



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**



Núcleo de Bioensaios Biossntese e
Ecofisiologia de Produtos Naturais
Instituto de Química UNESP - Araraquara

**Estudo químico dos alcalóides piridínicos encontrados em
*Senna multijuga***

Welington Francisco

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

Araraquara

2011

WELINGTON FRANCISCO

**Estudo químico dos alcalóides piridínicos encontrados em
*Senna multijuga***

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

Dissertação apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de mestre em Química.

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

F818e	Francisco, Welington Estudo químico dos alcalóides piridínicos encontrados em <i>Senna multijuga</i> / Welington Francisco. – Araraquara: [s.n], 2011 171 f.: il.
	Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani
	1. Produtos naturais. 2. <i>Senna multijuga</i> . 3. Alcalóides piridínicos. 4. atividade anticolinesterásica. I. Título.


Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

WELINGTON FRANCISCO

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

Araraquara, 16 de fevereiro de 2011.

BANCA EXAMINADORA



Prof^a Dr^a Vanderlan da Silva Bolzani (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Ribeirão Preto



Prof^a Dr^a Patrícia Sartorelli
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, Diadema

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome Wellington Francisco
Nascimento 19/05/1987 – Estrela D'Oeste/SP – Brasil
CPF 365.994.988-41

Formação Acadêmica/Titulação

- 2011** Mestrado em Química.
Instituto de Química, UNESP – Araraquara, Brasil
Título: Estudo químico dos alcalóides piridínicos encontrados em *Senna multijuga*.
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani
Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2009** Licenciando em Química.
Instituto de Química, UNESP – Araraquara, Brasil
- 2005 – 2008** Graduação em Bacharelado em Química.
Instituto de Química, UNESP – Araraquara, Brasil
Título: Estudo Químico das Flores de *Senna multijuga* (Fabaceae)
Orientadora: Vanderlan da Silva Bolzani
Bolsista do Ministério da Educação – Secretaria de Ensino Superior

Formação Complementar

- 2010 – 2010** Oficina em *Uso de estudos de casos e de textos de divulgação científica no Ensino de Química*.
VIII Evento de Educação em Química, Araraquara - Brasil.
- Curso de curta duração em *Parâmetros para a Elaboração de Atividades Didáticas para o Ensino de Ciências*.
VIII Evento de Educação em Química, Araraquara - Brasil.
- Curso de curta duração em *A percepção de ciência no cinema*.
XV Encontro Nacional de Ensino de Química, Brasília - Brasil.
- Curso de curta duração em *The context of systems biology: a rational approach to search for lead molecules from nature*.
Biota Fapesp International Workshop on Metabolomics, São Paulo - Brasil.
- 2009 – 2009** Curso em *Escola de Produtos Naturais: Alcalóides*.
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Araraquara – Brasil.
- Curso de curta duração em *Introdução à pesquisa em ensino de ciências*.

- II Escola de Formação de Pesquisadores em Educação em Ciências, Florianópolis – Brasil
- 2008 – 2008** Curso de curta duração em *Tintas e tratamento de superfícies*.
XXXVIII Semana da Química, Araraquara – Brasil.
- Curso de curta duração em *A maresia como proposta para o ensino da Eletroquímica*.
XIV Encontro Nacional de Ensino de Química, Curitiba – Brasil.
- 2007 – 2007** Curso de curta duração em *Toxicologia*.
XXXVII Semana da Química, Araraquara – Brasil.
- 2006 – 2006** Curso de curta duração em *Química forense*.
XXXVI Semana da Química, Araraquara – Brasil.
- 2005 – 2005** Curso de curta duração em *Tópicos em química medicinal*.
XXXV Semana da Química, Araraquara – Brasil.
- Curso de curta duração em *Introdução à cosmetologia*.
XXXV Semana da Química, Araraquara – Brasil.
- Curso de curta duração em *História da ciência*.
III Evento de Educação em Química, Araraquara – Brasil.

Atuação Profissional

- 2008 – Atual** **Tágoras Soluções Ensino e Cursos**
Cargo: Professor
Disciplinas ministradas: Química e Física, além de desenvolver material didático.
- 2009 – Atual** **ONG FONTE (Organização Não-Governamental Frente Organizada pela Temática Étnica)**
Cargo: Professor
Disciplinas ministradas: Química.
- 2010 – Atual** **Escola APOIO**
Cargo: Professor
Disciplinas ministradas: Química e Física.
- 2009 – 2009** **Easycomp Internacional**
Cargo: Professor
Disciplinas ministradas: Química, Física e Matemática.
- 2007 – 2008** **Instituto de Química UNESP – Araraquara**
Atividade técnico-científica, Departamento de Química Orgânica
Especificação: Estudante de Iniciação Científica
- 2006 – 2008** **Instituto de Química UNESP – Araraquara**

Atividade de pesquisa-ensino-extensão, Programa de Educação Tutorial (PET)

Especificação: Integrante bolsista

Produção em C, T & A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. SERRANO, M. A. R.; PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; LOPES, M. N.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Acetylcholinesterase Inhibitory Pyridine Alkaloids of the Leaves of *Senna multijuga*. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 482-484, 2010.
2. FRANCISCO JUNIOR, W. E.; FRANCISCO, W.; MORAIS, M. A.; MANOCHIO, C. V. A.; RUIZ, M. Estudo da implementação de um curso introdutório ao software ACDLabs ChemsSketch a graduandos em Química. **Revista Brasileira de Ensino de Química**, v. 4, p. 55-64, 2009.
3. FRANCISCO JUNIOR, W. E.; FRANCISCO, W. Proteínas: Hidrólise, Precipitação e um Tema para o Ensino de Química. **Química Nova na Escola**, v. 22, p. 12-15, 2006.

Capítulos de livros publicados

1. FRANCISCO JUNIOR, W. E.; FRANCISCO, W. Opressores-Oprimidos: Paulo Freire dialogando pela igualdade étnica no ensino de ciências. In: Elizabeth Antônia L. de M. Martines; Wilmo Ernesto Francisco Junior. (Org.). **Professores de Ciências - Um encontro de águas**. São Carlos: Pedro & João Editores, 2008, p. 55-62.
2. FRANCISCO, W.; FRANCISCO JUNIOR, W. E. Considerações acerca da bioquímica nos livros didáticos de Química aprovados pelo PNLEM 2007. In: Wilmo Ernesto Francisco; Ana Carolina Garcia de Oliveira; Elizabeth Antônia L. de M. Martines. (Org.). **Educação em Ciências em Rondônia: Pesquisas e interações universidade-escola**. Porto Velho: Edufro (no prelo).

Trabalhos completos publicados em anais de congressos

1. FRANCISCO, W. ; FRANCISCO JUNIOR, W. E. . Analogias em Livros de Química: Uma Análise das Obras de Química Geral Destinadas ao Ensino Superior. In: VII Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências, 2009, Florianópolis. **Anais...**, Florianópolis: ABRAPEC, 2009.
2. FRANCISCO, W. ; MORAIS, M. A.; MANOCHIO, C. V. A. ; FRANCISCO JUNIOR, W. E.; RUIZ, M. Implementação e avaliação de um curso introdutório ao software ACDLabs ChemsSketch a graduandos em Química. In: Encontro Nacional de Ensino de Química, 2008, Curitiba. **Anais...** Curitiba: UFPR/DQ, 2008. p. R0364-1.
3. FRANCISCO, W. ; FRANCISCO JUNIOR, W. E. Racismo: Buscando Relações com o Ensino de Ciências. In: Encontro nacional de Pesquisa em Educação em Ciências,

2007, Florianópolis. EM: MORTIMER, E. F. (ORG.). **Anais...** Belo Horizonte: ABRAPEC. 2007. Belo Horizonte: ABRAPEC, 2007. p. 1-10.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. FRANCISCO, W.; FRANCISCO JUNIOR, W. E.; ZANON, D. A. V. Leitura, escrita e experimentação por meio de vídeos: análise inicial de uma atividade em sala de aula. In: VIII Evento de Educação em Química, 2010, Araraquara. **Livro de Resumos**, 2010. p. 68-70.

2. FRANCISCO, W.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M. Estudo Químico das Flores de *Senna multijuga*. In: XX Congresso de Iniciação Científica - UNESP, 2008, São José dos campos. **Caderno de resumos**, 2008.

Resumos publicados em anais de congressos

1. FRANCISCO, W.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, N. P.; BOLZANI, V. S. Alcalóides piridínicos isolados de *Senna multijuga*. In: 33° Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. **Caderno de Resumos**, 2010.

2. LIMA, S. P.; FRANCISCO, W.; FRANCISCO JUNIOR, W. E. Textos suplementares nos livros de Química aprovados pelo PNLEM 2007. In: 33° Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia. **Caderno de Resumos**, 2010.

3. FRANCISCO, W.; PASSARELI, F.; TOZETTI, S. A. O.; ZANON, D. A. V. Realização de experimentos investigativos por estagiários na abordagem de conceitos químicos. In: VIII Evento de Educação em Química, 2010, Araraquara. **Livro de Resumos**, 2010, p. 40-40.

4. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; FRANCISCO, W.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P. Purificação e caracterização dos alcalóides homólogos (-)-cassina e (-)-espectralina de *Senna spectabilis* (Fabaceae). In: 31° Reunião da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia. **Caderno de Resumos**, 2008.

5. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; FRANCISCO, W.; CASTRO-GAMBOA, I.; VIEGAS JUNIOR, C.; LOPES, E. M. C.; YOUNG, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S. Acetylcholinesterase inhibitors alkaloids (-)-cassine and (-)-spectaline from *Senna spectabilis* (Fabaceae). In: 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas. **Book of Abstracts**, 2008.

6. PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; FRANCISCO, W.; LOPES, N. P.; FURLAN, M.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S. Purificação e caracterização dos alcalóides homólogos (-)-cassina e (-)-espectralina de *Senna spectabilis* (Fabaceae). In: VI Simpósio e VI Reunião de Avaliação do Programa Biota/FAPESP - 2008, 2008, Araraquara. **Livro de Resumos**, 2008.

Apresentações de trabalho

1. FRANCISCO, W.; FRANCISCO JUNIOR, W. E. A bioquímica a partir de livros didáticos: um estudo dos livros de química aprovados pelo PNLEM 2007, 2010, **Encontro Nacional de Ensino de Química - ENEQ**.
2. PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; SERRANO, M. A. R.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N.; BOLZANI, V. S. New bioactive pyridine alkaloids from the leaves of *Senna multijuga*, 2009, **7th International Congress of Pharmaceutical Sciences – CIFARP**.
3. FRANCISCO, W.; FRANCISCO JUNIOR, W. E. Analogias em livros de Química: Uma análise das obras de Química Geral destinadas ao Ensino Superior, 2009, **Encontro Nacional de Pesquisa em Educação em Ciências – ENPEC**.
4. FRANCISCO JUNIOR, W. E.; FRANCISCO, W. Conteúdos bioquímicos nos livros didáticos de Química aprovados pelo PNLEM 2007, 2009, **Evento de Educação em Química – EVEQ**.
5. FRANCISCO, W.; BOLZANI, V. S. Alcalóides Piridínicos de *Senna multijuga*, 2009, **IV Workshop NuBBE no Instituto de Química de Araraquara – UNESP**.

Produção técnica

1. FRANCISCO, W.; VALDIVIESSO, G. A. **Apostila de Física**. 2010. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional - Material didático).
2. FRANCISCO, W.; MORAIS, M. A. **Introdução ao Curso do ACDLabs ChemsSketch**. 2007. (Curso de curta duração ministrado/Outra).

Dedico aos meus pais,
IRENE e WILMO, ao meu irmão WILMO JUNIOR e
a minha noiva, JULIANA.
Sem essas pessoas nada teria se concretizado.

AMO VOCÊS NO CÉREBRO!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS, pois é quem me dá forças para continuar lutando e buscando meus objetivos. À minha família e minha noiva, que estão comigo em todos os momentos da minha vida, dando apoio, carinho, alegrias... Sempre permaneceram ao meu lado e espero contar com vocês sempre. Amo vocês!

- *À professora Vanderlan, pela oportunidade de trabalho, confiança e todo o apoio nessa jornada, sobretudo, em incentivar-me a outra área que gosto tanto, a educação.*
- *Ao amigo Pivatto, que desde que entrei no laboratório estava sempre disposto a me ensinar e discutir sobre diversos assuntos. Sem ele, não seria possível desenvolver meu trabalho de mestrado, pois foi ele que me ensinou o pouco que sei hoje. Continue sempre assim que terá muito sucesso.*
- *Ao Luiz Otávio Regasini, que me ajudou nas análises dos espectros de RMN e pelo apoio durante todos os anos. Não posso esquecer-me da sua sinceridade e seu jeito divertido de orientar seus alunos.*
- *Aos companheiros de disciplinas e de laboratório, Carol, Miller, Gabriel (Porcão), Paulo, Alan, Jú, Meri, pelos estudos, conversas e discussões sobre Química Orgânica Avançada. Meu Deus, o que era aquilo!*
- *Aos demais colegas de laboratório, Amanda, Aline, Marília, Néia, Vanessa, João, Marcão, Thaís, “Maic” e Ana (desculpe-me se esqueci alguém) pelas conversas e ajuda.*
- *Aos meus amigos Boí, Pará, Navas e “Renatinha”, que desde a graduação estão ao meu lado e que jamais me esquecerei.*

- *A todos os professores, em especial a Ângela, Ian, Alberto e Wagner, pelas contribuições no trabalho e ensinamentos durante esses anos.*
- *Aos técnicos Nivaldo, “Albertinho” e Marquinhos, pela ajuda em conseguir as coisas e realização de experimentos.*
- *As bibliotecárias pelo suporte bibliográfico e ajuda na busca de artigos preciosos.*
- *A todos os demais funcionários que de alguma forma me ajudou em todos esses anos.*
- *Aos cursinhos que ministrou aulas: Tágoras Soluções, ONG FONTE e Escola APOIO, pela oportunidade ímpar de desenvolver um trabalho que é muito especial e gratificante para mim.*
- *Aos meus alunos que sempre me incentivaram a buscar meus objetivos.*
- *Aos colegas de turma da Licenciatura e aos professores, que seguraram a barra quando não conseguia estar presente nas aulas e me compreenderam.*
- *Ao CNPQ pela bolsa cedida.*

Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio a fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza, e no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.

Johann Joachim Becher, *Physica Subterranea* (1667)

Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que fazeres se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.

Paulo Freire, *Pedagogia da autonomia* (1996)

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo químico da fração diclorometânica das folhas de *Senna multijuga*, visando o isolamento, purificação e elucidação estrutural de alcalóides piridínicos com potencial farmacológico. Inicialmente foi preparado o extrato hidroalcolólico das folhas, o qual foi submetido à partição líquido/líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila. As quatro frações obtidas foram avaliadas por CCD, sendo a fração diclorometânica a de maior concentração alcaloídica. Essa fração foi submetida à extração ácido/base e a fração alcaloídica submetida à CCD preparativa de sílica, que foi desenvolvida com uma mistura dos solventes hexano:CHCl₃:AcOEt (1,5:2:6,5), de onde foram isolados cinco alcalóides que apresentaram absorção na região do ultravioleta a 254 e 286 nm. Desta separação obteve-se dois alcalóides puros, *7'-multijuginona* (**5**), *12'-hidroxi-7'-multijuginona* (**2**), e os demais foram purificados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE): *4'-multijuginato de metila* (**3**), *7'-multijuginol* (**4a** e **4b**) e *12'-hidroxi-7'-multijuginol* (**1a** e **1b**). Estas substâncias tiveram suas estruturas elucidadas pelo uso dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas com ionização por *eletrospray* (EM). A partir destas análises foi possível determinar a estrutura de sete substâncias, sendo todas inéditas na literatura. As substâncias apresentaram atividade anticolinesterásica moderada, o que justifica a importância de estudos com metabólitos secundários. Os pares **1a** e **1b** e **4a** e **4b** isolados apresentam isomeria que ainda não determinada. Pelas análises do perfil alcaloídico determinado no estudo sobre a espécie, pode-se constatar que os demais órgãos também acumulam alcalóides, porém, em concentrações diferentes, prevalendo um ou dois deles.

Palavras chaves: *Senna multijuga*, alcalóides piridínicos, atividade anticolinesterásica.

ABSTRACT

This present work deals with the chemical study of the dichloromethane fraction of the *Senna multijuga* leaves, aiming the isolation, purification and structural elucidation of the new bioactive pyridine alkaloids, which can be useful for further pharmacological evaluation. The leaves ethanol extract was subjected a liquid/liquid partitions with hexane, dichloromethane and ethyl acetate, resulting in four fractions, which were evaluated for TLC, being the dichloromethane the fraction with the highest concentration of alkaloids. This fraction was subjected to acid/basic extraction, and the alkaloidal fraction (1.42 g) was subjected to silica preparative TLC, and eluted with a solvent system: *n*-hexane:CHCl₃:AcOEt (1.5:6.5:2), which were isolated five alkaloids. From this procedures were obtained alkaloids, 7'-multijuguinone (**5**), 12'-hydroxyl-7'-multijuguinone (**2**) and the resulting mixture was further purified by HPLC yielding methyl 4'-multijuguinatate (**3**), 7'-multijuguinol (**4a** e **4b**) and 12'-hydroxyl-7'-multijuguinol (**1a** e **1b**). The structure of all alkaloids were determined by RMN and mass spectral data analysis resulting in seven new moderate acetylcholinesterase inhibitor derivatives. The alkaloids pairs, **1a;1b** and **4a;4b**, are isomeric mixtures, not identified yet. Through the alkaloid profile has been established after several data accumulated from this plant, it was observed that others organs also accumulate the same alkaloids, but in different concentration prevailing one or two alkaloids.

Keywords: *Senna multijuga*, pyridines alkaloids, Acetylcholinesterase activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alcalóides piperidínicos isolados de <i>Senna spectabilis</i> no NuBBE.	32
Figura 2. <i>Senna multijuga</i> : árvore florida, folhas e flores, vagens, sementes, tronco e lenho.	34
Figura 3. Drogas utilizadas para o tratamento da doença de Alzheimer	35
Figura 4. Pereirina, isolada de <i>Geissospermum vellosii</i> .	37
Figura 5. As três categorias de alcalóides segundo a classificação de Cordell: (i) <i>alcalóides</i> ; (ii) <i>protoalcalóides</i> ; e (iii) <i>pseudoalcalóides</i> .	38
Figura 6. Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>Senna multijuga</i> .	42
Figura 7. Fluxograma da extração ácido/base para a subfração CH ₂ Cl ₂ .	43
Figura 8. CCD analítica revelada com o reagente de Dragendorff: (A) Fração hexânica (1); Fração CH ₂ Cl ₂ (2); Fração AcOEt (3); Fração hidrometanólica (4) e (B) CCD analítica da Fração CH ₂ Cl ₂ da extração ácido-base.	45
Figura 9. CCD analítica revelada com o reagente de Dragendorff (A) e CCD preparativa sob luz UV366 nm (B).	46
Figura 10. Cromatograma do ALC 1 ($R_f = 0,22$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	46
Figura 11. Cromatograma do ALC 2 ($R_f = 0,33$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	47
Figura 12. Cromatograma do ALC 3 ($R_f = 0,44$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	47
Figura 13. Cromatograma do ALC 4 ($R_f = 0,61$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	48
Figura 14. Cromatograma do ALC 5 ($R_f = 0,72$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	48
Figura 15. Cromatograma da condição otimizada da mistura do ALC 1; isocrático (80 min com três injeções intercaladas), 80% de MeOH, C = 48,0 mg/mL, vol. Inj. 50 µL, fluxo: 5,5 mL/min e detector UV 286 nm.	50
Figura 16. Cromatograma da condição otimizada da mistura do ALC 4; isocrático (30 min), 75% de MeOH, C = 42,0 mg/mL, vol. Inj. 50 µL, fluxo: 5,5 mL/min e detector UV 286 nm.	50

Figura 17. Cromatograma da fração alcaloídica AcOEt; gradiente (35 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	51
Figura 18. Cromatograma da condição otimizada para separação do alcalóide 3 , 1a , 1b e 2 na fração alcaloídica AcOEt; isocrático (20 min), 40% MeOH; 46gradiente (5 min), 40% a 65% MeOH; isocrático (20 min) 65% MeOH, C = 35,0 mg/mL, vol. Inj. 50 µL, fluxo: 5,5 mL/min e detector UV 286 nm.	52
Figura 19. Estrutura química do alcalóide 5 .	53
Figura 20. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 5 .	67
Figura 21. Estrutura química do alcalóide 2 .	70
Figura 22. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 2 .	87
Figura 23. Estrutura química do alcalóide 3 .	89
Figura 24. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 3 .	100
Figura 25. Estrutura química do alcalóide 1a .	103
Figura 26. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 1a .	113
Figura 27. Estrutura química do alcalóide 1b .	114
Figura 28. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 1b .	123
Figura 29. Estrutura química do alcalóide 4a .	126
Figura 30. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 4a .	137
Figura 31. Estrutura química do alcalóide 4b .	138
Figura 32. Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de 4b .	149
Figura 33. Proposta de fragmentação para os alcalóides 1a e 1b .	151
Figura 34. Proposta de fragmentação para os alcalóides 2 e 5 .	154
Figura 35. Proposta de fragmentação para os alcalóides 4a e 4b .	156
Figura 36. Proposta de fragmentação para o alcalóides 3 .	157
Figura 37. Ensaio qualitativo em CCD da atividade anticolinesterásica da fração alcaloídica.	158
Figura 38. Ensaio qualitativo em CCD da atividade anticolinesterásica dos alcalóides 1a , 2 , 3 e 5 .	158
Figura 39. Ensaio qualitativo em CCD da atividade anticolinesterásica dos alcalóides 1b , 4a e 4b .	159
Figura 40. Cromatograma da fração alcaloídica referente às folhas; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.	162
Figura 41. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração das folhas e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H ₂ O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV	162

286 nm.

Figura 42. Cromatograma da fração alcaloídica referente aos galhos; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm. 163

Figura 43. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração dos galhos e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm. 163

Figura 44. Cromatograma da fração alcaloídica referente às flores; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm. 163

Figura 45. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração das flores e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm. 164

Figura 46. Cromatograma da fração alcaloídica referente aos frutos; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm. 164

Figura 47. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração dos frutos e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35–100% de MeOH–H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm. 165

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. IES-EM alta resolução do alcalóide 5 .	53
Espectro 2. Espectro na região de IV do alcalóide 5 .	54
Espectro 3. Espectro de RMN de ^1H de 5 (500 MHz, CDCl_3).	55
Espectro 4. Ampliação do espectro 3 (δ 0,8–1,4).	55
Espectro 5. Ampliação do espectro 3 (δ 1,5–2,7).	56
Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C de 5 (125 MHz, CDCl_3).	57
Espectro 7. Espectro de RMN de DEPT 135 de 5 (125 MHz, CDCl_3).	57
Espectro 8. Espectro de RMN de DEPT 90 de 5 (125 MHz, CDCl_3).	58
Espectro 9. Mapa de contorno gHMQC de 5 (δ 10–45; 500 MHz; CDCl_3).	58
Espectro 10. Mapa de contorno gHMQC de 5 (δ 12–44; 500 MHz; CDCl_3).	59
Espectro 11. Mapa de contorno gHMQC de 5 (δ 22–34; 500 MHz; CDCl_3).	59
Espectro 12. Mapa de contorno gHMQC de 5 (δ 117–127; 500 MHz; CDCl_3).	60
Espectro 13. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 20–34; 500 MHz; CDCl_3).	61
Espectro 14. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 33–40; 500 MHz; CDCl_3).	61
Espectro 15. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 20–46; 500 MHz; CDCl_3).	62
Espectro 16. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 12–44; 500 MHz; CDCl_3).	62
Espectro 17. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 120–155; 500 MHz; CDCl_3).	63
Espectro 18. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 148–158; 500 MHz; CDCl_3).	63
Espectro 19. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 120–155; 500 MHz; CDCl_3).	64
Espectro 20. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 141–157; 500 MHz; CDCl_3).	64
Espectro 21. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 204–220; 500 MHz; CDCl_3).	65
Espectro 22. Mapa de contorno gHMBC de 5 (δ 148–158; 500 MHz; CDCl_3).	65
Espectro 23. Mapa de contorno gCOSY de 5 (δ 1,0–2,8; 500 MHz; CDCl_3).	66
Espectro 24. Mapa de contorno gCOSY de 5 (δ 6,8–7,1; 500 MHz; CDCl_3).	66
Espectro 25. Espectro de RMN de HOMODEC de 5 (H–irradiado, H–desacoplado) (500 MHz, CDCl_3).	68
Espectro 26. Espectro de RMN de TOCSY 1D de 5 , irradiando H-12' (δ 0,88; 500 MHz; CDCl_3).	69
Espectro 27. Espectro de RMN de TOCSY 1D de 5 , irradiando H-2' (δ 1,64; 500 MHz; CDCl_3).	69
Espectro 28. Espectro de RMN de TOCSY 1D de 5 , irradiando H-1' (δ 2,67; 500 MHz; CDCl_3).	70

Espectro 29. IES-EM alta resolução do alcalóide 2 .	71
Espectro 30. Espectro na região de IV do alcalóide 2 .	71
Espectro 31. Espectro de RMN de ^1H de 2 (500 MHz, CDCl_3).	72
Espectro 32. Ampliação do espectro 31 (δ 1,1–1,8 ppm).	73
Espectro 33. Ampliação do espectro 31 (δ 2,4–3,8 ppm).	73
Espectro 34. Espectro de RMN ^{13}C de 2 (125 MHz, CDCl_3).	74
Espectro 35. Espectro de RMN de DEPT 135 de 2 (125 MHz, CDCl_3).	75
Espectro 36. Espectro de RMN de DEPT 90 de 2 (125 MHz, CDCl_3).	75
Espectro 37. Mapa de contorno gHMQC de 2 (δ 14–23; 500 MHz; CDCl_3).	76
Espectro 38. Mapa de contorno gHMQC de 2 (δ 21–35; 500 MHz; CDCl_3).	76
Espectro 39. Mapa de contorno gHMQC de 2 (δ 34–46; 500 MHz; CDCl_3).	77
Espectro 40. Mapa de contorno gHMQC de 2 (δ 60–73; 500 MHz; CDCl_3).	77
Espectro 41. Mapa de contorno gHMQC de 2 (δ 118–127; 500 MHz; CDCl_3).	78
Espectro 42. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 18–32; 500 MHz; CDCl_3).	79
Espectro 43. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 23–33; 500 MHz; CDCl_3).	80
Espectro 44. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 18–46; 500 MHz; CDCl_3).	80
Espectro 45. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 22–36; 500 MHz; CDCl_3).	81
Espectro 46. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 30–42; 500 MHz; CDCl_3).	81
Espectro 47. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 38–66; 500 MHz; CDCl_3).	82
Espectro 48. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 120–155; 500 MHz; CDCl_3).	82
Espectro 49. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 121–125; 500 MHz; CDCl_3).	83
Espectro 50. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 150–155; 500 MHz; CDCl_3).	83
Espectro 51. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 142–156; 500 MHz; CDCl_3).	84
Espectro 52. Mapa de contorno gHMBC de 2 (δ 206–220; 500 MHz; CDCl_3).	84
Espectro 53. Mapa de contorno gCOSY de 2 (500 MHz; CDCl_3).	85
Espectro 54. Mapa de contorno gCOSY de 2 (δ 1,4–3,8; 500 MHz; CDCl_3).	86
Espectro 55. Espectro de RMN de TOCSY 1D de 2 , irradiando H-12' (δ 3,67; 500 MHz; CDCl_3).	88
Espectro 56. Espectro de RMN de TOCSY 1D de 2 , irradiando H-1' (δ 2,68; 500 MHz; CDCl_3).	89
Espectro 57. Espectro na região de IV do alcalóide 3 .	90
Espectro 58. IES-EM alta resolução do alcalóide 3 .	90
Espectro 59. Espectro de RMN de ^1H de 3 (500 MHz, CH_3OD).	91
Espectro 60. Ampliação do espectro 59 (δ 1,8–2,7).	92
Espectro 61. Espectro de RMN ^{13}C de 3 (500 MHz, CH_3OD).	93

