

**CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DE 3 ESPÉCIES DO GÊNERO *CROTALARIA* DO
CAMPUS DA CIDADE UNIVERSITÁRIA DA UFRJ**

Sabrina Teixeira Martinez

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Ciências em Química.

Orientadores:

Prof. Dr. Angelo da Cunha Pinto

Prof. Dr. Carlos Roland Kaiser

Rio de Janeiro

Abril de 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DE 3 ESPÉCIES DO GÊNERO *CROTALARIA* DO CAMPUS DA CIDADE UNIVERSITÁRIA DA UFRJ

Sabrina Teixeira Martinez

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Química Orgânica), orientada pelo Prof. Angelo da Cunha Pinto (IQ/UFRJ) e pelo Prof. Carlos Roland Kaiser (IQ/UFRJ).

Aprovada por

Angelo da Cunha Pinto – IQ/UFRJ (Presidente/Orientador)

Carlos Roland Kaiser - IQ/UFRJ (Orientador)

Maysa Furlan – IQ/UNESP (Membro)

Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro - FF/UFRJ (Membro)

Claudia Moraes de Rezende - IQ/UFRJ (Membro)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Luiz Carlos Dias pelo espaço cedido em seu laboratório para a realização das transformações químicas, apresentadas nesta dissertação.

A Leila Conegero pelo apoio na realização das transformações químicas, pelas dicas e pela motivação.

Ao Eduardo Miguez, do Instituto de Macromoléculas, ao Lab-RMN IQ-UFRJ e ao Laboratório de RMN da UNICAMP pela realização dos espectros de RMN.

Ao Alfredo Heleno de Oliveira pela ajuda na coleta e identificação das espécies de *Crotalaria*.

A Prof.^a Rosana Abreu Sica (*in memorian*) cujo incentivo e confiança em mim depositada foram essenciais para minha vinda ao Rio de Janeiro.

A Prof.^a Cláudia M. Rezende e a todos os alunos dos laboratórios 621 e 626 do IQ-UFRJ. Obrigada pela receptividade, pelos momentos de descontração, pela preocupação e demonstração de carinho.

Aos meus pais, Eliana e Gelson, por saberem me fazer sorrir mesmo tão distantes e, apesar da saudade, me incentivarem para realização de meus sonhos.

Ao Prof. Angelo da Cunha Pinto, pela amizade, pelas goiabas, pelas cervejas, e pelo tempo que dedicou a nossas valiosas discussões científicas.

A FAPERJ pelo apoio financeiro.

Resumo

A presente dissertação descreve o isolamento e a identificação estrutural dos alcaloides monocrotalina das sementes de *Crotalaria retusa*, senecionina das sementes de *C. incana* e do flavonoide 7-O- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosídeo apigenina das sementes de *C. pallida*. Estas substâncias tiveram suas estruturas determinadas por técnicas de RMN ^1H e ^{13}C em uma e duas dimensões e por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas. Convém frisar que o flavonoide devido a sua natureza estrutural não foi analisado por CG-EM, e que a estrutura da senecionina foi proposta somente com base em fragmentações no espectro de massas e por comparação com os dados disponíveis no banco de espectros Wiley.

A monocrotalina foi hidrolisada para retronecina, a qual através das seguintes transformações químicas: diidroxilação com tetróxido de ósmio, hidrogenólise utilizando H_2 e Pd/ C 10 % e epoxidação com ácido *meta*-cloro perbenzoico produziram o (1*R*, 2*R*, 7*R*, 8*S*)-1-hidroximetil-1,2,7-tri-hidróxi-2,3,5,6,7,8-hexaidropirrolizidina, o retronecanol e o *N*-óxido- α -1,2-epóxido da retronecina, respectivamente. Todos estes derivados de retronecina foram obtidos com bons rendimentos e tiveram suas estruturas determinadas por RMN ^1H e ^{13}C em uma e duas dimensões e por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, com exceção do tetrol, que não pode ser analisado por CG dado a sua baixa volatilidade.

ABSTRACT

This work describes the isolation, identification and the structural determination of the monocrotaline alkaloid obtained from the seed of *Crotalaria retusa*, senecionine alkaloid from the seeds of *C. incana* and of the flavonoid apigenin-7-*O*- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopyranoside from the seeds of *C. pallida*. The structures of these compounds were established by one and two-dimensional NMR spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Due to low volatility the flavonoid apigenin-7-*O*-(α)-D-galactopyranosyl-(1-2)-(β)-D-glucopyranoside was not analyzed by GC-MS.

The structure of the senecionine alkaloid was proposed based only on GC-MS and by comparison with Wiley bank data.

Monocrotaline was hydrolyzed to retronecine, which suffered dihydroxy-addition with osmium tetroxide, hydrogenolysis in the presence of Pd/C (10%) and epoxidation with *m*-chloroperbenzoic acid (*m*-CPBA). These reactions yielded (1*R*, 2*R*, 7*R*, 8*S*)-1-hydroxymethyl-2,3,5,6,7,8-hexahydropyrrolizidine-1,2,7-Triol, retronecanol and (1*R*, 2*R*, 7*R*, 8*S*)-1 α , 2 α -epoxide retronecine *N*-oxide, respectively. All retronecine derivatives were obtained in good yields and had their structures established by GC-MS and by one and two-dimensional NMR experiments, except for tetrol that was not analysed by GC-MS due to low volatility.

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Esquemas.....	xi
Lista de Tabelas.....	xiii
Lista de Símbolos e Abreviaturas.....	xiv
 1- Introdução.....	 1
1.1 - Plantas do Gênero <i>Crotalaria</i>	2
1.2 - Alcaloides Pirrolozidínicos.....	3
1.3 - Biossíntese, distribuição e “turnover” de alcaloides pirrolizidínicos.....	6
1.4 - Ecologia Química.....	10
1.5 - A Busca de Alcaloides pirrolozidínicos com atividade anti-HIV.....	15
 2 – Objetivos.....	 16
 3 - Resultados e Discussão.....	 18
3.1 – Coleta das plantas, extração e partição ácido-base.....	19
3.2 - Isolamento das substâncias.....	21
3.2.1 - Monocrotalina: Alcaloide pirrolizidínico de <i>C. retusa</i>	21
3.2.2 - Senecionina: Alcaloide pirrolizidinico de <i>C. incana</i>	27
3.2.3 - Flavonoide de <i>C. pallida</i>	30
3.3 - Transformações Químicas.....	32
3.3.1 - Hidrólise alcalina da monocrotalina: obtenção da retronecina.....	32
3.3.2 - Reação de diidroxilação da retronecina.....	39
3.3.3 - Reação de Hidrogenólise da retronecina: obtenção do retronecanol.....	49

3.3.4 - Reação de Epoxidação da retronecina.....	59
4 - Conclusões e perspectivas.....	64
5 - Parte Experimental.....	67
5.1 - Instrumentação.....	68
5.2 - Coleta do Material.....	69
5.3 - Obtenção do extrato de <i>C. retusa</i>	69
5.3.1 - Fracionamento ácido-base do extrato de <i>C. retusa</i>	69
5.4 - Obtenção do extrato de <i>C. incana</i>	70
5.4.1 - Fracionamento ácido-base do extrato de <i>C. incana</i>	70
5.4.2 - Coluna cromatográfica do material da fração de pH 9 do fracionamento ácido-base do extrato de <i>C. incana</i>	71
5.5 - Obtenção do extrato de <i>C. pallida</i>	72
5.5.1 - Fracionamento ácido-base do extrato de <i>C. pallida</i>	72
5.5.2 - Coluna cromatográfica do extrato de <i>C. pallida</i>	72
5.6 - Hidrólise alcalina da monocrotalina.....	73
5.7 - Reação de Diidroxilação da retronecina.....	74
5.8 - Reação de Hidrogenólise da retronecina.....	75
5.9 - Reação de Epoxidação da retronecina.....	75
6 – Espectros.....	77
7 - Referências.....	94

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura do [3,3,0] azabiciclo octano.....	3
Figura 2: Exemplos de bases necinas.....	4
Figura 3: Estrutura química do ácido monocrotálico. Ácido néico que esterifica a monocrotalina.....	4
Figura 4: Estrutura geral para alcaloides pirrolizidínicos monoesterificados (A), diesterificados acíclicos (B) e diesterificados cíclicos (C).....	4
Figura 5: (A) lasiocarpina, alcaloide diesterificado acíclico; (B) heliotridina, alcaloide monoesterificado; (C) monocrotalina, alcaloide diesterificado macrocíclico.....	5
Figura 6: Ornitina (1), putrescina(2) e arginina(3).....	7
Figura 7: Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos em brotos de plantas de <i>C. officinale</i> marcadas com ^{14}C -putrescina.....	9
Figura 8: Estrutura do feromônio Hidroxidanaidal.....	11
Figura 9: Produção dos alcaloides de insetos.....	13
Figura 10: Metabólitos secundários ativos contra a enzima transcriptase reversa. (A) Iridoide fulvoplumierina, (B) alcaloide fenantridínico cloridrato de fagaronina, (C) polifenol do ácido tânico.....	14
Figura 11: Alcaloides indolizidínicos com atividade anti-HIV.....	15
Figura 12: Estrutura da retronecina (7) e da monocrotalina (8).....	17
Figura 13: Estrutura dos alcaloides indolizidínicos castanospermina (9) e swansonina (10).....	17
Figura 14: Imagens de <i>C. retusa</i> (A), <i>C. pallida</i> (B) e <i>C. incana</i> (C).....	19
Figura 15: Estrutura química da monocrotalina com a respectiva numeração.....	21
Figura 16: Estrutura química tridimensional da monocrotalina.....	22
Figura 17: Correlações $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ – COSY observadas na monocrotalina.....	24
Figura 18: Espectro de massas da monocrotalina.....	25
Figura 18: Alcaloide pirrolizidínico senecionina, isolado de <i>C. incana</i>	27
Figura 20: Espectro de massas do alcaloide senecionina.....	28

Figura 21: Estrutura do flavonoide 7- <i>O</i> - α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosídeo apigenina.....	30
Figura 22: Espectro de RMN ^1H da retronecina (300 MHz, solvente CDCl_3)	34
Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C da retronecina (75 MHz, solvente CDCl_3)	34
Figura 24: Espectro de massas da retronecina.....	36
Figura 25: Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico (1 <i>R</i> , 2 <i>R</i> , 7 <i>R</i> , 8 <i>S</i>)-1-hidroximetil-1,2,7-tri-hidróxi-2,3,5,6,7,8-hexaidropirrolizidine.....	42
Figura 26: Correlações encontradas no COSY para o tetrol.....	44
Figura 27: Espectro de RMN ^1H do tetrol (300 MHz, solvente CD_3OD)	44
Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C do tetrol (75 MHz, solvente D_2O)	45
Figura 29: Estrutura espacial do tetrol apresentada por diferentes ângulos.....	46
Figura 30: Estrutura química determinada por difração de Raio-X da retrorsina (A), rosmarinina (B) e monocrotalina (C)	47
Figura 31: Conformações da retronecina. (A) Conformação <i>exo</i> determinada por difração de Raio-X; (B) Conformação <i>exo</i> rígida em função da ligação H (11') e O (10); (C) conformação <i>endo</i>	48
Figura 32: Cromatograma de íons totais do produto de redução da retronecina.....	49
Figura 33: (A) retronecanol com a metila na orientação β , (B) retronecanol com a metila na orientação α	50
Figura 34: Correlações encontradas no COSY para o retronecanol.....	51
Figura 35: Espectro de RMN ^1H do retronecanol (300 MHz, solvente CDCl_3)	51
Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C do retronecanol (200 MHz, solvente CDCl_3) ...	52
Figura 37: Estrutura espacial do Retronecanol vista por diferentes ângulos.....	54
Figura 38: Espectro de massas do retronecanol.....	55
Figura 39: Estrutura química da platinecina.....	56
Figura 40: Espectro de massas da platinecina.....	57
Figura 41: (A) <i>N</i> -óxido- α -1,2-epóxido da retronecina; (B) <i>N</i> -óxido- β -1,2-epóxido da retronecina.....	60

Figura 42: Estrutura obtida por difração de Raio-X para a α -1,2-epóxi-retronecina.....	62
Figura 43: Espectros de RMN de ^1H da monocrotalina (A) e expansões (B) e (C) (CDCl_3 , 300 MHz).....	78
Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C da monocrotalina (CDCl_3 , 75 MHz).....	79
Figura 45: Espectro HMQC da monocrotalina (CDCl_3 , 300 MHz).....	79
Figura 46: Espectro HMBC da monocrotalina (CDCl_3 , 300 MHz).....	80
Figura 47: Espectro COSY da monocrotalina (CDCl_3 , 300 MHz).....	80
Figura 48: Espectro NOESY da monocrotalina (CDCl_3 , 300 MHz).....	80
Figura 49: Espectro de massas da monocrotalina.....	81
Figura 50: Espectro de RMN de ^1H da retronecina (A) e expansões (B) e (C) (300 MHz, CDCl_3).....	82
Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C da retronecina (75 MHz, CDCl_3).....	83
Figura 52: Espectro de massas da retronecina.....	83
Figura 53: Espectro de RMN de ^1H do tetrol (A) e ampliações (B) e (C) (300 MHz, CD_3OD).....	84
Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C do tetrol (75 MHz, D_2O).....	85
Figura 55: Espectro HMQC do tetrol (300 MHz, D_2O).....	85
Figura 56: Espectro HMBC do tetrol (300 MHz, D_2O).....	86
Figura 57: Espectro COSY do tetrol (300 MHz, D_2O).....	86
Figura 58: Espectro NOESY do tetrol (300 MHz, D_2O).....	87
Figura 59: Espectro de RMN de ^{13}C do retronecanol (50 MHz, CDCl_3).....	87
Figura 60: Espectro de RMN de ^1H do retronecanol (A) e ampliações(B) e (C) (300 MHz, CDCl_3).....	88
Figura 61: Espectro HMQC do retronecanol (300 MHz, CDCl_3).....	89
Figura 62: Espectro HMBC do retronecanol (300 MHz, CDCl_3).....	89
Figura 63: Espectro COSY do retronecanol (300 MHz, CDCl_3).....	89
Figura 64: Espectro NOESY do retronecanol (300 MHz, CDCl_3).....	90

Figura 65: Espectro de massas do retronecanol.....	x
Figura 66: Espectro de massas da platinecina.....	91
Figura 67: Espectro de RMN de ^{13}C do <i>N</i> -óxido- α -1,2-epóxido da retronecina (125 MHz, CD_3OD).....	91
Figura 68: Espectro de RMN de ^1H do <i>N</i> -óxido- α -1,2-epóxido da retronecina (A) e ampliação (B) (500 MHz, CD_3OD).....	92
Figura 69: Espectro de RMN ^{13}C do flavonoide (300 MHz, DMSO).....	93
Figura 70: Espectro de RMN ^1H do flavonoide (300 MHz, DMSO).....	93

Lista de Esquemas

Esquema 1: Rota alternatina para formação de putrescina. PLP= coenzima piri- doxal fosfato.....	7
Esquema 2: Rota biossintética dos alcaloides pirrolizidínicos.....	8
Esquema 3: Formação de feromônios em insetos a partir de alcaloides pirrolizidínicos.....	12
Esquema 4: Marcha utilizada para a obtenção de alcaloides pirrolizidínicos	20
Esquema 5: Formação do fragmento de m/z 236 derivado da monocrotalina	25
Esquema 6: Formação do fragmento de m/z 120 derivado da monocrotalina	26
Esquema 7: Formação dos fragmentos de m/z 93 e m/z 136 derivados da monocrotalina.....	26
Esquema 8: Formação do fragmento de m/z 220 derivado da senecionina.....	28
Esquema 9: Formação dos fragmentos de m/z 136 e m/z 93 derivados da senecionina	29
Esquema 10: Formação do fragmento de m/z 120 derivado da senecionina.....	29
Esquema 11: Hidrólise da monocrotalina.....	32
Esquema 12: Formação dos íons de m/z 80, 94 e 111 derivados da fragmentação da retronecina	36
Esquema 13: Formação do fragmento m/z 80 derivado da retronecina.....	37

Esquema 14: Formação do fragmento de m/z 94 da retronecina.....	38
Esquema 15: Reação de dihidroxilação da retronecina	39
Esquema 16: Mecanismo de oxidação com tetróxido de ósmio.....	39
Esquema 17: Esquema geral para obtenção do tetrol	40
Esquema 18: Reações realizadas por Nieto-Alvarez e colaboradores. Reagentes e condições: a) TsCl, piridina, 5 °C, 72 h, 95 %; b) piridina, refluxo, 45 %; c) KOH/MeOH, refluxo; d) Ac ₂ O, refluxo, 30 min, 85 %; e) NMO/OsO ₄ (cat), t.a., acetona/água 3:1, 45 min.; f) K ₂ CO ₃ /MeOH, t.a., 65 %.....	43
Esquema 19: Hidrogenação da retronecina	49
Esquema 20: Síntese do retronecanol	53
Esquema 21: Formação dos íons de m/z 97 e m/z 82 derivados da fragmentação do retronecanol.....	56
Esquema 22: Formação dos íons de m/z 82, 99 e 113 derivados da fragmentação da platinecina	58
Esquema 23: Reação de epoxidação da retronecina.....	59
Esquema 24: Formação do <i>N</i> -óxido da retronecina	59
Esquema 25: Formação do epóxido.....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1: Comparação dos dados de RMN da monocrotalina (8) com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C deste alcaloide descritos na literatura .	23
Tabela 2: Dados de RMN ^{13}C e ^1H do flavonoide	31
Tabela 3: Comparação dos dados de RMN do produto da reação de hidrólise da monocrotalina com os dados da literatura de RMN de ^1H e ^{13}C da retronecina.....	33
Tabela 4: Tabela de deslocamentos químicos do produto de hidroxilação.	40
Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H do tetrol*.	43
Tabela 6: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H do retronecanol. (Solvente: CDCl_3)	50
Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C do produto de hidrogenólise e do produto sintetizado por Pandey & Chakrabarti.	53
Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C do produto de epoxidação da retronecina com <i>m</i> -CPBA e da literatura.....	61
Tabela 9: Dados de RMN de ^1H do produto de epoxidação da retronecina com <i>m</i> -CPBA e da literatura.....	61
Tabela 10: Eluentes e frações da coluna cromatográfica do material da fração de pH 9 do fracionamento ácido-base do extrato de <i>C. incana</i>	71
Tabela 11: Eluentes e frações da coluna cromatográfica do extrato obtido de <i>C. pallida</i>	73

Lista de Símbolos e Abreviaturas

δ	Deslocamento químico
CCF	Cromatografia em camada fina
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i> ($^1\text{H} \times ^1\text{H}^3J$)
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Connectivity</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
m	Multipeto
<i>m</i> -CPBA	<i>m-chloroperbenzoic acid</i> (Ácido <i>meta</i> -cloro perbenzóico)
MHz	Megahertz
m/z	Relação massa por carga
NMO	<i>N</i> -metilmorfolina
NOESY	Espectroscopia de Efeito Nuclear de Overhouser
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Parte por milhão
q	Quarteto
RMN ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H
s	Sinpleto
sl	Sinpleto largo
t	Tripleto
tr	Tempo de Retenção

FICHA CATALOGRÁFICA

Martinez, Sabrina Teixeira

Constituintes químicos de 3 espécies do gênero *crotalaria* do campus da cidade universitária da UFRJ / Sabrina Teixeira Martinez. - Rio de Janeiro: UFRJ/ IQ, 2009.

iii, 98f.: il.

Orientadores: Angelo da Cunha Pinto e Carlos Roland Kaiser Dissertação (mestrado) – UFRJ/ IQ/ Programa de Pós-graduação em Química, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 95-98.

1. *crotalaria*. 2. gênero. I. Pinto, Angelo da Cunha; Kaiser, Carlos Roland. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Pós-graduação em Química. III. Título.

1.1 - Plantas do Gênero *Crotalaria*:

Existem cerca de 700 espécies do gênero *Crotalaria* L. Este é um dos maiores gênero da família Fabaceae/Leguminosae. Estas espécies estão distribuídas nos trópicos e subtrópicos do planeta. O centro de maior diversidade é na África tropical, onde estão concentrados cerca de 400 espécies (DOS SANTOS, 2007). Plantas pertencentes a este gênero são encontradas principalmente nos trópicos e subtrópicos da África, América, Ásia e Austrália. Na Etiópia são encontradas 85 espécies de *Crotalaria*. Cerca de 15 destas espécies são endêmicas no país, as restantes ocorrem em outros países tropicais, principalmente da África (ASRES; SPORER; WINK, 2004).

No continente americano ocorrem 71 espécies, estendendo-se desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina e o Uruguai, sendo o México e o Brasil os países com maior concentração de espécies do gênero. No Brasil foram descritas 31 espécies de *Crotalaria* (FILLIETTAZ, 2002; FLORES; MIOTTO, 2005; JACOBI; RAMALHO; SILVA, 2005).

Estas plantas possuem considerável plasticidade, adaptando-se a diferentes condições ambientais e sobrevivendo em solos com poucos nutrientes. Podem ocorrer em variados tipos de habitat, como áreas próximas a rios, morros litorâneos, restingas, orla de matas, campos e cerrados. São ditas plantas rústicas, pois crescem em solos secos, arenosos, cascalhentos e até mesmo em áreas arenosas de região costeira. As espécies são oportunistas, ocorrendo comumente no Brasil, em locais alternados como margem de estradas e como invasoras de culturas (FLORES; MIOTTO, 2005; <http://cnpab.embrapa.br/publicacoes/leguminosas/crotalar-ias.html>, 2008). Por serem plantas invasoras, as Crotalarias são facilmente encontradas em plantações de grãos e em pastagens (BARRETO *et al*, 2006).

O nome *Crotalaria* é relacionado com o gênero *Crotalus*, porque o som emitido pela cauda das cascavéis, cobras deste gênero, é semelhante ao som produzido pelas vagens secas das plantas quando sacudidas. (FILLIETTAZ, 2002; <http://cnpab.embrapa.br/publicacoes/leguminosas/crotalaria.html>, 2008). Em inglês recebe o nome de “rattlepod” ou “rattlebox”, cujo significado é semelhante ao mencionado acima (“rattle” = chocalho, matraca; “pod” = vagem; “box” = caixa). Em consequência disto, as Crotalarias são conhecidas popularmente por apelidos como chocalho, guizo de cascavel e matraca (CORRÊA, 1926-1952; FILLIETTAZ, 2002;).

As espécies de *Crotalaria* são plantas herbáceas com cerca de 50 centímetros de altura, ou arbustos com até 3 metros de altura, com folhas digitado-foliadas (que tem forma de dedo), unifoliadas ou simples. As flores geralmente são amarelas, às vezes estriadas com vermelho, dispostas em racemos (cachos) vistosos (FLORES; MIOTTO, 2005; <http://cnpab.embrapa.br/publicacoes/leguminosas/crotalaria.html>, 2008).

1.2 - Alcaloides Pirrolizidínicos:

Os Alcaloides pirrolizidínicos constituem uma classe de produtos naturais com aproximadamente 200 exemplos conhecidos. Estima-se que 3% das plantas do mundo contenham alcaloides pirrolizidínicos. Estes metabólitos ocorrem principalmente em plantas do gênero *Senecio* (Compositae), *Crotalaria* (Leguminosae) e *Heliotropium* (Boraginaceae) (ROBINS, 1989).

A maioria dos alcaloides pirrolizidínicos é formada pela união de aminoálcoois com um ou dois ácidos carboxílicos alifáticos. Os aminoálcoois, também chamados necinas, são derivados da pirrolizidina, [3,3,0] azabicyclo octano (Figura 1).

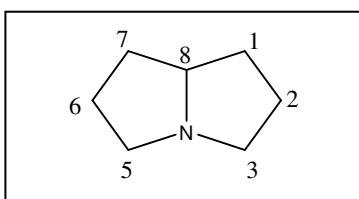


Figura 1: Estrutura do [3,3,0] azabicyclo octano.

A configuração em 8 pode ser tanto α quanto β , e a posição 7 pode ou não ser hidroxilada. Quando há uma hidroxila em C-7 trata-se de 1-hidroximetil pirrolizidinas ou de 1-hidroximetil 1- deidro, 2-pirrolizidinas (BRUNETON, 1991).

As bases necinas (Figura 2) diferem quanto ao grau de hidroxilação, estereoquímica dos substituintes e grau de insaturação do anel (ROBINS, 1989).

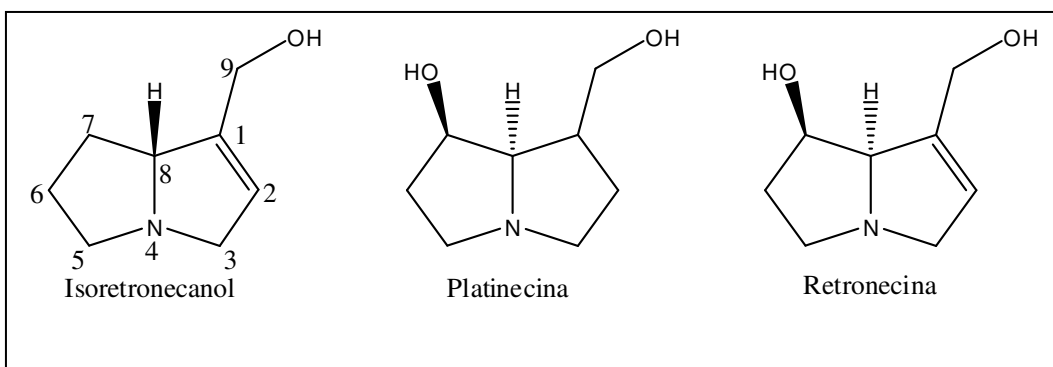


Figura 2: Exemplos de bases necinas.

Existem diferentes possibilidades de união do ácido néico (Figura 3) com o aminoálcool. Podem-se formar monoésteres ou diésteres de ácidos carboxílicos (Figura 4).

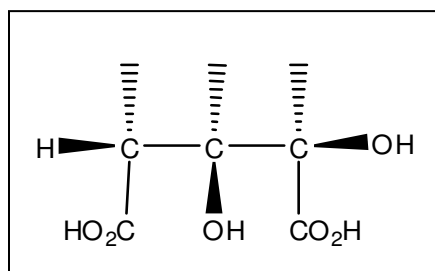


Figura 3: Estrutura química do ácido monocrotálico. Ácido néico que esterifica a monocrotalina.

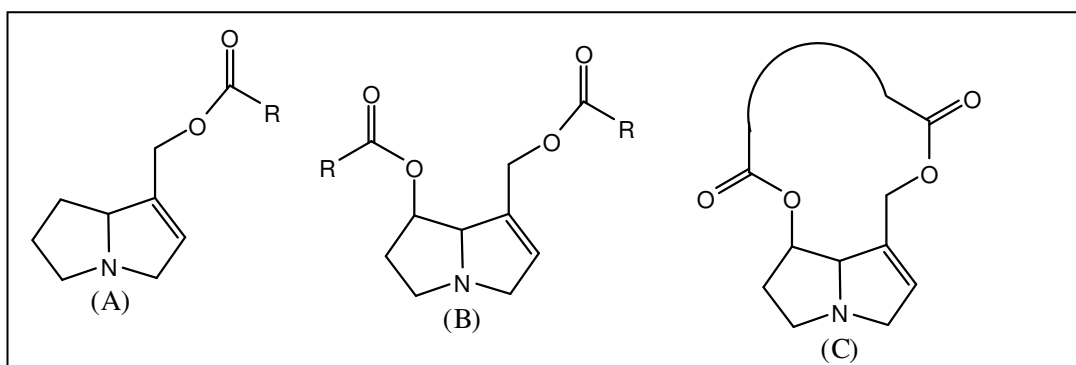


Figura 4: Estrutura geral para alcaloides pirrolizidínicos monoesterificados (A), diesterificados acíclicos (B) e diesterificados cíclicos (C).

Diésteres macrocíclicos são formados quando um ácido dicarboxílico esterifica a base necina nas posições C-7 e C-9 formando um anel macrocíclico de 11 membros ou mais. Por exemplo, a monocrotalina (Figura 5) tem 11 membros. Nestes casos, o ácido nécico que esterifica a base necina contém de 5 a 10 átomos de carbonos que diferem quanto ao grau de ramificação da cadeia, o número de hidroxilas e o grau de insaturação (ROBINS, 1989; BRUNETON, 1991; SIMÕES *et al*, 2004).

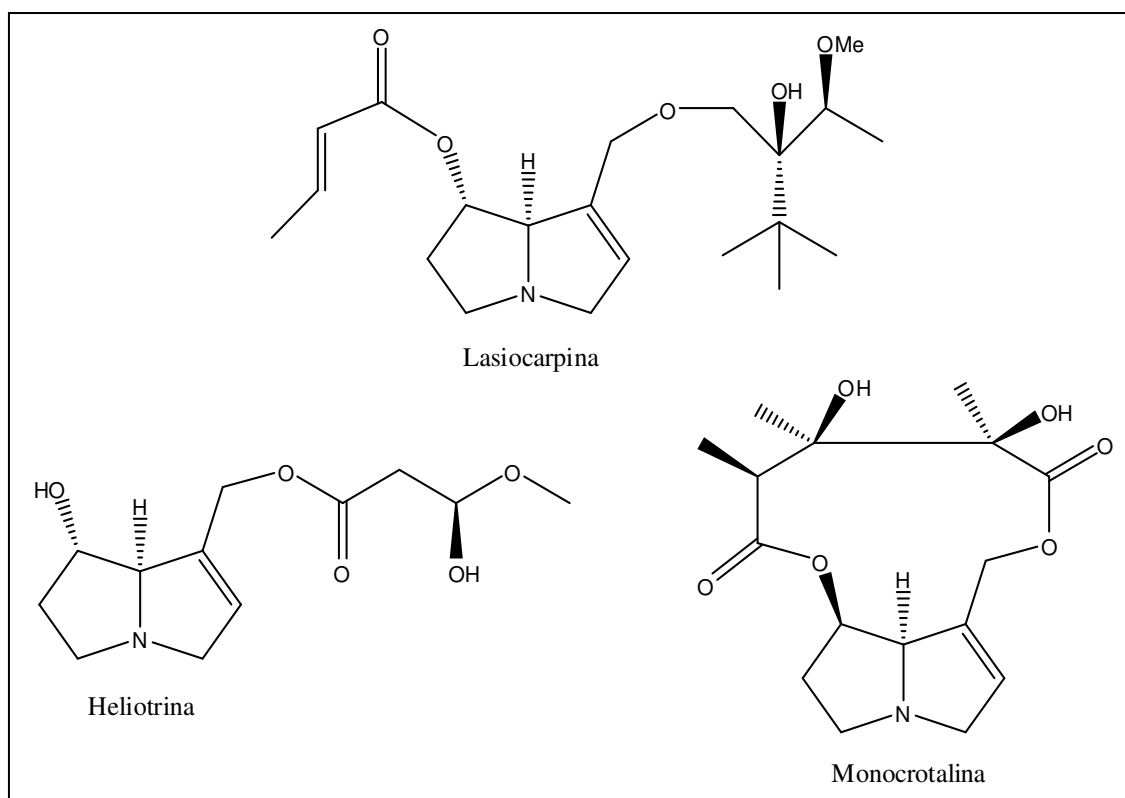


Figura 5: (A) lasiocarpina, alcaloide diesterificado acíclico; (B) heliotridina, alcaloide monoesterificado; (C) monocrotalina, alcaloide diesterificado macrocíclico.

1.3 – Biossíntese, distribuição e “turnover” de alcaloides pirrolizidínicos:

Os primeiros estudos sobre a biossíntese de alcaloides pirrolizidínicos foram realizados com o uso de marcadores radioativos (^3H e ^{14}C). Os alcaloides “marcados” foram isolados das plantas e seu local de marcação foi parcialmente estabelecido pelo número limitado de possíveis degradações químicas.

A proposta original de Sir Robert Robinson em que o sistema 1-hidroximetilpirrolizidina é derivado de duas moléculas de ornitina ou putrescina e que os ácidos nécicos de dez carbonos têm sua origem em terpenos foi refutada com base em estudos isotópicos. Os progressos que tornaram possível a utilização de precursores marcados com isótopos estáveis (^2H , ^{13}C e ^{15}N) e avanços na espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear permitiram a determinação de padrões de marcação confiáveis, mostrando, que na verdade, os ácidos nécicos são formados a partir de α -aminoácidos (ROBINS, 1989).

Birecka e coautores mostraram, em 1987, que o envolvimento da ornitina e putrescina na biossíntese das bases necinas via putrescina era controversa (BIRECKA; BIRECKI; IROHLICH, 1987). Estes autores demonstraram que na biossíntese de bases necinas em plantas do gênero *Heliotropium*, a putrescina é na maioria das vezes formada a partir da arginina, enquanto que em plantas do gênero *Senecio* e *Crotalaria* a principal rota para obtenção das bases necinas é a partir da ornitina. Os resultados deste trabalho contradiziam os de Hartmann e colaboradores, que em 1988 publicaram um trabalho onde a obtenção da putrescina na biossíntese das bases necinas em espécies de *S. vulgaris* se dava exclusivamente via arginina (HARTMANN *et al*, 1988).

Atualmente se admite que duas moléculas de ornitina **(1)** são utilizadas na formação do anel bicíclico do esqueleto pirrolizidínico, fornecendo 4 átomos de carbono e um de nitrogênio para a formação da base necina. A rota se dá com a formação da putrescina **(2)** como intermediário após uma enzima descarboxilase agir sobre a ornitina. A formação da putrescina pode também se dar por uma rota alternativa a partir da L-arginina **(3)** (Figura 6).

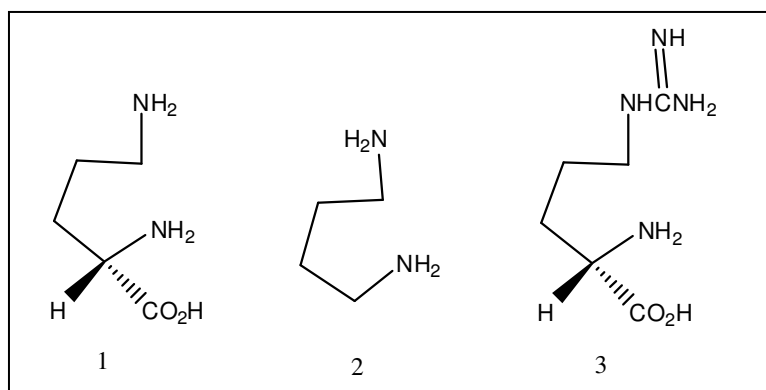
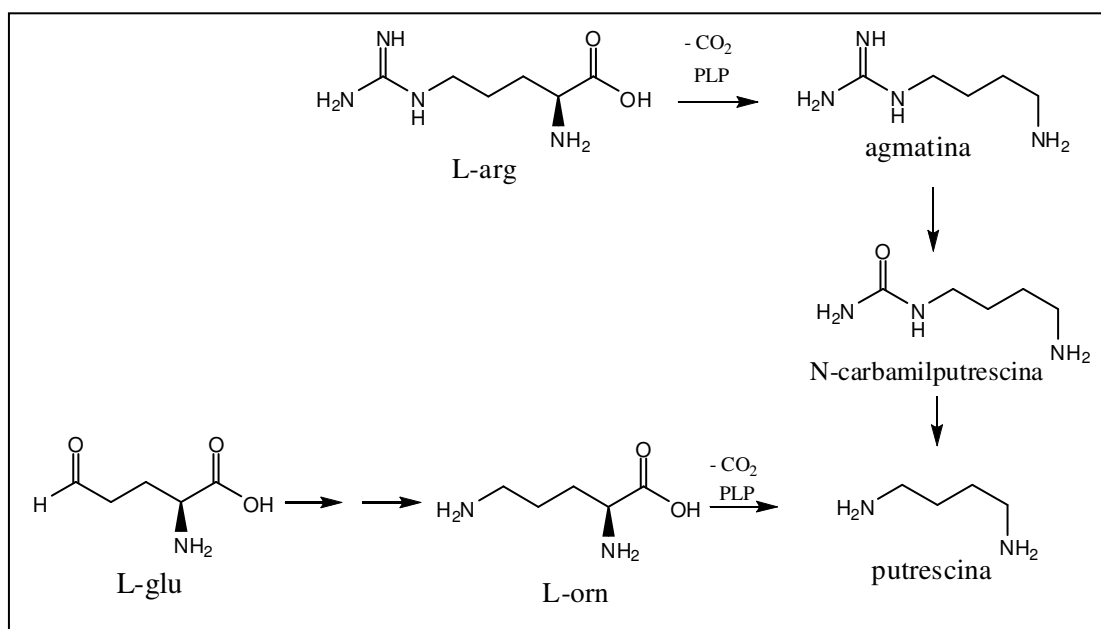
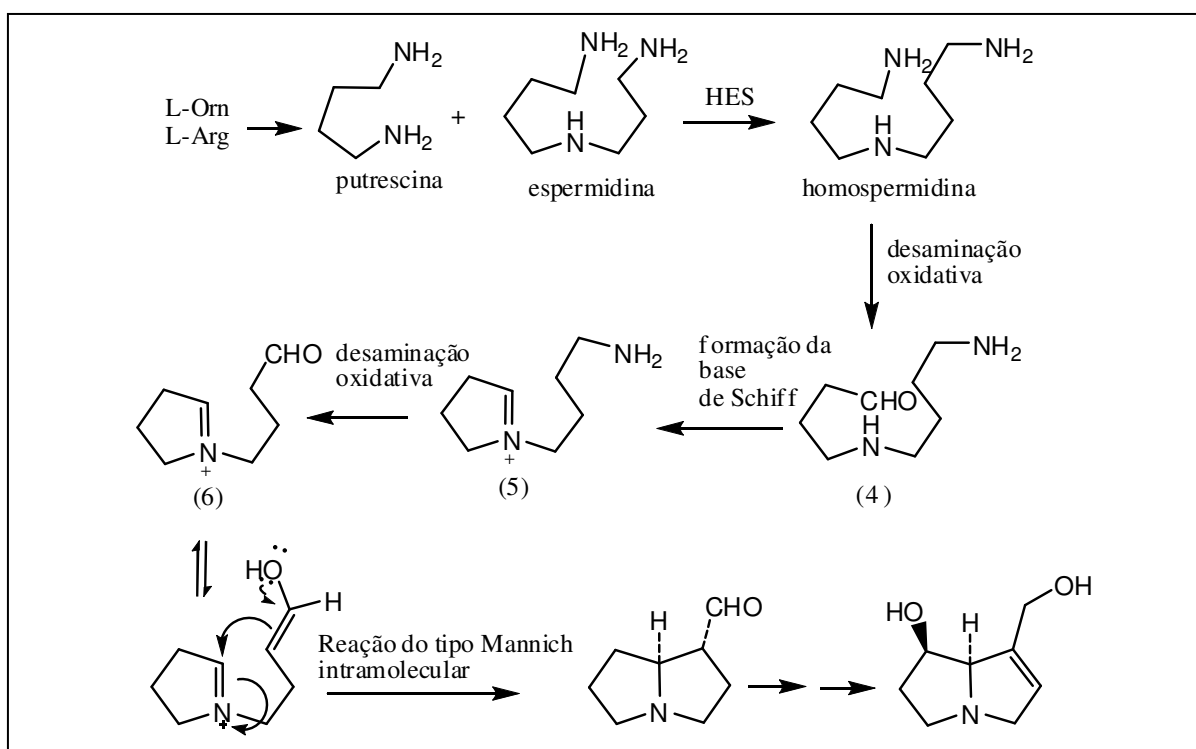


Figura 6: Ornitina (1), putrescina (2) e arginina (3).



Esquema 1: Rota alternativa para formação de putrescina. PLP = coenzima piridoxal fosfato.

