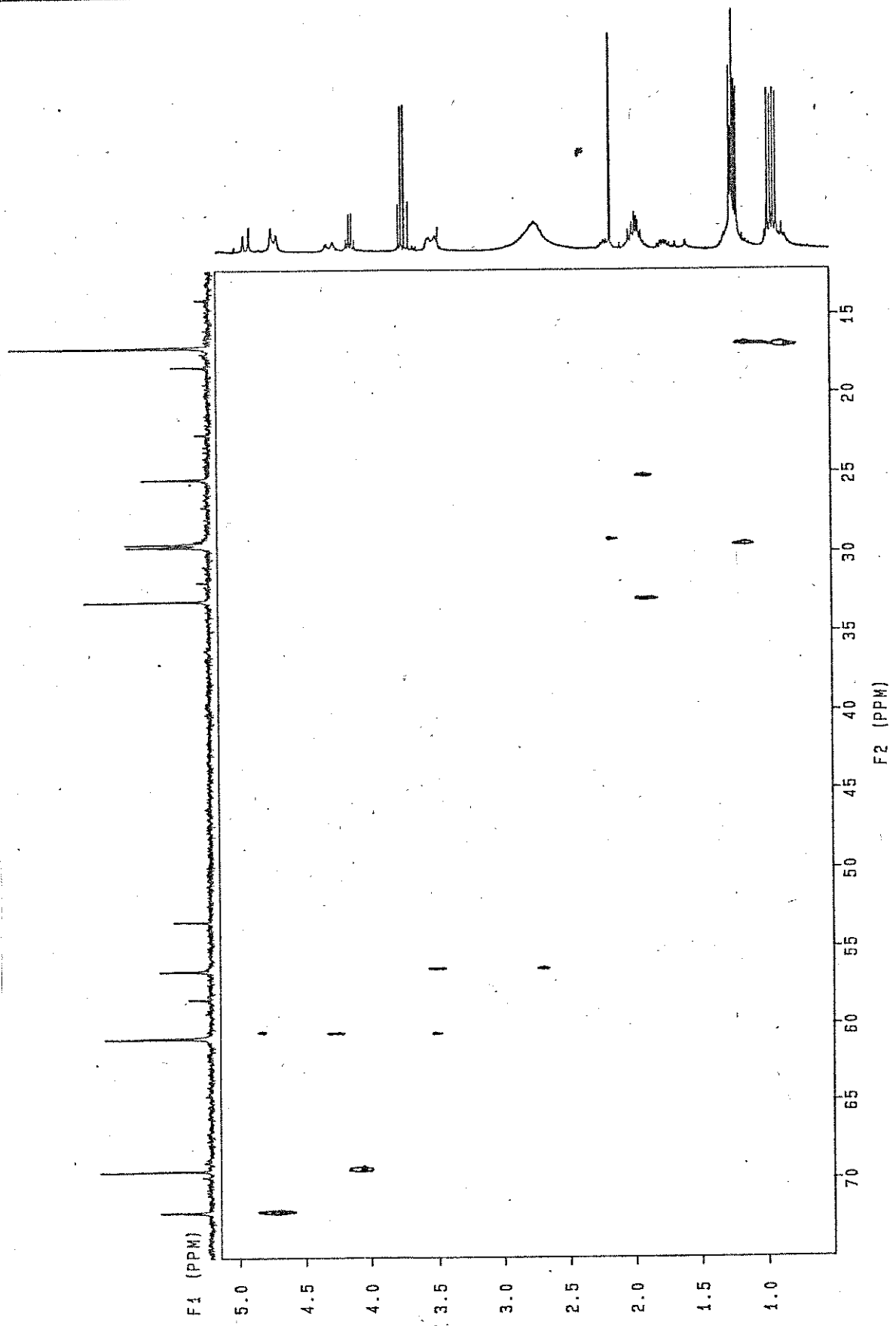


Figura 2.72. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 13c em CDCl_3 a 75 MHz.

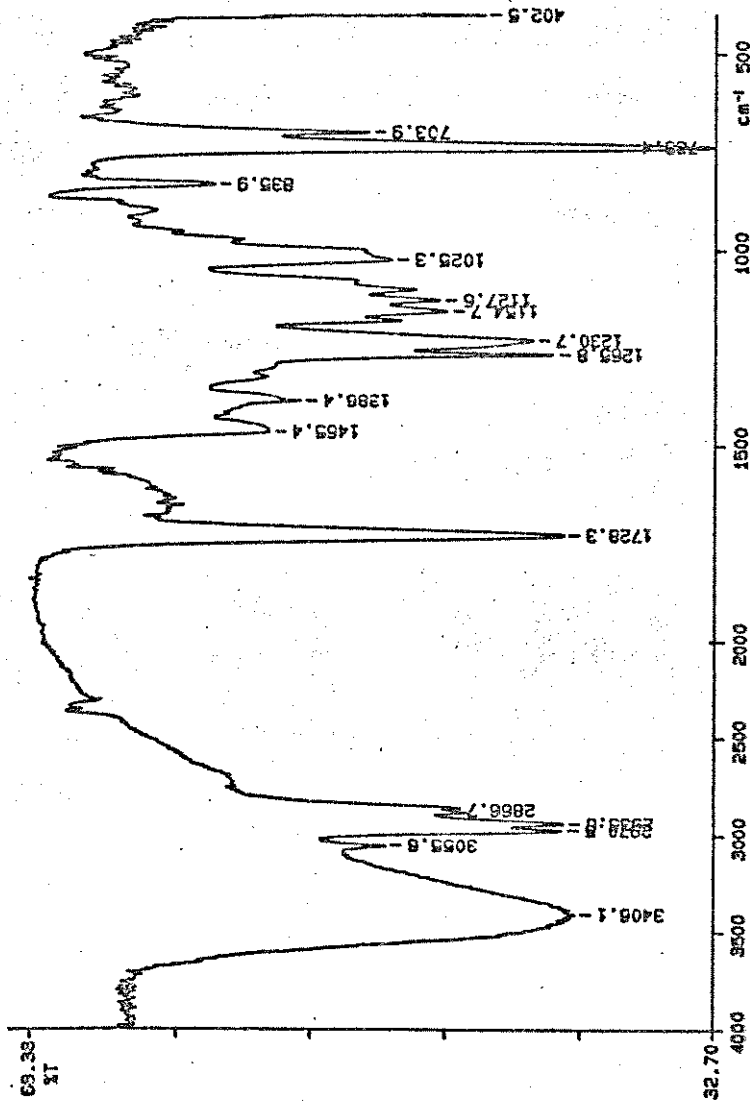


Figura 2.73. Infravermelho de 6c em filme.

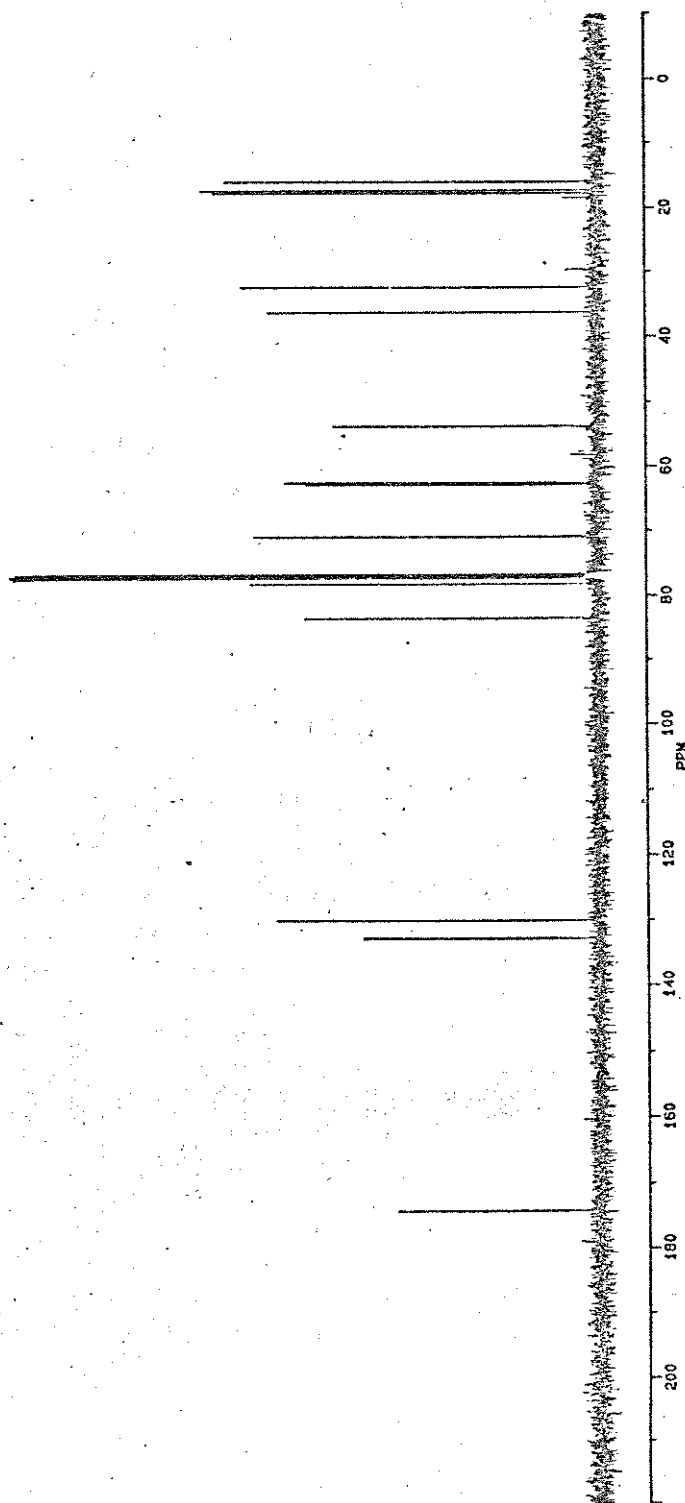


Figura 2.74. RMN ^{13}C de 6c em CDCl_3 a 100,6 MHz.

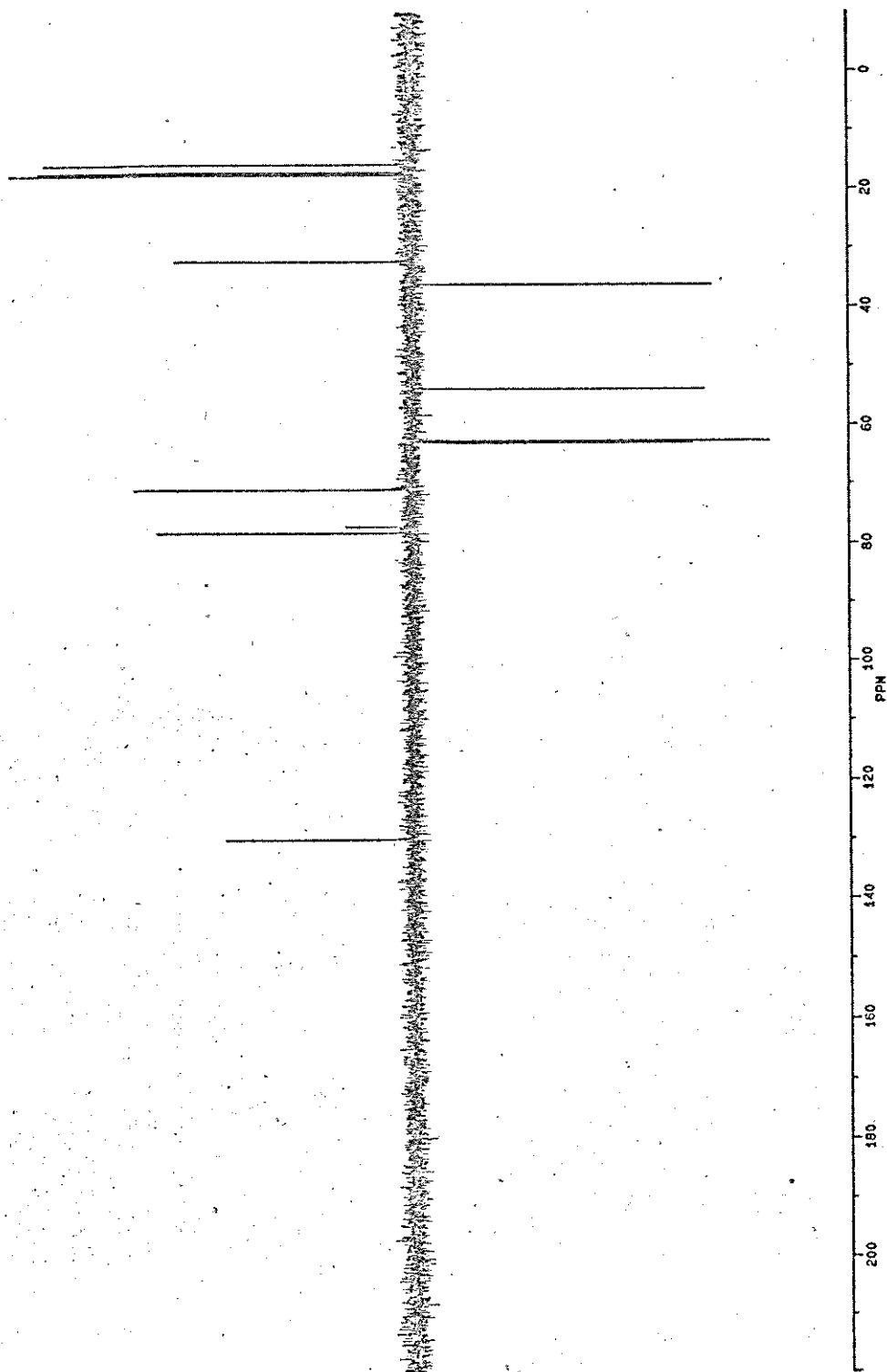


Figura 2.74a. RMN ^{13}C (DEPT) de 6c em CDCl_3 a 100,6 MHz.

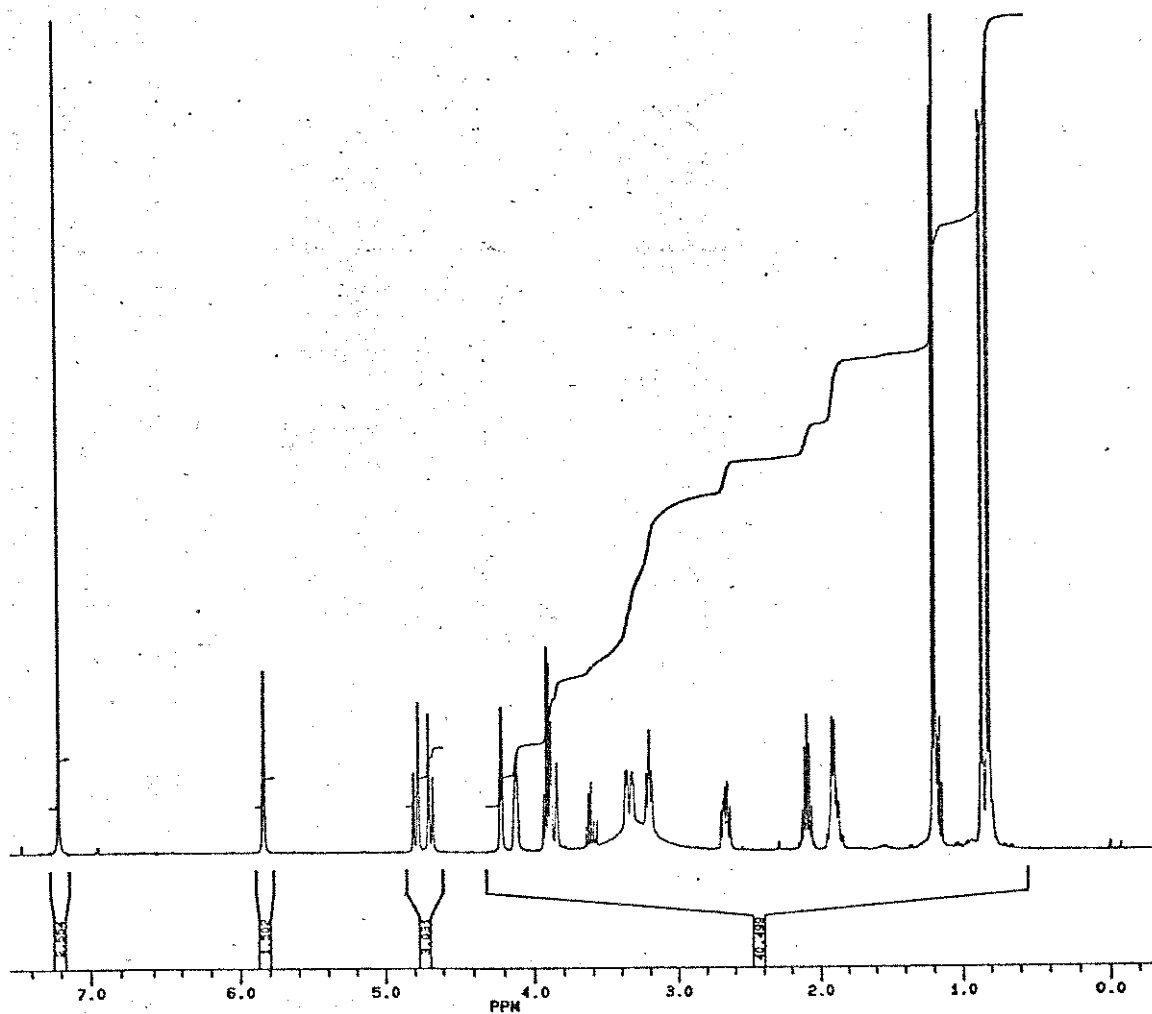


Figura 2.75. RMN ^1H de 6c em CDCl_3 a 400 MHz.

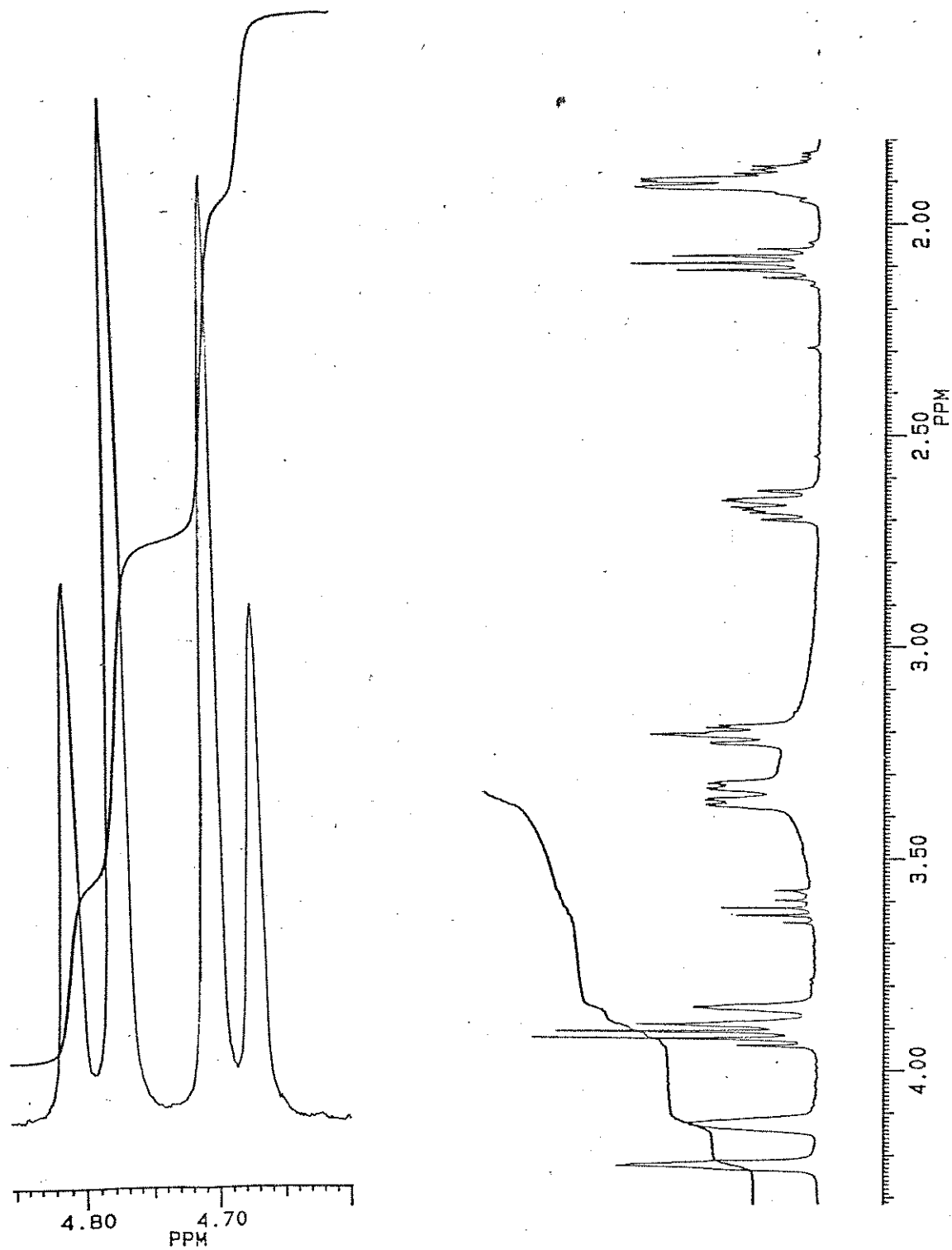


Figura 2.75a. RMN^1H (ampliação) de 6c em CDCl_3 a 400 MHz.

