



Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química – Araraquara

Luciene Ruiz Baccini

Dissertação de Mestrado

*Obtenção de derivados semissintéticos dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina
e avaliação do potencial antimalárico*

Araraquara

2013

LUCIENE RUIZ BACCINI

Obtenção de derivados semissintéticos dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina e avaliação do potencial antimalárico

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Célia Regina da Silva Garcia

Araraquara
2013

FICHA CATALOGRÁFICA

B117o Baccini, Luciene Ruiz
Obtenção de derivados semissintéticos dos alcaloides
(-) - cassina e (-) - espectralina e avaliação do potencial
antimalárico / Luciene Ruiz Baccini. –
Araraquara : [s.n], 2013
164 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
Coorientador: Célia Regina da Silva Garcia

1. Química orgânica. 2. Alcaloides piperidínicos.
3. Derivados semissintéticos. 4. Antimaláricos. I. Título.

LUCIENE RUIZ BACCINI

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

Araraquara, 26 de fevereiro de 2013.

BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Patrícia Sartorelli
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Diadema - SP



Drª Maria Cláudia Marx Young
Instituto de Botânica de São Paulo – USP, São Paulo - SP

DADOS CURRICULARES

1. Dados Pessoais

Nome: Luciene Ruiz Baccini

Nascimento: 09/10/1984, São Paulo-SP – Brasil

CPF: 332.253.318-21

2. Formação Acadêmica / Titulação

- 2013 Mestrado em Química.
Instituto de Química-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho –UNESP – Araraquara-SP, Brasil.
Título: Obtenção de derivados semissintéticos dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectalina e avaliação do potencial antimalárico.
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani.
Co-orientadora: Célia Regina da Silva Garcia
Bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, Brasil.
- 2010 Graduação em Química. Licenciatura.
Instituto de Química-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP – Araraquara-SP, Brasil.

3. Atuação profissional

- 2013 Escola Estadual Jardim Morumbi - Araraquara-SP
Professor PEB-II. Enquadramento funcional: Professor PEB-II
Disciplina específica: Química. Disciplina não específica: Física
- 2012-2012 Escola Estadual Profª Alzira Dias de Toledo Piza - Américo
Brasiliense-SP
Professor PEB-II. Enquadramento funcional: Professor PEB-II
Disciplina específica: Química. Disciplina não específica: Matemática
- 2008-2010 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP –
Araraquara-SP, Brasil.
Bolsista FAPESP. Enquadramento Funcional: Iniciação Científica.
Carga Horária: 30 horas por semana.
- 2006-2007 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP–
Araraquara-SP, Brasil.
Bolsista PROEX. Enquadramento Funcional: monitor.
Carga Horária: 20 horas por semana.

4. Produção Científica e Tecnológica

BACCINI, L. R.; SILVA, C. S.; MARUYAMA, J. A.; OLIVEIRA, L. A. A. De aluno a professor: decifrando dificuldades de aprendizagem e repensando o ensino. In: 30º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia - SP. **Caderno de Resumos**, 2007.

BACCINI, L. R.; BIZARI, M.; ROCHA, C. V.; ZANON, D. A. V.; RIBEIRO, F. L. Inserção da experimentação investigativa e contextual no ensino de Química. In: VIII EVENTO DE EDUCAÇÃO EM QUÍMICA -UNESP- Araraquara-SP, 2010.

BACCINI, L. R.; BOLZANI, V. S. Alcaloides piperidínicos isolados das flores de *Senna spectabilis* e derivados semissintéticos com atividade inibidora de acetilcolinesterase. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP- Araraquara-SP, 2010.

BACCINI, L. R.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S. Alcaloides piperidínicos isolados das flores de *Senna spectabilis* e derivados semi-sintéticos com atividade inibidora de acetilcolinesterase. In: XVIII JORNADAS DE JÓVENES INVESTIGADORES DE AUGM, Universidad Nacional Del Litoral - Santa Fé - Argentina. **Resumos da Asociación de Universidades Grupo Montevideo**, 2010.

PIVATTO, M.; BACCINI, L. R.; DANUELLO, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO-GAMBOA, I. ; BOLZANI, V. S. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos alcaloides homólogos (–)-cassina e (–)-espectralina isolados de *Senna spectabilis* e dos derivados semissintéticos (–)-3-O-acetil-cassina e (–)-3-O-acetil-espectralina. In: 34º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Florianópolis - SC. **Caderno de Resumos**, 2011.

PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; BACCINI, L. R.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Identificação de alcaloides piridínicos de *Senna multijuga* por CG-IE. In: 35º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP. **Caderno de Resumos**, 2012.

BACCINI, L. R.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; NAKABASHI, M.; BOLZANI, V. S.; GARCIA, C. R. S. Avaliação da atividade antimalárica de derivados semissintéticos dos alcaloides (–)-cassina e (–)-espectralina isolados de *Senna spectabilis*. In: 36º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia-SP. **Caderno de Resumos**, 2013 (em andamento).

4.1 Artigos completos publicados em periódicos

FRANCISCO, W. ; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O. ; BACCINI, L. R.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; BOLZANI, V.S. Pyridine alkaloids from *Senna multijuga* acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 408-413, 2012.

Dedico o meu trabalho a todos que direta ou indiretamente contribuíram
para a minha formação pessoal, profissional e, principalmente,
àqueles que duvidaram da minha capacidade intelectual.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha família pelo apoio e investimento na minha educação.

A todos os meus professores da educação básica (ensino fundamental e médio) e do ensino superior, pela contribuição na minha formação pessoal e profissional. Alguns serão exemplos para a vida toda, pois com respeito, ética, seriedade e profissionalismo foram capazes de indicar a direção correta.

Ao João Henrique, pelo companheirismo, pela dedicação, incentivo e amor.

Aos meus poucos e verdadeiros amigos, que pela estrada da vida, cruzaram meu caminho.

As professoras: Vanderlan da Silva Bolzani e Célia Regina da Silva Garcia, pela oportunidade de trabalho e, Maria Cláudia Marx Young e Patrícia Sartorelli, pela composição da banca examinadora e pelas contribuições enriquecedoras a este trabalho.

Ao Marcos Pivatto, pelas discussões científicas,

Aos membros do NuBBE (corpo docente e discente),

Ao Instituto de Química da UNESP – Araraquara-SP,

Ao Instituto de Biociências da USP – São Paulo-SP,

Ao Instituto de Química da UFSCAR – São Carlos-SP,

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto-SP,

e a CAPES, pela bolsa concedida.

De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando...
A certeza de que precisamos continuar...
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...
Portanto devemos:
Fazer da interrupção, um caminho novo
Da queda, um passo de dança
Do medo, uma escada
Do sonho, uma ponte
Da procura, um encontro.

Fernando Sabino

RESUMO

O projeto temático “*Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: diversidade química e prospecção de fármacos potenciais*” resultou no estudo químico de várias espécies de plantas e microorganismos, alguns de interesse farmacológico. Da espécie vegetal *Senna spectabilis* foram isolados vários alcaloides 3-piperidinóis-2,6-dissubstituídos, entre estes (–)-cassina e (–)-espectalina, duas substâncias homólogas de difícil separação, presente em grande quantidade nas flores desta planta, bastante utilizada como ornamental. Os alcaloides piperidínicos (–)-cassina e (–)-espectalina foram selecionados como material de partida para a obtenção de vários derivados semissintéticos, objetivando alguns estudos de Química Medicinal. Durante a pesquisa deste projeto de mestrado, (–)-cassina e (–)-espectalina foram submetidas a uma série de testes preliminares para avaliação da atividade antimalárica. Os ensaios moleculares foram feitos com a cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* transfectada com a Proteína de Fluorescência Verde (*Green Fluorescent Protein* - GFP), no Instituto de Biociências USP-SP, sob supervisão da Prof^a Dr^a Célia Regina da Silva Garcia, co-orientadora da presente pesquisa. Devido aos resultados positivos apresentados pelos alcaloides naturais, algumas modificações estruturais foram propostas para os compostos, objetivando potencializar a atividade antimalárica detectada nos produtos naturais. Sendo assim, foram planejadas várias esterificações no grupo hidroxílico do carbono na posição três do anel piperidínico destes alcaloides para a obtenção de uma série de derivados semissintéticos (ésteres) para posterior avaliação antimalárica: (–)-3-O-acetil-cassina, (–)-3-O-acetil-espectalina, (–)-3-O-pentanoil-cassina, (–)-3-O-pentanoil-espectalina, (–)-3-O-heptanoil-cassina, (–)-3-O-heptanoil-espectalina, (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina, (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina, (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina e (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectalina. Os compostos semissintéticos foram obtidos em bons rendimentos, caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear, Espectrometria de Massas, Infravermelho e submetidos ao ensaio antimalárico, resultando em ésteres potencialmente mais ativos que os produtos naturais, demonstrando que podem ser modelos potenciais para a obtenção de protótipos esquizotocidas.

Palavras-chave: *Senna spectabilis*, alcaloides piperidínicos, atividade antimalárica.

ABSTRACT

The project "Conservation and sustainable use of plant diversity in the Cerrado and Atlantic Forest: chemical diversity and prospecting for potential drugs" allowed the study of various plant and microorganisms species, several of these, of pharmacological interest. From *S. spectabilis* plant species were isolated various alkaloids 3-piperidinóis-2,6-disubstituted, being (–)-cassina and (–)-espectralina, two major homologous, of hard separation, which were chosen as raw material for the obtainment of several semi-synthetic derivatives, useful for further Medicinal Chemistry studies. During the research of this master's project, preliminary tests were carried out with (–)-cassina and (–)-espectralina for antimalarial activity. The molecular assays were performed with the 3D7 strain of *Plasmodium falciparum* transfected with Green Fluorescent Protein (GFP), at Institute of Biosciences University of São Paulo, under the supervision of Professor Dr. Regina Celia Garcia Silva, also a supervisor of this thesis. Due to the positive results for the natural alkaloids in this assay, aroused the interest for set several structural changes in these compounds, aiming to increase the antimalarial activity of the semi-synthetic ester derivatives. Thus, structural changes were made in the carbon hydroxyl group at C-3 of the piperidine ring of these alkaloids for obtaining a series of semisynthetic derivatives (esters): (–)-3-O-acetyl-cassina, (–)-3-O-acetyl-espectralina, (–)-3-O-pentanoyl-cassina, (–)-3-O-pentanoyl-espectralina, (–)-3-O-heptanoyl-cassina, (–)-3-O-heptanoyl-espectralina, (–)-3-O-(4-methyl-benzoyl)-cassina, (–)-3-O-(4-methyl-benzoyl)-espectralina, (–)-3-O-(3-bromo-benzoyl)-cassina, (–)-3-O-(3-bromo-benzoyl)-espectralina. The semi-synthetic compounds were characterized by a series of methods: nuclear magnetic resonance, mass spectrometry, infrared and the antimalarial activity was confirmed by the assays on *Plasmodium falciparum*.

Keywords: *Senna spectabilis*, piperidines alkaloids, antimalarial activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Senna spectabilis</i> : árvore, flores, frutos, sementes, casca e madeira.....	26
Figura 2 – Proposta mecanística para a formação de um anel piperidínico.....	27
Figura 3 – Alcaloides piperidínicos isolados de <i>Senna spectabilis</i> no NuBBE.....	29
Figura 4 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i>	30
Figura 5 – Alcaloides naturais e sintéticos utilizados no tratamento da malária.....	33
Figura 6 – Conformações possíveis para os alcaloides 1 e 5	40
Figura 7 – Preparação dos cloridratos de 1 e 5	41
Figura 8 – Perfil em CCD das reações do cloridrato da mistura de 1 e 5 com cloreto de ácido, sob aquecimento: a) 2 h; b) 4 h; c) 6 h de reação. (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :CH ₃ OH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador iodocloroplatinato).....	42
Figura 9 – Esterificação com cloretos de acila.....	43
Figura 10 – Esterificação com cloretos de benzoíla substituídos.....	43
Figura 11 – Estufa utilizada para incubação das cepas 3D7 de <i>P.falciparum</i>	47
Figura 12 – Representação esquemática de um esfregaço sanguíneo.....	48
Figura 13 – Esquema geral de uma placa de cultura em poliestireno (96 poços) para a realização de experimentos <i>in vitro</i>	49
Figura 14 – Fluxograma da partição do extrato etanólico das flores de <i>Senna spectabilis</i>	52
Figura 15 – CC1: CCD das frações obtidas por CC da fração diclorometano (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :CH ₃ OH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador iodocloroplatinato).....	53
Figura 16 – CC2: CCD das frações obtidas por CC de CC1 F ₂₁₋₃₃ (FE: sílica, FM: CHCl ₃ :CH ₃ OH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador iodocloroplatinato).....	54
Figura 17 – Cromatograma da fração CC2 F ₅₋₁₁ . Coluna analítica Phenomenex® Luna C18, 250 x 4,6 mm 5 µm; modo gradiente (35 min), 35-100% metanol - água dopada com ácido acético 0,1%, C = 1,5 mg.mL ⁻¹ , volume injeção = 15 µL, fluxo: 1 mL.min ⁻¹ e detector ELSD.....	55

Figura 18 – Cromatograma dos alcaloides 1 e 5 . Coluna analítica Phenomenex® Luna C ₁₈ 250 x 4,6 mm, 5 µm; modo gradiente (35 min), 35-100% metanol - água dopada com ácido acético 0,1%, C = 1,5 mg.mL ⁻¹ volume injeção = 15 µL, fluxo: 1 mL.min ⁻¹ e detector ELSD.....	56
Figura 19 – Curva de DSC para aferição do ponto de fusão de 1 e 5	57
Figura 20 – Espectro na região do IV dos alcaloides 1 e 5 (pastilha de KBr).....	58
Figura 21 – Espectro de RMN ¹ H da (–)-cassina (1) (500 MHz, CD ₃ OD).....	60
Figura 22 – Espectro de RMN ¹³ C de 1 (125 MHz, CD ₃ OD).....	60
Figura 23 – Espectro de RMN ¹ H da (–)-espectralina (5) (500 MHz, CD ₃ OD).....	61
Figura 24 – Espectro de RMN ¹³ C de 5 (125 MHz, CD ₃ OD).....	61
Figura 25 – Curva de DSC para aferição do ponto de fusão dos cloridratos de 1 e 5	62
Figura 26 – Espectro IV dos cloridratos de 1 e 5 (pastilha de KBr).....	62
Figura 27 – Espectro de RMN ¹³ C do cloridrato da (–)-cassina (125 MHz, CD ₃ OD).....	63
Figura 28 – Espectro de RMN ¹ H do cloridrato da (–)-cassina (300 MHz, CD ₃ OD).....	63
Figura 29 – Espectro de RMN ¹³ C do cloridrato da (–)-espectralina (125 MHz, CD ₃ OD).....	64
Figura 30 – Espectro de RMN ¹ H do cloridrato da (–)-espectralina (300 MHz, CD ₃ OD).....	64
Figura 31 – Proposta de mecanismo reacional para a partição líquido-líquido.....	66
Figura 32 – Caráter ácido-base dos derivados semissintéticos de 1 e 5	67
Figura 33 – Proposta mecanística para 9,10,29-32	68
Figura 34 – Proposta mecanística para 33-36	69
Figura 35 – Proposta mecanística com o uso de piridina (solvente e catalisador).....	70
Figura 36 – Proposta mecanística para a formação de éster e amida na mesma molécula.....	71
Figura 37 – Cromatograma da fase móvel: metanol-água dopada com ácido acético 0,1%.....	73
Figura 38 – Padrões: cloridrato (–)-cassina e cloridrato (–)-espectralina.....	74

Figura 39 – Cromatograma (–)-3-O-acetil-cassina (10).....	74
Figura 40 – Cromatograma (–)-3-O-acetil-espectalina (9).....	74
Figura 41 – Cromatograma (–)-3-O-pentanoil-cassina (29).....	75
Figura 42 – Cromatograma (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30).....	75
Figura 43 – Cromatograma (–)-3-O-heptanoil-cassina (31).....	75
Figura 44 – Cromatograma (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32).....	76
Figura 45 – Cromatograma (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (33).....	76
Figura 46 – Cromatograma (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina (34).....	76
Figura 47 – Cromatograma (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (35).....	77
Figura 48 – Cromatograma (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectalina (36).....	77
Figura 49 – Espectro IV de (–)-3-O-acetil-cassina (10) (pastilha de KBr).....	78
Figura 50 – Espectro IV de (–)-3-O-acetil-espectalina (9) (pastilha de KBr).....	78
Figura 51 – Espectro IV de (–)-3-O-pentanoil-cassina (29) (pastilha de KBr).....	79
Figura 52 – Espectro IV de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (pastilha de KBr).....	79
Figura 53 – Espectro IV de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (pastilha de KBr).....	80
Figura 54 – Espectro IV de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (pastilha de KBr).....	80
Figura 55 – Espectro IV de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (33) (pastilha de KBr).....	81
Figura 56 – Espectro IV de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (pastilha de KBr).....	81
Figura 57 – Espectro IV de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (35) (pastilha de KBr).....	82
Figura 58 – Espectro IV de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectalina (36) (pastilha de KBr).....	82
Figura 59 – ESI-EM alta resolução da (–)-cassina (1) protonada m/z 298,2748.....	86
Figura 60 – ESI-EM alta resolução da (–)-espectalina (5) protonada m/z 326,3056.....	86

- Figura 61** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-acetil-cassina (**10**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 340,2846 $[M + H]^+$, calculado para $C_{20}H_{38}NO_3^+$ com m/z 340,2846.....87
- Figura 62** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-acetil-espectalina (**9**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 368,3160 $[M + H]^+$, calculado para $C_{22}H_{42}NO_3^+$ com m/z 368,3159.....87
- Figura 63** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 382,3316 $[M + H]^+$, calculado para $C_{23}H_{44}NO_3$ 88
- Figura 64** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (**30**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 410,3629 $[M + H]^+$, calculado para $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.....88
- Figura 65** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 410,3642 $[M + H]^+$, calculado para $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.....88
- Figura 66** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (**32**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 438,3956 $[M + H]^+$, calculado para $C_{27}H_{52}NO_3^+$ com m/z 438,3942.....89
- Figura 67** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 416,3165 $[M + H]^+$, calculado para $C_{26}H_{42}NO_3^+$ com m/z 416,3159.....89
- Figura 68** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina (**34**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 444,3490 $[M + H]^+$, calculado para $C_{28}H_{46}NO_3^+$ com m/z 444,3472. Pode-se inferir que houve a formação de outro produto reacional **37**, observado em m/z 584,3732 $[M + Na]^+$, calculado para $C_{36}H_{51}NO_4Na^+$ com m/z 584,3818.....89
- Figura 69** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 480,2130 $[M+H]^+$, calculado para $C_{25}H_{39}BrNO_3^+$ com m/z 480,2108.....90
- Figura 70** – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectalina (**36**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 508,2441 $[M + H]^+$, calculado para $C_{27}H_{43}BrNO_3^+$ com m/z 508,2421.....90
- Figura 71** – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-acetil-cassina (**10**), caracterizado por m/z 280,2705, referente a molécula protonada $C_{20}H_{38}NO_3^+$ com m/z 340,2846.....92
- Figura 72** – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-acetil-espectalina (**9**), caracterizado por m/z 308,3004, referente a molécula protonada $C_{22}H_{42}NO_3^+$ com m/z 368,3159.....92

Figura 73 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-pentanoil-cassina (29), caracterizado por m/z 280,2698 , referente a molécula protonada $C_{23}H_{44}NO_3^+$ com m/z 382,3316.....	92
Figura 74 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (30), caracterizado por m/z 308,3009 , referente a molécula protonada $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.....	93
Figura 75 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31), caracterizado por m/z 280,2677 , referente a molécula protonada $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.....	93
Figura 76 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (32), caracterizado por m/z 308,2979 , referente a molécula protonada $C_{27}H_{52}NO_3^+$ com m/z 438,3942.....	93
Figura 77 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (33), caracterizado por m/z 280,2679 , referente a molécula protonada $C_{26}H_{42}NO_3^+$ com m/z 416,3159.....	94
Figura 78 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (34), caracterizado por m/z 308,2985 , referente a molécula protonada $C_{28}H_{46}NO_3^+$ com m/z 444,3472.....	94
Figura 79 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (35), caracterizado por m/z 208,2678 , referente a molécula protonada $C_{25}H_{39}BrNO_3^+$ com m/z 480,2108.....	94
Figura 80 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (36), caracterizado por m/z 308,2987 , referente a molécula protonada $C_{27}H_{43}BrNO_3^+$ com m/z 508.2421.....	95
Figura 81 – Proposta de fragmentação para 9, 10, 29-36	96
Figura 82 – Atribuição de correlações no gHMBC para 9 e 10	102
Figura 83 – Atribuição de correlações no gHMBC para 29-32	103
Figura 84 – Atribuição de correlações no gHMBC para 33-36	103
Figura 85 – Fases intraeritrocíticas de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i> , monitorados por um período de 48h (ciclo assexuado completo) em microscópio óptico.....	104
Figura 86 – Cloroquina (Padrão) $IC_{50} = 0,30 \mu M$	105
Figura 87 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-acetil-cassina (10) $IC_{50} = 0,38 \mu M$ e (–)-3-O-acetil-espectralina (9) $IC_{50} = 8,89 \mu M$	105
Figura 88 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-pentanoil-cassina (29) $IC_{50} = 4,03 \mu M$ e (–)-3-O-pentanoil-espectralina (30) $IC_{50} = 2,35 \mu M$	106

Figura 89 – Ensaio antimalárico: (–)-3-*O*-heptanoil-cassina (**31**) $IC_{50} = 3,68 \mu M$ e (–)-3-*O*-heptanoil-espectalina (**32**) $IC_{50} = 3,16 \mu M$ 106

Figura 90 – Ensaio antimalárico: (–)-3-*O*-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) $IC_{50} = 3,00 \mu M$ e (–)-3-*O*-(4-metil-benzoil)-espectalina (**34**) $IC_{50} = 0,12 \mu M$, ambos em mistura 106

Figura 91 – Ensaio antimalárico: (–)-3-*O*-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**) $IC_{50} = 3,78 \mu M$ e (–)-3-*O*-(3-bromo-benzoil)-espectalina (**36**) $IC_{50} = 0,16 \mu M$, ambos em mistura. 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Reagentes comerciais para as reações de semissíntese.....	37
Tabela 2 – Dados das reações de esterificação.....	43
Tabela 3 – Valor calculado para a concentração de cada poço: 1-12.....	49
Tabela 4 – Frações da partição líquido-líquido do extrato etanólico e seus rendimentos massa/massa.....	53
Tabela 5 – Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de 1 e 5 em CD_3OD	59
Tabela 6 – Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do cloridrato (-)-cassina e cloridrato (-)-espectralina (300 MHz, CD_3OD).....	65
Tabela 7 – Dados reacionais e rendimentos.....	67
Tabela 8 – Características físico-químicas dos compostos 9,10,29-36	72
Tabela 9 – Principais bandas de absorção no IV dos compostos 9,10,29-36	83
Tabela 10 – Resultados obtidos com a Espectrometria de Massas de Alta Resolução.....	91
Tabela 11 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 9 (300 MHz, CDCl_3) e 10 (500 MHz, CDCl_3).....	97
Tabela 12 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de 29 (300 MHz, CDCl_3) e 30 (500 MHz, CDCl_3).....	98
Tabela 13 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de 31 e 32	99
Tabela 14 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de 33 e 34	100
Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de 35 e 36	101
Tabela 16 – Valores de IC_{50} para os compostos 9,10,29-36	107

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A

APÊNDICE A1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-acetil-cassina (10) (500 MHz, CDCl_3).....	114
APÊNDICE A2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-acetil-cassina (10) (500 MHz, CDCl_3).....	115

APÊNDICE B

APÊNDICE B1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-acetil-espectalina (9) (300 MHz, CDCl_3).....	116
APÊNDICE B2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-acetil-espectalina (9) (300 MHz, CDCl_3).....	117

APÊNDICE C

APÊNDICE C1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-pentanoil-cassina (29) (300 MHz, CDCl_3).....	118
APÊNDICE C2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-pentanoil-cassina (29) (300 MHz, CDCl_3).....	119

APÊNDICE D

APÊNDICE D1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (500 MHz, CDCl_3).....	120
APÊNDICE D2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (500 MHz, CDCl_3).....	121
APÊNDICE D3 – Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (500 MHz, CDCl_3).....	122
APÊNDICE D4 – Ampliação Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (δ 15-70 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	123
APÊNDICE D5 – Ampliação Mapa de contorno $g\text{HMBC}$ de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (δ 170-215 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	124
APÊNDICE D6 – Mapa de contorno $g\text{COSY}$ de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (500 MHz, CDCl_3).....	125
APÊNDICE D7 – Ampliação Mapa de contorno $g\text{COSY}$ de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (δ 0,5-5,5 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	126
APÊNDICE D8 – Mapa de contorno $g\text{HMQC}$ de (–)-3-O-pentanoil-espectalina (30) (500 MHz, CDCl_3).....	127

APÊNDICE E

APÊNDICE E1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (500 MHz, CDCl_3).....	128
APÊNDICE E2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (500 MHz, CDCl_3).....	129
APÊNDICE E3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (500 MHz, CDCl_3).....	130
APÊNDICE E4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (δ 170-220 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	131
APÊNDICE E5 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (δ 10- 40 ppm ; 500 MHz, CDCl_3).....	132
APÊNDICE E6 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (δ 42-76 ppm ; 500 MHz, CDCl_3).....	133
APÊNDICE E7 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-cassina (20) (500 MHz, CDCl_3).....	134
APÊNDICE E8 – Ampliação Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (δ 0-6,5 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	135
APÊNDICE E9 – Mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (500 MHz, CDCl_3).....	136
APÊNDICE E10 – Ampliação mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (31) (δ 10-70 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	137

APÊNDICE F

APÊNDICE F1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (500 MHz, CDCl_3).....	138
APÊNDICE F2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (500 MHz, CDCl_3).....	139
APÊNDICE F3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (500 MHz, CDCl_3).....	140
APÊNDICE F4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (δ 170 -215 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	141
APÊNDICE F5 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (δ 10 -75 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	142
APÊNDICE F6 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (500 MHz, CDCl_3).....	143
APÊNDICE F7 – Ampliação Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (32) (δ 0,5-6 ppm; 500 MHz, CDCl_3).....	144

APÊNDICE F8 – Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de (–)-3- <i>O</i> -heptanoil-espectalina (32) (500 MHz, CDCl ₃).....	145
--	-----

APÊNDICE F9 – Ampliação mapa de contorno <i>g</i> HMQC de (–)-3- <i>O</i> -heptanoil-espectalina (32) (δ 13-77 ppm; 500 MHz, CDCl ₃).....	146
---	-----

APÊNDICE G

APÊNDICE G1 – Espectro de RMN ¹³ C de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (500 MHz, CDCl ₃).....	147
---	-----

APÊNDICE G2 – Espectro de RMN ¹ H de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (500 MHz, CDCl ₃).....	148
--	-----

APÊNDICE G3 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (500 MHz, CDCl ₃).....	149
---	-----

APÊNDICE G4 – Ampliação Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (δ 10-70 ppm; 500 MHz, CDCl ₃).....	150
--	-----

APÊNDICE G5 – Ampliação Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (δ 120-220 ppm; 500 MHz, CDCl ₃).....	151
---	-----

APÊNDICE G6 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (500 MHz,CDCl ₃).....	152
---	-----

APÊNDICE G7 – Ampliação Mapa de contorno <i>g</i> COSY de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-cassina (33) (δ 2,5-8,5 ppm; 500 MHz, CDCl ₃).....	153
---	-----

APÊNDICE H

APÊNDICE H1 – Espectro de RMN ¹³ C de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (500 MHz, CDCl ₃).....	154
---	-----

APÊNDICE H2 – Espectro de RMN ¹ H de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (500 MHz, CDCl ₃).....	155
--	-----

APÊNDICE H3 – Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (500 MHz, CDCl ₃).....	156
---	-----

APÊNDICE H4 – Ampliação Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (δ 5-75 ppm; 500 MHz, CDCl ₃).....	157
--	-----

APÊNDICE H5 – Ampliação Mapa de contorno <i>g</i> HMBC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (δ 120-220 ppm; 500 MHz, CDCl ₃).....	158
---	-----

APÊNDICE H6 – Mapa de contorno <i>g</i> COSY de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (500 MHz, CDCl ₃).....	159
--	-----

APÊNDICE H7 – Mapa de contorno <i>g</i> HMQC de (–)-3- <i>O</i> -(4-metil-benzoil)-espectalina (34) (500 MHz, CDCl ₃).....	160
--	-----

APÊNDICE I

APÊNDICE I1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (35) (300 MHz, CDCl_3).....	161
---	-----

APÊNDICE I2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (35) (300 MHz, CDCl_3).....	162
--	-----

APÊNDICE J

APÊNDICE J1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (36) (600 MHz, CDCl_3).....	163
--	-----

APÊNDICE J2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (36) (600 MHz, CDCl_3).....	164
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-DMAP	4-Dimetilaminopiridina
ACTs	<i>Artemisinin Combinations Therapies</i>
BzCl	Cloretos de benzoíla
CAD	Detector de Aerossol Carregado
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CH ₃ OH	Metanol
CHCl ₃	Clorofórmio
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DIC	Dissociação Induzida por Colisão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
E2	Eliminação 2
ELSD	Detector com Espalhamento de Luz
EM	Espectrometria de Massas
ESI	Ionização por <i>Eletrospray</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
HCl _(g)	Cloreto de hidrogênio
HCl _(l)	Ácido clorídrico
IC ₅₀	Concentração Inibitória Mínima de 50 %
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de potássio
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
PBS	Solução Salina (fosfatos) tamponada
PF	Ponto de fusão
RBC	<i>Red Cell Blood</i>
RBCi	<i>Infected Red Cell Blood</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
ROCl	Cloretos de acetila
t-Boc	t-butiloxicarbonil
TFA Na	Ácido trifluoracético sodiado
TMS	Trimetilsilano
TOF	<i>Time of Fly</i>
<i>t_R</i>	Tempo de Retenção
UHPL	Cromatografia Líquida de Ultra Alta Eficiência
UV	Ultravioleta
YOYO-1	Corante de cianina assimétrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Considerações gerais sobre <i>Senna spectabilis</i>	25
1.2 Alcaloides piperidínicos isolados no NuBBE.....	26
1.3 A malária e a quimioterapia antimalárica.....	29
2 OBJETIVOS.....	34
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.1 Instrumentação.....	35
3.2 Materiais.....	36
3.2.1 Solventes e Soluções.....	36
3.2.2 Reagentes.....	37
3.2.3 Cromatografia.....	37
3.2.4 Revelador.....	38
3.2.5 Ensaio antimalárico.....	38
3.3 Preparo do material vegetal, partição líquido-líquido e procedimento cromatográfico.....	39
3.4 Síntese dos derivados (–)-cassina (1) e (–)-espectralina (5).....	39
3.4.1 Reação de esterificação.....	41
3.5 Preparo das amostras para análise e caracterização.....	44
3.5.1 Cromatografia Líquida.....	44
3.5.2 Infravermelho (IV).....	44
3.5.3 Espectrometria de Massas (EM).....	45
3.5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	45
4. Ensaio Antimalárico.....	46
4.1 Procedimento experimental	46
4.1.1 Cultura <i>in vitro</i> de <i>Plasmodium falciparum</i>	46
4.1.2 Sincronização da cultura.....	47
4.1.3 Preparo das placas de diluição e de cultura.....	48
4.1.4 Fixação.....	50
4.1.5 Marcação.....	50
4.1.6 Análise por Citometria de Fluxo (FACS).....	51
4.1.7 Análise Estatística.....	52

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Caracterização dos Produtos reacionais	72
5.1.1 Análise dos produtos por medição do Ponto de Fusão (PF)	72
5.1.2 Análise dos produtos por Cromatografia Líquida	72
5.1.3 Análise dos produtos por Espectroscopia Vibracional de Absorção na região do Infravermelho (IV)	77
5.1.4 Análise dos produtos por EM e fragmentações	85
5.1.5 Elucidação Estrutural por RMN	96
5.1.6 Análise da atividade antimalárica	104
6 CONCLUSÃO	108
7 PERSPECTIVAS	109
REFERÊNCIAS	110
APÊNDICES	114

1 INTRODUÇÃO

A composição química da flora brasileira por ser ainda pouco explorada pode apresentar um conjunto valioso de estruturas moleculares inéditas, úteis para o planejamento de substâncias farmacologicamente ativas. Dentre os inúmeros metabólitos secundários, muitos podem ser utilizados na preparação de derivados semissintéticos ou mesmo servirem de inspiração para a síntese de novas moléculas, objetivando a potencialização das propriedades farmacológicas e o desenvolvimento de novos fármacos (BRAZ FILHO, 2010).

O Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) durante os 15 anos de sua criação vem investindo na busca por metabólitos secundários bioativos que possam ser utilizados como modelos para posterior estudo como protótipos de fármacos. Neste projeto priorizou-se o planejamento de vários ésteres estruturalmente derivados dos alcaloides piperidínicos (–)-cassina e (–)-espectalina, encontrados com relativa abundância nas flores de *Senna spectabilis* (sin. *Cassia spectabilis*) (PIVATTO et al., 2005; VIEGAS JUNIOR et al., 2004; VIEGAS JUNIOR et al., 2005), visando a obtenção de substâncias antimalárica.

1.1 Considerações gerais sobre *Senna spectabilis*

No Brasil ocorrem 200 gêneros e 1500 espécies da família Fabaceae, que estão distribuídas na maioria dos ecossistemas, sendo relatada como a família botânica mais bem representada na caatinga, com 293 espécies, constituindo aproximadamente um terço de todos os vegetais deste bioma. O gênero *Senna*, juntamente com o gênero *Cassia*, são fontes importantes de substâncias com relativa diversidade estrutural na família Fabaceae (SILVA et al., 2010).

Senna spectabilis (Figura 1) 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. É decídua, heliófita e xerófita, 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. Pode atingir de 6-9 m

de altura, com tronco de 30-40 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas pinadas, tendo de 10-20 pares de folíolos de 2-4 cm de comprimento (LORENZI, 1998).

Figura 1 – *Senna spectabilis*: árvore, flores, frutos, sementes, casca e madeira.



Fonte: (LORENZI, 1998).

1.2 Alcaloides piperidínicos isolados no NuBBE

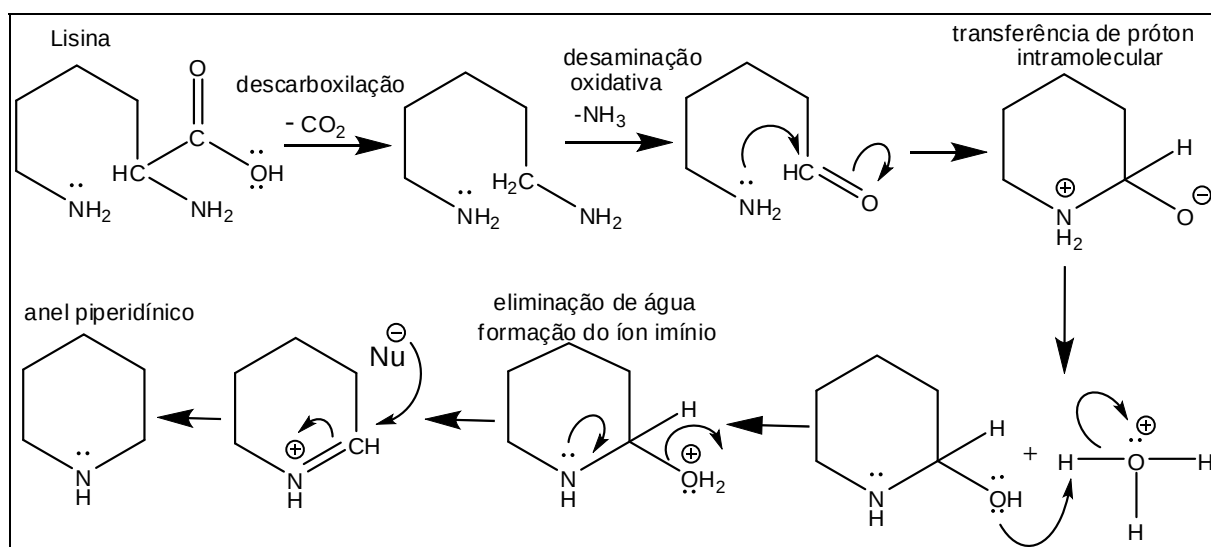
Alcaloide pode ser definido, segundo Pierre J. Pelletier, como um composto orgânico, cíclico, contendo um átomo de nitrogênio num estado de oxidação negativo, cuja distribuição esta limitada aos organismos vivos. Os alcaloides apresentam diversas funções nos vegetais, entre elas: reserva de nitrogênio, proteção contra radiação UV, proteção contra herbívoros e microorganismos patogênicos, atua como regulador de crescimento, no metabolismo interno e na reprodução. Os alcaloides são substâncias conhecidas pelas várias propriedades farmacológicas como estimulante e alucinógeno. Algumas são bastante tóxicas e muitas são utilizadas como medicamento, especialmente pela ação no SNC (RUBIRALTA, 1991).

Alcaloides são biossintetizados a partir de aminoácidos, como os alcaloides fenetilamínicos (derivados da fenilalanina), os alcaloides isoquinolínicos (derivados da tirosina), os alcaloides indólicos e quinolínicos (derivados do triptofano), os alcaloides pirrolidínicos (derivados da ornitina) e os alcaloides piperidínicos

(derivados da lisina). Alguns têm como precursor o ácido nicotínico, como por exemplo, os alcaloides piridínicos (DEWICK, 2002). Podem ser classificados como alcaloides verdadeiros: possui o átomo de nitrogênio no anel heterocíclico, são derivados de aminoácidos e classificados de acordo com o sistema anelar de origem, como descrito anteriormente; protoalcaloides: o átomo de nitrogênio não pertence ao sistema heterocíclico e são derivados de aminoácidos e pseudoalcaloides: compostos nitrogenados contendo ou não anéis heterocíclicos e não derivados de aminoácidos.

Os alcaloides piperidínicos, foco deste estudo, podem ser obtidos biogeneticamente a partir do aminoácido lisina. Uma proposta para a formação desta classe, fundamenta-se na descarboxilação inicial da lisina, seguida de uma reação de desaminação oxidativa, pela eliminação de uma molécula de amônia. Várias etapas reacionais estão envolvidas a partir do intermediário formado, como a adição nucleofílica da amina primária formada à carbonila do aldeído, formando o anel de seis membros, e a transferência intramolecular de um próton do nitrogênio para o oxigênio, formando um amino álcool. A protonação do oxigênio por um catalisador ácido converte a hidroxila em um bom grupo de saída, perdendo uma molécula de água e formando o íon imínio (Base de Schiff). Este pode sofrer uma adição nucleofílica (Reação de Mannich) formando o anel piperidínico ($C_5H_{11}N$) (Figura 2) (CLAYDEN, 2001).

Figura 2 – Proposta mecanística para a formação do hexa anel dos alcaloides piperidínicos.

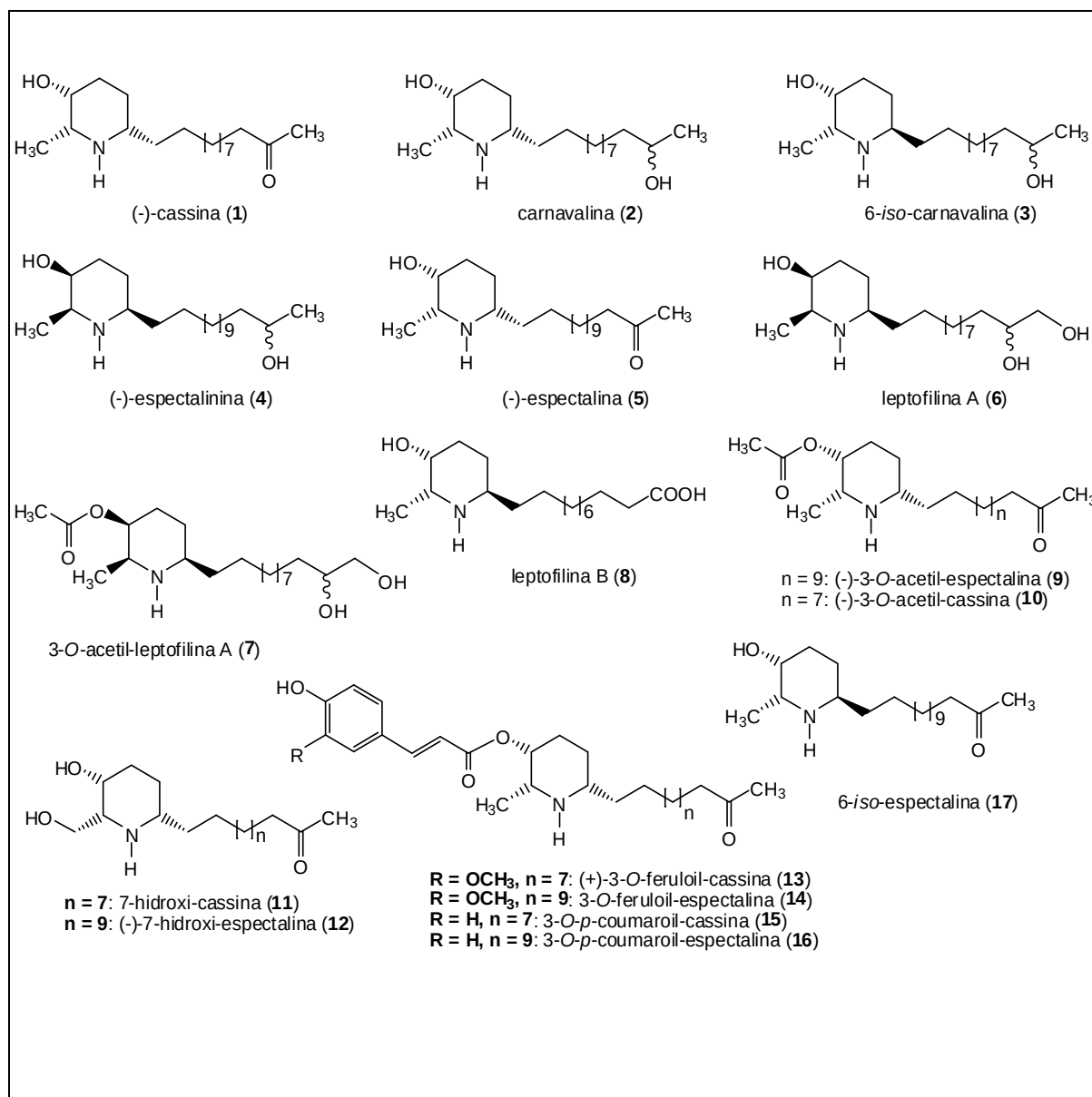


Fonte: Elaborada pelo autor.

Em reações bioquímicas, as enzimas geralmente utilizam um grupo amino para reagir com aldeídos e cetonas e formar um intermediário, o íon imínio, um precursor empregado em muitas rotas metabólicas, como na biossíntese de alcaloides (RUBIRALTA,1991). Até o momento poucos estudos existem na literatura sobre a biossíntese dos alcaloides 3-piperidinóis-2,6-dissubstituídos, raros em plantas, os quais podem ser encontrados nas espécies vegetais do gênero *Senna* e *Cassia*, estudadas pela equipe de trabalho do NuBBE.

Dentre as pesquisas realizadas, destacam-se os estudos pioneiros de Bolzani (1995), que isolou uma série de alcaloides piperidínicos (**2-8**) (Figura 3), fracionando os extratos ativos das folhas de uma espécie citada como *Cassia leptophylla*, anos depois identificada como *C. spectabilis* sin. *S. spectabilis*. Em seguida, Viegas Junior et al. (2004), estudando as flores de *C. spectabilis* isolou três novos alcaloides (**9**, **12** e **17**), além do derivado **5** já isolado anteriormente (Figura 3). Pivatto et al. (2005) em estudo realizado com os frutos de *S. spectabilis*, utilizando a espectrometria de massas *tandem* com ionização por eletrospray, identificou a presença de séries homólogas de novos alcaloides piperidínicos (**1**, **2**, **4**, **5**, **9-17**) (Figura 3). Entre as substâncias identificadas está o alcaloide **1**, primeiro metabólito isolado das folhas e galhos de *Cassia excelsa* Shrad. (sin. *C. spectabilis* e *S. spectabilis*) (HIGHET, 1964) e seu homólogo **5** (Figura 3). Viegas Junior et al. (2007) isolou os alcaloides **5**, **9** e **13** dos frutos verdes de *C. spectabilis*. Recentemente, os alcaloides **9** e **10** estão sendo submetidos aos estudos de fase pré-clínica pela APSEN. O objetivo é viabilizar algum derivado que possa resultar num protótipo de fármaco que atue no SNC como inibidor de acetilcolinesterase, com citotoxicidade baixa/moderada (VIEGAS JUNIOR et al., 2005a; VIEGAS JUNIOR et al., 2005b; U.S. Pat.Appl. 20080076799).

Figura 3 – Alcaloides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis* no NuBBE.



Fonte: (PIVATTO, 2010).

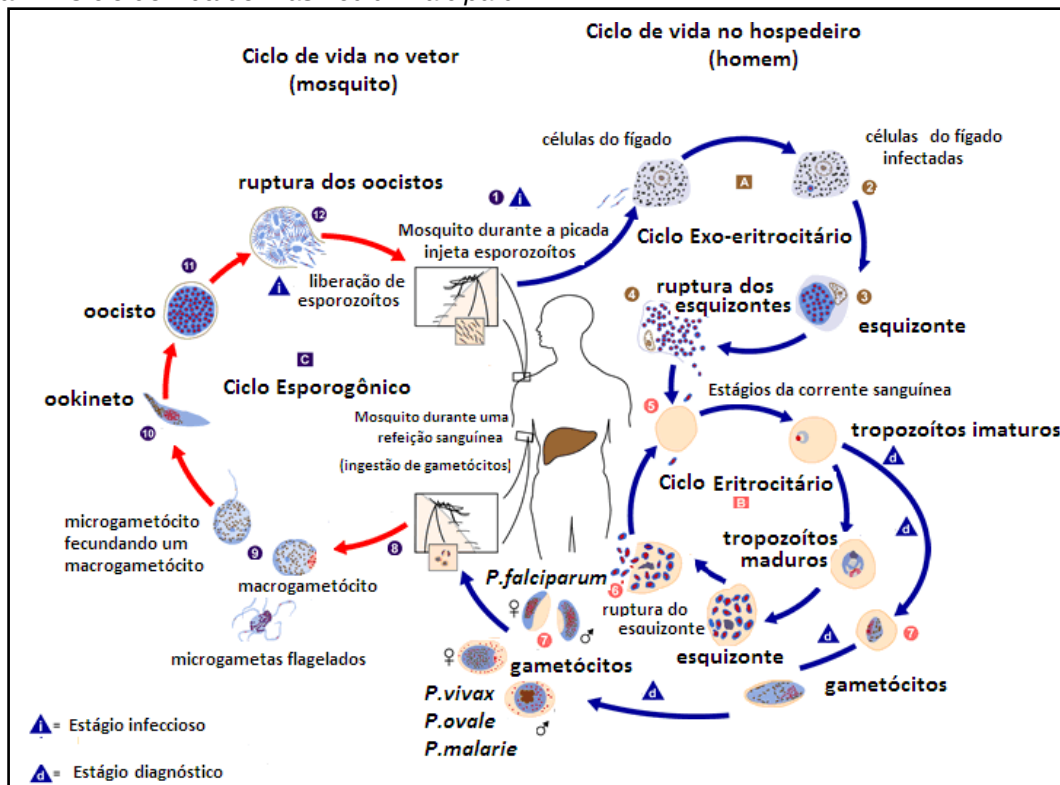
1.3 A malária e a quimioterapia antimalárica

A identificação de compostos antimaláricos é importante, tendo em vista que a malária é uma das doenças negligenciadas que afeta mais de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo a causa de cerca de 2,5 milhões de mortes anualmente, na maioria crianças. Esta doença concentra-se principalmente nos países em desenvolvimento da América Latina, grandes áreas da Ásia Meridional, Oceania e países subdesenvolvidos como a África (FRANÇA et al., 2008).

A malária é causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, transmitidos ao homem por fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* infectadas. Dentre aproximadamente cem espécies destes protozoários, apenas quatro são responsáveis pela infecção de seres humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, sendo o primeiro, o causador da forma mais grave da doença. Esta apresenta como sintomas: febre, dores no corpo, anemia, icterícia, inchaço do fígado e do baço (WINZELER, 2008).

O protozoário causador da malária apresenta um ciclo de vida complexo (Figura 4), dividido entre o inseto vetor (fase sexuada ou esporogônica) e o hospedeiro humano (fase assexuada).

Figura 4 – Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*.



Fonte: (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010) (Modificada).

A reprodução sexuada (esporogônica) do parasita da malária ocorre no estômago do mosquito, após a diferenciação dos gametócitos em gametas e a sua fusão, com formação do zigoto. Este se transforma em uma forma móvel (ocineto) que migra até a parede do intestino médio do inseto, formando o oocisto, no interior do qual se desenvolverão os esporozoítos. O tempo requerido para que se complete o ciclo esporogônico nos insetos varia com a espécie de *Plasmodium* e com a temperatura, situando-se geralmente em torno de 10 a 12 dias. Os esporozoítos

produzidos nos oocistos são liberados na hemolinfa do inseto e migram até as glândulas salivares, de onde são transferidos para o sangue do hospedeiro humano durante o repasto sanguíneo.

O ciclo assexuado do *Plasmodium falciparum*, denominado esquizogônico, inicia-se após a picada do anofelino, com a inoculação de esporozoítos infectantes. A seguir, os esporozoítos circulam na corrente sanguínea durante alguns minutos e rapidamente penetram nas células do fígado (hepatócitos), dando início ao ciclo pré-eritrocítico ou esquizogonia tecidual. Ao final do ciclo tecidual, os esquizontes rompem o hepatócito, liberando milhares de merozoítos na corrente sanguínea. Os merozoítos irão invadir as hemácias, dando início ao segundo ciclo de reprodução assexuada dos *P.falciparum*: o ciclo sanguíneo ou eritrocítico, invadindo hemácias em qualquer fase evolutiva. Durante um período de aproximadamente 48 h, o parasita se desenvolve no interior da hemácia até provocar sua ruptura, liberando novos merozoítos que irão invadir novas hemácias. Inicialmente, no ciclo sanguíneo, o parasito sofre uma série de transformações morfológicas – sem divisão celular – até chegar a fase de esquizonte, quando se divide e origina novos merozoítos que serão lançados na corrente sanguínea, após a ruptura do eritrócito. Assim, no exame microscópico do sangue pode-se observar variada morfologia do parasita: anéis, trofozoítos jovens e maduros, formas irregulares, esquizontes jovens e maduros. Após um período de replicação assexuada, alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos machos e fêmeas, que amadurecem sem divisão celular e tornam-se infectantes aos mosquitos. A função destes gametócitos é reprodutiva, isto é, garantir a perpetuação da espécie. Eles podem ser de dois tipos: os microgametócitos (masculinos) e os macrogametócitos (femininos) (BRASIL, 2009).

Os antimaláricos naturais, quinina (18) e artemisinina (24) são exemplos marcantes do enorme potencial dos produtos naturais como fonte de fármacos ou de matéria-prima para a produção de derivados semissintéticos ativos no combate a malária (BRAZ FILHO, 2010). Até meados do século passado, a quinina, um alcaloide quinolínico isolado das cascas de *Chinchona officinallis*, foi utilizado como quimioterápico no combate a malária. Isolada por Pierre J. Pelletier e Joseph Caventou, em 1820, teve sua estrutura confirmada por síntese total apenas em 1944, por Woodward (Prêmio Nobel de Química em 1965) e Doering. Este metabólito pode ser considerado o responsável pelo desenvolvimento dos

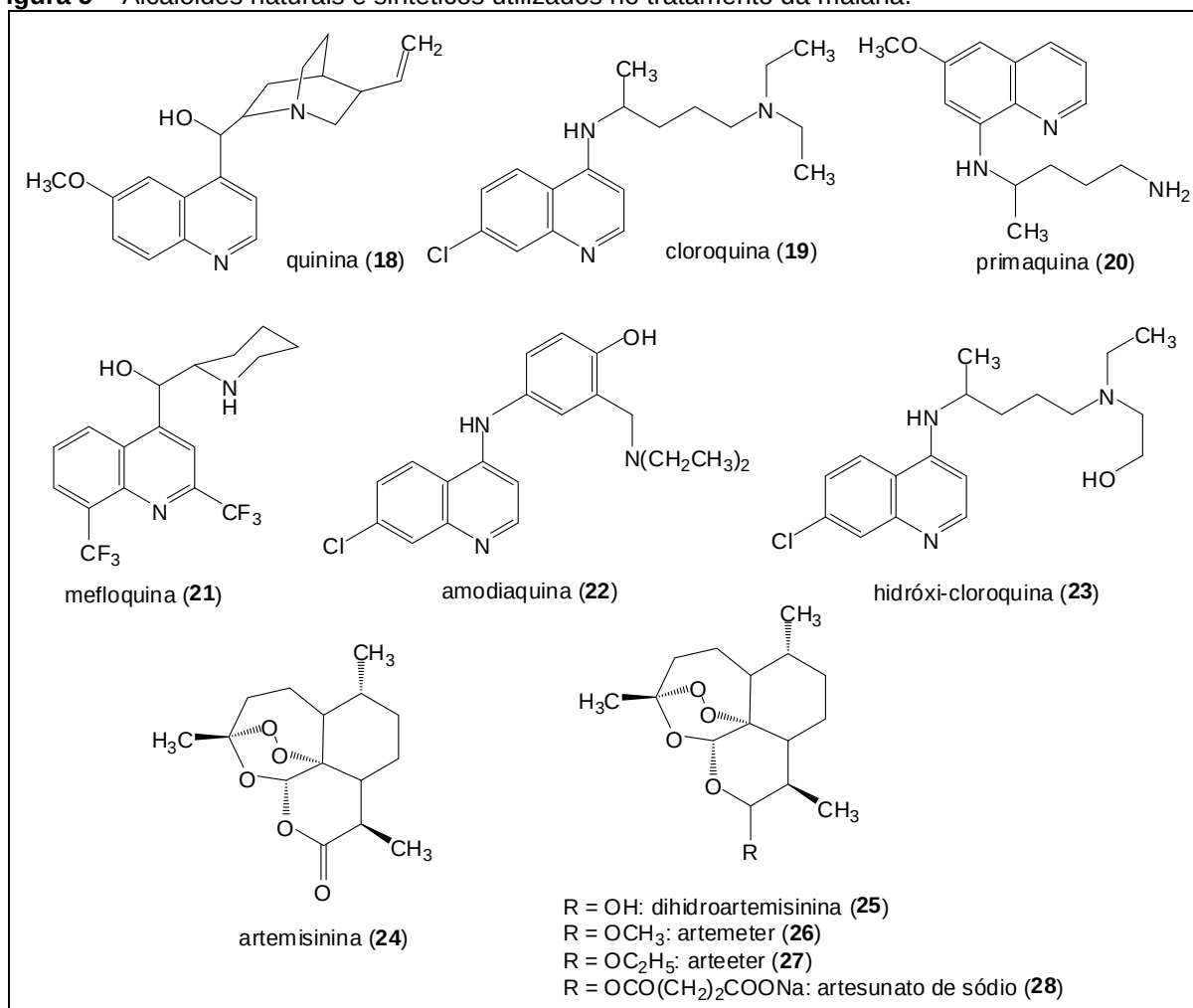
antimaláricos sintéticos do grupo 4- e 8-aminoquinolinas, de que fazem parte a cloroquina (**19**) e a primaquina (**20**) (Figura 5) (BARREIRO, 1990).

Outros antimaláricos como a mefloquina (**21**), amodiaquina (**22**) e a hidroxicloroquina (**23**) (Figura 5) têm sido usados no combate ao *P. falciparum* resistente a cloroquina (**19**). Entretanto, o composto **21** apresenta severos efeitos colaterais: tonturas, distúrbios psicológicos e gastrointestinais, não sendo recomendada para o tratamento de pacientes com histórico de epilepsia ou problemas psiquiátricos. Já o composto **22**, é mais tóxico que o **23** (FRANÇA, 2008).

A artemisinina (**24**) (Figura 5), uma lactona sesquiterpênica com uma função endoperóxido, extraída de uma planta medicinal chinesa *Artemisia annua*, é um potente antimalárico. O uso de **24**, combinado com outros antimaláricos que apresentam mecanismo de ação diferente, foi recomendado pela Organização Mundial da Saúde, a fim de evitar que os plasmódios causadores da doença desenvolvam resistência aos fármacos administrados separadamente. Esse método terapêutico ficou conhecido como ACTs - *Artemisinin Combinations Therapies* (WHO, 2010). A partir da artemisinina, foram sintetizados vários análogos com propriedades farmacocinéticas diversificadas, como a dihidroartemisinina (**25**), artemeter (**26**), arteeter (**27**) e o artesunato de sódio (**28**) (Figura 5). Estas substâncias são ativas contra cepas de *Plasmodium* resistentes a todos os outros fármacos tendo aplicação crescente no tratamento de malária *falciparum* aguda, sobretudo no sudeste asiático (FRANÇA, 2008). Porém há relatos da ocorrência de resistência em áreas localizadas na fronteira entre o Camboja e a Tailândia (WHO, 2010).

Vários estudos mostram que a ponte de endoperóxido da artemisinina e de seus análogos pode ser clivada por uma reação de redução com o íon ferroso (Fe^{2+}) presente no grupo heme da hemoglobina ou de origem exógena. Esta clivagem forma um ou mais radicais livres que podem alquilar ou modificar covalentemente proteínas dos parasitas, conferindo a atividade antimalárica (BRAZ FILHO, 2010).

Figura 5 – Alcaloides naturais e sintéticos utilizados no tratamento da malária.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Um dos problemas relacionados à enfermidade malárica é que muitas cepas do protozoário causador da doença têm se tornado resistente aos medicamentos atuais, além da ocorrência de reinfecção, fenômeno muito comum em regiões endêmicas (BRASIL, 2009). O *Plasmodium* infecta tanto células do fígado quanto do sangue, o que dificulta a ação dos fármacos, além disso, também apresenta capacidade de mutação, o que pode levar à resistência a quimioterapia disponível atualmente, baseada nas ACTs (BRASIL, 2010; SANCHEZ, 2007). É necessário mencionar que fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes contra outras. Estas características tem impedido o desenvolvimento de vacinas eficientes contra a malária (SOARES, 1998).

Recentemente, com a publicação do genoma do *P. falciparum*, avanços no sentido de entender o ciclo completo do protozoário no sistema biológico, pode

possibilitar a descoberta de novas proteínas específicas, com funções exclusivas no parasita, sendo potenciais alvos para a descoberta de novos quimioterápicos mais seletivos e eficientes (GARCIA, 2008). A resistência de alguns gêneros de *Plasmodium* aos quimioterápicos utilizados no combate a malária e os desafios da farmacogenômica fazem dos produtos naturais uma fonte alternativa na busca por novos fármacos antimaláricos. (FRANÇA, 2008; WINZELER, 2008).

Durante o desenvolvimento deste projeto de mestrado, foram realizados testes preliminares com a (–)-cassina (**1**) e a (–)-espectralina (**5**) para atividade antimalárica, objetivando explorar derivados semissintéticos destes alcaloides piperidínicos como alvos moleculares. Os ensaios foram feitos com a cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* transfectada com a Proteína de Fluorescência Verde (*Green Fluorescent Protein* - GFP), no Instituto de Biociências USP-SP, sob supervisão da Prof^a Dr^a Célia Regina Silva Garcia, co-orientadora desta dissertação. Devido aos resultados positivos para os alcaloides naturais **1** ($IC_{50} = 1,82 \text{ uM}$) e **5** ($IC_{50} = 2,76 \text{ uM}$), despertou-se o interesse para a realização de modificações estruturais nestes compostos, com o intuito de avaliar o aumento da atividade antimalárica, a qual é influenciada pelas propriedades físico-químicas (solubilidade, ligação de hidrogênio etc.) e fatores estruturais (tamanho da cadeia carbônica e o impedimento estérico dos grupos funcionais existentes). Assim, uma série de ésteres semissintéticos foi planejada, visando à modificação estrutural no grupo hidroxílico do carbono na posição três do anel piperidínico destes alcaloides.

2 OBJETIVOS

O presente projeto teve por objetivo:

- Estudo fitoquímico do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* para obtenção dos alcaloides homólogos (–)-cassina e (–)-espectralina para posterior modificação estrutural;
- Obtenção dos cloridratos de (–)-cassina e (–)-espectralina em quantidade suficiente para uso como material de partida nas reações de derivatização;
- Planejamento de uma série de derivados de ésteres;
- Testes bioquímicos para avaliação do potencial antimalárico destes compostos com cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum*.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentação

As análises espectrométricas e cromatográficas foram realizadas utilizando os seguintes equipamentos:

- Espectrômetro de *RMN Varian INOVA 300[®]*, *RMN Varian INOVA 500[®]*, *RMN BRUKER 600[®]* operando em frequência de 300 MHz, 500 MHz e 600 MHz, respectivamente. Os dados são processados com o auxílio do software *MestReNova*.
- Espectrômetro de massas *Bruker Daltonics MicroTOF-QII[®]* de alta resolução, utilizando Ionização por Eletrospray (ESI) e analisador de massa por Tempo de Voo (TOF). As amostras são introduzidas utilizando seringa (100 µL), adaptada a uma bomba de infusão com fluxo 100 µL.h⁻¹. O capilar é aquecido a 150°C com fluxo de gás nebulizante 4 L.min.⁻¹ e 4 kV. A análise é feita no modo positivo ou negativo. Os dados são processados com o auxílio do software *DataAnalysis*.
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) *Shimadzu[®]* composto pelos seguintes módulos: bombas (LC-8A), degaseificador (SPD-10 AVP), autoinjeter (SIL-10AF), detector ultravioleta (UV-Vis SPD-10 AVP) e detector por espalhamento de luz evaporativo (ELSD-LT), controlados pelo software *LC Workstation CLASS-VP*. Para o desenvolvimento da cromatografia foram utilizadas: coluna analítica *Phenomenex Luna[®] (C18)*, 5 µm, 250 x 4,60 mm, e coluna semi-preparativa *Phenomenex Synergi Hidro-RP[®] (C18)*, 4 µm, 100 x 21,20 mm.
- Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPLC) *Dionex[®]* Ultimate3000, equipado com duas bombas modelo DGP-3600RS, detector de arranjo de diodos (DAD) modelo DAD3000(RS), detector de aerossol carregado (CAD Corona Ultra) e amostrador automático modelo WPS3000RS. Para o desenvolvimento da cromatografia foi utilizado coluna analítica *Phenomenex Luna[®] (C18)*, 5 µm, 250 x 4,60 mm. Os dados são processados com o auxílio do software *Chromeleon* versão 6.8.
- Câmera UV/Visível (365-254 nm)

- Ponto de fusão medido em aparelho digital da MicroQuímica, modelo MQAPF – 301.
- Ponto de fusão e curvas de DSC determinados em aparelho de análise térmica, modelo DSC Q10 V9.4 Build 287 - UNIVERSAL V4.2E TA e DSC Q10 V9.9 Build 303 – UNIVERSAL V3.9A TA.
- Espectrofotômetro no Infravermelho com Transformada de Fourier da Perkin Elmer, modelo *FT-IR spectrum 2000*. A análise é feita na forma de pastilha de KBr. A região de análise corresponde a 400 - 4000 cm^{-1} . Os dados são processados com o auxílio do software *Origin* versão 8.0.