Após a formação da putrescina, esta reage com a espermidina, sob ação da enzima homoespermidina sintase (**HES**), para gerar a homoespermidina (REIMANN *et al*, 2004). A desaminação oxidativa da homospermidina gera o intermediário **4**. Este, após formação de base de Schiff forma **5** que é oxidado a **6**. O intermediário **6** por meio de uma reação de Mannich intramolecular leva a formação do sistema biciclo dos alcaloides pirrolizidínicos (Esquema 2).



Esquema 2: Rota biossintética dos alcaloides pirrolizidínicos. Adaptado de DEWICK, 2002 e REIMANN, 2004.

Em 1995, um estudo com alcaloides pirrolizidínicos em espécimes de *Cynoglossum officinale* mostrou que a conversão das bases necinas saturadas para 1,2-insaturadas, ocorre com retenção de configuração (VAN DAM *et al*, 1995).

Robins e colaboradores, em 1974, realizaram um trabalho sobre a biossíntese dos ácidos néricos de alcaloides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Crotalaria* (ROBINS; BALE; CROUT, 1974). Este trabalho mostrou que a isoleucina e a treonina, em espécimes de *Crotalaria retusa*, são incorporadas na formação do ácido monocrotálico, o ácido nérico que diesterifica a retronecina para formar a monocrotalina.

Os alcaloides pirrolizidínicos são encontrados nas plantas predominantemente como *N*-óxidos, pois desta forma são armazenados, facilmente transportados e mantidos em sua forma não tóxica. Os *N*-óxidos são reduzidos à aminas livres no intestino de herbívoros (VAN DAM *et al*, 1995; DEWICK, 2002).

Em espécies de plantas monocárpicas, como por exemplo, *Cynoglossum officinale*, em que a floração ocorre uma vez ao ano, as flores têm grande importância para a planta. A perda das flores pode não ser totalmente compensada pela planta, então elas diminuem este risco aumentando em suas flores a

concentração de alcaloides pirrolizidínicos. Nestas espécies existem diferenças nos níveis de alcaloides pirrolizidínicos entre folhas jovens e folhas velhas. As folhas jovens possuem maiores níveis de alcaloide pirrolizidínicos, o que reflete o esforço da planta em preservar o local onde se dará sua produção de energia pela fotossíntese.

O estudo realizado por van Dam e colaboradores sobre o transporte dos alcaloides pirrolizidínicos com espécimes intactas de *Cynoglossum officinale* alimentadas com ^{14}C -putrescina é mostrado conforme a figura abaixo (VAN DAM *et al*, 1995).

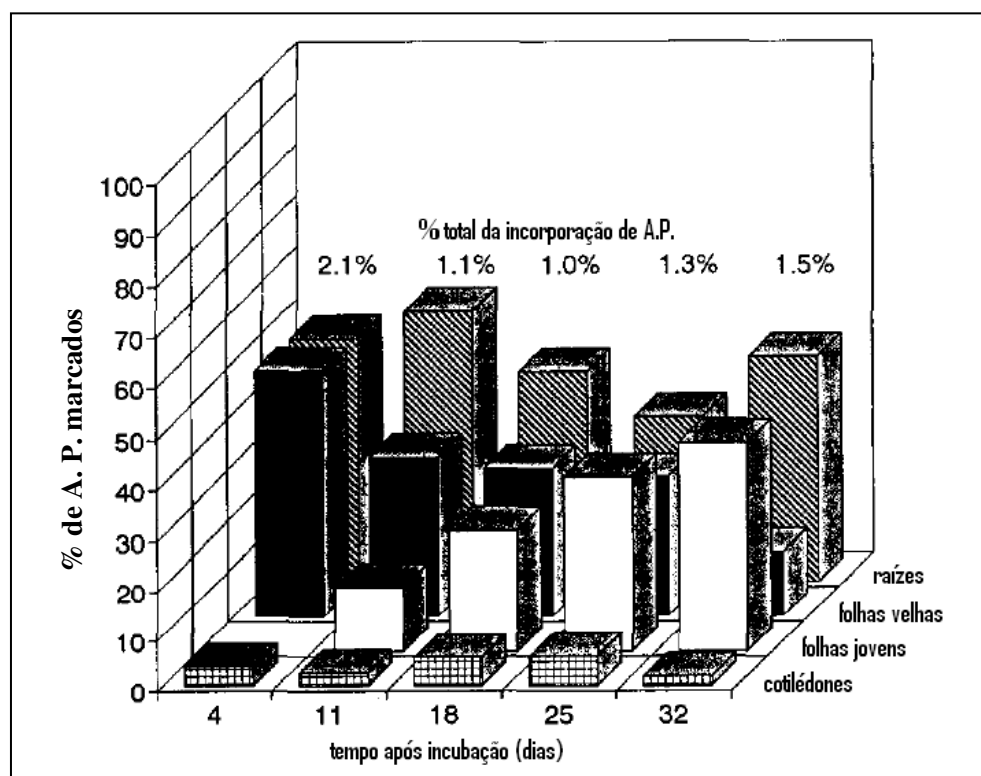


Figura 7: Abundância relativa de alcaloides pirrolizidínicos em brotos de plantas de *C. officinale* marcadas com ^{14}C -putrescina. A.P.= Alcaloides Pirrolizidínicos.

Van Dam e colaboradores observaram que o percentual de incorporação de alcaloides pirrolizidínicos varia com o tempo de incubação e a parte da planta analisada. Quatro dias depois da incubação, os extratos ainda apresentavam poliaminas e putrescina marcadas, mas a partir de 11 dias foram encontrados alcaloides pirrolizidínicos marcados nos extratos. O percentual de alcaloides pirrolizidínicos não diminuiu com o tempo, o que pode significar que a partir de 11

dias os alcaloides pirrolizidínicos podem estar sendo redistribuídos dentro da planta. O percentual de alcaloides pirrolizidínicos na planta varia de 30 % a 50 %. Apenas de 5 a 10 % de alcaloides pirrolizidínicos marcados foram encontrados nos cotilédones. Tanto nos cotilédones quanto nas raízes não ocorreram grandes variações do percentual de alcaloides pirrolizidínicos. Por outro lado, à medida que o tempo passava o percentual de alcaloides pirrolizidínicos marcados diminuía nas folhas velhas e aumentava nas folhas jovens.

A translocação dos alcaloides pirrolizidínicos das folhas velhas ocorre, provavelmente, em simultaneidade com a redistribuição do nitrogênio e outros nutrientes para as folhas jovens (VAN DAM *et al*, 1995).

1.4 - Ecologia Química:

Os sinais químicos, de um modo geral, são os grandes responsáveis pela comunicação entre os insetos e seu meio ambiente. As substâncias químicas que mediam a comunicação interespecífica, como inseto-planta, são denominadas aleloquímicos e as substâncias que mediam a comunicação intraespecífica são denominadas feromônios (CORRÊA; VIEIRA, 2007).

Alguns insetos, como a mariposa *Utetheisa ornatrix* (Lep., Arctiidae), adquirem de plantas substâncias químicas que estão vinculadas a sua sobrevivência. Esta defesa química foi constatada ao se observar que ao cair na teia da aranha *Nephila claviceps* (Tetragnathidae) as mariposas, machos e fêmeas, eram liberadas depois de examinadas pela aranha. A liberação acontecia porque as mariposas continham alcaloides pirrolizidínicos de gosto amargo indesejáveis para o predador, adquiridas pelas lagartas ao se alimentarem de plantas do gênero *Crotalaria* (Fabaceae) (HARTMANN *et al*, 2005).

Mas se uma mariposa adulta que foi criada em ambiente livre de alcaloide pirrolizidínicos, como uma plantação de feijão para alimentação humana, for colocada na teia, a mariposa é morta pela aranha, o que demonstra que alcaloides pirrolizidínicos estão envolvidos na defesa da mariposa (ROUHI, 2000). Os ovos das mariposas que possuem alcaloides pirrolizidínicos tornam-se protegidos contra os predadores.

As substâncias que são adquiridas pelas fêmeas oriundas dos machos são denominadas pelo químico-ecólogo Thomas Eisner de alcaloides do dom nupcial.

Isto, porque a fêmea recebe do macho, imediatamente após o acasalamento, estes alcaloides que persistem até sua velhice, protegendo a si e a seus ovos. Portanto, a fêmea escolhe o macho que possa aumentar sua chance de sobrevivência. O macho tem apenas cerca de cinco segundos de namoro para convencer a fêmea que é o pai ideal para sua prole (ROUHI, 2000). Mas como o macho convence a fêmea? Durante o namoro, o macho exhibe um par de escovas de seu abdômen. Estas escovas secretam uma substância denominada hidroxidanaidal (Figura 8), que pode ser obtida a partir da base necina da monocrotalina, o principal alcaloide pirrolizidínico encontrado nas plantas que servem de alimento para as mariposas. A fêmea é capaz de detectar a substância com suas antenas. A intensidade do sinal de hidroxidanaidal é proporcional à quantidade de alcaloide pirrolizidínico do macho.

O hidroxidanaidal atua como um importante feromônio de atração sexual em várias espécies de mariposas (HARTMANN; THEURING; BERNAYS, 2003).

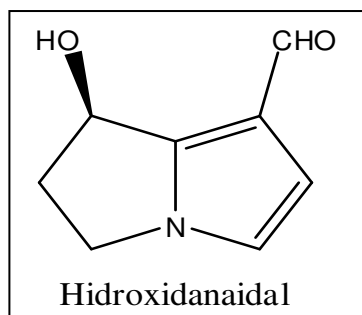
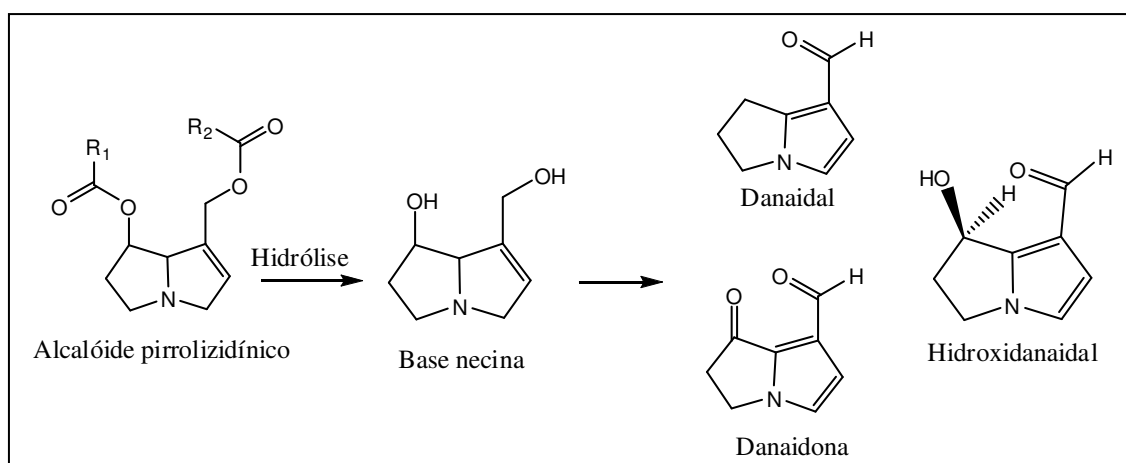


Figura 8: Estrutura do feromônio Hidroxidanaidal.

O hidroxidanaidal em espécimes da mariposa *Cretononon transiens*, se forma a partir do alcaloide pirrolizidínico heliotrina. Ocorre primeiro a epimerização do C-7 para atingir a configuração *R*, depois a aromatização do anel diidropirrólico, seguida da hidrólise do éster e oxidação do álcool primário para aldeído (Esquema 3) (HARTMANN; THEURING; BERNAYS, 2003).



Esquema 3: Formação de feromônios em insetos a partir de alcaloides pirrolizidínicos.

Os insetos, como as larvas ou espécies adultas de *Estigmene acrea*, são capazes de sintetizar seus próprios alcaloides, chamados alcaloides de insetos, podendo representar de 40 a 70 % do teor total de alcaloides. Isto acontece pela capacidade dos insetos em aproveitar a base necina dos alcaloides pirrolizidínicos sequestrados de plantas, e esterificá-las com seus próprios ácidos.

A alimentação de espécies de larvas *E. acrea* com alcaloides pirrolizidínicos de *Crotalaria pumila* (supinidina, subulacina, pumilina A, pumilina B, pumilina C, além de um outro alcaloide do tipo monocrotalina) demonstrou que os insetos são capazes de produzir seus próprios alcaloides através da esterificação das bases supinidina e retronecina de origem vegetal com os ácidos 2-hidróxi-3-metilbutírico e 2-hidróxi-3-pentanoico que produzem.

Os ésteres de supinidina são estigmina A e estigmina B, enquanto os ésteres de retronecina são cretonina A e cretonina B (HARTMANN; THEURING; BERNAYS, 2003).

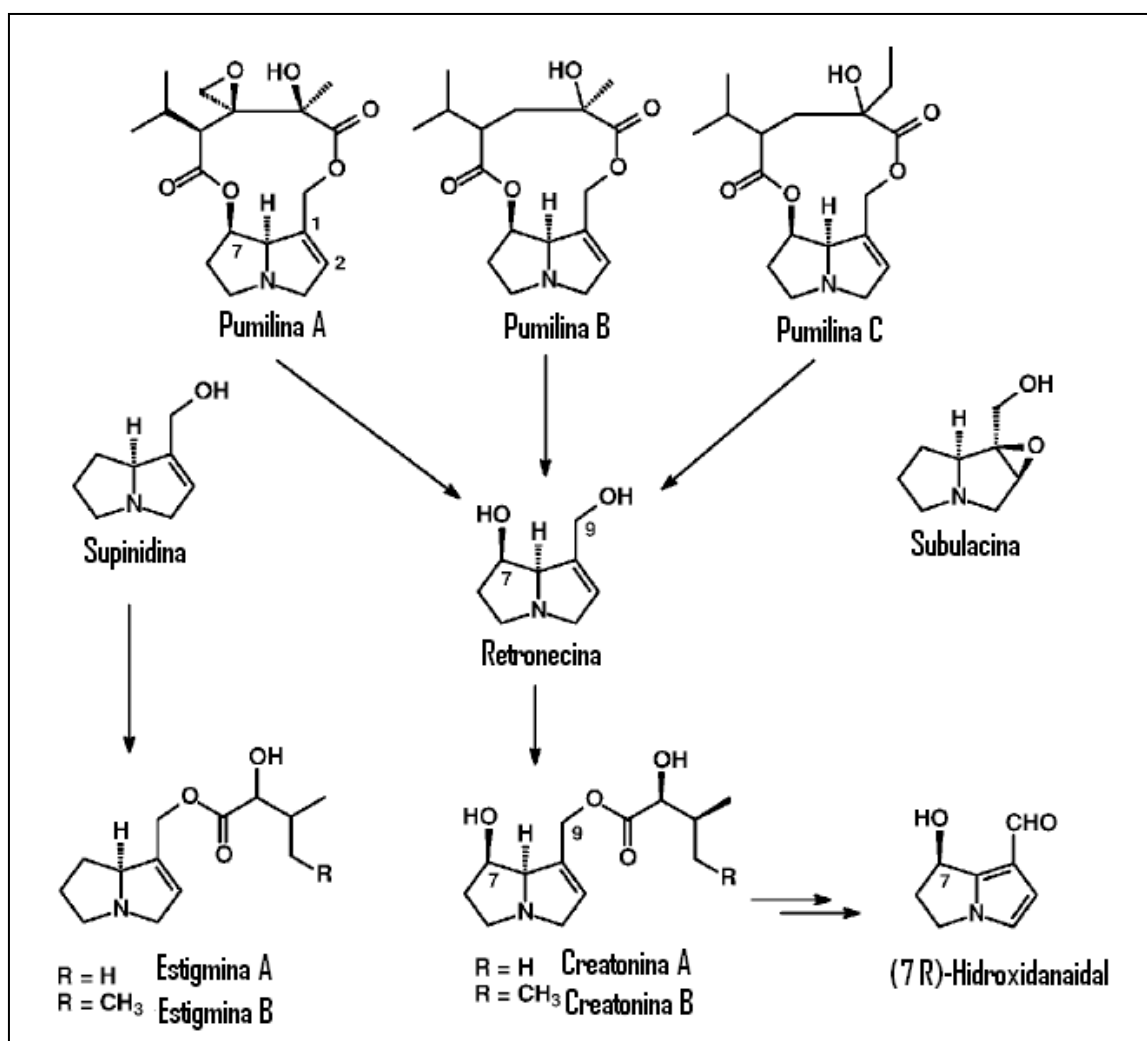


Figura 9: Produção dos alcaloides de insetos.

A supinidina é uma base necina que ocorre na forma livre em espécies de *C. pumila*, enquanto a retronecina encontra-se apenas como base necina comum aos alcaloides pumilina A, pumilina B e pumilina C. Portanto, todas as retronecinas utilizadas pelos insetos derivam da hidrólise das pumilinas.

Para a formação do feromônio sexual hidroxidanaidial é necessária o aproveitamento da base retronecina proveniente da hidrólise das pumilinas. A diferença da capacidade entre os machos e as fêmeas adultos em sintetizarem creatoninas e o feromônio hidroxidanaidial é um mecanismo que permanece desconhecido.

1.5 - A busca de alcaloides com atividade Anti-HIV:

O vírus da imunodeficiência humana ou “Human Immunodeficiency Virus” (HIV) faz parte da família dos retrovírus (composto de RNA). Este vírus é capaz de parasitar o sistema imunológico do homem levando a doença infecciosa denominada Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) ou “Acquired Immuno Deficiency Syndrome” (AIDS). O principal alvo de ataque no organismo do vírus HIV é o sistema imunológico. O HIV ao infectar os linfócitos T conduz à falta de coordenação do sistema imunológico e à sua progressiva inoperância, estabelecendo, assim, uma imunodeficiência (SOUZA; ALMEIDA, 2003).

A transcriptase reversa é a enzima necessária para a replicação viral, ela transfere as informações genéticas do vírus a partir do RNA para o DNA. Inibidores específicos desta enzima são antivirais úteis que se tornaram moléculas alvo na procura de agentes com atividade contra o vírus HIV. Tan e colaboradores, 1991, mostraram que moléculas provenientes de produtos naturais como iridoides, alcaloides benzofenantridínicos e polifenóis (por exemplo, ácido tânico) (Figura 10), são capazes de inibir esta enzima (TAN *et al*, 1991).

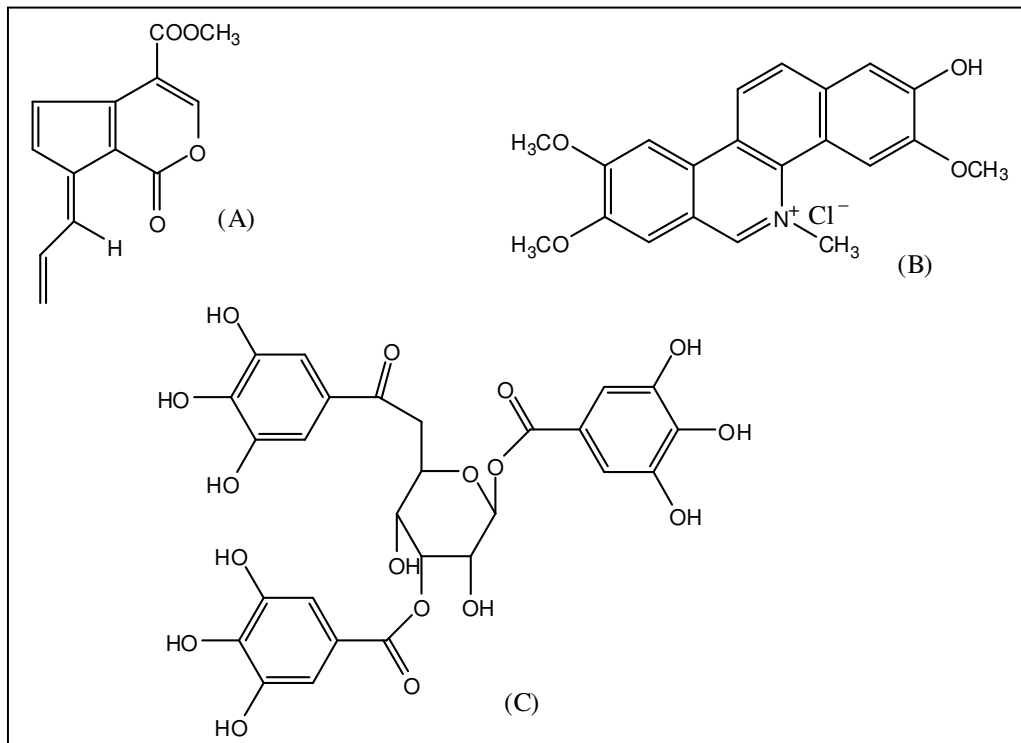


Figura 10: Metabólitos secundários ativos contra a enzima transcriptase reversa. (A) Iridoide fulvoplumierina, (B) alcaloide fenantridínico cloridrato de fagaronina, (C) polifenol do ácido tânico.

A inibição de enzimas conhecidas como glicosidases é outro alvo das moléculas que apresentam atividade anti-HIV. A castanospermina e a swansonina (Figura 11), alcaloides indolizidínicos poli-hidroxilados, são potentes inibidores desta classe de enzimas. Atualmente a castanospermina está sendo utilizada em ensaios clínicos como potencial droga contra o vírus HIV (CORREIA, 2001).

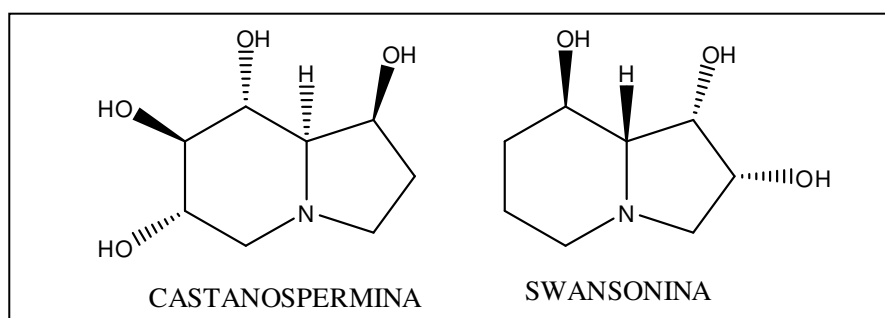


Figura 11: Alcaloides indolizidínicos com atividade anti-HIV.

Este trabalho teve como objetivos o estudo dos constituintes químicos de três espécies do gênero *Crotalaria*: *C. retusa*, *C. incana* e *C. pallida*, e o aproveitamento do esqueleto pirrolizidínico [3,3,0]-azabicyclo octano da retronecina (**7**), base necina do alcaloide monocrotalina (**8**), como matéria-prima para transformações químicas (Figura 12).

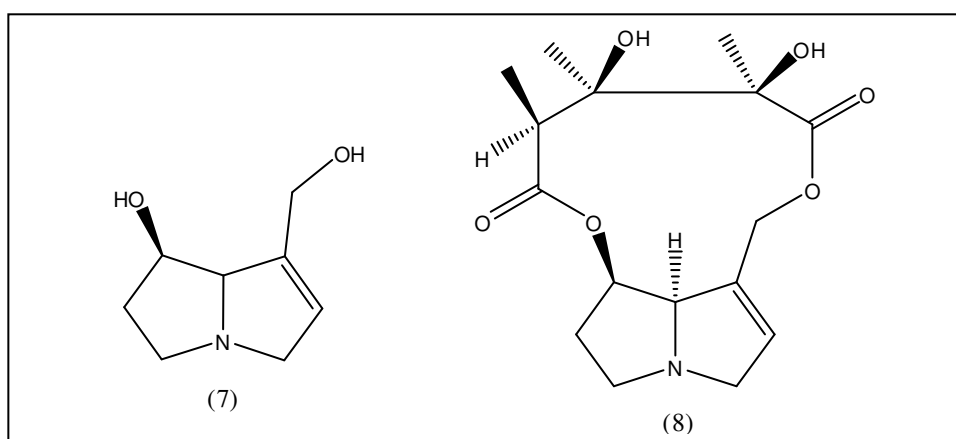


Figura 12 : Estrutura da retronecina (7) e da monocrotalina (8).

As transformações químicas planejadas foram as reações de dihidroxilação, redução e epoxidação, com vistas à obtenção de análogos estruturais dos alcaloides indolizidínicos castanospermina (**9**) e swansonina (**10**), moléculas com atividade anti-HIV (Figura 13). Uma vez que há analogia estrutural entre estes alcaloides e aqueles derivados da retronecina, adotou-se esta estratégia como busca de novos agentes com atividade antiviral.

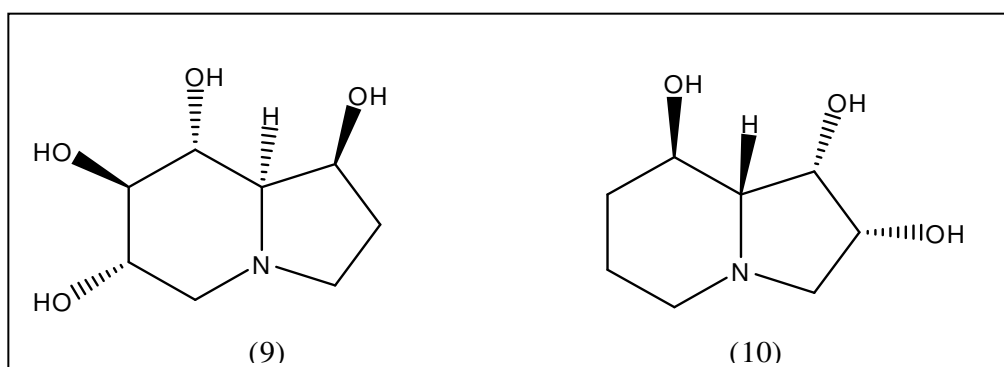


Figura 13: Estrutura dos alcaloides indolizidínicos castanospermina (9) e swansonina (10).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de realizar transformações químicas nos alcaloides pirrolizidínicos isolados das sementes de espécies do gênero *Crotalaria*, foram estudados os extratos de *C. retusa*, *C. pallida* e *C. incana*. Embora as plantas e as sementes coletadas fossem aparentemente semelhantes (Figura 14), o estudo fitoquímico mostrou grandes diferenças na constituição química das 3 espécies de *Crotalaria* estudadas.

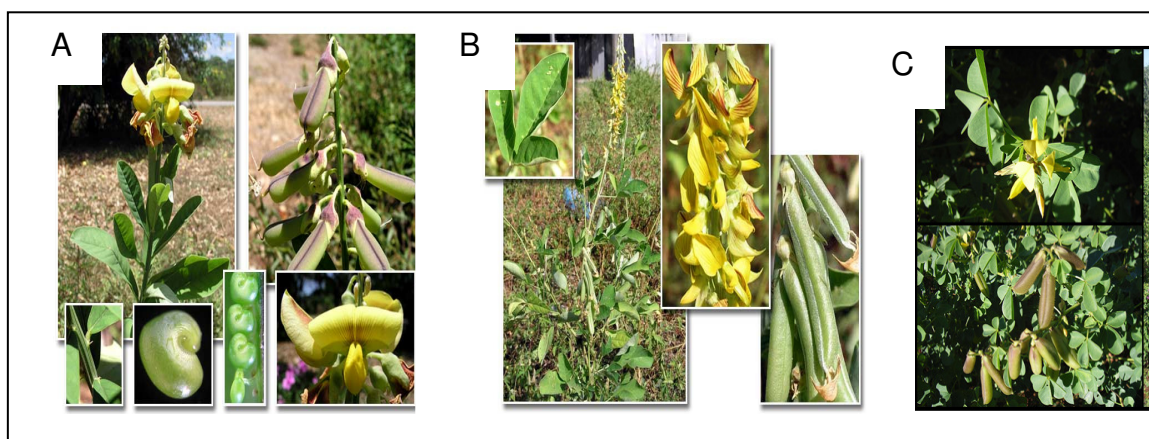


Figura 14: Imagens de *C. retusa* (A), *C. pallida* (B) e *C. incana* (C).
http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/var/riz_guyane/storage/images/media/images/crotalaria_retusa/9105-1-fre-FR/crotalaria_retusa.jpg;
http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/var/riz_guyane/storage/images/media/images/crotalaria_pallida/9108-1-fre-FR/crotalaria_pallida.jpg;
<http://florabase.dec.wa.gov.au/science/timage/18147ic1.jpg>).

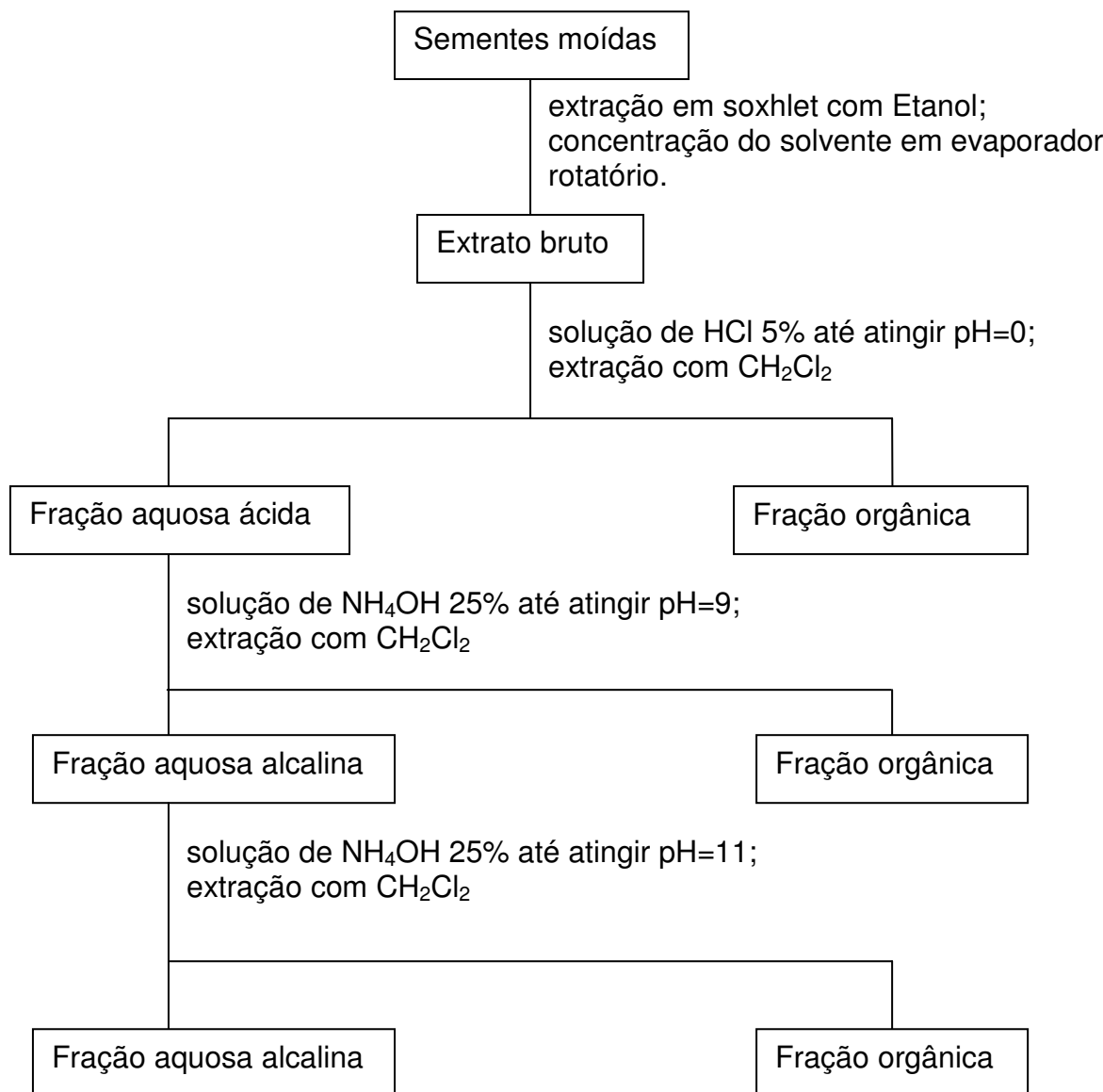
3.1 – Coleta das plantas, extração e partição ácido-base.

Asres e colaboradores estudaram diferentes espécies do gênero *Crotalaria* e concluíram que, de um modo geral, o maior teor de alcaloides pirrolizidínicos destas espécies é encontrado nas sementes (ASRES; SPORER; WINK, 2004). Diante dos resultados de Asres e colaboradores este trabalho foi dirigido para o estudo da composição química das sementes das 3 *Crotalaria*s estudadas.

As sementes dos exemplares das 3 espécies foram coletadas no Parque Tecnológico da Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro. As plantas apresentavam-se com flores e sementes secas.

O material coletado foi tratado de maneira similar - as sementes foram moídas, submetidas à extração com etanol em soxhlet e a partição ácido-base.

Utilizou-se o mesmo procedimento de extração com o objetivo de comparar a composição química das 3 espécies de *Crotalaria* coletadas no campus da Cidade Universitária da Ilha do Fundão.



Esquema 4: Marcha utilizada para a obtenção de alcaloides pirrolizidínicos.

3.2 - Isolamento das substâncias:

3.2.1 - Monocrotalina: Alcaloide pirrolizidínico de *C. retusa*

O fracionamento ácido-base do extrato etanólico obtido a partir de sementes secas de *C. retusa* forneceu o alcaloide monocrotalina em 5 % de rendimento (Esquema 4).

A estrutura da monocrotalina (**8**) foi confirmada através das técnicas espectroscópicas de RMN ^1H e RMN ^{13}C associadas aos espectros bidimensionais de correlações homonucleares $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (COSY) e heteronucleares $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ (HMBC e HMQC). Os dados espectroscópicos obtidos estão de acordo com os dados da literatura (DOS SANTOS, 2007).

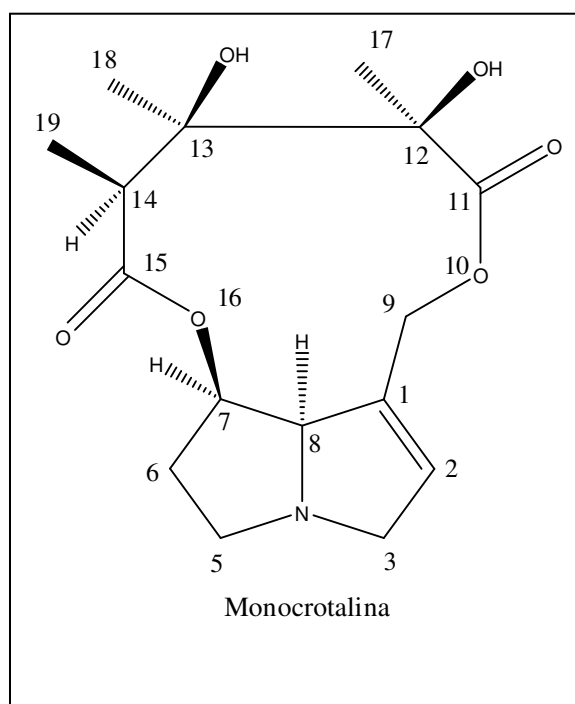


Figura 15: Estrutura química da monocrotalina com a respectiva numeração.

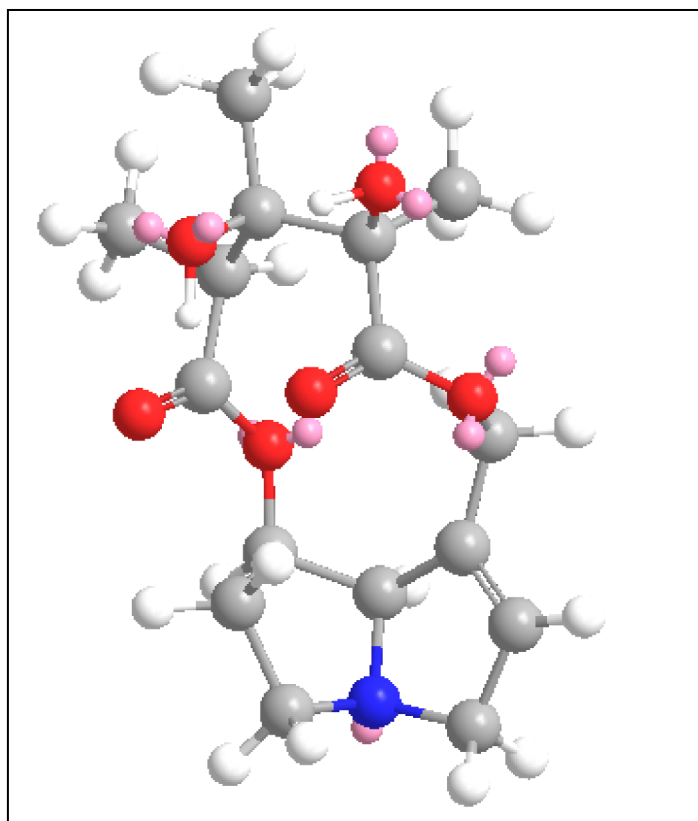


Figura 16: Estrutura química tridimensional da monocrotalina.

Tabela 1: Comparação dos dados de RMN da monocrotalina (8) com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C deste alcaloide descritos na literatura (DOS SANTOS, 2007).

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Lit*.	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) Lit*	COSY
1	132,8	132,8			
2	134,2	134,3	6,0 (1H, d, $J=1,9$)	6,0	3,4; 3,9 4,5; 4,7
3	60,4	60,4	α 3,4 (1H, ddd, $J=1,4; 5,2;$ 16,2)		3,9; 4,5 6,0
			β 3,9 (1H,m)		3,4; 4,5 4,7; 6,0
5	53,7	53,7	α 2,6 (1H,m)		2,1; 3,3
			β 3,3 (1H, m)		2,1; 2,6
6	33,6	33,5	2,1(2H, m)	2,1	2,6; 3,3 5,1
7	74,9	75,0	5,1 (1H, m)	5,1	2,1; 4,5
8	76,8	76,7	4,4 (1H, m)		3,4; 3,9; 5,1
9	61,3	61,3	α 4,7 (1H, dd, $J=11,8; 0,9$)	4,7	3,9; 4,8 6,0
			β 4,8 (1H, d, $J=11,8$)	4,9	4,7
11	173,6	173,5			
12	78,9	78,7			
13	77,0	76,8			
14	44,3	44,2	2,8 (1H, q, $J=7,1$)		1,2
15	174,1	174,1			
17	22,1	22,0	1,4 (3H, s)	1,4	
18	17,8	17,7	1,3 (3H, s)	1,4	
19	13,8	13,6	1,2 (3H, d, $J=7,1$)	1,2	2,8

* Lit: Dos Santos, 2007. Solvente CDCl_3 .

