

unesp



Universidade Estadual Paulista – Unesp
Instituto de Química – Araraquara

“Júlio de Mesquita Filho”

**Espectrometria de massas aplicada aos estudos de biossíntese
de alcalóides de *Senna spectabilis***

Marcos Pivatto
(Doutorando)

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani
Co-Orientadora: Prof. Dr^a Maysa Furlan

Araraquara
2010

Marcos Pivatto

Espectrometria de massas aplicada aos estudos de biossíntese de
alcalóides de *Senna spectabilis*

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Vanderlan da Silva Bolzani
Co-Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Maysa Furlan

Araraquara
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Pivatto, Marcos
B693e Espectrometria de massas aplicada aos estudos de biossíntese de alcalóides
de *Senna spectabilis* / Marcos Pivatto. – Araraquara : [s.n], 2010
199 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
Co-orientador: Maysa Furlan

1. Produtos naturais. 2. Biossíntese. 3. Espectrometria de massas *tandem*.
4. Alcalóides piperidínicos. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais

Nome Marcos Pivatto
Nascimento 16/01/1979 - Corbélia/PR - Brasil
CPF 91473845149

Formação Acadêmica/Titulação

- 2006** Doutorado em Química.
Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil
Título: Estudo das vias biossintéticas dos alcalóides piperidínicos de *Senna spectabilis*.
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani
Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- 2003 - 2005** Mestrado em Química.
Instituto de Química, UNESP - Araraquara, Brasil
Título: Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla*.
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 1999 - 2003** Graduação em Bacharelado em Química
Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Cuiabá, Brasil
Título: Estudo da sorção do inseticida endossulfan e seu metabólito sulfato de endossulfan em solos do tipo glei húmico e latossolo vermelho amarelo.
Orientadora: Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dores
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

- 2009 - 2009** Extensão universitária em Radioproteção.
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, ICB-USP, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Bioensaios Celulares: Princípios e Aplicações.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Metabolismo de Fármacos e Toxicologia.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil e obter melhores resultados.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Biodiversity & Bioprospection: evaluation of feasibility of MRN for plant metabolomics.
Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais, NuBBE, Brasil
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2008 - 2008** Curso de curta duração em Aspectos da Interdisciplinaridade em Química Medicinal.
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
- 2007 - 2007** Extensão universitária em Realização dos ensaios anticolinesterásicos.
Instituto de Botânica, IBT, São Paulo, Brasil
- 2007 - 2007** Curso de curta duração em Operação do Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Química Medicinal.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em 3D QSAR Strategies in Drug Design.
3rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, BrazMedChem, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Workshop da Divisão de Produtos Naturais.
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Fármacos de origem natural.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Biosynthesis and Biotransformation.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
- 2006 - 2006** Curso de curta duração em Descoberta de novos fármacos: estratégias clássicas e racionais.
Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, São Carlos, Brasil
- 2005 - 2005** Curso de curta duração em A riqueza farmacológica da biodiversidade.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil

- 2005 - 2005** Curso de curta duração em A riqueza farmacológica da biodiversidade.
V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa BIOTA/FAPESP, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Os Fenômenos de Superfícies.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2003 - 2003** Curso de curta duração em Química dos Alimentos.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Curso de Extração de Princípios Ativos de Plantas.
Universidade de Cuiabá, UNIC, Cuiabá, Brasil
- 2002 - 2002** Curso de curta duração em Espectrometria de Massa e Suas Aplicações.
Universidade de Brasília, UNB, Brasília, Brasil
- 2001 - 2001** Curso de curta duração em Química Nova na Escola.
Sociedade Brasileira de Química, SBQ, Brasil

Atuação profissional

1. Instituto de Química UNESP - Araraquara

- 08/2009 - 12/2009** Graduação, Bacharelado em Química e Química Tecnológica
Disciplinas Ministradas: Química Orgânica II
- 08/2009 - 12/2009** Graduação, Bacharelado em Química
Disciplinas Ministradas: Química Analítica Orgânica
- 08/2009 - 12/2009** Graduação, Licenciatura em Química - Noturno
Disciplinas Ministradas: Química Orgânica II
- 01/2008 - 12/2008** Serviço Técnico Especializado, Laboratório de pesquisa NuBBE III
Especificação: Supervisão do laboratório de pesquisa

2. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo - Depto de Botânica - IB - USP

- 2008 - 2008** Estágio, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica
Estágio: Técnicas de germinação de sementes

3. Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

- 08/2002 - 07/2003** Outra atividade técnico-científica, Pró-Reitoria de Ensino e Graduação, Departamento de Química
Especificação: Bolsista de Iniciação Científica
- 08/2001 - 07/2002** Outra atividade técnico-científica, Pró-Reitoria de Ensino e Graduação, Departamento de Química
Especificação: Bolsista de Iniciação Científica
- 08/2000 - 07/2001** Outra atividade técnico-científica, Pró-Reitoria de Ensino e Graduação, Departamento de Química
Especificação: Bolsista de Iniciação Científica
- 08/2000 - 04/2003** Estágio, Pró-Reitoria de Ensino e Graduação, Departamento de Química
Estágio: Estágio no Grupo de Estudos de Poluentes Ambientais, envolvendo Análise de Resíduos de Biocidas.

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SERRANO, M. A. R.; PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; LOPES, M. N.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Acetylcholinesterase inhibitory pyridine alkaloids of the leaves of *Senna multijuga*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 482-484, 2010.
2. VIEGAS JUNIOR, C.; NICASTRO, P. C.; FOSSALUZZA, P. C.; GOMES, C. P.; SANTOS, L. A.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; SILVA, D. J. C.; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; COSTA, R. S.; AREAS, T. F. M. A.; CASTRO, N. G. Modificações estruturais na (-)-cassina e LASSBio-767: estratégias para a descoberta e otimização de novos candidatos a fármacos. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 117-127, 2009.
3. CARVALHO, C. T. de; SIQUEIRA, A. B.; IONASHIRO, E. Y.; PIVATTO, M.; IONASHIRO, M. Synthesis and characterization of solid 2-methoxycinnamylidenepyruvic acid. **Eclética Química**, v. 33, p. 61-68, 2008.
4. VIEGAS JUNIOR, C.; SILVA, D. H. S.; PIVATTO, M.; REZENDE, A. de; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; NAIR, M. G. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from green fruits. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 2026-2028, 2007.
5. PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A. de; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1431-1438, 2005.

Apresentação de Trabalho

1. REGASINI, L. O.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; GIANNINI, M. J. S. M., SILVA, D. H. S. Antifungal phenolic compound from *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae), 2009, **2nd Brazilian Conference on Natural Products – BCNP**.
2. PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; SERRANO, M. A. R.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; YONG, M. C. M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. New bioactive pyridine alkaloids from the leaves of *Senna multijuga*, 2009, **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP**.
3. FOSSALUZZA, P. C.; NICASTRO, P. C.; SANTOS, L. A.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. J. C.; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Planejamento, semi-síntese e avaliação analgésica e antiinflamatória de ésteres derivados da (–)-cassina, 2009, **II Jornada Científica da UNIFAL-MG**.
4. FOSSALUZZA, P. C.; NICASTRO, P. C.; SANTOS, L. A.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. J. C.; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C.; VIEGAS JUNIOR, C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Planejamento, semi-síntese e avaliação analgésica e antiinflamatória de ésteres derivados da (–)-cassina, 2009, **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**
5. SILVA, M. R.; CARDOSO-LOPES, E. M.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S., YONG, M. C. M. Pyridine alkaloids levels in leaves, stems and flowers of *Senna multijuga* (Rich.) Irwin et Barn, 2009, **2nd Brazilian Conference on Natural Products – BCNP**.
6. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; FRANCISCO, W.; CASTRO-GAMBOA, I.; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; LOPES, E. M. C. Acetylcholinesterase inhibitors alkaloids (–)-cassine and (–)-spectaline from *Senna spectabilis* (Fabaceae), 2008, **4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem**.
7. DANUELLO, A.; ROMEIRO, N.; PIVATTO, M.; VIEGAS JUNIOR, C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S.; GIESEL, G.; VERLI, H.; CASTRO, N. G. Molecular modeling studies of semi-synthetic piperidine anti-Alzheimer prototypes, 2008, **4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem**.
8. GOMES, C. P.; LAIGNIER, E. P.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. J. C. da; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C. da; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. New antinociceptive and anti-inflammatory semi-synthetic piperidinyl-arylhydrazones prepared from natural (–)-cassine, 2008, **4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem**.

9. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; FRANCISCO, W.; LOPES, N. P.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Purificação e caracterização dos alcalóides homólogos (-)-cassina e (-)-espectralina de *Senna spectabilis* (Fabaceae), 2008, **31 Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**.
10. VALLI, M.; OLIVEIRA, C. L.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; ROMEIRO, N.; VIEGAS JÚNIOR, C.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S. Híbridos Moleculares oxipiridínicos candidatos a inibidores de acetilcolinesterase, 2008, **31 Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – SBQ**.
11. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; FRANCISCO, W.; LOPES, N. P.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Purificação e caracterização dos alcalóides homólogos (-)-cassina e (-)-espectralina de *Senna spectabilis* (Fabaceae), 2008, **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**.
12. DANUELLO, A.; ROMEIRO, N.; PIVATTO, M.; VIEGAS JÚNIOR, C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S. Docking studies of new semisynthetic piperidine anti-alzheimer prototypes with acetylcholinesterase, 2008, **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**.
13. OLIVEIRA, C. L.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; VALLI, M.; VIEGAS JÚNIOR, C.; ROMEIRO, N.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S. Híbridos moleculares oxipiridínicos candidatos a inibidores de acetilcolinesterase, 2008, **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**.
14. VALLI, M.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; OLIVEIRA, C. L.; VIEGAS JUNIOR, C.; ROMEIRO, N.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S. Híbridos moleculares tiopiridínicos candidatos a inibidores de acetilcolinesterase, 2008, **VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp**.
15. FRANCISCO, W.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S. Estudo químico das flores de *Senna multijuga*, 2008, **XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**.
16. GOMES, C. P.; VIEGAS JUNIOR, C.; VELOSO, M. P.; BRIGAGÃO, M. R. P. L.; MELO, G. M. A.; SILVA, Y. K. C.; SILVA, D. J. C.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S. Semi-síntese e avaliação farmacológica de aril-hidrazonas como novos candidatos a fármacos analgésicos e antiinflamatórios, 2008, **Jornada Científica da UNIFAL-MG**.
17. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; SERRANO, M. A. R.; LOPES, N. P.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Screening for alkaloids and biological evaluation of *Senna/Cassia* species, 2007, **1st Brazilian Conference on Natural Products – BCNP and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology – RESEM**.
18. VALLI, M.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; OLIVEIRA, C. L.; VIEGAS JUNIOR, C.; ROMEIRO, N.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S. Thiopyridine hybrids candidates to acetylcholinesterase inhibitors, 2007, **6th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP**.

19. VALLI, M.; DANUELLO, A.; PIVATTO, M.; OLIVEIRA, C. L.; VIEGAS JUNIOR, C.; ROMEIRO, N.; FRAGA, C. A. M.; BOLZANI, V. S. Híbridos moleculares tiopiridínicos candidatos a inibidores de acetilcolinesterase, 2007, **XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**.

20. PIVATTO, M.; DANUELLO, A. Produtos Naturais: da Etnofarmacologia a Química Medicinal, 2007. Palestra ministrada na **V Jornada Científica** - Faculdade Santa Giulia, Taquaritinga/SP.

21. PIVATTO, M.; VIEGAS JUNIOR, C.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Potential acetylcholinesterase inhibition of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis*, 2006, **The 3rd Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry – BrazMedChem**.

22. PIVATTO, M.; ABREU, A. B. G. de; DORES, E. F. G. C.; MARTINS, E. L.; CARBO, L.; CUNHA, M. L. F. Estudo da adsorção do inseticida endosulfan e seu metabólito sulfato de endosulfan em solo do tipo glei húmico, 2002, **II Encontro Centro-Oeste de Química**.

Outras informações

1. Supervisão científica do trabalho de iniciação científica da aluna Luciene Ruiz Baccini (bolsista FAPESP) entre outubro de 2007 e dezembro de 2009, intitulado: **Estudo químico do extrato etanólico dos frutos de *Senna spectabilis* (Fabaceae)**.
2. Supervisão científica do trabalho de monografia do aluno Welington Francisco entre maio de 2007 e dezembro de 2008, intitulado: **Estudo Químico das Flores de *Senna multijuga* (Fabaceae)**.

Citações em bases bibliográficas

Web of Science Número total de citações: 13; Número de trabalhos: 3 Data: 12/04/2010; Fator H: 2;


SCOPUS Número total de citações: 12; Número de trabalhos: 3 Data: 12/04/2010

MARCOS PIVATTO

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 23 de abril de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Profª Drª Márcia Nasser Lopes
Instituto de Química - UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Frederico Guaré Cruz
Instituto de Química - UFBA, Salvador



Drª Maria Claudia Marx Young
Instituto de Botânica de São Paulo – IB, São Paulo

*Às quatro mulheres que alicerçaram meu caráter:
minha avó, minha mãe e minhas tias.
À minha esposa e meu filho com amor.
A meu pai com saudade!*

AGRADECIMENTOS

Nesse momento agradeço especialmente a minha avó, minha mãe e minhas tias que por vezes desejei tê-las perto. Doação, perseverança e sacrifício me levaram a realização profissional, sempre alicerçado pelo carinho e amor incondicional dessas mulheres.

- ✓ À Amanda, minha esposa e companheira, por saber enxergar minhas virtudes. Posso dizer que foi um dos maiores prazeres que a química orgânica me trouxe, amo você!
- ✓ A meu filho Felipe, dono do sorriso que me dá força para continuar, com quem aprendi o significado do amor incondicional. Te amo!
- ✓ À professora Vanderlan, pela orientação e exemplo de postura acadêmica e científica invejáveis, a quem tenho profunda e sincera admiração. Obrigado pela confiança na minha capacidade profissional.
- ✓ Aos professores do departamento de Química Orgânica pelos ensinamentos. Em especial a professora Ângela, profissional exemplar que tive o privilégio de dividir a disciplina de Química Orgânica II.
- ✓ Ao Ian, meu amigo e mestre pela oportunidade de estagiar como docente. Vejo em você o exemplo de dinamismo que a ciência precisa.
- ✓ Ao professor Massao, pelos princípios básicos da análise térmica, a quem tenho grande admiração e respeito.
- ✓ Ao professor Claudião, pela prontidão e eficiência das inúmeras curvas de DSC.
- ✓ Ao meu grande amigo Adriano, professor e pesquisador exemplar, pelas saudosas discussões científicas e futebolísticas. A sua esposa Adriana pelos inúmeros jantares em nossas casas, quando por vezes os filhos não nos permitiam freqüentar os botequins de outrora.
- ✓ Ao professor e amigo Norberto (Betão) da USP de Ribeirão Preto, exemplo do profissional dinâmico a quem tenho profunda admiração e respeito.
- ✓ Ao professor Marcos Buckeridge e alunos Wanderley Dantas dos Santos, Adriana Grandis e Bruna C. Arenque do Instituto de Botânica da USP pelo estágio e conhecimentos compartilhados na germinação das sementes de *S. spectabilis*

- ✓ Às professora Maria Cláudia Marx Young, Luci Brandão e Elaine M. C. Lopes do Instituto de Botânica pela oportunidade do estágio e ensaios anticolinesterásicos.
- ✓ Ao meu “irmão” Luis Octavio pelas valiosas discussões científicas e pessoais que com os anos solidificaram nossa amizade, admiração e respeito mútuos.
- ✓ À gordinha (Aline), Marília, Marcão, Gabriel, Néia, Thais, Mike, Ana, Vaninha, Lidi e demais colegas do NuBBE pela convivência prazerosa em busca do conhecimento nesses anos de pós-graduação.
- ✓ Ao tio Breno e à tia Jana, meus grandes amigos, pelo suporte quando fui bolsista didático e pelos quilos a mais dos nossos jantares. Tenho profunda gratidão e carinho.
- ✓ A meu primo Aleks, pelo companheirismo, amizade e prestatividade. Tenho imenso orgulho por tê-lo instigado a trilhar os caminhos da química.
- ✓ À Fer, Nina, Marina e Grá que mesmo a distância sempre fizeram parte da minha vida.
- ✓ À Jane (minha sogra), bibliotecária exemplar, pelos artigos, livros e atualizações curriculares a quem tenho grande carinho e admiração.
- ✓ Aos funcionários da biblioteca e da pós-graduação, pelo profissionalismo, dedicação e rapidez sempre que solicitados.
- ✓ Ao Nivaldo, Alberto Alécio e Marquinhos pelos excelentes espectros, suporte técnico e discussões.
- ✓ À minha aluna de Iniciação Científica Luciene Ruiz Baccini cujo exemplo de organização me inspira, com certeza será uma pós-graduanda exemplar.
- ✓ Ao meu ex-aluno de Iniciação Científica e agora colega de pós-graduação Wellington, pelas discussões científicas e amizade.
- ✓ À FAPESP pela bolsa concedida.

**“Meditai se só as nações fortes podem fazer
ciência ou se é a ciência que as fazem fortes”**

Oswaldo Cruz

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo das vias biossintéticas dos alcalóides piperidínicos presentes em *Senna spectabilis*, motivado pela potente atividade anticolinesterásica e baixa toxicidade observada no derivado (-)-3-*O*-acetil-espectalina (**15**), eleito como composto líder para o desenvolvimento de fármacos anti-Alzheimer que estão em fase de estudos pré-clínicos. Por outro lado, o interesse acadêmico no conhecimento das vias metabólicas, pode levar a estudos futuros de engenharia genética para potencializar a produção desses metabólitos uma vez que a síntese é extremamente complexa em função da presença de três centros estereogênicos. Tendo isso em vista, foram selecionadas seis espécies de *Senna* e *Cassia* para avaliar a presença dos alcalóides e selecionar aquela que os produz em maior quantidade. Foram estudadas as flores de *S. spectabilis*, *S. multijuga*, *S. macranthera*, *S. velutina*, *C. fistula*, *C. leptophylla*, sendo que só foram detectados alcalóides piperidínicos e piridínicos em *S. spectabilis* e *S. multijuga*, respectivamente, utilizando a espectrometria de massas *tandem*. Embora sejam de classes diferentes, esses metabólitos têm padrão de substituição similar, porém, apresentaram atividade anticolinesterásica diferenciada. De *S. spectabilis* foram isolados os alcalóides piperidínicos: (-)-cassina (**1**), (-)-espectalina (**9**), (-)-3-*O*-acetil-espectalina (**15**), (-)-3-*O*-acetil-cassina (**16**) e identificados 7-hidroxi-carnavalina (**71**), 7-hidroxi-cassina (**18**) e/ou espicigerina (**42**) utilizando a EM. De *S. multijuga* foram isolados os alcalóides piridínicos: 7'-multijuguinona (**67**) e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona (**69**) e identificados 7'-multijuguinol (**68**) e 12'-hidroxi-7'-multijuguinol (**70**). Para os estudos biossintéticos dos alcalóides piperidínicos foi inicialmente proposta a biogênese onde lisina e acetato foram eleitos potenciais precursores das vias metabólicas. Os experimentos foram realizados utilizando precursores isotópicamente marcados (L-lisina-[U-¹⁴C], acetato de sódio-1-[¹³C] ou CD₃¹³CO₂Na), administrados *in vivo* e *in vitro* nas flores, folhas, sementes (plântulas) e extratos enzimáticos, porém até o momento não foi observada incorporação significativa que pudesse ser detectada pelos métodos espectrométricos utilizados. Com esses resultados fica evidente que o estudo das vias biossintéticas dos alcalóides de *S. spectabilis* (arbórea) não é uma tarefa trivial e demanda maior investimento, principalmente em plântulas, para avaliação do início da atividade enzimática e produção dos metabólitos.

Palavras-chave: *Senna spectabilis*. Alcalóides piperidínicos. Espectrometria de massas *tandem*. Biossíntese.

ABSTRACT

The following work encompass as main goal the study of biosynthetic pathways to produce piperidine alkaloids using *Senna spectabilis* as natural matrix. Such research was instigated due to the high acetylcholinesterase activity and low toxicity showed by the derivative (–)-3-*O*-acetyl-spectaline (**15**), selected as a lead compound against Alzheimer's disease and currently under pre-clinical trials. Still yet, the academic interest on researching metabolic pathways that may lead to further genetic engineering studies to enhance the production of these metabolites is of extremely importance, due to the inability of producing any commercially viable synthetic strategy for their stereogenic centers. We selected six *Senna* and *Cassia* species to evaluate the presence of these metabolites aiming to select which matrix will produce them the most. We studied flowers from *S. spectabilis*, *S. multijuga*, *S. macranthera*, *S. velutina*, *C. fistula* and *C. leptophylla*. From those, we were able to detect piperidine and pyridine alkaloids only in *S. spectabilis* and *S. multijuga*, respectively, using tandem mass spectrometry. Regardless of the different structural nature towards **15**, those metabolites have similar substitution patterns and showed differential acetylcholinesterase activity. From *S. spectabilis* were isolated the piperidine alkaloids: (–)-cassine (**1**), (–)-spectaline (**9**), (–)-3-*O*-acetyl-spectaline (**15**), (–)-3-*O*-acetyl-cassine (**16**), and identified 7-hydroxycarnavaline (**71**), 7-hydroxycassine (**18**) and/or spicigerine (**42**) by tandem mass spectrometry and from *S. multijuga* were isolated the pyridine alkaloids: 7'-multijuguinone (**67**), 12'-hydroxy-7'-multijuguinone (**69**) and, identified by MS: 7'-multijuguinol (**68**) and 12'-hydroxy-7'-multijuguinol (**70**). We initially proposed the incorporation of lysine and acetate as main precursors of the piperidine alkaloids biosynthetic pathway and thus isotopically pure L-lysine-[U-¹⁴C], and sodium acetate-1-[¹³C] or CD₃¹³CO₂Na, were incorporated *in vivo* and *in vitro* to flowers, leaves, seedlings and enzymatic extracts. However, we did not observe any significant incorporation of those markers that could be detected using the spectrometric methods employed in the analysis. It is clear that the biosynthetic metabolic pathways to produce piperidine alkaloids is not a trivial task and requires more time research investment mainly towards the understanding of seedling incorporation of the markers, aiming to evaluate the initial enzymatic activity and production of these metabolites.

Keywords: *Senna spectabilis*. Piperidine alkaloids. Tandem mass spectrometry. Biosynthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfina, isolada do látex da papoula (<i>Papaver somniferum</i>).	33
Figura 2 - Coniina (<i>Conium maculatum</i>), causadora da morte do filósofo grego Sócrates.	34
Figura 3 - Atropina, isolada de <i>Hyoscyamus níger</i> .	34
Figura 4 - Curare utilizado pelos índios nos dardos e flechas para a caça.	35
Figura 5 - Alcalóides piperidínicos isolados de espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	37
Figura 6 - Modelo molecular para inibidores de AChE.	38
Figura 7 - Alcalóides piperidínicos bioativos isolados de <i>Solenopsis saevissima</i> .	39
Figura 8 - Alcalóides piperidínicos isolados de <i>Solenopsis</i> ssp.	39
Figura 9 - Alcalóides piperidínicos isolados de espécies de <i>Prosopis</i> .	41
Figura 10 - Alcalóides piperidínicos isolados de <i>Carica papaya</i> e <i>Azima tetraacantha</i> .	42
Figura 11 - Biogênese da coniina a partir da lisina.	42
Figura 12 - Biogênese da coniceína a partir do acetato.	43
Figura 13 - Biossíntese dos alcalóides da cicuta (<i>Conium maculatum</i>).	44
Figura 14 - Biossíntese da pinidina (<i>Pinus jeffreyi</i>).	44
Figura 15 - Biossíntese da peletierina (<i>Punica granatum</i>) e anabasina (<i>Nicotiana glauca</i>).	45
Figura 16 - Biogênese da espicigerina (<i>Prosopis spicigera</i>).	45
Figura 17 - Biogênese da carpaína (<i>Carica papaya</i>).	46
Figura 18 - <i>Senna spectabilis</i> , detalhes da planta: flores e folhas (A: LORENZI, 2002; B: foto tirada do mesmo espécime no terminal rodoviário de Araraquara).	47
Figura 19 - Flores <i>in natura</i> e secas em estufa com circulação de ar.	52
Figura 20 - Partição líquido/líquido do EESS-F1 de <i>S. spectabilis</i> .	53
Figura 21 - Extração ácido/base.	54
Figura 22 - Reações químicas envolvidas no ensaio por bioautografia.	55
Figura 23 - Espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> .	56
Figura 24 - Proposta de fragmentação para os alcalóides identificados em <i>S. spectabilis</i> .	61
Figura 25 - Proposta de fragmentação para os alcalóides identificados em <i>S. multijuga</i> .	64

Figura 26 - CCD das sub-frações coluna PDC01 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt).	65
Figura 27 - CCD das sub-frações coluna PDC03 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt).	66
Figura 28 - Cromatograma de A; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	67
Figura 29 - Cromatograma de B; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	67
Figura 30 - Cromatograma de C; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	68
Figura 31 - Cromatograma de B em coluna semi-preparativa; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 200 mg/mL, vol. inj. 50 µL, fluxo: 8 mL/min. e detector: UV 280 nm.	68
Figura 32 - CCD das sub-frações coluna PDC08 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt).	69
Figura 33 - Cromatograma das sub-frações PDC08 F ₁₁₋₁₈ ; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	70
Figura 34 - Cromatograma das sub-frações PDC08 F ₁₁₋₁₈ em coluna semi-preparativa; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 200 mg/mL, vol. inj. 50 µL, fluxo: 8 mL/min. e detector: UV 280 nm.	70
Figura 35 - Fração alcaloídica: (A) CCD analítica (FE: sílica, FM: <i>n</i> -hexano–CH ₂ Cl ₂ –AcOEt (1,5:2,0:6,5) e revelador: Dragendorff), (B) CCD preparativa sob luz UV366 nm.	71
Figura 36 - CCD de 1 (A: base livre, B: cloridrato), 9 (C: base livre, D: cloridrato) (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt).	72
Figura 37 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão e pureza de 1 (base livre).	72
Figura 38 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão e pureza de 1 (cloridrato).	73
Figura 39 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão de 9 (base livre).	91
Figura 40 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão de 9 (cloridrato).	91
Figura 41 - Configuração absoluta de 1 e 9 .	107

Figura 42 - CCD de 16 (A: base livre, B: cloridrato), 15 (C: base livre, D: cloridrato) (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).	108
Figura 43 - Configuração absoluta de 15 e 16 .	118
Figura 44 - Sistema de Kipp modificado para preparação dos cloridratos.	119
Figura 45 - Preparação dos derivados 15a e 16a .	119
Figura 46 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 67 .	132
Figura 47 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 69 .	152
Figura 48 - Ensaio por bioautografia de 1 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25), avaliação do limite de detecção.	156
Figura 49 - Ensaio por bioautografia de 67 e 69 (FE: sílica, FM: <i>n</i> -hexano:CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (1,5:2,0:6,5), avaliação do limite de detecção.	156
Figura 50 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	157
Figura 51 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	158
Figura 52 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 5 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	158
Figura 53 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 3 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	159
Figura 54 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 5 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	159
Figura 55 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	160
Figura 56 - Cromatograma de 1 ; gradiente (25 min.), 10–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	160

- Figura 57 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 10–100% de MeOH–HOAc 0,1%,
C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: UV 280 nm.
161
- Figura 58 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 20–100% de MeOH–HOAc 0,1%,
C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 161
- Figura 59 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 30–100% de MeOH–HOAc 0,1%,
C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 162
- Figura 60 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 30–100% de MeOH–HOAc 0,1%,
C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: UV 280 nm.
162
- Figura 61 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%,
C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 163
- Figura 62 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 40–100% de MeOH–HOAc 0,1%,
C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 163
- Figura 63 - Cromatograma de **20**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc
0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 164
- Figura 64 - Cromatograma de **20**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc
0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
UV 280 nm. 165
- Figura 65 - Cromatograma da mistura **1** e **20**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–
HOAc 0,1%, C = 0,25 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 165
- Figura 66 - Cromatograma da mistura **1** e **20**; gradiente (25 min.), 35–100% MeOH–
HOAc 0,1%, C = 0,25 mg/mL, vol. inj. 10 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
UV 280 nm. 166
- Figura 67 - Cromatograma da SSFr–CH₂Cl₂; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–
HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector:
light scattering. 167

Figura 68 - Cromatograma da SSFr-CH ₂ Cl ₂ , adição de 1 como padrão interno; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	167
Figura 69 - Biogênese para os alcalóides piperidínicos.	168
Figura 70 - Experimento de incorporação de radioisótopos nas flores de <i>S. spectabilis</i> : (A) cacho com flores; (B) incorporação; (C e D) incubação.	169
Figura 71 - Cromatograma do experimento depois de 24 h; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 100 mg/mL, vol. inj. 50 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	169
Figura 72 - Cromatograma do experimento depois de 48 h; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 100 mg/mL, vol. inj. 50 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	170
Figura 73 - Cromatograma do experimento depois de 72 h; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 100 mg/mL, vol. inj. 50 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: <i>light scattering</i> .	170
Figura 74 - Incorporação do precursor nas flores de <i>S. spectabilis</i> .	171
Figura 75 - Esquema geral da extração enzimática a partir das flores de <i>S. spectabilis</i> .	172
Figura 76 - Procedimento geral do ensaio enzimático.	173
Figura 77 - CCD da coluna PDC07 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICIpt).	174
Figura 78 - CCD da coluna PDC09 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICIpt).	174
Figura 79 - Abundância natural dos isótopos M+1 e M+2, calculada para o alcalóide 16 .	175
Figura 80 - Experimento de incorporação de acetato de sódio-1-[¹³ C] nas raques com folíolos de <i>S. spectabilis</i> .	177
Figura 81 - CCD da coluna PDC11 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICIpt).	177
Figura 82 - Cromatograma de íons totais da fração PDC11 F ₁₅ .	178
Figura 83 - Mapa de fragmentação do alcalóide 9 .	180
Figura 84 - Germinação de sementes: (A) sementes de <i>S. spectabilis</i> , (B e C) placas com as sementes germinadas depois de quatro dias.	181

Figura 85 - CCD dos extratos CHCl ₃ obtidos das sementes germinadas em placa de Petri (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt); Padrão (-)-cassina (1) (R _f = 0,46), Plântulas 7 dias (A), 14 dias (B).	182
Figura 86 - Micro-tubo de ensaio para administração de acetato de sódio-1-[¹³ C] nas sementes de <i>S. spectabilis</i> .	182
Figura 87 - Sementes germinadas em placas de Petri com papel de filtro umedecido.	184
Figura 88 - CCD da coluna BIO01 (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt).	185
Figura 89 - Biogênese para o alcalóide 1 com base no experimento utilizando CD ₃ ¹³ COONa.	185
Figura 90- Alcalóides majoritários observados por IES-EM na subfração BIO01 F ₇₋₉ .	186
Figura 91 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 342.	187
Figura 92 - Proposta de fragmentação para o íon <i>m/z</i> 344.	187
Figura 93 - Biogênese para o alcalóide 16 com base no experimento usando CD ₃ ¹³ COONa.	188
Figura 94 - CCD da coluna PDC14 frações F ₁₁₋₂₉ (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt).	189

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1 - IES-EM da fração CH ₂ Cl ₂ de <i>S. spectabilis</i> .	57
Espectro 2 - IES-EM da fração CH ₂ Cl ₂ de <i>S. multijuga</i> .	57
Espectro 3 - IES-EM da fração CH ₂ Cl ₂ de <i>S. macranthera</i> .	58
Espectro 4 - IES-EM da fração CH ₂ Cl ₂ de <i>S. velutina</i> .	58
Espectro 5 - IES-EM da fração CH ₂ Cl ₂ de <i>C. fistula</i> .	59
Espectro 6 - IES-EM da fração CH ₂ Cl ₂ de <i>C. leptophylla</i> .	59
Espectro 7 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 298 do alcalóide 1 de <i>S. spectabilis</i> .	60
Espectro 8 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 326 do alcalóide 9 de <i>S. spectabilis</i> .	60
Espectro 9 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 340 do alcalóide 16 de <i>S. spectabilis</i> .	61
Espectro 10 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 314 do alcalóide 18 de <i>S. spectabilis</i> .	61
Espectro 11 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 292 do alcalóide 67 de <i>S. multijuga</i> .	62
Espectro 12 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 294 do alcalóide 68 de <i>S. multijuga</i> .	63
Espectro 13 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 308 do alcalóide 69 de <i>S. multijuga</i> .	63
Espectro 14 - IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 310 do alcalóide 70 de <i>S. multijuga</i> .	63
Espectro 15 - IES-EM das frações A, B e C (PDC03).	66
Espectro 16 - IES-EM alta resolução do alcalóide 1 .	73
Espectro 17 - Espectro na região do IV do alcalóide 1 (cloridrato).	74
Espectro 18 - Espectro de RMN ¹ H de 1 (500 MHz, CDCl ₃).	75
Espectro 19 - Ampliação do espectro 18 (δ 1,8–2,4), alcalóide 1 .	76
Espectro 20 - Ampliação do espectro 18 (δ 1,15–1,65), alcalóide 1 .	76
Espectro 21 - Mapa de contorno gCOSY do alcalóide 1 .	78
Espectro 22 - Mapa de contorno gCOSY (δ 1,2–3,6) do alcalóide 1 .	78
Espectro 23 - Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 1 (125 MHz, CDCl ₃).	79

Espectro 24 - Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl ₃) do alcalóide 1 .	80
Espectro 25 - Ampliação do espectro 24 (δ 20–65), alcalóide 1 .	80
Espectro 26 - Espectro de RMN de DEPT 90 (125 MHz, CDCl ₃) do alcalóide 1 .	81
Espectro 27 - Mapa de contorno gHMQC (500 MHz, CDCl ₃), do alcalóide 1 .	83
Espectro 28 - Mapa de contorno gHMQC (δ 18–38), do alcalóide 1 .	83
Espectro 29 - Mapa de contorno gHMQC (δ 40–70), do alcalóide 1 .	84
Espectro 30 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CDCl ₃), do alcalóide 1 .	84
Espectro 31 - Mapa de contorno gHMBC (δ 16–32), do alcalóide 1 .	85
Espectro 32 - Mapa de contorno gHMBC (δ 21–34), do alcalóide 1 .	85
Espectro 33 - Mapa de contorno gHMBC (δ 42–60), do alcalóide 1 .	86
Espectro 34 - Mapa de contorno gHMBC (δ 45–75), do alcalóide 1 .	86
Espectro 35 - Mapa de contorno gHMBC (δ 198–222), do alcalóide 1 .	87
Espectro 36 - Mapa de contorno gHMBC (δ 20–70), do alcalóide 1 .	87
Espectro 37 - Mapa de contorno gHMBC (δ 40–70), do alcalóide 1 .	88
Espectro 38 - Mapa de contorno gHMBC (δ 54–72), do alcalóide 1 .	88
Espectro 39 - Mapa de contorno gHMBC (δ 25–60), do alcalóide 1 .	89
Espectro 40 - Mapa de contorno gHMBC (δ 15–70), do alcalóide 1 .	89
Espectro 41 - Mapa de contorno gHMBC (δ 14–38), do alcalóide 1 .	90
Espectro 42 - IES-EM alta resolução do alcalóide 9 .	92
Espectro 43 - Espectro na região do IV do alcalóide 9 (base livre).	93
Espectro 44 - Espectro de RMN ¹ H de 9 (500 MHz, CD ₃ OD).	94
Espectro 45 - Ampliação do espectro 44 (δ 1,4–3,6), alcalóide 9 .	94
Espectro 46 - Ampliação do espectro 45 (δ 1,35–1,65), alcalóide 9 .	95
Espectro 47 - Ampliação do espectro 45 (δ 1,65–2,05), alcalóide 9 .	95
Espectro 48 - Ampliação do espectro 45 (δ 2,5–3,6), alcalóide 9 .	96
Espectro 49 - Mapa de contorno gCOSY do alcalóide 9 .	98
Espectro 50 - Mapa de contorno gCOSY (δ 1,0–3,6) do alcalóide 9 .	98
Espectro 51 - Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 9 (125 MHz, CD ₃ OD).	99
Espectro 52 - Ampliação do espectro 51 (δ 20–65), alcalóide 9 .	99
Espectro 53 - Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CD ₃ OD) do alcalóide 9 .	100
Espectro 54 - Espectro de RMN de DEPT 90 (125 MHz, CD ₃ OD) do alcalóide 9 .	100
Espectro 55 - Mapa de contorno gHMQC (500 MHz, CD ₃ OD), do alcalóide 9 .	102
Espectro 56 - Mapa de contorno gHMQC (δ 24–38), do alcalóide 9 .	102
Espectro 57 - Mapa de contorno gHMQC (δ 28–46), do alcalóide 9 .	103

Espectro 58 - Mapa de contorno gHMQC (δ 20–45), do alcalóide 9 .	103
Espectro 59 - Mapa de contorno gHMQC (δ 56–74), do alcalóide 9 .	104
Espectro 60 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD ₃ OD), do alcalóide 9 .	104
Espectro 61 - Mapa de contorno gHMBC (δ 15–75), do alcalóide 9 .	105
Espectro 62 - Mapa de contorno gHMBC (δ 204–224), do alcalóide 9 .	105
Espectro 63 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CD ₃ OD), irradiando o sinal δ 2,80 do alcalóide 1 .	106
Espectro 64 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CD ₃ OD), irradiando o sinal δ 2,78 do alcalóide 9 .	107
Espectro 65 - IES-EM alta resolução do alcalóide 15 .	108
Espectro 66 - IES-EM alta resolução do alcalóide 16 .	109
Espectro 67 - Espectro na região do IV do alcalóide 15 (cloridrato).	109
Espectro 68 - Espectro na região do IV do alcalóide 16 (cloridrato).	110
Espectro 69 - Espectro de RMN ¹ H de 15 (500 MHz, CDCl ₃).	112
Espectro 70 - Ampliação do espectro 69 (δ 1,1–2,2), alcalóide 15 .	112
Espectro 71 - Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 15 (125 MHz, CDCl ₃).	113
Espectro 72 - Ampliação do espectro 71 (δ 20–70), alcalóide 15 .	113
Espectro 73 - Espectro de RMN ¹ H de 16 (500 MHz, CDCl ₃).	114
Espectro 74 - Ampliação do espectro 73 (δ 1,1–1,7), alcalóide 16 .	114
Espectro 75 - Ampliação do espectro 73 (δ 2,0–2,6), alcalóide 16 .	115
Espectro 76 - Espectro de RMN ¹³ C do alcalóide 16 (125 MHz, CDCl ₃).	115
Espectro 77 - Ampliação do espectro 72 (δ 20–70), alcalóide 16 .	116
Espectro 78 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CDCl ₃), irradiando o sinal δ 2,90 do alcalóide 15 .	117
Espectro 79 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CD ₃ OD), irradiando o sinal δ 2,89 do alcalóide 16 .	117
Espectro 80 - IES-EM alta resolução do alcalóide 67 .	120
Espectro 81 - Espectro de RMN de ¹ H de 67 (500 MHz, CDCl ₃)	121
Espectro 82 - Ampliação do espectro 81 (δ 0,8–1,4) do alcalóide 67 .	121
Espectro 83 - Ampliação do espectro 81 (δ 1,5–2,7) do alcalóide 67 .	122
Espectro 84 - Espectro de RMN ¹³ C de 67 (125 MHz, CDCl ₃).	123
Espectro 85 - Espectro de RMN de DEPT 135 de 67 (125 MHz, CDCl ₃).	123
Espectro 86 - Espectro de RMN de DEPT 90 de 67 (125 MHz, CDCl ₃).	124
Espectro 87 - Mapa de contorno gHMQC de 67 (δ 10–45; 500 MHz; CDCl ₃).	124

Espectro 88 - Mapa de contorno gHMQC de 67 (δ 12–44; 500 MHz; CDCl ₃).	125
Espectro 89 - Mapa de contorno gHMQC de 67 (δ 22–34; 500 MHz; CDCl ₃).	125
Espectro 90 - Mapa de contorno gHMQC de 67 (δ 117–127; 500 MHz; CDCl ₃).	126
Espectro 91 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 20–34; 500 MHz; CDCl ₃).	127
Espectro 92 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 33–40; 500 MHz; CDCl ₃).	127
Espectro 93 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 20–46; 500 MHz; CDCl ₃).	128
Espectro 94 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 12–44; 500 MHz; CDCl ₃).	128
Espectro 95 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 120–155; 500 MHz; CDCl ₃).	129
Espectro 96 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 148–158; 500 MHz; CDCl ₃).	129
Espectro 97 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 120–155; 500 MHz; CDCl ₃).	130
Espectro 98 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 141–157; 500 MHz; CDCl ₃).	130
Espectro 99 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 204–220; 500 MHz; CDCl ₃).	131
Espectro 100 - Mapa de contorno gHMBC de 67 (δ 148–158; 500 MHz; CDCl ₃).	131
Espectro 101 - Mapa de contorno gCOSY de 67 (δ 1,0–2,8; 500 MHz; CDCl ₃).	133
Espectro 102 - Mapa de contorno gCOSY de 67 (δ 6,8–7,1; 500 MHz; CDCl ₃).	133
Espectro 103 - Espectro de RMN de HOMODEC de 67 (H–irradiado, H–desacoplado) (500 MHz, CDCl ₃).	134
Espectro 104 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de 67 , irradiando δ 0,88 (H-12'; 500 MHz; CDCl ₃).	135
Espectro 105 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de 67 , irradiando δ 1,64 (H-2'; 500 MHz; CDCl ₃).	135
Espectro 106 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de 67 , irradiando δ 2,67 (H-1'; 500 MHz; CDCl ₃).	136
Espectro 107 - IES-EM alta resolução do alcalóide 69 .	137
Espectro 108 - Espectro de RMN de ¹ H de 69 (500 MHz, CDCl ₃).	138
Espectro 109 - Ampliação do espectro 108 (δ 1,1–1,8) do alcalóide 69 .	138
Espectro 110 - Ampliação do espectro 108 (δ 2,4–3,8) do alcalóide 69 .	139
Espectro 111 - Espectro de RMN ¹³ C de 69 (125 MHz, CDCl ₃).	140
Espectro 112 - Espectro de RMN de DEPT 135 de 69 (125 MHz, CDCl ₃).	141
Espectro 113 - Espectro de RMN de DEPT 90 de 69 (125 MHz, CDCl ₃).	141
Espectro 114 - Mapa de contorno gHMQC de 69 (500 MHz; CDCl ₃).	142
Espectro 115 - Mapa de contorno gHMQC de 69 (δ 14–23; 500 MHz; CDCl ₃).	142
Espectro 116 - Mapa de contorno gHMQC de 69 (δ 21–35; 500 MHz; CDCl ₃).	143
Espectro 117 - Mapa de contorno gHMQC de 69 (δ 34–46; 500 MHz; CDCl ₃).	143

Espectro 118 - Mapa de contorno gHMQC de 69 (δ 60–73; 500 MHz; CDCl ₃).	144
Espectro 119 - Mapa de contorno gHMQC de 69 (δ 118–127; 500 MHz; CDCl ₃).	144
Espectro 120 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (500 MHz; CDCl ₃).	145
Espectro 121 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 18–32; 500 MHz; CDCl ₃).	146
Espectro 122 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 23–33; 500 MHz; CDCl ₃).	146
Espectro 123 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 18–46; 500 MHz; CDCl ₃).	147
Espectro 124 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 22–36; 500 MHz; CDCl ₃).	147
Espectro 125 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 38–66; 500 MHz; CDCl ₃).	148
Espectro 126 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 60–64; 500 MHz; CDCl ₃).	148
Espectro 127 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 30–42; 500 MHz; CDCl ₃).	149
Espectro 128 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 120–155; 500 MHz; CDCl ₃).	149
Espectro 129 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 121–125; 500 MHz; CDCl ₃).	150
Espectro 130 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 150–155; 500 MHz; CDCl ₃).	150
Espectro 131 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 142–156; 500 MHz; CDCl ₃).	151
Espectro 132 - Mapa de contorno gHMBC de 69 (δ 206–220; 500 MHz; CDCl ₃).	151
Espectro 133 - Mapa de contorno gCOSY de 69 (500 MHz; CDCl ₃).	153
Espectro 134 - Mapa de contorno gCOSY de 69 (δ 1,4–3,8; 500 MHz; CDCl ₃).	153
Espectro 135 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de 69 , irradiando δ 3,67 (H-12'; 500 MHz; CDCl ₃).	154
Espectro 136 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de 69 , irradiando δ 2,68 (H-1'; 500 MHz; CDCl ₃).	155
Espectro 137 - IES-EM da subfração PDC09 F ₄ (16).	175
Espectro 138 - Espectro de massas de 9 por IE.	179
Espectro 139 - IES-EM da sub-fração BIO01 F ₇₋₉ .	185
Espectro 140 - IES-EM/EM do íon m/z 342 (sub-fração BIO01 F ₇₋₉).	186
Espectro 141 - IES-EM/EM do íon m/z 344 (sub-fração BIO01 F ₇₋₉).	187

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i> estudadas	52
Tabela 2 - Preparo do extrato etanólico de <i>S. spectabilis</i>	53
Tabela 3 - Dados de RMN ^1H e gCOSY de 1 (500 MHz, CDCl_3)	77
Tabela 4 - Dados de RMN ^{13}C , DEPT, gHMQC e gHMBC de 1	82
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e gCOSY de 9 (500 MHz, CD_3OD)	97
Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C , DEPT, gHMQC e gHMBC de 9	101
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 15 e 16 (500 MHz, CDCl_3)	111
Tabela 8 - Dados de RMN de 67 em CDCl_3^a	132
Tabela 9 - Dados de RMN de 69 em CDCl_3^a	152
Tabela 10 - Abundâncias isotópicas de 16	176
Tabela 11 - Concentrações avaliadas do precursor administrado	183

LISTA DE ABREVIATURAS

- AChE – acetilcolinesterase
- BIO – Ensaio de Biossíntese
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada
- CC – cromatografia em coluna
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- d – dubleto
- dq – duplo quadrupeto
- DSC – Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)
- DTT – 1,4-ditiotreitól
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético (dissódico)
- EESS-FI – extrato etanólico de *Senna spectabilis* flores
- EM – Espectrometria de Massas
- FE – Fase Estacionária
- FM – Fase Móvel
- gCOSY – **G**radient **C**orrelation **S**pectroscop**Y**
- gHMBC – **G**radient **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation
- gHMQC – **G**radient **H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**orrelation
- hex – hexano
- HOAc – ácido acético
- IClPt – revelador Iodocloroplatinato
- IES – Ionização por electrospray
- IES-EM – Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray
- MeOH – metanol
- m – multipeto
- NOESY – **N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**
- NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
- PDC – As duas primeiras letras são o código (**P**ivatto e **D**outorado), a terceira letra descreve o procedimento (**C**oluna) seguida do número
- PVPP – Polivinilpolipirrolidona
- qt – quintupeto

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze

SSFI- CH_2Cl_2 – *Senna spectabilis* flores fração dicloro metano

SSFr- CH_2Cl_2 – *Senna spectabilis* frutos fração dicloro metano

s – singleto

sl – singleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

J – constante de acoplamento (em Hertz)

t – tripleto

TRIS – triidroxiaminometano

δ – deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	Alcalóides	33
1.1.1	Alcalóides piperidínicos de <i>Senna</i> e <i>Cassia</i>	36
1.1.2	Outras fontes de alcalóides piperidínicos	39
1.1.3	Proposta biossintética para os alcalóides piperidínicos	42
1.1.4	Descrição botânica de <i>Senna spectabilis</i>	46
2	OBJETIVOS	48
3	MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1	Instrumentação	48
3.2	Materiais utilizados	50
3.2.1	Reagentes e solventes	50
3.3	Cromatografia	50
3.3.1	Reveladores utilizados	51
3.3.1.1	Revelador de iodocloroplatinato (detecção de alcalóides)	51
3.3.1.2	Revelador Dragendorff (detecção de alcalóides)	51
3.3.1.3	Revelador anisaldeído (detecção de substâncias com potencial nucleofílico)	51
3.3.1.4	Iodo sublimado (detecção de substâncias orgânicas)	51
3.4	Preparo do material vegetal	51
3.5	Partição líquido/líquido	53
3.6	Extração ácido-base	53
3.7	Preparo das amostras para EM e CLAE	54
3.8	Avaliação da atividade anticolinesterásica	54
3.8.1	Preparo das soluções:	55
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
4.1	Triagem das espécies que biossintetizam alcalóides	56
4.2	Estudo fitoquímico das flores de <i>S. spectabilis</i>	64
4.2.1	Extrato etanólico	64
4.2.2	Extrato CHCl ₃	68
4.3	Estudo fitoquímico das flores de <i>S. multijuga</i>	71
4.4	Elucidação estrutural dos alcalóides	72
4.4.1	Elucidação estrutural de 1	72

4.4.2	Elucidação estrutural de 9	90
4.4.3	Estereoquímicas relativa e absoluta dos alcalóides 1 e 9	106
4.4.4	Elucidação estrutural dos alcalóides 15 e 16	108
4.4.5	Estereoquímicas relativa e absoluta dos alcalóides 15 e 16	116
4.4.6	Elucidação estrutural do alcalóide 57	119
4.4.7	Elucidação estrutural do alcalóide 59	136
4.5	Avaliação da atividade anticolinesterásica	155
4.6	Otimização das condições cromatográficas em CLAE com detector <i>light scattering</i>	156
4.7	Experimentos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> com L-lisina-[U- ¹⁴ C] e acetato de sódio-1-[¹³ C]	168
4.7.1	Experimento <i>in vivo</i> (flores) de L-lisina-[U- ¹⁴ C]	168
4.7.2	Experimento <i>in vitro</i> (flores) com L-lisina-[U- ¹⁴ C]	171
4.7.2.1	Extração enzimática	171
4.7.2.2	Experimento enzimático	172
4.7.3	Experimento <i>in vivo</i> (flores) com acetato de sódio-1-[¹³ C]	173
4.7.4	Experimentos <i>in vivo</i> com acetato de sódio-1-[¹³ C] nas folhas de <i>S. spectabilis</i>	176
4.7.5	Germinação de sementes de <i>S. spectabilis</i>	180
4.7.6	Otimização das condições para os experimentos <i>in vivo</i> utilizando acetato de sódio	182
4.7.7	Experimento <i>in vivo</i> com acetato de sódio (CD ₃ ¹³ COONa) nas sementes de <i>S. spectabilis</i>	183
5	CONCLUSÕES	189
	REFERÊNCIAS	191

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas como fonte de medicamentos é uma prática constante e disseminada pela população ao longo dos anos que tem suas raízes na antiguidade, onde o homem primitivo intuitivamente buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas, como nutrição e cura de enfermidades. É provável que o emprego de plantas como medicamentos seja tão antigo quanto o próprio homem. Em estudos com chimpanzés realizados na Tanzânia verificou-se que estes ingeriam em jejum folhas de certas plantas que os livravam de vermes intestinais (MIGUEL; MIGUEL, 2000).

1.1 Alcalóides

O termo alcalóide foi cunhado em 1819 pelo farmacêutico alemão Carl Meissner, lingüisticamente derivado da palavra árabe *al-qali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida, representa os compostos nitrogenados farmacologicamente ativos encontrados predominantemente nas angiospermas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

O estudo dos alcalóides teve início em 1806 quando o farmacêutico alemão Friedrich Serturmer isolou pela primeira vez do ópio (*Papaver somniferum*) a morfina (alusão à Morfeu, deus dos sonhos na mitologia grega), cuja fórmula estrutural só foi proposta em 1925, por Robinson (Figura 1) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; YUNES; CALIXTO, 2001).



Figura 1 - Morfina, isolada do látex da papoula (*Papaver somniferum*).

Desde os primórdios da civilização o uso de extratos vegetais contendo alcalóides como medicamentos, venenos e poções mágicas já era observado, sendo um exemplo clássico a bebida preparada à base de cicuta que contem o alcalóide coniina, utilizada em execuções na Grécia antiga, como no caso do filósofo Sócrates no ano de 399 a.C. (Figura 2) (BOER, 1950).

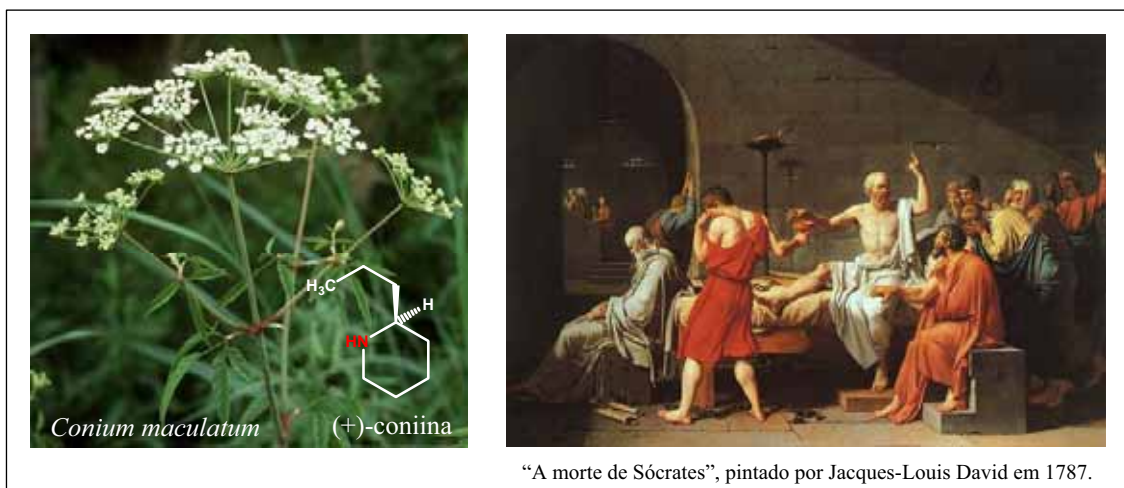


Figura 2 - Coniina (*Conium maculatum*), causadora da morte do filósofo grego Sócrates.

Durante o Império Romano, Lívia, esposa do Imperador Augusto, eliminava seus inimigos e adversários políticos assassinando-os com banquetes envenenados por beladona, fonte de atropina (SIMÕES et al., 2003). A rainha Cleópatra também utilizava este alcalóide, proveniente de extratos de *Hyoscyamus niger*, para dilatar suas pupilas e parecer mais sedutora a seus rivais políticos (Figura 3) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

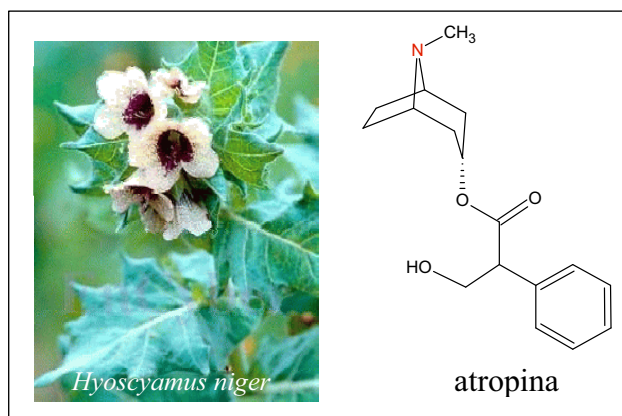


Figura 3 - Atropina, isolada de *Hyoscyamus niger*.

No Brasil, os índios da bacia Amazônica utilizavam o extrato à base de plantas (*Chondodendron* e *Strychnos*), conhecido como “curare”, para preparar dardos e flechas envenenadas que eram empregados na caça e nas guerras. Os curares são o exemplo da argúcia do índio sul-americano, que dentre diversas plantas, descobriu aquela que podia fornecer-lhe o veneno (*d*-tubocurarina), inócuo por via oral, porém uma única gota injetada era capaz de prostrar a presa em fração de segundos (Figura 4) (MARINI-BETTÒLO, 1973; BARREIRO, 1990; GOTTLIEB; MORS, 1978; PINTO, 1995).

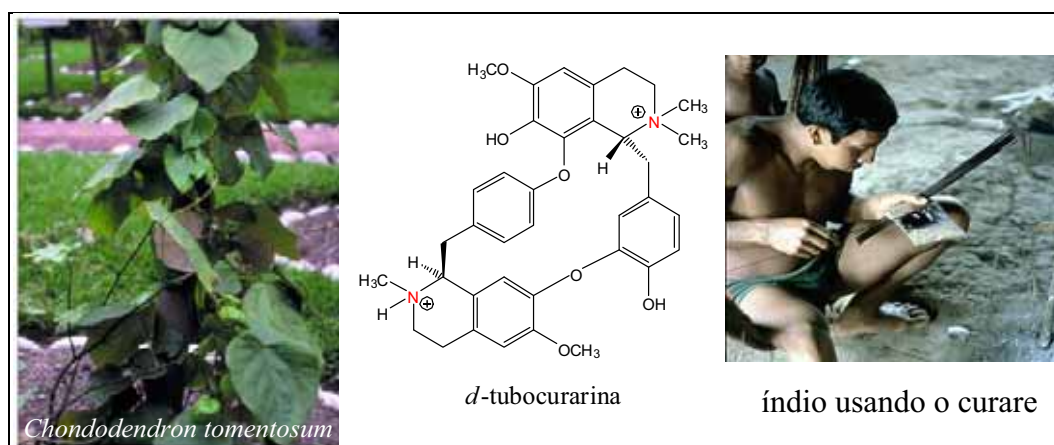


Figura 4 - Curare utilizado pelos índios nos dardos e flechas para a caça.

Desde a descoberta da morfina, mais de 12000 alcalóides já foram isolados, sendo que este vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural representa cerca de 20% das substâncias naturais descritas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Pelletier tentando estabelecer uma definição para essa classe de substâncias formulou que: *Um alcalóide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo nitrogênio num estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos.* Dessa definição, exclui-se compostos nitrogenados como aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso. Outras definições foram cunhadas por diferentes pesquisadores, porém nenhuma completamente abrangente (SIMÕES et al., 2003).

Alcalóides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. As substâncias com o átomo de nitrogênio não-pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas de protoalcalóides e compostos nitrogenados

com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (SIMÕES et al., 2003).

1.1.1 Alcalóides piperidínicos de *Senna* e *Cassia*

O primeiro relato de alcalóides em *Cassia excelsa* Schrad. (sin. *Senna spectabilis*) não descreve estruturas, mas testes específicos indicaram que as duas substâncias isoladas, cassilisina e cassilisidina, são alcalóides com atividade antimicrobiana (LIMA et al., 1958; CIFERRI; MACHADO; ARAUJO, 1958). Estudos fitoquímicos posteriores com a mesma espécie levaram ao isolamento de alcalóides piperidínicos, sugerindo que estas duas substâncias poderiam ser metabólitos da mesma classe.

Em 1964, foi isolada pela primeira vez a (-)-cassina (**1**) (Figura 5), presente nas folhas de *C. excelsa* (HIGHET, 1964), sendo que sua estrutura e estereoquímica foram discutidas e propostas por Highet e Highet (1966), porém a configuração absoluta foi estabelecida por Rice e Coke (1966). Em 1967, Lythgoe e Vernengo estudando *C. carnavalia* Speg. isolaram das folhas desta planta quatro alcalóides, sendo **1** o alcalóide majoritário e outros três inéditos: carnavalina (**2**), (+)-prosopinona (**3**) e o alcalóide D (**4**), cuja estereoquímica não foi definida (LYTHGOE et al., 1972). Posteriormente, Christofidis, Welter e Jadot (1977a; 1977b), estudando os extratos de *C. spectabilis* identificaram **1** e isolaram (-)-6-*iso*-carnavalina (**5**), (-)-espectalinina (**6**), (-)-6-*iso*-cassina (**7**) e (+)-espectalina (**8**) (Figura 5). Em 1971, **1** e **2** foram identificados nas flores de *C. jahnii*, utilizada na medicina popular dos Andes Venezuelanos como purgativo. Além destes, neste mesmo espécime também foram encontrados compostos antraquinônicos, bastante conhecidos pelo poder laxativo (MENDEZ, 1971).

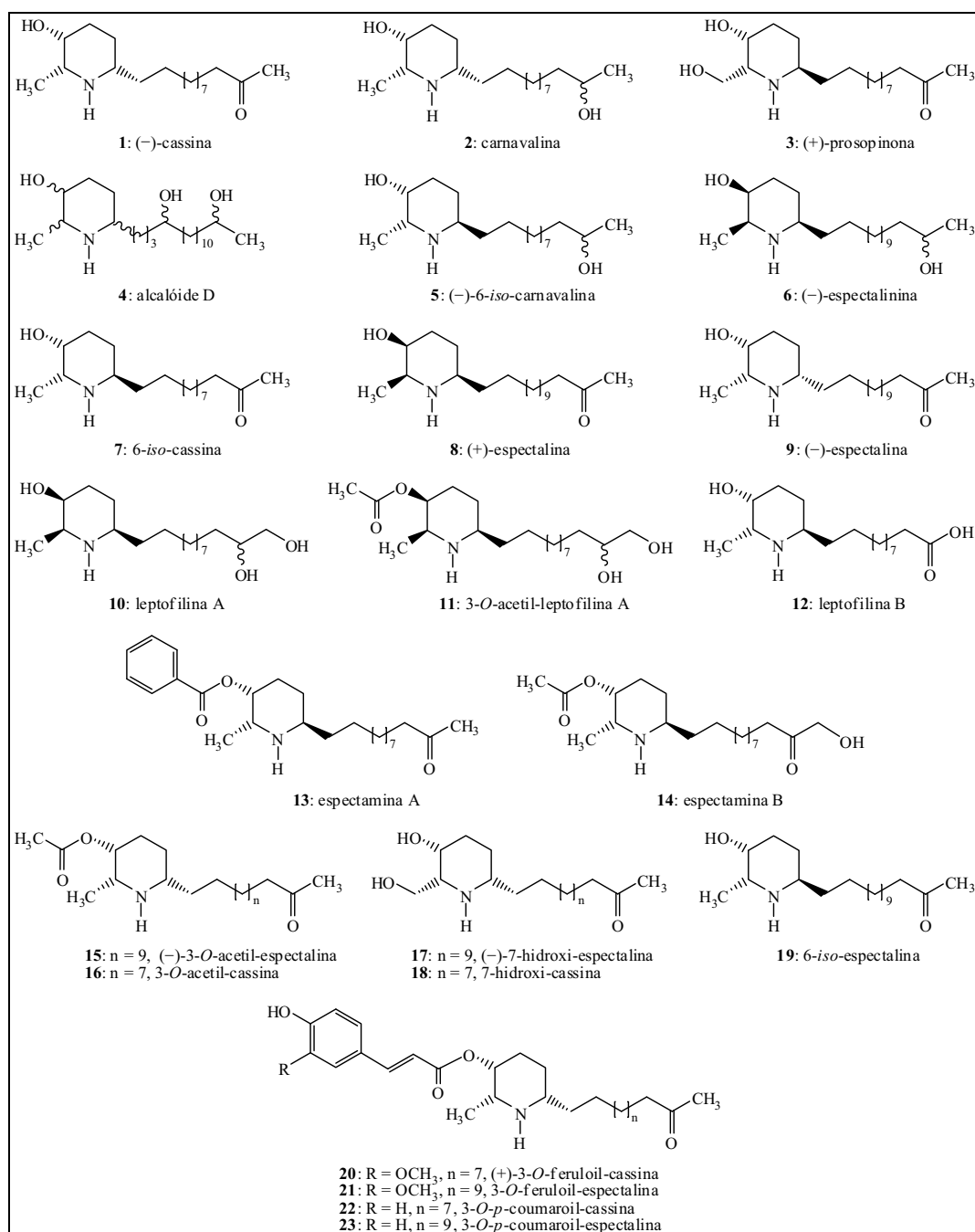


Figura 5 - Alcalóides piperidínicos isolados de espécies de *Senna* e *Cassia*.

No final da década de 80 Bolzani et al., (1999) estudou várias espécies de Rubiaceae da flora paulista, principalmente da Mata Atlântica e do Cerrado, com o objetivo de conhecer a composição química das várias espécies destes biomas e também detectar substâncias antifúngicas e antitumorais. Ao longo de quinze anos, mais de trinta espécies de Rubiaceae tiveram suas composições químicas e atividades biológicas avaliadas. Dentre as espécies estudadas estava *Cassia leptophylla*, identificada erroneamente nos primeiros estudos e posteriormente corrigida como *C. spectabilis* sin.

S. spectabilis, que não faz parte de Rubiaceae, mas foi selecionada em função de estudos preliminares que evidenciaram atividade citotóxica seletiva dos extratos das folhas, frutos e ramos no ensaio com linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, que indicava a presença de substâncias com potencial para atuar em células com deficiência no reparo do DNA (BOLZANI et al., 1995). O estudo químico das folhas desta espécie levou ao isolamento de sete alcalóides piperidínicos: (-)-espectralina (**9**), leptofilina A (**10**), 3-*O*-acetil-leptofilina A (**11**), leptofilina B (**12**), (-)-espectalinina (**6**), carnavalina (**2**) e 6-*iso*-carnavalina (**5**) (Figura 5), sendo que as substâncias **2**, **6** e **9** apresentaram atividade citotóxica seletiva nas linhagens de *S. cerevisiae*, indicativo de atividade antitumoral potencial (BOLZANI et al., 1995).

Estudos com uma espécie de *C. spectabilis* coletada na África resultaram no isolamento de dois alcalóides piperidínicos inéditos denominados espectaminas A (**13**) e B (**14**) (Figura 5), que foram identificados como inibidores específicos de ânion superóxido em macrófagos. Uma vez que estes ânions são produzidos pelo corpo humano e estão relacionados com processos inflamatórios, cânceres e hipertensão, substâncias inibidoras são potenciais fármacos para o tratamento de enfermidades relacionadas (KAMO et al. (2003).

Posteriormente, Viegas Junior et al. (2004), estudando as flores de *C. spectabilis* isolaram três novos alcalóides: (-)-3-*O*-acetil-espectralina (**15**), (-)-7-hidroxi-espectralina (**17**) e 6-*iso*-espectralina (**19**), além da (-)-espectralina (**9**) já descrita anteriormente (Figura 5). Dentre os diversos metabólitos isolados, o derivado **15** chamou atenção por apresentar uma unidade de acetilcolina internalizada na sua estrutura molecular, o que despertou o interesse para a avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase (Figura 6) (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003; VIEGAS JUNIOR et al., 2005a; VIEGAS JUNIOR et al., 2005b).

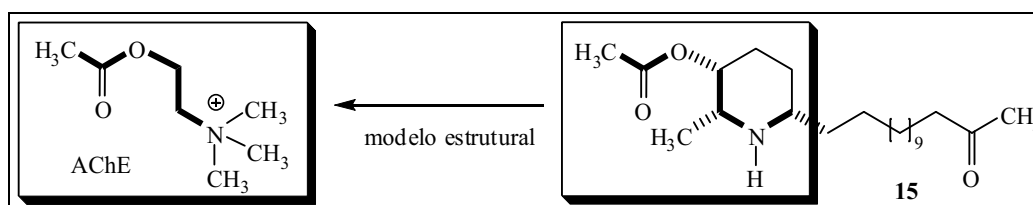


Figura 6 - Modelo molecular para inibidores de AChE.

Devido ao potencial farmacológico apresentado pelo cloridrato de **15** e citotoxicidade moderada, este derivado foi eleito como modelo de fármaco

anticolinesterásico e encontra-se em estudo de fase pré-clínica (VIEGAS JUNIOR et al., 2005a; VIEGAS JUNIOR et al., 2005b; U.S. Pat. Appl. 20080076799).

Estudo posterior realizado com os frutos de *S. spectabilis*, utilizando a espectrometria de massas *tandem* com ionização por electrospray, identificou a presença de séries homólogas de alcalóides piperidínicos inéditos (**1**, **2**, **6**, **9**, **15-23**) (PIVATTO et al., 2005). Recentemente os alcalóides **9**, **15** e **20** foram isolados dos frutos verdes de *C. spectabilis* (VIEGAS JUNIOR et al., 2007).

1.1.2 Outras fontes de alcalóides piperidínicos

Uma fonte singular de alcalóides piperidínicos é encontrada nas glândulas de espécies de formigas venenosas, como as do gênero *Solenopsis saevissima*, cuja ocorrência foi relatada nos Estados Unidos da Carolina do Norte até o Texas. Essas formigas sintetizam uma mistura de vários alcalóides muito tóxicos (**24-28**) (Figura 7) com atividade hemolítica, inseticida e antibiótica, de grande interesse biológico (McCONNELL, BLUM, 1971).

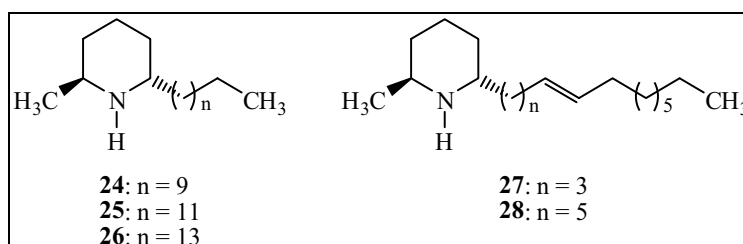


Figura 7 - Alcalóides piperidínicos bioativos isolados de *Solenopsis saevissima*.

O grande interesse nesses alcalóides levou Braekman e Dalozze (1996), a estudar a composição química desse veneno, isolando novos metabólitos chamados de solenopsinas (**29-34**) (Figura 8), que também foram estudados do ponto de vista biossintético.

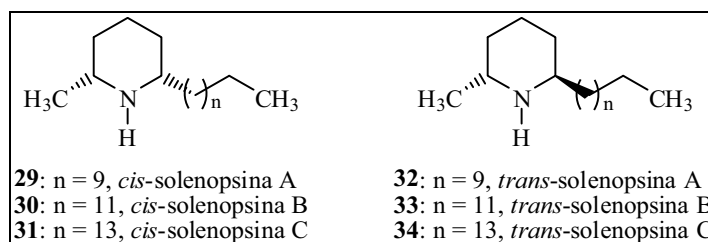


Figura 8 - Alcalóides piperidínicos isolados de *Solenopsis* ssp.

Outra fonte de alcalóides piperidínicos bioativos, são as espécies do gênero *Prosopis*. De *Prosopis africana* foram isolados os alcalóides prosopina (**35**), prosopinina (**36**), α -isoprosopinina (**37**), β -isoprosopinina (**38**), prosofilina (**39**), prosafrina (**40**) e prosafrinina (**41**) (RATLE et al., 1966; KHUONG-HUU et AL., 1972a; KHUONG-HUU et al., 1972b), já de *Prosopis spicigera* foi isolada a espicigerina (**42**) (JEWERS et al., 1974; JEWERS et al., 1976; PATERNE; BROWN, 1985). De *Prosopis juliflora* foram isolados os alcalóides julifloridina (**43**), juliflorina = juliprosopina (**44**) (AHMAD; BASHA; HAQUE, 1978; PATERNE; BROWN, 1985; AHMAD; KHAN; AHMAD, 1992; OTT-LONGONI; VISWANATHAN; HESSE, 1980), juliprosina (**45**) (DATWYLER et al., 1981), juliprosinena (**46**), juliflorinina (**47**; AHMAD; SULTANA; QAZI, 1989), 3''''-oxo-juliflorina = 3''''-oxo-juliprosopina (**48**), 3-oxo-juliprosina (**49**), 3'-oxo-juliprosina (**50**), secojuliprosopinal (**51**), julifloricina (**52a e 52b**), isojuliprosina (**53**) (NAKANO et al., 2004a; NAKANO et al., 2004b; NAKANO, 2010). De *Prosopis Alba* foi isolado o alcalóide **54** (Figura 9) (ASTUDILLO et al., 1999).

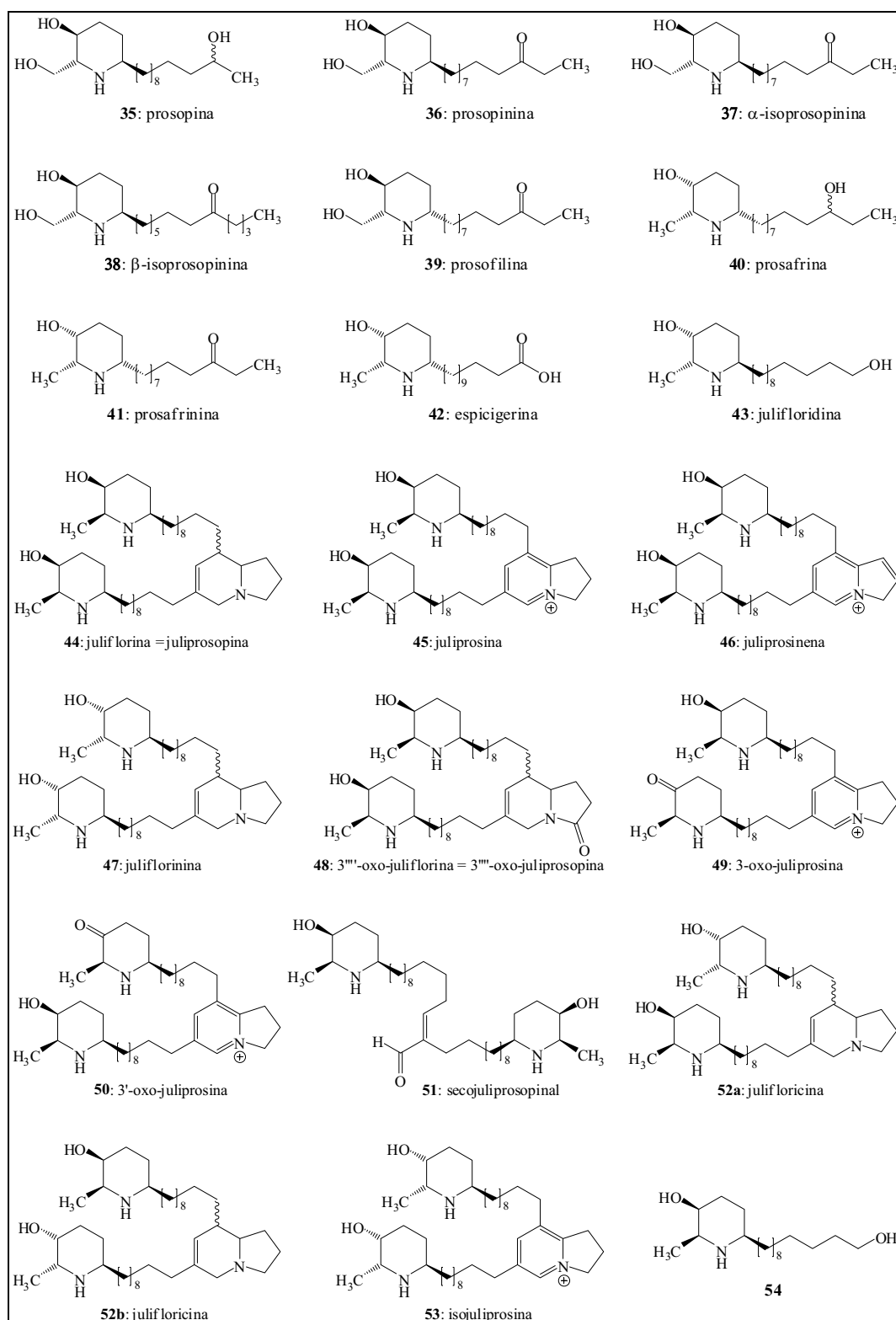


Figura 9 - Alcalóides piperidínicos isolados de espécies de *Prosopis*.

Outros alcalóides piperidínicos com estruturas diméricas como a carpaína (**55**) foram isolados de *Carica papaya* L. (GOVINDACHARI; NAGARAJAN; VISWANATHAN, 1965). De *Azima tetraantha* Lam. foram isoladas a azimina (**56**) e

azcarpina (**57**) (Figura 10) (SMALBERGER; RALL; WAAL, 1968; RALL; SMALBERGER; WAAL, 1967).

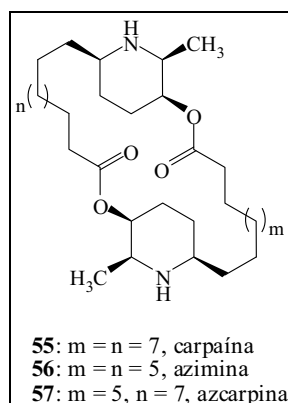


Figura 10 - Alcalóides piperidínicos isolados de *Carica papaya* e *Azima tetracantha*.

1.1.3 Proposta biossintética para os alcalóides piperidínicos

Os alcalóides piperidínicos apresentam uma grande diversidade química, sendo metabolizados por animais, microrganismos e plantas (O'DONOVAN; KEOGH, 1968). Devido a essa diversidade torna-se difícil estabelecer uma rota biossintética comum a todos esses sistemas. Devido ao conhecimento milenar das propriedades tóxicas da cicuta (*Conium maculatum*), seus alcalóides vem sendo alvo de vários estudos ao longo dos anos objetivando estabelecer a rota biossintética responsável por essa classe de metabólitos em plantas superiores (Figuras 11-13).

A biogênese para o núcleo piperidínico foi proposta pela primeira vez por Robinson (1917), onde a lisina (I) seria o precursor do anel piperidínico. Uma etapa de desaminação oxidativa, seguida de descarboxilação do aminoácido levaria a um intermediário Δ^1 -piperideína (II). A condensação desta imina (II) com ácido acetoacético (III, acetoacetyl CoA) leva ao intermediário IV, que após descarboxilação seguida de redução levaria aconiina (**58**) (Figura 11).

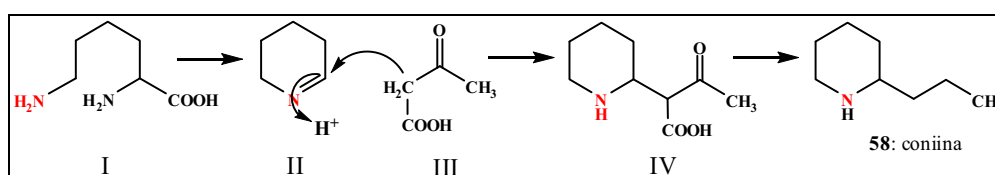


Figura 11 - Biogênese da coniina a partir da lisina.

Uma segunda alternativa de biogênese seria a condensação de unidades de ácido acético (acetil CoA), levando a um policetídeo com oito átomos de carbono. Sucessivas reações de redução levariam ao 5-ceto-octanal, que por reação de transaminação seguida de ciclização levaria a coniceína (**59**), intermediário direto da coniina (**58**), encontrado na cicuta (Figura 12) (LEETE, 1964).

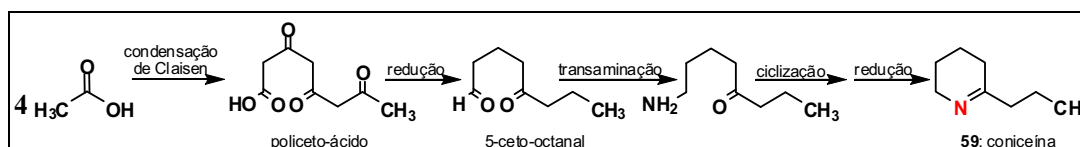


Figura 12 - Biogênese da coniceína a partir do acetato.

Na tentativa de determinar qual a via responsável pela biossíntese dos alcalóides da cicuta, Leete (1964), influenciado pela proposta de Robinson (1917), realizou experimentos com DL-lisina-[2- ^{14}C] e cadaverina-[1,5- ^{14}C], precursor direto do núcleo piperidínico da anabasina (**66**). Nesse experimento foi detectada radioatividade nos tecidos da planta, porém não foi observada incorporação no extrato alcaloídico. Nessa mesma época, Schiedt e Hoss acreditavam ter conseguido incorporar L-lisina-[U- ^{14}C], produzindo coniina (**58**) radioativa. Entretanto não foram realizados estudos de degradação para confirmar se o radioisótopo estava presente no anel piperidínico, isso levou a suposição que a radioatividade poderia ser atribuída à metabolização da L-lisina-[U- ^{14}C] para unidades radioativas de acetato que seriam então, incorporadas pela coniina (**58**) (LEETE, 1964; LÓPEZ; CID; BIANCHINI, 1999).

Dando continuidade aos estudos (LEETE, 1964), foram realizados experimentos com acetato de sódio-[1- ^{14}C], cujo extrato alcaloídico apresentou radioatividade. Depois de isolados, estudos de degradação confirmaram a incorporação do radioisótopo pela coniina (**58**) e conhidrina (**62**), comprovando assim a biossíntese dos alcalóides da cicuta pela via do acetato (Figura 13) (LÓPEZ; CID; BIANCHINI, 1999; VETTER, 2004).

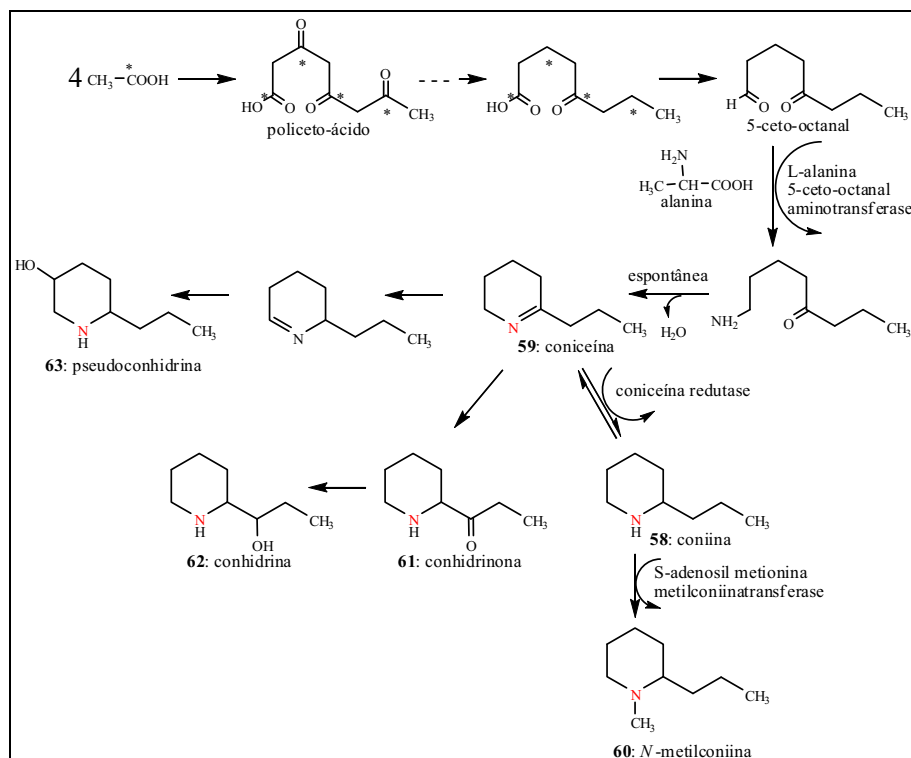


Figura 13 - Biossíntese dos alcalóides da cicuta (*Conium maculatum*).

A pinidina (**64**) isolada de *Pinus jeffreyi*, apresenta biossíntese semelhante à coniina (**58**), experimentos com acetato de sódio-[1- 14 C], e malonato de dietila-[1- 14 C] comprovaram a hipótese proposta (Figura 14) (LEETE; LECHLEITER; CARVER, 1975; DEWICK, 2002)

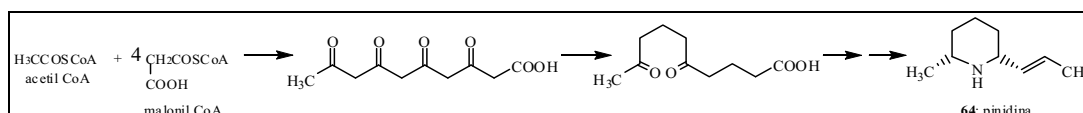


Figura 14 - Biossíntese da pinidina (*Pinus jeffreyi*).

