

RAMON PRATA DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DE NOVOS ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS DE *Crotalaria  
paulina***

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2017

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

O48i  
2017

Oliveira, Ramon Prata de, 1982-  
Isolamento, determinação estrutural e avaliação da  
atividade antibacteriana de novos alcaloides pirrolizidínicos de  
*Crotalaria paulina* : . / Ramon Prata de Oliveira. – Viçosa, MG,  
2017.  
xii, 109f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Antônio Jacinto Demuner.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.100-109.

1. Química de produtos naturais. 2. *Crotalaria paulina*.
3. Alcaloides pirrolizidínicos. 4. Plantas medicinais.
5. Ressonância Magnética Nuclear. 6. Espectroscopia Raman.
7. Espectroscopia no infravermelho. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Doutorado em Agroquímica. II. Título.

CDD 22 ed. 547.7

RAMON PRATA DE OLIVEIRA

**ISOLAMENTO, DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
ANTIBACTERIANA DE NOVOS ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS DE *Crotalaria  
paulina***

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Viçosa, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, para obtenção do título de  
*Doctor Scientiae*.

APROVADA: 27 de novembro de 2017.

---

Elson Santiago de Alvarenga

---

João Paulo Viana Leite

---

Vagner Tebaldi de Queiroz

---

Marcelo Henrique dos Santos

---

Antônio Jacinto Demuner  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força, proteção e sensatez durante toda a jornada.

Aos meus pais, Sônia Maria Prata de Oliveira e Marcos Antônio de Oliveira, pelo amor, dedicação, apoio e incentivo sempre.

À minha irmã, Paloma Prata de Oliveira, pelo carinho e cumplicidade.

Aos meus Avós Antônio Francisco Prata Filho (*in memoriam*) e Heremita Maria de Jesus por todo carinho e educação.

À minha Avó, Edith Rosa Rabelo Teixeira, pelo carinho e apoio.

Aos meus tios, Rogério Prata e Jésus Antônio Prata, pelo incentivo inicial aos estudos.

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Química e ao Laboratório de Síntese de Agroquímicos (LASA), pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao professor Antônio Jacinto Demuner pela orientação, amizade e confiança durante todos esses anos.

Ao professor Elson Santiago de Alvarenga cuja amizade, apoio e orientação foram determinantes para a realização deste trabalho.

Ao professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa pela orientação, incentivo e pela recepção em seu laboratório na UFMG para o isolamento e determinação estrutural dos alcaloides.

Aos professores João Paulo Viana Leite (UFV), Marcelo Henrique dos Santos (UFV), Célia Regina Álvares Maltha (UFV), Vagner Tebaldi de Queiroz (UFES) e Richard Michael Grazul (UFJF) pelos ensinamentos e conhecimentos compartilhados.

A professora Simone Gonçalves e a discente Silvia Pietra do Departamento de Microbiologia da UFMG pela realização dos testes biológicos.

Aos amigos Thiago Melo Silva (Pós Doc.-UFMG) e Mônica Parma (IC-UFV) pela grande colaboração no desenvolver deste trabalho.

Aos técnicos e funcionários do DEQ da UFV e UFMG pela prestação de serviços.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pela concessão dos recursos para a realização deste trabalho.

Ao técnico agropecuário José Francisco Duarte (Chiquinho) e ao professor Ricardo Henrique Silva Santos por fornecer espaço para o cultivo das espécies de *Crotalaria* no Departamento de Agroecologia da UFV.

Aos demais amigos e familiares que torceram e acreditaram no meu sucesso e todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho, a quem quero expressar o meu sincero reconhecimento.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	xi
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
1. Considerações gerais.....	1
2. O gênero <i>Crotalaria</i> .....	2
3. Alcaloides pirrolizidínicos (APs) .....	3
4. Estudo fitoquímico de Crotalárias.....	4
5. Atividade biológica das Crotalárias .....	7
6. Justificativa e objetivos.....	8
CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS DAS FOLHAS DE <i>Crotalaria paulina</i> .....	12
1.1 Introdução .....	12
1.1.1 A espécie <i>Crotalaria paulina</i> .....	12
1.2 Material e métodos.....	14
1.2.1 Instrumentação .....	14
1.2.2 Obtenção e coleta do material vegetal .....	15
1.2.3 Obtenção do extrato etanólico .....	16
1.2.4 Extração ácido-base para obtenção do extrato alcaloídico bruto .....	16
1.2.5 Preparo do reagente de Dragendorff .....	16
1.2.6 Prospecção de alcaloides por cromatografia em camada delgada.....	17
1.2.7 Fracionamento do extrato alcaloídico bruto da espécie <i>C. paulina</i> por cromatografia de adsorção em coluna.....	17
1.3 Resultados e discussão .....	20
1.3.1 Purificação do extrato alcaloídico bruto das folhas de <i>C. paulina</i> .....	20
1.3.2 Análise por CG-EM do extrato alcaloídico bruto da espécie <i>C. paulina</i> .....	21
1.3.3 Detecção dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas frações semipurificadas de <i>C. paulina</i> por CG-EM.....	31
1.3.4 Isolamento dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas frações C1F2 e C2F5 por CLAE .....	36
1.3.5 Elucidação estrutural dos alcaloides pirrolizidínicos isolados das folhas de <i>C. paulina</i> .....	37

1.3.5.1	Substância 1 .....	37
1.3.5.2	Substância 2 .....	45
1.3.5.3	Substância 3 .....	53
1.3.5.4	Substância 4 .....	53
CAPÍTULO 2: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO NA CARACTERIZAÇÃO DA MONOCROTALINA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E RAMAN 60		
2.1	Introdução .....	61
2.2	Material e Métodos.....	65
2.2.1	Procedimentos gerais .....	65
2.2.2	Material vegetal .....	66
2.2.3	Isolamento da monocrotalina.....	66
2.2.4	Estudo Computacional.....	67
2.3	Resultados e discussão .....	67
2.3.1	Vibrações do grupo carbonílico .....	68
2.3.2	Vibrações do grupo alqueno .....	69
2.3.3	Vibrações do grupo amina.....	69
2.3.4	Vibrações do grupo hidroxila .....	70
2.3.5	Vibrações dos grupos metilas.....	70
2.3.6	Vibração do hidrogênio vinílico.....	71
2.3.7	Deformação esquelética e o modo vibracional de respiração do anel.....	71
CAPÍTULO 3: UM NOVO ALCALOIDE ISOLADO DE <i>Crotalaria paulina</i> E CARACTERIZADO POR RMN E CÁLCULOS DFT .....		
3.1	Introdução .....	76
3.2	Material e Métodos.....	78
3.2.1	Material vegetal .....	78
3.2.2	Procedimentos experimentais gerais.....	78
3.2.3	Isolamento .....	79
3.2.4	Métodos de espectroscopia de RMN.....	79
3.2.5	Cálculos Computacionais .....	80
3.2.6	Análise DP4 .....	80
3.2.7	Análise do erro absoluto médio (EAM) .....	81
3.3	Resultados e discussão .....	81

CAPÍTULO 4: ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE <i>Crotalaria paulina</i> .....	91
4.1 Introdução .....	91
4.2 Material e Métodos.....	92
4.2.1 Micro-organismos utilizados .....	92
4.2.2 Preparo do inóculo.....	93
4.2.3 Preparo dos alcaloides isolados .....	93
4.2.4 Concentração inibitória mínima (CIM) .....	94
4.3 Resultados e discussão .....	94
5. Conclusões gerais .....	98
5.1 Capítulo 1 .....	98
5.2 Capítulo 2.....	98
5.3 Capítulo 3.....	99
5.4 Capítulo 4.....	99
6. Referências bibliográficas.....	100
Anexo A.....	120
Anexo B.....	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APs	Alcaloides Pirrolizidínicos
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
COSY	<i>CO</i> rrrelation <i>Sp</i> ectroscopY (Espectroscopia de correlação)
DFT	<i>D</i> ensity <i>F</i> unctional <i>T</i> heory (Teoria do funcional da densidade)
DAD	<i>D</i> iode <i>A</i> rray <i>D</i> etector (Detector de rede de diodos)
Da	Dalton
d	Dupleto
dd	Duplo Dupleto
ESI	<i>E</i> lectron <i>S</i> pray <i>I</i> onization (Ionização por spray de elétrons)
IE	Impacto de Elétrons
EM	Espectrometria de Massas
°GL	Grau Gay Lussac
HRMS	<i>H</i> igh <i>R</i> esolution <i>M</i> ass <i>S</i> pectrometry (Espectrometria de massa de alta resolução)
HSQC	<i>H</i> eteronuclear <i>S</i> ingle- <i>Q</i> uantum <i>C</i> orrelation (Correlação heteronuclear de simples-quantum)
HMBC	<i>H</i> eteronuclear <i>M</i> ultiple <i>B</i> ond <i>C</i> orrelation (Correlação heteronuclear de múltiplas ligações)
Hz	Hertz
IM	Íon Molecular
IT	Ion Trap
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
MeOH	Metanol
m	Multiplete
<i>m/z</i>	Massa/carga
MHz	MegaHertz
NOE	<i>N</i> uclear <i>O</i> verhauser <i>E</i> ffect (Efeito Overhauser nuclear)
NOESY	<i>N</i> uclear <i>O</i> verhauser <i>E</i> ffect <i>S</i> pectroscopy (Espectroscopia com

	efeito nuclear Overhauser)
NIST	<i>National Institute of Standards and Technology</i> (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
R <sub>f</sub>	Fator de retenção
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Simpleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
t <sub>r</sub>	Tempo de retenção
TOF	<i>Time Of Fly</i> (Tempo de voo)
UV	Ultra Violeta
δ	Deslocamento químico em RMN

## RESUMO

OLIVEIRA, Ramon Prata de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2017. **Isolamento, determinação estrutural e avaliação da atividade antibacteriana de novos alcaloides pirrolizidínicos de *Crotalaria paulina*.** Orientador: Antônio Jacinto Demuner. Coorientadores: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa e Célia Regina Álvares Maltha.

O gênero *Crotalaria* L., com cerca de 700 espécies, pertence à família Fabaceae/Leguminosae. Juntamente com os gêneros *Heliotropium* e *Senecio*, as Crotalárias são as principais fontes de alcaloides pirrolizidínicos (APs) do reino vegetal. Esses metabólitos secundários apresentam importante papel na defesa química dessas plantas. Neste estudo, objetivou-se isolar, caracterizar e avaliar o potencial antibacteriano de alcaloides pirrolizidínicos. Para isso, as folhas de *Crotalaria paulina* foram coletadas, secas, moídas e submetidas à extração a frio com etanol. O extrato etanólico foi submetido a extração ácido base obtendo-se assim o extrato alcaloídico bruto. Esse extrato foi submetido à análise por CG-EM, permitindo-se a detecção dos alcaloides pirrolizidínicos presentes no extrato através da comparação do padrão de fragmentação de compostos já descritos na literatura. Foram detectadas seis bislactonas macrocíclicas de onze membros, sendo três destas inéditas. Em seguida, o extrato alcaloídico foi submetido ao fracionamento por sílica gel e cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa, fornecendo, assim, quatro compostos puros. Das folhas dessa planta foram isolados a monocrotalina e mais três compostos com estrutura desconhecida, cuja caracterização foi realizada por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , técnicas bidimensionais HMBC, HSQC, HETCOR, NOESY e espectrometria de massas. Além dessas técnicas, para dois compostos foram realizados cálculos computacionais em paralelo com técnicas espectroscópicas a fim de se determinar, de forma inequívoca, a estereoquímica dessas substâncias. Com a monocrotalina, associou-se a teoria do funcional da densidade (DFT) com as espectroscopias Raman e Infravermelho. Com o alcaloide inédito etilcrotalina, utilizou-se a DFT associada à ressonância magnética nuclear uni e bidimensional. Esse foi o primeiro estudo detalhado dos alcaloides presentes nas folhas de *C. paulina*. Posteriormente, os quatro compostos isolados foram testados contra as bactérias *Klebsiella*

*pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Acinetobacter baumannii*. Os alcaloides foram testados nas concentrações de 0,25 µg mL<sup>-1</sup> até 128 µg mL<sup>-1</sup> e mesmo na maior concentração, não foi demonstrada atividade bactericida para estes compostos.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, Ramon Prata de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2017. **Isolation, structural determination and evaluation of the antibacterial activity of new pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria paulina***. Adviser: Antônio Jacinto Demuner. Co-advisers: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa and Célia Regina Álvares Maltha.

The genus *Crotalaria* L., with about 700 species, belongs to the family Fabaceae/Leguminosae. Together with the genera *Heliotropium* and *Senecio*, *Crotalaria* are the main sources of pyrrolizidine alkaloids (PAs) in the plant kingdom. These secondary metabolites play an important role in the chemical defense of these plants. In this study, we aimed to isolate, characterize and evaluate the antibacterial potential of pyrrolizidine alkaloids. For this, the leaves of *Crotalaria paulina* were collected, dried, ground and subjected to cold extraction with ethanol. The ethanolic extract was subjected to base acid extraction to obtain the crude alkaloid extract. This extract was submitted to GC-MS analysis, allowing the detection of pyrrolizidine alkaloids present in the extract by comparing the fragmentation pattern of compounds already described in the literature. Six macrocyclic 11-membered bislactones were detected, three of which were unpublished. The alkaloid extract was then subjected to silica gel fractionation and semi-preparative high performance liquid chromatography, thus providing four pure compounds. From the leaves of this plant were isolated monocrotaline and three compounds with unknown structure whose characterization was performed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, HMBC, HSQC, HETCOR, NOESY bidimensional techniques and mass spectrometry. Besides these techniques, to two compounds we use computational calculations in parallel with spectroscopic techniques in order to unequivocally determine the stereochemistry of these substances. With monocrotaline, we associate the theory of density functional (DFT) with Raman and IR spectroscopy. With the unpublished alkaloid ethylcrotaline, we used DFT associated with uni and bidimensional nuclear magnetic resonance. This was the first detailed study of the alkaloids present in the leaves of *C. paulina*. Subsequently, the four compounds isolated were tested against the bacteria *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Acinetobacter baumannii*. The

alkaloids were tested at concentrations of  $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$  to  $128 \mu\text{g mL}^{-1}$  and even at the highest concentration, no bactericidal activity has been demonstrated for these compounds.

## INTRODUÇÃO GERAL

### 1. Considerações gerais

Historicamente, a natureza tem sido utilizada como fonte de moléculas para o tratamento de diversas enfermidades, com inúmeros relatos da sua utilização terapêutica por civilizações antigas como mesopotâmicos e egípcios há mais de 2000 anos A.C.<sup>1</sup>

O desenvolvimento da química orgânica ocorreu em paralelo com a química de produtos naturais, principalmente a partir do século XIX, quando foram registradas as primeiras investigações, com base científica, sobre os vegetais.<sup>2</sup>

No século XX, com o surgimento de antibióticos produzidos por fermentação microbiana, aliado ao desenvolvimento de fármacos sintéticos, houve o declínio no investimento em fármacos de origem vegetal. Nas últimas décadas, uma mudança nos valores da sociedade ocidental fez com que as plantas medicinais passassem, novamente, a ocupar papel de destaque por populações de países desenvolvidos e em desenvolvimento.<sup>2</sup>

Estima-se que cerca de 250.000 substâncias naturais são conhecidas e aproximadamente 4.000 novas são descobertas a cada ano.<sup>3</sup> Dentre os 877 novos protótipos de baixo peso molecular inseridos no mercado mundial como fármacos, de 1981 a 2014, ao redor de 61% são substâncias naturais ou derivadas de produtos naturais ou, ainda, planejadas a partir deles.<sup>1</sup>

De acordo com Newman e Cragg<sup>4</sup>, os produtos naturais continuam sendo uma fonte importante de novos produtos farmacêuticos, constituindo a fonte mais produtiva para o desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Além disso, o Brasil se situa em posição privilegiada para a ciência de produtos naturais, em decorrência de ser um dos países com grande biodiversidade e ter constituído um grande corpo de pesquisadores de química de produtos naturais.<sup>5</sup>

Assim, diante deste contexto, a busca de novos compostos com aplicação terapêutica bem como de substâncias com outras finalidades (agrícola, biotecnológica) tornam-se relevantes e justificam o investimento nas pesquisas atuais.

## 2. O gênero *Crotalaria*

O gênero *Crotalaria* L. pertence à tribo Crotalariaeae (Benth.) Hutch., sendo o único, dentre os 11 gêneros dessa tribo, que apresenta representantes nativos no Brasil.<sup>3,6,7</sup> Na figura abaixo, temos um representante do gênero *Crotalaria*, a espécie *Crotalaria spectabilis*.



**Figura 1-** *Crotalaria spectabilis*.

Este gênero é um dos mais numerosos da família Fabaceae, com aproximadamente 690 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, em especial no Hemisfério Sul, particularmente na África e na Índia. A literatura menciona cerca de 70 espécies distribuídas pelo continente Americano, sendo que 59 são endêmicas. Desse total de espécies endêmicas na América, 35 são encontradas especialmente no Brasil. Na região neotropical, área natural do gênero, pode ser encontrada tais espécies desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Uruguai.<sup>18</sup>

Suas espécies têm como característica apresentar porte herbáceo ou arbustivo, folhas digitado-trifolioladas, unifolioladas ou simples, e flores com corola predominantemente amarela. Essas plantas podem ser encontradas em diferentes condições ambientais, como áreas próximas a rios, morros litorâneos, restingas, orlas de florestas, campos e cerrados. Além disso, são oportunistas e, comumente, invasoras de cultura e de locais alterados como, por exemplo, em margem de

estradas e pastagens.<sup>8,9</sup> O legume inflado, quando próximo à deiscência, possui as sementes livres em seu interior e, dessa forma, quando agitado produz sonoridade similar ao de um chocalho ou ao guizo da cobra cascavel (*Crotalus sp.*). Diante desse fato, surgiram os nomes populares como guizo de cascavel, xique xique ou chocalho de cascavel, assim como o nome do gênero.<sup>10</sup>

Algumas espécies são apontadas como tóxicas devido aos alcaloides pirrolizidínicos produzidos pelo vegetal, os quais apresentam importante papel na defesa química dessas plantas. Essa classe de composto é considerada tóxica para os vertebrados e não palatáveis para insetos e herbívoros.<sup>11</sup> Entretanto, apesar do reconhecido efeito tóxico atribuído a estes tipos de alcaloides, em muitos países algumas espécies de *Crotalaria* são usadas na medicina popular.<sup>12</sup>

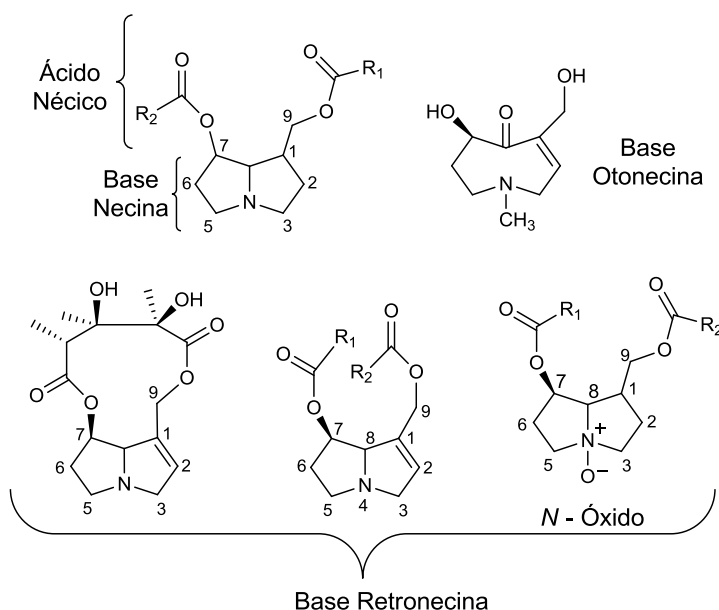
### 3. Alcaloides pirrolizidínicos (APs)

Os alcaloides pirrolizidínicos (APs) constituem uma classe de produtos naturais com aproximadamente 700 compostos conhecidos. Esses compostos ocorrem principalmente em plantas da família Compositae (gênero *Senecio*, *Eupatorium* e em outros das tribos Senecioneae e Eupatorieae), Boraginaceae (gênero *Heliotropium*, *Trichodesma* e *Symphytum*) e Fabaceae (gênero *Crotalaria*). Estima-se que mais de 6000 espécies contenham APs, o que corresponde a 3% das angiospermas.<sup>13,14</sup>

Esses metabólitos secundários são ésteres de amino álcoois, derivados de núcleos heterocíclicos em que a estrutura básica compreende dois anéis de cinco membros unidos por um átomo de nitrogênio na posição 4, podendo ser saturados ou 1,2-insaturados (Figura 2). Essa estrutura é comumente conhecida como base necina e pode ser do tipo otonecina ou retronecina (Figura 2). As bases necinas se diferenciam através do grau de hidroxilação, estrutura e estereoquímica dos substituintes. Na maioria das vezes são esterificadas nos C-9 e/ou C-7 com grande variedade de cadeias ramificadas, geralmente com ácidos carboxílicos denominados de ácidos nélicos ou ácidos esterificantes. Nas plantas, esses alcaloides podem estar na forma de monoéster ou diésteres (bis lactona), podendo ser encontrados como uma mistura de base livre e seus *N*-óxidos, sendo este o mais predominante<sup>15</sup>.

No que tange à nomenclatura, APs são geralmente conhecidos pelos seus nomes triviais normalmente derivados de nomes de suas plantas de origem.

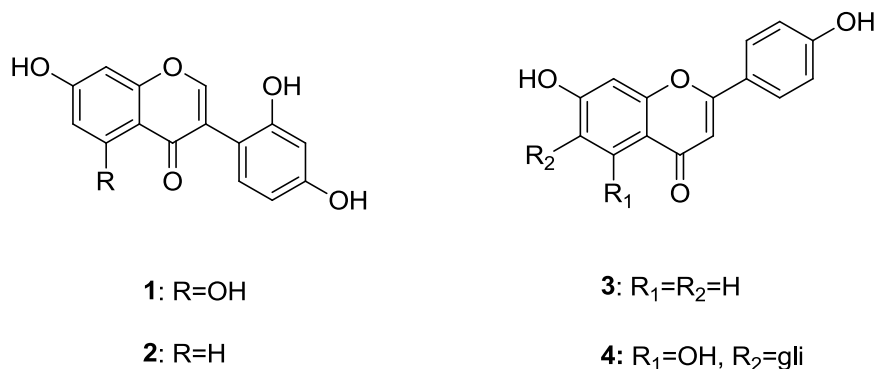
As ramificações nas posições 1 e 7 diferenciam os alcaloides pirrolizidínicos entre si, podendo ser de cadeia monocíclica ou bicíclicas.<sup>16</sup> (Figura 2)



**Figura 2** – Esqueleto básico dos alcaloides pirrolizidínicos.

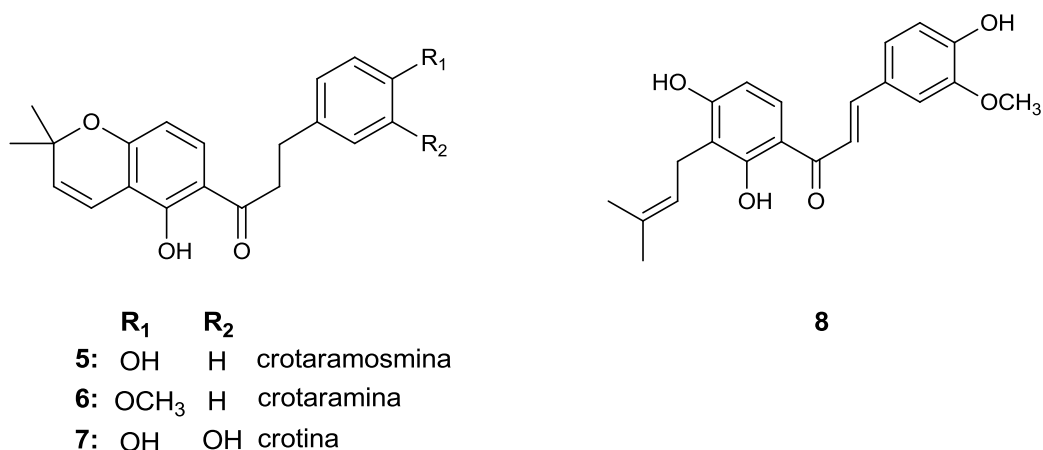
#### 4. Estudo fitoquímico de Crotalárias

Muitos estudos têm demonstrado uma grande variedade de classes químicas em diferentes órgãos de várias espécies de *Crotalaria*. Na investigação do extrato total de *Crotalaria sessiliflora* foram isolados quatro flavonóides, a saber: 2',4',5,7-tetraidroxiflavona **(1)**, 2',4',7-triidroxiflavona **(2)**, 4',7-diidroxiflavona **(3)** e isovitexina **(4)**. Sendo que as moléculas 2',4',7-triidroxiflavona **(2)** e 4',7-diidroxiflavona **(3)** nunca haviam sido descritas no gênero *Crotalaria*.<sup>17</sup> (Figura 3)



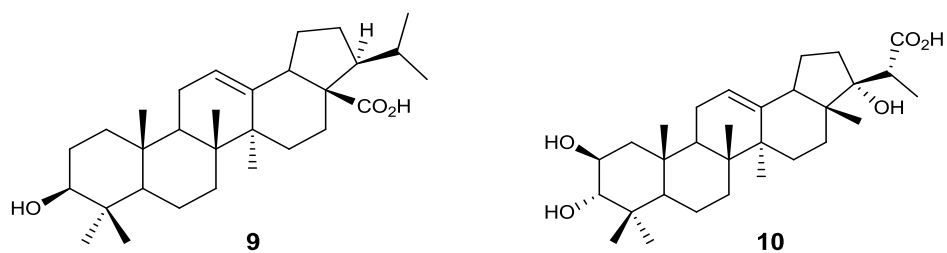
**Figura 3** – Estrutura química dos quatro flavonóides isolados de *C. sessiflora*.

Da espécie *Crotalaria ramosissima*, uma planta originaria da Índia, foram isolados três novos cromenos diidrochalconas denominadas de crotamosmina (**5**), crotamina (**6**) e crotina (**7**).<sup>18</sup> (Figura 4) O mesmo grupo de pesquisa isolou uma chalcona prenilada das partes aéreas de *Crotalaria orixensis*, a crotorixina (**8**).<sup>18</sup> (Figura 4).



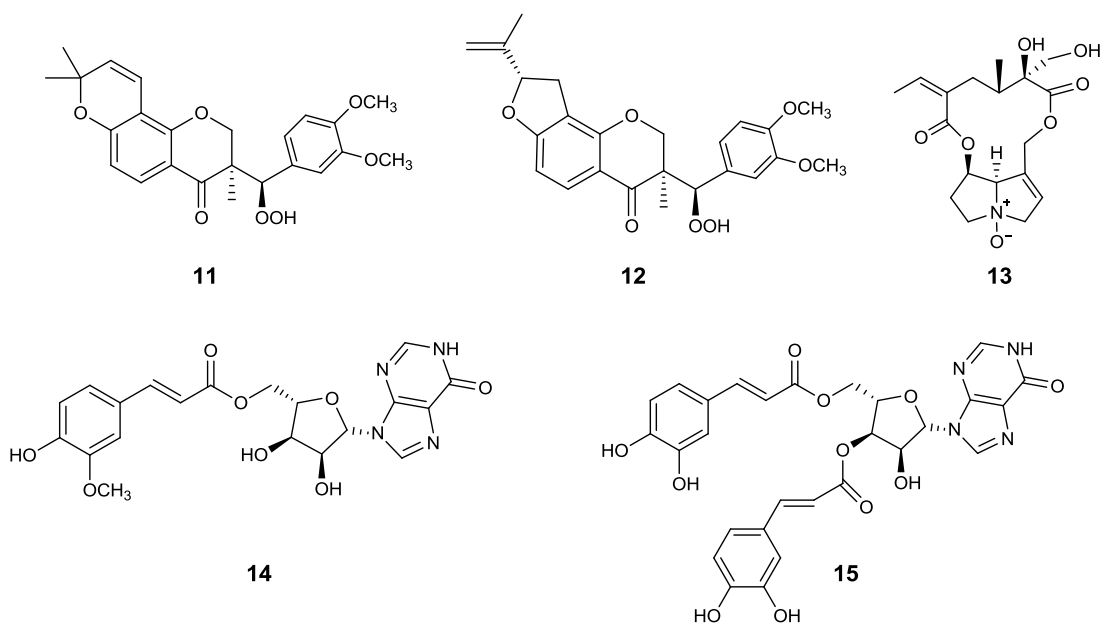
**Figura 4** – Estrutura das diidrochalconas (5, 6 e 7) e da chalcona prenilada (8).

Das partes aéreas de *Crotalaria emarginella* foram isolados e caracterizados dois triterpenos, o ácido 3 $\alpha$ -hidroxiarbor-12-eno-28-carboxílico e o ácido 2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,21-triidroxiarbor-12-eno-29-carboxílico, denominados respectivamente de ácido crotálico (9) e ácido emarginélico (10).<sup>19</sup> (Figura 5)



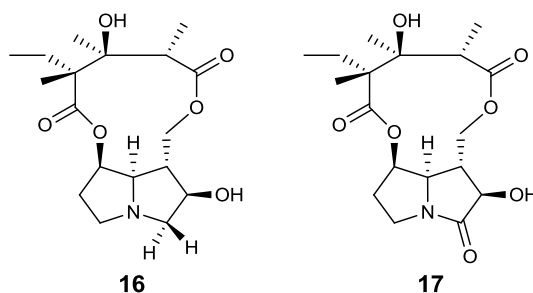
**Figura 5** – Estruturas dos triterpenos isolados de *C. emarginella*.

O estudo fitoquímico das sementes da espécie *Crotalaria pallida* levou ao isolamento de cinco compostos inéditos, sendo dois homoisoflavonóides (11 e 12) e três alcaloides (13, 14 e 15) (Figura 6).<sup>20</sup>



**Figura 6** – Estruturas dos flavonoides e alcaloides isolados de *C. pallida*.

Das folhas de *Crotalaria albida* foram isolados dois novos alcaloides pirrolizidínicos denominados neocroalbidina (16) e neocroalbidinona (17) (Figura 7).<sup>21</sup>



**Figura 7** – Estruturas dos alcaloides pirrolizidínicos isolados de *C. albida*.

## 5. Atividade biológica das Crotalárias

Tradicionalmente, espécies de *Crotalaria* são importantes na agricultura como planta forrageira, na adubação verde e em consórcios de culturas, pois atenuam os problemas de erosão e melhoram a fertilidade do solo, visto que a incorporação das suas partes aéreas tem sido uma forma de adicionar matéria orgânica e fixar nitrogênio ao solo.<sup>22</sup> No mais, essa estratégia também vem sendo explorada com resultados satisfatórios no controle de nematoides.<sup>23,24,25</sup>

Já foi comprovado que a introdução de *Crotalaria grahamiana* como planta forrageira em culturas de milho e feijão reduziu de forma expressiva a infestação por nematoides, como o *Meloidogyne javanica* nas culturas e no solo. Além disso, interferem no crescimento de nematoides indutores de lesões como *Pratylenchus zae*, *P. thornei*, *P. pseudopratensis*, *Helicotylenchus pseudorobustus* e *Scutellonema brachyurus*, aumentando a produção destas culturas.<sup>26</sup> Adicionalmente, os alcaloides pirrolizidínicos (APs) demonstraram expressivos efeitos nematicidas, afetando diversos estágios de desenvolvimento dos nematoides. Contudo, segundo testes *in vivo*, os APs na forma de *N*-óxido mostraram-se menos eficazes que sua forma reduzida.<sup>27</sup>

Em comunidades da América do Sul e da Índia as espécies *C. spectabilis* e *C. juncea* são utilizadas na medicina popular para tratar diversas doenças de pele como sarna, impetigo e psoríase.<sup>28</sup> A principal restrição ao uso medicinal é devido ao grande teor de alcaloides em seus órgãos. Entretanto, sabe-se que os APs com base necina saturada são atóxicos para os seres humanos.<sup>29</sup> Sendo assim, pode-se encontrar na literatura diversos trabalhos reportando o poder antibacteriano e antifúngico de diversas espécies de *Crotalaria*.<sup>30,31,32,33,34,35,36</sup>

Nas sementes, é possível encontrar uma grande variedade de peptídeos com função de defesa e que são genericamente chamados de defensinas. Em um estudo realizado com as sementes de *C. pallida* foi possível purificar um peptídeo catiônico, o Cp-AMP, com massa molecular de 5340 Da, que inibiu o desenvolvimento do fungo filamentosso *Fusarium oxysporum* e da bactéria gram-negativa *Proteus* sp. Futuramente, a identificação deste composto pode contribuir para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos, como plantas transgênicas com elevada resistência a fungos patógenos e/ou para a produção de antibióticos no controle de infecções bacterianas.<sup>37</sup> A avaliação da atividade biológica contra tripanossomos foi demonstrada com uma espécie endêmica da Etiopia, a *Crotalaria phillipsiae*. Os ensaios foram realizados *in vitro* utilizando o extrato em diclorometano do caule que induziu, de forma expressiva, a morte em tripomastigotas sanguíneos de *Trypanosoma brucei* com valores de concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) de 12,67 µg mL<sup>-1</sup>. Na África, esse protozoário é conhecido por ser o agente causal da doença do sono. Portanto, essa planta pode ser considerada promissora no sentido de ser uma fonte de compostos tripanomicidas para o tratamento dessa enfermidade.<sup>38</sup>

## 6. Justificativa e objetivos

O gênero *Crotalaria* tem sido utilizado para diversos fins na agricultura, mas devido à grande toxicidade dos APs, poucos estudos foram conduzidos a cerca da aplicabilidade farmacológica e biotecnológica das substâncias isoladas deste gênero. Diante deste contexto, observou-se a inexistência de trabalhos publicados relatando o isolamento e a caracterização de substâncias a partir da espécie *Crotalaria paulina*. Nesse sentido, como contribuição ao conhecimento sobre os constituintes químicos da espécie supramencionada foram realizados estudos para identificar conclusivamente as substâncias presentes nos extratos assim como suas propriedades antibacterianas.

Portanto, os principais objetivos deste trabalho foram:

1. Detectar os alcaloides pirrolizidínicos presentes no extrato etanólico das folhas da espécie *Crotalaria paulina* por CG/EM.

2. Isolar os alcaloides pirrolizidínicos presentes no extrato etanólico das folhas da espécie *C. paulina* e caracterizá-los com auxílio de técnicas espectroscópicas e cálculos computacionais.

3. Realizar testes de atividade bactericida com as substâncias isoladas.

Assim, para atingir estes objetivos o trabalho foi dividido nos seguintes capítulos:

No Capítulo 1, foi feita uma descrição sobre o estudo fitoquímico e atividade biológica da espécie *Crotalaria paulina*. Em seguida, descrevem-se os materiais e equipamentos empregados, os procedimentos de extração e purificação do extrato por cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Na sequência, são relatados os procedimentos de detecção, por CG-EM dos compostos presentes no extrato alcaloídico das folhas de *C. paulina*, isolamento e caracterização por HR-ESI-MS e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D dos alcaloides isolados das folhas de *C. paulina*.

O Capítulo 2 relata a análise espectroscópica no Infravermelho e Raman do alcaloide monocrotalina. As principais bandas presentes nestes espectros foram caracterizadas com o auxílio de cálculos computacionais permitindo-se assim uma descrição detalhada das vibrações que levaram a atribuição inequívoca de cada banda no espectro.

No Capítulo 3 está descrito a caracterização do novo alcaloide pirrolizidínico etilcrotalina por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D e 2D. A definição da estereoquímica desta molécula foi realizada através da análise do espectro NOESY com o auxílio de cálculos de mecânica quântica. Os dados de deslocamentos químicos de RMN de oito estruturas candidatas foram comparados com os dados experimentais de RMN da substância isolado através de metodologias estatísticas (EAM e DP4).

O Capítulo 4 descreve o ensaio antibacteriano dos quatro alcaloides pirrolizidínicos isolados contra as seguintes espécies de bactérias: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Acinetobacter baumannii*.

## CAPÍTULO 1: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS DAS FOLHAS DE *Crotalaria paulina*

### 1.1 Introdução

#### 1.1.1 A espécie *Crotalaria paulina*

A *Crotalaria paulina* (Figura 1.1) é uma planta anual, ereta, podendo alcançar mais de 2 metros de altura. Possui ciclo vegetativo longo, florescendo em 140-160 dias, sendo as flores de coloração amarela e a vagem de coloração parda variando de 2 a 8 cm de comprimento e encerrando grande número de sementes. Apresenta folhas de coloração verde quando novas, tornando-se verde escura mais tarde e quando amassadas, as folhas possuem odor de pepinos. Na primeira fase, seu desenvolvimento é lento, sendo uma planta resistente à murcha.<sup>39</sup>



**Figura 1.1** – *Crotalaria paulina*

Sua distribuição geográfica inclui países da África como Etiópia, Quênia, Zimbábue e da América do sul como Brasil, Colômbia e Venezuela.<sup>40</sup>

São poucos os estudos fitoquímicos dessa espécie, sendo o de maior destaque o trabalho realizado por Trigo *et al.*<sup>11</sup> cujo foco foi à investigação dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas sementes de 28 espécies nativas de *Crotalaria*, dentre elas *C. paulina*, com a finalidade de definir os marcadores taxonômicos para este gênero. Assim, os extratos alcaloídicos de 28 espécies foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e os alcaloides foram detectados segundo comparação com os padrões de fragmentação de compostos já relatados na literatura. Nas sementes da espécie *C. paulina* foram detectados nove alcaloides, e desses, o autor classificou dois como sendo alcaloides pirrolizidínicos do tipo monocrotalina de estrutura desconhecida. Entretanto, nenhum dos compostos foi elucidado estruturalmente.

Além desse, das sementes de *C. paulina* foi purificado um inibidor peptídico de tripsina com massa molecular 20 kDa, capaz de inibir eficientemente as tripsinas humana, bovina e suína, e fracamente a atividade da quimiotripsina bovina.<sup>41</sup> Os inibidores de proteases são eficientes na regulação da atividade proteolítica das plantas e também na defesa contra predadores e patógenos, visto que esses organismos não possuem sistema imunológico.<sup>42</sup>

Posteriormente, foi isolada uma pequena lectina com massa molecular de 30 kDa de *C. paulina* que aglutina tanto eritrócitos humanos, quanto bovinos. Essa lectina foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *passiflorae*<sup>43</sup>, que são bactérias causadoras de infecções em culturas de feijões e frutas, e limitam a produção agrícola em várias regiões do Brasil.<sup>44</sup> As lectinas, também chamadas de hemaglutininas, são glicoproteínas amplamente encontradas na natureza que se ligam reversível e especificamente a carboidratos na membrana de células eucarióticas e de microrganismos, promovendo sua aglutinação. Devido a essa propriedade, tal proteína tem sido caracterizada pela capacidade de aglutinar hemácias e de identificar os grupos sanguíneos. São principalmente expressas em plantas e especialmente nas sementes da família das leguminosas. Estão associadas na defesa contra predadores e patógenos e nas interações simbióticas entre planta hospedeira e microrganismos fixadores de nitrogênio.<sup>45</sup>

A adubação verde com leguminosas, prática que contribui para a melhoria das condições físicas, químicas e biológicas do solo, com reflexos positivos sobre a produção de soja<sup>46</sup>, tem se mostrado boa opção para o controle de fitonematóides.<sup>47</sup> Valle *et al.*<sup>48</sup> investigaram, em casa de vegetação, a reação de algumas espécies vegetais, dentre essas, a espécie *C. paulina*, quanto a sua reação a uma população de nematoides de cisto da soja, *Heterodera glycines* Ichinohe. Foi observado pequeno desenvolvimento dos nematoides juvenis nas raízes destas espécies, mas sem a posterior formação de adultos.

Desta forma, visto que ainda são escassos os relatos científicos sobre a composição fitoquímica da espécie *C. paulina* o presente trabalho visa identificar os alcaloides pirrolizidínicos presentes nas folhas desta espécie.

## 1.2 Material e métodos

### 1.2.1 Instrumentação

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) e de carbono (RMN de <sup>13</sup>C) foram obtidos em espectrômetro VARIAN MERCURY 300 (B<sub>0</sub> = 7,05 T) operando a 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75 MHz para <sup>13</sup>C, existente no Departamento de Química da UFV. Utilizou-se como solvente clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>). Os espectros foram referenciados pelo sinal do clorofórmio ( $\delta = 7,26$ ). As constantes de acoplamento escalar (*J*) foram expressas em Hertz (Hz). Também foram realizadas análises de RMN em espectrômetro BRUCKER DRX-400 linha AVANCE existente no Departamento de Química da UFMG. Tetrametilsilano (TMS) foi empregado como padrão de referência interna, tendo metanol deuterado e clorofórmio deuterado como solventes.