Espectro 62. Mapa de contorno gHMBC de 3 (δ 140–155; 500 MHz; CH ₃ OD).	93
Espectro 63. Mapa de contorno gHMQC de 3 (δ 119–130; 500 MHz; CH ₃ OD).	94
Espectro 64. Mapa de contorno gHMQC de 3 (δ 63–75; 500 MHz; CH ₃ OD).	95
Espectro 65. Mapa de contorno gHMQC de 3 (δ 43–56; 500 MHz; CH ₃ OD).	95
Espectro 66. Mapa de contorno gHMQC de 3 (δ 18–38; 500 MHz; CH ₃ OD).	96
Espectro 67. Mapa de contorno gHMBC de 3 (δ 168–182; 500 MHz; CH ₃ OD).	97
Espectro 68. Mapa de contorno gHMBC de 3 (δ 115–130; 500 MHz; CH ₃ OD).	97
Espectro 69. Mapa de contorno gHMBC de 3 (δ 26–40; 500 MHz; CH ₃ OD).	98
Espectro 70. Mapa de contorno gCOSY de 3 (δ 1,4–3,0; 500 MHz; CDCl ₃).	99
Espectro 71. Mapa de contorno gCOSY de 3 (δ 6,8–7,2; 500 MHz; CDCl ₃).	99
Espectro 72. IES-EM alta resolução do alcalóide 1a .	101
Espectro 73. IES-EM alta resolução do alcalóide 1b .	101
Espectro 74. Espectro na região de IV do alcalóide 1a .	102
Espectro 75. Espectro na região de IV do alcalóide 1b .	102
Espectro 76. Espectro de RMN de ¹ H de 1a (500 MHz, CH ₃ OD).	104
Espectro 77. Ampliação do espectro 76 (δ 3,6–2,6).	104
Espectro 78. Ampliação do espectro 76 (δ 1,7–1,1).	105
Espectro 79. Espectro de RMN ¹³ C de 1a (500 MHz, CH ₃ OD).	106
Espectro 80. Espectro de RMN DEPT 135 de 1a (500 MHz, CH ₃ OD).	106
Espectro 81. Mapa de contorno gHMBC de 1a (δ 144–155; 500 MHz; CH ₃ OD).	107
Espectro 82. Mapa de contorno gHMQC de 1a (δ 121,5–125,5; 500 MHz; CH ₃ OD).	108
Espectro 83. Mapa de contorno gHMQC de 1a (δ 61–75; 500 MHz; CH ₃ OD).	109
Espectro 84. Mapa de contorno gHMQC de 1a (δ 16–40; 500 MHz; CH ₃ OD).	109
Espectro 85. Mapa de contorno gHMBC de 1a (δ 120–155; 500 MHz; CH ₃ OD).	110
Espectro 86. Mapa de contorno gHMBC de 1a (δ 62–76; 500 MHz; CH ₃ OD).	110
Espectro 87. Mapa de contorno gHMBC de 1a (δ 24–36; 500 MHz; CH ₃ OD).	111
Espectro 88. Mapa de contorno gCOSY de 1a (δ 6,7–7,2; 500 MHz; CDCl ₃).	112
Espectro 89. Mapa de contorno gCOSY de 1a (δ 1,2–3,6; 500 MHz; CH ₃ OD).	112
Espectro 90. Espectro de RMN de ¹ H de 1b (500 MHz, CH ₃ OD).	115
Espectro 91. Ampliação do espectro 90 (δ 1,2–3,6).	115
Espectro 92. Espectro de RMN ¹³ C de 1b (500 MHz, CH ₃ OD).	116
Espectro 93. Espectro de RMN DEPT 135 de 1b (500 MHz, CH ₃ OD).	117
Espectro 94. Mapa de contorno gHMBC de 1b (δ 142–156; 500 MHz; CH ₃ OD).	117
Espectro 95. Mapa de contorno gHMQC de 1b (δ 120–127; 500 MHz; 118	

CH ₃ OD).	
Espectro 96. Mapa de contorno gHMQC de 1b (δ 40–75; 500 MHz; CH ₃ OD).	119
Espectro 97. Mapa de contorno gHMQC de 1b (δ 18–40; 500 MHz; CH ₃ OD).	119
Espectro 98. Mapa de contorno gHMBC de 1b (δ 125–155; 500 MHz; CH ₃ OD).	120
Espectro 99. Mapa de contorno gHMBC de 1b (δ 62–80; 500 MHz; CH ₃ OD).	120
Espectro 100. Mapa de contorno gHMBC de 1b (δ 26–38; 500 MHz; CH ₃ OD).	121
Espectro 101. Mapa de contorno gCOSY de 1b (δ 6,5–7,5; 500 MHz; CH ₃ OD).	122
Espectro 102. Mapa de contorno gCOSY de 1b (δ 1,2–3,8; 500 MHz; CH ₃ OD).	122
Espectro 103. Espectro na região de IV do alcalóide 4a .	125
Espectro 104. Espectro na região de IV do alcalóide 4b .	125
Espectro 105. IES-EM alta resolução do alcalóide 4a .	126
Espectro 106. IES-EM alta resolução do alcalóide 4b .	126
Espectro 107. Espectro de RMN de ¹ H de 4a (500 MHz, CH ₃ OD).	127
Espectro 108. Ampliação do espectro 107 (δ 1,0–2,8).	128
Espectro 109. Espectro de RMN ¹³ C de 4a (500 MHz, CH ₃ OD).	129
Espectro 110. Espectro de RMN DEPT 135 de 4a (500 MHz, CH ₃ OD).	129
Espectro 111. Ampliação do espectro 110 (δ 15–50, 500 MHz, CH ₃ OD).	130
Espectro 112. Mapa de contorno gHMQC de 4a (δ 120–128; 500 MHz; CH ₃ OD).	131
Espectro 113. Mapa de contorno gHMQC de 4a (δ 48–74; 500 MHz; CH ₃ OD).	132
Espectro 114. Mapa de contorno gHMQC de 4a (δ 29–41; 500 MHz; CH ₃ OD).	132
Espectro 115. Mapa de contorno gHMQC de 4a (δ 13–28; 500 MHz; CH ₃ OD).	133
Espectro 116. Mapa de contorno gHMBC de 4a (δ 144–156; 500 MHz; CH ₃ OD).	133
Espectro 117. Mapa de contorno gHMBC de 4a (δ 125–155; 500 MHz; CH ₃ OD).	134
Espectro 118. Mapa de contorno gHMBC de 4a (δ 67–78; 500 MHz; CH ₃ OD).	134
Espectro 119. Mapa de contorno gHMBC de 4a (δ 20–38; 500 MHz; CH ₃ OD).	135
Espectro 120. Mapa de contorno gCOSY de 4a (δ 6,75–7,20; 500 MHz; CH ₃ OD).	136
Espectro 121. Mapa de contorno gCOSY de 4a (δ 0,8–3,4; 500 MHz; CH ₃ OD).	136
Espectro 122. Espectro de RMN de ¹ H de 4b (500 MHz, CH ₃ OD).	139
Espectro 123. Ampliação do espectro 107 (δ 2,6–3,6).	139
Espectro 124. Ampliação do espectro 107 (δ 0,9–1,7).	140
Espectro 125. Espectro de RMN ¹³ C de 4b (500 MHz, CH ₃ OD).	141
Espectro 126. Espectro de RMN DEPT 135 de 4b (500 MHz, CH ₃ OD).	141

Espectro 127. Mapa de contorno gHMBC de 4b (δ 144–158; 500 MHz; CH ₃ OD).	142
Espectro 128. Mapa de contorno gHMQC de 4b (δ 118–130; 500 MHz; CH ₃ OD).	143
Espectro 129. Mapa de contorno gHMQC de 4b (δ 48–74; 500 MHz; CH ₃ OD).	144
Espectro 130. Mapa de contorno gHMQC de 4b (δ 29–39; 500 MHz; CH ₃ OD).	144
Espectro 131. Mapa de contorno gHMQC de 4b (δ 14–28; 500 MHz; CH ₃ OD).	145
Espectro 132. Mapa de contorno gHMBC de 4b (δ 120–155; 500 MHz; CH ₃ OD).	146
Espectro 133. Mapa de contorno gHMBC de 4b (δ 25–75; 500 MHz; CH ₃ OD).	146
Espectro 134. Mapa de contorno gHMBC de 4b (δ 22–36; 500 MHz; CH ₃ OD).	147
Espectro 135. Mapa de contorno gCOSY de 4b (δ 6,5–7,5; 500 MHz; CH ₃ OD).	148
Espectro 136. Mapa de contorno gCOSY de 4b (δ 1,0–3,8; 500 MHz; CH ₃ OD).	148
Espectro 137. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 310 do alcalóide 1a .	150
Espectro 138. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 310 do alcalóide 1b .	151
Espectro 139. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 308 do alcalóide 2 .	152
Espectro 140. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 292 do alcalóide 5 .	153
Espectro 141. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 294 do alcalóide 4a .	155
Espectro 142. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 294 do alcalóide 4b .	155
Espectro 143. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> 210 do alcalóide 3 .	157
Espectro 144. IES-EM da fração alcaloídica referente às folhas.	160
Espectro 145. IES-EM da fração alcaloídica referente aos galhos.	161
Espectro 146. IES-EM da fração alcaloídica referente às flores.	161
Espectro 147. IES-EM da fração alcaloídica referente aos frutos.	161
Espectro 148. Comparação entre as absorções na região do UV entre as frações alcaloídicas e os alcalóides isolados.	165

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frações da partição líquido-líquido do EEF e seus rendimentos massa/massa (m/m).	44
Tabela 2. Dados de RMN de 5 em CDCl_3^a .	67
Tabela 3. Dados de RMN de 2 em CDCl_3^a .	87
Tabela 4. Dados de RMN de 3 em CH_3OD^a .	100
Tabela 5. Dados de RMN de 1a em CH_3OD^a .	113
Tabela 6. Dados de RMN de 1b em CH_3OD^a .	123
Tabela 7. Dados de RMN de 4a em CH_3OD^a .	137
Tabela 8. Dados de RMN de 4b em CH_3OD^a .	149
Tabela 9. Valores de concentração inibitória mínima dos alcalóide piridínicos isolados.	159

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AChE – enzima acetilcolinesterase
- ACh - acetilcolina
- AcOEt – acetato de etila
- CCD – cromatografia em camada delgada
- CCDA – cromatografia em camada delgada analítica
- CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa
- CDCl_3 – clorofórmio deuterado
- CH_3OD – metanol deuterado
- CIM – concentração inibitória mínima
- CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
- d – duplete
- DA – doença de Alzheimer
- DEPT – **D**istortionless **E**nhancement by **P**olarization **T**ransfer
- EEF – extrato etanólico das folhas
- EM – espectrometria de massas
- FE – fase estacionária
- FM – fase móvel
- gCOSY – **G**radient **C**ORrelation Spectroscop**Y**
- gHMBC – **G**radient **H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond Coherence
- gHMQC – **G**radient **H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum Coherence
- HOMODEC – **H**OMOnuclear **DEC**oupling
- IES-EM – espectrometria de massas com ionização por electrospray
- IV – infravermelho
- J* – constante de acoplamento
- m – multiplete
- MeOH – metanol
- NuBBE – Núcleo de bioensaios, biossíntese e ecofisiologia de produtos naturais
- PVC – policloreto de vinila
- quint. – quintuplete

RMN – ressonância magnética nuclear

SNC – sistema nervoso central

TMS – tetrametil-silano

TOCSY – **TO**tally **C**orrelated **S**pectroscop**Y**

UV – ultravioleta

s – singleto

t – tripleto

ϵ – absorvidade molar

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1. Por que pesquisar <i>Senna multijuga</i> e o que se pretende estudar?	30
1.2. Considerações gerais sobre <i>Senna multijuga</i>	33
1.3. A doença de Alzheimer e as drogas anticolinesterásicas	34
1.4. Considerações gerais sobre os alcalóides	36
2 OBJETIVOS	38
3 PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1. Instrumentação	39
3.2. Materiais Utilizados	40
3.2.1. Solventes	40
3.2.2. Cromatografia	40
3.3. Reveladores	41
3.3.1. Revelador Dragendorff	41
3.3.2. Revelador de Anisaldeído	41
3.4. Preparo do Material Vegetal e Partição Líquido/Líquido	41
3.5. Extração ácido/base	42
3.6. Preparo das amostras para análise por EM e CLAE	43
3.7. Avaliação da atividade anticolinesterásica	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1. Análise das substâncias alcaloídicas isoladas por CLAE	46
4.1.1. Isolamento e purificação das misturas alcaloídicas ALC 1 e ALC 4 por CLAE	49
4.1.2. Isolamento e purificação do ALC 3 por CLAE	50
4.2. Elucidação estrutural dos alcalóides isolados de <i>Senna multijuga</i>	52
4.2.1. Elucidação estrutural do alcalóide 5	52
4.2.2. Elucidação estrutural do alcalóide 2	70
4.2.3. Elucidação estrutural do alcalóide 3	89
4.2.4. Qual a relação estrutural entre os alcalóides 1a e 1b isolados?	100

4.2.5. Qual a relação estrutural entre os alcalóides 4a e 4b isolados?	124
4.3. Espectrometria de massas com ionização por electrospray e as propostas de fragmentações dos alcalóides isolados	150
4.4. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos alcalóides isolados	157
4.5. Perfil alcaloídico de <i>Senna multijuga</i> por EM e CLAE	159
5 CONCLUSÕES	166
REFERÊNCIAS	168

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são substâncias de marcado interesse no passado e presente. São candidatos promissores para a descoberta de bioprodutos, sendo medicamentos a categoria que mais teve exemplos de sucesso ao longo do tempo, demonstrando que os metabólitos secundários continuam desempenhando um papel importante no futuro dos programas de desenvolvimento de fármacos (NEWMAN E CRAGG, 2007). À busca por princípios bioativos demanda muitas variáveis. Uma importante é o conhecimento tradicional e cultural (etnobotânica e etnofarmacologia), que ao ser validado pelo conhecimento científico (química, farmacologia, toxicologia) pode contribuir de forma marcante no processo de descoberta de fármacos. Inúmeros exemplos de medicamentos hoje no mercado, em todo o mundo, resultaram do estudo racional sobre plantas medicinais (GERTSCH, 2009) – outra é o levantamento sistemático de dados clínicos, para que associados ao conhecimento tradicional existente possam ser incluídos em projetos de desenvolvimento de novos fármacos (GRAZ, FALQUET e ELISABETSKY, 2010).

Um processo de investigação comum é convergir o levantamento de campo (etnofarmacologia) com o estudo fitoquímico, com a ideia de que a pesquisa possa contribuir para o desenvolvimento econômico, caso um novo fármaco possa ser encontrado e, posteriormente comercializado. Ademais, é preciso que as relações éticas e culturais sejam mantidas com os donos do conhecimento tradicional (GRAZ, FALQUET e ELISABETSKY, 2010). No entanto, o caminho para o desenvolvimento de um novo fármaco é excessivamente longo, mesmo nos raros casos de sucesso.

Um exemplo desse tempo excessivo ocorre até mesmo no desenvolvimento de um fitoterápico, demonstrando que apenas um estudo químico bem elaborado, mesmo com uma planta de conhecimento tradicional, não é suficiente para validação de um medicamento de origem natural. Isso vem de encontro com a conclusão do estudo fitoquímico de *Garcinia mangostana* com potencial farmacológico evidente, feito por Obolskiy et al. (2009), na qual afirmaram que "uma das graves lacunas no conhecimento fitoquímico é a falta de dados clínicos, aliada a poucas conclusões sobre as atividades farmacológicas e seu real potencial clínico". Tais evidências demonstram que é preciso uma gama de conhecimentos e inúmeras informações sobre uma

determinada planta medicinal, para prover um bom progresso na área e ser aprovado para um determinado uso.

Recentemente, o programa *Fantástico* da *TV Globo*, mostrou uma série denominada “**É BOM PRA QUÊ?**”, discutindo os usos e abusos dos tratamentos médicos feitos com produtos derivados de plantas e suas perspectivas na fitoterapia medicinal. No entanto, muitas dessas plantas ainda não passaram pelo crivo científico dos estudos clínicos. É imbuído nessa linha, que a etnofarmacologia pode contribuir para a exploração de recursos fitoterápicos para uso em diferentes contextos, além de fornecer dados que poderão ajudar a responder perguntas do tipo: "Entre todos diferentes tratamentos para uma doença associada, qual é o mais eficaz? (ETKIN e ELISABETSKY, 2005). O mais importante de tudo isso, é a relação que deve existir entre aspectos éticos, culturais, ambientais, sociais, políticos e econômicos para um desenvolvimento de fármacos mais racional, relacionado com os porvindouros estudos fitoquímicos e clínicos das plantas ditas medicinais.

Além disso, no Brasil, país com uma das maiores biodiversidades do planeta, em torno de 22% do total, o número de espécies estudadas é muito pequeno em relação ao potencial existente. Sendo assim, a bioprospecção auxiliada por testes biológicos gerais e/ou específicos é hoje considerada uma das formas mais racionais para a busca de fármacos potenciais de origem vegetal, visando também substâncias importantes para produzir novos alimentos, fibras, combustíveis, lubrificantes dentre outros (GERTSCH, 2009).

Na busca por novas substâncias com possíveis potencialidades terapêuticas, *Senna multijuga* foi selecionada para o estudo fitoquímico. A escolha desta espécie e os porquês do estudo se basearam na seguinte pergunta: Por que pesquisar *Senna multijuga* e o que se pretende estudar com este trabalho?

1.1. Por que pesquisar *Senna multijuga* e o que estudar?

Senna multijuga (Rich.) Irwin et Barneby (sin. *Cassia multijuga* Rich.) possui importantes propriedades medicinais, sendo as sementes usadas no tratamento oftálmico e infecções cutâneas, apresentando ainda propriedades antibióticas (DUBEY e GUPTA, 1980). Além disso, relatos apontam que índios tenharins Topeiuia utilizam as folhas de

S. multijuga como sedativo em ritual de benzimento, passando os ramos no rosto das crianças (DI STASI, 1995).

Uma das características importantes acerca de um estudo fitoquímico é saber se as substâncias alvo apresentam alguma atividade farmacológica, que referendem o conhecimento popular descrito. Preservar tal conhecimento tradicional e entender as bases farmacológicas dos medicamentos fitoterápicos pode ser considerado uma razão válida para se proteger as florestas tropicais ou se engajar na sua conservação (KIM, 2005). Ademais, o uso de plantas medicinais é uma estratégia terapêutica amplamente aceita por milhões de pessoas acríicas e muitas vezes, passa a ser a única forma de tratamento e cura de enfermidades para os indivíduos de uma determinada sociedade (GERTSCH, 2009).

De um estudo de triagem de seis espécies do gênero *Senna* e *Cassia*, utilizando a técnica de espectrometria de massas, foi possível identificar a presença de alcalóides piridínicos inéditos na literatura em uma matriz complexa de *Senna multijuga* (PIVATTO, 2010; SERRANO et al., 2010; FRANCISCO, 2008; SERRANO, 2006). Tal resultado é muito relevante, uma vez que substâncias alcaloídicas apresentam diversas atividades farmacológicas (VIEGAS JUNIOR, 2006; CORREIA, 2001).

Ademais, esse resultado vai ao encontro com os objetivos do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), que depois de dez anos de bioprospecção da flora paulista e de centenas de espécies estudadas que pertencem a diversos grupos taxonômicos, selecionou as espécies de *Senna* e *Cassia* para um estudo com atenção especial devido aos alcalóides piperidínicos isolados de *S. spectabilis* com ação sobre o sistema nervoso central. Esses estudos fazem parte do projeto “*Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade química e prospecção de fármacos potenciais*”, concluído em dezembro de 2010, mas que terá continuidade com a submissão de outro projeto.

O trabalho pioneiro de Bolzani (1995), fracionando os extratos ativos das folhas de *C. leptophylla* (anos depois reclassificada como *C. spectabilis* sin. *S. spectabilis*), levou ao isolamento dos primeiros alcalóides piperidínicos (**2–8**) no NuBBE (Figura 1). Em seguida, Viegas Junior et al. (2004), estudando as flores de *C. spectabilis* isolaram três novos alcalóides (**9**, **12** e **17**; Figura 1), juntamente com a substância **5** já isolada anteriormente. Foi a partir da observação de uma unidade de acetilcolina ligada as estruturas moleculares em **7–9**, que esta classe de metabólitos despertou a atenção para a avaliação da atividade inibidora da acetilcolinesterase e posteriores estudos de

farmacologia e toxicologia. Devido ao potencial farmacológico e citotoxicidade moderada apresentado pelos cloridratos dos metabólitos 7–9, destes derivados, 7 sendo o derivado majoritário produzido pela espécie, foi eleito como modelo de fármaco potencial e encontra-se em estudo de fase pré-clínica (VIEGAS JUNIOR et al., 2005a; VIEGAS JUNIOR et al., 2005b; U.S. Pat. Appl. 20080076799). Em estudos posteriores realizados com os frutos de *S. spectabilis*, utilizando a técnica de espectrometria de massas *tandem* com ionização por electrospray (IES-EM), foi identificada a presença de séries homólogas de outros alcalóides piperidínicos (1, 2, 4, 5, 9–17) (PIVATTO et al., 2005). Dentre esses metabólitos identificados, está o alcalóide 1, primeiro metabólito isolado das folhas e galhos de *C. excelsa* Shrad. (sin. *C. spectabilis*; HIGHET, 1964) e seu homólogo 5. Recentemente os alcalóides 5, 9 e 13 foram isolados dos frutos verdes de *C. spectabilis* (VIEGAS JUNIOR et al., 2007).

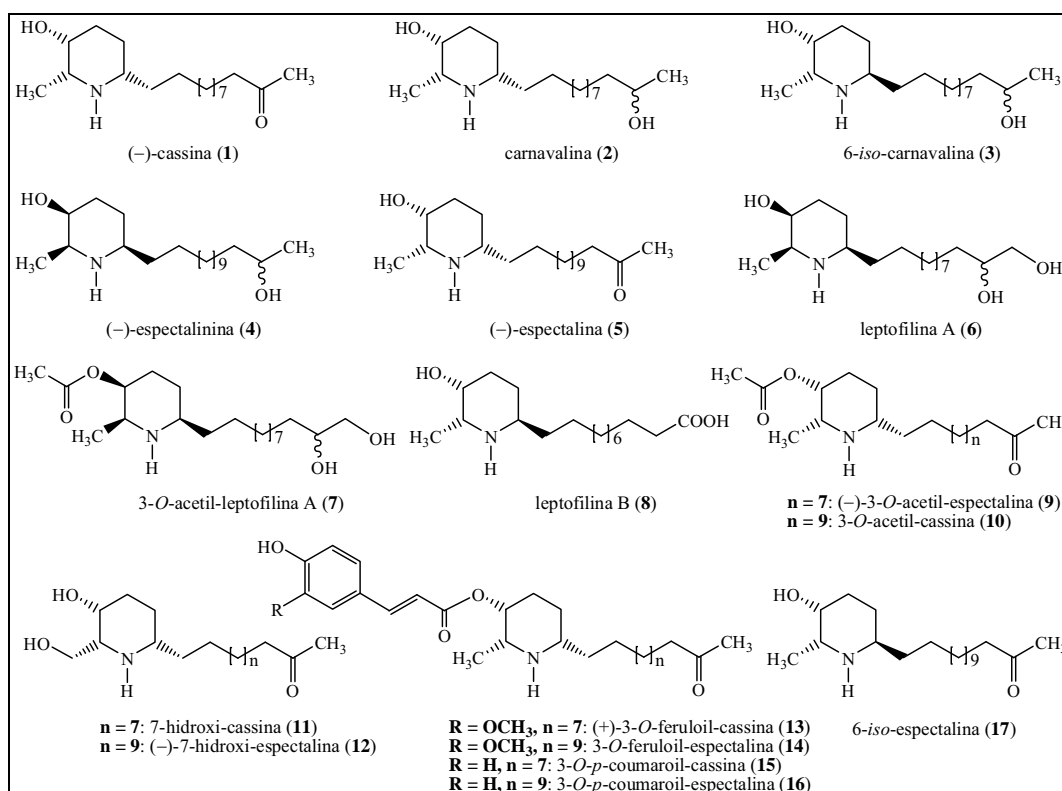


Figura 1. Alcalóides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis* no NuBBE.

Assim, devido ao grande interesse em mapear e catalogar o maior número de espécies de Fabaceae que biossintetizam substâncias com possível potencial farmacológico, sobretudo as substâncias alcaloídicas, o estudo botânico, químico,

biológico e farmacológico de espécies de *Senna/Cassia* estão sendo priorizados pelo NuBBE, incluindo a *S. multijuga* que é alvo deste estudo.

1.2. Considerações gerais sobre *Senna multijuga*

Senna multijuga é uma árvore de pequeno porte (Figura 2), atingindo até 10 m de altura, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Caesalpinioideae, conhecida popularmente como pau-cigarra, aleluia, canafistula ou caquera (DI STASI, 1995). Dependendo da região do país pode ser utilizada como planta ornamental em paisagismo, devido à coloração amarela de suas flores e vegetação de matas ciliares (DAVIDE, FARIA e BOTELHO, 1995). Sua madeira pode ser empregada para caixotaria leve, confecção de brinquedos, lenha e carvão. As sementes apresentam dormência, provocando problemas na germinação (CARVALHO, 1994).

Estudos realizados com as sementes de *Senna multijuga* reportaram a presença de diferentes compostos, dentre os quais se destacam diversas antraquinonas glicosiladas e um flavonol glicosilado (DUBEY; GUPTA, 1980 e SINGH, 1981). Além destas substâncias, um estudo realizado por Singh (1982) evidenciou a presença de outros tipos de metabólitos secundários nas folhas de *Senna multijuga*, sendo essas pertencentes aos grupos das cromonas, algumas ocorrendo na forma de glicosídeos.

Posteriormente, Tiwari e Singh (1983) isolaram e caracterizaram a partir do extrato das raízes de *Senna multijuga*, as antraquinonas: a 1,3-diidroxi-2-metil-antraquinona e a 1,3,8-triidroxi-6-metóxi-2-metil-antraquinona, além outras glicosiladas. No entanto, um estudo fitoquímico mais amplo de metabólitos secundários e avaliação de atividades biológicas não tem sido realizado desde então.



Figura 2. *Senna multijuga*: árvore florida, folhas e flores, vagens, sementes, tronco e lenho.

1.3. A doença de Alzheimer e as drogas anticolinesterásicas

O avanço tecnológico que o mundo passou e continua passando afeta diretamente a medicina. Doenças antes incuráveis, hoje são controladas com grande facilidade. Esse progresso é um dos fatores do aumento da expectativa de vida no mundo. No entanto, as doenças relacionadas à idade estão prevalecendo sem cura ou tratamento eficaz, tornando-se problemas de saúde pública. Segundo a Projeção da População por Sexo e Idade 1980-2050, a expectativa de vida média do brasileiro alcançará os 78,2 anos para os homens e 84,5 anos para as mulheres em 2050 enquanto que a taxa de fecundidade chegará aos 0,24% no mesmo ano (BRASIL, 2008).

Assim, uma das causas mais comuns de demência em pessoas acima de 65 anos, afetando cerca de 10% das pessoas acima desta faixa etária e 50% das pessoas acima de 85 anos é a doença de Alzheimer (SEIDL, 2010; VIEGAS JUNIOR et al., 2005). A doença de Alzheimer (DA) foi descrita primeiramente pelo médico patologista alemão Alois Alzheimer em 1907. É uma doença mental complexa, multifatorial, heterogênea e irreversível relacionada à idade, caracterizada pela perda gradual de memória, alterações no comportamento e na personalidade e também pelo declínio das habilidades intelectuais (MARCHESI, 2011; VIEGAS JUNIOR et al., 2005).

Atualmente, existem cinco drogas aprovadas para o tratamento clínico da doença de Alzheimer: donepezila (1), galantamina (2), rivastigmina (3), tacrina (4) e memantina (5) (SEIDL, 2010, Figura 3). Dentre estas, as quatro primeiras são classificadas como drogas anticolinesterásicas, ou seja, inibidores da enzima acetilcolinesterase e a última atua como antagonista do receptor de glutamato aumentando os níveis de acetilcolina na fenda sináptica.

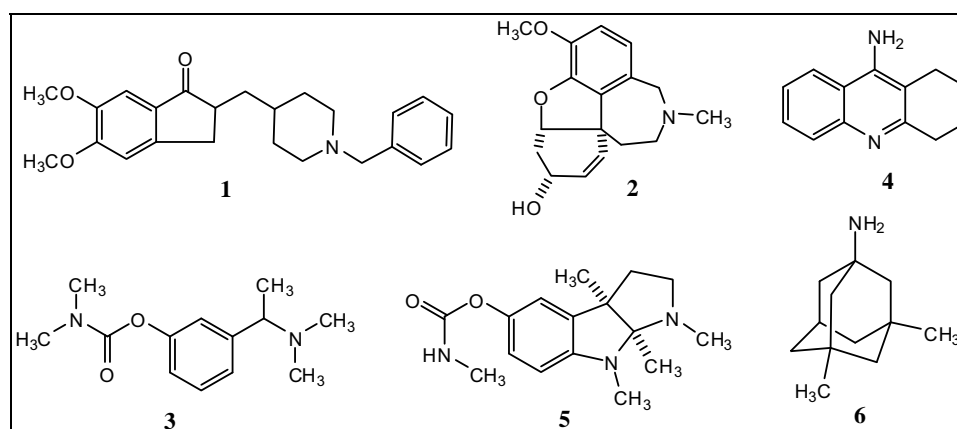


Figura 3. Drogas utilizadas para o tratamento da doença de Alzheimer.

