INFLUÊNCIA DE DOIS TIPOS DE SOLOS SOBRE O TEOR TOTAL DE ALCALÓIDES DO COMFREY (*Symphytum* sp.)

FERNANDO ROMARIZ DUARTE

Orientador : Prof. Dr. WALTER RADAMÉS ACCORSI

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia. Área de concentração : Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro - 1984

Ao Prof. PAULO CHANEL D. DE FREITAS

Dedico e ofereço

AGRADECIMENTO

- Ao Departamento de Biofarmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, que tornou possível a realização dos trabalhos práticos de laboratório, representado através do corpo docente e funcionários, pela ajuda inestimável, material, logística, conselhos, sugestões e incentivos.
- Aos irmãos Helena, Maria Christina e Adriano pela ajuda e dedicação.
- A todos os colegas da Seção de Plantas Aromáticas e Fumo do Instituto Agronômico de Campinas, pela amizade, ajuda e incentivo constantes.
- À minha esposa pelo sacrifício.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO DE LITERATURA	5
1. Introdução	5
2. Atividade medicinal	6
3. Princípios ativos	7
3.1 Compostos vários	7
3.2 Ácido silícico	7
3.3 Colina, vitamina, Germânio	8
3.4 Ácido fólico	9
3.5 Alantoína	10
3.6 Proteína	11
3.7 Alcalóides	12
3.7.1 Química	13
3.7.2 Toxidêz	15
3.7.3 Agente Anti-Cancer	19
3.7.4 Teores: Isolamento	21
4. Variações de Princípios ativos	25
III. MATERIAL E MÉTODOS	31
1. Espécie Botânica	31
2. Atividades de campo	31
3. Atividades de Laboratório	33
3.1 Gravimetria	34
3.2 Cromatografia	34
3.3 Titulometria	35
4. Tratamento estatístico	36

	Página
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
1. Dados e considerações sobre a análise dos solos	37
1.1 Solo da área experimental em Tietê	39
1.2 Solo da área experimental em Campinas .	40
2. Dados e considerações sobre análise qualitativa cromatográfica	41
3. Dados e considerações sobre análise quantitativa dos experimentos	48
3.1 Gravimetria	48
3.2 Volumetria	52
4. Considerações finais	56
V. CONCLUSÕES	60
VI. LITERATURA CITADA	62
VII. APÊNDICES	77
1. Alcalóides/funções	77
2. Alcalóides Pirrolizidínicos/Toxicidade	79
3. Alcalóides Pirrolizidínicos/Atividade Anticâncer	80

INFLUÊNCIA DE DOIS TIPOS DE SOLOS SOBRE O TEOR TOTAL DE
ALCALOIDES DO COMFREY (*Symphytum sp*)

AUTOR: Fernando Romariz Duarte

ORIENTADOR: Prof. Dr. Walter Radamês Accorsi

RESUMO

Partindo da importância do confrei, *Symphytum officinale* L., como planta utilizada na medicina humana, constituiu o presente trabalho de revisão bibliográfica, principalmente sob os aspectos terapêuticos e fitoquímicos de seus compostos naturais mais conhecidos e medicinalmente determinantes. Nesta revisão é dada ênfase aos alcalóides pirrolizidínicos, em virtude de seu comportamento ambíguo de atuarem como carcinogênicos e como agentes anti câncer.

Na parte experimental, é proposto o estudo da variação dos teores de alcalóides totais nas folhas do confrei, em função do tipo de solo aonde foi cultivado. Testou-se dois solos: Litosol e Latosol situados respectivamente em Tie-tê e Campinas.

Foram experimentados os métodos gravimétrico e titulométrico para análise quantitativa dos alcalóides totais. Realizou-se análise cromatográfica em camada delgada para separação dos alcalóides da mistura, avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos mesmos; foi utilizada uma amostra padrão para identificação de dois componentes.

Os resultados da análise gravimétrica não mostraram diferenças entre os dois solos na produção de alcalóides. Entretanto, a análise titulométrica revelou haver diferenças entre as médias relativas aos teores produzidos em cada solo. A análise cromatográfica confirma a diferença entre os teores de alcalóides nas amostras provenientes dos 2 tipos de solos, proporcionando validade quanto a influência dos mesmos sobre os teores totais.

A cromatografia apresentada, através do padrão utilizado, permite a identificação dos alcalóides: 7 acetillicopsamina + 7 acetilintermida, além da licopsamina, intermidina e equimidina.

INFLUENCE OF TWO TYPES OF SOILS ON TOTAL ALKALOID CONTENT
IN COMFREY (*Symphytum sp*)

AUTOR: Fernando Romariz Duarte

ORIENTADOR: Prof. Dr. Walter Radamés Accorsi

SUMMARY

The present study was carried out to better understand the importance of comfrey, *Symphytum officinale* L., as a medicinal plant which has been used to different humans diseases, through an extensive bibliographic review about fitochemistry and terapeuthical point of view. In this review, emphasis is given to the pyrrolizidine alkaloids for its ambiguous activities whether carcinogenics or as a anti-tumor agents.

After that, were proposed the study of the variation of total alkaloids contents in comfrey leaves produced from two different soils type influence: Litosol type and Latosol type respectively situated in Tiete and Campinas, both cities of São Paulo State.

Gravimetric and titulometric methods were used to quantify total alkaloidal contents. Its was performed a thin layer chromatography, to obtain the separation of alkaloids from the inicial mixture, and to permit a qualitative and a semi-quantitative comparative valuation the two original datas.

The gravimetric analysis did not appoint differences between the two soils with respect their influences

under alkaloidal contents in comfrey leaves.

But, by titulometric methods was possible to establish differences between means originated from each soils data. In this sense, latossolic soil datas showed the lower content in confront with the litosol type, the last reaching twice total alkaloids contents.

Through thin layer chromatography was possible to identify the following alkaloids from the crude base mixture: 7-acetyl-lycopsamine + 7-acetyl-intermedine, lycopsamine + intermedine and echimidine.

I. INTRODUÇÃO

A utilização do confrei, *Symphytum officinale* L., como planta medicinal, remonta mais de dez séculos na história; atualmente, em muitos países inclusive no Brasil, intensificou-se o uso popular sob as mais variadas formas, sem qualquer critério médico ou científico.

Por outro lado, durante esta última metade de século, a busca do conhecimento de princípios biologicamente ativos existentes em muitos produtos naturais, particularmente no reino vegetal, tem sido a orientação seguida pela investigação científica, preocupada na obtenção de novas substâncias possuidoras de atividades farmacologicamente comprovadas para a medicina humana.

Dentro deste enfoque, o confrei também vem sendo pesquisado em vários países do mundo, objetivando-se o reconhecimento das substâncias responsáveis pelas diferentes atividades medicinais atribuídas à esta planta. Foram identificados nas raízes e folhas compostos comuns nos vegetais, como taninos, mucilagens e gomas, cujas propriedades adstringentes e emolientes observadas na droga, são tradicionalmente citadas e utilizadas desde a mais remota antiguidade. A seguir foi identificada a alantoína, substância cujo teor é elevado no

confrei, devendo-se à mesma o excepcional valor desta erva como cicatrizante, regenerador ou estimulante de tecidos novos, estendendo-se esse poder à nível de tecido ósseo.

Durante o desenvolvimento das pesquisas químico analíticas, foram isoladas determinadas substâncias, caracterizadas como alcalóides do grupo pirrolizidínico. Estes são encontrados também em outras famílias botânicas além das boragináceas, principalmente nas compostas, leguminosas, gramíneas, sapotáceas, santaláceas, papilionáceas, e apocináceas. Vários desses alcalóides são conhecidos como possuidores de toxicidade em diferentes graus para animais domésticos e para o homem. Através da literatura científica pertinente, se tem notícia de que diversos alcalóides deste grupo, mostram atividades contra determinados tipos de câncer induzidos ou espontâneos em animais experimentais. Por outro lado, pesquisas têm demonstrado a possibilidade do comportamento carcinogênico devido a esses alcalóides pirrolizidínicos.

O teor de alcalóides no confrei é baixo, variando em relação à muitos fatores, entre 0,001 -0,3%; todavia, a possibilidade de sua toxicidade é assim mesmo reconhecida. Acrescenta-se ao fato, indicações da existência de efeito cumulativo devido uso prolongado, em alguns órgãos do corpo como pulmões, baço e especialmente fígado. Por esse motivo se tem pesquisado extensivamente os alcalóides pirrolizidínicos, que tenham direta ou indiretamente relação com o consumo humano ou animal. O confrei tem sido estudado em vários centros científicos do mundo, devido ao crescente aumento no consumo da erva sob formas diversas, havendo imediata necessidade do conhecimento de sua toxicidade potencial e de suas possibilidades terapêuticas.

A moderna metodologia química de produtos naturais, desenvolve o conhecimento de substâncias novas de ori-

gem vegetal, isolando-as em estado puro e oferecendo a possibilidade de estudos vários, principalmente de natureza farmacológica e/ou toxicológica.

Sob o ponto de vista da produção do princípio ativo na planta, este apoio técnico metodológico da química, permite o estudo sistemático de muitos parâmetros implicados na formação, teor e composição, daquelas substâncias. Deste modo, é possível se conhecer o comportamento padrão do princípio ativo, e suas variações sob a influência de fatores naturais e ou artificiais. De posse desses conhecimentos, se torna viável o manejo racional e adequado à produção de substâncias medicinais de elevado valor biológico em quantidades economicamente viáveis.

Dentre os fatores naturais de variação de caráter ambiental aos quais as plantas podem estar sujeitas, distinguem-se os fatores climáticos e edáficos. O tipo de solo, através de sua natureza físico-química, pode ser responsável por variações significativas na composição qualitativa e/ou quantitativa dos princípios ativos em plantas medicinais.

O objetivo desse trabalho é tomar conhecimento dos teores médios de alcalóides totais no confrei, cultivado no Estado de São Paulo. Pretende-se ainda, avaliar e comparar a influência de dois tipos de solo, sobre as possíveis diferenças nas produções de alcalóides, assumindo nas condições propostas, as mesmas influências de ordem climática..

As informações obtidas serão relativas aos dois solos descritos sob condições físicas e químicas atuais; outras condições, tipos de solo ou alterações de manejo, certamente determinarão variações de natureza quantitativa, e/ou qualitativa no complexo alcaloídico.

Fornecerão entretanto dados preliminares médios, proporcionando uma primeira noção sobre o teor de alcalóides totais em território nacional. Fornecerá também o caráter da possível influência do substrato sobre esses teores.

Sob o ponto de vista técnico, resulta no primeiro passo para continuidade de pesquisas integradas, agrônômica - fitoquímica - farmacológica, no interesse do conhecimento das propriedades anticancerígenas e carcinogênicas especialmente devidas a este grupo de alcalóides. Resulta ainda, sob o ponto de vista prático imediato, na indicação de qual solo seria mais adequado à produção de plantas detentoras de maior ou menor teor do princípio ativo.

É proposto também um objetivo de ordem mais geral para este trabalho, apresentado sob a forma de fatos e dados que levaram a considerar o confrei como uma planta medicinal, através de análise de informações e discussões da literatura, sob os pontos de vista fitoquímico e terapêutico. Reservou-se especial atenção aos princípios ativos portadores de atividades anticancerígenas. Neste contexto, está incluído o estudo dos alcalóides, propostos como objetivo do trabalho experimental, os quais tem sido alvo de investigações internacionais aparentemente conflitantes.

II. REVISÃO DE LITERATURA

1. Introdução.- O confrei como planta medicinal retomamos dos registros de Dioscórides (médico grego do exército romano, séc. I da nossa era). Em sua obra, "Matéria Médica", publicada em seis volumes, apresenta os medicamentos conhecidos na época nos três reinos da natureza, principalmente os vegetais. Descreve mais de 600 espécies de plantas, entre as quais, algumas do gênero *Symphytum* (descrição constante no Cap. II, Livro IV), com o nome de *Symphytum alterum* ou *S. pecto*, segundo QUER (1980). Os tradutores e revisores medievais europeus da obra de Dioscórides, Laguna (1499) e Mattioli (1543), citado por QUER (1980), consideraram estas espécies sob descrição relacionadas ao gênero *Symphytum*.

Sabe-se que o confrei como agente terapêutico antecede ao registro de Dioscórides, estendendo-se sua utilização histórica provavelmente a séculos antes da era cristã. Lineu em 1573, denominou a espécie conhecida e utilizada na medicina herbolária contemporânea européia, como *Symphytum officinale* L. Ao criar o vocábulo "officinallis", (officinale), quis o autor caracterizar a utilização de espécies vegetais em oficinas de farmácia.

2. Atividade Medicinal.- Sobre o mérito das virtudes terapêuticas atribuídas ao confrei ao longo do tempo, existem informações oficialmente descritas em tratados: de botânica médica, farmacêutica, farmacopéias, farmacognosias, inclusive em matéria médica homeopática, merecendo destaque em resumo as seguintes indicações que têm resistido ao tempo:

a) atividade hemostática, devida entre outras substâncias aos elevados teores em taninos, os quais atuam como adstringente em processos hemorrágicos de diversas naturezas e origens.

b) atividade anti-inflamatória em geral, à custa dos princípios tanínicos e mucilaginosos existentes principalmente nas raízes.

c) atividade cicatrizante, acreditada ser principalmente devido à substância alantoína, sendo por isso, muitas as indicações terapêuticas da utilização de órgãos ou preparações desta erva como regenerador, estimulando crescimento de tecidos novos e sadios. Assim, tem sido utilizado secularmente, para úlceras internas e externas, feridas, cortes, queimaduras, males da pele em geral, fissuras, gangrenas. E, em especial para afecções do osso, ou seja para consolidação de fraturas ósseas, traumatismos ósseos, osteomielites, osteosarcoma, sendo indicado como indutor de produção calcárea.

Estas e outras indicações não tão gerais, são encontradas nos compêndios dos seguintes autores: LANGGAARD (1872), HACQART (1872), MOQUIN (1875), TANDON (1875), BAILLON (1884), BEILLE (1904), ROSEMBERG (1925), GILG (1926), BATLLE (1929), P. CORREA (1931), MORRA (1940), HAGER (1942), PERROT (1944), YOUNGKEN (1950), WAKELEY (1954), OSOL e FARRAR (1955), UpHOF (1959), BETHEL (1968), LUCAS (1968), MOREIRA (1971),

PALAISEUL (1972), SEABRA (1972), MERCK INDEX (1976), HOEHNE (1978), CAIRO (1978), BALME (1978), MORGAN (1979), QUER (1980).

3. Princípios Ativos/3.1 - Compostos vários.-

Durante os últimos 80 anos tem havido interesse em se conhecer a identidade e os teores de cada princípio ativo presente no complexo da droga, relacionando quando possível, cada qual ao seu principal efeito terapêutico.

Foram identificadas várias substâncias, das quais muitas testadas terapeuticamente; em resumo se destacam: taninos, mucilagens, gomas, açúcares vários, resinas, ácidos orgânicos, amino-ácidos e alantoína, através de pesquisas conduzidas por DIETRICH (1913), BATLLE (1929), BALAVOINE (1946), IKEDA (1962), SHUKHOBOSKII (1962), PINKAS et alii (1965).

Testando centena de plantas como fonte de drogas com propriedades anti-tumorais, PERDUE e HARTWELL (1969), relacionaram este tipo de efeito em 35% dos casos, com a presença de taninos nos extratos brutos dos vegetais.

