



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

THEMÍSTOCLES DA SILVA NEGREIROS NETO

**ALCALOIDES DO GÊNERO *CROTALARIA*: ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL, SÍNTESE DE DERIVADOS E POTENCIAL BIOLÓGICO**

NATAL-RN
2015

THEMÍSTOCLES DA SILVA NEGREIROS NETO

**ALCALOIDES DO GÊNERO *CROTALARIA*: ISOLAMENTO, ELUCIDAÇÃO
ESTRUTURAL, SÍNTESE DE DERIVADOS E POTENCIAL BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada à Coordenação do
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADOR: PROFA. DRA. RAQUEL BRANDT GIORDANI

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. MAURO VIEIRA DE ALMEIDA

NATAL-RN

2015

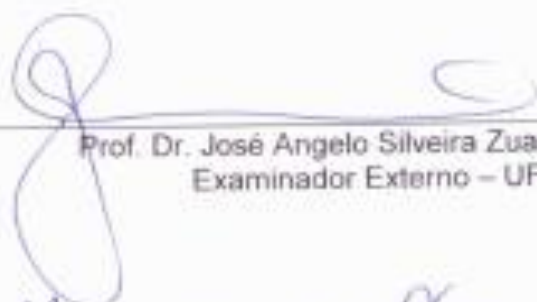
THEMÍSTOCLES DA SILVA NEGREIROS NETO

ALCALOIDES DO GÊNERO CROTALARIA: ISOLAMENTO,
ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL, SÍNTESE DE DERIVADOS E
POTENCIAL BIOLÓGICO

Banca Examinadora:



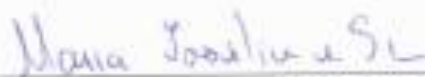
Profa. Dra. Raquel Brandt Giordani
Presidente – UFRN



Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Examinador Externo – UFRGS



Prof. Dr. Mauro Vieira de Almeida
Examinador Externo – UFJF



Profa. Dra. Maria Joselice e Silva
Examinador Interno – UFRN

Natal, 24 de fevereiro de 2015

NATAL / RN
2015

Catálogo da Publicação na Fonte
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Negreiros Neto, Themístocles da Silva.

Alcalóides do gênero *crotalaria*: isolamento, elucidação estrutural, síntese de derivados e potencial biológico / Themístocles da Silva Negreiros Neto. - Natal, 2015.

122f: il.

Coorientador: Prof. Dr. Mauro Vieira De Almeida.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Raquel Brandt Giordani.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

1. Alcaloides pirrolizidínicos - Dissertação. 2. *Crotalaria pallida* - Dissertação. 3. *Crotalaria retusa* - Dissertação. I. Giordani, Raquel Brandt. II. Título.

RN/UF/BSA01

CDU 543.645.3

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof. Raquel Giordani, pela oportunidade, confiança, principalmente paciência e pela força nos momentos difíceis dessa jornada, pelos inúmeros conselhos e ensinamentos sempre acompanhados pelo seu jeito simples de ser o qual admiro muito, aprendizado que vou levar pro resto da vida, além de orientadora, foi uma grande amiga.

Ao meu Co-orientador, Prof. Mauro Almeida, por acreditar nesse projeto, por ter me dado à oportunidade de conhecer os caminhos da química orgânica os quais sempre quis conhecer desde os tempos de graduação. Pela paciência mesmo quando tudo dava errado, e pelos inúmeros ensinamentos.

Aos professores Alexandre Macedo, Euzébio Guimarães e Tiana Tasca pela colaboração, que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de Laboratório do PNbio, em especial ao Técnico Walteçá, Emerson, Thaciane, e principalmente, o grupo dos alcaloides (Danielle, Eloísa, Kariliny, Gabrielle, Letícia, Fernanda) que me receberam tão bem e pelo grande aprendizado, principalmente pela zuera e momentos felizes que tive nesses dois anos de convivência.

Aos meus amigos e colegas que fiz no Laboratório de Química orgânica da UFJF em especial ao Celso, Camila, Fábio, Bruno, Lucas, Larissa, Isabela, Danielle, Amanda, Jaqueline, Adriane, Larissa, Mariana, Pedro, Balbino, Mathias e Eloah, que tornaram meus momentos no laboratório sempre momentos de felicidades e aprendizado.

Aos alunos de iniciação científica Ana Jéssica, Priscilla, Fabiolange, Wamberto que me ajudaram nessa jornada, e me permitirem compartilhar um pouco do que aprendi, e também, pelo aprendizado. Aprendemos juntos cada etapa deste trabalho.

Aos meus amigos, em especial à Leandro e Lilian, pelos inúmeros conselhos, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, acima de tudo, pelos ensinamentos.

À minha família, pelo apoio, amor, carinho e educação que me proporcionaram ao longo da minha vida.

À Graziela, pelo companheirismo, compreensão, carinho e amor.

Ao CNPq pela bolsa de Mestrado, que me permitiu ter tranquilidade de me dedicar ao máximo a este trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro a este projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelo apoio financeiro, que me propiciou fazer parte do meu mestrado na UFJF.

À Deus, por tudo que me proporcionou na vida, o qual só tenho a agradecer.

RESUMO

As espécies do gênero *Crotalaria* estão distribuídas de forma abundante em zonas tropicais, principalmente na Argentina e no Brasil, devido a sua alta capacidade de adaptação aos mais variados ambientes. No Rio Grande do Norte são encontradas duas espécies de *Crotalaria*: *Crotalaria retusa* e *Crotalaria pallida*. Este trabalho visa à obtenção de extratos enriquecidos em alcaloides assim como o isolamento e caracterização dos mesmos. A partir destes isolados busca-se aproveitar o núcleo base para síntese de novas moléculas bioativas. Os extratos foram preparados por maceração exaustiva com etanol 96% e submetidos à extração ácido-base para obtenção de frações enriquecidas em alcaloides. Foram obtidas frações com rendimento satisfatório, o que permitiu o fracionamento e isolamento de alcaloides pirrolizidínicos, dentre eles a monocrotalina, extraída de *C. retusa*, que foi utilizada para síntese de derivados, e a pallidina, um novo alcaloide extraído de *C. pallida*. A monocrotalina deu origem a dois derivados semi-sintéticos: retronecina e azida-retronecina. A atividade frente a *T. vaginalis* foi avaliada e os resultados apontam para o potencial da monocrotalina em inibir o crescimento do parasito em 80% a 1 mg/mL de forma seletiva, uma vez que não é tóxico frente a células epiteliais vaginais e não é hemolítico. Por outro lado, o derivado retronecina não apresentou atividade anti-tricomonas enquanto o derivado azida mostrou-se mais ativo que a monocrotalina, matando 85 % dos parasitos a 1 mg/ml. Pallidina apresenta características estruturais importantes que a diferem dos alcaloides pirrolizidínicos previamente isolados. Ainda, esse alcaloide foi avaliado frente à atividade antibiofilme e demonstrou a capacidade de inibir mais de 50 % da formação de biofilme de *Staphylococcus epidermidis* sem apresentar atividade biocida na concentração de 1 mg/mL, características desejáveis uma vez que o mecanismo de ação em fatores de virulência contribuem para a não indução de resistência microbiana. Finalmente, sugere-se os alcaloides pirrolizidínicos como sendo promissores protótipos para novos fármacos, especialmente de uso tópico para evitar a hepatotoxicidade, e também, indica-se as condições edafoclimáticas do Rio Grande do Norte como favoráveis para obtenção de novos esqueletos químicos.

Palavras-chaves: alcaloides pirrolizidínicos, *Crotalaria retusa*, *Crotalaria pallida*, monocrotalina, pallidina, *T. vaginalis*, síntese de derivados

ABSTRACT

Crotalaria is widespread in tropical areas mainly in Argentina and Brazil. Two species of *Crotalaria*: *Crotalaria retusa* and *Crotalaria pallida* could be found in Rio Grande do Norte, Brazil. The aim of this study is to obtain extracts containing alkaloids as well as the isolation and structural characterization of these metabolites. In addition, the potential of the pyrrolizidine alkaloids obtained was evaluated regarding biological properties and synthesis of derivatives. The extracts were prepared by exhaustive maceration with ethanol 96%. The crude extract was subjected to an acid-base extraction to obtain alkaloids-enriched fractions. Additional purification procedures afforded monocrotaline from *C. retusa* and pallidine from *C. pallida*. Monocrotaline was submitted to synthesis of two derivatives: retronecine and azide-retronecine. The activity against *T. vaginalis* was evaluated and the results indicated inhibition on parasite growth of 80% at 1 mg/mL neither cytotoxicity against vaginal epithelial cells nor hemolytic activity. On the other hand, retronecine showed no anti-*T. vaginalis* activity while azide-retronecine was more active than monocrotaline by killing 85% of the parasites at 1 mg/mL. Pallidine is an uncommon pyrrolizidine alkaloid that has important structural features. Furthermore, pallidine was evaluated against antibiofilm activity and demonstrated the ability to inhibit more than 50% of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation at 1mg/mL, without providing biocidal activity. It is an outstanding start point to develop new antibiofilm strategies. Finally, the pyrrolizidine alkaloids are suggested as promising prototypes for new drugs as well as our results suggests that the edaphoclimatic conditions of Rio Grande do Norte could affect the biosynthesis of these alkaloids and facilitate the occurrence of new chemical skeletons.

Key-words: pyrrolizidine alkaloids, *Crotalaria retusa*, *Crotalaria pallida*, monocrotaline, pallidine, *T. vaginalis*, , synthesis derivatives

Lista de Figuras

Figura 1- Estrutura química dos diversos tipos de compostos nitrogenados encontrados em Fabaceae. (Adaptado de WINK, 2013).....	20
Figura 2 - Estrutura química das classes de alcaloides heterocíclicos. (Adaptado de EVANS, 2009).	30
Figura 3 - Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico.	31
Figura 4 - Estrutura química dos diferentes grupos de alcaloides pirrolizidínicos. (Adaptado de HARTMANN; WITTE, 1995).....	32
Figura 5 - Alcaloides pirrolizidínicos já descritos em sementes de <i>C. retusa</i>	44
Figura 6- Cromatograma da fração clorofórmica alcalina das folhas de <i>C. retusa</i> obtido em CG-EM.	61
Figura 7 - Cromatograma da fração clorofórmica alcalina das cascas de <i>C. retusa</i> obtido em CG-EM.	62
Figura 8 - - Cromatograma da fração butanólica das folhas de <i>C. retusa</i> obtido em CG-EM.	63
Figura 9- Cromatograma da fração butanólica das cascas de <i>C. retusa</i> obtido em CG-EM.	64
Figura 10- Cromatograma do isolado 1 (monocrotalina) obtido em CG-EM.	65
Figura 11 - Espectro RMN ¹³ C da monocrotalina (125 MHz, CDCl ₃).....	66
Figura 12- Espectro RMN ¹ H da monocrotalina (500 MHz, CDCl ₃).	67
Figura 13- Espectro de massas da monocrotalina (ionização por impacto de elétrons 70 eV).	67
Figura 14- Produtos da hidrólise da monocrotalina: estrutura química do ácido monocrotálico e retronecina.	72
Figura 15- Espectro RMN ¹ H da retronecina (500 MHz, CD ₃ OD).	73
Figura 16- Espectro RMN ¹³ C da retronecina (125 MHz, CD ₃ OD).	73
Figura 17- Espectro RMN ¹³ C do derivado azido-retronecina (125 MHz, CDCl ₃).	75
Figura 18- Espectro RMN ¹ H do derivado azido-retronecina (500 MHz, CDCl ₃).	76
Figura 19- Espectro IV do derivado azido-retronecina.	76
Figura 20- Espectro COSY ¹ H- ¹ H do derivado azido -retronecina (500 MHz, CDCl ₃).....	77
Figura 21- Avaliação da atividade anti- <i>T. vaginalis</i> da monocrotalina.....	78
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade da monocrotalina frente à linhagem celular HMVII..	79
Figura 23 - Avaliação da atividade anti- <i>T. vaginalis</i> da Retronecina.	80
Figura 24 - Avaliação da atividade anti- <i>T.vaginalis</i> do derivado azido-retronecina.....	80

Lista de Esquemas

Esquema 1 - Incorporação estéreo específica da putrescina marcada com deutério. (Adaptado de ROBINS, 1982).....	34
Esquema 2 - Rota biosintética dos alcaloides pirrolizidínicos. (Adaptado de HARTMANN; WITTE, 1995).....	36
Esquema 3-Formação dos principais fragmentos no espectro de massas da monocrotalina (NEUNER-JEHLE; NEVABDA; SPITELLER, 1965).	69
Esquema 4- Esquema proposto para síntese de derivados do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (1): retronecina (2), azido-retronecina (5), ácido monocrotálico (3) e amidas do ácido monocrotálico (4).....	70
Esquema 5- Reação de Síntese do derivado amídico do ácido monocrotálico: mostrando o composto formado diferente do esperado.....	71
Esquema 6- Reação de tosilção da retronecina.	74
Esquema 7 -Esquema de síntese do derivado azido-retronecina.....	75

Lista de Quadros

Quadro 1- Metabólitos secundários nitrogenados de Fabaceae, sua ocorrência e propriedades bioativas.(Adaptado de WINK, 2013).....	21
Quadro 2- Alcaloides utilizados na terapêutica e sua aplicação (Adaptado AMIRKIA; HEINRICH, 2014).....	27

Lista de abreviaturas e siglas

$\alpha 2$	Receptor adrenérgico tipo $\alpha 2$
5-HT ₂	Receptor de serotonina tipo 2
AChE	Acetilcolinesterase
ANZFSA	Australian New Zealand Food Safety Authority
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Humana
ATCC	American Type Culture Collection
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentração inibitória mínima
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas
d	Dupleto
D ₂	Receptor de dopamina tipo 2
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSTs	Doenças sexualmente transmissíveis
EB	Extrato bruto
FDA	Food and Drug Administration
GABA	Ácido γ -aminobutirico
GSH	Glutationa
dd	Duplo dupleto
HCN	Ácido cianídrico
HIV	<i>Human Immunodeficiency Vírus</i>
HPLC	<i>High performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IC ₅₀	Índice de Citotoxicidade 50%
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MHz	Megahertz
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
nAChR	Receptor nicotínico de acetilcolina

mAChR	Receptor muscarínico de acetil colina
MAO	Monoamino oxidase
NAD	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect spectroscopy</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDB	<i>Protein database</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H
s	Singleto
SAR	Solução aquosa residual
t	triplete

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
2.1	Família Fabaceae.....	19
2.2	Aspectos Químicos	24
2.2.1	Alcaloides.....	25
2.2.2	Propriedades dos alcaloides.....	25
2.2.3	Alcaloides bioativos.....	26
2.2.4	Estrutura e classificação dos alcaloides	29
2.2.5	Alcaloides pirrolizidínicos	30
2.3	Aspectos Farmacológicos	37
2.3.1	Atividades farmacológicas de alcaloides pirrolizidínicos.....	37
2.3.2	Toxicidade de alcaloides pirrolizidínicos.....	38
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
4	CAPÍTULO I – <i>Crotalaria retusa</i>	42
4.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	43
4.1.1	Aspectos botânicos	43
4.1.2	Aspectos químicos	43
4.1.3	Aspectos farmacológicos	45
4.1.4	<i>Trichomonas vaginalis</i>	45
4.1.5	Produtos naturais ativos contra <i>Trichomonas vaginalis</i>	48
4.1.6	Semissíntese de produtos naturais	51
4.2	METODOLOGIA	52
4.2.1	Material vegetal.....	52
4.2.2	Extração dos alcaloides.....	53
4.2.3	Isolamento e caracterização química dos alcaloides	53
4.2.4	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massas – CG/EM.....	55
4.2.5	Ressonância magnética nuclear - RMN	55
4.2.6	Síntese de derivados anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	55
4.2.7	<i>Docking</i> da monocrotalina.....	57
4.2.8	Avaliação da atividade anti- <i>Trichomonas vaginalis</i>	58
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.3.1	Material vegetal e extração dos alcaloides.....	59

4.3.2	Isolamento e caracterização química dos alcaloides	66
4.3.3	Síntese de derivados anti- <i>T. vaginalis</i>	69
4.3.4	Avaliação da atividade anti- <i>T. vaginalis</i>	77
4.3.5	Conclusões Parciais.....	81
CAPÍTULO II: ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>MOLECULES</i> (Qualis B1): Novel pyrrolizidine alkaloid from <i>Crotalaria pallida</i> seeds possesses antibiofilm activity.....		
5	CONCLUSÕES GERAIS.....	111
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	112

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como fonte de produtos terapêuticos vem desde os primórdios da humanidade, onde o homem utilizava estas plantas de forma empírica e observava os seus efeitos tóxicos e terapêuticos, gerando o conhecimento básico para sua utilização como planta medicinal (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Ao longo dos séculos as plantas foram utilizadas para o tratamento, cura e prevenção de doenças, no entanto, apenas no século XIX foram registrados os primeiros estudos com base científica de plantas com propriedades medicinais conhecidas, na época ocorria o desenvolvimento da química orgânica que possibilitou o isolamento de compostos. Estes estudos resultaram no isolamento de moléculas que se consagraram como princípios ativos eficazes, como morfina, quinina e cânfora, que são utilizados até hoje para o tratamento de certas doenças (WHEELWRIGHT, 1974; GOTTLIEB et al., 1996).

Atualmente, estima-se que 40% dos fármacos disponíveis foram obtidos e/ou desenvolvidos a partir destas fontes naturais, dos quais 25% são oriundos de plantas, 13% de microorganismos e 3% de animais. Este percentual de produtos naturais que se tornaram fármacos mostra-se maior para os antitumorais e antibióticos, aproximadamente 70%. Ainda, destaca-se que entre os anos de 2000 e 2010, 50% das pequenas moléculas descobertas como novos fármacos são produtos naturais (CRAGG et al., 1997; NEWMAN; CRAGG, 2012). A biodiversidade mundial vem sendo investigada discretamente, embora já tenham sido obtidos 140 mil compostos isolados, dos quais muitos ainda não tiveram seu potencial farmacológico avaliado principalmente frente a diferentes modelos biológicos (CORDELL et al., 2001).

A avaliação das propriedades biológicas dos produtos naturais (moléculas ativas ou toxinas) é de fundamental importância, visto que permite compreender os complexos fenômenos relacionados à biologia molecular, interação com receptores, canais iônicos ou enzimas. Esse enfoque de investigação contribui para elucidar o mecanismo de ação dos compostos no metabolismo, o que pode revelar a molécula como um futuro fármaco ou, ainda, indicá-la como protótipo para síntese de

análogos, visando à obtenção de novas moléculas com melhor perfil farmacológico (SHU, 1998; YUNES; PEDROSA; CECHINEL-FILHO, 2001).

Dentre as classes de metabólitos secundários, os alcaloides apresentam histórica importância terapêutica, visto suas diversas interações com organismos vivos, o que resultou em muitos fármacos que foram obtidos ou desenvolvidos a partir desta classe. Sabe-se que além das propriedades intrínsecas, muitos análogos químicos foram sintetizados e, ainda, alcaloides podem ser hibridizados com outras moléculas para melhorar sua ação terapêutica (GELBAUM et al., 1982; BARREIRO et al., 2002). Os alcaloides pirrolizidínicos apresentam um núcleo considerado quimicamente simples, com atividades farmacológicas relacionadas às suas propriedades tóxicas, no entanto, contém na molécula pontos cruciais passíveis de alteração estrutural para síntese de análogos com elevado rendimento. Ainda, as modificações estruturais permitem o manejo da potencial toxicidade. Dessa maneira, este trabalho visa o isolamento dos alcaloides pirrolizidínicos presentes nas espécies *Crotalaria retusa* e *Crotalaria pallida*, além de realizar estudos de síntese de derivados dos mesmos com o objetivo de desenvolver novas moléculas ou protótipos com atividade biológica.

Para melhor entendimento do trabalho, a seguir é apresentada uma fundamentação teórica geral e posteriormente os resultados estão apresentados em dois capítulos. O **Capítulo I** aborda a espécie *Crotalaria retusa*, isolamento dos seus alcaloides, síntese de derivados e avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*. O **Capítulo II** aborda a espécie *Crotalaria pallida*, o isolamento dos seus alcaloides, a elucidação do alcaloide inédito pallidamina e a avaliação da atividade antibiofilme.

2 - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

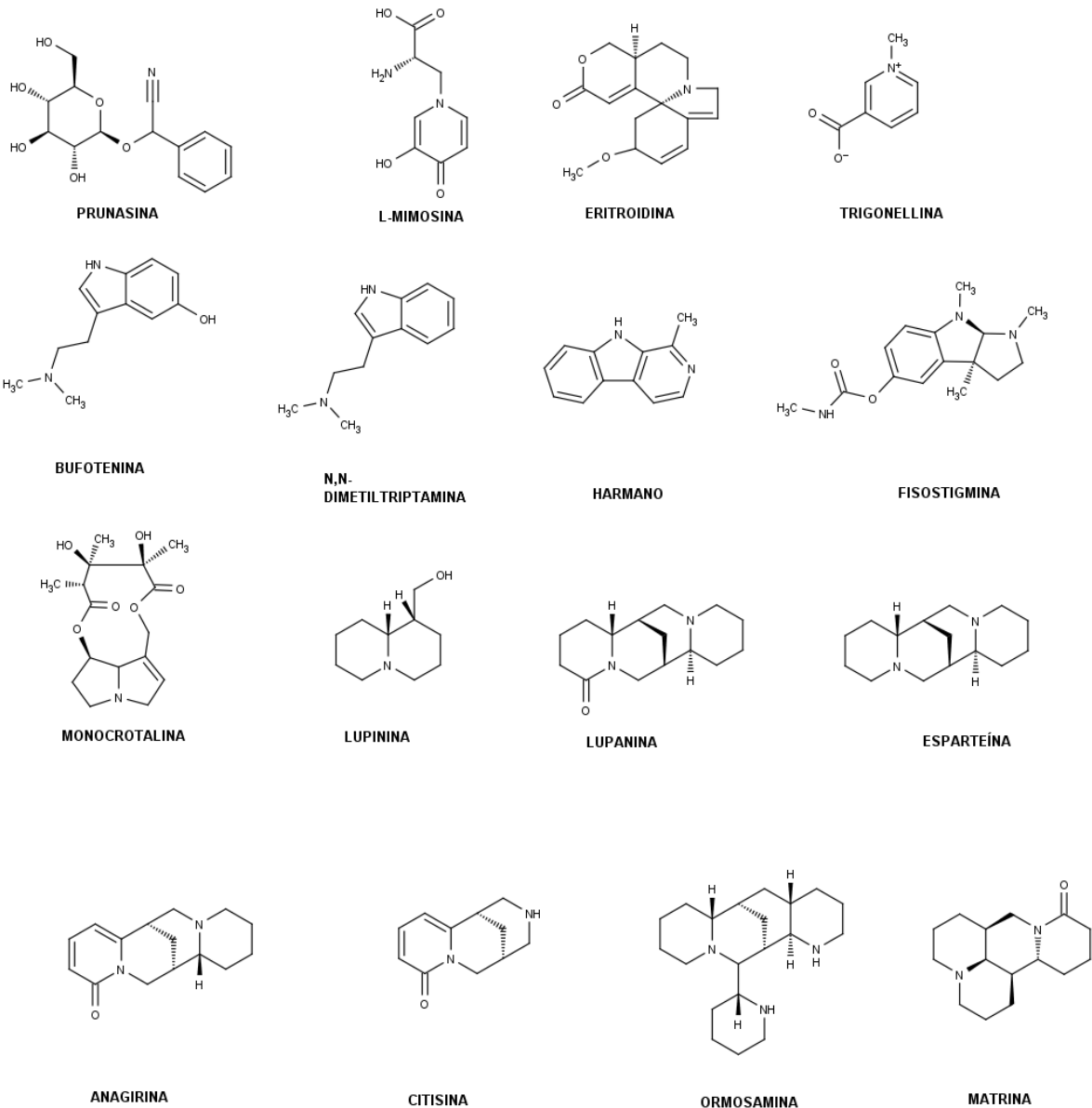
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Família Fabaceae

A família Fabaceae (Leguminosae) é considerada a terceira maior família dentro do reino das plantas compreendendo 750 gêneros e mais de 19.500 espécies (LEWIS et al., 2005). Devido ao grande número de espécies e à biodiversidade intrafamília, Fabaceae foi dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Papilionoideae e Mimosoideae. A subfamília Papilionoideae apresenta o maior número de espécies e a maior diversidade com 440 gêneros e 12.000 espécies agrupados em 40 tribos. As principais tribos compreendem Swartzieae, Sophoreae, Dalbergieae, Amorpheae, Thephrosieae, Robinieae, Indigofereae, Phaseoleae, Desmodieae, Psoraleae, Loteae, Galegeae, Trifolieae, Podalyrieae, Liparieae, Bossiaeeae, Crotalarieae, Thermopsidae e Genisteae. Papilionoideae é também a subfamília que apresenta maior importância econômica devido principalmente às leguminosas que são fonte de alimento (amendoim, feijão e ervilhas são alguns exemplos), fibra, óleo, corantes, madeira de lei e plantas ornamentais (LAVIN; DOYLE; PALMER, 1990). As espécies de Papilionoideae são encontradas quase em qualquer tipo de vegetação, desde florestas tropicais até no deserto. Mimosoideae compreende cerca de 80 gêneros que apresentam distribuição nas zonas subtropicais e tropicais, ocorrendo nas regiões áridas e semiáridas ao longo do mundo, sendo uma importante fonte de forragem e combustível. Diversos estudos de filogenética demonstraram que Papilionoideae e Mimosoideae formam subfamílias monofiléticas, enquanto que Caesalpinioideae parece ser parafilético. Essas evidências apontam que Mimosoideae não forma a base da árvore das leguminosas, mas que é derivada de um ancestral da subfamília Caesalpinioideae (KÄSS; WINK, 1996; LUCKOW et al., 2003).

A família Fabaceae apresenta uma grande diversidade de produção de metabólitos secundários, sobretudo os compostos nitrogenados (aminoácidos não-proteicos, amins, glucosinolatos e alcaloides), conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1- Estrutura química dos diversos tipos de compostos nitrogenados encontrados em Fabaceae. (Adaptado de WINK, 2013)



A maioria das espécies de Papilionoideae e Mimosoideae são fixadoras de nitrogênio, em contrapartida apenas 25% da Caesalpinioideae apresentam essa habilidade. Estas plantas são capazes de produzir uma maior quantidade e diversidade de metabólitos secundários contendo nitrogênio em sua estrutura do que plantas não-fixadoras. Os principais metabólitos secundários produzidos pelas leguminosas incluem alcaloides, aminoácidos não-proteicos, compostos cianogênicos, peptídeos, fenólicos, policetídeos e terpenoides. A síntese e

armazenamento desses metabólitos são considerados estratégias de defesa (contra herbívoros e fitopatógenos), e também com papel importante na ecologia química, uma vez que alguns compostos podem atrair insetos polinizadores, animais para dispersar os frutos ou rizóbios (bactérias fixadoras de nitrogênio quando em simbiose com leguminosas). Além de sintetizar, as plantas armazenam esses compostos em alta concentração em vacúolos (compostos hidrofílicos) e em canais de resina, tricomas, laticíferos ou cutículas (compostos lipofílicos) (WINK; WITTE, 1984; WINK, 1993; SPRENT; MCKEY, 1994; WINK, 2013).

Os metabólitos secundários estão amplamente distribuídos na família Fabaceae, alguns apresentam ocorrência restrita enquanto outros não. Tão ampla e singular como é sua distribuição estão às propriedades ativas desses compostos, alguns têm ações farmacológicas notáveis enquanto outros são tóxicos ou pouco estudados farmacologicamente. A distribuição e propriedades bioativas desses compostos são sumarizados no Quadro 1.