O alcalóide peletierina (**65**), isolado das cascas das raízes da romãzeira (*Punica granatum*), apresenta biossíntese mista, cujo anel piperínico tem origem na lisina e cadeia lateral a partir de duas unidades de acetil-CoA, como proposto por Robinson (1917). Estudos de marcação isotópica comprovam esta hipótese e indicaram que o α -amino é perdido durante a biossíntese, enquanto o ϵ -amino é retido. Também foi observado que a incorporação de lisina-[2- 14 C], gerava peletierina (**65**) marcada somente no carbono dois (Figura 15). Esses dados indicam que a biossíntese de **65** não tem a cadaverina como intermediário (CLAYDEN, 2000; LEETE, 1967). Outro alcalóide [anabasina (**66**)], encontrado no tabaco (*Nicotiana glauca*), tem biossíntese

semelhante à peletierina (**65**), no entanto experimentos com radioisótopos mostraram que a cadaverina é incorporada com maior eficiência que a lisina (Figura 15) (LEETE, 1956; LEETE; GROS; GILBERTSON, 1964).

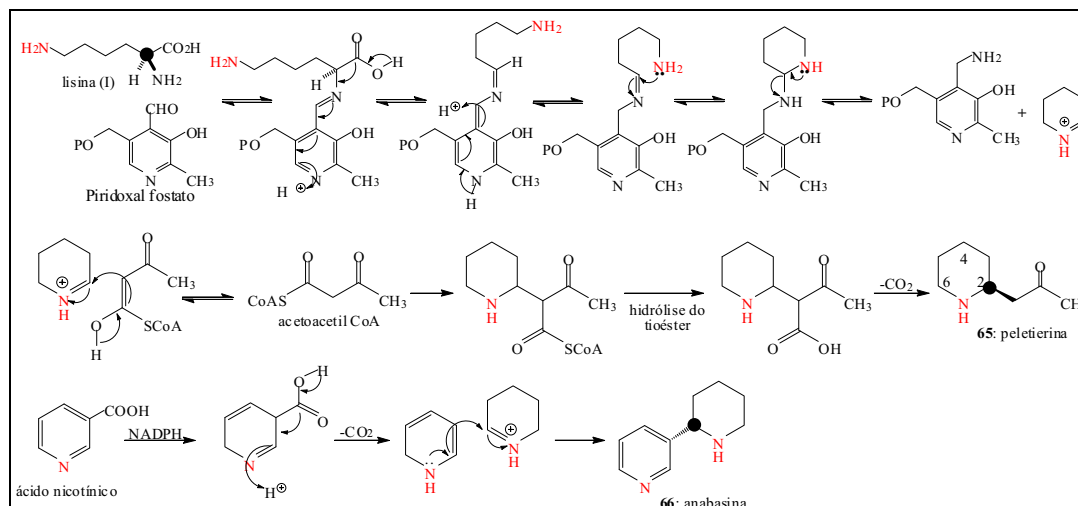


Figura 15 - Biossíntese da peletierina (*Punica granatum*) e anabasina (*Nicotiana glauca*).

Poucos estudos sobre a biossíntese dos alcalóides 3-piperidinóis-2,6-dissubstituídos estão descritos na literatura até o momento, no entanto Leete (1975), ao elucidar a biossíntese da pinidina (**64**), descreve a biogênese da espicigerina (**42**) (*Prosopis spicigera*), com base na semelhança estrutural entre estes alcalóides (Figura 16). Uma vez que a espicigerina (**42**) apresenta retenção da carboxila no final da extensão da cadeia lateral (C-6), que seria uma evidência do acetato como precursor. A leptofilina B (**12**), isolada de *Senna spectabilis*, também apresenta uma grande semelhança estrutural com **42**, o que indicaria uma via biossintética comum, no entanto o número de metilenos na cadeia lateral é menor e não há relatos de estudos de marcação isotópica para confirmação da biogênese destes alcalóides (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995; BOLZANI et al., 1999).

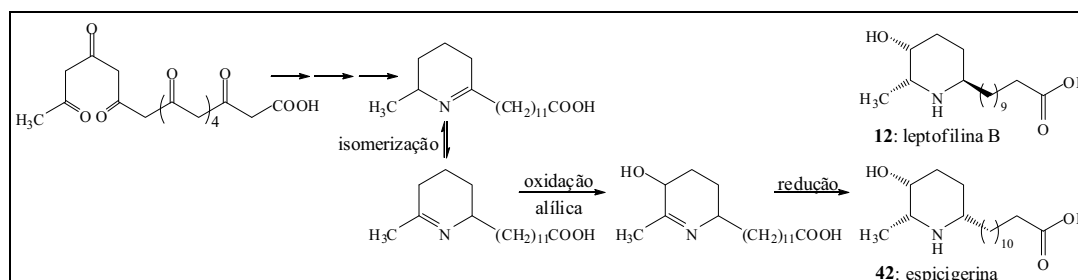


Figura 16 - Biogênese da espicigerina (*Prosopis spicigera*).

A carpaína (**55**) foi isolada das folhas de *Carica papaya* e teve sua biossíntese elucidada a partir de experimentos com acetato-[2-¹⁴C], lisina-[U-¹⁴C] e mevalonato-[2-¹⁴C], que demonstraram maior eficiência na incorporação do primeiro, indicando este como precursor das vias biossintéticas (Figura 17) (BEVAN; OGAN, 1964; LEETE, 1967; BRUNETON, 1999).

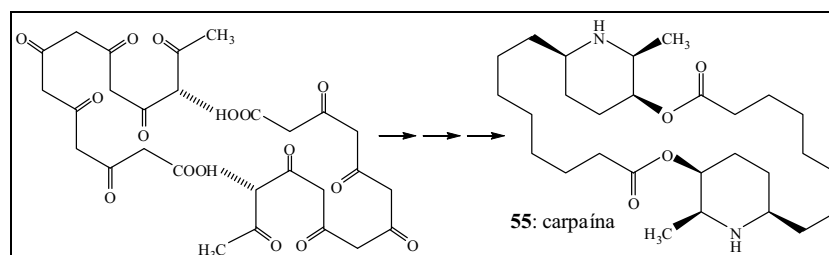


Figura 17 - Biogênese da carpaína (*Carica papaya*).

Até o momento poucos estudos existem na literatura sobre a biossíntese dos 3-piperidinóis-2,6-dissubstituídos. Este tipo de alcalóide apresenta interesse farmacológico, principalmente aqueles acumulados em *Senna spectabilis*, com propriedades sobre o sistema nervoso central, o que motivou o presente estudo de determinação das vias biossintéticas visando estudos adicionais de biologia molecular para futuramente potencializar a produção desses metabólitos secundários na espécie.

1.1.4 Descrição botânica de *Senna spectabilis*

Com o novo sistema de classificação taxonômica adotado para a família Leguminosae, várias espécies de *Cassia* que eram tidas como sinônimas de *Senna*, foram reclassificadas passando para o gênero *Senna*, considerado morfologicamente distinto, outras espécies continuaram como *Cassia* e algumas continuam como sinônimo de *Senna*. Esta família, uma das maiores dentre as Angiospermae, pela nova classificação passou a ser denominada Fabaceae e está subdividida em três subfamílias: Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinioideae. Nesta última, estão incluídos os gêneros *Cassia* e *Senna*, bastante estudados, devido à importância de seus usos na medicina popular (RIBEIRO et al., 1999, VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Senna spectabilis (Figuras 18) é uma planta arbórea, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), sub-família Caesalpinioideae, conhecida popularmente como são-joão, cássia-do-nordeste, canafístula-de-besouro e pau-de-ovelha, possuindo como

sinonímias botânicas *Cassia spectabilis*, *Cassia excelsa* W. Schrad. e *Cassia fastigiata* Nees (LORENZI, 2002; VIEGAS JUNIOR et al., 2004). É decídua¹, heliófita², seletiva xerófila³, pioneira e característica do nordeste semi-árido (caatinga), mas também é comum no cerrado do estado de São Paulo. Ocorre preferencialmente em solos mais profundos, bem drenados e de razoável fertilidade (LORENZI, 2002).

Pode atingir de 6–9 m de altura, com tronco de 30–40 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas pinadas⁴, tendo de 10–20 pares de folíolos de 2–4 cm de comprimento. Sua madeira, devido às limitações de tamanho, é aproveitada apenas para a confecção de objetos leves, caixotaria, lenha e carvão. A árvore é ornamental durante o longo período em que permanece florida, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo em geral. Pelo porte pequeno e beleza de sua florada, é ideal para arborização de ruas, o que já vem sendo feito em muitas cidades do Estado de São Paulo. O período de floração ocorre durante os meses de dezembro–abril, já a maturação dos frutos ocorre nos meses de agosto–setembro (LORENZI, 2002).

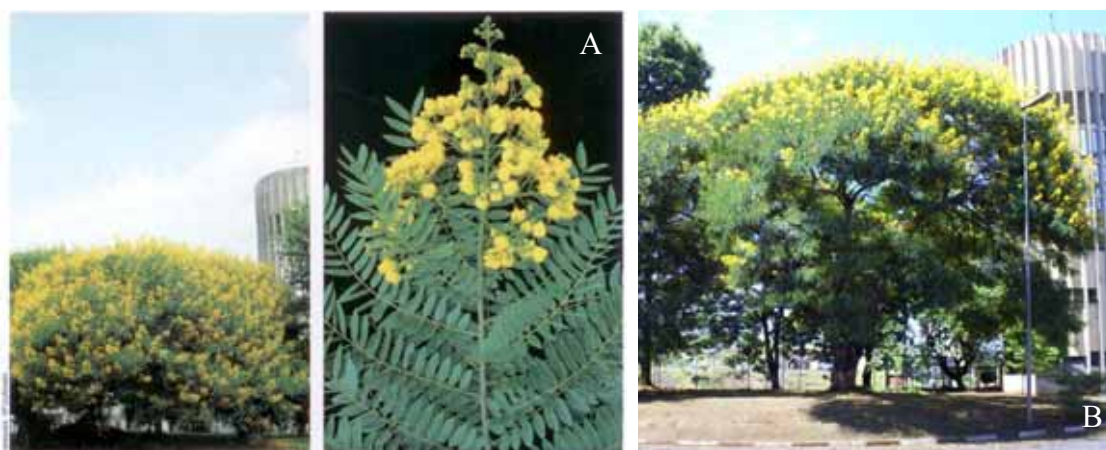


Figura 18 - *Senna spectabilis*, detalhes da planta: flores e folhas (A: LORENZI, 2002; B: foto tirada do mesmo espécime no terminal rodoviário de Araraquara).

¹ decídua: vegetal que perde suas folhas numa estação específica do ano.

² heliófita: vegetal que necessita da luminosidade solar para o desenvolvimento.

³ xerófila: vegetal que vive em ambiente seco e apresenta adaptações estruturais e funcionais que minimizam a perda de água por evaporação, próprio de regiões áridas ou com longo período de estiagem.

⁴ pinadas: folhas com mais de três folíolos saindo de vários pontos na raque central, ex.:



2 OBJETIVOS

- ✓ Avaliação do perfil alcaloídico de algumas espécies de *Senna* e *Cassia*.
- ✓ Isolamento e determinação estrutural dos alcalóides (–)-cassina e (–)-espectralina das flores de *S. spectabilis*, que foram utilizados como padrões para os estudos de biossíntese.
- ✓ Avaliação da atividade anticolinesterásica dos alcalóides isolados.
- ✓ Experimentos de biossíntese (*in vivo* e/ou *in vitro*) utilizando L-lisina-[U-¹⁴C], acetato de sódio-1-[¹³C] e CD₃¹³CO₂Na.
- ✓ Desenvolvimento de metodologias rápidas [espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (injeção direta) e/ou por cromatografia gasosa acoplada com espectrômetro de massas de impacto eletrônico (CG-EM)] para analisar as frações alcaloídicas obtidas dos experimentos de biossíntese.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Instrumentação

As análises espectrométricas, polarimétricas, cromatográficas, ponto de fusão e pureza, foram realizadas utilizando-se os seguintes equipamentos:

- ✓ Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics ultrOTOFG com ionização por *electrospray*. As amostras foram solubilizadas em MeOH e introduzidas utilizando seringa (100 µL), adaptada a uma bomba de infusão com fluxo 100 µL h⁻¹. O capilar foi aquecido a 150 °C com fluxo de gás nebulizante 4 L min⁻¹ e 4 kV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.
- ✓ Cromatografo de alta eficiência Shimadzu® composto pelos seguintes módulos: bombas LC-8A, degaseificador SPD-10 AVP, autoinjeter SIL-10AF, detectores de UV-Vis SPD-10 AVP e evaporativo de espalhamento de luz ELSD-LT, controlados pelo programa LC Workstation CLASS-VP. Para o desenvolvimento do método foram utilizadas as colunas: Phenomenex Gemini 5 µm, C18, 250 x 4,6 mm, n°. 286293-11, Monolítica Onyx, C18, 100 x 4,6 mm, n°. 050560-56 e coluna semi-preparativa Phenomenex Synergi Hydro 4 µm, C18, 100 x 21,20 mm, n°. 347085-1.

- ✓ Espectrômetro de RMN Varian INOVA 500 (11,7 Tesla), operando em frequência de 500 MHz para os núcleos de hidrogênio e 125 MHz para o carbono.
- ✓ Polarímetro da marca PerkinElmer, modelo 341 LC.
- ✓ Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa da marca Shimadzu[®] modelo QP 2010. Coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB-5MS (0,25 µm de espessura de filme); O equipamento foi operado nas seguintes condições: temperatura do injetor de 240 °C; programação da coluna com temperatura inicial de 100 °C, permanecendo por 2 min, sendo acrescidos 12 °C/min até atingir 250 °C, permanecendo por 10 min em seguida foram acrescidos 15 °C/min até atingir 280 °C, permanecendo por 10 min; tempo total da análise: 36 min; gás carreador hélio (1 mL min⁻¹); pressão inicial na coluna: 73,0 kPa; taxa de split 1:30 e volume injetado de 1 µL (1% de solução em diclorometano). Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto: 70 eV; scan speed (velocidade de aquisição dos dados) foi de 769 u.m.a./s; e fragmentos de *m/z* 40 a 400 Da, medidos a intervalos de 0,5/s.
- ✓ Aparelho de DSC da marca TA Instruments DSC-Q10 com sensor metálico, que opera da temperatura ambiente até 750 °C (temp. máxima), sendo controlado pelo software TA Instruments. A calibração do sistema foi realizada utilizando-se um padrão de Índio 99%, conforme as recomendações fornecidas pelo fabricante. O Suporte da amostra foi um cadinho de alumínio com tampa perfurada e como referência um cadinho similar vazio, colocados sobre um sensor térmico metálico, responsável pela medida de fluxo de calor. As curvas DSC foram obtidas até a temperatura de 200°C, procurando-se reproduzir o mais fielmente possível as condições de análise para todas as amostras e referência, sendo utilizada uma razão de aquecimento de 2 °C min⁻¹, com massa de amostra 1 mg e fluxo de ar sintético de 50 mL min⁻¹.

3.2 Materiais utilizados

3.2.1 Reagentes e solventes

- ✓ Acetato de sódio [$1-^{13}\text{C}$] 99% de ^{13}C : Sigma-Aldrich, prod. n. 27,929-3
- ✓ Acetato de sódio [$1-^{13}\text{C}-2-d_3$] ($\text{CD}_3^{13}\text{CO}_2\text{Na}$) 99% de ^{13}C , 99% de D: Sigma-Aldrich, prod. n. 29,804-2
- ✓ L-lisina-[$\text{U}-^{14}\text{C}$], 0,11 mCi/mL; 240 mCi/mmol: Sigma-Aldrich, prod. n. L-3273
- ✓ Acetonitrila (CH_3CN): Mallinkrodt Chromar[®] HPLC
- ✓ Metanol (CH_3OH): J. T. Baker; Baker Analyzed[®] HPLC
- ✓ Ácido acético glacial ($\text{H}_3\text{CCO}_2\text{H}$), ensaio mín. 99,7%: Quemis P.A. ACS
- ✓ Ácido sulfúrico (H_2SO_4), ensaio (H_2SO_4) 95,0–98,0%: Quemis P.A. ACS
- ✓ Cloreto de metileno (CH_2Cl_2): Synth P.A. ACS
- ✓ Clorofórmio (CHCl_3): Synth P.A. ACS
- ✓ Hidróxido de amônio (NH_4OH), ensaio (NH_3) 28,0–30,0%: Synth P.A. ACS
- ✓ Solventes grau técnico, purificados em destilador semi-industrial com coluna de fracionamento (4 m de altura): hexano, acetato de etila, etanol, metanol, acetona.
- ✓ Água ultrapura em aparelho da marca Milli-Q plus
- ✓ Solventes deuterados:
 - Clorofórmio-*d* 99,8% CIL
 - Metanol-*d*₄ 99,8% CIL

3.3 Cromatografia

Para as separações cromatográficas em coluna aberta foram utilizadas as seguintes fases estacionárias:

- ✓ Alumina neutra (Al_2O_3) Sigma
- ✓ Sílica gel (SiO_2) para cromatografia flash (0,035 – 0,070 mm, diâmetro de poro ca 6 nm) ACROS Organics

3.3.1 Reveladores utilizados

Para as visualizações em placas cromatográficas foram utilizados os seguintes reveladores (TOUCHSTONE; DOBBINS, 1978):

3.3.1.1 Revelador de iodocloroplatinato (detecção de alcalóides)

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV) ($\text{H}_2(\text{PtCl}_6) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Solução B: Solução aquosa a 10% (m/m), de iodeto de potássio (KI).

Solução spray: Misturar solução A, solução B e H_2O (1:9:10)

3.3.1.2 Revelador Dragendorff (detecção de alcalóides)

Solução A: 0,85 g de subnitrato de bismuto (BiONO_3) numa mistura de 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água.

Solução B: 8 g de iodeto de potássio (KI), em 20 mL de água.

Solução estoque: Misturar A e B (1:1)

Solução spray: Misturar solução estoque, HOAc e H_2O (1:2:10)

3.3.1.3 Revelador anisaldeído (detecção de substâncias com potencial nucleofílico)

Anisaldeído/HOAc/MeOH/ H_2SO_4 (1:20:170:10).

Obs.: Adicionar os reagentes nessa mesma ordem e de preferência em banho de gelo.

3.3.1.4 Iodo sublimado (detecção de substâncias orgânicas)

Foi utilizada câmara de vidro saturada por vapor de Iodo sólido (I_2).

3.4 Preparo do material vegetal

O material vegetal (flores) das espécies de *Senna* e *Cassia* foi coletado em Araraquara e as exsiccatas foram depositadas no Instituto de Botânica de São Paulo (Tabela 1). As flores foram maceradas e submetidas à extração com etanol

imediatamente após a coleta (planta *in natura*). Os processos de extração foram repetidos três vezes, com intervalo de cinco dias entre uma extração e outra, obtendo-se assim os seis extratos das espécies selecionadas.

Tabela 1 - Espécies de *Senna* e *Cassia* estudadas

Espécie *	Exsicata	Local da coleta	
		Latitude (sul)	Longitude (oeste)
<i>S. spectabilis</i> (DC.) Irwin & Barneby	SP 384 109	21°48'26,7"	48°11'28,4"
<i>S. multijuga</i> (Rich.) Irwin & Barneby	SP 384 103	21°48'16,5"	48°12'24,1"
<i>S. macranthera</i> (Collad.) Irwin & Barneby	SP 384 104	21°48'46,0"	48°11'35,9"
<i>S. velutina</i> (Vogel) Irwin & Barneby	SP 384 108	21°48'26,2"	48°11'29,5"
<i>C. fistula</i> L	SP 384 110	21°48'00,7"	48°11'14,8"
<i>C. leptophylla</i> Vogel	SP 370 916	—	—

* As identificações foram feitas pela profa. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo.

Para o isolamento dos alcalóides, foram coletadas flores de *S. spectabilis* (38 Kg) que foram secas (7,9 Kg) em estufa com circulação de ar por cinco dias (Figura 19). Em seguida as flores foram trituradas em moinho de facas e submetidas à extração com etanol. O processo de extração foi repetido cinco vezes com intervalo de sete dias entre as extrações (Tabela 2).



Figura 19 - Flores *in natura* e secas em estufa com circulação de ar.

Tabela 2 - Preparo do extrato etanólico de *S. spectabilis*

Extração	Massa de extrato (g)
1 ^a extração	397,38
2 ^a extração	471,04
3 ^a extração	418,43
4 ^a extração	334,10
5 ^a extração	258,47
total	1.879,42

3.5 Partição líquido/líquido

O extrato etanólico (31,11 g, EESS-FI) foi dissolvido em metanol/água (4:1) e submetido à partição com hexano e diclorometano sucessivamente (Figura 20).

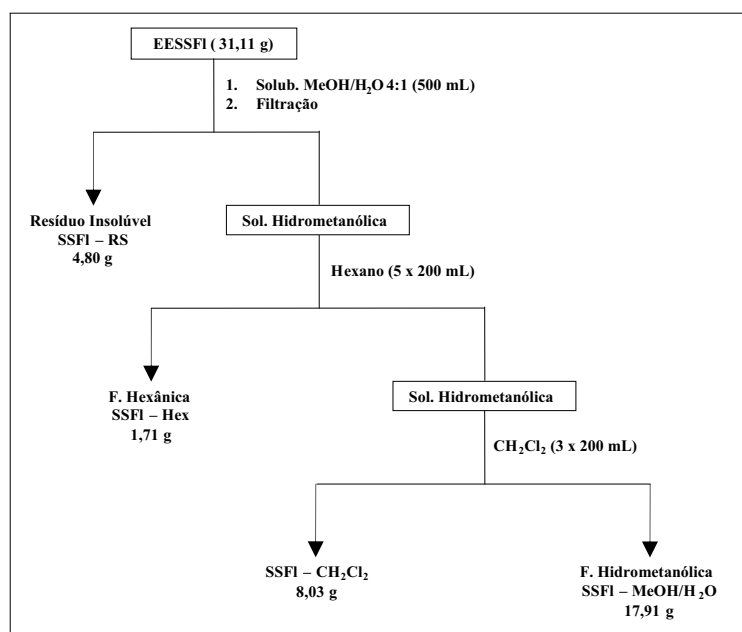


Figura 20 - Partição líquido/líquido do EESS-FI de *S. spectabilis*.

3.6 Extração ácido-base

Para a extração ácido/base foram pesados 2 g de cada um dos extratos (Tabela 1), que foram solubilizados em solução aquosa ácida a 5%, filtrados e particionados com hexano. Em seguida a solução aquosa ácida foi basificada e

particionada com CH_2Cl_2 para fornecer a fração alcaloídica (Figura 21) (SRIPHONG et al., 2003).

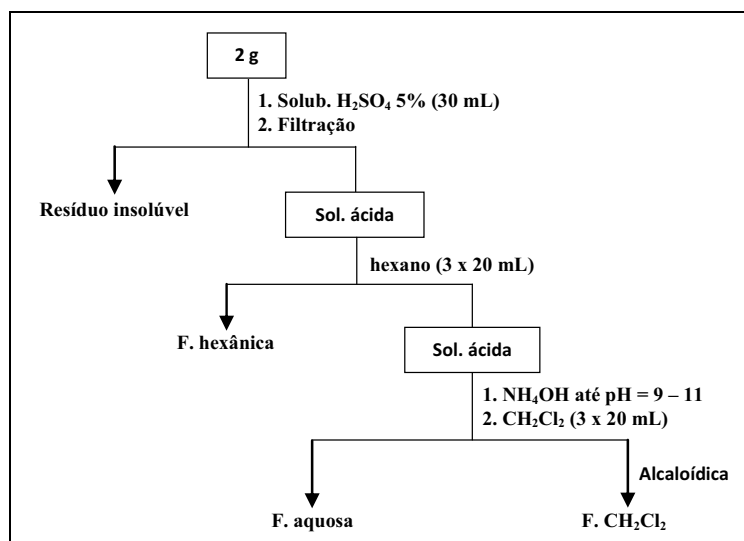


Figura 21 - Extração ácido/base.

3.7 Preparo das amostras para EM e CLAE

As amostras foram pesadas (1 mg, fração alcaloídica), solubilizadas em metanol (1 mL) e filtradas utilizando um sistema constituído de seringa adaptada com uma membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), diâmetro de poro de 0,45 μm da marca Gelman. O filtrado foi coletado em frasco de 1,5 mL e submetido à análise.

3.8 Avaliação da atividade anticolinesterásica

O ensaio quali e semi-quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD), consiste no desenvolvimento de uma cromatoplaça com a substância em análise, juntamente com um controle positivo (galantamina ou fisostigmina) inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (Figura 22). Para os ensaios semi-quantitativos (Limite de detecção) foram aplicadas quantidades conhecidas e em ordem decrescente de massa, para encontrar a menor quantidade inibidora de AChE que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia, a cromatoplaça foi borrifada com a solução da enzima (Solução A) e incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos. Em seguida borrifada com a solução do revelador (Solução D). A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de halo branco

sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade enzimática. A Figura 22 mostra um esquema das reações que se sucedem até o aparecimento da coloração na cromatoplaca (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

Os resultados foram observados e fotografados em câmera fotográfica Epson e os valores de R_f calculados para os halos onde houve inibição da enzima.

3.8.1 Preparo das soluções:

Preparo do tampão: 0,313 g Tris/HCl em 40 mL de H₂O deionizada (ajustar pH ~7,8)

Solução A: A enzima acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto n° C2880) é previamente dissolvida em 1 mL da solução tampão Tris/HCl, pH ~ 7,8. Dessa solução, 200 µL são diluídos em 30 mL do tampão e adicionado 30 mg de albumina bovina;

Solução B: 12,5 mg de acetato de 1-naftila em 5 mL de etanol;

Solução C: 50 mg do sal Fast Blue B em 20 mL de água destilada;

Solução D: juntar as solução B e C.

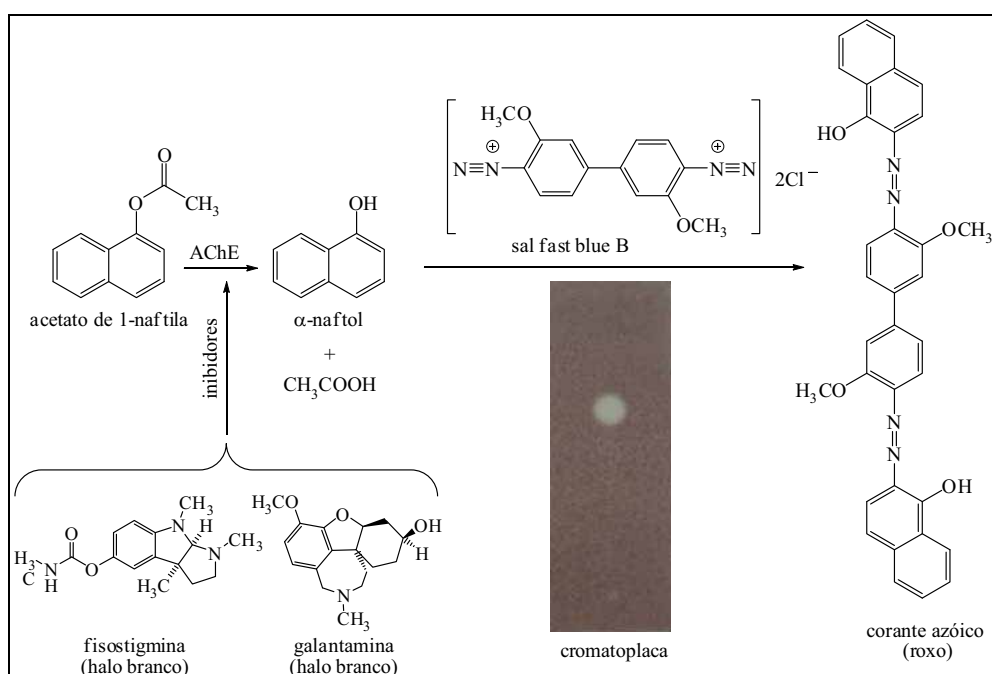


Figura 22 - Reações químicas envolvidas no ensaio por bioautografia.

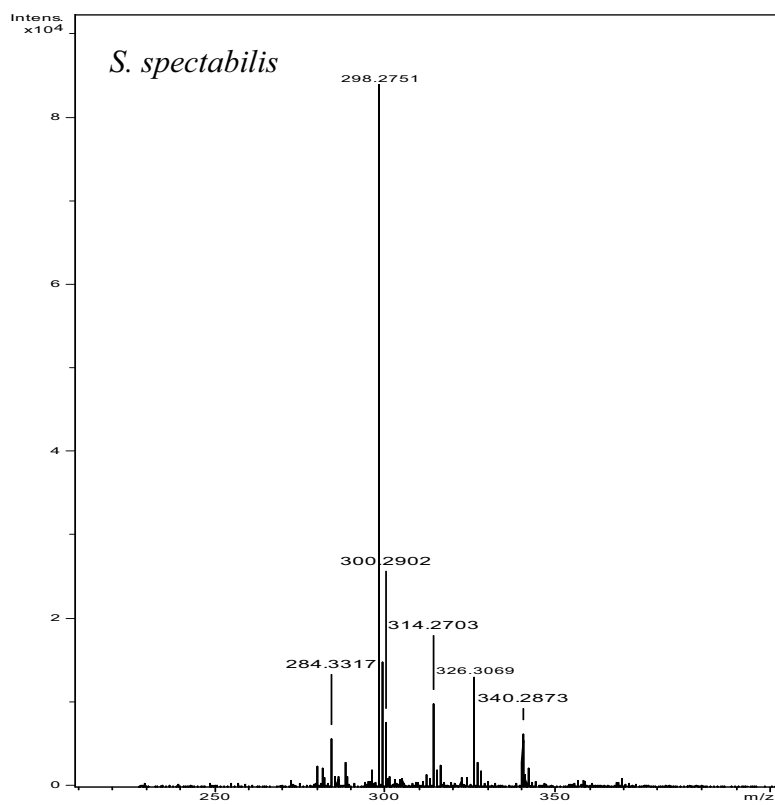
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem das espécies que biossintetizam alcalóides

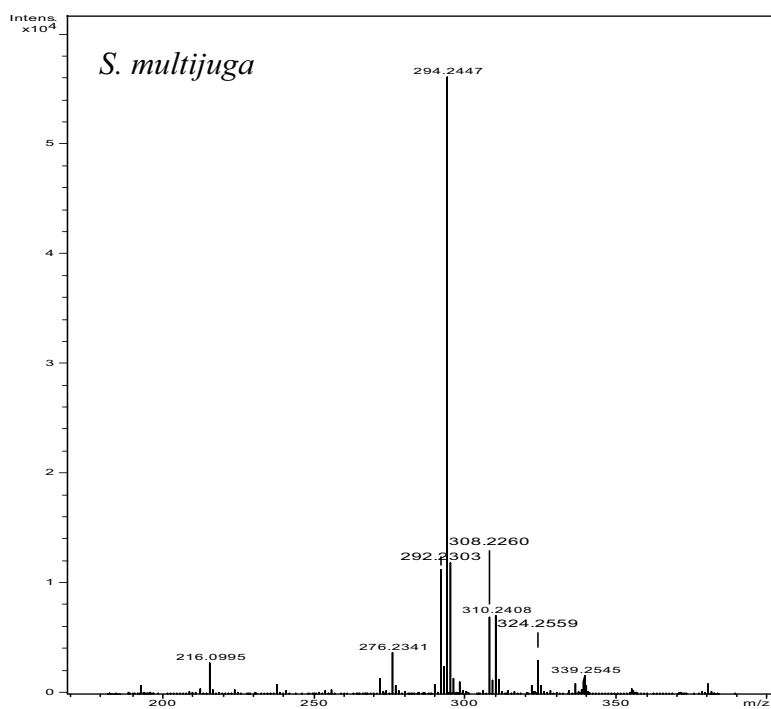
Com o intuito de avaliar se outras espécies também acumulam alcalóides piperidínicos, flores de seis espécies pertencentes aos gêneros *Senna* e *Cassia* (Figura 23) (LORENZI, 1998) foram selecionadas e identificadas pela prof^a Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo, onde as exsicatas estão depositadas (Tabela 1). Os extratos etanólicos foram preparados e dois gramas foram submetidos à extração ácido/base, como descrito no item 3.6. Em seguida as amostras foram filtradas como descrito no item 3.7 e submetidas a análise por espectrometria de massas *tandem* (IES–EM), alta resolução com injeção direta, a fim de avaliar o perfil alcaloídico das respectivas frações. Em estudos realizados por Viegas Junior et al., (2004), foi relatado que a concentração de alcalóides é bastante elevada nas flores de *S. spectabilis*, devendo ter papel ecológico importante para o táxon. As frações CH₂Cl₂ (alcaloídicas) avaliadas por espectrometria de massas corroboram com os estudos realizados permitindo a identificação e diferenciação rápidas de tais substâncias em matrizes complexas como mostram os Espectros 1–6.



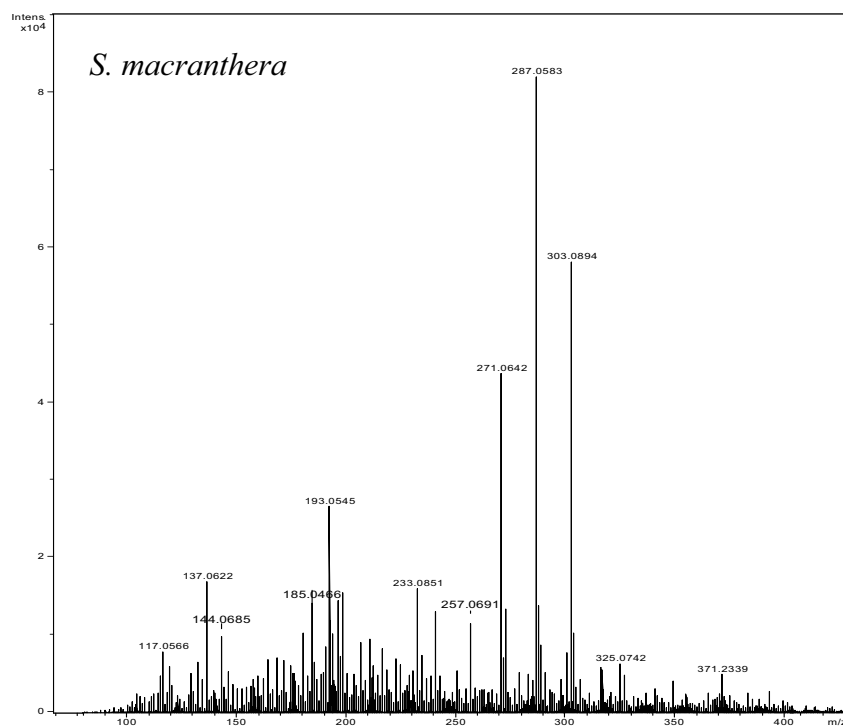
Figura 23 - Espécies de *Senna* e *Cassia*.



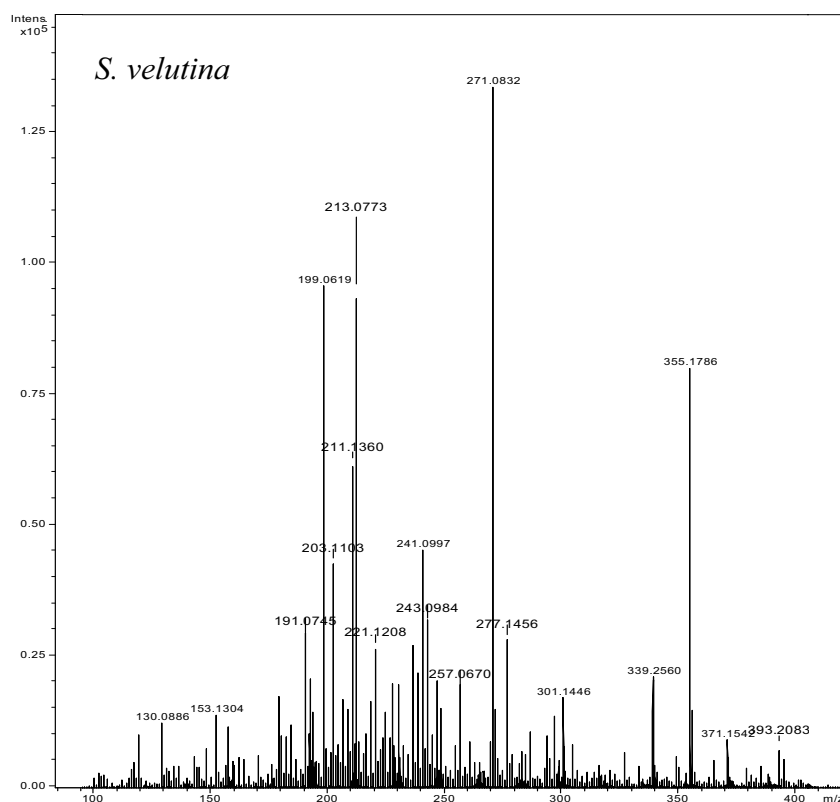
Espectro 1 - IES-EM da fração CH₂Cl₂ de *S. spectabilis*.



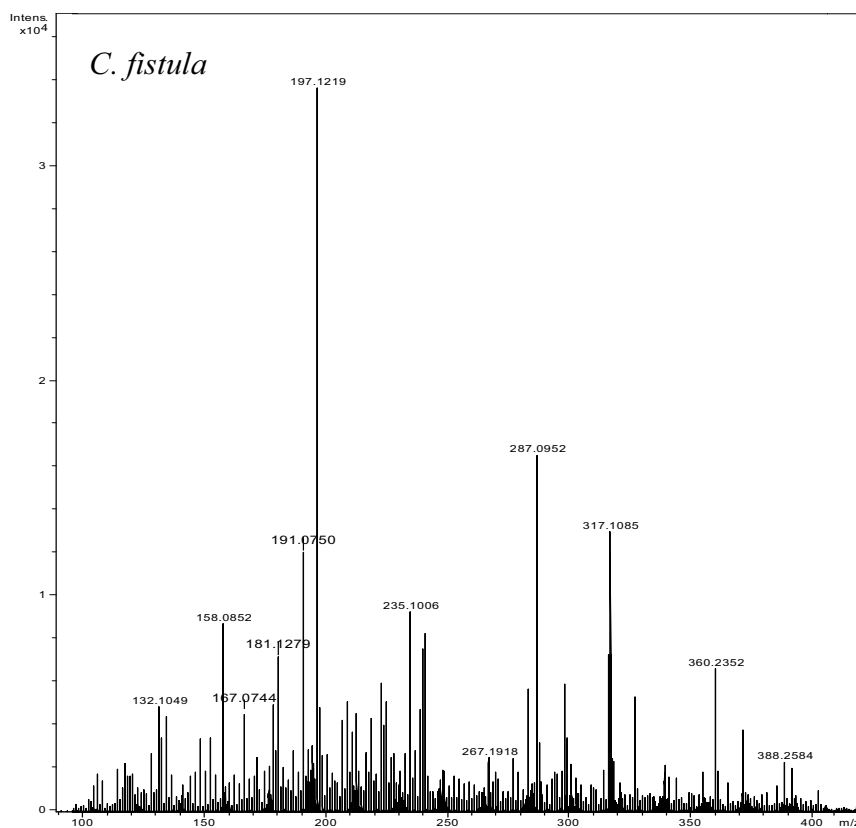
Espectro 2 - IES-EM da fração CH₂Cl₂ de *S. multijuga*.



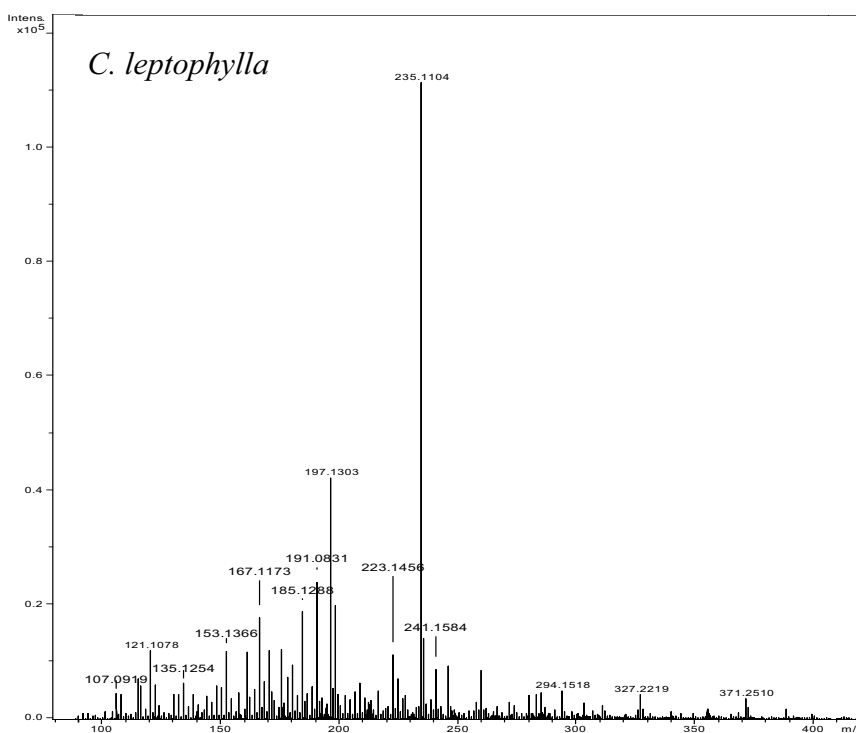
Espectro 3 - IES-EM da fração CH₂Cl₂ de *S. macranthera*.



Espectro 4 - IES-EM da fração CH₂Cl₂ de *S. velutina*.

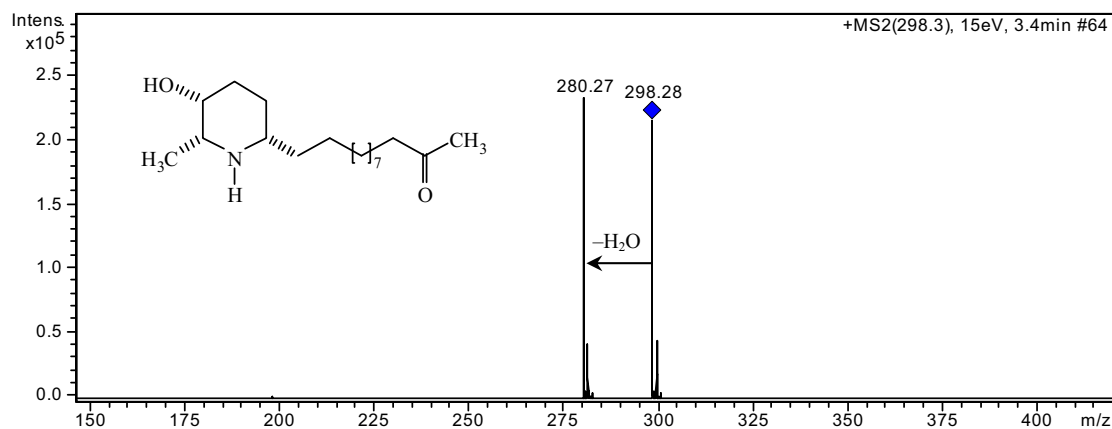


Espectro 5 - IES-EM da fração CH₂Cl₂ de *C. fistula*.

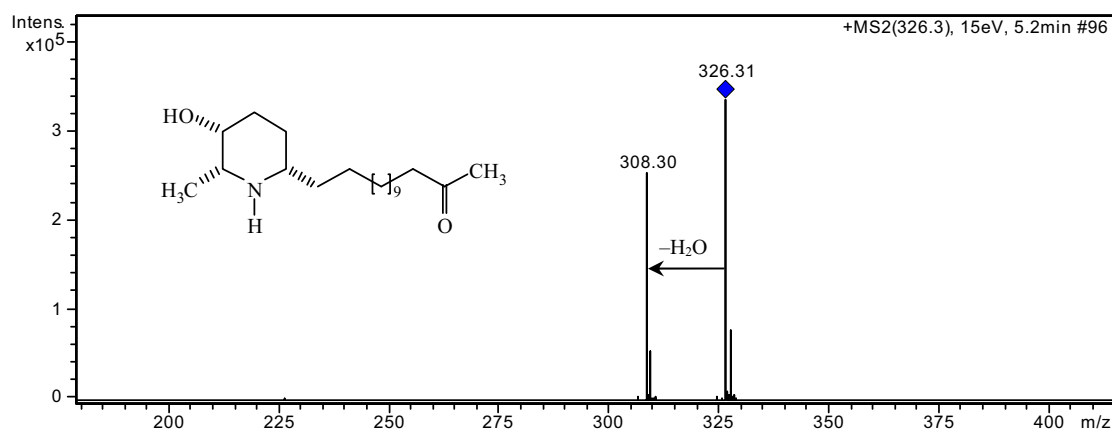


Espectro 6 - IES-EM da fração CH₂Cl₂ de *C. leptophylla*.

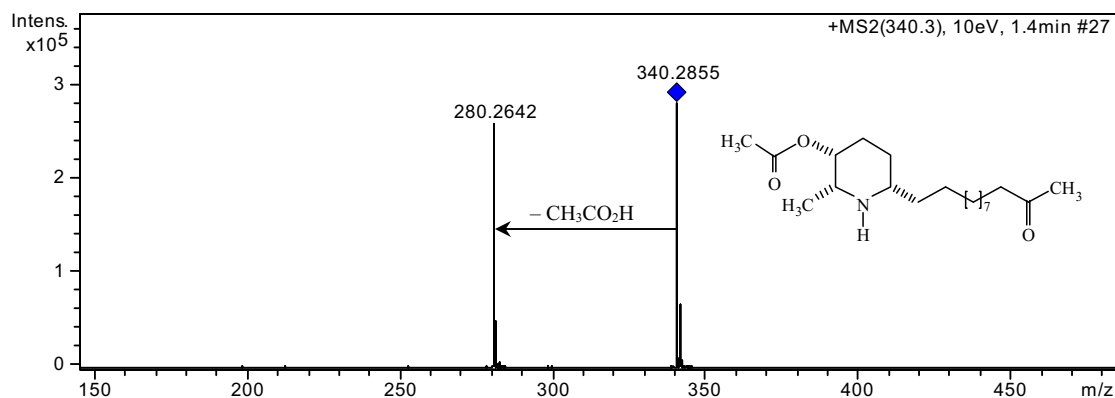
Analisando os espectros de massas foi possível observar que somente *S. spectabilis* e *S. multijuga* apresentam íons *quasi*-molecular com massas pares $[M + H]^+$, isso caracteriza a presença de substâncias com número ímpar de nitrogênio (alcalóides). Os principais íons de massa par dessas frações foram submetidos à EM/EM (Espectros 7–10). Foi possível observar a presença de alcalóides piperidínicos em *S. spectabilis*, sendo a (–)-cassina (**1**), m/z 298, alcalóide majoritário e a (–)-espectralina (**9**), m/z 326, seu co-metabólito (Espectros 7 e 8). Foi possível observar ainda a presença do derivado (–)-3-*O*-acetil-cassina (**16**), m/z 340 e 7-hidroxi-cassina (**18**), m/z 314 (Espectros 9 e 10), que estão de acordo com as moléculas propostas no esquema de fragmentação (Figura 24) (PIVATTO et al., 2005).



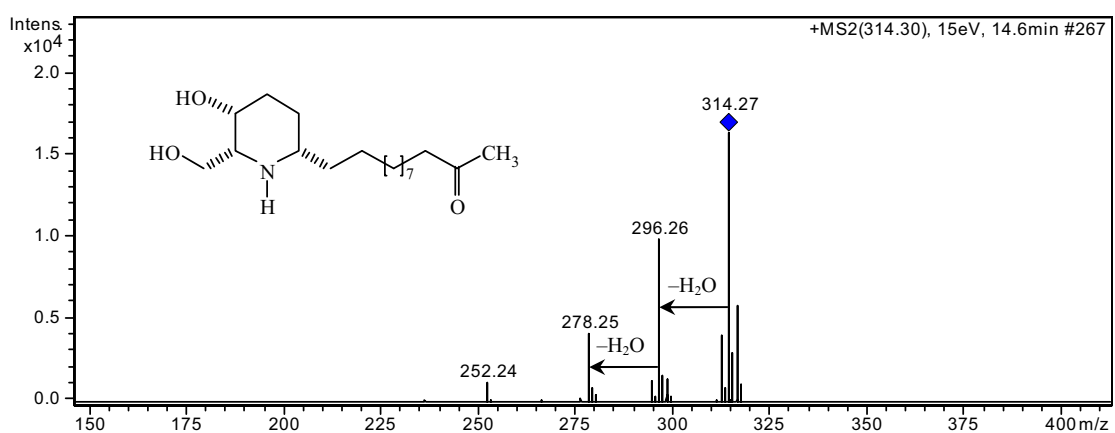
Espectro 7 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 298 do alcalóide **1** de *S. spectabilis*.



Espectro 8 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 326 do alcalóide **9** de *S. spectabilis*.



Espectro 9 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 340 do alcalóide **16** de *S. spectabilis*.



Espectro 10 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 314 do alcalóide **18** de *S. spectabilis*.

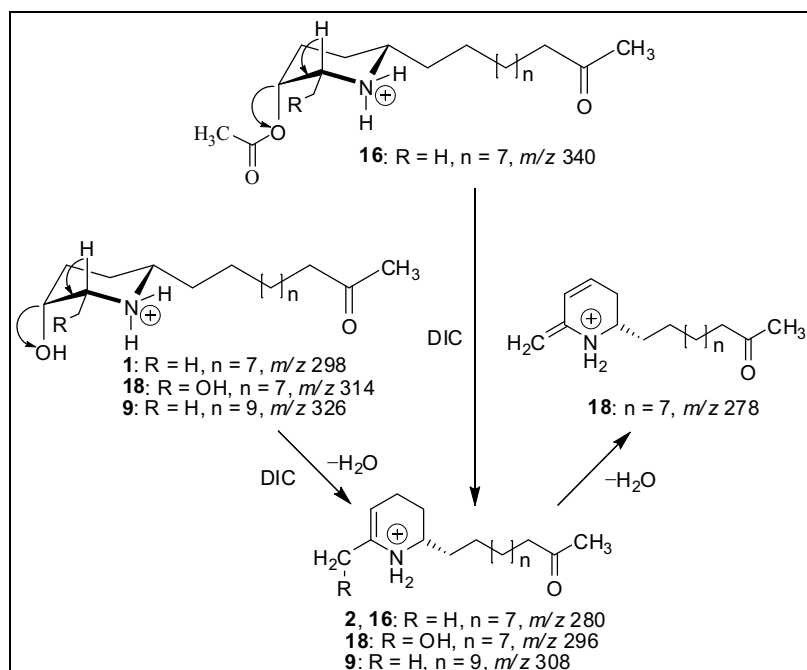
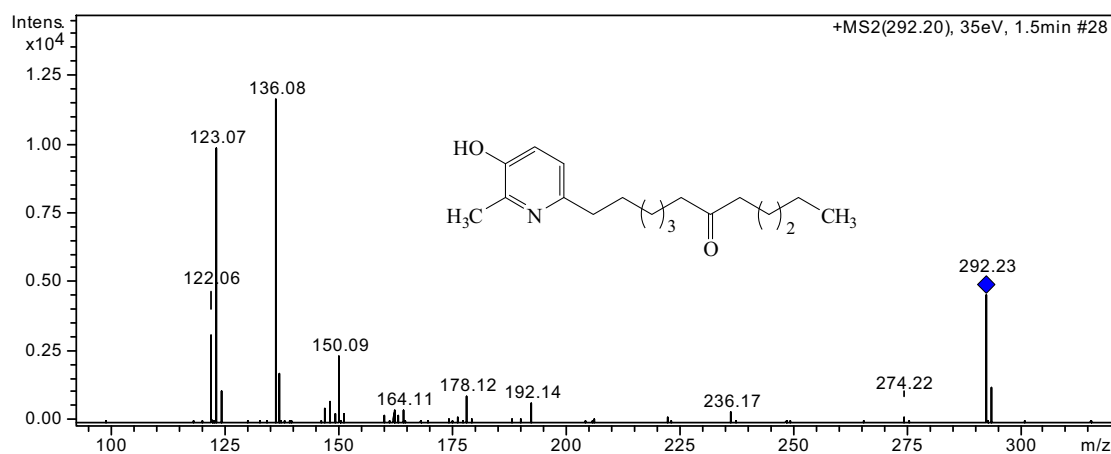


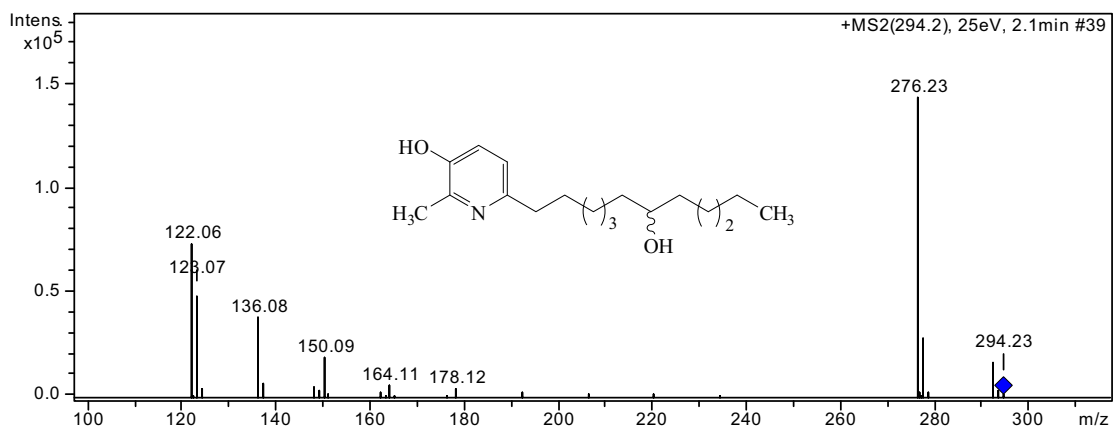
Figura 24 - Proposta de fragmentação para os alcalóides identificados em *S. spectabilis*.

Já os alcalóides de *S. multijuga* foram identificados como sendo do tipo piridínico (SERRANO, 2006; SERRANO et al., 2010). Analisando o Espectro 2 foi possível observar quatro íons *quasi*-molecular majoritários (m/z 292, 294, 308 e 310), sendo que o íon m/z 294 (**68**), corresponde ao constituinte majoritário dessa fração e quando submetido à EM/EM (Espectro 12), apresentou como principal fragmento a eliminação neutra de água, proveniente da hidroxila da extensão da cadeia lateral, como mostra a proposta de fragmentação (Figura 25). Os íons m/z 308 (**69**) e 310 (**70**) também apresentam eliminações neutras de água provenientes das hidroxilas da cadeia lateral (Espectro 13 e 14, Figura 25), já o íon m/z 292 (**67**), apresenta uma eliminação neutra de água proveniente da hidroxila do anel piridínico, com a formação de um íon piridíno, mais difícil de ocorrer, o que é justificado pela baixa intensidade do íon fragmento m/z 274 (Espectro 11, Figura 25). Já os íons m/z 122 e m/z 123 foram observados para as quatro moléculas, sendo que a eliminação neutra da cadeia lateral e uma cisão homolítica entre os carbonos C-1' e C-2', respectivamente, justificam esses fragmentos (Figura 25). Proposta para os demais fragmentos estão descritos na Figura 25.

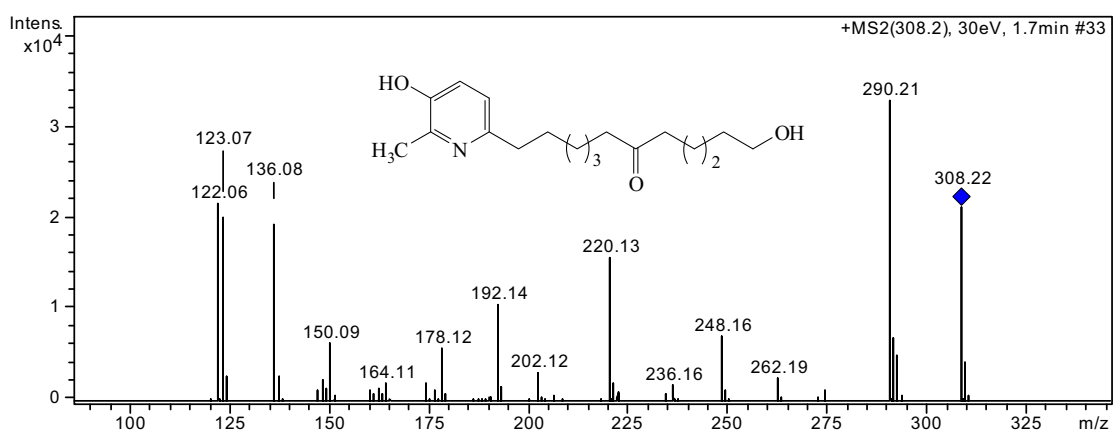
A espectrometria de massas foi uma ferramenta importante para a elucidação e identificação de metabólitos e nesta pesquisa foi muito útil para mapear o perfil alcaloídico, incluindo derivados ainda inéditos.



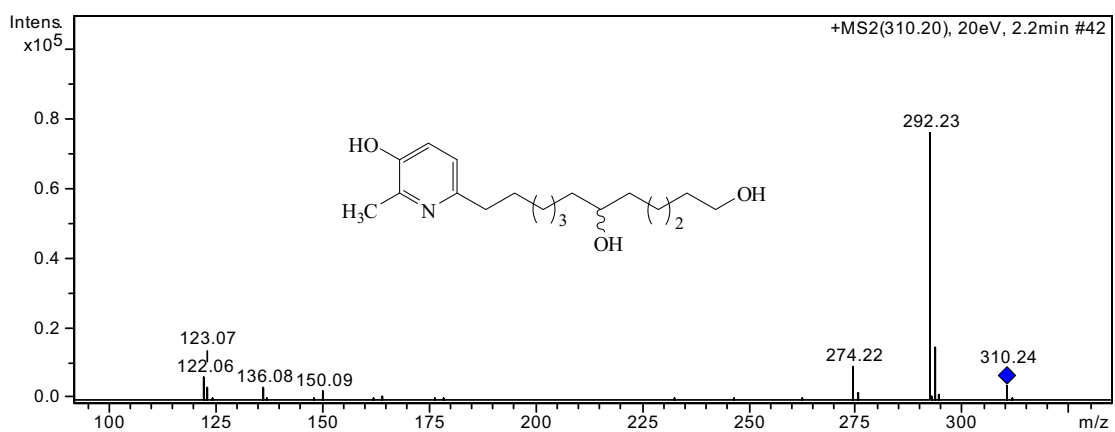
Espectro 11 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 292 do alcalóide **67** de *S. multijuga*.



Espectro 12 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 294 do alcalóide **68** de *S. multijuga*.



Espectro 13 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 308 do alcalóide **69** de *S. multijuga*.



Espectro 14 - IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 310 do alcalóide **70** de *S. multijuga*.

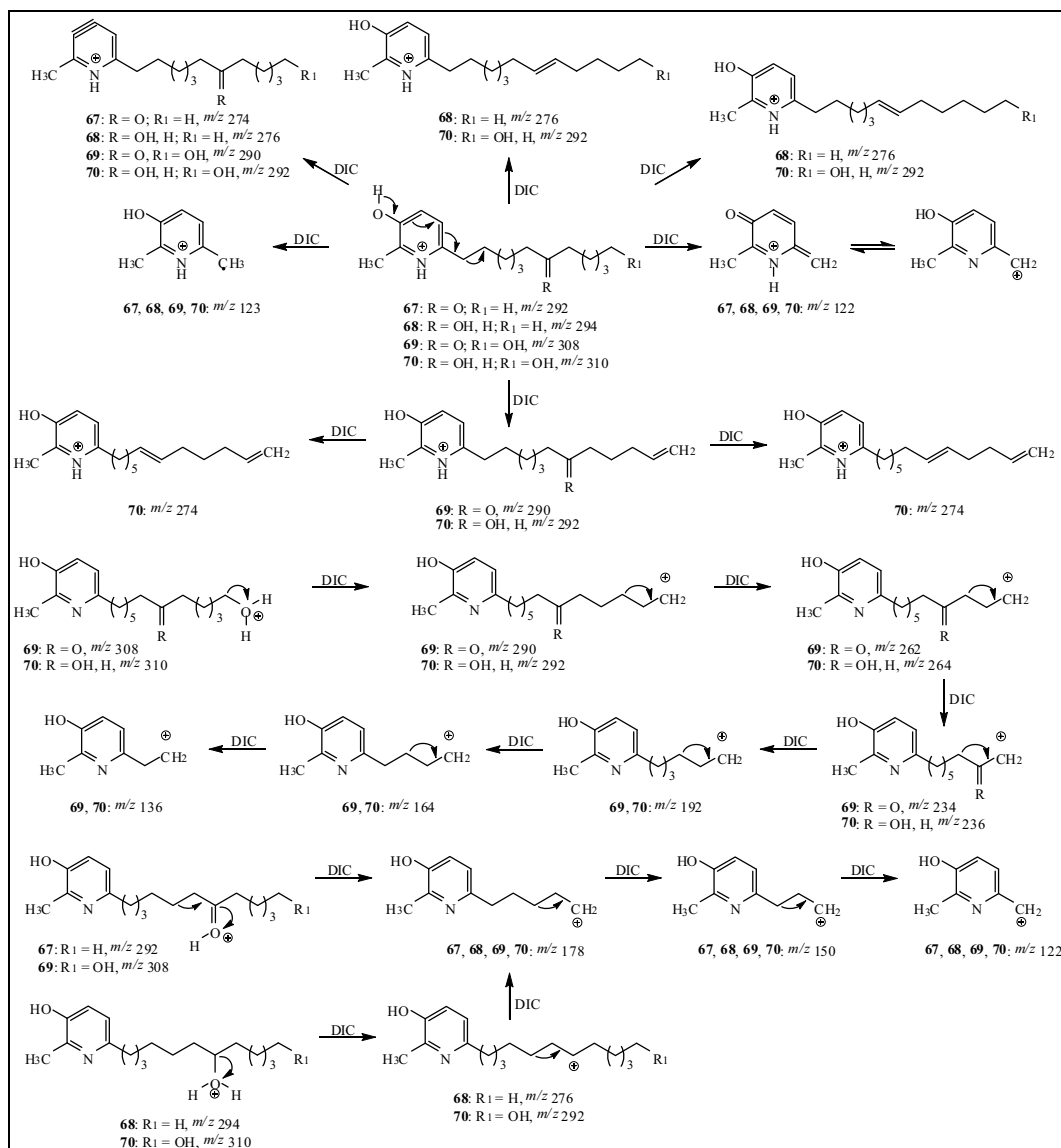


Figura 25 - Proposta de fragmentação para os alcalóides identificados em *S. multijuga*.

4.2 Estudo fitoquímico das flores de *S. spectabilis*

4.2.1 Extrato etanólico

Tendo constatada a presença dos alcalóides piperidínicos em *S. spectabilis*, 31 g do EESS-FI foram submetidos à partição líquido/líquido, conforme descrito no item 3.5 (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

A análise por CCD das frações da partição confirmou que a maior concentração dos alcalóides estava na fração CH₂Cl₂, chamada de SSFI-CH₂Cl₂ (8 g). Essa fração foi submetida à cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária (FE) alumina neutra (h = 20 cm, Ø = 5 cm e m_{Al₂O₃} = 263 g). A eluição foi feita em gradiente

de CHCl_3 :MeOH (9:1) até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de vinte sub-frações (PDC01, Figura 26). A análise por CCD permitiu reagrupar as quatro primeiras sub-frações em PDC01 F₁₋₄ (1,76 g), que apresentou uma mistura de “dois alcalóides” majoritários de R_f 0,42 e 0,58 respectivamente (Figura 26). Essa sub-fração foi novamente submetida a CC.

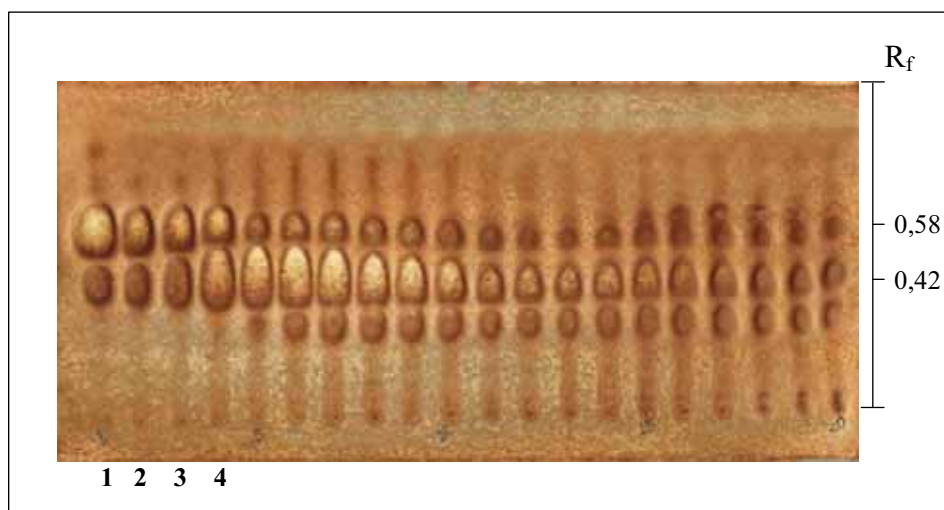


Figura 26 - CCD das sub-frações coluna PDC01 (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

A sub-fração PDC01 F₁₋₄ foi submetida CC utilizando sílica como FE e CHCl_3 :MeOH: NH_4OH como sistema isocrático de eluição (PDC03). Sendo os alcalóides substâncias com caráter básico, sua separação se torna extremamente difícil quando se utiliza sílica como FE, devido à ligação com os grupos silanóis, sítios com caráter ácido. Para diminuir esse tipo de interação (silanóis e alcalóides), foi adicionado hidróxido de amônia (NH_4OH) a fase móvel (amina competidora), diminuindo assim a retenção desses metabólitos (McCALLEY, 2002; PAHL et al., 1997). Foram coletadas vinte e cinco sub-frações, as quais foram reagrupadas por CCD (Figura 27).

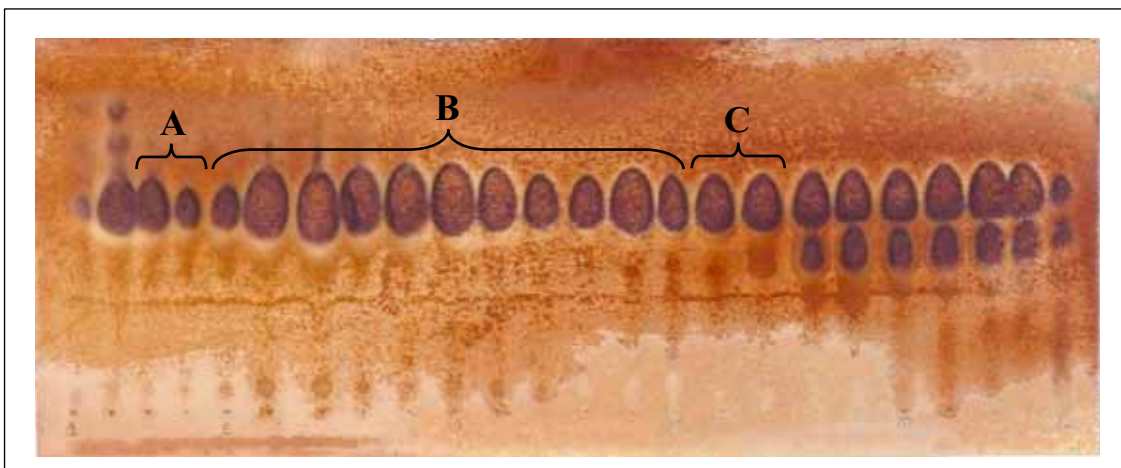
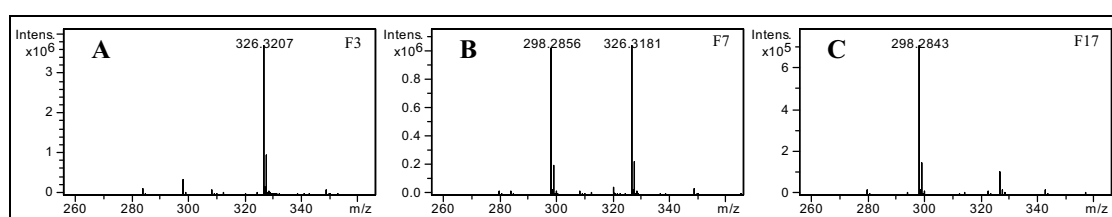


Figura 27 - CCD das sub-frações coluna PDC03 (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

As frações ímpares da coluna PDC03 (Figura 27) foram analisadas por espectrometria de massas (IES-EM), onde foi observado que as frações PDC03 F₃₋₄ (**A**) apresentavam um alcalóide com m/z 326 (espectralina, **9**), as frações PDC03 F₅₋₁₅ (**B**) apresentavam uma mistura de dois alcalóides m/z 298 e m/z 326 (**1** e **9**, respectivamente) em proporções variadas, e as frações PDC03 F₁₆₋₁₇ (**C**) apresentavam um alcalóide m/z 298 (cassina, **1**) (Espectro 15). A diferença de massa entre **1** e **9** é de vinte e oito unidades, que corresponde a dois grupos metilênicos na cadeia lateral de **9**. Esta diferença estrutural é suficiente para alterar as propriedades físico-químicas dessa substância, tornando-a mais apolar, conseqüentemente tem maior velocidade de eluição que o seu homólogo **1** de cadeia menor, quando se trata de cromatografia de fase normal (sílica).



Espectro 15 - IES-EM das frações A, B e C (PDC03).

As frações **A**, **B** e **C** foram analisadas por CLAE nas condições cromatográficas discutidas no item 4.6 (Figuras 28–30). Foi possível observar que **A** e **C** estavam puras e correspondiam aos alcalóides **9** ($t_r = 15,20$ min.) e **1** ($t_r = 11,55$ min.), respectivamente. Foi observado que a ordem de eluição em CLAE (fase reversa) estava invertida, quando comparada com a ordem de eluição em coluna de sílica (fase normal),

justificando o maior tempo de retenção para o alcalóide **9**, ligeiramente mais apolar em função das duas unidades metilênicas adicionais. A mistura dos alcalóides **1** e **9** (**B**) foi submetida CLAE semi-preparativo onde foram purificados (Figura 31).

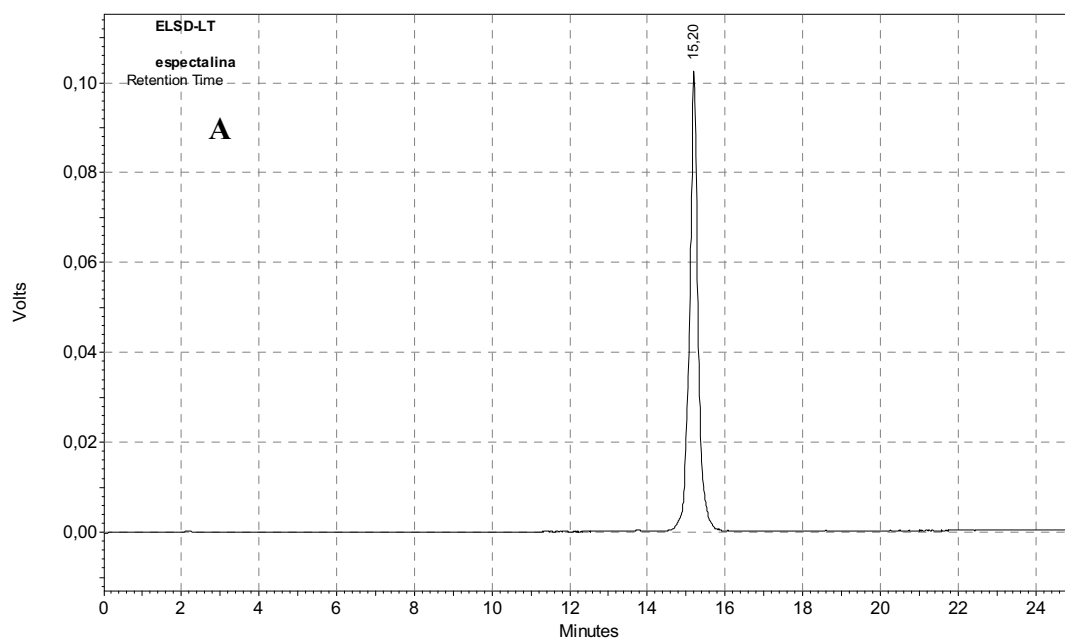


Figura 28 - Cromatograma de **A**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

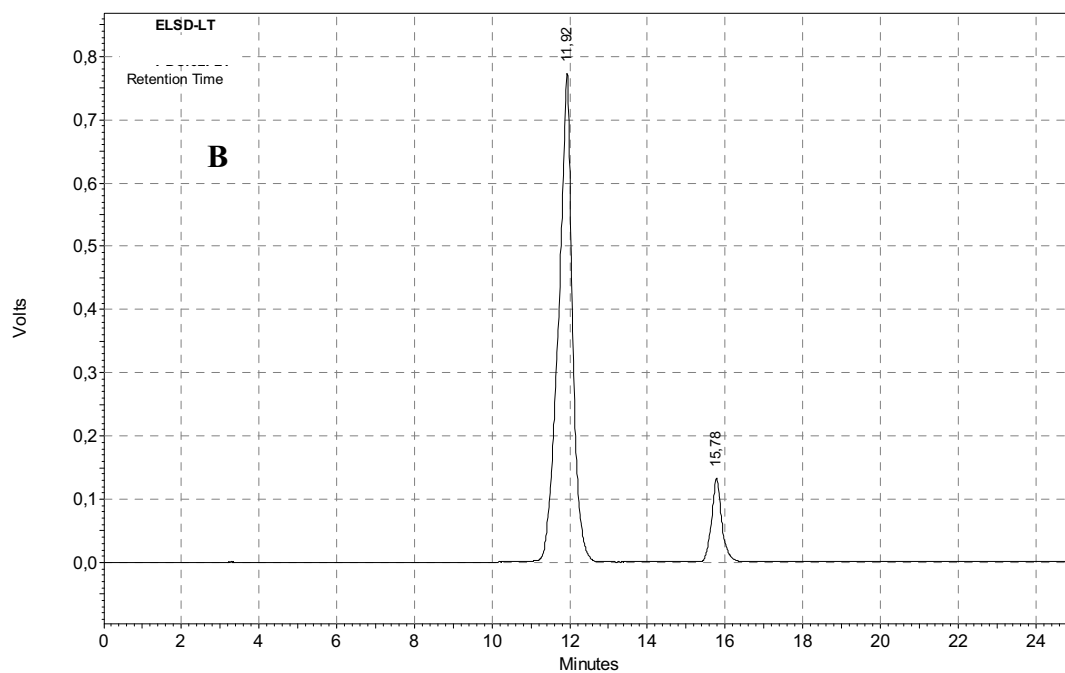


Figura 29 - Cromatograma de **B**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

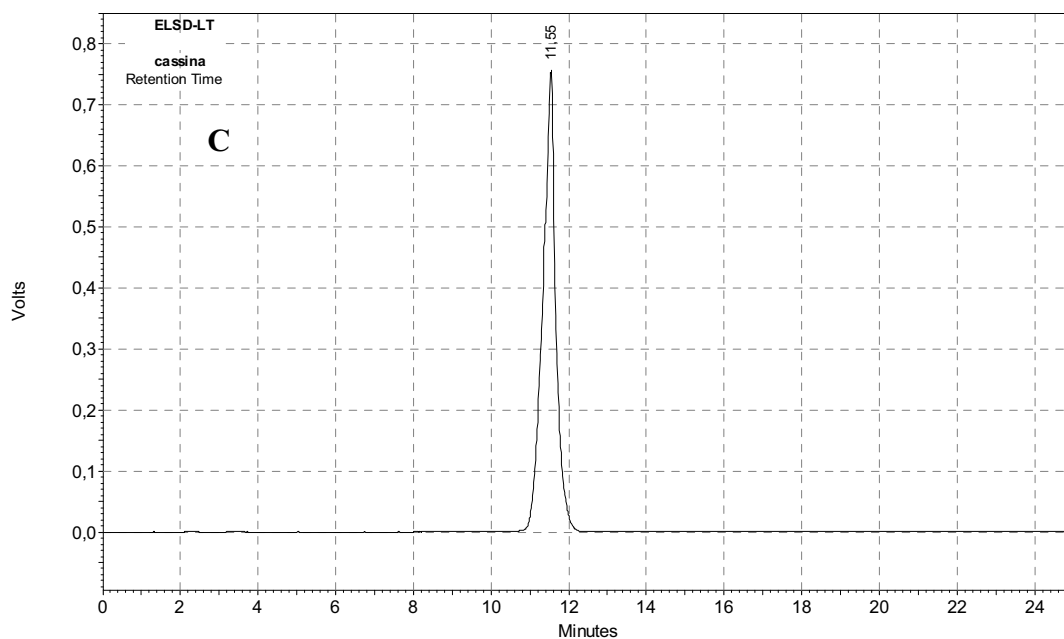


Figura 30 - Cromatograma de **C**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

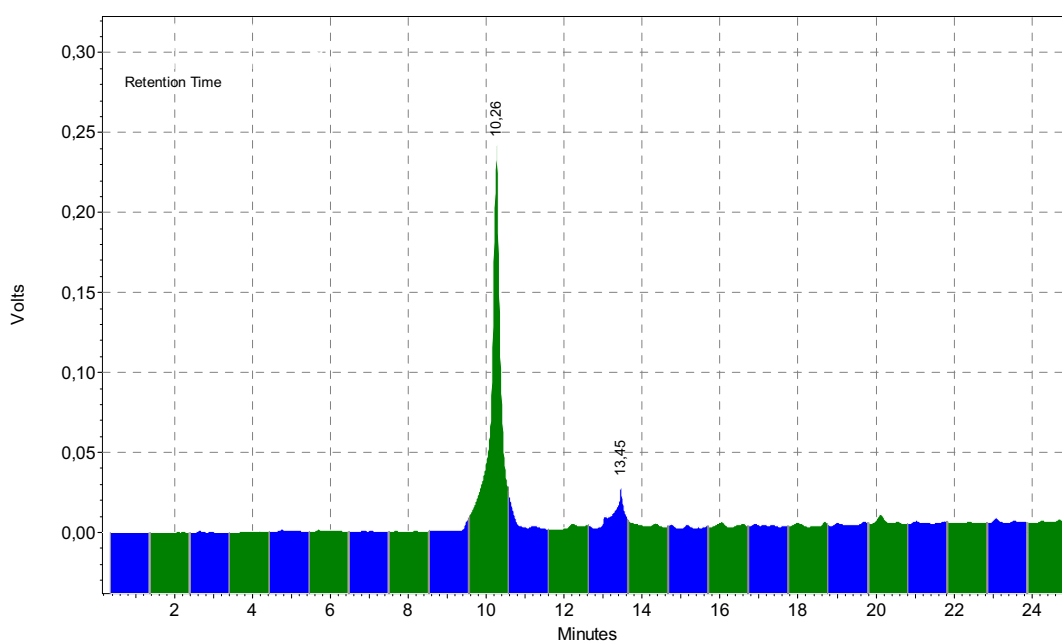


Figura 31 - Cromatograma de **B** em coluna semi-preparativa; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 200 mg/mL, vol. inj. 50 μ L, fluxo: 8 mL/min. e detector: UV 280 nm.

4.2.2 Extrato CHCl_3

O extrato CHCl_3 foi preparado a partir das flores *in natura* que foram congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Em seguida foi adicionado CHCl_3 ao material triturado, sonicado em ultra-som por

30 minutos, filtrado e o solvente evaporado em rotaevaporador. Este procedimento foi repetido duas vezes para obter o extrato CHCl_3 (13,05 g). Esse extrato (5,00 g) foi submetido a CC (PDC06) utilizando como FE alumina ($h = 10$ cm, $\varnothing = 4,5$ cm e $m_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 75$ g). A eluição foi feita em gradiente de Éter:MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de trinta e sete sub-frações. A análise por CCD permitiu reagrupar as sub-frações em PDC06 F₁₆₋₂₁ (927,30 g), que foi submetida novamente a CC (PDC08).

A sub-fração PDC06 F₁₆₋₂₁ (350,00 mg) foi submetida CC (PDC08) utilizando como FE sílica ($h = 15$ cm, $\varnothing = 1,2$ cm e $m_{\text{SiO}_2} = 35$ g) e CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (95:05:2,5) como sistema isocrático de eluição, obtendo-se assim um total de trinta sub-frações (Figura 32). A análise por CCD permitiu reagrupar as sub-frações em PDC08 F₁₁₋₁₈ (76,80 mg), que foi submetida à análise por CLAE com detector *light scatterig* (Figura 33). Dessa análise foi possível observar que se tratava de uma mistura dos alcalóides 3-*O*-acetil-cassina (**16**) e 3-*O*-acetil-espectralina (**15**) que em seguida foram separados em CLAE semi-preparativo [$t_r = 12,5$ min. (5,10 mg) e $t_r = 16,3$ min. (2,70 mg), respectivamente] (Figura 34).