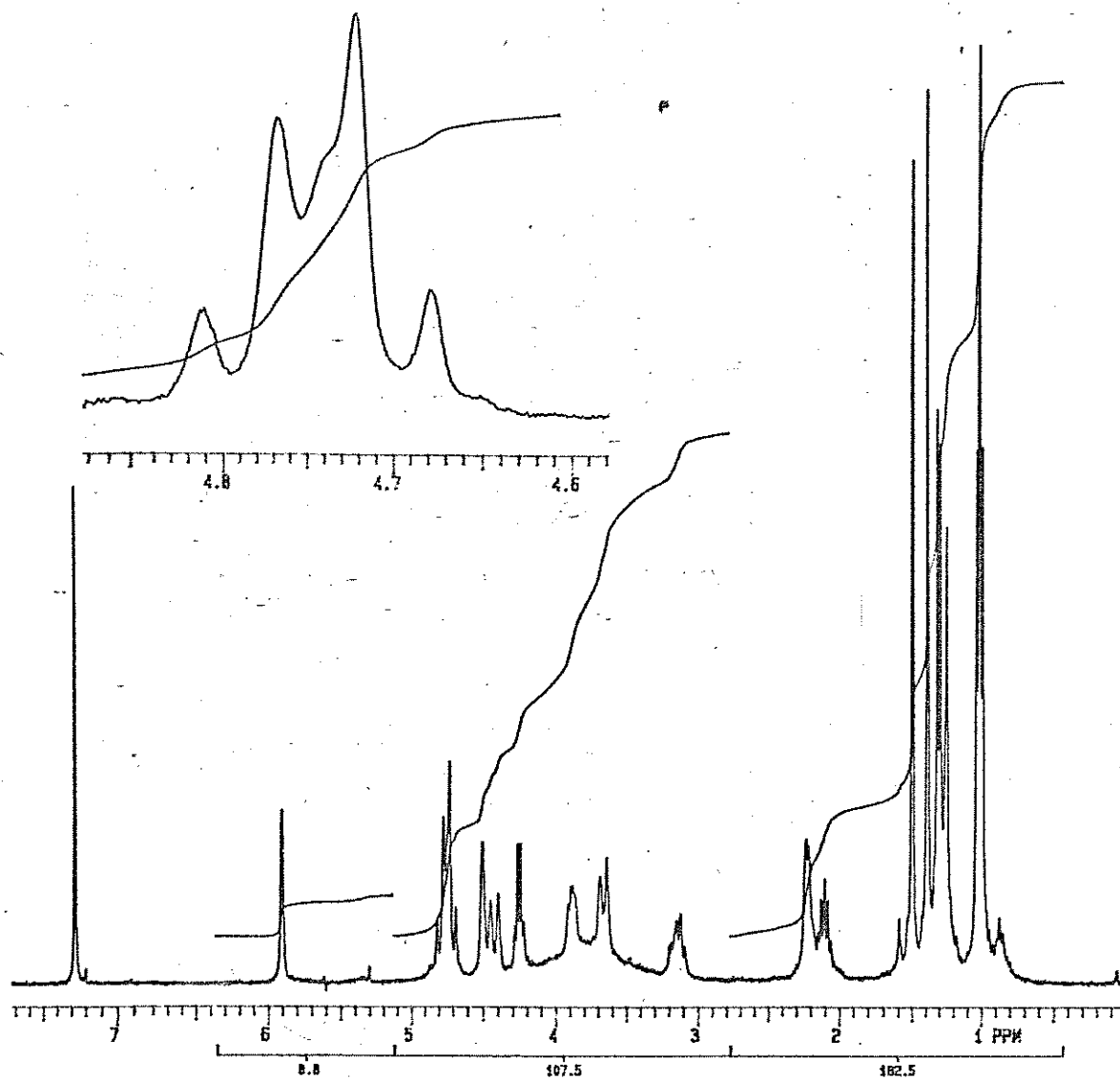


Figura 2.76. RMN^1H de 47 em CDCl_3 a 300 MHz.

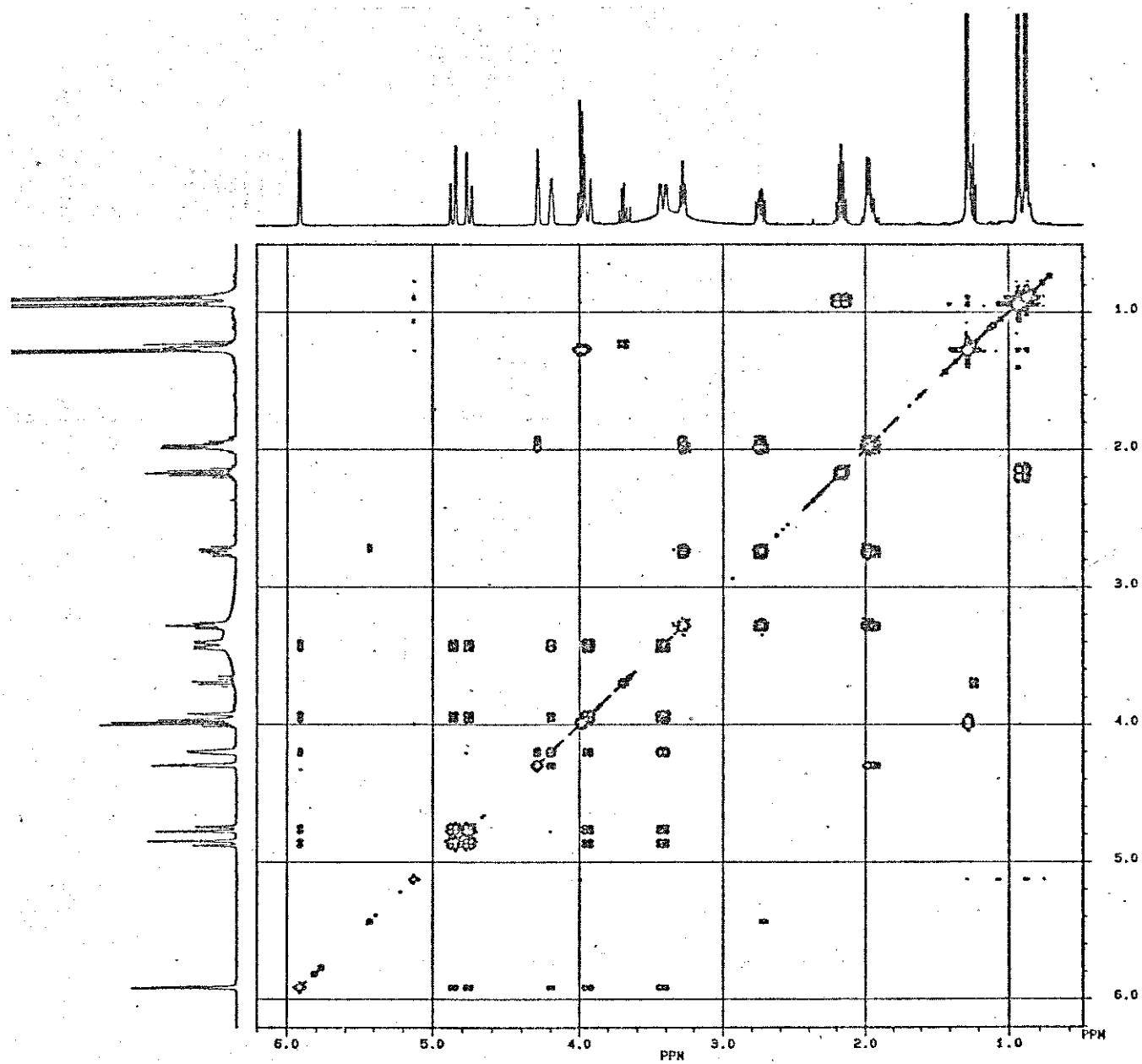


Figura 2.77. COSY (^1H - ^1H) de 6c em CDCl_3 a 400 MHz.

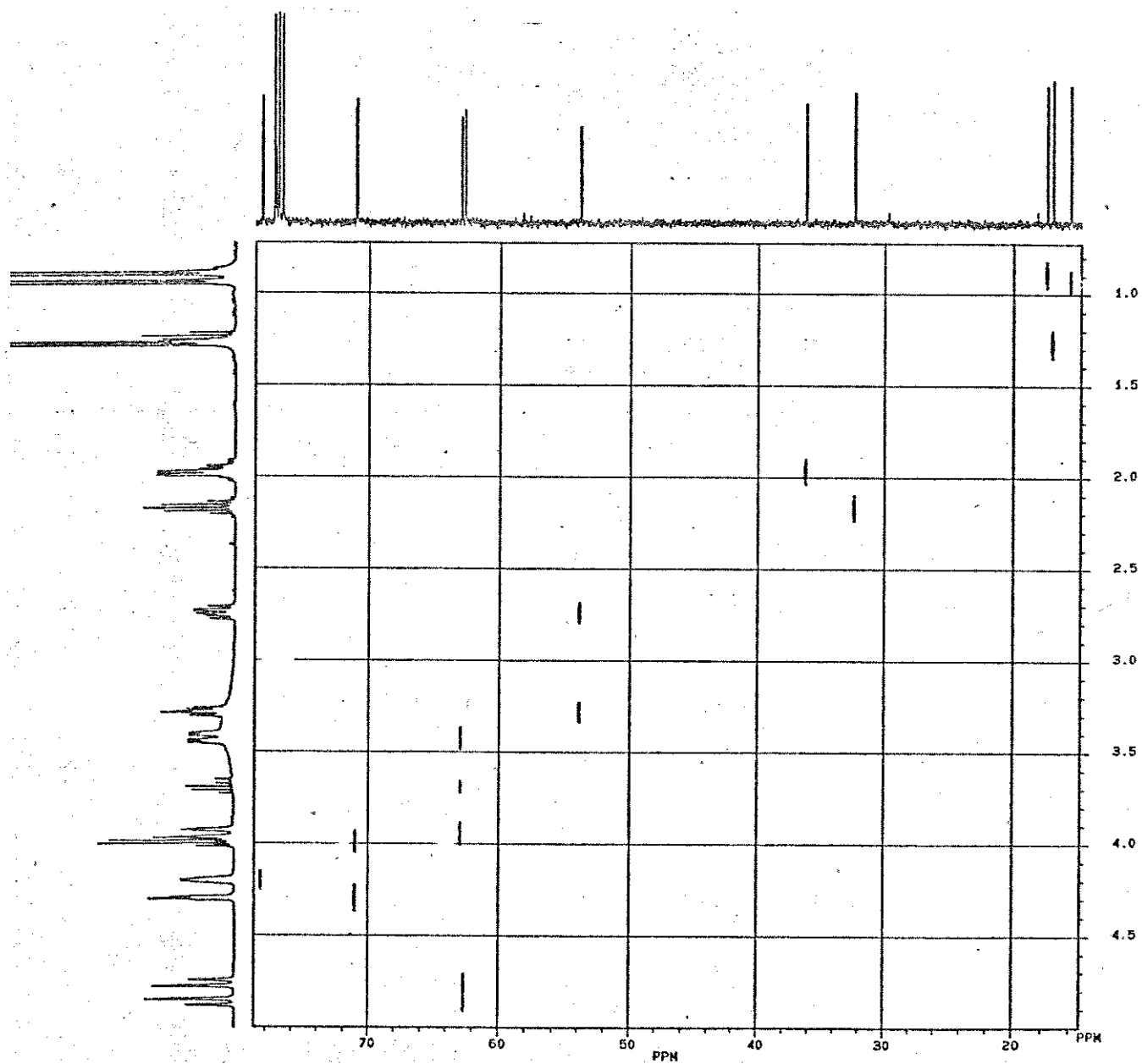


Figura 2.78. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 6c em CDCl_3 a 100,6 MHz.

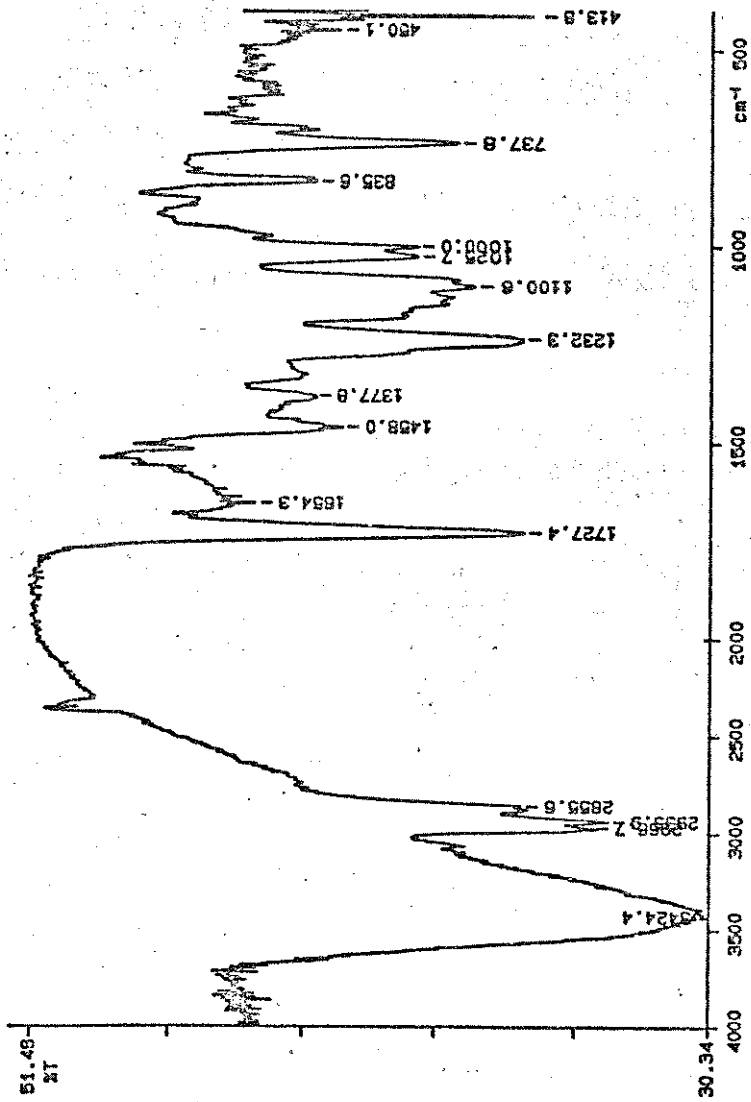


Figura 2.79. Infravermelho de 6b em filme.

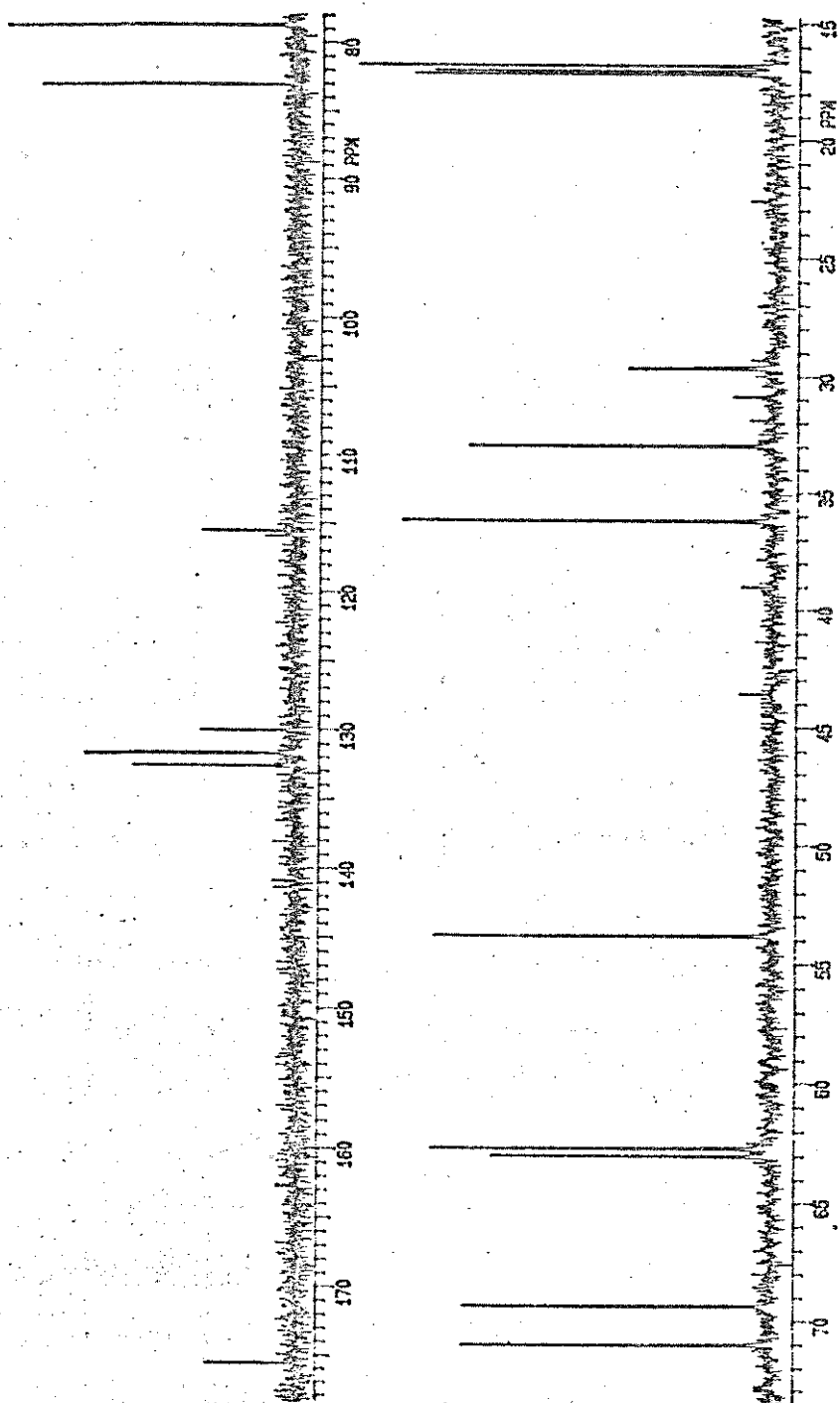


Figura 2.80. RMN¹³C de 6b em CDCl₃ a 75 MHz.

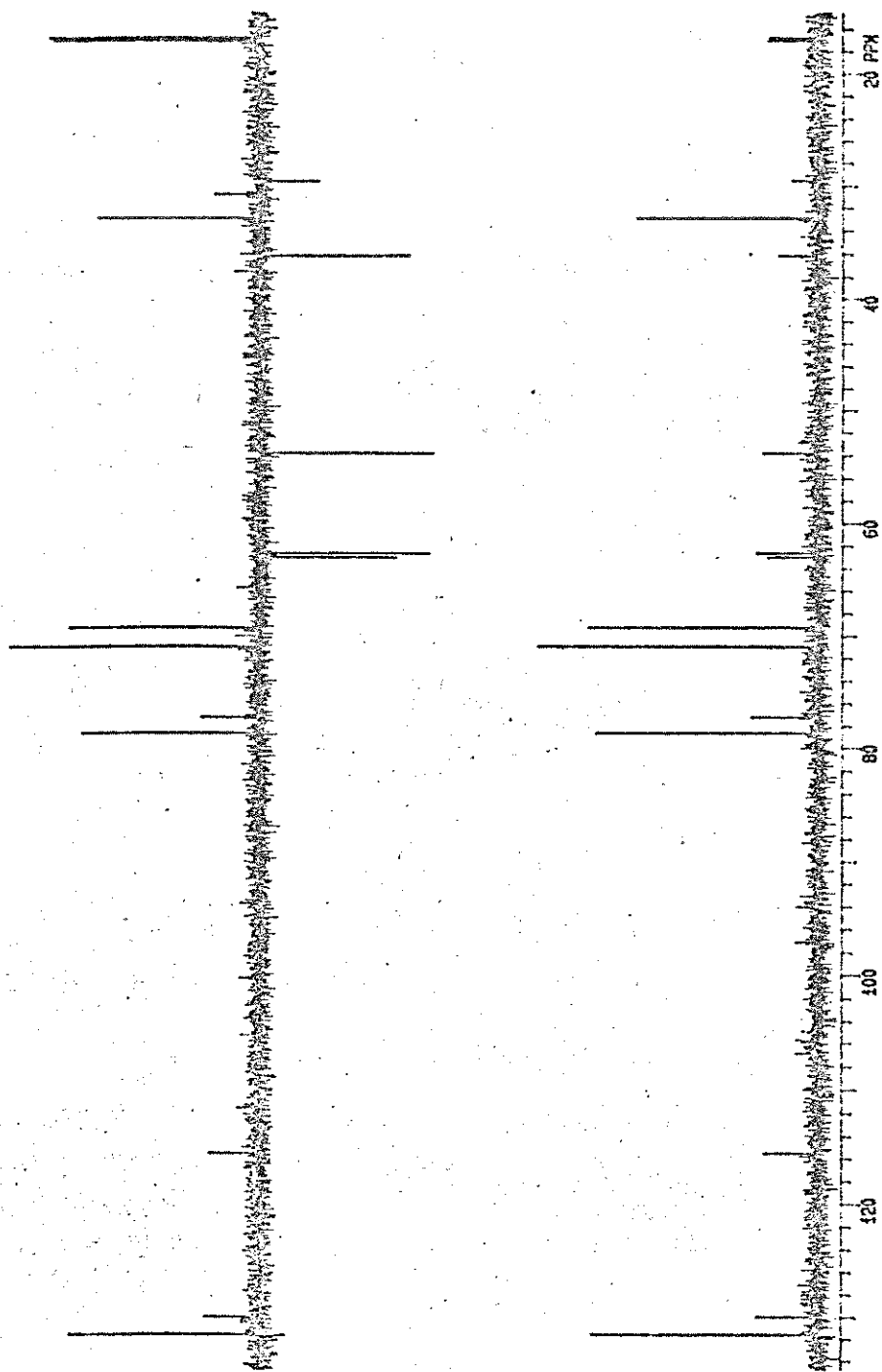


Figura 2.80a. RMN¹³C (DEPT) de 6b em CDCl₃ a 75 MHz.

