

**Maria Auxiliadora C. Kaplan**

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ, 21941 – Rio de Janeiro – RJ

**Maria Raquel Figueiredo**

Instituto de Química, USP, 05508 – São Paulo – SP

**This paper extends the tendencies of micromolecular evolution in plants, evidenced by Gottlieb and co-workers to the Ranunculaceae family.**

## INTRODUÇÃO

Em 1888, Stahl publicou um estudo biológico sobre os princípios defensivos das plantas contra a predação por lesmas<sup>1</sup>. Essa função ecológica atribuída aos metabólitos secundários foi generalizada para envolver outros predadores, por Fraenkel em 1959, em um trabalho de grande aceitação<sup>3</sup> que inspirou Erlich e Raven em 1964 a falarem de uma co-evolução planta/borboleta<sup>3</sup>. Mais recentemente, em 1978, Janzen definiu substâncias secundárias como produtos químicos produzidos por plantas e animais para interação com outros organismos que não o produtor<sup>4</sup>, conceito esse que Harborne em 1988 aproveitou para explicar a riqueza do metabolismo secundário como um arsenal químico diversificado<sup>5</sup>.

Em uma primeira crítica, Gottlieb considerou a literatura do século a respeito da função ambiental dos metabólitos secundários, baseada em evidências circunstanciais e introduziu evidência experimental rigorosa para se desvendarem os mecanismos de formação das micromoléculas vegetais<sup>6</sup>. A metodologia, que consiste no registro da ocorrência das classes biossintéticas e na quantificação das características químicas dos representantes dessas classes, leva ao conhecimento de gradientes químicos evolutivos comparáveis a gradientes morfológicos evolutivos<sup>7,8</sup>. Dentre os gradientes químicos, dois merecem destaque com referência a Angiospermae. O primeiro diz respeito ao bloqueio gradual dos intermediários da via do ácido chiquímico, como precursores de grupos biogenéticos de metabólitos secundários<sup>9</sup>. O segundo fala da progressiva eficiência de transferência de oxigênio, na evolução fitoquímica em direção à diversidade<sup>7</sup>.

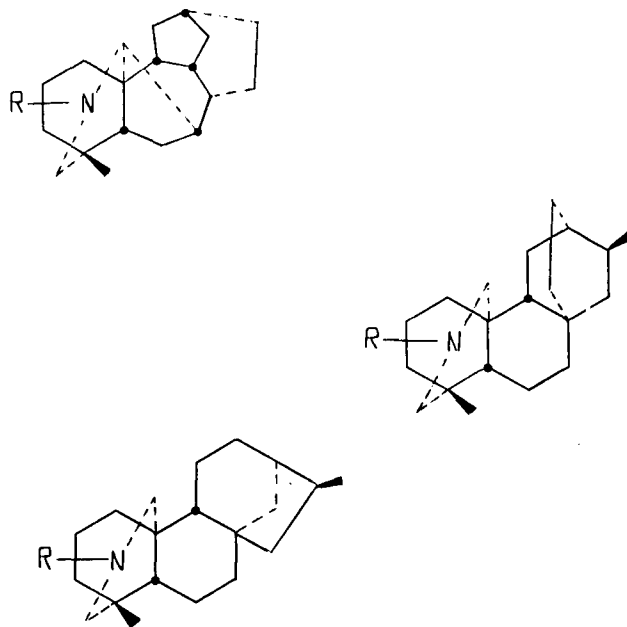
O presente trabalho visa demonstrar mais uma vez a validade desses conceitos tão originais e tão enfaticamente demonstrados por Gottlieb, em uma centena de trabalhos extremamente minuciosos. Ambos os pontos merecerão aqui uma análise centralizada na família Ranunculaceae.