Os ensaios antimaláricos foram realizados utilizando os seguintes equipamentos:

- Capela com fluxo laminar, para a manipulação das cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum* e para o preparo de garrafas e placas de cultivo.
- Estufa para incubação dos parasitas.
- Centrífuga para “eppendorf”.
- Microscópio óptico *Carl Zeiss Axiolab* (Lente de aumento 100X com imersão em óleo) para a análise dos estágios de desenvolvimento do protozoário e contagem da parasitemia.
- Citômetro de Fluxo *BD FACSCalibur*[®], equipado com laser de argônio a 488 nm, com emissão de fluorescência em 520-530 nm. Os dados são obtidos através do software *FlowJo*.

3.2 Materiais

3.2.1 Solventes e Soluções

- Metanol (CH_3OH): J. T. Baker; Baker Analyzed[®] HPLC
- Metanal (H_2CO): formaldeído comercial 37% Synth P.A. ACS
- Ácido acético glacial (CH_3COOH): Quemis P.A. ACS
- Ácido sulfúrico (H_2SO_4): Quemis P.A. ACS
- Ácido clorídrico (HCl): Quemis P.A. ACS
- Cloreto de metileno (CH_2Cl_2): Synth P.A. ACS
- Clorofórmio (CHCl_3): Synth P.A. ACS
- Dimetilsulfóxido (CH_3)₂SO: Synth P.A. ACS

- Hidróxido de amônio (NH₄OH): Synth P.A. ACS
- Solvente grau técnico, purificado em destilador semi-industrial com coluna de fracionamento (4 m de altura): hexano, etanol, metanol
- Corante hematológico: Panótico Rápido LB[®]
- Solução salina tamponada com fosfatos (*Phosphate Buffered Saline* – PBS 10X)
- Solução 10% D-Sorbitol[®] em água destilada
- Solução 10% Triton X -100[®] (Sigma-Aldrich) em água destilada
- RPMI-1640[®] (Sigma-Aldrich)
- Solução de Albumina de soro bovino: ALBUMAX[®]
- Solventes deuterados:
 - Clorofórmio-*d* 99,8%: Cambridge Isotope Laboratories
 - Metanol-*d*₄ 99,8%: Cambridge Isotope Laboratories

3.2.2 Reagentes

Para as reações de esterificação foram utilizados alguns cloretos de ácido com alto grau de pureza (Tabela 1):

Tabela 1 – Reagentes comerciais para as reações de semissíntese.

Reagente ^a	Grau de pureza	Fórmula Molecular (formato linear)	Massa molecular (g.mol ⁻¹)	Densidade (g.mL ⁻¹) a 25 °C
Cloreto de acetila	98%	CH ₃ COCl	78,50	1,11
Cloreto de pentanoíla	98%	CH ₃ (CH ₂) ₃ COCl	120,58	1,02
Cloreto de heptanoíla	99%	CH ₃ (CH ₂) ₅ COCl	148,63	0,96
Cloreto de p-toluíla	99%	CH ₃ C ₆ H ₄ COCl	154,59	1,19
Cloreto de 3-bromo-benzoíla	98%	BrC ₆ H ₄ COCl	219,47	1,66

^a Produto comercial da Sigma – Aldrich.

Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.3 Cromatografia

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

- Sílica gel (SiO₂) para cromatografia flash (0,035 – 0,070 mm, diâmetro de poro 6 nm) ACROS Organics

- C18 sílica gel, premium grade (tamanho de partícula: 40-63 μm – 230 x 400 mesh, porosidade: 60 Å) Sorbent Technologies

Para as cromatografias em camada delgada foram utilizadas as seguintes fases estacionárias:

- Placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄) 0,20 mm de espessura.
- Placas de sílica gel 60 G preparadas aplicando-se uma suspensão da fase estacionária em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placas de vidro de 5, 10 e 20 x 20 cm, obtendo-se espessuras variadas do adsorvente (0,25; 0,50; 0,75 e 1,00 mm) através de espalhador Quickfitt. Depois de preparadas, as placas são secadas a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 6 h, em seguida ativadas em estufa (120 °C) por 2 h. As revelações são feitas por: irradiação ultravioleta (UV 254 ou 365 nm) ou por nebulização de reveladores específicos para alcaloides.

3.2.4 Revelador

Para as visualizações em placas cromatográficas será utilizado o revelador Iodocloroplatinato, um revelador químico específico para alcaloides (TOUCHSTONE, 1978):

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: solução A: solução B (1:9) e diluição com igual volume de água.

3.2.5 Ensaio antimalárico

Para o desenvolvimento do ensaio antimalárico foram utilizados os seguintes materiais:

- Cepas 3D7 de *Plasmodium falciparum* criopreservadas no IB-USP-SP.
- Eritrócitos de sangue humano do tipo A⁺ e plasma sanguíneo humano do tipo O⁺, fornecidos pelo hemonúcleo de São Paulo – SP.
- Marcador de ácidos nucleicos: YOYO-1

- Garrafas de cultura celular, em polietileno, com área superficial de 25, 75 ou 175 cm².
- Placas de cultura estéril com 96 poços, em polietileno, contendo fundo chato e tampa, para análises microscópicas e medições espectrométricas.

3.3 Preparo do material vegetal, partição líquido-líquido e procedimento cromatográfico

O extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* foi obtido a partir do material vegetal coletado no perímetro do Terminal Rodoviário de Araraquara-SP, cuja exsicata foi depositada no Instituto de Botânica de São Paulo sob o nº SP 370 917. As flores foram secadas ao sol, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração com etanol, com intervalo de aproximadamente sete dias entre uma extração e outra, contabilizando um total de cinco extrações.

Para a verificação dos alcaloides presentes no extrato bruto, foi utilizada a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA): cromatoplaça de sílica gel, eluente CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador de Iodocloroplatinato. Confirmada a presença dos mesmos, foi adotado um procedimento de partição líquido-líquido, no qual 120,00 g deste extrato foram solubilizados em metanol: água (4:1) e a partição realizada com hexano e diclorometano, sucessivamente.

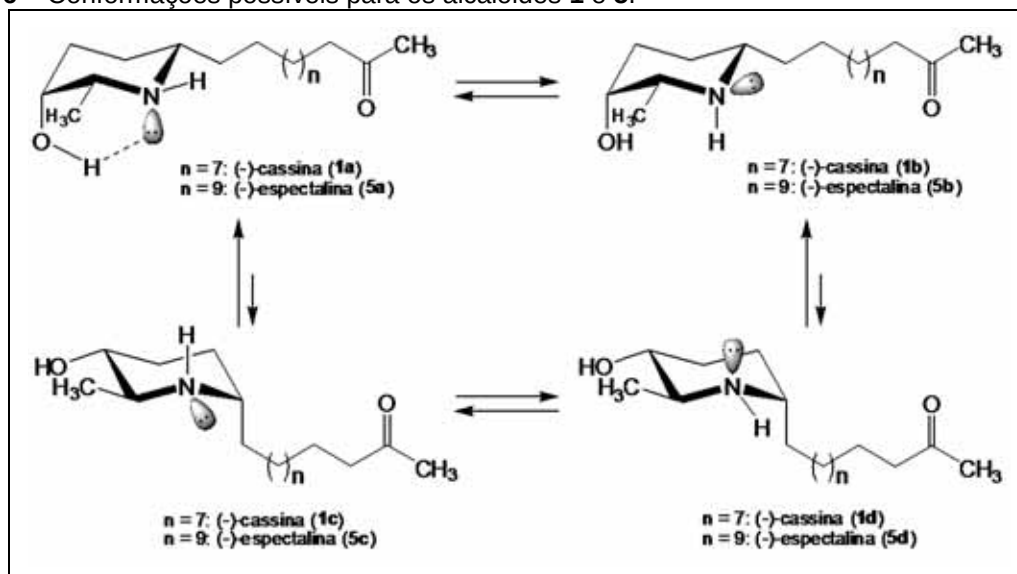
A fração diclorometânica, por apresentar a maior concentração de alcaloides, foi submetida à cromatografia em coluna (CC) utilizando sílica gel como fase estacionária (FE) e eluição modo gradiente CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH (95:05:0,25) até 50% de metanol. As frações enriquecidas em alcaloides foram submetidas a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de forma a isolar os precursores reacionais (–)-cassina e (–)-espectralina. Estes procedimentos foram protocolados em estudos anteriores (PIVATTO, 2010).

3.4 Síntese dos derivados (–)-cassina (1) e (–)-espectralina (5)

Com o objetivo de sintetizar uma série de ésteres análogos com potencial atividade antimalárica foram propostas modificações estruturais na hidroxila ligada ao carbono na posição três do núcleo piperidínico dos alcaloides **1** e **5**. Inicialmente foram propostas reações de esterificação com cloretos de ácidos de cadeia linear,

tarefa não trivial quando se trabalha com piperidinóis 2,6-dissubstituídos, uma vez que diferenças nas conformações e interconversões eletrônicas do nitrogênio, presente no núcleo piperidínico (RUBIRALTA et al.,1991), tornam a hidroxila pouco reativa. A análise detalhada da Figura 6 mostra que o confômero **1a** apresenta ligação de hidrogênio intramolecular entre a hidroxila e o nitrogênio do anel piperidínico, tornando esta hidroxila pouco reativa. Também é preciso levar em consideração que a nucleofilicidade do nitrogênio é maior que a da hidroxila (função a ser esterificada), levando a subprodutos de reação no nitrogênio (amidas). Esses produtos podem ser obtidos quando o par de elétrons do nitrogênio não está comprometido nas ligações intramoleculares, representado pelos confômeros **1b**, **1c**, **1d**, **5b**, **5c** e **5d** (Figura 6). Para contornar esse problema foi proposto o preparo dos cloridratos de **1** e **5**, uma vez que estes não apresentam ligações intramoleculares, tornando a hidroxila um melhor nucleófilo que o nitrogênio, agora na forma de sal de amínio.

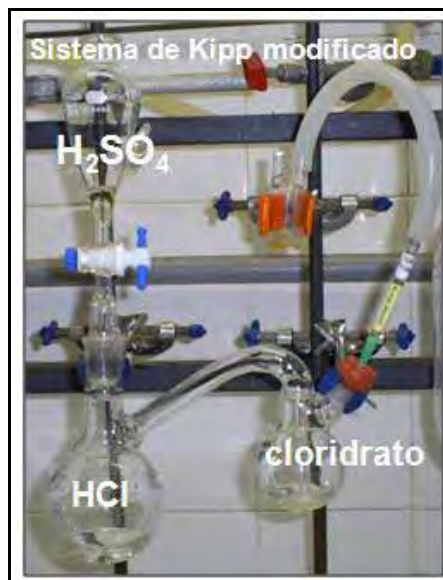
Figura 6 – Conformações possíveis para os alcaloides **1** e **5**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando a discussão anterior, a metodologia sintética proposta consistiu no preparo dos cloridratos de **1** e **5**, por adição de $\text{HCl}_{(g)}$, gerado a partir do gotejamento de $\text{H}_2\text{SO}_{4(l)}$ sobre $\text{HCl}_{(l)}$ (Figura 7), através de um sistema de Kipp modificado (PIVATTO, 2010), onde cloreto de hidrogênio foi borbulhado em 3 mL de CHCl_3 contendo a amostra de **1** ou **5** por no mínimo 30 min.

Figura 7 – Preparação dos cloridratos de **1** e **5**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para verificar o grau de pureza dos cloridratos preparados, foram feitas medidas dos seus pontos de fusão, utilizando a técnica de DSC e, medidas de absorção na região do Infravermelho (IV) entre $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, com o objetivo de observar a presença de grupos funcionais característicos destes compostos, como o grupo carbonílico (cetona) da cadeia alquílica ligada ao C-6, a função hidroxílica no C-3 e o anel piperidínico.

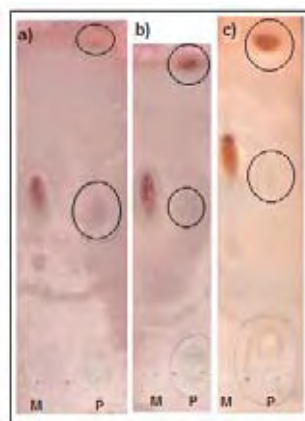
A partir dos cloridratos foram feitas reações de esterificação (VIEGAS JUNIOR et al., 2005), utilizando alguns cloretos de ácidos com cadeia aberta e linear, como os cloretos de acetila, pentanoíla e heptanoíla, e alguns cloretos de ácido derivados aromáticos, contendo grupo ativante ou desativante, como o cloreto de p-toluíla e cloreto de 3-bromo-benzoíla, respectivamente. As reações de esterificação com os cloretos de ácidos foram otimizadas utilizando o cloridrato da mistura dos alcaloides **1** e **5**, tendo em vista que **1** encontra-se em maior proporção que **5** nas flores de *S. spectabilis*.

3.4.1 Reação de esterificação

Para a otimização das condições reacionais foram adotados dois procedimentos: um para os cloretos de ácido com cadeia aberta e outro para cloretos de ácido com anel aromático substituído. Para o procedimento 1, foram pesados 2,00 mg ($5,9 \times 10^{-3}$ mmol) do cloridrato da mistura dos alcaloides **1** e **5**,

transferidos para um balão reacional e solubilizados em 1,5 mL de CHCl_3 , previamente tratado, segundo descrito na literatura (ARMAREGO; CHAI, 2003). A reação foi testada com cloreto de acetila ($4,21 \times 10^{-3}$ mL, $5,9 \times 10^{-3}$ mmol) o qual foi adicionado a mistura reacional, sob atmosfera inerte de nitrogênio. A reação foi monitorada por CCDA (Figura 8), sendo observado, depois de 2 h, a conversão parcial do substrato no produto esterificado. Considerando que uma parcela da mistura dos alcaloides ainda não havia reagido, uma nova alíquota do cloreto de acetila ($8,42 \times 10^{-3}$ mL, $11,8 \times 10^{-5}$ mmol) foi adicionada a mistura reacional e esta monitorada por um período de mais 2 h. Esse procedimento foi adotado até que fosse observado, por meio de CCDA, a conversão do material de partida no produto esperado, sendo utilizado no total a proporção de 1:30 ($12,63 \times 10^{-3}$ mL, $17,7 \times 10^{-5}$ mmol). A reação foi mantida por no mínimo 6 h. Para o procedimento 2, as mesmas etapas foram repetidas, porém, a reação foi otimizada com 4-metil-benzoíla (0,046 mL; 0,36 mmol) na proporção de 1:60. Ambas as reações foram otimizadas sob aquecimento e agitação magnética.

Figura 8 – Perfil em CCDA das reações do cloridrato da mistura de **1** e **5** com cloreto de ácido, sob aquecimento: a) 2 h; b) 4 h; c) 6 h de reação.
FE: sílica, FM: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) e revelador iodocloroplatinato.

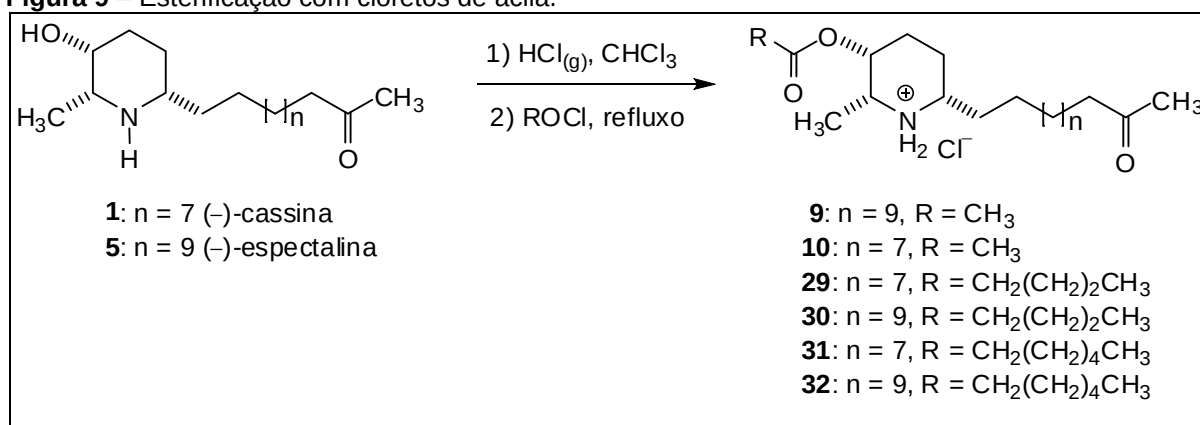


M = cloridrato da mistura de **1** e **5**

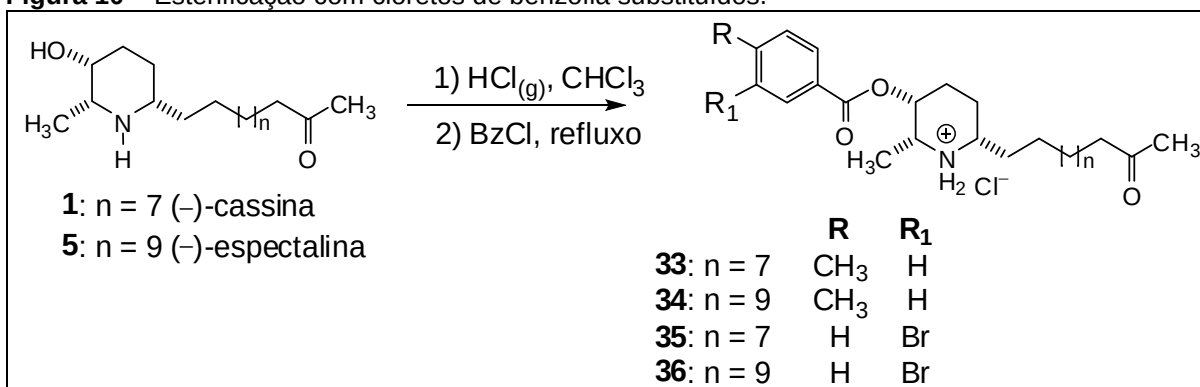
P = produto(s) formado(s)

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir das condições otimizadas, as reações de esterificação (Figuras 9 e 10) foram feitas com 20,0 mg do cloridrato da (–)-cassina ou cloridrato da (–)-espectralina, solubilizados em 5 mL de CHCl_3 . O cloreto de ácido carboxílico foi adicionado em excesso (1:30 para os cloretos de acetila, pentanoíla e heptanoíla; 1:60 para os cloretos de 4-metil-benzoil e 3-bromo-benzoil). Os dados referentes a cada reação encontram-se descritos na Tabela 2.

Figura 9 – Esterificação com cloretos de acila.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 10 – Esterificação com cloretos de benzoíla substituídos.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 2 – Dados das reações de esterificação.

Produtos	(-)-cassina(1) ^a		(-)-espectralina(5) ^a		Reagente ^b	
	mg	mmol	mg	mmol	m L	mmol
9			20,0	0,055	0,40	5,6
10	20,0	0,060			0,42	5,9
29	20,0	0,060			0,20	1,7
30			20,0	0,055	0,18	1,5
31	20,0	0,060			0,28	1,8
32			20,0	0,055	0,25	1,6
33^c	20,0	0,060			0,47	3,6
34^c			20,0	0,055	0,50	3,8
35^c	20,0	0,060			0,48	3,6
36^c			20,0	0,055	0,44	3,3

^a Substrato na forma de cloridrato.^b Descrito nas figuras 9 e 10.^c Adição de catalisador (4-DMAP) na proporção de 1:2 em relação aos cloridratos de **1** e **5**.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para as reações com cloreto de 4-metil-benzoíla e 3-bromo-benzoíla, foi adicionado também o catalisador 4-DMAP, na proporção 1:2, pois dependendo do grupo R, a reação de esterificação, nestas condições, praticamente não ocorria.

As reações foram mantidas sob atmosfera de nitrogênio, agitação magnética, refluxo (110°C) e monitoradas por CCDA, sendo observado, depois de 24 h, no máximo, o aparecimento de compostos mais apolares, indicando a formação do produto esperado. Considerando que no processo reacional ocorre a formação de água, empregou-se uma temperatura maior que 100°C de forma que a água, no estado vapor, pudesse ser removida do meio reacional através do arraste com o gás inerte, favorecendo assim o deslocamento do equilíbrio no sentido da formação dos ésteres. Por fim, o solvente foi removido em rotaevaporador e os produtos (coloração ligeiramente amarelada) submetidos à purificação.

3.5 Preparo das amostras para análise e caracterização

3.5.1 Cromatografia Líquida

Os derivados semissintéticos (**9**, **10**, **29-36**) foram analisados em Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPLC), equipado com Detector de Aerossol Carregado (CAD Corona Ultra). As amostras foram solubilizadas em metanol ($C=1 \text{ mg.mL}^{-1}$) e filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com diâmetro de poro 0,45 μm . O filtrado foi coletado em vial de 2,0 mL e 10 μL de cada amostra foram submetidos à análise no modo gradiente 35-100% metanol – água dopada com ácido acético 0,1% durante 30 min. Sendo assim, os cromatogramas foram obtidos e analisados com o auxílio do software *Chromeleon* versão 6.80. As análises foram realizadas no Instituto de Química da UNESP, em Araraquara-SP.

3.5.2 Infravermelho (IV)

Os derivados semissintéticos (**9**, **10**, **29-36**) foram analisados em Espectrofotômetro no Infravermelho com Transformada de Fourier. As amostras foram pesadas (1 mg) e misturadas com KBr, trituradas e prensadas para a formação de uma pastilha fina. Sendo assim, os espectros de Infravermelho foram obtidos na faixa de 4000-400 cm^{-1} e analisados com o auxílio do software *Origin* versão 8.0. As medidas de absorção na região do Infravermelho foram realizadas no Instituto de Química da UNESP, em Araraquara-SP.

3.5.3 Espectrometria de Massas (EM)

Os derivados semissintéticos (**9**, **10**, **29-36**) foram analisados por Espectrometria de Massas de Alta Resolução, utilizando Ionização por Eletrospray (ESI) e analisador de massa por Tempo de Voo (TOF). As amostras foram pesadas (0,8 mg), solubilizadas em metanol:água e filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com diâmetro de poro 0,45. O filtrado foi coletado em vial de 2,0 mL e submetido à análise, sem a adição de modificadores (agente protonador), pois os compostos já se encontram na forma protonada, ou seja, na forma de sal amínico. Sendo assim, os espectros de massas foram obtidos no modo positivo e analisados com o auxílio do software *DataAnalysis*. Ácido trifluoracético sodiado e Monensina foram utilizados como padrão de calibração interna. As análises de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, em Ribeirão Preto-SP.

3.5.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os derivados semissintéticos (**9**, **10**, **29-36**) foram analisados por Ressonância Magnética Nuclear, utilizando um espectrômetro de *RMN Varian INOVA 300*[®], *RMN Varian INOVA 500*[®], *RMN Bruker 600*[®] operando em frequência de 300 MHz, 500 MHz e 600 MHz, respectivamente. Cada amostra foi pesada (10 mg), solubilizada em metanol ou clorofórmio deuterados e submetida à análise. Sendo assim, os espectros de RMN foram obtidos e analisados com o auxílio do software *MestReNova*. Trimetilsilano foi utilizado como padrão de calibração interna. As análises de RMN foram realizadas no Instituto de Química da UNESP, em Araraquara-SP e no Instituto de Química da UFSCAR, em São Carlos-SP.

4. Ensaio Antimalárico

4.1 Procedimento experimental

Os derivados semissintéticos (**9**, **10**, **29-36**) foram testados como antimaláricos na etapa esquizonticida do ciclo de desenvolvimento do *Plasmodium falciparum*, estágio sanguíneo assexuado do parasita, responsável pelas manifestações clínicas da doença no hospedeiro humano, como febre, calafrio, dor de cabeça e anemia (NOGUEIRA, 2010). Os ensaios antimaláricos foram realizados no Instituto de Biociências da USP, em São Paulo-SP.

4.1.1 Cultura de *Plasmodium falciparum* in vitro

A cultura do *Plasmodium falciparum*, protozoário causador da malária, baseia-se no cultivo do parasita em eritrócitos, procedimento desenvolvido na década de 1970 (LAMBROS; VANDERBERG, 1979). Isso foi possível devido a remoção do parasita da corrente sanguínea de pacientes e sua transferência para o ambiente de laboratório, altamente controlado. Desta forma, várias linhagens de *P. falciparum* foram desenvolvidas, entre elas a cepa 3D7, a qual foi utilizada para o ensaio dos derivados **9**, **10**, **29-36**.

Cepas 3D7 de *P. falciparum* foram mantidas em cultivo contínuo em eritrócitos humanos de grupos sanguíneos O⁺ ou A⁺, incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ (Figura 11). O meio de cultivo utilizado foi o RPMI-1640 suplementado com bicarbonato de sódio e plasma humano, para manter o pH entre 7,2-7,4. As culturas foram preservadas em garrafas com hematócrito de 3-7%. A manutenção das culturas foi feita trocando-se o meio a cada 24h com o acompanhamento diário da parasitemia por esfregaços sanguíneos. Uma vez detectada parasitemia elevada, as culturas eram diluídas com hemácias não infectadas. Para manter esta cepa no banco de cepas do laboratório, os parasitas foram criopreservados, sendo a técnica descrita por Meryman & Hornblower (1972), que consiste em congelar o parasita em solução concentrada de glicerol (Glycerolyte[®] 57-BAXTER: 6,2 M de glicerol, 142,7 mM de acetato de sódio, 4 mM de cloreto de potássio, 3,7 mM de fosfato de sódio monobásico, 8,7 mM de fosfato de sódio dibásico, pH = 6,8) em nitrogênio líquido.

Figura 11 – Estufa utilizada para incubação das cepas 3D7 de *P.falciparum*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

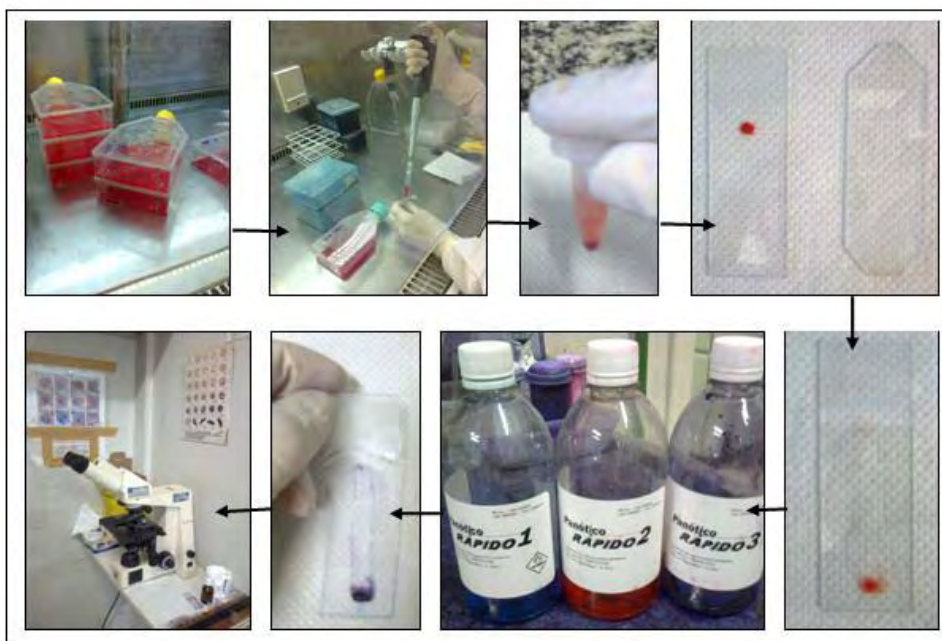
4.1.2 Sincronização da cultura

Foi desenvolvido um procedimento simples para a sincronização de culturas de *P. falciparum*, de acordo com Lambros e Vanderberg (1979), que permite escolher um estágio específico do desenvolvimento do parasita (anel, trofozoíto ou esquizonte) durante um ciclo de 48 h, utilizando uma solução de D-sorbitol, que induz por osmólise a lise de hemácias infectadas com os parasitas na fase trofozoíto e esquizonte, sincronizando a cultura na fase de anel, fase indicada para a incubação do parasita com as drogas que serão testadas, para posterior avaliação do potencial antimalárico.

Sendo assim, parasitas mantidos rotineiramente em 6 garrafas de cultura (meio de eritrócitos humanos do tipo A⁺ (6% parasitemia e 2% hematócrito), RPMI-1640, suplementado com soro sanguíneo do tipo O⁺ ou ALBUMax-albumina de soro bovino e bicarbonato de sódio) foram transferidos para uma única garrafa, sendo retirada uma alíquota de 0,5 mL do meio de cultura e mantida num eppendorf, o qual foi submetido a centrifugação por 5 min. Em seguida, 1 µL de hematócrito (precipitado) foi colocado sob uma lâmina de microscópio para a realização do esfregaço sanguíneo. Após a secagem em temperatura ambiente, a lâmina foi corada com Panótico Rápido LB[®], cujo princípio baseia-se na coloração hematológica estabelecida por Romanowsky: a extensão hematológica é submetida a ação de um fixador (solução 0,1% de triarilmetano) e duas soluções corantes (solução 0,1% de xantenos e solução 0,1% de triazinas) por meio de imersões de

no máximo 20 s em cada solução (GURR, 1971). Em seguida, o excesso de solução corante foi retirado com água destilada e a lâmina submetida a estufa (37 °C) por 15 min. Decorrido este tempo, a lâmina pode ser analisada no microscópio óptico *Carl Zeiss Axiolab*, para a contagem da parasitemia, a qual pode ser definida: $\text{parasitemia (\%)} = (\text{número de eritrócitos infectados}) / (\text{número de eritrócitos infectados e não infectados}) \times 100$. A contagem da parasitemia pela microscopia óptica demanda muito tempo e é uma técnica laboriosa. Dentre outros fatores, a reprodutibilidade da contagem irá depender de uma boa preparação do esfregaço sanguíneo e da habilidade técnica do microscopista. Consequentemente, todas essas variáveis podem comprometer a precisão e a reprodutibilidade do ensaio. A Figura 12 descreve o procedimento descrito anteriormente.

Figura 12 – Representação esquemática de um esfregaço sanguíneo.



Fonte: Elaborada pelo autor.

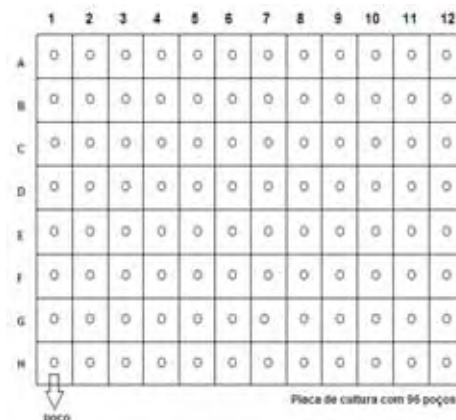
4.1.3 Preparo das placas de diluição e de cultura

Foram preparadas soluções-estoque na concentração de 10 mM em 500 µL de metanol para cada amostra escolhida para o ensaio antimalárico (9,10,29-36).

Cada três linhas de uma placa de cultura (ex: A, B, C) foram utilizadas para a aplicação de uma única amostra, ou seja, foi realizado um experimento em triplicata (Figura 13). Partindo-se do poço 1 até o 12, foram realizadas diluições

seriadas (mais concentrado para o menos concentrado), cujas concentrações foram calculadas e especificadas na Tabela 3.

Figura 13 – Esquema geral de uma placa de cultura em poliestireno (96 poços) para a realização de experimentos *in vitro*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Valor calculado para a concentração de cada poço: 1 até o 12.

Numeração horizontal da placa de cultura	Concentração ^a (µM)	Fator de diluição	Volume (µL) Amostra	Volume (µL) RPMI-1640 ^b
1	400,0	25	8	192
2	134,0	3	67	133
3	44,89	3	67	133
4	15,038150	3	67	133
5	5,03778025	3	67	133
6	1,687656384	3	67	133
7	0,565364888	3	67	133
8	0,189397237	3	67	133
9	0,063448074	3	67	133
10	0,021255105	3	67	133
11	0,007120460174	3	67	133
12	0,002385354158	3	67	133

^aConcentração teórica calculada para um poço de 200 µL. Considerar que quanto maior o número de casas decimais maior é o erro experimental.

^bO volume de RPMI-1640 foi estabelecido em função da capacidade do poço (V = 200 µL) da placa de cultura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Foi transferido uma alíquota de 50 µL de cada amostra da placa de diluição para os respectivos poços de uma outra placa com 96 poços (placa de cultura), começando da mais concentrada para a mais diluída. Após, completou-se o volume de cada poço com 150 µL de meio de cultura contendo: 2% de hematócrito (*Red Cell Blood* - RBC), 1% de parasitemia (*Infected Red Cell Blood* -RBCi) e RPMI-1640,

para um volume total de 200 μL . As placas foram incubadas por 48h em estufa a 37°C, sob atmosfera de 90% N_2 , 5% CO_2 e 5% O_2 .

4.1.4 Fixação

Após 48 horas, o meio de cultura foi removido das placas e em seguida os poços foram preenchidos com 190 μL de solução 2% formaldeído em solução salina tamponada com fosfatos (*Phosphate Buffered Saline* - PBS). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por pelo menos 24 h (SCHUCK, 2011).

4.1.5 Marcação

Ao término da fixação, as placas de cultura foram centrifugadas, o sobrenadante retirado e, logo em seguida, o centrifugado foi lavado com PBS. Após esse tratamento, cada amostra foi marcada com: 10 μL de solução 10% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) em água destilada, 2 μL de solução 0,1% YOYO-1 em DMSO e 188 μL de PBS (volume para completar 200 μL). As placas foram colocadas em estufa a 37°C por 40 min e analisadas por Citometria de Fluxo (SCHUCK, 2011).

O marcador YOYO-1 é um corante de cianina assimétrico utilizado para a detecção de ácidos nucleicos, empregado para discriminar entre eritrócitos infectados e não infectados em fases de desenvolvimento dos parasitas de *P. falciparum*. O princípio deste ensaio é o contraste entre eritrócitos humanos, que não apresentam DNA e nem RNA, e entre os parasitas da malária, que tem tanto DNA quanto RNA, por isso, são utilizados corantes que mostram uma maior fluorescência na presença de ácidos nucleicos, como o YOYO-1 (GUNTHER, 2010; YARMOLUK, 2008).

A fluorescência do corante YOYO-1 complexado com o material genético pode ser visualizada através de leitores de fluorescência em microplacas (LI, 2007) ou separadores de células ativadas por fluorescência (*Fluorescence Activated Cell Sorter*- FACS), como será feito neste trabalho.

Outro método desenvolvido recentemente utiliza parasitos transfectados com a GFP em ensaios de triagem de drogas, não sendo necessário qualquer preparação prévia das amostras para a leitura de fluorescência. A fluorescência gerada pela GFP pode ser detectada em microscópio de fluorescência. Os parasitas

maláricos transgênicos expressam a luciferase, proteína fluorescente. Isso permite utilizar a fluorescência como um marcador para identificar os parasitos. A proteína de GFP foi descoberta em 1961, pelo Dr. Osamu Shimomura e seu gene foi clonado pela primeira vez em 1992, de uma água viva de nome científico *Aequorea victoria*. Além de esclarecer a biologia da bioluminescência do organismo, a clonagem do gene da GFP permitiu o seu uso como marcador genético para identificar células e organismos vivos por microscopia de fluorescência e monitorar a localização de proteínas de interesse, visualizando eventos celulares. Atualmente, a transformação genética com a proteína GFP tem sido obtida para várias espécies de *Plasmodium* (SANCHEZ, 2007).

4.1.6 Análise por Citometria de Fluxo (FACS)

O citômetro de fluxo, aparelho utilizado para avaliar a emissão de fluorescência é capaz de analisar várias partículas em cada segundo em "tempo real" e pode ativamente separar e isolar partículas com propriedades específicas. Um citômetro de fluxo é similar a um microscópio que produz, ao invés de imagens da célula, uma quantificação de um conjunto de parâmetros. Seis parâmetros são considerados básicos e podem ser medidos simultaneamente, são eles: tamanho (FS); granularidade interna das células (SS); fluorescência verde (FL1); fluorescência amarela (FL2); fluorescência laranja (FL3); fluorescência vermelha (FL4); fluorescência roxa (FL5).

A maioria dos citômetros de fluxo utiliza lasers como luz estável, monocromática e de alta potência. O laser de íon argônio (*argon ion laser*) é o mais empregado, por ter uma emissão a 488 nm, comprimento de onda muito utilizado para a excitação de vários grupos fluorocromos. Os fluorocromos oferecem um método sensível para obter informação acerca da estrutura, função e vitalidade das células, podendo ligar-se covalentemente ou não a moléculas de determinados componentes celulares e variar suas características em função do microambiente que os cerca. A disponibilidade de fluorocromos específicos e suas propriedades são essenciais para o desenvolvimento das aplicações em citometria de fluxo.

Os eritrócitos humanos são anucleados e não apresentam DNA. Esta vantagem permite a utilização da citometria de fluxo para a identificação dos estágios de desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* em hemácias sanguíneas

infectadas com o parasita. Desta forma, as suspensões sanguíneas contendo as amostras **9, 10, 29-36**, marcadas com o YOYO-1, foram processadas em citômetro de fluxo *FACScalibur*, equipado com um laser de Argônio a 488 nm, com emissão de fluorescência em 520–530 nm, e analisadas com o software *FlowJo*, sob a forma de histogramas, em função da fluorescência verde (FL1-H).

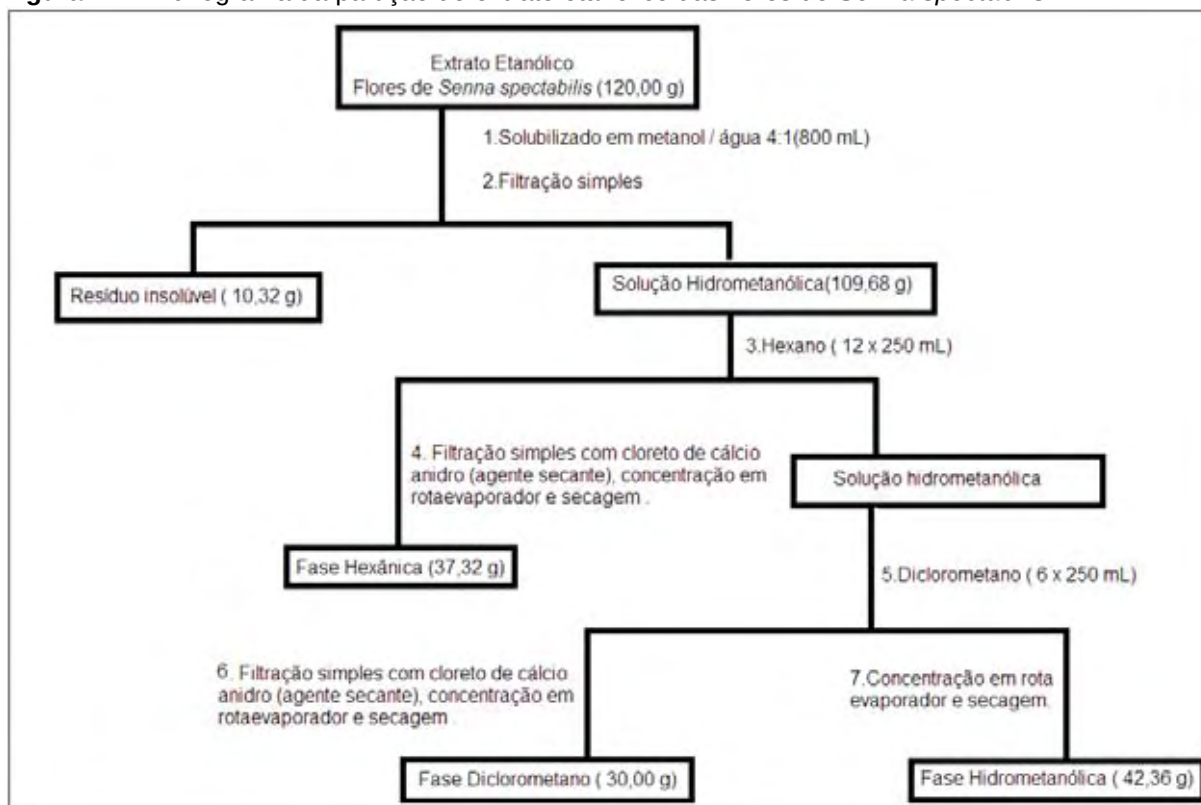
4.1.7 Análise Estatística

Foi utilizado o software *GraphPad Prism* para o cálculo do IC₅₀. Ao menos três experimentos independentes em triplicata foram feitos nas condições descritas nos itens 4.1.1- 4.1.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após o preparo do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* (120,0 g) como descrito no item 3.3, este foi submetido à partição líquido-líquido (Figura 14), resultando em três subfrações com diferentes níveis de polaridade (Tabela 4).

Figura 14 – Fluxograma da partição do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis*.



Fonte: Elaborada pelo autor.

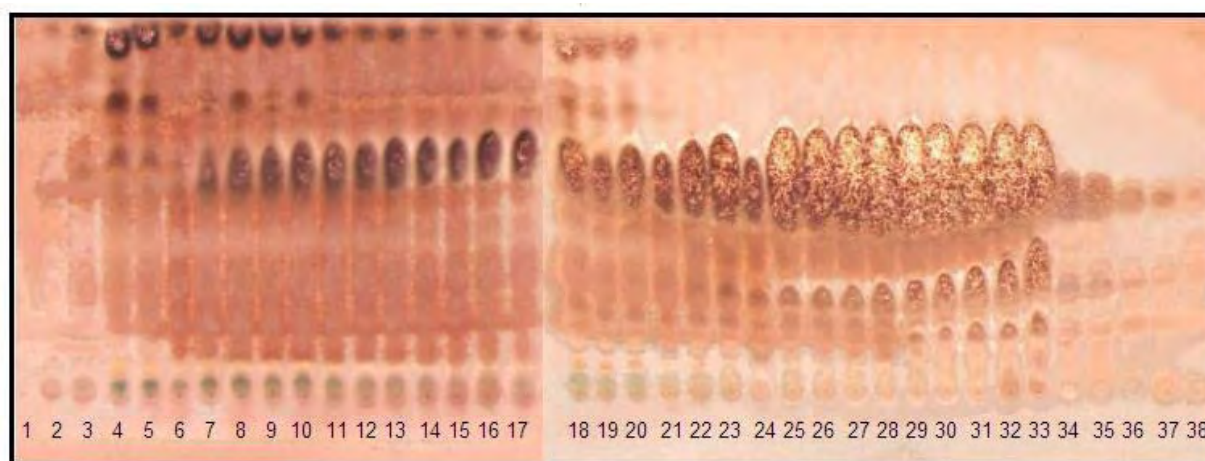
Tabela 4 – Frações da partição líquido-líquido do extrato etanólico e seus rendimentos massa/massa.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânica	37,32	31,10
Diclorometânica	30,00	25,00
Hidrometanólica	42,36	35,30
Resíduo Insolúvel	10,32	8,60

Fonte: Elaborada pelo autor.

As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄). A fase móvel consistiu no eluente $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25), sendo feita a revelação com iodocloplatino, um revelador específico para substâncias alcaloídicas, o qual forma um complexo (sal) de coloração amarronzada com bases de Lewis.

A fração diclorometânica, por apresentar a maior concentração de alcaloides, foi submetida à cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica como fase estacionária (FE) ($m_{\text{amostra}} = 1,00 \text{ g}$, $h = 15 \text{ cm}$, $\varnothing = 2,0 \text{ cm}$ e $m_{\text{sílica}} = 19,00 \text{ g}$). A eluição foi feita no modo gradiente: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (95:05:0,25) até 50% de metanol obtendo-se 38 subfrações (Figura 15).

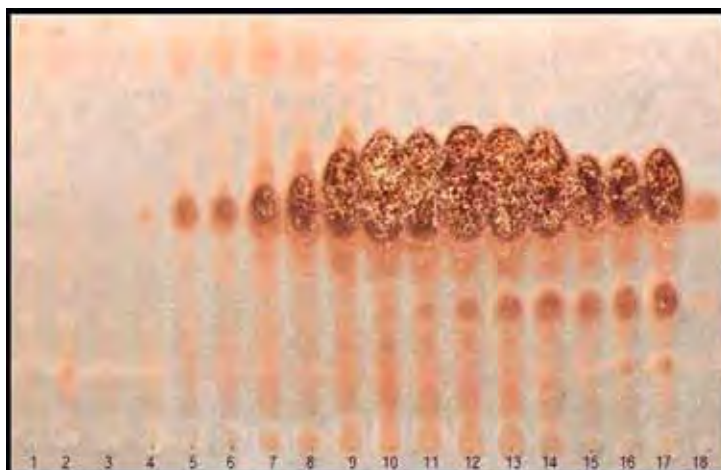
Figura 15 – CC1: CCDA das frações obtidas por CC da fração diclorometano (FE: sílica, FM: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) e revelador Iodocloroplatino).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise por CCDA permitiu reagrupar as frações CC1 F₂₁₋₃₃ que foram submetidas novamente a cromatografia em coluna (CC), utilizando sílica como FE ($m_{\text{amostra}} = 400,00 \text{ mg}$, $h = 10 \text{ cm}$, $\varnothing = 1,00 \text{ cm}$ e $m_{\text{sílica}} = 10,00 \text{ g}$). A eluição foi feita

no modo gradiente: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (95:05:0,25) até 70% de metanol obtendo-se 18 subfrações (Figura 16).

Figura 16 – CC2: CCD das frações obtidas por CC de CC1 F₂₁₋₃₃
FE: sílica, FM: $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) e revelador Iodocloroplatinato.

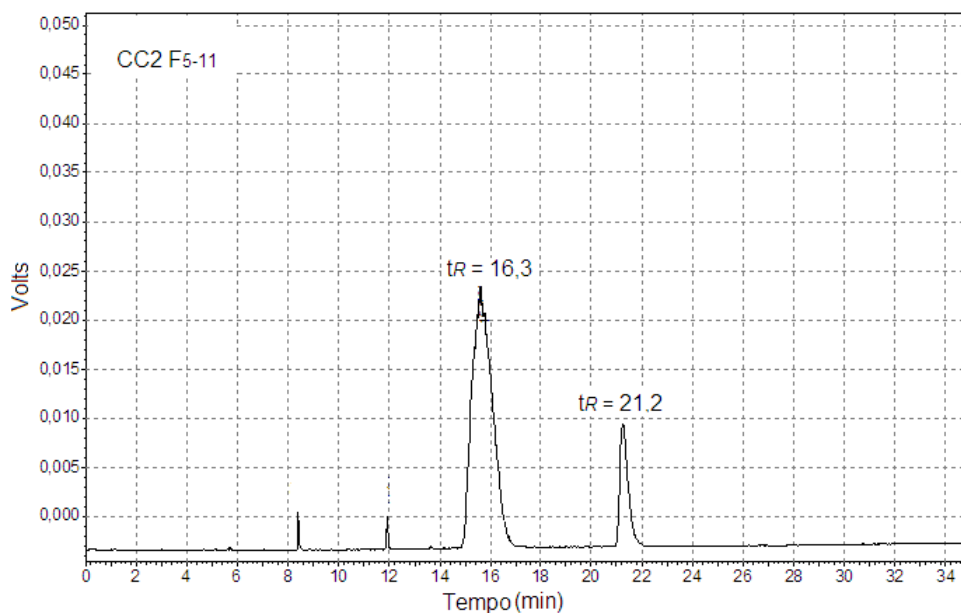


Fonte: Elaborada pelo autor.

A separação de alcaloides é extremamente dificultada quando se utiliza sílica como fase estacionária. Os grupos silanóis (caráter ácido) contidos na sílica tendem a interagir com os alcaloides (caráter básico), aumentando a adsorção e por consequência a retenção destes metabólitos secundários. Para diminuir este tipo de interação foi adicionado hidróxido de amônio (NH_4OH) a fase móvel (McCALLEY, 2002). Pela análise das cromatoplasas ilustradas nas Figuras 15 e 16, pode-se inferir que os halos das frações eluídas estão mais concêntricos e simétricos indicando a diminuição desta interação. Caso não fosse utilizado o hidróxido de amônio como competidor básico, provavelmente seria observado um encaudamento, provocado pelo arraste dos alcaloides durante o processo cromatográfico.

Por CCDA da fração CC2 F₅₋₁₁ (Figura 16), pode-se inferir, qualitativamente, a presença de um alcaloide aparentemente puro. No entanto, a análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) utilizando Detector por Espalhamento de Luz Evaporativo (*Evaporative Light Scattering Detector* - ELSD), permitiu a identificação de dois alcaloides em mistura com $t_R = 16,3$ min e $t_R = 21,3$ min, respectivamente (Figura 17).

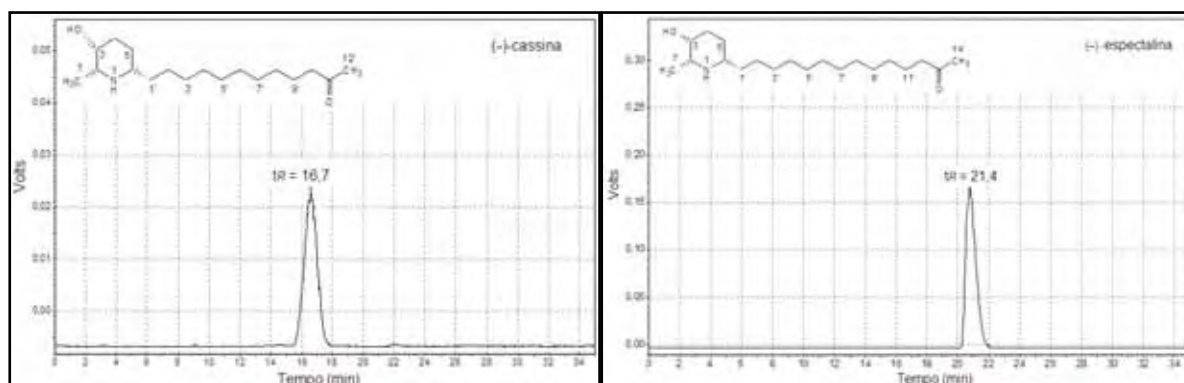
Figura 17 – Cromatograma da fração CC2 F₅₋₁₁. Coluna analítica Phenomenex® Luna C18, 250 x 4,6 mm 5 µm; modo gradiente (35 min), 35-100% metanol - água dopada com ácido acético 0,1%, C = 1,5 mg.mL⁻¹, volume injeção = 15 µL, fluxo: 1 mL.min⁻¹ e detector ELSD.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Assim, a fração CC2 F₅₋₁₁ (230,00 mg) foi submetida à CLAE semi-preparativo, resultando na separação dos alcaloides. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna semi-preparativa Phenomenex® Synergi Hidro-RP (C₁₈) 100 x 21,20 mm 4 µm, modo gradiente (35 min), fase móvel 35-100% metanol - água dopada com ácido acético 0,1%, C_{amostra} = 200 mg.mL⁻¹ com volume de injeção de 40 µL, fluxo de 8 mL.min⁻¹ e detector ELSD. Depois de purificados, os alcaloides foram concentrados em rotaevaporador, e novamente analisados em CLAE para a confirmação da pureza, sendo caracterizados como (–)-cassina (**1**) com $t_R = 16,7$ min e (–)-espectralina (**5**) com $t_R = 21,4$ min, alcaloides piperidínicos homólogos, que diferem em duas unidades metilênicas na cadeia lateral (Figura 18).

Figura 18 – Cromatograma dos alcaloides **1** e **5**. Coluna analítica Phenomenex® Luna C₁₈, 250 x 4,6 mm, 5 µm; modo gradiente (35 min), 35-100% metanol - água dopada com ácido acético 0,1%, C = 1,5 mg.mL⁻¹ volume injeção = 15 µL, fluxo: 1 mL.min⁻¹ e detector ELSD.



Fonte: Elaborada pelo autor.

O ácido acético é utilizado como agente protonador para os alcaloides (–)-cassina (**1**) e (–)-espectralina (**5**) em CLAE: o nitrogênio do anel piperidínico dos alcaloides **1** e **5** apresenta caráter básico e, na presença de ácido, abstrai H⁺, sendo rapidamente protonado. Na forma protonada, estes alcaloides apresentam um caráter mais hidrofílico, interagindo favoravelmente com a fase móvel contendo solventes com caráter mais polar, como o metanol e a água e, conseqüentemente, propicia a diminuição da retenção destes alcaloides pela fase estacionária C18, com caráter mais apolar.

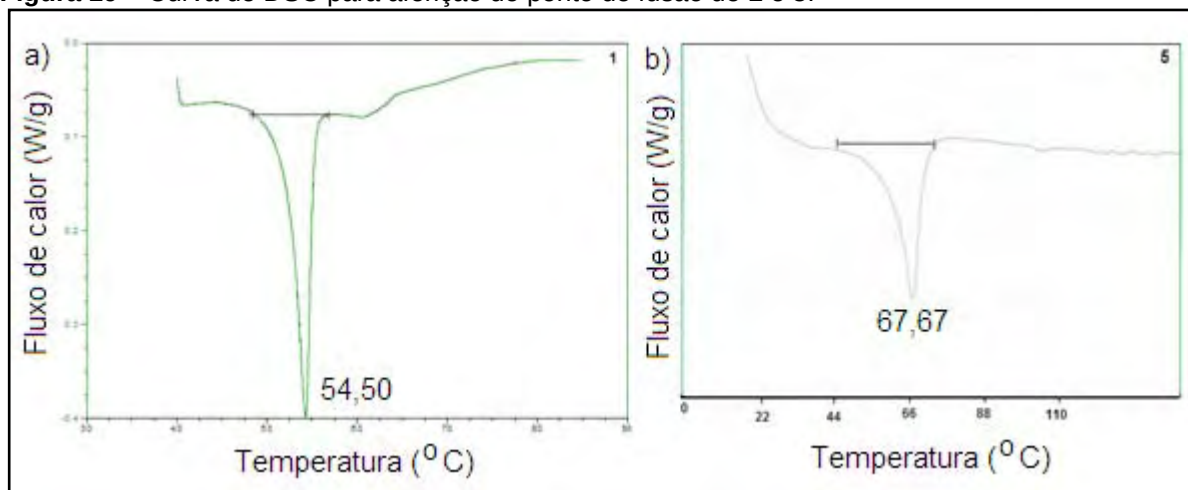
A ordem de eluição em CLAE, com fase estacionária C18 (fase reversa), é invertida quando comparada com a ordem de eluição em coluna aberta, com fase estacionária de sílica (fase normal), justificando o maior tempo de retenção para a (–)-espectralina (**5**), ligeiramente mais apolar que a (–)-cassina (**1**), devido a dois grupos metilênicos a mais na cadeia carbônica aberta, sendo suficiente para alterar as propriedades físico-químicas do composto.

Os mesmos procedimentos cromatográficos foram adotados para o restante da fração diclorometano (COLLINS et al., 2006).

Para verificar o grau de pureza dos precursores reacionais (–)-cassina e (–)-espectralina, foram feitas medidas do ponto de fusão utilizando a técnica de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) (Figura 19). A DSC é uma técnica que permite a determinação da curva de fusão da amostra durante o aquecimento até o ponto de fusão. Quanto maior a concentração de impurezas, mais larga é a faixa de fusão. Analisando a Figura 19, pode-se observar que o alcaloide **1**, apresenta um ponto de fusão de 54,50°C e um pico relativamente fino e simétrico, indicando um

maior grau de pureza (97,2%). O ponto de fusão está entre a faixa de 54-56°C, como descrito por Makabe et al. (2003). Já o alcaloide **5** apresenta um ponto de fusão de 67,67°C e um pico mais largo, indicando um menor grau de pureza (93,3%).

Figura 19 – Curva de DSC para aferição do ponto de fusão de **1** e **5**.

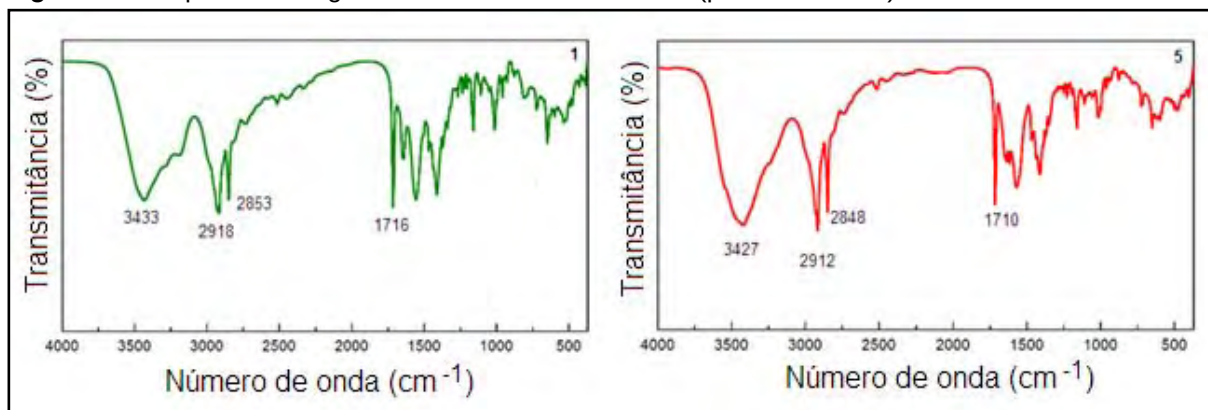


- a) (**1**) m = 0,7 mg; pureza = 97,2%; ponto de fusão = 54,50 °C; MM = 297,27 g mol⁻¹
 b) (**5**) m = 0,9 mg; pureza = 93,3%; ponto de fusão = 67,67 °C; MM = 325,30 g mol⁻¹

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise do espectro na região do Infravermelho (IV) confirmou a presença dos grupos funcionais característicos na estrutura molecular dos alcaloides **1** e **5** (Figura 20). Para o alcaloide **1**, verifica-se uma banda em torno de 3433 cm⁻¹, proveniente do estiramento do grupo –OH de um álcool ligado provavelmente por ligação de hidrogênio intramolecular com o átomo de N, devido ao conformero preferencial desta molécula, como discutido anteriormente no item 3.5, e para o alcaloide **5**, uma banda em 3427 cm⁻¹. A banda proveniente do estiramento N–H está sobreposta a banda da hidroxila, portanto não foi possível observá-la em nenhum dos espectros. Os grupos metilênicos puderam ser identificados para o alcaloide **1** pelas bandas em 2918 cm⁻¹ e 2853 cm⁻¹, e para o alcaloide **5** pelas bandas em 2912 cm⁻¹ e 2848 cm⁻¹, oriundas do estiramento assimétrico e simétrico, respectivamente. A banda relativa ao estiramento da carbonila (C=O) da cetona foi observada em 1716 cm⁻¹ para o alcaloide **1** e em 1710 cm⁻¹ para o alcaloide **5** (BARBOSA, 2007; PAVIA et al., 2010)

Figura 20 – Espectro na região do IV dos alcaloides **1** e **5** (pastilha de KBr).



Fonte: Elaborada pelo autor.

O alcaloide **1** foi isolado como um sólido branco. A análise do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 21), permitiu identificar como principais sinais um tripleto em δ 2,46, integrando para dois hidrogênios e um singlete em δ 2,12 integrando para três hidrogênios, que foram atribuídos ao H-10' e H-12', respectivamente, localizados na cadeia lateral. Os hidrogênios do anel piperidínico aparecem em δ 2,80 (H-2), em δ 3,60 (H-3) e em δ 2,60 (H-6) (Tabela 5). No espectro de RMN DE ¹³C (125 MHz, CD₃OD) (Figura 22) foi possível identificar os deslocamentos químicos característicos do anel piperidínico em δ 56,40 (C-2), em δ 67,88 (C-3) e em δ 57,83 (C-6). A carbonila do grupo metil-cetona, localizada na cadeia lateral, apresenta um δ 212,2. Os carbonos metílicos aparecem em δ 29,76 (C-12') e em δ 18,07 (C-7). Na região de δ 30,2–30,8 ocorre a sobreposição dos sinais provenientes dos hidrogênios metilênicos (Tabela 5).

O alcaloide **5** foi isolado como um sólido amarelo claro. A análise do espectro de RMN de ¹H (500 MHz, CD₃OD) (Figura 23), evidencia a semelhança estrutural entre os alcaloides (Tabela 5), no entanto no espectro de RMN de ¹³C foi observado duas unidades metilênicas adicionais para o alcaloide **5** (Figura 24). Os deslocamentos químicos dos carbonos C-3'–8' (**1**) e C-3'–10' (**5**) foram propostos com auxílio do software *ChemDraw Ultra* porém é difícil atribuir com precisão o deslocamento químico relativo a cada carbono uma vez que a diferença numérica encontra-se na terceira casa decimal.

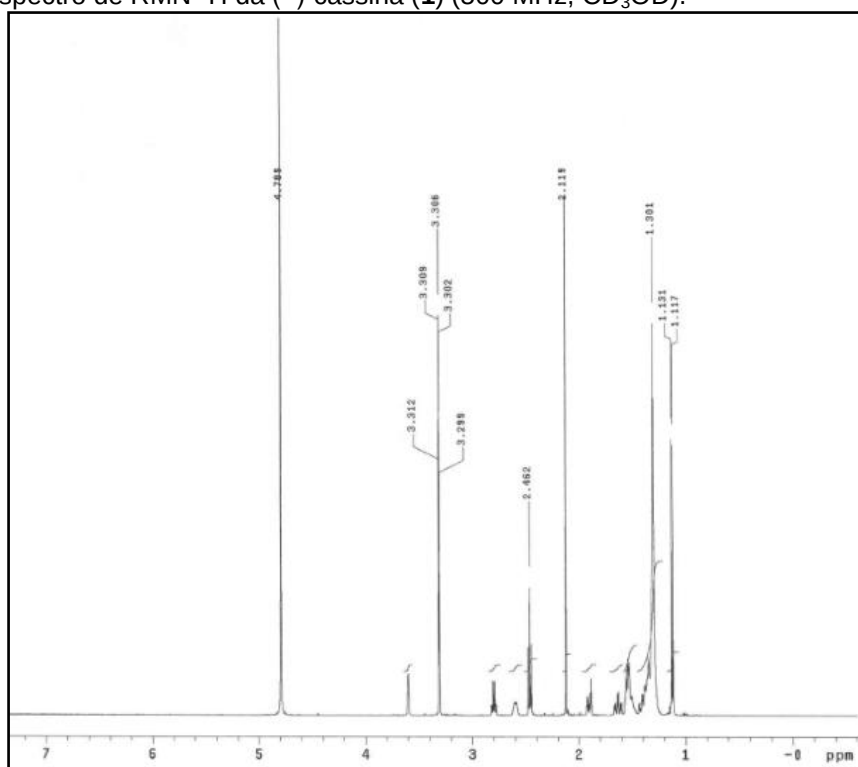
Tabela 5 – Dados de RMN ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) de **1** e **5** em CD_3OD .