As análises por CG-EM foram realizadas em equipamento Shimadzu GCMS-QP5050A presente no Departamento de Química da UFV. Empregou-se coluna capilar RT-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) e recheio (5% de fenil e 95% de dimetilpolisiloxano). As amostras foram injetadas com o aparelho configurado da seguinte forma: Injetor 250 °C; detector 280 °C; programa de temperatura 150-280 °C, 4 °C min<sup>-1</sup>; gás de arraste Hélio, 1 mL min<sup>-1</sup>; volume de amostra injetada 1  $\mu$ L; método de ionização por impacto de elétrons (70 eV); modo scan, *m/z* 40,00 a 700,00, razão de split 1:5.

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em escala analítica foram realizadas no Departamento de Química da UFMG em um aparelho SHIMADZU, constituído de duas bombas LC-20AT, detector UV/VIS SPD-20A, software LC solution v.1.21 (SHIMADZU) e coluna NSTC18, com dimensões de 250 mm x 3 mm x 5  $\mu$ m, LC100111 (NST).

As análises por CLAE preparativa também foram realizadas no Departamento de Química da UFMG utilizando-se cromatógrafo líquido VARIAN PRO STAR, equipado com uma bomba PS210, detector UV/VIS PS325, coluna NSTC18, com dimensão de 250 mm x 10,0 mm x 5  $\mu$ m, LC280211 (NST) protegida por uma pré-coluna e software GALAXIE v.1.10.0.5550.

Após a purificação, as amostras foram liofilizadas empregando o equipamento Termo Fisher SCIENTIFIC FR-Drying Digital Unit, presente no Departamento de Química da UFMG.

As amostras purificadas foram analisadas por espectrometria de massas de alta resolução (HRMS-ESI-TOF). Após solubilização e centrifugação, injetaram-se as amostras em um cromatógrafo líquido Shimadzu® LCMS-IT-TOF (225-07100-34), situado no Departamento de Química da UFMG. Esse aparelho está equipado com: degaseificador in line modelo DGU-20A3, duas bombas modelo LC-20AD, auto sampler modelo SIL-20A e módulo comunicador CBM-20A. A ionização foi realizada através de electrospray (ESI). O analisador de massas empregado foi Time of Flight (TOF) com acumulador Íon Trap (IT). A temperatura do bloco de aquecimento foi de 250 °C, a voltagem no capilar foi 4,5 kV, a temperatura da CDL foi ajustada em 200 °C e a tensão no detector foi de 1,76 kV.

### 1.2.2 Obtenção e coleta do material vegetal

As sementes da espécie *C. paulina* foram adquiridas da empresa BR SEEDS® e a identificação botânica foi realizada pela Dra. Andréia Silva Flores do Museu Integrado de Roraima. A exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFV, recebendo o código VIC 45.165. As sementes foram plantadas em campo de cultivo da Horta Velha da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa – MG (latitude 20° 45' sul, longitude 42° 51' oeste e altitude de 651 m) em outubro de 2013, e suas folhas foram coletadas entre os meses de janeiro e março de 2014.

### 1.2.3 Obtenção do extrato etanólico

As folhas de *C. paulina* (8,3 kg), coletadas na Horta Velha da UFV, foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçado a 50 °C, durante 24 h. Após secagem e moagem (moinho tipo Willye, Tecnal, modelo TE 650) foi obtido 1 kg de material, o qual foi submetido à extração a frio com etanol (3 x 2L) durante três dias, sob agitação ocasional e trocando-se o solvente a cada 24 horas. Em seguida, por filtração simples, obteve-se o filtrado que foi concentrado em evaporador rotatório sob vácuo, com temperatura do banho-maria mantido a 50 °C, aproximadamente, fornecendo assim o extrato etanólico bruto (98 g). Esse extrato foi submetido à extração ácido-base.<sup>11</sup>

### 1.2.4 Extração ácido-base para obtenção do extrato alcaloídico bruto

O extrato etanólico bruto (98 g) foi dissolvido em água destilada e posteriormente, com adição de solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ , foi ajustado o pH 2. Em seguida, a solução aquosa ácida foi submetida à extração com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 150 mL) em funil de separação, com a finalidade de remover as substâncias neutras após teste negativo com o reagente de Dragendorff. Na sequência, a fração aquosa ácida resultante foi submetida à reação de redução com Zn em pó durante 3 horas a temperatura ambiente. Dessa forma, os alcaloides que estavam na forma de *N*-óxido foram reduzidos.<sup>20</sup> A solução ácida foi filtrada e alcalinizada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado, até pH 11. A solução aquosa básica foi extraída com solução de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$  (4:1) (3 x 80 mL). As frações orgânicas assim obtidas foram secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtradas e evaporadas sob pressão reduzida, com temperatura do banho a aproximadamente 50 °C, obtendo-se assim o extrato alcaloídico bruto (17,3 g).<sup>46</sup>

### 1.2.5 Preparo do reagente de Dragendorff

O reagente de Dragendorff foi preparado a partir de duas soluções. A primeira foi preparada dissolvendo-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico

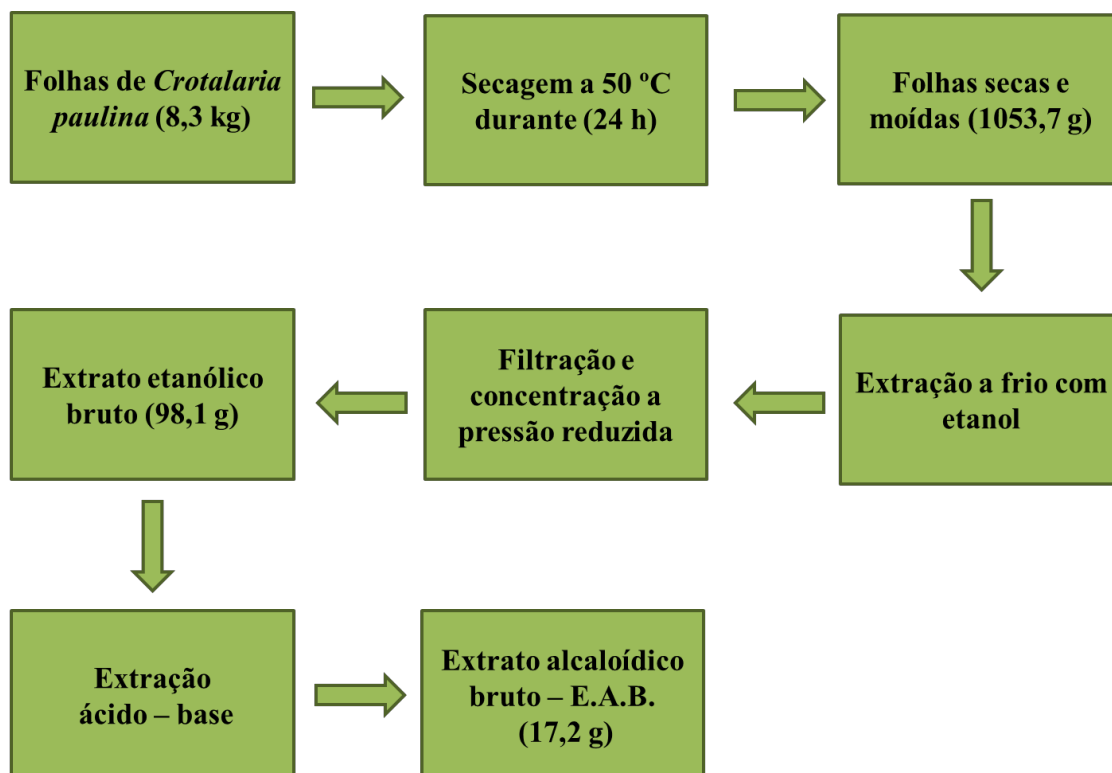
em 80 mL de água. A segunda foi preparada dissolvendo-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água. Em seguida, partes iguais das duas soluções foram misturadas obtendo-se assim o reagente de Dragendorff.<sup>49</sup>

#### **1.2.6 Prospecção de alcaloides por cromatografia em camada delgada**

Para realizar as análises por cromatografia em camada delgada (CCD), foram utilizadas placas de alumínio Whatman UV 254 (0,25 mm) recobertas com sílica-gel, e como fase móvel o eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH na proporção de 2% até 20% de MeOH em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. As placas foram observadas sob lâmpada ultravioleta ( $\lambda = 254$  nm) e posteriormente reveladas com solução de Dragendorff, que evidencia a presença do nitrogênio dos prováveis alcaloides por manchas de cor laranja características.

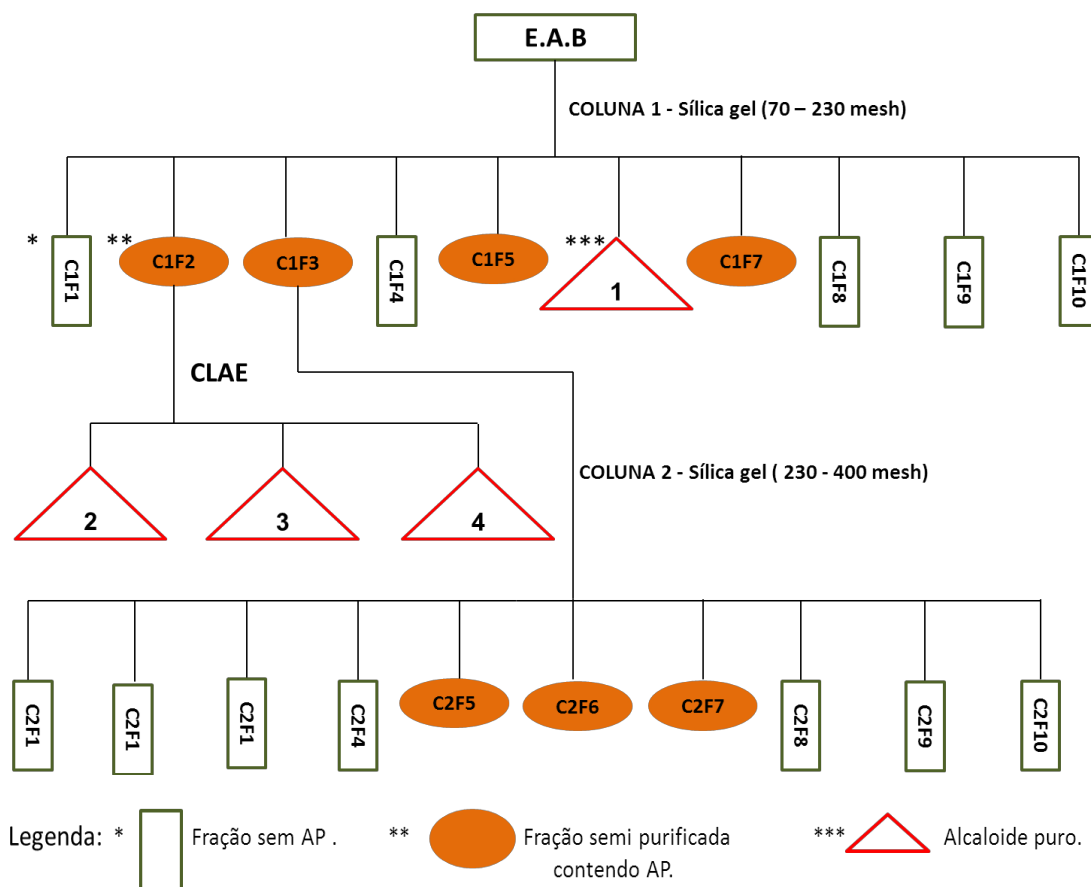
#### **1.2.7 Fracionamento do extrato alcaloídico bruto da espécie *C. paulina* por cromatografia de adsorção em coluna**

Após o procedimento de obtenção do extrato etanólico bruto e posteriormente do extrato alcaloídico bruto (descritos nos tópicos 1.2.3 e 1.2.4, respectivamente, e sumarizados no fluxograma da figura 1.2), realizou-se o fracionamento em coluna cromatográfica deste extrato.



**Figura 1.2** – Fluxograma de obtenção do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina*.

O esquema de fracionamento dos compostos do extrato alcaloídico bruto (E.A.B.) está representado na Figura 1.3.



**Figura 1.3** - Esquema de fracionamento do extrato alcaloídico bruto (E.A.B.) das folhas de *C. paulina*.

Parte do extrato alcaloídico bruto (E.A.B.) obtido a partir das folhas de *C. paulina* (6,5 g) foi submetido à separação em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel 60 (70-230 mesh) no solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Como eluente, foram utilizados diclorometano e metanol em gradiente variando de 4% até 50% de metanol.

A segunda coluna cromatográfica, realizada com a fração C1F3 (2,5 g), foi empacotada com sílica gel 60 (230-400 mesh) no solvente  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Como eluente, foi utilizada a mistura diclorometano:metanol em gradiente variando de 2% até 50% de metanol. Em ambas as colunas, as frações obtidas foram monitoradas por análise em CCD e por CG-EM para se determinar o grau de pureza e a provável presença de alcaloides. Os compostos purificados foram analisados por RMN.

### 1.3 Resultados e discussão

#### 1.3.1 Purificação do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina*

A partir da primeira coluna cromatográfica, foram coletadas 201 frações de 70 mL cada e as frações que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes, de acordo com o  $R_f$ , foram combinadas o que resultou em 10 novas frações. Na Tabela 1.1 são apresentados os dados obtidos da primeira separação cromatográfica (coluna I).

**Tabela 1.1** - Dados da separação cromatográfica do extrato alcaloídico bruto das folhas de *Crotalaria paulina*.

COLUNA I				
Frações reunidas	Código	Massa (g)	Eluente CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH	Aspecto
1-26	C1F1	0,073	96:4	Óleo amarelo
27-38	C1F2	0,182	94:6	Óleo amarelo
39-55	C1F3	2,532	92:8	Óleo amarelo
56-68	C1F4	0,016	90:10	Sólido amarelo
69-85	C1F5	0,593	90:10	Sólido branco
86-108	C1F6	0,464	90:10	Sólido branco
109-147	C1F7	0,303	88:12	Sólido amarelo
148-160	C1F8	0,764	86:14	Óleo amarelo
161-194	C1F9	0,535	80:20	Óleo amarelo
195-201	C1F10	0,097	50:50	Óleo amarelo

Das frações obtidas anteriormente, foi verificada a presença de alcaloide através de teste positivo com reagente de Dragendorff nas frações C1F2, C1F3, C1F5, C1F6 e C1F7. A análise por CG-EM revelou a presença de um pico majoritário com alguns traços de impurezas no cromatograma das frações C1F5 e C1F7. A fração C1F6 apresentou apenas um pico em seu cromatograma. Logo, esta fração foi analisada por espectroscopia de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C e os dados obtidos serão discutidos no tópico 1.3.5.1 (substância 1). Após a análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, foi verificado que as frações C1F5, C1F6 e C1F7 correspondem ao mesmo composto.

As frações semipurificada C1F2 e C1F3 foram analisadas por CG-EM e seus cromatograma apresentaram uma mistura de alcaloides com picos em tempo de retenção muito próximos um do outro, conforme será visto no item 1.3.3.

Neste sentido, a fração semi purificada C1F3 (2,5 g) foi submetida à nova separação cromatográfica (coluna II). No total, foram coletadas 260 frações de 35 mL cada e as frações que apresentavam perfis cromatográficos semelhantes, de acordo com o  $R_f$ , foram reunidas resultando em 9 novas frações (Tabela 1.2).

**Tabela 1.2** - Dados da cromatografia em coluna da fração C1F3.

<b>COLUNA II</b>				
Frações reunidas	Código	Massa (g)	Eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$	Aspecto
1-57	C2F1	0,114	99:2	Óleo amarelo
58-67	C2F2	0,065	98:4	Óleo amarelo
68-79	C2F3	0,036	94:6	Óleo amarelo
80-91	C2F4	0,025	94:6	Óleo amarelo
92-141	C2F5	0,186	92:8	Óleo amarelo
142-177	C2F6	0,696	90:10	Óleo amarelo
178-211	C2F7	0,509	85:15	Sólido amarelo
212-229	C2F8	0,178	80:20	Óleo amarelo
230-260	C2F9	0,080	50:50	Óleo amarelo

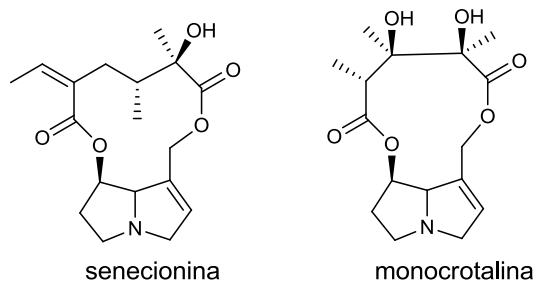
Das frações obtidas desta coluna, apenas a C2F5, C2F6 e C2F7 demonstraram a presença de alcaloides quando reveladas com reagente de Dragendorff. A análise por CG-EM da fração C2F5 revelou a presença de apenas três picos em seu cromatograma, todos com fragmentação característica de alcaloides pirrolizidínicos. Já nas frações C2F6 e C2F7, a análise por CG-EM mostrou a presença de uma mistura de alcaloides pirrolizidínicos. Os cromatogramas das frações acima mencionadas serão vistos no tópico (item 1.3.3).

### 1.3.2 Análise por CG-EM do extrato alcaloídico bruto da espécie *C. paulina*

Foi possível constatar que as bibliotecas utilizadas (NIST e WILEY) não contêm o espectro de todos os alcaloides pirrolizidínicos já relatados na literatura e

devido à similaridade estrutural destes compostos, não foi possível identificar de forma inequívoca todos os picos observados nos cromatogramas. Logo, ao obter um cromatograma com vários picos em diferentes tempos de retenção, o banco de dados sugeriu a mesma substância para todos os picos presentes. Diante deste fato, os alcaloides foram detectados através da comparação do padrão de fragmentação do espectro de massas de compostos já relatados na literatura.

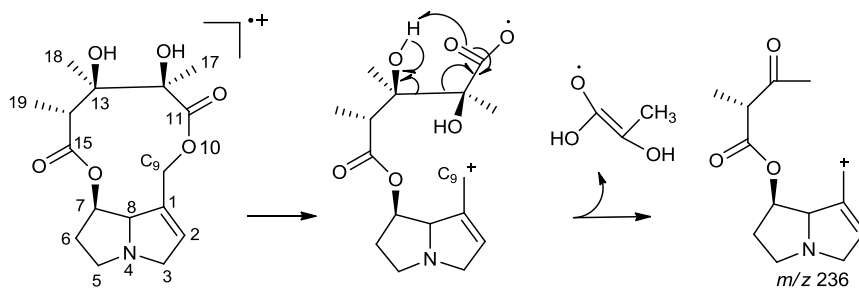
Antes do início da análise dos picos no espectro de massas para a detecção dos alcaloides é válido mencionar que no gênero em estudo é mais provável encontrar bislactonas macrocíclicas. Estas podem ser classificadas como sendo do tipo monocrotalina e senecionina com anel externo apresentando 11 e 12 membros, respectivamente (Figura 1.4).



**Figura 1.4** – Estrutura das bislactonas macrocíclicas.

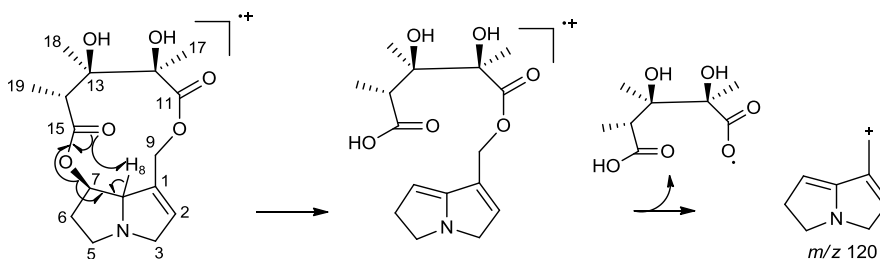
Tanto os compostos do tipo monocrotalina quanto os do tipo senecionina são formados por uma base necina (dois anéis de cinco membros unidos por um átomo de nitrogênio) denominada retronocina, que fornece o padrão de fragmentação com  $m/z$  136, 120, 119, 93 e 80.

A diferenciação dos compostos com anel macrocíclico de 11 e 12 membros foi feita baseando-se no estudo de Rashkes, em que foi constatado que os compostos do tipo monocrotalina apresentam o íon  $[M-89]^+$  com  $m/z$  236. Esse fragmento é formado pela quebra da ligação C9-O, seguido de rearranjo de McLafferty envolvendo a carbonila de C-11 e a hidroxila de C-13 (Figura 1.5)<sup>50</sup>.



**Figura 1.5** – Formação do fragmento  $m/z$  236 derivado da monocrotalina.

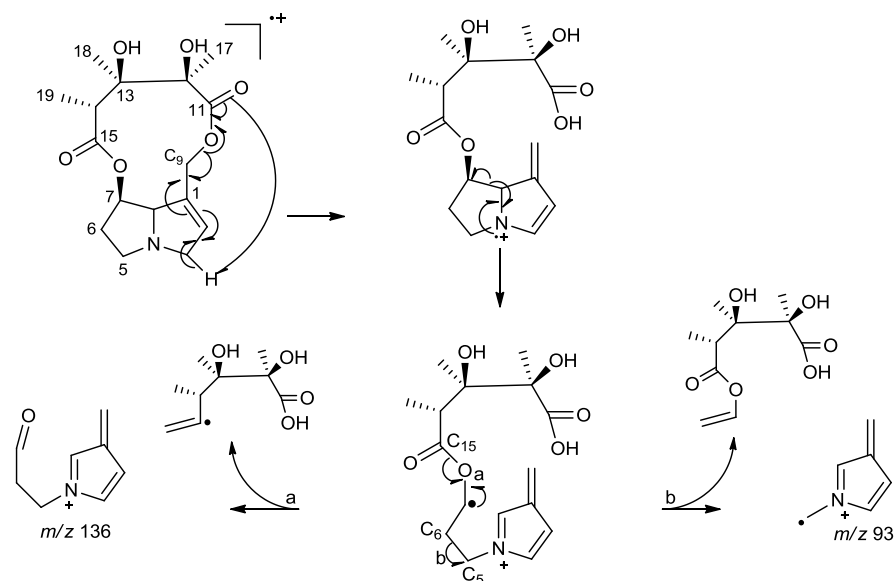
O fragmento  $m/z$  120 é formado pelo rearranjo de McLafferty envolvendo o H-8 e a carbonila de C-15, seguido da quebra da ligação C9 – O (Figura 1.6)



**Figura 1.6** – Formação do fragmento  $m/z$  120 derivado da monocrotalina.

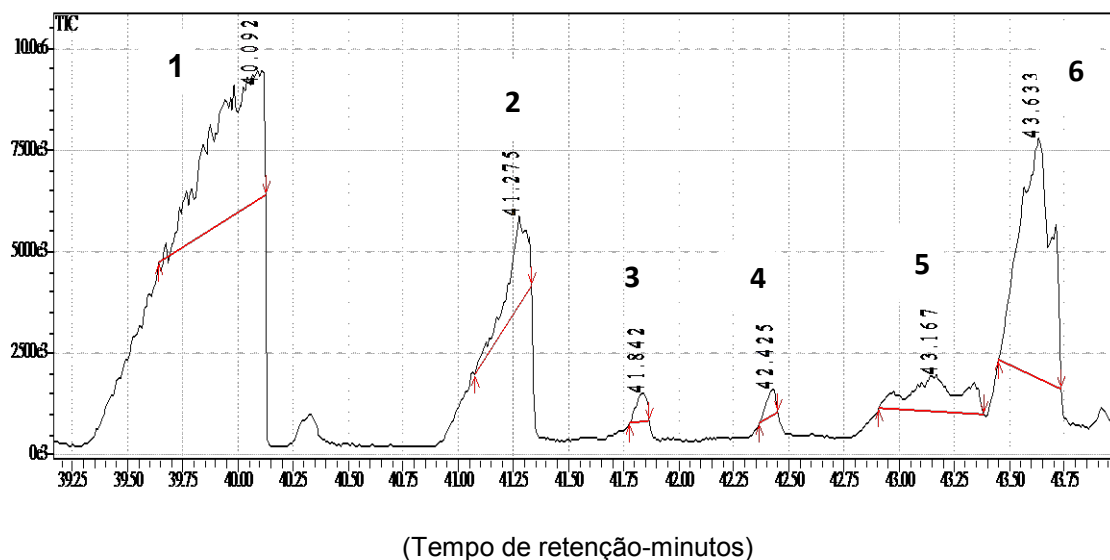
Os fragmentos  $m/z$  93 e 136 são formados inicialmente pela mesma via (Figura 1.7). Ocorre uma transferência de hidrogênio de C-3 para a carbonila de C-11 com ruptura da ligação C9-O, e a formação do cátion-radical pela quebra da ligação C7-C8.

A formação de  $m/z$  93 resulta da quebra da ligação C5-C6, já o fragmento de  $m/z$  136 é formado pela quebra da ligação C15-O (Figura 1.7).



**Figura 1.7** – Formação do fragmento  $m/z$  136 e  $m/z$  93 derivados da monocrotalina.

Logo, com base nos dados de fragmentação provenientes da análise do espectro de massas, foi possível detectar a presença de seis alcaloides pirrolizidínicos referente a seis picos observados no cromatograma do extrato alcaloídico bruto dessa espécie (Figura 1.8).



**Figura 1.8** – Cromatograma parcial (CG-EM) do extrato alcaloídico bruto de *C. paulina*.

Na Tabela 1.3, observa-se o tempo de retenção (Tr) de cada pico no cromatograma e a detecção dos respectivos compostos através do padrão de fragmentação e análise do íon molecular.

Nesta mesma Tabela, fica explícito que havia um composto majoritário e outros em baixa concentração quando comparados ao alcaloide majoritário, ou apenas como traço, sendo estes detectados, no presente trabalho, apenas por CG-EM.

**Tabela 1.3** – Alcaloides pirrolizidínicos detectados por CG-EM no extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina*.

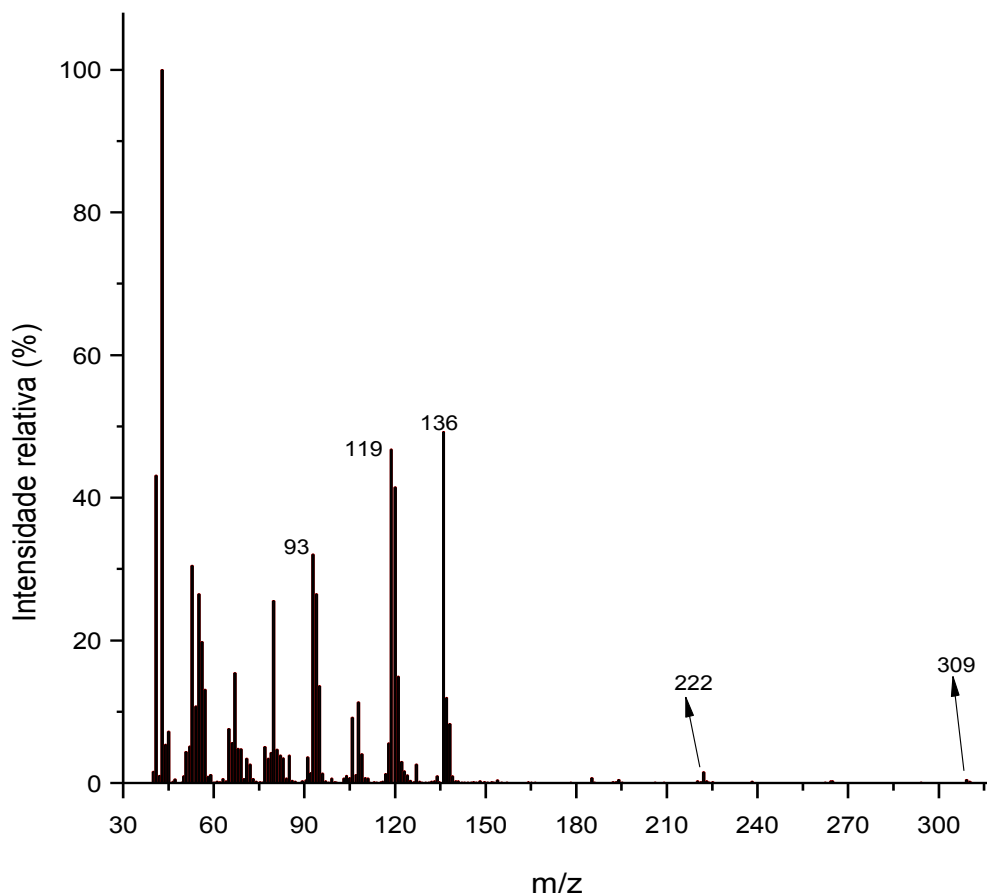
Pico Nº	**Tr (min.)	m/z	*IM	Alcaloide detectado	Abundância relativa (%)
1	40,092	264; 222; 136; 120; 119; 93; 80.	309	Tipo monocrotalina desconhecido	70,16
2	41,275	236; 208; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93 e 80.	323	Tipo monocrotalina desconhecido	16,01
3	41,842	251; 194; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93 e 80.	325	Tipo monocrotalina desconhecido	2,92
4	42,425	264; 220; 185; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93; 80; 43.	351	Tipo monocrotalina (trichodesmina)	2,27
5	43,167	254; 236; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93 e 80.	Não observado	monocrotalina	2,50
6	43,633	338; 264; 222; 136; 120; 119; 93; 83 e 80.	353	Tipo trichodesmina	6,14

\*IM = íon molecular; \*\*Tr = tempo de retenção em minutos

Na sequência, têm-se uma breve discussão referente a cada pico e seus respectivos dados.

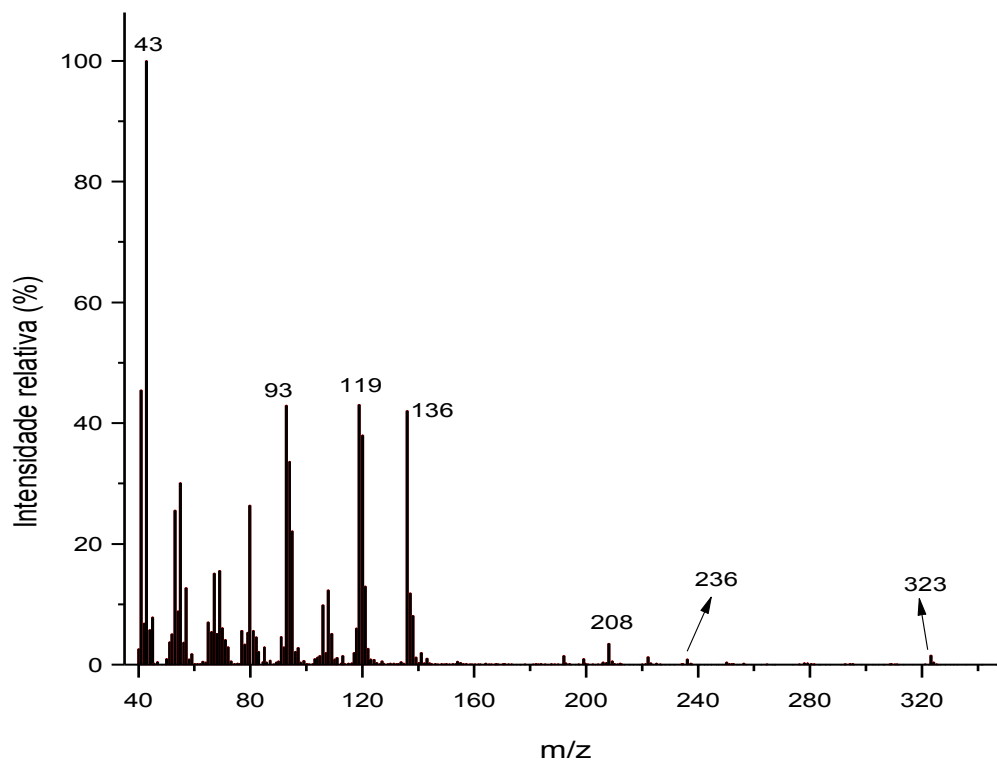
No espectro de massas da substância relativa ao pico 1 (Tr = 40,092 min.) do cromatograma da figura 1.8 observam-se fragmentos característicos de uma bislactona macrocíclica com  $m/z$  93, 94, 95; 119, 120, 121 e 136, 137 e 138. Além destes, temos picos que caracterizam a estrutura de APs do tipo monocrotalina com  $m/z$  264 e  $m/z$  222. Ainda, observa-se neste espectro a presença do íon molecular

em  $m/z$  309, o que pode sugerir ser um composto do tipo monocrotalina com estrutura desconhecida (Figura 1.9).<sup>49</sup>



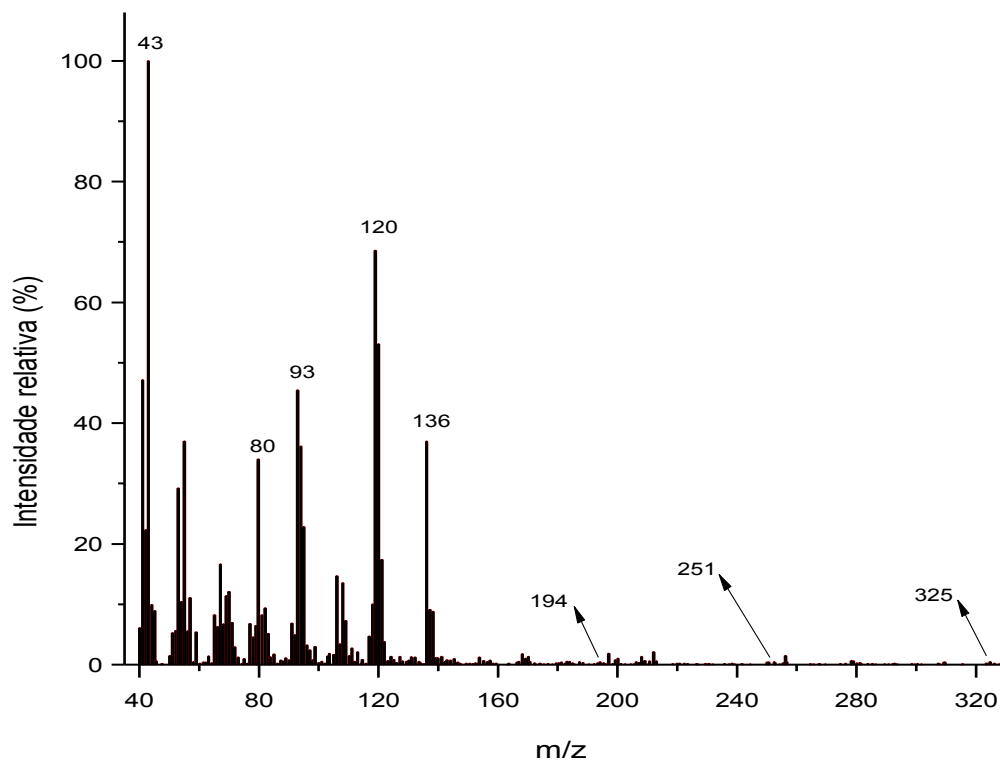
**Figura 1.9** - Espectro de massas do pico N° 1 ( $Tr = 40,092$  min.) do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina* obtido por CG-EM.

No espectro de massas do segundo pico ( $Tr = 41,275$  min.) do cromatograma pôde-se constatar a presença de fragmentos usualmente encontrados em APs do tipo diéster macrocíclico 1,2-insaturados com  $m/z$  93, 94, 95; 119, 120, 121 e 136, 137 e 138 (Figura 1.10). Ainda, têm-se os picos relativos aos fragmentos  $m/z$  236 e 208 e a presença do íon molecular em  $m/z$  323, que pode ser de um alcaloide pirrolizidínico do tipo monocrotalina com estrutura desconhecida.<sup>11, 51</sup>



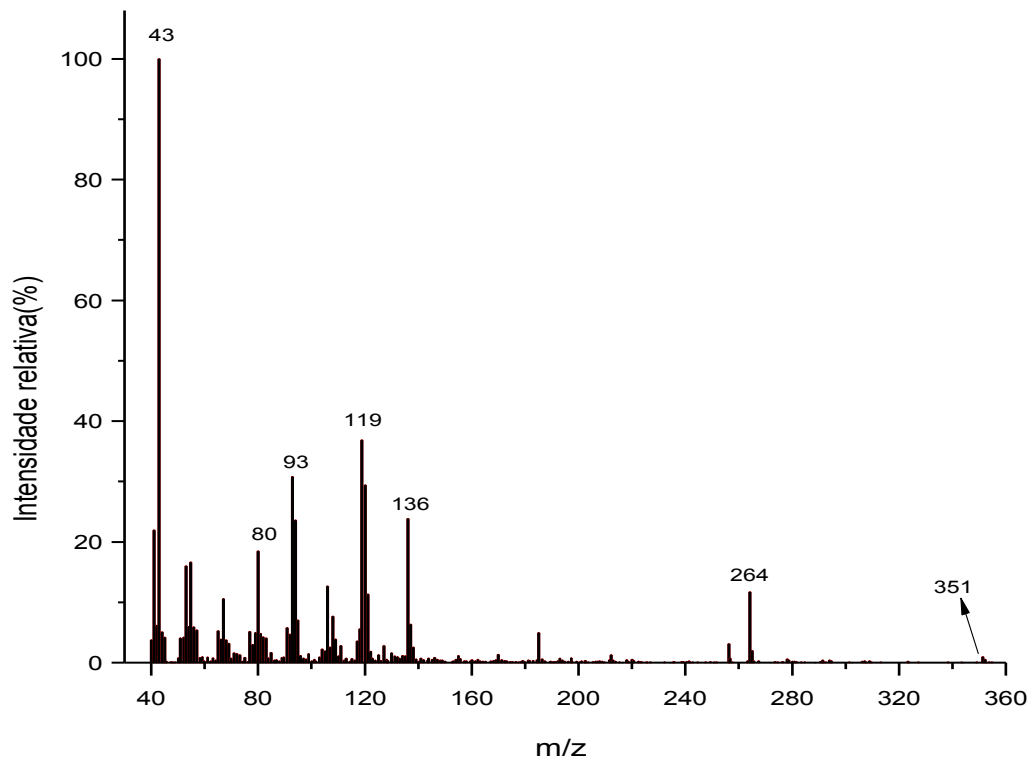
**Figura 1.10** - Espectro de massas do pico N° 2 (Tr = 41,275 min.) do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina* obtido por CG-EM.

Em relação ao padrão de fragmentação do terceiro pico (Tr = 41,842 min.) presente no cromatograma, pôde-se inferir que se trata de um diéster macrocíclico com base necina insaturada, devido aos fragmentos em  $m/z$  93, 94, 95; 119, 120, 121 e 136, 137 e 138 (Figura 1.11). Adicionalmente, observam-se picos em  $m/z$  251, 194 e o íon molecular em  $m/z$  325 o que pode ser referente a um alcaloide do tipo monocrotalina desconhecido.<sup>11, 50</sup>



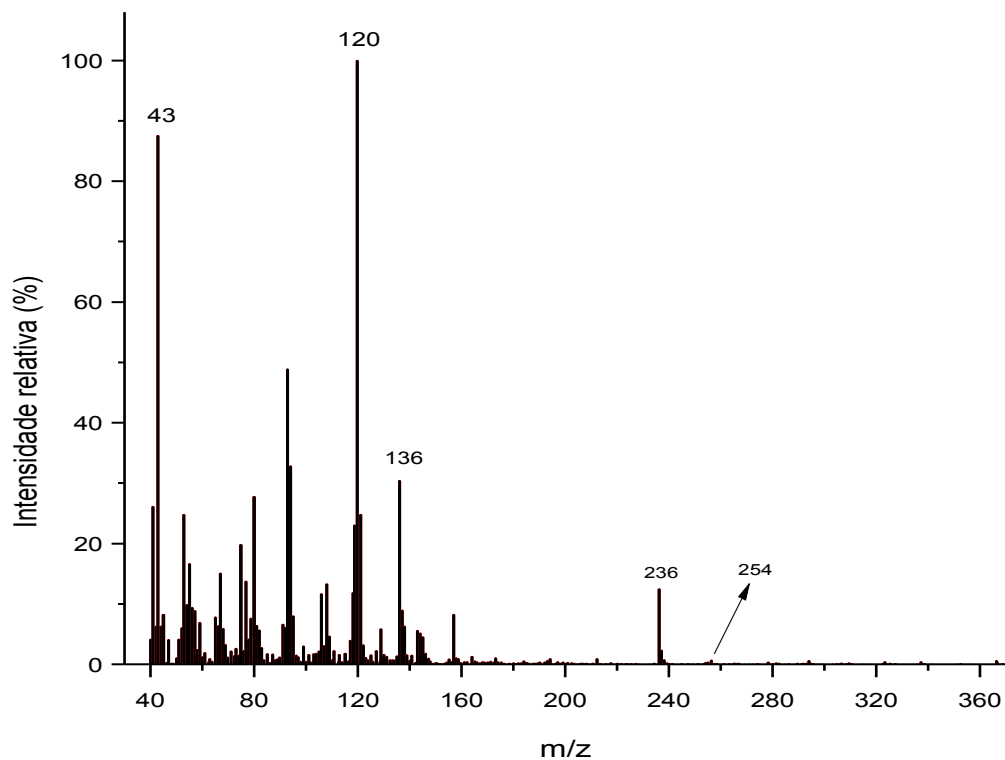
**Figura 1.11** - Espectro de massas do pico N° 3 (Tr = 41,842 min.) do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina* obtido por CG-EM.