O primeiro inibidor da acetilcolinesterase utilizado foi a fisostigmina (6, Figura 3), um alcalóide primeiramente isolado da espécie *Physostigma venenosum*, L. (Fabaceae). Hoje em dia, a fisostigmina é muito utilizada como controle positivo de bioensaios de novas substâncias, pois seu tempo de meia vida é muito curto. Contudo, sua estrutura química forneceu um modelo para o desenvolvimento da rivastigmina, outra substância com melhor perfil farmacocinético utilizada atualmente na terapia da doença. A galantamina, outro alcalóide de origem natural, foi extraído primeiramente da espécie *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae), e posteriormente de outras espécies da mesma família como *Narcissus* sp. e *Leucojum* sp. Esta droga é comercializada desde 1996, possuindo um modo duplo de ação: atua como inibidor seletivo e reversível da enzima acetilcolinesterase; e modula os receptores nicotínicos cerebrais (SEIDL, 2010).

As drogas anticolinesterásicas possuem um papel importante no tratamento da DA, pois elas agem inibindo a acetilcolinesterase (AChE) que hidrolisa a acetilcolina (ACh), principal neurotransmissor na DA, sendo reconhecidamente importante para o aprendizado e memória (SEIDL, 2010). A deficiência de ACh na DA levou ao estabelecimento da hipótese colinérgica a qual explica que a incapacidade de transmitir

impulsos neurológicos entre as sinapses cerebrais é a razão para as disfunções cognitivas e comportamentais. Isto porque, quando a AChE hidrolisa a ACh, cessa o efeito desse neurotransmissor nas sinapses colinérgicas.

Com o intuito de buscar novos anticolinesterásicos com uma vasta diversidade estrutural e explorar a possibilidade dos diferentes modos de ação, intensificaram os estudos fitoquímicos com diversas espécies de plantas e/ou microrganismos com base no uso popular e/ou dados etnobotânicos. A pesquisa de tais inibidores, sobretudo os oriundos da classe alcaloídica, é de extremo interesse tanto na área dos produtos naturais quanto no campo da modelagem molecular, permitindo criar bancos de dados com diversas estruturas como futuros protótipos.

1.4. Considerações gerais sobre os alcalóides

Em 1819, o farmacêutico alemão Carl Meissner cunhou o termo alcalóide. Tal vocábulo é derivado da palavra árabe *al-qali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida, representando os compostos nitrogenados farmacologicamente ativos encontrados, predominantemente, nas angiospermas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Desde então, o estudo sobre os alcalóides se intensificou levando a inúmeros isolamentos e elucidações estruturais.

No Brasil, por exemplo, o primeiro alcalóide isolado e identificado foi a pereirina (Figura 4), encontrado na casca do pau-pereira (*Geissospermum vellosii*), árvore da família das apocináceas. Esta substância, usada durante muito tempo como medicamento contra febres (inclusive as provocadas pela malária), foi isolada em 1838, no Rio de Janeiro, por um farmacêutico brasileiro. A descoberta da pereirina, a qual foi reivindicado por pesquisadores de outros países, mostra que na primeira metade do século XIX já se faziam estudos químicos de produtos naturais no país (ALMEIDA et al., 2009).

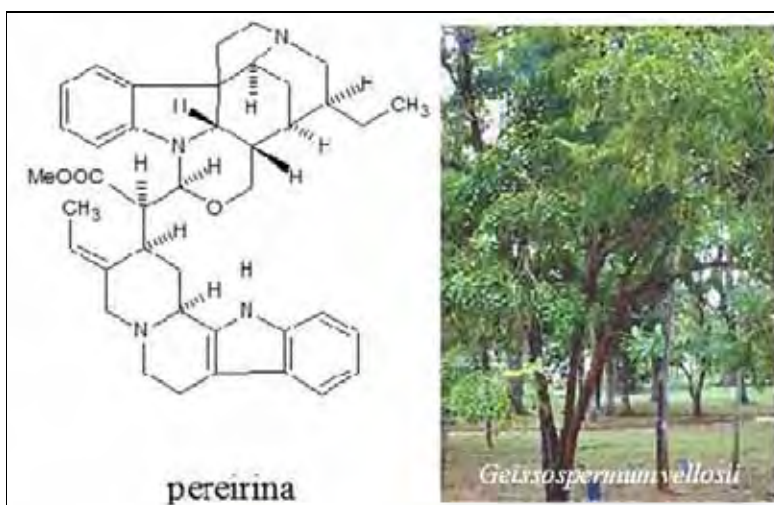


Figura 4. Pereirina, isolada de *Geissospermum vellosii*.

Os alcalóides fazem parte de uma das classes de substâncias naturais mais importantes em virtude das propriedades tóxicas e farmacológicas demonstradas em diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* (VIEGAS JUNIOR, 2006). Com estrutura molecular bastante diversificada, contendo pelo menos um átomo de nitrogênio básico em sua estrutura, amiúde, apresentam atividade sobre o sistema nervoso central (SNC), podendo causar paralisia, aumento ou diminuição da pressão sanguínea (CORREIA, 2001).

Este vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural representa cerca de 20% das substâncias naturais descritas na literatura (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Existem diversas classes de alcalóides que são divididos em três categorias de acordo com a proposição de Cordell: (i) *alcalóides verdadeiros*: aqueles que contêm um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico, classificados com base no sistema anelar presente na molécula que são derivados de aminoácidos (1, 2, Figura 5); (ii) *protoalcalóides*: substâncias cujo átomo de nitrogênio não se encontra em um sistema heterocíclico. São considerados como aminas simples (3, 4, 5, Figura 5); (iii) *pseudoalcalóides*: compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos (6, 7, Figura 5, CORREIA, 2001).

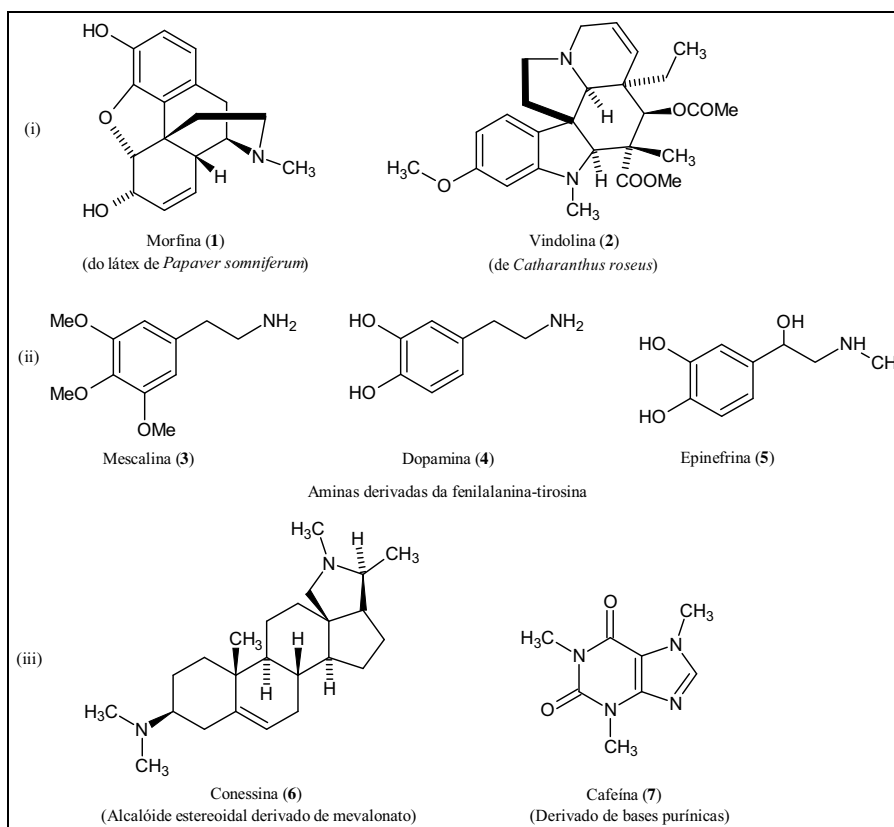


Figura 5. As três categorias de alcalóides segundo a classificação de Cordell: (i) *alcalóides*; (ii) *protoalcalóides*; e (iii) *pseudoalcalóides*.

2 OBJETIVOS

Os objetivos delineados do trabalho foram:

- Isolar, purificar e elucidar as estruturas das substâncias alcaloídicas presentes no extrato das folhas de *Senna multijuga*, que foram identificadas por espectrometria de massas (EM);
- Avaliar possíveis atividades biológicas das substâncias isoladas;
- Traçar o perfil alcaloídico das demais partes da planta (flores, frutos e galhos) por EM e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

3 PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental consistiu na instrumentação e materiais utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

3.1. Instrumentação

As análises espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas foram realizadas utilizando-se os seguintes equipamentos:

- Espectrômetro de RMN Varian INOVA 500 (11,7 Tesla), operando em frequência de 500 MHz para os núcleos de hidrogênio e 125 MHz para o carbono.
- Cromatógrafo líquido da marca Varian ProStar, consistindo de uma bomba ternária mod. 240, um detector de arranjo de diodo mod. 330 e um injetor automático mod. 410, controlados pelo programa Star Chromatography Workstation versão 5.3.
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu[®] composto pelos seguintes módulos: bombas LC-8A, degaseificador SPD-10 AVP, autoinjeter SIL-10AF, detectores de UV-Vis SPD-10 AVP e evaporativo de espalhamento de luz ELSD-LT, controlados pelo programa LC Workstation CLASS-VP. Para o desenvolvimento do método foram utilizadas as colunas: Phenomenex Gemini 5 μm , C18, 250 x 4,6 mm, n^o. 286293-11, Phenomenex LC18 5 μm , 250 x 4,6 mm.
- Espectrômetro de massas de alta resolução Bruker Daltonics ultrTOF-Q, ionização por electrospray. As amostras foram solubilizadas em metanol e introduzidas utilizando seringa (100 μL), adaptada a uma bomba de infusão com fluxo 100 $\mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$. O capilar é aquecido a 150 °C com fluxo de gás nebulizante 4 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e 4 kV. Os dados podem ser adquiridos no modo positivo ou negativo.
- Espectrofotômetro na região do infravermelho da marca Nicolet, modelo IMPACT 400.
- Ponto de fusão medido em aparelho digital da marca Micro Química, modelo MQAPF – 301.
- Espectrofotômetro (UV/Visible Spectrophotometer), da marca Amersham Biosciences, modelo Ultrospec 2100 *pro*.

3.2. Materiais Utilizados

Os materiais utilizados foram: os solventes para o preparo dos extratos, partições líquido/líquido e solubilização de amostras; as fases estacionárias para as análises cromatográficas; e os reveladores para identificar as substâncias alcaloídicas.

3.2.1. Solventes

- Metanol (CH₃OH): J. T. Baker; Baker Analyzed[®] HPLC
- Ácido acético glacial (H₃CCO₂H): Quemis P.A. ACS
- Cloreto de metileno (CH₂Cl₂): Synth P.A. ACS
- Clorofórmio (CHCl₃): Synth P.A. ACS
- Hidróxido de amônio (NH₄OH): Synth P.A. ACS
- Solventes de grau técnico, purificados em destilador semi-industrial com coluna de fracionamento (4 m de altura): hexano, acetato de etila, etanol, metanol, acetona, n-butanol.
- Água deionizada em aparelho da marca Milli-Q plus
- Solventes deuterados:
 - Clorofórmio-*d* 99,8% ACROS Organics
 - Metanol-*d*₄ 99,8% Cambridge Isotope Laboratories, Inc

3.2.2. Cromatografia

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 e Alumina G, preparadas aplicando-se uma suspensão da fase 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 foram secadas a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 6 h e em

seguida ativadas em estufa a 120 °C, por 2 h. As revelações foram feitas por: irradiação ultravioleta (UV 254 ou 366 nm) ou por nebulização dos reveladores descritos no item 3.3

3.3. Reveladores

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

3.3.1. Revelador Dragendorff

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

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

Solução estoque: Misturar partes iguais das Soluções A e B.

Solução spray: Misturar a solução estoque, ácido acético e água (1:2:10).

Resultados: Detecção de alcalóides

3.3.2. Revelador de Anisaldeído

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

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

Resultado: Revelador universal.

3.4. Preparo do Material Vegetal e Partição Líquido/Líquido

As folhas de *Senna multijuga* (4,55 kg) foram coletadas em Araraquara na estrada que dá acesso a fazenda Salto Grande (latitude sul – 21°48'16,5"; longitude oeste – 48°12'24,1"), sendo que uma exsicata está depositada no Instituto de Botânica sob o número SP 384103. As folhas foram secadas em estufa com sistema de circulação por um período de quatro dias a 40 °C (1,90 kg). Em seguida elas foram trituradas em moinho de facas e submetidas à extração com etanol por um período de sete dias até a filtração e evaporação do solvente em rotaevaporador. Este procedimento foi repetido por três vezes, resultando no extrato hidroalcolico das folhas (EEF, 310 g).

Para o estudo das folhas de *S. multijuga* foram dissolvidos 309 g do extrato em metanol/água (4:1) que em seguida, foi filtrado em papel de filtro. Esse filtrado foi submetido à partição líquido-líquido com os solventes hexano, diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt), sucessivamente, resultando em quatro subfrações (Figura 6).

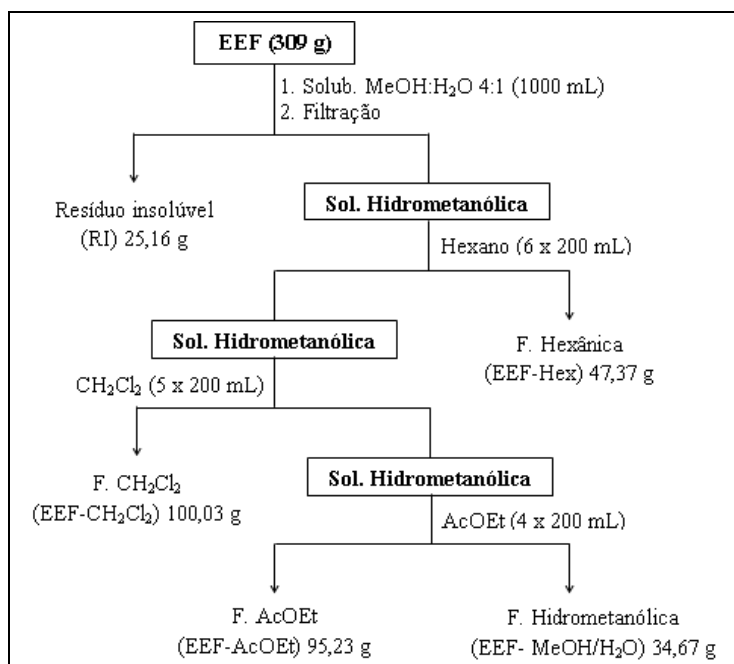


Figura 6. Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *Senna multijuga*.

3.5. Extração ácido/base

O procedimento da extração ácido/base consistiu em solubilizar 99 g da subfração CH_2Cl_2 em ácido clorídrico 5%, filtrar e particionar com AcOEt. Em seguida, foi adicionado hidróxido de amônio na fase ácida até elevar o pH no intervalo de 10–13 seguido de extração com CH_2Cl_2 , cuja análise em CCDA revelou a presença de alcalóides (Figura 7) (SRIPHONG et al., 2003). O mesmo procedimento foi realizado para 90 g da subfração AcOEt.

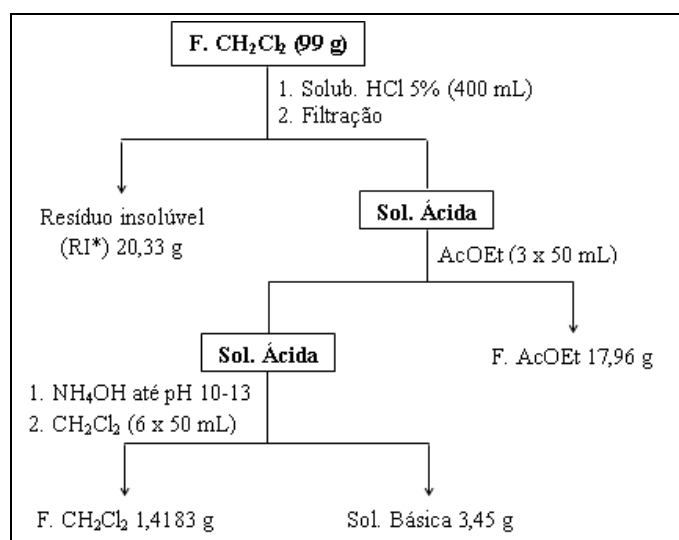


Figura 7. Fluxograma da extração ácido/base para a subfração CH₂Cl₂.

3.6. Preparo das amostras para análise por EM e CLAE

Todas as frações alcalóidicas e as substâncias alcalóidicas isoladas foram pesadas (1,0 mg) e solubilizadas em metanol (1,0 mL) grau HPLC. Tais soluções foram filtradas em membranas de PVC 0,22 µm e submetidas às análises.

3.7. Avaliação da atividade anticolinesterásica

O ensaio quali e quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD), realizado no Instituto de Botânica de São Paulo pelo grupo da Prof^a Dr^a Maria Cláudia MarxYoung, consistiu no desenvolvimento de uma cromatoplaça com a substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (fisostigmina ou galantamina). Para os ensaios quantitativos (Concentração Inibitória Mínima – CIM) foram aplicadas quantidades conhecidas e em ordem decrescente de massa, das amostras e com o controle positivo em massa padronizada, objetivando encontrar a menor quantidade inibidora de AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da placa, a mesma foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66 U) (Solução A) e o solvente evaporado com secador de cabelo. A placa foi incubada em câmara úmida fechada a 37 °C por 20 minutos, e em seguida borrifada com a Solução D (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

A coloração roxa aparece em aproximadamente 2 minutos. O aparecimento de mancha branca indica a que houve inibição da enzima, sobre um fundo de coloração roxa que indica a atividade da acetilcolinesterase. (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002). Os resultados foram fotografados e os valores de R_f calculados para os halos onde houve a inibição da enzima.

As soluções foram preparadas de acordo com o procedimento abaixo:

Solução A: Acetilcolinesterase (1000 U, Sigma, produto nº C2880) dissolvida em 150 mL do tampão Tris-HCl (0,05 M; pH 7,9), a solução estoque será armazenada a 4 °C, no momento do uso será adicionado 0,1% de albumina de soro bovino fração V;

Solução B: 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol;

Solução C: 400 mg do sal Fast Blue B em 160 mL de água destilada;

Solução D: mistura de 10 mL da **solução B** + 40 mL da **solução C**.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. multijuga* (310 g; 16,31% de rendimento), este foi submetido à partição líquido/líquido como descrito no item 3.4, resultando em quatro subfrações com diferentes níveis de polaridade (Tabela 1). As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como fase estacionária (FE) sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV₂₅₄). A fase móvel (FM) consistiu em uma mistura de AcOEt:Hexano (4:1), sendo a revelação feita pelo reagente de Dragendorff que é um revelador específico para substâncias alcaloídicas.

Tabela 1. Frações da partição líquido-líquido do EEF e seus rendimentos massa/massa.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânica	47,37	15,33
CH ₂ Cl ₂	100,03	32,37
AcOEt	95,23	30,82
Hidrometanólica	34,67	11,22
Resíduo insolúvel	25,16	8,14

Após a revelação com o reagente de Dragendorff foram observadas manchas amarelas, pouco intensas, na fração CH₂Cl₂, sugerindo a presença de substâncias alcaloídicas (Figura 8). Devido a pouca intensidade da coloração após a revelação, foi realizada uma extração ácido/base, para obter uma fração enriquecida nos alcalóides, descrita no item 3.5. Da análise por CCDA, observou-se que a fração enriquecida concentra os alcalóides (1,4183 g; 0,46 % de rendimento; Figura 7). Tal procedimento também foi realizada na subfração AcOEt, obtendo uma fração alcaloídica enriquecida (70,0 mg; 0,02% de rendimento).

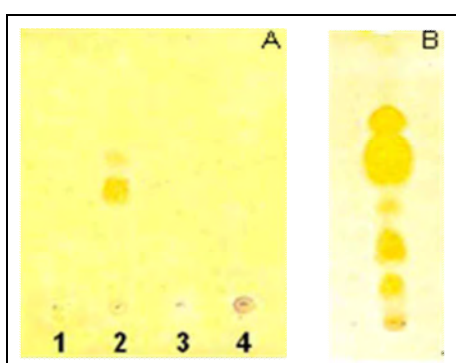


Figura 8. CCD analítica revelada com o reagente de Dragendorff: (A) Fração hexânica (1); Fração CH₂Cl₂ (2); Fração AcOEt (3); Fração hidrometanólica (4) e (B) CCD analítica da Fração CH₂Cl₂ da extração ácido-base.

Visando o isolamento das cinco substâncias que foram identificadas pela análise por CCDA e que apresentaram R_f diferentes, a fração alcaloídica enriquecida (F. CH₂Cl₂ após a extração ácido/base) foi submetida à cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP, *Analtech – SILICA GEL GF* com indicador de fluorescência (UV₂₅₄), 20 x 20 cm e 500 microns). Utilizou-se 12 placas preparativas, aplicando aproximadamente 100,0 mg da fração alcaloídica em cada uma. A FM consistiu em uma mistura de Hexano:CHCl₃:AcOEt (1,5:2,0:6,5), na qual a placa foi eluída duas vezes para uma melhor separação (Figura 9). As cinco substâncias isoladas foram denominadas de ALC 1 (110 mg; $R_f = 0,22$), ALC 2 (12,3 mg; $R_f = 0,33$), ALC 3 (19,0 mg; $R_f = 0,44$), ALC 4 (130 mg; $R_f = 0,61$) e ALC 5 (25,1 mg; $R_f = 0,72$), de acordo com seus R_f em ordem crescente (Figura 9). Em seguida, todas as substâncias foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

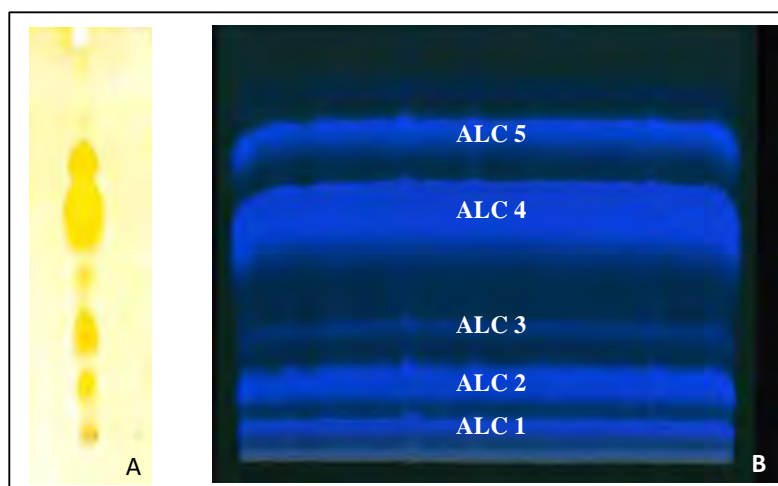


Figura 9. CCD analítica revelada com o reagente de Dragendorff (A) e CCD preparativa sob luz UV366 nm (B).

4.1. Análise das substâncias alcaloídicas isoladas por CLAE

As cinco substâncias alcaloídicas isoladas em CCDP foram submetidas à análise por CLAE, utilizando uma coluna analítica Phenomenex LC18 5 μ m, 250 x 4,6 mm. (Figura 10, 11, 12, 13 e 14). Foi utilizado um gradiente iniciando com 35% de metanol até 100% como condição cromatográfica, com o objetivo de verificar a eficiência da purificação por CCDP (Figura 10, 11, 12, 13 e 14).

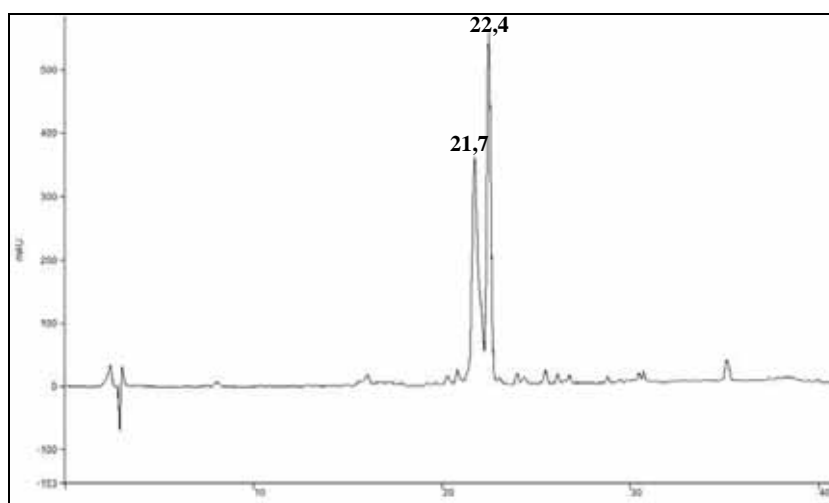


Figura 10. Cromatograma do ALC 1 ($R_f = 0,22$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 μ L, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

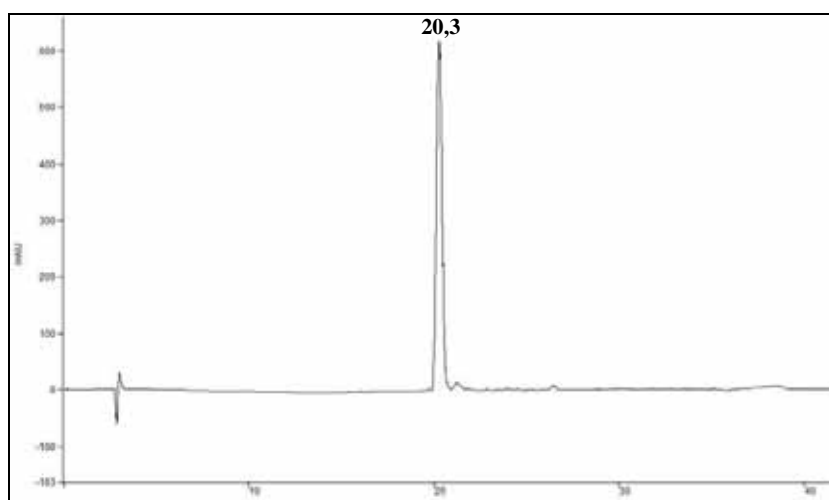


Figura 11. Cromatograma do ALC 2 ($R_f = 0,33$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 μ L, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

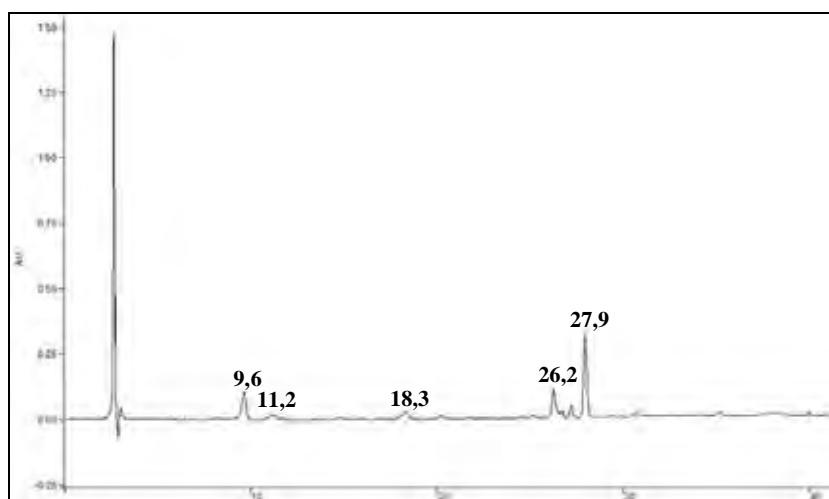


Figura 12. Cromatograma do ALC 3 ($R_f = 0,44$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 μ L, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

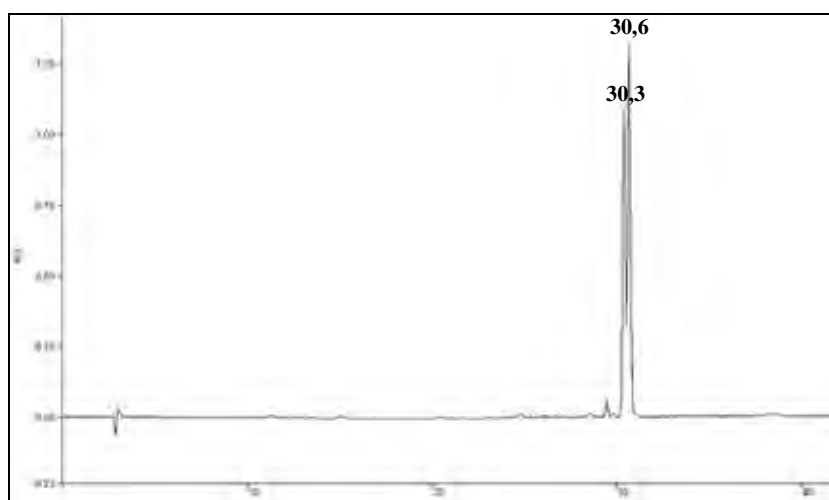


Figura 13. Cromatograma do ALC 4 ($R_f = 0,61$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 μ L, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

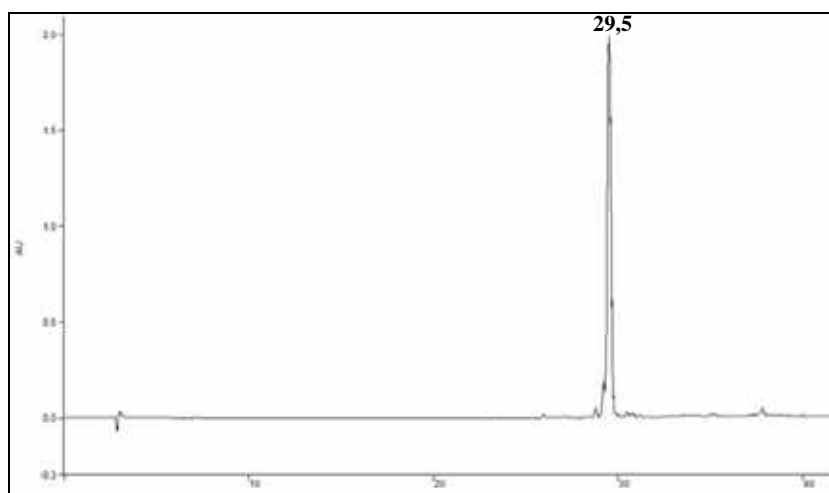


Figura 14. Cromatograma do ALC 5 ($R_f = 0,72$); gradiente (40 min), 35–100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 μ L, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

A análise dos cromatogramas dos ALC 2 (12,3 mg; 0,004 % de rendimento) e ALC 5 (25,1 mg; 0,008 % de rendimento) mostrou que o isolamento e purificação por CCD preparativa foi eficiente, uma vez que os cromatogramas não apresentaram detecção de outros compostos, após uma varredura em diversos comprimentos de onda. Desta forma, ambos os alcalóides foram submetidos a análises espectroscópicas para determinação estrutural e bioensaios (SERRANO et al, 2010).