Quadro 1- Metabólitos secundários nitrogenados de Fabaceae, sua ocorrência e propriedades bioativas.(Adaptado de WINK, 2013).

Classe de metabólito secundário	Exemplo de substâncias	Principal ocorrência	Atividades Farmacológicas e Toxicológicas
Alcaloides quinolizidínicos	Esparteína, lupanina, anagirina, citisina, matrina, lupinina	Clado genistoide; <i>Clado ormosia</i> ; <i>Sophora secundiflora</i> ; <i>Calia bolusanthus</i>	Neurotoxinas; modulação de nAChR e mAChR; Bloqueadores de canais de Na ⁺
Alcaloides isoquinolínicos simples	Salsolina, salsolidina	<i>Desmodium</i> , <i>Alhagi</i> , <i>Cytisus</i> , <i>Dendrolobium</i>	Antagonistas da dopamina
Alcaloides indolizidínicos	Swainsonina, castanospermina	Astragaleae; <i>Castanospermum</i>	Inibidores de hidrolases endoplasmáticas

Continua

Quadro 1- *Continuação*

Classe de metabólito secundário	Exemplo de substâncias	Principal ocorrência	Atividades Farmacológicas e Toxicológicas
Alcaloides pirrolizidínicos	Monocrotalina, senecionina	<i>Crotalaria, Lotononis</i>	Mutagênicos e carcinogênicos; moduladores de muitos neuroreceptores incluindo 5-HT ₂ , mAChR, GABA, D ₂ e α ₂
Alcaloides piperidínicos	Ammodendrina, ácido 2-piperidino carboxílico, ácido 4-hidroxi-2-piperidino carboxílico,	Clado genistoide, Muitos membros das três subfamílias	Causam má formação em embriões
Alcaloides piridínicos	trigonellina	Presente em todas as subfamílias	Antimicrobiano
Alcaloides β-carbolínicos	Harmano, harmalano, tetraidroharmano, leptocladina	<i>Petalostyles labicheoides, Acacia complanata, Burkea africana, Prosopis nigra, Desmodium gangeticum</i>	Inibidores da MAO; agonista dos receptores de serotonina; intercalação com DNA; mutagênicos
Alcaloides de Erythrina	Erisodina, erisopina, eritralina, eritroidina	<i>Erythrina</i>	Agentes bloqueadores neuromusculares
Alcaloides indólicos simples	Fisostigmina	<i>Physostigma venenosum, Dioclea spp.</i>	Inibidores da AChE
Alcaloides imidazólicos	Cinodina, cinometrina	<i>Cynometra spp.</i>	-

Continua

Quadro 1- *Continuação*

Classe de metabólito secundário	Exemplo de substâncias	Principal ocorrência	Atividades Farmacológicas e Toxicológicas
Poliaminas	Espermina, espermidina	Principalmente Phaseoleae	Reguladores de crescimento
Feniletilaminas	<i>N</i> -metilfeniletilamina	Principalmente <i>Acacia</i> spp.; Caesalpinoideae	Psicoativos
Tiraminas	<i>N,N</i> -dimetilriptamina; bufotenina; <i>N</i> -metilriptamina	Mimosoideae	Agonista dos receptores de serotonina; alucinógeno
Histamina	<i>N</i> -canamoilhistamina	<i>Acacia</i> spp., <i>Spartidium</i>	-
Aminoácidos não-proteicos	Canavanina, albiziina, carboxietilcisteína, ácido 2-acetamido-2-aminopropanoico, ácido djenkolico, homoarginina, mimosina, ácido 4-hidroxipipicolico, willardiina	Amplamente presente em todas as tribos (exceto aquelas com alcaloides)	antimetabólitos; anti-herbívoro e antimicrobiana
Glucosídeos cianogênicos	Prunasina, linamarina, lotaustralina, proacacipetalina	<i>Acacia</i> spp.; <i>Holocalyx balansae</i> , <i>Lotononis</i> spp., <i>Lotus</i> spp., <i>Ornithopus</i> spp., <i>Trifolium repens</i> , <i>Phaseolus lunatus</i>	Liberação de HCN; inibidor da cadeia respiratória; forte veneno animal

Os alcaloides quinolizidínicos são encontrados em maior abundância nas tribos Genisteeae, Sophoreae e Thermopsidaeae apresentam potencial bioativo relacionado às suas propriedades nefrotóxicas ou neuro moduladoras, como é o caso da esparteína e lupanina. Alguns apresentam propriedades antimicrobianas, como o extrato alcaloídico de *Lupinus angustifolius* (rico em hidroxilupanina e lupanina) que demonstraram atividade antibacteriana frente a cepas de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, e antifúngica frente à *Candida albicans* e *Candida krusei*. Estudos corroboram a teoria de que esses

metabólitos são produzidos como defesa frente a herbívoros e ataque de microrganismos. Alguns alcaloides e aminas apresentam atividades psicotrópicas, como a bufotenina, *N,N*-dimetiltriptamina, metilmescalina e alcaloides β -carbolínicos. Existem alguns alcaloides oriundos de leguminosas que são conhecidos pelas propriedades alucinógenas, muitas vezes utilizados em rituais. Além dos alcaloides e aminas, temos os glucosídeos cianogênicos que ao sofrerem hidrólise formam o ácido cianídrico (HCN), que atua bloqueando a cadeia respiratória mitocondrial causando envenenamento. Os aminoácidos não-proteicos são análogos de um dos 20 aminoácidos constitutivos que quando são incorporados em proteínas provocam um envelhecimento diferente levando a proteínas inativas ou defeituosas. Estes aminoácidos são considerados como antimetabólicos tóxicos, uma vez, que afetam herbívoros, bactérias, fungos e vírus (WINK, 2013). Sumarizando, embora a família Fabaceae seja ampla e diversa, aponta-se os alcaloides como metabólitos de interesse em prospecção devido às suas características bioativas.

2.2 Aspectos Químicos

As plantas são utilizadas como fonte de fármacos desde os primórdios da humanidade e mesmo que tenha se passado tanto tempo, ainda continuam com grande importância na obtenção de substâncias ativas que possam se tornar futuros fármacos. Em sua maioria, as substâncias são oriundas do metabolismo secundário das plantas, por isso são chamados de metabólitos secundários, sendo estes divididos em classes diferentes de acordo com seu esqueleto químico (flavonoides, terpenos, alcaloides, saponinas, etc). Diversos medicamentos foram obtidos de plantas diretamente ou indiretamente (síntese de análogos estruturais) como a morfina e codeína, analgésicos obtidos de *Papaver somniferum*, a artemisinina, presente em *Artemisia annua* com potente ação antimalárica, alguns quimioterápicos utilizados para o tratamento do câncer como vincristina e vimblastina extraídas de *Catharantus roseus*, e principalmente do taxol que fizeram com que renascesse o interesse da indústria farmacêutica nos produtos naturais (VEIGA-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; HARVEY, 2008). Dentre as classes de metabólitos secundários que mais contribuíram para a terapêutica está a classe dos alcaloides, por isso, será discutido nos tópicos subsequentes as características químicas dessa classe com

ênfoque nos alcaloides pirrolizidínicos, alcaloides majoritários presentes no gênero *Crotalaria*.

2.2.1 Alcaloides

Os alcaloides são uma classe de metabólitos secundários taxonomicamente e quimicamente diversificada, apresentando uma significativa variedade de estruturas químicas. Possuem ampla distribuição no reino vegetal e animal, somando um total descrito de 27.683 estruturas químicas. Estas moléculas apresentam um nitrogênio como heteroátomo de cadeias carbônicas cíclicas. Por este motivo, apresentam grande importância para o vegetal, desempenhando papel na fisiologia da planta; do mesmo modo, é observada a sua ação em outros organismos vivos como os humanos, para o qual foram descobertas diversas moléculas bioativas. As plantas ricas em alcaloides são pouco utilizadas na fitoterapia devido à toxicidade embora sejam utilizadas na homeopatia, cuja concentração é infinitamente reduzida (CORDELL et al., 2001; EVANS, 2009; AMIRKIA; HEINRICH, 2014).

2.2.2 Propriedades dos alcaloides

Os alcaloides apresentam-se, normalmente, como estruturas cristalinas que na presença de ácidos formam sais. Nas plantas, são encontrados na forma de sal, bases livres ou *N*-óxidos para facilitar a estocagem e transporte. A molécula dos alcaloides é formada por átomos de carbono, hidrogênio e nitrogênio, no entanto, podem conter átomos de oxigênio em sua estrutura (BROSSI, 1985).

A solubilidade dos alcaloides e sais de alcaloides é de grande importância para indústria farmacêutica no desenvolvimento de formulações e também no método clássico de extração e isolamento destes compostos. Os alcaloides na sua forma de sal são solúveis em água e apresentam baixa solubilidade em solventes orgânicos, enquanto na forma de base livre apresentam baixa solubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos. O método clássico de extração ácido-base utiliza este princípio de solubilidade dos alcaloides e seus sais em diferentes pH para conseguir extraí-los (EVANS, 2009).

2.2.3 Alcaloides bioativos

Plantas contendo alcaloides vêm sendo utilizadas ao redor do mundo há mais de 4000 anos como fonte medicinal para tratar uma série de doenças. No entanto, o isolamento e identificação dessas moléculas só ocorreram posteriormente. Teve início no começo do século 19, com advindo de novas tecnologias (novos métodos de identificação e isolamento) e inícios dos primeiros experimentos científicos que buscavam entender e identificar quais substâncias eram responsáveis pela ação terapêutica. Nos primeiros anos do século 19 Friedrich Sertürner isolou o alcaloide que conhecemos hoje como morfina (isolado de *Papaver somniferum*), a partir daí diversas descobertas e isolamentos se sucederam incluindo a xantina (1817), estriçnina (1818), atropina (1819), quinina (1820) e cafeína (1820). Ao longo dos séculos 19 e 20 houve uma evolução nas técnicas de isolamento favorecendo que muitas substâncias ativas fossem descobertas e das quais muitas se tornaram fármacos ou serviram de protótipo para síntese de derivados. Atualmente cerca de 27683 alcaloides já foram isolados. Estas moléculas tem grande importância na sociedade, uma vez que, o emprego terapêutico é bastante amplo, desde antimalárico, agentes anti-hipertensivos até fármacos para o tratamento da asma. Atualmente, 200 fármacos oriundos desses compostos são comercializados internacionalmente (Quadro 2) (AMIRKIA; HEINRICH, 2014).

Quadro 2- Alcaloides utilizados na terapêutica e sua aplicação (Adaptado AMIRKIA; HEINRICH, 2014)

Nome do alcaloide	Sinônimo	Aplicação
Aconitina	-	Reumatismo, neuralgia, ciática
Adenina	-	Agente antiviral, auxiliar farmacêutico utilizado para estender o tempo de armazenamento do sangue total
Ajmalina	Ajimalina, giluritmal, merabitol, raugallina, rauwolfina, ritmalina, tachmalina	Agentes antiarrítmicos
Atropina	Tropato de tropina	Antiespasmódico, anti-parkinson, fármaco ciclopérgico
Berberina	Berbericina, umbellatina	Irritação ocular, AIDS, hepatite
Boldina	-	Colelitíase, vômitos, constipação
Cafeína	-	Apneia neonatal, dermatite atópica
Canescina	Harmonil, raunormina, recanescina, reserpidina	Agente antihipertensivo
Cathina	Norpseudoefedrina, norisoefedrina	anoréxico
Cinchonidina	Cinchon-9-ol	Aumento dos reflexos, convulsões epileptiformes
Cocaína	-	Anestésico local
Codeína	Metilmorfina, codicept, kodeina, tussipan	Antitussígeno, analgésico
Colchicina	-	Tratamento da amiloidose e artrite gotosa
Dietanolamina	2,2'-dihidroxidietilamina, diolamina	Base utilizada em excipientes farmacêuticos
Emetina	Ipecina, metilcefaleina	Amebíase intestinal, expectorante
Efedrina	-	Descongestionante nasal, broncodilatador

Continua

Quadro 2- *Continuação*

Nome do alcaloide	Sinônimo	Aplicação
Ergometrina	Ergonovina, ergotrato, ergobasina, ergotocina, ergotetrina	Hemorragia pós-parto e pós-aborto
Ergotamina	-	Tratamento da migração
Eserina	Fisostigmina	Oftalmológico, antídoto (envenenamento)
Esparteina	-	Contrações uterinas, arritmias cardíacas
Estricnina	-	Desordens oculares
Galantamina	Jilkon, karantonina, licoremina	Relaxante muscular, tratamento do Alzheimer
Hidrastina	-	Desordens intestinais
Hioscina	Escopolamina	Enjoo
Hiasciamina	Daturina, duboisina	Antiespasmódico, anti-parkinson, cicloplégico
Ioimbina	-	Afrodisíaco, incontinência urinária
Lobelina	-	Asma, tosse, antitabagismo
Morfina	-	Alívio da dor, diarreia
<i>N,N</i> -dialilbis-nortoxinerina	Cloreto de alcurônio	Relaxante muscular de ação curta
Narceina	-	Supressor da tosse
Nicotina	-	Antitabagismo
Noscapina	Narcotina	Supressor da tosse
Papaverina	Tetrametil éter de papaverolina	Vasodilatador, desordens intestinais
Pelletierina	-	Infestações por tênia
Pilocarpina	Ocucarpina, pilocarpol, sincarpina	Miótico no tratamento do glaucoma, lepra
Quinidina	Conquinina, Conchinina, pitainina	Ventricular e supraventricular
Quinina	Chinina	Malária, babesiose, distúrbios miotônicos
Raubasina	Ajmalicina	Desordens vasculares
Rescinnamina	Reserpidinina, anaprel, apoterina	Hipertensão
Reserpina		Hipertensão, psicoses
Rotundina	Argemonina, bisnorargemonina	Sedativo, analgésico, agente hipnótico
Sanguinarina	-	Antiplaquetário

Continua

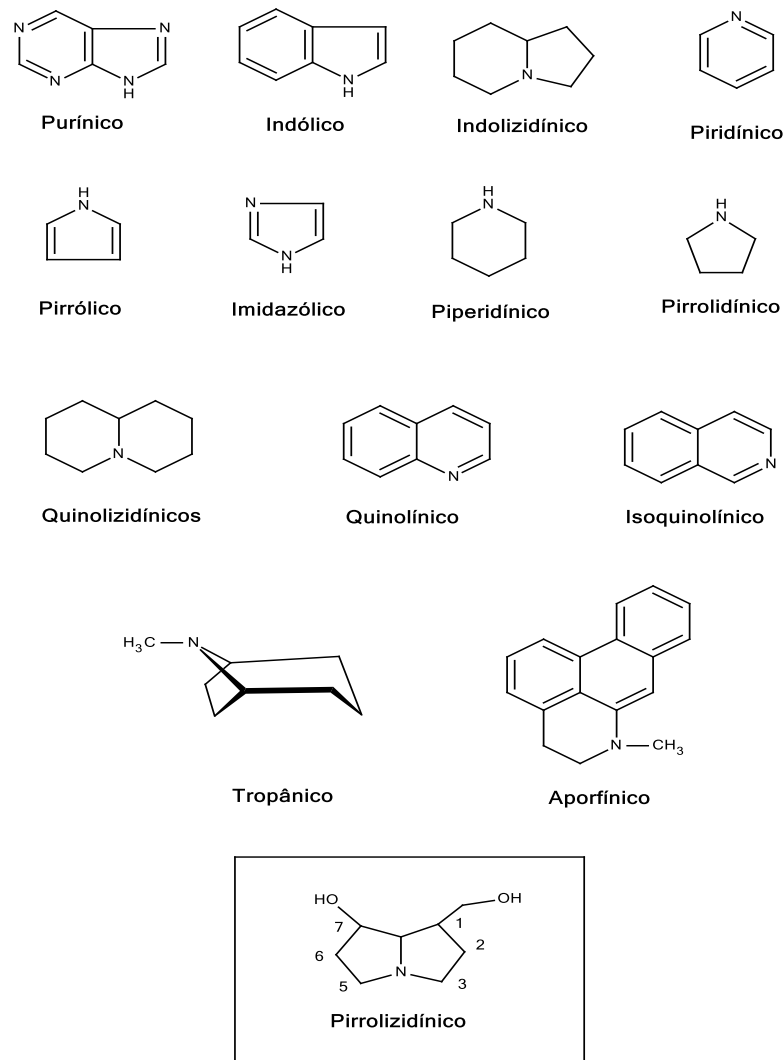
Quadro 2- *Continuação*

Nome do alcaloide	Sinônimo	Aplicação
Sinefrina	-	Vaso constritor, descongestionante conjuntival, emagrecedor
Taxol	Paclitaxel, Taxol A, Anzatax, Yewtaxan	Carcinoma de ovário e mama
Teobromina	-	Asma, diurético
Teofilina	-	Asma broncoespasmos
Tubocurarina	Tubarina	Relaxante muscular
Vimblastina	-	Doença de Hodgkin, câncer testicular, desordens sanguíneas
Vincamina	-	Vasodilatador
Vincristina	-	Linfoma de Burkitt
Vindesina	-	Quimioterápico

2.2.4 Estrutura e classificação dos alcaloides

O grupo dos alcaloides é composto por uma variedade de estruturas químicas oriundas de diferentes rotas biossintéticas, decorrentes da sua origem botânica ou bioquímica. Os alcaloides são substâncias que apresentam um átomo de nitrogênio em um esqueleto carbônico que pode ou não formar moléculas cíclicas. São considerados alcaloides verdadeiros aqueles que apresentam como precursor biossintético um aminoácido. Os compostos não heterocíclicos incluem os protoalcaloides e as aminas biológicas. Os compostos heterocíclicos diferem em sua classificação de acordo com a estrutura do anel, sendo divididos em 14 classes, dentre elas estão os alcaloides pirrolizidínicos conforme Figura 2 (BROSSI, 1985; EVANS, 2009).

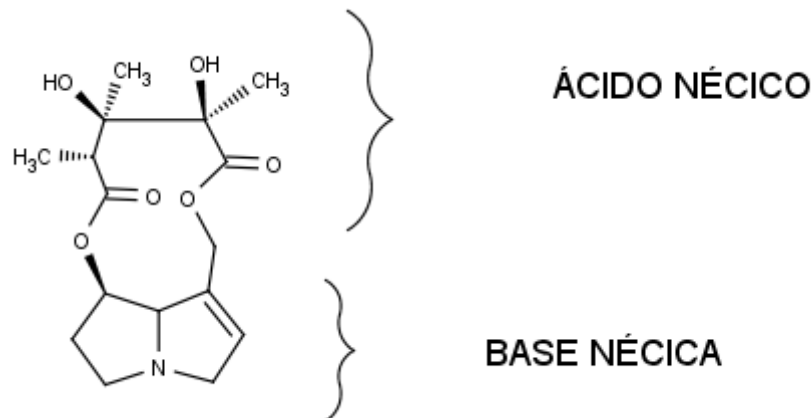
Figura 2 - Estrutura química das classes de alcaloides heterocíclicos. (Adaptado de EVANS, 2009).



2.2.5 Alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides pirrolizidínicos apresentam estrutura química composta por uma base chamada necina (formada por dois anéis fundidos de 5 membros unidos por um átomo de nitrogênio) algumas bases nécicas podem ser esterificadas por ácidos denominados de ácido nécico (Figura 2), ocorrendo na forma de monoésteres, diésteres de cadeia aberta ou triésteres e diésteres formando estruturas macrocíclicas (PRAKASH et al., 1999).

Figura 3 - Estrutura química do alcaloide pirrolizidínico.

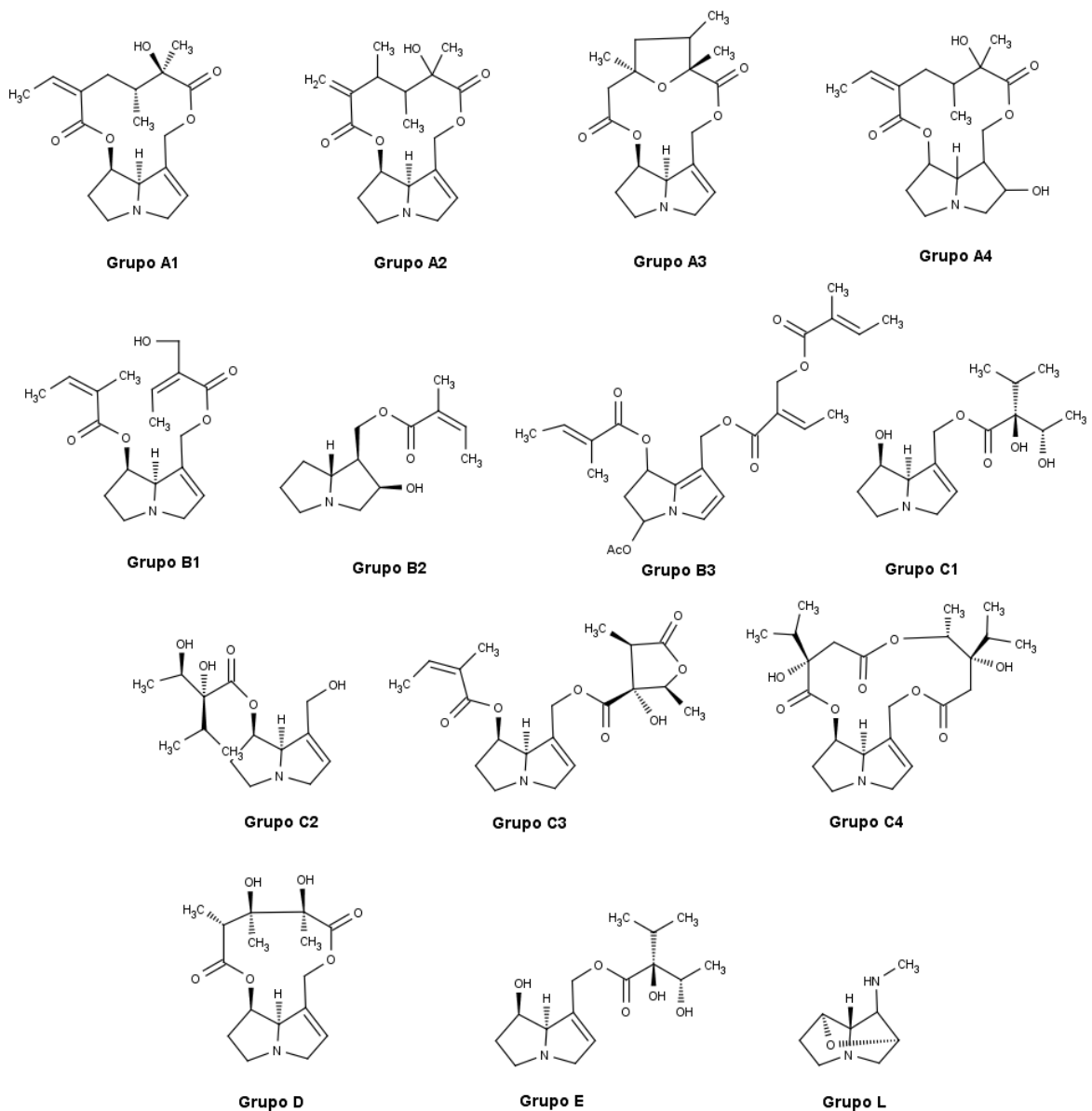


Os alcaloides pirrolizidínicos são produzidos pela planta de forma constitutiva, provavelmente como proteção contra herbívoros devido à toxicidade causada pelos alcaloides 1,2-insaturados. Por outro lado, alguns insetos estocam e utilizam esses alcaloides como forma de proteção contra predadores devido ao gosto amargo. Ainda, parte da necina pode ser convertida em cetonas voláteis que são utilizadas como feromônios, constituindo uma relação complexa na ecologia química (BOPPRÉ, 1989; ROBINS, 1989). Já foram descritos cerca de 400 alcaloides pirrolizidínicos distribuídos de forma restrita a algumas Angiospermas. Dentre as espécies que apresentam esses alcaloides, 95% delas pertencem a apenas 5 famílias: Asteraceae (tribos Eupatorieae e Senecioneae), Boraginaceae (a maioria dos gêneros), Apocynaceae (4 gêneros), Fabaceae (principalmente o gênero *Crotalaria*) e Orchidaceae (10 gêneros) (OBER; KALTENEGGER, 2009). Os alcaloides pirrolizidínicos também foram encontrados nas famílias Celastraceae, Rhizophoraceae (alcaloides contendo enxofre), Ranunculaceae, Santalaceae, Sapotaceae e alcaloides foram isolados da família Convolvulaceae (gênero *Ipomoea*) (ROBINS, 1982; MATTOCKS, 1986).

Os alcaloides pirrolizidínicos apresentam uma variedade de estruturas químicas, por isso, foram divididos em relação a sua semelhança estrutural em 6 grandes grupos (Figura 4), tipo senecionina (grupo A), triangularina (grupo B), licopsamina (grupo C), monocrotalina (grupo D), phalaenopsina (grupo E) e lolina (grupo L). Além disso, os grupos A, B e C apresentam subdivisões: tipo senecionina (grupo A1), senecivernina (grupo A2), nemorensina (grupo A3), rosmarinina (grupo

A4); Triangularina (grupo B1), macrophilina (grupo B2), senampelina (grupo B3); licopsamina (grupo C1), isolicopsamina (grupo C2), latifolina (grupo C3) e parsonina (grupo C4) (HARTMANN; WITTE, 1995).

Figura 4 - Estrutura química dos diferentes grupos de alcaloides pirrolizidínicos. (Adaptado de HARTMANN; WITTE, 1995)



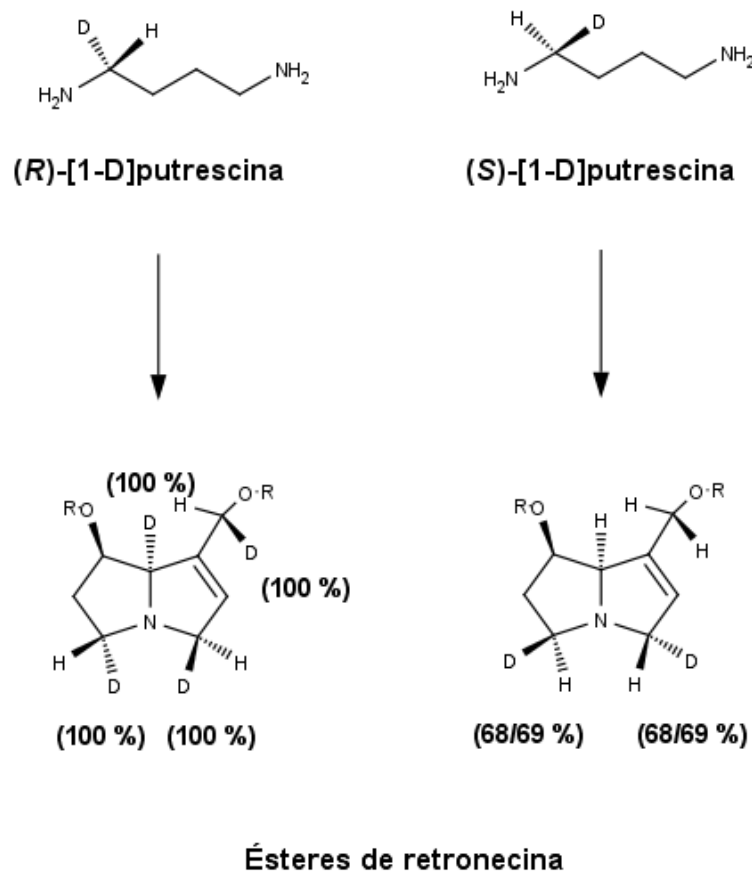
2.2.5.1 Biossíntese dos alcaloides pirrolizidínicos

A biossíntese dos alcaloides pirrolizidínicos foi estudada pela primeira vez por Nowacki e Byerrum (1962), utilizando átomos marcados radiotivamente para observação da incorporação pela planta e análise dos compostos formados. No estudo, a espécie *Crotalaria spectabilis* que produz o alcaloide pirrolizidínico monocrotalina foi alimentada com [2-¹⁴C] ornitina, [1-¹⁴C] acetato e [1-¹⁴C] propionato. A monocrotalina formada foi hidrolisada e os produtos (retronecina e ácido monocrótico) foram analisados, demonstrando que a ornitina é incorporada especificamente para formação da retronecina (base nécica), enquanto que acetato e propionato foram encontrados na porção do ácido nécico. Em um estudo semelhante Bottomley e Geissman (1964) alimentando *Senecio douglasii* com [1,4-¹⁴C] putrescina, [2-¹⁴C] ornitina e [5-¹⁴C] ornitina, espécie que produz diversos alcaloides pirrolizidínicos, os quais apresentam a mesma base nécica, a retronecina, demonstrou que tanto a putrescina como a ornitina eram incorporados na formação da retronecina. A extensão destes primeiros estudos com marcadores radioativos demonstraram que a retronecina tem como precursores os aminoácidos L-ornitina ou L-arginina, assim como as aminas putrescina, espermina e espermidina. Experimentos utilizando putrescina marcada com ¹³C e análise por espectroscopia de RMN de ¹³C confirmaram que a incorporação de duas moléculas de putrescina leva à formação de uma molécula de retronecina. A degradação dos alcaloides marcados indicava que um intermediário simétrico do tipo C₄-N-C₄ estava envolvido na biossíntese, sugerido posteriormente como sendo a homospermidina. Estudos utilizando homospermidina marcada com ¹³C e ¹⁴C mostraram que ela é incorporada intacta à retronecina. A hipótese de que a homospermidina fosse um intermediário na síntese dos pirrolizidínicos foi reforçada por um estudo no qual a homospermidina foi incubada, sob condições fisiológicas, com diamino oxidases de ervilha. As poliaminas foram oxidadas aos respectivos dialdeídos em equilíbrio com um íon imino, que sofre ciclização formando 1- formilpirroizidínico. Após a adição de álcool desidrogenase ocorreu à formação da (±) Traquelantamidina (KHAN; ROBINS, 1981; HANA, ROBINS, 1983; KHAN, ROBINS, 1985).