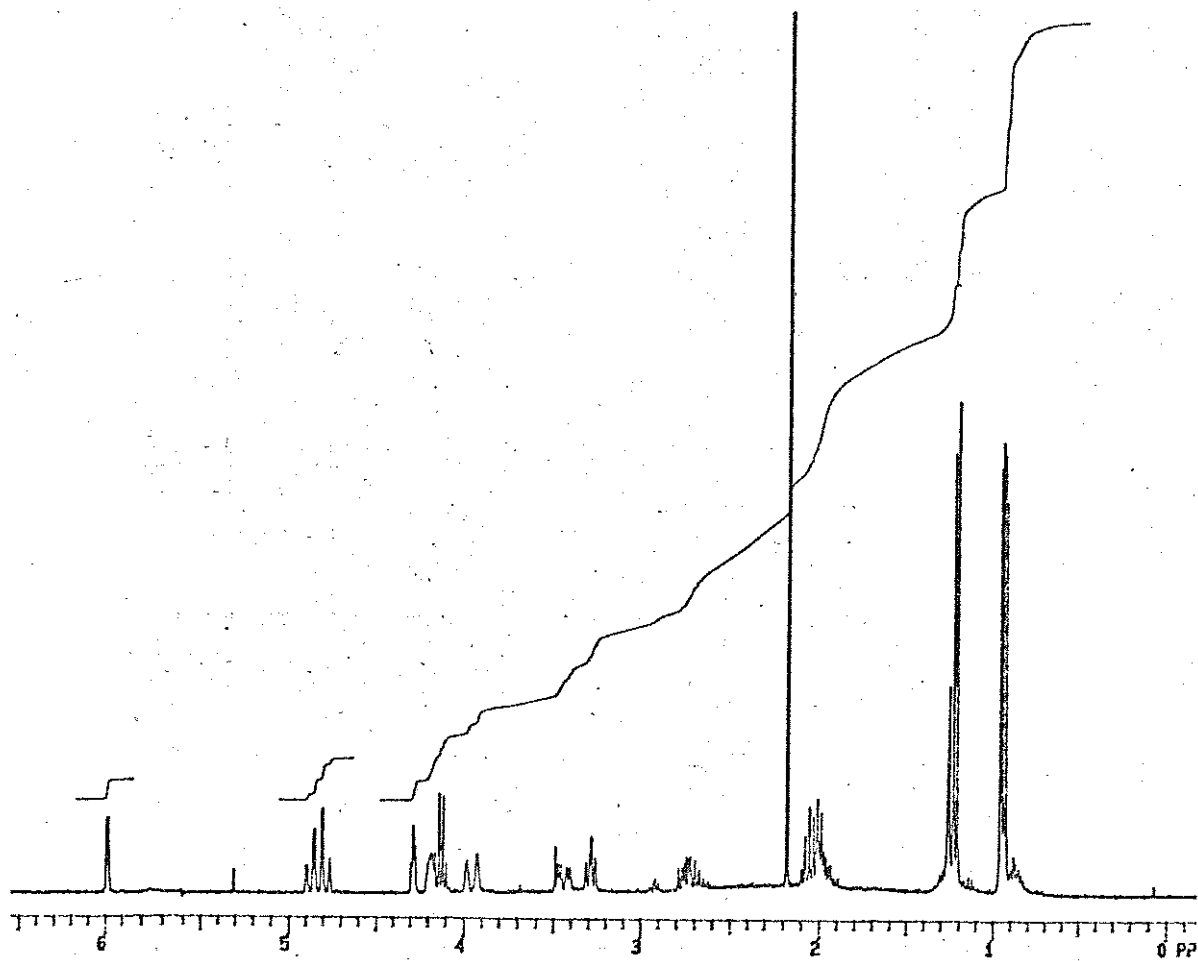


Figura 2.81. RMN¹H de 6b em CDCl₃ a 300 MHz.

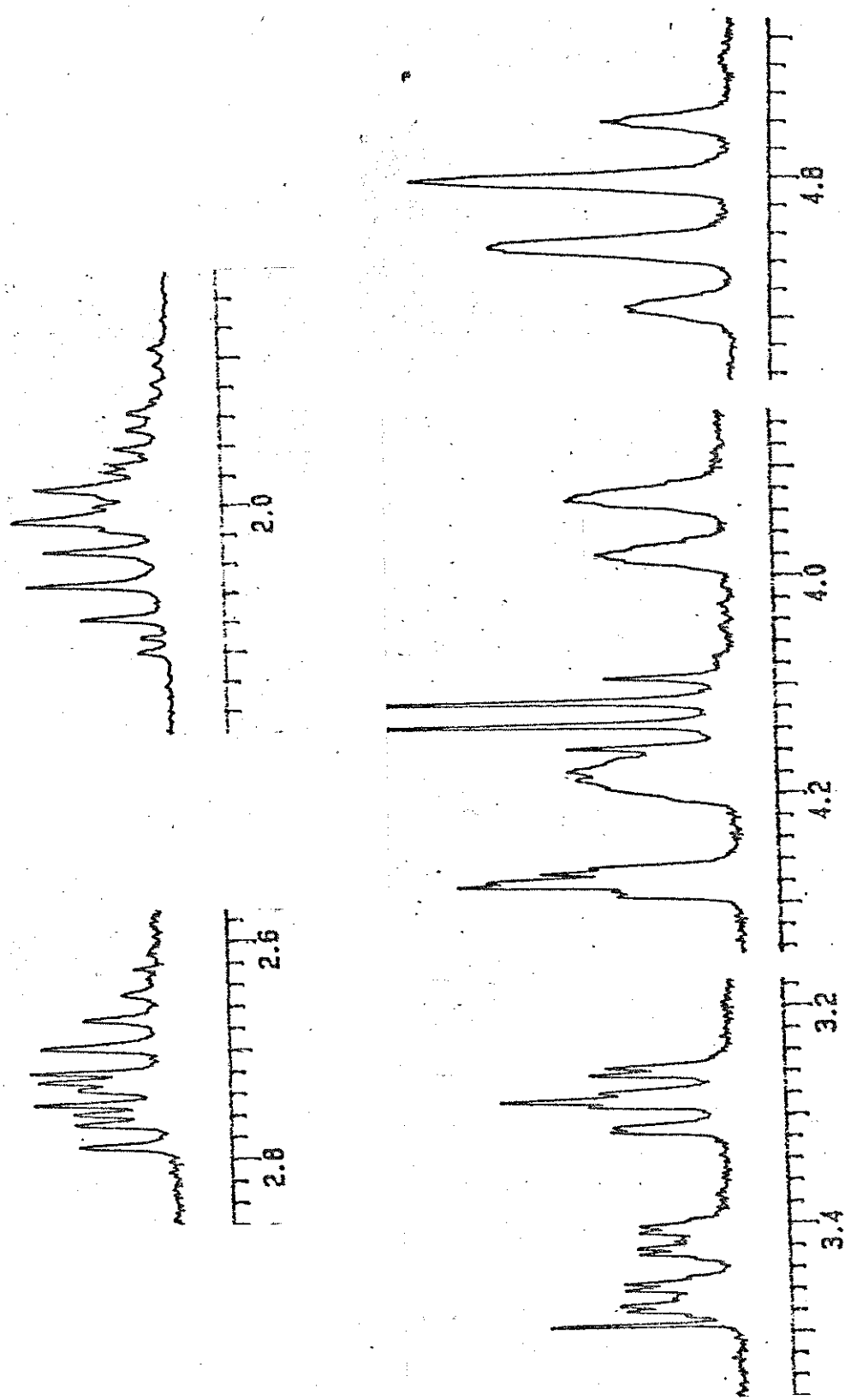


Figura 2.81a. RMN^1H (ampliação) de 6b em CDCl_3 a 300 MHz.

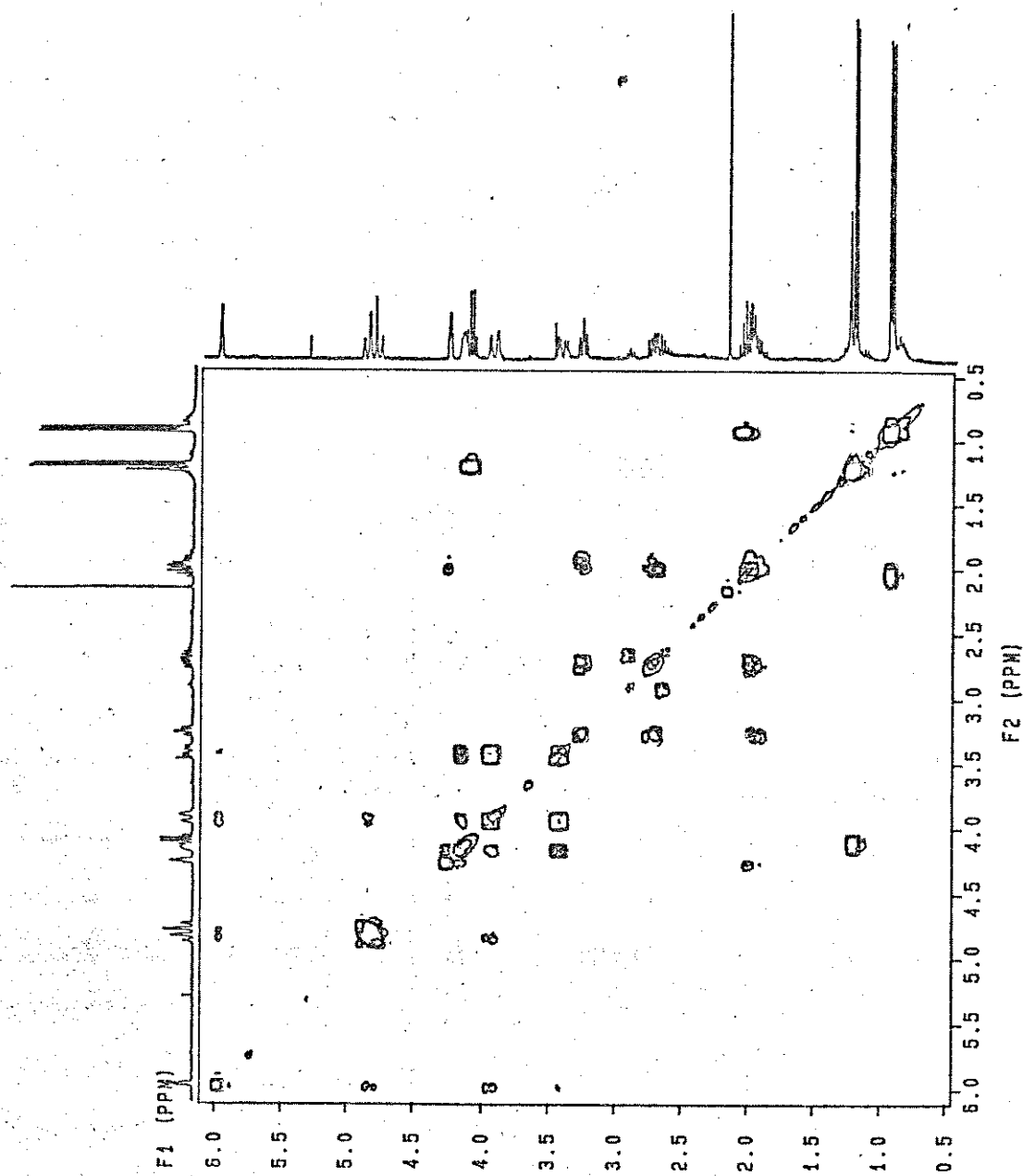


Figura 2.82. COSY (^1H - ^1H) de 6b em CDCl_3 a 300 MHz.

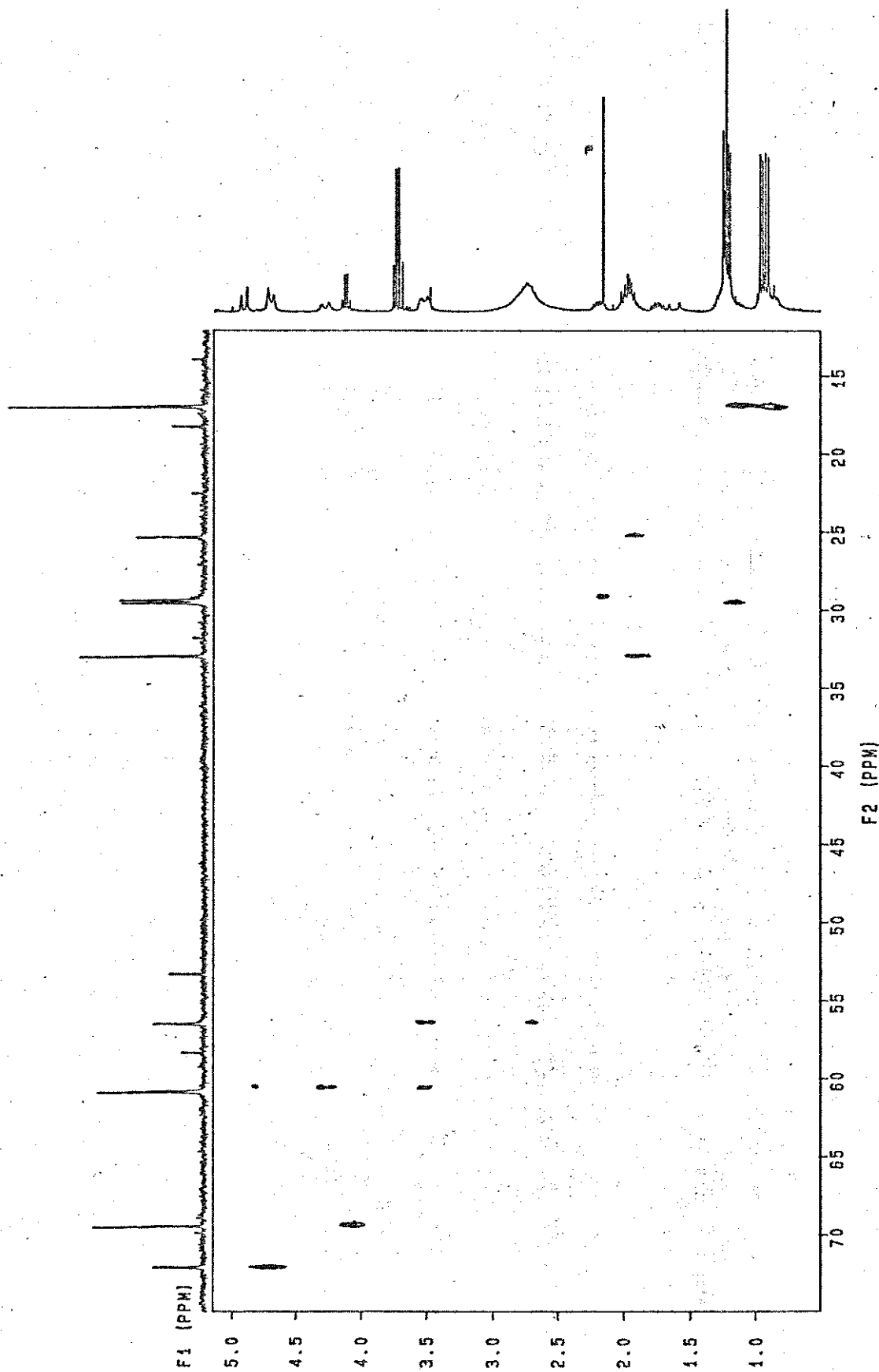


Figura 2.83. HETCOR (¹H-¹³C) de 6b em CDCl₃.

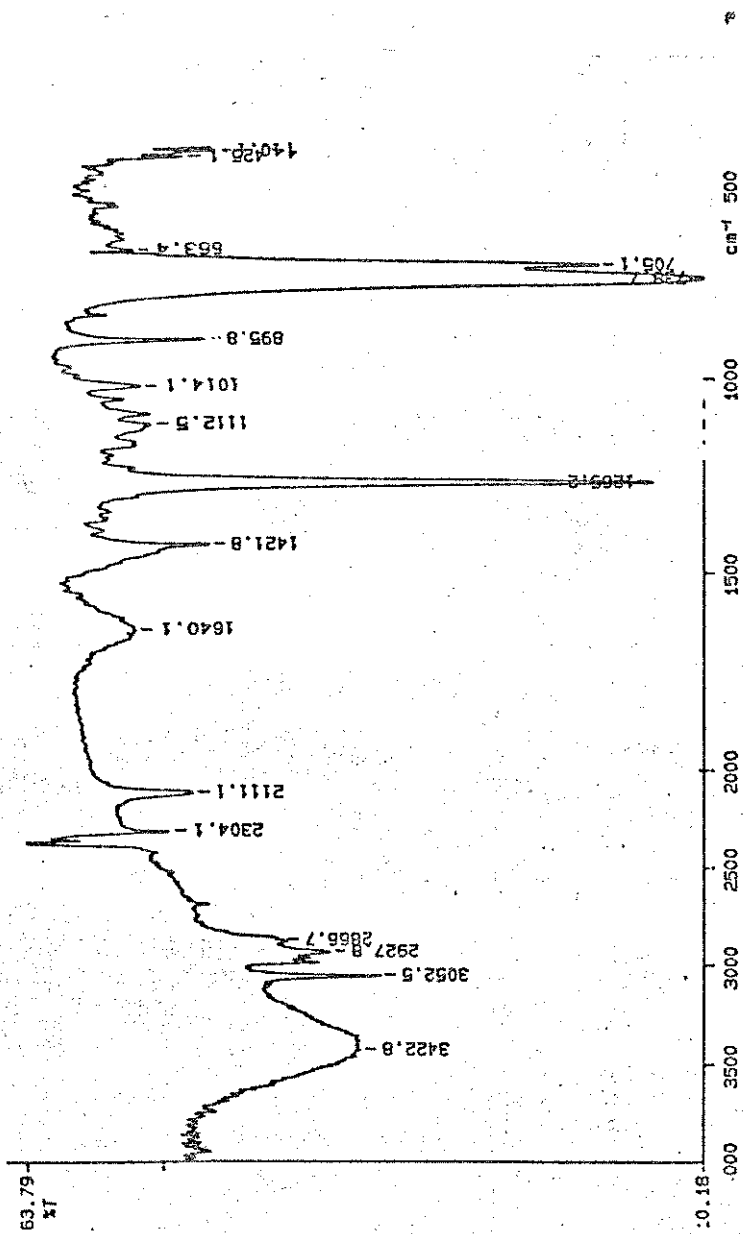


Figura 2.84. Infravermelho de 3a em filme.