O cromatograma do ALC 3 não foi conclusivo em relação à pureza do alcalóide, pois foi observada a absorção de outras substâncias com intensidades grandes, não permitindo identificar qual dos picos se referia ao ALC 3. Desta forma, foi necessário

reavaliá-lo para prover uma melhor purificação, mostrado adiante. A análise dos cromatogramas referentes aos alcalóides **1** e **4** indicou a presença de duas substâncias com tempo de retenção assaz, próximos e de mesma intensidade (Figuras 10 e 13). Devido às características dessas picos cromatográficos e comparando estes dados com os obtidos em CCD, pode-se inferir que estes alcalóides possuem estruturas químicas muito semelhantes, podendo ser pares homólogos ou isoméricos.

4.1.1. Isolamento e purificação das misturas alcaloídicas ALC 1 e ALC 4 por CLAE

Para a separação da mistura dos alcalóides **1** e **4** foi utilizada uma coluna semipreparativa (Phenomenex Synergi–Hydro–RP 4 μ m, 100 x 21,2 mm). Como não havia um protocolo de separação nem substâncias padrões para uma possível orientação, foi preciso otimizar uma condição cromatográfica para as misturas alcaloídicas. Foram variados dois parâmetros para encontrar uma condição adequada: força de eluição da FM no modo isocrático e fluxo da corrida cromatográfica.

Com base no tempo de retenção dos ALC 1 e ALC 4 no gradiente exploratório supracitado nas figuras 10 e 13, foi estimado a porcentagem de metanol presente na corrida quando os alcalóides foram detectados. Partindo desta referência, a força de eluição da FM foi variada até encontrar uma melhor resolução. Depois, fixou-se a melhor porcentagem de metanol na FM e variou os valores dos fluxos na corrida cromatográfica. Deste modo, foi possível otimizar as condições para as duas misturas, sendo elas: mistura do ALC 1 – 80 % MeOH (isocrático) em 80 minutos com três injeções intercaladas e fluxo de 5,5 mL/min (Figura 15) – mistura do ALC 4 – 75 % MeOH (isocrático) em 30 minutos e fluxo de 5,5 mL/min (Figura 16).

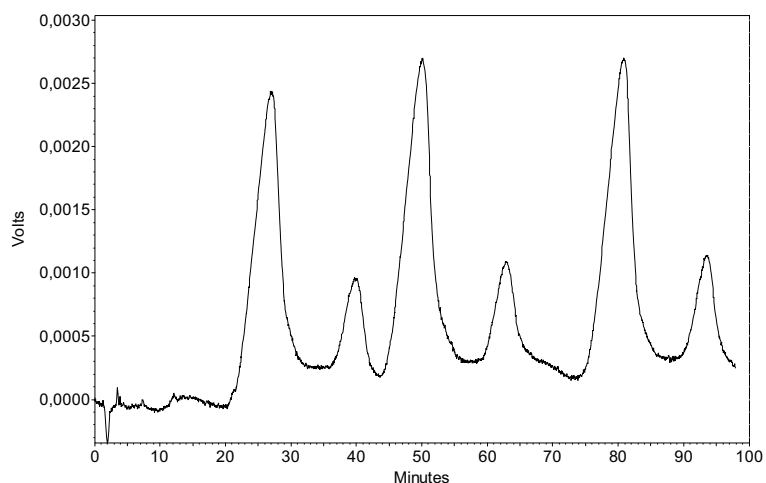


Figura 15. Cromatograma da condição otimizada da mistura do ALC 1; isocrático (80 min com três injeções intercaladas), 80 % de MeOH, C = 48,0 mg/mL, vol. Inj. 50 μ L, fluxo: 5,5 mL/min e detector UV 286 nm.

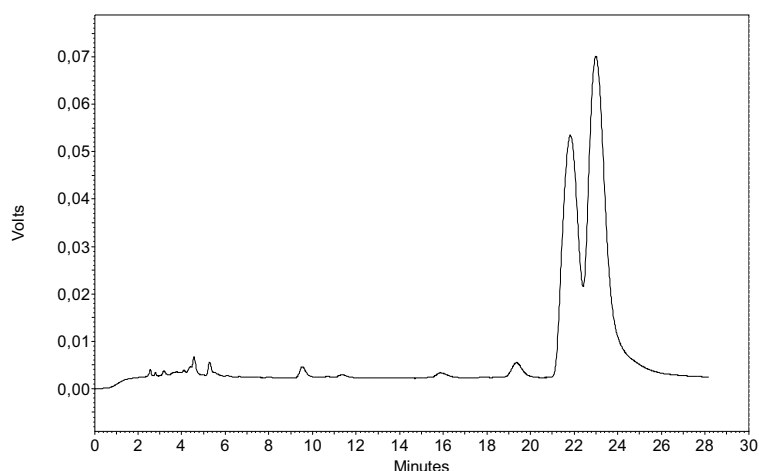


Figura 16. Cromatograma da condição otimizada da mistura do ALC 4; isocrático (30 min), 75 % de MeOH, C = 42,0 mg/mL, vol. Inj. 50 μ L, fluxo: 5,5 mL/min e detector UV 286 nm.

Após a separação foram obtidas 13,4 mg do ALC 1a (0,004 % de rendimento), 31,2 mg do ALC 1b (0,01 % de rendimento), 21,0 mg do ALC 4a (0,007 % de rendimento) e 23,4 mg do ALC 4b (0,008 % de rendimento). Estes resultados mostram a importância e eficiência na utilização das técnicas cromatográficas para o isolamento e purificação de metabólitos secundários.

4.1.2. Isolamento e purificação do ALC 3 por CLAE

Visto que a fração ALC 3 analisada por CLAE estava impura, difícil de identificar a substância de interesse e em quantidade ínfima, sendo necessário repetir todo o procedimento para angariar mais massa, a solução foi verificar se as substâncias alcaloídicas também estavam presentes em outras subfrações da partição líquido/líquido. Devido à semelhança entre as polaridades dos solventes diclorometano, acetato de etila e a hidrometanólica, as duas últimas subfrações foram submetidas ao mesmo procedimento de extração ácido/base.

Após a extração ácido/base, obtiveram 70,0 mg da fração AcOEt e 30,3 mg da fração Hidrometanólica, as quais foram analisadas por CCD nas mesmas condições que a fração CH₂Cl₂ e reveladas com o reagente de Dragendorff. As manchas amareladas características de substâncias alcaloídicas foram observadas apenas na fração AcOEt, totalizando três manchas com R_f iguais a 0,22; 0,33 e 0,44. Quando submetida à análise por CLAE, as três substâncias apresentaram tempos de retenção iguais a 13,8; 20,6; 21,7 e 22,3 minutos. Tais resultados indicaram que os respectivos alcalóides eram o ALC 3, ALC 2, ALC 1a e ALC 1b (Figura 17).

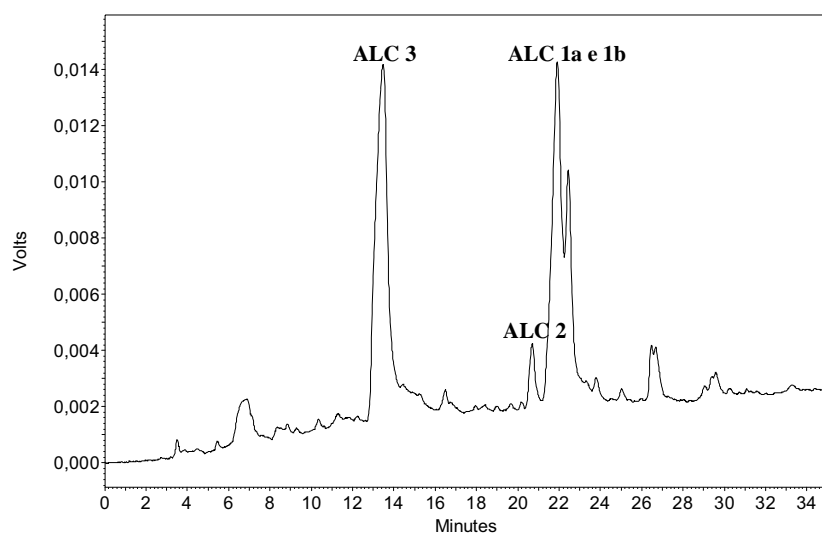


Figura 17. Cromatograma da fração alcaloídica AcOEt; gradiente (35 min), 35 - 100% de MeOH - H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

Para a separação e purificação do alcalóide **3** e visando obter mais massa dos alcalóides **1a**, **1b** e **2**, foi otimizada uma condição cromatográfica melhor para estes, uma vez que o ALC **3** já estava em condições de ser isolado. Após a obtenção da nova condição (Figura 18), 69,0 mg da fração alcaloídica AcOEt foram submetidas à análise

por CLAE utilizando uma coluna semi-preparativa (Phenomenex Synergi-Hydro-RP 4 μ m, 100 x 21,2 mm).

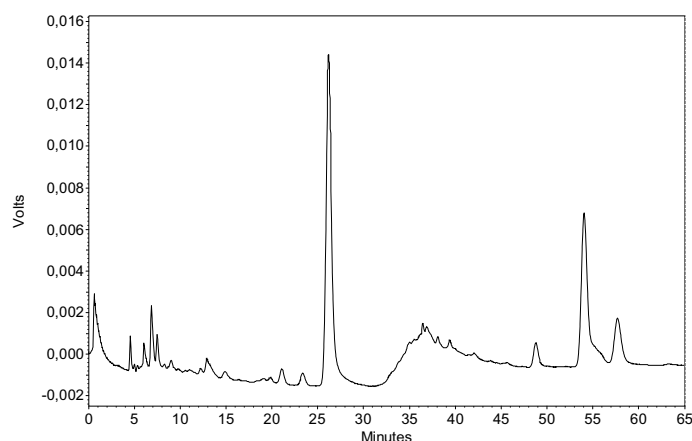


Figura 18. Cromatograma da condição otimizada para separação do alcalóide **3**, **1a**, **1b** e **2** na fração alcaloídica AcOEt; isocrático (20 min), 40 % MeOH; gradiente (5 min), 40 % a 65 % MeOH; isocrático (20 min) 65 % MeOH, C = 35,0 mg/mL, vol. Inj. 50 μ L, fluxo: 5,5 mL/min e detector UV 286 nm.

Após a coleta e evaporação das frações em rotaevaporador, foram obtidos 13,4 mg do alcalóide **3** (0,004% de rendimento), 2,1 mg do alcalóide **2**, 10,2 mg e 2,7 mg dos alcalóides **1a** e **1b**, respectivamente. Novamente a técnica cromatográfica mostrou-se hábil e muito importante para o isolamento e purificação de metabólitos secundários de plantas.

4.2. Elucidação estrutural dos alcalóides isolados de *Senna multijuga*

Para a elucidação estrutural dos sete alcalóides isolados utilizou-se das análises dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) unidimensional (^1H , ^{13}C e DEPT 90 e 135); RMN bidimensional (COSY, HMQC, HMBC); dos espectros na região do Infravermelho (IV) e Ultravioleta (UV); e dos espectros de massas.

4.2.1. Elucidação estrutural do alcalóide **5**

A substância **5** foi isolada na forma de um sólido incolor (i.f. 103–105 °C), que ao ser analisada por CCD e revelada com o reagente de Dragendorff, apresentou coloração

amarela ($R_f = 0,72$), característica de substâncias alcalóidicas, sendo um composto inédito na literatura e denominado de 7'-*multijuguinona* (Figura 19).

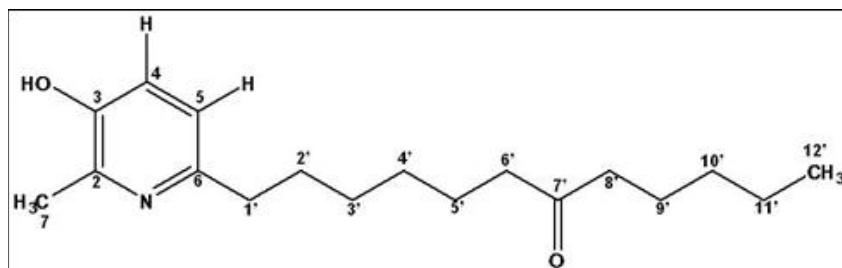
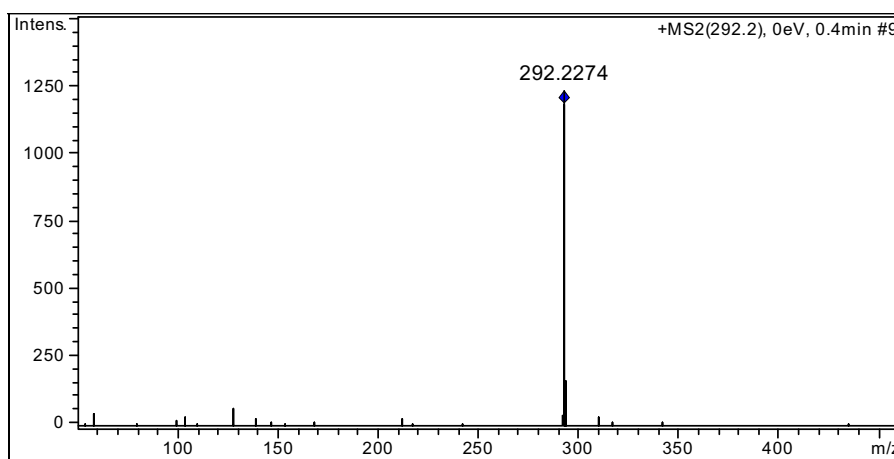
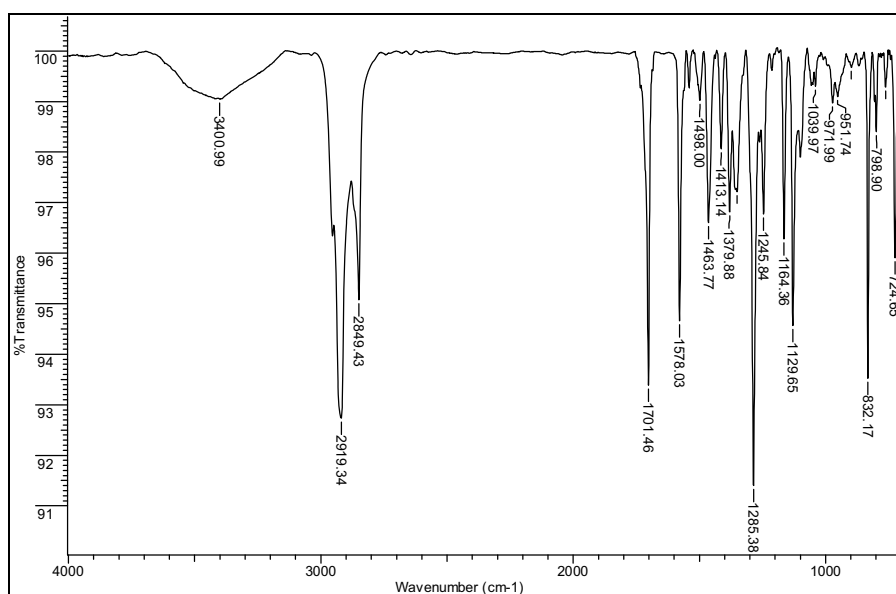


Figura 19. Estrutura química do alcalóide 5.

Quando submetida à análise por EM de alta resolução, modo positivo foi possível estabelecer sua fórmula molecular como sendo $C_{18}H_{29}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco. O pico referente ao íon *quasi*-molecular (*aduto cationizado com próton*) foi observado em m/z 292,2274 $[M+H]^+$, calculado para $C_{18}H_{30}NO_2^+$, 292,2271 (Espectro 1). O espectro na região de UV, com absorção máxima em 222 nm ($\epsilon = 6654,3$) e 286 nm ($\epsilon = 4294,3$), sugere a presença de uma cetona e um anel aromático substituído como grupos cromóforos, respectivamente. As bandas de absorção na região IV foram atribuídas para os grupos funcionais hidroxílicos (3401 cm^{-1}), carbonílico (1701 cm^{-1}), e o anel piridínico ($1578, 1498$ e 1464 cm^{-1}) (Espectro 2).

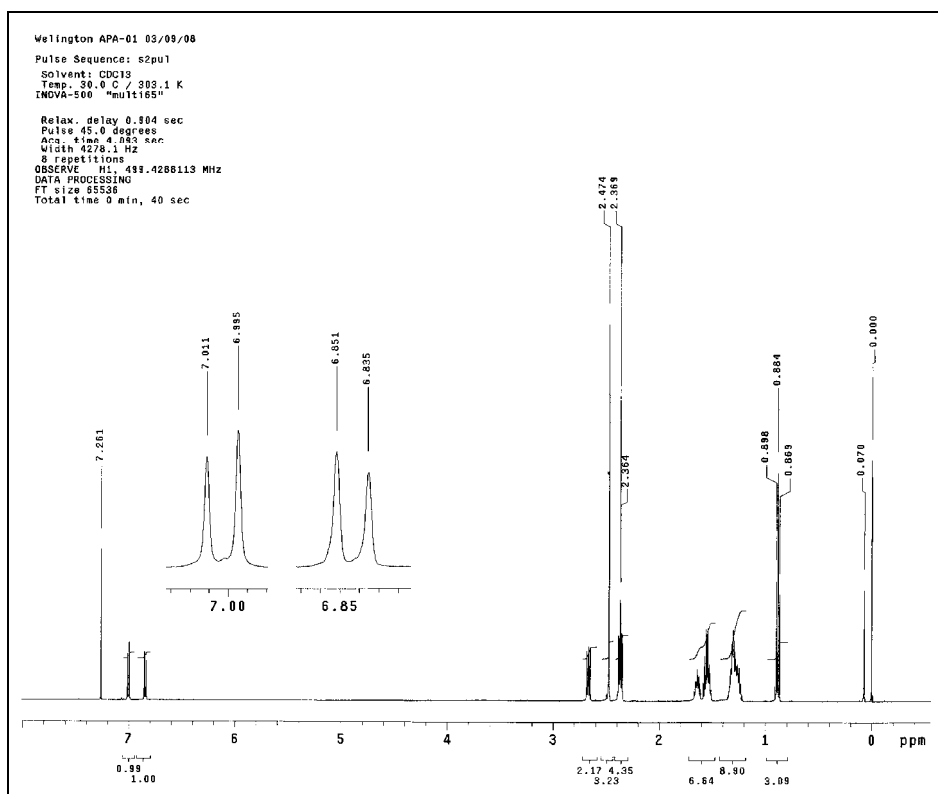


Espectro 1. IES-EM alta resolução do alcalóide 5.

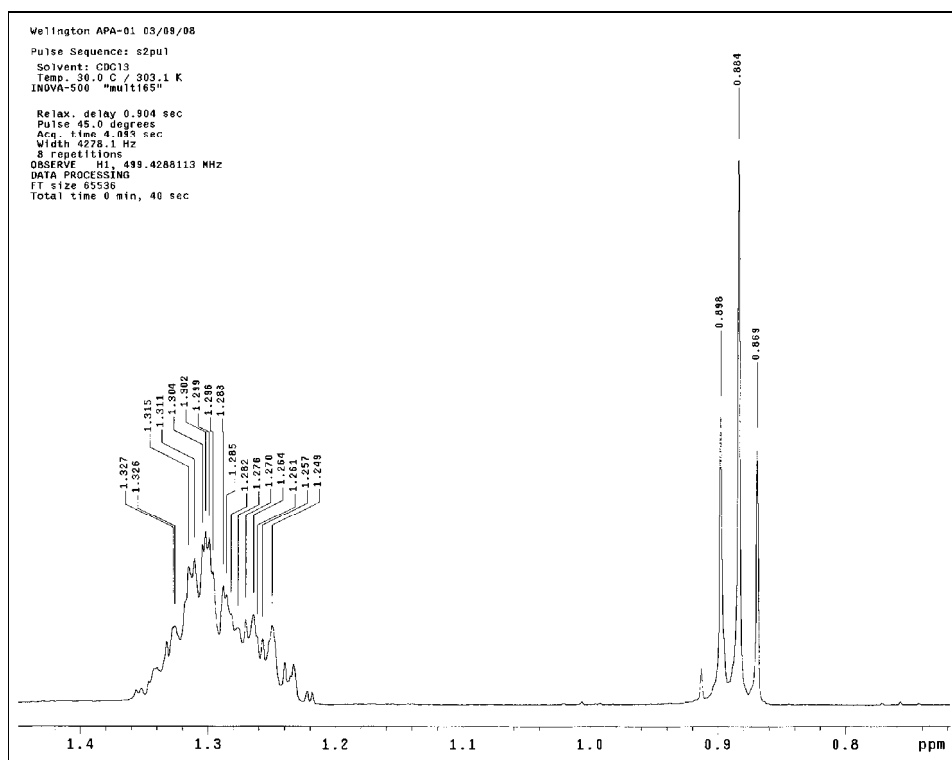


Espectro 2. Espectro na região de IV do alcalóide **5**.

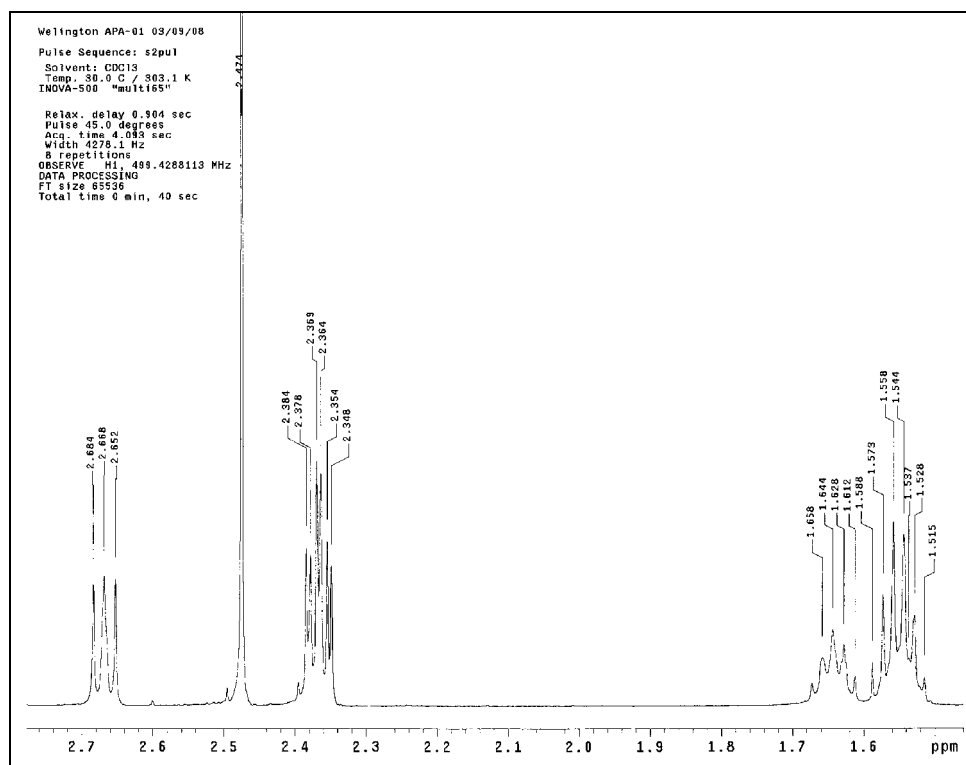
A análise do espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos δ 6,84 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,00 (1H, $J = 8$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos em posição *orto*. Um singleto em δ 2,47 (3H), característico de metila ligada a um sistema aromático e um tripleto em δ 0,88 (3H) referente a um grupo metílico terminal, ligado a um metilênico pertencente a uma cadeia alquílica longa. Foram observados ainda três tripletos; δ 2,67 (2H), δ 2,36 (2H) e δ 2,37 (2H), um quintuplo em δ 1,64 (2H) e dois multipletos em δ 1,55 e δ 1,30, integrando para quatro e oito hidrogênios, respectivamente (Espectros 3, 4 e 5; Tabela 2).



Espectro 3. Espectro de RMN de ^1H de **5** (500 MHz, CDCl_3).

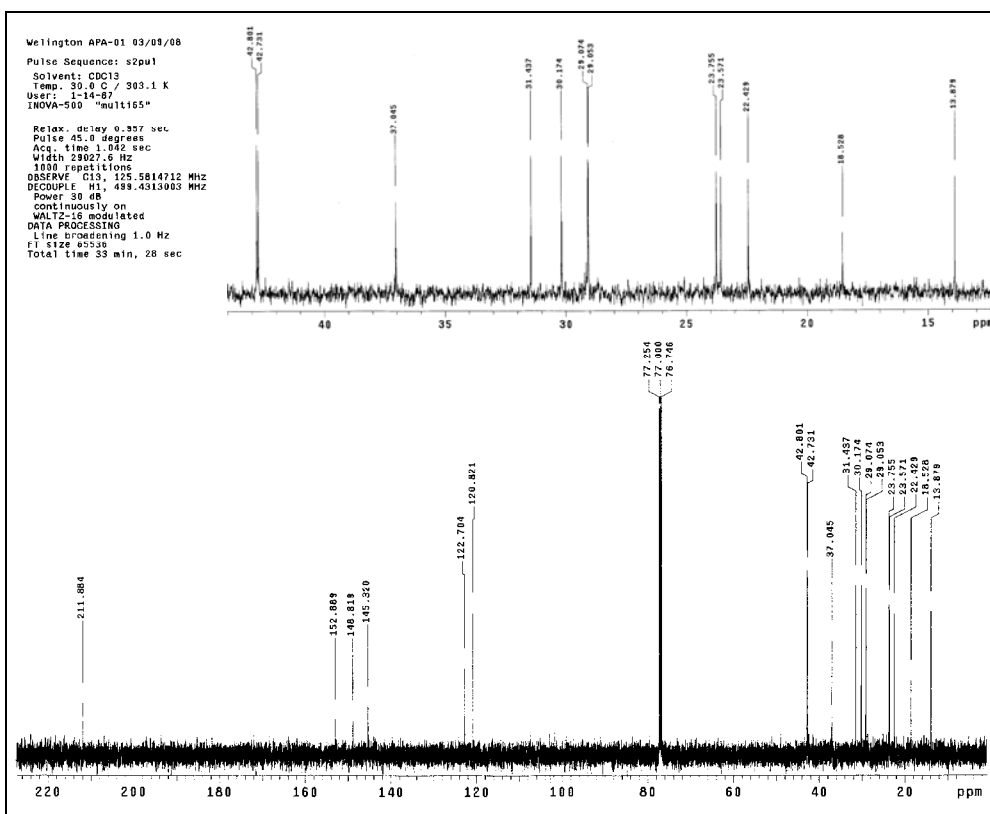


Espectro 4. Ampliação do espectro 3 (δ 0,8–1,4).