O quarto pico (Tr = 42,425 min.) do cromatograma da figura 1.8 apresenta fragmentação característica de APs macrocíclicos com base necina tipo retronecina com fragmentos em:  $m/z$  138, 137 e 136; 121, 120 e 119; e 95, 94 e 93. Têm-se também o pico em  $m/z$  264; 220; 185; 80 e 43, referentes a compostos do tipo trichodesmina e a presença do íon molecular em  $m/z$  351 (Figura 1.12).<sup>11, 52</sup>



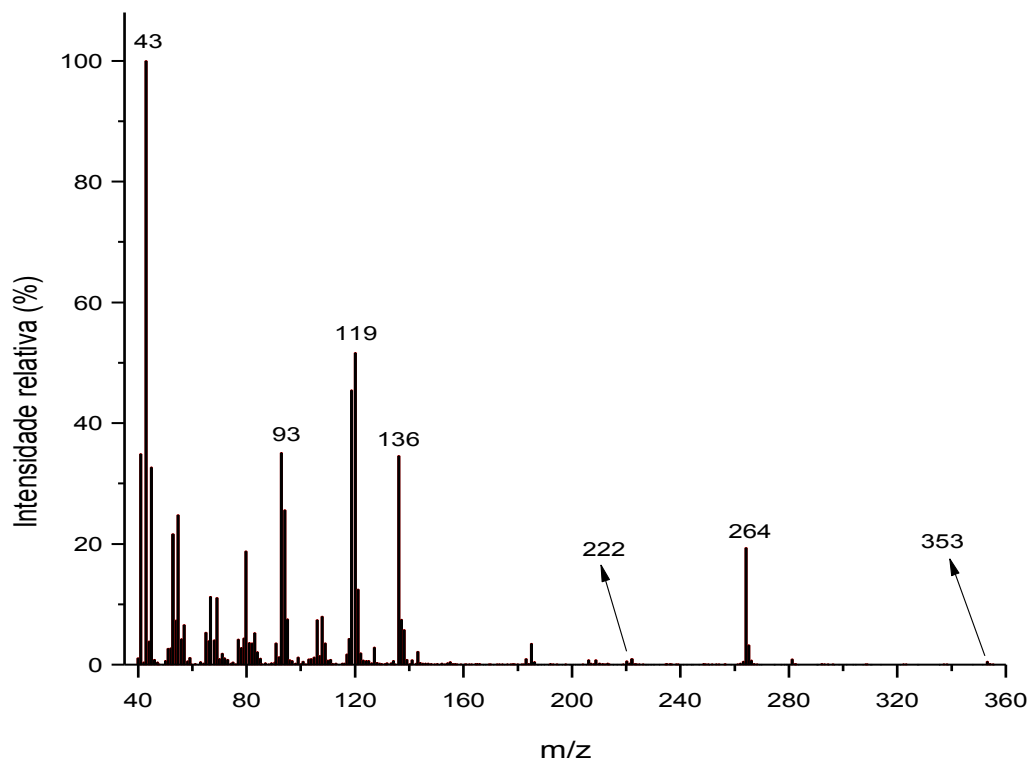
**Figura 1.12** - Espectro de massas do pico N° 4 (Tr = 42,425 min.) do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina* obtido por CG-EM.

No quinto pico (Tr = 43,167 min.) do cromatograma da figura 1.8, tem-se os fragmentos em  $m/z$  254 e 236 (Figura 1.13). Este último, característico de um rearranjo de McLafferty da molécula de monocrotalina.<sup>11, 51</sup>



**Figura 1.13** - Espectro de massas do pico N° 5 (Tr = 43,167 min.) do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina* obtido por CG-EM.

No espectro da figura 1.14, relativo ao sexto pico (Tr = 43,633 min.) do cromatograma (Figura 1.8), além da presença usual de picos referentes a um diéster macrocíclico com base tipo retronecina, observa-se também a presença de picos em  $m/z$  353; 338; 264 e 222, característicos de compostos tipo monocrotalina (trichodesmina).<sup>11, 50</sup>

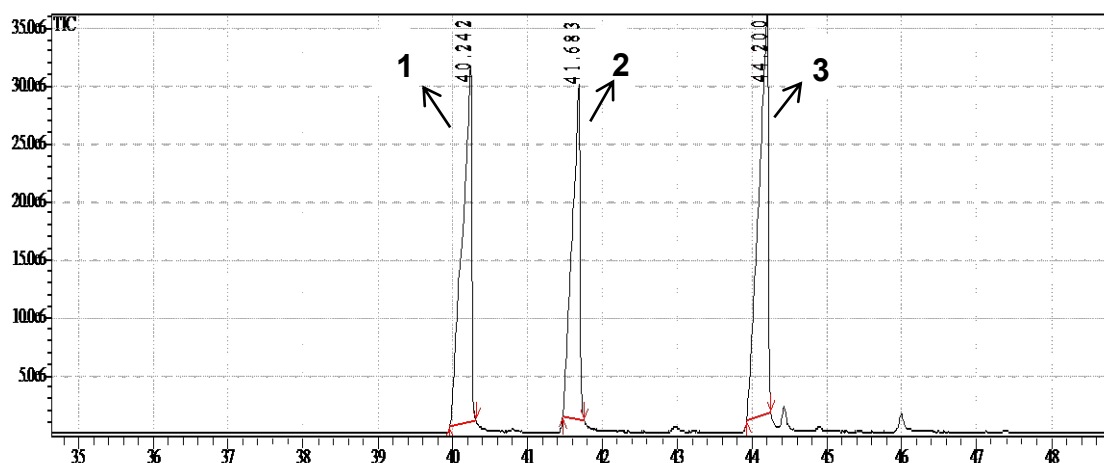


**Figura 1.14** - Espectro de massas do pico N° 6 (Tr = 43,633 min.) do extrato alcaloídico bruto das folhas de *C. paulina* obtido por CG-EM.

### 1.3.3 Detecção dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas frações semipurificadas de *C. paulina* por CG-EM

Após o fracionamento por coluna do extrato alcaloídico bruto (E.A.B.) das folhas de *C. paulina* foi possível a obtenção das frações semipurificadas C1F2, C1F3, C1F5, C1F6, C1F7, C2F5, C2F6 e C2F7.

No cromatograma da fração C1F2 e da fração C2F5 (Figura 1.15) pôde-se observar a presença de três picos. A identificação de cada um dos picos pode ser visualizada na Tabela 1.4. Os compostos detectados nas frações C1F2 e C2F5 foram os mesmos, desta forma, somente os dados da fração C1F2 foram apresentados. Vale destacar que a partir dessas frações que foi possível obter os compostos inéditos 2, 3 e 4, os quais estão representados pelos picos 1, 2 e 3 respectivamente.



(Tempo de retenção-minutos)

**Figura 1.15** – Cromatograma parcial (CG-EM) das frações semi purificada C1F2 e C2F5.

**Tabela 1.4** - Alcaloides detectados via CG-EM nas frações semipurificada C1F2 e C2F5.

Pico N°	*Tr (min.)	m/z	Íon Molecular	Alcaloide detectado
1	40,242	264; 222; 138; 137; 136;120; 119; 95; 94; 93; 80.	309	Tipo monocrotalina desconhecido
2	41,683	236; 208; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93; 80.	323	Tipo monocrotalina desconhecido
3	44,200	292; 291; 250; 222; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93; 80.	337	Tipo monocrotalina desconhecido

\*Tr = tempo de retenção em minutos

A fração C1F3 apresentou seis picos em seu cromatograma (Figura 1.16). Todos estes picos foram detectados como sendo alcaloides pirrolizidínicos de acordo com os fragmentos apresentados na Tabela 1.5. Comparando-se os cromatogramas das frações C1F2 e C1F3, pode-se notar que os picos 1 e 2 são comuns às duas frações. Logo, os picos número 1 e 2 estarão ausentes na Tabela 1.5.

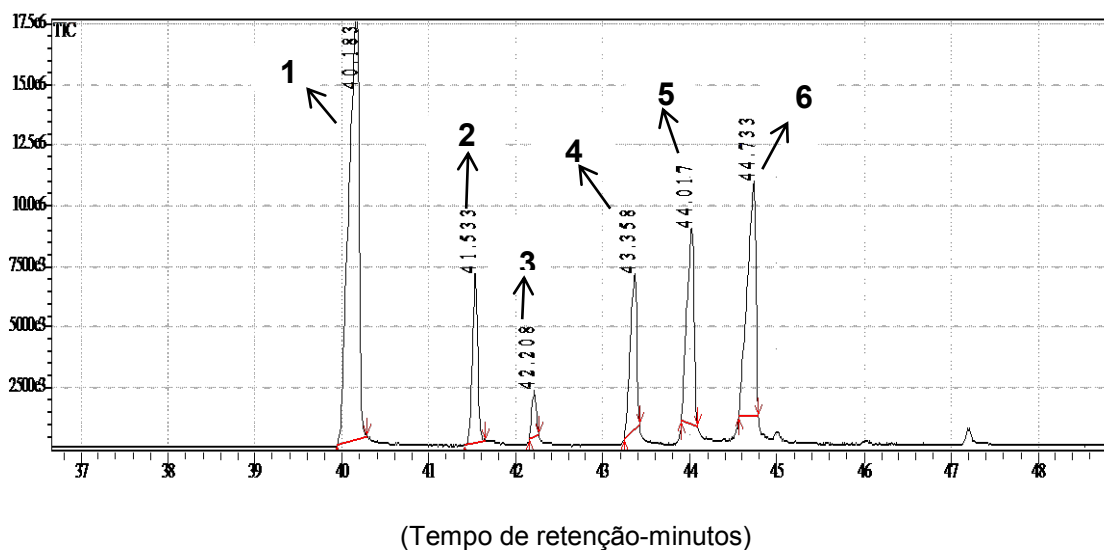


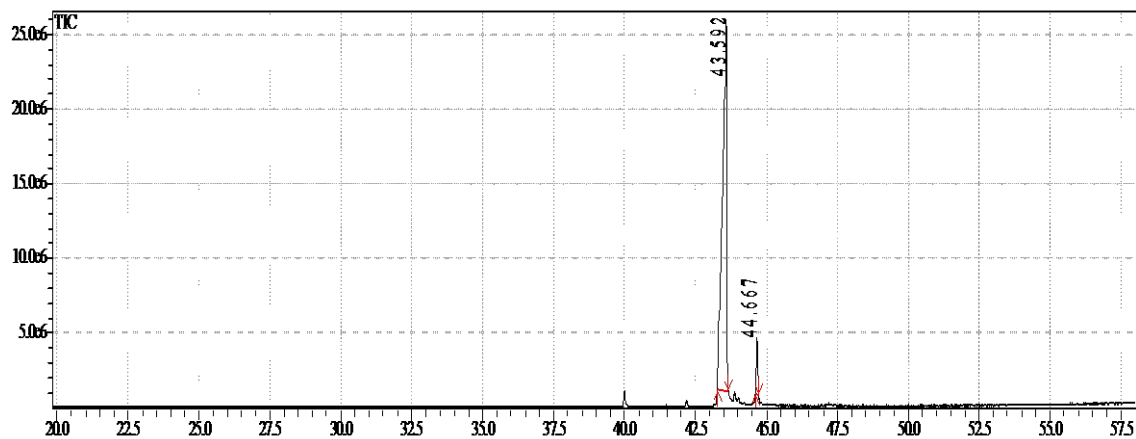
Figura 1.16 – Cromatograma parcial (CG-EM) da fração semi purificada C1F3.

Tabela 1.5 - Alcaloides presentes, exclusivamente, na fração semi purificada C1F3.

Pico Nº	*Tr (min.)	m/z	Íon Molecular	Alcaloide detectado
3	42,208	250; 226; 208; 138; 137; 136; 121; 120; 119; 95; 94; 93; 80.	Não observado	Tipo monocrotalina desconhecido
4	43,358	254; 236; 136; 120; 119; 93; 80.	325	monocrotalina
5	44,017	338; 264; 222; 136; 120; 108; 94; 93; 80.	Não observado	Tipo trichodesmina
6	44,733	339; 324; 268; 250; 136; 120; 93; 80.	339	14-metilmonocrotalina

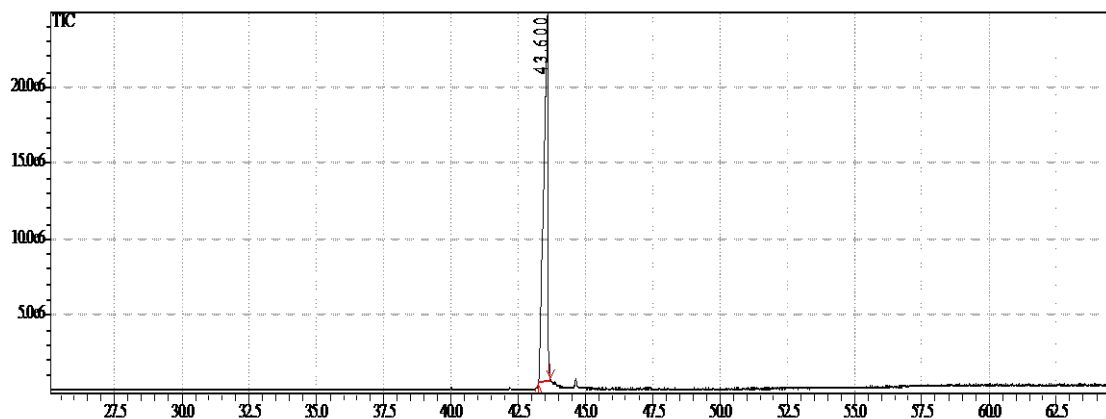
\*Tr = tempo de retenção em minutos

Nos cromatogramas das frações C1F5 (Figura 1.17), C1F6 (Figura 1.18) e C1F7 (Figura 1.19) a monocrotalina foi detectada como o único alcaloide presente. No entanto, a fração C1F6 apresentou-se mais pura em relação às outras e, dessa forma, esta foi utilizada para a realização dos experimentos de RMN 1D e 2D e espectrometria de massas de alta resolução (HRMS-ESI-TOF). A elucidação estrutural desta molécula (substância 1) está descrita no item 1.3.5.1 (página 38).



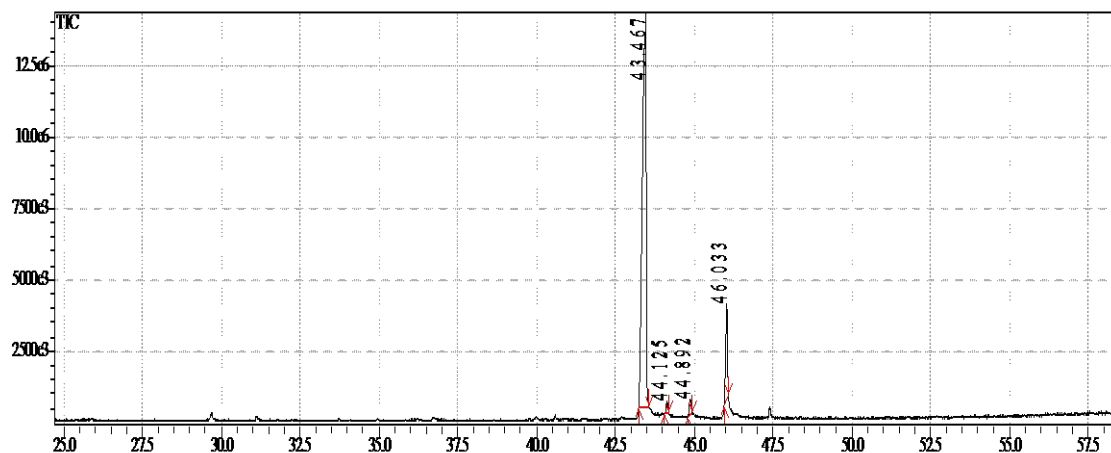
(Tempo de retenção-minutos)

**Figura 1.17** – Cromatograma parcial (CG-EM) da fração semi purificada C1F5.



(Tempo de retenção-minutos)

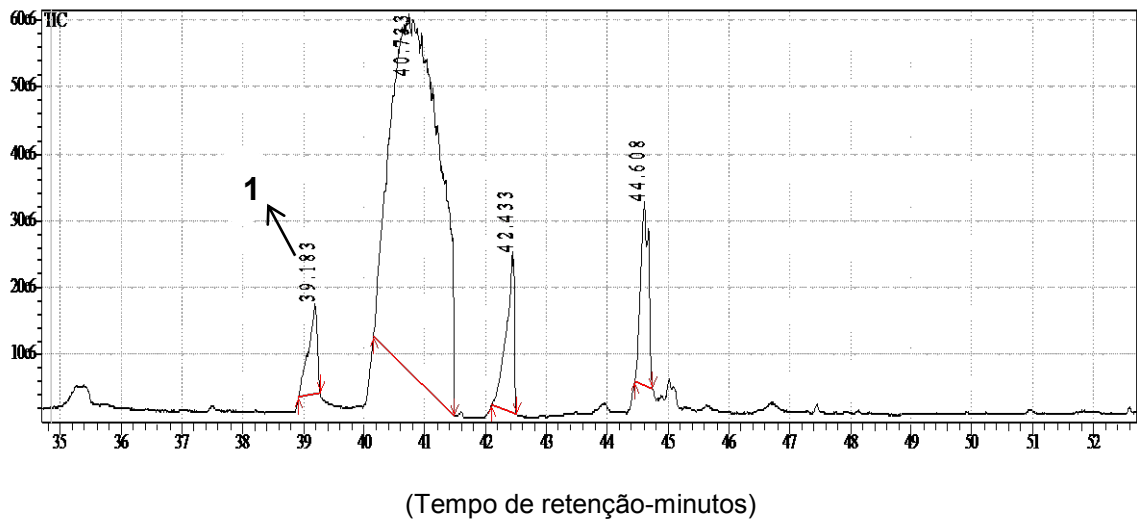
**Figura 1.18** – Cromatograma parcial (CG-EM) da fração semi purificada C1F6.



(Tempo de retenção-minutos)

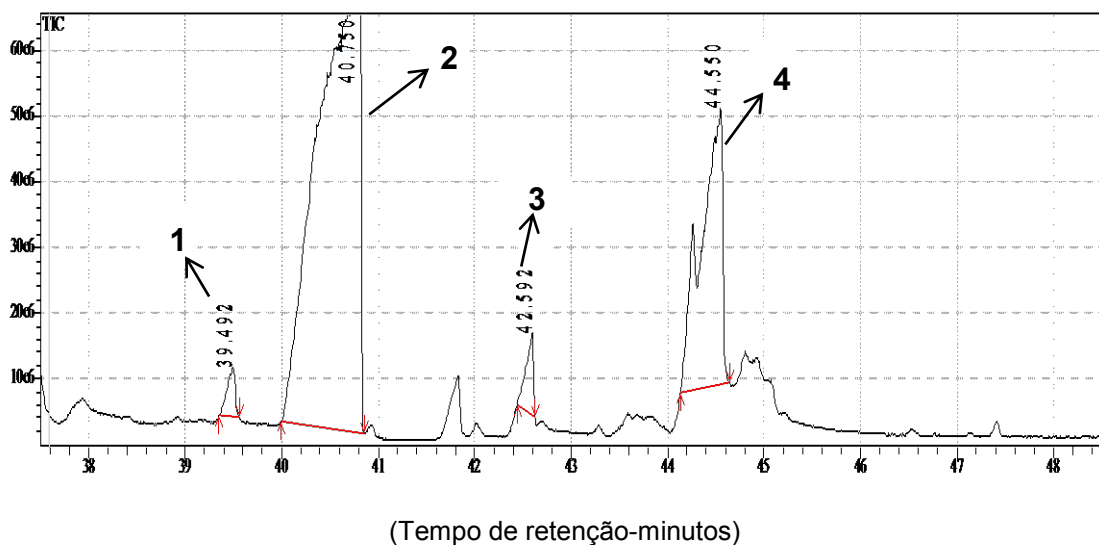
**Figura 1.19** – Cromatograma parcial (CG-EM) da fração semi purificada C1F7.

A fração C2F6 apresentou quatro picos em seu cromatograma, relativos a alcaloides pirrolizidínicos, sendo todos eles já encontrados em frações anteriores, exceto o pico número 1 em  $T_r = 39,183$  min (Figura 1.20). Esse composto foi detectado como 7-octanoilretronecina com íon molecular em  $m/z$  281 e com outros picos em  $m/z$  264, 220, 154, 137, 136, 124, 111, 106, 94, 80 e 43, característico deste composto.



**Figura 1.20** – Cromatograma parcial (CG-EM) da fração semi purificada C2F6.

Por fim, o cromatograma da fração C2F7 revelou quatro picos relativos a alcaloides (Figura 1.21), sendo todos eles já detectados em frações anteriores.



**Figura 1.21** – Cromatograma parcial (CG-EM) da fração semi purificada C2F7.

Após o fracionamento e com a posse dos dados espectroscópicos, o trabalho foi focado no isolamento e caracterização dos compostos presentes nas frações C1F2 e C2F5.

#### 1.3.4 Isolamento dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas frações C1F2 e C2F5 por CLAE

Para realizarmos a purificação dos três compostos inéditos presentes nas frações C1F2 e C2F5 foram realizadas análises por CLAE analítica com a finalidade de obter o melhor sistema de solvente para posterior injeção em escala preparativa. Portanto, as amostras (1 mg) foram diluídas em 1 mL de metanol e aplicadas manualmente com um volume de injeção igual a 20  $\mu\text{L}$ , fluxo constante de 0,7 mL/min e coluna NSTC18 (250 mm x 3,0 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) LC100111 (NST). Os cromatogramas obtidos foram analisados nos comprimentos de onda de 210 e 220 nm. Obtido o melhor sistema de solventes e com a finalidade de isolar os fitoconstituintes, realizou-se um fracionamento preparativo no modo isocrático, utilizando a seguinte mistura de eluentes: **(A)** água 65% [0,05% de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (pH 11  $\pm$  0,5)] e **(B)** acetonitrila 35%. Foi preparada uma solução contendo estes dois solventes na concentração supracitada, visto que o cromatógrafo é monofásico. Dez amostras (15 mg cada) foram injetadas manualmente com um volume de injeção de 1 mL e fluxo constante de 4,7 mL  $\text{min}^{-1}$ , de acordo com as especificações “Scale-up” linear da coluna NSTC18 (250 mm x 10,0 mm x 5  $\mu\text{m}$ ) LC280211 (NST). O tempo de análise foi no intervalo de 0,0 a 16,0 min. Com este método foi possível realizar a separação de três fitoconstituintes que foram liofilizados e posteriormente pesados (Tabela 1.6).

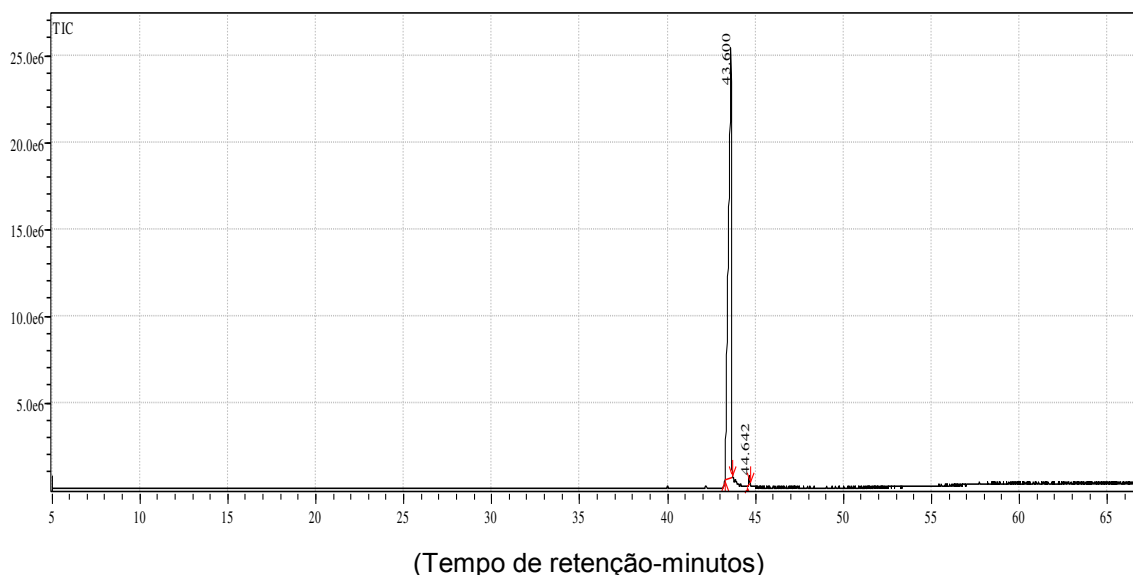
**Tabela 1.6** – Substâncias isoladas a partir do fracionamento da fração C1F2 e C2F5.

Fitoconstituente	Massa (mg)	Tempo de retenção (min.)
2	9,9 mg	9,34
3	3,8 mg	13,45
4	4,1 mg	15,55

### 1.3.5 Elucidação estrutural dos alcaloides pirrolizidínico isolados das folhas de *C. paulina*

#### 1.3.5.1 Substância 1

Pelo cromatograma da figura 1.22, verifica-se a presença de um pico majoritário em 43,6 minutos e com 99,31% de área.

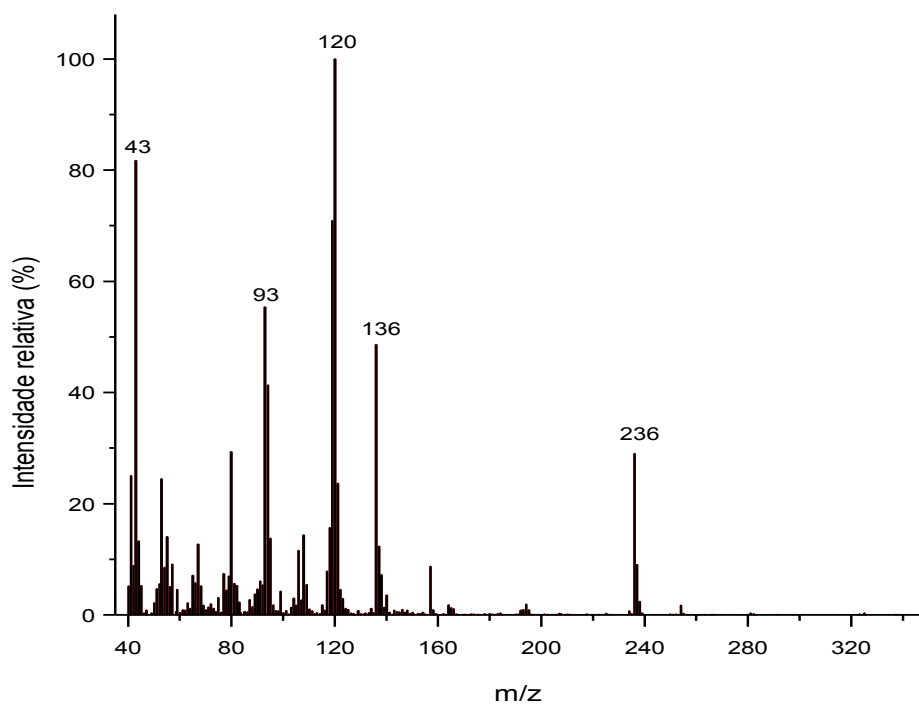


**Figura 1.22** – Cromatograma (CG-EM) da substância 1.

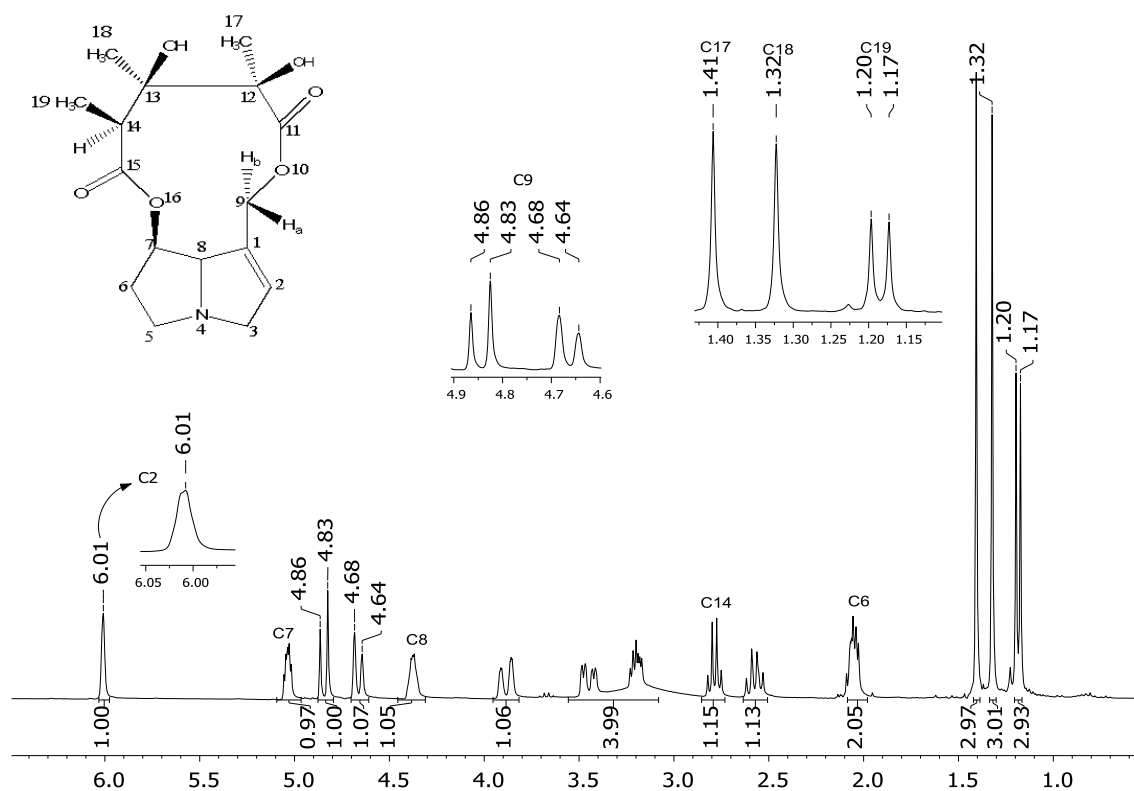
Observando-se o espectro de massas desta substância (Figura 1.23), pode-se notar a presença de picos relativos a fragmentos característicos da molécula de monocrotalina com  $m/z$  236, 136, 120 e 93. O mecanismo de fragmentação proposto para explicar a formação dos principais picos no espectro de massas da monocrotalina foi apresentado no item 1.3.2.

Para se confirmar a estrutura dessa molécula, foram realizadas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  associadas aos espectros bidimensionais de correlações homonucleares  $^1\text{H} \times ^1\text{H}$  (COSY) e heteronucleares  $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$  (HSQC e HMBC). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 1.24) observou-se um simpleto largo em  $\delta$  6,01 (s, 1H) que foi atribuído ao hidrogênio H-2, ligado ao carbono olefínico C-2. Para os

dois hidrogênios H-9 são observados dois dupletos em  $\delta$  4,66 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1H) e  $\delta$  4,84 (d,  $J = 11,9$  Hz, 1H). Além destes sinais, há dois simpletos referentes aos hidrogênios metílicos H-17 e H-18, com deslocamentos químicos em  $\delta$  1,32 (s, 3H) e  $\delta$  1,41 (s, 3H), respectivamente. Aparece também um duplete em  $\delta$  1,20 (d,  $J = 7,1$  Hz, 3H) atribuído a H-19. As atribuições foram realizadas em comparação com dados da literatura referentes ao alcaloide isolado de *Crotalaria aegyptiaca*.<sup>53</sup>

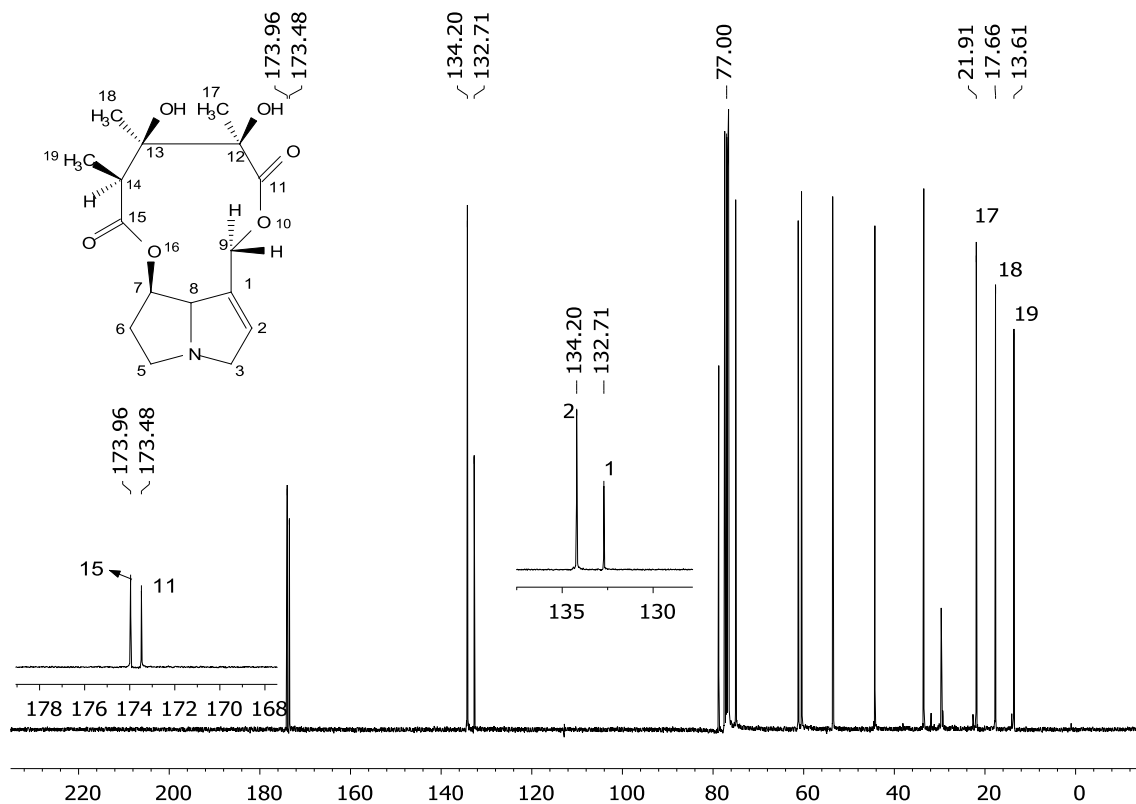


**Figura 1.23** – Espectro de massas da substância 1.



**Figura 1.24** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 1.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 1.25), pode-se visualizar em campo baixo, a presença de dois sinais de carbonos de carbonilas em  $\delta$  173,9 e 173,4. Além destes, percebe-se dois sinais na região de carbonos olefínicos em  $\delta$  134,2 e 132,7, que são característicos dos carbonos da ligação dupla presente na base necina. Também se notam três sinais, em campo alto, relativos aos carbonos metílicos 17, 18 e 19, apresentando deslocamentos químicos em  $\delta$  21,9, 17,6 e 13,6, respectivamente<sup>52</sup>. Os demais sinais observados no espectro de  $^{13}\text{C}$  estão de acordo com a estrutura da monocrotalina.



**Figura 1.25** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 1.

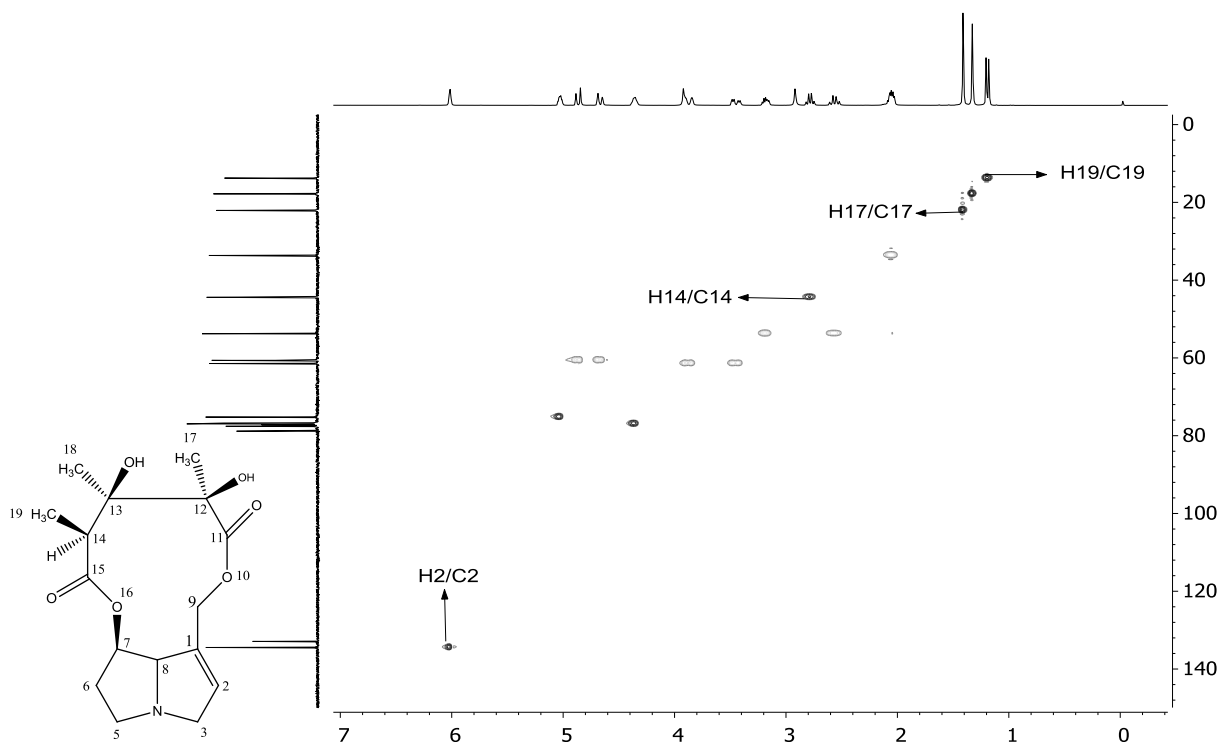
Os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , suas multiplicidades e valores de constantes de acoplamento da substância 1 encontram-se descritos na Tabela 1.7. Além disso, nessa mesma tabela, temos a comparação dos dados experimentais com os dados da literatura.<sup>5</sup>

**Tabela 1.7** – Comparação dos dados experimentais de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) com os relatados na literatura para a substância 1.

