

MAIQUE WEBER BIAVATTI

ESTUDOS SOBRE 8,10-DI-*n*-PROPIL-LOBELIDIOL:
UM NOVO ALCALÓIDE ISOLADO DE *Siphocampylus*
verticillatus (CHAM.) G. DON., CAMPANULACEAE.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química do Setor de Ciências Exatas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química.

CURITIBA

1994

*Este trabalho é dedicado à Glóris T.
Weber Biavatti, quem eu amo e admiro.*

AGRADECIMENTOS

Em especial, agradeço a orientação e o incentivo indispensáveis do Prof. Cid Airbiré de Moraes Santos.

A Prof^ª. Maria Consuelo A. Marques, co-orientadora, pela valiosa contribuição nos experimentos farmacológicos, assim como aos Professores Herbert A. Trebien e Lia Rieck do Departamento de Farmacologia, UFPR.

A Adriana Contin, pelas colaborações durante o estudo desta planta.

Ao Departamento de Química da Universidade de Manchester, Inglaterra, pelos espectros.

A todos que acompanharam e colaboraram direta e indiretamente a realização deste trabalho, obrigada.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	v
Abstract	vi
Lista de abreviaturas	vii
Lista de esquemas	viii
Lista de figuras e tabelas	ix
Introdução	1
Biossíntese dos alcalóides derivados da lisina	4
Sobre a família Campanulaceae Juss.	8
Sobre o gênero <i>Siphocampylus</i> Pohl.	11
Sobre a espécie <i>S. verticillatus</i> (Cham.) G. Don.	12
Minimização de energia molecular	15
Farmacologia dos alcalóides piperidínicos	16
Resultados e Discussão	18
Separação e identificação dos alcalóides	18
Estudos farmacológicos sobre 8,10-di- <i>n</i> -propil-lobelidiol	34
Experimental	44
Referências Bibliográficas	52

RESUMO

O extrato clorofórmico dos rizomas de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G. Don., que cresce abundantemente em locais brejosos entre 1000 e 2000 m de altitude no Estado do Paraná, forneceu três alcalóides, denominados SV-1, SV-2 e SV-3. A caracterização do alcalóide de maior rendimento, SV-1, levou a uma estrutura inédita de um alcalóide com núcleo piperidínico o qual foi denominado 8,10–di-*n*-propil-lobelidiol. Os alcalóides SV-2 e SV-3 não foram identificados e estão sendo analisados espectroscopicamente.

Estudos farmacológicos preliminares *in vivo* realizados com o extrato bruto, fração alcaloídica e com o alcalóide SV-1, mostraram atividade antinociceptiva, atividade estimulante sobre o sistema nervoso central e ação direta sobre receptores nicotínicos ganglionares.

ABSTRACT

The crude chloroform extract of *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G. Don., which grows abundantly in wasteland between 1000 and 2000 m altitude in the Paraná State, resulted in isolation of three alkaloids named as SV-1, SV-2 and SV-3. The high yield compound, SV-1, was characterized as a novel alkaloid with piperidine nucleus as 8,10-di-*n*-propyl-lobelidiol. The SV-2 e SV-3 could not be identified yet and are under way for spectroscopic analysis.

Preliminary pharmacological studies performed with the crude extract, alkaloid fraction and SV-1 have shown indistinctly antinociceptive activity, stimulatory activity on the central nervous system and direct action on ganglionar nicotinic receptors.

LISTA DE ABREVIATURAS

A.T.	alcalóides totais
COSY	COrelated SpectroscopY
CCD	cromatografia em camada delgada
SV-1	8,10--di- <i>n</i> -propil-lobelidiol
DL ₅₀	dose letal 50%
e.v.	endovenosa
E.B.	extrato bruto
IV	infravermelho
i.p.	intraperitoneal
PSM	pressão sanguínea média
RNM	ressonância nuclear magnética
S.N.C.	sistema nervoso central
s.c.	subcutânea
TGA	teste geral de atividade
UV	ultravioleta

LISTA DE ESQUEMAS

		Página
Esquema 1	Reações gerais biossintéticas para alcalóides	4
Esquema 2	Formação da lisina	5
Esquema 3	Formação da Δ^1 -piperideína	5
Esquema 4	Biossíntese da lobelina	7
Esquema 5	Fragmentação geral de SV-1	22
Esquema 6	Fragmentação geral de SV-1	23
Esquema 7	Fragmentação geral de SV-1	24

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

		Página
Figura 1	Núcleos alcaloídicos	3
Figura 2	Núcleo piperidínico	4
Figura 3	Fotos de <i>S. verticillatus</i>	14
Figura 4	Espectro de massa de SV-1	20
Figura 5	Espectro de ¹³ C RNM	26
Figura 6	Espectro de ¹ H RNM	27
Tabela 1	Dados de ¹ H RNM de SV-1 diacetato	28
Figura 7	Espectro de ¹ H RNM do diacetato	30
Figura 8	Espectro de COSY ¹ H RNM do diacetato	31
Figura 9	DL ₅₀ do extrato bruto de <i>S. verticillatus</i>	36
Figura 10	DL ₅₀ dos alcalóides de <i>S. verticillatus</i>	37
Figura 11	DL ₅₀ de SV-1	37
Figura 12	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	39
Figura 13	Contorções abdominais acumuladas induzidas por ácido acético	39
Figura 14	Curva dose-resposta	41
Tabela 2	Dados de ¹ H RNM de SV-1	47
Tabela 3	Dados de ¹³ C RNM de SV-1	48

INTRODUÇÃO

A utilização de alcalóides pelo homem em preparações como poções, chás, cataplasmas e venenos remonta 4000 anos. Apesar disso, as primeiras tentativas de isolar os princípios ativos de extratos vegetais brutos ocorreram apenas no começo do século XIX, devido ao advento da percolação para a extração de drogas. O isolamento dos primeiros alcalóides datam de 1803 (narcotina), pelo apotecário francês Derosne, e de 1806 pelo apotecário alemão Serturmer, o primeiro a cristalizar um alcalóide, a morfina. O nome alcalóide se deve ao farmacêutico alemão Meissner (1792-1853), aludindo às suas propriedades alcalinas, pois, até então acreditava-se que as plantas produzissem apenas compostos ácidos ou neutros.^{1,2}

Em 1826, Pelletier e Caventou obtiveram conifina, um alcalóide de importância histórica, não apenas por ter sido o responsável pela morte de Sócrates, mas também foi o primeiro alcalóide a ser caracterizado (1870) e sintetizado (1886). Ao final de 1978, contava-se com aproximadamente 4000 alcalóides estruturalmente definidos, e hoje, estima-se cerca de 6000 estruturas diferentes já descobertas.³

Um grande número de drogas utilizadas pela medicina atual deriva de plantas produtoras de alcalóides, como sulfato de vincristina, sulfato de atropina, pseudoefedrina, etc. O grupo químico assim denominado é bastante variado, possuindo classes diferentes que são unificadas apenas pelas propriedades químicas do nitrogênio básico presente em suas estruturas, e pela sua acentuada ação em sistemas biológicos, seja ela tóxica (maioria das vezes), terapêutica ou alucinógena.^{1,4,5}

O grau de basicidade dos alcalóides varia bastante, dependendo da estrutura da molécula, da presença e da localização de outros grupos funcionais. Apesar da dificuldade em defini-los, eles tem um grande número de propriedades físicas e químicas em comum. A maior parte é insolúvel ou levemente solúvel em água, mas seus sais formados por reação com ácidos

solubilizam-se. Os alcalóides livres são solúveis em solventes orgânicos, e são estruturas sólidas cristalinas na maioria das vezes. Como outras aminas, eles formam sais duplos com compostos de metais pesados, que precipitam.^{1,4,5}

Os alcalóides podem se acumular em todo, ou em qualquer parte do vegetal, e têm sido feitas muitas sugestões a respeito da função dos alcalóides na própria planta, mas, até agora nenhuma evidência tem sido convincente. As hipóteses sugeridas incluem:^{4,5}

- (1) Os alcalóides como forma de armazenar e transportar na planta ácidos particulares em formas solúveis.
- (2) Os alcalóides como sendo de natureza não essencial. Aparentemente inofensivos para a planta, eles seriam formados dependendo das enzimas presentes e da disponibilidade dos precursores, sendo considerados como produtos finais do metabolismo de detoxificação da planta.
- (3) Os alcalóides na defesa da planta contra o oxigênio radicalar ($\cdot O_2$), o qual produz danos em todos os organismos vivos e é produzido nos tecidos vegetais na presença de luz.
- (4) Os alcalóides atuando como agente de proteção contra insetos e herbívoros, posto que a maioria dos alcalóides possui sabor amargo e são tóxicos, sendo aqui considerada a proteção mais como uma consequência, não como razão para a sua presença.
- (5) Os alcalóides como fatores regulatórios do crescimento.
- (6) Os alcalóides como fontes de reserva de nitrogênio e outras substâncias necessárias ao metabolismo vegetal.

Compostos alcaloídicos distribuem-se por todo o reino vegetal, sendo mais abundantes nas angiospermas, em inúmeras ordens diferentes.

Alguns animais como *Bufo* sp.,⁶ vários insetos produtores de feromonas, organismos marinhos (*Gonyaulax catenella*) e microorganismos (*Claviceps purpurea*)³ também são capazes de produzir alcalóides.

Têm sido sugeridos vários modos de classificar os alcalóides. As classificações mais utilizadas estão baseadas na estrutura do anel ou aminoácido que lhe deu origem. Segundo estes parâmetros, os alcalóides estudados neste trabalho são classificados como sendo piperidínicos-

piridínicos, derivados do aminoácido lisina (1). Na Figura 1, tem-se as estruturas dos principais núcleos alcaloídicos.

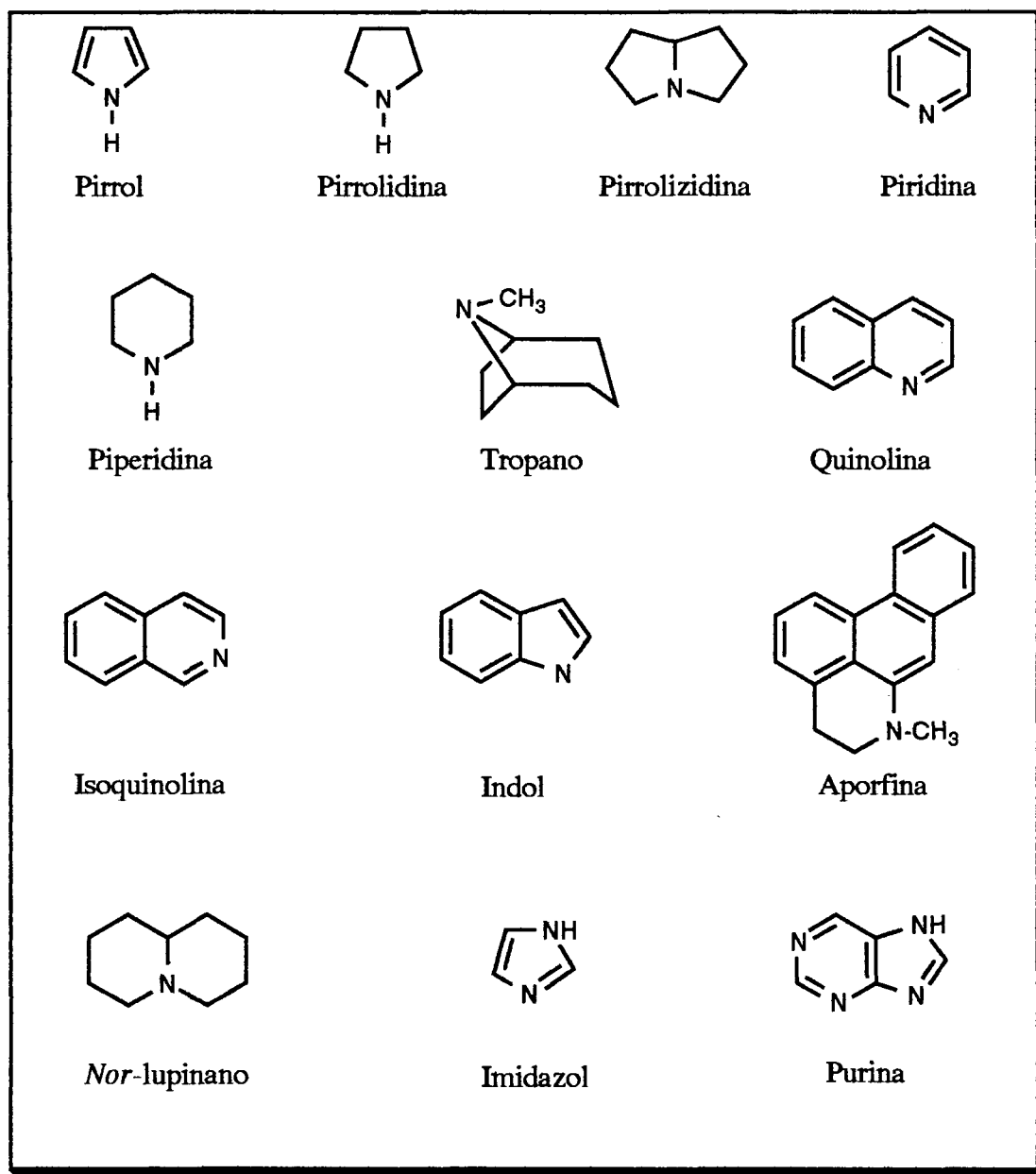
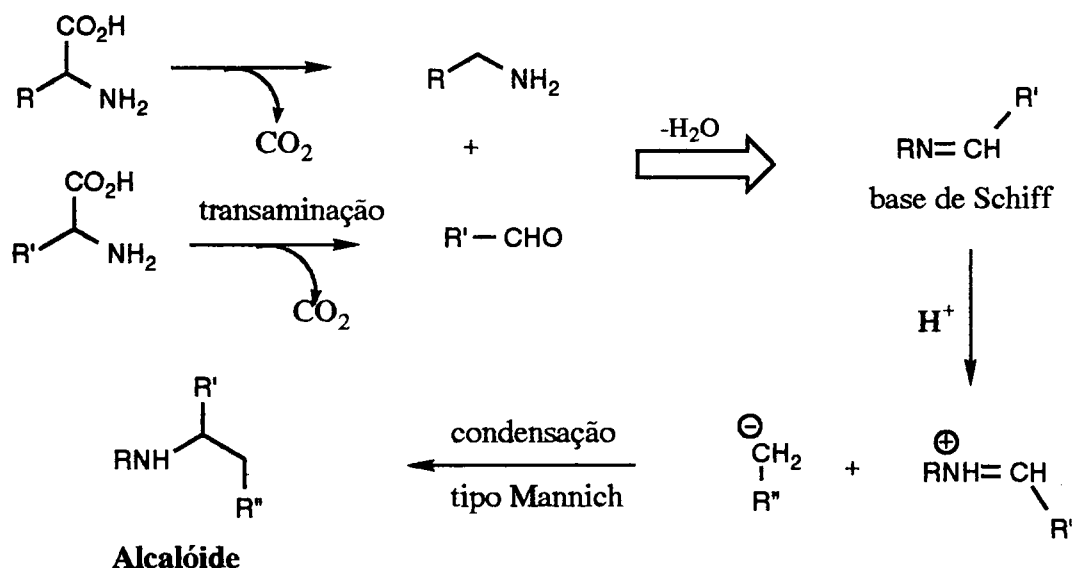


Figura 1

Em linhas gerais, os aminoácidos são os precursores da maioria dos alcalóides, os quais sofrem descarboxilação e transaminação para formar uma base de Schiff, que por sua vez pode reagir com carbânion numa condensação tipo Mannich. Estas reações gerais são demonstradas no Esquema 1.⁴



Esquema 1

Especificamente, considera-se a lobelina (2) (Esquema 4) como o alcalóide mais representativo da classe piperidínica em evidência neste trabalho, sendo o mais estudado e utilizado como modelo para estudos biossintéticos.⁷

BIOSSÍNTESE DOS ALCALÓIDES DERIVADOS DA LISINA

O aminoácido lisina (1) é considerado precursor do anel piperidínico de muitos tipos de alcalóides.⁷⁻¹¹ No caso do grupo da lobelina (2), a *L*-lisina é incorporada via um intermediário não simétrico, onde ambos os radicais nas posições C-6 e C-2 são derivadas da fenilalanina (3) (Figura 2).⁷⁻¹²

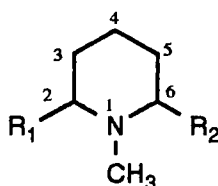
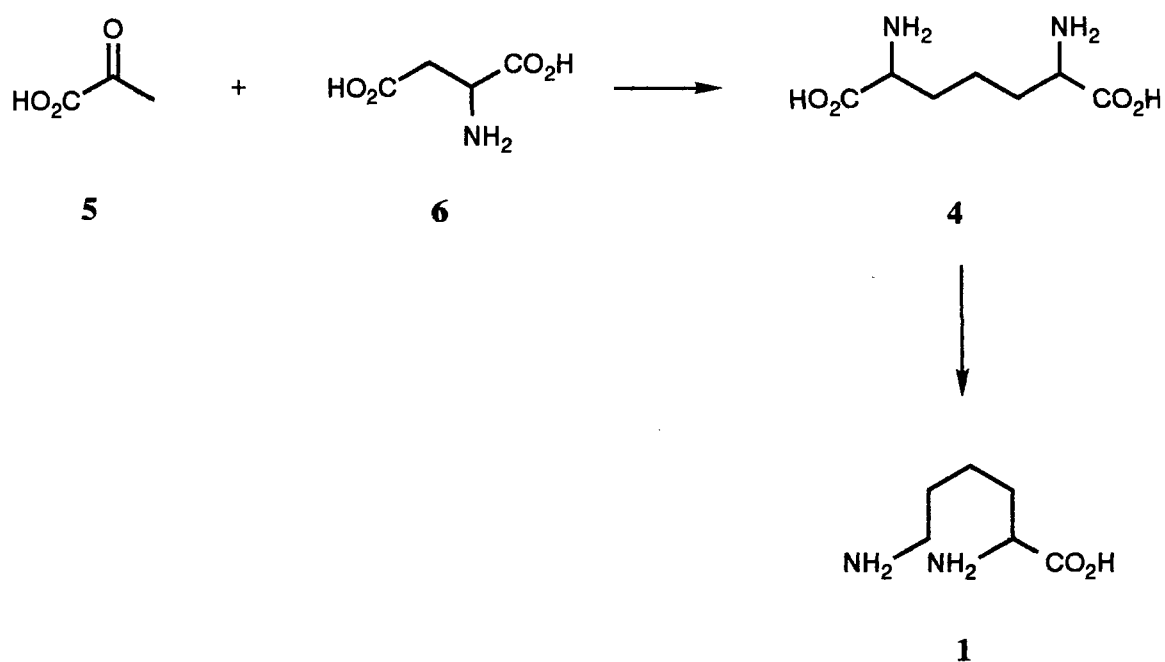