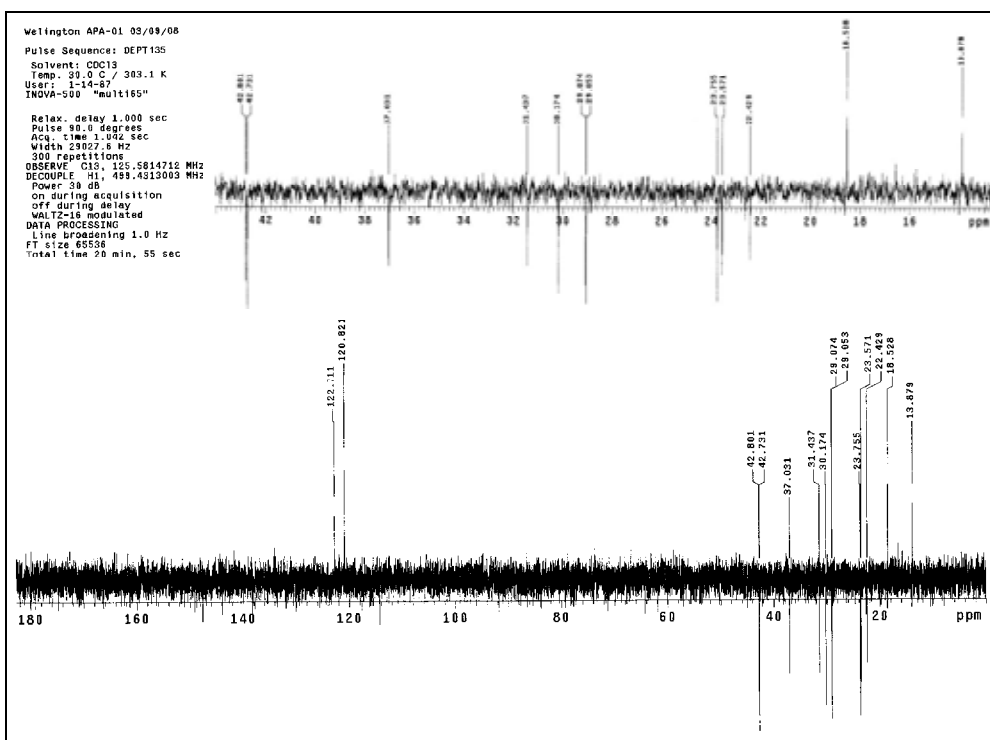


Espectro 5. Ampliação do espectro 3 (δ 1,5–2,7).

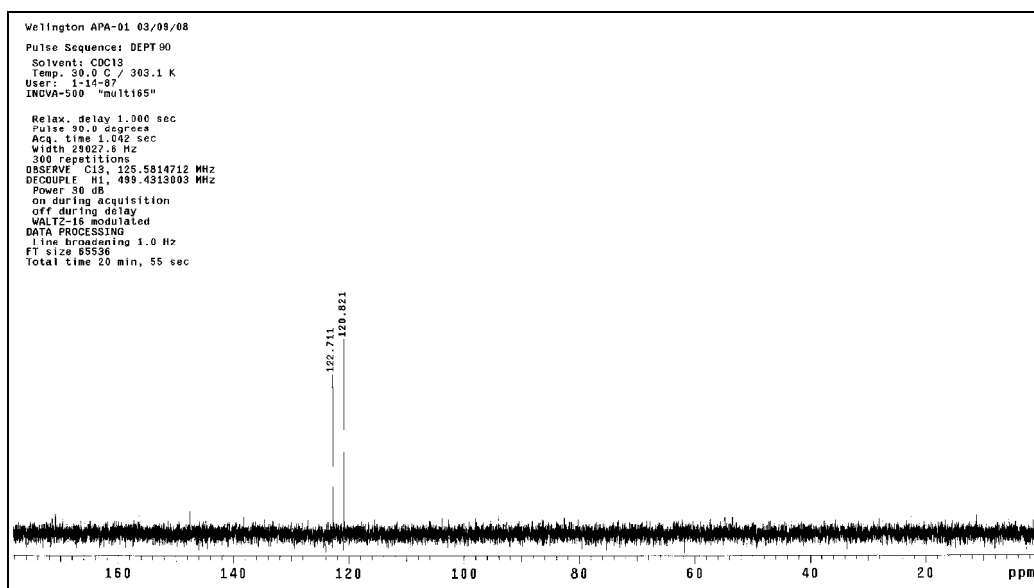
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários (δ 145,3; 148,8 e 152,9), com deslocamento químico característico de carbonos ligados a átomos mais eletronegativos e dois metínicos δ 120,8 e 122,7. Foi observada ainda a presença de duas metilas δ 13,9 e 18,5, uma carbonila δ 211,9 e dez metilênicos, o que sugere uma cadeia linear longa (Espectros 6, 7 e 8; Tabela 2). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com dados da literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6 trissubstituído.



Espectro 6. Espectro de RMN ^{13}C de **5** (125 MHz, CDCl_3).

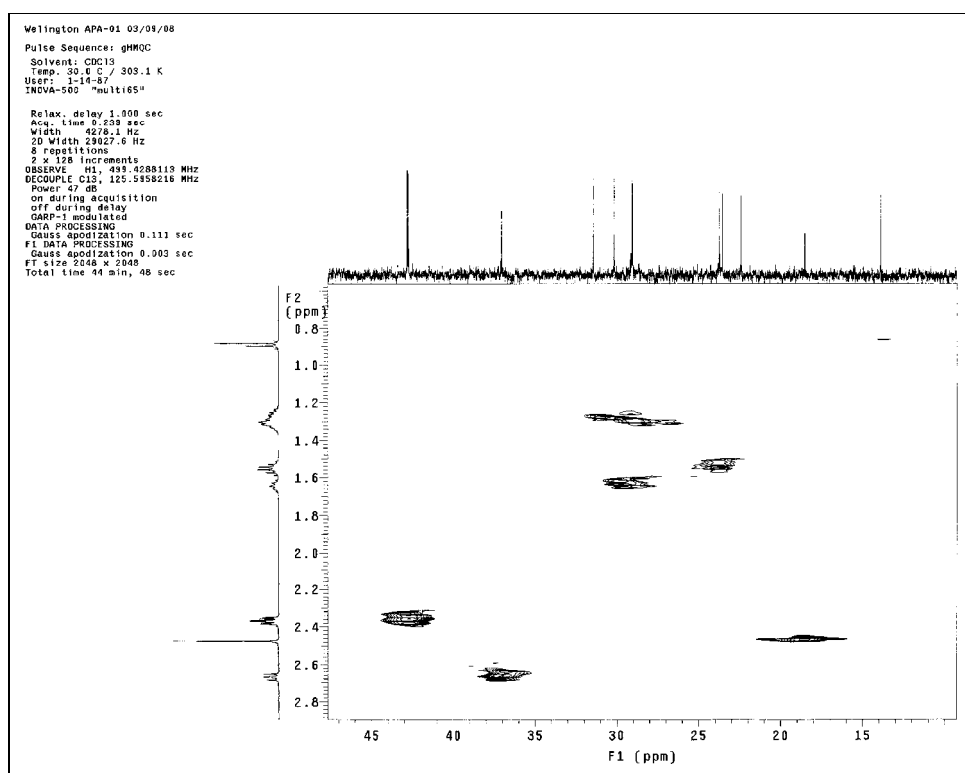


Espectro 7. Espectro de RMN de DEPT 135 de **5** (125 MHz, CDCl_3).

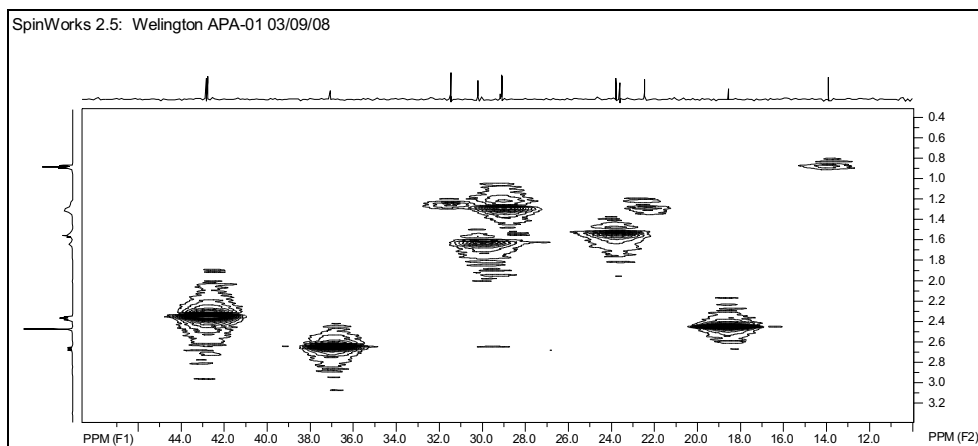


Espectro 8. Espectro de RMN de DEPT 90 de **5** (125 MHz, CDCl₃).

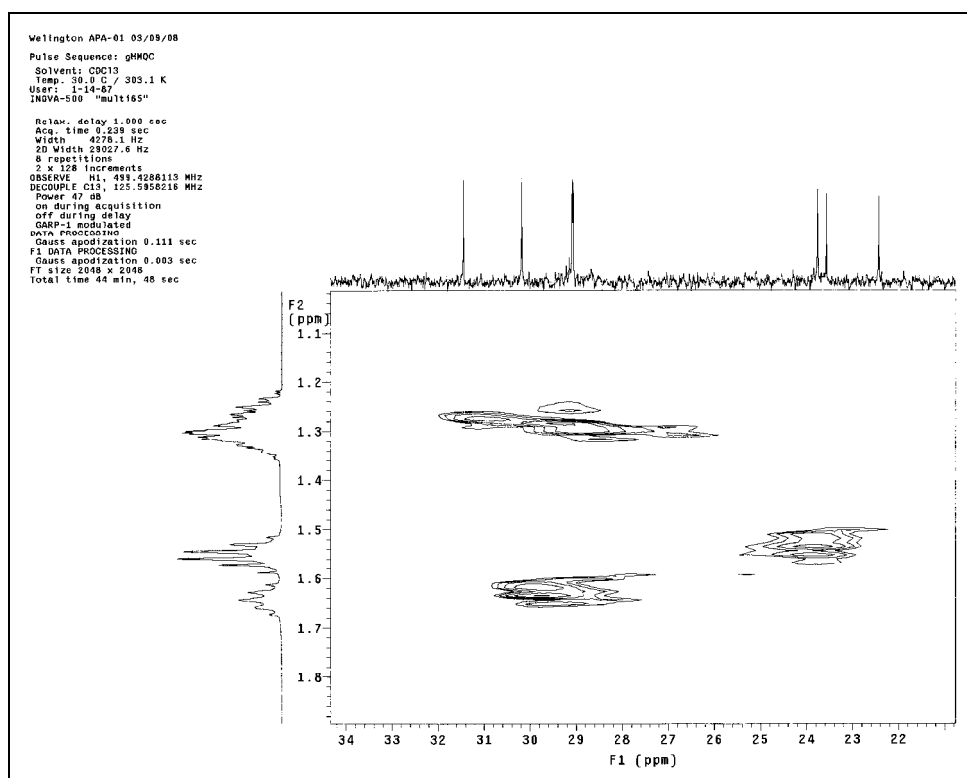
A partir dos experimentos de *g*HMQC foi possível correlacionar os hidrogênios aos respectivos carbonos (Espectros 9–12, Tabela 2).



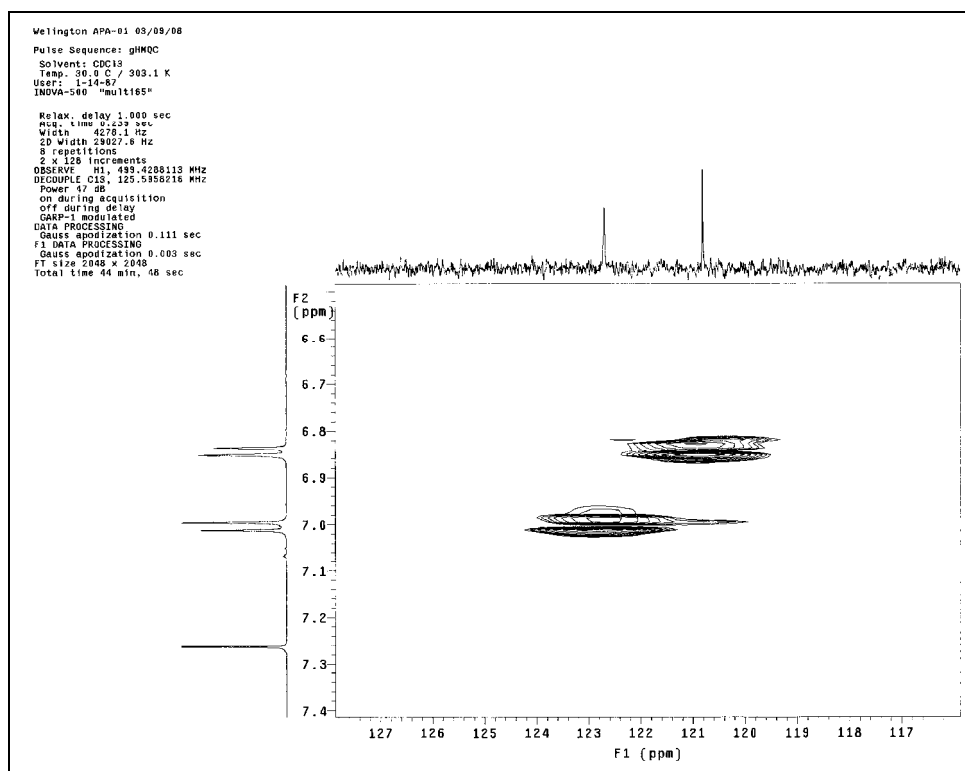
Espectro 9. Mapa de contorno *g*HMQC de **5** (δ 10–45; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 10. Mapa de contorno gHMQC de **5** (δ 12–44; 500 MHz; CDCl_3).

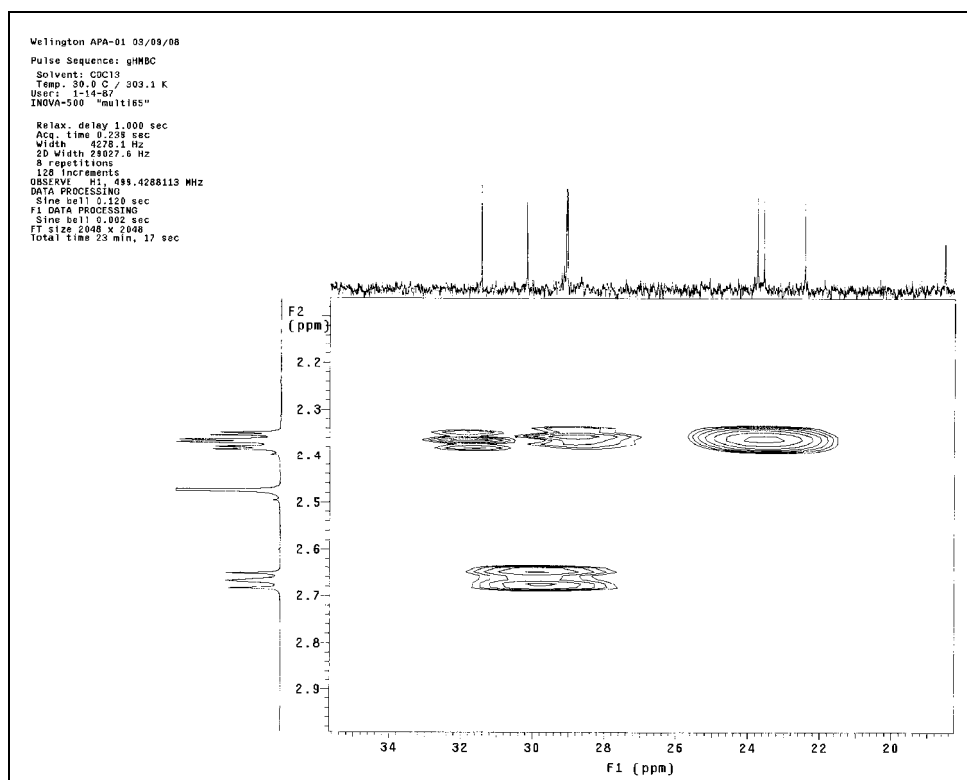


Espectro 11. Mapa de contorno gHMQC de **5** (δ 22–34; 500 MHz; CDCl_3)

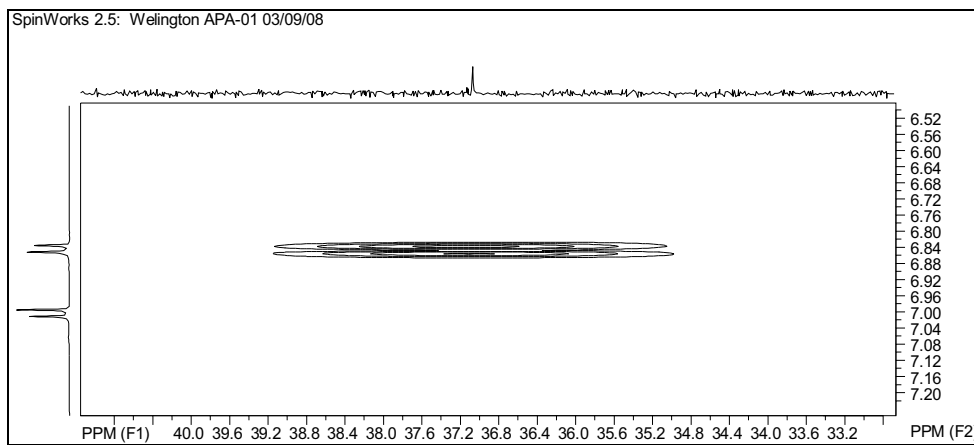


Espectro 12. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 117–127; 500 MHz; CDCl₃).

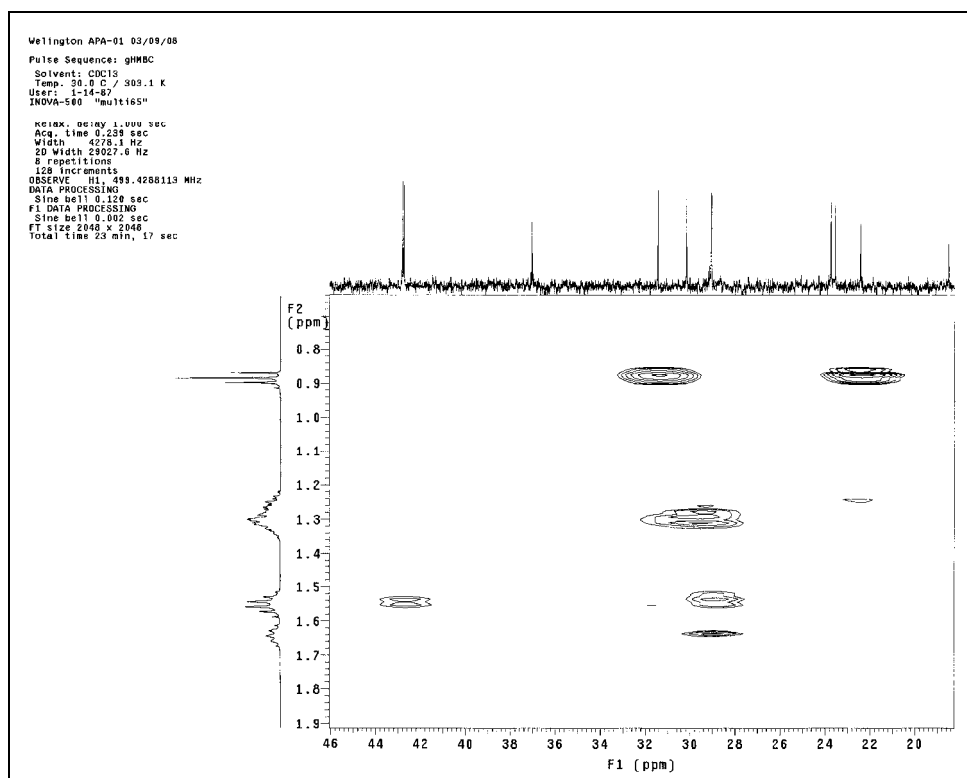
Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,00) e C-2 (3J , 145,3), C-3 (2J , 148,8), C-5 (2J , 120,8) e C-6 (3J , 152,9), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença do grupo hidroxílico ligado. Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,84) e C-3 (3J , 148,8), C-4 (2J , 122,7), C-6 (2J , 152,9) e C-1' (3J , 37,0) e entre H-7 (δ 2,47) e C-2 (145,3) e C-3 (148,8) (Figura 20, Tabela 2). A partir das verificações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,67) e C-5 e H-2' (δ 1,64) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6. A linearidade da cadeia foi confirmada a partir das correlações entre os grupos metilênicos, destacando-se aquelas entre H-5' (3J , 1,55), H-6' (2J , 2,37), H-8' (2J , 2,36), e H-9' (3J , 1,55), com a carbonila (δ 211,9), justificando a sua posição em C-7'. Correlações entre o grupo metílico (H-12', δ 0,88) e C-10' (3J , 31,4) e C-11' (2J , 22,4) e entre H-10' (δ 1,27) e C-9' (2J , 23,5) e C-8' (3J , 42,7), corroboram para a linearidade da cadeia e a posição da carbonila (C-7') (Espectros 13-22, Figura 20, Tabela 2).



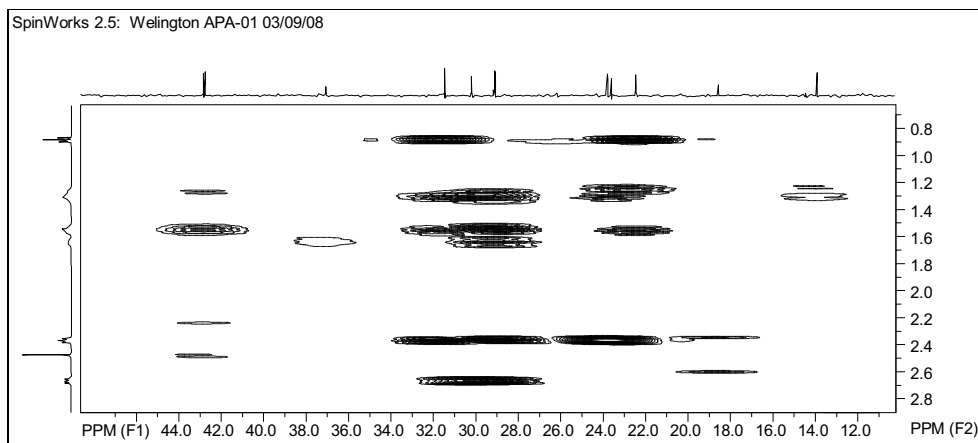
Espectro 13. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 20–34; 500 MHz; CDCl₃).



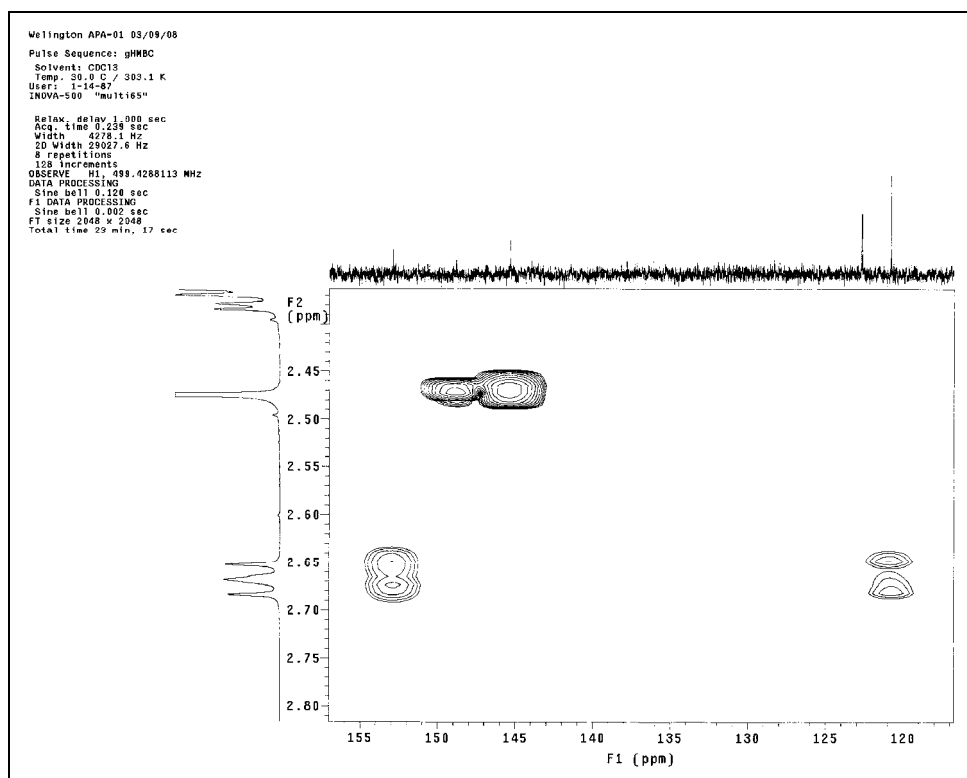
Espectro 14. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 33–40; 500 MHz; CDCl₃).



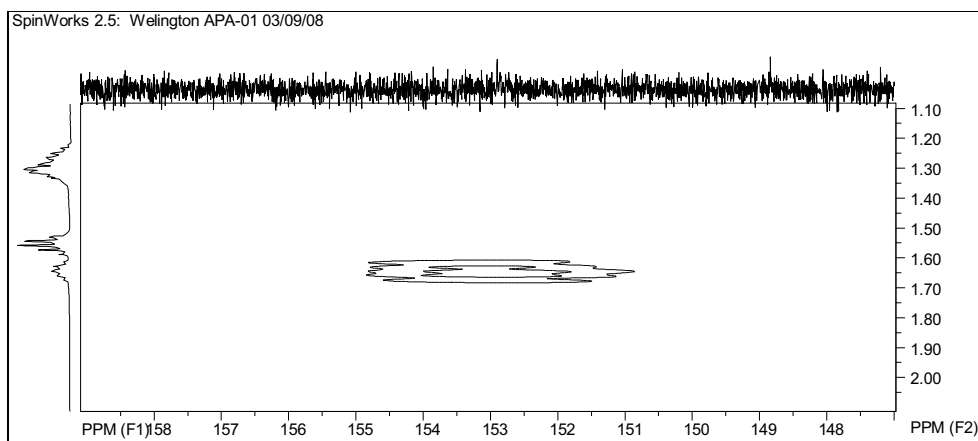
Espectro 15. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 20–46; 500 MHz; CDCl₃).



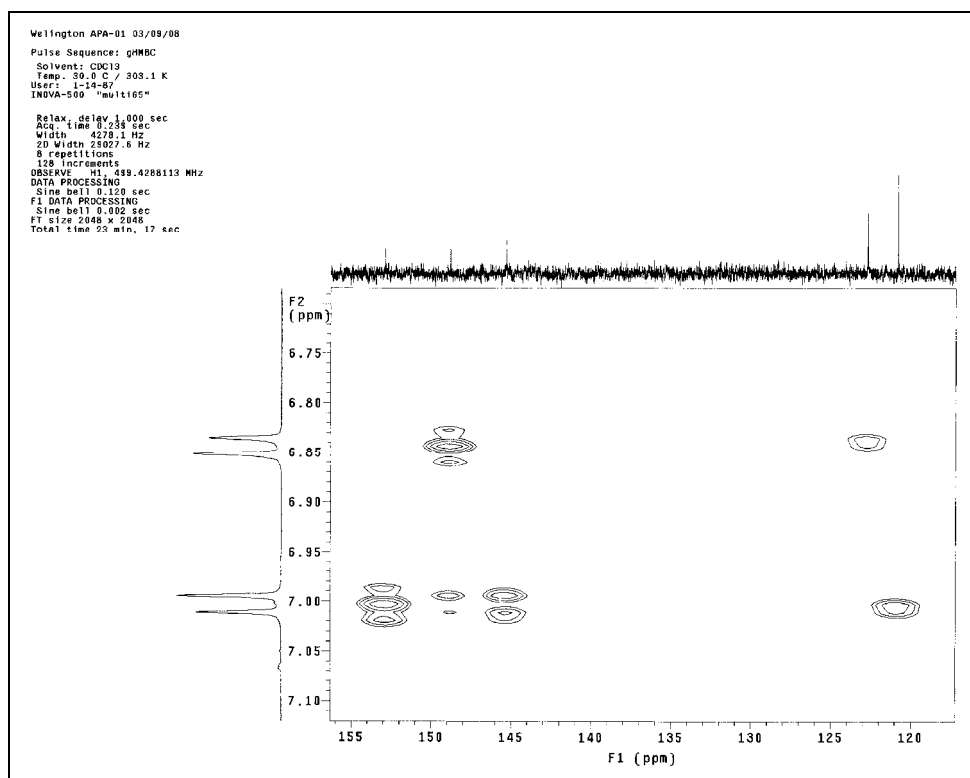
Espectro 16. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 12–44; 500 MHz; CDCl₃).