## METABOLISMO SECUNDÁRIO E OXIGENAÇÃO EVOLUTIVA DAS SUBSTÂNCIAS EM RANUNCULACEAE

A ordem Ranunculales é formada principalmente pelas famílias Berberidaceae e Menispermaceae, ambas lenhosas e muito ricas em alcalóides benzilisoquinolínicos derivados de fenilalanina, um intermediário da via do ácido chiquímico, ao lado da família Ranunculaceae herbácea e mais evoluída<sup>10</sup>. Tais alcalóides também ocorrem em Ranunculaceae, mesmo que restritos aos gêneros *Thalictrum*, *Hydrastis*, *Coptis*, *Aquilegia* e *Letptopyrum*. Esses derivados de fenilalanina são, no entanto, substituídos como micromoléculas mais abundantes

em outros gêneros da família, por derivados da via do ácido acético/ácido mevalônico, como esteróides em *Adonis* e *Hel-leborus* e por alcalóides diterpenoidicos nos gêneros *Aconitum* e *Delphinium*. Há assim, claramente em Ranunculaceae, a família mais evoluída da ordem, uma nítida passagem da química micromolecular derivada de chiquimato ("lignosa"), para uma química micromolecular derivada de mevalonato ("herbácea"). Nota-se adicionalmente, dentro de cada classe metabólica, um aumento evolutivo da diversidade micromolecular caracterizado pela oxigenação crescente das substâncias. Para demonstrar esse segundo ponto foram selecionados os alcalóides diterpenoidicos da família Ranunculaceae, marcadores taxonômicos valiosos que são, para os gêneros *Aconitum* e *Delphinium*.

Com base nas suas estruturas e nas suas atividades biológicas, esses alcalóides podem ser considerados em dois grandes grupos (Fig. 1):



**Figura 1.** Tipos estruturais de alcalóides diterpenoidicos.

1. Alcalóides do tipo aconano, com 19 átomos de carbono, altamente tóxicos e extremamente ricos em grupos substi-

tuintes oxigenados. Em todas as substâncias representantes do grupo, o átomo de nitrogênio é terciário e suporta um grupo metila ou etila. Substituintes hidroxila ou metoxila são frequentes e, às vezes, as hidroxilas estão esterificadas com ácido acético e/ou ácido benzóico (Fig. 2). É impressionante a toxidez de espécies dos gêneros *Delphinium* e *Aconitum* devido a presença de alcalóides do tipo aconano. A dose letal de aconitina (1), para o homem, é de apenas 2-5mg<sup>11</sup>. Uma grande causa de morte de gado nos Estados Unidos é o envenenamento por *Delphinium barbeyi*<sup>12</sup>, planta bastante comum no país. A substância responsável pela atividade biológica é a lycocotamina (2) que, juntamente com outras substâncias correlatas, causa paralização das vias respiratórias<sup>13</sup>.

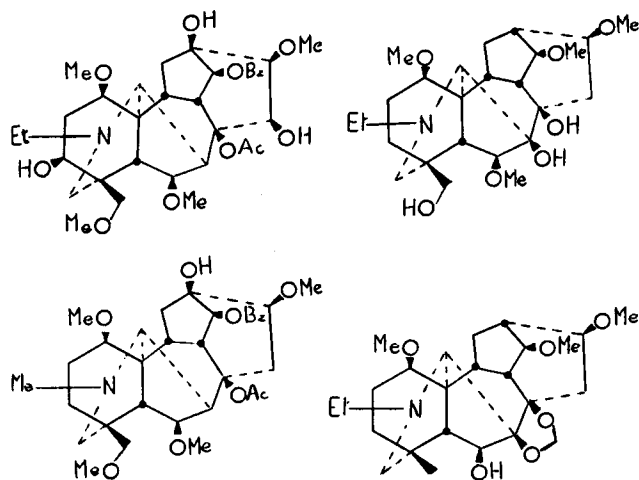


Figura 2. Exemplos de alcalóides diterpenóidicos do tipo aconano.

2. Alcalóides dos tipos atisano e caurano, com 20 átomos de carbono, são menos tóxicos e muito menos oxigenados (Fig. 3). Em plantas da família Ranunculaceae tais alcalóides ocorrem frequentemente acompanhados de um ou mais derivados do tipo aconano. Alcalóides com esqueletos atisano e caurano aparecem também em *Spiraea* (Rosaceae), *Garrya* (Garryaceae) e *Anopterus* (Escalloniaceae).