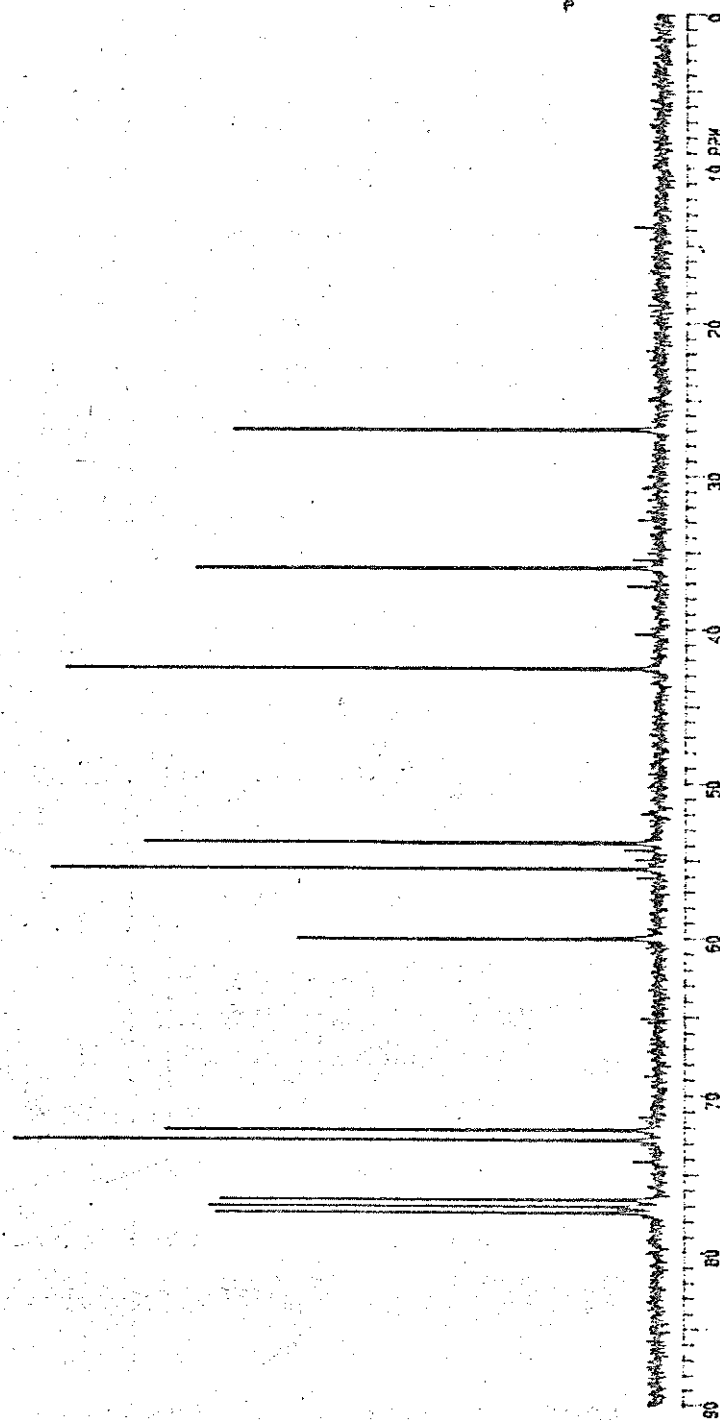
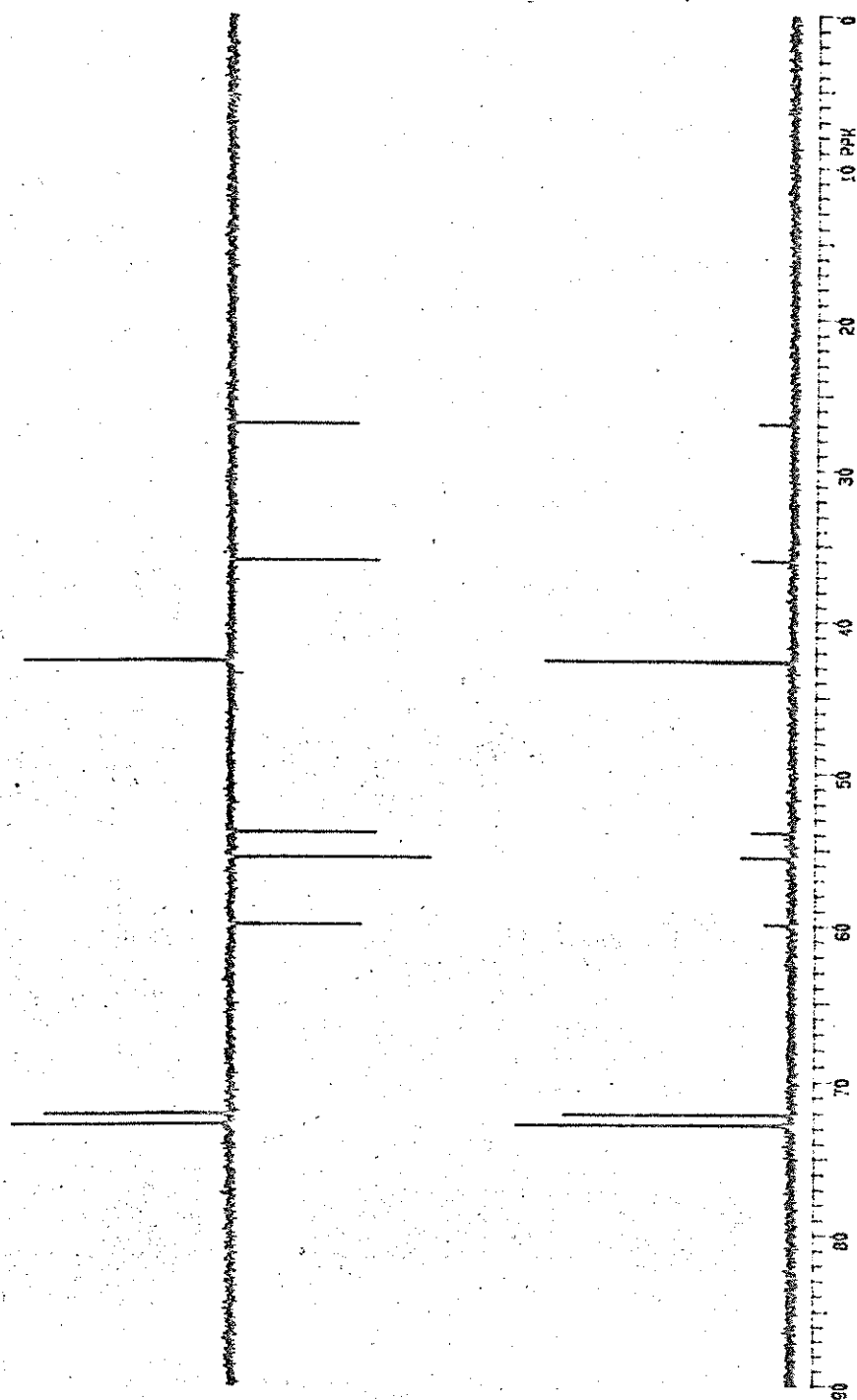


Figura 2.85. RMN¹³C de 3a em CDCl₃ a 75 MHz.

Figura 2.85a. RMN¹³C (DEPT) de 3a em CDCl₃ a 75 MHz.

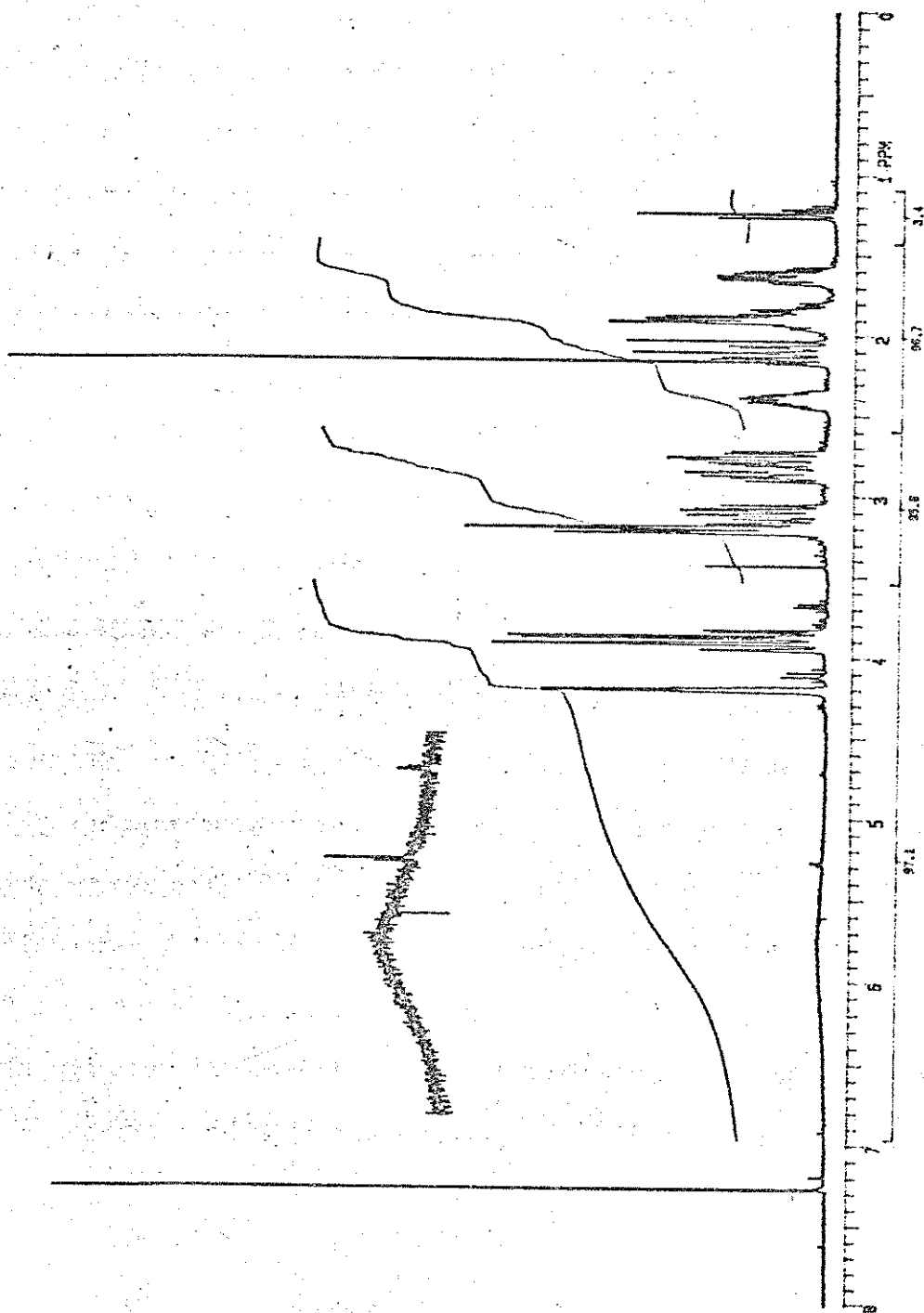


Figura 2.86. RMN^1H de 3a em CDCl_3 a 300 MHz.

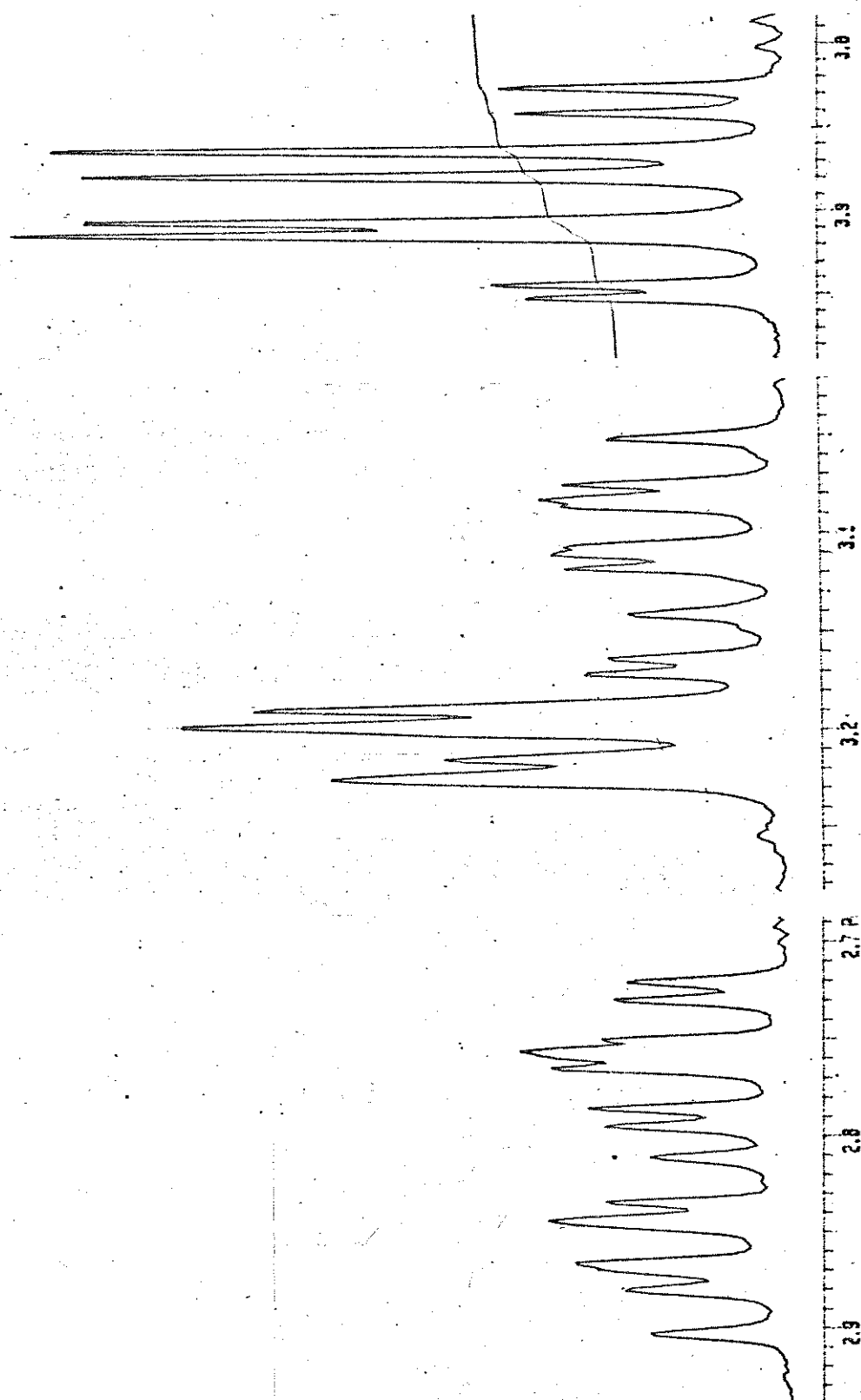


Figura 2.86a. RMN¹H (ampliação) de 3a em CDCl₃ a 300 MHz.

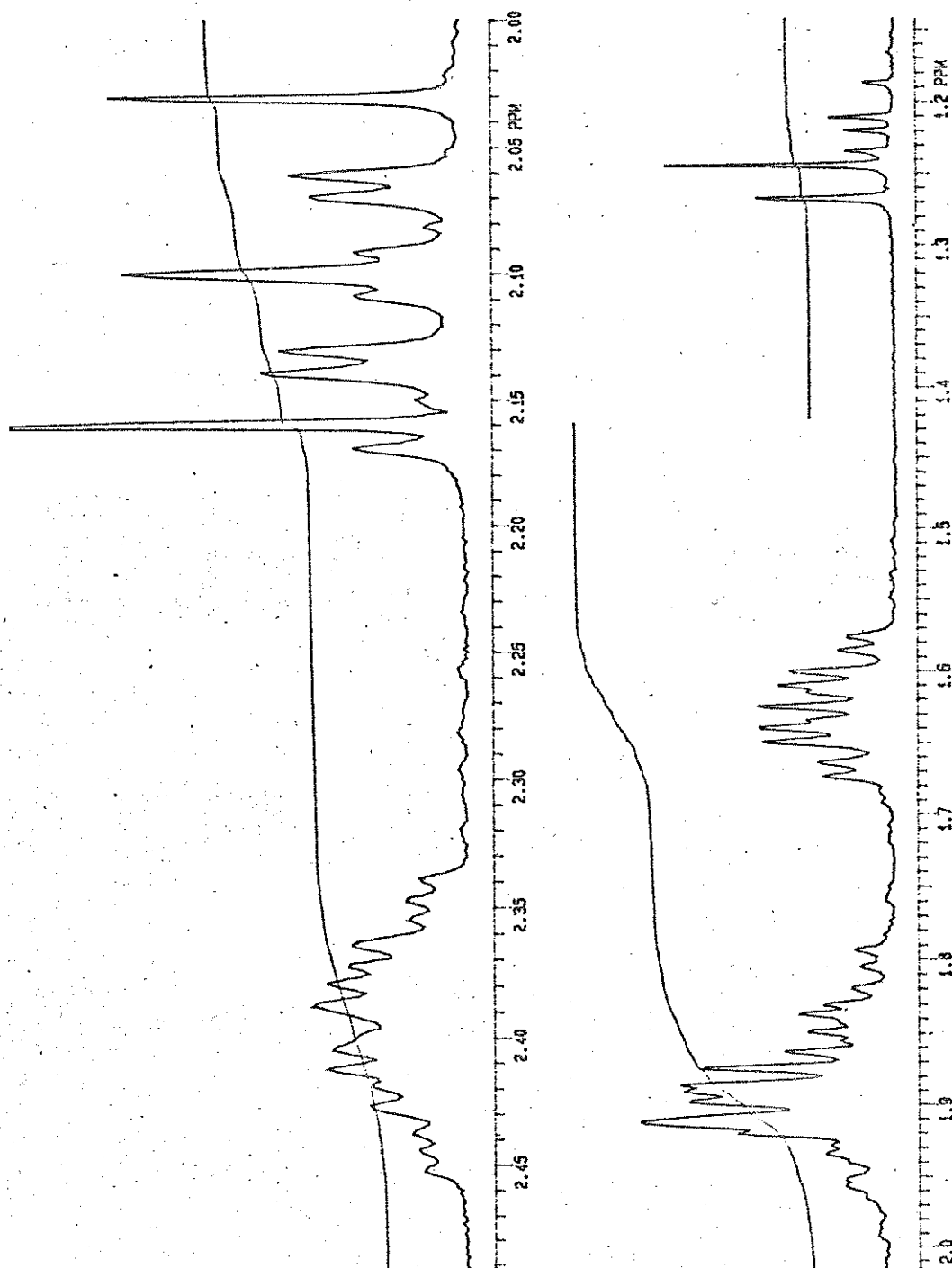


Figura 2.86b. RMN ^1H (ampliação) de 3a em CDCl_3 a 300 MHz.

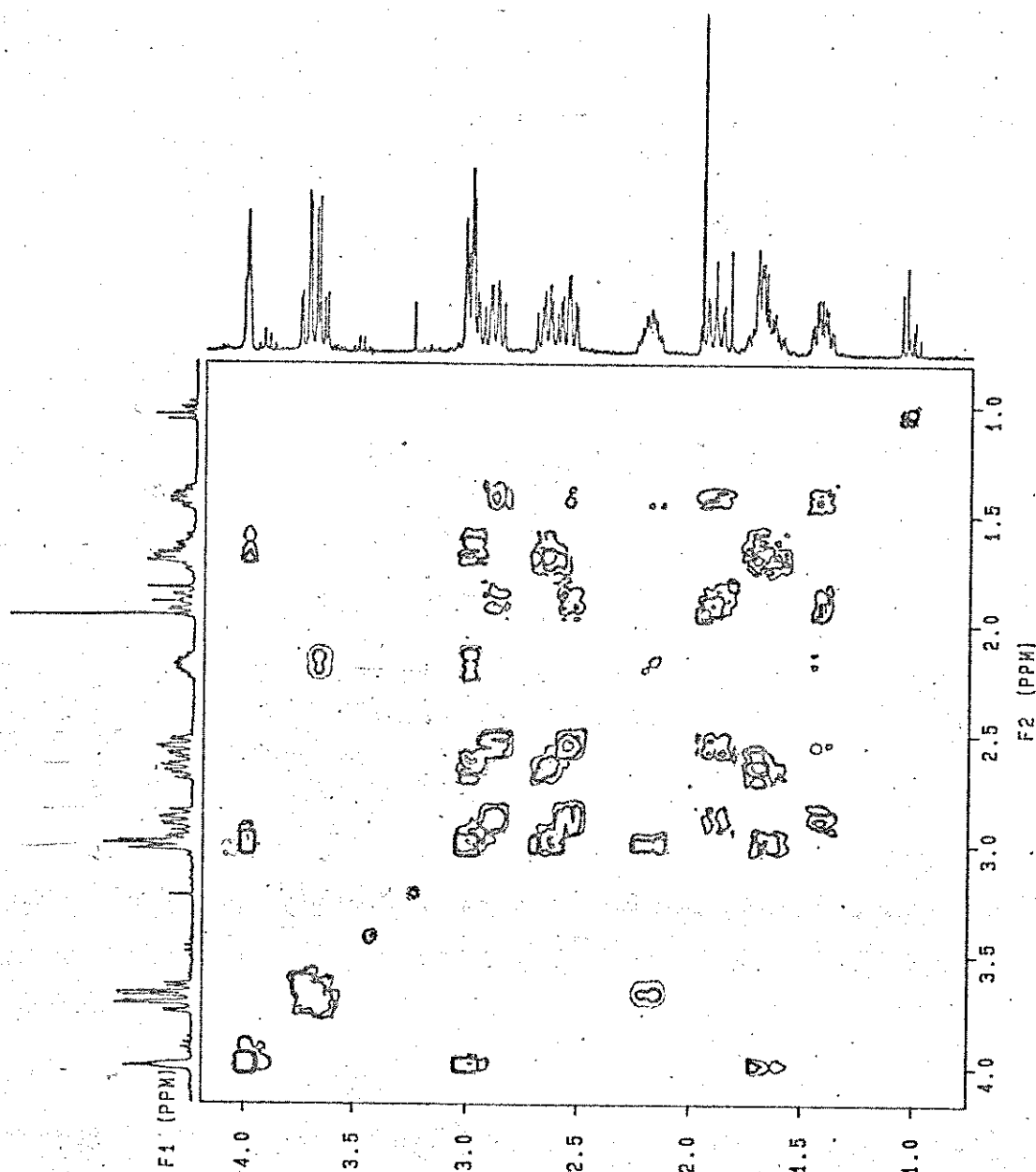


Figura 2.87. COSY (^1H - ^1H) de 3a em CDCl_3 a 300 MHz.