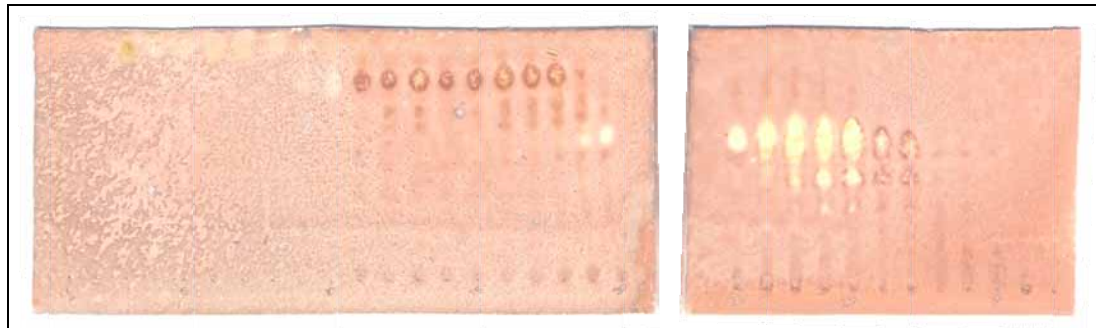


Figura 32 - CCD das sub-frações coluna PDC08 (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

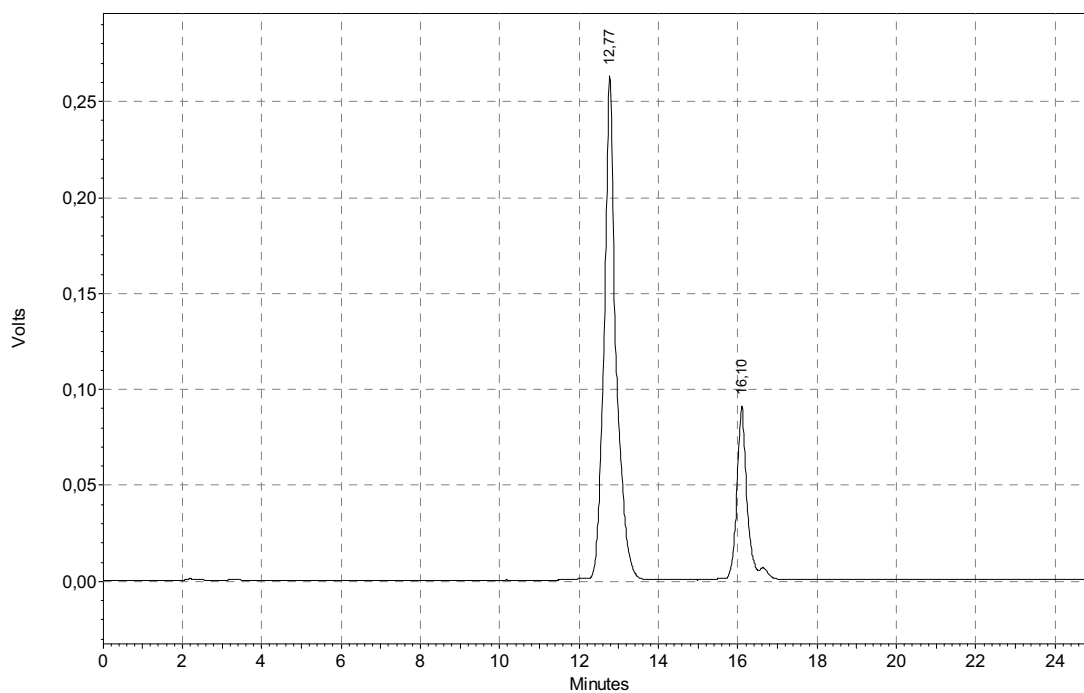


Figura 33 - Cromatograma das sub-frações PDC08 F₁₁₋₁₈; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 µL, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

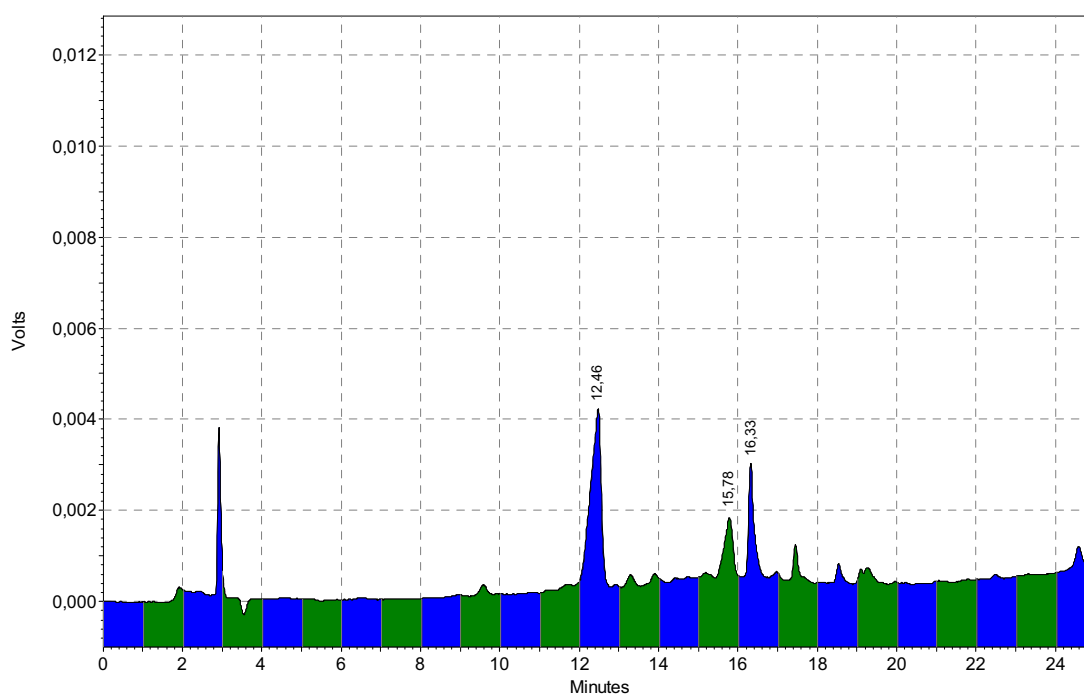


Figura 34 - Cromatograma das sub-frações PDC08 F₁₁₋₁₈ em coluna semi-preparativa; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 200 mg/mL, vol. inj. 50 µL, fluxo: 8 mL/min. e detector: UV 280 nm.

4.3 Estudo fitoquímico das flores de *S. multijuga*

Foi preparado o extrato etanólico das flores de *S. multijuga*, sendo 100 g dissolvido em metanol/água (4:1), filtrado e submetido à partição líquido-líquido com *n*-hexano (250 mL × 5), CH₂Cl₂ (250 mL × 4), AcOEt (250 mL × 4) e *n*-BuOH (250 mL × 2), sucessivamente. A fração CH₂Cl₂ (15,92 g) foi submetida à extração ácido/base, que consistiu em solubilizar a amostra em solução aquosa de HCl 5% (500 mL, pH 2), filtrar e particionar com AcOEt (50 mL × 3). Em seguida a fase ácida foi basificada com NH₄OH (30%) até pH 9 e particionada com CH₂Cl₂ (50 mL × 5). A fase CH₂Cl₂ foi particionada com água (100 mL × 3) e então concentrada a pressão reduzida para dar a fração alcaloídica (2,10 g). A análise por CCD revelou a presença de alcalóides (Figura 35). A fração alcaloídica foi submetidas a CCD preparativa, utilizando como sistema de solvente *n*-hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (1,5:2,0:6,5), sendo a placa desenvolvida duas vezes, de onde foram isolados os alcalóide **67** (25,1 mg) e **69** (12,3 mg).

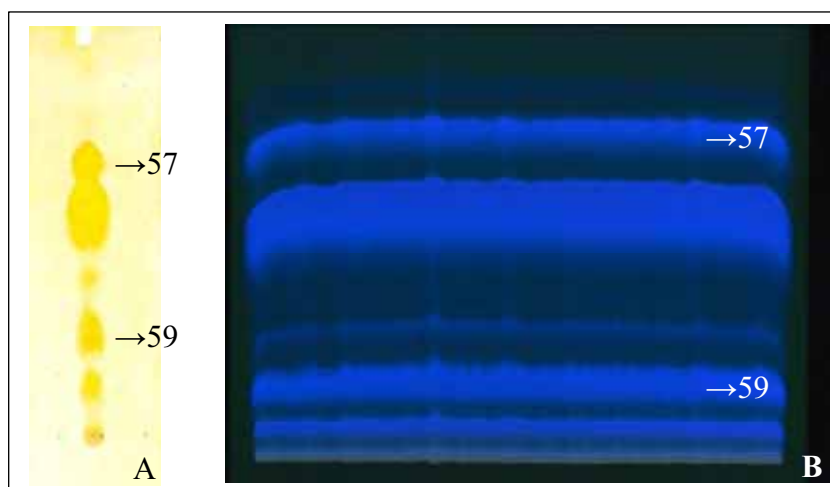


Figura 35 - Fração alcaloídica: (A) CCD analítica (FE: sílica, FM: *n*-hexano-CH₂Cl₂-AcOEt (1,5:2,0:6,5) e revelador: Dragendorff), (B) CCD preparativa sob luz UV366 nm.

4.4 Elucidação estrutural dos alcalóides

4.4.1 Elucidação estrutural de 1 (cassina)

O alcalóide **1** foi isolado como um sólido branco que apresentou teste positivo para o reagente de ICIPt (R_f 0,64, Figura 36). Os pontos de fusão para a base livre e cloridrato foram 54,3 e 161,4 °C, respectivamente (Figuras 37 e 38).



Figura 36 - CCD de **1** (A: base livre, B: cloridrato), **9** (C: base livre, D: cloridrato) (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

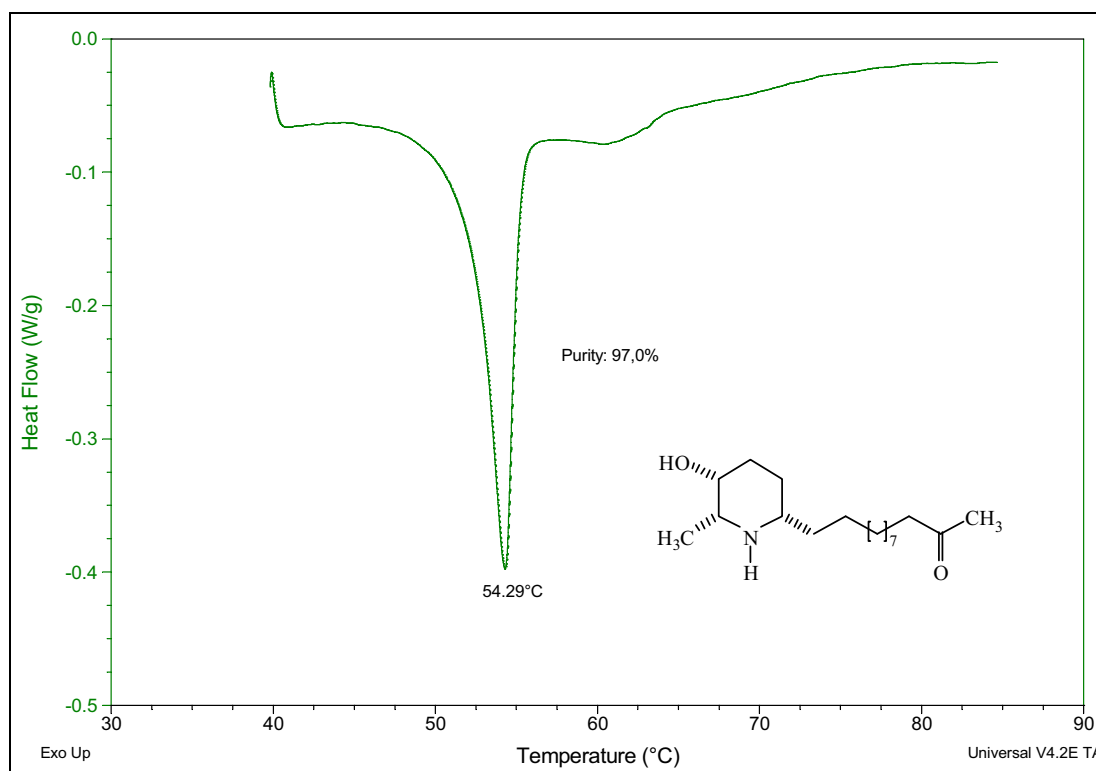


Figura 37 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão e pureza de **1** (base livre).

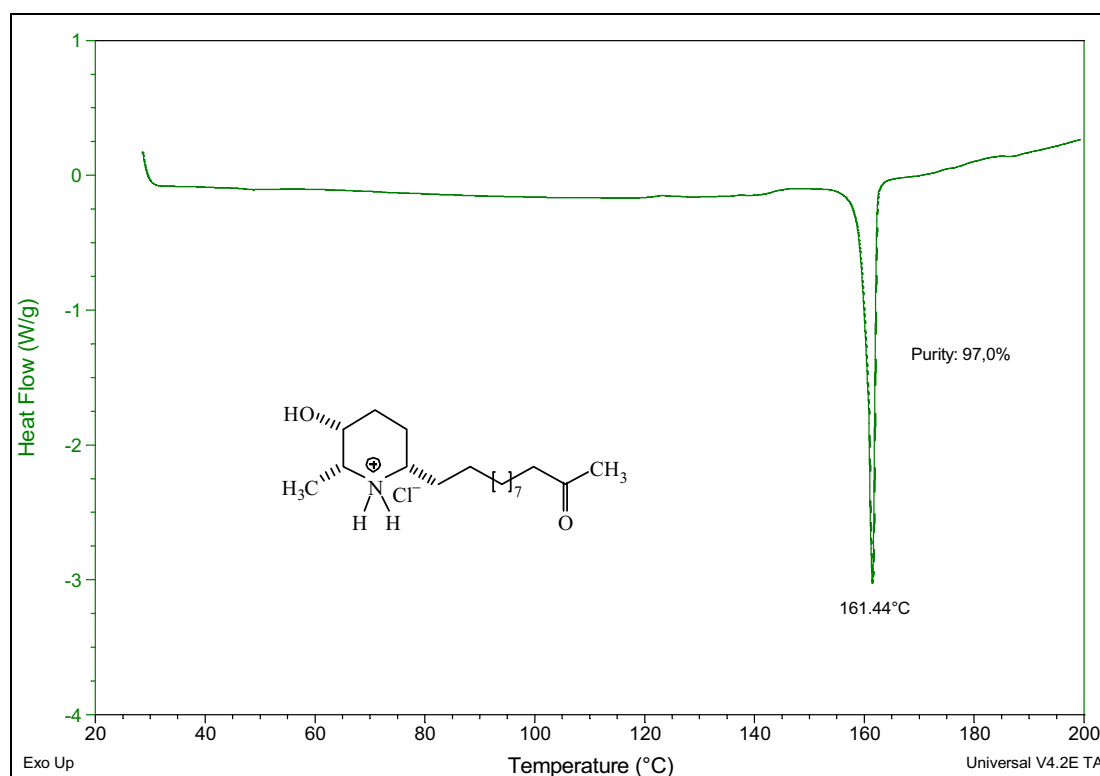
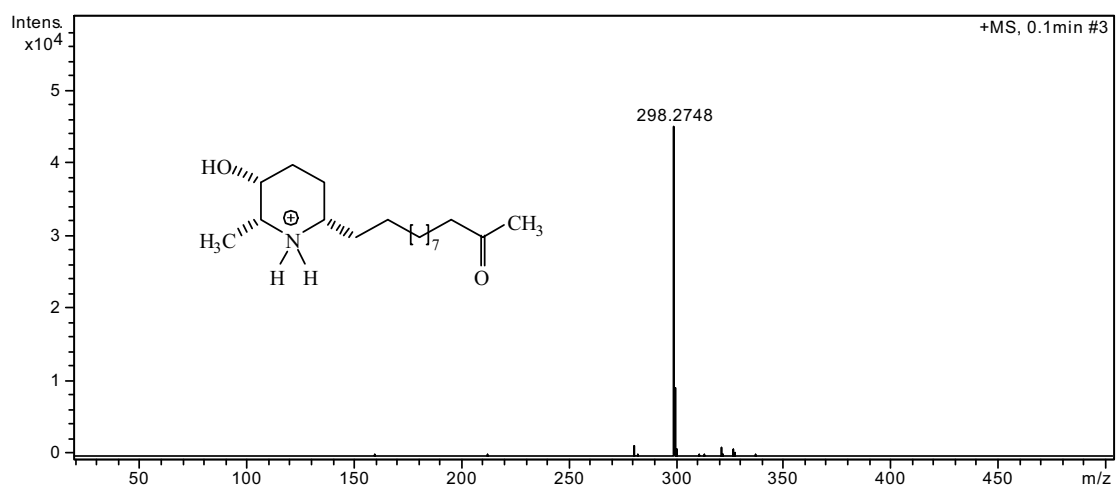


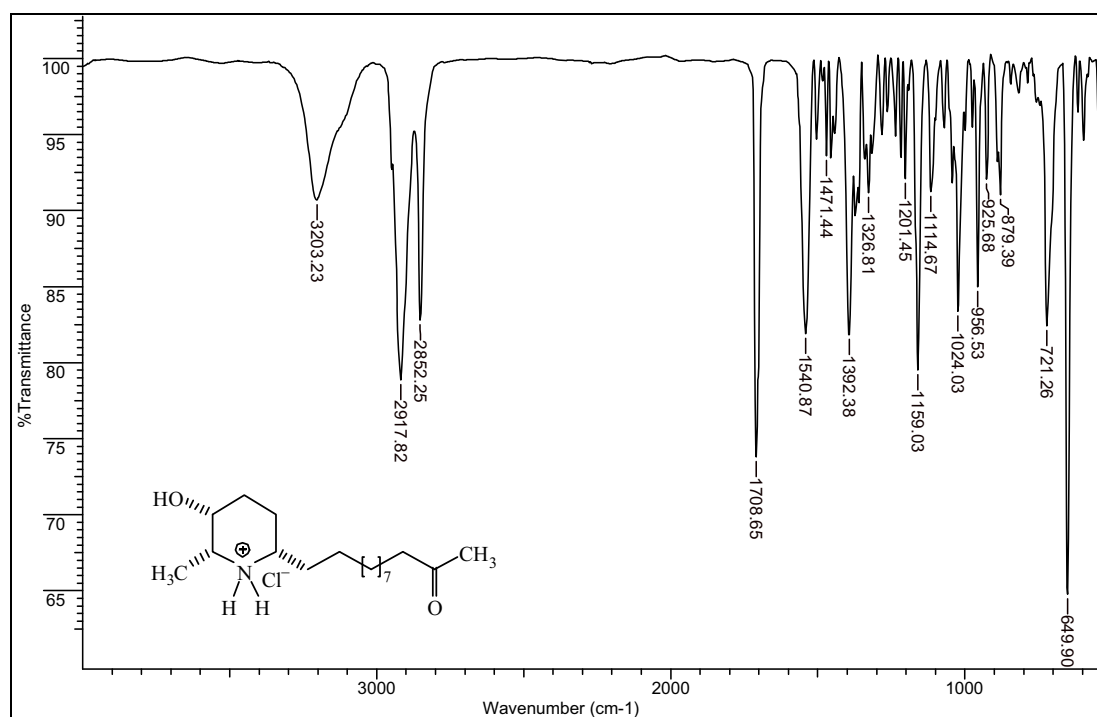
Figura 38 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão e pureza de **1** (cloridrato).

O alcalóide **1** foi submetido a análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{18}H_{35}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O pico referente ao íon *quasi*-molecular foi observado em m/z 298,2748 $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{36}NO_2^+$, 298,2746 (Espectro 16).



Espectro 16 - IES-EM alta resolução do alcalóide **1**.

A análise do espectro na região do infravermelho permitiu identificar uma banda em 3203 cm^{-1} , proveniente do estiramento do grupo O–H livre. Os estiramentos simétrico e assimétrico dos C–H alifáticos foram identificados em ν_s 2852 e ν_{as} 2918 cm^{-1} , respectivamente. A banda relativa ao estiramento da função carbonila (C=O) da cetona foi observada em ν 1709 cm^{-1} , assim como as absorções relativas às deformações angulares assimétricas em ν 1541 e simétricas em ν 1392 das metilas (Espectro 17). Não foi possível observar a banda proveniente do estiramento N–H devido a sobreposição da banda da hidroxila.



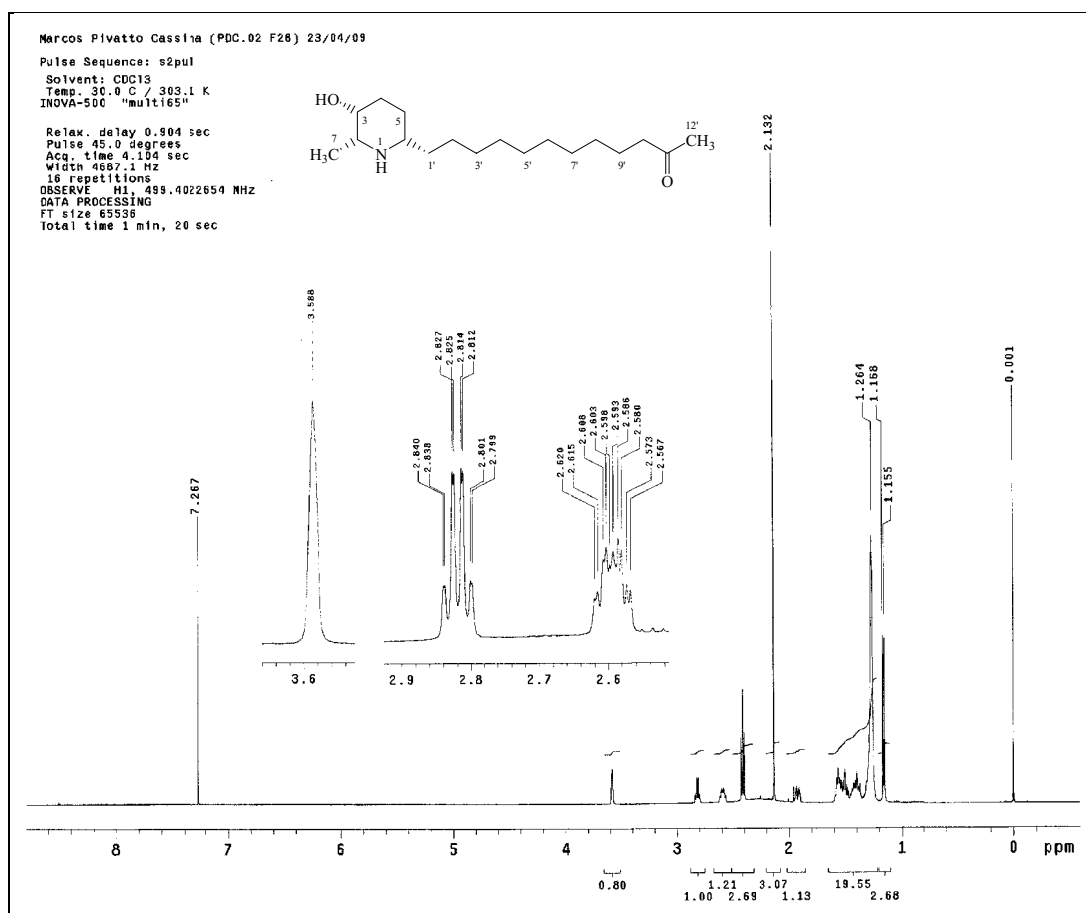
Espectro 17 - Espectro na região do IV do alcalóide **1** (cloridrato).

A análise do espectro de RMN ^1H de **1** (Espectros 18–20), permitiu identificar como principais sinais que caracterizam o núcleo piperidínico trissubstituído, um duplo quadrupletto em δ 2,82, integrando para 1H, atribuído a H–2 ($J = 6,5$ e $1,5$ Hz), um dubleto em δ 1,16, integrando para 3H que apresentou acoplamento com H–2 ($J = 6,5$ Hz) no mapa de contorno gCOSY e foi atribuído aos 3H–7 (Espectro 21 e 22), um singletto largo em δ 3,59, referente ao H–3 hidroximetínico (1H), que correlacionou com H–4a, H–4b no mapa de contorno gCOSY, um multipletto em δ 2,59 (1H), atribuído ao H–6 que apresentou correlação com H–5a, H–5b, H–1a', H–1b' e C–2' nos mapas de contorno gCOSY e gHMBC, respectivamente, indicando a presença de um substituinte ligado nessa posição, além de quatro sinais em δ 1,91 (1H), 1,52 (1H), 1,50

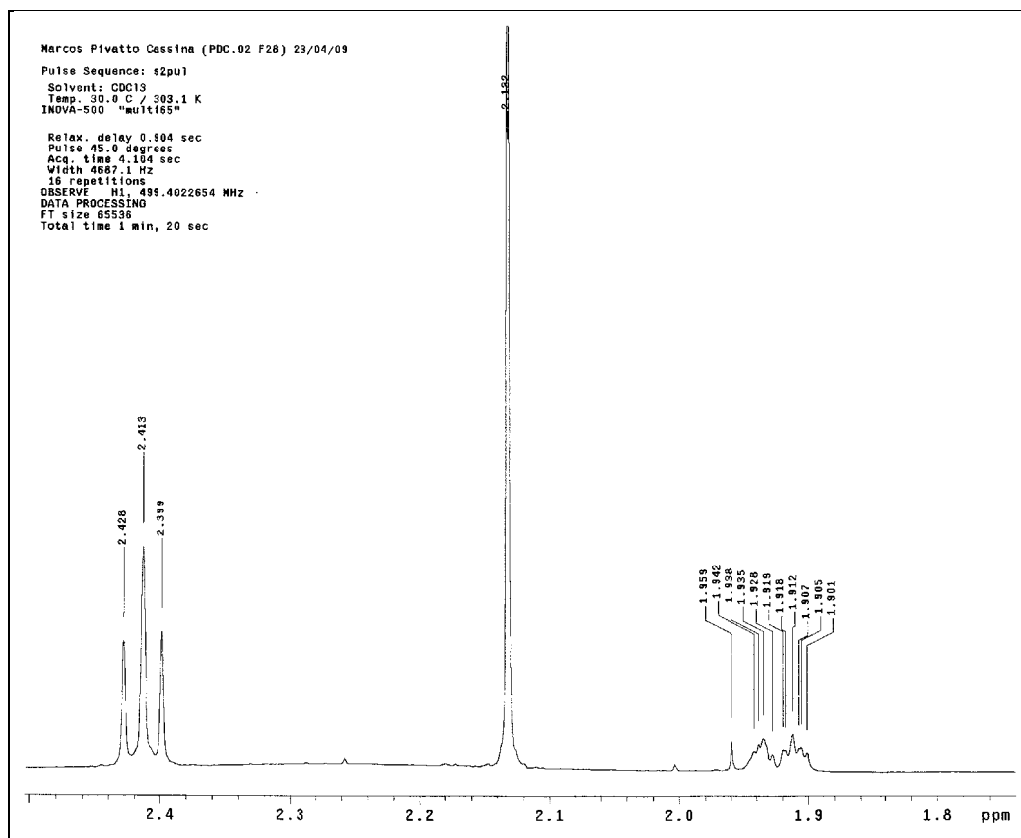
e 1,40 que se correlacionavam no mapa de contorno gCOSY e foram atribuídos aos hidrogênios H-4a, H-4b, H-5a, H-5b, respectivamente (Espectros 21–22, Tabela 3).

A extremidade da cadeia lateral, funcionalizada pelo grupo metil-cetona foi identificada pela presença de um tripleto em δ 2,41, integrando para 2H e um singlete em δ 2,13 (3H), que foram atribuídos aos 2H-10' e 3H-12', respectivamente. Esta dedução foi confirmada pelo mapa de contorno gHMBC (Espectro 30–41), que apresentou correlações (2J) entre H-10' e H-12' com C-11' (δ 209,63). Os sinais relativos aos hidrogênios metilênicos da cadeia lateral encontram-se sobrepostos na região de δ 1,26 (Espectro 20).

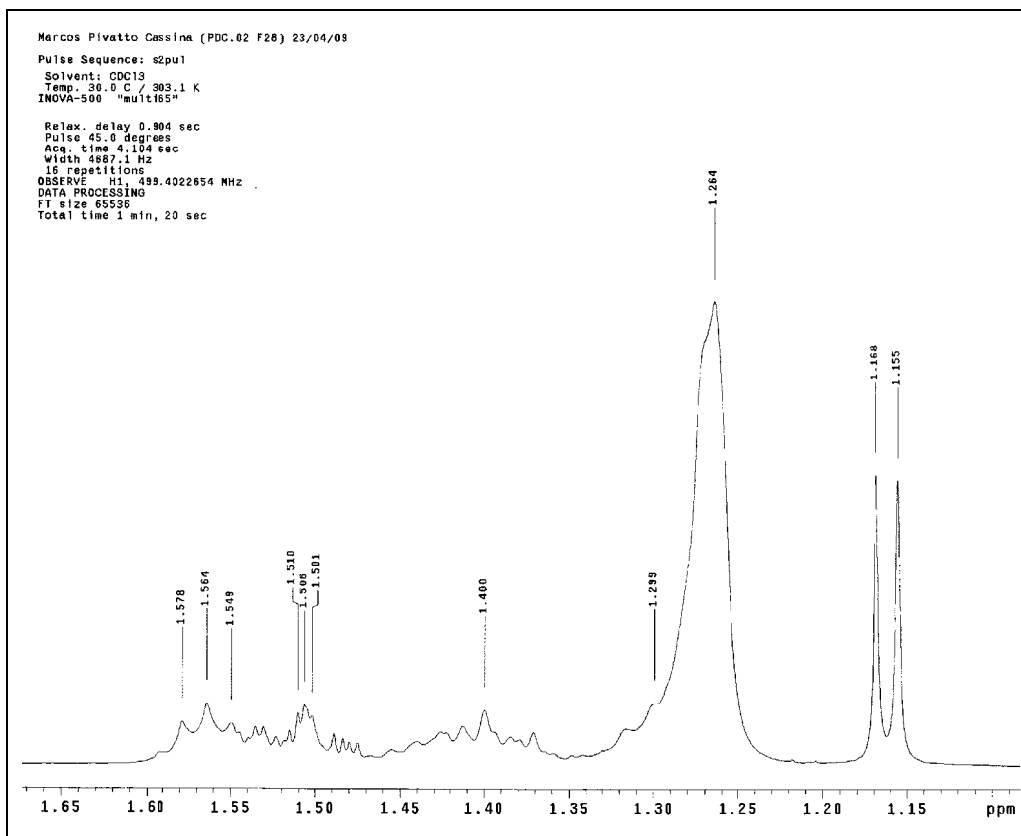
As estruturas foram estabelecidas a partir das correlações observadas entre os hidrogênios e carbonos nos mapas de contorno de gHMQC e gHMBC (Espectros 27–41).



Espectro 18 - Espectro de RMN ^1H de **1** (500 MHz, CDCl_3).



Espectro 19 - Ampliação do espectro 18 (δ 1,8–2,4), alcalóide **1**.



Espectro 20 - Ampliação do espectro 18 (δ 1,15–1,65), alcalóide **1**.

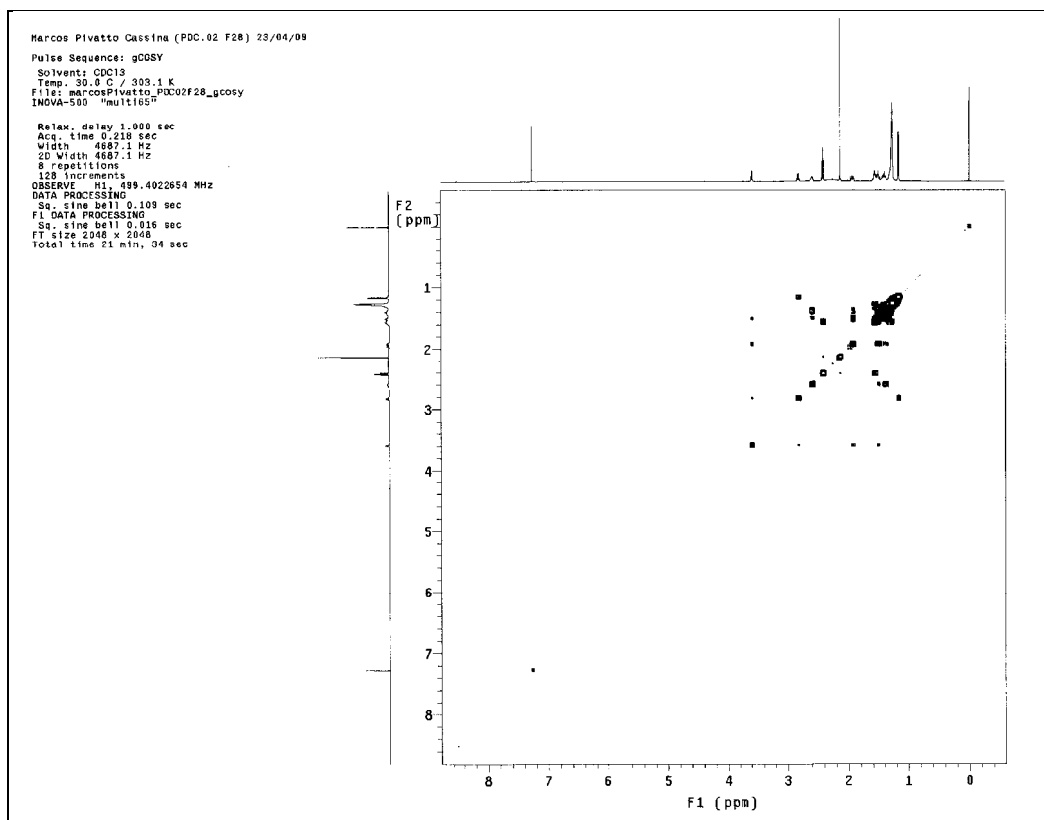
Tabela 3 - Dados de RMN ^1H e gCOSY de **1** (500 MHz, CDCl_3)

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, m ^c , J ^b	gCOSY
2	2,82 dq (6,5; 1,0)	H-7, H-3
3	3,59 sl	H-2, H-4a, H-4b
4a	1,91 m	H-3, H-4b, H-5a, H-5b
4b	1,51 m	H-3, H-4a, H-5a, H-5b
5a	1,50 m	H-4a, H-4b, H-5b, H-6
5b	1,40 m	H-4a, H-4b, H-5a, H-6
6	2,59 m	H-5a, H-5b, H-1'a, H-1'b
7	1,16 d (6,5)	H-2
1'a	1,50 m	H-6, H-2'
1'b	1,40 m	H-6, H-2'
2'	1,30 m	H-3'
3'- 8'	1,26 sl	H-2', H-9'
9'	1,56 m	H-8', H-10'
10'	2,41 t (7,0)	H-9', H-12'
11'	-----	-----
12'	2,13 s	H-10'

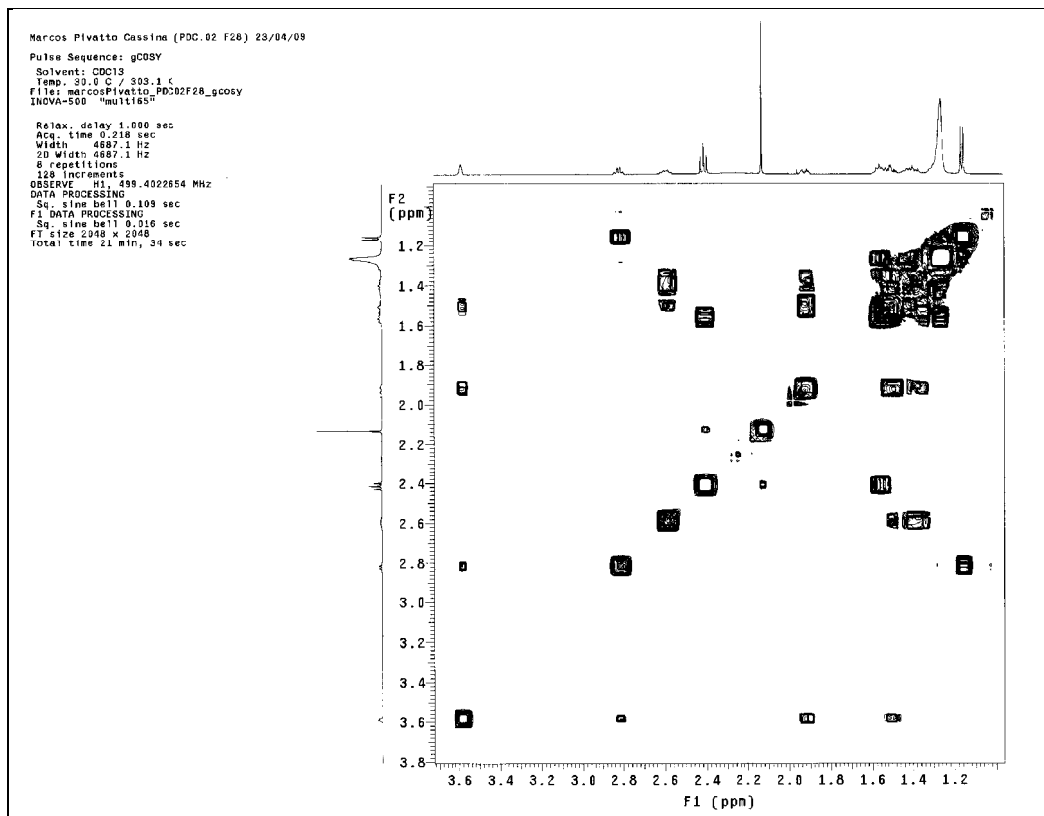
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz

^c m = multiplicidade

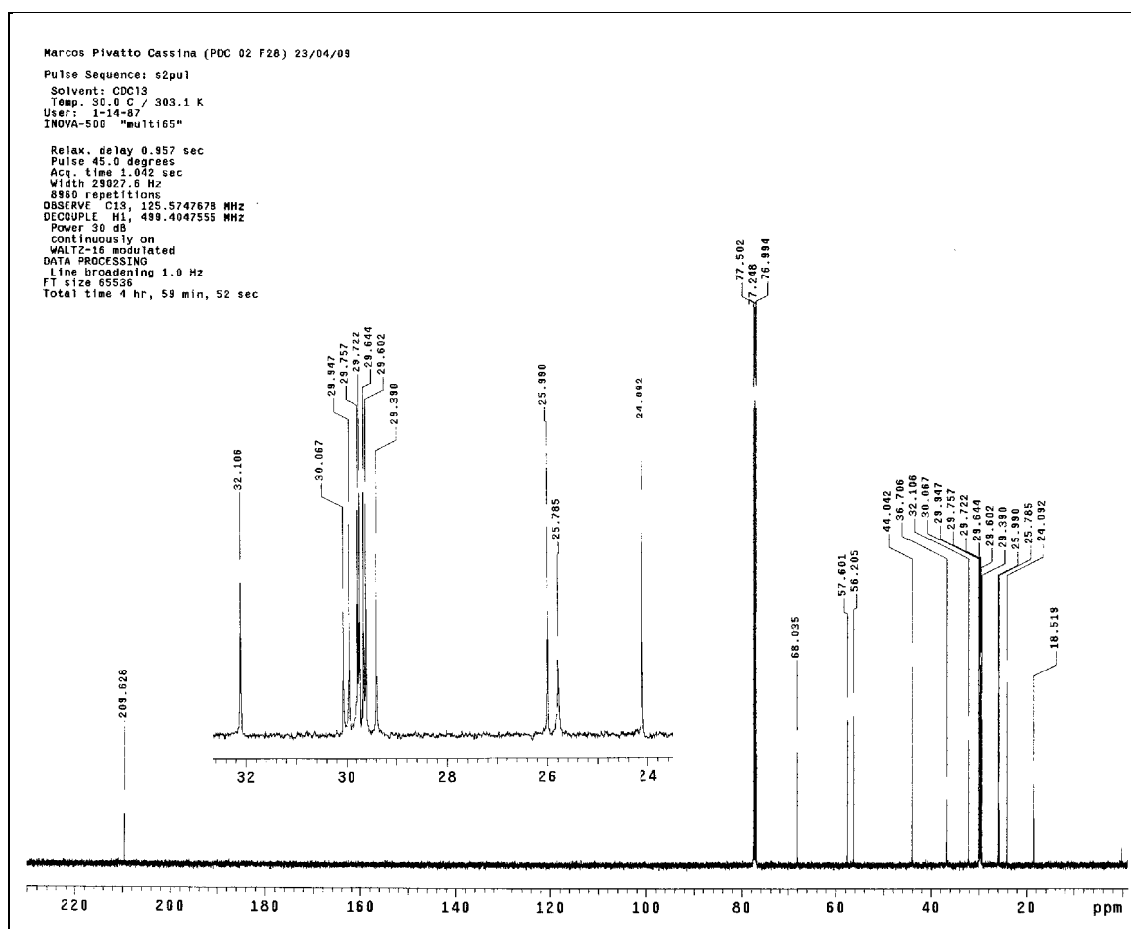


Espectro 21 - Mapa de contorno gCOSY do alcalóide 1.

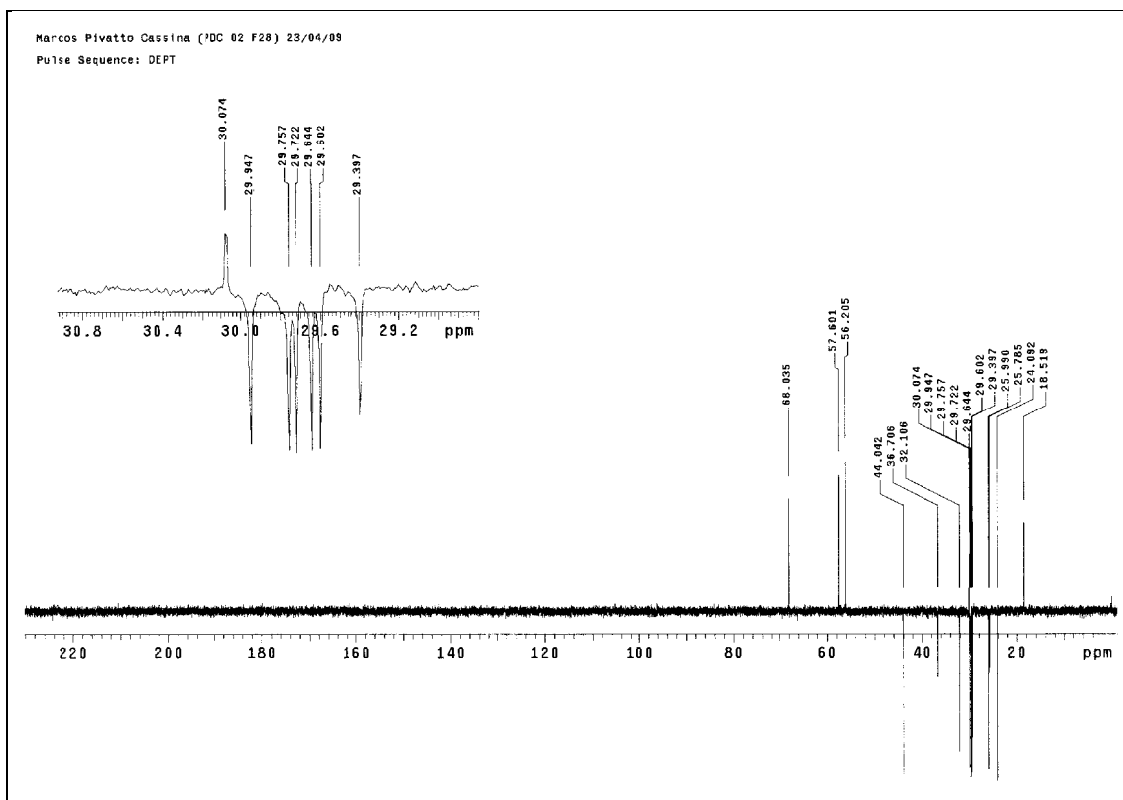


Espectro 22 - Mapa de contorno gCOSY (δ 1,2–3,6) do alcalóide 1.

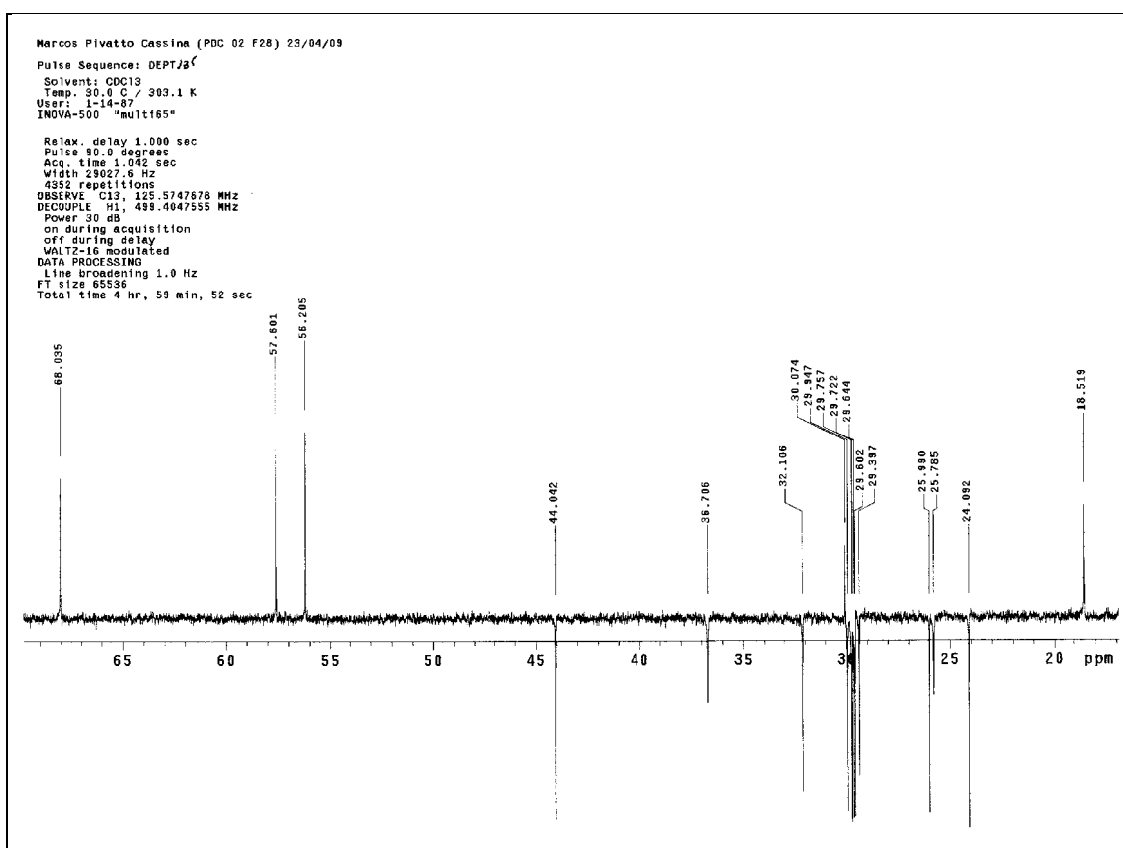
O comprimento da cadeia lateral foi estabelecido pelo número de metilenos observados nos espectros de ^{13}C e DEPT 135 (Espectros 23–26), principalmente na região entre δ 29,40–29,95, que correlacionavam com os hidrogênios em δ 1,19 (H-2'–8') no mapa de contorno gHMQC (Espectro 23–29). A extensão da cadeia lateral está de acordo com os dados do espectro de massas de alta resolução, em conformidade com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2$, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 298,2871, para a presença de dez metilenos seguidos de uma metil-cetona, além do núcleo piperidínico trissubstituído.



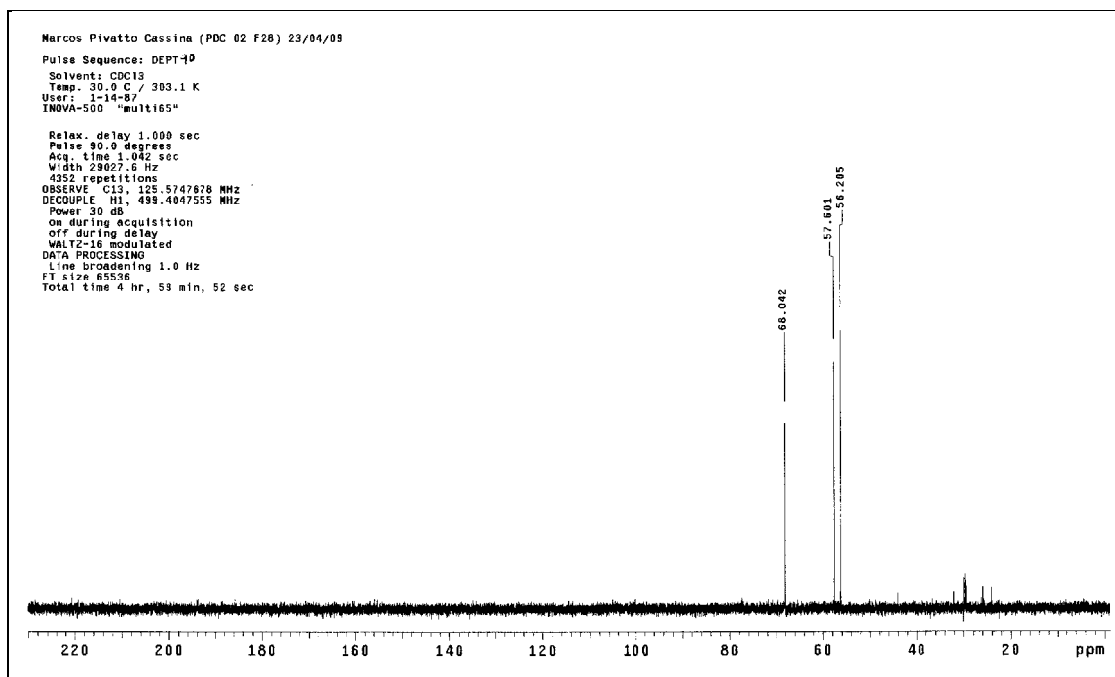
Espectro 23 - Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **1** (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 24 - Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1.



Espectro 25 - Ampliação do espectro 24 (δ 20–65), alcalóide 1.



Espectro 26 - Espectro de RMN de DEPT 90 (125 MHz, CDCl₃) do alcalóide **1**.

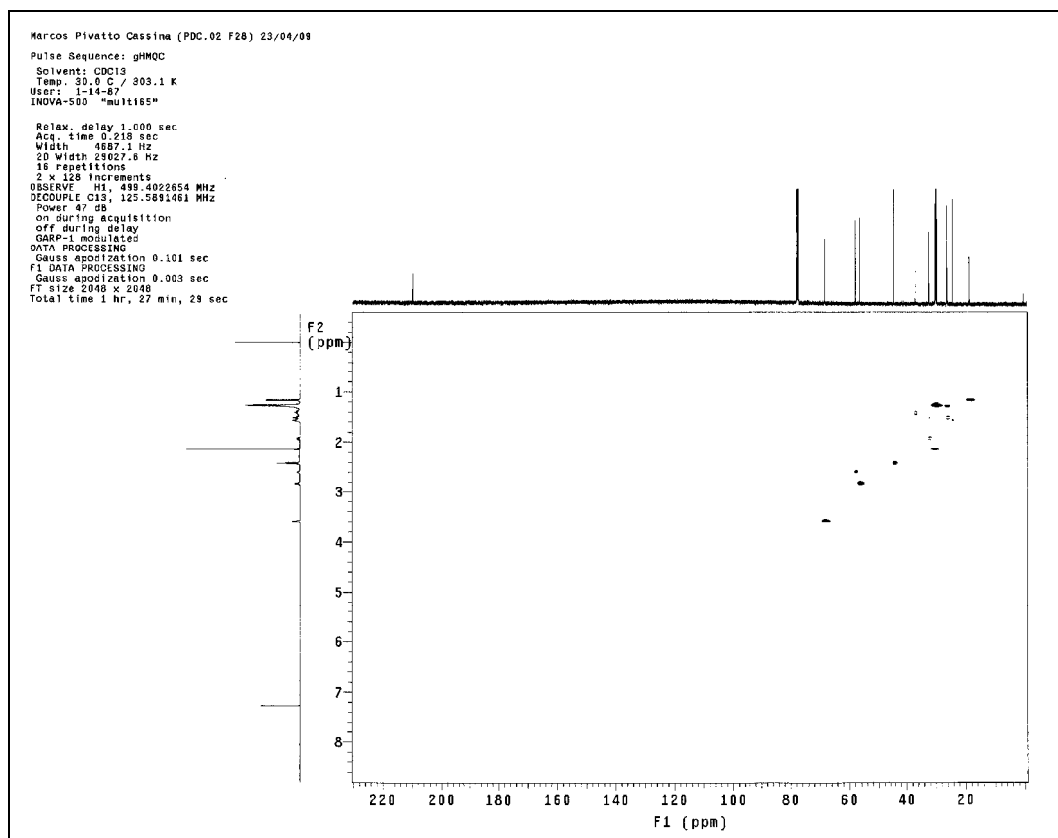
Tabela 4 - Dados de RMN ^{13}C , DEPT, gHMQC e gHMBC de **1**

Posição	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a	DEPT	gHMQC	gHMBC
2	55,70	56,20	CH	2,82	H-6, H-7
3	67,64	68,04	CH	3,59	H-2, H-4, H-5, H-7
4	31,08	32,11	CH ₂	1,91; 1,51	H-2, H-3, H-6
5	27,98	25,78	CH ₂	1,50; 1,40	H-3, H-4, H-6, H-1'
6	56,05	57,60	CH	2,59	H-2, H-4, H-5, H-1'
7	18,70	18,52	CH ₃	1,16	H-2, H-3
1'	36,45	36,71	CH ₂	1,50; 1,40	H-6, H-2', H-3'
2'	26,30	25,99	CH ₂	1,30	H-6, H-1', H-3', H-4'
3'	29,65	29,72 ^c	CH ₂	1,26	
4'	29,62	29,64 ^c	CH ₂	1,26	
5'	29,73	29,76 ^c	CH ₂	1,26	
6'	29,46	29,60 ^c	CH ₂	1,26	
7'	28,87	29,39 ^c	CH ₂	1,26	
8'	29,90	29,95 ^c	CH ₂	1,26	
9'	23,90	24,09	CH ₂	1,56	H-7', H-8', H-10'
10'	43,80	44,04	CH ₂	2,41	H-9', H-12'
11'	207,85	209,63	C	-----	H-9', H-10', H-12'
12'	27,90	30,07	CH ₃	2,13	H-10'

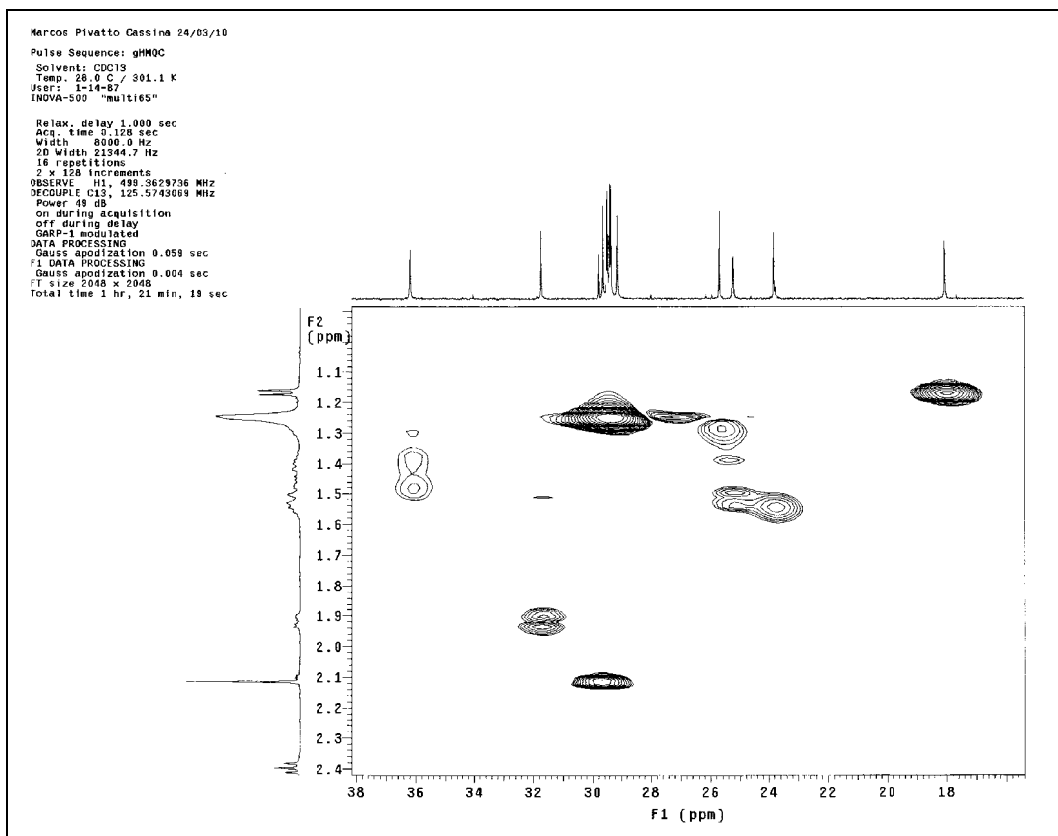
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b Valores calculados pelo programa ChemSkech 4.0

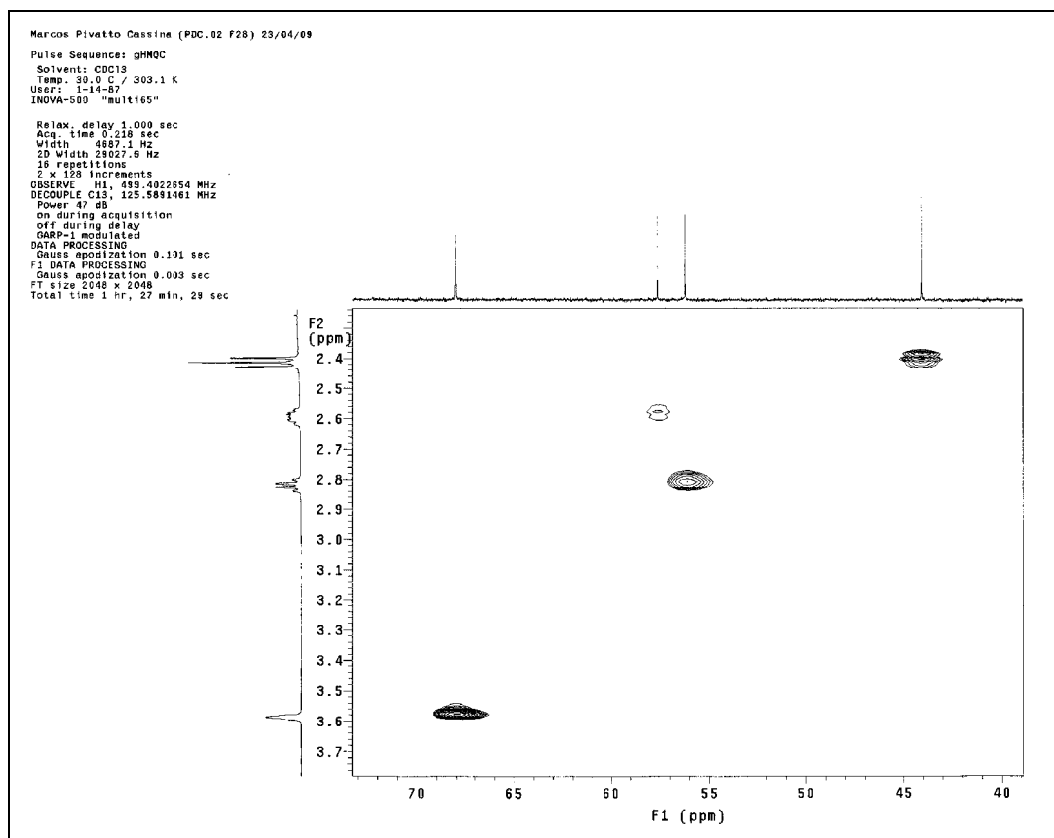
^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados (podem estar intercambiados)



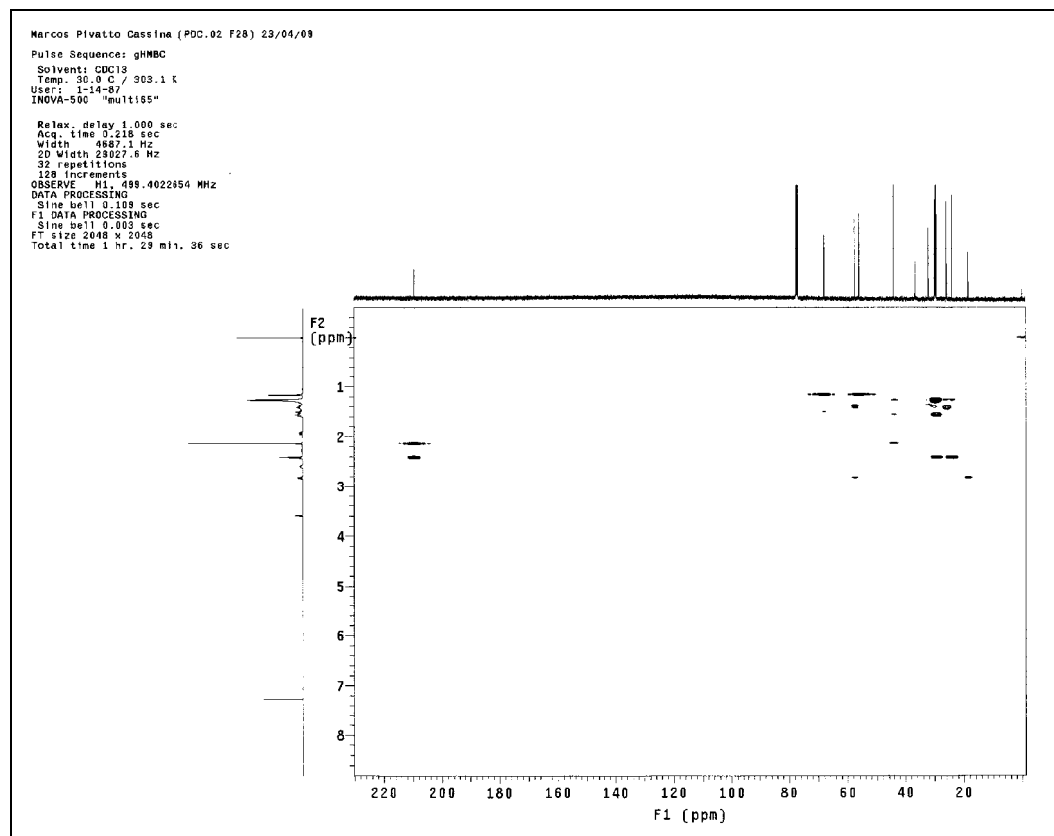
Espectro 27 - Mapa de contorno gHMOC (500 MHz, CDCl₃), do alcalóide **1**.



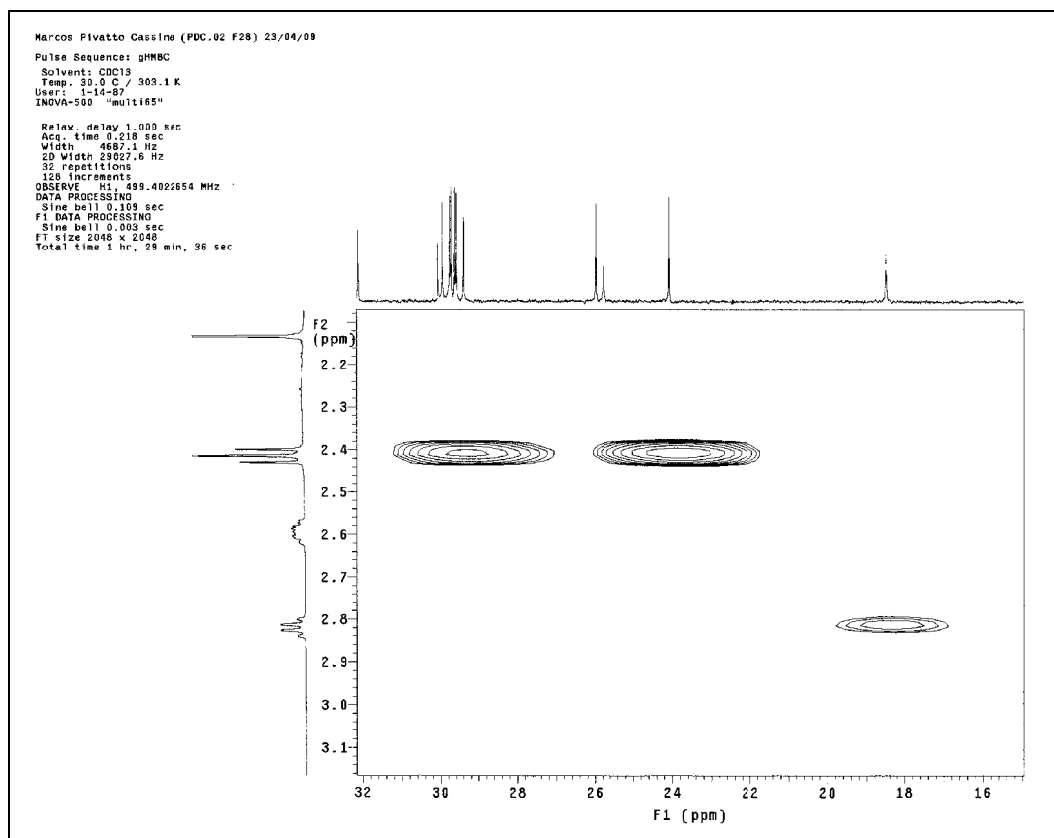
Espectro 28 - Mapa de contorno gHMOC (δ 18–38), do alcalóide **1**.



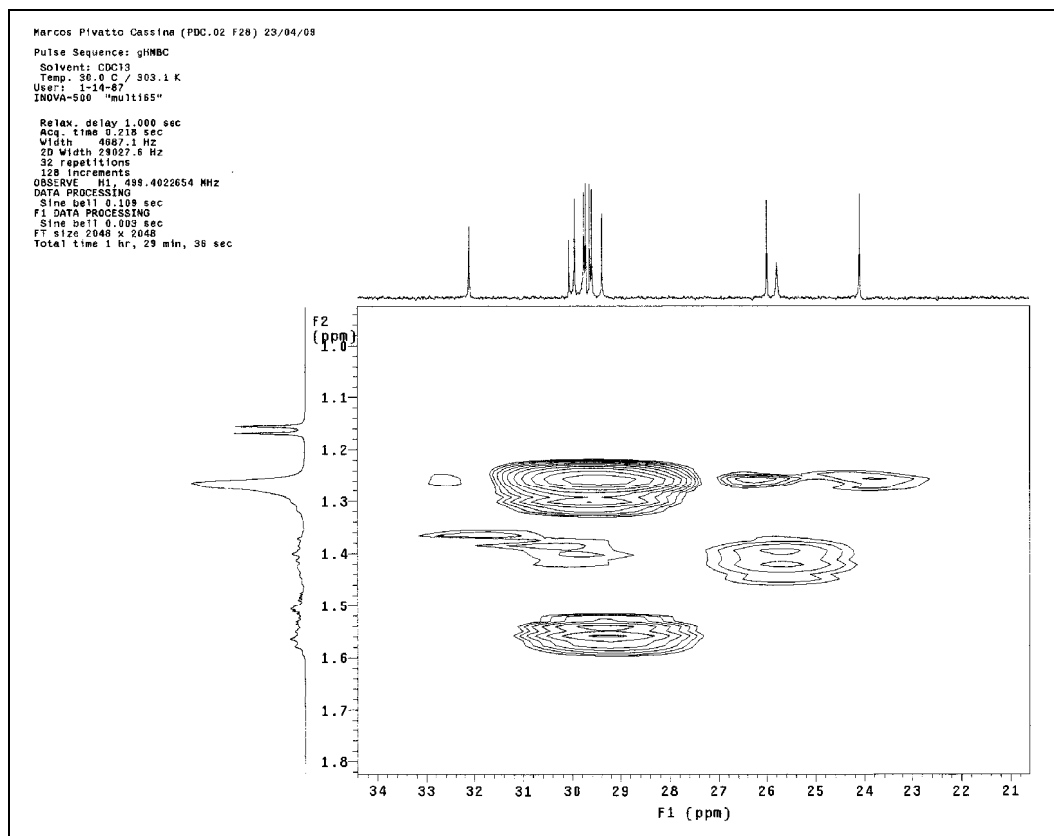
Espectro 29 - Mapa de contorno gHMOC (δ 40–70), do alcalóide **1**.



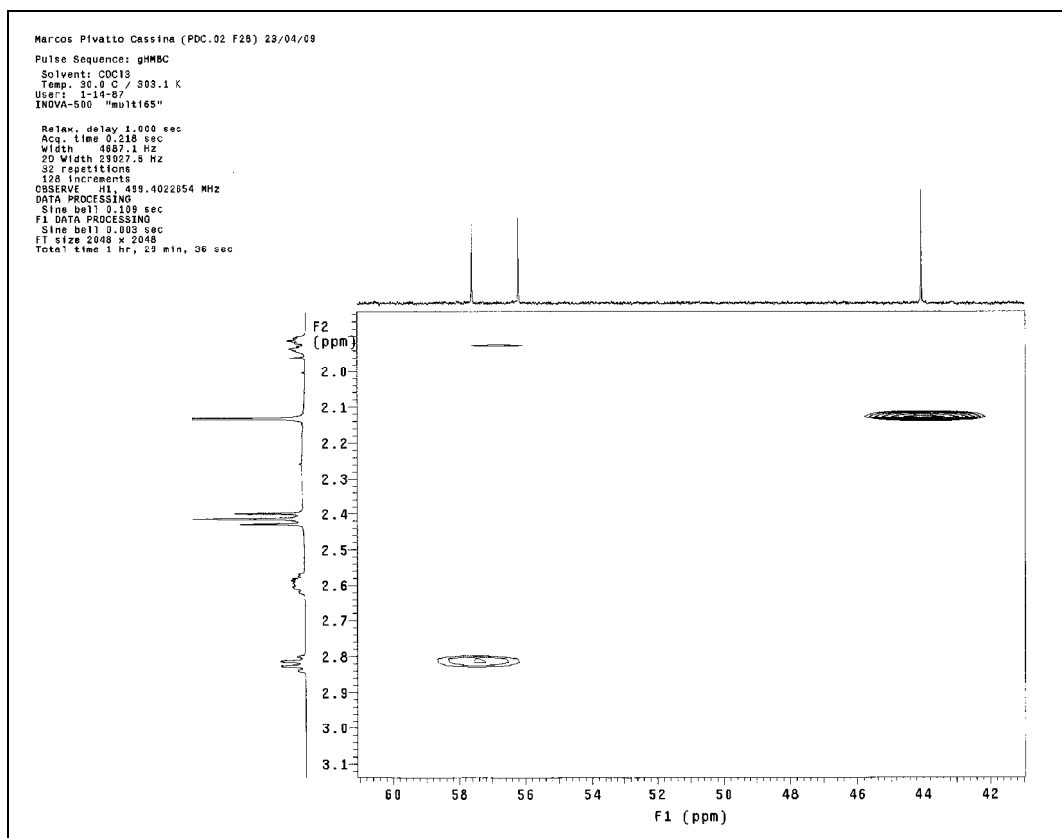
Espectro 30 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CDCl₃), do alcalóide **1**.



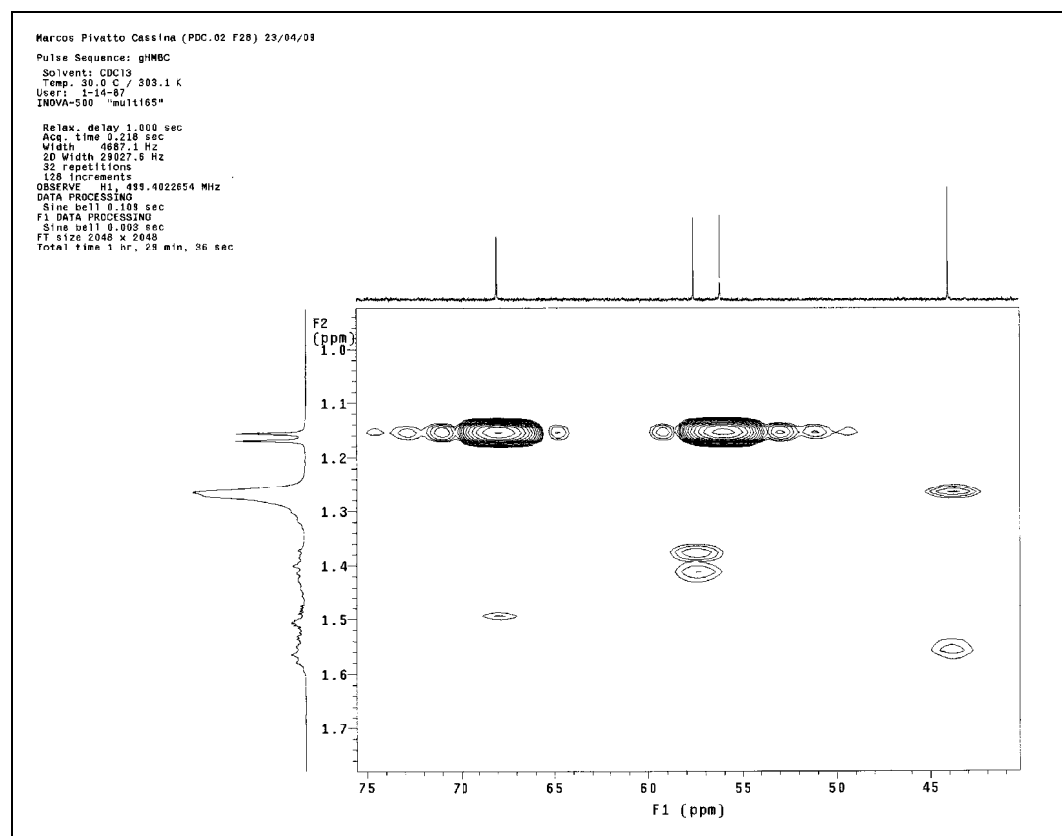
Espectro 31 - Mapa de contorno gHMBC (δ 16–32), do alcalóide 1.



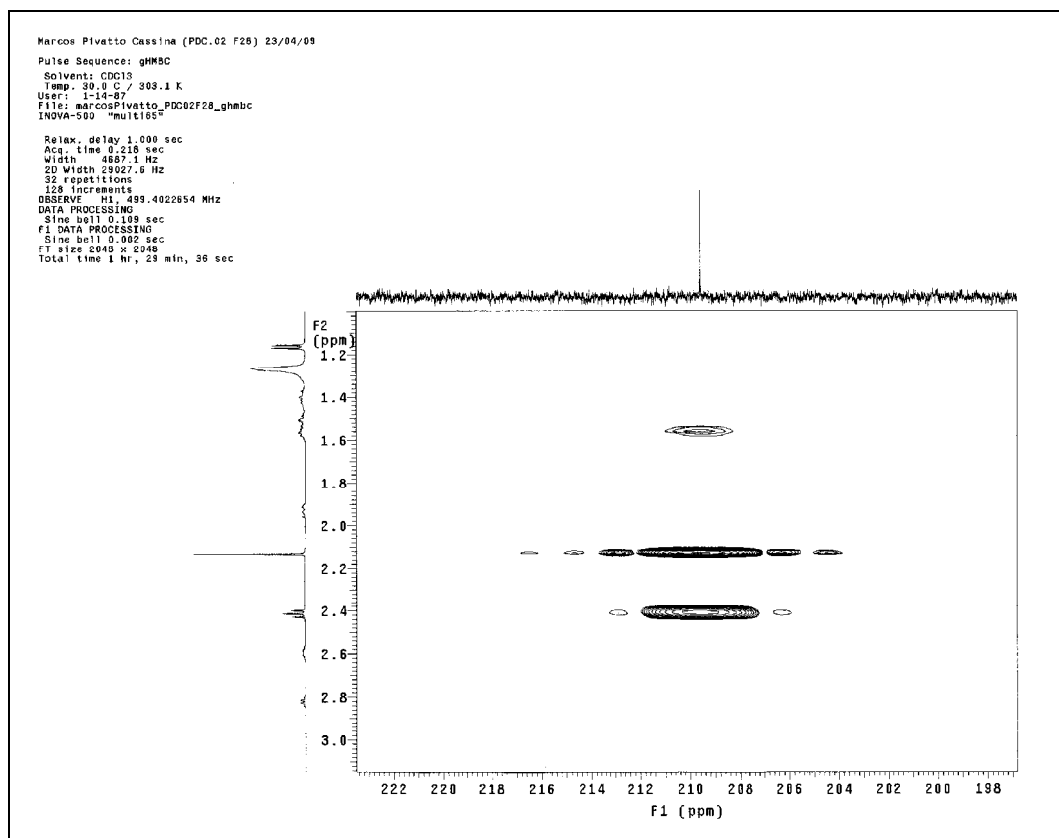
Espectro 32 - Mapa de contorno gHMBC (δ 21–34), do alcalóide 1.



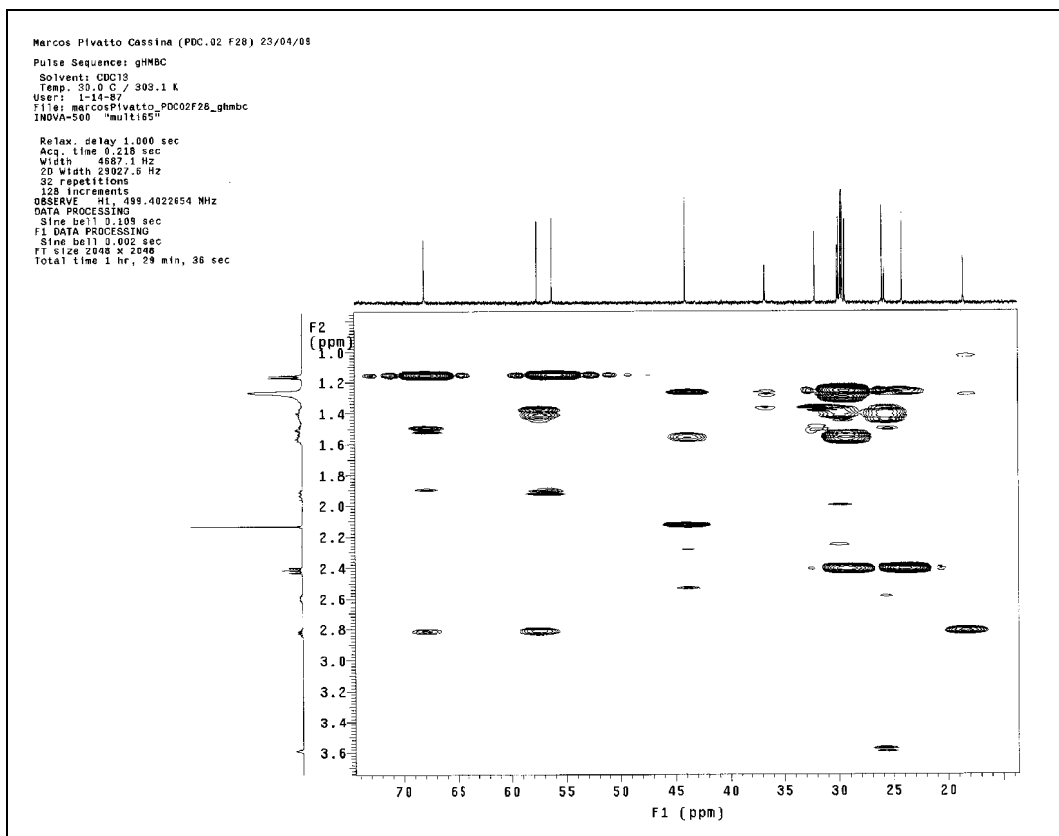
Espectro 33 - Mapa de contorno gHMBC (δ 42–60), do alcalóide **1**.



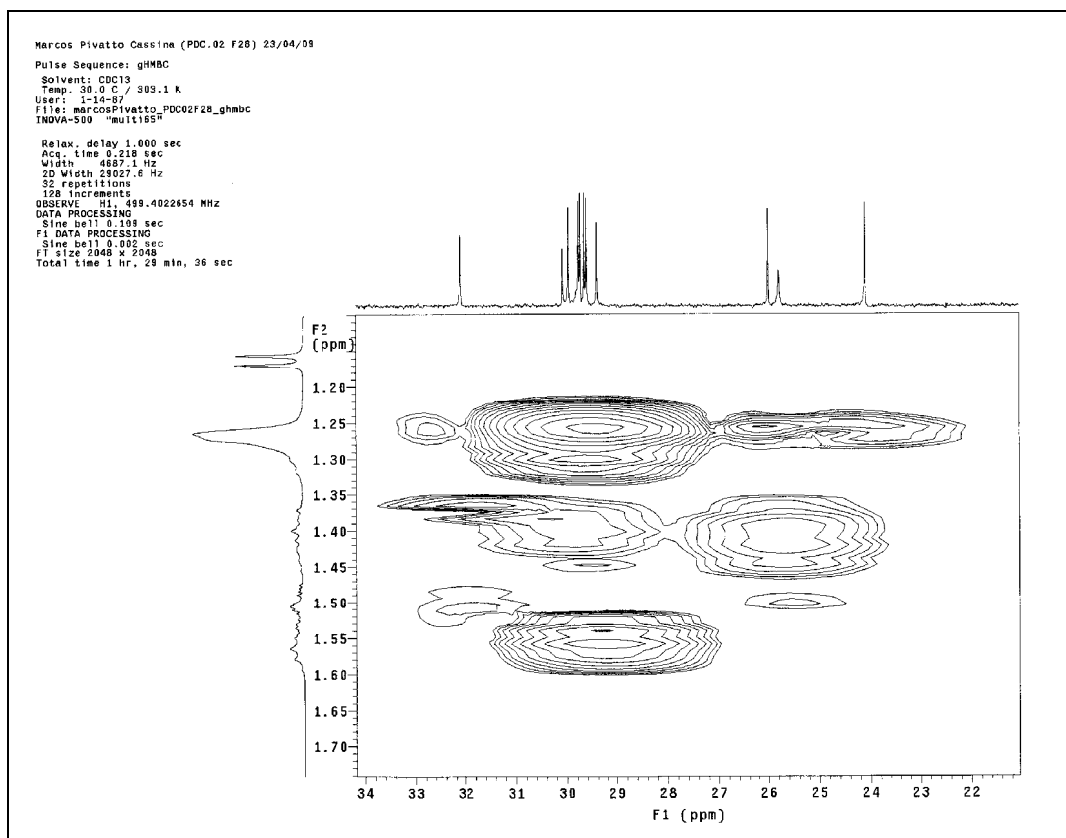
Espectro 34 - Mapa de contorno gHMBC (δ 45–75), do alcalóide **1**.



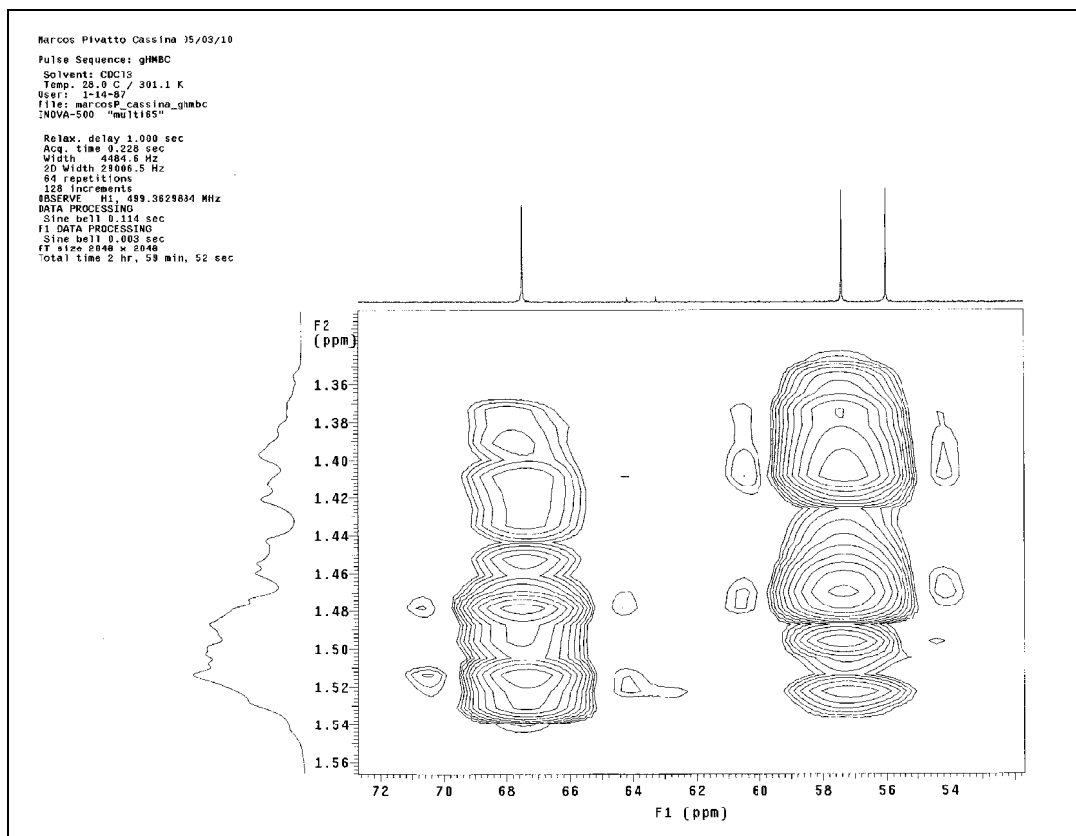
Espectro 35 - Mapa de contorno gHMBC (δ 198–222), do alcalóide 1.