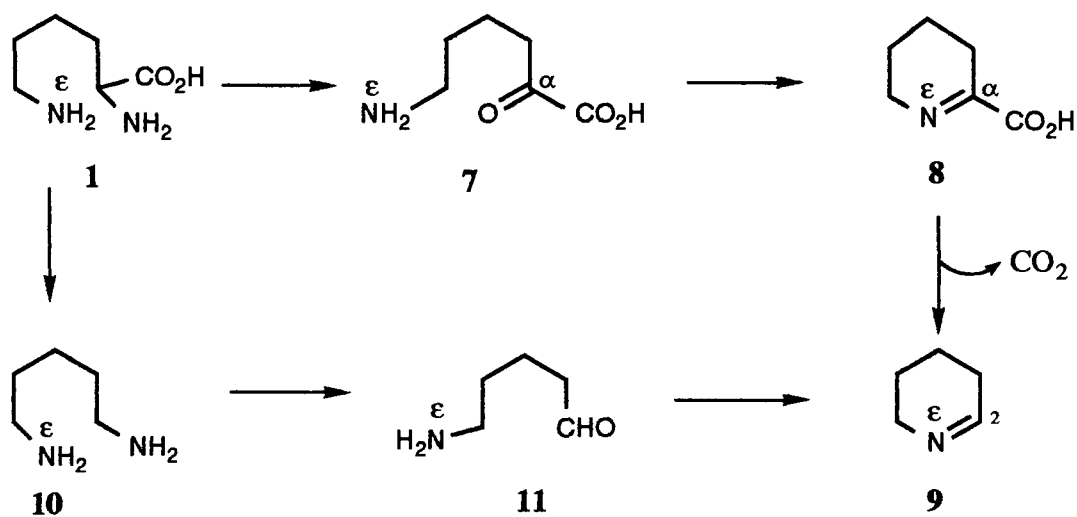
Figura 2

A lisina (1) é sintetizada pelas plantas superiores envolvendo a descarboxilação do ácido 2,6-diaminopimérico (4), o qual é formado pela condensação do piruvato (5) com aspartato (6) ou derivado (Esquema 2).¹³



Esquema 2

É o ϵ -amino grupo da lisina que fornece o nitrogênio para o anel piperidínico, e o seu carbono α é transformado em C₂ no núcleo piperidínico (Esquema 3).^{9,12}



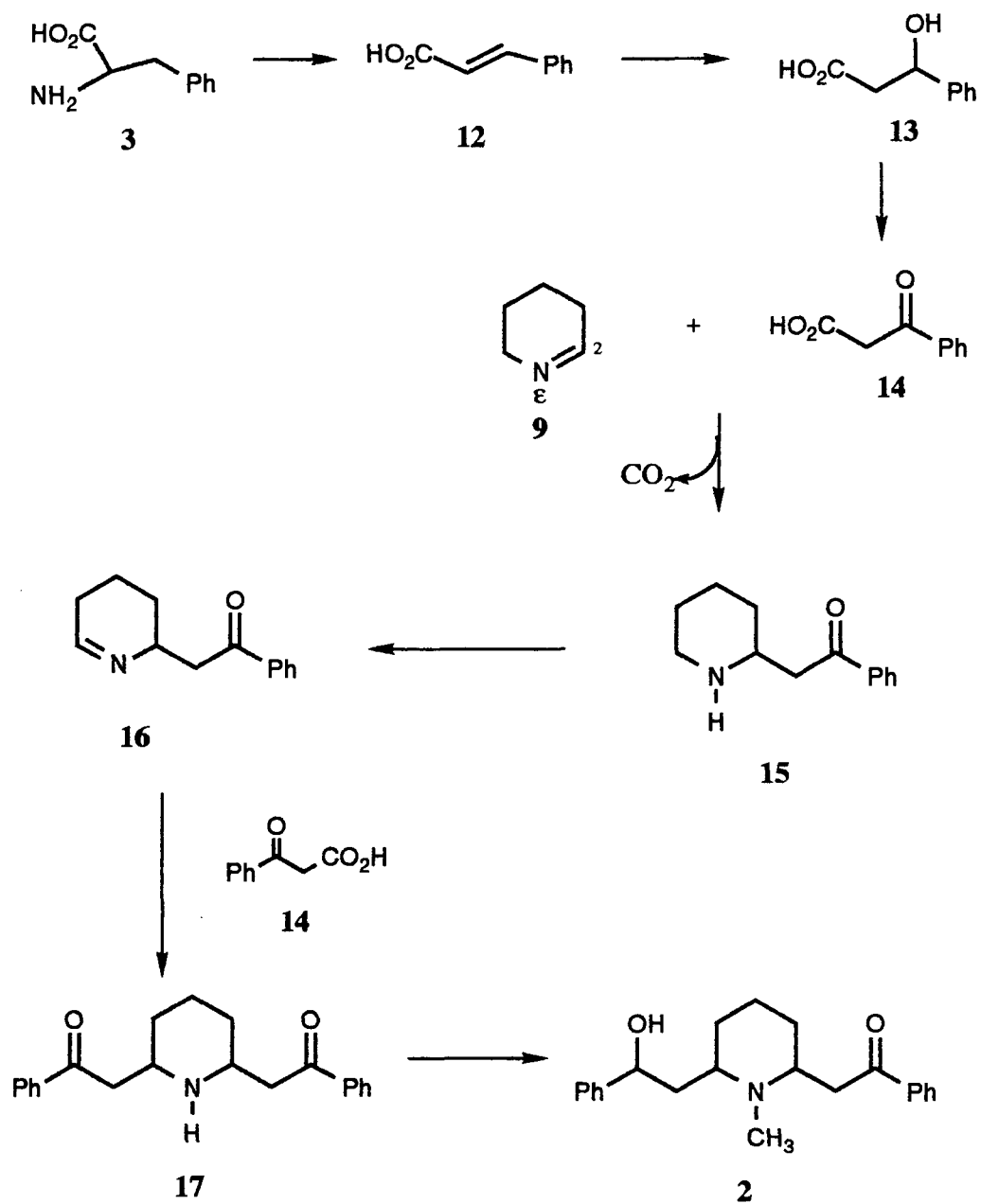
Esquema 3

Alguns trabalhos defendem a hipótese de que a lisina é incorporada via um intermediário não simétrico, pela sua α transaminação, originando o ácido ϵ -amino- α -cetocapróico (7), o qual cicliza formando o ácido Δ^1 -piperideína-2-carboxílico (8). Pela descarboxilação de 8 há a formação de Δ^1 -piperideína (9), que é considerado o precursor imediato do anel piperidínico.¹⁴⁻¹⁶

Existe também a hipótese da lisina ser incorporada via intermediário simétrico, através da sua descarboxilação, formando cadaverina (pentano-1,5-diamino) (10), a qual pode ser convertida a Δ^1 -piperideína via 5-aminopentanal (11). Estes intermediários são também propostos como intermediários para a formação de vários alcalóides, como sedamina,^{15,17,18} anabasina,^{12,19} N-metilisopelletierina⁸ e lobelina.^{7,10,11} (Esquema 3)

A incorporação das cadeias laterais à Δ^1 -piperideína começa pela deaminação da fenilalanina (3) produzindo o ácido *trans* cinâmico (12) através da enzima fenilalanina-amônia-liase. A hidroxilação do ácido cinâmico fornece o ácido 3-hidroxi-3-fenilpropanóico (13), que oxidado produz o ácido benzoilacético (14). A condensação de 14 com 9 fornece uma amino-cetona (15), através da reação de Mannich. Supõe-se que a redução da função carbonila no composto 15 ocorra após a dehidrogenação e posterior condensação de 16 com outra molécula de ácido benzoilacético (14), fornecendo a lobelanina (17), que é considerada o intermediário simétrico da via metabólica. A lobelanina sofre metilação na etapa de obtenção da lobelina (2)(Esquema 4).^{11,17,20}

Nem todos os alcalóides de núcleo piperidínico têm como precursores os aminoácidos lisina e fenilalanina; alguns alcalóides do grupo da lobélia são formados a partir do aminoácido lisina e acetato para as cadeias laterais, outros como nicotina, coniína e conhidrina são inteiramente derivados do acetato. No caso da lobelina, a biossíntese segue a hipótese biogenética clássica proposta por Robinson.¹⁵



Esquema 4

SOBRE A FAMÍLIA CAMPANULACEAE JUSS.

A família Campanulaceae pertence a ordem Campanulales Lindley, que é descrita por Cronquist²¹ como: arbustos, ou às vezes secundariamente lenhosos ou raramente plantas arborescentes, comumente armazenam carboidratos como inulina, algumas vezes produzindo alcalóides piridínicos (Lobelioideae), algumas famílias produzem compostos iridóides (algumas Styliaceae e Goodeniaceae), e outras poliacetilenos (Campanulaceae), mas raramente produzem compostos cianogênicos, saponinas e taninos, e geralmente não produzem ácido elágico e proantocianidinas.

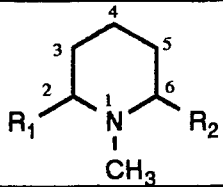
Esta família consiste de plantas usualmente herbáceas, às vezes secundariamente lenhosas, formando arbustos ou arvoretas (algumas lobélias), com flores características de corola simpétala campanulada ou tubuloso-bilabiada.

O nome Campanulaceae vem do latim e quer dizer campainha, alusivo à forma das flores. Consiste em setenta gêneros com um número de espécies em torno de duas mil, de distribuição cosmopolita principalmente em zonas temperadas, subtropicais e tropicais.

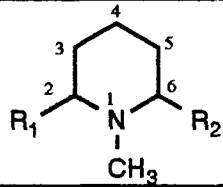
As campanuláceas possuem duas subfamílias bem delimitadas, as Campanuloideae e Lobelioideae, sendo a segunda a mais desenvolvida. Hegnauer²² considera o caráter quimiotaxonômico como forte evidência para separá-las em duas famílias distintas, devido às Lobelioideae conterem as espécies que acumulam alcalóides e ácido quelidônico, havendo também diferença na composição de polifenóis dessas subfamílias, devido a última não produzir ácido cafeico.^{22,23} Esta subfamília reúne 25 gêneros, como *Lobelia* e *Siphocampylus*.

O gênero *Lobelia* tem sido utilizado como modelo para estudos químicos e farmacológicos dos alcalóides piperidínicos. Este gênero é reconhecido em várias farmacopéias, devido às suas propriedades de estimulação respiratória e tem sido incorporado em preparações contra asma brônquica e bronquite crônica. O sulfato de lobelina é utilizado como substituto da nicotina no tratamento do tabagismo, e o seu hidrocloreto é administrado intramuscularmente como estimulante respiratório.^{24,25} Esta ação é devida aos alcalóides piperidínicos presentes no gênero, sendo os mesmos classificados em quatro grupos, a saber:^{26,27}

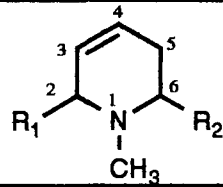
1. Grupo da LOBELINA, que inclui as bases principais: lobelanina, *L*- e *DL*-lobelina, lobelanidina e as respectivas aminas secundárias, *nor*-lobelanina e *nor*-lobelanidina.

	R ₁	R ₂
lobelanina	C ₆ H ₅ COCH ₂ -	-CH ₂ COC ₆ H ₅
lobelina	C ₆ H ₅ COHCH ₂ -	-CH ₂ COC ₆ H ₅
lobelanidina	C ₆ H ₅ COHCH ₂ -	-CH ₂ COHC ₆ H ₅

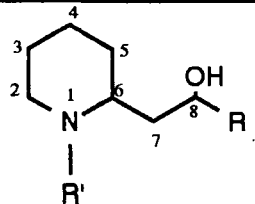
2. Grupo da LELOBINA, que distingue-se pela natureza das suas cadeias laterais, possuindo apenas uma com substituinte aromático.

	R ₁	R ₂
lelobanidina I	C ₂ H ₅ CHOHCH ₂ -	-CH ₂ CHOHC ₆ H ₅
lelobanidina II	C ₂ H ₅ CHOHCH ₂ -	-CH ₂ CHOHC ₆ H ₅

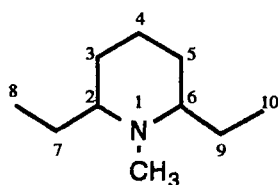
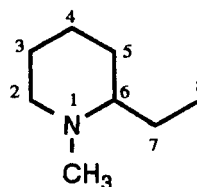
3. Grupo da LOBININA, que caracteriza-se pela presença do núcleo piridínico parcialmente reduzido, com uma dupla ligação entre C₃ e C₄.

	R ₁	R ₂
lobinina	C ₆ H ₅ COCH ₂ -	-CH ₂ CHOHC ₂ H ₅
isobobinina	C ₆ H ₅ COCH ₂ -	-CH ₂ CH ₂ CHOHCH ₃
lobinanidina	C ₆ H ₅ CHOHCH ₂ -	-CH ₂ CHOHC ₂ H ₅
isobobinanidina	C ₆ H ₅ CHOHCH ₂ -	-CH ₂ CHOHC ₂ H ₅

4. Um grupo de alcalóides de menor peso molecular, em virtude de não possuírem uma das duas cadeias laterais.

	R'	R
8-fenil-lobelol I	H ₃ C-	-C ₆ H ₅
8-fenil-norlobelol I	H-	-C ₆ H ₅
8-etil-norlobelol I	H-	-C ₂ H ₅

Os alcalóides do primeiro grupo são os mais abundantes. Sabe-se que estes alcalóides se interrelacionam em seus grupos.^{27,28} Neste trabalho, será adotada a nomenclatura sistemática introduzida para os alcalóides da lobélia de acordo com sua origem biogenética, conforme demonstrado nas estruturas **A** e **B** abaixo:^{29,30}

**A****B**

O nome básico *lobeli-* é usado para designar alcalóides do tipo **A**, e *lobel-* para designar alcalóides do tipo **B**. A oxidação nas posições C₈ e C₁₀ é indicada pelo sufixo *-ol* para grupo hidroxila e *-ona* para grupo carbonila, e para funções combinadas *-on-*. A estereoquímica relativa em C₂ e C₆ em **A** é indicada pelos prefixos *cis-* ou *trans-*. Em casos onde houverem grupos diferentes em C₈ e C₁₀, o grupo com menor números de carbonos é colocado a esquerda (C₈), exceto em lobelionóis, cujo carbono hidroxilado deve ser designado C₈. Desde que os alcalóides da *Lobelia*, *Sedum* e *Siphocampylus* são correlatos, sugere-se tratá-los com esta nomenclatura.

Além da família Campanulaceae, outras também são capazes de produzir alcalóides piperidínicos correlatos aos da lobélia, por exemplo: Euphorbiaceae,^{31,32} Crassulaceae³³⁻³⁵ e Punicaceae.²²

Ainda as famílias Piperaceae, Solanaceae, Chenopodiaceae, Leguminosae,²⁸ Pinaceae,³⁶⁻³⁸ Tiliaceae,³⁹ e Umbelliferae⁴⁰ entre outras, também são produtoras de alcalóides de núcleo piperidínico-piridínico. Estes alcalóides (por exemplo: nicotina, coniína, anabasina, pelletierina, gentianina, sparteína, citisina), apesar da grande diferença estrutural em relação à lobelina e correlatos, também são capazes de promover ações no sistema nervoso central e periférico sob o termo genérico de efeitos nicotínicos.^{29,41-43}

SOBRE O GÊNERO *Siphocampylus* POHL.

Os gêneros *Lobelia* e *Siphocampylus* são sistematicamente muito próximos, possuindo em comum, entre outras características, a produção de látex pelo caule.²³

O gênero *Siphocampylus* (cujo nome significa "tubo curvo")⁴⁴ está distribuído principalmente nas regiões tropicais do globo, e é abundante nos trópicos americanos, especialmente na região andina. No Brasil, a sua distribuição vai da Bahia ao Rio Grande do Sul, estendendo-se até Goiás e Mato Grosso, frequentemente entre 1000 e 2000 metros de altitude.⁴⁵ No Paraná foi relatada a presença de quatro espécies amplamente encontradas em locais brejosos, beiras de riachos e interior de capões.⁴⁶ Segundo Hegnauer,²² este gênero possui 206 espécies.

Existem poucos trabalhos sobre o gênero *Siphocampylus*. Garello,⁴⁷ em 1950 estudou anatômica e quimicamente *S. foliosus*, isolando uma substância alcaloídica que ele denominou sifocampilina, a qual não foi identificada. Foram testadas tinturas da planta em coelhos confirmando apenas a sua toxicidade, devido não ser habitual a animais de criação alimentarem-

se de tal planta. Corral⁴⁸ em 1970 identificou substâncias já conhecidas nesta mesma espécie, palmitato de β -amirina, ácido ursólico e colina.

Magalhães⁴⁹ em 1988 isolou poliacetilenos de algumas espécies brasileiras da subfamília Lobelioideae. Mesmo com o pequeno número de espécies e indivíduos analisados, foi possível verificar a estreita relação entre os gêneros *Lobelia* e *Siphocampylus*, caracterizados por poliacetilenos acíclicos C₁₄, enquanto para outras espécies de Campanulaceae tem sido relatada a presença de piranoacetilenos C₁₄.