De maneira geral, quanto à presença e uso medicinal (no confrei) de taninos, mucilagens, gomas, resinas, amido, açúcares vários, ácido gálico, e outras substâncias se encontra amplas referências nos compêndios: BEILLE (1904), CORREA (1931), HAGER (1924), PERROT (1944), YOUNGKEN (1950), LARROUSE (1952), QUER (1980).

3.2 - Ácido Silícico.-

Na análise da composição mineral do confrei se tem observado elevados teores em sílica (SiO_2); assim, foi encontrado nas cinzas das raízes e tubérculos LUCIEN et LEROUX (1919), ou presente na planta toda, cujos valores foram superiores comparativamente à todas outras plantas analisadas segundo WILLEY (1962).

Ainda, PELIKAN (1962), cita 20% de ácido silícico nas cinzas. Discute a relação existente entre: teor em sílica, o hábito das borragináceas de vegetarem em terrenos silicosos, o revestimento periférico externo de natureza silícea, atribuindo as propriedades medicinais da família, em parte, à este "processo silicoso" muito particularizado.

Segundo o mesmo autor, o confrei como medicamento, estimula fortemente as forças vitais, através da injeção de forças estruturantes que seriam provenientes do ácido silícico, explicando assim sua participação também nas propriedades vulnerárias, bem como a atividade favorável observada sobre afecções ósseas e fraturas, induzindo energia para uma reestruturação desses tecidos à forma habitual.

3.3- Colina, Vitaminas e Germânio.- Outra substância de interesse com atividade biológica, a colina, é encontrada no confrei em quantidades apreciáveis.

BOLESLAW et alii (1966), determinaram elevados teores de colina livre em plantas secas de confrei.

VOISIN (1971), cita sais de colina exercendo atividade contra tumores cancerosos.

A colina integra o complexo vitamínico B, sendo o mesmo conhecido como coadjuvante para o tratamento do câncer.

As vitaminas B₂ e B₁₂ foram também detectadas em extratos do confrei por HIROSAKI (1977), além de alantoína, proteínas e o elemento Germânio; os extratos foram testados e confirmados clinicamente em pacientes contra a cirrose do fígado e o diabetes.

A vitamina B₁₂, normalmente sintetizada no fígado, é raramente encontrada em células vegetais. É conhecida como agente útil na prevenção e tratamento da anemia perniciosa, sendo essencial para a maturação normal e o desenvolvimento das hemácias, CONN e STUMPF (1975), e LEHNINGER (1977).

Trabalhando com extratos de confrei, HIROSAKI (1977) determina a presença do elemento Germânio; Hammett e Nowrey, (1922) in OSOL e FARRAR (1960), observaram que o dióxido de germânio (Ge O₂), tem o poder de estimular a formação de células vermelhas no sangue devido à sua ação sobre a medula óssea, incluindo observações sobre a sua baixa toxicidade. Por outro lado, Bailley, (1925) in OSOL e FARRAR (1960), encontrou ação hematopoética, porém estabelecendo a ação tóxica do germânio sobre vários órgãos.

Dentro da esfera de ação da hematopoese, para que esta se processe normalmente, são encontrados essenciais, conforme descrito, a vitamina B₁₂ (cianocobalamina), o ácido ascórbico e ainda o ácido fólico; pesquisas têm detectado a presença dessas três substâncias no confrei.

3.4- Ácido Fólico.- O ácido fólico também tem sido indicado para o tratamento de anemias macrocíticas e megaloblásticas, OSOL e FARRAR (1960); derivados de ácido fólico parecem exercer importante função na formação de eritrócitos normais, CONN e STUMPF (1975).

PERDUE e HARTWELL (1966), citam o papiro de Ebers (1550 A.C.), o mais antigo documento médico que se tem notícia, descoberto nas pirâmides egípcias, no qual consta recomendações sobre a levedura, importante fonte de ácido fólico, para tratamento do câncer, indicação esta que segundo o autor, conduziu ao uso deste ácido como antagonista de tumores.

3.5 - Alantoína. - A alantoína, quimicamente considerada um produto de oxidação do ácido úrico, é largamente encontrada em plantas do gênero *Symphytum*, em estado livre e estável. Certos animais, mas não o homem, possuem a enzima uricase que promove esta oxidação. É considerada produto final do metabolismo das purinas, The MERCK INDEX (1976). São abundantes as referências sobre a presença de alantoína no confrei, assim como sua atividade biológica de promover estímulo à regeneração celular, responsabilizando-a pela interferência positiva no processo de cicatrização. DIETRICH (1913), cita para úlceras e CLARKE (1969) considera-a um agente dermatológico. Segundo The MERCK INDEX (1976), é indicada para terapia de úlceras da pele, usada topicamente para estimular o tratamento de feridas supurantes e úlceras resistentes. VAN LINGUE (1979), descreve o processo de formação de tecidos em regeneração sob a influência de preparações farmacêuticas contendo derivados de alantoína. Os médicos ingleses Thiterley e Coppin (1912), citados por QUER (1980), atribuíram à alantoína, presente em extratos da planta *Symphytum officinale* L., a propriedade que estes exibiam de promover a formação de células novas em tecido do corpo humano. Cita ainda a utilização como antibiótico e bacteriostático, induzindo mais rápida proliferação das células sãs. Por outro lado, CONSTANTINESCU et alii (1961), não conseguiram provar atividade da alantoína contra tumores experimenatis.

Em relação aos teores de alantoína no confrei, dependendo do método utilizado, da parte da planta analisada, ou ainda da época do ano, teremos variações nas taxas. KACZMAREK e WALICKA (1958), determinaram nas raízes, através processo colorimétrico, 0,7% na primavera, 0,6% no verão e 1,3% no outono.

CONSTANTINESCU et alii (1959), em estudo farmacognóstico do *S. officinale* L., citam teores entre 0,6 - 0,8%

de alantoína na composição química da raiz.

REPTA (1962), encontrou 1,5% de alantoína nas raízes e 1,3% nas folhas, através de determinação fotométrica.

FELL e PECK (1968), separando a alantoína por cromatografia em camada delgada, estimaram os teores por espectrofotometria U.V. encontrando uma variação entre 0,14 - 0,50% nas folhas, dependendo da época do ano.

3.6 - Proteína.- O confrei tem sido extensamente estudado e citado como fonte alternativa de alimento tanto para animais quanto para o homem devido ao elevado teor em proteína e a presença de aminoácidos essenciais livres.

Para o consumo humano foi mencionada como cultura emergente, sob várias formas inclusive a utilização de brotos novos, CORREIA (1931), UPHOF (1959) e MOREIRA (1971), sendo considerada altamente nutritiva por BETHEL (1968). Há a considerar que, na época não se conheciam os efeitos tóxicos devido aos alcalóides, localizados em maiores proporções principalmente nos brotos e folhas mais novas segundo MATTOCKS (1980); entretanto, afirma o autor, o extrato de proteínas *S. officinale*, pode não ser perigoso, tendo concluído após análise de amostras, que conforme havia previsto, estava completamente livre dos alcalóides.

Encontramos amplas referências na literatura, objetivando o conhecimento da composição proteínica e outras substâncias de interesse bromatológico, presentes em espécies do gênero *Symphytum*.

Assim, através de pesquisas com objetivos de alimentação animal, se tem verificado suas possibilidade como

forrageira, silagem ou feno verde de elevado valor proteínico, culos teores totais, dependendo da espécie considerada, do local, da técnica empregada, tem resultado ser entre 22%, EL BASSOUSY et alii (1975) e (1977), e, 33% citado em ARIKI (1978).

As espécies mais estudadas neste sentido tem sido:

S. peregrinum: WILLEY e KNIGHT (1926) encontraram 23% de proteínas totais; pesquisaram a mesma espécie PATEL et alii (1962) e HULPOI (1967).

S. asperum: VAVILOV et alii (1973); EL BASSOUSY et alii (1975) e (1977) determinaram entre 22-23%; trabalharam ainda com esta espécie EITHE (1977), MARCIULIONIS e GLIAUBERTIENE (1977), DENISIUK e DUDKIN (1979).

S. orientale: ULUBELEM e OKAL (1977).

Sob a denominação geral de confrei, não havendo citação da espécie, pesquisaram: RUBNER (1916); FUKUMOTO (1969); OGINARA e HAKOYAMA (1977) determinaram 21% de proteínas; e NAKANISHI et alii (1978).

No Brasil, HOEHNE (1978) cita o confrei como forrageira; FAVORETTO (1978) estabelece sua composição química bromatológica, e ARIKI et alii (1978) para arração de aves de postura.

3.7 - Alcalóides. - Durante o desenvolvimento das análises químicas do confrei, se constatou a presença de substâncias de caráter básico, possuindo certa atividade biológica caracteristicamente tóxica. Nos tratados farmacêuticos, farmacognósticos e congêneres encontramos referências desde o começo do século. (Apêndice 1).

BEILLE (1904), confirma a presença de uma base pouco conhecida - sinfitocinoglossina - também citada por CORREA (1931); HAGER (1942), constata a presença da mesma substância, já considerando-a um alcalóide, referindo-se ainda quanto à presença de mais uma substância, como um glucósido, a consolidina. Esta, foi também considerada por PERROT (1944) e QUER (1980), os quais descrevem como um glucósido mal definido que excerceria atividades excitantes sobre o sistema nervoso central, podendo, em altas doses, provocar parada cardíaca. Na verdade, a consolidina é um glico-alcalóide, hidrolisável à glicose e consolidina, presentes também nestas formas, tendo a propriedade de provocar paralisia no sistema nervoso central HENRY (1939).

YOUNGKEN (1950), já considera as duas substâncias, consolina e sinfitocinoglossina, como sendo alcalóides que exerceriam atividades depressantes sobre o sistema nervoso central.

3.7.1 Química.- Os alcalóides encontrados no confrei pertencem ao grande grupo químico pirrolizidínico. São considerados ésteres de amino-alcoóis de núcleo pirrolizidina e de ácidos mono e di-carboxílicos.

Já foram isolados inúmeros amino-alcoóis característicos desses alcalóides, e a variedade na assemtria molecular sob as quais se apresentam é responsável pelo aparecimento de muitos isômeros, dificultando de maneira exaustiva sua análise de acordo com COSTA (1977).

A estrutura em anel da pirrolizidina é mostrada em (I), constando de dois anéis de cinco lados cada um, conjugando um átomo de nitrogênio em comum na posição 4.

R = H

R = OH

Os dois anéis se acham inclinados um em direção ao outro, ao longo do eixo de ligação N - C (na posição 8). Os alcalóides que apresentam toxicidade, são todos ésteres do tipo (II). As ligações de éster segundo McLEAN (1970), são possíveis a partir das posições C1 e C7.

Normalmente, estes alcalóides co-existem nos vegetais em equilíbrio dinâmico com as formas denominadas N-óxidos, havendo tendência para esta última, cuja estrutura é idêntica à das formas aminadas, FURUYA e ARIKI (1968).

Estas formas N-óxidos são amino-óxidos dos alcalóides, originadas da oxidação da função amino-terciária, isto é, em virtude da ligação de um átomo de oxigênio ao nitrogênio básico. Possuem propriedades em tudo muito similares às dos alcalóides segundo MATTOCKS (1968), solubilidade, reações com ácidos, espectros de absorção e propriedades farmacológicas, embora esta última em regra geral sejam mais atenuadas. Em laboratório, por tratamento das formas aminadas pelo peróxido de hidrogênio, obtem-se o N-óxido correspondente, e, jun-

tando-se zinco às soluções ácidas, regeneram-se as formas amínicas, isto é, pela ação de redutores, transformam-se nos respectivos alcalóides, de acordo com:

Os N-Óxidos reagem com os ácidos originando um sal cristalino à semelhança dos alcalóides, COSTA (1977).

3.7.2 - Toxidez.- Relativamente à toxicidade desse grupo de alcalóides, há longo tempo se conhece como causadores de envenenamento crônico do fígado de animais, tendo sido já bem descrita sua patologia. Alcalóides como a senecionina, heliotrina, lasiocarpina, retrorsina e outros, testados em doses simples, provocaram danos progressivos do fígado em ratos experimentais. Usualmente os alcalóides mais hepato-tóxicos são di-ésteres cíclicos, como a retrorsina (I) e a senecionina (II); altas doses de lasiocarpina (III) e ainda maiores de heliotrina (alcalóides de ésteres abertos), são necessários para produzir os mesmos efeitos.

(III) lasiocarpina

(éster aberto)

- (I) R - OH Retrorsina
 (II) R - H Senecionina

(Di-ester cíclico)

Uma nova classe de metabólito portando estrutura tipo pirrôlica foi observada em tecidos de animais envenenados por alcalóides pirrolizidínicos, e, de acordo com MATTOCKS (1968), existia correlação entre o grau de toxicidade hepática e a quantidade de pirrol detectado no fígado; constatou também evidências de tipos de reações, entre metabólitos e constituintes de tecidos hepáticos.

Determinados distúrbios do fígado e outras doenças humanas, observadas em nações em desenvolvimento, têm sido atribuídos ao consumo de alimentos e preparados medicinais de ervas, a partir de plantas contendo alcalóides pirrolizidínicos. A exposição humana à substâncias pertencentes a este grupo através produtos alimentares ou medicinais é uma possibilidade real também nos países desenvolvidos, conforme DEINZER et alii (1977). Em vários locais do mundo, foram observadas plantas dos gêneros *Senecio*, *Heliotropium*, *Crotalaria*, crescendo invariavelmente como ervas daninhas em culturas anuais como o milho, trigo e outros cereais. Colhidas mecanicamente com os

grãos, aquelas ervas se tornam contaminantes desses alimentos, sendo espécies portadoras de substâncias consideradas carcinógenos naturais, CASTRO (1982). (Apêndice 2).

Pesquisando alcalóides, FARNSWORTH (1978), alerta o público contra o consumo do confrei, (*Symphytum officinale*), de maneira descuidada inclusive na forma de chá. Inclui observações sobre a toxicidade do mesmo, devido à presença de alcalóides pirrolizidínicos hepato-tóxicos, como a lasiocarpina, a qual provocou câncer em fígado de roedores, ao nível de 50ppm, em estudos de alimentação. Segundo o referido autor, estudos bem controlados têm revelado que 0,5% de folhas de confrei incorporadas à dieta é suficiente para induzir câncer no baço e no fígado em testes de alimentação.

CULVENOR (1980) identificou oito alcalóides do tipo hepato-tóxico nas folhas de *Symphytum X uplandicum* (híbrido do *S. officinale* e *S. asperum*), os quais combinados produzem lesões crônicas em fígado de ratos. Segundo CULVENOR, parece estar bem estabelecida a suscetibilidade de seres humanos ao envenenamento por estes alcalóides, mesmo não sendo disponíveis estimativas mais amplas sobre o consumo à baixo nível levando à toxicidade; refere-se aos trabalhos de McLEAN (1970), MOHABAT (1976) e DEINZER (1977).