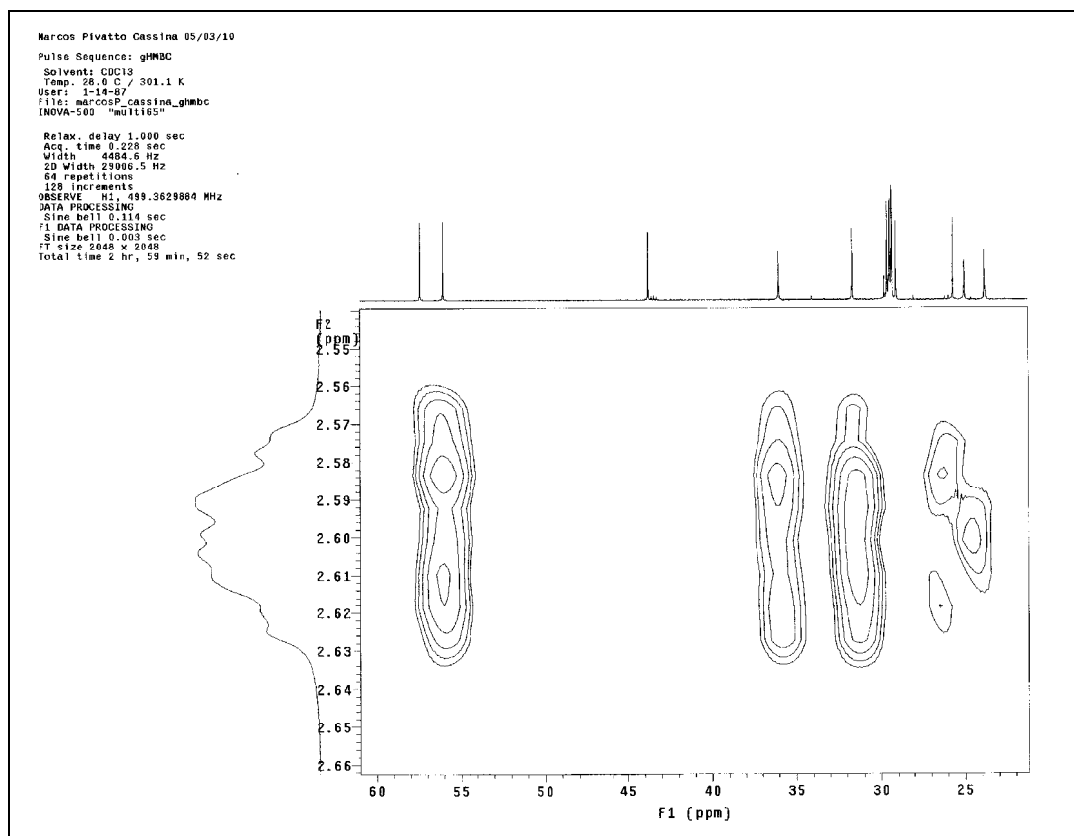
Espectro 36 - Mapa de contorno gHMBC (δ 20–70), do alcalóide 1.



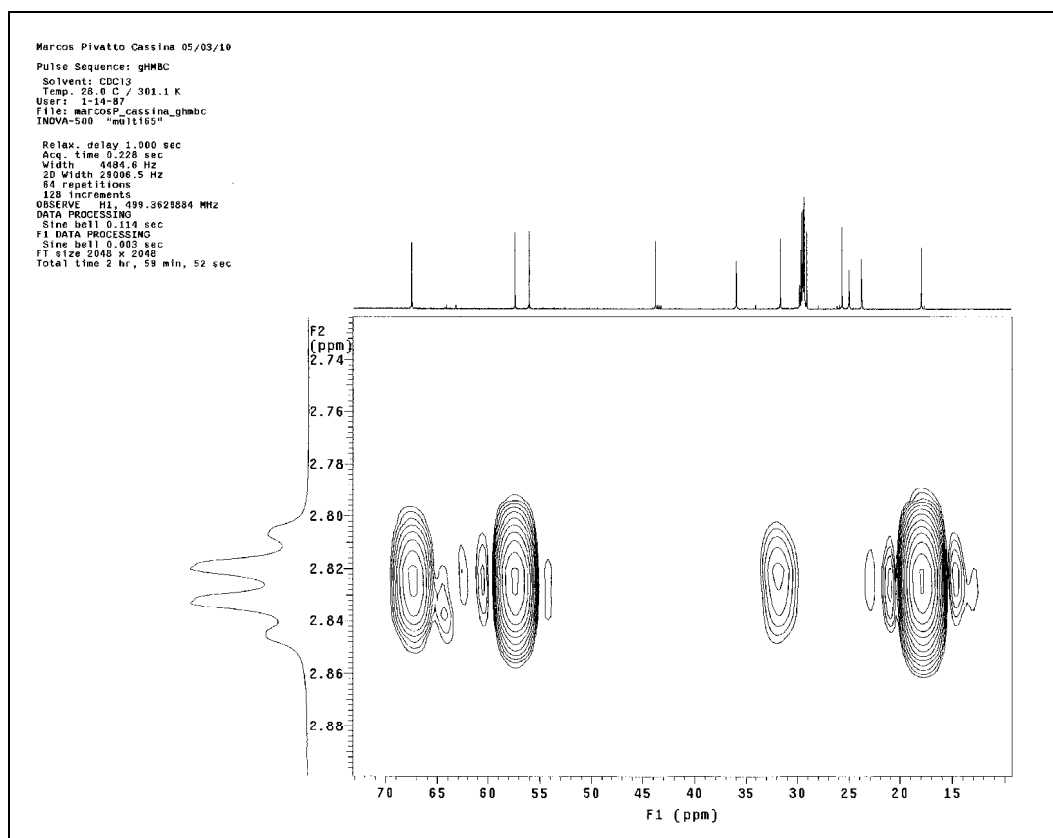
Espectro 37 - Mapa de contorno gHMBC (δ 40–70), do alcalóide 1.



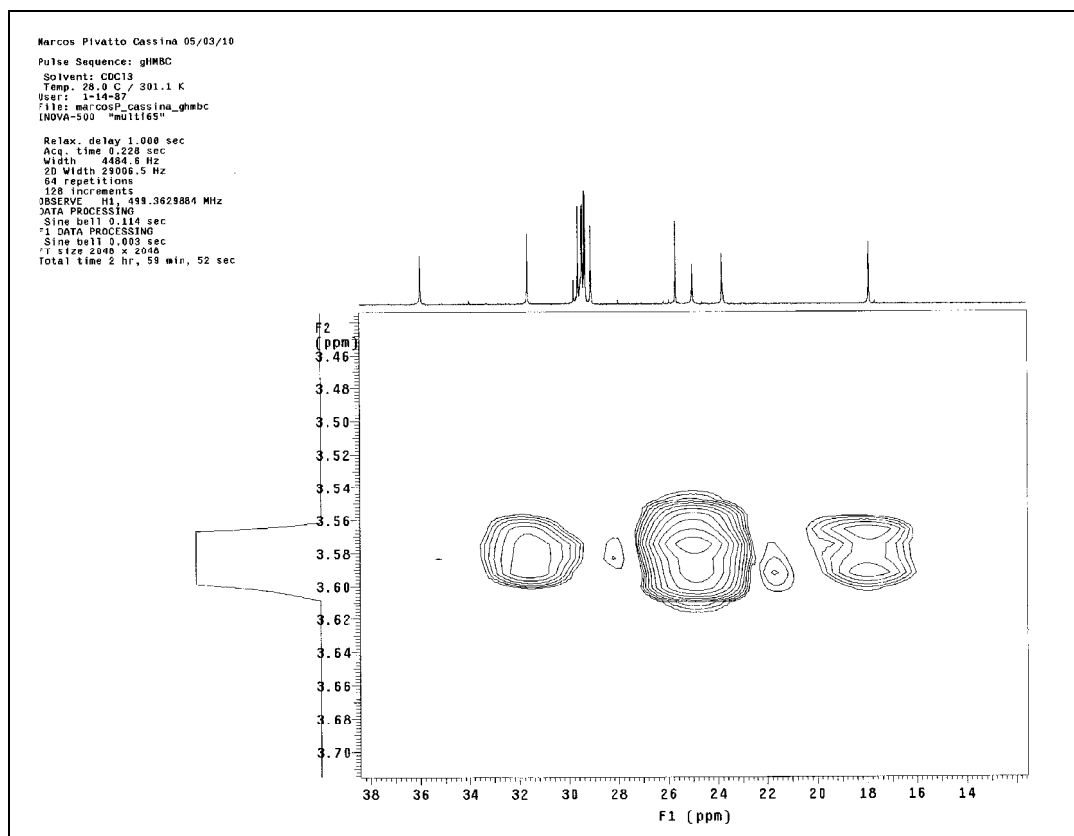
Espectro 38 - Mapa de contorno gHMBC (δ 54–72), do alcalóide 1.



Espectro 39 - Mapa de contorno gHMBC (δ 25–60), do alcalóide 1.



Espectro 40 - Mapa de contorno gHMBC (δ 15–70), do alcalóide 1.



Espectro 41 - Mapa de contorno gHMBC (δ 14–38), do alcalóide **1**.

4.4.2 Elucidação estrutural de **9** (espectralina)

O alcalóide **9** foi isolado como um sólido branco que apresentou mesmo valor de R_f que **1**, quando submetido as mesmas condições cromatográficas (R_f 0,64, Figura 36). Os pontos de fusão para a base livre e cloridrato foram 67,7 e 161,9 °C, respectivamente (Figuras 39 e 40).

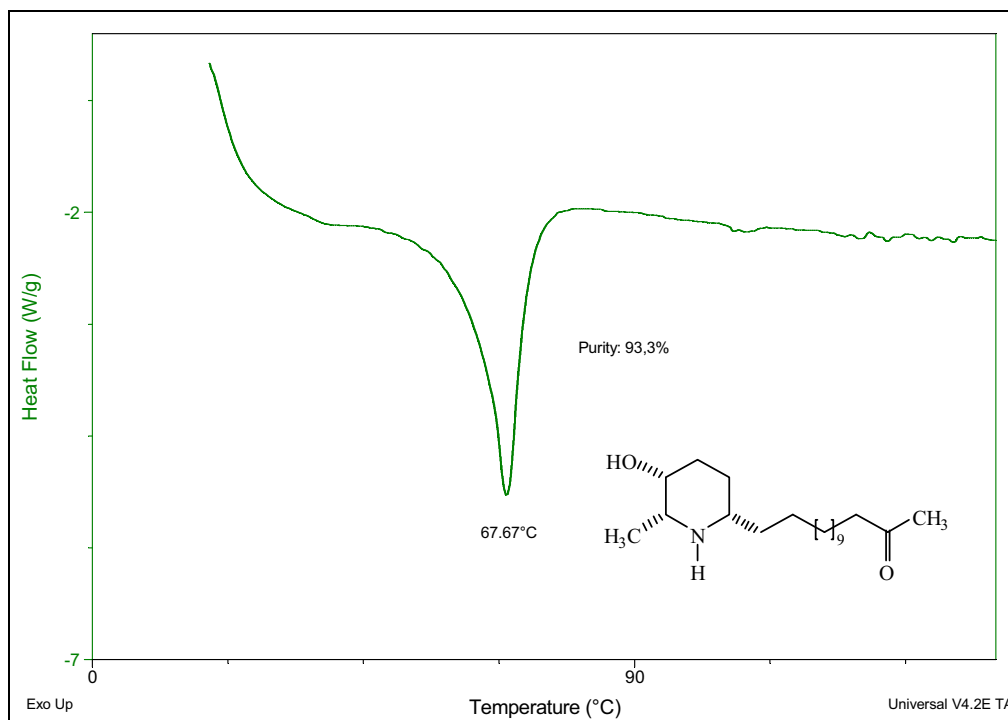


Figura 39 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão de **9** (base livre).

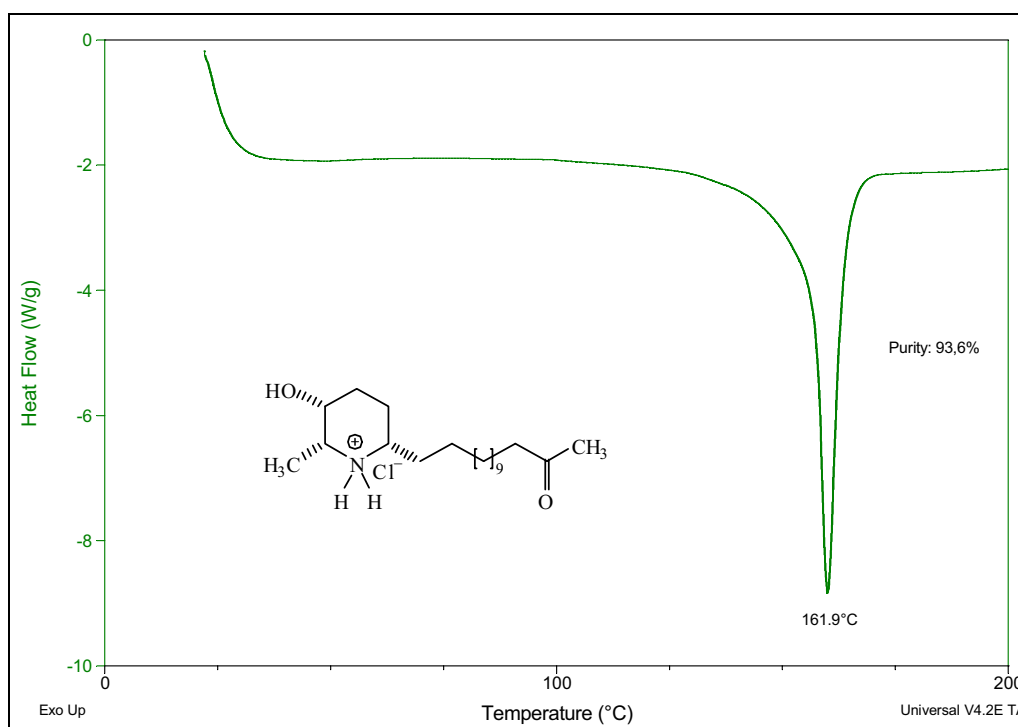
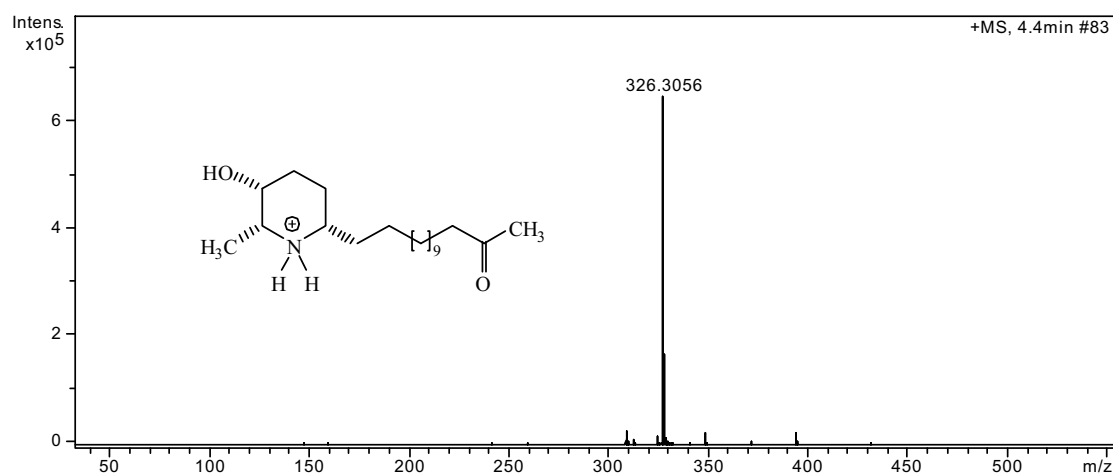


Figura 40 - Curva de DSC para aferição do ponto de fusão de **9** (cloridrato).

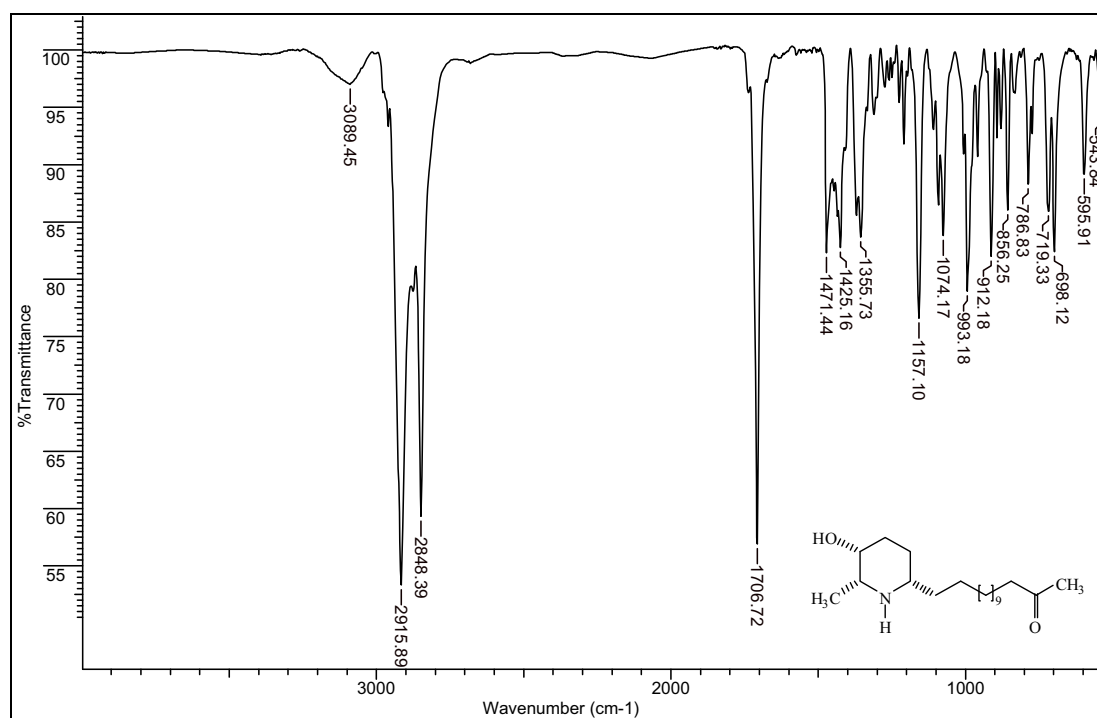
O alcalóide **9** foi submetido a análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{20}H_{39}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a dois. O pico referente ao íon *quasi-*

molecular foi observado em m/z 326,3056 $[M+H]^+$, calculado para $C_{20}H_{40}NO_2^+$, 326,3054 (Espectro 42).



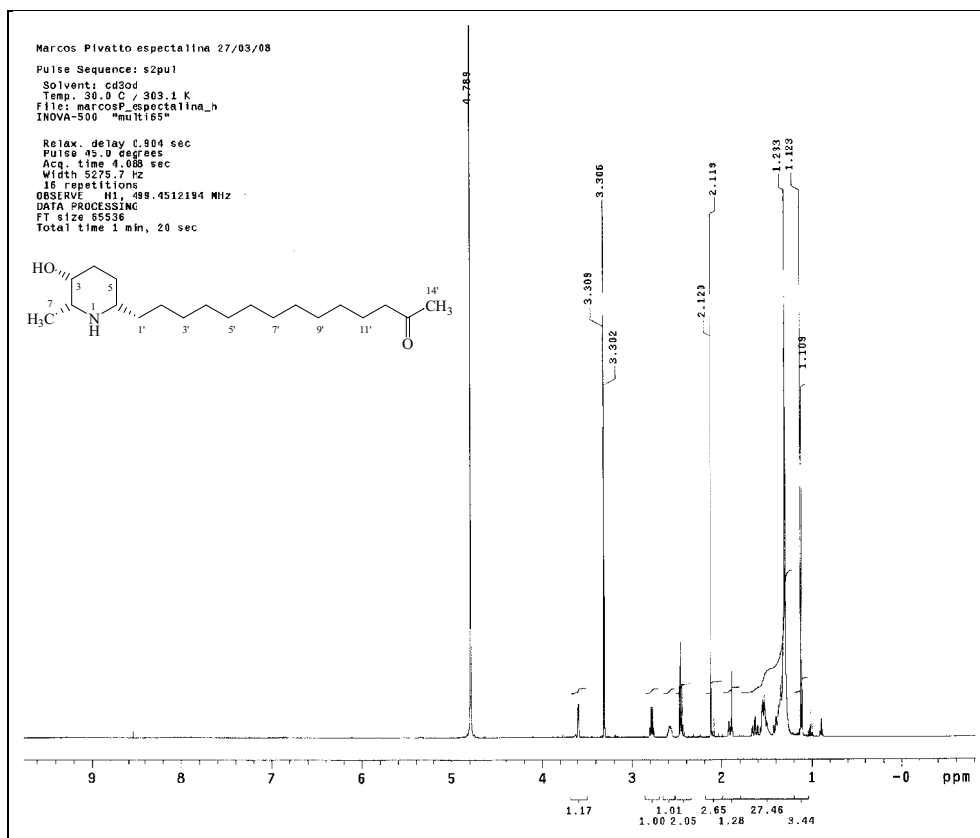
Espectro 42 - IES-EM alta resolução do alcalóide **9**.

A análise do espectro na região do infravermelho permitiu identificar uma banda em 3089 cm^{-1} , proveniente do estiramento do grupo O–H. Os estiramentos simétrico e assimétrico (C–H alifáticos) foram identificados em ν_s 2848 e ν_{as} 2916 cm^{-1} , respectivamente. A banda relativa ao estiramento da função carbonila (C=O) da cetona foi observada em ν 1707 cm^{-1} , assim como as absorções relativas às deformações angulares assimétricas em ν 1471 e simétricas em ν 1425 das metilas (Espectro 43). Não foi possível observar a banda proveniente do estiramento N–H.

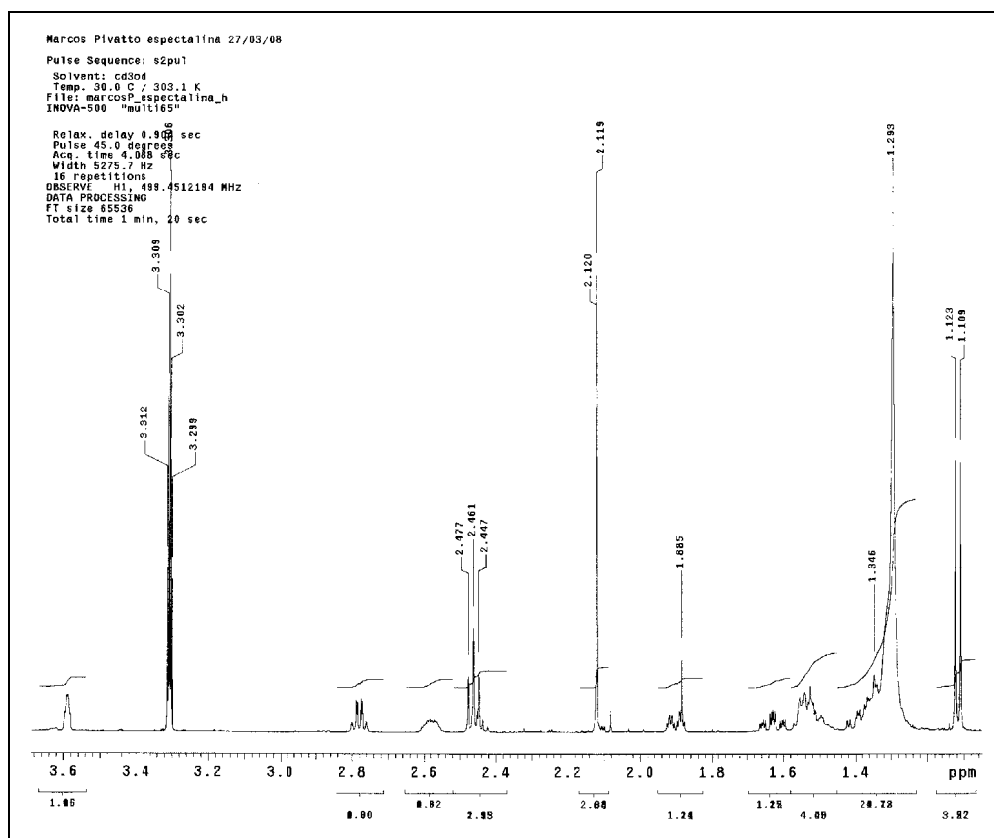


Espectro 43 - Espectro na região do IV do alcalóide **9** (base livre).

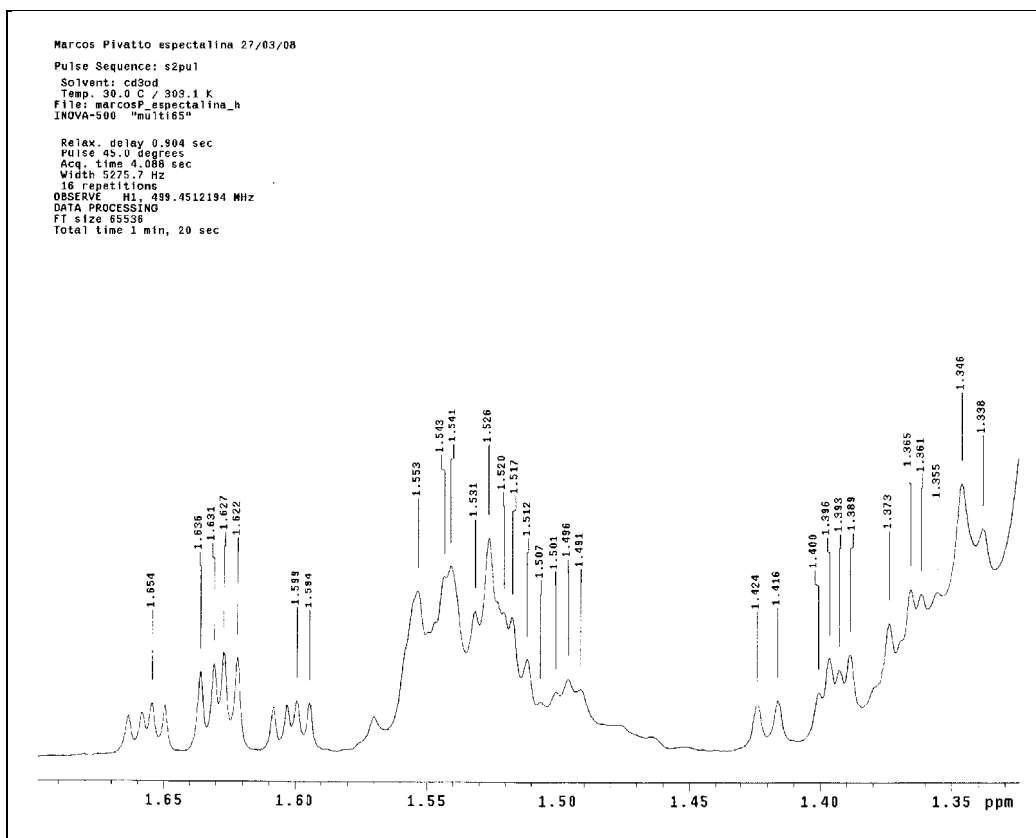
A análise dos espectros de RMN de **9** (Espectros 44–62), permitiu observar que os sinais que identificam o núcleo piperidínico trissubstituído e a metil-cetona são idênticos ao do alcalóide **1**, porém o número de sinais de carbono que aparece na região δ 30,24–30,86, corresponde a oito metilenos para o alcalóide **9**, que podem ser visivelmente caracterizados quando levamos em consideração duas casas decimais (Tabelas 5 e 6). A extensão da cadeia lateral está de acordo com os dados do espectro de massas de alta resolução, em conformidade com a fórmula molecular $C_{20}H_{39}NO_2$, $[M+H]^+$ 326,3056, para a presença de doze metilenos seguidos da metil-cetona, além do núcleo piperidínico trissubstituído.



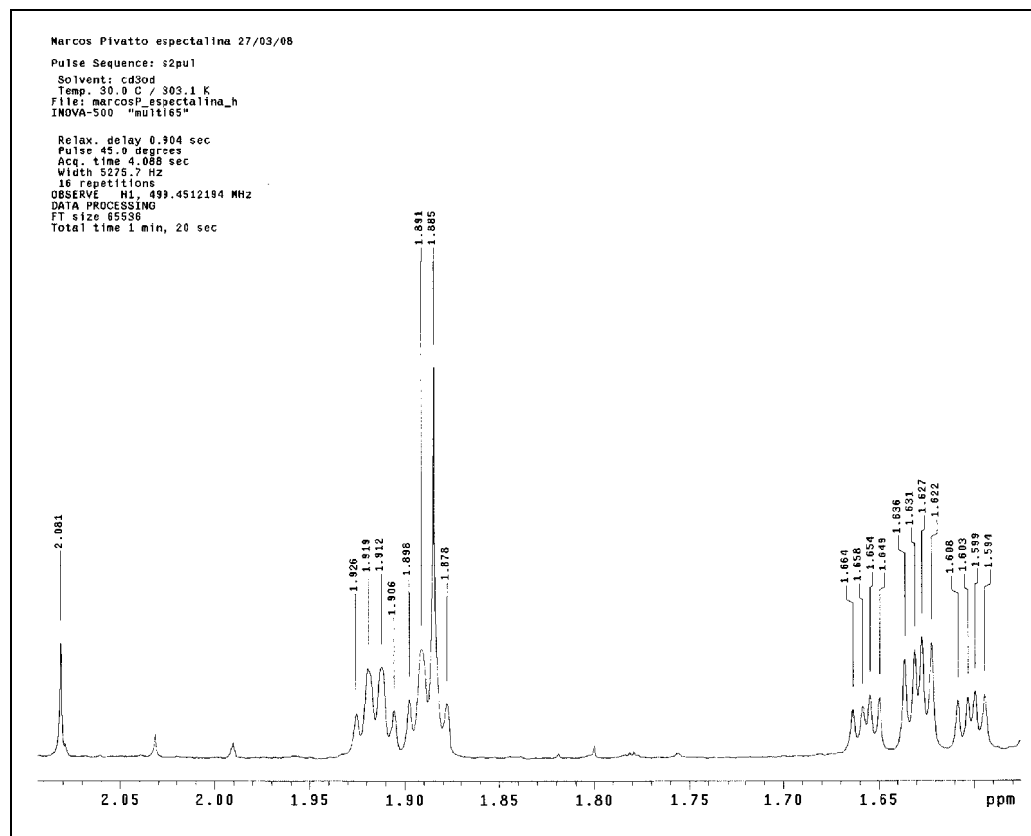
Espectro 44 - Espectro de RMN ^1H de **9** (500 MHz, CD_3OD).



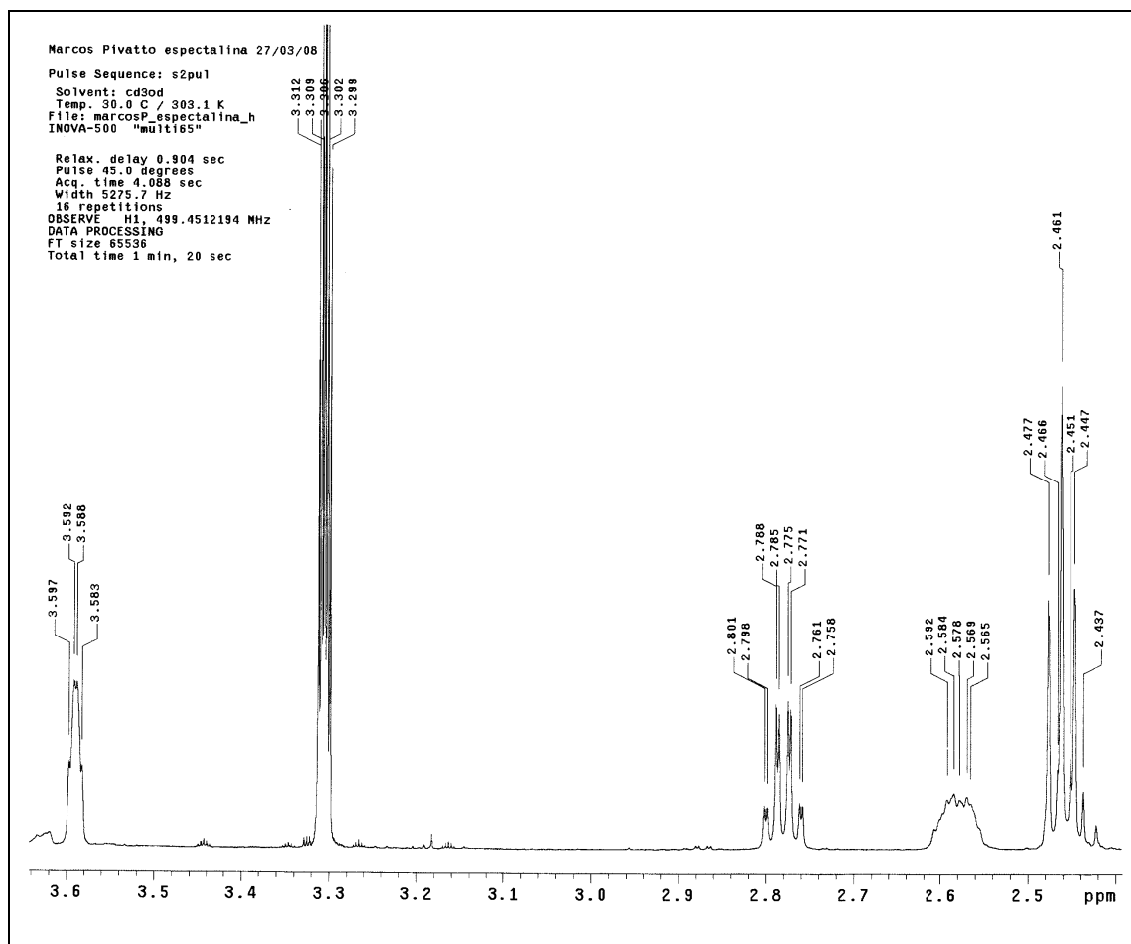
Espectro 45 - Ampliação do espectro 44 (δ 1,4–3,6), alcalóide **9**.



Espectro 46 - Ampliação do espectro 45 (δ 1,35–1,65), alcalóide **9**.



Espectro 47 - Ampliação do espectro 45 (δ 1,65–2,05), alcalóide **9**.



Espectro 48 - Ampliação do espectro 45 (δ 2,5–3,6), alcalóide **9**.

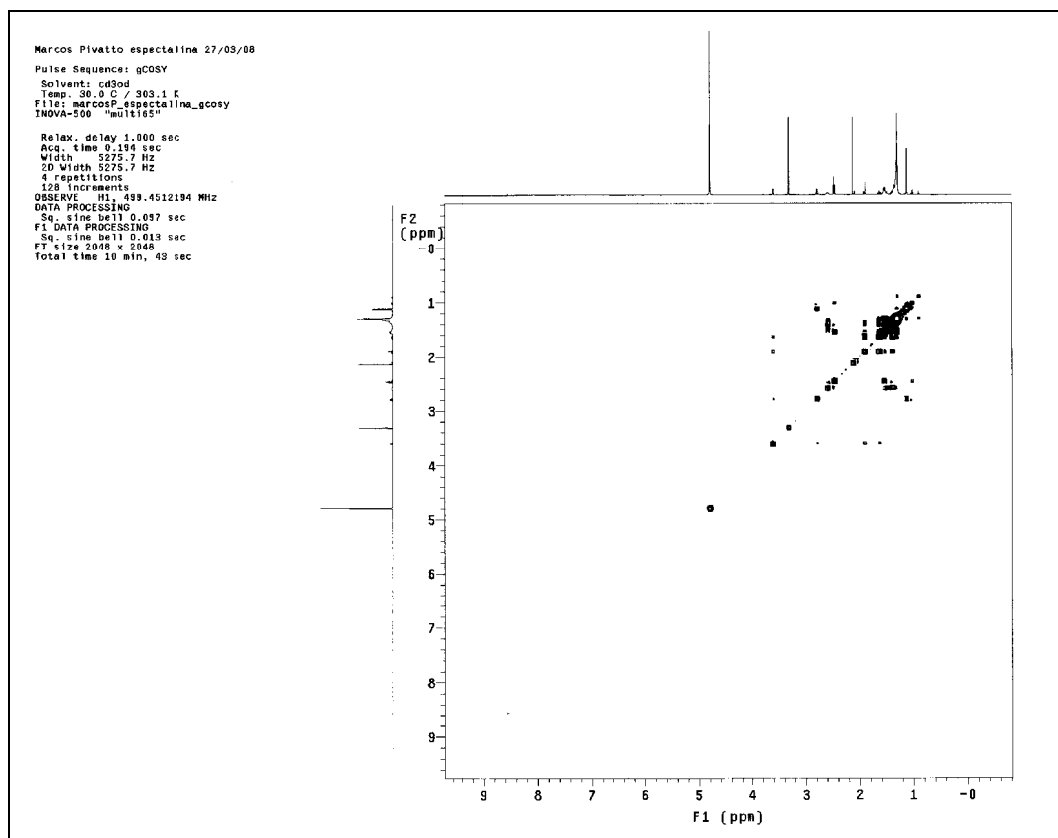
Tabela 5 - Dados de RMN ^1H e gCOSY de **9** (500 MHz, CD_3OD)

Posição	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$, m^{c} , J^{b}	gCOSY
2	2,78 dq (7,0; 1,5)	H-7, H-3
3	3,59 sl	H-2, H-4a, H-4b
4a	1,90 m	H-3, H-4b, H-5a, H-5b
4b	1,63 m	H-3, H-4a, H-5a, H-5b
5a	1,52 m	H-4a, H-4b, H-5b, H-6
5b	1,39 m	H-4a, H-4b, H-5a, H-6
6	2,58 m	H-5a, H-5b, H-1'a, H-1'b
7	1,12 d (7,0)	H-2
1'a	1,49 m	H-6, H-2'
1'b	1,35 m	H-6, H-2'
2'	1,36 m	H-3'
3'- 10'	1,29 sl	H-2', H-9'
11'	1,55 m	H-8', H-10'
12'	2,46 t (7,0)	H-9', H-12'
13'	-----	-----
14'	2,12 s	H-10'

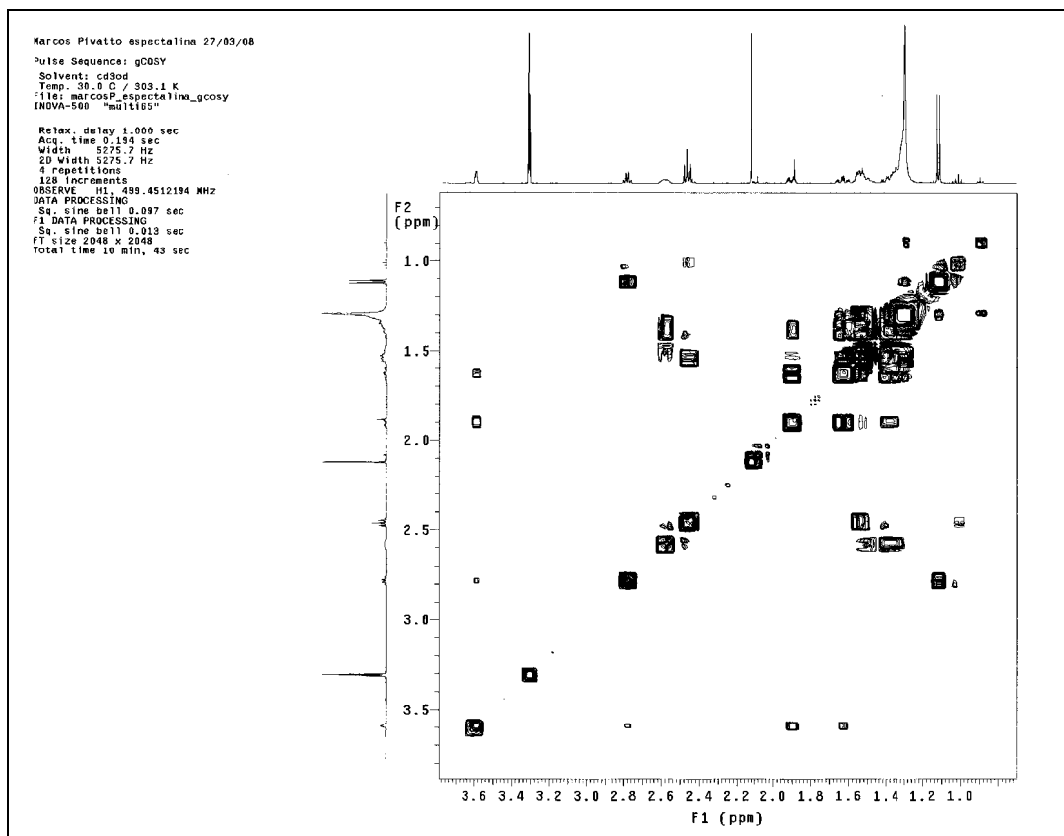
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

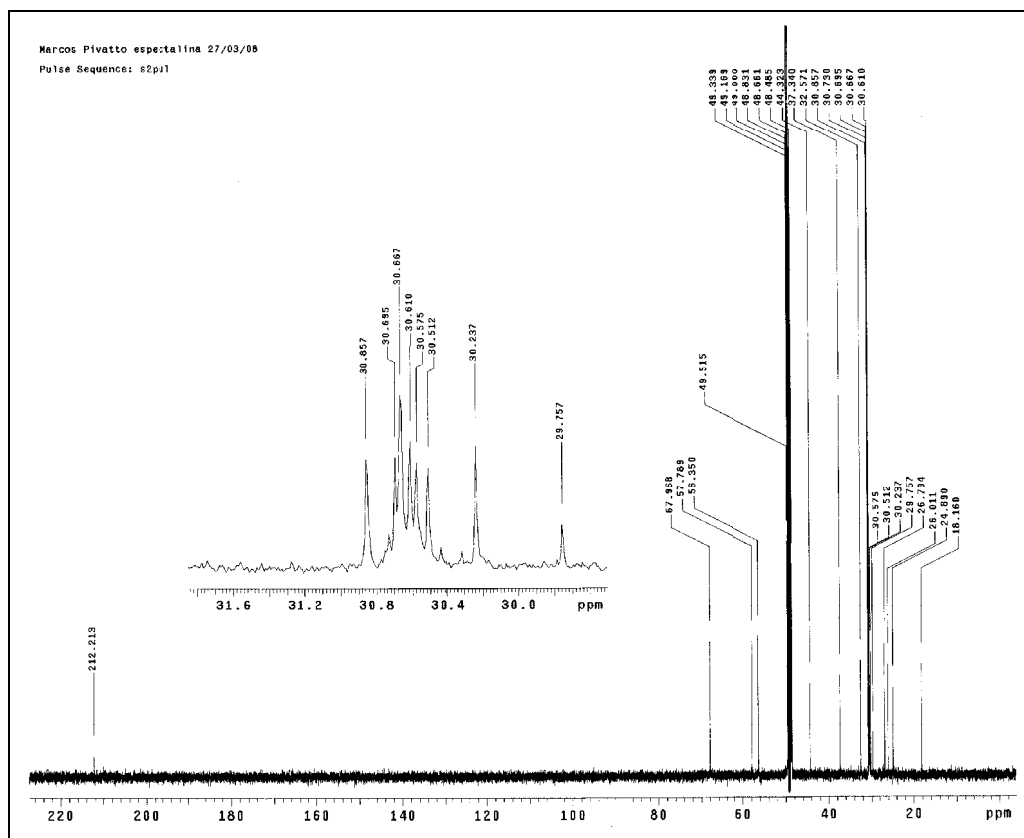
^b Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz

^c m = multiplicidade

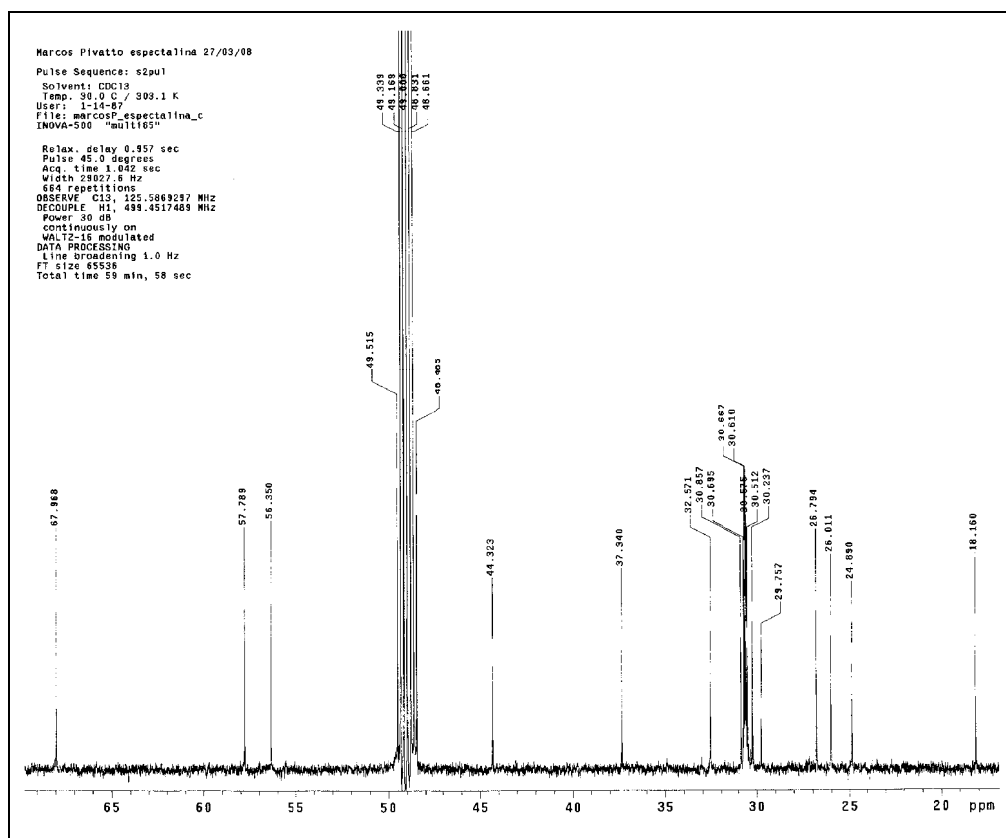


Espectro 49 - Mapa de contorno gCOSY do alcalóide 9.

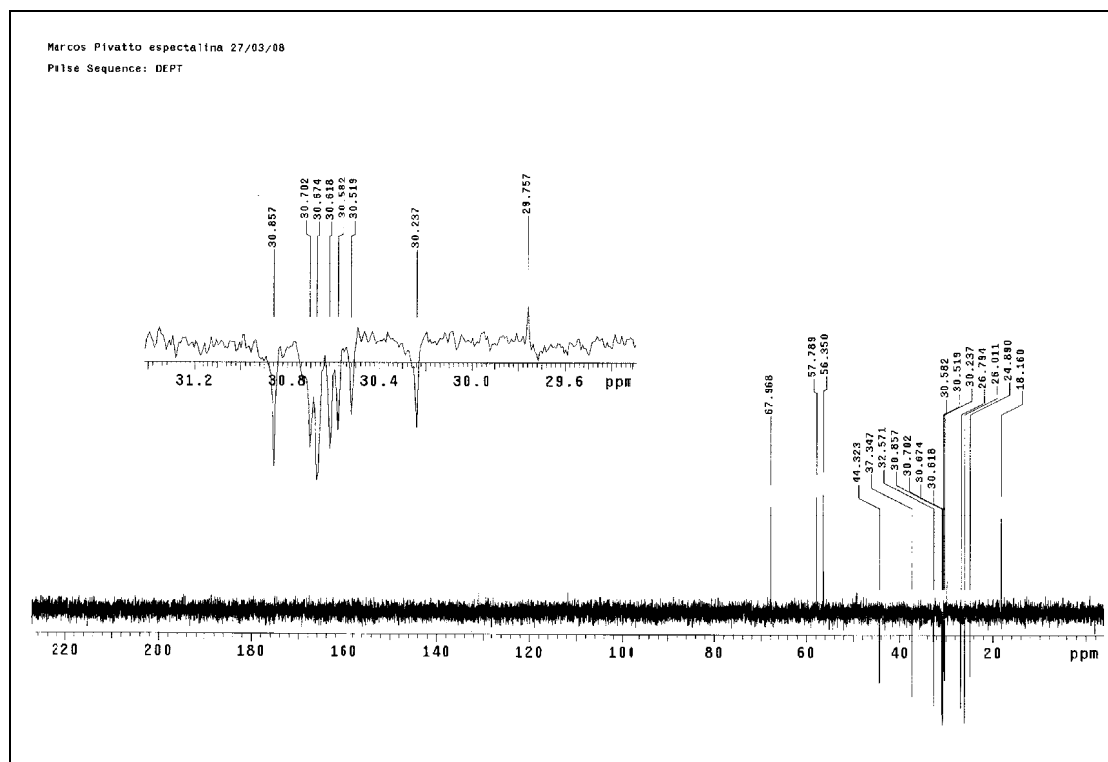
Espectro 50 - Mapa de contorno gCOSY (δ 1,0–3,6) do alcalóide 9.



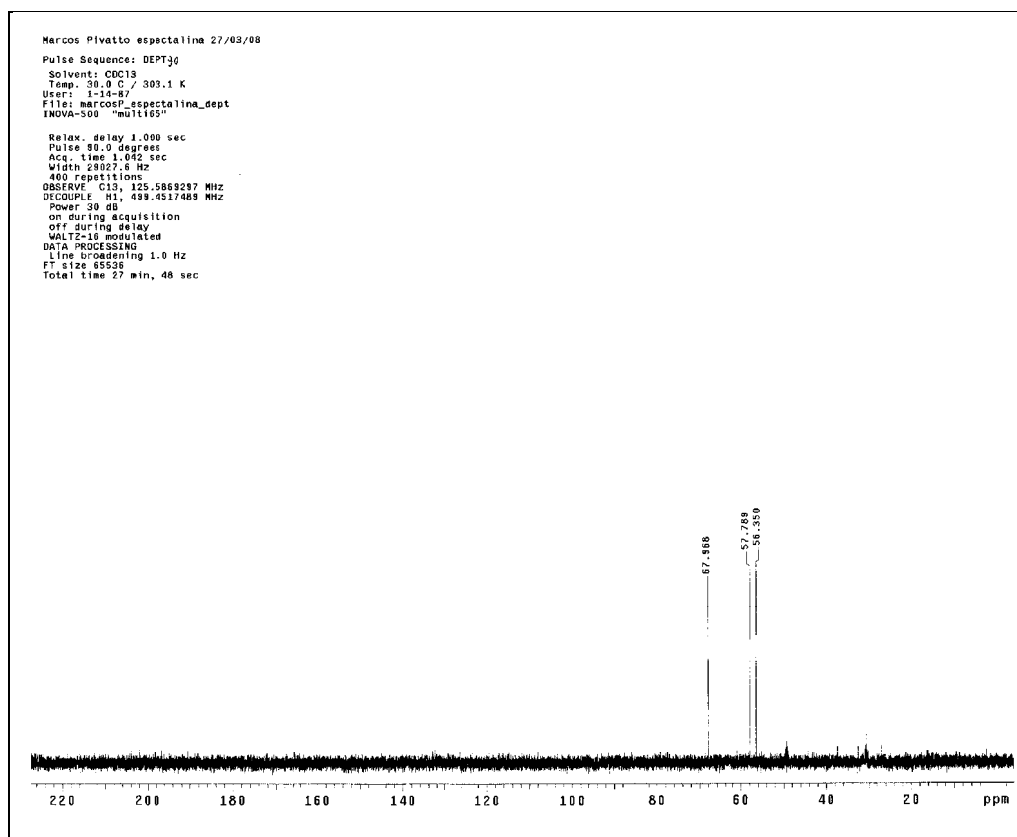
Espectro 51 - Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **9** (125 MHz, CD_3OD).



Espectro 52 - Ampliação do espectro 51 (δ 20–65), alcalóide **9**.



Espectro 53 - Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CD₃OD) do alcalóide **9**.



Espectro 54 - Espectro de RMN de DEPT 90 (125 MHz, CD₃OD) do alcalóide **9**.

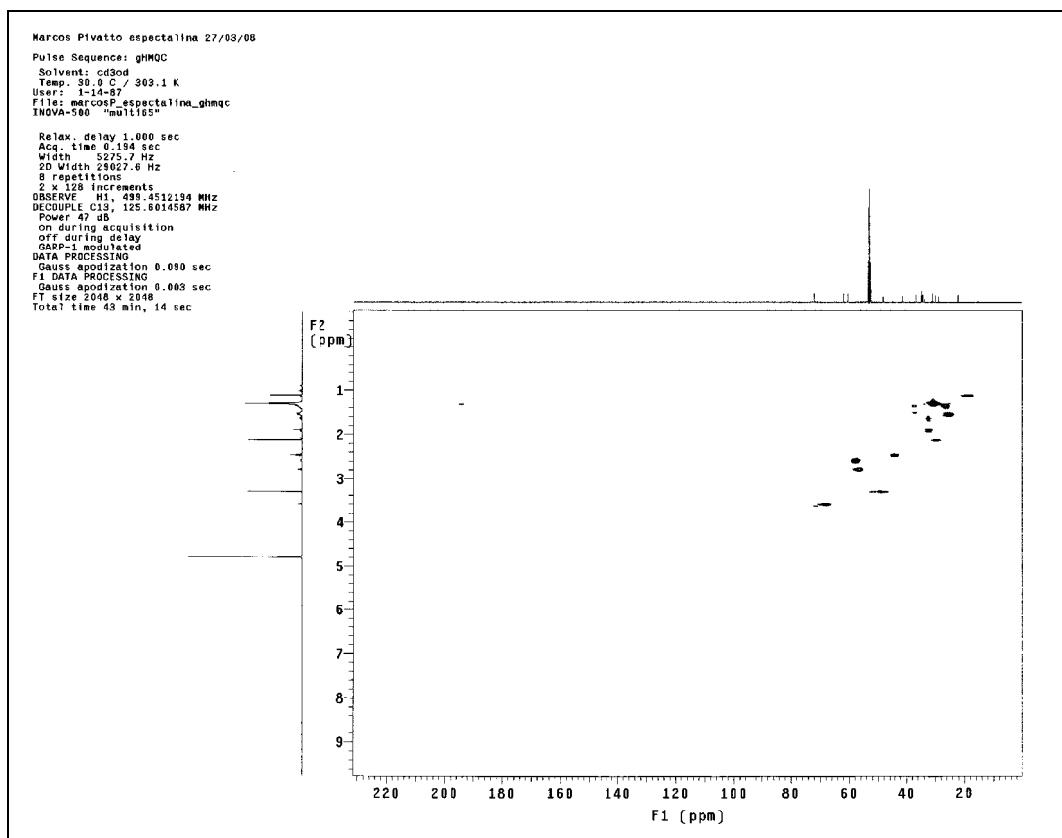
Tabela 6 - Dados de RMN ^{13}C , DEPT, gHMQC e gHMBC de **9**

Posição	δ_{C} calculado ^b	δ_{C} ^a	DEPT	gHMQC	gHMBC
2	55,70	56,35	CH	2,78	H-7, H-6
3	67,95	67,97	CH	3,59	H-2, H-4, H-5, H-7
4	32,00	32,57	CH ₂	1,90; 1,63	H-2
5	26,10	26,01	CH ₂	1,52; 1,39	H-3, H-4, H-1'
6	57,20	57,79	CH	2,58	H-2, H-4, H-5, H-1'
7	18,70	18,16	CH ₃	1,12	H-2
1'	37,10	37,34	CH ₂	1,49; 1,35	H-2', H-3'
2'	25,90	26,79	CH ₂	1,36	H-3', H-4'
3'	29,20	30,51 ^c	CH ₂	1,29	
4'	29,50	30,61 ^c	CH ₂	1,29	
5'	29,60	30,70 ^c	CH ₂	1,29	
6'	29,60	30,67 ^c	CH ₂	1,29	
7'	29,51	30,67 ^c	CH ₂	1,29	
8'	29,46	30,58 ^c	CH ₂	1,29	
9'	28,87	30,24 ^c	CH ₂	1,29	H-11'
10'	29,90	30,86 ^c	CH ₂	1,29	H-11', H-12'
11'	23,90	24,89	CH ₂	1,55	H-9', H-10', H-12'
12'	43,80	44,32	CH ₂	2,46	H-10', H-11', H-14'
13'	207,85	212,21	C	-----	H-11', H-12', H-14'
14'	27,90	29,76	CH ₃	2,12	H-12'

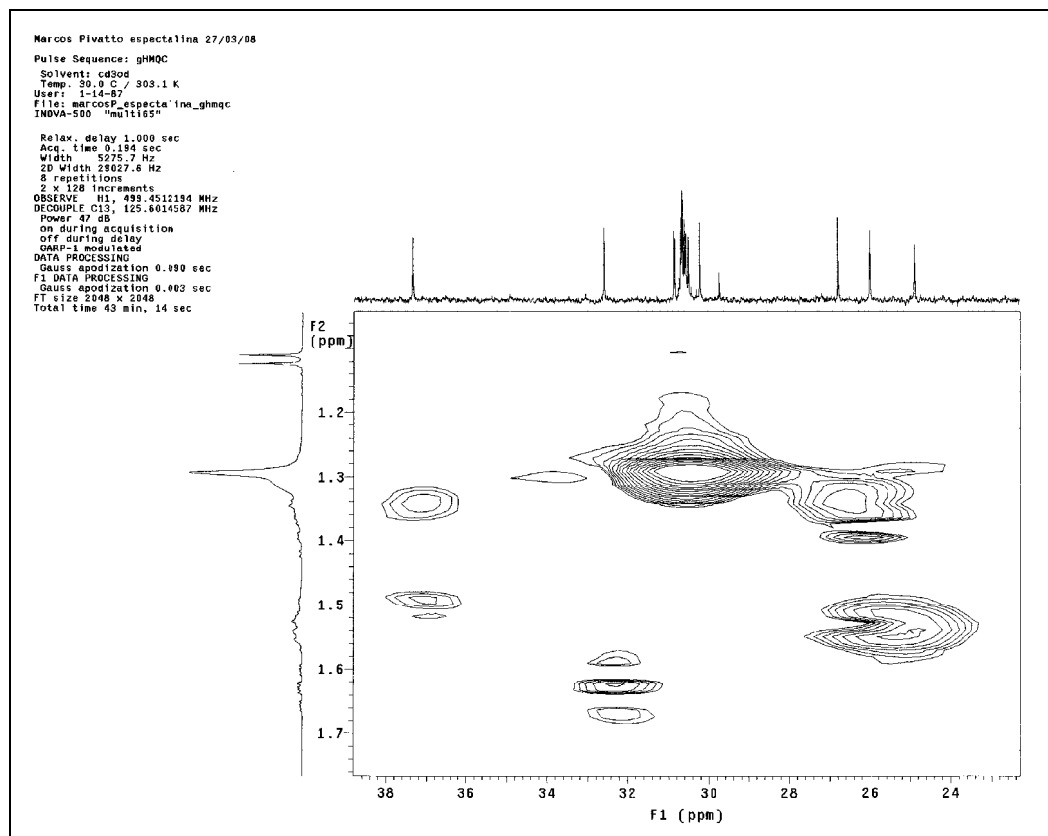
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

^b Valores calculados pelo programa ChemSkech 4.0

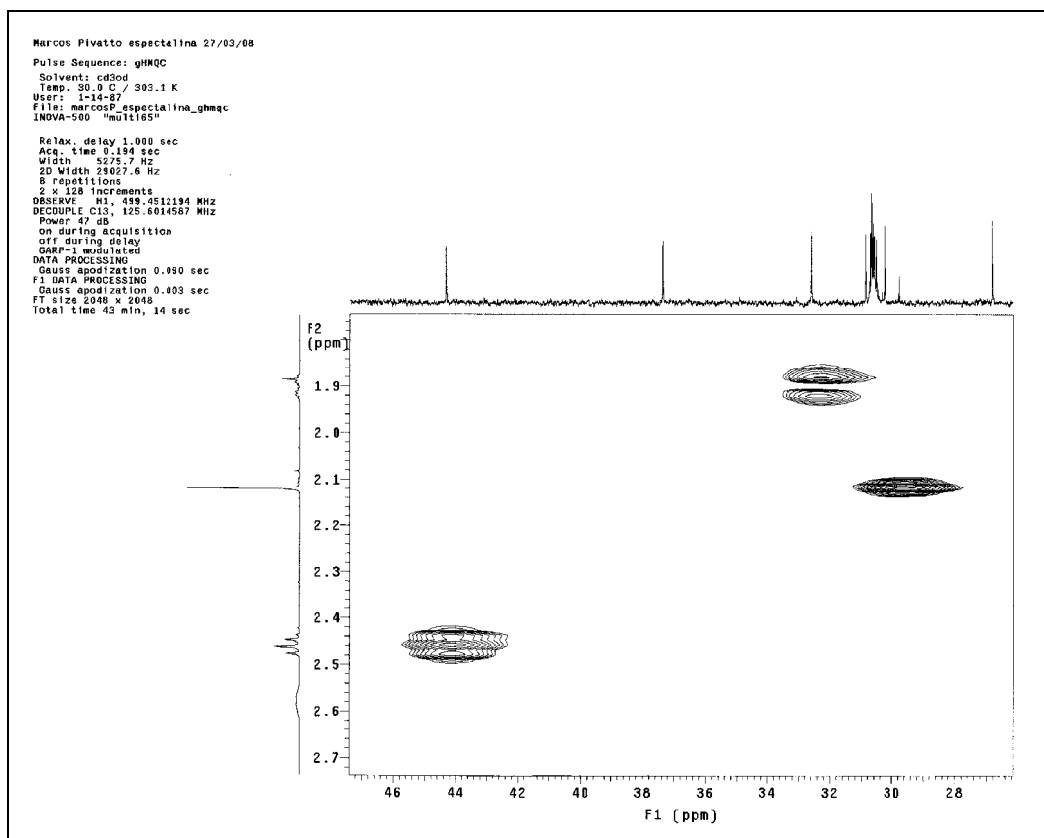
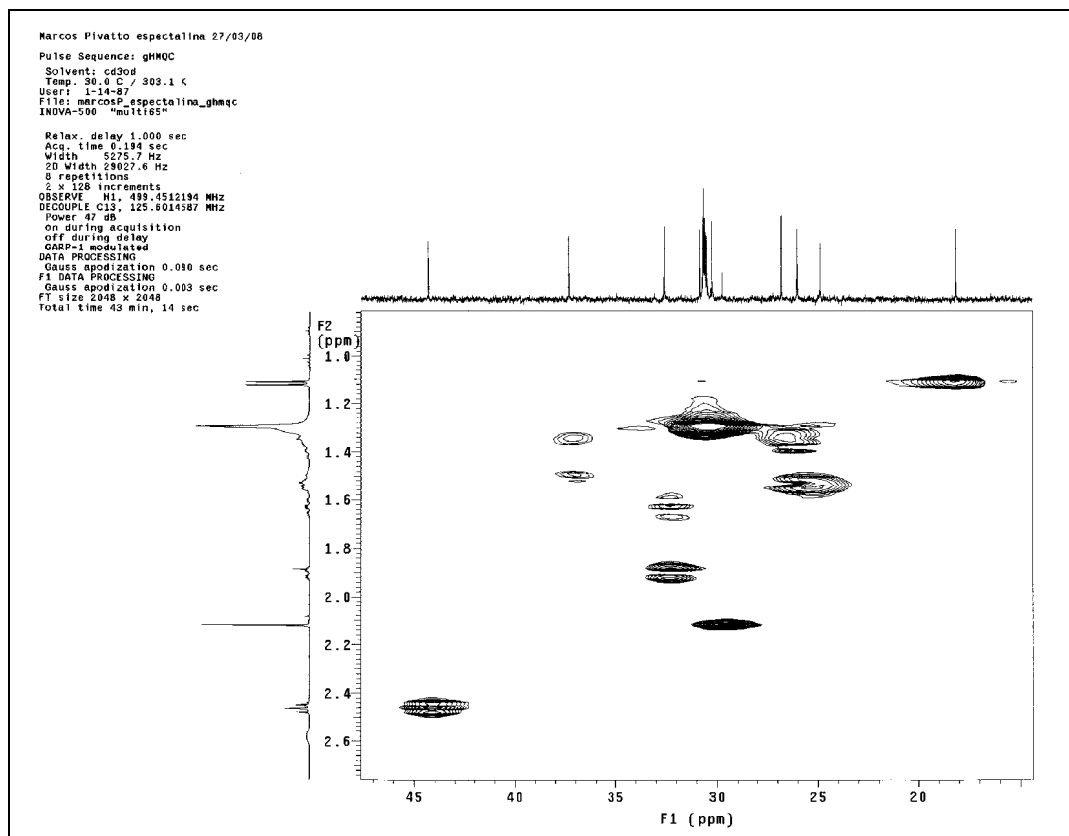
^c Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados (podem estar intercambiados)

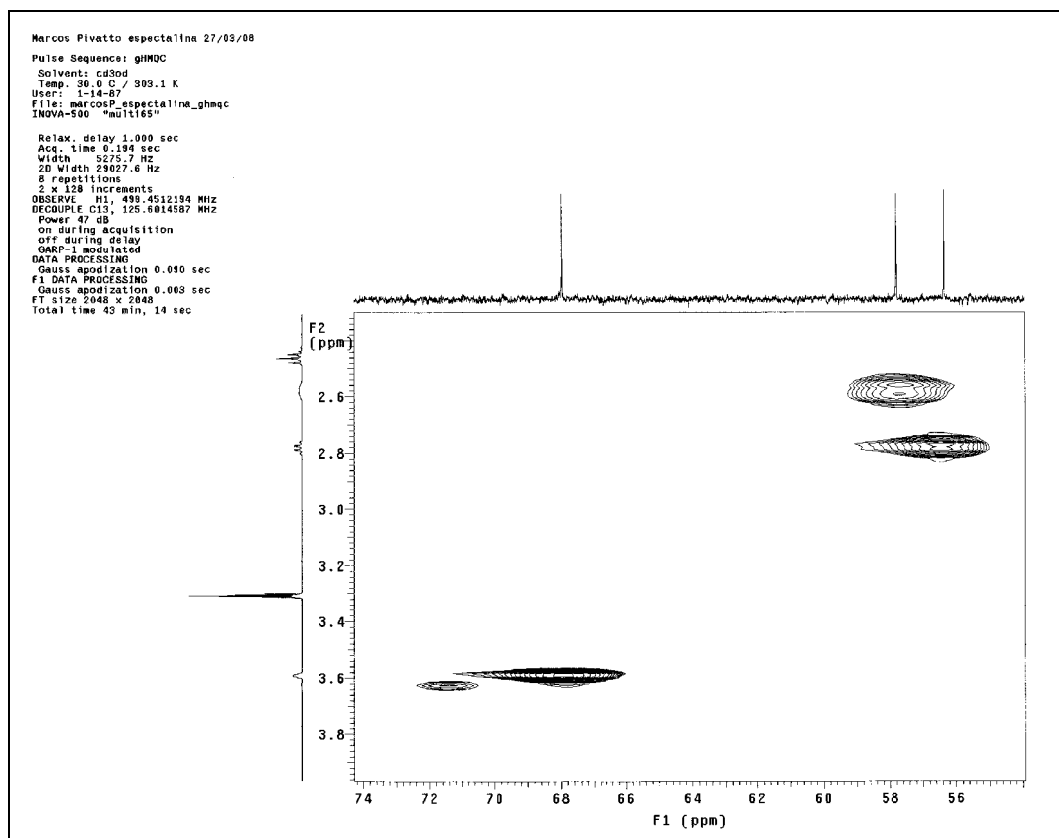


Espectro 55 - Mapa de contorno gHMQC (500 MHz, CD₃OD), do alcalóide **9**.

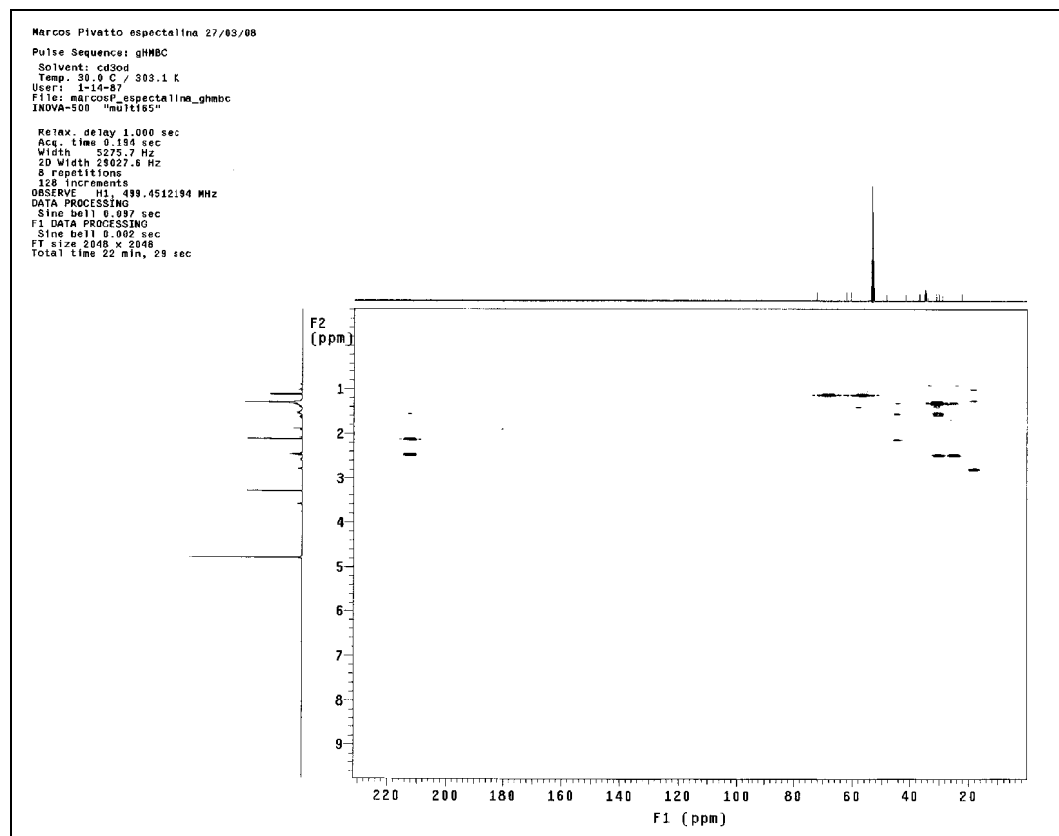


Espectro 56 - Mapa de contorno gHMQC (δ 24–38), do alcalóide **9**.

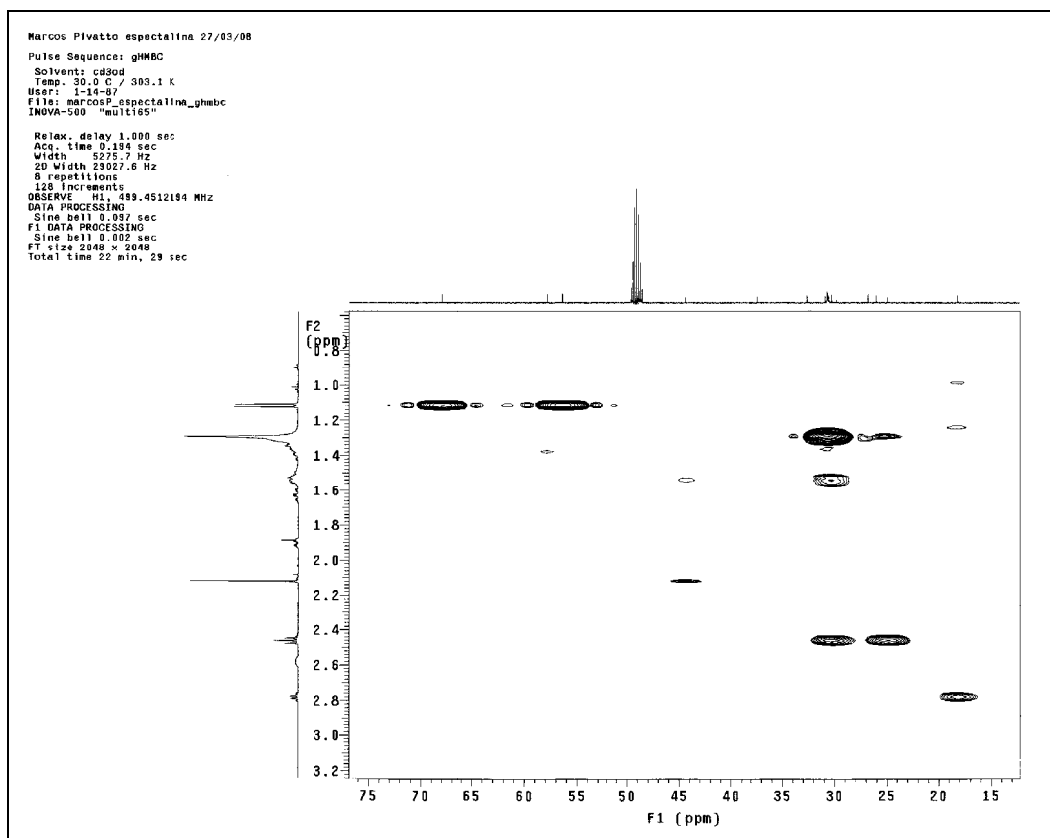
Espectro 57 - Mapa de contorno gHMQC (δ 28–46), do alcalóide 9.Espectro 58 - Mapa de contorno gHMQC (δ 20–45), do alcalóide 9.



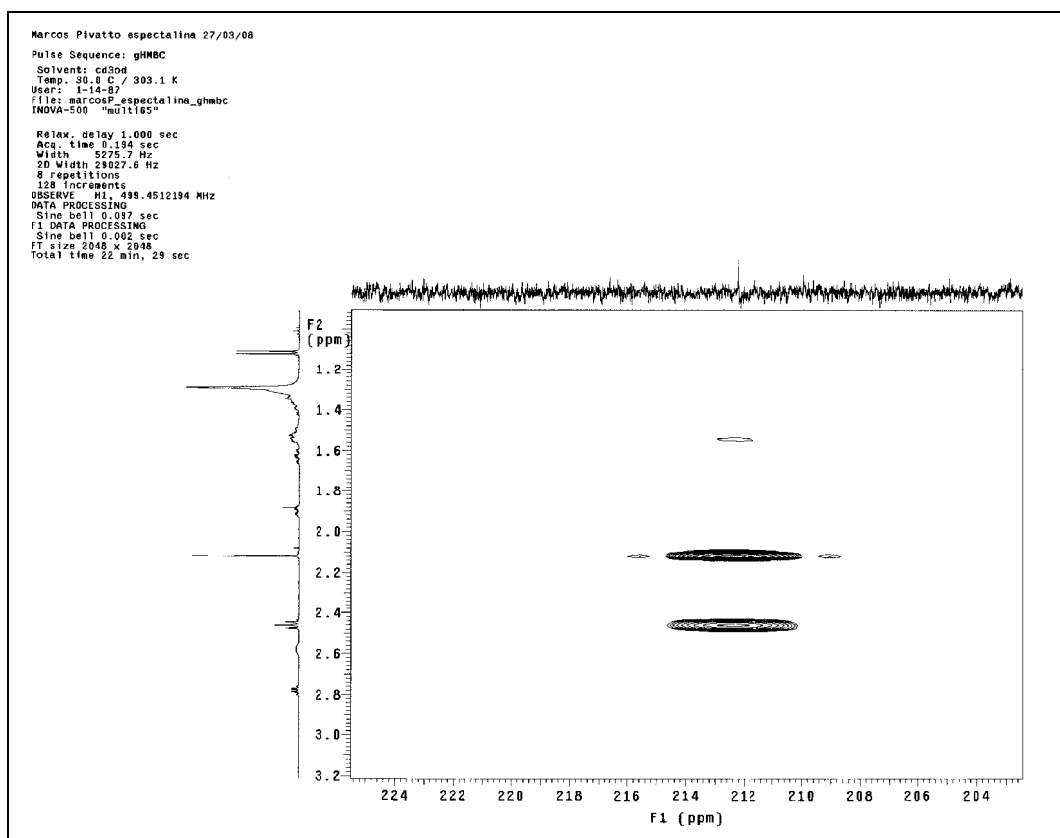
Espectro 59 - Mapa de contorno gHMDC (δ 56–74), do alcalóide **9**.



Espectro 60 - Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD₃OD), do alcalóide **9**.



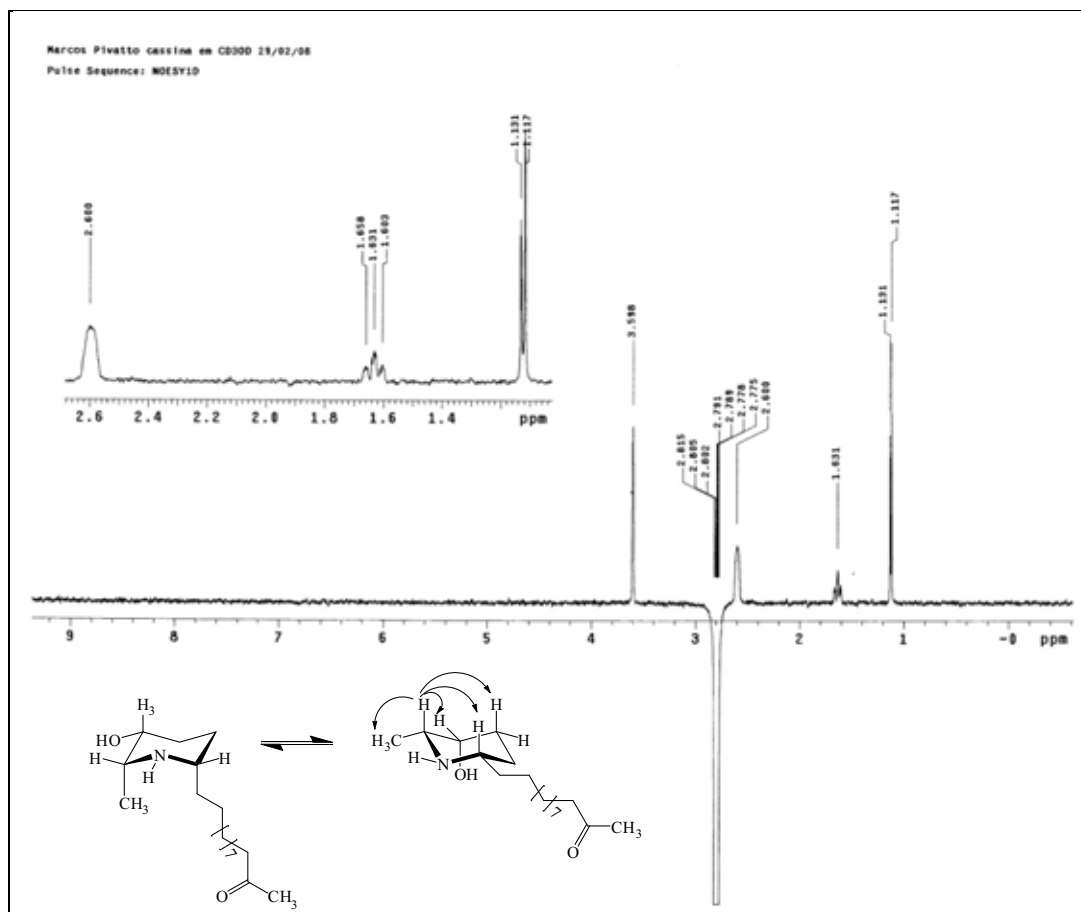
Espectro 61 - Mapa de contorno gHMBC (δ 15–75), do alcalóide **9**.



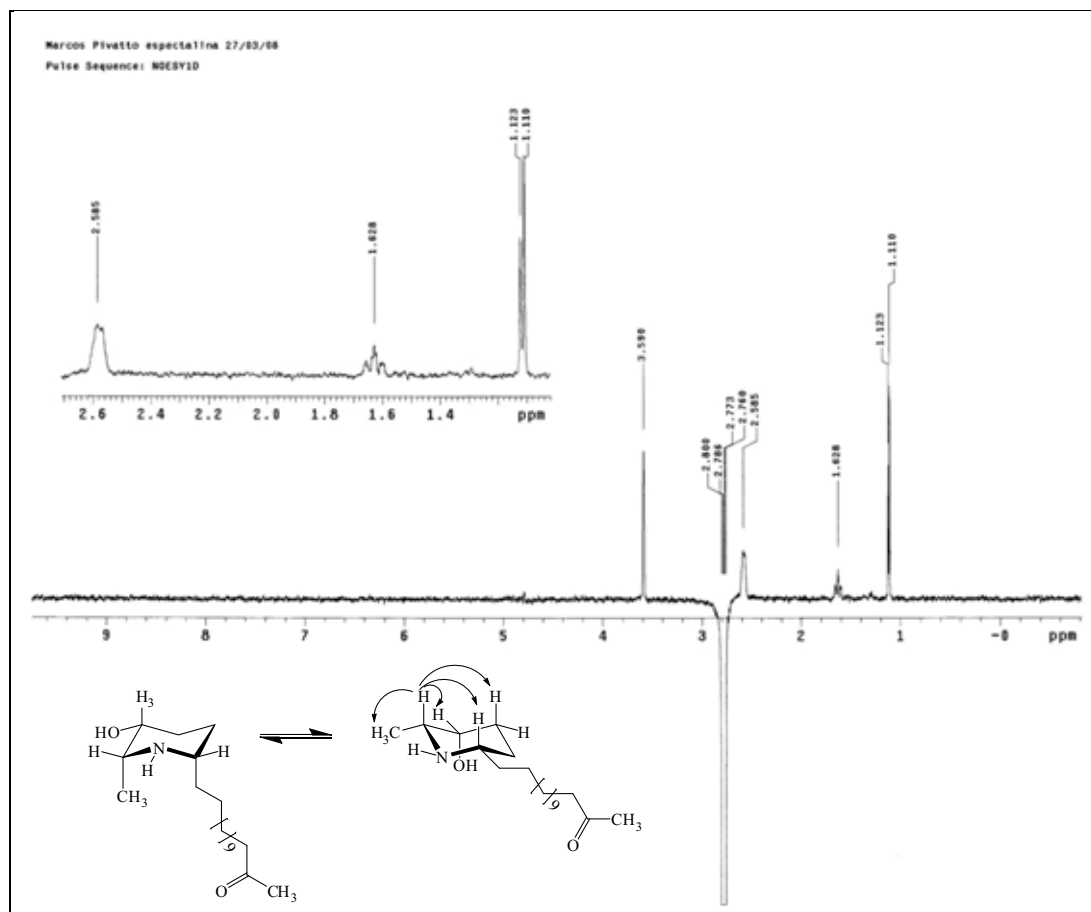
Espectro 62 - Mapa de contorno gHMBC (δ 204–224), do alcalóide **9**.

4.4.3 Estereoquímicas relativa e absoluta dos alcalóides **1** e **9**

As configurações relativas dos centros estereogênicos presentes no núcleo piperidínico dos alcalóides **1** e **9**, foram propostas com base nos experimentos de NOESY 1D (Espectros 63 e 64). Quando irradiado o sinal referente ao H-2, foi possível observar as correlações com os sinais referentes aos hidrogênios H-3, H-4b e H-7, indicando que estes mantinham uma relação *cis*, que poderia ser alfa ou beta ao plano do anel. A análise das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3, indicou acoplamento axial/equatorial ($J_{ae} = 1,0$ Hz; $\alpha = 60^\circ$), quando comparado com a curva de Karplus (SILVERSTEIN, 2000; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

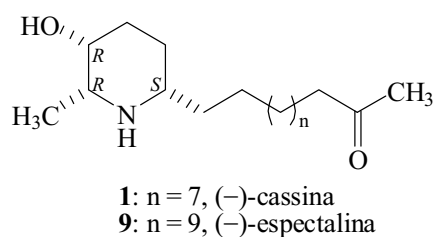


Espectro 63 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CD₃OD), irradiando o sinal δ 2,80 do alcalóide **1**.



Espectro 64 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CD₃OD), irradiando o sinal δ 2,78 do alcalóide **9**.

A configuração absoluta dos alcalóides foi proposta com base nos dados de polarimetria comparados com aqueles da literatura (Figura 41) (ROMERO, 1998).