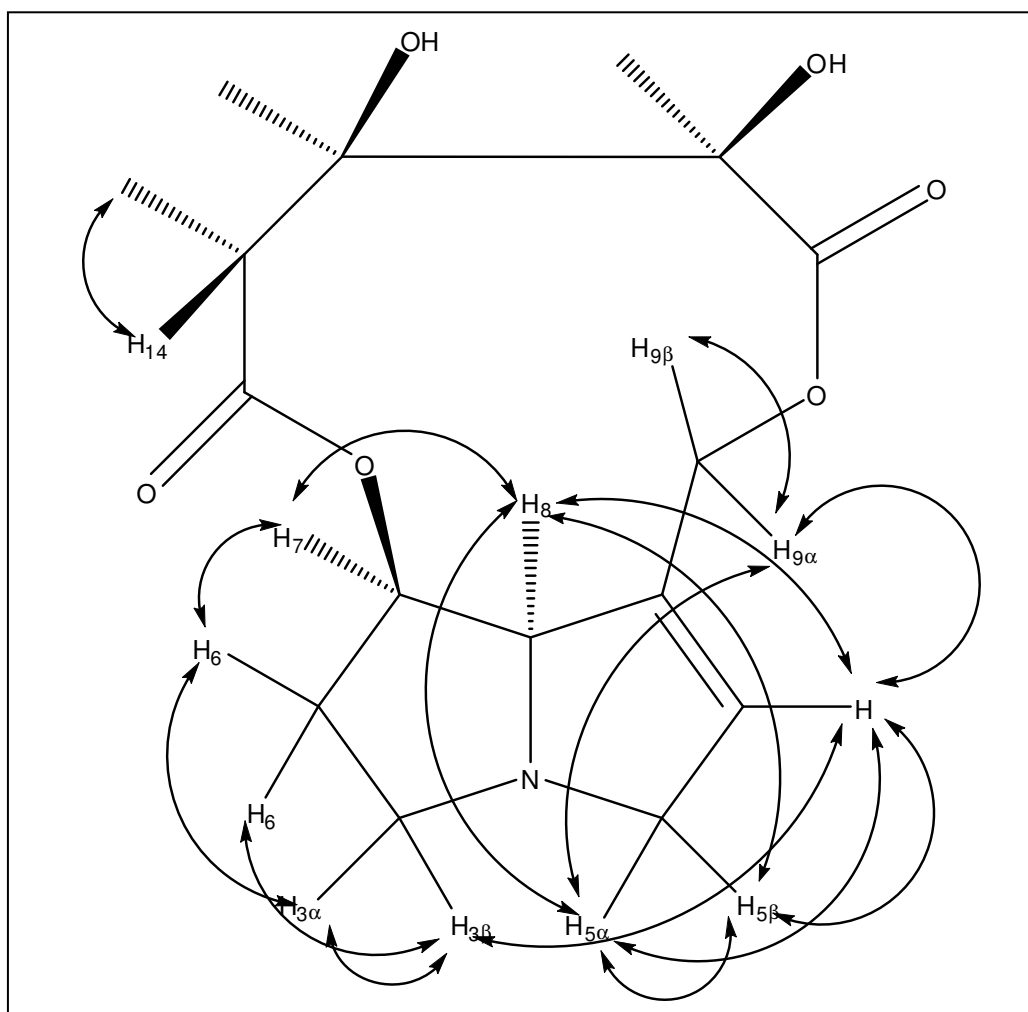


Figura 17: Correlações ¹H X ¹H – COSY observadas na monocrotalina.

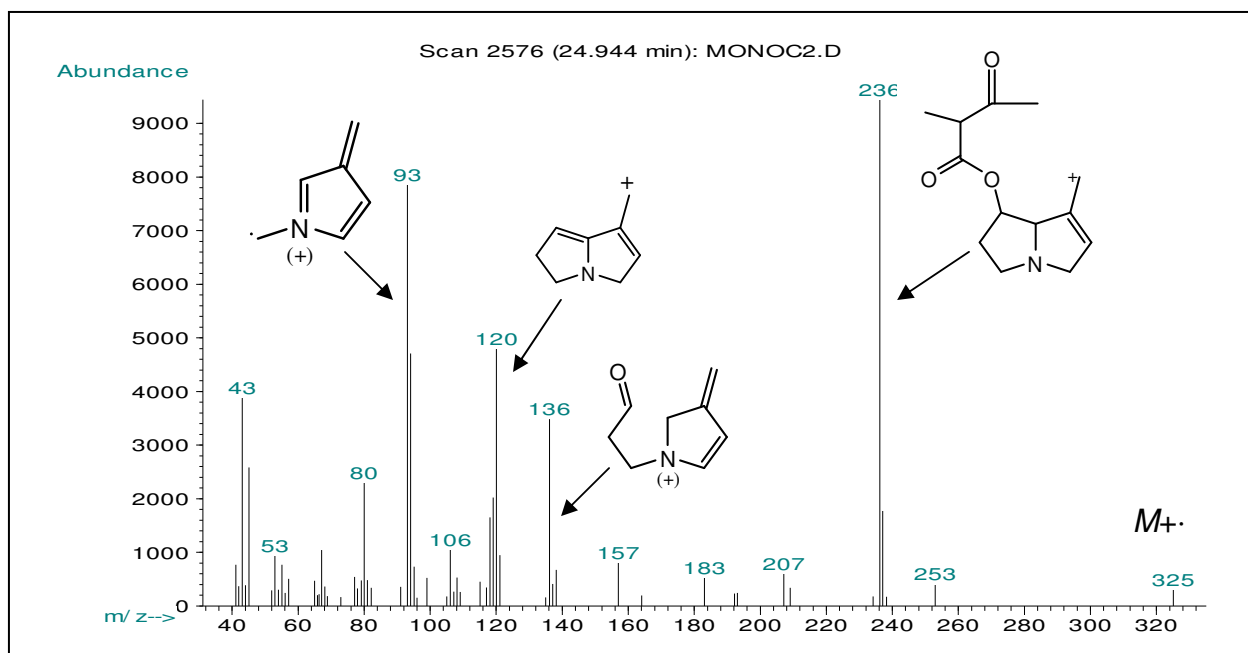
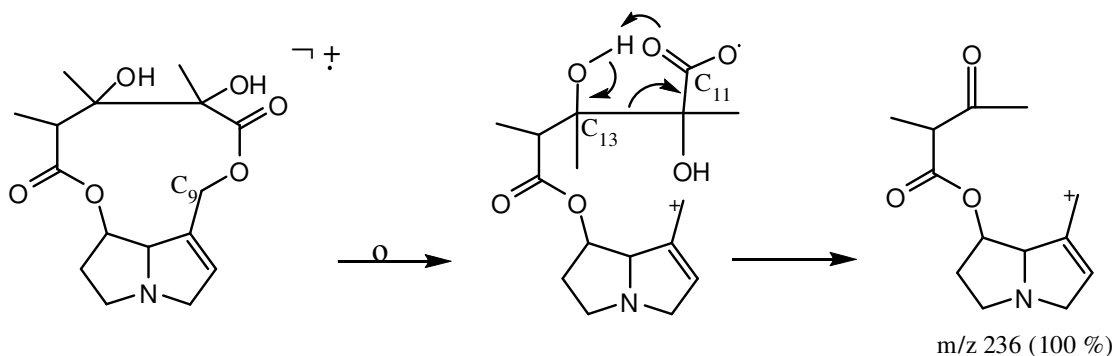


Figura 18: Espectro de massas da monocrotalina.

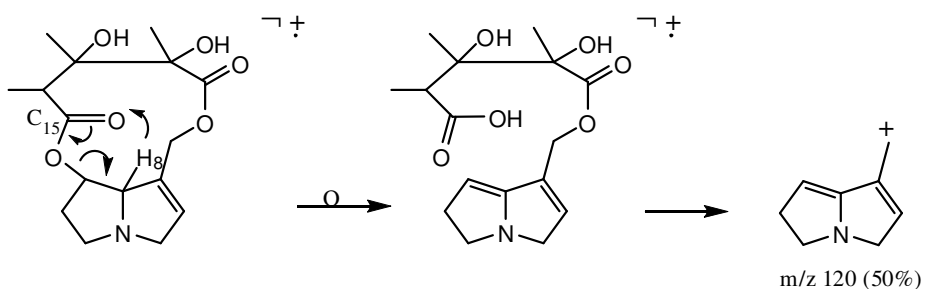
O espectro de massas da monocrotalina (Figura 18) apresenta o íon molecular de m/z 325, compatível com a fórmula molecular da monocrotalina.

O fragmento de m/z 236, o pico base do espectro, é formado pela quebra da ligação C_9-O , seguida do rearranjo de McLafferty envolvendo a carbonila de C_{11} e a hidroxila de C_{13} (Esquema 5) (NEUNER-JEHLE; NEVABDA; SPITELLER, 1965).



Esquema 5: Formação do fragmento de m/z 236 derivado da monocrotalina.

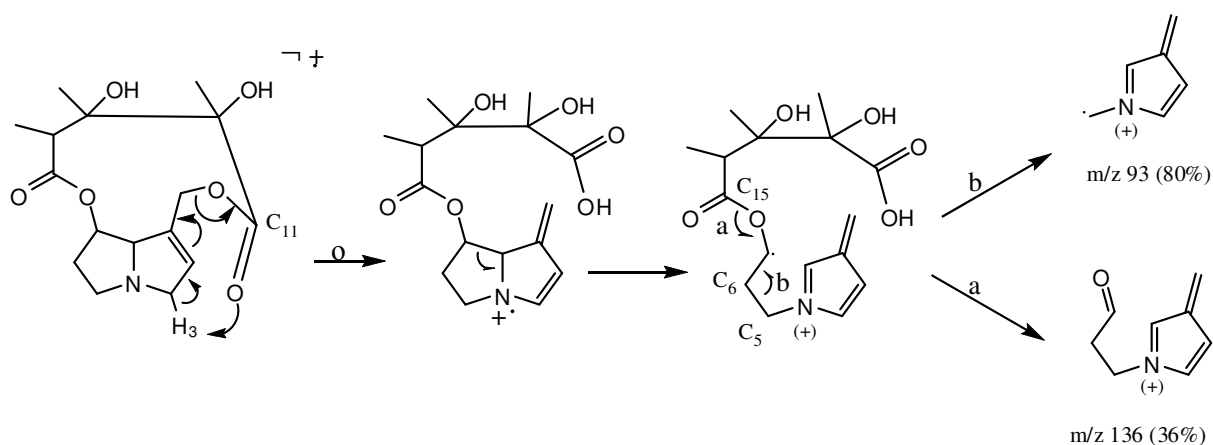
O fragmento de m/z 120 é formado pelo rearranjo de McLafferty envolvendo o H_8 e a carbonila de C_{15} , seguido da quebra da ligação C_9-O (Esquema 6).



Esquema 6: Formação do fragmento de m/z 120 derivado da monocrotalina.

Os fragmentos de m/z 93 e 136 são formados inicialmente pela mesma via (Esquema 7). Ocorre uma transferência de hidrogênio de C_3 para a carbonila de C_{11} com ruptura da ligação C_9-O , e a formação do cátion-radical pela quebra da ligação C_7-C_8 .

A formação de m/z 93 resulta da quebra da ligação C_5-C_6 , e a do fragmento de m/z 136 acontece devido à quebra da ligação $C_{15}-O$.



Esquema 7: Formação dos fragmentos de m/z 93 e m/z 136 derivados da monocrotalina.

3.2. 2 - Senecionina: Alcaloide pirrolizidínico de *C. incana*:

O fracionamento ácido-base do extrato etanólico de *C. incana* seguiu o procedimento conforme descrito no esquema 4. A diferença na coloração do extrato já indicou grande diferença entre os constituintes químicos das sementes de *C. incana* com os de *C. retusa*. Enquanto o extrato etanólico das sementes de *C. retusa* apresentava coloração marrom com muito precipitado, o extrato de *C. incana* apresentava a mesma coloração, mas isento de precipitado.

Após o fracionamento ácido-base foram analisadas por cromatografia em camada delgada o material obtido nas frações de pH 0, pH 9 e pH 11. A mancha referente a fração de pH 9 apresentou coloração laranja após ser revelado com o reagente de Dragendorff, um forte indicativo da presença de alcaloides. Diante deste resultado partiu-se para a purificação do material de aspecto resinoso da fração de pH 9 em coluna cromatográfica de gel de sílica, que forneceu 3,4 mg do alcaloide pirrolizidínico senecionina (Figura 19).

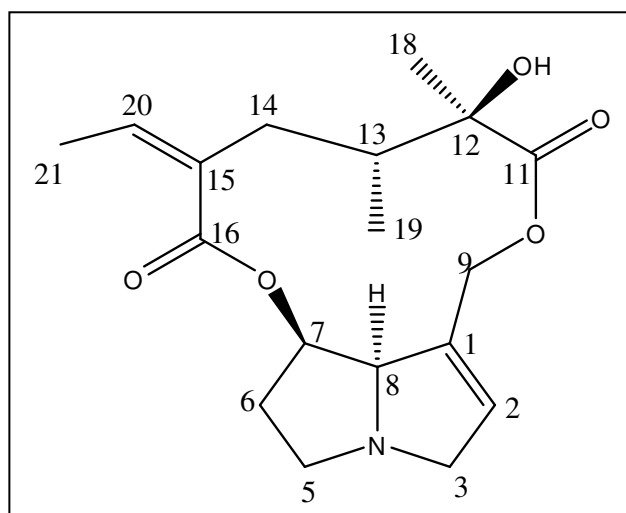


Figura 19: Alcaloide pirrolizidínico senecionina, isolado de *C. incana*.

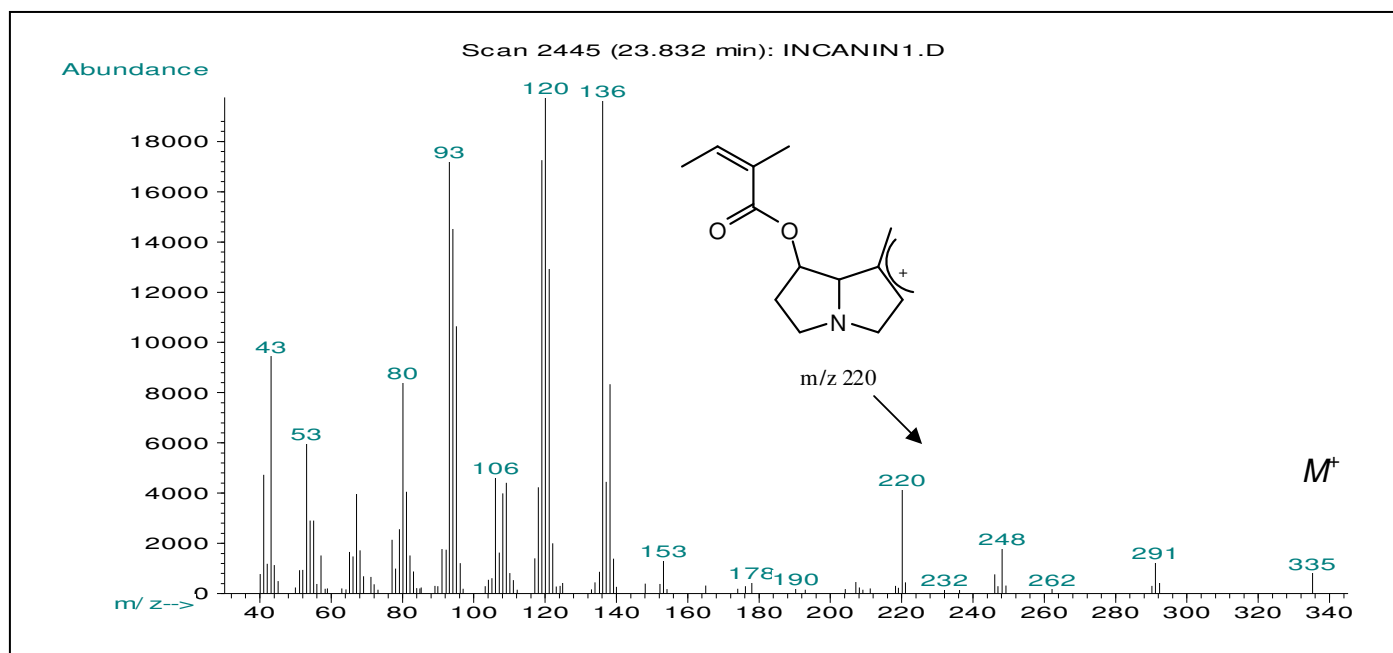
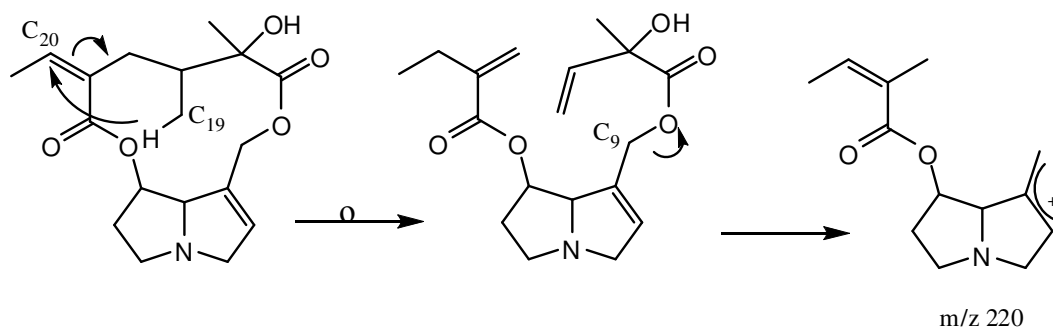


Figura 20: Espectro de massas do alcaloide senecionina.

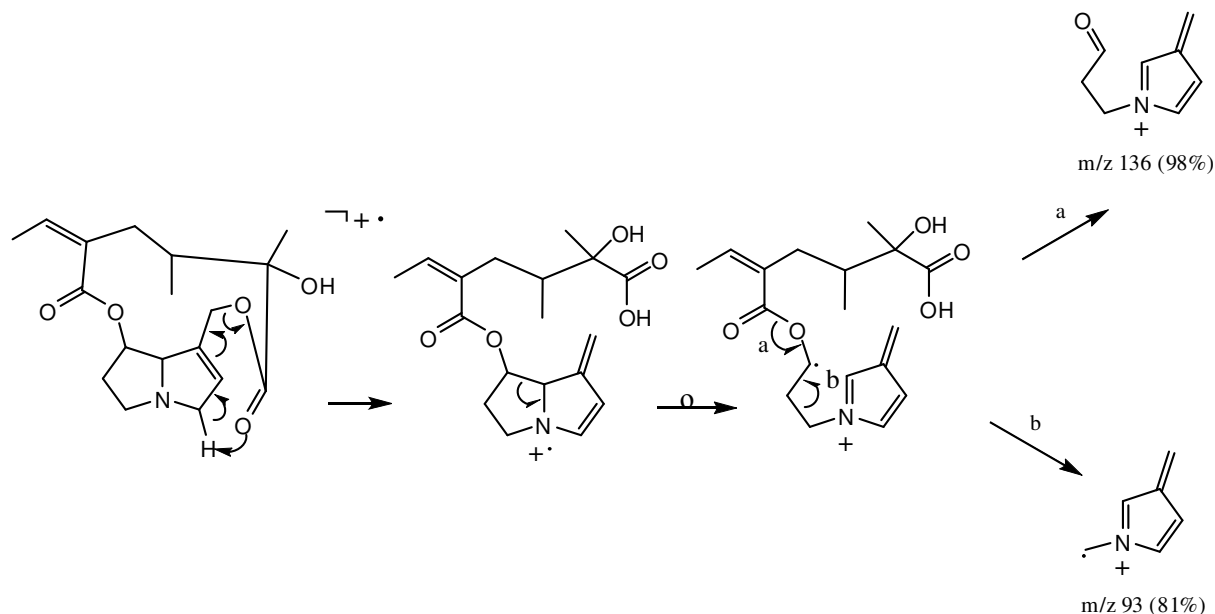
O espectro de massas da senecionina possui o íon molecular de m/z 335, conforme pode ser visto na Figura 20.

O íon de m/z 220 é formado pela migração de um dos hidrogênios de C_{19} para C_{20} (rearranjo 1, 6), seguido da quebra da ligação C_9 -O (Esquema 8).



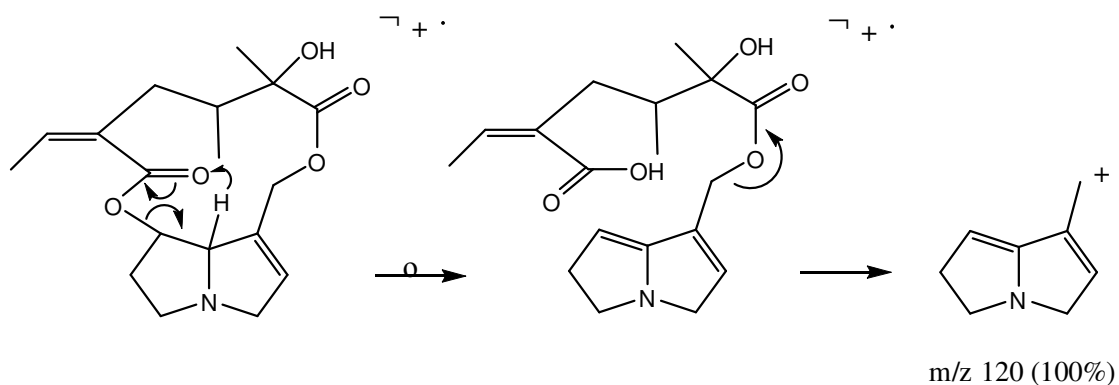
Esquema 8: Formação do fragmento de m/z 220 derivado da senecionina.

A formação dos fragmentos de m/z 93 e de m/z 136 ocorre pelo mesmo mecanismo que acontece com a monocrotalina. Inicialmente há a transferência de um dos hidrogênios de C_3 para a carbonila de C_{11} , seguida da ruptura da ligação C_9 -O, e a formação do cátion-radical devida a quebra da ligação C_7 - C_8 . A quebra da ligação O - C_7 gera o cátion de m/z 136 (98%), e a da ligação C_5 - C_6 o cátion-radical de m/z 93 (81%) (Esquema 9).



Esquema 9: Formação dos fragmentos de m/z 136 e m/z 93 derivados da senecionina.

O fragmento de m/z 120 é formado devido ao rearranjo de McLafferty envolvendo o H_8 e a carbonila de C_{16} , seguido da quebra da ligação C_9-O (Esquema 10).



Esquema 10: Formação do fragmento de m/z 120 derivado da senecionina.

A estrutura da senecionina foi proposta somente com base em fragmentações no espectro de massas e por comparação com os dados disponíveis no banco de espectros Wiley.

3.2.3 - Flavonoide de *C. pallida*:

As frações obtidas a partir do fracionamento ácido-base em pH 0, pH 9 e pH 11, foram analisadas por cromatografia em camada fina, e as frações de pH 9 e pH 11 apresentaram manchas com fraca coloração laranja, após revelação com reagente de Dragendorff, mesmo quando o material aplicado apresentava-se bastante concentrado.

Diante deste resultado e como se dispunha de pouca quantidade de amostra, optou-se pela análise do extrato bruto em coluna aberta de gel de sílica. Devido à possível pequena concentração de alcaloides nas frações obtidas, nenhuma destas revelou positivo com o reagente de Dragendorff.

A fração eluída da coluna com MeOH : CH₂Cl₂ (70 : 30) por ter apresentado massa apreciável foi analisada por RMN ¹H e ¹³C e os sinais observados indicaram a presença de um flavonoide.

O flavonoide glicosilado, composto majoritário na fração trabalhada de *C. pallida*, foi identificado de acordo com os dados de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT. No espectro de RMN de ¹H foram observados dois dubletos em δ 7,99 ($J = 8,4$ Hz) e 6,93 ($J = 8,4$ Hz) indicando a diss substituição 1,4 do anel B. Este espectro mostrou ainda os sinais em δ 6,72 (s) e 6,34 (s) atribuídos aos H₆ e H₈, respectivamente. Foi observado ainda um sinal em δ 5,22 (sl) atribuído ao H₃ que indicou a presença de uma ligação dupla entre os C₂ e C₃. A análise dos dados de RMN de ¹H indicou que a aglicona tratava-se de uma flavona.

No espectro de RMN de ¹³C foram atribuídos 15 sinais para a flavona, estes quando comparados com os dados apresentados na literatura foram compatíveis para a apigenina (AGRAWAL, 1989). A presença de unidades de açúcar na flavona foi evidenciada pelo conjunto de sinais observados no espectro de RMN de ¹H entre 3,00 e 5,00. Este espectro exibiu um dubleto em δ 4,53 ($J = 7,2$) característico para hidrogênio anomérico de um açúcar com a configuração β (OH) e outro sinal em δ 5,16 ($J = 3,6$) indicando um hidrogênio anomérico de um açúcar com a configuração α (OH).

No espectro de RMN de ¹³C foram observados 12 sinais de maior intensidade atribuídos a duas unidades de açúcares, o sinal em δ 82,5 indicou que a flavona era monodesmosídeo e que as unidades de açúcar estariam ligadas pelos C₂, C₃ ou C₄.

Os dados de RMN de ^{13}C foram comparados com os disponíveis na literatura sendo estes compatíveis para uma β -D-glucose com uma α -D-galactose ligada ao C_2 (AGRAWAL, 1989; BREITMAIER; VOELTER, 1989; FICO *et al*, 2007).

Normalmente os flavonoides O-glicosilados possuem os açúcares ligados nas hidroxilas dos C_3 , C_7 ou C_4 . Provavelmente, de acordo com os valores dos deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de ^{13}C , o açúcar do flavonoide encontra-se no C_7 . Assim a flavona foi identificada como a 7-O- α -D-galactopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosídeo apigenina.

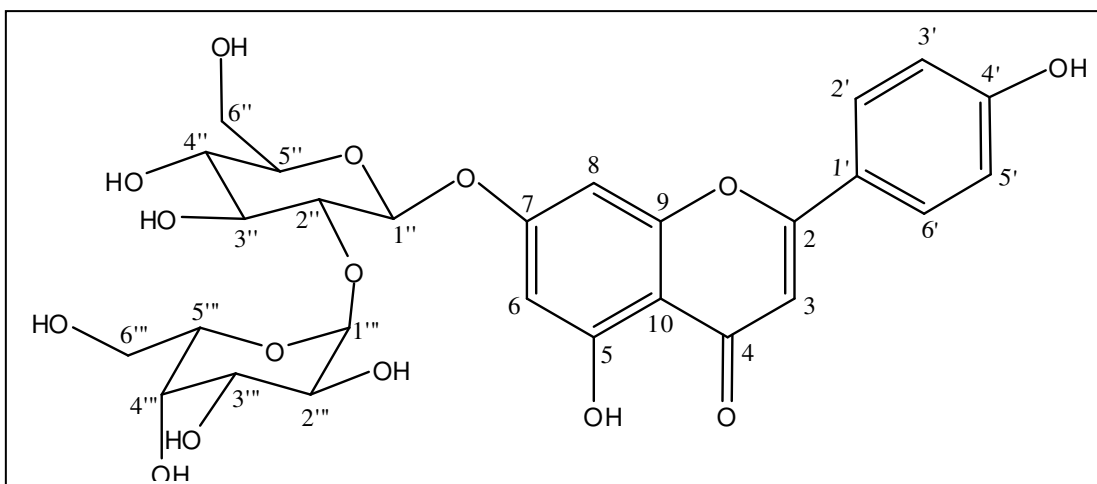


Figura 21: Estrutura do Flavonoide apigenina 7-O- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosídeo.

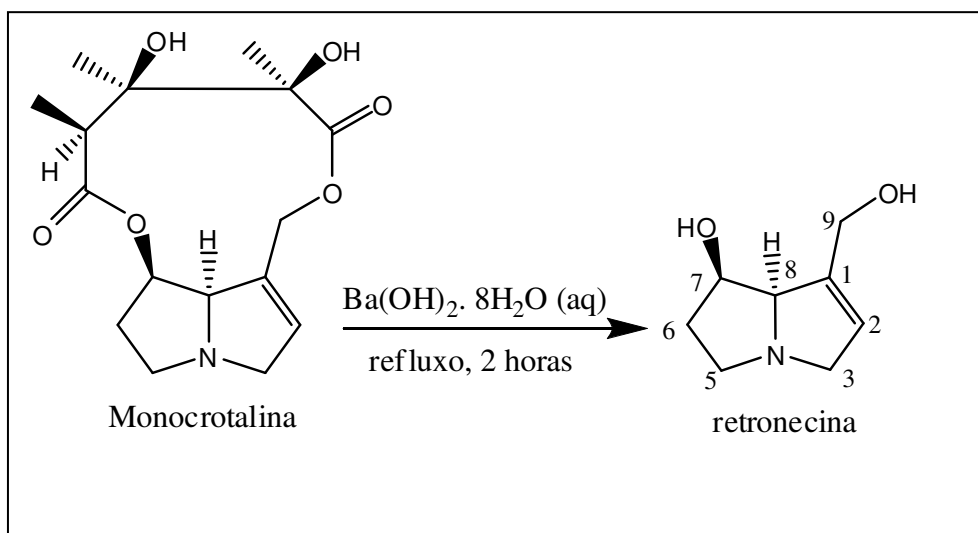
Tabela 2: Dados de RMN ^{13}C e ^1H do flavonoide.

Posição	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)
2	162,6	
3	104,6	5,2 (1H, sl)
4	182,1	
5	161,4	
6	98,5	6,7 (1H, s)
7	164,2	
8	91,8	6,3 (1H, s)
9	155,9	
10	104,1	
1'	121,5	
2'/6'	129,0	7,9 (2H, d, $J = 8,4$)
3'/5'	116,1	6,9 (2H, d, $J = 8,4$)
4'	160,6	
1''	100,3	4,5 (1H, d, $J = 7,2$)
2''	82,5	3,1 – 4,82 (m)
3''	74,4	3,1 – 4,82 (m)
4''	69,9	3,1 – 4,82 (m)
5''	77,3	3,1 – 4,82 (m)
6''	62,2	3,1 – 4,82 (m)
1'''	102,4	5,1 (1H, d, $J = 3,6$)
2'''	72,8	3,1 – 4,82 (m)
3'''	72,9	3,1 – 4,82 (m)
4'''	70,6	3,1 – 4,82 (m)
5'''	71,7	3,1 – 4,82 (m)
6'''	62,2	3,1 – 4,82 (m)

Solvente: DMSO.

3.3 - Transformações Químicas.

3.3.1 - Hidrólise alcalina da monocrotalina: Obtenção da retronecina.



Esquema 11: Hidrólise da monocrotalina.

Realizou-se a reação de hidrólise da monocrotalina sob refluxo por duas horas com hidróxido de bário. O produto obtido foi isolado em coluna cromatográfica contendo alumina básica como fase fixa e a mistura de solventes CHCl_3 : MeOH : NH_4OH (8,5 : 1,5 : 0,2) como fase móvel. A retronecina foi obtida com 84 % de rendimento.

A retronecina foi identificada por RMN ^1H , RMN ^{13}C e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas. Os dados obtidos estão de acordo com os da literatura (MOLYNEUX *et al*, 1982; HOVERMALE *et al*, 1984).

Tabela 3: Comparação dos dados de RMN obtidos do produto da reação de hidrólise da monocrotalina com os dados da literatura de RMN de ^1H e ^{13}C da retronecina.

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Lit*	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) Lit**
1	137,5	137,8		
2	127,4	127,2	5,7 (1H, s)	5,6
3	61,8	61,9	α 3,4 (1H, dd, J=15,4; 5,0)	3,3
			β 3,8 (1H, dd, J=15,4; 1,4)	3,7
5	54,1	54,2	α 2,7 (1H, m)	2,6
			β 3,2 (1H, t, J=7,3)	3,1
6	35,3	35,3	α, β 1,9 (2H, m)	1,8
7	71,0	71,0	4,3 (1H, m) ***	4,3
8	79,4	79,4	4,3 (1H, m) ***	4,1
9	58,8	58,6	α, β 4,3 (2H, m) ***	4,1

* Lit: Molyneux *et al*, 1982. Solvente: CDCl_3 .

** Lit: Hovermale *et al*, 1984. Solvente: D_2O .

*** Os hidrogênios H_7 , H_8 , $\text{H}_{9\alpha}$ e $\text{H}_{9\beta}$ aparecem sob a forma de multiplete em 4,3 ppm.

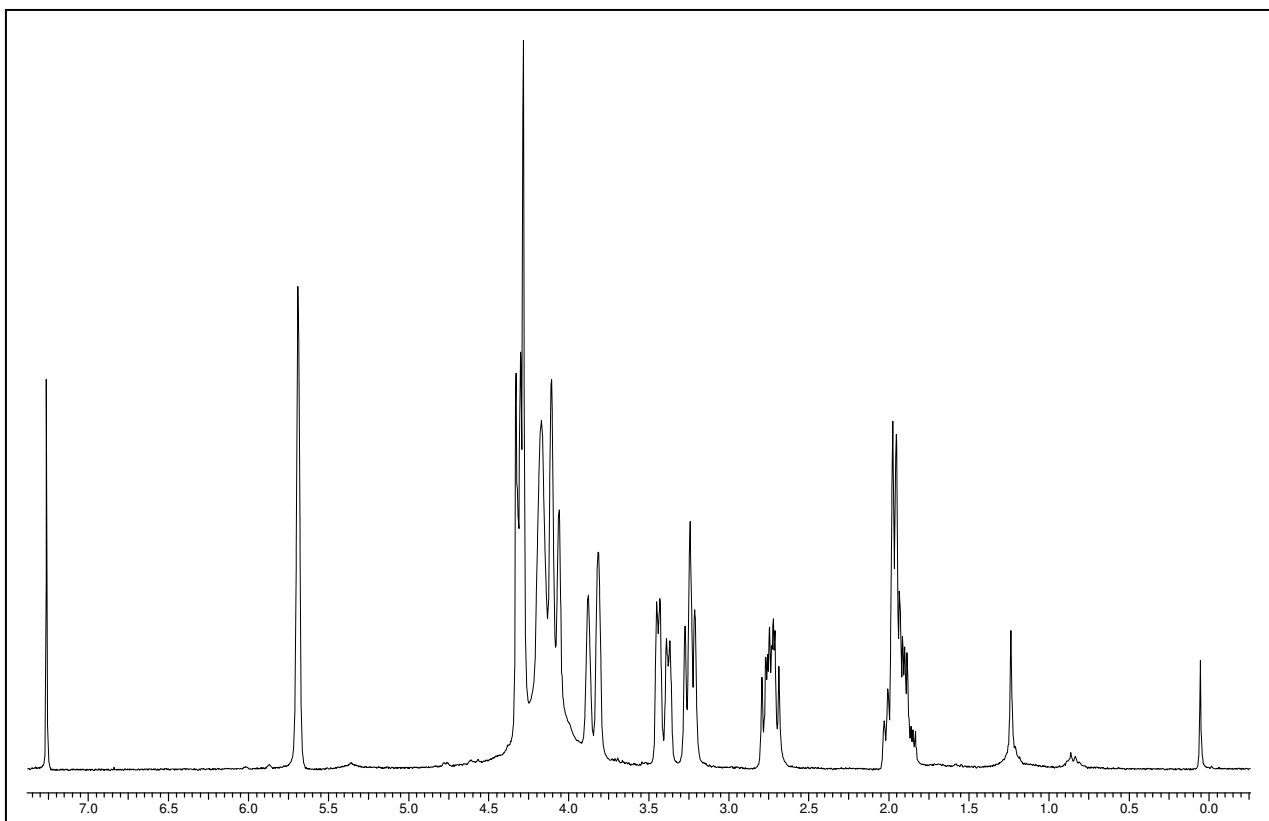


Figura 22: Espectro de RMN ^1H da retronecina (300 MHz, solvente CDCl_3).

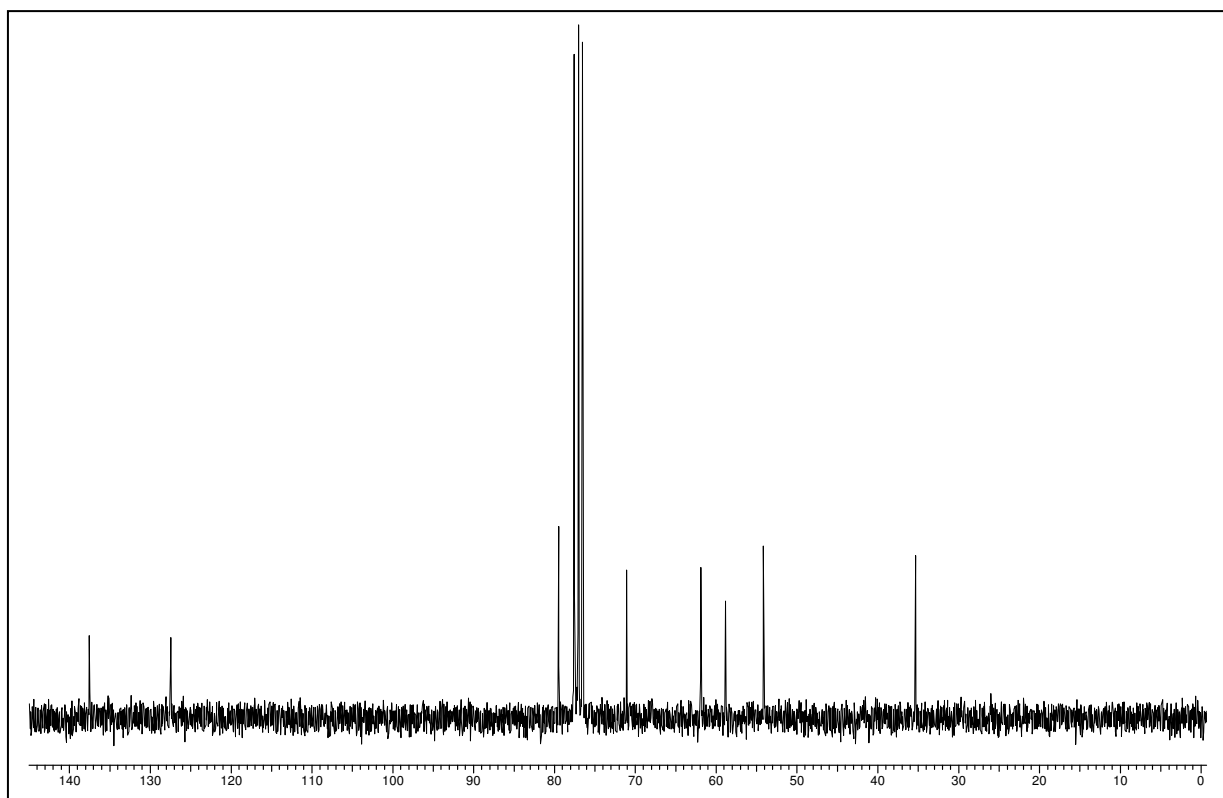


Figura 23: Espectro de RMN ^{13}C da retronecina (75 MHz, solvente CDCl_3).

Os sinais dos carbonos olefínicos (C_1 e C_2) aparecem em 137,5 e 127,4 ppm e os carbonos metilênicos (C_3 , C_5 , C_6 e C_9) na região entre 35,3 e 61,8 ppm. O carbono 6 (C_6) aparece na região de menor frequência do espectro em 35,3 ppm por ser o único carbono metilênico do anel com hibridação sp^3 que não está ligado ao átomo de nitrogênio.

Os sinais de carbonos metínicos (C_7 e C_8) absorvem em 71,0 e 79,4 ppm. O carbono 8 (C_8), diretamente ligado ao nitrogênio, absorve em maior frequência.

O espectro de RMN de hidrogênio da retronecina tem duas regiões com sobreposições de multipletos ocasionados por seis hidrogênios geminais não equivalentes ligados a C_3 , C_5 e C_9 .

O multipeto na região de menor frequência é referente aos hidrogênios ligados ao carbono 6, o único carbono metilênico do anel com hibridação sp^3 que não está ligado a heteroátomo. O singleto em maior frequência (5,7 ppm) pertence ao hidrogênio olefínico do carbono 2.

O grupo de sinais entre 4,0 e 4,5 ppm são referentes aos hidrogênios $H_{7\alpha}$ e $H_{8\alpha}$ e aos dois hidrogênios ligados ao carbono 9. Os dois multipletos na região de 3,4 a 3,9 ppm pertencem aos hidrogênios do carbono 3.

Os hidrogênios referentes ao carbono 5 ($H_{5\alpha}$ e $H_{5\beta}$) aparecem sob a forma de dois multipletos na região entre 2,6 e 3,3 ppm.