Em uma epidemia envolvendo trigo contaminado com sementes de *Heliotropium popovii* subsp. *gillianum*, CULVENOR (1980) cita a quantidade de alcalóides que causou severa doença no fígado, no prazo de 2 anos, tendo sido estimada em cerca de 2 mg/pessoa/dia, ou aproximadamente 30-40 µg/kg/dia. A taxa de ingestão de alcalóides através do confrei, pode exceder esse nível, desde que podem ser consumidas várias folhas/pessoa/dia, sendo possível encontrar-se aproximadamente 1 mg de alcalóides por folha. Este autor afirma que, doses em pro-

porções similares provocaram lesões crônicas em animais experimentais, porém, produzidos por alcalóides de toxicidade aguda superior. Tem-se observado que aqueles alcalóides que são positivamente tóxicos para o fígado, quando testados convenientemente, revelaram-se carcinogênicos em animais experimentais. A mais baixa dose efetiva ainda não foi estabelecida, tendo a lasiocarpina produzido tumores em ratos sob doses equivalentes a 170 mg/kg/dia. Raízes e folhas de *Symphytum officinale* em 0,5 e 0,8% respectivamente da dieta, usados em testes de alimentação com ratos, mostraram-se carcinogênicos segundo CULVENOR (1980). Este autor propõe cuidado no uso do confrei para consumo humano, especialmente em relação às crianças, devido à grande sensibilidade dos animais jovens aos efeitos deste tipo de alcalóide. A falta de conhecimento sobre a real toxicidade a despeito de sua utilização tradicional, segundo o mesmo autor, não é necessariamente um fator de segurança de sua inocuidade. Também enfatizou que os efeitos desses alcalóides são cumulativos, e que as lesões podem ser muito retardadas em sua manifestação, tornando difícil uma associação entre causa e efeito.

MATTOCKS (1980) adverte sobre os possíveis riscos para pessoas que ingerem confrei como bebida, informando que as folhas e as raízes da espécie *Symphytum officinale* em experimentos com ratos mostraram-se carcinogênicas. Foram detectados 8 alcalóides pirrolizidínicos de estrutura tóxica, e pelo menos a sinfitina isolada, comportou-se como indutora de câncer em ratos. O autor detectou as menores taxas de alcalóides totais em folhas maduras e bem desenvolvidas.

Na tentativa de se conhecer uma estimativa da quantidade de alcalóides ingeridos, através de um copo de chá de raízes do confrei, ROITMAN (1981) preparou uma infusão de acordo com indicações do pacote comercial, 250 ml de H₂O para 8,7g de raízes picada. Separou o líquido gelatinoso sobrena-

dante por centrifugação e analisou-o por RMN (ressonância magnética nuclear), encontrando nesta fração de preparação cerca de 8,5mg de alcalóide, o que, segundo o autor, representava 33% do teor desta amostra. Normalmente todo o resíduo gelatinoso rejeitado teria sido consumido em conjunto no copo de chá; assim, o autor estimou em 26 mg/copo o total de alcalóides ingerido em uma só vez. Apesar de se dispor extensivamente de dados toxicológicos sobre efeitos crônicos de alcalóides pirrolizidínicos em animais, para seres humanos as informações são escassas, principalmente porque os efeitos do envenenamento crônico são de manifestação tardia, não se estabelecendo as correlações necessárias. As informações mais seguras que se conhece pela quantidade de dados, segundo ROITMAN (1981), provêm do incidente envolvendo um grupo de 7.200 pessoas vivendo em comunidade isolada. Todas foram examinadas após um consumo estimado em 2 mg/dia de alcalóides pirrolizidínicos, presentes em farinha de trigo contaminada por sementes de *Heliotropium indicum*. Após 2 anos, 23% da população analisada apresentava sérios danos no fígado. A partir desta informação e dos resultados de sua pesquisa, ROITMAN (1981) desaconselha o uso habitual do confrei em cujas preparações caseiras, portam quantidades de 4 a 13 vezes maior que a cifra citada para aquela população, podendo pois apresentar sérias conseqüências para a saúde humana. Conclui o autor que também as folhas do confrei (*Symphytum officinale*), deveriam ser evitadas, ainda que possuam teores em alcalóides muito inferiores às raízes. Pesquisas, demonstraram a carcinogenicidade experimental em ratos alimentados com dieta de folhas desta planta.

3.7.3 - Agente Anti-Câncer.- Os alcalóides de maneira geral, parecem ser a fonte mais promissora em quantidade e qualidade de novos agentes anti-câncer. Essas substâncias, bem distribuídas pelo reino vegetal, são especialmente encontradas nas famílias das apocináceas, papaveráceas, legu-

minosas, ranunculaceas, rubiáceas, borragináceas e compostas. Como grupo químico, os alcalóides são bem conhecidos pela sua atividade farmacológica, e atualmente tem assumido um importante lugar na moderna medicina. Eles são diferentes sob muito pontos de vista, mas segundo PERDUE e HARTWELL (1960), coletivamente são ativos para diversos tipos de tumores animais.

Existem referências variadas de que certos alcalóides pirrolizidínicos, estão sendo testados experimentalmente para atividade anti-câncer. Partindo de pesquisas sobre propriedades químicas e toxicológicas, CULVENOR (1968) constatou que aqueles alcalóides causadores de hepato-toxicidade, inibem a mitose celular de maneira irreversível nas células do fígado, induzindo um crescimento anormal de suas células e do núcleo destas, provocando ainda a quebra dos cromossomas. Estas atividades, somadas a ações mutagênicas comprovadas, sugeriram para o autor possíveis atividades antitumorais. (Apêndice 3).

CULVENOR (1968), examinou 23 substâncias do grupo químico em estudo, ou derivadas das mesmas, testando suas propriedades anti-tumorais. Constatou atividade satisfatória exibida por 10 compostos, cujos testes demonstraram níveis significativos de atividade contra um ou mais sistemas tumorais. A lasiocarpina por exemplo, existente também no confrei, apresentou atividade contra vários tipos desses sistemas tumorais. Concluiu o pesquisador, que, para o exercício da atividade anti-tumoral existe um nível ótimo, ou uma série de níveis, entre as propriedades: solubilidade na água, coeficiente de partição (lipídio-água) e força básica. De acordo com o mesmo autor, alta hepato-toxicidade está relacionada com baixa solubilidade em água e baixa força básica, como encontramos para a lasiocarpina.

ULUBELEN e DOGANCA (1971), relacionam atividade anti-tumor da lasiocarpina em sistemas experimentais de cultura de células tumorais.

PEDERSEN (1975), comenta a tendência das pesquisas com os alcalóides pirrolizidínicos orientada para o tratamento do câncer, revelando alguns resultados promissores, a despeito do interesse inicial nestas substâncias terem originado de seus efeitos tóxicos sobre animais.

HUIZING e MALINGRÉ (1981) e HUIZING et alii (1981) propondo métodos químicos cromatográficos para análise de alcalóides pirrolizidínicos de várias fontes, inclusive do confrei, enfatizam o interesse do estudo de métodos para análise desse grupo químico, devido a importância relacionada às suas propriedades hepato-tóxicas e pelo fato de alguns possuírem potencialidade não desprezível como agente citostático na terapia do câncer. Citam o consumo generalizado nos EUA do confrei, em preparações comuns, como chás, enfatizando a solubilidade dos alcalóides em água, e a reconhecida toxicidade hepática dessas substâncias.

Os efeitos agudos e crônicos, atualmente conhecidos e comprovados, devido aos alcalóides pirrolizidínicos, tem impedido o sucesso das pesquisas para a atividade anti-tumoral que também reconheceu-se manifestada neste grupo de compostos. Entretanto, segundo CULVENOR (1980), pode ser possível utilizar a ação antimitótica seletiva a aparentemente permanente, exercida pelos alcalóides sobre células parenquimais do fígado.

3.7.4 - Teores/Isolamento.- Com o desenvolvimento das técnicas de análise química passou-se a um maior domínio do conhecimento da composição qualitativa e quantitativa dos alcalóides do confrei.

MAN'KO et alii (1967) determinaram alcalóides totais em *S. asperum*, encontrando 0,19% e 0,3% do peso seco, para folhas e raízes respectivamente.

FURUYA e ARAKI (1968) isolaram e identificaram os alcalóides sinfitina e equimidina do *S. officinale* L. Determinaram as formas N-Óxido, presentes em maiores quantidades durante o período de florescimento, sendo maior a predominância das formas reduzidas (alcaloídicas) na raiz, durante o verão.

MAN'KO et alii (1969) determinaram por gravimetria em função da matéria seca, teores de alcalóides totais, em raízes e folhas, das seguintes espécies:

<u>espécie</u>	<u>raiz</u>	<u>folhas</u>
<i>S. officinale</i>	0,13 - 0,18	0,29 - 0,32
<i>S. caucasicum</i>	0,22	0,18
<i>S. asperum</i>	0,08	0,25

Através análise cromatográfica em papel observaram que o alcalóide mais representado correspondia ao valor R_f da lasiocarpina.

ULUBELEN e DOGANCA (1970), usando a técnica de espectrofotometria de massa e RMN (ressonância magnética nuclear), determinaram a estrutura do alcalóide anadolina, isolado de extratos alcalinos de raízes do *S. orientale*, conjuntamente com seis outros alcalóides.

MAN'KO et alii (1970) verificaram a variação de alcalóides totais em *S. asperum* em função da fase de desenvolvimento. Determinaram valores mais elevados nas partes aéreas durante o florescimento, 0,13% do peso seco, e nas raízes 0,19%

du-ante a fase de frutificação. A análise cromatográfica em camada delgada, revelou a presença de asperumina e heliosupina-N-óxido nas partes aéreas, e nas raízes este último e equinatina.

Esses mesmos autores pesquisando a espécie *S. officinale*, encontraram 0,06% nas partes aéreas por ocasião do florescimento e 0,31% nas raízes no final da frutificação. Concluíram que a composição qualitativa dos alcalóides diferiam entre partes aéreas e raízes, em função da fase vegetativa. Através de cromatografia em papel, identificaram nas partes aéreas a lasiocarpina e heliosupina e nas raízes a viridiflorina, equinatina e heliosupina-N-óxido.

ULUBELEN e DOGANCA (1971) analisaram várias substâncias da espécie *S. orientale*, inclusive alcalóides como anadolina, sinfitina e equinatina já conhecidos, detectando mais um desconhecido.

MAN'KO e MALYSHEVA (1972), estudaram a composição qualitativa e quantitativa de alcalóides em diferentes órgãos de *S. caucasicum* durante seu desenvolvimento. O teor máximo de 0,48% ocorreu nas raízes. Através análise cromatográfica em camada delgada determinaram 8 alcalóides, identificando 3 deles, asperumina, lasiocarpina, equinatina, e isolando a equimidina-N-óxido.

EDGAR e CULVENOR (1974) identificaram um alcalóide ester pirrolizidínico, a licopsamina, em extratos de antenas de uma determinada espécie de borboleta australiana. Este alcalóide é típico de plantas para as quais aquela borboleta mostra atração específica. Foram detectados nas secreções dos pêlos das antenas do inseto macho, revelando pertencer ao complexo feromônico, o qual, possui atividade importante na re produção sexual do mesmo.

PEDERSEN (1975) investigou os teores de alcalóides totais em 19 espécies dinamarquesas da família *Boraginaceae*, das quais 4 pertenciam ao gênero *Symphytum*. Através de processos analíticos gravimétricos e titulométricos, encontrou variações entre 0,09 - 0,2% para as quatro espécies consideradas. Identificou as seguintes alcalóides para as citadas espécies: licopsamina, 7-acetil-licopsamina, sinfitina, equimidina e 7-acetil-intermidina.

ULUBELEN e OCAL (1977) executaram a análise fitoquímica do *S. tuberosum*, determinando a partir do extrato alcoólico 6 alcalóides, dos quais identificaram a equimidina e anadolina.

CULVENOR et alii (1980) identificaram 8 alcalóides pirrolizidínicos do tipo hepato-tóxico em folhas de *S. X uplandicum*; equimidina, sinfitina, licopsamina e intermidina, já conhecidos, e, 7-acetil-licopsamina, 7-acetil-intermidina, sinlandina e uplandicina, caracterizados pela primeira vez. O teor total dos alcalóides variou entre 0,01- 0,15%. Em outra pesquisa com o *S. X uplandicum*, CULVENOR et alii (1980) novamente isolaram os 8 alcalóides citados, concluindo que o teor em alcalóides totais desta espécie é variável e usualmente baixo; encontraram em função do peso seco, 0,15% em folhas jovens, 0,01% em folhas maduras e 0,05% na maior parte das folhas de maturidade intermediária.

MATTOCKS (1980) estimou o teor em alcalóides totais da espécie *S. X uplandicum*, isolando-os e analisando-os por espectrofotometria. Achou valores de 0,003% para folhas maiores que 18cm e 0,049% para as menores que 15cm; os maiores teores foram encontrados em folhas de apenas 15 dias de idade 0,115%. Estes dados revelam a concentração diferencial dos alcalóides de acordo com a maturidade das folhas.

4 - Variação de Princípios Ativos.- Tem-se registrado a influência de inúmeros fatores determinando variações por vezes considerável sobre o teor e a composição de princípios ativos em plantas medicinais. Estas variações podem ser função dos grandes ciclos estacionais anuais; podem também variar qualitativa e quantitativamente em relação ao ciclo de um dia, correspondendo à específicos estados metabólicos da planta, como é conhecido ocorrer com os glicosídeos cardiotônicos das espécies do gênero *Digitalis*.

A composição e teor de princípios ativos em geral, podem também apresentar variações provocadas por diferentes situações geográficas, como altitude, latitude, luz, exposição (foto período). Apresentam oscilações em função de fatores individuais da própria planta, tais como: idade, maturidade e posição do órgão na planta, condições de sanidade ou fatores genéticos.

Variam ainda, em função de condições climáticas locais (temperatura, umidade, precipitação), nas quais se desenvolvem; respondem por vezes às práticas e manejos culturais que estejam sujeitas, e principalmente aos métodos de colheita e secagem.

Assim, condições locais como solo, clima, competição com outras plantas, ou práticas de manejo como adição de nutriente, irrigação, combate a ervas, colheita no tempo certo são fatores determinantes na obtenção de teor e qualidade, indispensáveis à produção desta matéria prima especializada, com alto valor biológico e de maneira econômica.

Existem observações sobre as variações sazonais na produção da alantoina do confrei; por exemplo: VOGL (1918) encontrou nos rizomas teores maiores durante o inverno e meno-

res no verão, enquanto que KACZMAREK e WALICKA (1950), obtiveram para as raízes valores mais elevados durante o outono e os mais baixos teores registrados durante o verão.

Existem amplas referências na literatura científica, sobre uma diversidade de plantas medicinais, correlacionando princípios ativos e fase de desenvolvimento do vegetal. De maneira geral, a fase de florescimento correlaciona-se com o aumento de determinados princípios ativos, podendo porém, ocorrer o fenômeno inverso entre algumas espécies ou em relação a outras substâncias na mesma planta.

O confrei tem o teor de alcalóides totais aumentado no período de florescimento segundo FURYA e ARAKI (1968) e MAN'KO et alii (1970). Observou-se variações diferenciais, relacionadas à fase de desenvolvimento da planta conforme MAN'KO et alii (1970) ou em relação à maturidade das folhas MAN'KO e MALISHEVA (1972), CULVENOR (1980) e MATTOCKS (1980).

Não foi encontrado na literatura consultada, informações sobre a influência de fatores externos determinando variações nos teores de alcalóides em plantas do gênero *Symphytum*. Para muitas plantas medicinais, foram realizadas pesquisas visando se conhecer o padrão de comportamento dos princípios ativos (entre eles muitos alcalóides de elevado interesse econômico), sob a influência de uma diversidade de fatores, principalmente experimentos de nutrição mineral ou localizações geográficas muito diferentes.

A maior parte das pesquisas no setor de nutrição envolvem observações sobre a influência de fertilizantes, principalmente N, P e K, sobre a produção do princípio ativo de interesse na cultura em estudo. Quase invariavelmente, os experimentos foram realizados adicionando-se quantidades cres-

centes de um determinado nutriente ou a exclusão do mesmo, parcial ou totalmente, tendo sido conduzidos em solos naturais, culturas de areia ou soluções nutritivas.