C	$\delta^{13}\text{C}^*_{\text{Obs}}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^*_{\text{Lit}}^{52}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^{**}_{\text{Obs}}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}^{**}_{\text{Lit}}^{52}$ (ppm)
1	132,7	132,8	-	-
2	134,2	134,3	6,01 (sl, 1H)	6,0
3	60,4	60,4	H $\alpha$ 3,42 (1H, dd, $J = 15,9, 4,7$ Hz) H $\beta$ 3,91 (1H, d, $J = 15,9$ Hz)	-
5	53,6	53,7	H $\alpha$ 2,58 (1H, m) H $\beta$ 3,20 (1H, m)	-
6	33,5	33,5	2,12 (2H, m)	2,1
7	76,5	75,0	5,13 (1H, m)	5,1
8	76,7	76,7	4,40 (1H,m)	
9	61,2	61,3	H $\alpha$ 4,66 (1H, d, $J = 11,9$ Hz) H $\beta$ 4,84 (1H, d, $J = 11,9$ Hz)	$\alpha$ 4,7 $\beta$ 4,9
11	173,4	173,5	-	-
12	78,7	78,7	-	-
13	76,8	76,8	-	-
14	44,29	44,2	2,81 (1H, q, $J = 7,1$ Hz)	-
15	173,9	174,1	-	-
17	21,9	22,0	1,41 (s, 3H)	1,4
18	17,6	17,7	1,32 (s, 3H)	1,4
19	13,6	13,6	1,20 (3H, d, $J = 7,1$ Hz)	1,2

Legenda:  $\delta^{13}\text{C}$  (ppm): Deslocamento químico de carbono em partes por milhão;  
 $\delta^1\text{H}$  (ppm): Deslocamento químico de hidrogênio em partes por milhão;  
 Obs.: Observado; Lit.: literatura;

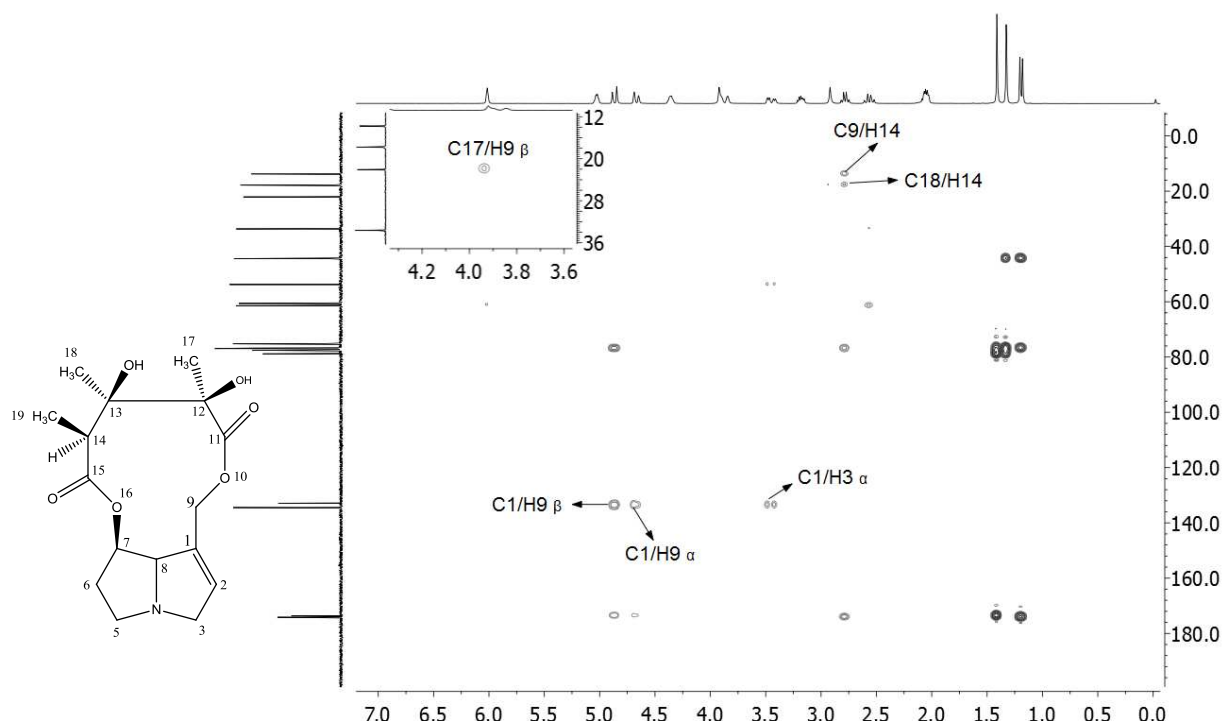
A Figura 1.26 apresenta o mapa de contornos HSQC da substância 1. Os sinais de hidrogênio estão correlacionados com seus respectivos carbonos da seguinte forma: [ $\delta$  H 1,2 (H-19),  $\delta$  C 13,6 (C-19)]; [ $\delta$  H 6,01 (H-2),  $\delta$  C 134,2 (C-2)]; [ $\delta$  H 2,81 (H-14),  $\delta$  C 44,2 (C-14)]; [ $\delta$  H 1,41 (H-17),  $\delta$  C 21,9 (C-17)].



**Figura 1.26** – Mapa de contornos HSQC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 1.

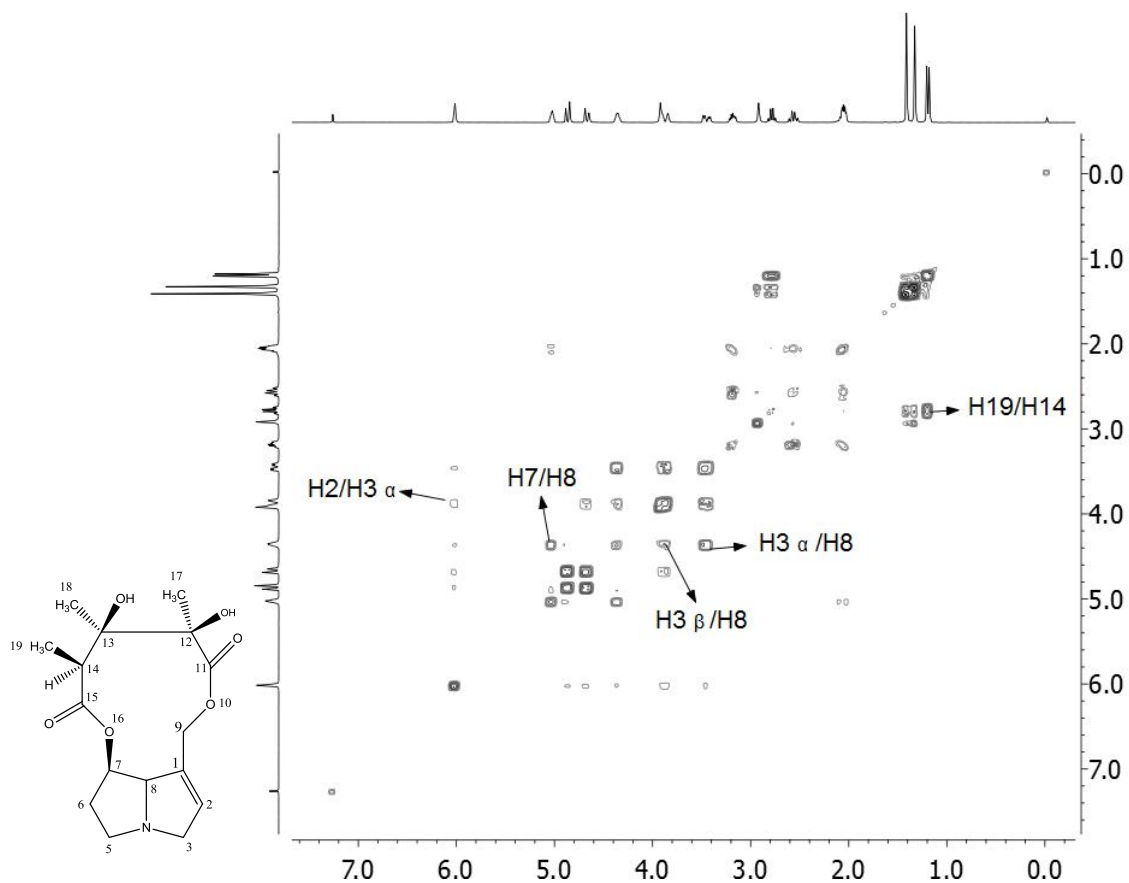
As correlações correspondentes aos carbonos quaternários podem ser visualizadas no espectro HMBC (Figura 1.27). Nesse espectro, pode-se observar a correlação do carbono quaternário C-1 em  $\delta$  C 132,7 com os hidrogênios H-3 $\alpha$  ( $\delta$  H 3,42), H-9 $\alpha$  ( $\delta$  H 4,66) e H-9 $\beta$  ( $\delta$  H 4,84). Confirma-se assim a presença de uma base necina insaturada. Tem-se também a correlação do grupo metil C-17 em  $\delta$  C 21,9 com o hidrogênio H-9 $\beta$  ( $\delta$  H 4,84). Observa-se o grupo metil C-18 ( $\delta$  C 17,6) em correlação com o hidrogênio H-14 ( $\delta$  H 2,81). Com estas atribuições, pode-se inferir a presença de dois carbonos quaternários no anel macrocíclico.

Nota-se o sinal de carbono C-19 ( $\delta$  C 13,6) correlacionando-se com o hidrogênio H-14 ( $\delta$  H 2,81), o que indica a presença de um grupo metil conectado ao C-14 no anel macrocíclico externo.



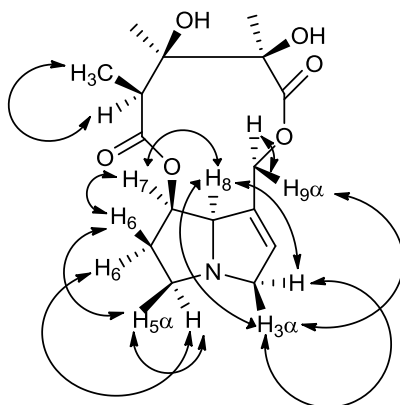
**Figura 1.27** – Mapa de contornos HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 1.

A Figura 1.28 apresenta o mapa de contornos COSY da substância 1. Este espectro mostra a correlação do sinal de H-19 ( $\delta$  H 1,20) com H-14 ( $\delta$  H 2,81) e, portanto, confirma que a bislactona macrocíclica é trissubstituída e com quatro carbonos quaternários.



**Figura 1.28** – Mapa de contornos COSY (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 1.

Na figura 1.29 estão representadas as correlações COSY, observadas no espectro, entre os hidrogênios da base necina. Além dessas, tem-se as correlações entre a base necina e o anel macrocíclico superior (H-3/H-9) definindo a conectividade entre o anel inferior e superior.

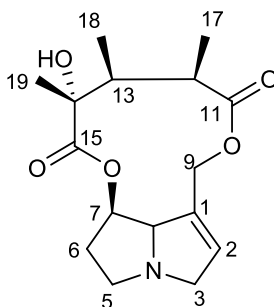


**Figura 1.29** – Correlações observadas no espectro COSY da substância 1.

Assim, com base na comparação entre as informações da literatura e os dados obtidos através de CG-EM e RMN, conclui-se que a substância é, de fato, a monocrotalina. Nesse caso, como se trata de uma molécula extensamente estudada, dispensou-se a análise do espectro NOESY. Por fim, a espectrometria de massas de alta resolução forneceu a massa molecular de  $m/z$  326,1179 [M+H], correspondente à fórmula molecular  $C_{16}H_{24}NO_6$ .

#### 1.3.5.2 Substância 2

O substância 2 (Figura 1.30) foi obtido como um sólido branco amorfo e sua massa exata, determinada pela técnica HR-ESI-MS, com  $m/z$  309,1576 (fórmula molecular  $C_{16}H_{23}NO_5$ ).



**Figura 1.30** - Estrutura da substância 2.

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) (Figura 1.31) e de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) (Figura 1.32) dessa molécula, foi verificada a presença de uma bislactona macrocíclica de onze membros com os seguintes sinais: um simpleto metílico em [ $\delta$  H 1,44 (3H, s),  $\delta$  C 27,0, Me-19]; dois dupletos metílicos a [ $\delta$  H 1,17 (d,  $J = 7,04$  Hz, 3H),  $\delta$  C 18,5, Me-18] e [ $\delta$  H 1,15 (d,  $J = 7,48$  Hz, 3H),  $\delta$  C 11,2, Me-17]; um grupo metileno C9 ( $-\text{CH}_2-\text{O}-$ ) [ $\delta$  H 3,92 (1H, d,  $J = 11,9$  Hz, H-9 $\alpha$ ) e  $\delta$  H 3,56 (1H, d,  $J = 11,9$  Hz, H-9 $\beta$ ),  $\delta$  C 60,8, (C-9)]; um metino C7 ( $-\text{CH}-\text{O}$ ) em [ $\delta$  H 5,12 (1H, m),  $\delta$  C 76,0, (C-7)]; um carbono quaternário oxigenado em [ $\delta$  C 77,4, (C-14)]; duas carbonilas em [ $\delta$  C 176,2, (C-11) e  $\delta$  C 175,8, (C-15)]; dois carbonos amino metilênicos [ $\delta$  C 61,6, (C-3) e  $\delta$  C 54,0, (C-5)]; um carbono amino metínico [ $\delta$  C 77,5, (C-8)]; dois carbonos olefínicos em [ $\delta$  C 134,4, (C-1) e  $\delta$  C 135,6, (C-2)]; e um carbono metilênico em [ $\delta$  C 34,1, (C-6)]. Os valores de deslocamento químico de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão sumarizados na Tabela 1.8.

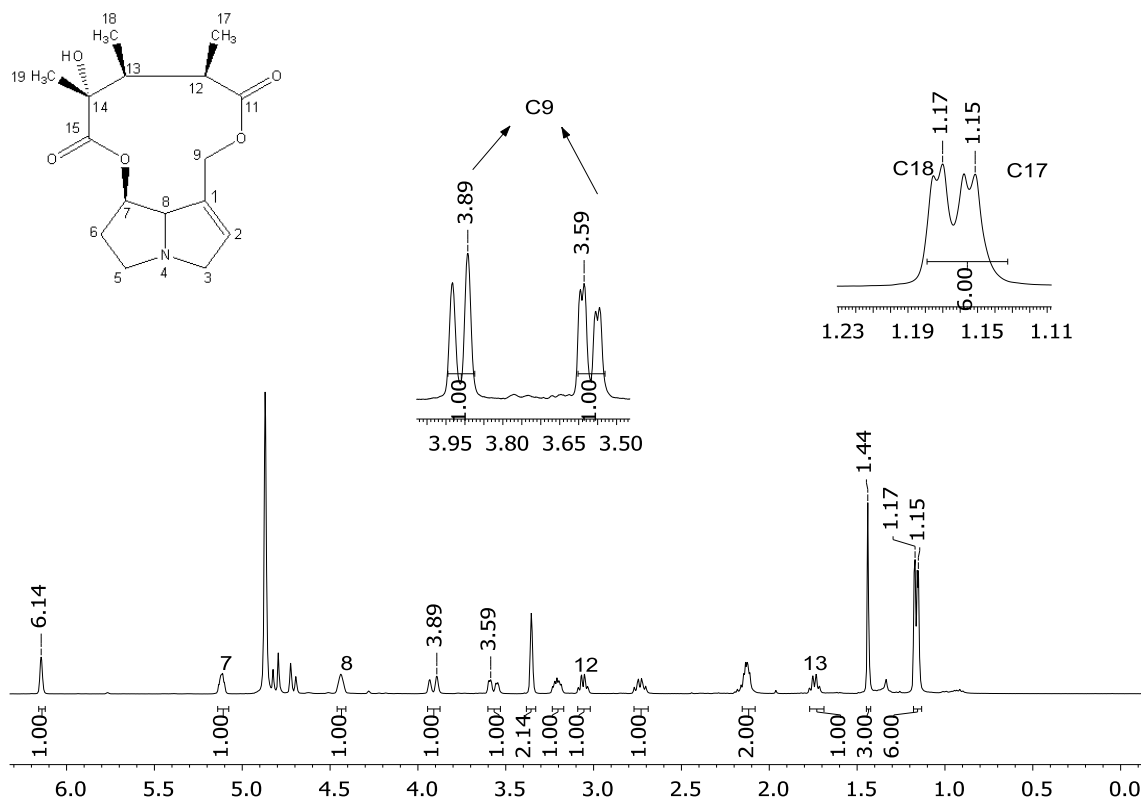


Figura 1.31 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 2.

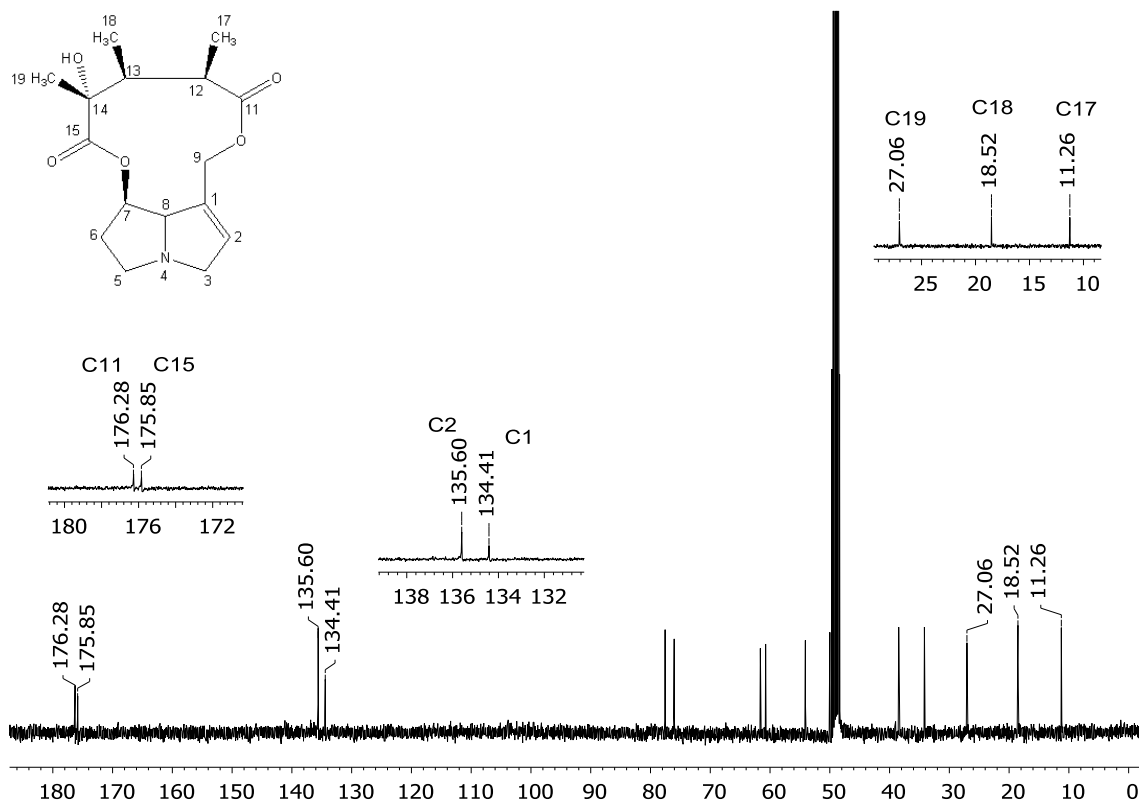


Figura 1.32 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 2.

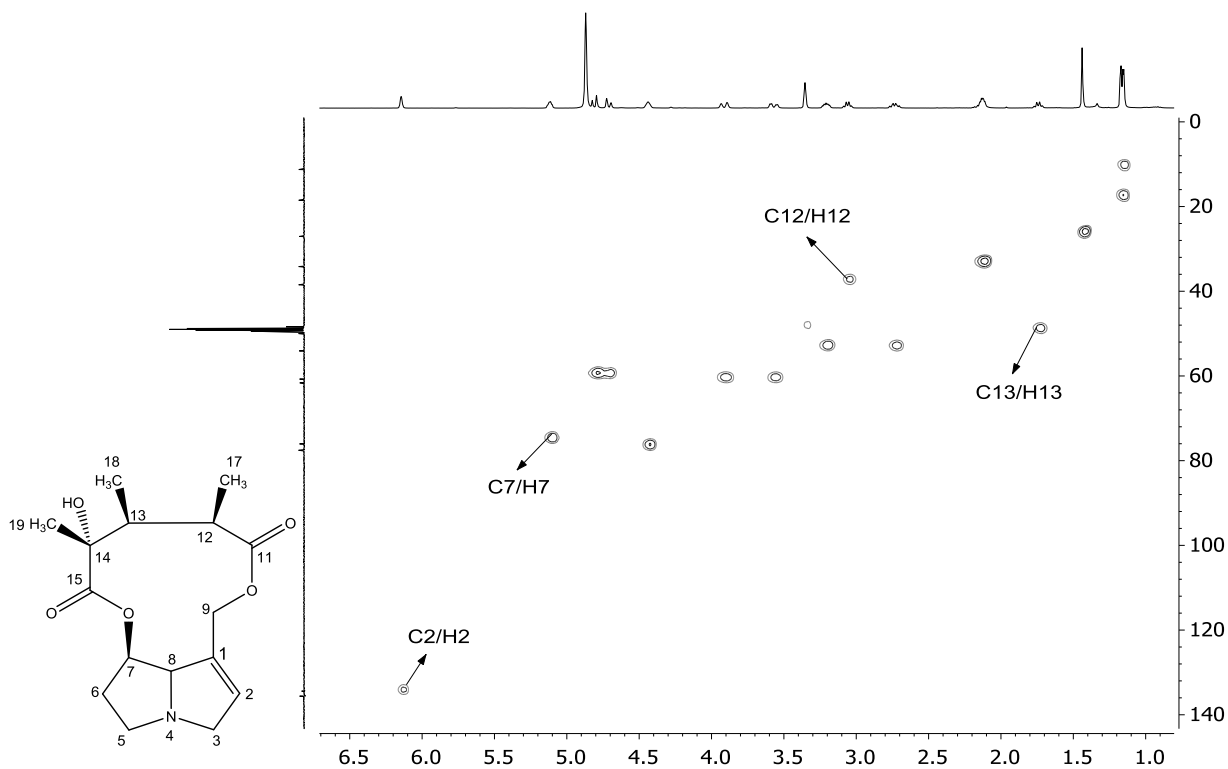
**Tabela 1.8** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 2.

Carbono	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^{**}\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	134,4	-
2	135,6	6,14 (s; 1H)
3	61,6	H $\alpha$ 4,81 (d, $J = 11,9$ Hz; 1H); H $\beta$ 4,71 (d, $J = 11,9$ Hz; 1H)
5	54,0	H $\alpha$ 3,21 (m, 1H); H $\beta$ 2,74 (dd, $J = 16,5; 9,5$ Hz; 1H)
6	34,1	2,15 (m, 2H)
7	76,0	5,12 (m, 1H)
8	77,5	4,44 (s, 1H)
9	60,8	H $\alpha$ 3,92 (d, $J = 11,9$ Hz, 1H) e H $\beta$ 3,56 (dd, $J = 11,9, 1,1$ Hz, 1H)
11	176,2	-
12	38,4	3,06 (m, 1H)
13	50,0	1,74 (q, $J = 7,3$ Hz, 1H)
14	77,4	-
15	175,8	-
17	11,2	1,15 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H)
18	18,5	1,17 (d, $J = 7,4$ Hz, 3H)
19	27,0	1,44 (s, 3H)

Legenda:  $^*\delta^{13}\text{C}$  (ppm): Deslocamento químico de carbono em partes por milhão;

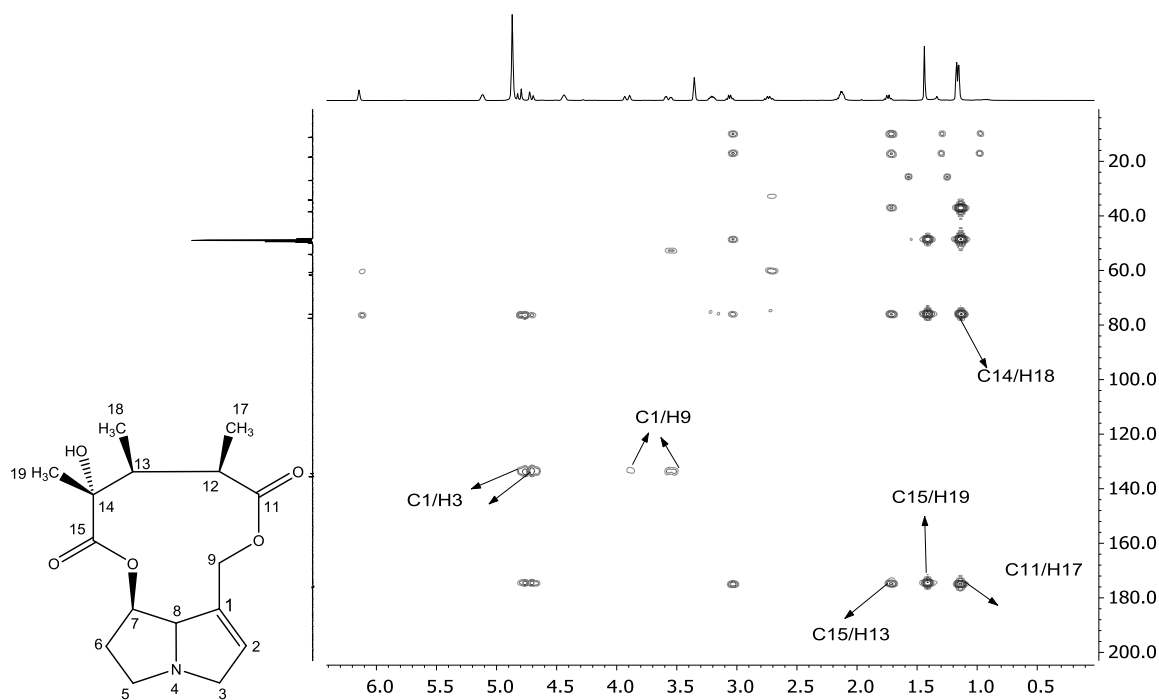
$^{**}\delta^1\text{H}$  (ppm): Deslocamento químico de hidrogênio em partes por milhão

Observando-se o mapa de contornos HSQC (Figura 1.33) é possível notar as seguintes correlações  $^1J_{\text{CH}}$ : [ $\delta$  H 6,14 (H-2),  $\delta$  C 135,6 (C-2)]; [ $\delta$  H 5,12 (H-7),  $\delta$  C 76,0 (C-7)]; [ $\delta$  H 3,06 (H-12),  $\delta$  C 38,4 (C-12)]; [ $\delta$  H 1,74 (H-13),  $\delta$  C 50,0 (C-13)].



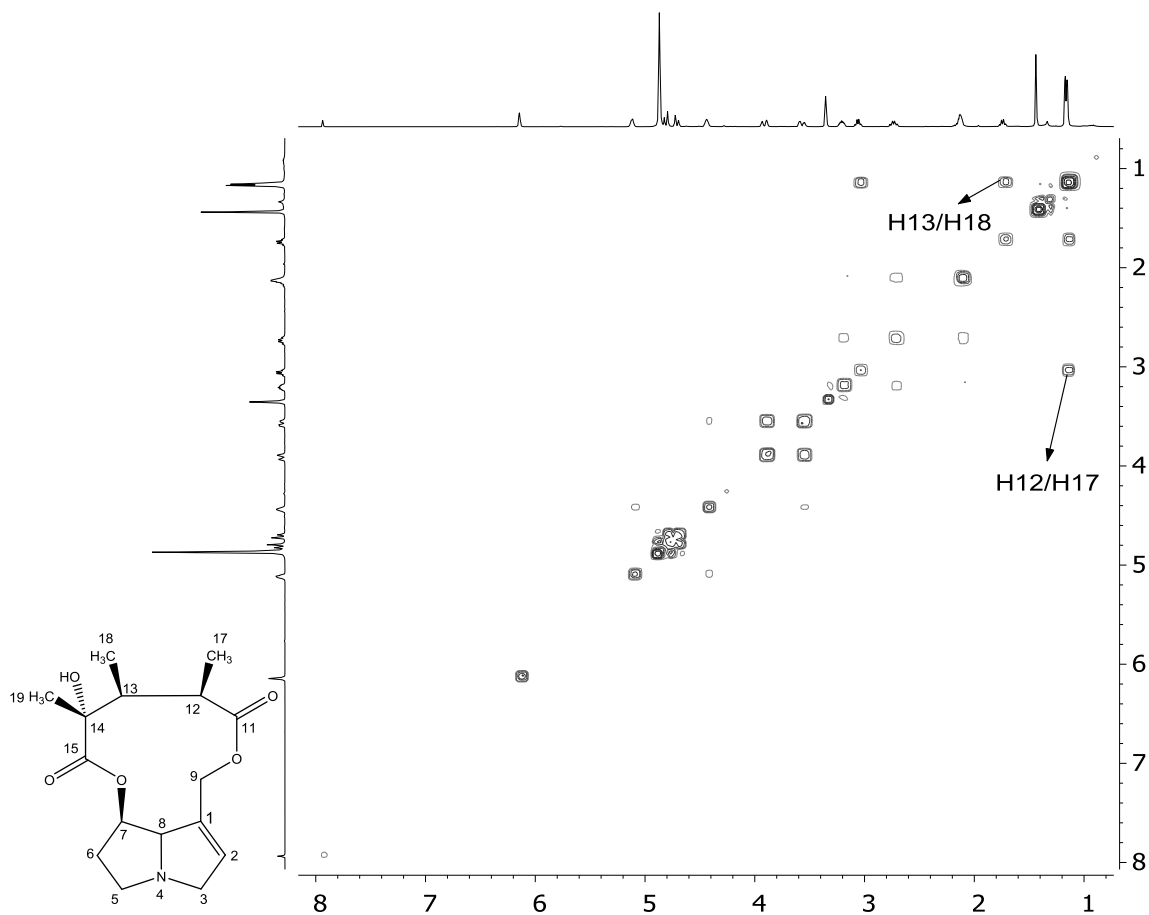
**Figura 1.33** - Mapa de contornos HSQC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 2.

As correlações dos carbonos quaternários (C-1, C-11, C-14 e C-15) podem ser visualizadas no espectro HMBC (Figura 1.34) por acoplamentos à longa distância  $^{3-4}J_{C-H}$  entre [ $\delta$  H 3,89 e 3,59 (H-9),  $\delta$  C 134,4 (C-1)]; [ $\delta$  H 1,17 (H-18),  $\delta$  C 77,4 (C-14)]; [ $\delta$  H 3,06 (H-12),  $\delta$  C 176,2 (C-11)]; [ $\delta$  H 1,15 (H-17),  $\delta$  C 176,2 (C-11)]; [ $\delta$  H 1,44 (H-19),  $\delta$  C 175,8 (C-15)].



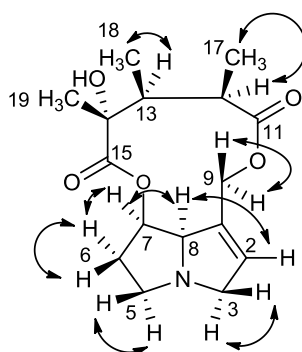
**Figura 1.34** - Mapa de contornos HMBC (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 2 .

Pela análise do mapa de contornos COSY (Figura 1.35) foi possível atribuir os acoplamentos entre os hidrogênios H13 e H18, bem como entre H12 e H17, estabelecendo-se assim a conectividade dos átomos presentes no anel macrocíclico da bislactona.



**Figura 1.35** - Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 2.

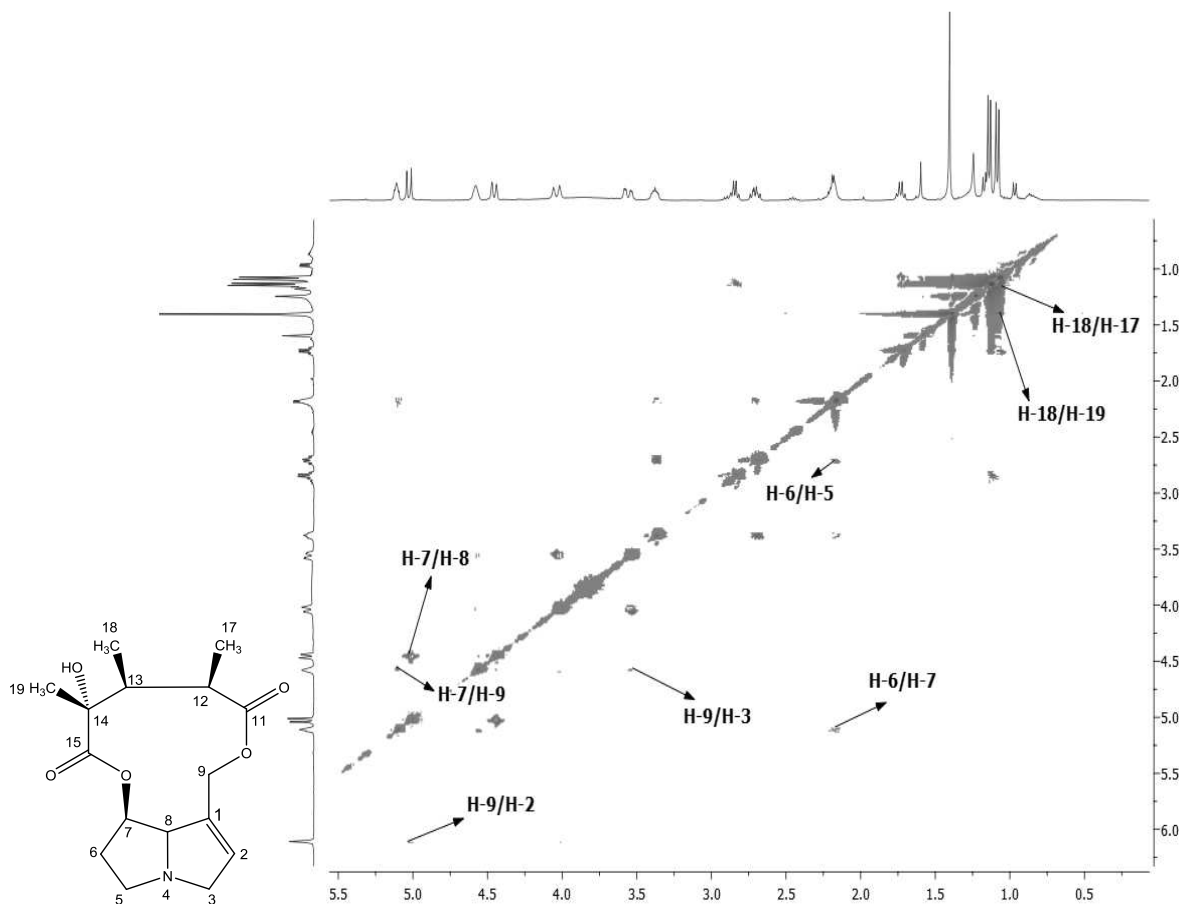
Na figura 1.36 estão representadas as correlações COSY presentes na base necina e observadas no espectro. Além dessas, tem-se as correlações presentes no diéster macrocíclico.



**Figura 1.36** – Correlações observadas no espectro COSY da substância 2.

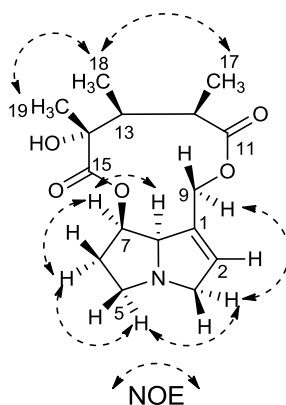
Por meio do espectro NOESY (Figura 1.37) definiu-se a estereoquímica da base necina através das seguintes correlações NOE: H-6/H-5; H-6/H-7; H-7/H-8; H-

7/H-9; H-9/H-3; H-9/H-2. A configuração relativa do carbono (C-14) foi determinada pela correlação com (H-18). A configuração do carbono (C-13) foi determinada através da correlação NOE com (H-17) e (H-19).



**Figura 1.37** - Mapa de contornos NOESY (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância 2.

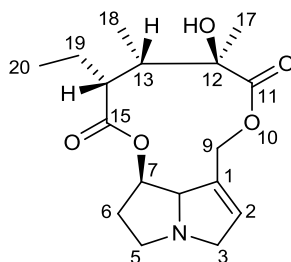
Na figura 1.38, estão representadas todas as correlações NOE presentes no espectro NOESY da substância 2.



**Figura 1.38**- Correlações NOE observadas no espectro NOESY do alcaloide 2.

### 1.3.5.3 Substância 3

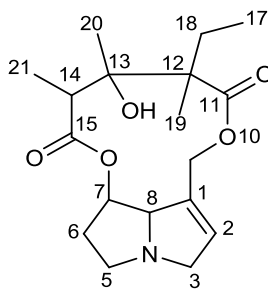
Para o alcaloide 3 (Figura 1.39) foi dedicado um capítulo a parte (capítulo 3 – Página 76) devido a utilização de metodologias complementares para determinar de forma inequívoca a estereoquímica dessa molécula.



**Figura 1.39** - Estrutura da substância 3.

### 1.3.5.4 Substância 4

A fórmula estrutural desta substância, representada na figura 1.40, foi definida a partir do estudo dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC, HMBC e COSY. Através de HR-ESI-MS foi proposta a fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_5$  desse novo alcaloide pela massa molecular obtida em  $m/z$  337,1889.



**Figura 1.40** – Fórmula estrutural do alcaloide 4 sem a determinação da configuração relativa dos carbonos quirais.

Assim como nas estruturas anteriormente elucidadas, essa substância também indicou a presença de uma bislactona macrocíclica de onze membros, em que os principais sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 1.41) e de  $^{13}\text{C}$  (Figura 1.42) foram: dois simpletos metílicos em [ $\delta$  H 1,39 (3H, s),  $\delta$  C 28,9, Me-19] e [ $\delta$  H

1,17 (3H, s),  $\delta$  C 19,8, Me-20]; dois simpletos metilênicos [ $\delta$  H 1,95 (s, 1H); 1,35 (s, 1H),  $\delta$  C 32,8, C-18]; um tripleto metílico [ $\delta$  H 0,81 (t, 3H,  $J = 7,6$  Hz),  $\delta$  C 8,9, C-17]; um duplete metílico em [ $\delta$  H 1,14 (d,  $J = 7,5$  Hz, 3H);  $\delta$  C 13,4, Me-21]; um grupo metileno oxigenado em [ $\delta$  H 3,93 (1H, d,  $J = 16,6$  Hz, H-9 $\alpha$ ) e  $\delta$  H 3,45 (1H, dd,  $J = 16,6; 5,2$  Hz, H-9 $\beta$ ),  $\delta$  C 61,7, (C-9)]; um metino oxigenado em [ $\delta$  H 5,16 (1H, m),  $\delta$  C 74,1, (C-7)]; um carbono quaternário oxigenado em [ $\delta$  C 77,0, (C-13)]; duas carbonilas em [ $\delta$  C 176,9, (C-11) e  $\delta$  C 174,3, (C-15)]; dois carbonos amino metilênicos [ $\delta$  C 61,0, (C-3) e  $\delta$  C 54,1, (C-5)]; um carbono amino metínico [ $\delta$  C 77,0, (C-8)]; dois carbonos olefínicos em [ $\delta$  C 132,0, (C-1) e  $\delta$  C 135,6, (C-2)]; e um carbono metilênico em [ $\delta$  C 34,5, (C-6)]. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  estão descritos na Tabela 1.9.

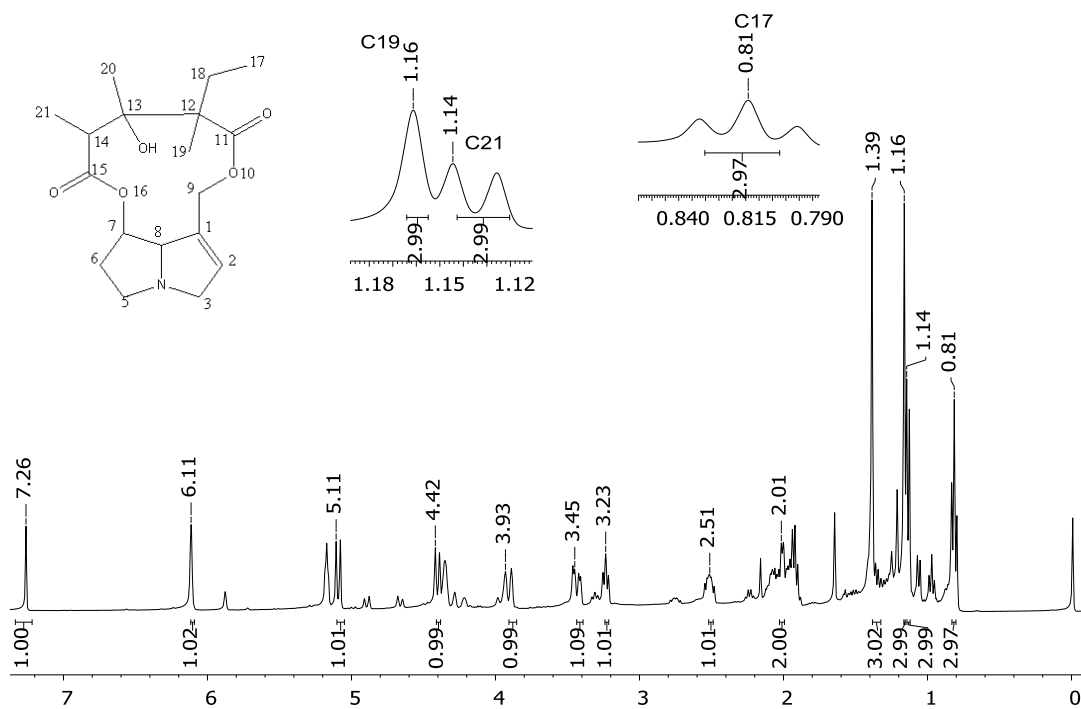


Figura 1.41 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 4.