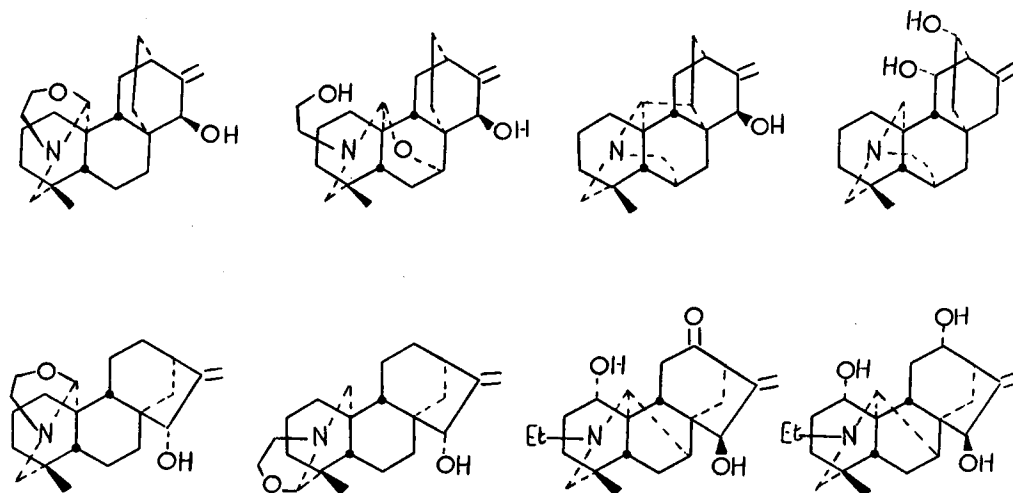


Figura 3. Exemplos de alcalóides diterpenóidicos dos tipos atisano e caurano.

Um levantamento bibliográfico de estrutura/ocorrência dos três tipos de alcalóides diterpenóidicos revelou a existência em *Aconitum* de 157 aconanos, 30 atisanos e 22 cauranos e, em *Delphinium* de 132 aconanos, 19 atisanos e 3 cauranos. Para cada uma das posições biossinteticamente equivalentes dos tipos diterpenícos (indicadas pela numeração idêntica na Fig. 1), foi determinada a percentagem dos átomos de carbono oxigenados, no conjunto das substâncias descritas. Reunidos na Tabela 1, esses dados indicam claramente um aumento da oxidação global no sentido caurano-atisano-aconano. Não obstante percebe-se, pela considerável diversidade na incidência de oxigenação para átomos de carbono biossinteticamente equivalentes, não serem os cauranos precursores dos atisanos (Tabela 1, Esquema 1). De fato, a via biossintética de formação dos alcalóides diterpenóidicos sofre uma bifurcação partindo de um mesmo precursor, derivando seja cauranos, seja atisanos → aconanos<sup>14</sup>.

Com respeito aos cauranos pode-se notar uma grande diferença na oxigenação dos átomos de carbono de mesma posição. Assim, para *Delphinium* a oxigenação incide principalmente nas posições 5, 6, 7, 11 e 12, enquanto que para *Aconitum* a oxigenação preferencial ocorre em 12, 14 e 19. Essa observação poderia ter valor taxonômico.

Comparação dos atisanos para os dois gêneros revela uma maior constância da oxigenação, com duas diferenças possivelmente significativas ao se passar de *Delphinium* para *Aconitum*, um aumento de percentagem de oxigenação no átomo de carbono 14 e diminuição de oxigenação no carbono 15. Com relação aos aconanos a única diferença digna de nota ao se passar de *Delphinium* para *Aconitum* é a diminuição de oxigenação no carbono 7.

Mais importante do que isso, no entanto, é a comparação de atisanos com aconanos para os dois gêneros. Aqui sim, a comparação das oxigenações sugere o papel de precursor desempenhado pelos atisanos na biossíntese dos aconanos. De fato, na passagem dos tipos atisano para aconano, muitos átomos de carbono ficam mais oxigenados. Já os carbonos 11 e 14 se tornam estericamente mais impedidos, o que significa menos aptos a sustentarem um oxi-grupo, em aconanos. É evidente que a análise mecanística desses dados poderá contribuir para o conhecimento das seqüências biossintéticas envolvidas que são ainda tão mal conhecidas.