Godoy⁴⁵ em 1989 realizou o levantamento florístico e quimiosistemático da família Campanulaceae na região da Cadeia do Espinhaço, Minas Gerais, analisando a constituição parafínica das ceras foliares de *Lobelia* e *Siphocampylus* ocorrentes na região e correlacionou essas características químicas ao nicho ecológico ocupado pelas mesmas.

SOBRE A ESPÉCIE *Siphocampylus verticillatus* (CHAM.) G. DON.

A respeito desta espécie, Leonart,⁵⁰ em 1983 descreveu uma investigação química preliminar comparativa a *S. sulfureus* Wimmer, ambas encontradas em locais brejosos nas cercanias de Curitiba. Este trabalho constata que é possível diferenciar as duas espécies pela presença de alcalóides apenas em *S. verticillatus*. Esta composição alcaloídica foi comparada em cromatografia em camada delgada (CCD) frente ao extrato etéreo de *Lobelia hassleri* A. Zahlb, a padrões de lobelina, lobelanina e lobelanidina. Os resultados obtidos pelo autor sugeriram haver alguma semelhança estrutural entre os alcalóides de *Siphocampylus* e *Lobelia*.

Buras⁴⁶ em 1985 confirmou os resultados obtidos por Leonart e evidenciou a presença de esteróides e/ou triterpenos. Verificou-se nesse estudo que os extratos hexânicos de órgãos de *S. verticillatus* (folhas, caules e flores) obtidos por extração contínua em aparelho Soxhlet, inibem o crescimento bacteriano *in vitro* de nove espécies bacterianas testadas. A fração alcaloídica testada em separado inibe *in vitro* o crescimento de duas espécies: *Shigella flexneri* e

S. boydii. Esta propriedade antibacteriana vem sendo testada para outros alcalóides correlatos, como andrachamina, andrachcina e micropina.^{31,32,39}

Dando continuidade a este trabalho, Contin²³ em 1993 estudou frações do extrato bruto de partes aéreas de *S. verticillatus*, isolando o composto mais abundante em cada fração. Foram identificadas uma cumarina (escoparona) na fração toluênica, um flavonóide (luteolina) na fração acetato de etila, um triterpeno pentacíclico (ácido ursólico) na fração insolúvel no extrato hidroalcoólico bruto. Foi isolado um composto cristalino na fração metanólica, que foi caracterizado como um alcalóide, mas não foi identificado.

Apesar desta espécie não possuir história de uso popular, que serviria de indicativo para pesquisas fitoquímicas, observou-se nos estudos realizados até então que esta espécie produz alcalóides em grande quantidade, e, por definição, devem possuir atividade biológica.

Pelo fato do gênero *Siphocampylus* estar quimiotaxonomicamente próximo ao gênero *Lobelia*, é esperado encontrar nesta planta alcalóides com esqueleto piperidínico, e ação fisiológica tipo lobelina-nicotina.

Este estudo visou a caracterização da estrutura desses alcalóides e um estudo farmacológico preliminar, de forma a verificar o tipo de ação que esses exercem *in vivo*.

Caso se torne interessante a extração comercial dos alcalóides de *S. verticillatus*, existe uma grande viabilidade econômica para tal, devido ao fato desta planta crescer abundantemente em locais brejosos, que normalmente não são utilizados para agricultura.

Posição taxonômica da espécie segundo Wagenitz.^{23,46}

Divisão	Angiospermae
Classe	Dicotyledonea
Sub-classe	Sympetalae
Ordem	Campanulales
Família	Campanulaceae
Sub-família	Lobelioideae
Tribu	Lobeliinae
Gênero	<i>Siphocampylus</i>
Epíteto específico	<i>verticillatus</i>
Espécie	<i>Siphocampylus verticillatus</i>

Características da espécie *S. verticillatus* (Cham.) G. Don. resumidas:⁵¹

"Arbusto, geralmente simples, caule glabro latescente. Folhas verticiladas, linear-oblongas, subsésseis, membranáceas, bordos finamente denteados. Inflorescência terminal e axial. Corola vermelha ou roseada por fora e internamente amarela. Filetes eretos, glabros; tubo das anteras esverdeados, glabros. As duas anteras inferiores apresentam-se com um tufo de pelos no ápice. Gineceu de ovário ínfero, bicarpelar e bilocular com muitos rudimentos seminiais. Fruto seco, capsular oval. Não foram observadas sementes."

Sinonímia científica:²³

Lobelia verticillata Presl.

L. (Siphocampylus) verticillata Cham.



Figura 3: Fotos de *Siphocampylus verticillatus* (Cham.) G. Don. em seu habitat.

MINIMIZAÇÃO DE ENERGIA MOLECULAR

Os cálculos de minimização de energia são uma ferramenta importante para estudos de geometria molecular, energias e propriedades relacionadas à estrutura de compostos orgânicos.⁵² Estes cálculos estão baseados em dados experimentais, e incluem uma variedade de equações conjugadas aos parâmetros necessários para átomos não ligantes dados por estiramentos e ângulos de ligação, torsões e as interações de van der Waals. A somatória de todos esses fatores é chamada *energia estérica*, que fornece a conformação para uma dada estrutura, minimizando a energia em relação à geometria. Isto tudo depende da força do campo representada por essas equações, as quais descrevem a variação de energia da estrutura quando a molécula é deformada na sua geometria.

O programa MM2 para estes cálculos estabelecido por Allinger⁵³ tem sido muito utilizado e tornou-se um método padrão para a determinação da geometria molecular. Esta metodologia está sendo estendida de forma a ser utilizada em moléculas contendo nitrogênio conjugado a sistemas π , onde sistemas deslocalizados na molécula precisam de um método mais elaborado para determinar os vários parâmetros específicos para cada ligação deslocalizada nestes sistemas.

A vantagem de utilizar este método não é apenas visualizar a estrutura no seu estado mínimo de energia, mas também possibilita a análise de compostos previstos em trabalhos de síntese orgânica ou isolados de vegetais, assim como confirma resultados de métodos espectroscópicos como Ressonância Nuclear Magnética (RNM). Se tomarmos como exemplo os comprimentos de ligação, o programa MM2⁵³ fornece a medida correta, definida como distância média entre os átomos, a partir dos valores medidos por difração de elétrons. Os valores obtidos por cristalografia de raio X à baixa temperatura contém um erro de cerca de 0,015 ângstrons, devido à vibração da molécula no cristal, enquanto que os valores obtidos por MM2 são mais precisos porque são baseados nas posições nucleares. O raio X mede o centro da densidade eletrônica, por exemplo, tendendo a deixar as ligações C-N e C-O muito longas

devido a presença dos seus pares de elétrons livres, o que faz o centro da densidade eletrônica parecer mais distante da nuvem do carbono do que o núcleo de fato.

Recentemente, o método MM3 tem sido publicado com poucas diferenças para hidrocarbonetos, e com diferenças substanciais para hidroxilas e carbonilas, porque não são mais utilizadas as interações de pares de elétrons livres.⁵⁴⁻⁵⁶

O programa MM2 foi utilizado neste trabalho como forma de estabelecer as possíveis conformações dos alcalóides objeto deste estudo.

FARMACOLOGIA DOS ALCALÓIDES PIPERIDÍNICOS

As principais características farmacológicas dos alcalóides deste grupo são: estimulação respiratória,^{57,58} simpática e parassimpática de gânglios, ações adrenérgicas e estimulação central,⁵⁹ principalmente medular, durante o primeiro estágio da sua ação. Um segundo estágio é caracterizado por um fenômeno depressivo.⁴²

As ações farmacológicas da lobelina e nicotina são muito semelhantes. A lobelina, porém é menos potente que a nicotina. A maior parte de suas atividades farmacológicas recaem sobre os gânglios autônomos, exercendo estimulação. No sistema nervoso periférico, a ação principal da nicotina consiste inicialmente em estimulação transitória, seguida de depressão mais persistente em todos os gânglios autônomos. A nicotina apresenta ação bifásica também sobre a medula adrenal; pequenas doses provocam descargas de catecolaminas e grandes doses impedem sua liberação. Sabe-se que a nicotina, como a acetilcolina, estimula alguns receptores sensoriais, nos quais se incluem os mecanorreceptores, barorreceptores,⁶⁰ quimiorreceptores do corpo carotídeo,⁶¹⁻⁶³ receptores térmicos da pele⁶⁴ e da língua e receptores da dor.⁶⁵

A nicotina estimula de forma acentuada o sistema nervoso central (SNC). Em doses altas ocorrem tremores seguidos de convulsão, depressão e morte, a qual resulta de

insuficiência respiratória devido à paralisia central e ao bloqueio periférico dos músculos respiratórios.

Quando administrada pela via intravenosa (i.v.), a nicotina produz aumento característico na frequência cardíaca e na pressão arterial. No trato gastrointestinal, a ativação combinada dos gânglios parassimpáticos e das terminações nervosas colinérgicas provoca aumento do tônus e da motilidade intestinal. A lobelina antagoniza a depressão respiratória causada pela morfina e heroína, e é utilizada nas intoxicações por estes alcalóides.^{27,42}

Existem alguns estudos recentes sobre a relação entre a estrutura e a atividade de alcalóides piperidínicos,⁶⁶⁻⁶⁸ os quais sugerem que a intensidade da interação droga-receptores nicotínicos depende da presença de duplas ligações, que permitem a interação da droga com uma provável área plana no receptor nicotínico. Foi verificado também que o grupo metila ligado ao nitrogênio e as funções oxigenadas nas cadeias laterais alteram a intensidade da resposta fisiológica.

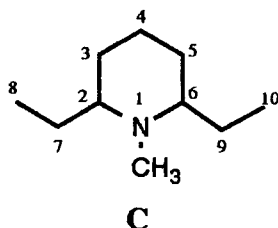
RESULTADOS E DISCUSSÃO

SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES

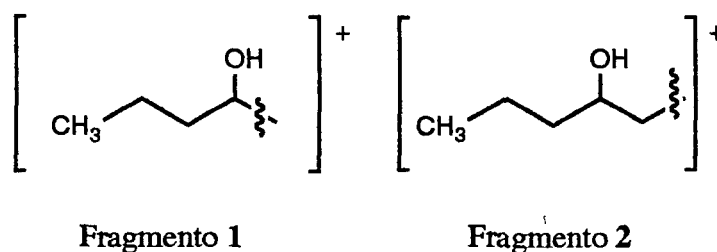
Os rizomas e a parte inicial do caule aéreo de *S. verticillatus* coletados durante a floração da planta (dezembro à fevereiro) mostraram um maior rendimento para a extração de alcalóides.^{47,50} O material foi dessecado em estufa à 60°C por 24 horas, pulverizado e macerado em solução de ácido clorídrico 1% (HCl) e filtrado. O extrato bruto assim obtido foi concentrado e tratado com solução de amônia diluída²⁵ e posteriormente extraído com clorofórmio (CHCl₃). O extrato clorofórmico foi então submetido à cromatografia em sílica gel 60 e 60 G (70-230 mesh), com subsequente purificação, obtendo-se o isolamento de três alcalóides.

O alcalóide principal (SV-1) cristalizou-se como finas agulhas brancas em metanol (MeOH), p.f. 31-32°C, $[\alpha]_D^{20}$ 0° (c 2,0 e 4,0; MeOH), com íon molecular M⁺ no espectro de massa de alta resolução em m/z 271,2501 correspondendo a C₁₆H₃₃NO₂. O espectro de infravermelho (IV) mostrou um sinal largo em 3377 cm⁻¹ e outro agudo a 2932 cm⁻¹ (estiramento O-H e N-CH₃) indicando a presença de hidroxila e grupo amina. O espectro de ultravioleta (UV) em MeOH não mostrou nenhuma absorção significativa entre 200 e 400 nm.

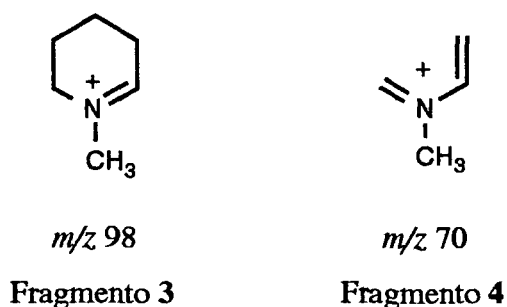
Sabendo-se que na família Campanulaceae é comum a presença de alcalóides com núcleo piperidínico com cadeias laterais nas posições 2,6 ao anel,²² é possível prever que esse alcalóide isolado de *Siphocampylus* tivesse o mesmo tipo de estrutura (C).

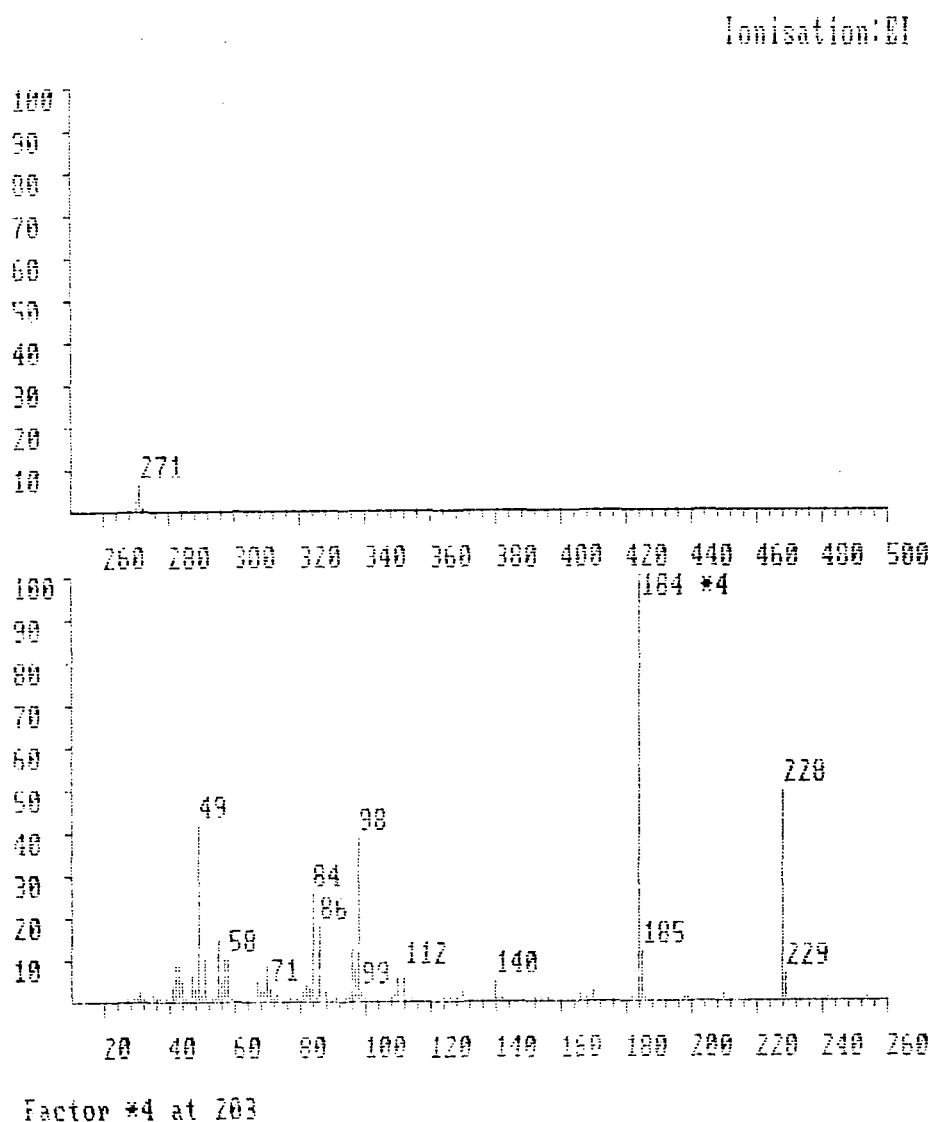


O espectro de massa de SV-1 (Figura 3) apresentou fragmentos importantes em m/z 228, 198, 184, 170, 98, 84 e 70. O fragmento a m/z 228 indicou a possível perda de um grupo *n*-propil (C_3H_7), enquanto o fragmento em m/z 198 mostrou a provável perda de um grupo C_4H_9O o que poderia ser $C_3H_7+CH_2O$ indicando a presença de um grupo hidroxila, verificada no espectro de infravermelho (Fragmento 1). O fragmento em m/z 184 poderia indicar a perda de grupo $C_5H_{11}O$ ($C_4H_9O+CH_2$) o qual seria devido a perda de mais um grupo metileno acoplado ao fragmento 1. O fragmento 2 formado, estaria ligado ao anel piperidínico em uma das cadeias laterais.³²



O fragmento m/z 98 (calculado para $C_6H_{12}N$ 98,0966) pode ser a espécie 3; o íon m/z 70 (4) também é de freqüente ocorrência neste tipo de alcalóide, os quais demonstram a presença de metila ligada ao nitrogênio do anel piperidínico.³³

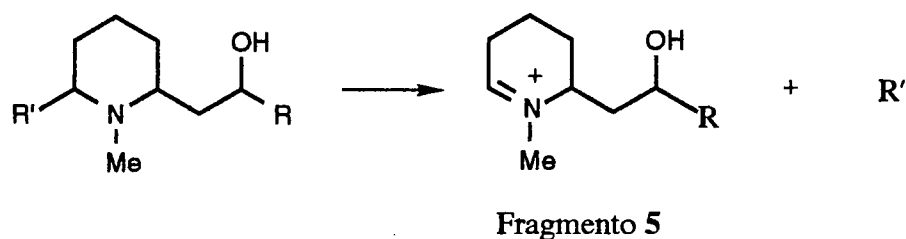




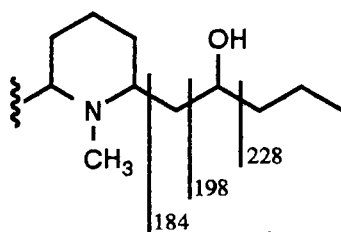
No.	Mass	%Int	No.	Mass	%Int	No.	Mass	%Int	No.	Mass	%Int	No.	Mass	%Int
1	272	0.2	17	166	1.6	33	110	5.1	51	81	2.3	75	43	8.4
2	271	1.5	18	156	0.6	34	109	1.4	52	79	0.6	76	42	8.1
3	270	0.5	19	154	0.2	35	108	0.3	54	73	1.3	77	41	4.2
4	254	0.1	20	152	0.2	36	100	0.2	56	71	2.8			
5	242	0.2	21	142	0.5	37	99	2.6	57	70	8.6			
6	229	1.6	22	141	0.3	38	98	39.2	59	69	2.7			
7	228	12.3	23	140	4.9	39	97	7.3	59	68	2.0			
8	210	0.4	24	138	0.6	40	96	14.6	60	67	4.4			
9	199	0.3	25	130	4.1	41	95	0.9	62	58	9.9			
10	198	0.5	26	128	0.1	42	94	1.0	63	57	9.7			
11	196	0.6	27	126	0.7	45	98	2.2	64	56	4.5			
12	185	11.6	28	124	0.3	46	86	17.5	65	55	14.7			
13	184	100.0	29	114	0.2	47	85	0.7	68	51	9.8			
14	182	1.1	30	113	0.4	48	84	25.4	70	49	41.9			
15	170	2.3	31	112	6.7	49	83	3.1	72	47	6.3			
16	168	0.7	32	111	1.0	50	82	3.8	74	44	4.8			

Figura 4: Espectro de Massa de SV-1 (18)

O fragmento **5**, característico de alcalóides piperidínicos 2,6 dissubstituídos,³³ é evidenciado pela presença do intenso pico a m/z 184, pico base, onde R corresponderia a C_3H_7 ($[M-43]$).