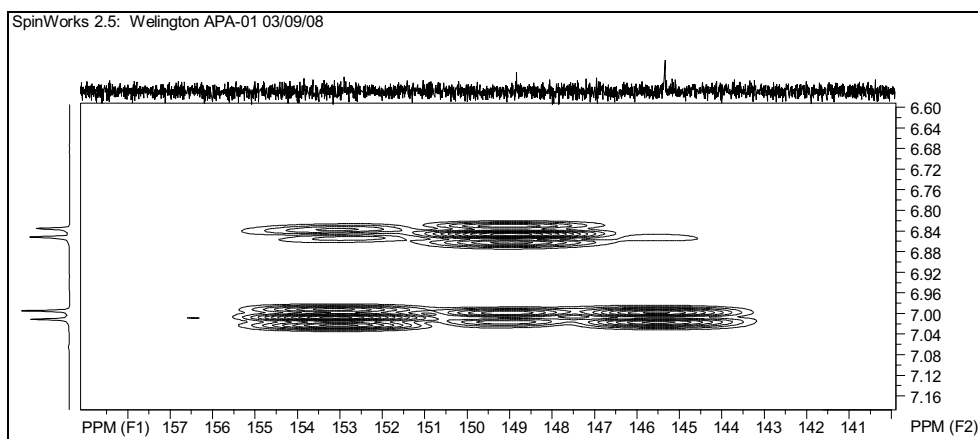
Espectro 17. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 120–155; 500 MHz; CDCl₃).



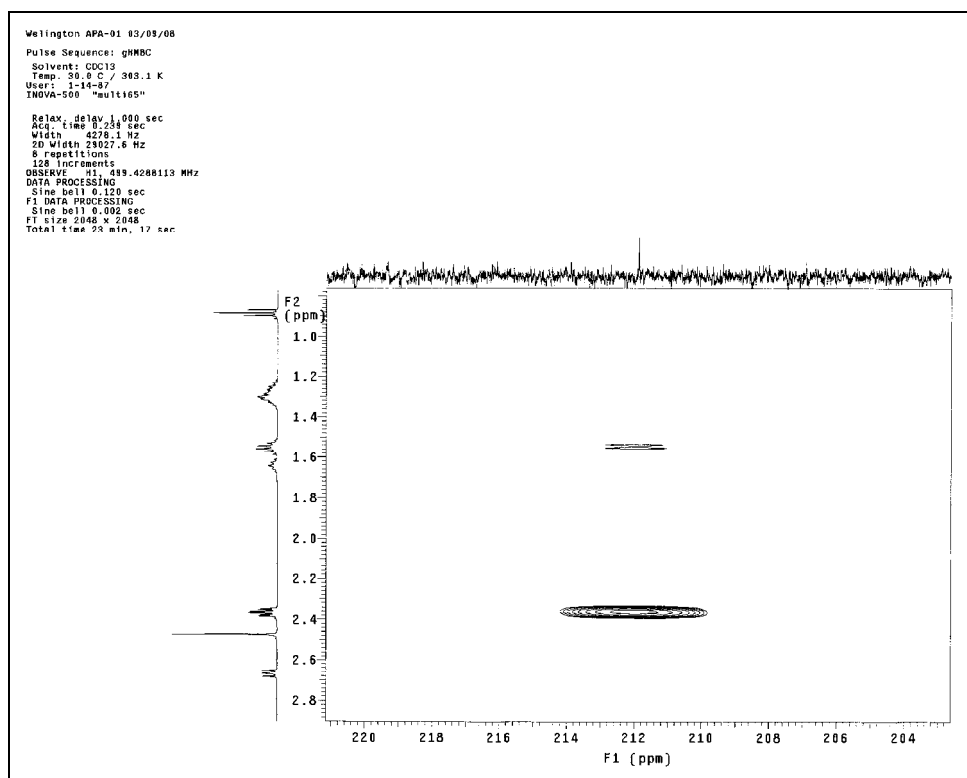
Espectro 18. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 148–158; 500 MHz; CDCl₃).



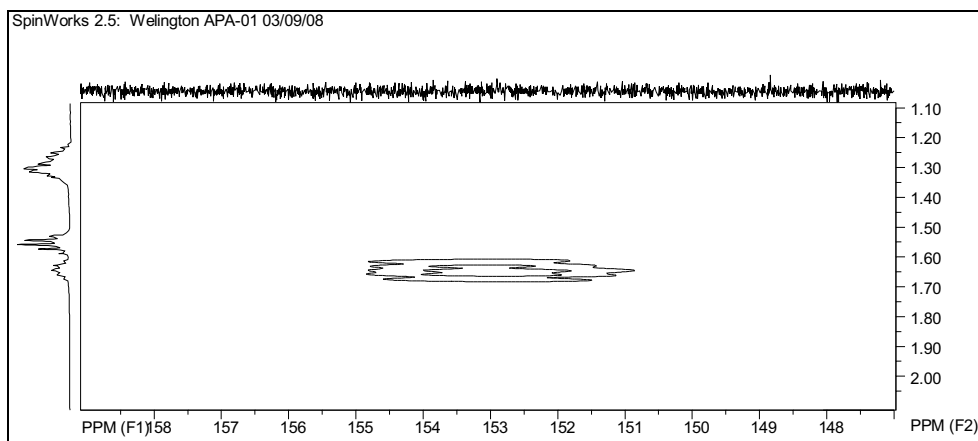
Espectro 19. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 120–155; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 20. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 141–157; 500 MHz; CDCl₃).

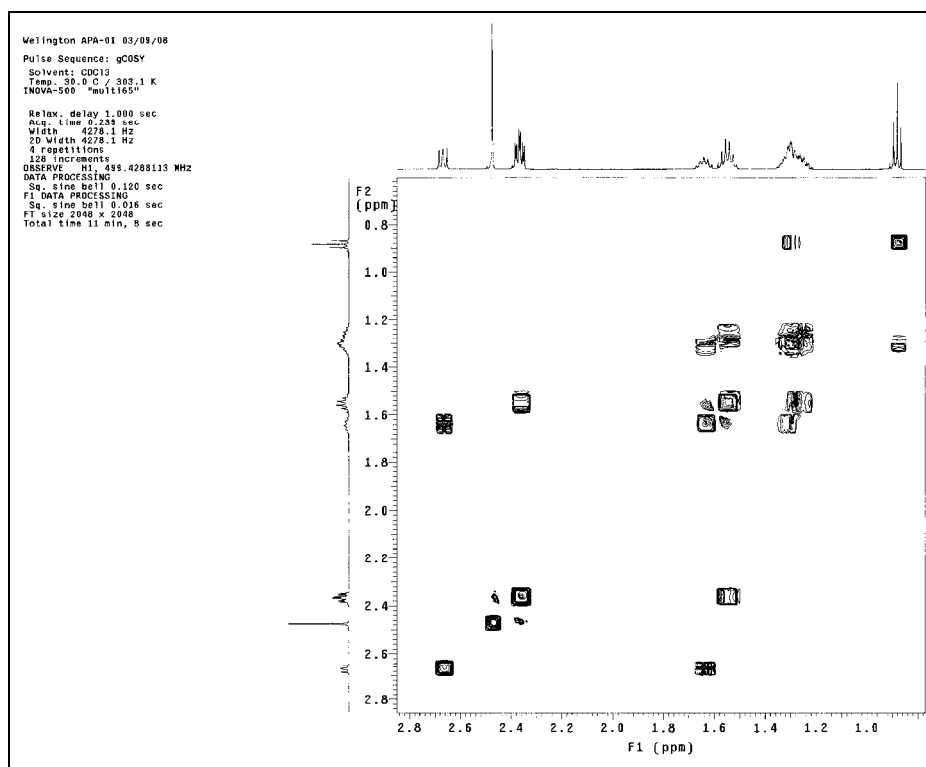


Espectro 21. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 204–220; 500 MHz; CDCl₃).

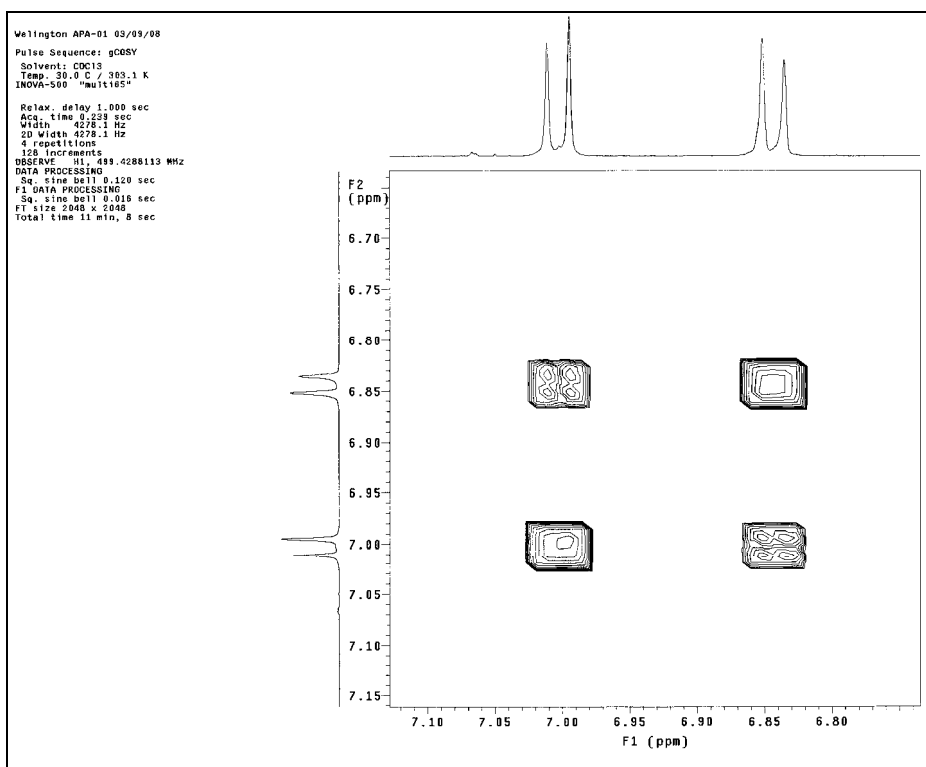


Espectro 22. Mapa de contorno gHMBC de **5** (δ 148–158; 500 MHz; CDCl₃).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY ajudam a confirmar a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, destacam-se as correlações entre H-1' e H-2', H-5' e H-6', H-8' e H-9', H-9' e H-10', H-11' e H-12' (Espectros 23 e 24, Tabela 2).



Espectro 23. Mapa de contorno gCOSY de **5** (δ 1,0–2,8; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 24. Mapa de contorno gCOSY de **5** (δ 6,8–7,1; 500 MHz; CDCl₃).

Tabela 2. Dados de RMN de **5** em CDCl₃^a

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

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

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

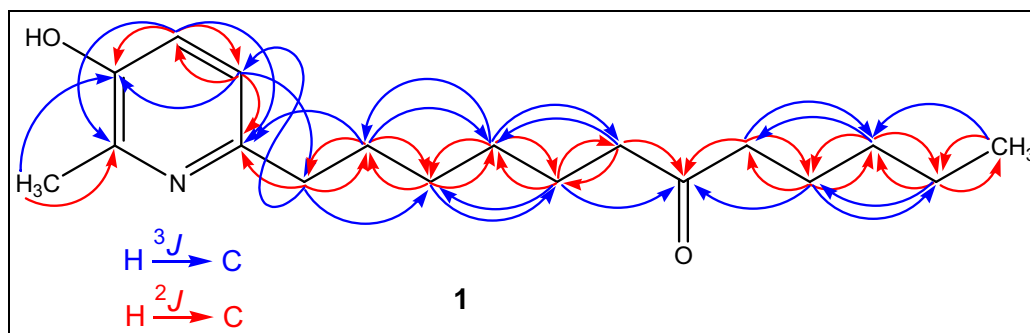
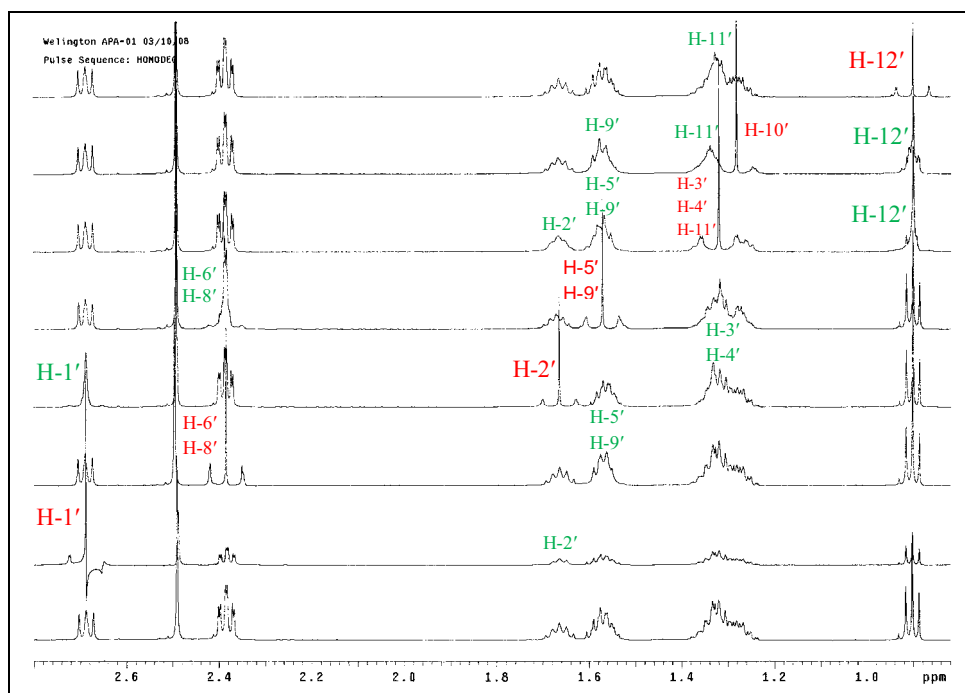


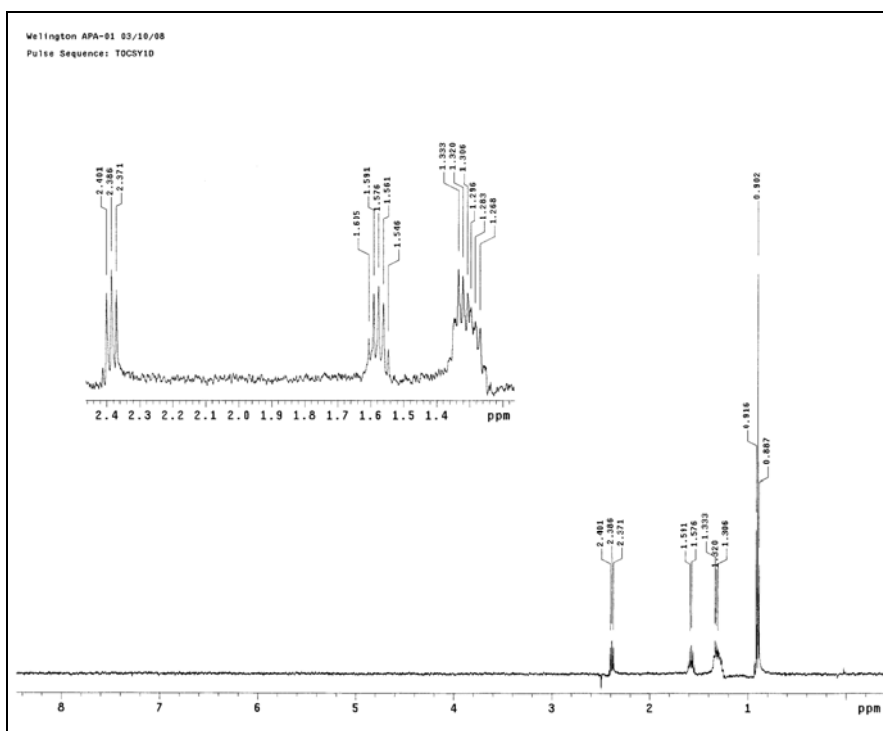
Figura 20 . Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **5**.

A partir dos espectros de HOMODEC foram atribuídas algumas correlações de hidrogênios que estavam sobrepostos (Espectro 25).

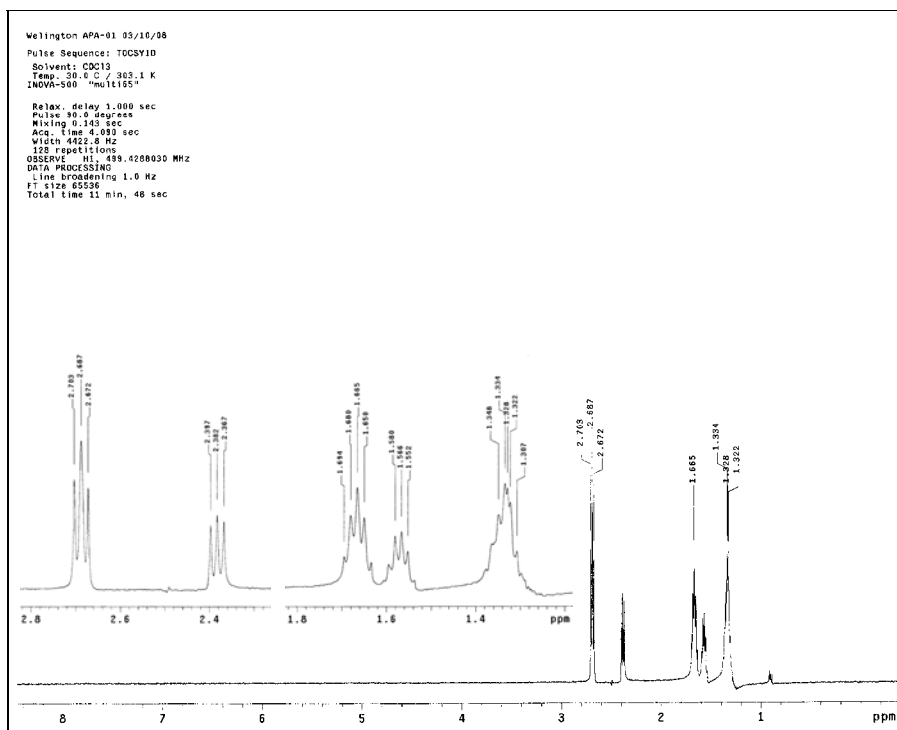


Espectro 25. Espectro de RMN de HOMODEC de **5** (H-irradiado, H-desacoplado) (500 MHz, CDCl_3).

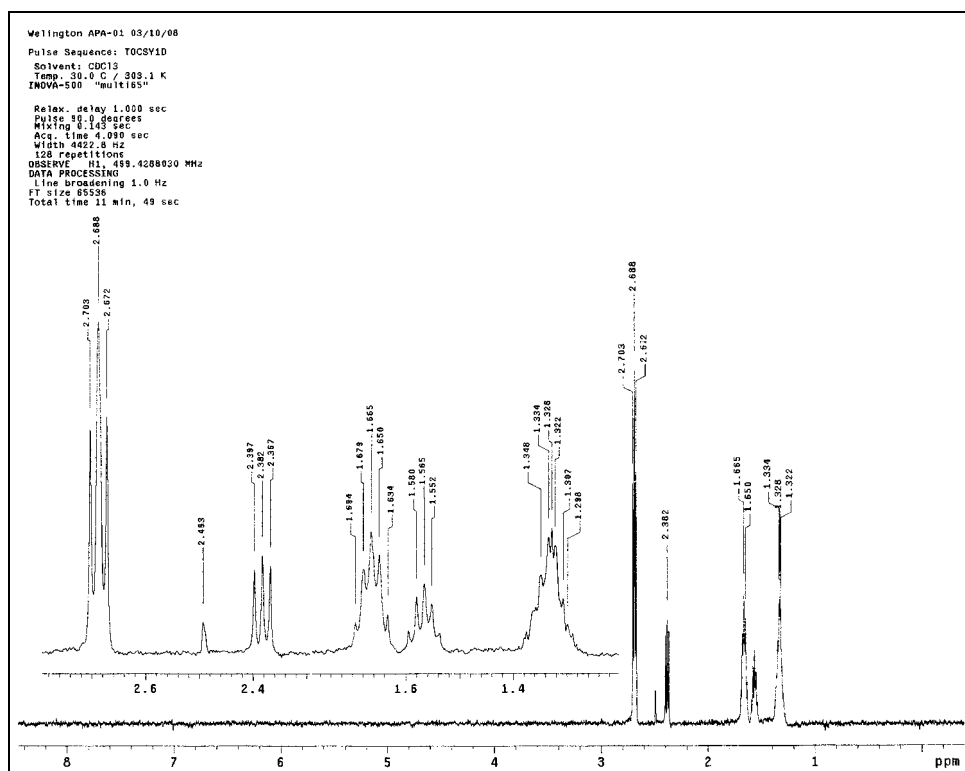
Através do experimento de RMN de TOCSY 1D foi observada a transferência de magnetização entre os hidrogênios com mesmo sistema de spins, ou seja, entre hidrogênios vicinais. Primeiramente foi irradiado H-12' (δ 0,88) e observada à transferência de magnetização através de H-11' (δ 1,30), H-10' (δ 1,27), H-9' (δ 1,55) e H-8' (2,37) (Espectro 26). Em seguida foi irradiado H-2' (δ 1,64) e observada à transferência de magnetização através de H-1' (δ 2,67), H-3' (δ 1,30), H-4' (δ 1,30), H-5' (δ 1,55) e H-6' (δ 2,37) (Espectro 27). E por último foi irradiado H-1' e observada à transferência de magnetização através de H-2', H-3', H-4', H-5' e H-6' (Espectro 28). Foi possível ainda, observar claramente a multiplicidade desses sinais.



Espectro 26. Espectro de RMN de TOCSY 1D de **5**, irradiando H-12' (δ 0,88; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 27. Espectro de RMN de TOCSY 1D de **5**, irradiando H-2' (δ 1,64; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 28. Espectro de RMN de TOCSY 1D de **5**, irradiando H-1' (δ 2,67; 500 MHz; CDCl_3).

4.2.2. Elucidação estrutural do alcalóide **2**

O composto **2** foi isolado na forma de um sólido branco (i.f. 71–73 °C), que ao ser analisado por CCD e revelado com o reagente de Dragendorff, também apresentou coloração amarela característica de alcalóide, sendo também uma substância inédita na literatura que foi chamada de *12'-hidroxi-7'-multijuguinona* (Figura 21).

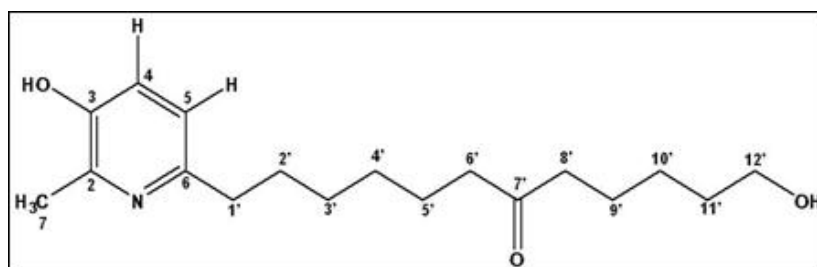
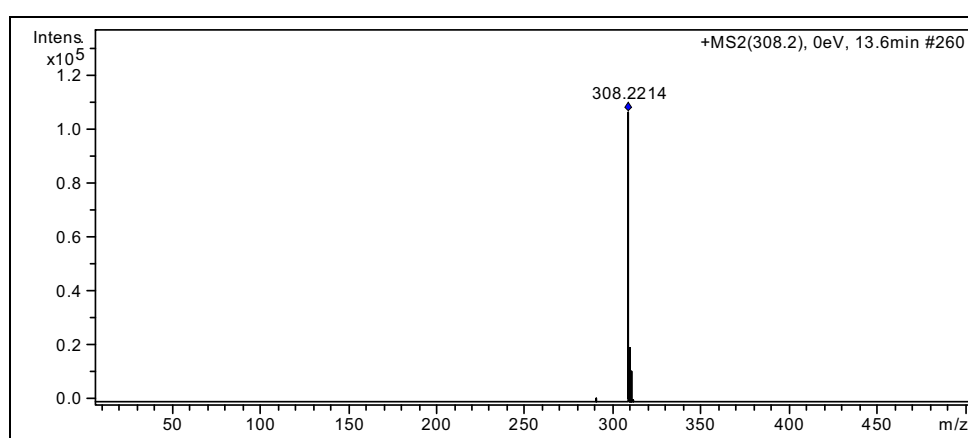


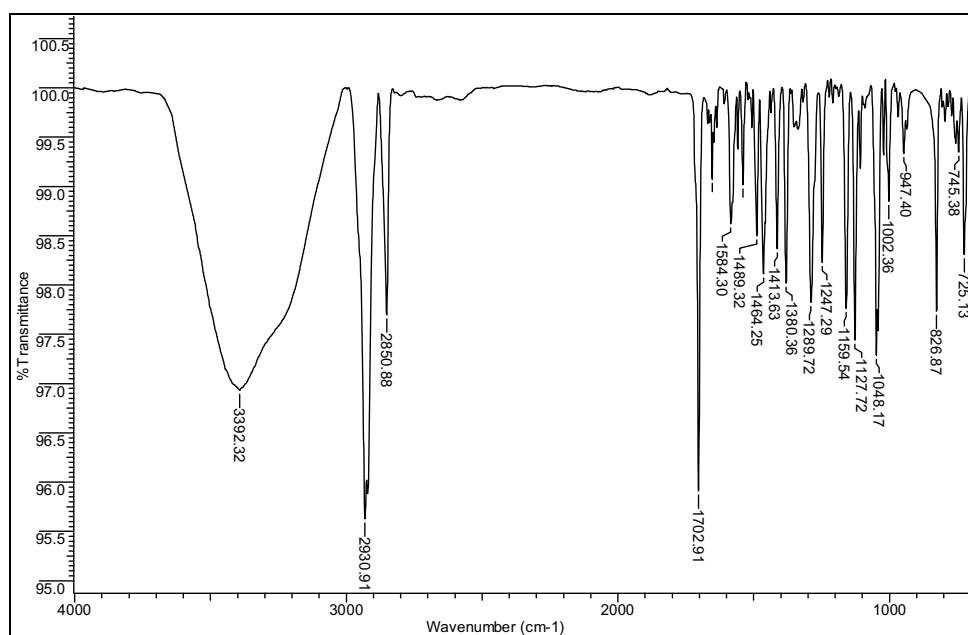
Figura 21. Estrutura química do alcalóide **2**.

Após a análise por EM foi possível identificar o pico do íon *quasi*-molecular (*aduto cationizado por próton*) em m/z 308,2226 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{NO}_3^+$,

308,2220), determinando assim a fórmula molecular do composto com um índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco e sendo 16 unidades de massa maior que a da substância **5** (Espectro 29). O espectro na região de IV revelou uma banda referente a uma carbonila em 1703 cm^{-1} , três bandas referentes ao anel piridínico em 1584 , 1489 e 1464 cm^{-1} e um grupo hidroxílico em 3392 cm^{-1} (Espectro 30). O espectro na região de UV, com absorção máxima em 222 nm ($\epsilon = 5082,9$) e 286 nm ($\epsilon = 3365,7$), sugere a presença de uma cetona e um anel aromático substituído como grupos cromóforos, respectivamente.