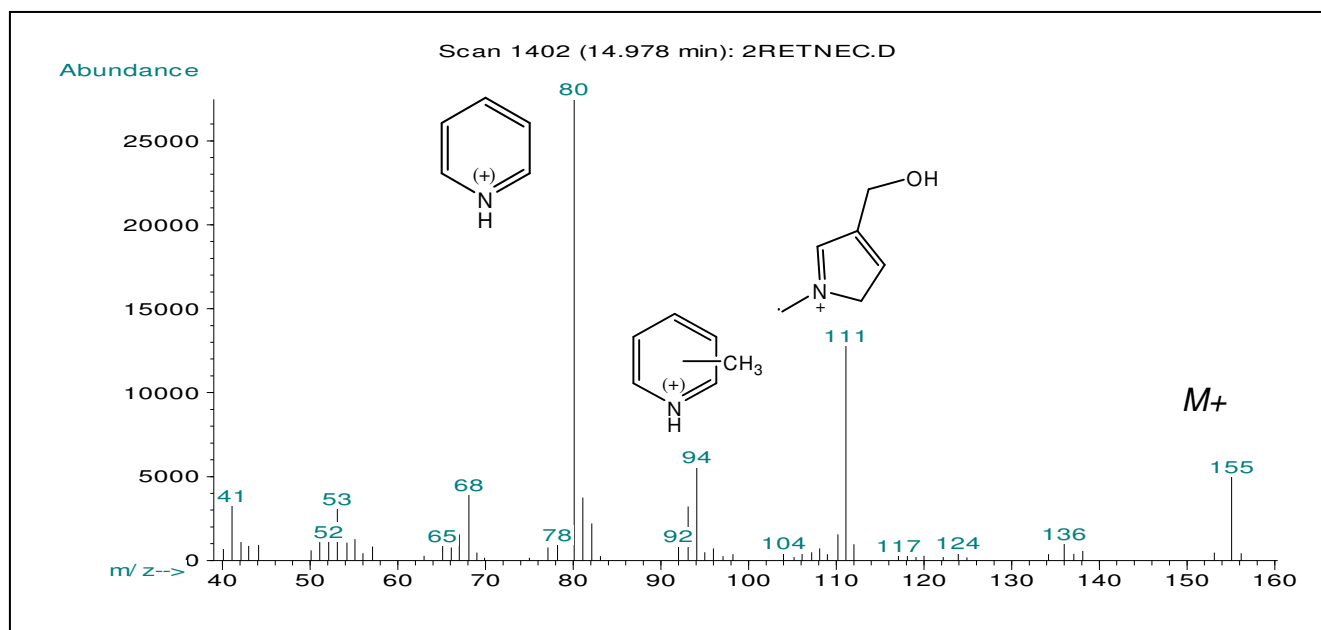
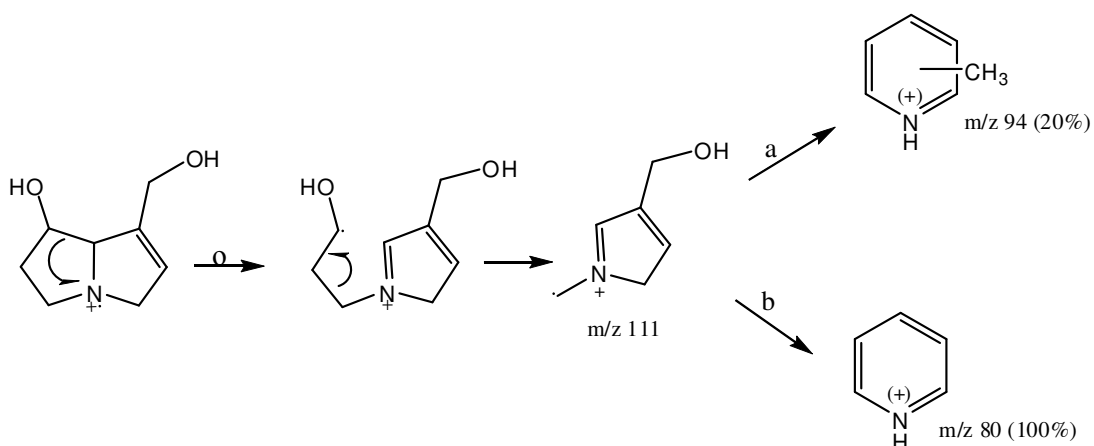


Figura 24: Espectro de massas obtido da retronecina.

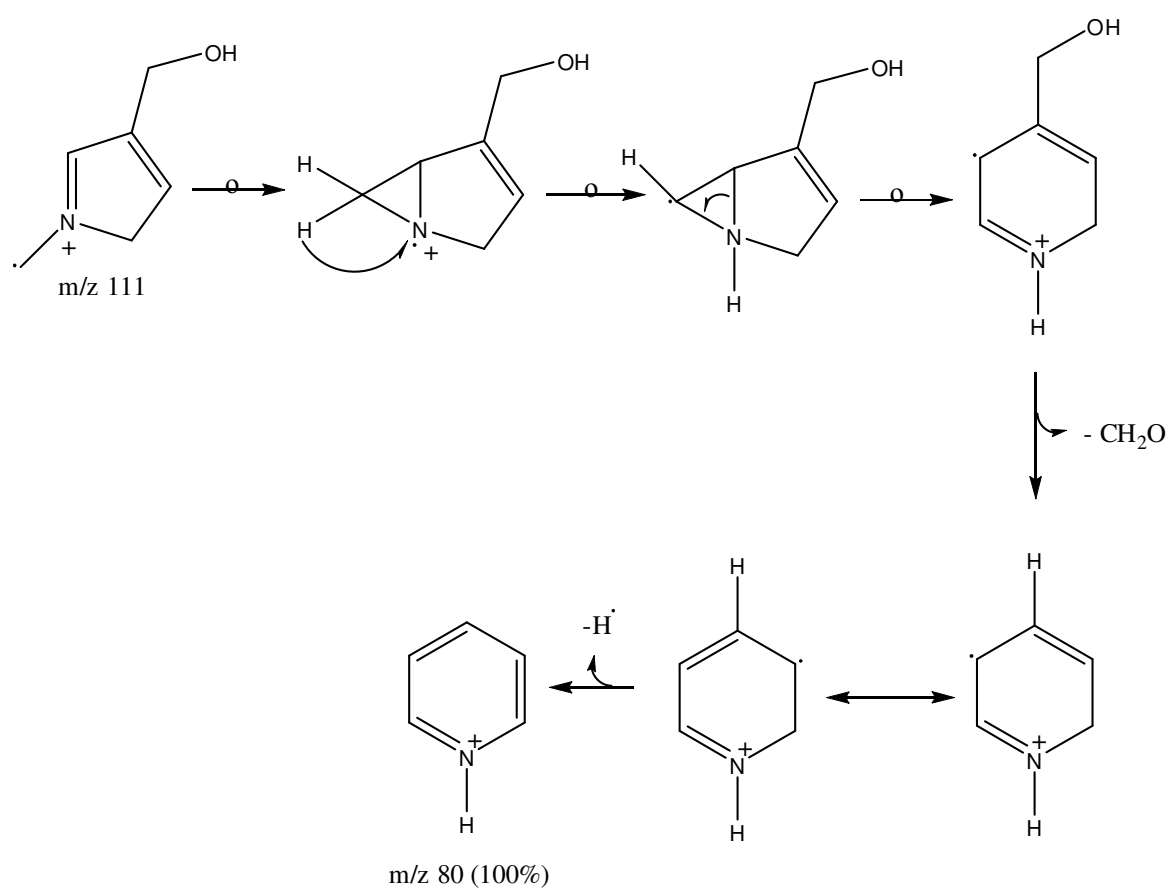
No Espectro de massas acima (Figura 24) o pico de m/z 155 é referente ao íon molecular da retronecina.

O Fragmento de m/z 111 é formado pela quebra da ligação C_7-C_8 seguida pela perda de $CH_2=CH-OH$ (Esquema 12).

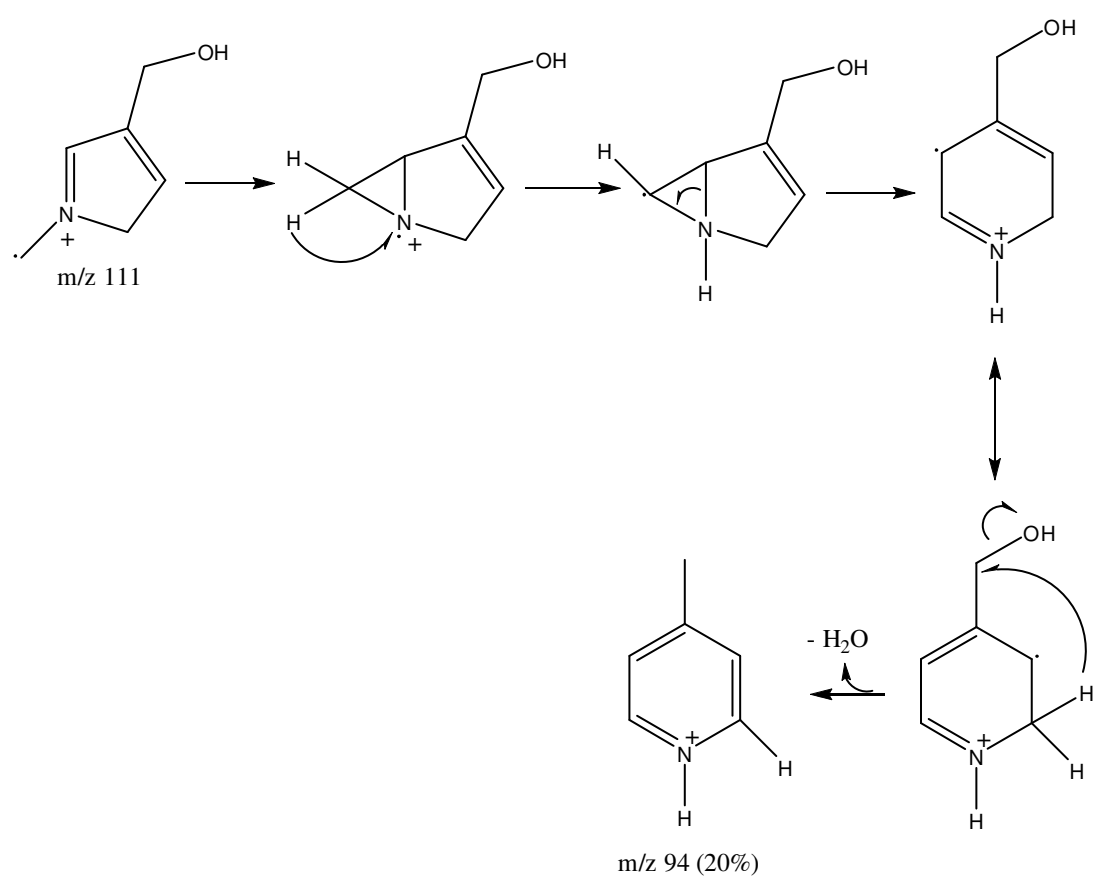


Esquema 12: Formação dos íons de m/z 80, 94 e 111 derivados da fragmentação da retronecina.

O cátion-radical de m/z 111 pode se rearranjar para gerar os fragmentos de m/z 80 e de m/z 94 como pode ser visto nos esquemas 13 e 14.

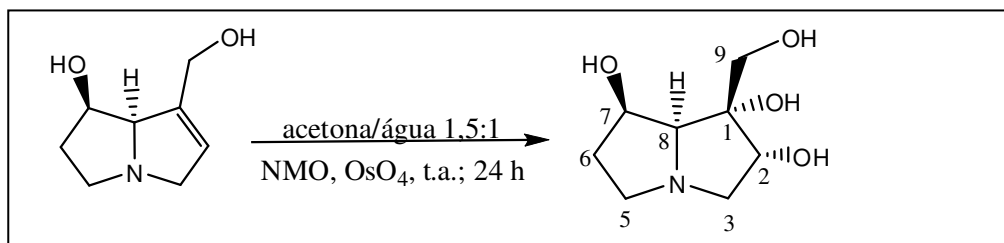


Esquema 13: Formação do fragmento m/z 80 derivado da retronecina.



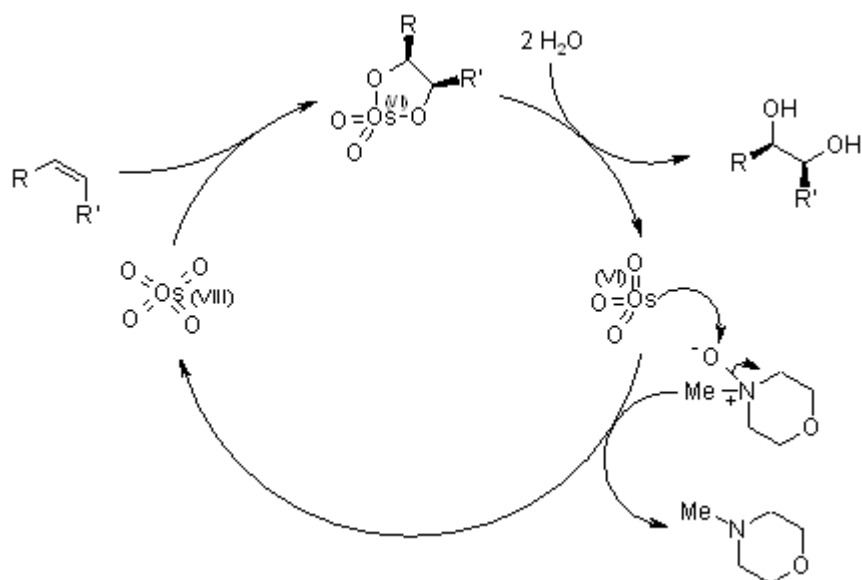
Esquema 14: Formação do fragmento de m/z 94 da retronecina.

3.3.2- Reação de diidroxilação da Retronecina

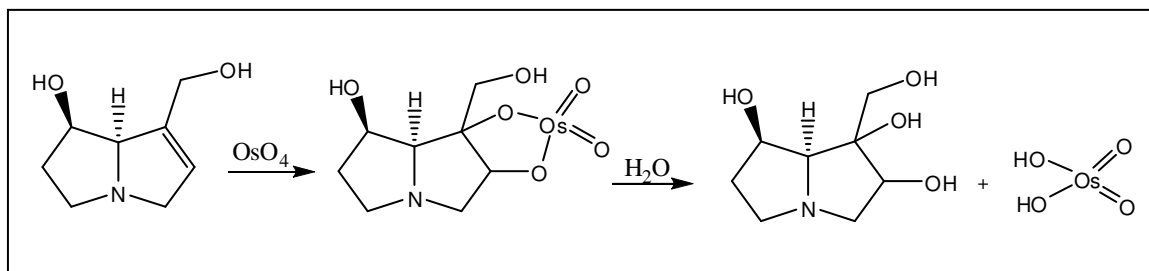


Esquema 15: Reação de diidroxilação da retronecina.

A diidroxilação de Upjohn, reação que utiliza tetróxido de ósmio como catalisador e *N*-metilmorfolina (NMO) como agente co-oxidante, foi a metodologia escolhida para a diidroxilação da retronecina. A presença de NMO permite que o tetróxido de ósmio seja utilizado em quantidades catalíticas, uma vez que o NMO reoxida o ósmio (VI) a ósmio (VIII), como pode ser visto no esquema 16. A diidroxilação de olefinas com tetróxido de ósmio é uma adição *syn* (PILLI, 2001), cujo intermediário cíclico ao ser hidrolisado resulta na incorporação das duas hidroxilas na mesma face da molécula.



Esquema 16: Mecanismo de oxidação com tetróxido de ósmio (retirado de <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/upjohn-dihydroxylation.shtm>, acessada em 2008).



Esquema 17: Esquema geral para obtenção do tetrol.

A reação de hidroxilação, utilizando tetróxido de ósmio, do alcaloide pirrolizidínico retronecina, obtido a partir da hidrólise da retrorsina e da retronecina derivada da rosmarinina, tiveram como produto o alcaloide hidroxilado pela face α do anel (NIETO-ALVAREZ; ALDERÓN; MANCILLA, 2003; CONEGERO, 2006).

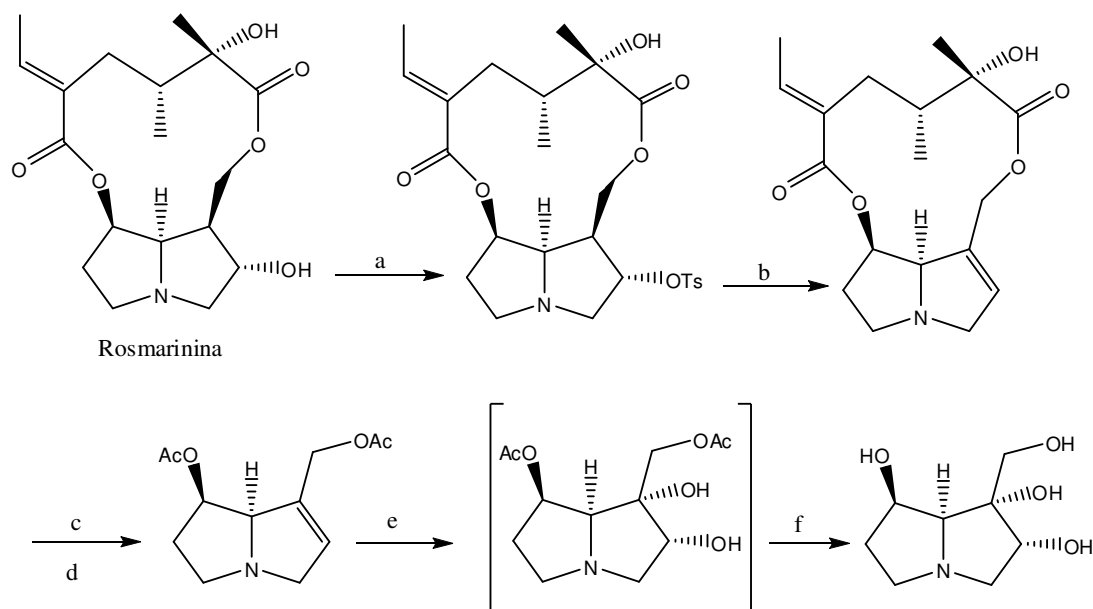
Os dados de deslocamento químico de RMN de ^{13}C (Tabela 4) do tetrol estão de acordo com os da literatura (CONEGERO, 2006).

Tabela 4: Tabela de deslocamentos químicos do produto de hidroxilação.

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)* Lit.
1	80,2	80,0
2	71,1	70,9
3	58,0	57,9
5	53,4	53,4
6	35,1	35,2
7	69,6	69,3
8	76,2	76,3
9	62,9	62,7

* Lit: Conegero, 2006. Solvente: D_2O .

Conegero (CONEGERO, 2006) não atribuiu a estereoquímica do alcaloide, aqui chamado de tetrol, em função da sobreposição dos sinais dos hidrogênios carbinólicos dos centros estereogênicos.



Esquema 18: Reações realizadas por Nieto-Alvarez e colaboradores. Reagentes e condições: a) TsCl, piridina, 5 °C, 72 h, 95 %; b) piridina, refluxo, 45 %; c) KOH/MeOH, refluxo; d) Ac₂O, refluxo, 30 min, 85 %; e) NMO/OsO₄(cat), t.a., acetona/água 3:1, 45 min.; f) K₂CO₃/MeOH, t.a., 65 %.

Nieto-Alvarez e colaboradores atribuíram a estereoquímica do alcaloide hidroxilado (tetrol) (Figura 25) com base nos experimentos de NOESY, devido às correlações por eles observadas entre os hidrogênios de C₉ (H_{9α} e H_{9β}) com os hidrogênios H₂, H₃ e H₅, que estão, por sua vez, ausentes com os hidrogênios H₇ e H₈. Estas observações indicaram que as hidroxilas nos carbonos C₁ e C₂ estão do mesmo lado de H₈ (NIETO-ALVAREZ; ALDERÓN; MANCILLA, 2003). Porém, as correlações de H₉ com H₃ e H₅, observadas por Nieto-Alvarez e colaboradores, geram dúvida em função da distância entre estes hidrogênios¹.

¹ O tetrol é pouco solúvel em CDCl₃, solvente usado por Nieto-Alvarez.

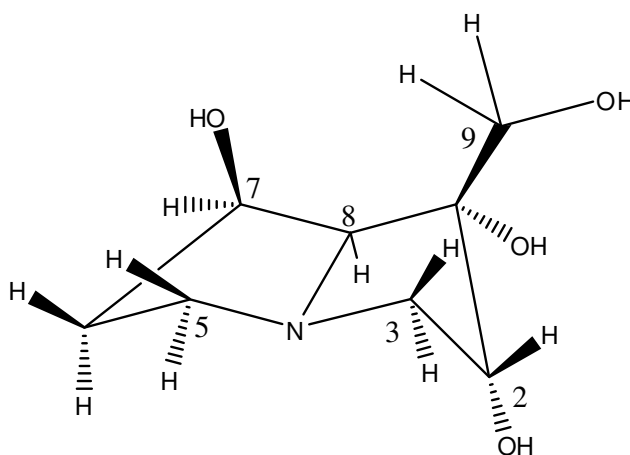


Figura 25: Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico (1*R*, 2*R*, 7*R*, 8*S*)-1-hidroximetil-1,2,7-tri-hidróxi-2,3,5,6,7,8-hexaidropirrolizidina-1,2,7 (NIETO-ALVAREZ; ALDERÓN; MANCILLA, 2003).

A tabela 5 mostra os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H e as correlações homocleares e binucleares do alcaloide tetraidroxilado, obtido com 76 % de rendimento.

Tabela 5: Dados espectroscópicos de RMN ^{13}C e ^1H do tetrol.

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)*	$\delta^1\text{H}$ (ppm)**		COSY**	HMBC ($^2J_{\text{C,H}}$; $^3J_{\text{C,H}}$)**
1	81,1	-----			3,9 ($\text{H}_{9\beta}$)
2	71,8	4,4 (1H,t, $J=8,5$)		3,0; 3,2	3,0 ($\text{H}_{3\alpha}$); 3,8 ($\text{H}_{9\alpha}$), 3,9 ($\text{H}_{9\beta}$)
3	60,8	α	3,0 (1H, m)	3,2; 4,4	4,4 (H_2)
		β	3,2 (1H, m)	3,0; 4,4	
5	54,8	α	2,9 (1H, m)	3,3; 1,9	3,0 ($\text{H}_{3\alpha}$); 4,3 (H_7)
		β	3,3 (1H, m)	2,9; 1,9	
6	36,8	1,9 (2H, m)		2,9; 3,3; 4,3	
7	70,4	4,3 (1H, sl)		3,4; 1,9	
8	79,0	3,4 (1H, sl)		4,3	3,8 ($\text{H}_{9\alpha}$), 3,9 ($\text{H}_{9\beta}$)
9	64,3	α	3,8 (1H,d, $J=11,4$)	3,9	4,4 (H_2)
		β	3,9 (1H,d, $J=11,4$)	3,8	

* Solvente: D_2O ** Solvente: CD_3OD .

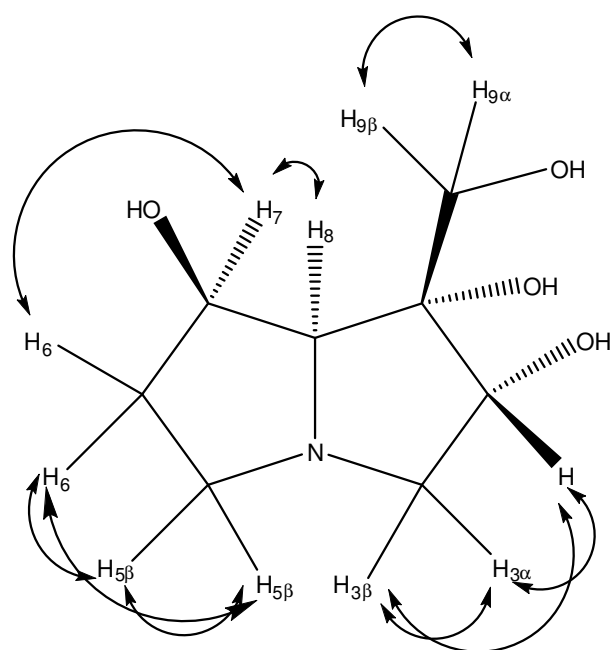


Figura 26: Correlações encontradas no COSY para o tetrol.

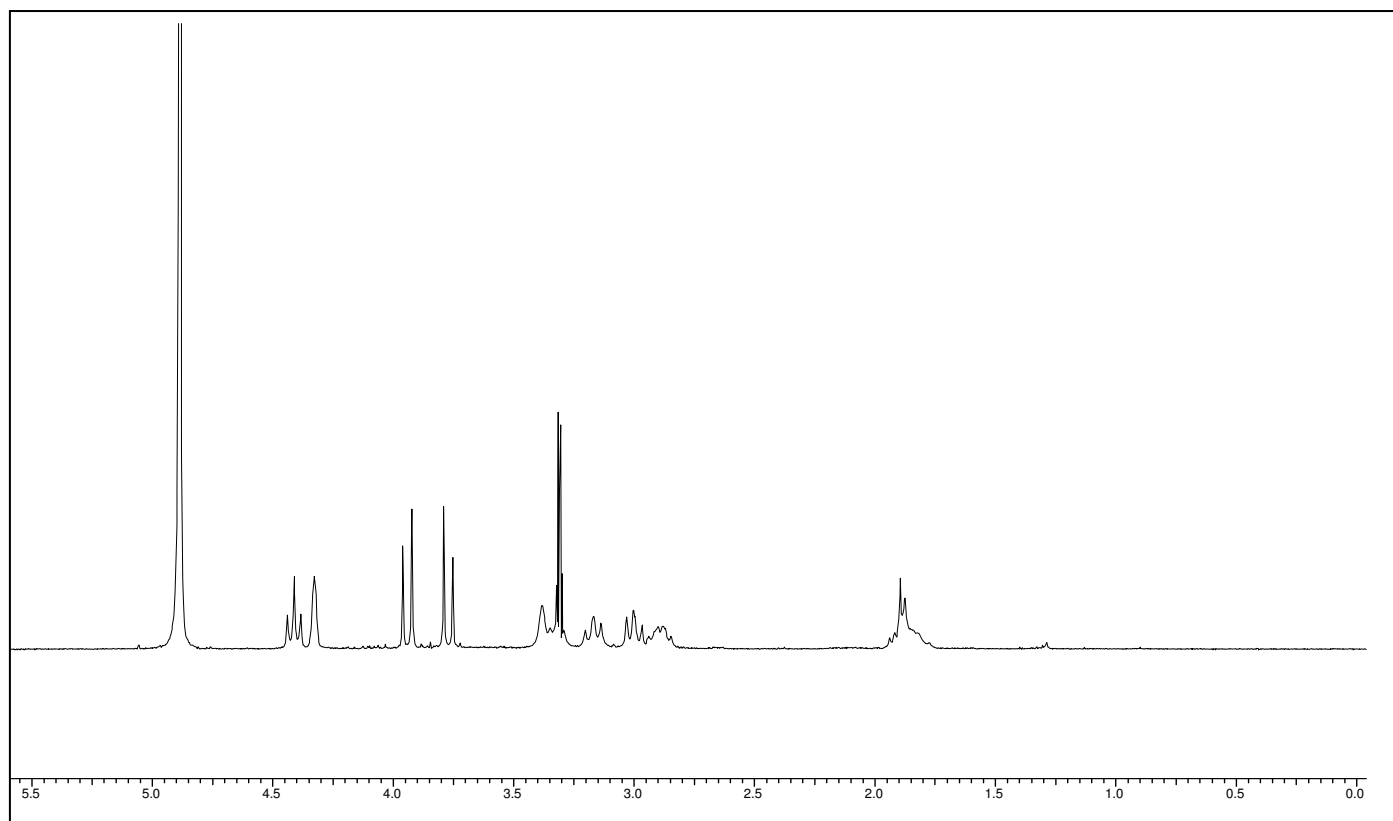


Figura 27: Espectro de RMN ^1H do tetrol (300 MHz, solvente CD_3OD).

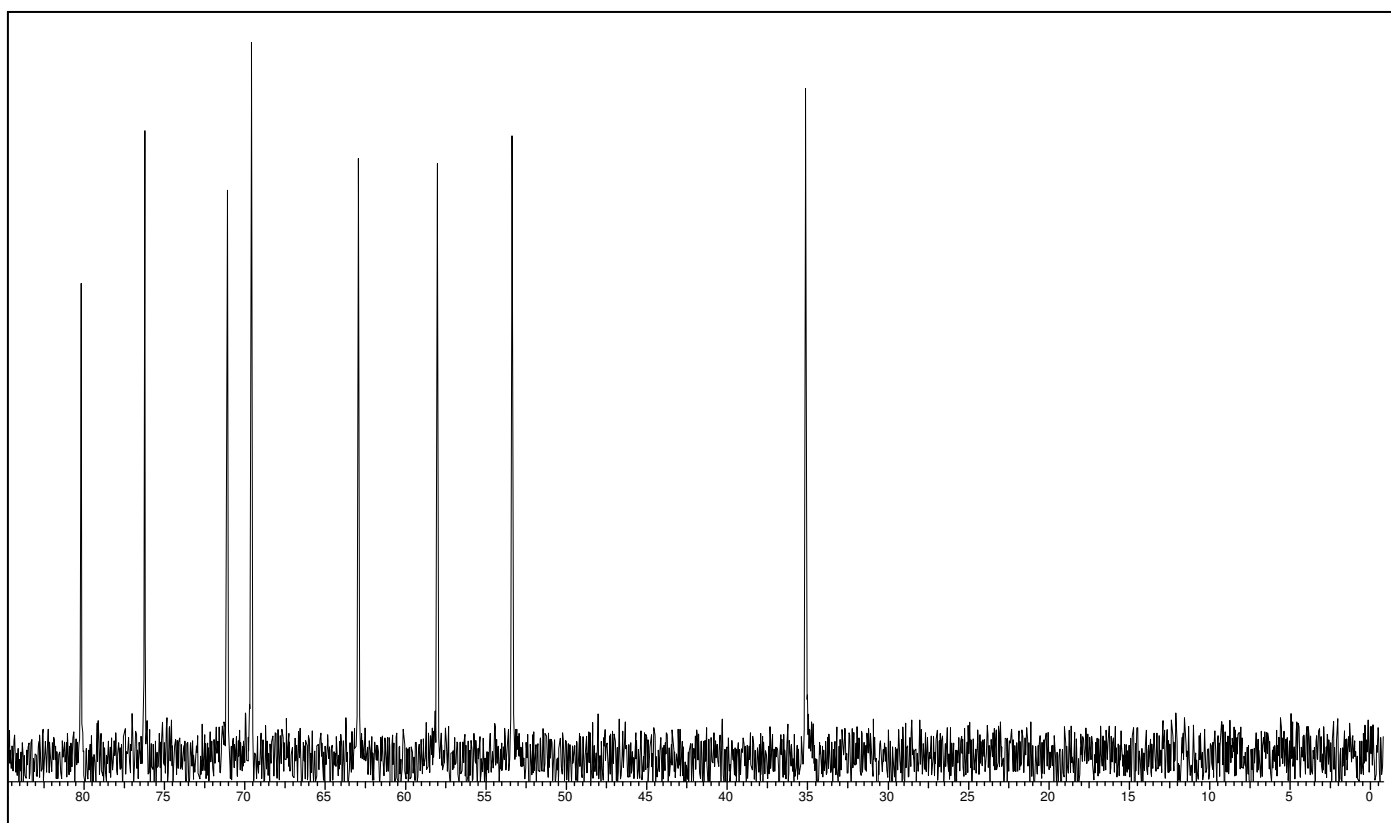


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C do tetrol (75 MHz, solvente D_2O).

Diante dos resultados de Conegero (CONEGERO, 2006) e Nieto-Alvarez e colaboradores (NIETO-ALVAREZ; ALDERÓN; MANCILLA, 2003), resolveu-se investigar a estereoquímica relativa do tetrol.

O espectro de RMN ^{13}C confirma a diidroxilação da ligação $\text{C}_1\text{-C}_2$ por causa do desaparecimento dos carbonos olefínicos em 137,5 ppm e 127,4 ppm, presentes na retronecina.

O sinal referente ao hidrogênio 2 aparece na região de maior frequência do espectro (4,4 ppm). O singlete largo referente ao H_7 aparece em 4,3 ppm. Os pares de hidrogênios diastereotópicos de C_3 , C_5 e C_9 estão, respectivamente, em 3,0; 3,2 ($\text{H}_{3\alpha}$ e $\text{H}_{3\beta}$); 2,9; 3,3 ($\text{H}_{5\alpha}$ e $\text{H}_{5\beta}$) e 3,8; 3,9 ppm ($\text{H}_{9\alpha}$ e $\text{H}_{9\beta}$), sendo os sinais referentes aos hidrogênios $\text{H}_{9\alpha}$ e $\text{H}_{9\beta}$ dois dubletos que acoplam com J de 11,4 Hz.

Os hidrogênios de C_6 aparecem na forma de multipletos em 1,9 ppm, enquanto que o singlete largo referente a H_8 absorve em 3,4 ppm. Todos os acoplamentos e atribuições de deslocamentos químicos foram confirmados por experimento COSY.

Os espectros de NOESY mostraram as correlações dos hidrogênios $\text{H}_{9\alpha}$ com H_2 e $\text{H}_{9\beta}$ com H_2 e H_7 . Não foram observadas correlações dos hidrogênios $\text{H}_{9\alpha}$ e $\text{H}_{9\beta}$

com H_8 . Estes dados confirmam os resultados encontrados por Nieto-Alvarez e colaboradores (NIETO-ALVAREZ; ALDERÓN; MANCILLA, 2003) que mostraram que a hidroxilação da retronecina com tetróxido de ósmio ocorre pela sua face α .

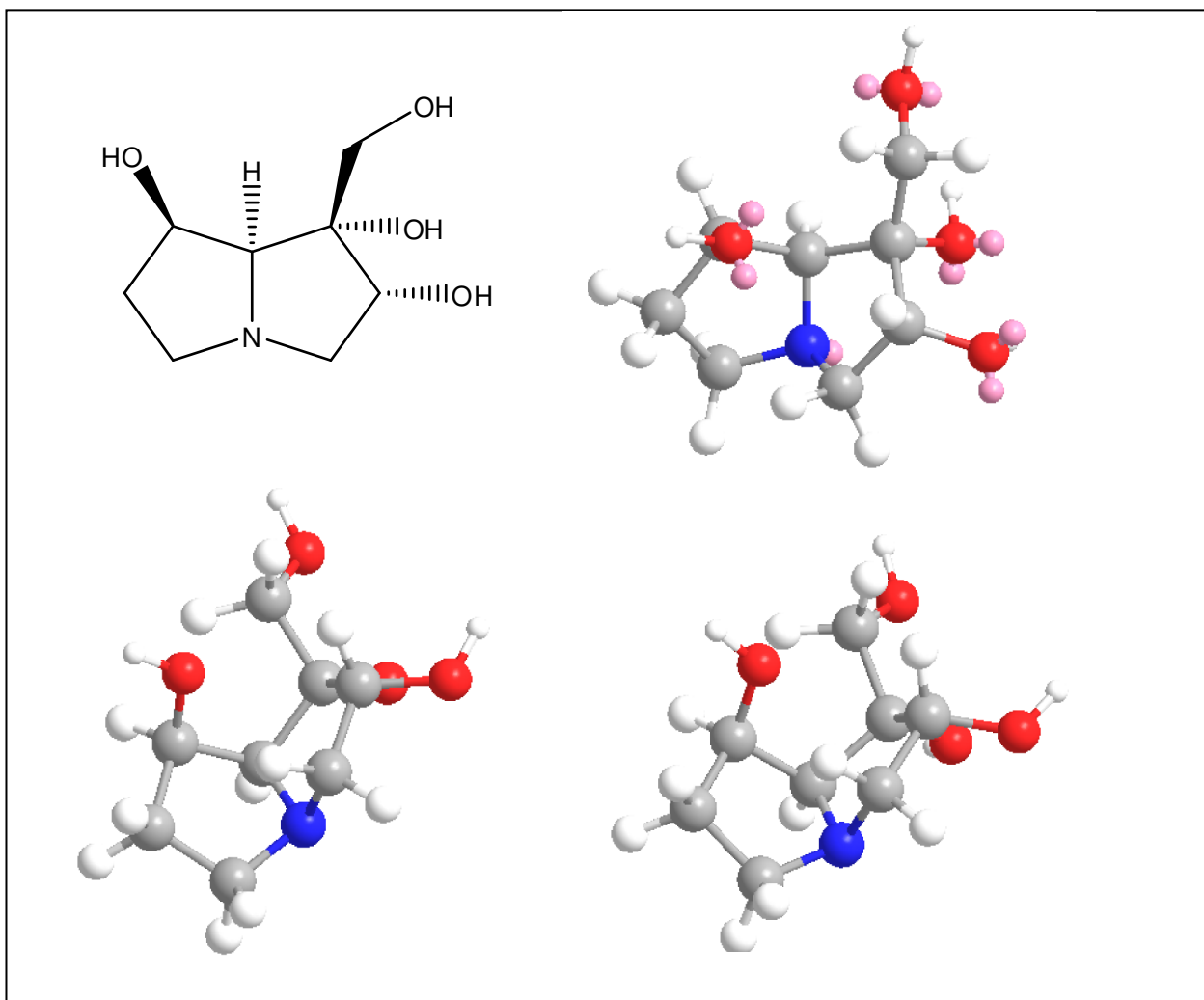


Figura 29: Estrutura espacial do tetrol apresentada por diferentes ângulos.

Os alcaloides monocrotalina, retrorsina e retronecina possuem fusão de anel *cis*, estruturas confirmadas por difração de Raio-X (Figura 30), em que o par de elétrons do átomo de nitrogênio está do mesmo lado do hidrogênio ligado a C_8 (STOECKLI-EVANS, 1979; COLEMAN; COUCOURAKIS; PRETORIUS, 1980; FREER; KELLY; ROBINS, 1986).

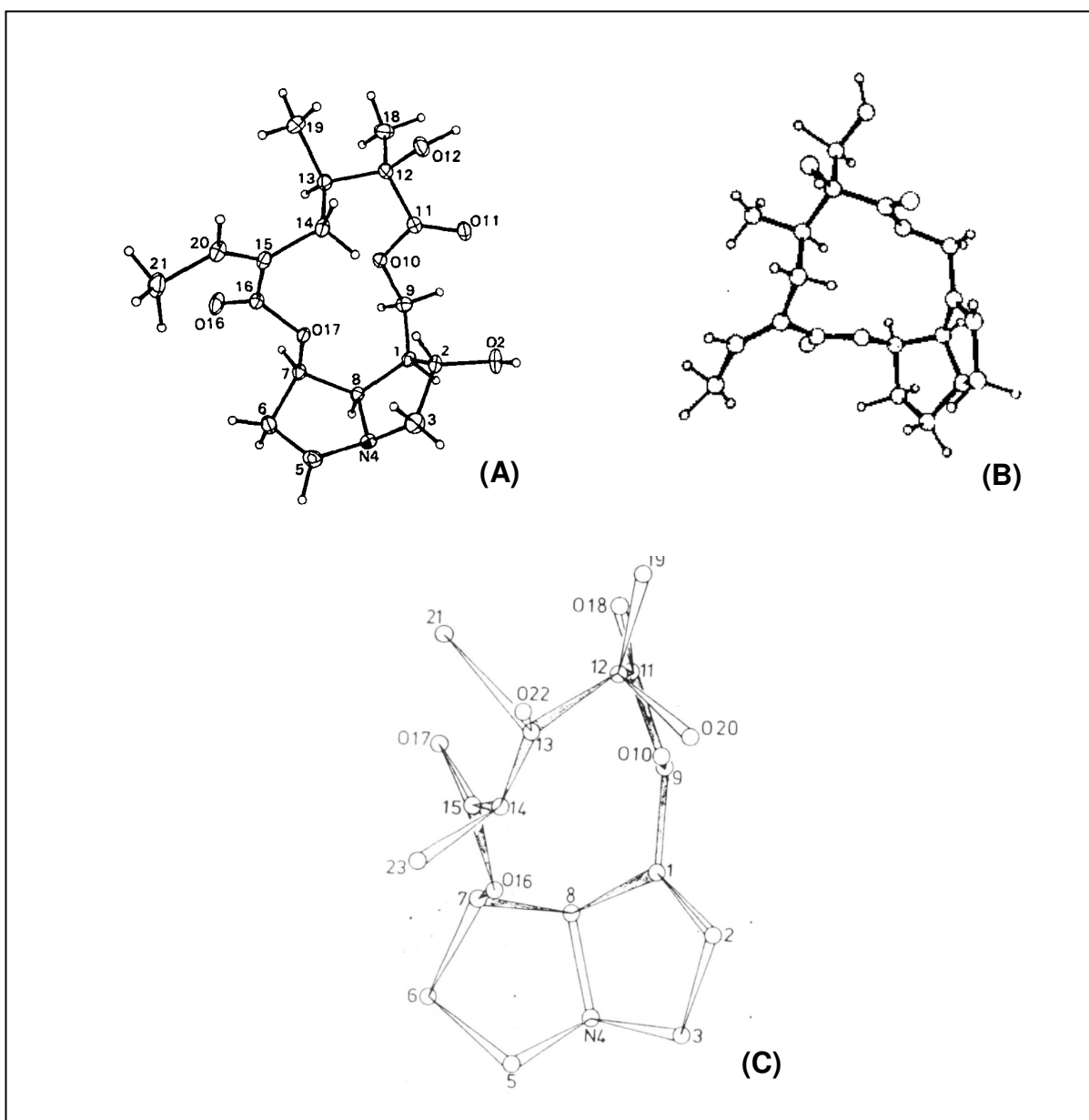


Figura 30: Estrutura química determinada por difração de Raio-X da retrorsina (A), rosmarinina (B) e monocrotalina (C).