De maneira geral, para plantas portadoras de alcalóides, as quais foram observadas sob este aspecto, como a *Atropa belladonna*, *Hyoscyamus niger*, *Datura stramonium*, *D. innoxia* e *Nicotiana* sp, aportes nitrogenados na forma inorgânica, ou orgânica de estêrco, determinaram significantes aumentos nos teores de alcalóides segundo CROMWELL (1937) e PRASAD (1946). Entretanto, para *Lobelia inflata* em todas investigações similares conhecidas o nitrogênio reduziu drasticamente o teor de alcalóides totais de acordo com MASCRE e GENOT (1932) e (1933).

Pode-se citar muitos outros exemplos sobre a influência dos nutrientes. O nitrogênio, o mais estudado dos nutrientes, em seguida o fósforo, potássio, e ainda, os microelementos como boro, zinco e cobre, sobre o aumento ou diminuição de princípios ativos de muitas plantas medicinais.

Durante pesquisas visando a seleção de raças de *Datura innoxia*, ricas em alcalóides, por exemplo, FLÜCK e NISOLI (1954) acharam necessário estudar a influência de adubos azotados sobre o teor de alcalóides totais, em cujo resultado observaram aumento da ordem de 0 a 60%, com média de 20%.

Verificou-se ser nos tecidos de maior atividade metabólica o local onde se encontra a principal formação de alcalóides. Segundo ROBINSON (1974), pode-se admitir que fatores que estimulam o metabolismo, provoquem estímulo na biossíntese de alcalóides; de acordo com o ponto de vista deste autor, fatores como luz, temperatura, nutrientes, etc., que favorecessem o crescimento ou estimulassem o metabolismo da plan

ta de qualquer maneira, favoreciam também o incremento na síntese de alcalóides, sendo porém constatadas muitas exceções neste particular.

Em relação à outros compostos químicos de interesse no confrei, foram realizadas pesquisas relacionando a influência de diferentes fatores sobre os mesmos. Assim, IKEDA et alii (1962) verificaram a espécie *S. peregrinum*, sob deficiência mineral de N, P e K, decréscimo de ácido ascórbico nas folhas; por outro lado, N e K mostraram efeito determinante na produção de vitaminas, sendo que a fertilização com cálcio também aumentou o teor em ácido ascórbico.

FROLOV (1967) registrou dados e observações, sobre mudanças morfológicas e características biológicas para *S. asperum*, em função de várias áreas geográficas diferentes, constatando significativas mudanças nos ritmos de crescimento da planta, aumento na produção de brotos e sementes, e formação de massa vegetal. IKEDA e KUROZUMI (1967) estudaram a influência dos elementos: cobre, cobalto, manganês, molibdênio, zinco e boro sobre o *S. asperum*, conduzindo culturas em vasos, preenchidos com solos de uma região japonesa, na qual se havia observado deficiência de cobalto, através de animais de pasto. Os vasos receberam também adubação sob a forma de sulfato de amônio, salitre, superfosfato e sulfato de potássio. Observaram que o confrei respondeu mais favoravelmente à adubação com sulfato de amônio do que com salitre. Aumentou de 30% o crescimento do vegetal com cobalto, molibdênio e boro, decrescendo porém com manganês. Os teores de amino-ácidos básicos foram mais elevados também com o sulfato de amônio do que com adubação salitrada, acontecendo o inverso para os outros amino-ácidos. Houve ainda respostas diferenciais na composição em aminoácidos em relação aos diversos microelementos-TABIN e BERBEC (1968), visando melhorar a produção e a colhei-

ta de folhas verdes do *S. peregrinum*, pesquisaram durante 3 anos o efeito do cálcio sob diferentes teores de umidade do solo. Realizaram o experimento em vasos no interior de casas de vegetação, utilizando solo argilo-barrento. Observaram que a mais elevada produção foi obtida ao nível de umidade de 60% e a mais baixa à 75%; àquele nível de 60%, o cálcio sob a forma de carbonato não teve efeito significativo sobre a produção, determinando porém ao nível de 75% de umidade, abaixamento sensível da produção e queda de resistência das plantas. Os autores não conseguiram averiguar influência significativa da umidade ou do cálcio sobre a composição química do confrei, sendo os fatores, tempo de colheita e idade da planta mais importantes neste aspecto.

Relativamente à influência do solo sobre princípios ativos de interesse medicinal em geral, se tem observado, em estudos similares para outras culturas de plantas medicinais, que o teor depende do solo no qual a planta foi cultivada. Assim, FIJALKOWSKI e SEROCZYNSKA (1977), pesquisando a influência do solo sob os teores de alantoína registraram valores de 1,66 - 2,55% em solos rendiznas férteis, decrescendo para 1,35 - 1,80% em solos marrons pseudopodzólicos e 0,87-1,18% para os solos "loess". Os mais baixos valores de alantoína foram registrados para os podzóis 0,75 - 0,8 formados de areia barrenta.

Conforme depreendemos até o instante, o interesse pelo estudo dos alcalóides do confrei como substância de possibilidades terapêuticas e toxicológicas é relativamente recente razão pela qual ainda são raros os trabalhos relacionando os teores totais à quaisquer fatores externos.

Na medida em que a toxicidade potencial possa representar um fator de risco, pelo uso popular difundido e

ampliado da erva "in natura", acreditamos ser de interesse, to
da e qualquer informação que leve ao conhecimento da matéria,
no sentido de melhor disciplinamento do uso terapêutico.

III. MATERIAL E MÉTODOS

O desenvolvimento da parte experimental do presente trabalho constou de atividades de campo e análises químicas de laboratório.

1. Espécie Botânica.- A determinação da espécie vegetal trabalhada, foi executada através da análise botânica dos órgãos florais, folhas, haste e raízes, de acordo com BAILEY (1977), sob a orientação do Departamento de Botânica da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", tendo-se concluído tratar-se da espécie *Symphytum officinale* L.

2. Atividade de campo.- Foram selecionados dois tipos de solos, pedogeneticamente diversos, localizados nos municípios de Tietê e Campinas (distantes entre si de 70km) em estações experimentais do Instituto Agronômico. Definidas as áreas apresentando aparente homogeneidade, destinadas à instalação dos canteiros experimentais, procedeu-se a coleta de amostras do solo para análises químicas e físicas.

Foi preparado um canteiro experimental de área de 64m², em cada localidade, submetendo-os aos tratamentos normais destinados às culturas comuns, tendo recebido adubação orgânica de origem vegetal antes do plantio. Em seguida, foram

estabelecidas 100 plantas, no espaçamento de 0,80 x 0,80m, das quais 12 seriam escolhidas ao acaso, destinadas à análise química.

De acordo com limitações de ordem material e econômica, considerou-se suficiente 12 repetições de dados individuais, refletindo comportamento do alcalóide da planta em função de cada solo considerado, permitindo aferição das médias respectivas e análise comparativa entre solos.

Cada lote constituiu-se de plantas sadias de *Symphytum officinale* L., descendentes de mesma origem clonal. Iniciado de uma única planta-mãe, através de multiplicação vegetativa, após alguns ciclos sucessivos, alcançou-se o número de plantas necessárias à pesquisa, permitindo assim o controle de variações de origem genética.

Todos os rizomas destinados ao plantio foram selecionados dentro de um mesmo critério, considerados aproximadamente em tamanho, peso, espessura e vigor. Durante o desenvolvimento no campo, as mudas não receberam tratamentos especiais, apenas irrigação por aspersão em períodos de longo estio e algum controle de ervas invasoras quando necessário.

As plantas desenvolveram-se por três anos nestas condições. A colheita foi executada através de corte rente ao solo de toda a parte aérea da planta, constituindo-se o material para análise química por folhas de todas idades fisiológicas. As colheitas foram executadas todas no mesmo horário, evitando possíveis variações devido a periodicidade diária no metabolismo, ainda não pesquisado para o confrei, porém fenômeno conhecido para muitas plantas medicinais produtoras de alcalóides.

Assumiu-se não haver diferença significativa de ordem climática entre as duas localidades geográficas, de praticamente mesmas altitudes e situadas próximas, sendo similares em seus parâmetros de importância. Assim, aqueles fatores climáticos definidores: temperatura, precipitação, umidade e evaporação, combinados determinam o mesmo tipo de clima, cuja área de ação envolve aquelas duas localidades proximais. De acordo com a Comissão de Solos (1960), o clima atualmente nesta área é do tipo Cwa, segundo a classificação de Köppen. Este clima é definido como mesotérmico, de inverno seco, com média de temperatura no mês mais frio inferior a 18°C e a do mês mais quente de 22°C . O total de chuvas do mês mais seco não ultrapassa 30mm. O índice pluviométrico deste tipo climático varia entre 1.100 e 1.700mm.

3. Atividades de Laboratório.- Os dados analíticos, referentes aos teores em alcalóides totais, presentes nas amostras, foram obtidas através dos métodos gravimétricos e titulométrico.

A análise qualitativa, através da qual visualiza-se a separação dos componentes da mistura dos alcalóides totais, foi realizada através de cromatografia em camada delgada, para todas amostras.

A secagem das amostras foi feita em estufa ventilada, à mesma temperatura na faixa de $45-55^{\circ}\text{C}$, durante 48 horas assegurando o máximo teor de princípio ativos conforme KACZMAREK e WALICKA (1959).

O material seco foi moído várias vezes, passado através de malha nº 40 ABNT, tomando-se 100g deste para extração. A extração dos alcalóides totais foi baseada em PEDERSEN (1965), CULVENOR (1980) e STENGL (1982).

Cada amostra previamente umedecida com álcool metílico foi submetida à percolação com este solvente, à temperatura ambiente durante 4-5 dias, até completo esgotamento. O solvente foi removido por evaporação sob pressão negativa e temperatura de 50°C.

O resíduo foi suspenso em ácido sulfúrico 1N, deixando-se em repouso por 12 horas, submetendo-se em seguida a mistura à centrifugação, 3.000 rpm por 5 minutos.

Após decantação da fase ácida, repetiu-se a extração mais duas vezes com ácido sulfúrico 1N. Os extratos reunidos foram tratados com excesso de zinco em pó, deixando-se em repouso por mais 12 horas, com a finalidade de redução dos N-óxidos dos alcalóides presentes. Após filtração o pH foi ajustado para 9-10 com NH_4OH concentrado, procedendo-se a seguir a extração dos alcalóides da solução aquosa pelo clorofórmio, repetindo esta operação cinco vezes. A base bruta foi submetida a purificação através de re-extração ácida, repetida 5 vezes, com ácido sulfúrico 0,5N, basificando-se em seguida com solução aquosa de NH_3 e re-extraindo-se as bases com clorofórmio, repetindo-se novamente 5 vezes as extrações. Pela evaporação total do solvente, obtem-se a base bruta total.

3.1 Gravimetria.- O resíduo alcaloídico foi seco por 4 horas (30-40°) em vácuo e então pesado, registrando-se os dados para análise gravimétrica.

3.2 Cromatografia.- Após secagem das amostras, retomou-se o resíduo básico total, solubilizando-o em 5ml de clorofórmio, destinado a análise cromatográfica.

Utilizou-se a cromatografia em camada delgada em placas de vidro (20 x 20) revestidas por sílica G-60 na es

pessura de 0,2mm, de acordo com SHARMA et alii (1965). Estas análises foram repetidas em placas prontas de folhas de alumínio (20 x 20) de sílica G-60.

As placas foram ativadas a 110°C de temperatura por 1 hora pelo menos. O sistema de solventes para a fase móvel utilizado foi clorofórmio, metanol e amônia concentradas (85:14:1), conforme HUIZING e MALINGRE (1981).

As placas foram desenvolvidas no interior de cubas de vidro no sentido ascendente, preparadas uma hora antes do uso. Foram aplicadas as amostras nas placas com microseringa depositando-se 4 μ l de cada amostra. Os alcalóides: 7 acetil-licopsamina + 7 acetil-intermedina e equimidina, enviados pelo pesquisador Dr. Culvenor, da Austrália, foram aplicados na placa como padrão, para possível identificação dos alcalóides das amostras.

Após desenvolvimento de 15cm na placa, esta foi seca a temperatura ambiente.

Para revelação dos alcalóides separados, o cromatograma foi pulverizado com o reagente p-cloranila em solução de 1% de tolueno, sendo em seguida aquecidos a 105°C, por 15 minutos, pulverizando-se finalmente com ácido sulfúrico 2N para intensificação da cor, de acordo com HUIZING et alii (1980).

3.3 Titulometria.- As soluções clorofórmicas das bases totais foram secas novamente, repousando-se o resíduo em dessecador por 12 horas, dissolvendo-se em seguida em 50ml de ácido acético glacial.

Foi adicionado a seguir 2ml de anidrido acético, (titulação em meio não aquoso), titulando-se volumetrica-

mente a solução com ácido perclórico 0,036N e violeta cristal como indicador. Os volumes consumidos foram anotados para os cálculos necessários, tomando-se o valor de 350, segundo PEDERSEN (1975), como peso molecular médio dos alcalóides.

4. Tratamento estatístico.- A metodologia quantitativa se resume na construção de alguns indicadores estatísticos, com objetivo de tecer considerações de ordem comparativa, através do auxílio de parâmetros selecionados. Assim, os dados amostrais serão analisados por medidas estatísticas: de tendência central, de dispersão e de associação linear.

Foram selecionadas para estimação as médias aritméticas ($\bar{X}$), desvios padrões (S_X), coeficiente de variação (V_X), intervalos de confiança para as médias (I.C.) e coeficientes de correlação simples (r).

A medida fornecida pelo coeficiente de variação, tratando-se de uma medida de dispersão relativa, presta-se para comparações de variações de distribuições de duas (ou mais) variações aleatórias, cujas médias possam ser muito diferentes, de acordo com BRYANT (1960).

Assim, torna-se possível a comparação entre as médias obtidas através dos dois métodos químicos quantitativos diferentes, propostos na seção anterior, proporcionando a possibilidade de discussões comparativas sobre os seus resultados experimentais. Na medida em que possam os citados métodos serem considerados alternativos, para quantificação dos teores de alcalóides totais no confrei, será aplicado o coeficiente de correlação linear simples para avaliar o grau de associação entre os mesmos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Dados e considerações sobre a análise dos solos

As análises químicas e físicas efetuadas pela Seção de Pedologia do Instituto Agrônômico, referente as amostras colhidas das áreas experimentais, nas seguintes profundidades 0 -20cm e 20 -40cm são apresentadas nas tabelas 1, 2 e 3.

Análise Física

TABELA 1 - Análise granulométrica

Amostra	Prof.	Argila	Silte	Areia fina	Areia grossa
Tietê	0 - 20	16	16	61	07
Tietê	20 - 40	16	19	57	08
Campinas	0 - 20	37	05	23	35
Campinas	20 - 40	44	03	21	32

De acordo com as análises pedológicas os solos foram classificados como:

- a) Área em Tietê - Litossol, eutrófico, franco arenoso. Apresenta alto teor de silte e areia fina.
- b) Área em Campinas - Latossolo Vermelho-Escuro eutrófico, argilo-arenoso. Apresenta teores bem distribuídos de argila, areia fina e areia grossa.