Posição	(-)-cassina (1)		(-)-espectralina (5)	
	δH^a (ppm), m^c , J^b	δC^a (ppm)	δH^a (ppm), m^c , J^b	δC^a (ppm)
2	2,80 dq (7,0; 1,5)	56,40	2,78 dq (7,0; 1,5)	56,35
3	3,60 m	67,88	3,59 m	67,97
4a	1,90 m	32,51	1,90 m	32,57
4b	1,63 m		1,63 m	
5	1,37 m	26,77	1,36 m	26,79
6	2,60 m	57,83	2,58 m	57,79
7	1,12 d (7,0)	18,07	1,10 d (7,0)	18,16
1'	1,30 m	37,23	1,35 m	37,34
2'	1,43 m	25,91	1,40 m	26,01
3'	1,30 m	30,55	1,29 m	30,51
4'	1,30 m	30,50	1,29 m	30,61
5'	1,30 m	30,58	1,29 m	30,67
6'	1,30 m	30,60	1,29 m	30,67
7'	1,30 m	30,23	1,29 m	30,73
8'	1,30 m	30,83	1,29 m	30,58
9'	1,54 m	24,88	1,29 m	30,24
10'	2,46 t (7,5)	44,31	1,29 m	30,86
11'		212,20	1,55 m	24,89
12'	2,12 s	29,76	2,46 t (8,0)	44,32
13'				212,21
14'			2,12 s	29,76

^a Deslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS. ^b Constantes de acoplamento (J), expressas em Hz. ^c multiplicidade = s (singleto); d (dubleto); t (tripleto); m (multiplete)

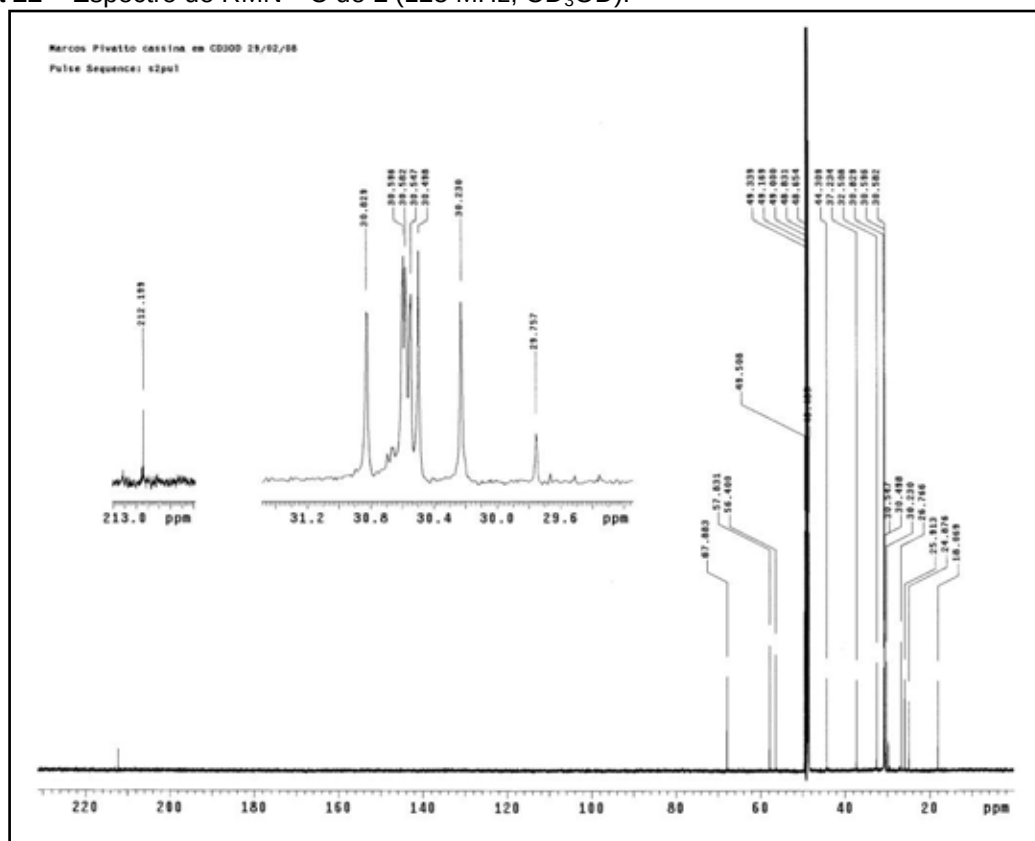
Fonte: (PIVATTO, 2010).

Figura 21 – Espectro de RMN ^1H da (–)-cassina (**1**) (500 MHz, CD_3OD).



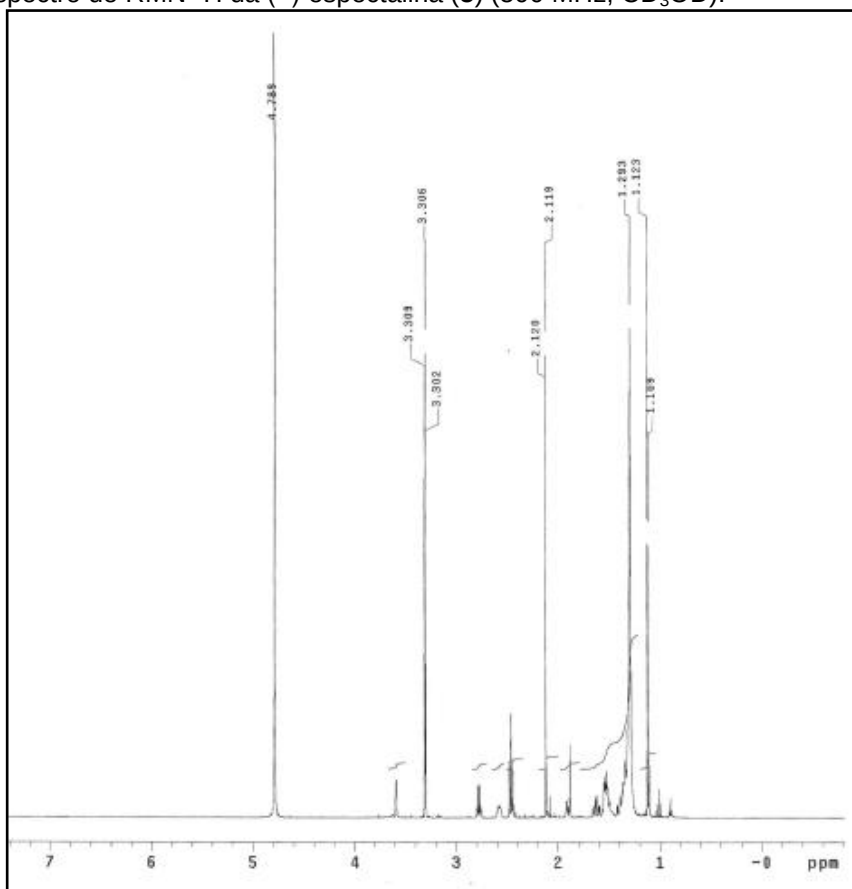
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C de **1** (125 MHz, CD_3OD).



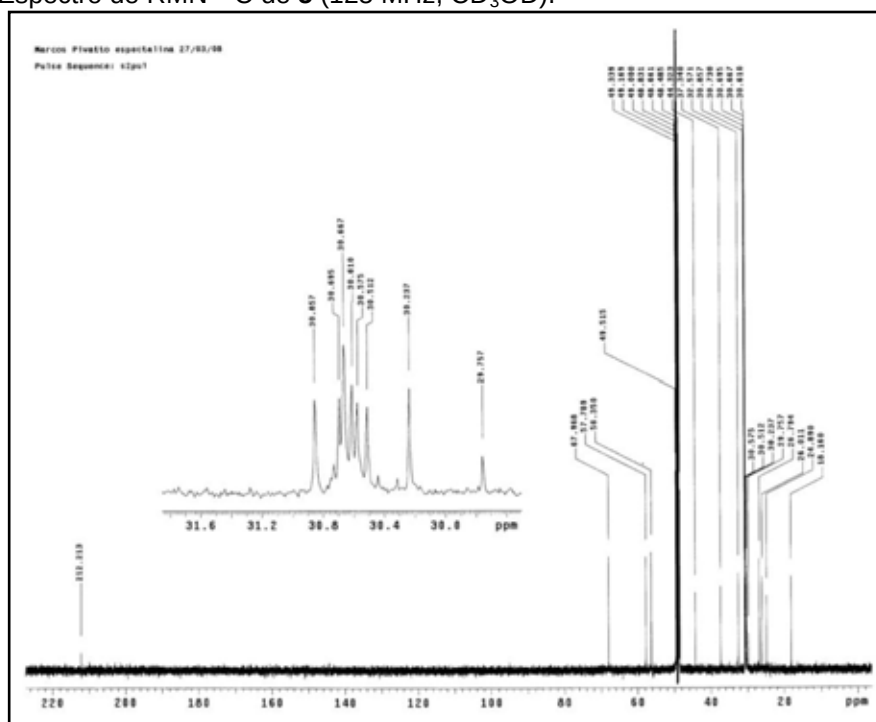
Fonte: (PIVATTO, 2010).

Figura 23 – Espectro de RMN ^1H da (–)-espectralina (**5**) (500 MHz, CD_3OD).



Fonte: Elaborada pelo autor.

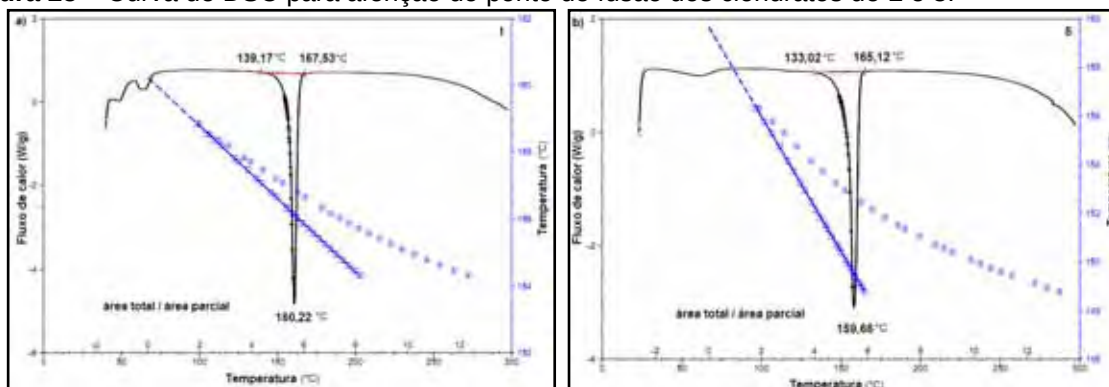
Figura 24 – Espectro de RMN ^{13}C de **5** (125 MHz, CD_3OD).



Fonte: (PIVATTO, 2010).

Para realizar a síntese dos derivados da (–)-cassina (**1**) e da (–)-espectralina (**5**), foram preparados previamente os respectivos cloridratos, como descrito no item 3.4. O ponto de fusão dos cloridratos foi aferido utilizando a técnica de DSC, sendo obtido para o cloridrato de **1** p.f = 160,2°C (97,5% de pureza) e para o cloridrato de **5**, p.f = 159,7°C (92,7% de pureza) (Figura 25).

Figura 25 – Curva de DSC para aferição do ponto de fusão dos cloridratos de **1** e **5**.



a) cloridrato de **1**:

m = 1,56 mg; pureza = 97,52%; ponto de fusão = 160,22 °C; MM = 333,24 g mol⁻¹

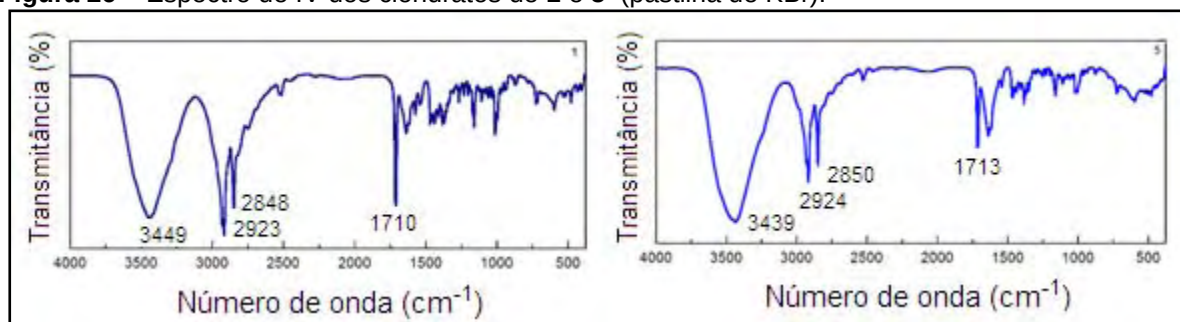
b) cloridrato de **5**:

m = 1,72 mg; pureza = 92,72%; ponto de fusão = 159,66 °C; MM = 361,27 g mol⁻¹

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise dos espectros na região do Infravermelho (IV) para os cloridratos de **1** e **5** (Figura 26) indicam a presença dos mesmos grupos funcionais característicos na estrutura molecular dos alcaloides **1** e **5**, uma vez que se trata de seus respectivos sais de amínio, variando na intensidade da absorção.

Figura 26 – Espectro de IV dos cloridratos de **1** e **5** (pastilha de KBr).

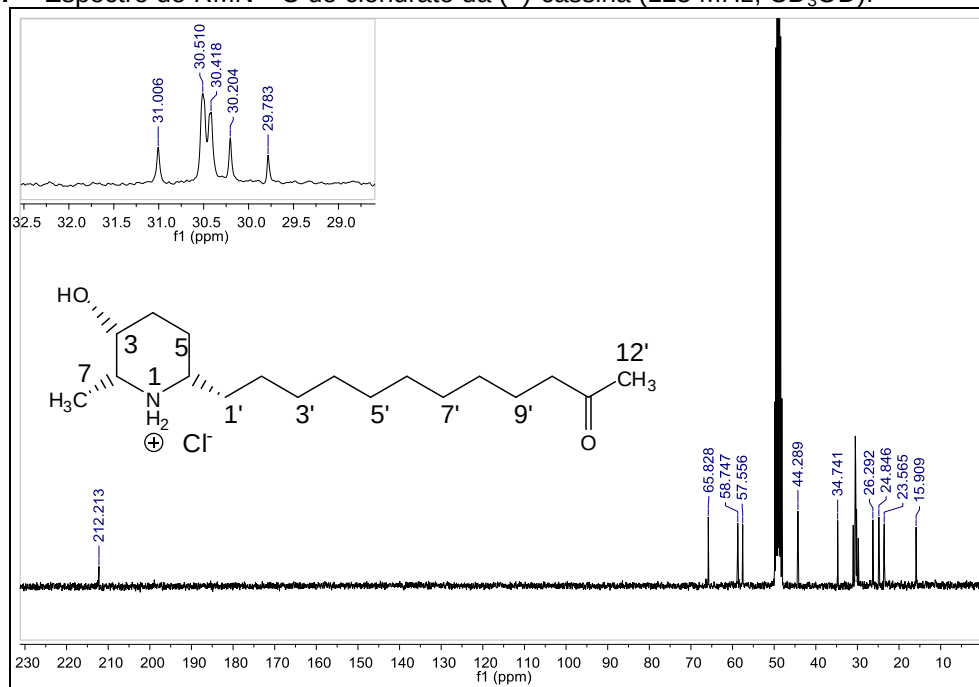


Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise dos espectros de RMN de ¹³C e ¹H dos cloridratos de **1** e **5** (Figuras 27 e 28 ; Figuras 29 e 30 , respectivamente) permite inferir que ambos apresentam os deslocamentos químicos característicos de seus precursores reacionais, havendo

pequena mudança nos deslocamentos químicos dos C-2, C-3 e C-6 do anel piperidínico (Tabela 6) , devido a formação de sal amínico.

Figura 27 – Espectro de RMN ^{13}C do cloridrato da (-)-cassina (125 MHz, CD_3OD).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 28 – Espectro de RMN ^1H do cloridrato da (-)-cassina (300 MHz, CD_3OD).

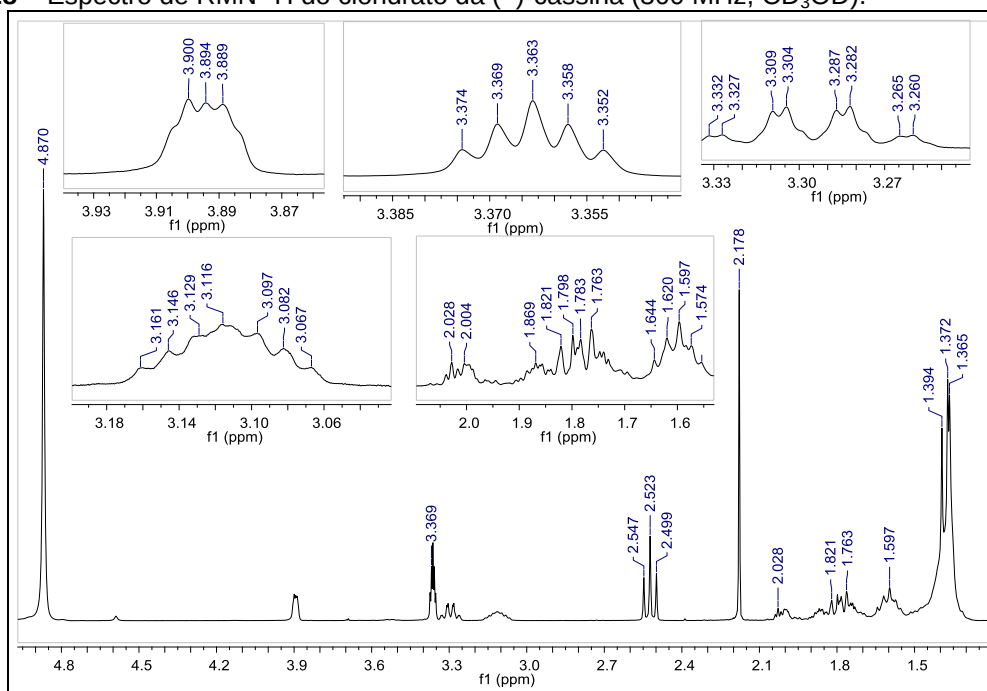
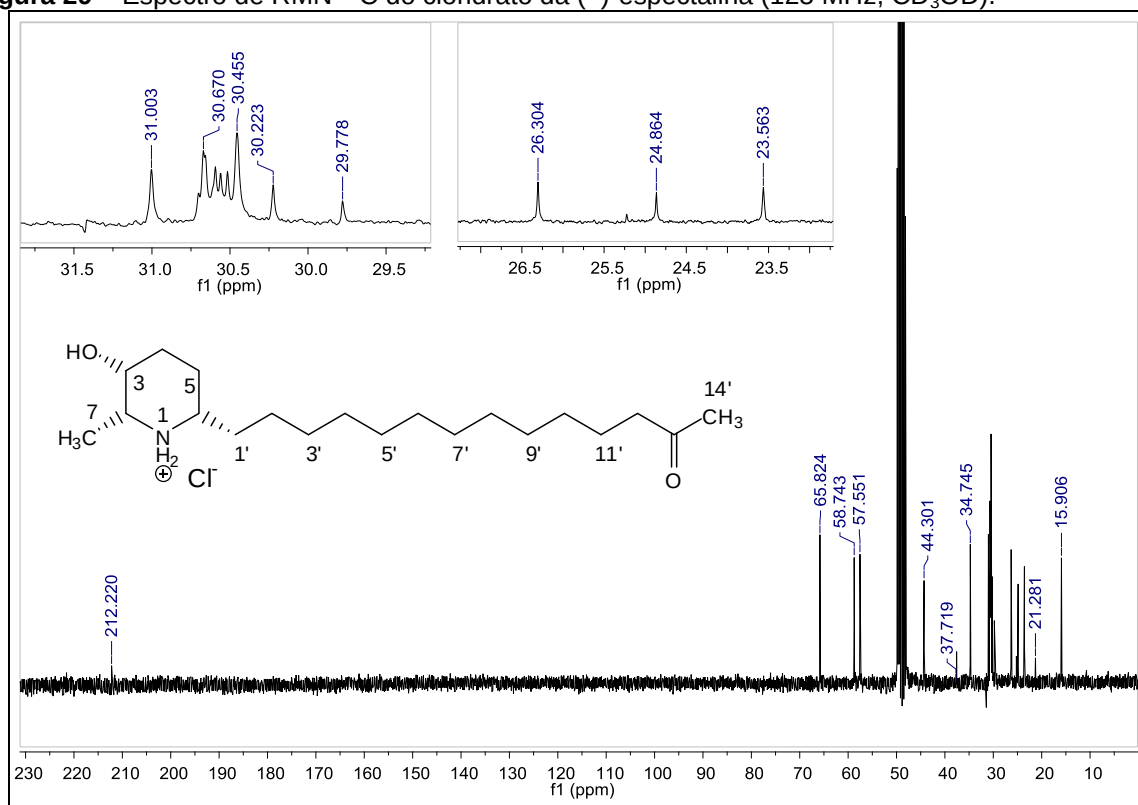
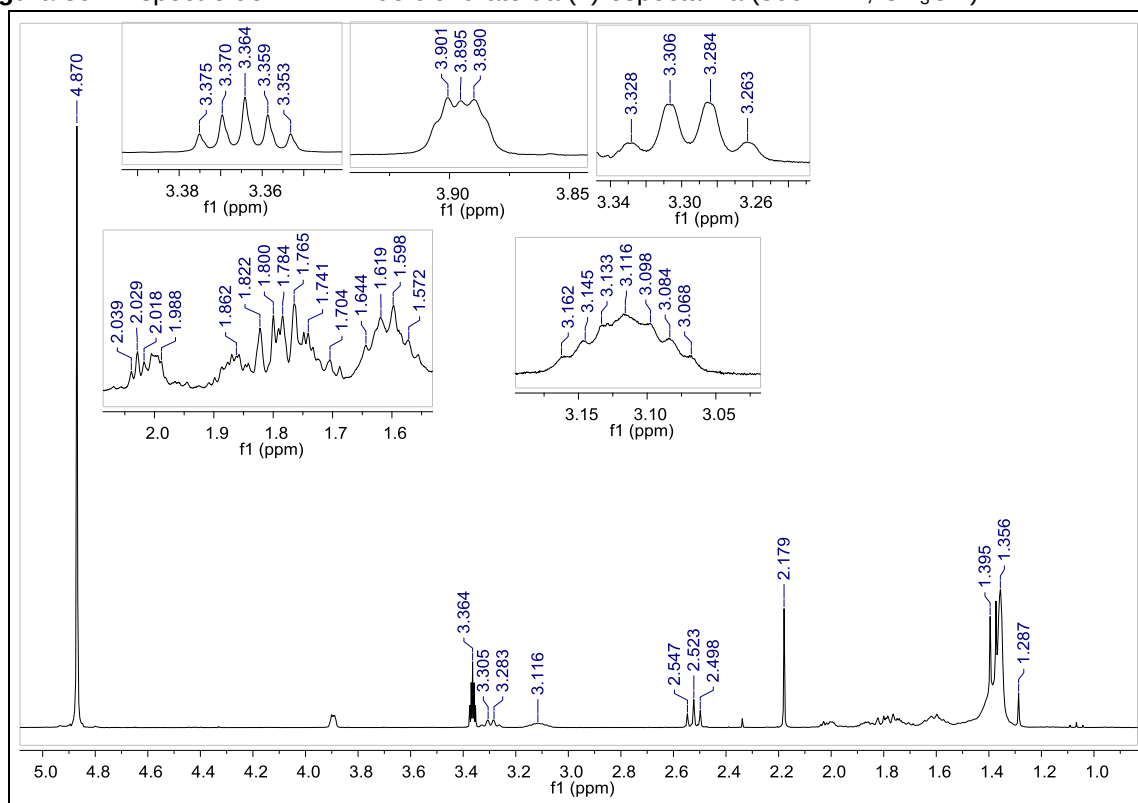


Figura 29 – Espectro de RMN ^{13}C do cloridrato da (–)-espectralina (125 MHz, CD_3OD).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 30 – Espectro de RMN ^1H do cloridrato da (–)-espectralina (300 MHz, CD_3OD).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6 – Dados de RMN de ^{13}C e ^1H do cloridrato (–)-cassina e cloridrato (–)-espectralina (300 MHz, CD_3OD).

cloridrato (–)-cassina			cloridrato (–)-espectralina		
Posição	$\delta \text{ C}^{\text{a}}$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^{\text{a}}$ (em ppm); (multiplicidade) ^c	Posição	$\delta \text{ C}^{\text{a}}$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^{\text{a}}$ (em ppm); (multiplicidade) ^c
2	57,556 (CH)	3,2-3,3(m)	2	57,551 (CH)	3,2-3,3 (m)
3	65,828 (CH)	3,828 (m)	3	65,824 (CH)	3,895 (m)
4	26,292 (CH_2)	1,56;1,31 (m) ^d	4	26,304 (CH_2)	1,56;1,31 (m) ^d
5	24,846 (CH_2)	2,12;1,87 (m) ^d	5	24,864 (CH_2)	2,12;1,87 (m) ^d
6	58,747 (CH)	3,116(m)	6	58,743 (CH)	3,116 (m)
7	15,909 (CH_3)	1,70 (d) ^d	7	15,906 (CH_3)	1,70 (d) ^d
1'	30,9 (CH_2) ^d	1,99 (m) ^d	1'	30,9 (CH_2) ^d	1,99 (m) ^d
2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
7'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	7'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
8'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	8'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
9'	23,565 (CH_2)	1,597 (m)	9'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
10'	44,289(CH_2)	2,523 (t)	10'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
11'	212,213 (C)		11'	23,563 (CH_2)	1,598 (m)
12'	29,8 (CH_3) ^d	2,178 (s)	12'	44,301 (CH_2)	2,523 (t)
13'			13'	212,220 (C)	
14'			14'	29,8 (CH_3) ^d	2,179 (s)

^a Deslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS.

^b Constante de Acoplamento (J) em Hz.

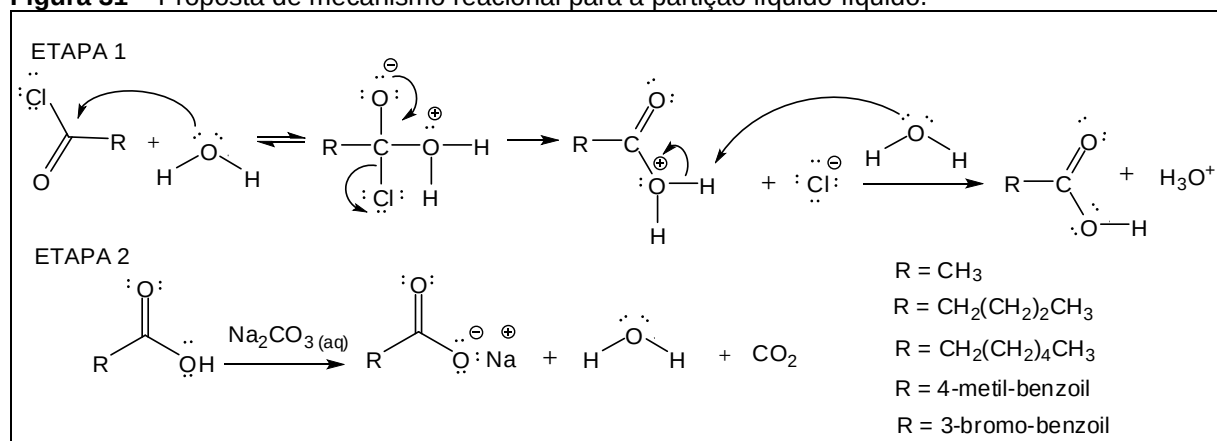
^c multiplicidade = s (singleto); d (dubleto); t (tripleto); m (multiplete)

^d Deslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os produtos (–)-3-O-acetil-cassina (**10**), (–)-3-O-acetil-espectalina (**9**), (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**), (–)-3-O-pentanoil-espectalina (**30**), (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**), (–)-3-O-heptanoil-espectalina (**32**), (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**), (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina (**34**), (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**) e (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectalina (**36**) foram obtidos de acordo com o descrito no item 3.4.1. Sendo assim, as misturas reacionais foram submetidas à purificação. Os cloretos de ácido reagem com água e formam o respectivo ácido carboxílico, o qual é praticamente insolúvel em meio aquoso (Figura 31). Para separá-lo do meio reacional, foi feita uma partição líquido-líquido com solvente orgânico (clorofórmio), o qual apresenta maior afinidade pelos derivados semissintéticos, e solução aquosa saturada de carbonato de sódio (pH = 10), para transformar o ácido carboxílico num sal orgânico (Figura 31), portanto solúvel em meio aquoso, formando assim uma mistura heterogênea: fase orgânica, contendo o produto reacional, e uma fase aquosa, contendo o respectivo sal orgânico do ácido carboxílico. Dessa forma, foi possível a separação parcial dos produtos de interesse. Como a partição foi feita a temperatura ambiente, sem aquecimento, a hidrólise básica dos ésteres foi evitada.

Figura 31 – Proposta de mecanismo reacional para a partição líquido-líquido.

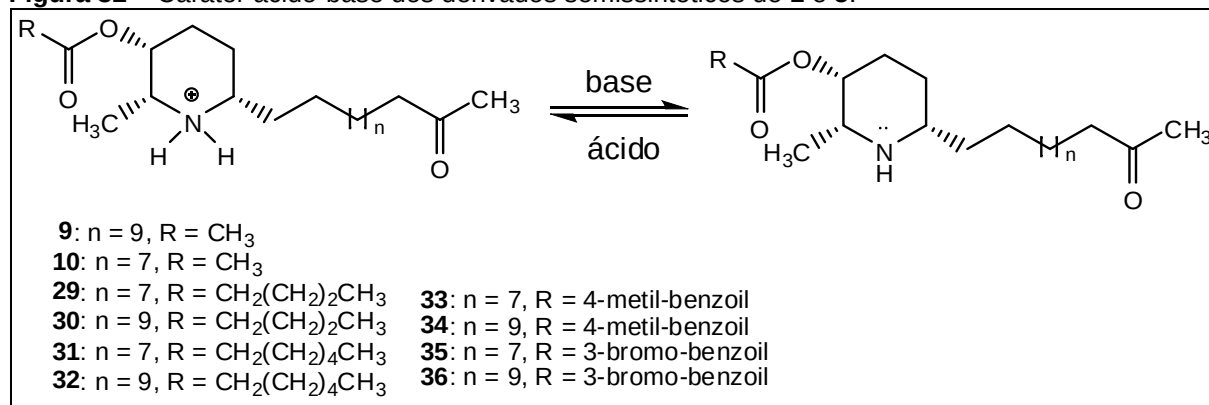


Fonte: Elaborada pelo autor.

Através de CCDA, foi possível verificar que o excesso de ácido carboxílico e seu respectivo sal orgânico haviam sido removidos do meio reacional, porém, material de partida sem reagir ainda continuava em mistura. Sendo assim, placas preparativas (FE: sílica gel, FM: CHCl₃:CH₃OH:NH₄OH (95:05:2,5)) foram utilizadas no processo de purificação. Tendo em vista que os precursores (–)-cassina e (–)-espectalina e seus derivados semissintéticos alifáticos não absorvem no UV, diferentemente dos derivados que apresentam um anel aromático como cromóforo,

foi possível utilizar a câmera de UV para identificar a banda de interesse e separar o produto desejado sem fazer uso de revelador químico, o qual degradaria o produto. Porém, adotando-se esta metodologia, os derivados semissintéticos, uma vez na forma protonada, retornaram a forma de base livre, tendo em vista o caráter ácido-base dos alcaloides (Figura 32) (COSTA, 2005).

Figura 32 – Caráter ácido-base dos derivados semissintéticos de **1** e **5**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Numa etapa adiante, todos os produtos foram convertidos novamente em cloridrato, uma vez que na forma de sal apresentam maior estabilidade química e maior solubilidade em solventes mais polares, como em meio aquoso, propriedade fundamental de um candidato a fármaco.

O rendimento teórico (em massa) dos produtos descritos anteriormente e o rendimento final, obtido ao final do processo de purificação, encontram-se discriminados na Tabela 7.

Tabela 7 – Dados reacionais e rendimentos.

Produtos	(-)-cassina(1) ^a		(-)-espectralina(5) ^a		Reagente ^b		Rendimento teórico (mg)	Massa obtida (mg)	Rendimento final ^d %
	mg	mmol	mg	mmol	m L	mmol			
9			20,0	0,055	0,40	5,6	22,4	21,5	96,1
10	20,0	0,060			0,42	5,9	22,6	22,0	97,5
29	20,0	0,060			0,20	1,7	25,1	19,5	78,0
30			20,0	0,055	0,18	1,5	24,7	20,2	81,8
31	20,0	0,060			0,28	1,8	26,8	21,0	78,0
32			20,0	0,055	0,25	1,6	26,2	18,0	68,6
33^c	20,0	0,060			0,47	3,6	27,1	19,3	71,1
34^c			20,0	0,055	0,50	3,8	26,6	15,2	56,4
35^c	20,0	0,060			0,48	3,6	31,0	22,0	70,8
36^c			20,0	0,055	0,44	3,3	30,1	20,0	66,4

^a Substrato na forma de cloridrato. ^b Descrito nas Figuras 9 e 10.

^c Adição de catalisador (4-DMAP) na proporção de 1:2 em relação aos cloridratos de **1** e **5**.

^d Produto obtido após purificação.

Fonte: Elaborada pelo autor.

O mecanismo envolvido nas reações de esterificação para a obtenção dos compostos **9,10,29-32**, sem o uso de catalisador, está descrito na Figura 33. Já a Figura 34, descreve o mecanismo reacional para os compostos **33-36**, obtidos com o uso do catalisador 4-DMAP.

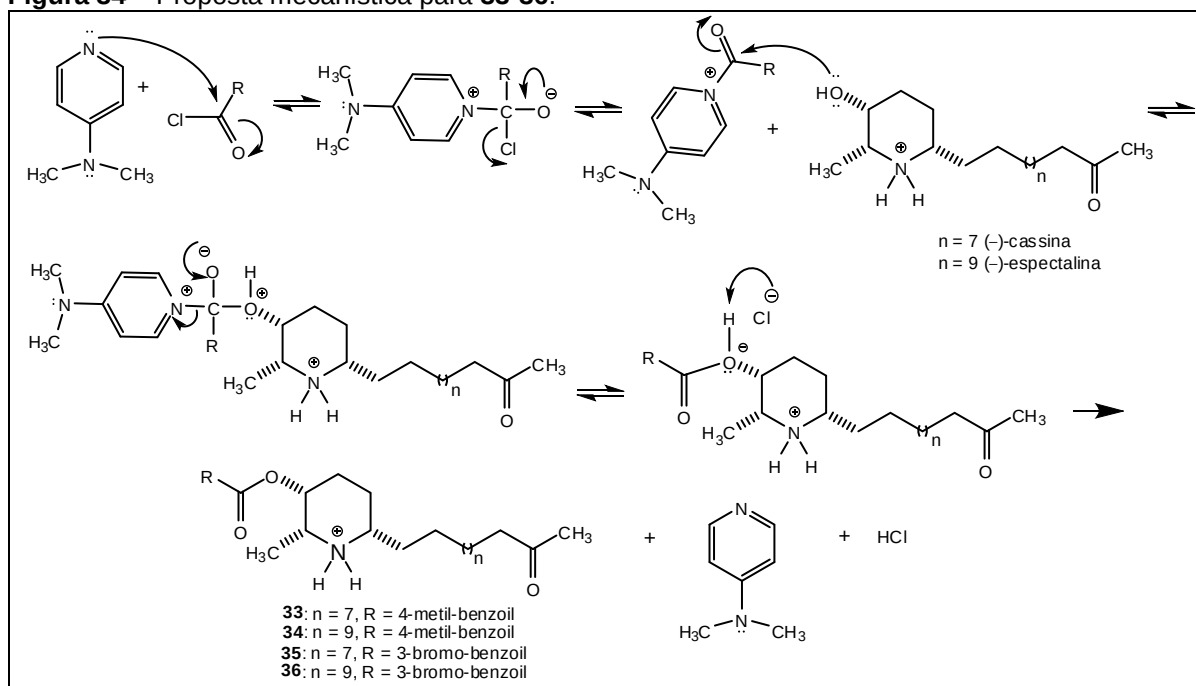
Figura 22. Propuesta mecanística para 9, 29, 32 y 31.

cloruro de ácido

$n = 7$ (-)-cassina
 $n = 9$ (-)-espectralina

$\mathbf{9}$: $n = 9$, $R = \text{CH}_3$ $\mathbf{29}$: $n = 7$, $R = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ $\mathbf{31}$: $n = 7$, $R = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$
 $\mathbf{10}$: $n = 7$, $R = \text{CH}_3$ $\mathbf{30}$: $n = 9$, $R = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ $\mathbf{32}$: $n = 9$, $R = \text{CH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$

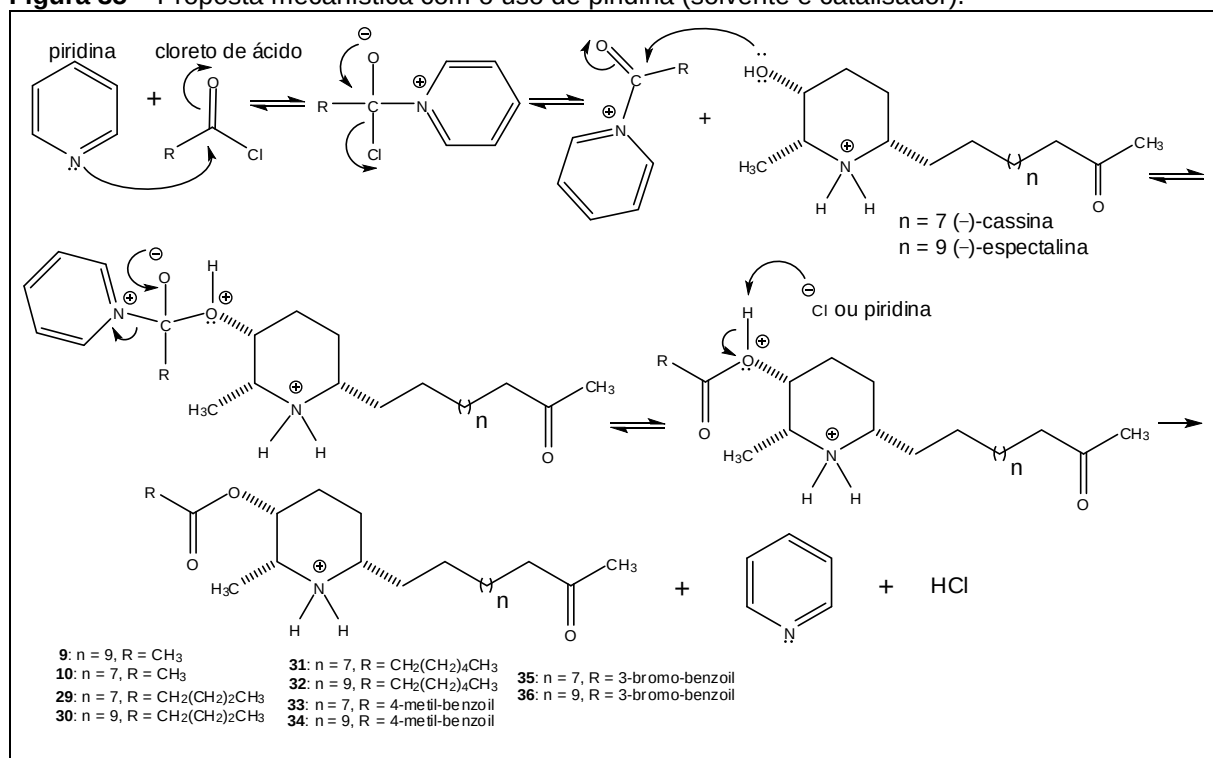
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 34 – Proposta mecanística para 33-36.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma alternativa a este tipo de reação de esterificação seria utilizar piridina como solvente e catalisador ao mesmo tempo (Figura 35) (CLAYDEN, 2001), ao invés de clorofórmio (solvente) e 4-DMAP (catalisador). A piridina é um nucleófilo para grupos carbonílicos e frequentemente é usada como catalisador nucleofílico em reações de acilação. Esta, por ser mais nucleofílica que o álcool (precursor), ataca o cloreto de ácido rapidamente, formando uma espécie intermediária altamente eletrofílica. Este então reage com o álcool para formar o éster. Porém, a piridina pode abstrair um próton do nitrogênio do anel piperidínico retornando o cloridrato a forma de base livre, permitindo a formação de amida neste sítio reacional.

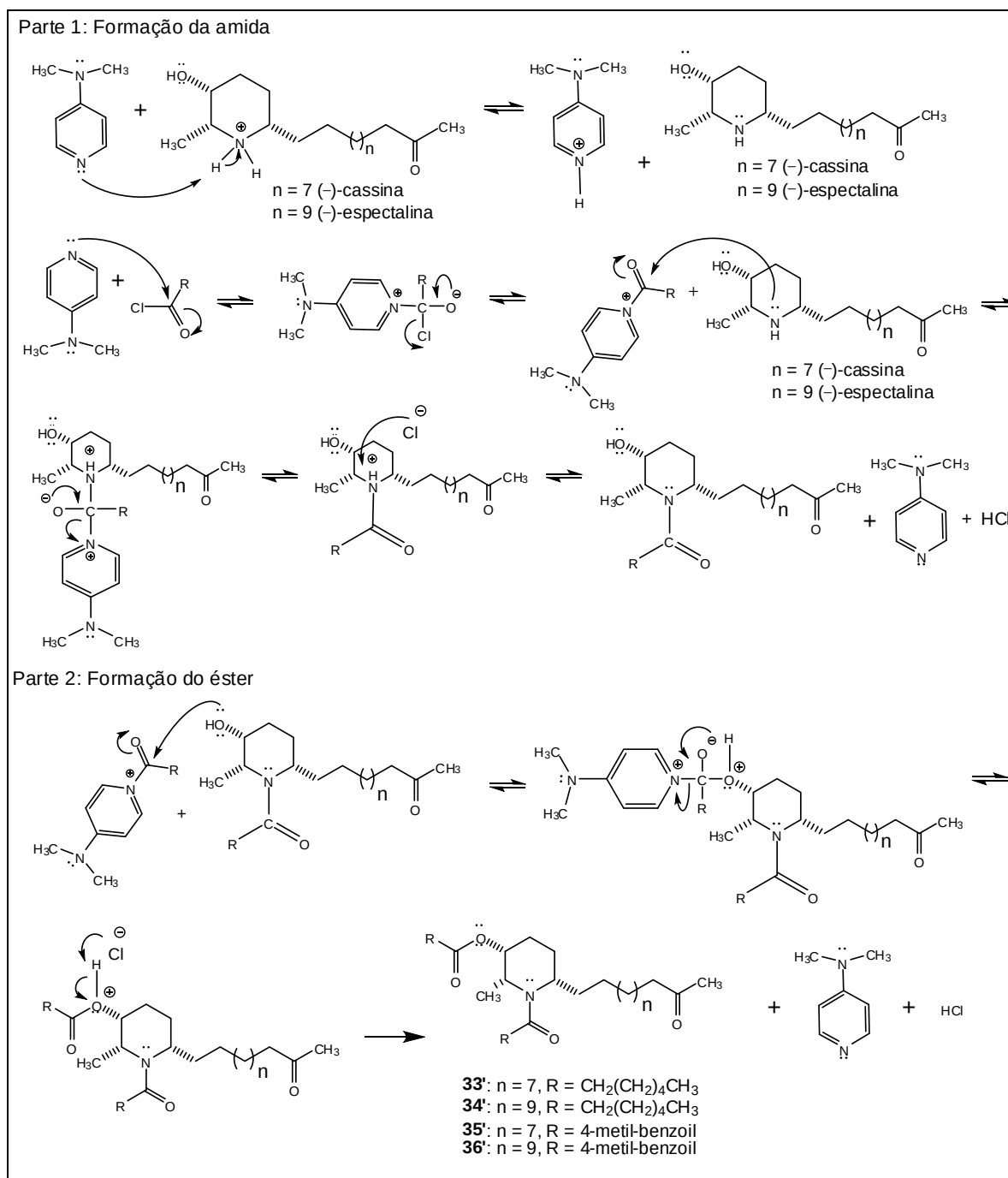
Figura 35 – Proposta mecanística com o uso de piridina (solvente e catalisador).



Fonte: Elaborada pelo autor.

O 4-DMAP é um catalisador muito mais efetivo na acilação catalítica do que a piridina. A presença do grupo amino na sua estrutura molecular reforça a natureza nucleofílica do átomo de nitrogênio. O 4-DMAP atua como uma base podendo reagir com o cloridrato da (-)-cassina e da (-)-espectralina, abstrair um próton e retornar estes precursores a forma de base livre. Sendo assim, a desproteção do nitrogênio do anel piperidínico aliado a sua maior nucleofilicidade quando comparado ao oxigênio da hidroxila (álcool), propicia a formação de amida e éster, na mesma molécula (Figura 36). Isto pode ser observado para as reações nas quais o 4-DMAP foi utilizado como catalisador.

Figura 36 – Proposta mecanística para a formação de éster e amida na mesma molécula.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Uma estratégia sintética seria utilizar o *t*-Boc (*t*-butiloxicarbonil) como grupo protetor para o nitrogênio do anel piperidínico (MAKABE, 2003). Desta forma, a formação de amida neste sítio reacional estaria impedida. A remoção do grupo protetor poderia ser feita com a adição de solução de HCl em metanol.

5.1 Caracterização dos Produtos reacionais

5.1.1 Análise dos produtos por medição do Ponto de Fusão

Os produtos **9,10,29-32** foram submetidos a aferição do ponto de fusão. As principais características destes produtos foram reunidas na Tabela 8. Como os compostos de **33-36** estão em mistura, não foi possível determinar o ponto de fusão.

Tabela 8 – Características físico-químicas dos compostos **9,10,29-36**.

Produto	Estado físico	Ponto de Fusão (°C)	Coloração
10	sólido	67-69	branco
9	sólido	61-63	branco/amarelo
29	sólido	58-60	amarelo claro
30	sólido	52-55	amarelo claro
31	sólido/pastoso	35-40	amarelo claro
32	sólido/pastoso	35-40	amarelo claro
33^a	pastoso/oleoso		amarelo
34^a	pastoso/oleoso		amarelo
35^a	oleoso		amarelo/laranja
36^a	oleoso		amarelo/laranja

^a Produto em mistura.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.2 Análise dos produtos por Cromatografia Líquida

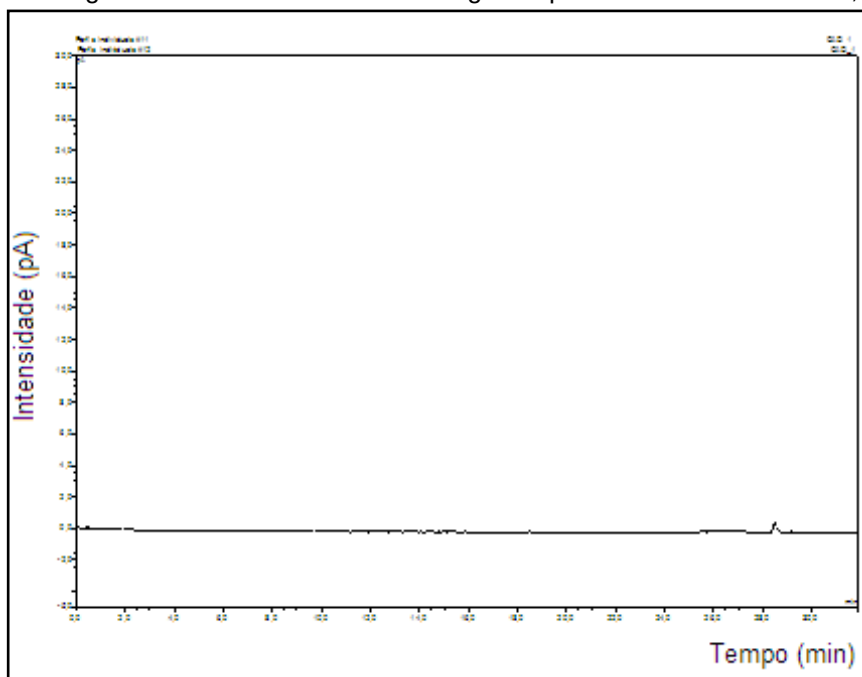
Os produtos reacionais (**9,10,29-36**) foram analisados em Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência com o auxílio do detector CAD-Corona. O detector CAD-Corona detecta quaisquer analitos não voláteis ou semi-voláteis, com ou sem cromóforos, independentemente da estrutura química molecular. Apresenta maior desempenho que os detectores com espalhamento de luz e é compatível com o modo de eluição gradiente. Devido à indisponibilidade de uso do cromatógrafo Líquido acoplado ao detector ELSD, utilizado anteriormente para identificar, isolar e purificar os precursores reacionais (–)-cassina e (–)-espectralina, foi utilizado o CAD–Corona como detector alternativo para os compostos semissintetizados. As condições cromatográficas empregadas foram: coluna analítica Phenomenex® Luna C18, 250 x 4,6 mm 5 µm; modo gradiente (30 min), 35-100% metanol - água

dopada com ácido acético 0,1%, $C = 1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$, volume injeção = 10 μL , fluxo: 1 mL.min^{-1} .

Os cromatogramas foram analisados (Figuras 38-46) e os dados obtidos indicam a presença de alguma substância muito polar para todos os compostos sintetizados e para os precursores reacionais, em $t_R = 1,5 \text{ min}$ e $t_R = 3,5 \text{ min}$, proveniente de impurezas ou de produto de degradação das próprias amostras, pois pelo cromatograma do branco (Figura 37) é possível verificar que não se trata de problemas com a fase móvel e nem com a coluna. O cloridrato (–)-cassina e o cloridrato (–)-espectralina (Figura 38) apresentam um tempo de retenção dentro do esperado, $t_R = 11,4 \text{ min}$ e $t_R = 15,4 \text{ min}$ respectivamente, ou seja, com uma diferença de 4 minutos entre os mesmos.

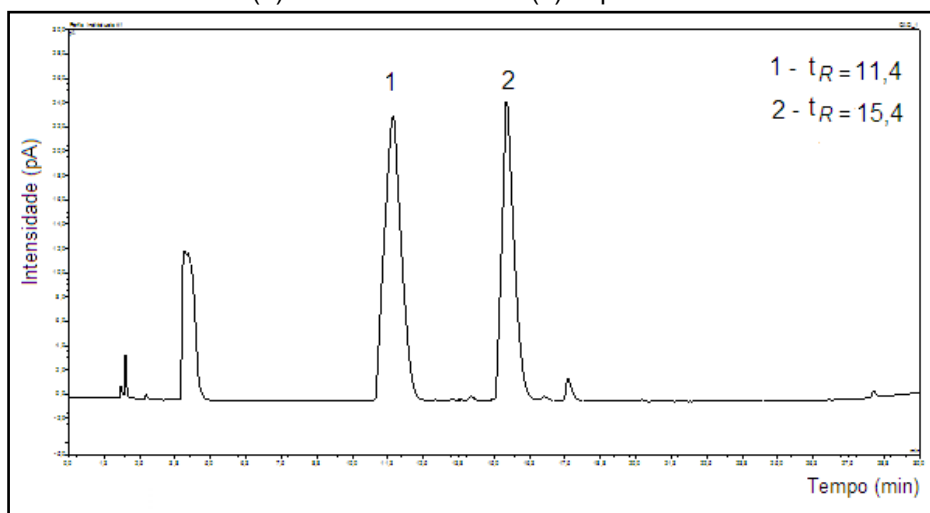
Os cromatogramas dos compostos (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**) e (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (Figuras 41 e 44) apresentam praticamente um único pico, indicando o éster como produto majoritário, com $t_R = 16,6 \text{ min}$ e $t_R = 21,4 \text{ min}$, respectivamente. Em contrapartida, os compostos **33**, **34** e **36** apresentam três picos significativos, indicando a formação do éster (esterificação entre a hidroxila do C-3 do anel piperidínico com o cloreto de ácido) e da possibilidade de formação dos subprodutos amida (N do anel piperidínico com o cloreto de ácido) e éster e amida na mesma molécula, como discutido anteriormente.

Figura 37 – Cromatograma da fase móvel: metanol-água dopada com ácido acético 0,1%.



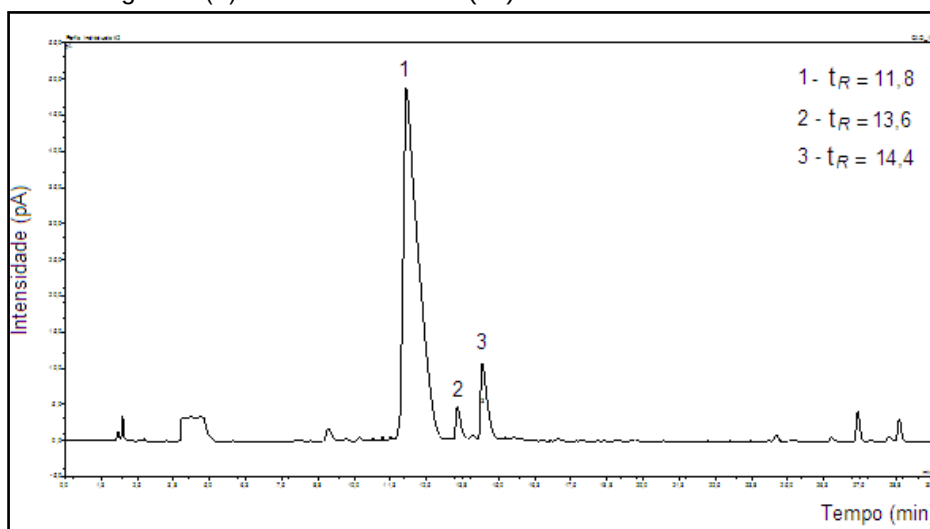
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 38 – Padrões: cloridrato (–)-cassina e cloridrato (–)-espectralina.



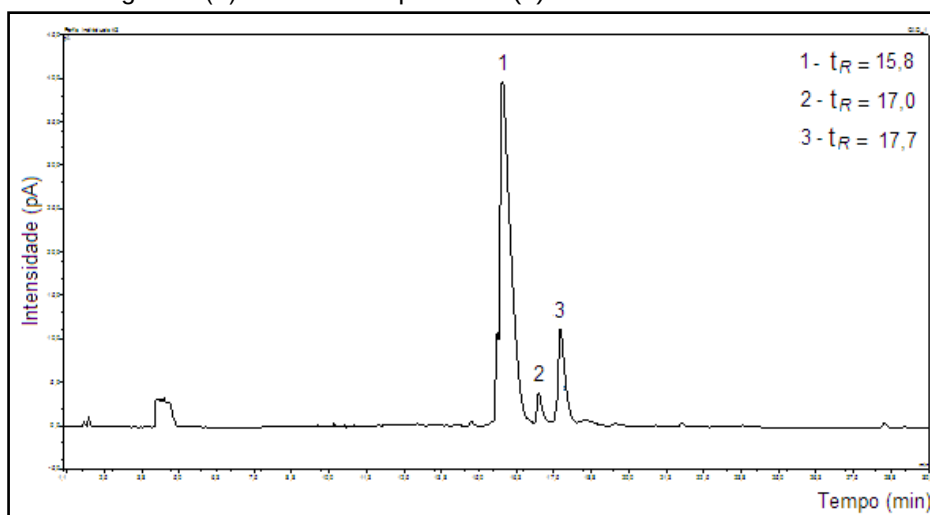
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 39 – Cromatograma (–)-3-O-acetil-cassina (10).



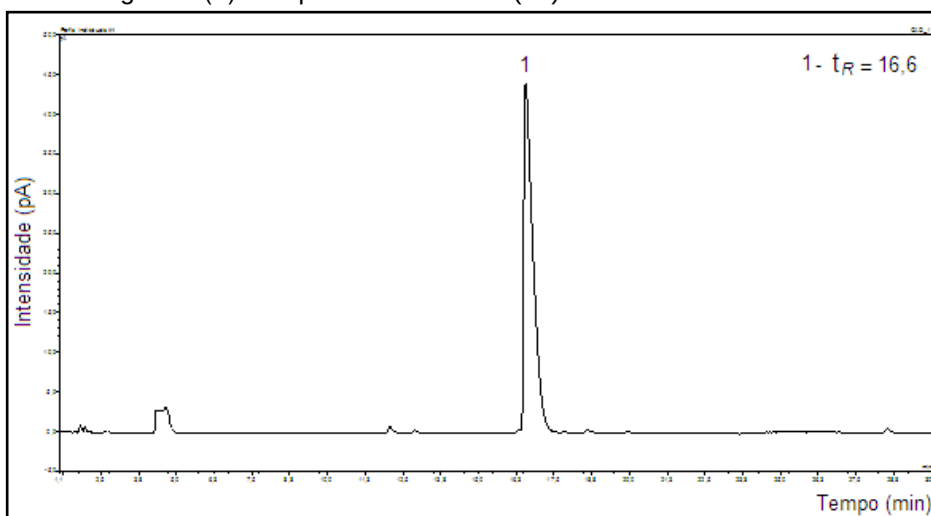
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 40 – Cromatograma (–)-3-O-acetil-espectralina (9).



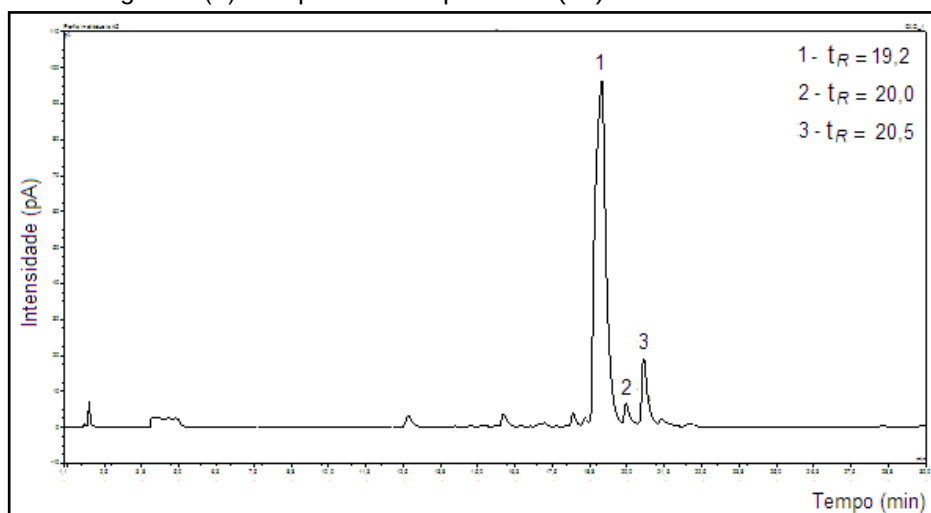
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 41 – Cromatograma (–)-3-*O*-pentanoil-cassina (**29**).



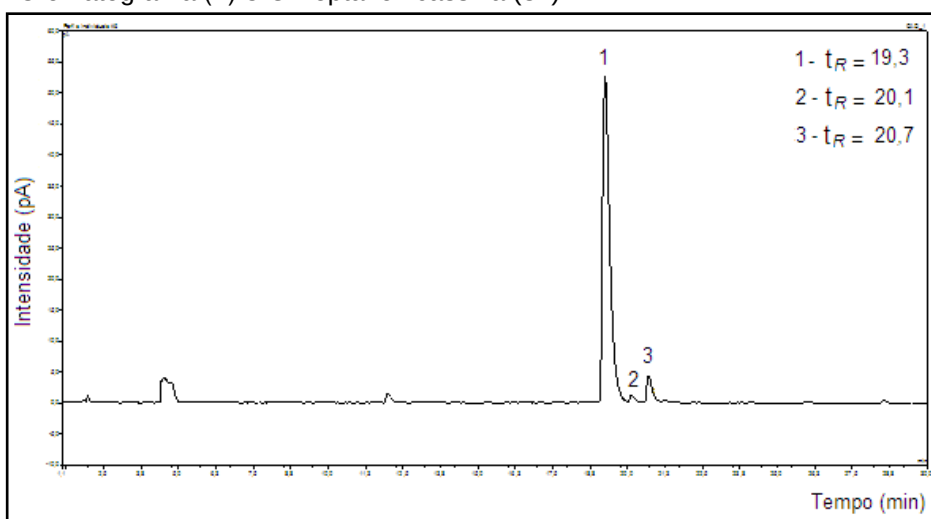
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 42 – Cromatograma (–)-3-*O*-pentanoil-espectalina (**30**).



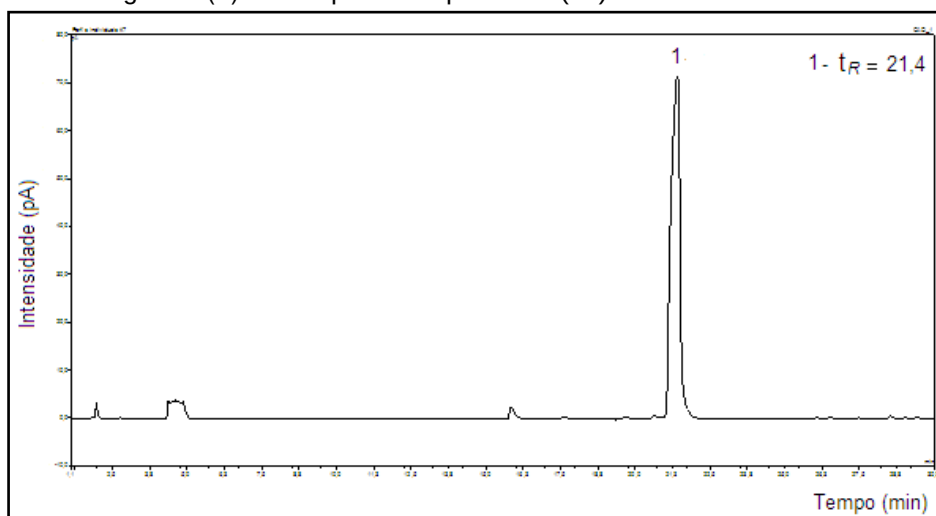
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 43 – Cromatograma (–)-3-*O*-heptanoil-cassina (**31**).