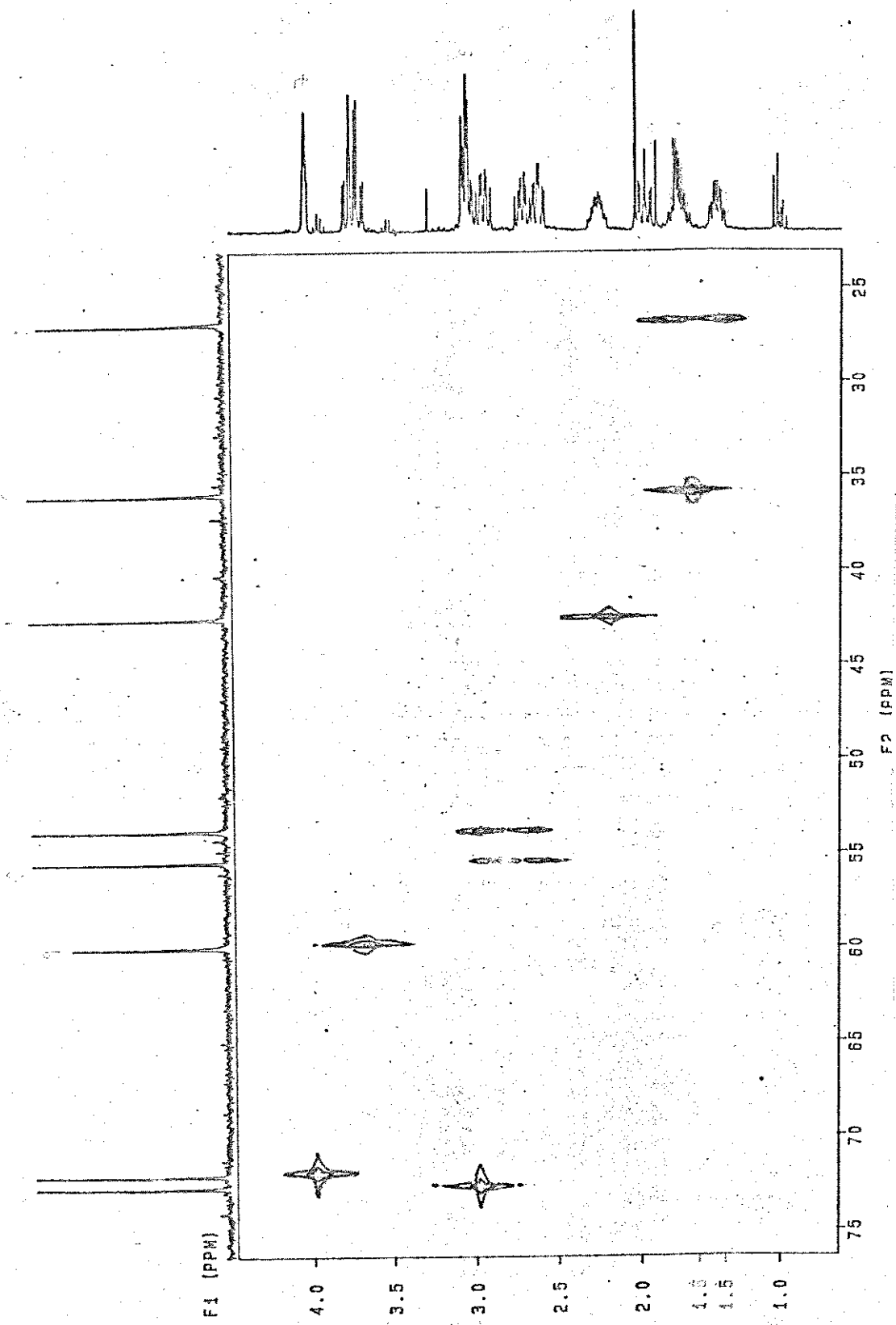


Figura 2.88. HETCOR (^1H - ^{13}C) de 3a em CDCl_3 .

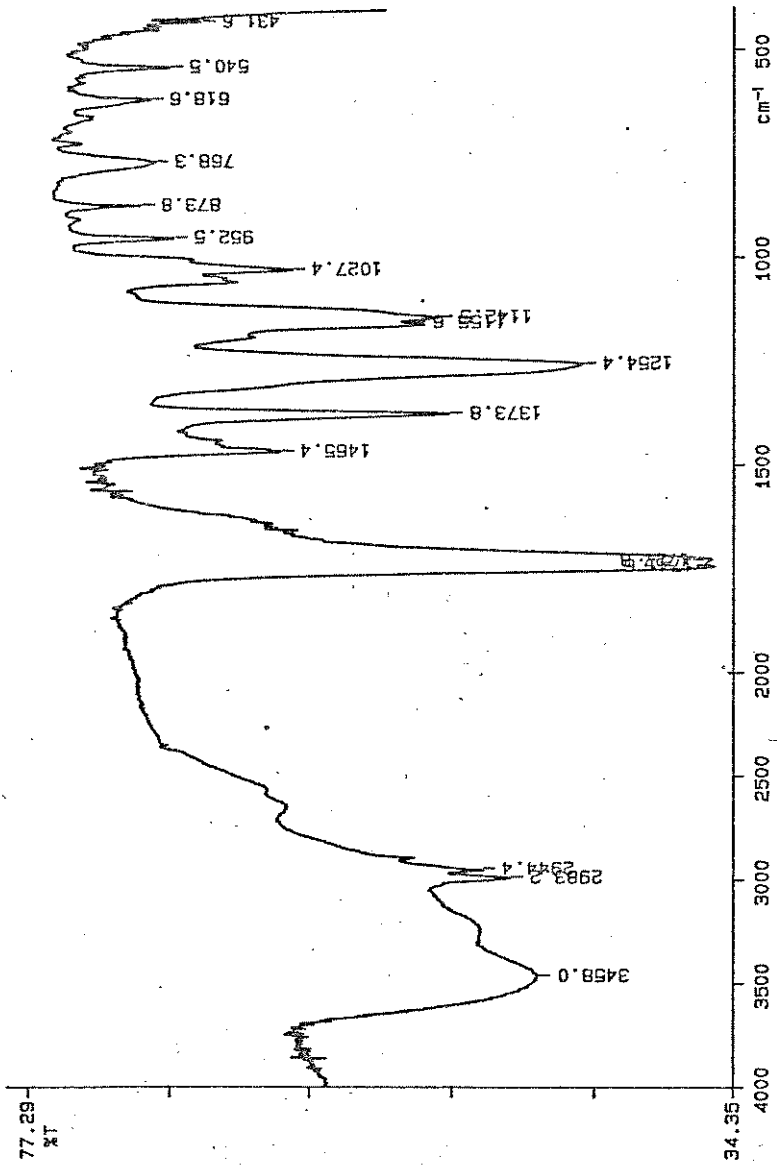


Figura 2.89. Infravermelho de 49 em filme.

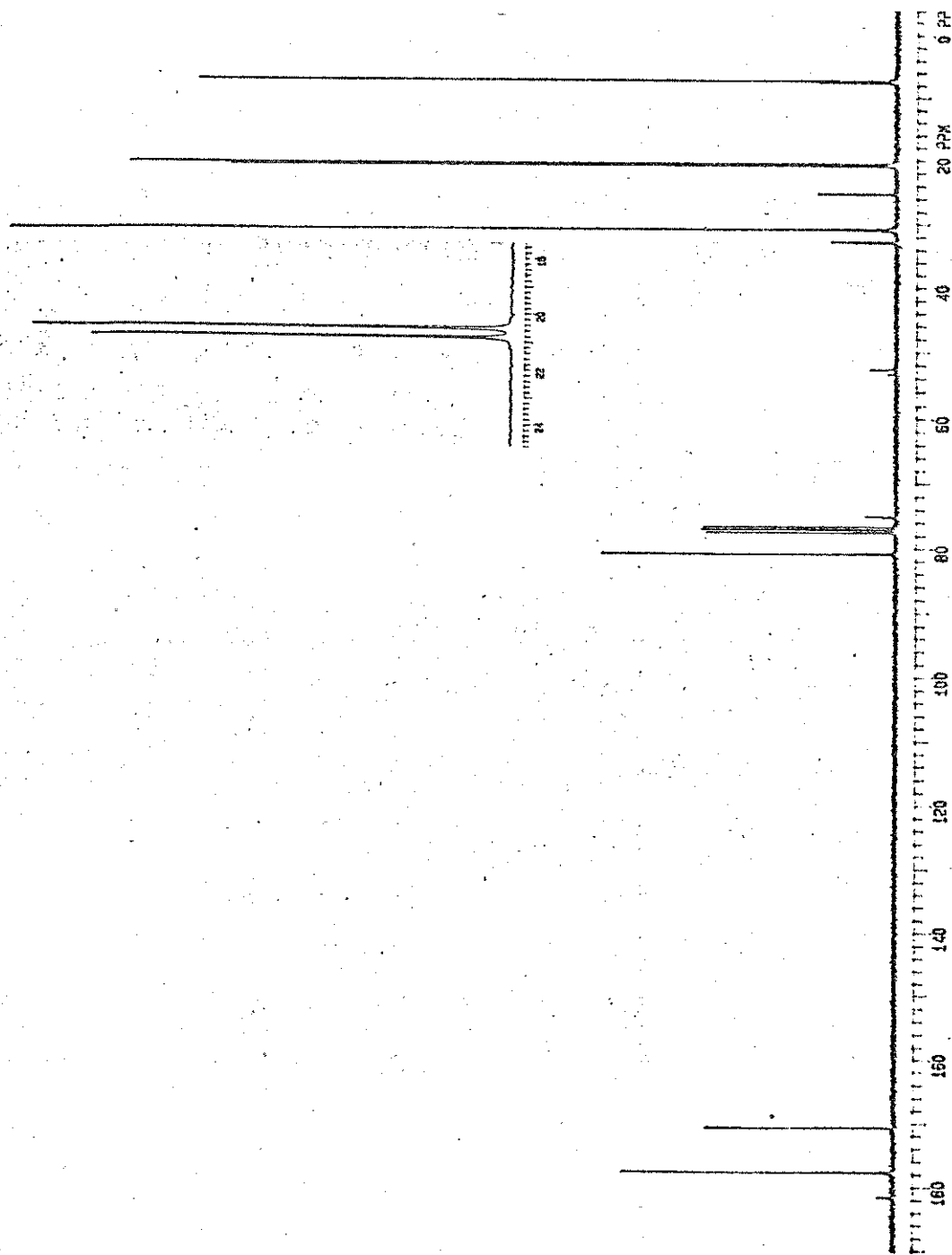


Figura 2.90. RMN¹³C de 49 em CDCl₃ a 75 MHz.

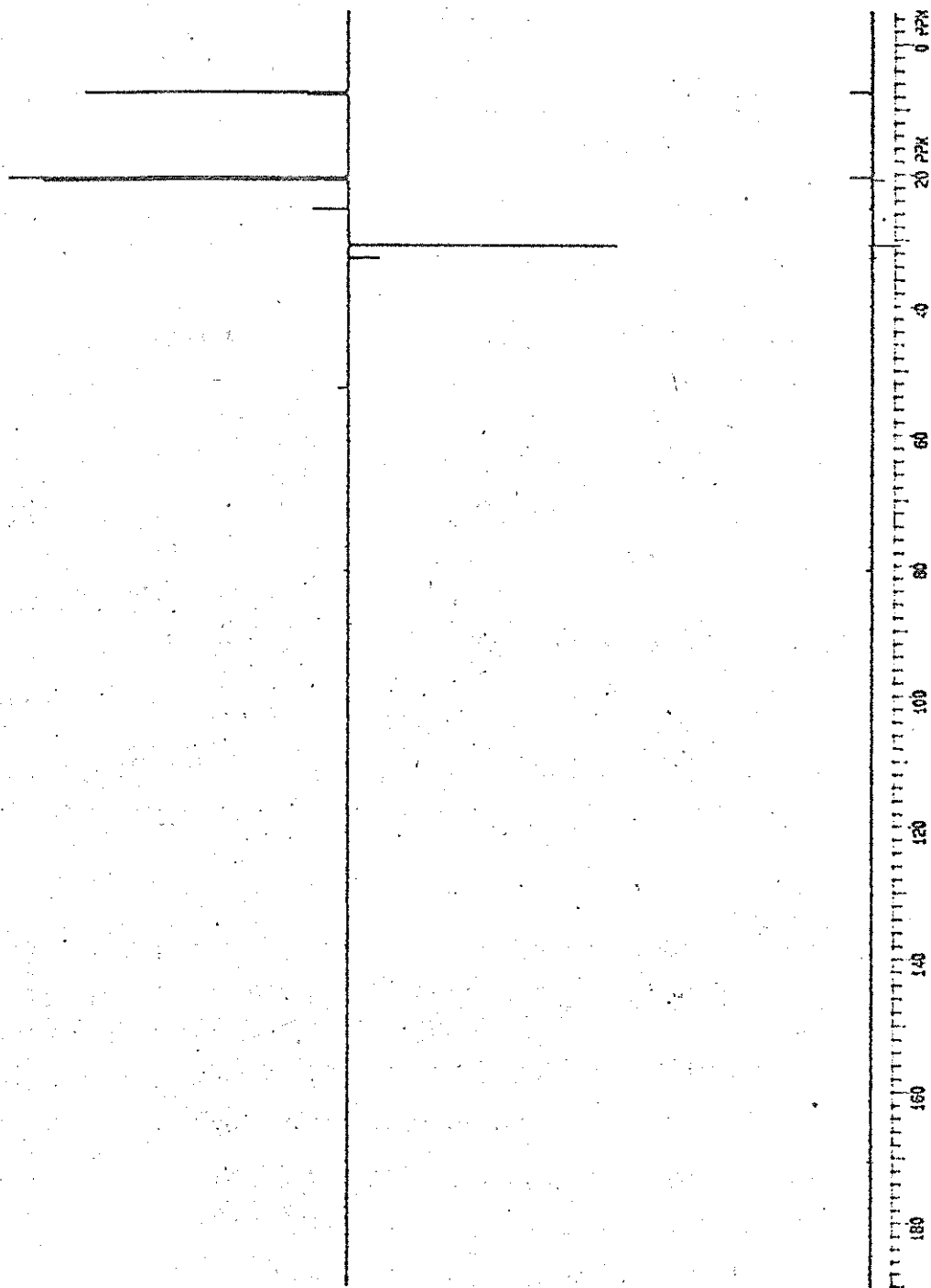


Figura 2.90a. RMN¹³C (DEPT) de 49 em CDCl₃ a 75 MHz.

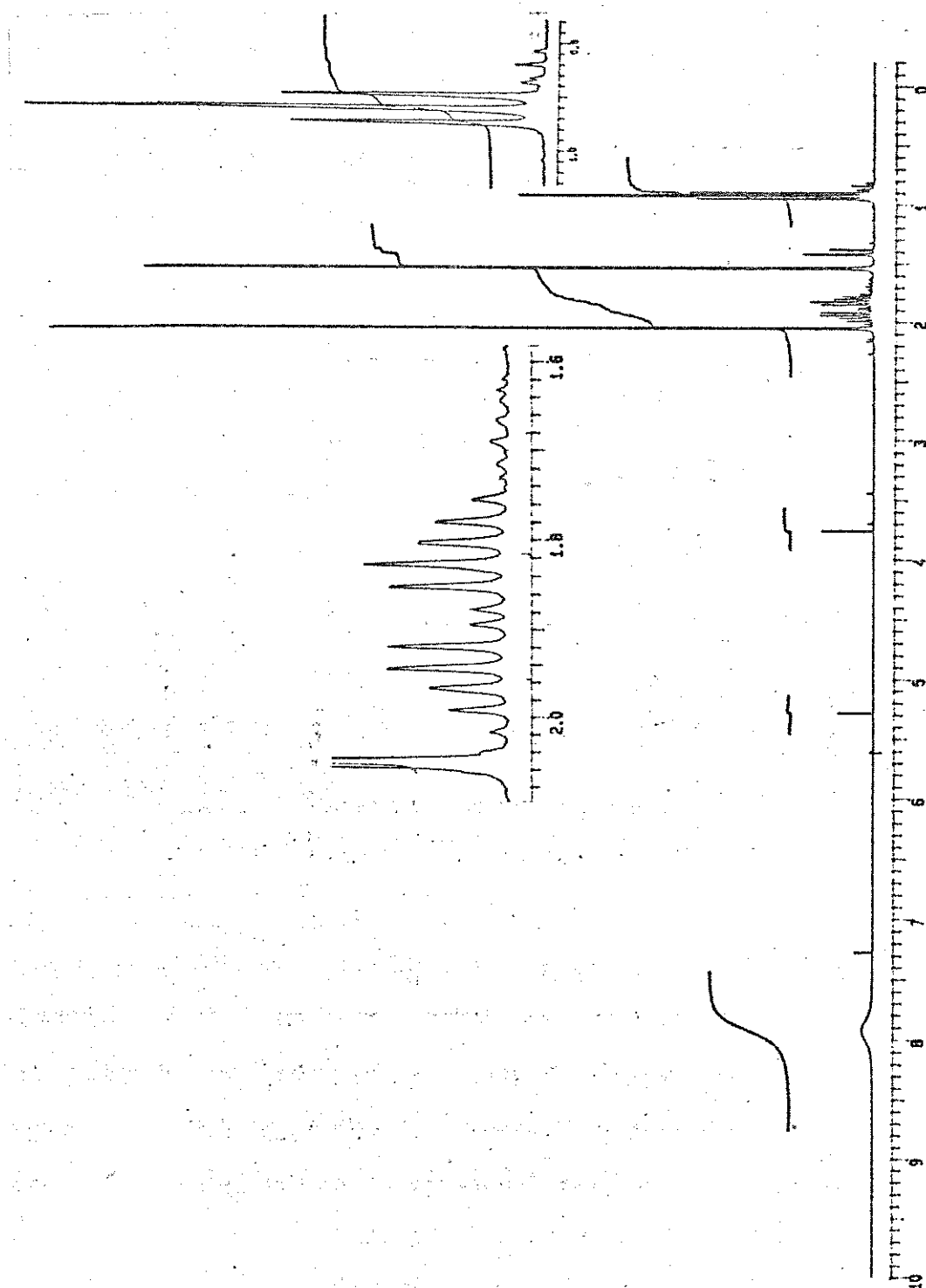


Figura 2.91. RMN^1H de 49 em CDCl_3 a 300 MHz.

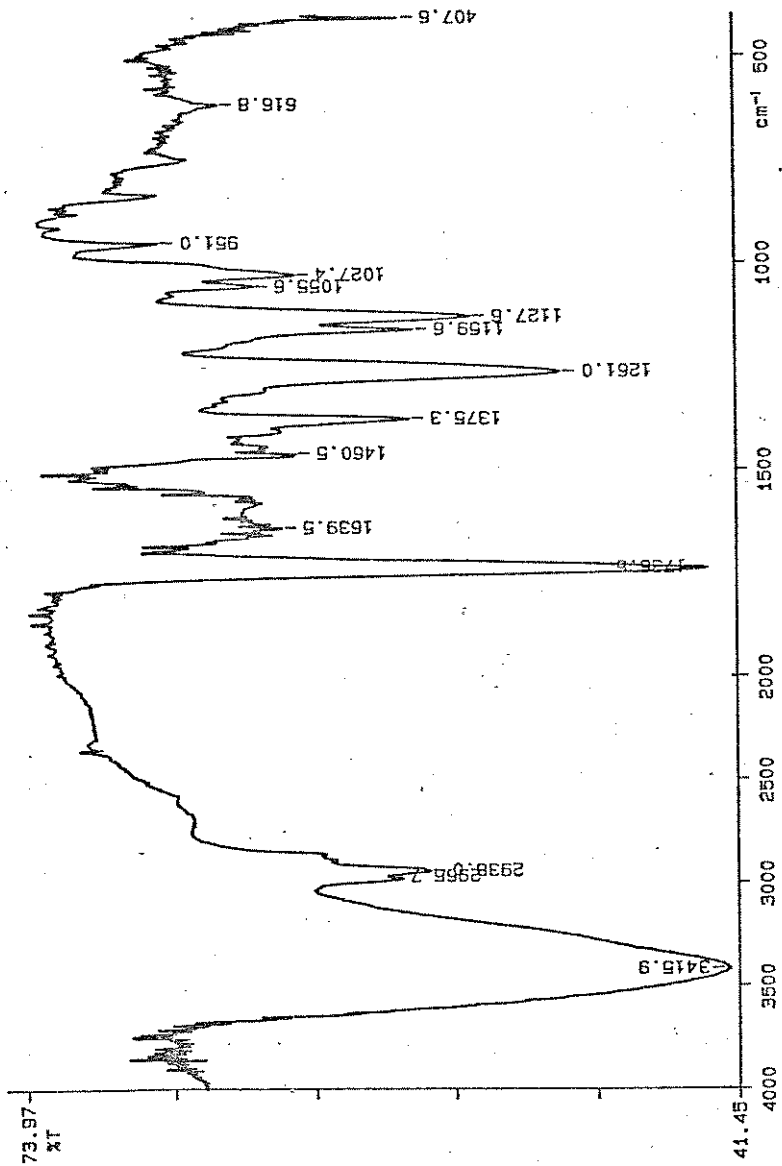
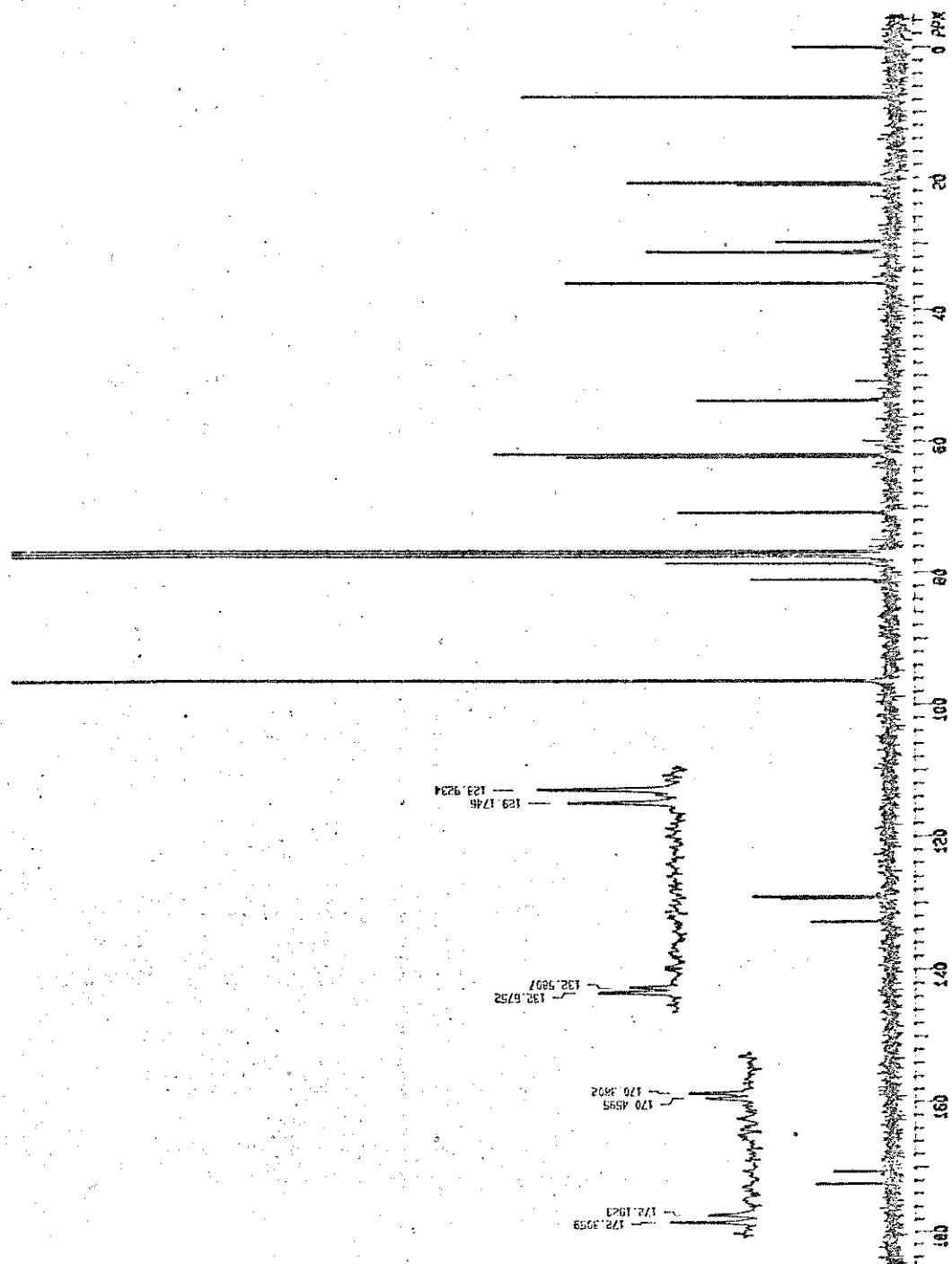


Figura 2.92. Infravermelho de 40a em filme.