Tabela 1. % de oxigenação nos diferentes átomos de carbono para esqueletos dos tipos Aconano, Atisano e Caurano para os gêneros *Aconitum* e *Delphinium*.

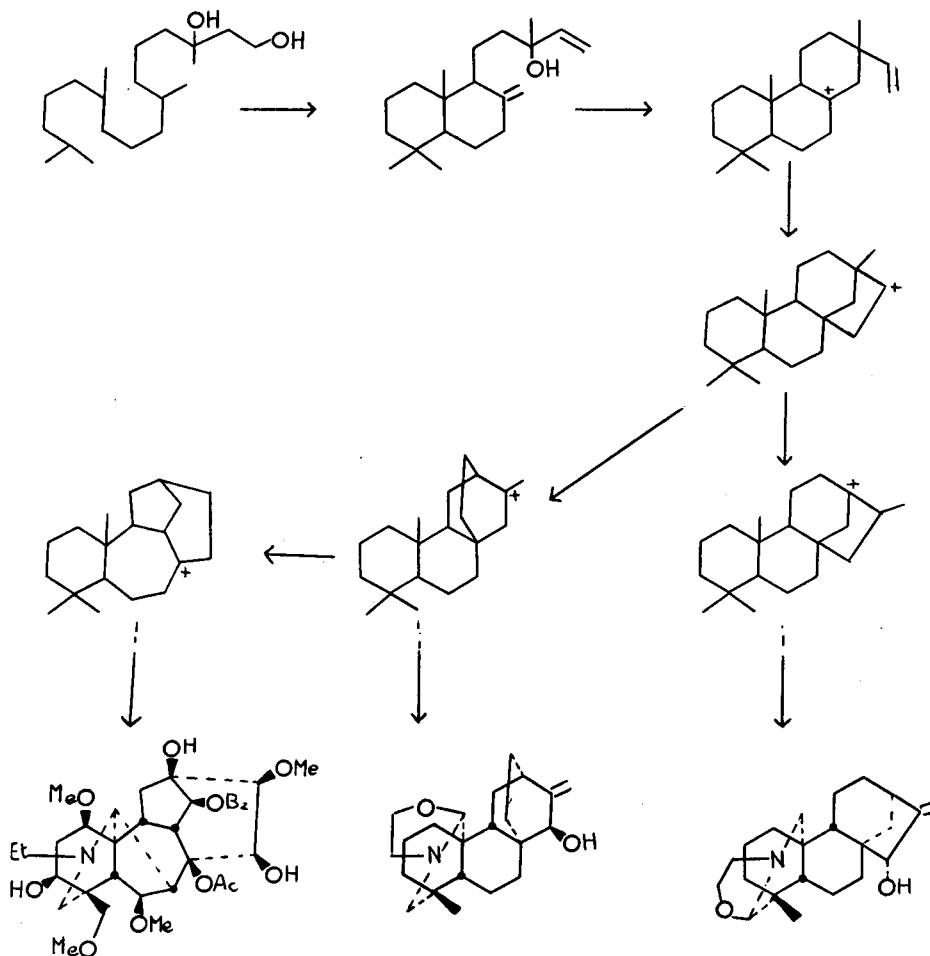
C	Aconitum			Delphinium			C
	Aconano	Atisano	Caurano	Aconano	Atisano	Caurano	
1	97	20	0	98	5	0	1
2	0	50	0	0	74	75	2
3	3	7	0	2	5	0	3
4	-	-	-	-	-	-	4
5	0	0	0	0	0	75	5
6	63	27	0	77	16	75	6
7	23	7	0	80	16	50	7
8	100	-	-	100	-	-	8
9	7	10	0	28	0	0	9
10	-	-	-	-	-	-	10
11	0	63	0	1	63	100	11
12	0	0	100	0	0	100	12
13	100	10	0	100	16	0	13
14	0	73	100	4	26	0	14
15	99	30	0	90	68	0	15
16	22	13	0	0	0	0	16
17	-	13	0	-	10	0	17
18	1	3	0	5	5	0	18
19	85	0	36	64	5	0	19
20	100	100	100	100	100	100	20