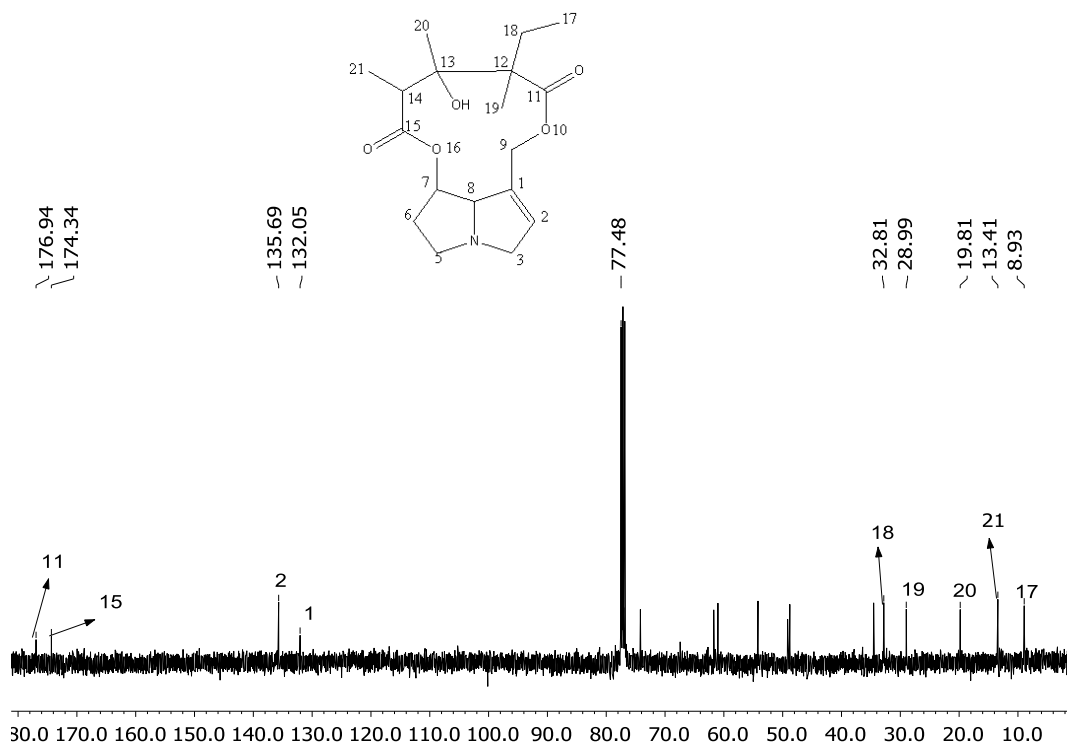


Figura 1.42 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da substância 4.

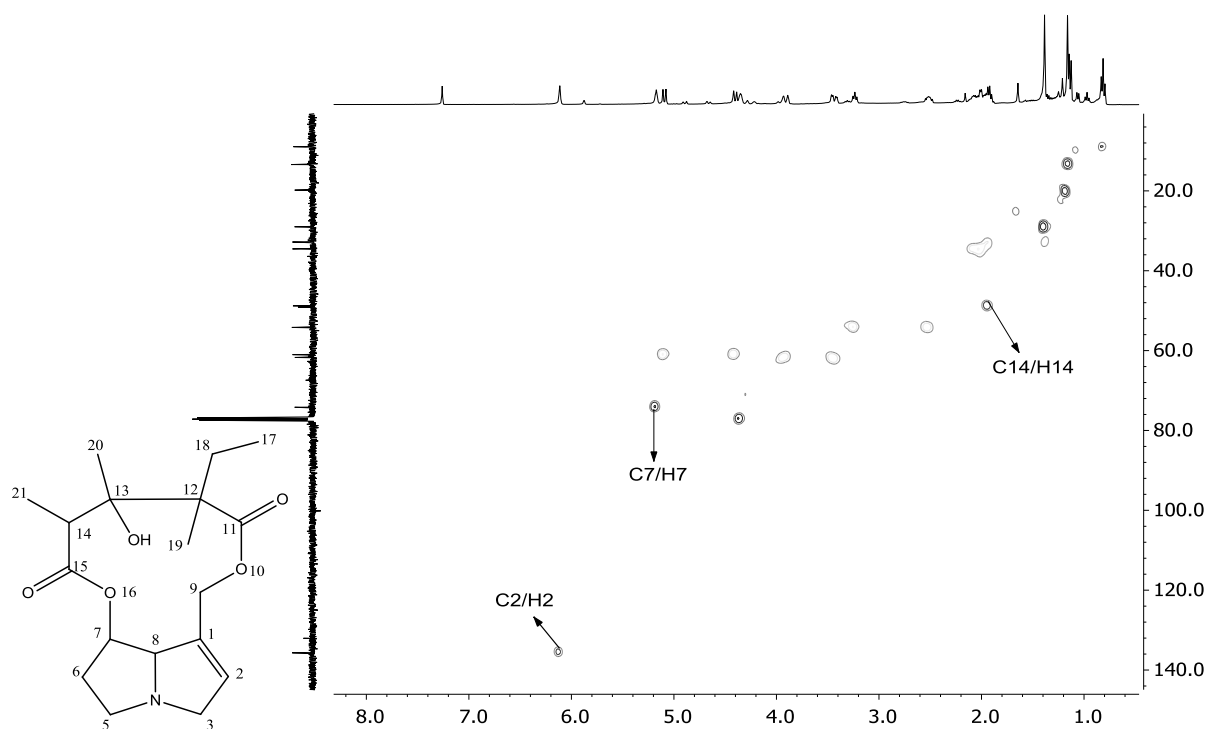
**Tabela 1.9** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 4.

Carbono	$^*\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$^{**}\delta^1\text{H}$ (ppm)
1	132,0	-
2	135,6	6,12 (s; 1H)
3	61,0	H $\alpha$ 5,11 (d, $J = 11,7$ Hz; 1H) e H $\beta$ 4,42 (d, $J = 11,7$ Hz; 1H)
5	54,1	H $\alpha$ 3,24 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H) e H $\beta$ 2,52 (m, 1H)
6	34,5	2,02 (d, 2H, $J = 5,6$ Hz)
7	74,1	5,16 (s, 1H)
8	77,0	4,36 (s, 1H)
9	61,7	H $\alpha$ 3,93 (d, $J = 16,6$ Hz, 1H); H $\beta$ 3,45 (dd, $J = 16,6$ ; 5,2 Hz, 1H)
11	176,9	-
12	49,1	-
13	77,0	-
14	48,7	1,93 (s, 1H)
15	174,3	-
17	8,9	0,81 (t, 3H, $J = 7,6$ Hz)
18	32,8	1,95 (m, 1H); 1,35 (m, 1H)
19	28,9	1,39 (s, 3H)
20	19,8	1,17 (s, 3H)
21	13,4	1,14 (d, $J = 7,5$ Hz, 3H);

Legenda:  $^*\delta^{13}\text{C}$  (ppm): Deslocamento químico de carbono em partes por milhão;

$^{**}\delta^1\text{H}$  (ppm): Deslocamento químico de hidrogênio em partes por milhão

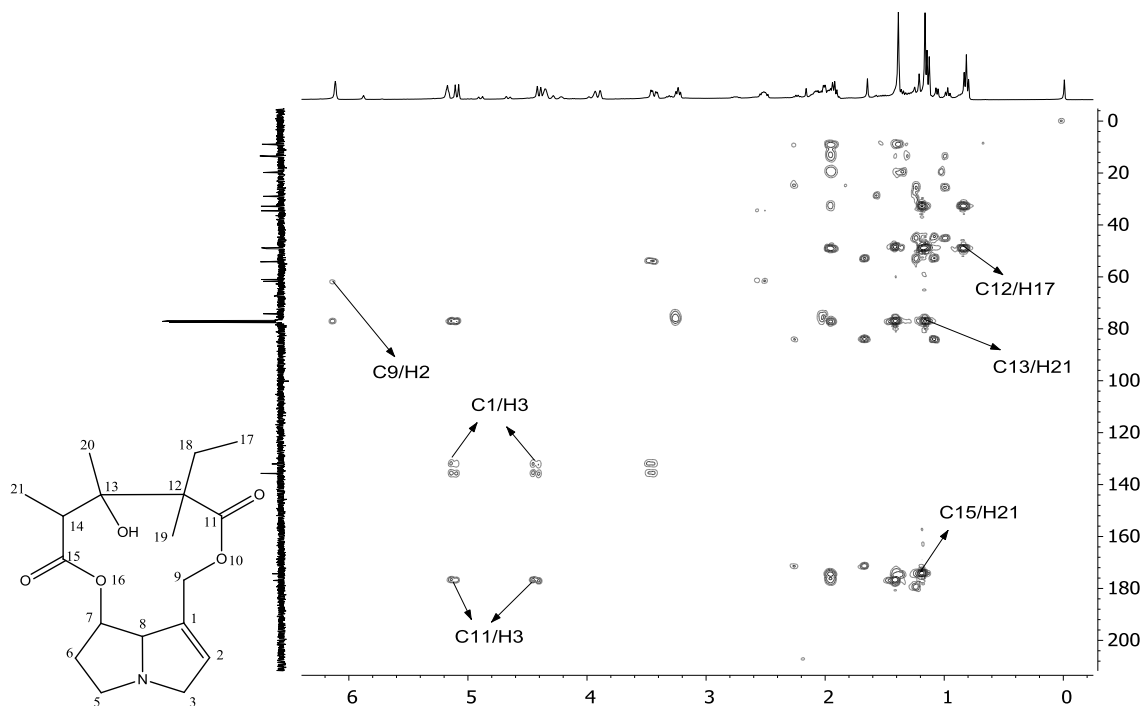
Através da análise do espectro 2D HSQC ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (Figura 1.43) foi possível estabelecer as seguintes correlações: [ $\delta$  H 6,12 (H-2),  $\delta$  C 135,6 (C-2)]; [ $\delta$  H 5,16 (H-7),  $\delta$  C 74,1 (C-7)]; [ $\delta$  H 1,93 (H-14),  $\delta$  C 48,7 (C-14)].



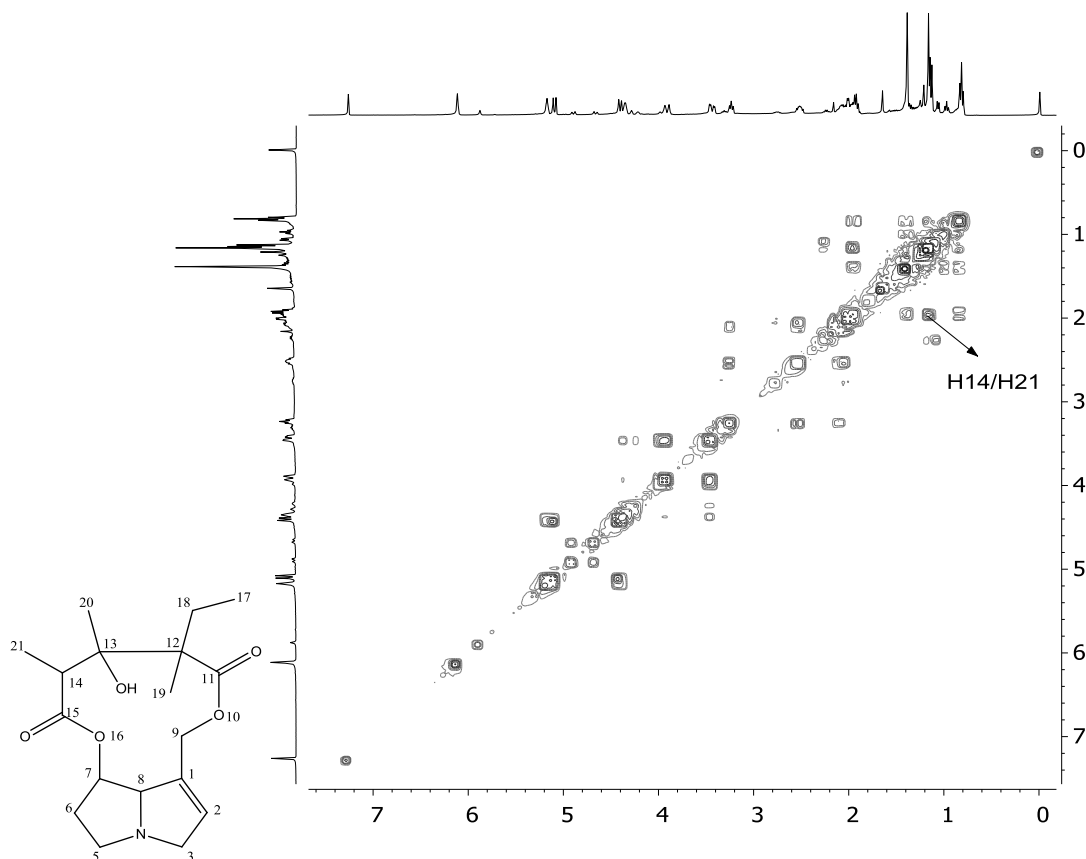
**Figura 1.43** - Mapa de contornos HSQC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 4.

Os carbonos quaternários foram determinados através do espectro de correlação ( $^3\text{-}^4J_{\text{C-H}}$ ) HMBC (Figura 1.44). As seguintes correlações são observadas neste espectro: [ $\delta$  H 5,11 e 4,42 (H-3),  $\delta$  C 132,0 (C-1)]; [ $\delta$  H 5,11 e 4,42 (H-3),  $\delta$  C 176,9 (C-11)]; [ $\delta$  H 0,81 (H-17),  $\delta$  C 49,1 (C-12)]; [ $\delta$  H 1,14 (H-21),  $\delta$  C 77,0 (C-13)]; [ $\delta$  H 1,14 (H-21),  $\delta$  C 174,3 (C-15)]; Logo, foram identificados 5 carbonos quaternários nesta estrutura.

Pelo espectro COSY (Figura 1.45) foi possível estabelecer correlação entre H14/H21. Desta forma, pode-se inferir que no anel externo da bislactona macrocíclica estão presentes quatro carbonos quaternários.

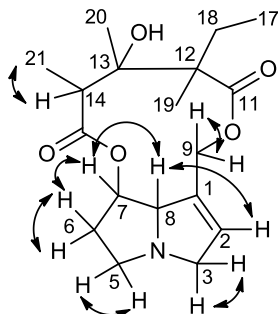


**Figura 1.44** - Mapa de contornos HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 4.



**Figura 1.45** - Mapa de contornos COSY (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 4.

Na figura 1.46 estão representadas as correlações COSY, observadas no espectro, presentes na base necina e no anel macrocíclico externo.



**Figura 1.46** – Correlações observadas no espectro COSY da substância 4.

A configuração relativa dos carbonos quirais da substância 4 não foi possível de ser determinada visto que o espectro NOESY apresentou pequenas impurezas, o que torna a interpretação duvidosa. Além disso, esta substância apresentou-se na forma de óleo o que torna inviável sua análise por Raio-X.

## CAPÍTULO 2: ESTUDO EXPERIMENTAL E TEÓRICO NA CARACTERIZAÇÃO DA MONOCROTALINA POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO E RAMAN

### RESUMO

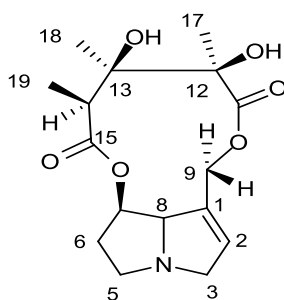
A monocrotalina foi isolada das folhas de *Crotalaria paulina* e caracterizada por espectroscopia no Infravermelho (IV) e Raman com o suporte da teoria do funcional da densidade (DFT). Os espectros no Infravermelho e Raman da monocrotalina foram registados a temperatura ambiente variando numa faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Os cálculos DFT com o funcional híbrido B3LYP e o conjunto de bases 6-31+G(d,p) foram realizados com o objetivo de obter informações sobre as propriedades estruturais e vibracionais da molécula. Foi observada uma boa aproximação entre as frequências experimentais oriundas dos espectros no Infravermelho e Raman e os valores calculados. Assim, realizou-se a completa identificação da monocrotalina por tais técnicas.

## 2.1 Introdução

O gênero *Crotalaria* L. (Leguminosae-Faboideae) pertence à tribo *Crotalaria* (Benth.) Hutch sendo o único dos 11 gêneros com representantes nativos no Brasil<sup>54</sup>. Constitui um dos gêneros mais numerosos da família Fabaceae, com aproximadamente 690 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, particularmente no Hemisfério Sul, e é mais abundante na África e na Índia<sup>7</sup>.

As espécies desse gênero são notórias por produzirem metabólitos secundários, conhecidos como alcaloides pirrolizidínicos (APs) que são uma classe de produtos naturais com aproximadamente 700 compostos relatados, ocorrendo especialmente em plantas das famílias Compositae, Boraginaceae e Fabaceae (gênero *Crotalaria*). Mais de 6.000 espécies produzem este tipo de alcaloide, o que corresponde a 3% das angiospermas<sup>12</sup>. Devido à diversidade de estruturas apresentadas pelos alcaloides, inúmeras atividades biológicas, como nematicidas<sup>55</sup>, antibacteriana<sup>56</sup> e inseticidas<sup>57</sup>, foram descritas para esses compostos.

A monocrotalina (Figura 2.1) é uma bis-lactona formada pela condensação entre um núcleo pirrolizidínico (base necina) e um ácido alifático (ácido néxico). As bases necinas são caracterizadas por ter um sistema bicíclico com um nitrogênio terciário como cabeça de ponte, um grupo hidroximetil em C1 e uma hidroxila em C7.



**Figura 2.1** - Estrutura da monocrotalina

Os APs com uma dupla ligação no carbono C1 são altamente tóxicos para os mamíferos, enquanto os análogos saturados são inofensivos<sup>58</sup>.

Os alcaloides têm propriedades peculiares em relação a outras classes de produtos naturais e, portanto, apresentam seus próprios desafios específicos na elucidação estrutural e estudos de biossíntese. Devido à complexidade destes

compostos, a sua determinação estrutural e o desenvolvimento de novos métodos sintéticos são considerados desafios atraentes para os químicos.

A espectroscopia vibracional é um valioso método com o qual é possível estudar o comportamento dinâmico das estruturas dos alcaloides<sup>8</sup>. As técnicas de espectroscopia Raman e Infravermelho investigam transições vibracionais através da interação da molécula com a radiação eletromagnética, que resulta em informações sobre a geometria molecular, a natureza das ligações químicas presentes nas moléculas e as interações da molécula com o seu meio<sup>59</sup>. Vale ressaltar que, apesar de se basear no processo de interação entre radiação e matéria, cada uma dessas técnicas é baseada em diferentes fenômenos físicos.

A espectroscopia no IV é uma técnica que utiliza a absorção de radiação para obter informações sobre a estrutura molecular. Quando a molécula é irradiada por um feixe na região do Infravermelho, a radiação pode ser absorvida se sua frequência corresponder ao modo vibracional molecular<sup>60</sup>. Por outro lado, a espectroscopia Raman é governada por um processo de dispersão de luz. A mudança de energia entre a luz espalhada elasticamente e inelásticamente fornece informações sobre os modos vibracionais do sistema. A diferença de energia entre o fóton incidente e o fóton dispersado inelásticamente é a energia da transição vibracional molecular no processo Raman<sup>61</sup>.

Esses métodos analíticos são complementares porque, dependendo da simetria, um modo vibracional ativo no IV não é observado na espectroscopia Raman, e uma banda detectada na espectroscopia Raman não é ativa no IV. As espectroscopias IV e Raman são ferramentas não destrutivas, além de serem técnicas rápidas e versáteis. Assim, essas técnicas são de grande importância na química dos produtos naturais<sup>62</sup>.

O uso da espectroscopia Raman e IV para a identificação de produtos naturais foram previamente reportados para carotenóides. Baranska *et al.*<sup>63</sup> relataram espectros vibracionais de vários extratos de espécies de plantas com foco na localização do estiramento vibracional e estiramentos da ligação C=C, para posteriormente concluir que estes são influenciados tanto pelo comprimento quanto pelos substituintes terminais da cadeia de carotenóides e da presença de outros compostos presentes na planta (proteínas, ácidos gordurosos, etc.). Foi possível analisar as mudanças conformacionais dos isômeros *cis* e *trans* dos carotenos

durante o processamento da amostra. Com base nas informações geradas a partir dos espectros Raman destes compostos foi possível obter informações detalhadas sobre os componentes químicos da planta, cuja amostra pode ser avaliada, com sucesso, no material fresco e no processado, permitindo assim a diferenciação através das principais bandas presentes em diferentes espectros de espécies de plantas.<sup>64</sup>

Outra classe de produto natural muito estudada através da técnica de espectroscopia Raman são os terpenos. Talian *et al.*<sup>65</sup> trabalharam com três ácidos fracamente detectáveis (ácido caurenóico, abiético e giberélico) usando diferentes modos de espectroscopia Raman. Devido às semelhanças entre as estruturas analisadas na ausência de grupos altamente polarizáveis, a espectroscopia Raman convencional não é adequada para sua identificação inequívoca. Logo, para aumentar a sensibilidade do método foram utilizadas espectroscopias UV-Raman e espectroscopia Raman de superfície melhorada (SERS). Os espectros UV-Raman destes compostos em etanol / água (50:50) mostraram apenas poucas linhas Raman melhoradas. Os espectros de SERS com excitação em 514 nm também foram relativamente fracos. Os melhores espectros de SERS foram obtidos com excitação em 785 nm com novo substrato nanoestruturado, "silício preto", revestido com uma camada de ouro de 400 nm. Esse espectro mostrou melhorias significativas, e essas "impressões digitais" seriam adequadas para a identificação inequívoca desses ácidos diterpênicos.<sup>14,15</sup>

No estudo de óleos essenciais, realizado por Schulz *et al.*<sup>12</sup>, empregou-se técnicas espectroscópicas (Raman e IV) para a caracterização de óleos essenciais de várias espécies de plantas coletadas na Turquia. Os espectros vibracionais obtidos de ambas as técnicas a partir dos óleos essenciais hidrodestilados do material vegetal seco, ao ar, apresentaram bandas características dos principais componentes voláteis individuais, como por exemplo; carvacrol, timol, *para*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno, cânfora, 1,8-cineol,  $\alpha$ - e  $\beta$ -pineno. A análise dos principais componentes foi efetuada e os dados espectrais proporcionaram uma distinção clara entre as espécies estudadas. Assim, os autores concluíram que as técnicas vibracionais descritas têm o potencial de substituir não apenas os métodos padrões utilizados para fins de controle de qualidade, mas também a avaliação contínua dos processos de destilação.

Na literatura, é possível encontrar vários estudos sobre a aplicação de técnicas espectroscópicas para a determinação de flavonóides<sup>15,66,67</sup>. O trabalho de Baranska *et al.*<sup>16</sup> foi o primeiro a descrever a utilização de espectroscopia Raman para identificação *in situ* de aspalatina e na quantificação das diidrochalconas em rooibos verdes secos (*Aspalathus linearis*). Com o auxílio da espectroscopia de correlação bidimensional, bandas características da aspalatina, assim como flavonoides e antioxidantes que ocorrem em rooibos, foram localizados e detectados nas várias amostras de plantas.

A determinação de alcaloides através de técnicas de espectroscopia Raman e IV já são relatadas na literatura e demonstraram ser ferramentas muito promissoras para a determinação rápida e confiável dos principais alcaloides (morfina, codeína, papaverina, tebaína e noscapina).<sup>14,68</sup> De acordo com Schulz e Baranska<sup>17</sup>, essas técnicas são úteis para fins de controle de qualidade na indústria alimentar, farmacêutica e forense. A espectroscopia Raman mostra numerosas bandas significativas na região entre 700 cm<sup>-1</sup> e 1500 cm<sup>-1</sup>, o que pode estar relacionado às vibrações de deformação e estiramento do sistema de anel do alcaloide. No espectro no IV, podemos verificar a presença de bandas intensas a 1050 cm<sup>-1</sup> que são predominantemente devidas aos estiramentos –C–O–C–. Devido à semelhança estrutural entre as moléculas de morfina, codeína e tebaína, não existem diferenças significativas nos seus espectros Raman. As bandas características são encontradas na faixa de vibrações de estiramento e deformação do anel (1600 cm<sup>-1</sup> e 1650 cm<sup>-1</sup> e 630 cm<sup>-1</sup> e 650 cm<sup>-1</sup>, respectivamente). No entanto, pode-se mencionar que a molécula noscapina, cujo espectro mostra bandas intensas em 1765 cm<sup>-1</sup> no Infravermelho e 1784 cm<sup>-1</sup> no espectro Raman, podem ser atribuídas aos estiramentos vibracionais dos grupos carbonílicos do anel da lactona. Normalmente, ambos os métodos de espectroscopia complementar são ferramentas muito sensíveis para distinguir os alcaloides da papoula e, portanto, permitem a detecção desses compostos em diferentes tecidos vegetais, bem como em vários medicamentos contendo alcaloides, mesmo em baixa concentração.

Nesse sentido, o estudo de espectroscopia vibracional de substâncias bioativas extraída de plantas medicinais é essencial para fornecer informações detalhadas sobre suas propriedades estruturais e vibracionais<sup>69,70,71,72,73</sup>. Até o momento, nenhum estudo experimental e computacional sobre as propriedades

vibracionais da monocrotalina foi relatado. Portanto, a presente investigação foi realizada para preencher essa lacuna e apresentar os espectros vibracionais dessa molécula, com a atribuição dos vários modos normais. Assim, será relatada a caracterização desse alcaloide isolado das folhas de *Crotalaria paulina*.

## **2.2 Material e Métodos**

### **2.2.1 Procedimentos gerais**

As análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel revestidas de alumínio.

Os espectros de Infravermelho por transformada de Fourier foram registrados em um espectrofotômetro Perkin Elmer Paragon 1000 Refletância total atenuada, varredura de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$ .

A análise de Raman foi realizada à temperatura ambiente usando um espectrômetro Renishaw inVia micro-Raman. Para reduzir os efeitos da fluorescência, foi utilizado um laser de 785 nm como excitação. O espectro Raman foi obtido com um laser de 10 mW de potência na amostra por  $50\times$  (N.A = 0.75) na lente de objetiva, resultando em um ponto de laser com poucos micrómetros. Devido ao forte sinal da amostra neste comprimento de onda de excitação, apenas 10s do tempo de exposição e 5 acumulações foram suficientes para um bom espectro. Para melhor precisão, as posições dos picos nos espectros IV e Raman foram obtidas por ajustes de Lorentzian depois de subtrair as linhas de base usando o programa PeakFit 4.12.

O reagente Dragendorff foi preparado misturando-se duas soluções (A e B). A solução (A) contendo 1,7 g de nitrato de bismuto e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água foi misturada com a solução (B) contendo 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água na proporção de 1:1.<sup>49</sup>

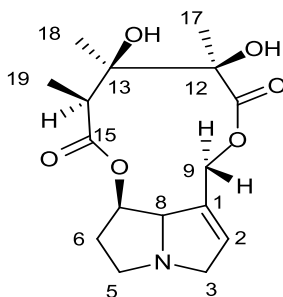
### 2.2.2 Material vegetal

As sementes de *C. paulina* foram plantadas no *Campus* da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Após o crescimento (150 dias), as partes aéreas foram coletadas entre janeiro e março de 2014. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFV sob o número VIC 45165.

### 2.2.3 Isolamento da monocrotalina

Após a secagem e moagem, as partes aéreas (1 kg) foram extraídas exaustivamente com etanol (3 x 2 L) à temperatura ambiente. A mistura etanólica foi filtrada e concentrada sob pressão reduzida para fornecer 98g de extrato. Este extrato foi parcialmente dissolvido em água destilada e depois acidificado até pH 2 – 3, com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 mol  $\text{L}^{-1}$ . Em seguida, a solução aquosa ácida foi particionada três vezes com diclorometano (3 x 150 mL) em funil de separação. As fases orgânicas foram combinadas e concentradas, e os resíduos testados com o reagente de Dragendorff. Esse resíduo foi descartado após teste negativo para alcaloides. A fase aquosa foi submetida a reação com excesso de zinco em pó durante 3 h para reduzir os alcaloides na forma de *N*-óxido para APs na sua forma livre. Em seguida, a solução aquosa ácida foi filtrada e alcalinizada adicionando gota a gota  $\text{NH}_4\text{OH}$  concentrado para elevar o pH para 11-12. Essa solução aquosa básica foi extraída com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : MeOH (4:1) até se obter uma fase orgânica com teste negativo para alcaloides, utilizando Dragendorff. As fases orgânicas foram combinadas e secas com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro, filtradas e evaporadas até à *secura*, proporcionando o extrato alcaloídico (17 g). Parte desse extrato (6,5 g) foi fracionada em coluna de sílica gel (mesh 70-230) e eluída com gradiente de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH (iniciando na proporção de 96:4 até 80:20). As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente os solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH na mesma proporção utilizada no isolamento. A detecção dos APs foi realizada sob inspeção em luz UV a 254 nm, e por pulverização da placa com reagente de Dragendorff. A partir dessa coluna foram coletadas 201 frações de 70 mL cada, e as frações que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes de acordo com o  $R_f$  foram combinadas em 10

novas frações. A monocrotalina (594 mg) representada na figura 2.2 foi isolada a partir da fração 5 até a fração 7.



**Figura 2.2** - Estrutura da monocrotalina.

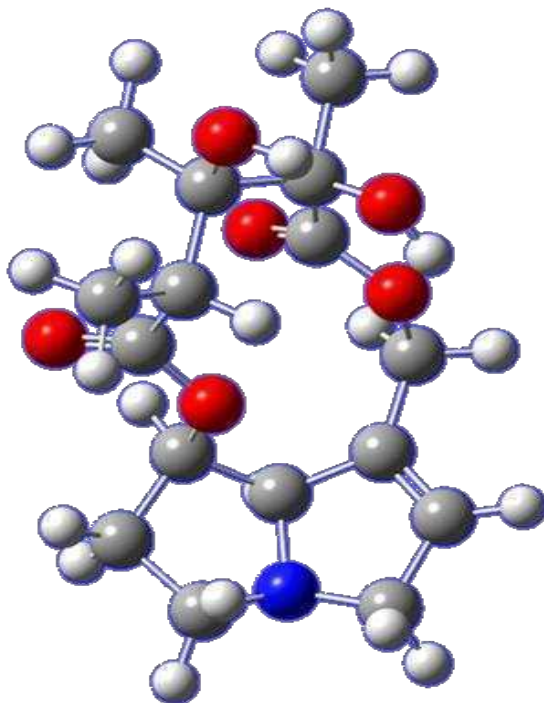
#### 2.2.4 Estudo Computacional

A otimização da geometria e as pesquisas conformacionais foram realizadas com o campo de força da mecânica molecular (MMFF) no Spartan14v118 [<https://www.wavefun.com/>]. O conformero mais estável foi então submetido à otimização da geometria e ao cálculo de frequência utilizando DFT no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p), onde B3LYP é o funcional híbrido de três parâmetros de Becker usando a correlação funcional de Lee – Yang – Parr. A otimização da geometria e o cálculo da frequência foram realizados com o auxílio do programa Gaussian 09.<sup>74</sup> As frequências vibracionais calculadas foram corrigidas multiplicando pelo fator de escalonamento (0,964) conforme determinado a partir dos dados em *Computational Chemistry Comparison and Benchmark DataBase* (CCCBDB; <http://cccbdb.nist.gov/vibscalejust.asp>).

### 2.3 Resultados e discussão

Os espectros de absorção são normalmente complexos, com várias bandas difíceis de serem atribuídas baseando-se apenas em dados de literatura. Com a monocrotalina, que é um alcaloide com três grupos funcionais e três anéis fundidos, não foi diferente. Portanto, para atribuir completamente todas as bandas presentes nos espectros IV e Raman da monocrotalina, foram utilizados cálculos teóricos no

nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p). A estrutura tridimensional otimizada da monocrotalina está representada na figura 2.3.



**Figura 2.3** – Estrutura da monocrotalina otimizada no nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p).

A atribuição completa de todos os modos vibracionais observados nos espectros IV e Raman são mostradas na Tabela 2.1. As bandas mais relevantes observadas nos espectros experimentais no IV e Raman são discutidos abaixo.

### 2.3.1 Vibrações do grupo carbonílico

A bis-lactona macrocíclica possui duas carbonilas. Logo, duas bandas distintas foram observadas, através de cálculos teóricos, para o estiramento das carbonilas, sendo uma de maior intensidade do que a outra. A banda em  $1721\text{ cm}^{-1}$  (menor) é devido ao estiramento da carbonila [C = O (15)], enquanto a banda em  $1733\text{ cm}^{-1}$  (maior) está associada à carbonila [C = O (11)]. Nos espectros experimentais, a sobreposição dessas bandas dificulta a observação destas

separadas, mas após a deconvolução dos dados é possível distinguir as duas bandas nos espectros IV e Raman (ANEXO A).

No espectro IV, foram observadas bandas em  $1717\text{ cm}^{-1}$  e  $1730\text{ cm}^{-1}$ , sendo estas atribuídas aos carbonos 15 e 11, respectivamente. No Raman, foram observadas bandas em  $1720\text{ cm}^{-1}$  e  $1731\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo aos carbonos 15 e 11, respectivamente. A superposição dessas bandas é devida a vibração da carbonila da lactona.

### 2.3.2 Vibrações do grupo alqueno

Os alcenos não conjugados são caracterizados pelo estiramento da ligação dupla C = C, cuja banda resultante de intensidade moderada a fraca aparece na região entre  $1667\text{ cm}^{-1}$  e  $1640\text{ cm}^{-1}$  no Infravermelho. A presença de um pico, no espectro de Infravermelho, depende da variação no momento de dipolo da ligação e este pode ser o motivo da ausência desta banda. No entanto, a vibração da ligação dupla carbono-carbono foi observada no espectro Raman em  $1664\text{ cm}^{-1}$  pois essa técnica independe da variação do momento de dipolo. A presença da carbonila foi evidente no IV enquanto que a banda devido à ligação C=C foi intensa no espectro Raman. A presença de uma banda em uma técnica e ausência na outra mostra a complementaridade dessas técnicas.

### 2.3.3 Vibrações do grupo amina

As bandas de absorção das aminas estão localizadas na região entre  $1250\text{ cm}^{-1}$  e  $1020\text{ cm}^{-1}$ , e são devidas ao estiramento da ligação C-N.

Nos espectros experimentais IV e Raman é possível perceber bandas em  $1184\text{ cm}^{-1}$ . Os dados gerados por cálculos teóricos exibem em  $1179\text{ cm}^{-1}$  o estiramento relacionado à ligação C-N que influencia e, conseqüentemente, deforma todo o esqueleto bicíclico do alcaloide pirrolizidínico. O estiramento da ligação Csp<sup>3</sup>-H (CH<sub>2</sub> e CH do esqueleto pirrolizidínico) é observado em  $2854\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros experimentais no IV e Raman exibem bandas entre  $2847\text{ cm}^{-1}$  e  $2863\text{ cm}^{-1}$  devido aos grupos CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e CH.

#### 2.3.4 Vibrações do grupo hidroxila

Sabe-se que o grupo hidroxila pode exibir bandas de diferentes intensidades e frequências. Essa dependência pode ser atribuída à presença ou ausência de uma ligação de hidrogênio na molécula. No caso de moléculas que não exibem ligação de hidrogênio, uma banda de baixa intensidade no espectro de Infravermelho pode ser observada na região entre  $3650\text{ cm}^{-1}$  e  $3584\text{ cm}^{-1}$ . Por outro lado, quando essa interação intermolecular está presente, o estiramento da hidroxila é observado na região de  $3550\text{ cm}^{-1}$  e  $3200\text{ cm}^{-1}$ . No espectro experimental IV, observa-se uma banda de baixa intensidade localizada em  $3497\text{ cm}^{-1}$ , o que é explicado pela ligação de hidrogênio. No espectro Raman, a banda referente à hidroxila não foi observada, porém os cálculos teóricos apresentaram o estiramento axial de duas hidroxilas presentes na molécula. Uma delas está conectada ao carbono 12 em  $3657\text{ cm}^{-1}$  e a outra ao carbono 13 em  $3615\text{ cm}^{-1}$ , ambas situadas no anel macrocíclico externo. A grande diferença entre os valores experimentais e calculados para o estiramento da hidroxila é porque nos cálculos teóricos a ligação de hidrogênio não é considerada.

#### 2.3.5 Vibrações dos grupos metilas

Ao examinar a estrutura da monocrotalina, é possível a presença de três grupos metilas conectados aos carbonos 12, 13 e 14 do anel macrocíclico. As bandas referentes ao estiramento desses grupos estão localizadas em torno de  $2900\text{ cm}^{-1}$  nos espectros experimentais. No entanto, estas ramificações são claramente visíveis e diferenciáveis no espectro DFT. O estiramento da ligação C-H para as metilas ligadas aos carbonos 12, 13 e 14 estão localizados em  $3050\text{ cm}^{-1}$ ,  $3060\text{ cm}^{-1}$  e  $3047\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

As frequências vibracionais experimentais se aproximaram mais dos valores teóricos, multiplicando as frequências calculadas pelo fator de correção 0,964, conforme mencionado no tópico 2.2.4. Isto acontece, pois, o cálculo da estrutura eletrônica é aproximado. As melhores aproximações, pelo fator de correção, são obtidas em frequências mais baixas do que em frequências mais altas (Tabela 2.1).

### 2.3.6 Vibração do hidrogênio vinílico

O estiramento vibracional da ligação  $Csp^2$ -H está localizado em  $3072\text{ cm}^{-1}$  em oposição aos estiramentos da ligação  $Csp^3$ -H que ocorrem ao redor de  $2900\text{ cm}^{-1}$ . Isso ocorre, pois, a ligação  $Csp^2$ -H é mais forte do que a ligação  $Csp^3$ -H. A banda em  $3072\text{ cm}^{-1}$  é muito pequena nos espectros IV e Raman, já que a monocrotalina é uma molécula relativamente grande e possui apenas um grupo  $Csp^2$ -H. A deformação vibracional da ligação  $Csp^2$ -H ocorre em  $1224\text{ cm}^{-1}$  no IV e  $1226\text{ cm}^{-1}$  no espectro Raman. A atribuição da banda relacionada ao estiramento da ligação  $Csp^2$ -H poderia ser feita consultando dados tabelados de Infravermelho. Entretanto, sua vibração deformacional não poderia ser feita usando a mesma estratégia. Assim, essa atribuição foi realizada com o auxílio de cálculos teóricos.

### 2.3.7 Deformação esquelética e o modo vibracional de respiração do anel

Em regiões de baixa frequência, tanto no espectro IV quanto no Raman, é possível notar a presença de várias bandas cuja atribuição, sem o auxílio de cálculos teóricos, seria impossível de ser feita. Nesse sentido, nota-se no IV uma banda de intensidade média localizada em  $1110\text{ cm}^{-1}$ , e no Raman, uma banda de baixa intensidade em  $1102\text{ cm}^{-1}$ . Os dados teóricos mostram que a banda em  $1110\text{ cm}^{-1}$  corresponde a uma deformação esquelética.

As bandas presentes no espectro Infravermelho em  $563\text{ cm}^{-1}$  e no espectro Raman em  $565\text{ cm}^{-1}$  correspondem, com base nos cálculos teóricos, a um modo vibracional denominado de respiração do anel em  $569\text{ cm}^{-1}$ .

Os espectros experimentais no IV e Raman são mostrados na figura 2.4. Os dados experimentais de IV e Raman assim como a atribuição dos dados calculados estão resumidos na Tabela 2.1.