	(-)-cassina (HIGHET, 1964)	(-)-espectralina (BOLZANI, 1995)	1	9
Rotação específica	$[\alpha]_D^{25} - 0,60$ (c 8,00 EtOH)	$[\alpha]_D^{25} - 8,20$ (c 0,32 CHCl ₃).	$[\alpha]_D^{25} - 0,62$ (c 8,00 EtOH)	$[\alpha]_D^{25} - 3,35$ (c 1,00 CHCl ₃)

Figura 41 - Configuração absoluta de **1** e **9**.

4.4.4 Elucidação estrutural dos alcalóides **15** (3-*O*-acetil-espectralina) e **16** (3-*O*-acetil-cassina)

Os alcalóides **15** e **16** foram isolados como óleos ligeiramente amarelos que apresentaram teste positivo para o reagente de ICIpt (R_f 0,79, Figura 42)

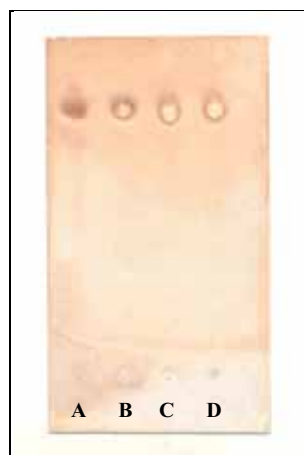
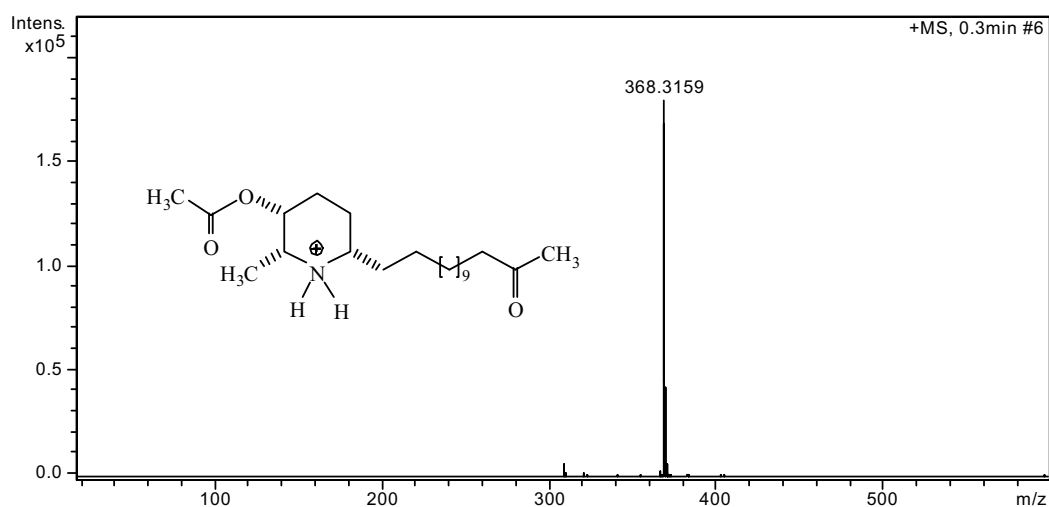
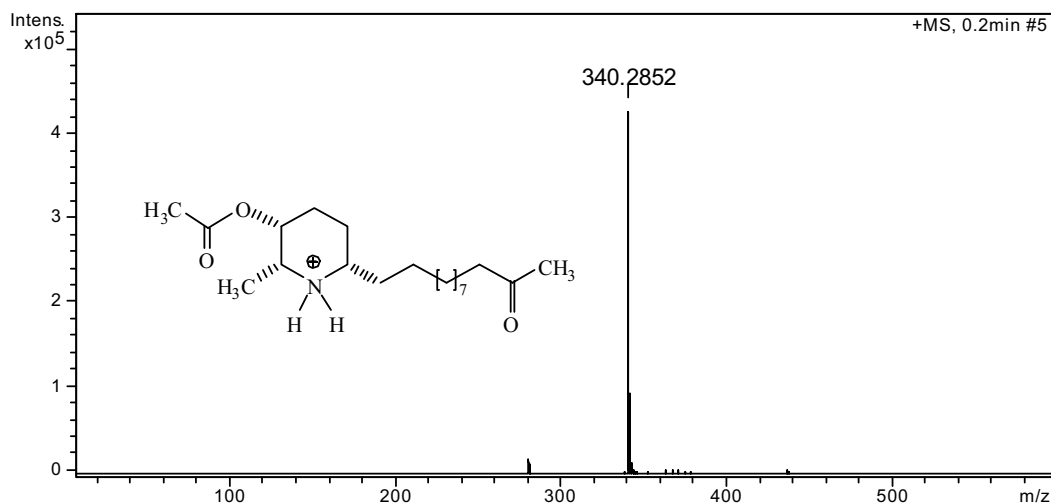


Figura 42 - CCD de **16** (A: base livre, B: cloridrato), **15** (C: base livre, D: cloridrato) (FE: sílica, FM: CHCl₃:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: ICIpt).

Os alcalóides **15** e **16** foram submetidos à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, que possibilitou estabelecer as fórmulas moleculares C₂₂H₄₁NO₃ e C₂₀H₃₇NO₃, respectivamente, com índices de deficiência de hidrogênio igual a três. Os picos referentes aos íons *quasi*-molecular de **15** e **16** foram observados em m/z 368,3159 [M+H]⁺ e 340,2852 [M+H]⁺, calculados para C₂₂H₄₂NO₃⁺, 368,3165 e C₂₀H₃₈NO₃⁺, 340,2852, respectivamente (Espectros 65 e 66).

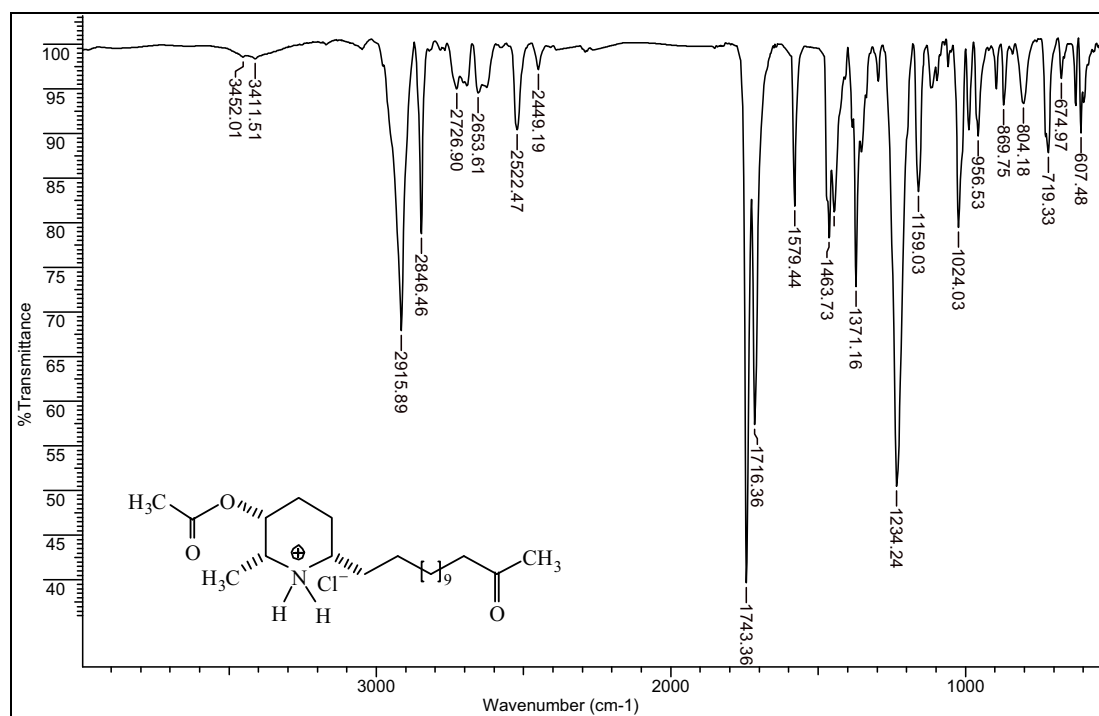


Espectro 65 - IES-EM alta resolução do alcalóide **15**.

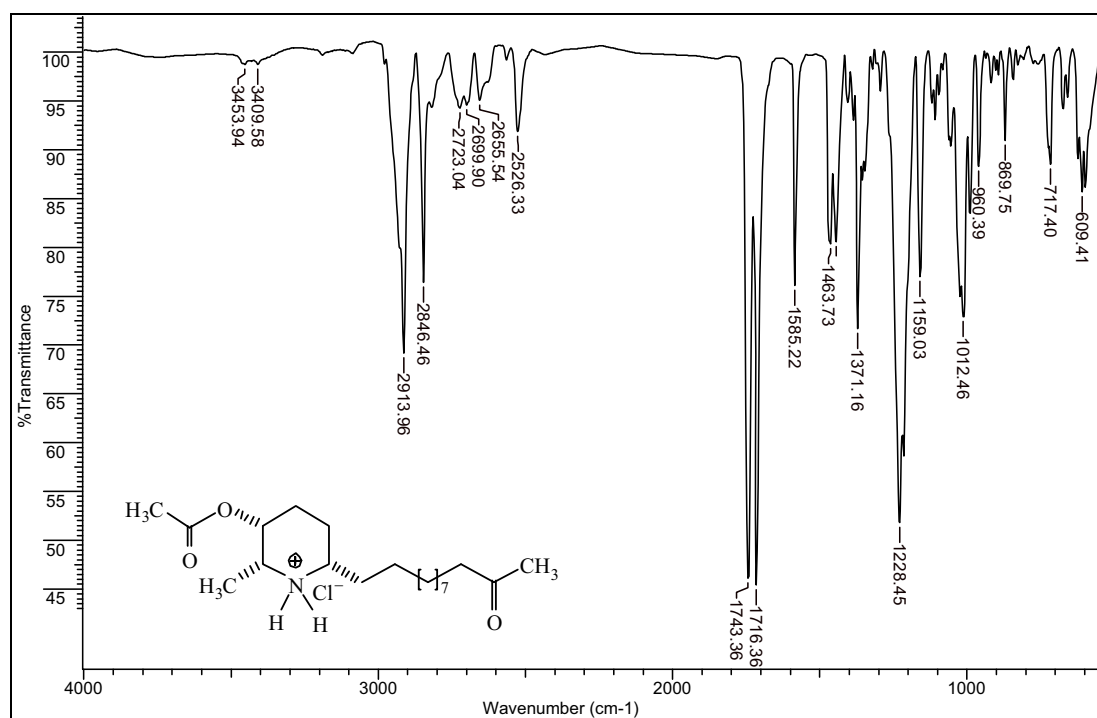


Espectro 66 - IES-EM alta resolução do alcalóide **16**.

A análise dos espectros na região do infravermelho permitiu identificar bandas de baixa intensidade em 3411 e 3409 cm^{-1} para **15** e **16** respectivamente, que foram atribuídas ao estiramento de N–H. Os estiramentos de C–H alifáticos foram identificados em ν_s 2846 e ν_{as} 2916 cm^{-1} para **15** e ν_s 2846 e ν_{as} 2914 para **16**. Foram observadas duas bandas relativas aos estiramentos das carbonilas (C=O) de cetona e éster em 1716 e 1743 cm^{-1} , respectivamente (Espectro 67 e 68).



Espectro 67 - Espectro na região do IV do alcalóide **15** (cloridrato).



Espectro 68 - Espectro na região do IV do alcalóide **16** (cloridrato).

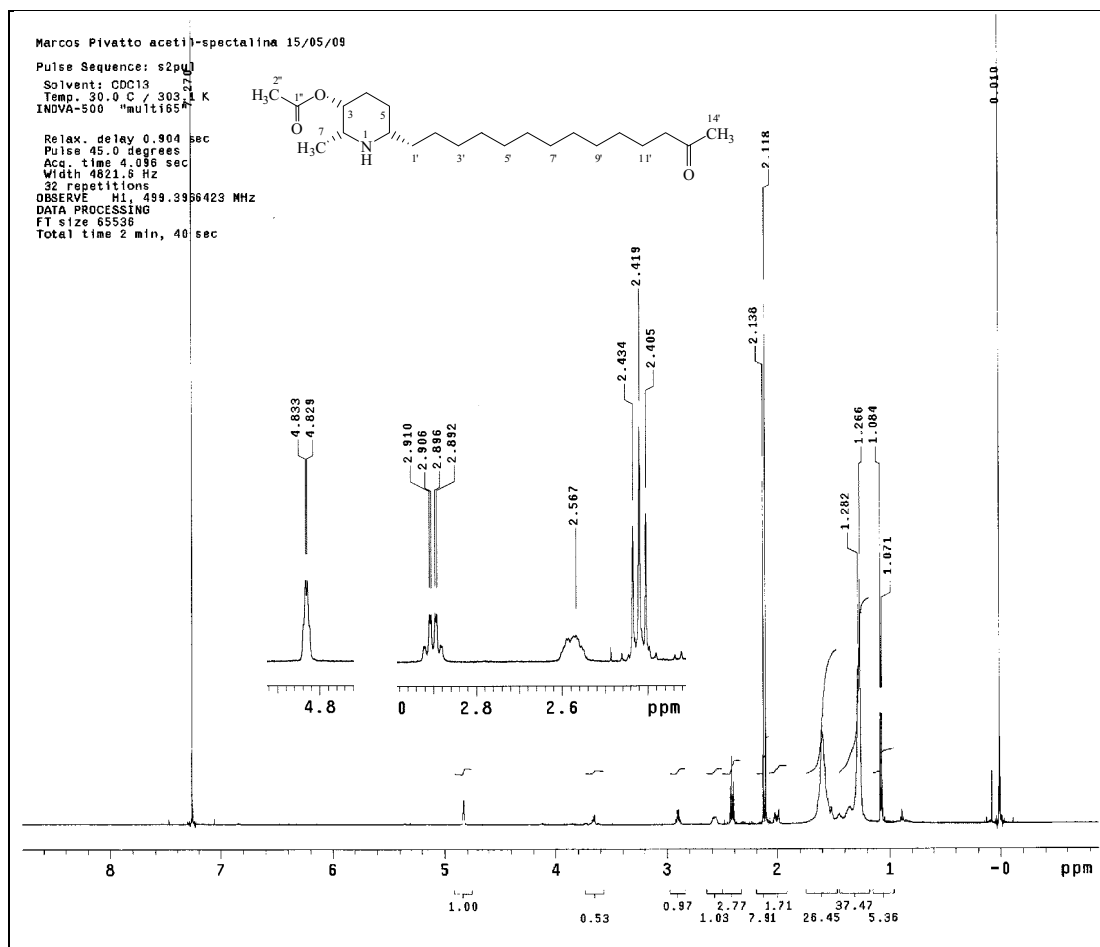
A análise dos espectros de RMN de **15** e **16** (Espectros 69–77), permitiu observar que são co-metabólitos cujos sinais que identificam o núcleo piperidínico trissubstituído e a metil-cetona também são idênticos aos dos alcalóides **1** e **9**, porém o aparecimento de um singlete (3H) adicional, juntamente com a desproteção dos sinais referentes aos H-3, leva a concluir que o oxigênio de C-3 está ligado a um grupo acetila. Essa desproteção também é observada sobre o carbono (C-3), porém em menor intensidade. Aliado a esses dados foi observado o aparecimento de dois sinais de carbonos adicionais, quando comparado aos homólogos **1** e **9**, sendo um primário (C-2") e um quaternário (C-1") em δ 21 e 171, respectivamente.

As extensões das cadeias laterais estão de acordo com os dados dos espectros de massas de alta resolução, em conformidade com as fórmulas moleculares $C_{22}H_{41}NO_3$, $[M+H]^+$ 368,3159 e $C_{20}H_{37}NO_3$, $[M+H]^+$ 340,2852, para a presença de doze e dez metilenos (**15** e **16**, respectivamente), seguidos da metil-cetona além do núcleo piperidínico trissubstituído.

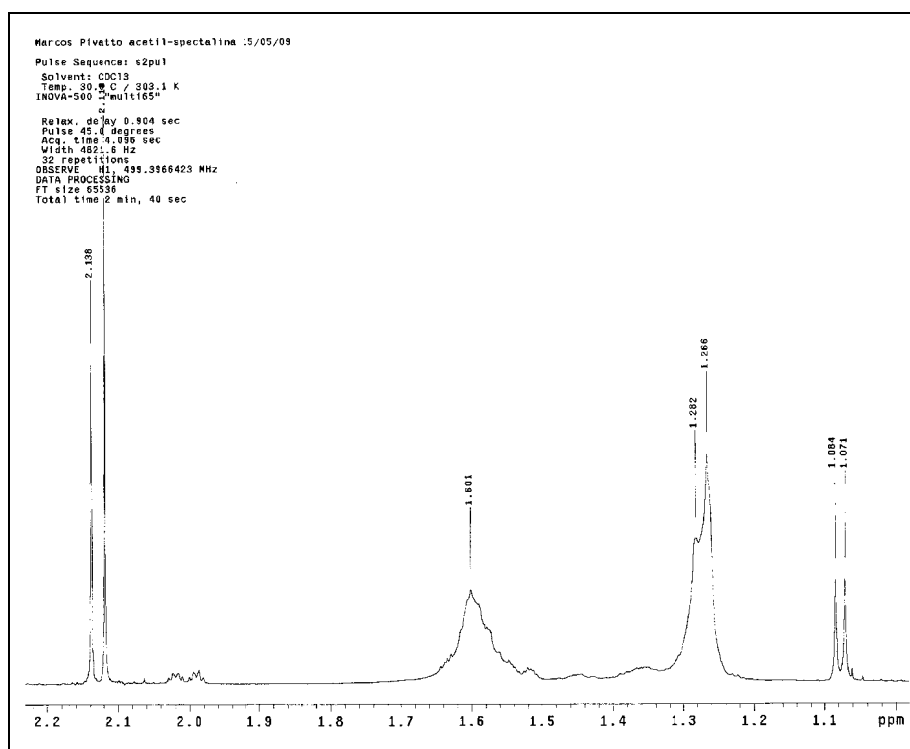
Tabela 7 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **15** e **16** (500 MHz, CDCl_3)

posição	15		16	
	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (m^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{c} , J^{b})	$\delta_{\text{C}}^{\text{a}}$ (m^{c})	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (m^{c} , J^{b})
2	54,00 (CH)	2,90 dq (6,5; 2,0)	53,95 (CH)	2,89 dq (6,5; 2,0)
3	70,56 (CH)	4,83 q (2,0)	70,58 (CH)	4,82 q (2,0)
4a	29,19 (CH_2)	2,00 m	29,16 (CH_2)	2,00 m
4b		1,62 m		1,62 m
5a	26,78 (CH_2)	1,58 m	26,81 (CH_2)	1,52 m
5b		1,58 m		1,50 m
6	56,68 (CH)	2,57 m	56,63 (CH)	2,56 m
7	18,49 (CH_3)	1,08 d (6,5)	18,50 (CH_3)	1,06 d (6,5)
1'a	37,01 (CH_2)	1,36 m	37,08 (CH_2)	1,43 m
1'b		1,36 m		1,35 m
2'	25,98 (CH_2)	1,28 m	25,96 (CH_2)	1,35 m
3'	29,40 (CH_2) ^d	1,27 sl	29,35 (CH_2) ^d	1,27 sl
4'	29,58 (CH_2) ^d	1,27 sl	29,49 (CH_2) ^d	1,27 sl
5'	29,70 (CH_2) ^d	1,27 sl	29,51 (CH_2) ^d	1,27 sl
6'	29,61 (CH_2) ^d	1,27 sl	29,40 (CH_2) ^d	1,27 sl
7'	29,58 (CH_2) ^d	1,27 sl	29,35 (CH_2) ^d	1,27 sl
8'	29,45 (CH_2) ^d	1,27 sl	29,73 (CH_2) ^d	1,27 sl
9'	29,35 (CH_2) ^d	1,27 sl	23,86 (CH_2)	1,57 m
10'	29,76 (CH_2) ^d	1,27 sl	43,79 (CH_2)	2,42 t (7,5)
11'	23,89 (CH_2)	1,56 m	209,28 (qC)	–
12'	43,83 (CH_2)	2,42 t (7,5)	29,79 (CH_3)	2,14 s
13'	209,29 (qC)	–		
14'	28,82 (CH_3)	2,14 s		
1''	171,01 (qC)	–	171,00 (qC)	–
2''	21,29 (CH_3)	2,12 s	21,27 (CH_3)	2,12 s

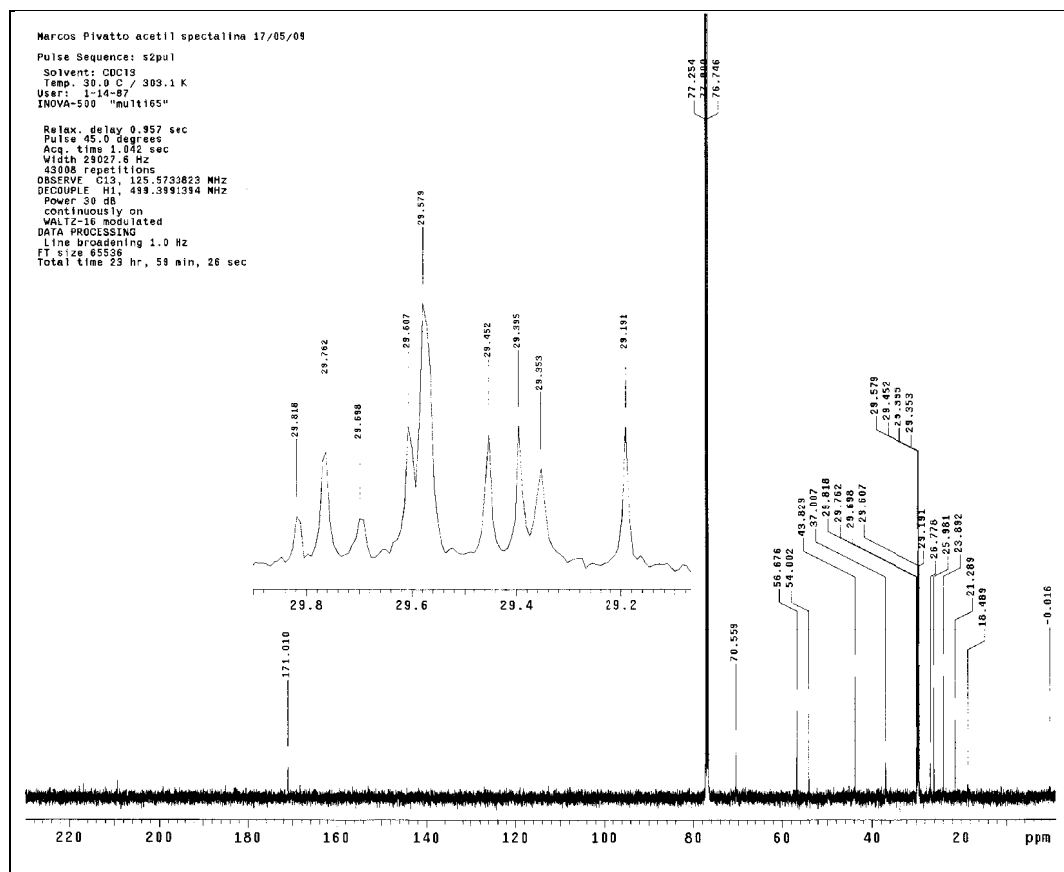
^a Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno^b Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz^c m = multiplicidade^d Valores estabelecidos com base nos deslocamentos químicos calculados (podem estar intercambiados)



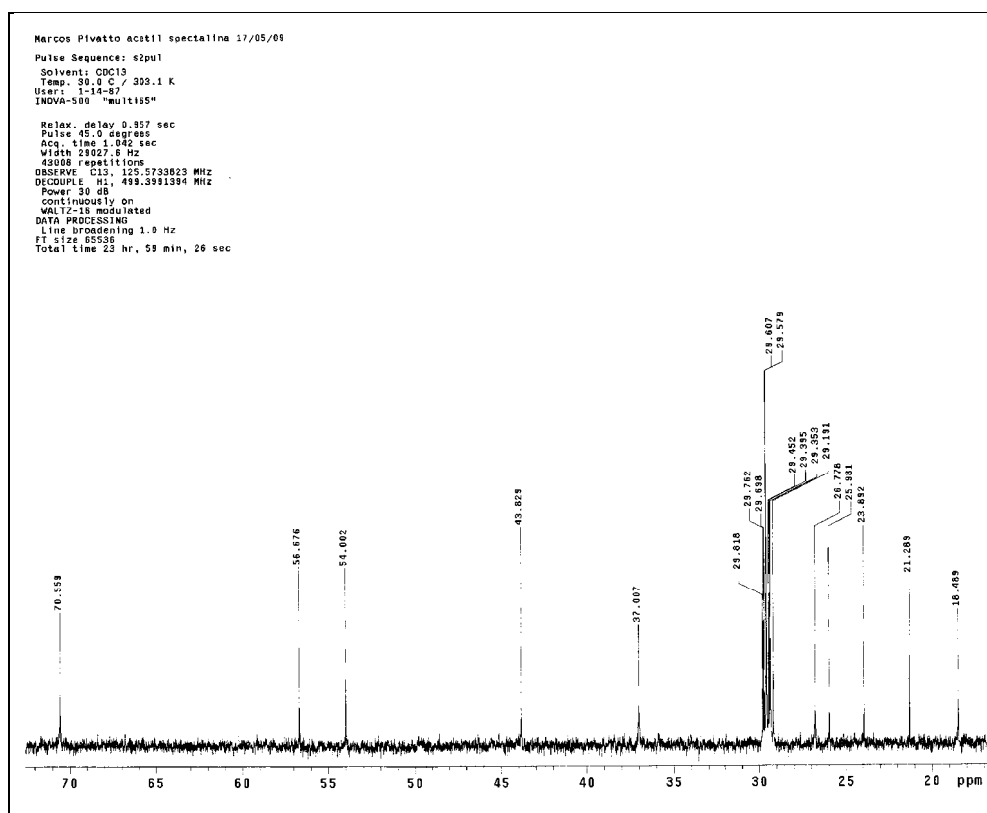
Espectro 69 - Espectro de RMN ^1H de **15** (500 MHz, CDCl_3).



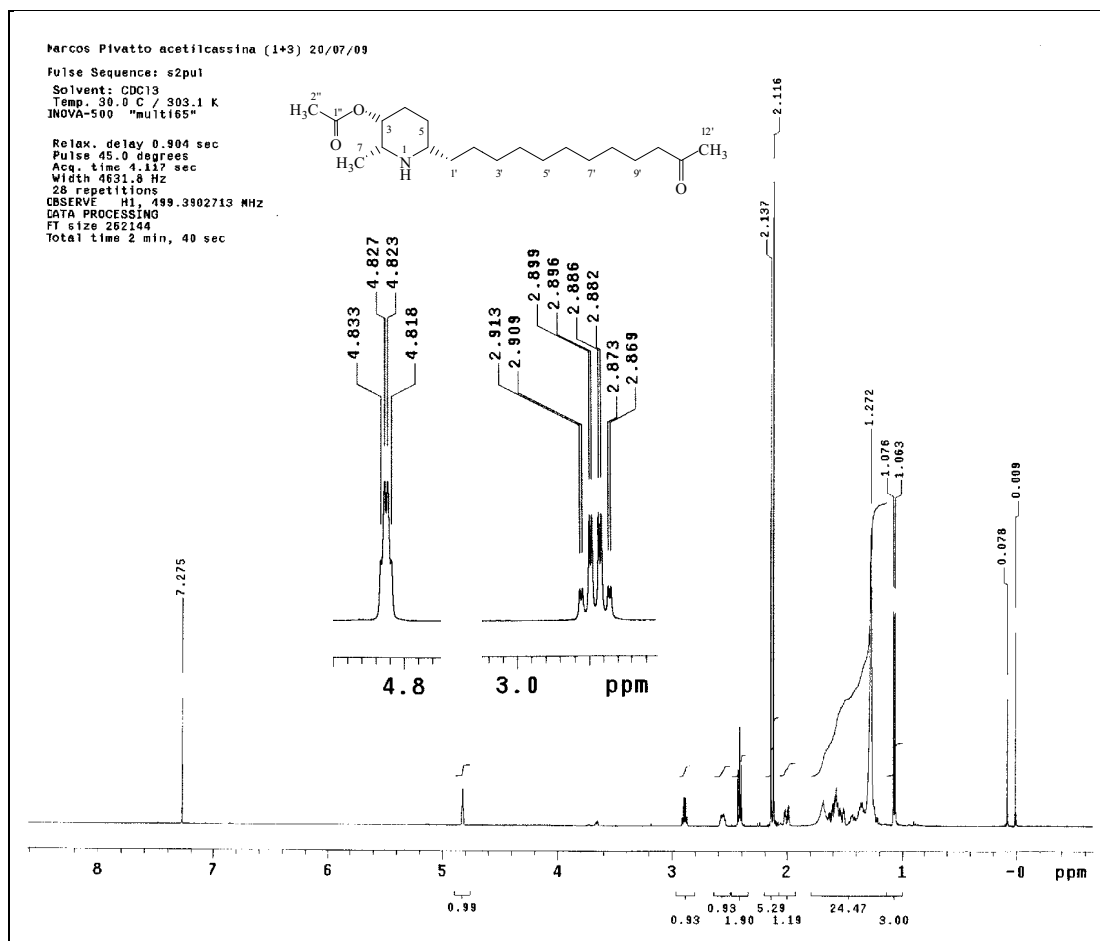
Espectro 70 - Ampliação do espectro 69 (δ 1,1–2,2), alcalóide **15**.



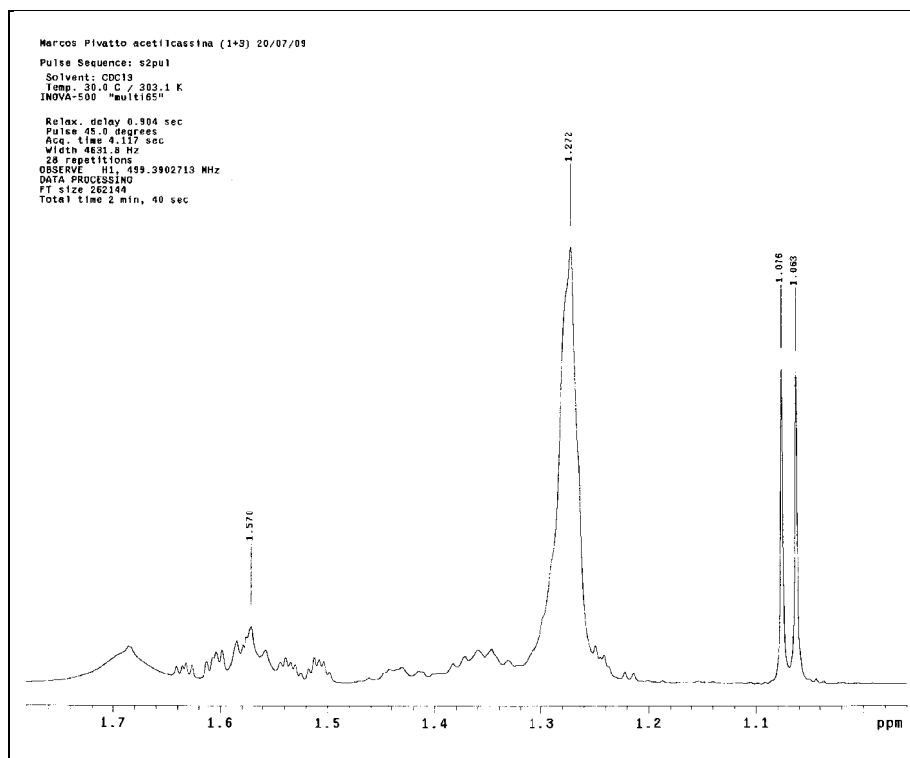
Espectro 71 - Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide **15** (125 MHz, CDCl_3).



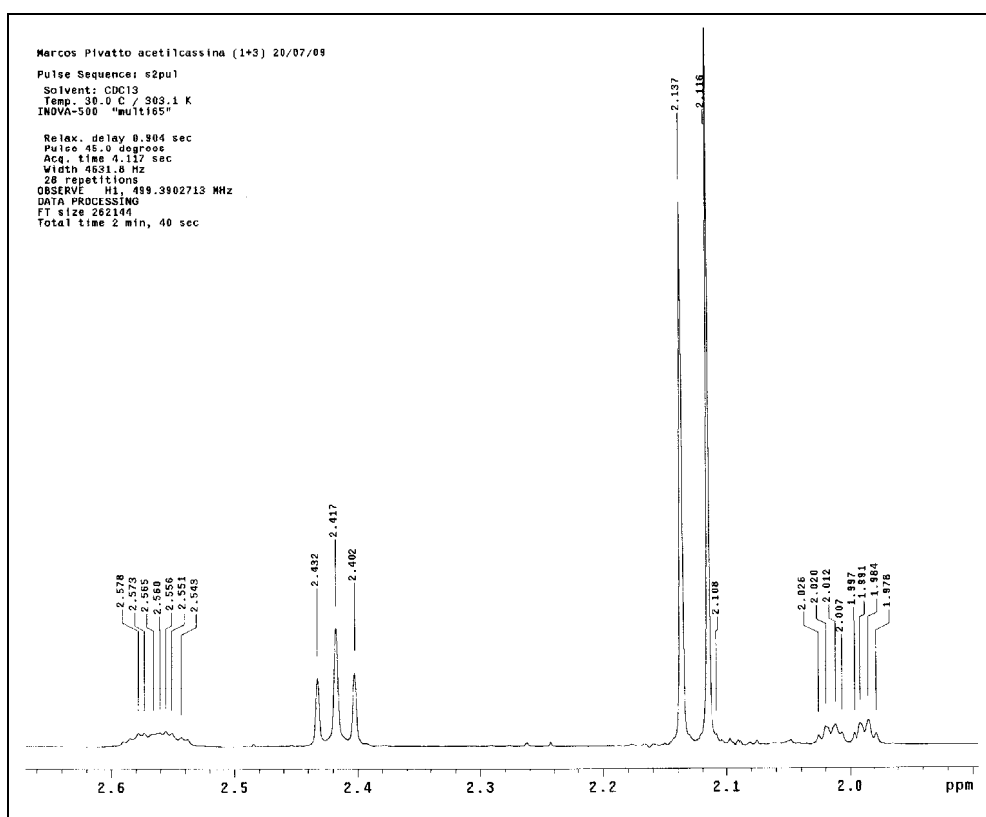
Espectro 72 - Ampliação do espectro 71 (δ 20–70), alcalóide **15**.



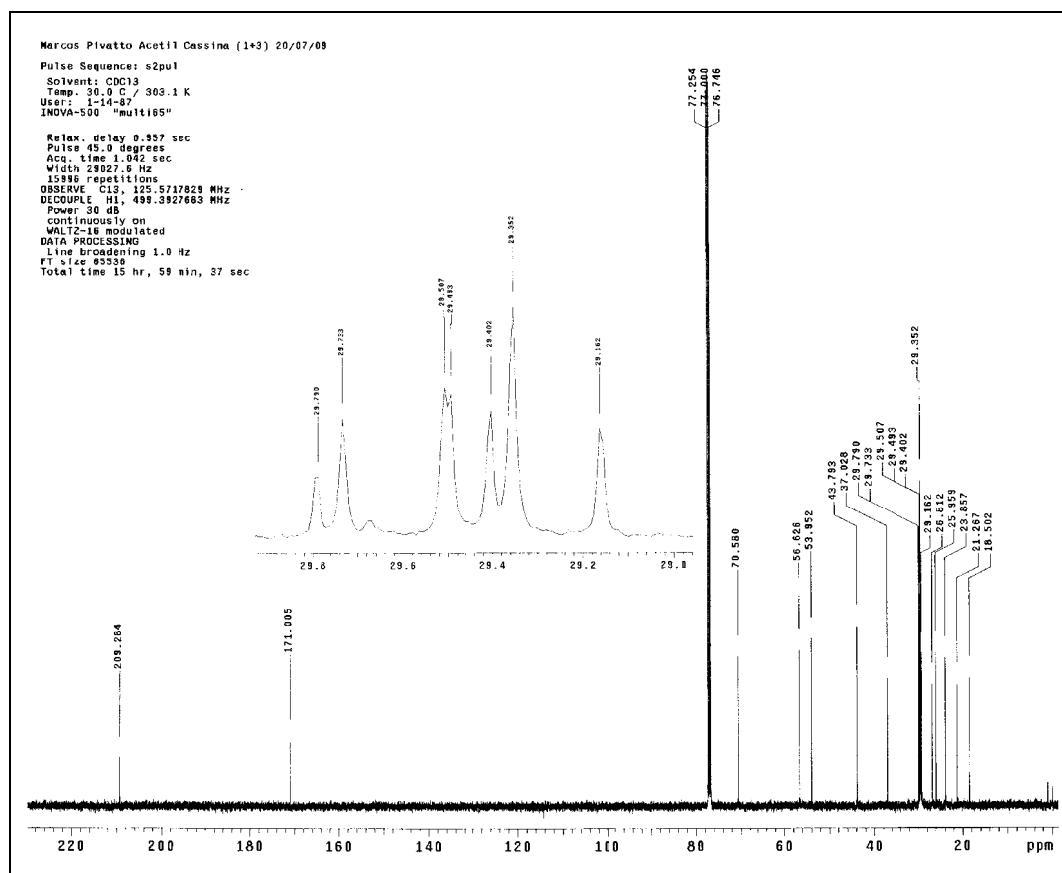
Espectro 73 - Espectro de RMN ¹H de 16 (500 MHz, CDCl₃).



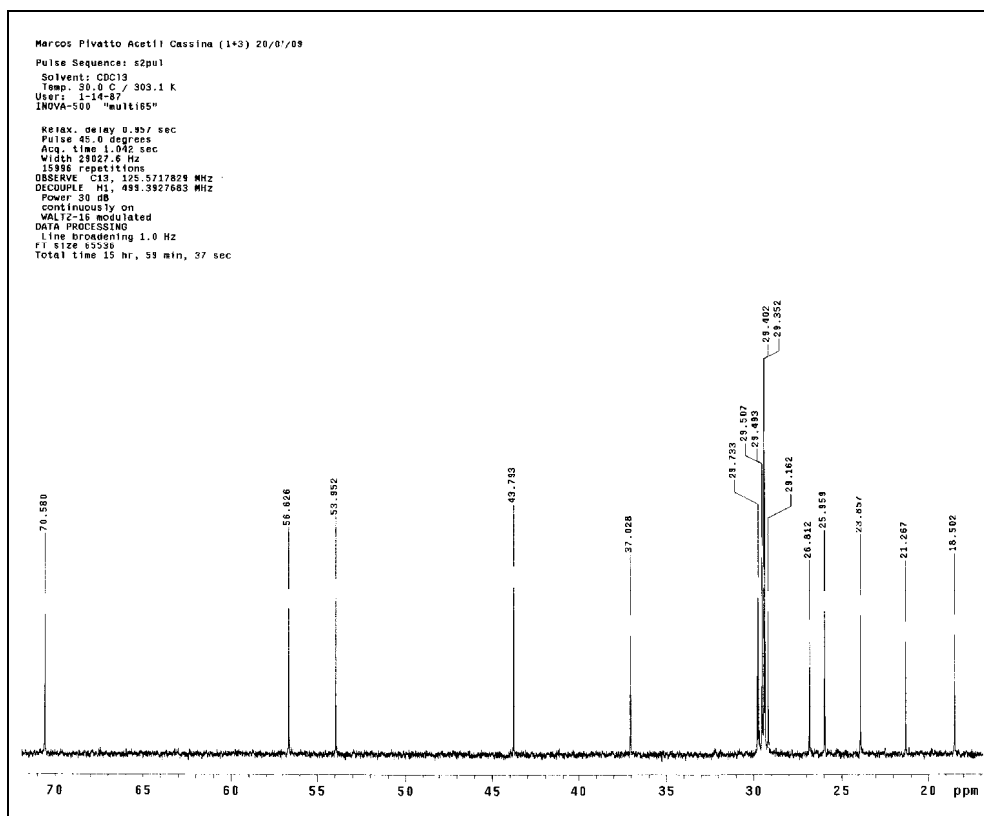
Espectro 74 - Ampliação do espectro 73 (δ 1,1–1,7), alcalóide 16.



Espectro 75 - Ampliação do espectro 73 (δ 2,0–2,6), alcalóide 16.



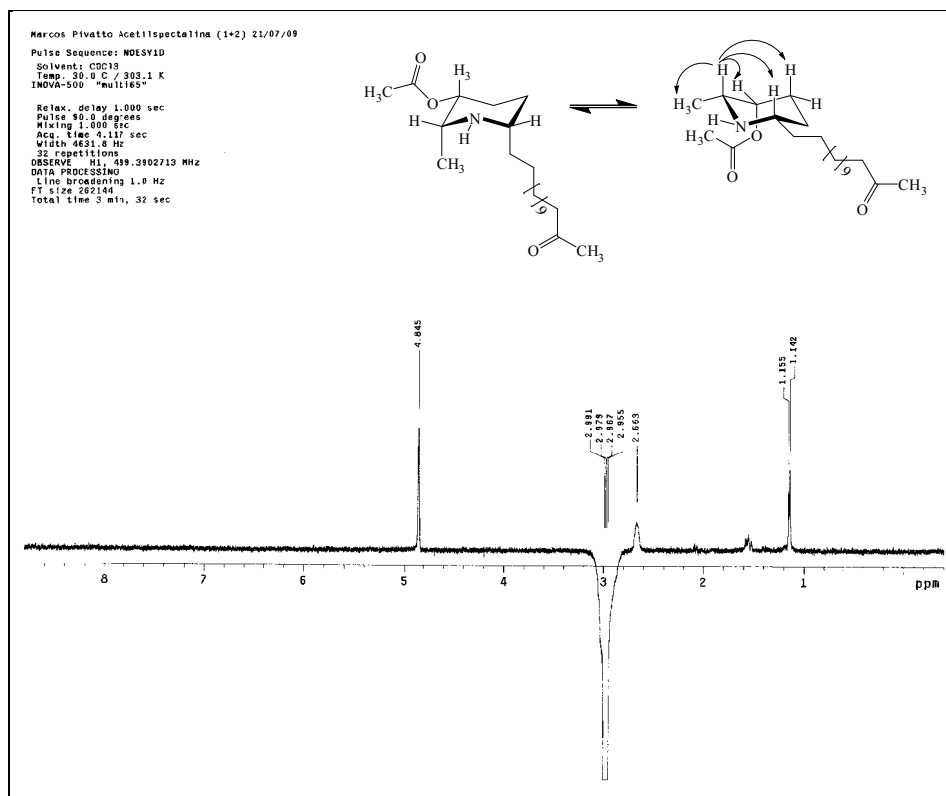
Espectro 76 - Espectro de RMN ^{13}C do alcalóide 16 (125 MHz, CDCl_3).



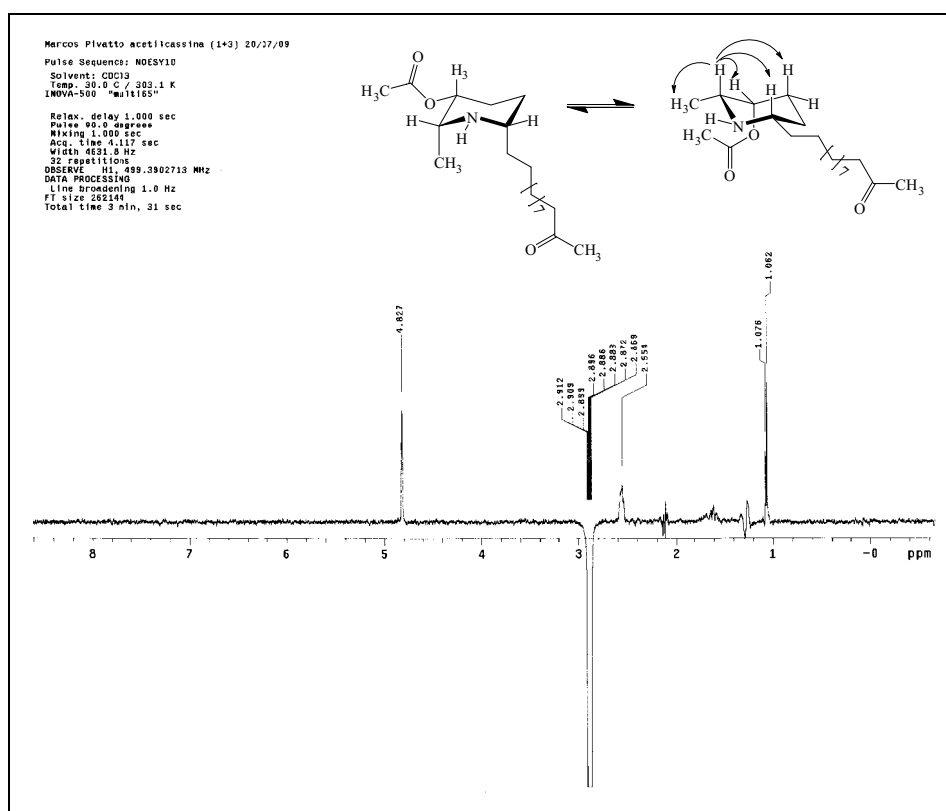
Espectro 77 - Ampliação do espectro 72 (δ 20–70), alcalóide **16**.

4.4.5 Estereoquímicas relativa e absoluta dos alcalóides **15** e **16**

As configurações relativas dos centros estereogênicos presentes no núcleo piperidínico dos alcalóides **15** e **16**, são muito semelhantes as dos alcalóides **1** e **9** e também foram propostas com base nos experimentos de NOESY 1D (Espectros 78 e 79). Quando irradiado o sinal referente ao H-2, foi possível observar as correlações com os sinais referentes aos hidrogênios H-3, H-4b e H-7, indicando que estes mantinham uma relação *cis*, que poderia ser alfa ou beta ao plano do anel. A análise das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3, indicou acoplamento axial/equatorial ($J_{ac} = 2,0$ Hz; $\alpha = 60^\circ$), quando comparado com a curva de Karplus, corroborando com a proposta de estereoquímica (SILVERSTEIN, 2000; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

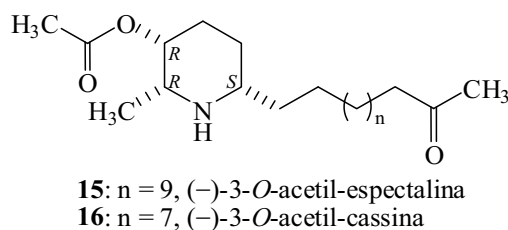


Espectro 78 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CDCl₃), irradiando o sinal δ 2,90 do alcalóide 15.



Espectro 79 - Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CD₃OD), irradiando o sinal δ 2,89 do alcalóide 16.

A configuração absoluta do alcalóide **15** foi proposta com base nos dados de polarimetria comparados com aqueles da literatura (Figura 43) (ROMERO, 1998).



	(-)-3-O-acetil-espectalina (VIEGAS JUNIOR et al., 2004)	15	16
Rotação específica	$[\alpha]_D^{20} - 16$ (c 0,19 CH ₂ Cl ₂)	$[\alpha]_D^{32} - 2,96$ (c 0,14 MeOH)	$[\alpha]_D^{32} - 3,45$ (c 0,29 MeOH)

Figura 43 - Configuração absoluta de **15** e **16**.

Para a determinação da configuração absoluta de **16** e confirmação da estereoquímica de **15**, foram realizadas reações de acetilação de **1** e **9**, cujas estereoquímicas já são conhecidas. Em seguida os resultados das análises de RMN e polarimetria foram comparados com aqueles dos alcalóides naturais.

A metodologia utilizada para a formação dos derivados acetilados foi inicialmente preparar os respectivos cloridratos por adição de HCl(g), gerado a partir do gotejamento de H₂SO₄(l) sobre HCl(l), utilizando um sistema de Kipp (Figura 44) modificado (Figura 45), onde os vapores do gás formado foram borbulhados em 3 mL de CHCl₃ contendo a amostra de **1** (30 mg) ou **9** (20 mg) por 30 min. A partir dos cloridratos foram feitas as reações de acetilação utilizando cloreto de acetila (excesso) em CHCl₃ previamente tratados em atmosfera inerte de N₂ (Figura 45). As reações foram mantidas em agitação e refluxo e monitoradas por CCD, sendo que após 4 h todo material de partida tinha sido convertido nos respectivos produtos (Figura 45). Após o término da reação, os produtos (coloração ligeiramente amarelada) foram secos em rotaevaporador e suas estruturas confirmadas pelos métodos espectrométricos (RMN e EM) e polarimetria. Os resultados de RMN ¹H e ¹³C, dos produtos semi-sintéticos (**15a** e **16a**) foram idênticos (deslocamentos químicos, multiplicidade e constante de acoplamento) àqueles dos alcalóides naturais (**15** e **16**), juntamente com os dados de polarimetria, indicando assim que **15** e **16** têm a mesma estereoquímica absoluta que os alcalóides **1** e **9** (Figura 45), que indica a especificidade enzimática envolvida na biossíntese desses metabólitos.



Figura 44 - Sistema de Kipp modificado para preparação dos cloridratos.

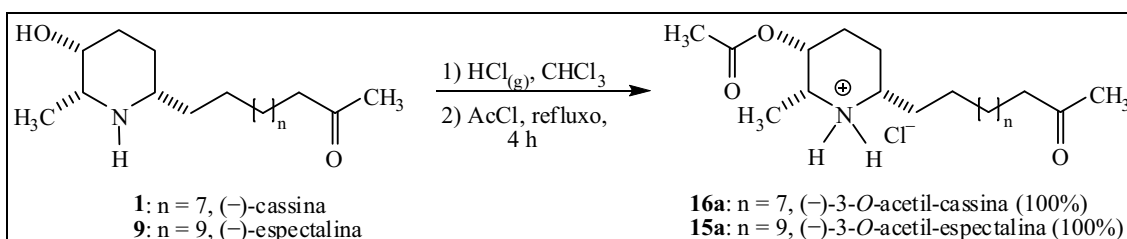
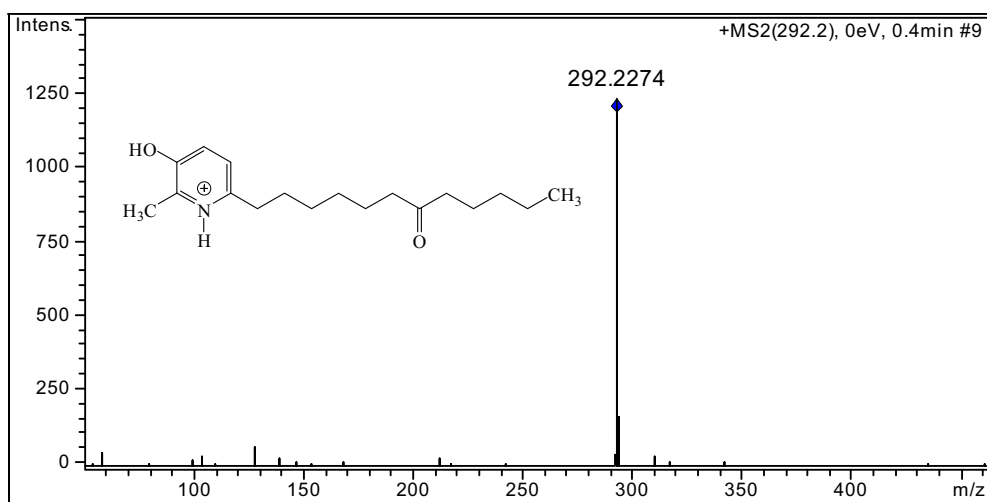


Figura 45 - Preparação dos derivados **15a** e **16a**.

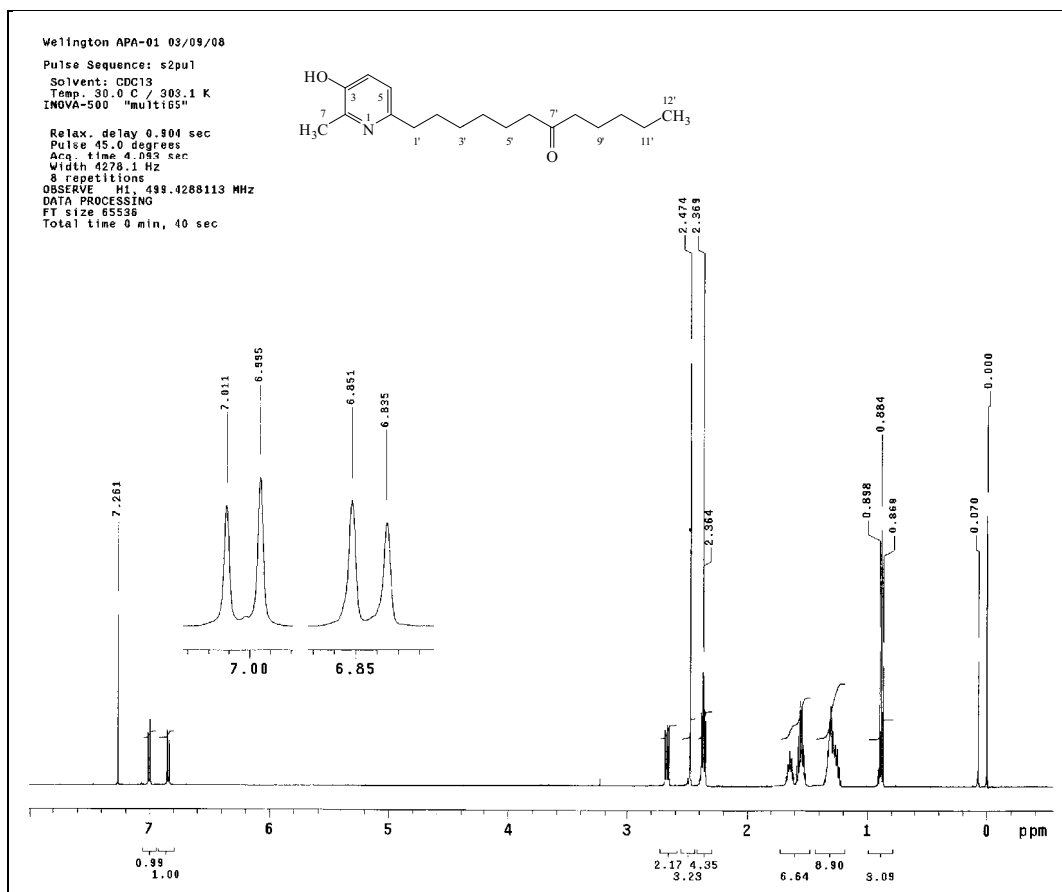
4.4.6 Elucidação estrutural do alcalóide **67** (7'-multijuguinona)

A substância **67** foi isolada na forma de um sólido branco com faixa de fusão entre 103-105 °C, que ao ser analisada por CCD e revelada com o reagente de Dragendorff, apresentou coloração amarela (R_f 0,50), característica de alcalóide (Figura 35). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer sua fórmula molecular como sendo $C_{18}H_{29}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco. O pico referente ao íon *quasi*-molecular foi observado em m/z 292,2274 $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{30}NO_2^+$, 292,2271 (Espectro 80).

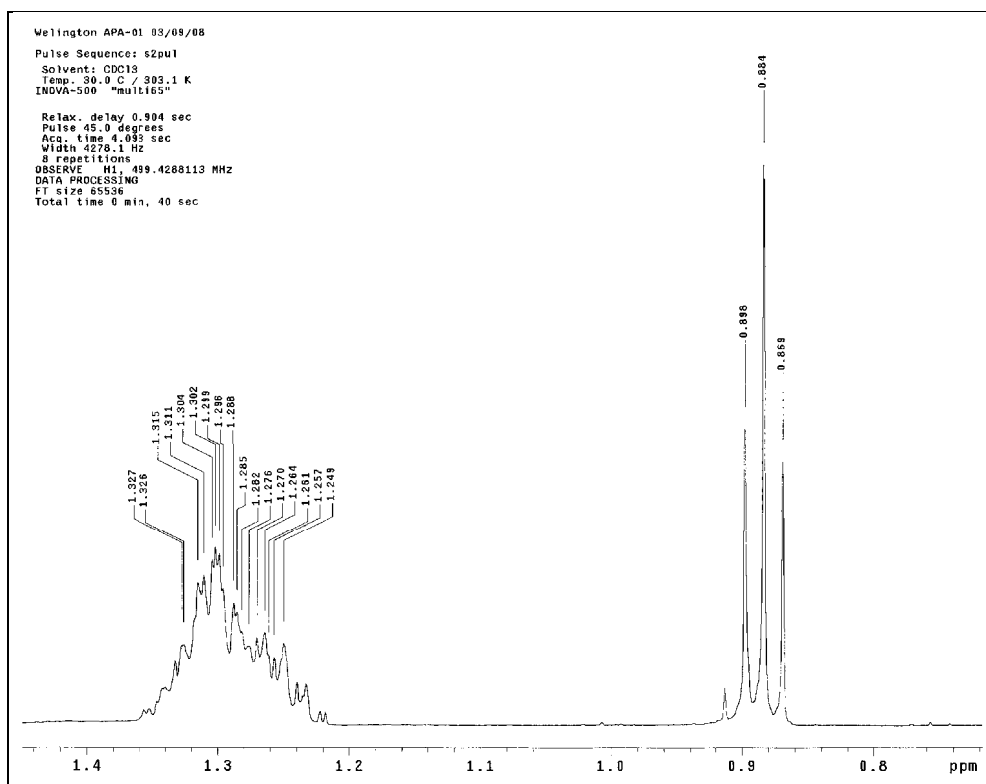


Espectro 80 - IES-EM alta resolução do alcalóide **67**.

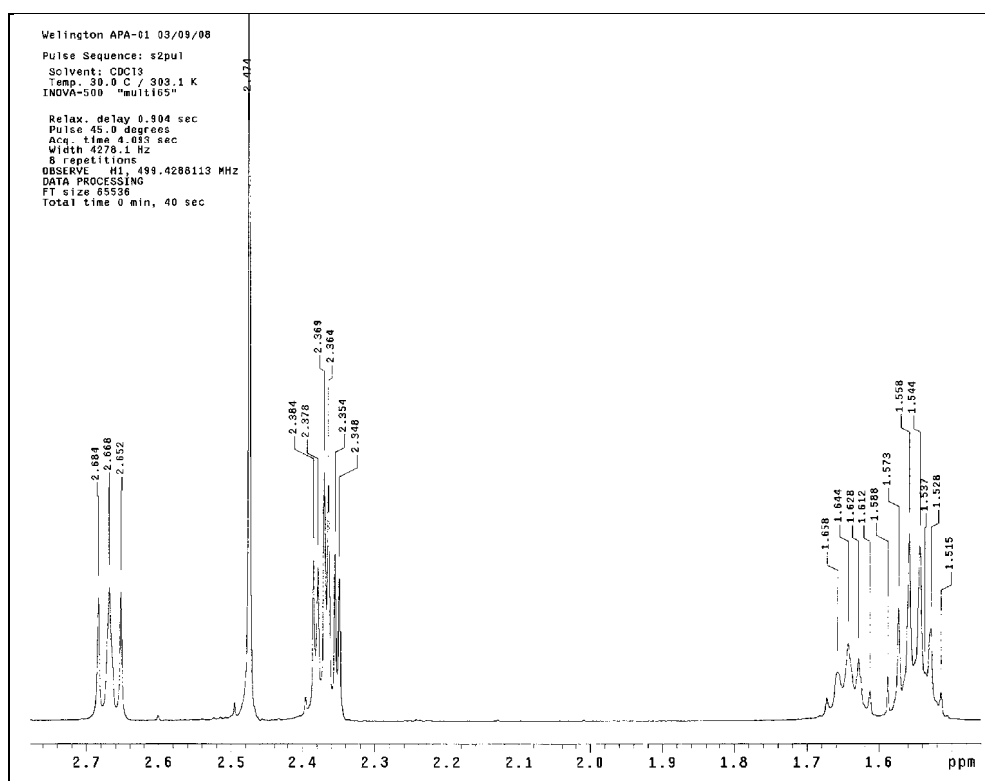
A análise do espectro de RMN de ^1H de **67** apresentou dois dubletos δ 6,84 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,00 (1H, $J = 8,0$ HZ), indicando hidrogênios aromáticos na posição *orto*, um singlete em δ 2,47 (3H), característico de metila ligada a um sistema aromático e um tripleto em δ 0,88 (3H) referente a uma metila ligada a metileno. Foram observados ainda três tripletos; δ 2,67 (2H), δ 2,36 (2H) e δ 2,37 (2H), um quintupletto em δ 1,64 (2H) e dois multipletos em δ 1,55 e δ 1,30, integrando para quatro e oito hidrogênios, respectivamente (Espectros 81–83; Tabela 8).



Espectro 81 - Espectro de RMN de ^1H de **67** (500 MHz, CDCl_3)

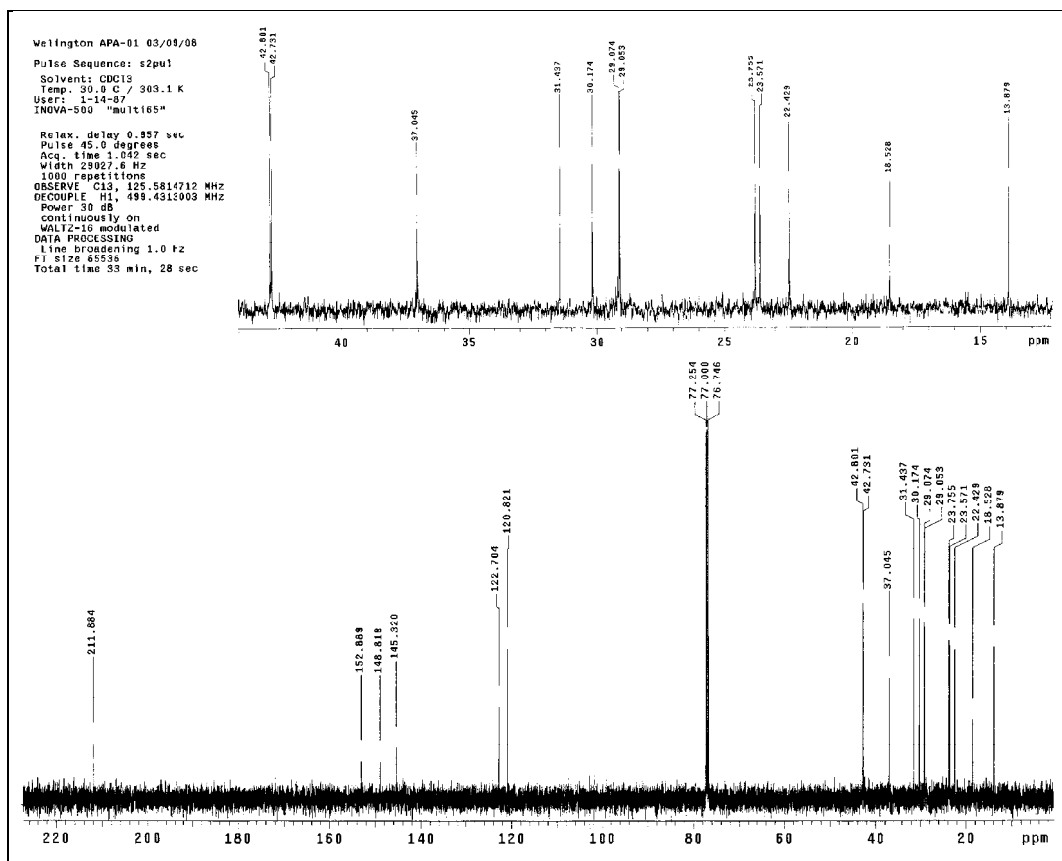


Espectro 82 - Ampliação do espectro 81 (δ 0,8–1,4) do alcalóide **67**.

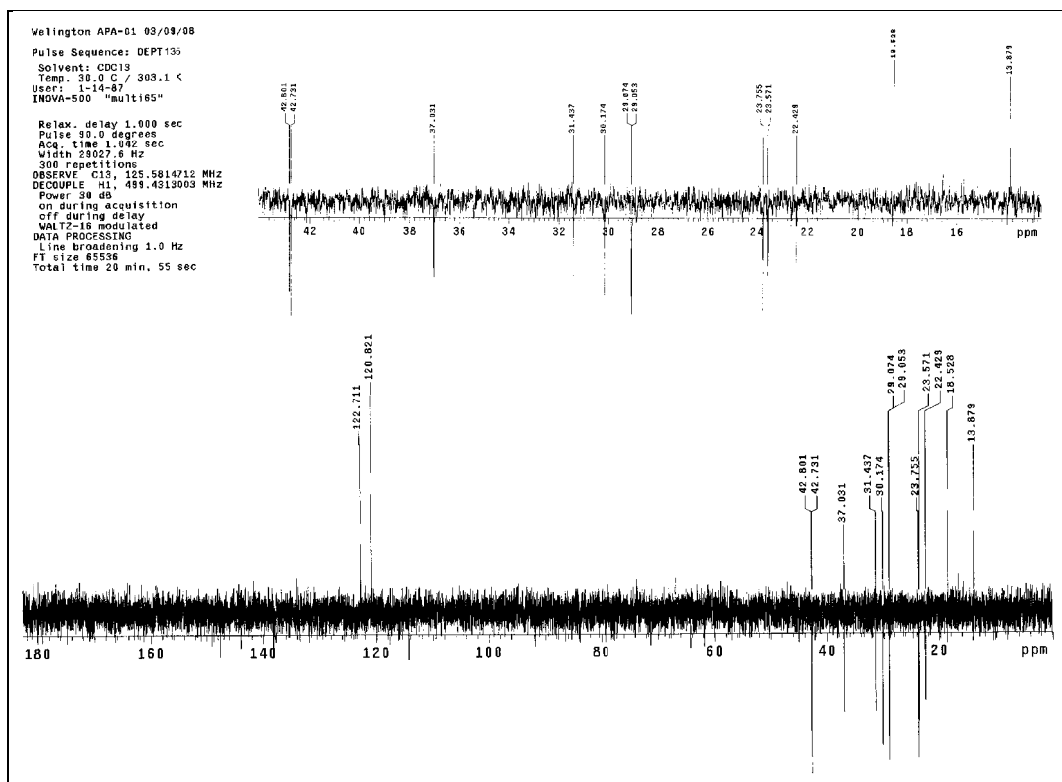


Espectro 83 - Ampliação do espectro 81 (δ 1,5–2,7) do alcalóide **67**.

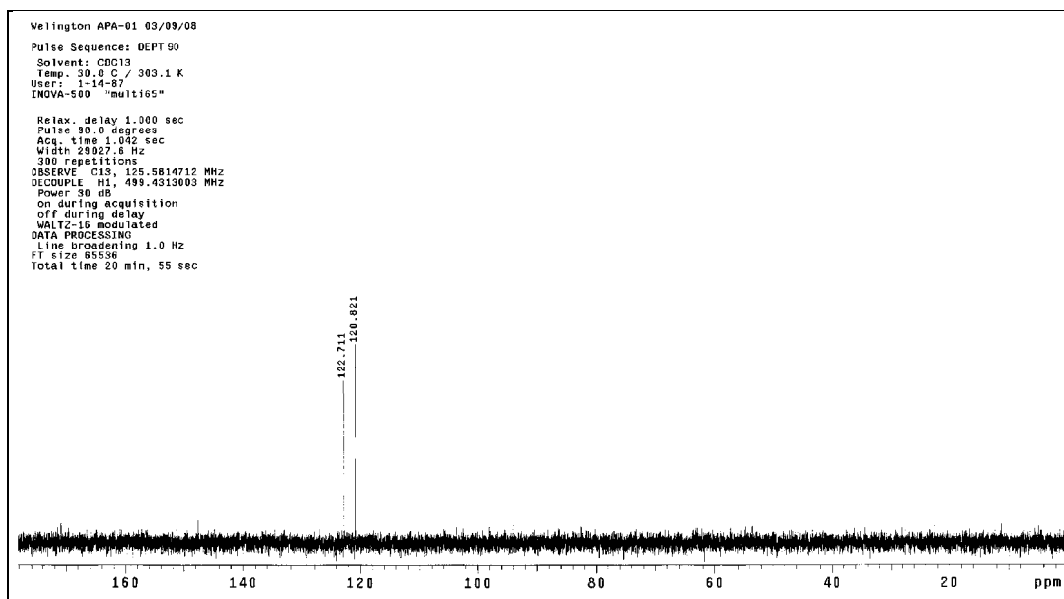
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários (δ 145,3; 148,8 e 152,9), com deslocamento químico característico de carbonos ligados a átomos eletronegativos e dois metinos δ 120,8 e 122,7. Foi observada ainda a presença de duas metilas δ 13,9 e 18,5, uma carbonila cetônica δ 211,9 e dez metilenos, o que sugere uma cadeia linear (Espectros 84–86; Tabela 8). Quando comparados, os sinais dos carbonos aromáticos, com aqueles da literatura, foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trisubstituído.



Espectro 84 - Espectro de RMN ^{13}C de **67** (125 MHz, CDCl_3).

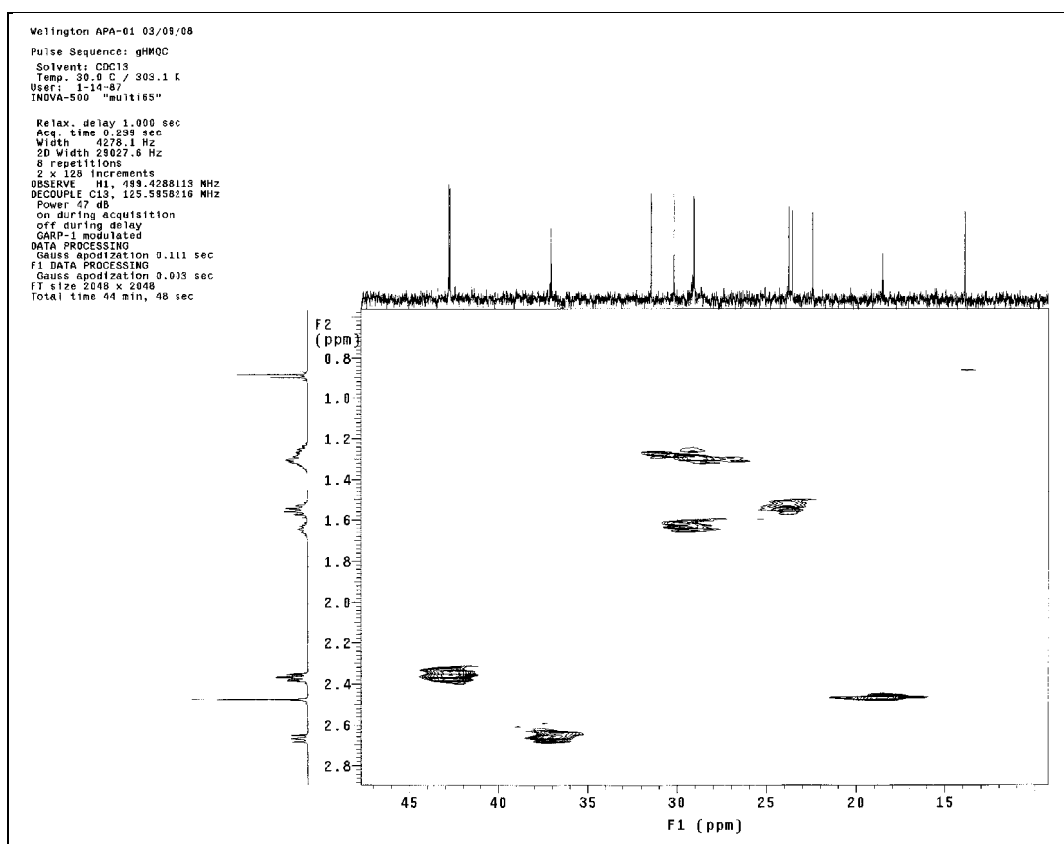


Espectro 85 - Espectro de RMN de DEPT 135 de **67** (125 MHz, CDCl_3).

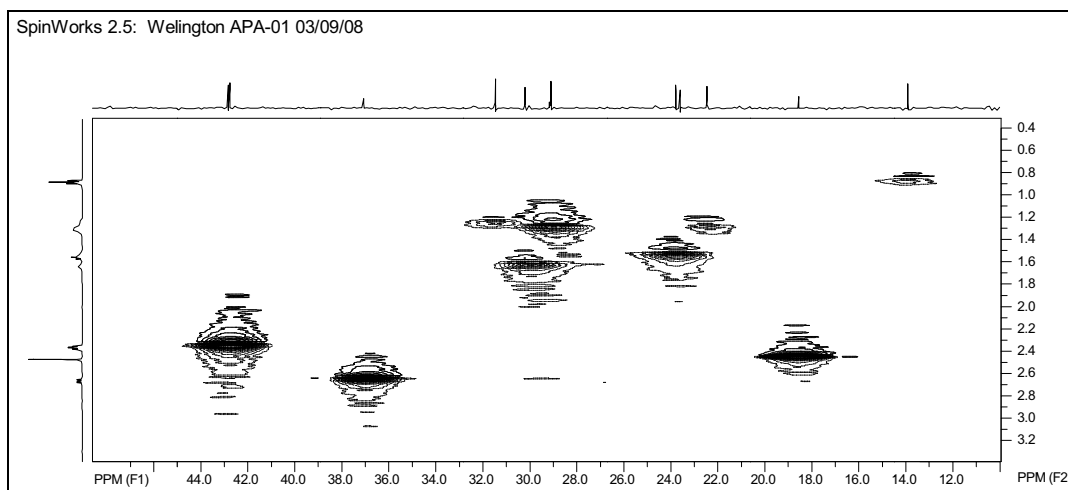


Espectro 86 - Espectro de RMN de DEPT 90 de **67** (125 MHz, CDCl₃).

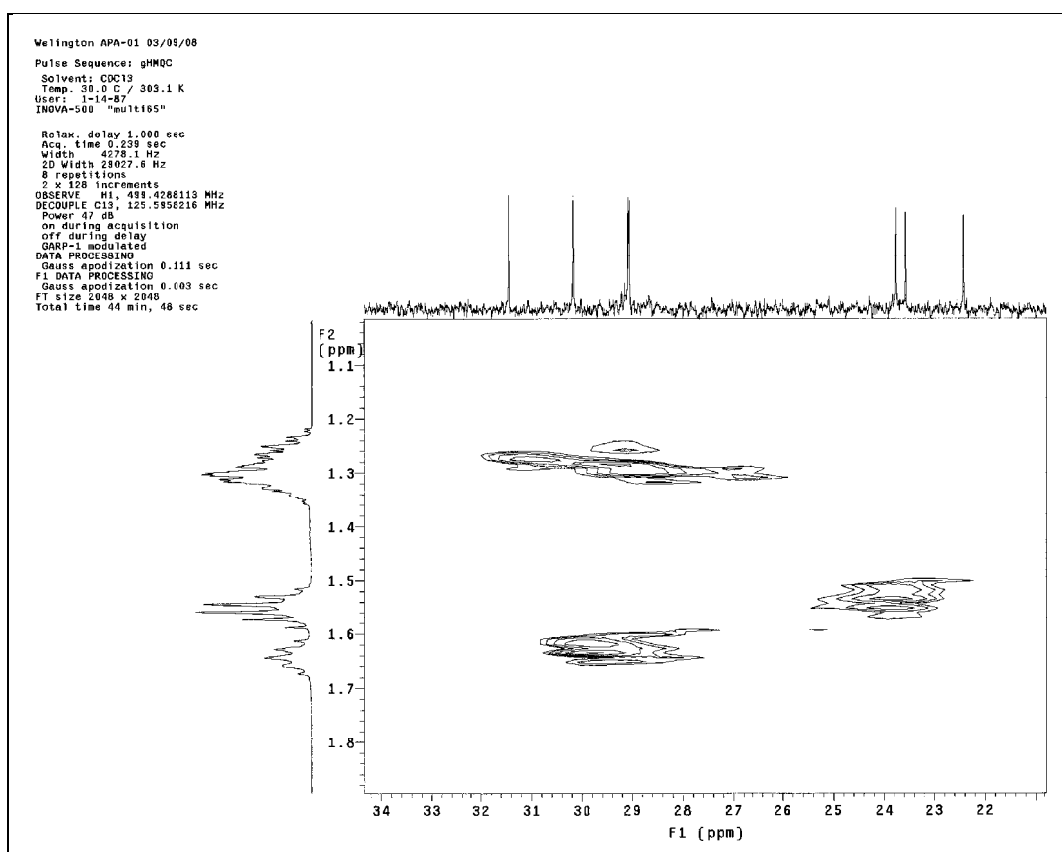
A partir dos experimentos de gHMQC foi possível correlacionar os hidrogênios aos respectivos carbonos (Espectros 87–90; Tabela 8).



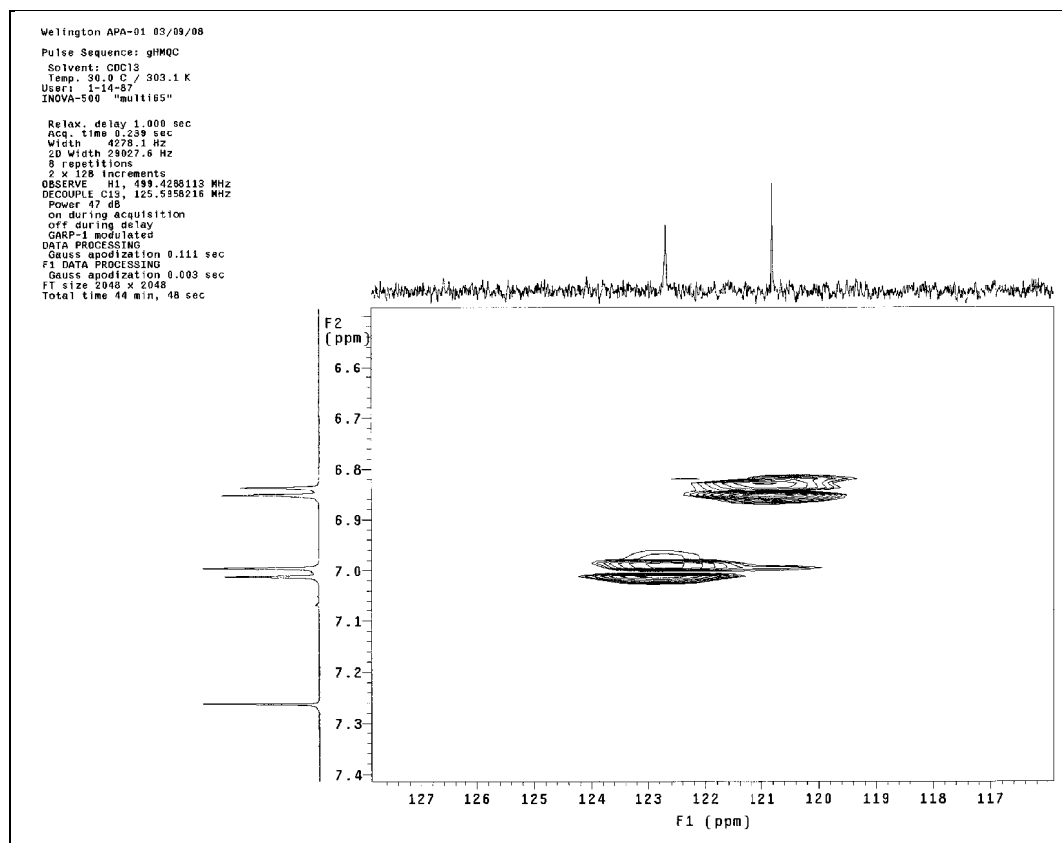
Espectro 87 - Mapa de contorno gHMQC de **67** (δ 10–45; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 88 - Mapa de contorno gHMQC de 67 (δ 12–44; 500 MHz; CDCl_3).

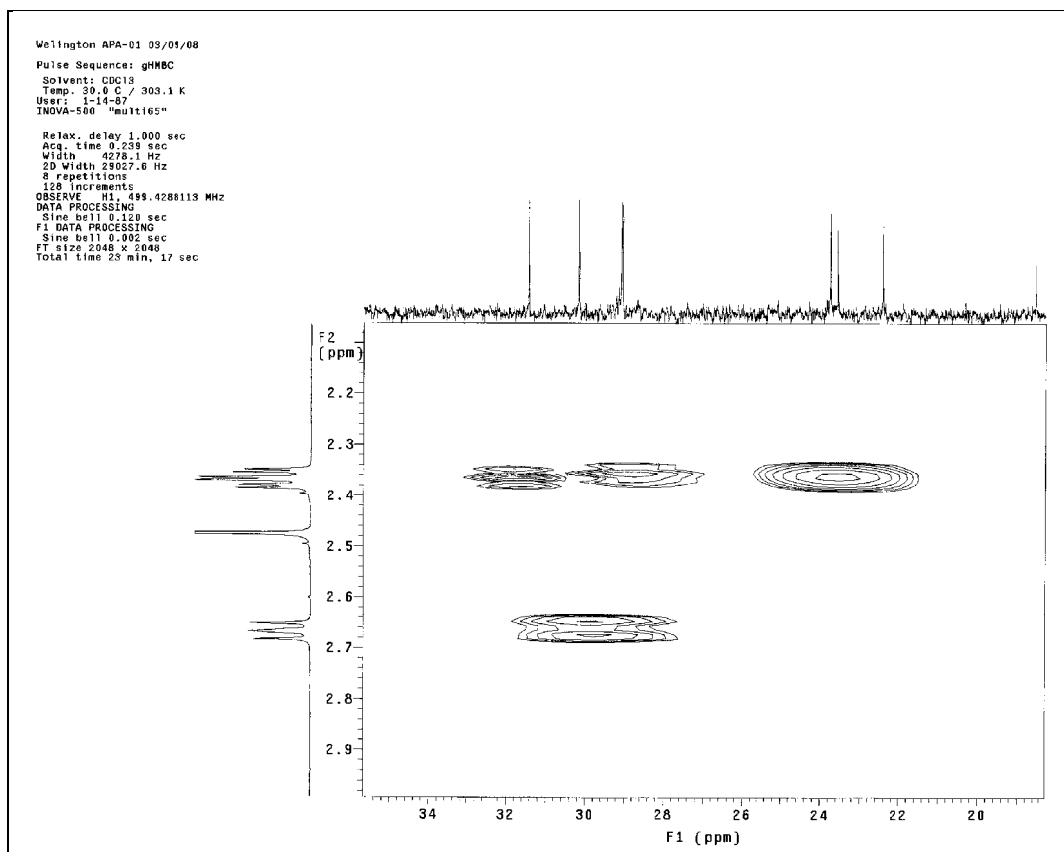


Espectro 89 - Mapa de contorno gHMQC de 67 (δ 22–34; 500 MHz; CDCl_3).

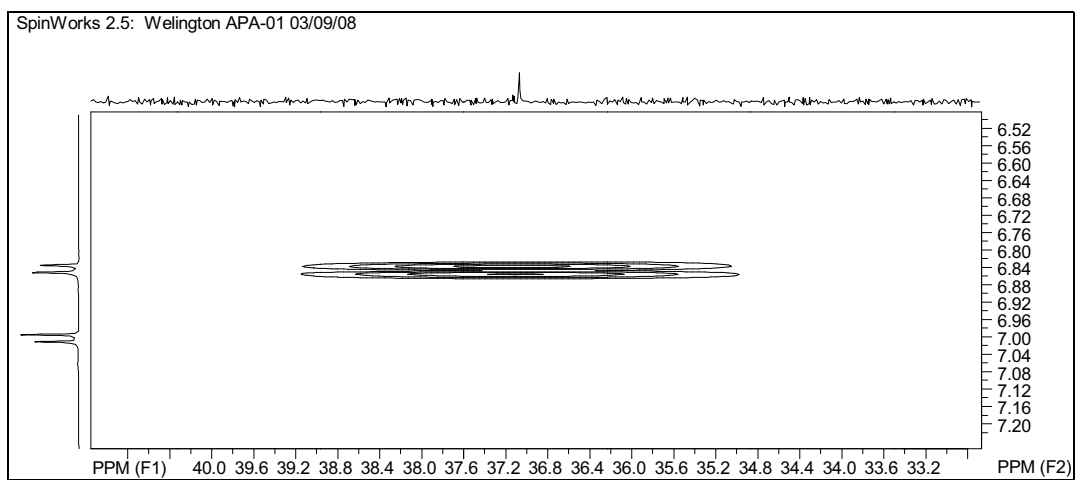


Espectro 90 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 117–127; 500 MHz; CDCl₃).

