

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA – UFPB
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS
BIOATIVOS

DENISE ALINE CASIMIRO BEZERRA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS TÓXICAS DO SEMIÁRIDO:
Crotalaria vitellina Ker Gawl e *Ipomoea philomega* (Vell.) House.

JOÃO PESSOA – PB

2013

DENISE ALINE CASIMIRO BEZERRA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS TÓXICAS DO
SEMIÁRIDO: *Crotalaria vitellina* Ker Gawl e *Ipomoea philomega* (Vell.) House.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de
Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba,
como requisito para a obtenção do título de Doutorado em
Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

Área de concentração: Farmacoquímica

1º ORIENTADOR: Prof. Dr. MARCELO SOBRAL DA SILVA

2º ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSEAN FECHINE TAVARES

JOÃO PESSOA – PB

2013

B574c Bezerra, Denise Aline Casimiro.
Contribuição ao estudo químico de plantas tóxicas do
Semiárido: *Crotalaria vitelina* Ker Gawl e *Ipomoea philomega*
(Vell.) House / Denise Aline Casimiro Bezerra.-- João Pessoa,
2013.
145f. : il.
Orientadores: Marcelo Sobral da Silva, Josean Fechine
Tavares
Tese (Doutorado) – UFPB/CCS
1. Produtos naturais. 2. *Crotalaria vitellina*. 3. Fabaceae.
4. Alcaloide pirrolizidínico. 5. *Ipomoea philomega*.
6. Convolvulaceae.

UFPB/BC

CDU: 547.9(043)

DENISE ALINE CASIMIRO BEZERRA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS TÓXICAS DO
SEMIÁRIDO: *Crotalaria vitellina* Ker Gawl e *Ipomoea philomega* (Vell.) House.**

Tese aprovada em: 12 / 08 / 2013

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

Universidade Federal da Paraíba (Orientador)

Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior

Universidade Federal de Alagoas – (Examinador Externo)

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa

Universidade Regional do Cariri – (Examinador Externo)

Profª Drª Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Universidade Federal da Paraíba – (Examinadora Interna)

Profª Drª Bárbara Viviana de Oliveira Santos

Universidade Federal da Paraíba - (Examinadora Interna)

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Maria Zilma Casimiro Bezerra e Cícero Soares Bezerra (**in memoriam**) pelo exemplo de amor, de fé, de humildade, honestidade e perseverança em quem orgulhosamente me espelho para me tornar um ser humano cada vez melhor,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me presentear com uma família linda que me faz perceber diariamente Seu amor e cuidado comigo, por cada pessoa que Ele coloca em minha vida que torna minha caminhada mais leve e feliz.

Aos meus pais **Maria Zilma Casimiro Bezerra** e **Cícero Soares Bezerra** (*in memoriam*) cujo apoio incondicional sempre me encorajou a buscar meus objetivos, mesmo quando as dificuldades se mostravam intransponíveis eu sempre escutava, “vai, nós damos um jeito”, ainda que esse “jeito” significasse abrir mão das suas próprias realizações. Por me passarem valores morais e éticos que norteiam minha vida e principalmente por terem me apresentado a Deus e assim poder experimentar do seu infinito amor!

Aos meus irmãos **José Dalton Casimiro Bezerra**, **Cícero Wanderlô Casimiro Bezerra** e **Ana Lígia Casimiro Bezerra** (meus três amores) pelo amor, companheirismo e convivência harmoniosa que tornam minha vida muito mais alegre e cheia de graça! Obrigada por todo apoio! Saber que posso contar com vocês me impulsiona a ir cada vez mais longe! A minha cunhada **Rebeca Napoleão de Araújo** pela amizade, conselhos sábios, pelas ligações tão providenciais, como se “adivinhasse” quando preciso ouvir palavras de incentivo. Obrigada por fazer parte de nossas vidas!

À minha avó **Ubalдина Casimiro** por todo o carinho e dedicação!!!

À **família Silveira**, “minha família paraibana”, que me adotou e acolheu com carinho, **Raffaela** e **D. Betânia Medeiros e Moraes**, **D. Beta**, **Beatriz** (*in memoriam*), **Vanessa** e todo o clã **Silveira** de Campina Grande, que na ausência da minha família de sangue, é o lugar onde encontro aconchego, carinho e cuidado como se fosse a minha casa! À **Paula Gecyslane**, minha amiga querida que me acolheu e me apresentou o que havia de melhor em João Pessoa, a quem devo o amor e o encantamento que tenho por essa cidade.

Aos meus orientadores **Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva** e **Prof. Dr. Josean Fachine Tavares** pelo acolhimento, apoio, paciência, por seus ensinamentos, e toda a dedicação dispensada na execução desse trabalho.

À Prof^a Dra. **Marianna Vieira Sobral Castelo Branco**, pela parceria e dedicação na realização dos ensaios toxicológicos. Às alunas do LABETOX **Tatiane Motta**, **Débora**, **Monaliza**, **Aline Xavier**, **Heloísa** e **João Carlos** por toda a ajuda, dedicação e paciência na realização dos experimentos.

À minha turma do doutorado 2009.1, **Marianne Guedes**, **Antonilêni Medeiros**, **Fabiana Lima**, **Analucia Guedes** e **Ana Paloma** pela convivência harmoniosa no laboratório, pelo

apoio nas disciplinas, relatórios, enfim todas as experiências trocadas. A **Meri Emili** também todo o meu carinho e agradecimento por toda atenção a mim dedicada no período da seleção do doutorado.

À turma de mestrado **2009.1** com quem compartilhei boa parte das disciplinas cursadas, por tanto tempo de convivência considero como minha essa turma de pessoas muito especiais que para não correr o risco de esquecer de citar alguém evitarei colocar os nomes, mas todos, sem exceção foram grandes companheiros, muitos dos quais se tornaram amigos que quero levar pra sempre no meu coração.

À Equipe Sobral **Sócrates Golzio, Vicente Carlos, Steno Lacerda, Paula Ferreira, Camila Albuquerque, Sarah Alves, Caroline Siqueira, Marcelo Cavalcante (Manso), Viviane Marcelino, Isis Fernandes, Helane Fabrícia, Andressa, Amanda, Fernanda, Thainá, Anne Dayse, Suzyane, Clarice, Ania Ochoa e Tânia (cubanas)** por todo apoio, incentivo e ajuda no dia a dia do laboratório, pela agradável convivência que tornam a rotina da bancada mais leve e menos cansativa.

Aos alunos de iniciação científica **Kaio Lucena, Amanda** e em especial a **Fernanda Lima Subrinho** por toda ajuda essencial para a realização desse trabalho, pela amizade que quero levar pra sempre comigo.

Aos alunos da equipe da Professora Fátima Vanderley, **Marianne Guedes, Yanna Teles, Milen, Jéssica, Otemberg, Denise, Michaelly, Thiago, Raffaella, Severino, Thalysson, Francisco Casimiro**, meus queridos colegas de bancada, **Camila Figueiredo** (Equipe Barbosa) pela convivência harmoniosa, compartilhamento de vidrarias, solventes, enfim tudo o que era necessário para facilitar nosso trabalho no laboratório. Pelas conversas divertidas, momentos agradáveis de intervalos para lanche, companhia para ficar até mais tarde no laboratório, que faziam a rotina e o ritmo de trabalho mais leve. Além dos demais colegas de laboratórios adjacentes, **Jaqueline, Jéssica Celestino, Madalena, Gracielly, Ana Silvia, Raquel, Salete, Flávio, Evandro, Micheline Marques, Antonilêni, Aline Coutinho, Eugênia Abrantes e Ayala, Narlize Lira**, pela agradabilíssima companhia.

À **Paula Ferreira dos Santos** (“afilhada do coração”), pela amizade, confiança, ombro amigo, por todo o apoio nas horas difíceis, por todos os bons momentos compartilhados! Chegamos juntas aqui e tenho certeza que independente de distância nossa amizade sempre seguirá inabalável.

Às amigas **Micheline Viviane, Janiere, Clécia**, pela convivência e apoio dentro e fora das dependências do laboratório, pela agradabilíssima companhia de almoços e passeios nos finais

de semana, conversas intermináveis e momentos de descontração que tornaram meus dias mais felizes.

Aos colegas de longe que passaram pelo laboratório e, apesar do pouco tempo de convivência, tornaram-se pessoas marcantes em minha vida, cuja amizade quero levar pra sempre, independente de distância são eles **Annia Ochoa (Cuba), Tannia (Cuba) e Vinicyus Teles (São Luis- MA)**.

A todos os funcionários da PgPNSB pelos diversos serviços prestados, especialmente aos técnicos, **Raimundo Nonato** por viabilizar todo o trabalho de bancada, pela gentileza e amizade. A **Vicente Carlos e Alessandro** pela obtenção dos espectros de RMN. A **Sócrates Golzio** pela obtenção dos espectros de massa e todo o suporte técnico. A **Crispim** pela obtenção dos animais para os experimentos, pela imensa ajuda na execução dos experimentos. A **Wellington**, por todos os espectros de Infravermelho. A todos vocês obrigada pela atenção e amizade!!!

A todos os **professores do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos**, pelos conhecimentos repassados que fizeram toda a diferença na minha formação acadêmica.

Aos funcionários da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos **Caroline Manguiera, Tânia Maria e Casimiro**, por toda a ajuda necessária com as questões burocráticas e pela amizade.

A todos os funcionários da limpeza e segurança, que sempre vão além das suas obrigações para nos ajudar no que for preciso são eles **Dinho, Geruza, Sr. João (segurança)** dentre outros.

Ao **CNPq** pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de doutorado .

A todos os que direta ou indiretamente participaram dessa etapa da minha vida o meu ***muitíssimo obrigada!!!!***

Denise Aline Casimiro Bezerra

RESUMO

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO DE PLANTAS TÓXICAS DO SEMIÁRIDO: *Crotalaria vitellina* Ker Gawl e *Ipomoea philomega* (Vell.) House. 2013. Tese (Doutorado em Farmacoquímica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde – CCS, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 2013.

A pesquisa sobre plantas tóxicas para animais têm-se limitado principalmente à identificação das espécies, bem como à sua epidemiologia, patologia e sinais clínicos. Sendo, no entanto, pouco conhecidos os seus princípios ativos, cujo conhecimento é de grande importância no desenvolvimento de métodos preventivos da intoxicação, responsáveis por inúmeras mortes de animais e, conseqüentemente, perdas econômicas. Visando contribuir para o conhecimento dos princípios ativos dessas plantas, as espécies *Crotalaria vitellina* Ker Gawl (Fabaceae) e *Ipomoea philomega* (Vell.) House (Convolvulaceae) foram submetidas a um estudo fitoquímico para isolamento de seus constituintes químicos por métodos cromatográficos, seguidos de identificação através de métodos espectroscópicos tais como Infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bi-dimensionais e Espectroscopia de Massas (EM) juntamente com a comparação com dados da literatura. O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto dos frutos e folhas de *C. vitellina* resultou no isolamento de um alcalóide pirrolizidínico do tipo otonecina, descrito pela primeira vez na literatura, nomeado crotavitelina (Cv-1). Essa substância foi submetida avaliação da toxicidade pré-clínica aguda, de acordo com o Guia da OECD-423 (*Guideline for Testing of Chemicals*), em camundongos (machos e fêmeas) nas doses de 50 e 300 mg/Kg e apresentou baixa toxicidade nos parâmetros avaliados. Entretanto, estudos histopatológicos, especialmente em nível de tecido hepático, devem ser realizados para a investigação de possíveis efeitos tóxicos em nível celular e tecidual. *Ipomoea philomega*, Convolvulaceae, igualmente submetida a estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das suas folhas possibilitou o isolamento de oito substâncias da fase diclorometano: lanosterol (Ip-1), ácido cafeico (Ip-2), *p*-cumarato de etila (Ip-3), lupeol (Ip-4), cafeato de etila (Ip-5), umbeliferona (Ip-6), escopoletina (Ip-7) e a 1,2-benzopirona (Ip-8), descritas pela primeira vez para *I. philomega*.

Palavras-chave: *Crotalaria vitellina*, Fabaceae, alcalóide pirrolizidínico, *Ipomoea philomega*, Convolvulaceae, toxicidade pré-clínica aguda.

ABSTRACT

CONTRIBUTION TO CHEMICAL STUDY OF POISONOUS PLANTS OF THE SEMIARID: *Crotalaria vitellina* Ker Gawl and *Ipomoea philomega* (Vell.) House. 2013. Thesis (Ph.D. in Pharmachemistry of Natural Products and Bioactive Synthetic) - Centro de Ciências da Saúde – CCS, Universidade Federal da Paraíba – UFPB, 2013.

The poisonous plants to livestock research has been restricted only the identification of poison species, epidemiology and clinical signs. But the active principle of toxic plants are little known and its knowledge its very important to develop preventive methods to poisoning which are responsible by countless cattle deaths. This work aimed the contribution to knowledge of active principle these plants, *Crotalaria vitellina* Ker Gawl (Fabaceae) e *Ipomoea philomega* (Vell.) House (Convolvulaceae). This work aimed the contribution to knowledge of active principle these plants, *Crotalaria* and *Ipomoea* were submitted to phytochemical study for the isolation of its chemical constituents by cromatographic methods followed by its identification through spectroscopic techniques such as Infrared (IR), one and two-dimentional Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of ^1H and ^{13}C , and Mass Spectrometry (MS) besides literature data. The phytochemical study of *C. vitellina* resulted on the isolation of the pyrrolizidine alkaloid (type otonecine) named crotavitelin (Cv-1), and were obtained from the crude extract of its fruits, described by first time in the literature. This substance was subjected to acute toxicological evaluation according to OECD Guide – 423 (Guideline for Testing of Chemicals), in mice (males and females) orally exposed to 50 and 300 mg/Kg doses and showed a low toxicity on the parameters evaluated. However, histopatologic studies should be performed to investigate the possible toxic effects in celular and tissue levels. *Ipomoea philomega* was submitted also to phytochemical studies and were isolated eight compounds from the dicloromethane phase of the ethanolic crude extract of the leaves: lanosterol (Ip-1), caffeic acid (Ip-2), ethyl *p*-coumarate (Ip-3), lupeol (Ip-4), ethyl caffeate (Ip-5), umbelliferone (Ip-6), scopoletin (Ip-7), and the 1,2-benzopirone (Ip-8), has been described for first time in *I. philomega*.

Keywords: *Crotalaria vitellina*, Fabaceae, pyrrolizidine alkaloid, *Ipomoea philomega*, Convolvulaceae, acute toxicological evaluation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
AST	Aspartato Aminotransferase
APT	Attached Proton Test
APs	Alcaloides Pirrolizidínicos
BB	Broad Band
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
VCM	Volume Corpuscular Médio
Cv	<i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl
CD₃OD	Metanol Deuterado
CDCl₃	Clorofórmio Deuterado
DL₅₀	Dose Letal Média
<i>d</i>	Dubleto
D	Deuterado
<i>dd</i>	Duplo-dubleto
δ	Deslocamento químico em ppm
HR-ESI-MS	High Resolution Eletron Spray Ionization Mass Spectra
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Correlation
Hz	Hertz
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IV	Infravermelho
Ip	<i>Ipomoea philomega</i> (Vell.) House
<i>J</i>	Constante de acoplamento

KBr	Brometo de potássio
<i>m</i>	Multiplete
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OECD	OECD - Guidelines for the Testing of Chemicals
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Triplete

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 -	Extração do Material Botânico de <i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl.	52
Fluxograma 2 -	Marcha para Extração de Alcaloides das folhas de <i>Crotalaria vitellina</i>	53
Fluxograma 3 -	Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico Bruto dos Frutos de <i>Crotalaria vitellina</i>	55
Fluxograma 4 -	Fracionamento Cromatográfico da Fração de Alcaloides Totais das Folhas de <i>Crotalaria vitellina</i>	55
Fluxograma 5 -	Partição líquido-líquido do Extrato Etanólico Bruto de <i>Ipomoea philomega</i> (Vell.) House.	58
Fluxograma 6 -	Fracionamento Cromatográfico da Fase Diclorometano de <i>Ipomoea philomega</i>	59
Fluxograma 7 -	Avaliação da toxicidade aguda de Cv-1	62
Fluxograma 8 -	Procedimento com as doses de 50 e 300 mg/Kg, OECD - 423	63

LISTA DE FIGURAS

Fig. nº

1	Mapa de distribuição geográfica de <i>Crotalaria</i>	29
2	<i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl	29
3	Estrutura de um alcaloide pirrolizidínico	32
4	Mapa de distribuição geográfica de <i>Ipomoea</i>	43
5	<i>Ipomoea philomega</i> (Vell.) House.	44
6	Estrutura do alcaloide pirrolizidínico isolado de <i>C. vitellina</i> , crotavitelina (Cv-1).	68
7	NOESY e efeito anisotrópico de C-1' em H-3' de Cv-1	68
8	Estrutura proposta para a retrobiossíntese da substância Cv-1	70
9	Espectro IV, (KBr, cm^{-1}) de Cv-1.	70
10	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Cv-1	71
11	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 6,0-3,0 ppm.	71
12	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 2,2-0,9 ppm.	72
13	Expansão do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 1,01-0,97 ppm.	72
14	Espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1	73
15	Expansão do espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 1,45-0,80 ppm	73
16	Expansão do espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 3,3-1,8 ppm	74
17	Expansão do espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 5,9-4,6 ppm	74
18	Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1	75
19	Expansão do espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 210,0-140,0 ppm	75
20	Expansão do espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 70,0-15,0 ppm	76
21	Espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1	76
22	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 210,0-80,0 ppm	77
23	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 77,4-76,4 ppm	77
24	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de Cv-1 na região de 65,0-15,0 ppm	78
25	Espectro de RMN ^1H e ^{13}C HMBC (CDCl_3 , 500 x 125 MHz) de Cv-1	78

26	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (CDCl_3 500 x 125 MHz) de Cv-1 na região de 210,0-140,0 ppm	79
27	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (CDCl_3 , 500 x 125 MHz) de Cv-1 na região de 80,0-10,0 ppm	79
28	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (CDCl_3 , 500 x 125 MHz) de Cv-1 na região de 174,0 -168,0 ppm	80
29	Expansão do espectro de RMN ^1H x ^{13}C HMBC (CDCl_3 , 500 x 125 MHz) de Cv-1 na região de 138,0-131,0 ppm.	80
30	Espectro de RMN ^1H X ^1H NOESY (Piridina-d5, 500 MHz) de Cv-1	81
31	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H NOESY (Piridina-d5, 500 MHz) de Cv-1 na região de 5,9-4,6 ppm.	81
32	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H NOESY (Piridina-d5, 500 MHz) de Cv-1 na região de 6,0-4,6.	82
33	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H NOESY (Piridina-d5, 500 MHz) de Cv-1 na região de 3,2-1,8 ppm.	82
34	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H NOESY (Piridina-d5, 500 MHz) de Cv-1.	83
35	Espectro de RMN ^1H X ^1H COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1	83
36	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 6,2-4,0 ppm	84
37	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 6,1-5,2 ppm	84
38	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 3,8- 1,8 ppm	85
39	Expansão do espectro de RMN ^1H X ^1H COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1 na região de 3,5-0,5 ppm	85
40	Espectro de massas ESI ⁺ - MS de Cv-1.	86
41	Estrutura do composto Ip-1, Lanosterol .	88
42	Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Ip-1	89
43	Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Ip-1 na região de 1,65-0,70 ppm	89
44	Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-1	90
45	Expansão do espectro de ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-1 na região de 33,0-16,0 ppm	90
46	Expansão do espectro de ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-1 na região de 55,0-0 ppm	91
47	Estrutura do composto Ip-2, Ácido Cafeico.	92
48	Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CD_3OD) de Ip- 2	94
49	Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) de Ip- 2 na região de 7,6-6,2 ppm	94
50	Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-2	95
51	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-2 na região de 190,0-30,0 ppm	95
52	Estrutura do composto Ip-3, <i>p</i> -cumarato de etila.	96
53	Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de Ip-3	98

54	Expansão do espectro de RMN (500 MHz, CDCl ₃) de Ip-3 na região de 8,1-6,1 ppm.	98
55	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Ip-3 na região de 4,5-3,9 ppm	99
56	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Ip-3 na região de 1,8-0 ppm	99
57	Espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de Ip-3	100
58	Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de Ip-3 na região de 160,0-112,0 ppm	100
59	Estrutura do composto Ip-4, Lupeol	102
60	Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de Ip-4	103
61	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de Ip-4	103
62	Expansão do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de Ip-4 na região de 5,1-2,2 ppm	103
63	Expansão do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CDCl ₃) de Ip-4 na região de 1,85-0,55 ppm	104
64	Espectro de RMN ¹³ C APT (50 MHz, CDCl ₃) de Ip-4	104
65	Expansão do espectro de RMN ¹³ C APT (50 MHz, CDCl ₃) de Ip-4 na região de 60,0-34,0 ppm	105
66	Estrutura do composto Ip-5, Cafeato de etila	106
67	Espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) de Ip-5	107
68	Expansão do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) de Ip-5 na região de 9,5-1,0 ppm	107
69	Expansão do espectro de RMN ¹ H (200 MHz, CD ₃ OD) de Ip-5 na região de 5,4-1,0 ppm	108
70	ESI ⁻ - MS de Ip-5, Cafeato de Etila	108
71	Estrutura do composto Ip-6, Umbeliferona.	109
72	Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de Ip-6	111
73	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Acetona D ₆) de Ip-6	111
74	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, Acetona D ₆) de Ip-6 na região de 8,5-6,1 ppm	112
75	Espectro de RMN ¹³ C BB (125 MHz, Acetona D ₆) de Ip-6	112
76	Expansão do espectro de RMN ¹³ C BB (125 MHz, Acetona D ₆) de Ip-6 na região de 114,5-11,9 ppm	113
77	Estrutura do composto Ip-7, Escopoletina.	115
78	Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de Ip-7	116
79	Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Ip-7	116
80	Expansão do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de Ip-7 na região de 8,2-3,8 ppm	117
81	Espectro de RMN ¹³ C APT (125 MHz, CDCl ₃) de Ip-7	117
82	Estrutura do composto Ip-8, 1,2-benzopirona	118
83	Espectro de IV (KBr, cm ⁻¹) de Ip-8	120

84	Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Ip-8 na região de 13,0-0 ppm	120
85	Expansão do espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Ip-8 na região de 7,4-5,9 ppm	121
86	Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-8	121
87	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-8 na região de 182,0-126,0 ppm	122
88	Expansão do espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-8 na região de 125,0-75,0 ppm	122

LISTA DE QUADROS

Quadro - 1	Constituintes Químicos isolados de Espécies de <i>Crotalaria</i> .	30
Quadro - 2	Alcaloides Pirrolizidínicos Isolados de Espécies de <i>Crotalaria</i>	35
Quadro - 3	Constituintes Químicos Isolados de Espécies de <i>Ipomoea</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados de RMN da substância Cv- 1, δ em ppm, J em Hz.	69
Tabela 2	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-1.	88
Tabela 3	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-2.	93
Tabela 4	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-3.	97
Tabela 5	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-4.	102
Tabela 6	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-5.	106
Tabela 7	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-6.	110
Tabela 8	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-7.	115
Tabela 9	Dados de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-8.	119
Tabela 10	Tabela 10 - Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg) sobre o consumo de água, ração e avaliação ponderal de camundongos experimentais.	124
Tabela 11	Avaliação do índice e percentual de variação ponderal dos animais (n = 6) submetidos aos diferentes tratamentos.	124
Tabela 12	Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg) no índice dos órgãos de camundongos experimentais.	125
Tabela 13	Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.	127
Tabela 14	Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos.	127
Tabela 15	Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos	128

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	22
2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	26
2.1	Considerações sobre a Família Fabaceae	26
2.1.2	Considerações sobre o gênero <i>Crotalaria</i>	27
2.2.	Alcaloides Pirrolizidínicos	32
2.3.	Considerações sobre a família Convolvulaceae	41
2.3.1.	Considerações sobre o gênero <i>Ipomoea</i>	41
3.	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo Geral	48
3.2	Objetivos Específicos	48
4.	EXPERIMENTAL	50
4.1	Especificações dos Materiais, Métodos e Equipamentos Utilizados	50
4.2	Coleta de Material Botânico	51
4.3.	Processamento do Material Botânico	51
4.4.	Obtenção dos Extratos Brutos.	52
4.4.1	Obtenção do Extrato Bruto dos Frutos de <i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl	52
4.4.1.2	Obtenção do Extrato Bruto das Folhas de <i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl	52
4.4.2.	Obtenção do Extrato Bruto das Folhas de <i>Ipomoea philomega</i> (Vell.) House.	54
4.5.	Fracionamento Cromatográfico	54
4.5.1.	Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etnólico Bruto Básico dos Frutos de <i>Crotalaria vitelina</i> Ker Gawl	54
4.5.1.2	Fracionamento Cromatográfico da Fração de Alcaloides Totais (FAT) do Extrato Etanólico Bruto das Folhas de <i>Crotalaria vitelina</i> Ker Gawl.	53
4.5.2.	Fracionamento Cromatográfico das folhas de <i>Ipomoea philomega</i> (Vell.) House.	56
4.6.	Avaliação da Toxicidade Pré-Clínica Aguda de Cv-1	60
4.6.1	Local da Pesquisa	60
4.6.2	Material	60
4.6.3	Animais	60
4.6.4	Avaliação Comportamental e Investigação da DL ₅₀	60
4.6.5	Avaliação Ponderal e Consumo de Água e Ração	64
4.6.6	Análises de Parâmetros Bioquímicos	64
4.6.7	Avaliação do Índice dos Órgãos	64
4.7.	Análise Estatística	64
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	Substância isolada de <i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl.	66
5.2.	Determinação estrutural da substância Cv-1.	66
5.3.	Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos de <i>Ipomoea philomega</i> (Vell.) House.	87

5.3.1	Determinação Estrutural da substância Ip-1	87
5.3.2.	Determinação Estrutural da substância Ip-2	92
5.3.3	Determinação Estrutural da substância Ip-3	96
5.3.4.	Determinação Estrutural da substância Ip-4	101
5.3.5.	Determinação Estrutural da substância Ip-5	106
5.3.6.	Determinação Estrutural da substância Ip-6	109
5.3.7.	Determinação Estrutural da substância Ip-7	114
5.3.7.	Determinação Estrutural da substância Ip-8	118
5.4.	Avaliação da Toxicidade Pré-Clínica Aguda de Cv-1	123
5.4.1	Avaliação comportamental e Investigação da DL ₅₀	123
5.4.2.	Avaliação Ponderal e Consumo de Água e Ração	123
5.4.3	Avaliação dos Índices dos Órgãos	125
5.4.4	Análises de Parâmetros Bioquímicos	125
6.	CONCLUSÕES	130
	REFERÊNCIAS	132
	ANEXOS	141
	Certidão do Comitê de Ética para o Uso de Animais	142
	Artigo : Structural elucidation and NMR assignments of a new pyrrolizidine alkaloid from <i>Crotalaria vitellina</i> Ker Gawl	143

Introdução



1. INTRODUÇÃO

Os vegetais respondem a diferentes estímulos ambientais, de natureza química, física e biológica, dos quais depende a sua relação e interação no ambiente no qual se encontram. Dessa forma utilizam-se da interação química, através da produção de substâncias oriundas, principalmente, do seu metabolismo secundário (PERES, 2008).

Evidências experimentais relatam que metabólitos secundários de plantas são características adaptativas que se diversificaram durante a evolução das plantas por mecanismos de seleção natural. Muitos deles estão envolvidos na proteção das plantas contra vírus, bactérias, fungos, competição entre plantas e principalmente contra herbívoros (WINK & MOHAMED, 2003). Essas substâncias têm uma distribuição muito restrita em relação aos metabólitos primários no reino vegetal, são muitas vezes encontrados apenas em uma espécie de planta ou de um grupo taxonomicamente relacionado de espécies. Elevadas concentrações de metabólitos secundários podem resultar em uma planta mais resistente a adversidades (MAZID et al., 2011). No entanto, essas substâncias podem afetar animais silvestres e domésticos inclusive seres humanos, provocando intoxicações.

Pode-se definir como planta tóxica de interesse pecuário aquela que, quando ingerida pelos animais sob condições naturais, causa danos à saúde, e pode ser letal (TOKARNIA, et al., 2000). As principais classes químicas de substâncias responsáveis pela toxicidade de plantas são: alcaloides, glicosídeos, lectinas e ácidos orgânicos (BARBOSA et al., 2007).

No Brasil, atualmente, o número de plantas que causam intoxicação espontânea em animais domésticos chega a 131 espécies e 79 gêneros e esses números aumentam permanentemente (PESSOA; MEDEIROS e RIET-CORREA, 2013). O consumo dessas plantas por animais é determinado por diversos fatores que incluem palatabilidade, carência de forragens, longos períodos de privação hídrica e introdução de animais em pastagens desconhecidas (RIET-CORREA & MÉNDEZ, 1993).

Muitas das plantas conhecidas como tóxicas são também utilizadas como forragem em algumas regiões do Brasil que, quando fornecidas em quantidade adequada, são uma importante fonte de alimento para o rebanho, principalmente em períodos de estiagem. Porém o seu consumo de forma intensificada pode acarretar intoxicações nos rebanhos, convertendo-se em perda de produtividade e, em muitos casos, dos animais intoxicados.

Plantas tóxicas de interesse zootécnico são causa de grandes perdas de produtividade no Brasil e em muitos países do mundo. Estima-se que plantas tóxicas sejam responsáveis pela morte de cerca de 1.755,763 bovinos no Brasil, o que corresponde a aproximadamente

15,83% das causas de mortes desses animais no país (PESSOA, MEDEIROS e RIET-CORREA, 2013).

Pequenos ruminantes também são muito vulneráveis à intoxicações por plantas, fato que também se reflete em redução de produtividade nas diversas regiões do país. No Rio Grande do Sul a mortalidade de ovinos afeta 15-20%, chegando a perdas de 54.000 a 72.000 animais ao ano (RIET CORREA & MEDEIROS, 2001). Em regiões como o Nordeste, por exemplo, onde os rebanhos de pequenos ruminantes são expressivos e representam importante fonte de renda para a população rural, as intoxicações por plantas também são uma das principais causas de perdas de animais. No estado da Paraíba estima-se que a perda econômica anual, por morte de animais por intoxicação, em ruminantes e equinos, seja de R\$ 2.733.097,00 (ASSIS, et al, 2010). A importância econômica das plantas tóxicas deve-se a três fatores: perdas por mortes de animais; perdas por diminuição da produção e por custos das medidas de controle e profilaxia (RIET-CORREA; MEDEIROS 2001).

A pesquisa sobre plantas tóxicas atualmente tem se limitado principalmente a identificação das espécies tóxicas, bem como a sua epidemiologia, patologia e sinais clínicos, limitando uma ação eficaz na redução de casos e pouco se investiu na identificação do princípio ativo desses vegetais. Segundo Molyneux, et al. (1994), o isolamento e a caracterização dos princípios ativos tóxicos são os primeiros passos para prevenir as perdas causadas por plantas tóxicas. Esse conhecimento é necessário para desenvolver técnicas mais eficientes de controle das intoxicações por plantas e para a adoção de medidas terapêuticas adequadas. Técnicas essas obtidas a partir de programas interdisciplinares que contemplem os diferentes aspectos da intoxicação, principalmente a identificação dos princípios ativos dessas plantas.

Pesquisas *in vivo* realizadas em pequenos ruminantes pelo Grupo de Pesquisa de Plantas Tóxicas do Nordeste, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos-PB, coordenados pelo prof. Dr. Franklin Riet-Correa, tem contribuído significativamente para o conhecimento e identificação de plantas tóxicas no que diz respeito aos seus aspectos clínicos, patológicos e epidemiológicos de inúmeras espécies tóxicas para animais de produção. Até o ano 2000 eram conhecidas apenas 8 plantas tóxicas no estado da Paraíba e, após a criação desse grupo de pesquisa este número aumentou para 21 plantas tóxicas (RIET-CORREA et al. 2006). Esses estudos tem resultado em importante fonte de pesquisa e informação para pesquisadores e produtores rurais sobre o conhecimento das principais plantas tóxicas da região Nordeste. No entanto há ainda dificuldades em identificar os constituintes químicos dessas plantas responsáveis pela atividade tóxica. De acordo com Riet-

Correa & Medeiros, (2001) é desconhecido o princípio ativo de, pelo menos, 32 das 88 espécies tóxicas descritas no Brasil.

Desta forma, diante da importância de responder às necessidades de produtores rurais, bem como do crescente mercado de carnes brasileiro, sobre um tratamento eficaz para intoxicações por plantas que evite ou reduza as perdas dos animais, propõe-se a realização de um trabalho que viabilize o isolamento e a identificação dos princípios ativos de duas espécies de plantas potencialmente tóxicas do Semiárido paraibano: *Crotalaria vitellina* Ker Gawl e *Ipomoea phillomega* (Vell.) House cujos princípios tóxicos e não tóxicos ainda são desconhecidos.

Fundamentação Teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações Sobre a Família Fabaceae

Fabaceae Lindl. (Leguminosae Juss) é considerada a terceira maior família de angiospermas, com 727 gêneros e 19.325 espécies, distribuídas em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LEWIS et al., 2005). As análises filogenéticas têm demonstrado que Fabaceae é uma família monofilética (WOJCIECHOWSKI, 2003; WOJCIECHOWSKI et al. 2004). Em termos taxonômicos as subfamílias Papilionoideae e Mimosoideae são relatadas como monofiléticas, mas elas são abrigadas na subfamília Caesalpinioideae, que é parafilética (QUEIROZ, 2009).

É típico em Fabaceae o fruto em forma de legume (vagem) de deiscência valvar, seguindo as suturas dorsal e ventral com várias sementes em fileira. As inflorescências são sempre racemosas; há panículas, cachos, espigas, capítulos e flores solitárias (SCHULTZ, 1984).

As Fabaceae (Papilionoideae) são caracterizadas pelas folhas geralmente pinadas, na maioria trifolioladas ou plurifolioladas, nunca bipinadas; flores papilionáceas com simetria zigomorfa e corola com prefloração imbricada vexilar; sementes com a região do hilo bem delimitada e radícula com eixo infletido (GUNN 1981; POLHILL 1981), o que as diferencia das Caesalpinioideae e Mimosoideae (BORTOLUZZI et al., 2004).

Essa família é de grande importância ecológica e econômica já que além de possuir inúmeras espécies com potencial alimentício, medicinal, madeireiro, produtor de fibras e óleos, contribui com a fixação de Nitrogênio no solo, (WOJCIECHOWSKI et al. 2004), através de associação simbiótica com bactérias fixadoras de N₂, como as do gênero *Rhizobium*, auxiliando na recuperação de áreas degradadas e na manutenção da sustentabilidade dos solos (HERRERA et al. 1993, FRANCO & FARIA, 1997).

No Brasil, Fabaceae está representada por 188 gêneros e 2100 espécies, distribuídas em quase todas as formações vegetais (LEWIS, et al, 2005). Porém, as espécies que compõem essa família, se diferenciam entre as áreas, não só quanto à ocorrência, mas quanto à abundância (TUCKER, 2003).

Essa família também possui grande interesse econômico, como por exemplo, espécies usadas na alimentação humana, como o feijão (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glycine max*), o amendoim (*Arachys hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o grão-de-bico (*Cicer arietinum*) e o tamarindo (*Tamarinus indica*). Inúmeras espécies de Fabaceae são usadas como

ornamentais, sendo a principal família usada na arborização urbana no Brasil (SOUZA; LORENZI, 2008).

A fitoquímica de Fabaceae é comparativamente bem documentada. Vários tipos de alcaloides, aminoácidos não-proteicos, aminas, flavonoides, isoflavonoides, cumarinas, fenilpropanoides, antraquinonas, di-, sesqui e triterpenos, glicosídeos cianogênicos, inibidores da protease e lectinas têm sido descritos nesta família, a maioria atuam na defesa química ou como compostos sinalizadores (WINK & MOHAMED, 2003). Também podem ser encontrados taninos, alguns glicosídeos cianogênicos, cristais de proteínas e também grãos de amido (JUDD, 1999). Essas substâncias exercem distintos e importantes papéis sobre a saúde humana pela sua atividade biológica diversificada, tais como ação antimicrobiana, antitumoral, efeitos tóxicos, mutagenicidade, dentre tantos outros, o que mostra a necessidade de estudos aprofundados para uma melhor exploração desse potencial biológico. (SOUZA et al., 2005).

Nas décadas de 70 e 80, Harbone (1999) relacionou 500 tipos diferentes de fitoalexinas (substância produzida pelo vegetal em resposta a uma infecção por um agente patogênico em espécies de Fabaceae), contribuindo, dessa forma, para o conhecimento quimiotaxonômico desta família. Através desses estudos, ficou confirmado que apenas essa família botânica possui esses metabólitos de defesa com tamanha variedade estrutural que permite utilizá-los como marcadores filogenéticos (GRAYEY; KOKUBUM, 2001).

2.1.2. Considerações Sobre o Gênero *Crotalaria*

O gênero *Crotalaria*, pertence à subfamília Papilionoideae, com aproximadamente 600 espécies já descritas possui plantas herbáceas, arbustivas, eretas e pouco ramificadas. Estas são distribuídas principalmente por regiões tropicais e subtropicais, apenas um número restrito ocorre em regiões temperadas (FLORES; TOZZI, 2008). Seus centros de diversidade são o leste e o sul da África tropical com dois centros adicionais encontrados no México e no Brasil (FLORES; TOZZI, 2009). As espécies desse gênero adaptam-se a diferentes condições ambientais, ocorrendo em variados tipos de habitats, como áreas próximas de rios, morros litorâneos, restingas, orla de matas, campos e cerrados. As espécies são oportunistas, muito comuns em locais alterados como margem de estradas e como invasoras de culturas (FLORES & MIOTTO, 2005). O mapa de distribuição geográfica do gênero *Crotalaria* é mostrado na figura 1, pág. 29.

As plantas do gênero *Crotalaria*, no Brasil, recebem comumente nomes como “xique-xique”, “guizo-de-cascavel”, “chocalho-de-cascavel” e possuem vagens secas que quando tocadas se assemelham ao som emitido pela cauda da cascavel (WILLIAMS & MOLYNEUX, 1987). Muitas espécies são empregadas na agricultura na adubação verde. No entanto, várias espécies são responsáveis também por perdas econômicas devido à intoxicação de animais domésticos e devido à exposição da população humana que usam muitas dessas plantas na medicina popular (ATAL & SAWHNEY, 1973; MATTOCKS, 1986).

A toxicidade das espécies de *Crotalaria* se dá principalmente por estas serem produtoras de alcaloides pirrolizidínicos, um metabólito secundário encontrado principalmente em plantas das famílias Boraginaceae (todos os gêneros, incluindo *Echium* e *Heliotropum*), Asteraceae (gêneros *Senecio* e *Eupatorium*) (CHEEKE, 1998). Mais de 500 alcaloides pirrolizidínicos já são relatados na literatura, e são as principais toxinas encontradas no gênero *Crotalaria*. Além de ser uma importante linha de defesa no vegetal, são potencialmente hepatotóxicos, e apresentam efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, fetotóxicos, carcinogênicos e também são capazes de produzir inflamação, hemorragia e fibrose (HONÓRIO JÚNIOR et al, 2010).

Apesar da conhecida toxicidade, muitas espécies de *Crotalaria* apresentam compostos com atividade biológica e algumas ainda são utilizadas como medicinais em algumas partes do mundo. Na Índia, *C. juncea* é utilizada no tratamento de anemia, impetigo, menorragia, psoríase, dentre outras patologias. O extrato etanólico de suas flores e sementes foram testados frente a bactérias patogênicas e suas sementes revelaram significativa atividade antibacteriana (CHOUHAN & SINGH, 2010). A atividade antimicrobiana dos extratos aquoso, éter-de petróleo, clorofórmico e metanólico da raiz de *C. buhria* Buch.-Ham também foi comprovada, sendo eficazes contra as bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*), Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*) e os fungos *Aspergillus niger* e *Candida albicans* (KATARIA et al, 2010). Algumas das substâncias isoladas de espécies de *Crotalaria* estão ilustrados no Quadro 1, p. 30.

A espécie *Crotalaria vitellina* Ker Gawl (Fig. 2, pág. 29) é amplamente distribuída desde o México até o sul da América do Sul. No Brasil, é encontrada principalmente em restingas, nas encostas de morros litorâneos e próxima de dunas de areia no Paraná até o litoral de Santa Catarina (FLORES & MIOTO, 2005). É encontrada também na Caatinga, como outras espécies do gênero. No entanto não há na literatura relatos sobre o estudo

químico dessa espécie e a investigação dos seus constituintes pode contribuir para o conhecimento químico do gênero.

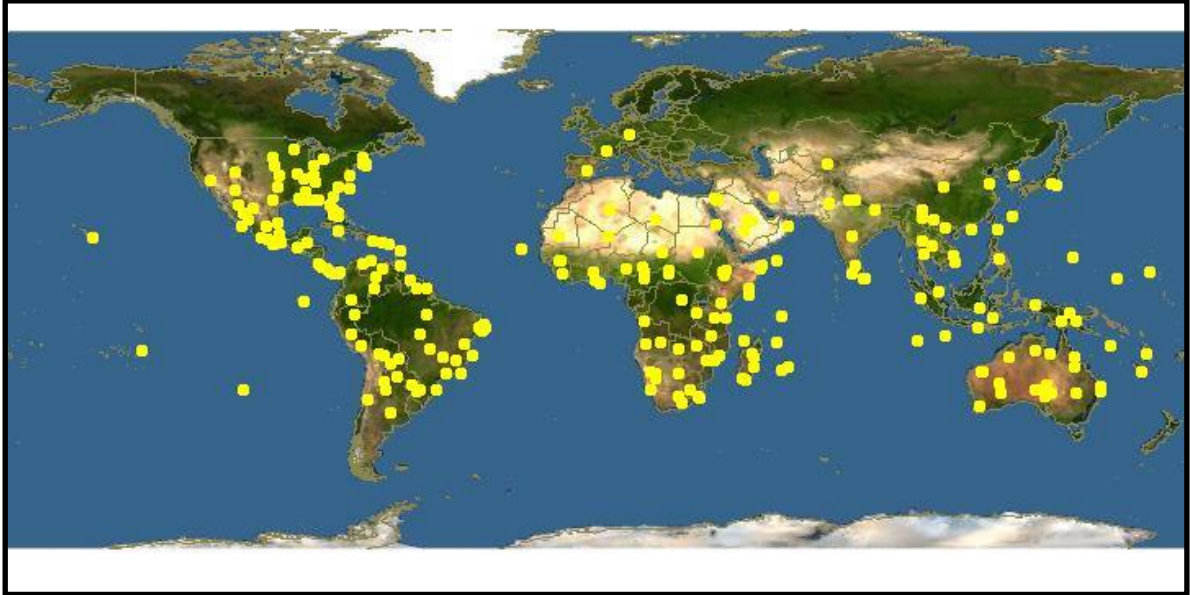


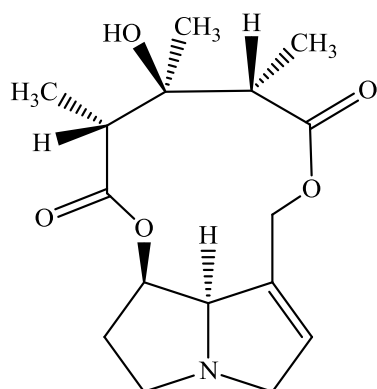
Figura 1: Mapa de distribuição geográfica de *Crotalaria* (Fonte: www.discoverlife.org)
Dez/2012



FOTO: J.F. Tavares. Jun/2011

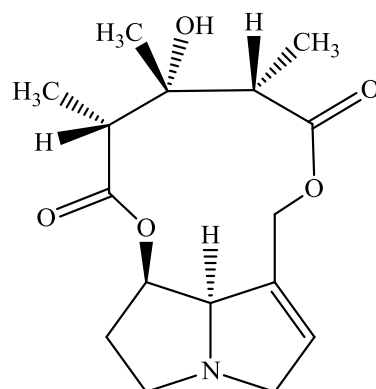
Figura 2: *Crotalaria vitellina* Ker Gawl.

Quadro 1. Constituintes Químicos Isolados de Espécies de *Crotalaria*



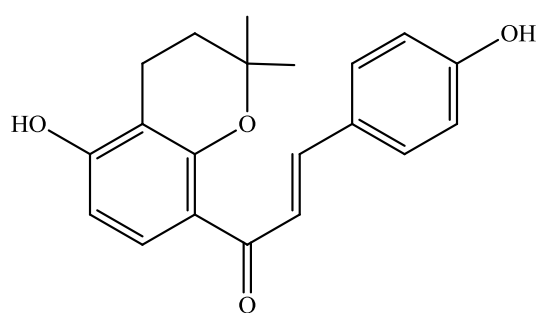
fulvina

C. fulva (CULVENOR; SMITH, 1963).



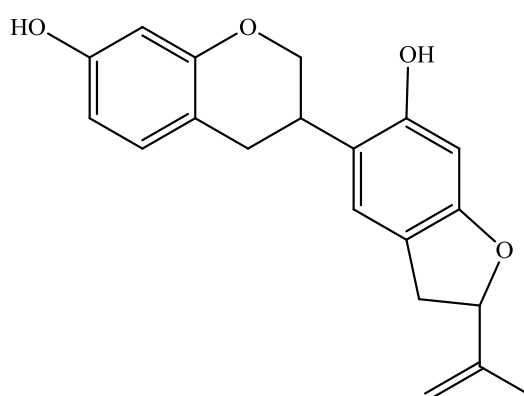
crispatina

C. fulva (CULVENOR; SMITH, 1963).



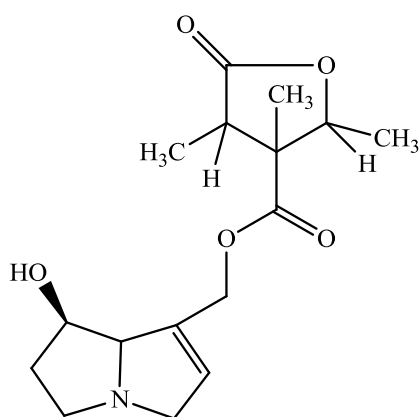
crotmadina

C. mandurensis (BHAKUNI & CHATURVEDI, 1984).



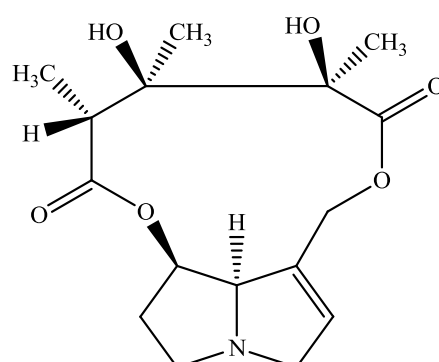
crotmarina

C. mandurensis (BHAKUNI & CHATURVEDI, 1984).



assamicadina

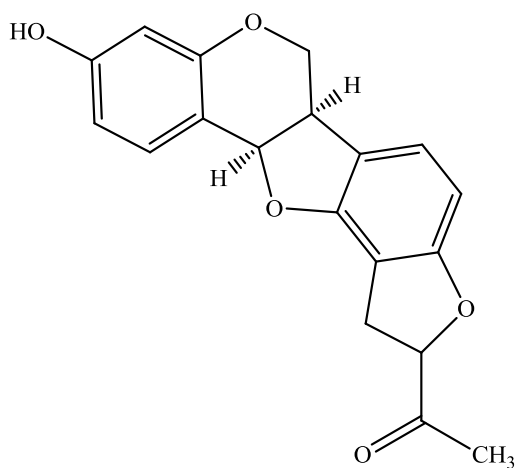
C. assamica (CHENG, LIU, CHU, 1989).



monocrotalina

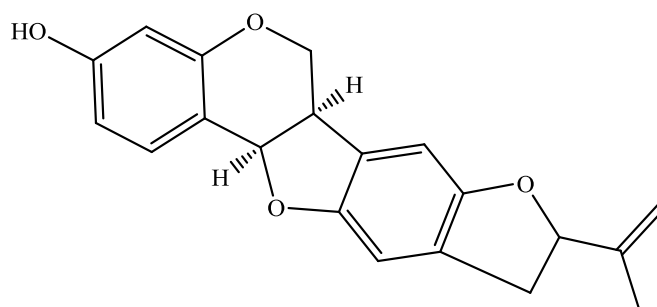
C. retusa L. (ROCHA et al, 2009)

Quadro 1. Constituintes Químicos Isolados de Espécies de *Crotalaria* (Continuação)



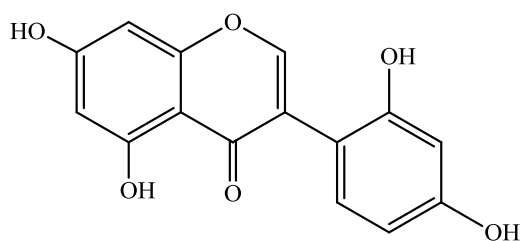
crotafurano B

C. pallida (KO et al, 2004)



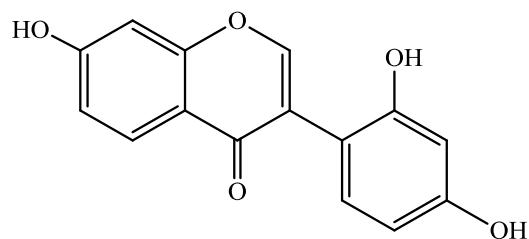
barbacarpano

C. barbata (BABU, BHANDARI, GARG, 1998)



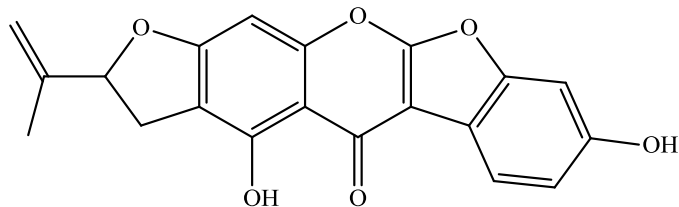
2'4'5,7- tetrahidroxiisoflavona

C. sessiflora (YOO et al, 2004)



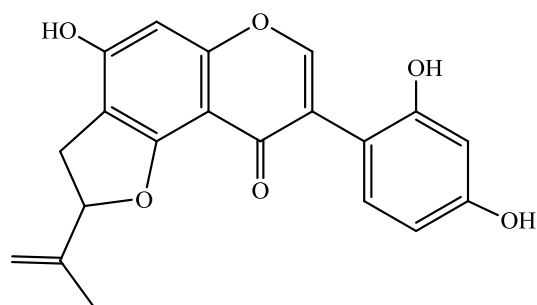
2'4',7- trihidroxiisoflavona

C. sessiflora (YOO et al, 2004)



lachnoisoflavona B

C. lachnophora (AWOUEAFACK et al, 2011)



lachnoisoflavona A

C. lachnophora (AWOUEAFACK et al, 2011)

2.2. Alcaloides Pirrolizidínicos (APs)

Alcaloides do tipo éster pirrolizidínicos (APs) geralmente contêm uma base do tipo necina, um sistema com uma fusão de anéis 5/5 com o átomo de nitrogênio como cabeça de ponte representando uma base terciária clássica. Na maioria dos casos, as necinas possuem um grupo hidroximetil no C-1, bem como um grupo hidroxila no C-7. Esses grupos hidroxila são geralmente esterificados como ácidos nécicos, de modo que esses alcaloides podem ocorrer como monoésteres, diésteres de cadeia aberta e diésteres macrocíclicos, além disso, além de C-7, eles podem também adicionalmente conter um grupo hidroxila no C-2 ou C-6, resultando na formação de estereoisômeros. As necinas podem ser saturadas ou possuir uma insaturação na posição 1,2 (ROEDER, 1999).

A necina otonecina não é somente um sistema de anel pirrolizidínico bicíclico, mas sim um N-metil azaciclooctan-4-ona que age como um 1,2-dehidropirrolizidínico, devido à ligação transanular entre o nitrogênio e o grupo carbonila, (Fig. 3, pág. 32). Os alcaloides otonecina e todos os alcaloides pirrolizidínicos com necinas incorporando uma dupla ligação entre as posições 1,2 são tóxicos (WIEDENFELD et al, 2008).

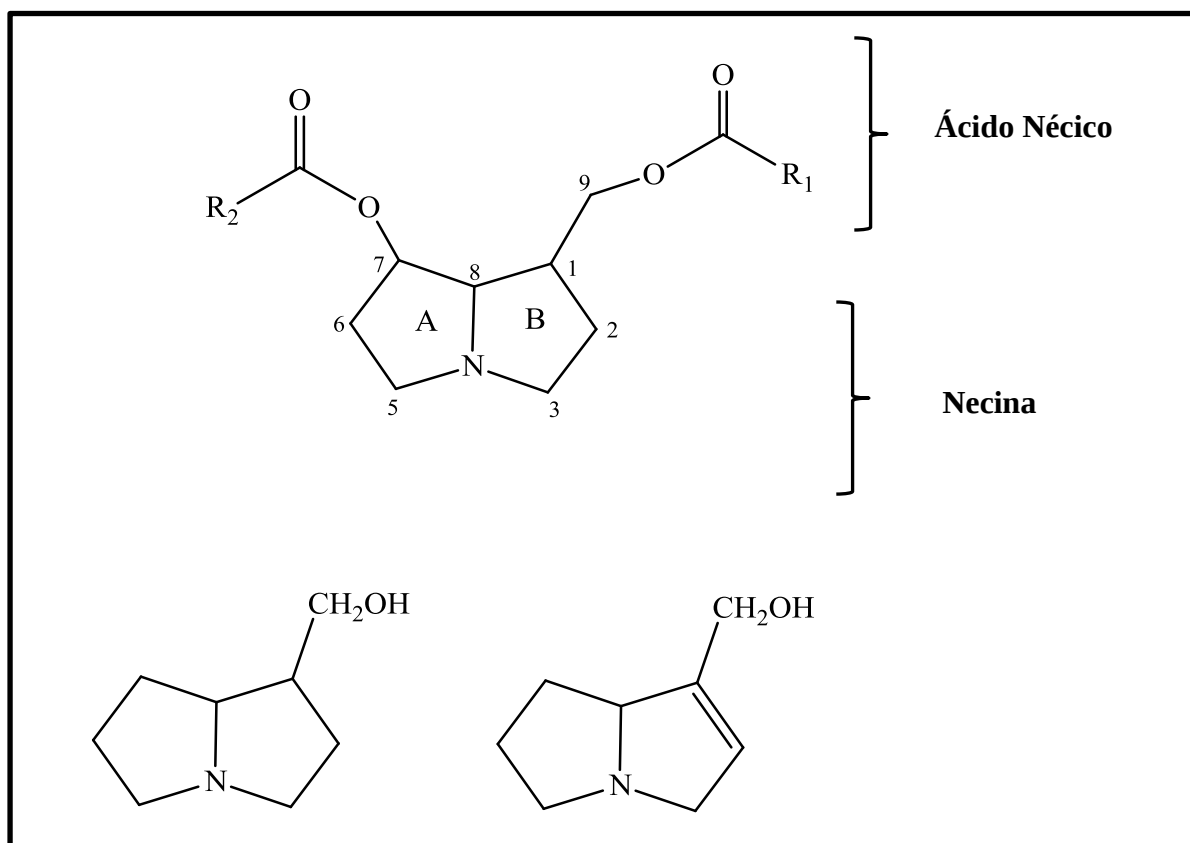


Figura 3 – Estrutura de um alcaloide pirrolizidínico. Fonte: Roeder (1999).

Os alcaloides pirrolizidínicos (APs) tóxicos são um grande grupo de substâncias, com pelo menos 160 já conhecidas, que ocorrem principalmente em espécies do gênero *Crotalaria* (Fabaceae), *Senecio*, *Heliotropium*, *Trichodesma*, *Symphytum*, *Echium* e a outros gêneros relacionados às famílias Asteraceae e Boraginaceae (PACHECO & SILVA LÓPEZ, 2010). A citotoxicidade desses compostos se dá devido aos seus metabólitos pirrólicos formados por bioativação microssomal. A biotransformação no fígado forma um agente alquilante que pode se ligar ao DNA e proteínas (ASRES, SPORER & WINK, 2004).

Essa classe de metabólitos secundários de plantas possui importantes atividades biológicas além de hepatotóxicos, são também mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos. No entanto possuem também propriedades anticâncer (ASRES, SPORER & WINK, 2004), além de ser uma importante forma de defesa de vegetais contra herbivoria (HONÓRIO JÚNIOR et al, 2010). Essas substâncias são uma classe química bem conhecida, responsável por interações ecológicas e também têm sido usadas como marcadores quimiotaxonômicos na família, subfamília e em níveis infragenéricos em plantas. Embora seu uso para inferir relações entre taxa seja questionável, uma vez que eles ocorrem em outras mono e dicotiledôneas diferentes (FLORES, TOZZI & TRIGO, 2009).

A monocrotalina é o principal alcaloide pirrolizidínico encontrado em *Crotalaria* e é ativamente oxidada, in vivo, pelo citocromo P₄₅₀ no fígado, formando intermediários altamente reativos tipo pirrólicos que são responsáveis pela ligação cruzada do DNA-DNA e DNA-proteína (HONÓRIO-JÚNIOR et al, 2010). Embora primariamente hepatotóxica, a monocrotalina também possui efeitos pneumotóxicos, nefrotóxicos, cardiotoxicos, teratogênicos e carcinogênicos (RIBEIRO et al., 1993; THOMAS et al., 1998; CHEECKE, 1998; MEDEIROS et al., 2000; KOSOGOF et al., 2001).