Análises Químicas

TABELA 2 - Acidez, C% e M.O. %

Amostra	Prof.	pH		C %	M.O. %
		H ₂ O	KCl		
Tietê	0 - 20	6,1	5,5	1,0	1,72
Tietê	20 - 40	6,1	5,2	0,5	0,86
Campinas	0 - 20	6,6	6,3	2,5	4,3
Campinas	20 - 40	7,1	6,6	0,8	1,37

TABELA 3 - Cátions em e.mg/100g solo

Amostra	Prof.	Ca ⁺⁺	Mg ⁺⁺	K ⁺	Na ⁺	Al ³⁺	H ⁺	V%
Tietê	0 - 20	6,8	0,8	0,10	0,14	0,1	2,1	75,4
Tietê	20 - 40	7,0	0,7	0,15	0,16	0,0	1,5	83,4
Campinas	0 - 20	9,8	1,5	1,05	0,14	0,1	3,3	78,6
Campinas	20 - 40	7,1	0,7	0,09	0,05	0,0	1,4	85,0

1.1 Solo da área experimental em Tietê

O solo da Estação Experimental de Tietê, classificada como Litosol, tem sua origem a partir de folhelhos ou argilitos das séries Passa Dois, Itararé e Tubarão.

Da análise granulométrica, ressalta-se a fração silte muito elevada, 16 e 19% respectivamente para as duas profundidades consideradas, correspondendo a mais de 35% de silte + argila.

0 C%, garantindo um teor de matéria orgânica de 1,72 e 0,86%, é considerado médio para aquelas profundidades. A CTC devida à fração mineral é média, sendo de 10 e.mg/100g e 9,5 e.mg/100g de solo referentes às citadas cotas. A soma de bases permutáveis foi cerca de 8 e.mg/100g para as duas profundidades de solo, com absoluta predominância do Ca⁺⁺, 86%.

A porcentagem de saturação de bases (V%) é elevada, 75 e 83% nas duas profundidades consideradas, sendo que 65 e 73% respectivamente, devidas ao Ca⁺⁺.

Os valores para os cátions Mg^{++} , K^+ e Na^+ são considerados médios.

1.2 Solo da área experimental em Campinas

As análises do solo do Centro Experimental de Campinas revelaram tratar-se de um Latosol Vermelho Escuro, argilo-arenoso, eutrófico.

São solos formados a partir de folhelhos, argilitos ou varvitos, geralmente pobres, com saturação de bases fraca. Predomina argila do tipo 1:1, teores de óxidos de ferro e alumínio elevados, pelo que, espera-se a ocorrência de baixa concentração de cátions; entretanto, encontram-se particularmente entre os solos vermelhos, originados dos materiais parentais citados acima, camadas de calcário dando origem a solos com saturação de bases elevada, levando-as à categoria de eutróficos.

Na análise granulométrica nota-se o valor referente a areia grossa com valores elevados, todavia, este e outros valores distoantes em relação à descrição da unidade, se devem ao fato de serem solos intensamente trabalhados há muitas décadas, no centro experimental.

O teor de C%, de 2,5 e 0,8% para as duas profundidades, garante 4,3 e 1,4% de matéria orgânica, valores esses considerados altos.

A capacidade de permuta de cátions (CTC), foi de 15,7 e 9,3 e.mg/100g de terra, a primeira nos 20cm iniciais de solo. A soma das bases permutáveis foi de 12,5 e 8,0 e.mg/100g de solo nas duas profundidades estudadas, apresentando também para este solo, predominância do cátion Ca^{++} , respectivamente 74 e 89 e.mg/100g.

A porcentagem de saturação de bases (V%) revelou valores elevados 78,6 e 85,0%, a maior parte devido ao Ca^{++} , 61,6 e 76,0%, respectivamente para 0 - 20 e 20 - 40cm de profundidade.

O teor de Mg^{++} e Na^+ são considerados altos e o teor de K^+ revelou ser extremamente alto nos primeiros 20cm de solo, provavelmente resultado de adubações anteriores.

2. Dados e considerações sobre a análise qualitativa e cromatográfica

A seguir são apresentados em dados esquemáticos, (Fig. I e Fotos I, II), os resultados obtidos através do processo de cromatografia em camada delgada. A análise qualitativa, processada pelo desenvolvimento diferencial das amostras na cromatoplaça, tornou evidente a visualização da composição relativa da mistura alcaloídica.

Examinando o cromatograma, pode-se estabelecer comparações e avaliações semi-quantitativas entre as manchas, através dos seus tamanhos, intensidade das cores e definição de seus contornos.

Foi utilizado como padrão, uma amostra enviada da Austrália pelo pesquisador Dr. C.C.J. Culvenor em quantidades para identificação qualitativa. Constava ser uma mistura dos alcalóides isômeros 7-acetil-licopsamina + 7-acetil-intermidina.

Conforme podemos observar pelas fórmulas estruturais desses alcalóides a diferença entre os isômeros se estabelece apenas nas disposições espaciais inversas de um H e

um radical OH, CULVENOR (1980), tornando muito difícil a separação entre os mesmos; apresentam valor Rf aproximadamente em torno de 0,50.

7 act.licopsamina — R = MeCO

licopsamina — R = H

7 act.intermedina — R = MeCO

intermedina — R = H

Entretanto, após o desenvolvimento desta mistura isomérica na placa, observou-se o aparecimento de duas manchas correspondendo a valores Rf distantes entre si, isto é, 0,50 e 0,11.

Segundo os autores CULVENOR et alii (1980) pode-se esperar que a zona de mancha referente ao $R_f = 0,11$ seja devida ao alcalóide licopsamina e/ou licopsamina + intermidina. em virtude do comportamento da mistura padrão utilizada (composta dos alcalóides, 7-acetil-licopsamina + 7-acetil-intermidina). Esta mistura isomérica quando estocada em solução metanólica, converte-se facilmente em licopsamina, devido ao grupo acetoxi da 7-acetil-licopsamina ser muito lábil. Assim, conforme podemos observar através da cromatoplaça, o aparecimento de duas manchas de R_f 0,50 e 0,11, no desenvolvimento do padrão comprova a dissociação da mistura dos alcalóides citados.

Deste modo, as manchas de R_f 0,11 referentes ao desenvolvimento das amostras, podem ser identificadas como sendo devidas a presença do alcalóide licopsamina e/ou licopsamina + intermedina. Com relação aos seus teores, de acordo com os citados critérios de avaliação de manchas (tamanho, intensidade da cor e nitidez), deduz-se sobre sua baixa representatividade relativa na mistura.

Tornaram-se visíveis por suas quantidades relativas na mistura, 6 manchas. Em trabalhos prévios, temos determinado até 8 manchas bem definidas. Neste caso, é necessário partir de maiores quantidades de material para extração, bem como rapidês no tratamento químico; ainda assim, duas manchas aparecem pouco nítidas e de contornos difusos, revelando sua baixa concentração na mistura. Por estas razões não se tornaram visíveis na presente cromatografia.

Conforme pode-se apreciar esquematicamente, na Fig. I e fotos apresentados, destacam-se pelo menos 3 manchas principais, nítidas, carregadas na cor e de contornos circulares definidos.

FIGURA I - Cromatografia em camada delgada dos alcalóides pirrolizidínicos de folhas de confrei. Impregnante sílica gel G 60; eluente: $\text{CHCl}_3\text{MeOH-NH}_4\text{OH}$ cc.(85:14:1).

A = 7-acetil-licopsamina + 7-acetil-intermidina.

B = licopsamina + intermidina (provável).

CROMATOGRAFIA DOS ALCALÓIDES DE FOLHAS DE CONFREI.

FOTO I

Acty = acet.licops.+ acet.inter.(Rf=0.50) e licops.(Rf=0.11).
Ecn = equimidina (Rf=0.48).

FOTO II

T₁ - T₄ = alcalóides de plantas cultivadas em litosol.
C₁ - C₄ = idem , em solo latossólico.

Com o auxílio de resultados citados na literatura, e o exame das posições relativas das amostras e do padrão no cromatograma, sugere-se a possibilidade das manchas mais aparentes e representativas, de $R_f = 0,59$ e $0,50$, corresponderem respectivamente aos alcalóides: sinfitina e à mistura acetil-licopsamina + acetil-intermedina, estando de acordo com as técnicas e valores R_f obtidos por PEDERSEN (1975), CULVENOR et alii (1980) e CULVENOR et alii (1980), HUIZING e MALINGRÉ (1981) e STENGL (1982).

Segundo resultados obtidos pelos autores citados, a mancha de valor R_f aproximado $0,48$, poderia se relacionar a equimidina.

São apresentados à seguir os valores R_f obtidos por alguns autores.

Utilizando cloroetileno em lugar do clorofórmio como solvente da fase móvel, STENGL (1982), encontrou para o *S. officinale* os valores $R_f = 0,42$ e $0,11$, respectivamente para as misturas: 7-acetil licopsamina + 7-acetil intermidina e licopsamina + intermidina

PEDERSEN (1975) e CULVENOR (1980), usando as mesmas fases móvel e estacionária, encontraram os seguintes alcalóides e valores R_f para as espécies e variedade de confrei, tabela 4.

TABELA 4 - Valores Rf para alguns alcalóides de espécies e variedades de confrei. (Dados segundo PEDERSEN, 1975).

Espécie/Var.	Equim.	Licops.	7 acet. licops.	7 acet. interm.	Int.
<i>S. officinale</i>	0,50	-	0,39	-	-
<i>S. off.</i>	-	0,07	0,41	-	-
<i>S. X uplandicum</i>	0,53	0,10	0,44		
	0,25*	0,11*	0,30*	0,20*	0,10*
		(a)	(b)		
<i>S. asperum</i>	0,41	-	0,27		

* CULVENOR (1980) - (a) licopsamina + intermidina

(b) acetil-licops. + acetil-intermidina

Evidências através de análise das massas espectrais segundo PEDERSEN (1975), revelaram que os principais constituíntes da mistura de alcalóides tinham grandes estruturas representadas por acetil-licopsamina, intermidina e licopsamina em espécies de confrei dinamarquesas.

Confrontando os dados da literatura com os resultados oferecidos pela cromatografia, concluímos para as amostras analisadas, que os componentes mais representativos na mistura dos alcalóides totais estariam representados pela sinfitina, 7-acetil-licopsamina, 7-acetil-intermidina e equimidina.

Por outro lado, a análise cromatográfica identifica claramente a existência de diferenças nas concentrações de alcalóides, entre as duas séries amostrais, referentes a cada solo estudado.

Através da Fig. I e pelas Fotos I e II das placas desenvolvidas em laboratório, podemos apreciar nítida diferença entre as amostras provenientes de Tietê e Campinas. As 12 amostras de cada local se comportaram de maneira similar e constante, indicando teores de alcalóides em plantas cultivadas no solo Latossolo Vermelho Escuro (Campinas), sensivelmente inferiores àqueles produzidos no solo litólico eutrófico (Tietê).

3. Dados e considerações sobre a análise quantitativa dos experimentos

Os resultados dos experimentos sobre o teor de alcalóides totais em folhas de confrei, obtidos pelos processos gravimétrico e titulométrico são apresentados nas tabelas 5 e 7 respectivamente. As estatísticas em ambas tabelas, estão expressas em gramas por cem gramas de peso seco. Apresentam os resultados obtidos a partir de plantas cultivadas em solos Litosol eutrófico franco arenoso situado em Tietê, e Latossol Vermelho Escuro situado em Campinas.

Os indicadores estatísticos selecionados estão apresentados nas tabelas 6 e 8, correspondendo respectivamente aos resultados analíticos das tabelas 5 e 7.

3.1 Gravimetria.- Considerando os dados apresentados pela análise gravimétrica, tabela 6, observa-se que, embora as médias dos teores de alcalóides totais produzidos em cada solo, demonstraram valores distantes entre si, a variação dentro de cada grupo de dados amostrais é suficiente-

mente alta para estabelecer a intersecção dos respectivos intervalos de confiança. Este fato, leva a conclusão de que todos os dados estatísticos amostrais referentes aos dois solos pertencem à mesma população. Portanto, através do método gravimétrico, constata-se não haver diferenças entre teores de alcalóides totais, em folhas de confrei, cultivados em solos litólico e latossólico.

Pode-se apreciar ainda os coeficientes de variação, cujos valores foram da ordem de 50% e 60% para os teores produzidos naqueles solos, denotando um grau de variação relativamente elevado dentro de cada uma das tomadas de amostras.

Esta variação em parte se explica através de limitações implícitas ao método gravimétrico, devido a possibilidade de detecção de impurezas retidas durante o tratamento químico, não sendo o método mais praticado segundo KOROKOLVAS (1984), para a análise quantitativa de alcalóides em geral. Para o confrei, estas dificuldades são também de natureza instrumental, em virtude dos baixos teores em alcalóides existentes nas folhas, cuja ordem de grandeza se situa entre os valores 0,001 - 0,2%, sendo possível que a presença de quaisquer contaminantes da ordem de milésimos, interfira nos resultados.

Os alcalóides conhecidos das borragináceas, citados anteriormente como pertencentes ao grupo pirrolizidínico, são termo-lábeis, de acordo com PEDERSEN (1975) e MATTOCKS (1961). Para não se decomporem após o extenso processamento, envolvendo secagem, extração e purificação das amostras, não devem estar sujeitos a temperaturas acima de 50°C por tempo prolongado.

Assim, na preparação das amostras pelo método gravimétrico utilizado, é necessário conduzi-los à secura, conforme citado na seção dedicada a material e métodos.

Tabela 5. Método gravimétrico.

Estatísticas amostrais percentuais dos alcalóides totais do confrei cultivado nos solos: Litosol e Latossolo.

Repetições	Litosol (Tietê) (%) alcalóides T.	Latosol (Campinas) (%) alcalóides T.
1	0,1344	0,1578*
2	0,1550	0,2367*
3	0,1880	0,0742
4	0,0920	0,0304
5	0,1217	0,0361
6	0,1030	0,0433
7	0,0658	0,0400
8	0,0939	0,0563
9	0,2933	0,1543
10	0,2353	0,1486
11	0,0511	0,1457
12	0,1595	0,0913

* Elementos amostrais não considerados para cálculos.

TABELA 6. Método gravimétrico.

Indicadores estatísticos referentes aos dados expostos na tabela 5.

Indicadores	Litosol (Tietê)	Latosol (Campinas)
$\bar{X}$	0,1410	0,0820
Sx	0,0705	0,0492
Vx	50%	60%
Ic	$0,097 < \mu < 0,185$	$0,046 < \mu < 0,1177$

Esta etapa, encontrada em PEDERSEN (1975), é realizada através de secagem em vácuo à baixas temperaturas (30-40°C). Todavia, não foi possível obter com os recursos instrumentais disponíveis, amostras absolutamente isentas de água pelo citado processo, tendo sido esta última o provável contaminante responsável durante as pesagens. As amostras de números 1 e 2 de Campinas, tabela 5, apresentaram teores de água contaminante mais elevados que as outras amostras trabalhadas. Esta água agregada à mistura dos alcalóides, não foi expulsa pelo processo utilizado, sugerindo a rejeição daqueles dados para a análise quantitativa, conforme indicado na tabela.

Procurando estabelecer comparações entre os dados obtidos e aqueles citados na literatura, utilizando o mesmo processo gravimétrico, podemos citar: MAN'KO (1969) na Rússia, pesquisando folhas de confrei e PEDERSEN (1975) na Dinamarca, trabalhando e analisando folhas e raízes de variedades de confrei.

Tomando os valores extremos e a média obtidos experimentalmente, tabelas 5 e 7, estabelecemos comparações com alguns valores encontrados pelos citados pesquisadores, tabela 9 adiante.