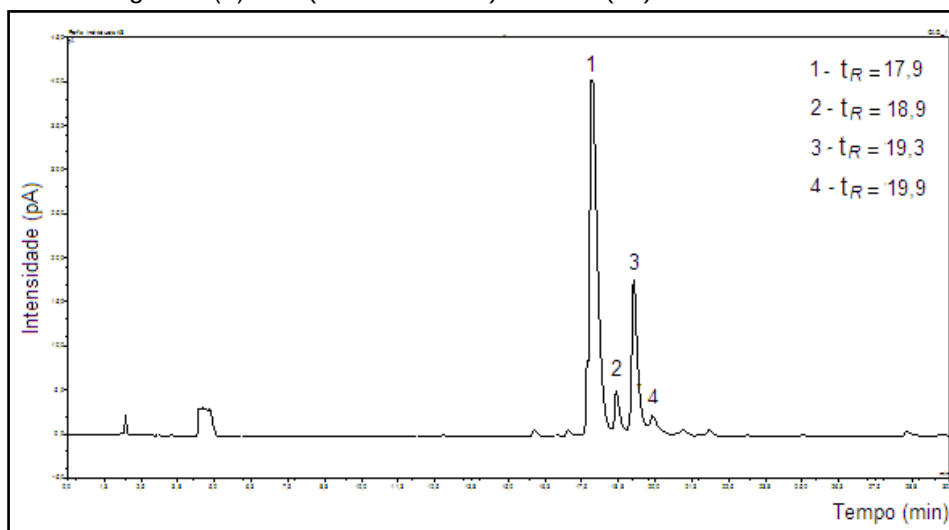
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 44 – Cromatograma (–)-3-O-heptanoil-espectalina (**32**).



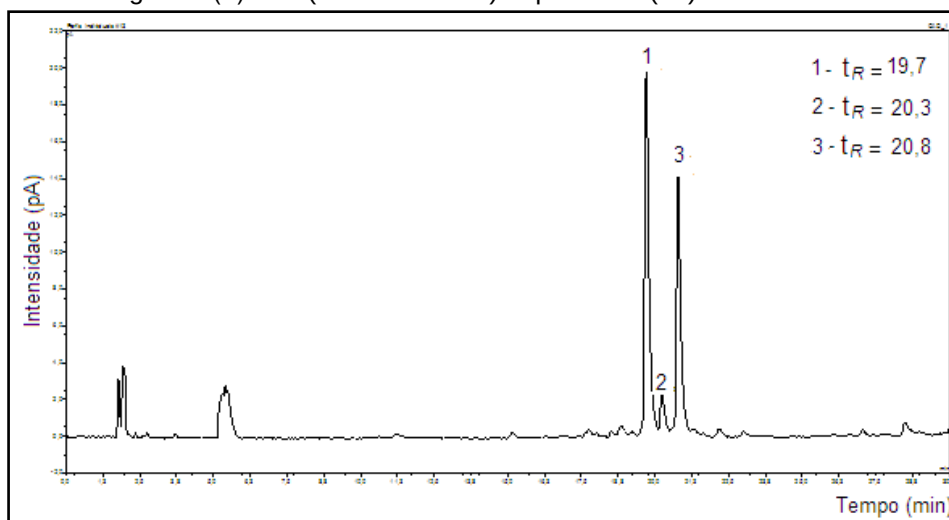
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 45 – Cromatograma (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**).



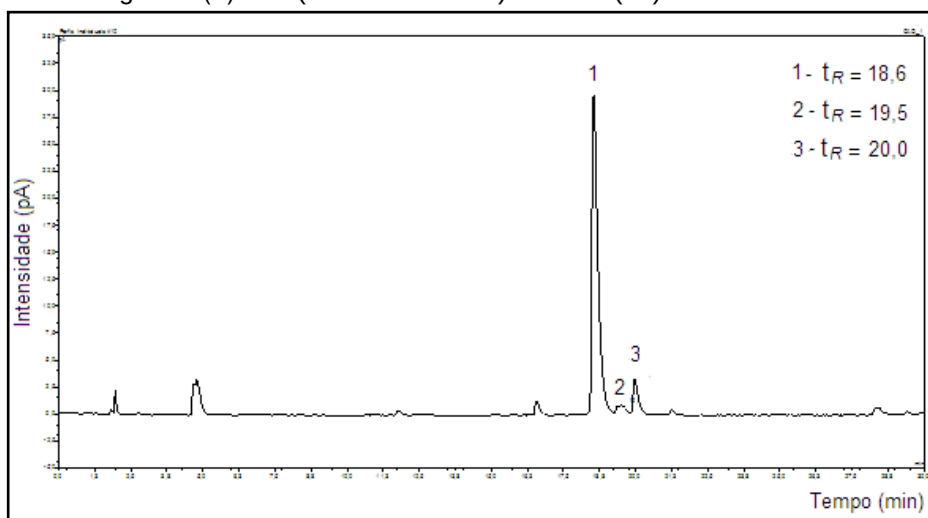
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 46 – Cromatograma (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina (**34**).



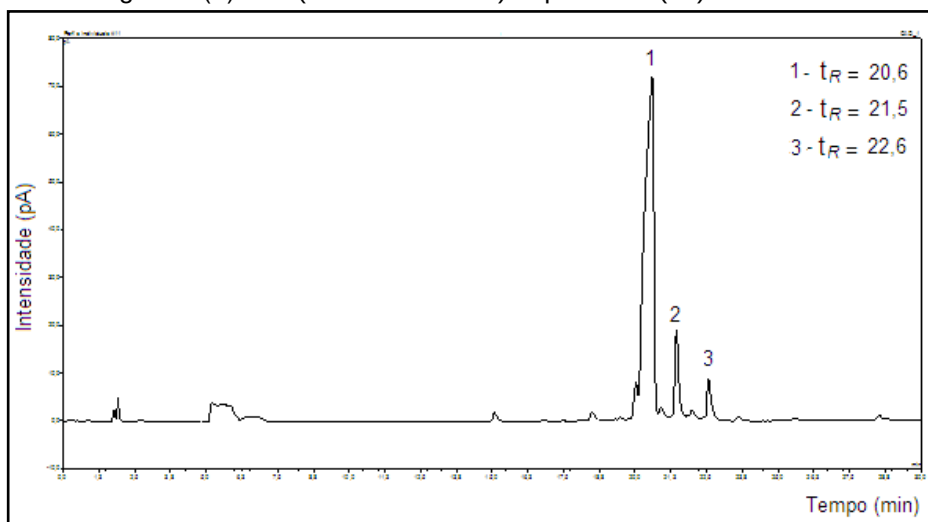
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 47 – Cromatograma (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 48 – Cromatograma (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (**36**).

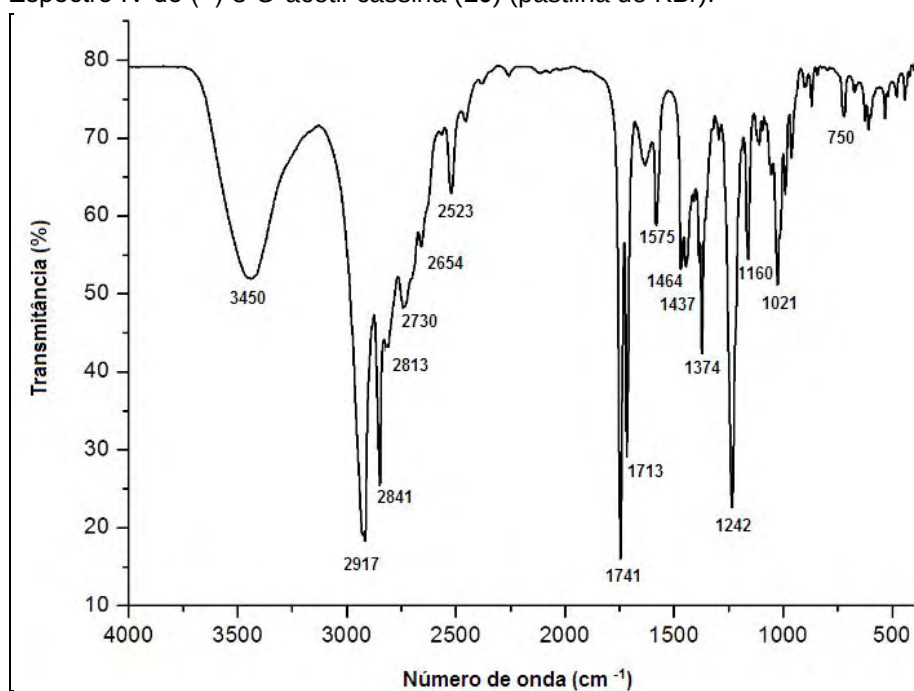


Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.3 Análise dos produtos por Espectroscopia Vibracional de Absorção na região do Infravermelho (IV)

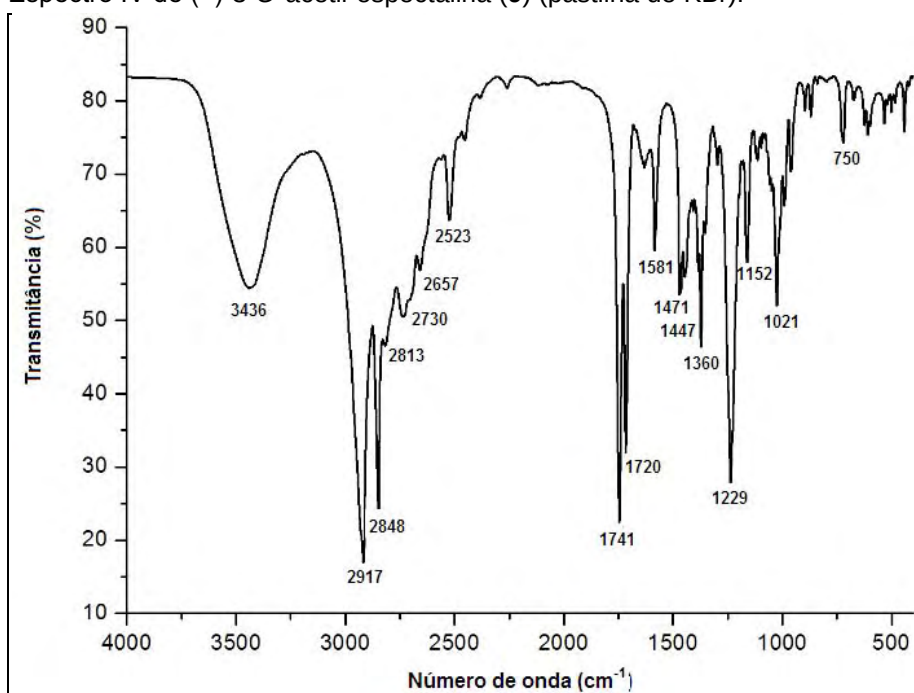
Os produtos reacionais foram analisados em espectrofotômetro no IV na região de 4000 a 400 cm^{-1} . Bandas de absorção foram atribuídas aos principais grupos funcionais presentes na estrutura molecular dos compostos **9**, **10**, **29-36** (Figuras 49-58) considerando que os produtos podem apresentar os grupos funcionais amina, éster, cetona, amida e aromático. Os valores das absorções foram discriminados na Tabela 9.

Figura 49 – Espectro IV de (–)-3-*O*-acetil-cassina (**10**) (pastilha de KBr).



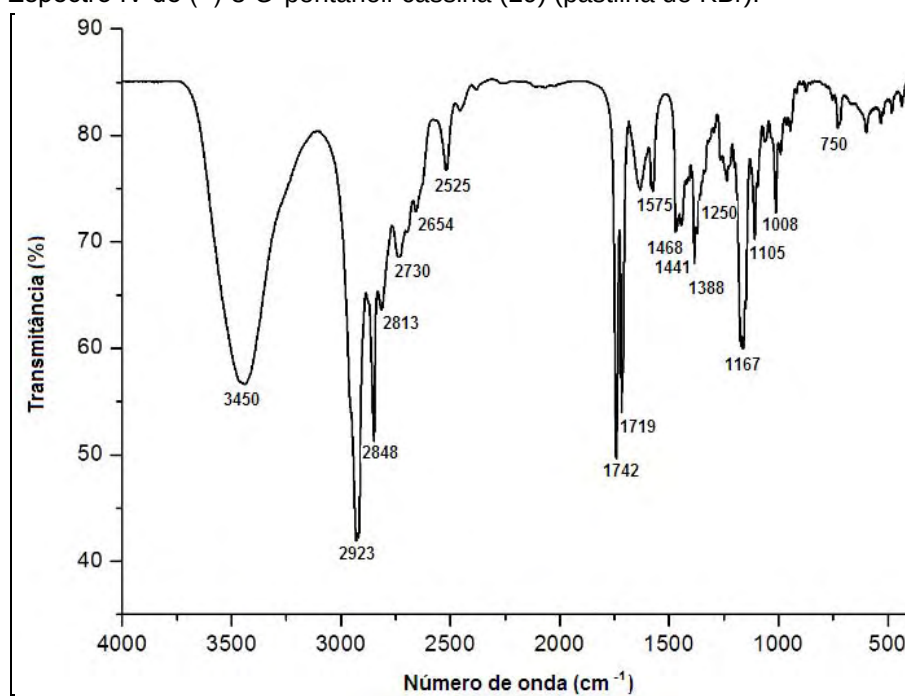
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 50 – Espectro IV de (–)-3-*O*-acetil-espectralina (**9**) (pastilha de KBr).



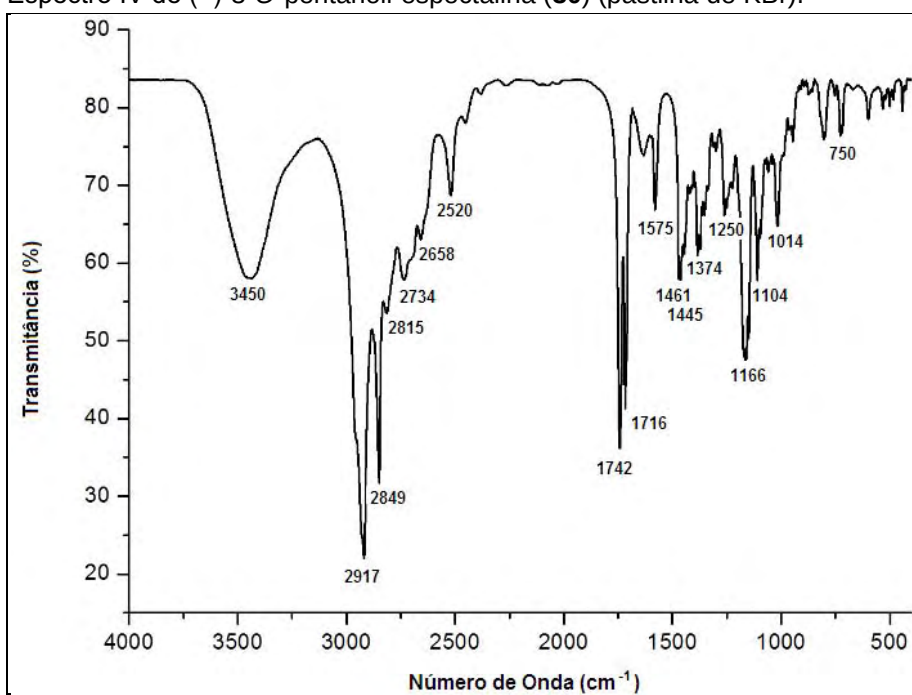
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 51 – Espectro IV de (–)-3-*O*-pentanoil-cassina (29) (pastilha de KBr).



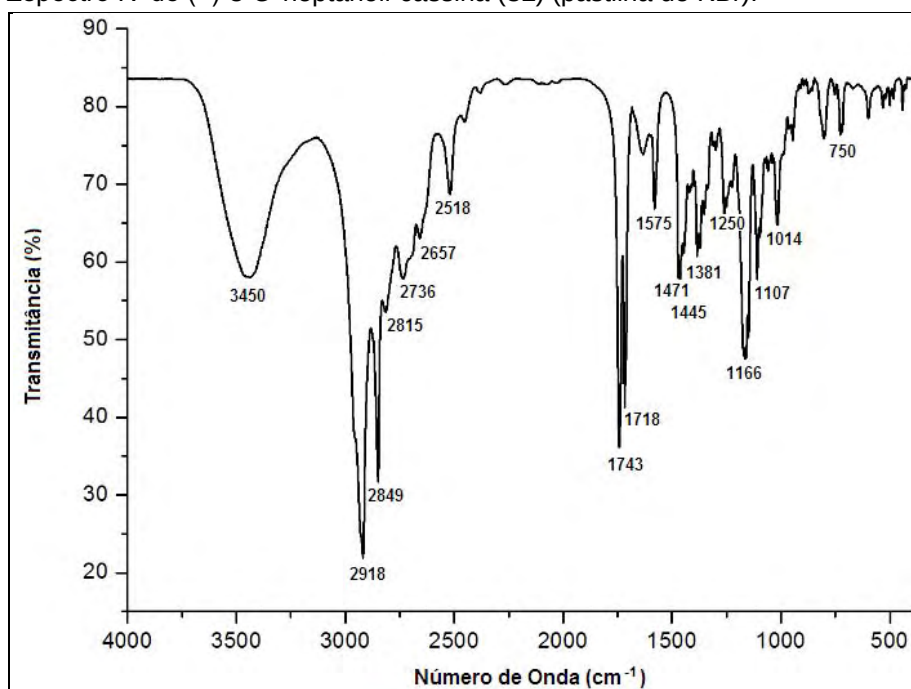
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 52 – Espectro IV de (–)-3-*O*-pentanoil-espectralina (30) (pastilha de KBr).



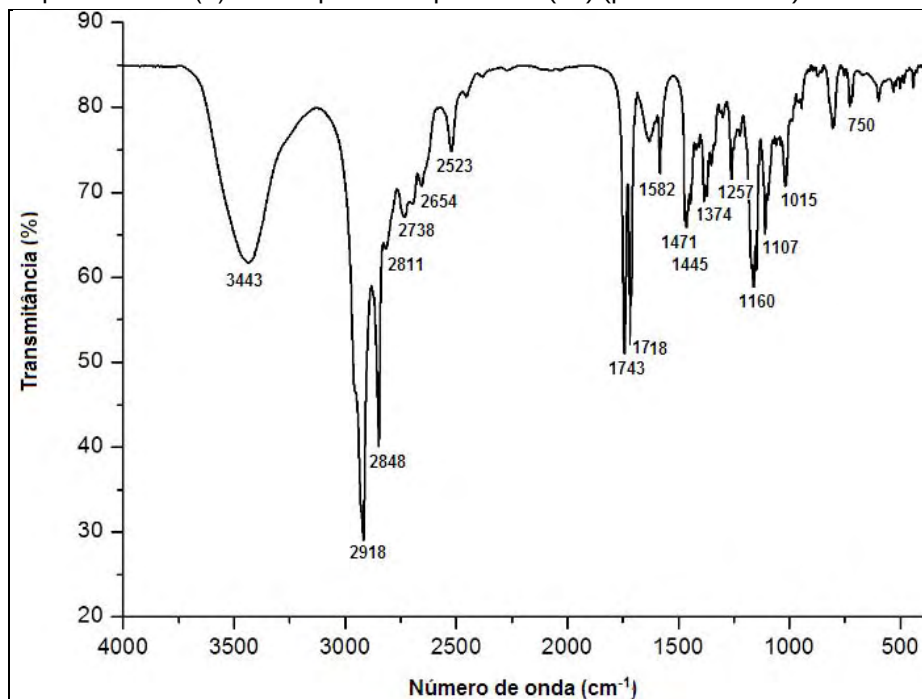
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 53 – Espectro IV de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (pastilha de KBr).



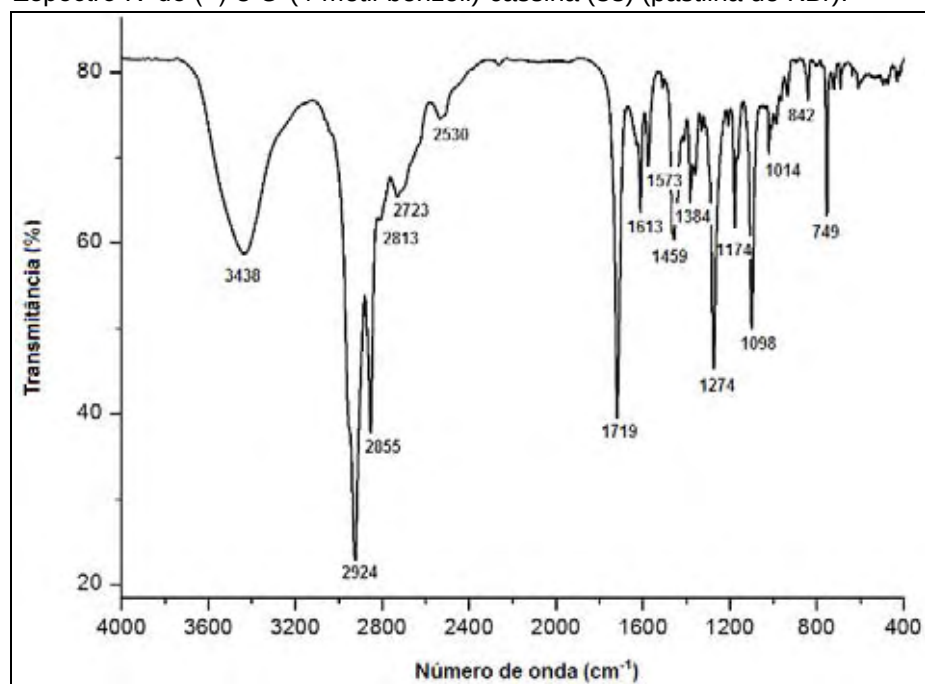
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 54 – Espectro IV de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (pastilha de KBr).



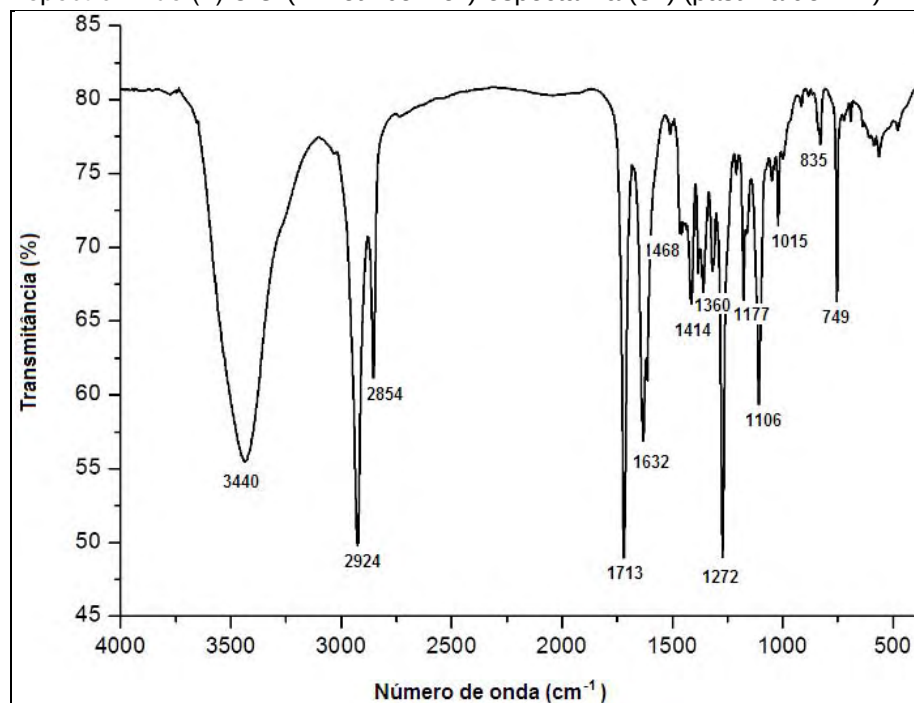
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 55 – Espectro IV de (–)-3-*O*-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) (pastilha de KBr).



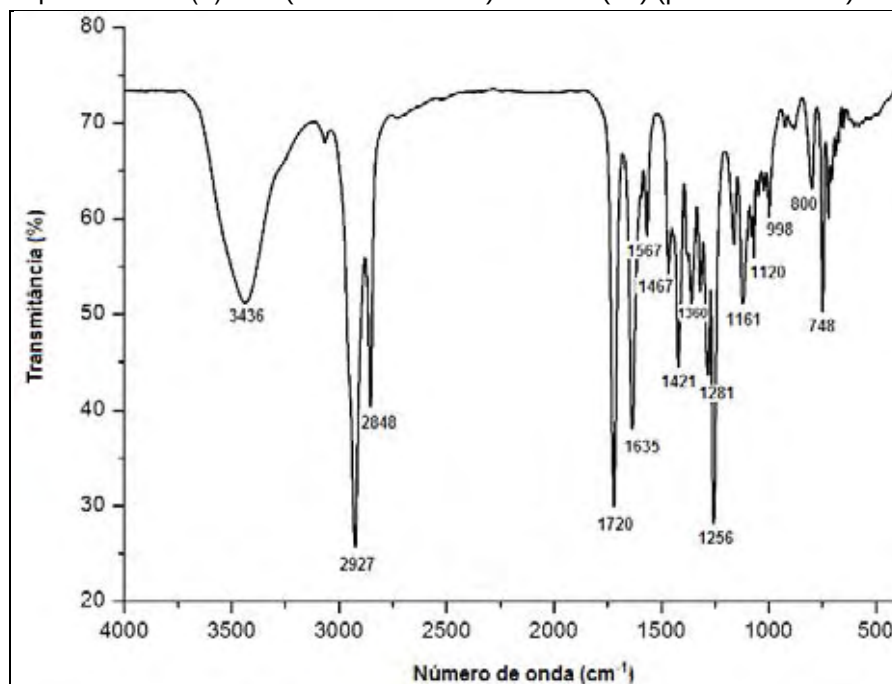
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 56 – Espectro IV de (–)-3-*O*-(4-metil-benzoil)-espectalina (**34**) (pastilha de KBr).



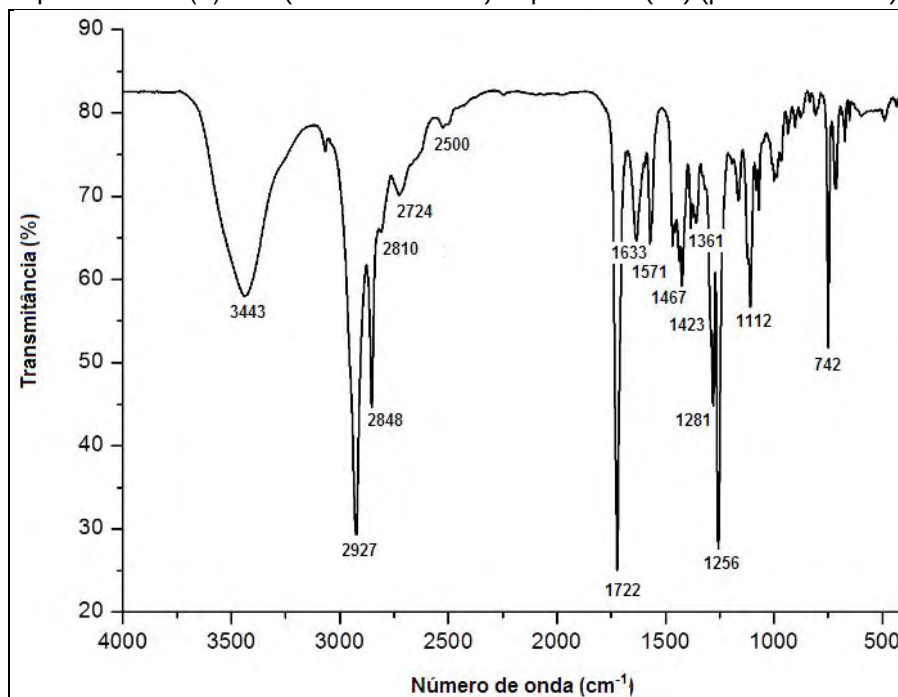
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 57 – Espectro IV de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**) (pastilha de KBr).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 58 – Espectro IV de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (**36**) (pastilha de KBr).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Principais bandas de absorção no IV dos compostos **9,10,29-36**.

Produto	ν O-H (F) sobreposto ao ν N-H (f) amina secundária	ν =CH aromático	ν_{as} C_{sp^3} -H	ν_s C_{sp^3} -H	ν N-C-H	ν N-H ⁺ (m) sal de amínio	ν C=O(F) cetona	ν C=O(F) éster
10	3450		2917	2841	2813	2730, 2654, 2523	1713	1741
9	3436		2917	2848	2813	2730, 2657, 2523	1720	1741
29	3450		2923	2848	2813	2730, 2654, 2525	1719	1742
30	3450		2917	2849	2815	2734, 2658, 2520	1716	1742
31	3450		2918	2849	2815	2736, 2657, 2518	1718	1743
32	3443		2918	2848	2811	2738, 2654, 2523	1718	1743
33	3438	3020	2924	2855	2813	2723, 2656, 2530	1719	
34	3440	3010	2924	2854			1713	
35	3436	3030	2927	2848			1720	
36	3443	3030	2927	2848	2810	2724, 2656, 2518	1722	

Produto	ν C=O amida terciária	δ N-H (f) amina secundária	δ_{as} CH ₂	δ_{as} CH ₃ e δ_{as} CH ₃ CO metil cetona	ν C-CO-O	ν O-C-C	γ C-H anel benzênico dissubstituído	ω N-H (f) amina secundária	γ =C-H aromático
10		1575	1464	1437	1374	1242	1160	750-700	
9		1581	1471	1447	1360	1229	1152	750-700	
29		1575	1468	1441	1388	1250	1167	750-700	
30		1575	1461	1445	1374	1250	1166	750-700	
31		1575	1471	1445	1381	1250	1166	750-700	
32		1575	1471	1445	1374	1257	1160	750-700	
33	1613 ^a	1582	1459	1384	1362	1274	1174	842	750-700 749
34	1632 ^a	1573	1468	1414	1360	1272	1177	835	750-700 749
35	1635 ^a	1567	1467	1421	1360	1281	1161	760-790	750-700 748
36	1633 ^a	1571	1467	1423	1361	1281	1159	760-790	750-700 742

F = banda de intensidade forte

f = banda de intensidade fraca

m = banda de intensidade média

^a= O valor do estiramento pode estar sobreposto ao estiramento de C=O de éster.Nota: As absorções foram medidas em cm⁻¹.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tendo como base as bandas de absorções indicadas nos espectros dos compostos **9,10,29-36** (Figuras 49-58) e os dados da Tabela 9, fez-se as seguintes correlações (BARBOSA, 2007):

O estiramento de ligação N-H ocorre em torno de $3500-3300\text{ cm}^{-1}$, sendo geralmente uma banda muito fraca, ficando sobreposta ao estiramento O-H, uma banda forte e larga. Como os compostos foram purificados e o material de partida removido do meio, os estiramentos observados nesta região são provenientes do estiramento O-H de água contida no KBr, muito higroscópico, neste caso apresentando valores em torno de $3450-3430\text{ cm}^{-1}$ (Figuras 49-58). O estiramento N-H de amidas também ocorre nesta região, porém, como os precursores (–)-cassina e (–)-espectralina podem formar apenas amida terciária com o N do anel piperidínico, não há como ocorrer absorção de estiramento de ligação N-H. Para verificar que houve a formação de amida terciária é necessário observar o estiramento de C=O em torno de $1670-1630\text{ cm}^{-1}$, como pode ser observado para os compostos **33-36** (Figuras 55-58).

O tratamento de aminas secundárias com ácido, como no caso do anel piperidínico, o converte em sal de amínio (cloridrato), o qual apresenta estiramento de ligação N-H em $2720-2520\text{ cm}^{-1}$. Geralmente várias bandas agrupadas são observadas nesta região. A deformação angular da ligação N-H para aminas secundárias ocorre em torno $1560-1580\text{ cm}^{-1}$, sendo de intensidade baixa e de difícil observação, podendo estar sobreposta ao estiramento C=C de aromáticos em torno de 1580 cm^{-1} . Também apresentam uma banda de deformação angular fora do plano, absorvendo em $750-700\text{ cm}^{-1}$.

Os compostos **9, 10, 29-36** (Figuras 49-54) apresentam banda característica do estiramento C=O de éster (banda forte e fina) na região de $1743-1741\text{ cm}^{-1}$. Já os compostos **33-36** (Figuras 55-58) apresentam banda característica de amida em $1635-1613\text{ cm}^{-1}$. A presença de um grupo aril conjugado a carbonila resulta no enfraquecimento da ligação C=O devido à ressonância, e com isso provoca a diminuição no número de onda, o que pode ocasionar a sobreposição destas bandas na região do IV.

As bandas de absorção das ligações C-O são mais largas que as correspondentes à da ligação C=O. Isso ocorre em parte devido às interações com as vibrações das ligações C-C vizinhas. No caso dos compostos **9, 10, 29-36** são observadas duas bandas em torno de $1281-1229\text{ cm}^{-1}$ e em $1159-1177\text{ cm}^{-1}$. A

primeira envolve o estiramento da ligação entre o oxigênio e o carbono da carbonila, acoplada ao estiramento da ligação C-C e a segunda, envolve o estiramento da ligação entre o átomo de oxigênio e o outro carbono, provavelmente com sobreposição da banda de estiramento C-N.

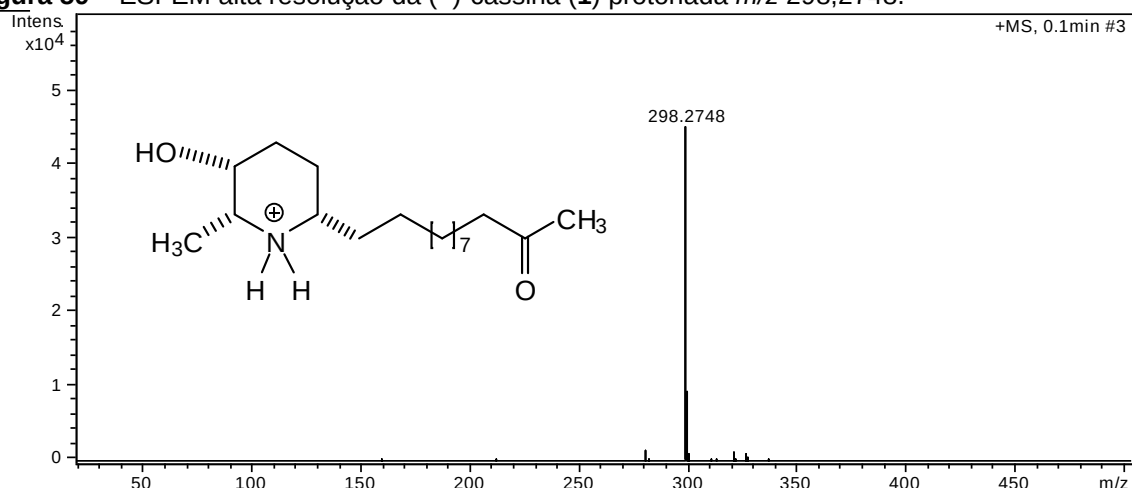
Os compostos **9**, **10**, **29-36** apresentam também banda característica do estiramento C=O de cetona alifática saturada (banda forte e fina) na região de 1722-1713 cm^{-1} . Como estas cetonas estão ligadas diretamente a um grupo $-\text{CH}_3$, apresentam banda típica de deformação angular em torno de 1360-1355 cm^{-1} , porém com sobreposição da banda de deformação angular de grupos metílicos.

Nos espectros de IV dos compostos **33-36** podem ser observados: estiramento de ligação =C-H de anel aromático em 3010 cm^{-1} e 3020 cm^{-1} para **33** e **34**, respectivamente, e em 3030 cm^{-1} para **35** e **36**; deformação angular fora do plano para a ligação C-H de anel benzênico 1,4-dissubstituído em 760-790 cm^{-1} para **33** e **34** (Figuras 55 e 56) e para anel benzênico 1,3-dissubstituído na região de 842 cm^{-1} e 835 cm^{-1} para **35** e **36** (Figuras 57 e 58, respectivamente) ; deformação angular fora do plano para ligação =C-H de aromático em 749 cm^{-1} para os compostos **33** e **34** e em 748 cm^{-1} e 742 cm^{-1} para os compostos **35** e **36**, respectivamente.

5.1.4 Análise dos produtos por EM e fragmentações

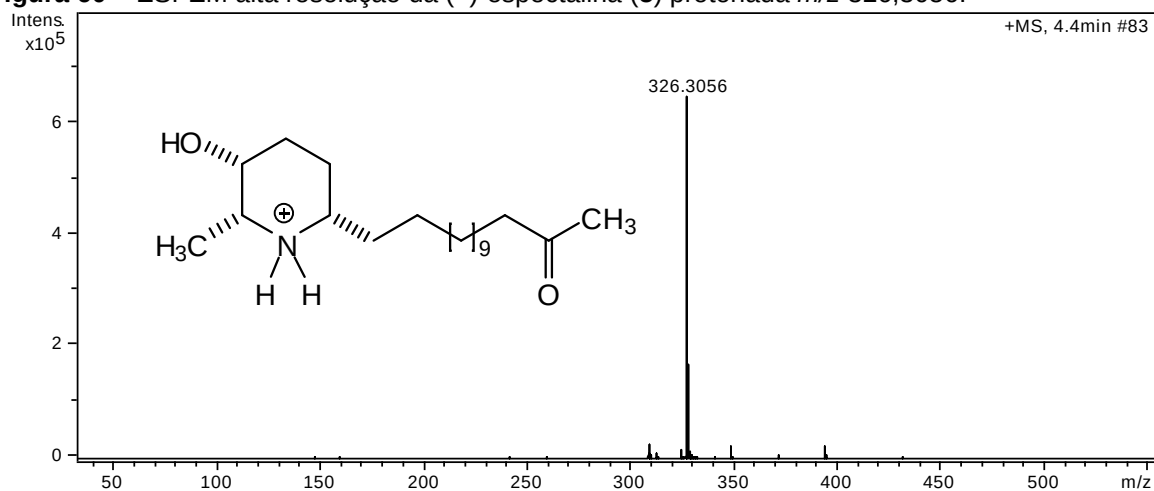
Em estudos anteriores, os alcaloides piperidínicos (–)-cassina (**1**) fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ e (–)-espectalina (**5**) fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_2$, precursores dos derivados semissintéticos, foram caracterizados com m/z 298,2748 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2^+$ (Figura 59) e m/z 326,3056 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NO}_2^+$, (Figura 60), respectivamente (PIVATTO, 2010).

Figura 59 – ESI-EM alta resolução da (-)-cassina (**1**) protonada m/z 298,2748.



Fonte: (PIVATTO, 2010).

Figura 60 – ESI-EM alta resolução da (-)-espectralina (**5**) protonada m/z 326,3056.



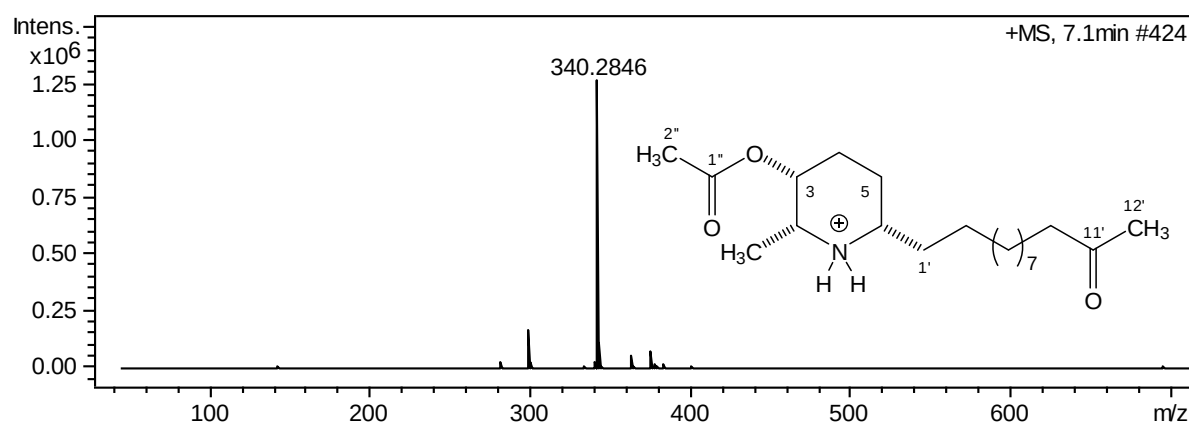
Fonte: (PIVATTO, 2010).

Para a análise dos produtos reacionais (**9,10,29-36**) foi utilizado um Espectrômetro de Massas de Alta Resolução, contendo fonte de Ionização por Eletrospray (ESI) e Analisador de Massas por Tempo de Voo (*Time of Flight* - TOF). Na ESI a solução contendo a amostra é borrifada na ponta de um tubo capilar fino para dentro de uma câmara aquecida. O tubo capilar pelo qual a amostra percorre tem um potencial de alta voltagem em sua superfície e pequenas gotículas carregadas são expulsas para dentro da câmara de ionização. As gotículas carregadas enfrentam um contra fluxo de um gás de secagem (N_2) que provoca a evaporação do solvente. Assim, a densidade de carga de cada gotícula aumenta até que as forças repulsivas eletrostáticas excedam a tensão superficial da gotícula quando então a gotícula divide-se em gotículas menores. O processo continua até que íons da amostra, livres de solvente, sejam deixados na fase gasosa. Depois que a molécula é ionizada, o feixe de íons é acelerado por um campo elétrico e então

entra no analisador de massa, região do espectrômetro de massa onde os íons são separados de acordo com suas razões massa/carga (m/z). O analisador de massa por tempo de voo (TOF) baseia-se na idéia simples de que as velocidades de dois íons criados no mesmo instante, com a mesma energia cinética, variarão conforme a massa dos íons – o íon mais leve será mais rápido. Se esses íons forem na direção do detector de espectrômetro de massa, o íon mais rápido (mais leve) chegará primeiro ao detector.

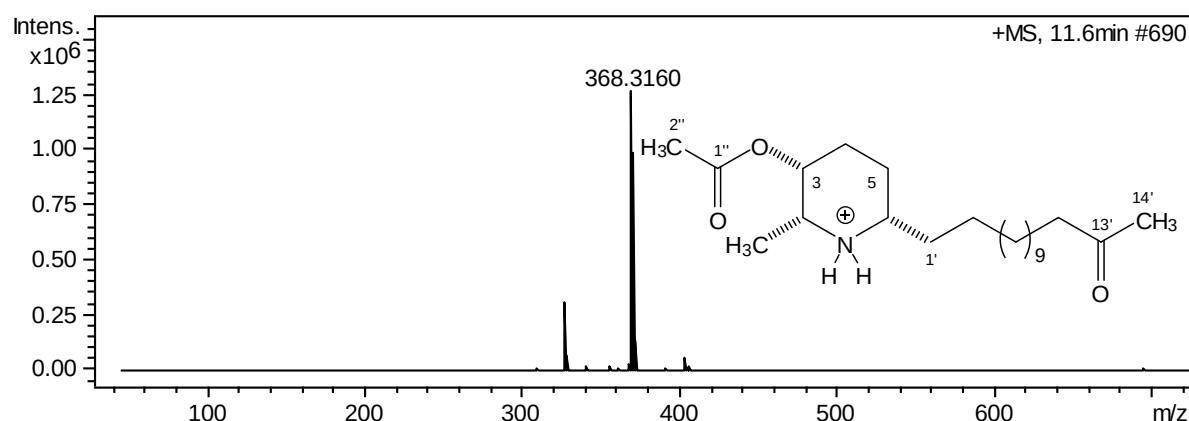
Sendo assim, os produtos reacionais das semissínteses puderam ser identificados (Figuras 61-70) e os dados obtidos reunidos na Tabela 10.

Figura 61 – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-acetil-cassina (**10**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 340,2846 $[M + H]^+$, calculado para $C_{20}H_{38}NO_3^+$ com m/z 340,2846.



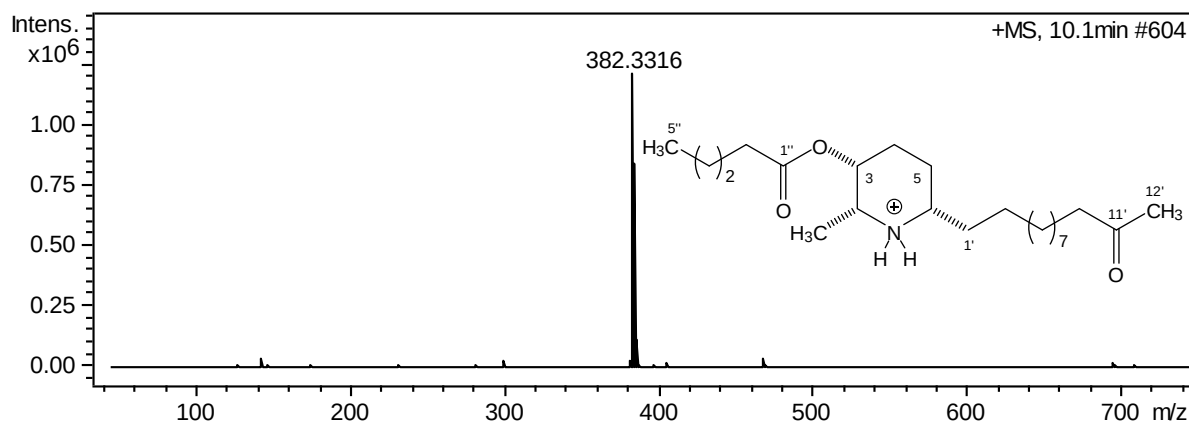
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 62 – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-acetil-espectalina (**9**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 368,3160 $[M + H]^+$, calculado para $C_{22}H_{42}NO_3^+$ com m/z 368,3159.



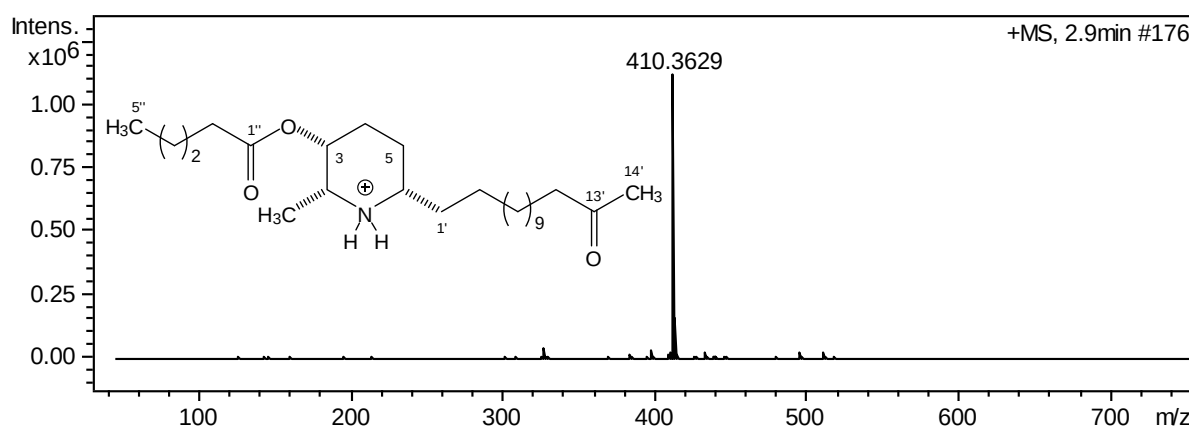
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 63 – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 382,3316 $[M + H]^+$, calculado para $C_{23}H_{44}NO_3^+$ com m/z 382,3316.



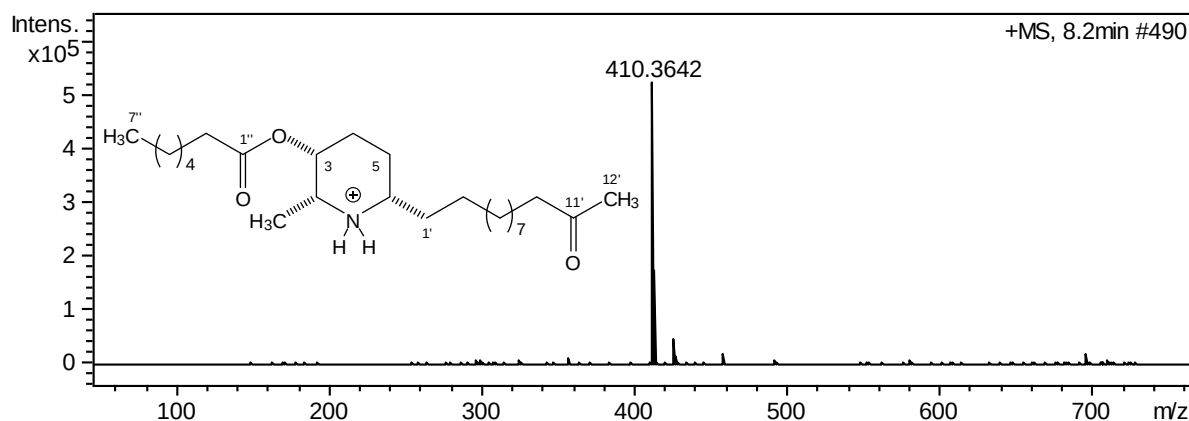
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 64 – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 410,3629 $[M + H]^+$, calculado para $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.



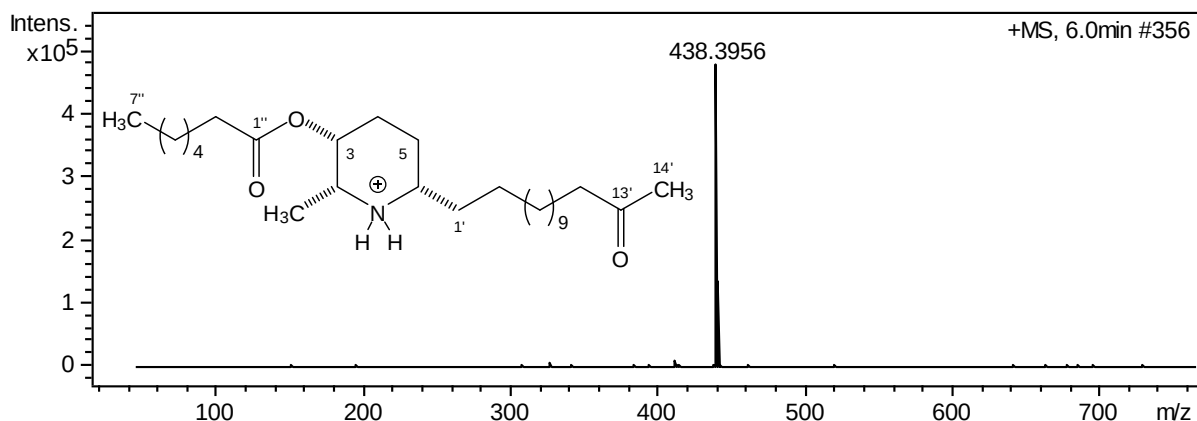
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 65 – ESI-EM alta resolução de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 410,3642 $[M + H]^+$, calculado para $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.



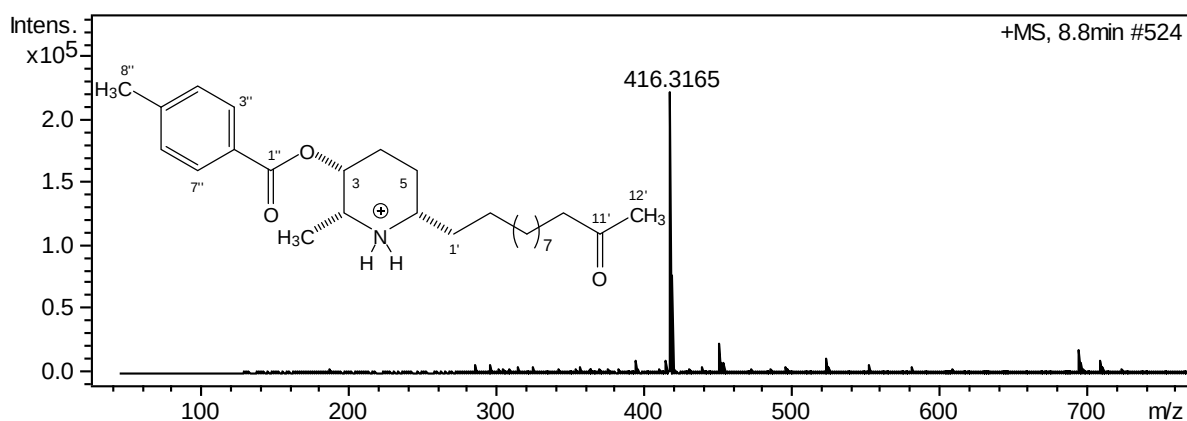
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 66 – ESI-EM alta resolução de (-)-3-O-heptanoil-espectalina (**32**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 438,3956 $[M + H]^+$, calculado para $C_{27}H_{52}NO_3^+$ com m/z 438,3942.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 67 – ESI-EM alta resolução de (-)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 416,3165 $[M + H]^+$, calculado para $C_{26}H_{42}NO_3^+$ com m/z 416,3159.

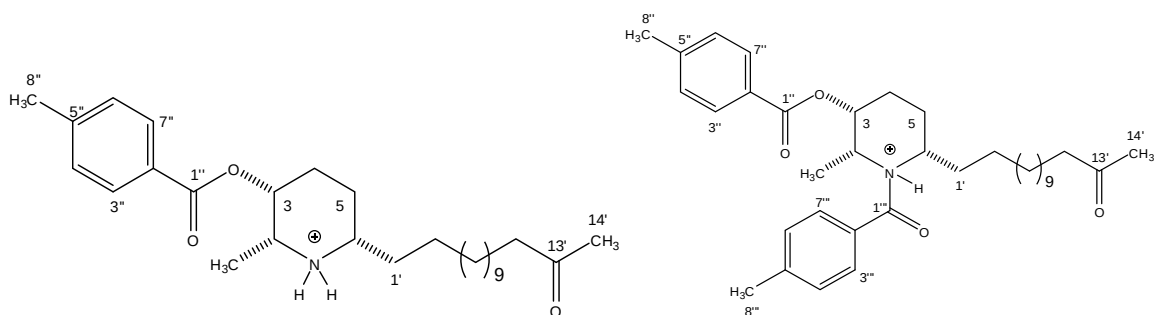


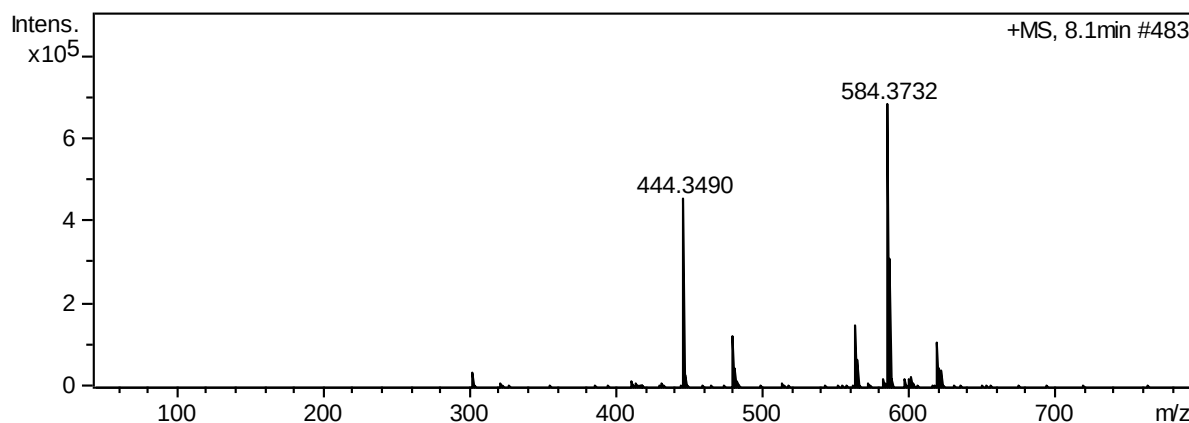
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 68 – ESI-EM alta resolução de (-)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectalina (**34**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 444,3490 $[M + H]^+$, calculado para $C_{28}H_{46}NO_3^+$ com m/z 444,3472. Pode-se inferir que houve a formação de outro produto reacional **37**, observado em m/z 584,3732 $[M + Na]^+$, calculado para $C_{36}H_{51}NO_4Na^+$ com m/z 584,3818.

34: m/z 444,3490

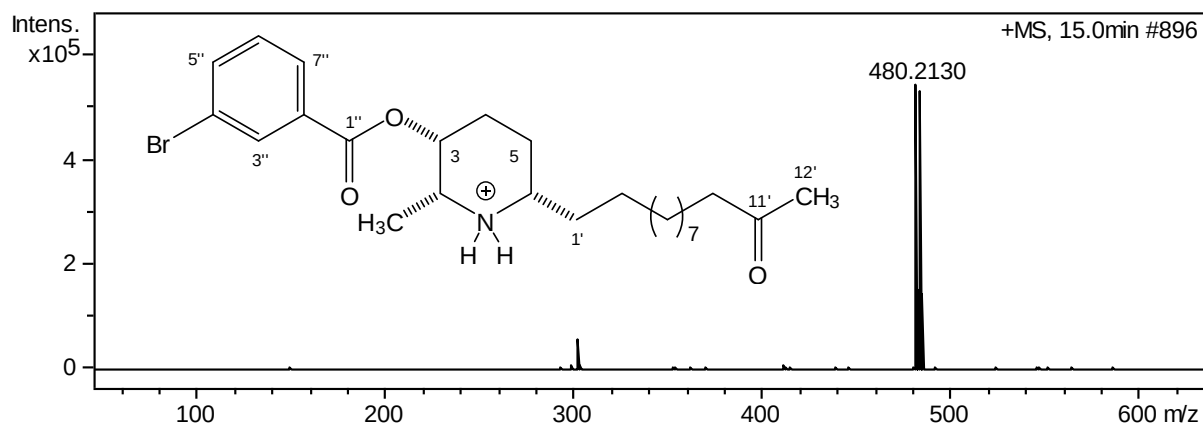
37: m/z 584,3732





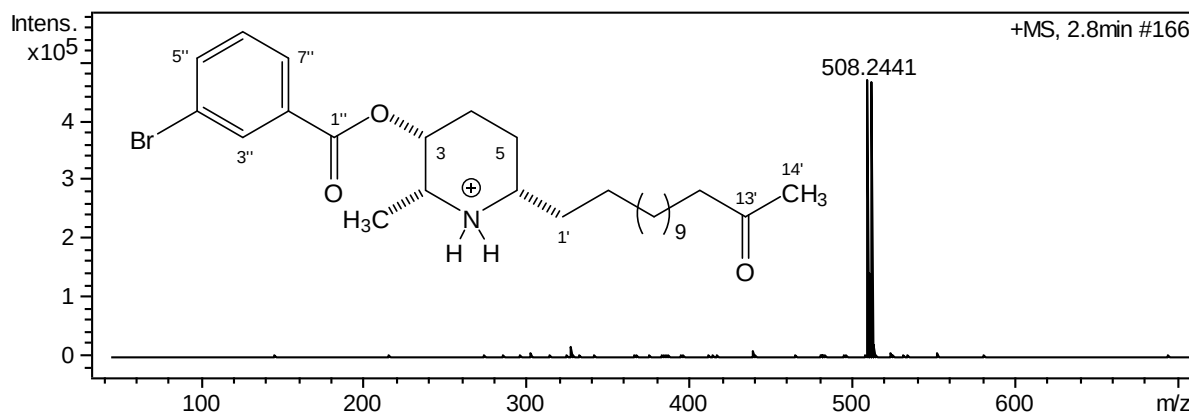
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 69 – ESI-EM alta resolução de (-)-3-O-(3-bromo-benzoyl)-cassina (**35**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 480,2130 $[M+H]^+$, calculado para $C_{25}H_{39}BrNO_3^+$ com m/z 480,2108.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 70 – ESI-EM alta resolução de (-)-3-O-(3-bromo-benzoyl)-espectralina (**36**). O pico referente a molécula protonada foi observado em m/z 508,2441 $[M + H]^+$, calculado para $C_{27}H_{43}BrNO_3^+$ com m/z 508,2421.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 10 – Resultados obtidos com a Espectrometria de Massas de Alta Resolução.

Produto	Fórmula da molécula protonada	m/z calculado ^a (massa exata)	m/z observado	Erro (ppm)
10	$C_{20}H_{38}NO_3^+$	340,2846	340,2846	0
9	$C_{22}H_{42}NO_3^+$	368,3159	368,316	0
29	$C_{23}H_{44}NO_3^+$	382,3316	382,3316	0
30	$C_{25}H_{48}NO_3^+$	410,3629	410,3629	0
31	$C_{25}H_{48}NO_3^+$	410,3629	410,3642	3,17
32	$C_{27}H_{52}NO_3^+$	438,3942	438,3956	3,19
33	$C_{26}H_{42}NO_3^+$	416,3159	416,3165	1,44
34	$C_{28}H_{46}NO_3^+$	444,3472	444,3490	4,05
35	$C_{25}H_{39}BrNO_3^+$	480,2108	480,213	4,58
36	$C_{27}H_{43}BrNO_3^+$	508,2421	508,2441	3,94
37	$C_{36}H_{52}NO_4Na^+$	584,3818	584,3732	4,79

^a A massa exata foi calculada com o auxílio do software *Chem Draw Ultra* versão 10.0

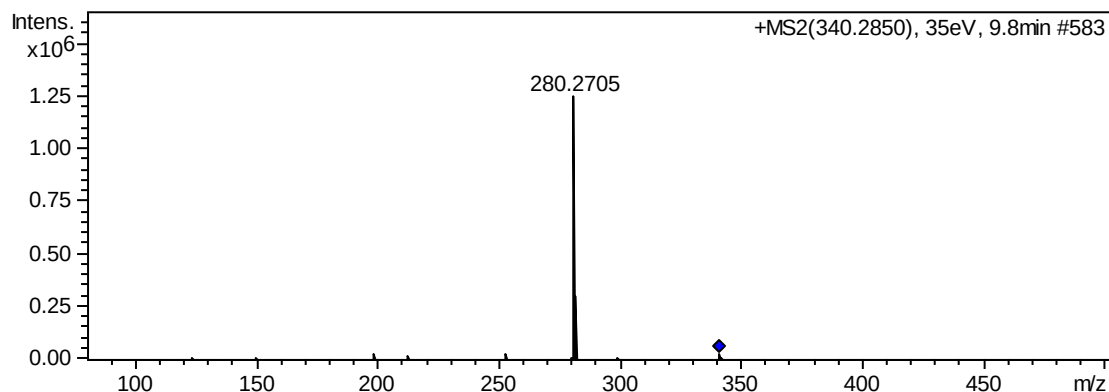
Fonte: Elaborada pelo autor.