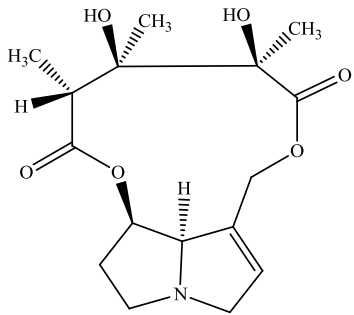
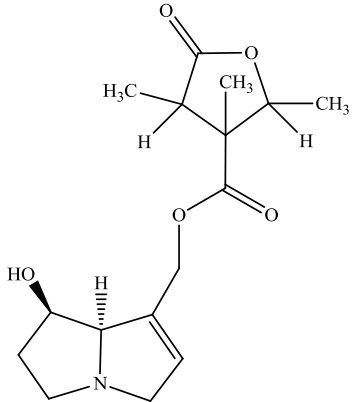
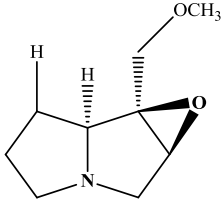
Inúmeros relatos são encontrados na literatura a respeito da intoxicação de animais por plantas que contém monocrotalina. Equídeos de 8 fazendas no estado da Paraíba foram intoxicados por monocrotalina, após a ingestão de *C. retusa* (NOBRE et al, 2004). Em caprinos foi observado um surto da intoxicação hepática aguda por alcaloides pirrolizidínicos associado à ingestão de *C. retusa* no município de Patos, Paraíba. Intoxicações por *C. retusa* em ovinos também foram observadas no estado da Paraíba onde 16 ovinos de um total de 80 animais de diferentes idades morreram após uma evolução clínica de 12 horas. E um segundo surto diagnosticado em agosto no estado do Rio Grande do Norte, um rebanho de 150 ovinos morreram 34 (22,6%), após ingerir a planta apresentando sinais de hepatotoxicidade em ambos os casos (LUCENA et al, 2010). Estudos realizados por Prakash, Dehadrai & Jonathan (1995) mostraram que *C. juncea* provocou danos nos rins, pulmões, baço e adrenais

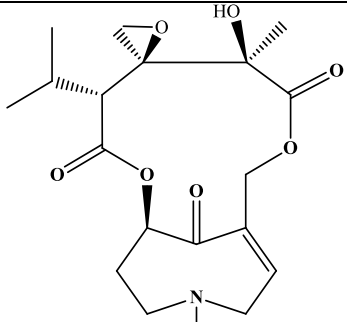
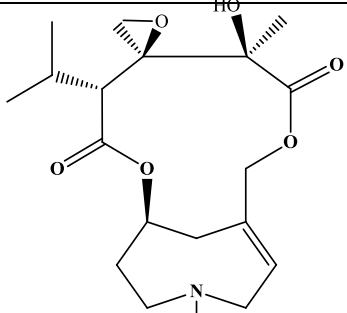
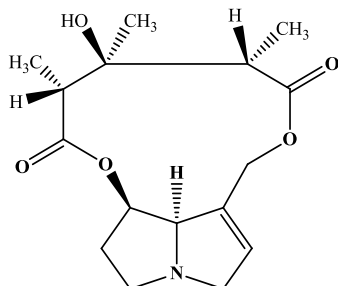
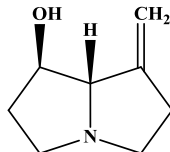
de ratos adultos, além de danos no fígado associados a alcaloides pirrolizidínicos presentes nessa espécie.

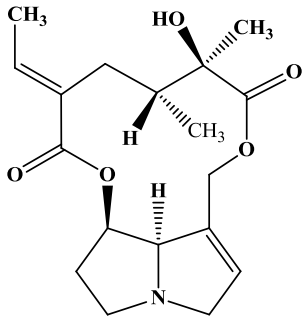
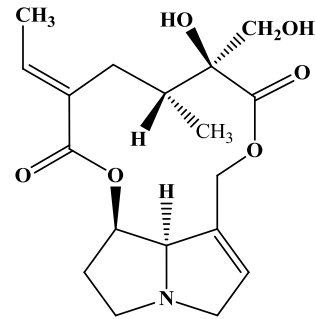
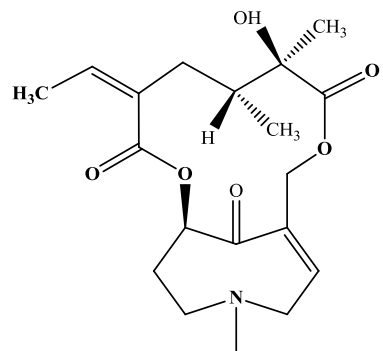
Os APs também podem entrar na cadeia alimentar humana como contaminantes de grãos, ou através de produtos de origem animal como leite, ovo e mel, ou ainda, podem ser consumidos como constituintes de algumas ervas medicinais (KEMPF et al., 2010).

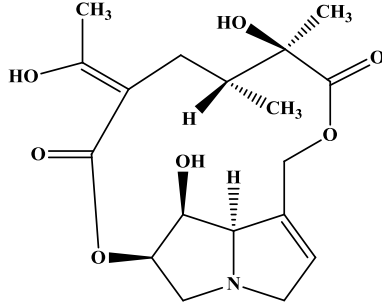
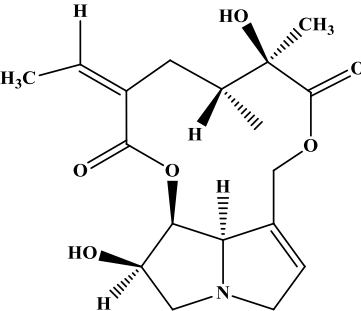
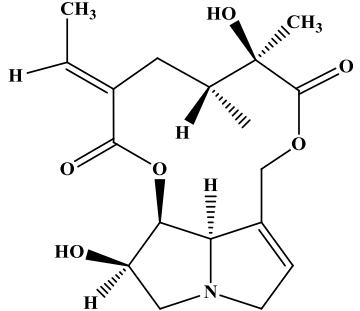
A ingestão crônica desses alcaloides pode induzir a diversos tipos de câncer em animais experimentais, embora, ainda não haja registros da associação clínica entre o câncer e a exposição humana aos APs (PRAKASH, 1999). Alguns dos alcaloides pirrolizidínicos (APs) encontrados no gênero *Crotalaria* estão dispostos no Quadro 2, p. 35.

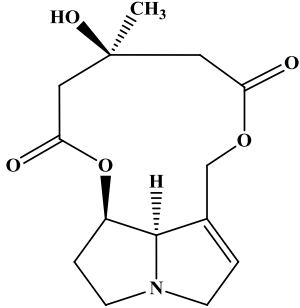
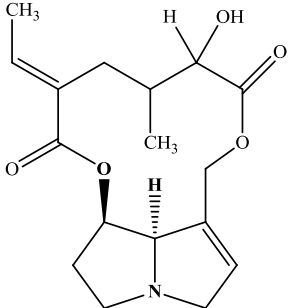
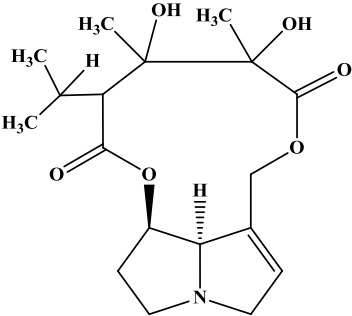
Quadro 2. Alcaloides Pirrolizidínicos Isolados de Espécies de *Crotalaria*

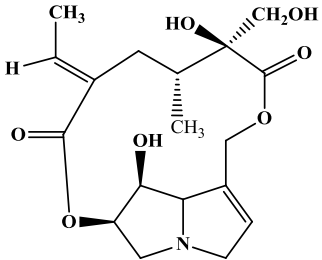
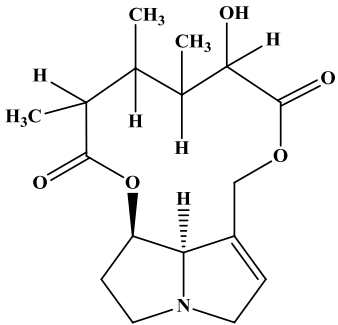
ESTRUTURA	NOMENCLATURA OU NOME USUAL	PARTE ESTUDADA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
	Monocrotalina		<i>C. retusa</i> <i>C. novae- renodiae</i> <i>C. grahemiana</i> <i>C. crispata</i> <i>C. brevis Domin</i> <i>C. alata</i> <i>C. spectabilis</i>	(ROCHA, et al, 2009).
	Assamicadina	Sementes	<i>C. assamica</i>	(CHENG et al, 1989)
	1β,2β-epoxi-7β-hidroxi-1α-metoximetil-8α-pirrolizidínico		<i>C. medicanigea</i>	(FLETCHER et al, 2009).

	Cromedina		<i>C. medicanigea</i>	(FLETCHER et al, 2011).
	Pumilina A		<i>C. medicanigea</i>	(FLETCHER et al, 2011).
	Fulvina	Folhas e caule	<i>C. madurensis</i> <i>C. crispata</i> <i>C. brevis</i> Domin <i>C. alata</i>	(BHAKUNI et al, 1984). (FLETCHER et al, 2009).
	7β-hidroxi-1-metileno-8β-pirrolidizínico		<i>C. maypurensis</i> <i>C. gorensis</i>	CULVENOR et al, 1968).

	Interrigimina		<i>C. mucronata</i> <i>C. lachnosema</i> <i>C. naragutensis</i>	(FLETCHER et al, 2009).
	Usaramina		<i>C. medicanigea</i>	(MATTOCKS et al, 1988)
	O- crotaverina		<i>C. medicanigea</i>	(FLETCHER et al, 2009).

	Maduresina	Semente	<i>C. capensis</i>	(VERDOORN and VAN WYK, 1992) (ADBEGAZ et al, 1967)
	Anacrotina	Semente	<i>C. capensis</i>	(VERDOORN and VAN WYK, 1992) (MATTOCKS et al, 1988)
	Trans-anacrotina	Semente	<i>C. capensis</i>	(VERDOORN and VAN WYK, 1992) (MATTOCKS et al, 1988)

	Dicrotalina		<i>C. lachnosema</i>	(MATTOCKS et al, 1988)
	Nilgirina		<i>C. lachnosema</i> <i>C. mucronata</i>	(MATTOCKS et al, 1988)
	Globiferina		<i>C. globifera</i>	(BROWN, DEVLIN and ROBINS, 1984)

	Crotaflorina	Flores	<i>C. rosenii</i>	(ADBEGAZ et al, 1967)
	Crotanamina	Sementes	<i>C. nana</i>	(SIDDIQI, et al, 1979).

2.3. Considerações Sobre a Família Convolvulaceae

As plantas da família Convolvulaceae, popularmente conhecida como Morning Glory Family (Manhã Gloriosa – plantas que abrem suas flores pela manhã), são geralmente trepadeiras, rizomatosas, ocasionalmente com pouca ou nenhuma clorofila e parasitas. As raízes muitas vezes armazenam carboidratos, com floema presente. A presença de lactíferos, geralmente com látex, é a base monofilética dessa família (JUDD et al., 2002).

A família Convolvulaceae é formada por aproximadamente 1650 espécies predominantemente tropicais, com muitos gêneros endêmicos de um único continente. Embora a família seja mais conhecida nas regiões temperadas por seus representantes daninhos (por exemplo, *Calystegia*, *Convolvulus*), muitas espécies de plantas são ornamentais, medicinais, e de culturas alimentares (STEFANOVIC et al., 2002).

2.3.1. Considerações Sobre o Gênero *Ipomoea*

O gênero *Ipomoea* é o mais representativo da família, compreendendo cerca de 700 espécies que medram nas regiões tropicais e temperadas do globo. Na região do semiárido do Nordeste brasileiro foram registradas 47 espécies distribuídas em 10 gêneros, sendo que *Ipomoea* está representado por sete espécies (COELHO, 2006). A figura 4, pág. 43, mostra o mapa de distribuição geográfica do gênero *Ipomoea*.

Diversos estudos químicos mostram a diversidade química do gênero *Ipomoea*. Trabalhos realizados por Hofmann, (1964) mostraram a ocorrência de alcaloides do tipo indólico como agroclavina, piroclavina, ergotamina, elimoclavina, setoclavina e ergometrina isolados de espécies de *I. violaceae*, *I. pestigridis*, *I. carnea*, *I. uniflora*, *I. pentaphylla*, *I. pilosa*, *I. fistulosa*, *I. muricata*, *I. quamoclit*, *I. pes-caprae*.

Do extrato metanólico de *I. cairica* foram isolados duas lignanas arctigenina e trachelogenina que apresentaram forte atividade anti-HIV *in vitro* (SCHRODER et al, 1990).

O látex de algumas espécies é rico em alcaloides (JUDD et al., 2002). Em estudos espectroscópicos realizados por Silva et al. (2007), permitiram a identificação de um flavonoide (I), uma flavanona (II), do esteroide sitosterol (III) e do triterpeno lupeol (IV) da espécie *I. batatas*.

A avaliação fitoquímica da espécie *I. subincana* Meisn apresentou os triterpenos (lupeol, α -amirina, β -amirina), esteroides (3- β -O- β -glicopiranosil-sitosterol, β -sitosterol, estigmasterol), *cis-p*-cumarato de *n*-docosila e *trans-p*-cumarato de *n*-icosila, os ácidos

cinâmico e vanílico, vanilina, cafeato de metila, cafeato de etila, escopoletina, aromadendrano-4 β ,10 α -diol, 3,4-dimetoxi-cinamato de metila, bem como os flavonoides (quercetina, quercetina 3-*O*- β -D-glicopiranosídeo) os quais foram identificados através da comparação direta dos dados espectroscópicos obtidos com os descritos na literatura para essas substâncias (MEIRA et al., 2008). O quadro 3, pág. 45, mostra alguns constituintes químicos já isolados de espécies de *Ipomoea*.

Muitas espécies de *Ipomoea* são responsáveis por intoxicações espontâneas em animais, e estão incluídas no grupo de plantas que provocam perdas econômicas na produção animal. Algumas espécies como *I. sericophylla* e *I. riedelii*, dentre outras do gênero, possuem o alcaloide indolizidínico swainsonina, responsável pela doença de armazenamento de glicoproteínas em caprinos (BARBOSA, et al, 2007). A swainsonina inibe as enzimas alfa-manosidase lisossomal e alfa-manosidase II do aparelho de Golgi. A redução destas resulta no acúmulo lisossomal de oligossacarídeos incompletamente processados, acarretando dilatação lisossomal, vacuolização, morte neuronal e degeneração Walleriana (degeneração do axônio e da bainha de mielina) (RIET-CORREA et al, 2011).

Casos de intoxicação envolvendo plantas do gênero *Ipomoea* também são relatados principalmente com *Ipomoea asarifolia*, conhecida popularmente como salsa, por provocar uma síndrome tremorgênica caracterizada por tremores e incoordenação. Inicialmente os tremores podem atingir a cabeça e o pescoço, mas quando os animais são excitados eles se agravam, estendendo-se por todo o corpo e provocando decúbito durante alguns minutos (RIET-CORREA et al, 2002). Santos et al. (2001) caracterizaram uma proteína, lectina com ação neurotóxica, presente nas folhas frescas de *I. asarifolia* como o agente causador da sintomatologia e a denominou Lectina Tóxica de Salsa (LTS). Em camundongos, a proteína purificada causou dispneia, convulsões tônico-clônicas e paralisia flácida, quadro que evoluiu para o óbito.

Embora casos de intoxicação em animais sejam frequentes, espécies de *Ipomoea* também apresentam diversificada atividade farmacológica, sendo utilizada como medicinal em diversas partes do mundo. A literatura relata seu uso para o tratamento de várias doenças como diabetes, hipertensão, disenterias, constipação, artrites, reumatismos, hidrocefalia, meningites e inflamações. Algumas espécies apresentam também atividades antimicrobiana, analgésica, espasmolítica e espasmogênica, hipoglicêmica, hipotensiva, anticoagulante, anti-inflamatória, anticancerígena, dentre outras (MEIRA, et al, 2011). As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico bruto das folhas de *I. involucrata* foram testadas em camundongos e uma significativa atividade antinociceptiva e anti-

inflamatória foi observada. Um considerável aumento na tolerância à dor, dose-dependente, nas doses de 25-100 mg/Kg e com redução do edema da pata nas doses de 25-100 mg/Kg também dose-dependente, confirmam a eficácia da planta, cuja triagem fitoquímica indicou a presença de substâncias como alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas e taninos (IJEOMA et al, 2011). Estudos com *Ipomoea bahiensis* revelaram significativa atividade anticâncer, contra Sarcoma 180 em camundongos e atividade antimicrobiana de quatro novos glicosídeos isolados dessa planta (BIEBER et al, 1986).

Há registros de *Ipomoea philomega* (Vell.) House (Figura 5, pág. 44) desde o México até a América do Sul tropical, no Brasil, Equador, Colômbia, Guianas e Venezuela (AUSTIN; HUÁMAN, 1996). A espécie ocorre também na caatinga, no entanto não há estudos sobre seus constituintes químicos ou atividade biológica. A investigação sobre seus constituintes químicos e atividade biológica pode contribuir para o conhecimento químico do gênero, bem como para a busca de novos compostos com potencial farmacológico.

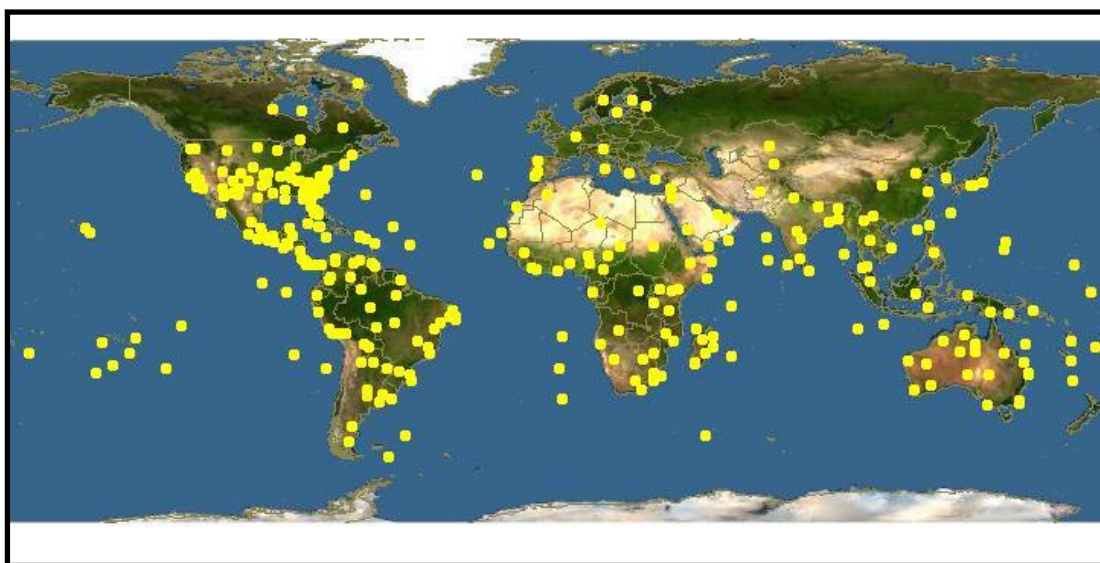


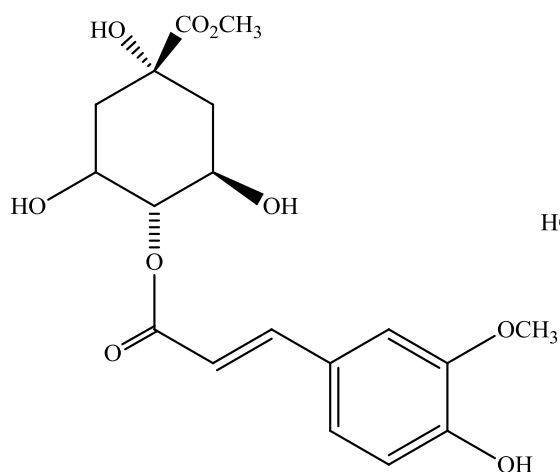
Figura 4: Mapa de distribuição geográfica de *Ipomoea* (Fonte: <http://www.discoverlife.org>) Dez/2012.



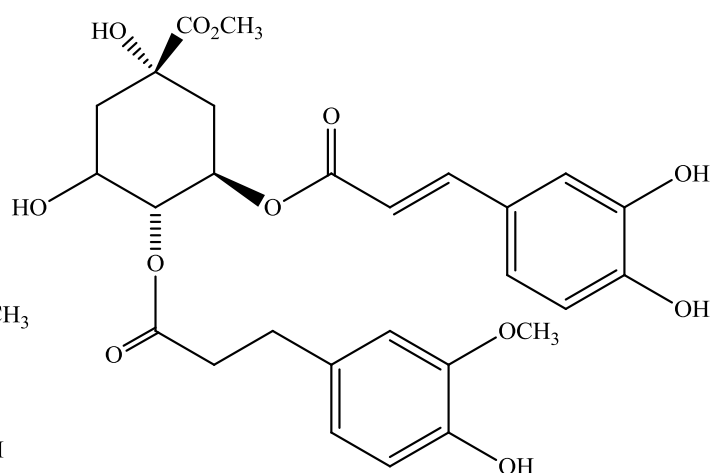
FOTO: J.F. Tavares. Jun/11

Figura 5: *Ipomoea philomega* (Vell.) House.

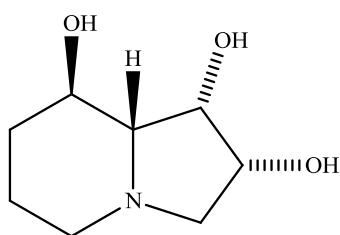
Quadro 3. Constituintes Químicos Isolados de Espécies de *Ipomoea*



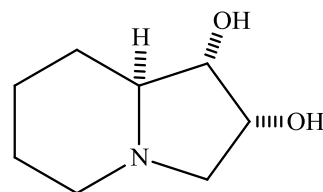
4-*O-E*- cafeoilquínico
I. subincana (MEIRA, 2008).



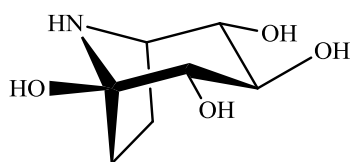
4-*O-E*-feruloil-5- *O-E*-cafeoil-quinato de metila
I. subincana (MEIRA, 2008).



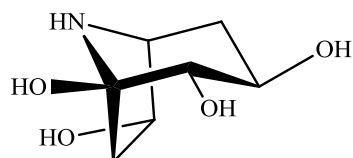
Swasionina
I. carnea (HARAGUICHI et al, 2003)



2-*epi*- Lentiginosina
I. carnea (IKEDA et al, 2003).

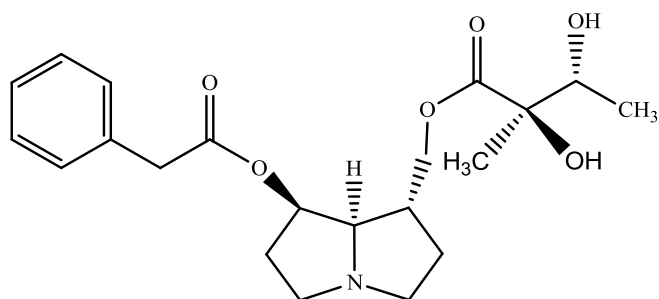


Calistegina B₁
I. carnea (IKEDA et al, 2003).



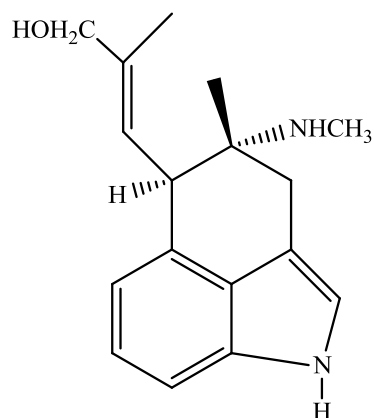
Calistegina B₂
I. carnea (IKEDA et al, 2003).

Quadro 3 - Constituintes químicos Isolados de Espécies de *Ipomoea* (Continuação)



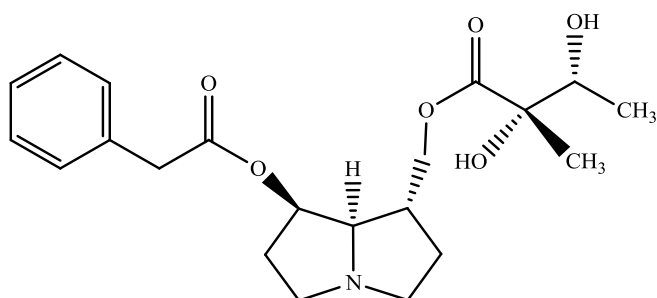
Ipangulina

I. heredifolia (JENNET-SIEMS, ALOGA, EICH, 1993)



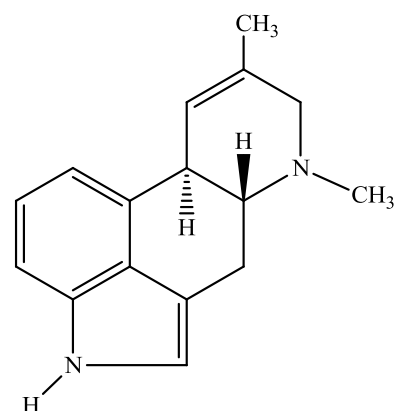
Chanoclavina

I. muricata (MAURYA, & SRIVASTAVA 1, 2009)



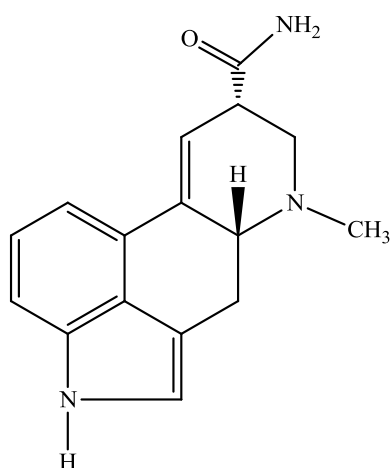
Isoipangulina A

I. heredifolia (JENNET-SIEMS, KALOGA, EICH, 1993)



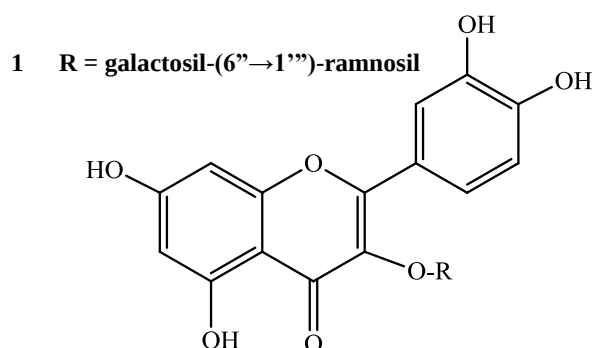
Agroflavina

I. fistulosa, *I. muelleri*, *I. tricolor* (MEIRA, et al, 2011)



Erginina

I. muelleri, *I. corymbosa*, *I. tricolor*, *I. violacea*
(MEIRA, et al, 2011)



1- Quercetina 3 galactosil-(6''→1''')-ramnosil
I. fistulosa (LAMIDI et al, 2000)

Objetivos



3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Isolar e identificar constituintes químicos de espécies potencialmente tóxicas do Semiárido paraibano, *Crotalaria vitellina* Ker Gawl e *Ipomoea philomega* (Vell.) House.

3.2. Objetivos Específicos

- ❖ Isolar constituintes químicos de frutos e folhas de *Crotalaria vitellina* através de métodos cromatográficos;
- ❖ Isolar os constituintes químicos das folhas *Ipomoea philomega* através de métodos cromatográficos;
- ❖ Identificar e/ou elucidar a estrutura de seus constituintes químicos, através de técnicas de Infravermelho, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear (uni e bidimensionais);
- ❖ Realizar ensaios de toxicidade aguda em camundongos para avaliar os efeitos tóxicos agudos de substâncias isoladas de *Crotalaria vitellina* e/ou *Ipomoea philomega*

Experimental



4. EXPERIMENTAL

4.1. Especificações dos Materiais, Métodos e Equipamentos Utilizados

a-) Cromatografias de adsorção em colunas foram realizadas em colunas de vidro de comprimentos e diâmetros variados, utilizando como adsorvente sílica gel 60 (70-230 mesh-ASTM, Merck), e para cromatografia flash, sílica gel 60 (230 – 400 mesh-ASTM, Merck).

b-) Cromatografia em Média Pressão (MPLC) - Medium Performance Liquid Chromatography, Büchi Pump Manager C-615.

c-) Cromatografias em Camada Delgada Analítica e Preparativa (CCDA e CCDP) foram feitas com sílica gel 60 PF₂₅₄ artigo 7749, Merck, suspensas em água destilada (1:2), espalhadas sobre placas de vidro por meio de um cursor “Quick fit” conferindo à camada espessuras de 0,25 e 1,00 mm, respectivamente. As cromatoplas obtidas eram secas ao ar e, em seguida, ativadas em estufa a 110°C durante duas horas. Foram usadas também cromatofolhas de alumínio para Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), de sílica gel com indicador de fluorescência UV₂₅₄, 20 x 20 cm e espessura de 250 µm.

d-) As revelações das cromatoplas foram realizadas por irradiação a luz ultravioleta, em comprimentos de onda 254 e 366 nm, por meio de aparelho Mineralight, modelo UVGL-58, para os dois tipos de cromatografia, e reveladas com vapores de iodo e reagente de Dragendorff (tetraiodobismutato de potássio) para as placas analíticas;

e-) Os espectros de absorção na região de infravermelho (IV) foram obtidos em espectrômetro, MODELO BOMEM SERIE 100MB, na faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas de KBr (0,5 mg da amostra/ 100 mg de KBr);

f-) Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital para ponto de fusão, marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo “Kofle”, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que varia de 0 a 350° C. Os valores obtidos não foram corrigidos.

g-) Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetros VARIAN-NMR SYSTEM, operando a 500 (RMN ¹H) e a 125 (RMN ¹³C) MHz e VARIAN modelo MERCURY operando a 200 (RMN ¹H) E 50 MHz (RMN ¹³C). Os

deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicações das RMN ^1H foram indicadas segundo a convenção: *s* (singleto), *sl* (singleto largo), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *t* (tripleto), *tl* (tripleto largo) *q* (quarteto) e *m* (multiplete);

h-) Os espectros de massas foram registrados em espectrômetros de baixa resolução da marca Bruker, modelo Microtof II e Ion Trap-Amazonx, respectivamente, pela técnica de Ionização em Eletrospray, modo positivo (ESI+) ou modo negativo (ESI-), usando como aditivo H_2O (0,1%)/ FMI: H_2O : MeCN (1:1), localizado no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LCMA) da UFPB além de espectrômetro de alta resolução HR-ESI⁺ sob condições: HV = 4500V; Nebulizer = 41/min; Temperatura = 180°C; Fluxo = 240ul/h; Solvente = ACN: H_2O (1:1) realizado na Universidade de São Paulo – USP.

4.2. Coleta de Material Botânico

Os frutos e folhas de *Crotalaria vitellina* Ker Gawl, bem como a parte aérea de *Ipomoea philomega* (Vell.) House foram coletados no Pico do Jabre, município de Maturéia – PB, Brasil, em junho de 2011. O material botânico foi identificado pela Prof^a Dr^a Maria de Fátima Agra e a exsicata de cada espécie encontra-se depositada no Herbário Lauro Pires Xavier da Universidade Federal da Paraíba, catalogada sob número Agra et al, n° 5375 (JPB) para *Crotalaria vitellina* e Agra et al, n° 7412 (JPB) para *Ipomoea philomega*.

4.3. Processamento do Material Botânico

As folhas e frutos de *C. vitellina* e folhas de *I. philomega* foram desidratadas em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 3 dias. Após secagem, foram submetidas a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 2,115 Kg, e 2,457 Kg respectivamente. Os frutos de *C. vitellina* foram também desidratados em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 3 dias, obtendo-se 500g.

4.4. Obtenção dos Extratos Brutos.

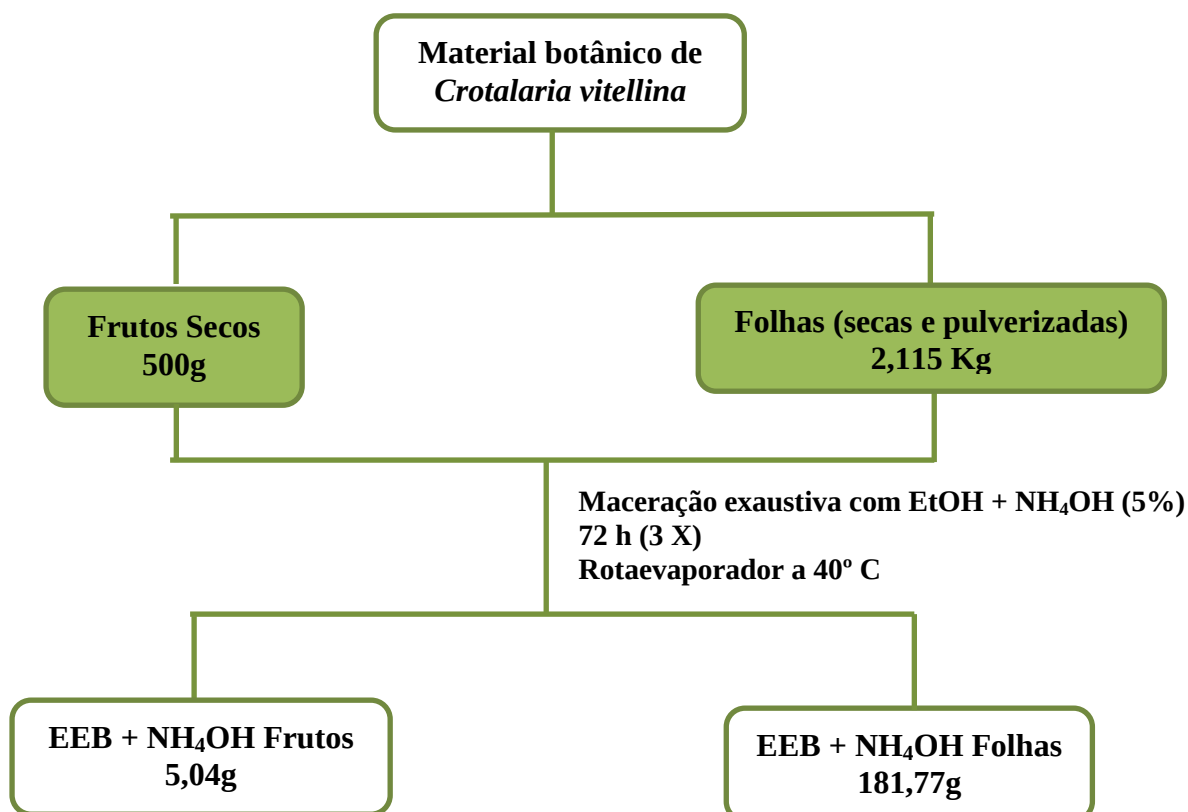
4.4.1. Obtenção do Extrato Bruto dos Frutos de *Crotalaria vitellina*

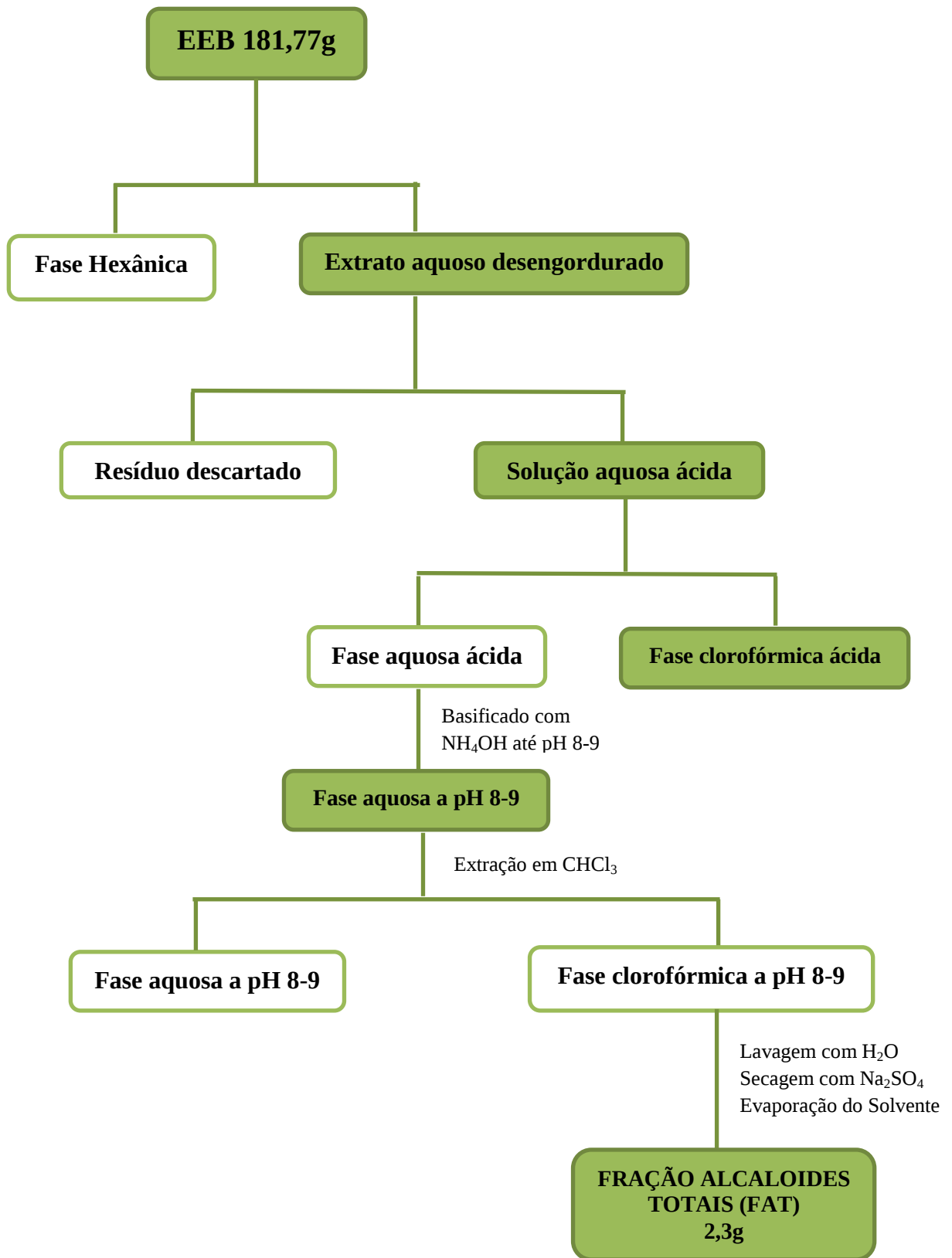
Os frutos secos (500 g) foram macerados com etanol e NH_4OH (5%) por 72 horas repetido por 3 vezes, em seguida concentrado sob pressão reduzida obtendo-se 5,04g de extrato etanólico (Fluxograma 1, pág.52).

4.4.1.2. Obtenção do Extrato Bruto das Folhas de *Crotalaria vitellina*

O pó obtido das folhas (2,115 Kg), foi macerado em etanol + NH_4OH (5%) por 72 horas repetido por 3 vezes, em seguida concentrado sob pressão reduzida obtendo-se 181,77 g de extrato etanólico e submetido a uma metodologia para isolamento de alcaloides (Fluxograma 1, pág. 52).

Fluxograma 1 - Extração do Material Botânico de *Crotalaria vitellina* Ker Gawl



Fluxograma 2 - Marcha para extração de alcaloides das folhas de *Crotalaria vitellina*

4.4.2. Obtenção do Extrato Bruto das Folhas de *Ipomoea philomega*.

O pó obtido das folhas (2,457 Kg) foi macerado com etanol por 72 horas repetido por 3 vezes, em seguida concentrado sob pressão reduzida obtendo-se então 112,6g de extrato etanólico bruto. O extrato bruto obtido foi suspenso em uma mistura de metanol/água (7:3v/v) obtendo-se uma suspensão hidroalcoólica submetida a um processo de partição líquido-líquido com os seguintes solventes hexano, diclorometano e acetato de etila (Fluxograma 2, pág. 53).

4.5. Fracionamento Cromatográfico

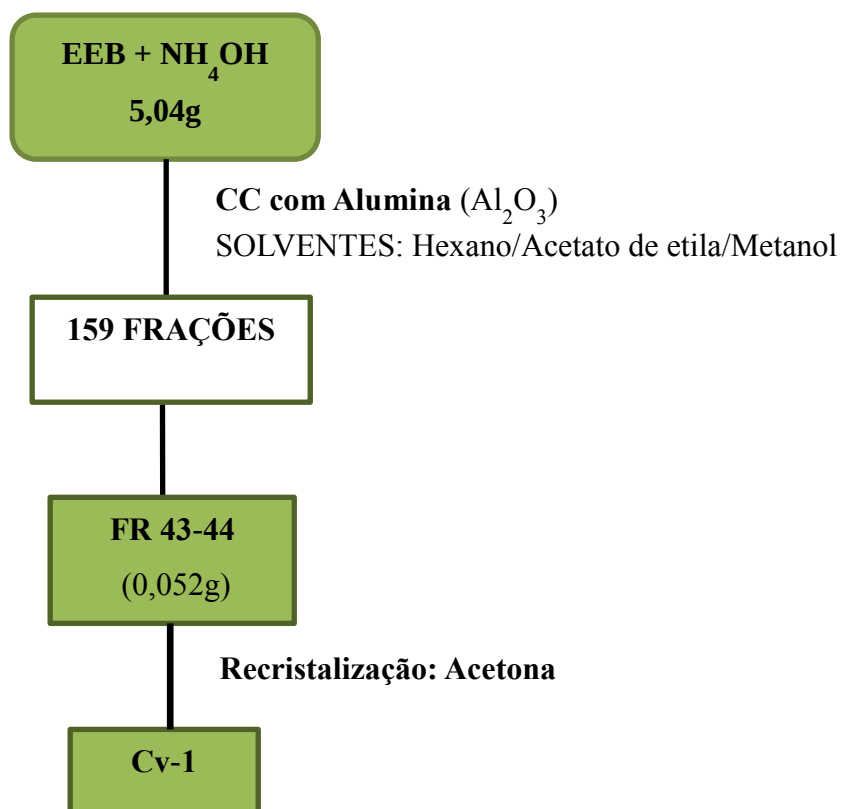
4.5.1. Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etnólico Bruto Básico dos Frutos de *Crotalaria vitellina*.

O extrato etanólico básico dos frutos de *C. vitellina* (5,04g) foi submetido à cromatografia em coluna com Alumina (Al_2O_3) e como eluentes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 159 frações de 50 mL cada que foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos em CCDA. O grupo de frações 43-44 (52 mg) que foi eluída da coluna em hexano: acetato de etila (6:4) foi recristalizado em acetona obtendo-se o composto **Cv-1** (32 mg) (Fluxograma 3, pág. 55).

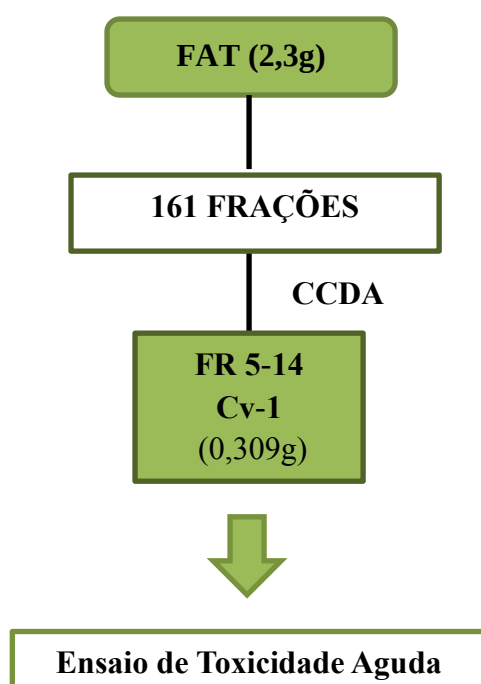
4.5.1.2 Fracionamento Cromatográfico da Fração de Alcaloides Totais (FAT) do Extrato Etanólico Bruto Básico das Folhas de *Crotalaria vitellina*

A fração de alcaloides totais (2,3g) foi submetida à cromatografia em coluna com Alumina (Al_2O_3) como fase estacionária e como eluentes diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, gerando 161 frações de 50mL cada que foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos em CCDA. Das frações agrupadas 5-14 (0,309 g) eluídas em diclorometano: metanol (99:1), foi obtida a substância **Cv-1**, a mesma isolada dos frutos. Devido à quantidade obtida, a substância **Cv-1** foi reservada para ensaios toxicológicos realizados em colaboração com as professoras Dr^a Margareth Formiga Melo Diniz e Dr^a Marianna Vieira Sobral Castello Branco no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX), UFPB) (Fluxograma 4, pág. 55).

Fluxograma 3 - Fracionamento Cromatográfico do Extrato Etanólico Bruto dos Frutos de *Crotalaria vitellina*



Fluxograma 4 - Fracionamento Cromatográfico da Fração de Alcaloides Totais das Folhas de *C. vitellina*



4.5.2. Fracionamento Cromatográfico das Folhas de *Ipomoea philomega*.

Dos 112,6 g de extrato etanólico bruto obtidos, 81,6 g foram submetidos à partição líquido-líquido (Fluxograma 5, pág. 58) com os solventes hexano, diclorometano e acetato de etila (Fluxograma 2, pág. 53) obtendo-se as fases hexânica (32,27g), diclorometano (9,57g) e acetato de etila (4,06 g). A fase diclorometano foi submetida à cromatografia em coluna (CC – 1) usando como fase estacionária sílica gel (70-230 mesh-ASTM, Merck) e como eluentes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade, obtendo-se 146 frações de 50 mL cada. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCDA, em seguida recromatografados em coluna com sílica gel 60 (230 – 400 mesh-ASTM, Merck) como fase estacionária e eluentes hexano, diclorometano e metanol, puros ou em misturas binárias em grau crescente de polaridade (Fluxograma 6, pág. 59). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade das amostras e as quantidades de fases estacionárias a serem utilizadas.

As frações agrupadas 31-33 (0,0298g) quando analisadas em CCDA e eluídas em pelo menos três sistemas de solventes diferentes, apresentaram-se aparentemente puras pela presença de uma única mancha na placa e foi codificada como o composto **Ip-1**. Da mesma forma as frações agrupadas 37-39 ssb (0,0990g) codificadas como o composto **Ip-2**. A fração 70 (0,0009g) eluída em hexano/diclorometano (4:6) levou ao isolamento do composto **Ip-3**, e o grupo de frações 117-122 (87,7 mg) codificados como o composto **Ip-6** (Fluxograma 6, pág. 59).

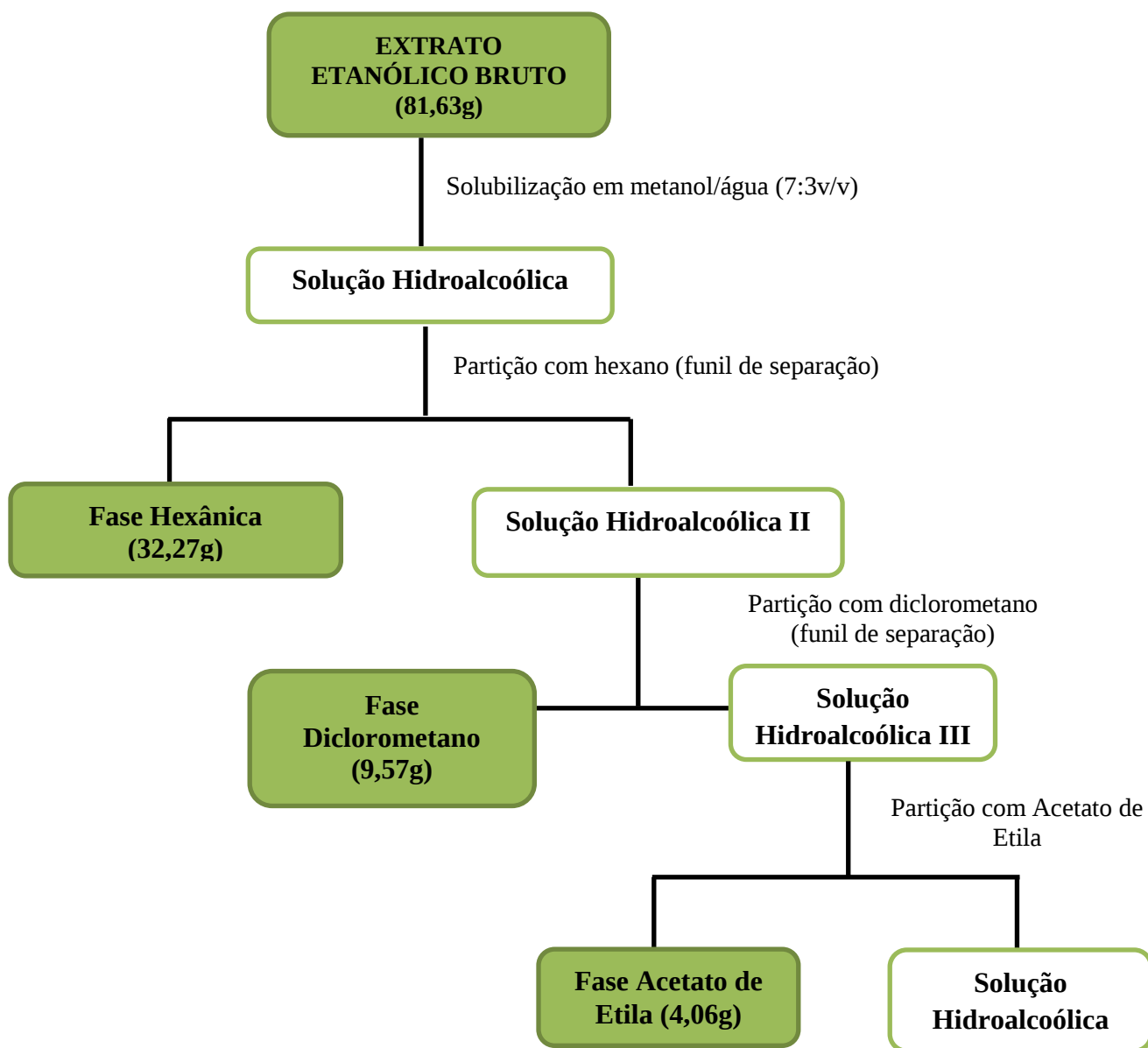
A partir das observações em CCDA o grupo de frações 64-84 (0,1196g) foi recromatografado em (CC-1.1) com sílica gel e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade, obtendo-se 50 frações de 50 mL cada, igualmente reunidas em grupos de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCDA. Na análise em CCDA o grupo de frações (10-19) foi recromatografado em (CC-1.1-A) com sílica gel com os solventes acima citados, gerando 5 frações, cujos perfis cromatográficos foram obtidos por CCDA, dos quais a fração 3 (0,0015g), mostrou-se aparentemente pura observada pela presença de uma única mancha e foi codificada como o composto **Ip-8**. O grupo de frações 21-29 ppt (0,0140g) da (CC-1.1) mostrou-se pura o bastante em análise de CCDA, observada pela presença de uma única mancha e codificada como o composto **Ip-7** (Fluxograma 6, pág. 59).

Da mesma forma o grupo de frações 74-78 (0,0837g), recromatografado em CC com Sephadex, eluída em diclorometano e metanol, gerando 5 frações, das quais a fração 2

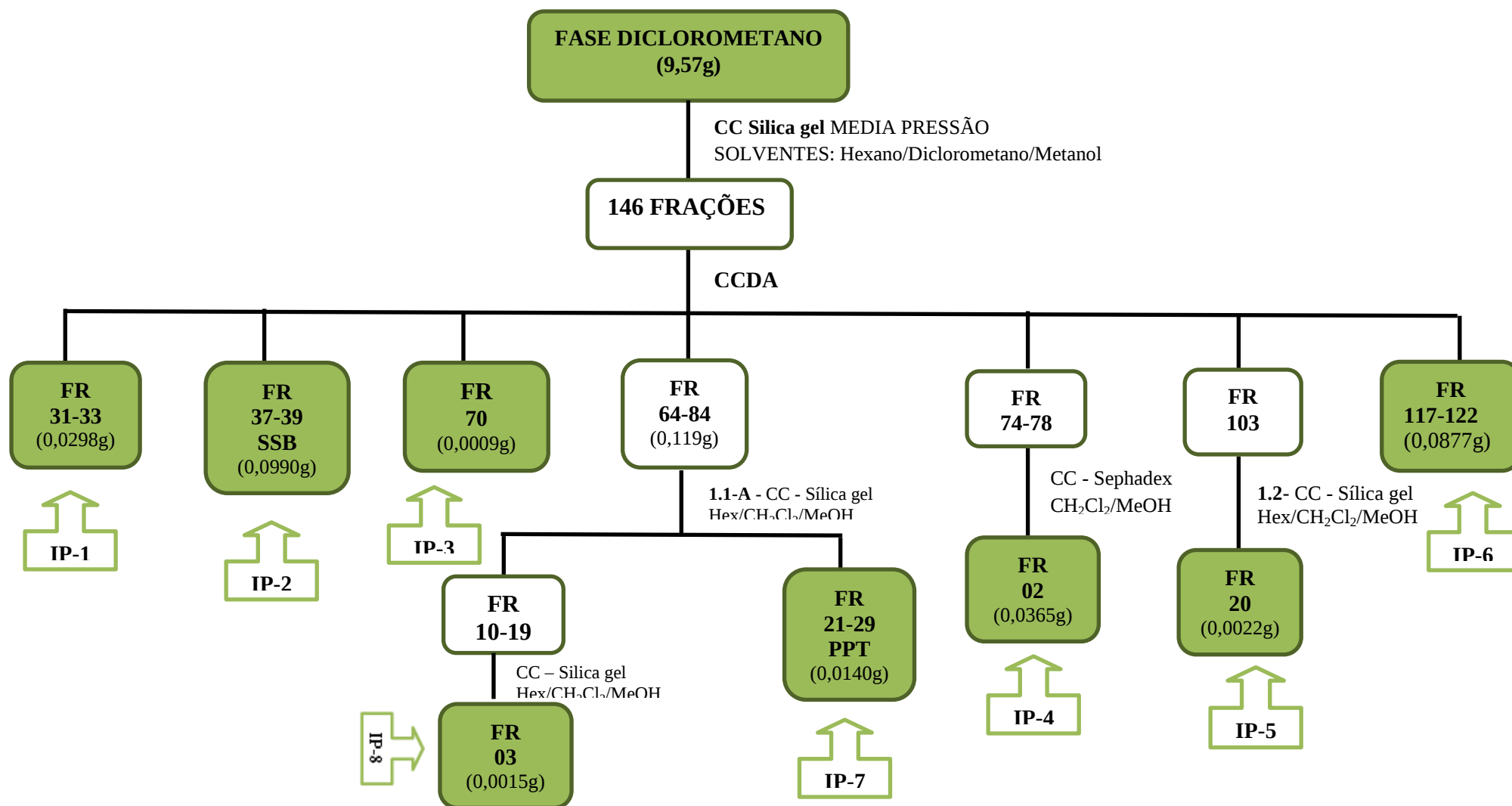
(0,0365g), na análise em CCDA, mostrou-se aparentemente pura em análise de CCDA, observada pela presença de uma única mancha, sendo codificada como o composto **Ip-4** (Fluxograma 6, pág. 59).

A fração 103 da **(CC-1)**, também foi recromatografado em **(CC-1.2)** com sílica gel e como eluentes os solventes hexano, diclorometano e metanol puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade, gerando 23 frações 10mL, das quais a fração 20 (0,0022 g), na análise em CCDA, mostrou-se aparentemente pura em análise de CCDA, observada pela presença de uma única mancha, sendo codificada como o composto Ip-5 (Fluxograma 6, pág. 59).

Fluxograma 5 - Partição Líquido-líquido do Extrato Etanólico Bruto de *Ipomoea philomega* (Vell.) House.



Fluxograma 6 - Fracionamento Cromatográfico da Fase Diclorometano de *Ipomoea philomega*.



4.6. Avaliação da Toxicidade Pré-Clínica Aguda de Cv-1

4.6.1 Local da Pesquisa

As atividades de pesquisa foram desenvolvidas no Laboratório de Ensaios Toxicológicos (LABETOX) e no Biotério Prof. Thomas George, ambos localizados no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), onde funciona o Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB) em colaboração com as professoras Dr^a Margareth Formiga Melo Diniz e Dr^a Marianna Vieira Sobral Castello Branco.

4.6.2 Material

Relatos da literatura mostram que os alcaloides pirrolizidínicos (APs) tóxicos são um grande grupo de substâncias com aproximadamente 160 já conhecidas (PACHECO & SILVA LÓPEZ, 2010). Com base nesses dados, o alcaloide pirrolizidínico crotavitelina (Cv-1) foi submetido a ensaios de toxicidade pré-clínica aguda para avaliação da sua toxicidade.

A substância testada, Cv-1, foi isolada dos frutos e das folhas de *Crotalaria vitelina* Ker Gaw por métodos de extração e isolamento descritos a partir do item 4.4.1.2.

4.6.3 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) machos e fêmeas, pesando entre 25 e 30 g, com faixa etária próxima de 60 dias, obtidos do biotério Prof. Thomas George (CBiotec/UFPB). Os animais foram agrupados em gaiolas de polietileno, mantidos sob condições controladas de temperatura de $21 \pm 1^{\circ} \text{C}$, sem uso de qualquer medicação, tendo livre acesso à comida (tipo *pellets* de ração da marca Purina[®]) e água potável disponível em garrafas graduadas de polietileno, com bicos em vidro, colocadas nas grades metálicas das gaiolas na sua parte superior. Os animais foram mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas. Antes da realização de qualquer protocolo experimental, os animais foram colocados no ambiente de trabalho por pelo menos 30 minutos de antecedência à execução do experimento.