TABELA 9. Método gravimétrico.

Teor (%) alcalóides totais. Valores: mínimos, máximos e média. Autor.

Lócal	Mínimo	Máximo	Média	Autor
Tietê	0,05	0,29	0,14	IAC
Campinas	0,03	0,15	0,08	IAC
Rússia	-	-	0,29-0,32	MAN'KO et alii
Dinamarca	0,08	0,20	-	PEDERSEN

Portanto, apesar das limitações discutidas os dados fornecidos pela análise gravimétrica apresentam consistência, quando comparados com dados similares citados na literatura e obtidos através do mesmo método, apresentando a mesma amplitude de variação entre as amostras analisadas.

3.2 Volumetria.- A análise quantitativa dos dados obtidos pelo processo volumétrico, revelam a existência de diferença entre os dois solos relativamente às suas influências individuais sobre a produção de alcalóides. Pela análise dos números apresentados na tabela 8, observa-se que os intervalos de confiança das médias apresentam valores disjuntos.

Pelo método volumétrico portanto, apesar também de suas limitações específicas, aparece indicada uma diferença entre os teores referentes aos dois solos propostos, ou seja, é sugerido um efeito determinante, supostamente o solo, sobre a produção de alcalóides totais em folhas de confrei. Observa-se uma média para o teor produzido em solo litólico (Tietê), que revela ser o dobro do valor da média obtida para o solo latossólico (Campinas), valores estes cujos intervalos de confiança não se contêm mutuamente.

Ainda pelo método em discussão, os valores obtidos para os coeficientes de variação dentro das amostras, principalmente para os dados tomados em Tietê, tabela 8, se mostraram elevados, sugerindo um certo grau de variação da distribuição por amostragem.

Anota-se valores variando de 0,02 - 0,13% dentro dos dados amostrais, os quais devem sob condições de uma amostragem ampliada, apresentar menor variabilidade.

TABELA 7. Método titulométrico.

Estatísticas amostrais percentuais dos alcalóides totais do confrei cultivado nos solos: Litosol e Latosol.

Repetições	Litosol (Tietê) (%) alcalóides T.	Latosol (Campinas) (%) alcalóides T.
1	0,0338	0,0243
2	0,0345	0,0179
3	0,0441	0,0153
4	0,0294	0,0268
5	0,0798	0,0217
6	0,0313	0,0230
7	0,0275	0,0243
8	0,0460	0,0307
9	0,0499	0,0383
10	0,1329	0,0358
11	0,0319	0,0294
12	0,1162	0,0319

TABELA 8. Método titulométrico.

Estatísticas amostrais referentes aos dados expostos na tabela 7.

Indicadores	Litosol (Tietê)	Latosol (Campinas)
$\bar{X}$	0,0277	0,0547
Sx	0,0069	0,0345
Vx	25%	63%
Ic	0,0232 < μ < 0,0322	0,0327 < μ < 0,0767

Por outro lado, a literatura informa sobre a existência de variações no teor de alcalóides totais em plantas do gênero *Symphytum*, cuja amplitude porém, ocorre ser devido a circunstâncias produtivas distintas, tais como, estações do ano e/ou períodos fisiológicos opostos.

Uma vez que as amostragens foram tomadas através de idêntico tratamento analítico, mantendo-se constantes todos os demais fatores externos aos objetivos propostos pela pesquisa, o conhecimento adquirido neste aspecto sobre a espécie considerada, conduziria a uma expectativa de menor grau de variação. Desse modo, o fator tamanho da amostra, parece ter exercido alguma influência.

A mesma ordem de comentários gerais dirigidos ao processo gravimétrico cabe ao processo titulométrico. Este último, conforme proposto na metodologia, exige que a titulação se realize em meio não aquoso, KOROKOLVAS (1984).

Portanto, se as amostras contiverem 0,05% de água pode haver alterações nas reações, influenciando os resultados analíticos. Segundo se sabe, não é impossível também a presença de contaminantes de outras naturezas químicas além da água; resíduos não completamente expulsos pelos processos químicos extrativos e de purificação, por exemplo, tratando-se como é o caso de misturas entre compostos bioquímicos de alta complexidade.

Também em relação ao processo titulométrico, observamos que os resultados obtidos, revelam consistência com resultados semelhantes, publicados pela literatura sobre o assunto. Assim, tabela 11, comparando-se os valores mais baixos, os mais altos e os médios, com os valores correspondentes obtidos por PEDERSEN (1975), trabalhando com variedades de confrei, observa-se concordância dentro dos mesmos limites.

TABELA 11. Método titulométrico.

Teor (%) alcalóides totais. Valores: mínimo, máximo e média/autor.

	Mínimo	Máximo	Média	Autor
Tietê	0,02	0,01	0,05	IAC
Campinas	0,01	0,03	0,02	IAC
Dinamarca	0,02	0,09	-	PEDERSEN

Os números revelam que apesar da variabilidade interna observada entre os dados experimentais desse estudo, os mesmos permanecem consistentemente comparáveis com aqueles obtidos por PEDERSEN (1975) na Dinamarca, obtida pelos mesmos processos, apresentando amplitude de variação também comparável.

Finalmente, para se estudar uma possível associação entre métodos, foram obtidos coeficientes de correlação (r).

Conforme podemos observar na tabela 10, os valores dos coeficientes de correlação simples estimados (r), não sugerem, à primeira vista, elevado grau de associação linear entre processos de medição da variável em estudo. O que dentro das limitações já comentadas, sugeriram a negação da hipótese de que os processos utilizados são alternativos na determinação da medida procurada. Embora não seja objetivo direto deste trabalho, as estimativas dos coeficientes de correlação citadas, devem ser apreciadas com cautela, tendo em vista diversos aspectos: tamanho da amostra, correlações espúrias, dificuldades operacionais de tomada de medidas, etc.

TABELA 10. Métodos: Gravimétrico x titulométrico
Indicador estatístico de correlação (r).

Solo	Valor
Litosol (Tietê)	0,2413
Latosol (Campinas)	0,0939

4. Considerações finais

Os dados e discussões apresentados nos itens anteriores desta seção, são a seguir reunidos e comentados em sentido geral.

De acordo com a hipótese inicial proposta por este trabalho, a produção de alcalóides totais em folhas de confrei parece sofrer a influência do solo aonde foi cultivado.

Por outro lado, não foi considerada a influência do fator clima sobre estes teores, por razões expostas nas seções anteriores, baseadas em informações bibliográficas sobre pesquisas com várias plantas medicinais.

Estas pesquisas revelaram como condição predisponente, a existência de um diferencial significativo entre índices ambientais. Assim, segundo FLÜCK (1955), situações geográficas opostas, tais como, hemisférios, zonas temperadas ou tropicais; diferenciais elevados na temperatura, luz e umidade, ou altitudes discrepantes, poderiam determinar novas tendências na composição qualitativa e/ou quantitativa de princípios ativos em plantas medicinais em geral.

Devido a similaridade existente entre as condições ambientais às quais estão sujeitas as áreas experimentais, envolvidas pelas influências gerais médias do mesmo tipo climático, conforme descrito na seção dedicada à metodologia, não foi admitida a existência de efeitos exercidos pelo clima.

Portanto, responsabilizando o solo como o principal fator de influência, cabe considerações gerais sobre os dados analíticos e de classificação revelado para os dois tipos propostos.

Para ambos os solos estudados foram encontrados valores muito baixos para a acidez. Assim, pode-se esperar boas condições em relação à disponibilidade de nutrientes às plantas, pois a CTC/pH dependente, aumenta com o aumento do pH, sendo bem conhecida a correlação altamente significativa existente entre aumentos de C% e a CTC dependente do pH.

Porém, as amostras do solo latossólico de Campinas reuniram melhores condições de fertilidade em relação ao solo litólico de Tietê, apresentando valores de matéria orgânica mais elevados, assim como, os valores para a soma de bases permutáveis, saturação de bases (V %), pH cerca da neutralidade, além dos elevados valores para os cátions Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ e Na^+ .

O único fator realmente muito diferente entre os dois solos estudados foi o teor de potássio, muito elevado para o Latosol, particularmente na fração de solo que é explorado por aproximadamente 80% do sistema radicular do confrei, isto é, nos primeiros 20 - 30cm de profundidade.

Em amplo trabalho de revisão bibliográfica sobre o assunto, FLÜCK (1954) discutiu as pesquisas então publicadas sobre a influência de fatores do solo e práticas de adu-

bação sobre os princípios ativos de muitas plantas medicinais. De acordo com esta revisão, o potássio parece abaixar em alguma extensão o teor de alcalóides em: *Atropa belladonna* (Vreven et al, 1911), *Datura stramonium* (Boshart, 1931), *Datura innoxia* (Nisoli, 1950), *Nicotiana* sp e *Lupinus* sp (Guillaume, 1928) e *Punica granatum* (Maurin, 1928). Inversamente, em outras pesquisas foram encontrados altos teores em plantas adubadas com potássio: *Hyoscyamus niger* L. (PRASAD, 1946), *Aconitum* (Salgues, 1938) e *Solanum tuberosum* (Sabalistchka et al, 1925). Por outro lado, (Gstirner, 1950) não conseguiu detectar efeito em folhas de *Atropa belladonna*, porém um aumento de cerca de 3% no teor de alcalóides das raízes, quando tratadas com o potássio. Também (Barber, 1941 e Esdorn, 1940) detectaram claros aumentos nos teores em *Lobelia*, mesmo em cultura de areia. Já em *Papaver somniferum* o teor de morfina não foi alterado pelo potássio (Boshart, 1931).

Conforme exposto, observa-se disparidade nas reações das plantas, em relação ao efeito do potássio, sobre seus efeitos nos teores de princípios ativos em geral.

Fica indicado entretanto, uma possibilidade de relacionamento dependente, entre níveis de potássio no solo e teor de alcalóides totais no confrei, proposta como hipótese para pesquisa futura.

Caso se consiga provar uma influência decisiva do cátion K^+ na diminuição dos teores de alcalóides do confrei, teremos uma forma de aumentar a produção vegetal, minimizando a produção alcaloídica.

Paralelamente às informações e inferências sobre a fertilidade, apresentada pela análise dos dois solos, há que se acrescentar observações práticas efetuadas sobre as

plantas de acordo com o seu comportamento vegetativo no campo. Assim, as plantas cultivadas no solo latossólico (Campinas) apresentaram resultados mais satisfatórios, nos termos gerais de uma avaliação empírica, isto é, análise visual proporcionou suciente clareza para distinção dos caracteres: vigor, aspecto geral, tamanho, peso e formato das folhas e raízes. Sob comparação, esses mesmos caracteres observados em plantas cultivadas no solo litólico (Tietê) foram evidentemente menos sugestivos.

Relativamente à produção de alcalóides, a análise quantitativa dos dados titulométricos nos informou haver diferenças entre os dois solos: os resultados indicaram que os teores mais elevados de alcalóides totais foram produzidos em solo litólico (Tietê).

Esta indicação foi confirmada pela análise cromatográfica, (Fig. I e Fotos), na qual semi quantitativamente, se pode apreciar notória diferença entre as manchas produzidas, através de suas intensidade de cor, tamanho e nitidez, em relação às manchas devidas às amostras do solo latossólico de Campinas.

É interessante notar que o solo latossólico no qual houve o melhor desenvolvimento vegetativo, a produção de alcalóides foi inferior, ocorrendo fenômeno inverso para o Litosol, cujas plantas de desenvolvimento geral notadamente inferior, produziram, de acordo com os dados obtidos, os mais elevados teores observados.

Aqui também se pode admitir, uma relação existente entre estágio nutricional, e teor em alcalóides. Isto é, pode-se procurar entre os fatores nutricionais correspondentes à fertilidade do solo, aquele ou aqueles que tenham participação simultânea no estado geral de desenvolvimento da planta e na intensidade de sua influência sobre o teor de alcalóides totais no confrei.

V. CONCLUSÕES

De acordo com a revisão bibliográfica apresentada, concluiu-se sobre a importância da execução de pesquisas interdisciplinares (agronômica - fitoquímica - farmacológica - médica), objetivando o total aproveitamento das várias atividades potenciais e terapêuticamente específicas, devido aos princípios existentes nas espécies do gênero *Symphytum*, para o proveito do homem e animais domésticos.

A produção de alcalóides totais em folhas de confrei, *Symphytum officinale* L., apresenta teores mais elevados quando cultivado em Litosol eutrófico franco arenoso, do que em relação ao Latosol Vermelho Escuro eutrófico.

O desenvolvimento geral vegetativo da planta, apresenta maior vigor quando o cultivo é feito em solo latossólico, situando este em relação ao litólico, como o mais adequado a alcançar produções elevadas de massa verde com baixos teores em alcalóides totais.

A amplitude de variação dos teores em alcalóides totais presentes nas folhas do confrei, se estabelece entre 0,01 e 0,2%, independente da planta ter sido cultivada em Latosol ou Litosol.

O confrei cultivado no Estado de São Paulo apresenta em sua composição alcaloídica, os alcalóides identificados: 7-acetil-licopsamina, 7-acetil-intermidina, licopsamina, intermidina e equimidina.

VI. LITERATURA CITADA

AMES, M.M. e G. POWIS, 1978. Determination of indicine N-oxide and indice in plasma and urine by eletrone-capture gas-liquid Chromatography. Journal of Chromatography, Amsterdam, 166(2):519-526.

ARIKI, J. e A.C. CASTILHO e V. FAVORETTO e J.J. Oliveira Fº., 1978. Feno de Confrei (*Symphytum* sp) na Alimentação de Poedeiras. Científica. Jabotical, 6(3):477-481.

BAILLEY, L.H., 1977. Manual of Cultivated Plants. Nova Yorque Mac Millan Publishing Co., 116p.

BAILLON, H., 1884. Traité de Botanique Medicale Phanerogamique. Paris.

BALAVOINE, P., 1946. The mucilage Content of some mucoplectic plants. Abstract. Pharm. Acta Helv., 21:19-22.

BALME, F., 1978. Plantas Medicinais. S. Paulo, Hemus Livraria Editora Limitada, 398p.

- BARNES, J.M. e P.N. MAGEE e R. SCHOENTAL, 1964. Lesions in the lungs and livers of rats poisoned with the pyrolizidine alkaloid fulvine and its N-oxide. Abstracts, J. Pathol Bacteriol. Inglaterra, 88(2):521-531.
- BATLLE, E.S., (tradutor), 1929. Medicamenta Guia teórico-prático para Farmacêuticos, Médicos y Veterinarios. Barcelona, Editora Labor.
- BEILLE, L., 1904. Précis de Botanique Pharmaceutique.
- BETHEL, M., 1968. The healing Power of Herbs. Edição 1974. California, Wilshire Book Company, 160p.
- BODROGKOZY, G. e J. HORVATH, 1977. Connection between stand pattern and the organic matter production in the marshlands of the inundation area at Kortvelyes. Tiscia. Hungria, 12:65-70.
- BOLESLAW, B. e E. ANORZEJEWSKA, 1966. Choline content in some medicinal plants. Abstracts, Farm. Polska 22(3):181-184.
- BRYANT, E., 1960. Statistical Analysis. Nova Yorque. McGraw-Hill Book Co., Inc., 303p.
- CAIRO, M., 1978. Guia da Medicina Homeopática, 21ª Edição S. Paulo, Ed. Livraria Teixeira, 1054p.
- CASTRO, J.A., 1982. El Cancer el alimento y la alimentación, Carcinógenos en alimentos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Buenos Aires. XVI(2):243-264.