Para entender a estereoseletividade da incorporação da putrescina para formar a retronecina, moléculas de putrescina opticamente distintas marcadas com deutério foram utilizadas. Espécimes de *Senecio vulgaris* e *S. isatideus* foram

alimentadas com (*R*)-[1-D] putrescina e (*S*)-[1-D] putrescina (Esquema 1). O deutério marcado foi localizado por espectroscopia de RMN ^1H nos alcaloides pirrolizidínicos produzidos por essas plantas. O padrão encontrado sugere dois passos de oxidação das amins primárias para formação da homospermidina com perda do hidrogênio *pro-S*. A retenção de 68% e 69% de deutério nos experimentos utilizando a (*S*)-[1-D] putrescina quando o esperado seria de 50% é explicado pelo efeito intramolecular de isótopos de deutério durante a oxidação enzimática (GRUE-SORENSEN; SPENSER, 1983; RANA, ROBINS, 1986).

Esquema 1 - Incorporação estéreo específica da putrescina marcada com deutério. (Adaptado de ROBINS, 1982).

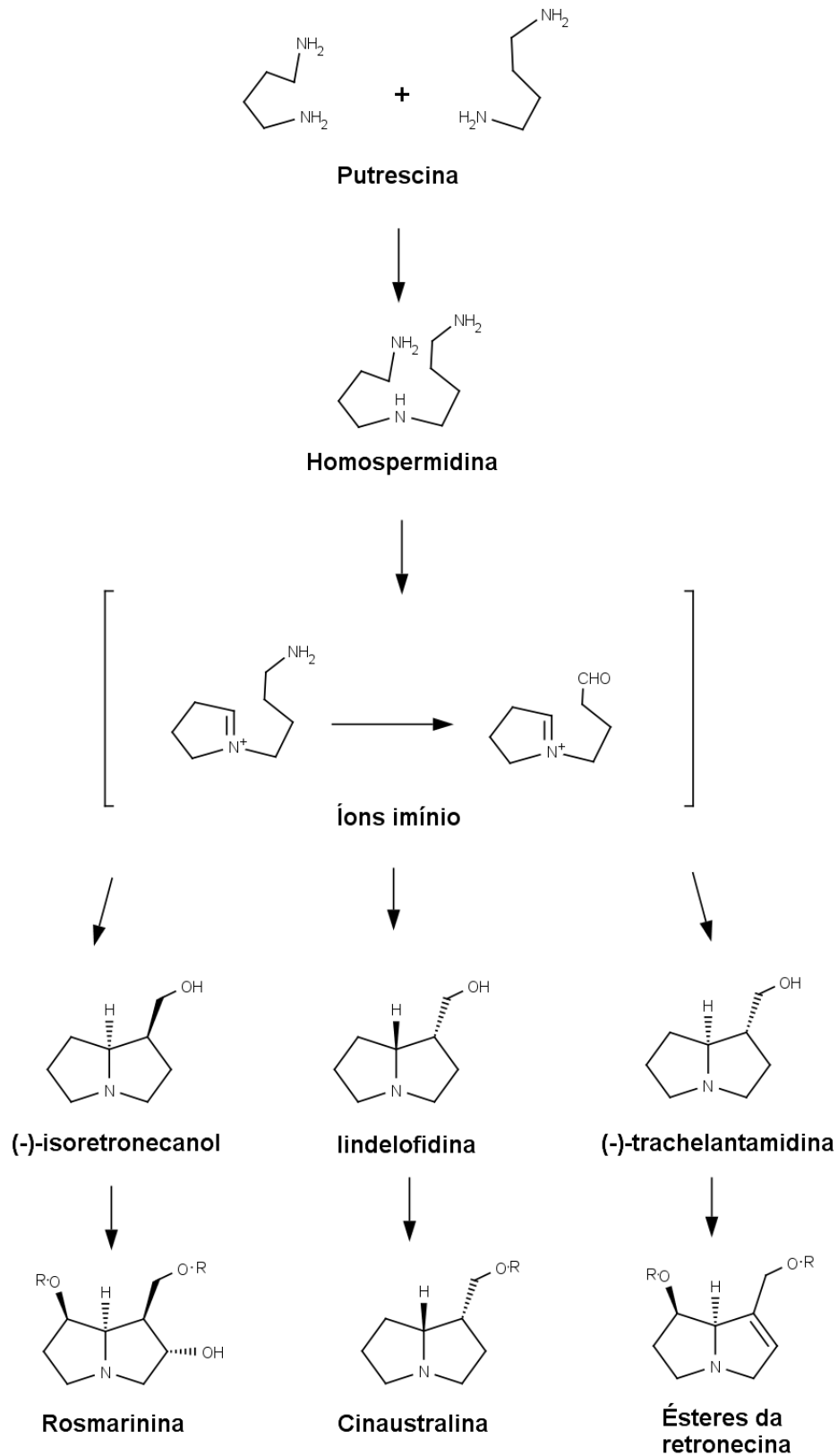


Durante a biossíntese dos alcaloides pirrolizidínicos via homospermidina o intermediário íon imínio pode gerar 4 estereoisômeros, três deles representados no Esquema 2. É conhecido que a (-)-traquelantamidina é especificamente incorporada à retronecina, enquanto que o (-)-isoretronecanol é precursor dos alcaloides 2-hidroxilados como a rosmarinecina, alguns alcaloides (cianaustralina e cinaustina) que apresentam o hidrogênio 8 com estereoquímica β são derivados da

lindelofindina (RANA, LETTE, 1985; KUNEC, ROBINS, 1986; KELLY, ROBINS 1987; KUNEC, ROBINS, 1989; DENLHOLM, KELLY, ROBINS, 1991). Estudo realizado por Frölich et al (2007) demonstrou que a traquelantamidina forma um composto intermediário, a supinidina, que pode dar o origem às necinas heliotridina e retronecina que posteriormente são esterificadas. No entanto, a retronecina é mais eficientemente esterificada do que a seu isômero heliotridina.

No entanto, as enzimas responsáveis por essa rota biossintética e a relação dos precursores desta via com o metabolismo primário não haviam sido elucidadas. Böttcher et al. (1993) descreveu a primeira enzima específica da síntese dos alcaloides pirrolizidínicos, a homospermidina sintase, enzima responsável por ligar o metabolismo primário com o metabolismo secundário. Esta enzima transfere um grupo aminobutila da espermidina para putrescina, em uma reação NAD + dependente, resultando na síntese da homospermidina. Em seu estudo culturas de raízes de várias espécies do gênero *Senecio* foram nutridas com o precursor putrescina marcado radiotivamente e na presença de β -hidroxiletildrazina, um inibidor de diamino oxidases, consequentemente bloqueando a incorporação de homospermidina em alcaloides pirrolizidínicos. Foi observado o acúmulo de homospermidina marcada, e que após a transferência das culturas de raízes para um meio livre de inibidor, tinham o seu acúmulo cessado. A enzima homospermidina sintase foi isolada e teve sua atividade estudada, demonstrando que ela tem a putrescina como substrato exclusivo e, que são necessários 2 mol de putrescina em presença de NAD⁺ para síntese de 1 mol de homospermidina. Concluiu-se que as diamino oxidases não eram as enzimas responsáveis pela biossíntese da homospermidina, e sim, a enzima homospermidina sintase.

Esquema 2 - Rota biosintética dos alcaloides pirrolizidínicos. (Adaptado de HARTMANN; WITTE, 1995).



2.2.5.2 Síntese, transporte e armazenamento dos alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides pirrolizidínicos normalmente são encontrados em todas as partes da planta, diferindo em qualidade e quantidade nos diferentes tecidos e durante a ontogênese da planta. Em espécies de *Heliotropium* os alcaloides pirrolizidínicos são encontrados em maior quantidade nas folhas jovens, inflorescências e raízes (CATALFAMO; MARTIN-JR; BIRECKA, 1982). Nas espécies *Senecio vulgare* e *Senecio vernalis* 90% dos alcaloides totais são encontrados nas inflorescências. Alguns alcaloides majoritários são encontrados prioritariamente em determinada parte da planta, como ocorre com *S. vernalis* no qual a senecionina é encontrada majoritariamente nas inflorescências enquanto o senkirquina é o alcaloide majoritário das folhas (HARTMANN; ZIMMER, 1986). Estudos utilizando *N*-óxidos de senecionina marcados demonstraram que nas espécies do gênero *Senecio* os alcaloides pirrolizidínicos são sintetizados nas raízes, sendo posteriormente convertidos em *N*-óxidos, que lhes conferem solubilidade em água, para serem levados para as demais partes da planta, exclusivamente via floema, onde são estocados (HARTMANN et al., 1989).

2.3 Aspectos Farmacológicos

2.3.1 Atividades farmacológicas de alcaloides pirrolizidínicos

A literatura não dispõe de muitos estudos enfocando a aplicação terapêutica dos alcaloides pirrolizidínicos. Possivelmente, esse fato está relacionado à potencial toxicidade desses compostos. Toma et al. (2004) descreveram que o extrato das inflorescências do *Senecio brasiliensis*, rico em alcaloides pirrolizidínicos, apresenta atividade antiúlcera quando testado em modelo animal com ratos (12,5 mg/kg). Singh et al. (2002) descreveram que a fração clorofórmio e éter do extrato das partes aéreas de *Heliotropium subulatum*, rica em alcaloides pirrolizidínicos, apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Penicillium chrysogenum*.

2.3.2 Toxicidade de alcaloides pirrolizidínicos

Os alcaloides pirrolizidínicos são considerados moléculas bioativas, pois são capazes de causar alterações no organismo. Esta classe de alcaloides é encontrada, principalmente, nas sementes e é bastante conhecida por sua toxicidade relatada após ingestão de partes do vegetal por animais e por humanos (dieta). Dos mais de 660 alcaloides pirrolizidínicos identificados cerca de metade deles apresenta toxicidade hepática (JIANG; FU; LIN, 2006). Estes compostos não apresentam toxicidade em si, no entanto, alcaloides contendo insaturação na posição C1-C2 e hidroxila esterificada em C-9 e C-7, ao serem ingeridos sofrem metabolismo hepático (reações de C-oxidação e N-oxidação) pela enzima citocromo P₄₅₀ (isoenzimas CYP3A E CYP2B), dando origem a ésteres pirrólicos instáveis e, conseqüentemente, a íons carbocátions altamente reativos, que podem reagir com nucleófilos biológicos como enzimas e ácidos nucléicos ocasionando a toxicidade que inclui citotoxicidade, hepatotoxicidade, genotoxicidade, e tumorigenicidade. (CHEN et al, 2010). A formação de ésteres pirrólicos ocorre de forma diferente dependendo da estrutura do alcaloide pirrolizidínico, nos ésteres de retronecina e heliotridina acontece pela hidroxilação da base néica (no carbono C-3 ou C-7) seguida de desidratação espontânea. Nos pirrolizidínicos ésteres de ontonecina ocorre primeiro a reação de *N*-desmetilação seguida de fechamento do anel através da eliminação espontânea de formaldeído, em seguida, ocorre desidratação para formar os ésteres pirrólicos. Uma vez formados os ésteres pirrólicos tendem rapidamente a formar ligações com macromoléculas de caráter nucleofílico que acarretam sua toxicidade, ou seja, quando os mesmos se ligam ao DNA formando ligações cruzadas ou a formação de adutos. Estas ligações cruzadas entre os carbocátions reativos formados em C-7 ou C-9 ésteres pirrólicos com o nitrogênio cíclico da guanossina. A formação de adutos com o DNA é responsável pela mutagenicidade e teratogenicidade. Outro mecanismo presente na toxicidade dos alcaloides pirrolizidínicos é a *N*-oxidação, este processo ocorre apenas para ésteres do tipo retronecina e heliotridina e consiste na geração de *N*-óxidos que podem sofrer redução e retornar aos alcaloides pirrolizidínicos de origem, que posteriormente, são convertidos em álcoois pirrólicos que tem papel na intoxicação, também chamados de metabólitos tóxicos secundários. Os ésteres pirrólicos recém-formados tendem a reagir localmente com os hepatócitos ou atravessar os

sinusoides adjacentes alcançando as veias hepáticas e reagindo com as células endoteliais provocando a doença oclusiva venosa hepática, conseqüentemente, levando a insuficiência hepática. Os pirróis podem alcançar o pulmão e o coração se ligando às hemácias e causando dano pulmonar. Apesar de estudos com animais demonstrarem que os alcaloides pirrolizidínicos tem a atividade tumorigênica, não foi observado câncer de fígado em humanos (HUXTABLE, 1990; HINKS et al., 1991; FU et al., 2004; XIA et al., 2006).

Estudos de toxicidade experimental em equinos e suínos mostram que a intoxicação por *Crotalaria retusa* provoca um quadro de anorexia, mal estar geral, irritabilidade, bocejos, espasmos musculares, agressividade, andar esmo e icterícia tanto em suínos, ovinos e equinos (GARDINER et al., 1965; NOBRE et al., 2004). A monocrotalina é o alcaloide predominante no gênero *Crotalaria* e tem o seu provável mecanismo de ação descrito. *In vivo* a monocrotalina é convertida em deidromonocrotalina, que, por sua vez, é capaz de se ligar ao DNA e as proteínas. A deidromonocrotalina parece ser detoxificada pela conjugação com a glutatona (GSH). Desse modo, aminoácidos como a cisteína que apresenta em sua estrutura química um grupo sulfidril, e taurina previnem contra os efeitos tóxicos (TEPE; WILLIAMS, 1999; KOSOGOF et al., 2001).

A via que leva à toxicidade da monocrotalina também é observada para algumas substâncias como antibióticos e antitumorais. Estes compostos são ativados por meio de oxidação ou redução *in vivo* formando um composto intermediário tipo pirrol altamente reativo que fazem reações cruzadas com macromoléculas, como o DNA (TEPE; WILLIAMS, 1999).

A intoxicação por alcaloides pirrolizidínicos em humanos é conhecida e ocorre por ingestão de comida contaminada ou por plantas medicinais (chás e suplementos alimentares). A ingestão de 10 µg/kg pode levar a doença oclusiva venosa hepática em humanos. A Australian New Zealand Food Safety Authority (ANZFSA) determina que a dose tolerada de alimentos contendo alcaloides pirrolizidínicos é de 1µg/kg (WHO-IPCS, 1988; ANZFSA, 2001).

O uso tópico de plantas medicinais contendo estes compostos não infere em toxicidade, isto leva a um leque de potenciais alvos ou utilizações tanto terapêuticos

como para outros fins. Uma vez que esses compostos foram pouco explorados, o uso tópico frente a microrganismos, como os causadores de infecções cutâneas ou ginecológicas, pode ser uma alternativa, assim como a sua utilização industrial revestindo superfície de materiais sejam eles hospitalares ou não que podem ser afetados pela formação de biofilme causados, comumente, por bactérias como *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Considerando os produtos naturais como fonte de importantes compostos bioativos; o potencial farmacológico dos alcaloides pirrolizidínicos e a crescente necessidade de novas entidades químicas ativas frente a microrganismos o presente trabalho tem como objetivo analisar os alcaloides presentes nas folhas e sementes de *Crotalaria retusa* e *Crotalaria pallida* e caracterizar esses produtos naturais ou seus derivados sintéticos como moléculas bioativas.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção de extratos enriquecidos em alcaloides a partir das folhas e sementes de *C. retusa* e *C. pallida*.
- Avaliar o perfil alcaloídico dos extratos através de Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Gasosa.
- Isolar os alcaloides de *C. retusa* e *C. pallida* através de técnicas cromatográficas preparativas.
- Caracterizar a estrutura química dos alcaloides isolados através de técnicas espectroscópicas.
- Realizar a síntese de derivados do alcaloide pirrolizidínico majoritário produzido pelas espécies *C. retusa*.
- Analisar o potencial anti-*Trichomonas vaginalis* e antimicrobiano frente a *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* de alcaloides pirrolizidínicos isolados, bem como dos seus derivados sintéticos.

4.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

4.1.1 Aspectos botânicos

Dentre a subfamília Papilionoidae encontra-se o gênero *Crotalaria*, que compreende cerca de 700 espécies vegetais. As espécies do gênero *Crotalaria* apresentam grande capacidade de se adaptar a diferentes condições ambientais, ocorrendo em vários tipos de habitats, como áreas próximas de rios, morros litorâneos, restingas, orla de matas, campos e cerrados. Ainda, estão distribuídas de forma abundante em zonas tropicais, neotropicais e subtropicais, principalmente na África, Índia, México, sul dos Estados Unidos, até a Argentina e Brasil que representam os principais centros da biodiversidade do gênero (PALOMINO; VASQUEZ, 1991; MARTINEZ et al., 2009) .

Consideradas plantas invasoras de culturas, são facilmente encontradas em plantações de grãos e pastagens (FLORES; MIOTTO, 2005). No Brasil, as 40 espécies do gênero já encontradas estão amplamente distribuídas, sendo encontradas nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (FLORES, 2012). Segundo o Herbário da UFRN, no estado do Rio Grande do Norte ocorrem duas espécies: *Crotalaria retusa* e *Crotalaria pallida*.

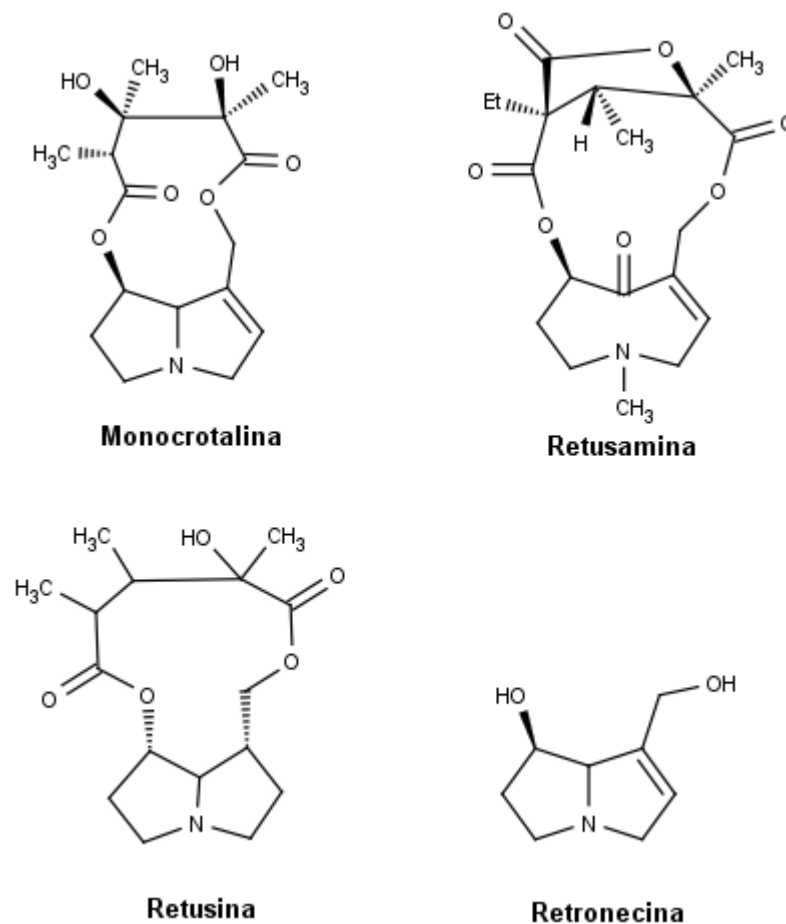
A *Crotalaria retusa* é encontrada nas regiões Norte (Pará), Nordeste (Maranhão, Piauí, Bahia e Rio Grande do Norte), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). A espécie *C. retusa* é um subarbusto, com folhas simples, oblanceoladas, de flores amareladas e de fruto inflado, conhecida vulgarmente como guizo-de-cascavel, chocalho ou xique-xique devido ao barulho provocado por suas sementes no interior do fruto quando seco (GEMTCHÚJNICOV, 1976; BASTA; BASTA, 1982; FLORES; MIOTTO, 2005).

4.1.2 Aspectos químicos

A espécie *Crotalaria retusa* é conhecida por conter alcaloides pirrolizidínicos, no entanto, a análise fitoquímica preliminar das partes aéreas demonstrou a presença de flavonoides, saponinas e terpenoides (SEKAR; FRANCIS, 1999). As sementes são ricas em óleos constituídos principalmente de ácidos graxos. Um estudo realizado na África analisou a composição de ácidos graxos das sementes de *C. retusa* em diversas regiões, evidenciando a presença de ácido linoleico (57,54

%), ácido olêico (15,50%) e ácido esteárico (11,02%) como os ácidos graxos majoritários (AREMU; BAMIDELE; AMOKAHA, 2012). Além disso, é nas sementes que se concentram os alcaloides pirrolizidínicos, que são os compostos de maior importância em decorrência das suas propriedades bioativas. O alcaloide majoritário encontrado nas sementes é a monocrotalina, cujo rendimento pode chegar a 5 % do extrato bruto. Além disso, os alcaloides retusina, retusamina (Figura 5) e *N*-óxidos de retronecina foram isolados (CULVENOR; SMITH, 1957; MARTINEZ et al., 2009). Estudo realizado com *C. retusa* coletados em Caucaia-CE, Itapema-SC e São Gonçalo do Sapucaí-MG demonstrou que a monocrotalina é o único alcaloide presente nas sementes (FLORES; TOZZY; TRIGO, 2009).

Figura 5 - Alcaloides pirrolizidínicos já descritos em sementes de *C. retusa*.



4.1.3 Aspectos farmacológicos

Os alcaloides pirrolizidínicos, e, portanto, de *C. retusa*, são amplamente conhecidos por sua toxicidade causada após metabolização hepática. Estão disponíveis poucos estudos na literatura sobre os aspectos farmacológicos da monocrotalina, um deles descrevendo as propriedades antitumorais, no qual foi observada uma alta taxa de inibição da proliferação de células Walker 256 (intramusculares) (CULVENOR, 1968). A avaliação do potencial antimicrobiano foi realizada com objetivo de evidenciar a relação ecológica da produção desse alcaloide para combater o ataque de microorganismos e nematoides. A monocrotalina foi capaz de inibir o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sambucinum* e *Trichoderma* sp. O potencial terapêutico da monocrotalina, assim como dos alcaloides pirrolizidínicos, ainda permanece pouco explorado (WANG; SIPES; SCHMIT, 2002; JOOSTEN; VEEN, 2011).

4.1.4 *Trichomonas vaginalis*

O *Trichomonas vaginalis* é um protozoário flagelado da família Trichomonadidae que afeta o trato geniturinário humano causando a tricomonose ou tricomoníase, que é a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo afetando cerca de 276 milhões de pessoas todos os anos (WHO, 2010). Estudos comprovam que infecção por esse patógeno leva a outras complicações como infertilidade, doença inflamatória pélvica, predisposição ao câncer cervical, aumento no risco de infecção pelo papilomavírus humano (HPV), má formação fetal e aumento na transmissão e aquisição do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (GOLDSTEIN, GOLDMAN, CRAMER, 1993; VIKKI et al., 2000; CHERPES et al., 2006; NOËL et al., 2009). As infecções causadas por *T. vaginalis* são comumente associadas a outras doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) normalmente gonorréia. Diferente das outras DSTs que tem alta prevalência entre adolescentes e adultos jovens, a tricomonose tem prevalência entre mulheres sexualmente ativas de vários grupos de idade (SKWEBKE, BURGESS, 2004). O período de incubação da infecção por *T. vaginalis* varia de 3 a 28 dias. Um fator que contribui para disseminação do *T. vaginalis* é a baixa prevalência dos sintomas da tricomonose, estima-se que cerca de 80 % dos casos são assintomáticos. A

prevalência de casos assintomáticos é maior nos homens chegando a 77 % dos casos. A infecção no homem normalmente permanece dormente, mas quando se manifesta acompanha corrimento e prurido. Normalmente os casos sintomáticos desaparecem dentro de 10 dias. Em casos graves, que ocorrem muito raramente, pode levar à infertilidade, e estudos recentes associam a infecção por *T. vaginalis* ao mal prognóstico do câncer de próstata. Na mulher os sintomas da tricomonose costumam acompanhar corrimento vaginal, prurido e irritação. Os sinais da infecção incluem corrimento vaginal (42%), odor forte ou desagradável (50%), edema e eritema (22 a 37%), outros sinais incluem dor abdominal baixa e disúria. O sinal clínico específico para infecção por *T. vaginalis* é a *Colpitis macularis* (colo do útero em forma de morango) que é detectado pelo exame de colposcopia em apenas 2-5 % dos pacientes. (CUDMORE et al., 2004). A severidade dos sintomas depende de uma série de fatores. Na mulher o *T. vaginalis* é capaz de reduzir ou eliminar a flora de lactobacilos provocando aumento do pH vaginal. Normalmente o pH vaginal está em cerca de 4, mas com ação do parasito pode chegar a valores acima de 7. O aumento do pH cria melhores condições para invasão e crescimento do parasita. Além disso, o sangue da menstruação também aumenta o pH e serve como fonte de ferro aumentando a fixação do *T. vaginalis*. Em contrapartida, o homem parece ter uma proteção natural contra o patógeno, uma vez que, a natureza oxidativa do trato genital masculino parece inibir certos fatores patogênicos, assim como, o zinco presente no fluido prostático tem ação citotóxica contra o parasita (WOLNER-HANSEN et al., 1989; SHWEBKE, BURGESS, 2004).