4.6.4. Avaliação Comportamental e Investigação da DL₅₀

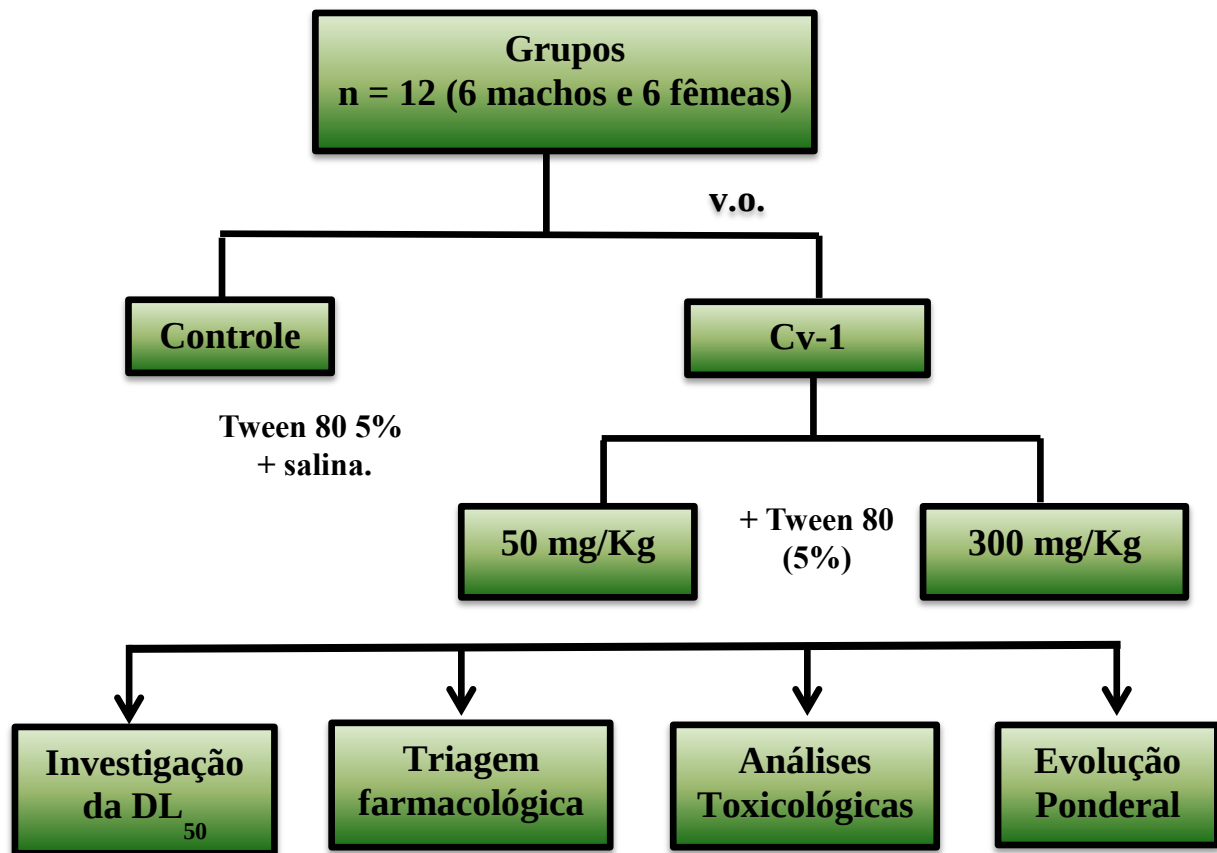
Os ensaios de toxicidade aguda em roedores foram realizados de acordo com o “*OECD Guideline for Testing of Chemicals*” (OECD – 423, 2001) com algumas modificações. Este método de classificação de toxicidade aguda é um procedimento gradual com a utilização de três animais do mesmo sexo por etapa. Dependendo da mortalidade e / ou o estado de morbidade dos animais, em média, 2 a 4 passos podem ser necessários para se avaliar a toxicidade aguda de uma substância de teste. Este procedimento é reprodutível, utiliza poucos animais e é capaz de classificar as substâncias de uma maneira semelhante à dos outros métodos de ensaio de toxicidade aguda. O método de classificação de toxicidade aguda baseia-se na avaliação biométrica com doses fixas, separadas apropriadamente de modo a permitir que uma substância seja avaliada para fins de classificação e avaliação de risco.

Camundongos albinos Swiss, 12 animais por grupo (sendo seis machos e seis fêmeas), incluindo os grupos tratados e controle, foram submetidos a doses de 50 e 300 mg/Kg do alcaloide pirrolizidínico crotavitelina, codificado como **Cv-1**, diluídas em solução Tween 80 a 5%, e ao grupo controle foi administrado apenas o veículo (solução salina + Tween 80 a 5%) (Fluxograma 7, pág. 62). Foi utilizado inicialmente a dose de 50 mg/Kg, devido à falta de informação sobre a substância, visto que esta foi testada pela primeira vez, visando a proteção dos animais, conforme Fluxograma 8, pág. 63.

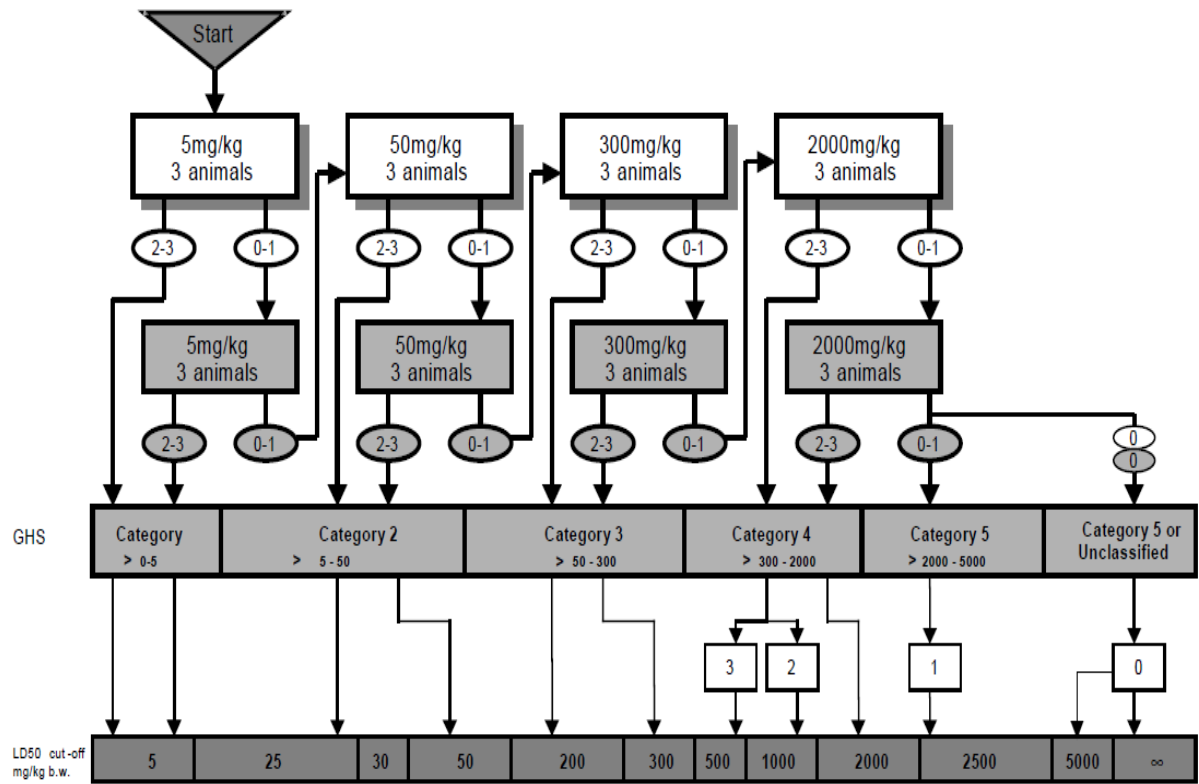
O mapeamento de alterações comportamentais, sugestivas de atividade sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Autônomo (SNA), foi realizado a partir da observação cuidadosa para se detectar sinais tóxicos de caráter geral, após a administração, nos intervalos: 0, 15, 30 e 60 minutos; após 4 horas; e diariamente durante 14 dias, utilizando-se protocolo experimental descrito por Almeida et al. (1999), com algumas modificações. Ao fim do período de observação todos os animais sobreviventes foram eutanasiados e autopsiados.

Todos os procedimentos experimentais foram analisados e previamente aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UFPB (CEUA), sob certidão 0504/13.

Fluxograma 7 – Avaliação da Toxicidade Aguda de Crotavitelina - Cv-1.



Fluxograma 8 - Procedimento com as Doses Únicas de 50 e 300 mg/Kg, OECD-423.



4.6.5 Avaliação Ponderal e Consumo de Água e Ração

Para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos após o tratamento com o alcaloide Cv-1, os animais foram pesados no início e no final do tratamento e diariamente foram avaliados o consumo de água e ração.

4.6.6 Análise de Parâmetros Bioquímicos

Após o período de 14 dias de observação os animais foram anestesiados com tiopental sódico (40 mg/Kg - Thiopentax[®], Cristália) e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital. Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados utilizando-se kits específicos para o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus[®] (Roche Diagnostic System) e para o analisador hematológico celular automático *Animal Blood Counter Vet* (Horiba ABX Diagnostics), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas automaticamente no HEMATEL 200[®] e analisadas em microscópio óptico TAIMIN[®], para realização da contagem diferencial de leucócitos.

4.6.7 Avaliação dos Índices dos Órgãos

Após a coleta do sangue para análises bioquímicas e hematológicas, todos os animais foram eutanasiados, por deslocamento cervical, e os órgãos (timo, baço, fígado, rins, pulmão e coração) extirpados, pesados, examinados macroscopicamente, para investigação de mudanças de coloração, hemorragias ou outras alterações. e em seguida foram fixados em formaldeído (10 %). O índice dos órgãos foi calculado seguindo a fórmula (índice = mg órgão/g animal).

4.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos *in vivo* foram analisados empregando-se o teste análise de variância (ANOVA) *one-way*, seguido do teste de Tukey onde os valores estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média (e.p.m.), sendo os resultados considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão



5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Substância Isolada de *Crotalaria vitellina* Ker Gawl

O estudo fitoquímico dos frutos e folhas de *Crotalaria vitellina* resultou no isolamento e determinação estrutural do alcaloide pirrolizidínico **Cv-1**, nomeado crotavitelina, que está sendo relatado pela primeira vez na literatura.

5.2 Determinação Estrutural da Substância Cv-1.

A substância codificada como Cv-1 (Fig. 6, pág. 68), foi isolada na forma de um pó amorfo branco com um ponto de fusão entre 206-209 °C, $[\alpha]_D^{25} +16,2$ ($c. = 0.001$, CHCl₃). O espectro de absorção na região do Infravermelho (IV) mostrou absorções em 1757, 1734, 1718 sugestivas de uma carbonila de ciclopentanona, uma carbonila de cetona α, β insaturada no anel de sete membros e uma carbonila de éster respectivamente, (Fig. 9, pág. 70).

No espectro de Ressonância Magnética Nuclear de ¹³C, APT (CDCl₃, 125 MHz) (Fig. 21, pág. 76) observou-se a presença de 19 sinais correspondentes a 19 átomos de carbonos. Destes, 7 foram atribuídos a átomos de carbonos não hidrogenados, 3 a átomos de carbonos metínicos, 5 a átomos de carbonos metilênicos e 4 a átomos de carbonos metílicos. Os sinais em δ_C 134,90, 134,70, 57,60, 53,00, 35,60, 76,30 juntamente com o sinal em δ_C 192,0, este definido por espectro de RMN bidimensional heteronuclear ¹H x ¹³C HMBC, (Fig. 25 a 29, págs. 78-80) foram compatíveis com esqueleto carbônico de alcaloides pirrolizidínicos do tipo otonecina e foram atribuídos a C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7 e C-8, respectivamente (FLETCHER et al, 2011).

No espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz), (Fig.10, pág. 71) observou-se o sinal em δ_H 5,90 (sl, 1H) atribuído a H-2 (Fig. 10, pág. 71). No espectro de RMN bidimensional de correlação homonuclear ¹H x ¹H COSY (Fig 35-39, págs. 83-85) foi observada uma correlação dos hidrogênios H-2 com os sinais em δ_H 3,42 (d, $J = 18,9$ Hz, 1H), 3,14 (d, $J = 18,9$ Hz, 1H) confirmando estes deslocamentos químicos para 2H-3. O deslocamento químico observado em δ_H 5,34 (t, $J = 3,5$ Hz) foi atribuído à α configuração em H-7 (Fig. 11, pág. 71) (CHENG, LIU and CHU, 1989). Ainda no espectro de COSY foram observadas correlações entre os sinais em δ_H 2,38 (m, 1H) e δ_H 1,90 (dq, $J = 14,5; 3,5$ Hz, 1H) correspondentes aos hidrogênios 2H-6, além da correlação entre os hidrogênios 2H-6 com os sinais em δ_H 2,88 (ddd, $J = 12,5; 5,0; 3,5$ Hz) e δ_H 2,68 (dt, $J = 12,5; 3,5$ Hz) referentes a 2H-5. O espectro de

RMN de ^1H mostrou ainda sinais em δ_{H} 5,16 (d, $J = 11,5$ Hz, 1 H) e δ_{H} 4,39 (dt, $J = 11,5$ e $J = 1,5$ Hz, 1 H) correspondentes aos hidrogênios 2H-9 (Fig. 11, pág. 71), além dos sinais em δ_{H} 1,19 (s, 3 H), 0,98 (d, $J = 6,5$ Hz, 3 H) e 0,99 (s, 3 H) atribuídos aos grupos metílicos $\text{CH}_3\text{-8'}$, $\text{CH}_3\text{-9'}$ e $\text{CH}_3\text{-10'}$ e ainda o sinal em δ_{H} 2,11 (s, 3H, N-Me) atribuído ao grupo $\text{CH}_3\text{-11'}$ (Fig. 12, pág. 72). Também no espectro RMN COSY foi possível observar correlações entre os sinais de hidrogênio da metila $\text{CH}_3\text{-9'}$ (δ_{H} 0,98) e os sinais em δ_{H} 3,13 (H-3'), 2,77 (dd, $J = 19,0$ e 9,0 Hz) e 1,83 (dd, $J = 19,0$ e 11,5 Hz) atribuídos aos hidrogênios 2H-4' (Fig 35-39, págs. 83-85). O deslocamento químico de H-3' (δ_{H} 3,13) foi justificado pelo efeito anisotrópico do grupo carbonila em C-1' como pode ser observado na figura 6, pág. 68.

O valores dos deslocamentos das metilas $\text{CH}_3\text{-8'}$ (s, δ_{H} 1,38), $\text{CH}_3\text{-9'}$ (d, δ_{H} 0,88) e $\text{CH}_3\text{-10'}$ (s, δ_{H} 1,08) foram melhor observados no espectro de RMN de ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) (Fig. 15, pag. 73), no qual ficou evidente o dubleto em δ_{H} 0,88 atribuído à metila $\text{CH}_3\text{-9'}$ valores estes que não foram observados apenas com o espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) que mostrou valores muito próximos para as metilas $\text{CH}_3\text{-9'}$ (δ_{H} 0,98) e $\text{CH}_3\text{-10'}$ (δ_{H} 0,99).

A presença dos carbonos quaternários em δ_{C} 55,6 e δ_{C} 65,1 e os sinais de carbono em δ_{C} 32,5, δ_{C} 42,0 e δ_{C} 211,6 permitiram inferir a conexão da otonecina com 10 átomos de carbono como observado na retrobiossíntese proposta para a estrutura da substância Cv-1. (Fig. 8, pág. 70).

No espectro de HMBC (Fig. 25 a 29, págs. 78-80) foram observadas correlações entre os sinais de hidrogênio em δ_{H} 5,16, δ_{H} 4,39 e δ_{H} 5,90 com o sinal de carbono δ_{C} 134,9 confirmando os assinalamentos para os carbonos C-2, C-3 e 2H-9. As correlações entre os sinais de hidrogênio da metila $\text{CH}_3\text{-9'}$ (δ_{H} 0,98) com o sinal de carbono em δ_{C} 32,5 e com o sinal de carbono δ_{C} 42,0 foram atribuídos aos carbonos C-3' e C-4' respectivamente. As correlações entre os sinais de hidrogênio da metila $\text{CH}_3\text{-8'}$ (δ_{H} 1,19) com os sinais dos carbonos δ_{C} 169,8, δ_{C} 211,6, δ_{C} 65,1 e δ_{C} 55,6 confirmaram o assinalamento dos carbonos C-7', C-5', C-6' e C-2' respectivamente (Fig. 25, pág. 78). As correlações observadas entre os sinais de hidrogênio da metila $\text{CH}_3\text{-10'}$ (δ_{H} 0,99) com os sinais de carbono δ_{C} 55,6; δ_{C} 172,0 e δ_{C} 32,5 confirmaram a união entre os carbonos C-2' – C-1' e C-7' – C-6' para a formação da ciclopentanona, um núcleo não usual em alcaloides pirrolizidínicos (Fig. 25, pág. 78). O grupo carbonila na posição 8 do anel pirrolizidínico foi confirmado através de correlações dos sinais de hidrogênio em δ_{H} 5,16 (H-9) e δ_{H} 5,91 (H-2) com o sinal de carbono em δ_{C} 192,0 atribuído ao C-8. Os demais sinais estão compilados na Tabela 1, pág. 69.

No espectro de RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ NOESY (Piridina- d_5 , 500 MHz), (Fig. 30, pág. 81) foi possível observar correlações entre os hidrogênios da metila $\text{CH}_3\text{-8'}$ (δ_{H} 1,38) com os hidrogênios das metilas $\text{CH}_3\text{-9'}$ (δ_{H} 0,88) e $\text{CH}_3\text{-10'}$ (δ_{H} 1,08). A estereoquímica relativa dos demais centros quirais também foi determinada por NOESY (Fig. 31-33, págs. 81-82).

Após as análises dos dados de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais foi possível assinalar todos os deslocamentos químicos da substância **Cv-1** que, juntamente com o espectro de massas obtido em HR-ESI-MS (Fig. 40, pág. 86), que mostrou o pico da molécula protonada em m/z 364.1763 $[\text{M}+\text{H}]^+$ compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_6$ (calc. por $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{NO}_6$, 363.17), pôde-se afirmar que esta substância se tratava de um novo alcaloide pirrolizidínico nomeado **crotavitelina**.

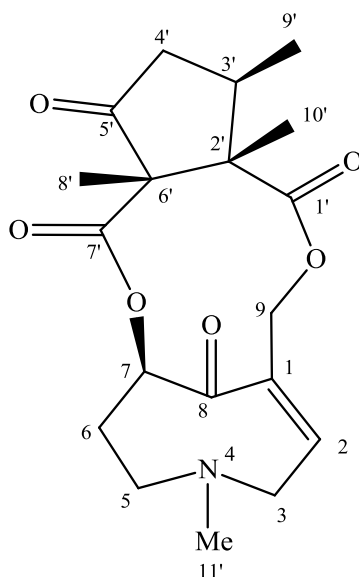


Figura 6 - Estrutura do alcaloide pirrolizidínico isolado de *C. vitelina*, **crotavitelina (Cv-1)**.

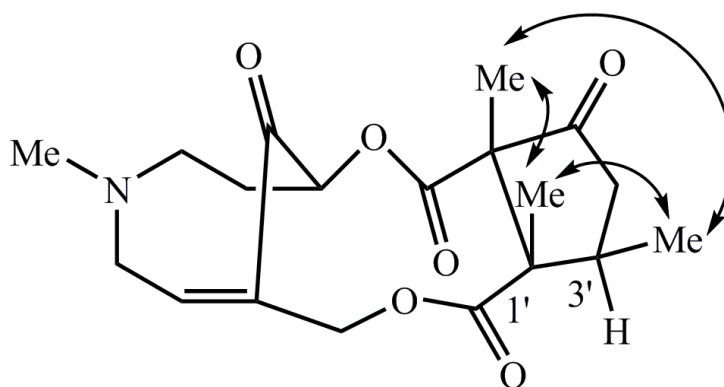
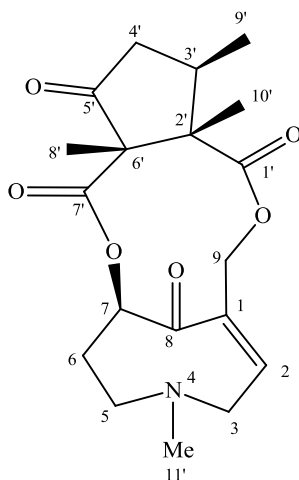


Figura 7 - NOESY e efeito anisotrópico de C-1' em H-3 de **Cv-1**.

Tabela 1. Dados Espectroscópicos de RMN da Substância **Cv- 1**, δ em ppm, J em Hz.

		HSQC*	HMBC*		¹ H em C ₅ D ₅ N
	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	134,9	—	2H-9	2H-3	—
2	134,7	5,90 (br s)	2H-3	2H-9	5,91 (br s)
3	57,6	3,42 (d, <i>J</i> = 18.9) 3,14 (d, <i>J</i> = 18.9)	H-2	H-5b, 3H-11'	3,23 (br d, <i>J</i> = 18.9) 2,94 (dd, <i>J</i> = 18.9; 2.5)
5	53,0	2,88 (ddd, <i>J</i> = 12,5; 5,0; 3,5) 2,68 (dt <i>J</i> = 12,5; 3,5)	H-6a	2H-3, 3H-11'	2,60 (m), 2.57 (m)
6	35,6	2.38 (m), 1,90 (dq <i>J</i> = 14,5; 3,5)	H-5b		2,18 (m), 1.83 (m)
7	76,3	5,34 (t, <i>J</i> = 3,5)		2H-5	5,60 (t, 4.7)
8	192,0	—		H-2, H-9a	—
9	65,6	5,16 (d, <i>J</i> = 11.5) 4,39 (dt, <i>J</i> = 11.5; 1.5)		H-2	5,28 (d, 11.4) 4,62 (dt, 11.4, 1.2)
1'	172,0	—		2H-9, 3H-10'	—
2'	55,6	—	H-3', 3H-10'	2H-4', 3H-8'	—
3'	32,5	3,13 (m)	2H-4', 3H-9'	3H-10'	3,23 (m)
4'	42,0	2,77 (dd, <i>J</i> = 19.0, 9.0) 1,83 (dd, <i>J</i> = 19.0, 11.5)		3H-9'	2,89 (dd, <i>J</i> = 19.2, 8.9) 1,98 (dd, <i>J</i> = 19.2, 11.4)
5'	211,6	—	2H-4'	3H-8'	—
6'	65,1	—	3H-8'	3H-10'	—
7'	169,8	—		H-7, 3H-8'	—
8'	12,9	1.19 (s)		—	1,38 (s)
9'	12,3	0,98 (d, <i>J</i> = 6.5)	H-3'	—	0,88 (d, <i>J</i> = 6.8)
10'	14,6	0,99 (s)		H-3'	1,08 (s)
11'	40,4	2,11 (s)		2H-3, 2H-5	2,03 (s)

* Dados em CDCl₃; ¹H = 500 MHz, ¹³C = 125 MHz, ¹H em C₅D₅N.

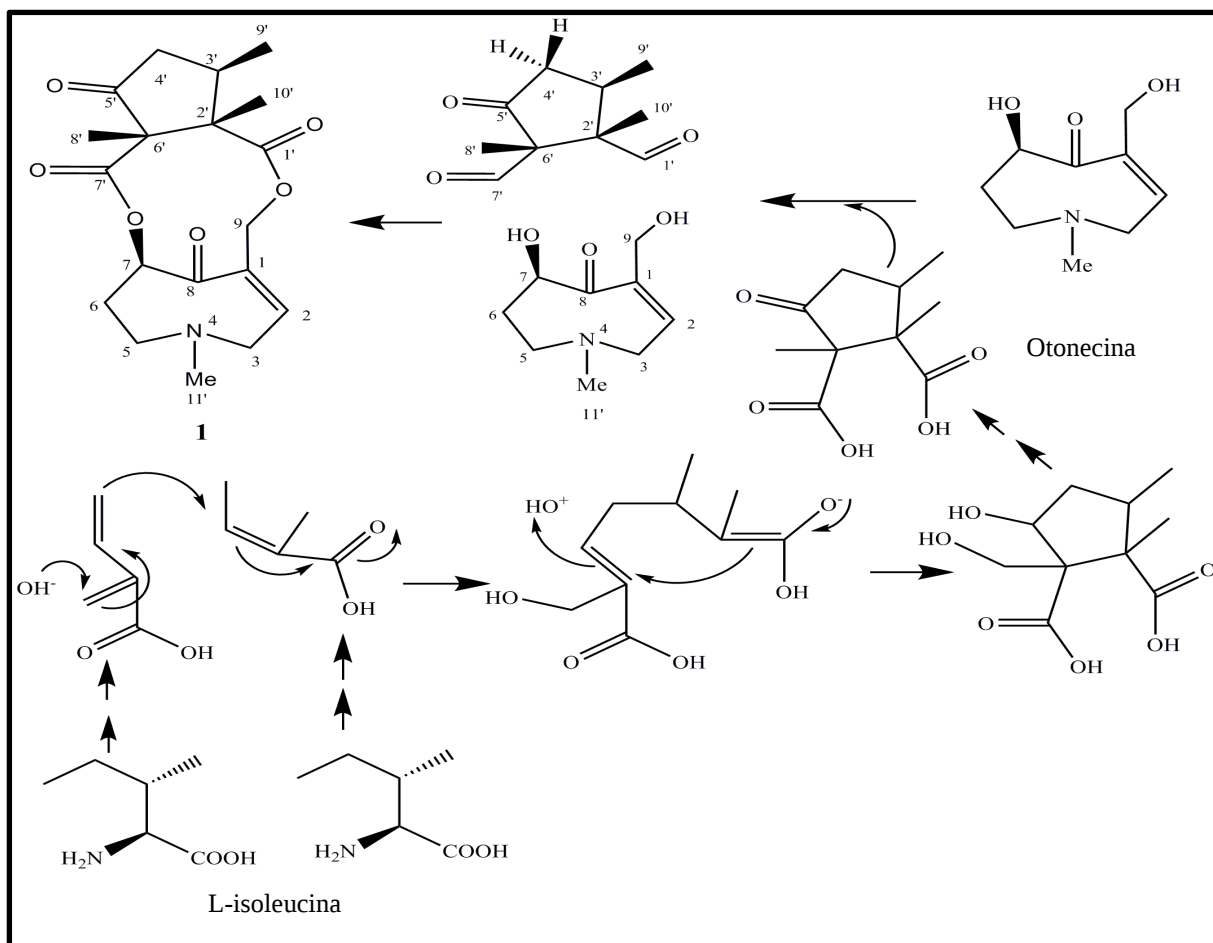


Figura 8 - Estrutura e proposta para a retrobiossíntese da substância **Cv-1**.

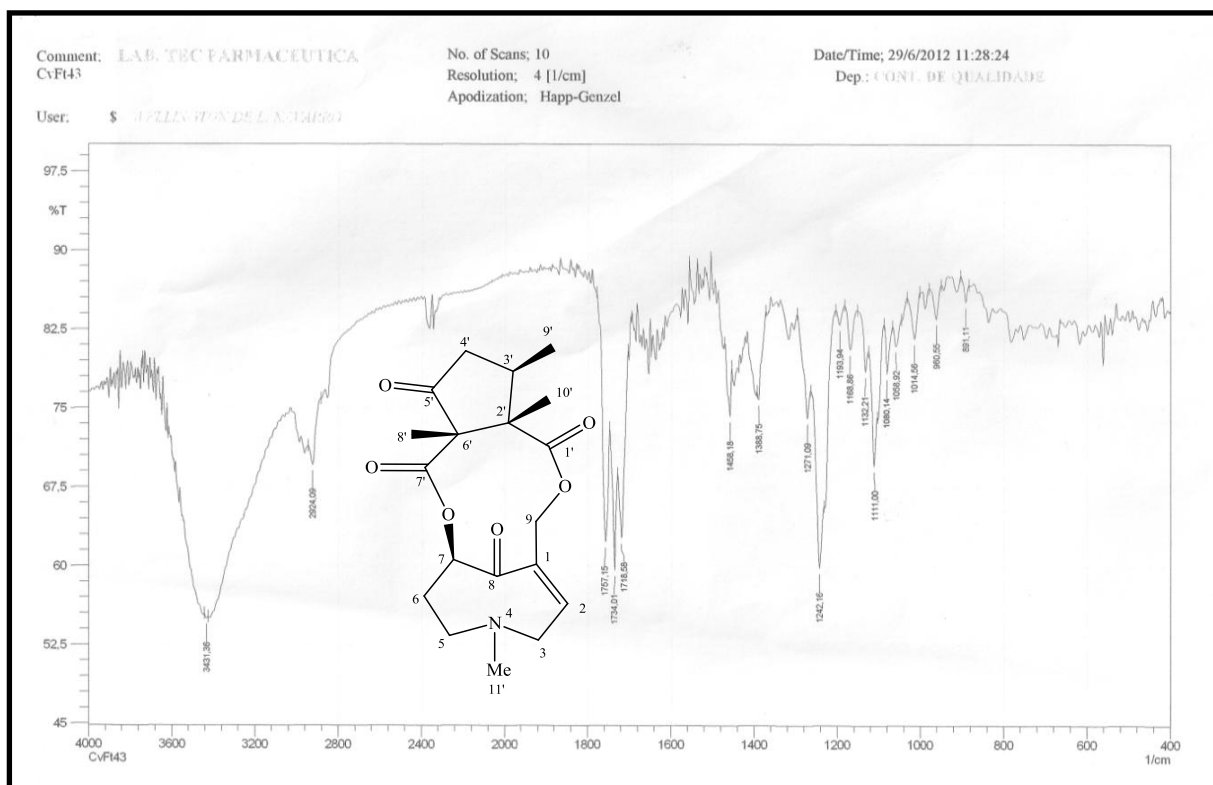


Figura 9 - Espectro IV, (KBr, cm^{-1}) de Cv-1.

¹H NMR spectrum of 1,2,3,4,5-pentachlorobenzene in CDCl₃. The spectrum displays several multiplets in the aromatic region (6.0-8.2 ppm) and aliphatic region (2.6-3.5 ppm). Integration values are provided below the baseline, and chemical shifts are labeled above the peaks.

Chemical Shift (ppm)	Integration
8.11	8.11
8.13	8.13
8.56	8.56
8.71	8.71
8.75	8.75
8.81	8.81
9.57	9.57

Figura 11 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

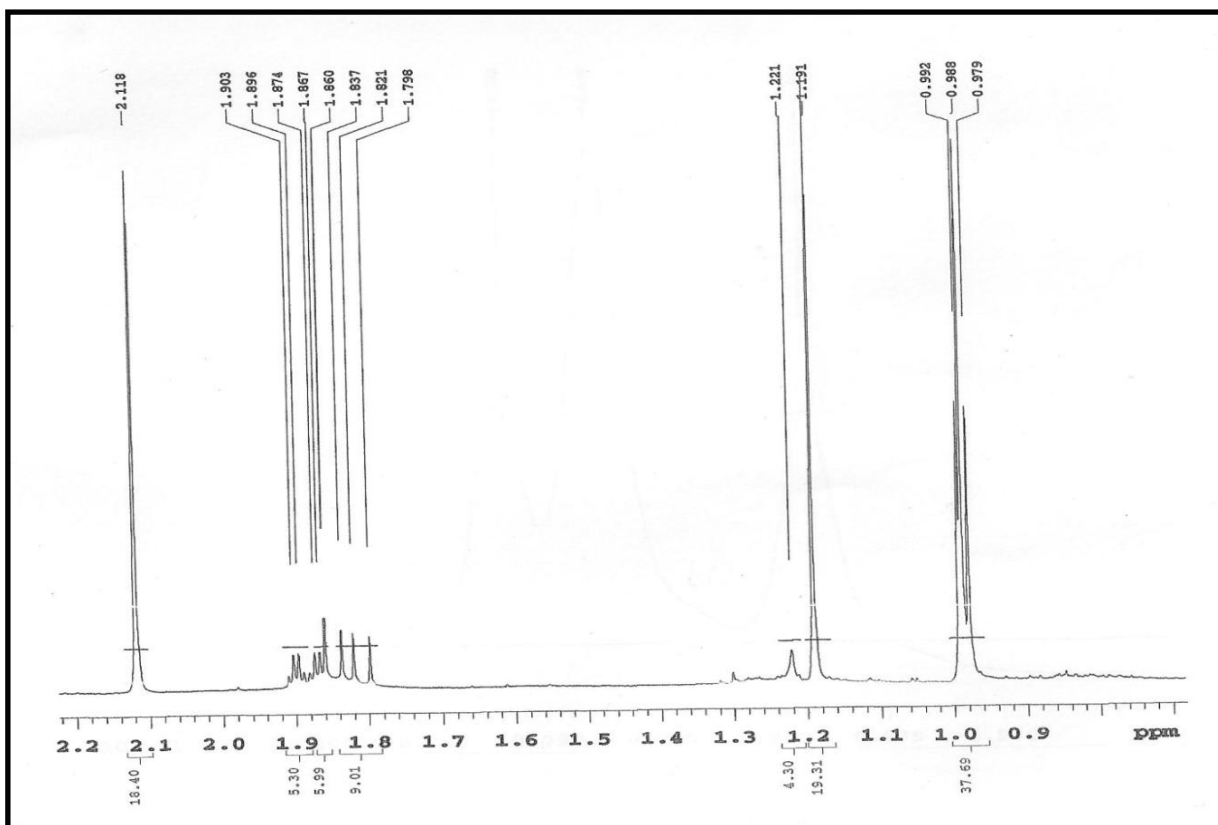


Figura 12 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

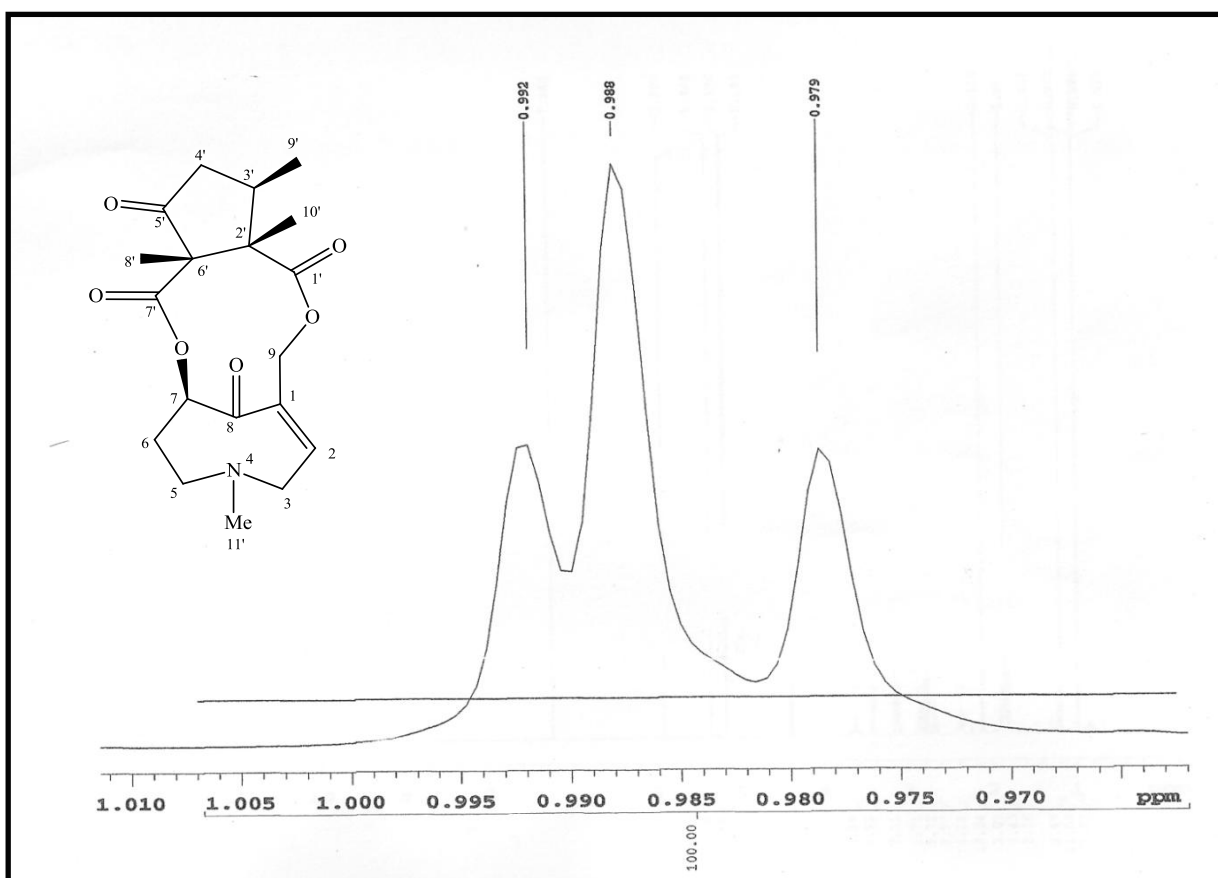


Figura 13 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

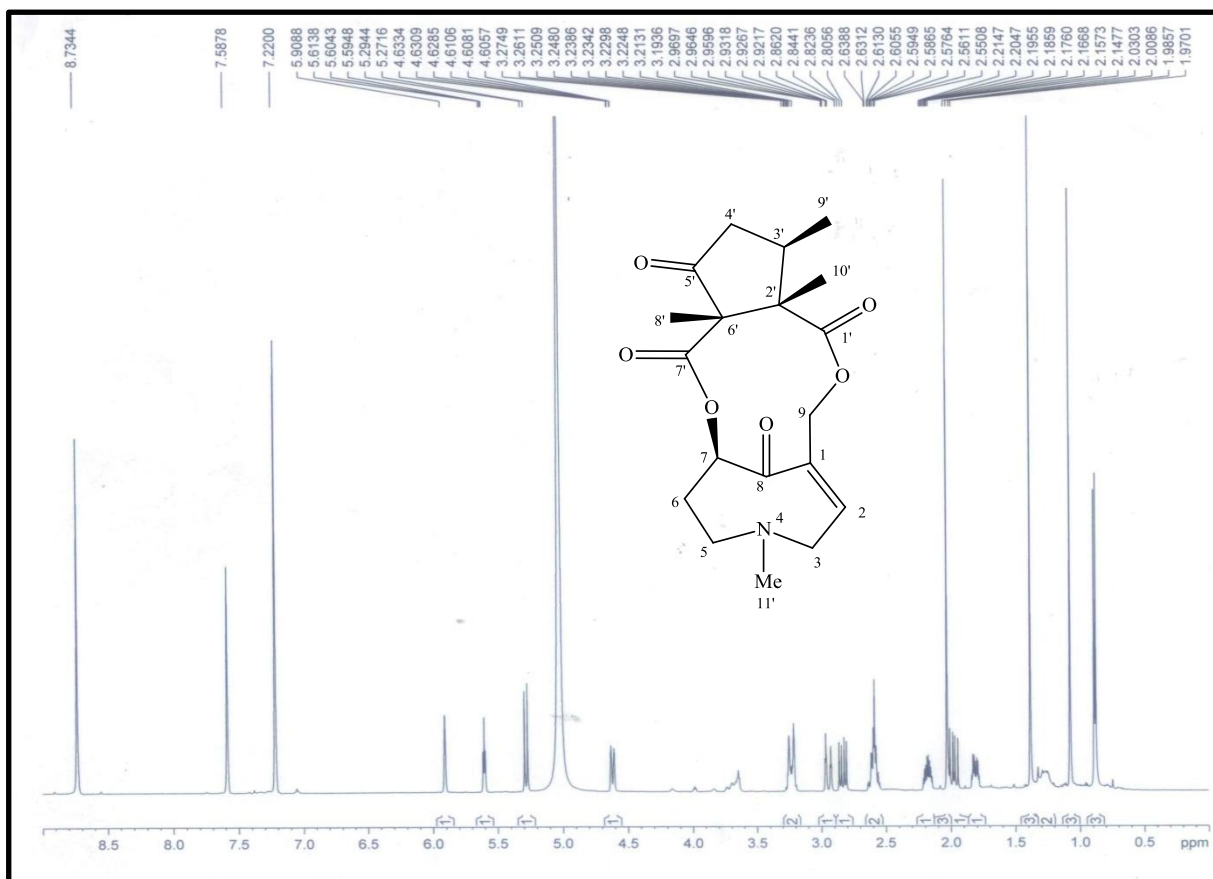


Figura 14 - Espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1.

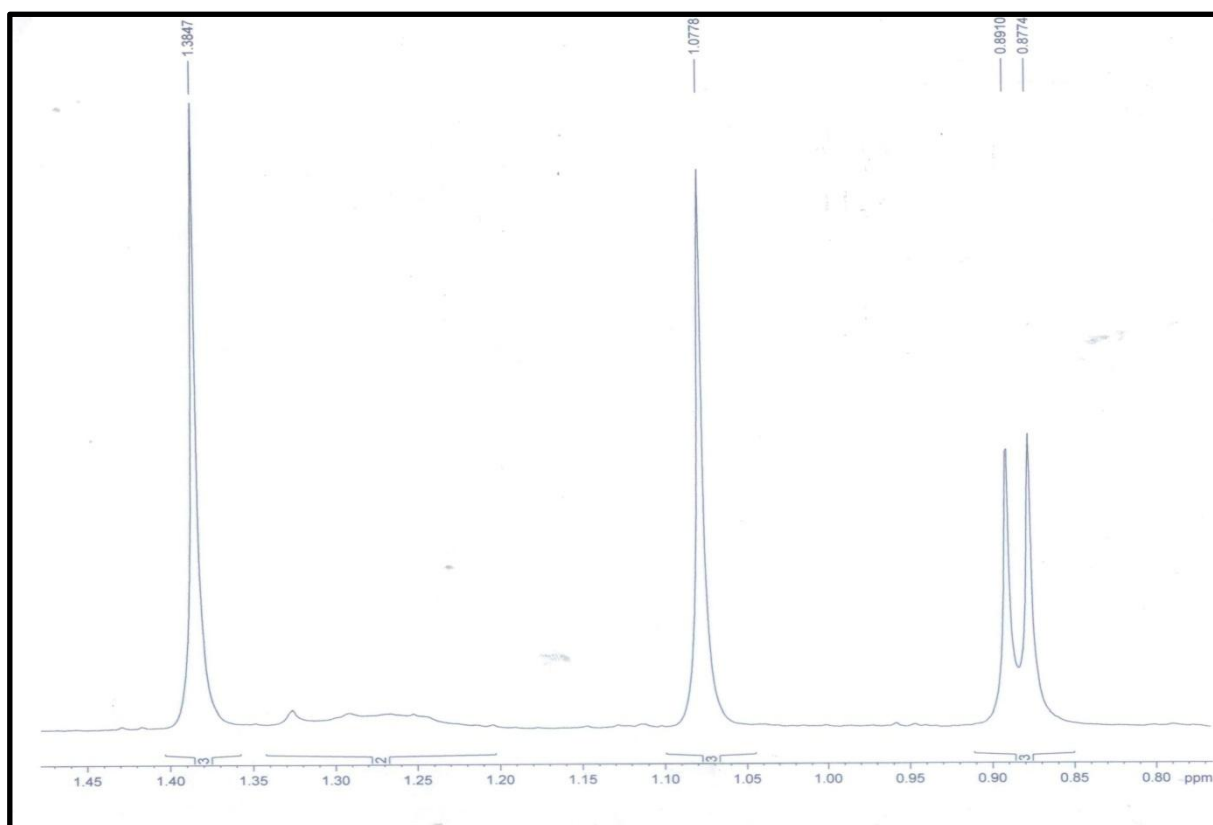


Figura 15 - Espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1, expansão

Chemical shift (ppm): 5.9088, 5.6138, 5.6043, 5.5948, 5.2944, 5.2716, 4.6334, 4.6309, 4.6285, 4.6106, 4.6081, 4.6057.

Integration values: 1.00, 1.00, 1.00, 1.00.

Figura 17 - Espectro de RMN ^1H (Piridina- d_5 , 500 MHz) de Cv-1, expansão

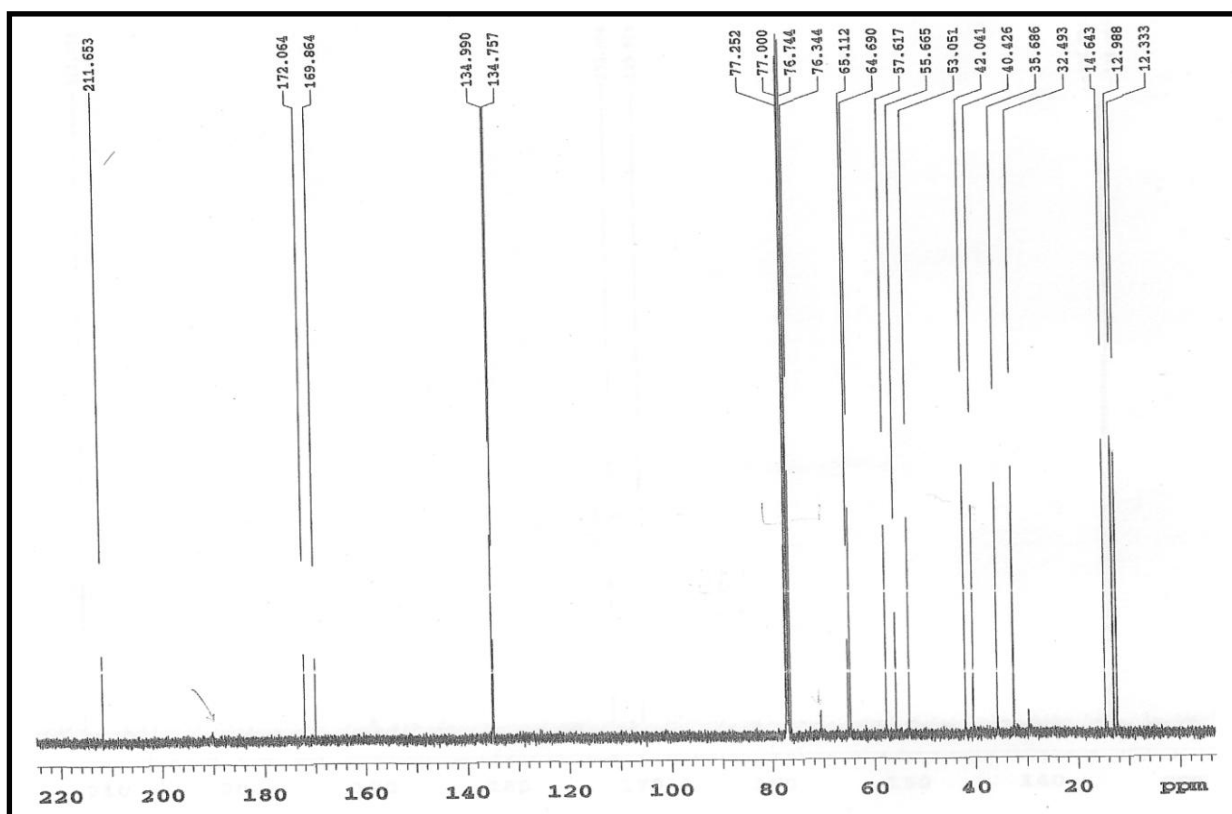


Figura 18 - RMN ^{13}C BB (CDCl_3 , 125 MHz) de Cv-1.

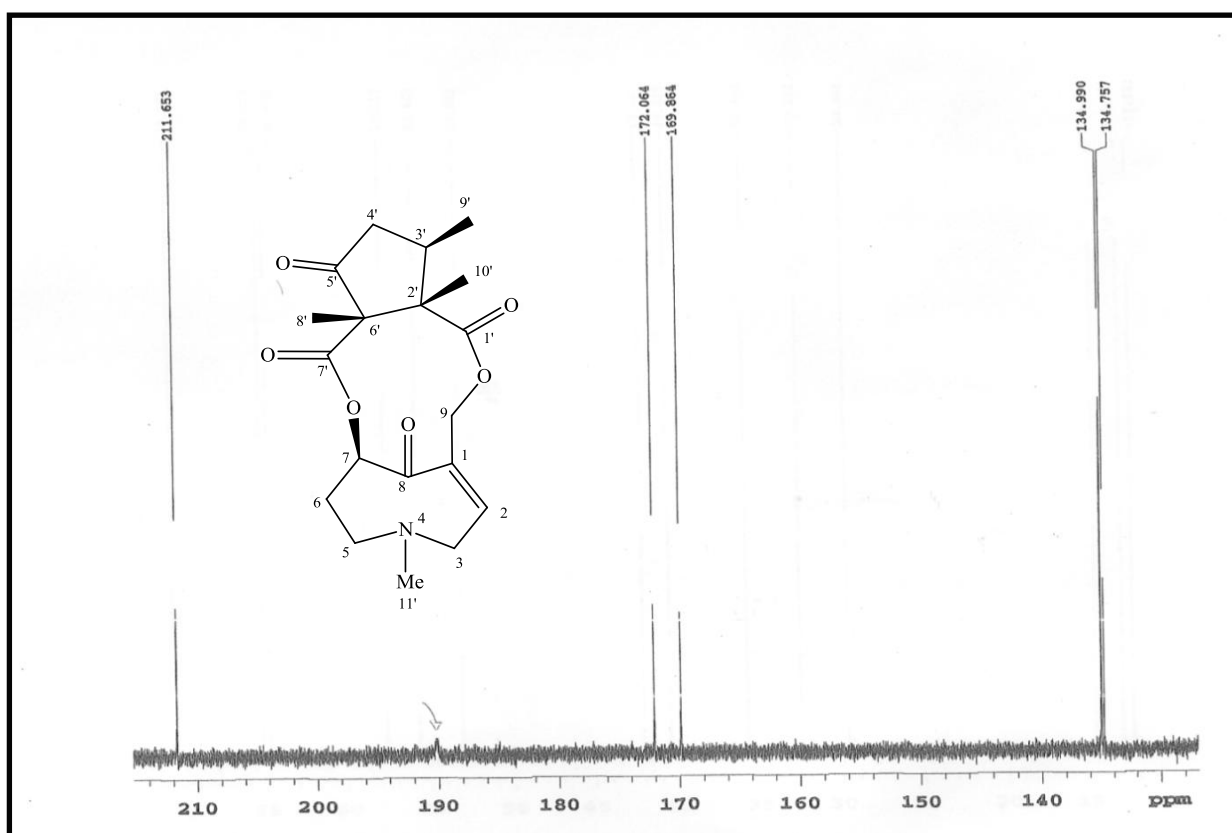


Figura 19 - RMN ^{13}C BB (CDCl_3 , 125 MHz) de Cv-1, expansão.

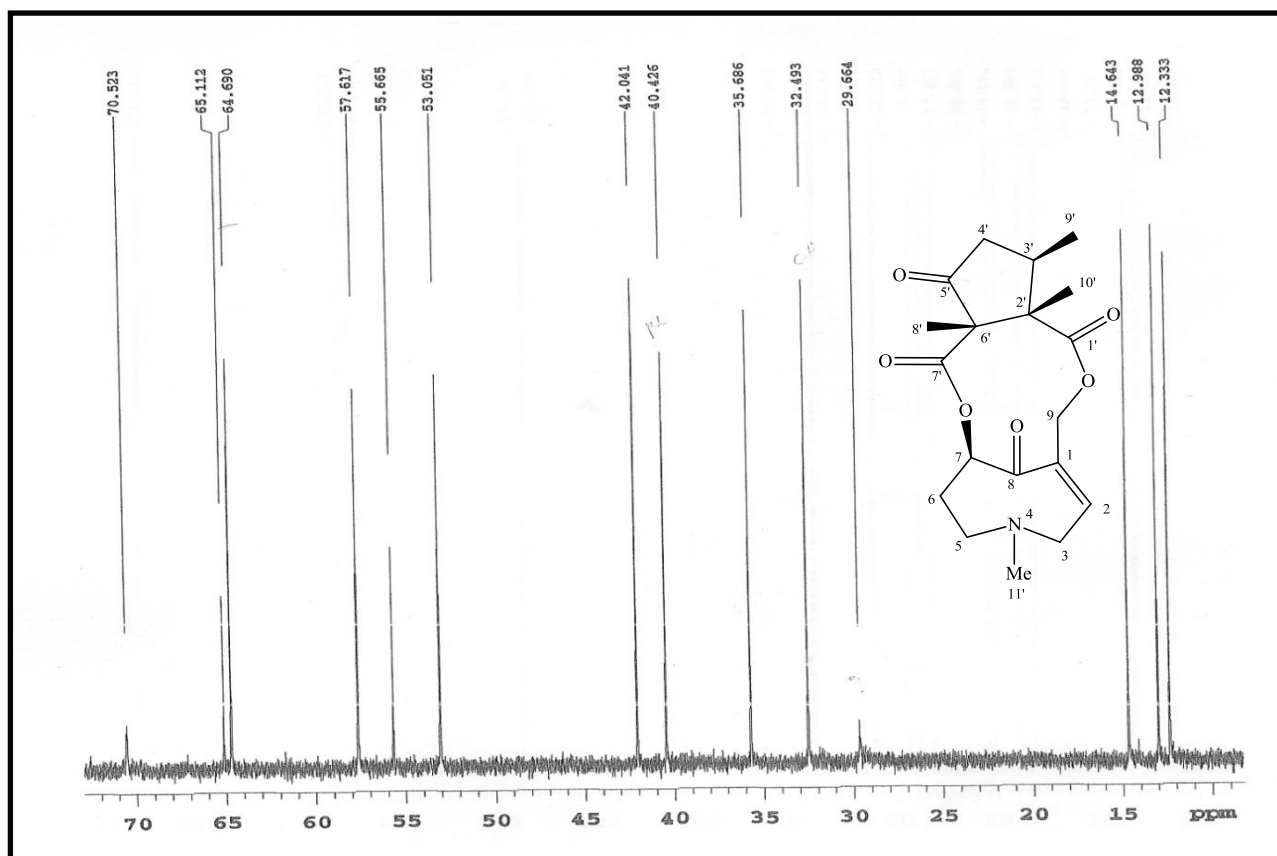


Figura 20 - RMN ^{13}C BB (CDCl₃, 125 MHz) de Cv-1, expansão.

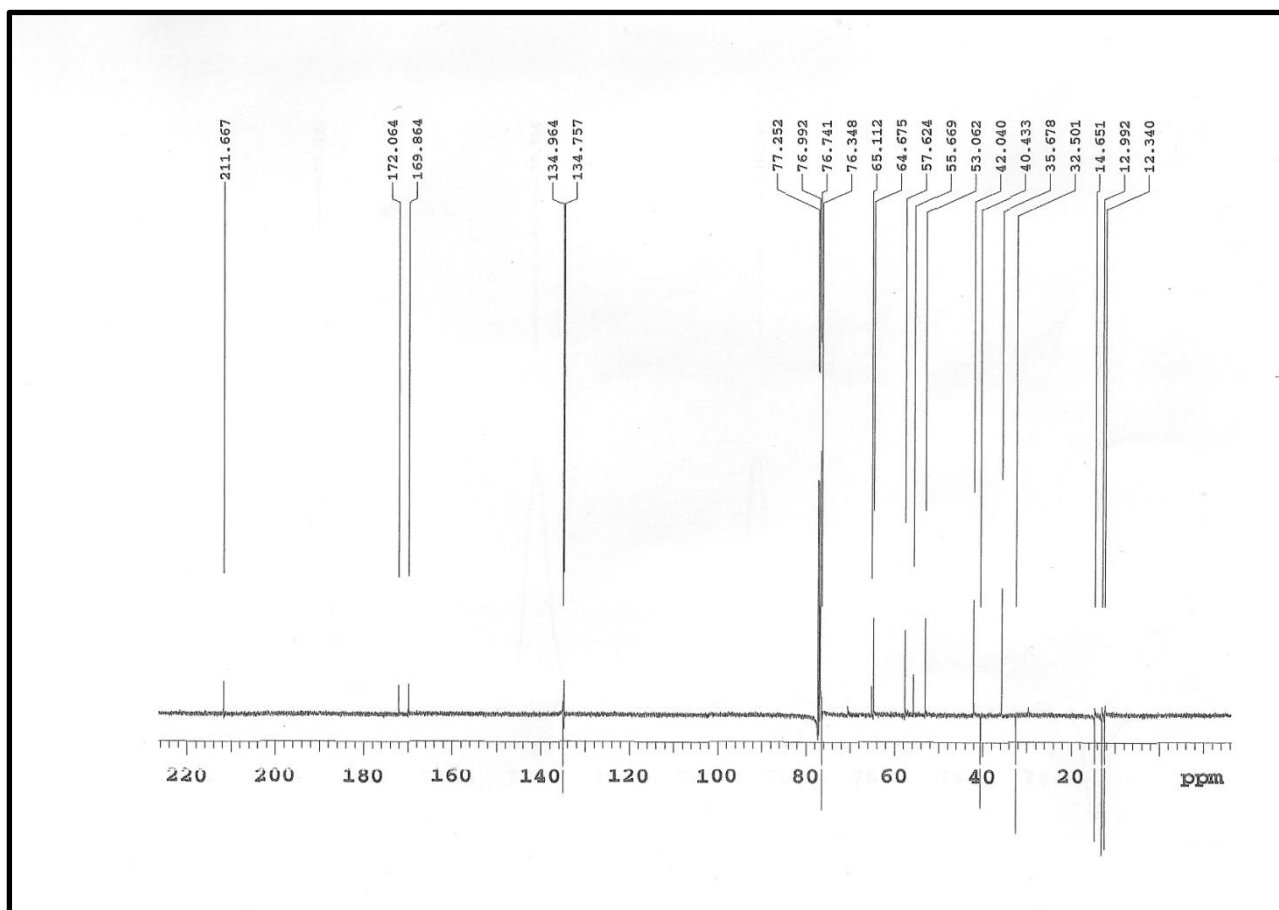


Figura 21 - RMN ^{13}C APT (CDCl₃, 125 MHz) de Cv-1.

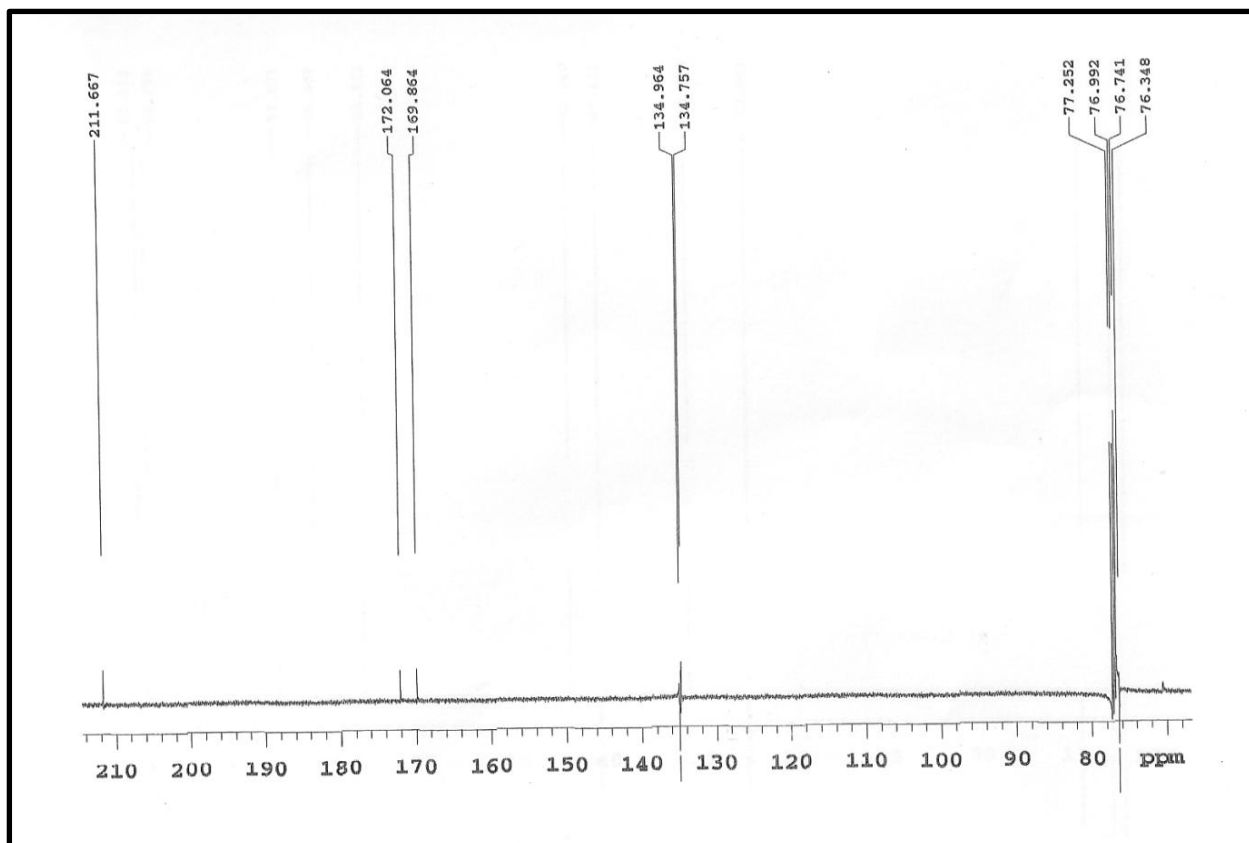


Figura 22 - RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Cv-1, expansão.