Há duas conformações principais possíveis para a retronecina: *exo* e *endo*. Cálculos semi-empíricos (MP3 e *ab initio*) mostraram que a conformação *exo*, devido, em parte, a ligação de hidrogênio intramolecular entre H (11') e O (10) é mais estável cerca de 2,6 Kcal mol⁻¹ do que a conformação *endo* (CULVENOR; HEFFERMAN; WOODS, 1965; GLINSKI; VAN DERVEER; ZALKOW, 1985; GIORDAN; CUSTÓDIO; TRIGO, 1996; GIORDAN, 1998).

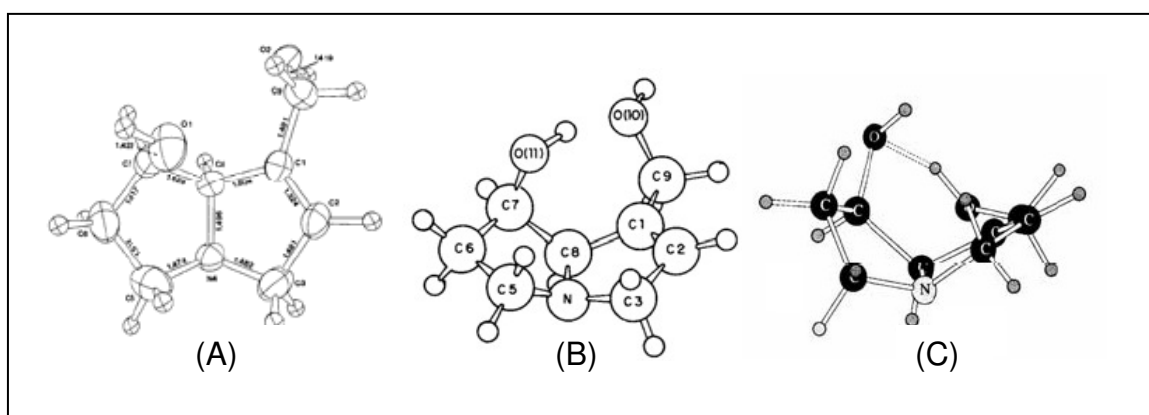
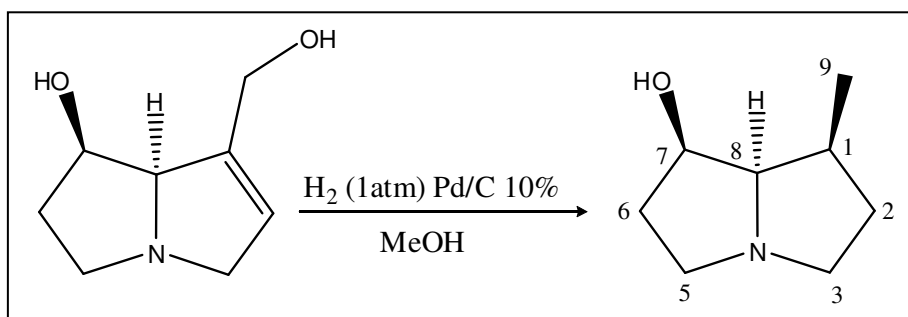


Figura 31: Conformações da retronecina. (A) Conformação *exo* determinada por difração de Raio-X; (B) Conformação *exo* rígida em função da ligação H (11') e O (10); (C) conformação *endo*.

Esta interação de hidrogênio forma um pseudoanel de sete membros, deixando a face convexa da molécula mais acessível.

Estes dados corroboram o porquê da dihidroxilação da retronecina ocorrer pela face α da molécula, já que esta é bem menos impedida, logo mais acessível.

3.3.3 - Reação de Hidrogenólise da retronecina: Obtenção do retronecanol



Esquema 19: Hidrogenação da retronecina.

A retronecina foi hidrogenada à pressão de uma atmosfera, na presença de Pd/C 10% como catalisador, durante 24 horas. Por CCF observou-se que toda a retronecina foi consumida, devido à presença de uma única mancha na placa.

Entretanto, quando se analisou o produto da reação por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas constatou-se a presença de 2 picos com tempos de retenção (tr) muito distintos. O 1º pico com tr de 10,83 minutos é amplamente majoritário em relação ao composto com tr de 23,83 minutos. Os íons moleculares destes dois compostos foram de m/z 141 e 157, respectivamente.

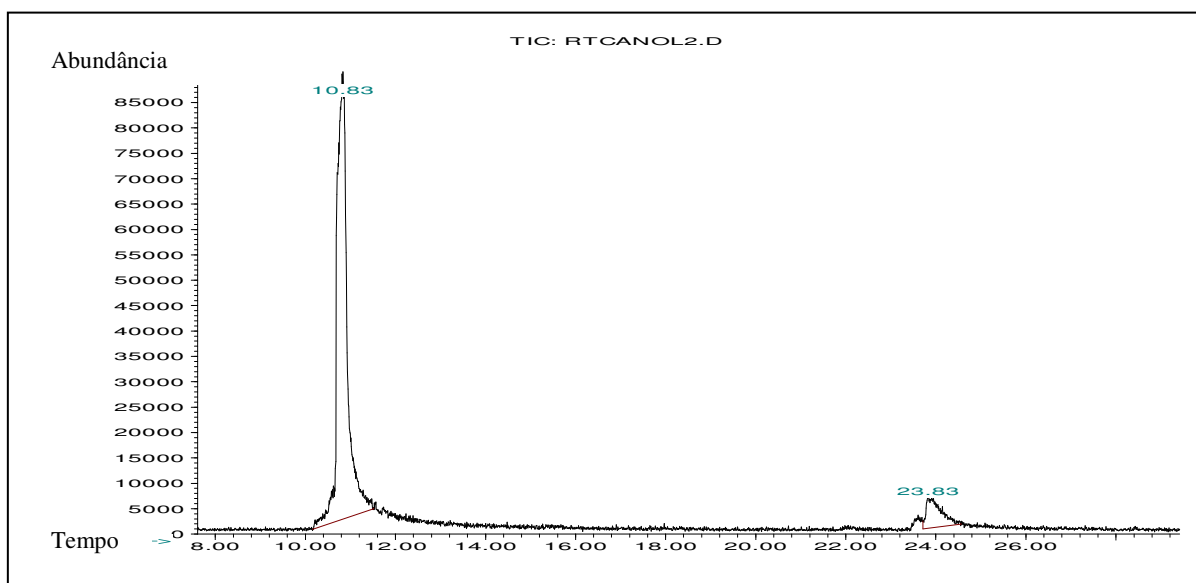


Figura 32: Cromatograma de íons totais do produto de redução da retronecina. Condições de análise: Coluna DB1-HT (15 m x 0,2 mm), fluxo de He 1 mL/min, modo de injeção: split, temperatura inicial: 40 °C, gradiente 3 °C/min (T = 200 °C) e gradiente de 15 °C/min (T = 250 °C). Temperatura do injetor: 250 °C e temperatura auxiliar: 300 °C.

Os espectros de RMN ^{13}C , ^1H e de massas revelaram que o produto majoritário da hidrogenação de retronecina é o retronecanol, produto proveniente da hidrogenólise da retronecina. Entretanto, a metila ligada a C_1 tanto pode ter orientação α como β (Figura 33).

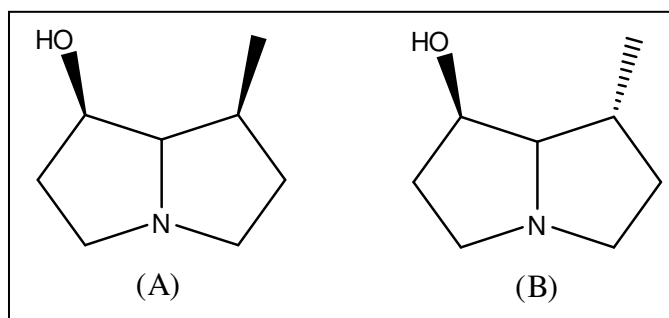


Figura 33: (A) retronecanol com a metila na orientação β , (B) retronecanol com a metila na orientação α .

Tabela 6: Dados espectroscópicos de RMN de ^{13}C e RMN de ^1H para o retronecanol. Solvente: CDCl_3 .

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)		$\delta^1\text{H}$ (ppm)	COSY	HMBC ($^2J_{\text{C,H}}$; $^3J_{\text{C,H}}$)
1	34,9		2,5 (1H,m)	1,3; 3,9	1,9 ($\text{H}_{2\alpha}$); 3,1 ($\text{H}_{3\beta}$)
2	32,0	α	1,9 (1H, m)	3,6	1,3 (H_9)
		β	2,2 (1H, m) *	4,0; 3,6; 3,1	
3	55,2	α	3,1 (1H, m)	3,6; 2,2	
		β	3,6 (1H, m)	3,9; 2,2; 1,9	
5	54,5	α	3,2 (1H, m)	4,0	2,1 ($\text{H}_{6\alpha}$); 3,1 ($\text{H}_{3\beta}$)
		β	4,0 (1H, m)	2,2; 3,2; 2,1	
6	36,8	α	2,1 (1H, m)	4,0; 4,6	
		β	2,2 (1H, m) *	4,0	
7	71,3		4,6 (1H, sl)	4,0; 2,1	
8	74,2		3,9 (1H, m)	4,6; 2,5	1,9 ($\text{H}_{2\alpha}$); 1,3 (H_9)
9	12,7		1,3 (3H, d, $J=6,7$)	2,5	2,5 (H_1); 2,2 ($\text{H}_{2\beta}$)

* Os hidrogênios $\text{H}_{2\beta}$ e $\text{H}_{6\beta}$ aparecem no multipeto em 2,2 ppm.

O espectro COSY confirma os acoplamentos observados no espectro de RMN ^1H , além de mostrar alguns acoplamentos à longa distância.

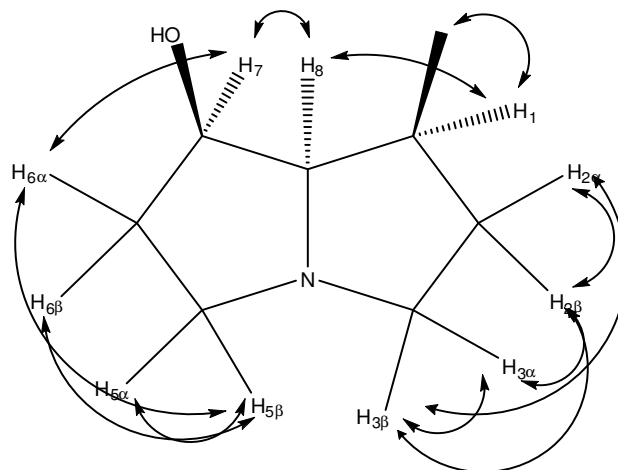


Figura 34: Correlações encontradas no COSY para o retronecanol.

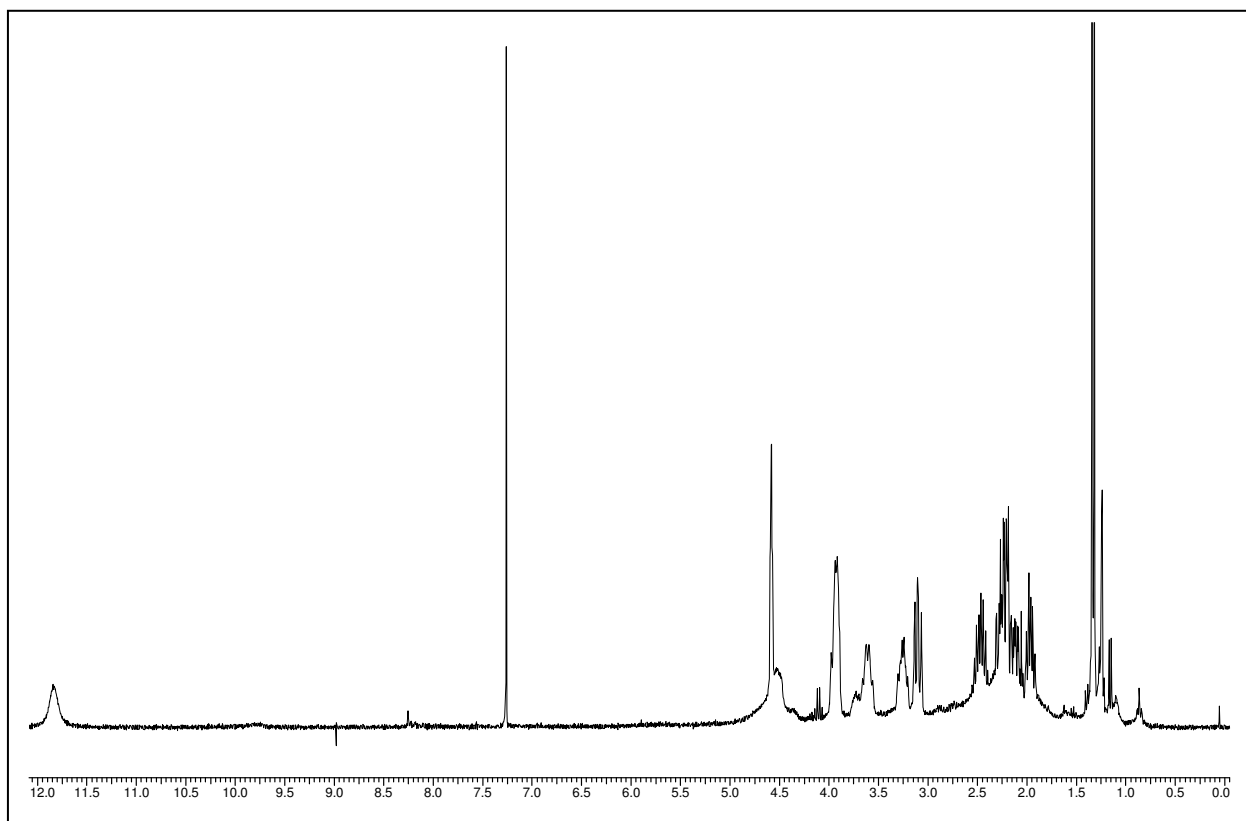


Figura 35: Espectro de RMN ^1H do retronecanol (300 MHz, solvente CDCl_3).

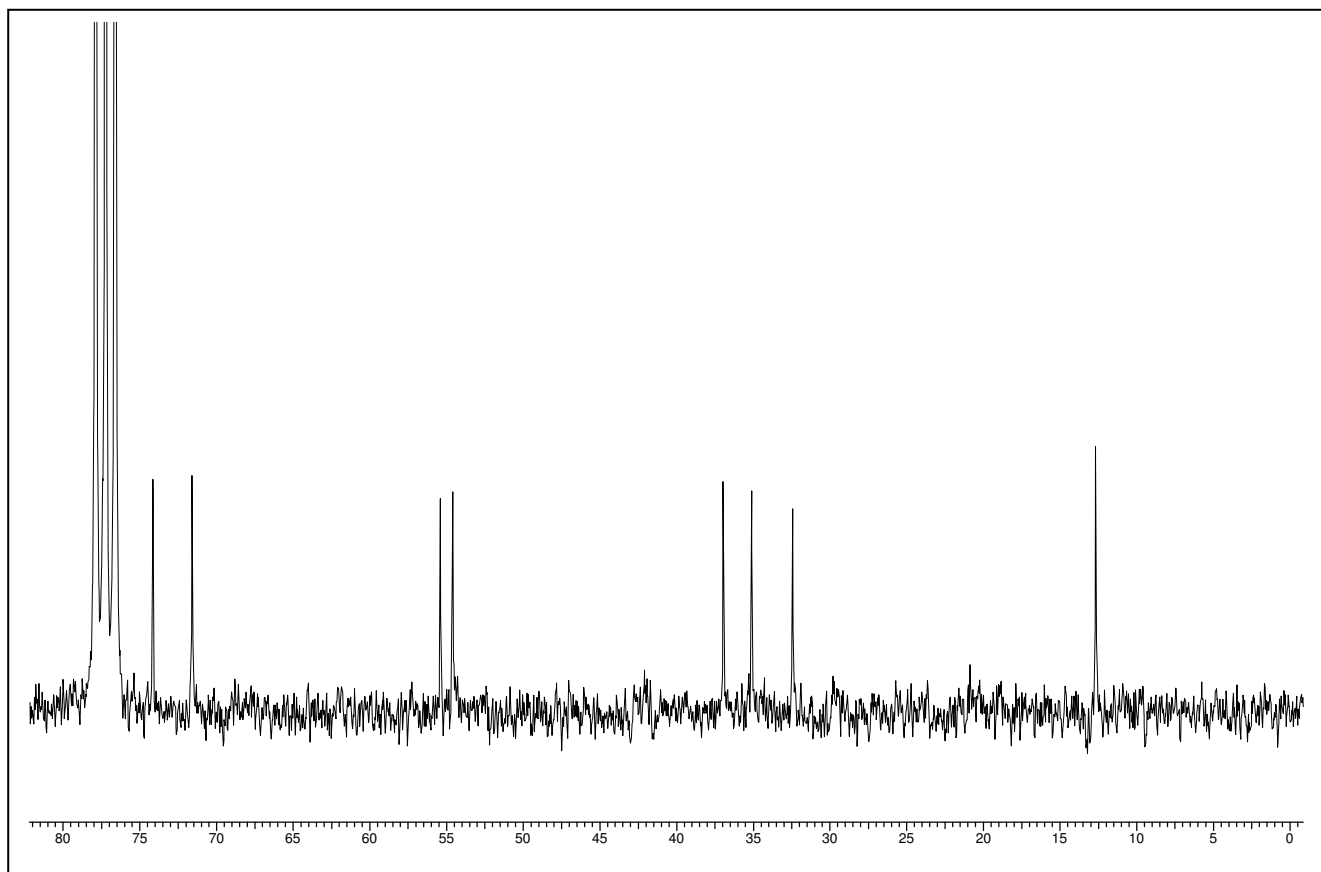


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C do retronecanol (50 MHz, solvente CDCl_3).

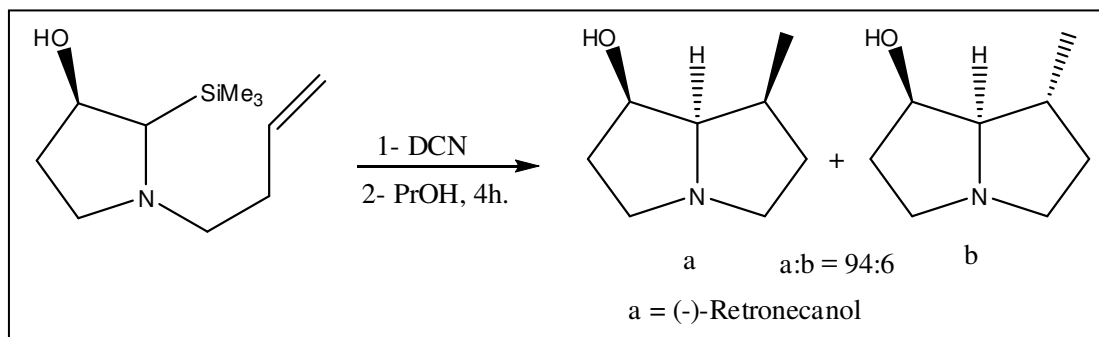
O espectro de RMN de ^{13}C dessa mistura, obtida em 72 % de rendimento, mostrou apenas a presença de oito sinais, referentes ao composto majoritário.

No espectro de RMN ^1H , aparece em maior frequência o singlete largo referente a H_7 (4,6 ppm); hidrogênio que está ligado ao carbono hidroxilado.

Todos os hidrogênios metilênicos da molécula são diastereotópicos. Entre 3,8 e 4,0 está o multipeto referente aos hidrogênios $\text{H}_{5\beta}$ e H_8 , e o multipeto em 2,2 ppm é devido aos hidrogênios $\text{H}_{2\beta}$ e $\text{H}_{6\beta}$.

Os dubleto em 1,3 ppm é referente aos hidrogênios da metila de C_9 .

Pandey e colaboradores sintetizaram, através da reação fotoquímica por transferência de elétrons, o que eles acreditaram ser o retronecanol (Esquema 20) (PANDEY; CHAKRABARTI, 1996).



Esquema 20: Síntese do retronecanol (Pandey, Chakrabarti, 1996).

Porém, os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C , principalmente os referentes a C_3 e C_8 , do alcaloide chamado por Pandey & Chakrabarti de retronecanol (apresentados como nota bibliográfica do artigo), não coincidem com os do nosso produto de reação.

Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C do produto de hidrogenólise e do produto sintetizado por Pandey & Chakrabarti.

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Lit*
1	34,9	33,5
2	32,0	30,7
3	55,2	60,7
5	54,5	55,0
6	36,8	35,6
7	71,3	69,0
8	74,2	69,8
9	12,7	14,2

* Lit.: Pandey; Chakrabarti, 1996. Solvente não especificado.

A grande discrepância encontrada entre os valores de RMN de ^{13}C para o retronecanol obtido por síntese e o retronecanol obtido pela redução da retronecina pode ser explicada pela diferença na orientação da metila ligada ao C_1 .

Segundo Pandey & Chakrabarti, o produto obtido em sua reação encontra-se com a metila na orientação β , mas estes autores não apresentam dados espectroscópicos de correlações espaciais.

Na análise de NOESY para o produto de hidrogenólise da retronecina, as fortes correlações entre o hidrogênio de C_8 com os hidrogênios de C_9 e com o hidrogênio de C_1 confirmam que a metila tem orientação β , e que a análise de Pandey & Chakrabarti está, certamente, equivocada. O produto obtido por síntese deve corresponder ao epímero do (-)-retronecanol, obtido por nós nesta dissertação.

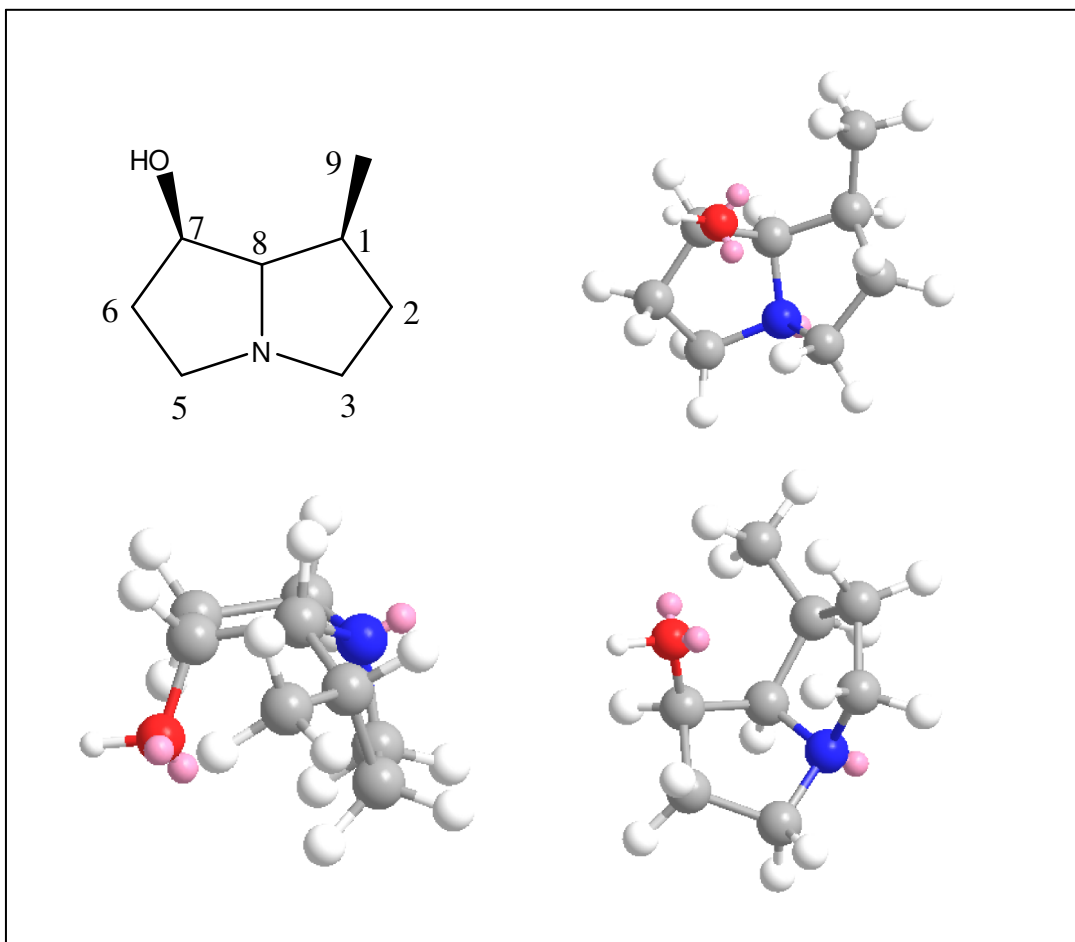


Figura 37: Estrutura espacial do Retronecanol vista por diferentes ângulos.

O espectro de massas abaixo (Figura 38) é referente ao produto majoritário da reação.

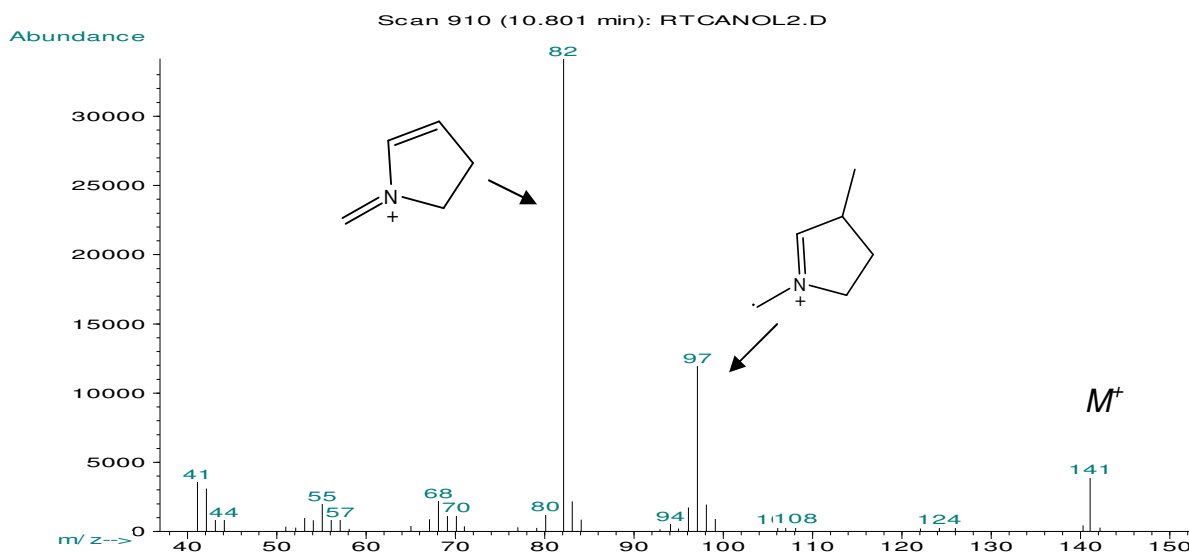
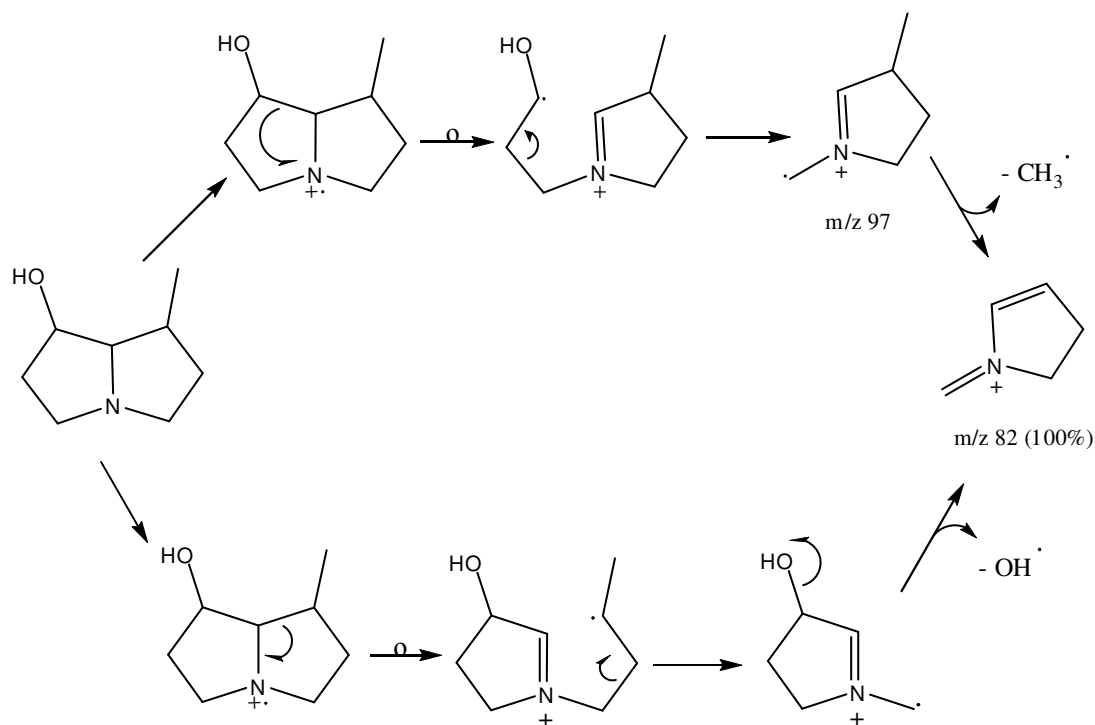


Figura 38: Espectro de massas do retronecanol.

A formação do fragmento de m/z 97 resulta da quebra da ligação C_7-C_8 , seguido da perda de $CH_2=CH-OH$ (Esquema 21).

O fragmento de m/z 82 pode ser formado via duas rotas de fragmentação:

- A partir de m/z 97 por perda de $\cdot CH_3$.
- A partir da quebra da ligação C_8-C_1 , seguido da perda de $CH_3-CH=CH_2$ e do radical $\cdot OH$.



Esquema 21: Formação dos íons de m/z 97 e m/z 82 derivados da fragmentação do retronecanol.

O espectro de massas do produto minoritário da reação (Figura 40), com íon molecular de m/z 157, é referente à hidrogenação da ligação dupla da retronecina, a platinecina (Figura 39).

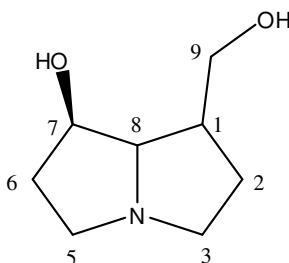


Figura 39: Estrutura química da platinecina.

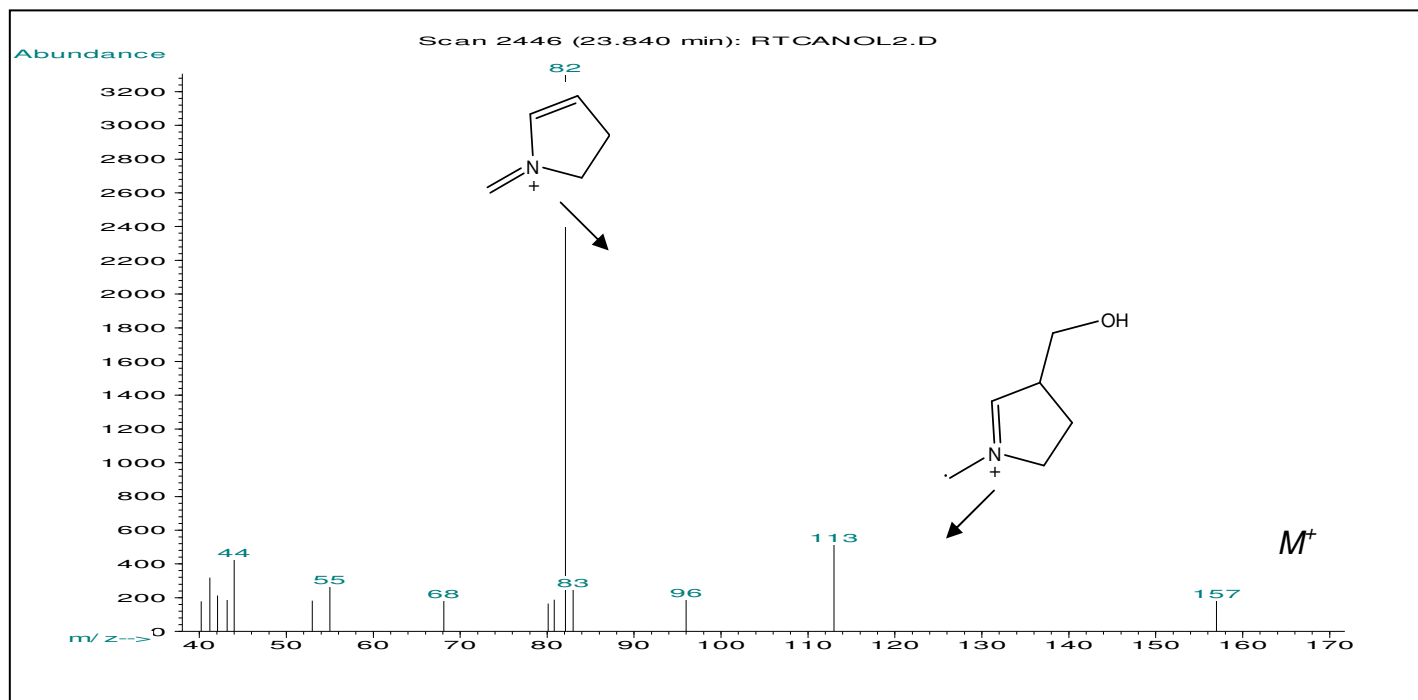
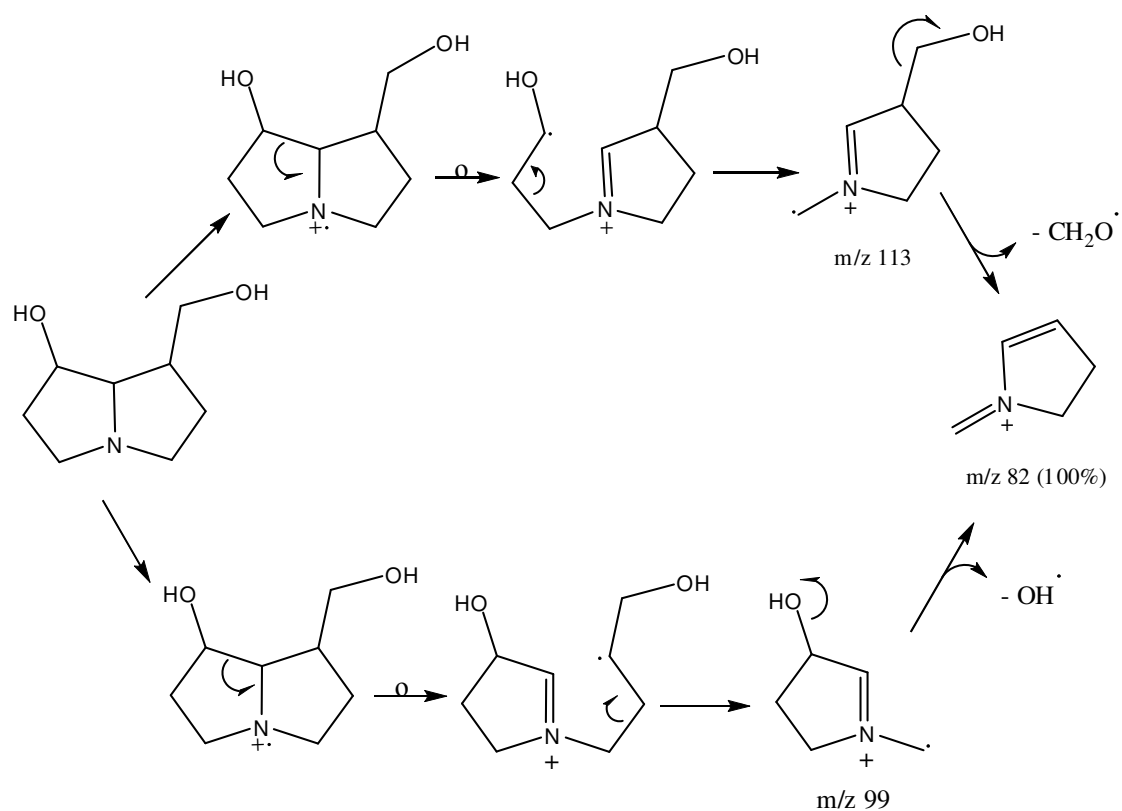


Figura 40: Espectro de massas da platinecina.

A formação de m/z 113 resulta da quebra da ligação C₇-C₈, seguido da perda do fragmento CH₂=CH-OH (Esquema 22).

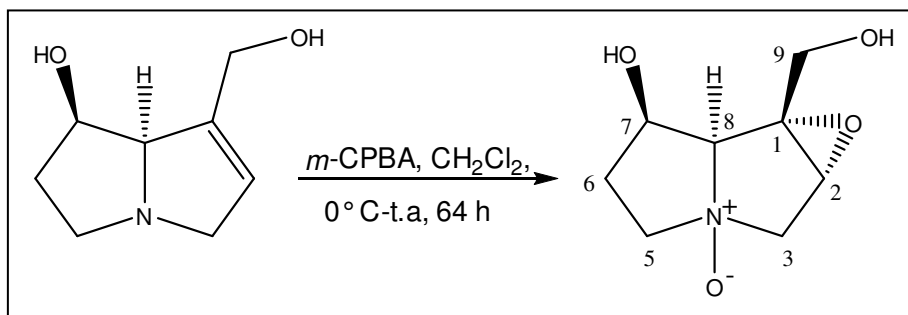
O fragmento de m/z 82 pode ser proposto via duas rotas de fragmentação:

- A partir de m/z 113 por perda do radical $\cdot$ CH₂OH.
- A partir da quebra da ligação C₈-C₁, seguido da perda de CH₂=CH-CH₂OH e do radical $\cdot$ OH.



Esquema 22: Formação dos íons de m/z 82, 99 e 113 derivados da fragmentação da platinecina (NEUNER-JEHLE; NEVASBDA; SPITELLER, 1965).