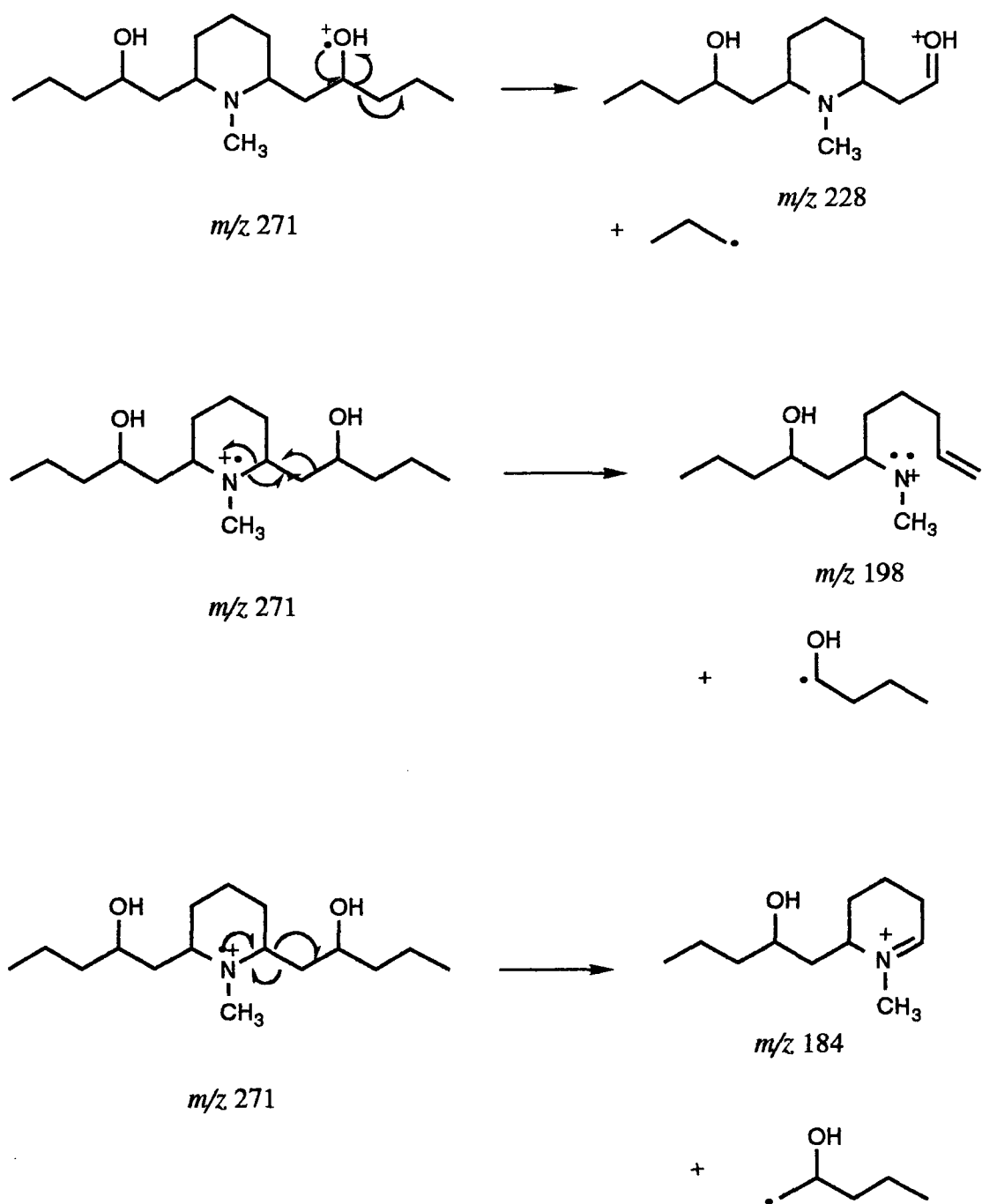


Assim, pode-se propor a seguinte fragmentação a uma das cadeias laterais do anel piperidínico:

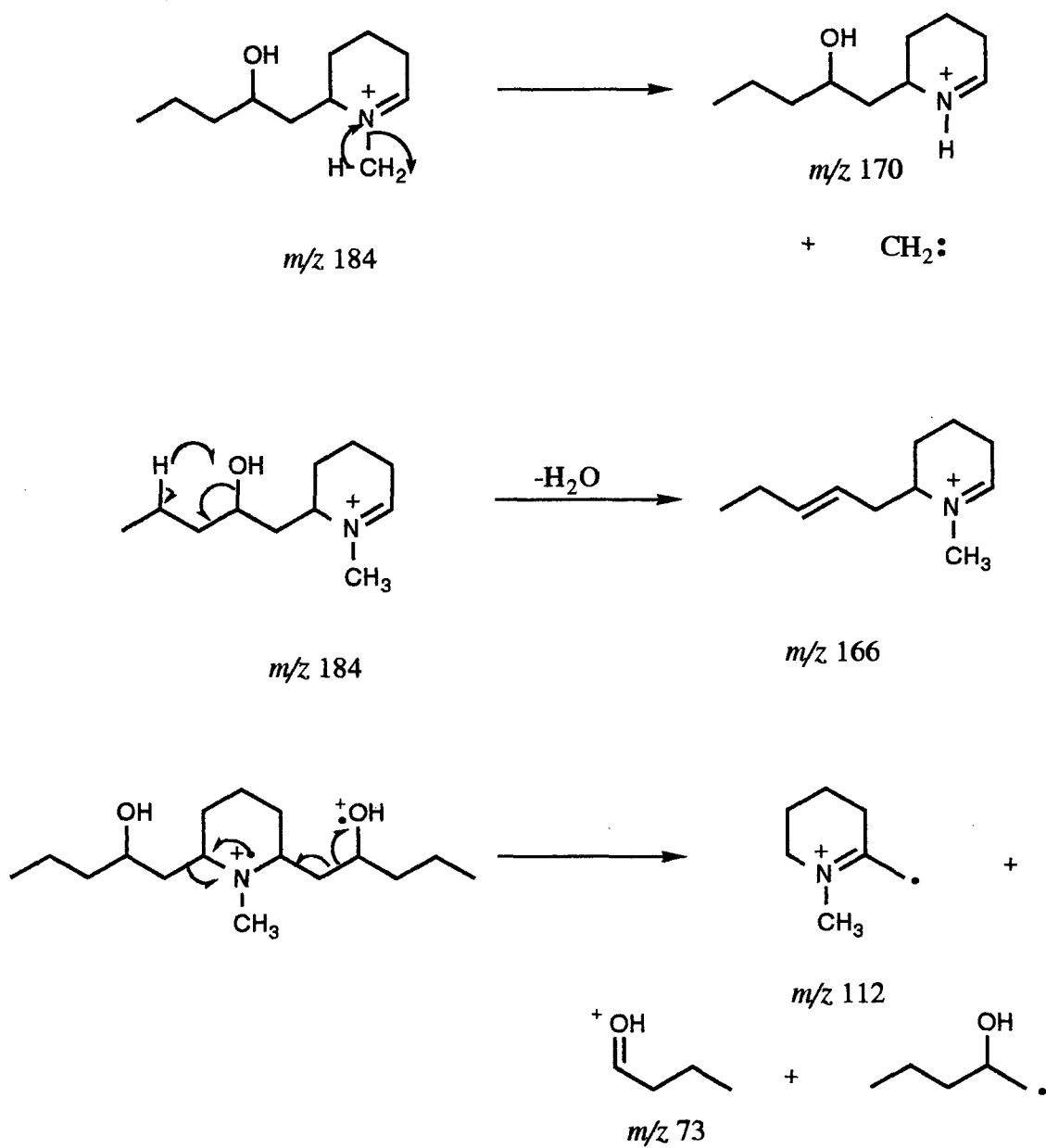


O fragmento m/z 170 pode ser oriundo do fragmento m/z 184, pela perda da metila ligada ao nitrogênio. Ainda, à partir do fragmento m/z 184, pela perda de uma molécula de água seria gerado o fragmento m/z 166. A fragmentação geral de composto SV-1 está representada nos esquemas **5**, **6** e **7**.

O fragmento estável m/z 96 também é observado em alcalóides piperidínicos correlatos.⁶⁹

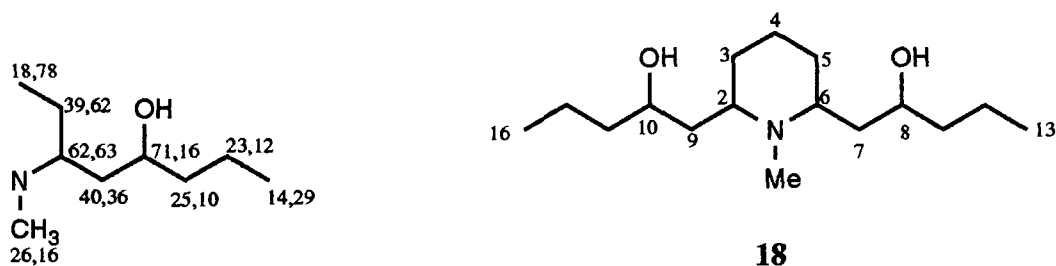


Esquema 5



Esquema 6

Os deslocamentos químicos atribuídos pelo espectro de ^{13}C RNM (Figura 5) foram compatíveis aos atribuídos em literatura para alcalóides correlatos,^{31,32,70} à exceção de δ 26,16, atribuído a metilamina, mostrando a presença de apenas nove ambientes químicos diferentes, sugerindo ser um composto simétrico, apresentando as mesmas substituições nas posições 2 e 6 do anel piperidínico, indicando ser a estrutura **18** a mais provável para SV-1.



Para confirmar a estrutura proposta para SV-1, as informações mais importantes foram provenientes dos espectros de ressonância nuclear de próton (200 e 300 MHz) e carbono-13 (75 MHz). O espectro de ^1H RNM de SV-1 (Figura 6) apresentou um triplete distorcido em δ 0,8 (6H, $J=7\text{Hz}$), correspondente aos grupos metila terminais (H-13/16) adjacentes aos grupos metilenos em C-12/15. Um multiplete em δ 1,1-1,7 foi atribuído aos diversos grupos metilenos em C-3/5, 4, 7/9, 11/14 e 12/15. Um singlete em δ 2,10 foi atribuído a N-CH₃, enquanto que os multipletes em δ 3,00-3,15 e δ 3,65-3,85 foram assinalados para os prótons em C-2/6 e para os C8/10, ligados ao grupo hidroxila, respectivamente.

A fim de facilitar a solubilidade do composto em clorofórmio e confirmar a presença dos grupos hidroxila, foi feita a acetilação do composto com anidrido acético e piridina, deixados em repouso a temperatura ambiente por uma noite. A solução foi concentrada em evaporador rotatório usando tolueno e suspensa com clorofórmio após lavagem com ácido clorídrico e bicarbonato de sódio diluídos para retirar o excesso de piridina, o composto apresentou pico característico para carbonila no espectro de infravermelho (1752 cm^{-1}) desaparecendo a banda inicial em 3377 cm^{-1} .

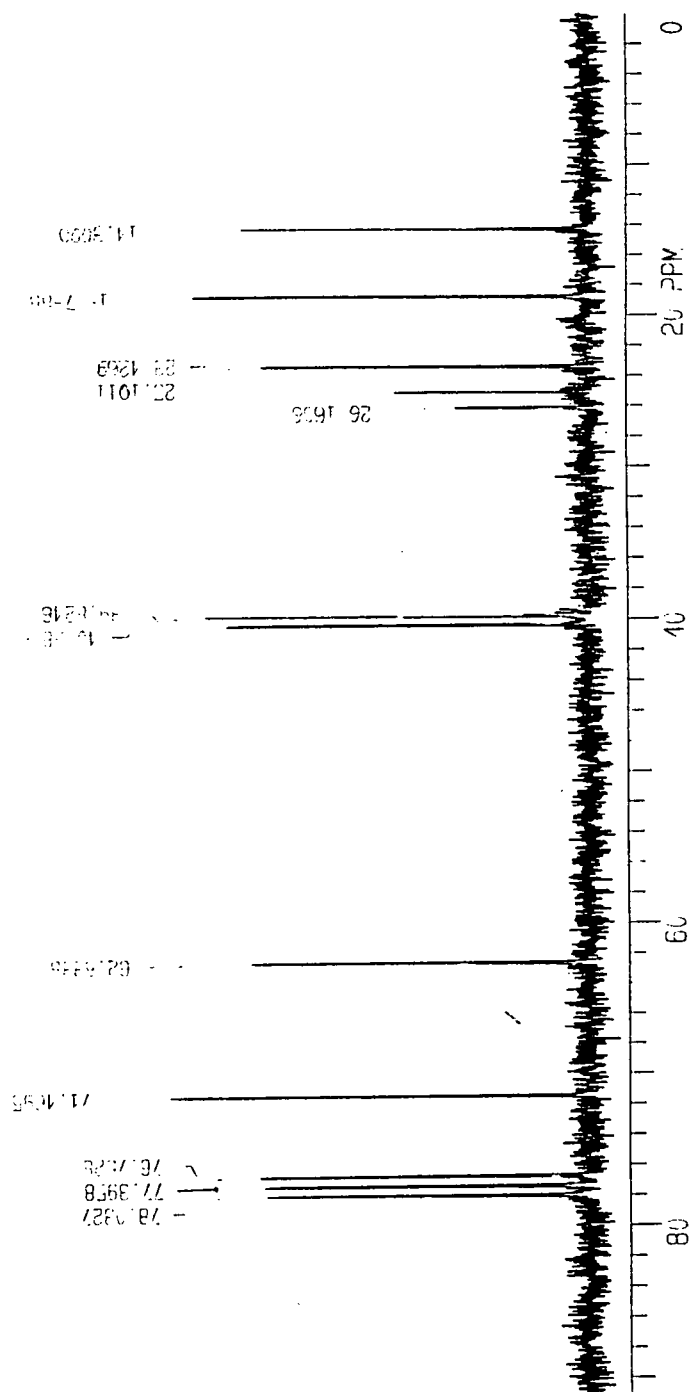


Figura 5: Espectro de ^{13}C RNM (75 MHz) de SV-1 (18).