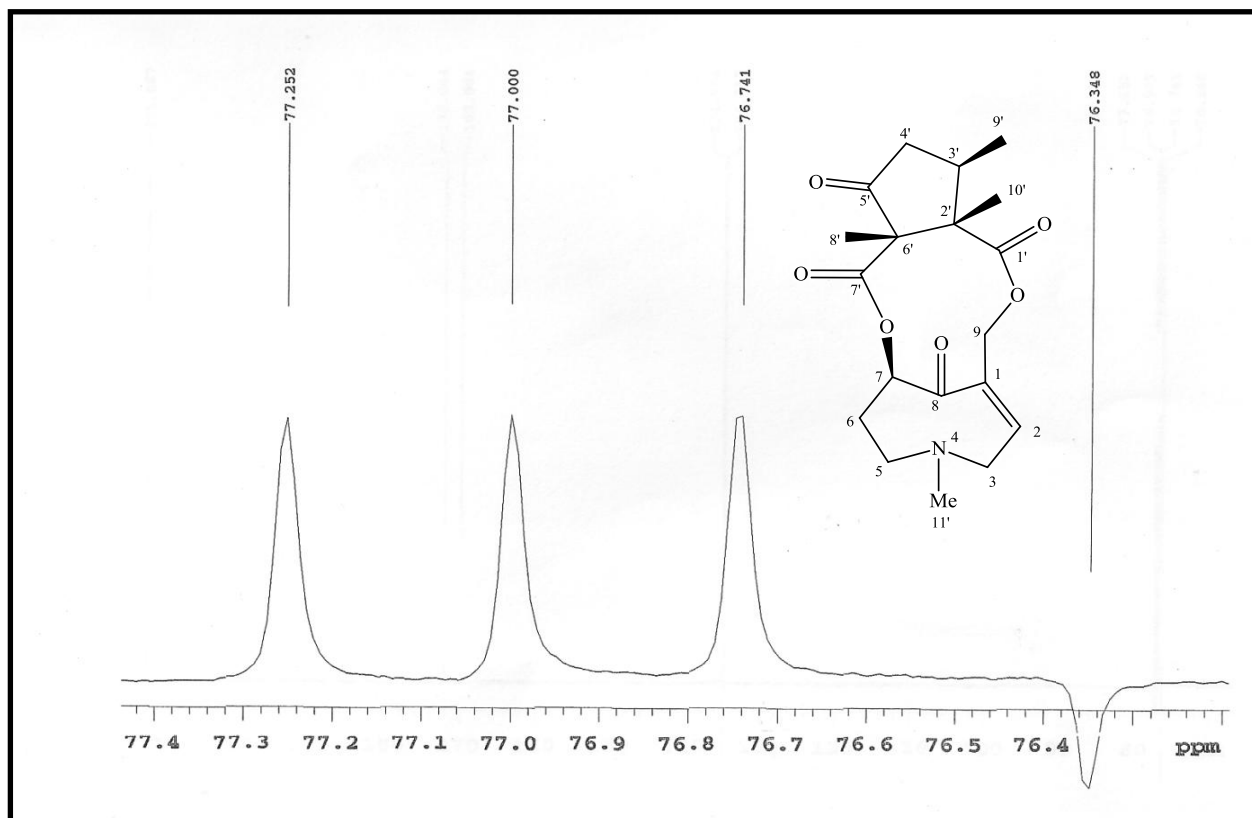


Figura 23 - RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Cv-1, expansão.

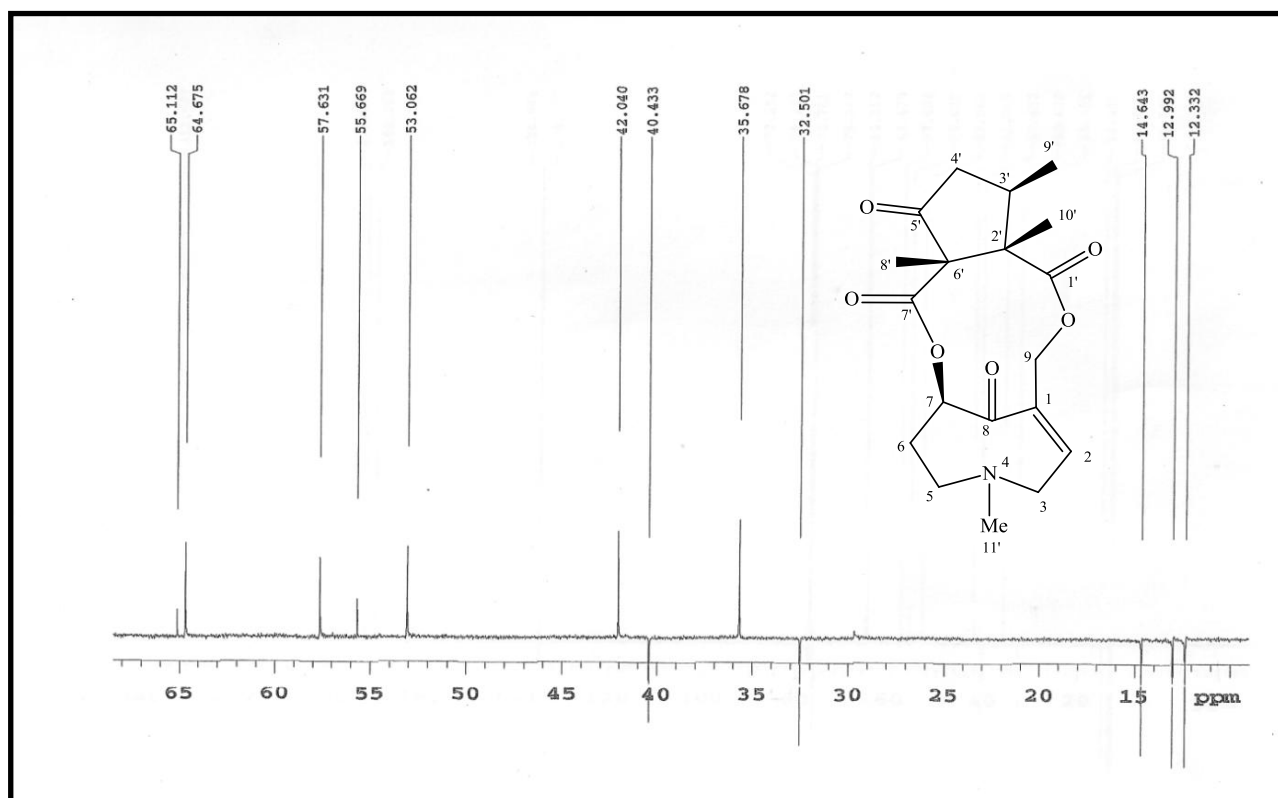


Figura 24 - RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Cv-1, expansão.

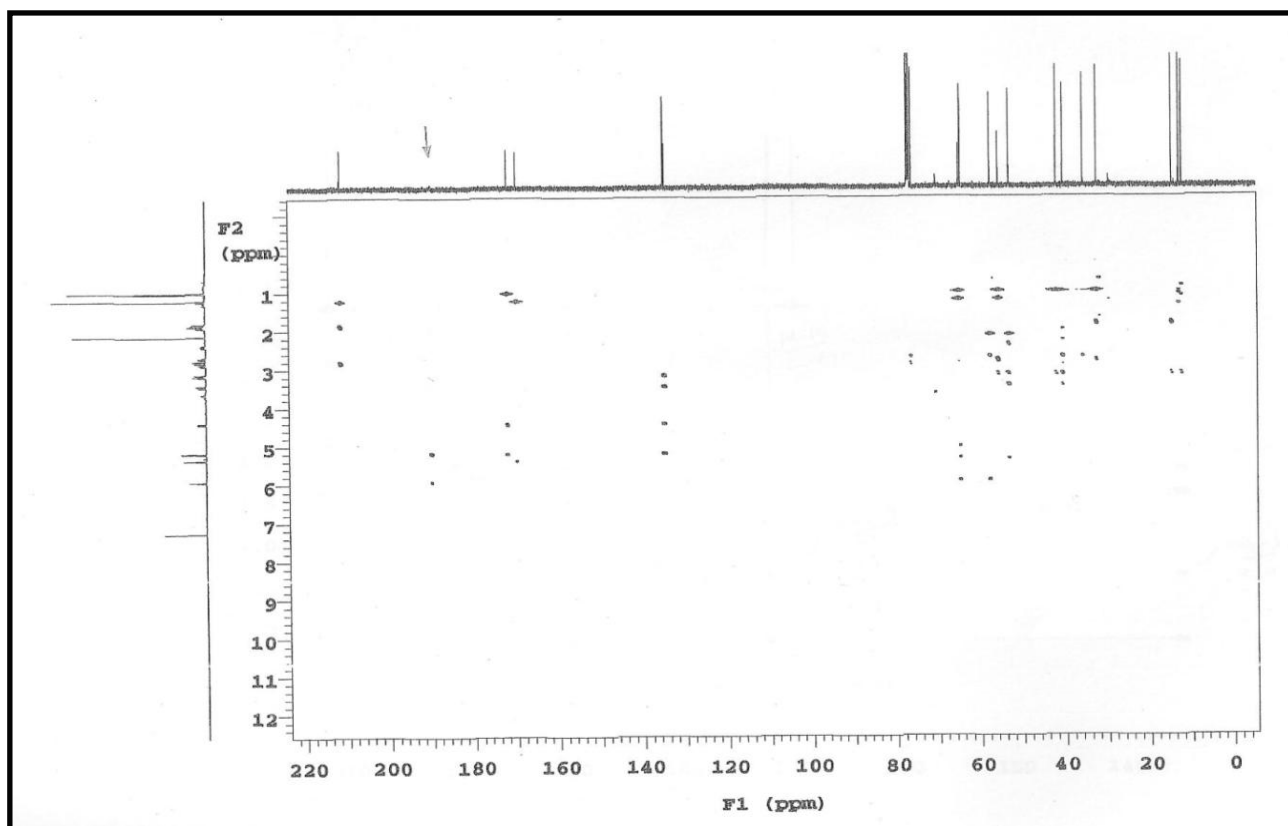


Figura 25- Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 500 x 125 MHz) de Cv-1.

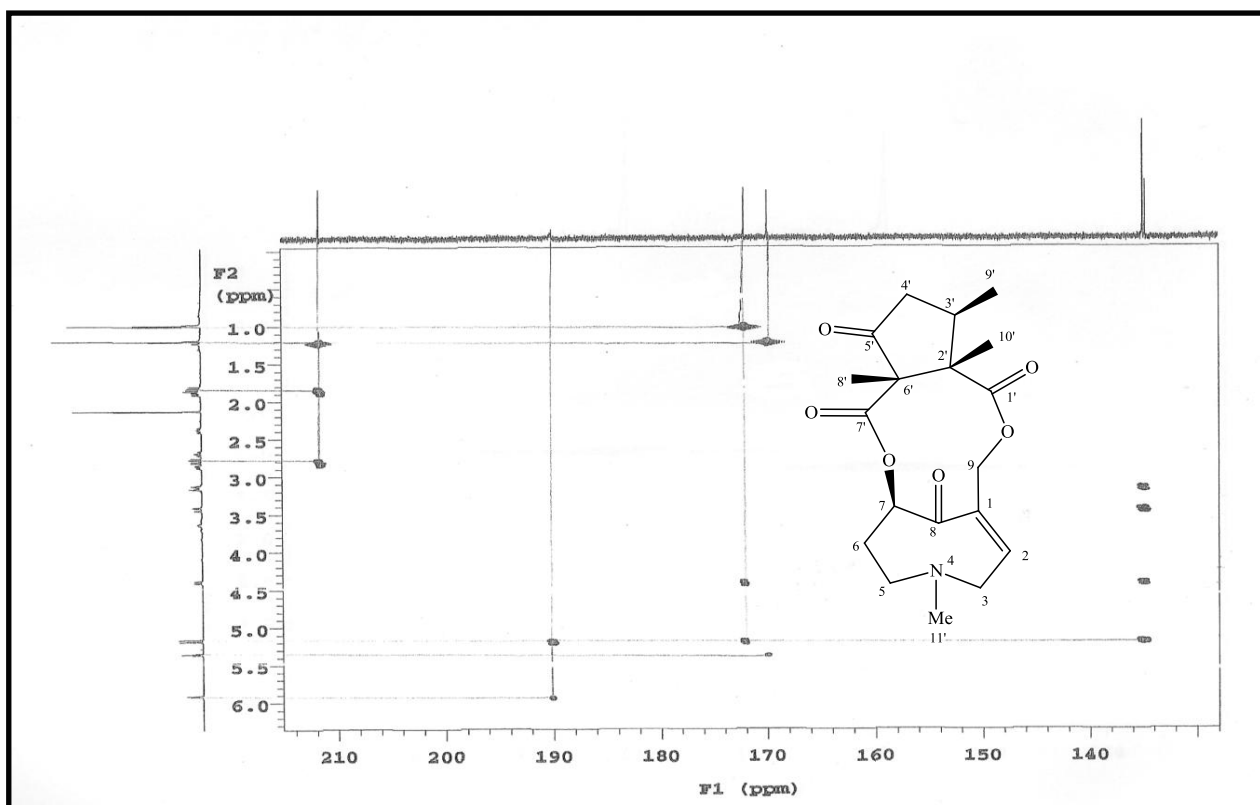


Figura 26 - Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 500 x 125 MHz) de Cv-1, expansão.

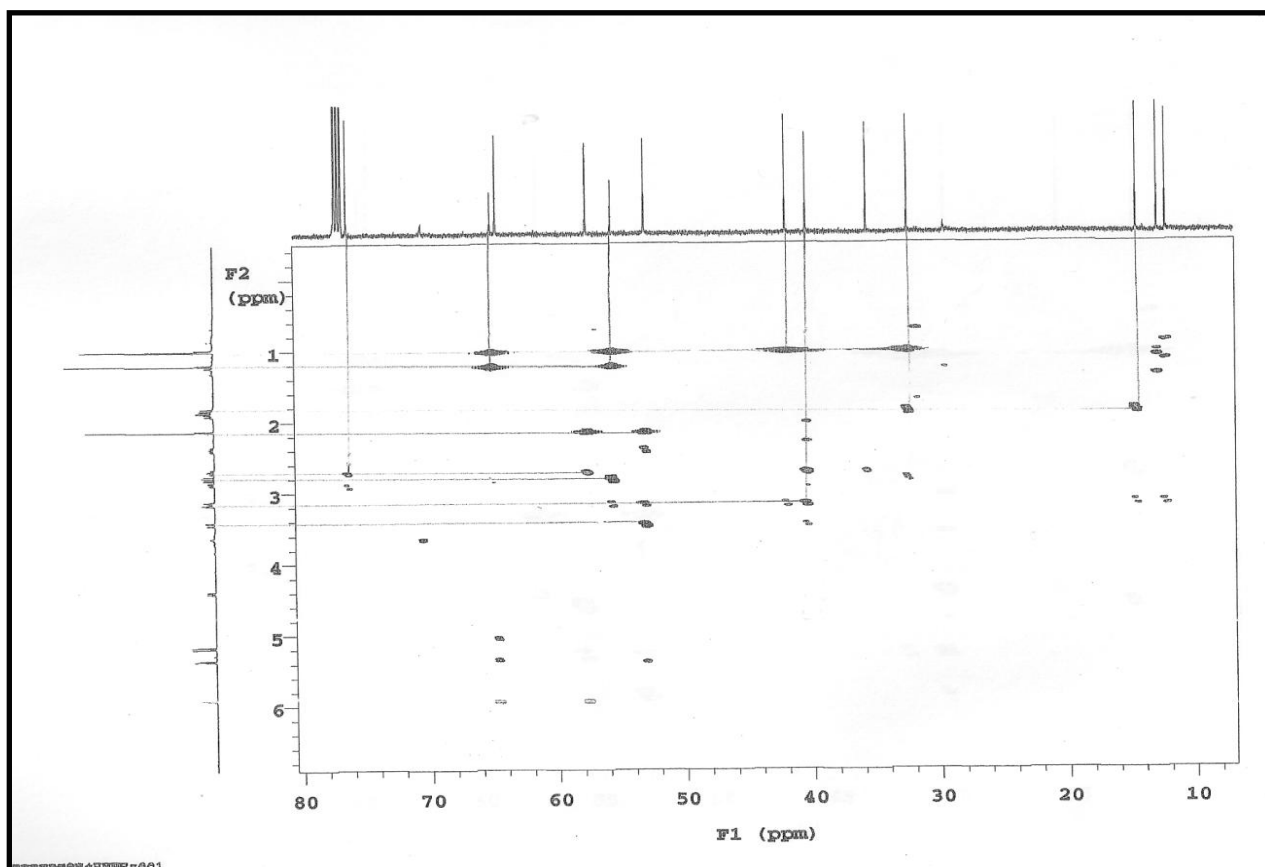


Figura 27 - Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 500 x 125 MHz) de Cv-1, expansão.

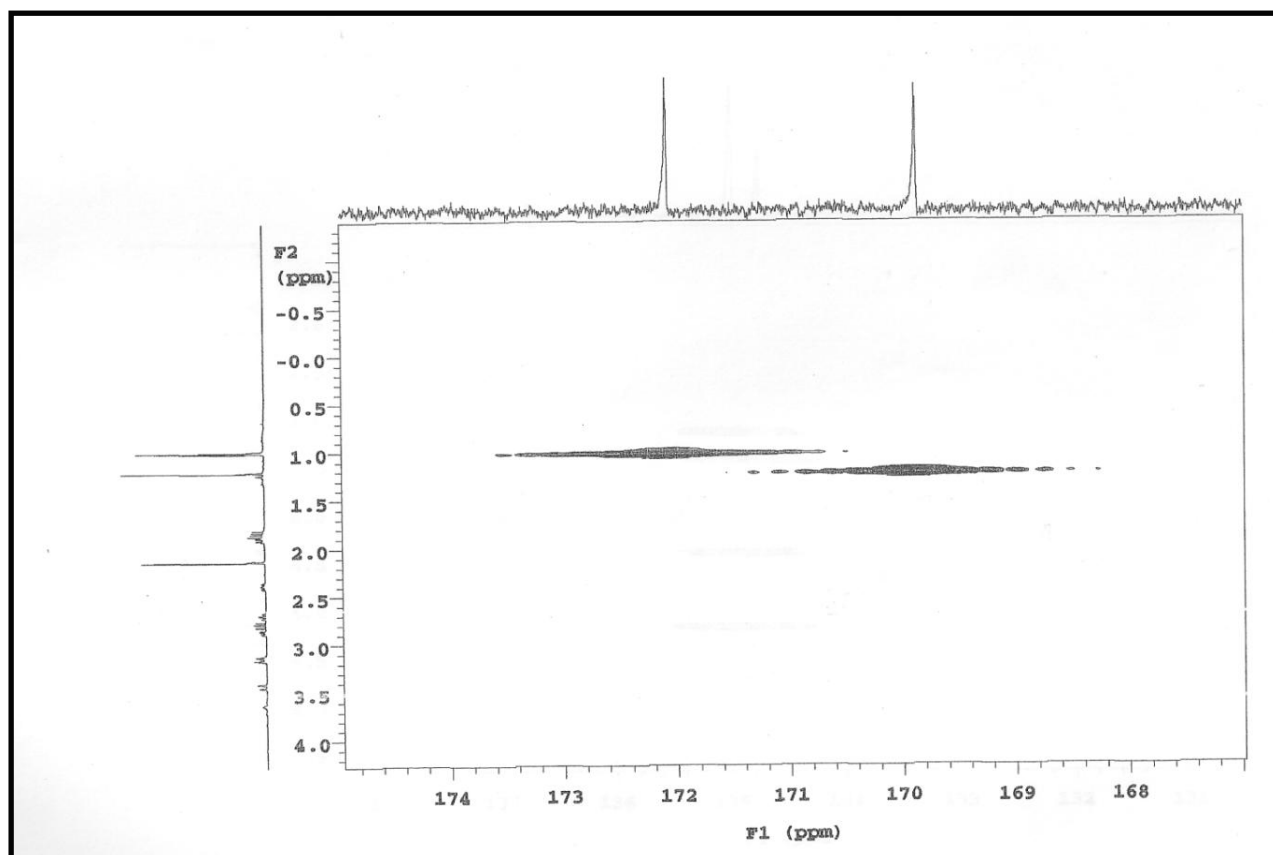


Figura 28 - Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 500 x 125 MHz) de Cv-1, expansão.

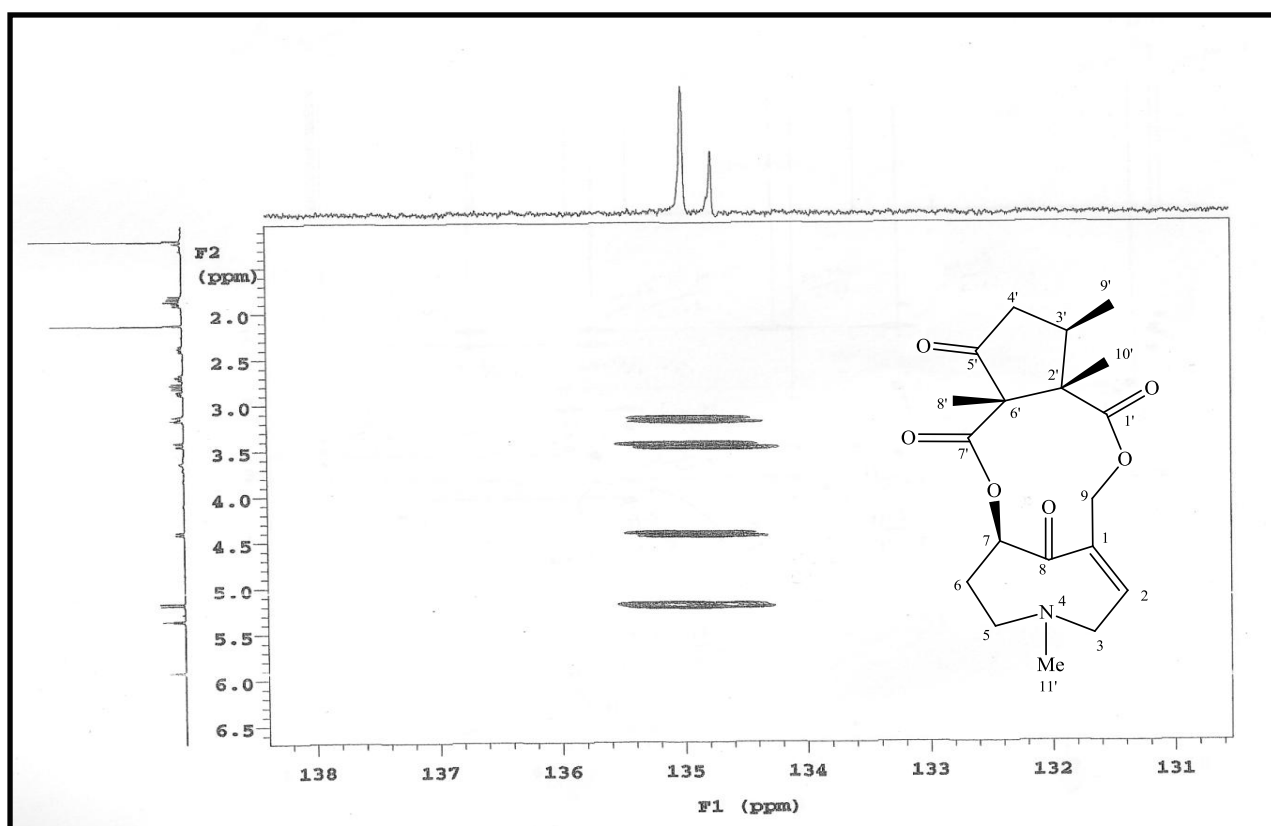


Figura 29 - Espectro de RMN HMBC (CDCl_3 500 x 125 MHz) de Cv-1, expansão.

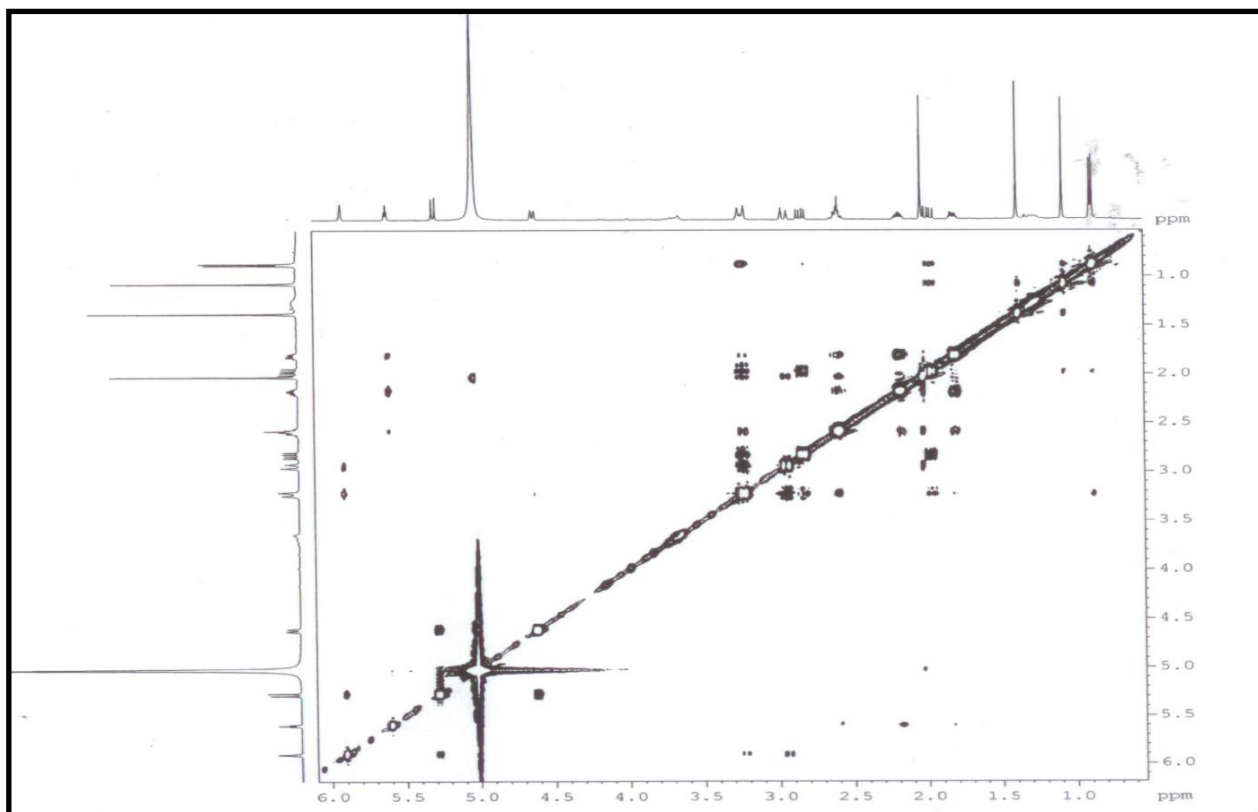


Figura 30 - Espectro de RMN NOESY (Piridina-d₅, 500 MHz) de Cv-1.

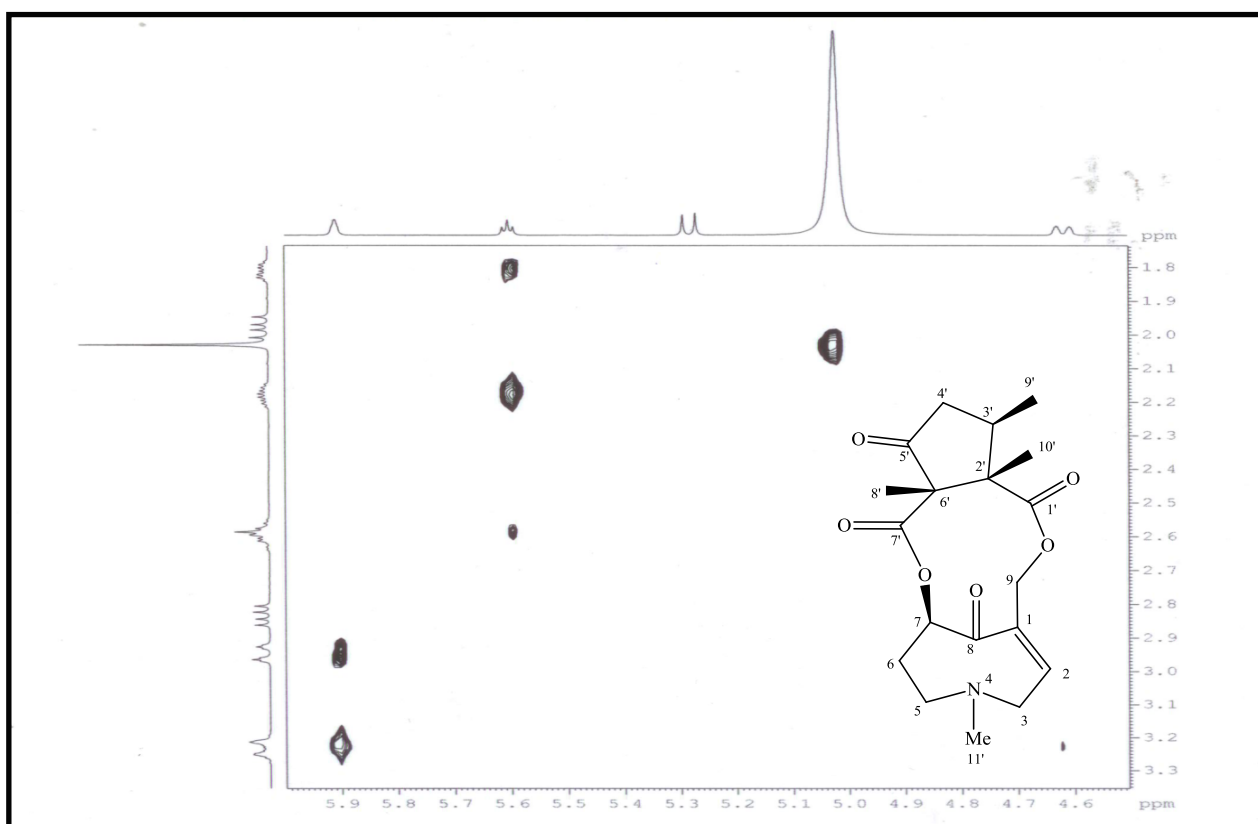


Figura 31 - Espectro de RMN NOESY (Piridina-d₅, 500 MHz) de Cv-1, expansão.

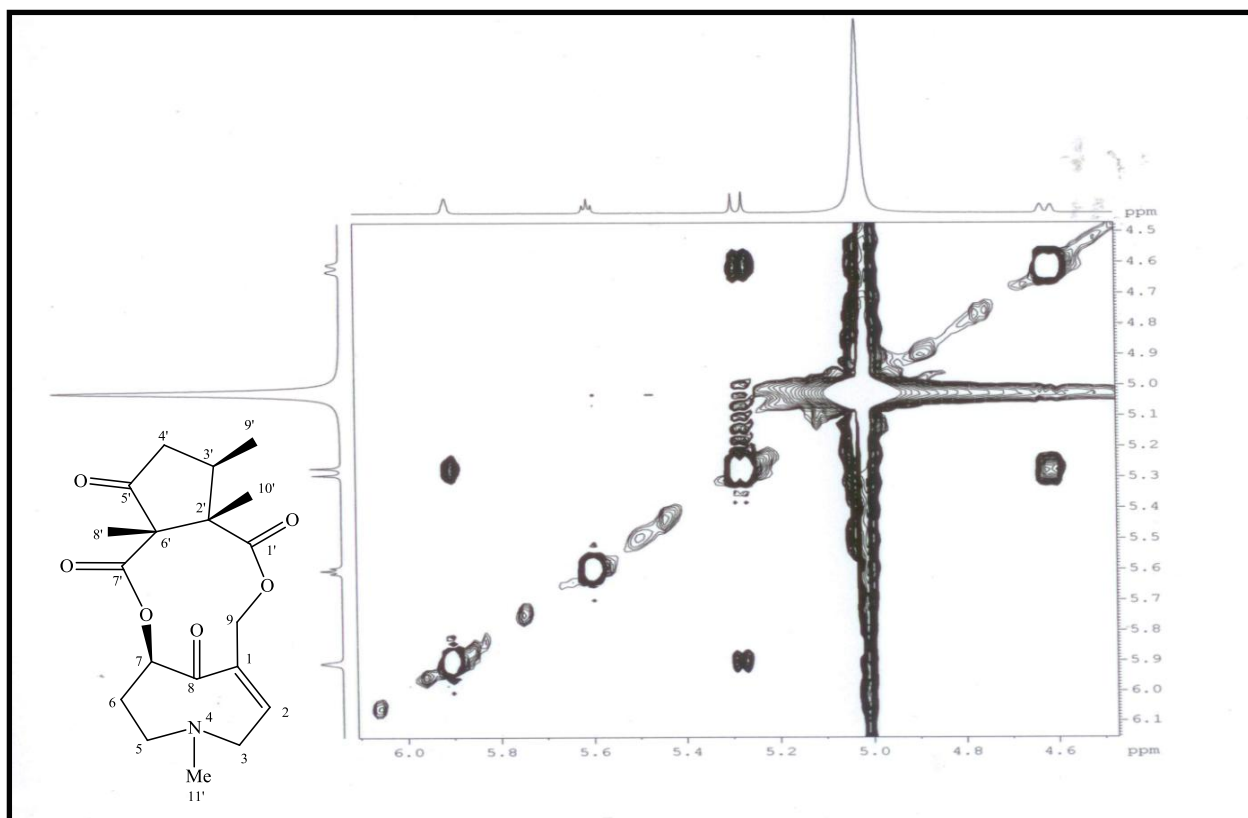


Figura 32 - Espectro de RMN NOESY (Piridina-d₅, 500 MHz) de Cv-1, expansão.

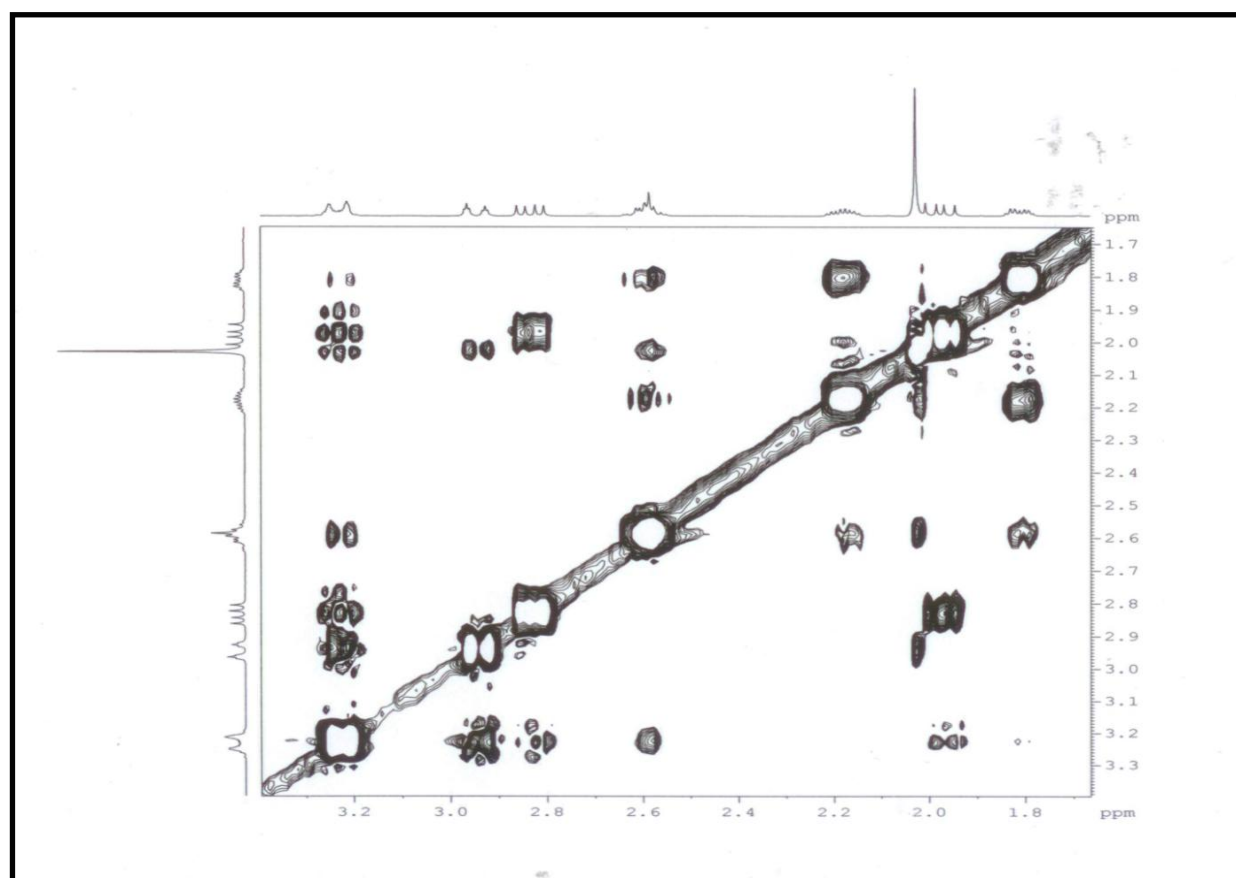


Figura 33 - Espectro de RMN NOESY (Piridina-d₅, 500 MHz) de Cv-1, expansão.

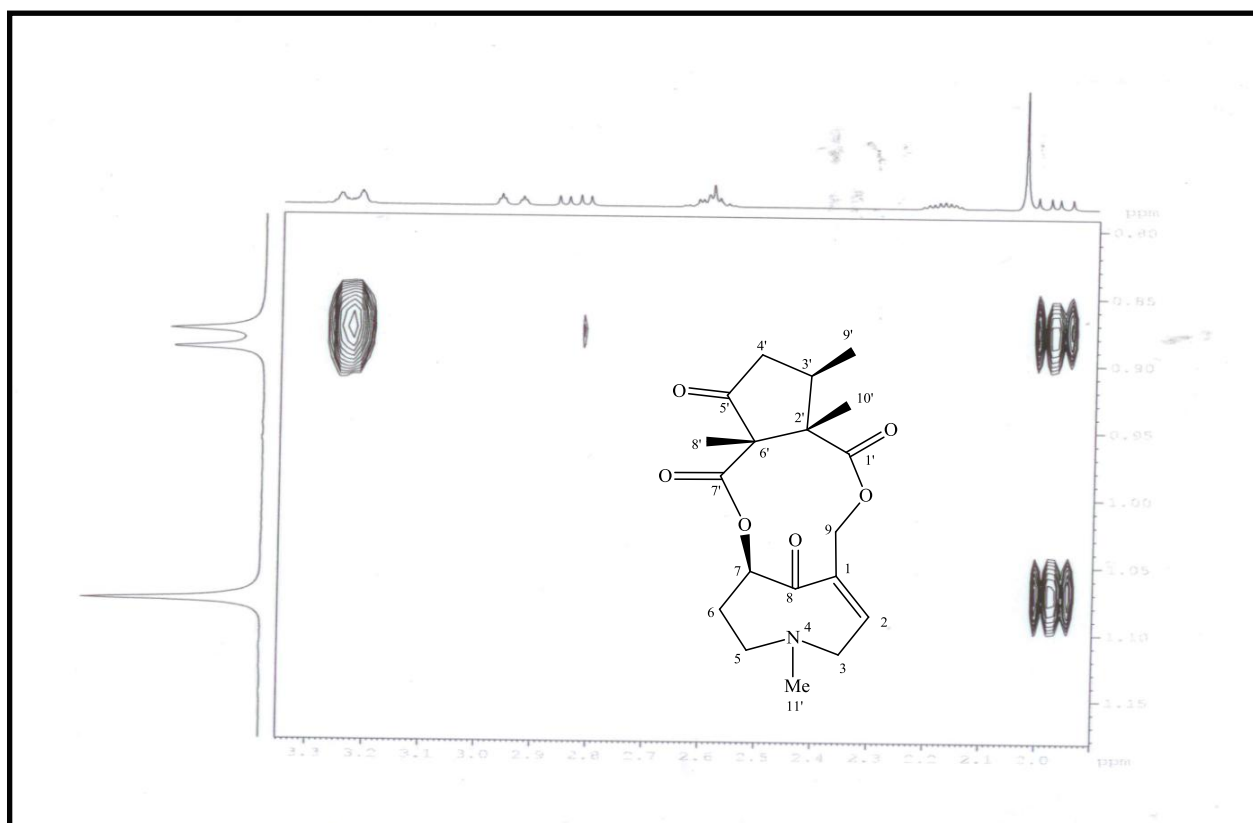


Figura 34- Espectro de RMN NOESY (Piridina-d₅, 500 MHz) de Cv-1, expansão.

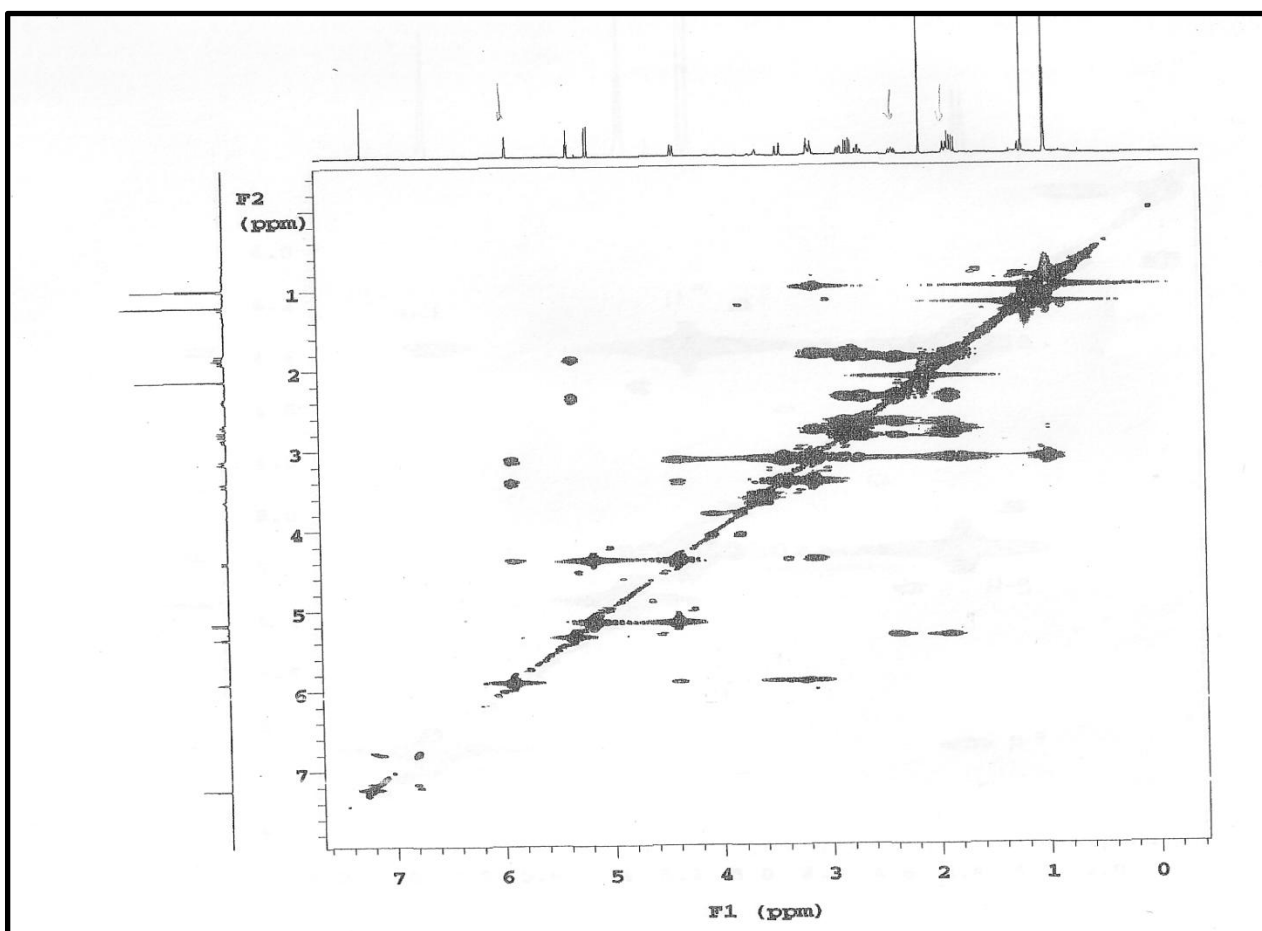


Figura 35- Espectro de RMN COSY (CHCl₃, 500 MHz) de Cv-1.

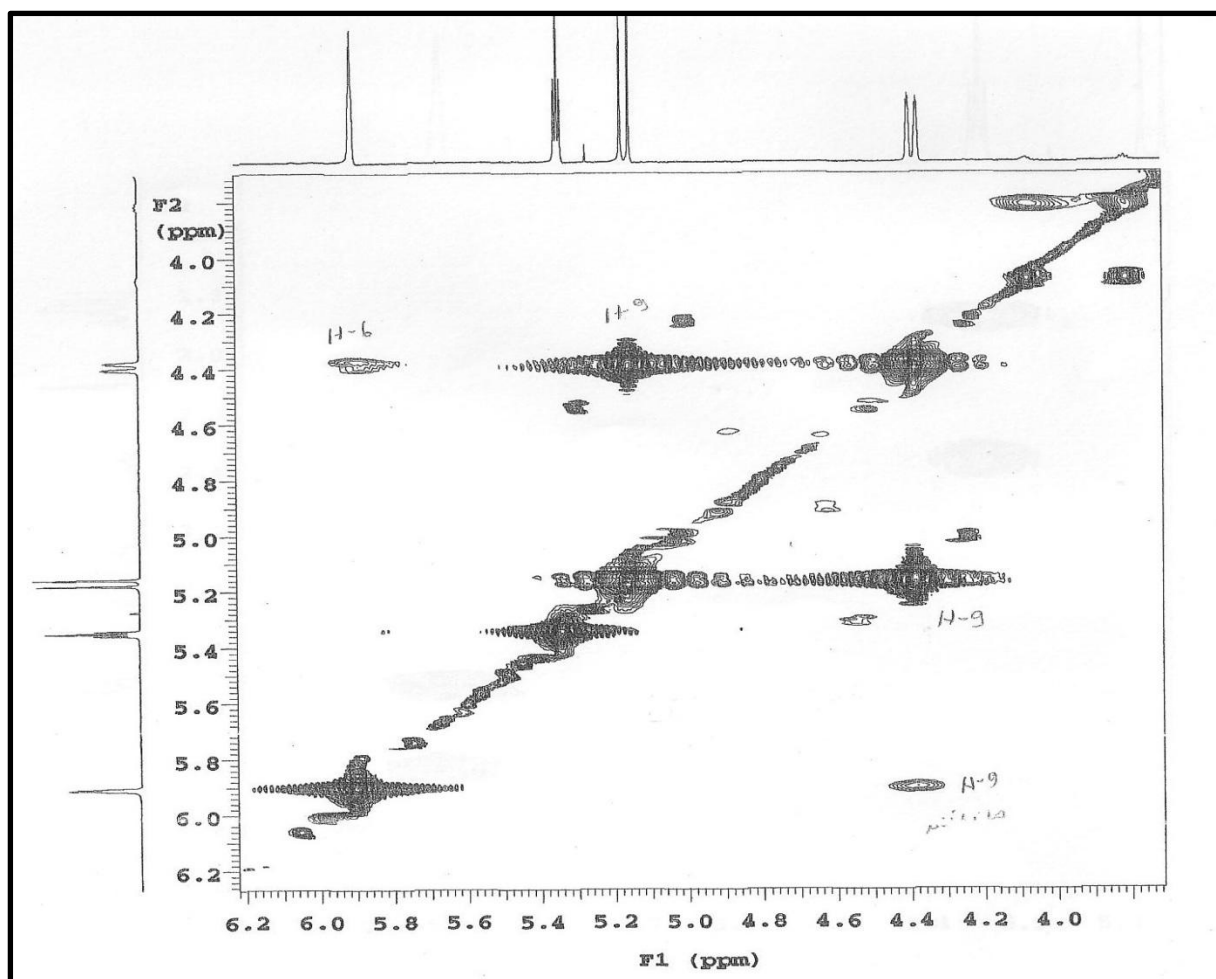


Figura 36- Espectro de RMN COSY (CHCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

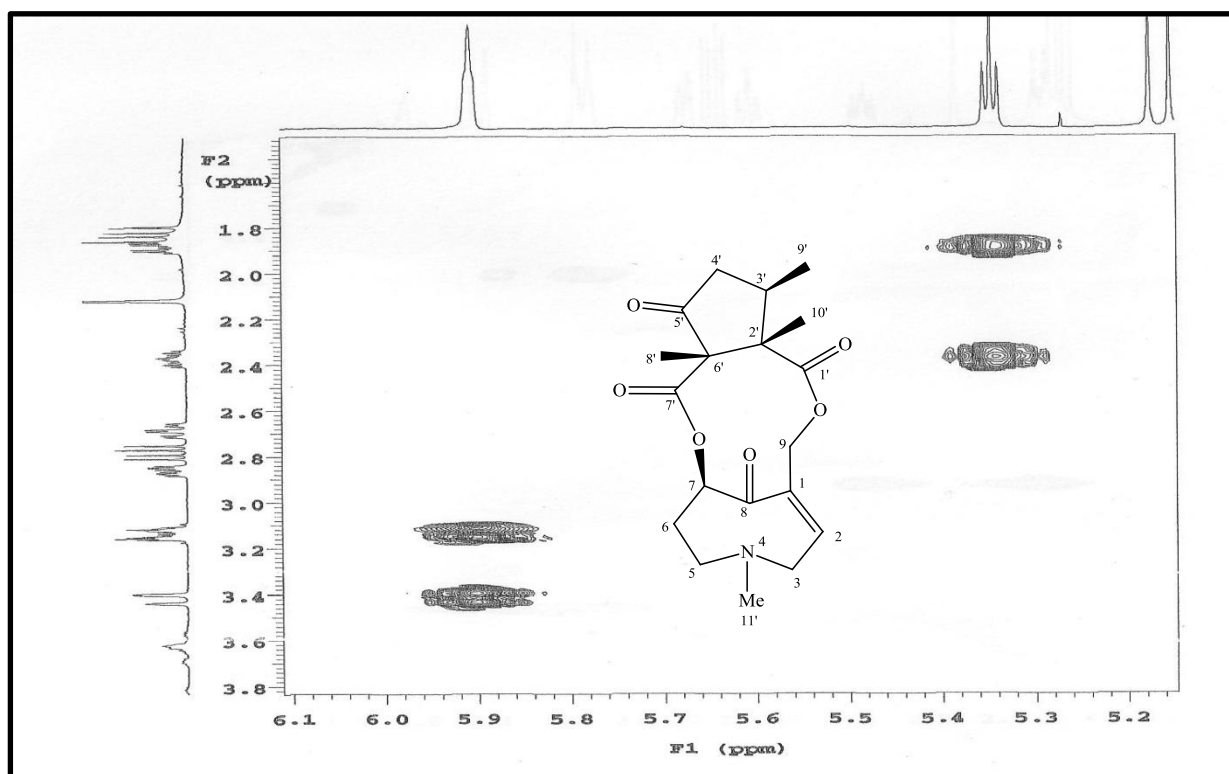


Figura 37- Espectro de RMN COSY (CHCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

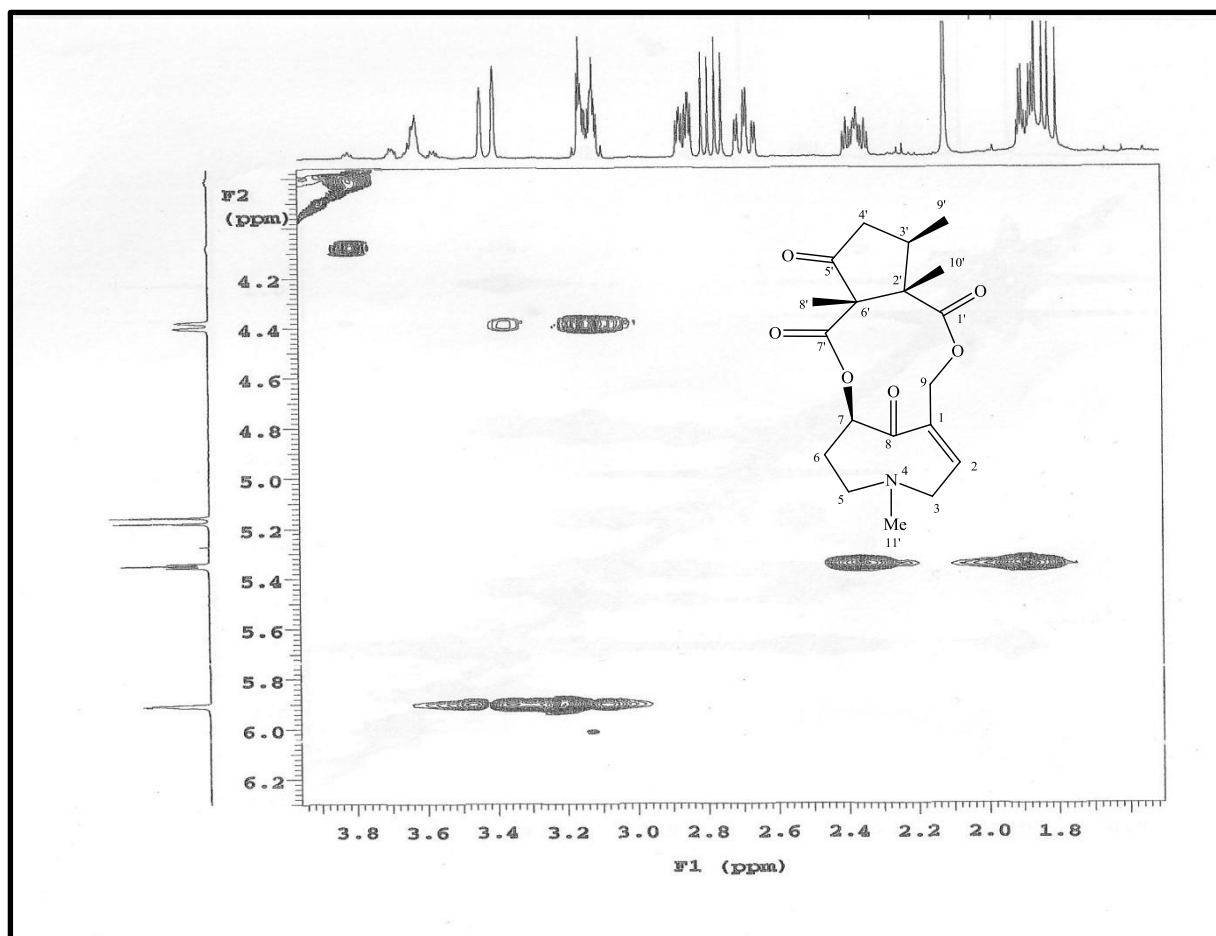


Figura 38- Espectro de RMN COSY (CHCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

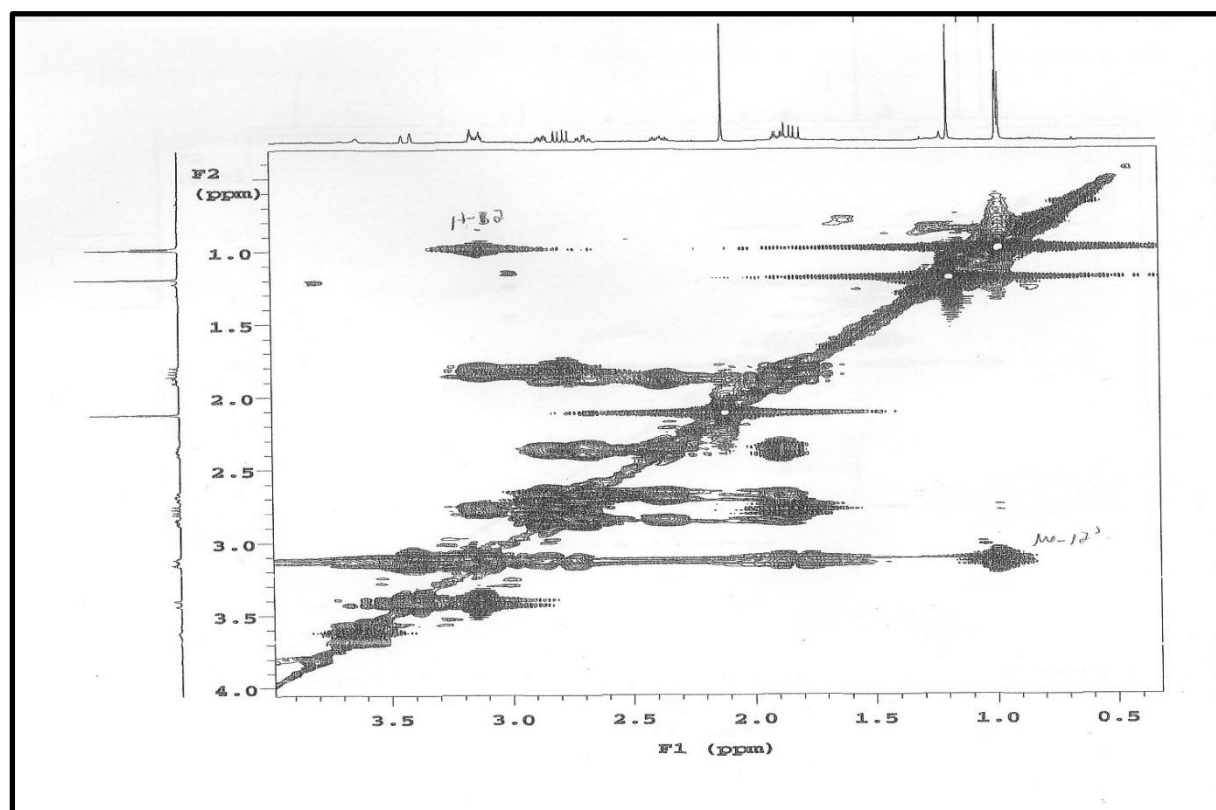


Figura 39- Espectro de RMN COSY (CHCl_3 , 500 MHz) de Cv-1, expansão.