**Tabela 2.1** – Dados calculados e experimentais de Raman e IV e suas respectivas atribuições para a monocrotalina.

$\nu$ Calculado -1 cm	$\nu$ IV exp. -1 cm	$\nu$ Raman exp. -1 cm	Intensidade IV (%)	Atividade Raman (%)	Depolar(u)	Depolar(p)	Atribuições
3657	3497	-	42	18	0,1902	0,1051	$\nu$ O-H (C <sub>12</sub> )
3615	3497	-	19	23	0,1831	0,1008	$\nu$ O-H (C <sub>13</sub> )
3083	3072	3072	4	61	0,4404	0,2824	$\nu$ C <sub>sp<sup>2</sup></sub> -H (C <sub>2</sub> )
3060	-	-	1	12	0,8451	0,7317	$\nu$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (C <sub>18</sub> )
3050	-	-	1	19	0,8473	0,7350	$\nu$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (C <sub>17</sub> )
3047	-	-	3	27	0,7685	0,6241	$\nu$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (C <sub>19</sub> )
2866	2863	2863	21	100	0,2387	0,1355	$\nu$ C-H (C <sub>3</sub> )
2854	2855	2855	11	64	0,4342	0,2773	$\nu$ C-H (C <sub>8</sub> )
2849	2847	2847	28	10	0,4258	0,2755	$\nu$ C-H (C <sub>5</sub> )
1733	1731	1731	100	4	0,0526	0,0270	$\nu$ C=O (C <sub>11</sub> )
1721	1717	1720	26	1	0,5059	0,3386	$\nu$ C=O (C <sub>15</sub> )
1651	-	1662	1	28	0,2366	0,1341	$\nu$ C=C (C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> )
1386	1385	1386	10	0,4	0,5132	0,3452	$\delta$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (C <sub>18</sub> )
1364	-	-	1	0,2	0,8391	0,7228	$\delta$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (C <sub>19</sub> )
1356	1359	1360	2	1	0,8431	0,7287	$\delta$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (C <sub>17</sub> )
1296	1300	1295	0.7	1	0,8521	0,7423	$\delta$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (base necina)
1240	1242	-	61	4	0,3902	0,2424	$\delta$ C <sub>sp<sup>3</sup></sub> -H (base necina)
1223	1224	1226	5	4	0,7384	0,5852	$\delta$ C <sub>sp<sup>2</sup></sub> -H
1179	1184	1184	14	1	0,3343	0,2007	$\nu$ C-N
1110	1107	-	33	1	0,7106	0,5511	Deformação esquelal

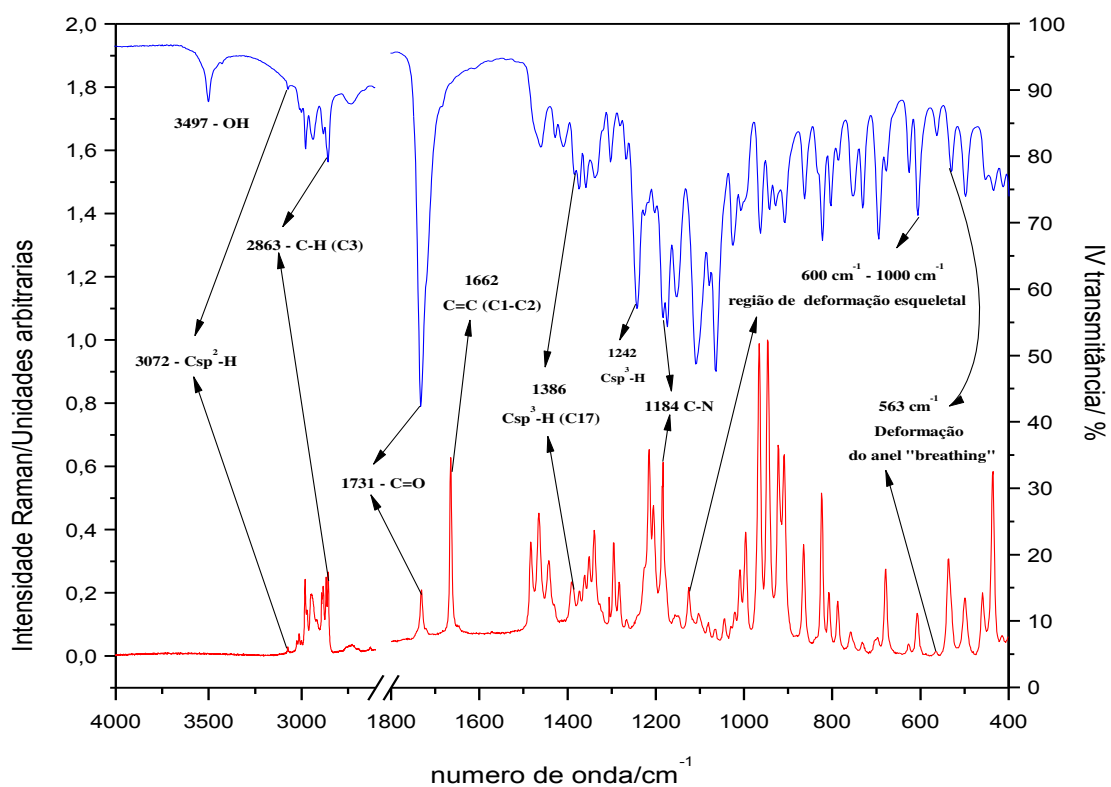
continuação...

$\nu$ Calculado -1 cm	$\nu$ IV exp. -1 cm	$\nu$ Raman exp. -1 cm	Intensidade IV (%)	Atividade Raman (%)	Depolar (u)	Depolar (p)	Atribuições
1068	1064	1064	12	0,8	0,8470	0,7347	Deformação esquelal
1022	1025	-	1	1	0,8543	0,7456	Deformação esquelal
867	863	864	3	0,4	0,6840	0,5197	Deformação esquelal
797	803	-	9	0,4	0,7958	0,6609	Deformação esquelal
758	-	758	2	1	0,3507	0,2126	Deformação esquelal (ácido néxico)
723	729	729	5	1	0,6960	0,5338	Deformação esquelal
693	697	698	1	0,3	0,6949	0,5324	Deformação esquelal
569	563	563	4	1	0,6358	0,4661	Deformação do anel "breathing"

Nota: A vibração molecular (deformação e estiramento da ligação) é disponibilizada através do arquivo de saída do Gaussian (log file). Este arquivo pode ser executado pelo GaussView (<http://www.gaussian.com>).

<sup>a</sup> B3LYP/6-31+G(d,p)//campo de força da mecânica molecular.

<sup>b</sup>  $\delta$  Vibração de deformação;  $\nu$  Vibração de estiramento



**Figura 2.4 – Espectro Raman e IV da monocrotalina.**

Para o espectro Raman, a linha de base foi ajustada e a intensidade normalizada. Ambos os espectros foram cortados de 2600 até 1800  $\text{cm}^{-1}$  para destacar as principais bandas.

### **CAPÍTULO 3: UM NOVO ALCALOIDE ISOLADO DE *Crotalaria paulina* E CARACTERIZADO POR RMN E CÁLCULOS DFT**

#### **RESUMO**

Os alcaloides pirrolizidínicos (APs) são metabólitos secundários encontrados no gênero *Crotalaria*, conhecidos por terem várias atividades biológicas. Uma nova bislactona macrocíclica foi isolada e purificada a partir das folhas de *Crotalaria paulina*. Esse alcaloide foi identificado com o auxílio da espectrometria de massas de alta resolução e técnicas avançadas de ressonância magnética nuclear. A completa definição da estereoquímica dos centros estereogênicos do alcaloide foi realizada comparando-se os deslocamentos químicos teóricos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de oito estruturas candidatas com os dados experimentais. A melhor equivalência entre os dados teóricos das oito estruturas candidatas e os dados experimentais foi definida pelas análises estatísticas DP4 e pelo cálculo do erro absoluto médio (EAM).

### 3.1 Introdução

O gênero *Crotalaria*, com aproximadamente 690 espécies, é considerado um dos principais gêneros da família Fabaceae. As espécies desse gênero são conhecidas por produzirem metabólitos secundários denominados alcaloides pirrolizidínicos, os quais desempenham um importante papel na defesa química dessas plantas.<sup>12</sup>

Atualmente, os APs são conhecidos por suas propriedades hepatotóxicas, cancerígenas, mutagênicas, teratogênicas e pneumotóxicas. Nesse sentido, existem inúmeros casos de intoxicação humana e animal decorrentes do consumo de plantas ricas em APs ou produtos contaminados com esses compostos.<sup>75,76,77</sup>

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma ferramenta poderosa para determinar a estrutura de novos compostos, permitindo a caracterização de moléculas complexas com poucos miligramas de amostra.<sup>78,79,80</sup> No entanto, mesmo com esse suporte, é comum encontrar na literatura informações estruturais incompletas ou erradas. Uma das razões para a determinação equivocada da estereoquímica de um produto natural reside no elevado gasto de tempo e recursos financeiros, se caso o interesse do grupo de pesquisa for a síntese total para confirmação da estereoquímica desta substância.<sup>81</sup>

Nesse contexto, os métodos modernos de química computacional, especialmente a DFT (teoria do funcional da densidade), tornaram-se essenciais para a confirmação da estereoquímica de uma molécula. Essa abordagem começou com Bifulco em 1987<sup>82</sup> e agora podemos encontrar na literatura vários estudos relacionando cálculos teóricos com deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C.<sup>83,84,85</sup> Também é comum encontrar trabalhos para confirmar ou determinar a estereoquímica de várias classes de produtos naturais, como; alcaloides,<sup>86</sup> flavonóides,<sup>87</sup> cumarinas,<sup>88</sup> esteróides,<sup>89</sup> lignanas<sup>90</sup> e catequinas.<sup>91</sup>

A abordagem utilizada para determinar a estereoquímica de uma molécula consiste em calcular os deslocamentos químicos para as estruturas candidatas, realizando-se a média ponderada de Boltzmann dos deslocamentos calculados para todos os confórmeros candidatos e depois compará-los com os dados experimentais, a fim de decidir qual estrutura possui melhor equivalência.<sup>92,93</sup>

Para a correlação linear entre os deslocamentos químicos experimentais e calculados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , há vários métodos estatísticos descritos na literatura e os mais importantes são o erro absoluto médio  $\text{EAM (ppm)} = \frac{1}{n} \sum |\sigma_{\text{Calc}} - \sigma_{\text{Exp}}|$  e a raiz da média dos quadrados  $\text{RMS (ppm)} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (\sigma_{\text{Calc}} - \sigma_{\text{Exp}})^2}$ . Esses métodos dão uma dimensão de aproximação entre dados experimentais e calculados.<sup>94,95,86</sup>

A técnica computacional para a análise do EAM é às vezes considerada inconveniente, pois a etapa de otimização da geometria é demorada. Atualmente, métodos inovadores que fornecem estruturas otimizadas com menor tempo têm sido desenvolvidos.<sup>96</sup>

O uso da DFT (B3LYP ou similar) acoplada com o conjunto de bases 6-31+G(d,p) funciona corretamente para moléculas orgânicas comuns. Esses níveis de teoria são considerados aceitáveis para moléculas de tamanho médio. Entretanto, para moléculas maiores o tempo de processamento se torna longo visto que, a contribuição relativa de cada conformero deve ser considerada na análise de distribuição de Boltzmann. Portanto, o tempo de processamento dos cálculos é considerado um fator relevante em ocasiões em que a velocidade é considerada essencial.<sup>97</sup>

Grande mérito no desenvolvimento dessa área é atribuído a Smith e Goodman (2009), que introduziram métodos estatísticos (CP3 e DP4) para a determinação da estereoquímica, comparando os deslocamentos químicos calculados e experimentais. Esses métodos são acessíveis devido à disponibilidade de um *web site* hospedado na Universidade de Cambridge. O parâmetro CP3 foi desenvolvido para atribuir dois conjuntos de dados experimentais a duas estruturas candidatas, enquanto o DP4 é usado para decidir entre dois isômeros com apenas um conjunto de dados experimentais.<sup>98</sup>

Considerando o interesse por metabólitos secundários bioativos produzidos por plantas e fungos, o grupo envolvido nesta presente pesquisa tem trabalhado na busca de novas moléculas com potencial atividade biológica.<sup>99,100</sup> Publicações recentes relatam o isolamento e a caracterização de produtos naturais, bem como a produção de seus derivados sintéticos. Cálculos teóricos também já foram utilizados

para a determinação estrutural de vários produtos, originados de forma imprevisível, formados após reações de Diels-Alder.<sup>101,102</sup>

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi útil na purificação de um produto natural não cristalino, portanto, inadequado para o estudo de difração de raio-X. Todavia, os métodos modernos de RMN permitiram a realização de estudos estruturais com uma quantidade mínima de amostra. Após análise detalhada do espectro NOESY, a estereoquímica do anel macrocíclico superior não pôde ser definida de forma precisa. Portanto, a interpretação dos espectros experimentais de RMN foi combinada com cálculos teóricos mecânicos quânticos para oito estruturas candidatas, com a finalidade de definirmos de maneira inequívoca a estrutura correta deste novo alcaloide natural.

## **3.2 Material e Métodos**

### **3.2.1 Material vegetal**

Sementes de *C. paulina* foram plantadas no *Campus* da Universidade federal de Viçosa. Uma exsicata da espécie foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Viçosa com o número VIC 45165.

### **3.2.2 Procedimentos experimentais gerais**

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em um cromatógrafo líquido SHIMADZU, composto por duas bombas LC-20AT, detector SPD-20A UV/VIS, software (SHIMADZU) LC solution v.1.21 e coluna ODS HYPERSIL (C18), 250,0 mm x 4,6 mm x 5 µm (SUPELCO). Para a análise semi-preparativa e, por conseguinte, separação dos alcaloides, utilizou-se um cromatógrafo líquido Shimadzu. O equipamento consistiu de uma bomba LC-10AV, detector SPD-10AV UV/VIS, software PC/Chrom + (u8A Scientific) e coluna DYNAMAX Microsorb C-18 10C-5, 250,0 mm x 10,0 mm (VARIAN), protegido por uma pré-coluna. Após os procedimentos semi-preparativos, as amostras foram liofilizadas utilizando o aparelho Termo Fisher SCIENTIFIC FR-Drying.

Para a análise por HRESIMS, (espectrometria de massa de alta resolução – ionização por eletrospray de elétrons) a amostra foi solubilizada em metanol e na sequência, submetida à centrifugação. A amostra foi submetida à análise em um cromatógrafo líquido Shimadzu® LCMS-IT-TOF (225-07100-34), equipado com; colector em linha DGU-20A3, duas bombas modelo LC-20AD, amostrador automático SIL-20A e comunicador Módulo CBM-20A. A ionização foi realizada utilizando eletrospray (ESI). O analisador de massa utilizado foi o de tempo de voo (TOF) com acumulador Ion Trap (IT). A temperatura do bloco de aquecimento foi de 250 °C, a tensão capilar foi de 4,5 kV, a temperatura do CDL foi ajustada a 200 °C e a tensão no detector foi de 1,76 kV.

As folhas coletadas foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçado a uma temperatura de 50 °C. Essas folhas foram então moídas em um moinho tipo Willye da Tecnal, modelo TE 650.

### 3.2.3 Isolamento

A substância foi extraída e parcialmente purificada das folhas de *C. paulina*, seguindo a metodologia descrita por Trigo *et al.*<sup>103</sup> Uma das frações (150 mg) obtida a partir de cromatografia de adsorção de coluna foi submetida a análise por HPLC no modo isocrático, utilizando a seguinte mistura de eluentes: (A) 65% de água e (B) 35% de acetonitrila. A esta solução foi adicionado 0,05% de NH<sub>4</sub>OH (pH 11 ± 0,5). O tempo de corrida ocorreu na faixa de 0,0 a 16,0 min. O volume de injeção foi de 1000 µL, injetado manualmente, com um fluxo constante de 4,0 mL/min. e usando coluna ODS HYPERSIL (C18), 250,0 mm x 4,6 mm x 5 µm (SUPELCO). Os dados cromatográficos foram obtidos, analisados e armazenados em 210 nm. Os fitoquímicos foram separados manualmente e liofilizados, rendendo assim 3,8 mg de etilcrotalina.

### 3.2.4 Métodos de espectroscopia de RMN

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H), carbono (RMN de <sup>13</sup>C), COSY (espectroscopia de correlação), HSQC (correlação heteronuclear simples-quantum), HMBC (correlação heteronuclear de múltiplas

ligações) e NOESY (espectroscopia com efeito nuclear Overhauser) foram obtidos em espectrômetro BRUCKER AVANCE DRX-400. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registradas em ppm e as constantes de acoplamento escalar ( $J$ ) em Hz. O tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interno, tendo o clorofórmio deuterado como solvente. O deslocamento químico dos hidrogênios foram registrados em relação ao sinal do clorofórmio deuterado em  $\delta = 7,26$  ppm. Os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  foram referenciados usando o sinal do  $\text{CDCl}_3$  em  $\delta = 77,16$  ppm.

### 3.2.5 Cálculos Computacionais

Passo 1: Uma estrutura de entrada é desenhada pela primeira vez no Spartan para as estruturas candidatas R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8 e uma biblioteca de conformeros é então gerada, usando uma pesquisa conformacional de mecânica molecular. A pesquisa conformacional foi realizada em fase gasosa usando campo de força da mecânica molecular (MMFF) e procedimento Monte-Carlo, que foi definido especificando o número máximo de conformeros examinados igual a 1000. Todos os conformeros abaixo de  $14 \text{ kcal mol}^{-1}$  de energia foram submetidos às análises DP4 e MAE.

### 3.2.6 Análise DP4

Passo 2: Cada um dos conformeros (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8) (Passo 1) foram submetidos a cálculos de tensores de blindagem no nível de teoria B3LYP/6-3+G(d,p), usando Gaussian 09.<sup>75</sup>

Passo 3: Os tensores de blindagem calculados para cada núcleo foram submetidos à média ponderada de Boltzmann e depois convertidos em valores de deslocamentos químicos empiricamente escalonados para cada núcleo (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8). Os conjuntos de valores resultantes dos tensores de blindagem foram convertidos em deslocamentos químicos ao subtrair o valor do tensor de blindagem do tetrametilsilano (TMS) neste nível de teoria.

Etapa 4: A análise DP4 foi realizada inserindo os deslocamentos químicos calculados e experimentais na ferramenta de análise DP4 disponibilizada online no seguinte *web site*: (<http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>).

### 3.2.7 Análise do erro absoluto médio (EAM)

Passo 5: Cada um dos conformeros R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8 (Passo 1) foram submetidos a otimização de geometria e cálculo de frequência no nível de Teoria M06-2x/6-31+G(d,p), no Gaussian 09. Os valores de frequência fornecem as energias livres usadas na análise de Boltzmann e a possibilidade de verificar se qualquer geometria otimizada não é um ponto de sela local, isto é, estrutura de transição.

Passo 6: Os valores dos tensores de blindagem de RMN foram calculados para cada um dos conformeros otimizados com o funcional B3LYP e o conjunto de base 6-311+G(2d,p), estabelecido no Gaussian 09.

Passo 7: Os tensores de blindagem calculados para cada núcleo foram submetidos à média ponderada de Boltzmann e depois convertidos em valores de deslocamentos químicos empiricamente escalonados para cada núcleo R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8.

Os parâmetros de análise de regressão de Lodewyk *et al.* foram utilizados para referenciar os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Essas operações foram repetidas para cada uma das estruturas candidatas R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8. O conjunto de dados experimentais foi comparado com os dados calculados e os valores do erro absoluto médio foram determinados.

## 3.3 Resultados e discussão

Diante da contribuição das plantas superiores para o desenvolvimento de quimioterápicos a partir de seus metabólitos secundários, os APs são considerados de grande importância farmacológica.<sup>104</sup> Essa classe de substância já foi isolada de uma grande variedade de espécies de plantas, especialmente as do gênero *Crotalaria*. Várias espécies desse gênero têm sido objeto de estudo, levando ao isolamento de APs.<sup>105</sup> O grupo de pesquisa deste trabalho isolou e caracterizou a

monocrotalina a partir da espécie *C. paulina*, um alcaloide cujos dados espectroscópicos já estão descritos na literatura.<sup>106,107</sup> Logo, a partir da experiência com esse tipo de estrutura, foi feita a comparação entre este novo alcaloide isolado e o esqueleto da monocrotalina. Portanto, o ponto de partida desse trabalho foi uma bislactona macrocíclica de 11 membros com um anel bicíclico insaturado. Contudo, foram observadas diferenças espectroscópicas para os dois alcaloides, principalmente no anel macrocíclico superior.

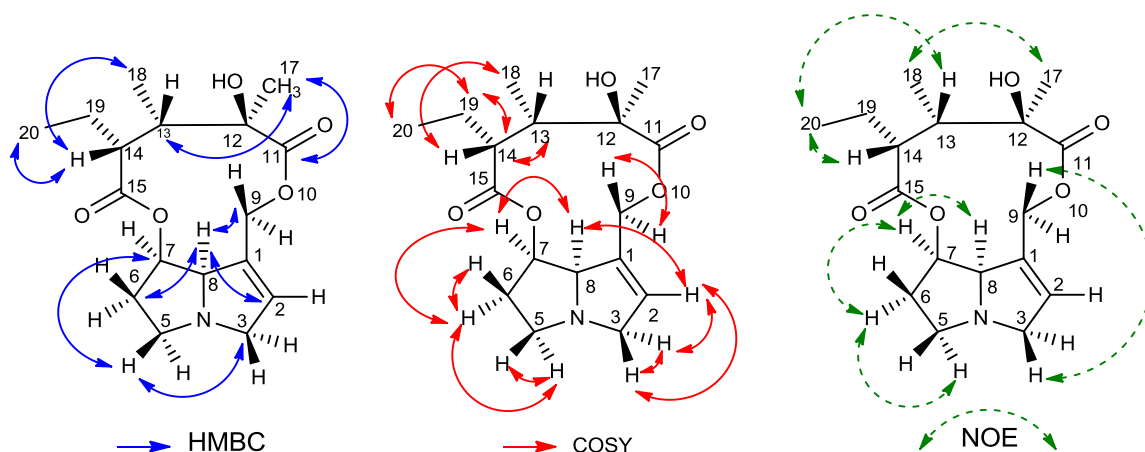
A massa exata do alcaloide foi determinada por eletrospray (HRMS-ESI-TOF) sendo encontrado o valor de  $m/z$  324,1851 [M+H].

No espectro de RMN de hidrogênio (ANEXO B – Figura B1), observou-se um singlete a  $\delta = 6,11$  (s, 1H) correspondente ao H-2 ligado ao carbono olefínico C-2. Os sinais de H-9 e H-9' foram observados como dois dupletos a 4,5 ppm (d,  $J = 11,7$  Hz, 1H) e 5,00 ppm (d,  $J = 11,7$  Hz, 1H), referindo-se ao grupo metileno ligado ao oxigênio. Além desses sinais, observou-se um singlete metílico referente a H-17 com deslocamento químico em  $\delta = 1,41$  ppm (s, 3H), um duplete em  $\delta = 1,11$  ppm (d,  $J = 7,6$  Hz, 3H) para H-18 e um tripleto em  $\delta = 0,87$  ppm (t,  $J = 7,3$  Hz, 3H), relacionado ao H-20. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (ANEXO B – Figura B2) a presença de duas carbonilas pôde ser evidenciada em campo baixo a  $\delta = 176,1$  e  $174,1$  ppm. Além destes, dois sinais na região de carbonos olefínicos em  $\delta = 134,20$  e  $132,71$  ppm correspondem a uma ligação dupla presente no anel bicíclico inferior. Existem também três sinais em campo alto relacionados aos carbonos metílicos 17, 18 e 20, com deslocamentos químicos a 27,3, 12,1 e 12,1 ppm, respectivamente. Os dados espectroscópicos de RMN 1D e 2D estão sumarizados na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1.** Dados de RMN da etilcrotalina em CDCl<sub>3</sub>: Deslocamento químico experimental ( $\delta_{\text{exp}}$ ), multiplicidade (m), constante de acoplamento ( $J$ ) e correlações COSY, NOESY e HMBC.

Átomo	$\delta C_{\text{exp}}$ (ppm)	Átomo	$\delta H_{\text{exp}}$ (ppm) m, $J$ (Hz)	COSY	NOESY	HMBC
C-1	132,8	H-1	-	-	-	-
C-2	135,7	H-2	6,11 (s, 1H)	H3, H3', H9	H3, H4, H9	H3, H9, H9'
C-3	61,1	H-3	3,51 (dd, $J = 16,3, 4.6$ Hz, 1H)	H3', H9	H4, H5, H9	H2, H5
		H-3'	3,90 (d, $J = 16,3$ Hz, 1H)	H3, H8	H2, H3, H9	-
C-5	53,6	H-5	2,60 (m, 1H)	H6, H5'	H3, H6, H7, H13, H20	H3, H6
		H-5'	3,20 (m, 1H)	H6, H5	H5, H7	-
C-6	34,2	H-6	2,10 (m, 2H)	H5, H5', H7	H5, H6	H5, H5'
C-7	75,0	H-7	5,11 (m, 1H)	H6, H8	H7, H9, H18	H5, H5', H6
C-8	76,7	H-8	4,35 (m, 1H)	H3, H3', H7, H2	H3, H4, H6, H7, H8	H2, H6, H9, H9'
C-9	61,6	H-9	4,50 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H)	H3', H9'	H11	H2
		H-9'	5,00 (d, $J = 11,7$ Hz, 1H)	H9	H2	-
C-11	176,1	-	-	-	-	H9, H9', H13, H17
C-12	76,7	-	-	-	-	H13, H14, H18
C-13	46,3	H-13	1,75 (m, 1H)	H14, H18	H20, H21	H14, H18, H19, H19'
C-14	45,7	H-14	2,60 (m, 1H)	H13, H19	H13, H18, H19, H21	H13, H18, H19, H20
C-15	174,1	-	-	-	-	H7, H13, H19
C-17	27,3	H-17	1,41 (s, 3H)	H20, H9'	H18, H20	H13
C-18	12,1	H-18	1,11 (d, $J = 7,6$ Hz, 3H)	H19', H14	H19, H20	H13, H14, H17
C-19	26,6	H-19	1,34 (m, 1H)	H20, H19'	H20, H21	H13, H14, H20
		H-19'	1,79 (m, 1H)	H20, H14	H18, H19, H21	
C-20	12,1	H-20	0,87 (t, $J = 7,3$ Hz, 3H)	H19, H19'	H13, H19	H14, H19

A análise inicial do espectro de RMN de hidrogênio nos permitiu atribuir H2, H9, H9' e os grupos metílicos. Com essas informações e com a análise do espectro COSY, a conectividade dos átomos na molécula foi determinada. As correlações entre os hidrogênios que são acoplados por  ${}^{2-3}J_{H,H}$  (acoplamentos geminais e vicinais) são normalmente observadas nesse experimento bidimensional, o qual permite estabelecer a conectividade dos átomos na estrutura. Como consequência, após análise do espectro COSY (ANEXO B – Figura B3) foi estabelecida as seguintes sequências: **a**: -CH<sub>2</sub> (C-5) -CH<sub>2</sub> (C-6) -CH (C-7) -CH (C-8) -C (C-1) -CH (C-2) -CH<sub>2</sub> (C-3) -[(CH<sub>2</sub> (C9)]; **b**: -CH<sub>3</sub> (C-18) -CH (C-13) -CH (C14) CH<sub>2</sub> (C19) CH<sub>3</sub> (C-20). As correlações mais relevantes estão representadas na figura 3.1.



**Figura 3.1.** Correlações HMBC, COSY e NOE.

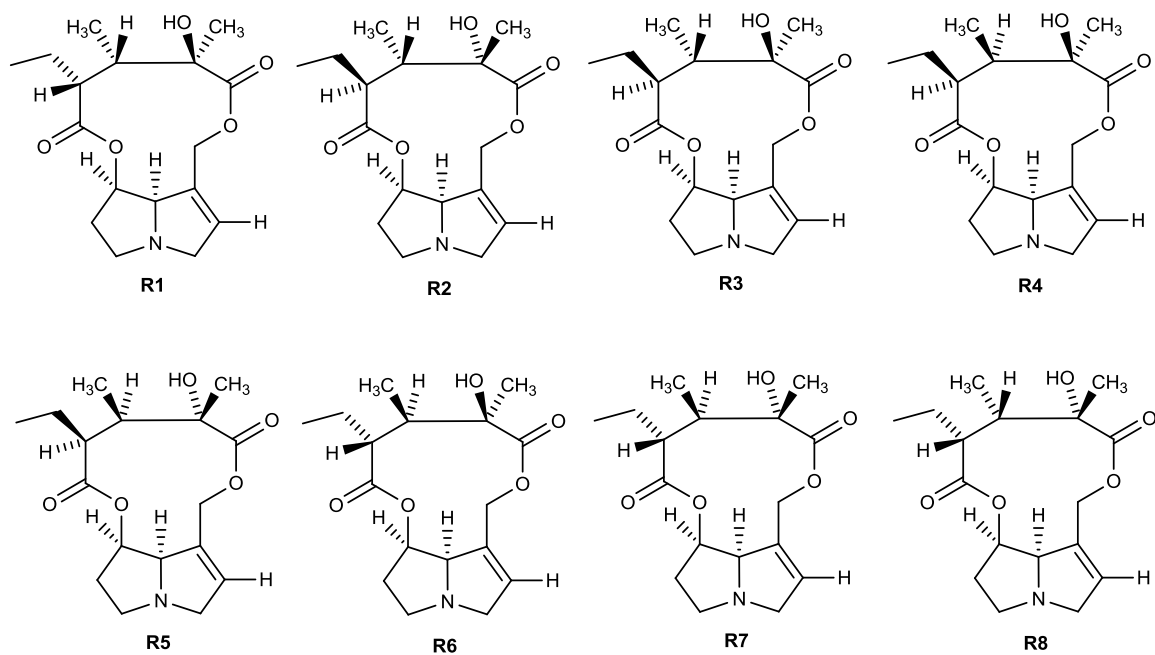
A partir da análise dos espectros de RMN de  ${}^1\text{H}$ ,  ${}^{13}\text{C}$  e COSY, foi possível estabelecer características importantes da molécula. Por outro lado, as correlações dos carbonos não hidrogenados são importantes para auxiliar na elucidação estrutural da molécula. Essas correlações foram obtidas através da análise do espectro HMBC (ANEXO B – Figura B4). A localização do grupo etila no anel macrocíclico foi estabelecida pela correlação entre H-19 com a carbonila C-15 e C-13. A correlação de C-18 (carbono metílico) com H-14 e o hidrogênio (H-18) com C-12 indica que o carbono metílico (C-18) é separado de C-12 e C-14 por C-13 (duas ligações separadas). A localização do segundo grupo carbonílico (C-11) foi determinada pela correlação com H-17 e H-9. Também foi observada correlação do

carbono metílico (C-17) com H-13 e C-17, conectado ao C-12. Assim, análises adicionais pôde-se definir que C-11, C-12, C-13, C-14 e C-15 estão organizados em uma sequência para formar a bislactona macrocíclica.

Após as análises iniciais dos espectros, foi possível estabelecer o esqueleto do alcaloide e a determinação da estereoquímica através do espectro NOESY (ANEXO B – Figura B5). A configuração relativa dessa molécula foi inicialmente atribuída através das correlações NOE observadas entre H-17/H-18; H-7/H-8 indicando que esses átomos estão próximos no espaço. A posição do grupo metil (C-18) foi determinada pela correlação com H-17 (Figura 3.1).

O estudo mecânico quântico computacional para produtos naturais mostra o poder dessa abordagem para distinguir estereoisômeros. Assim, para diferenciar quais das oito estruturas (R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8) são as mais adequadas para o conjunto de dados, utilizamos as metodologias estatísticas DP4 e MAE para avaliar qual dos dados teóricos mais se aproximam dos deslocamentos químicos experimentais de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto natural.

O primeiro método estatístico utilizado foi o DP4, após atribuição dos sinais pela interpretação dos espectros de RMN. Em seguida, foram calculados os deslocamentos químicos de RMN de carbono e hidrogênio para as estruturas candidatas R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8, no nível de teoria B3LYP/6-3+G(d,p) (Figura 3.2)



**Figura 3.2.** Estruturas candidatas R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8.

Na sequência, os deslocamentos químicos calculados bem como, os deslocamentos experimentais foram alinhados e transferidos para o software disponível online em <http://www-jmg.ch.cam.ac.uk/tools/nmr/DP4/>, que calculou a probabilidade de aproximação dos dados de forma prática e rápida.

Esses cálculos foram realizados de três formas distintas. A primeira foi alinhar os dados experimentais com os deslocamentos químicos calculados de  $^{13}\text{C}$  de R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8. Na sequência, os deslocamentos experimentais de hidrogênio foram comparados com os deslocamentos químicos calculados de hidrogênio para R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8. E, finalmente, os deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio foram simultaneamente comparados com os respectivos dados teóricos. Os resultados dessas análises estão resumidos na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2.** Análise DP4 dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para as estruturas candidatas R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8.

Probabilidade DP4 (%) <sup>a</sup>		
Estruturas candidatas	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
R1	100	100
R2	0	0
R3	0	0
R4	0	0
R5	0	0
R6	0	0
R7	0	0
R8	0	0

<sup>a</sup> Os cálculos foram realizados utilizando o nível de teoria B3LYP/6-31+G(d,p)//campo de força da mecânica molecular (MMFF).

De acordo com os resultados da metodologia DP4, os dados experimentais estão mais próximos dos valores calculados da estrutura candidata R1 do que das outras estruturas candidatas. A probabilidade de ser a estrutura R1 foi de 100%, considerando os deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Abordagens alternativas, especialmente aquelas que descrevem outras estratégias para comparação de conjuntos de dados experimentais com dados calculados, são conhecidas. Uma dessas metodologias é o cálculo do erro absoluto médio (EAM). Este é considerado um tratamento efetivo para uso na comparação entre valores experimentais e valores teóricos. Logo, empregou-se esta técnica para avaliar o quão perto os deslocamentos químicos experimentais estão dos deslocamentos teóricos. Para isso, foi necessário realizar os cálculos teóricos para as estruturas candidatas R1, R2, R3, R4 (Tabela 3.3) e R5, R6, R7, R8 (Tabela 3.4), usando uma base mais extensa do que a usada para análise DP4.

Os deslocamentos químicos calculados de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  usando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p) são apresentadas na Tabela 3.3 e 3.4. Os dados experimentais são comparados com os valores teóricos lado a lado e o MAE é calculado utilizando uma planilha.

**Tabela 3.3.** Dados experimentais e calculados de RMN para as estruturas candidatas R1, R2, R3 e R4 na análise do EAM.

H	C	$\delta$ Expt.		Calc. $\delta_H$				Calc. $\delta_C$				$\Delta\delta_H$				$\Delta\delta_C$			
		$\delta_H$	$\delta_C$	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
H-2	C-1	6,11	132,78	6,07	6,02	6,09	6,19	133,98	134,59	132,63	133,50	0,04	0,09	0,02	0,08	1,2	1,81	0,15	0,72
H-3	C-2	3,51	135,70	3,41	3,45	3,33	3,4	136,68	136,49	137,89	137,81	0,1	0,06	0,18	0,11	0,98	0,79	2,19	2,11
H-3'	C-3	3,90	61,08	3,82	3,86	3,92	3,89	60,72	62,35	60,89	61,91	0,08	0,04	0,02	0,01	0,36	1,27	0,19	0,83
H-5	C-5	2,60	53,55	2,48	2,58	2,50	2,64	52,84	51,66	53,90	54,50	0,12	0,02	0,1	0,04	0,71	1,89	0,35	0,95
H-5'	C-6	3,20	34,17	2,99	2,86	3,10	3,15	33,68	30,84	33,67	33,61	0,21	0,34	0,1	0,05	0,49	3,33	0,5	0,56
H-6	C-7	2,10	74,98	2,08	1,97	1,94	1,94	75,27	78,41	70,59	70,70	0,02	0,13	0,16	0,16	0,29	3,43	4,39	4,28
H-7	C-8	5,11	76,67	4,74	4,74	5,27	5,48	77,11	75,77	78,83	79,40	0,37	0,37	0,16	0,37	0,44	0,9	2,16	2,73
H-8	C-9	4,35	61,60	4,32	4,30	4,54	4,33	59,79	60,83	57,72	58,19	0,03	0,05	0,19	0,02	1,81	0,77	3,88	3,41
H-9	C-11	4,50	176,08	4,28	4,15	4,68	3,95	176,12	175,13	176,76	177,48	0,22	0,35	0,18	0,55	0,04	0,95	0,68	1,4
H-9'	C-12	5,00	76,67	4,85	4,88	4,90	5,1	75,88	75,92	74,06	75,12	0,15	0,12	0,1	0,1	0,79	0,75	2,61	1,55
H-13	C-13	1,80	46,31	1,70	2,24	2,48	2,42	47,20	44,68	44,17	44,22	0,10	0,44	0,68	0,62	0,89	1,63	2,14	2,09
H-14	C-14	2,60	45,73	2,66	2,07	2,45	2,19	46,71	52,27	53,39	52,65	0,06	0,53	0,15	0,41	0,98	6,54	7,66	6,92
H-17	C-15	1,41	174,12	1,33	1,26	1,41	1,33	173,98	174,83	173,01	173,16	0,08	0,15	0,00	0,08	0,14	0,71	1,11	0,96
H-18	C-17	1,11	27,34	1,09	1,04	1,27	1,1	26,66	24,25	18,13	26,67	0,02	0,07	0,16	0,01	0,68	3,09	9,21	0,67
H-19	C-18	1,34	12,05	1,29	1,51	1,68	1,42	11,36	12,95	11,42	13,30	0,05	0,17	0,34	0,08	0,69	0,9	0,63	1,25
H-19'	C-19	1,80	26,64	1,77	1,56	2,02	1,76	27,94	29,15	27,31	20,95	0,03	0,24	0,22	0,04	1,3	2,51	0,67	5,69
H-20	C-20	0,87	12,05	0,86	0,94	0,98	0,9	10,94	13,16	11,23	13,04	0,01	0,07	0,11	0,03	1,11	1,11	0,82	0,99
EAM* <sup>a</sup>												<b>0,09</b>	<b>0,19</b>	<b>0,17</b>	<b>0,16</b>	<b>0,76</b>	<b>1,9</b>	<b>2,31</b>	<b>2,18</b>

<sup>a</sup> EAM: erro absoluto médio. <sup>b</sup> Cálculos foram feitos utilizando o nível de teoria B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p).

**Tabela 3.4.** Dados experimentais e calculados de RMN para as estruturas candidatas R5, R6, R7 e R8 na análise do EAM

H	C	$\delta$ Expt.		Calc. $\delta_H$				Calc. $\delta_C$				$ \Delta\delta_H $				$ \Delta\delta_C $			
		$\delta_H$	$\delta_C$	R5	R6	R7	R8	R5	R6	R7	R8	R5	R6	R7	R8	R5	R6	R7	R8
H-2	C-1	6,11	132,78	6,02	6,11	6,00	6,01	136,50	133,80	134,87	134,24	0,09	0,00	0,11	0,10	3,72	1,02	2,09	1,46
H-3	C-2	3,51	135,70	3,53	3,40	3,38	3,39	136,63	136,87	134,78	133,83	0,02	0,11	0,13	0,12	0,93	1,17	0,92	1,87
H-3'	C-3	3,90	61,08	3,77	3,85	3,89	3,90	60,03	61,20	62,41	62,72	0,13	0,05	0,01	0,00	1,05	0,12	1,33	1,64
H-5	C-5	2,60	53,55	2,77	2,49	2,54	2,56	49,88	53,22	53,56	53,72	0,17	0,11	0,06	0,04	3,67	0,33	0,01	0,17
H-5'	C-6	3,20	34,17	2,81	3,04	3,11	3,14	32,11	33,92	33,17	33,55	0,39	0,16	0,09	0,06	2,06	0,25	1	0,62
H-6	C-7	2,10	74,98	1,93	2,06	1,97	1,96	78,42	74,99	74,12	73,35	0,17	0,04	0,13	0,14	3,44	0,01	0,86	1,63
H-7	C-8	5,11	76,67	4,81	4,73	5,13	5,22	75,96	77,81	78,00	77,88	0,3	0,38	0,02	0,11	0,71	1,14	1,33	1,21
H-8	C-9	4,35	61,60	4,24	4,32	4,35	4,32	58,48	59,93	58,60	59,67	0,11	0,03	0	0,03	3,12	1,67	3,0	1,93
H-9	C-11	4,50	176,08	4,28	4,17	4,36	4,09	176,16	177,06	175,37	176,11	0,22	0,33	0,14	0,41	0,08	0,98	0,71	0,03
H-9'	C-12	5,00	76,67	4,75	4,95	4,81	5,05	74,56	76,51	76,96	77,79	0,25	0,05	0,19	0,05	2,11	0,16	0,29	1,12
H-13	C-13	1,80	46,31	1,94	2,19	2,18	2,04	45,57	42,71	44,68	44,22	0,14	0,39	0,38	0,24	0,74	3,60	1,63	2,09
H-14	C-14	2,60	45,73	2,91	2,23	2,20	2,45	48,17	48,07	50,48	48,48	0,31	0,37	0,4	0,15	2,44	2,34	4,75	2,75
H-17	C-15	1,41	174,12	1,38	1,27	1,33	1,34	175,18	177,23	175,77	176,95	0,03	0,14	0,08	0,07	1,06	3,11	1,65	2,83
H-18	C-17	1,11	27,34	1,27	1,04	1,15	1,21	25,61	24,76	24,52	24,68	0,16	0,07	0,04	0,10	1,73	2,58	2,82	2,66
H-19	C-18	1,34	12,05	1,44	1,45	1,61	1,44	11,47	8,09	14,66	8,44	0,1	0,11	0,27	0,10	0,58	3,96	2,61	3,61
H-19'	C-19	1,80	26,64	1,70	1,67	1,83	1,69	26,65	23,28	25,29	26,79	0,1	0,13	0,03	0,11	0,01	3,36	1,35	0,15
H-20	C-20	0,87	12,05	0,92	0,77	0,88	0,89	11,19	11,57	8,26	12,05	0,05	0,10	0,01	0,02	0,86	0,48	3,79	0,00
EAM <sup>*,a</sup>												<b>0,16</b>	<b>0,15</b>	<b>0,12</b>	<b>0,11</b>	<b>1,66</b>	<b>1,55</b>	<b>1,77</b>	<b>1,52</b>

<sup>a</sup> EAM: erro absoluto médio <sup>b</sup> Cálculos foram feitos utilizando o nível de teoria

B3LYP/6-311+G(2d,p)//M06-2X/6-31+G(d,p)

O EAM para a estrutura candidata R1 foi de 0,09 e 0,76, para o hidrogênio e o carbono, respectivamente, enquanto que para R2, R3, R4, R5, R6, R7 e R8 foram maiores em relação à R1, conforme apresentado nas Tabelas 3.3 e 3.4. Portanto, ambas as análises estatísticas (EAM e DP4) estabeleceram que os deslocamentos químicos calculados para a estrutura candidata R1 se aproximam mais dos dados experimentais de RMN da etilcrotalina. Nesta análise, observa-se que os valores do EAM para o hidrogênio são inferiores aos do carbono e geralmente, são considerados por terem melhor precisão na distinção entre os isômeros.<sup>108</sup>

As análises do EAM também foram realizadas sem atribuição dos sinais, ou seja, os deslocamentos químicos experimentais e calculados foram alinhados lado a lado em ordem crescente em uma planilha, e os valores do EAM foram também calculados. Os valores sem atribuição foram idênticos em relação aos cálculos com atribuição de sinais. Nesse sentido, isso é considerado uma vantagem para a determinação estrutural, pois a atribuição dos sinais em RMN demanda tempo, requerendo pessoas experientes na técnica para a interpretação dos espectros.