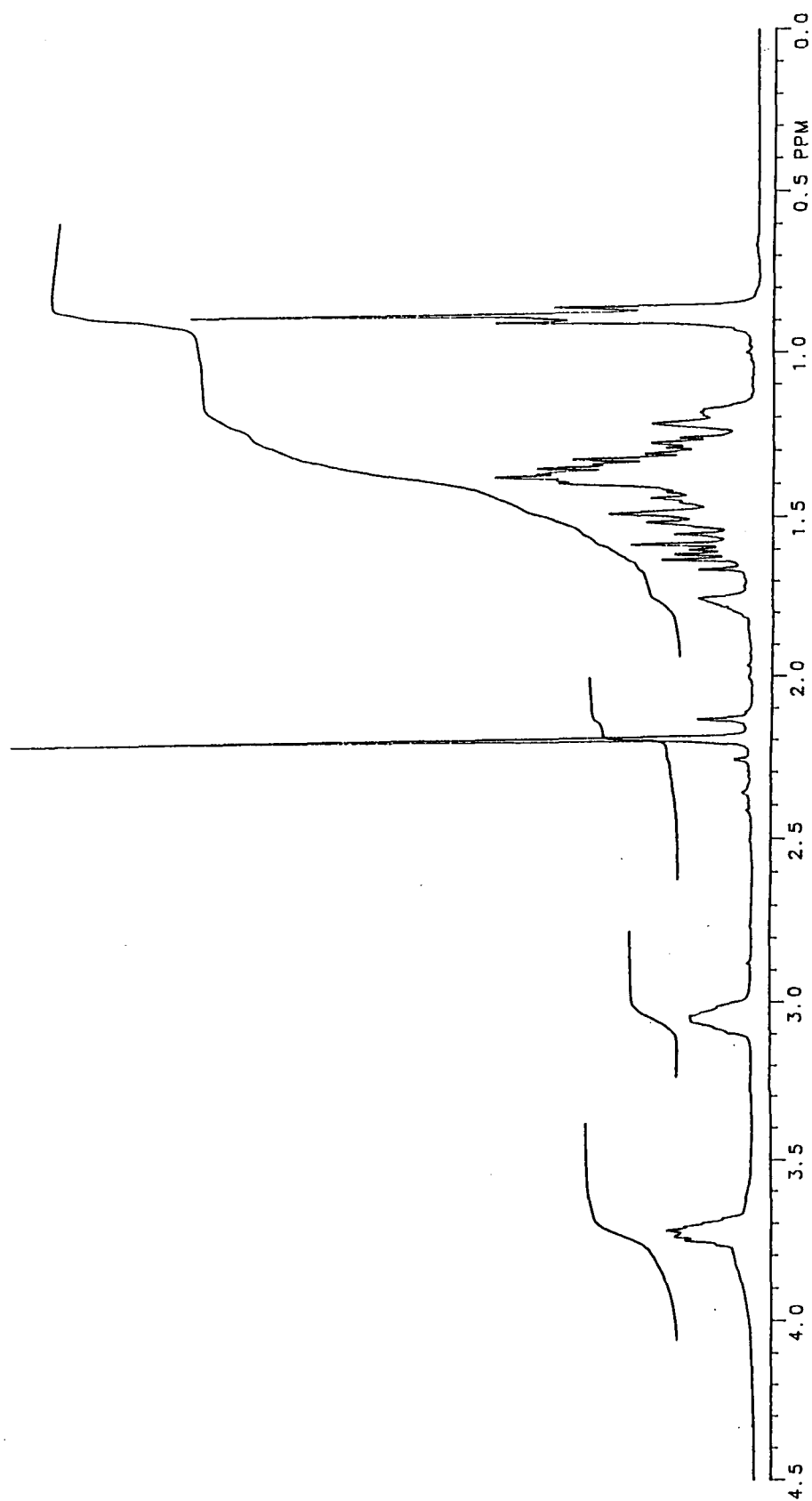
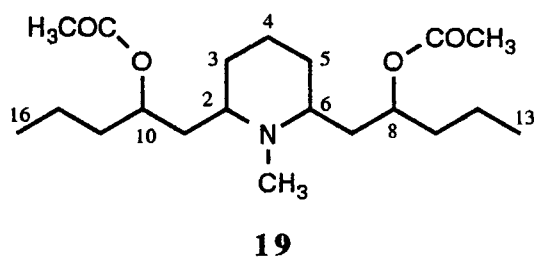


Figura 6: Espectro de ^1H RNM (300 MHz) de SV-1 (18).

O espectro de ^1H RNM (300 MHz) do composto acetilado **19** (Figura 7), associado a experimentos de desacoplamento seletivo, sumarizados na Tabela 1, apresentou um quinteto em δ 4,86 (2H, $J = 13$ e 6,5 Hz) correspondente aos prótons em C-8/10 com acoplamento de 13 Hz com o próton H-7_a/9_a e de 6,5 Hz com H₂-11/14, indicando que as hidroxilas foram acetiladas, além dos sinais característicos de acetato em δ 1,93. Irradiação em δ 4,36 transformou o quinteto em δ 1,79 em um duplo-duplete e o quarteto em δ 1,41 em triplete mostrando o acoplamento de C-11/14 com C-12/15 e de C-7_a/9_a com C2/6 e C-3/5, consistentes com o resultado apresentado no espectro de COSY ("CORrelated SpectroscopY") mostrado na Figura 8. Os prótons em C-2/6 apareceram como um largo multiplete em δ 2,20-2,40 que quando irradiados mostraram acoplamentos com o quinteto em δ 1,79 que passou a ser um duplo duplete (H-7_a/9_a) e com o multiplete em δ 1,10-1,35. Quando δ 1,79 foi irradiado o quinteto em δ 4,86 apareceu como um quarteto referente apenas ao acoplamento de C-8/10 com C-11/14, enquanto que irradiação de δ 1,41 (H-11/14) mostrou seu acoplamento com H-8/10 e com o multiplete em δ 1,10-1,35 referente ao metileno H-12/15. O triplete em δ 0,80 referente aos grupos metilas terminais C-13/16 mostrou-se como um singlete quando o multiplete em δ 1,10-1,35 foi irradiado, o qual, por sua vez, mostrou os acoplamentos referentes a H-2/6, H-7_a/9_a e H-11/14.

Tabela 1: ^1H RNM (300 MHz) de SV-1 diacetato (**19**).

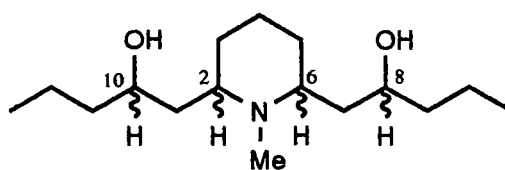
H	δ	multiplicidade	J Hz (H acoplado)
8/10	4,86	quinteto	13 (7 _a /9 _a), 6,5 (11/14)
2/6	2,20-2,40	largo multiplete	-
N-CH ₃	2,10	singlete	-
2 x Ac	1,93	singlete	-
7 _a /9 _a	1,79	quinteto	13(8/10), 7,5(3/5)
11/14	1,41	quarteto	-
3,4,5,7 _b ,9 _b ,12	1,10 - 1,35	multiplete	-
13/16	0,80	triplete	7



A atribuição dos deslocamentos dos prótons de SV-1 foi comparada com os dados de espectros apresentados na literatura de alcalóides piperidínicos correlatos, como o sinal para H-2/6 em δ 2,20-2,40 sem acoplamento com H-8/10, e um sinal em torno de δ 2,10, atribuído a metilamina.^{31,32,34,69}

O experimento de COSY (200 MHz) (Figura 8) revelou todos os relacionamentos de acoplamento da molécula e ao mesmo tempo confirmou os resultados mostrados no experimento de desacoplamento seletivo, comprovando a estrutura proposta pela análise do espectro de massa e ^{13}C RNM.

Estes resultados levaram a um amplo estudo bibliográfico indicando ser **18** um novo alcalóide piperidínico, simétrico, o qual foi denominado de 8,10-di-*n*-propil-lobelidiol.



8,10-di-*n*-propil-lobelidiol

No entanto, neste estágio a estereoquímica correta referente aos carbonos quirais C-2/6 e C-8/10 não poderia ser estabelecida por estudos de ressonância nuclear magnética, restando a possibilidade de se obter monocristais e usar difração por raio-X ou aplicação do método de Horeau^{71,72} já anteriormente utilizado por Ahmad^{31,32} na identificação de andrachina e outros alcalóides.^{35,73}

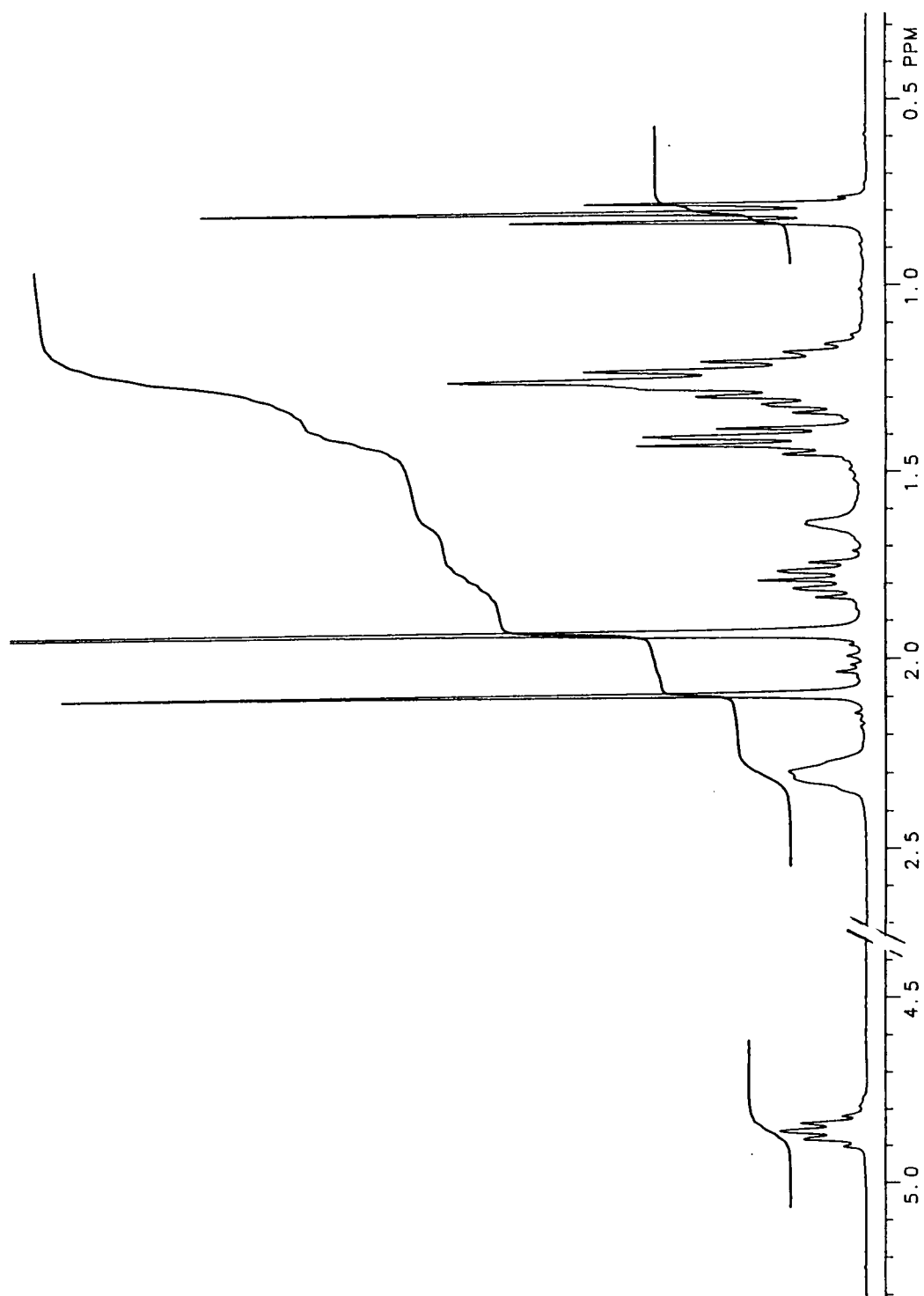


Figura 7: Espectro de ^1H RNM (300 MHz) de SV1-diacetato (19).

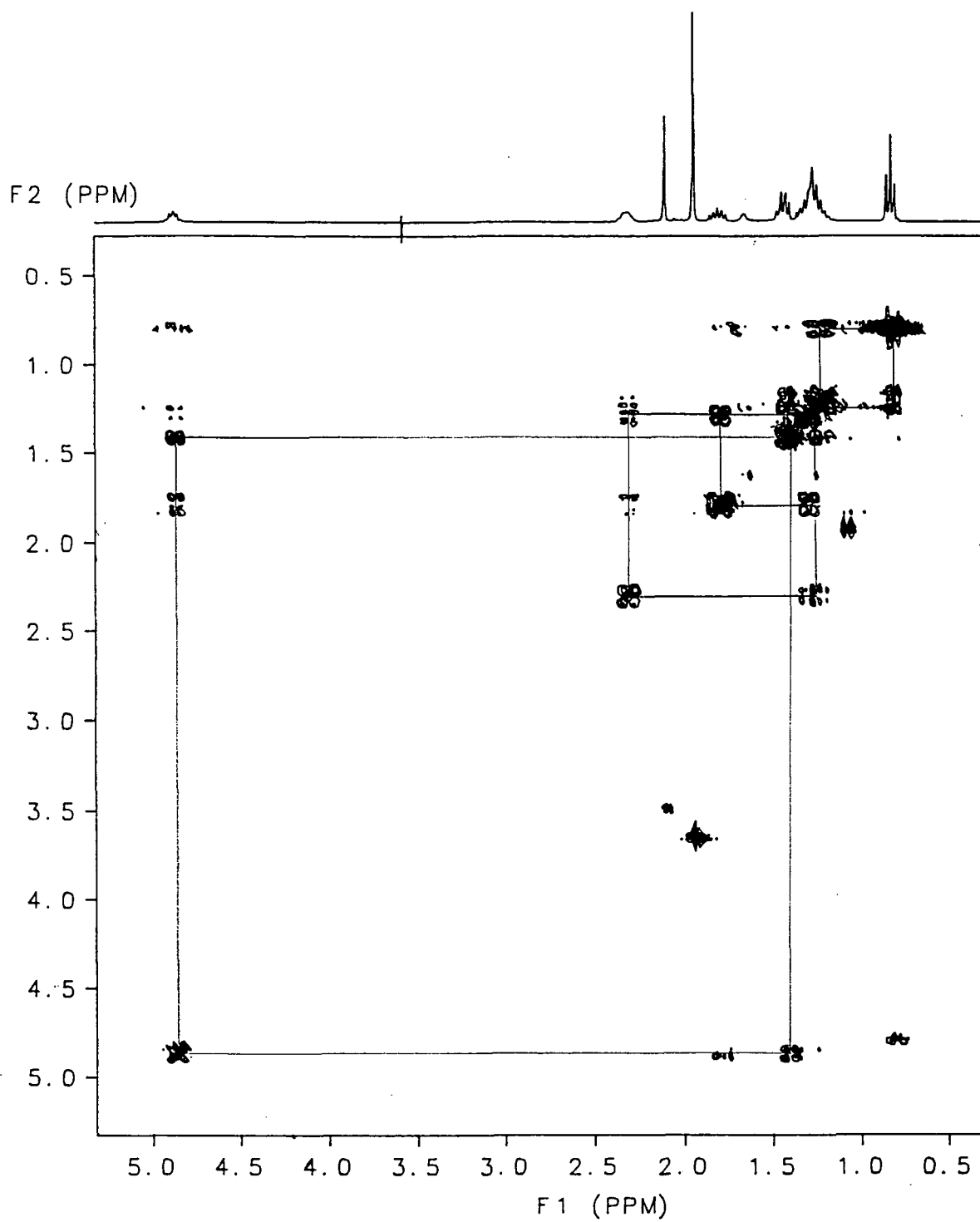


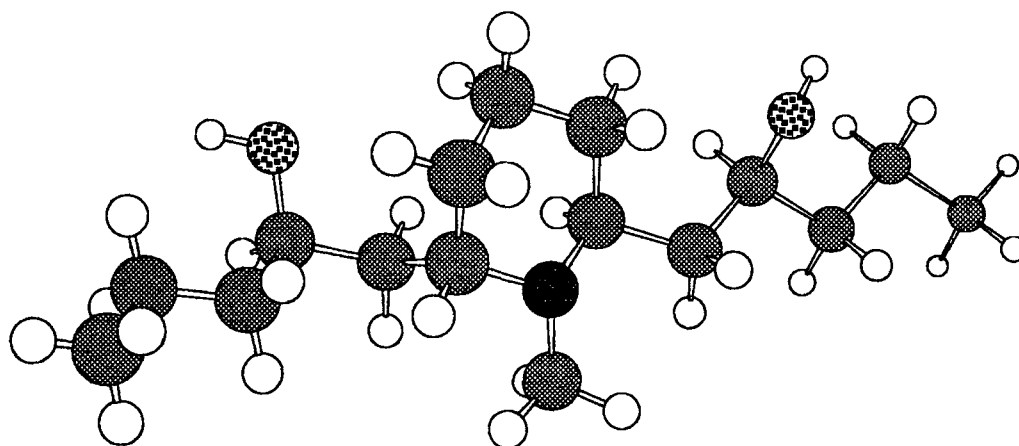
Figura 8: Espectro de COSY ^1H RNM (200 MHz) de SV1-diacetato (19).

É esperado que a configuração 2,6 *trans* diaxial (conformação **D**) do anel seja mais estável que *cis*-diequatorial (conformação **E**) o que, conseqüentemente, levaria a uma diferença nos ambientes químicos tanto para estes prótons como para carbonos nos seus respectivos espectros. Pela revisão bibliográfica realizada, observou-se que alcalóides com estruturas semelhantes, que não apresentam atividade ótica, possuem estrutura *cis* 8,10-lobelidiol, corroborando a hipótese da configuração *trans* do anel.^{30,74}

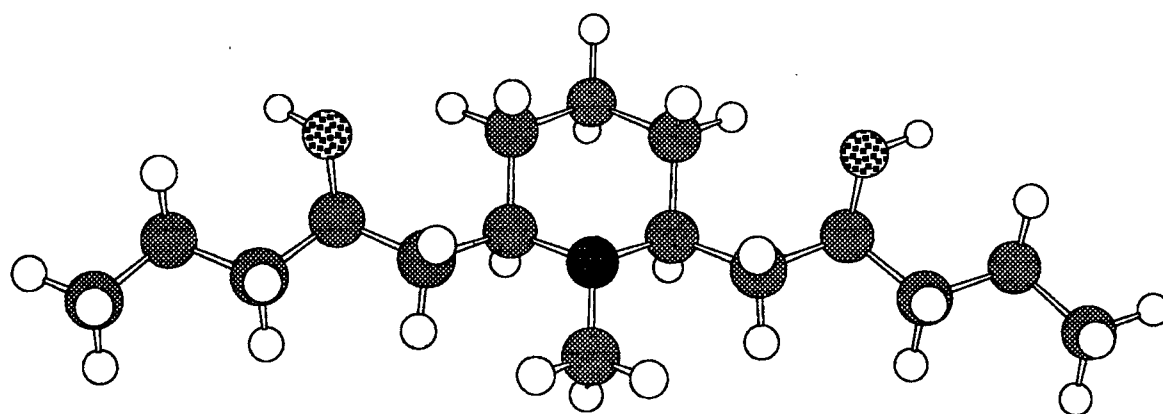
Através de estudos de análise conformacional em ¹³C RNM,⁷⁵ verifica-se que a estrutura *trans*-2,6-dimetil, apresenta para C-4 em espectro de ¹³C RNM, um deslocamento de δ 19,3, enquanto que para a conformação *cis* do anel, C-4 apresenta-se em δ 24,7. Neste trabalho, verificou-se um valor de δ 18,7 para C-4 em SV-1, o mesmo valor atribuído por Ahmad,³² que confirmou a estrutura *trans* diaxial no anel pelo método de Horeau. Estes dados de literatura sugerem que o anel piperidínico de SV-1 tenha a configuração *trans*.