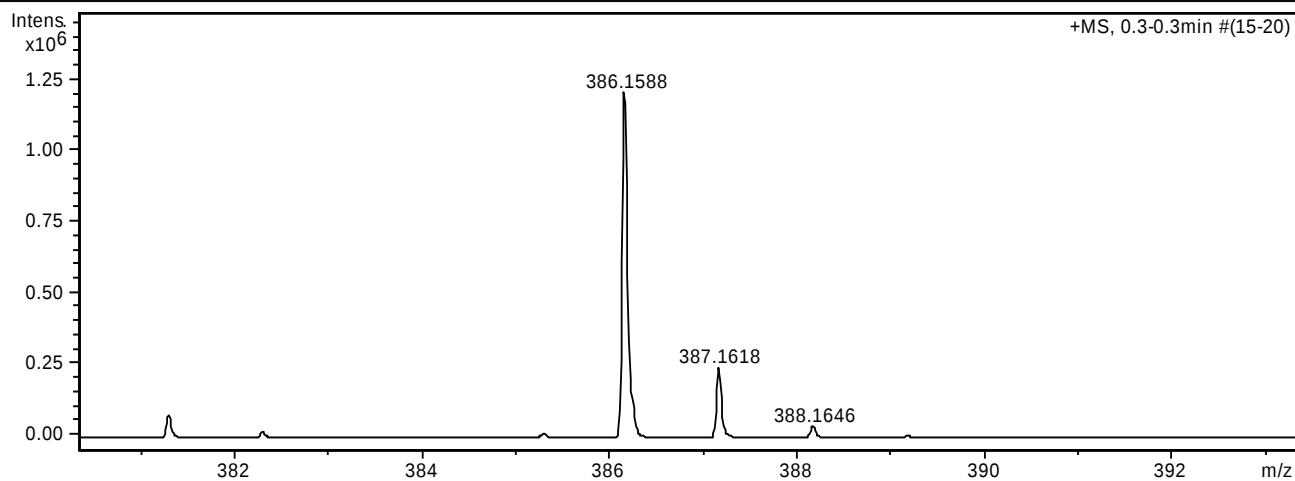
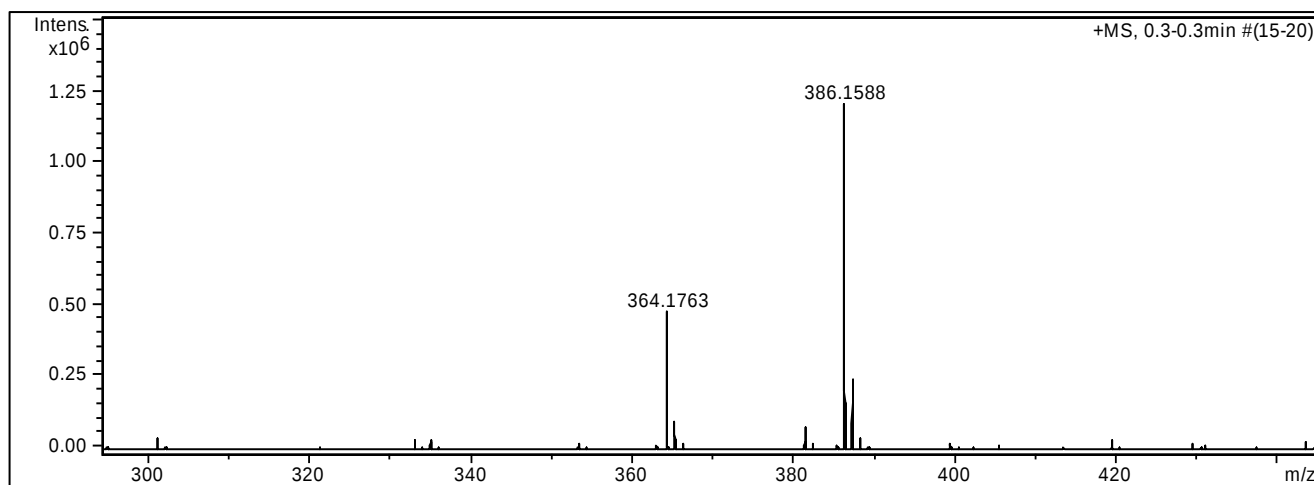
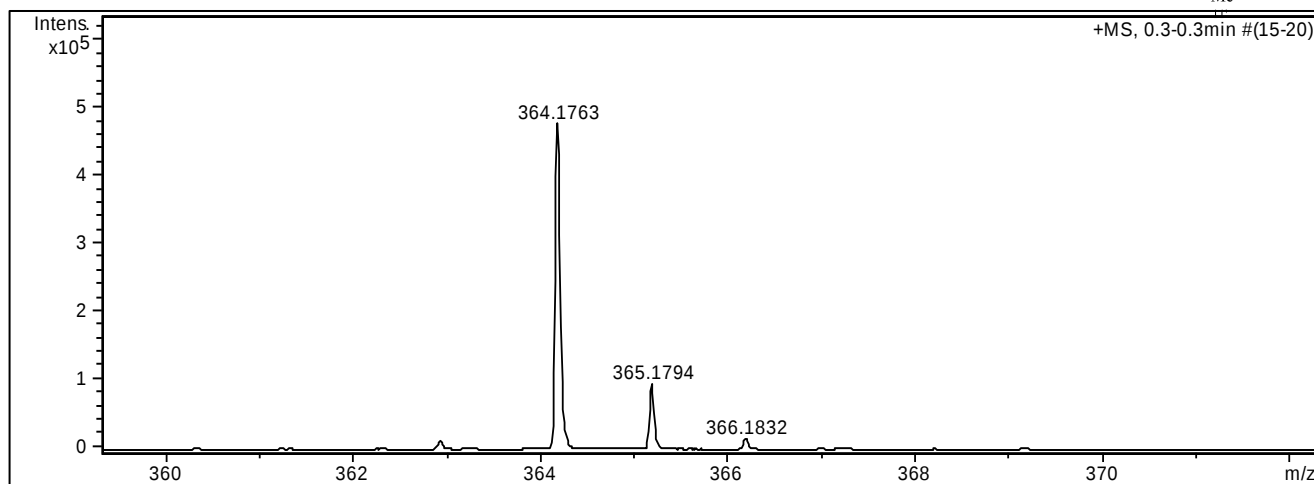
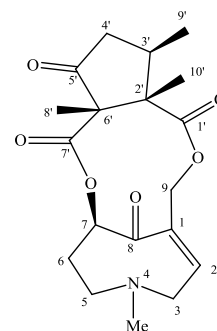
Equipamento: MicroTOF**Fabricante: Bruker Daltonics**

HV= 4500V

Nebulizer 4 l/min

Temp: 180C

Fluxo: 240ul/h

Amostra: Alcaloide**ESI+****Solvente: ACN : H2O (1:1)****Figura 40-** Espectro de massas HR-ESI⁺ - MS de Cv-1.

5.3. Determinação Estrutural dos Constituintes Químicos de *Ipomoea philomega*

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto das folhas de *Ipomoea philomega* resultou no isolamento e determinação estrutural de oito compostos da fase diclorometano: lanosterol, ácido cafeico, *p*-cumarato de etila, lupeol, cafeato de etila, umbeliferona, escopoletina e cumarina.

5.3.1. Determinação Estrutural da Substância Ip-1

A substância codificada como Ip-1 (Fig. 41, pág. 88) foi isolada na forma de pó branco e ponto de fusão 136,5-139° C, e massa 29,8 mg.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 42, pág. 89) observou-se a presença de um duplo dubleto em δ_{H} 3,23 (dd, $J = 4,5$ e $11,5$ Hz) característico de hidrogênio carbinólico. Seis sinais foram observados entre δ_{H} 0,69 e 1,0 referentes aos grupos CH_3 , além de outros dois sinais em δ_{H} 1,59 e 1,67 referentes às metilas do grupo isopropil (H-26 e H-27) (Fig. 43, pág. 89). Um multiplete em δ_{H} 5,07 sugeriu a presença de um hidrogênio olefínico (H-24) (Fig. 41, pág. 88).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Fig. 45, pág. 90) apresentou sinais entre δ_{C} 15,5 e δ_{C} 28,1 confirmando a presença dos 8 grupos CH_3 observadas no espectro de RMN ^1H . Os sinais para carbonos metínicos foram observados em δ_{C} 49,6, δ_{C} 50,9 e δ_{C} 35,4 referentes aos carbonos C-5, C-17, C-20 respectivamente (Fig. 46, pág. 91), e ainda dois sinais em δ_{C} 79,0 referente ao carbono carbinólico C-3 e em δ_{C} 125,0 referente ao carbono olefínico C-24. A presença de sinais em δ_{C} 39,9, δ_{C} 37,2, δ_{C} 44,1 e δ_{C} 50,0 foi atribuída aos carbonos quaternários ligados às metilas C-4, C-10, C-13 e C-14, respectivamente (Fig. 44, pág. 90), além de sinais em δ_{C} 130,0, δ_{C} 134,0 e δ_{C} 133,5 atribuídos aos carbonos quaternários com dupla ligação, C-24, C-8 e C-9, além disso, os valores de deslocamento para os carbonos 8 e 9, sugerem a presença de um esqueleto triterpênico tetracíclico do tipo lanostano (Fig. 44, pág. 90) (LUE, MU & ZHENG, 1998).

Comparações entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura permitiram identificar a substância codificada como Ip-1 como o triterpeno lanosterol (SHIN, TAMAI and TERAZAWA, 2000). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-1 estão compilados na Tabela 2, pág. 88.

O lanosterol é um triterpeno obtido a partir da conversão de (S)-2,3-dxido-esqualeno a lanosterol, que é precursor do colesterol outros triterpenos e outros esteroides. O colesterol, seus metabólitos e precursores biossintéticos desempenham papéis essenciais na fisiologia da

membrana celular, a absorção de nutrientes na dieta, biologia reprodutiva respostas ao estresse, sal e balanço hídrico, e metabolismo do cálcio (VILLAGRA et al, 2007).

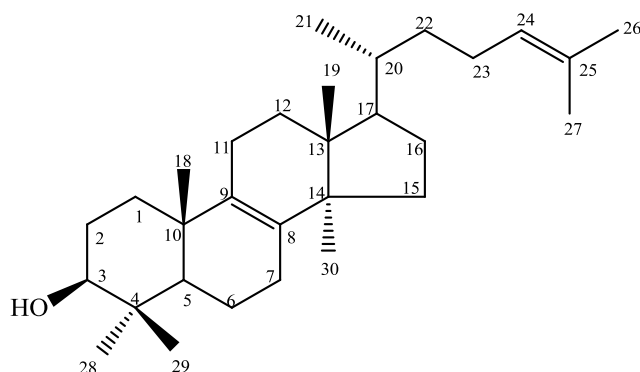


Figura 41 - Estrutura da substância **Ip-1**, Lanosterol

Tabela 2 - Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-1.

Nº	δ_{H} Ip-1(500 MHz, CDCl_3)	δ_{C} Ip-1 (125 MHz, CDCl_3)	δ_{H} (SHIN, TAMAI and TERAZAWA, 2000). (500 MHz, CDCl_3)	δ_{C} (SHIN, TAMAI and TERAZAWA, 2000). (125 MHz, CDCl_3)	TIPO
1	—	36,34	—	36,0	CH_2
2	—	28,12	—	28,3	CH_2
3	3,23 (dd, $J = 4,5$ e $11,5$ Hz)	79,04	3,22 (dd, $J = 4,6$ Hz)	79,4	CH
4	—	38,86	—	39,3	C
5	1,54 (m)	49,69	1,05 (m)	50,8	CH
6	—	18,95	—	18,7	CH_2
7	—	27,67	—	26,7	CH_2
8	—	134,03	—	134,8	C
9	—	133,55	—	134,8	C
10	—	37,27	—	37,4	C
11	—	21,52	—	21,4	CH_2
12	—	30,90	—	31,4	CH_2
13	—	44,12	—	44,9	C
14	—	50,03	—	50,2	C
15	—	30,90	—	31,3	CH_2
16	1,23 (s)	29,76	—	28,6	CH_2
17	1,41 (m)	51,00	1,48 (m)	50,8	CH
18	0,73 (s)	15,65	0,69 (s)	15,8	CH_3
19	0,93 (s)	18,95	0,98 (s)	19,5	CH_3
20	1,41 (m)	35,43	1,40 (m)	36,7	CH
21	0,85 (d, $J = 6,5$ Hz)	18,95	0,91 (d, $J = 6,5$ Hz)	19,0	CH_3
22	—	35,89	—	36,7	CH_2
23	—	24,94	—	25,3	CH_2
24	5,07 (m)	125,0	5,1 (t)	125,7	CH
25	—	130,85	—	131,3	C
26	1,66 (s)	25,72	1,68 (s)	26,1	CH_3
27	1,58 (s)	17,69	1,60 (s)	17,9	CH_3
28	0,98 (s)	28,08	1,00 (s)	28,4	CH_3
29	0,83 (s)	15,54	0,81 (s)	16,2	CH_3
30	0,84 (s)	24,4	0,87 (s)	24,6	CH_3

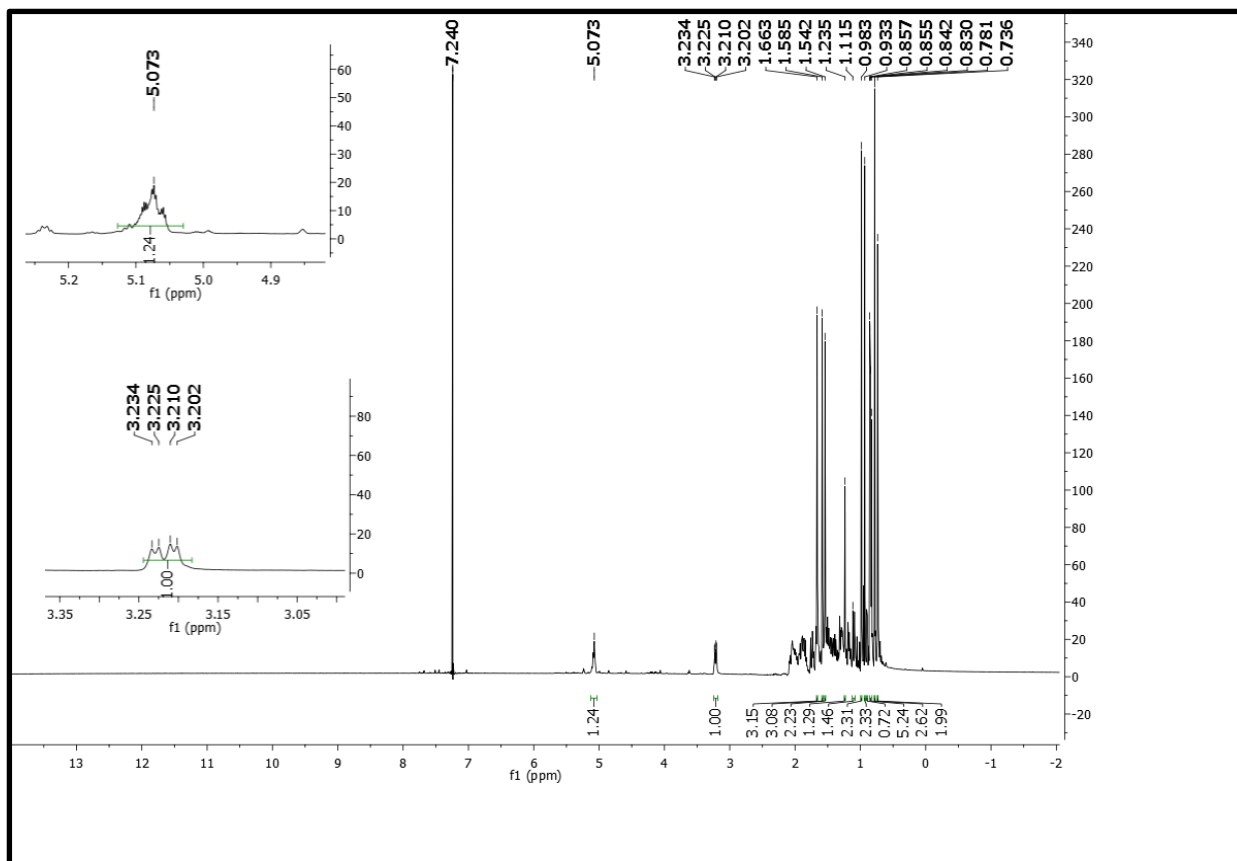


Figura 42 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-1.

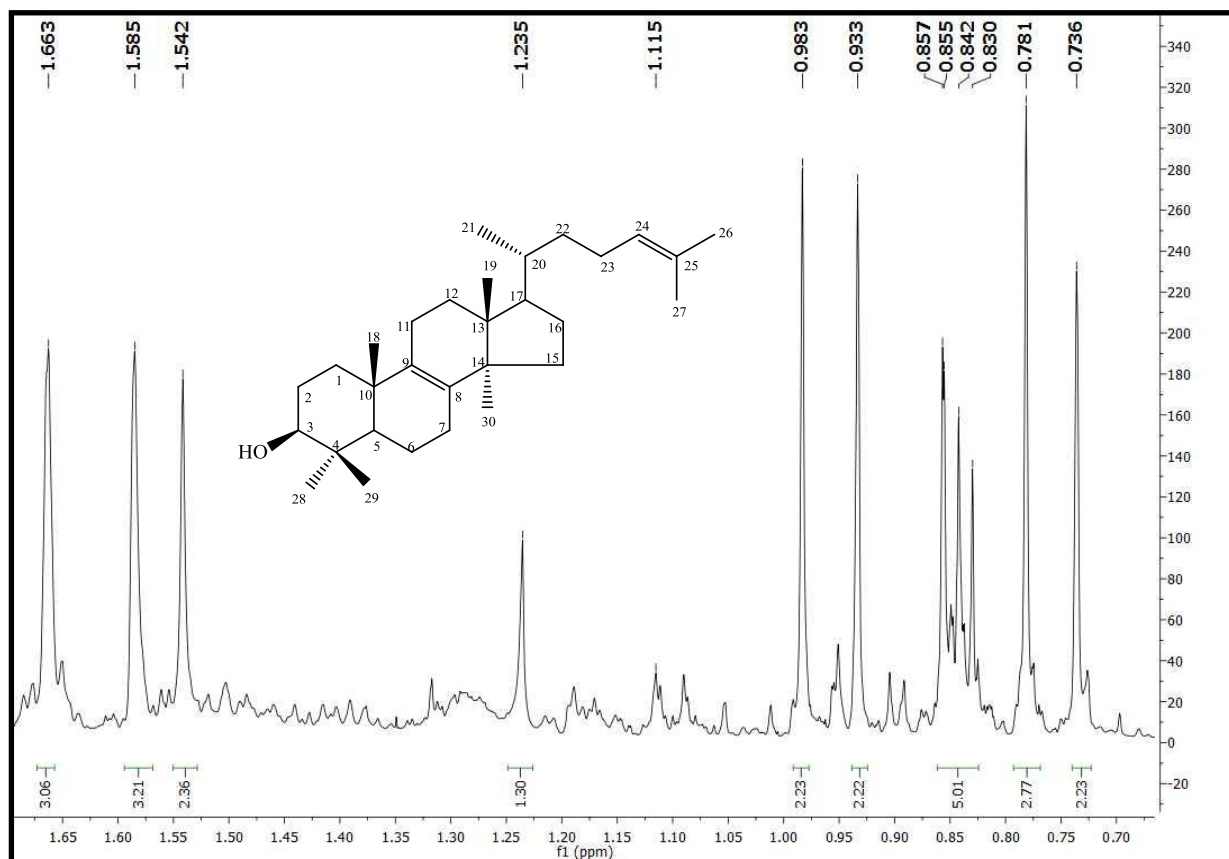


Figura 43– Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-1, expansão.

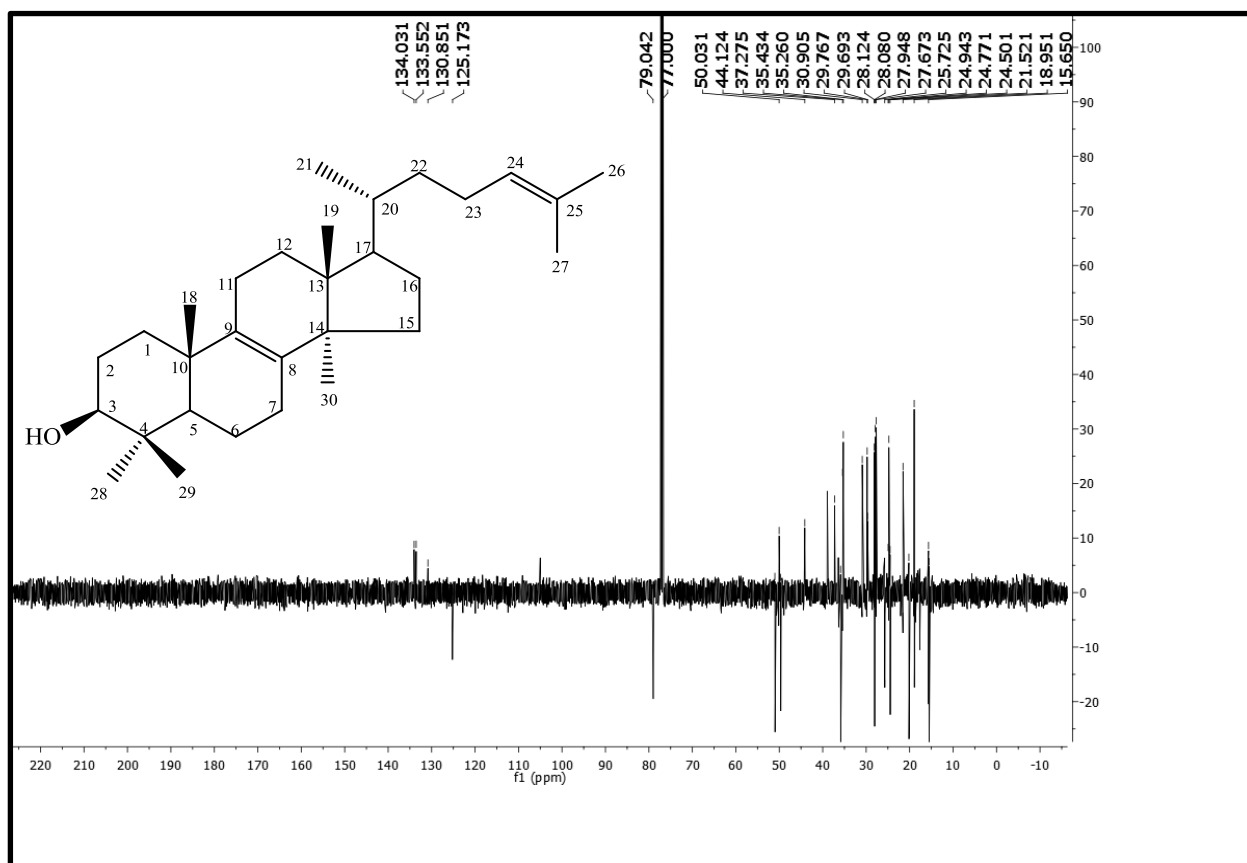


Figura 44 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Ip-1.

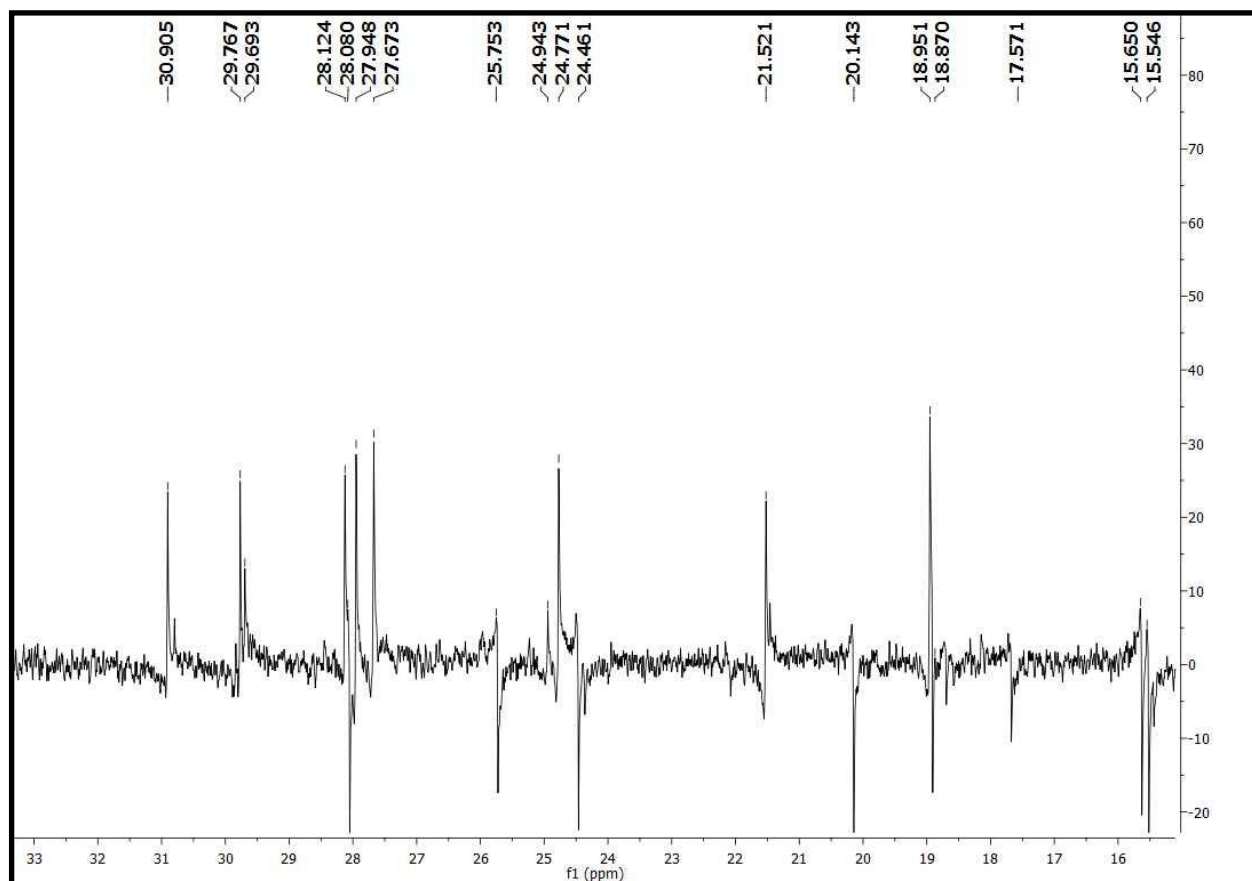


Figura 45 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Ip-1.

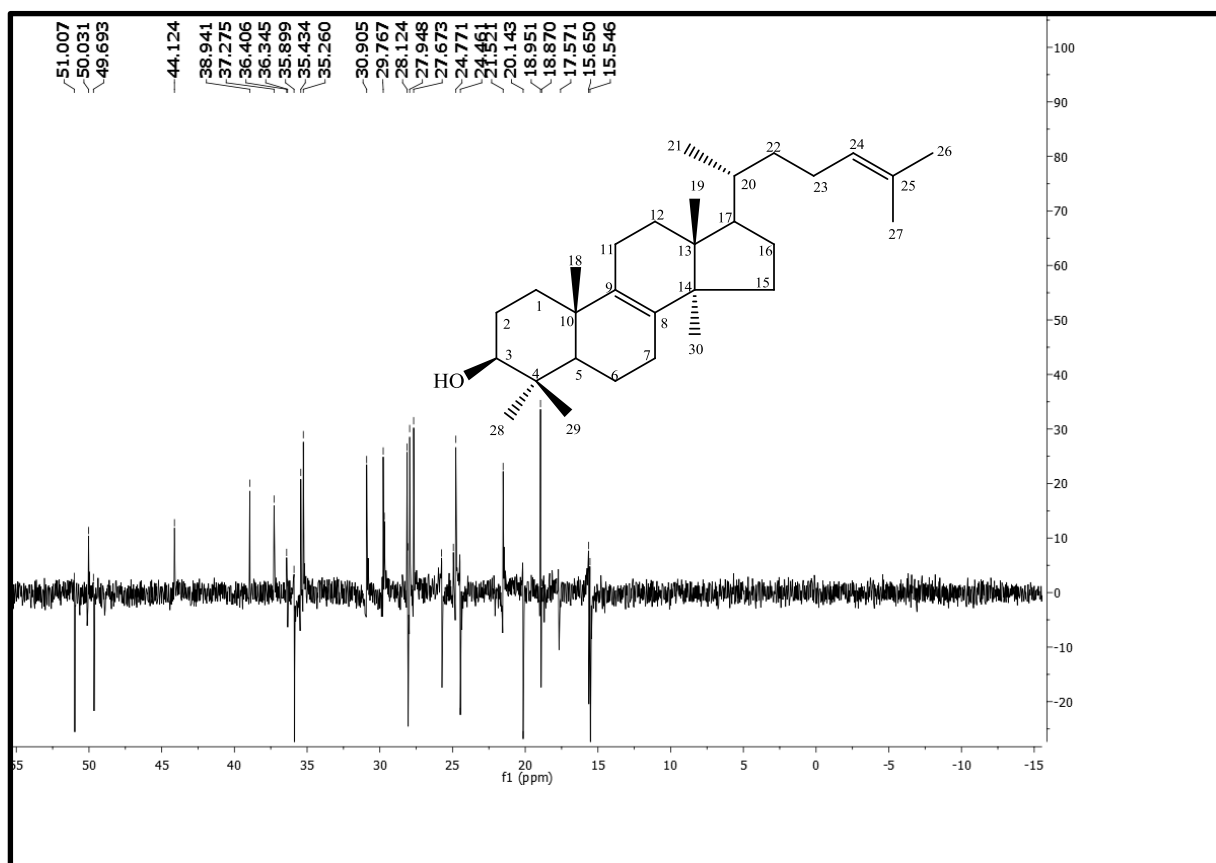


Figura 46 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Ip-1, expansão.

5.3.2. Determinação Estrutural da Substância Ip-2

A substância codificada como Ip-2 (Fig. 47, pág. 92), foi isolada na forma de sólido amorfo amarelo e ponto de fusão 211-213° C e massa 29,6 mg.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD) (Fig. 48, pág. 94) mostrou dois sinais em δ_{H} 7,56 e 6,24 (d, $J = 16,0$ Hz), acoplando em *trans* referentes aos hidrogênios olefínicos α e β à carbonila H-7 e H- 8, respectivamente. Os sinais em δ_{H} 6,95 (dd, $J = 8,2$ e 2 Hz), 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz) e 7,03 (d, $J = 2$ Hz) indicaram a presença de um anel aromático trissubstituído (Fig. 49, pág. 94).

No espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CD_3OD) (Fig. 50, pág. 95) foram observados sinais em δ_{C} 146,75 e δ_{C} 149,43 sugestivos da presença de grupos hidroxila ligadas ao anel aromático (BHATT, 2011). O sinal observado em δ_{C} 171,04 indicou a presença de uma carbonila de ácido atribuída ao carbono C-9 (Fig. 50, pág. 95).

Comparações entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura permitiram identificar a substância Ip-2 como o ácido cafeico (JEONG et al, 2011). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-2 estão compilados na Tabela 3, pág.93.

O ácido cafeico é encontrado em alimentos de origem vegetal na forma de ácido clorogênico, um éster do ácido quínico e ácido cafeico (ácido 5-cafeolquínico) (GARAMBONE e ROSA, 2007). Estudos realizados tem comprovado a importante atividade antioxidante desse composto fenólico em diferentes ensaios, incluindo os de atividade antioxidante total pelo método do tiocianato férrico (GÜLÇIN, 2006).

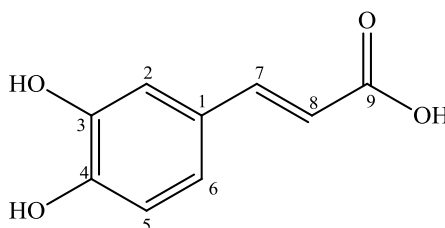
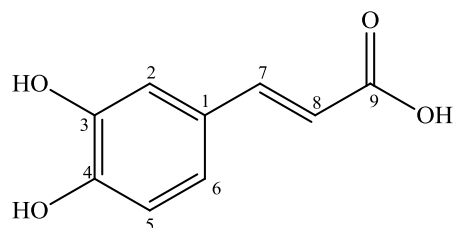


Figura 47 – Estrutura da Substância **Ip-2**, Ácido Cafeico.

Tabela 3 - Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-2.

Nº	δ_{H} Ip-2 (200 MHz, CD_3OD)	δ_{C} Ip-2 (50 MHz, CD_3OD)	δ_{H} (JEONG et al, 2011) (500 MHz, CD_3OD)	δ_{C} (JEONG et al, 2011) (125 MHz, CD_3OD)	TIPO
1	_____	127,72	_____	128,3	C
2	7,03 (d, $J = 1,5$ Hz)	115,59	7,07 (d, $J = 2$ Hz)	115,7	CH
3	_____	146,75	_____	147,2	C
4	_____	149,43	_____	149,8	C
5	6,78 (d, $J = 8$ Hz)	116,49	6,81 ($J = 8,2$ Hz)	117,0	CH
6	6,95 (dd, $J = 8$ e 2 Hz)	122,79	6,95 (dd, $J = 8,2$ e 2 Hz)	123,4	CH
7	7,56 (d, $J = 16$ Hz)	147,02	7,55 (d, $J = 15,9$ Hz)	147,6	CH
8	6,24 (d, $J = 16$ Hz)	115,06	6,24 (d, $J = 15,9$)	116,0	CH
9	_____	171,04	_____	171,6	C

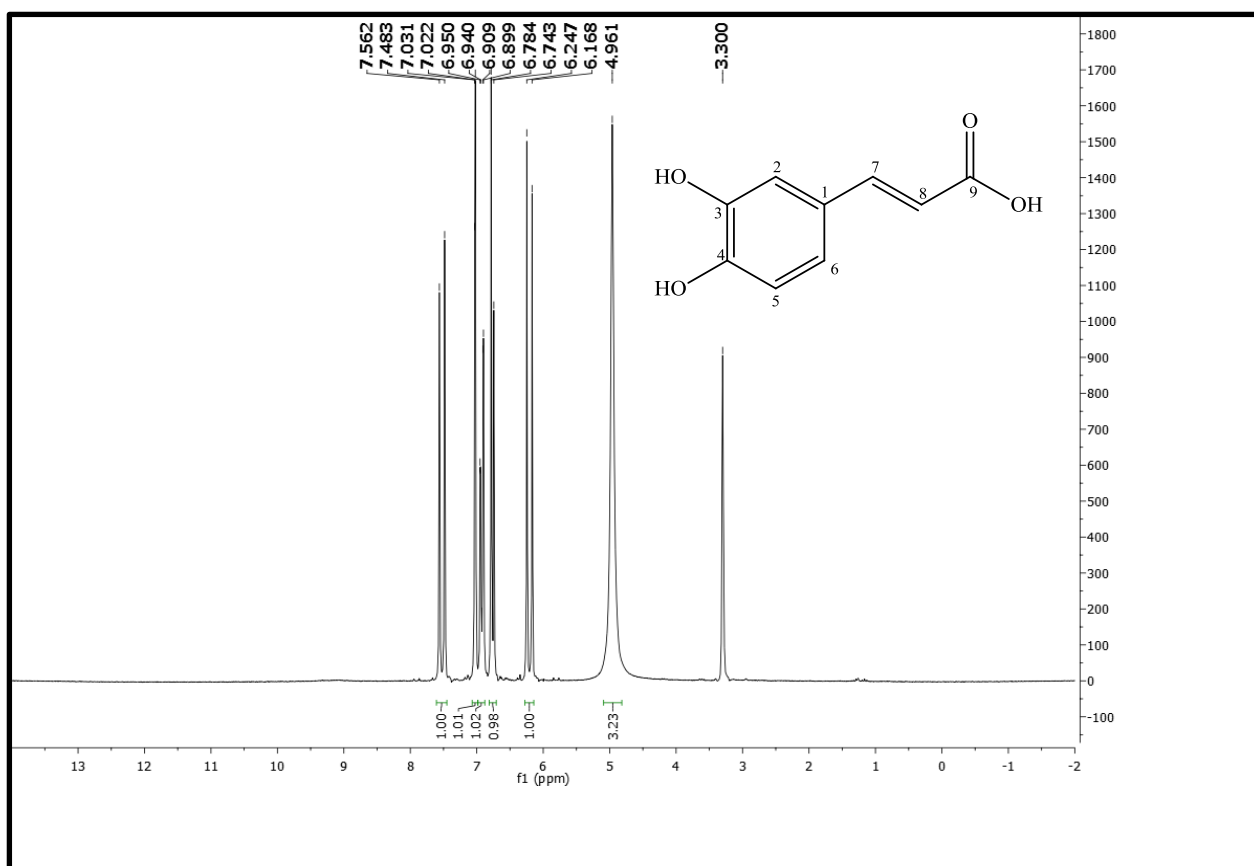


Figura 48 – Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de Ip-2.

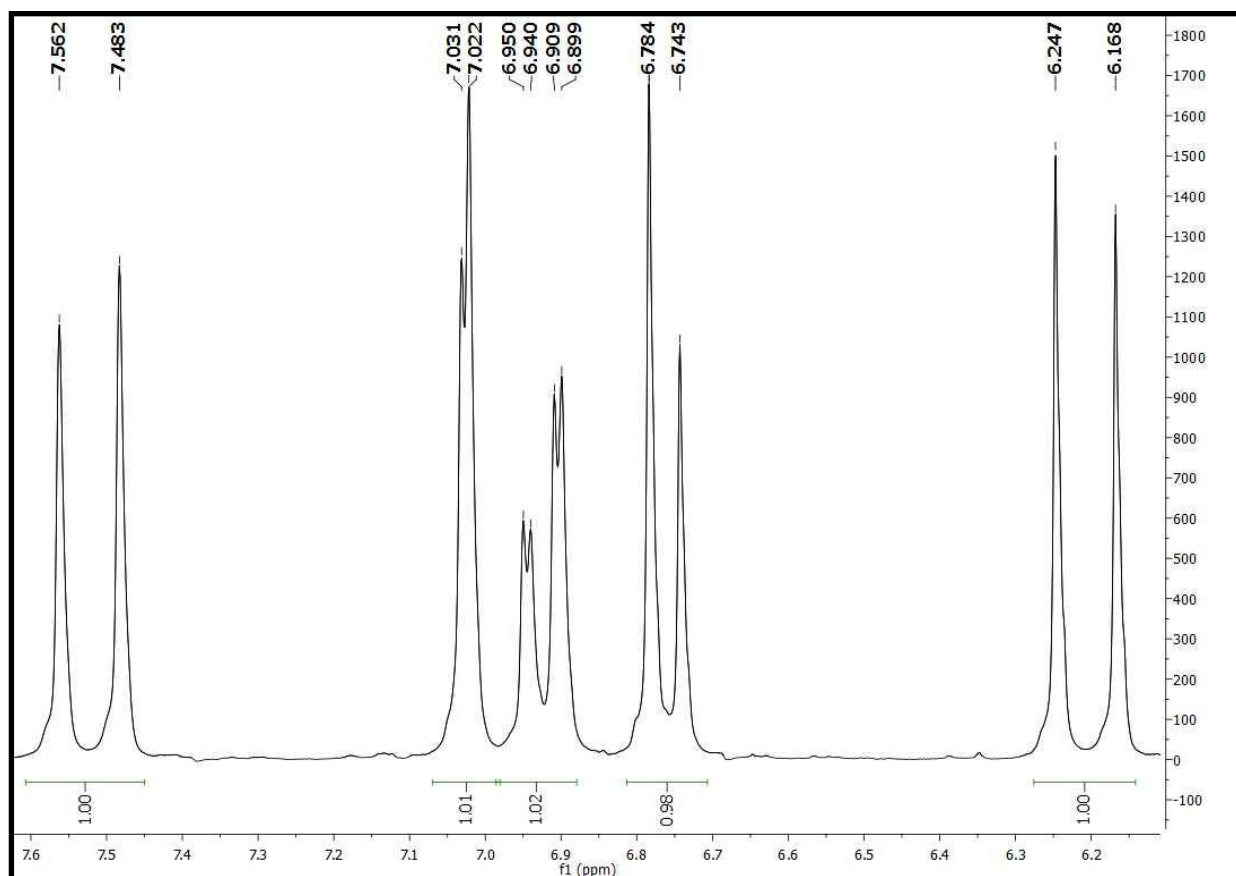


Figura 49 – Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de Ip-2, expansão.

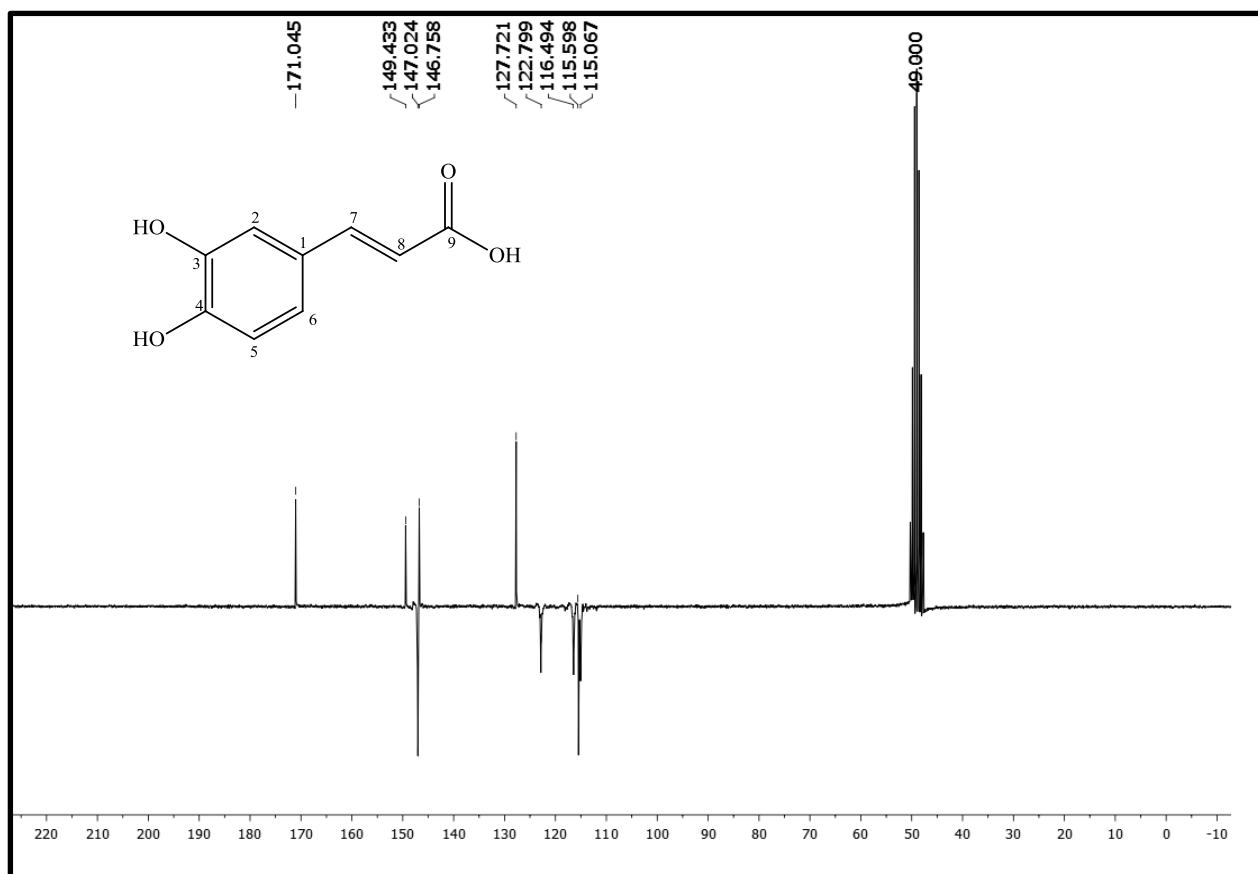


Figura 50 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CD₃OD, 50 MHz) de Ip-2.

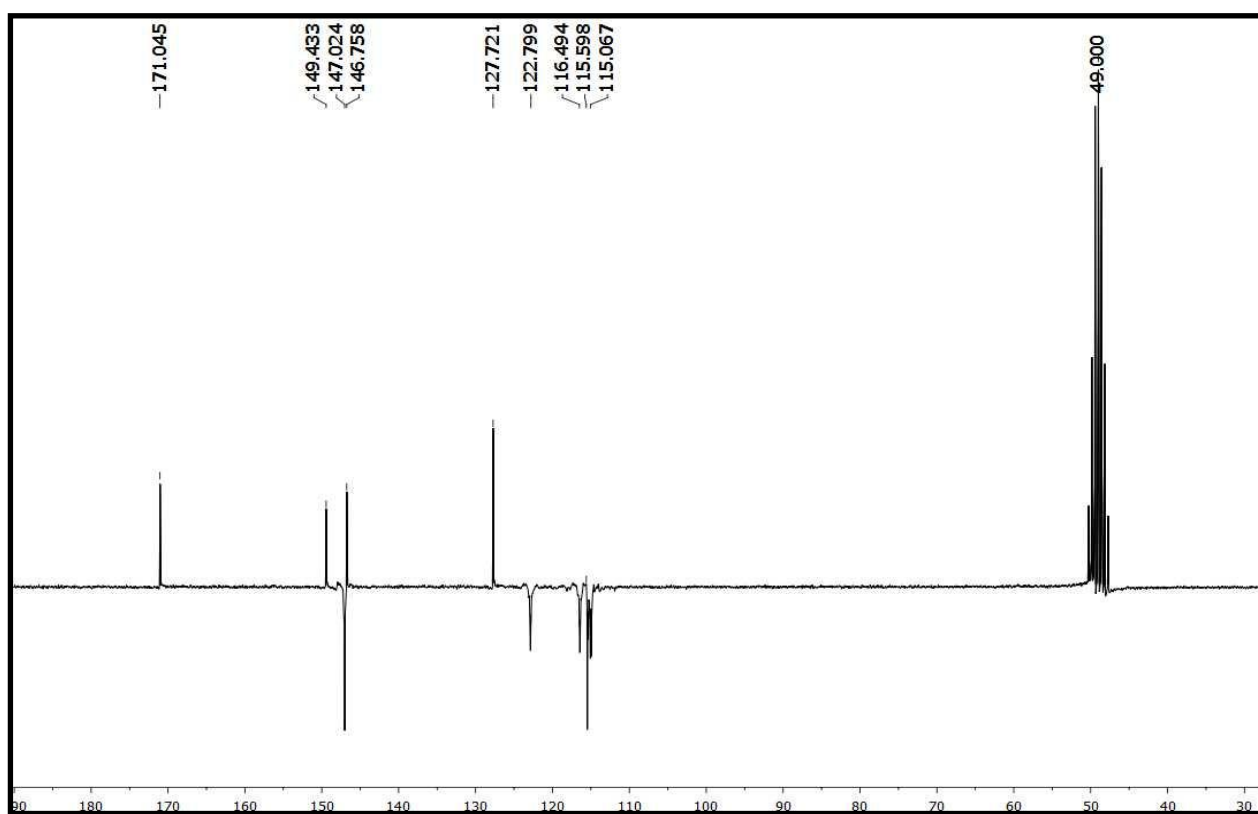


Figura 51 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CD₃OD, 50 MHz) de Ip-2.

5.3.3. Determinação Estrutural da Substância Ip-3

A substância codificada como Ip-3 (Fig. 52, pág. 96) foi isolada na forma de cristais incolores e ponto de fusão 65-68° C e massa 11 mg.

No espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) (Fig. 53 e 54, pág. 98) observou-se sinais em δ_{H} 7,41 (d, $J = 8,5$ Hz) e δ_{H} 6,82 (d, $J = 8,5$ Hz) acoplando em *orto* na região de hidrogênios aromáticos, característicos de sistema AA'BB', dois dubletos em δ_{H} 7,59 (d, $J = 16$ Hz) e δ_{H} 6,28 (d, $J = 16$ Hz) acoplando *trans*, referentes aos hidrogênios olefínicos H-7 e H- 8. Um quarteto e um triplete observados em δ_{H} 4,23 (q, $J = 7$ Hz) e δ_{H} 1,30 (t, $J = 7$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios do grupo etoxila (Fig. 55 e 56, pág. 99).

O espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (Fig.), apresentou sinais em δ_{C} 167,5 para carbonila de éster e em δ_{C} 157,7 referente ao carbono oxigenado na posição 4 do anel aromático (Fig. 57, pág. 100), além dos sinais em δ_{C} 129,8 e δ_{C} 115,74 para 4 carbonos do anel aromático, confirmando assim, a presença do sistema AA'BB' sugerido no RMN ^1H (Fig. 58, pág. 100).

Comparações entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura permitiram identificar o composto codificado como Ip-3 como *p*-cumarato de etila (etil *p*-hidroxicumarato) (BARBOSA-FILHO et al, 2004). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-3 estão compilados na Tabela 4, pág. 97.

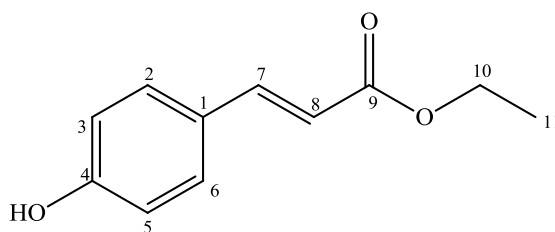
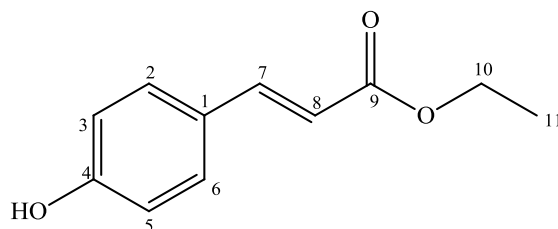


Figura 52 - Estrutura da substância **Ip-3**, *p*-cumarato de etila.

Tabela 4 - Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-3.

Nº	δ_{H} Ip-3	δ_{C} Ip-3	δ_{H} (BARBOSA-FILHO et al, 2004) (300 MHz, CDCl_3)	δ_{C} (BARBOSA-FILHO et al, 2004) (75 MHz, CDCl_3)	TIPO
1	_____	127,29	_____	125,94	C
2	7,41 (d, $J = 8,7$ Hz)	129,80	7,55 (d, $J = 8,6$ Hz)	130,43	CH
3	6,82 (d, $J = 8,7$ Hz)	115, 89	7,11(d, $J = 8,6$ Hz)	116,66	CH
4	_____	157,70	_____	161,26	C
5	6,28 (d, $J = 8,7$ Hz)	115,89	(d, $J = 8,6$ Hz)	116,66	CH
6	7,38 (d, $J = 8,7$ Hz)	129,80	7,55 (d, $J = 8,6$ Hz)	130,43	CH
7	7,62 (d, $J = 16$ Hz)	144,41	7,89 (d, $J = 15,9$ Hz)	144,87	CH
8	6,28 (d, $J = 16$ Hz)	115,89	5,98 (d, $J = 15,9$ Hz)	115,09	CH
9	_____	167,28	_____	167,14	C
10	4,23 (q, $J = 7$ Hz)	60,32	4,20 (q, $J = 7,1$ Hz)	60,01	CH_2
11	1,30 (t, $J = 7$ Hz)	14,29	1,15 (t, $J = 7,1$ Hz)	14,29	CH_3

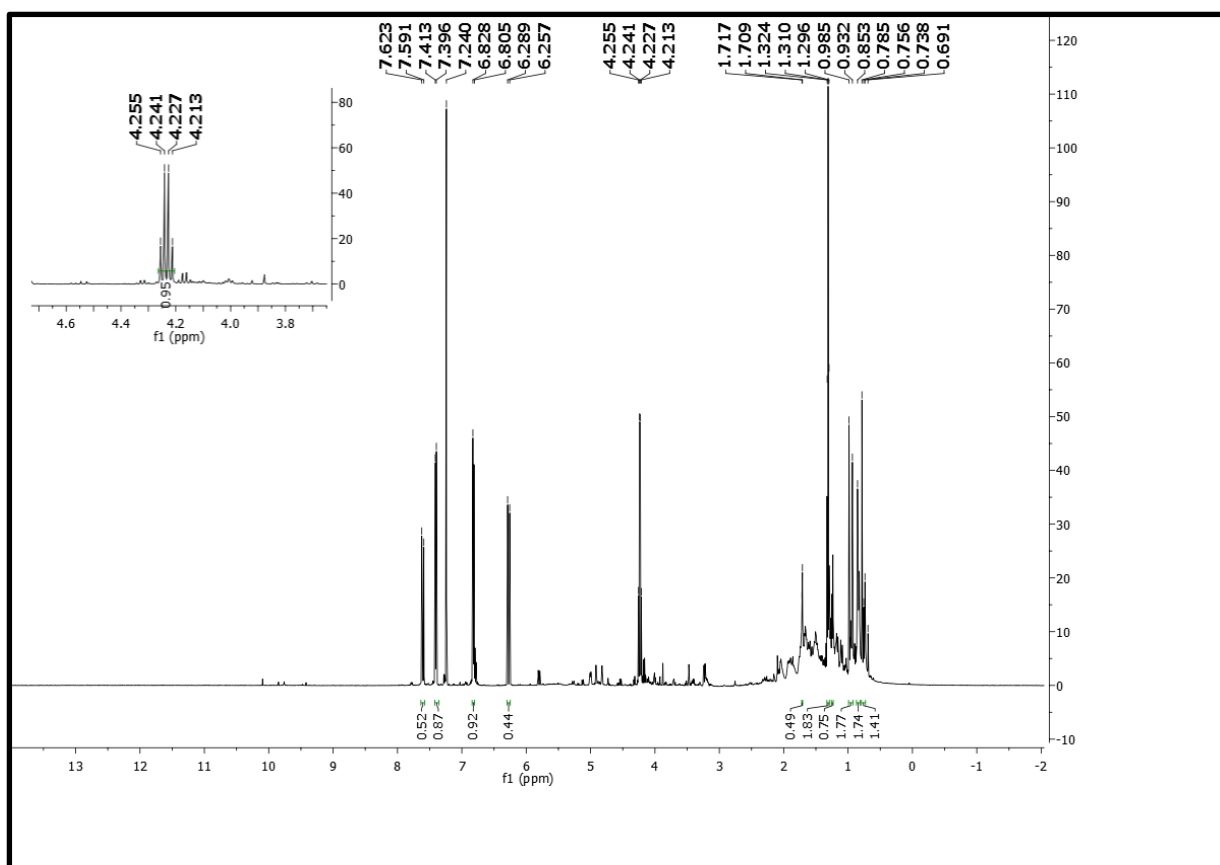


Figura 53 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-3.

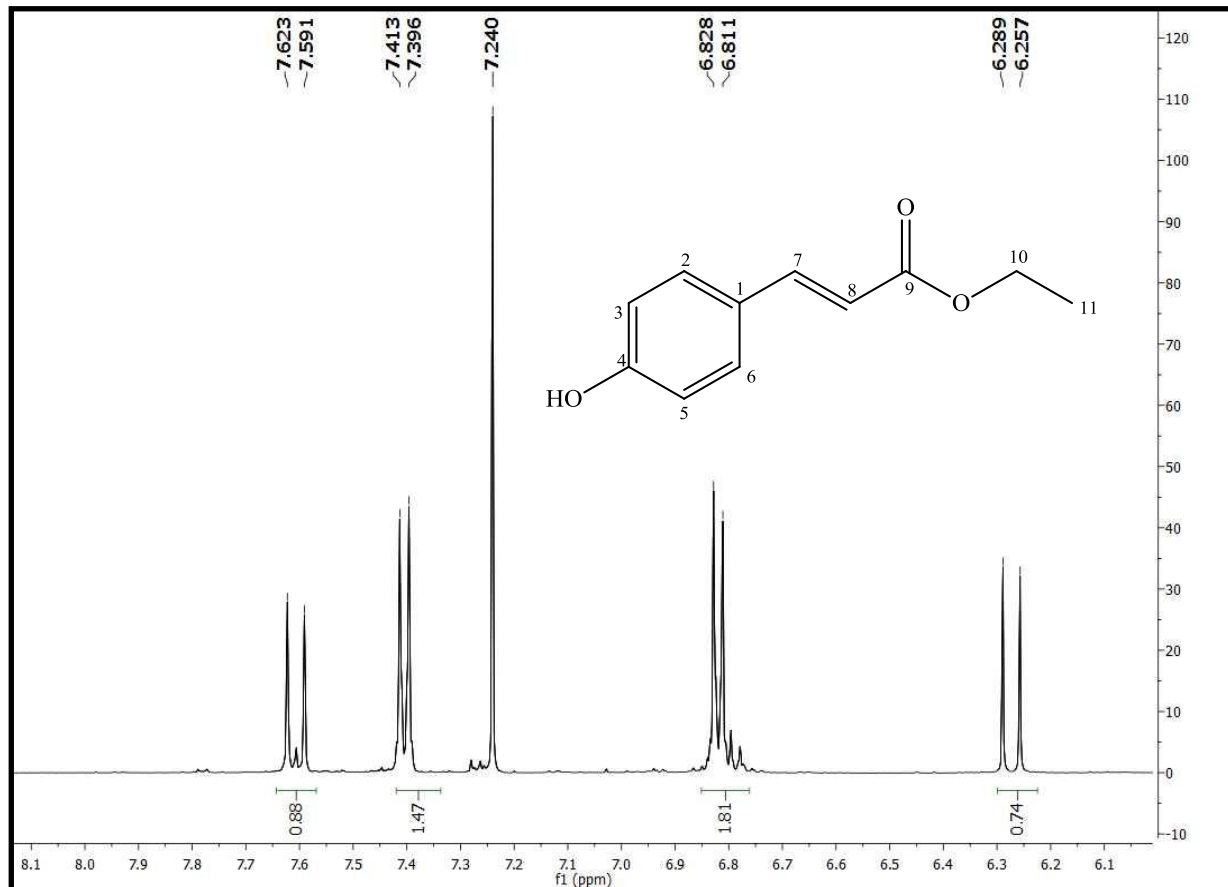


Figura 54 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-3, expansão.