- CHALMERS, A.H. e C.C.J. CULVENOR e L.W. SMITH., 1965. Characterisation of Pirrolizidine paper Chromatography. Journal of Chromatography, Amsterdam, 20:270-277.
- CLAUS, E.P. e V.E. Tyler e L.R. BRADY., 1970. Pharmacognosy, 6ª ed., Filadelfia, USA, Lea & Febiger 518p.
- CLARKE, E.G.C. 1969. Isolation and Identification of Drugs, Londres.
- COMISSÃO DE SOLOS., 1960. Levantamento de Reconhecimento dos Solos do Estado de São Paulo. Ministério de Agricultura. Rio de Janeiro, 634p.
- CONN, E.E. e P.K. STUMPF., 1975. Introdução à Bioquímica. Trad. 3ª ed. americana. São Paulo, Edgar Blücher, 450p.
- CONSTANTINESCU, E. e I. CIULEI e M. STANESCU., 1959. Studiul farmacognostic al plantei *Symphytum officinale*. Farmacia. Bucureste 7(6):531-538.
- CONSTANTINESCU, E. e P. NEDELESCU e I. CIULEI e M. STANESCU., 1961. Contributii la actiunea alantoiniei din *Symphytum officinale* L. asupra tumorilor de grefa (Walker si Guerin) la sobolan. Farmacia., Bucureste 5:285-290.
- COSTA, A.F., 1977. Farmacognosia. 2ª ed., Lisboa. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 3 vol., 3180p.
- CULVENOR, C.C.J., 1968. Tumor inhibitory activity of Pyrrolizidine alkaloids. Journal of Pharmaceutical Sciences, 57 (7):1112-1117.

- CULVENOR, C.C.J. e J.A. EDGAR e J.L. FRAHN e L.W. SMITH, 1980. The alkaloids of *Symphytum X uplandicum* (Russian Comfrey). Australian Journal of Chemistry, Australia 33(5):1105-1113.
- CULVENOR, C.C.J. e M. CLARKE e J.A. EDGAR e J.L. FRAHN e M.V. JAGO e J.E. PEDERSON e L.W. SMITH, 1980. Structure and toxicity of the alkaloids of Russian Comfrey (*Symphytum X uplandicum* Nyman), a medicinal herb and item of human. Experientia. Basel, Suíça 36(4):377-379.
- DEAGEN, J.T. e M.L. DEINZER, 1977. Improvements in the Extraction of Pyrrolizidine Alkaloids. Lloydia, 40(4):395:397.
- DEINZER, M.L. e P.A. THOMSON e O.M. BURGETT e D.L. ISAACSON, 1977. Pirrolizidine Alkaloids: Their occurrence in Honey from Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea* L.). Science, Nova Yorque, 195:497-499.
- DENISYUK, N.A. e M.S. DUOKIN, 1979. Chemical composition of Prickly Comfrey (*Symphytum asperum*) leaves and stems. Rastif Resur, Odessa, URSS, 15(3):443-446.
- DIETRICH, H., 1913. Notes on new medicinal drugs. Abstracts. Schweizs-Wochsch, 51:453-5.
- DIXON, W.J. e MASSEY, F.J. Jr., 1969. Introduction to Statistical Analysis, McGraw-Hill Book Co., New York, 3ªed. 638p.
- EDEL'SHTEIN, M.M. e I.V. SOLOVEVA, 1971. Comparative evaluation of the quality of new ensilage crops in the Moscow region. Abstract, Dokl. Tskha, 168:52-56.
- _____, 1974. Carotene and ascorbic acid content in ensilage crops. Abstract, Dokl. Tskha, 204:51-4.
- EDGAR, J.A. e C.C.J. CULVENOR, 1974. Pirrolizidine ester alkaloid in danaid butter-flies. Nature, Londres 248:614-616.

- EIHE, E., 1977. Experience of cultivating new food plants on peat soils in the Latvian SSR. Abstracts Latv. PSR Zinat Akad Vestis, 8:34-43.
- EL BASSOUSY, A. e F. EL SABBAN e A.M. MAKKY e M.S. EL DANASSORY e M.A. EL ASHRY, 1975. Nutritive value of Russian Comfrey. Abstract. Agriculture Research Review, 3(8):15727, Egito, 53(7):59-64.
- EL BASSOUSY, A., 1975. Productivity and composition of Russian Comfrey as a forer crop in Egypt. Abstracts. Agric. Res. Review, 53(7):51-57.
- FARNSWORTH, N.R., 1978. The present and future of Pharmacognosy. News Letter of the American Society of Pharmacognosy, 16(1):4-12.
- FAVORETTO, V. e J. ARIKI e I. ARCARO Jr, 1978. Produção de Matéria Seca e Composição Química Bromatológica do Confrei (*Symphytum* sp) quando cortado em diferentes idades. Científica. Jaboticabal, 6(3):471-476.
- FELL, K.R. e J.M. PECK, 1968. Phytochemical investigation of some species of the Boraginaceae. Planta Médica, 16(4): 411-420.
- FIJALKOWSKI, D. e M. SEROCZYNSKA, 1977. Studies of the cultivation and content of alantoin in *Symphytum officinale* L., Abstracts, Herba Pol. 23(1):47-53
- FLÜCK, H., 1954. Review article - The influence of the soil on the content of active principles in medicinal plants. J. Pharm. Pharmacol. 6:153-163.

FLÜCK, M.M.H. e A. NISOLI, 1954. Influence des engrais sur la teneur en alcaloides. Annales Pharmaceutiques Françaises, 12:250-257.

_____, 1955. Review Article - The influence of climate on the active principles in medicinal plants. J. Pharm. Pharmacol. 7:361-383.

FONT QUER, P., 1980. Plantas Medicinales. El Dioscórides Renovado. 6ª edição, Barcelona, Editorial Labor, 1033p.

FROLOV, J.M., 1977. Variation in morfological and biological characteristics of the prickly Confrey in its northward movement. Abstracts. Rastif Resur. 13(2):322-326.

FURUYA, I. e K. ARAKI, 1968. Studies on constituents of Crude Drugs. I. Alkaloids of *Symphytum officinale* L. Chem. Pharm. Bull. 16(12):2512-2516.

FURUYA, T. e M. HIKICHI, 1971. Alkaloids and triterpenoids of *Symphytum officinale*. Phytochemistry, Inglaterram 10: 2217-2220.

GILG, E., 1926. Botânica aplicada à farmácia.

HACQUAT, P., 1872. Traité Pratique et Rationnel de Botanique Medicale. Paris.

HAGER, A., 1942. Tratado de farmácia prática. Barcelona, Editorial Labor S.A., 2. V.

HENRY, T.A., 1939. The plant alkaloids. 3ª ed. Londres. J. & A. Churchill Ltda. 690p.

HIROSAKI, K., 1977. Comfrey extracts for treatment of liver cirrhosis. Abstracts. Nippon Netsukatitsuchi Yakuhin KOTTO 78, 127, 811.

_____, 1977. Extracts of Comfrey as anti tumor agent. Abstracts, Kokai 78,88,312.

_____, 1977. Pharmaceutical for diabetis treatment. Abstracts. Nippon Netsukaritsuchi Yakuhin.

HOENNE, F.C., 1978. Plantas e Substâncias Vegetais Tóxicas e Medicinais. Reimpressão. Departamento de Botânica do Estado de S. Paulo.

HULPOI, N., 1967. Yield and quality of *Symphytum peregrinum* under irrigation conditions. Abstracts. Fundelea Inst. Cent. Agri. Ser. B. 35:657-662.

HUIZING, H.J. e F. DE BOER e T.M. MALINGRÉ, 1980. Chloranil, a sensitive detection reagent for pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. Journal of Chromatography, Amsterdam. 195:407-411.

_____, 1981. Preparative ion-pair-high-performance liquid chromatography and gas-chromatography of pyrrolizidine alkaloids from Comfrey. Journal of Chromatography, Amsterdam, 214(2):257-262.

HUIZING, H.J. e T.M. MALINGRÉ, 1981. Ion-pair adsorption chromatography of pyrrolizidine alkaloids. Journal of Chromatography, Amsterdann, 205:218-222.

KOROLKOVAS, A., 1984. Análise Farmacêutica. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Dois S.A., 208p.

- KUGELMAN, M. e W.C. LIU e M. AXELROD e T.J. McBRIDE e K.V. RAO, 1976. Indicine-N-oxide: The Antitumor principle of *Heliotropium indicum*. Loydia, 39(2 e 3):125-128.
- KUPCHAN, S.M. e R.W. DOSKOTCH e P.W. VANEVENHOVEN, 1964. Tumor inhibitors. III. Monocrotaline, the active principle of *Crotalaria spectabilis*. Journal of Pharmaceutical Science, 53(3):343-345.
- KUPCHAN, S.M. e M.I. SUFFNESS, 1967. Tumor inhibitor XXII. Senecionine and Senecionine-N-oxide, the active principles of *Senecio triangularis*. Journal of Pharmaceutical Science, 56:541-543.
- IKEDA, M. et alii, 1963. Nitrogen content of Russian Comfrey. Abstracts. Hiroshima Daigaku Shishibusan Gakubu Kiyo 5(1): 165-173.
- JAMES, W.O., 1953. Los alcaloides en las plantas. Endeavour, XII(46):76-79.
- LANGGAARD, T.J.H., 1872. Dicionário de Medicina Médica e Popular.
- LEHNINGER, A.L., 1977. Bioquímica, Trad. 2ª ed. americana, São Paulo, Edgar Blücher, 4 volumes, 770p.
- LUCAS, R., 1968. Nature's Medicine. Londres. Editora Tandem, 248p.
- LUCIEN, A. e D. LEROUX, 1919. Contribution to the study of mineral substance in plants. The ash of certain roots and tubers. Abstracts. Ann. Chim. Anal. Chim. App. 2(I):207-209.

MAN'KO, I.V. et alii, 1967. Alkaloids of *Symphytum asperum*.
Abstracts. Farm. Inst. 21:137-143.

_____, 1969. Alkaloids of some *Symphytum* species.
Abstracts. Rast. Resur. 5(4):508-512.

_____, 1970. Level of alkaloids in *Symphytum officinale*
dependent of the phase of plant development. Abstracts.
Rast. Resur. 6(3):409-411.

MAN'KO, I.V. et alii, 1970. Accumulation of alkaloids in
Symphytum asperum dependent on the phase of plant develop-
ment. Abstracts. Farm. Inst. Rest. Resur. 6(4):582-3.

_____, 1972. Accumulation of alkaloids in
different organs of *Symphytum caucasicum*. Abstracts. Rast.
Resur. 8(4):538-541.

MARCIULIONIS, V. e V. GLIAUBERTIENE, 1977. Biological and
Biochemical characteristics of promising silage plants.
Abstracts. Liet. TSR Mokslu Akad. Darb. Ser. 4:139-143.

MASCRÉ, M. e H. GÉNOT, 1932. Experiences culturelles sur la
lobélie "*Lobelia inflata*" L. Bulletin des Sciences Pharma-
cologiques, 39:165-172.

_____, 1933. Nouvelles expériences sur la
culture de la lobélie (*Lobelia inflata* L.). Bulletin des
Sciences Pharmacologiques, 40:453-459.

MATTOCKS, A.R, 1961. Extraction of Heat-labile alkaloids from
plantas. Nature. Londres, 23:1281-1282.

- _____, 1967. Detection of pyrrolizidine alkaloids on thin-layer chromatograms. Journal of Chromatography, Amsterdamm, 27:505-508.
- _____, 1967. Spectrophometric determination of unsaturated pyrrolizidine alkaloids. Analitica Chimica, Inglaterra, 39:443-447.
- _____, 1968. Spectrophometric determination of pyrrolizidine alkaloids in some improvements. Analitica Chimica, 40(11):1749-1750.
- _____, 1968. Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. Nature. Londres, 217:723-728.
- _____, 1980. Toxic pyrrolizidine alkaloids in Comfrey. The Lancet. 22:1136-1137.
- McLEAN, E.K., 1970. The toxic actions of pyrrolizidine (Senecio) alkaloids. Pharmacological Review, 22(4):429-483.
- MEDINA, H.P., 1960. Caracterisação de uma gleba da Estação Experimental de Tietê. Bragantia 19(2):CLXI.
- MOHABBAT, O. e M.S. YOUNOS e A.A. MERZAD e R.N. SRIVASTAVA e G.G. SEDIR e G.M. ARAM, 1976. An Outbreak of hepatic Venooclusive Disease in North-western Afghanistan. The Lancet, II, 7980:269-271.
- MOQUIN, T., 1875. Elements de Botanique Médicale. Paris.
- MOREIRA, F., 1971. As plantas que curam. São Paulo. Hemus Liv. Ed. Ltda. 256p.

- MORGAN, R., 1979. Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais. Hemus Livraria Editora Ltda.
- MORRA, V., 1940. Medicina Vegetal - Argentina.
- NAKANISHI, G. et alii, 1978. Feed efficiency of Comfrey for pigs. Abstracts. Daigaku Nojuigakubu Gakujutsu Kenkyu Hokoku. 35:271-298.
- OGIWARA, K. e T. HAKOYAMA., 1977. Nutritional values of leaf proteins. Abstract. Kiyo-Nagano-Ken Tanki Daigaku 32:1-4.
- OSOL, A. e G.E. FARRAR e colaboradores, 1955. The Dispensatory of the U.S.A. 25^a Ed., Filadelfia, J.B. Lippincott Company, 2139p.
- PAECH, K. e M.U. TRACEY, 1955. Moderne Methoden der Pflanzenanalyse. 4^a edição, Berlin, Ed. Springer Verlag. VI vol.
- PALAISEUL, J., 1972. Nos Grand-mères savaient la vérité sur les plantes et la vie naturelle. Paris, Edições Robert Laffont, 423p.
- PARK, Y., 1979. Studies on the development of leaf protein resources. I. Chemical composition of Comfrey (*Symphytum officinale* L.). Abstracts, Chayon Kwahak Pyon. 13:265-270.
- PATEL, B.M. e P.S. PATEL e P.C. SHUKLA, 1962. Nutritive value of neem leaves, mongolds and Comfrey. Indian Journal of Dairy Science, Ananda, India 15(4):139-145.
- PEDERSEN, E., 1975. Pyrrolizidine alkaloids in Danish species of the family "Boraginaceae". Arch. Pharm. Chemi. Sci. Ed. Soborg, Dinamarca, 3:55-64.

- PELIKAN, W., 1962. L'Homme et les plantes medicinales. Paris. Ed. Triades, 2 V., 684p.
- PERDUE Jr., R.E. e B.J. ABBOTT e J.L. HARTWELL, 1970. Screening plants for anti-tumor activity. II. A Comparison of two methods of sampling herbaceous plants. Lloydia. 33(1):1-6.
- PERROT, E., 1944. Matières Premières Usuelles du Regne Végétal. Paris, Masson et Cie Editeurs, 2 vol. 2344p.
- PHILIPSON, J.D., 1978. Alkaloidal N-oxides. A review of recent developments. Lloydia, 41(5):385-431.
- PINKAS, M. et alii, 1965. Composition of Comfrey mucilage. Abstracts. Compt. Rend. 26(3):834-837.
- PIO CORREA, M., 1951. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, 6 vol.
- POWIS, G. e M.M. AMES e J.S. KOVACH, 1979. Metabolic conversion of indicine N-oxide to indicine in Rabbits and humans. Cancer Research 39:3564-3570.
- POWIS, C. et alii, 1979. Relationship of the reductive metabolism of indicine N-oxide to its anti-tumor activity. Abstracts. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 24(3): 559-570.
- PRASAD, S., 1946. The influence of fertilizers on the growth and alkaloidal content of *Hyoscyannus niger* Linn. Journal of the American Pharmacy Association (Scientific) 35:121-127.