3.3.4 - Reação de Epoxidação da Retronecina

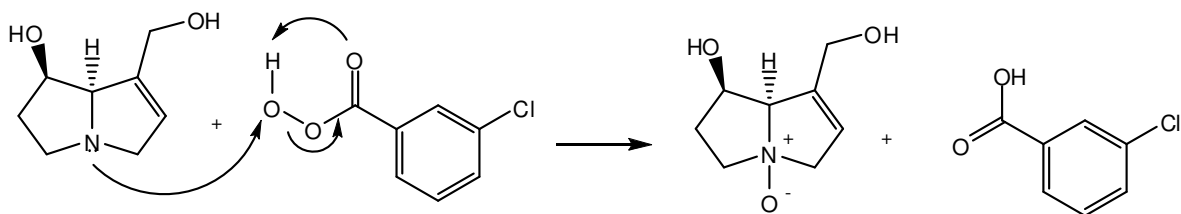


Esquema 23: Reação de epoxidação da retronecina.

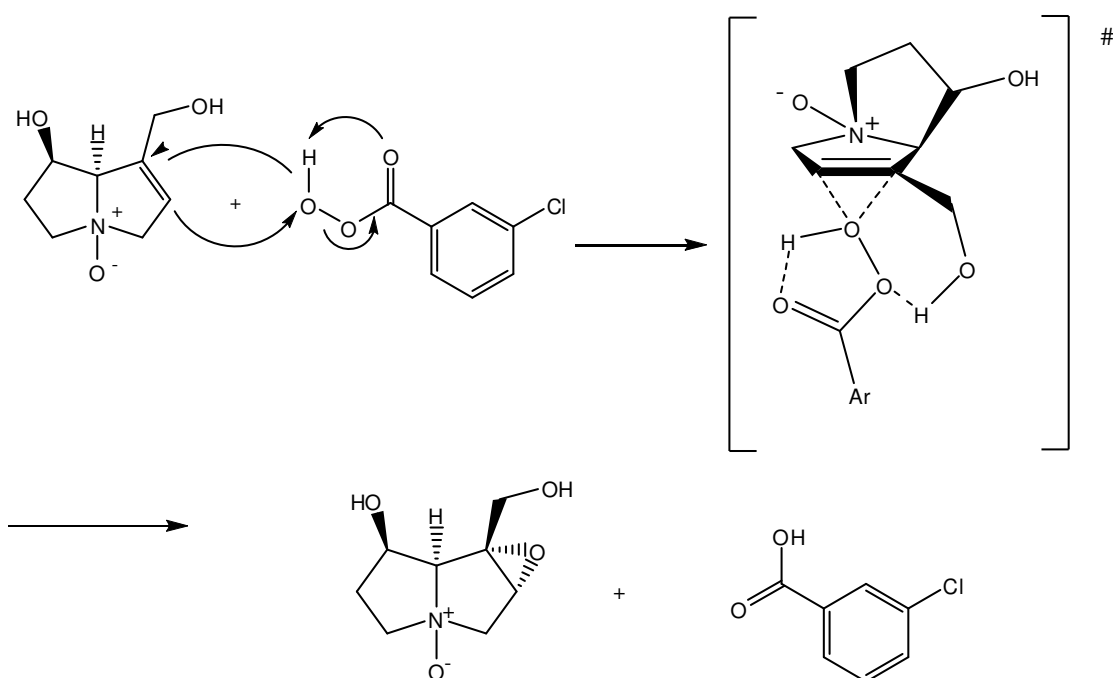
A epoxidação da retronecina com ácido *meta*-cloro perbenzóico levou a formação do produto em 70 % de rendimento, após sua purificação em coluna de gel de sílica.

O mecanismo da reação de epoxidação passa por um estado de transição cíclico em que o oxigênio eletrofílico se adiciona a ligação *pi* ao mesmo tempo que ocorre a transferência do próton do ácido peroxicarboxílico para um grupo carbonila, liberando uma molécula de ácido carboxílico como grupo de saída. As 2 novas ligações C-O do peróxido produzido provém dos pares de elétrons da ligação *pi* da ligação dupla e da quebra da ligação O-H (VOLLHARDT; SCHORE, 2004).

No caso da epoxidação da retronecina, antes que o epóxido seja formado, o nitrogênio da amina terciária reage com o agente oxidante formando o respectivo *N*-óxido.



Esquema 24: Formação do *N*-óxido da retronecina.



Esquema 25: Formação do epóxido (CONEGERO, 2006).

Oxidações com peroxiácidos são estereoespecíficas, trata-se de uma adição *sin*, em que é mantida a estereoquímica do alqueno original.

Espera-se que o α -epóxido seja obtido, uma vez que a formação do β -epóxido é dificultada devido à conformação *endo* da retronecina e ao impedimento estérico causado pela ponte de hidrogênio entre H(11') e O (10) (conferir discussão na página 47).

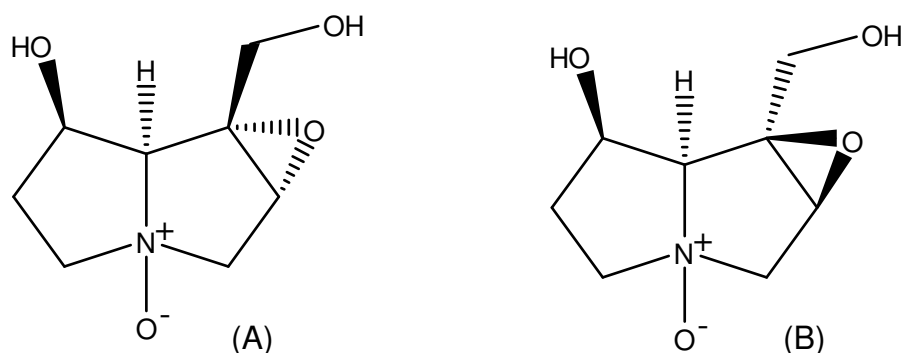


Figura 41: (A) N -óxido- α -1,2-epóxido da retronecina; (B) N -óxido- β -1,2-epóxido da retronecina.

Os dados de RMN de ^{13}C e ^1H abaixo estão de acordo com o produto esperado.

Tabela 8: Dados de RMN de ^{13}C do produto de epoxidação da retronecina com *m*-CPBA (solvente CD_3OD) e da literatura.

C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) Lit*
1	66,1	67,3
2	70,4	70,7
3	74,0	74,8
5	73,9	74,5
6	34,8	35,9
7	59,6	59,0
8	90,0	90,9
9	59,7	60,6

*Lit: Conegero, 2006. Solvente CD_3OD .

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H do produto de epoxidação da retronecina com *m*-CPBA (solvente CD_3OD) e da literatura.

$\delta^1\text{H}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm) Lit*
4,7 (1H, m)	4,76 (1H, m)
4,3 (1H, d, $J = 13,0$)	4,31 (1H, d, $J = 3,5$)
4,2 (2H, m)	4,28 (1H, d, $J = 12,5$)
	4,26 - 4,23 (1H, m)
4,1 (2H, m)	4,17 (1H, d, $J = 14$)
	4,14 (1H, d, $J = 13,5$)
4,0 (1H, s)	4,06 (1H,s)
3,9 (1H, dd, $J = 11,5 ; 8,5$)	3,99 (1H, dd, $J = 11,5 ; 8,5$)
3,8 (1H, d, $J = 13,0$)	3,78 (1H, d, $J = 13$)
2,6 (1H, m)	2,63 – 2,55 (1H, m)
2,1 (1H, m)	2,18 (1H, dd, $J = 13,5; 6,5$)

* Lit.: Conegero, 2006. Solvente CD_3OD .

Espera-se que a epoxidação da retronecina tenha ocorrido pela face α do anel, porque esta é a face menos impedida da molécula. A redução do *N*-óxido- α -1,2-epóxido da retronecina leva ao correspondente alcaloide pirrolizidínico, conforme a figura 42 (GLINSKI; VAN DERVEER; ZALKOW, 1985).

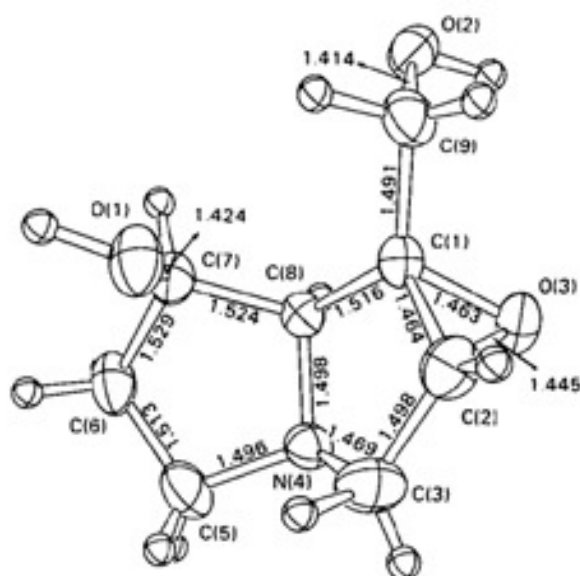
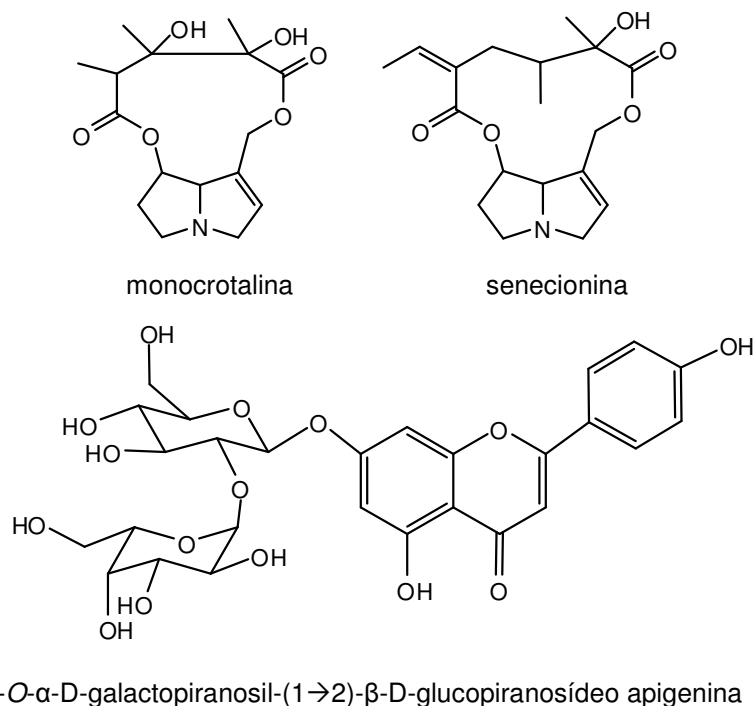


Figura 42: Estrutura obtida por difração de Raio-X para a α -1,2-epóxi-retronecina.

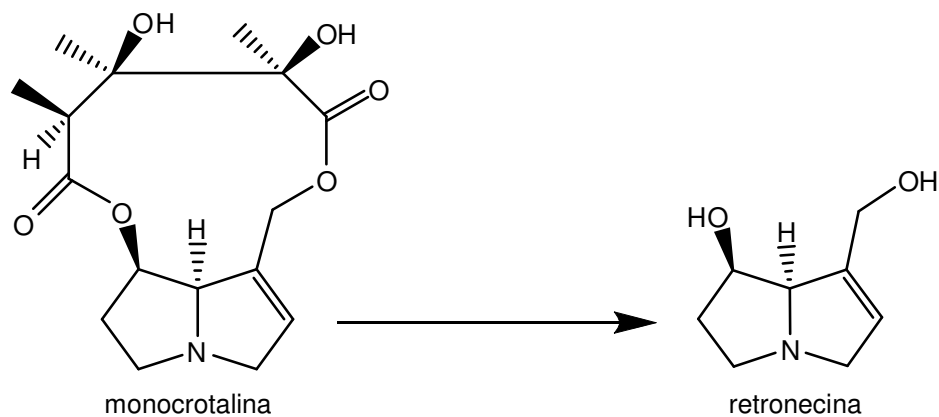
4 - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O estudo fitoquímico de sementes das espécies de *Crotalaria* mostrou que apesar da semelhança morfológica entre estas 3 plantas, as suas constituições químicas são bem distintas. Enquanto que *C. retusa* forneceu o alcaloide pirrolizidínico monocrotalina em 5% de rendimento, *C. incana* forneceu o alcaloide pirrolizidínico senecionina (0,01 %) e *C. pallida* o flavonoide 7-O- α -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-glucopiranosídeo apigenina (0,04 %).

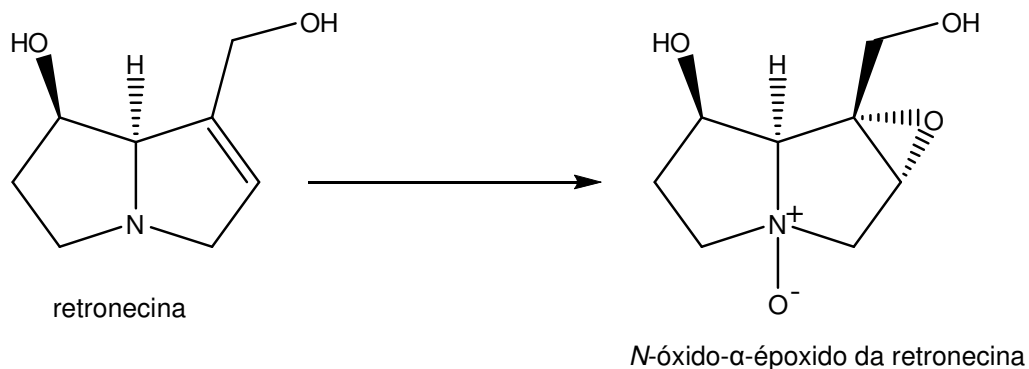
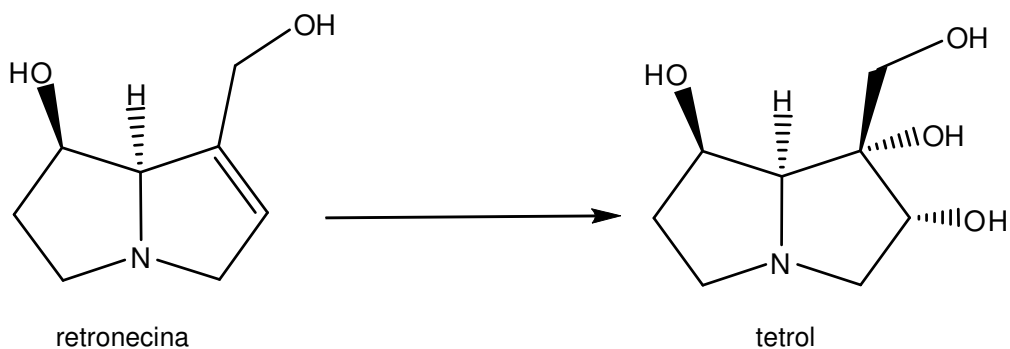


Apenas o alcaloide pirrolizidínico monocrotalina foi isolado em quantidade suficiente para a realização de transformações químicas.

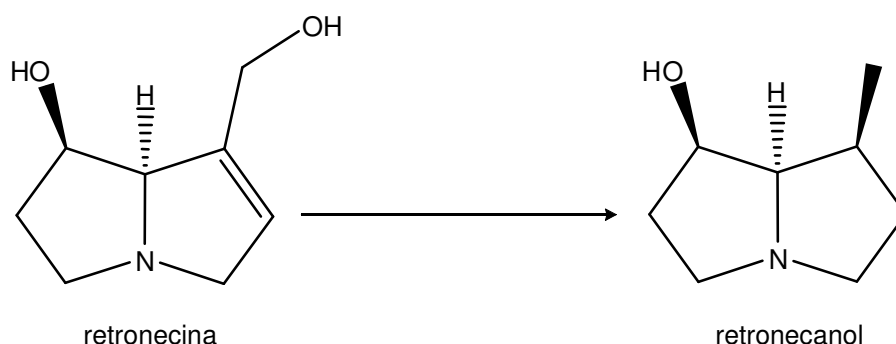
A partir da reação de hidrólise alcalina da monocrotalina com hidróxido de bário obteve-se a retronecina em alto rendimento (84 %).



A reação de dihidroxilação da retronecina com tetróxido de ósmio forneceu 76 % do tetrol, e o seu tratamento com ácido *meta*-cloro perbenzóico (*m*-CPBA) o 1,2-epóxido na forma de *N*-óxido.



A reação de hidrogenação de retronecina na presença Pd/C 10% como catalizador levou a formação do produto de hidrogenólise (-)-retronecanol, em 72 % de rendimento.



A obtenção do (-)-retronecanol revelou que a estrutura deste alcaloide foi erroneamente atribuída por Pandey & Chakrabarti, 1996, que, na verdade, obtiveram o seu epímero, que corresponde ao (+)-retronecanol. Esta nossa conclusão foi respaldada por interpretação dos espectros de NOESY do retronecanol.

Todas as reações com a retronecina apresentaram uma regioespecificidade pela face α do anel, que pode estar ligada com a cisão *cis* entre o par de elétrons do nitrogênio e o hidrogênio do carbono 8 do esqueleto azabíciclo, e com o pseudo anel formado entre H (11') e O (10).

Como perspectivas ficam os ensaios biológicos sobre a possível atividade dos derivados hidroxilados de retronecina como antivirais. Estes ensaios deverão ser realizados pelo grupo do Professor Amilcar Tanuri do Instituto de Biologia do Centro de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5.1 – Instrumentação:

As análises de Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H foram realizadas nos espectrofotômetros Bruker AC-300p (300 MHz, 7.0 Tesla), Varian Gemini 300 (300 MHz, 7.0 Tesla) e Varian Inova 500 (500 MHz, 11.7 Tesla), localizados no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas e em aparelho da marca Varian Mercury de 300 MHz localizado no Instituto de Macromoléculas da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Também foram obtidos espectros de Ressonância Magnética Nuclear no Departamento de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro no aparelho da marca Bruker, modelo Avance, de 4,7T (200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C) e 7,0T (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C).

Todas as medidas foram feitas em tubos de 5 mm de diâmetro utilizando tetrametil-silano (TMS) como referencial interno. Os valores dos deslocamentos químicos foram expressos em unidades adimensionais (δ), representando partes por milhão (ppm) da frequência aplicada. As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração utilizando o programa ACD – SpecManager 4.0.

As análises por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas foram realizadas em cromatógrafo Hewlett Packard modelo 6890 acoplado a um detetor de massas Hewlett Packard modelo 5972 com ionização por impacto de elétrons a 70eV. A coluna capilar utilizada foi DB-1 HT (composição-apolar) de 15m de comprimento, 0,2 mm de diâmetro interno e 0,10 μm de espessura de fase interna. O gás de arraste utilizado foi hélio com uma razão de 1 mL/min. A temperatura da coluna foi inicialmente 40°C (durante 8 min após a injeção), seguida por uma rampa de temperatura a 3°C/min até 200°C e 15°C/min até 250°C. O injetor foi operado a 250°C.

As sementes foram moídas em moinho tipo Willye da marca Tecnal, modelo TE 650.

Os produtos de reação foram purificados em coluna cromatográfica utilizando sílica gel da Aldrich (70-230 mesh), alumina básica da Merck (70-230 mesh) e resina de troca iônica Dowex 50 Wx8 – 400 (Aldrich).

O acompanhamento das reações e das separações em colunas cromatográficas foi realizado por cromatografia em camada fina utilizando cromatofolhas de alumínio da marca Merck, recobertas por sílica gel 60 F₂₅₀.

5.2 - Coleta do Material:

Vagens contendo sementes secas de *Crotalaria retusa*, *Crotalaria pallida* e *Crotalaria incana* foram coletadas no Parque Tecnológico do campus da Cidade Universitária da Universidade Federal do Rio de Janeiro em julho de 2008.

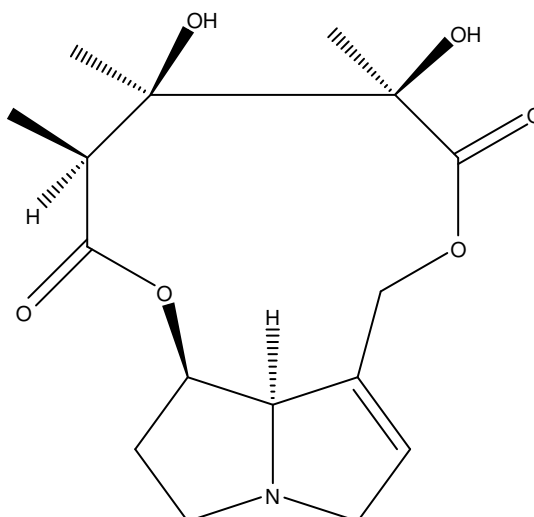
5.3 - Obtenção do extrato de *C. retusa*:

Em um balão de fundo redondo (500 mL) contendo 300 mL de etanol foi acoplado um extrator do tipo soxhlet contendo 50 g de sementes moídas de *Crotalaria retusa*. O tempo de extração foi de 24 horas. O extrato obtido após concentração sob pressão reduzida forneceu 7,4 g de uma resina de coloração marrom.

5.3.1- Fracionamento ácido-base do extrato de *C. retusa*:

O extrato obtido (7,5 g) foi solubilizado em 75 mL de solução HCl 3% (pH 0) e 7 mL de metanol com auxílio de leve aquecimento. A fração aquosa ácida foi extraída com diclorometano (5 x 25 mL) em funil de separação até que a fase orgânica se torna-se incolor. As fases orgânicas foram reunidas e evaporadas. À solução aquosa adicionou-se NH_4OH até atingir pH 9. Em seguida, esta fração básica foi extraída exaustivamente com diclorometano. As fases orgânicas, a medida que foram sendo obtidas, foram evaporadas separadamente em evaporador rotatório. Cada fração orgânica evaporada resultou em um pó branco. Somente quando cessou a obtenção deste sólido branco se encerrou a extração em pH alcalino. Obteve-se 2,5 g de sólido branco (5,0 %). Este sólido foi identificado como sendo a monocrotalina.

Cromatografia em camada fina (CCF) em cromatofolhas de sílica gel 60 do sólido obtido resultante do fracionamento ácido-base, utilizando-se como eluente diclorometano : metanol (1 : 1), após revelação com o reagente de *Dragendorff*, apresentou uma mancha de cor laranja com R_f de 0,4.



RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3), δ : 174,1 ; 173,6 ; 134,2 ; 132,8 ; 78,9 ; 77,0 ; 76,8 ; 74,9 ; 61,3 ; 60,4 ; 53,7 ; 44,3 ; 33,6 ; 22,1 ; 17,8 ; 13,8.

RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ (integração, multiplicidade, J em Hz): 6,0 (1H, d, $J=1,9$) ; 5,1 (1H, m); 4,8 (1H, d, $J=11,8$); 4,7 (1H, dd, $J=11,8; 0,9$); 4,4 (1H, m) ; 3,9 (1H, m) ; 3,4 (1H, ddd, $J=1,4; 5,2; 16,2$) ; 3,3 (1H, m) ; 2,8 (1H, q, $J=7,1$); 2,6 (1H, m) ; 2,1 (2H, m); 1,4 (3H, s); 1,3 (3H, s) ; 1,2 (3H, d, $J=7,1$) .

5.4 - Obtenção do Extrato de *C. incana*:

Em um balão de fundo redondo (500 mL) contendo 300 mL de etanol foi acoplado um extrator do tipo soxhlet contendo 50 g de sementes moídas de *Crotalaria incana*. O tempo de extração foi de 24 horas. O extrato obtido após concentração sob pressão reduzida forneceu 3,48 g (6,9 % de rendimento) de uma resina de coloração marrom.

5.4.1 - Fracionamento ácido-base do extrato de *C. incana*:

Na tentativa de isolar alcaloides pirrolizidínicos, 1,57 g do extrato foram submetidos ao fracionamento ácido-base. O Extrato foi solubilizado e acidificado com solução de HCl 5% (pH 0) e extraído com diclorometano. Em seguida a solução aquosa foi alcalinizada com NH_4OH 25% até atingir pH 9 e pH 11. As frações com pH alcalinos foram extraídas com diclorometano (5 x 20 mL). A evaporação do solvente orgânico resultou em 0,25 g de material da fração de pH 9 e 0,01 g da fração de pH

11. Ambos os sólidos apresentaram aspecto resinoso de coloração marrom. Estes quando aplicados em placa cromatográfica e eluídos com MeOH : EtOH (1 : 1) apresentaram coloração laranja após revelados com reagente de Dragendorff. Na tentativa de purificar este material de aspecto resinoso, a fração de pH 9 foi cromatografada em coluna aberta de gel de sílica.

5.4.2 - Coluna Cromatográfica do material obtido na fração de pH 9 do fracionamento ácido-base do extrato obtido de *C. incana*:

Uma alíquota do material obtido do fracionamento ácido-base do pH 9 (0,25 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica. A eluição da coluna foi feita com misturas de solventes em diferentes proporções (CH₂Cl₂ : CH₂Cl₂/MeOH : MeOH).

Tabela 10: Eluentes e frações da coluna cromatográfica do material da fração de pH 9 do fracionamento ácido-base do extrato de *C. incana*.

Eluente	%	frações
CH ₂ Cl ₂	100	1-3
CH ₂ Cl ₂ /MeOH	95	4-19
	90	20-30
	85	31-35
	80	36-39
	75	40-43
	70	44-47
	65	48-51
	60	52-57
	55	58-61
	50	62-65
	45	66
	40	67-69
	35	70-74
	30	75-77
	25	78-79
	20	80-83
	15	84-87
	10	88-89
	5	90-91
MeOH	100	92-97

Após a análise por CCF, as frações que se mostraram semelhantes foram reunidas:

5-9	20-21	33-35	41-45	63-65	74-79
10-14	22-24	36-37	48-49	66-67	80-85
15-18	25-29	38-39	53-54	68-73	86-90

5.5 - Obtenção do extrato de *C. pallida*:

Em um balão de fundo redondo (500 mL) contendo 300 mL de etanol foi acoplado um extrator do tipo soxhlet contendo 50 g de sementes moídas de *Crotalaria pallida*. O tempo de extração foi de 24 horas. O extrato obtido após concentração sob pressão reduzida forneceu 4,2 g de uma resina de coloração marrom.

O extrato etanólico das sementes de *C. pallida* apresentou-se o mais distinto dentre as 3 espécies estudadas. O cartucho feito com papel de filtro, contendo sementes moídas da espécie, ficou tingido de amarelo durante as primeiras 22 horas de extração. O extrato também de coloração amarela não apresentou precipitado.

5.5.1 - Fracionamento ácido-base do extrato de *C. pallida*:

Com o objetivo de isolar alcaloides pirrolizidínicos 1,0 g do extrato de *C. pallida* foram dissolvidos em solução de HCl 3% com auxílio de 5 gotas de metanol, o extrato aquoso ácido (pH 0) resultante foi submetido a extração com diclorometano (5 x 20 mL). As frações orgânicas foram reunidas e evaporadas.

Em seguida, adicionou-se NH_4OH 25% até atingir pH 9. A fração de pH 9 foi extraída com diclorometano (5 x 20 mL), adicionou-se mais NH_4OH 25% até que a fração atingisse pH 11, e esta também foi extraída com diclorometano (5x 20 mL). As fases orgânicas foram evaporadas fornecendo 0,4 g de material da fração de pH 9 e 0,2 g de material da fração de pH 11. Ambos os produtos apresentaram aspecto resinoso de coloração marrom.

5.5.2 - Coluna cromatográfica do extrato de *C. pallida*:

Com o objetivo de purificar o extrato 1.50 mg do mesmo foi adsorvido em sílica desativada, numa relação aproximada extrato:sílica de 1,5:1 e aplicado em coluna cromatográfica em sílica gel. A eluição foi realizada com misturas de solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano/acetato, acetato de etila/metanol). Foram recolhidas 45 frações de 130 mL.

Tabela 11: Eluentes e frações da coluna cromatográfica do extrato obtido de *C. pallida*.

Eluente	%	Fração
Hexano	100	1-2
Diclorometano	100	3-5
Diclorometano/Acetato de etila	90	6-10
	75	11-13
	50	14-15
	25	16-25
Acetato de etila	100	27-29
Acetato de etila/Metanol	90	30-32
	75	33-35
	50	36-37
	25	38-39
Metanol	100	40-43

Após evaporação do solvente foi realizada CCF de todas as frações, sendo as placas reveladas com solução de sulfato cérico.

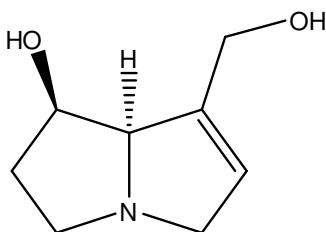
As frações de 33 a 35 apresentaram sinais característicos de flavonoides em RMN de ^1H .

RMN de ^1H (300 MHz, DMSO), δ (integração, multiplicidade, J em Hz): 7,9 (2H, d, $J=8,4$); 6,9 (2H, d, $J=8,4$); 6,7 (1H, s); 6,3 (1H, s); 5,2 (1H, sl); 5,1 (1H, d, $J=3,6$); 4,5 (1H, d, $J=7,2$); 3,1 (10H, m).

RMN ^{13}C (75 MHz, DMSO), δ : 182,1; 164,2; 162,6; 161,4; 160,6; 155,9; 129,0; 121,5; 116,1; 104,6; 104,1; 102,4; 100,3 ; 98,5; 91,8; 82,5; 77,3; 74,4; 72,9; 72,8; 70,6; 69,9; 71,7; 62,2.

5.6 - Hidrólise alcalina da monocrotalina:

Em um balão de 2 bocas colocou-se 5,3 g de monocratalina, 80 mL de água e 3,3 g de hidróxido de bário octa-hidratado. Esta suspensão foi refluxada durante 120 minutos sob atmosfera inerte de argônio e agitação. Em seguida o hidróxido de bário foi precipitado com CO₂ (gelo seco), e a solução resultante foi filtrada e evaporada. O produto da hidrólise foi isolado em coluna cromatográfica de alumina básica com a mistura de eluente CHCl₃ : MeOH : NH₄OH (42,5 : 7 : 1). Foram coletadas 30 frações que depois de evaporadas resultaram em 2,63g de um sólido amarelo claro. O rendimento da reação foi de 84%.

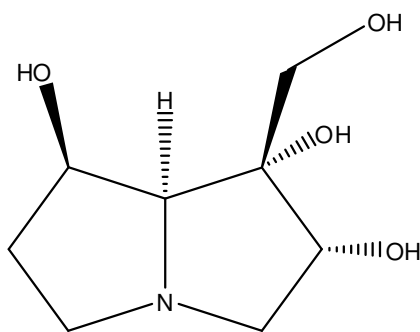


RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃), δ : 137,5 ; 127, 4 ; 79,4 ; 71,0 ; 61,8 ; 58,8 ; 54,1 ; 35,3.

RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃), δ (integração, multiplicidade, J em Hz): 5,7 (1H, s); 4,3 (4H, m); 3,8 (1H, dd, J=15,4; 1,4); 3,4 (1H, dd, J=15,4; 5,0); 3,2 (1H, d, J = 7,3); 2,7 (1H, m); 1,9 (2H, m).

5.7 - Reação de Diidroilação da Retronecina:

Em um balão de fundo redondo (25 mL) 50 mg de retronecina foi dissolvida em 1,9 mL de acetona e 1,3 mL de água destilada. A essa solução foi adicionado 75 mg de *N*-óxido de *N*-metilmorfolina (NMNO) e 0,16 mL de solução de tetróxido de ósmio (0,2 M). A reação foi mantida a temperatura ambiente sob agitação por 24 horas. Como a reação não ocorreu neste tempo, adicionou-se mais 75 mg de (NMNO) e 0,16 mL de tetróxido de ósmio, mantendo-se a reação por mais 12h. A mistura reacional foi purificada em coluna de resina de troca iônica.

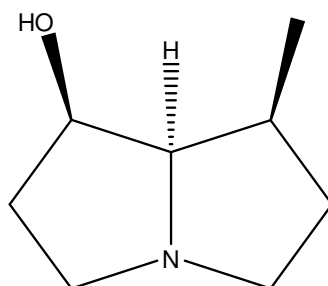


RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ : 81,1 ; 79,0 ; 71,8; 70,4 ; 64,3 ; 60,8 ; 54,8 ; 36,8.

RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD), δ (integração, multiplicidade, J em Hz): 4,4 (1H, t, $J=8,5$); 4,3 (1H, sl); 3,9 (1H, d, $J=11,4$); 3,8 (1H, d, $J=11,4$); 3,4 (1H, sl); 3,3 (1H, m); 3,2 (1H, m); 3,0 (1H, m); 2,9 (1H, m); 1,9 (2H, m).

5.8 - Reação de Hidrogenólise da Retronecina:

Em um balão de 10 mL foi adicionado 114 mg de Retronecina, 12 mg de Pd/C 10% e 2 mL de acetona. A solução foi mantida, sob agitação, sob atmosfera de hidrogênio (1atm) por 24 horas. A mistura reacional foi filtrada em algodão e em coluna de sílica gel com CHCl_3 : MeOH : NH_4OH (14 : 6 : 1).



RMN ^{13}C (50 MHz, CDCl_3), δ : 74,2 ; 71,3 ; 55,2; 54,5 ; 36,8 ; 34,9 ; 32,0 ; 12,7.

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3), δ (integração, multiplicidade, J em Hz): 4,6 (1H, sl); 4,0 (1H, m); 3,9 (1H, m); 3,6 (1H, m); 3,2 (1H, m); 3,1 (1H, m); 2,5 (1H, m); 2,2 (2H, m); 2,1 (1H, m); 1,9 (1H, m); 1,3 (3H, d, $J=6,7$).

5.9 - Reação de Epoxidação da Retronecina:

Em um balão de 50 mL contendo 300 mg de retronecina foi adicionado 12 mL de diclorometano, sob agitação, a temperatura ambiente. Após a solubilização da retronecina, o balão foi mantido em banho de gelo até que 1,33 mg de ácido *meta*-cloro perbenzóico fossem adicionados. Após 64 horas de reação, sob atmosfera inerte de argônio, a temperatura ambiente e agitação constante, o solvente foi evaporado e o material cromatografado em coluna de sílica gel com o eluente CHCl_3 : MeOH : NH_4OH (14 : 6 : 1). O rendimento da reação foi de 70%.

RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD), δ : 90,0 ; 74,0 ; 73,9 ; 70,4 ; 66,1 ; 59,7 ; 59,6 ; 34,8.

RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD), δ (integração, multiplicidade, J em Hz): 4,7 (1H, m); 4,3 (1H, d, $J = 13,0$); 4,2 (2H, m); 4,1 (2H, m); 4,0 (1H, s); 3,9 (1H, dd, $J = 11,5$; 8,5); 3,8 (1H, d, $J = 13,0$); 2,6 (1H, m); 2,1 (1H, m).

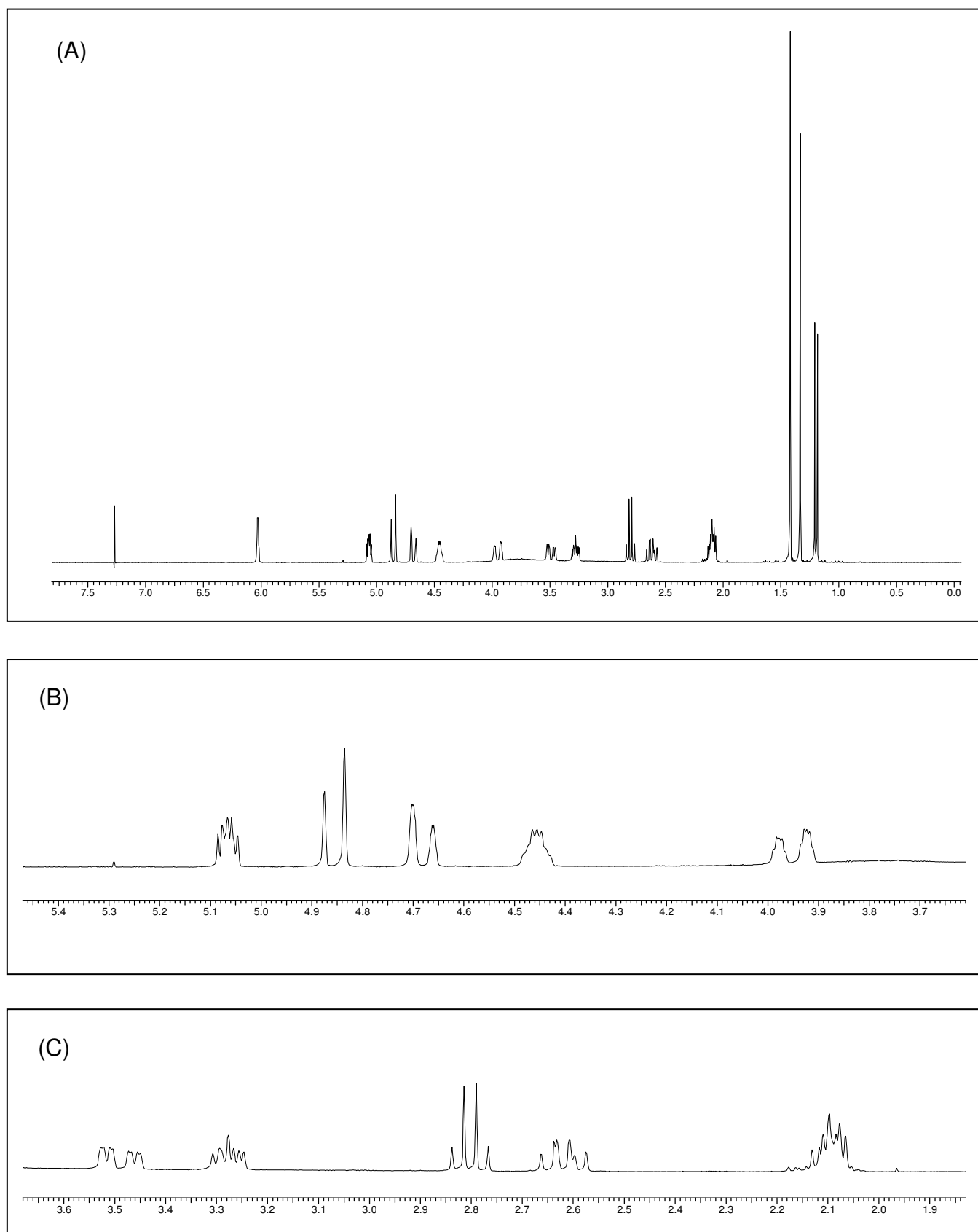


Figura 43: Espectros de RMN de ^1H da monocrotalina (A) e expansões (B) e (C) (CDCl_3 , 300 MHz).