Aplicando-se a Regra do Nitrogênio aos compostos **9,10,29-37** (Figuras 61-70), pode-se inferir a presença de um átomo de nitrogênio na estrutura molecular de cada composto. De acordo com esta regra, se o composto (forma não protonada) conter um número par de átomos de nitrogênio, sua massa molecular terá um valor de massa par. Por sua vez, uma molécula contendo um número ímpar de átomos de nitrogênio apresentará um valor de massa molecular ímpar, como é o caso destes compostos: retirando-se o valor em massa do elemento que forma o aduto (forma protonada contendo um H^+ ou Na^+), obtém-se um valor de massa molecular ímpar.

Analisando os espectros das Figuras 69 e 70 é possível inferir que ambos os compostos **35** e **36** apresentam um átomo de bromo em suas estruturas químicas, devido ao pico do íon molecular M e $M+2$. O bromo apresenta dois isótopos que diferem em duas unidades de massa: ^{79}Br e ^{81}Br , sendo as intensidades relativas entre os picos de 100% e 98%, respectivamente (PAVIA et al., 2010).

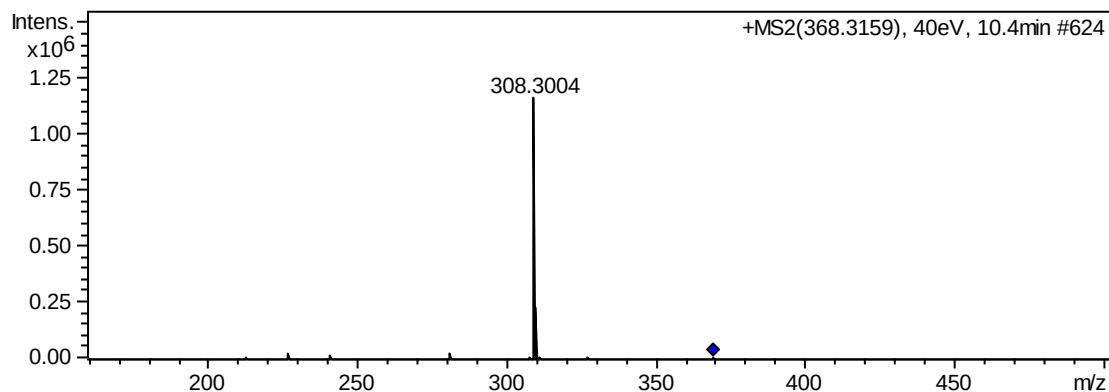
As moléculas protonadas dos compostos **9, 10, 29-36** foram fragmentadas e os seus respectivos íons fragmento identificados e caracterizados (Figuras 71-80):

Figura 71 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-*O*-acetil-cassina (**10**), caracterizado por m/z 280,2705, referente a molécula protonada $C_{20}H_{38}NO_3^+$ com m/z 340,2846.



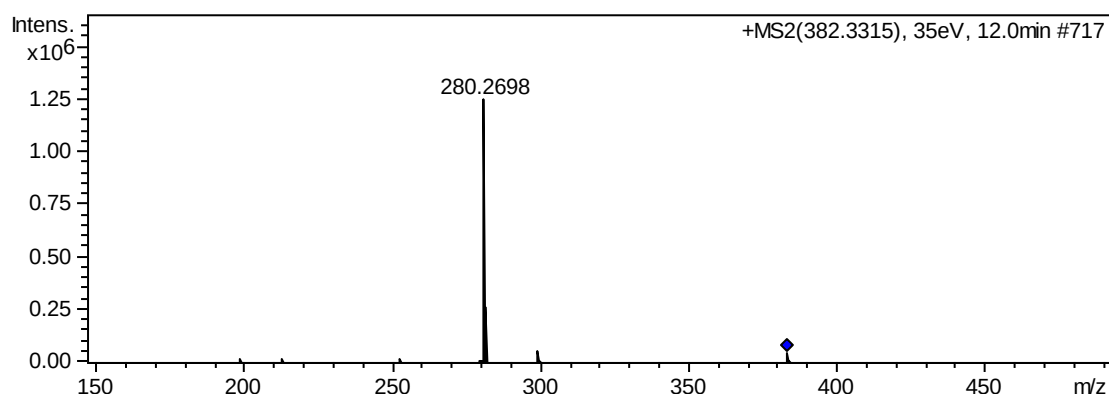
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 72 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-*O*-acetil-espectralina (**9**), caracterizado por m/z 308,3004, referente a molécula protonada $C_{22}H_{42}NO_3^+$ com m/z 368,3159.



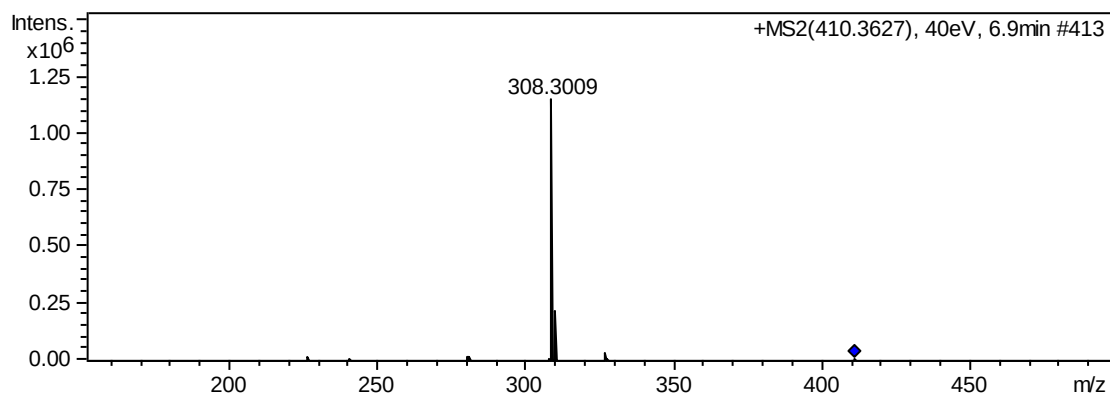
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 73 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-*O*-pentanoil-cassina (**29**), caracterizado por m/z 280,2698, referente a molécula protonada $C_{23}H_{44}NO_3^+$ com m/z 382,3316.



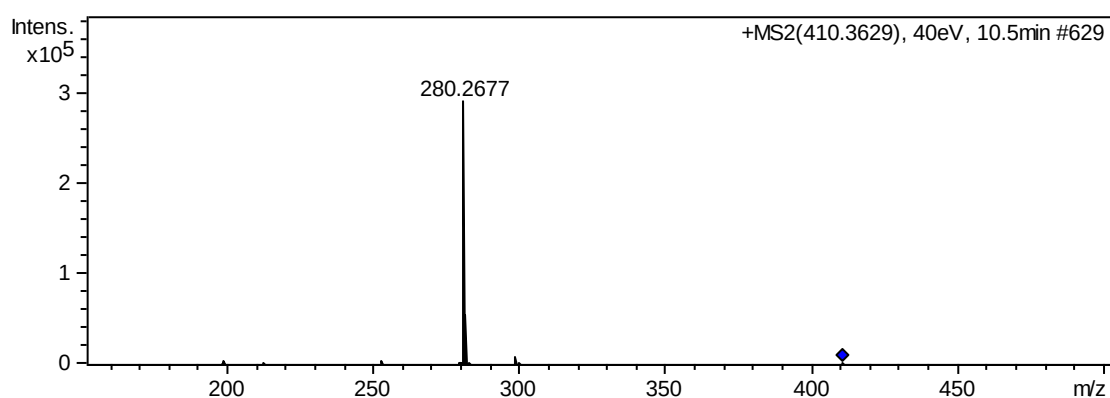
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 74 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-*O*-pentanoil-espectralina (**30**), caracterizado por m/z 308,3009 , referente a molécula protonada $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.



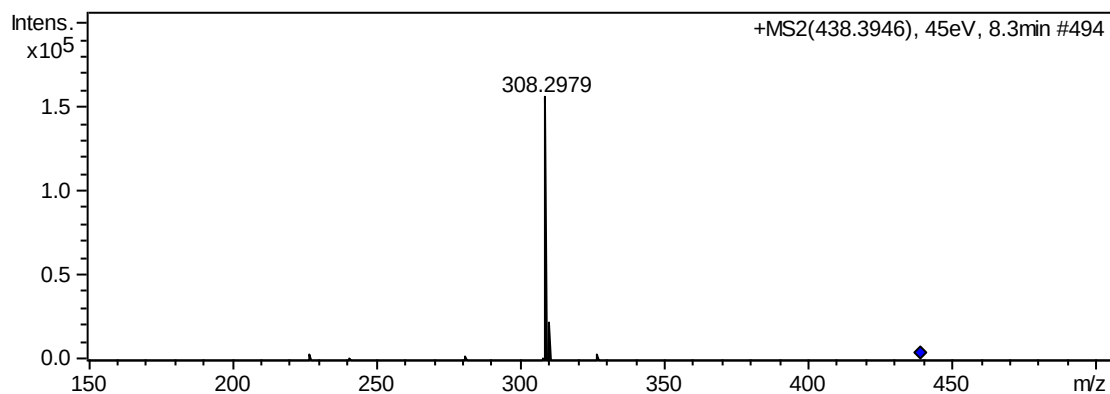
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 75 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-*O*-heptanoil-cassina (**31**), caracterizado por m/z 280,2677 , referente a molécula protonada $C_{25}H_{48}NO_3^+$ com m/z 410,3629.



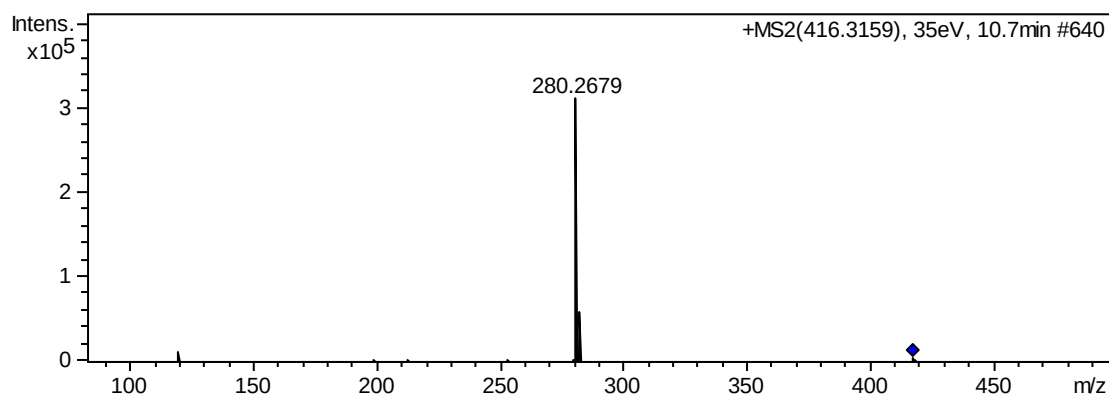
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 76 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-*O*-heptanoil-espectralina (**32**), caracterizado por m/z 308,2979 , referente a molécula protonada $C_{27}H_{52}NO_3^+$ com m/z 438,3942.



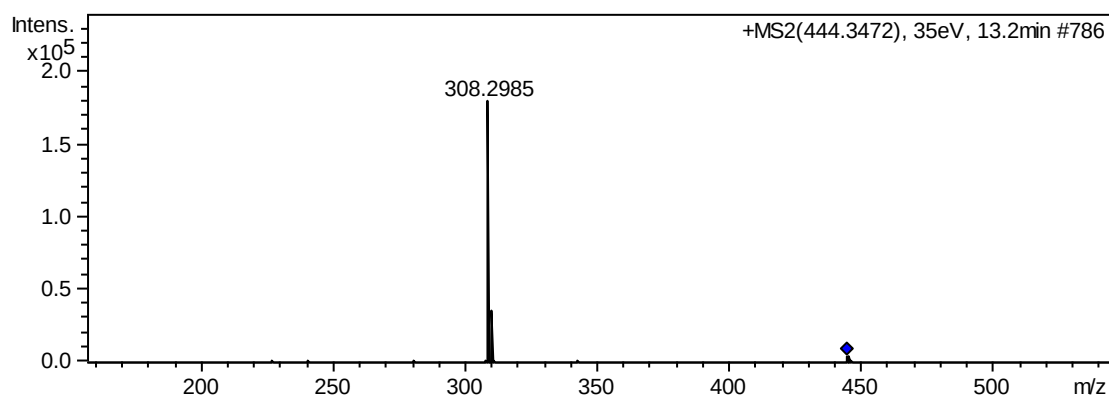
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 77 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**), caracterizado por m/z 280,2679 , referente a molécula protonada $C_{26}H_{42}NO_3^+$ com m/z 416,3159.



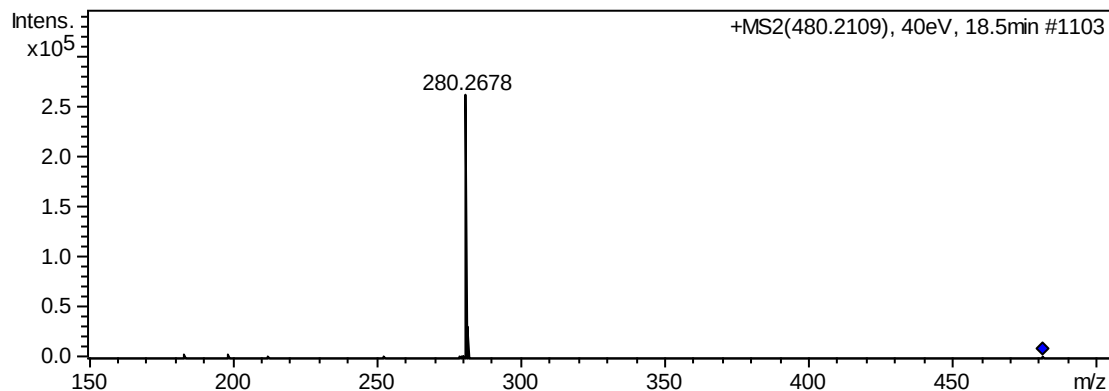
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 78 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**), caracterizado por m/z 308,2985 , referente a molécula protonada $C_{28}H_{46}NO_3^+$ com m/z 444,3472.



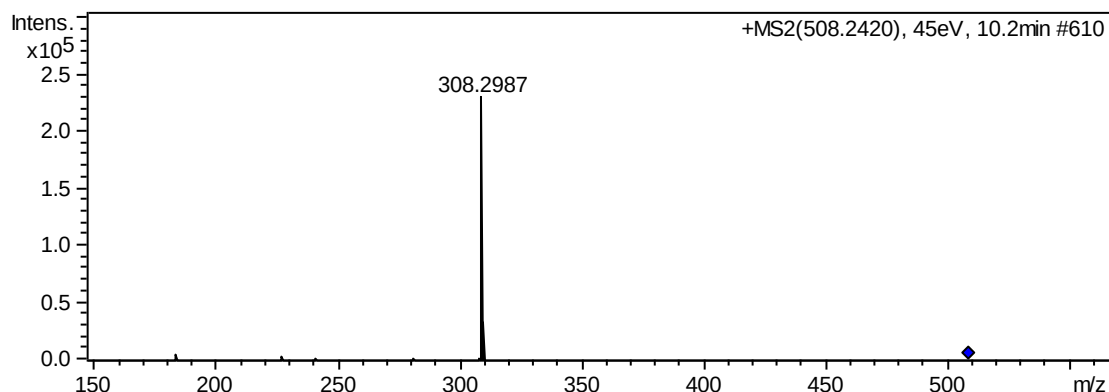
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 79 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**), caracterizado por m/z 208,2678 , referente a molécula protonada $C_{25}H_{39}BrNO_3^+$ com m/z 480,2108.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 80 – ESI-EM em alta resolução do íon fragmento de (–)-3-O-(3-bromo-benzoi)-espectralina (**36**), caracterizado por m/z 308,2987, referente a molécula protonada $C_{27}H_{43}BrNO_3^+$ com m/z 508.2421.



Fonte: Elaborada pelo autor.

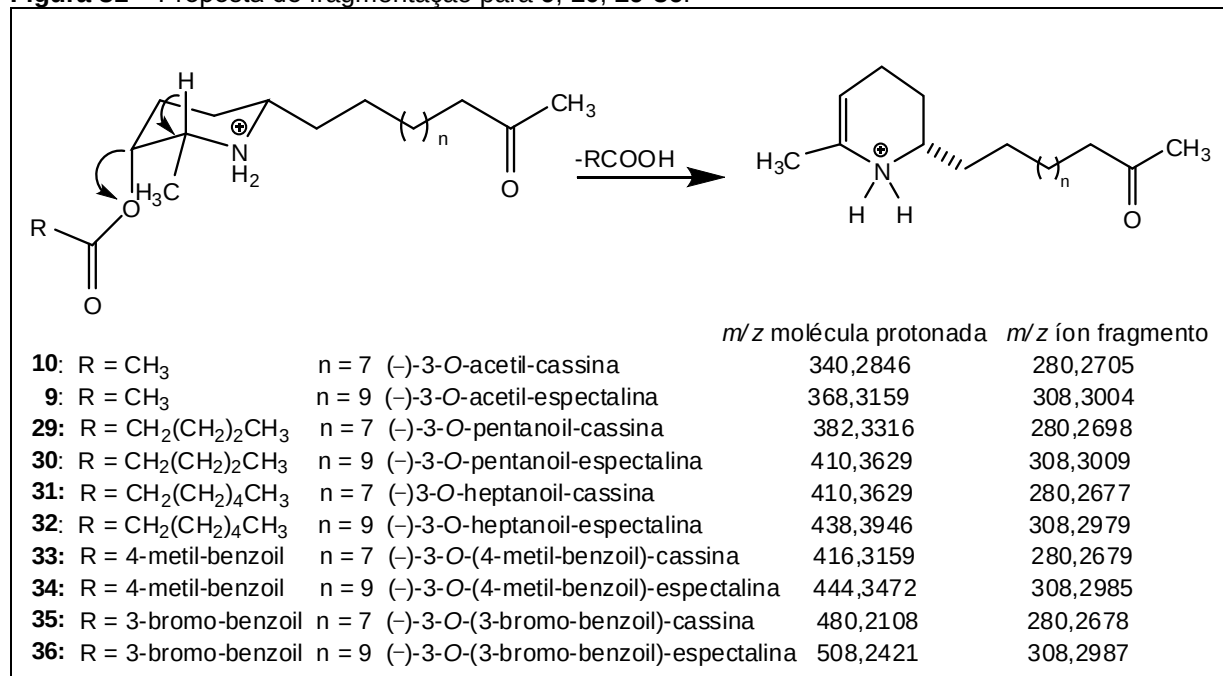
A estrutura dos íons fragmento de **9**, **10**, **29-36** foram propostas na Figura 81, de acordo com a perda de moléculas eletricamente neutras, as quais não aparecem no espectro de massa, mas podem ser deduzidas por meio da diferença de massa do íon da molécula protonada e do íon fragmento. A fragmentação é dada por dissociação induzida por colisão (DIC), ou seja, colisão das moléculas de gás inerte com os íons formados no *eletrospray*.

A proposta de fragmentação pode ser baseada no fato de que os hidrogênios adjacentes ao átomo de nitrogênio apresentam caráter ácido, semelhantemente aos hidrogênios alfa de compostos carbonílicos (CLAYDEN, 2001). Sendo assim, o hidrogênio ligado diretamente ao C-2 do anel piperidínico destes compostos pode ser removido facilmente por uma base, formando uma ligação π e eliminando uma molécula de ácido carboxílico correspondente ao cloreto de ácido utilizado para formar o próprio composto. O hidrogênio ligado diretamente ao C-4 do anel piperidínico também poderia ser abstraído uma vez que esta antiperiplanar ao grupo de saída, porém, ocorre a formação do alceno mais estável, ou seja, aquele com o maior número de substituintes alquila ligados ao Csp^2 (compostos **9,10,29-36**). Entretanto, alcenos conjugados são mais estáveis, embora não sejam os mais substituídos (BRUICE, 2006).

Este tipo de eliminação (E2), ocorre numa única etapa, sem a formação de intermediários. A eliminação em substâncias cíclicas segue as mesmas regras estereoquímicas da eliminação de substâncias de cadeia aberta. Para alcançar a geometria antiperiplanar que é preferida para uma reação E2, os dois grupos que estão sendo eliminados de uma substância cíclica devem estar em relação trans. No

caso de anéis de seis membros, os grupos que são eliminados estão antiperiplanares apenas se os dois estiverem nas posições axiais.

Figura 81 – Proposta de fragmentação para **9, 10, 29-36**.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.5 Elucidação Estrutural por RMN

A análise dos espectros de RMN ¹H e ¹³C para os produtos **9,10,29-36** (APÊNDICE A-J, respectivamente) permitiu inferir os deslocamentos químicos (em ppm) para os carbonos e hidrogênios nas posições dois, três e seis do anel piperidínico e para os grupos metílicos (PAVIA et al., 2010). Os deslocamentos das carbonilas puderam ser observados, indicando a presença da função cetona e função éster na estrutura das moléculas. Alguns compostos apresentaram deslocamento característico de amida, indicando a formação de subprodutos. Os valores dos carbonos metilênicos e de seus respectivos hidrogênios foram estabelecidos com base nos deslocamentos químicos teóricos, uma vez que os sinais característicos aparecem sobrepostos. Os deslocamentos químicos de **9,10,29-36** foram reunidos nas Tabelas 11-15.

Tabela 11 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **9** (300 MHz, CDCl_3) e **10** (500 MHz, CDCl_3).

(-)-3-O-acetil-espectalina (9)			(-)-3-O-acetil-cassina (10)		
Posição	$\delta \text{ C}^a$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^a$ (em ppm); (multiplicidade) ^c	Posição	$\delta \text{ C}^a$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^a$ (em ppm); (multiplicidade) ^c
2	55,728 (CH)	3,331 (m)	2	55,628 (CH)	3,281 (m)
3	67,615 (CH)	5,084 (m)	3	67,574 (CH)	5,076 (m)
4	27,839 (CH_2)	1,41;1,66 (m) ^d	4	27,813 (CH_2)	1,41;1,66 (m) ^d
5	25,836 (CH_2)	1,87;2,12 (m) ^d	5	25,722 (CH_2)	1,87;2,12 (m) ^d
6	58,288 (CH)	3,094 (m)	6	58,213 (CH)	3,017 (m)
7	16,153 (CH_3)	1,70 (d) ^d	7	15,827(CH_3)	1,70 (d) ^d
1'	33,386 (CH_2)	1,99 (m) ^d	1'	33,122 (CH_2)	1,99 (m) ^d
2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
7'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	7'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
8'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	8'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
9'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	9'	24,003 (CH_2)	1,510 (m)
10'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	10'	43,947 (CH_2)	2,406 (t)
11'	24,036 (CH_2)	1,53 (m) ^d	11'	209,629 (C=O)	
12'	43,984 (CH_2)	2,408 (t)	12'	29,8 (CH_3) ^d	2,124 (s)
13'	209,506 (C=O)		13'		
14'	29,8 (CH_3) ^d	2,125 (s)	14'		
1''	170,557 (C=O)		1''	170,579 (C=O)	
2''	21,573 (CH_3)	2,21 (s) ^d	2''	21,277 (CH_3)	2,255 (s)

^aDeslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS.^bConstante de Acoplamento (J) em Hz.^cmultiplicidade = s (singleto); d (dubleto); t (tripleto); m (multiplete)^dDeslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de **29** (300 MHz, CDCl_3) e **30** (500 MHz, CDCl_3).

(-)-3-O-pentanoil-cassina (29)			(-)-3-O-pentanoil-espectralina (30)		
Posição	$\delta \text{ C}^{\text{a}}$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^{\text{a}}$ (em ppm); (multiplicidade) ^c	Posição	$\delta \text{ C}^{\text{a}}$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^{\text{a}}$ (em ppm); (multiplicidade) ^c
2	55,552 (CH)	3,281 (m)	2	55,571 (CH)	3,296 (m)
3	67,348 (CH)	5,078 (m)	3	67,376 (CH)	5,077(m)
4	22,727 (CH_2)	1,41;1,66 (m) ^d	4	27,899 (CH_2)	1,41;1,66 (m) ^d
5	27,895 (CH_2)	1,87;2,12 (m) ^d	5	22,753 (CH_2)	1,87;2,12 (m) ^d
6	58,211 (CH)	3,010 (m)	6	58,240 (CH)	3,027 (m)
7	15,814 (CH_3)	1,70 (d) ^d	7	15,835 (CH_3)	1,70 (d) ^d
1'	33,121 (CH_2)	1,99 (m) ^d	1'	33,195 (CH_2)	1,99 (m) ^d
2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
7'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	7'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
8'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	8'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
9'	24,007 (CH_2)	1,53 (m) ^d	9'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
10'	43,948 (CH_2)	2,407 (t)	10'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
11'	209,453 (C=O)		11'	24,040 (CH_2)	1,53 (m) ^d
12'	29,990 (CH_3)	2,126 (s)	12'	43,982 (CH_2)	2,409 (t)
13'			13'	209,534 (C=O)	
14'			14'	29,991 (CH_3)	2,127 (s)
1''	173,431 (C=O)		1''	173,431 (C=O)	
2''	34,072 (CH_2)	2,553 (t)	2''	34,111 (CH_2)	2,554 (t)
3''	27,174 (CH_2)	1,64 (m) ^d	3''	27,192 (CH_2)	1,64 (m) ^d
4''	22,336 (CH_2)	1,363 (m)	4''	22,353 (CH_2)	1,367 (m)
5''	13,935 (CH_3)	0,919 (t)	5''	13,948 (CH_3)	0,922 (t)

^a Deslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS.

^b Constante de Acoplamento (J) em Hz.

^c multiplicidade = s (singleto); d (dubleto); t (tripleto); m (multiplete)

^d Deslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 13 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de **31** e **32**.

(–)-3-O-heptanoil-cassina (31)			(–)-3-O-heptanoil-espectralina (32)		
Posição	$\delta \text{ C}^a$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^a$ (em ppm); (multiplicidade) ^c	Posição	$\delta \text{ C}^a$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^a$ (em ppm); (multiplicidade) ^c
2	55,540 (CH)	3,220 (m)	2	55,538 (CH)	3,279 (m)
3	67,339 (CH)	5,017 (m)	3	67,364 (CH)	5,073 (m)
4	22,702 (CH ₂)	1,41;1,66 (m) ^d	4	22,665 (CH ₂)	1,41;1,66 (m) ^d
5	27,886 (CH ₂)	1,87;2,12 (m) ^d	5	27,886 (CH ₂)	1,87;2,12 (m) ^d
6	58,184 (CH)	2,937 (m)	6	58,202 (CH)	2,994 (m)
7	15,757 (CH ₃)	1,70 (d) ^d	7	15,613 (CH ₃)	1,70 (d) ^d
1'	33,092 (CH ₂)	1,99 (m) ^d	1'	33,123 (CH ₂)	1,99 (m) ^d
2'	29,1 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d	2'	29,1 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d
3'	29,6 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d	3'	29,6 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d
4'	29,6 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d	4'	29,6 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d
5'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d	5'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
6'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d	6'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
7'	29,3 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d	7'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
8'	29,1 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d	8'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
9'	24,008 (CH ₂)	1,495 (m)	9'	29,3 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d
10'	43,947 (CH ₂)	2,350 (t)	10'	29,1 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d
11'	209,482 (C=O)		11'	24,038 (CH ₂)	1,558(m)
12'	29,8 (CH ₃) ^d	2,069 (s)	12'	43,979 (CH ₂)	2,408 (t)
13'			13'	209,539 (C=O)	
14'			14'	29,8 (CH ₃) ^d	2,126 (s)
1''	173,436 (C=O)		1''	173,436 (C=O)	
2''	34,299 (CH ₂)	2,540 (t)	2''	34,309 (CH ₂)	2,547(t)
3''	25,055 (CH ₂)	1,615 (m)	3''	25,066 (CH ₂)	1,673(m)
4''	28,878 (CH ₂)	1,29 (m) ^d	4''	28,890 (CH ₂)	1,29 (m) ^d
5''	31,631 (CH ₂)	1,29 (m) ^d	5''	31,637 (CH ₂)	1,29 (m) ^d
6''	22,657 (CH ₂)	1,31 (m) ^d	6''	22,714 (CH ₂)	1,31 (m) ^d
7''	14,164 (CH ₃)	0,810 (t)	7''	14,165 (CH ₃)	0,869 (t)

^aDeslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS.^bConstante de Acoplamento (J) em Hz.^cmultiplicidade = s (singlete); d (dubleto); t (triplete); m (multiplete)^dDeslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 14 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (500 MHz, CDCl_3) de **33** e **34**.

(-)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (33)			(-)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (34)		
Posição	δ C ^a (em ppm)	δ H ^a (em ppm); (multiplicidade) ^c	Posição	δ C ^a (em ppm)	δ H ^a (em ppm); (multiplicidade) ^c
2	55,376 (CH)	3,422 (m)	2	55,390 (CH)	3,430 (m)
3	68,158 (CH)	5,299 (m)	3	71,952 (CH)	5,301 (m)
4	22,795 (CH ₂)	1,41;1,66 (m) ^d	4	22,842 (CH ₂)	1,41;1,66 (m) ^d
5	25,807 (CH ₂)	1,87;2,12 (m) ^d	5	25,853 (CH ₂)	1,87;2,12 (m) ^d
6	58,259 (CH)	3,082 (m)	6	64,581 (CH)	3,095 (m)
7	15,821 (CH ₃)	1,70 (d) ^d	7	15,919 (CH ₃)	1,70 (d) ^d
1'	33,067 (CH ₂)	1,99 (m) ^d	1'	33,938 (CH ₂)	1,99 (m) ^d
2'	29,1 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d	2'	29,1 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d
3'	29,6 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d	3'	29,6 (CH ₂) ^d	1,25 (m) ^d
4'	29,6 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d	4'	29,6 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d
5'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d	5'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
6'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d	6'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
7'	29,3 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d	7'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
8'	29,1 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d	8'	29,6 (CH ₂) ^d	1,26 (m) ^d
9'	24,003 (CH ₂)	1,53 (m) ^d	9'	29,3 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d
10'	43,941 (CH ₂)	2,396 (t)	10'	29,1 (CH ₂) ^d	1,29 (m) ^d
11'	209,465 (C=O)		11'	24,042 (CH ₂)	1,53 (m) ^d
12'	29,8 (CH ₃) ^d	2,122 (s)	12'	43,983 (CH ₂)	2,4 (t) ^d
13'			13'	209,585 (C=O)	
14'			14'	29,8 (CH ₃) ^d	2,130 (s)
1''	166,073 (C=O)		1''	165,649 (C=O)	
2''	126,328 (C)		2''	126,270 (C)	
3''	130,978 (CH)	8,370 (d)	3''	129,750 (CH)	8,330 (d)
4''	129,430 (CH)	7,297 (d)	4''	129,259 (CH)	7,210 (d)
5''	144,351 (C)		5''	143,708 (C)	
6''	129,430 (CH)	7,297 (d)	6''	129,259 (CH)	7,210 (d)
7''	130,978 (CH)	8,370 (d)	7''	129,750 (CH)	8,330 (d)
8''	21,854 (CH ₃)	2,34 (s) ^d	8''	21,529 (CH ₃)	2,363 (s)

^aDeslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS.

^bConstante de Acoplamento (J) em Hz.

^c multiplicidade = s (singleto); d (dubleto); t (triplete); m (multiplete)

^dDeslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300 MHz, CDCl_3) de **35** e **36**.

(–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (35)			(–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (36)		
Posição	$\delta \text{ C}^a$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^a$ (em ppm); (multiplicidade) ^c	Posição	$\delta \text{ C}^a$ (em ppm)	$\delta \text{ H}^a$ (em ppm); (multiplicidade) ^c
2	55,282(CH)	3,717 (m)	2	55,213 (CH)	3,444 (m)
3	68,999 (CH)	5,321 (m)	3	68,991 (CH)	5,322 (m)
4	27,568 (CH_2)	1,59;1,84 (m) ^d	4	27,974 (CH_2)	1,59;1,84 (m) ^d
5	26,491 (CH_2)	1,87;2,12 (m) ^d	5	25,836 (CH_2)	1,87;2,12 (m) ^d
6	58,320 (CH)	3,441 (m)	6	58,320 (CH)	3,093 (m)
7	15,839 (CH_3)	1,70 (d) ^d	7	15,801 (CH_3)	1,70 (d) ^d
1'	32,078 (CH_2)	1,99 (m) ^d	1'	33,213 (CH_2)	1,99 (m) ^d
2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	2'	29,1 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d	3'	29,6 (CH_2) ^d	1,25 (m) ^d
4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	4'	29,6 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	5'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d	6'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
7'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	7'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
8'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d	8'	29,6 (CH_2) ^d	1,26 (m) ^d
9'	24,014 (CH_2)	1,558 (m)	9'	29,3 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
10'	43,964 (CH_2)	2,416 (t)	10'	29,1 (CH_2) ^d	1,29 (m) ^d
11'	209,487 (C=O)		11'	24,012 (CH_2)	1,548 (m)
12'	29,8 (CH_3) ^d	2,131 (s)	12'	43,971 (CH_2)	2,405 (t)
13'			13'	209,620 (C=O)	
14'			14'	29,8 (CH_3) ^d	2,125 (s)
1''	164,236 (C=O)		1''	164,823 (C=O)	
2''	132,3 (C) ^d		2''	132,3 (C) ^d	
3''	132,0 (CH) ^d	8,26 (s) ^d	3''	132,0 (CH) ^d	8,26 (s)d
4''	122,673 (C)		4''	122,587 (C)	
5''	136,281 (CH)	7,80 (d) ^d	5''	136,007 (CH)	7,80 (d) ^d
6''	130,158 (CH)	7,45 (t) ^d	6''	130,083 (CH)	7,45 (t) ^d
7''	128,335 (CH)	8,01 (d) ^d	7''	128,290 (CH)	8,01 (d) ^d

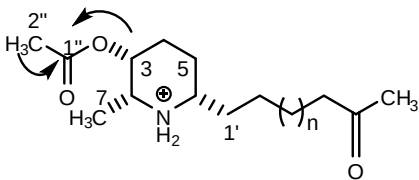
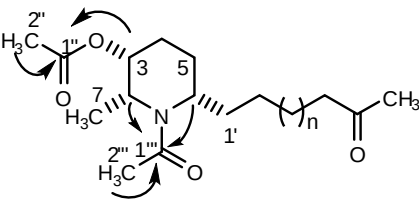
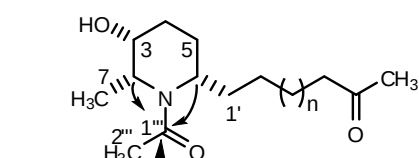
^a Deslocamentos químicos (δ) em relação ao padrão interno TMS.^b Constante de Acoplamento (J) em Hz.^c multiplicidade = s (singleto); d (dubleto); t (triplete); m (multiplete)^d Deslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise de gHMBC foi utilizada como parâmetro para indicar se houve a formação do éster, além dos dados complementares de IV e Massas de Alta Resolução. Entretanto, a análise para os compostos **9** e **10** (Figura 82), **29** (Figura 83) e **35** e **36** (Figura 84) não foi feita pois os equipamentos de RMN disponíveis para pesquisa estavam quebrados, sem previsão de funcionamento e fora do prazo para o término deste trabalho. As correlações para estes compostos foram sugeridas com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Através do gHMBC foi possível observar a correlação do H-2'' e do H-3 com o C-1''' (C=O) da função éster para os compostos **30-32** (Figura 83). Os compostos **33** e **34** além de apresentarem as mesmas correlações, apresentaram correlação do H-2, H-6, H-3''' e H-7''' com o C-1''', indicando a possibilidade de formação de amida como subproduto (Figura 84). O mesmo pode ser extrapolado para os compostos **35** e **36** (Figura 84) pois foram semissintetizados nas mesmas condições reacionais e apresentam um mesmo perfil dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , embora a análise de gHMBC não tenha sido feita, como discutido anteriormente.

Figura 82 – Atribuição de correlações no gHMBC para **9** e **10**.

		n = 7 (10)		n = 9 (9)	
	H-2'' $\xrightarrow{2J}$	C-1''	2,255 170,579 ^c	2,269 170,557 ^c	
	H-3 $\xrightarrow{3J}$	C-1''	5,076 170,579 ^c	5,084 170,577 ^c	
	H-2'' $\xrightarrow{2J}$	C-1''	2,255 170,579 ^c	2,269 170,557 ^c	
	H-3 $\xrightarrow{3J}$	C-1''	5,076 170,579 ^c	5,084 170,557 ^c	
	H-2 $\xrightarrow{3J}$	C-1'''	3,281 170,579 ^c	3,331 170,557 ^c	
	H-6 $\xrightarrow{3J}$	C-1'''	3,017 170,579 ^c	3,094 170,557 ^c	
	H-2''' $\xrightarrow{2J}$	C-1'''			
	H-2 $\xrightarrow{3J}$	C-1'''	3,281 170,579 ^c	3,331 170,557 ^c	
	H-6 $\xrightarrow{3J}$	C-1'''	3,017 170,579 ^c	3,094 170,557 ^c	

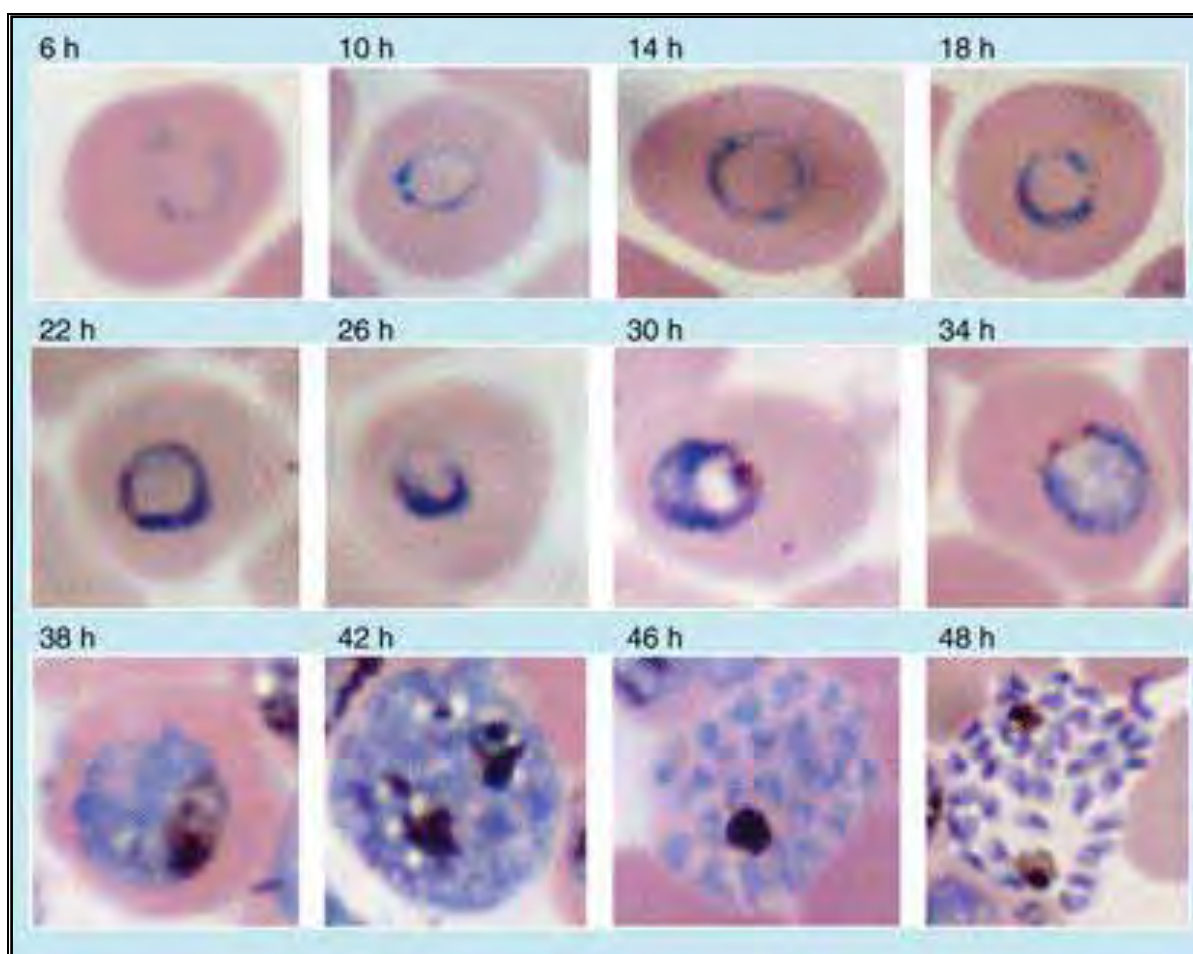
a = correlação encontrada no gHMBC
b = correlação não encontrada no gHMBC
c = possibilidade de correlação pois a análise no gHMBC não foi feita, devido a problemas no equipamento de RMN.
Nota : Valores de deslocamento químico em ppm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.1.6 Análise da atividade antimalárica

A Figura 85 representa uma população de *P. falciparum* para um ciclo de 48 h com os diferentes estágios de desenvolvimento do *P. falciparum* em eritrócitos humanos:

Figura 85 – Fases intraeritrocíticas de *P. falciparum* monitoradas por um período de 48h (ciclo assexuado completo) em microscópio óptico.



Corante: Giemsa ou Wright's
Eritrócitos: tonalidade cinza,rosa
Cromatina do parasita: tonalidade vermelha
Citoplasma: tonalidade azul, roxa

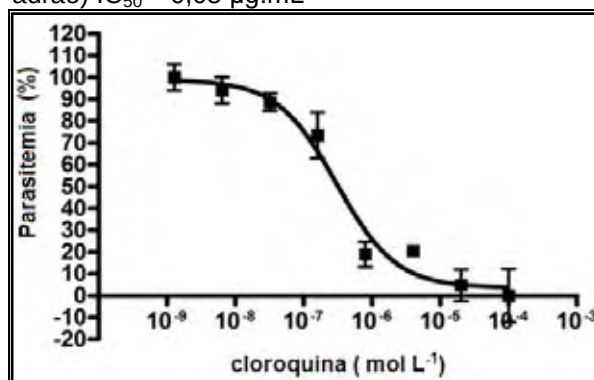
Fonte: (RADFAR et al., 2009).

Os estágios de desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* podem ser observados e divididos em: fase anel (6-22h) , fase trofozoíta (22-38h) e fase esquizonticida (38-48h). A fase anel é assim denominada por razões morfológicas. Ela é seguida pela fase trofozoíto, onde o parasita possui intensa atividade metabólica, captando nutrientes e ativando vias biossintéticas. A fase esquizonte

segue a de trofozoíto e é caracterizada por divisões mitóticas. Após a passagem pelas três fases, os eritrócitos se rompem e liberam novos merozoítos, reiniciando o ciclo.

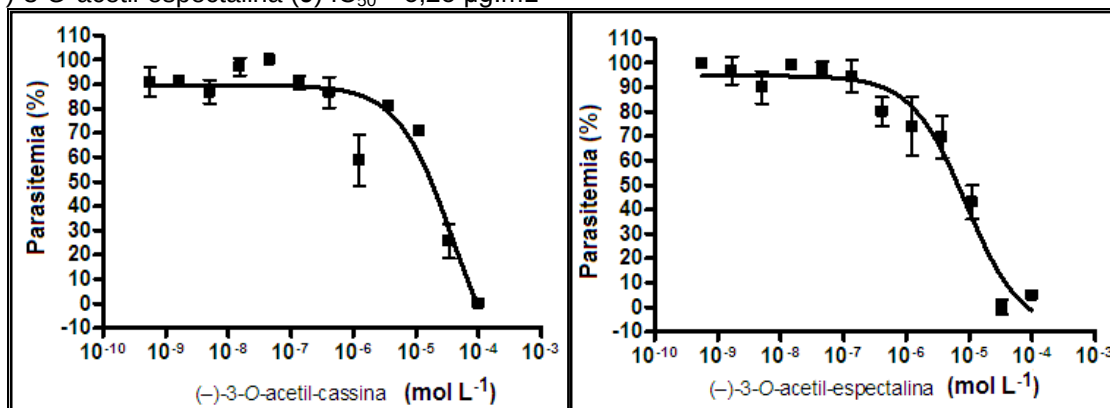
Tendo em vista que a maioria das drogas antimaláricas atua na fase esquizonte, os compostos **9**, **10**, **29-36** foram incubados com hematócitos parasitados nas fases anel e trofozoíta, pois mesmo que o parasita se desenvolva até o final do ciclo, ele morrerá se o composto testado apresentar atividade. De acordo com o exposto e tendo como base o procedimento descrito nos itens 4.1.1 – 4.1.6, os ensaios antimaláricos foram realizados e os resultados expressos em concentração inibitória mínima de 50% (IC_{50}) (Figuras 86-91). A cloroquina foi utilizada como padrão positivo.

Figura 86 – Cloroquina (Padrão) $IC_{50} = 0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$



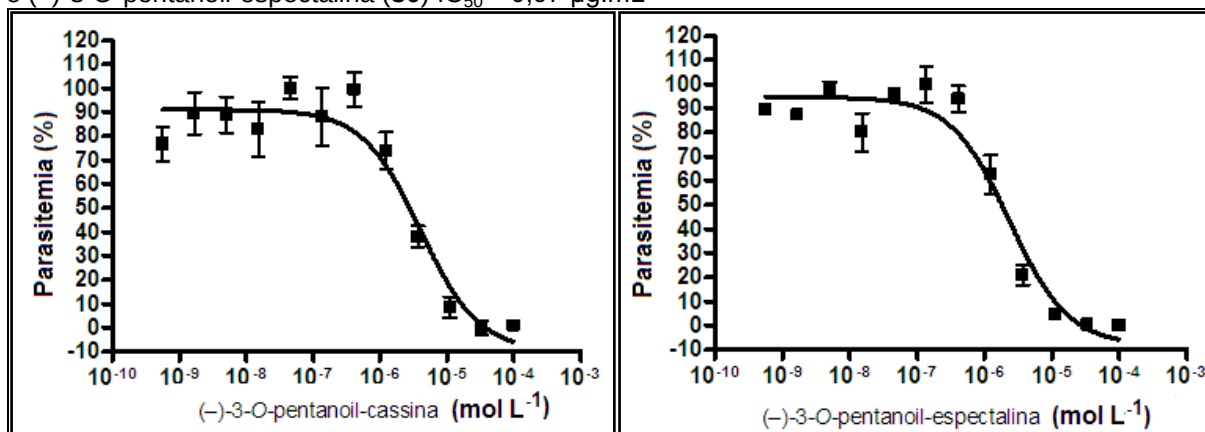
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 87 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-acetil-cassina (**10**) $IC_{50} = 0,13 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e (–)-3-O-acetil-espectralina (**9**) $IC_{50} = 3,28 \mu\text{g.mL}^{-1}$



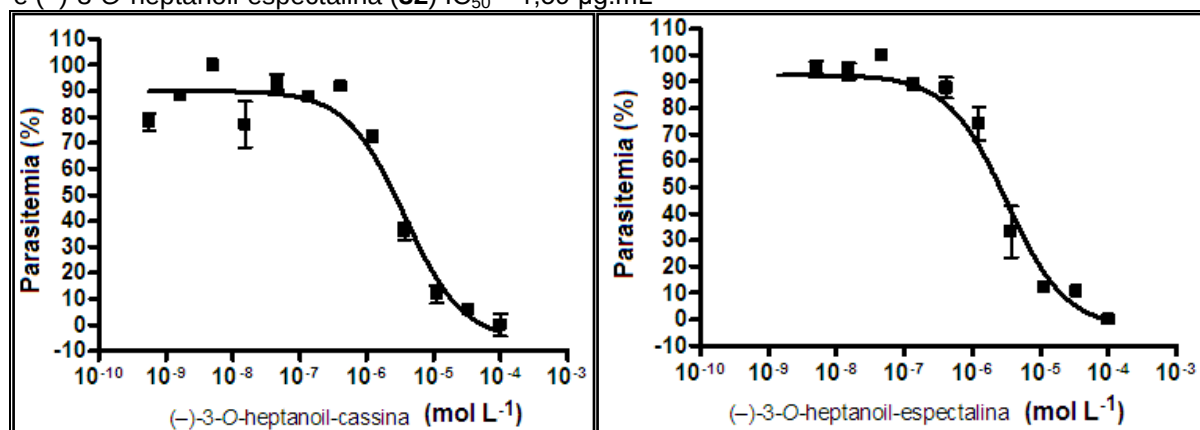
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 88 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**) $IC_{50} = 1,54 \mu g.mL^{-1}$ e (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) $IC_{50} = 0,97 \mu g.mL^{-1}$



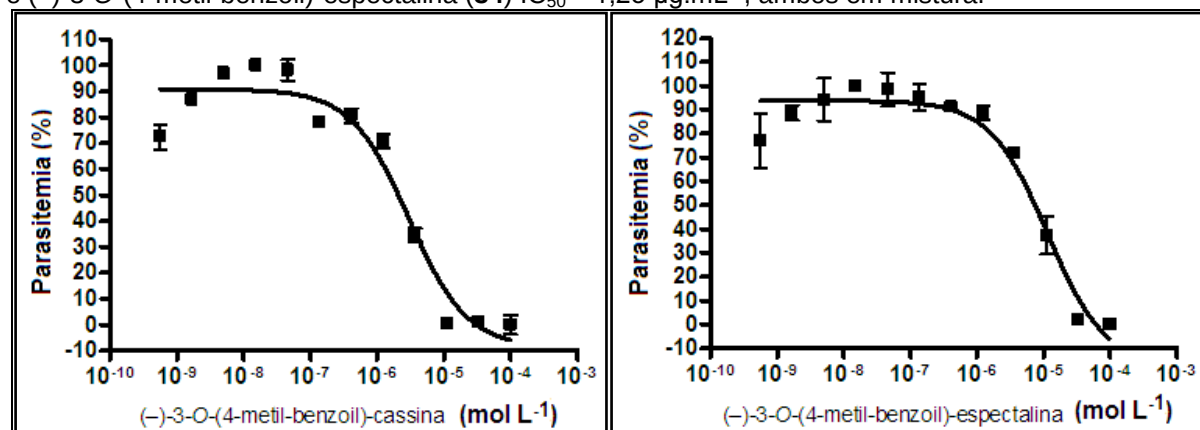
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 89 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) $IC_{50} = 1,51 \mu g.mL^{-1}$ e (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) $IC_{50} = 1,39 \mu g.mL^{-1}$



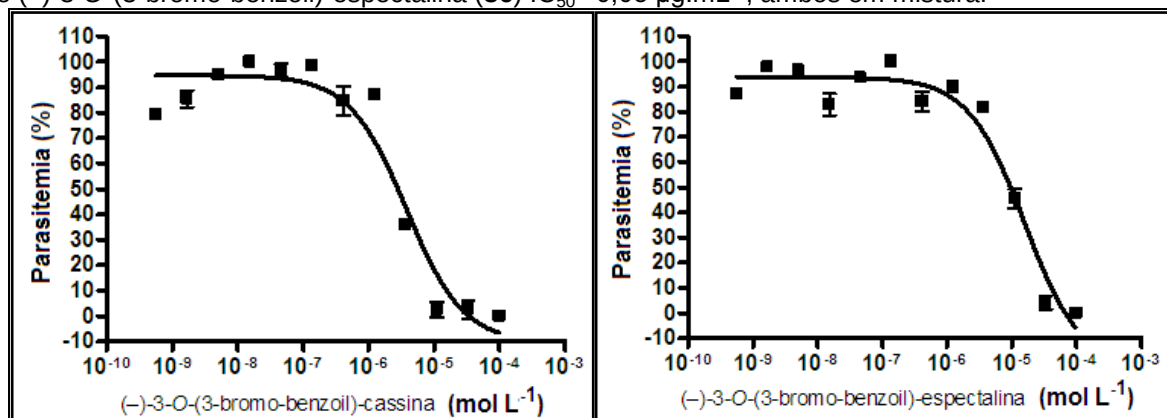
Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 90 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) $IC_{50} = 0,06 \mu g.mL^{-1}$ e (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**) $IC_{50} = 1,25 \mu g.mL^{-1}$, ambos em mistura.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 91 – Ensaio antimalárico: (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**) $IC_{50} = 1,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (**36**) $IC_{50} = 0,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$, ambos em mistura.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de IC_{50} dos compostos **9,10,29-36** obtidos durante o ensaio foram comparados com os antimaláricos cloroquina e artemisinina. A cloroquina ($IC_{50} = 0,300 \mu\text{M}$) foi utilizada como padrão por ser um fármaco eficaz contra a forma sanguínea esquizonte do protozoário *P. falciparum*, apresentar baixa toxicidade e baixo custo. Os compostos **34** e **36**, comparados com a cloroquina, apresentam valor de IC_{50} bem menor que o padrão (Tabela 16), portanto, maior atividade antimalárica. Quando comparados com dados da literatura, por exemplo com a artemisinina ($IC_{50} = 0,009 \mu\text{M}$) (FRANCISCO; VARGAS, 2010), um dos fármacos recomendados pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento da malária causada pelo *P.falciparum*, apresentam também atividade significativa, indicando a possibilidade de novos protótipos a fármacos antimaláricos.

Tabela 16 – Valores de IC_{50} para os compostos **9,10,29-36**.

Produto	Nome	$IC_{50} (\mu\text{g.mL}^{-1})$
Padrão	cloroquina	0,05
Padrão	artemisinina	0,0025
10	(–)-3-O-acetil-cassina	0,13
9	(–)-3-O-acetil-espectralina	3,28
29	(–)-3-O-pentanoil-cassina	1,54
30	(–)-3-O-pentanoil-espectralina	0,97
31	(–)-3-O-heptanoil-cassina	1,51
32	(–)-3-O-heptanoil-espectralina	1,39
33^a	(–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina	1,25
34^a	(–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina	0,06
35^a	(–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina	1,82
36^a	(–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina	0,08

^a Produto em mistura

Fonte: Elaborada pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Senna spectabilis é uma fonte importante de alcaloides piperidínicos bioativos, como (–)-cassina (**1**) e (–)-espectralina (**5**). Esses metabólitos secundários foram utilizados como substratos para o preparo de dez derivados semissintéticos: (–)-3-O-acetil-cassina (**10**), (–)-3-O-acetil-espectralina (**9**), (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**), (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**), (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**), (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**), (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**), (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**), (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-cassina (**35**) e (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (**36**), os quais foram identificados e caracterizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, Espectrometria de Massas, Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear. Os compostos **33-36** foram caracterizados na forma de mistura.

Os compostos **9,10,29-36** foram submetidos ao ensaio antimalárico com a cepa 3D7 de *Plasmodium falciparum* e os dados expressos em IC_{50} . A cloroquina foi utilizada como padrão de comparação. Dentre os resultados obtidos, os compostos **34** e **36**, apresentaram maior atividade antimalárica provavelmente pelo sinergismo entre as substâncias em mistura. Os compostos **9,10,29-32** contendo somente o éster apresentaram uma atividade menor em relação aos compostos em mistura. Conclui-se então, que a atividade antimalárica é atribuída primeiramente ao anel piperidínico e, dependendo das modificações estruturais nos precursores reacionais (–)-cassina ($IC_{50} = 0,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e (–)-espectralina ($IC_{50} = 0,90 \mu\text{g.mL}^{-1}$) esta atividade pode ser otimizada. Um fator preponderante é que o aumento da cadeia carbônica favorece uma maior interação lipofílica entre as membranas plasmáticas do protozoário propiciando a difusão do composto até o vacúolo digestivo do *Plasmodium falciparum*. Em pH fisiológico estes compostos encontram-se na forma desprotonada (forma de base livre) mas no vacúolo digestivo onde o pH é ácido, tornam-se protonados (sais de amínio), com caráter mais hidrofílico, perdendo a capacidade de atravessar a membrana plasmática e por consequência, provocam a morte do protozoário. Isto pode ser aplicado para os pares de homólogos **29** ($IC_{50} = 1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e **30** ($IC_{50} = 0,97 \mu\text{g.mL}^{-1}$), **31** ($IC_{50} = 1,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e **32** ($IC_{50} = 1,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$), **33** ($IC_{50} = 1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e **34** ($IC_{50} = 0,06 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e **35** ($IC_{50} = 1,82 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e **36** ($IC_{50} = 0,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$), onde os compostos **30, 32, 34** e **36** apresentam maior atividade antimalárica.

7 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais sobre a metodologia reacional empregada nas esterificações são necessários para direcionar a formação do produto de interesse já que a estrutura molecular dos precursores reacionais (–)-cassina e (–)-espectralina permite a formação de éster e amida na presença de cloretos de ácido. Dentre as possibilidades há a formação de éster (puro), amida (pura), éster e amida na mesma molécula e a mistura de ambos. A comparação dos valores de IC_{50} destes possíveis produtos permitiria inferir o quanto cada um, isoladamente e em mistura, influenciaria na atividade antimalárica.

REFERÊNCIAS

ARMAREGO, W. L. F.; CHAI, C. L. L. **Purification of laboratory chemicals**. 5th ed. Oxford: Elsevier, 2003. 609 p.

BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007. 189 p.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. **Química Nova**, v. 13, n. 1, p. 29-39, 1990.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de diagnóstico laboratorial da malária**. 2. ed. Brasília, DF, 2009. 116 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_diagnostico_malaria.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia prático de tratamento da malária no Brasil**. Brasília, DF, 2010. 36 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/guia_pratico_tratamento_malaria_brasil_2602.pdf>. Acesso em: 18 jul. 2012.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n.1, p. 229-239, 2010.

BRUCE, P. Y. **Química orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006. v. 1, 509 p.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Biology**: malaria. 2010. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/malaria/about/biology/index.html>>. Acesso em: 18 jul. 2012.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. UNICAMP, 2006. 453 p.

COSTA, P.; FERREIRA, V.; ESTEVES, P.; VASCONCELLOS, M. **Ácidos e bases em química orgânica**. Porto Alegre: Bookman, 2005. 151 p.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2001. 1512 p.

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

FRANCISCO, A. I.; VARGAS, M. D. Ferroquina: o antimalárico do futuro. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 2, p. 118-129, 2010.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

GARCIA, C. R. S.; AZEVEDO, M. F.; WUNDERLICH, G.; BUDU, A.; YOUNG, J. A.; BANNISTER, L. *Plasmodium* in the postgenomic era: new insights into the molecular cell biology of malaria parasites. In: JEON, K. W. **Internacional review of cell and molecular biology**. New York: Academic Press, 2008. v. 266, cap. 3, p. 85-156.

GUNTHER, K.; MERTIG, M.; SEIDEL, R. Mechanical and structural properties of YOYO-1 complexed DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 19, p. 6526-6532, May 2010.

GURR, E. **Synthetic dyes in biology, medicine and chemistry**. London: Academic Press, 1971. 807 p.

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

LAMBROS, C.; VANDERBERG, J. P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. **Journal of Parasitology**, v. 65, p. 418-420, 1979.

LI, Q.; GERENA, L.; XIE, L.; ZHANG, J.; KYLE, D.; MILHOUS, W. Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1. **Cytometry Part A** v.71 A, p. 297-307, Dec. 2007.

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.

MAKABE, H.; KONG, L. K.; HIROTA, M. Total synthesis of (–)-cassine. **Organic Letters**, v. 5, n.1, p. 27-29, 2003.

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.

NOGUEIRA, F.; ROSÁRIO, V. E. D. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v.1, n. 3, p.109-124, set. 2010.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R.; SANTOS, P. S.; BARROS, P. **Introdução à espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010. 700 p.

PIVATTO, M. **Estudo das vias biossintéticas dos alcaloides piperidínicos de *Senna spectabilis***. 2010. 196 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

PIVATTO, M.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; CASTRO-GAMBOA, I.; REZENDE, A.; VIEGAS JUNIOR, C.; YOUNG, 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.

RADFAR, A.; MÉNDEZ, D.; MONERIZ, C.; LINARES, M.; MARÍN-GARCIA, P.; PUYET, A.; DIEZ, A.; BAUTISTA, J. M. Synchronous culture of *Plasmodium falciparum* at high parasitemia levels. **Nature Protocols** 4, p. 1899-1915, 2009. Disponível em: <http://www.nature.com/nprot/journal/v4/n12/box/nprot.2009.198_BX2.html>. Acesso em: 18 jul. 2012.

RUBIRALTA, M.; GIRALT, E.; DIEZ, A. **Piperidine**: structure, preparation, reactivity, and synthetic applications of piperidine and its derivatives. New York: Elsevier, 1991. 444 p.

SANCHEZ, V. E. D. **Plasmódios transfectados com a Proteína de Fluorescência Verde (GFP) para ensaios de quimioterapia experimental**. 2007. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde: doenças infecciosas e parasitárias) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte, 2007.

SILVA, F. O.; OLIVEIRA, I. R.; SILVA, M. G. V.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos das folhas de *Senna spectabilis* (DC) Irwin & Barneby var. excelsa (schrad.) Irwin & Barneby. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1874-1876, 2010.

SCHUCK, D. C.; RIBEIRO, R. Y.; NERY, A. A.; ULRICH, H.; GARCIA, C. R. S. Flow cytometry as a tool for analyzing changes in *Plasmodium falciparum* cell cycle following treatment with indol compounds. **Cytometry Part A**, v. 79 A, p. 959-964, Aug. 2011.

SOARES, I. S.; RODRIGUES, M. M. Malaria vaccine: roadblocks and possible solutions. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, v. 31, n. 3, p. 317-332, 1998.

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

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n.12, p. 908-910, 2004.