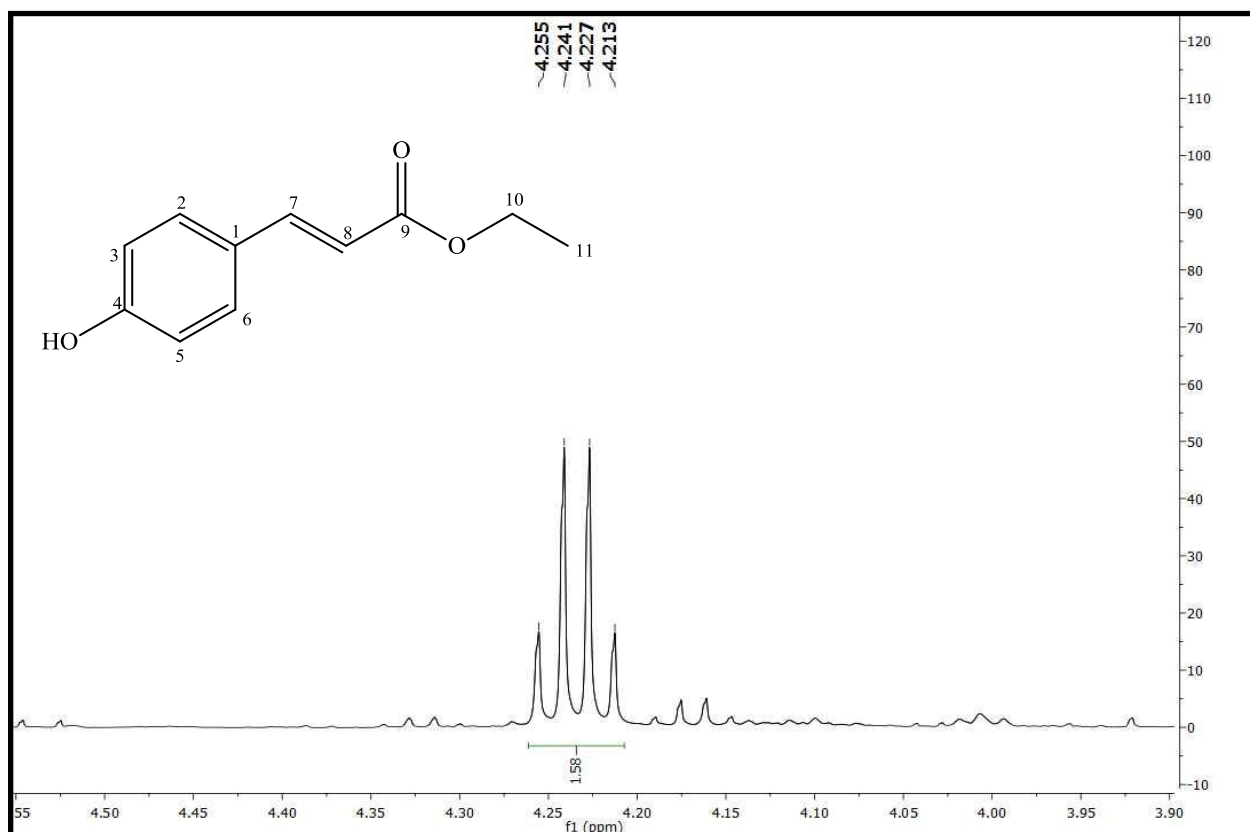


Figura 55 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-3, expansão.

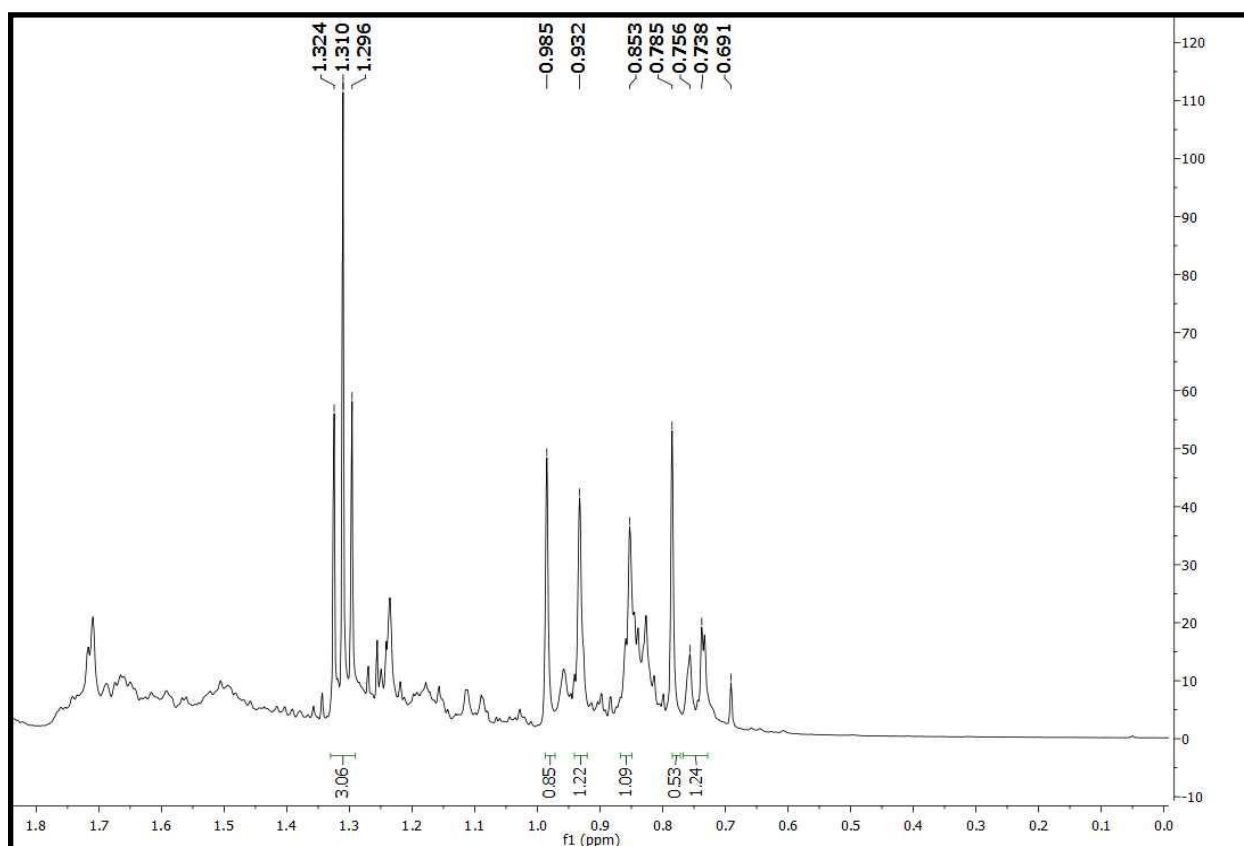


Figura 56 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-3, expansão.

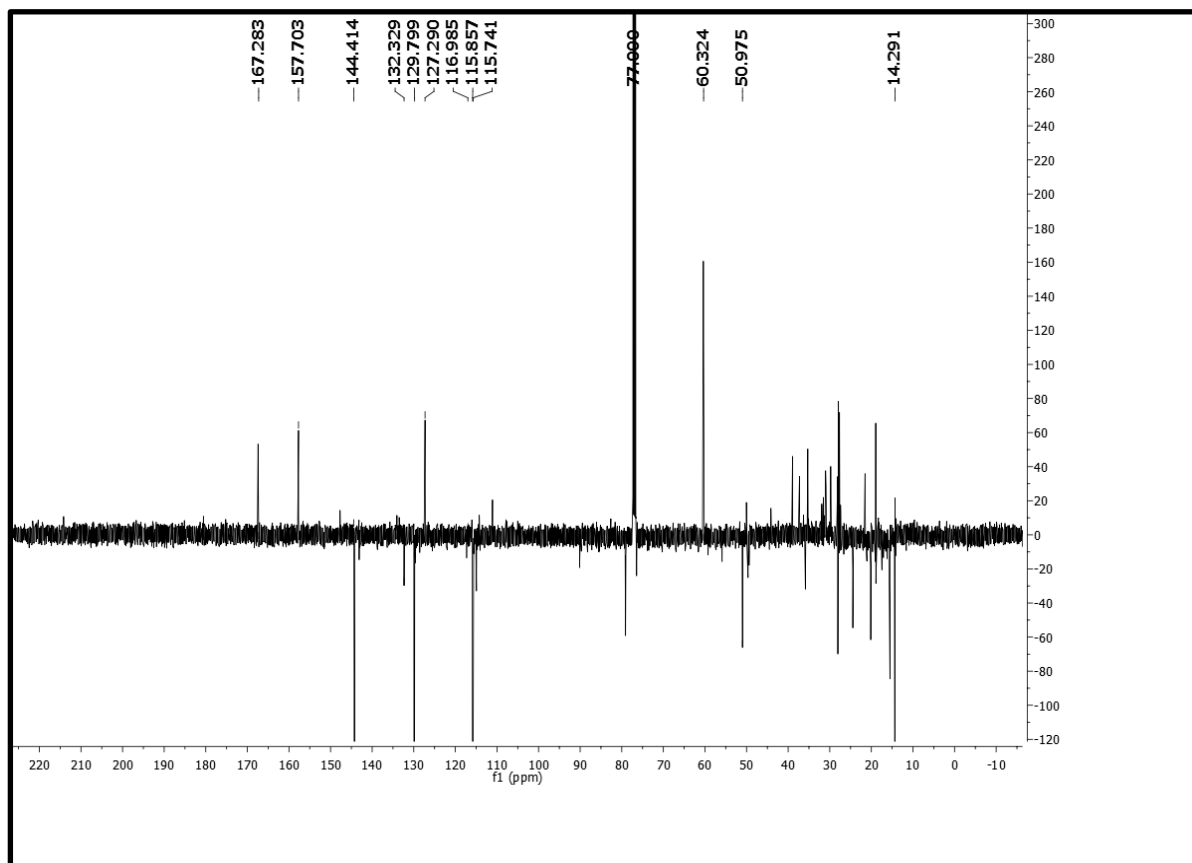


Figura 57 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Ip-3.

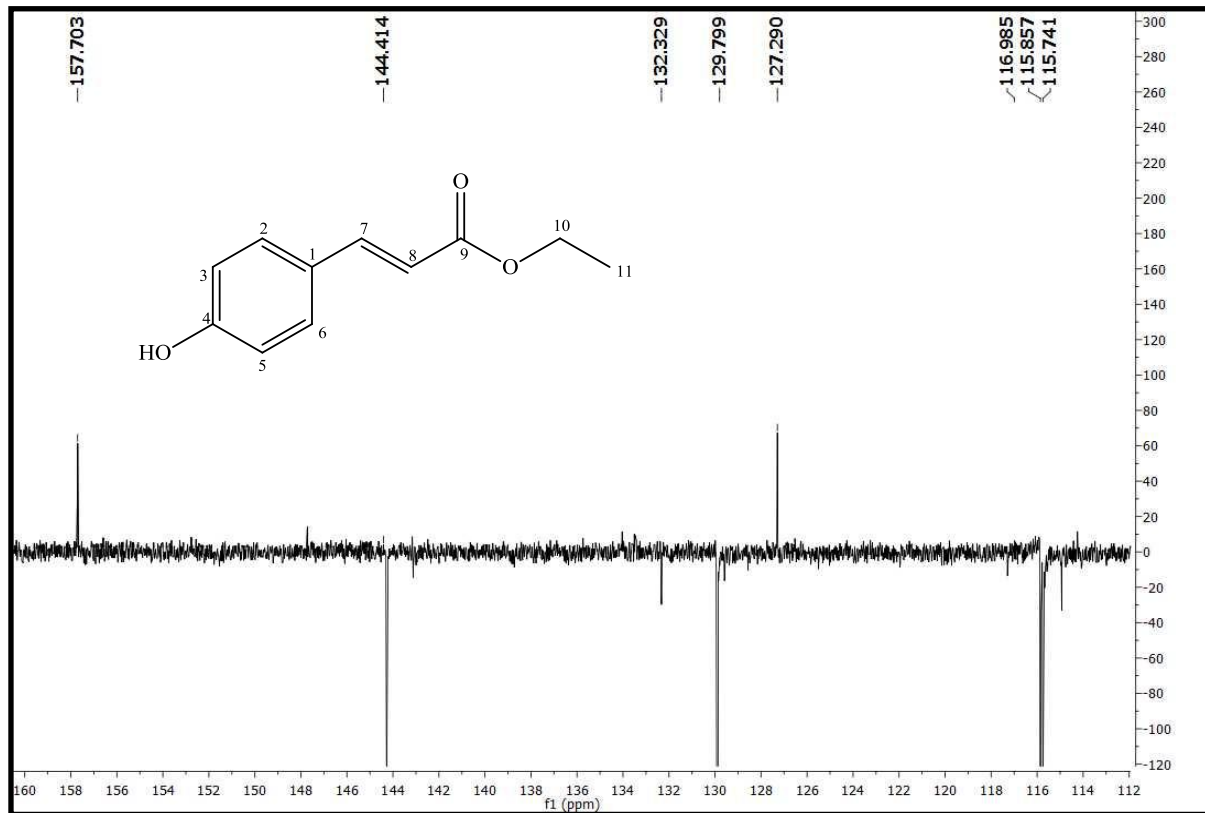


Figura 58 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 125 MHz) de Ip-3.

5.3.4. Determinação Estrutural da Substância Ip-4.

A substância codificada como Ip-4 (Fig. 59, pág. 102), foi isolada na forma de cristal incolor e ponto de fusão 205,3 - 206,1° C e massa 36,5 mg. O espectro de IV (Fig. 60, pág. 103) obtido em pastilha de KBr mostrou absorções em 3443, 1670, 1458 característicos de grupo hidroxila e carbono olefínico, respectivamente.

No espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3), (Fig. 62, pág. 104), observou-se a presença de dois sinais em δ_{H} 4,54 (m) e δ_{H} 4,67 (d, $J = 2,4$ 1Hz) referentes ao grupo metileno terminal do hidrogênio vinílico (H-29). Um sinal em δ_{H} 1,65 característico de metila ligada a carbono olefínico e seis sinais em δ_{H} 0,73; δ_{H} 0,76; δ_{H} 0,80; δ_{H} 0,92; δ_{H} 0,94 e δ_{H} 1,0, que correspondem a hidrogênios metílicos (Fig. 63, pág. 104) (LIMA et al, 2010). Um sinal em δ_{H} 3,16 (dd, $J = 5,2$ e 10 Hz) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono carbinólico (Fig. 61, pág. 103). Esses sinais sugeriram a presença de um esqueleto triterpênico da série lupano.

O espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) (Fig. 64, pág. 105) indicou a presença de 30 sinais de carbono em δ_{C} 151,06 (C-20); δ_{C} 109,1 (C-29), e δ_{C} 18,2 (C-28) característicos do esqueleto triterpênico lupano (BAEK et al, 2010), além de um sinal em δ_{C} 78,86 atribuído ao carbono carbinólico (Fig. 64, pág. 105). Com base em dados da literatura, o grupo OH foi inserido no C-3, justificando que triterpenos cuja OH está ausente, o C-3 absorvem entre δ_{C} 42,1 e o C-1 em δ_{C} 40,3. No entanto, quando C-3 está hidroxilado, sua absorção ocorre entre δ_{C} 79,0 - 76,0 enquanto que o C-1 absorve entre δ_{C} 38-36, devido ao efeito γ -gauche (MAHATU & KUNDU, 1994).

Comparações entre os dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C com dados da literatura permitiram identificar a substância Ip-4 como o triterpeno pentacíclico lupeol (MAIA, 2008). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-2 estão compilados na Tabela 5, pág. 102.

O triterpeno lupeol ocorre naturalmente em diversas famílias de plantas e inúmeras atividades farmacológicas são atribuídas a esse composto dentre elas anticâncer, antiprotozoária e antiinflamatória (GALLO; SARACHINE, 2009).

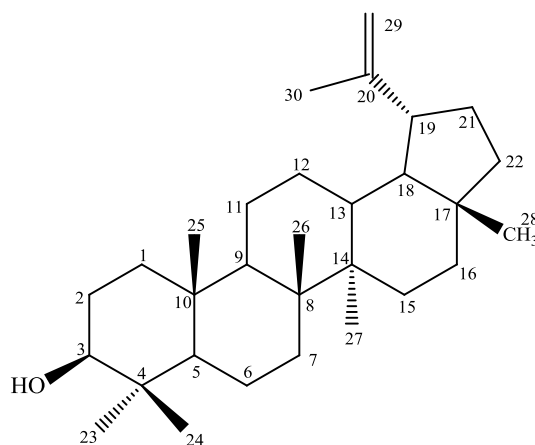


Figura 59 - Estrutura da substância **Ip-4**, Lupeol.

Tabela 5 - Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-4.

Nº	δ_{H} Ip-4 (200 MHz, CDCl_3)	MHz, δ_{C} Ip-4 (50 CDCl_3)	δ_{H} (MAIA, 2008) (200 MHz, CDCl_3)	δ_{C} (MAIA, 2008) (50MHz, CDCl_3)	TIPO
1		38,71		38,65	CH_2
2		27,29		27,37	CH_2
3	3,20 (dd, $J = 10$ e 5,2 Hz)	78,85	3,15 (m)	78,95	CH
4	—	38,94	—	38,82	C
5		55,12		55,25	CH
6		18,18		18,28	CH_2
7		34,12		34,23	CH_2
8	—	40,67	—	40,78	C
9		50,27		50,39	CH
10	—	37,01	—	37,11	C
11		20,78		20,88	CH_2
12		24,97		25,08	CH_2
13		37,88		37,99	CH
14	—	42,67	—	42,78	C
15		27,79		27,37	CH_2
16		35,43		35,54	CH_2
17	—	42,85	—	42,96	C
18		48,23		48,25	CH
19	2,37(m)	47,77	2,33 (m)	47,95	CH
20	—	150,83	—	150,95	C
21		29,69		29,80	CH_2
22		39,86		39,97	CH_2
23	0,73	27,95	1,17 (s)	27,95	CH_3
24	0,76	15,19	0,75 (s)	15,35	CH_3
25	0,80	15,98	0,96 (s)	16,09	CH_3
26	0,92	15,27	1,28 (s)	15,93	CH_3
27	0,94	14,36	1,02 (s)	14,52	CH_3
28	1,00	17,80	0,84 (s)	17,97	CH_3
29	4,67(d, $J = 2,4$ Hz); 4,54 (m)	109,19	4,65 (d, $J = 2,2$ Hz); 4,53 (m)	109,31	CH_2
30	1,65 (s)	19,19	1,77 (m)	19,27	CH_3

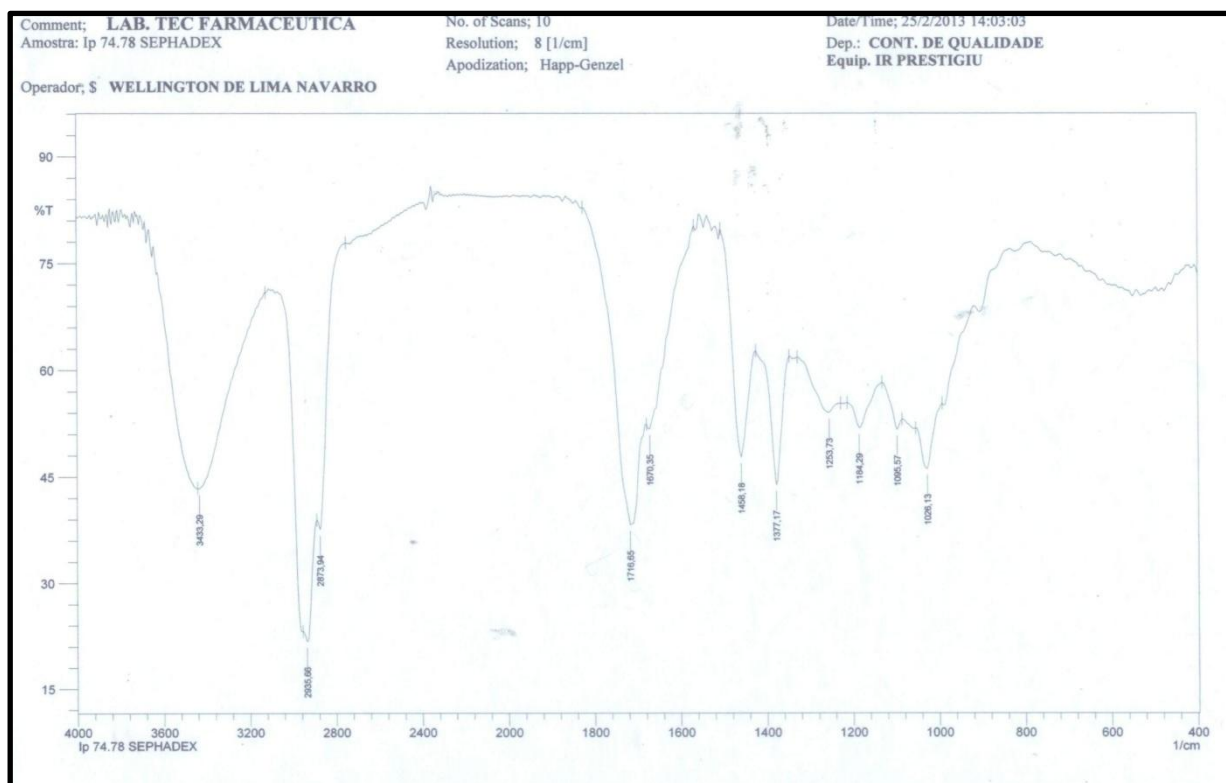


Figura 60 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Ip-4

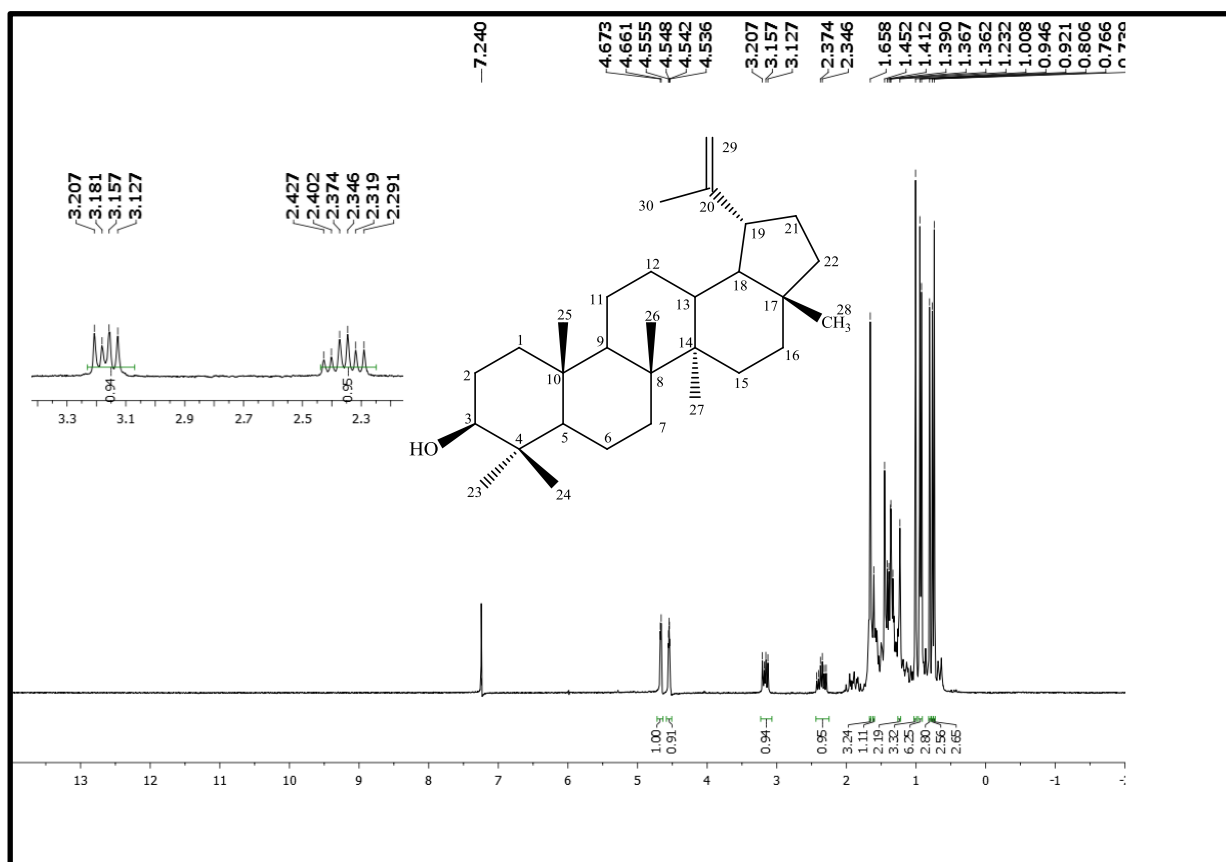


Figura 61 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-4.

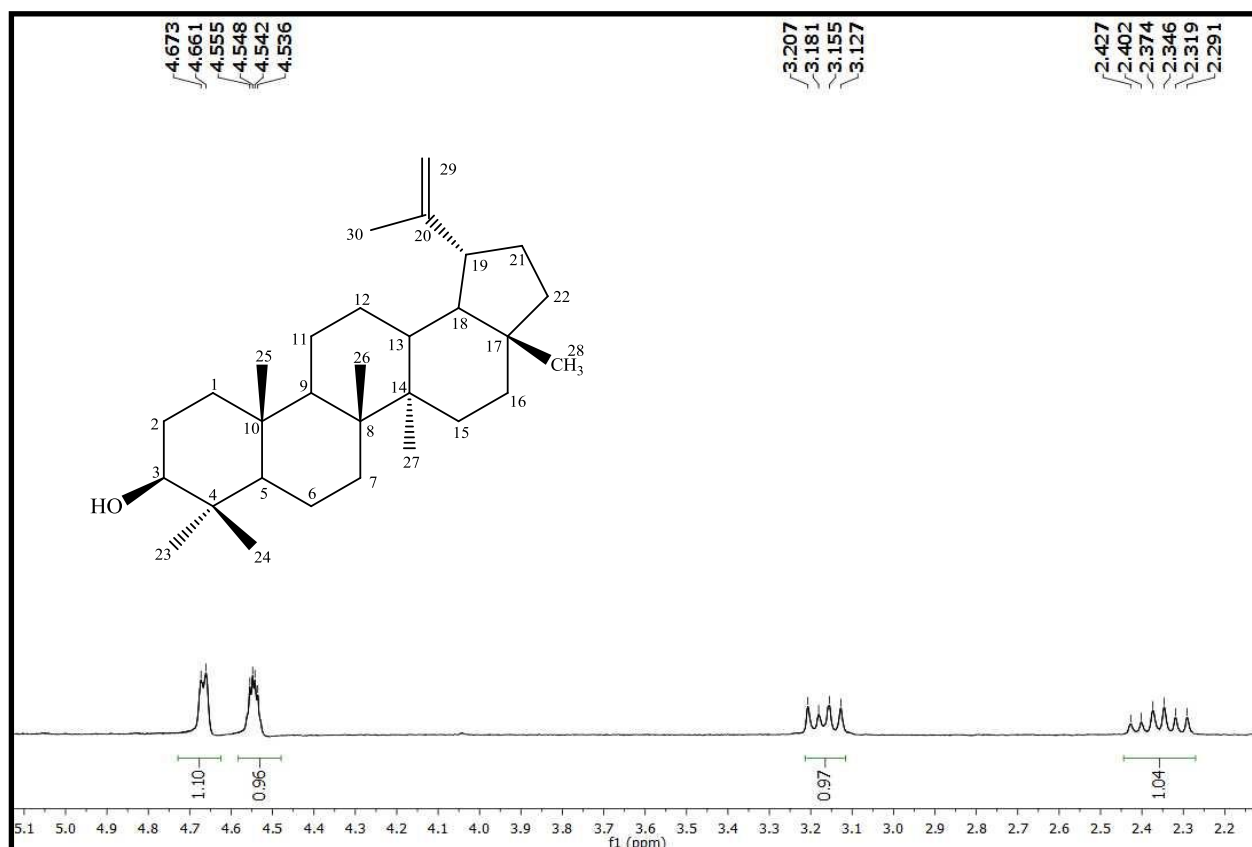


Figura 62 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz) de Ip-4, expansão.

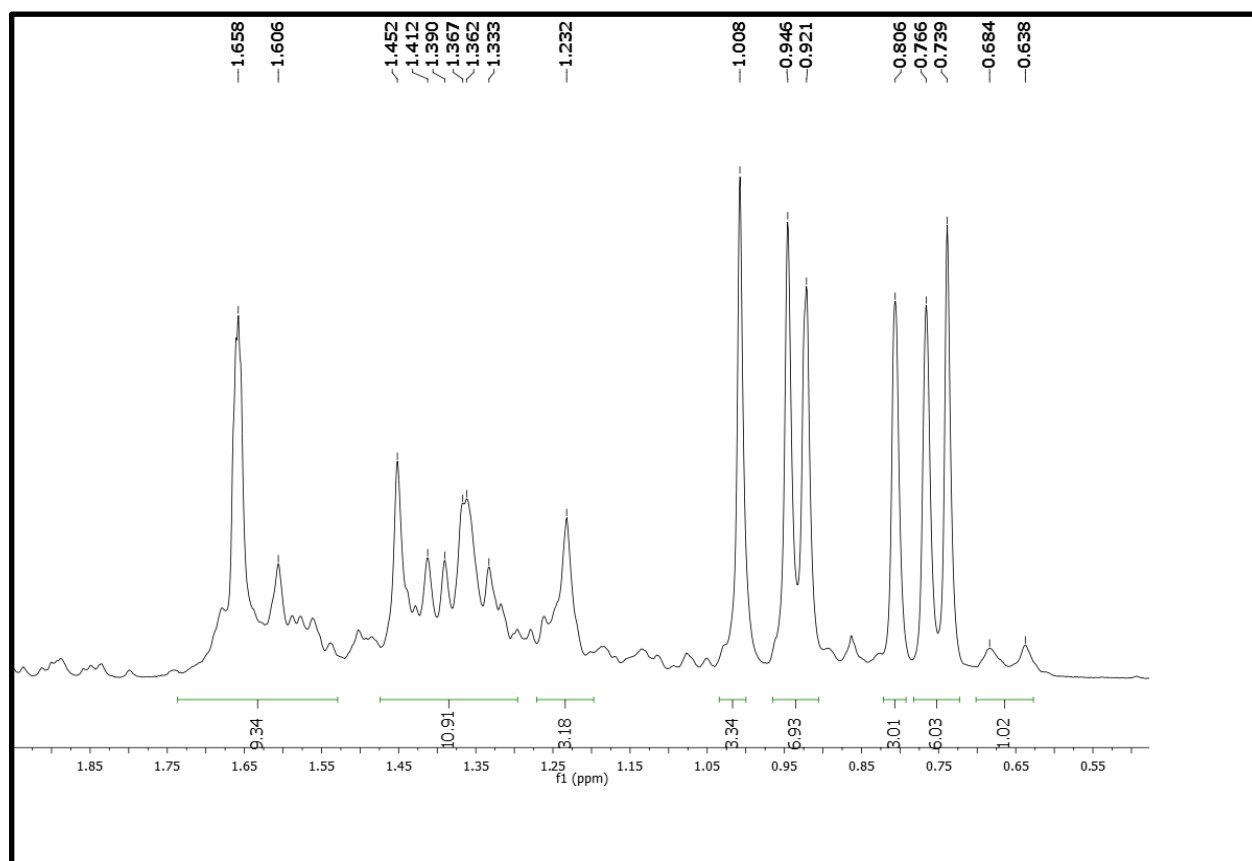


Figura 63 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-4, expansão.

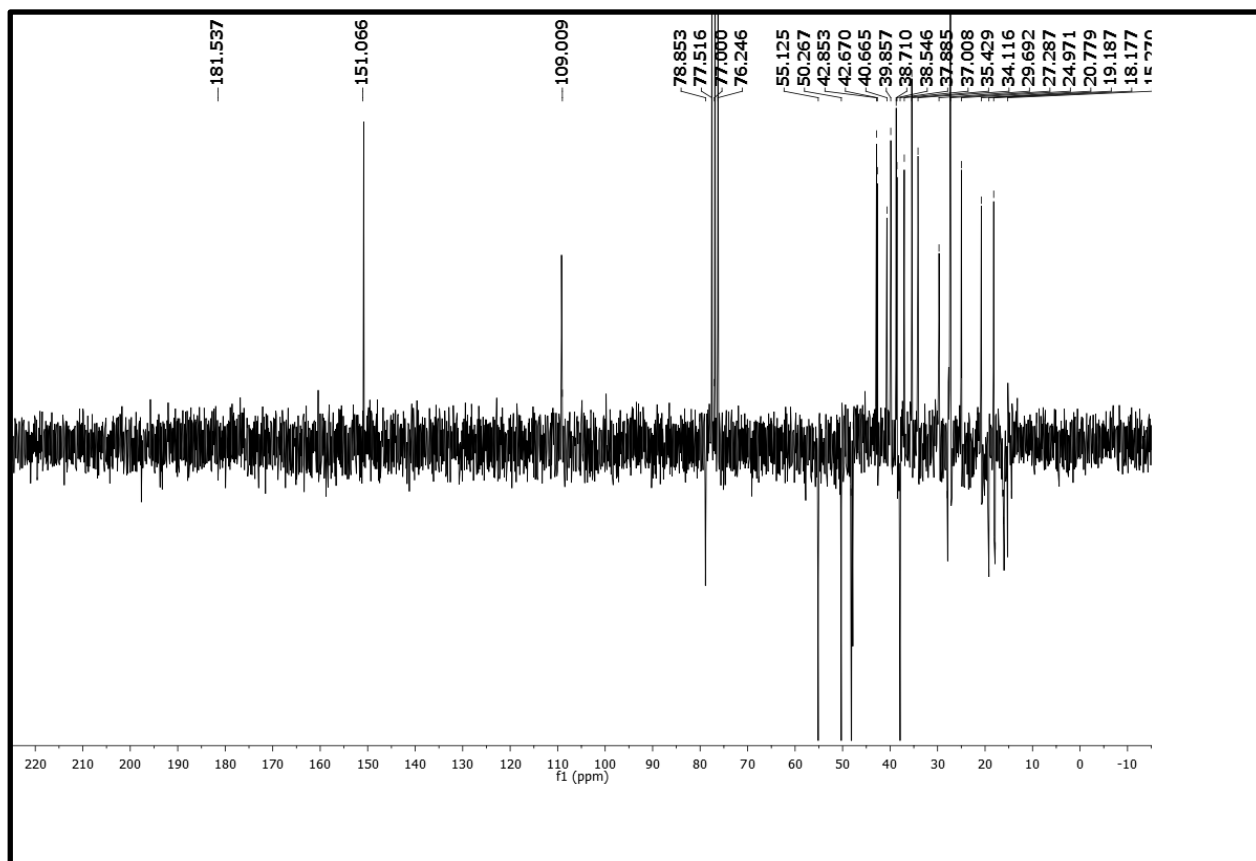


Figura 64 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ip-4.

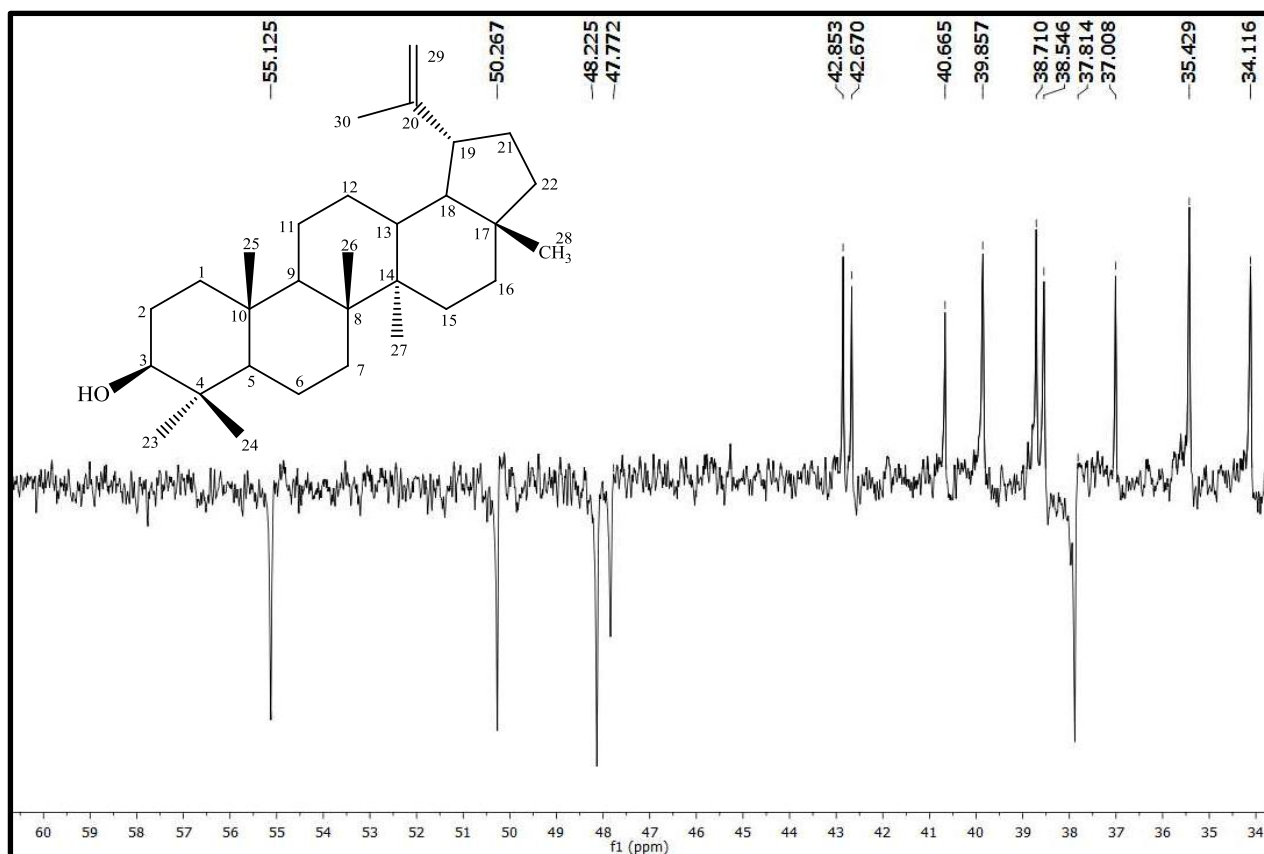


Figura 65 – Espectro de RMN ^{13}C APT (CDCl_3 , 50 MHz) de Ip-4.

5.3.5. Determinação Estrutural da Substância Ip-5

A substância codificada como Ip-5 (Fig. 66, pág. 106) foi isolada na forma de pó amarelado 151-154°C e massa de 0,0022 g.

O espectro de RMN ^1H (200 MHz, CD_3OD), (Fig. 67-68, pág. 107), mostrou dois sinais em δ_{H} 6,27 e δ_{H} 7,57 ambos com ($J = 16,0$ Hz), referentes aos hidrogênios olefínicos α e β à carbonila, respectivamente. Os sinais em δ_{H} 6,95 (dd, $J = 8,4$ e 2 Hz), 6,78 (d, $J = 8,2$ Hz) e 7,02 (d, $J = 2$ Hz) característicos de anel aromático trissubstituído (Fig. 69, pág 108). O éster etílico apresentou-se como um quarteto em δ_{H} 4,27 (q, $J = 7$ Hz) e a metila terminal como um triplete em 1,35 (t, $J = 7$ Hz). Os dados de RMN ^1H dispostos acima para o composto codificado como Ip-5, sugerem a presença da substância fenólica cafeato de etila.

O espectro de massas de Ip-5, obtido por ESI negativo (ESI-MS), (Fig. 70, pág. 108) apresentou pico do íon molecular m/z 207, sendo compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$. Os dados de RMN ^1H de Ip-5 estão compilados na Tabela 6, pág. 106.

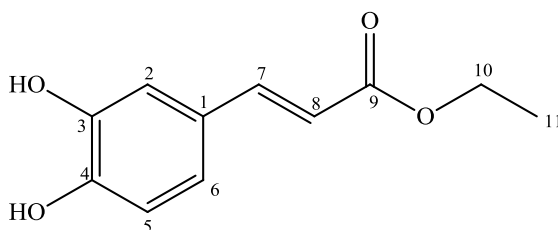


Figura 66 - Estrutura da substância **Ip-5**, Cafeato de etila.

Tabela 6 – Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-5.

Nº	δ_{H} Ip-5 (200MHz, CD_3OD)	δ_{H} (ZHANG et al, 2012) (600 MHz, CD_3OD)
1	_____	_____
2	7,02 (d, $J = 2$ Hz)	7,09 (1H, d, $J = 1,8$ Hz)
3	_____	_____
4	_____	_____
5	6,95 (dd, $J = 8,4$ e 2 Hz)	7,00 (1H, dd, $J = 7,8$ e $1,8$ Hz)
6	6,78 (d, $J = 8,2$ Hz)	6,87 (1H, d, $J = 7,8$ Hz)
7	7,57 (d, $J = 16$ Hz)	7,57 (1H, d, $J = 15,6$ Hz)
8	6,27 (d, $J = 15,8$ Hz)	6,24 (1H, d, $J = 15,6$ Hz)
9	_____	_____
10	4,27 (q, $J = 7$ Hz)	4,25 (2H, q, $J = 6,6$ Hz)
11	1,35 (t, $J = 7$ Hz)	1,34 (3H, t, $J = 6,6$ Hz)

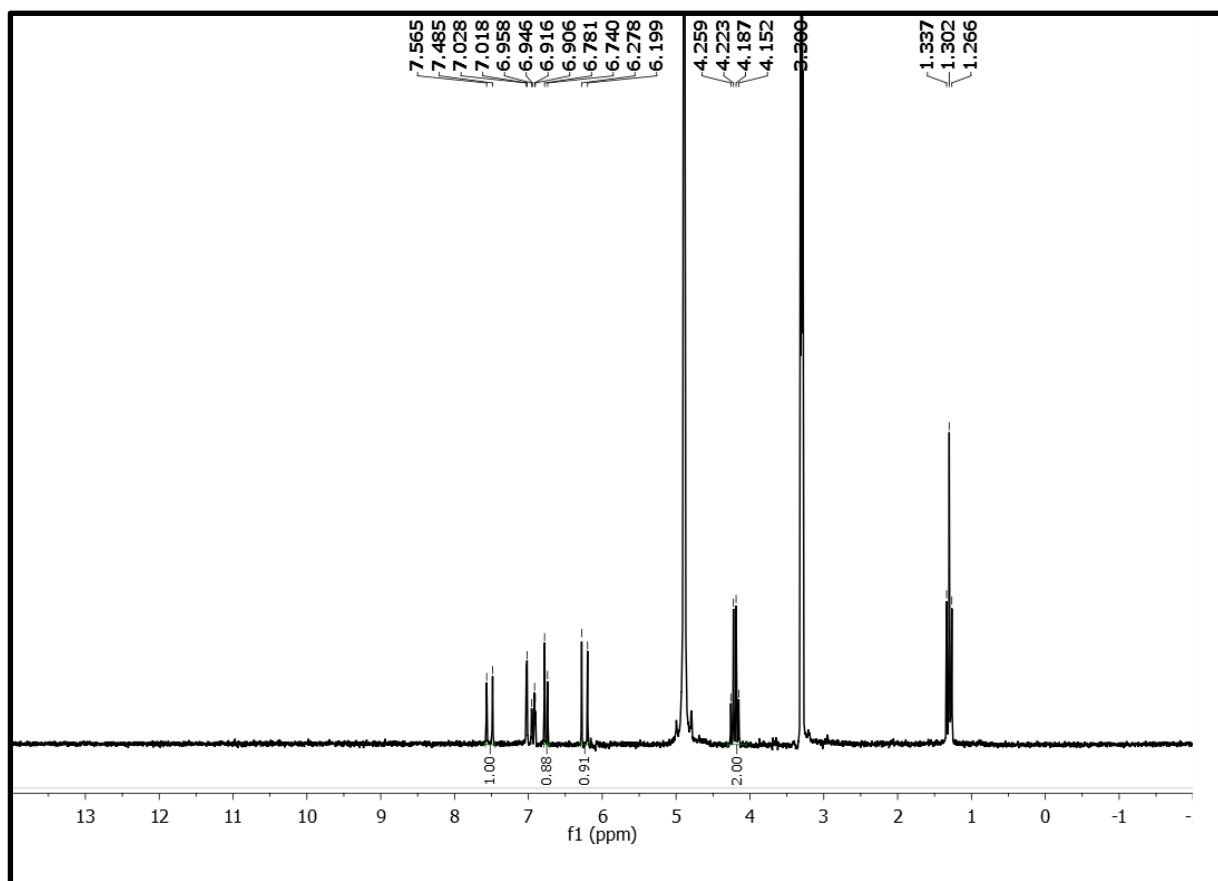


Figura – 67 Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de Ip-5.

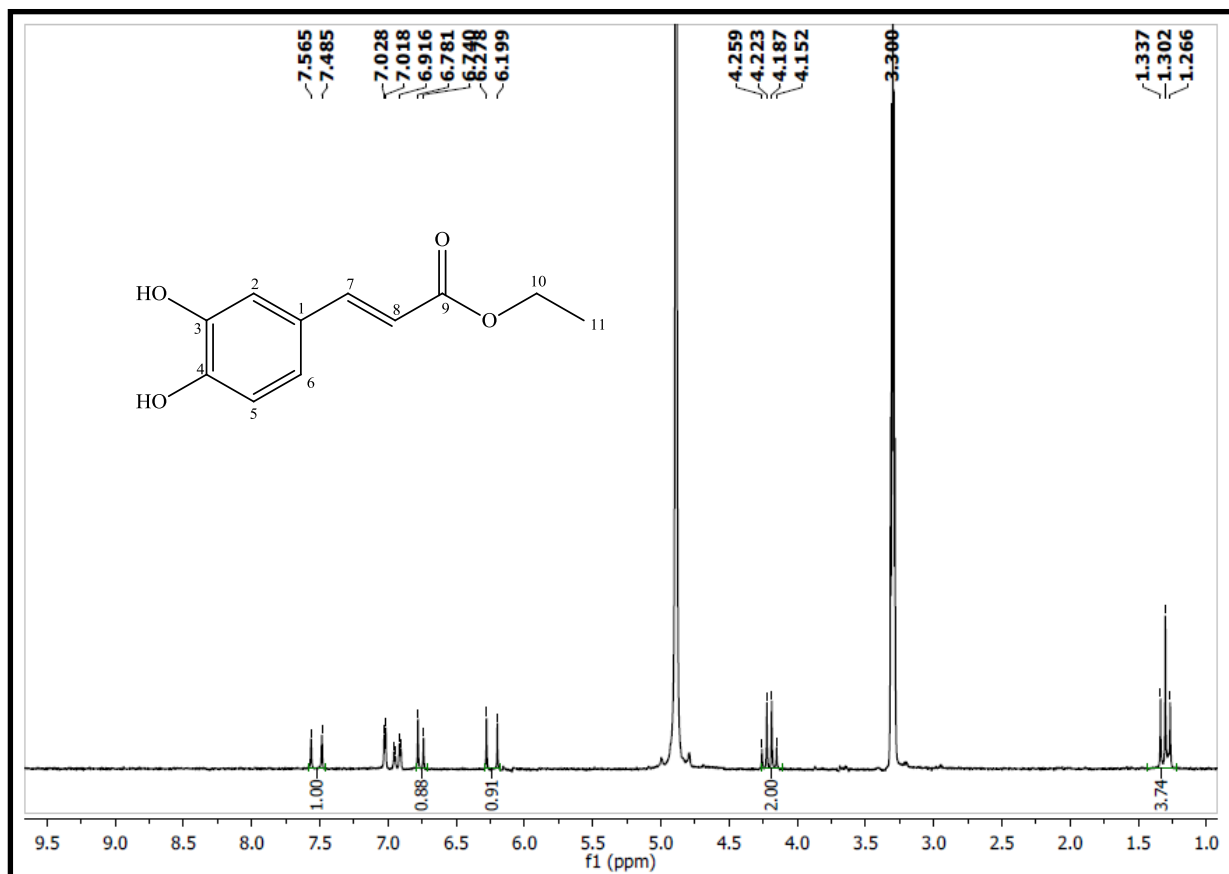


Figura – 68 Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de Ip-5, expansão.

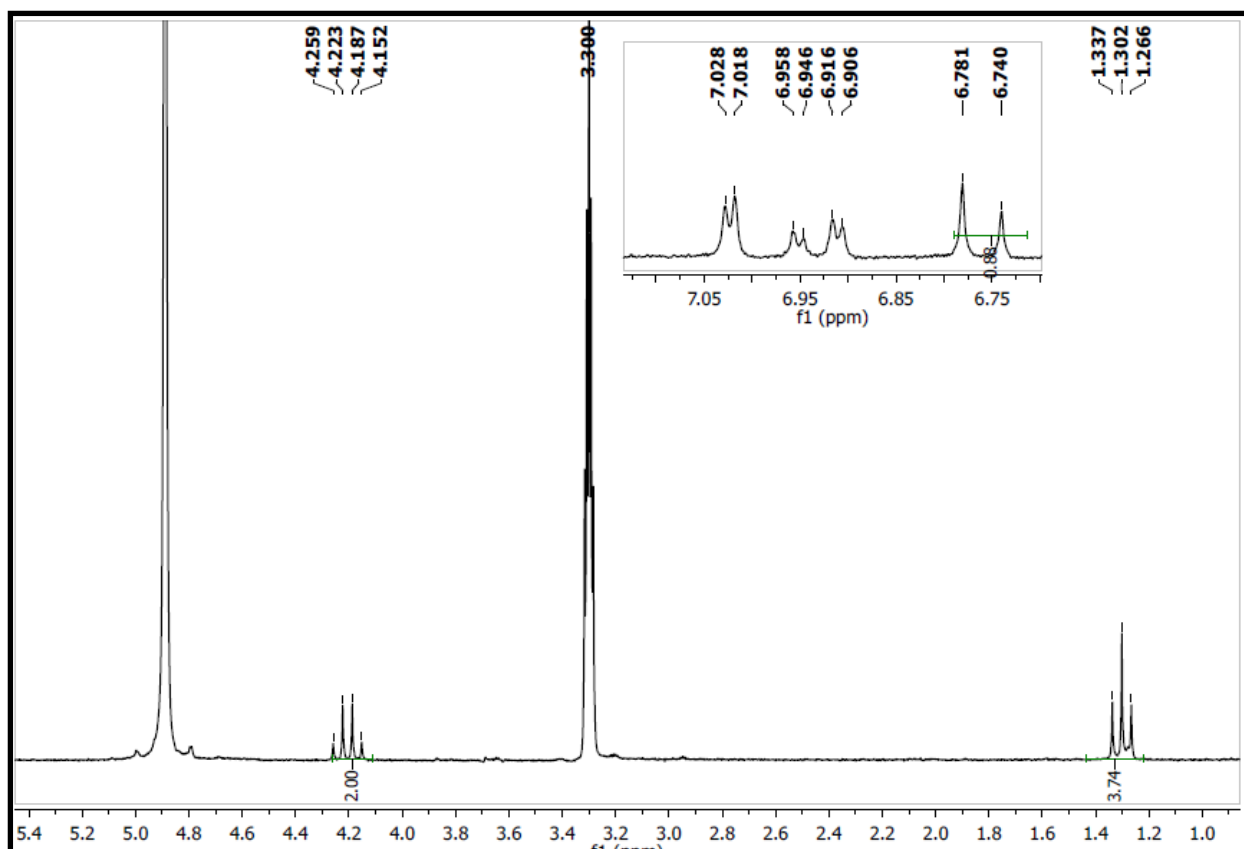


Figura 69 – Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 200 MHz) de Ip-5, expansão

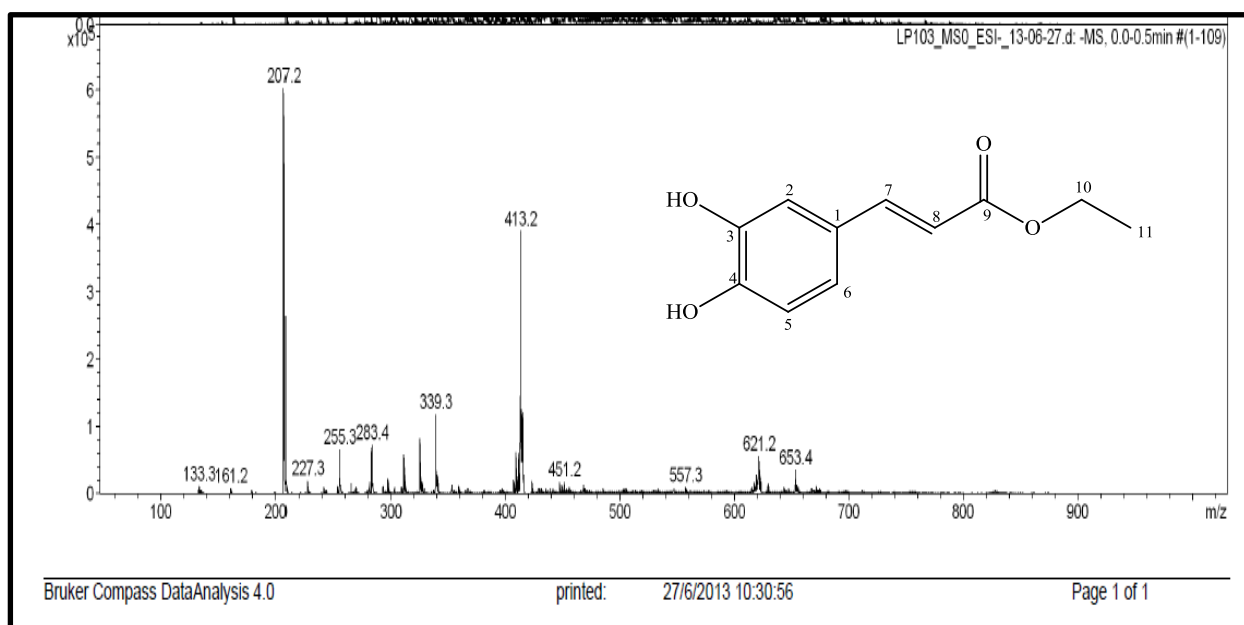


Figura 70 - Espectro de massas obtido por ESI negativo (ESI⁻ - MS) de Ip-5.

5.3.6. Determinação Estrutural da Substância Ip-6.

A substância codificada como Ip-6 (Fig. 71, pág. 109), foi isolado na forma de pó branco e ponto de fusão 230 - 232,2° C. O espectro de IV, (Fig. 72 pág. 111), obtido em pastilha de KBr mostrou absorções em 3159 cm^{-1} , característicos de grupo hidroxila, e absorções em 1708 cm^{-1} sugestivo da presença de lactona α,β insaturada, observada em valores mais baixos, justificando a presença do anel lactônico de seis membros conjugado com anel aromático e ainda a presença da dupla ligação α,β insaturada que move a banda de estiramento normal (1735 cm^{-1}) para uma frequência mais baixa (1700-1675 cm^{-1}) (PAVIA et al, 2010).

O espectro de RMN ^1H (500 MHz, Acetona D_6) apresentou dois dubletos em δ_{H} 6,17 (d, $J = 9,5$ Hz) e δ_{H} 7,86 (d, $J = 9,5$ Hz) referentes aos hidrogênios H-3 e H-4, respectivamente, característicos de esqueleto cumarínico (Fig. 74 pág. 112). A presença de dois dubletos em δ_{H} 7,51 (d, $J = 8,4$ Hz), δ_{H} 6,75 (d, $J = 2,5$ Hz) e um duplo dubleto em δ_{H} 6,85 (dd, $J = 8,5$ e 2Hz) na região de aromáticos foram atribuídos aos hidrogênios H-5, H-8 e H-6, respectivamente (Fig. 74 pág. 112). A ausência do sinal característico de hidrogênio aromático, permitiu sugerir a presença de uma hidroxila como substituinte no anel aromático na posição 7 (Fig. 73, pág. 111).

O espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, Acetona D_6) (Fig. 75 pág. 112), apresentou sinais em δ_{C} 162,19 sugerindo a presença de um grupo hidroxila no C-7, proposto no RMN ^1H , δ_{C} 144,1 referente ao C-4, α,β insaturado ao grupo carbonila, além do sinal em δ_{C} 161,14 referente ao grupo carbonila em C-2, sugerindo a presença de anel lactônico.

Comparações entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura permitiram identificar o composto codificado como Ip-6 como a 7-hidroxicumarina conhecida como umbeliferona (LIU and TIAN, 2004). Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-6 estão compilados na Tabela 7, pág. 110.

Godoy e colaboradores (2005) demonstraram a atividade antifúngica da umbeliferona contra o fungo *Leucoagaricus gongylophorus*, simbionte de formigas cortadeiras *Atta sexdens*, consideradas uma praga na agricultura. O que sugere que a umbeliferona pode vir a ser um antifúngico natural.

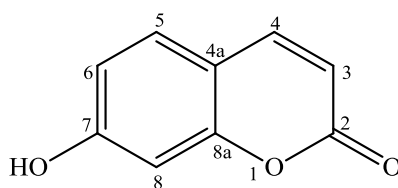
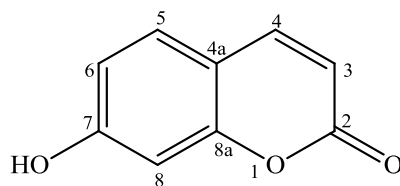


Figura 71 - Estrutura da substância **Ip-6**, umbeliferona.

Tabela 7 - Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-6.