- REPTA, M., 1962. Contributii la studiul farmacognostic la unor specii din genul *Symphytum*. Farmacica, Bucurest. X(11): 645-649.
- ROBINSON, T., 1974. Metabolism and Function of Alkaloids in Plants. Science, Nova Yorque, 184:430-435.
- ROITMAN, J., 1981. Comfrey and Liver damage. The Lancet. 944.
- ROSEMBERG, H., 1925. Pharmacopendium. Barcelona, Editorial Labor S.A., 1876p.
- RUBNER, M., 1916. The nutritive utilisation of several importants vegetable and their cost. Abstracts. Chem.Zentr. Berlin, I:1035-1036.
- SEABRA, A., 1972. Higiene e Tratamento Homeopático das doenças domésticas. 12ª ed., São Paulo, Ed. Pensamento, 404p.
- SHARMA, R.K. e G.S. KHAJURIA e C.K. ATAL, 1965. Thin-Layer Chromatography of pirrolizidine alkaloids. Journal of Chromatography, Amsterdann, 19:433-434.
- SHUKHOBODSKII, B.A. et alii, 1970. Representatives of Boraginaceae as source of Physiologically active agents. Abstracts. Rast. Resur. 6(3):345-350.
- STENGL, P.V. e H. WIEDENFELD e E. RÖDER, 1982. Lebertoxische Pyrrolizidinalkaloide in *Symphytum*-Präparaten. Deutsche Apotheker Zeiting, Bonn, Alemanha, 122(16):851-855.
- TABIN, S. e S. BERBEC, 1968. Effect of calcium at different soil humidities, on the yield and quality of green crop of *Symphytum peregrinum*. Abstracts. Ann. Univ. Marie Curie Sklodw. Sect. 23:301-321.

- TAHA, A. e G. RÜCKER, 1977. Utility of II-Acceptors in Alkaloid assay. Archiv. der Pharmazie, Weinheim, Austria, 310:485-494.
- TANDON, B.M. e H.D. TANDON e R.K. TANDON e M. NARNDRAMATHAN e Y.K. JOSHI, 1976. An Epidemic of Veno-occlusive disease of liver in Central India. The Lancet. II-7980:271-272.
- TAYLOR, A.R. e N.C. TAYLOR, 1963. Protective effect of *Symphytum officinale* on Mice Bearing Spontaneous and Transplant Tumors. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 144:772-774.
- THE MERCK INDEX, 1976. 9ª Edição.
- THE PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA. (18ª Revisão), 1970. Preparada pelo Comitê de Revisão e Publicada pelo "Board of Trustees", 1115p.
- ULUBELEN, A. e S. DOGANCA, 1970. Anadoline, a new Senecio alkaloid from *Symphytum orientale*. Abstracts. Tetraedron Let. 30:2583-2585.
- _____, 1971. Boraginaceae. Alkaloidal and other constituents of *Symphytum orientale*. Phytochemistry, Inglaterra, 10:441-442.
- ULUBELEN, A. e F. ÜCAL, 1977. Alkaloids and other compounds of *Symphytum tuberosum*. Phytochemistry, Inglaterra, 16:499-58.
- UpHOF, J.C.T.H., 1959. Dictionary of Economic Plants. Nova Iorque, H.R. Engelmann & J. Cramer Editores.

- VAVILOV, P.F. e M.M. EDEL'SHTEIN e I.V. SOLOVEVA, 1973. Fractional composition of protein in the green mass of new ensilage crops. Abstracts. Izv. Timiryazeva Sel'Skokhoz, 5:84-93.
- VAN LINGUE, D. et alii, 1979. Pharmaceutical preparation containing an allantoin derivative for wound treatment. Abstracts. Ger. Offen. 2:922.
- VOGL, A., 1918. Occurrence of allantoin in rhizome of *Symphytum officinale* and other Boraginaceae. Abstracts. Pharm. Post. 51:181-184.
- VOISIN, A., 1971. Suelo, Hierba, Cancer (3ª reimpressão de 1ª edição 1961). Madrid, Editorial Tecnos S.A., 421p.
- WILLEY, L.A. e L.R. KNIGHT, 1962. Russian Comfrey (*Symphytum peregrinum*). Jour. Natl. Inst. Agric. Bot. Cambridge. 9(2):139-144.
- WAKELEY, C. "Ed.", 1954. The Mac Millan Medical Dictionary. Londres, Sir Cecil Wakeley Editora.
- YOUNGKEN, H.W., 1950. Textbook of Pharmacognosy. 6ª Ed. Nova Iorque, McGraw-Hill Book Com., 1063p.

VII. APÊNDICES

1. Alcalóides - Funções

Provavelmente o interesse inicial por substâncias de natureza alcaloídica tenha sido de origem médica, porque muitas plantas utilizadas como drogas por milhares de anos, possuíam atividade relacionada à sua presença.

Os alcalóides, de maneira geral, são produtos do metabolismo do nitrogênio, não tendo sido ainda demonstrado de maneira satisfatória uma explicação de seu significado relativo ao metabolismo de planta FLÜCK (1954).

A teoria sobre a função do alcalóide como substância protetora, baseia-se na sua elevada toxicidade, e também, pelo fato de se acumular normalmente nas regiões apicais, mais vulneráveis ao ataque estranho, hipótese esta rejeitada, já que a toxidez do alcalóide observou-se ser altamente específica, repelente ou fatal para um predador e absolutamente inócuo para outro predador JAMES (1955).

Outra hipótese prevê para os alcalóides funções auto-depuradoras para a planta, através de um metabolismo denominado de aprisionamento de substâncias finais e indesejáveis.

Em virtude deste metabolismo os alcalóides seriam compartimentados em locais determinados no interior da planta, pois de outro modo, seriam prejudiciais ao vegetal. Por outro lado, os pesquisadores têm concluído que os alcalóides são produtos finais do metabolismo, destinados à expulsão, como o ácido carbônico ou a uréia, que em sua desintegração determinam liberação energética, JAMES (1953).

Aceita-se que pelas vias biossintéticas os alcalóides se originem de aminoácidos; plantas portadoras de alcalóides teriam desenvolvido uma cadeia adicional de reações metabólicas, partindo de aminoácidos, sendo esta uma característica hereditária, a qual colocaria sob controle genético da planta, segundo ROBINSON (1974), a síntese e a degradação dos seus alcalóides. Outros fisiologistas, conforme JAMES (1953), atribuem aos alcalóides possíveis funções reguladoras do metabolismo, agindo associados a vitaminas ou co-enzimas, ou exercendo diretamente eles mesmos, as funções regulares do crescimento. Poderiam ainda se constituir em reservas principalmente de nitrogênio, na economia da planta, a semelhança com os amidos e algumas proteínas.

Atualmente se sabe que os alcalóides não são produtos inertes, encontrando-se sob flutuações dinâmicas constantes; nas espécies do gênero *Symphytum* por exemplo, se acham em equilíbrio dinâmico com a forma oxidada N-óxido, ambos exercendo importantes e complexas funções no metabolismo enzimático oxidativo destas plantas.

2. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS - TOXICIDADE

Em alguns centros populacionais humanos isolados no mundo asiático em desenvolvimento, foram observadas explosões epidêmicas de uma doença não comum no fígado, caracterizada como oclusão venohepática. Pesquisas locais constataram contaminação de cereais por sementes da planta *Crotalaria* sp., portadora de alcalóides do grupo pirrolizidínico, as quais consumidas pela população, e segundo TANDON et alii (1976), teria sido responsável por 42% de óbitos dos 67 casos da doença registrados. Posteriormente, de acordo com os mesmos autores, no distrito de Madya Pradesh, na Índia Central, foram observados pacientes submetidos a testes para funções hepáticas, sendo também executadas biópsias de fígados lesados e necrópsias de tecidos nos casos fatais, tendo sido descrita a patologia típica deste envenenamento específico. Esses casos clínicos teriam sido provocados, mais uma vez, por cereais de consumo humano, contaminados por sementes de uma planta não identificada botanicamente, parecendo pertencer ao gênero *Crotalaria* sp, na qual foram detectados alcalóides do grupo citado.

BARNES et alii (1964) detectaram lesões patológicas não só no fígado como nos pulmões, em ratos experimentais que tinham recebido uma dose simples do alcalóide fulvina e sua forma N-óxido, extraídos da planta *Crotalaria fulva*. Se-

gundo os autores, um quadro patológico não usual de edema pulmonar desenvolveu-se entre 4 - 6 semanas após a ingestão de uma única dose da droga. Esta planta é usada normalmente como chá medicinal na Jamaica, considerando-se a relevância dessas informações para doenças humanas.

Também MOHABBAT et alii (1976) e DEINZER et alii (1977) na introdução de seus trabalhos, citam estudos clínico-patológicos demonstrando casos típicos da forma característica de injúria tóxica ao fígado, ocasionada pelo mesmo grupo químico alcaloídico. Citam casos constatados na Jamaica, onde o consumo de plantas dos gêneros *Senecio* e *Crotalaria*, na forma de chás medicinais, é extensivo e onde a doença aparece endemicamente, considerando-se aquelas plantas como responsáveis. Descrevem outros casos desta lesão hepática não comum, verificados em populações nativas sul-africana, reconhecidos regionalmente como "síndrome de Budd-Chiari", provocados pelo consumo de pães feitos com farinha contaminada por plantas de *Senecio*. Estas teriam sido recolhidas em conjunto com o trigo por ocasião da colheita, aonde vegetavam como plantas invasoras.

MOHABBAT et alii (1976) registraram suas próprias observações sobre uma doença com as mesmas características da oclusão veno-hepática numa grande explosão epidêmica ocorrida no Afeganistão, demonstrando ser ocasionada pelo consumo de sementes da planta *Heliotropium indicum*, da família Boraginacea.

DEINZER et alii (1977), estudando o mel proveniente do nectar e pólen da planta *Senecio jacobaea* L. e outras espécies afins, constaram a presença de alcalóides do grupo senecio, potencialmente carcinogênicos e teratogênicos, podendo ser perigoso à saúde dos consumidores. Comenta que o maior problema dos criadores de gado no Oregon, USA, e também

em outras partes do mundo, é o envenenamento do gado pelo consumo de *Senecio jacobaea* e outras espécies do mesmo gênero, plantas normalmente infestantes de pastos. Alertaram sobre o consumo prolongado de alimentos contaminados por carcinógenos químicos potenciais, mesmo quando presentes em quantidades traço, lembrando ainda que os alcalóides pirrolizidínicos em particular são conhecidos como formadores de matabólitos ativos, os quais ligam-se irreversivelmente à regiões no fígado e outros órgãos vitais, tendo seus efeitos cumulativos. Os autores citam valores para a dose letal média (LD 50) de alcalóides do grupo senecio como sendo cerca de 100 mg/kg em animais experimentais. Enfatiza a importância dos experimentos em animais, cujos resultados, tem revelado certos alcalóides do grupo em estudo como sendo carcinogênicos, mutagênicos e teratogênicos.

3. ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS - ATIVIDADE ANTI-CÂNCER

KUPCHAN et alii (1964), executando um levantamento de plantas portadores de atividade anti-tumoral, demonstraram que o extrato alcoólico dos frutos da *Crotalaria spectabilis* Roth, tem atividade reproduzível contra o adeno-carcinoma 755 em Camundongo. Os autores isolaram o alcalóide pirrolizidínico monocrotalina, responsabilizando-a pela atividade observada.

SHARMA et alii (1965), trabalhando com análise química cromatográfica dos alcalóides deste grupo, comentam através das referências bibliográficas, as atividades hepatotóxicas em gado, mutagências em ratos incluindo as propriedades anti-cancerígenas devida aos mesmos alcalóides.

KUPCHAN e SUFFNESS (1967), ocuparam-se do estudo de espécies pertencentes à família das compostas, consideradas das mais ricas em número de representantes, portanto alcalóides pirrolizidínicos. Especialmente no gênero *Senecio*, os autores consideram surpreendente o fato de que várias espécies tenham sido utilizadas para tratamento de câncer em muitos países, apresentando variada referência bibliográfica a respeito. Citam o *Senecio vulgaris*, planta comum e erva invasora dos cam

pos e pastos, portadora, entre outros, do alcalóide senecionina. Esses autores relatam a utilização deste vegetal, desde o século IV para tumores dos pés e dos tendões, e a partir do século X para o câncer. Entretanto, também outros gêneros de plantas como *Petasites*, *Cynoglossum*, *Echium*, *Heliotropium*, *Tournefortia* *Cytisus*, possuem, de acordo com os estudiosos, atividade terapêutica para o câncer, informações estas originárias do folclore de vários países. O trabalho dos autores citados acima, envolve a análise do extrato alcoólico do *Senecio triangularis* Hook, descrevendo seus alcalóides principalmente a senecionina e sua forma N-óxido. Demonstraram a atividade anti-câncer reproduzível, contra o carcinoma Walker 256 (intramuscular) em ratos.

KUGELMAN et alii (1976), trabalhando com extratos de *Heliotropium indicum* L., da mesma família do confrei, demonstraram atividade significativa do princípio ativo previamente isolado, o N-óxido do alcalóide indicina. Informam que esta planta é usada tradicionalmente como medicinal na Índia, em particular para afecções hepáticas. Experimentaram aquela substância contra sistemas tumorais em ratos e leucemias em camundongos, revelando significativa atividade inibitória; outros alcalóides e seus N-óxidos foram testados em vários sistemas tumorais demonstrando seletividade na atividade, cada substância sendo efetiva para determinado tipo de tumor.

AMES e POWIS (1978), também trabalharam com a indicina e seu N-óxido, os mais representados no extrato de *Heliotropium indicum*, reproduzindo a mesma atividade anti-tumor significativa para uma variedade de sistemas; estas substâncias foram consideradas de baixa toxicidade pelos autores, Comentam que muitos alcalóides do grupo pirrolizidínico exibem atividades anti-tumorais promissoras, porém a toxicidade aguda ou crônica associada, não tem permitido o seu uso clínico.

Normalmente os alcalóides em sua forma típica básica apresentam maior atividade biológica do que a correspondentes formas N-óxidos; a indicina-N-óxido é uma exceção, exibindo maior atividade anti-tumor do que a base livre indicina, segundo POWIS et alii (1979). Estes autores estudaram ainda o relacionamento do metabolismo redutivo da indicina-N-óxido e sua atividade, concluindo que a conversão para a forma aminada básica - o alcalóide indicina - não afetou a atividade anti-tumor. POWIS et alii (1979) mostraram que a indicina-N-óxido é metabolizada a indicina em coelhos e seres humanos. Estas substâncias não apresentam os efeitos tóxicos observados em outros alcalóides e suas formas associadas N-óxidos. Os autores mostraram "in vitro" a redução anaeróbica da indicina-N-óxido à indicina, provocada por catálise de frações microsomais hepáticas e flora intestinal. Estudos posteriores em coelho vivo sugeriram que a flora intestinal condicionava a maior parte desta redução. Esta possibilidade foi indicada através de substâncias específicas que provocavam diminuição no número de bactérias do trato intestinal, conduzindo a um decréscimo nos níveis de indicina no sangue e na urina.