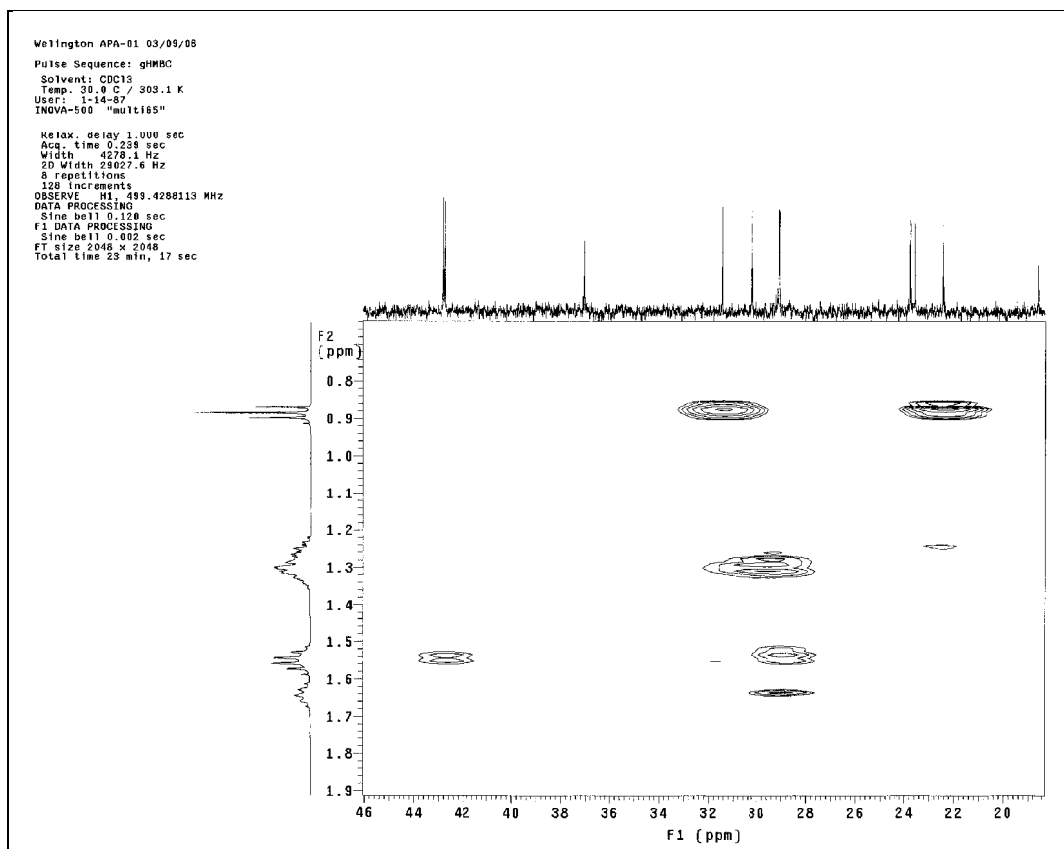
Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,00) e C-2 (3J , 145,3), C-3 (2J , 148,8), C-5 (2J , 120,8) e C-6 (3J , 152,9), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de uma hidroxila. Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,84) e C-3 (3J , 148,8), C-4 (2J , 122,7), C-6 (2J , 152,9) e C-1' (3J , 37,0) e entre H-7 (δ 2,47) e C-2 (145,3) e C-3 (148,8) (Espectros 91–100; Figura 46; Tabela 8). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,67) e C-5 e H-2' (δ 1,64) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6. A linearidade da cadeia foi confirmada a partir das correlações entre os metilenos, dentre as principais destacam-se aquelas entre H-5' (3J , 1,55), H-6' (2J , 2,37), H-8' (2J , 2,36), e H-9' (3J , 1,55), com a carbonila (δ 211,9), justificando a mesma na posição C-7'. Correlações entre a metila (H-12', δ 0,88) e C-10' (3J , 31,4) e C-11' (2J , 22,4) e entre H-10' (δ 1,27) e C-9' (2J , 23,5) e C-8' (3J , 42,7), corroboram para a linearidade da cadeia e a posição da carbonila (C-7') (Espectros 91–100; Figura 46; Tabela 8).



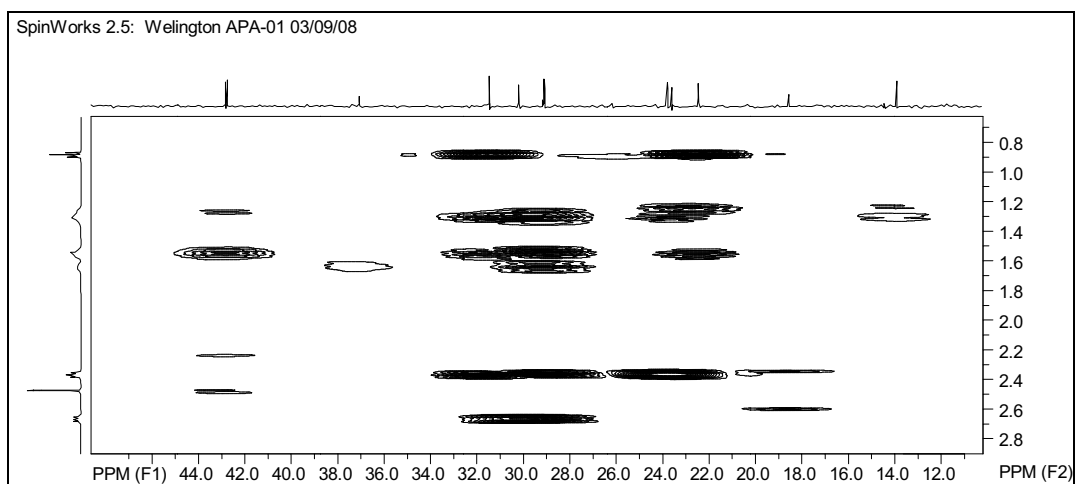
Espectro 91 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 20–34; 500 MHz; CDCl₃).



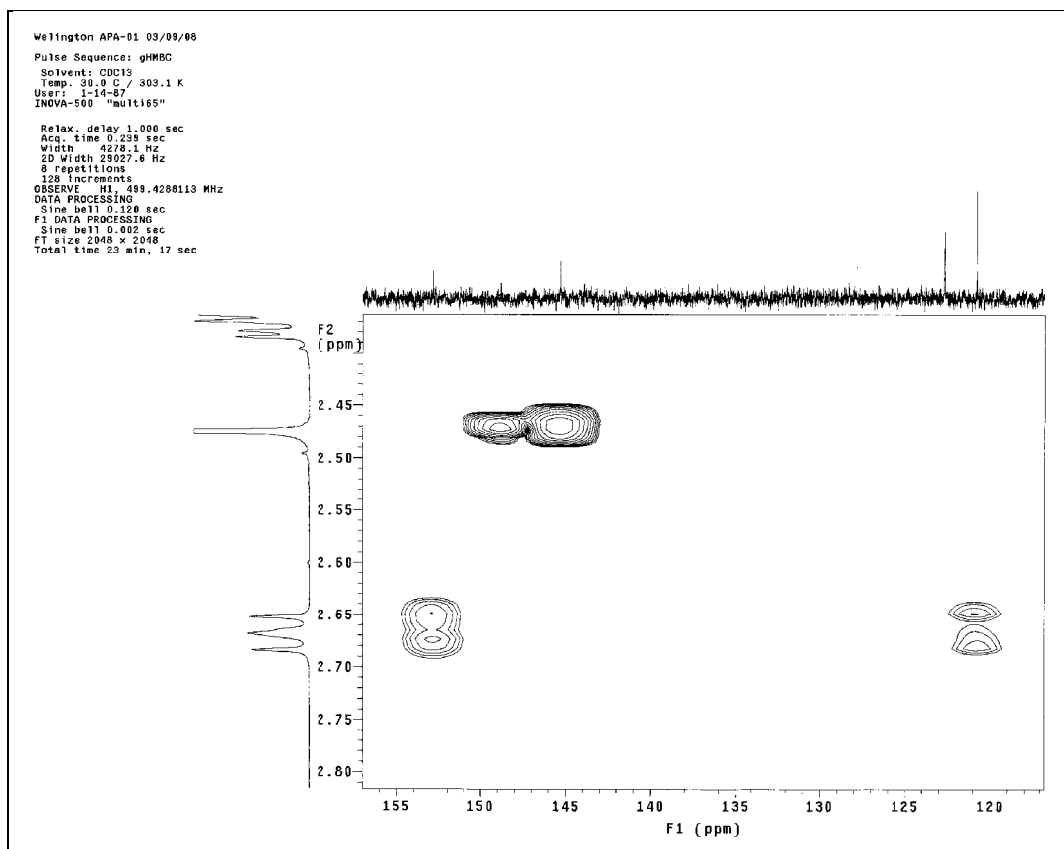
Espectro 92 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 33–40; 500 MHz; CDCl₃).



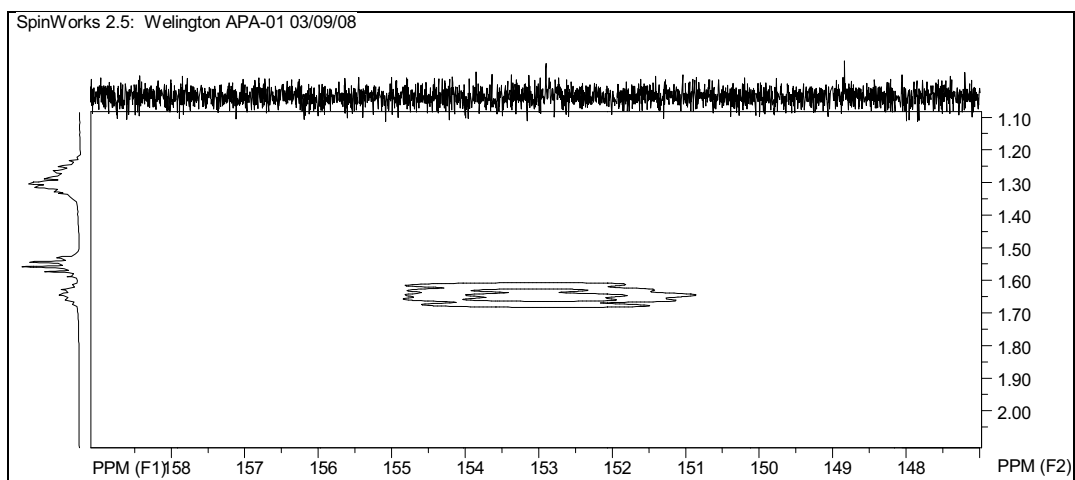
Espectro 93 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 20–46; 500 MHz; CDCl₃).



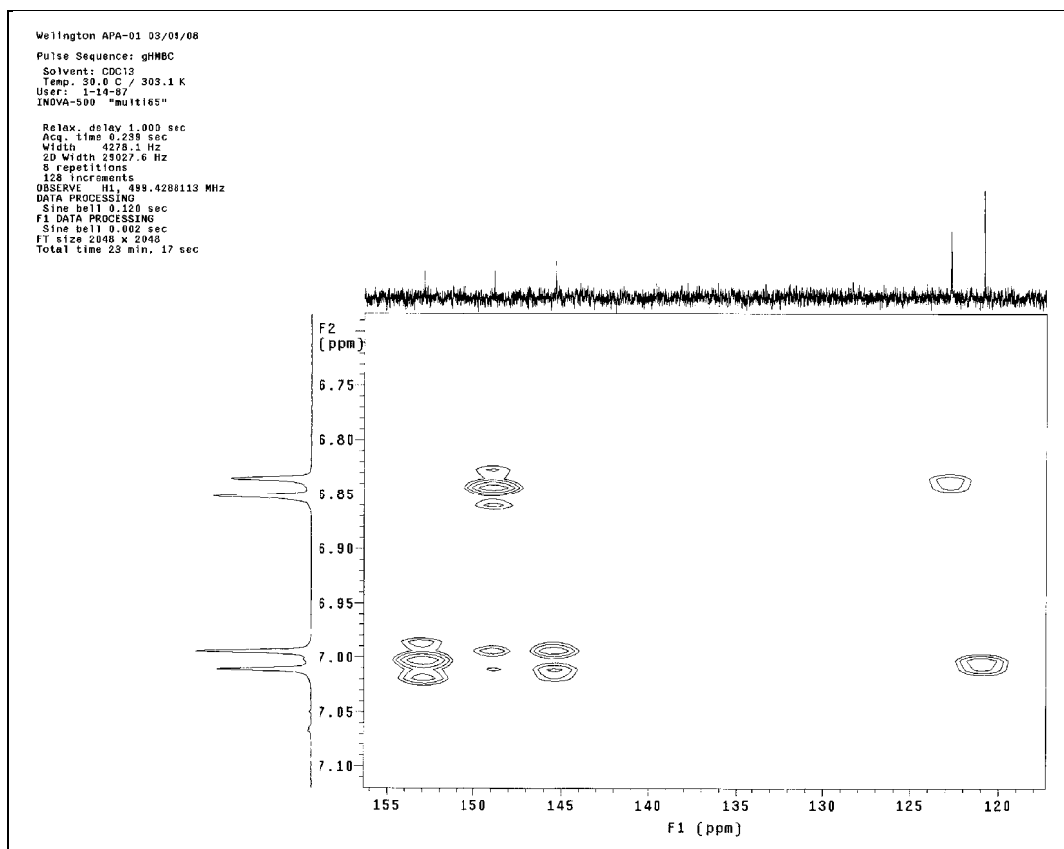
Espectro 94 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 12–44; 500 MHz; CDCl₃).



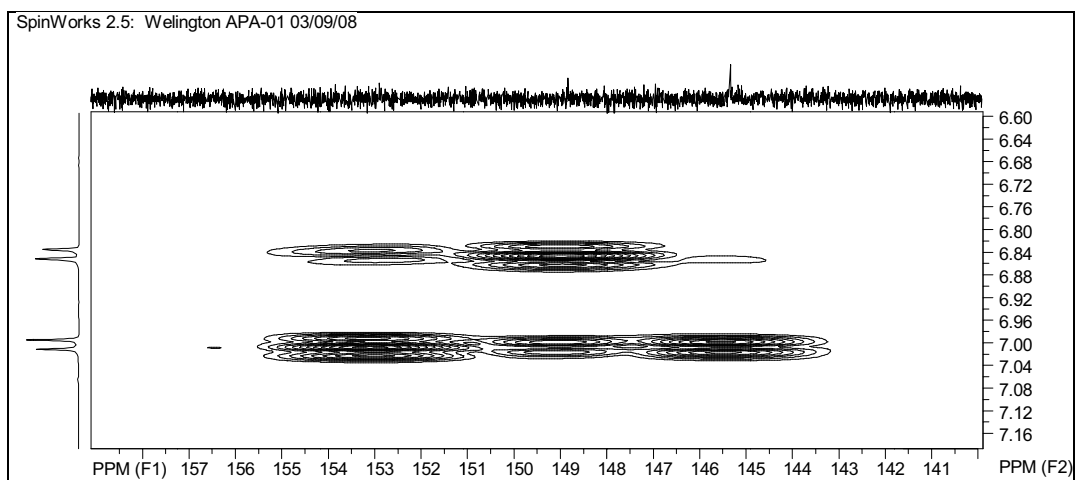
Espectro 95 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 120–155; 500 MHz; CDCl₃).



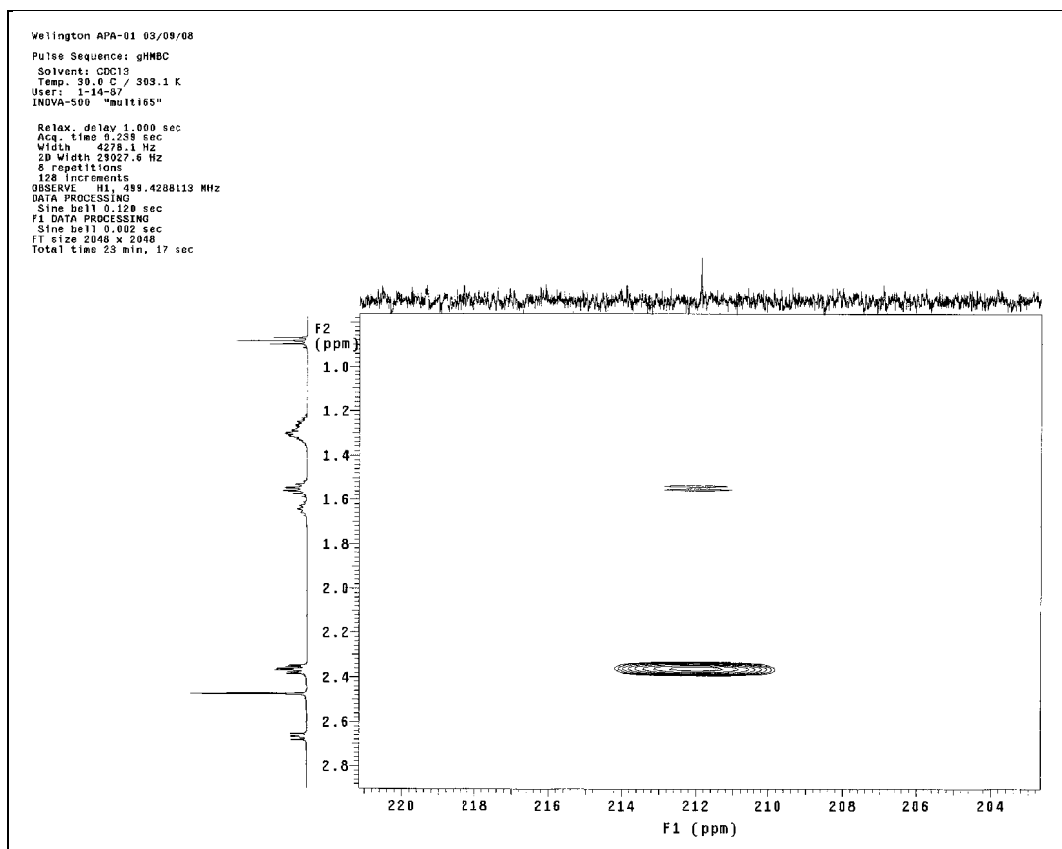
Espectro 96 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 148–158; 500 MHz; CDCl₃).



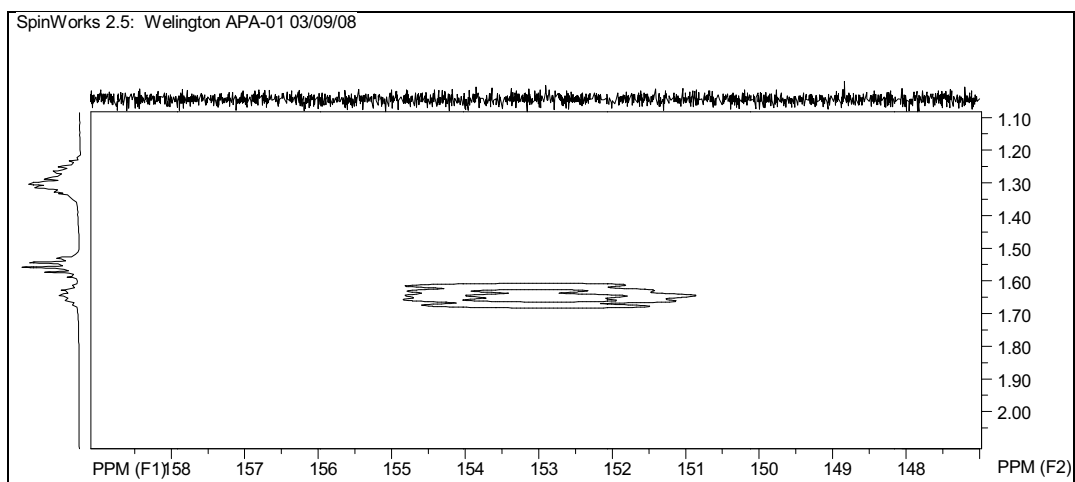
Espectro 97 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 120–155; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 98 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 141–157; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 99 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 204–220; 500 MHz; CDCl₃).



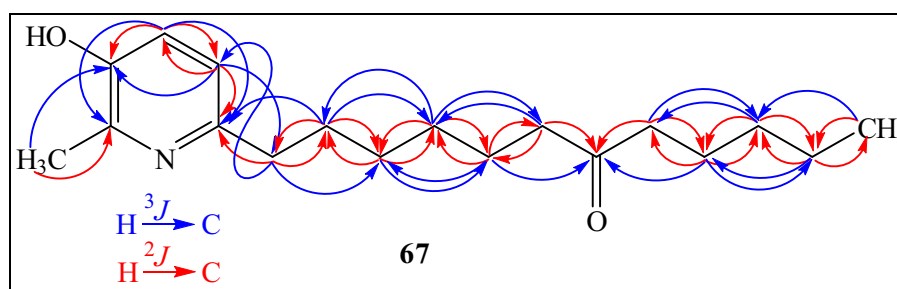
Espectro 100 - Mapa de contorno gHMBC de **67** (δ 148–158; 500 MHz; CDCl₃).

Tabela 8 - Dados de RMN de **67** em CDCl_3^a

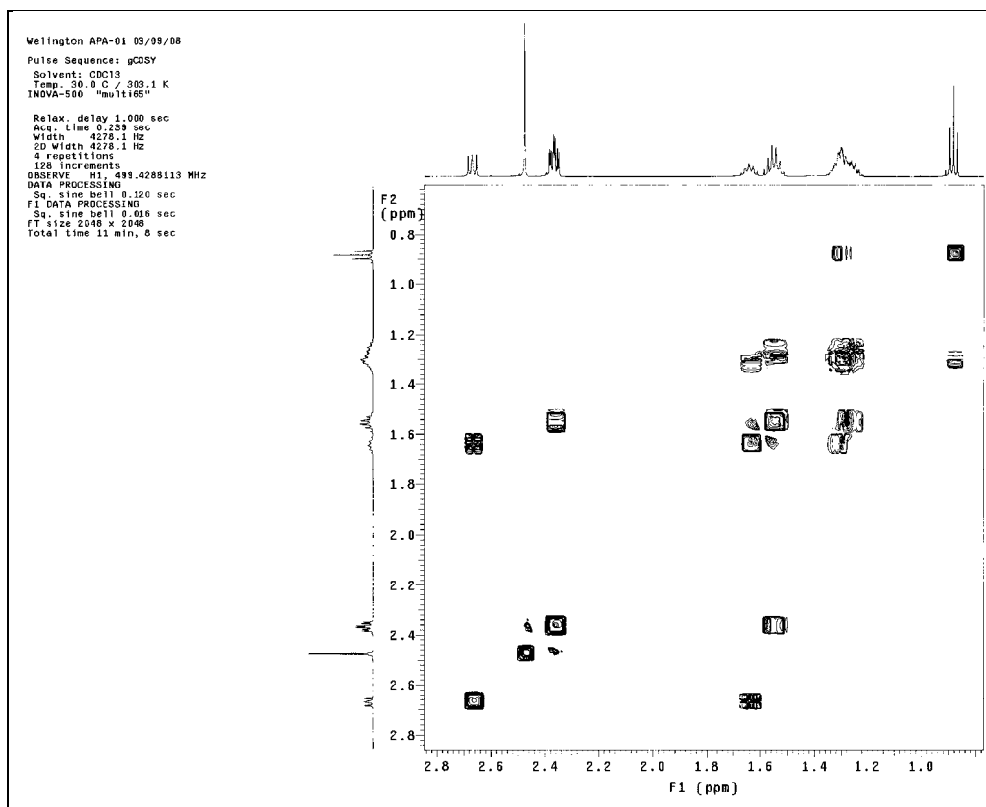
C	δ_c^b	gHMQC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	145,3 s	–	H-4; H-7	–
3	148,8 s	–	H-4; H-7; H-5	–
4	122,7 d	7,00 d (8,0)	H-5	H-5
5	120,8 d	6,84 d (8,0)	H-4; H-1'	H-4
6	152,9 s	–	H-4; H-5; H-1'; H-2'	–
7	18,5 q	2,47 s	–	–
1'	37,0 t	2,67 t (8,0)	H-5; H-2'	H-2'
2'	30,2 t	1,64 qt (8,0)	H-1'; H-3'; H-4'	H-1'; H-3'
3'	29,1 t	1,30 m	H-1'; H-2'; H-4'; H-5'	H-2'
4'	29,0 t	1,30 m	H-2'; H-3'; H-5'; H-6'	H-5'
5'	23,8 t	1,55 qt (7,5)	H-3'; H-4'; H-6'	H-4'; H-6'
6'	42,8 t	2,37 t (7,5)	H-4'; H-5'	H-5'
7'	211,9 s	–	H-5'; H-6'; H-8'; H-9'	–
8'	42,7 t	2,36 t (7,5)	H-9'; H-10'	H-9'
9'	23,5 t	1,55 qt (7,5)	H-8'; H-10'; H-11'	H-8'; H-10'
10'	31,4 t	1,27 m	H-8'; H-9'; H-11'; H-12'	H-9'; H-11'
11'	22,4 t	1,30 m	H-9'; H-10'; H-12'	H-10'; H-12'
12'	13,9 q	0,88 t (7,5)	H-11'	H-11'

^a Experimento de RMN ^1H e ^{13}C realizado a 500 e 125 MHz, respectivamente.

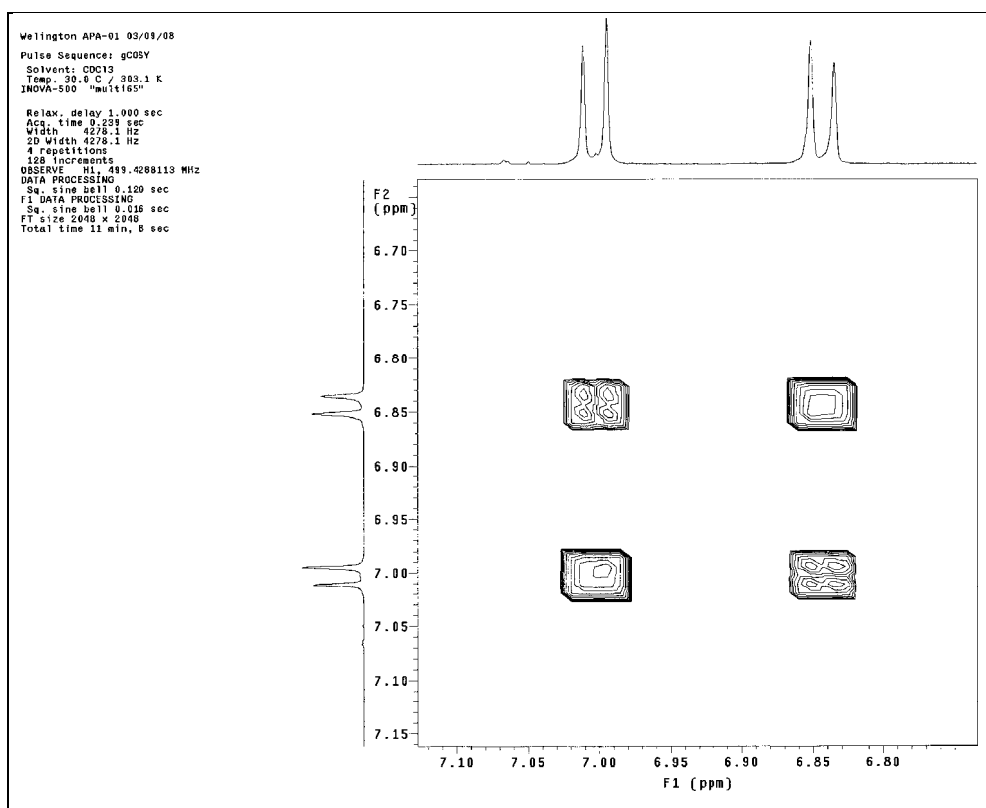
^b Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

**Figura 46** - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **67**.

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, destacam-se as correlações entre H-1' e H-2', H-5' e H-6', H-8' e H-9', H-9' e H-10', H-11' e H-12' (Espectros 101 e 102; Tabela 8).

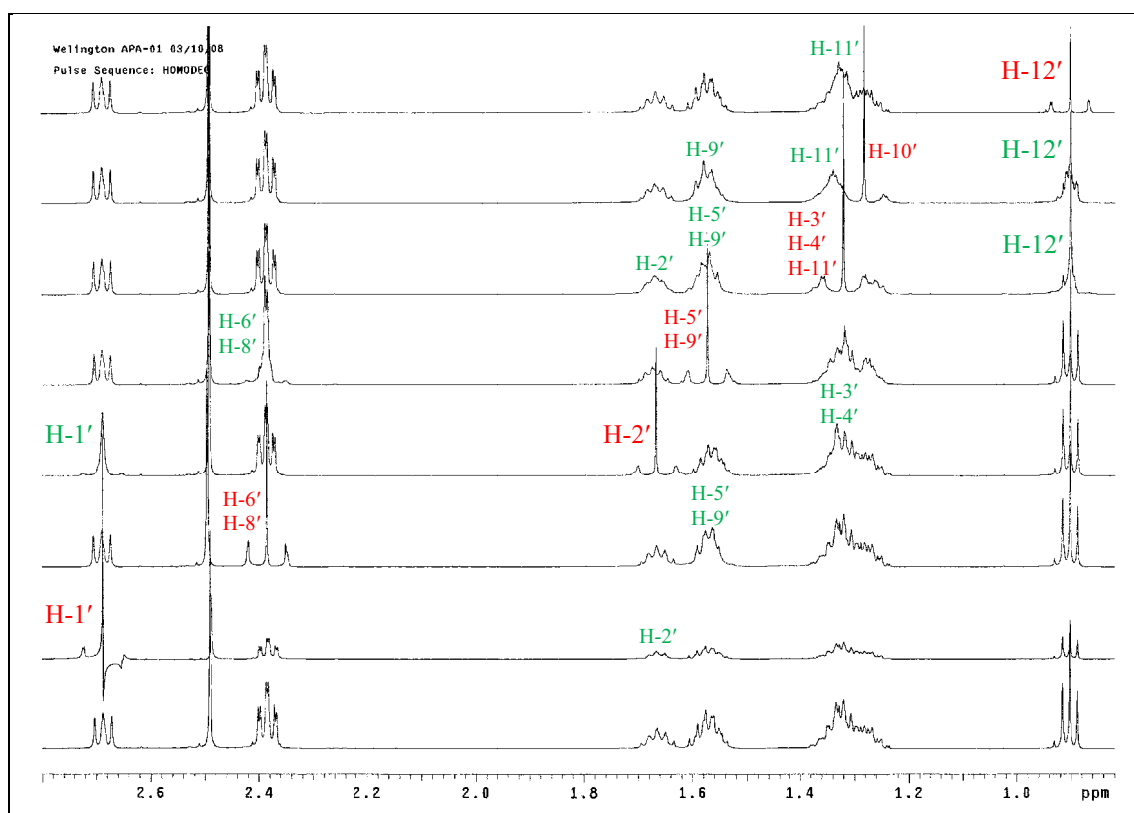


Espectro 101 - Mapa de contorno gCOSY de **67** (δ 1,0–2,8; 500 MHz; CDCl₃).



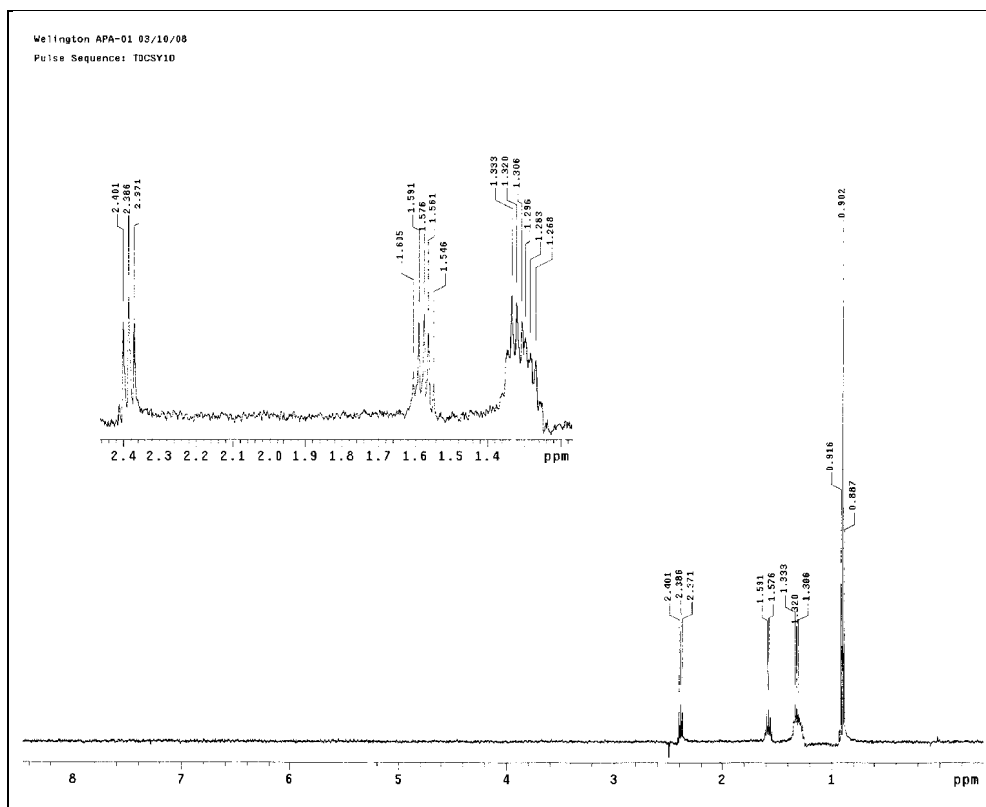
Espectro 102 - Mapa de contorno gCOSY de **67** (δ 6,8–7,1; 500 MHz; CDCl₃).

A partir dos espectros de HOMODEC foram atribuídas correlações de hidrogênios que estavam sobrepostos (Espectro 103).

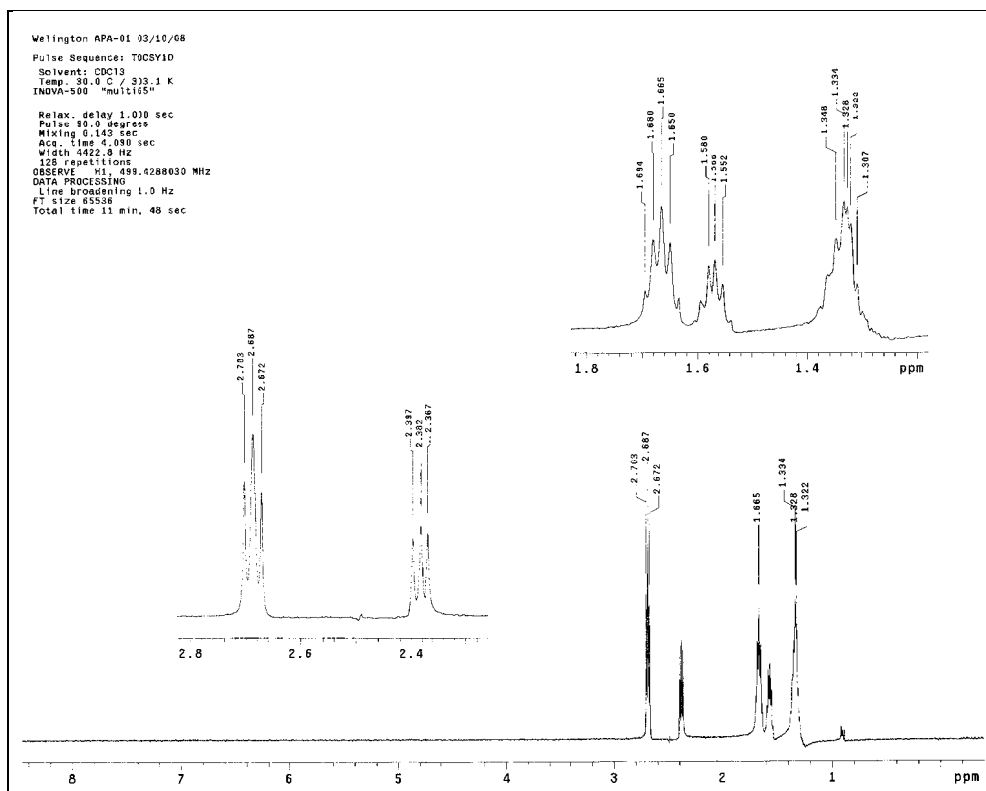


Espectro 103 - Espectro de RMN de HOMODEC de **67** (H-irradiado, H-desacoplado) (500 MHz, CDCl_3).

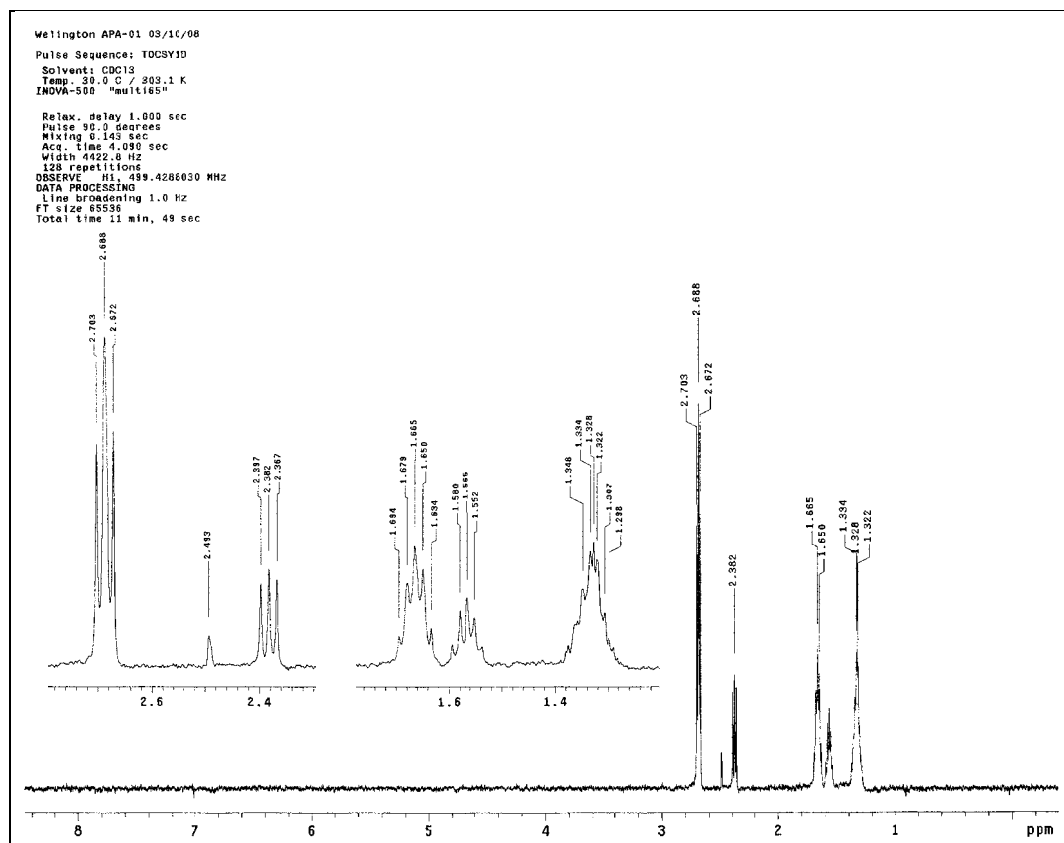
Através do experimento de RMN de TOCSY 1D onde é observada a transferência de polarização entre os hidrogênios vicinais, foi irradiado δ 0,88 (H-12') e observada a transferência de polarização através de δ 1,30 (H-11'), 1,27 (H-10'), 1,55 (H-9') e 2,37 (H-8') (Espectro 104). Em seguida foi irradiado δ 1,64 (H-2') e observada a transferência de polarização através de δ 2,67 (H-1'), 1,30 (H-3'), 1,30 (H-4'), 1,55 (H-5') e 2,37 (H-6') (Espectro 105). E por último foi irradiado δ 2,67 (H-1') e observada a transferência de polarização através de δ 1,64, 1,30, 1,30, 1,55 e 2,37 (H-2', H-3', H-4', H-5' e H-6', respectivamente) (Espectro 106). Foi possível ainda, observar claramente a multiplicidade desses sinais.



Espectro 104 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de **67**, irradiando δ 0,88 (H-12'; 500 MHz; CDCl_3).



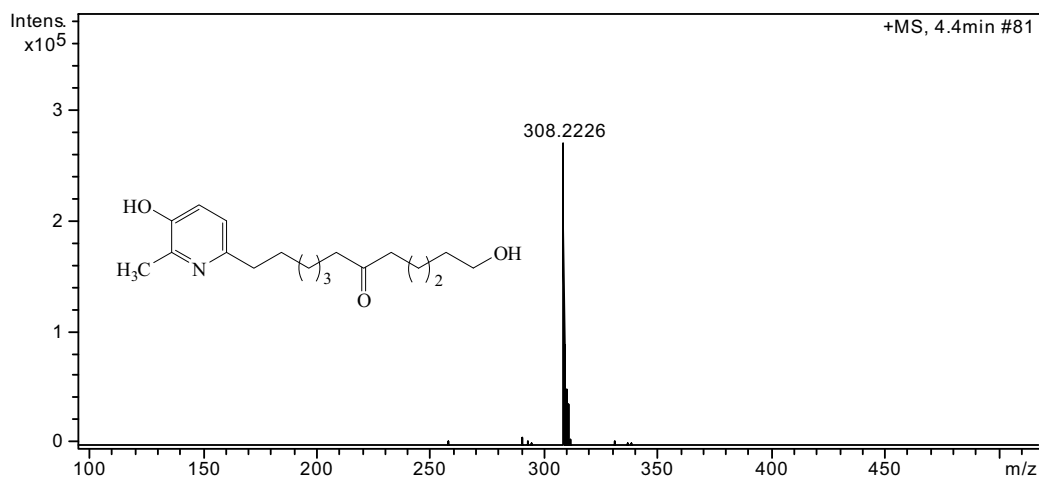
Espectro 105 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de **67**, irradiando δ 1,64 (H-2'; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 106 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de **67**, irradiando δ 2,67 (H-1'; 500 MHz; CDCl_3).

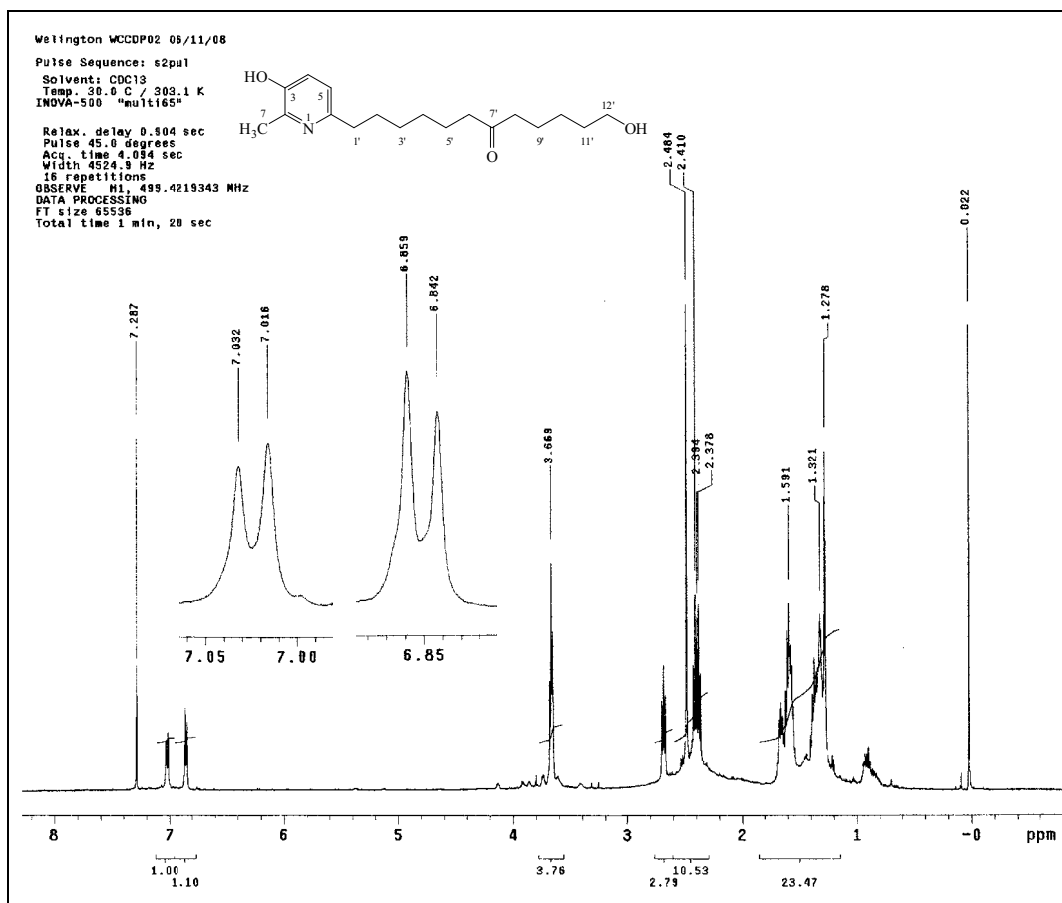
4.4.7 Elucidação estrutural do alcalóide **69** (12'-hidroxi-7'-multijuguinona)

A substância **69** foi isolada na forma de um sólido branco com faixa de fusão entre 71-73 °C, que ao ser analisada por CCD e revelada com o reagente de Dragendorff, apresentou coloração amarela (R_f 0,18), característica de alcalóide (Figura 35). Quando submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer sua fórmula molecular como sendo $\text{C}_{18}\text{H}_{29}\text{NO}_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco. O pico referente ao íon *quasi*-molecular foi observado em m/z 308,2226 $[\text{M}+\text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_3^+$, 308,2220 (Espectro 107).

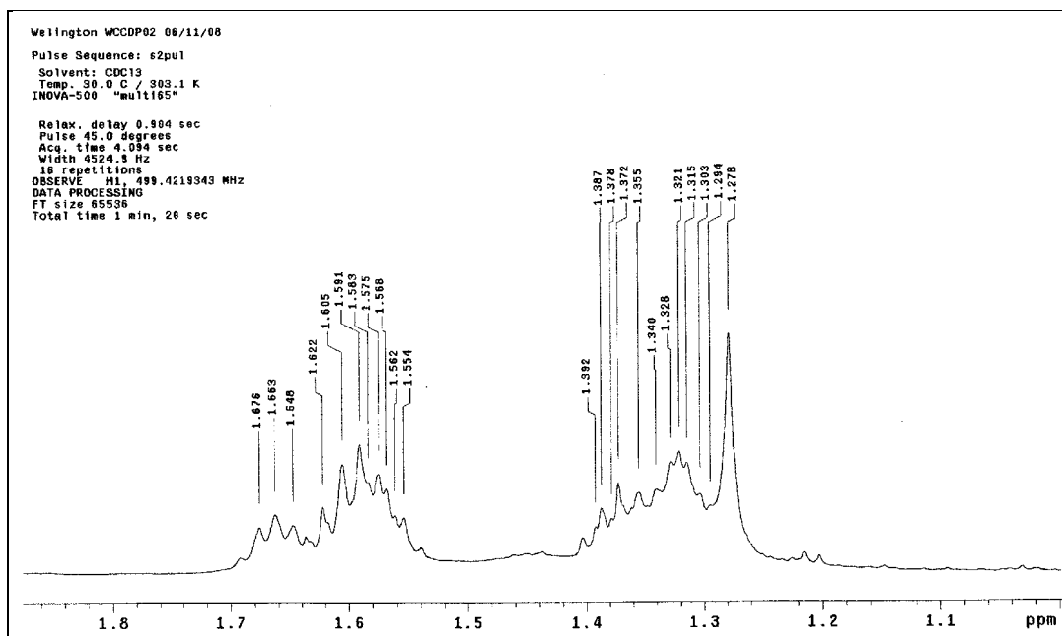


Espectro 107 - IES-EM alta resolução do alcalóide **69**.

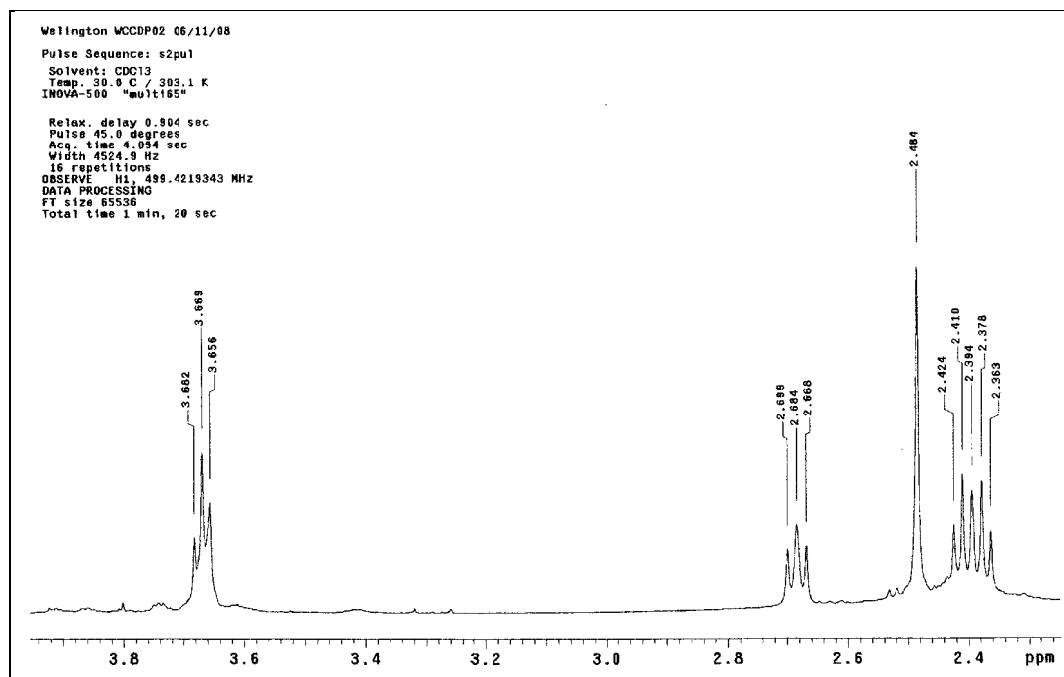
A análise do espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos δ 6,85 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,02 (1H, $J = 8,0$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos na posição *orto*, um singlete em δ 2,48 (3H), característico de metila ligada a um sistema aromático e um tripleto em δ 3,68 (2H) referente a um hidroxil metileno ligado a metileno. Foram observados ainda três tripletos; δ 2,68 (2H), δ 2,38 (2H) e δ 2,41 (2H), três quintupletos em δ 1,66 (2H), δ 1,59 (4H) e δ 1,61 (2H) e três multipletos em δ 1,28, δ 1,33 e δ 1,39 (Espectros 108–110; Tabela 9).



Espectro 108 - Espectro de RMN de ¹H de **69** (500 MHz, CDCl₃).

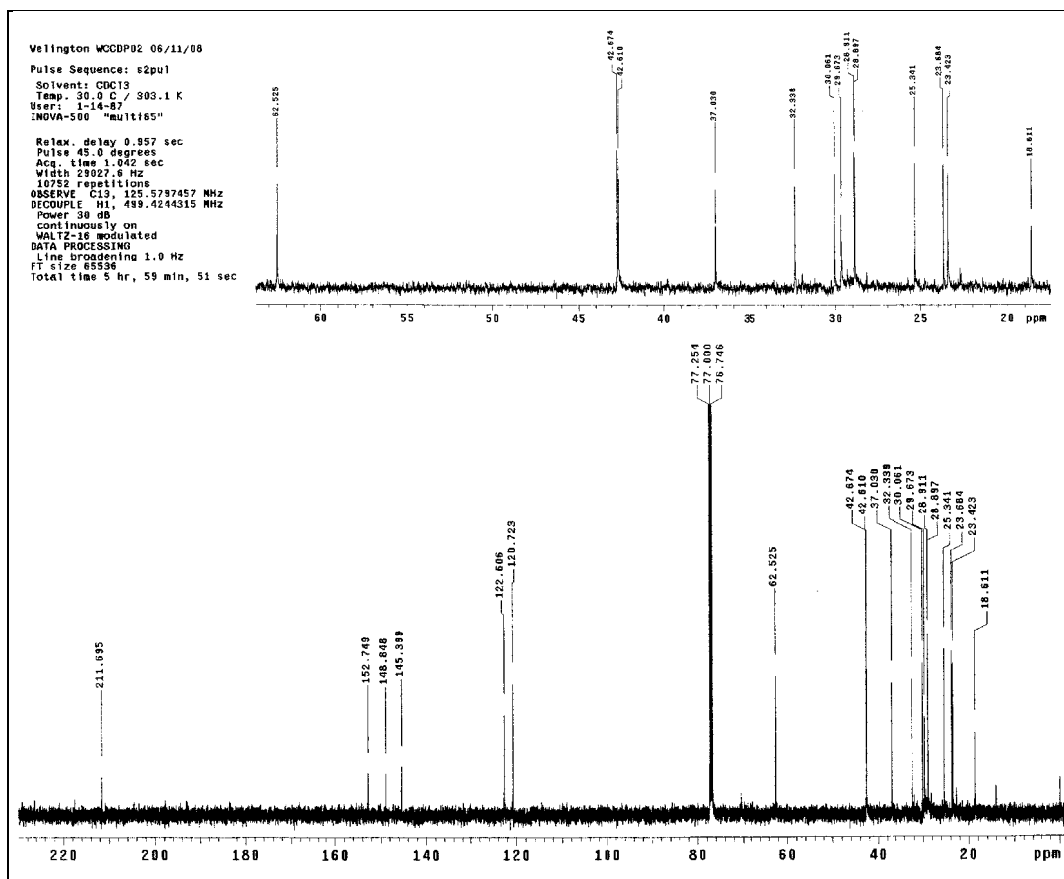


Espectro 109 - Ampliação do espectro 108 (δ 1,1–1,8) do alcalóide **69**.

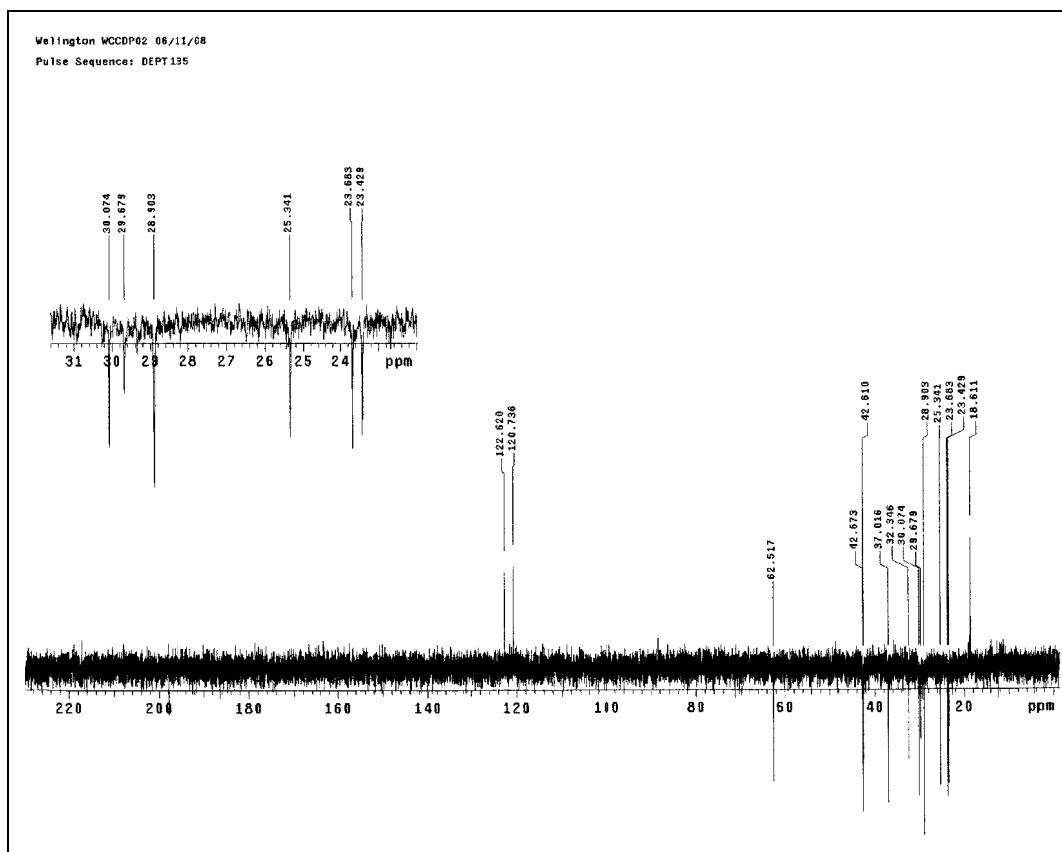


Espectro 110 - Ampliação do espectro 108 (δ 2,4–3,8) do alcalóide **69**.

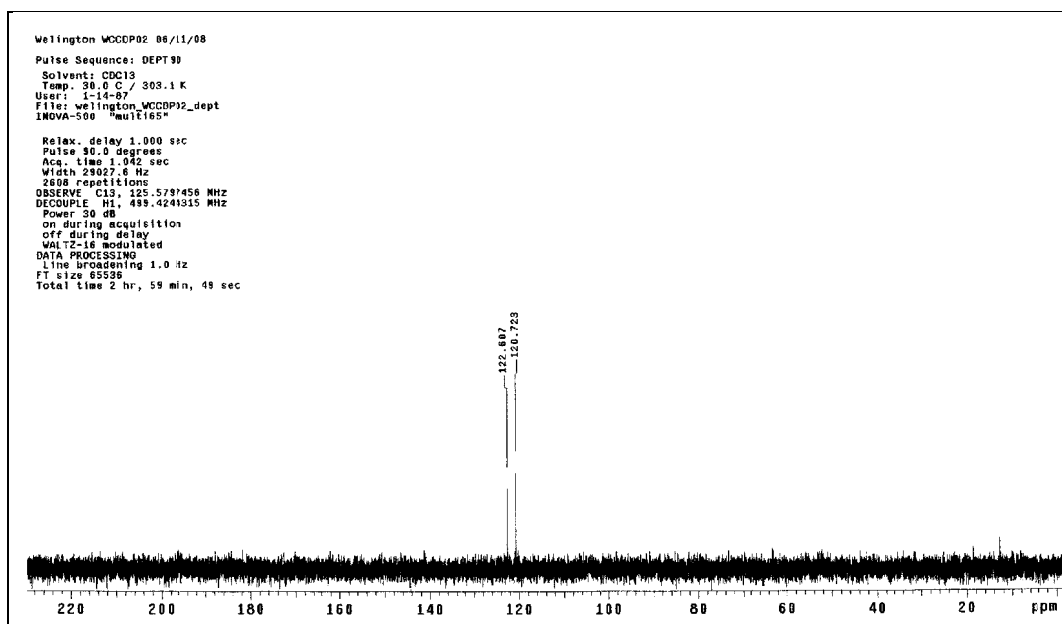
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários (δ 145,4; 148,8 e 152,7), com deslocamento químico característico de carbonos ligados a átomos eletronegativos e dois metinos δ 120,7 e 122,6. Foi observada ainda a presença de uma metila δ 18,6, uma carbonila δ 211,7, um hidroxí metileno e dez metilenos, o que sugere uma cadeia linear com uma hidroxila no último carbono (δ 62,5; Espectros 111–113; Tabela 9). Quando comparados, os sinais dos carbonos aromáticos, com aqueles da literatura, foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.



Espectro 111 - Espectro de RMN ^{13}C de **69** (125 MHz, CDCl_3).

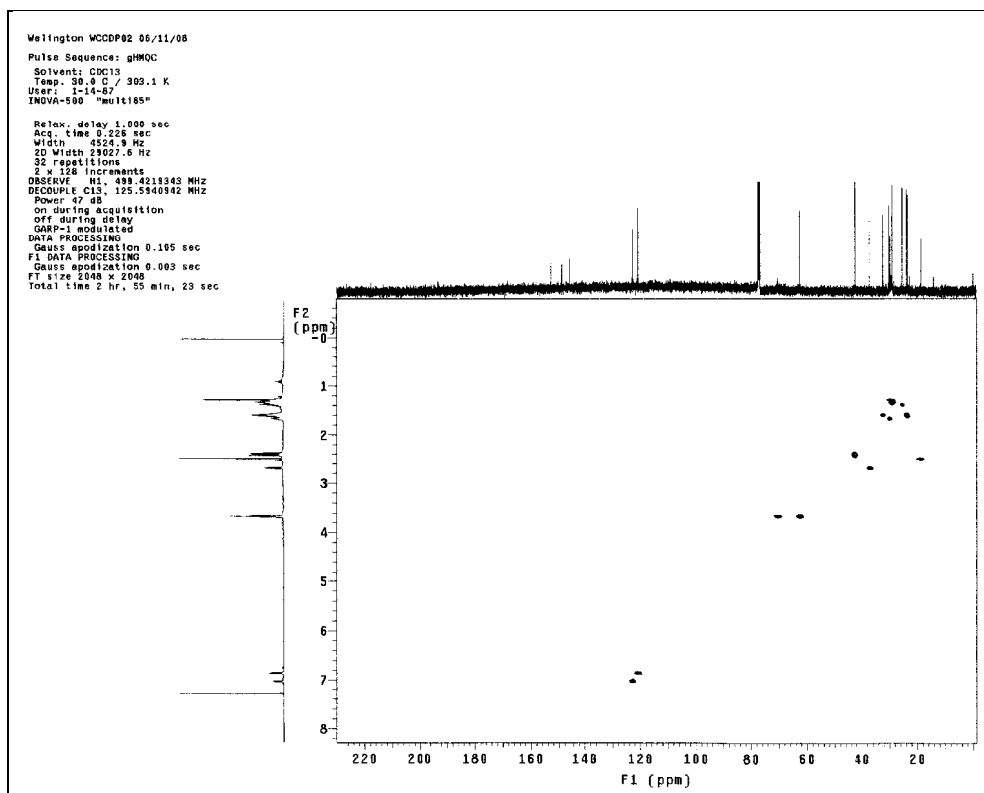


Espectro 112 - Espectro de RMN de DEPT 135 de **69** (125 MHz, CDCl_3).

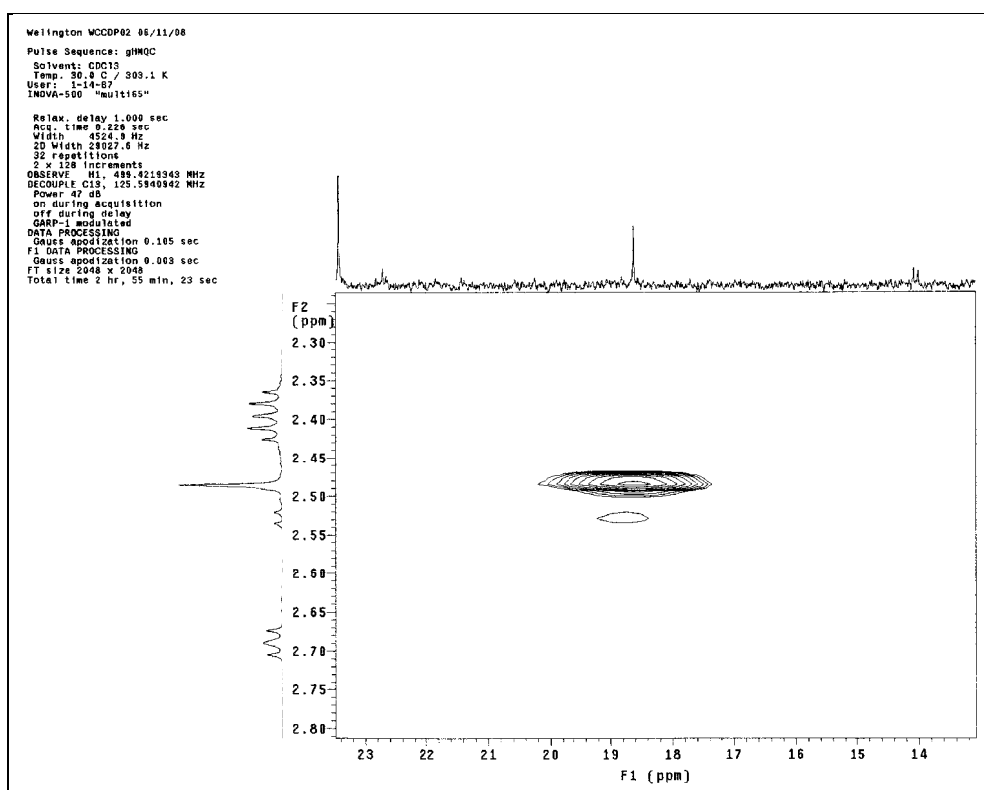


Espectro 113 - Espectro de RMN de DEPT 90 de **69** (125 MHz, CDCl_3).

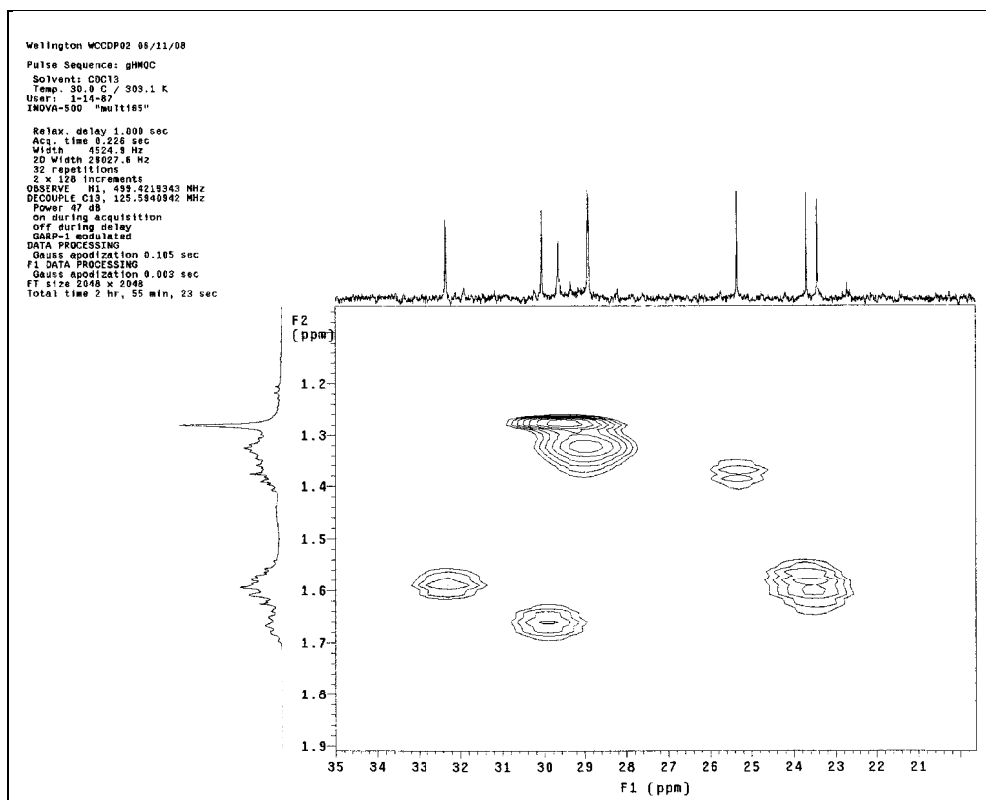
A partir dos experimentos de gHMQC foi possível correlacionar os hidrogênios aos respectivos carbonos (Espectros 114–119; Tabela 9).



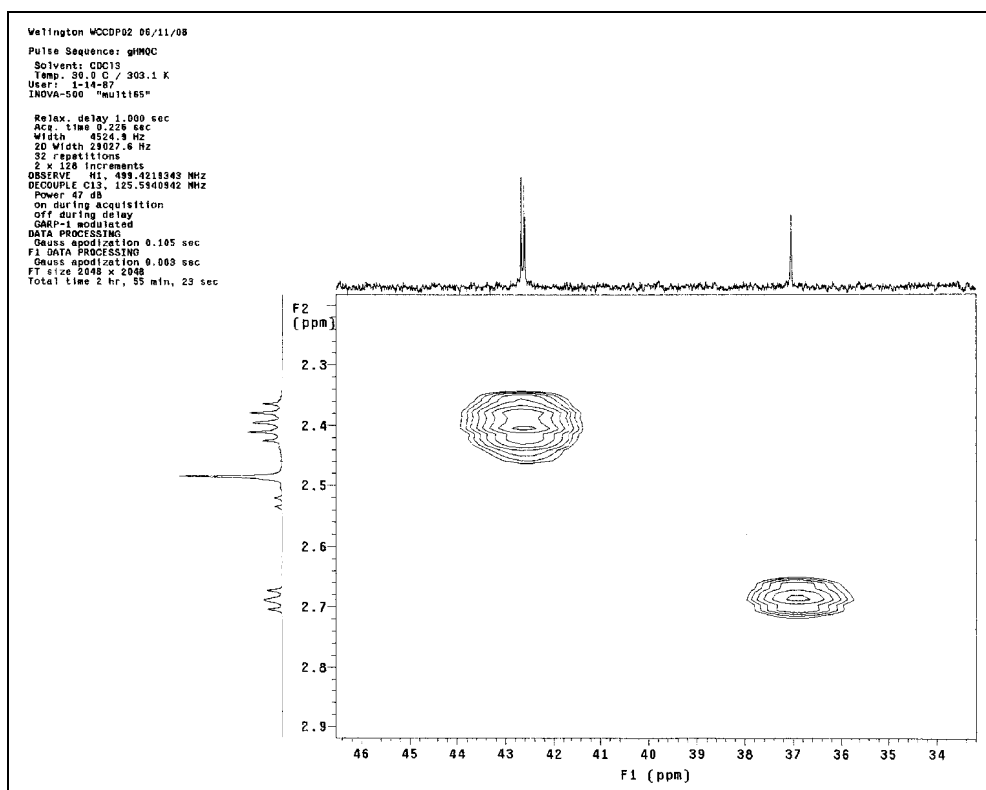
Espectro 114 - Mapa de contorno gHMQC de **69** (500 MHz; CDCl₃).



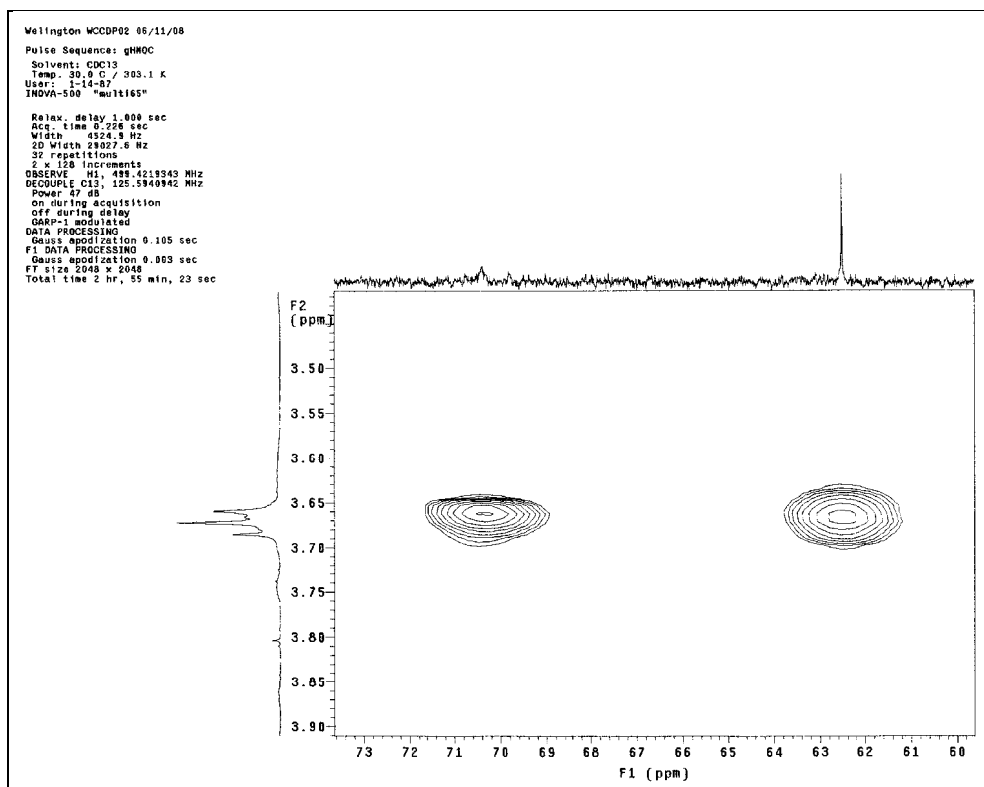
Espectro 115 - Mapa de contorno gHMQC de **69** (δ 14–23; 500 MHz; CDCl₃).



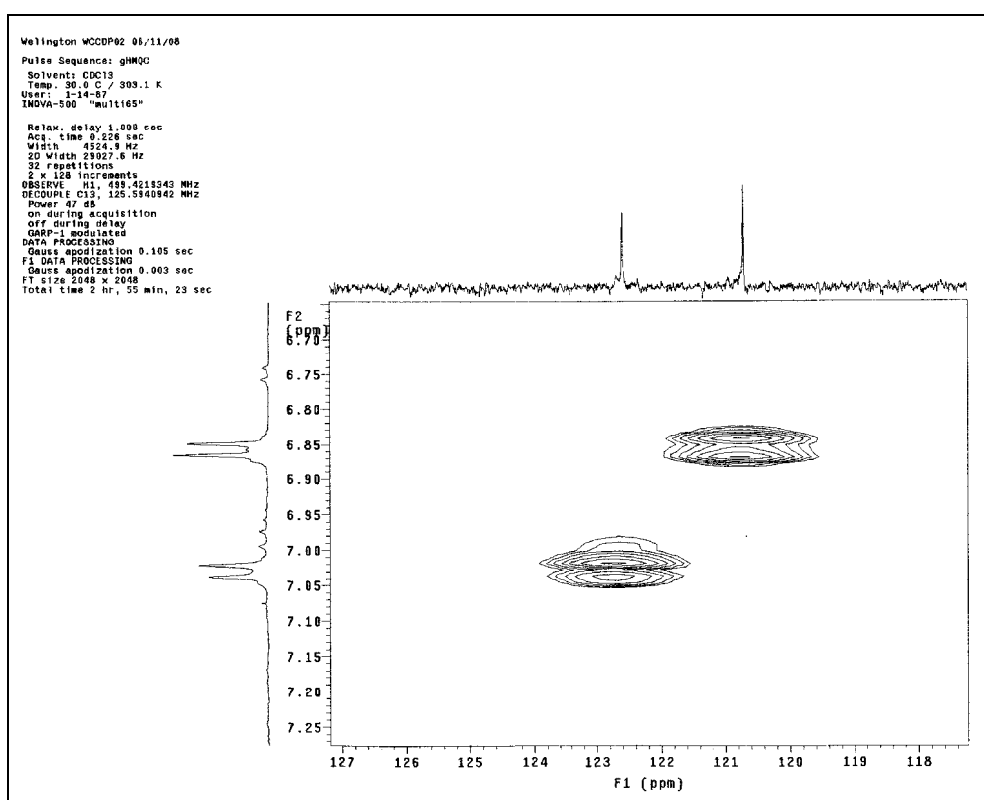
Espectro 116 - Mapa de contorno gHMQC de **69** (δ 21–35; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 117 - Mapa de contorno gHMQC de **69** (δ 34–46; 500 MHz; CDCl₃).

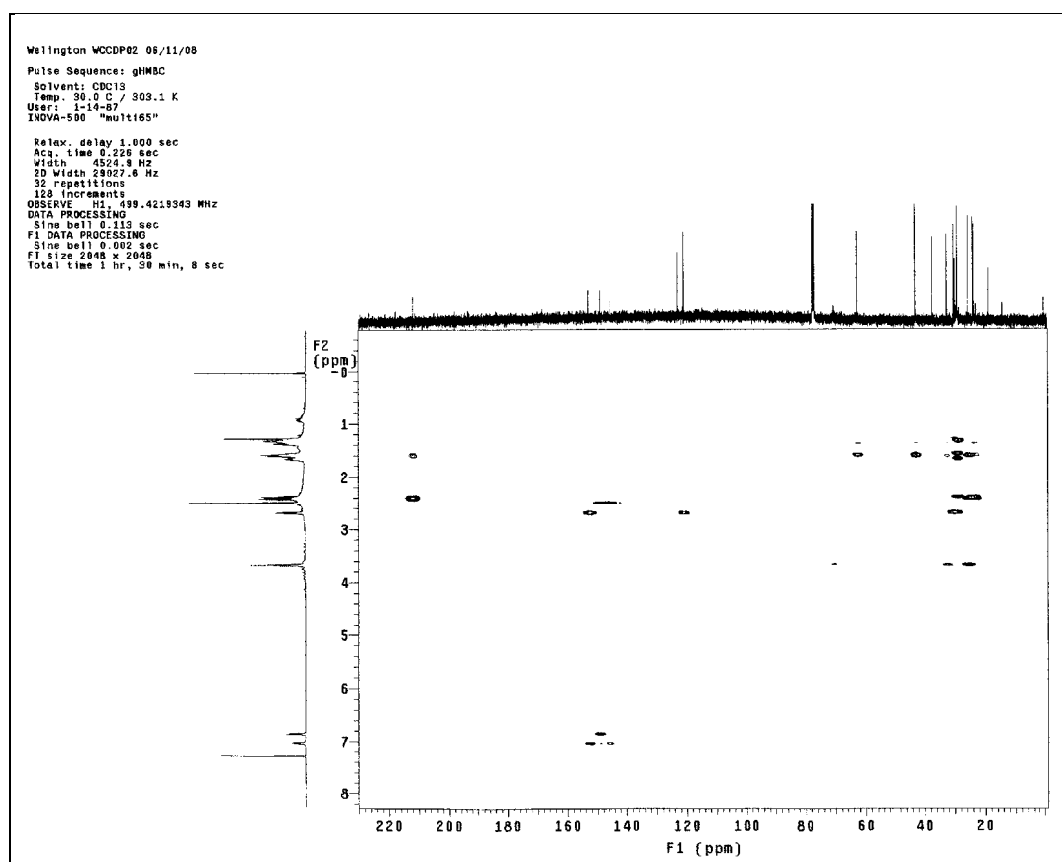


Espectro 118 - Mapa de contorno gHMOC de **69** (δ 60–73; 500 MHz; CDCl₃).

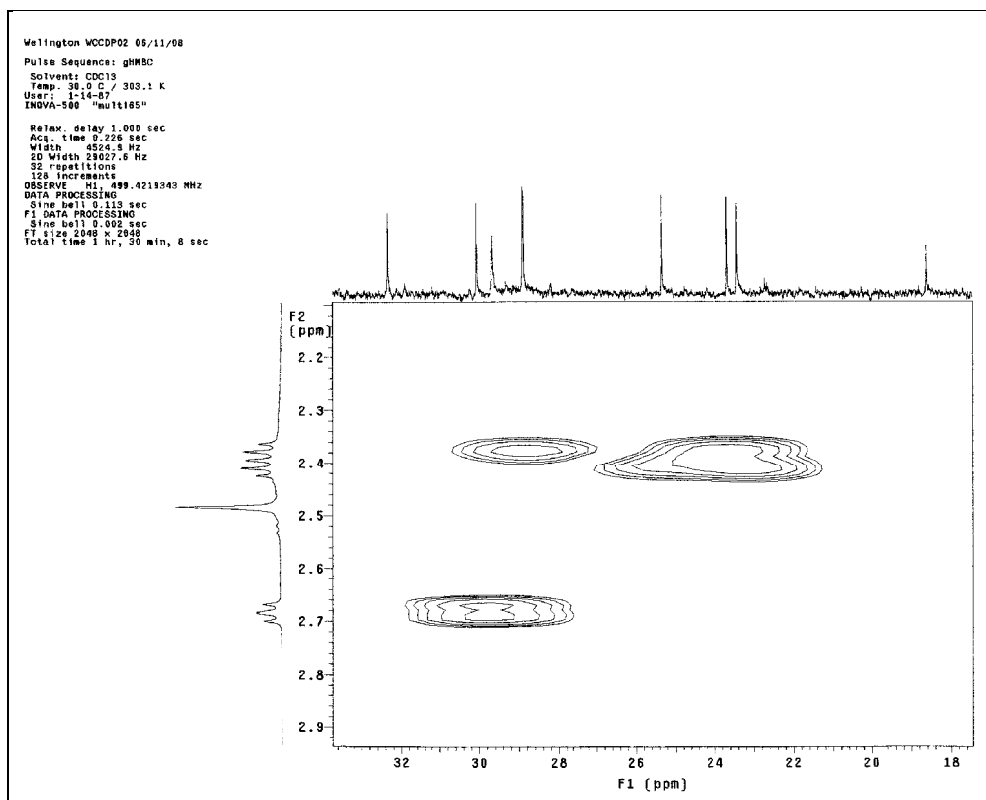


Espectro 119 - Mapa de contorno gHMOC de **69** (δ 118–127; 500 MHz; CDCl₃).

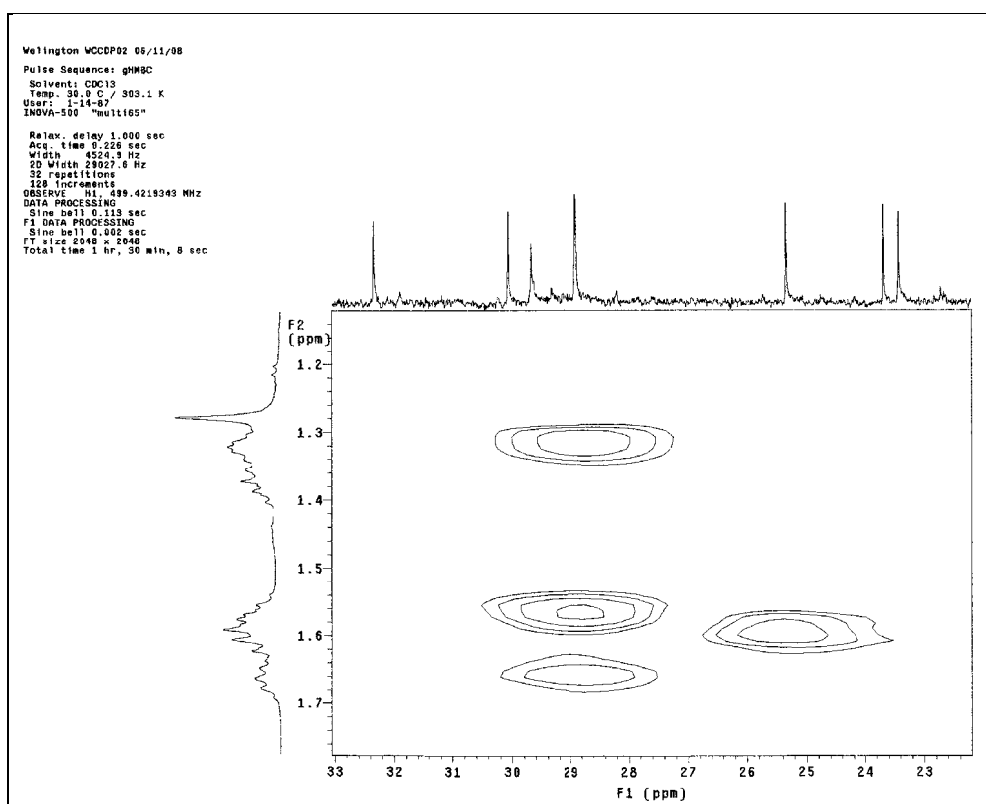
Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,00) e C-2 (3J , 145,4), C-3 (2J , 148,8) e C-6 (3J , 152,7), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de uma hidroxila. Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,85) e C-3 (3J , 148,8), C-4 (2J , 122,6), C-6 (2J , 152,7) e C-1' (3J , 37,0) e entre H-7 (δ 2,48) e C-2 (145,4) e C-3 (148,8) (Espectros 120-132; Figura 47; Tabela 9). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,68) e C-5 e H-2' (δ 1,66) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6. A linearidade da cadeia foi confirmada a partir das correlações entre os metilenos, dentre as principais destacam-se aquelas entre H-5' (3J , 1,59), H-6' (2J , 2,38), H-8' (2J , 2,41), e H-9' (3J , 1,61), com a carbonila (δ 211,7), justificando a mesma na posição C-7'. Correlações entre o hidroxil metileno (H-12', δ 3,67) e C-10' (3J , 31,4) e C-11' (2J , 22,4) e entre H-10' (δ 1,39) e C-8' (2J , 42,7), C-9' (3J , 23,4), C-11' (3J , 32,3) e C-12' (3J , 62,5) corroboram para a linearidade da cadeia e a posição da carbonila (C-7) (Espectros 120-132; Figura 47; Tabela 9).