Nº	δ_{H} Ip-6 (500 MHz, Acetona D_6)	δ_{C} Ip-6 (125 MHz, Acetona, D_6)	(LIU and TIAN, 2004) (500 MHz, Acetona D_6)	δ_{C} (LIU and TIAN, 2004) (125 MHz, Acetona, D_6)	TIPO
			δ_{H}		
1	_____	_____	_____	_____	_____
2	_____	161,14	_____	161,40	C
3	6,16 (d, $J = 9,5$ Hz)	112,96	6,14 (d, $J = 9,2$ Hz)	112,60	CH
4	7,86 (d, $J = 9,5$ Hz)	144,1	7,85 (d, $J = 9,2$ Hz)	144,80	CH
4a	_____	113,92	_____	112,60	C
5	7,51 (d, $J = 8,5$ Hz)	130,57	7,48 (d, $J = 8,4$ Hz)	130,40	CH
6	6,85 (dd, $J = 8,5$ e 2Hz)	113,04	6,82 (dd, $J = 8,4$ e 2,1 Hz)	113,80	CH
7	_____	162,19	_____	162,20	C
8	6,75 (d, $J = 2,5$ Hz)	103,47	6,82 (d, $J = 2,1$ Hz)	103,10	CH
8a	_____	157,15	_____	156,80	C

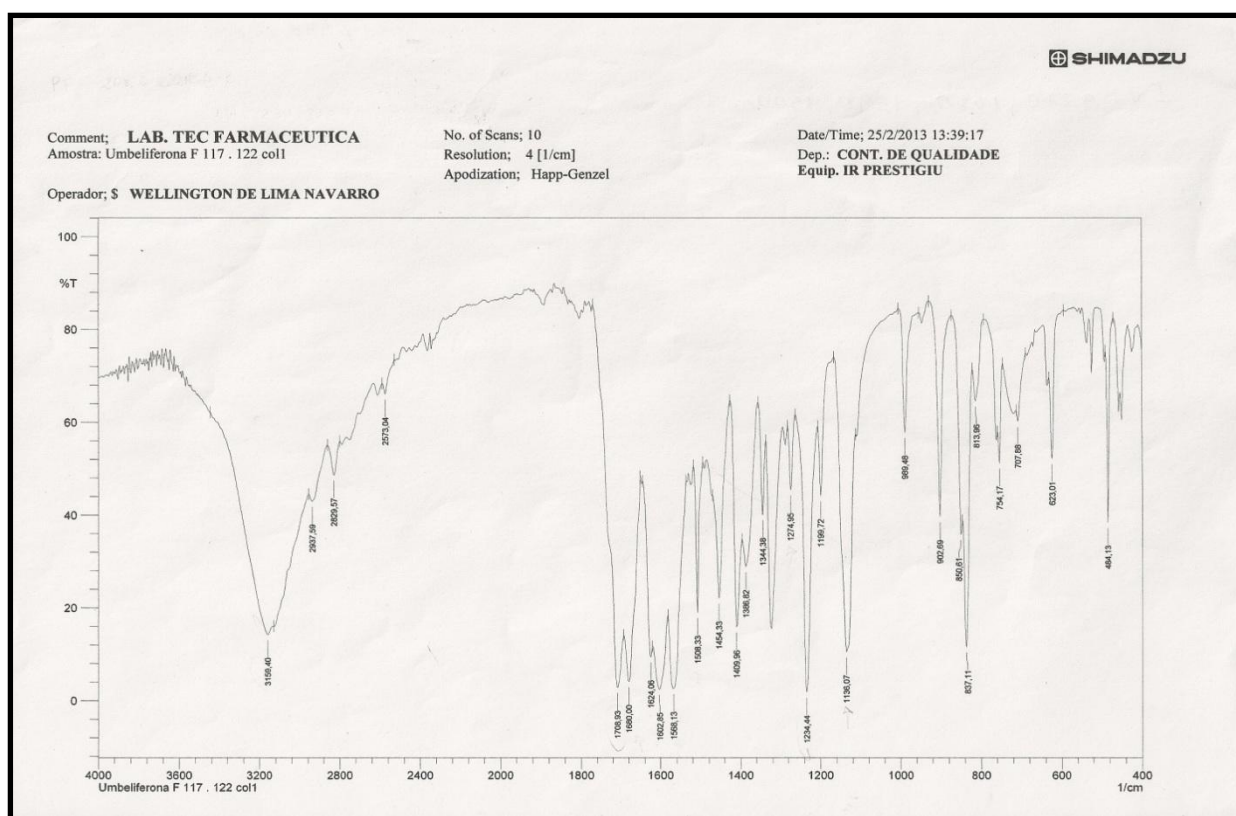


Figura 72 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Ip-6.

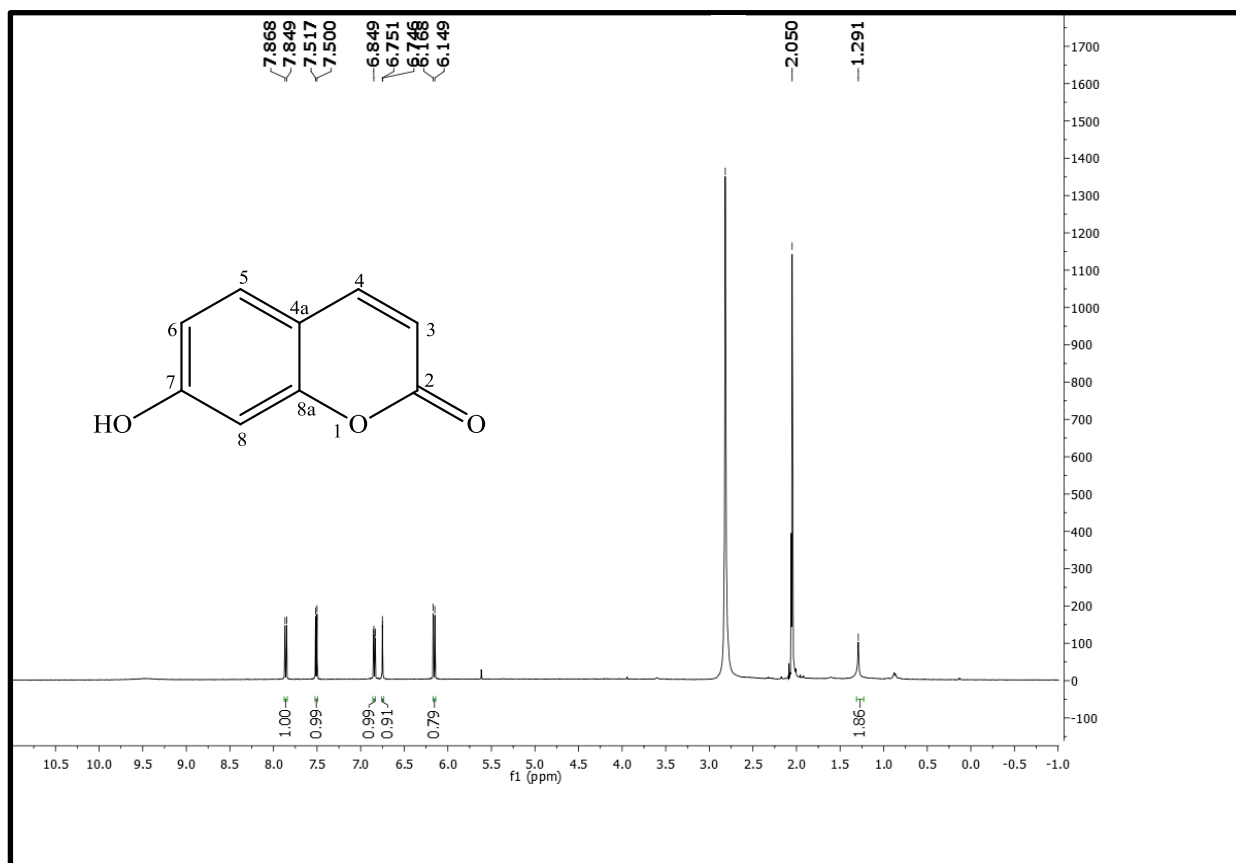


Figura 73 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, Acetona D_6) de Ip-6.

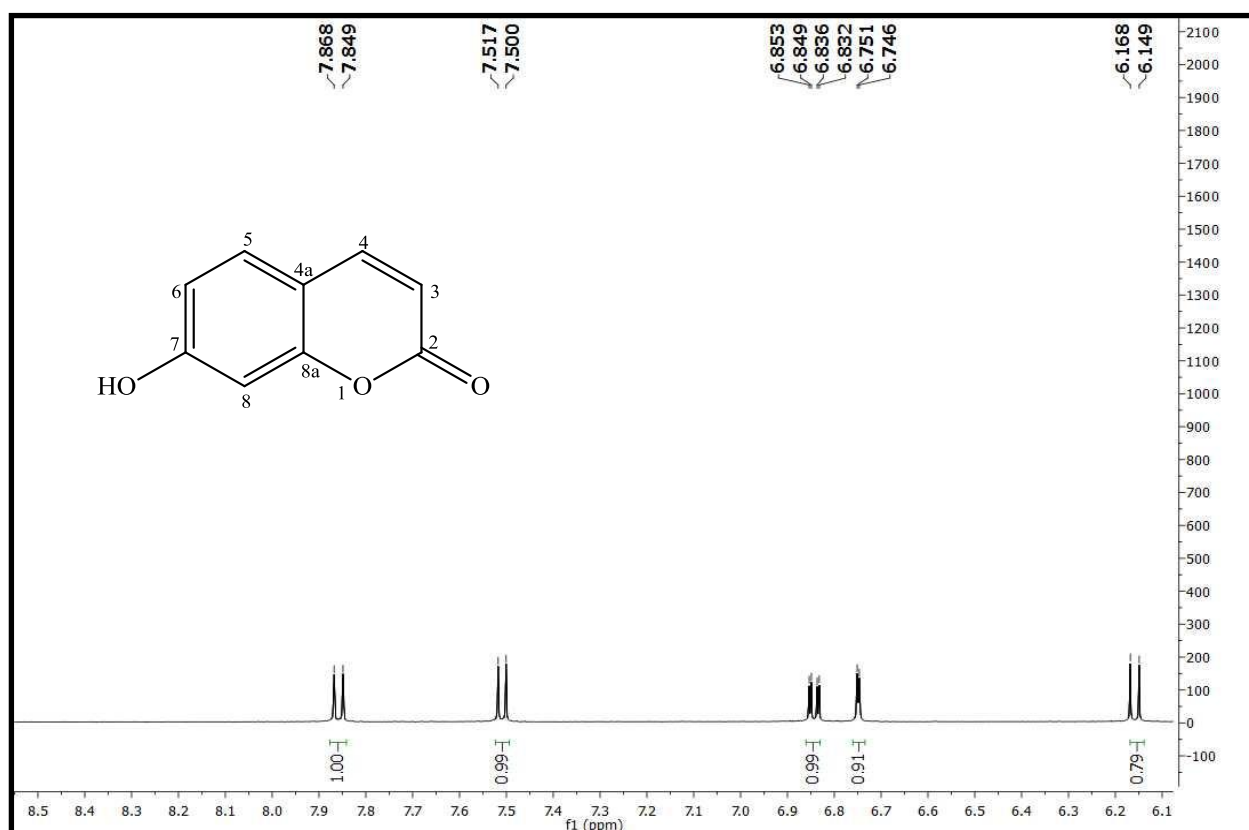


Figura 74 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, Acetona D_6) de Ip-6, expansão.

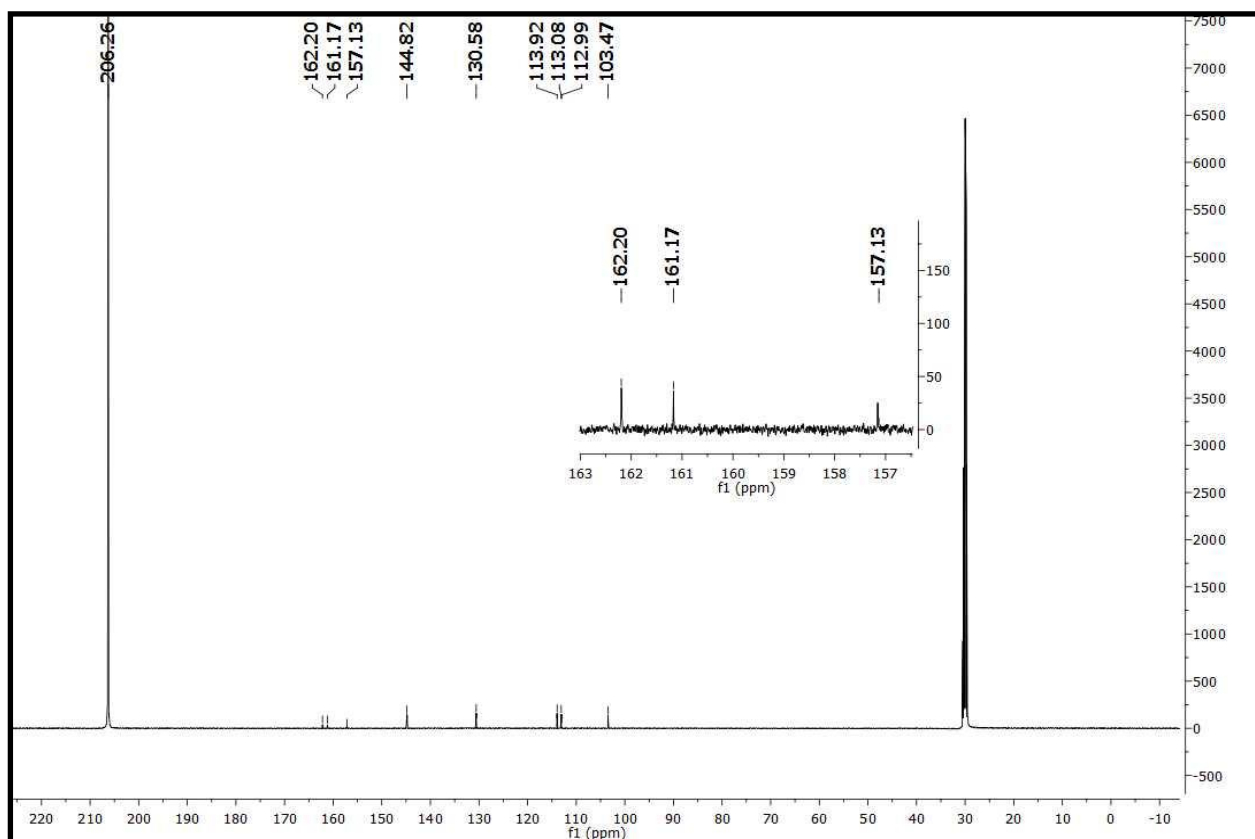


Figura 75 – Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, Acetona D_6) de Ip-6.

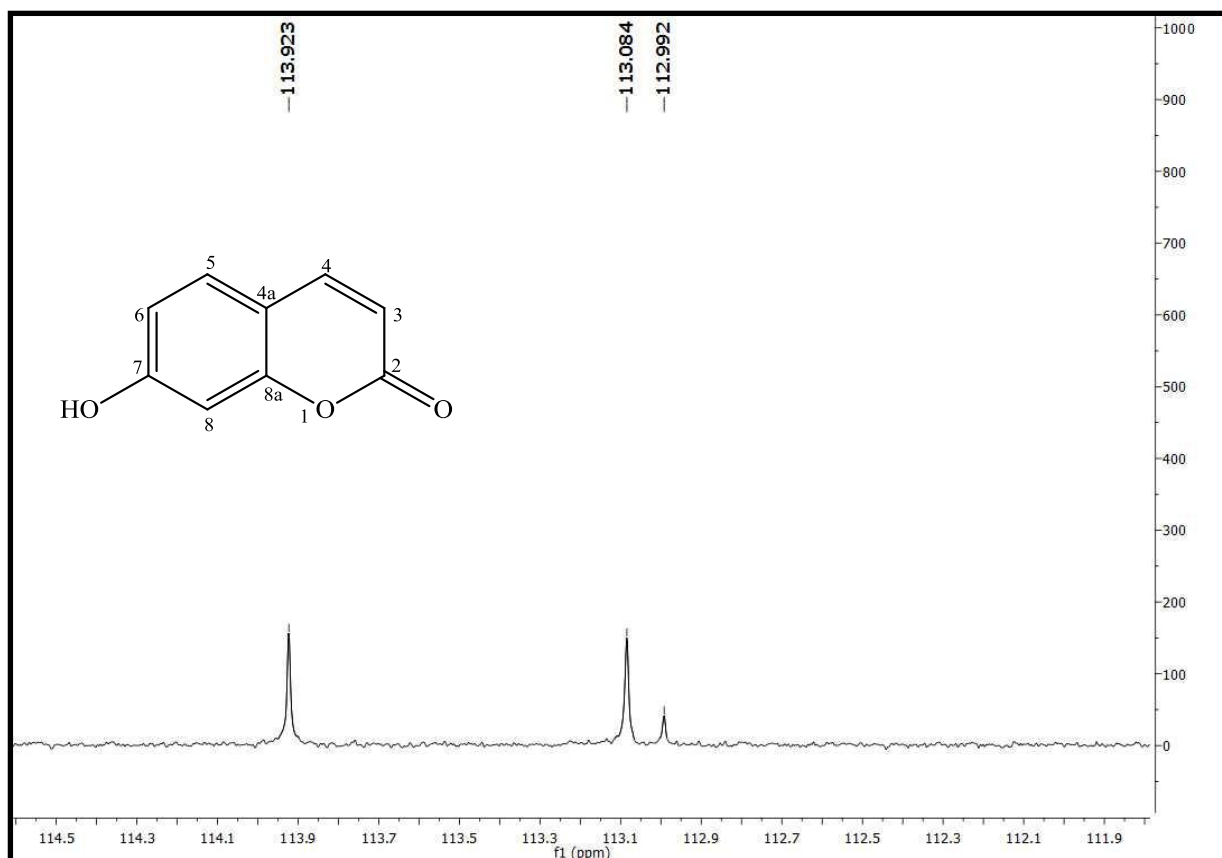


Figura 76 – Espectro de RMN ^{13}C BB (125 MHz, Acetona D_6) de Ip-6, expansão.

5.3.7. Determinação Estrutural da Substância Ip-7.

A substância codificada como Ip-7 (Fig. 77, pág. 115), foi isolada na forma de pó branco e ponto de fusão 206 - 207,9° C e massa 11 mg.

O espectro de IV, (Fig. 78, pág. 116), obtido em pastilha de KBr mostrou absorções em 3340, característicos de grupo hidroxila, e absorções em 1705 cm^{-1} sugestivo da presença de lactona α,β insaturada, observada em valores mais baixos, justificando a presença do anel lactônico de seis membros conjugado com anel aromático e ainda a presença da dupla ligação α,β insaturada que move a banda de estiramento normal (1735 cm^{-1}) para uma frequência mais baixa (1700-1675 cm^{-1}) (PAVIA et al, 2010). Além de absorções em 1566, 1512 e 923 cm^{-1} indicativo da presença de anel aromático e ligação dupla olefínica (CARVALHO et al, 2006).

O espectro de RMN ^1H (500MHz, CDCl_3) apresentou dois singletos em δ_{H} 6,89 e δ_{H} 6,82 referentes a (H-8) e (H-5), respectivamente e dois dubletos em δ_{H} 6,25 e δ_{H} 7,57 (d, $J = 9,5$ Hz), característicos de um esqueleto cumarínico (Fig. 80, pág. 117), além da presença de uma metoxila em δ_{H} 3,93 na posição 6 (Fig. 79, pág. 116) (CARVALHO, et al, 2006; COSTA, et al; 2012).

O espectro de RMN- ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3), (Fig. 81, pág. 117), apresentou sinais em δ_{C} 56,36, referente à metoxila em C-6, δ_{C} 143,27 referente ao C-4, $\alpha-\beta$ insaturado à lactona, e sinais em δ_{C} 113,34, δ_{C} 107,54 e δ_{C} 103,19 para carbonos metínicos. Além de 5 sinais para carbonos quaternários em δ_{C} 161,42 e δ_{C} 149,75, referente à lactona $\alpha-\beta$ insaturada, δ_{C} 150,26, referente ao C-7 e sinais em δ_{C} 144,05 e δ_{C} 111,49.

Comparações entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C com dados da literatura (CARVALHO, et al, 2006; COSTA, et al; 2012), permitiram identificar a substância Ip-7 como a cumarina 6-metoxi, 7-hidroxycumarina, conhecida como escopoletina. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-7 estão compilados na Tabela 8, pág. 115.

A escopoletina, é uma cumarina com atividade farmacológica comprovada, atuando na regulação da pressão arterial e possui atividade bactericida contra várias espécies, incluindo *Escherichia coli* (ARISAWA et al., 1983).

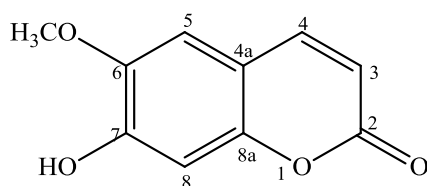
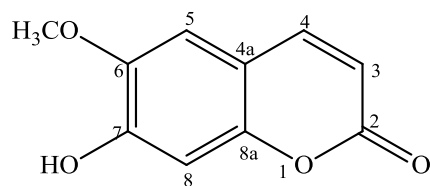


Figura 77 - Estrutura da substância **Ip-7**, escopoletina.

Tabela 8 - Dados Espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da Substância Ip-7.

Nº	δ_{H} Ip-7 (500 MHz, CDCl_3)	δ_{C} Ip-7 (125 MHz, CDCl_3)	δ_{H} COSTA et al, (2012) (200 MHz, CDCl_3)	δ_{C} (COSTA et al, 2012) (50 MHz, CDCl_3)	TIPO
1	—	—	—	—	—
2	—	161,42	—	161,64	C
3	6,25 (d, $J = 9,5\text{Hz}$)	113,34	6,25 (d, $J = 9,5\text{Hz}$)	113,48	CH
4	7,57 (d, $J = 9,5\text{Hz}$)	143,27	7,58 (d, $J = 9,5\text{Hz}$)	143,26	CH
4a	—	111,49	—	111,56	C
5	6,82 (s)	107,54	6,91 (s)	107,68	CH
6	3,93 (s)	150,26	3,96 (s)	150,37	C
7	6,09 (s)	149,75	6,17 (s)	149,81	C
8	6,89 (s)	103,19	6,84 (s)	103,28	CH
8a	—	144,05	—	144,10	C
MeO	—	56,36	—	56,49	MeO

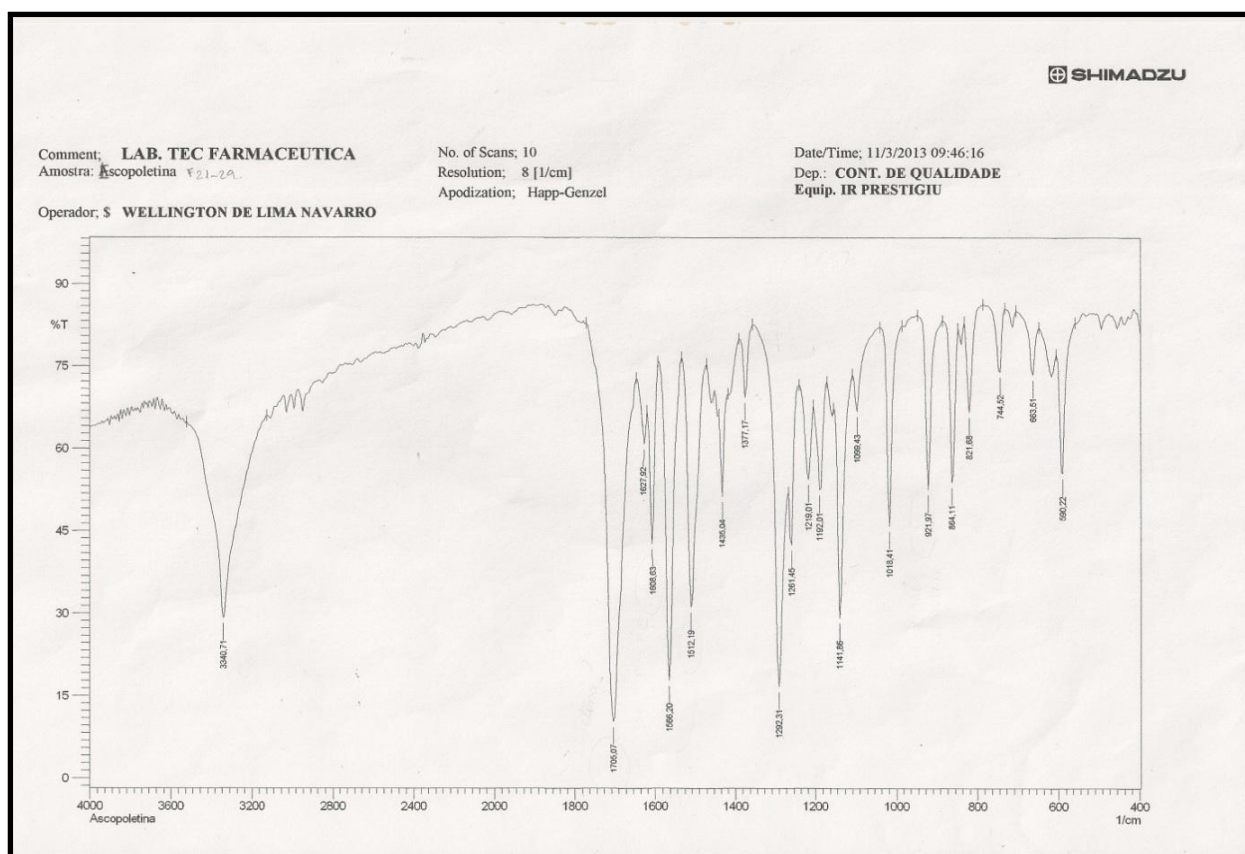


Figura 78 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Ip-7.

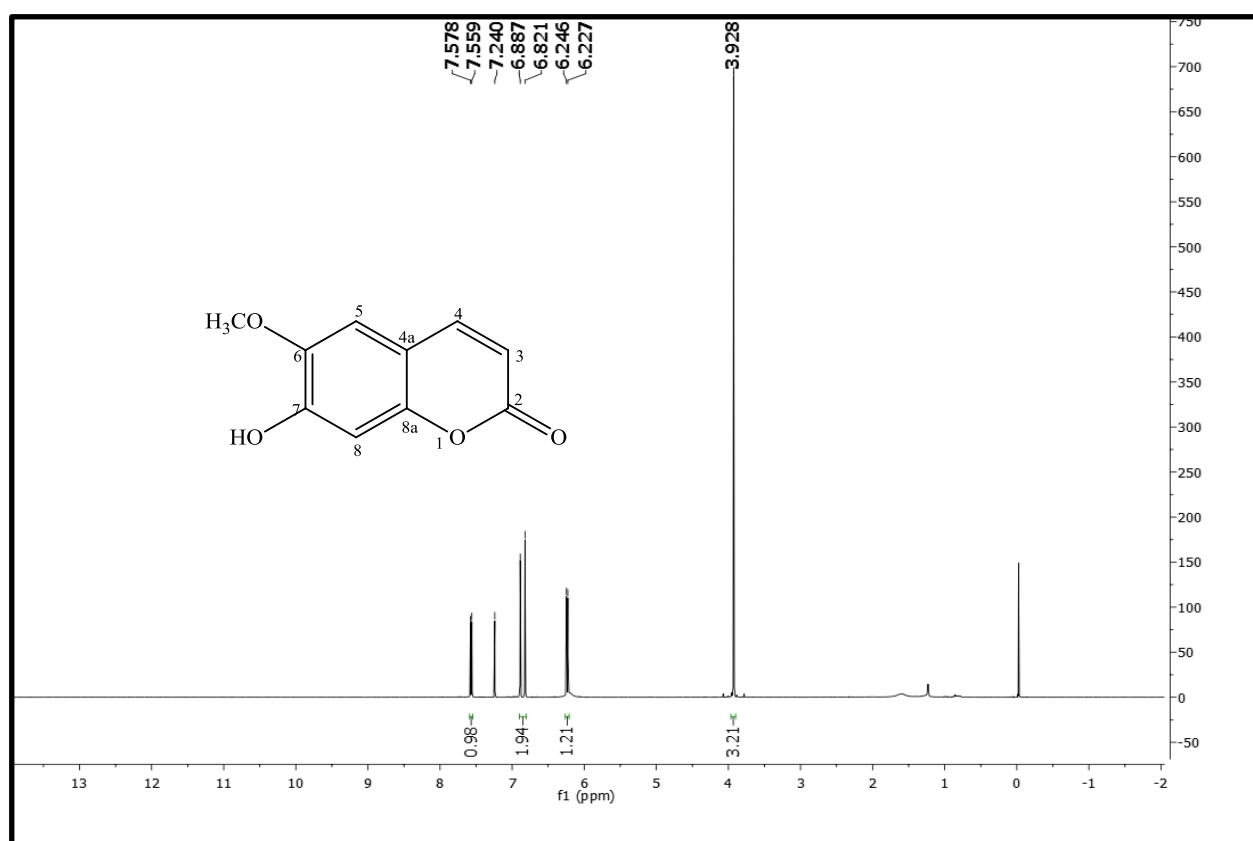


Figura 79 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-7.

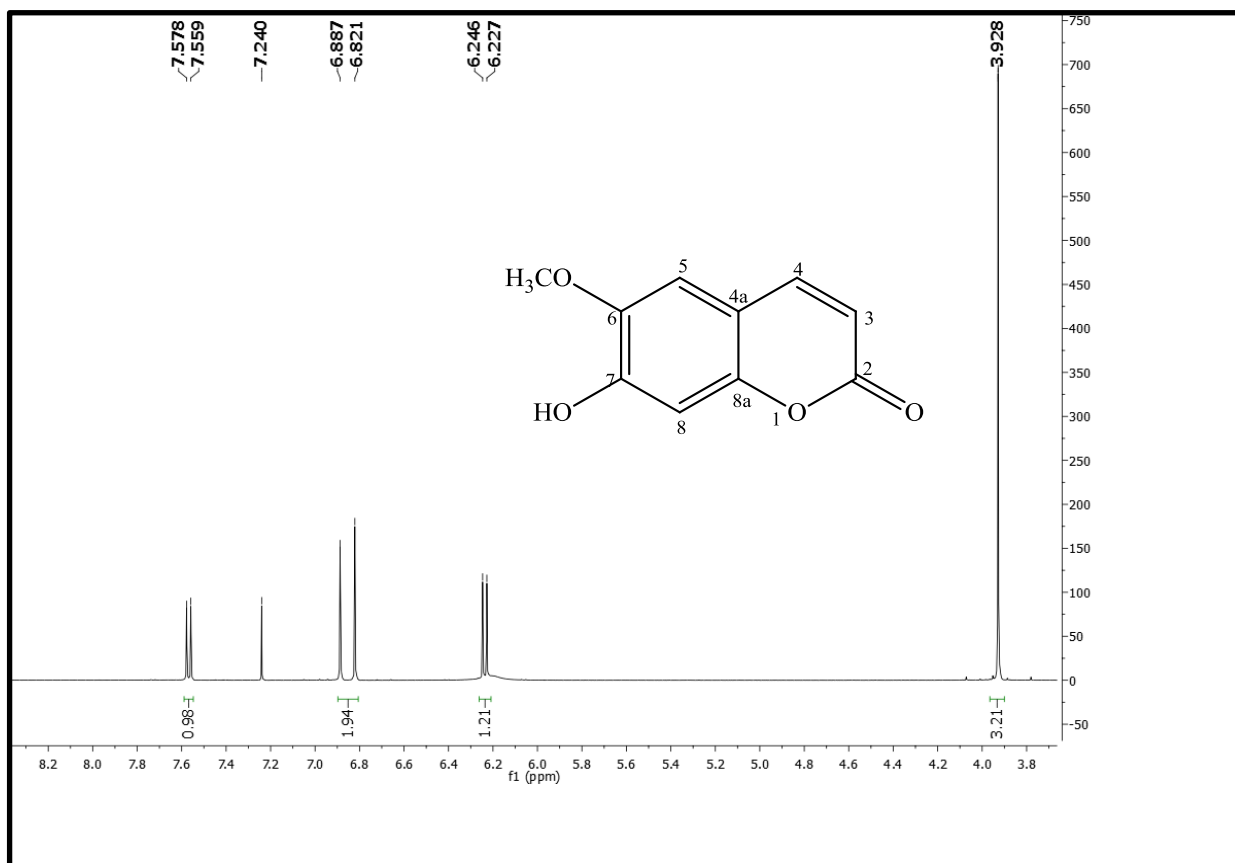


Figura 80 – Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de Ip-7.

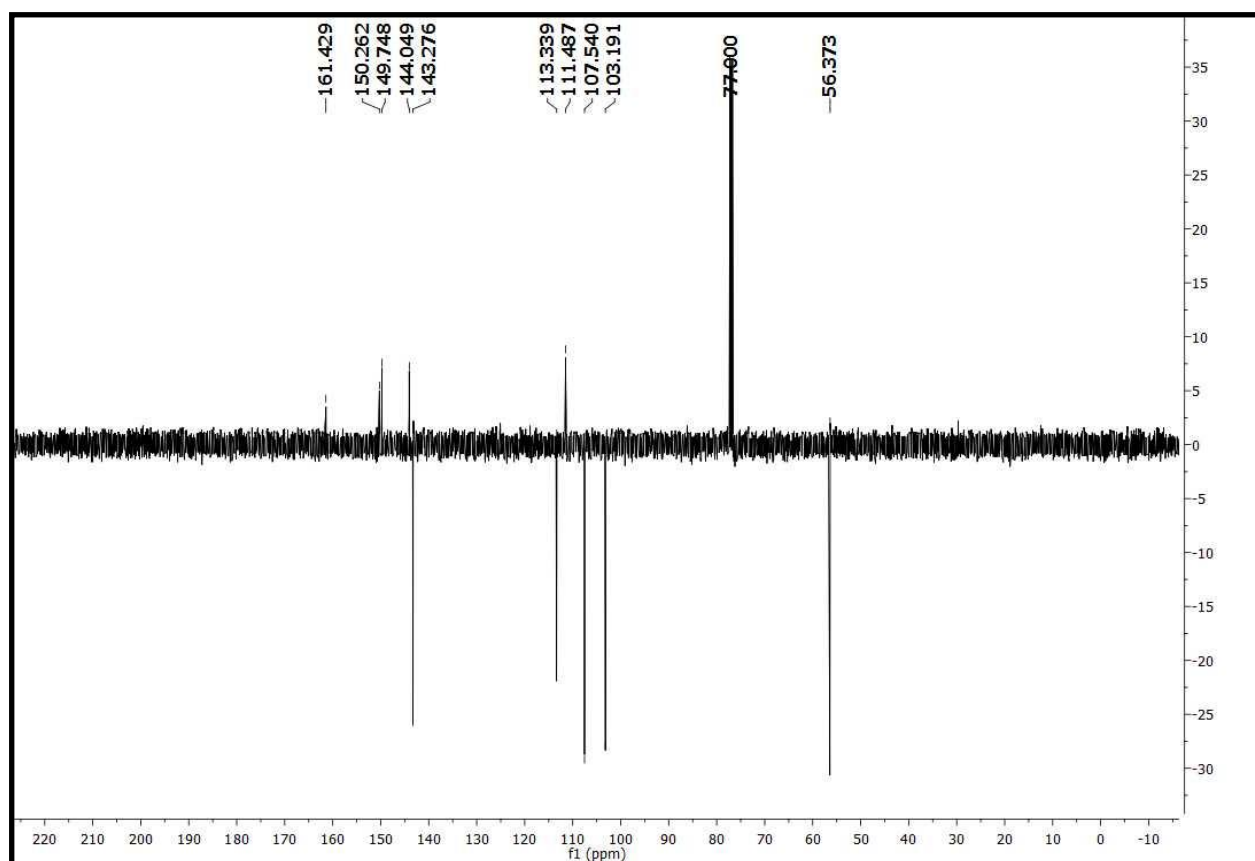


Figura 81 – Espectro de RMN ^{13}C APT (125 MHz, CDCl_3) de Ip-7.

5.3.8. Determinação Estrutural da Substância Ip-8.

A substância codificada como Ip-8 (Fig. 82, pág. 118) foi isolada na forma de cristais incolores, com ponto de fusão 68,6 - 72,8 ° C e massa 1,5 mg.

O espectro de IV, (Fig. 83, pág. 120), obtido em pastilha de KBr mostrou absorções 1705 cm^{-1} , sugestivo da presença de lactona α,β insaturada, respectivamente, observadas em valores mais baixos, justificando a presença do anel lactônico de seis membros conjugado com anel aromático e ainda a presença da dupla ligação α,β insaturada que move a banda de estiramento normal (1735 cm^{-1}) para uma frequência mais baixa ($1700\text{-}1675\text{ cm}^{-1}$) (PAVIA et al, 2010). Além de sinais em 1604 , 1562 e 929 cm^{-1} , característicos de anel aromático e dupla olefínica (CARVALHO et al, 2006).

No espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Fig. 84, pág. 120), foi observado um conjunto de absorções entre δ_{H} 6,73 a 7,07 ppm sugestivos de hidrogênios de anel aromático e dois dubletos em δ_{H} 5,94 (d, $J = 9,6\text{ Hz}$) e em δ_{H} 7,19 (d, $J = 9,6\text{ Hz}$), sugestivo de hidrogênios olefínicos atribuídos a H-3 e H-4, respectivamente (Fig. 85, pág. 121).

O espectro de RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) apresentou três sinais em δ_{C} 160,79, sugestivo de carbono de carbonila na posição 2, e em δ_{C} 143,91 e δ_{C} 116,10 característicos de dupla olefínica de lactona α,β -insaturada atribuídos aos carbonos C-4 e C-3 respectivamente (Fig. 87, pág.122), além de sinais em δ_{C} 131,77, δ_{C} 127,45; δ_{C} 124,12 e δ_{C} 116,80 para carbonos metínicos, sugestivo de esqueleto cumarínico (Fig. 86, pág.121). O conjunto de informações obtidas por dados espectrais de RMN ^1H , ^{13}C e IV permitiram identificar a substância Ip-8 como a cumarina 1,2-benzopirona, conhecida como cumarina. Os dados de RMN ^1H e ^{13}C de Ip-8 estão compilados na Tabela 9, pág. 119.

De acordo com Gasparetto et al, (2010), vários autores atribuem importantes atividades terapêuticas à 1,2-benzopirona tais como, anti-inflamatória, imunossupressora, hipolipidêmico, relaxante vascular, anticoagulante, hipotensora, espasmolítica, antioxidante, antiofídica, dentre outras. Ensaios farmacológicos realizados com uma solução padrão de cumarina (1,2-benzopirona) demonstraram efeitos antiespasmolítico, antiedematogênico e broncodilatador (PEDROSO et al, 2008).

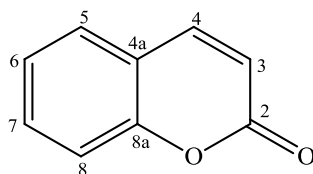
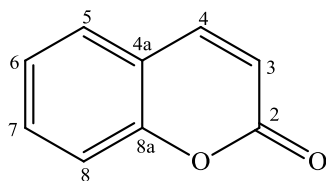


Figura 82 - Estrutura da substância **Ip-8**, 1,2-benzopirona.

Tabela 9 - Dados espectroscópicos de RMN ^1H e ^{13}C da substância Ip-8.

Nº	δ_{H} Ip-8 (200 MHz, CDCl_3)	δ_{C} Ip-8 (50 MHz, CDCl_3)	δ_{C} (GOTTLIEB, LIMA and MONACHE, 1979) (22,63 MHz, CDCl_3)	TIPO
2	-	160,79	161,98	C
3	5,94 (d, $J = 9,6$ Hz)	116,10	116,51	CH
4	7,19 (d, $J = 9,6$ Hz)	143,41	144,70	CH
4a	-	118,47	119,36	C
5		131,77	128,57	CH
6		127,45	125,07	CH
7		124,12	132,42	CH
8		116,80	117,00	CH
8 ^a	-	153,76	154,31	C

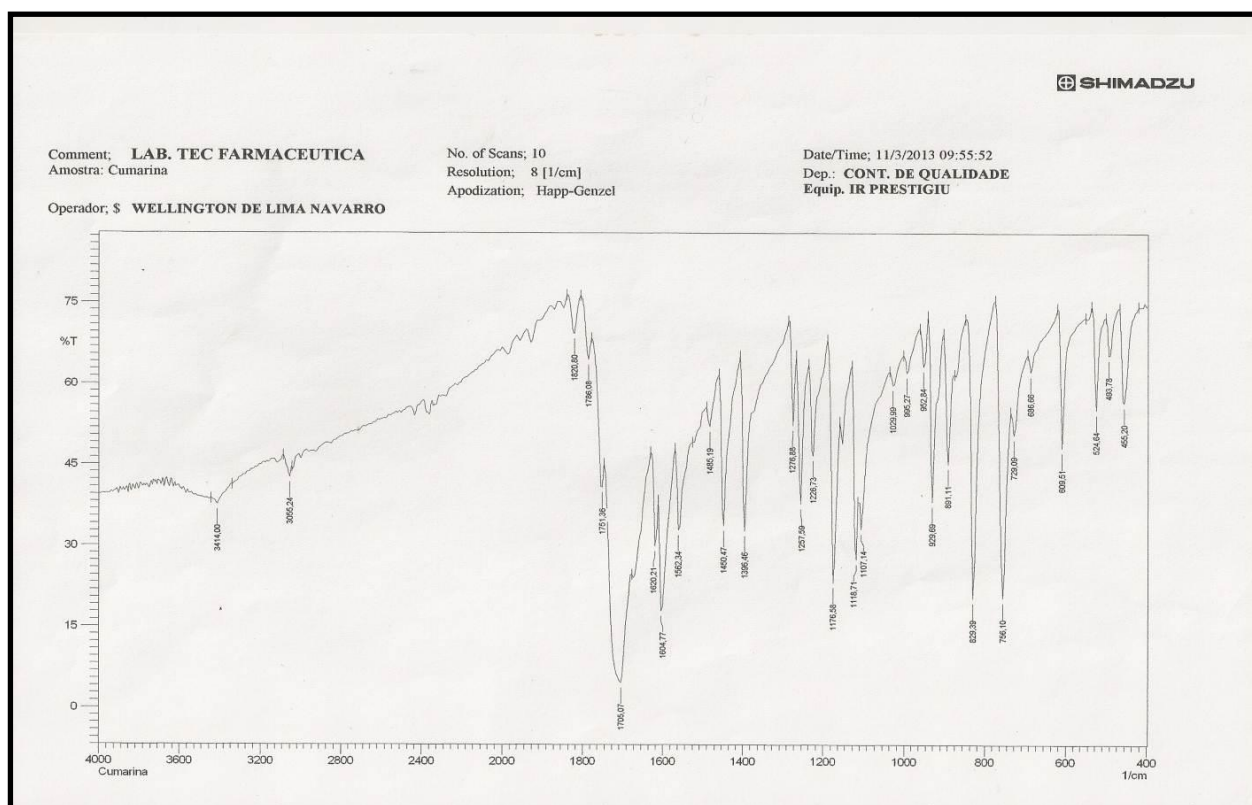


Figura 83 – Espectro de IV (KBr, cm^{-1}) de Ip-8.

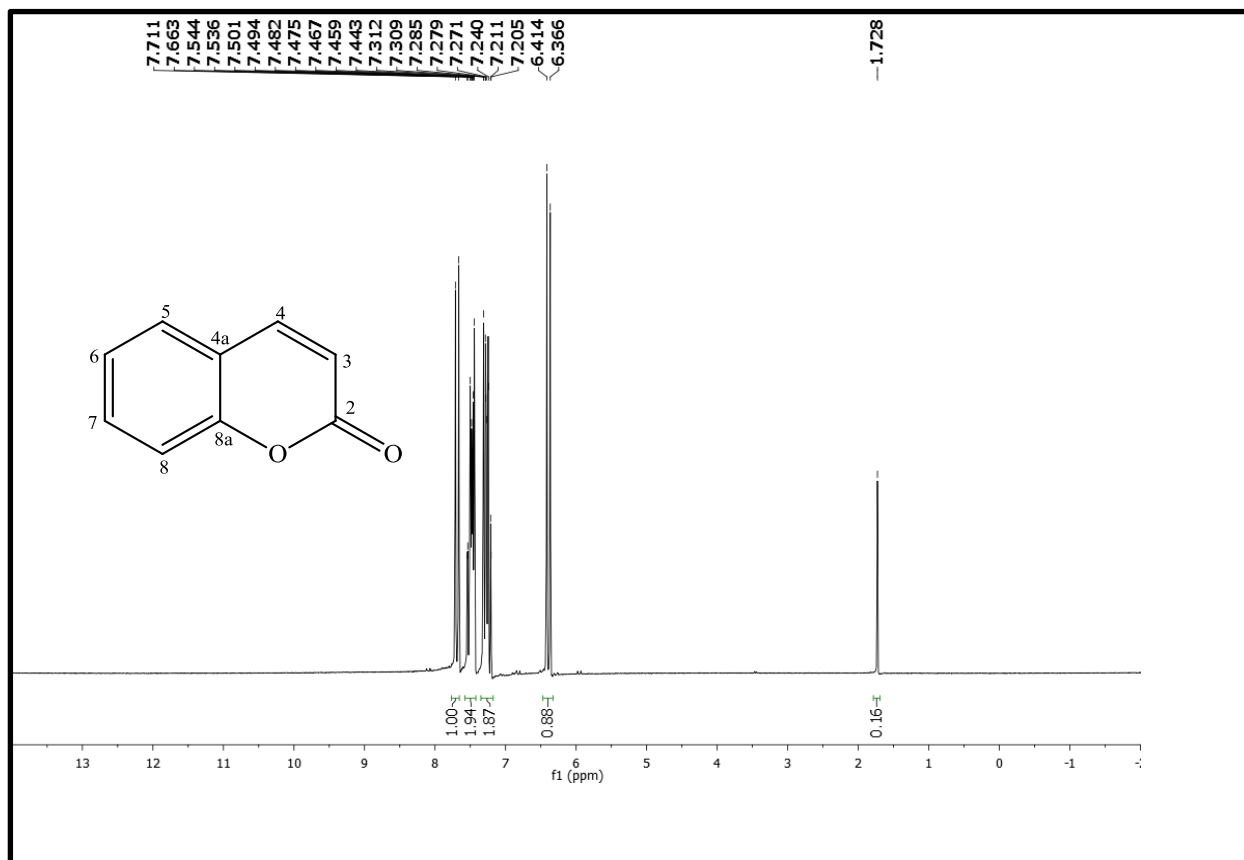


Figura 84 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Ip-8.

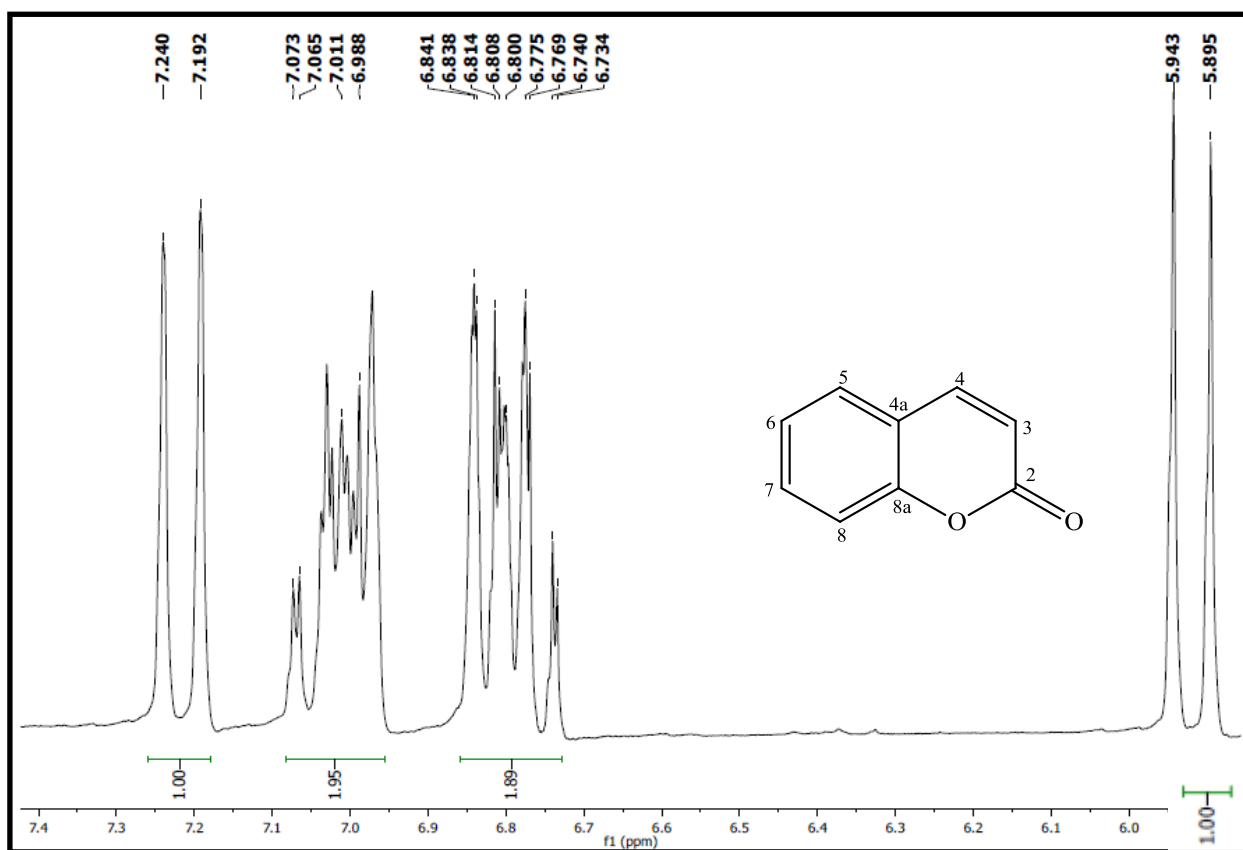


Figura 85 – Espectro de RMN ^1H (200 MHz, CDCl_3) de Ip-8, expansão.

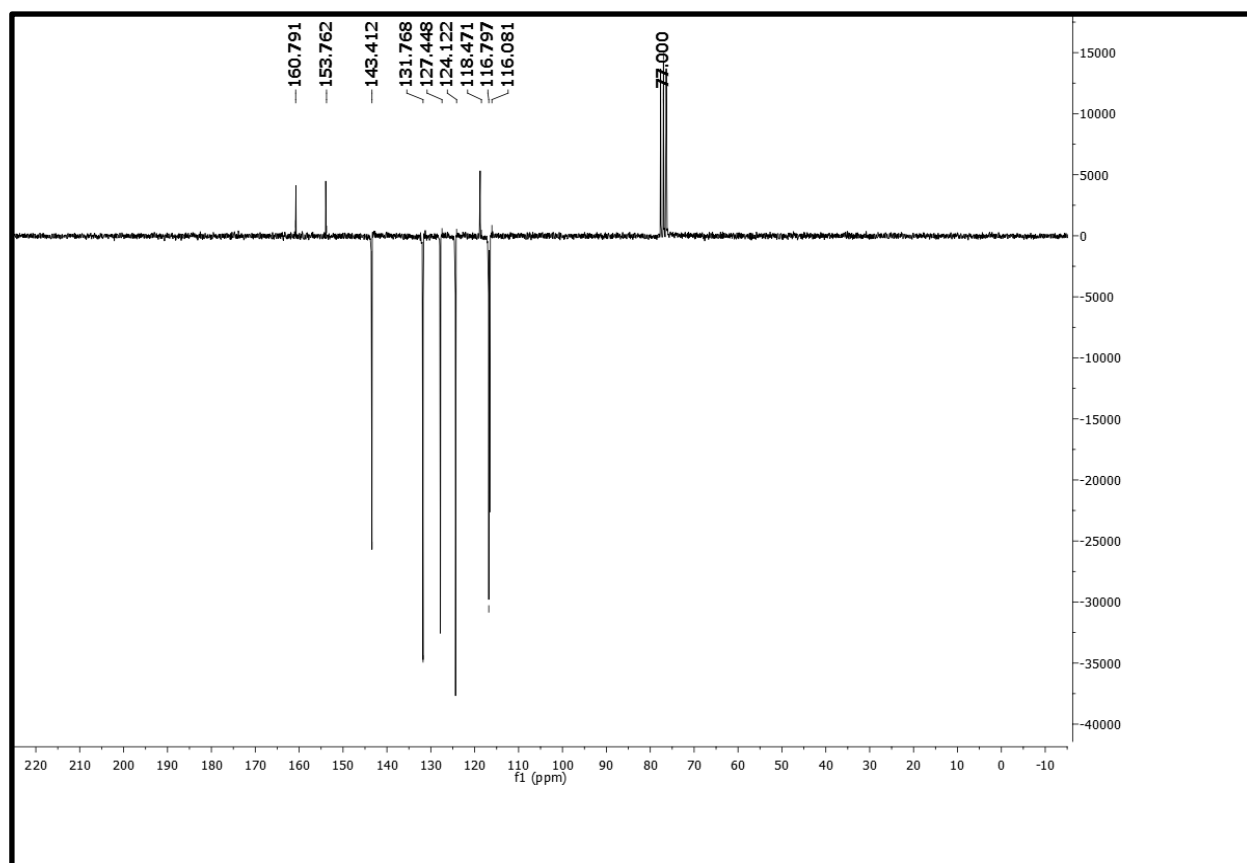


Figura 86 – Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-8.

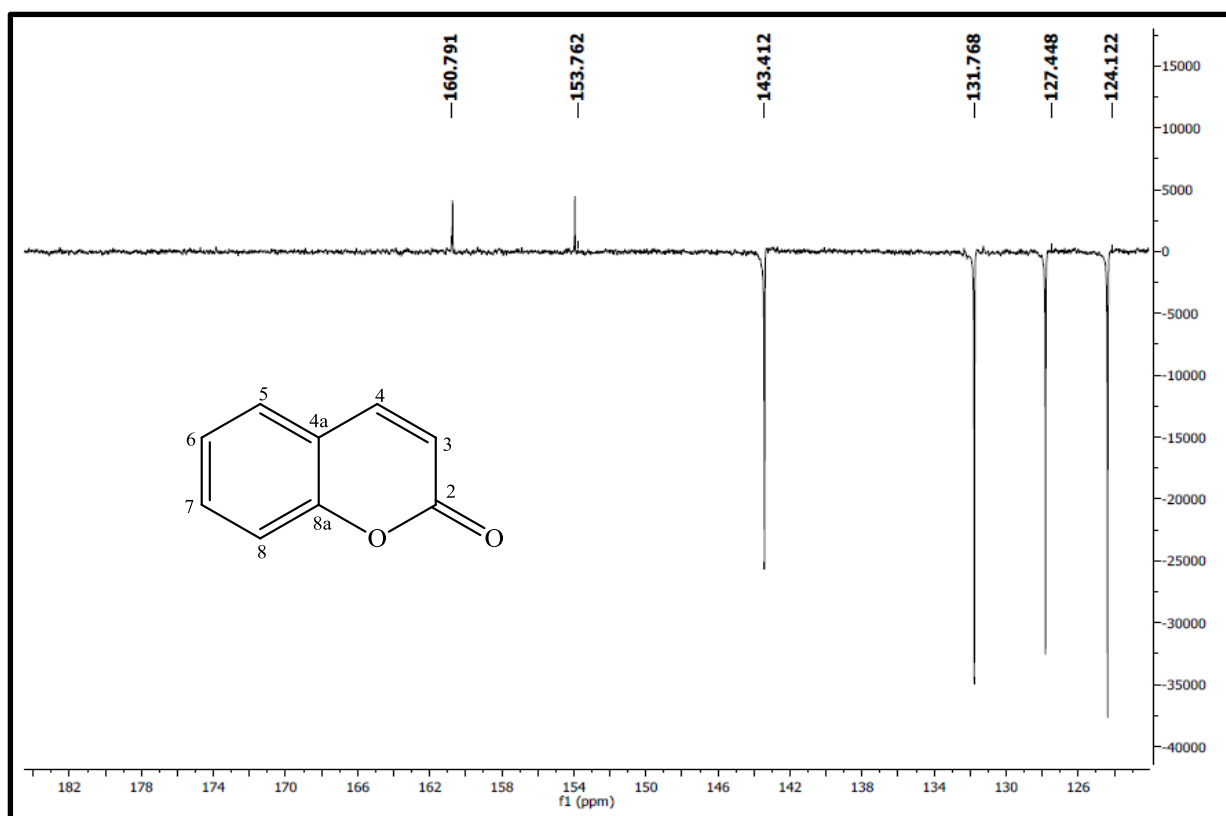


Figura 87 – Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-8, expansão.

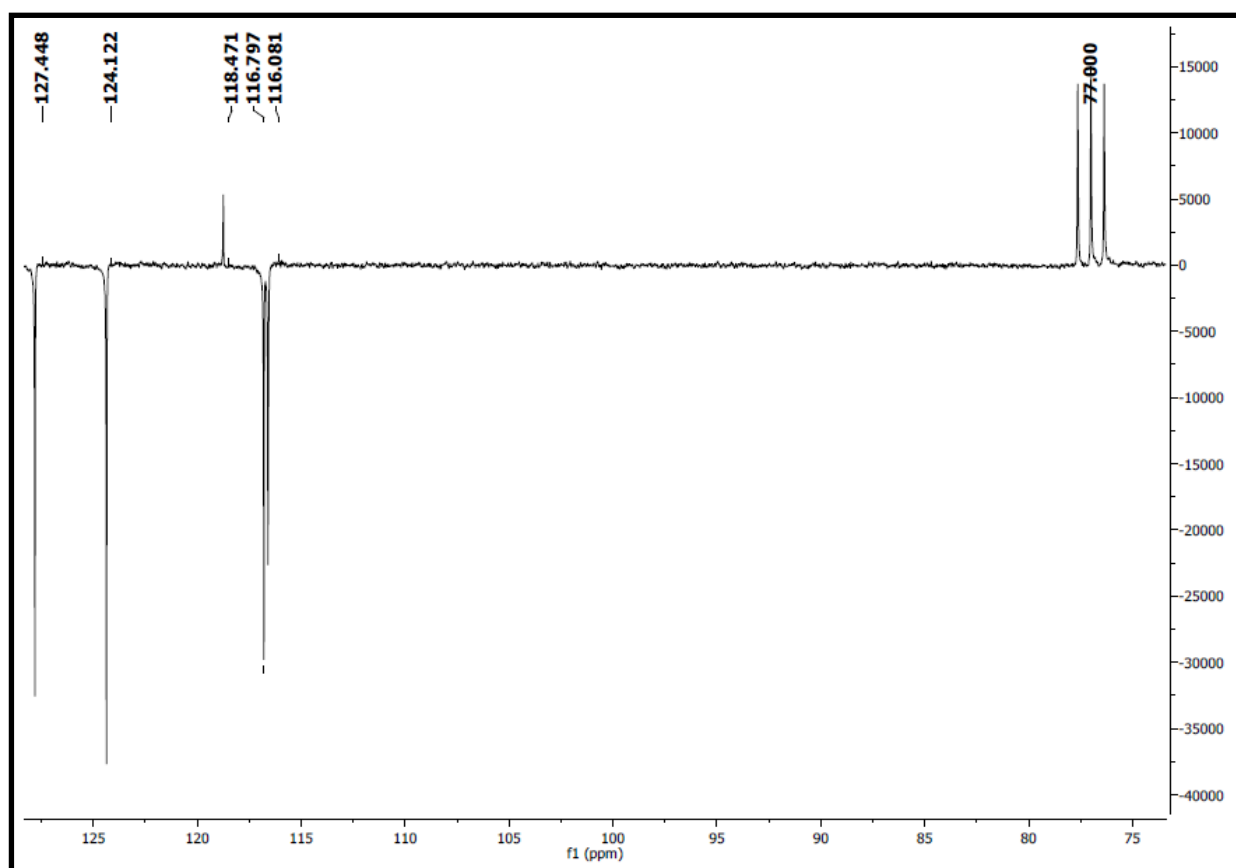


Figura 88 – Espectro de RMN ^{13}C APT (50 MHz, CDCl_3) de Ip-8, expansão.