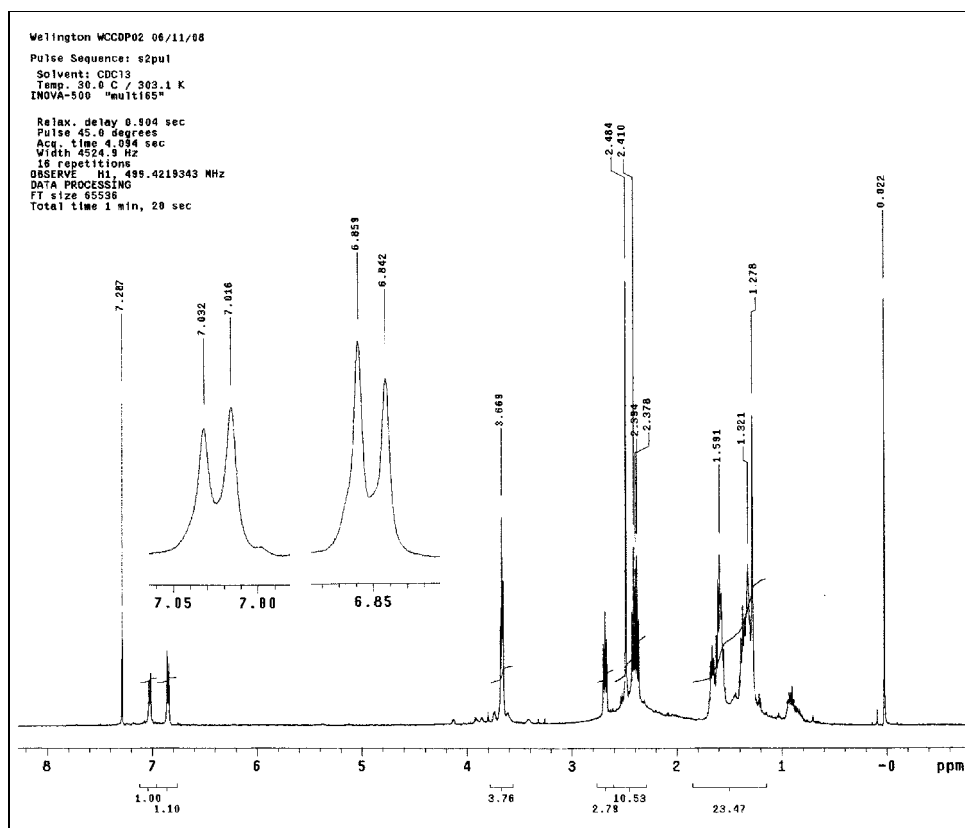


Espectro 29. IES-EM alta resolução do alcalóide **2**.

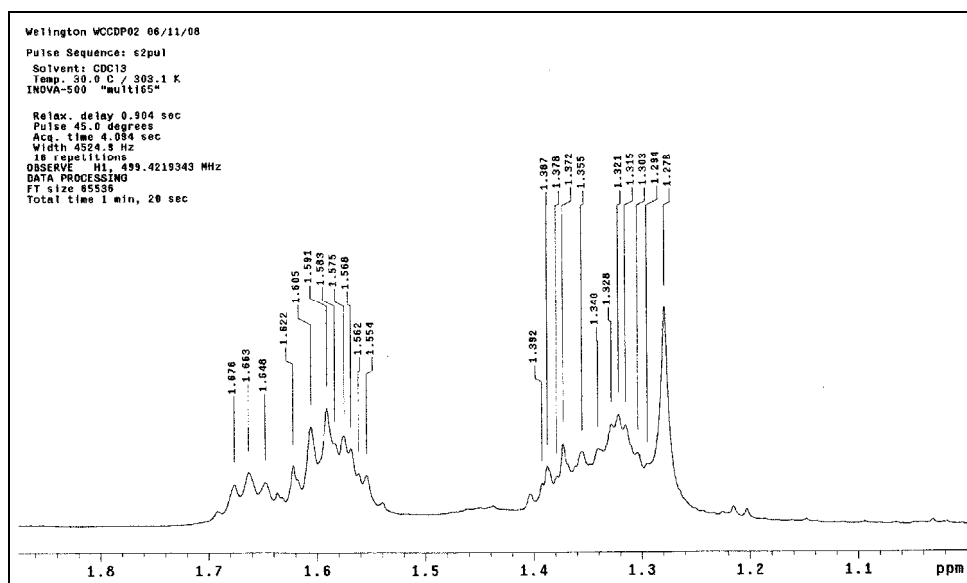


Espectro 30. Espectro na região de IV do alcalóide **2**.

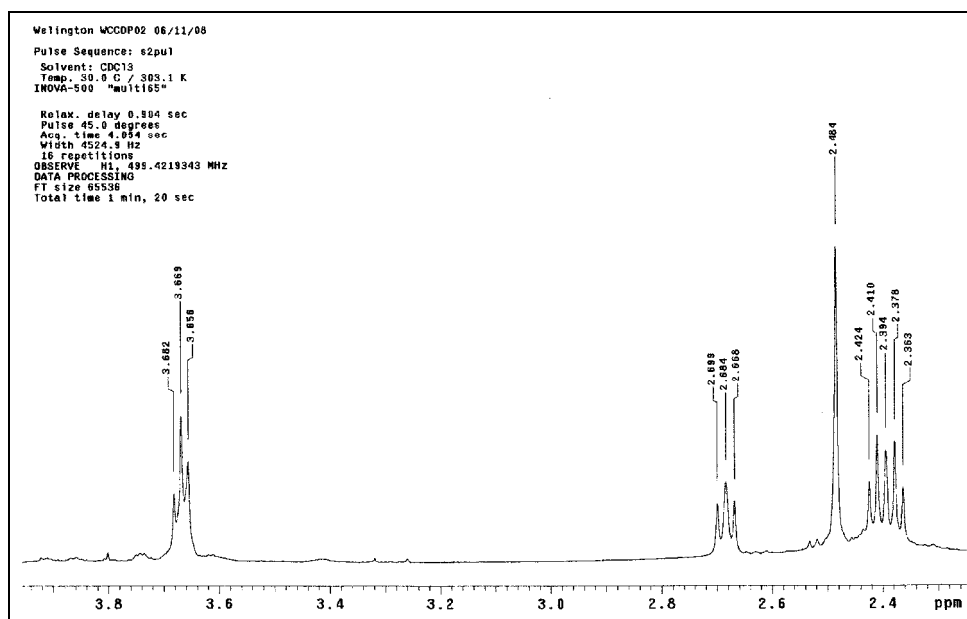
A análise do espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos δ 6,85 (1H, $J=8,0$ Hz) e δ 7,02 (1H, $J=8,0$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos em posição *orto*, um singlete em δ 2,48 (3H), característico de um grupo metílico ligado a um sistema aromático e um tripleto em δ 3,68 (2H) referente a um hidroximetilênico ligado a um metilênico. Foram observados ainda outros três tripletos; δ 2,68 (2H), δ 2,38 (2H) e δ 2,41 (2H), três quintupletos em δ 1,66 (2H), δ 1,59 (4H) e δ 1,61 (2H) e três multipletos em δ 1,28, δ 1,33 e δ 1,39 (Espectros 31, 32 e 33; Tabela 3).



Espectro 31. Espectro de RMN de ^1H de **2** (500 MHz, CDCl_3).



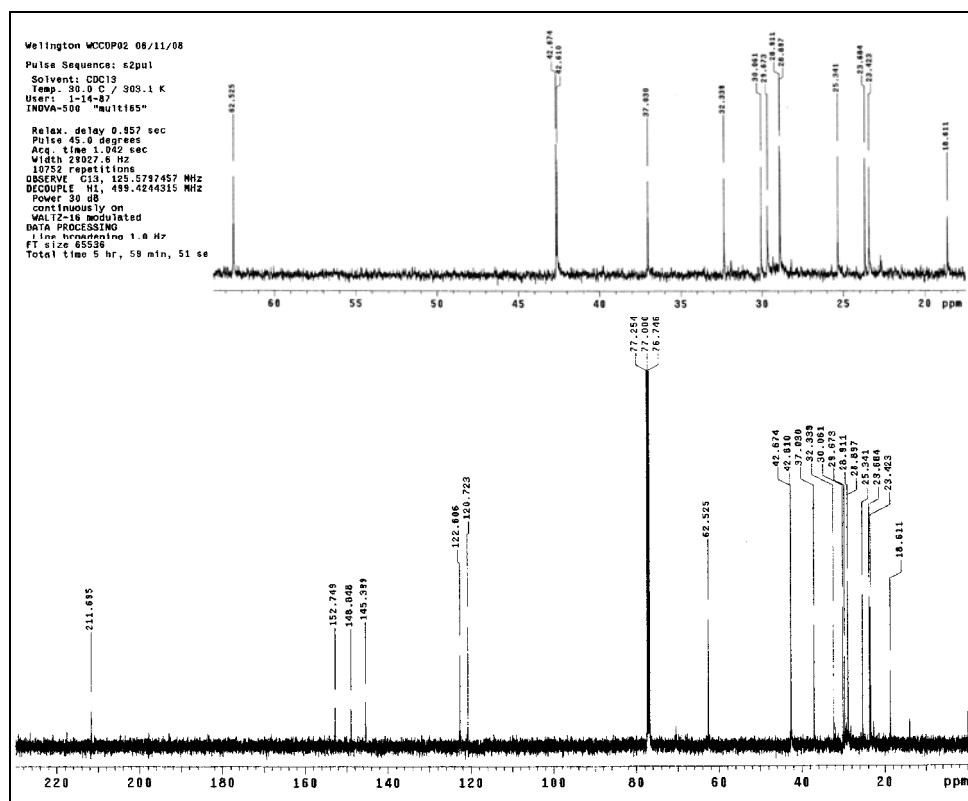
Espectro 32. Ampliação do espectro 31 (δ 1,1–1,8 ppm).



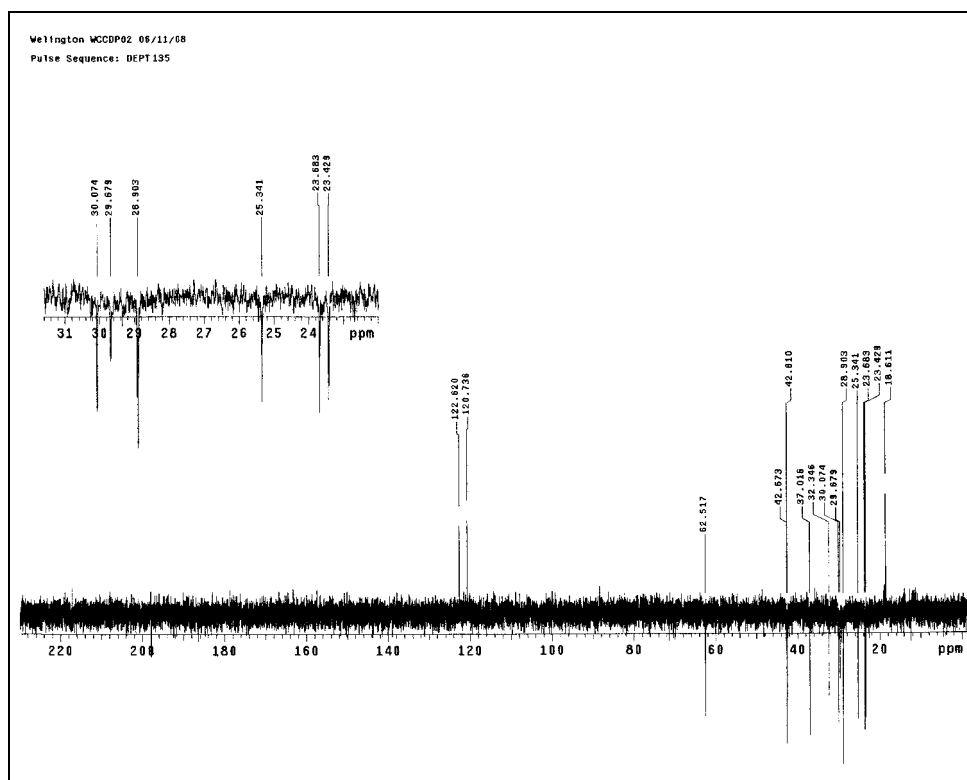
Espectro 33. Ampliação do espectro 31 (δ 2,4–3,8 ppm).

Nos espectros de ¹³C, DEPT 90 e 135 foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários (δ 145,4; 148,8 e 152,7), com deslocamento químico característico de carbonos ligados a átomos mais eletronegativos e dois metínicos δ 120,7 e 122,6. Foi observada ainda a presença de um grupo metílico (δ 18,6), um carbonílico (δ 211,7), um hidroximetilênico e dez metilênicos, sugerindo uma cadeia linear com um grupo hidroxílico ligada ao último carbono (δ 62,5, Espectros

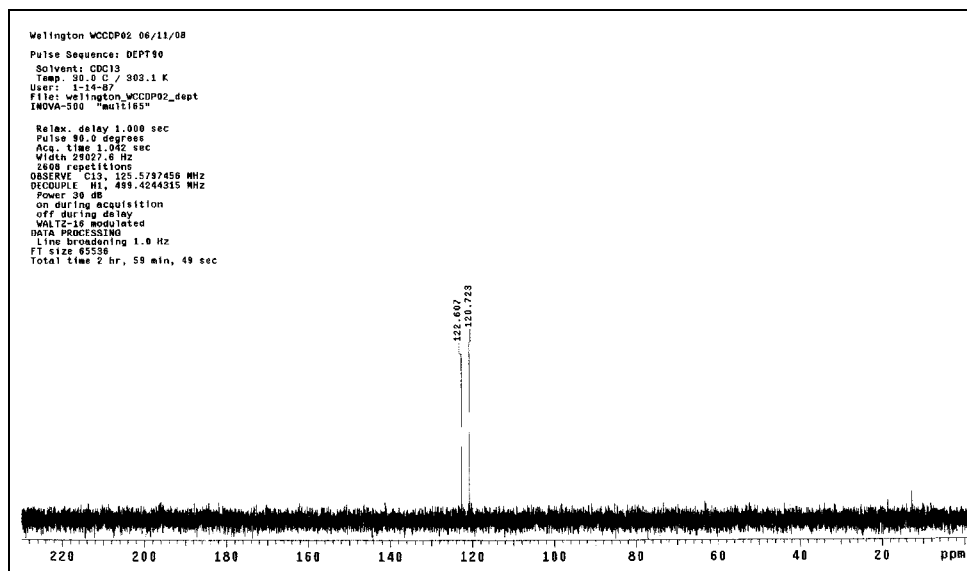
34-36; Tabela 3). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com os encontrados na literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.



Espectro 34. Espectro de RMN ^{13}C de 2 (125 MHz, CDCl_3).

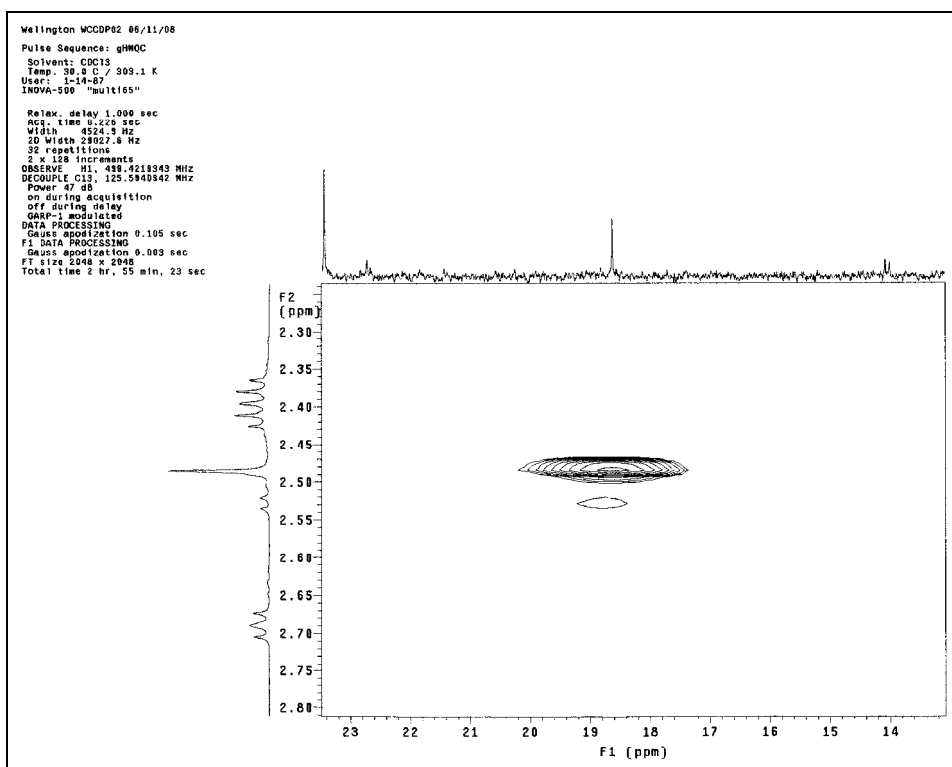


Espectro 35. Espectro de RMN de DEPT 135 de **2** (125 MHz, CDCl₃).

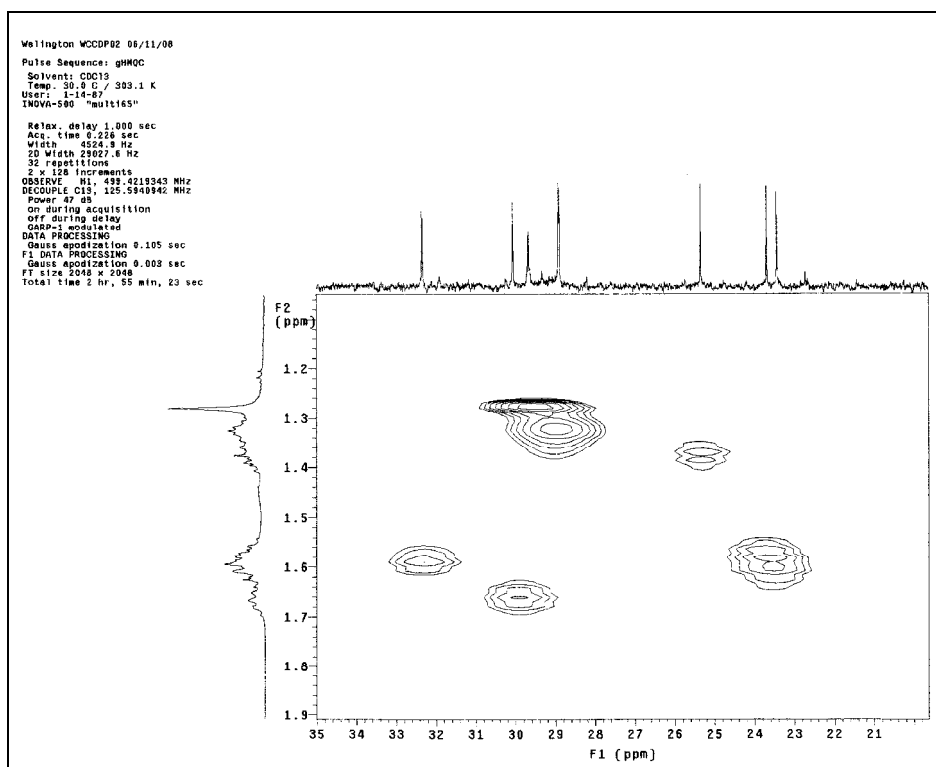


Espectro 36. Espectro de RMN de DEPT 90 de **2** (125 MHz, CDCl₃).

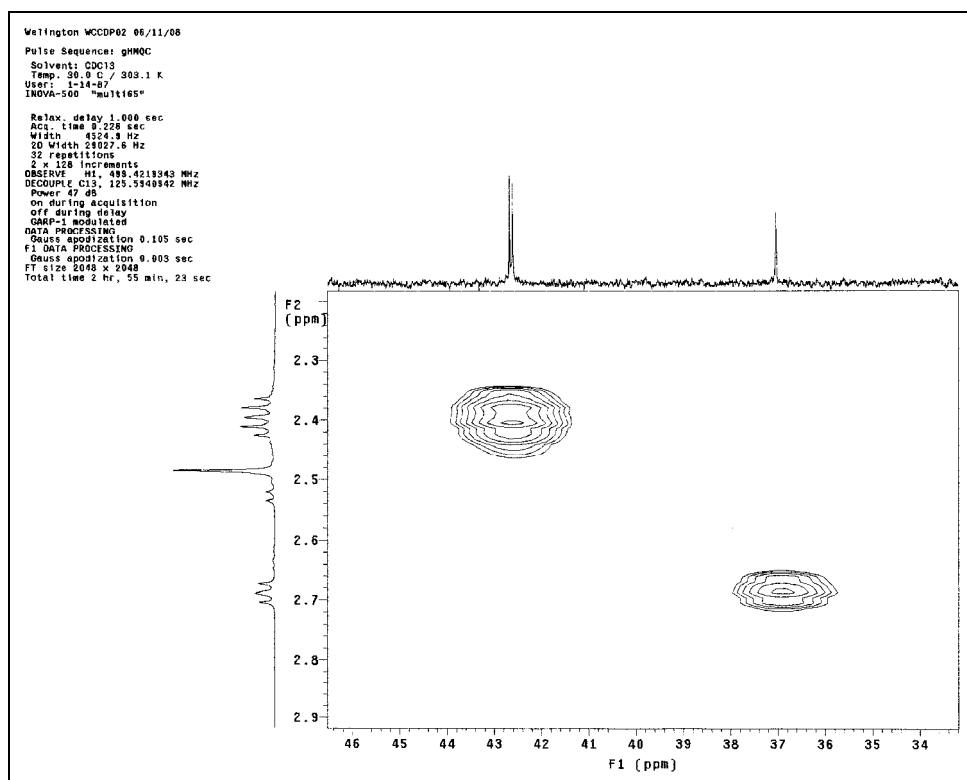
A partir dos experimentos de gHMQC foi possível correlacionar os hidrogênios aos respectivos carbonos (Espectros 37–41, Tabela 3).



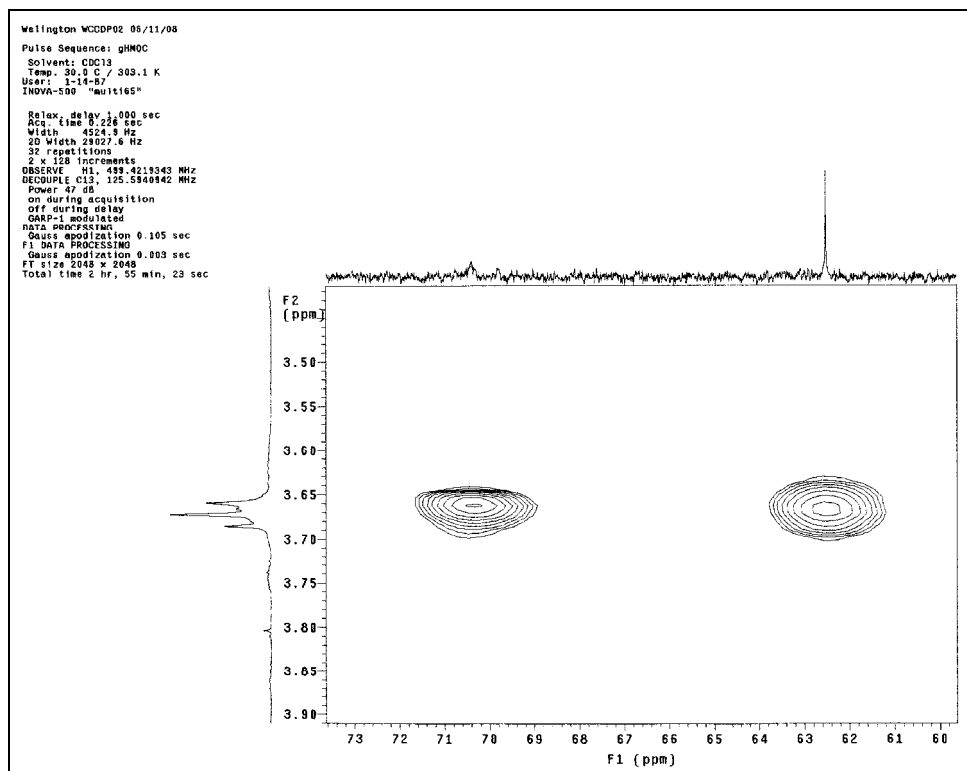
Espectro 37. Mapa de contorno gHMQC de **2** (δ 14–23; 500 MHz; CDCl₃).



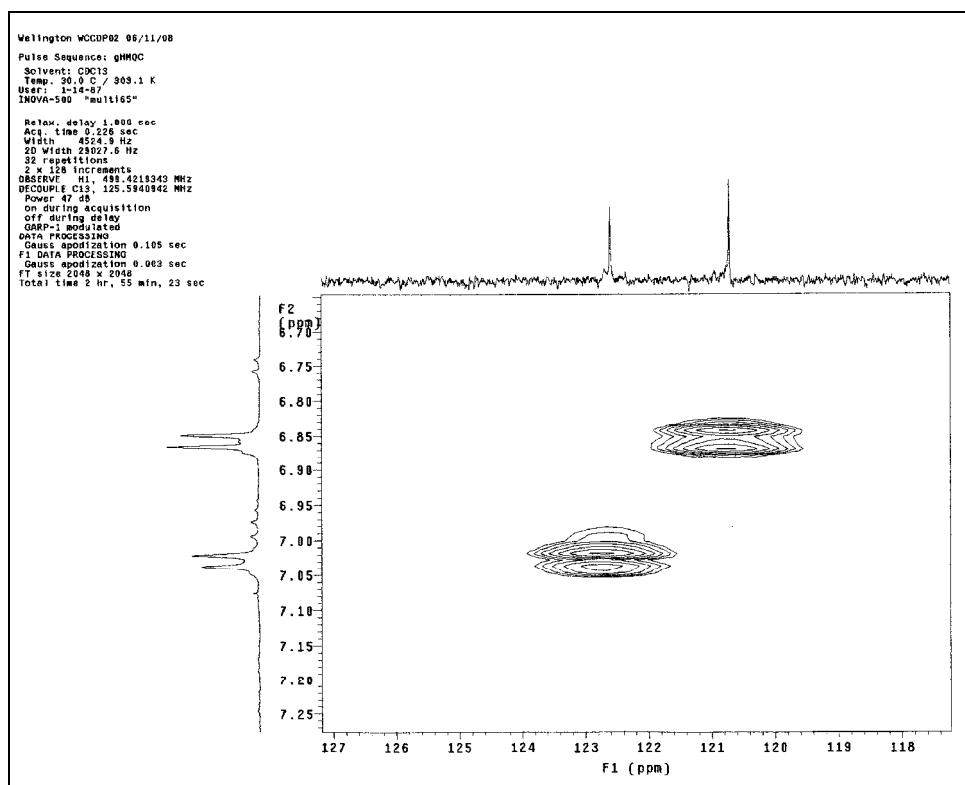
Espectro 38. Mapa de contorno gHMQC de **2** (δ 21–35; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 39. Mapa de contorno gHMOC de **2** (δ 34–46; 500 MHz; CDCl₃).



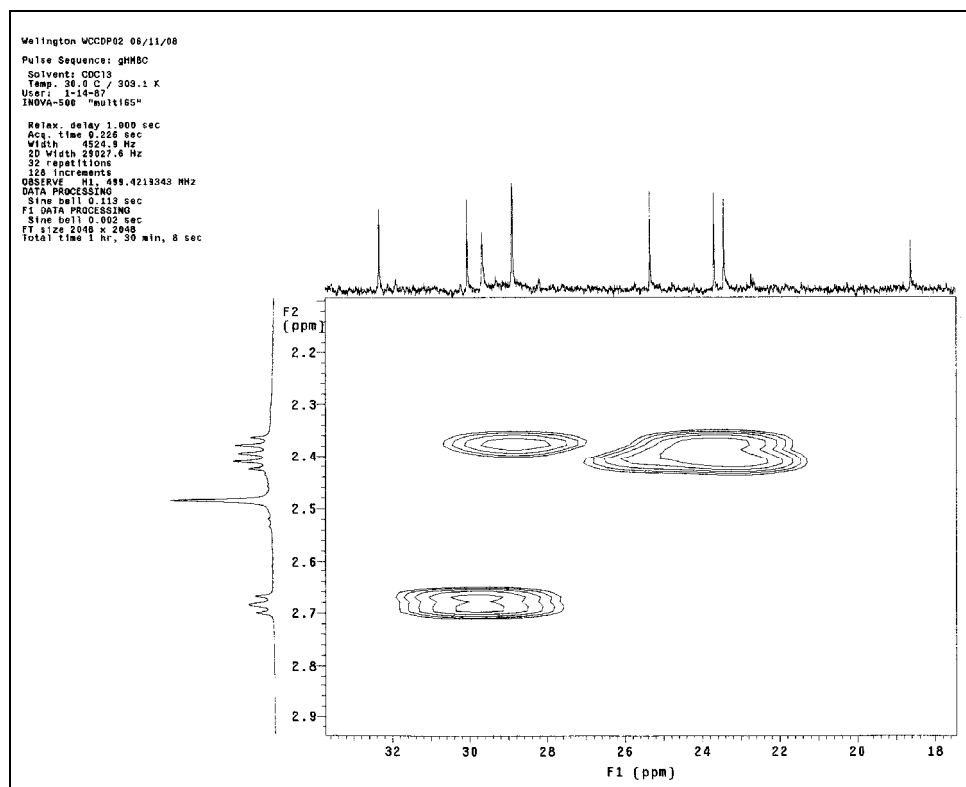
Espectro 40. Mapa de contorno gHMOC de **2** (δ 60–73; 500 MHz; CDCl₃).