Na falta de monocristais apropriados e de reativos para proceder a determinação de estereoquímica pelo Método de Horeau, a estrutura do composto foi submetida a estudos de modelos moleculares computadorizados com a finalidade de sugerir a possível conformação mais estável pela energia estérica final após minimização. Assim, as conformações **D** e **E** para 8,10-di-*n*-propil-lobelidiol foram as mais estáveis, apresentando energia estérica final usando parâmetros MM2 com valores finais de 29,6881 e 29,7094, respectivamente.

Os dados acima não foram suficientes para propor uma conformação definitiva para SV-1 indicando que apenas a análise cristalográfica dos monocristais do alcalóide, ou derivado deste, levariam a uma definição estereoquímica.



D



E

ESTUDOS FARMACOLÓGICOS SOBRE 8,10-*n*-DIPROPIL-LOBELIDIOL

TESTE GERAL DE ATIVIDADES (TGA)

Extrato bruto

O extrato bruto (E.B.) de *S. verticillatus* administrado em camundongos por via intraperitoneal nas doses entre 0,4 e 0,8 g/kg, causou diminuição de motilidade, piloereção e contorções abdominais, sugerindo que a administração do extrato provocou uma reação dolorosa nos animais, de modo a reduzirem a movimentação espontânea. Alguns animais que receberam doses mais elevadas apresentaram movimentos estereotipados, indicando uma possível ação do extrato sobre o sistema nervoso central (SNC).

Doses a partir de 1 g/kg, evidenciaram sinais indicativos de ações mais específicas do extrato bruto. Estes sinais foram de intensidade dose-dependente, observando-se agitação, prostração, perda de apreensão das patas, alteração do tônus muscular do dorso, tremores, dificuldade respiratória, cianose, convulsões e morte. No entanto, alguns animais que receberam doses entre 1 e 3 g/kg não evoluíram até convulsões e morte, apresentando recuperação após intensa dificuldade respiratória e cianose.

Após a administração de 4 g/kg, ficaram mais evidentes os efeitos sobre a musculatura esquelética e SNC. A redução da motilidade, o arrasto do trem posterior, a dificuldade respiratória e a cianose sugerem ação sobre os receptores da junção neuromuscular, enquanto que os movimentos estereotipados, as convulsões e morte produzidas por esse extrato indicam ação sobre o SNC.

Alcalóides totais

A administração da mistura de alcalóides obtida a partir do extrato bruto da planta apresentou potência até dez vezes superior àquela observada pela administração do extrato

bruto. Não foram observados os sinais de dor pela administração intraperitoneal (i.p.), sendo mais evidentes os efeitos sobre a musculatura esquelética e SNC. Doses de 0,05 até 1 g/kg, provocaram prostração, tremores, descoordenação motora e dificuldade respiratória, sugerindo ação sobre a musculatura esquelética. Outros efeitos como a elevação da cauda dos animais (Straub positivo), piloereção, movimentos estereotipados, convulsões e morte indicam que essa fração também apresenta ações sobre o SNC.

Nas doses superiores a 0,5 g/kg não foi possível a observação daquelas ações que foram nítidas com doses menores, pois imediatamente após a administração os animais apresentaram convulsões e morte.

Esses efeitos verificados são em muitos aspectos semelhantes as ações de agonistas nicotínicos típicos, como a lobelina e a nicotina.⁷⁶⁻⁷⁹

Alcalóide SV-1

O teste geral de atividades realizado em camundongos por via i.p. com alcalóide SV-1 puro na forma cristalina, mostrou atividade a partir da dose de 0,05 g/kg.

Os efeitos observados inicialmente sugerem ação depressora, seguida de ação estimulante do SNC. A redução da motilidade, a sedação, a ptose palpebral, a perda da sensibilidade dolorosa, e a catatonia eram progressivamente substituídas por movimentos estereotipados, agitação, excitação, convulsões e morte. A intensidade desses sinais foram dependentes da dose.

Pela administração do alcalóide SV-1 verifica-se de forma mais clara as ações sobre a musculatura esquelética e SNC. Em muitos aspectos estas ações são semelhantes àquelas produzidas por agonistas nicotínicos.

O teste geral de atividades realizado em camundongos sugere que os extratos obtidos desta planta possuem ação sobre a musculatura esquelética e sobre o SNC.

Toxicidade aguda

A determinação dos índices de toxicidade aguda dos extratos de *S. verticillatus* indicam que em camundongos tratados por via i.p. o extrato bruto (Figura 9) foi capaz de provocar a morte de 50% dos animais (DL₅₀) com dose de 3,39 g/kg. A fração de alcalóides totais testada mostrou-se aproximadamente vinte vezes mais potente e promoveu a morte de 50% dos camundongos com a dose de 157 mg/kg (Figura 10). O alcalóide isolado SV-1, que apresentou DL₅₀ de 112 mg/kg, foi tão potente quanto a mistura de alcalóides testada, indicando que este alcalóide é o maior responsável pela toxicidade aguda observada (Figura 11).

Os sinais mais evidentes do efeito do alcalóide observados durante os testes preliminares e de toxicidade aguda serviram de base para as investigações posteriores.

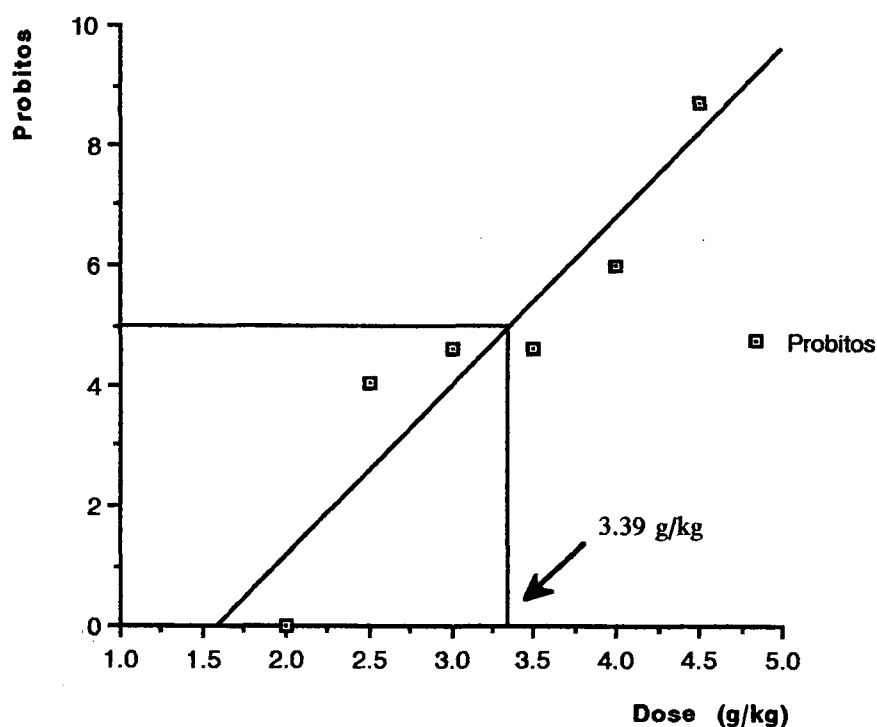


Figura 9: DL₅₀ do extrato bruto de *S. verticillatus*.

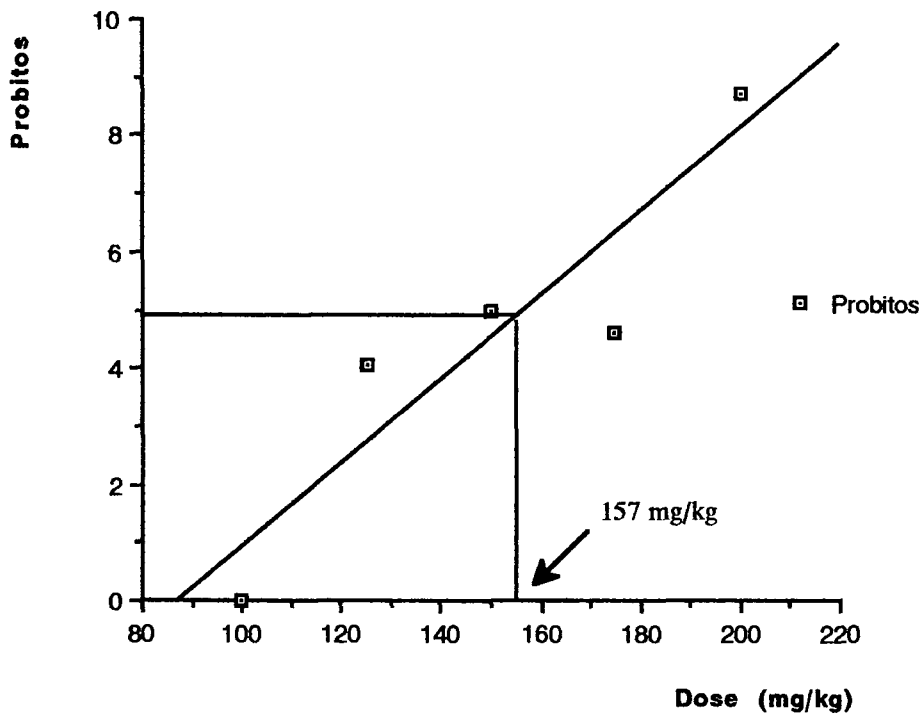


Figura 10: DL₅₀ da fração de alcalóides totais de *S. verticillatus*.

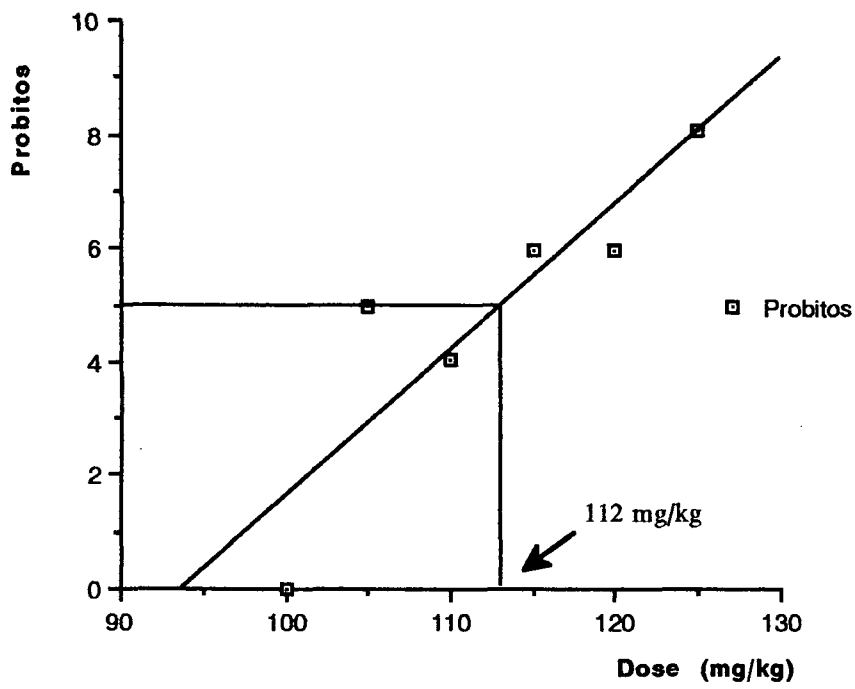


Figura 11: DL₅₀ de SV-1.

Ação de SV-1 sobre o SNC

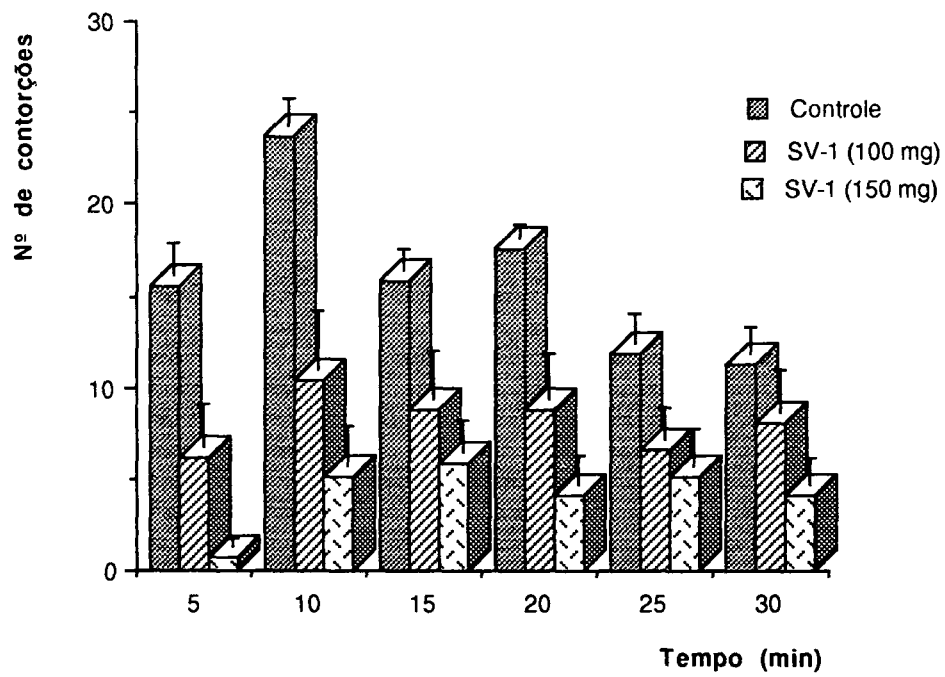
Durante a realização do TGA e DL₅₀, observou-se claramente que as convulsões apresentadas pelos camundongos são dose-dependente. As convulsões clônico-tônicas produzidas pelo alcalóide SV-1 foram observadas a partir da dose de 105 mg/kg. Com o objetivo de tentar o bloqueio destas convulsões,⁸⁰ foi realizado um teste preliminar com drogas anticonvulsivantes clássicas com mecanismos de ação conhecidos. Dentre as drogas testadas (difenhidantoína, diazepam, fenobarbital e haloperidol), apenas o diazepam na dose de 10 mg/kg foi capaz de proteger os animais das convulsões induzidas pelo alcalóide. No entanto, o diazepam não protegeu os animais da morte. Pode-se supor que o alcalóide SV-1 tenha potencializado o efeito depressivo do diazepam ou que o alcalóide tenha promovido o relaxamento da musculatura esquelética, o qual ficou mais evidente quando os efeitos estimulantes foram bloqueados com o diazepam. Uma ação semelhante a esta é observada com drogas tipo nicotina,^{81,82} que também causam relaxamento muscular.

De modo contrário, o haloperidol na dose de 10 mg/kg facilitou o aparecimento das convulsões, diminuindo o tempo de latência para o início destes efeitos estimulantes.

Estes dados sugerem que as convulsões induzidas por SV-1 sejam mais devido a uma facilitação da excitação do que por um bloqueio dos mecanismos inibitórios.

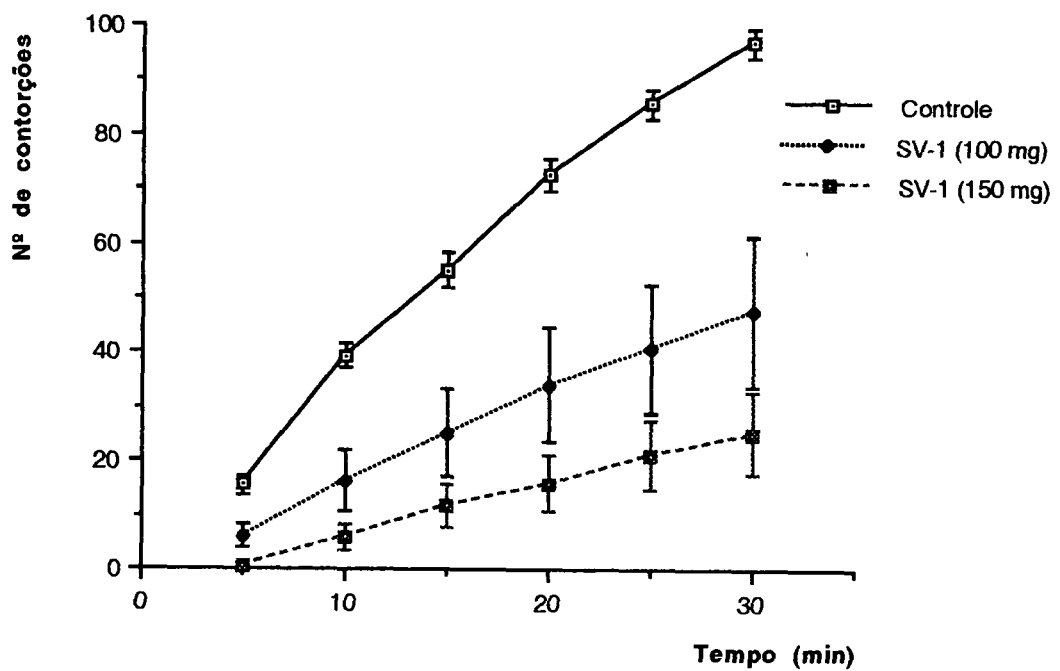
Atividade antinociceptiva de SV-1

O conjunto de sinais caracterizados por Straub positivo, perda de sensibilidade dolorosa e agitação dos animais, observadas no TGA, sugeriram a realização de testes para a avaliação de uma possível atividade antinociceptiva deste alcalóide (efeito tipo morfina). Esta propriedade foi avaliada no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético (Writhing test). Foi observado que a injeção prévia (30 minutos) de SV-1 nas doses de 100 e 150 mg/kg (s.c.) causou uma diminuição dose-dependente no número de contorções abdominais de 50 e 73%, respectivamente (Figuras 12 e 13).



$p < 0,05$

Figura 12: Contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%



$p < 0,05$

Figura 13: Contorções abdominais acumuladas induzidas por ácido acético 0,8%.