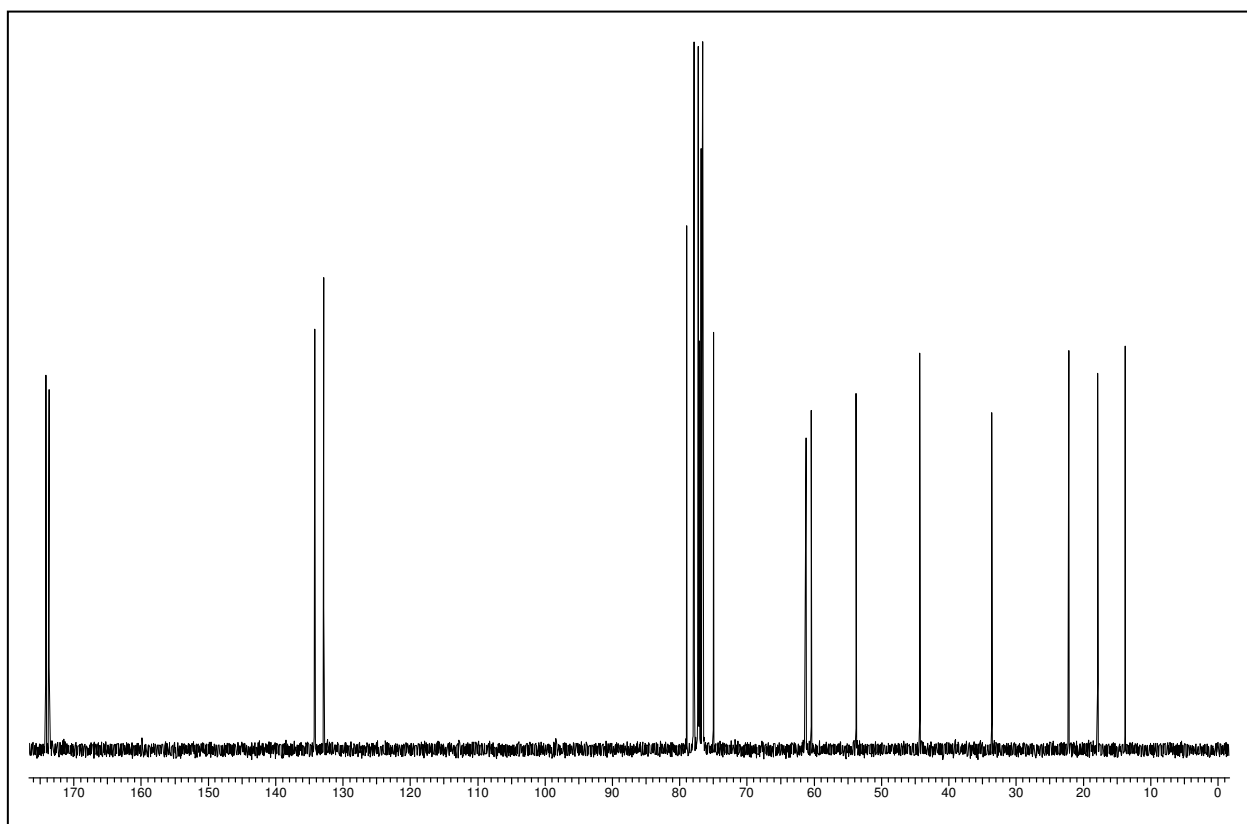


Figura 44: Espectro de RMN de ^{13}C da monocrotalina (CDCl_3 , 75 MHz).

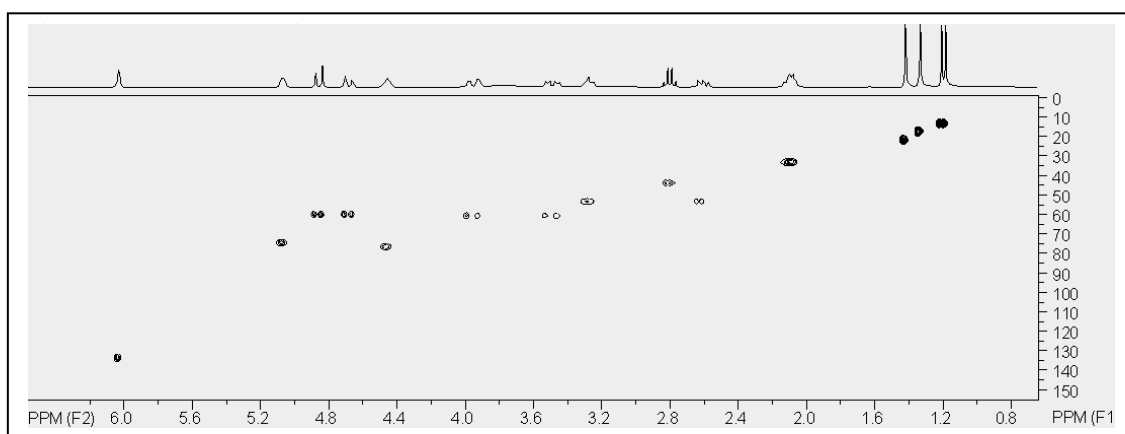


Figura 45: Espectro HMQC da monocrotalina (CDCl_3 , 300 MHz).

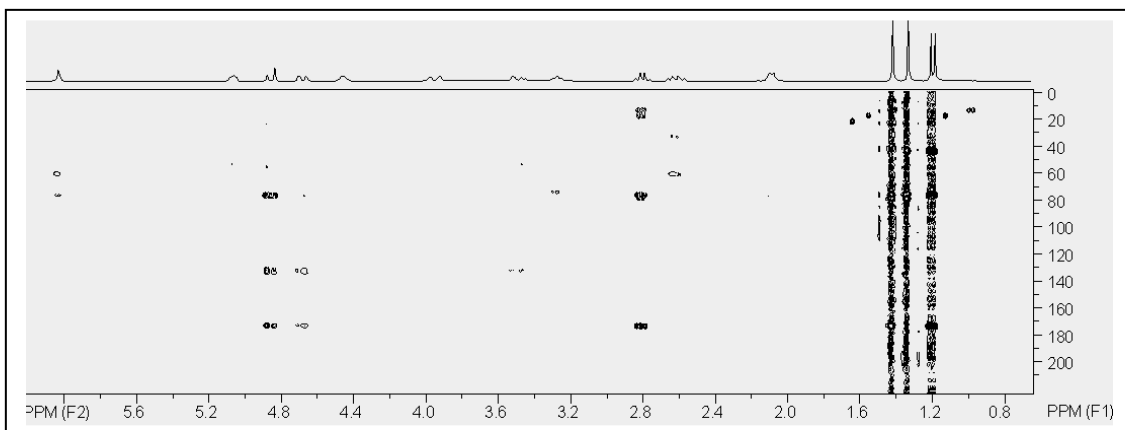


Figura 46: Espectro HMBC da monocrotalina (CDCl₃, 300 MHz).

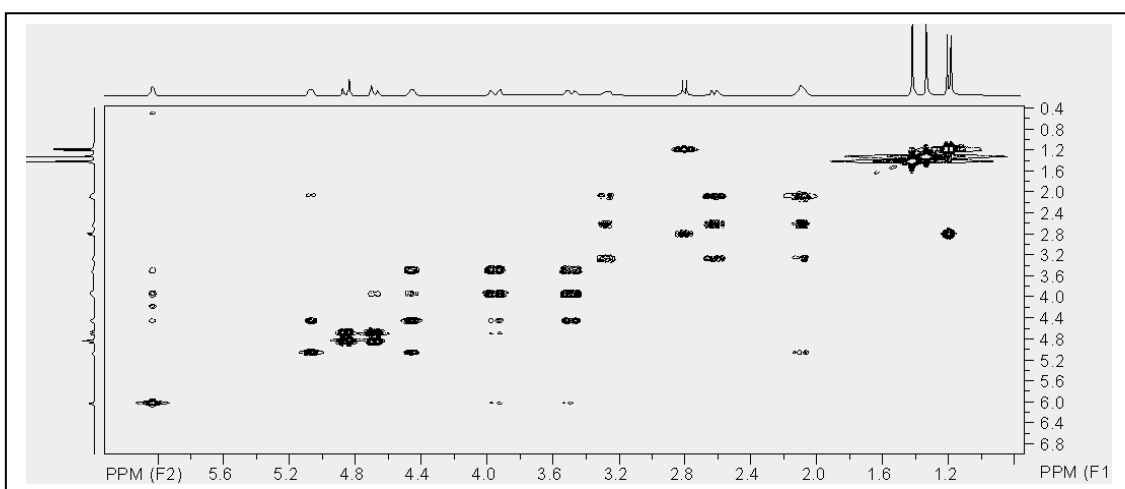


Figura 47: Espectro COSY da monocrotalina (CDCl₃, 300 MHz).

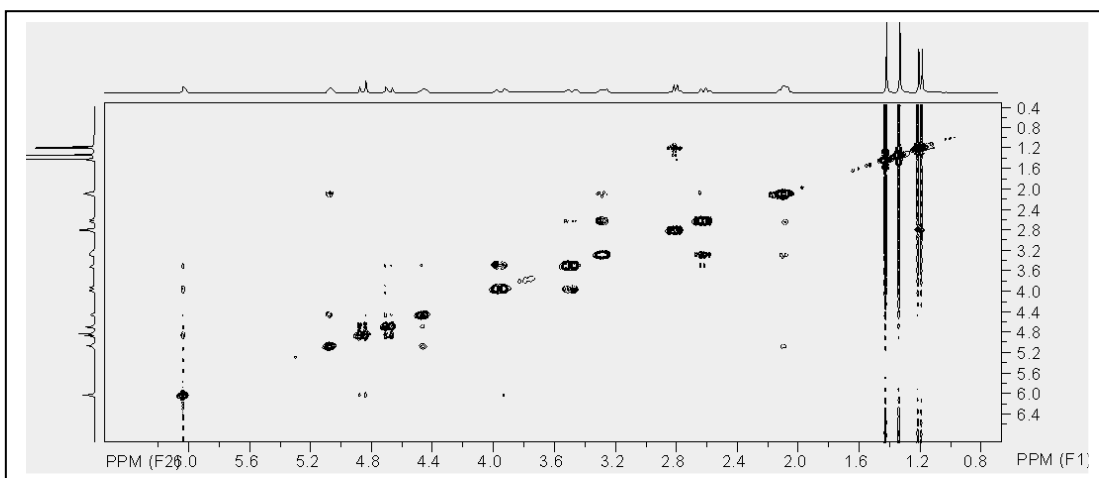


Figura 48: Espectro NOESY da monocrotalina (CDCl₃, 300 MHz).

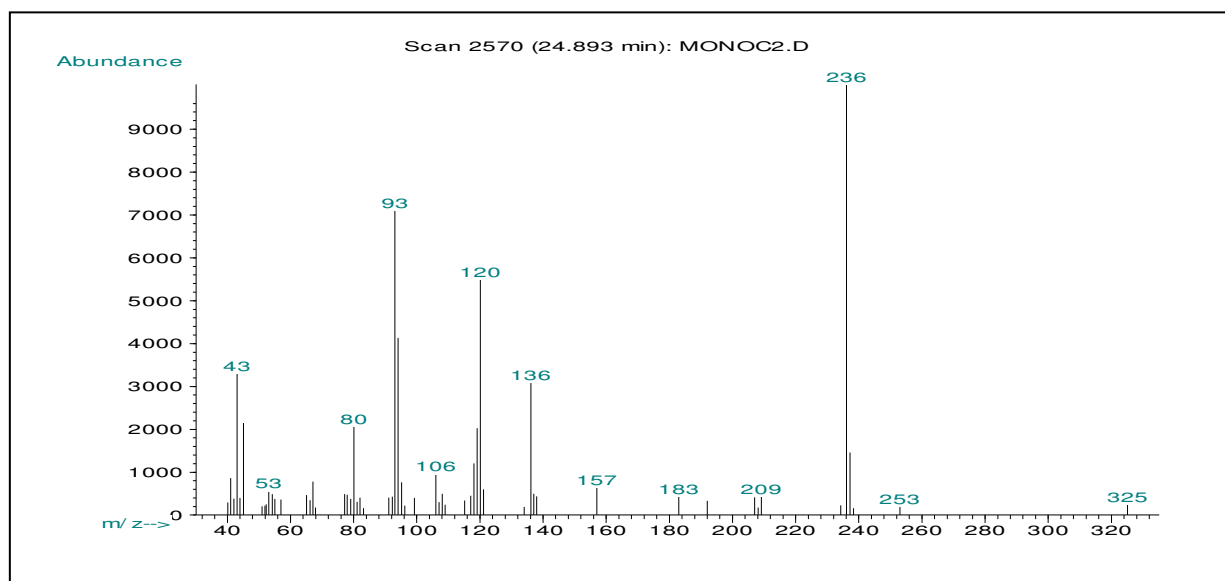


Figura 49: Espectro de massas da monocrotalina.

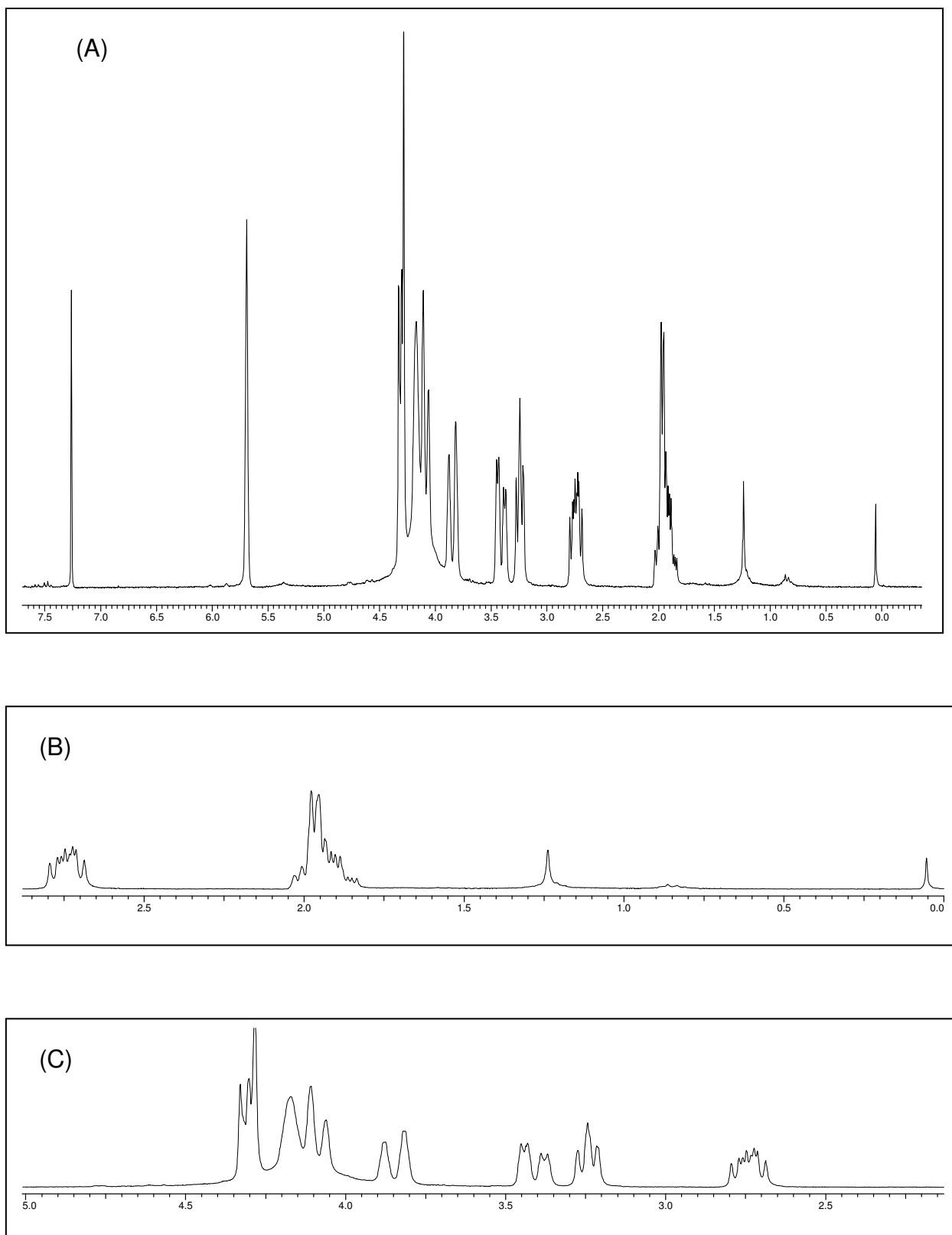


Figura 50: Espectro de RMN de ^1H da retronecina (A) e expansões (B) e (C) (300 MHz, CDCl_3).

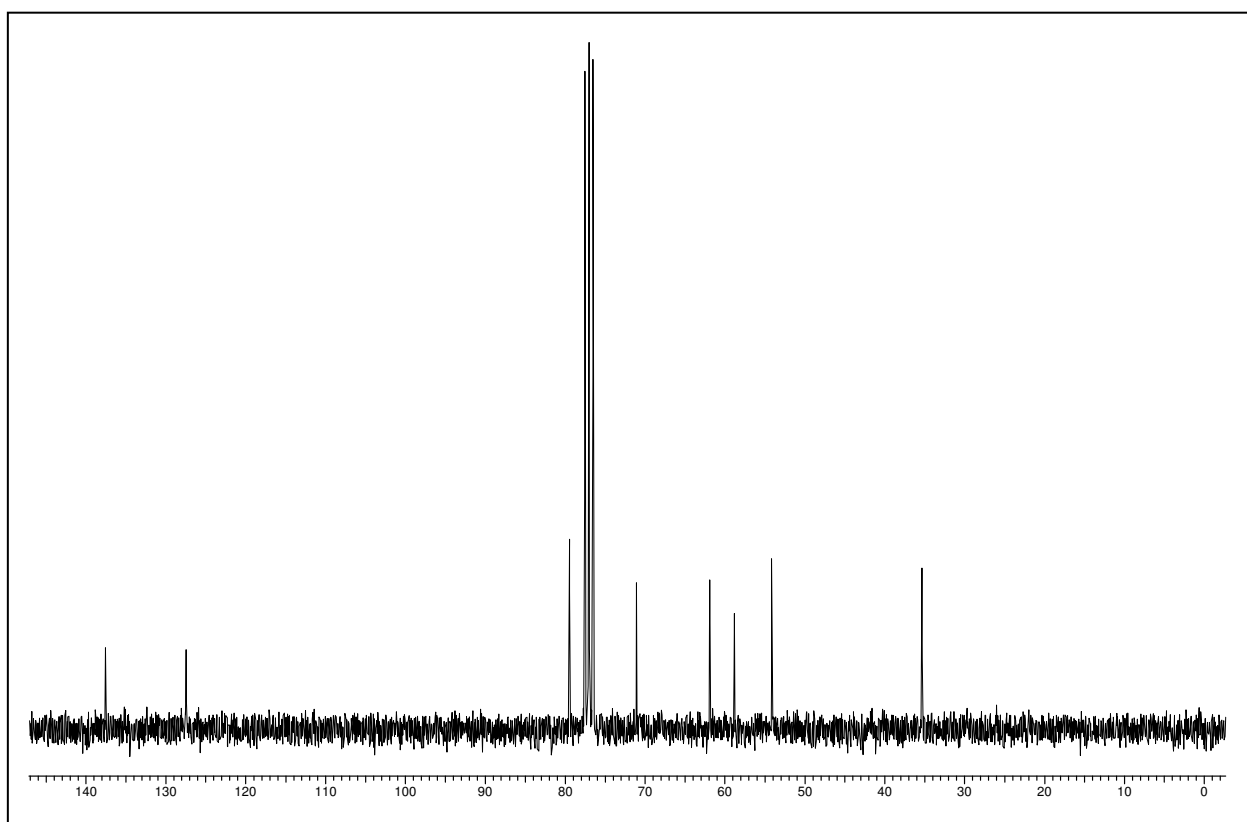


Figura 51: Espectro de RMN de ^{13}C da Retronecina (75 MHz, CDCl_3).

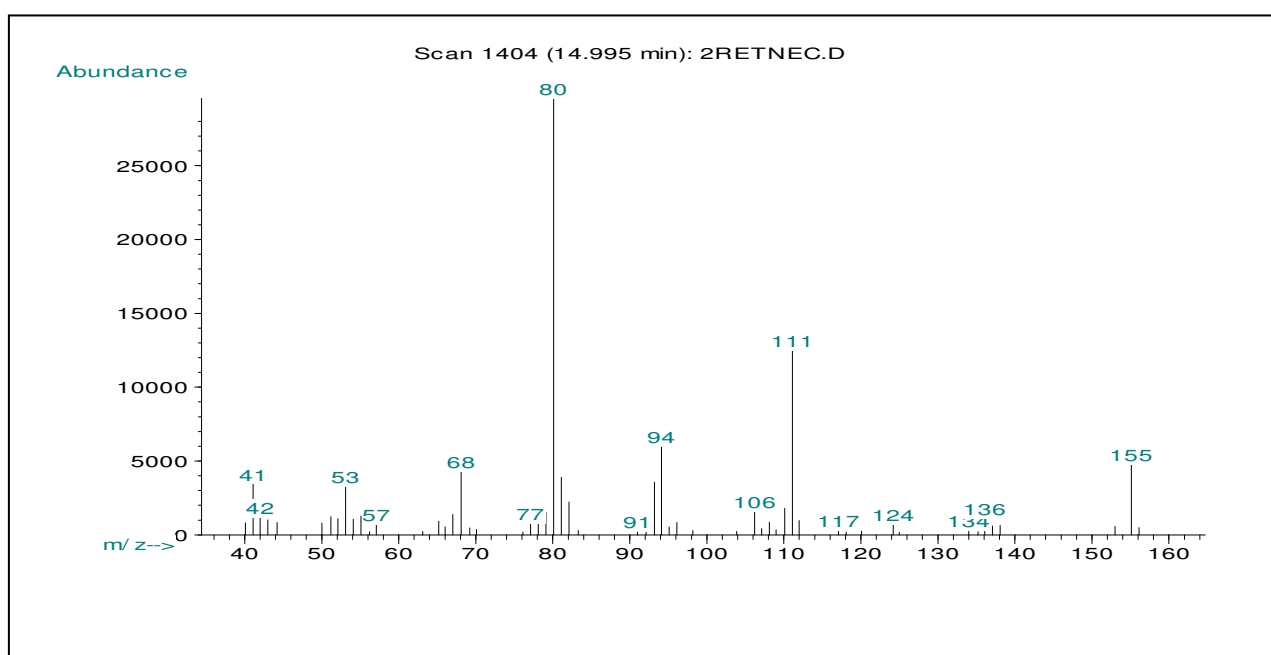


Figura 52: Espectro de massas da retronecina.

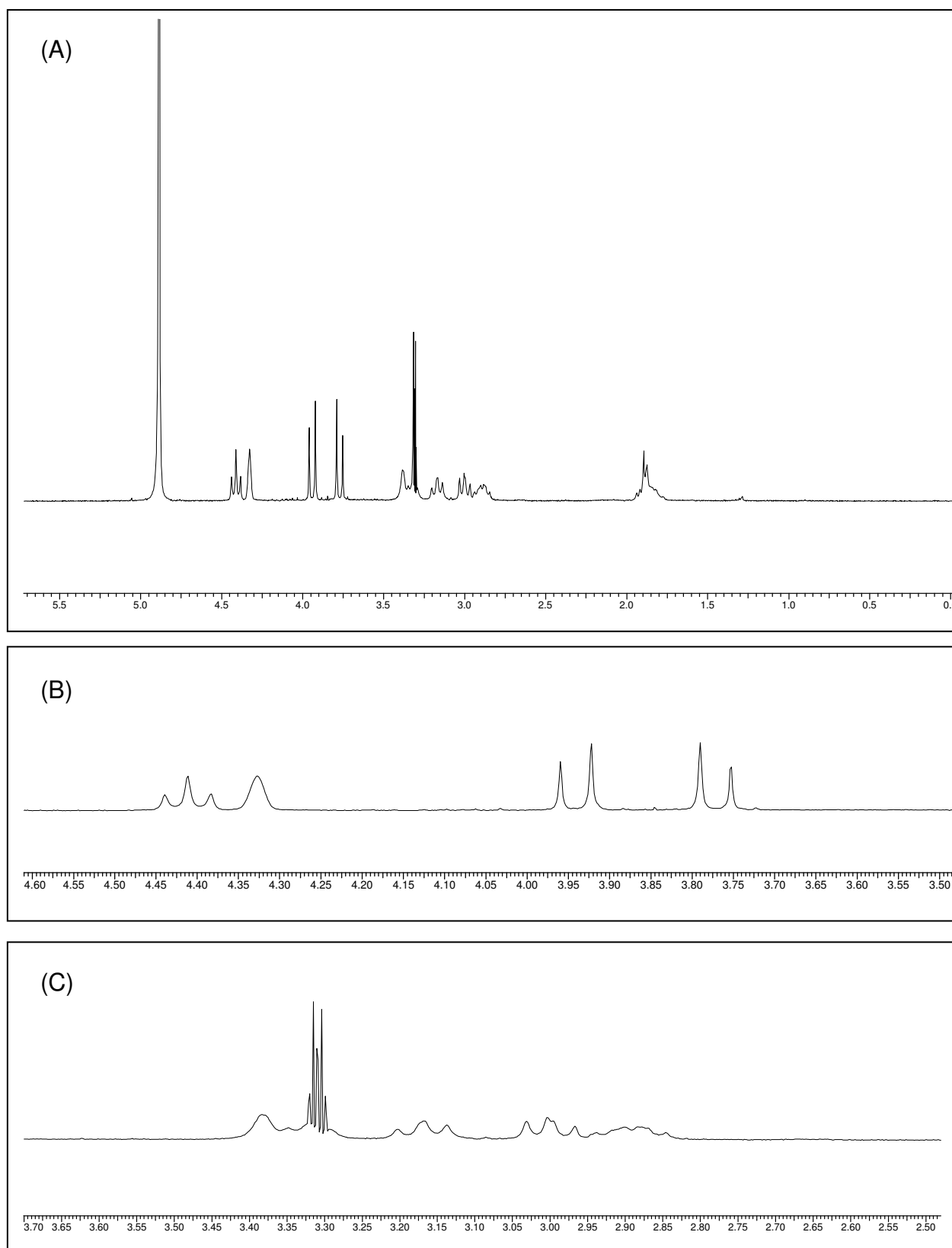


Figura 53: Espectro de RMN de ^1H do tetrol (A) e ampliações (B) e (C) (300 MHz, CD_3OD).

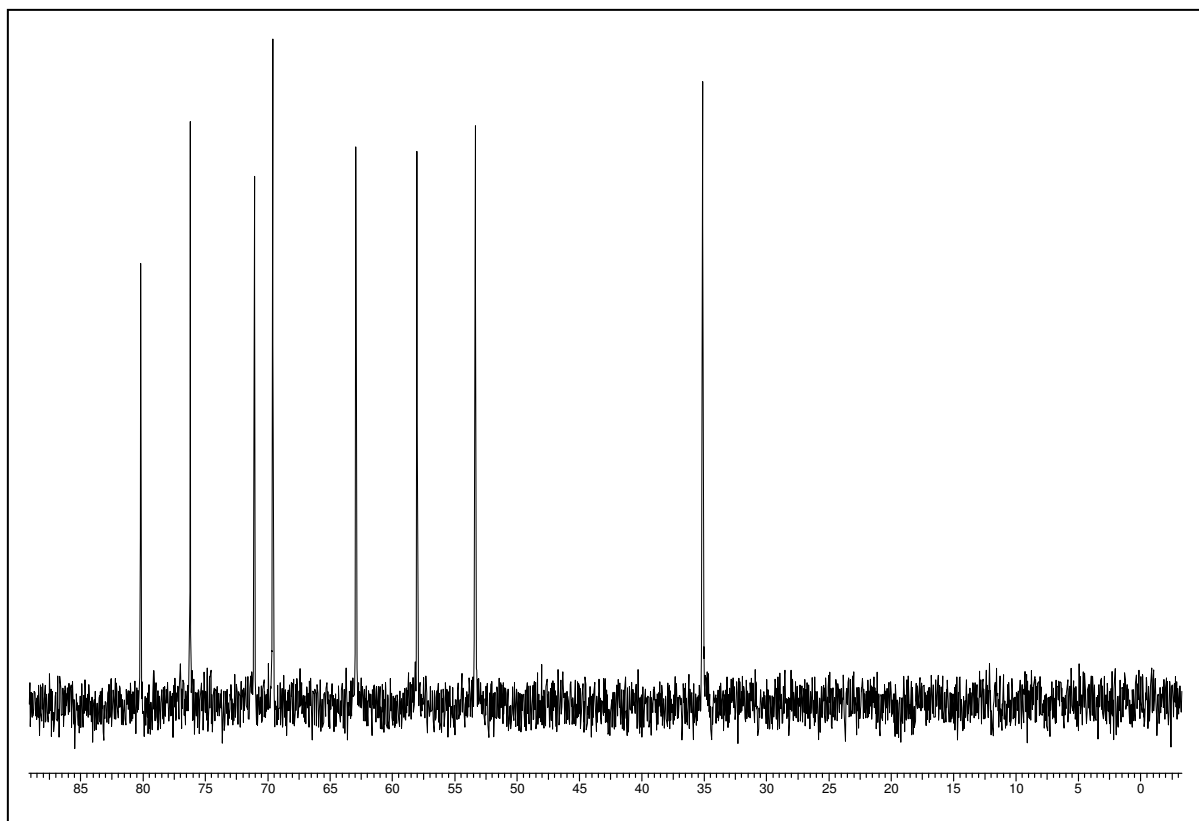


Figura 54: Espectro de RMN de ^{13}C do tetrol (75 MHz, D_2O).

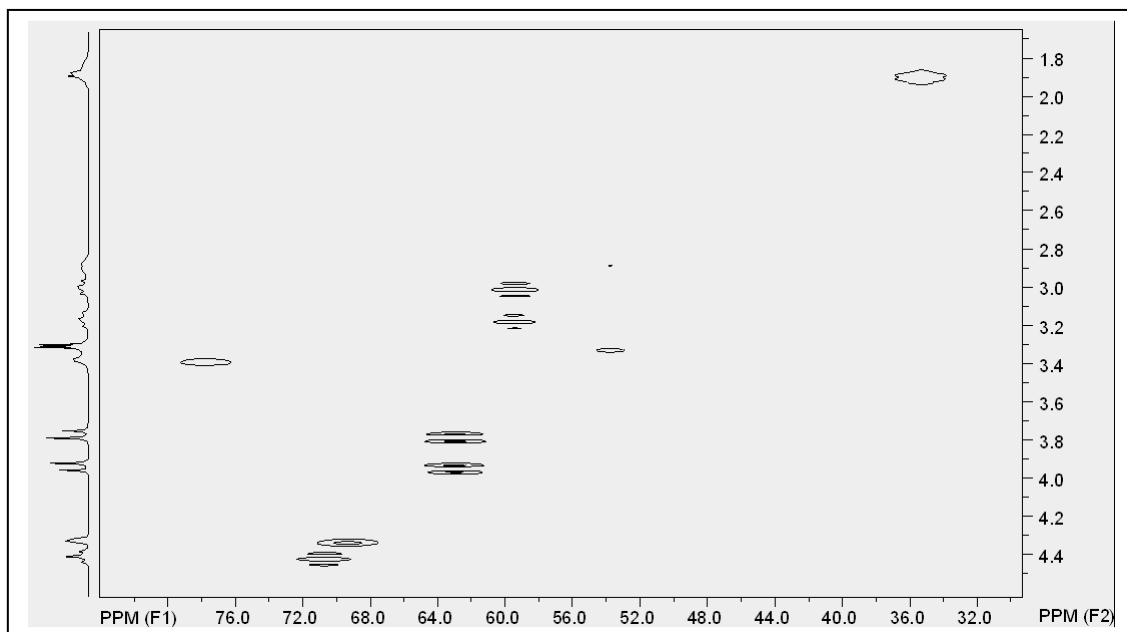


Figura 55: Espectro HMQC do tetrol (300 MHz, D_2O).

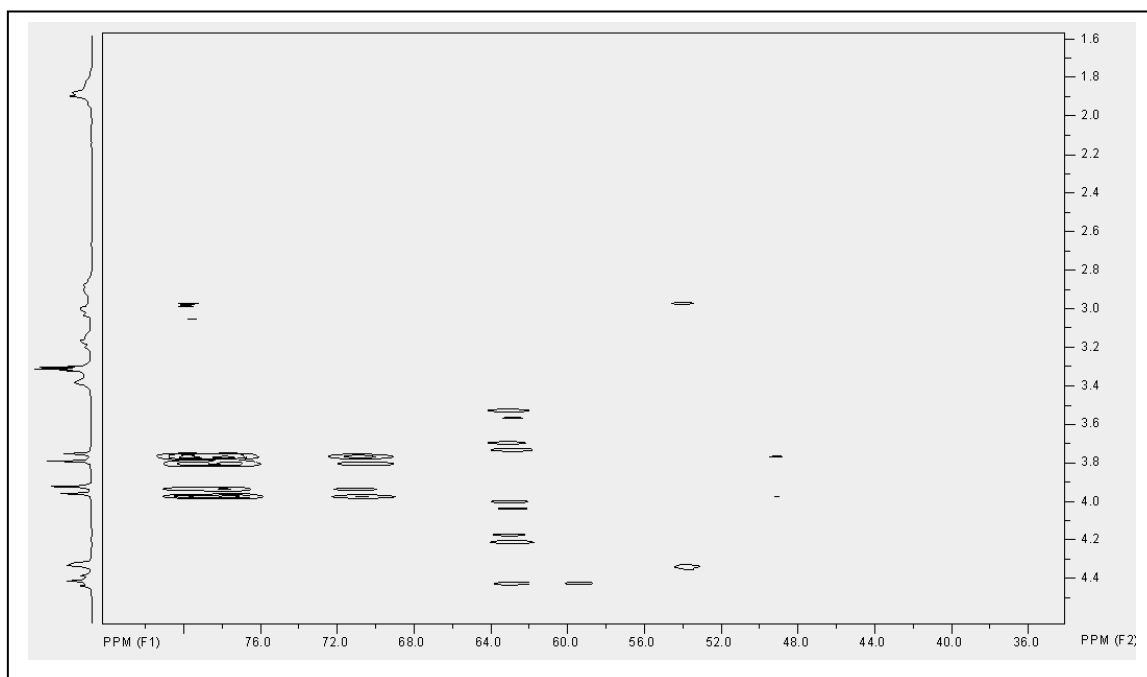


Figura 56: Espectro HMBC do tetrol (300 MHz, D₂O).

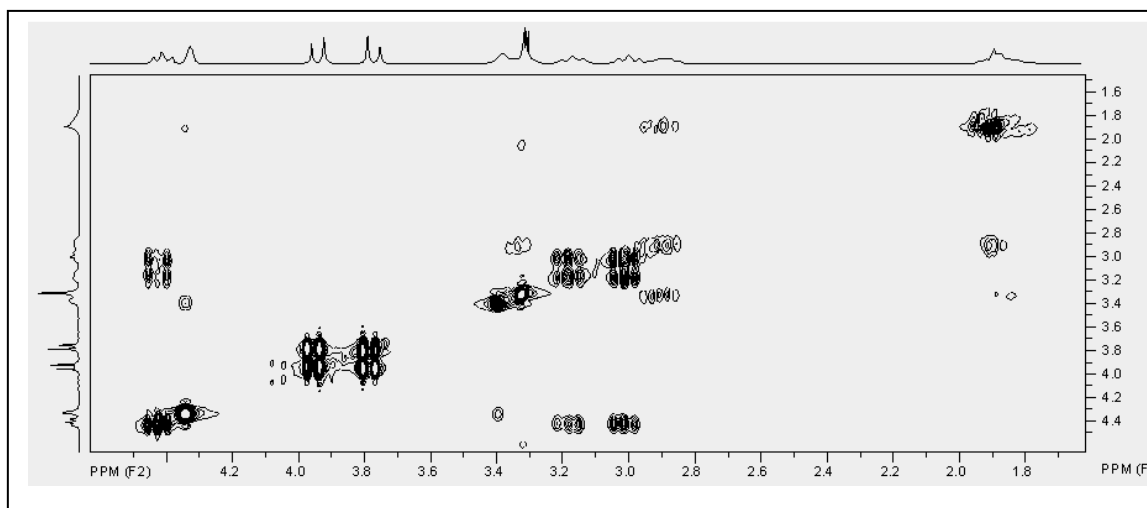


Figura 57: Espectro COSY do tetrol (300 MHz, D₂O).

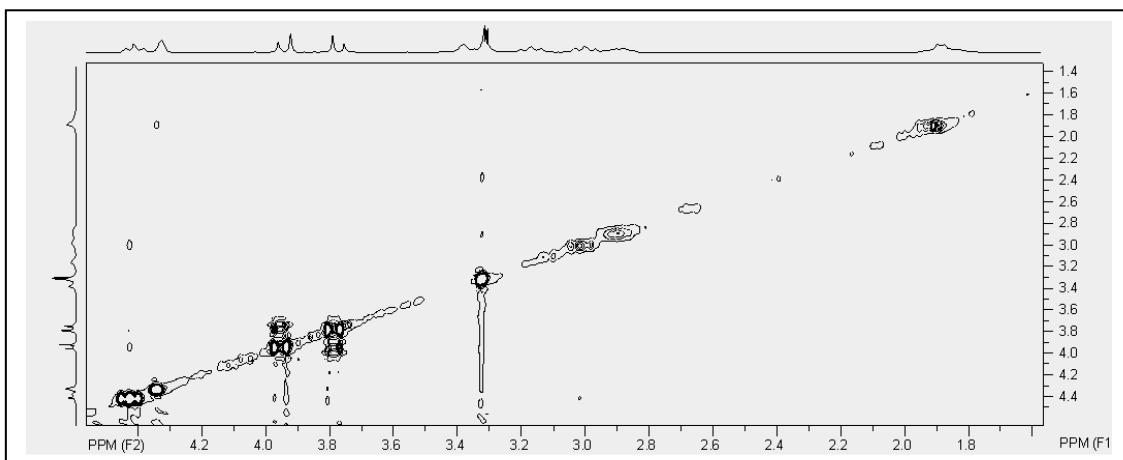


Figura 58: Espectro NOESY do tetrol (300 MHz, D₂O).

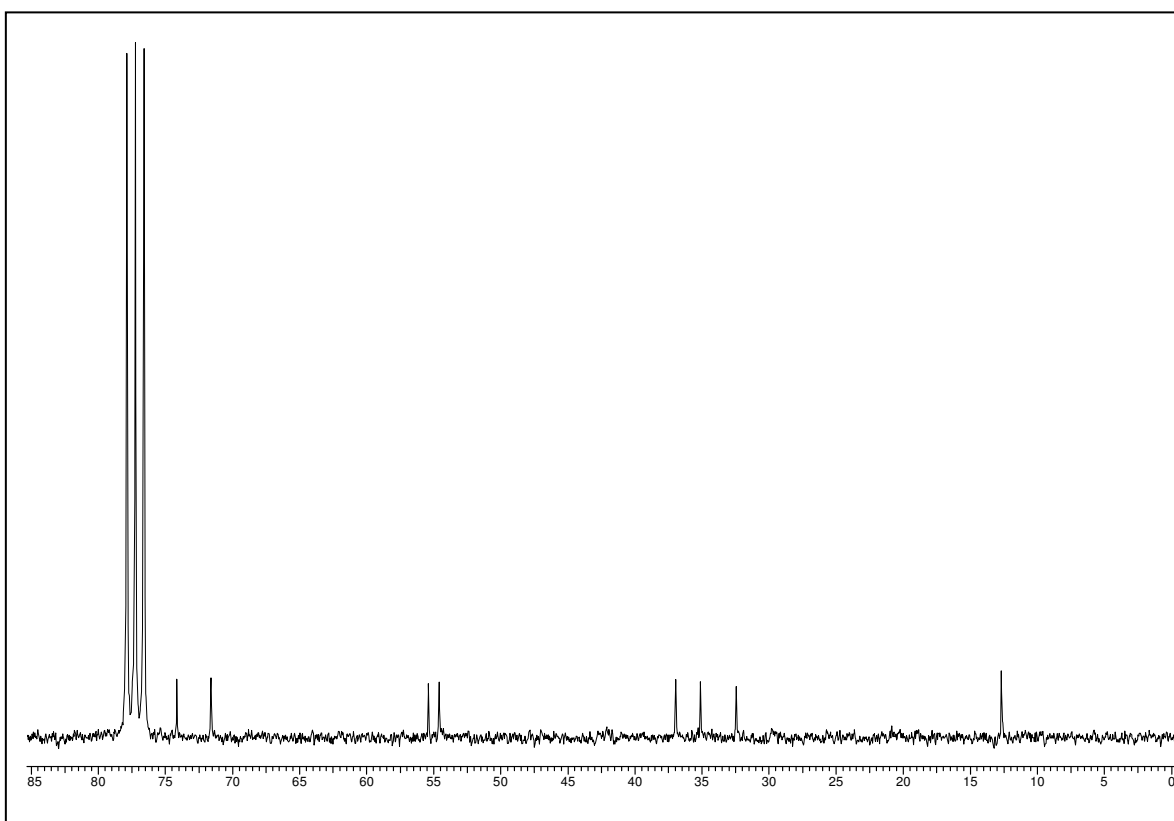


Figura 59: Espectro de RMN de ¹³C do retronecanol (50 MHz, CDCl₃).