O tratamento das infecções causadas por *T. vaginalis* são tratadas com quimioterápicos denominados de 5-nitroimidazol, existem dois fármacos aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA), metronidazol e tinidazol. O fármaco de primeira escolha é o metronidazol que foi introduzido na terapêutica em 1959 e pode ser administrado tanto pela via oral quanto pela via endovenosa. Em 1962 ocorreram relatos de falhas terapêuticas envolvendo o seu uso, com isso aumentaram as pesquisas para obtenção de um novo medicamento. Desde 2004, o tinidazol vem sendo utilizado na terapêutica em casos em que há resistência ao metronidazol (LOSSICK, 1990; HOUGHTON et al., 1979). O metronidazol é um fármaco bastante tóxico provocando algumas reações adversas como náusea, vômitos, diarreia, tonturas e dor de cabeça. Outras reações adversas mais sérias podem ocorrer como

anorexia, leucopenia, hipersensibilidade, palpitação, confusão, encefalopatia e neuropatia periférica. O tinidazol possui maior distribuição tecidual comparado ao metronidazol, e a sua concentração encontrada na secreção vaginal é muito próxima dos níveis plasmáticos. Além disso, a dose letal mínima para várias cepas do *T. vaginalis* é consideravelmente menor. Esses fatores contribuem para o tinidazol apresentar menores reações adversas e melhor eficácia clínica. (LOSSICK, 1990; CUDMORE et al., 2004).

As reações adversas graves causadas por esses fármacos contribuem para o insucesso da terapêutica, uma vez que o paciente suspende o tratamento temporariamente. Apesar de as reações adversas contribuírem para insucesso terapêutico, o grande contribuinte para falha terapêutica é a resistência aos fármacos utilizados. Ao longo dos anos cepas de *T. vaginalis* mostraram ser resistentes aos fármacos utilizados na terapêutica. Um estudo demonstrou que 10% dos isolados clínicos são resistentes aos 5-nitroimidazóis. Por serem da mesma classe terapêutica com estruturas químicas muito semelhantes, há relatos de falha terapêutica com tinidazol. O metronidazol entra no meio intracelular do parasita por meio de difusão passiva. O fármaco em si não é ativo e precisa ser ativado, isso ocorre por meio de redução anaeróbica que forma um ânion nitro radical. Há a hipótese de que o radical nitro se liga transitoriamente ao DNA interrompendo ou quebrando as cadeias, conseqüentemente, levando à morte celular (CUDMORE et al., 2004). O tinidazol apresenta um mecanismo de ação muito semelhante ao metronidazol, isso faz com que certas cepas desenvolvam resistência cruzada, comprometendo a terapêutica. Estudo realizado por Upcroft et al (2006) buscando novos análogos 5-nitroimidazólicos demonstrou que muitos derivados eram muito ativos contra cepas de *T. vaginalis* não resistentes ao metronidazol, porém, não eram ativos contra todas as cepas resistentes, demonstrando a importância da resistência cruzada e a necessidade de se desenvolver novos fármacos oriundos de uma nova classe química.

A resistência ao metronidazol é atribuída a alterações de rotas metabólicas do parasito, assim como, a acumulação intracelular do fármaco é diminuída decorrente da inibição do processo de importação do fármaco para interior celular e/ou pelo aumento da sua excreção (ELLIS et al., 1994; RASOLOSON et al., 2001).

O mecanismo de resistência ao metronidazol ocorre de duas formas (aeróbica e anaeróbica). A primeira é atribuída à resistência aerobiótica que foi observada em estudos *in vivo*, e caracteriza-se pela redução do processo de remoção do oxigênio intracelular. Este aumento da concentração de oxigênio no interior do parasita compromete o potencial redox que é necessário para ativação do metronidazol, possivelmente a ferredoxina está envolvida. A resistência aeróbica é muito importante clinicamente, uma vez que, pode se desenvolver *in vivo* em *Trichomonas* tratados com níveis terapêuticos do metronidazol, e não requer exposição gradual ou prolongada. Estudo *in vitro* demonstrou que transcrição do gene da ferredoxina é reduzida em cepas que apresentam o mecanismo de resistência aeróbica. O fator é atribuído à interconversão do metronidazol ativado no próprio metronidazol, que posteriormente, é reduzido à ânion superóxido. Os ânions superóxidos causam dano celular limitado e não levam à morte celular como os nitro radicais. A resistência anaeróbica parece estar relacionada à diminuição ou ausência da atividade da enzima piruvato/ferredoxina oxido redutase. Além disso, Atividade da enzima hidrogenase está diminuída ou ausente, com isso ocorre inibição da produção de hidrogênio pelo hidrogenossoma, organela com similaridade à mitocôndria (CUDMORE et al., 2004).

Os pacientes que estão infectados com cepas resistentes normalmente são tratados com doses altíssimas dos fármacos o que leva a um aumento das reações adversas, principalmente delírio, intolerância que no final acaba acarretando na falha do tratamento (WEBER, COURVALIN, 2005; RASOLOSON et al., 2002; GEHRIG; EFFERTH, 2009).

4.1.5 Produtos naturais ativos contra *Trichomonas vaginalis*

A presença de cepas resistentes e o desconforto gerado pela terapêutica ineficaz estimulou a pesquisa por novos fármacos mais efetivos que servissem como alternativa terapêutica ao tratamento da tricomonose. O potencial dos produtos naturais no tratamento de doenças é bastante conhecido, por isso muitos dos estudos foram realizados com moléculas, extratos enriquecidos ou brutos oriundos de produtos naturais. A terapêutica contra o *T. vaginalis* se restringe a uma única

classe de compostos, os 5-nitroimidazóis. Os altos números de novos casos anuais e a necessidade de uma nova abordagem terapêutica como novas classes química de compostos tem levado a um esforço dos pesquisadores em busca alternativas principalmente nos produtos naturais. Uma das estratégias abordadas tem sido a triagem de extratos vegetais utilizados ou não na medicina popular. Estudo realizado por Vuuren e Naidoo (2010) realizou um *screening* com 18 plantas utilizadas tradicionalmente na África do Sul para tratar infecções causadas por doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) sendo evidenciado que todas apresentaram atividade anti-*T. vaginalis*. Os extratos obtidos com solventes orgânicos (diclorometano:metanol, 1:1 v/v) apresentaram atividades notáveis, com destaque para o extrato das folhas de *Tarchonanthus camphoratus* (0,5 mg/mL). Os extratos aquosos não apresentaram boa atividade com exceção dos extratos das folhas de *Sansevieria aethiopica* (1,3 mg/ml) e *Tarchonanthus camphoratus* (2,3 mg/ml) que apresentaram atividade moderada. Em estudo semelhante realizado por Calzada, Yopez-Mulia e Tapia-Contreras (2007) foi analisado o extrato metanólico de 22 plantas medicinais mexicanas, das quais *Carica papaya* e *Cocos nucifera* mostraram melhor atividade anti-*T. vaginalis* com valores de IC₅₀ de 5,6 e 5,8 µg/mL, respectivamente. Os extratos de *Bocconia frutescens*, *Geranium mexicanum*, e *Lygodium venustum* apresentaram atividade moderada com valores de IC₅₀ variando de 30,9 a 60,9 µg/mL.

Espécies do gênero *Cussonia* são utilizadas na medicina popular como analgésicos e contra distúrbios intestinais, malária e doenças sexualmente transmissíveis. Extratos metanólicos de 13 espécies deste gênero foram avaliados frente à atividade antimicrobiana e antimalárica, sendo evidenciando que as espécies apresentam boa atividade anti-*T. vaginalis* com Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 0,8-1,3 mg/mL (VILLIERS et al., 2010).

Outro estudo realizado com plantas medicinais da África do Sul, usadas individualmente e em combinação para tratar DSTs, investigou a citotoxicidade e atividade antimicrobiana de 19 plantas. Os extratos orgânicos (diclorometano:metanol, 1:1 v/v) de todas as plantas apresentaram atividade frente ao *T. vaginalis* com valores de CIM variando de 1 a 12 mg/mL. As espécies *Bidens pilosa* (1mg/mL), *Ozoroa engleri* (1mg/mL), *Sarcophyte sanguínea* (1 mg/mL), *Syzygium cordatum* (1 mg/mL) e *Tabernaemontana elegans* (1 mg/mL) foram as mais ativas (NAIDOO et al., 2013).

No Brasil um estudo com 44 extratos aquosos de 23 plantas do bioma Caatinga utilizados na medicina popular tiveram a atividade anti *T. vaginalis* avaliada frente a dois isolados, um clínico e um ATCC. Dos 44 extratos apenas o extrato das raízes de *Polygala decumbens* apresentou atividade com valor de CIM de 1,56 mg/mL (FRASSON et al., 2012).

O estudo fitoquímico de plantas medicinais tem levado ao isolamento de moléculas bioativas, alguns com atividade melhores do que o extrato bruto o qual foi isolado. Esses compostos apresentam uma grande diversidade química e também de propriedades bioativas. Compostos químicos da classe dos fenólicos, antraquinonas, saponinas, terpenos e alcaloides apresentaram atividade contra *T.vaginalis*.

Compostos fenólicos como o ácido S-(-) úsnico (com menor concentração de 0,4 mg/mL) presente nos gêneros *Cladonia*, *Usnea*, *Lecanora*, *Ramalina* e *Ervinia*, foram capazes de inibir cepas de *T. Vaginalis* em um estudo *in vitro*. Em outro estudo realizado por Wang (1993) utilizando *Rheum valuate* (Polygonaceae) foi evidenciado que em concentrações muito baixas (1:5000) o extrato foi capaz de matar as cepas de *T. vaginalis*. O estudo fitoquímico resultou no isolamento da antraquinona emodina, que posteriormente, foi evidenciado que era o composto responsável pela ação.

Terpenoides como a heradina, um terpenoide pentacíclico, isolado de *Cussonia holstii* (Araliaceae), foi ativo contra *T. vaginalis* na concentração de 2,8 mM (HE et al., 2003). Em outro estudo realizado extratos de *Azorella yareta* (Apiaceae), planta nativa do nordeste do Chile Nordeste da Argentina, resultou no isolamento dos diterpenoides, azorellanol e ácido mulinólico que apresentaram atividade moderada com valores de LD₅₀ de 40 µM e 6 µM, respectivamente. Os sesquiterpenos stolizina, alantolactone e centaurepensina, isolados de plantas da família Astearaceae apresentaram grande atividade em concentrações variando de 0,24 a 7,8 µg/mL (MOO-PUC et al., 2014).

Saponinas encontradas nas espécies *Passiflora alata* e *Quillaja saponaria* apresentaram ótima atividade com valores de CIM de 0,25 mg/mL demonstrando o primeiro relato de atividade contra *T. vaginalis* dessas duas espécies (ROCHA et al., 2012).

A classe dos alcaloides também vem sendo estudada frente à atividade antiprotozoária. Nos últimos anos plantas do gênero *Hippeastrum* (Amaryllidaceae)

apresentaram importantes propriedades anti-tricomonas. O alcaloide licorina isolado de *H. santacatarina* demonstrou notória capacidade de inibição das enzimas NTPDase e ecto-5'-nucleotidase que faz com que o parasito tenha maior susceptibilidade à resposta imune do hospedeiro. Ainda, o alcaloide apresentou capacidade de inviabilizar o parasito em 60 % na concentração de 71,8 µg/mL. Outro alcaloide do gênero *Hippeastrum*, candimina, isolado de *H. morelianum* apresentou atividade tricomonocida na concentração de 86,2 µg/mL. (GIORDANI et al., 2010; GIORDANI et al., 2011).

Uma das estratégias da química medicinal bastante utilizada é a síntese de análogos estruturais. O alcaloide licorina, foi utilizado como protótipo para síntese de derivados, adicionando-se à molécula cadeias alifáticas e grupos aromáticos, sendo os mesmos avaliados frente a *T. vaginalis*. Todos os derivados foram ativos independente da natureza do substituinte, e também, da posição da esterificação (substituinte em C1 e ou C2). A melhor atividade foi obtida com a esterificação com o grupo lauril na posição C-2. Os derivados semissintéticos apresentaram atividade melhor do que o seu protótipo (licorina). Assim como a licorina, outros alcaloides com propriedades bioativas foram utilizados como protótipos para síntese de derivados, os quais contribuíram para entendimento do mecanismo de ação e melhora da ação terapêutica (GIORDANI et al., 2010). Os alcaloides são considerados a classe de compostos com largo espectro de atividades bioativas, incluindo atividades antiprotozoárias, antihelmínticas, antifúngicas, antiinflamatória e antibacteriana.

4.1.6 Semissíntese de produtos naturais

Os produtos naturais têm sido fonte de novos fármacos há muito tempo, apesar de que ao passar dos anos novas moléculas são isoladas e submetidas a testes *in vitro* e *in vivo* buscando uma utilidade terapêutica para esses compostos. Além dos muitos compostos bioativos que foram isolados, diversos análogos estruturais foram desenvolvidos com intuito de melhorar a ação terapêutica. A síntese de derivados semissintéticos é uma das ferramentas da Química Medicinal, na qual uma série de derivados semissintéticos são utilizados buscando

compreender a estrutura responsável pela ação ou grupamento farmacofórico, assim como, melhorar o seu potencial biológico.

Fármacos como a morfina e codeína foram modificados buscando análogos com outras atividades, um desses exemplos é a naloxona utilizada como antagonista dos receptores opióides. A cocaína isolada de *Erythroxylum* originou derivados semissintéticos anestésicos locais como lidocaína, benzocaina, dibucaína (CLARK, 1996). A fisostigmina que é um alcaloide de ocorrência natural teve uma modificação estrutural formando um éster de carbamato dando origem a neostigmina. A utilização dessa estratégia de síntese teve grande importância no combate ao câncer e no surgimento de novos agentes antimicrobianos. Após a descoberta da penicilina por Alexander Flemming, as demais penicilinas foram obtidas por semissíntese a partir do núcleo 6-aminopenicilinâmico, processo semelhante ocorreu com as cefalosporinas. Assim como o surgimento dos quimioterápicos irinotecano e topotecano, que são derivados semi-sintéticos da camptotecina, o etoposídeo, derivado da podofilotoxina, são alguns exemplos de fármacos obtidos por semi-síntese que tiveram grande importância na terapêutica (CLARK, 1996).

Nesse contexto considerando a crescente necessidade de alternativas terapêuticas contra a tricomonose, os alcaloides pirrolizidínicos como entidades químicas bioativas, a monocrotalina como alcaloide abundante e de fácil obtenção a partir de *C. retusa*, e a semissíntese de derivados como ferramenta de obtenção de novas moléculas bioativas foi planejado e realizado este trabalho.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Material vegetal

O material vegetal foi coletado na Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN (EMPARN), em Parnamirim-RN. Materiais testemunhos foram depositados no herbário da UFRN (n°16083). Após a coleta, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante sob temperatura não superior a 45°C, o qual foi separado em cascas do fruto, sementes e folhas, e moído separadamente com o auxílio de um liquidificador industrial. Autorização da coleta foi concedida pelo

SISBIO (32749-2) e a autorização de acesso ao patrimônio genético foi concedida pelo CNPq/CGEN (010142/2012-6).

4.2.2 Extração dos alcaloides

As cascas, as folhas e as sementes foram submetidas à maceração exaustiva com etanol 96% à temperatura ambiente resultando no extrato bruto (EB). O EB foi seco em evaporador rotatório à temperatura de 40°C. Em seguida, foi retomado em água e acidificado com solução de ácido clorídrico 10%, até pH 0, e submetido à remoção do material neutro com clorofórmio. A solução aquosa residual (SAR) foi alcalinizada com hidróxido de amônio 25% até pH 9 e realizada extração com clorofórmio resultando na fração B, posteriormente, a SAR foi alcalinizada com hidróxido de amônio 25%, até pH 11, e realizada extração com clorofórmio resultando na fração C. Finalmente, foi realizada a extração com *n*-butanol, para obtenção da fração D.

As frações foram secas em evaporador rotatório à temperatura de 40°C e pesadas para cálculo do rendimento. O perfil cromatográfico foi avaliado por Cromatografia em Camada Delgada na fase móvel (90:10, clorofórmio:metanol, v/v) e por Cromatografia Gasosa (item 4.2.4).

4.2.3 Isolamento e caracterização química dos alcaloides

As frações B e C das sementes foram submetidas à recristalização com metanol, no qual foram solubilizadas com pequeno volume de metanol grau HPLC, realizando a completa solubilização sob aquecimento em banho-maria a 40°C, metanol foi adicionado aos poucos até solubilização total. Em seguida, as amostras foram retiradas do banho-maria, resfriadas à temperatura ambiente e, por fim, foram resfriadas à temperatura de 8°C por 24 horas. Em seguida, retirou-se o sobrenadante, e o cristal formado teve seu perfil cromatográfico analisado por CCD utilizando cromatoplaças de gel de sílica 60 GF₂₅₄ (Macherey-Nagel), sistema eluente de clorofórmio:metanol (83:14, v/v) com vapores de hidróxido de amônio, reveladas com os reagentes Vanilina sulfúrica e Dragendorff, e observadas à luz

visível. A substância isolada (monocrotalina) foi submetida à caracterização química por RMN de ^1H e ^{13}C .

Monocrotalina RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1,23 (3 H, d, $J=12$), 1,36 s (3H), 1,45 s (3H), 2,10 m (2H), 2,61 q (1H, $J=14$), 2,81 q (1H, $J=12$) 3,24 m (1H), 3,49 dd (1H $J=17,5, 9,5$), 3,92 dd (1H, $J=24, 3$), 4,41 m (1H), 4,70 d (1H, $J=20$), 4,92 d (1H, $J=20$), 5,06 m (1H), 6,05 s (1H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ 13,6 (C14'), δ 17,7 (C13'), δ 21,9 (C12'), δ 33,5 (C6), δ 44,4 (C14), δ 53,6 (C5), δ 60,6 (C9), δ 61,3 (C3), δ 75,1 (C7), δ 76,8 (C8), δ 76,9 (C12), δ 78,7 (C13), δ 132,7 (C1), δ 134,2 (C2), δ 173,5 (C15), δ 174,0 (C11);

A fração D das sementes foi submetida à CCD preparativa utilizando gel de sílica 60GF₂₅₄ como adsorvente e sistema eluente de clorofórmio:metanol (55:45, v/v) obtendo-se o isolado 1 (monocrotalina). Placas de vidro (20 cm x 20 cm) foram cobertas de forma homogênea utilizando-se 25 g de sílica em 50 ml de água destilada em cada placa. As placas foram aquecidas em estufa à temperatura de 100°C durante 20 minutos imediatamente antes da aplicação da amostra. Foram aplicados 50 mg de amostra por placa, após a eluição a lateral da placa foi revelada com reagente de Dragendorff para observação de bandas características de alcaloides. Em seguida, a sílica correspondente à banda de alcaloides foi removida e lavada com 100 ml de metanol sob vácuo. O filtrado foi seco em evaporador rotatório à temperatura de 40°C e teve o perfil cromatográfico analisado por CCD utilizando cromatoplasmas de gel de sílica 60 GF₂₅₄, sistema eluente clorofórmio:metanol (55:45, v/v), reveladas com os reagentes Vanilina sulfúrica e Dragendorff, e observadas à luz visível.

Isolado 1 (Monocrotalina) RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 1,03 (3 H, d, $J=12$), 1,20 s (3H), 1,27 s (3H), 1,90 m (2H), 2,55 q (1H, $J=10,5$), 2,94 q (1H, $J=12$), 3,17 m (1H), 3,39 dd (1H, $J=17, 2,5$), 3,75 d (1H, $J=27$), 4,30 m (1H), 3,90 d (1H, $J=20$), 4,67 d (1H, $J=19,5$), 4,97 m (1H), 5,95 s (1H); RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ 14,2 (C14'), δ 18,3 (C13'), δ 22,7 (C12'), δ 34,2 (C6), δ 44,1 (C14), δ 54,5 (C5), δ 59,9 (C9), δ 61,9 (C3), δ 75,6 (C7), δ 77,4 (C8), δ 78,3 (C12), δ 80,1 (C13), δ 134,3 (C1), δ 135,4 (C2), δ 175,3 (C15), δ 176,4 (C11);

As frações B e C das cascas e folhas foram reunidas, e junto com a fração D tiveram o perfil cromatográficos analisados por CCD e por Cromatografia Gasosa acoplada à espectrômetro de massas.

4.2.4 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massas – CG/EM

Os cromatogramas e espectros de massas foram obtidos com Cromatografo a Gás Shimadzu modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado à espectrômetro de massas com fonte de ionização por Impacto de elétrons (70 eV). As amostras foram analisadas seguindo o método descrito por Kreh; Matustch; Witte (1995).

4.2.5 Ressonância magnética nuclear - RMN

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) 1D e 2D e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos utilizando espectrômetro Bruker Avance DRX (Bruker, Billerica, MA, EUA). Os espectros foram mensurados a temperatura de 25°C utilizando o CDCl_3 e Metanol-D4 como solventes.

4.2.6 Síntese de derivados anti-*Trichomonas vaginalis*

4.2.6.1 Tentativa de síntese de amidas de cadeia longa do ácido monocrotálico

A tentativa de síntese dos compostos *N,N*-didodecil-2,3-dihidroxi-2, 3, 4-trimetilpentanodiamida e *N,N*-dioctil-2,3-dihidroxi-2, 3, 4-trimetilpentanodiamida foi testada utilizando-se 0,2 mmol de monocrotalina e 0,8 mmol da monoamina correspondente, dodecilamina e octilamina respectivamente, solubilizadas em etanol sob refluxo à 100°C durante, sem catalizador e com catalizador (Zn-La ($\text{ZnO.La}_2\text{CO}_5.\text{LaOOH}$) a 5 %. Zn-La) . A purificação dos produtos de síntese foi realizada por Cromatografia em Coluna utilizando-se como adsorvente sílica gel 60G e como eluente um sistema gradiente onde a polaridade foi crescente com incrementos de 10% do solvente mais polar: hexano:acetato de etila (90:10, v/v), até acetato de etila puro, diclorometano:metanol (90:10, v/v) até metanol puro. O volume de cada fração coletada foi de 50 mL. As frações foram analisadas por CCD com os reveladores: vapor de iodo metálico e solução etanólica de ácido sulfúrico 20%, e os compostos isolados foram analisados por RMN.

Derivado amídico do ácido monocrotálico RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0,88 t (3 H, $J=7$), 1,50 m (10 H), 1,65 s (3H), 1,81 s (3H), 2,13 s (3H), 3,10 m (1H,) 3,23 m (1H), 6,40 s (1H); RMN de ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) δ 8,8, δ 13,3, δ 14,2, δ 22,6, δ 22,8, δ 26,9, δ 29,3, δ 29,4, δ 29,5, δ 31,9, δ 39,6, δ 88,0, δ 122,1, δ 162,0, 168,5, δ 173,1.

4.2.6.2 Hidrólise da monocrotalina

Em um balão de 50 mL foram adicionados 3 g de monocrotalina (9,2 mmol), 1,86 g de hidróxido de bário (10 mmol) em 15 mL de água. A mistura permaneceu sob refluxo e agitação por 2 horas e, em seguida, foi saturada com dióxido de carbono e filtrada. A solução obtida foi seca à pressão reduzida e o óleo obtido foi submetido à purificação por Cromatografia em Coluna utilizando-se como adsorvente sílica gel 60G e como eluente um sistema isocrático com cloreto de metileno:metanol 4:1 (v/v) e 6 gotas de hidróxido de amônio a cada 100 mL de solvente orgânico. O volume de cada fração coletada foi de 50 mL. As frações foram analisadas por CCD utilizando-se como reveladores vapor de iodo metálico e solução etanólica de ácido sulfúrico 20%. A substância isolada foi analisada por RMN.

Retronecina: RMN de ^1H (CD_3OD , 500 MHz) δ 1,98 (2 H, m), 2,80 (1H, m), 3,26 (1H, m), 3,30 (1H, m), 3,45 (1H, dd, $J=2,13$), 3,88 (1H, d, $J=15$), 4,21 (3H, m), 4,33 (1H, m, 4,33), 5,70 (1H,s); RMN de ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) δ 36,8 (C6), 54,9 (C5), 59,8 (C9), 63,1 (C3), 71,9 (C7), 79,57 (C8), 125,5 (C2), 140,0 (C1).

4.2.6.3 Mesilação da retronecina

Em um balão de 25 mL foram adicionados 0,1 g de retronecina (0,6 mmol) em 5 mL de piridina. A essa mistura, sob agitação e em banho de gelo, adicionou-se 0,062 g de cloreto de mesila (1,2 mmol; 1 equivalente molar). Após 5 horas de reação, o solvente foi removido à pressão reduzida e a mistura submetida à purificação por Cromatografia em Coluna utilizando-se como adsorvente sílica gel 60G (0,63 – 0,200 μm) e como eluente um sistema gradiente com cloreto de metileno:metanol 9:1 (v/v) até metanol puro, aumentando de em 10% o gradiente. O volume de cada fração coletada foi 100 mL. As frações foram analisadas por CCD

utilizando-se como reveladores vapor de iodo metálico e luz UV 254 nm. A substância isolada foi analisada por RMN.

4.2.6.4 Tosilação da retronecina

Em um balão de 25 mL foram adicionados 0,2 g de retronecina (1,2 mmol) em 5 mL de piridina. A essa mistura, sob agitação e em banho de gelo, adicionou-se 0,30 g de cloreto de tosila (1,5 mmol; 1,2 equivalente molar). Após 5 horas de reação, o solvente foi removido à pressão reduzida e a mistura submetida à purificação por Cromatografia em Coluna utilizando-se como adsorvente sílica gel 60G (0,63 – 0,200 μm) e como eluente um sistema isocrático com cloreto de metileno:metanol 9:1 (v/v). O volume de cada fração coletada foi 100 mL. As frações foram analisadas por CCD utilizando-se como reveladores vapor de iodo metálico e luz UV 254 nm. A substância isolada foi analisada por RMN.

4.2.6.5 Síntese da azido-derivada da retronecina

Em um balão de 50 mL foram adicionados 0,3 g de retronecina-Ts (0,1 mmol) e 0,505 g de azida de sódio (7,8 mmol) em 15 mL de uma solução de água e etanol (1:5, v/v). A reação permaneceu sob agitação e refluxo durante 3h, levando à formação de uma solução avermelhada (Esquema 7). O solvente foi então removido sob pressão reduzida e adicionado diclorometano 50 mL seguido por resfriamento. O sólido formado (excesso de NaN_3) foi filtrado e o sobrenadante foi analisado por RMN e infravermelho.

Azido-retronecina: ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz) δ 1,96 (2 H, m), 2,71 (1H, m), 3,23 (1H, t), 3,40 (1H, dd, $J=5,5, 10$), 3,84 (1H, d, $J= 15,5$), 4,12 (1H, d, $J= 12$), 4,17 (1H, s), 4,32 (2H, m), 5,71 (1H,s); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ 35,6 (C6), 54,3 (C5), 59,3 (C9), 62,3 (C3), 71,4 (C7), 79,7 (C8), 128,1 (C2), 137,5 (C1).

4.2.7 Docking da monocrotalina

A monocrotalina foi submetida a um *screening* virtual por docking utilizando o software Autodock Vina versão 1.2 confrontando o composto com proteínas do PDB (*Protein Database*).

4.2.8 Avaliação da atividade anti-*Trichomonas vaginalis*

4.2.8.1 Cultura do *T. vaginalis*

Para este ensaio foram utilizados isolados de *T. vaginalis* ATCC 30236 (American Type of Culture Collection). Os trofozoítos de *T. vaginalis* foram cultivados *in vitro* em meio TYM (pH 6) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado termicamente, e incubados a 37°C. Os organismos em fase logarítmica de crescimento e exibindo mais do que 95% de viabilidade e morfologia normal, foram coletados, centrifugados e ressuspensos em meio novo TYM para testes com a monocrotalina e derivados. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, e com, pelo menos, três culturas independentes (n = 3).