Este efeito assemelha-se mais ao efeito antinociceptivo da nicotina do que da morfina, uma vez que para a dose de 150 mg/kg de alcalóide foi observada a ocorrência da diarreia em 83% dos animais, sugerindo aumento da motilidade gastrointestinal típico da nicotina, enquanto que a morfina diminui o trânsito intestinal.⁸³

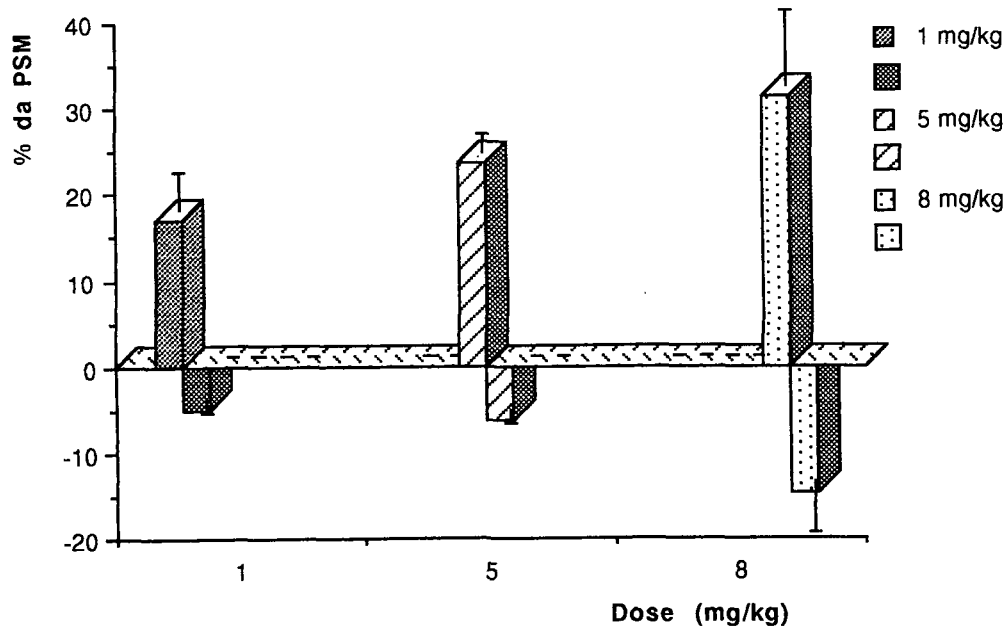
Nestas doses e via de administração testada não foram verificados sinais de hiperalgesia, como também vem sendo relatado em literatura para lobelina e nicotina.^{64,65,83,84} O que está bem demonstrado é que os efeitos de analgesia e hiperalgesia são dose-dependentes; quais sejam, doses baixas causam analgesia e altas doses causam hiperalgesia. Além disso, a ocorrência de efeito analgésico ou hiperalgésico também depende da estrutura do SNC na qual o agonista nicotínico é injetado.^{81,85}

Diversos trabalhos tem demonstrado que a nicotina e a lobelina interferem com diversos sistemas neuromensageiros ao nível do SNC, como gabaérgicos e dopaminérgicos, mas não se conhece o(s) mecanismo(s) exato(s) dos seus efeitos sobre a sensação dolorosa.^{86,87} Porém, tanto os efeitos analgésicos como os hiperalgésicos são antagonizados pela naltrexona (antagonista de receptores opióides) e pela mecamilamina (antagonista de receptores nicotínicos) demonstrando claramente que estes efeitos decorrem da ação sobre receptores opióides e nicotínicos.^{81,85}

Alteração da pressão arterial de ratos por SV-1

Os efeitos de hiperemia e prostração observados nos testes preliminares indicaram que o alcalóide SV-1 poderia exercer ação sobre o sistema vascular. Para verificar esta hipótese, realizaram-se testes sobre os níveis pressóricos em ratos anestesiados.

A administração (i.v.) de SV-1 produziu elevação nos níveis pressóricos (Figura 14). A pressão sanguínea média foi elevada em $17,2 \pm 4,32\%$ com a dose de 1 mg/kg, em $23,7 \pm 1,9\%$ com a dose de 5 mg/kg e em $31,4 \pm 8,6\%$ com a dose de 8 mg/kg. O efeito hipertensor foi na maioria das vezes seguido por hipotensão, mas esta não mostrou uma clara relação com a dose administrada conforme pode ser visto na figura 14.



$p < 0,05$

Figura 14: Curva dose-resposta de SV-1 sobre a pressão arterial em ratos.

Para verificar se houve uma redução do efeito hipertensor produzido pela administração de doses repetidas, realizamos testes com três doses consecutivas do alcalóide a intervalos de 5 minutos. Doses repetidas de 5 mg/kg produziram sempre hipertensão com intensidade semelhante, indicando a ausência de um processo de dessensibilização, taquifilaxia e/ou outro que fosse capaz de alterar uma segunda ou terceira resposta do alcalóide para esta dose. No entanto, foi verificada uma queda no nível pressórico basal, após a aplicação repetida da mesma dose do alcalóide, sugerindo a possibilidade de estar ocorrendo bloqueio ganglionar, efeito este comumente observado na presença de agonistas nicotínicos.

Os resultados obtidos sugerem:

- 1) Uma ação vasoconstrictora que poderia estar ocorrendo por estimulação direta ou indireta de receptores α -adrenérgico de vasos (principalmente em arteríolas);
- 2) Uma ação estimulante sobre os receptores β -adrenérgicos cardíacos;
- 3) Uma ação bloqueadora de receptores β -adrenérgicos de vasos

4) Uma ação estimulante sobre receptores nicotínicos ganglionares.

Para esclarecer se a hipertensão produzida pelo alcalóide pode estar ocorrendo através da estimulação de receptores α -adrenérgicos em vasos sanguíneos (arteríolas), foram realizados experimentos com ioimbina 4 mg/kg, que é uma droga bloqueadora dos receptores α -adrenérgicos. O efeito hipertensor de SV-1 (5 mg/kg) foi reduzido de $22,8 \pm 1,8\%$ para $13,6 \pm 3,8\%$ após a administração de ioimbina, indicando que aproximadamente 50% do efeito hipertensor produzido pelo alcalóide foi devido a estimulação dos receptores α -adrenérgicos de vasos sanguíneos, que são responsáveis pelo aumento da resistência periférica total e elevação dos níveis pressóricos. Este resultado, no entanto, não permite concluir se a estimulação dos receptores α -adrenérgicos produzida pelo alcalóide SV-1 ocorreu através de uma ação direta ou indireta. Por outro lado, o efeito hipotensor do SV-1 (5 mg/kg) foi potencializado de $6,4 \pm 1,4\%$ para $22,1 \pm 4,4\%$, após o bloqueio dos receptores α -adrenérgicos com ioimbina sugerindo a ocorrência de uma somação de efeitos. A hipotensão aumentada após a ioimbina seria resultante da diminuição do tônus simpático após o bloqueio dos receptores α -adrenérgicos de arteríolas com consequente redução da resistência periférica total e da ação do alcalóide em outro sítio de ação, além dos receptores α -adrenérgicos de arteríolas.

Para testar a hipótese de uma possível ação do alcalóide sobre os receptores β -adrenérgicos, foi realizado o registro dos níveis pressóricos em presença do bloqueador propranolol na dose de 1 mg/kg. A ação hipertensora induzida por 5 mg/kg do alcalóide SV-1 não foi alterada pela administração de propranolol, sugerindo que esta ação do alcalóide não está sendo mediada por receptores β -cardíacos, já que quando estes estão bloqueados a hipertensão continua ocorrendo. Por outro lado, a ação hipotensora provocada pelo alcalóide SV-1 (5 mg/kg) de $6,4 \pm 1,4\%$ antes da administração de propranolol foi potencializada para $26,7 \pm 9,2\%$ após a sua administração, indicando neste caso, que o bloqueio dos receptores β -cardíacos soma-se ao efeito do alcalóide levando a uma maior hipotensão resultante.

O efeito hipotensor produzido por SV-1 não foi alterado pelo bloqueio dos receptores colinérgicos muscarínicos, através da administração endovenosa de atropina 100 μ g/kg, descartando uma possível ação do alcalóide sobre esses receptores.

Como o antagonismo dos receptores α -adrenérgicos com ioimbina 4 mg/kg foi capaz de bloquear somente cerca de 50% do efeito hipertensor promovido pelo alcalóide, sugere-se que o alcalóide pode estar promovendo a estimulação da cadeia ganglionar simpática, levando desta forma à liberação de neurotransmissores endógenos para que estes atuem sobre os receptores α e β -adrenérgicos de arteríolas. Esta hipótese justificaria inclusive o aumento da hipotensão observada após o bloqueio dos receptores α -adrenérgicos com ioimbina, pois a adrenalina endógena com liberação aumentada estaria promovendo uma maior estimulação dos receptores β -adrenérgicos causando vasodilatação, enquanto os receptores α -adrenérgicos estão bloqueados. Para testar esta hipótese, considerando também as características quimiotaxonômicas da planta, as quais sugerem semelhança com a nicotina, promoveu-se o bloqueio dos receptores nicotínicos ganglionares com hexametônio (1 mg/kg). O bloqueio dos receptores nicotínicos ganglionares reduziu aproximadamente 50% do efeito hipertensor de SV-1 (5 mg/kg), confirmando as já supostas ações deste alcalóide sobre os receptores nicotínicos de gânglios.

Os resultados obtidos sugerem que o alcalóide SV-1 promove a estimulação dos receptores nicotínicos ganglionares e da medula adrenal, causando uma descarga simpática, com aumento dos níveis circulantes de adrenalina e noradrenalina endógena causando estimulação dos receptores α -adrenérgicos de arteríolas com conseqüente vasoconstrição, aumento da resistência periférica total e elevação dos níveis pressóricos.

A semelhança estrutural de SV-1 e lobelina, cujas ações sobre receptores nicotínicos⁸⁸⁻
⁹² estão bem descritas em literatura, corrobora com os resultados obtidos neste trabalho.

EXPERIMENTAL

Equipamentos e reagentes

As cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em sílica gel 60 G e GF₂₅₄ Merck em placas de vidro ativadas à 100°C por uma hora em estufa tendo como fase móvel a mistura acetato de etila (EtOAc):isopropanol (*i*-PrOH):hidróxido de amônio (NH₄OH) (80:15:5) e como revelador específico para alcalóides Dragendorff acético.⁹³

Para as cromatografias de adsorção em coluna foram utilizadas sílica gel 60 G Merck 70-230 mesh e Aldrich 100-200 mesh como fases estacionárias. Como fases móveis utilizou-se hexano, tolueno, diclorometano (CH₂Cl₂), clorofórmio (CHCl₃), acetato de etila (EtOAc), isopropanol (*i*-PrOH) e metanol (MeOH). O ponto de fusão foi determinado em aparelho Kofler; a rotação ótica em polarímetro Cenco; os espectros infravermelho (IV) em espectrômetro Perkin Elmer em pastilhas de KBr, os espectros de ¹H RNM foram obtidos em espectrômetros Varian Gemini 200 a 200 MHz e em Bruker XL 300 a 300 MHz, em CDCl₃, sendo que os deslocamentos químicos estão descritos em δ em relação ao tetrametilsilano (TMS). Os espectros de ¹³C RNM foram obtidos também em Varian Gemini 200 a 75 MHz. Os espectros de massa e a fórmula molecular foram obtidos num espectrômetro Kratos Concept. Os espectros foram realizados no Departamento de Química da Universidade de Manchester, Inglaterra.

As estruturas em 3D foram processadas em computador Apple Macintosh[®], processador MC68030 CPU, coprocessador MC68882 FPU, e as energias minimizadas sob parâmetros MM2 usando Chem 3D Plus[™].

Para os estudos de pressão arterial em ratos utilizou-se manômetro de mercúrio de Condon e quimógrafo com papel esfumado.

Para os testes *in vivo* foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos (*Rattus norvegicus* variedade *albinus*, 200 ±30 g); camundongos (*Mus musculus*, 23 ±6 g) de ambos os sexos, fornecidos pelo biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura e iluminação com livre acesso a água e ração.

Todas as drogas e extratos testados *in vivo* foram diluídas em solução salina (NaCl) 0,9% até a concentração necessária para cada dose a ser administrada.

Todas as drogas padrões utilizadas nos testes farmacológicos são de procedência Sigma Chemical Co. e Merck S.A.

Coleta do material

O material foi coletado às margens da BR-277 (Curitiba-Paranaguá), nas proximidades do Km 70, durante o período de floração do vegetal nos meses de janeiro de 1993 e 1994. A identificação do material coletado foi feita pelo professor Rubens Leonart e foi comparado à excicata UPCB 12401 do herbário do Departamento de Botânica do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Foram coletadas partes aéreas e rizomáticas que, limpas, pesaram 6 kg. Após secagem em estufa 60°C por 24 horas, separou-se para os experimentos os rizomas até 1/3 do caule aéreo^{47,50} pesando 1 kg após moídos.

Extração

O material reduzido a pó foi macerado em solução aquosa de HCl 1%, filtrado e lavado até não dar mais reação positiva frente ao reativo de Dragendorff. O extrato assim obtido foi filtrado por algodão e papel filtro respectivamente e concentrado em banho maria até 1/3 do seu volume inicial. Foi então alcalinizado com amônia diluída²⁵ até pH básico em papel de tornassol (entre 9 e 10) e extraído com CHCl₃ até reação negativa frente a reativo de Dragendorff.

Fracionamento do extrato

A fração CHCl_3 concentrada em rotavapor forneceu 3,40 g do extrato alcaloídico, o qual foi percolado em coluna com 120 g de sílica (numa proporção aproximada de trinta vezes o peso do material em sílica), eluindo-se com tolueno, tolueno: CH_2Cl_2 (9:1), tolueno: CH_2Cl_2 (4:1), tolueno: CH_2Cl_2 (1:1), tolueno: CH_2Cl_2 (1:2), CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 : CHCl_3 (9:1), CH_2Cl_2 : CHCl_3 (4:1), CH_2Cl_2 : CHCl_3 (4:1), CH_2Cl_2 : CHCl_3 (1:1), CH_2Cl_2 : CHCl_3 (1:2), CHCl_3 , CHCl_3 :EtOAc e EtOAc:MeOH nas mesmas proporções já citadas, até MeOH.

Deste fracionamento foram obtidas 370 frações, e a partir da fração 220 observou-se manchas marron avermelhadas em CCD quando reveladas com Dragendorff acético.⁹³

Foram reunidas as frações de 220-329 (A), 330-338 (B) e 340 até 370 (C), tendo sido desprezadas as frações iniciais (até 219) por não conterem alcalóides em quantidades representativas.

Isolamento dos alcalóides

A partir do fracionamento obtido conforme acima, a fração A foi eluída através de CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 : CHCl_3 (1:1), CH_2Cl_2 : CHCl_3 (1:2), CHCl_3 , CHCl_3 :EtOAc (1:1), CHCl_3 :EtOAc (1:2), EtOAc, EtOAc:MeOH (1:1), EtOAc:MeOH (1:2), MeOH em aproximadamente trinta vezes o seu peso em sílica, obtendo-se 150 frações.

As frações anteriores a 40 foram desprezadas por não apresentarem manchas quando reveladas com Dragendorff em CCD.

As frações 40-70 foram reunidas por apresentarem uma mancha apenas em CCD, a menos polar de uma série de manchas reveladas com Dragendorff.

Após purificação em cromatografia preparativa em fase móvel EtOAc:*i*-PrOH: NH_4OH (80:15:5), retomada em CHCl_3 , obteve-se um precipitado alcaloídico não cristalino que pesou 10 mg, denominado SV-2.

As frações 70-150 da fração A a fração B, por ser uma fração intermediária, continham uma mistura dos alcalóides da planta, as quais foram reunidas e utilizadas para experimentos *in vivo*, denominada alcalóides totais (A.T.)

A fração C foi concentrada, fornecendo 1,5 g de resíduo seco, o qual foi percolado com 30 g de sílica pela fase móvel $\text{CHCl}_3:i\text{-PrOH}$ (7:3). Deste fracionamento assim obtido, juntou-se as frações que apresentaram maior semelhança ao padrão de manchas por CCD, obtendo-se três frações que continham uma das manchas em maior proporção. Essas frações foram denominadas de SV-1, SV-2 e SV-3, correspondendo aos três alcalóides presentes em maior quantidade na planta.

O resíduo seco da fração SV-1 foi percolado com aproximadamente trinta vezes o seu peso em sílica, utilizando a fase móvel $\text{CHCl}_3:i\text{-PrOH}$ (7:3), obtendo-se 190 frações.

Deste fracionamento, as frações 1 a 30 forneceram cristais alcaloídicos determinados SV-1, numa quantidade de 107 mg, com ponto de fusão entre 31-32°C, $[\alpha]_D = 0^\circ$ (MeOH, c 2,0 e 4,0).

Dados espectroscópicos de SV-1, 8,10-*n*-dipropilobelidiol (18)

Cristalizado a partir de CHCl_3 como finas agulhas brancas, $[M^+]$ 271,2501; $\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{NO}_2$.

CCD: EtOAc:*i*-PrOH: NH_4OH (80:15:5) $R_f=0,6$

I.V.: ν 3377,0, 2932,0, 1466,0, 1346,0, 1158,0, 844,0, 755,0 cm^{-1}

MS : m/z 271 $[M^+]$, 228 $[M - 43]$; 184 $[M - 87]$ (100%), 170 $[M - 101]$, 166 $[M - 105]$, 140 $[M - 131]$, 98 $[M - 173]$, 86, 84, 70 e 55.