## **CAPÍTULO 4: ENSAIOS DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ALCALOIDES PIRROLIZIDÍNICOS ISOLADOS DAS FOLHAS DE *Crotalaria paulina***

### **4.1 Introdução**

A utilização de produtos naturais pela sociedade na busca por alívio e cura de enfermidades, é praticada desde a antiguidade<sup>109</sup>. No Brasil, a busca por metabólitos secundários como fonte de fármacos vem crescendo devido à grande diversidade de espécies vegetais pertencentes ao bioma nacional. Estima-se que cerca de 20% do número total de espécies do planeta.<sup>110</sup> Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos que reside sua maior potencialidade.<sup>111</sup> Logo, entre os anos de 1981 e 2006, foi relatado que mais da metade das novas moléculas encontradas no mercado eram derivadas de produtos naturais ou sintetizadas a partir destes, sendo que, diversos fármacos que se consagraram medicamentos industrializados, são oriundos de sínteses com a finalidade de reproduzir a ação das moléculas encontradas na natureza.<sup>4</sup>

Os extratos de produtos naturais podem servir como ponto de partida para a obtenção de metabólitos secundários a partir dos quais podem ser preparados derivados sintéticos. Alguns extratos exibem atividade biológica maior ou diferente de seus componentes isolados por apresentarem uma rica diversidade de substâncias como polifenóis, alcaloides, peptídeos e terpenóides, que podem atuar na manutenção e/ou correção das condições fisiológicas de humanos e animais<sup>112</sup>.

O isolamento de substâncias naturais com atividades biológicas, seja de origem vegetal ou de outras fontes, como microrganismos, apresenta diversas vantagens em relação ao uso de extratos, visto que a substância bioativa pode ser administrada e/ou quantificada de forma reprodutível e em doses exatas, gerando

benefícios do ponto de vista experimental e terapêutico<sup>113</sup>. Além disso, apresentam alta afinidade por receptores específicos, que geralmente são proteínas, podendo ativá-los ou inibi-los, e possuem ampla variabilidade química, as quais são utilizadas para a prevenção e tratamento de uma gama de enfermidades<sup>114,115</sup>.

Estudos recentes relatam que a monocrotalina, isolada das sementes de *Crotalaria retusa*, demonstrou atividade contra *Trichomonas vaginalis*, e os resultados indicaram inibição de 80% no crescimento do parasita a 1 mg mL<sup>-1</sup>. Além disso, não se observou citotoxicidade contra células epiteliais vaginais nem atividade hemolítica. Por outro lado, a retronecina não mostrou atividade contra *T. vaginalis* enquanto a azido-retronecina, um derivado semissintético, foi mais ativa que a monocrotalina, matando 85% dos parasitas a 1 mg mL<sup>-1</sup>.<sup>116</sup>

Com relação ao gênero *Senecio*, também conhecido por possuírem alcaloides pirrolizidínicos, são descritos diversos trabalhos na literatura relatando a atividade antimicrobiana<sup>117</sup>. Em um desses estudos focado na avaliação do potencial biológico dos extratos diclorometânico e etanólico das partes aéreas de *Senecio desiderabilis* (Asteraceae), relatou-se que o extrato diclorometânico apresentou-se mais ativo contra as cepas bacterianas e fúngicas do que o extrato etanólico<sup>118</sup>.

Logo, diante do extenso número de doenças infecciosas que acometem a humanidade, torna-se relevante o estudo da atividade biológica dos quatro alcaloides pirrolizidínicos isolados das folhas de *C. paulina* com a finalidade de controle desses males.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Micro-organismos utilizados**

As espécies bacterianas utilizadas nesse estudo foram: *Klebsiella pneumoniae* ATCC13882, *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomonas aeruginosa*

ATCC27853, *Staphylococcus aureus* ATCC33591, *Enterococcus faecalis* ATCC19433 e *Acinetobacter baumannii* ATCC19606 pertencentes à Coleção de Cultura de Micro-organismos do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios do ICB-UFMG sob a coordenação da Profa. Dra Simone Gonçalves dos Santos.

#### 4.2.2 Preparo do inóculo

O inóculo bacteriano foi preparado a partir do crescimento das amostras em BHI (*Brain Heart Infusion*) incubadas a 37 °C, por aproximadamente 24 horas. A concentração da suspensão bacteriana foi padronizada, comparando a turbidez do inóculo com o padrão 0,5 da escala de *MacFarland*, em espectrofotômetro (625 nm). Essa turvação é semelhante à padronizada para o antibiograma e o resultado da absorbância deve estar entre 0,08 e 0,10, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

A suspensão-padrão foi, então, homogeneizada em vórtex, diluída 1:50 e em seguida a 1:20 em caldo Mueller-Hinton, para obtenção do inóculo utilizado no teste (de  $1 \times 10^5$  a  $2 \times 10^5$  UFC/mL). A suspensão resultante foi diluída à concentração 1:1 quando os poços foram inoculados em microplaca de poliestireno de 96 poços, chegando-se à concentração final desejada (de  $0,5 \times 10^5$  a  $1,0 \times 10^5$  UFC/mL) (CLSI, 2012).

#### 4.2.3 Preparo dos alcaloides isolados

Para o teste da concentração inibitória mínima dos compostos foi realizado o método da microdiluição em caldo, em placa de poliestireno de 96 poços, conforme proposto pelo documento M7-A9 do “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2012).

Uma solução inicial de cada composto testado na concentração de  $256 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada utilizando-se como solvente metanol e como diluente o

meio caldo Mueller-Hinton. Em seguida, foram feitas diluições seriadas de modo que as concentrações testadas dos compostos variaram de 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Posteriormente, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada concentração foram distribuídas nos poços. Como controle de crescimento e de esterilidade foi usado somente o caldo Mueller-Hinton, sem a adição da substância e solvente. Como controle de toxidez do solvente usou-se o meio de cultura, juntamente com o solvente, nesse caso o metanol.

#### 4.2.4 Concentração inibitória mínima (CIM)

À cada poço teste e de controle de crescimento foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de inóculo bacteriano. As placas foram incubadas por 22-24 horas, a 37°C. A leitura foi realizada visualmente (CLSI, 2012) e a densidade óptica analisada por meio do espectrofotômetro (625 nm).

### 4.3 Resultados e discussão

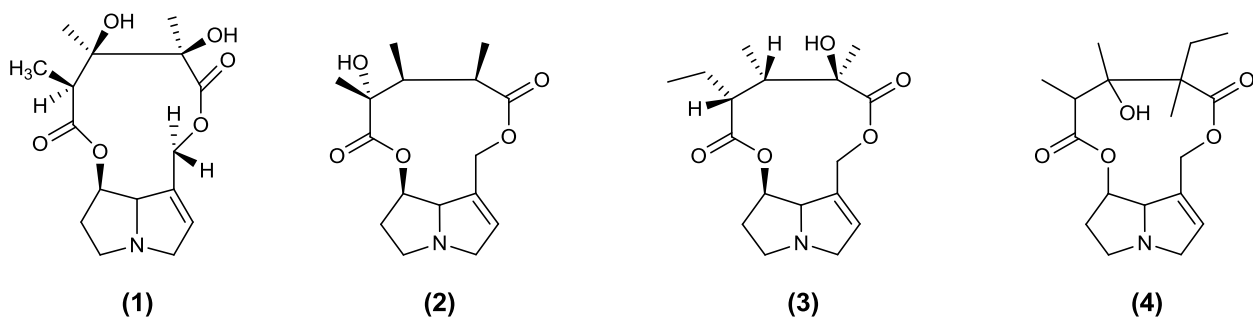
No presente estudo, o potencial antibacteriano dos quatro compostos isolados das folhas de *C. paulina* foi avaliado nas concentrações de 0,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  até 128  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na Tabela abaixo, pode-se observar os valores de CIM dos quatro alcaloides contra os respectivos microrganismos.

**Tabela 4.1.** Valores de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) encontrados para os quatro alcaloides avaliados sobre seis cepas de bactérias.

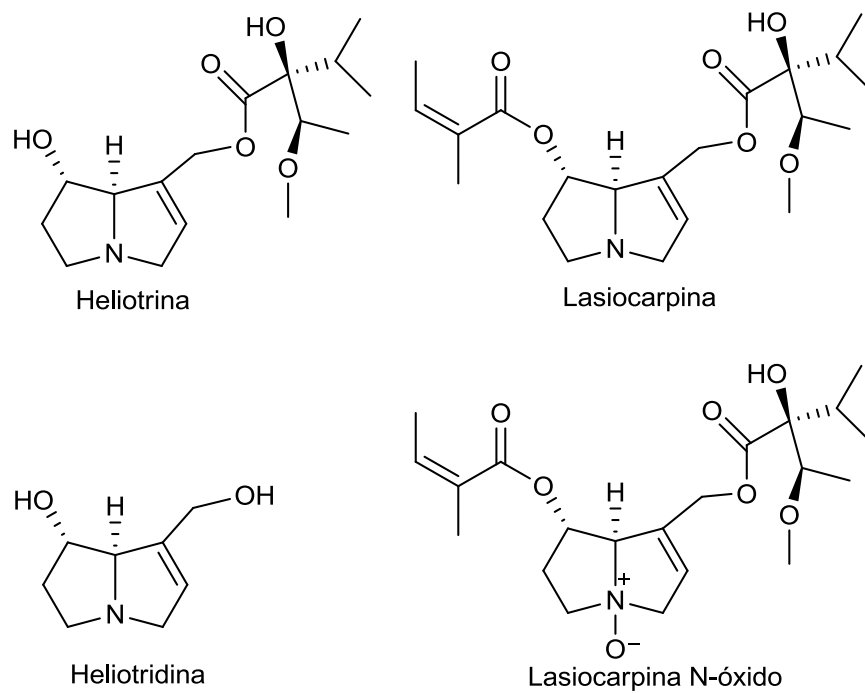
Bactérias	Alcaloide	Alcaloide	Alcaloide	Alcaloide
	1	2	3	4
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13882	>128	>128	>128	>128
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>128	>128	>128	>128
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>128	>128	>128	>128
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	>128	>128	>128	>128
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC19433	>128	>128	>128	>128
<i>Acinetobacter baumannii</i> ATCC 19606	>128	>128	>128	>128

Observando-se os resultados, percebe-se que, mesmo na maior concentração testada ( $128 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) as bactérias ainda continuaram a crescer. Essa concentração, segundo a CLSI, é tida como alta, pois tomando como base o antibiótico Azitromicina, este é considerado resistente com a CIM de  $8 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Uma possível explicação para os altos valores de CIM reside nas estruturas dos APs testados. Nos presentes testes, foram avaliados apenas bislactonas macrocíclicos de onze membros (Figura 4.1). Entretanto, em estudo realizado com os APs isolados das partes aéreas de *Heliotropium ellipticum*, cuja estrutura são diésteres de cadeia aberta, demonstrou a inibição do crescimento das bactérias *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Streptococcus pneumoniae*. Na figura 4.2 pode-se observar as estruturas dos compostos isolados das partes aéreas de *Heliotropium ellipticum*<sup>119</sup>.

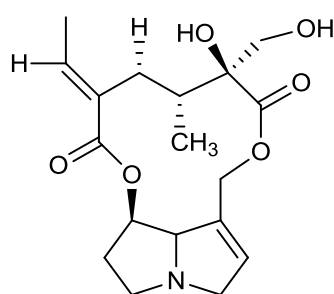


**Figura 1.** Estruturas das bislactonas macrocíclicas isoladas das partes aéreas de *C. paulina*.



**Figura 4.2.** Estruturas dos diésteres de cadeia aberta isolados das partes aéreas de *Heliotropium ellipticum*.

Em um estudo realizado com o AP usaramina (Figura 4.3), um diéster macrocíclico de 12 membros, isolado das sementes de *Crotalaria pallida*, mostrou redução de mais de 50% na formação de biofilme, sem matar a bactéria na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup>. Além disso, não foi observado efeito sobre células planctônicas sugerindo uma ação específica sobre a produção de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* (gram positiva)<sup>10</sup>.



**Figura 4.3** Estrutura da usaramina.

A usaramina também foi testada em ensaios com cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (gram-negativa) e não foram observadas atividades bactericidas e nem de inibição da formação de biofilme, sugerindo uma ação seletiva contra *S. epidermidis*<sup>10</sup>. Essa seletividade pode ser atribuída à dificuldade dos produtos naturais agirem sobre cepas gram-negativas<sup>120</sup>.

A literatura relata alguns alcaloides possuindo atividade como antibiótico: 3-indolilacetoneitrila e indol-3-carboxialdeído<sup>121</sup>, piperina e reserpina<sup>122</sup>, cafeína<sup>123</sup>, tomatidina<sup>124</sup>, bromoageliferina<sup>125</sup> e berberina<sup>126</sup>, sendo na sua maioria, ativa contra bactérias gram-negativas.

## 5. Conclusões gerais

### 5.1 Capítulo 1

Neste capítulo, foi relatado o estudo da composição química do extrato alcaloídico bruto da espécie *Crotalaria paulina*. Através de CG-EM, foi possível detectar 6 alcaloides pirrolizidínicos neste extrato. Desses seis compostos, foram isolados a monocrotalina e mais três compostos inéditos. A elucidação estrutural dos compostos isolados foi feita por RMN e HRMS-ESI-TOF (Ionização de eletrospray – Espectrometria de massas de alta resolução). Desta forma, em vista da escassez de trabalhos minuciosos sobre os constituintes químicos de *C. paulina* a presente pesquisa permitiu identificar, conclusivamente, os alcaloides presentes nas folhas desta espécie contribuindo assim para o conhecimento fitoquímico desta planta.

Parte dos resultados deste capítulo foram apresentados num painel na “5th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP and XXXI Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - RESEM” (5th BCNP) 2015, Atibaia - Brasil.

### 5.2 Capítulo 2

Os cálculos teóricos foram realizados como uma ferramenta de suporte na interpretação dos dados espectroscópicos experimentais (Infravermelho e Raman) encontrados para a monocrotalina. As principais bandas observadas nos espectros IV e Raman foram caracterizadas com o auxílio de cálculos DFT. Desta maneira, a deformação denominada de respiração do anel assim como outras de baixas frequências, como a denominada deformação esquelética, foram atribuídas. Portanto, a análise espectroscópica no IV e Raman, em conjunto com cálculos teóricos,

forneçeram uma descrição detalhada das vibrações que levaram à atribuição inequívoca de cada banda no espectro.

Este trabalho resultou na publicação de um artigo em maio de 2017 na revista *Journal of Molecular Structure*, **2017**, 1135, 228-233.

### **5.3 Capítulo 3**

A elucidação estrutural do novo alcaloide pirrolizidínico (etilcrotalina) isolado das folhas de *C. paulina* foi determinada por análises espectroscópicas, tais como, HR-ESI-MS e experimentos de RMN 1D e 2D. A determinação completa da estereoquímica do novo alcaloide natural foi realizada por NOESY (2D) e por cálculos de mecânica quântica de deslocamentos químicos de RMN associados à avaliações estatísticas (EAM e DP4).

Em Setembro de 2017 estes resultados foram aceitos para publicação na revista *Journal of Molecular Structure*, **2018**, 1152, 337-343. Estes dados também foram apresentados num painel na “6th Brazilian Conference on Natural Products - BCNP and XXXII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology - RESEM” (6th BCNP) 2017, Vitória - ES - Brasil.

### **5.4 Capítulo 4**

Os alcaloides isolados e testados contra cinco espécies de bactérias não apresentaram resultados promissores uma vez que as bactérias utilizadas no teste continuaram a crescer em uma concentração considerada elevada (128 µg mL<sup>-1</sup>).

## 6. Referências bibliográficas

---

- <sup>1</sup> NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- <sup>2</sup> CORDELL, G.A. Changing strategies in natural products chemistry. **Phytochemistry**, v. 40, p. 1585-1612, 1995.
- <sup>3</sup> VERPOORTE, R. **Comprehensive Natural Products II**, Chemistry and Biology. Oxford: Elsevier, 3 ed., 2010.
- <sup>4</sup> NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461–477, 2007.
- <sup>5</sup> BERLINCK, R.G.S.; BORGES, W.S.; SCOTTI, M.T.; VIEIRA, P.C. The chemistry of natural products in Brazil in the XXI century. **Química Nova**, v.40 (6), p. 706-710, 2017.
- <sup>6</sup> POLHILL, R.M. **Advances in Legumes Systematics**. Royal Botanic Gardens, kew, v. 1, p. 399-402, 1981.
- <sup>7</sup> MILLER, R.H. *Crotalaria* seed morphology, anatomy and identification. **Technical Bulletin**, v. 1373, p. 1-73, 1967.
- <sup>8</sup> NARENDER, T.; SHWETA, T.K.; RAO, M.S.; SRIVASTAVA, K.; PURI, S.K. Prenylated chalcones isolated from *Crotalaria* genus inhibits in vitro growth of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, p. 2453- 2455, 2005.

- 
- <sup>9</sup> AHMED, B.; AL-HOWIRINY, T.A.; MOSSA, J.S. Crostateroidocin: a new steroidoid from *Crotalaria emarginella* and its anti-inflammatory activity. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 61, p. 629-635, 2006.
- <sup>10</sup> QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da caatinga**. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana. p. 467, 2009.
- <sup>11</sup> FLORES, A.S.; TOZZI, A.M.G.A.; TRIGO, J.R. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 459-469, 2009.
- <sup>12</sup> PENALOZA, A.; GIANNI, C.; PELAEZ, J.; CARLOS, A. Evaluation of biological activity of *Crotalaria juncea* extracts through a *Drosophila melanogaster* model. **Vitae**, v. 15, p. 279-284, 2008.
- <sup>13</sup> TRIGO, J. R. The Chemistry of Antipredator Defense by Secondary Compounds in Neotropical Lepidoptera: Facts, Perspectives and Caveats **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, p. 551-561, 2000.
- <sup>14</sup> ROBINS, D.J. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids. **Chemical Society Reviews**, v. 18, p. 375-408, 1989.
- <sup>15</sup> NEUNER, J.N.; NESVABDA, H.; SPITELLER, G. Anwendung der massenspektrometrie zur strukturaufklärung von alkaloiden. **Monatshefte für Chemie**, v. 96, p. 321-338, 1965.

- 
- <sup>16</sup> BAH, M.; PEREDA-MIRANDA, R. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**, Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/UFSC. p. 847-867, 2004.
- <sup>17</sup> YOO, H.S.; LEE, J.S.; KIM, C.Y.; KIM, J. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora*. **Archives Pharmaceutical Research**, v. 5, p 544-546, 2004.
- <sup>18</sup> NARENDER, T.; GUPTA, S.A. A convenient and biogenetic type synthesis of few naturally occurring chromeno dihydrochalcones and their in vitro antileishmanial activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 4, p. 3913–3916, 2004.
- <sup>19</sup> BAHAR, A.; AL-HOWIRIMY, T. A.; MOSSA, J.S. Crotalic and emarginellic acids: two tripterpenes from *crotalaria emarginella* and anti-inflammatory and anti-hepatotoxic activity of crotalic acid **Phytochemistry**, v. 67, p. 956-954, 2006.
- <sup>20</sup> HU, X.R.; CHOU, G.X.; ZHANG, C.G.X. Flavonoids, alkaloids from the seeds of *Crotalaria pallida* and their cytotoxicity and anti-inflammatory activities. **Phytochemistry**, v. 143, p. 64-71, 2017.
- <sup>21</sup> SUN, Q.H.; YANG, J.J.; WEI, X.H.; XU, H.; CHOU, G.X. Two new pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria albida*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 449-452, 2013.
- <sup>22</sup> ANDRADE, D.A.V.; ORTOLANI, F.A.; MORO, J.R.; MORO, F.V. Aspectos morfológicos de frutos e sementes e caracterização citogenética de *Crotalaria lanceolata* E. Mey (Papilionoideae - Fabaceae). **Acta Botanica Brasileira**, v. 22, p. 1150-1162, 2008.

- 
- <sup>23</sup> MIAN, I.H.; RODRÍGUEZ-KÁBANA, R. Organic amendments with high tannin and phenolic contents for control of *Meloidogyne arenaria* in infested soil. **Nematropica**, v.12, p. 235-246, 1982.
- <sup>24</sup> AKHTAR, M.; ALAM, M.M. Utilization of waste materials in nematode control: a review. **Bioresource Technology**, v. 45, p. 1-7, 1993.
- <sup>25</sup> FERRAZ, S.; FREITAS, L.G. Use of antagonistic plants and natural products. In: CHEN, Z., S. CHEN & D.W. DICKINSON (ed). Nematology – Advances and Perspectives. **Nematode Management and Utilization**, v. 2, p. 931-978, 2004.
- <sup>26</sup> DESAEGER, J.; RAO, M.R. The potential of mixed covers of *Sesbania*, *Tephrosia* and *Crotalaria* to minimize nematode problems on subsequent crops. **Field Crops Research**. v. 70, p. 111-125, 2001.
- <sup>27</sup> THODEN, T.C.; BOPPRE, M. J. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. **Pest Management Science**, v. 65, p. 823-830, 2009.
- <sup>28</sup> MAREGESI, S.M.; NGASSAPA, O.D.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A.J. Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 457-470, 2007.
- <sup>29</sup> SMET, P.A.G.M.; KELLER, K.; HANSEL, R. ;CHANDLER, R.F. **Adverse Effects of Herbal Drugs**, Springer Verlag – Germany, 1992.
- <sup>30</sup> GOVINDAPPA, M.; BHARATH, N.; SHRUTHI, H. B.; SADANANDA, T. S.; SHARANAPPA, P. Antimicrobial, antioxidant and in vitro anti-inflammatory activity

---

and phytochemical screening of *Crotalaria pallida* Aiton **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 2359-2371, 2011.

<sup>31</sup> MATTOCKS, A.R. **Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids**. Academic Press, London. p. 393, 1986.

<sup>32</sup> KATARINA, S.; SHRIVASTAVA, B.; KHAJURIA, R.K.; SURI, K.A.; SHARMA, P. Antimicrobial activity of *Crotalaria burhia* Buch.-Ham roots. **India Journal of Natural Products and Resources**, v. 1, p. 481-484, 2010.

<sup>33</sup> BHAKSHU, M.D.; VENKATA RATNAM, K.; VENKATARAJU, R. R. Medicinal Properties and Antimicrobial Activity of *Crotalaria madurensis* Var. *kurnoolica*. **Ethnobotanical Leaflets**, v. 12, p. 758-62, 2008.

<sup>34</sup> RAMA, D.M.; SUBRAMANIAN, S.; GUPTA, V.R.M.; SANDEEP, K.; KUMAR, P. Screening of Anti-Microbial activity of Leaf Extract of *Crotalaria pulchra* Andr. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v. 4, p. 572-573, 2011.

<sup>35</sup> AWOUAFACK, M.D.; SPITELLER, P. ; LAMSHÖFT, M.; KUSARI, S.; IVANOVA, B.; TANE, P.; SPITELLER, M. Antimicrobial isopropenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. **Journal of Natural Products**, v. 74 (2), p. 272–278, 2011.

<sup>36</sup> ARAGÃO, D.P.; SOUZA, B.S.; BRITO, T.V.; SANTANA, L.A.B.; SILVA, R.M.P.; OLIVEIRA, A.P.; PEREIRA, A.C.T.C.; FERREIRA, G.P.; BARBOSA, A.L.R.; OLIVEIRA, J.S. The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 536–542, 2017.

- 
- <sup>37</sup> PELEGRINI, P. B.; FARIAS, L.R.; SAUDE, A. C. M.; COSTA, F. T.; BLOCH, C.; SILVA, L. P.; OLIVEIRA, A. S.; GOMES, C. E. M.; SALES, M. P.; FRANCO, O.L. A novel antimicrobial peptide from *Crotalaria pallida* seed with activity against human and phytopathogens. **Current microbiology**, v. 59, p. 400-404, 2009.
- <sup>38</sup> NIBRET, E.; SOPRER, F.; ASRES, K.; WINK, M. Antitripanosomal and cytotoxic activities of pyrrolizidine alkaloidproducing plants of Ethiopia. **Journal of pharmacie and pharmacology**, v. 61, p 801-808, 2009.
- <sup>39</sup> BISBY, F.A.; ZARUCCHI, J.L.; SOUTHON, I.W.; BUCKINGHAM, J.; HARBORNE, J. **Phytochemical dictionary of the leguminosae**. Ed. Glascow: Chapman e Hall. v. 1, p. 350, 1994.
- <sup>40</sup> FLORES, A.S.; MIOTTO, S.T.S. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na Região Sul do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19(2), p. 245-249, 2005.
- <sup>41</sup> PANDO, L.A.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J.C.; OLIVEIRA, B.; PASCHOLATTI, S.F.; WEDER, J.K.; MARANGONI, S. Isolation and characterization of a new trypsin inhibitor from *Crotalaria paulina* seeds. **IUBMB Life**, v. 48, p. 519-523, 1999.
- <sup>42</sup> SILVA-LOPEZ, R. E. Inibidores de Proteases Oriundas de Plantas: Uma Abordagem Útil para o Desenvolvimento de Novos Fármacos. **Revista Fitos**, v. 4, p. 108-119, 2009.

- 
- <sup>43</sup> PANDO, L.A.; DE CARVALHO, D.D.; TOYAMA, M.H.; DI CIERO, L.; NOVELLO, J.C.; PASCHOLATTI, S.F.; MARANGONI, S. Purification and characterization of a lectin from *Crotalaria paulina* seeds. **Protein Journal**, v. 23, p. 437-444, 2004.
- <sup>44</sup> NAKATANI, A.K.; LOPES, R. CAMARGO, L.E.A. Variabilidade genética de *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae*. **Summa Phytopathologica**, v. 35, p. 116-120, 2009.
- <sup>45</sup> DE HOOFF, P.L.; BRILL, L.M.; HIRSCH, A.M. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. **Molecular Genetic Genomics**, v. 1, p. 1-15, 2009.
- <sup>46</sup> TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A.; DIAS, O S.; CAMPIDELLI, C.; BULISANI, E. A. Cultivo da soja após incorporação de adubo verde e orgânico. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 27, p. 1477-1483, 1992.
- <sup>47</sup> MONTEIRO, A. R.; **Controle de nematóides por espécies de adubos verdes**. In: Wutke, E. B.; Bulisani, E. A. Mascarenhas, H. A. A., eds. Curso sobre adubação verde no Instituto Agronômico. Campinas: Instituto Agronômico, p. 109-121, 1993.
- <sup>48</sup> VALLE, L.A.C.; DIAS, W.P.; FERRAZ, S. Reação de algumas espécies vegetais, principalmente leguminosas, ao nematoide de cisto de soja, *Heterodera glycines* Ichinohe. **Nematologia Brasileira**, v. 20, p 30-40, 1996.
- <sup>49</sup> KIRCHNER, J.G.; PERRY, E.S. **Thin-Layer Chromatography: Techniques of Chemistry**, 2 Eds., John Wiley and Sons, v. 14, 1978.

- 
- <sup>50</sup> WITTE, L.; RUBIOLO, P.; BICCHI, C.; HARTMANN, T. Comparative analysis of pyrrolizidine alkaloids from natural sources by gas chromatography-mass spectrometry. **Phytochemistry**, v. 32, p. 187–196, 1993.
- <sup>51</sup> BREDENKAMP, M.W. **The mass spectrometry of pyrrolizidine alkaloids**. CRC Press, p. 147-168, 1990.
- <sup>52</sup> COOPER, R.A.; BOWERS, R.J.; BECKHAM, C.J.; HUXTABLE, R.J. Preparative separation of pyrrolizidine alkaloids by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 732, p. 43-50, 1996.
- <sup>53</sup> ROEDER, E.; SARG, T.; EL, D.S.; Ghani, A.A. Pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria aegyptiaca*. **Phytochemistry**, v. 34, p. 1421-1423, 1993.
- <sup>54</sup> DEVECCHI, M.F.; PIRANI, J.R.; MELO-DE-PINNA, G.F.A. Comparative leaf anatomy and morphology of some Brazilian species of *Crotalaria* L. (Leguminosae: Papilionoideae: Crotalarieae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, p. 583-593, 2014.
- <sup>55</sup> THODEN, T.; BOPPRE, M. Plants producing pyrrolizidine alkaloids: sustainable tools for nematode management? **Nematology**, v. 12, p. 1-24, 2010.
- <sup>56</sup> SINGH, B.; SAHU, P.M.; SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Fitoterapia**, v. 73(2), p. 153-155, 2002.
- <sup>57</sup> MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v.13, p. 51-54, 2002.

- 
- <sup>58</sup> REINA, M.; GONZALEZ-COLOMA, A.; GUTIERREZ, C.; CABRERA, R.; HENRIQUEZ, J.; VILLARROEL, L. Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 845-853, 1997.
- <sup>59</sup> MISHRA, R.; JOSHI, B.D.; SRIVASTAVA, A.; TANDON, P.; JAIN, S. Quantum chemical and experimental studies on the structure and vibrational spectra of an alkaloid–Corlumine. **Spectrochimica Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 118, p. 470-480, 2014.
- <sup>60</sup> WARTEWIG, S.; NEUBERT, R. Pharmaceutical applications of Mid-IR and Raman spectroscopy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1144-1170, 2005.
- <sup>61</sup> GERRARD, D.L. Raman spectroscopy, **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 64, p. 502-513, 1992.
- <sup>62</sup> SCHULZ, H.; OZKAN, G.; BARANSKA, M.; KRÜGER, H.; OZCAN, M. Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy **Vibrational Spectroscopy**, v. 39, p. 249-256, 2005.
- <sup>63</sup> BARANSKA, M.; ROMAN, M.; DOBROWOLSKI, J. C.Z.; SCHULZ, H.; BARANSKI, R. Recent Advances in Raman Analysis of Plants: Alkaloids, Carotenoids, and Polyacetylenes **Current Analytical Chemistry**, v. 9, p. 108-127, 2013.
- <sup>64</sup> SCHRADER, B.; KLUMP, H.; SCHENZEL, K.; SCHULZ, H. Non-destructive NIR FT Raman analysis of plants. **Journal of Molecular Structure**, v. 509, p. 201-212, 1999.

---

<sup>65</sup> TALIAN, I.; ORINAK, A.; EFREMOV, E.V.; ARIESE, F.; KANIANSKY, D.; ORINAKOV, R.; HÜBNER, J. Detection of biologically active diterpenoic acids by Raman Spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 41, p. 964-968, 2010.

<sup>66</sup> BARANSKA, M.; SCHULZ, H.; JOUBERT, E.; MANLEY, M. In situ flavanoid analysis by FT-Raman spectroscopy: Identification, distribution and quantification of aspalathin in green rooibos (*Aspalathus linearis*). **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 7716-7721, 2006.

<sup>67</sup> SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, p 13-25, 2007.

<sup>68</sup> JOSHI, B.D.; SRIVASTAVA, A.; TANDON, P.; JAIN, S. Molecular structure, vibrational spectra and HOMO, LUMO analysis of yohimbine hydrochloride by density functional theory and ab initio Hartree–Fock calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 82, p. 270-278, 2011.

<sup>69</sup> MELO, I.R.S.; TEIXEIRA, A.M.R.; SENA JUNIOR, D.M.; SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; RODRIGUES, A.S.; BRAZ-FILHO, R.; GUSMÃO, G.O.M.; SILVA, J.H.; FARIA, J.L.B.; BENTO, R.R.F. FT-Raman and FTIR-ATR spectroscopies and DFT calculations of triterpene acetyl aleuritolic acid. **Journal of Molecular Structure**, v. 1058, p. 221-227, 2014.

<sup>70</sup> TEIXEIRA, A.M.R.; SANTOS, H.S.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N.; RODRIGUES, A.S.; SILVA, C.B.; GUSMÃO, G.O.M.; FREIRE, P.T.C.; BENTO, R.R.F. Vibrational Spectroscopy of Xanthoxyline Crystals and DFT Calculations. **Brazilian Journal of Physics**, v. 42, p. 180-185, 2012.

---

<sup>71</sup> TOLEDO, T.A.; SILVA, L.E.; BOTELHO, T.C.; RAMOS, R.J.; SOUZA, P.T.; TEIXEIRA, A.M.R.; FREIRE, P.T.C.; BENTO, R.R.F. Characterization of flavonoid 3-Methoxyquercetin performed by FT-IR and FT-Raman spectroscopies and DFT calculations. **Journal of Molecular Structure**, v.1029, p. 22-27, 2012.

<sup>72</sup> ABRAHAM, J.P.; SAJAN, D.; MATHEW, J.; HUBERT JOE, I.; GEORGE, V.; JAYAKUMAR, V.S. Structural conformations and electronic interactions of the natural product, oroxylin: a vibrational spectroscopic study. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 39, p. 1821-1831, 2008.

<sup>73</sup> SRIVASTAVA, A.; TANDON, P.; AYALA, A.P.; JAIN, S. Solid state characterization of an antioxidant alkaloid boldine using vibrational spectroscopy and quantum chemical calculations, **Vibrational Spectroscopy**, v. 56, p. 82-88, 2011.

<sup>74</sup> FRISCH, M.J.; TRUCKS, G.W.; SCHLEGEL, H.B.; SCUSERIA, G.E.; ROBB, M.A.; CHEESEMAN, J.R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G.A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H.P.; IZMAYLOV, A.F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J.L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, J.A.; PERALTA, J.E.; OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J.J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K.N.; STAROVEROV, V.N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J.C.; IYENGAR, S.S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J.M.; KLENE, M.; KNOX, J.E.; CROSS, J.B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R.E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A.J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J.W.; MARTIN, R.L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V.G.; VOTH, G.A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J.J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A.D.;

---

FARKAS, O.; FORESMAN, J.B.; ORTIZ, J.V.; CIOSLOWSKI, J.; FOX, D.J. **Gaussian 09**, Revision E.01, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.

<sup>75</sup> JOOSTEN, L.; VAN VEEN, J. A. Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against microorganisms. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 127-136, 2011.

<sup>76</sup> HEIDARI, M. R.; AZAD, E. M.; MEHRABANI, M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: possible mechanism involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p. 345-349, 2006.

<sup>77</sup> MATTSSON, J. L. Mixtures in the real world: the importance of plant selfdefense toxicants, mycotoxins, and the human diet. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 223, p 125-132, 2007.

<sup>78</sup> FLACK, H. D.; BERNARDINELLI, G. The use of X-ray crystallography to determine absolute configuration. **Chirality**, v. 20, p. 681-690, 2008.

<sup>79</sup> VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B.; CEDILLO-PORTUGAL, E.; JOSEPH-NATHAN, P.; BURGUEÑO-TAPIA, E. Complete 1H NMR assignments of pyrrolizidine alkaloids and a new eudesmanoid from *Senecio polypodioides*. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 52, p. 251-257, 2014.

<sup>80</sup> ARCINIEGAS, A.; PÉREZ-CASTORENA, A. L.; GONZÁLEZ, K.; REYES-LEZAMA, M.; VILLASEÑOR, J. L.; VIVAR, A. R. Pyrrolizidine Alkaloids and Diterpenes from *Villasenorina orcuttii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 1167-1171, 2013.

---

<sup>81</sup> NICOLAOU, K. C.; SNYDER, S. A. Chasing molecules that were never there: misassigned natural products and the role of chemical synthesis in modern structure elucidation. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, p. 1012-1044, 2005.

<sup>82</sup> BARONE, G.; DUCA, D.; SILVESTRI, A.; GOMEZ-PALOMA, L.; RICCIO, R.; BIFULCO, G. Determination of the relative stereochemistry of flexible organic compounds by Ab initio methods: conformational analysis and Boltzmann-averaged GIAO <sup>13</sup>C NMR chemical shifts. **Chemistry - A European Journal**, v. 8, p. 3240–3245, 2002.

<sup>83</sup> MEDINA, J. C. M.; GAUZE, G. F.; VIDOTTI, G. J.; SARRAGIOTTO, M. H.; BASSO, E. A.; PEIXOTO, J. L. B. Structural characterization of saturated pyrrolizidine alkaloids from *Hilotrobium transalpinum* var. *transalpinum* Vell by NMR spectroscopy and theoretical calculations. **Tetrahedron Letters**, v. 50, p. 2640-2642, 2009.

<sup>84</sup> DOMÍNGUEZ, H.; CRESPIÁN, G.; SANTIAGO-BENÍTEZ, A.; GAVÍN, J.; NORTE, M.; FERNÁNDEZ, J.; DARANAS, A. Stereochemistry of Complex Marine Natural Products by Quantum Mechanical Calculations of NMR Chemical Shifts: Solvent and Conformational Effects on Okadaic Acid. **Marine Drugs**, v. 12, p. 176-192, 2014.

<sup>85</sup> SAIELLI, G.; NICOLAOU, K. C.; ORTIZ, A.; ZHANG, H.; BAGNO, A. Addressing the stereochemistry of complex organic molecules by density functional theory-NMR: vannusal B in retrospective. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 6072-6077, 2011.

<sup>86</sup> PARADOWSKA, K.; WOLNIAK, M.; PISKLAK, M.; GLIŃSKI, J. A.; DAVEY, M. H.; WAWER, I. <sup>13</sup>C, <sup>15</sup>N CPMAS NMR and GIAO DFT calculations of stereoisomeric

---

oxindole alkaloids from Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*). **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 34, p. 202-209, 2008.

<sup>87</sup> ROSSELLI, S.; BRUNO, M.; MAGGIO, A.; BELLONE, G.; FORMISANO, C.; MATTIA, C. A. S.; DI MICCO, C. A.; BIFULCO, G. Two new flavonoids from *Bonannia graeca*: a DFT-NMR combined approach in solving structures. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 15, p. 2504-2510, 2007.

<sup>88</sup> AL-AMIERY, A. A.; KADHUM, A. A. H.; MOHAMAD, A. B. Antifungal activities of new coumarins. **Molecules**, v. 17, p. 5713-5723, 2012.

<sup>89</sup> COLOMBO, D.; FERRABOSCHI, P.; RONCHETTI, V.; TOMA, L. Stereochemical analysis of the 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxy metabolites of tibolone through NMR and quantum-chemical investigations. An experimental test of GIAO calculations **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 40, 581-588, 2002.