4.2.8.2 Ensaio de atividade anti-*T. vaginalis*

A atividade anti-*T. vaginalis* foi determinada *in vitro*. As amostras foram solubilizadas em DMSO 2,5 %. Para o ensaio foram utilizados microplacas de 96 poços contendo 50 µL de meio TYM e uma diluição seriada foi realizada utilizando-se 50 µL da solução estoque (8 mg/mL) no primeiro poço. Em seguida, em cada poço foram adicionados 150 µL de suspensão contendo o parasita ($1,3 \times 10^5$ trofozoítos/mL) resultando numa concentração final de $1,0 \times 10^5$ trofozoítos/mL. Foram utilizados dois controles: controle negativo contendo o meio, parasitos e DMSO 2,5%, e o controle positivo onde a amostra foi substituída por metronidazol 12,5 µM.

4.2.8.3 Ensaio de citotoxicidade contra células HMVII

A linhagem celular HMVII, representativa de células epiteliais vaginais, foi utilizada para avaliar a citotoxicidade da monocrotalina. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e incubadas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Para o ensaio, $1,5 \times 10^4$ células/poço foram semeadas em microplacas de 96 poços e cultivadas durante 24 horas. Após este período, o meio foi substituído por meio fresco contendo ou não (condição controle) monocrotalina a 3 mM (1 mg/mL). Uma solução contendo 0,2% de Triton X-100 foi

utilizada como controle positivo. As placas foram incubadas durante 24h, e em seguida, após uma lavagem com PBS, uma solução de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazólio) a 0,5 mg/mL foi adicionada e mantida nos poços durante 1h. As placas foram lavadas duas vezes com PBS e o formazan púrpura insolúvel foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). A quantidade de MTT reduzido foi medida a 570 nm. O experimento foi realizado três vezes (n = 3).

4.2.8.4 Ensaio de hemólise

O ensaio de hemólise foi realizado de acordo com Rocha et al. (2012) com algumas modificações. Sangue do tipo O positivo de voluntários saudáveis foram coletados em tubos com heparina e centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. A fração eritrocitária foi lavada 3 vezes com PBS (pH 7,0) e foi ressuspensa resultando em uma suspensão a 1%. A monocrotalina foi dissolvida em DMSO 2,5% na concentração final de 1 mg/mL. Usando microtubos, a suspensão de eritrócitos a 1,0% foi misturada com a solução de amostras e/ou água para se obter uma concentração final de cerca de 0,7% de eritrócitos. Os microtubos foram incubados a 37°C sob agitação horizontal por 1h, em seguida, foi centrifugado a 3500 rpm por 5 minutos. A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 540 nm. O experimento foi realizado em triplicata no qual a porcentagem de hemólise foi calculada em comparação a 100 % de hemólise causada pelo reagente controle tritonX-100.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Material vegetal e extração dos alcaloides

A coleta do material vegetal foi feita na Empresa de Pesquisa Agropecuária do RN (EMPARN), em Parnamirim –RN, local no qual a vegetação é litorânea. No nordeste do Brasil estão presentes os biomas Caatinga e Mata Atlântica, no entanto a vegetação litorânea compartilha de características importantes como o baixo índice pluviométrico e a alta incidência de luz solar. A espécie *Crotalaria retusa* já foi estudada em outros países e também no Brasil, mas uma planta oriunda da região Nordeste, mais especificamente no Rio Grande do Norte ainda não havia sido

investigada. Foram realizadas macerações das cascas dos frutos, sementes e folhas buscando comparar os perfis cromatográficos em relação à presença de alcaloides.

O processo extrativo gerou a fração ácida (fração a) e frações alcalinas (Clorofórmio – fração B e C, e butanólica – fração D). Após uma extração ácido/base e análise do perfil cromatográfico por CCD, verificou-se que os alcaloides se concentraram nas frações alcalinas, sendo encontrados em quantidade majoritária e com rendimento satisfatório nas sementes. As Espécies da família Fabaceae apresentam uma variação do conteúdo alcaloídico em diferentes partes da planta, muitas vezes se concentrando em uma parte específica. No gênero *Crotalaria* a planta produz os alcaloides nas raízes, depois, estes alcaloides são transportados para as inflorescências e sementes da planta onde são armazenados como *N*-óxidos ou base livres, no caso da *C. retusa* são armazenados nas sementes (NUHU; ABDURRAHMAN; SHOK, 2009; TRIGO, 2009). A fração ácida das sementes apresentou um aspecto oleoso de cor amarelada, provavelmente composta por ácidos graxos como descrito por Aremu, Bamidele e Amokaha (2012). A análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas demonstrou que as frações clorofórmicas das folhas e cascas, com exceção da fração butanólica das folhas, apresentam a monocrotalina (tempo de retenção 20,5 min) como único alcaloide pirrolizidínico (Figura 6-9). As frações ácidas foram descartadas por não apresentarem alcaloides.

Figura 6- Cromatograma da fração clorofórmica alcalina das folhas de *C. retusa* obtido em CG-EM.

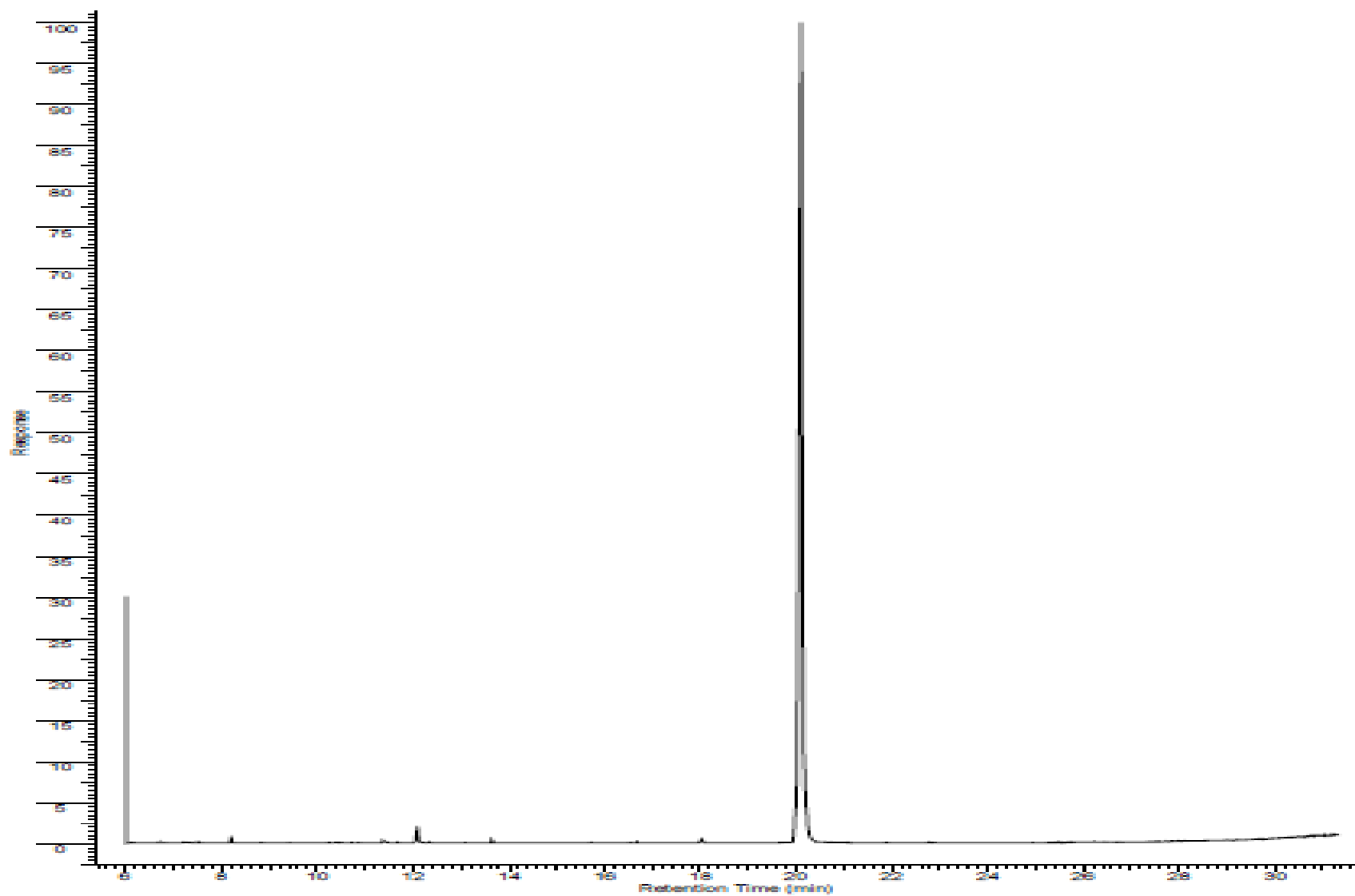


Figura 7 - Cromatograma da fração clorofórmica alcalina das cascas de *C. retusa* obtido em CG-EM.

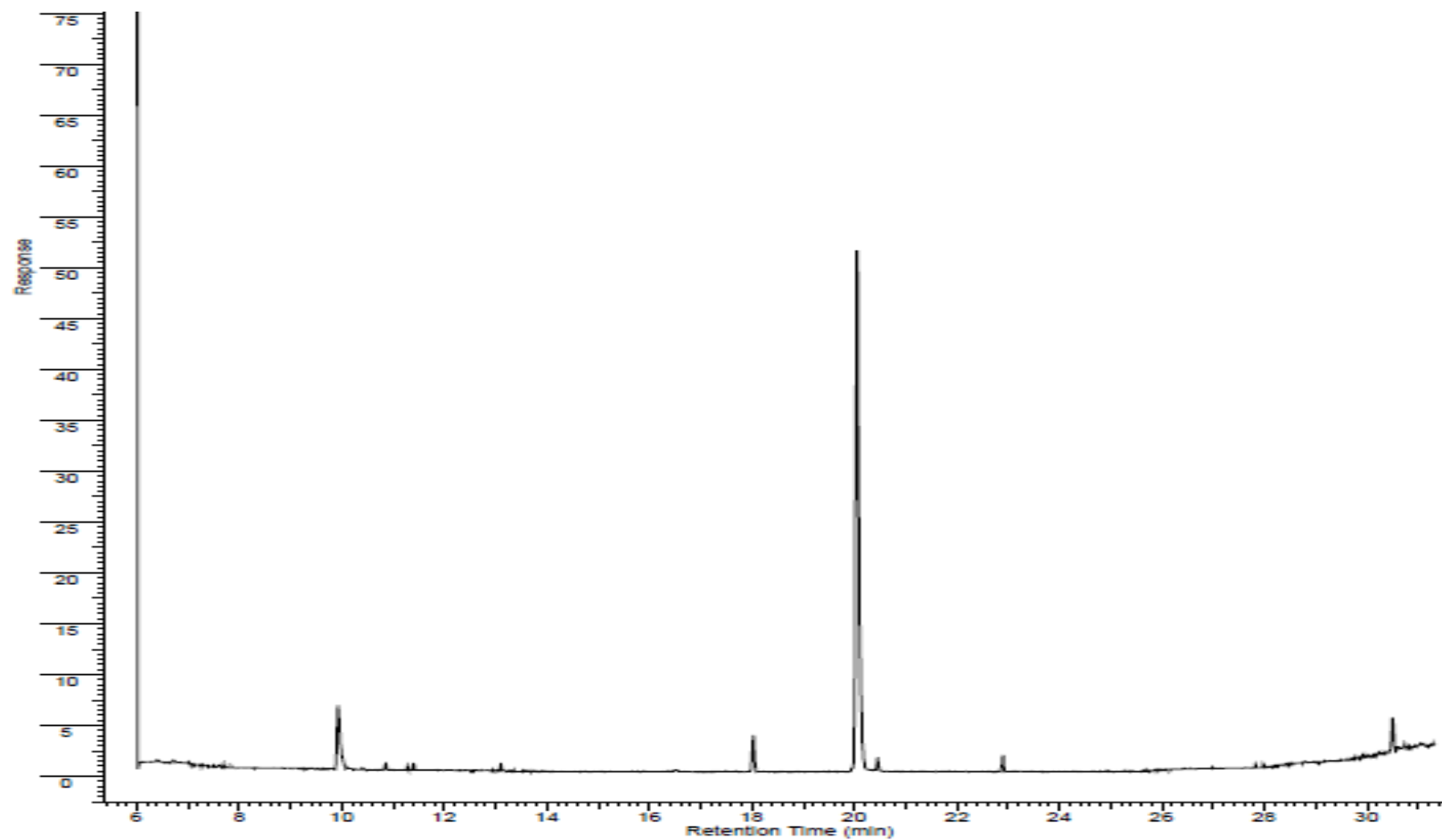


Figura 8 - - Cromatograma da fração butanólica das folhas de *C. retusa* obtido em CG-EM.

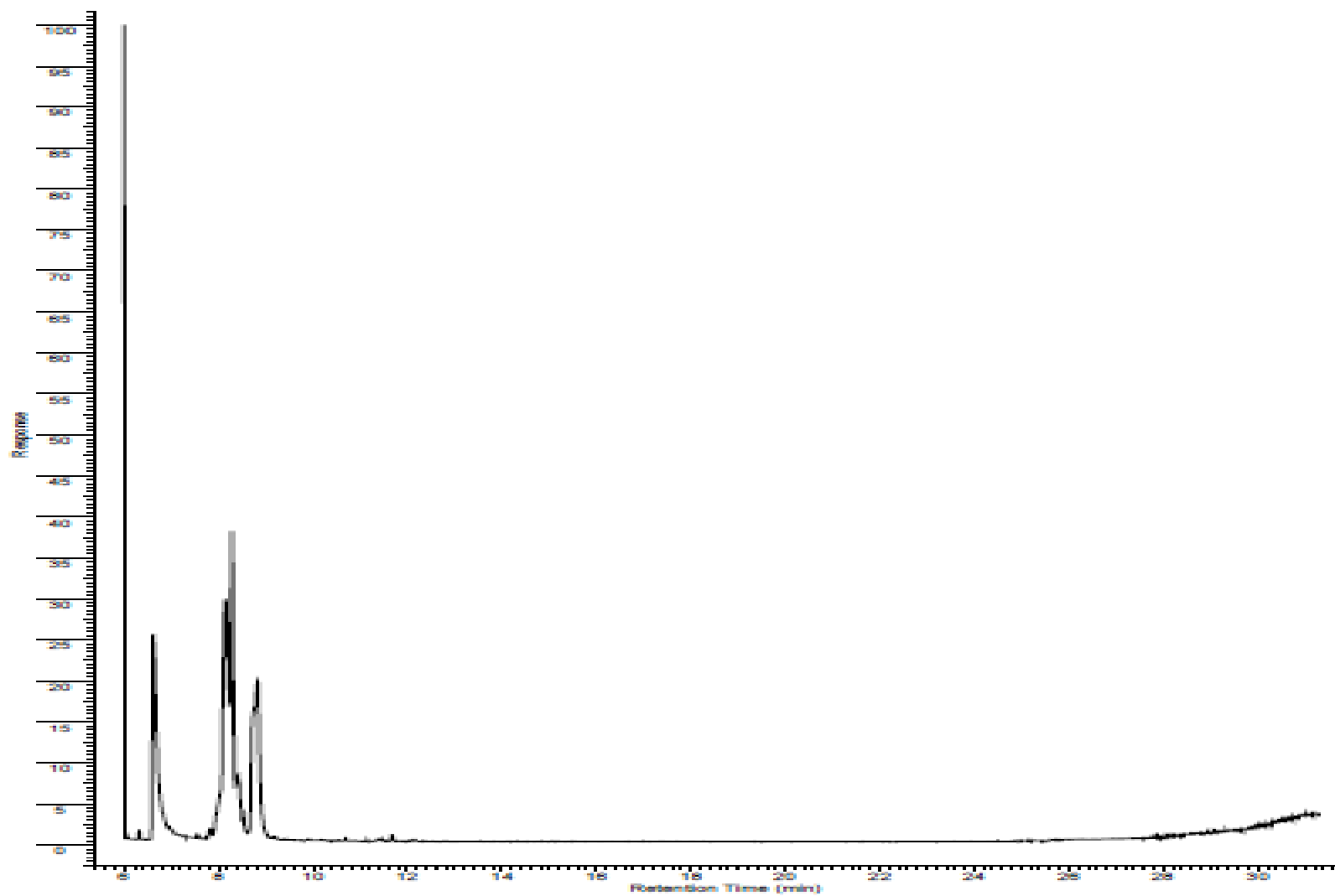


Figura 9- Cromatograma da fração butanólica das cascas de *C. retusa* obtido em CG-EM.

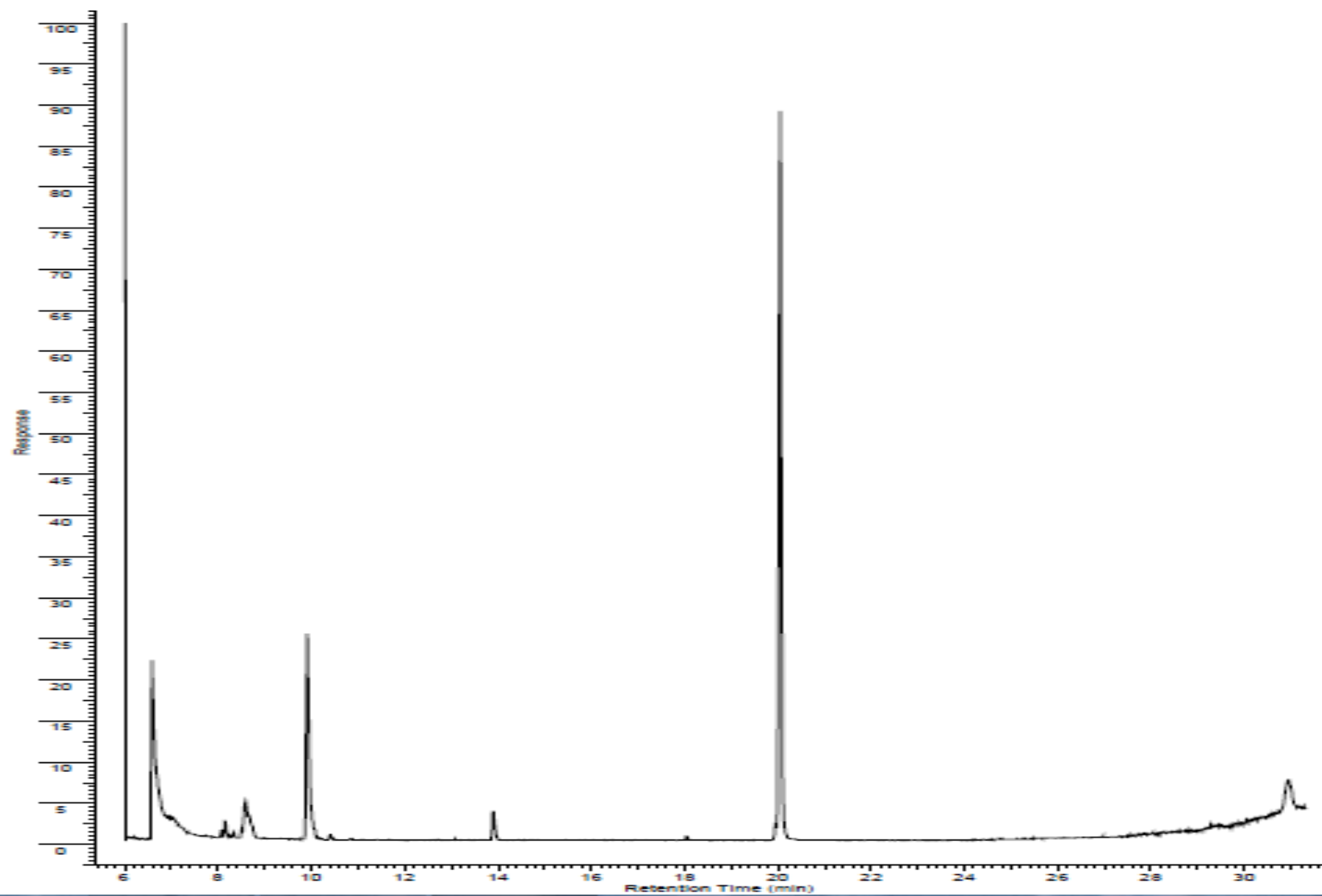
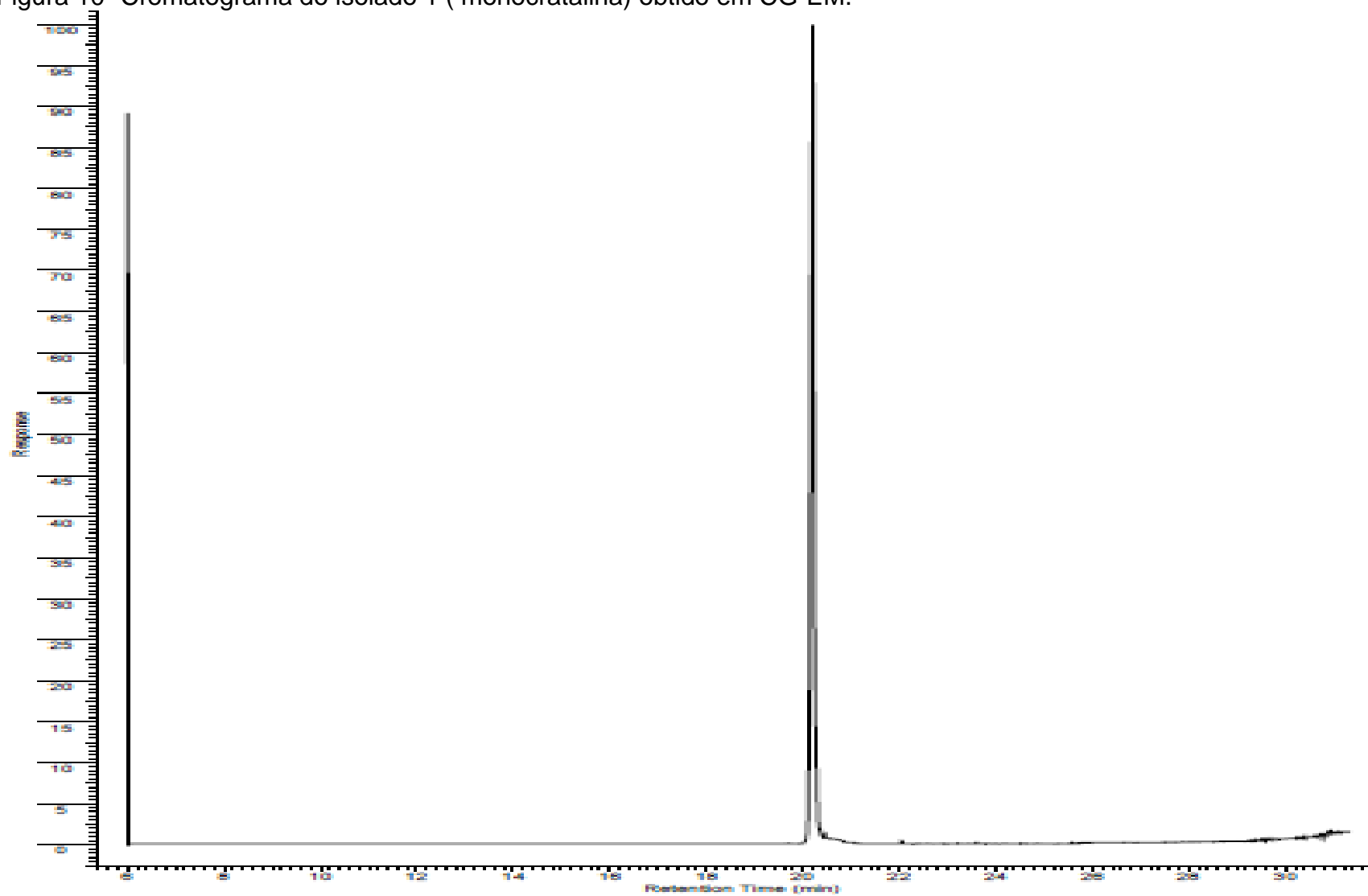


Figura 10- Cromatograma do isolado 1 (monocatalina) obtido em CG-EM.



4.3.2 Isolamento e caracterização química dos alcaloides

Foram utilizadas 96,5 g de sementes de *C. retusa*, das quais obteve-se 1,9732 g de fração B e 0,2145 g de fração C rendimento de 2,26 %. A análise do perfil cromatográfico por CCD mostrou que ambas as frações apresentavam o mesmo perfil, com um alcaloide majoritário. Com base no trabalho de Martinez (2009) que utilizava a recristalização com metanol gelado para obtenção da monocrotalina, esta metodologia foi utilizada e foram obtidas 1,4656 g (1,54 %) de alcaloide isolado que teve a estrutura química elucidada por técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H e ^{13}C e CG-EM), sendo identificado como monocrotalina. Os espectros de ressonância magnética de ^{13}C e ^1H (Figura 11 e 12) foram comparados com dados da literatura (NIWA et al. 1992; RUSSEL et al. 1982), os quais, assim como o padrão de fragmentação, foram compatíveis com a monocrotalina, conforme descrito no Esquema 3 (NEUNER-JEHLE; NESVABDA; SPITELLER, 1965).

Figura 11 - Espectro RMN ^{13}C da monocrotalina (125 MHz, CDCl_3)

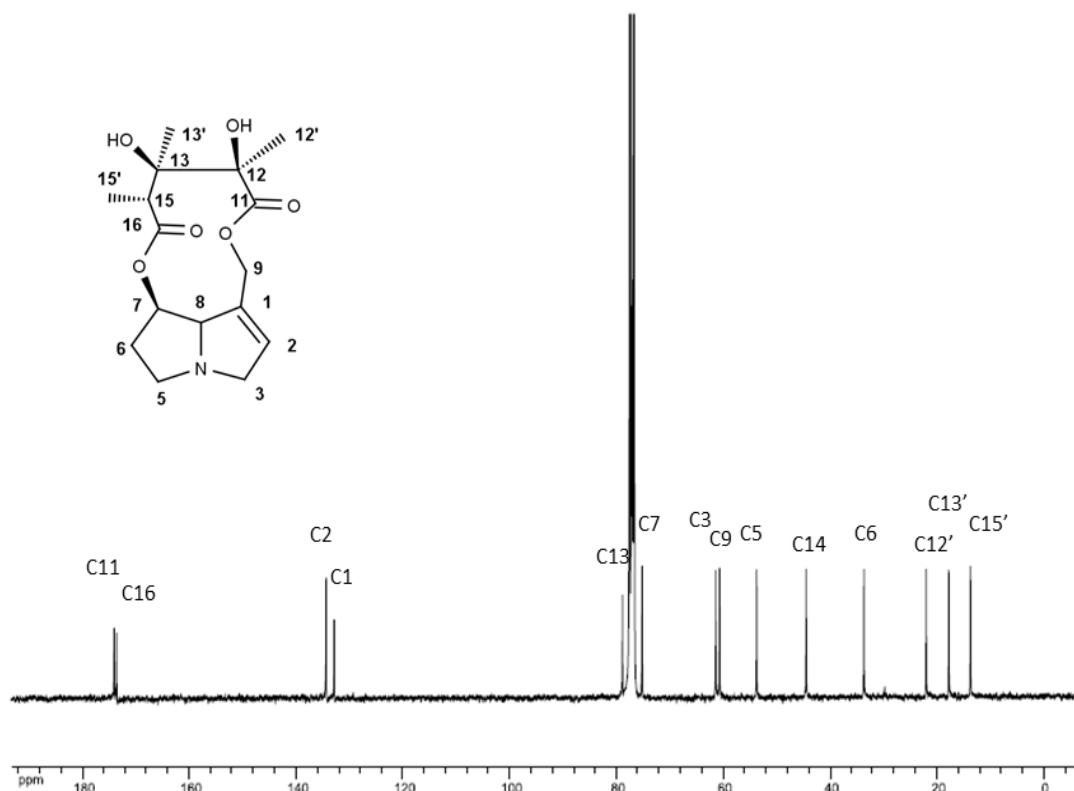


Figura 12- Espectro RMN ^1H da monocrotalina (500 MHz, CDCl_3).