Figura 2.93. RMN^{13}C de 40a em CDCl_3 a 75 MHz.

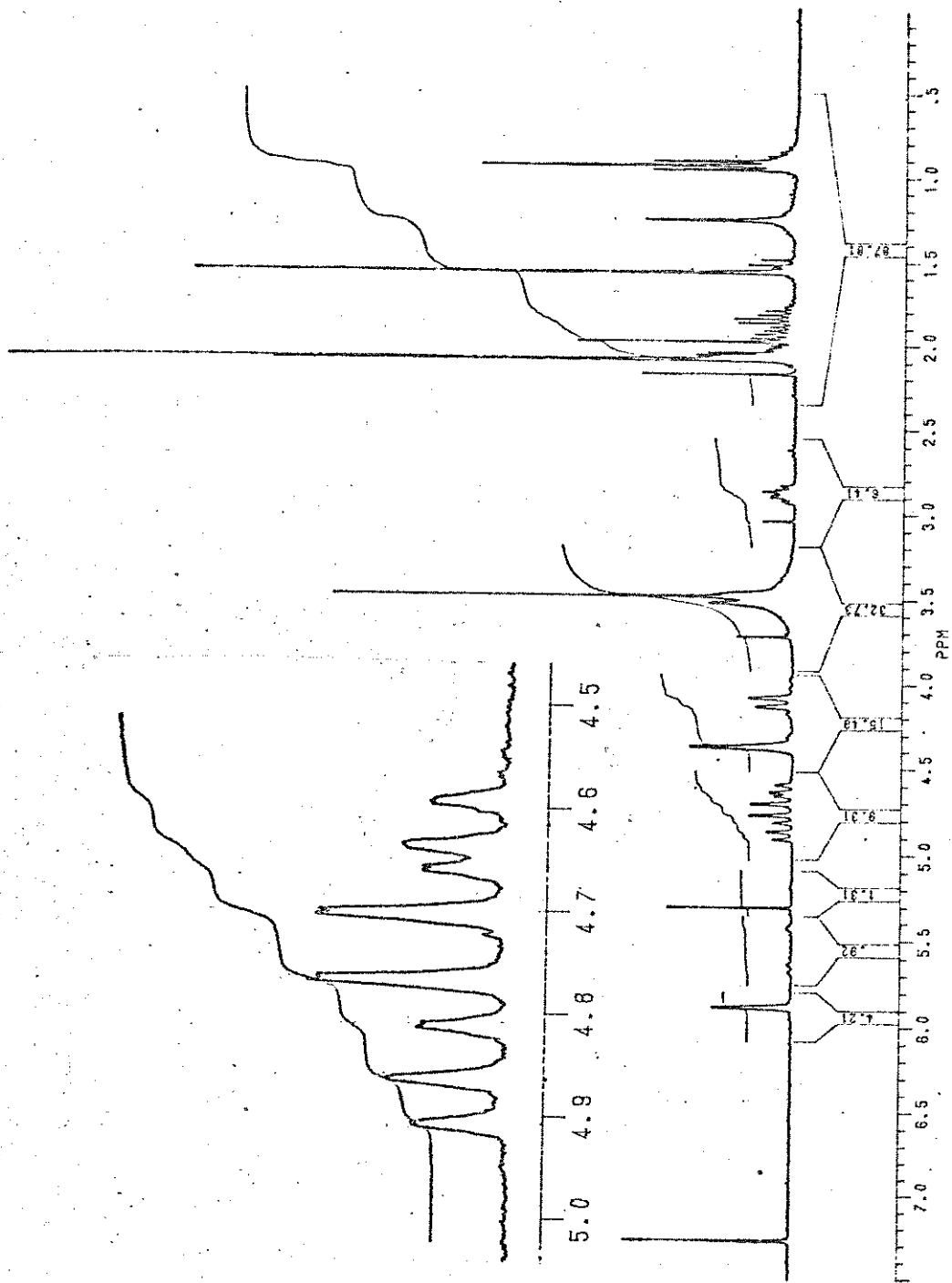


Figura 2.94. RMN^1H de 40a em CDCl_3 a 300 MHz.

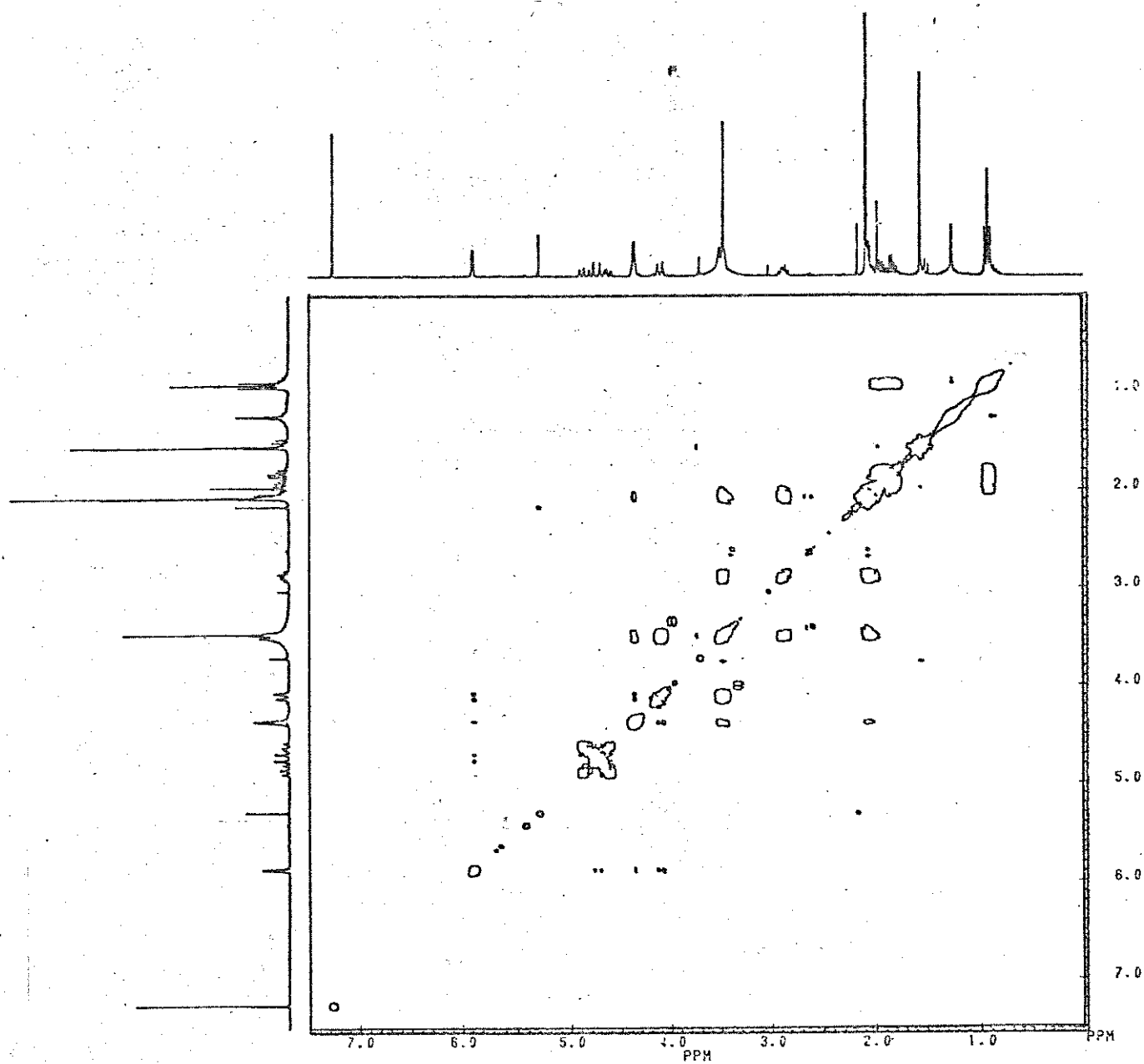


Figura 2.95. COSY (¹H-¹H) de 40a em CDCl₃ a 300 MHz.

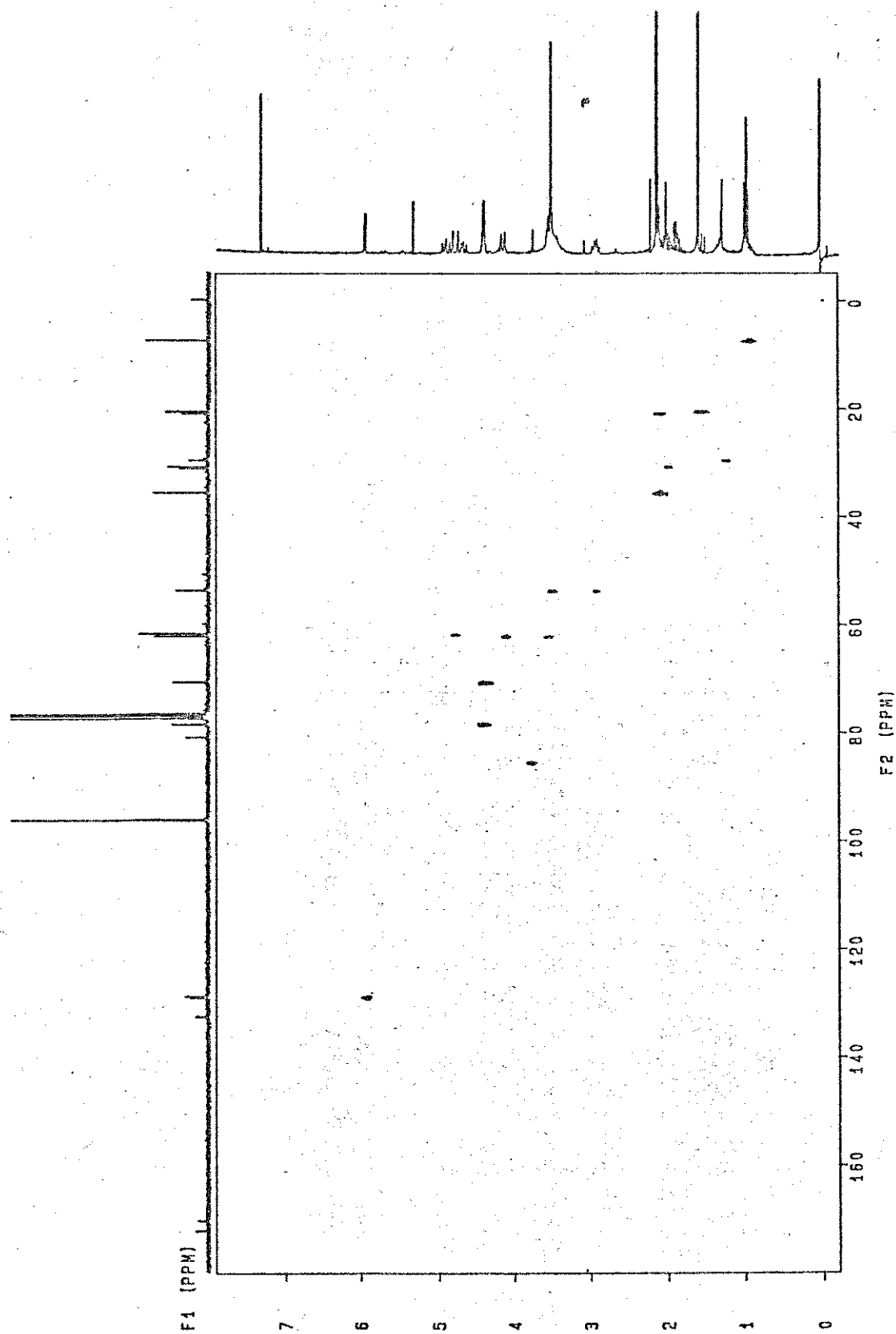
Figura 2.96. HETCOR (¹H-¹³C) de 40a em CDCl₃.

Tabela 1. Variação qualitativa de PAs em partes da planta. Análise por CG-EM (Programa de temperatura 150-300°C, 6°C/min).

Prestonia acutifolia - Mata da Pedra

Alcalóide	IRK	M ⁺	m/z (abundância relativa, %)	
			Raízes	Folhas
15	1967	285	32	ND
13	1975	283	<1	ND
éster de 4	1983	285?	1	ND
éster de 4	1977	?	<1	ND
15	2003	285	<1	ND
16	2025	299	18	ND
16	2036	299	<1	ND
17	2045	297	2	ND
18	2060	327	2	ND
éster de 3	2075	?	<1	ND
éster de 3	2140	?	<1	ND
6	2131	299	ND	7
6	2145	299	ND	45
6	2152	299	<1	14
23	2155	?	<1	ND
6	2172	299	<1	20
19	2178	355	2	ND
éster de 3	2194	?	<1	ND
éster de 4	2218	?	<1	ND
20	2262	369	4	ND
20	2268	369	4	ND
21	2322	367	21	ND
22	2358	381	2	ND
22	2365	381	1	ND
éster de 4	2390	?	<1	ND

Alcalóide	IRK	M ⁺	m/z (abundância relativa, %)	
			Raízes	Folhas
25	2415	385	<1	ND
25	2423	385	<1	ND
éster de 3	2453	?	<1	ND
éster de 3	2458	?	<1	ND
26	2473	383	2	ND
26	2477	383	<1	ND
27	2505	397	1	ND
27	2510	397	<1	ND
32	2815	439	ND	12

Eupatorium pauciflorum - UNICAMP

Alcalóide	IRK	M ⁺	m/z (abundância relativa, %)		
			Raízes	Folhas	Inflorescências
iso 23	1805	239	2	ND	ND
iso 5?	1810	237?	ND	ND	<1
iso 5	1822	237	11	11	ND
iso 5?	1875	237?	<1	ND	ND
15?	1970	285?	<1	ND	ND
13	1978	283	<1	8	84
éster de 2	2005	?	ND	ND	<1
éster de 2	2028	?	ND	ND	<1
14	2067	325	<1	ND	4
6	2131	299?	<1	ND	4
6	2145	299?	ND	ND	<1
6	2152	299?	<1	ND	4
diéster de 1	2182	?	<1	ND	ND
éster de 4	2188	?	<1	ND	ND
éster de 1	2208	?	<1	ND	ND
éster de 1	2226	?	<1	ND	ND
éster de 1	2258	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2275	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2297	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2305	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2342	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2352	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2410	369?	3	ND	ND
diéster de 1	2473	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2477	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2518	?	3	ND	ND
41	2560	397	76	81	3
diéster de 1	2580	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2608	?	2	ND	ND

Alcalóide	IRK	M ⁺	m/z (abundância relativa, %)		
			Raízes	Folhas	Inflorescências
diéster de 1	2648	?	2	ND	ND
diéster de 1	2742	?	<1	ND	ND
diéster de 3	2780	?	<1	ND	ND
diéster de 1	2832	?	<1	ND	ND

BIBLIOGRAFIA

- AASEN, A.J. & CULVENOR, C.C.J. (1969) The saturated pyrrolizidine diols. III. A partial synthesis of turneforcidine. *Aust. J. Chem.*, 22:2657-2662.
- AASEN, A.J. & CULVENOR, C.C.J. & SMITH, L.W. (1969) Spectral studies and the conversion of an ester of dihydroxyheliotridane into the (+) enantiomer of hastanecine. *J. Org. Chem.*, 34:4137-4143.
- ABE, F.; YAMAUCHI, T.; YAGA, S. & MINATO, K. (1991) Pyrrolizidine alkaloids from *Parsonsia laevigata* in Okinawa Island (Studies on *Parsonsia*. V). *Chem. Pharm. Bull.*, 139:1576-1577.
- ACKERY, P.R. (1987) The Danaid Genus *Tellervo* (Lepidoptera, Nymphalidae) - A Cladistic Approach. *Zool. J. Linn. Soc.*, 89:203-274.
- ACKERY, P.R. & VANE-WRIGHT, R.I. (1984) Milkweed Butterflies: Their Cladistics and Biology. British Museum (Natural History), London.
- ADAMS, R. & ROGERS, E.F. (1941) *J. Am. Chem. Soc.*, 63:537-541.
- AHMED, W.; AHMED, Z. & MALIK, A. (1991) The pyrrolizidine alkaloids from *Senecio racemosus*. *Heterocycles*, 32:1729-1736.
- APLIN, R.T. & ROTHSCHILD, M.R. (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 "Toxins of Animal and Plant Origin." Eds. A. DeVRIES & K. KOCHVA. Gordon & Breach. pp. 579-595.
- AMES, M.M. & POWIS, G. (1978) Determination of indicine N-oxide and indicine in plasma and urine by electron-capture gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 166:519-526.
- ASIBAL, C.F.; GLINSKI, J.A.; GELBAUM, L.T. & ZALKOW, L.H. (1989) Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum creticum*. Synthesis of the pyrrolizidine alkaloids echinatine, rinderine, and analogues. *J. Nat. Prod.*, 52:109-118.

- BARTH, F.G. (1985) *Insects and flowers*. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- BATES, H.W. (1862) Contributions to an Insect Fauna of the Amazon Valley, Lepidoptera: Heliconidae. *Trans. Linn. Soc. Lond.*, 23:495-506.
- BELL, T.W.; BOPPRÉ, M.; SCHNEIDER, D. & MEINWALD, J. (1984) Stereochemical course of pheromone biosynthesis in the arctiid moth, *Cretonotos transiens*. *Experientia*, 40:713-714.
- BELL, T.W. & MEINWALD, J. (1986) Pheromones of two arctiid moths (*Cretonotos transiens* and *C. gangis*); chiral components from both sexes and achiral female components. *J. Chem. Ecol.*, 12:385-409.
- BICCHI, C., R.CANIATO, R.TABACCHI AND G.TSOUPRAS. (1989) Capillary gas chromatography/positive and negative ion chemical ionization mass spectrometry on pyrrolizidine alkaloids of *Senecio inaequidens* using ammonia and hydroxyl ions as the reagent species. *J. Nat. Prod.*, 52:32-41.
- BINGLEY, J.B. (1968) Solvent and Temperature Effects in the Determination of Pyrrolizidine Alkaloids with 4-Dimethylaminobenzaldehyde. *Anal. Chem.*, 40:1166-1167.
- BILLER, A.; EHMKE, A.; WITTE, L.; THEURING, C. & HARTMANN, T. (1991) Sequestration and partial biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae*. VII Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology. Dijon, France.
- BLAU, P.A.; FEENY, P.; CONTARDO, L. & ROBSON, D.S. (1978) Allylglucosinolates and herbivorous Caterpillars: a Contrast in Toxicity and Tolerance. *Science*, 200:1296-1298.
- BLUM, M.S. (1974) Deciphering the communicative rosetta stone. *Bull. Ent. Soc. Amer.*, 20:30-35.
- BOPPRÉ, M. (1978) Chemical Communication, Plant Relationships and Mimicry in the Evolution of Danaid Butterflies. *Ent. Exp. & Appl.*, 24:264-277.
- BOPPRÉ, M. (1984) Redefining "pharmacophagy". *J. Chem. Ecol.*, 10:1151-1154.
- BOPPRÉ, M. (1986) Insects pharmacophagously utilizing defensive plant chemicals (pyrrolizidine alkaloids). *Naturwissenschaften*, 73:17-26.