## PROPOSTAS BIOSINTÉTICAS PARA OS ALCALÓIDES DITERPENÓIDICOS

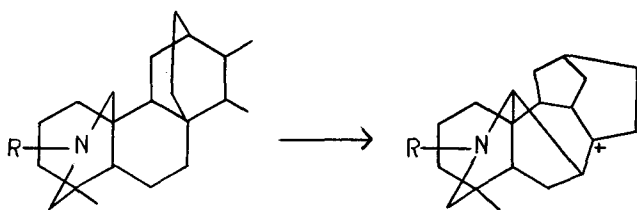
Embora o conhecimento sobre biossíntese de alcalóides diterpenóidicos seja ainda limitado, algumas propostas têm aparecido na literatura. Um esquema geral hipotético para a formação de alguns alcalóides do tipo aconano, partindo de um precursor terpenóidico de cadeia aberta, geranillalol, foi formulado por vários autores<sup>15</sup>. Nesse mesmo esquema a formação de alcalóides do tipo aconano se enquadra apropriadamente (Esquema 1).

O grande número de substâncias isoladas do tipo aconano pode também ser explicado por rearranjos moleculares subsequentes à introdução de grupos oxigenados na molécula. Por exemplo, o esqueleto proposto para a lycocetamina (2) e delphelina (4), pode ser relacionado biogeneticamente ao esqueleto atisano. O precursor do tipo atisano pode perder um grupo metila numa desmetilação biológica e, em seguida, sofrer um rearranjo tipo Wagner-Meerwein acompanhado de uma condensação de Mannich, para dar uma substância que contém esqueleto 2 ou 4 (Esquema 2).

Todo esse grupo de alcalóides é caracterizado ainda por duas outras particularidades: a primeira delas se refere à configuração *ent* da junção dos anéis A/B e a segunda diz respeito à introdução do átomo de nitrogênio nas moléculas, que poderia vir de etanolamina resultante da descarboxilação da serina<sup>16</sup>.



Esquema 1. Proposta biossintética para alcalóides diterpenóidicos.



Esquema 2. Proposta de transformação do esqueleto atisano em aconano.

## QUANTIFICAÇÃO DAS TENDÊNCIAS EVOLUTIVAS

A quantificação das tendências evolutivas observadas envolveu o cálculo de três parâmetros numéricos, o nível de oxidação, a especialização de esqueleto<sup>7</sup> e a diversidade das substâncias no táxon. As médias dos níveis de oxidação e das especializações de esqueleto de cada um dos três grupos biossintéticos (caurano, atisano, aconano) representam os chamados parâmetros de avanço evolutivo referentes à oxidação ( $AE_o$ ) e ao esqueleto ( $AE_e$ ) de cada táxon<sup>7</sup>, no caso, de cada um dos gêneros *Aconitum* e *Delphinium*. A diversidade relativa das substâncias por táxon também é calculada independentemente para cada um dos três grupos biossintéticos: caurano, atisano e aconano. Cada um desses grupos é subdividido em tipos de acordo com o número de oxigrupos por molécula. Finalmente, relaciona-se o número de substâncias por tipo ou seja, o número de substâncias mono-, di-, tri-, etc., oxigenadas. Dessa forma calcula-se o índice de diversidade ID, para cada grupo biossintético, pelo produto do número de substâncias e do número de tipos. ( $ID = NS \times NT$ ).

As correlações de  $AE_o$ , tanto com  $AE_e$  como com ID são positivas (Fig. 4 e 5). Em conseqüência resulta o potencial de oxidação da célula viva não só determinante da biossíntese ou

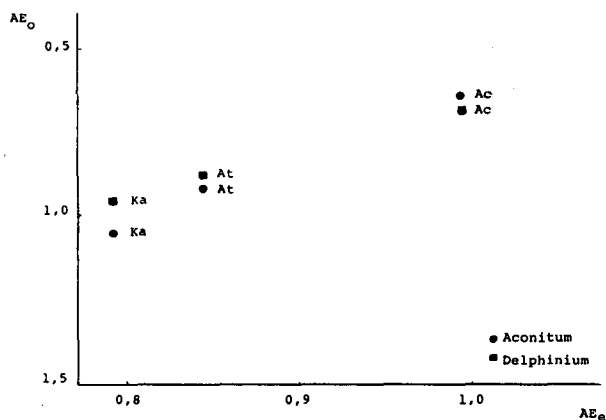


Figura 4. Correlação do índice de avanço evolutivo relativo à oxidação ( $AE_o$ ) com o índice de avanço evolutivo relativo ao esqueleto ( $AE_e$ ) de cauranos, atisanos e aconanos nos gêneros *Aconitum* e *Delphinium*. (Listagem completa das substâncias e valores numéricos dos parâmetros calculados constam da Ref. 17).