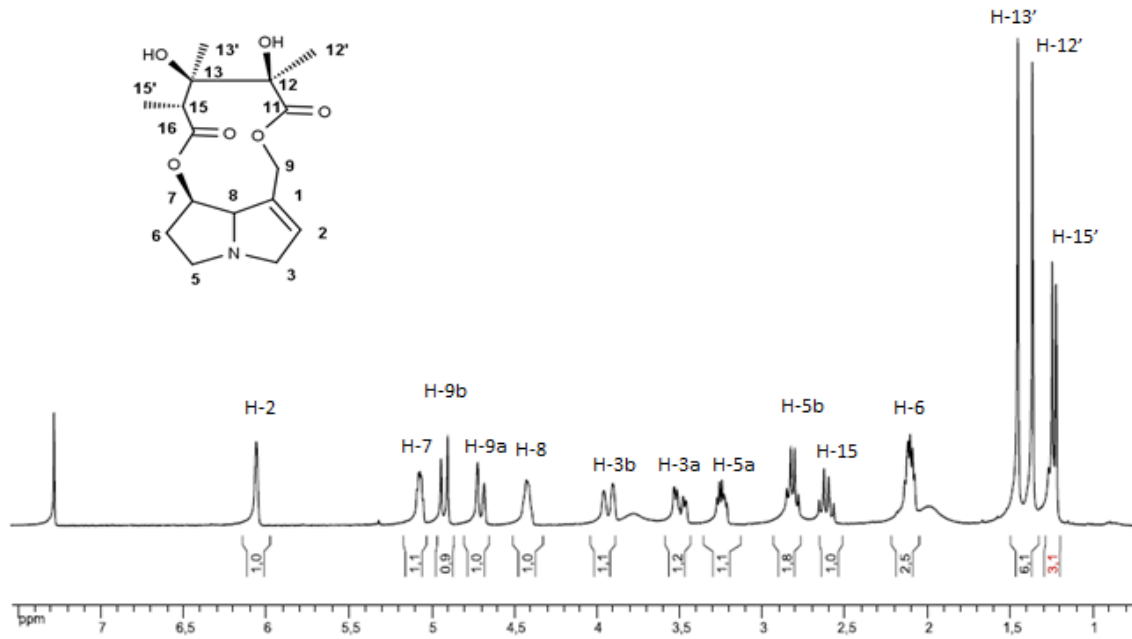
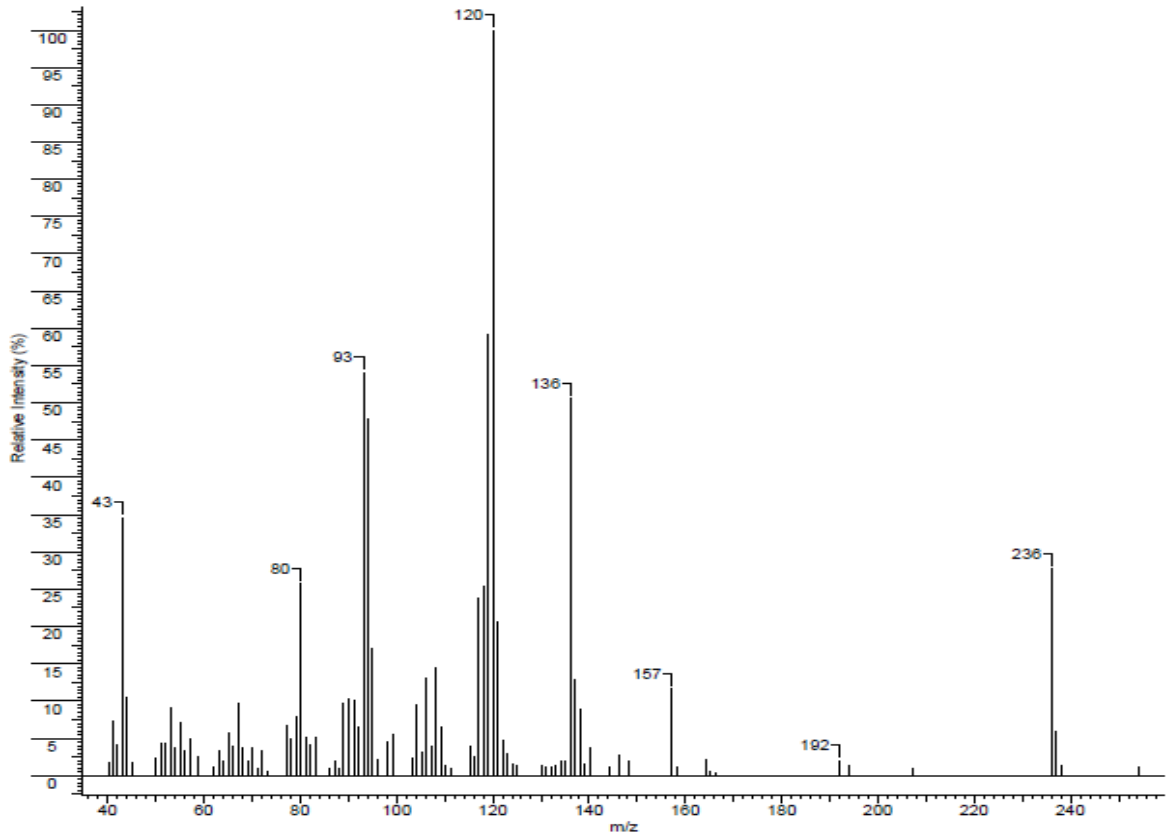


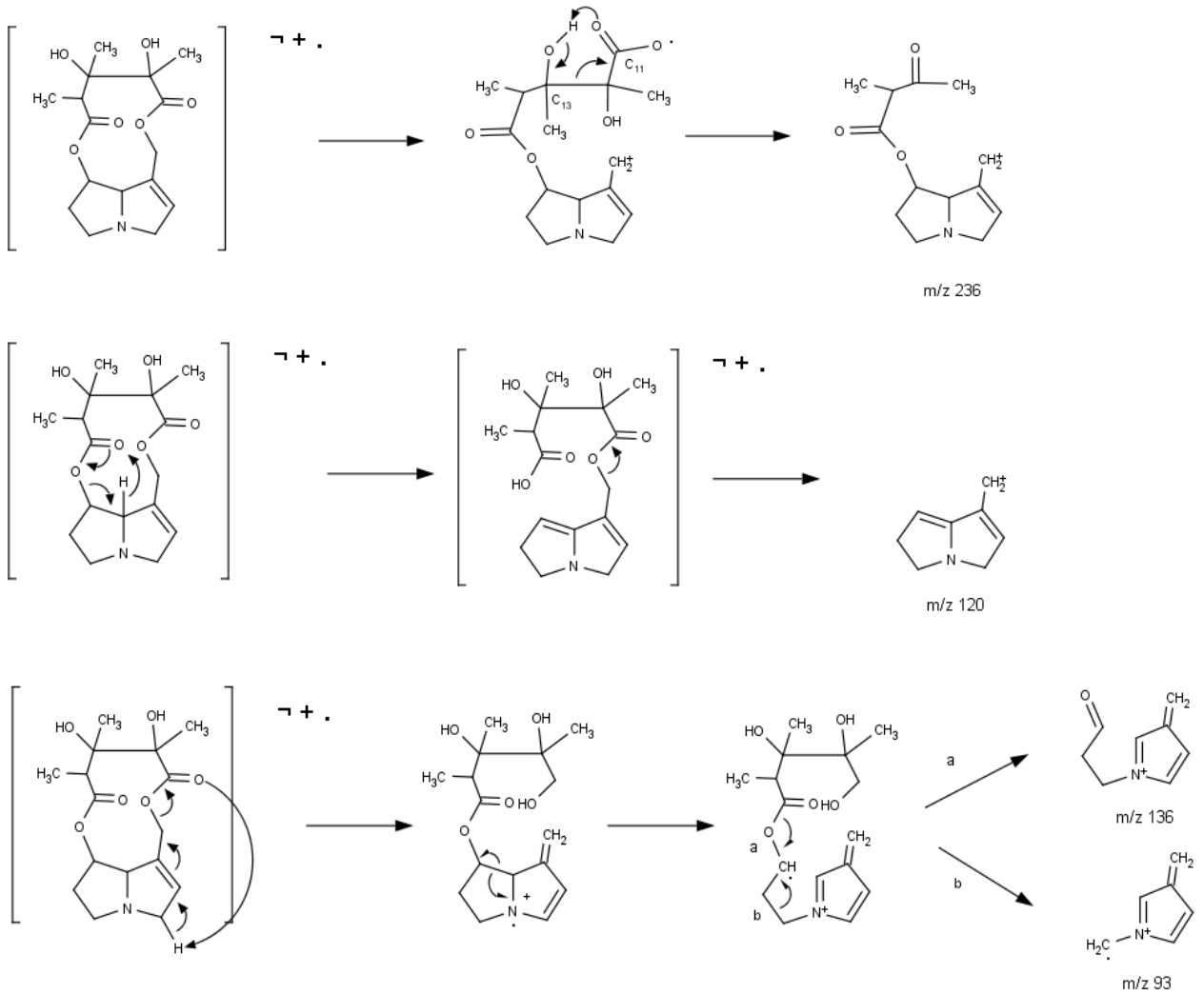
Figura 13- Espectro de massas da monocrotalina (ionização por impacto de elétrons 70 eV).



A análise do espectro de massas do isolado demonstrou o padrão de fragmentação correspondente ao da monocrotalina, no espectro não é possível observar o pico do íon molecular. O pico base do espectro de massas é um fragmento de 120 m/z . O fragmento m/z 236 é formado pela quebra da ligação C₉-O, seguida de rearranjo de McLafferty envolvendo a carbonila do C₁₁ e a hidroxila do C₁₃ (Esquema 3). Os fragmentos m/z 93, 120 e 136 são característicos de alcaloides pirrolizidínicos que apresentam a retronecina como base néica. O fragmento de m/z 120 é formado por um rearranjo semelhante ao de McLafferty envolvendo o H₈ e C₁₅, seguido da ruptura da ligação C₉-O. Os fragmentos m/z 93 e 136 são formados por uma via comum. Inicialmente, ocorre a transferência de hidrogênio de C₃ para a carbonila de C₁₁ ocorrendo a ruptura da ligação C₉-O, seguida da quebra da ligação C₇-C₈ formando um cátion-radical. Em seguida, ocorre a formação dos fragmentos de m/z 93 e 136. O fragmento a ser formado dependerá de qual ligação será quebrada. Na formação do fragmento de m/z 93 ocorre a quebra da ligação C₅-C₆. Já o fragmento de m/z 136 ocorre devido à ruptura da ligação C₁₅-O (NEUNER-JEHLE; NEVABDA; SPITELLER, 1965, WEI et al., 1981).

A fração butanólica das sementes de *C. retusa* (fração D) apresentou um rendimento de cerca de 500 mg, e esta foi submetida à CCD preparativa utilizando-se 100 mg de amostra. O alcaloide isolado foi analisado por CCD e a elucidação estrutural foi realizada com a análise por RMN de ¹H e ¹³C utilizando CD₃OD como solvente. Análise dos espectros de RMN demonstrou que o composto apresenta deslocamentos compatíveis com a monocrotalina. Na literatura não é descrito o RMN da monocrotalina em metanol, no entanto, os deslocamentos observados são compatíveis, assim como, a multiplicidade dos sinais do ¹H é idêntica. Além disso, a análise do perfil da fração butanólica das sementes demonstrou a presença de um único alcaloide com tempo de retenção idêntico ao da monocrotalina, confirmando que o composto é a monocrotalina.

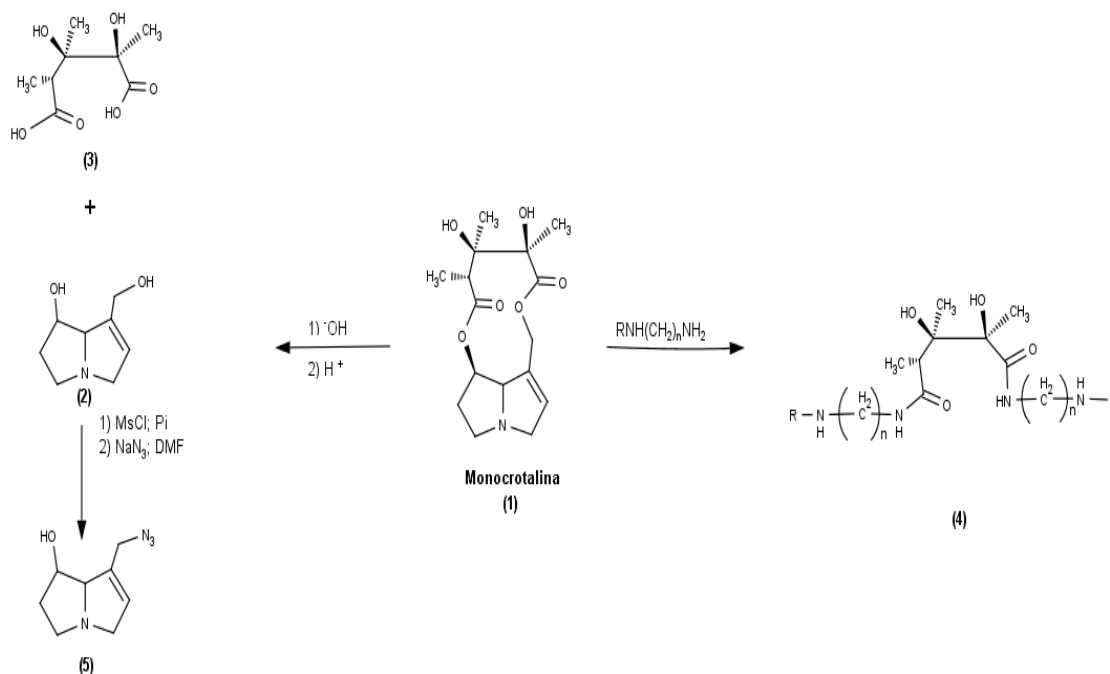
Esquema 3-Formação dos principais fragmentos no espectro de massas da monocrotalina (NEUNER-JEHLE; NEVABDA; SPITELLER, 1965).



4.3.3 Síntese de derivados anti-*T. vaginalis*

Devido ao rendimento expressivo da monocrotalina aliada à sua fácil obtenção a partir das sementes de *C. retusa*, esse alcaloide pirrolizidínico foi selecionado para a realização dos ensaios anti-tricomonas assim como foi utilizado como ponto de partida para a semi-síntese de derivados (Esquema 4).

Esquema 4- Esquema proposto para síntese de derivados do alcaloide pirrolizidínico monocrotalina (1): retronecina (2), azido-retronecina (5), ácido monocrotálico (3) e amidas do ácido monocrotálico (4).



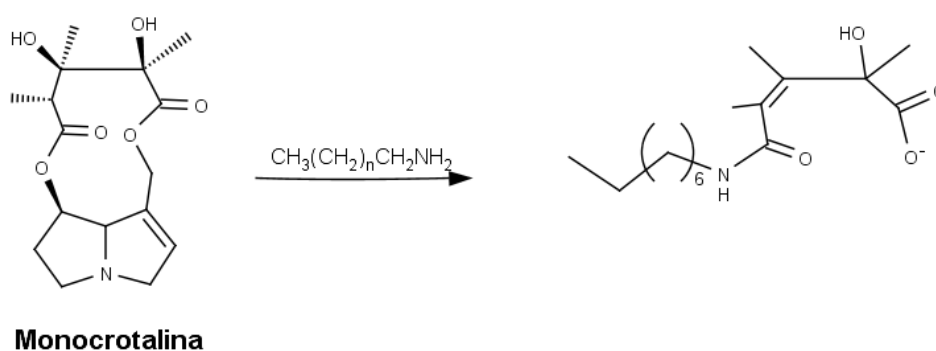
4.3.3.1 Síntese de amidas de cadeia longa do ácido monocrotálico

A primeira estratégia de síntese de derivados foi uma reação da monocrotalina com aminas alifáticas para síntese dos derivados amídicos. Nas condições utilizadas não houve a formação dos produtos esperados. A análise do perfil cromatográfico por CCD demonstrou que a monocrotalina foi consumida após uma semana de reação. A análise por RMN de ¹H e ¹³C da mistura reacional bruta demonstrou que não haviam deslocamentos característicos de amidas. Foi evidenciado que no espectro de RMN ¹³C não havia deslocamentos característicos de carbono carbonílico de amida (155-185 ppm), confirmando que o derivado amídico não havia sido formado, e que os compostos de partida foram degradados devido ao amplo tempo de reação.

A mesma reação foi realizada utilizando um catalisador conhecido como Zn-La (ZnO.La₂CO₅.LaOOH) a 5 %. Zn-La é utilizado na catálise de reações de transesterificação, principalmente reações envolvendo triglicerídeos. Este catalisador foi empregado com sucesso em reações de aminólise para formação de amidas a partir de óleo obtido de *Passiflora edulis* e aminas de cadeia longa (ALMEIDA et al.,

2013). Após quatro dias de reação a monocrotalina foi totalmente consumida, de acordo com a CCD, e a análise por RMN de hidrogênio da mistura reacional bruta indicou a presença de um composto contendo um grupamento amida. Após isolamento por CCD preparativa e análise por RMN verificou-se que o composto formado não era o esperado, além de apresentar baixo rendimento (derivado amidico ácido monocrotálico). O produto da síntese (Esquema 5) apresentou a formação da amida em um único lado da estrutura, na outra extremidade foi possível observar a carbonila de um ácido carboxílico. No RMN de ^1H foi possível observar os hidrogênios diastereotópicos metilênicos vizinhos à amida, com deslocamentos de 3,11 e 3,15 ppm. Sugere-se que houve uma reação de eliminação liberando H_2O entre os C_{14} e C_{13} remanescentes do ácido monocrotálico, formando uma olefina. Isto é notado no espectro de ^{13}C no qual é observado uma grande diferença de deslocamentos entre os dois carbonos olefínicos, demonstrando que um dos carbonos está mais desblindado, possivelmente está no campo da carbonila da amida (ALMEIDA et al., 2013).

Esquema 5- Reação de Síntese do derivado amidico do ácido monocrotálico: mostrando o composto formado diferente do esperado.



Em estudo de catálise envolvendo compostos derivados do Zn, foi demonstrado que há a formação de compostos de coordenação do Zn com ácidos carboxílicos de cadeia longa. Isto justificaria a ausência do sinal do Hidrogênio do ácido carboxílico no espectro de ^1H . Ainda, é descrito que compostos de coordenação com ácidos carboxílicos são formados, assim como, a reação desses compostos com outros ácidos no meio, gerando carboxilatos (REINOSO; FERREIRA; TONETTO, 2013). Considerando o baixo rendimento e por não

corresponder ao produto esperado, comprometendo assim a série de análogos estruturais amídicos inicialmente planejados, a síntese dos derivados amídicos planejados foi abandonada.

4.3.3.2 Hidrólise da monocrotalina

A reação de hidrólise da monocrotalina tinha como objetivo utilizar o esqueleto químico da retronecina (base néctica) e do ácido monocrotálico para síntese de análogos (Figura 14). O ácido monocrotálico sofreu degradação durante a reação e não foi possível a sua obtenção. Adams e Rogers (1939) descreveram a hidrólise da monocrotalina na qual foi evidenciado que o ácido monocrotálico sofre descarboxilação, se transformando no ácido monocrótico. No entanto, a reação realizada neste trabalho evidenciou a degradação completa do ácido monocrotálico, restando apenas a retronecina para seguir na síntese de análogos. Obteve-se a retronecina, um óleo marrom, com rendimento de 90%, que teve sua estrutura química elucidada por RMN de ^1H e ^{13}C (Figura 9 e 10) cujos deslocamentos químicos foram compatíveis com aqueles descritos por Niwa et al. (1992). A retronecina foi um dos derivados da monocrotalina utilizados nos ensaios biológicos.

Figura 14- Produtos da hidrólise da monocrotalina: estrutura química do ácido monocrotálico e retronecina.

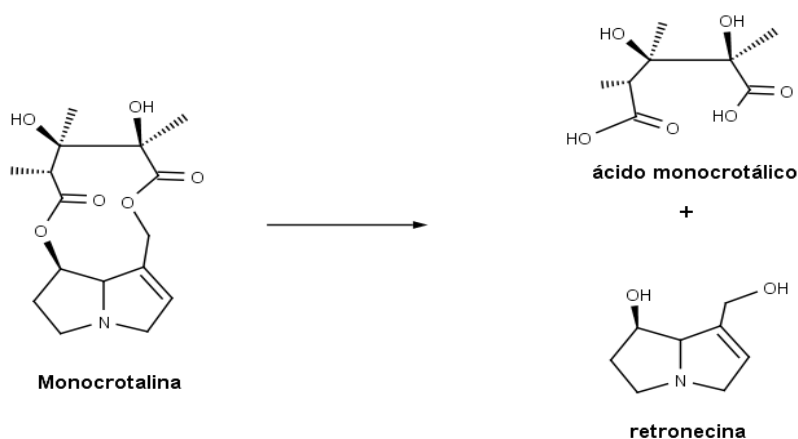


Figura 15- Espectro RMN ^1H da retronecina (500 MHz, CD_3OD).

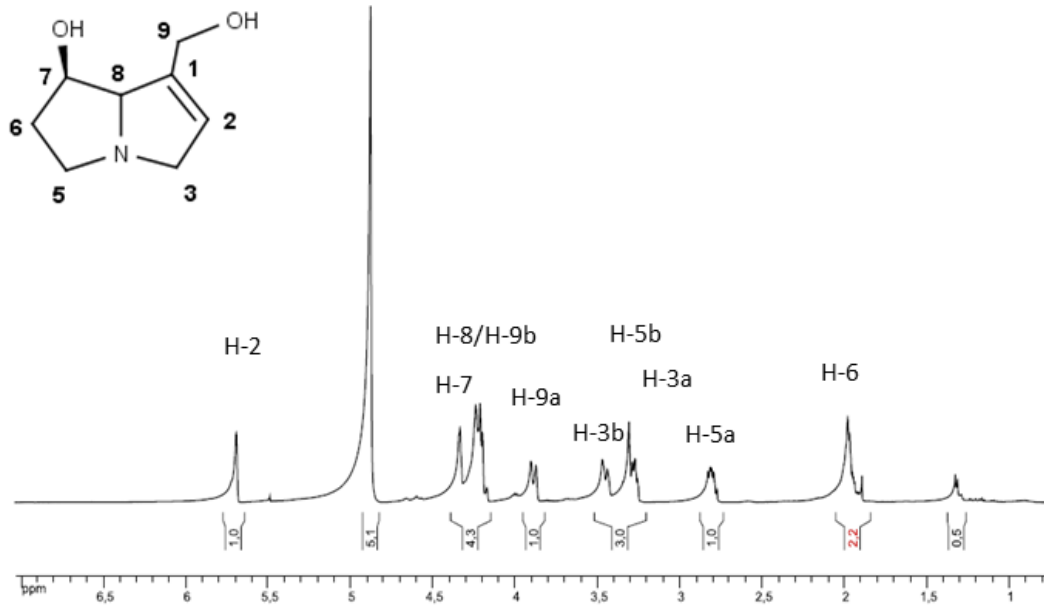
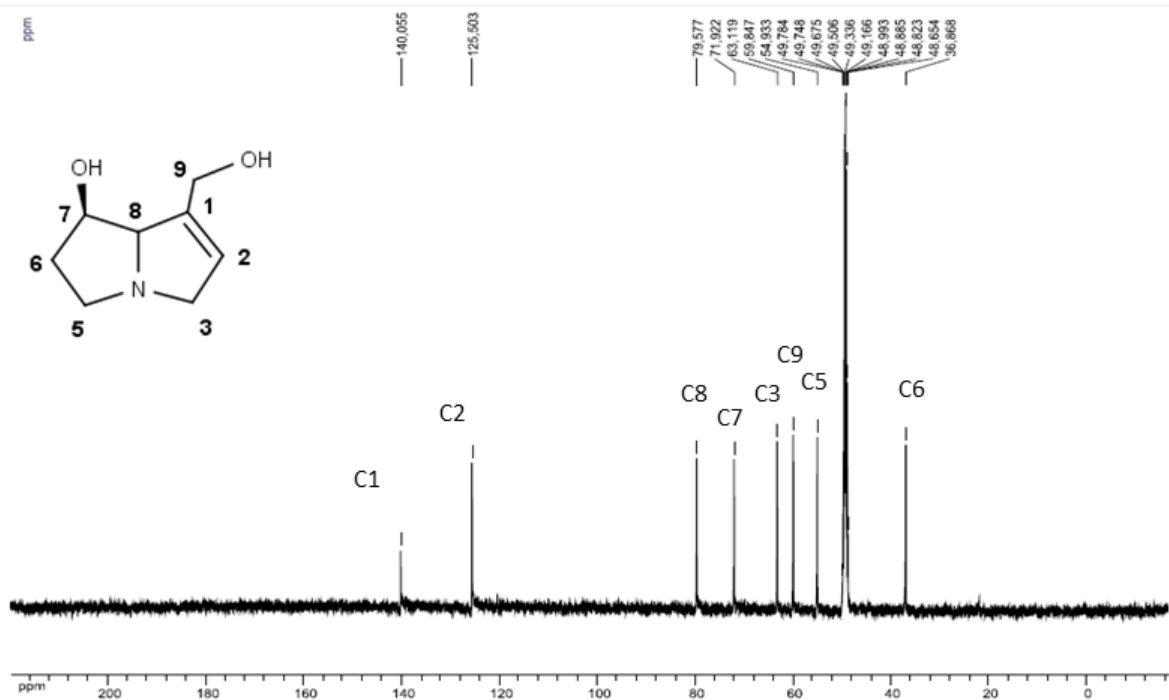


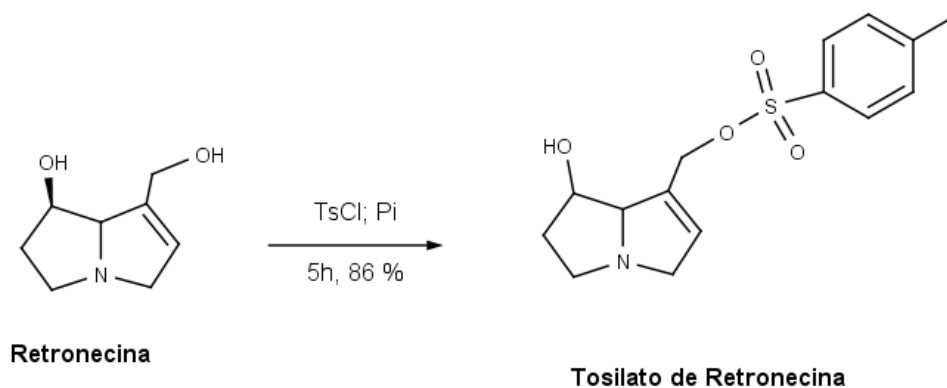
Figura 16- Espectro RMN ^{13}C da retronecina (125 MHz, CD_3OD).



4.3.3.3 Mesilação/Tosilação da retronecina

Inicialmente foi realizado a mesilação da retronecina que após a purificação por cromatografia em coluna, obteve-se um rendimento inferior a 10 %. Devido à dificuldade de purificação e baixo rendimento, optou-se por a estratégia de síntese utilizando o cloreto de tosil invés do cloreto de mesila. O tosilato de retronecina (Esquema 6) foi obtido com rendimento de 86 %, apresentando-se como um óleo marrom escuro. O grupamento tosil foi adicionado à retronecina para funcionar como um bom grupo abandonador, permitindo a substituição de nucleófilos aminados na posição C9 do núcleo pirrolizidínico. A confirmação da incorporação do grupo Tosil foi realizada pela presença dos sinais dos hidrogênios na região dos aromáticos no espectro de RMN ^1H e pela presença do sinal dos hidrogênios da metila com deslocamento próximo a 2,5 ppm. O tosilato da retronecina foi utilizado como intermediário na síntese da azido-retronecina.