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

WINZELER, E. A. Malaria research in the post-genomic era. **Nature**, v. 455, p. 751-756, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Report on Antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010. 2010.121p. Disponível em:

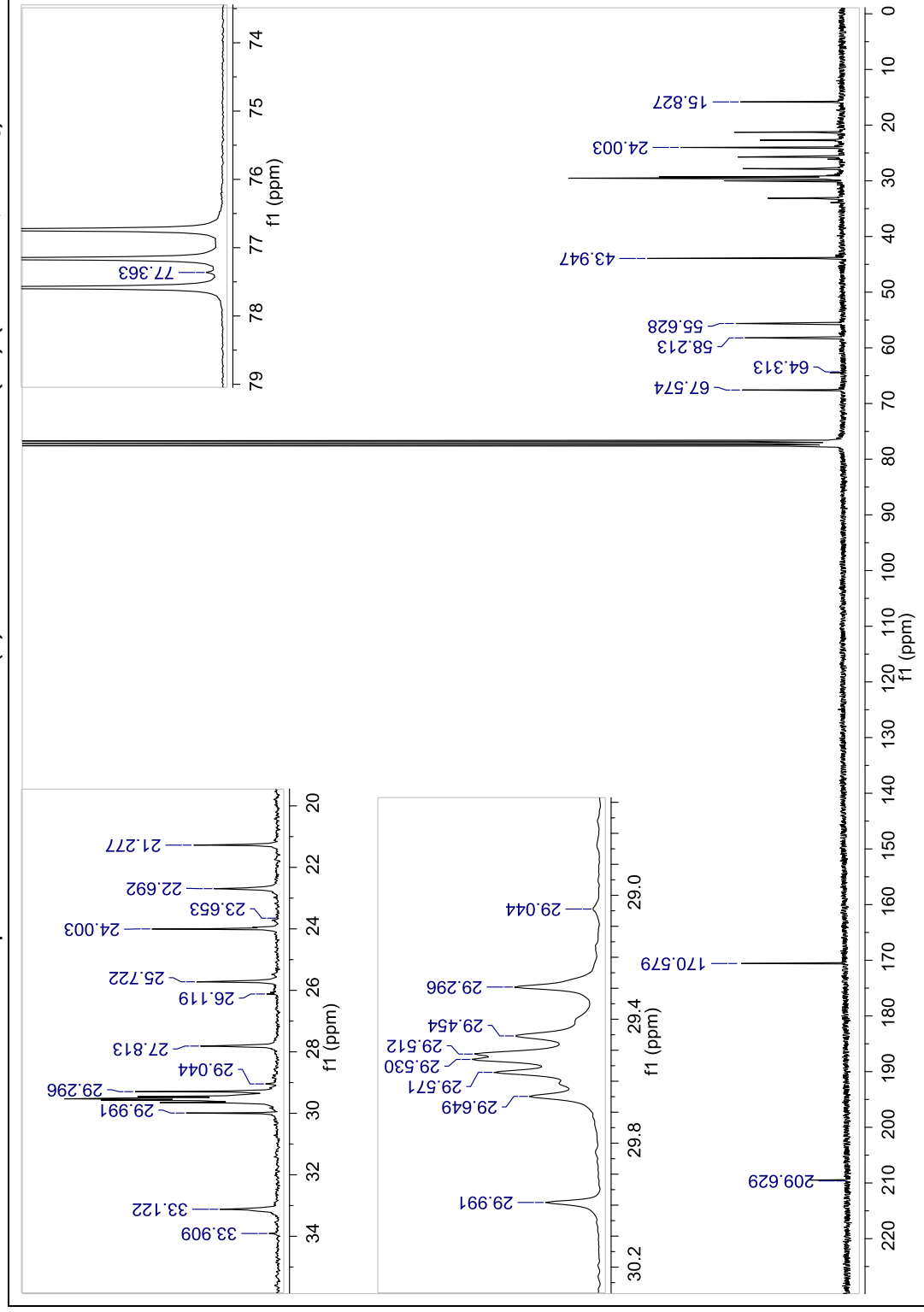
< <http://www.who.int/malaria/publications/atoz/9789241500470/en/index.html> >.

Acesso em: 10 mar. 2011.

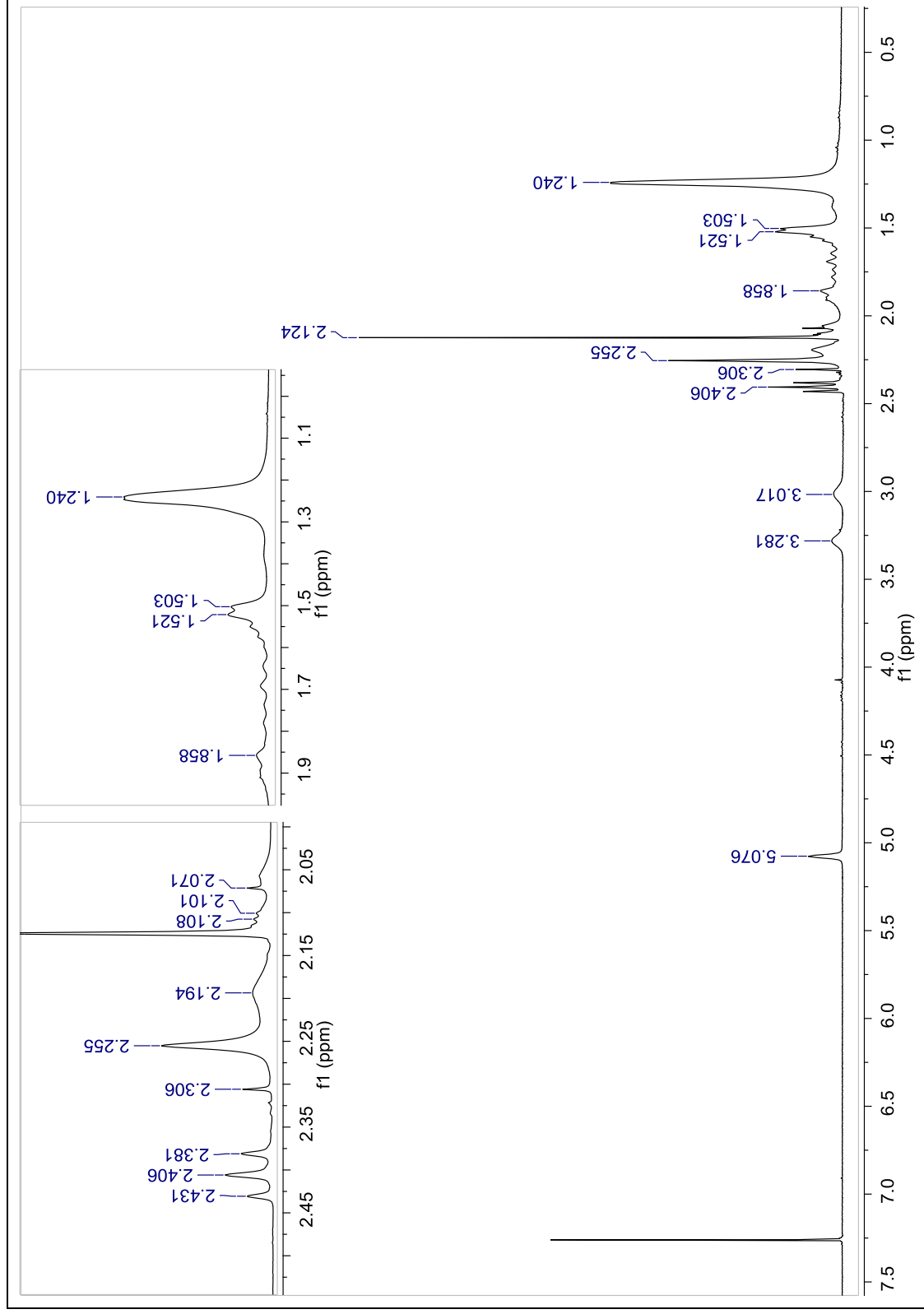
YARMOLUK, S. M.; KOVALSKA, V. B.; LOSYTSKY, M. Y. Symmetric cyanine dyes for detecting nucleic acids. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 83, n. 3/4, p. 131-145, July 2008.

APÊNDICE A

APÊNDICE A1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-acetil-cassina (**10**) (500 MHz, CDCl_3).

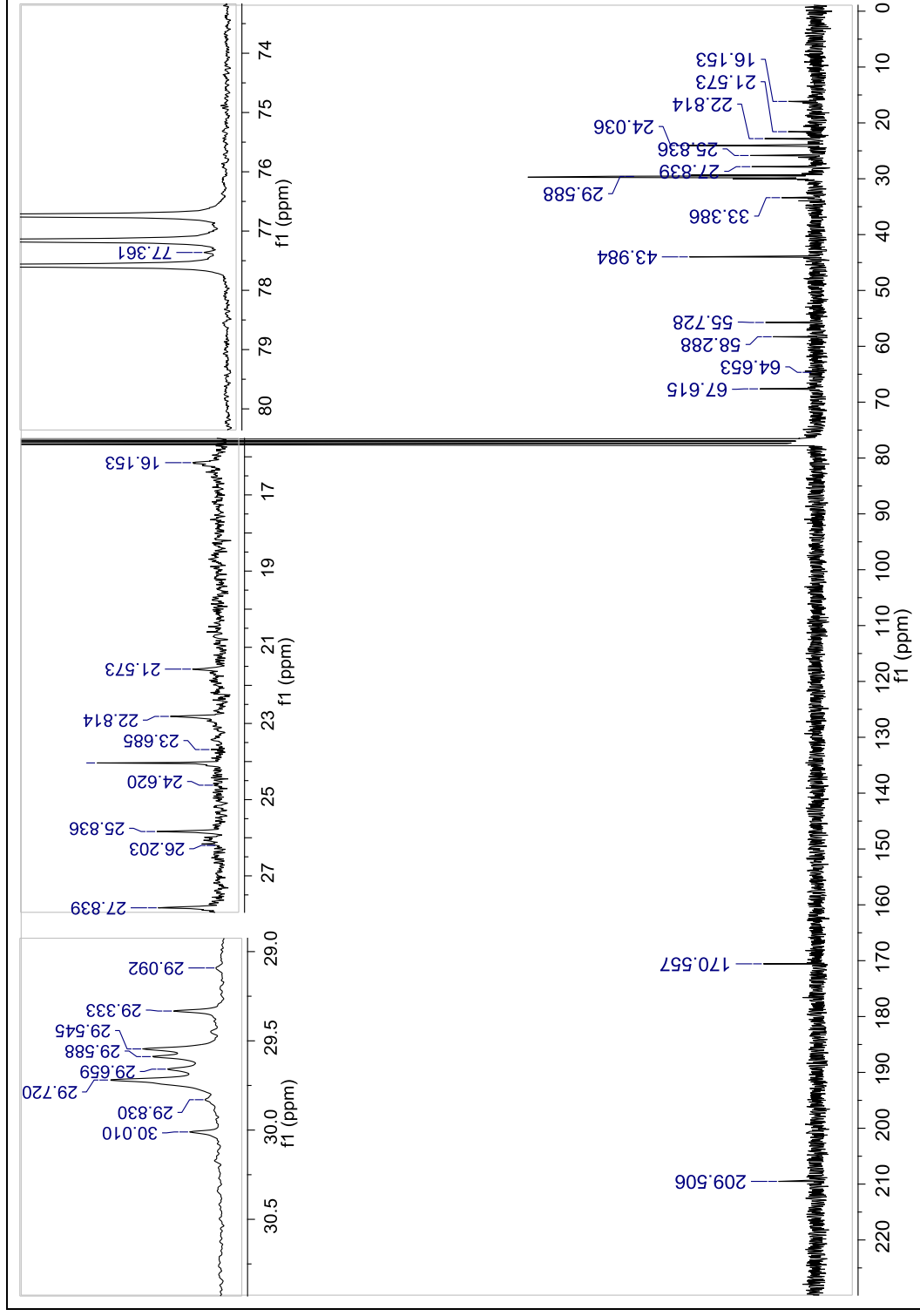


APÊNDICE A2 – Espectro de RMN ^1H de (-)-3-O-acetil-cassina (**10**) (500 MHz, CDCl_3).

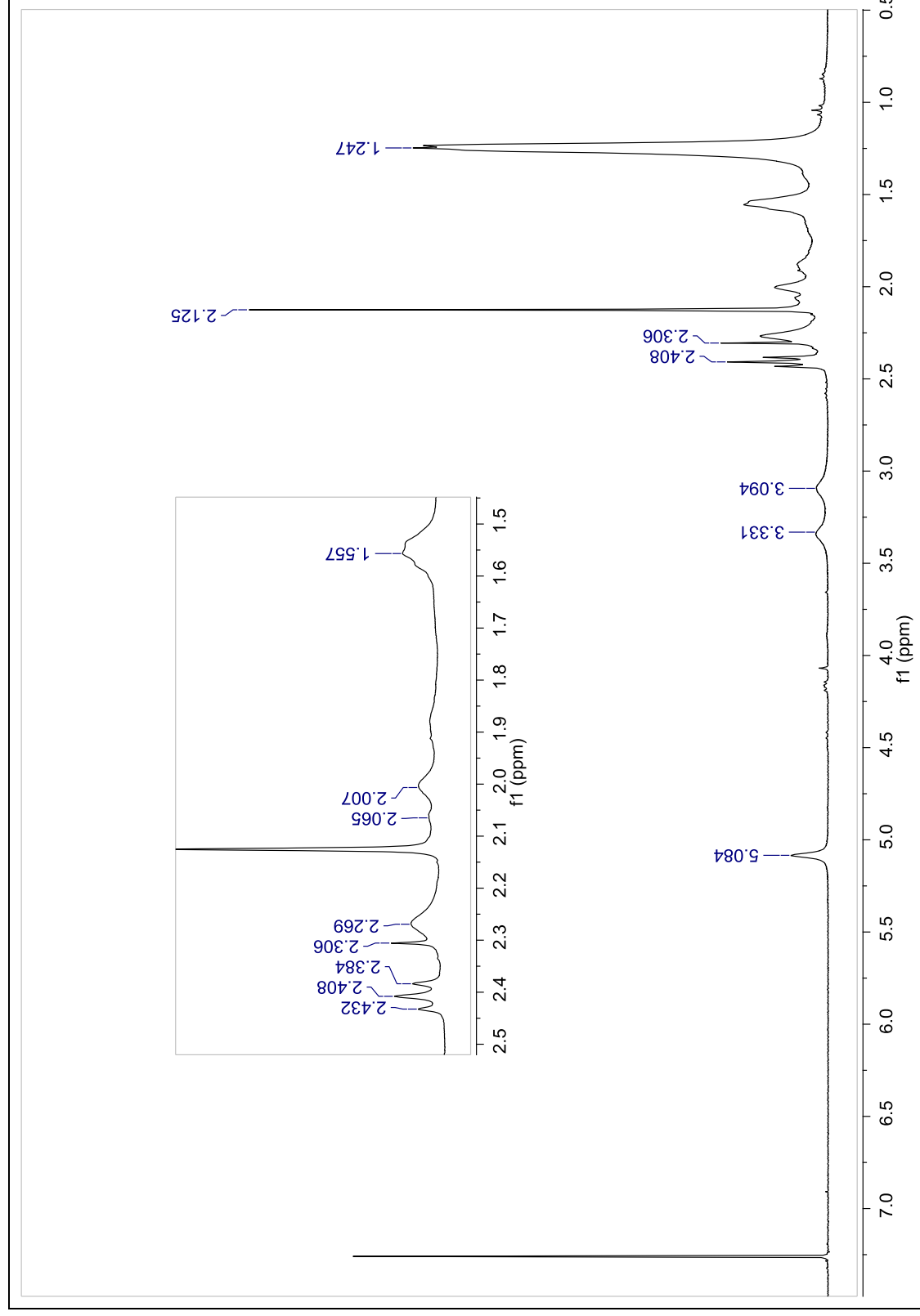


APÊNDICE B

APÊNDICE B1 – Espectro de RMN ^{13}C de (-)-3-O-acetil-espectralina (**9**) (300 MHz, CDCl_3).

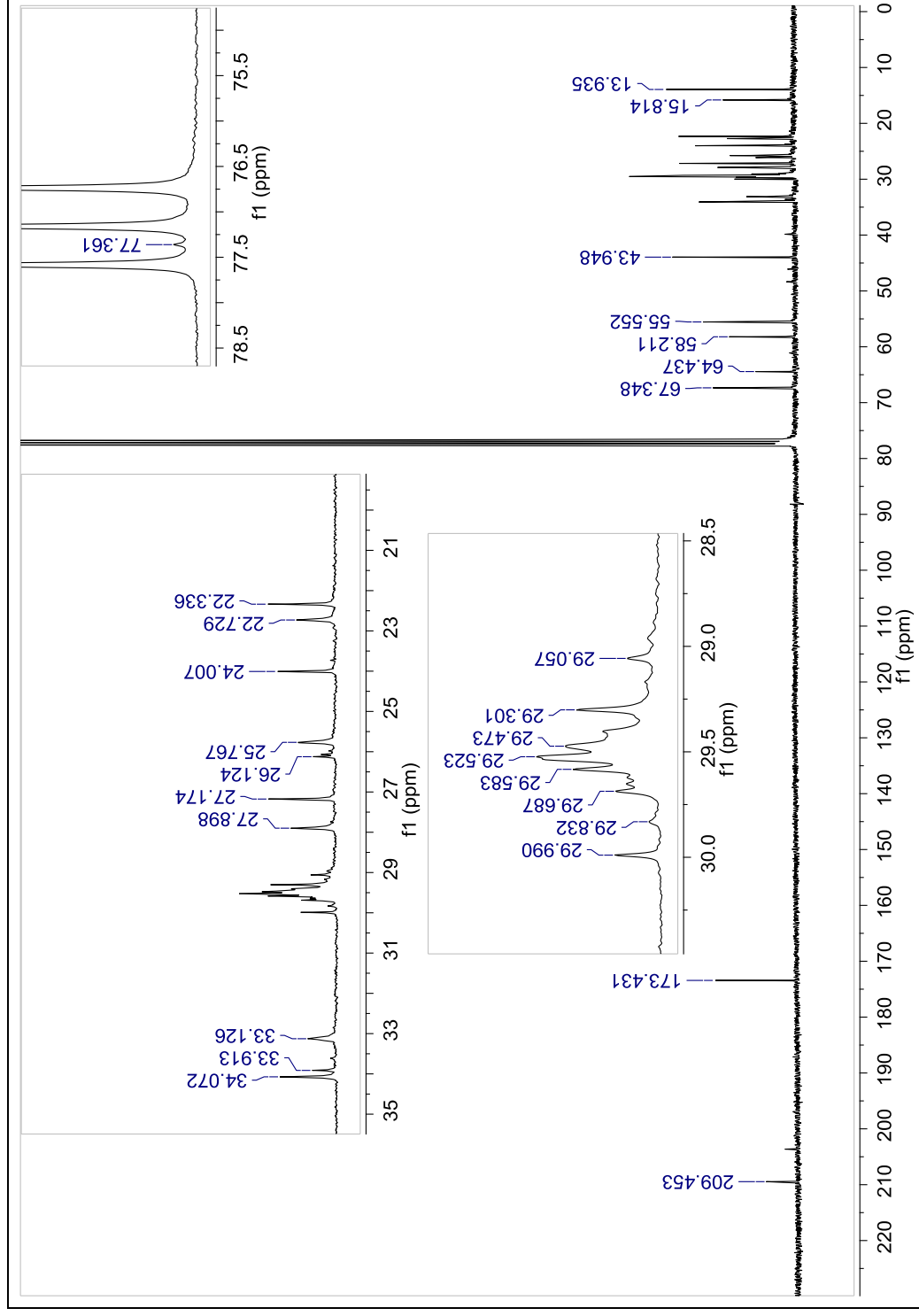


APÉNDICE B2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-*O*-acetil-espectralina (**9**) (300 MHz, CDCl_3).

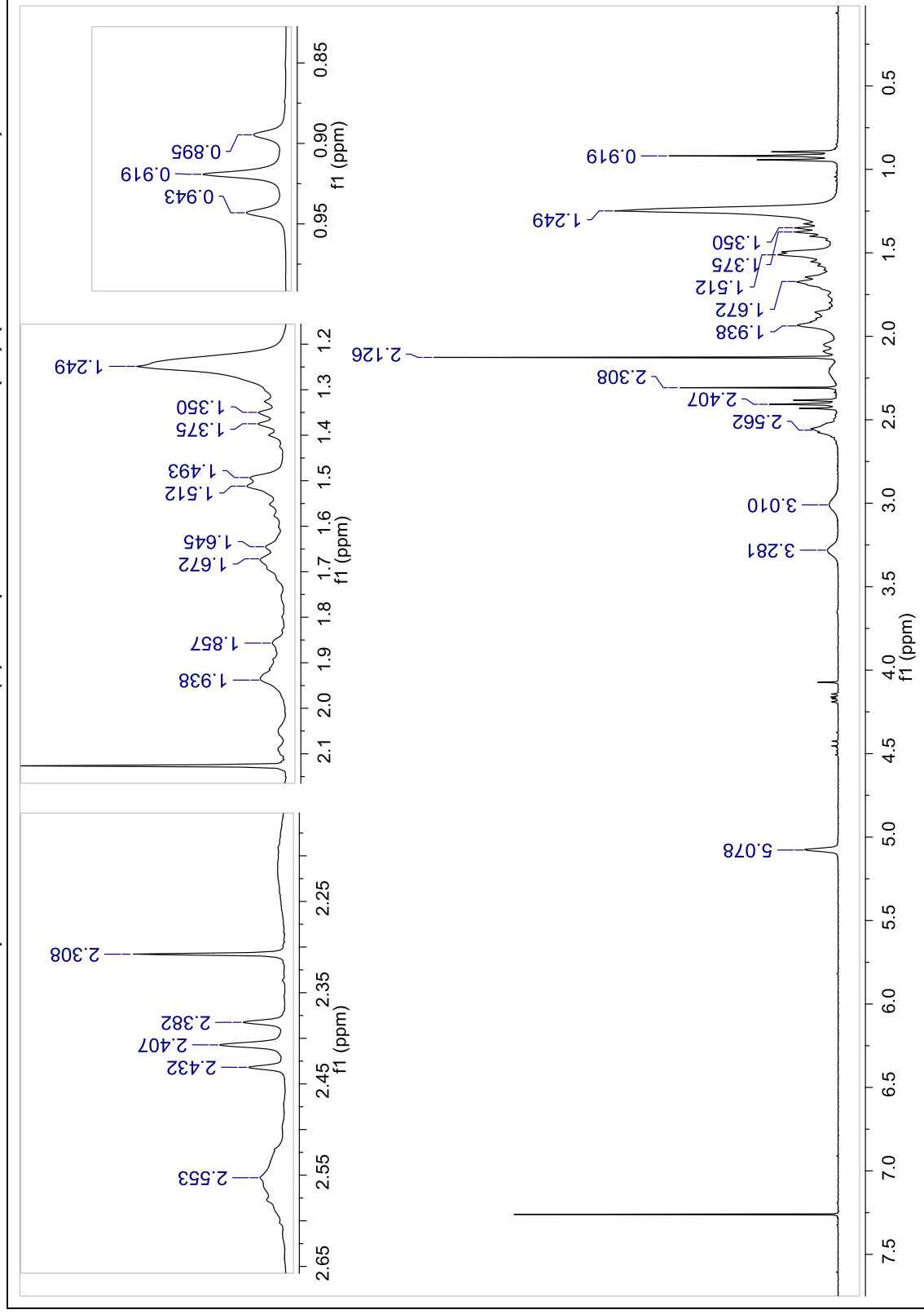


APÊNDICE C

APÊNDICE C1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**) (300 MHz, CDCl_3).

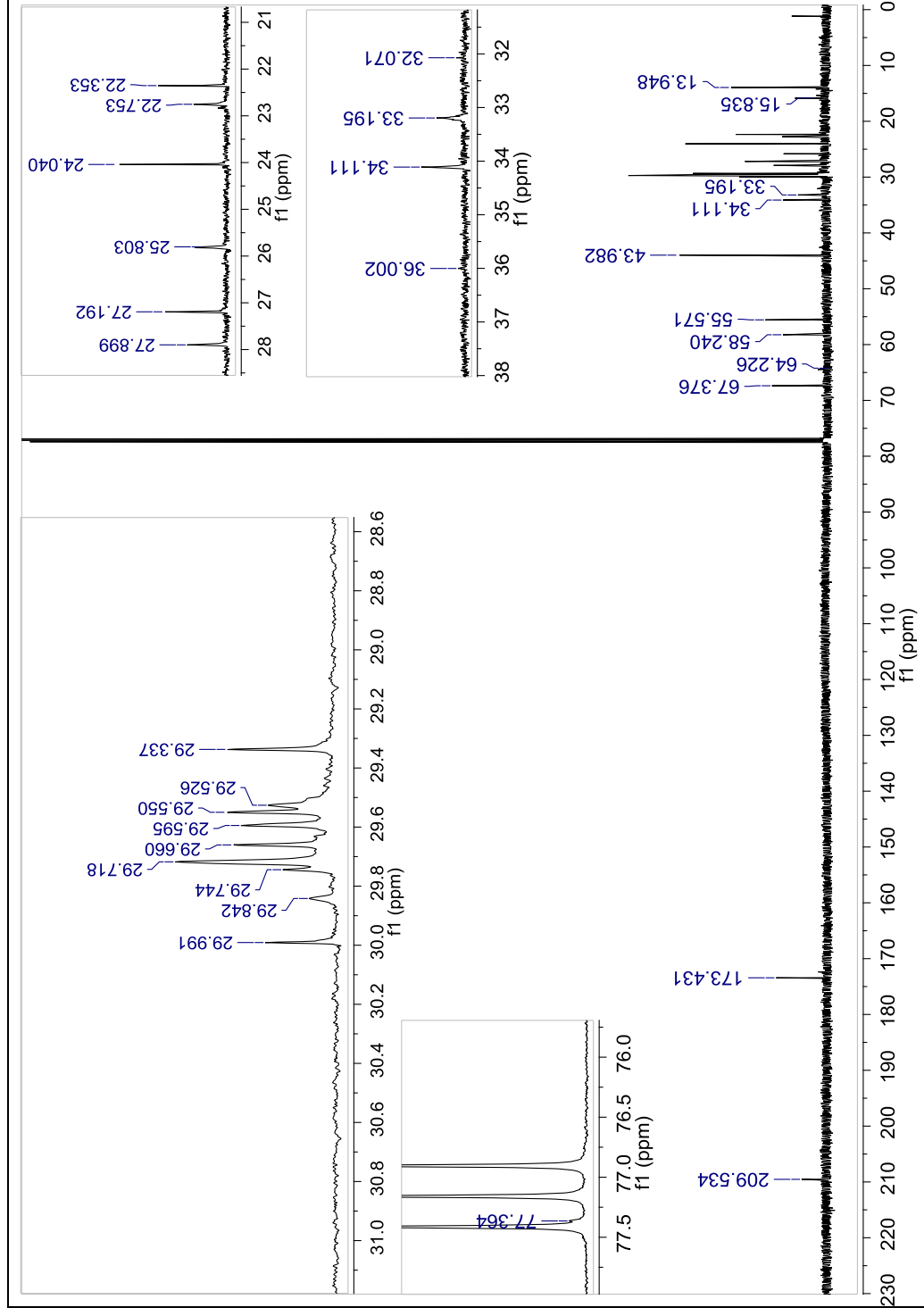


APÊNDICE C2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-pentanoil-cassina (**29**) (300 MHz, CDCl_3).

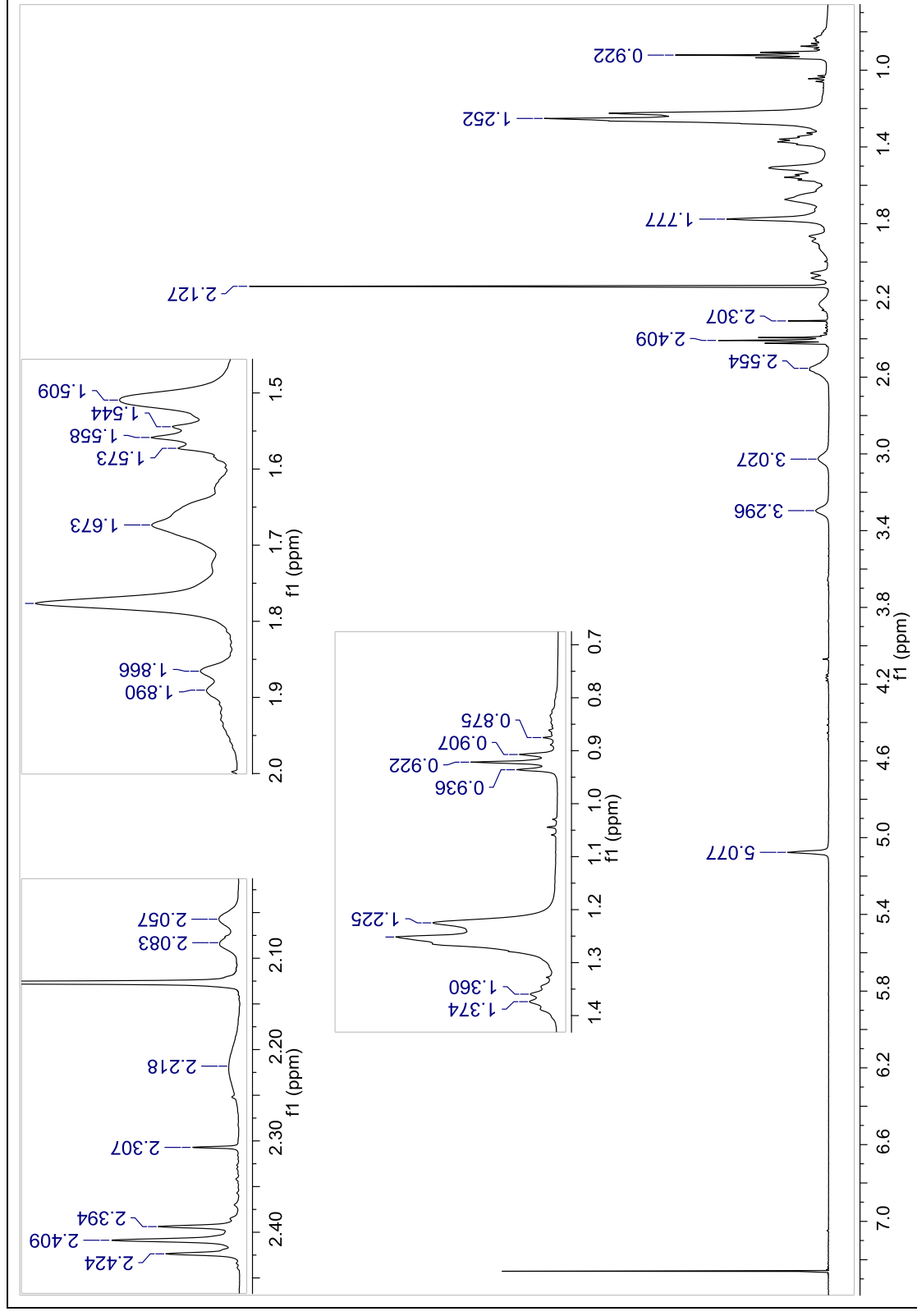


APÊNDICE D

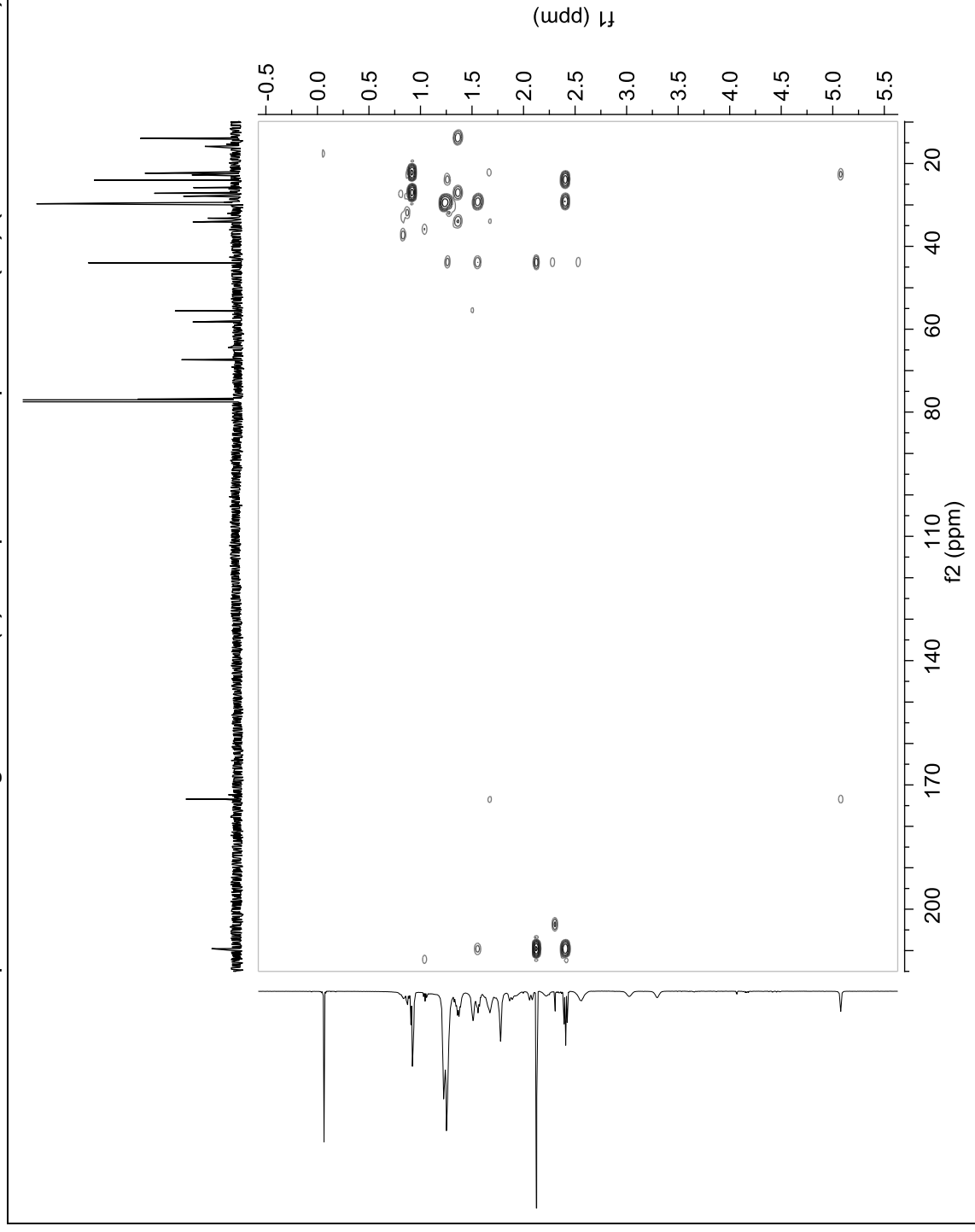
APÊNDICE D1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) (500 MHz, CDCl_3).



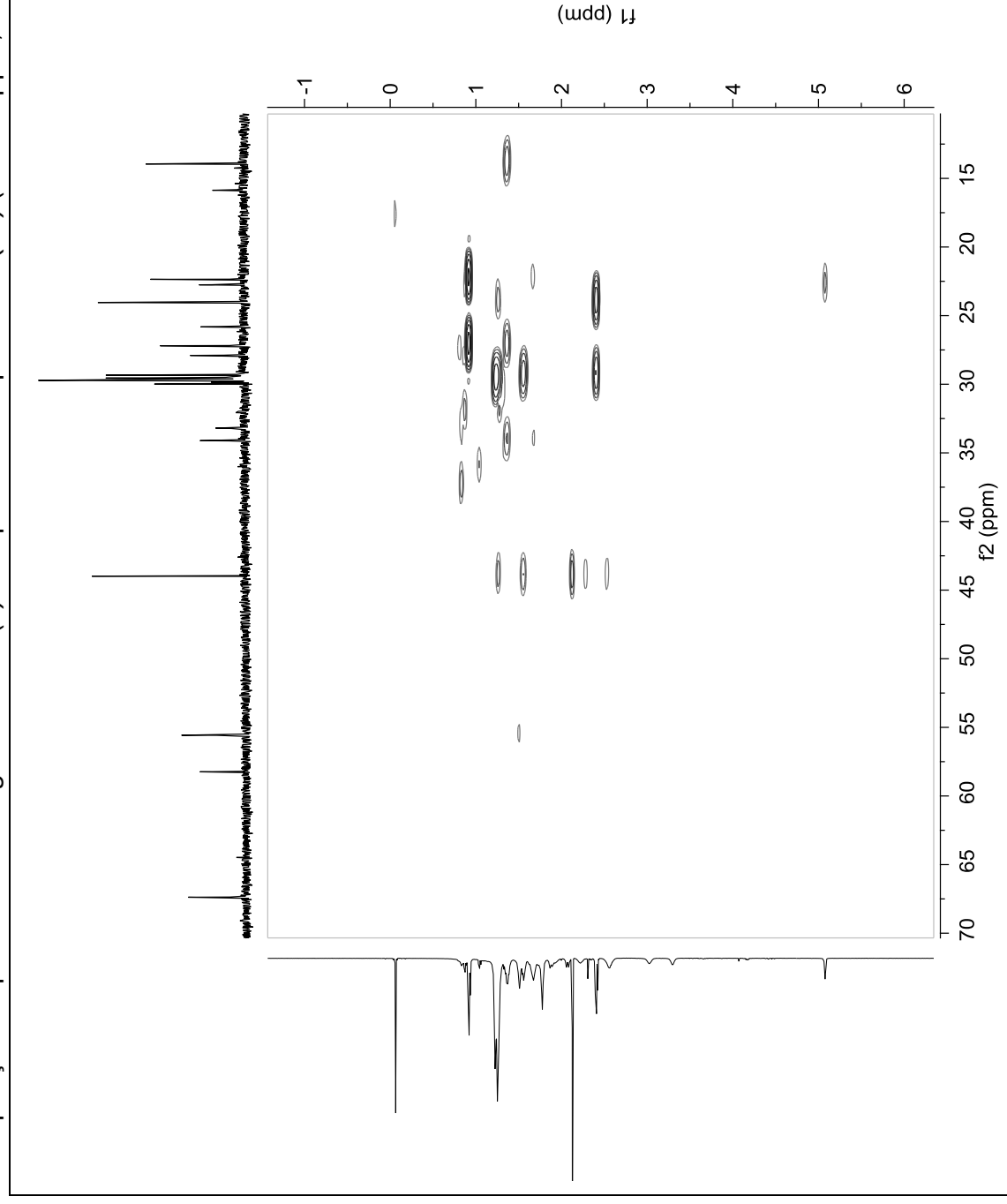
APÊNDICE D2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) (500 MHz, CDCl_3).



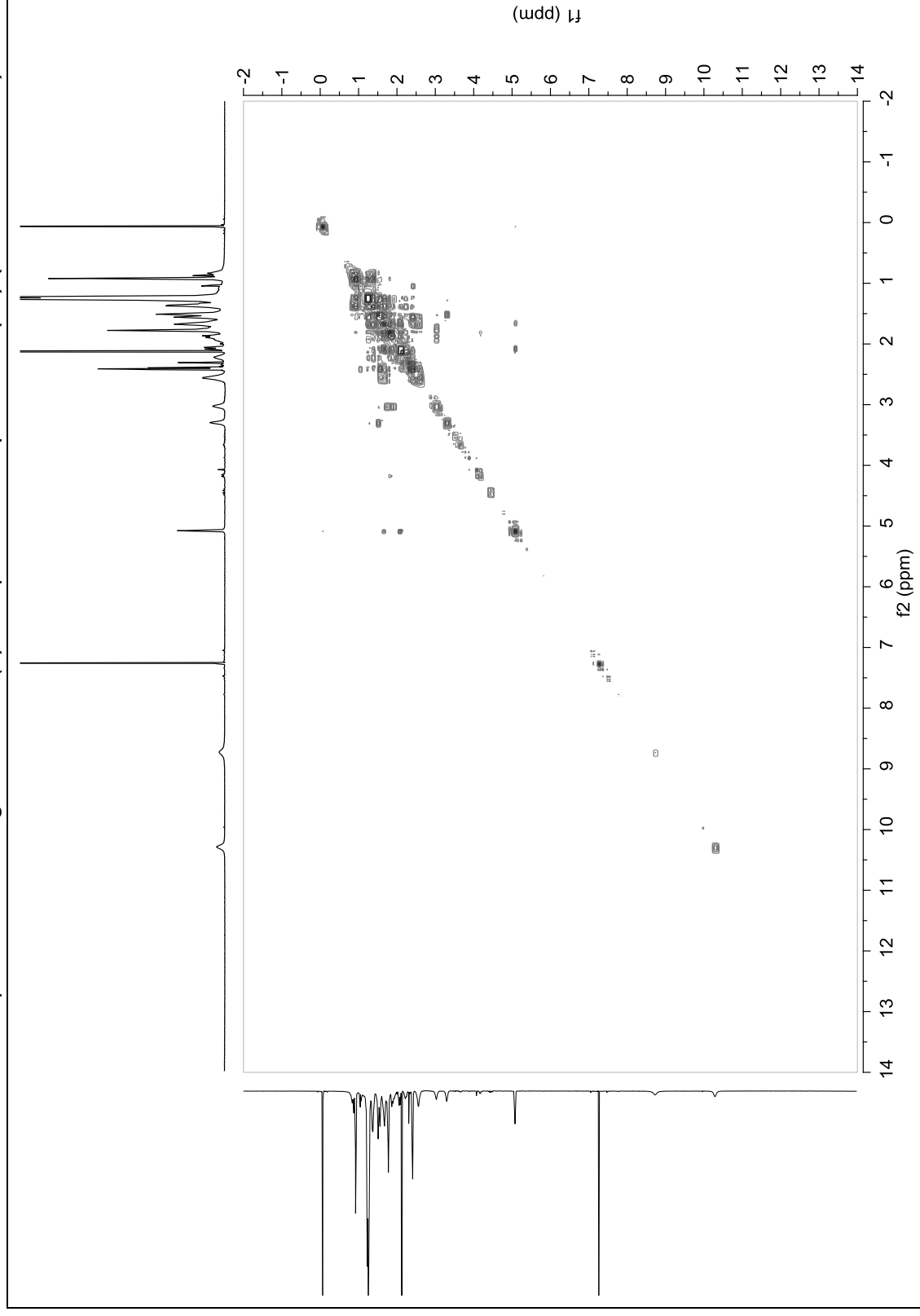
APÊNDICE D3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) (500 MHz, CDCl₃).



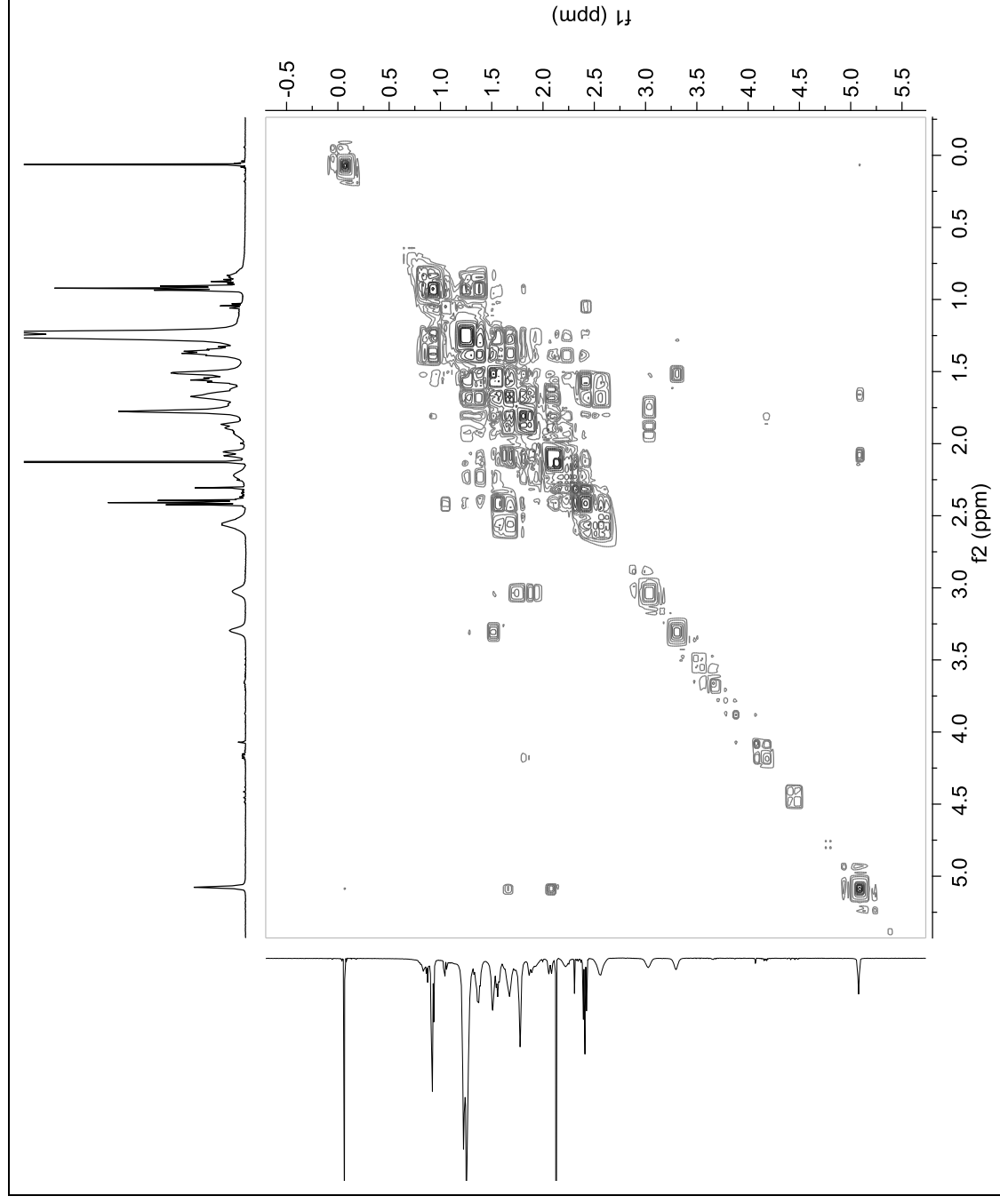
APÊNDICE D4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) (δ 15-70 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



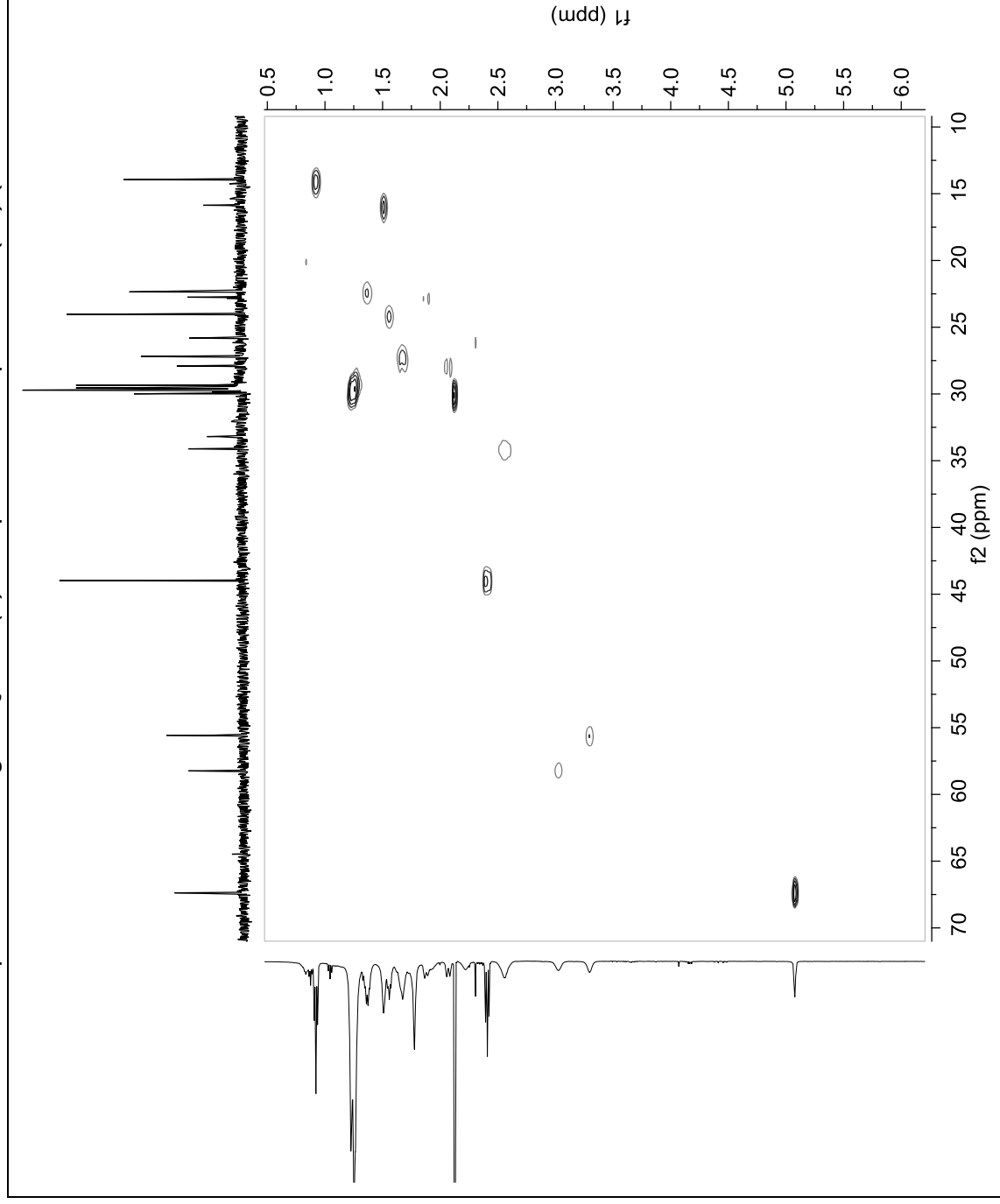
APÊNDICE D6 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) (500 MHz, CDCl₃).



APÊNDICE D7 – Ampliação Mapa de contorno gCOSY de (-)-3-O-pentanoil-espectralina (30) (δ 0,5-5,5 ppm; 500 MHz, CDCl_3).

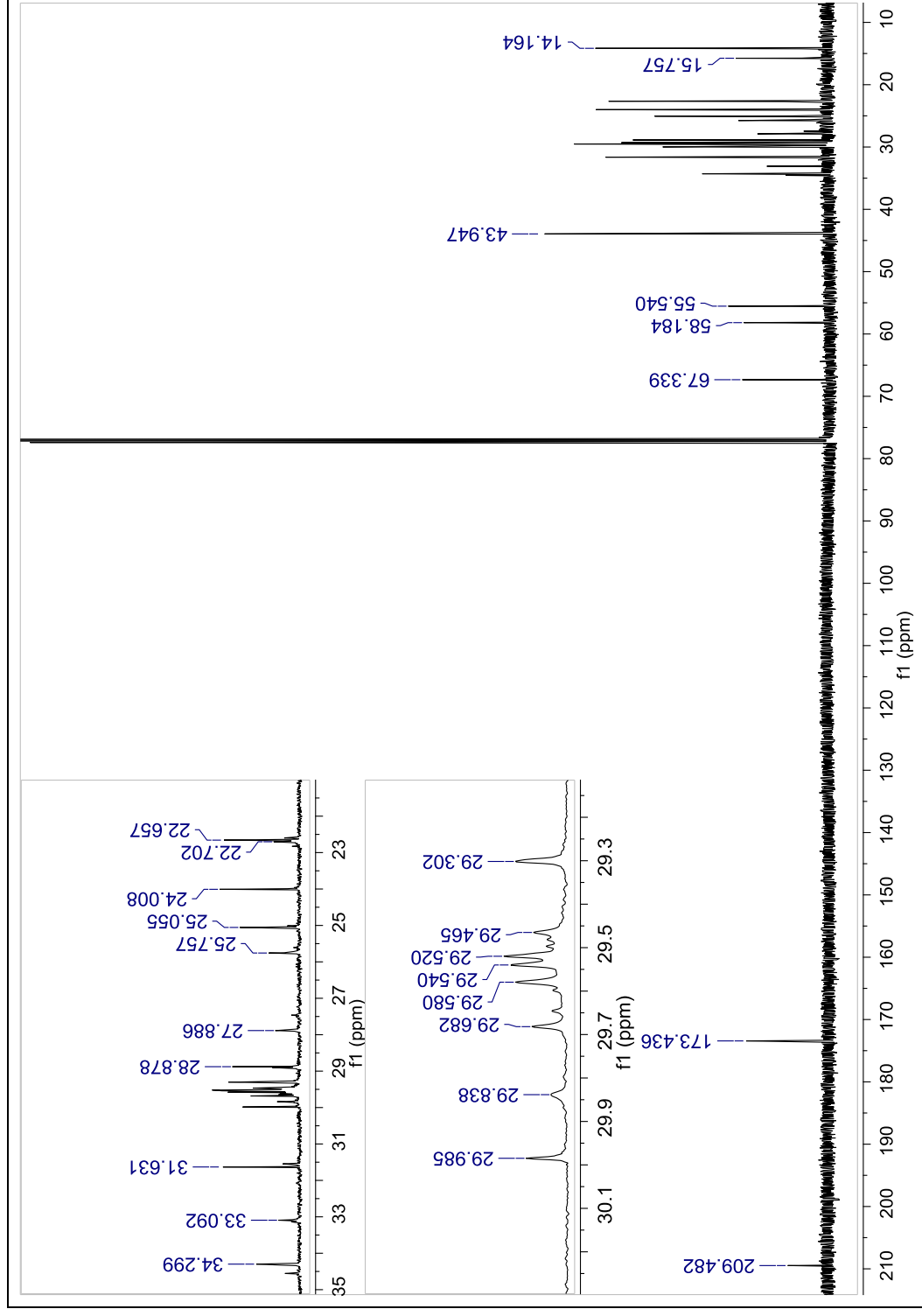


APÊNDICE D8 – Mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-pentanoil-espectralina (**30**) (500 MHz, CDCl₃).

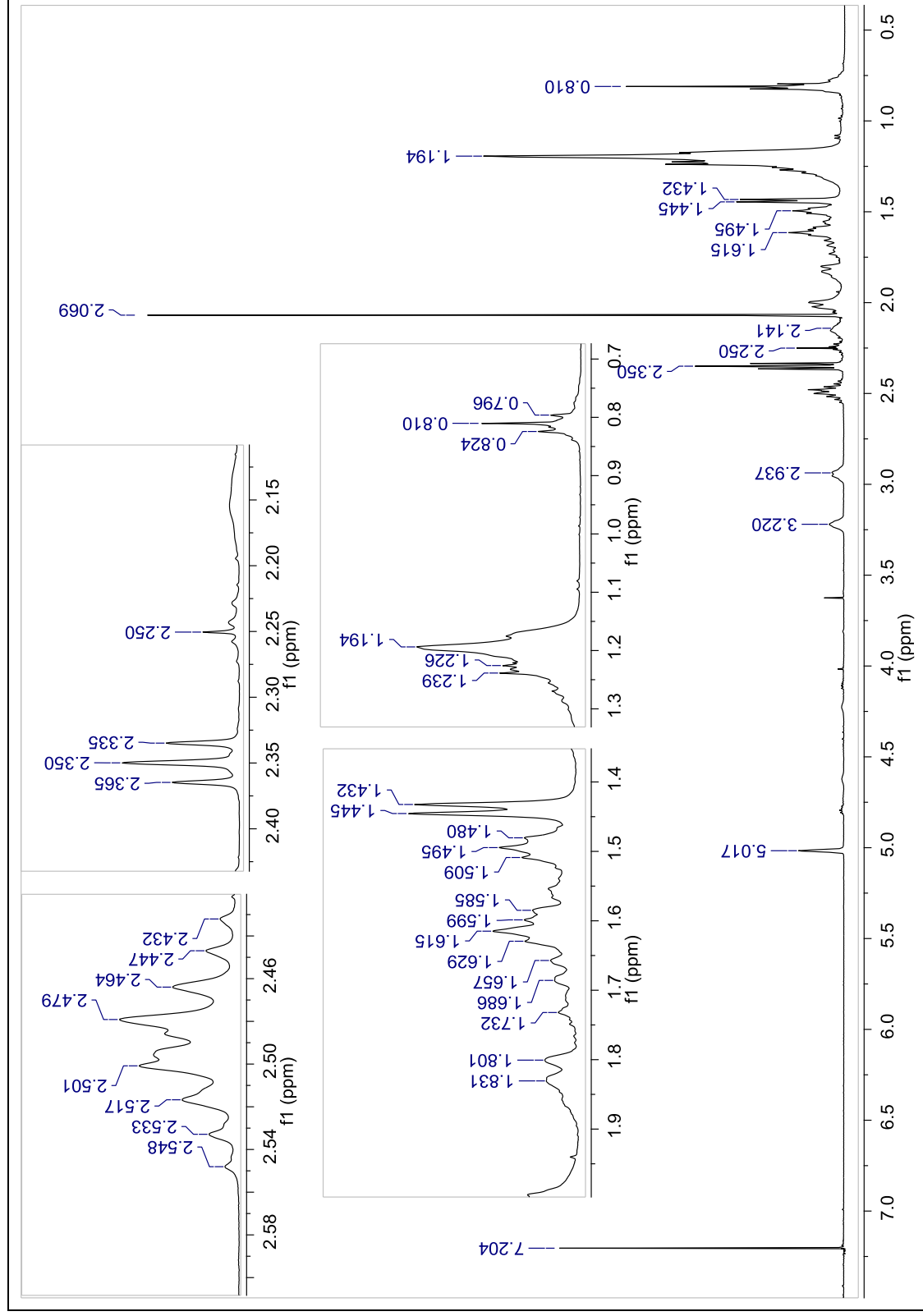


APÊNDICE E

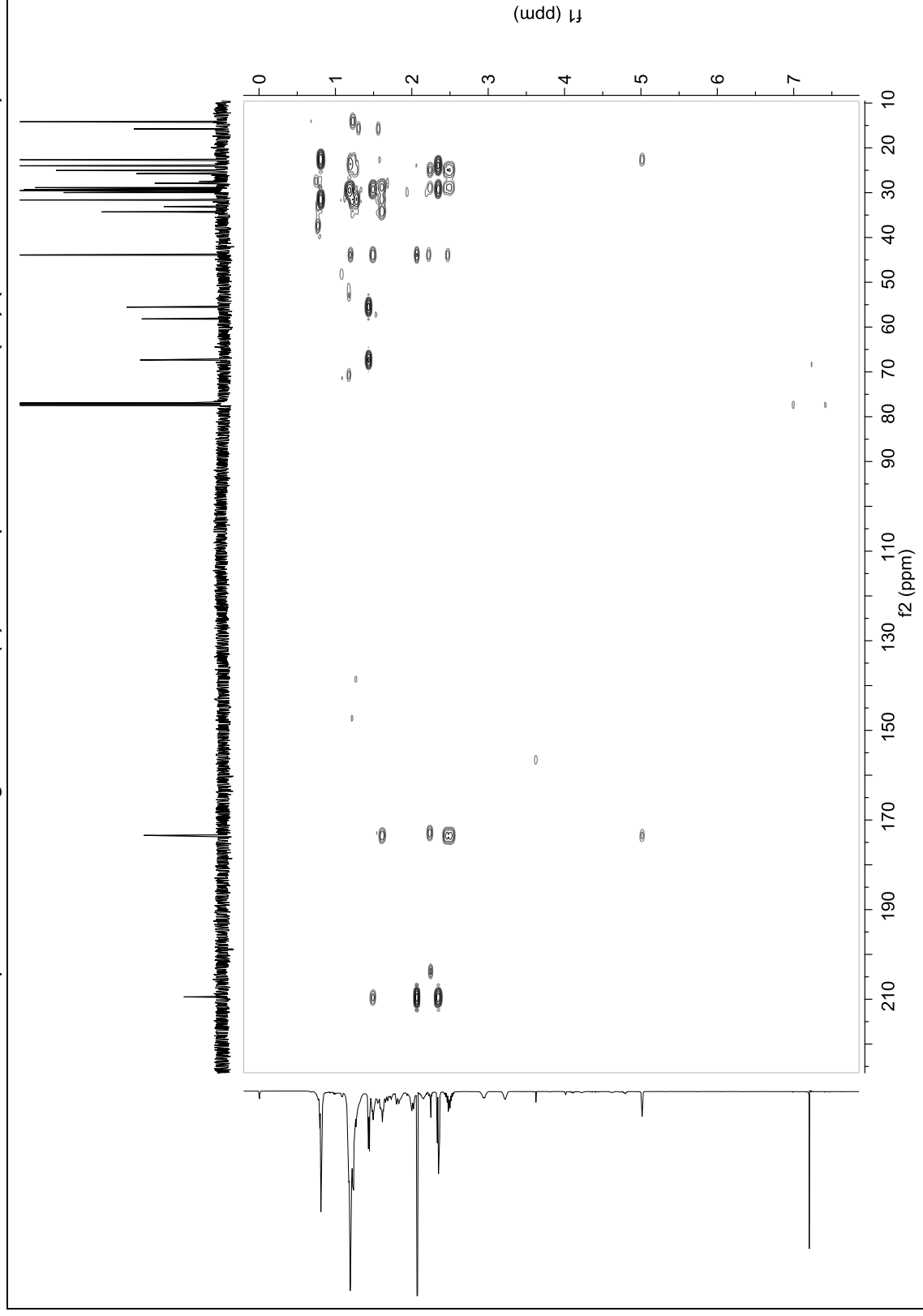
APÊNDICE E1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (500 MHz, CDCl_3).