- BOPPRE, M. (1990) Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids. Exemplification of complexity in chemical ecology. *J. Chem. Ecol.*, 16:165-185.
- BOWERS, M.D. (1983) The Role of Iridoid Glycosides in Host-Plant Specificity of Checkerspot Butterflies. *J. Chem. Ecol.*, 9:475-496.
- BOWERS, M.D. (1984) Iridoid Glycosides and Host-Plant Specificity in Larvae of the Buckeye Butterfly, *Junonia coenia* (Nymphalidae). *J. Chem. Ecol.*, 10:1567-1579.
- BRATTSTEN, L.B. (1979) Biochemical Defense Mechanisms in Herbivores Against Plant Allelochemicals. In "Herbivores, Their Interaction with Secondary Plant Metabolites." Eds. ROSENTHAL, G.A. & JANZEN, D.H.. Academic Press, pp. 200-270.
- BREDENKAMP, M.W. (1991) The mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids". Ed. A.M. RIZK, CRC Press, Florida. pp. 147-167.
- BROWER, L.P. (1984) Chemical Defense in Butterflies. In "The Biology of Butterflies. Eds. R.I. VANE-WRIGHT & P.R. ACKERY Academic Press, N.Y.. pp. 111-134..
- BROWER, L.P. & BROWER, J.V.Z. (1964) Birds, Butterflies and Plant Poisons: a Study in Ecological Chemistry. *Zool.*, 49:137-159.
- BROWER, L.P.; BROWER, J.V.Z. & CORVINO, J.M. (1967) Plant Poisons in a Terrestrial Food Chain. *Proc. Nat. Acad. Scien.*, 57:893-898.
- BROWN, F.M. (1968) Richard Middleton Fox. *J. Lep. Soc.*, 22:192-195.
- BROWN, F.M. (1975) An annotated entomological bibliography of Romualdo Ferreira D'Almeida (1891-1969). *J. Lep. Soc.*, 29:40-51.
- BROWN, K.S., JR. (1977a) Geographical Patterns of Evolution in Neotropical Lepidoptera: Differentiation of the Species of *Melinaea* and *Mechanitis* (Nymphalidae, Ithomiinae). *Syst. Ent.*, 2:161-197.
- BROWN, K.S., JR. (1977b) Centros de Evolução, Refúgios Quaternários e Conservação de Patrimônios Genéticos na Região Neotropical: Padrões de Diferenciação em Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Acta Amaz.*, 17:75-137.

- BROWN, K.S., JR. (1980) A Review of the Genus *Hypothyris* Hubner (Nymphalidae), with Descriptions of Three New Subspecies and Early Stages of *H. daphnis*. *J. Lep. Soc.*, 34:152-172.
- BROWN, K.S., JR. (1984) Adult-Obtained Pyrrolizidine Alkaloids Defend Ithomiine Butterflies Against a Spider Predator. *Nature*, 307:707-709.
- BROWN, K.S., JR. (1985) Chemical Ecology of Dehydropyrrolizidine Alkaloids in Adult Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Rev. Bras. Biol.*, 44:435-460.
- BROWN, K.S., JR. (1987) Chemistry at the Solanaceae/Ithomiinae Interface. *Ann. Missouri Bot. Gard.*, 74:359-397.
- BROWN, K.S. & D'ALMEIDA, R.F. (1970) The Ithomiinae of Brazil (Lepidoptera: Nymphalidae). II. A New Genus and Species of Ithomiinae with Comments on the Tribe Dircennini D'Almeida. *Trans. Am. Ent. Soc.*, 96:1-17.
- BROWN, K.S., JR.; MIELKE, O.H.H. & EBERT, H. (1970) Os Ithomiinae do Brasil (Lepidoptera: Nymphalidae). I. *Prittwitzia* G.N. para *Ithomyia hymenaea* Prittwitz e suas Subespécies. *Rev. Bras. Biol.*, 30:269-273.
- BROWN, K.S., JR. & VASCONCELOS-NETO, J. (1976) Predation of Aposematic Ithomiinae Butterflies by Tanagers (*Pipraeidea melanonota*). *Biotropica*, 8:136-141.
- BROWN, K.S. JR.; TRIGO, J.R.; FRANCINI, R.B.; MORAIS, A.B.B. & MOTTA, P.C. (1991) Aposematic Insects on Toxic Host Plants: Coevolution, Colonization, and Chemical Emancipation. In "Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions". Eds. PRICE, P.W.; LEWINSOHN, T.M.; FERNANDES, J.W. & BENSON, W.W., John Wiley & Sons, Inc., pp. 375-402.
- BROWN, P. & DJERASSI, C. (1967) Elektronestoß-induzierte Umlagerungen organischer Moleküle. *Ang. Chem.*, 11:481-540.
- CAVA, M.P.; RAO, K.V.; WEISBACH, J.A.; RAFFAUF, R.F. & DOUGLAS, B. (1968) The alkaloids of *Cacalia floridana*. *J. Org. Chem.*, 33:3570-3573.
- CHALMERS, A.H.; CULVENOR, C.C.J. & SMITH, L.W. (1965) Alkaloids of *Amsinckia* species - *A. intermedia*, *A. hispida* and *A. lycopsioides*. *J. Chromatogr.*, 20:270.
- COIMBRA-FILHO, A.F. (1981) Animais Predados ou Rejeitados pelo Sauri-Piranga, *Leontopithecus r. rosalia* (L., 1766) na sua area de ocorrência primitiva (Callitrichidae: Primates). *Rev. Bras. Biol.*, 4:717-731.

- CONNER, W.E.; EISNER, T.; VANDER MEER, R.K; GUERRERO, A. & MEINWALD, J. (1981) Precopulatory sexual interaction in an arctiid moth (*Utetheisa ornatrix*): role of a pheromone derived from dietary alkaloids. *Behav. Ecol. Sociobiol.*, 9:227-235.
- CROUT; D.H.G. (1969) Structures of axillarine and axillaridine, novel pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria axillaris* Ait.. *J. Chem. Soc. (C)*., 1379.
- CROWLEY, H.C. & CULVENOR, C.C.J. (1959) The alkaloids of *Heliotropium supinum* L., with observations of viridifloric acid. *Aust. J. Chem.*, 12:694-705.
- CULVENOR, C.C.J. (1966) *Tetrahedron Lett.*, 1091-1099.
- CULVENOR, C.C.J.; MORRISON, J.D.; NICHOLSON, A.J.C. & SMITH, L.W. (1962) Alkaloids of *Crotalaria trifoliastrum* Willd. II. 1-methoxymethyl-1,2-epoxypyrrolizidine. *Aust. J. Chem.* 16:131-135.
- CULVENOR, C.C.J.; HEFFERNAN, M.L. & WOODS, W.G. (1965) Nuclear magnetic resonance spectra of pyrrolizidine alkaloids. I. The spectra of retronecine and heliotridine. *Aust. J. Chem.*, 18:1605-1624.
- CULVENOR, C.C.J. & WOODS, W.G. (1965) Nuclear magnetic resonance spectra of pyrrolizidine alkaloids. II. The pyrrolizidine nucleus in ester and non-ester alkaloids and their derivatives. *Aust. J. Chem.*, 18:1625-1637.
- CULVENOR, C.C.J. & SMITH, L.W. (1966) The alkaloids of *Amsinckia* Species: *A. intermedia* Fisch & Mey., *A. hispida* (Ruiz & Pav.) Johnston and *A. lycopsoides* Lehm. *Austr. J. Chem.*, 19:1955-1964.
- CULVENOR, C.C.J. & SMITH, L.W. (1967) The alkaloids of *Cynoglossum australe* R.Br. and *C. amabile* Stapf & Drummond. *Aust. J. Chem.*, 20:2499-2503.
- CULVENOR, C.C.J.; KORETSKAYA, N.I.; SMITH, L. & UTKIN, L.M. (1968) The structures of the pyrrolizidine alkaloids neoplatyphilline and hastanecine. *Aust. J. Chem.*, 21:1671-1673.
- CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A.; SMITH, L.W. & TWEEDDALE, H.J. (1969) Dihydropyrrolizine analogue of pyrrolizidine alkaloids. *Tetrahedron Lett.*, 41:3599-3602.

- CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A.; SMITH, L.W. & TWEEDDALE, H.J. (1970a) Dihydropyrrolizines. III. Preparation and reactions of derivatives related to pyrrolizidine alkaloids. *Aust. J. Chem.* 23:1853-1857.
- CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A.; SMITH, L.W. & TWEEDDALE, H.J. (1970b) Dihydropyrrolizidines. IV. Manganese Dioxide Oxidation of 1,2-dehydropyrrolizidines. *Austr. J. Chem.*, 23:1869-1879.
- CULVENOR, C.C.J.; CROUT, D.J.; KLYNE, W.; MOSE, W.P.; RENWICK, J.D. & SCOPES, P.M. (1971) Circular dichroism of pyrrolizidine alkaloids and related compounds. *J. Chem. Soc. (C)*, 3653-3664.
- CULVENOR, C.C.J. & EDGAR, J.A. (1972) Dihydropyrrolizine secretions associated with coremata of *Utetheisa* moths (Family Arctiidae). *Experientia*, 28:627-628.
- DAI, W.M.; NAGAO, Y. & FUJITA, E. (1990) Recent progress in asymmetric synthesis of pyrrolizidines. *Heterocycles*, 30:1231-1261.
- DEINZER, M.; THOMSON, P; GRIFFIN, D. & DICKISON, E. (1978) A sensitive analytical method for pyrrolizidine alkaloids. The mass spectra of retronecine derivatives. *Biomed. Mass Spectrom.*, 5:175-179.
- DEVRIES, P.J. & STILES, F.G. (1990) Attraction of Pyrrolizidine Alkaloid Seeking Lepidoptera to *Epidendrum paniculatum* Orchids. *Biotropica*, 22:290-297.
- DRUMMOND III, B.A. (1976) Comparative Ecology And Mimetic Relationships of Ithomiine Butterflies in Eastern Ecuador. PhD Thesis, University of Florida page xvi + 361 pp.
- DRUMMOND III, B.A. (1986) Coevolution of Ithomiine Butterflies and Solanaceous plants. In "Solanaceae, Biology and Systematics." Eds. W.G.D'ARCY Columbia University Press, NY, pp. 307-327.
- DRUMMOND III, B.A. & BROWN, K.S. JR. (1987) Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae): Summary of Known Larval Foodplants. *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 74: 341-358.
- DUSSOURD, D.E.; UBIK, K.; HARVIS, C.; RESCH, J.; MEINWALD, J. & EISNER, T. (1988) Biparental defensive endowment of eggs with acquired plant alkaloid in the moth *Utetheisa ornatatrix*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5992-5996.

- EDGAR, J.A. (1975) Danainae (Lep.) and 1,2-dehydropyrrolozidine Alkaloid-containing Plants - with Reference to Observations made in the New Hebrides. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 272:467-476.
- EDGAR, J.A. (1982) Pyrrolizidine Alkaloids Sequestered by Solomon Island Danainae Butterflies. The Feeding Preferences of the Danainae and Ithomiinae. *J. Zool. Lond.*, 196:385-399.
- EDGAR, J.A. (1984) Parsonsieae: Ancestral Larval Foodplants of the Danainae and Ithomiinae. In "The Biology of Butterflies." Eds. ACKERY, P.A. & VANE-WRIGHT, R.I. Academic Press. pp. 91-96.
- EDGAR, J.A.; CULVENOR, C.C.J. & ROBINSON, G.S. (1973) Hairpencil dihydropyrrolizidines of Danainae the New Hebrides. *J. Austr. Ent. Soc.*, 12:144-150.
- EDGAR, J.A. & CULVENOR, C.C.J. (1975) Pyrrolizidine Alkaloids in *Parsonsia* Species (Family Apocyanaceae) which Attract Danaid Butterflies. *Experientia*, 31:393-394.
- EDGAR, J.A.; CULVENOR, C.C.J. & PLISKE, T.E. (1974) Coevolution of Danaid butterflies with their host plants. *Nature, London* 250:646-648.
- EDGAR, J.A.; CULVENOR, C.C.J. & PLISKE, T.E. (1976) Isolation of a Lactone Structurally Related to the Esterifying Acids of Pyrrolizidine Alkaloids from the Coastal Fringes of Male Ithomiinae. *J. Chem. Ecol.*, 2:263-270.
- EDGAR, J.A.; BOPPRE, M. & SCHNEIDER, D. (1979) Pyrrolizidine Alkaloid Storage in African and Australian Danaid Butterflies. *Experientia*, 35:1447-1448.
- EDGAR, J.A.; EGGERS, N.J.; JONES, A.J. & RUSSEL, G.B. (1980a) Unusual Macrocyclic pyrrolizidine Alkaloids from *Parsonsia heterophylla* A. Cunn and *Parsonsia spiralis* Wall. (Apocynaceae). *Tetrahedron Lett.*, 21:2657-2660.
- EDGAR, J.A.; CULVENOR, C.C.J.; COCKRUM, P.A.; SMITH, L.W. & ROTHSCHILD, M. (1980b) Callimorphine: identification and synthesis of the cinnabar moth "metabolite". *Tetrahedron Lett.*, 21:1383-1384.
- EHMKE, A.; WITTE, L.; BILLER, A. & HARTMANN, T. (1990) Sequestration, N-oxidation and transformation of plant pyrrolizidine alkaloids by the arctiid moth *Tyria jacobaeae* L.. *Z. Naturforsch.*, 45c:1185-1192.
- EHRlich, P.R. & BIRCH, L.C. (1967) The balance of nature and population control. *Am. Nat.* 101:97-107.

- EHRlich, P.R. & EHRlich, A.H. (1967) How to know the butterflies. Ed. W.M.C. BROWN, Co. Publishers, Dubuque, Iowa, 262 pp.
- EHRlich, P.R. & RAVEN, P.H. (1965) Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, 18:586-608.
- EISNER, T. (1982) For love of nature: exploration and discovery at biological field stations. *Bioscience*, 32:321-326.
- EISNER, T. & EISNER, M. (1991) Unpalatability of the pyrrolizidine alkaloid-containing moth *Utetheisa ornatrix*, and its larva, to wolf spiders. *Psyche*, 98:111-118.
- EVANS, J.V.; PENG, A. & NIELSEN, C.J. (1979) The gas chromatographic mass spectrometric analysis of the new antitumor drug Indicine N-oxide utilizing a novel reaction accompanying trimethylsilylation. *Biomed. Mass Spectrom.*, 6:38-43.
- EVANS, J.V.; DALEY, S.K.; McCLUSKY, G.A. & NIELSEN, C.J. (1980) Direct quantitative analysis of indicine N-oxide in cancer patient samples by gas chromatography using the internal standard heliotrine-N-oxide including a mass spectral comparison of their trimethylsilyl derivatives. *Biomed. Mass Spectrom.*, 7:65-73.
- FEENY, P. (1970) Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring by winter moth caterpillars. *Ecology*, 51:565-581.
- FEENY, P. (1975) Biochemical coevolution between plants and their insect herbivores. In "Coevolution of animals and plants." Eds. GILBERT, L.E. & RAVEN, P.H. Univ. of Texas Press, Austin and London pp. 3-19.
- FEENY, P.; ROSENBERRY, L. & CARTER, M. (1983) Chemical aspects of ovoposition behavior in butterflies. In "Herbivorous insects: Host-seeking behavior and mechanisms." Eds. AHMAD, S. Academic Press, N.Y. pp. 27-76.
- FLEET, G.W.J.; SEIJAS, J.A. & VÁZQUEZ-TATO, M.P. (1991) Synthesis of the necine base platynecine from glucose. *Tetrahedron Lett.* 47:525-530.
- FOX, R.M. (1949) The evolution and systematics of the Ithomiidae (Lepidoptera). *Univ. Pittsburgh, Bull.*, 45:1-12.
- FOX, R.M. (1967) A monograph of the Ithomiidae (Lepidoptera). Part III. The tribe Mechanitini Fox. *Am. Ent. Soc., Mem.*, 22:190pp.

- FOX, R.M. & REAL, H.G. (1971) A monograph of the Ithomiidae (Lepidoptera). Part IV. The tribe Napeogenini Fox. *Am. Ent. Inst., Mem.*, 15:368pp.
- FRAENKEL, G.S. (1959) The raison d'être of secondary plant substances. *Science*, 129:1466-1470.
- FRAHN, J.L.; CULVENOR, C.C.J. & MILLS, J.A. (1980) Preparative separation of the pyrrolizidine alkaloids intermedine and lycopsamine, as their borate complexes. *J. Chromatogr.*, 195:397-383.
- FRANCKE, W.; SCHULZ, S.; SINNWELL, V.; KÖNIG, W.A. & ROISIN, Y. (1989) Epoxytetrahydroedulan, a new terpenoid from the hairpencils of *Euploea* (Lep.: Danainae) butterflies. *Liebings Ann. Chem.*, 1195-1201.
- FURUYA, T. & ARAKI, K. (1968) Studies on constituents of crude drugs. I. Alkaloids of *Symphytum officinale* Linn. *Chem. Phar. Bull.*, 16:2512-2516.
- FUTUYMA, D.J. (1983) Evolutionary Interactions among Herbivorous Insects and Plants. In "Coevolution." Eds. FUTUYMA, D.J. & SLATKIN, M. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA pp. 207-231.
- GILBERT, L.E. & EHRLICH, P.R. (1970) The affinities of the Ithomiinae and Satyrinae (Nymphalidae). *J. Lep. Soc.*, 24:297-300.
- GOULD, S.J. & VRBA, E. (1982) Exaptation - a missing term in the science of form. *Paleobiology*, 8:4-15.
- HABER, W.A. (1978) Evolutionary Ecology of Tropical Mimetic Butterflies (Lepidoptera: Ithomiinae). PhD Thesis, University of Minnesota, xii + 257 pp.
- HAIRSTON, N.G.; SMITH, F.E. & SLOBODKIN, L.B. (1960) Community, structure, population control and competition. *Am. Nat.* 94:421-425.
- HARBORNE, J.B. (1988) Introduction to ecological biochemistry. 3^o Ed. Academic Press.
- HARBORNE, J.B. (1989) Recent Advances in Chemical Ecology. *Nat. Prod. Rep.*, 6:85-109.
- HARTMANN, T. (1988) Quinolizidines and pyrrolizidines. In "Cell culture and somatic cell genetics of plants." Vol. 5. Eds. F. CONSTABEL & I.K. VASIL. Academic Press, San Diego, CA. pp. 277-288.

- HARTMANN, T. & 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.; SANDER, H.; ADOLPH, R. & TOPPEL, G. (1988) Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta*, 175:82-90.
- HARTMANN, T.; BILLER, A.; WITTE, L.; ERNST, L. & BOPPRE, M. (1990) Transformation of plant pyrrolizidine alkaloids into novel insect alkaloids by arctiid moths (Lepidoptera). *Biochem. Syst. Ecol.*, 18:549-554.
- HENDRIKS, H.; HUIZING, H.J. & BRUINS, A.P. (1988) Ammonium positive-ion and hydroxide negative-ion chemical ionization gas chromatography mass spectrometry for the identification of pyrrolizidine alkaloids in *Eupatorium rotundifolium* L. var. *ovatum*. *J. Chromatogr.*, 428:352.
- HENDRIKS, H.; BRUINS, A.P. & HUIZING, H.J. (1991) Positive ion and negative ion chemical ionization mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally Occurring Pyrrolizidine Alkaloids". Ed. A.F.M. RIZK, CRC Press, USA, pp.170-190.
- HUIZING, H.J.; BOER, F.; HENDRIKS, H.; BALRAADJSING, W. & BRUINS, A.P. (1986) Positive and negative ion chemical ionization mass spectrometry of trimethylsilyl derivatives of pyrrolizidine alkaloids using NH^+ and OH^- as the reactant ions. *Biom. Environ. Mass Spectrom.* 13:293-298.
- IKEDA, M.; SATO, T. & ISHIBASHI, H. (1988) Recent advances in the synthesis of pyrrolizidines. *Heterocycles*, 27:1465-1488.
- JANZEN, D.H. (1980) When is it coevolution? *Evolution*, 34:611-612.
- JONES, A.J.; CULVENOR, C.C.J. & SMITH, L.W. (1982) Pyrrolizidine alkaloids - a carbon-13 N.M.R. study. *Aust. J. Chem.*, 35:1173-1184.
- KARCHESY, J.; DEINZER, M.; GRIFFIN, D. & ROHRER, D.C. (1984) Positive and electron capture negative ion methane chemical ionization mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids. *Biomed. Mass Spectrom.*, 11:455-461.
- KELLEY, R.B.; SEIBER, J.N.; JONES, A.D.; SEGALL, H.J. & BROWER, L.P. (1987) Pyrrolizidine alkaloids in overwintering monarch butterflies (*Danaus plexippus*) from Mexico. *Experientia*, 43:943-946.