<sup>90</sup> WU, Z.; LAI, Y.; ZHOU, L.; WU, Y.; ZHU, H.; HU, Z.; YANG, J.; ZHANG, J.; WANG, J.; LUO, Z.; XUE, Y.; ZHANG, Y. Enantiomeric Lignans and Neolignans from *Phyllanthus glaucus*: Enantioseparation and Their Absolute Configurations. **Scientific Reports**, v. 6, p. 24809, 2016.

<sup>91</sup> MUZOLF-PANEK, M.; GLISZCZYŃSKA-ŚWIGŁO, A.; SZYMUSIAK, H.; TYRAKOWSKA, B. The influence of stereochemistry on the antioxidant properties of catechin epimers. **Journal European Food Research**, v. 235, p. 1001-1009, 2012.

<sup>92</sup> SAROTTI, A. M.; PELLEGRINET, S. C. A MultiStandard Approach for GIAO <sup>13</sup>C NMR Calculations. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 7254-7260, 2009.

- 
- <sup>93</sup> SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning Stereochemistry to Single Diastereoisomers by GIAO NMR Calculation: The DP4 Probability. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, p. 12946-12959, 2010.
- <sup>94</sup> WILLOUGHBY, P. H.; JANSMA, M. J. HOYE. T. R. A guide to small-molecule structure assignment through computation of (<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C) NMR chemical shifts. **Nature Protocols**, v. 9, p. 643-660, 2014.
- <sup>95</sup> MIGDA, W.; RYS, B. GIAO/DFT evaluation of <sup>13</sup>C NMR chemical shifts of selected acetals based on DFT optimized geometries. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 42, p. 459-466, 2004.
- <sup>96</sup> LODEWYK, M. W.; SIEBERT, M. R.; TANTILLO, D. J. Computational Prediction of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C Chemical Shifts: A Useful Tool for Natural Product, Mechanistic, and Synthetic Organic. **Chemical Reviews**, v. 112, p. 1839-1862, 2012.
- <sup>97</sup> SAROTTI, A. M. Successful combination of computationally inexpensive GIAO <sup>13</sup>C NMR calculations and artificial neural network pattern recognition: a new strategy for simple and rapid detection of structural misassignments. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, p. 4847-4859, 2013.
- <sup>98</sup> SMITH, S. G.; GOODMAN, J. M. Assigning the Stereochemistry of Pairs of Diastereoisomers Using GIAO NMR Shift Calculation **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 4597-4607, 2009.
- <sup>99</sup> RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, D.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; HELLER, L.; CSUK, R. Novel hederagenin-tryazolyl derivatives as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 115, p. 257-267, 2016.

---

<sup>100</sup> DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A.; MIRANDA, A. C. M.; GERALDO, G. C.; DA SILVA, C. M.; GIBERTI, S.; BERTAZZINI, M.; FORLANI, G. The Fungal Phytotoxin Alternariol 9-Methyl Ether and Some of Its Synthetic Analogues Inhibit the Photosynthetic Electron Transport Chain. **Journal of Natural Products**, v. 76, p 2234-2245, 2013.

<sup>101</sup> RESENDE, G. C.; ALVARENGA, E. S.; WILLOUGHBY, P. H. Isolation and stereochemical assignment of phthalides resulting from the Diels–Alder reaction between 5-isopropoxyfuran-2(5H)-one and cyclopentadiene. **Journal of Molecular Structure**, v. 1101, p. 212-218, 2015.

<sup>102</sup> TEIXEIRA, M. G.; ALVARENGA, E. S. Characterization of novel isobenzofuranones by DFT calculations and 2D NMR analysis. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 54, p. 623-631, 2016.

<sup>103</sup> TRIGO, J. R.; BROWN, K. S.; WITTE, L.; HARTMANN, T.; ERNST, L.; BARATA, L. E. S. Tropane and pyrrolizidine alkaloids in the ithomiines *Placidula euryanassa* and *Miraleria cymothoe* (Lepidoptera: Nymphalidae) **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 58, p. 99-123, 1996.

<sup>104</sup> DOMÍNGUEZ, D. M.; REINA, M.; SANTOS-GUERRA, A.; SANTANA, O.; AGULLÓ, T.; LÓPEZ-BALBOA, C.; GONZALEZ-COLOMA, A. Pyrrolizidine alkaloids from Canarian endemic plants and their biological effects **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 153-166, 2008.

<sup>105</sup> SALLES, R. C.; LACERDA, V.; BEATRIZ, A.; ITO, F. M.; DOS SANTOS, R. B.; GRECO, S. J.; DE CASTRO, E. V. R.; DE LIMA, D. P. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectral data

---

of bioactive cage-like polycyclic compounds. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, p. 409-415, 2010.

<sup>106</sup> LOGIE, C. G.; GRUE, M. R.; LIDDELL, J. R. Proton NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 37, p. 43-109, 1994.

<sup>107</sup> ROEDER, E. Carbon-13 NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 29, p. 11-29, 1990.

<sup>108</sup> BROWN, S. G.; JANSMA, M. J.; HOYE, T. R. Case study of empirical and computational chemical shift analyses: Reassignment of the relative configuration of phomopsichalasin to that of diaporthichalasin. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 1326-1331, 2012.

<sup>109</sup> VIEGAS, C.V.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29(2), p. 326-337, 2006.

<sup>110</sup> PANDEY, R.C. Prospecting for Potentially New Pharmaceuticals from Natural Sources. **Medicinal Research Reviews**, v. 18, p. 333-346, 1998.

<sup>111</sup> BÔAS, G.K.V.; GADELHA, C.A.G. Opportunities in the pharmaceutical industry and the local development logic based on the Brazilian biomes: the basis for a national policy discussion. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro. v. 23(6), p. 1463-1471, 2007.

<sup>112</sup> LAMPÉN, L.R. Interactions of natural products with  $\beta$ -lactoglobulins, members of the lipocalin family. **Universidade Federal de Ouro Preto**. 162p. 2009. Dissertação

- 
- <sup>113</sup> VOLPATO, A.M.M. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (ASTERACEAE) para seu emprego como fitoterápico. **Universidade Estadual de Ponta Grossa**. 132p. 2005, Tese.
- <sup>114</sup> MOLINARI, G. Natural products in drug discovery: present status and perspectives. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 655, p. 13-27, 2009.
- <sup>115</sup> KINGSTON, D.G.I. Modern Natural Products Drug Discovery and its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 496–511, 2011.
- <sup>116</sup> NETO, T.S.N.; GARDNER, D.; HALLWASS, F.; LEITE, A.J.M.; ALMEIDA, C.G.; SILVA, L.N.; ROQUE, A.A.; BITENCOURT, F.G.; BARBOSA, E.G.; TASCA, T.; MACEDO, A.J.; ALMEIDA, M.V.; GIORDANI, R.B. Activity of pyrrolizidine alkaloids against biofilm formation and *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 323–329, 2016.
- <sup>117</sup> PÉREZ, C.; AGNESE, A.M.; CABRERA, J.L. The essential oil of *Senecio graveolens* (Compositae): chemical composition and antimicrobial activity tests **Journal of Ethnopharmacology**. v. 66, p. 91-96, 1999.
- <sup>118</sup> DEUSCHLE, R.; CAMARGO T.; FRANCESCATO L.N.; ALVES, S.H.; HEINZMANN, B.M. Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Compositae) **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 25, p. 356-359, 2006.
- <sup>119</sup> JAIN S.; SHARMA, R. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium ellipticum*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 35, p. 3487–3489, 1987.

---

<sup>120</sup> NIWA, H.; OGAWA, T.; OKAMOTO, O.; YAMADA, K. Total synthesis of optically active monocrotaline, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid possessing an eleven-membered retronecine dilactone. **Tetrahedron**, v. 48, p. 10531–10548, 1992.

<sup>121</sup> LEE J.H.; CHO M.H.; LEE, J. 3-indolylacetonitrile decreases *Escherichia coli* O157:H7 biofilm formation and *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Environmental Microbiology**, v. 13, p. 62–73, 2011.

<sup>122</sup> DUSANE, D.H.; HOSSEINIDOUST, Z.; ASADISHAD, B.; TUFENKJI, N. Alkaloids Modulate Motility, Biofilm Formation and Antibiotic Susceptibility of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Plos One**, v. 9, p. 112-123, 2014.

<sup>123</sup> NORIZAN, S.N.M.; YIN, W.F.; CHAN, K.G. Caffeine as a potential quorum sensing inhibitor. **Sensors**. v. 13, p. 5117–5129, 2013.

<sup>124</sup> MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; SÉGUIN, D.L.; GUAY, I.; GATTUSO, M.; MARSAULT, E.; BOUARAB, K.; MALOUIN, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 559–568, 2012.

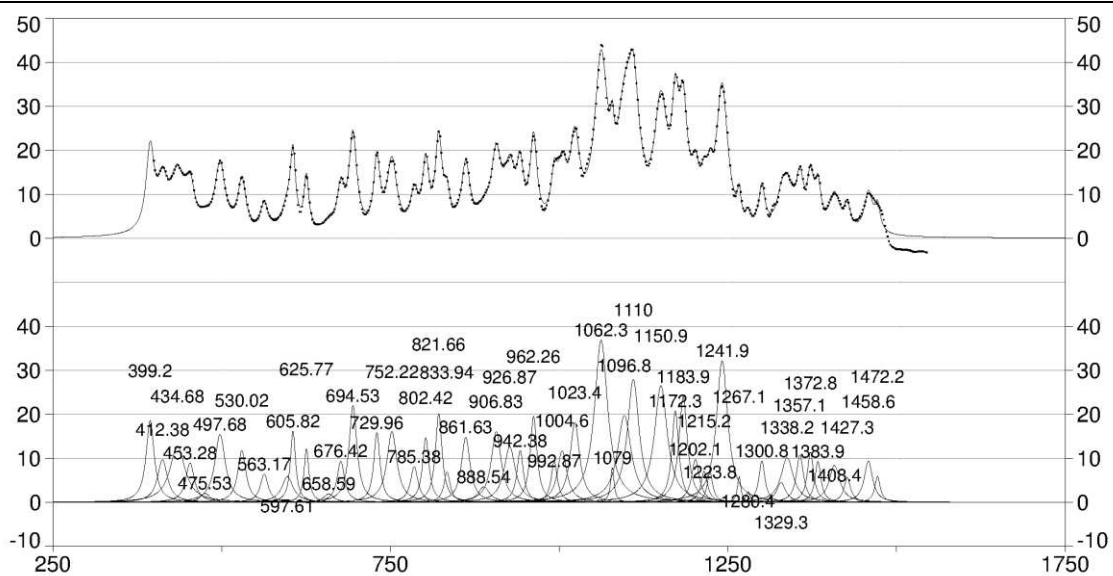
<sup>125</sup> HUIGENS, R.W.; MA, L.; GAMBINO, L.; MOELLER, P.D.; BASSO, A.; CAVANAGH, J.; WOZNAK, D.J.; MELANDER, C. Control of bacterial biofilms with marine alkaloid derivatives. **Molecular BioSystems**, v. 4, p. 614–621, 2008.

---

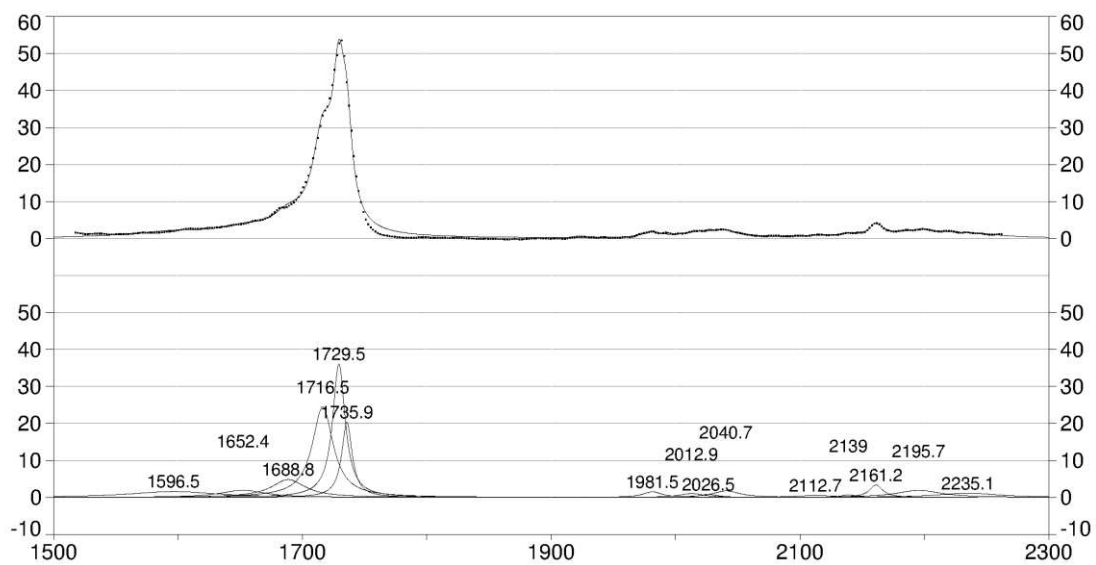
<sup>126</sup> WANG, X.; QIU, S.; YAO, X.; TANG, T.; DAI, K.; ZHU, Z.A. Berberine inhibits *Staphylococcus epidermidis* adhesion and biofilm formation on the surface of titanium alloy. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 27, p. 1487–1492, 2009.

---

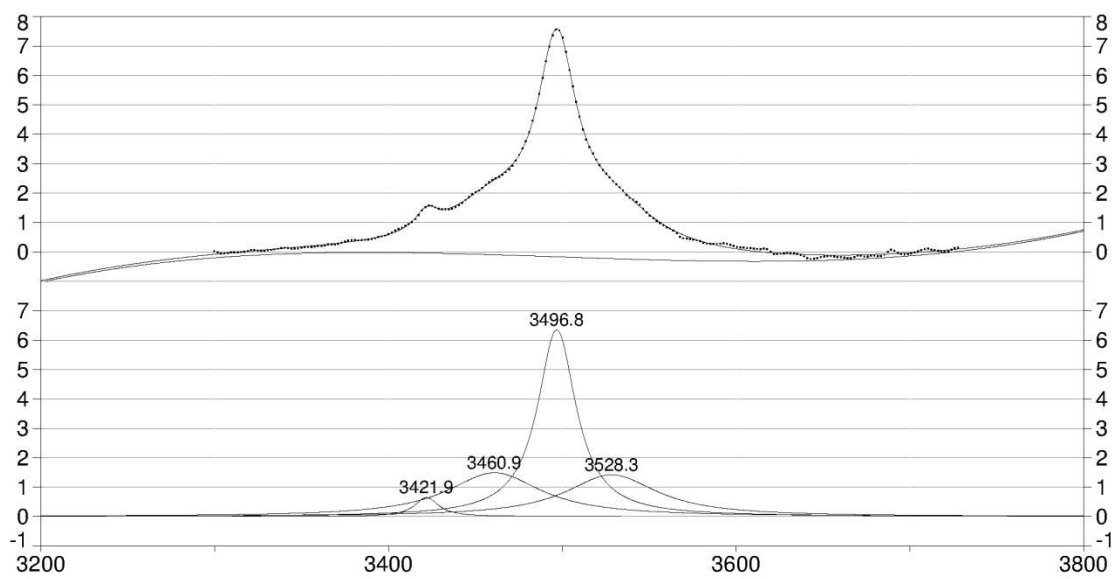
**ANEXO A**  
**Espectros no Infravermelho**



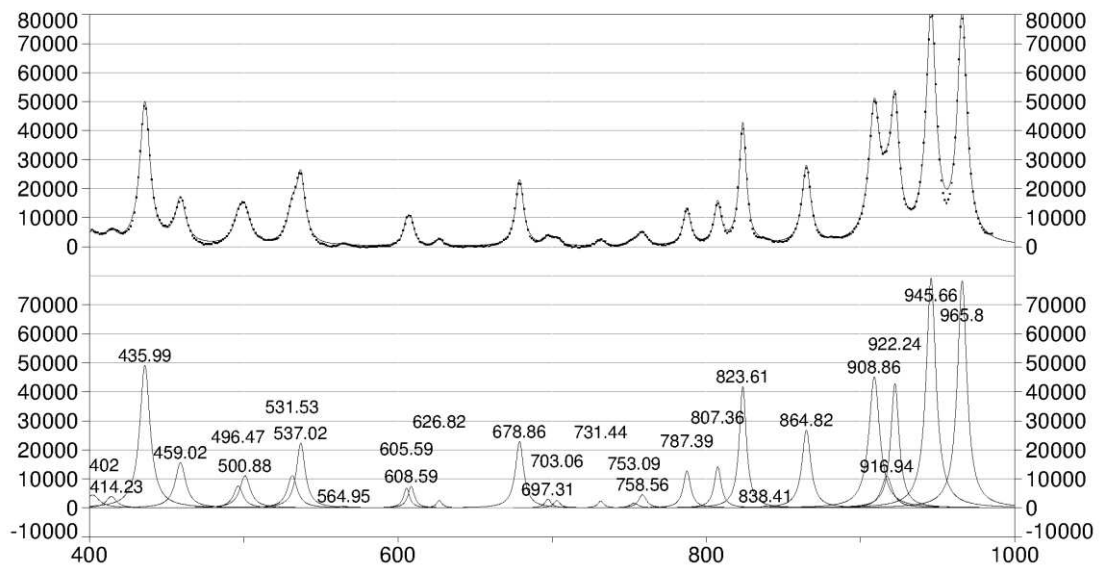
**Figura A1.** Espectro IV deconvolvido da monocrotalina na região entre 250-1750  $\text{cm}^{-1}$ .



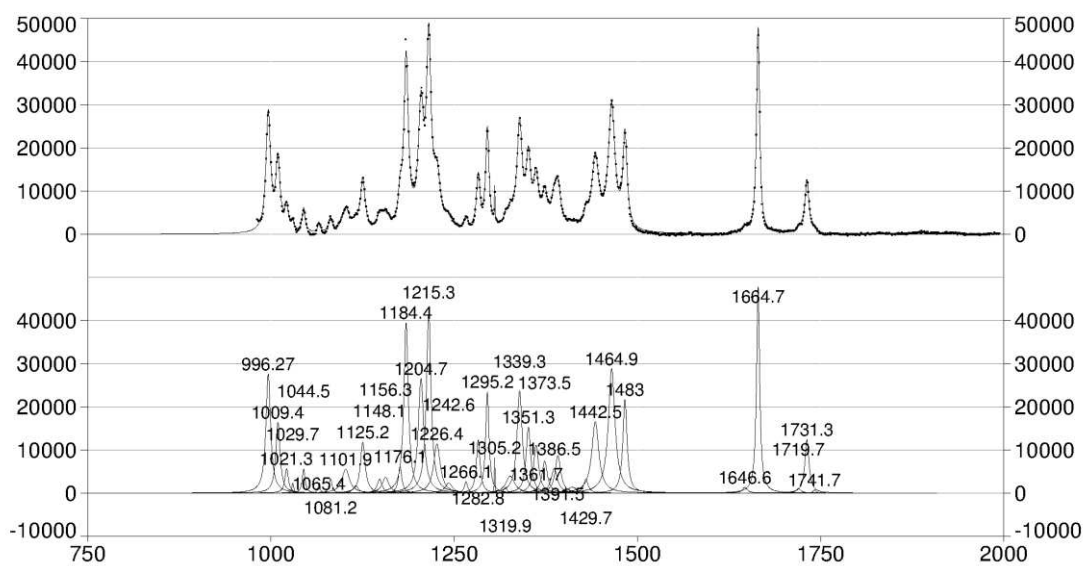
**Figura A2.** Espectro IV deconvolvido da monocrotalina na região entre 1500-2300  $\text{cm}^{-1}$ .



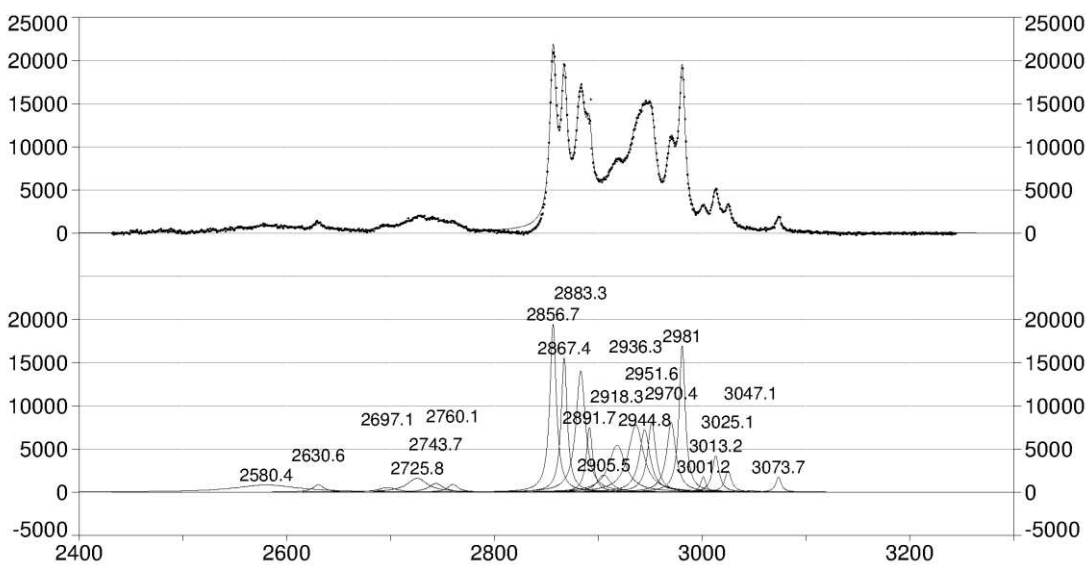
**Figura A3.** Espectro IV deconvoluido da monocrotalina na região entre 3200-3800  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura A4.** Espectro Raman deconvoluido da monocrotalina na região entre 400-1000  $\text{cm}^{-1}$ .



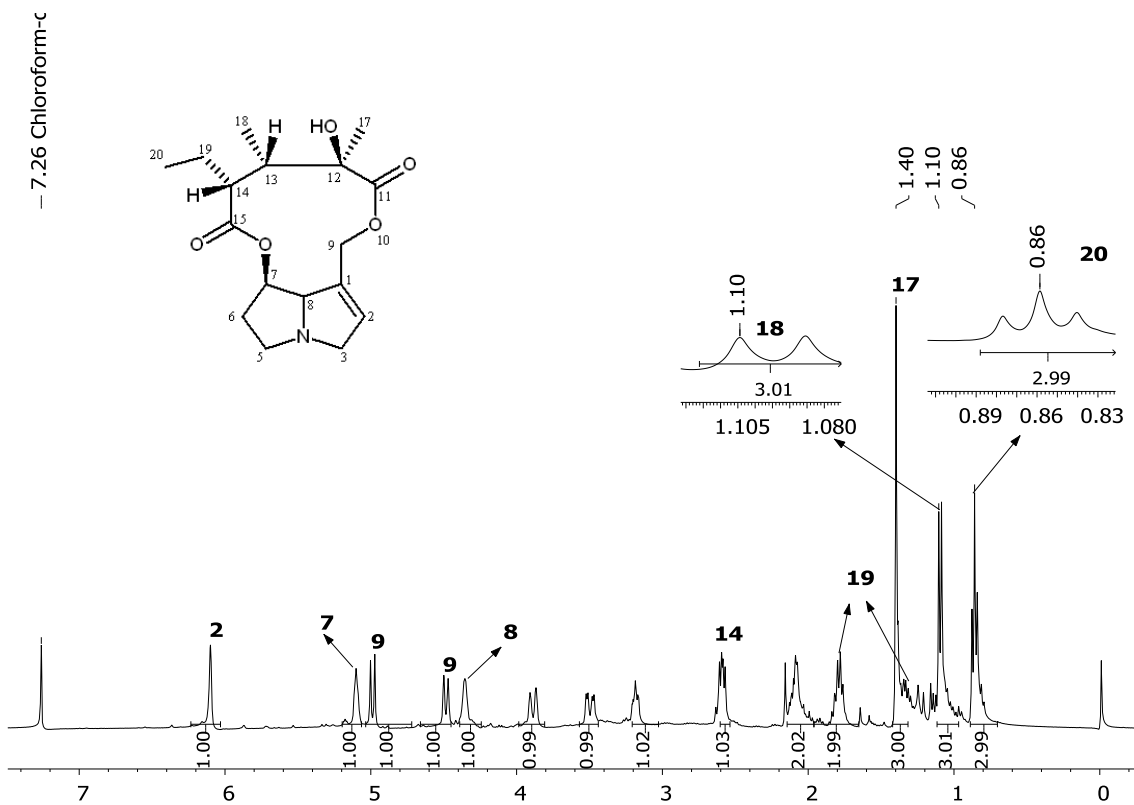
**Figura A5.** Espectro Raman deconvolvido da monocrotalina na região entre 750-2000  $\text{cm}^{-1}$ .



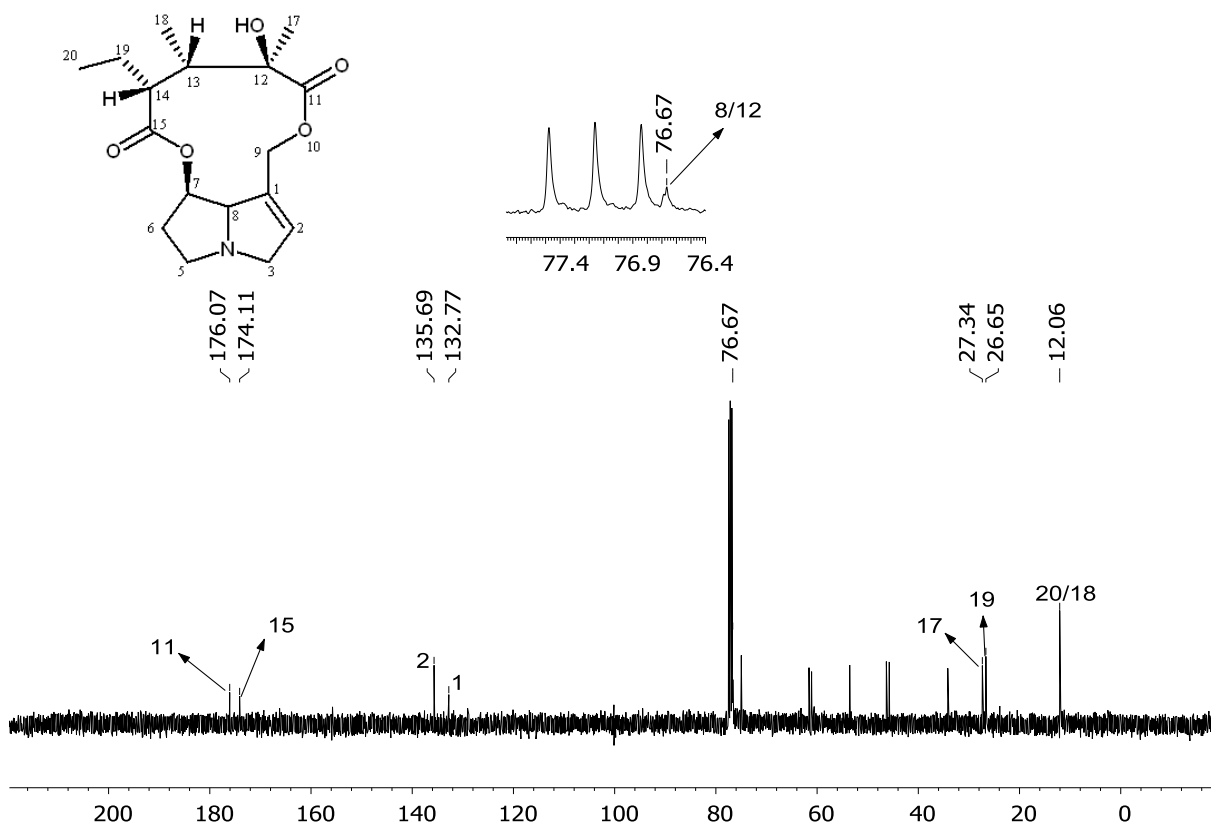
**Figura A6.** Espectro Raman deconvolvido da monocrotalina na região entre 2400-3300  $\text{cm}^{-1}$ .

---

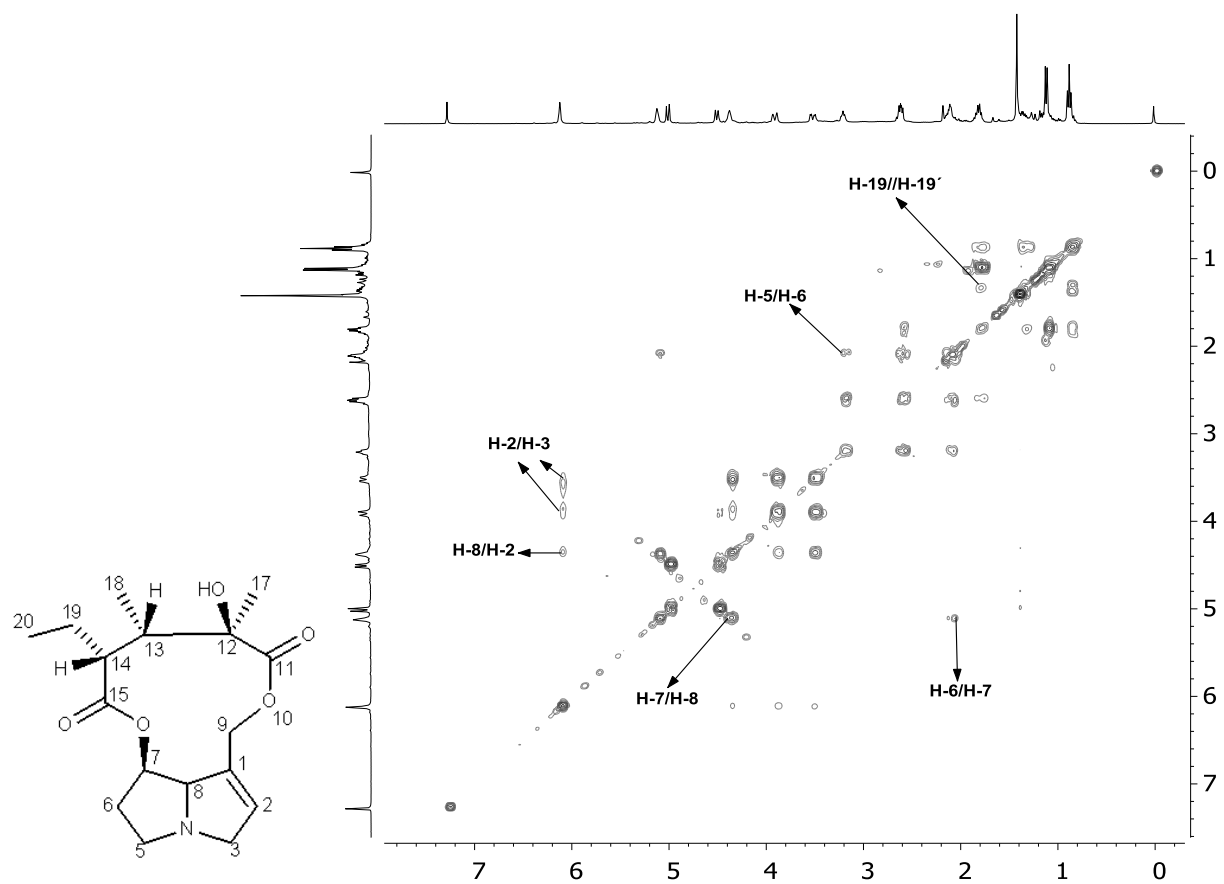
**Anexo B**  
**Espectros de RMN**



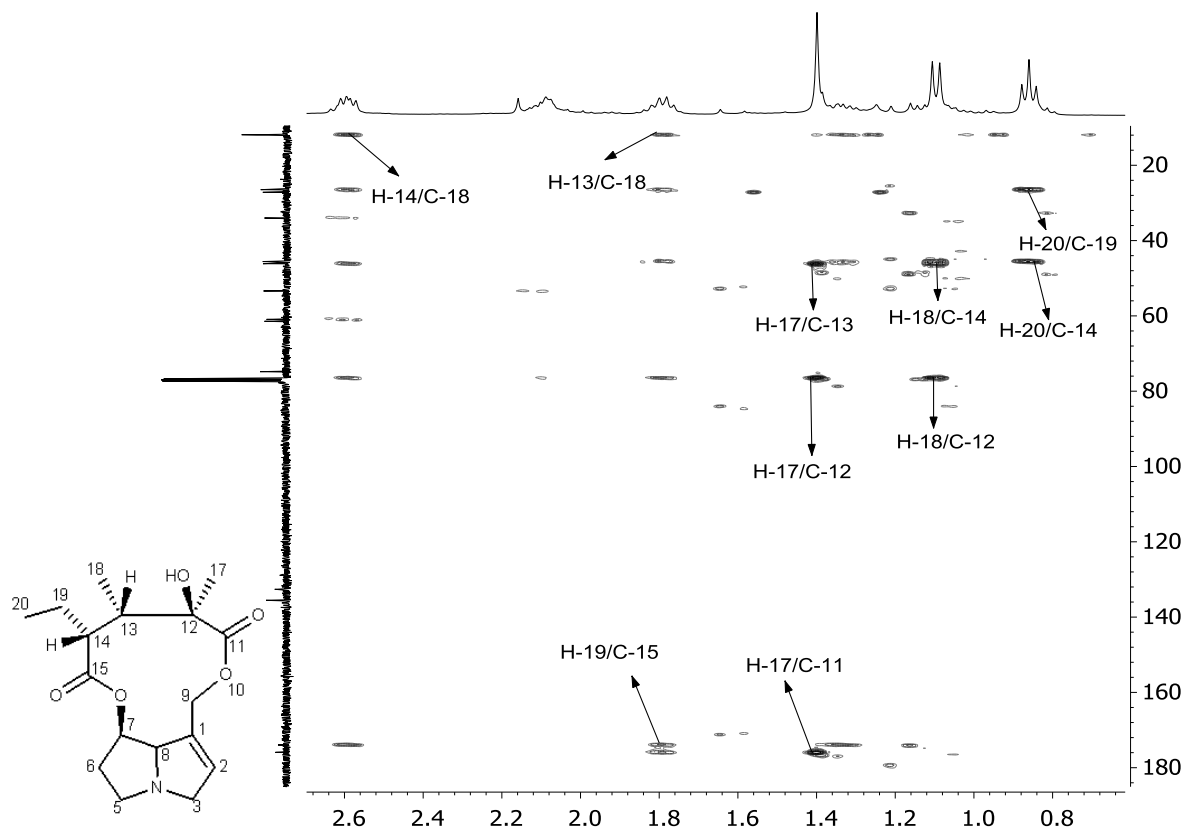
**Figura B1** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da etilcrotalina



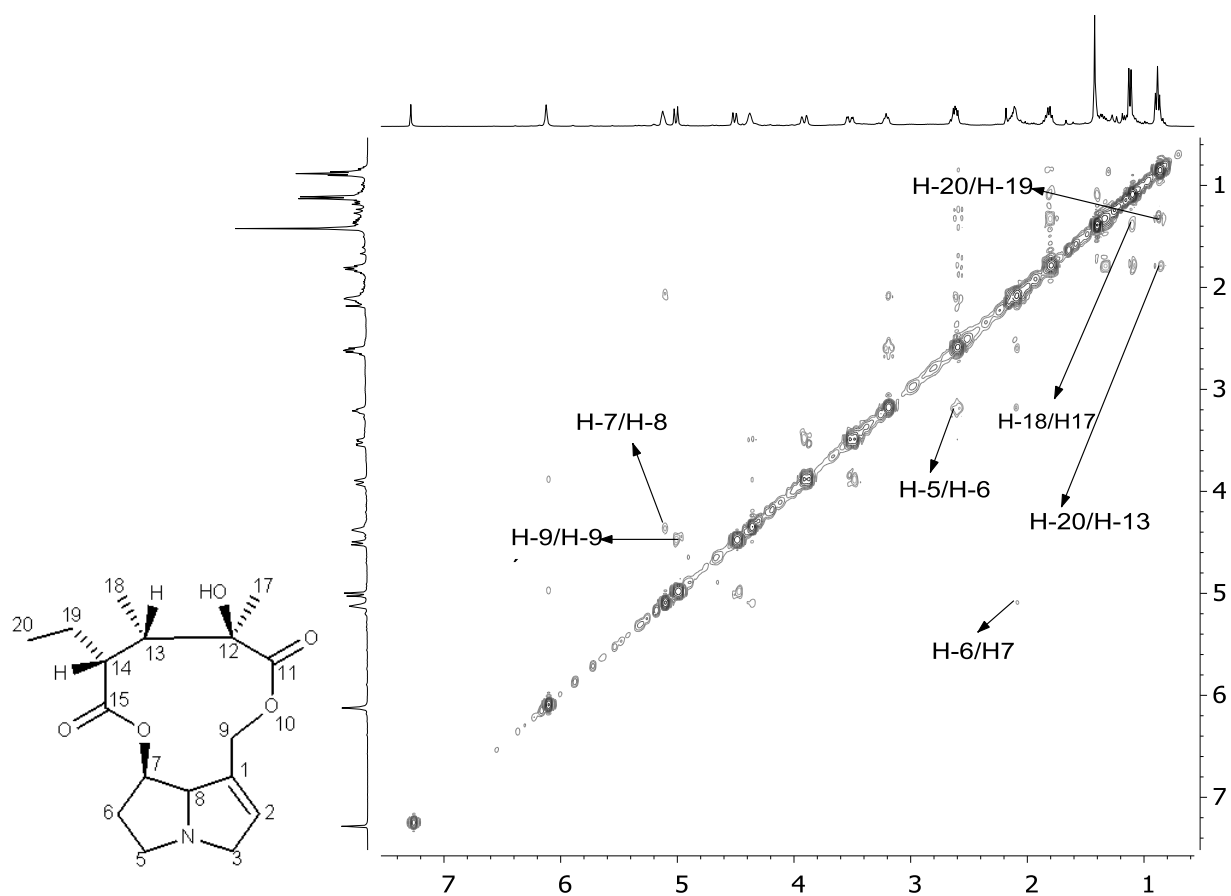
**Figura B2** - Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da etilcrotalina.



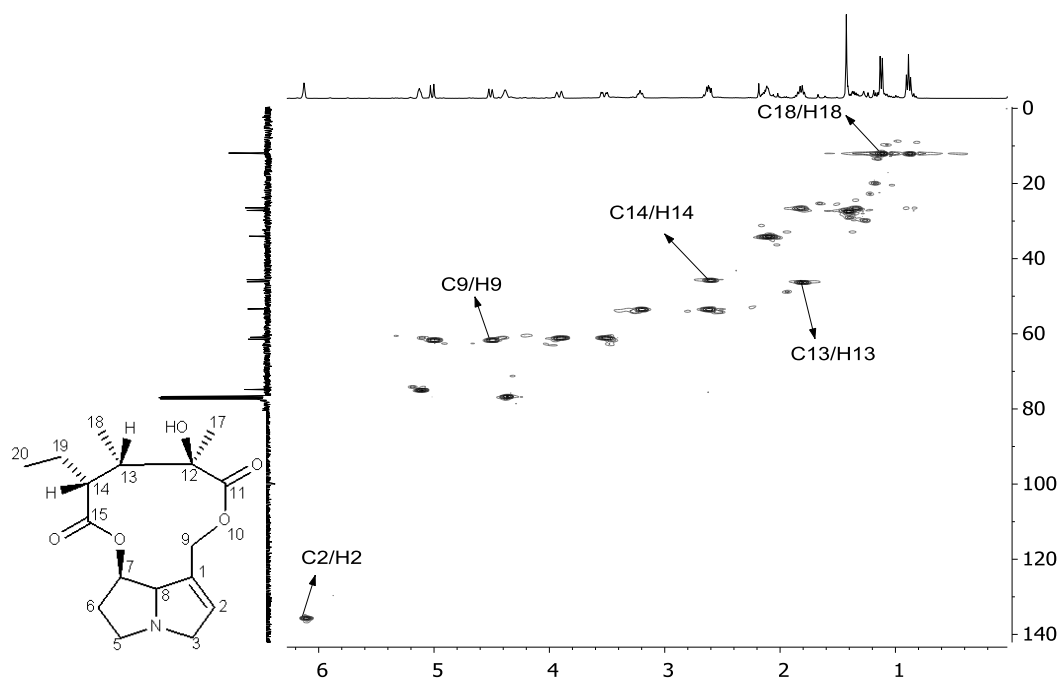
**Figura B3** - Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da etilcrotalina



**Figura B4** - Mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da etilcrotalina



**Figura B5** - Mapa de contornos NOESY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da etilcrotalina



**Figura B6** - Mapa de contornos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da etilcrotalina