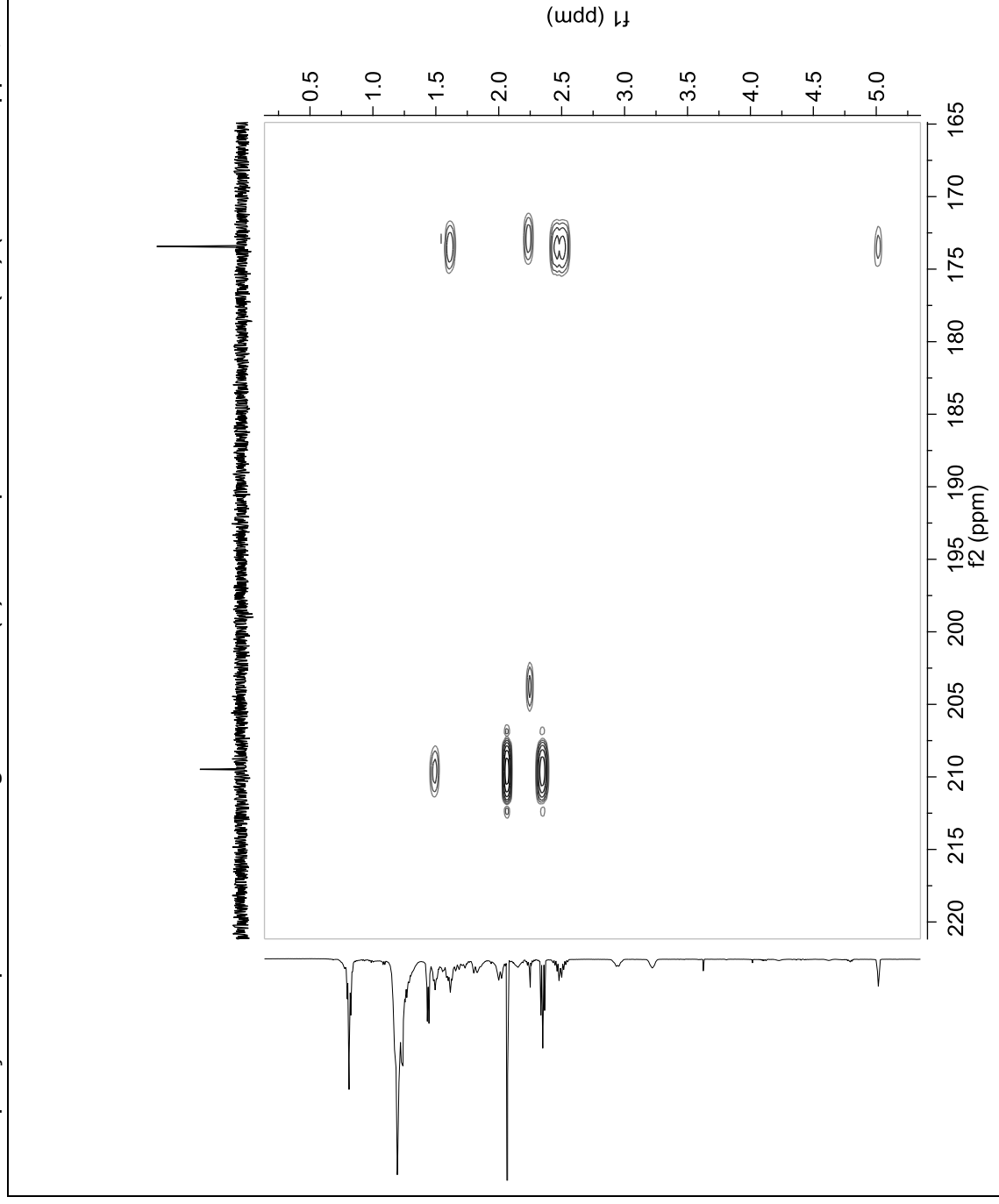
APÊNDICE E2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (500 MHz, CDCl_3).



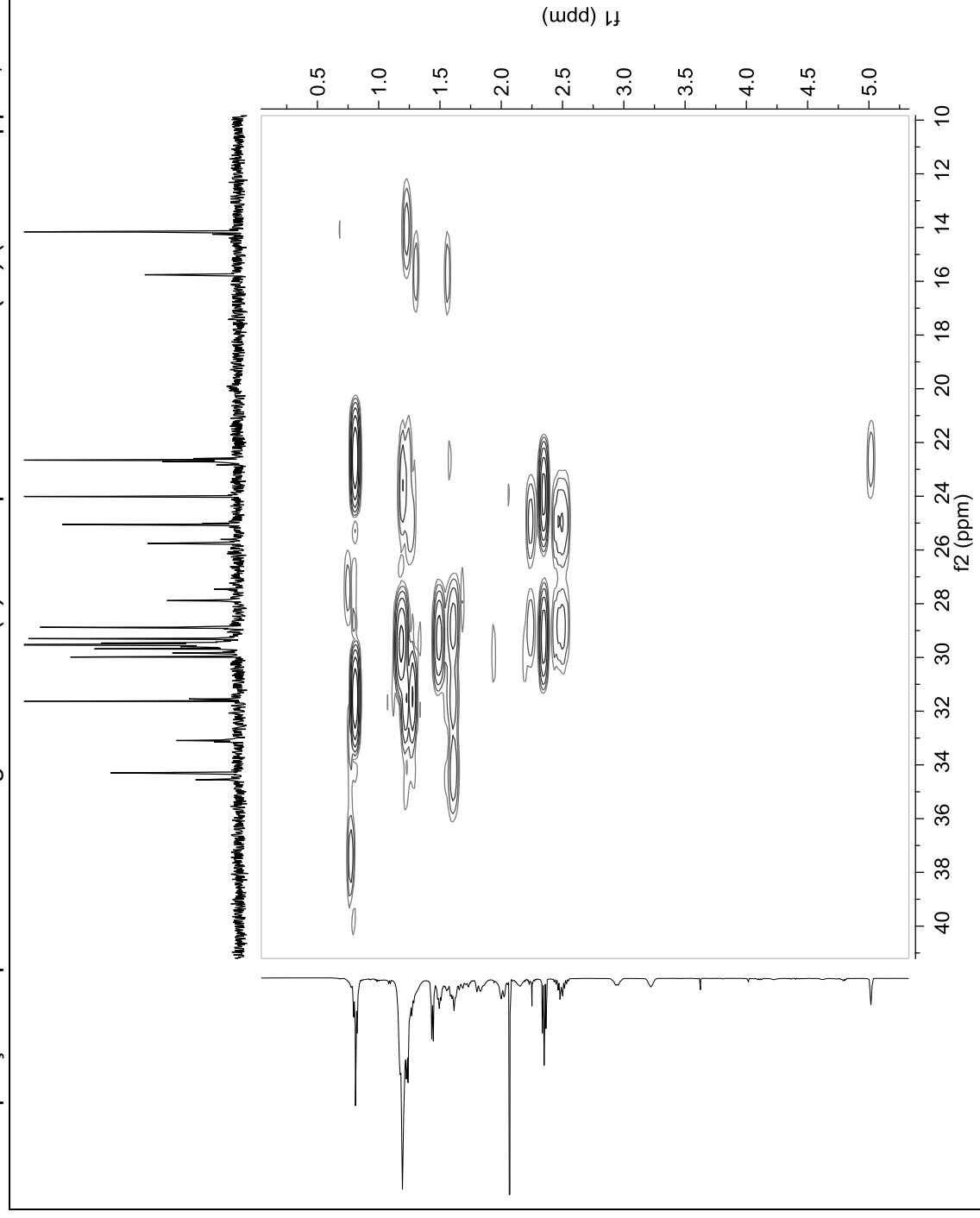
APÊNDICE E3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (500 MHz, CDCl₃).



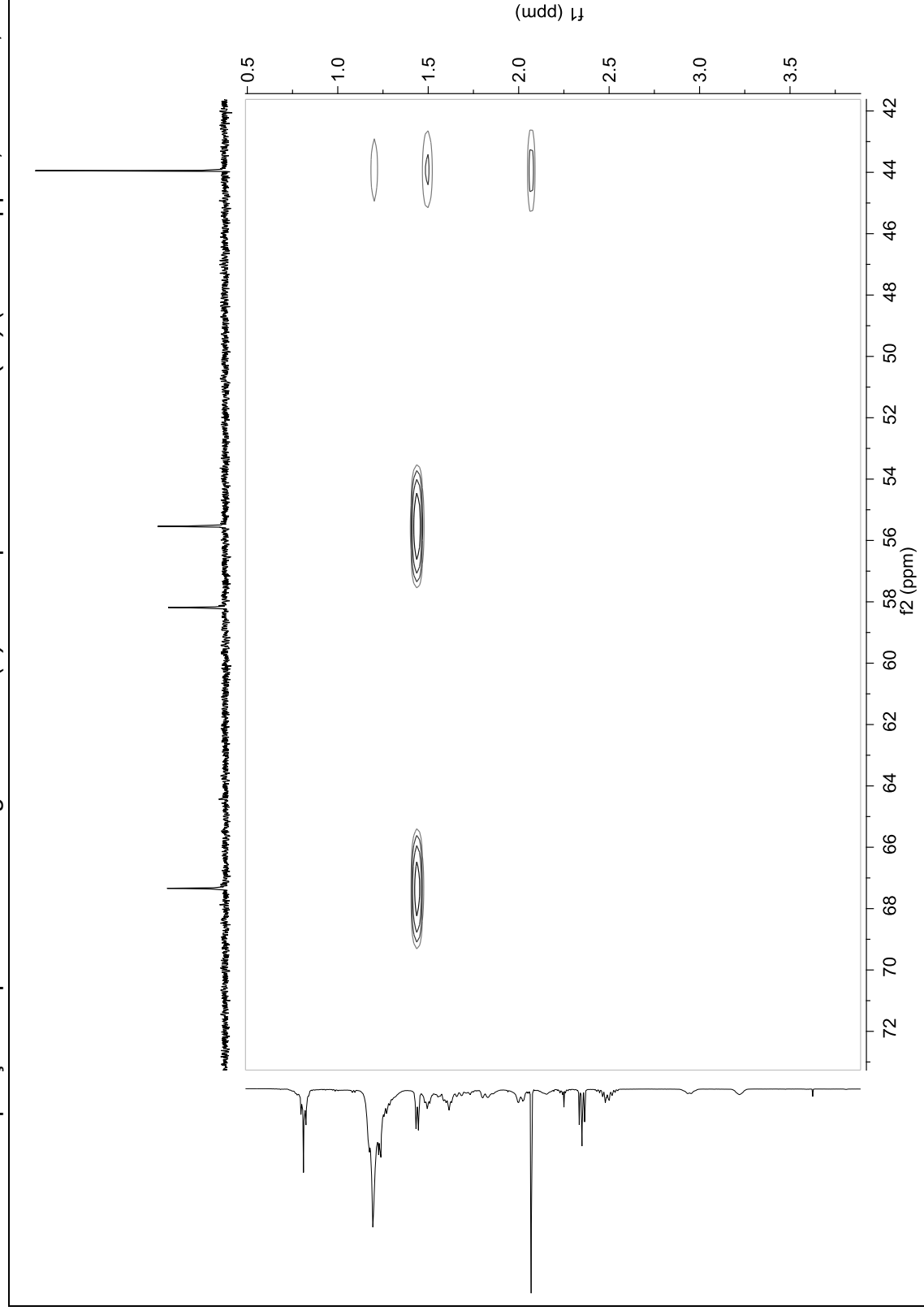
APÊNDICE E4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (δ 170-220 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



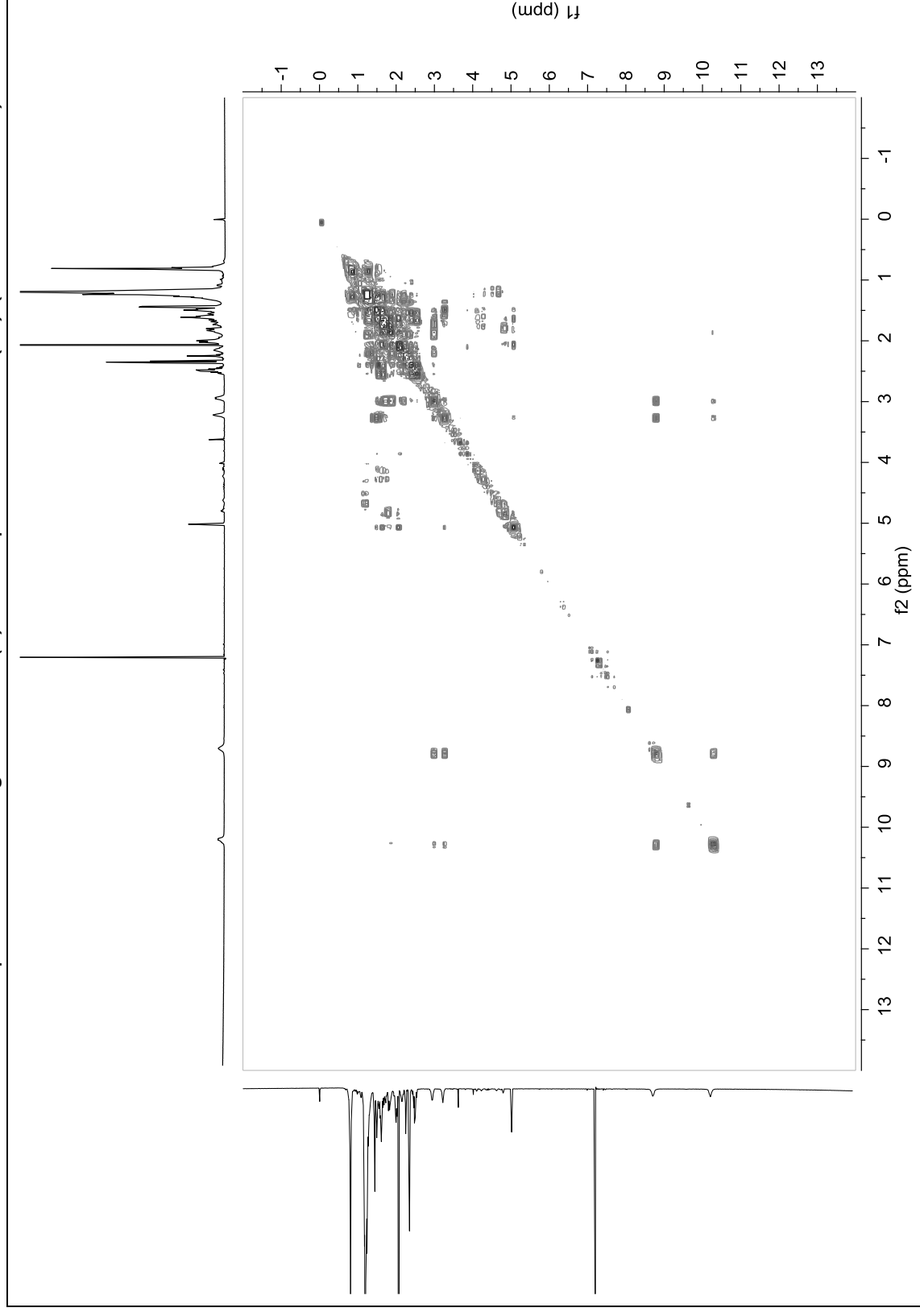
APÊNDICE E5 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (δ 10- 40 ppm ; 500 MHz, CDCl₃).



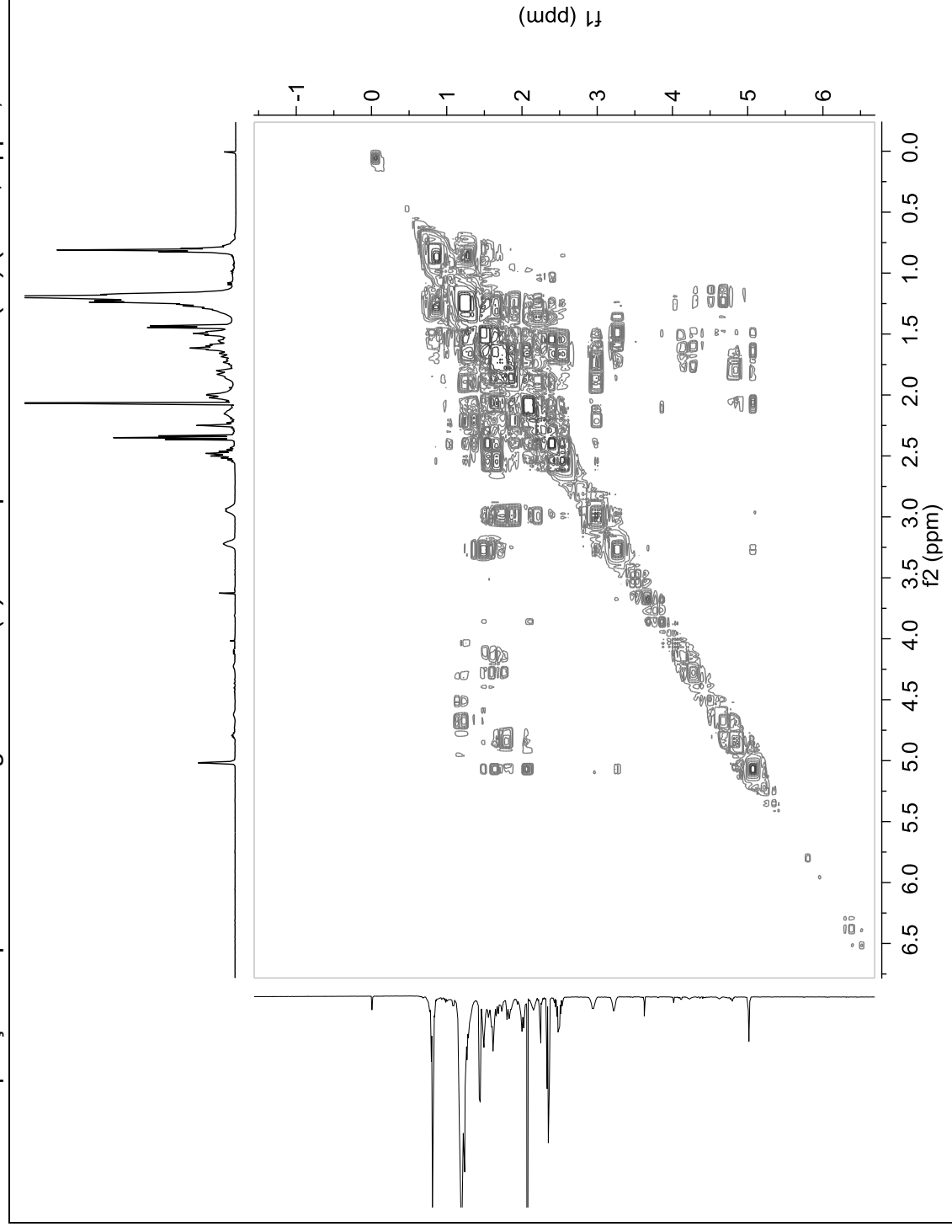
APÊNDICE E6 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (δ 42-76 ppm ; 500 MHz, CDCl₃).



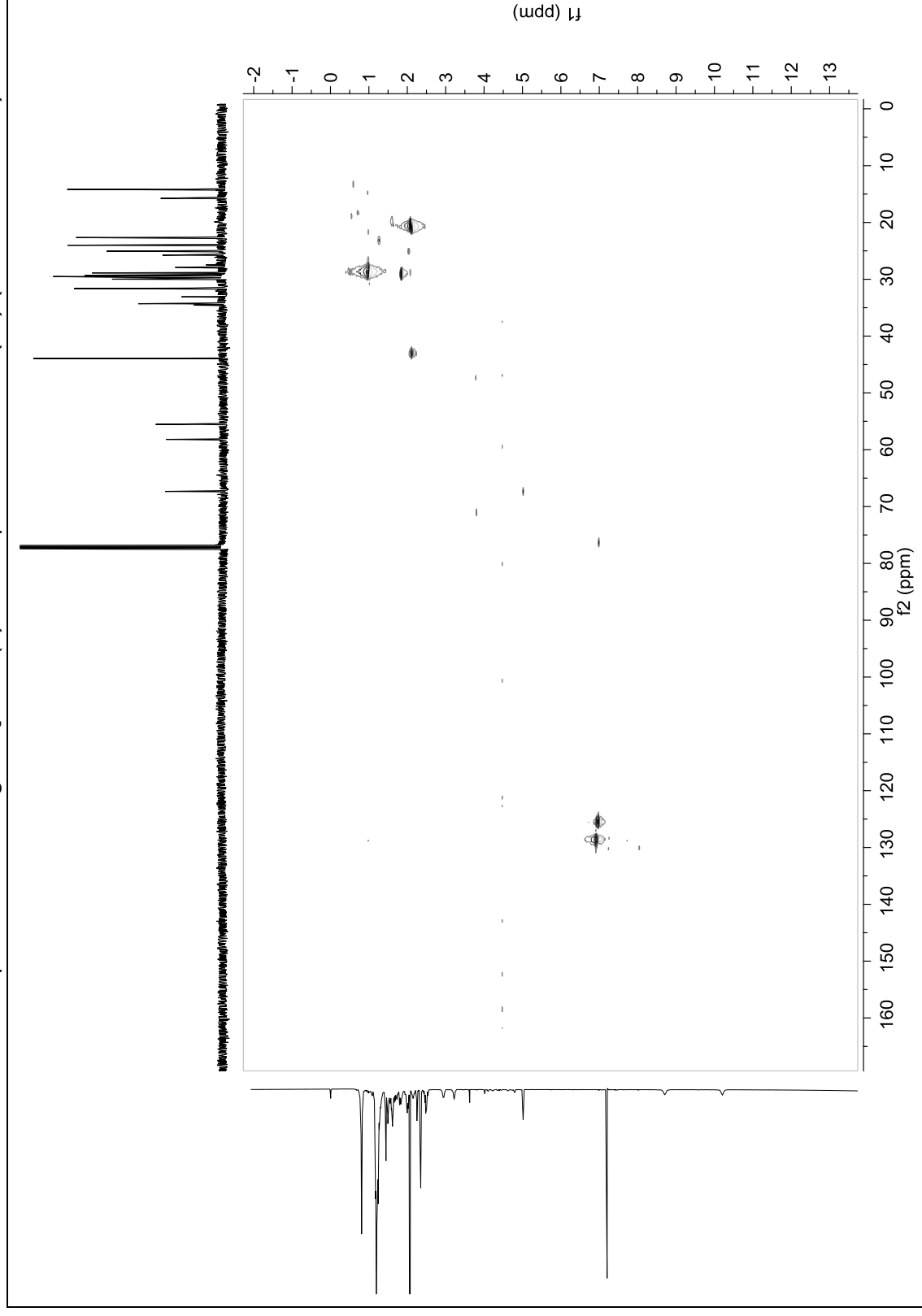
APÊNDICE E7 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (500 MHz, CDCl₃).



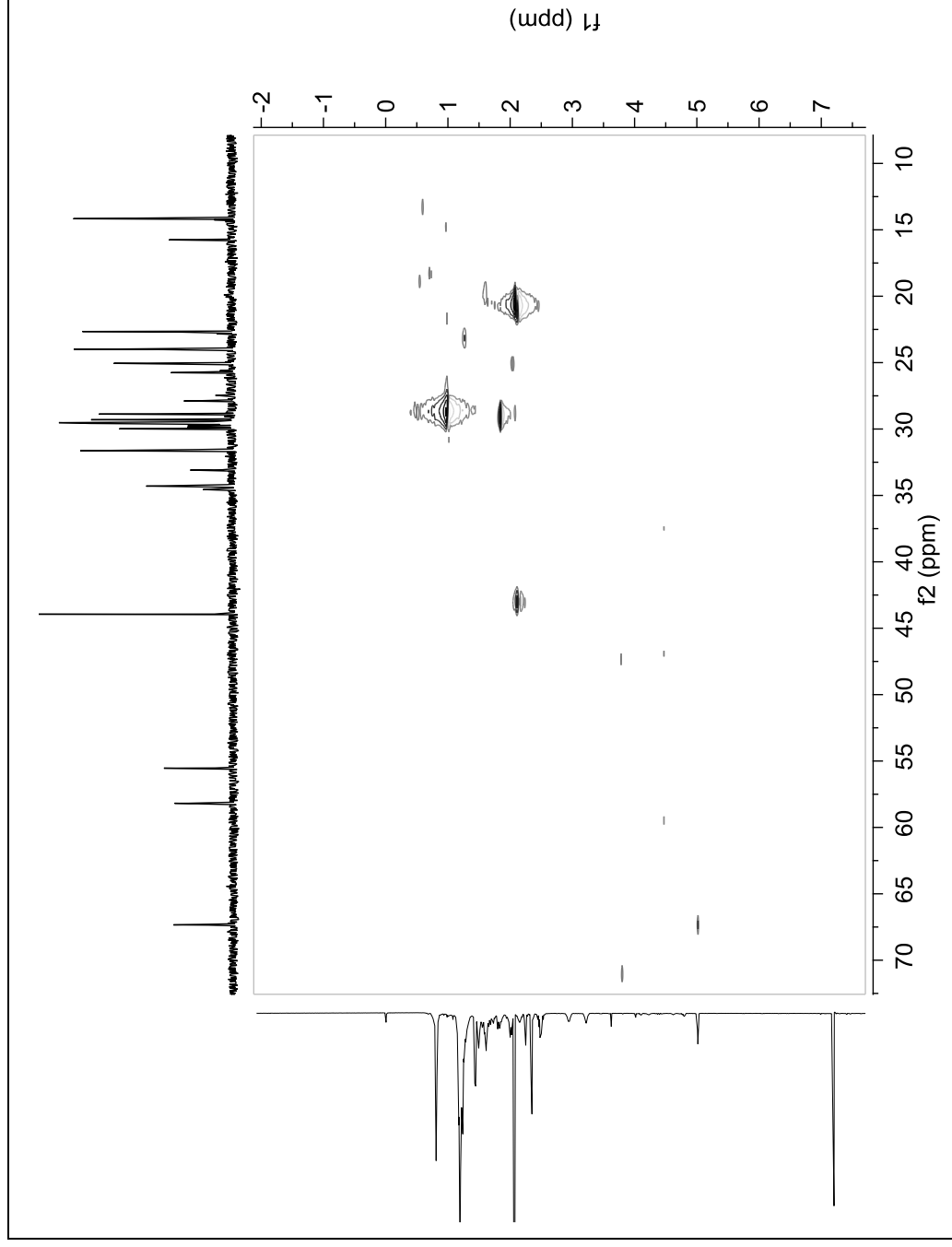
APÊNDICE E8 – Ampliação Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (δ 0-6,5 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



APÊNDICE E9 – Mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (500 MHz, CDCl₃).

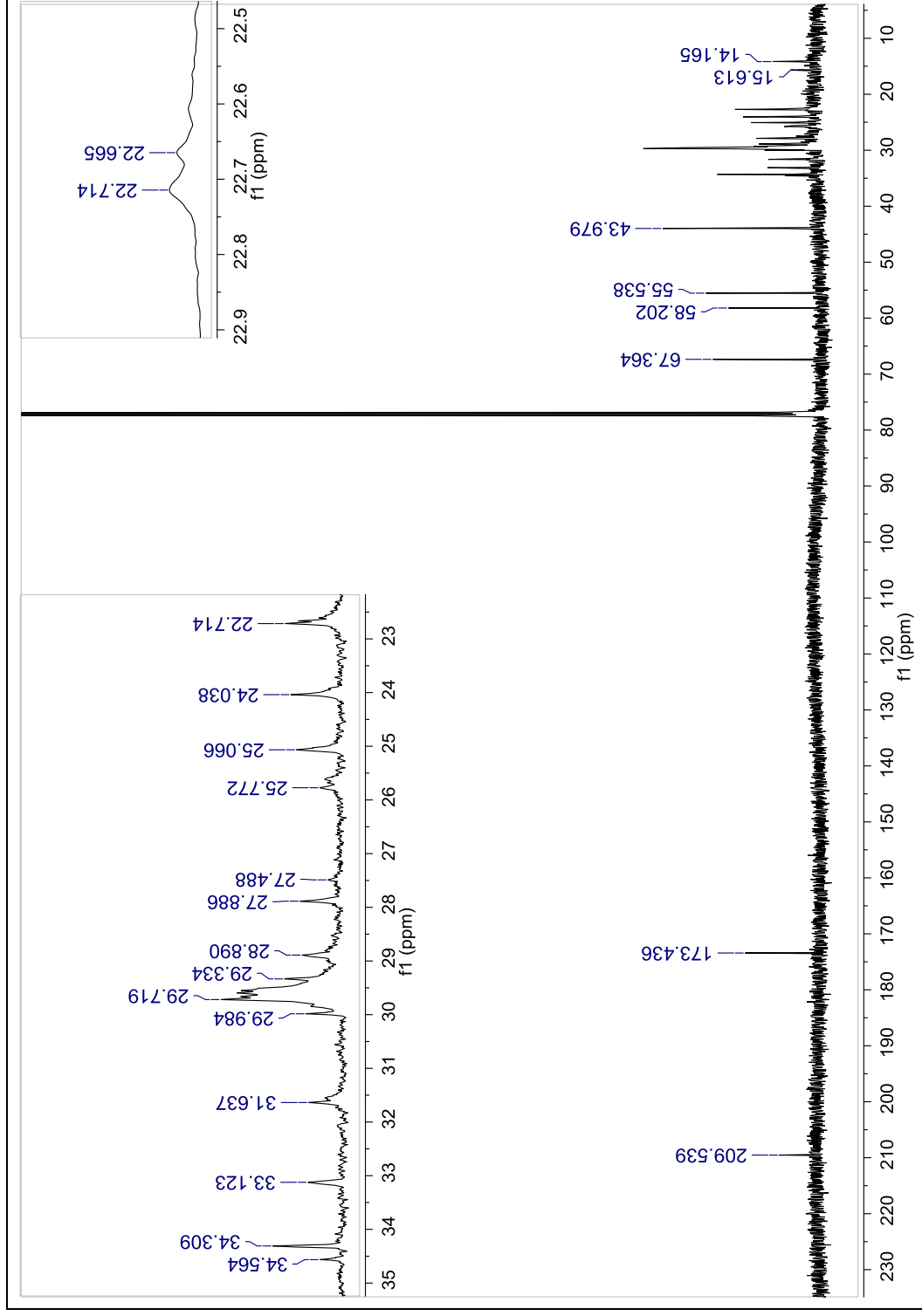


APÊNDICE E10 – Ampliação mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-heptanoil-cassina (**31**) (δ 10-70 ppm; 500 MHz, CDCl_3).

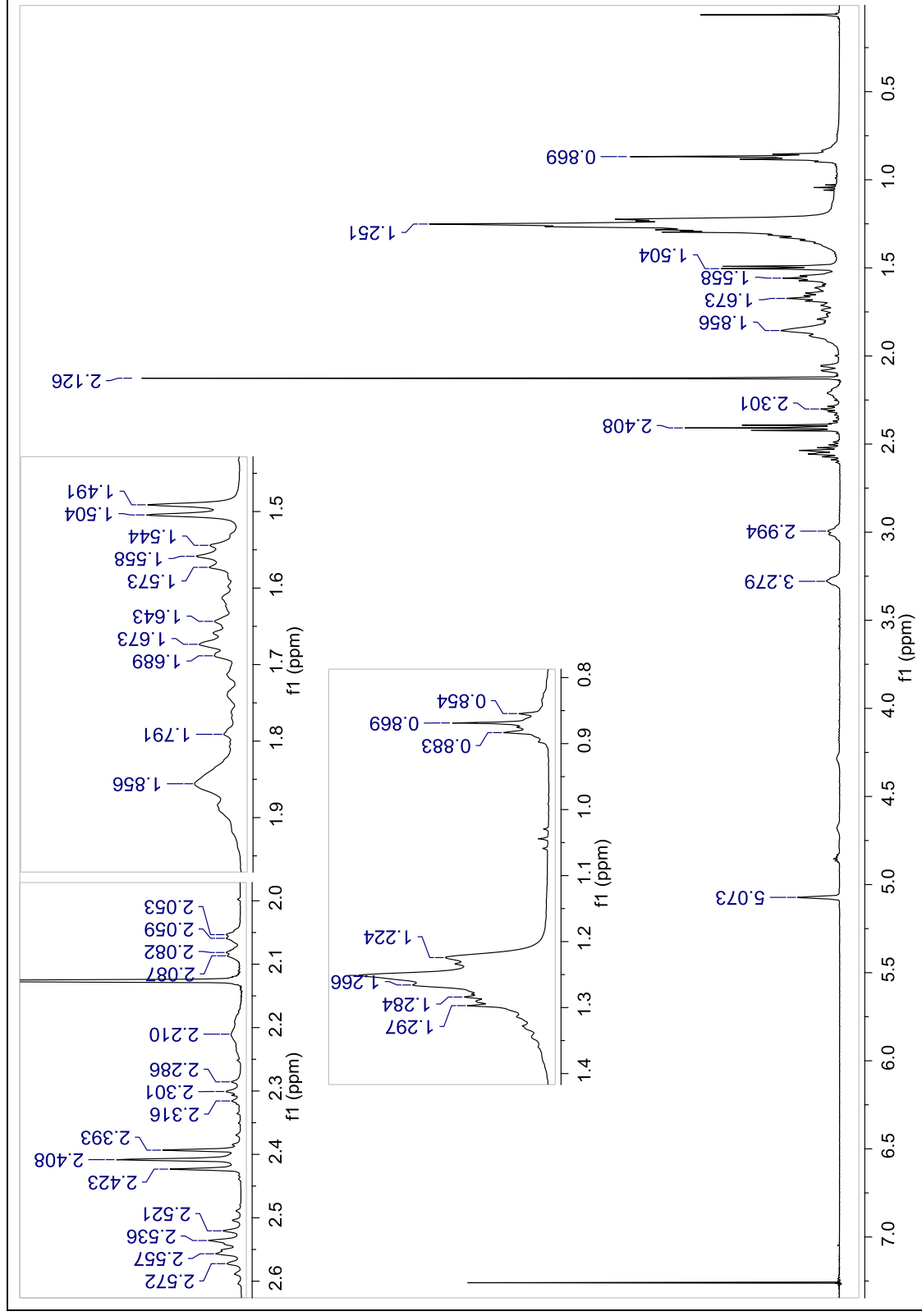


APÊNDICE F

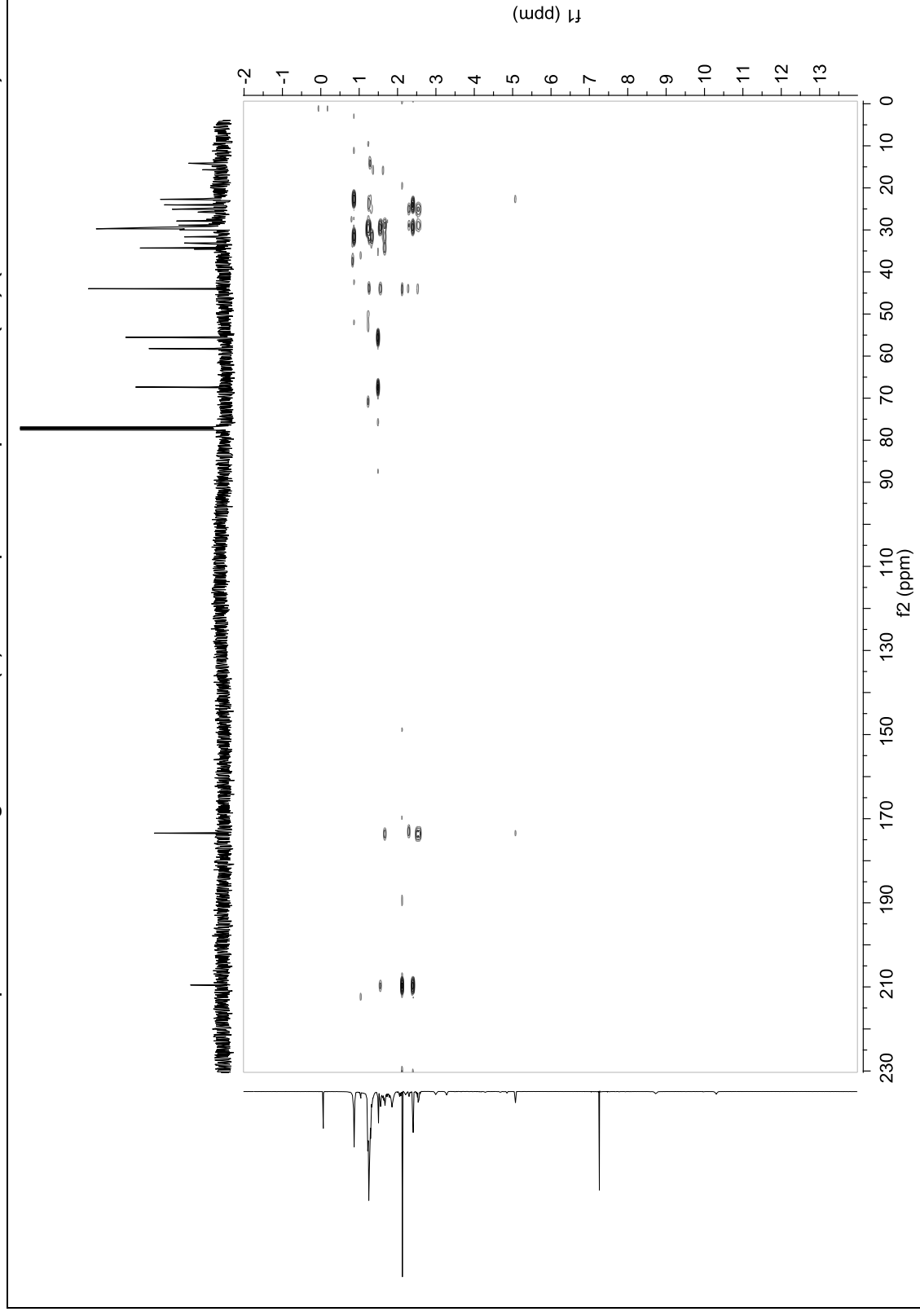
APÊNDICE F1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (500 MHz, CDCl_3).



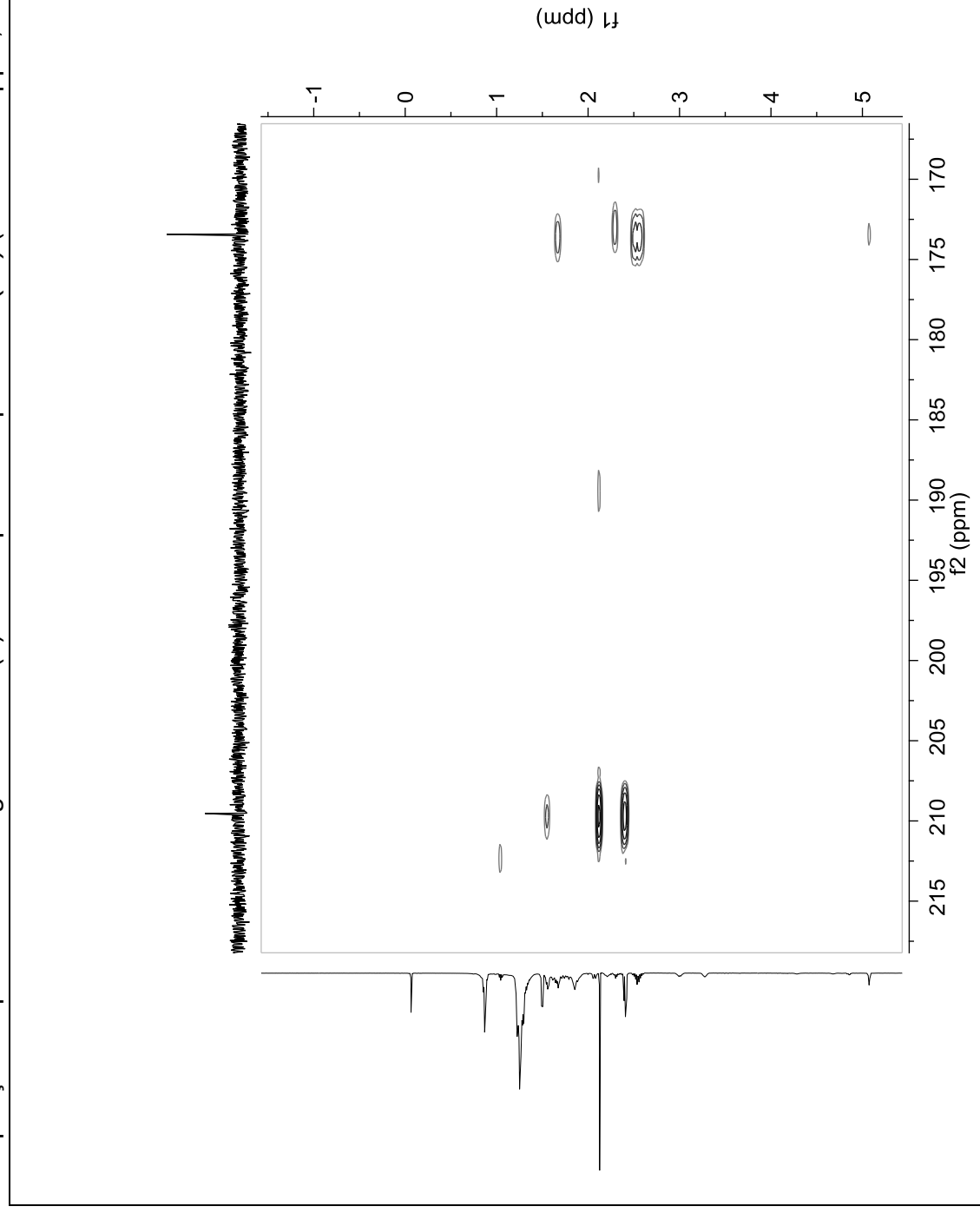
APÉNDICE F2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (500 MHz, CDCl_3).



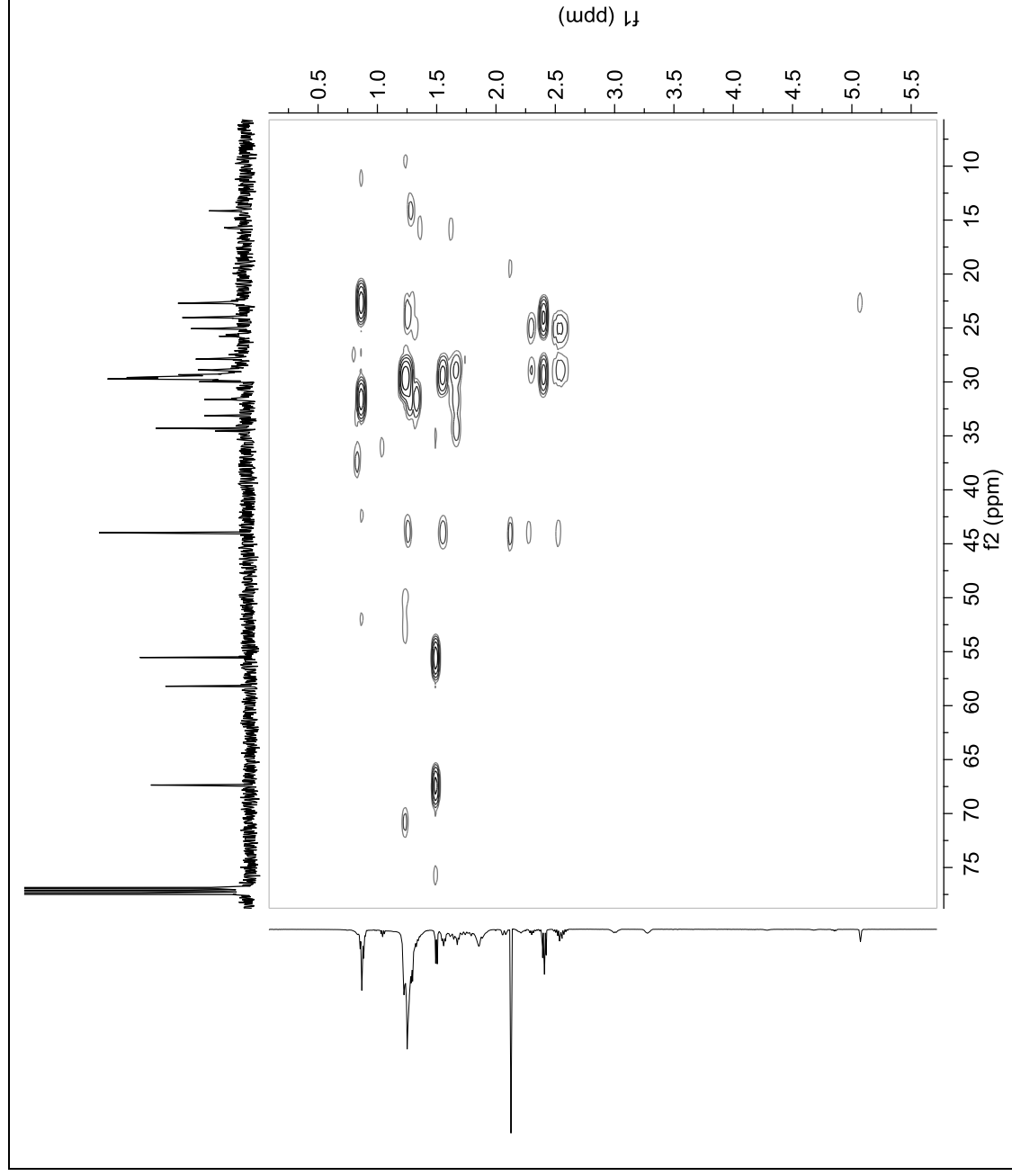
APÊNDICE F3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (**32**) (500 MHz, CDCl₃).



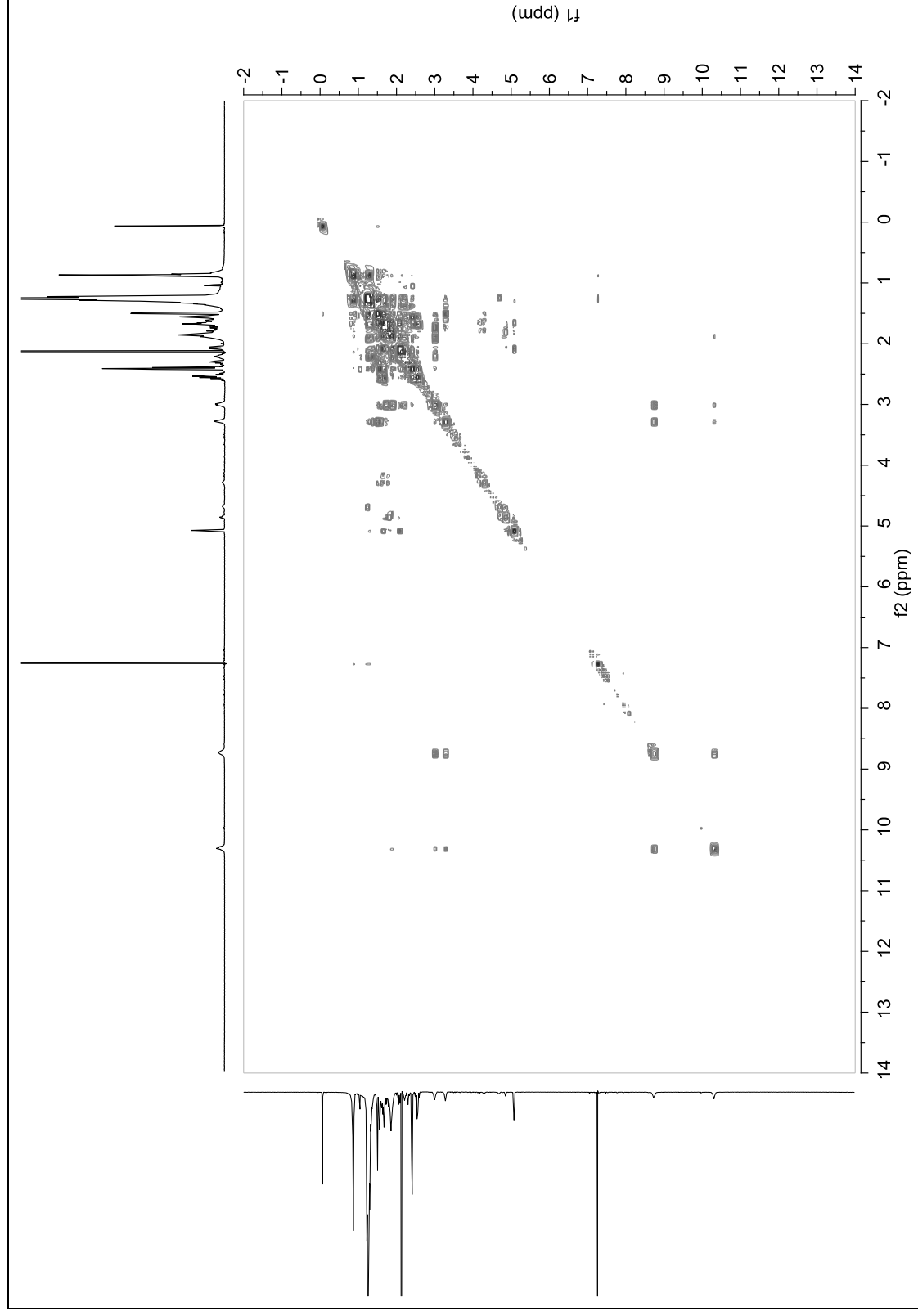
APÊNDICE F4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (δ 170 -215 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



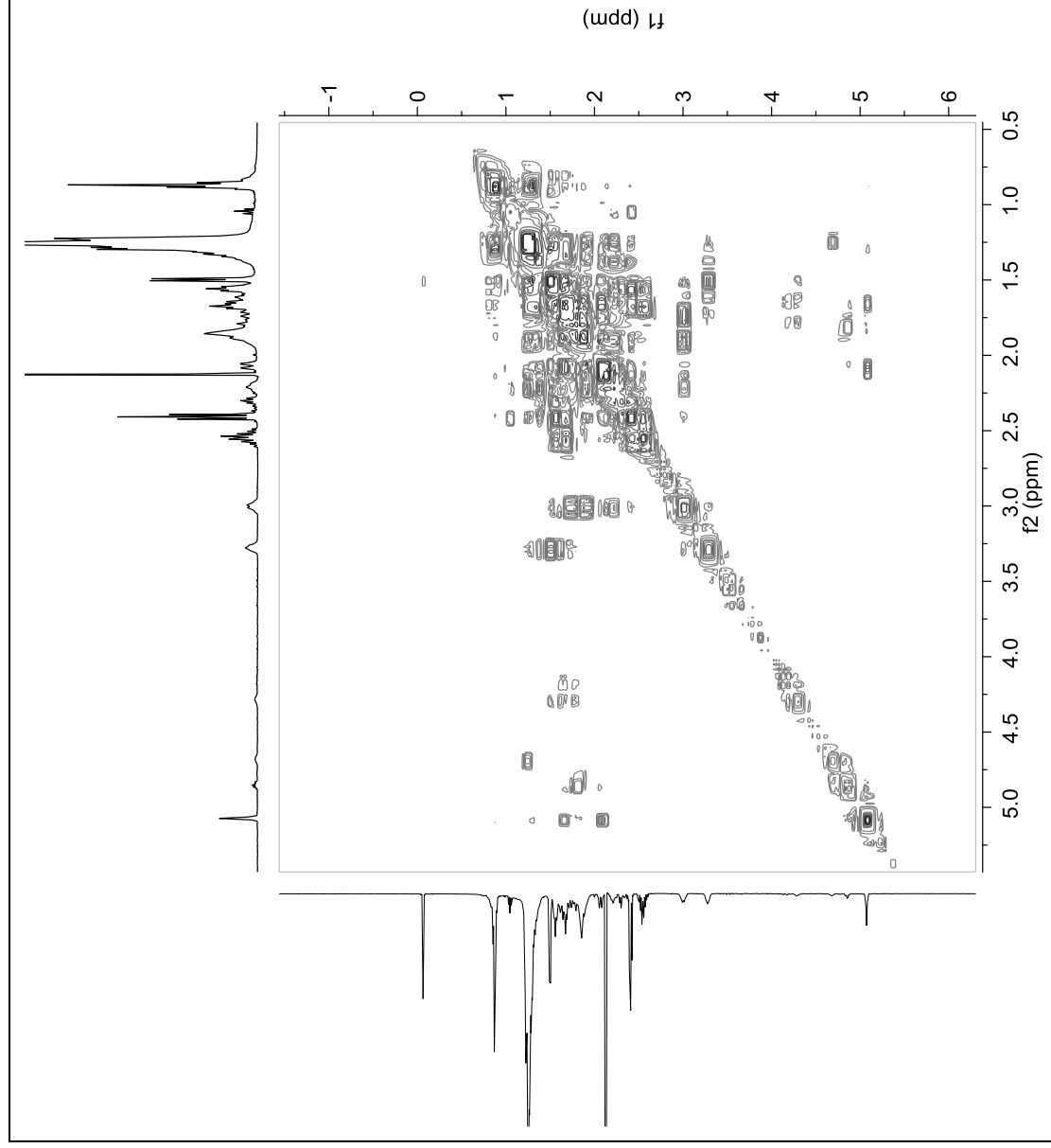
APÊNDICE F5 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (δ 10 -75 ppm; 500 MHz, CDCl₃).



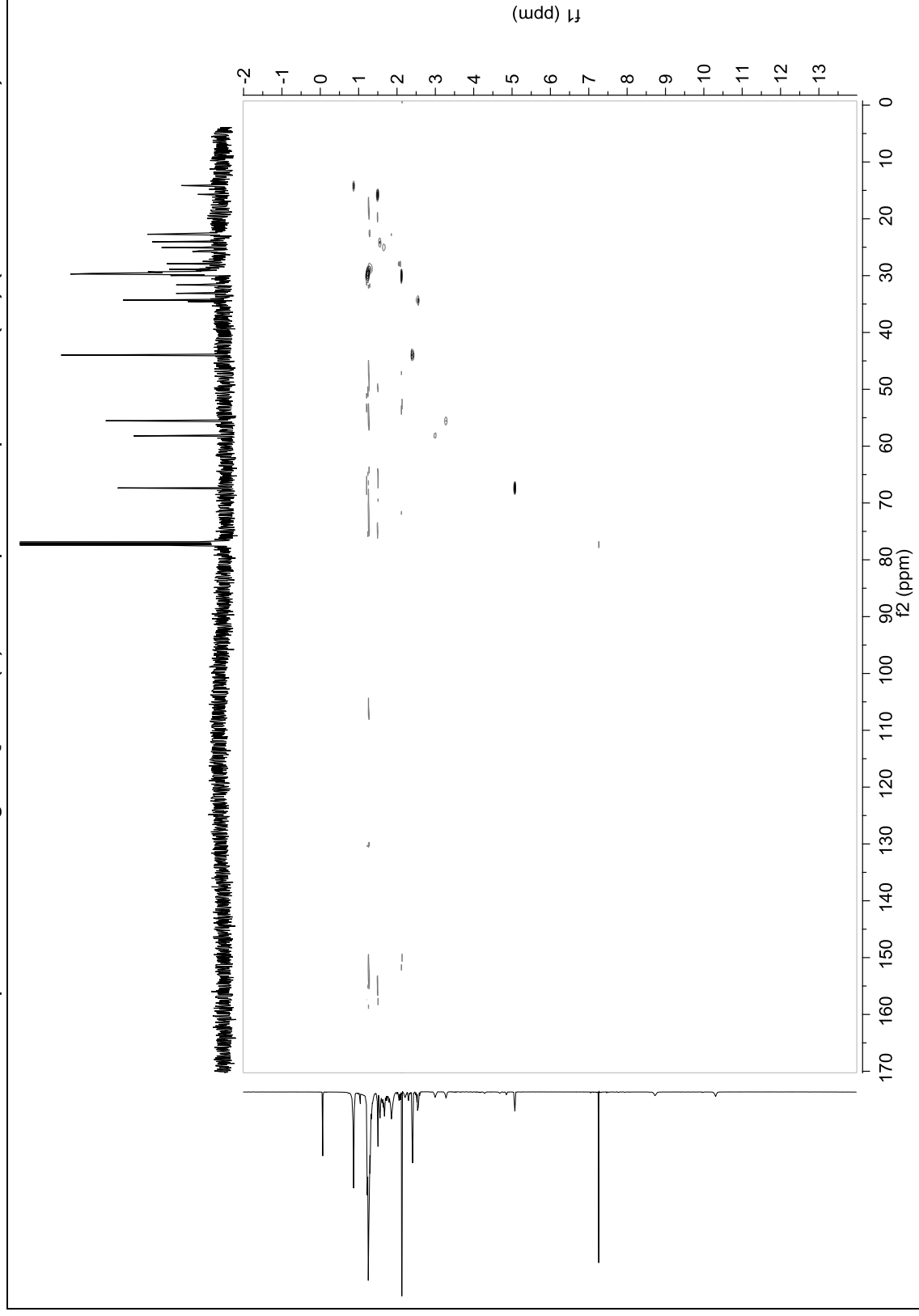
APÊNDICE F6 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (500 MHz, CDCl₃).



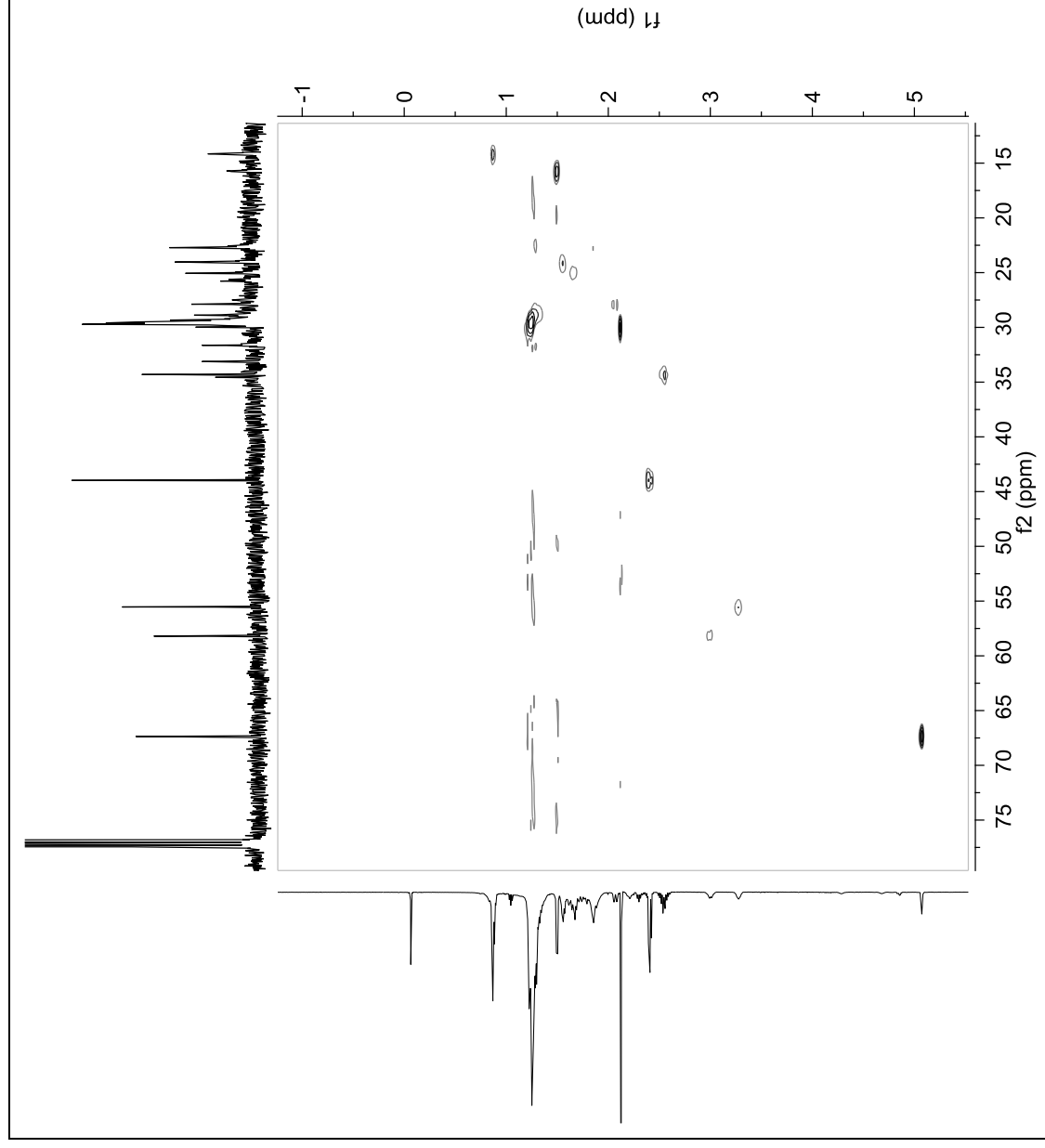
APÊNDICE F7 – Ampliação Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (δ 0,5-6 ppm; 500 MHz, CDCl₃).



APÊNDICE F8 – Mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-heptanoil-espectalina (**32**) (500 MHz, CDCl₃).

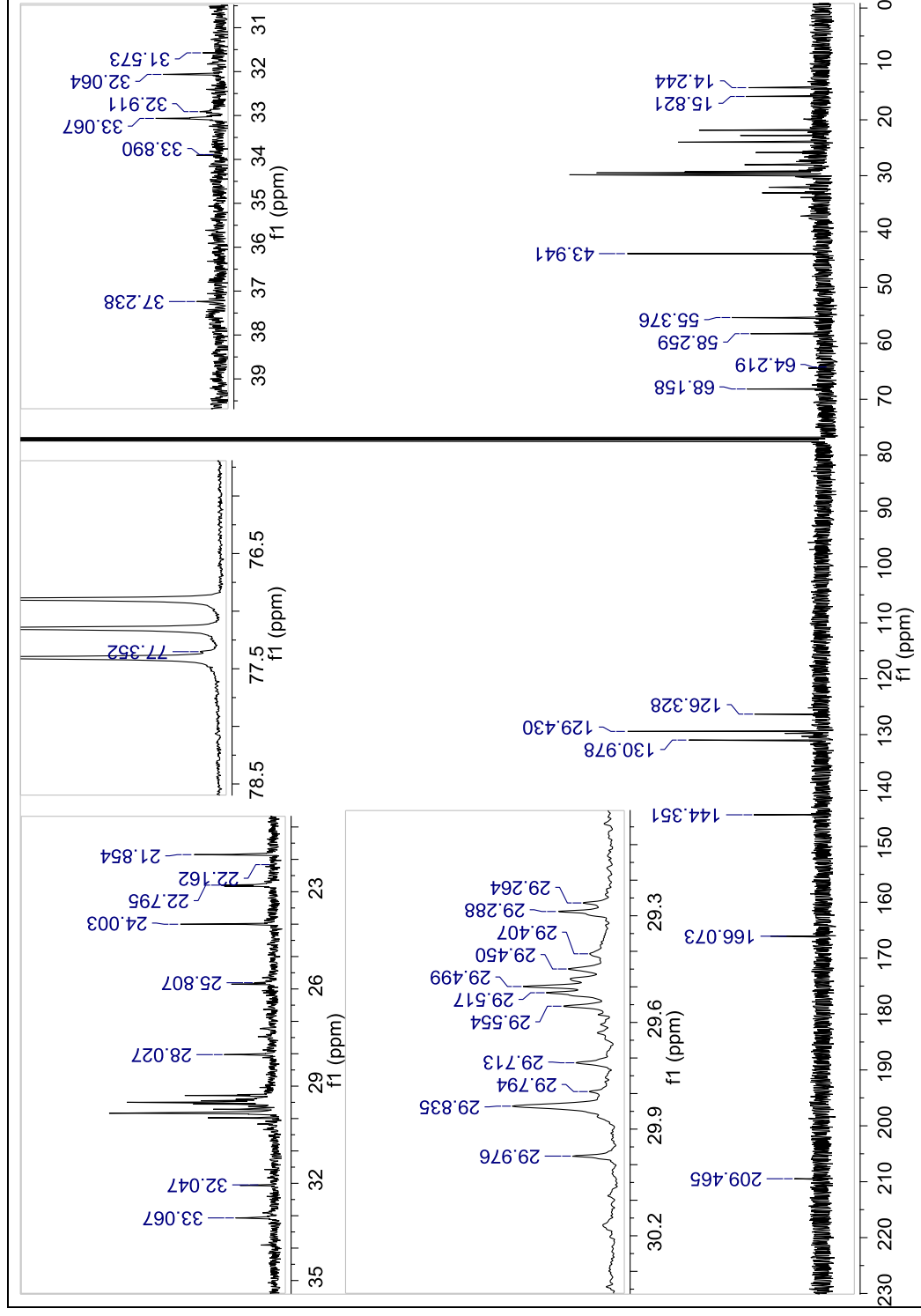


APÊNDICE F9 – Ampliação mapa de contorno gHMQC de (-)-3-O-heptanoil-espectralina (**32**) (δ 13-77 ppm; 500 MHz, CDCl₃).