Esquema 6- Reação de tosilação da retronecina.



4.3.3.4 Síntese da azida derivada da retronecina

A azido-retronecina (Esquema 7) foi obtida a na forma sólida, após a filtração e secagem do o sobrenante, com rendimento de 95 %. A sua estrutura foi confirmada utilizando espectroscopia por infravermelho e RMN 1D e 2D (Figura 11-14). Os compostos contendo o grupo azido apresentam uma banda característica na região $2155\text{-}2137\text{ cm}^{-1}$ decorrente do estiramento assimétrico do grupo azido e outra banda

entre 1261 e 1210 cm^{-1} devido ao estiramento simétrico. No composto analisado foi observado o estiramento assimétrico e simétrico em 2135 cm^{-1} e 1223 cm^{-1} , respectivamente. É possível observar o estiramento da ligação C-N com uma banda em 1186 cm^{-1} (LIEBERT et al., 1963). O espectro de RMN mostra ser bastante semelhante ao da retronecina, o que era esperado. A estrutura foi confirmada após análise das correlações entre os hidrogênios no espectro de RMN 2D COSY.

Esquema 7 -Esquema de síntese do derivado azido-retronecina.

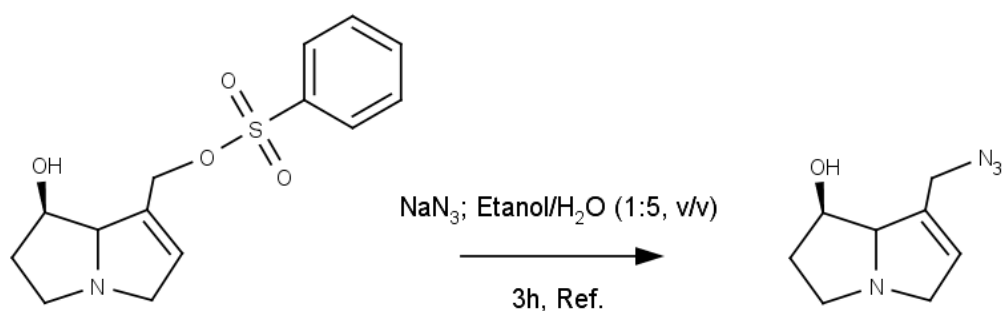


Figura 17- Espectro RMN ^{13}C do derivado azido-retronecina (125 MHz, CDCl_3).

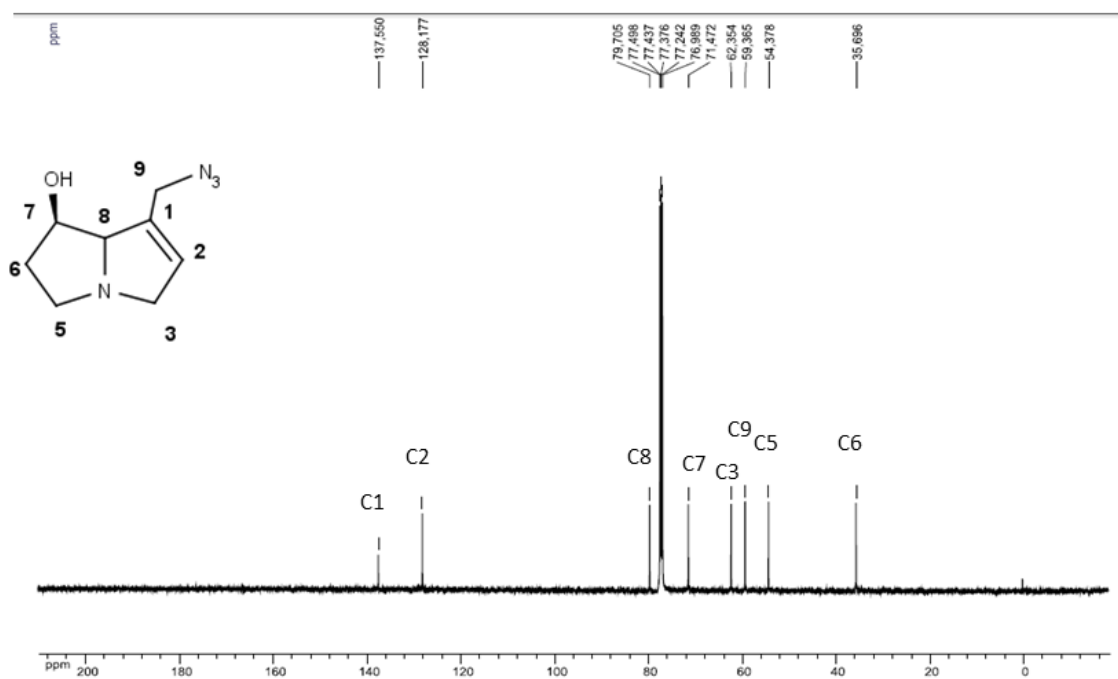


Figura 18- Espectro RMN ^1H do derivado azido-retronecina (500 MHz, CDCl_3).

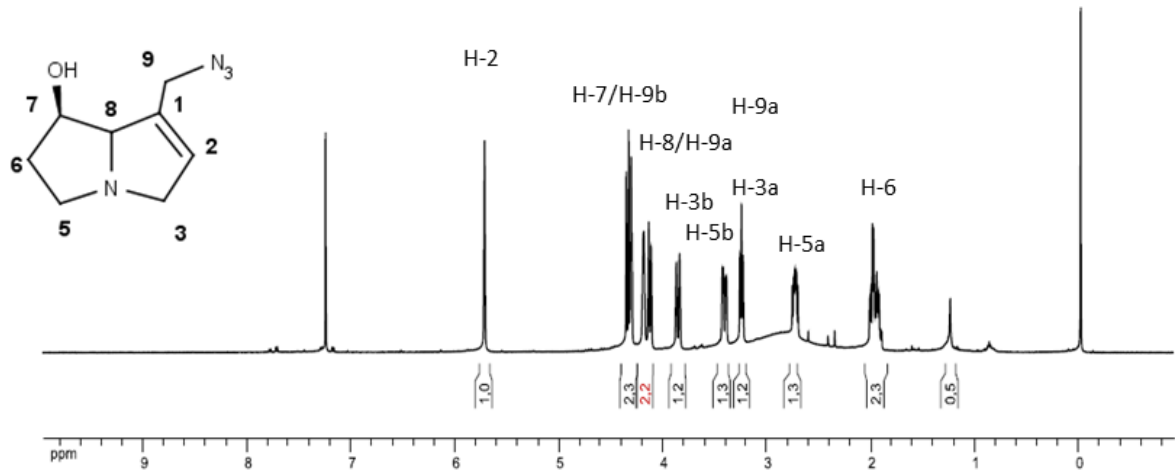


Figura 19- Espectro IV do derivado azido-retronecina.

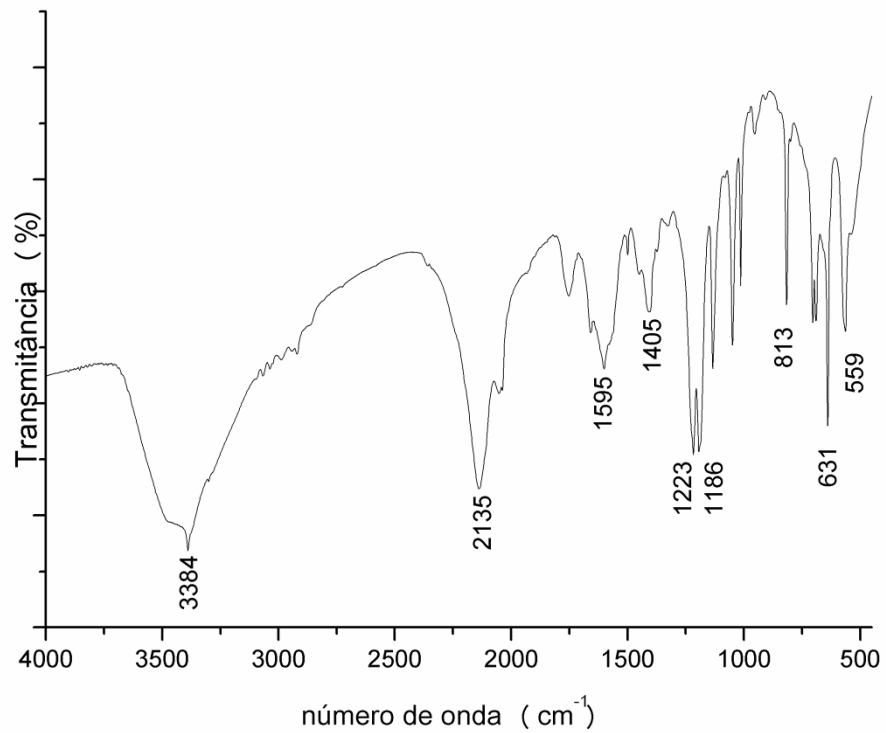
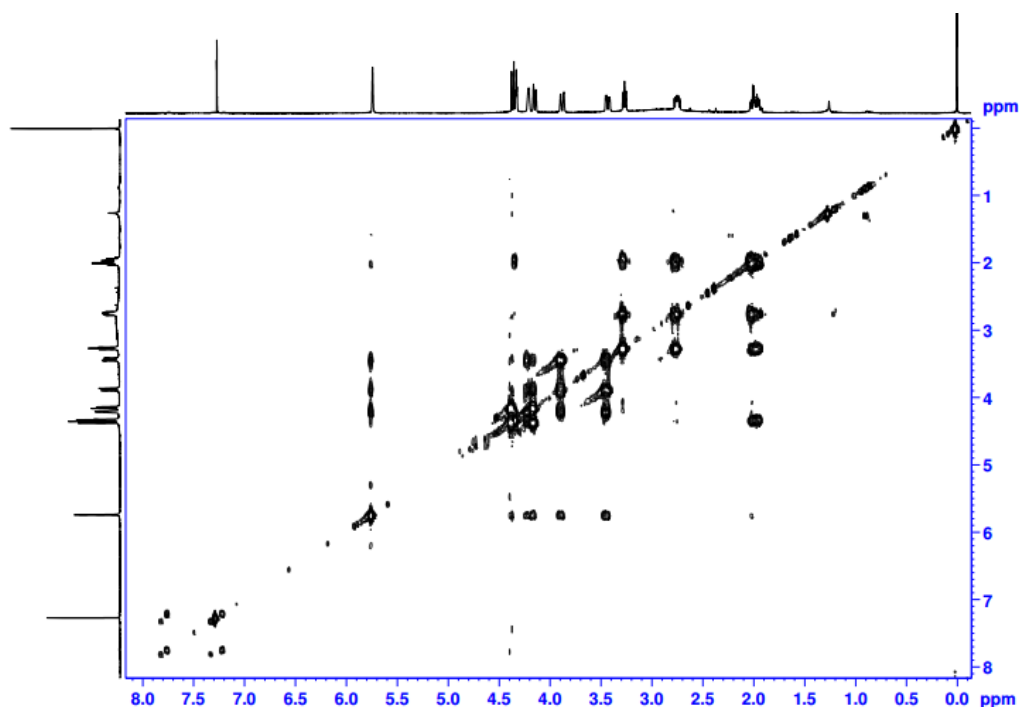


Figura 20-Espectro COSY ^1H - ^1H do derivado azido -retronecina (500 MHz, CDCl_3)

A síntese de derivados da monocrotalina para avaliar a atividade contra *T. vaginalis* mostrou-se promissora, uma vez que foi possível obter três derivados. A dificuldade nas reações de sínteses enfrentadas neste trabalho é decorrente dos poucos estudos de reatividade da molécula, que nem sempre reage formando os compostos desejados. A monocrotalina está sendo investigada como protótipo para desenvolvimento de outros derivados bioativos com potencial uso tópico, uma vez que, a monocrotalina apresenta limitações para o uso sistêmico.

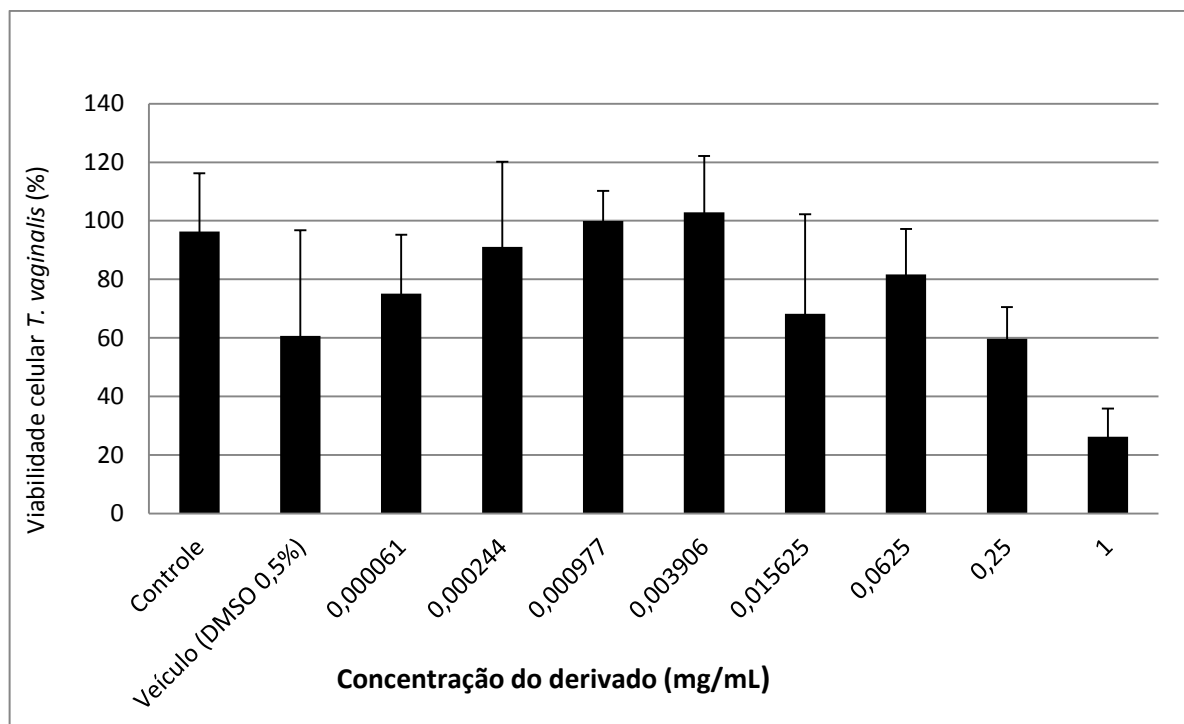
4.3.4 Avaliação da atividade anti-*T. vaginalis*

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde seus primórdios, e sua importância continua até os dias atuais. Apesar do avanço da química orgânica e química medicinal, os produtos naturais, principalmente os oriundos de plantas, ainda fornecem grande parcela dos fármacos que temos hoje. Além das plantas, os produtos naturais de origem marinha também estão sendo intensamente estudados. Muitos fármacos tiveram sua origem em plantas e depois serviram de espelho para síntese de análogos, como é o caso da morfina e seu derivado sintético, a codeína, assim, como vários agentes antimicrobianos e quimioterápicos

que representam grande importância na terapêutica (VEIGA-JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; HARVEY, 2008).

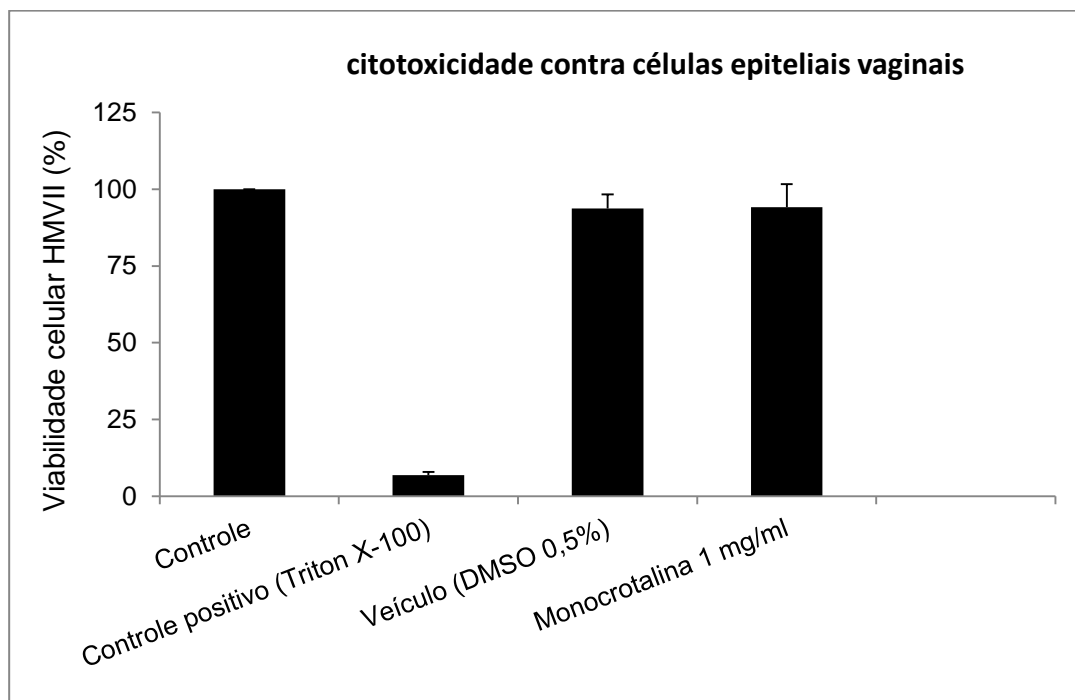
A tricomonose é a doença sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo, afetando cerca de 276 milhões de pessoas todos os anos (WHO, 2012), sua disseminação é agravada pelo fato dos sintomas não se manifestarem na maioria dos infectados, principalmente os do sexo masculino. Somado a isso, temos a terapêutica que carece de fármacos contando apenas com o Metronidazol e o Tinidazol (LOSSICK, 1990; HOUGHTON et al., 1979). O metronidazol teve seu uso disseminado pelo mundo o que levou a surgimento de cepas resistentes ao fármaco. Atualmente utiliza-se o metronidazol como fármaco de escolha, e em casos de resistência, se emprega o tinidazol. Apesar das propriedades clínicas melhores, já existem cepas resistentes aos dois fármacos. Isso deve-se à resistência cruzada, pois, ambos os fármacos pertencem a mesma classe química, os 5-nitroimidazóis (LOSSICK, 1990; CUDMORE et al., 2004). Ao longo dos anos muitos extratos e produtos naturais isolados de plantas foram investigados buscando novas alternativas terapêuticas. O alcaloide pirrolizidínico avaliado neste trabalho, a monocrotalina, apresentou excelente atividade anti-*T.vaginalis* uma vez que reduziu 80% da viabilidade dos parasitos na concentração de 1 mg/ mL (Figura 15) .

Figura 21- Avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* da monocrotalina.



Este é um resultado promissor, uma vez que, os alcaloides pirrolizidínicos praticamente não são explorados terapêuticamente devido à toxicidade quando metabolizados em nível sistêmico (JIANG; FU; LIN, 2006), mas seu uso tópico como no caso da tricomonose é um nicho científico a ser explorado. Além de boa atividade anti-*T. vaginalis*, a monocrotalina não apresentou citotoxicidade contra células epiteliais vaginais (Figura 22) e também não apresentou atividade hemolítica sugerindo seletividade em sua toxicidade ao parasito. Esses resultados aliados ao fácil processo de obtenção, purificação e caracterização da monocrotalina tornam esse alcaloide protótipo para investigação e desenvolvimento de uma nova alternativa terapêutica para a tricomonose.

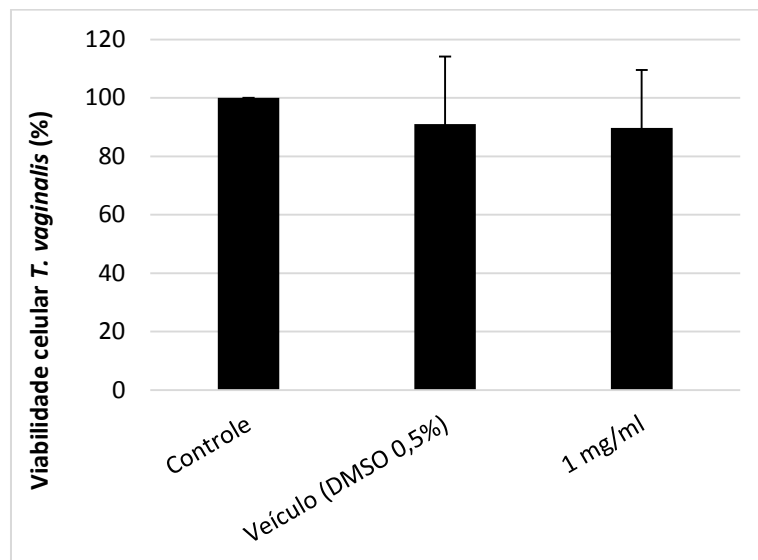
Figura 22 - Avaliação da citotoxicidade da monocrotalina frente à linhagem celular HMVII.



A monocrotalina apresentou atividade frente ao *T. vaginalis* e foi selecionada para ser o protótipo para síntese de análogos. Os análogos foram sintetizados buscando o melhoramento da atividade, e também, a retirada da porção da molécula reconhecida pelo CYP P₄₅₀, requisito para gerar os metabólitos tóxicos (os pirróis). Com isso poderia-se viabilizar um possível uso sistêmico desses derivados (CHEN

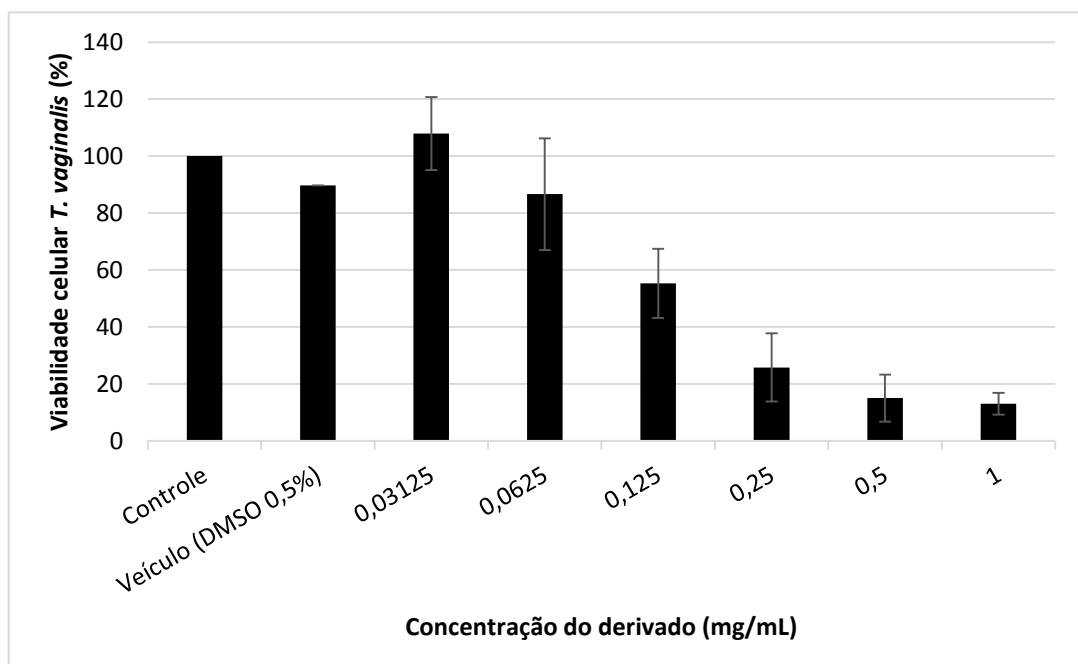
et al., 2010). Dois derivados foram sintetizados, caracterizados e testados frente a *T. vaginalis*: retronecina (Figura 23) e azido-retronecina, dos quais apenas o derivado azidico mostrou atividade promissora.

Figura 23 - Avaliação da atividade anti-*T. vaginalis* da Retronecina.



Azida da retronecina apresentou uma atividade melhor do que a monocrotalina chegando a matar 85 % dos parasitos na concentração de 1 mg /mL (Figura 18).

Figura 24 - Avaliação da atividade anti-*T.vaginalis* do derivado azido-retronecina.



A terapêutica contra o *T. vaginalis* precisa de compostos com mecanismo de ação inovador e quimicamente distinto dos derivados nitro-imidazólicos. Um estudo de síntese de derivados imidazólicos mostrou que nem todos foram ativos contra cepas resistentes, indicando um possível processo de resistência cruzada (UPCROFT et al., 2006). A síntese de análogos a partir de alcaloides é uma forma de obter novas moléculas e entender o seu possível mecanismo de ação pela relação estrutura atividade obtida pela síntese de uma série de análogos. A licorina alcaloide de *H. santacatarina* serviu de protótipo para síntese de análogos resultando em 6 compostos com boa atividade anti *T. vaginalis*. Apesar de serem menos ativos que o metronidazol eles apresentam um mecanismo de ação inovador que contribuiu também para a compreensão de novas rotas bioquímicas do parasito (GIORDANI et al., 2011).

As reações de síntese realizadas neste trabalho são apenas uma etapa inicial para síntese de novos análogos uma vez que a partir da monocrotalina, mais precisamente do seu produto de hidrólise, a retronecina, uma vasta gama de derivados podem ser obtidos para avaliação do potencial biológico. O potencial da monocrotalina foi evidenciado através de um *screening* virtual por *Docking* frente ao PDB (*Protein Database*) na busca por novos alvos. Nossos resultados apontam que a monocrotalina tem a habilidade de interagir com 97 proteínas de diferentes sistemas biológicos. Esse dado reforça a importância do desenvolvimento dos alcaloides pirrolizidínicos como ferramentas terapêuticas mesmo considerando sua potencial hepatotoxicidade se ingerido por via sistêmica. Os recursos de semi-síntese bem como novas formas farmacêuticas podem contribuir para a exploração desse potencial com o objetivo de obtenção de um medicamento.

4.3.5 Conclusões Parciais

A espécie *Crotalaria retusa* demonstrou ser fonte importante do alcaloide monocrotalina, encontrado de forma majoritária nas sementes. A monocrotalina foi obtida em rendimento satisfatório permitindo à avaliação das propriedades biológicas (atividade anti-*T. vaginalis* e avaliação da citotoxicidade). A monocrotalina

apresentou expressiva atividade matando 80 % das cepas de *T. vaginalis*. Devido ao elevado rendimento esse alcaloide foi utilizado para síntese de análogos, resultando em dois análogos: retronecina e azido-retronecina. A azido-retronecina apresentou atividade melhor do que a monocrotalina, matando 85 % dos parasitos, enquanto a retronecina foi inativa. Os alcaloides pirrolizidínicos apresentam um grande potencial a ser explorado, e os resultados obtidos neste trabalho são promissores para síntese de novos compostos bioativos oriundos dessa classe de alcaloides.

CAPÍTULO II: ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO *MOLECULES* (Qualis B1): Novel pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria pallida* seeds possesses antibiofilm activity

Themístocles da Silva Negreiros Neto¹, Ana Jéssica Matias Leite¹, Ana Kariliny Fernandes Felipe¹, Camila Guimarães de Almeida², Laura Nunes Silva³, Alan de Araújo Roque⁴, Euzébio Guimarães Barbosa¹, Alexandre José Macedo³, Mauro Vieira de Almeida² and Raquel Brandt Giordani^{1*}

¹Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Gustavo Cordeiro de Faria, SN, CEP 59010-180, Natal-RN, Brazil; E-Mail: theminegreiros@yahoo.com.br, ana@leite.org, kariliny_fernandes@hotmail.com, euzebiobg@gmail.com, raquebg@hotmail.com.