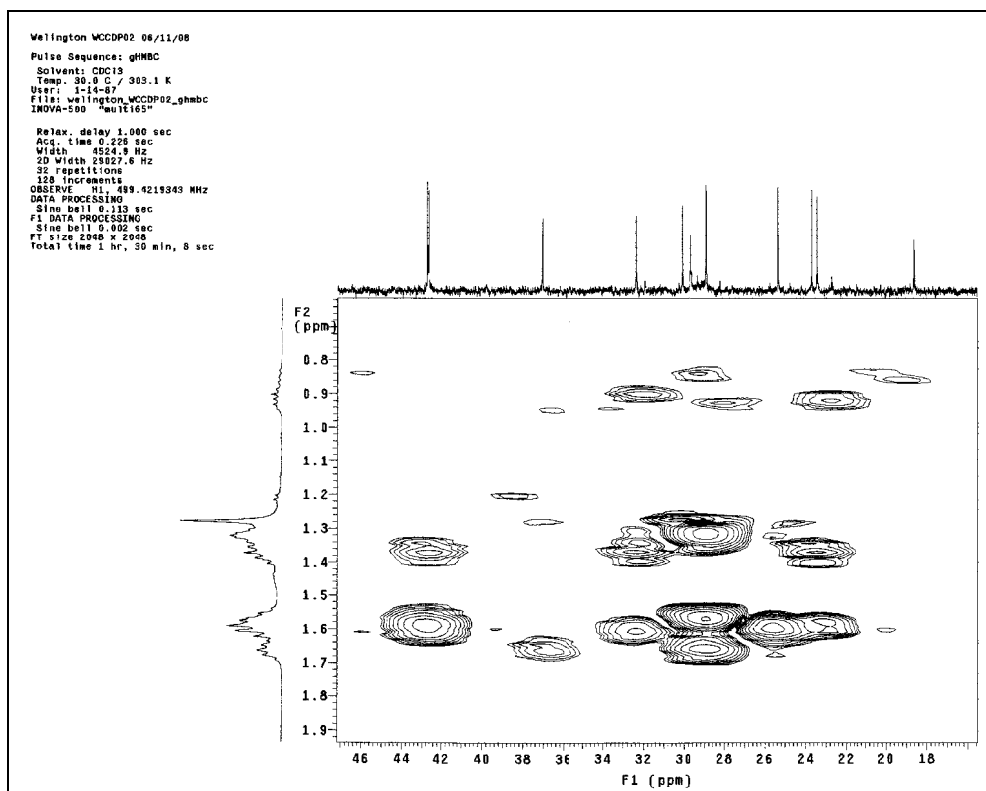
Espectro 120 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (500 MHz; CDCl₃).



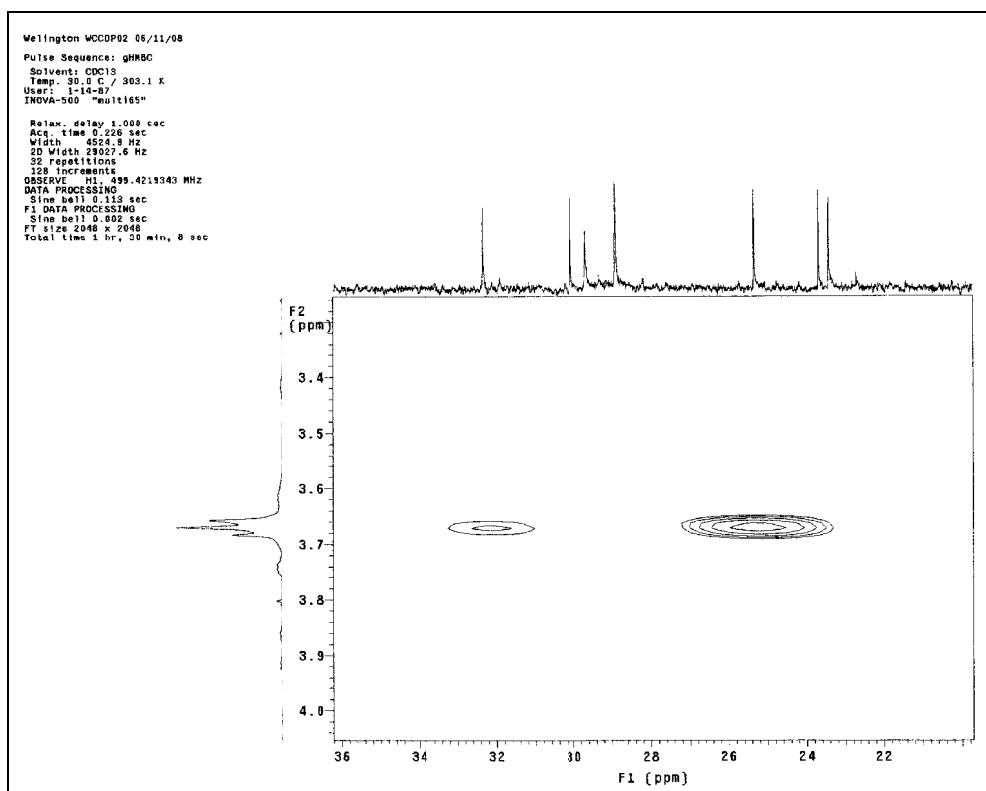
Espectro 121 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 18–32; 500 MHz; CDCl₃).



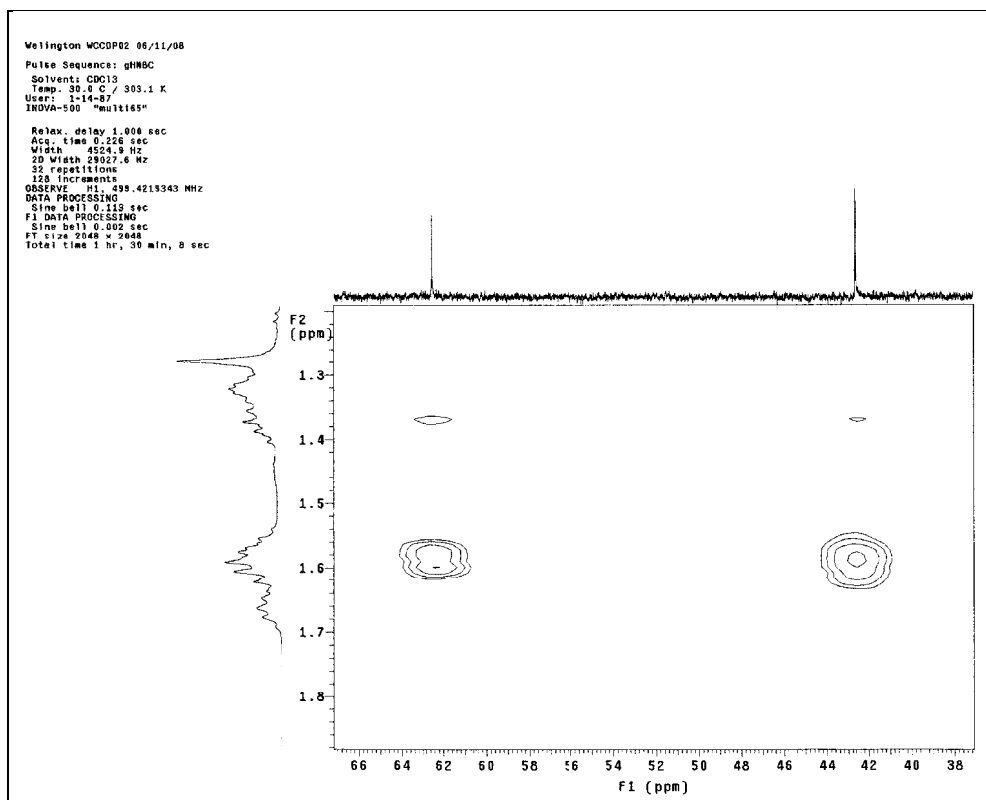
Espectro 122 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 23–33; 500 MHz; CDCl₃).



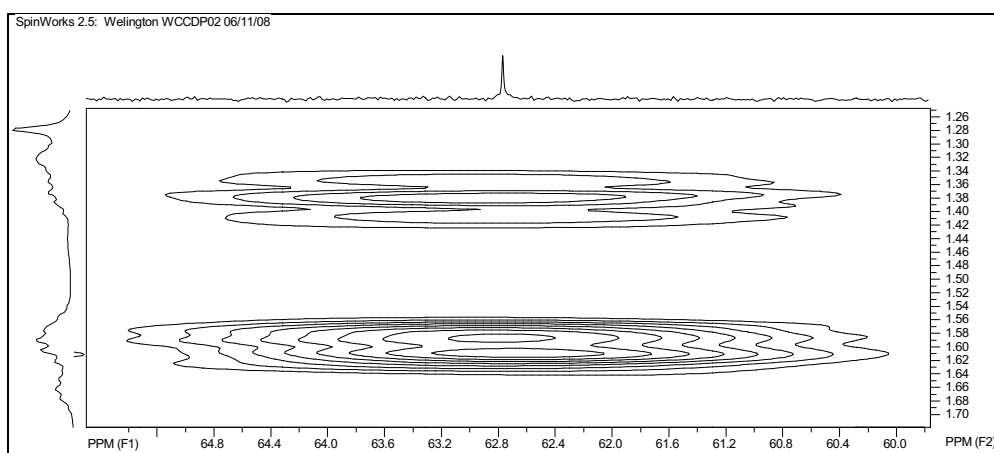
Espectro 123 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 18–46; 500 MHz; CDCl₃).



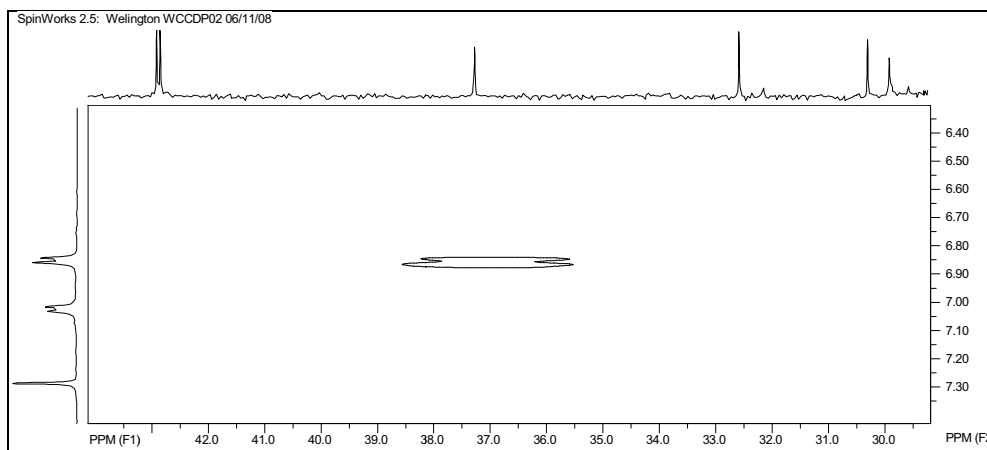
Espectro 124 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 22–36; 500 MHz; CDCl₃).



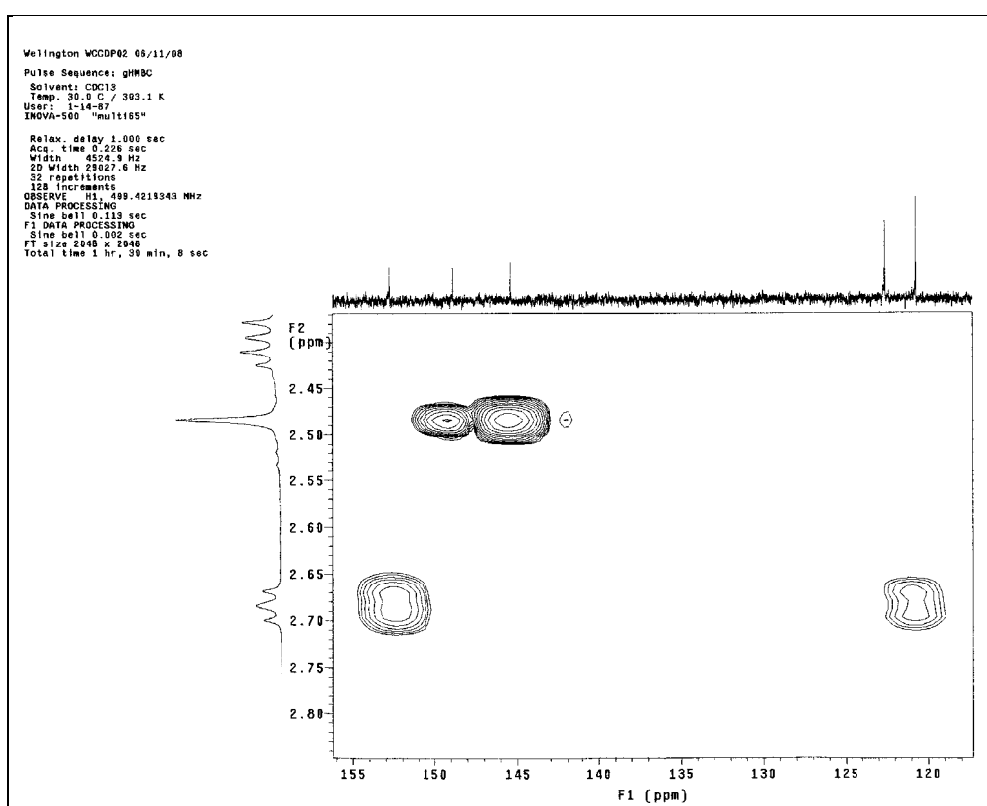
Espectro 125 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 38–66; 500 MHz; CDCl₃).



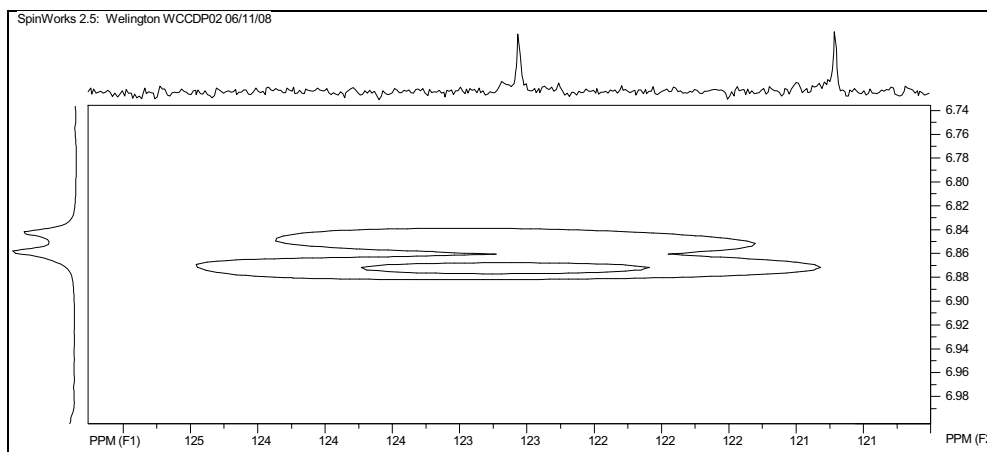
Espectro 126 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 60–64; 500 MHz; CDCl₃).



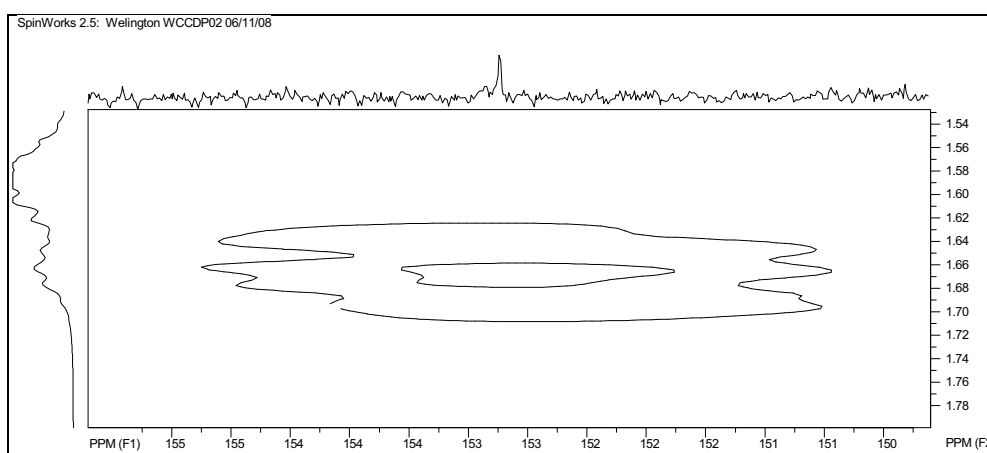
Espectro 127 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 30–42; 500 MHz; CDCl_3).



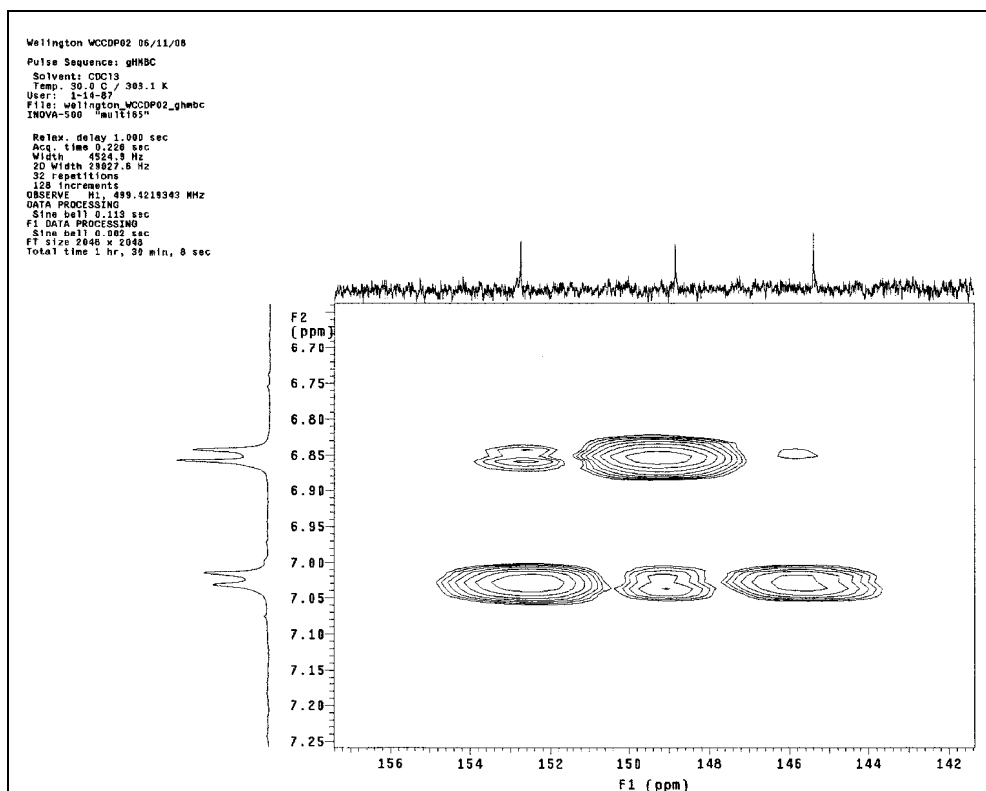
Espectro 128 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 120–155; 500 MHz; CDCl_3).



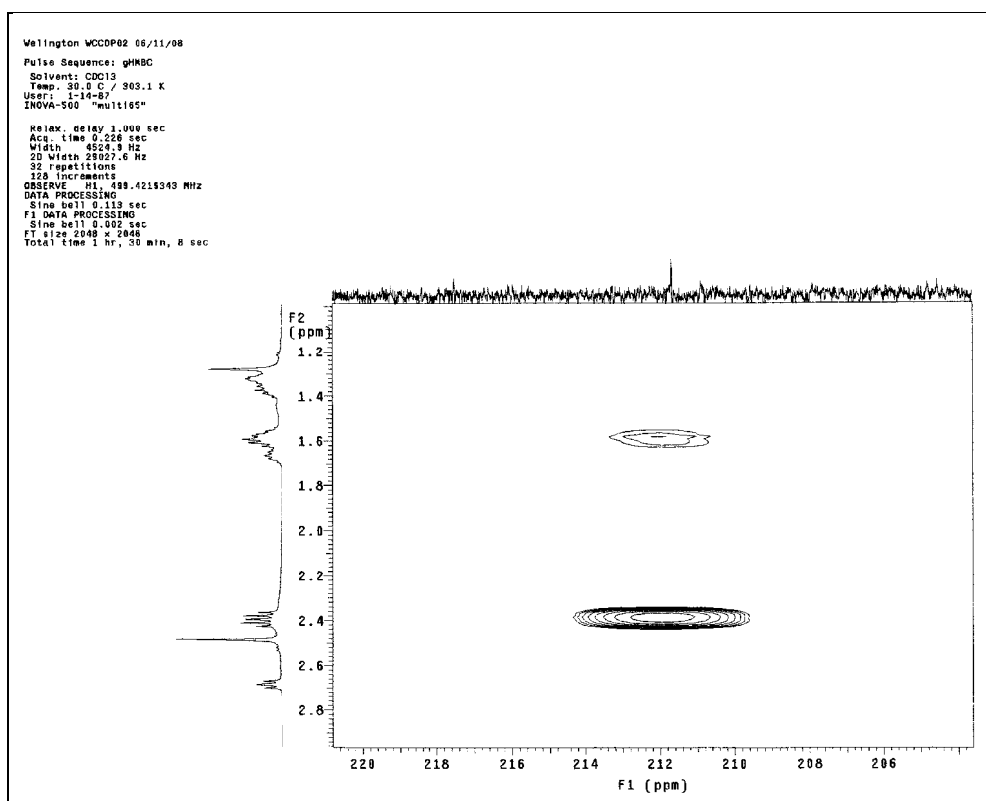
Espectro 129 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 121–125; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 130 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 150–155; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 131 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 142–156; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 132 - Mapa de contorno gHMBC de **69** (δ 206–220; 500 MHz; CDCl₃).

Tabela 9 - Dados de RMN de **69** em CDCl₃^a

C	δ_C^b	gHMQC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	145,4 s	–	H-4; H-7	–
3	148,8 s	–	H-4; H-5; H-7	–
4	122,6 d	7,02 d (8,0)	H-5	H-5
5	120,7 d	6,85 d (8,0)	H-1'	H-4
6	152,7 s	–	H-4; H-5; H-1'; H-2'	–
1'	37,0 t	2,68 t (7,5)	H-5; H-2'; H-3'	H-2'
2'	30,1 t	1,66 qt (7,5)	H-1'; H-3'; H-4'	H-1'
3'	29,7 t	1,28 m	H-1'; H-2'; H-4'; H-5'	no
4'	28,9 t	1,33 m	H-2'; H-3'; H-5'; H-6'	H-5'
5'	23,7 t	1,59 qt (7,5)	H-4'; H-6'	H-4'; H-6'
6'	42,6 t	2,38 t (7,5)	H-4'; H-5'	H-5'
7'	211,7 s	–	H-5'; H-6'; H-8'; H-9'	–
8'	42,7 t	2,41 t (7,5)	H-9'; H-10'	H-9'
9'	23,4 t	1,61 qt (7,5)	H-8'; H-10'; H-11'	H-8'; H-10'
10'	25,3 t	1,39 m	H-8'; H-9'; H-11'; H-12'	H-9'
11'	32,3 t	1,59 qt (6,5)	H-9'; H-10'; H-12'	H-12'
12'	62,5 q	3,67 t (6,5)	H-10'; H-11'	H-11'

^a Experimento de RMN ¹H e ¹³C realizado a 500 e 125 MHz, respectivamente.

^b Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

no = não observado

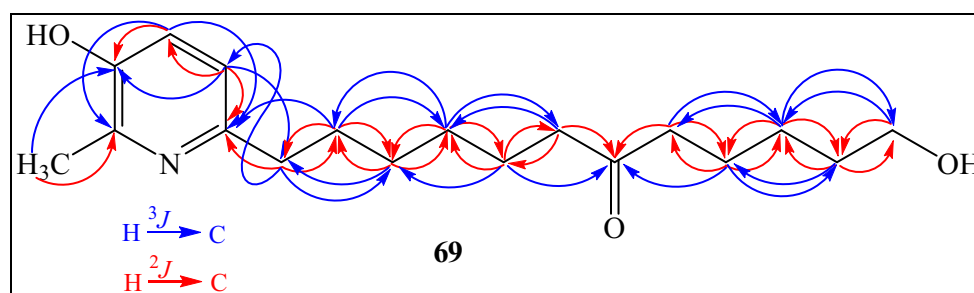
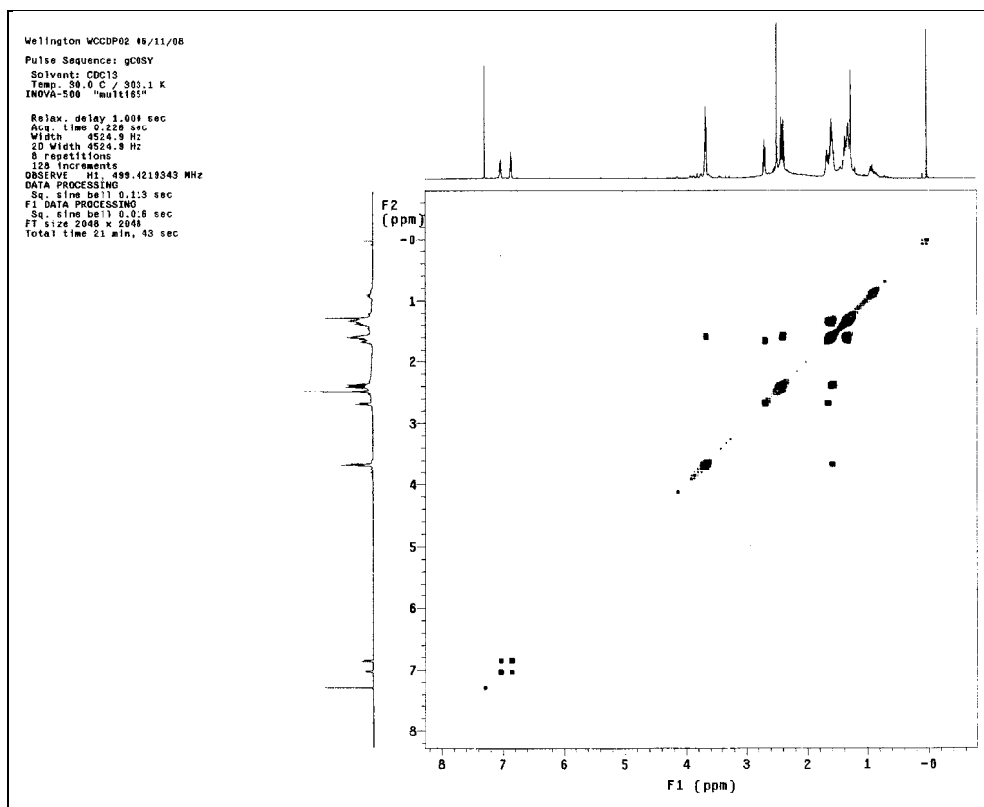
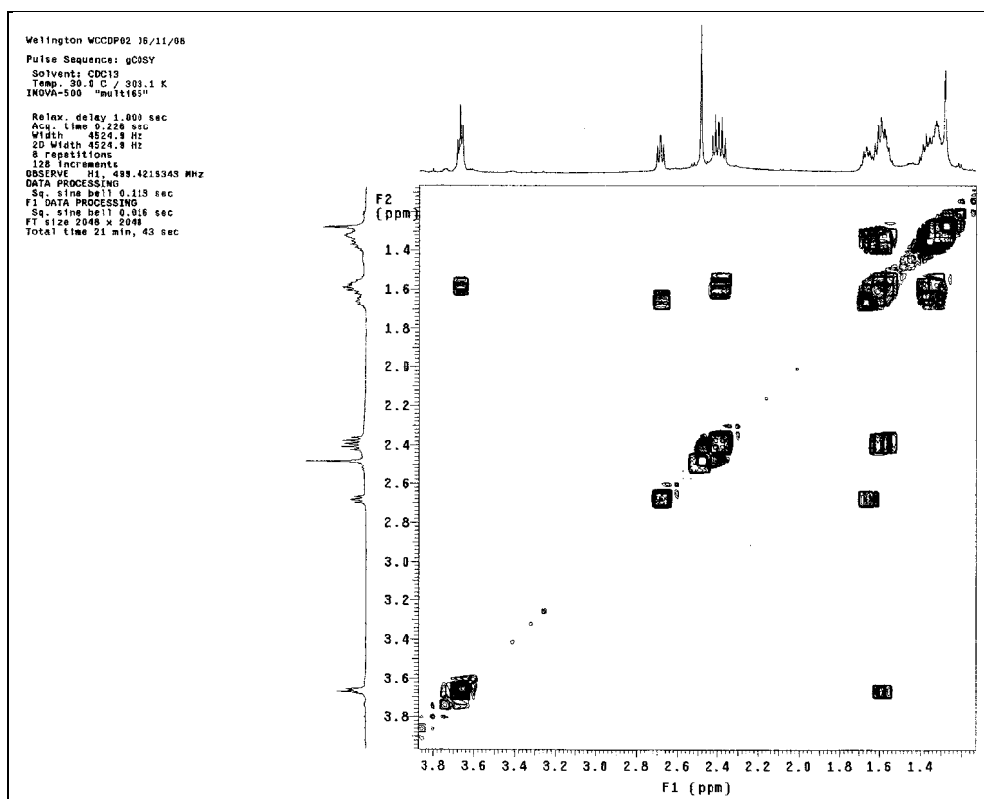


Figura 47 - Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **69**.

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, destacam-se as correlações entre H-1' e H-2', H-5' e H-6', H-8' e H-9', H-9' e H-10', H-11' e H-12' (Espectros 133 e 134; Tabela 9).

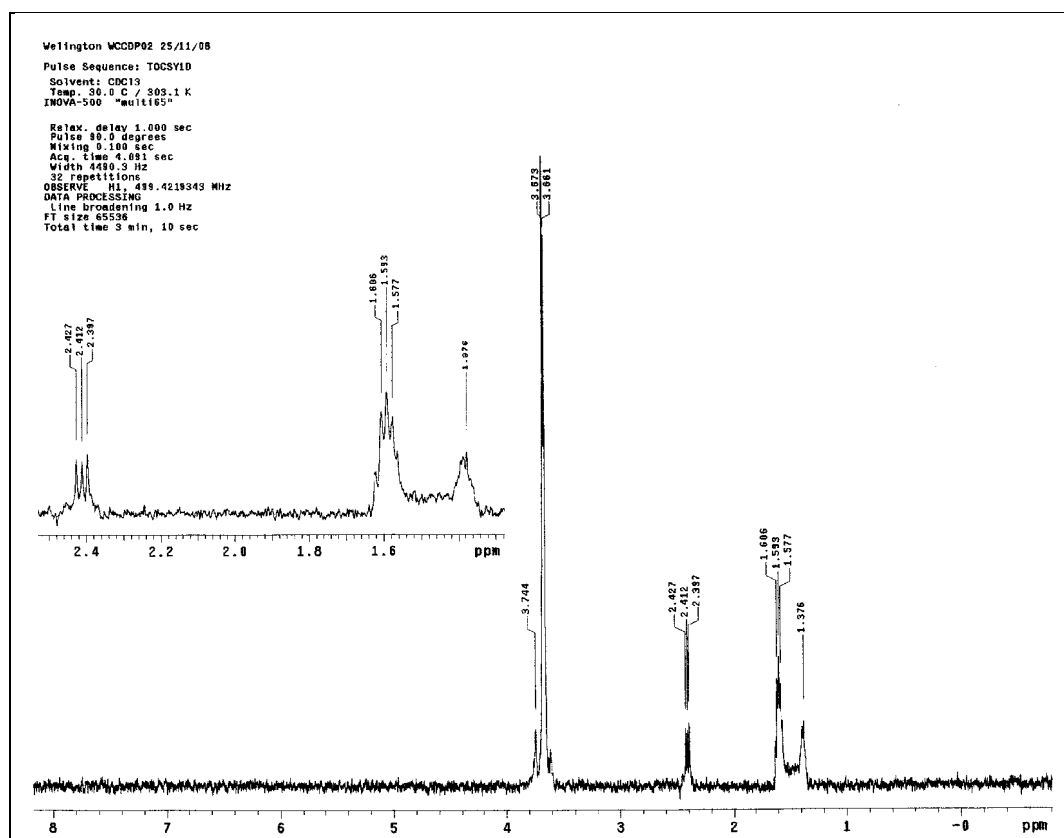


Espectro 133 - Mapa de contorno gCOSY de **69** (500 MHz; CDCl₃).

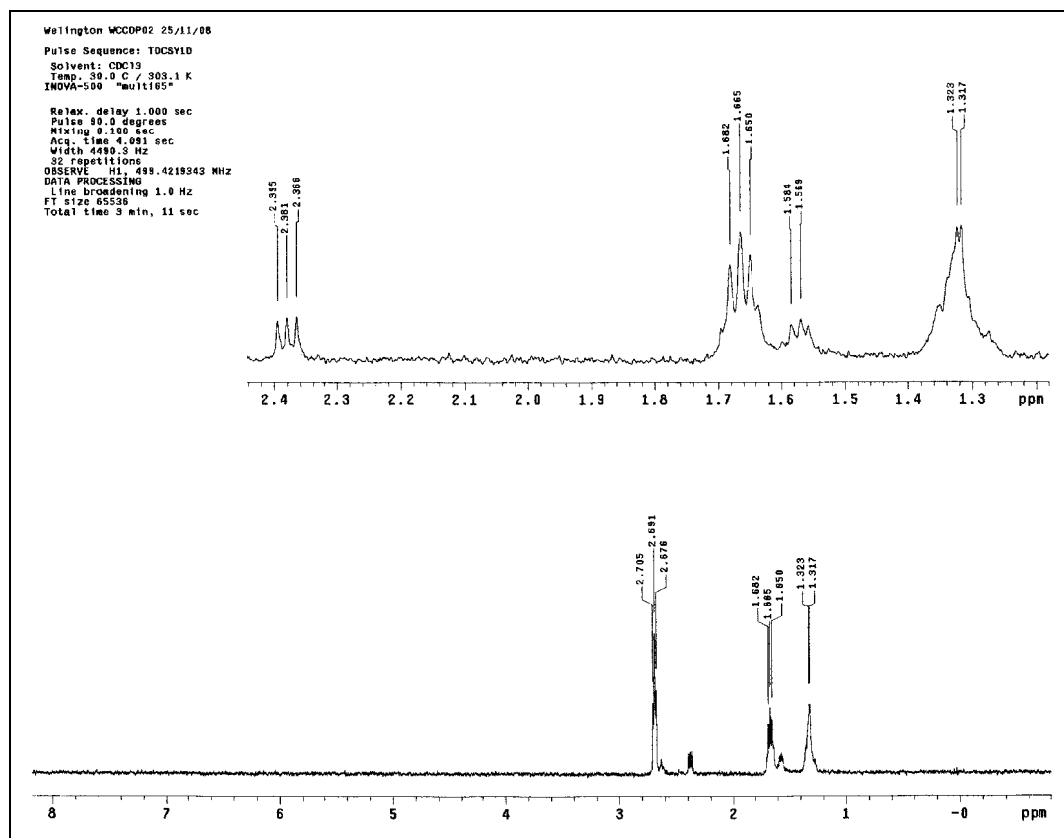


Espectro 134 - Mapa de contorno gCOSY de **69** (δ 1,4–3,8; 500 MHz; CDCl₃).

Através do experimento de RMN de TOCSY 1D, onde é observada a transferência de polarização entre os hidrogênios vicinais, foi irradiado δ 3,67 (H-12') e observada a transferência de polarização através de δ 1,59 (H-11'), 1,39 (H-10'), 1,61 (H-9') e 2,41 (H-8') (Espectro 135). Em seguida foi irradiado δ 2,68 (H-1') e observada a transferência de polarização através de δ 1,66 (H-2'), 1,28 (H-3'), 1,33 (H-4'), δ 1,59 (H-5') e δ 2,38 (H-6') (Espectro 136). Foi possível ainda observar com clareza a multiplicidade de alguns desses sinais.



Espectro 135 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de **69**, irradiando δ 3,67 (H-12'); 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 136 - Espectro de RMN de TOCSY 1D de **69**, irradiando δ 2,68 (H-1'; 500 MHz; CDCl_3).

4.5 Avaliação da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica foi avaliada pelo método de bioautografia em cromatoplaça de sílica, como descrito no item 3.8. Foram feitas as análises semi-quantitativas para os alcalóides **1**, **9**, **67** e **69** e observados os limites de detecção 0,30, 0,30, 0,75 e 0,18 μg , respectivamente (Figuras 48 e 49). Foram utilizadas como padrão de comparação a galantamina (1 μg) ou fisostigmina (0,05 μg).

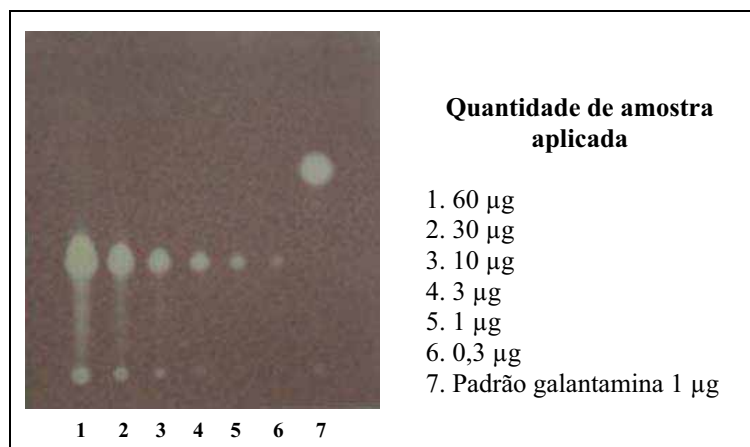


Figura 48 - Ensaio por bioautografia de **1** (FE: sílica, FM: CHCl₃:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25), avaliação do limite de detecção.

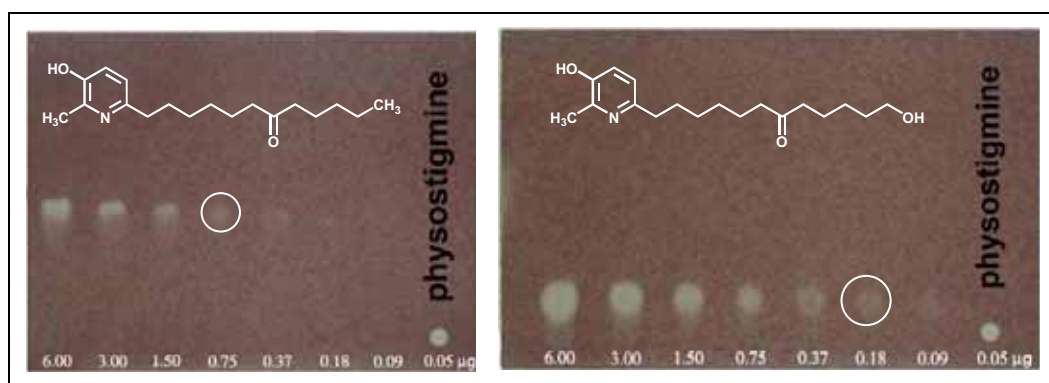


Figura 49 - Ensaio por bioautografia de **67** e **69** (FE: sílica, FM: *n*-hexano:CH₂Cl₂:AcOEt (1,5:2,0:6,5), avaliação do limite de detecção.

4.6 Otimização das condições cromatográficas em CLAE com detector *light scattering*

Para a otimização das condições cromatográficas foi utilizado um padrão do alcalóide **1** (PDC02 F₂₉₋₃₀), na concentração de 1 mg/mL (Figura 50). As análises foram feitas em gradiente de 25 minutos, sendo a primeira um gradiente exploratório partindo de 5% de metanol e 95% de água dopada com ácido acético 0,1% (v/v), até 100% de MeOH, mantido esse sistema de solvente por cinco minutos, para limpeza da coluna e em seguida, durante cinco minutos, voltava-se a condição inicial do solvente para nova análise, totalizando 35 minutos de análise. O volume injetado inicialmente foi 20 µL e o detector de *light scattering*, uma vez que o alcalóide não apresenta cromóforo (Figuras 57, 60 e 66). Foram avaliadas duas colunas: Phenomenex Gemini e Phenomenex Monolítica, sendo que a coluna Phenomenex Monolítica apresentou alta

retenção do alcalóide, mesmo utilizando modificador ácido. Segundo Faria et al. (2006), esse tipo de coluna tem sido bastante utilizada para análises rápidas, permitindo fluxos acima de $5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, no entanto tem um caráter ácido maior, causando assim maior retenção de substâncias básicas. As demais análises foram realizadas com a coluna Phenomenex Gemini, que apresentou melhores resultados para os alcalóides.

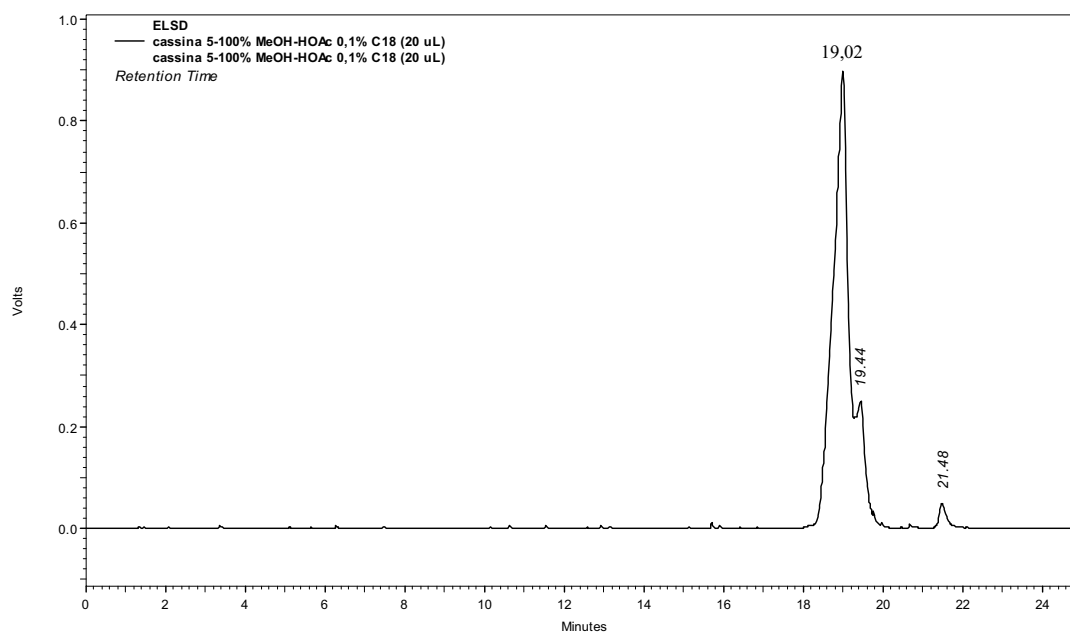


Figura 50 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 μL , fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

A primeira análise apresentou alargamento do pico cromatográfico, indicando que a amostra estava muito concentrada, além da co-eluição de uma outra substância. Foram avaliados volumes menores de injeção: 10, 5 e 3 μL (Figuras 51, 52 e 53).

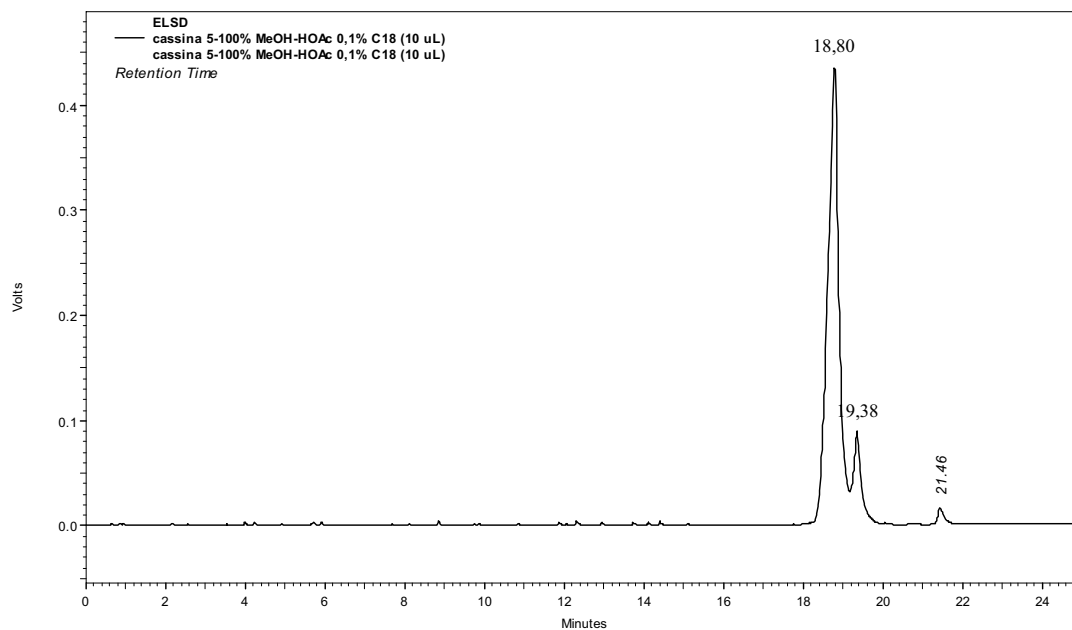


Figura 51 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

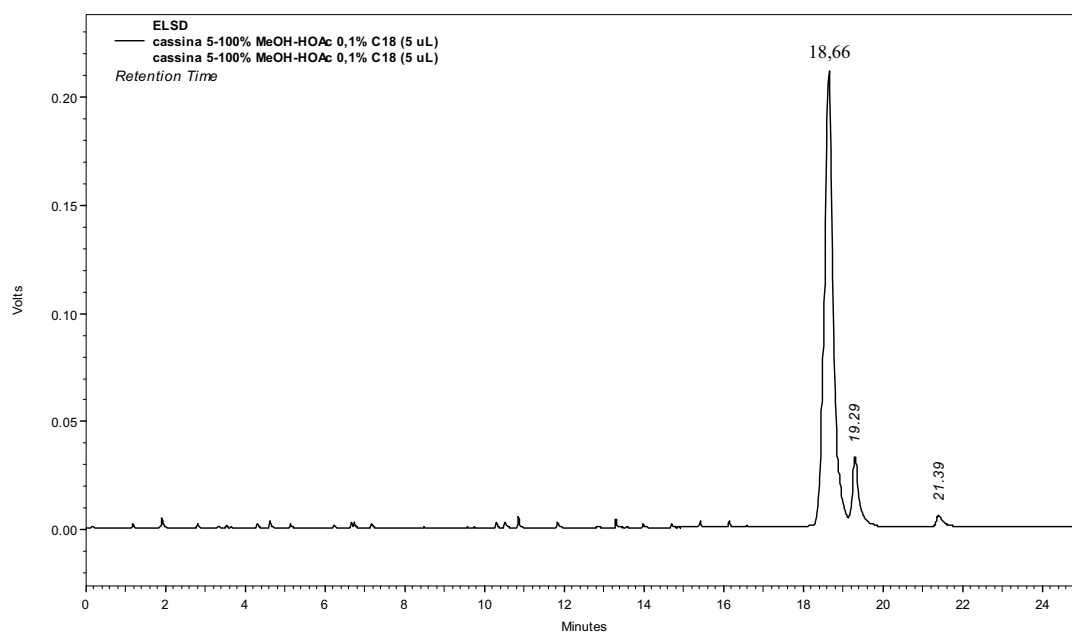


Figura 52 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 5 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

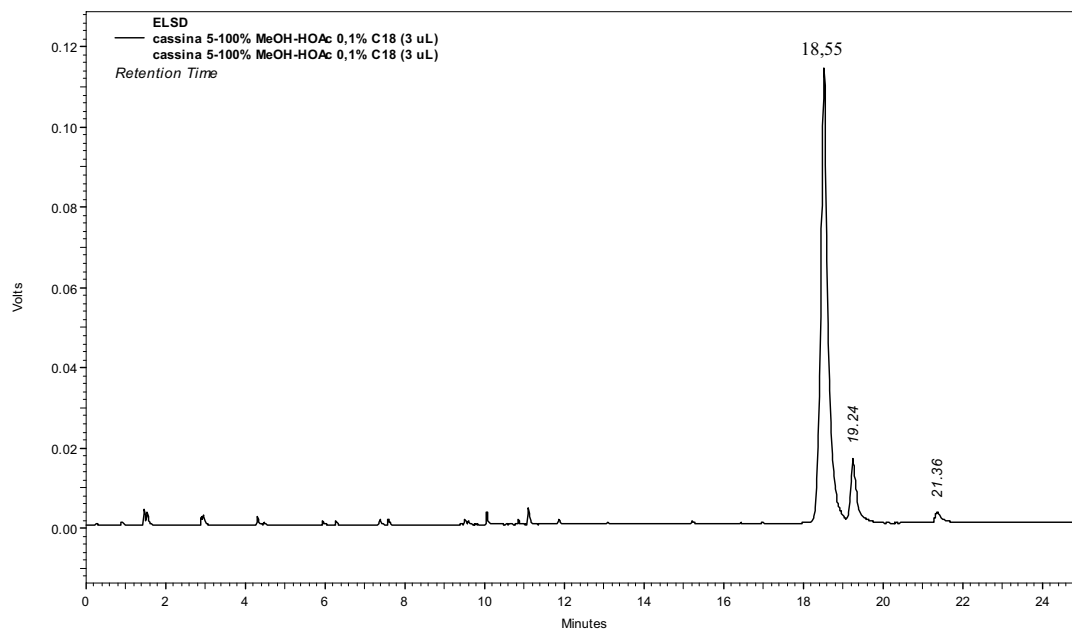


Figura 53 - Cromatograma de 1; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 3 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

Diminuindo o volume de injeção houve melhora na resolução, no entanto volumes muito pequenos causam muitos erros de reprodutibilidade, assim a amostra foi diluída (0,5 mg/mL) e os volumes injetados foram 5 e 10 μ L (Figuras 54 e 55).

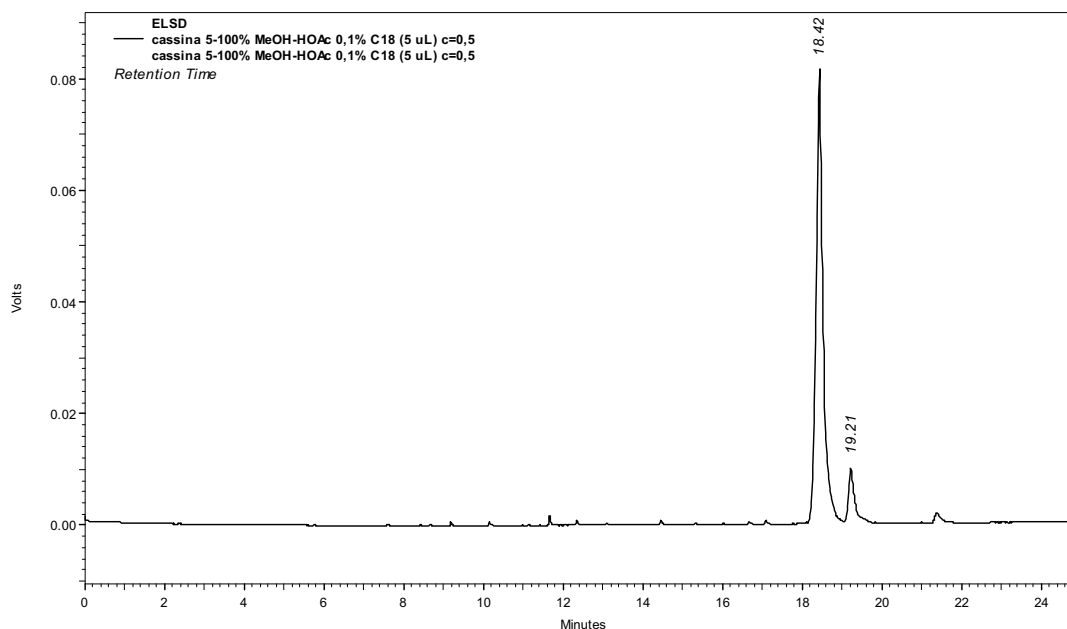


Figura 54 - Cromatograma de 1; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 5 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

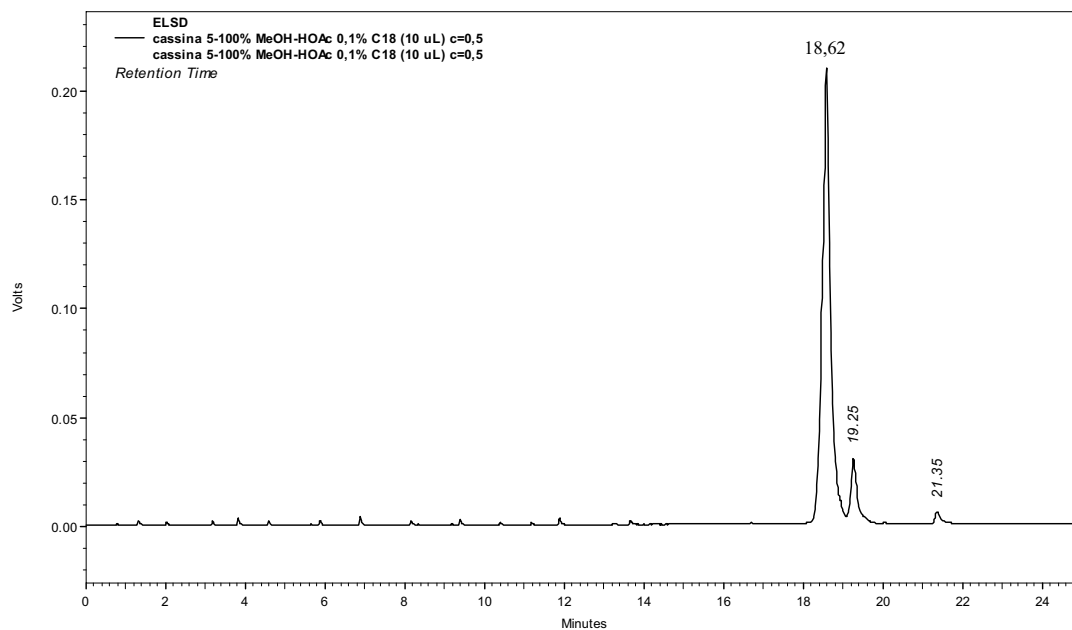


Figura 55 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

Na tentativa de diminuir o tempo de retenção e melhorar a resolução dos cromatogramas foi variada a concentração inicial de metanol para: 10, 20, 30, 35 e 40%, sendo o volume de amostra injetada 10 μ L (Figuras 56–62).

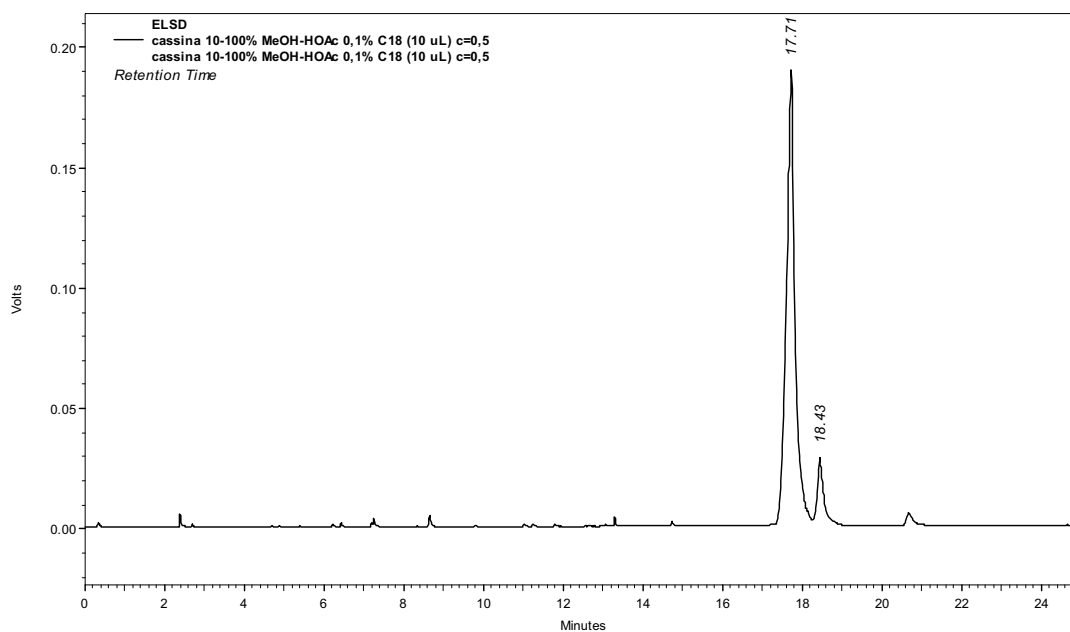


Figura 56 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 10–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

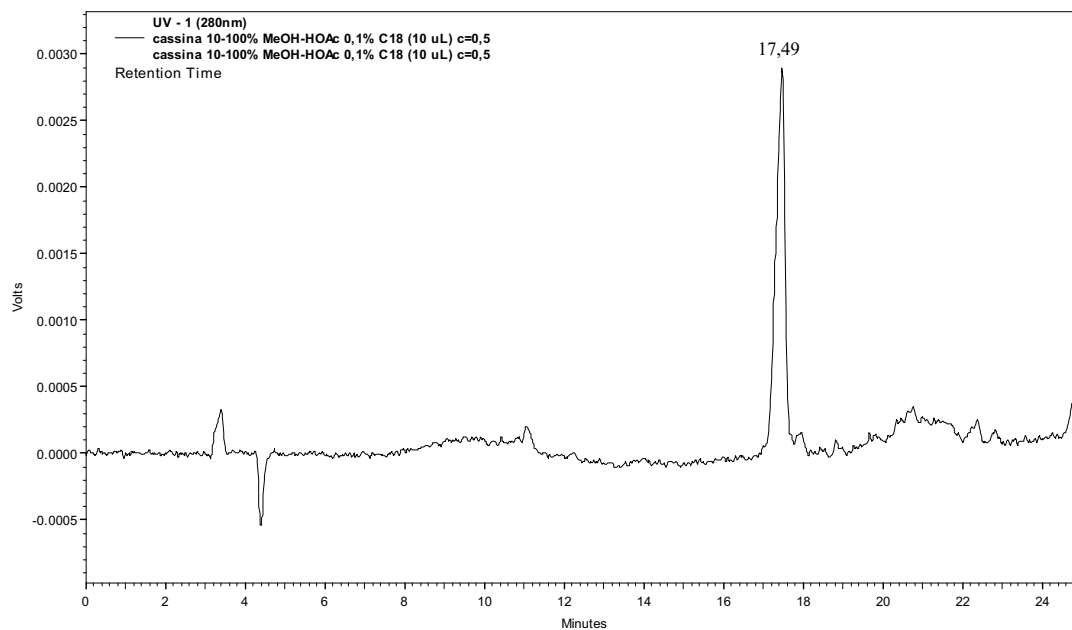


Figura 57 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 10–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: UV 280 nm.

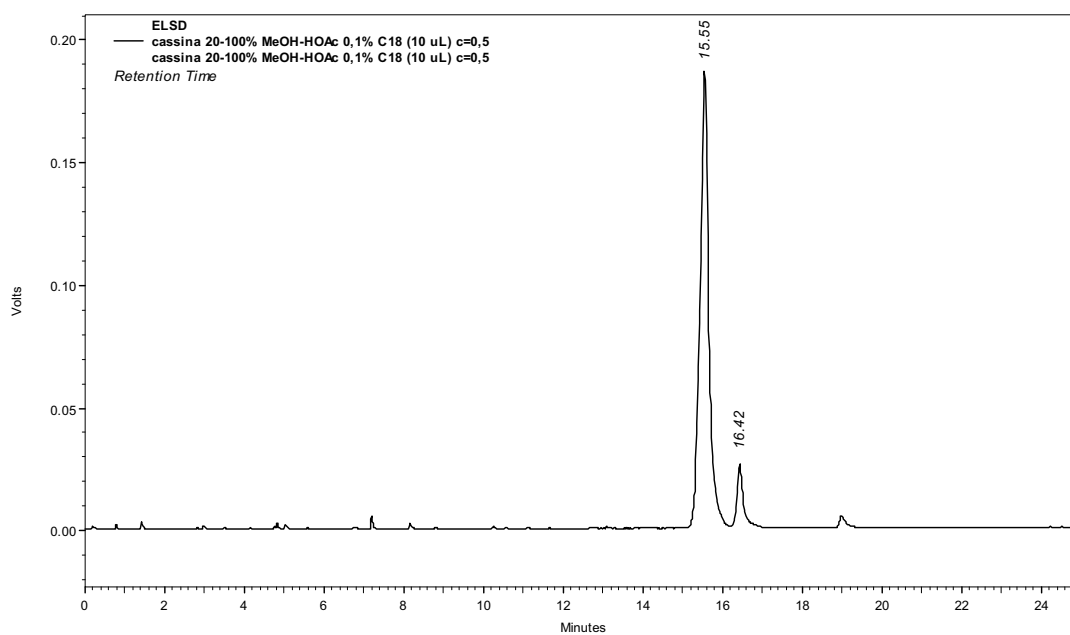


Figura 58 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 20–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

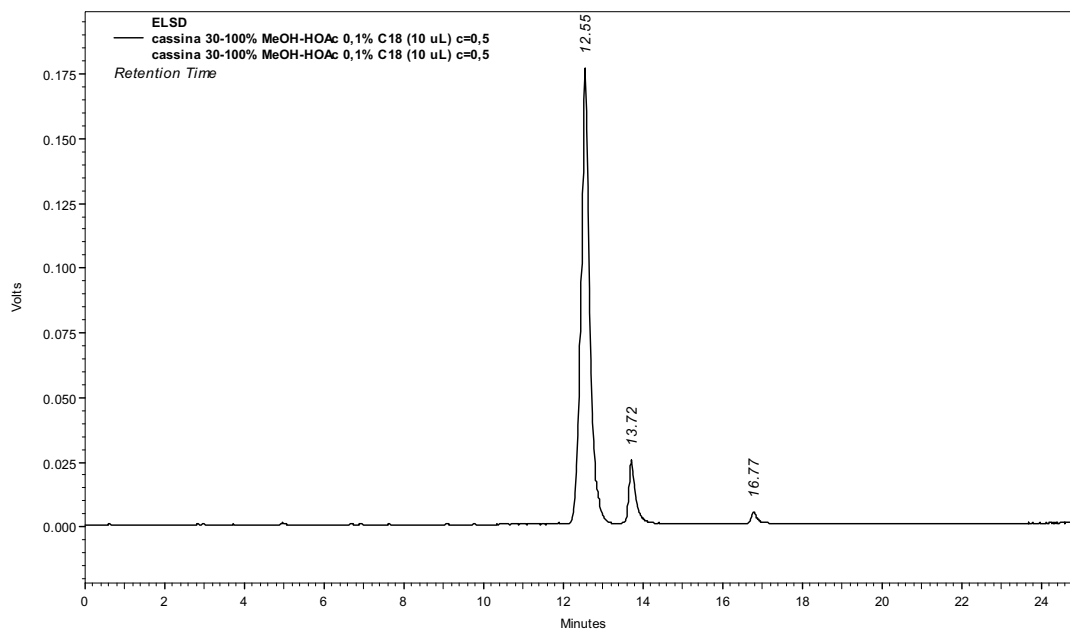


Figura 59 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 30–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

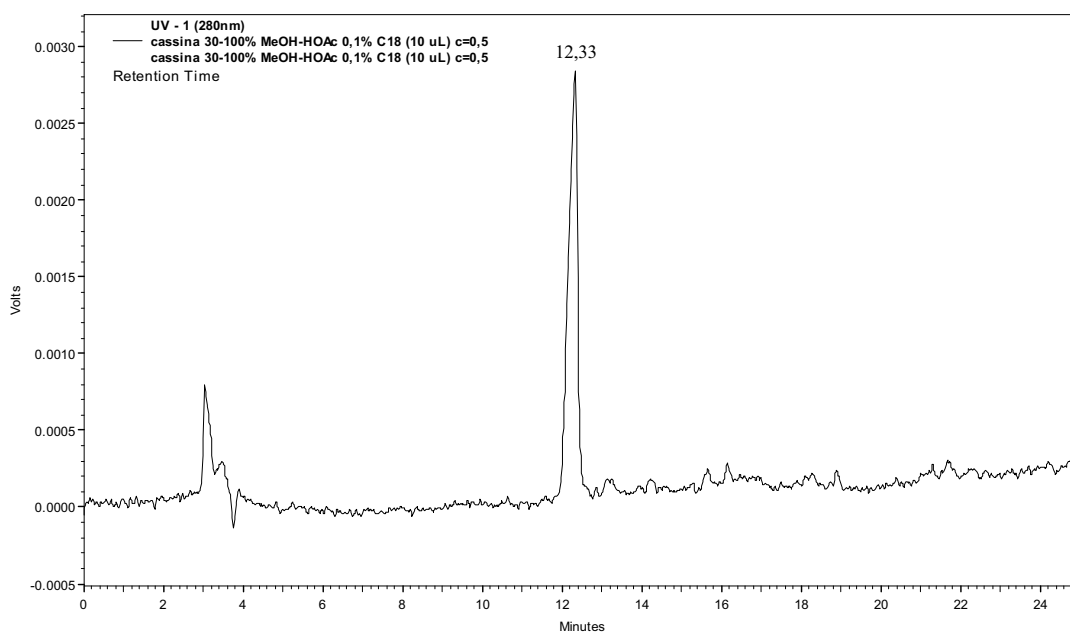


Figura 60 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 30–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: UV 280 nm.

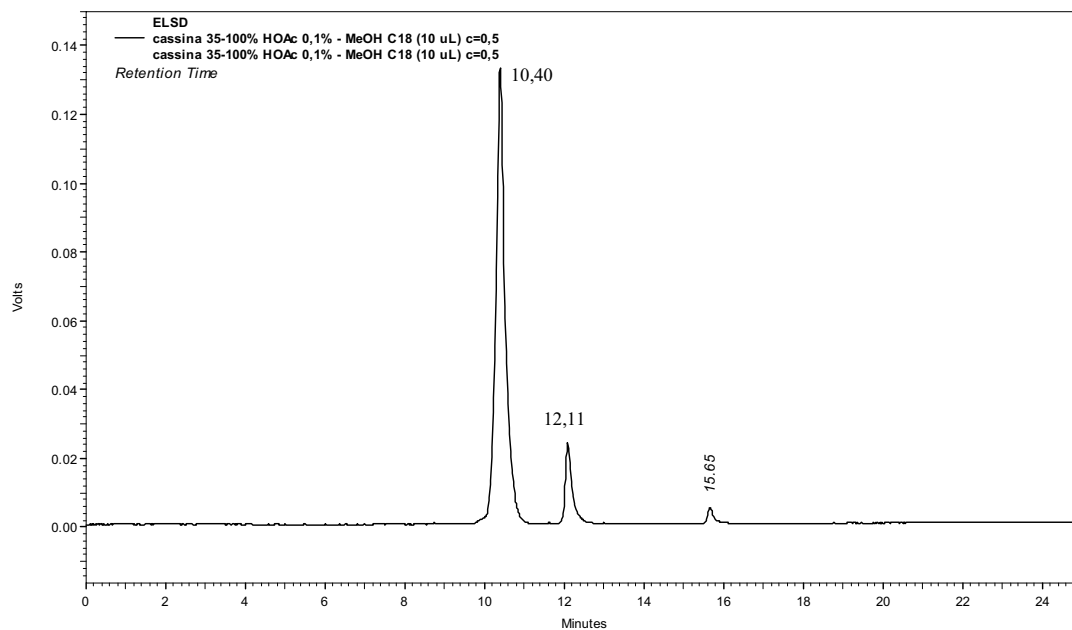


Figura 61 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

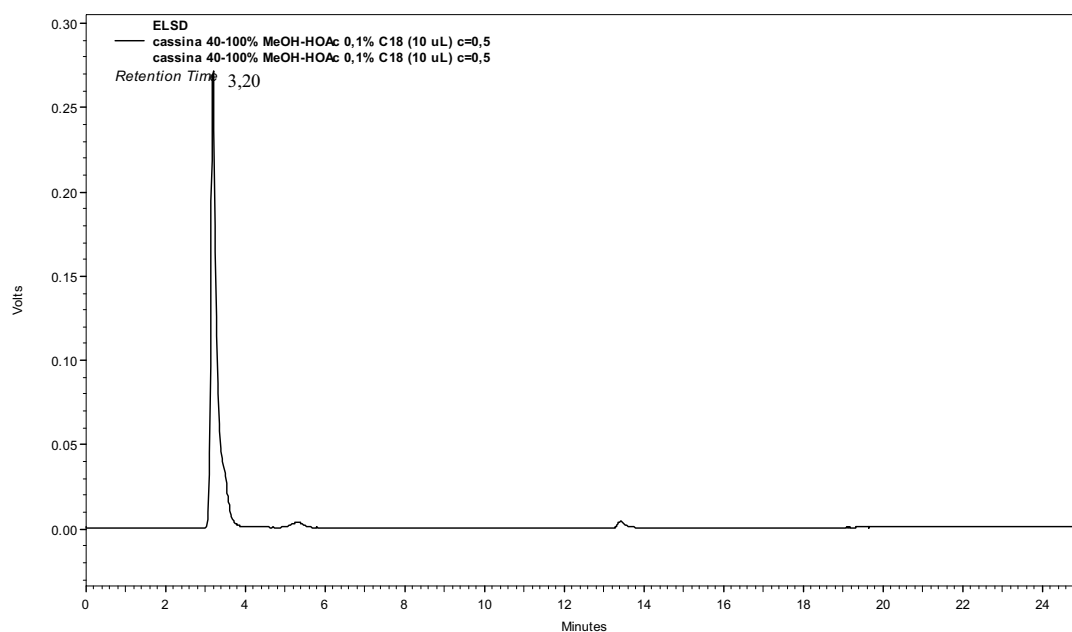


Figura 62 - Cromatograma de **1**; gradiente (25 min.), 40–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,5 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

Observou-se que a melhor condição foi o gradiente 35 a 100% MeOH-H₂O, sendo a água dopada com ácido acético (0,1%). Com o aumentando da força de eluição inicial as substâncias eluíam no volume morto (Figura 62). Para analisar o comportamento cromatográfico do alcalóide **1** numa matriz mais complexa, preparamos uma mistura de **1** com o derivado **20** (3-*O*-feruloil-cassina), isolado em estudos

anteriores (PIVATTO et al., 2005). Inicialmente **20** foi analisada na condição otimizada (35–100% MeOH–HOAc 0,1%), sendo monitorado pelos detectores *light scattering* e UV 280 nm, uma vez que **20** apresenta cromóforo (Figura 63 e 64). Em seguida foi analisada uma solução contendo **1** e **20** (C = 0,25 mg/mL para cada alcalóide). Foi possível observar boa resolução na separação dos alcalóides (Figura 65), sendo que no cromatograma com detecção por UV só foi possível observar o alcalóide **20** (Figura 66).

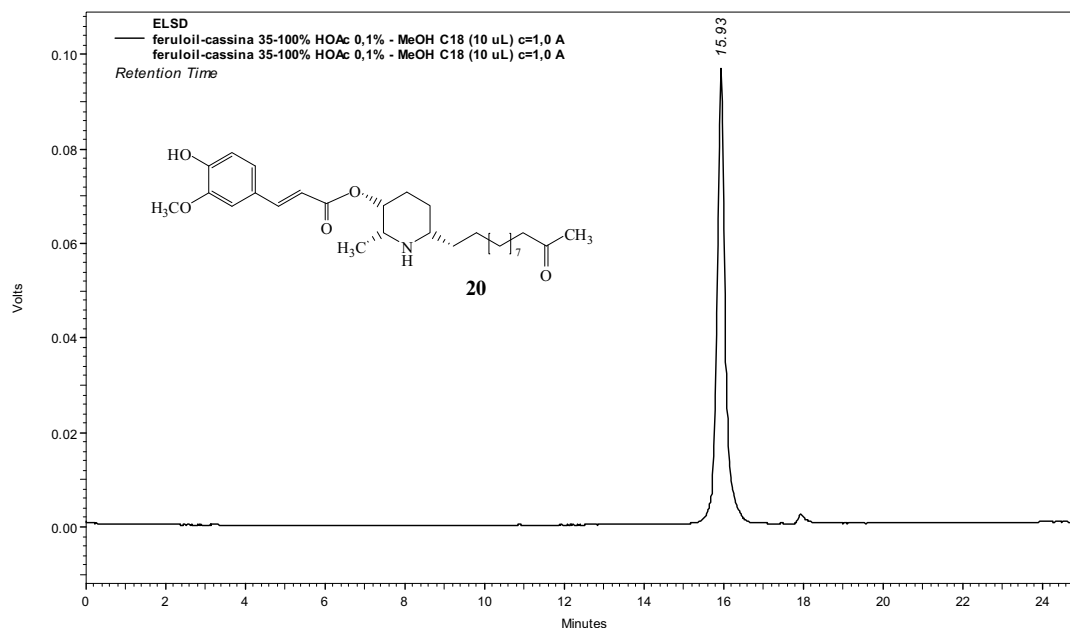


Figura 63 - Cromatograma de **20**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

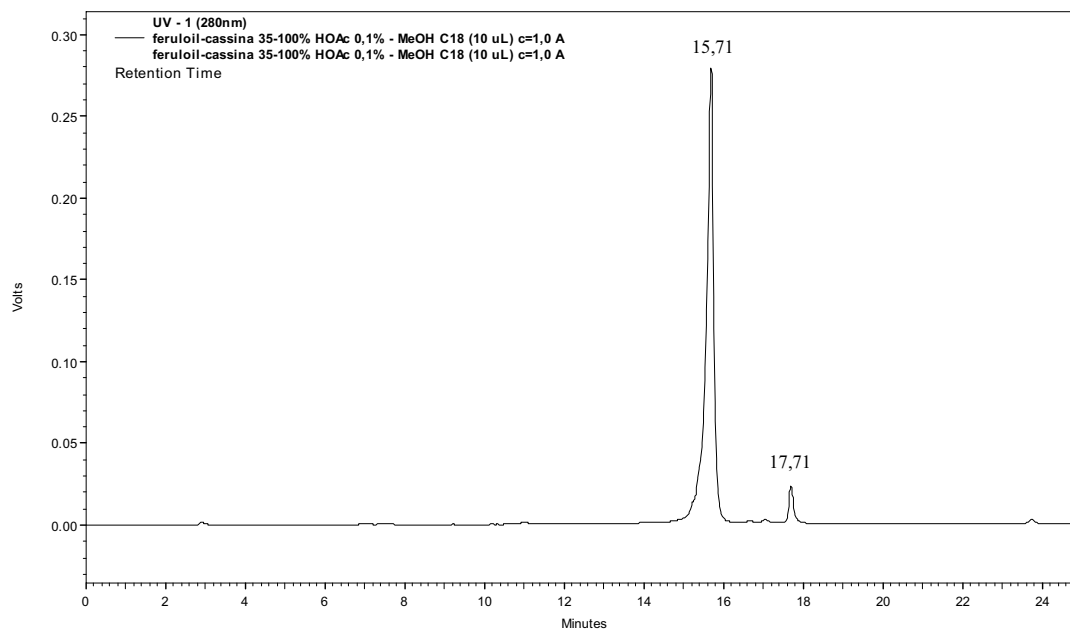


Figura 64 - Cromatograma de **20**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: UV 280 nm.

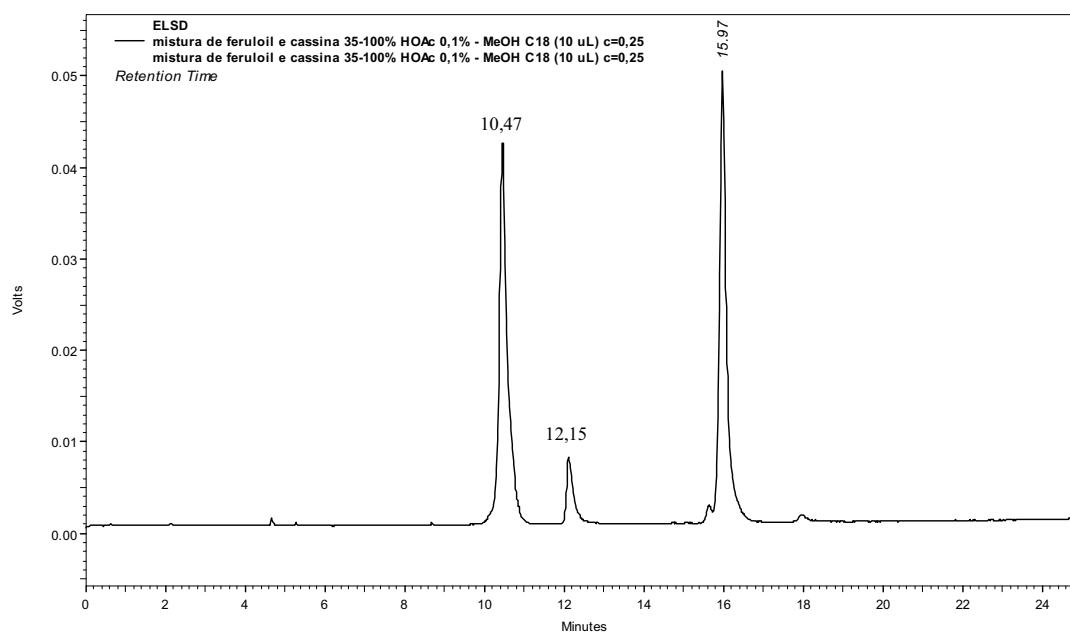


Figura 65 - Cromatograma da mistura **1** e **20**; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,25 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

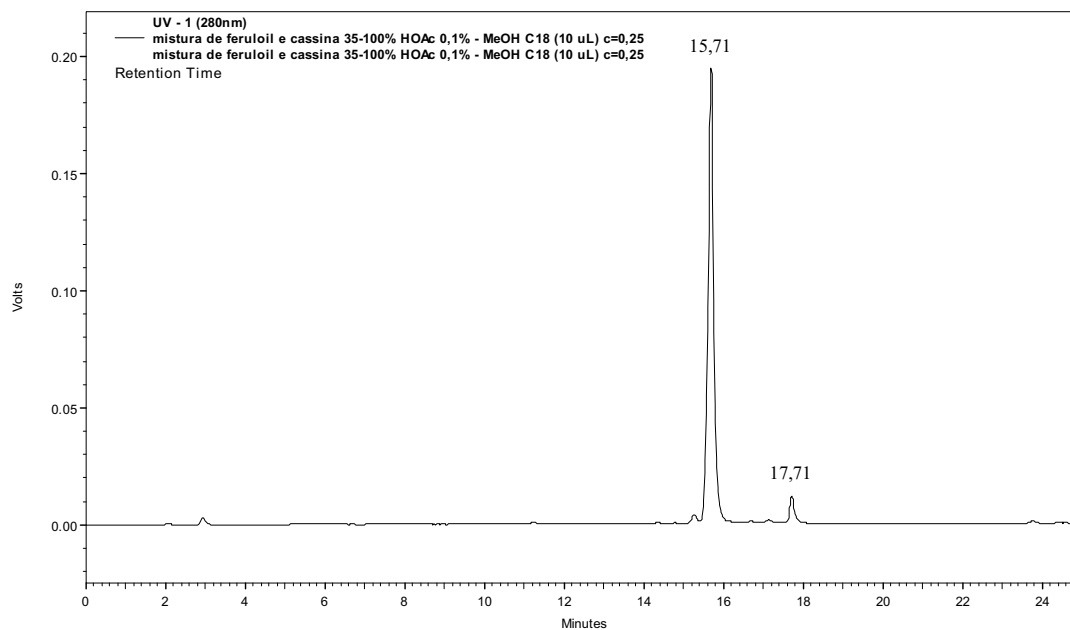


Figura 66 - Cromatograma da mistura **1** e **20**; gradiente (25 min.), 35–100% MeOH–HOAc 0,1%, C = 0,25 mg/mL, vol. inj. 10 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: UV 280 nm.

Por fim foi avaliada a fração CH_2Cl_2 da partição do extrato etanólico dos frutos de *S. spectabilis* (SSFr– CH_2Cl_2), matriz mais complexa estudada anteriormente para avaliação da eficiência da metodologia cromatográfica (Figura 67). Foi feita ainda uma análise com adição de padrão (**1**) para confirmar a banda cromatográfica referente a **1**. Foi preparada uma solução contendo 100 μ L de **1** (0,5 mg/mL) com 500 μ L de SSFr– CH_2Cl_2 (1 mg/mL), sendo 20 μ L injetados para observar o aumento do pico referente a **1** (t_r = 11,24 min.; Figura 68).