5.4. Avaliação da Toxicidade Pré-Clínica Aguda

5.4.1 Avaliação Comportamental e Investigação da DL₅₀

O alcaloide pirrolizidínico crotavitelina (Cv-1), isolado de *Crotalaria vitelina* foi usado para ensaios de toxicidade aguda baseado em dados da literatura de que essa classe de alcaloides é tóxica para animais de produção por serem hepatotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos (ASRES, SPORER & WINK, 2004).

Após o tratamento agudo, via oral, com doses únicas de 50 e 300 mg/kg em camundongos, não foi evidenciada nenhuma morte, nem alterações comportamentais nos animais avaliados, não sendo possível calcular matematicamente a DL₅₀ (dose que produz 50% de letalidade).

5.4.2 Avaliação da Evolução Ponderal e do Consumo de Água e Ração

Os valores referentes ao consumo de água e ração e evolução ponderal, avaliados durante os 14 dias de observação estão expressos na Tabela 10, pág. 124.

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que houve aumento no consumo de água, durante os dias de observação, nos animais machos tratados com dose única de 300 mg/Kg do alcaloide crotavitelina (Cv-1), em comparação com o grupo controle. Nas fêmeas, foi observado um aumento do consumo de água na dose de 50 mg/Kg e uma redução desse consumo após tratamento com dose única de 300 mg/Kg do alcaloide em teste. Em relação ao consumo de ração, não houve alteração significativa em ambos os gêneros tratados com as duas doses utilizadas. Já em relação à avaliação ponderal, houve aumento significativo no peso dos machos tratados 50 e 300 mg/Kg, em comparação com o controle. Esse efeito não foi observado no grupo das fêmeas, Tabelas 10 e 11, pág. 124.

A hepatotoxicidade produzida por alcaloides pirrolizidínicos é consequência da formação de metabólitos tóxicos, a partir da biotransformação, que ocorre especialmente no fígado (MEIJUAN et al, 2013). Efeitos da idade, gênero, dieta e espécie podem contribuir para variações no perfil de metabolização e, portanto alterar o perfil de toxicidade de substâncias dessa classe. Hormônios sexuais também afetam a resposta dos alcaloides pirrolizidínicos, sendo que adultos machos, independente da espécie, são mais susceptíveis do que as fêmeas à toxicidade por essas substâncias (SCHOENTAL, R, 1968). Essas informações corroboram com os resultados encontrados que mostram que os machos foram mais sensíveis a alterações, especialmente na avaliação ponderal.

Tabela 10 - Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg, via oral) sobre o consumo de água, ração e avaliação ponderal de camundongos experimentais.

Grupos	Gênero	Dose (mg/Kg)	Consumo de água (mL)	Consumo de ração (g)	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Controle	M	--	48,75 ± 2,47	42,13 ± 3,63	29,20 ± 1,36	33,93 ± 1,44 ^b
Cv-1	M	50	48,08 ± 3,56	43,00 ± 3,53	29,80 ± 1,06	40,05 ± 1,18 ^{a,b}
Cv-1	M	300	65,91 ± 5,51 ^{a,c}	43,85 ± 2,60	27,25 ± 0,65	38,40 ± 0,69 ^{a,b,c}
Controle	F	--	48,92 ± 1,82	42,29 ± 3,94	28,08 ± 0,37	33,53 ± 0,73 ^b
Cv-1	F	50	63,46 ± 5,98 ^a	41,92 ± 2,35	28,45 ± 0,38	35,57 ± 0,89 ^b
Cv-1	F	300	38,46 ± 1,54 ^a	46,42 ± 3,97	25,80 ± 0,39	32,95 ± 0,74 ^b

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ^aDados analisados com comparação com grupo controle. ^b em relação ao seu respectivo peso inicial e em ^c relação ao outro grupo tratado. Por teste T de *Student* não pareado com pós teste de *Mann-Whitney*. Significativos quando $p < 0,05$. M = macho, F = fêmea. Cv-1 = alcaloide crotavitelina.

Tabela 11 – Avaliação do índice e percentual de variação ponderal dos animais (n = 6) submetidos aos diferentes tratamentos.

Grupos	Gênero	Dose (mg/Kg)	Índice de variação ponderal (g)	% de variação
Controle	M	--	+ 4,73 ± 0,99	+ 16,61 ± 3,693
Cv-1	M	50	+ 10,25 ± 1,09 ^a	+ 34,92 ± 4,373 ^a
Cv-1	M	300	+ 11,15 ± 0,75 ^a	+ 41,20 ± 3,356 ^a
Controle	F	--	+ 5,45 ± 0,81	+ 19,51 ± 2,982
Cv-1	F	50	+ 7,12 ± 0,91	+ 25,09 ± 3,265
Cv-1	F	300	+7,15 ± 0,89	+ 27,90 ± 3,678

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ^aDados analisados com comparação com grupo controle. ^b relação ao outro grupo tratado por teste T de *Student* não pareado seguido por *Mann-Whitney*. Valores significativos quando $p < 0,05$. M = macho, F = fêmea. Cv-1 = alcaloide crotavitelina.

5.4.3 Avaliação dos Índices dos Órgãos

Os valores referentes ao índice dos órgãos (fígado, rins e baço) dos animais tratados com Cv-1. estão expressos na Tabela 12, pág. 125. Após a eutanásia dos animais, os órgãos foram removidos e pesados. Não houve alteração no índice de baço em ambos os gêneros. Entretanto, houve redução significativa nos índices de fígado e rins nos animais machos tratados com a dose de 50 mg/Kg e aumento significativo nos animais machos tratados com a dose de 300 mg/Kg. Não foram observadas alterações nos índices dos órgãos nas fêmeas tratadas com ambas as doses de Cv-1. Esses resultados, mais uma vez, corroboram com dados da literatura que mostram que os animais machos são mais sensíveis à toxicidade por alcaloides pirrolizidínicos (SCHOENTAL, R, 1968). Portanto, investigações adicionais, especialmente histopatológicas, são necessárias para identificar e caracterizar possíveis danos hepáticos produzidos por Cv-1, como sugerido através da alteração no índice desses órgãos.

Tabela 12 - Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg, via oral) no índice dos órgãos de camundongos experimentais.

Grupos	Gênero	Dose (mg/Kg)	Índice de fígado (mg/g)	Índice de rins (mg/g)	Índice de baço (mg/g)
Controle	M	--	58,23 ± 2,38	14,04 ± 0,77	5,81 ± 0,75
Cv-1	M	50	47,47 ± 2,78 ^a	11,57 ± 0,53 ^a	5,52 ± 0,19
Cv-1	M	300	64,45 ± 0,95 ^{a,b}	14,54 ± 1,02 ^{a,b}	5,26 ± 0,29
Controle	F	--	57,26 ± 3,74	11,79 ± 0,87	5,28 ± 0,71
Cv-1	F	50	53,92 ± 3,10	10,52 ± 0,63	5,02 ± 0,28
Cv-1	F	300	56,47 ± 1,51	10,89 ± 0,28	5,68 ± 0,52

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ^aDados analisados com comparação com grupo controle. ^b relação ao outro grupo tratado. por teste T de *Student* não pareado com pós teste de *Mann-Whitney*. significativos quando $p < 0,05$. M = Machos; F = Fêmeas; Cv-1 = alcaloide crotavitelina.

5.4.4 Avaliação de Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos

Em relação à análise bioquímica, não houve alterações significativas nos parâmetros AST, ALT e ureia. Entretanto, houve um aumento significativo na creatinina do grupo tratado fêmea com o Cv-1 (300 mg/Kg), quando comparado ao controle, Tabela 13, pág. 127.

Os compostos nitrogenados não protéicos (NPN) são formados no organismo como resultado do catabolismo de ácidos nucléicos, aminoácidos e proteínas. Concentrações elevadas dos principais componentes NPN (ureia, creatinina e ácido úrico) ocorrem como consequência da função renal reduzida. No músculo, a creatina é convertida em fosfocreatina,

que serve como uma fonte rica em energia. Sob condições fisiológicas, a creatina perde água espontaneamente, formando sua amida cíclica, creatinina. Uma vez formada, a creatinina não é reutilizada no metabolismo corporal e assim funciona exclusivamente como um produto de degradação (HENRY, 2008). A taxa de produção da creatinina está relacionada à massa muscular, à atividade muscular e à ingestão de creatina na carne, bem como à ingestão total de proteína; essas variáveis também interferem nas concentrações plasmáticas de creatinina (RAHN; HEIDENREICH; BRUCKNER, 1999). As elevações em cada uma das variáveis aumentam a creatinina plasmática, enquanto as reduções levam à concentração plasmática reduzida. A creatinina é excretada na circulação em uma taxa relativamente constante. Uma fração substancial da excreção da creatinina nos rins é resultado da secreção tubular proximal. A creatinina também é filtrada livremente pelos glomérulos, mas não é reabsorvida. A creatinina sérica elevada está associada com uma redução da taxa de filtração glomerular (HENRY, 2008). Existe uma variação diária relativamente pequena da creatinina em um indivíduo saudável, com variação média de aproximadamente 5% (KEEVIL et al., 1998). Portanto, pequenas alterações nos limiares de creatinina em um indivíduo servem como marcadores sensíveis de alterações na função renal se outras causas de alteração da creatinina puderem ser eliminadas (HENRY, 2008). Apesar de os resultados obtidos sugerirem uma possível toxicidade renal, a alteração observada encontra-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie.

Como células metabolicamente complexas, os hepatócitos contêm concentrações elevadas de inúmeras enzimas. Com a lesão hepática, estas enzimas podem extravasar para o plasma e podem ser úteis para o diagnóstico e monitoramento da lesão hepática. No hepatócito, as enzimas comumente medidas são encontradas em localizações específicas; o tipo de lesão hepática determina o padrão de alteração enzimática. As enzimas citoplasmáticas incluem a lactato desidrogenase (LDH), a aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). As enzimas mitocondriais, como a isoenzima mitocondrial da AST, são liberadas mediante o dano mitocondrial (HENRY, 2008). Os principais marcadores de lesão celular são as enzimas citoplasmáticas e mitocondriais, que não são específicas dos hepatócitos, e podem estar aumentadas com lesão em outros órgãos; todavia, as hepatopatias são a causa mais comum de elevação (HENRY, 2008). Como os resultados obtidos não mostraram alteração significativa nos níveis de AST e ALT, não há indício enzimático de comprometimento hepático. Entretanto, considerando que pode haver alterações histopatológicas em nível hepático mesmo na ausência de alterações bioquímicas, esses dados não excluem a possibilidade de toxicidade hepática. Portanto, investigações

adicionais, especialmente histopatológicas, são necessárias para identificar e caracterizar possíveis danos hepáticos produzidos por Cv-1, como sugerido através da alteração no índice desse órgão.

Tabela 13 – Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg, via oral) nos parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	Gênero	Dose (mg/Kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
Controle	M	--	201.3 ± 21.70	52.00 ± 15.70	52.00 ± 5.00	0.42 ± 0.12
Cv-1	M	50	185.0 ± 10.31	48.00 ± 10.76	51.20 ± 4.09	0.23 ± 0.01
Cv-1	M	300	182.8 ± 13.32	81.17 ± 16.89	42.67 ± 5.48	0.47 ± 0.06 ^b
Controle	F	--	136.5 ± 23.60	53.25 ± 13.47	52.60 ± 8.52	0.26 ± 0.02
Cv-1	F	50	117.2 ± 8.357	43.60 ± 11.72	35.20 ± 1.46	0.21 ± 0.02
Cv-1	F	300	158.2 ± 21.72	58.00 ± 9.93	40.50 ± 1.80	0.37 ± 0.03 ^{a,b}

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ^aDados analisados com comparação com grupo controle e em ^b relação ao outro grupo tratado por teste T de *Student* não pareado seguido por *Mann-Whitney*. Valores significativos quando $p < 0,05$. AST = Aspartato aminotransferase; ALT = Alanina Aminotransferase.

Em relação à avaliação hematológica, houve uma diminuição significativa na hemoglobina dos grupos tratados com 300 mg/Kg, apenas nas fêmeas, quando comparado ao controle, Tabela 14, pág. 127, caracterizando um quadro de anemia. De acordo com Kowach (1979), a anemia associada com doenças no fígado já foi relatada em muitas espécies de animais expostos cronicamente a esses alcaloides.

Tabela 14 – Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg, via oral) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	Gênero	Dose (mg/Kg)	Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)
Controle	M	--	9.41 ± 0.54	14.27 ± 0.97	54.20 ± 3.86
Cv-1	M	50	10.32 ± 0.37	16.42 ± 0.66	61.43 ± 2.11
Cv-1	M	300	9.69 ± 0.32	12.77 ± 0.38 ^b	55.23 ± 1.87
Controle	F	--	10.91 ± 0.61	15.44 ± 0.81	60.76 ± 2.46
Cv-1	F	50	9.73 ± 0.48	15.85 ± 0.54	56.92 ± 2.59
Cv-1	F	300	9.82 ± 0.27	12.77 ± 0.27 ^{a,b}	55.00 ± 1.92

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ^aDados analisados com comparação com grupo controle e em ^b relação ao outro grupo tratado por teste T de *Student* não pareado seguido por *Mann-Whitney*. Valores significativos quando $p < 0,05$.

Em relação tanto ao Volume Corpuscular Médio (VCM) quanto a Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média (CHCM), não houve alteração significativa nos grupos tratados machos e fêmeas em comparação aos seus respectivos grupo controle. Em relação à Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), houve uma diminuição significativa no grupo de camundongos machos tratados com a dose de 300 mg/Kg, Tabela 15, pág. 128.

Considerando que essas alterações observadas encontram-se dentro dos parâmetros de normalidade para a espécie e que se apresentam como alterações isoladas, independentes dos outros parâmetros complementares, considera-se que elas não apresentam importância clínica significativa.

Tabela 15 – Efeitos de Cv-1 (50 e 300 mg/Kg) nos parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos.

Grupos	Gênero	Dose (mg/Kg)	VCM (fm ³)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)
Controle	M	--	57,33 ± 1,61	15,20 ± 0,52	26,50 ± 1,27
Cv-1	M	50	59,50 ± 1,15	15,90 ± 0,23	26,72 ± 0,51
Cv-1	M	300	57,00 ± 1,69	13,20 ± 0,31 ^{a,b}	23,03 ± 0,43
Controle	F	--	55,80 ± 1,83	14,30 ± 1,03	25,52 ± 1,48
Cv-1	F	50	58,83 ± 1,28	16,42 ± 0,50	27,98 ± 0,89
Cv-1	F	300	56,00 ± 1,41	13,02 ± 0,28 ^b	23,27 ± 0,39 ^b

Dados estão apresentados como média ± erro padrão da média. ^a Dados analisados com comparação com grupo controle e em ^b relação ao outro grupo tratado por teste T de *Student* não pareado seguido por *Mann-Whitney*. Valores significativos quando p<0,05. VCM = Volume Corpuscular Médio; HCM = Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM = Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Conclusões



6. CONCLUSÕES

- ❖ Este trabalho atingiu o seu principal objetivo, fundamentado no isolamento e identificação dos constituintes químicos de espécies tóxicas do Semiárido paraibano, bem como sua contribuição ao conhecimento químico dos gêneros *Crotalaria* e *Ipomoea*;
- ❖ O estudo fitoquímico dos frutos e folhas de *Crotalaria vitellina* Ker Gawl levou ao isolamento de um alcaloide pirrolizidínico (AP) do tipo otonecina, descrito pela primeira vez na literatura, nomeado crotavitelina;
- ❖ O estudo fitoquímico da fase diclorometano de *Ipomoea philomega* (Vell.) House resultou no isolamento de dois triterpenos, um do tipo lanostano, o lanosterol, e um pentacíclico da série lupano, o lupeol, três compostos fenólicos, como o ácido caféico, o *p*-cumarato de etila e o cafeato de etila, as cumarinas umbeliferona, escopoletina e cumarina, muitos dos quais já descritos no gênero *Ipomoea*, porém descritos pela primeira vez na espécie em estudo;
- ❖ O Alcaloide Pirrolizidinico crotavitelina (Cv-1), isolado de frutos e folhas de *Crotalaria vitellina* Ker Gaw, apresentou baixa toxicidade nos parâmetros avaliados. Entretanto, estudos histopatológicos, especialmente em nível de tecido hepático, devem ser realizados para a investigação de possíveis efeitos tóxicos em nível celular e tecidual.

Referências



REFERÊNCIAS

- ABEGAZ, B., ATNAFU, G., DUDDECK, C., SNATZKE, G. Macrocyclic pyrrolizidine alkaloids of *Crotalaria rosenii*. **Tetrahedron**. v. 43. n. 14, p. 3263, 1987.
- ALMEIDA, R.N, FALCÃO, A.C.G.M., DINIZ, R.S.T, QUINTANS-JÚNIOR, L.J, POLARI, R.N, BARBOSA-FILHO, J.M, AGRA, M.F, DUARTE, J.C, FERREIRA, C.D, ANTONIOLLI, A.R, ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ARISAWA, M.; KINGHORN, A.D.; CORDELL, G.A.; FARNSWORT, N.R. Plant anticancer agents. XXIII. 6 α -Seneciolyloxychaparrin, a new antileukemic quassinoid from *Simaba multiflora*. **Journal of Natural Products**. v. 46, p. 218-221. 1983.
- ASRES, K., SPORER, F., WINK, M. Patterns of Pyrrolizidine Alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. **Biochemical and Systematics Ecology**. v.32, p. 915-930, 2004.
- ASSIS, T.S., MEDEIROS, R. M.T., RIET-CORREA, F., GALIZA J.N.G., DANTAS, A.F.M., OLIVEIRA, D. M. Intoxicações por plantas diagnosticadas em ruminantes e equinos e estimativa das perdas econômicas na Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n.1, p. 13-20, 2010.
- ATAL C.K, SAWHNEY RS. The pyrrolizidine alkaloids from Indian *Crotalaria*s. **Indian Journal of Pharmacology** , v. 35, p. 1-12, 1973.
- AWOUAFACK, M.D., SPITELLER, P., LAMSHOFT, M., KUSARI, S., IVANOVA, B., TANE, P., SPITELLER, M. Antimicrobial Isoprenyl-dihydrofuranoisoflavones from *Crotalaria lachnophora*. **Journal of Natural Products**. v. 74, p. 272-278, 2011.
- BABU, U.V., BHANDARI, S.P.S., GARG, H.S. Barbacarpan, a Pterocarpan from *Crotalaria barbata*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 8, p. 1457-1459, 1998.
- BAEK, M., CHO, J., LEE, D., AHN, E., JEONG, T., BAEK, N. Isolation of Triterpenoids from the Stem Bark of *Albizia julibrissin* and Their Inhibition Activity on ACAT-1 and ACAT-2. **Journal of the Korean Society for Applied Biological and Chemistry**. v. 53 n.3, p. 310-315, 2010.
- BARBOSA, R.C.; RIET-CORREA, F; LIMA, E.F.; MEDEIROS, R.M.T.; GUEDES, K.M.R.; GARDNER, D.R.; MOLYNEUX, R.J.; MELO, L.E.H. Experimental swainsonine poisoning in goats ingesting *Ipomoea sericophylla* and *Ipomoea ridelii* (Convolvulaceae). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 28, n.10, p. 409-414, 2007.
- BARBOSA-FILHO, J. M., LIMA, C. S. A., AMORIM, E. L. C , DE SENA, X. F.R., ALMEIDA, J. R. G.S, DA-CUNHA, E.V.L., SILVA, M.S., AGRA, M.F., BRAZ-FILHO, R. Botanical study, phytochemistry and antimicrobial activity of *Tabebuia aurea* (with 1 table & 1 figure). **Revista Internacional de Botânica Experimental**. 53º Aniversario. p. 221-228, 2004.
- BHACCA, N.S.; SHARMA, R.K.. Mucronatinine, a new alkaloid from *Crotalaria mucronata* Desv.-I. **Tetrahedron**. v.24, p. 6319-6326, 1968.

BHAKUNI, D.S., CHATURVEDI, R. Chemical constituents of *Crotalaria madurensis*. **Journal of Natural Products**. v. 47. n 4, p. 585-591, 1984.

BHATT, B. Chemical constituents of *Solanum xanthocarpum*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. v.3, n.3, p. 176-181, 2011.

BIEBER, L.W. , DA SILVA FILHO, A.A., LIMA, R.M.O., CHIAPPETA, A. A., NASCIMENTO, S.C., SOUZA, I.A., MELLO, J.F., VEITH, H.J. Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomoea bahiensis*. **Phytochemistry**. v. 25, n.5, p. 1077-1081, 1986.

BORTOLUZZI, R.L.C. CARVALHO-OKANO, R. M. de, GARCIA, F. C. P., TOZZI, A. M. G. de A. Leguminosae, Papilionoideae no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. II: árvores e arbustos escandentes. **Acta Botanica Brasilica**. v.18, n.1, p. 49-71, 2004.

BROWN, K., DEVLIN, J.A., and ROBINS, D. J. Globiferine, a pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria globifera*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 2, p. 457-459, 1984.

CARVALHO, M. G. de, ALVES, C. C.F., WERLE, A. A., BRAZ-FILHO, R. Metabólitos especiais isolados de *Lasaguea erecta* (Apocynaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.16, n.4, p. 497-500, 2006.

CHEEKE, P.R. **Natural Toxicants in Feeds, Forages, and Poisonous Plants**. 2nd ed. Interstate, Danville, Illinois. 479 p. 1998.

CHENG, D. LIU, Y., CHU, T.T. Assacadamine, a new pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria assamica*. **Journal of Natural Products**. v. 52, n.5, p. 1153-1155, 1989.

CHOUHAN, H. S. & SINGH, S. K. Antibacterial Activity of Seed and Flower Parts of *Crotalaria juncea* Linn. **American-Eurasian Journal of Scientific Research**. v.5 (3) p. 212-215, 2010.

COELHO, A. A. O. P. In: Diversidade e caracterização das Fanerógamas do Semiárido Brasileiro. GIULIETTI, A. M.; CONCEIÇÃO, A. A.; QUEIROZ, L. P., eds.; Instituto do Milênio do Semiárido, Editora APN, 2006, v. 1, p. 88.

COSTA, T.de O.G., ALMEIDA, R.A. de, KOOLEN, H.H.F., SILVA, F.M.A. da, PINTO, A.C. Constituintes químicos do caule de *Protium hebetatum* (Burseraceae). **Acta Amazonica**. v. 42, n. 4, p. 557-560, 2012.

CULVENOR, C.C.J. Pyrrolizidine alkaloids – occurrence and systematic importance in Angiosperms. **Botaniska Notiser**, v.131, p.473–486, 1978.

CULVENOR, C.C.J, SMITH, L.W. Alkaloids of *Crotalaria crispata* F. Muell. ex Benth., The Structures of Crispatine and Fulvine. **Australian Journal of Chemistry**. v.16, n. 2, p. 239 - 245, 1963.

D. CHENG, Y. LIU, T.T. CHU. **Journal of Natural Products**., v.52, n.5, 1153-1155, 1989.

DICKINSON J.O., Cooke M.P. & Mohamed P.A. Milk transfer of pyrrolizidine alkaloids in cattle. ***Journal of the American Veterinary Medical Association***. v.169, n. 2, p. 1192-1196. 1976.

FLETCHER, M. T., MCKENZIE, R. A., BLANEY, B. J., REICHMANN, K.G. Pyrrolizidine Alkaloids in *Crotalaria* taxa from Northern Australia: Risk to Grazing Livestock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v.57, p.311–319, 2009.

FLETCHER, M.T., HAYES, P.Y., SOMERVILLE, M.J., DE VOSS, J.J. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***. v.9, n.59, p.1888-92, 2011.

FLORES, A.S., MIOTTO STS. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria*. (Leguminosae-Faboideae) na Região Sul do Brasil. ***Acta Botanica Brasilica*** 19: 245-249. 2005.

FLORES, A.S., TOZZI, A. M.G.A. Phytogeographical patterns of *Crotalaria* species (Leguminosae-Papilionoideae) in Brazil. ***Rodriguesia***, v.59, n.3, p.477-486, 2008.

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***, v.37, p.459-469, 2009.

FRANCO, A.A. & FARIA, S.M. The contribution of N₂-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. ***Soil Biology and Biochemistry***. v.29, (5-6), p.897-903, 1997.

GALLO, M.B., SARACHINE, M.J. Biological activities of Lupeol. ***Internacional Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences***. v.3, n.1, p. 46-66, 2009.

GARAMBONE, E., ROSA, G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. ***Alim. Nutr.*** v.18, n.2, p. 229-235, 2007.

GASPARETTO, J.C., CAMPOS, F. R., BUDEL, J. M., PONTAROLO, R. *Mikania glomerata* Spreng. e *M. laevigata* Sch. Bip. ex Baker, Asteraceae: estudos agrônômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. ***Brazilian Journal of Pharmacognosy***. v.20, n.4, p. 627-640, 2010.

GODOY, M.P.F., VICTOR, S.R., BELLINI, A.M., GUERREIRO, G., ROCHA, W.C., BUENO, O.C., HEBLING, M.J.A., BACCI JÚNIOR, M., SILVA, M.F.G.F., VIEIRA, P.C., FERNANDES, J.B., PAGNOCA, F.C. Inhibition of the Symbiotic Fungus of Leaf-Cutting Ants by Coumarins. ***Brazilian Journal of Chemical Society***. v. 16, n. 3B, p. 669-672, 2005.

GOTTLIEB, H., LIMA, R.A., MONACHE, F. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of 6- and 7-Substituted Coumarins. Correlation with Hammett Constants. ***Journal of Chemistry Society. Perkin Transactions***. v.2, p. 435-437. 1979.

GRAYER, R.J., KOKUMBUM, T. Plant-fungal interactions: the search for phytoalexins and others antifungal compounds from higher plants. ***Phytochemistry***. v.56, p. 253-263, 2001.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). ***Toxicology***. v. 217 p. 213–220, 2006.

GUNN, C.R. Seed topography in the Fabaceae. **Seed Science Technology**. v. 9, p.737-757, 1981.

HARAGUCHI, M., GORNIK, S. L., IKEDA, K., MINAMI, Y., KATO, A., WATSON, A. A., NASH, R. J., MOLYNEUX, R.J., ASANO, N. Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). **Journal of Agricultural and Chemistry**. v. 51, p. 4995-5000, 2003.

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

HARBONE, J.B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in the plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 335-367, 1999.

HERRERA, M.A., SALAMANCA, C.P. & BAREA, J.M.. Inoculation of woody legumes with selected arbuscular mycorrhizal fungi and rhizobia to recover desertified mediterranean ecosystems. **Applied and Environmental Microbiology**. v.59 (1) p.129-133.1993.

HOFMANN, A. **Planta Medica**. v.12, p. 341-352, 1964.

HONÓRIO JÚNIOR, J.E.R., SOARES, P.M., MELO, C.L., ARRUDA FILHO, A.C.V. SENA FILHO, J.G., BARBOSA FILHO, J.M., SOUSA, F.C.F, FONTETES, M.M.F., LEAL, L.K.A, QUEIROZ, M.G.R., VASCONCELOS, S.M.M. Atividade farmacológica da monocrotalina isolada de plantas do gênero *Crotalaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20 (3) p. 453-458, 2010.

IJEOMA, U. F., ADERONKE, S. O., OGBONNA, O., AUGUSTINA, M. A., IFEYINWA, C. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of *Ipomoea involucrata* leaves in mice and rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. p.121-124, 2011.

IKEDA, K., KATO, A., ADACHI, I., HARAGUCHI, M., ASANO, N. Alkaloids from the Poisonous Plant *Ipomoea carnea*: Effects on Intracellular Lysosomal Glycosidase Activities in Human Lymphoblast Cultures. **Journal of Agricultural and Chemistry**. v. 51, p. 7642-7646, 2003.

JENNET-SIEMS, K., ALOGA, M. EICH, E. Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae. **Phytochemistry**. v.34, n.2, p. 437-440, 1993.

JENNET-SIEMS, K., SCHIMMING, T., KALOGA, M., EICH, E., SIEMS, K., GUPTA, M.P., WITTE, L., HARTMANN, T. Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species. **Phytochemistry**. v. 47, n.8, p. 1551-1560. 1998.

JEONG, C., JEONG, H. R., CHOI, G. N., Kim, D., LEE, U. and HE, H. J. Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from *Erigeron annuus* leaf. **Chinese Medicine**, v. 6, n.25, 2011

JUDD, W.S. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. [S. 1.] Sinauer Associates, USA, 1999.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F.; DONOGHUE, M.J. **Plant Systematics: a phylogenetic approach**. 2 Edition. Sinauer Associates, Sunderland, 2002.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

KATARIA, S., SHRIVASTAVA, B., KHAJURIA, R.K., SURI, K.A., SHARMA, P. Antimicrobial activity of *Crotalaria burhia* Buch.-Ham roots. **Indian Journal of Natural Products and Resources**. v. 1 (4), p. 481-484, 2010.

KEEVIL, B. G.; KILPATRICK, E. S.; NICHOLS, S. P.; MAYLOR, P. W. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. **Clinical Chemistry**, v. 44, p. 15-35, 1998.

KEMPF, M.; REINHARD, A.; BEUERLE, T. Pyrrolizidine alkaloids (PAs) in honey and pollen-legal regulation of PA levels in food and animal feed required. **Molecular Nutrition Food Research**, v.54, p.158-168, 2010.

KINGSBURY, C.A., LOOKER, J.H. Carnon-13 spectra of methoxyflavones. **Journal of Organic Chemistry**. v. 40, n.8, p. 1120-1124, 1974.

KO, H., WENG, J., TSAO, L., YEN, M., WANG, J., LIN, C. Anti-inflammatory flavonoids and pterocarpanoid from *Crotalaria pallida* and *C. assamica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 14, p. 1011-1014, 2004.

KOSOGOF C, TEPE JJ, WILLIAMS, RM. DNA cross-linking by a phototriggered pyrrolic progenitor developed from monocrotaline. **Tetrahedron Letters** v. 42, p. 6641-6643, 2001.

KOVACH, J. AMES, M.M., POWIS, G., et al. Toxicity and pharmacokinetics of a pyrrolizidine alkaloid, indicine N-oxide, in humans. **Cancer Research**. v. 39, p. 4540-4544. 1979.

LAMIDI, M., RONDI, M.L., OLIVIER, FAURE, R., EKEKANG, L.N., BALANSARD, G. Constituents of *Ipomoea fistulosa* leaves. **Fitoterapia**. v.71, p.203-204. 2000.

LEE, J.I., SON, H.S., PARK, H. an efficient synthesis of flavones from 2-hydroxybenzoic acids. **Bulletin of Korean Chemical Society**. v. 25, n.12, p. 1945-1947, 2004.

LEWIS, G.; SCHRINE, B.; MACKINDER, B. & LOCK, M. **Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 577. 2005.

LIMA, R.S. **Isolamento, determinação estrutural e atividades antitumoral e anti-inflamatória de triterpenos isolados de *Vochysia cinnamomea* (VOCHYSIACEAE)**. 2010. 88f. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Goiás, Goiânia, Goiás. 2010.

LIU, Z. and TIAN, X. The Components of *Cacalia tangutica*. **Bulletin. Korean of Chemistry Society**. v. 25, n. 7, 2004.

LUCENA, R. B., RISSI, D. R., MAIA, L. A., FLORES, M. M. DANTAS A. F. M., NOBRE, V. M. da T., RIET-CORREA, F., BARROS, C. S.L. Intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos e ruminantes e equinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 30, n.5, p.447-452, 2010.

LUE, Y. P., MU, Q., ZHENG, H. L. and LI, C. M. 24-Methylene tetracyclic triterpenes from *Polyalthia lancilimba*. **Phytochemistry**. v. 49, n. 7, p. 2053-2056, 1998.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ^{13}C NMR spectra of pentacyclitriterpenoids- a compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v. 37, p. 1517, 1994.

MAIA, G.L.A., **Estudo fitoquímico da espécie *Anadenanthera colubrina* var. *cebil* (Griseb.) Reis (Fabaceae)**. 2008. 154f. Tese (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba. 2008.

MATTOCKS, A.R. & NWANKWO- NWUDE. Pyrrolizidine alkaloids from *Crotalaria lachnosema* and *C. Naragutensis*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3289- 3291, 1988.

MATTOCKS, A.R. **Chemistry and Toxicology of Pyrrolizidine Alkaloids**. Academic Press, London, New York. 1986.

MAZID M., KHAN T.A, MOHAMMAD F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**. v.3 (2) Special Issue: 232-249. 2011.

MEDEIROS R.M.T, GÓRNIAC SL, GUERRA JL. Fetotoxicity and reproductive effects of monocrotaline in pregnant rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 69: 181-188, 2000.

MEIJUAN T., SIYUAN S., KAI W., XUEYING P., RUIHAN W., LIPING, L., SU Z., HUI Z., HUIDI J. Organic cation transporter 1 mediates the uptake of monocrotaline and plays an important role in its hepatotoxicity. **Toxicology**. Available online 3 July 2013,. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2013.06.009>. 2013.

MEIRA, M., da SILVA, E.P., DAVID, J.M., DAVID, J.P. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2011.

MEIRA, M.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; ARAÚJO, S.V.; Regis, T. L.; GIULIETTI, A. M.; de QUEIRÓZ, L. P. Constituintes químicos de *Ipomoea subincana* Meisn. (Convolvulaceae). **Química Nova**, v.31, n.4, 2008.

MOLYNEUX R.J., JAMES L.F., RALPHS M.H., PFISTER J.A., PANTER K.E. & NASH R.J. Polyhydroxy alkaloids glycosidase inhibitors from poisonous plants of global distribution: analysis and identification, p.107-112. In: **Colegate S.M. & Dorling P.R. (ed.) Plant Associated Toxins**. CAB International, Wallingford. 1994.

MONTANARI, C.A; BOLZANI, V.S. Planejamento nacional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24 (1) p.105-111, 2001.

NOBRE, V.M. da T., RIET-CORREA F., BARBOSA FILHO, J.M., DANTAS, A.F.M., TABOSA, I.M., VASCONCELOS, J.S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em equídeos no semiárido da Paraíba. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 24 (3) p. 132-143, 2004.

OECD Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method . **OECD Guideline for Testing of Chemicals**. Nº 423, 2001.

PACHECO, J. S, SILVA-LÓPEZ, R. E. S. Genus *Crotalaria* L. (Leguminosae). **Revista Fitos**. v.5, n.3, p. 43-52, 2010.

PAVIA, D.L., LAMPAM, G.M., KRIZ, G.S., VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. 4ª ed., São Paulo: Cenage Learning, 2010.

PEDROSO A.P. D., SANTOS, S. C., STEIL, A. A., DESCHAMPS F., BARISON, A., CAMPOS, F., BIAVATTI, M. W. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 18, n. 1, p. 63-69, 2008.

PERES, L.E.P. Metabolismo secundário. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, p.1-26.2004. Disponível em: <http://docentes.esalq.usp.br/lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>. Acesso em: Out. 2012.

PESSOA, C.R.M., MEDEIROS, R.M.T., RIET-CORREA, F. Importância econômica, epidemiologia e controle das intoxicações por plantas no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v.33, n. 6, p. 752-758, 2013.

POLHILL, R.M. Papilionoideae. In *Advances in legume systematics*. (R.M. Polhill & P.H. Raven, eds.). **Royal Botanical Gardens- Kew**, Part 1, p.191-204. 1981.

PRAKASH, A.O., DEHADRAI, S., JONATHAN, S. Toxicological studies on the ethanolic extract of *Crotalaria juncea* seeds in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p.167-176, 1995.

PRAKASH, A.S.; PEREIRA, T.N.; REILLY, P.E; SEAWRIGHT, A.A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research**, v.2, p.53-67, 1999.

QUEIROZ, L.P. **Leguminosas da Caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 467p. 2009.

RAHN, K. H.; HEIDENREICH, S.; BRUCKNER, D. How to assess glomerular function and damage in human. **Journal of Hypertension**, v. 17, p. 309-17, 1999.

RIBEIRO LR, SILVA AR, BAUTISTA AR, COSTA SL, SALES LA, RIOS AC, SALVADORI DM. Clastogenic effect of extracts obtained from *Crotalaria retusa* L. and *Crotalaria mucronata* Desv. on mouse bone marrow cells. **Mutation Research**. v.300, p. 253-258. 1993.

RIET-CORREA F. & MEDEIROS, R.M.T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 21, p.38-42. 2001.

RIET-CORREA F., MEDEIROS R.M.T. & DANTAS A.F.M.. **Plantas Tóxicas da Paraíba**. Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos, PB. Ed. SEBRAE/PB. 58p. 2006.

RIET-CORREA F., MÉNDEZ, M.C. **Introdução ao estudo das plantas tóxicas**. In: Riet-Correa F, Méndez M.C. & Schild A.L. (Eds). **Intoxicações por plantas e micotoxicoses em animais domésticos**. Pelotas: Hemisfério Sul, pp.1-20. 1993.

RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. Vol. II, 3ª ed. Santa Maria: Pallotti, 2007.

RIET-CORREA, F., BEZERRA, C.W.C. & MEDEIROS, R.M.T. **Plantas tóxicas do Nordeste**. INCT para o controle de plantas tóxicas. Patos, PB. 1ª ed. p. 82, 2011.

RIET-CORREA, F.; RIET-CORREA, G.; SCHILD, A.L. Importância do exame clínico para o diagnóstico das enfermidades do sistema nervoso em ruminantes e eqüídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.22, n.4, p.161-168, 2002.

ROCHA, L G.da, ARAGÃO, C.F.S., LOIOLA, M.I.B., BEZERRIL, R.A., PAIVA, N.R.F., HOLANDA, C.M.C.X de, BRITO, M.E.F. de. Evaluation of the leishmanicide action of etanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 19, n 1A, p. 51-56, 2009.

ROEDER, E. Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids. **Current Organic Chemistry**. v.3, p. 557-576, 1999.

SANTOS, L.F.L.; VASCONCELOS, I.M.; OLIVEIRA, J.T.A. Aspectos bioquímicos, estruturais e funcionais de uma lectina tóxica de *Ipomoea asarifolia*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.24, p.1-2, 2001.

SCHRODER, H.C.; MERZ, H., STEFFEN, R.; MULLER, W.F.G.; SARIN, P.S.; TRUMM, S.; SCHULZ, J.; EICH, E.Z. **Naturforsch**, v. 45, p. 1215-1221, 1990.

SCHOENTAL, R. Toxicology and Carcinogenic Action of Pyrrolizidine Alkaloids. **Cancer Research**. v.28, p. 2237-2246, 1968.

SCHULTZ, A. R. H. **Introdução à botânica sistemática**. 4. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 1984.

SHIN, Y., TAMAI, Y. AND TERAZAWA, M. Chemical Constituents of *Inonotus obliquus* I.: A new triterpene, 3 β -hydroxy-8,24-dien-lanosta-21 ,23-lactone from sclerotium. **Eurasian Journal of Forest Research**.v.1, pp. 43-50, 2000.

SIDDIQI, MUSHTAQ A., SURI, K.A., SURIT, OM P. , ATAL, C. K.. New pyrrolizidine alkaloids from *crotalaria candicans*. **Phytochemistry**. v. 18, p. 1413-1415. 1979.

SILVA, M.E.R.; FERNANDES, J.B.; da SILVA, M.F.G.F.; VIEIRA, P.C.; PAGNOCCA, F.C.; BUENO, O.C. Constituintes químicos de *Ipomoea batatas* (CONVOLVULACEAE). In: 30ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. **Anais...** Águas de Lindóia, São Paulo. 2007.

SOUZA, J.S.N.; MACHADO, L.L.; PESSOA, O.D.L, BRAZ-FILHO, R.; OVERK, C.R.; YAO, P.; CORDELL, G.A.; LEMOS, T.L.G. Pyrrolizidine Alkaloids from *Heliotropium indicum*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. vol.16 n.6. p. 1410-1414. 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2.Ed. Nova Odessa- SP, Instituto Plantarum, 2008.

STEFANOVIC S., KRUEGER L., AND OLMSTEAD, R.G. Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loci. **American Journal of Botany**. v.89(9): 1510–1522, 2002.

THOMAS HC, LAMÉ MW, DUNSTON SK, SEGALL HJ, WILSON DW. Monocrotaline pyrrole induces apoptosis in pulmonary artery endothelial cells. **Toxicology Applied Pharmacology**. v. 151: 236-244. 1998.

TOKARNIA, C.H., DÖBEREINER J. & PEIXOTO P.V. **Plantas Tóxicas do Brasil**. Editora Helianthus, Rio de Janeiro, p.215-221. 2000.

TUCKER, S.C. Floral developement in Legumes. **Plant Physiology**. v.131. p. 911-926, 2003.

VERDOORN, GERHARD H. and VAN WATT, BEN-ERIK. Pyrrolizidine alkaloids from seeds of *Crotalaria capensis*. **Phytochemistry**. v. l. 31, n. 1, p. 369-371, 1992.

VILLAGRA, A., ULLOA, N., ZHANG, X., YUAN,Z., SOTOMAYOR, E. SETO, E. Histone Deacetylase 3 Down-regulates Cholesterol Synthesis through Repression of Lanosterol Synthase Gene Expression. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 49, p. 35457–35470, 2007.

WIEDENFELD, H., ROEDER, E., BOURAUDEL, T., EDGAR, J. **Pyrrolizidine Alkaloids: Structure and Toxicity**. 1.Edition. V&R Unipress. Bonn University Press. Göttingen, Germany, 2008.

WILLIAMS MC, MOLYNEUX RJ 1987. Occurrence, concentration and toxicity of pyrrolizidine alkaloids in *Crotalaria* seeds. **Weed Science**. v. 35: 476-481.

WINK, M. MOHAMMED, G.I.A. Evolution of chemical defense traits in the Leguminosae: mapping of distribution patterns of secondary metabolites on a molecular phylogeny inferred from nucleotide sequences of the *rbcL* gene. **Biochemical Systematics and Ecology**. v.31, 897-917. 2003.

WOJCIECHOWSKI, M. F. Reconstructing the phylogeny of legumes (Fabaceae): an early 21st century perspective. **Advances in Legume Systematics**, B. B. Klitgaard and A. Bruneau (eds.), part 10, Higher level systematics, pp. 5-35. Royal Botanic Garden, Kew. 2003

WOJCIECHOWSKI, M.F., LAVIN, M. & SANDERSON, M.J.. A phylogeny of Legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *mat-K* gene resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**. V. 91: 1846-1862, 2004.

YOO, H. S., Ji LEE, S., KIM C. Y., KIM J. Flavonoids of *Crotalaria sessiliflora*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 27, n. 5, p.544-546, 2004.

ZHANG, X., GUO P., SUN, G., CHEN, S., YANG, M., FU, N., WU, H. and XU, X. Phenolic compounds and flavonoids from the fruits of *Pandanu stectorius* Soland. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 6, n.13, p. 2622-2626, 2012.

ANEXOS

Certificado de Aprovação do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 28 de maio de 2013.

CEUA Nº 0504/13

Ilmo(a). **MARCELO SOBRAL DA SILVA**

Departamento **CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - CCS - UFPB**

Orientando(a) : **DENISE ALINE CASIMIRO BEZERRA, (Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **27/05/13** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE CROTAVITELINA, UM ALCALÓIDE PIRROLIZIDÍNICO ISOLADO DE Crotalaria vitelina Ker Gawl.**

Com previsão de empregar **30 Camundongos SWISS Fêmeas;**
- ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **02/05/2013 a 15/06/2013**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuacbiotec/> – ceua@lff.ufpb.br

Structural elucidation and NMR assignments of a new pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria vitellina* Ker Gawl

Denise Aline Casimiro Bezerra,^a Josean Fechine Tavares,^{a*}
Paula Ferreira dos Santos,^a Marianna Vieira Sobral Castello Branco,^a
Maria de Fátima Agra,^a Fernanda Lima Subrinho,^a
Raimundo Braz-Filho^b and Marcelo Sobral da Silva^a

A new pyrrolizidine alkaloid, named *crotavitelin*, was isolated from fruits of *Crotalaria vitellina*, Fabaceae (Papilionoideae). The structure was established by spectroscopic techniques such as one-dimensional and two-dimensional NMR, IR, and MS. Copyright © 2013 John Wiley & Sons, Ltd.

Supporting information may be found in the online version of this article.

Keywords: ¹H NMR; ¹³C NMR; pyrrolizidine alkaloids; *Crotalaria vitellina*

Introduction

The genus *Crotalaria*, belongs to Fabaceae family, (subfamily Papilionoideae). The genus consists of about 600 species distributed in tropical and subtropical regions. Main diversity centers are in east and south east of Africa and India, besides two diversity centers in Mexico and Brasil.^[1] The species are rich in pyrrolizidine alkaloids (PAs), which are the principal toxins derived from plants that affect both animals and man.^[2,4] This work reports on structure elucidation for an unusual PA (Fig. 1), isolated from *Crotalaria vitellina*, and its NMR ¹H and ¹³C assignments using one-dimensional and two-dimensional techniques.

Results and Discussion

Compound 1 was obtained as an amorphous white powder with a melting temperature between 206 and 209 °C; (α)_D²⁰ +16.2 (c 0.001, CHCl₃). The HRESIMS showed a protonated molecular ion peak [M+H]⁺ at *m/z* 364.1763 compatible with the molecular formula C₁₉H₂₈NO₆ (calculated for C₁₉H₂₉NO₆, 364.1765). The IR spectrum gave absorptions at 1757, 1734, 1718, characteristic of a cyclopentanone carbonyl, a ketone carbonyl, α,β unsaturated seven-membered ring, and a carbonyl ester, respectively. The ¹³C NMR and Attached Proton Test spectra showed 19 signals corresponding to 19 carbon atoms, of which seven were assigned to quaternary carbons, three methine, five methylene, and four methyl carbons. The signals at δ_C 134.9, 134.7, 57.6, 53.0, 35.6, and 26.3, including the signal at δ_C 192.0 (this determined by HMBC), were compatible with the carbon skeleton of PAs (otonecine alkaloids), and they were attributed to C-1, C-2, C-3, C-5, C-6, C-7, and C-8, respectively.^[6] The ¹H NMR spectrum showed signal at 5.90 (br s, 1H) attributed to H-2.^[6] In the COSY spectrum was observed a correlation of H-2 with the signals at

δ_H 3.42 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H) and 3.14 (d, *J* = 18.9 Hz, 1H), confirming these chemical shifts for 2H-3. The chemical shifts observed at 5.34 (t, *J* = 3.5 Hz) correspond to H-7 in α configuration.^[6] In COSY, we observed this signal's correlation with signals at 2.38 (m, 1H), 1.90 (dq, *J* = 14.5, 3.5, 1H) corresponding to 2H-6. We also observed a correlation of 2H-6 with the signals at 2.88 and 2.68 (2H-5). In the ¹H NMR spectrum were observed signals at 5.16 (d, *J* = 11.5 Hz, 1H) and 4.39 (dt, *J* = 11.5 and *J* = 1.5 Hz, 1H), corresponding to 2H-9, δ_H 1.19 (s, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), and 0.99 (s, 3H) assigned to the methyl groups CH₃-8', CH₃-9', and CH₃-10' at 2.11 (s, 3H, N-Me). In the COSY spectrum, a correlation was observed of the signal at 0.98 (CH₃-9'), with those at 3.13 (H-3'), and 2.77 (dd, 19.0, 9.0), 1.83 (dd, 19.0, 11.5) attributed to 2H-4'. The chemical shift of H-3' (δ_H 3.13 m) can be justified by the anisotropic effect of the carbonyl group C-1', as it can be seen in Fig. 2.

The presence of quaternary carbons at δ_C 55.6 and 65.1, and the signals at δ_C 32.5, 42.0, and 211.6 inferred a connection of otonecine with the 10 carbon atoms unit as shown in the retrosynthetic proposal (Fig. 1). In the HMBC spectrum, we observed correlations between the signal at δ_C 134.9 with the hydrogens at δ_H 5.16, 4.39, and 5.90, confirming the assignments of C-2, C-3, and 2H-9. Correlations from δ_H 0.98 (CH₃-9'), to δ_C 32.5, and δ_C 42.0 attributed to C-3' and C-4', respectively, were

* Correspondence to: Josean Fechine Tavares, Universidade Federal do Paraná, Campus I, Castelo Branco, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil. E-mail: josean@ufpb.br

^a Departamento de Ciências Farmacéuticas, Universidade Federal do Paraná, 58051-970, João Pessoa, PB, Brazil

^b Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 28013-602, Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil

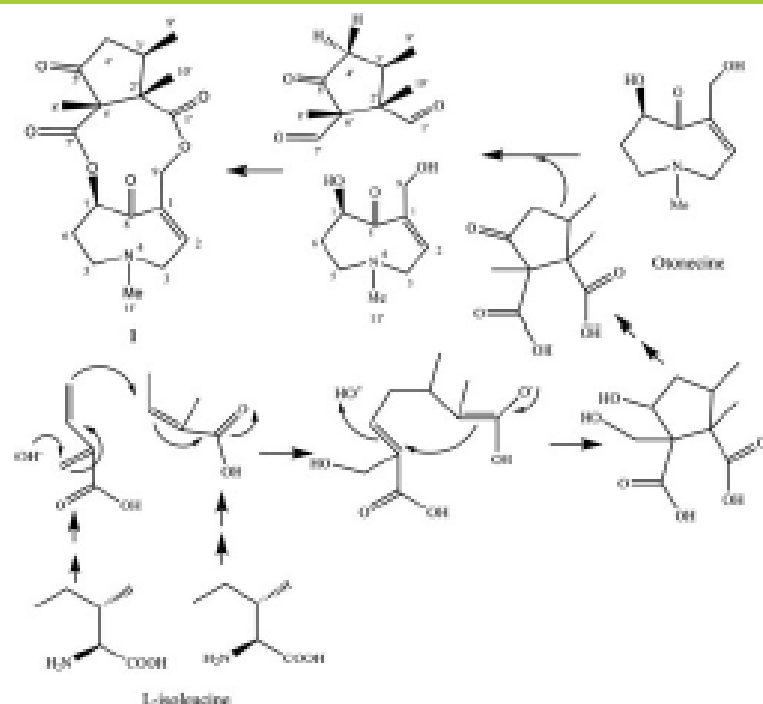


Figure 1. Structure and retrosynthesis postulated for compound 1.

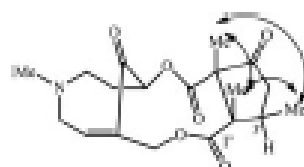


Figure 2. Key NOESY correlations observed for compound 1.

also observed. The signal δ_H 1.19 (CH_3 , 8) correlating with δ_C 169.8, 211.6, 65.1, and 55.6 confirmed the assignment to C-7', C-8', C-6', and C-2', respectively. Correlations from δ_H 0.99 (CH_3 , 10') to δ_C 55.6, 172.0 and 32.5 confirmed the connection between C-1'-C-2' and C-7'-C-6', forming cyclopentanone, an unusual moiety in PAs. The carbonyl group in position C-8 of the pyrrolidine unit was confirmed through the correlations from δ_H 5.16 (H-9) and 5.90 (H-2) to δ_C 192.0 assigned to C-8. The spectral data are compiled in Table 1. The relative configuration was determined by NOESY correlations (Fig. 2). After the NMR data analysis the assignment of all chemical shifts of compound 1, a new PA named *crotavitelin* was possible.

Experimental

General

The melting point was recorded with a Microquímica MQAPP-302 (Brazil by Microquímica Company) and not been corrected. IR spectra were recorded on a BOMEM MB 100 spectrophotometer. ^1H (500 MHz) and ^{13}C (125 MHz) NMR spectra were recorded on a VARIAN system spectrometer using CDCl_3 and $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$ with TMS as the internal standard. HRESIMS spectra were obtained with a Bruker Daltonics MicroTOF. The optical rotation was obtained using a Jasco

series P-2000 Polarimeter. Column chromatography with silica gel (Merck 0.063–0.20 mm); silica gel F254 was used as the preparative TLC, silica gel plates PF₂₅₄ 7749 (Merck) were used for analytical TLC, with visualization under UV (254 and 366 nm), or exposure to iodine vapor.

Plant material

C. vitellina Ker Gawl fruit was collected in Brazil, State of Paraíba, Municipality of Maturéia, Pico do Jabre, in June 2011, and the material was identified by Dra. Maria de Fátima Agra. A voucher specimen (Agra n° 5375 (JPB)) has been deposited at the *Lowry Pires Xavier Herbarium*, UFPB.

Extraction and isolation

Dry fruits of *C. vitellina* (500 g) were macerated using as solvent ethanol + NH_4OH (5%) for 72 h (for 3 times). Then, the solution was concentrated, and under reduced pressure, the crude extract was obtained. It (5.04 g) was subjected to silica gel CC eluted with hexane, dichloromethane, and methanol, pure or in binary mixture on increasing degree of polarity. From this procedure were obtained 159 fractions that were pooled in 12 groups according to its chromatographic profile on TLC.

The fraction group 43 to 44 (52 mg) was eluted from the column in hexane: ethyl acetate (6:4) and recrystallized in acetone to obtain the compound 1 (32 mg).

NMR data

A Varian system 500 spectrometer equipped with a 5 mm multinuclear, inverse detection probe was used to obtain all experimental results. CDCl_3 and $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$ (0.6 ml) with TMS as internal

Table 1. NMR spectroscopic data of **1**, **5** in parts per million, *J* in hertz

	HSQC*		HMBC*		¹ H in C ₆ D ₆ N
	δ _C	δ _H	² J _{CH}	³ J _{CH}	
1	134.9	—	2H-9	2H-3	—
2	134.7	5.90 (br s)	2H-3	2H-9	5.91 (br s)
3	57.6	3.42 (d, 18.9) 3.14 (d, 18.9)	H-2	H-6a, 3H-11'	3.23 (br d, 18.9) 2.94 (dd, 18.9, 2.5)
5	53.0	2.88 (dd, <i>J</i> = 12.5, 5.0, 3.5) 2.68 (dd, <i>J</i> = 12.5, 3.5)	H-6a	2H-3, 3H-11'	2.60 (m) 2.57 (m)
6	35.6	2.38 (m) 1.90 (dq, 14.5, 3.5)	H-5b	—	2.18 (m) 1.83 (m)
7	76.3	5.34 (t, 3.5)	—	2H-5	5.60 (t, 4.7)
8	192.0	—	—	H-2, H-6a	—
9	65.6	5.16 (d, 11.5) 4.39 (dt, 11.5, 1.5)	—	H-2	5.28 (d, 11.4) 4.62 (dt, 11.4, 1.2)
1'	172.0	—	—	2H-9, 3H-10'	—
2'	55.6	—	H-3', 3H-10'	2H-4', 3H-8'	—
3'	32.5	3.13 (m)	2H-4', 3H-9'	3H-10'	3.23 (m)
4'	42.0	2.77 (dd, 19.0, 9.0) 1.83 (dd, 19.0, 11.5)	—	3H-9'	2.89 (dd, 19.2, 8.9) 1.98 (dd, 19.2, 11.4)
5'	211.6	—	2H-4'	3H-9'	—
6'	65.1	—	3H-8'	3H-10'	—
7'	160.8	—	—	H-3', 3H-8'	—
8'	12.9	1.19 (s)	—	—	1.38 (s)
9'	12.3	0.98 (d, 6.5)	H-3'	—	0.88 (d, 6.8)
10'	14.6	0.99 (s)	—	H-3'	1.08 (s)
11'	40.4	2.11 (s)	—	2H-3, 2H-5	2.03 (s)

* Data in CDCl₃.

reference was used to dissolve compound **1**. Chemical shifts are reported in parts per million, and coupling constants (*J*) are expressed in hertz. The ¹H NMR data were acquired at 499.581 MHz with numbers of scans (NS) = 16, acquisition time (AT) = 4.000 s, relaxation time (RT) = 1.0 s, 45° pulse width = 4.55 ms, spectral width (SW) = 8012.83 Hz, line broadening (LB) = 0.0 Hz, and Fourier transform (FT) size = 32768. ¹³C NMR spectra were acquired at 125.632 Hz with NS = 50,000, AT = 1.0 s, RT = 1.0 s, 90° pulse width = 1.0 ms, SW = 30,487.8 Hz, line broadening (LB) = 1.0 Hz, and FT size = 32768. NOESY spectra were recorded using mixing times of 0.100, 0.250, and 0.500 s. The HSQC spectra were collected with NT = 64, NI = 512, and SWs of 17,101.3 (F2) and 3604.3 Hz (F1); the HMBC spectra were obtained with NT = 64, NI = 256, and SWs of 24,125.5 (F2) and 21,274.4 Hz (F1).

Crotavitelin

Amorphous white powder, mp: 206 to 209 °C; [α]_D²⁵ + 16.2 (c. 0.001, CHCl₃). HRESIMS (*m/z* + *H*)+, 364.1763 (calcd. for C₁₆H₂₅NO₆,

364.1765). IR in KBr ν_{max}/cm⁻¹: 1757, 1734, 1718. For ¹H and ¹³C NMR data, see Table 1).

Acknowledgements

The authors thank CNPq, CAPES, and FAPESQ-PB for the financial support, and the UMCA-Central Analytical UFPB and Federal University of Ceará (CENAUREM) for obtaining NMR spectra.

References

- [1] A. S. Flores, A. M. G. A. Tozzi, J. R. Trigo, *Biochem. Syst. Ecol.* **2009**, *37*, 459–469.
- [2] A. R. Mattos, *Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids*. Academic Press, London, **1986**.
- [3] P. P. Fu, Q. Xia, G. Lin, M. W. Chou, *Drug Metabol. Rev.* **2004**, *36*, 1–55.
- [4] M. T. Fletcher, P. Y. Hayes, M. J. Somerville, J. J. Voss, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1188–92.
- [5] D. Cheng, Y. Liu, T. T. Chu, *J. Nat. Prod.* **1999**, *52*, 1153–1155.