- KOVATS, E. (1958) Gas-cromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil 1: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone. *Helv. Chim. Acta*, 41:1915-1932.
- KRASNOFF, S.B. & ROELOFS, W.L. (1989) Quantitative and qualitative effects of larval diet on male scent secretions of *Estigmene acraea*, *Phragmatobia fuliginosa*, and *Pyrrharctia isabella* (Lepidoptera: Arctiidae). *J. Chem. Ecol.* 15:1077-1093.
- LAMAS, G. (1973) Taxonomia e evolução dos gêneros *Ithuna* Doubleday (Danainae) e *Paititia*, gen. n., *Thyridia* Hubner e *Methona* Doubleday (Ithomiinae) (Lepidoptera: Nymphalidae)., Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da USP, São Paulo, vii + 225 pp.
- L'EMPEREUR, K.M.; LI, Y. & STERMITZ, F.R. (1989) Pyrrolizidine alkaloids from *Hackelia californica* and *Gnophaela latipennis*, an *H. californica*-hosted arctiid moth. *J. Nat. Prod.*, 52:360-366.
- LEVIN, D.A. (1976) The Chemical Defenses of Plants to Pathogens and Herbivores. *Ann. Rev. Ecol. Sys.*, 7:121-159.
- LIU, K.; ROEDER, E.; CHEN, H.L. & XIU, X.J. (1992) Pyrrolizidine alkaloids from *Eupatorium fortunei*. *Phytochemistry*, 31:2573-2574.
- MACKEY, M.F.; SADEK, M. & CULVENOR, C.C.J. (1983) Lycopsamine and intermedine, C₁₅H₂₅NO₅: diastereoisomeric pyrrolizidine alkaloids. *Acta Cryst.*, C39:785-788.
- MACKEY, M.F.; MITRPRACHACHON, P.; OLIVER, P.J. & CULVENOR, C.C.J. (1985) Supinine, C₁₅H₂₅NO₄, and heleurine, C₁₅H₂₇NO₄, pyrrolizidine alkaloids. *Acta Cryst.*, C41:722-725.
- MARCH, J. (1968) Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms and Structures. McGraw-Hill. New York.
- MASTERS, A.R. (1990) Pyrrolizidine Alkaloids in Artificial Nectar Protect Adult Ithomiine Butterflies from Spider Predator. *Biotropica*, 22:298-304.
- MASTERS, A.R. (1991) Dual Role of Pyrrolizidine Alkaloids in Nectar. *J. Chem. Ecol.*, 17:195-205.
- MATTOCKS, A.R. (1967a) Spectrophotometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chem.*, 39:443-447.
- MATTOCKS, A.R. (1967b) Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. *J. Chromatogr.*, 27:505-508.

- MATTOCKS, A.R. (1968) Spectrophotometric determination of pyrrolizidine alkaloids - some improvements. *Anal. Chem.*, 40:1749-1750.
- MATTOCKS, A.R. (1969) Dihydropyrrolizine derivatives from unsaturated pyrrolizidine alkaloids. *J. Chem. Soc. (C)* 1155-1162.
- MATTOCKS, A.R. (1972) Toxicity and metabolism of *Senecio* alkaloids. In "Phytochemical Ecology." Eds. HARBORNE, J.B. Academic Press, pp. 179-199.
- MATTOCKS, A.R. (1986) Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids. Academic Press, New York, London.
- MATTOCKS, A.R.; SCHOENTAL, R.; CROWLEY, H.C. & CULVENOR, C.C.J. (1961) Indicine: the major alkaloid of *Heliotropium indicum* L. *J. Chem. Soc.*, 5400-5403.
- MCCOY, J.W.; ROBY, M.R. & STERMITZ, F.R. (1983) Analysis of plant alkaloid mixtures by ammonia chemical ionization mass spectrometry. *J. Nat. Prod.*, 46:894-900.
- MIELKE, O.H.H. & BROWN, K.S., JR. (1979) Suplemento ao catálogo dos Ithomiidae Americanos (Lepidoptera) de Romualdo Ferreira D'Almeida (Nymphalidae: Ithomiinae). Centro de Recursos Audiovisuais da UFPR, Curitiba, Paraná, 216 pp.
- MODY, N.V.; SAWHNEY, R.S. & PELLETIER, S.W. (1979) Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectral assignments for pyrrolizidine alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 42:417.
- MOHANRAJ, S. & HERZ, W. (1982) High resolution ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectra of saturated pyrrolizidine monoester alkaloids. *J. Nat. Prod.*, 45:328-336.
- MOHANRAJ, S.; SUBRAMANIAN, P.S. & HERZ, W. (1982) Minor alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. *Phytochemistry*, 21:1775-1779.
- MOLYNEUX, R.J.; ROITMAN, J.N.; BENSON, M. & LUNDIN, R.E. (1982) ^{13}C NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 21:439.
- MONTEIRO, R.F. (1981) Regulação Populacional de Ithomiinae (Lep.: Nymphalidae). Ecologia da Interação Parasitóide x Hospedeiro. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas (Ecologia), Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, viii + 91 pp.
- MULLER, F. (1878) Über die Vorteile der Mimicry bei Schmetterlinge. *Zool. Anz.*, 1:54-55.

- MULLER, F. (1879) *Ituna* and *Thyridia*: a remarkable case of mimicry in butterflies. *Proc. R. Ent. Soc. London*, xx-xxix.
- NEUNER-JEHLE, N.; NESVADBA, H. & SPITELLER, G. (1965) Anwendung der Massenspektrometrie zur Strukturaufklärung von Alkaloiden, 6. Mitt.: Pyrrolizidinalkaloide aus dem Goldregen. *Monatsch. Chem.*, 96:320-338.
- NGHIA, N.T.; SEDMERA, P.; KLÁSEK, A.; BOEVA, A.; DRJANOVSKA, L.; DOLEJS, L. & SANTAVY, F. (1976). Bulgarsenine and retroisenine, alkaloids from *Senecio memorensis* L., var. *bulgaricus* (Vel.) Stoj. et Stef. *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.*, 41:2952-2963.
- NISHIDA, R.; KIM, C.; FUKAMI, H. & IRIE, R. (1991) Ideamine N-oxides: pyrrolizidine alkaloids sequestered by the Danaine butterfly, *Idea leuconoe*. *Agric. Biol. Chem.*, 55:1787-1792.
- NISHIMURA, Y.; KONDO, S.; TAKEUCHI, T. & UMEZAWA, H. (1987) Total syntheses of indicine N-oxide, intermedine N-oxide, and their enantiomers using carbohydrate as a chiral educt. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 60:4107-4113.
- PAECH, K. (1959) *Biochemie und Physiologie der Sekundären Pflanzenstoffe*. (Springer V. Berlin), apud G.S. Fraenkel (1959). *Science*, 129:1466-1470.
- PASTEELS, J.M. (1982) Is kairomone a valid and useful term? *J. Chem. Ecol.*, 8:1079-1081.
- PEDERSEN, E. & LARSEN, E. (1970) Mass spectrometry of some pyrrolizidine alkaloids. *Org. Mass Spectr.*, 4:249-256.
- PELLMYR, O. & THIEN, L.B. (1986) Insect reproduction and floral fragrances: keys to the evolution of the angiosperms? *Taxon*, 35:76-85.
- PLISKE, T.E. (1975a) Pollination of pyrrolizidine alkaloid containing plants by male Lepidoptera. *Environ. Ent.*, 4:474-479.
- PLISKE, T.E. (1975b) Courtship behavior and use of chemical communication by males of certain species of ithomiine butterflies (Nymphalidae: Lepidoptera). *Ann. Ent. Soc. Am.*, 68:935-942.
- PLISKE, T.E. (1975c) Attraction of Lepidoptera to plants containing pyrrolizidine alkaloids. *Environ. Ent.*, 4:455-473.

- PLISKE, T.E.; EDGAR, J.A. & CULVENOR, C.C.J. (1976) The chemical basis of attraction of Ithomiine butterflies to plants containing pyrrolizidine alkaloids. *J. Chem. Ecol.*, 2:255-262.
- RAVI, S.; LAKSHMANAN; A.J. & HERZ, W. (1990) Iso-lycopsamine, a pyrrolizidine alkaloid from *Heliotropium keralense*. *Phytochemistry*, 29:361-364.
- RIZK, A.F.M. (1991) The pyrrolizidine alkaloids: plant sources and properties. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids." Ed. A.M. RIZK. CRC Press, Florida. pp.1-90.
- RIZK, A.F.M. & HUSSINEY, H.A. (1991) Extraction, fractionation, and identification of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids." Ed. A.M. RIZK. CRC Press, Florida. pp.91-110.
- RIZK, A.F.M. & KAMEL, A. (1991) Toxicity, carcinogenicity, pharmacology, and other biological activities of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids." Ed. A.M. RIZK. CRC Press, Florida. pp.211-226.
- ROBINS, D.J. (1982) Pyrrolizidine Alkaloids. *Fortschritte Ch. N. S.*, 41:115-203.
- ROBINS, D.J. (1985) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 2:213-220.
- ROBINS, D.J. (1986) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 3:297-305.
- ROBINS, D.J. (1987) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 4:577-590.
- ROBINS, D.J. (1989a) Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. *Chem. Soc. Rev.*, 18:375-408.
- ROBINS, D.J. (1989b) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 6:221-230.
- ROBINS, D.J. (1989c) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 6:577-589.
- ROBINS, D.J. (1990) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 7:377-386.
- ROBINS, D.J. (1991) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 8:213-221.
- ROBINS, D.J. (1992) Pyrrolizidine Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.*, 9:313-321.

- ROBINSON, T. (1974) Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. *Science*, 184:430-435.
- ROEDER, E. (1990) Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 29:11-29.
- ROEDER, E. (1991) Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids." Ed. A.M. RIZK. CRC Press, Florida. pp.111-146.
- ROEDER, E.; BREITMAIER, E.; BIRECKA, H.; FROHLICH, M.W. & BADZIES-CROMBACH, A. (1991) Pyrrolizidine alkaloids of *Heliotropium spathulatum*. *Phytochemistry*, 30:1703-1706.
- ROEDER, E. & BOURAUUEL, T. (1992) Pyrrolizidine Alkaloids from *Neotostema apulum*. *Phytochemistry*, 31:3613-3615.
- ROITMAN, J.N. (1983) The pyrrolizidine alkaloids of *Amsinckia menziesii*. *Aust. J. Chem.*, 36:769-778.
- ROSENTHAL, G.A. & JANZEN, D.H. (eds.) (1979) Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites. Academic Press.
- ROTHSCHILD, M. & EDGAR, J.A. (1978) Pyrrolizidine alkaloids from *Senecio vulgaris* sequestered and stored by *Danaus plexippus*. *J. Zool., Lond.*, 186:347-349.
- ROTHSCHILD, M.; APLIN, R.T.; COCKRUM, P.A.; EDGAR, J.A.; FAIRWEATHER, P. & LEES, R. (1979) Pyrrolizidine alkaloids in arctiid moths with a discussion on host plant relationships and the role of these secondary plant substances in the Arctiidae. *Biol. J. Linn. Soc.*, 12:305-326.
- SCHULZ, S. (1987) Die Chemie der Duftorgane männlicher Lepidopteren. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades des Fachbereichs Chemie, Institut für Organische Chemie, Universität Hamburg, Hamburgo, Alemanha.
- SCHULZ, S. (1991) Odor communication in tropical lepidoptera. In II Deutsch-Brasilianisches Naturstoffsymposium, Hannover, Alemanha. pp. 58-59.
- SCHULZ, S. (1992) Absolute configuration and synthesis of 2-hydroxy-2-(1-hydroxyethyl)-3-methyl- γ -butyrolactone, a presumed pheromone of ithomiine butterflies. *Liebigs Ann. Chem.*, 829-834.
- SCHULZ, S.; FRANCKE, W.; EDGAR, J. & SCHNEIDER, D. (1988a) Volatile Compounds from Androconial Organs of Danaine and Ithomiine Butterflies. *Zeit. für Naturforsch.*, 43c:99104.

- SCHULZ, S.; FRANCKE, W. & BOPPRÉ, M. (1988b) Carboxylic Acids from Hairpencils of Male *Amauris* Butterflies (Lep.: Danainae). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 369:633-638.
- SCOTT, J.A. (1985) The phylogeny (Papilionoidea and Hesperioidea). *J. Res. Lep.*, 24:241-281.
- SEIGLER, D.S. & PRICE, P.W. (1976) Secondary compounds in plants: primary functions. *Am. Nat.*, 110:101-105.
- SINCLAIR, A.R.E. (1975) The resource limitation of trophic levels in tropical grassland ecosystems. *J. Ann. Ecol.* 44:497-520.
- STAHL, E. (1888) *Jena. Z. Med. Naturwiss.*, 22:557-684 apud Rhoades, D.F. (1979). Ecological and evolutionary process. In "Herbivores, their interaction with secondary plant metabolites." Eds. ROSENTHAL, G.A. & JANZEN, D.H. Academic Press. pp. 4-55.
- STELLJES, M.E. & SEIBER, J.N. (1990) Pyrrolizidine alkaloids in an overwintering population of monarch butterflies (*Danaus plexippus*) in California. *J. Chem. Ecol.*, 16:1459-1470.
- SUBRAMANIAN, P.S.; SUBRAMANIAM, M.; COCKRUM, P.A.; CULVENOR, C.C.J.; EDGAR, J.A.; FRAHN, J.L. & SMITH, L.W. (1980) The alkaloids of *Heliotropium curassavicum*. *Aust. J. Chem.*, 33:1357-1363.
- TABASHNIK, B.E. (1987) Plant secondary compounds as oviposition deterrents for the cabbage butterfly, *Pieris rapae* (Lep.: Pieridae). *J. Chem. Ecol.*, 13:309-316.
- TOPPEL, G.; WITTE, L. & HARTMANN, T. (1988) N-oxidation and degradation of pyrrolizidine alkaloids during germination of *Crotalaria scassellatii*. *Phytochemistry*, 27:3757-3760.
- TRIGO, J.R. (1988) Ecologia química na interação Ithomiinae (Lepidoptera: Nymphalidae)/Echitoideae (Angiospermae: Apocynaceae). Tese de Mestrado em Ciências Biológicas (Ecologia), Instituto de Biologia, Campinas, SP, ix + 196pp.
- TRIGO, J.R. & BROWN, K.S. (1990) Variation of pyrrolizidine alkaloids in Ithomiinae: a comparative study between species feeding on Apocynaceae and Solanaceae. *Chemoecology*, 1:22-29.
- TRIGO, J.R. & MOTTA, P.C. (1990) Evolutionary implications of pyrrolizidine alkaloid assimilation by danaine and ithomiine larvae (Lepidoptera: Nymphalidae). *Experientia*, 46:332-334.

- TRIGO, J.R.; WITTE, L.; BROWN, K.S., Jr.; HARTMANN, T. & BARATA, L.E.S. (1993) Pyrrolizidine alkaloids in the arctiid moth *Hyalurga syma*. *J. Chem. Ecol.* (no prelo).
- VASCONCELLOS-NETO, J. (1980) Dinâmica de populações de Ithomiinae (Lep.: Nymphalidae) em Sumaré, SP. Tese de Mestrado em Ciências Biológicas (Ecologia). Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP. iv + 206 pp.
- VASCONCELLOS NETO, J. (1991) Interactions between Ithomiine butterflies and Solanaceae: feeding and reproductive strategies. In "Plant-Animal Interactions: Evolutionary Ecology in Tropical and Temperate Regions". Eds. PRICE, P.W.; LEWINSOHN, T.M.; FERNANDES, J.W. & BENSON, W.W., John Wiley & Sons, Inc. pp. 291-313.
- VASCONCELLOS-NETO, J. & LEWINSOHN, T.M. (1984) Discrimination and release of unpalatable butterflies by *Nephila clavipes*, a neotropical orb-weaving spider. *Ecol. Ent.*, 9:337-344.
- VIANNA, M.J.B. (1972) a neotropical orb-weaving spider. In Contribuição a Biologia de *Nephila clavipes* (L., 1767) (Aranae, Araneidae). Tese de Doutorado em Biologia. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu.
- VLIETINCK, A.J. & PIETERS, L.A.C. (1991) Quantitative determinations of pyrrolizidine alkaloids. In "Naturally occurring pyrrolizidine alkaloids." Ed. A.M. RISK, CRC Press, Florida. pp. 191-210.
- VRIELING, K. (1991) Costs and benefits of alkaloids of *Senecio jacobaea* L. PhD Thesis. Departament of Populational Biology, Research Group Ecology of Plants and Herbivores, University of Leiden, Leiden, Holanda.
- VRIELING, K.; SOLDAAT, L.L. & SMIT, W. (1991) The influence of pyrrolizidine alkaloids of *Senecio jacobaea* on *Tyria jacobaeae*, *Brachycaudus cardii* and *Haplothrips senecionis*. *Netherlands J. Zool.*, 41:228-239.
- WHITMAN, D.W. (1988) Allelochemical interactions among plants, herbivores, and their predators. In "Novel aspects of insect-plant interactions". Eds. P. BARBOSA & D.K. LETOURNEAU, John Wiley & Sons, pp. 11-64.
- WHITTAKER, R.H. & FEENY, P.P. (1971) Allelochemicals: chemical interactions between species. *Science*, 171:757-770.
- WIEDENFELD, H. & ROEDER, E. (1991) Pyrrolizidine alkaloids from *Ageratum conyzoides*. *Planta Med.*, 57:578-579.

- WILLIAMS, D.H.; STONE, M.S.; HAUCK, P.R. & RAHMAN, S.K. (1989) Why are Secondary Metabolites (Natural Products) Biosynthesized?. *J. Nat. Prod.*, 52:1189-1208.
- WINK, M.; SCHNEIDER, D. & WITTE, L. (1988) Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloid-derived pheromones in the arctiid moth, *Cretonotos transiens*: Stereochemical conversion of heliotrine. *Z. Naturforsch.*, 43c:737-741.
- WINK, M. & SCHNEIDER, D. (1988) Carrier-mediated uptake of pyrrolizidine alkaloids in larvae of the aposematic and alkaloid-exploiting moth *Cretonotos*. *Naturwissenschaften*, 75:524-525.
- WINK, M. & SCHNEIDER, D. (1990) Fate of Plant-Derived Secondary Metabolites in Three Moth Species (*Syntomis mogadorensis*, *Syntomeida epilais*, and *Cretonotos transiens*). *J. Comp. Physiol. B*, 160:389-400.
- WITTE, L.; ERNST, L.; ADAM, H. & HARTMANN, T. (1992) Chemotypes of two pyrrolizidine alkaloid-containing *Senecio* species. *Phytochemistry*, 559-565.
- WODAK, S.J. (1975) The crystal structure of heliotrine: a pyrrolizidine alkaloid monoester. *Acta Cryst. B*, 31:569-573.
- WRÓBEL, J.T. (1985) Pyrrolizidine alkaloids. *The Alkaloids* (Ed. A. BROSSI), 26:327-384.
- YOUNG, A.M. (1972) On the life cycle and natural history of *Hymenitis nero* (Lepidoptera: Ithomiinae) in Costa Rica. *Psyche*, 79:284-294.
- YOUNG, A.M. (1973) The life cycle of *Dircenna relata* (Ithomiidae) in Costa Rica. *J. Lep. Soc.*, 27:258-267.
- YOUNG, A.M. (1974a) On the biology of *Godyris zavaleta caesiopicta* (Lep.: Nymphalidae: Ithomiinae). *Ent. News*, 85:227-238.
- YOUNG, A.M. (1974b) A natural historical account of *Oleria zelica pagasa* (Lep.: Nymphalidae: Ithomiinae) in a Costa Rica mountain rain forest. *Stud. Neotrop. Fauna*, 9:123-140.
- YOUNG, A.M. (1974c) Notes on the biology of *Pteronymia notilla* (Ithomiidae) in a Costa Rica mountain-forest. *J. Lep. Soc.*, 29:257-268.
- YOUNG, A.M. (1978a) The biology of the butterfly *Aeria eurimedia agna* (Nymphalidae: Ithomiinae: Oleriini) in Costa Rica. *J. Kans. Ent. Soc.*, 51:1-10.

- YOUNG, A.M. (1978b) Notes on the biology of the butterfly *Hypoleria cassotis* (Bates) (Nymphalidae: Ithomiinae) in Northeastern Costa Rica. *Brenesia*, 14-15:97-108.
- YU, S.J. (1987) Microsomal oxidation of allelochemicals in generalist (*Spodoptera frugiperda*) and semispecialist (*Anticarsia gemmatalis*) insects. *J. Chem. Ecol.*, 13:423-436.
- ZALKOW, L.H.; GLINSKI, J.A.; GELBAUM, L.; FLEISCHMANN, T.J.; McGOWAN, L.S. & GORDON, M.M. (1985) Synthesis of pyrrolizidine alkaloids indicine, intermedine, lycopsamine, and analogues and their N-oxides. Potential antitumor agents. *J. Med. Chem.*, 28:687-694.
- ZAR, J.H. (1984) Biostatistical analysis. 2° ed. Prentice-Hall, New Jersey.