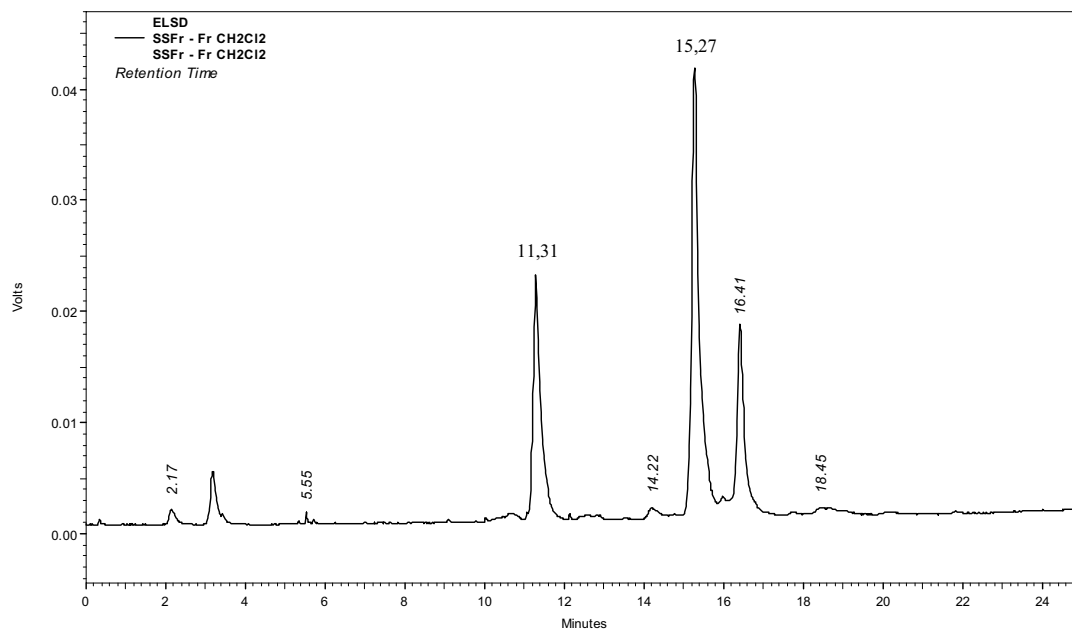


Figura 67 - Cromatograma da SSFr-CH₂Cl₂; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 μL, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

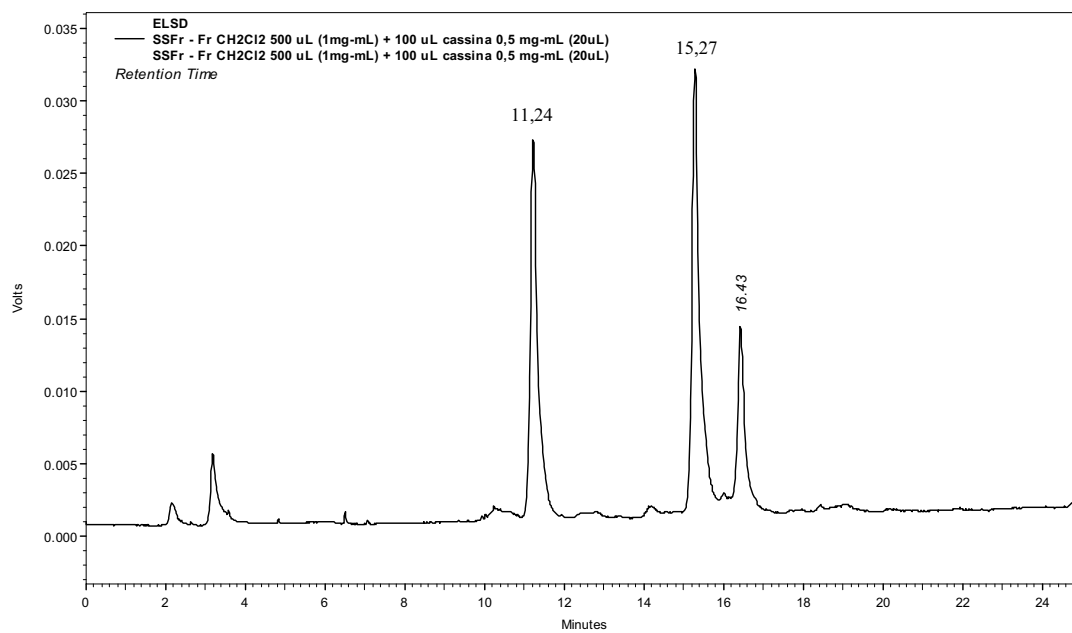


Figura 68 - Cromatograma da SSFr-CH₂Cl₂, adição de **1** como padrão interno; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 1 mg/mL, vol. inj. 20 μL, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

4.7 Experimentos *in vivo* e *in vitro* com L-lisina-[U-¹⁴C] e acetato de sódio-1-[¹³C] ou CD₃¹³CO₂Na

Levando em consideração os poucos estudos existentes na literatura sobre a biossíntese dos alcalóides 3-piperidínicos-2,6-dissubstituídos, fizemos duas propostas de biogênese para esses metabólitos que foram avaliadas nos experimentos *in vivo* e *in vitro* (Figura 69).

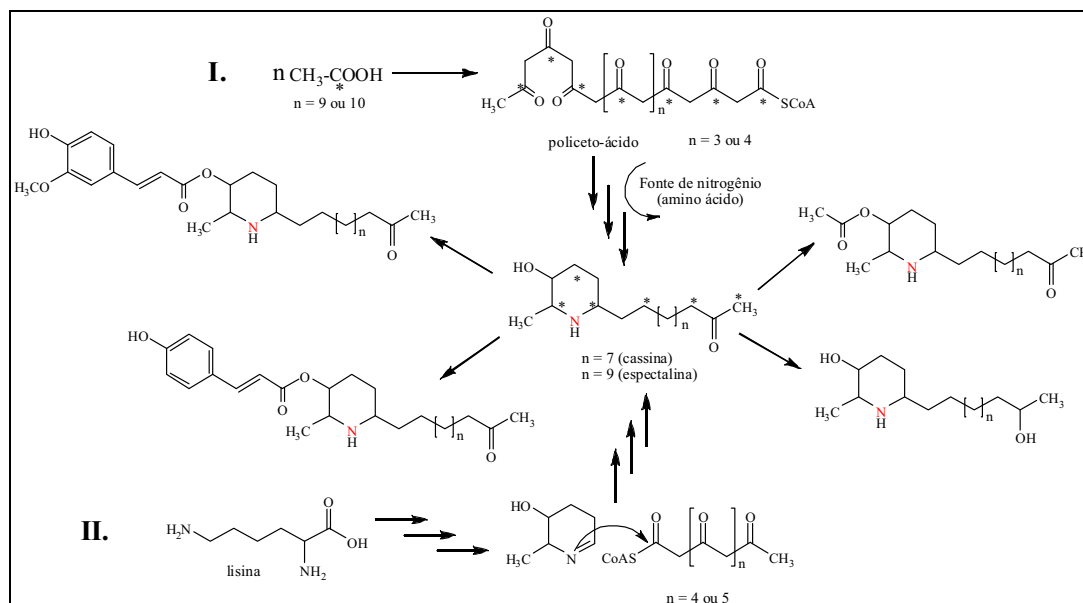


Figura 69 - Biogênese para os alcalóides piperidínicos.

4.7.1 Experimento *in vivo* (flores) de L-lisina-[U-¹⁴C]

Para verificação da conversão de L-lisina nos alcalóides piperidínicos, foram realizados experimentos com L-lisina-[U-¹⁴C], na concentração de 0,5 μCi/mL em solução aquosa contendo 2% de etanol.

Os pedúnculos com flores foram excisados e mergulhados em 100 μL de uma solução 0,5 μCi de lisina-[U-¹⁴C] (Figura 70), sendo ensaiados 10 pedúnculos para cada tempo de incubação. Quando toda a solução foi absorvida pelos pedúnculos, foram adicionados mais 100 μL de água e iniciou-se a contagem de tempo. Após a absorção dos 100 μL de água, os pedúnculos foram transferidos para erlenmeyers contendo água destilada, onde permaneceram por 24, 48 e 72 horas de incubação.

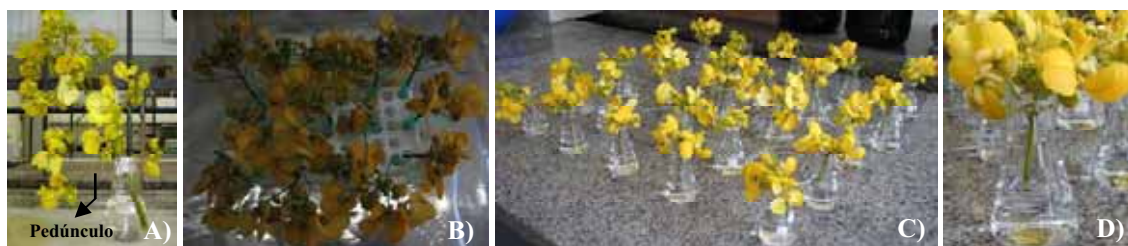


Figura 70 - Experimento de incorporação de radioisótopos nas flores de *S. spectabilis*: (A) cacho com flores; (B) incorporação; (C e D) incubação.

Após o tempo de incubação, as flores foram retiradas da água, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Foi adicionado 50 mL de CHCl_3 ao material triturado e sonicado em ultra-som por 30 minutos. Em seguida a fração clorofórmica foi recuperada e o solvente evaporado em capela. Este procedimento foi repetido duas vezes. O extrato obtido foi solubilizado em metanol e analisado por CLAE (Figuras 71, 72 e 73). Foram coletadas frações de 1 mL (25 minutos), adicionados 4 mL de solução cintilante e em seguida feita a contagem da radioatividade (2 minutos) para verificação da incorporação (Figura 74).

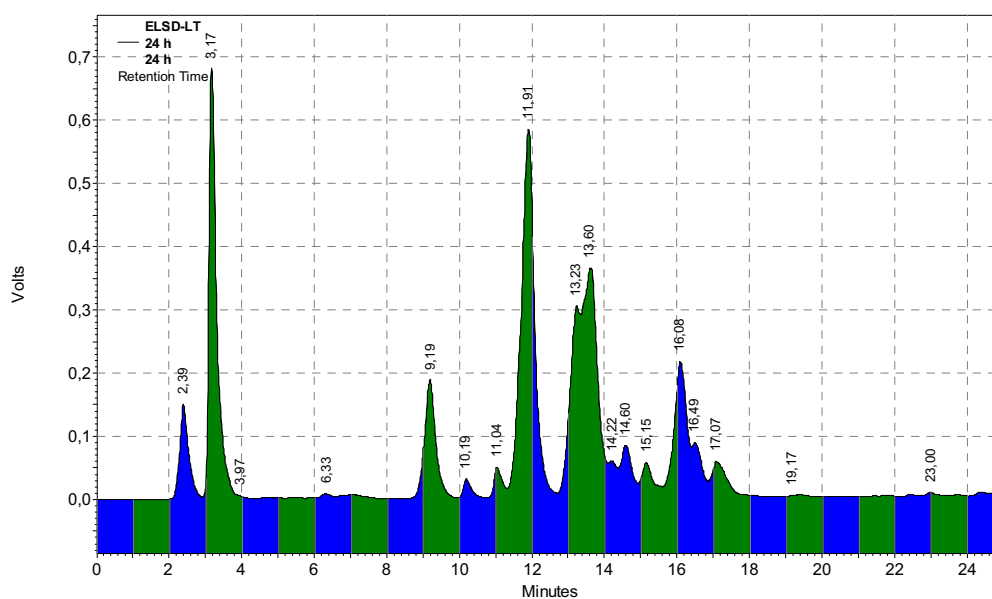


Figura 71 - Cromatograma do experimento depois de 24 h; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 100 mg/mL, vol. inj. 50 μL , fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

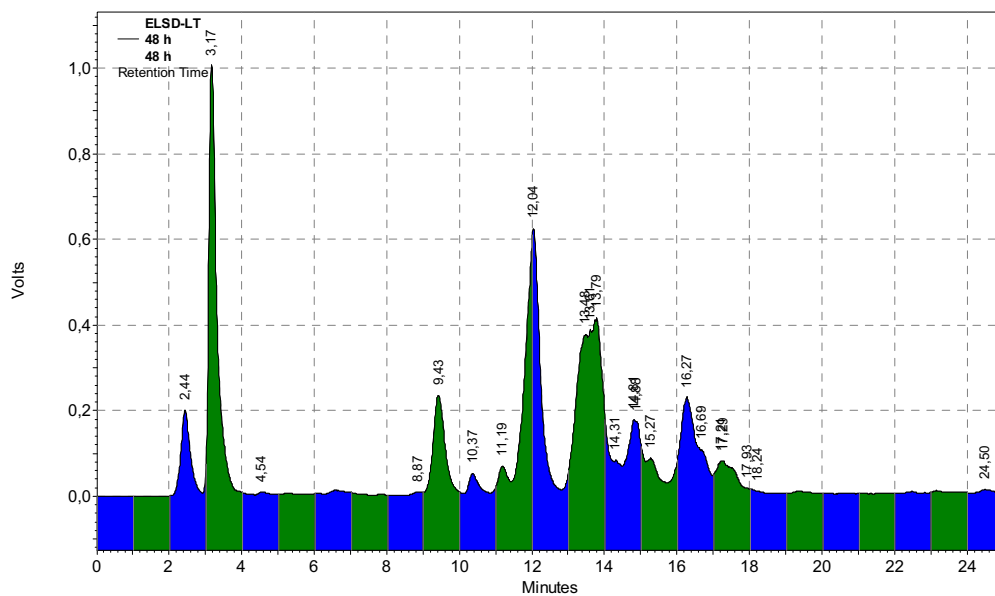


Figura 72 - Cromatograma do experimento depois de 48 h; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 100 mg/mL, vol. inj. 50 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

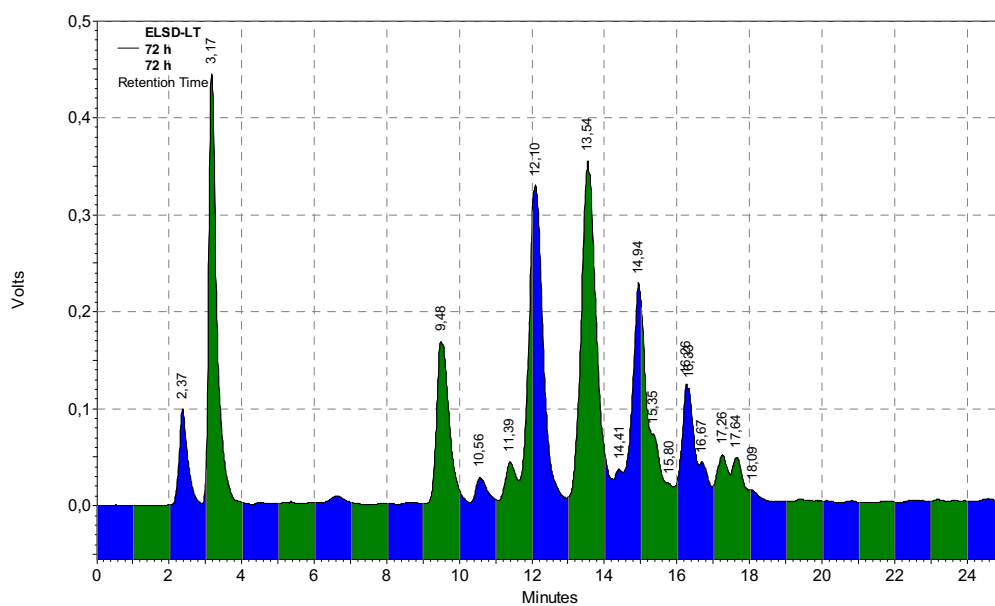


Figura 73 - Cromatograma do experimento depois de 72 h; gradiente (25 min.), 35–100% de MeOH–HOAc 0,1%, C = 100 mg/mL, vol. inj. 50 μ L, fluxo: 1 mL/min. e detector: *light scattering*.

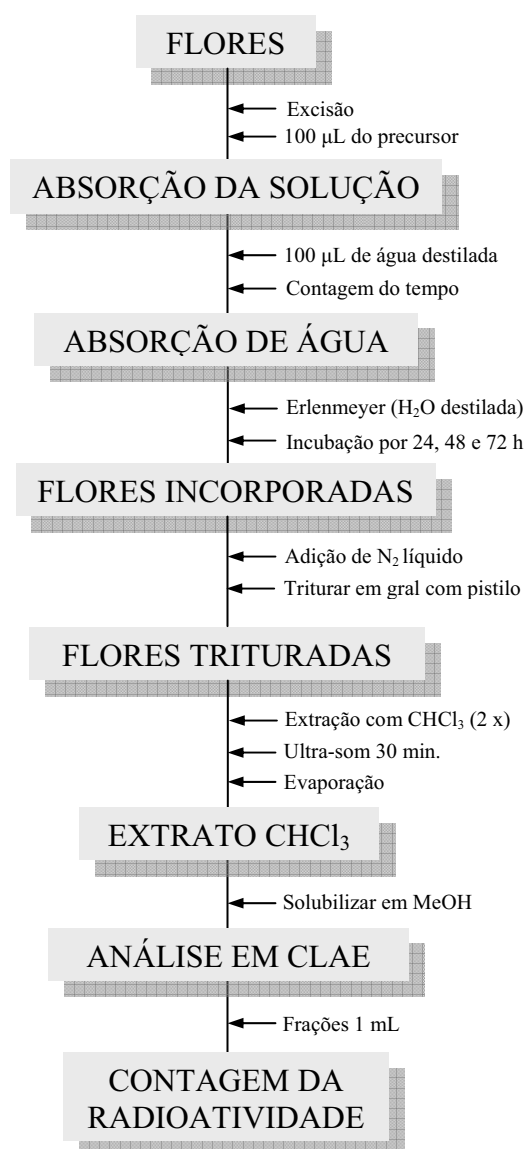


Figura 74 - Incorporação do precursor nas flores de *S. spectabilis*.

4.7.2 Experimento *in vitro* (flores) com L-lisina-[U-¹⁴C]

4.7.2.1 Extração enzimática

A extração das enzimas ou complexo enzimático, envolvido na biossíntese dos alcalóides piperidínicos, foi feita a partir das flores de *S. spectabilis*, que foram trituradas em N₂ líquido utilizando gral e pistilo. Posteriormente foi adicionada solução tampão TRIS-HCl [0,2 M] (pH 8,0) com PVPP (3% m/m), na proporção 1 g de flores para 3 mL de solução tampão. A solução tampão continha sacarose (0,25 M), ácido

ascórbico (40 mM), EDTA (1 mM) e DTT (5 mM). O PVPP foi adicionado à solução tampão extratora duas horas antes do experimento.

A suspensão obtida foi agitada por 10 minutos em banho de gelo (4 °C), filtrada em gaze e submetida a centrifugação refrigerada (16.300 x g) por 30 minutos. O precipitado foi descartado e o sobrenadante submetido ao ensaio enzimático (Figura 75).

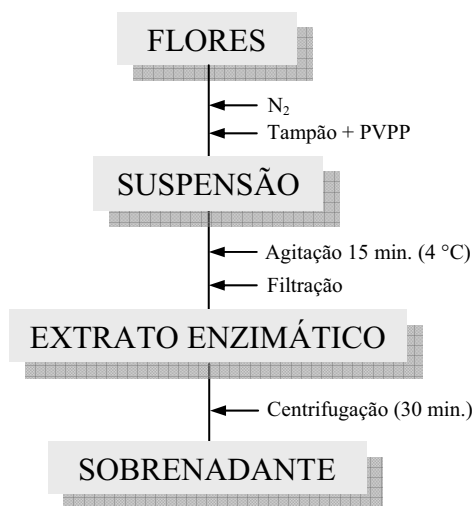


Figura 75 - Esquema geral da extração enzimática a partir das flores de *S. spectabilis*.

4.7.2.2 Experimento enzimático

O ensaio enzimático foi realizado utilizando 10 µL de MgCl₂ (500 mM), 10 µL de L-lisina-[U-¹⁴C] (1 µCi) e 480 µL do extrato enzimático, que foram incubados a 30 °C sob agitação. Após 60 minutos a reação foi finalizada com a adição de 10 µL de HCl (6 M) e 500 µL de clorofórmio. A solução foi agitada e centrifugada a 14000 rpm por trinta segundos. A fase orgânica foi separada e a fração aquosa foi extraída novamente com 500 µL de clorofórmio, que foi evaporado. O extrato obtido foi solubilizado em metanol e analisado por CLAE. Foram coletadas frações de 1 mL (25 minutos), adicionados 4 mL de solução cintilante e em seguida feita a contagem da radioatividade (2 minutos) para verificação da incorporação, sendo que a contagem indicou que não houve incorporação (Figura 76).

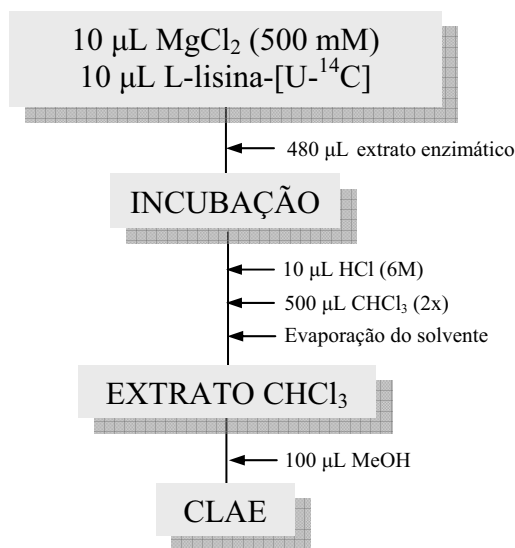


Figura 76 - Procedimento geral do ensaio enzimático.

4.7.3 Experimento *in vivo* (flores) com acetato de sódio-1-[¹³C]

Para verificação da conversão de acetato nos alcalóides piperidínicos, foram realizados experimentos utilizando flores de *S. spectabilis* e acetato de sódio-1-[¹³C], na concentração de 10 mg/mL em solução aquosa.

Os pedúnculos com flores foram excisados e mergulhados em 100 µL da solução de acetato de sódio-1-[¹³C] (10 mg/mL), sendo ensaiados 15 pedúnculos (semelhante ao da Figura 70). Após a absorção da solução foram adicionados 100 µL de água e iniciou-se a contagem de tempo, sendo os pedúnculos transferidos para erlenmeyers contendo água destilada, onde permaneceram por 72 h de incubação.

Após o tempo de incubação, as flores foram retiradas da água, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Foi adicionado 50 mL de CHCl₃ ao material triturado e sonicado por 30 minutos. Em seguida a fração clorofórmica foi recuperada e o solvente evaporado em rotaevaporador. Este procedimento foi repetido duas vezes. O extrato obtido (1,0 g) foi submetido a CC (PDC07), utilizando sílica flash como FE (h = 15 cm, Ø = 2,2 cm e m_{SiO₂} = 26,0 g). A eluição foi feita em gradiente de CHCl₃:MeOH:NH₄OH (95:05:0,25) até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de trinta e quatro subfrações (Figura 77). A análise por CCD permitiu reagrupar as subfrações 17-21 e 25-34 em PDC07 F₁₇₋₂₁ e PDC07 F₂₅₋₃₄, que foram submetidas novamente a CC.

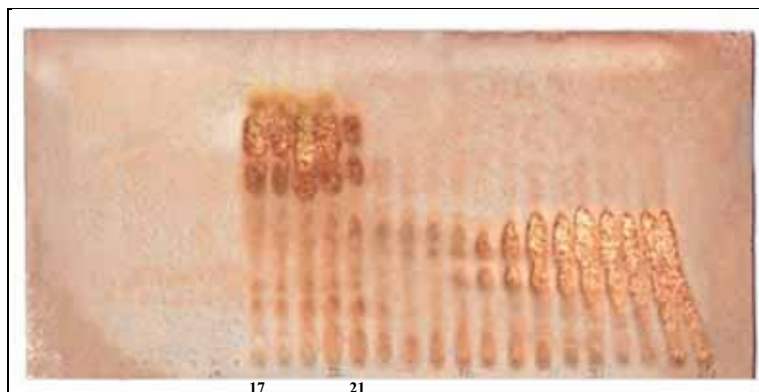


Figura 77 - CCD da coluna PDC07 (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

A subfração PDC07 F_{17-21} foi submetida novamente a CC (PDC09), utilizando sílica flash como FE ($h = 15 \text{ cm}$, $\text{Ø} = 1,9 \text{ cm}$ e $m_{\text{SiO}_2} = 18,3 \text{ g}$). A eluição foi feita utilizando um sistema isocrático de solvente que consistiu em CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25), obtendo-se vinte subfrações (Figura 78). Na análise por CCD foi possível observar que a subfração PDC09 F_4 estava pura (1,0 mg).

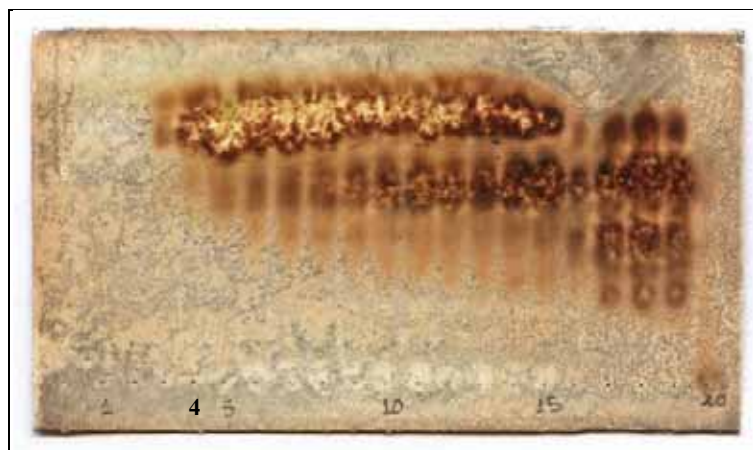
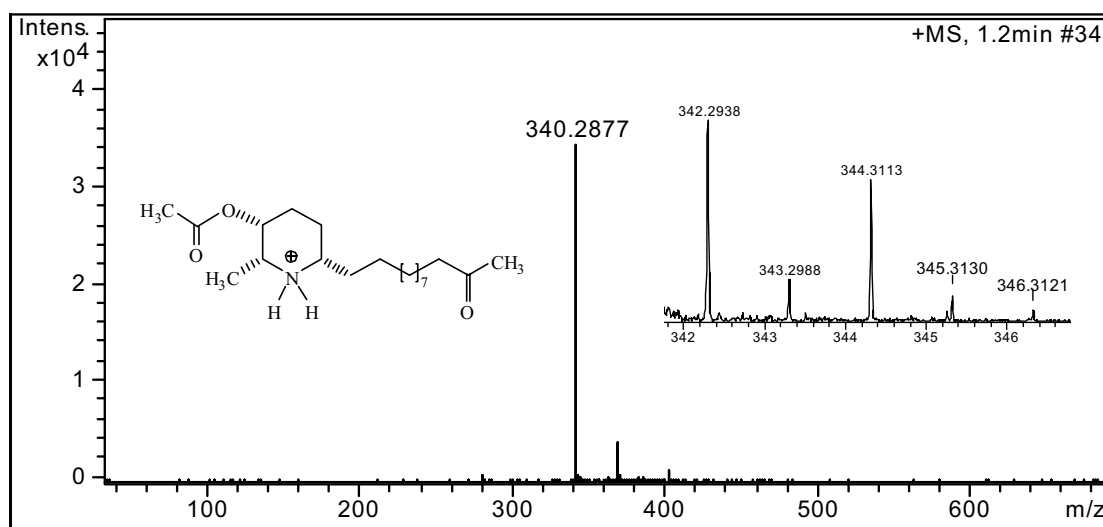


Figura 78 - CCD da coluna PDC09 (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

A fração PDC09 F_4 foi então submetida a espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM), a fim de se verificar se estavam presentes íons moleculares $M+1$, $M+2$, $M+3$... $M+10$, que seria evidência da incorporação das unidades de acetato marcado. A partir da análise de IES-EM foi possível observar que tratava-se do derivado **16** (3-*O*-acetil-cassina) (Espectro 137).



Espectro 137 - IES-EM da subfração PDC09 F₄ (16).

Como existe uma abundância natural dos isótopos M+1 e M+2, estes já eram esperados e suas intensidades foram calculadas (Figura 79, Tabela 10). Para confirmar a incorporação, os isótopos M+1, M+2, M+3... M+10 teriam que aparecer em intensidades maiores que as naturais. Foram observados isótopos M+1, M+2... M+5 (Espectro 137), porém em intensidades muito baixas, menores que as calculadas, indicando que não houve incorporação ou se existiu foi em porcentagens muito baixas.

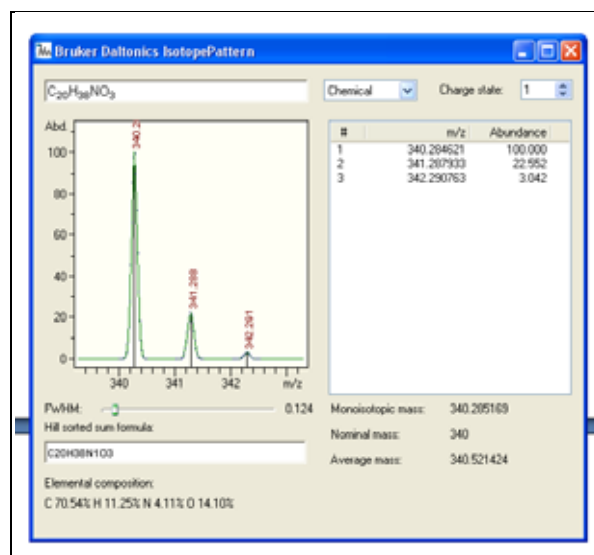


Figura 79 - Abundância natural dos isótopos M+1 e M+2, calculada para o alcalóide 16.

Tabela 10 - Abundâncias isotópicas de **16**

	calculado		observado	
	<i>m/z</i>	%	<i>m/z</i>	%
[M + H] ⁺	340,2846	100,00	340,2877	100,00
[M+1 + H] ⁺	341,2879	22,55	341,2909	18,54
[M+2 + H] ⁺	342,2908	3,04	342,2938	1,48
[M+3 + H] ⁺			343,2988	0,30
[M+4 + H] ⁺			344,3113	1,04
[M+5 + H] ⁺			345,3130	0,18
[M+6 + H] ⁺			346,3121	0,08
[M+7 + H] ⁺			no	
[M+8 + H] ⁺			no	
[M+9 + H] ⁺			no	
[M+10 + H] ⁺			no	

* no = não observado.

4.7.4 Experimentos *in vivo* com acetato de sódio-1-[¹³C] nas folhas de *S. spectabilis*

Para verificação da conversão de acetato nos alcalóides piperidínicos, foram realizados experimentos com acetato de sódio-1-[¹³C], na concentração de 10 mg/mL em solução aquosa.

As raques com folíolos foram excisadas e mergulhadas em 100 µL de uma solução 10 mg/mL de acetato de sódio-1-[¹³C], sendo ensaiados 10 raques. Quando toda a solução foi absorvida, foram adicionados mais 100 µL de água e iniciou-se a contagem de tempo. Após a absorção dos 100 µL de água, as raques foram transferidas para erlenmeyers contendo água destilada, onde permaneceram por 120 h de incubação (Figura 80).



Figura 80 - Experimento de incorporação de acetato de sódio-1- ^{13}C nas raques com folíolos de *S. spectabilis*.

Após o tempo de incubação, as raques foram retiradas da água, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Foi adicionado 50 mL de CHCl_3 ao material triturado e sonicado em ultra-som por 30 minutos. Em seguida a fração clorofórmica foi recuperada e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. Este procedimento foi repetido duas vezes. O extrato obtido (430 mg) foi submetido a CC (PDC11), utilizando sílica flash como FE ($h = 15$ cm, $\text{Ø} = 1,9$ cm e $m_{\text{SiO}_2} = 18,3$ g). A eluição foi feita em gradiente de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (95:05:0,25) até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de vinte oito subfrações (Figura 81). Pela análise em CCD foi possível observar que as frações 15, 16 e 17 apresentavam alcalóides, porém em pequena quantidade de massa. Devido a problemas instrumentais, a análise foi feita utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa Shimadzu[®] com ionização por IE. A fração PDC11 F₁₅ foi escolhida para análise, devido a maior pureza apresentada em CCD (Figura 81 e 82).

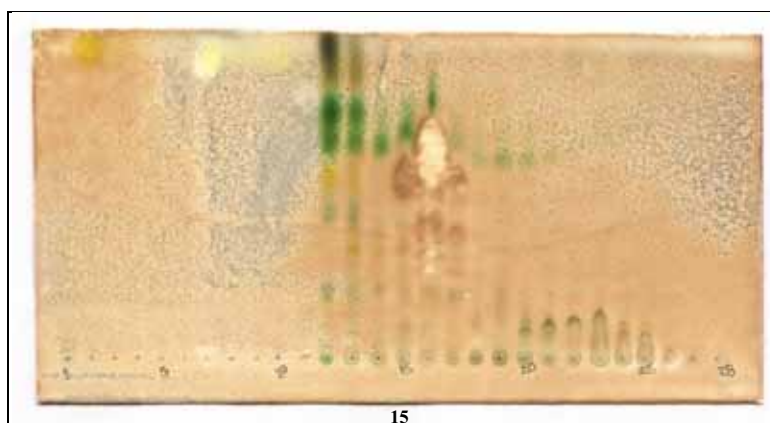


Figura 81 - CCD da coluna PDC11 (FE: sílica, FM: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

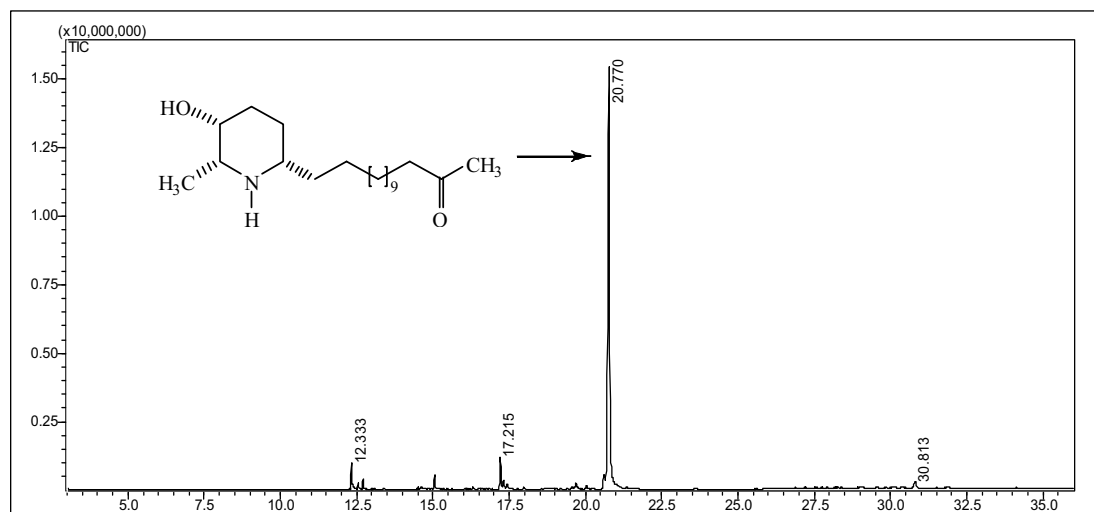
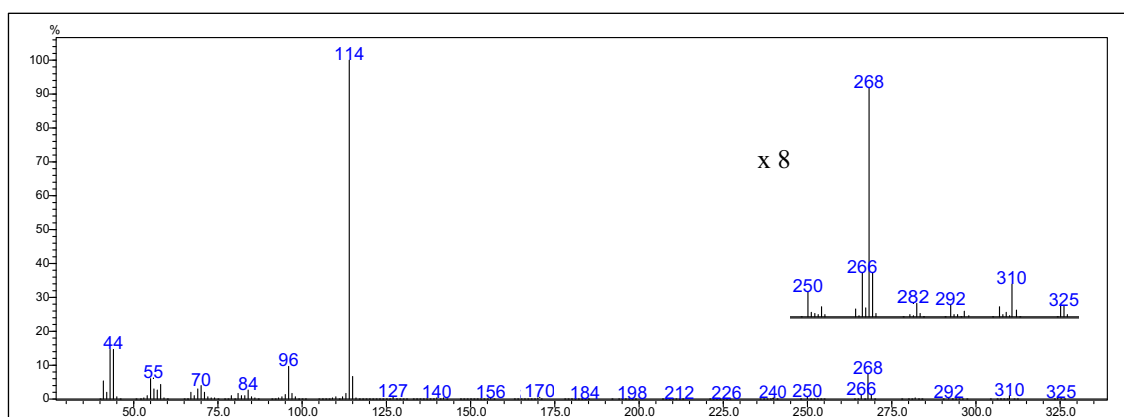


Figura 82 - Cromatograma de íons totais da fração PDC11 F₁₅.

O cromatograma de íons totais (Figura 82) apresentou uma banda intensa em 20,8 minutos, cujo espectro de massas por IE (Espectro 138) indicou o íon molecular m/z 325, sugerindo a fórmula $C_{20}H_{39}NO_2$, já identificada em estudos anteriores como sendo a (-)-espectralina (**9**) (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995; CHRISTOFIDIS; WELTER; JADOT, 1977a). O pico base observado no espectro de **9** foi m/z 114, referente a eliminação da cadeia lateral em C-6 com retenção da carga positiva no anel piperidínico (Figura 83) (LYTHGOE; VERNENGO, 1967). Este por sua vez elimina uma molécula de água gerando o íon m/z 96, confirmando assim a presença da hidroxila no anel piperidínico (JEWERS et al., 1976; SPITELLER-FRIEDMANN; SPITELER, 1964). Os íons correspondentes a M-1 e M-15 foram atribuídos a eliminação de hidrogênio e metila ligados aos carbonos alfa ao nitrogênio do anel piperidínico. O íon M-15 também pode resultar da eliminação da metila (C-14') do final da cadeia alifática, fragmentação característica dos aldeídos e cetonas que leva a formação do íon acílio m/z 310 (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000). A clivagem da ligação C₁₂-C₁₃, adjacente ao átomo de oxigênio da carbonila, leva a formação do íon acílio m/z 43. O íon m/z 282 foi atribuído a eliminação de monóxido de carbono a partir do íon acílio, seguido de fragmentos com intervalos de 14 u.m.a. até m/z 128, característico da cadeia alifática linear (JEWERS et al., 1976; AHMAD; BASHA; HAQUE, 1978). O íon acílio também pode sofrer eliminação de um ceteno, dando origem ao íon m/z 268, que por sua vez gera fragmentos com intervalos de 14 u.m.a. até m/z 128 (GOTTLIEB, 1968; LYTHGOE; VERNENGO, 1967; CHRISTOFIDIS; WELTER; JADOT, 1977a; CHRISTOFIDIS; WELTER; JADOT, 1977b). Porém, o íon

m/z 268 pode ter origem a partir do íon $M-1$ que por uma reação de *retro*-Diels-Alder (b), seguida de um estado de transição cíclico, elimina monóxido de carbono levando ao íon $M-57$ (Figura 83) (AHMAD; BASHA; HAQUE, 1978). O íon m/z 58 foi atribuído a um rearranjo de MacLafferty (a), característico dos compostos carbonílicos alifáticas. Outros íons foram observados e propostas de fragmentação estão descritas na Figura 83.

Era esperado, no caso da incorporação de acetato marcado, encontrar íons moleculares característicos $M+1$, $M+2$, $M+3$... $M+10$, com os respectivos fragmentos, como mostra o mapa de fragmentação (Figura 83). Esperava-se que o principal fragmento m/z 114 tivesse como isótopos os íons m/z 115 ($M+1$), m/z 116 ($M+2$) ou m/z 117 ($M+3$), referentes a até três unidades do precursor, caso o anel piperidínico tivesse origem na via do acetato.



Espectro 138 - Espectro de massas de **9** por IE.

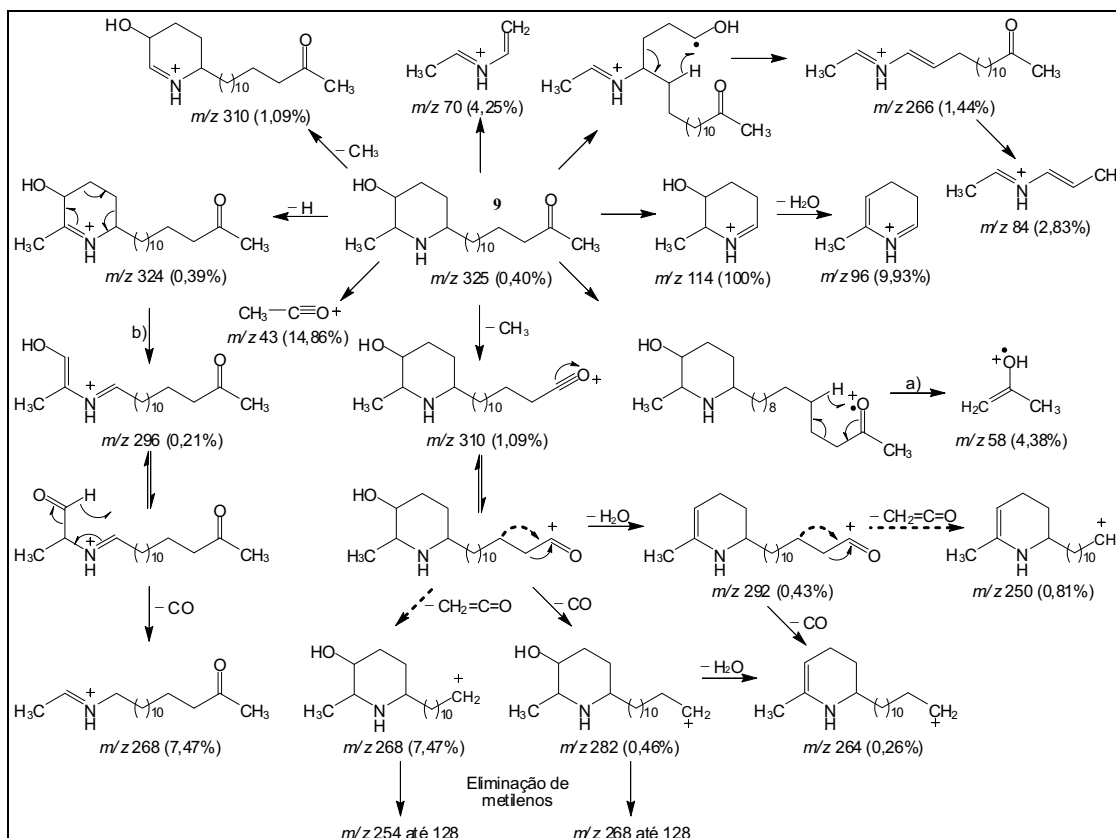


Figura 83 - Mapa de fragmentação do alcalóide 9.

4.7.5 Germinação de sementes de *S. spectabilis*

A baixa porcentagem de incorporação dos precursores nos ensaios realizados até o momento pode estar relacionada a vários fatores, entre esses, o tempo necessário para a metabolização dos precursores, sendo necessário maior período de incubação que aquele dos experimentos anteriores. Outro dado a ser revisto são as partes (órgãos da planta) que foram utilizadas nos experimentos e tem tempo de vida relativamente curto, entre 72 e 120 horas. Com a finalidade de manter os experimentos por maior tempo de incorporação (metabolismo), uma alternativa foi desenvolver uma metodologia utilizando plântulas de *S. spectabilis* (LOBO; LOURENÇO, 2007; SCHMIDT et al., 2007), tendo em vista que foi observada a presença de alcalóides em plântulas com quinze dias de germinação, sugerindo que o metabolismo enzimático esteja ativo.

Para obtenção das plântulas foram utilizadas sementes cedidas pela profa. Maria Claudia Marx Young, coletadas no Instituto de Botânica de São Paulo, sendo que para aumentar o rendimento germinativo as sementes foram submetidas à escarificação mecânica (lixa número 80), uma vez que nas leguminosas, a dormência das sementes é

uma característica hereditária, causada pelo bloqueio físico representado pelo tegumento (casca) resistente e impermeável que impede a absorção de água e trocas gasosas, não permitindo a embebição da semente nem a oxigenação do embrião (TEDESCO, et al., 2001). O processo de escarificação mecânica com lixa consiste na abrasão do tegumento da semente, favorecendo a absorção de água e oxigênio e contribuindo para uma germinação mais rápida (RODRIGUEZ; AGUIAR; SADER, 1990; BEWLEY; BLACK, 1994; BASKIN; NAN; BASKIN, 1998; FERREIRA; BORGHETTI, 2004; LACERDA et al., 2004; MARTINS et al., 2008). Em seguida trinta sementes foram colocadas em três placas de Petri contendo duas camadas de papel de filtro, previamente submetidos à autoclave por 20 min para eliminação de fungos e bactérias, onde foram mantidas umedecidas. As placas foram mantidas em casa de vegetação a temperatura ambiente (Figura 84).

Depois de 24 h foi observada a intumescência das sementes germinadas em placa, devido à absorção de água, porém o aparecimento de radículas e cotilédones só foi observado no quarto dia de germinação (Figura 84).



Figura 84 - Germinação de sementes: (A) sementes de *S. spectabilis*, (B e C) placas com as sementes germinadas depois de quatro dias.

Após sete dias de germinação, as plântulas de uma das placas foram retiradas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Foi adicionado 50 mL de CHCl_3 ao material triturado e sonificado em ultrassom por 30 minutos. Em seguida a fração clorofórmica foi recuperada e o solvente foi evaporado em rotaevaporador. Este procedimento foi repetido duas vezes. O extrato obtido foi submetido à análise por CCD para verificar a presença dos alcalóides (Figura 85). A análise foi repetida depois de quatorze dias e novamente foi confirmada a presença dos metabólitos (Figura 85). A última placa foi mantida para avaliar o tempo máximo em que as plântulas permaneciam saudáveis *in vitro* (~ 30 dias).

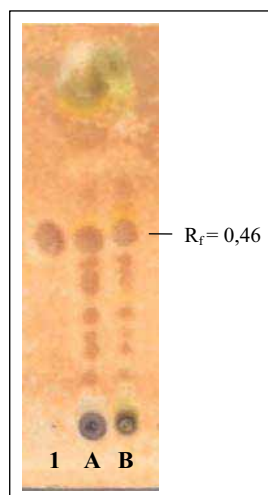


Figura 85 - CCD dos extratos CHCl_3 obtidos das sementes germinadas em placa de Petri (FE: sílica, FM: CHCl_3 :MeOH: NH_4OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt); Padrão (-)-cassina (**1**) ($R_f = 0,46$), Plântulas 7 dias (**A**), 14 dias (**B**).

4.7.6 Otimização das condições para os experimentos *in vivo* utilizando acetato de sódio

Na tentativa de minimizar a quantidade do precursor administrado, foram confeccionados micro-tubos de ensaio côncavos, para que as sementes ficassem com a parte escarificada imersa na solução do precursor, durante o período necessário para a absorção do volume estabelecido (Figura 86). Foram realizados experimentos com acetato de sódio não marcado para otimizar a quantidade do precursor e o volume de solvente (H_2O) que a semente pudesse absorver, sem que a germinação fosse prejudicada.

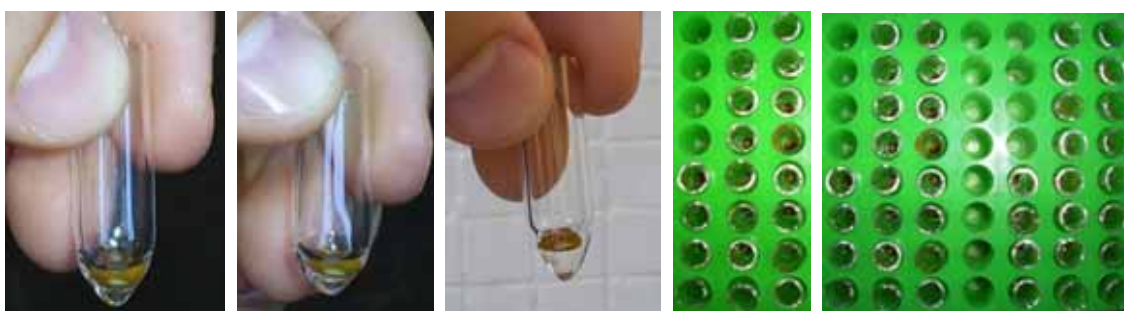


Figura 86 - Micro-tubo de ensaio para administração de acetato de sódio-1- ^{13}C nas sementes de *S. spectabilis*.

Inicialmente foi avaliado qual o melhor volume de solvente (H₂O) para administrar o precursor. Foram avaliadas (germinadas) dez sementes nos volumes de 25, 50 e 100 µL, sendo que as sementes têm pequena velocidade de absorção. O menor volume testado apresentou velocidade de evaporação do solvente maior que a velocidade de absorção da semente, o que foi observado pelo pequeno entumescimento após o período de absorção em comparação com os outros volumes avaliados. O maior volume apresentou um tempo relativamente grande para absorção (24 h). O volume intermediário foi o que apresentou melhor resultado para o experimento. Após 16 h todas as sementes tinham absorvido os 50 µL do precursor, sendo visível o entumescimento das sementes. Comparando com o peso médio de cada semente (30 mg), 50 µL da solução corresponde a quase duas vezes o peso de cada uma. Após o período de absorção do precursor as sementes foram transferidas para placas de Petri com duas camadas de papel de filtro, previamente esterilizadas em autoclave, onde permaneceram pelo período de germinação (Figura 84).

Em seguida foi avaliada qual a melhor concentração do precursor a ser administrado. Para os experimentos foram germinadas dez sementes em cada uma das concentrações, utilizando acetato de sódio não marcado. Foi observado baixa taxa de germinação nas concentrações acima de 1 mg/mL e aquelas que germinaram não apresentaram desenvolvimento igual as germinadas em concentrações menores do precursor (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentrações avaliadas do precursor administrado

C (mg/mL)	20,00	2,000	1,000 ^a	0,100	0,010	0,001
m (µg)	1000	100,0	50,00 ^a	5,000	0,500	0,050
Germinação (%)	10	60	90 ^a	80	80	100

^a Melhores condições observadas nos experimentos.

4.7.7 Experimento *in vivo* com acetato de sódio (CD₃¹³COONa) nas sementes de *S. spectabilis*

Para verificação da conversão de acetato de sódio (CD₃¹³COONa) nos alcalóides piperidínicos, foram realizados experimentos onde o precursor foi administrado nas sementes que posteriormente foram germinadas (condições otimizadas anteriormente, item 4.7.6). Foram germinadas 103 sementes por um período de 20 dias.

A temperatura e humidade relativa do ar foram monitoradas durante esse período e variaram entre 18–22 °C e 26–47%, respectivamente (Figura 87).

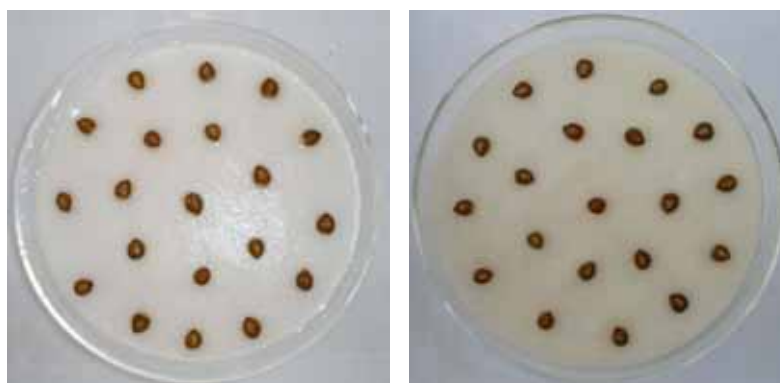


Figura 87 - Sementes germinadas em placas de Petri com papel de filtro umedecido.

Durante o tempo de germinação houve uma diminuição da temperatura (meses de junho e julho) o que fez com que as sementes germinassem mais lentamente, favorecendo a proliferação de fungos em algumas das placas. Depois de 20 dias de germinação, as plântulas foram retiradas da placa, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas até granulometria fina com auxílio de gral e pistilo. Foi adicionado 100 mL de CHCl_3 ao material triturado e sonicado por 30 minutos (2 ×). Em seguida a fração clorofórmica foi recuperada e o solvente evaporado em rotaevaporador. O extrato obtido (17,5 g) foi submetido a CC (BIO01), utilizando sílica flash como FE ($h = 5$ cm, $\text{Ø} = 1,4$ cm e $m_{\text{SiO}_2} = 1,85$ g). A eluição foi feita em gradiente de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (95:05:0,25) até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de vinte subfrações (Figura 88). A análise por CCD permitiu reagrupar as subfrações 7–9 em BIO01 F₇₋₉, que foi submetida a espectrometria de massas com ionização por electrospray (IES-EM; Espectro 139), para avaliar a presença de íons moleculares $M+3$, $M+6$ $M+9$... $M+n$, que seria evidência da incorporação das unidades de acetato marcado (Figura 89). A partir da análise cromatográfica e do espectro de massas foi possível observar que a mistura de alcalóides tratava-se dos metabólitos **1** (m/z 298,2778), **9** (m/z 326,3082), **16** (m/z 340, 2874) e **18** ou **42** (m/z 314,2730), sendo este último ainda não relatado na espécie. Os demais já foram identificados em estudos anteriores (Espectro 139; Figura 90) (PIVATTO, et al., 2005).



Figura 88 - CCD da coluna BIO01 (FE: sílica, FM: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

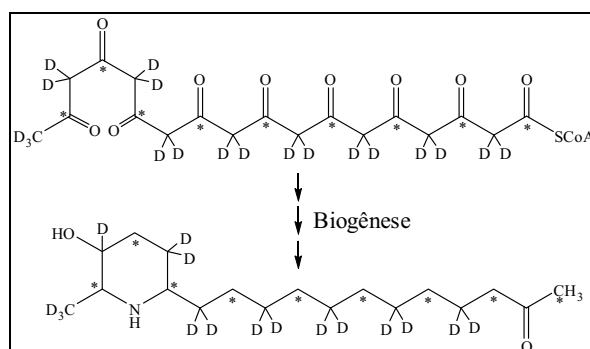
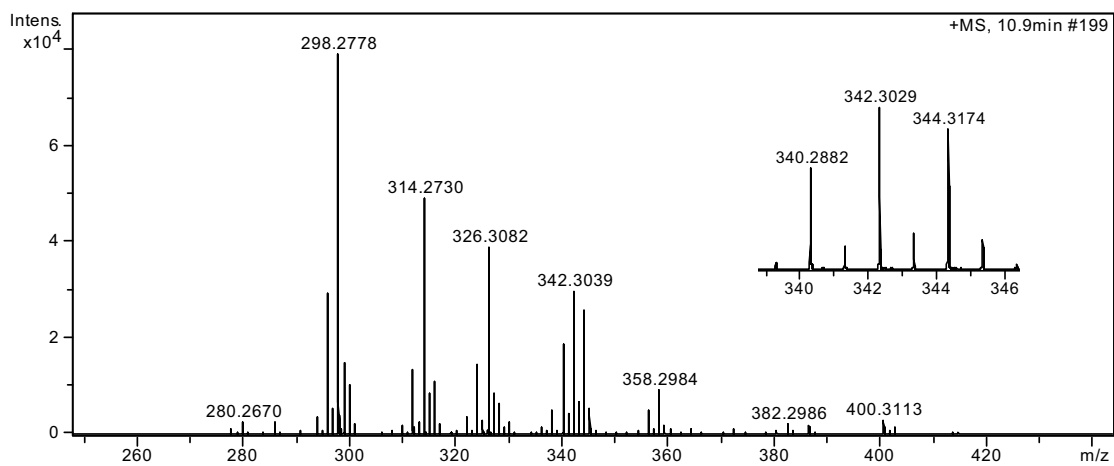


Figura 89 - Biogênese para o alcalóide **1** com base no experimento utilizando $\text{CD}_3^{13}\text{COONa}$.



Espectro 139 - IES-EM da sub-fração BIO01 F₇₋₉.

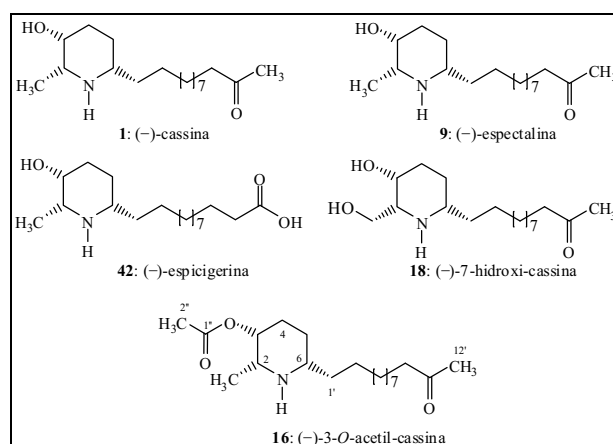
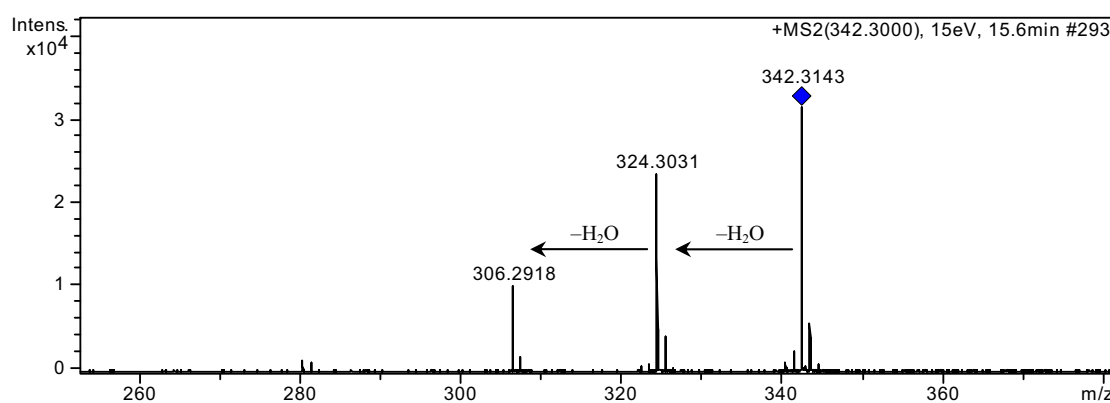


Figura 90- Alcalóides majoritários observados por IES-EM na subfração BIO01 F₇₋₉.

A análise do espectro de massas (IES-EM; Espectro 139) permitiu observar que não houve incorporação significativa do precursor nos alcalóides majoritários, porém foi possível observar dois íons moleculares (m/z 342,3029 e 344,3174) que poderiam ser atribuídos a isótopos não naturais de **16** (m/z 340,2882), com intensidades maiores que o próprio íon molecular, indicando assim a provável incorporação de uma unidade de acetato marcada (Espectro 139).

A fração alcaloídica BIO01 F₇₋₉ foi novamente analisada e os íons (m/z 342,3029 e 344,3174) submetidos ao experimento de IES-EM/EM (Espectros 140 e 141; Figuras 91 e 92).



Espectro 140 - IES-EM/EM do íon m/z 342 (sub-fração BIO01 F₇₋₉).

A partir da análise do espectro de IES-EM/EM do íon molecular m/z 342 (Espectro 140), foi observada a eliminação de dois fragmentos consecutivos de 18 u.m.a., que podem ser atribuídos a duas eliminações neutras de água para os alcalóides **18** e **42** (Figura 91).

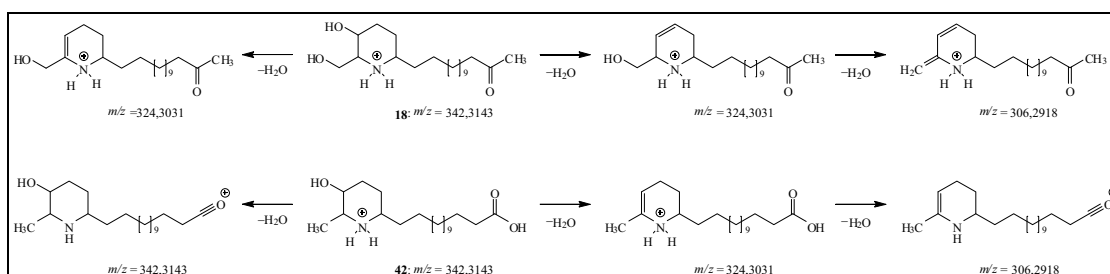
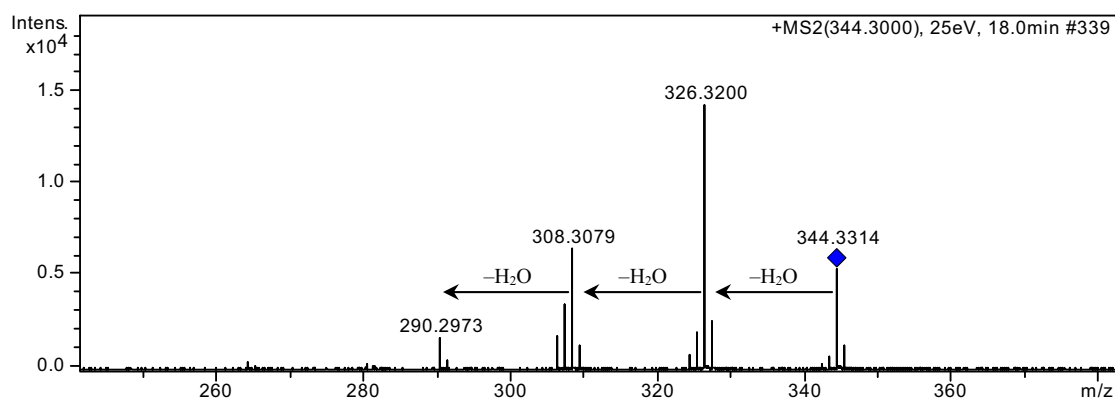


Figura 91 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 342.



Espectro 141 - IES-EM/EM do íon m/z 344 (sub-fração BIO01 F₇₋₉).

A análise do espectro de IES-EM/EM do íon molecular m/z 344 (Espectro 141), possibilitou observar três fragmentos consecutivos de 18 u.m.a., que podem ser atribuídas a três eliminações neutras de água do alcalóide **71** (7-hidroxi-carnavalina), relatado pela primeira vez (Figura 92).

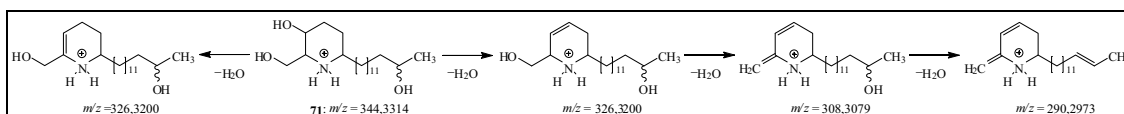


Figura 92 - Proposta de fragmentação para o íon m/z 344.

Os espectros de IES-EM/EM dos íons moleculares (m/z 342,3029 e 344,3174), “produtos da incorporação”, foram comparados com o espectro de massas do alcalóide **16** (m/z 340,2882; Espectro 9; Figura 24), evidenciando assim que não houve a incorporação da unidade de acetato como previsto anteriormente. Se um dos íons correspondesse ao produto de incorporação, esperava-se observar a presença de um fragmento m/z 280 u.m.a., referente a $[M + H - CD_3^{13}CO_2H]^+$ (Figura 24), caso a unidade de acetato fosse ligada na posição 3 do anel piperidínico, como mostra a

proposta biogenética (2ª etapa, Figura 93, ou m/z 280 + 3 u.m.a., referente a $[M + H - CH_3CO_2H]^+$, para o caso de uma unidade de acetato marcada ter sido incorporada na etapa de condensação, na primeira etapa da biogênese (Figura 93). A partir desses resultados foi possível observar que os íons m/z 342,3029 e 344,3174, correspondiam aos alcalóides **18** e/ou **42** e **71** (Espectros 139–141; Figuras 90–92).

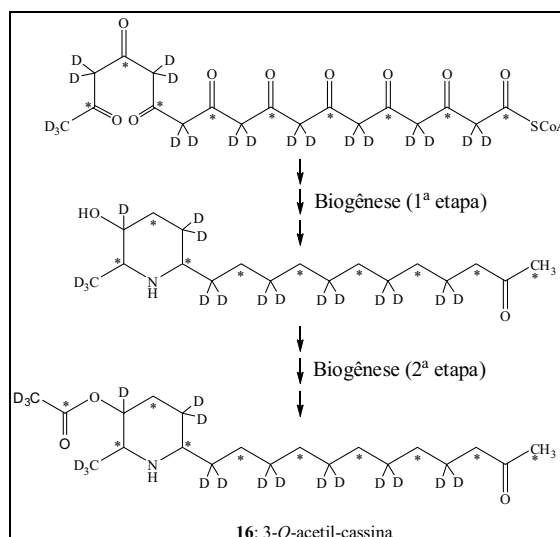


Figura 93 - Biogênese para o alcalóide **16** com base no experimento usando $CD_3^{13}COONa$.

Depois de constatado que os experimentos de biossíntese não levaram a alcalóides marcados, foi necessário reavaliar o procedimento para que as condições pudessem ser otimizadas. Dentro de um contexto geral do estudo biossintético dos alcalóides piperidínicos, um dos pontos mais importantes para a elucidação das vias, seria avaliar se as enzimas responsáveis pela produção dos alcalóides estão ativas no período de administração e incubação do precursor. Uma vez que constatada a presença dos alcalóides nas plântulas, acreditava-se que fosse produto do seu metabolismo. Para avaliar se esses metabólitos eram produzidos pelo metabolismo das plântulas e não seria produto acumulado anteriormente nas sementes que teria se mantido durante a germinação das plântulas, preparamos um extrato das sementes para avaliar a presença dos alcalóides. O extrato etanólico (5,39 g) foi preparado a partir das sementes (~3302), que foram trituradas e mantidas em etanol por quatorze dias. Em seguida o extrato foi submetido a CC (PDC14), utilizando sílica flash como FE ($h = 10$ cm, $\varnothing = 2,6$ cm e $m_{SiO_2} = 24,48$ g). A eluição foi feita em gradiente de $CHCl_3:MeOH:NH_4OH$ (95:05:0,25) até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de quarenta frações as quais foram

analisadas por CCD, que possibilitou constatar a presença dos alcalóides nas frações 11–29 (Figura 94).

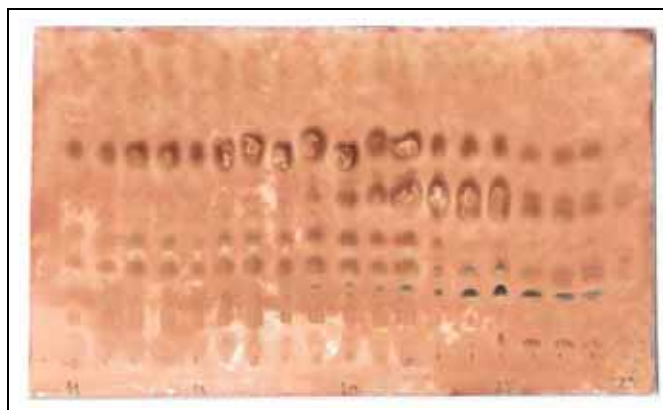


Figura 94 - CCD da coluna PDC14 frações F₁₁₋₂₉ (FE: sílica, FM: CHCl₃:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: ICIPt).

5 CONCLUSÕES

O estudo do perfil alcaloídico das espécies de *Senna* e *Cassia* (*S. spectabilis*, *S. multijuga*, *S. macranthera*, *S. velutina*, *C. fistula* e *C. leptophylla*) permitiu observar que somente *S. spectabilis* e *S. multijuga* acumulam alcalóides piperidínicos e piridínicos, respectivamente. Esses dados são importantes do ponto de vista quimiotaxonômico, uma vez que podem auxiliar na organização dessas espécies para a classificação botânica. De *S. spectabilis* foram isolados os alcalóides (–)-cassina (**1**), (–)-espectralina (**9**), (–)-3-*O*-acetil-espectralina (**15**) e (–)-3-*O*-acetil-cassina (**16**) e identificados 7-hidroxi-carnavalina (**71**), 7-hidroxi-cassina (**18**) e/ou espicigerina (**42**), utilizando a espectrometria de massas. De *S. multijuga* foram isolados os alcalóides piridínicos 7'-multijuguinona (**67**) e 12'-hidroxi-7'-multijuguinona (**69**) e identificados 7'-multijuguinol (**68**) e 12'-hidroxi-7'-multijuguinol (**70**). Vale destacar que é o primeiro relato do isolamento de **16**, **67** e **69** e identificação de **68** e **70**.

Da avaliação da atividade anticolinesterásica foi possível observar que os alcalóides de *S. spectabilis* apresentaram limite de detecção comparável com o padrão utilizado. Já os alcalóides piridínicos de *S. multijuga* não apresentaram limite de detecção comparável com o padrão. Também foi possível observar que o derivado **16**, homólogo de **15** que está em fase pré-clínica, também apresentou atividade inibidora de AChE, resultado importante pois o derivado **1** que é o precursor para as reações de

semi-síntese é o metabólito majoritário encontrado nas flores de *S. spectabilis*, viabilizando os estudos de fase pré-clínica que estão em andamento.

A espectrometria de massas, seja por injeção direta (IES-EM), seja acoplada a cromatografia gasosa, foi uma ferramenta eficiente para a identificação e isolamento dos pares homólogos que co-ocorrem em *S. spectabilis*. Esta técnica foi de grande importância para o estudo de biossíntese, uma vez que permite a análise de pequenas quantidades de amostras semi-purificadas, obtidas dos experimentos, fornecendo resultados rápidos e confiáveis sobre a incorporação dos precursores sem a necessidade do isolamento dos metabólitos.

Dentro das propostas biogenéticas, foram realizados experimentos utilizando L-lisina-[U-¹⁴C], acetato de sódio-1-[¹³C] e CD₃¹³CO₂Na que foram administrados *in vivo* e *in vitro* nas flores, folhas, sementes (plântulas) e extratos enzimáticos, porém até o momento não foi observada incorporação significativa que pudesse ser detectada pelos métodos espectrométricos utilizados.

Nossos últimos resultados sugerem que os alcalóides detectados nas plântulas podem ser de origem metabólica da planta que gerou as sementes e que tenham sido translocados e acumulados nesse órgão, podendo as enzimas não estarem ativas nas plântulas no período de administração e incubação dos precursores.

Com esses resultados fica evidente que o estudo das vias biossintéticas dos alcalóides de *S. spectabilis* (arbórea) não é uma tarefa trivial e demanda maior investimento, principalmente em plântulas para avaliação do início da atividade enzimática e produção dos metabólitos.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; KHAN, K. A.; AHMAD, V. Immunomodulating effect of juliflorine on the antibody response to *Listeria hemolysin Preliminary Report*. **Journal of Islamic Academy of Sciences**, v. 5, n. 3, p. 189-193, 1992.
- AHMAD, V. U.; BASHA, A.; HAQUE, W. New alkaloids from *Prosopis juliflora* DC. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 33b, p. 347-348, 1978.
- AHMAD, V. U.; SULTANA, A.; QAZI, S. Alkaloids from the leaves of *Prosopis juliflora*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 3, p. 497-501, 1989.
- ASTUDILLO, S. L.; JURGENS, S. K.; SCHMEDA-HIRSCHMAN, G.; GRIFFITH, G. A.; HOLT, D. J.; JENKINS, P. R. DNA binding alkaloids from *Prosopis alba*. **Planta Medica**, v. 65, p. 161-162, 1999.
- ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; MIRANDA, A. L. P. de; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Antinociceptive profile of (–)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta Medica**, v. 69, p. 795-799, 2003.
- BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.
- BASKIN, J. M.; NAN, X.; BASKIN, C. C. A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of *Senna* (Fabaceae). **Seed Science Research**, v. 8, p. 501-512, 1998.
- BEVAN, C. W. L.; OGAN, A. U. Studies on west African medicinal plants – I. Biogenesis of carpaine in *Carica papaya* Linn. **Phytochemistry**, v. 3, p. 591-594, 1964.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1994. 468 p.
- BOER, J. de. The death of Socrates. A historical and experimental study on the actions of coniine and *Conium maculatum*. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 83, n. 4, p. 473-490, 1950.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929-5934, 1995.

BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, A. R.; SILVA, D. H. S.; LOPES, M. N. Search for antifungal and anticancer compounds from native plant species of cerrado and atlantic forest. **Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 2, p. 181-186, 1999.

BRAEKMAN, J. C.; DALOZE, D. Defensive alkaloids from ants. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431- 1438, 1996.

BRUNETON, J. **Pharmacognosy: phytochemistry medicinal plants**. 2nd ed. Paris: Intercept, 1999. p. 856-865.

CHRISTOFIDIS, I.; WELTER, A.; JADOT, J. Spectaline and iso-6 cassine, two new piperidin 3-ol alkaloids from the leaves of *Cassia spectabilis*. **Tetrahedron**, v. 33, p. 977-979, 1977a.

CHRISTOFIDIS, I.; WELTER, A.; JADOT, J. Spectalinine and iso-6-carnavaline, two unprecedented piperidine alkaloids from the seeds of *Cassia spectabilis*. **Tetrahedron**, v. 33, p. 3005-3006, 1977b.

CIFERRI, O.; MACHADO, M. P.; ARAUJO, L. A. Substâncias antimicrobianas na canafistula (*Cassia excelsa* Schrad). II. Cassilisidina, um antibiótico de ação bacteriolítica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, n. 1, p. 33-37, 1958.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. New York: Oxford University Press, 2000. 1568 p.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plants Physiologists, 2000. Cap. 24, p. 1250-1318.

DATWYLER, P.; OTT-LONGONI, R.; SCHOPP, E.; HESSE, M. 188. Uber juliprosin, ein weiteres alkaloid aus *Prosopis juliflora* A. Dc. **Helvetica Chimica Acta**, v. 64, n. 6, p. 1959-1963, 1981.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. 507 p.

FARIA, A. M.; BOTTOLI, C. B. G.; JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H. Fases estacionárias monolíticas para separações cromatográficas. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 300-309, 2006.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 324 p.

GOTTLIEB, O. R. **Introdução à espectrometria de massa das substâncias orgânicas**. Rio de Janeiro: Diretoria de Bibliografia e Documentação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1968. 174 p.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Fitoquímica amazônica: uma apreciação em perspectiva. **Interciência**, v. 3, n. 4, p. 252-263, 1978.

GOVINDACHARI, T. R.; NAGARAJAN, K.; VISWANATHAN, N. Carpaine and pseudocarpaine. **Tetrahedron Letters**, n. 24, p. 1907-1916, 1965.

HIGHET, R. J. Alkaloids of *Cassia* species. I. Cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, p. 471-474, 1964.

HIGHET, R. J.; HIGHET, P. F. Alkaloids of *Cassia* species. II. The side chain of cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 1275-1276, 1966.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. **Princípios ativos de plantas superiores**. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003. 152 p.

JEWERS, K.; NAGLER, M. J.; ZIRVI, K. A.; AMIR, F. Lipids, sterols, and a piperidine alkaloid from *Prosopis spicigera* leaves. **Phytochemistry**, v. 15, p. 238-240, 1976.

JEWERS, K.; NAGLER, M. J.; ZIRVI, K. A.; AMIR, F.; COTTEE, F. H. Spicigerine, a new alkaloid from *Prosopis spicigera*. **Pahlavi Medical Journal**, v. 5, n. 1, p. 1-13, 1974.

KAMO, T.; MACHARA, K.; SATO, K.; HIROTA, M. Spectamines A and B, possible inhibitor of superoxide anion production of macrophages from *Cassia spectabilis*. **Heterocycles**, v. 60, n. 6, p. 1303-1306, 2003.

KHUONG-HUU, Q.; RATTLE, G.; MONSEUR, X.; GOUTAREL, R. II. Structures de la prosopine et de la prosopinine, alcaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 81, p. 425-442, 1972a.

KHUONG-HUU, Q.; RATTLE, G.; MONSEUR, X.; GOUTAREL, R. III. Nouveaux alcaloides du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub.: isoprosopinines A et B, prosophylline, prosafrine et prosafrinine. **Bulletin des Sociétés Chimiques Belges**, v. 81, p. 443-458, 1972b.

LACERDA, D. L.; LACERDA FILHO, J. P.; GOULART, M. F.; RIBEIRO, R. A.; LOVATO, M. B. Seed-dormancy variation in natural populations of two tropical leguminous tree species: *Senna multijuga* (Caesalpinoideae) and *Planthymenia reticulate* (Mimosoideae). **Seed Science Research**, v. 14, p. 127-135, 2004.

- LEETE, E. The biogenesis of nicotine and anabasine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 78, n. 14, p. 3520-3523, 1956.
- LEETE, E. Biosynthesis of the hemlock alkaloids. The incorporation of acetate-1-C¹⁴ into coniine and conhydrine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 12, p. 2509-2513, 1964.
- LEETE, E. Alkaloid biosynthesis. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 18, p. 179-196, 1967.
- LEETE, E.; GROS, E. G.; GILBERTSON, T. J. Biosynthesis of the pyrrolidine ring of nicotine: feeding experiments with N¹⁵-labelled ornithine-2-C¹⁴. **Tetrahedron Letters**, n. 11, p. 587-592, 1964.
- LEETE, E.; LECHLEITER, J. C.; CARVER, R. A. Determination of the "starter" acetate unit in the biosynthesis of pinidine. **Tetrahedron Letters**, n. 44, p. 3779-3782, 1975.
- LIMA, O. G.; MACHADO, M. P.; ALBUQUERQUE, I. L.; PINTO, G. P. Substâncias antimicrobianas na canafistula (*Cassia excelsa* Schrad). I. Cassilisina, um novo alcalóide com ação antibiótica. **Revista do Instituto de Antibióticos**, v. 1, n. 1, p. 23-31, 1958.
- LOBO, A. M.; LOURENÇO, A. M. (Ed.). **Biossíntese de produtos naturais**. Lisboa: IST Press, 2007. 272 p.
- LÓPEZ, T. A.; CID, M. S.; BIANCHINI, M. L. Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in liverstock. A review. **Toxicon**, v. 37, p. 841-865, 1999.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 1, p. 151, 167.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1, p. 184.
- LYTHGOE, D.; VERNENGE, M. J. Alkaloids from *Cassia carnaval* Speg.: cassine and carnavaline. **Tetrahedron Letters**, v. 12, p. 1133-1137, 1967.
- LYTHGOE, D.; BUSCH, A.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGE, M. J. Minor alkaloids from *Cassia carnaval*. **Anales de la Asociación Química Argentina**, v. 60, p. 317-321, 1972.
- MARINI-BETTÒLLO, G. B. di. Il curaro. **Le Scienze**, n. 60, p. 36-47, ag. 1973.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51-54, 2002.

MARTINS, C. C.; CAMARA, A. T. R.; MACHADO, C. G.; NAKAGAWA, J. Métodos de superação de dormência de sementes de barbatimão. **Acta Science Agronomy**, v. 30, n. 3, p. 381-385, 2008.

McCALLEY, D. V. Analysis of the *Cinchona* alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p. 1-19, 2002.

McCONNELL, J. G.; BLUM, M. S. The chemistry of fire ant venom. **Tetrahedron**, v. 26, p. 1129-1139, 1971.

MENDEZ, A. M. Aliphatic alcohols, β -sitosterols and alkaloids in *Cassia jahnii*. **Phytochemistry**, v. 10, p. 2255-2256, 1971.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 2000. 115 p.

NAKANO, H. Plant growth inhibitors from mesquite (*Prosopis juliflora*). In: RAMAWAT, K. G. (Ed.). **Desert plants**. Berlin: Springer, 2010. Chap. 16, p. 341-352.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; FUJII, Y.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Structure-activity relationships of alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.). **Plant Growth Regulation**, v. 44, p. 207-210, 2004a.

NAKANO, H.; NAKAJIMA, E.; HIRADATE, S.; FUJII, Y.; YAMADA, K.; SHIGEMORI, H.; HASEGAWA, K. Growth inhibitory alkaloids from mesquite (*Prosopis juliflora* (Sw.) DC.) leaves. **Phytochemistry**, v. 65, p. 587-591, 2004b.

O'DONOVAN, D. G.; KEOGH, M. F. Biosynthesis of piperidine alkaloids. **Tetrahedron Letters**, n. 3, p. 265-267, 1968.

OTT-LONGONI, R.; VISWANATHAN, N.; HESSE, M. 222. Die constitution des alkaloids juliprosopin aus *Prosopis juliflora* A. Dc. **Helvetica Chimica Acta**, v. 63, n. 7, p. 2119-2129, 1980.

PAHL, A.; OETTING, J.; HOLZKAMP, J.; MEYER, H. H. Diastereoselective and convergent synthesis of both 11'-epimers of (-)-(2*R*,3*R*,6*S*)-carnavaline. **Tetrahedron**, v. 53, n. 21, p. 7255-7266, 1997.

PATERNE, M.; BROWN, E. Studies related to the total synthesis of alkaloids in the carpaine and cassine series. Part 8. Total syntheses of (\pm)-spicigerine, methyl (\pm)-spicigerinate, and (\pm)-spectaline. **Journal of Chemical Research (S)**, n. 9, p. 278-279, 1985.

PAVIA, D.; LAMPMAN, G.; KRIZ, G. **Introduction to spectroscopy**. 3rd ed. Mexico, DF: Thomson Learning, 2001. 577 p.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

RALL, G. J. H.; SMALBERGER, T. M.; WAAL, H. L. Dimeric piperidine alkaloid from *Azima tetracantha* Lam.: azimine, azcarpine and carpaine. **Tetrahedron Letters**, n. 36, p. 3465-3469, 1967.

RATLE, G.; MONSEUR, X.; DAS, B. C.; YASSI, J.; KHUONG-HUU, Q.; GOUTAREL, R. La prosopine et la prosopinine, alcaloïdes du *Prosopis africana* (Guill. et Perr.) Taub. (Note préliminaire). **Bulletin de la Société Chimique de France**, n. 9, p. 2945-2947, 1966.

RIBEIRO, J. E. L. da S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. da S.; BRITO, J. M. de; SOUZA, M. A. D. de; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. da C.; SILVA, C. F. da; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, 1999. 800 p.

RICE, W. Y.; COKE, J. L. Structure and configuration of alkaloids. II. Cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 31, p. 1010-1012, 1966.

ROBINSON, R. A theory of the mechanism of the phytochemical synthesis of certain alkaloids. **Journal of the Chemical Society**, v. 111, p. 876-899, 1917.

RODRIGUEZ, E. H. A.; AGUIAR, I. B.; SADER, R. Quebra de dormência de sementes de três espécies do gênero *Cassia*. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 12, p. 17-27, 1990.

ROMERO, J. R. **Fundamentos de estereoquímica dos compostos orgânicos**. Ribeirão Preto: Holos, 1998. 108 p.

SMALBERGER, T. M.; RALL, G. J. H.; WAAL, H. L. The structures and configuration of azimine and azcarpine. **Tetrahedron**, v. 24, p. 6417-6421, 1968.

SCHMIDT, J.; BOETTCHER, C.; KUHN, C.; KUTCHAN, T. M.; ZENK, M. H. Poppy alkaloid profiling by electrospray tandem mass spectrometry and electrospray FT-ICR mass spectrometry after [*ring*-¹³C₆]-tyramine feeding. **Phytochemistry**, v. 68, p. 189-202, 2007.

SERRANO, M. A. R.; PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; LOPES, M. N.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Acetylcholinesterase inhibitory pyridine alkaloids of the leaves of *Senna multijuga*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 482-484, 2010.

SERRANO, M. A. R. **Estudo da composição química das folhas de *Senna multijuga* (Leguminosae)**. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2003. 833 p.

SPITELLER-FRIEDMANN, M.; SPITELER, G. Anwendung der massenspektrometrie zur strukturaufklärung von alkaloiden, 5. Mitt¹: die struktur des carpins. **Monatshefte für Chemie**, v. 95, p. 1234-1241, 1964.

SRIPHONG, L.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S.; WETWITAYAKLUNG, P.; CHAICHANTIPYUTH, C. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Planta Medica**, v. 69, p. 1054-1056, 2003.

TEDESCO, S. B.; STEFANELLO, M. O.; SCHIFINO-WITTMANN, M. T.; BATTISTIN, A.; DALL'AGNOL, M. Superação de dormência em sementes de espécies de *Adesmia* DC. (Leguminosa). **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7, n. 2, p. 89-92, 2001.

TOUCHSTONE, J. C.; DOBBINS, M. F. Visualization procedures. In: _____. **Practice of thin layer chromatography**. New York: John Wiley, 1978. Cap. 7, p. 161-223.

VETTER, J. Poison hemlock (*Conium maculatum* L.). **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 1373-1382, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 915-926, 2005a.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S. B.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184-4190, 2005b.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; TOMAZELA, D.; EBERLING, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 5, p. 908-910, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C.; SILVA, D. H. S.; PIVATTO, M.; REZENDE, A.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; NAIR, M. G. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 2026-2028, 2007.

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cássia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.