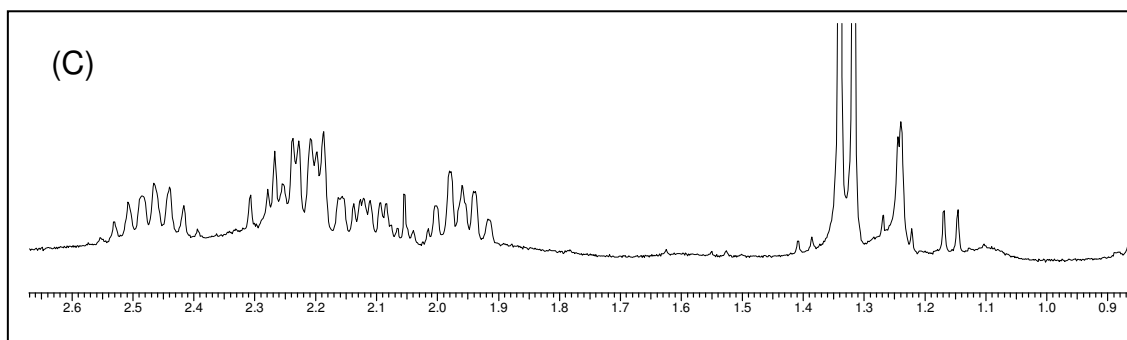
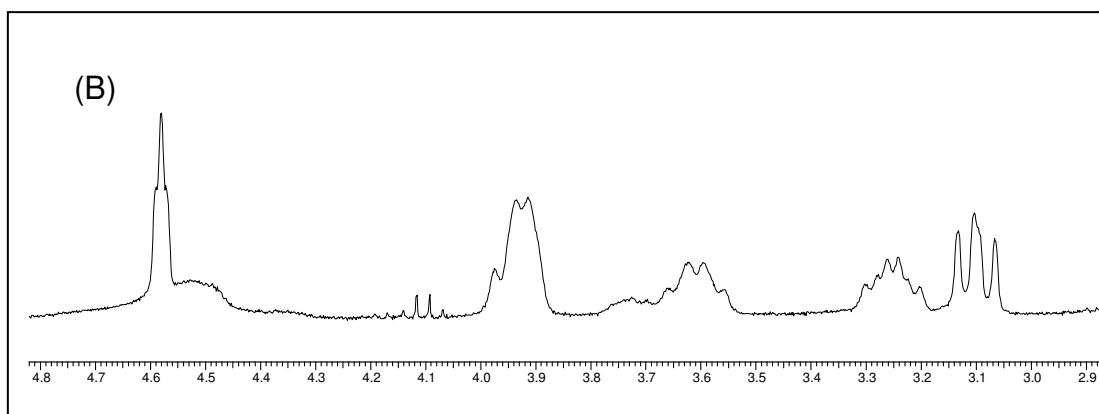
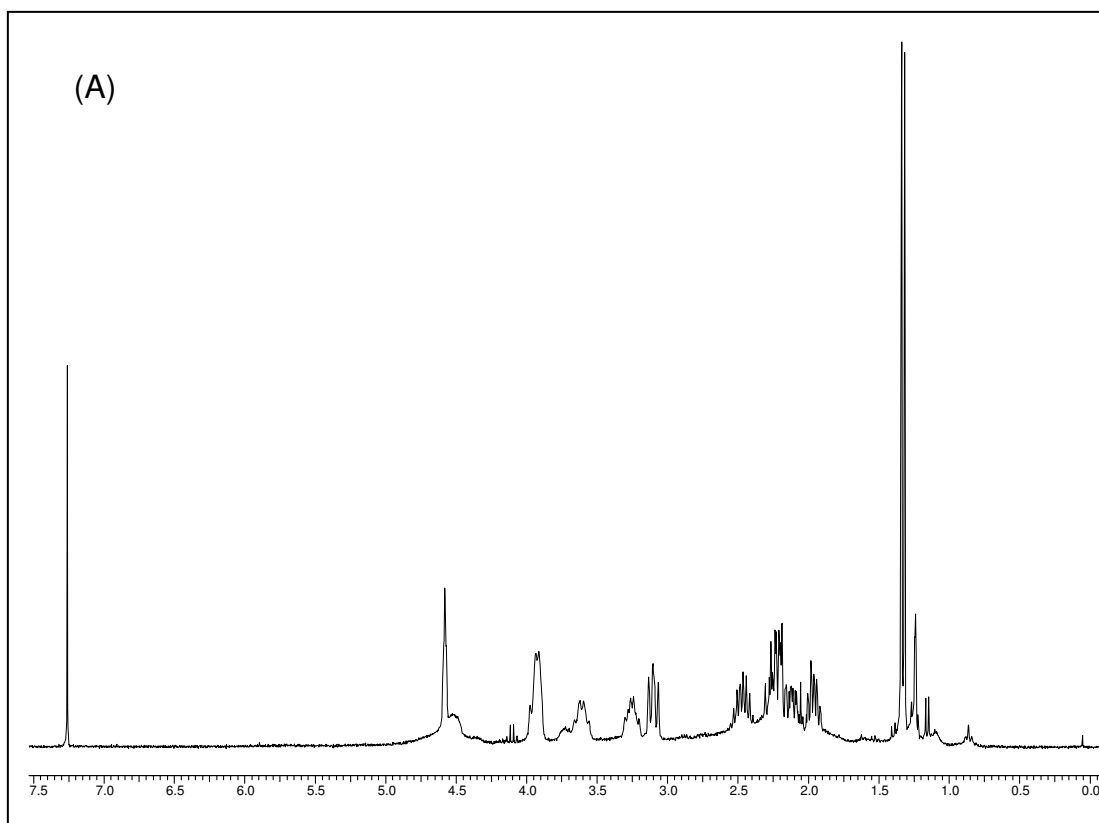


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H do retronecanol (A) e ampliações(B) e (C) (300 MHz, CDCl_3).

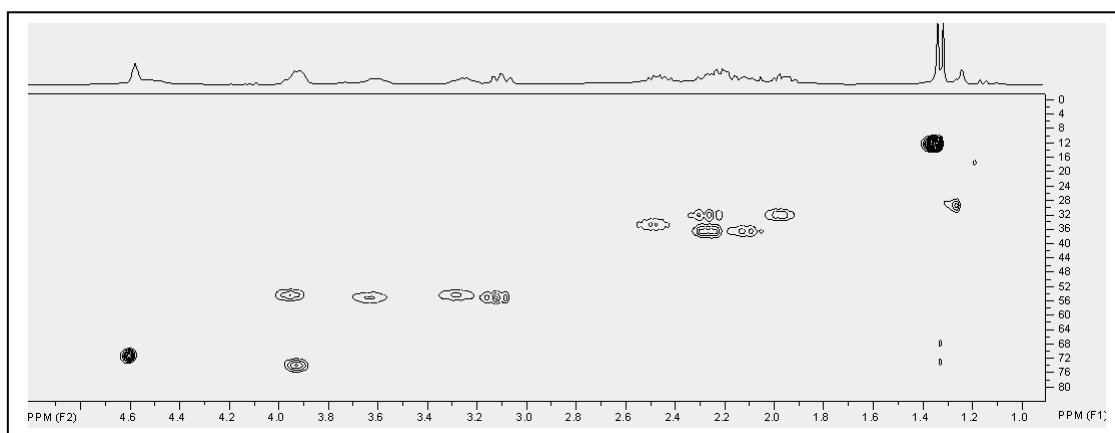


Figura 61: Espectro HMQC do retronecanol (300 MHz, CDCl₃).

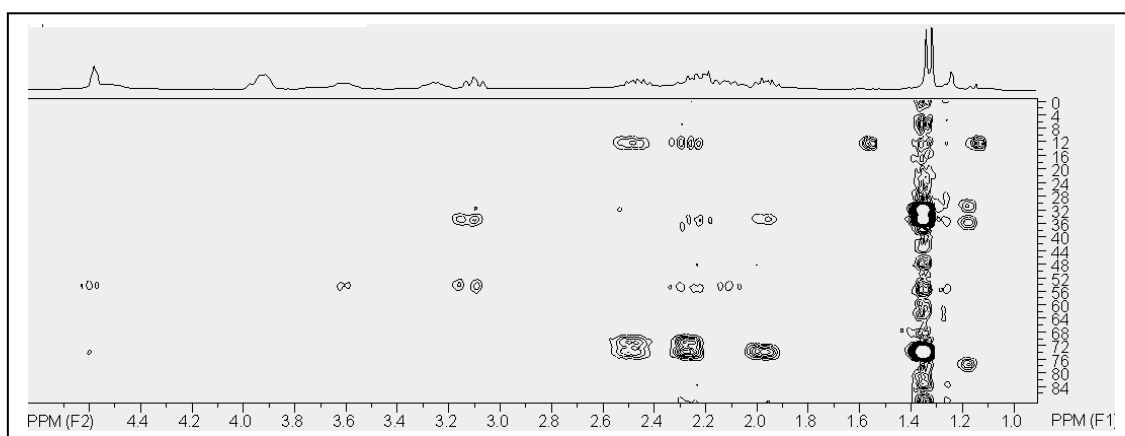


Figura 62: Espectro HMBC do retronecanol (300 MHz, CDCl₃).

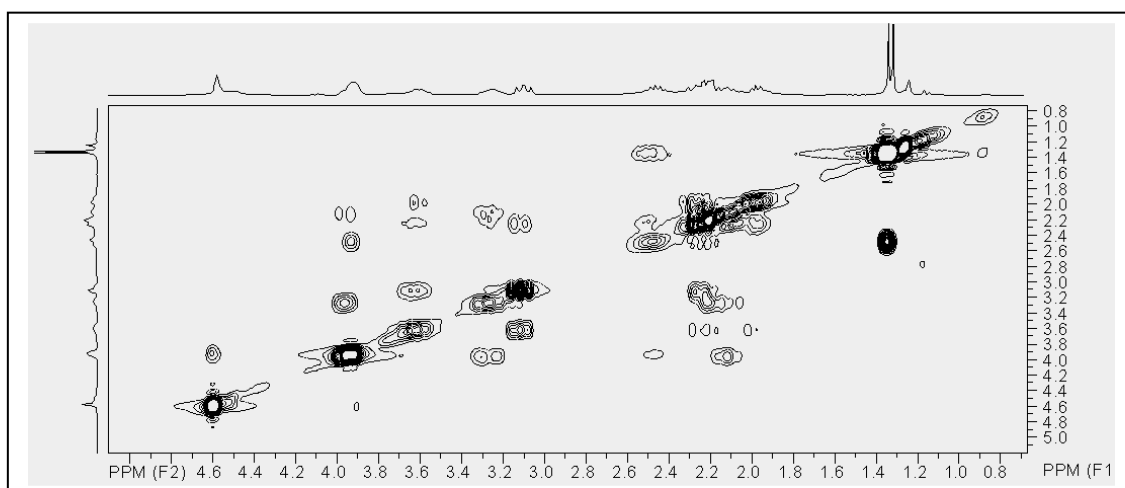


Figura 63: Espectro COSY do retronecanol (300 MHz, CDCl₃).

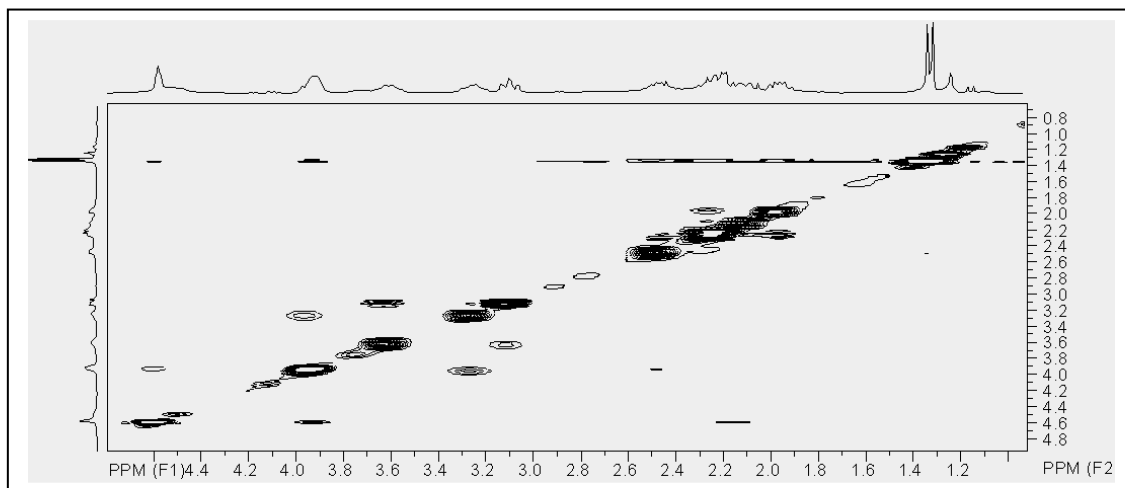


Figura 64: Espectro NOESY do retronecanol (300 MHz, CDCl₃).

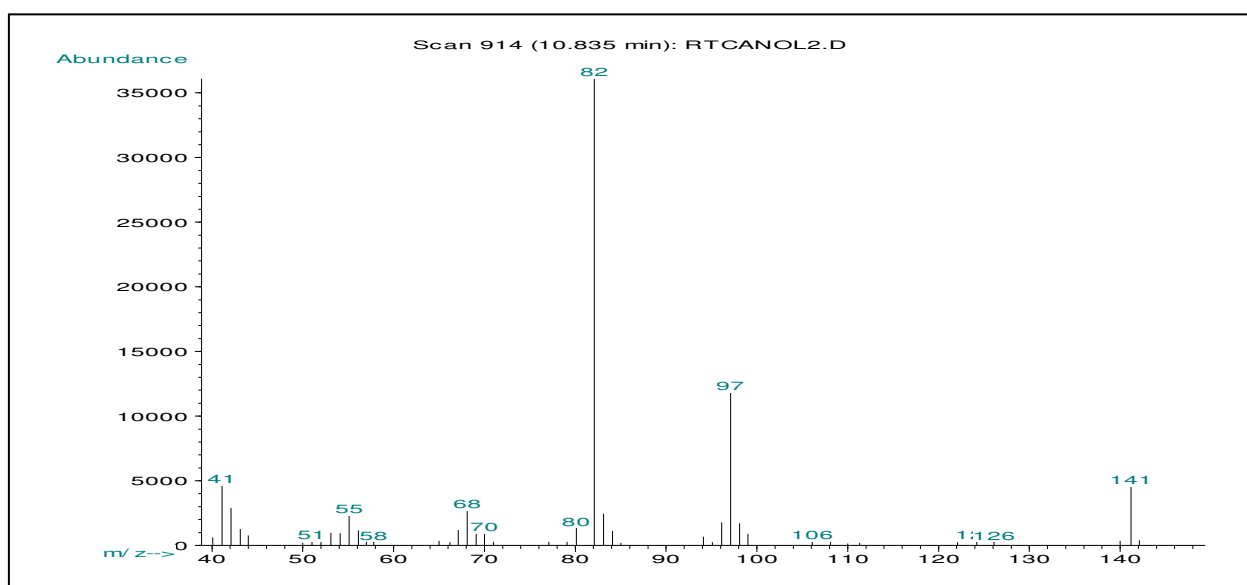


Figura 65: Espectro de massas do retronecanol.

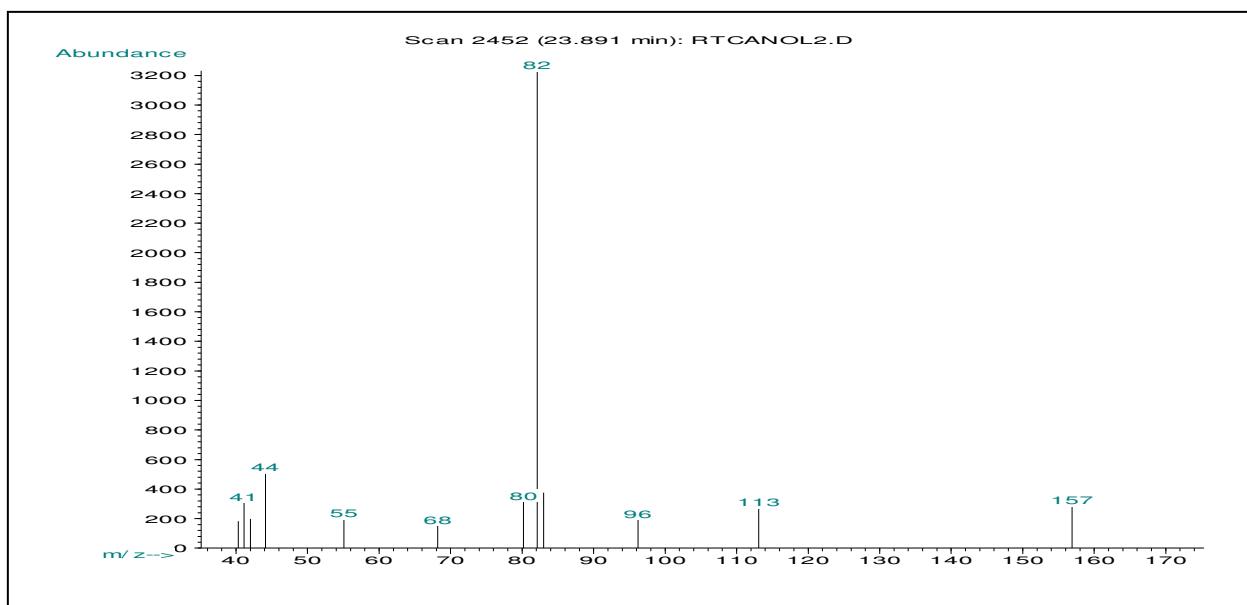


Figura 66: Espectro de massas da platinecina.

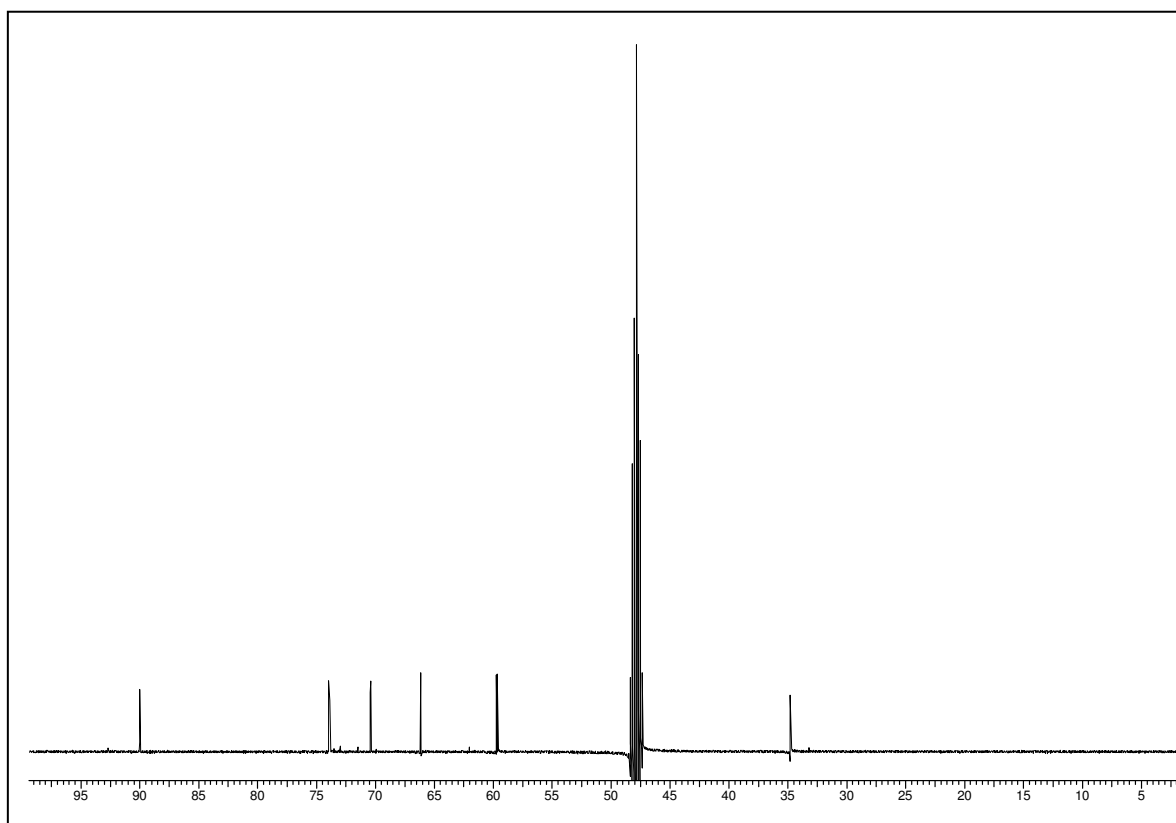


Figura 67: Espectro de RMN de ^{13}C do *N*-óxido- α -1,2-epóxido da retronecina (125 MHz, CD_3OD).

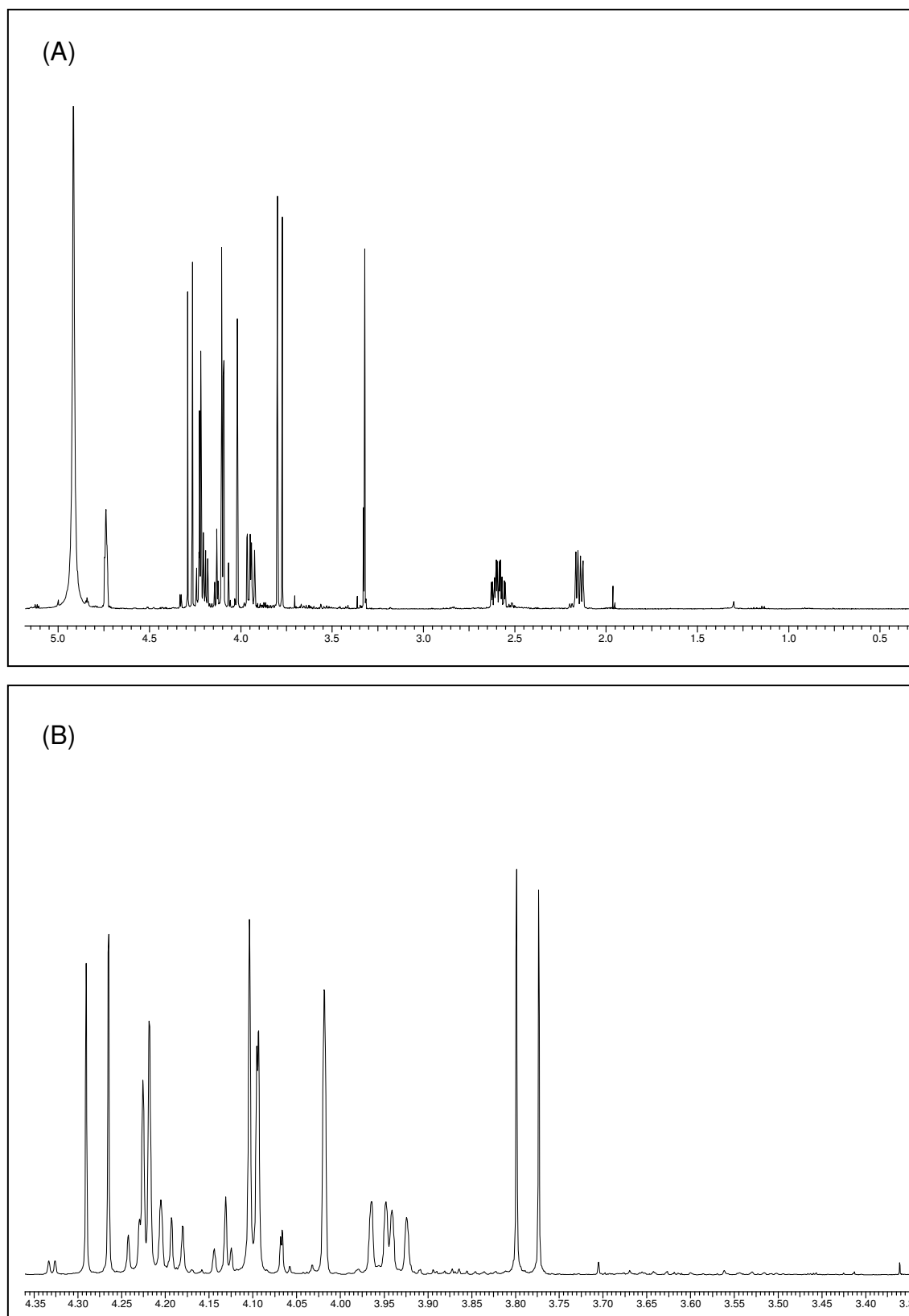


Figura 68: Espectro de RMN de ^1H do *N*-óxido- α -1,2-epóxido da retronecina (A) e ampliação (B) (500 MHz, CD_3OD).

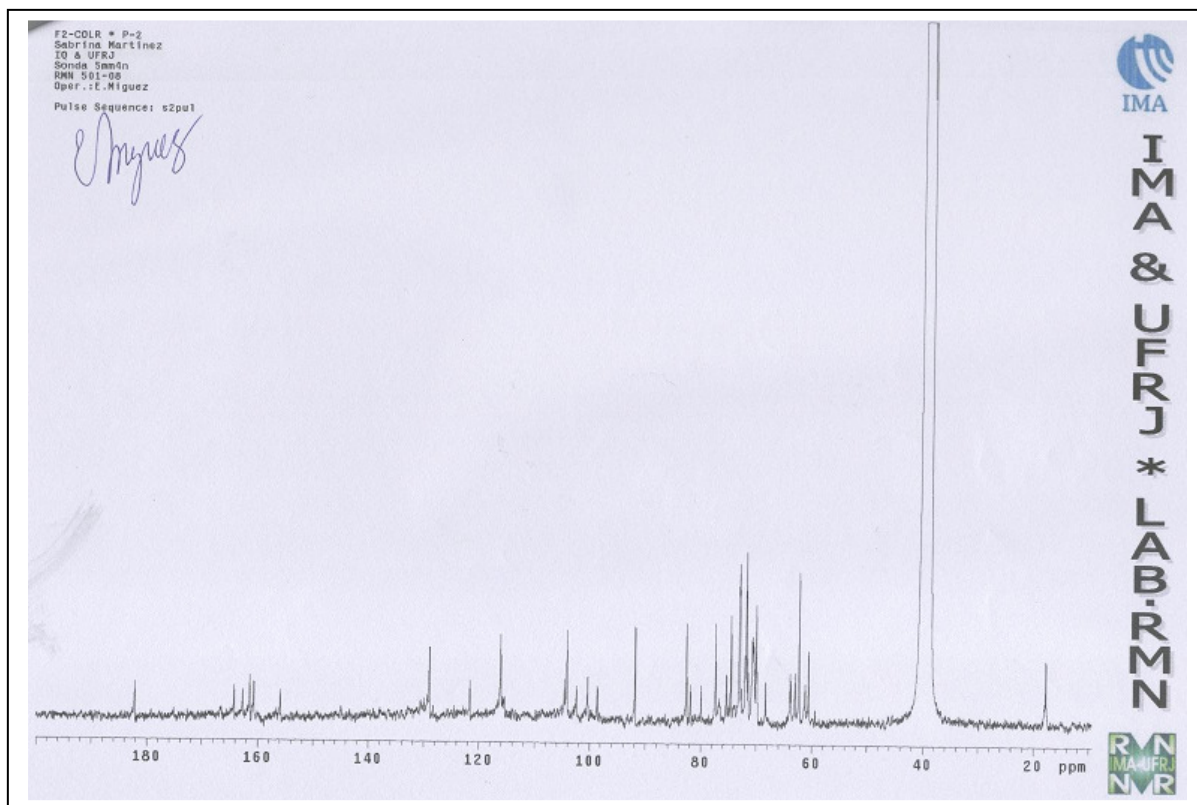


Figura 69: Espectro de RMN ^{13}C do flavonoide (300 MHz, DMSO).

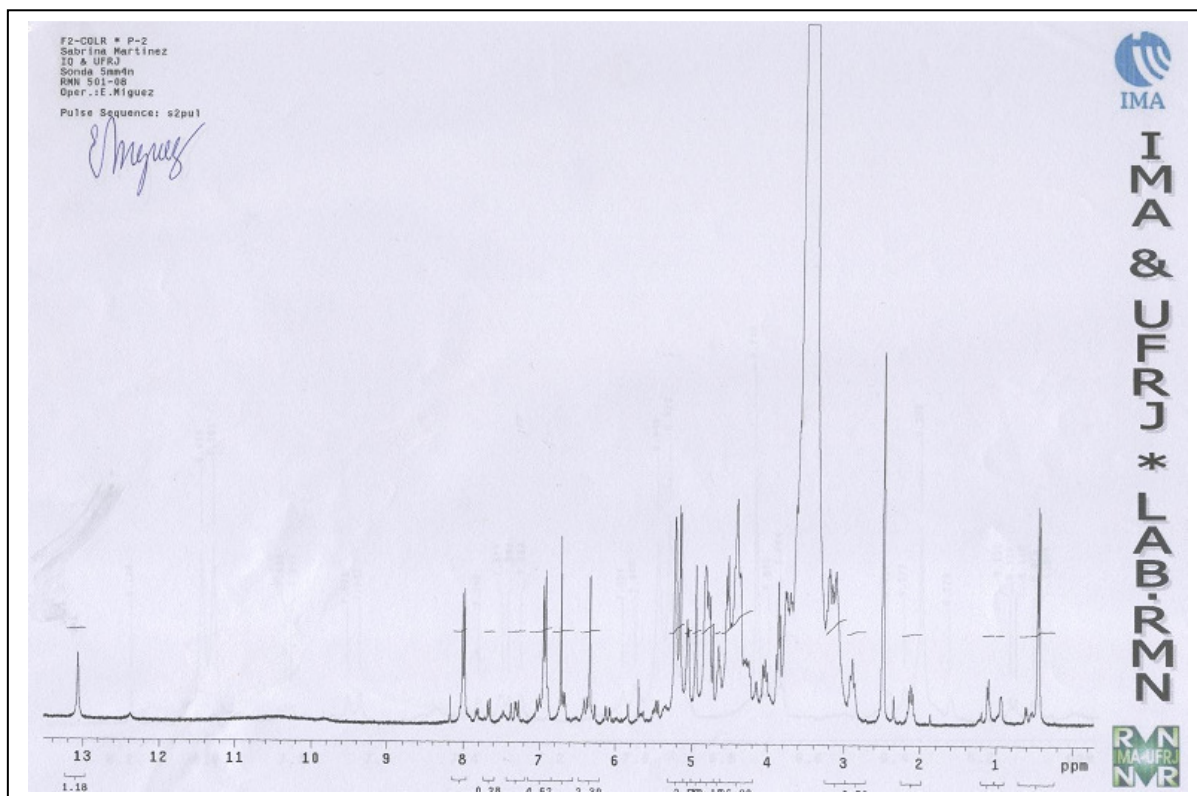


Figura 70: Espectro de RMN ^1H do flavonoide (300 MHz, DMSO).

- Agrawal, P. K. 1989. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier Science Publishing Company: Nova Iorque, 564 p.
- Asres, K.; Sporer, F.; Wink, M. 2004. Patterns of pyrrolizidine alkaloids in 12 Ethiopian *Crotalaria* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 915-930.
- Barreto, R. A.; Hughes, J. B.; Souza, C. S.; Silva, V. D. A.; Silva, A. R.; Velozo, E. S.; Batatinha, M. J. M.; Costa, M. F. D.; El-Bachá, R. S.; Costa, S. L. 2006. O alcaloide monocrotalina, extraído de *Crotalaria retusa*, altera a expressão de GFAP, a morfologia e o crescimento de culturas primárias de astrócitos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 7, 112-127.
- Birecka, H.; Birecki, M.; Irohlich, M. W. 1987. Evidence for arginine as the endogenous precursor of necines *Heliotropium*. *Plant Physiology*, 84, 42-46.
- Breitmaier, E.; Voelter, W. 1989. Carbon-13 NMR spectroscopy. VHC: Nova Iorque, 3ª ed, 530 p.
- Bruneton, J. 1991. *Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia*. Editoria Acribia, S. A., Zaragoza, 594p.
- Coleman, P. C.; Coucourakis, E. D.; Pretorius, J. A. 1980. Crystal structure of retrorsine. *South African Journal of Chemistry*, 33, 116-119.
- Conegero, L. 2006. Estudos visando a síntese de alcaloides pirrolizidínicos e indolizidínicos. Aproveitamento da (+)-retronecina e do ácido D-isoascórbico. Tese de Doutorado, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo.
- Corrêa, A. G.; Vieira, P. C. 2007. *Produtos Naturais no Controle de Insetos*. UFScar: São Carlos, 150 p.
- Corrêa, M. P. 1926-1952. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. V.2, imprensa Nacional, Rio de Janeiro, 707.
- Correia, C. R. D. 2001. *Síntese Estereosseletiva de Alcaloides e N-Heterociclos*. UFSCar: São Carlos, 97 p.
- Culvenor, C. C. J.; Heffernan, M. L.; Woods, W. G. 1965. Nuclear magnetic resonance spectra of pyrrolizidine alkaloids.I. The spectra of retronecine and heliotridine. *Australian Journal of Chemistry*, 18, 1605-1624.
- Dewick P. M. 2002. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons: Chichester, 507 p.
- Dos Santos, A. P. B. Isolamento, identificação e transformação Química de monocrotalina de *Crotalaria pallida*. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica). UFRJ, Rio de Janeiro, 2007.

- Fico, G.; Rodondi, G.; Flamini, G.; Passarella, D.; Tomé, F. 2007. Comparative phytochemical and morphological analyses of three Italian *Primula* species. *Phytochemistry*, 68, 1683-1691.
- Filliettaz, A. M. 2002. Estudos taxonômicos das espécies de *Crotalaria* sect. Calycinae Wight & Arn. (Leguminosae – Papilionioideae – Crotalariae) no Brasil. Tese de doutorado. Instituto de Biologia. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, 146 p.
- Flores, A. S.; Miotto, T. S. 2005. Aspectos fitogeográficos das espécies de *Crotalaria* L. (Leguminosae, Faboideae) na região sul do Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 19, 245-249.
- Freer, A. A.; Kelly, H. A.; Robins, D. J. 1986. Rosmarinine: A pyrrolizidine alkaloid. *Acta Crystallographica. Section C. Crystal Structure Communications*, 42, 1348-1350.
- Giordan, M.; Custódio, R.; Trigo, J. R. 1996. Pyrrolizidine alkaloids necine bases: An *Ab initio*, semiempirical and molecular mechanics study of molecular properties. *Journal of Computational Chemistry*, 17, 156-166.
- Giordan, M. 1998. Pyrrolizidine alkaloids necines bases II: Conformational analysis of free bases. *Journal of Computational Chemistry*, 19, 1853-1861.
- Glinski, J. A.; Van Derveer, D.; Zalkow, L. H. 1985. Retronecine and Heliotridine, $C_8H_{13}NO_2$: Diastereoisomeric pyrrolizidine bases necines. *Acta Crystallographica: Section C*, 41, 1342- 1345.
- Hartmann, T.; Sander, H.; Adolph, R.; Toppel, G. 1988. Metabolic links between the biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids and polyamines in root cultures of *Senecio vulgaris*. *Planta*, 175, 82-90.
- Hartmann, T.; Theuring, C.; Bernays, E. A. 2003. Are insect-synthesized retronecine esters (creatonotines) the precursors of the male courtship pheromone in the arctiid moth *Estigmene acrea*? *Journal of Chemical Ecology*, 29, 2603-2608.
- Hartmann, T.; Theuring, C.; Beuerle, T.; Klewer, N.; Schulz, S.; Singer, M. S. Bernays, E. A. 2005. Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 391-411.
- Hovermale, J. T.; Fleming, F. F.; White, J. D.; Craig, A. M. 1994. Improved labelling methods for C_9 - 2H -retronecine. *Heterocycles*, 38, 135-142.
- Jacobi, C. M.; Ramalho, M.; Silva, M. 2005. Pollination biology of the exotic rattleweed *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae) in NE Brasil. *Biotropica*, 37, 357-363.
- Molyneux, R. J.; Roitman, J. N.; Benson, M.; Ludin, R. E. 1982. ^{13}C NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. *Phytochemistry*, 21, 439 – 443.

- Neuner-Jehle, N.; Nesvabda, H.; Spiteller, G. 1965. Anwendung der massenspektrometrie zur strukturaufklärung von alkaloiden. Monatshefte für Chemie, *96*, 321 – 338.
- Nieto-Alvarez, D. A.; Alderón, J. S.; Mancilla, T. 2003. Synthesis of (1*R*, 2*R*, 7*R*, 7*aS*)-1-hidroxymethyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahidropyrrolizidina-1,2,7-triol from rosmarinine degradation. Natural Product Research, *17*, 33-36.
- Pandey, G.; Chakrabarti, D.; 1996. Further evidence on the PET cyclization of α -silylmetilaminas tethered with non-activated olefins: Demonstration by the total synthesis of (-)-retronecanol. Tetrahedron Letters, *37*, 2285 – 2288.
- Pilli, R. A. 2001. Catálise assimétrica e o Prêmio Nobel em Química de 2001: Novos paradigmas e aplicações práticas. Química Nova na Escola, *14*, 16-24.
- Reimann, A.; Nurhayati, N.; Backenkohler, A.; Ober, D. 2004. Repeated evolution of the pyrrolizidina alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. Plant Cell, *16*, 2272 - 2784.
- Robins, D. J. 1989. Biosynthesis of pyrrolizidina alkaloids. Chemical Society Reviews, *18*, 375-408.
- Robins, D. J.; Bale, N. M. ; Crout, D. H. G. 1974. Pyrrolizidina alkaloids: Biosynthesis of monocrotalica acid, the necic acid component of monocrotalina. Journal of the Chemical Society. Perkin Transactions 1, *18*, 2082-2086.
- Rouhi, A. M. 2000. Meet Tom and Jerry. Chemical & Engineering News, *78* (46), 33-34.
- Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Ros Petrovick, P. 2004. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5^o ed., Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, Porto Alegre/ Florianópolis, 1102p.
- Souza, M. V. N.; Almeida, M. V. 2003. Drogas anti-VIH: Passado, presente e perspectivas futuras. Química Nova, *26*, 366-372.
- Stoeckli-Evans, H. 1979. Monocrotalina: A pyrrolizidina alkaloid. Acta Crystallographica, Section B. *35*, 231-234.
- Tan, G. T.; Pezzuto, J. M.; Kinghorn, A. D.; Hughes, S. H. 1991. Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Reverse Transcriptase. Journal of Natural Products, *54*, 143-154.
- Van Dam, N. M.; Witte, L.; Theuring, C.; Hartmann, T. 1995. Distribution, biosynthesis and turnover of pyrrolizidina alkaloids in *Cynoglossum officinale*. Phytochemistry, *39*, 287-292.
- Vollhardt, K. P. C.; Schore, N. E. 2004. *Química Orgânica: Estrutura e função*. Bookman: Porto Alegre, 4^o Ed, 1112p.

Internet:

<http://florabase.dec.wa.gov.au/science/timage/18147ic1.jpg>, acessada em março de 2009.

http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/var/riz_guyane/storage/images/media/images/crotalaria_pallida/9108-1-fre-FR/crotalaria_pallida.jpg, acessada em março de 2009.

http://plantes-rizieres-guyane.cirad.fr/var/riz_guyane/storage/images/media/images/crotalaria_retusa/9105-1-fre-FR/crotalaria_retusa.jpg, acessada em março de 2009.

<http://www.cnpab.embrapa.br/publicacoes/leguminosas/crotalaria.html>, acessada em dezembro de 2008.

<http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/upjohn-dihydroxylation.shtm>, acessada em dezembro de 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)