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora-MG, Brazil; E-Mail: camilagdealmeida@gmail.com, mauro.almeida@ufjf.edu.br

³Centro de Biotecnologia e Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre-RS, Brazil; E-Mail: lauransilva@gmail.com, alexandre.macedo@ufrgs.br.

⁴Herbário da UFRN, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal-RN, Brazil; E-Mail: Alan.ufrn@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: raquebg@hotmail.com. Tel.: +55-084-33429818; Fax: +55-084-33429833.

Communication

Novel pyrrolizidine alkaloid from *Crotalaria pallida* seeds possesses antibiofilm activity

Themístocles da Silva Negreiros Neto¹, Ana Jéssica Matias Leite¹, Ana Kariliny Fernandes Felipe¹, Camila Guimarães de Almeida², Laura Nunes Silva³, Alan de Araújo Roque⁴, Euzébio Guimarães Barbosa¹, Alexandre José Macedo³, Mauro Vieira de Almeida² and Raquel Brandt Giordani^{1*}

¹Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Gustavo Cordeiro de Faria,SN, CEP 59010-180, Natal-RN, Brazil; E-Mail:

theminegreiros@yahoo.com.br,ana@ana.leite.org, kariliny_fernandes@hotmail.com, euzebiobg@gmail.com, raquebg@hotmail.com.

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora-MG, Brazil; E-Mail:

camilagdealmeida@gmail.com,mauro.almeida@ufjf.edu.br

³Centro de Biotecnologia and Faculdade de Farmácia, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre-RS, Brazil; E-Mail: lauransilva@gmail.com, alexandre.macedo@ufrgs.br.

⁴Herbário da UFRN, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Campus Universitário Lagoa Nova, CEP 59078-970, Natal-RN, Brazil; E-Mail: alan.ufrn@gmail.com

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: raquebg@hotmail.com.
Tel.: +55-084-33429818; Fax: +55-084-33429833.

Received: / Accepted: /Published:

Abstract: *Crotalaria* genus belongs to the subfamily Papilionoideae, which is comprised of about 600 species,spread throughout tropical, neotropical and subtropical regions. In this study the extraction and isolation was performed of a new pyrrolizidine alkaloid (**Pallidamine**) from *Crotalaria pallida* seeds and both antibiofilm and antibacterial activities were evaluated against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. The alkaloid was characterized as a 12-member macrocyclic ring (+)-heliotridine diester by using 1D and 2D NMR techniques as well GC-MS analysis. *Crotalaria* spp. is known to produce pyrrolizidine alkaloids with retronecine as necic base. However, our results enable us to propose that **Pallidamine** is the first heliotridine-like pyrrolizidine alkaloid characterized from *Crotalaria*. Importantly, this species harvested from the Brazilian Northeast has not been studied so far, therefore our results suggest that

5 CONCLUSÕES GERAIS

A busca por novos fármacos vem crescendo ao longo dos anos, muitas vezes devido à ineficácia da terapêutica atribuída principalmente à resistência ou à toxicidade. Os produtos naturais são usados há milhares de anos para tratar, curar e prevenir doenças, e são fonte de fármacos até os dias de hoje. As duas espécies de *Crotalaria* analisadas neste estudo mostraram serem ricas em alcaloides com rendimento satisfatório que permitiu a avaliação do seu potencial biológico, mostrando ser uma fonte de compostos que podem vir a se tornar novos fármacos ou servir de incentivo para mais estudos com essa classe de compostos que ainda é esquecida do ponto de vista terapêutico. Na espécie *Crotalaria retusa* foi isolado das sementes a monocrotalina com rendimento de 1,54 % (2,18 g) que permitiu a síntese de análogos estruturais (retronecina, azido-retronecina) e avaliação das propriedades biológicas (atividade anti-*T. vaginalis* e citotoxicidade). A monocrotalina (1 mg/mL) apresentou expressiva atividade matando 80 % das cepas de *T. vaginalis*. A azido-retronecina (1 mg/mL) apresentou atividade melhor do que a monocrotalina, matando 85 % dos parasitos, enquanto a retronecina foi inativa. Na espécie *C. pallida* foi isolado das sementes o alcaloide pallidamina, um novo alcaloide macrocíclico de 12 membros derivado da (+)-heliotridina. A pallidamina apresenta o mesmo esqueleto químico da usaramina (alcaloide previamente isolado de *C. pallida*) diferindo apenas na estereoquímica da base nécica. A (+) - heliotridina como a base nécica não é comum e ainda não foi descrita para *C. pallida*. Sugere-se que as condições edafoclimáticas poderiam afetar a biossíntese de alcaloides pirrolizidínicos em *C. pallida*, fato que não foi observado em *C. retusa*. Pallidamina demonstrou grande potencial para inibir a produção de biofilme em mais de 50% (1 mg/mL) contra *S. epidermidis* sem matar as bactérias, o que é um ponto de início promissor para o desenvolvimento de novas estratégias antibiofilme, já que por não ter atividade biocida não induziria resistência. Em conclusão, ambas as espécies são ricas em alcaloides pirrolizidínicos que apresentaram atividades biológicas promissoras, demonstrando um alto potencial biológico que pode ser utilizado futuramente tanto para o uso terapêutico (uso tópico) quanto para outras finalidades (uso industrial, revestimento de superfícies, etc).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.; ROGERS, E. F. The structure of monocrotaline, the alkaloid in *Crotalaria spectabilis* and *Crotalaria retusa*. I, **Journal of American Chemical Society**, v. 61, n.10, p.2815-2819, 1939.

ALMEIDA, C. G.; SOUZA, I. F.; SOUSA, I. F.; HYARIC, M. Direct aminolysis of triglyrides: A novel use for heterogeneous catalysts, **Catalysis Communications**, v. 42, p. 25-29, 2013.

ANZFSA. Pyrrolizidine alkaloids in Food. A toxicology Review and Risk Assessment. **Australia New Zealand Food Authority**, n. 2, p.1-16, 2001.

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads – A predictive structural and biodiversity-based analysis, **Phytochemistry Letters**, 2014.

AREMU, M. O.; BAMIDELE, T. O.; AMOKAHA, J. A. Compositional Studies of Rattle Box (*Crotalaria retusa* L.) Seeds Found in Nasarawa State, Nigeria, **Pakistan Journal of Nutrition**, n. 11, p. 880-885, 2012.

BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; MIRANDA, A. L. P.; RODRIGUES, C. R. A química medicinal de *n*-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos Analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos, **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002

BASTA, S. D.; BASTA, F. Estudos sobre a germinação e desenvolvimento de *Crotalaria retusa* L. **Resumos do III Congresso Latino-americanano de Botânica**, Peru, 1982.

BOPPRÉ, M. Lepidoptera and pyrrolizidine alkaloids, **Journal of Chemical Ecology**, n. 1, v. 16, p. 166-185, 1989.

BÖTTCHER, F.; ADOLPH, R.D.; HARTMANN, T. Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, **Phytochemistry**, v. 32, p. 679–689, 1993.

BOTTOMLEY, W.; GEISSMAN, T. A. Pyrrolizidine alkaloids. The biosynthesis of retronecine, **Phytochemistry**, v. 3, p. 357-360, 1964.

BROSSI, A. **The alkaloids: Chemistry and Pharmacology**, London, Academic Press, v. 16, p. 327-383, 1985.

CALZADA, F.; YEPEZ-MULIA, L.; TAPIA-CONTRERAS, AMPARO. Effect of Mexican medicinal plant used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites, **Journal of Ethnopharmacology**, n. 113, p. 248-251, 2007.

CATALFAMO, J. L.; MARTIN-JR, W. B.; BIRECKA, H. Accumulation of alkaloids and their necines in *Heliotropium curassavicum*, *H. spathulatum* and *h. indicum*, **Phytochemistry**, n. 11, v. 21, p. 2675-2669, 1982.

CHEN, T.; MEI, N.; FU, P. P. Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Journal of Applied Toxicology**, n. 30, p. 183–196, 2010.

CHERPES, T.L.; WIESENFELD, H.C.; MELAN, M.A.; KANT, J. A.; COSENTINO, L.A.; MEYN, L. A. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. **Sexually Transmitted Diseases**, n. 33, p. 747-52, 2006.

CLARK, A. M., Review: Natural Products as Resource for drugs, **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 8, p. 1133-1141, 1996.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery, **Phytotherapy Research**, n. 15, p. 185-205, 2001.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development, **Journal of Natural Products**, n. 60, p. 52-60, 1997.

CUDMORE, S.L.; DELGATY, K.L.; HAYWARD-MCCLELLAND, S.F.; PETRIN, D.P.; GARBER, G.E. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. **Clinical Microbiological**, n. 17, p. 783-793, 2004.

CULVENOR, C. C. J. Tumor-inhibitory activity of pyrrolizidine alkaloids, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 57, p. 1112-1117, 1968.

CULVENOR, C. C. J.; SMITH, L. W. The alkaloids of *Crotalaria retusa* L. **Australian Journal of Chemistry**, n. 10, p. 464-473, 1957.

DENLHOLM, A. A.; KELLY, H. A.; ROBINS, D. J. Pyrrolizidine Alkaloids Biosynthesis. Synthesis of *N*-([4-¹⁴C]-4-Aminobutyl)-1,2-didehydropyrrolidinium and its Incorporation into Different Pyrrolizidine bases (Necines). **Journal of Chemical Society**, p. 2003-2007, 1991.

ELLIS, J.E.; YARLETT, N.; COLE, D.; HUMPHREYS, M.J.; LLOYD, D. Antioxidant defences in the microaerophilic protozoan *Trichomonas vaginalis*: comparison of metronidazole-resistant and sensitive strains. **Microbiology**, n. 140, p. 2489-2494, 1994.

EVANS, C. W. **Trease and Evans's Pharmacognosy**, ed.16, United States: Stauders Ltda, p. 353-371, 2009.

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

FLORES, A. S.; TOZZI, A. M. G. A.; TRIGO, J. R. Pyrrolizidine alkaloid profiles in *Crotalaria* species from Brazil: Chemotaxonomic significance, **Biochemical Systematic and Ecology**, n. 37, p. 459-469, 2009.

FLORES, A.S. *Crotalaria In: Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB022902>).

FRASSON, A. P.; SANTOS, O.; DUARTE, M.; TRETIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; SILVA, A. G.; SILVA, M. V.; TASCA, T.; MACEDO, A. J. First report of anti-*Trichomonas vaginalis* activity of the medicinal plant *Polygala decumbens* from the Brazilian semi-arid region, Caatinga, **Parasitology research**, n. 110, p. 2581-2587, 2012.

FRÖLICH, C.; OBER, D.; HARTMANN, T. Tissue distribution, core biosynthesis and diversification of pyrrolizidine alkaloids of lycopsamine type in three Boraginaceae species, **Phytochemistry**, v. 68, p. 1026-1037, 2007.

FU, P. P.; XIA, Q.; LIN, G.; CHOU, M. W. Pyrrolizidine Alkaloids – Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanism, **Drug Metabolism Review**, n. 36 p.1-55, 2004.

GARDINER, M. R.; ROYCE, R.; BOKOR, A. Studies on *Crotalaria crispata*, a newly recognized cause of Kimberley horse disease, **Journal of Comparative Pathology**, n. 89, p. 43-53, 1965.

GEHRIG, S.; EFFERTH, T. Development of Drug Resistance in *Trichomonas vaginalis* and its overcoming with Natural Products, **The Open Bioactive Journal**, n. 2, p. 21-38, 2009.

GELBAUM, L. T.; GORDON, M. M.; MILES, M.; ZALKOW, L.H. Semisynthetic Pyrrolizidine Alkaloid Antitumor Agents, **The journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 13, p. 2502-2504, 1982.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual da taxonomia vegetal: Plantas de interesse econômico, agrícolas, ornamentais e medicinais**, São Paulo, ed. Agronômica Ceres, p. 146, 1976.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Candimine-Induced Cell Death of the Amitochondriate Parasite *Trichomonas vaginalis*. **Journal of Natural Products**, v.73, n.12, p. 2019-2023, 2010.

GIORDANI, R. B.; VIEIRA, P. B.; WEIZENMANN, M.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, A. P.; BONORINO, C.; DE CARLI, G. A.; BOGO, M. R.; ZUANAZZI, J. A.; TASCA, T. Lycorine induces cell death in the amitochondriate parasite, *Trichomonas vaginalis*, via an alternative non-apoptotic death pathway. **Phytochemistry**, v.72, n.7, p.645-650, 2011.

GOLDSTEIN, F; GOLDMAN, M. B.; CRAMER, D. W. Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. **American Journal of Epidemiology**, n.137, p. 577-84, 1993.

GOTTLIEB, O. R., KAPLAN, M, A.; BORIN, M. R. **Biodiversidade um Enfoque Químio-biológico**, Editora UERJ, Rio de Janeiro-RJ, 1996.

GRUE-SORENSEN, G.; SPENSER, I. D. Deuterium Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy as a Probe of Stereochemistry of Biosynthetic Reactions: The

Biosynthesis of Retronecine, **Journal of American Chemical Society**, n. 25, v. 105, p.7404-7407, 1983.

HANA, J.; ROBINS, D. J. Pyrrolizidine Alkaloids Biosynthesis: Incorporation of ^2H -Labelled Putrescines into Retronecine, **Journal of Chemical Society**, Chemical Communication, 1983.

HARTMANN, T.; EHMKE, A.; EILERT, U.; BORSTEL, K. V.; THEURING, C. Sites of synthesis, translocation and accumulation of pyrrolizidine alkaloids N-oxides in *Senecio vulgaris* L., **Planta**, n. 177, p. 98-107, 1989.

HARTMANN, T.; WITTE, L. Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. **Alkaloids: chemical and biological perspectives**, Oxford, UK, Pergamon Press, v. 9, p. 155-233, 1995.

HARTMANN, T.; ZIMMER, M. Organ-specific Distribution and Accumulation of Pyrrolizidine Alkaloids during the Life History of two annual *Senecio* Species, **Journal of Plant Physiology**, v. 122, p. 67-80, 1986.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery, **Drug discoveryToday**, v. 13, n. 19/20, 2008.

HE, W.; VAN PUYVELDE, L.; MAES, L.; BOSSELAERS, J.; DE KIMPE, N. Antitrichomonas *in vitro* activity of *Cussonia holstii* Engl. **Natural Products. Research.**, n. 17, p. 127-133, 2003.

HINKS, J. R.; KIM, H. Y.; SEGALL, H. J.; MOLYNEUX, R. J.; STERMITZ, F. R.; COULOMBE, R. A. DNA cross-linking in mammalian cells by pyrrolizidine alkaloids: Structure-activity relationships, **Toxicology and Applied Pharmacology**, n. 111, p. 90-98, 1991.

HOUGHTON, G. W.; SMITH, J.; THORNE, P. S.; TEMPLETON, R. The pharmacokinetics of oral and intravenous metronidazole in man. **Journal of Antimicrobiol and Chemotherapy**, , n. 5, 621-623, 1979.

HUXTABLE, R. J. Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. **Pharmacology and Therapeutics**, n. 7, p.371-389, 1990.

JIANG, Y.; FU, P. P.; LIN, G. Hepatotoxicity of naturally occurring pyrrolizidine alkaloids, **Asian Journal of Pharmacodynamics and Pharmacokinetics**, n.6, p. 187-192, 2006

JOOSTEN, L.; VEEN, J. A. V. Defensive properties of pyrrolizidine alkaloids against Microorganisms, **Phytochemistry reviews**, n. 10, p. 127-136, 2011.

KÄSS, E.; WINK, M. Molecular Evolution of the Leguminosae: Phylogeny of the Three Subfamilies Based on *rbcL*-sequences, **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 24, n. 5, p. 365-378, 1996

KELLY, H. A.; ROBINS, D. J. Pyrrolizidine Alkaloids Biosynthesis. Incorporation of ^{13}C - Labelled Precursors into Rosmarinine, **Journal of Chemical Society**, p. 177-180, 1987.

KHAN, H.A; ROBINS, D. J. Pyrrolizidine Alkaloids Biosynthesis: Incorporation of ^{13}C -Labelled Putrescines into Retronecine. **Journal of Chemical Society**, Chemical communication, 1981.

KHAN, H.A; ROBINS, D. J. Pyrrolizidine Alkaloids Biosynthesis: Synthesis of ^{13}C – Labelled Putrescines and their incorporation into Retronecine. **Journal of Chemical Society**, p. 100- 105, 1985.

KOSOGOF C.; TEPE J. J.; WILLIAMS, R. M. DNA cross-linking by a phototriggered pyrrolic progenitor developed from monocrotaline, **Tetrahedron Letters**, n. 42, p. 6641-6643, 2001.

KUNEC, E. K.; ROBINS, D. J. Pyrrolizidine Alkaloids Biosynthesis. Synthesis of ^3H -Labelled Trachelanthamidine and Isoretronecanol and Their Incorporation into Three Pyrrolizidine Bases (Necines). **Journal of Chemical Society**, p. 1437-1441, 1989.

KUNEC, E. K.; ROBINS, D. J.. Evidence for Different 1-Hydroxymethylpyrrolizidines as Intermediates in the Biosynthesis of Retronecine and Rosmarinecine, **Journal of Chemical Society**, p. 250-252, 1986.

LAVIN, M.; DOYLE, J. J. ; PALMER, J. D. Evolutionary significance of the loss of the chloroplast-DNA inverted repeat in the Leguminosae subfamily Papilionoideae. **Evolution**, v. 2, n. 44, p. 390-402, 1990.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B., LOCK, M.,. **Legumes of the World. The Royal Botanical Gardens**, Kew, 2005.

LEIBERT, E.; RAO, C. N. R.; THOMAS, A. E.; OFTEDAHL, E.; MINNIS, R.; NAMBURY, C. V. N. Infrared spectra of acid azides, carbamyl azides and other azido derivatives. Anomalous splittings of the N_3 stretching bands, **Spectrochimica Acta**, v. 19, p. 1135-1144, 1963.

LOSSICK, J.G. Treatment of sexually transmitted vaginosis/vaginitis. **Rev. Infect. Dis.**, n. 12. S665-S681, 1990.

LUCKOW, M.; MILLER, J. T.; MURPHY, D. J.; LIVSHULTZ, T. A phylogenetic analysis of the Mimosoideae (leguminosae) based on chloroplast DNA sequence data. **Royal botanic Gardens**, p. 192-220, 2003.

MARTINEZ, S. T.; KAISER, C. R.; PINTO, A.C. Estudo fitoquímico de 3 espécies do gênero *Crotalaria*, **32^a Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

MATTOCKS, A. R. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. **London: Academic Press**, 1986.

MOO-PUC, J. A.; MARTIN-QUINTAL, Z.; MIRON-LOPEZ, G. ; MOO-PUC, R. E.; QUIJANO, L.; MENA-REJON, G. J. Isolation and antitrichomonal activity of the chemical constituents of the leaves of *Maytenus phyllanthoides* Benth. (Celastraceae). **Quimica Nova**, v. 37, n.1, p. 85-U114, 2014.

NAIDOO, D.; VUUREN, S. F. V.; ZYL, R. L. V.; WET, H. D. Plants traditionally used individually and in combination to treat sexually transmitted infections in northern Maputaland, South Africa: Antimicrobial activity and cytotoxicity, **Journal of Ethnopharmacology**, n. 149, p. 656-667, 2013.

NEUNER-JEHLE, N.; NESVABDA, H.; SPITELLER, G.. Anwendung der massenspektrometrie zur strukturaufklärung von alkaloiden. **Monatshefte für Chemie**, n. 96, p. 321 – 338, 1965.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010, **Journal of Natural Products**, n. 75, p. 311-335, 2012.

NIWA, H.; OGAWA, T.; OKAMOTO, O.; YAMADA, K. Total synthesis of optically active Monocrotaline, a Carcinogenic Pyrrolizidine Alkaloid possessing an eleven-membered retronecine dilactone, **Tetrahedron**, v. 48, n. 48, p. 10531-10548, 1992.

NOBRE, V. M. T.; REIT-CORREA, F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DANTAS, A. F. M.; TABOSA, I. M.; VASCONCELOS, J. S. Intoxicação por *Crotalaria retusa* (Fabaceae) em Equídeos no semi-árido da Paraíba, **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 24, p. 132-143, 2004.

NOËL, J. C.; FAYT, I.; MUNOZ, M. R. R.; SIMON, P.; ENGOHAN-ALOGHE, C. High prevalence of high risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, n.282, p.503-505, 2009.

NOWACKI, E.; BYERRUM, R. U. Biosynthesis of lupanine from lysine and other labeled compounds, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 7, n. 1, p. 58-61, 1962.

NUHU, H.; ABDURRAHMAN, E. M.; SHOK, M. Comparative analysis of the alkaloids of three *Crotalaria* species, **Nigerian Journal Pharmaceutical Sciences**, v.8, n. 2, p. 54-58, 2009.

OBBER, D.; KALTENEGGER, E. Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plantsecondary metabolism, **Phytochemistry**, n. 70, p. 1687-1695, 2009.

PALOMINO G.; VAZQUEZ R. Cytogenetic studies in Mexican populations of species of *Crotalaria* (Leguminosae - Papilionoideae), **Cytologia**, n. 56, p. 343-351, 1991.

PRAKASH, A. S.; PEREIRA, T. N.; REILLY, P. E. B.; SEAWRIGHT, A. A. Pyrrolizidine alkaloids in human diet, **Mutation Research**, n. 444, p. 53-67, 1999.

RANA, J.; D. J. ROBINS. Application of ^{13}C N.M.R. Spectroscopy to study the biosynthesis of the quinolizidine alkaloids Lupine and Sparteine, **Journal of Chemical Society**, p. 1133-1137, 1986.

RANA, J.; LEETE, E. Biosynthesis of Riddelliine: Incorporation of [3,5- ^{14}C] Trachelanthamidine and [5- ^3H] Isoretronecanol into Retronecine Moiety of the Alkaloid, **Journal of Chemical Society**, p. 1742-1743, 1985.

RASOLOSON, D.; TOMKOVA, E.; CAMMACK, R.; KULDA, J.; TACHEZY, J. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. **Parasitology**, n. 123, p. 45-56, 2001.

RASOLOSON, D.; VANACOVA, S.; TOMKOVA, E.; RAZGA, J.; HRDY, I.; TACHEZY, J.; KULDA, J. Mechanisms of *in vitro* development of resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. **Microbiology**, n.148 p.2467-2477, 2002.

REINOSO, D. M.; FERREIRA, M. L.; TONETTO, G. M. Study of the reaction mechanism of transesterification of triglycerides catalyzed by zinc carboxylates, **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 377, p. 29-41, 2013.

ROBINS, D. J. Biosynthesis of pyrrolizidine alkaloids, **Chemical Society Reveiws**, v. 18, p. 375- 408, 1989.

ROBINS, D. J. **Programme of Chemical Organic Natural Productcs**, p. 115, 1982.

ROCHA, T. D.; VIEIRA, P. B.; GNOATTO, S. C.; TASCA, T.; GOSMANN, G. Anti-*Trichomonas vaginalis* activity of saponins from *Quillaja*, *Passiflora*, and *Ilex* species. **Parasitology Research**, v. 110, n.6, p. 2551-2556, 2012.

RUSSEL, J. M.; ROITMAN, J. N.; BENSON, M.; LUNDIN, R. E. ^{13}C NMR spectroscopy of pyrrolizidine alkaloids. **Phytochemistry**, n.2, p. 439-443, 1982.

SEKAR, T; FRANCIS, K. A preliminary investigation of some Maruthamalai forest plants for phytochemical Compounds, **Bioresource Technology**, n. 70, p. 303-304, 1999.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development:A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, n. 61, p. 1053-1071, 1998.

SHWEBKE, J. R.; BURGESS, D. Trichomiasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 4, p. 794-803, 2004.

SINGH, B.; SAHU, P. M.; SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidinealkaloids from *Heliotropium subulatum*, **Fitoterapia**, n. 73, p. 153-155, 2002.

SPRENT, J.I.; MCKEY, D. **Advances in Legume Systematics, Part 5, The Nitrogen Factor**. The Royal Botanical Gardens, ed. Kew. 1994.

TEPE J. J.; WILLIAMS R. M. DNA cross-linking by aphototriggered dehydromonocrotaline progenitor, **Journal of American Chemical Society**, n. 121, p. 2951-2955, 1999.

UPCROFT, J. A.; DUNN, L. A.; WRIGTH, J. M.; BENALKI, K.; UPCROFT, P.; VANELLE, P. 5- Nitroimidazole drugs effective against Metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* and *Giardia duodenalis*, **Antimicrobial agentes and chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 344-347, 2006.

TOMA, W.; TRIGO, J. R.; PAULA, A. C. B.; BRITO, A. R. M. S. Preventive activity of pyrrolizidine alkaloids from *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) on gastric and duodenal induced ulcer on mice and rats, **Journal of Ethnopharmacology**, n. 95, p. 345–351, 2004.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?, **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VEIGA-JR, V. F.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 326-337, 2006.

VIKKI, M.; PUKKALA, E.; NIEMINEM, P.; HAKAMA, M. Gynecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. **Acta Oncológica**, n. 39, p. 71-75, 2000.

VILLIERS, B.J.; VUUREN, S.F. V.; ZYL, R. L.; WYK, B. E. W. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae), **Journal of Ethnopharmacology**, n.129, p. 189-196, 2010.

VUUREN, S. F. V.; NAIDOO, D. An antimicrobial investigation of plants used traditionally in Southern Africa to treat sexually transmitted infections, **Journal of Ethnopharmacology**, n. 130, p. 552-558, 2010.

WANG, H.H. Antitrichomonal action of emodin in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 40,p. 111-116, 1993.

WANG, K. H.; SIPES, B. S; SCHMITT, D. P. *Crotalaria* As a cover crop for nematode management: a review, **Nematropica**, n. 1, v. 32, p. 35-57, 2002.

WEBER, J.T.; COURVALIN, P. An emptying quiver: antimicrobial drugs and resistance. **Emerging Infectious Diseases**., n .11, p. 791-793, 2005.

WHEELWRIGHT, E. G. **Medicinal Plants and their History**, New York-NY, Dover Publications, 1974.

WEI, F.; LIANG, B.; HUI, W.; GANG, CHAI. A study of the mechanism of fragmentation of pyrrolizidine alkaloids in mass spectrometry, **Acta Chimica Sinica**, v.39, n.2, 1981.

WHO-IPCS (World Health Organisation-International Programme of Chemical Safety). Pyrrolizidine Alkaloids. **Environmental Health Criteria** , n.80, p. 1-345, 1988.

WHO. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted infections: 2008: World Health Organization, Department of Reproductive Health and Research, 2012. Reproductive health matters, n. 20, v.40, p. 207-209, 2012.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae), **South Africa Journal of Botany**, n. 89, p. 164-175, 2013.

WINK, M. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. Chapter 1: allelochemical Properties or the Raison D'être of Alkaloids, **v. 43, p. 1-118, 1993.**

WINK, M., WITTE, L.. Turnover and transport of quinolizidine alkaloids: diurnal variation of lupanine in the phloem sap, leaves and fruits of *Lupinus albus* L. **Planta**, n. 161, p. 519–524. 1984.

WOLNER-HANSEN, P.; KRIEGER, J. N.; STEVENS, C. E.; KIVIAT, N. B.; KOUTSKY, L.; CRITCHLOW; DEROUEN, T.; HILLIER, S.; HOLMES, K. K... Clinical manifestations of vaginal trichomoniasis. **Journal of American Medical Association**, n. 261, p.571–576, 1989.

XIA, Q.; CHOU, M. W.; EDGAR, J.A.; DOERGE, D. R.; FU, P. P. Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine.. **Cancer Letters**, n. 231, p.138-145, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de Fitoterápicos e fitofármacos no brasil, **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.