Tabela 2: ^1H RNM (300 MHz, CDCl_3 , TMS)

H	δ	multiplicidade	J Hz (H acoplado)
8/10	3,75	tripleto	13 ($7_a/9_a$), 6,5 (11/14)
2/6	3,05	singleto (largo)	-
N- CH_3	2,20	singleto	-
$7_a/9_a$	1,78	quarteto	13 (8/10) (2/6); 7,5 (11/14) (3/5)
11/14	1,42	quarteto	7 (12/15) (9/7) (2/6) (8/10)
12/15, 3/5, 4	1,10-1,60	multipleto	7 (11/14) ($7_a/9_a$) (2/6) (8/10)
13/16	0,81	tripleto	7 (11/14)

Tabela 3: ^{13}C RNM (75 MHz, CDCl_3)

C	δ
8/10	71,16
2/6	62,63
7/9	40,36
3/5	39,62
N-CH ₃	26,16
11/14	25,10
12/15	23,12
4	18,78
13/16	14,29

Acetilação de SV-1

O composto SV-1 foi tratado com anidrido acético (*c* 10 ml/g) e piridina (*c* 5 ml/g) à temperatura ambiente, por 12 horas. Após evaporação sob pressão reduzida usando tolueno como mistura azeotrópica, o resíduo formado foi suspenso em clorofórmio e lavado com HCl 5% e NaHCO_3 10%, seco e percolado em coluna de alumina (atividade II-III) fornecendo o 8,10-di-*n*-propil-diacetil-lobelidiol (**19**). O produto amorfo foi então obtido por evaporação do solvente.

CCD: EtOAc:*i*-PrOH: NH_4OH (80:15:5) $R_f=0,8$

I.V. (cm^{-1}): 2932,0, 1752,0, 1465,0, 1345,0, 1052,0, 1158,0, 844,0.

^1H RNM, acetato (300 MHz, CDCl_3 , TMS): Tabela 1, página 28.

A fração denominada SV-3 foi purificada através de cromatografia preparativa em camada delgada com a fase móvel EtOAc:*i*-PrOH: NH_4OH (80:15:5) e posteriormente adicionada a uma coluna montada em pipeta Pasteur, eluindo-se CHCl_3 forneceu um precipitado branco não cristalino, que após evaporação em rotavapor pesou 17 mg. O mesmo

foi denominado de SV-3, correspondendo a mancha imediatamente inferior àquela produzida pelos cristais SV-1 em CCD.

Os compostos SV-2 e SV-3 estão sendo submetidos a estudos espectrométricos para os quais não se tem ainda dados a apresentar.

Teste Geral de Atividades em Camundongos

Para os estudos de atividade do alcalóide SV-1 foram coletados aproximadamente 20 kg da planta as quais foram dessecadas e submetidas ao isolamento de SV-1 conforme descrito anteriormente, apresentando um rendimento de cerca de 800 mg, utilizados exclusivamente para os testes *in vivo*.

Foram utilizados nove camundongos injetados intraperitonealmente (i.p.) com doses de extrato bruto (E.B.) de 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 2000, 3000 e 4000 mg/kg. Testou-se também em nove camundongos uma mistura de alcalóides totais da planta (A.T.) obtidos por cromatografia em coluna nas doses de 50, 100, 200, 300, 500 e 1000 mg/kg (i.p.) e o alcalóide SV-1 nas doses de 10, 50, 100 e 125 mg/kg (i.p.). Os animais controle (um por grupo) receberam veículo (solução salina 0,9%) em volume correspondente.

Todos os camundongos tratados foram observados em uma superfície plana antes da administração do extrato, da fração alcalóides totais e do alcalóide puro SV-1 e após 5, 10, 15, 30, 60 minutos e 2, 4, 6, 12, 24 horas. Com o resultado das observações foram preenchidas tabelas padronizadas adaptadas daquela descrita por Malone.⁹⁴

Cálculo da DL₅₀

Para a determinação da dose letal 50% do E.B., A.T., e SV-1 utilizou-se grupos de 6 camundongos fêmeas que receberam doses fixas pré-determinadas por via i.p. O E.B. foi administrado nas doses de 2; 2,5; 3; 3,5; 4; e 4,5 g/kg. A fração alcalóide foi testada nas doses

de 100, 125, 150, 175 e 200 mg/kg e o alcalóide SV-1 foi administrado nas doses de 100, 105, 110, 115, 120 e 125 mg/kg.

Os animais foram observados durante as primeiras 24 horas e calculadas as percentagens de morte através do método dos mínimos quadrados, utilizando a regressão retilínea com probitos.⁹⁵

Teste de pressão arterial em ratos

Os ratos foram anestesiados por via i.p. com a mistura de uretana 20% (0,8 g/kg) e pentobarbital sódico 1% (40 mg/kg) e fixados em decúbito dorsal em placa de cortiça, canulando-se a veia ilíaca externa para injeção de drogas e a artéria carótida para o registro da pressão arterial. As variações pressóricas foram obtidas através de manômetro de mercúrio de Condon e registradas em papel esfumado movimentado por quimógrafo, numa velocidade de 14 mm/min.

A pressão arterial foi inicialmente registrada durante 5 minutos, antes dos animais serem injetados com as substâncias em estudo. As injeções endovenosas (e.v.) das substâncias e drogas padrões não ultrapassaram 0,4 ml.

O bloqueio muscarínico, o bloqueio dos receptores α e β -adrenérgicos, e dos receptores nicotínicos foram efetuados com injeção de atropina (100 μ g/kg, e.v.), propranolol (1 mg/kg, e.v.), ioimbina (4 mg/kg, e.v.) e hexametônio (1 mg/kg, e.v.) respectivamente.

Após a realização da curva dose-efeito foi escolhida a dose de 5 mg/kg de SV-1 para verificação dos possíveis bloqueios.⁹⁶ Foram utilizados 6 animais para cada dose e drogas testadas. As diferenças entre os grupos foram analisados pelo teste "t" de Student e consideradas significantes aquelas em que $p < 0,05$.

Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Camundongos machos (15-30 g) foram divididos em três grupos e injetados previamente com solução salina (NaCl 0,9%, grupo 1 ou controle), SV-1 nas doses de 100 mg/kg (grupo 2) e 150 mg/kg (grupo 3) por via subcutânea e 30 minutos após todos os animais foram injetados com ácido acético 0,8% por via intraperitoneal, num volume de 0,1 ml para cada 10 g de peso corporal. A seguir foram contadas as contorções abdominais, seguidas da extensão de pelo menos uma das patas traseiras, por um período de 30 minutos, a intervalos de 5 minutos.

Os resultados foram expressos como a média do número de contorções em cada intervalo de 5 minutos (Figura 12) e como a média do número de contorções acumuladas a cada 5 minutos durante os 30 minutos (Figura 13). Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste "t" de Student e consideradas significantes aquelas em que $p < 0,05$.⁹⁷

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Finar, I. L. *Organic Chemistry*; 5th ed.; Longman: London, 1975; Vol. 2, pp 942.
- (2) Evans, W. C. *Trease and Evans' Pharmacognosy*; 13th ed.; Baillière Tindall: London, 1989, pp 832.
- (3) Cordell, G. A. *Introduction to Alkaloids - A Biogenetic Approach*; John Wiley & Sons: New York, 1981, pp 1055.
- (4) Tyler, V. E.; Brady, L. R.; Robbers, J. E. *Pharmacognosy*; 8th ed.; Lea & Febiger: Philadelphia, 1981, pp 520.
- (5) Trease, G. E.; Evans, W. C. *Pharmacognosy*; 11th ed.; Baillière Tindall: London, 1978, pp 784.
- (6) Sebben, A.; Schwartz, C. A.; Cruz, J. S. *Ciência Hoje* **1993**, *87*, 25.
- (7) Keogh, M. F.; O'Donovan, D. G. *J. Chem. Soc.* **1970**, 2470.
- (8) Leistner, E.; Spenser, I. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 4715.
- (9) Gupta, O. P.; Gupta, S. C.; Dhar, K. L.; Atal, C. K. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 601.
- (10) O'Donovan, D. G.; Forde, T. *J. Chem. Soc.* **1971**, 2889.
- (11) O'Donovan, D. G.; Long, D. J.; Forde, E.; Geary, P. *J. Chem. Soc. Perkin I.* **1975**, 415.
- (12) Leete, E.; Gros, E.; Gilbertson, T. J. *J. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3907.
- (13) Griffith, T.; Griffith, G. D. *Phytochemistry* **1966**, *5*, 1175.
- (14) Leete, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91*, 1697.
- (15) Gupta, R. N.; Spenser, I. D. *Can. J. Chem.* **1967**, *45*, 1275.
- (16) Keogh, M. F.; O'Donovan, D. G. *J. Chem. Soc.* **1970**, 1792.
- (17) Gupta, R. N.; Spenser, I. D. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 1937.

-
- (18) Gerdes, H. J.; Leistner, E. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 771-775.
- (19) Leete, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1958**, *80*, 4393.
- (20) O'Donovan, D. G.; Forde, T. *J. Chem. Soc.* **1971**, 2889.
- (21) Cronquist, A. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*; Columbia University Press: New York, 1981; Vol. 2.
- (22) Hegnauer, R. *Chemotaxonomie der Pflanzen*; Birkhäuser Verlag: Basel, 1966; Vol. 4.
- (23) Contin, A. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1993.
- (24) *Martindale - The Extra Pharmacopeia*; 29th ed.; Reynolds, J. E. F., Ed.; The Pharmaceutical Press: London, 1989.
- (25) *Farmacopéia Brasileira II*; 2ª ed.; Ind. Gráfica Siqueira S.A.: São Paulo, 1959.
- (26) Henry, T. A. *The Plant Alkaloids*; 4th ed.; J. & A. Churchill Ltd: London, 1949.
- (27) Costa, A. F. *Farmacognosia*; 2ª ed.; Fundação Calouste Gulbekian: Lisboa, 1977; Vol. 2.
- (28) *The Alkaloids - Chemistry and Physiology*; Manske, R. H. F.; Holmes, H. L., Ed.; Academic Press Inc.: New York, 1950; Vol. 1.
- (29) *The Alkaloids - Chemistry and Physiology*; Manske, R. H. F., Ed.; Academic Press Inc.: New York, 1968; Vol. XI.
- (30) Schöpf, C.; Kauffmann, T. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1957**, *608*, 88.
- (31) Ahmad, V. U.; Nasir, M. A. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 585.
- (32) Ahmad, V. U.; Nasir, M. A. *Heterocycles* **1986**, *24*, 2841.
- (33) Francis, L. P. S.; Francis, G. W. *Planta Med.* **1977**, *32*, 268.
- (34) Franck, B. *Chem. Ber.* **1960**, *93*, 2360.
- (35) Hootelé, C.; Coleau, B.; Halin, F. *Tetrahedron Let.* **1980**, *21*, 5063.
- (36) Stermitz, F. R.; Tawara, J. N.; Boeckl, M.; Pomeroy, M.; Foderaro, T. A.; Todd, F. *G. Phytochemistry* **1994**, *35*, 951.
- (37) Tawara, J. N.; Blokhin, A.; Foderaro, T. A.; Stermitz, F. R. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4813.
- (38) Tallent, W. H.; Horning, E. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 4467.

-
- (39) Aguinaldo, A. M.; Read, R. W. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2309.
- (40) Roberts, M. F.; Brown, R. T. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 447.
- (41) Reavill, C.; Walther, B.; Stolerman, L. P.; Testa, B. *Neuropharmacol.* **1990**, *29*, 619-624.
- (42) *The Alkaloids - Chemistry and Physiology*; Manske, R. H. F., Ed.; Academic Press Inc: New York, 1955; Vol. V.
- (43) Brioni, J. D.; O'Neill, A. B.; Kim, D. J. B.; Decker, M. W. *Eur. J. Pharmacol.* **1993**, *238*, 1-8.
- (44) Barroso, G. M. *Sistemática das Angiospermas do Brasil*; Imprensa Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, 1986; Vol. 3.
- (45) Godoy, S. A. P. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 1989.
- (46) Buras, J. S. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 1985.
- (47) Garelo, F. *Archivos de Farmacia y Bioquímica* **1950**, *5*, 5-46.
- (48) Corral, R. A.; Orazi, O. O.; Pizzorno, M. T. *Anales Asoc. Quím. Argentina* **1970**, *53*, 285-290.
- (49) Magalhães, A. F.; Vieira, D. M.; Magalhães, E. G.; Sheperd, G. J. *Química Nova* **1989**, *12*, 298.
- (50) Leonart, R.; Moreira, E. A.; Lamb, L.; Santos, C. A. M. *Tribuna Farmacêutica* **1983-4**, *51-52*, 26.
- (51) Cervi, A., Descrição botânica de *Siphocampylus verticillatus*, **1993**.
- (52) Burkert, U.; Allinger, N. L. *Molecular Mechanics*; ACS Monograph 177 ed.; American Chemical Society, ACS Monograph 177: Washington, D. C., 1982, pp 339.
- (53) Allinger, N. L. *Molecular Mechanisms 1987 Force Field*; Indiana University: 1988; Vol. MM2(87).
- (54) Lii, J. H.; Allinger, N. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8566.
- (55) Allinger, N. L.; Rahman, M.; Lii, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8293.
- (56) Allinger, N. L.; Yuh, Y. H.; Lii, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 8551.

-
- (57) Bettencourt, J. M. D.; Carvalho, J. S.; Pinto, B. G.; Pimentão, J. B. C. *R. Seances Soc. Biol. Fil.* **1977**, *171*, 329-333.
- (58) Yanaura, S.; Nishimura, T.; Hosokawa, T.; Abe, Y.; Iwase, H. *Folia Pharmacol. JPN* **1978**, *74*, 345-352.
- (59) Luterer, E. v.; Haxhiu, M. A.; Mitra, J.; Cherniack, N. S. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exercise Physiol.* **1984**, *56*, 737-745.
- (60) Rau, H.; Schweizer, R.; Zhuang, P.; Pauli, P.; Brody, S.; Larbig, W.; Heinle, H.; Mueller, M.; Elbert, T. *Psychopharmacol.* **1993**, *110*, 337-341.
- (61) Mccrimmon, D. R.; Lalley, P. M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1982**, *222*, 771-777.
- (62) Carvalho, L.; Silva, J.; Bettencourt, J. M.; Carvalho, J. S.; Pimentão, J. B.; Pinto, B. G. *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.* **1981**, *175*, 416-419.
- (63) Sasaki, T. *Jap. Heart J.* **1973**, *14*, 539-547.
- (64) Hamman, R. S.; Martin, W. R. *Brain Res. Bull.* **1992**, *29*, 507-509.
- (65) Yang, C. Y.; Wu, W. H.; Zbusek, V. K. *Psychopharmacol.* **1992**, *106*, 417.
- (66) Sloan, J. W.; Todd, G. D.; Martin, W. R. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1984**, *20*, 899-910.
- (67) Pec, P. *Biologia (Bratisl.)* **1986**, *40*, 1209-1216.
- (68) Barlow, R. B.; Johnson, O. *Br. J. Pharmacol.* **1989**, *98*, 799-808.
- (69) Williams, H. J.; Ray, A. C.; Kim, H. L. *J. Agr. Food Chem.* **1987**, *35*, 19-22.
- (70) Zhang, M. Z.; Wang, J. C.; Zhou, S. H. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 1353.
- (71) Horeau, A. *Tetrahedron Let.* **1961**, *15*, 506.
- (72) Horeau, A.; Nouaille, A. *Tetrahedron Let.* **1971**, *22*, 1939.
- (73) Colau, B.; Hootelé, C. *Can. J. Chem.* **1983**, *61*, 470.
- (74) Arthur, H. R.; Chan, R. P. K. *J. Chem. Soc.* **1963**, 750.
- (75) Eliel, E.; Kandasamy, D.; Yen, C.; Hargrave, K. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 3698.
- (76) Thesleff, S. *Acta Physiol. Scand.* **1955**, *34*, 218.
- (77) Mansuri, S. M.; Kelkar, V. V.; Jindal, M. N. *Indian J. Med. Res.* **1974**, *62*, 930-937.

-
- (78) Lambert, J. J.; Volle, R. L.; Henderson, E. G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1980**, *77*, 5003-5007.
- (79) Volle, R. L. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1974**, *282*, 335-347.
- (80) Caufield, M. P.; Higgins, G. A. *Neuropharmacol.* **1983**, *22*, 347-351.
- (81) Martin, W. R.; Kumar, S.; Sloan, J. W. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1988**, *29*, 725.
- (82) Zetler, G. *Neuropharmacol.* **1973**, *12*, 741-749.
- (83) Goodman, L. S.; Rall, T. W.; Murad, F. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*; 7ª ed.; Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1987.
- (84) Degtyarev, V. P. *Farmakol. Toksikol. (Mosc)* **1980**, *43*, 360.
- (85) Parvin, S.; Hamann, S. R.; Martin, W. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1992**, *265*, 286.
- (86) Sieklucka-Dziuba, M.; Kleinrok, Z. *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska Sect. D. Med.* **1982**, *37*, 301.
- (87) Mora, M. P. d. l.; Mendez-Franco, J.; Salceda, R.; Aguirre, J. A.; Fuxe, K. *Acta Physiol. Scand.* **1991**, *141*, 241-250.
- (88) Satoh, S.; Hashimoto, K. *Tohoku J. Exp. Med.* **1973**, *110*, 376-375.
- (89) Sakurai, Y.; Takano, Y.; Kohjimoto, Y.; Honda, K.; Kamiya, H. *Brain Research* **1982**, *242*, 99-106.
- (90) Haefely, W. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* **1974**, *281*, 93-117.
- (91) Alderdice, M. T.; Weiss, G. B. *Neuropharmacol.* **1975**, *14*, 811-817.
- (92) Borstel, R. W. v.; Evoniuk, G. E.; Wurtman, R. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**, *236*, 344-349.
- (93) Stahl, E. *Analyse Chromatographique et Microscopique des Drogues*; Societé P.I.C.: Genève, 1975.
- (94) Malone, M. H. *Pharmacological Approaches to Natural Product Screening and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity*; Springer - Verlag: Berlin, 1977.
- (95) Astudillo, V.; Wanderley, M. In *Organización Panamericana de la Salud*: 1976; pp 30.
- (96) Borges, C. R. A. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 1992.

- (97) Emim, J. A. S. Tese de Mestrado, Universidade de São Paulo, 1992.