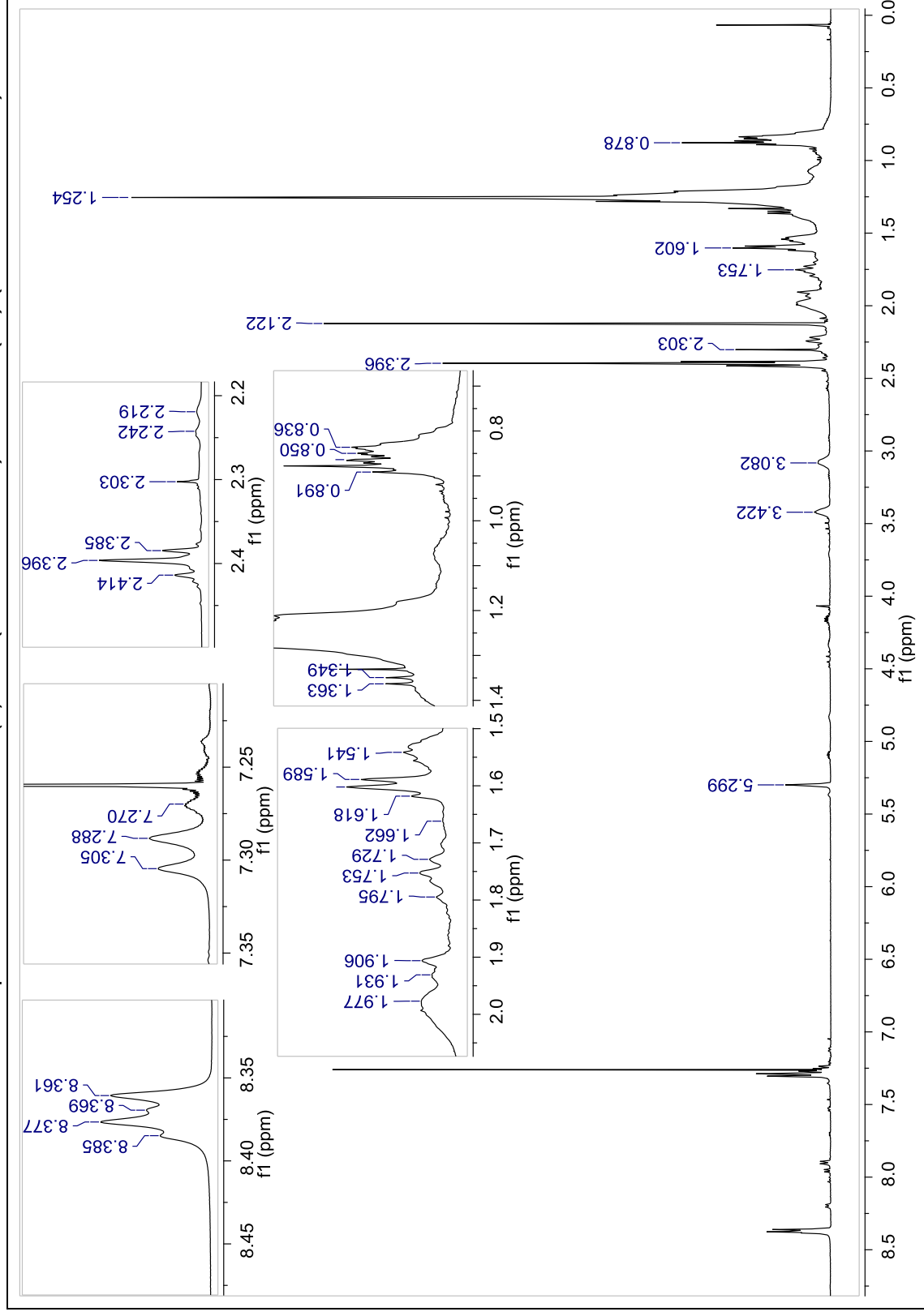


APÊNDICE G

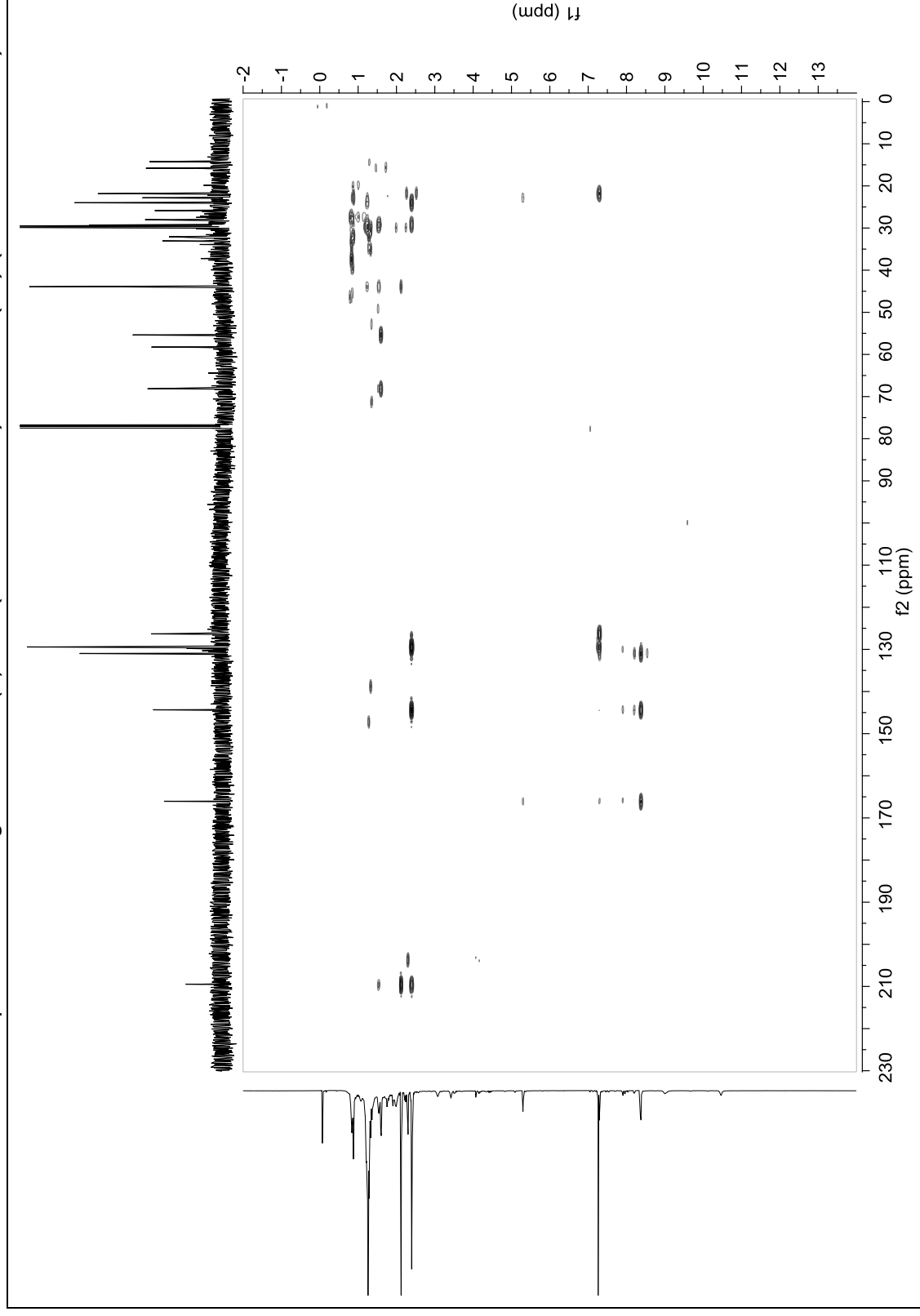
APÊNDICE G1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) (500 MHz, CDCl_3).



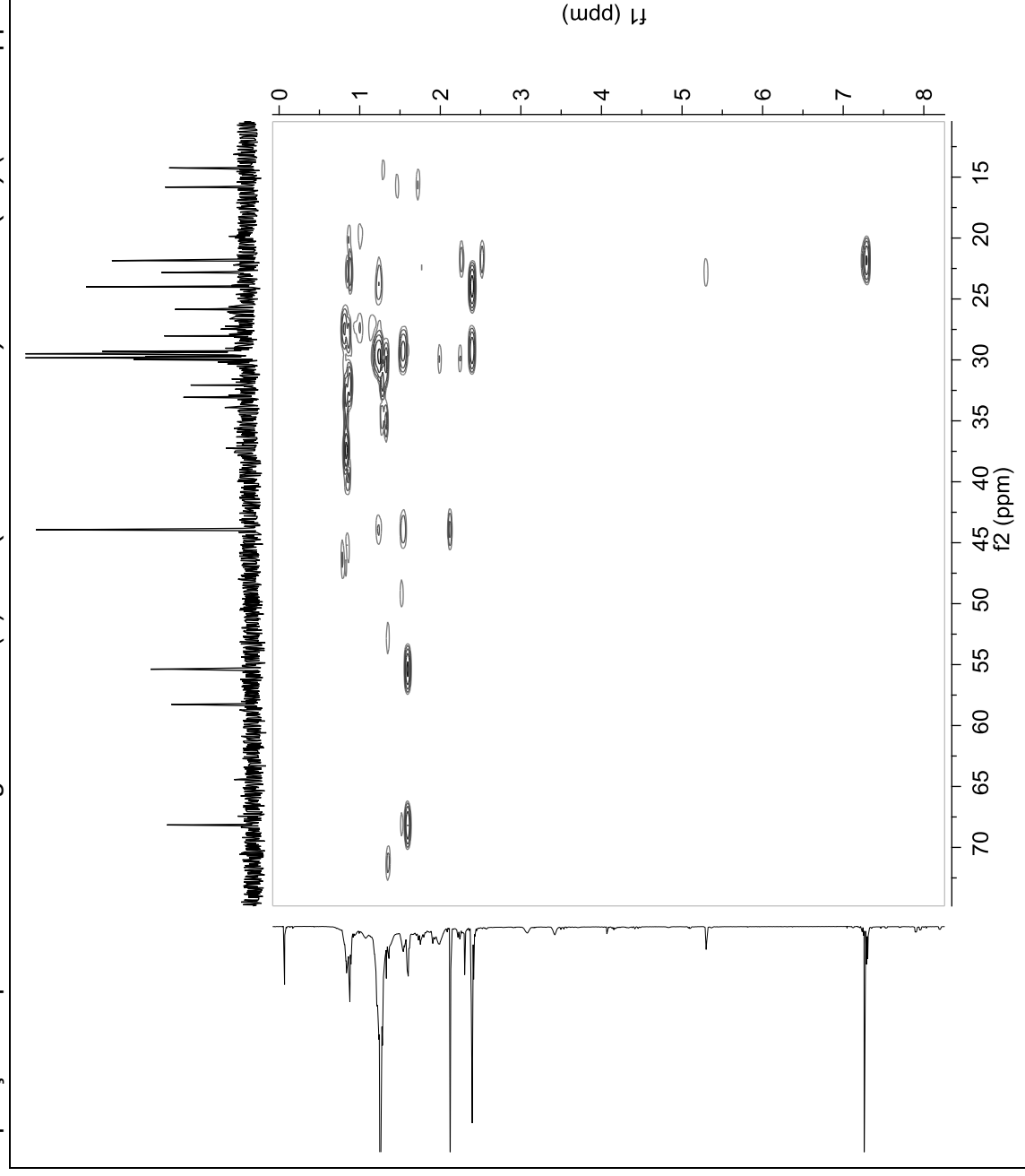
APÊNDICE G2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-(4-metil-benzoi)-cassina (**33**) (500 MHz, CDCl_3).



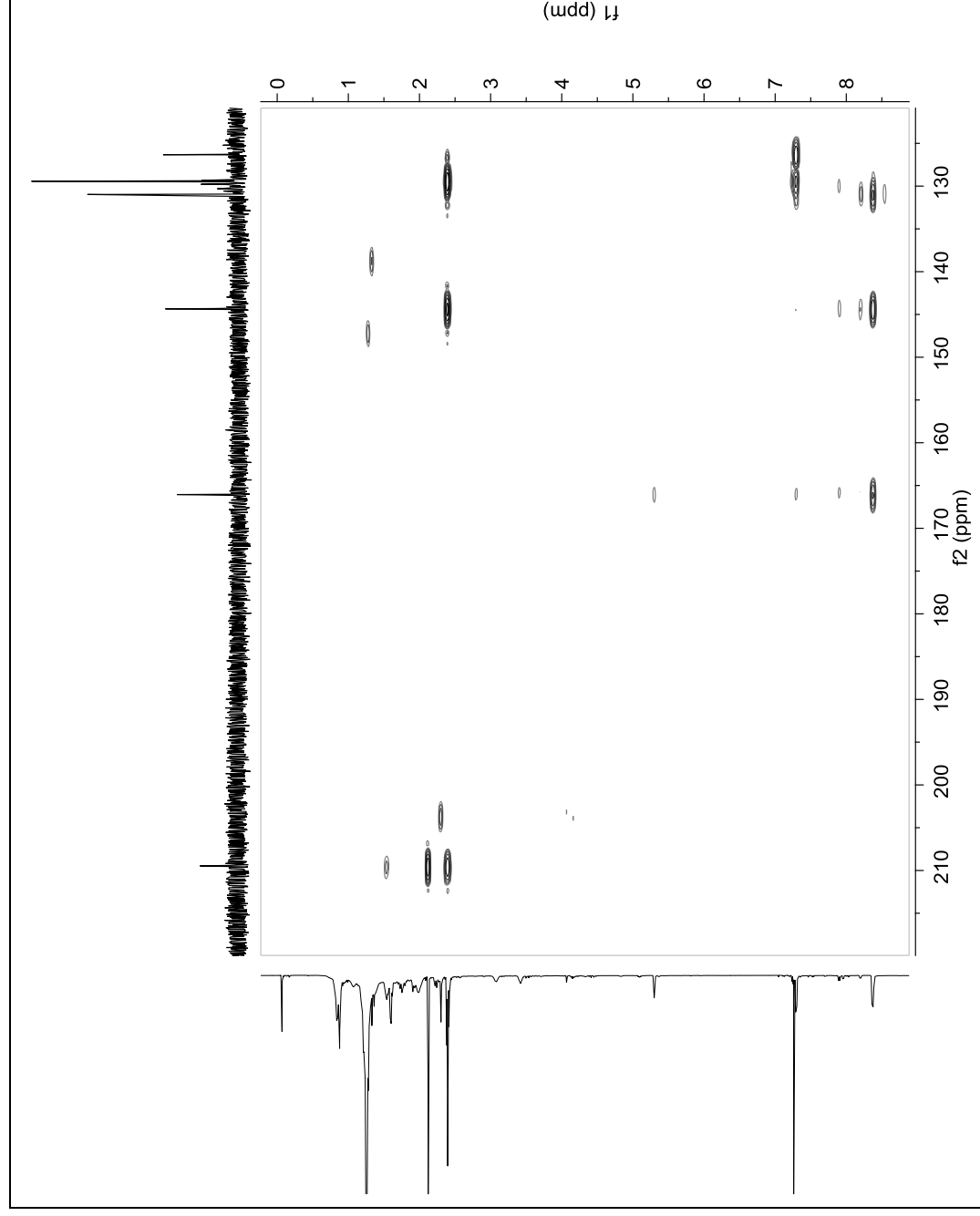
APÊNDICE G3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) (500 MHz, CDCl₃).



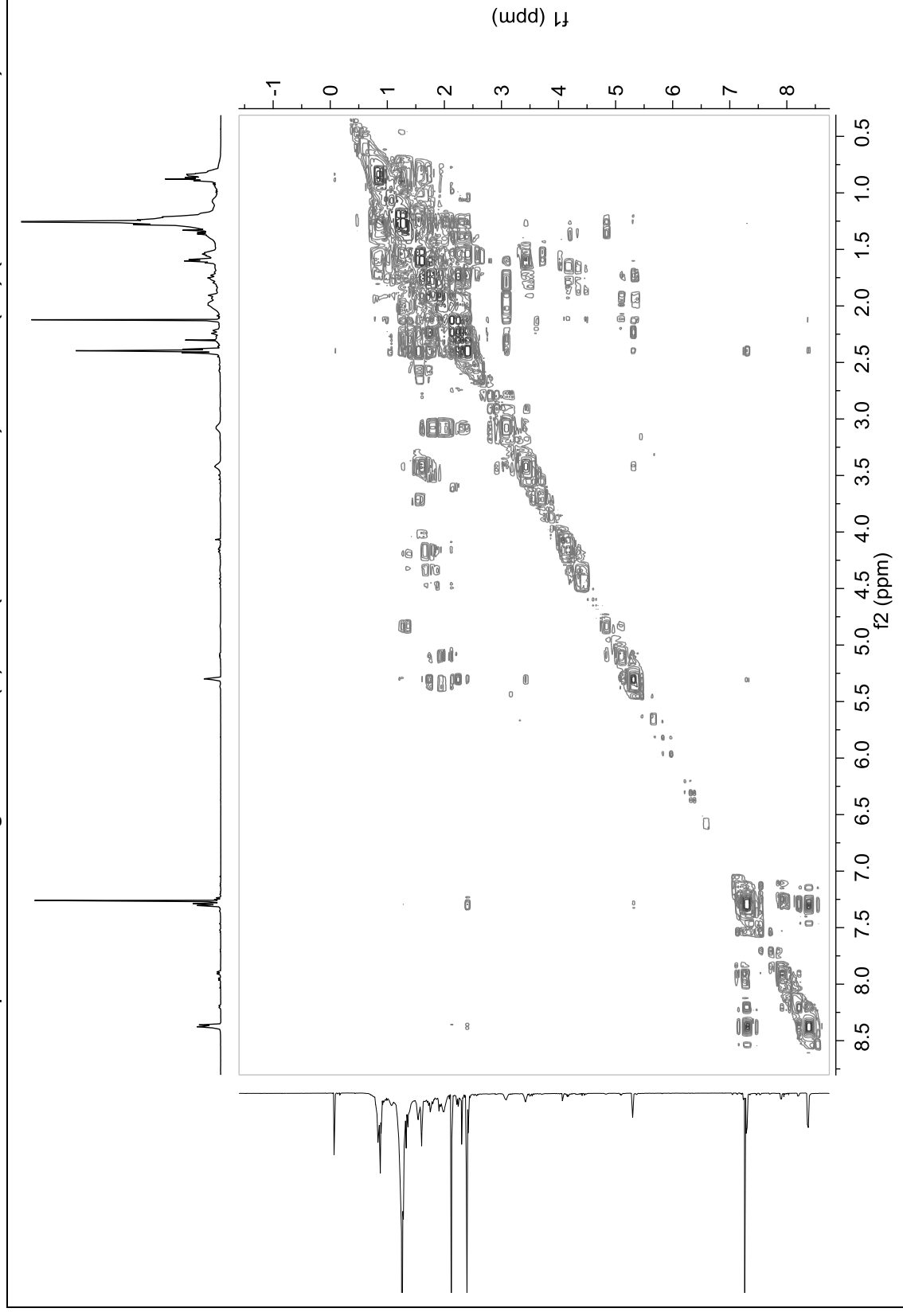
APÊNDICE G4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) (δ 10-70 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



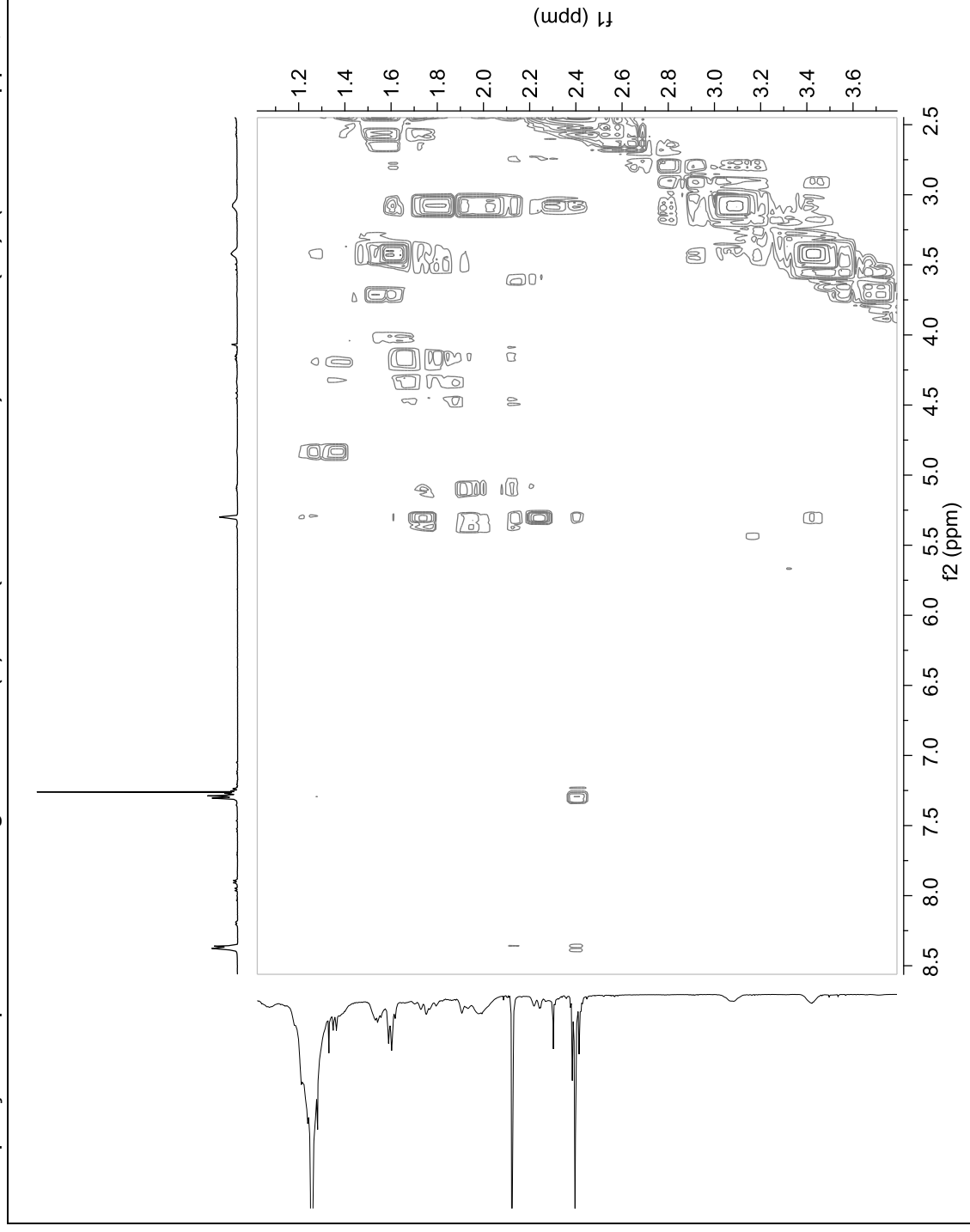
APÊNDICE G5 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-(4-metil-benzoi)-cassina (**33**) (δ 120-220 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



APÉNDICE G6 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) (500 MHz, CDCl₃).

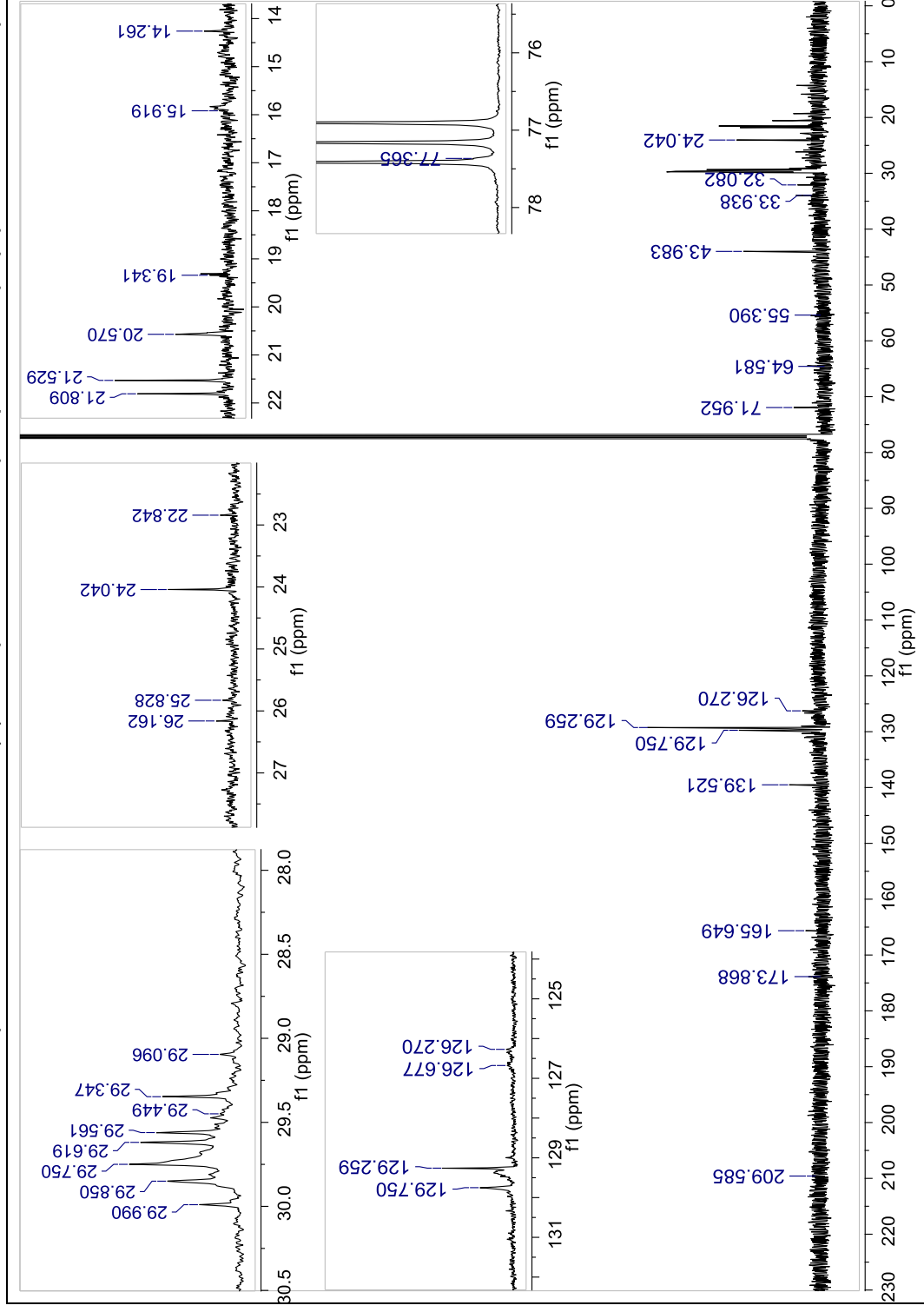


APÊNDICE G7 – Ampliação Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-cassina (**33**) (δ 2,5-8,5 ppm; 500 MHz, CDCl_3).

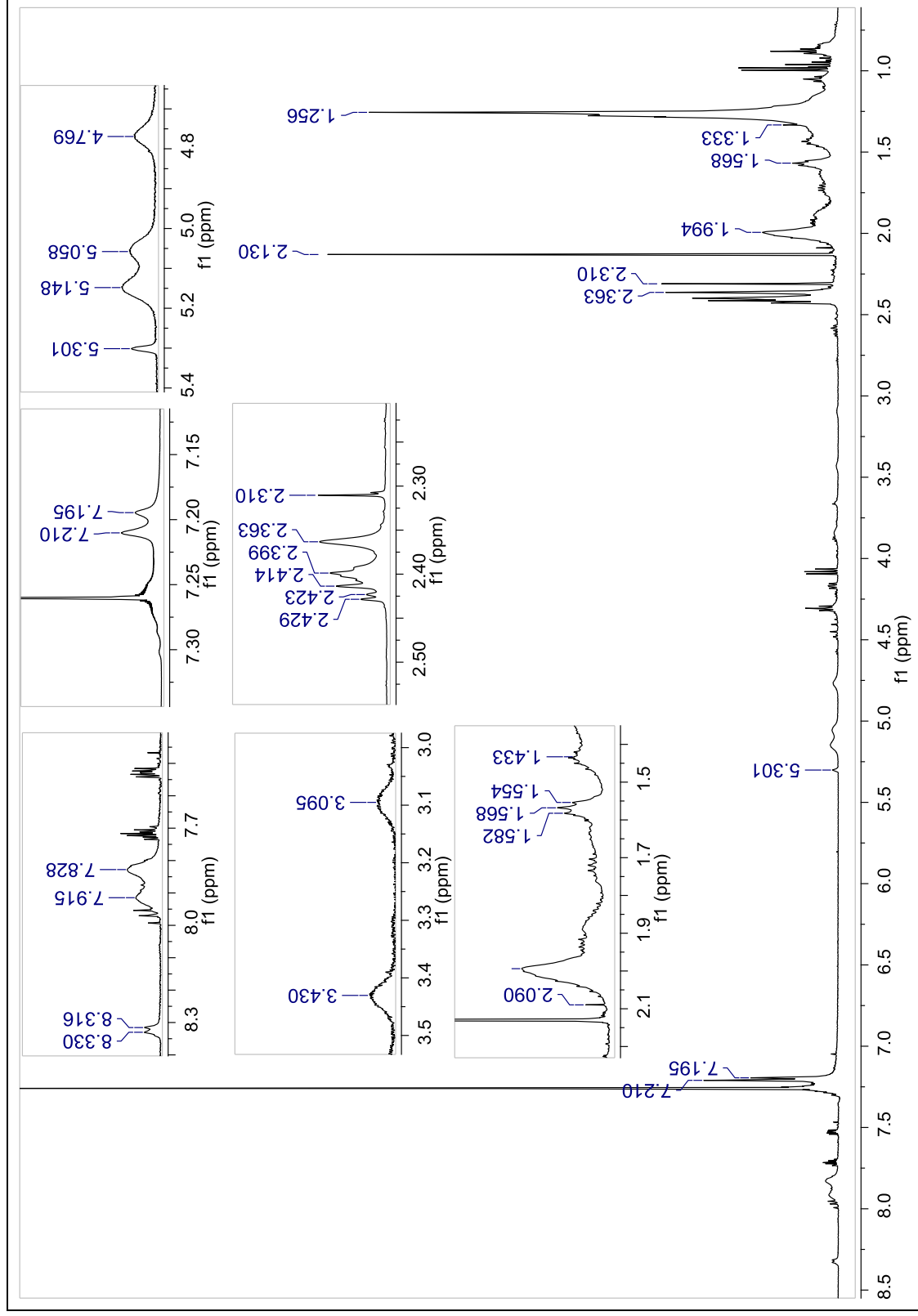


APÊNDICE H

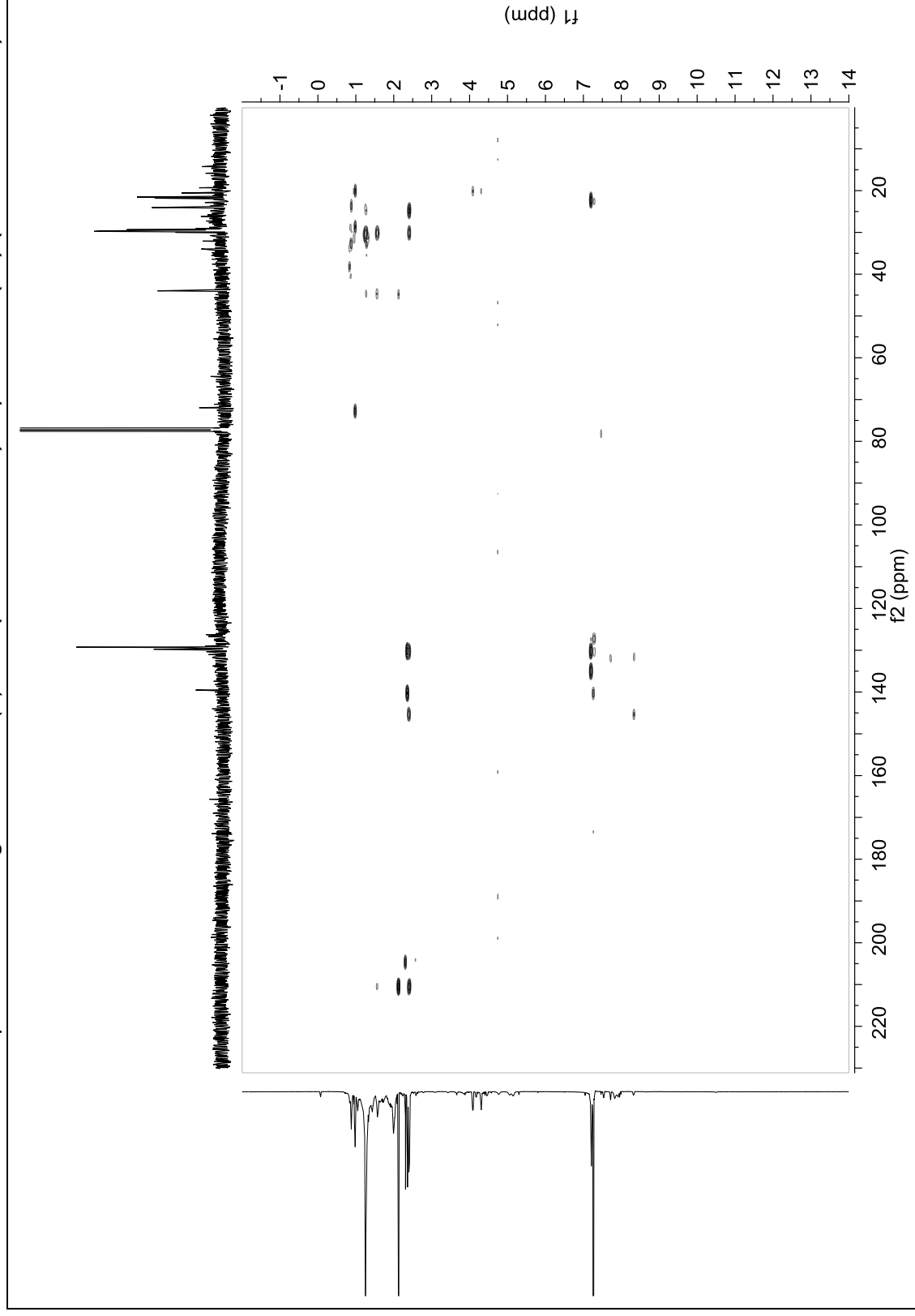
APÊNDICE H1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**) (500 MHz, CDCl_3).



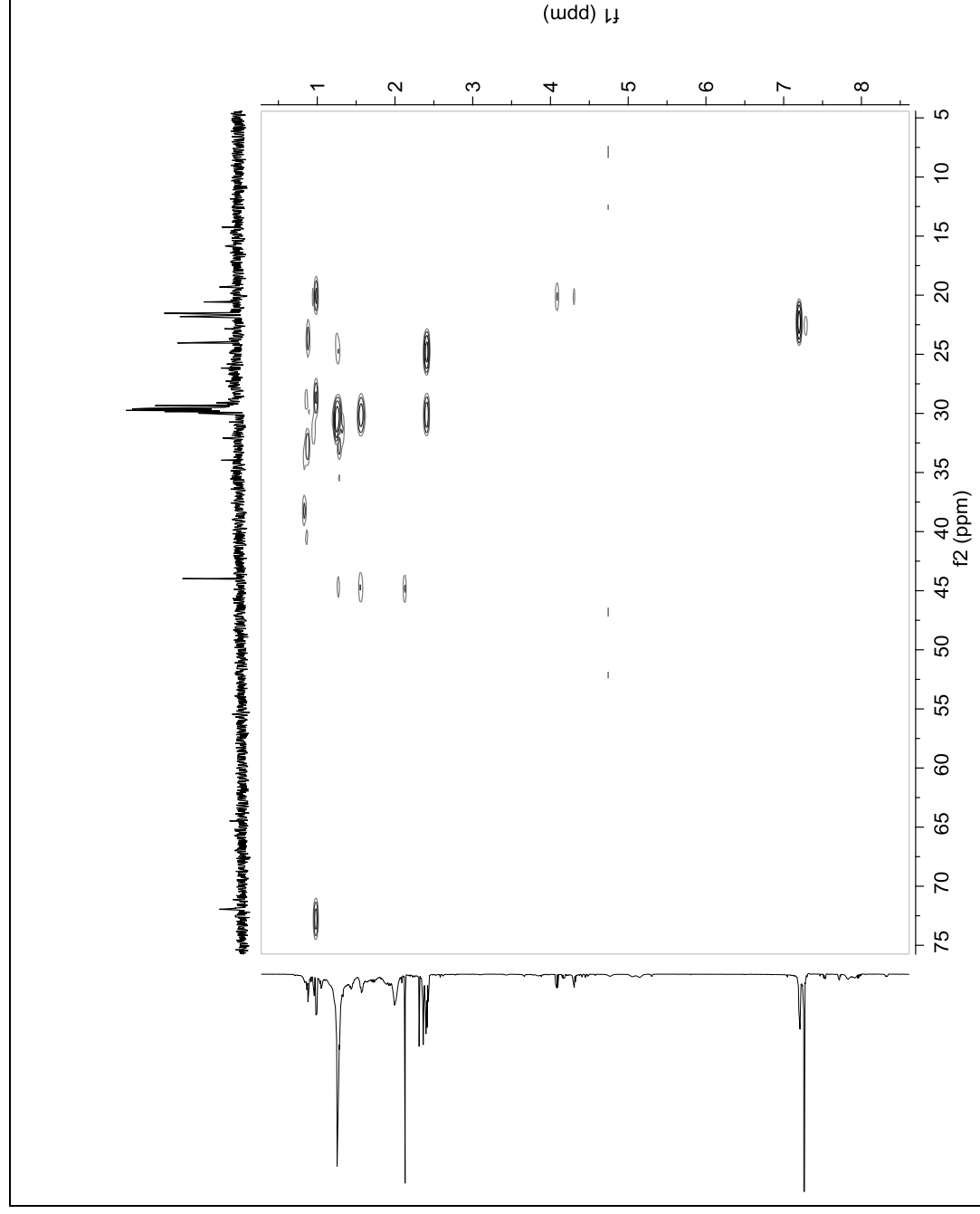
APÊNDICE H2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**) (500 MHz, CDCl_3).



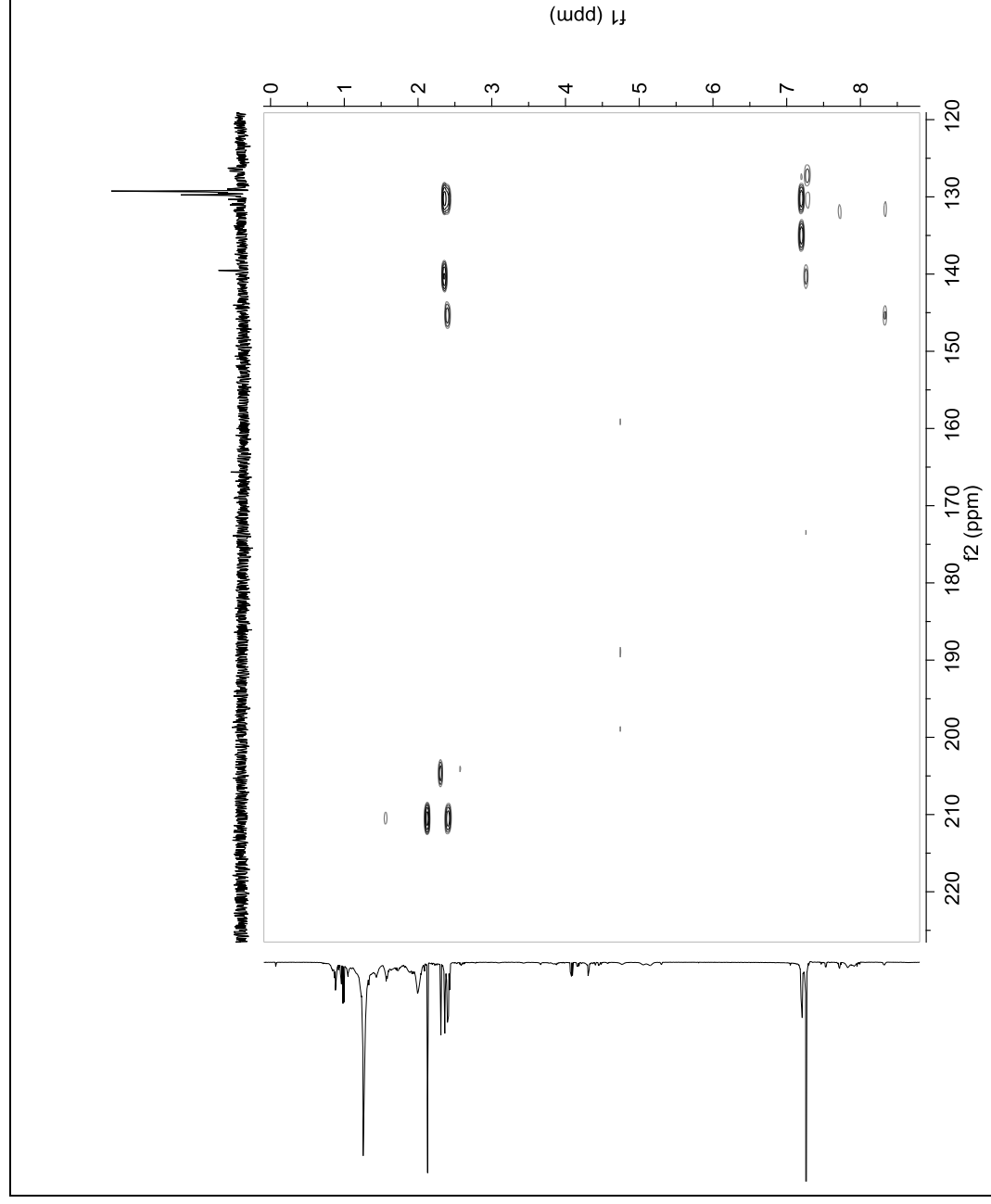
APÊNDICE H3 – Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**) (500 MHz, CDCl₃).



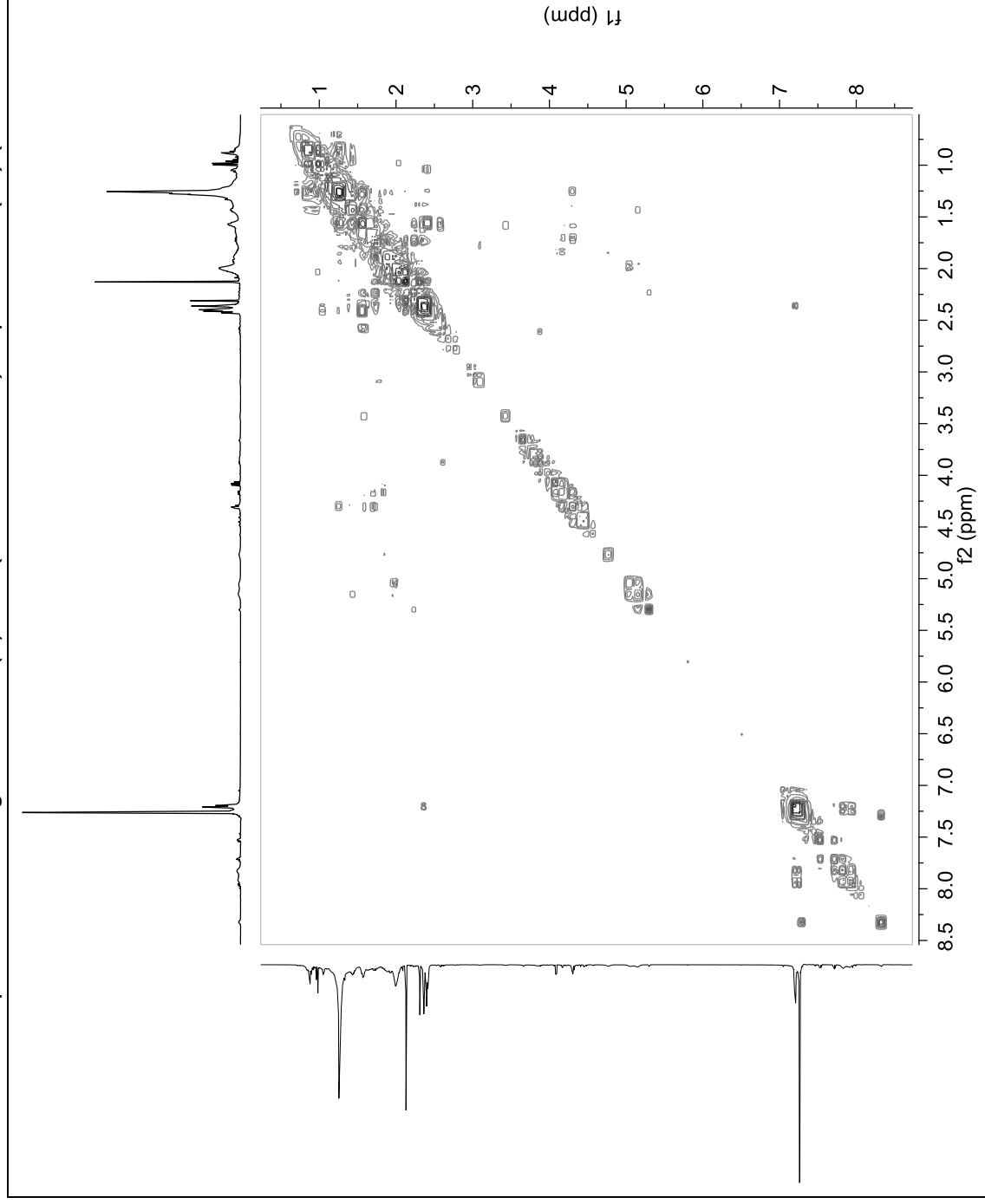
APÊNDICE H4 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**) (δ 5-75 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



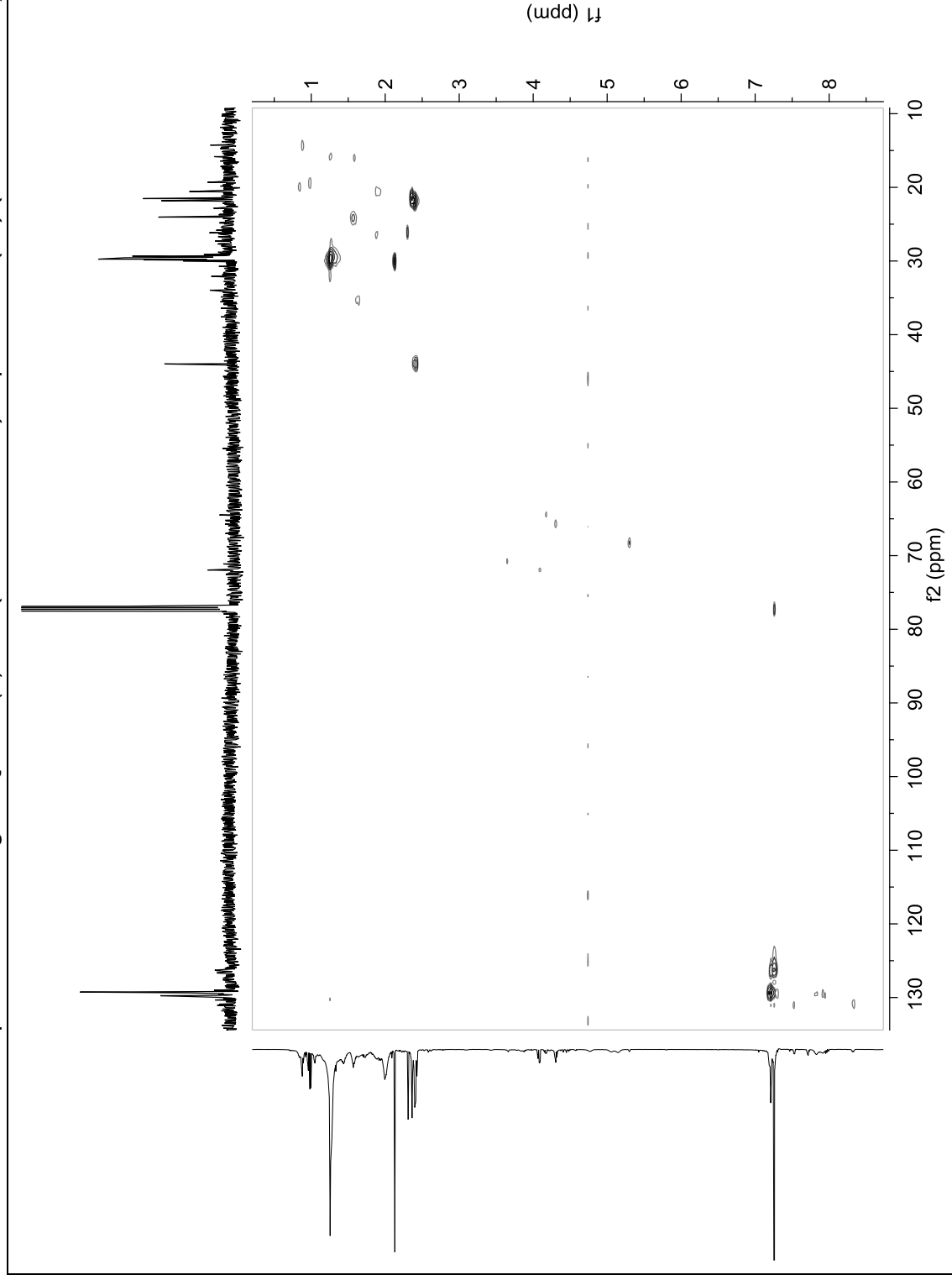
APÊNDICE H5 – Ampliação Mapa de contorno gHMBC de (–)-3-O-(4-metil-benzoi)-espectralina (**34**) (δ 120-220 ppm; 500 MHz, CDCl_3).



APÊNDICE H6 – Mapa de contorno gCOSY de (–)-3-O-(4-metil-benzoil)-espectralina (**34**) (500 MHz, CDCl₃)

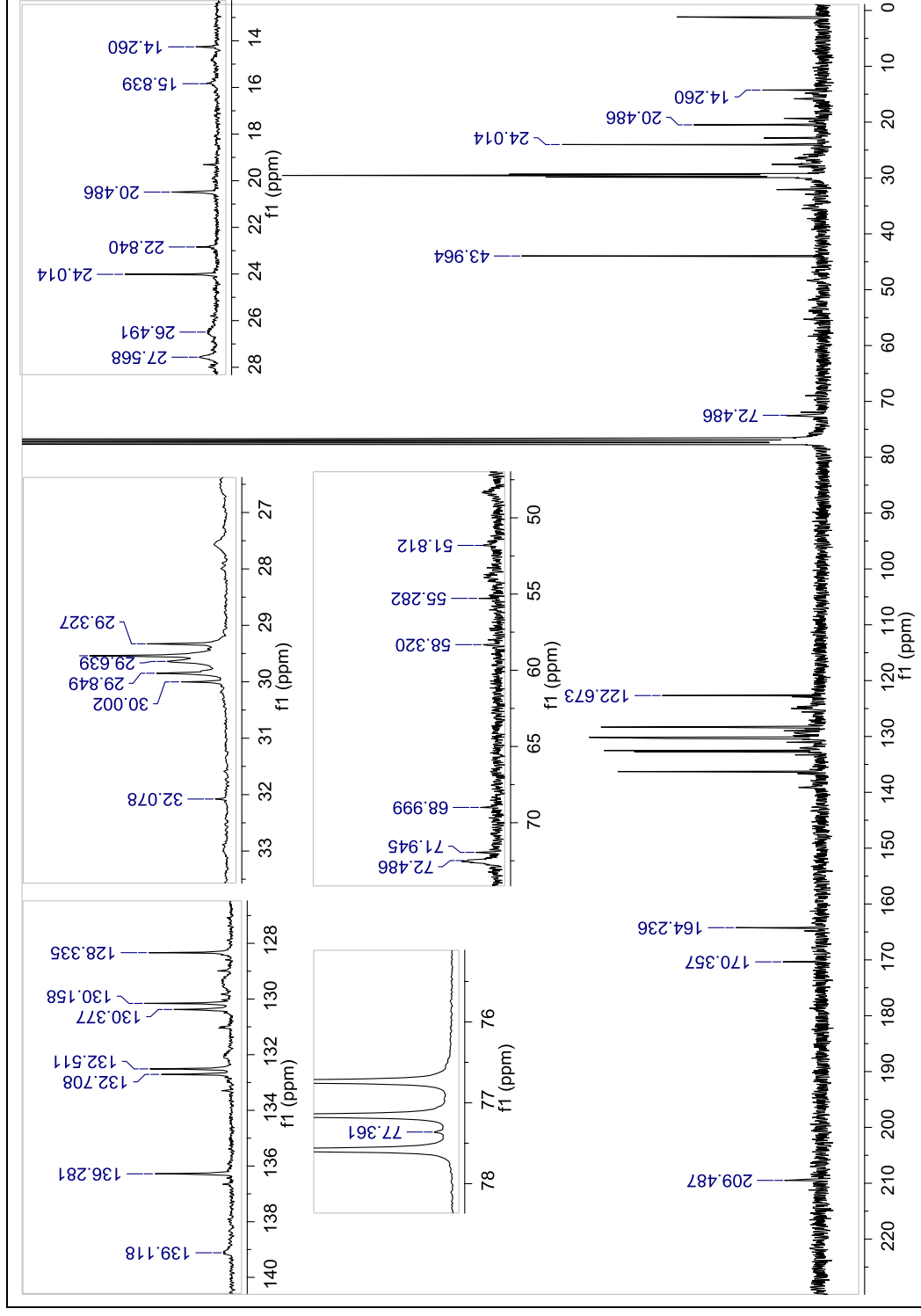


APÊNDICE H7 – Mapa de contorno gHMQC de (–)-3-O-(4-metil-benzoi)-espectralina (**34**) (500 MHz, CDCl₃).

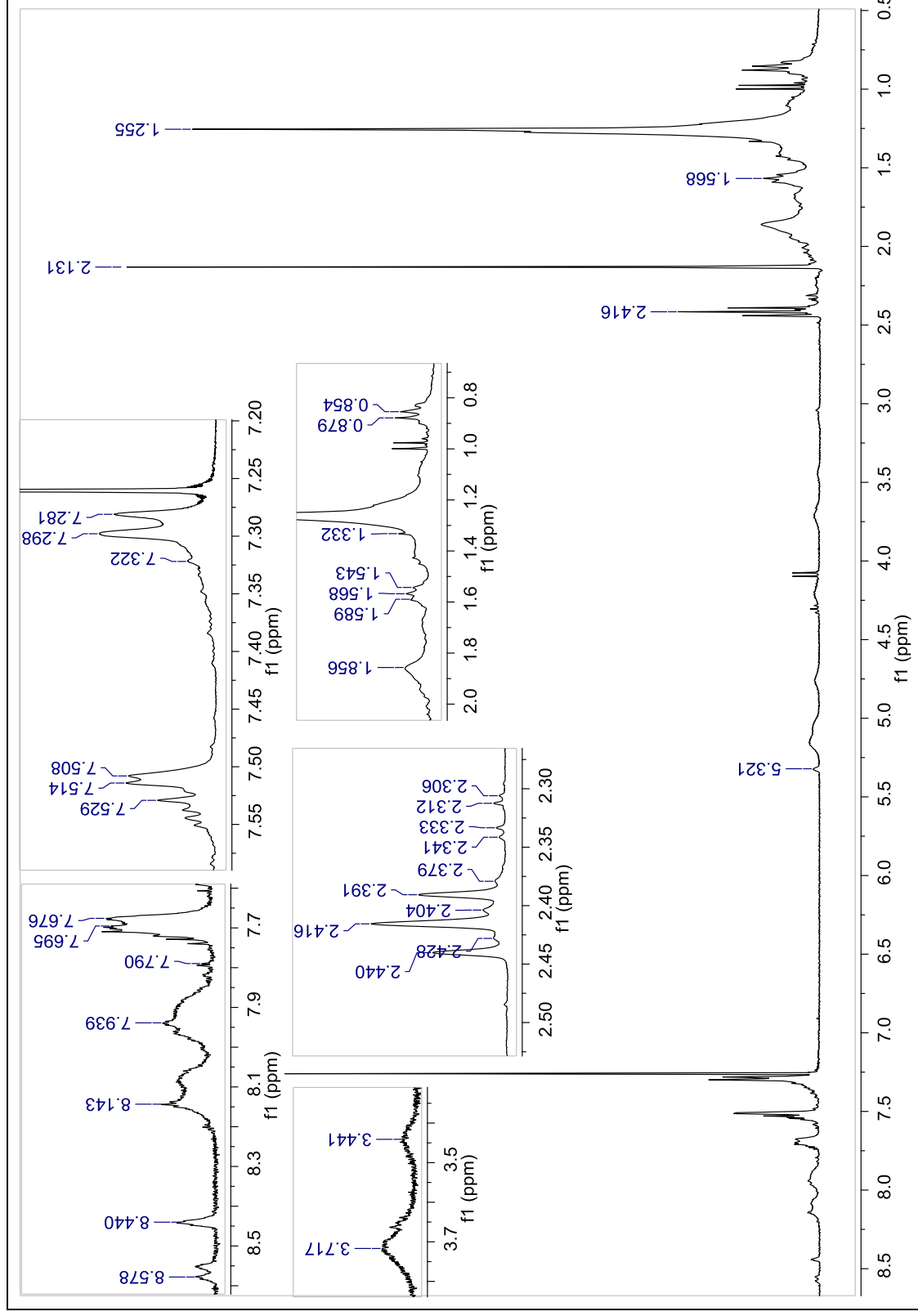


APÊNDICE I

APÊNDICE I1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-(3-bromo-benzoi)-cassina (**35**) (300 MHz, CDCl_3).

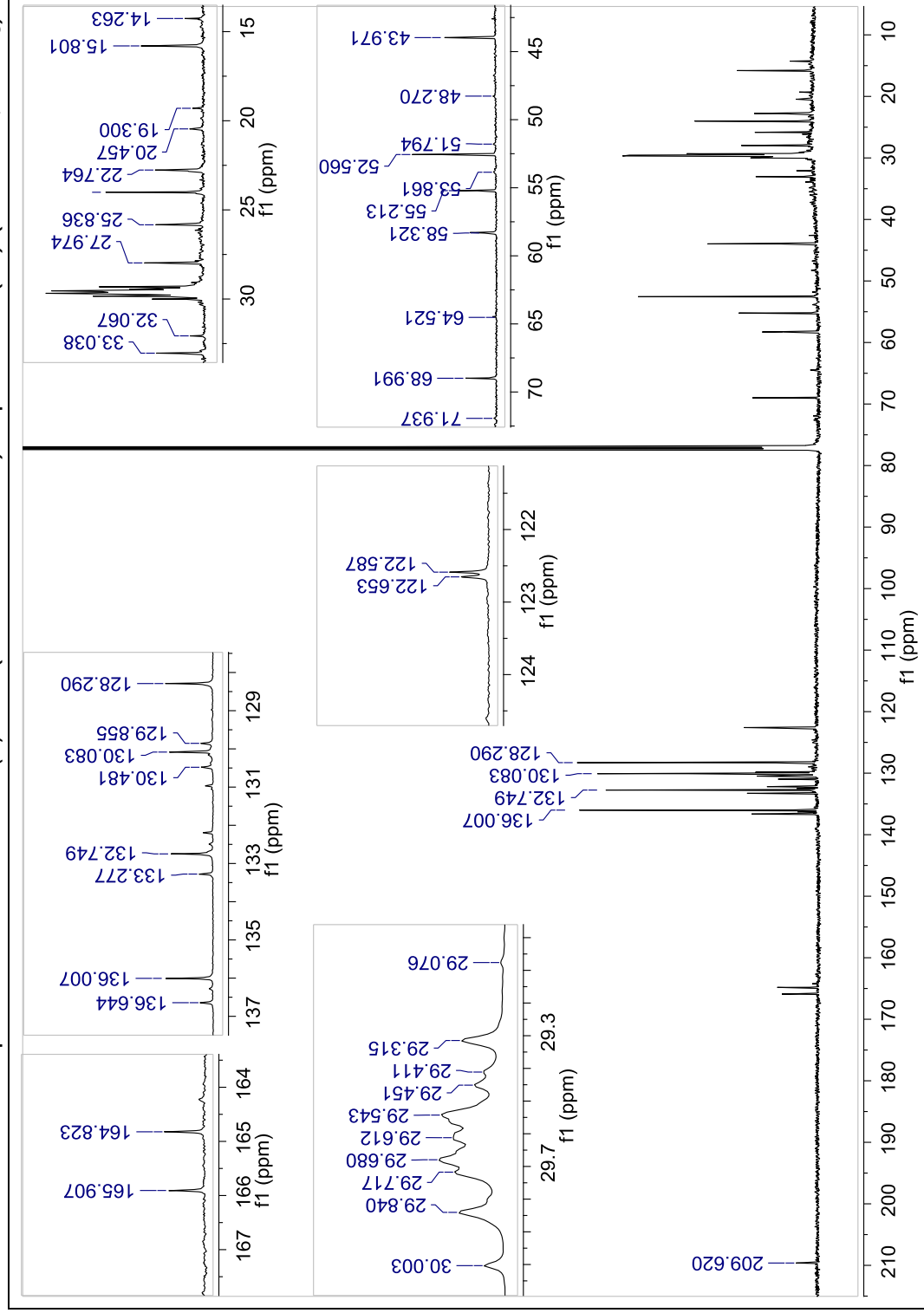


APÊNDICE I2 – Espectro de RMN ^1H de (-)-3-O-(3-bromo-benzoi)-cassina (**35**) (300 MHz, CDCl_3).



APÊNDICE J

APÊNDICE J1 – Espectro de RMN ^{13}C de (–)-3-O-(3-bromo-benzoi)-espectralina (**36**) (600 MHz, CDCl_3).



APÊNDICE J2 – Espectro de RMN ^1H de (–)-3-O-(3-bromo-benzoil)-espectralina (**36**) (600 MHz, CDCl_3).