das interconversões biossintéticas das substâncias, mas também indicativo da biodiversidade do grupo metabólico correspondente. Tais forças propulsoras do desenvolvimento do metabolismo secundário são intrínsecas, fisiológicas e, portanto, independentes de fatores extrínsecos oriundos da pressão que o ambiente exerce sobre as plantas. A composição química dessas assim se explica por sua evolução independente e não por sua bioatividade, a pressão ambiental exercendo apenas um papel secundário menos adaptativo do que acidental.

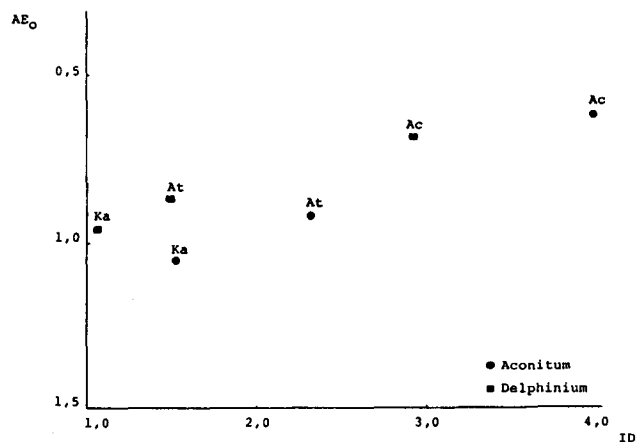


Figura 5. Correlação do índice de avanço evolutivo relativo à oxidação ( $AE_o$ ) com o índice de diversidade (ID) para cauranos, atisanos e aconanos nos gêneros *Aconitum* e *Delphinium*. (Listagem completa das substâncias e valores numéricos dos parâmetros calculados constam da Ref. 17).

## REFERÊNCIAS

1. Stahl, E.; *Jenaische Z. Naturwiss.* (1988), **15**, 557.
2. Fraenkel, G. S.; *Science* (1959), **129**, 1466.
3. Ehrlich, P. R.; Raven, P. H.; *Evolution* (1964), **18**, 586.
4. Janzen, D. H.; em *Biochemical Aspects of Plant and Animal Co-evolution*, J. B. Harborne, Ed., Academic Press, London, p. 163, (1978).
5. Harborne, J. B.; *Introduction to Ecological Biochemistry*, Academic Press, London (1988).
6. Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* (1990), **29**, 1715.
7. Gottlieb, O. R.; *Phytochemistry* (1989), **28**, 2545.
8. Gottlieb, O. R.; *Micromolecular Evolution Systematics and Ecology: An Essay into a Novel Botanical Discipline*, Springer Verlag, Heidelberg (1982).
9. Gottlieb, O. R.; em *Natural Products of Woody Plants: Chemicals Extraneous to the Lignocellulosic Cell Wall*, J. W. Rowe, Ed., Springer Verlag, Berlin, p. 125 (1989).
10. Cronquist, A.; *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia University Press, New York (1981).
11. Clarke, E. G. C.; em *The Alkaloids: Chemistry and Physiology*, Vol. XII, p. 533, Academic Press, London (1970).
12. Peletier, S. W.; Page, S. W.; *Nat. Prod. Reports* (1986), **1**, 451.
13. Keeler, R. F.; *Lloydia* (1975), **38**, 56.
14. Devon, T. K.; Scott, A. I.; *Handbook of Naturally Occurring Compounds*, Vol. II, p. 186, Academic Press, New York (1972).
15. Robinson, R.; *The Biochemistry of Alkaloids*, Ch. 13, Springer Verlag, Berlin (1981).
16. Wiesner, K.; *Tetrahedron* (1985), **41**, 485.
17. Figueiredo, M. R.; Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, prevista para 1991.