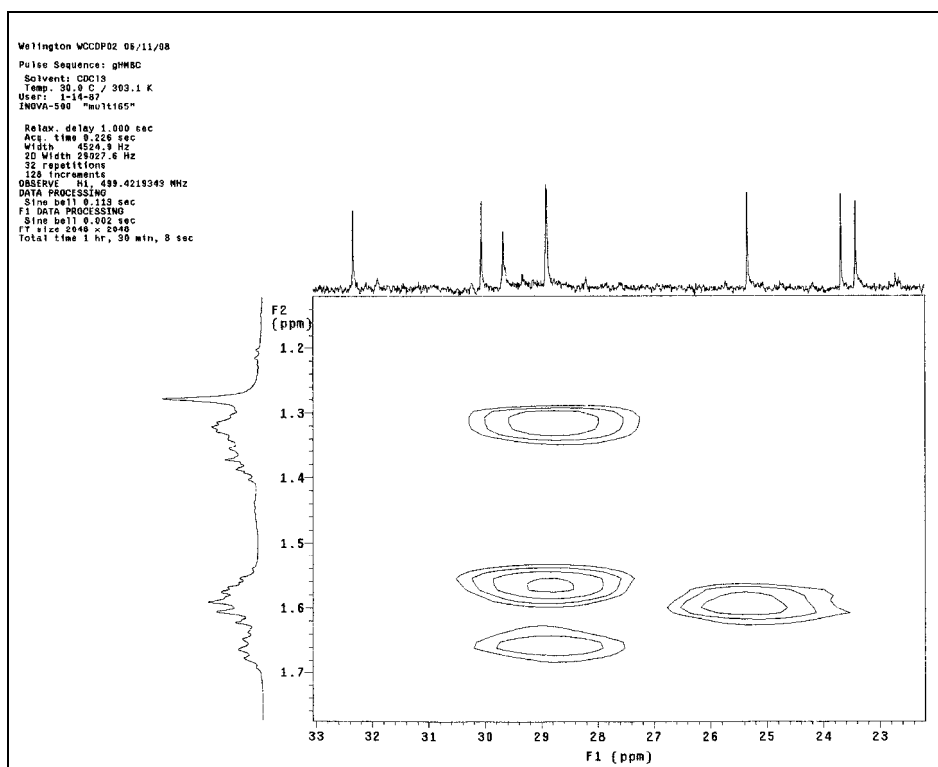
Espectro 41. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 118–127; 500 MHz; CDCl_3).

A partir dos experimentos de gHMBC foi possível correlacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Tabela 3). Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,00) e C-2 (3J , 145,4), C-3 (2J , 148,8) e C-6 (3J , 152,7), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de um grupo hidroxílico. Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,85) e C-3 (3J , 148,8), C-4 (2J , 122,6), C-6 (2J , 152,7) e C-1' (3J , 37,0) e entre H-7 (δ 2,48) e C-2 (145,4) e C-3 (148,8) (Espectros 42-52, Figura 22, Tabela 3). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,68) e C-5 e H-2' (δ 1,66) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6 no sistema aromático. A linearidade da cadeia foi confirmada a partir das correlações entre os metilênicos, que dentre as principais destacam-se aquelas entre H-5' (3J , 1,59), H-6' (2J , 2,38), H-8' (2J , 2,41), e H-9' (3J , 1,61) com o grupo carbonílico (δ 211,7), justificando assim a sua posição em C-7'. Correlações entre o hidroximetilênico (H-12', δ 3,67) e C-10' (3J , 31,4) e C-11' (2J , 22,4) e entre H-10' (δ 1,39) e C-8' (2J , 42,7), C-9' (3J , 23,4), C-11' (3J , 32,3)

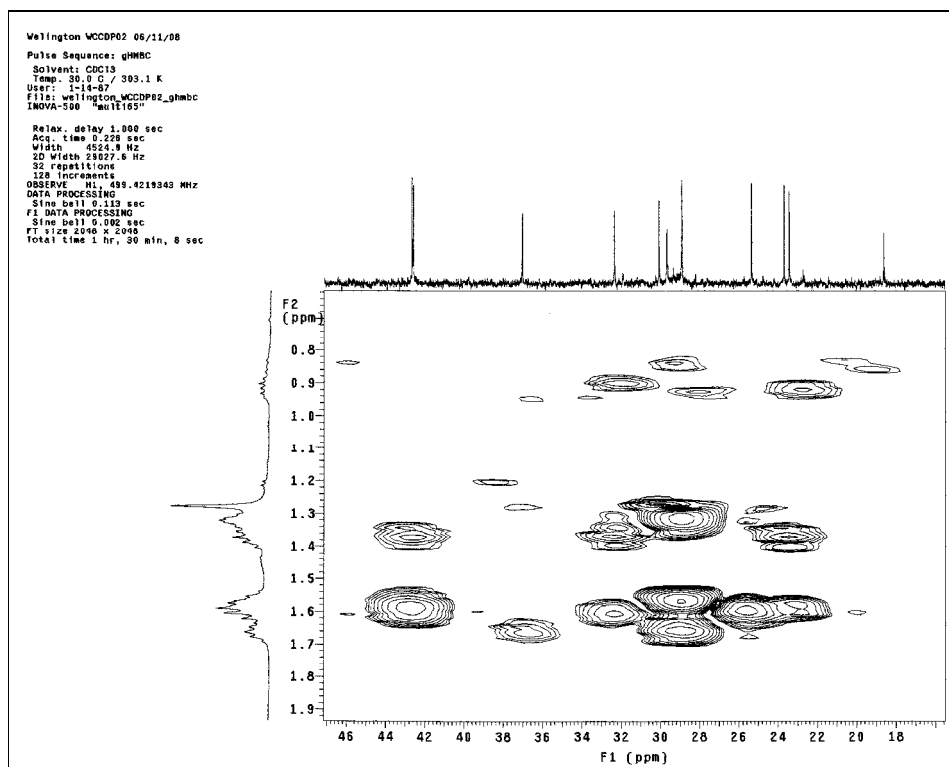
e C-12' (3J , 62,5) corroboram para a linearidade da cadeia e a posição do grupo carbonílico (C-7) ((Espectros 42-52, Figura 22, Tabela 3).



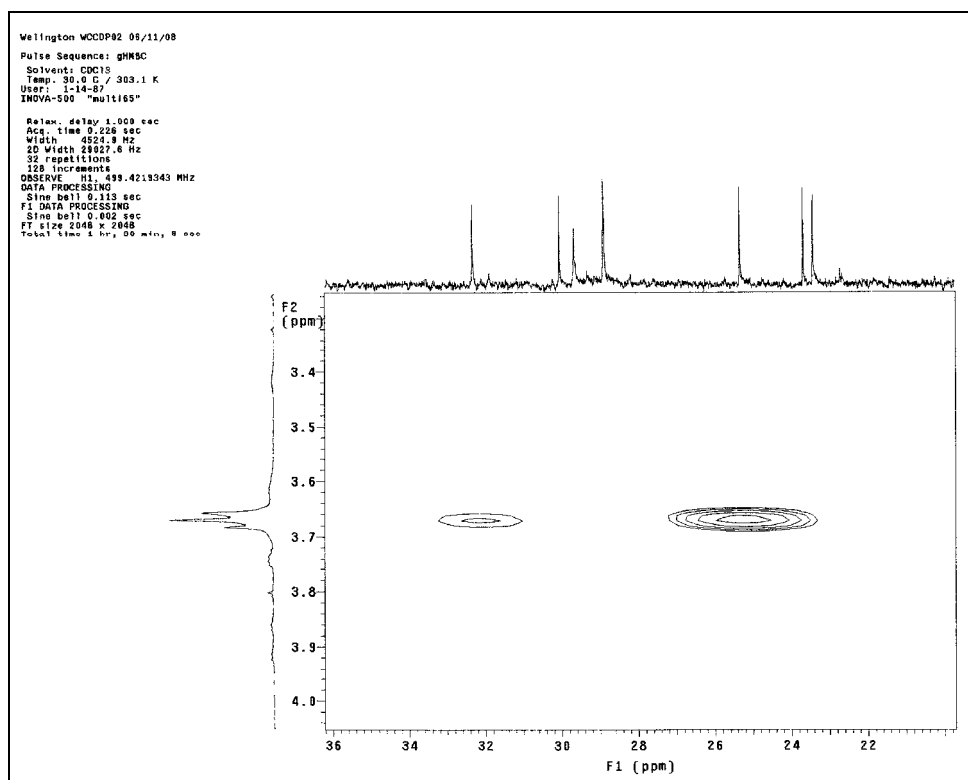
Espectro 42. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 18–32; 500 MHz; CDCl₃).



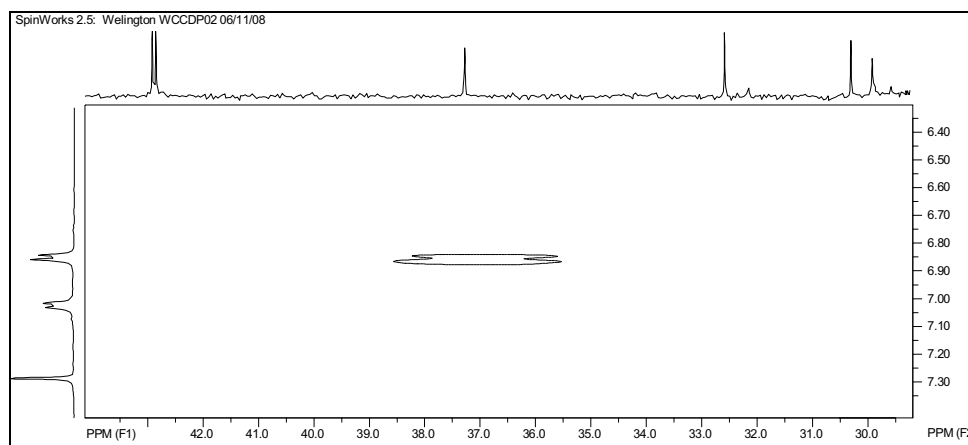
Espectro 43. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 23–33; 500 MHz; CDCl₃).



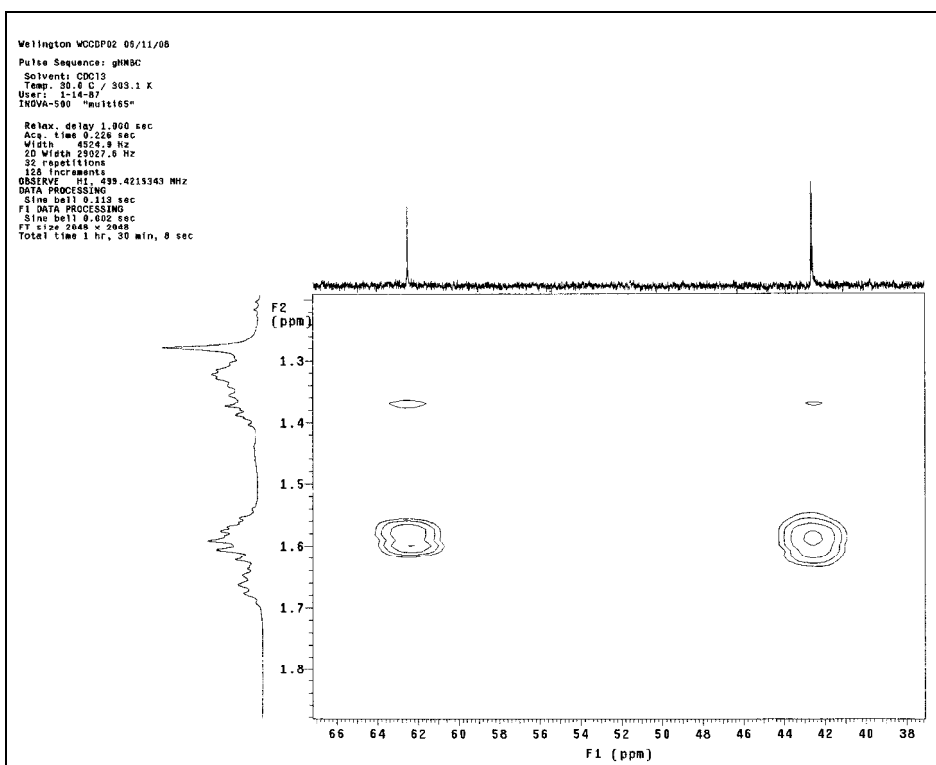
Espectro 44. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 18–46; 500 MHz; CDCl₃).



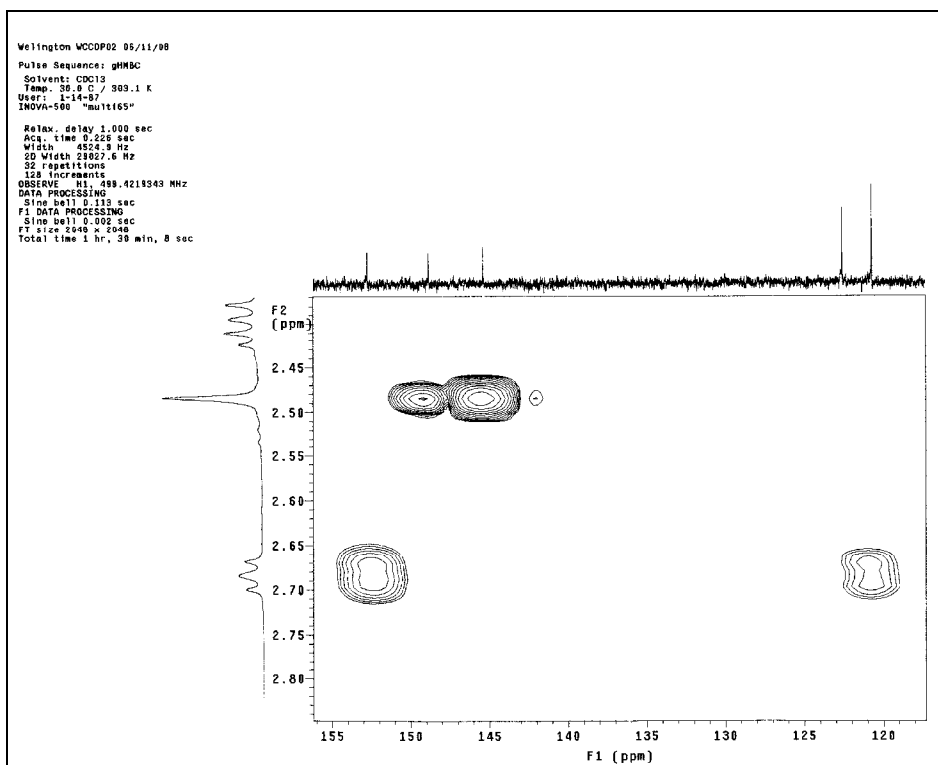
Espectro 45. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 22–36; 500 MHz; CDCl₃).



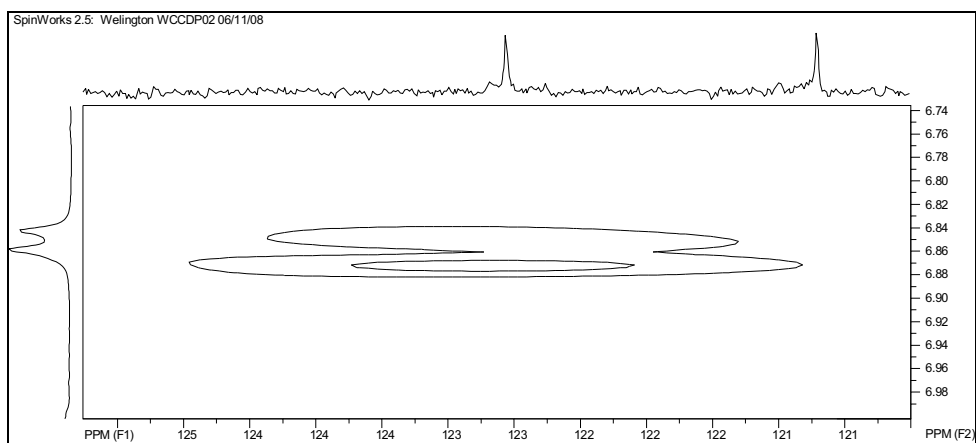
Espectro 46. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 30–42; 500 MHz; CDCl₃).



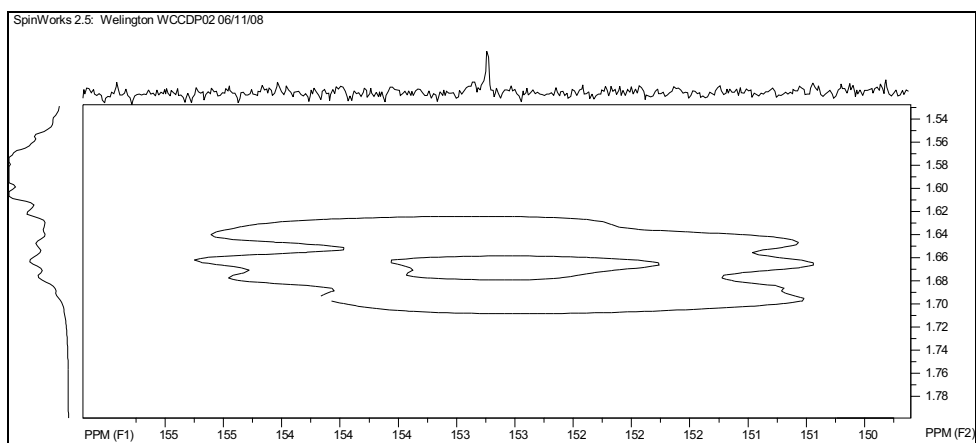
Espectro 47. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 38–66; 500 MHz; CDCl₃).



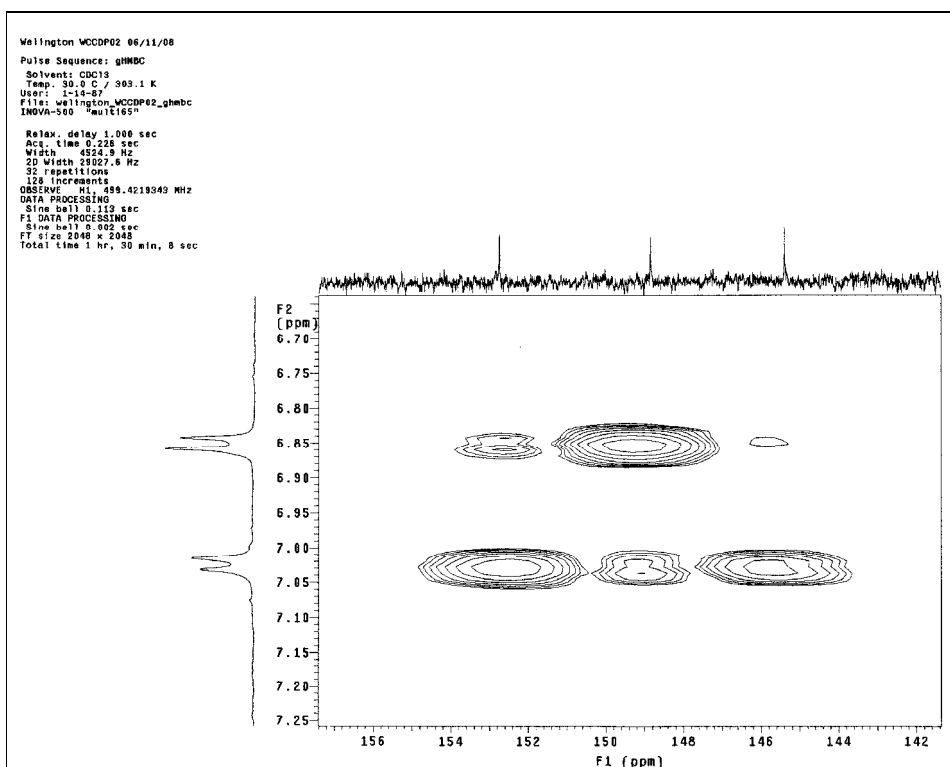
Espectro 48. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 120–155; 500 MHz; CDCl₃).



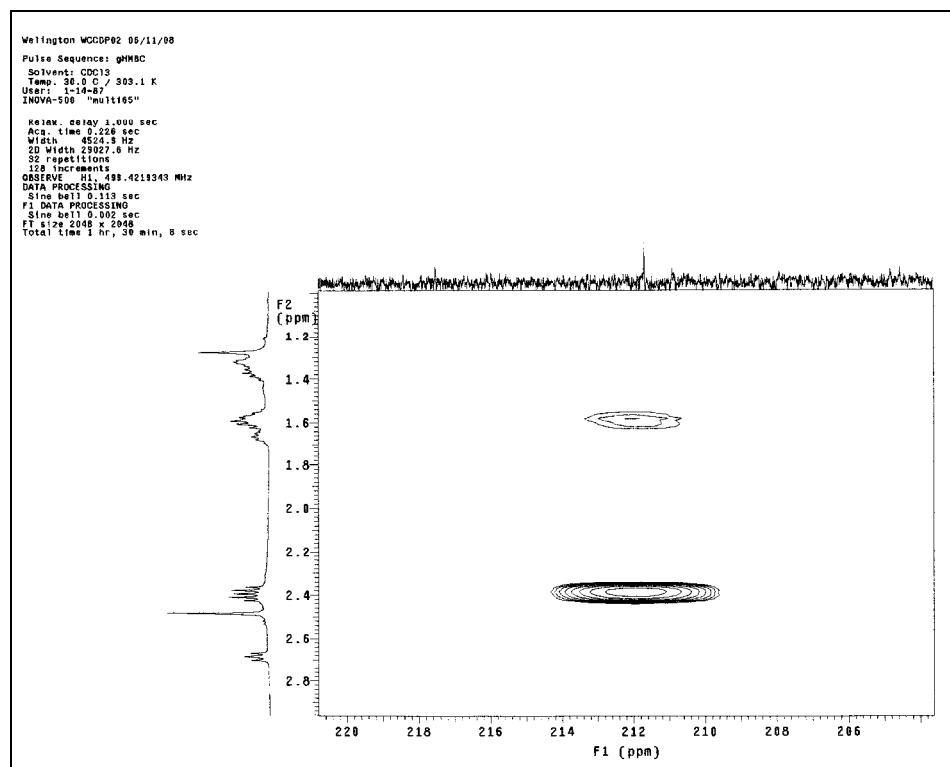
Espectro 49. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 121–125; 500 MHz; CDCl_3).



Espectro 50. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 150–155; 500 MHz; CDCl_3).

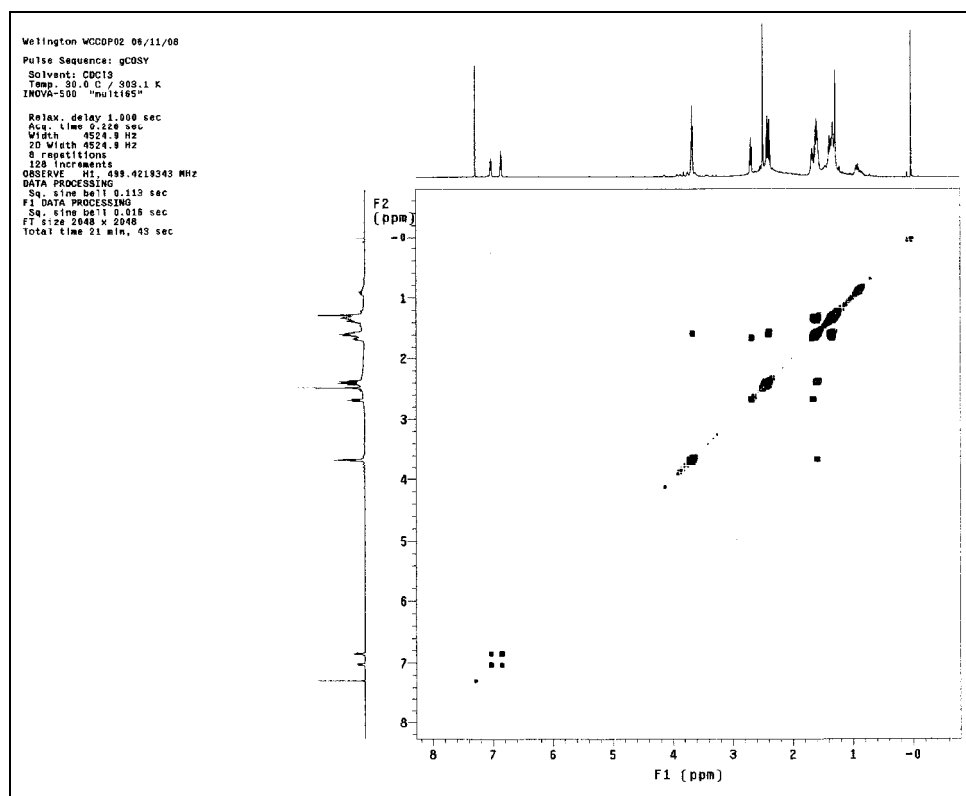


Espectro 51. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 142–156; 500 MHz; CDCl₃).

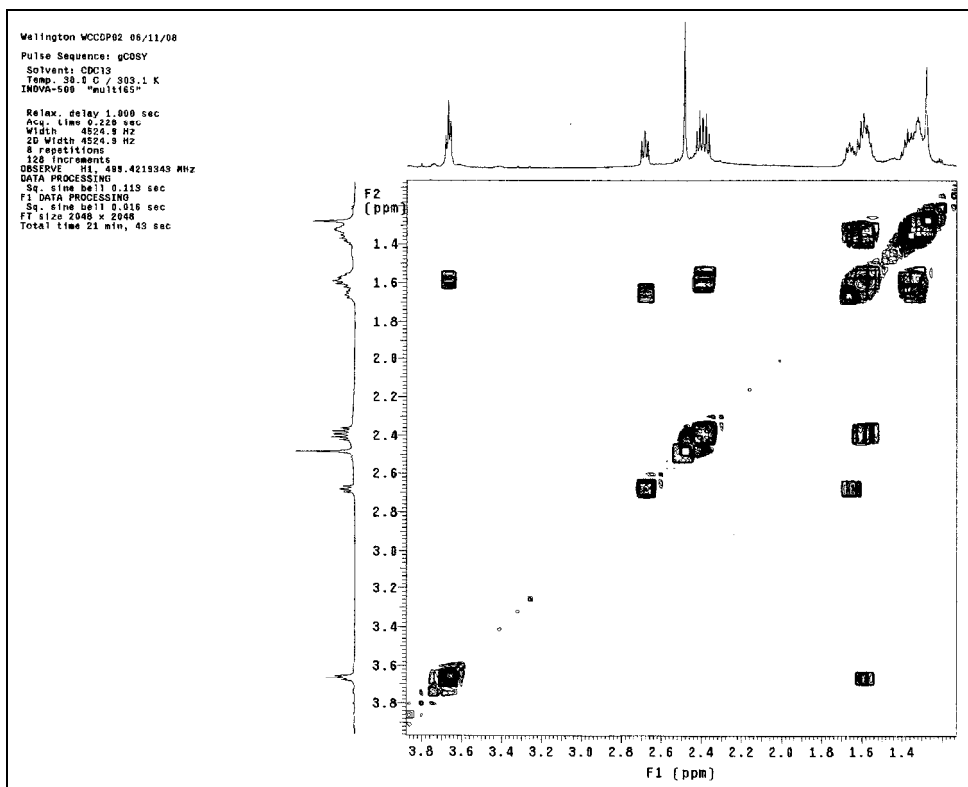


Espectro 52. Mapa de contorno gHMBC de **2** (δ 206–220; 500 MHz; CDCl₃).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, sendo as principais correlações entre H-1' e H-2', H-5' e H-6', H-8' e H-9', H-9' e H-10', H-11' e H-12' (Espectros 53 e 54, Tabela 3).



Espectro 53. Mapa de contorno gCOSY de **2** (500 MHz; CDCl₃).



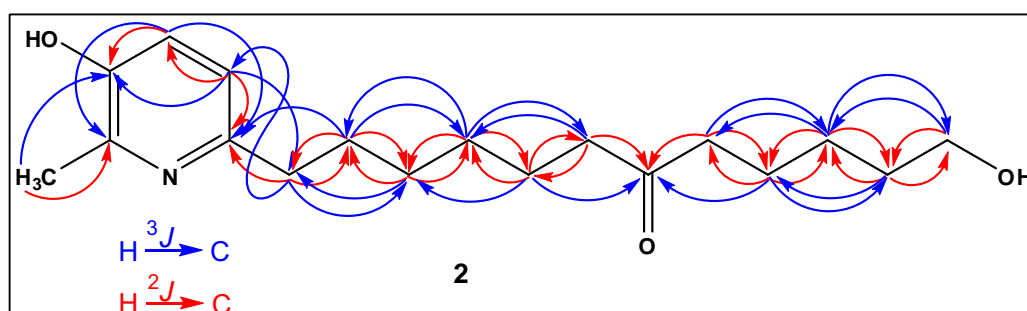
Espectro 54. Mapa de contorno gCOSY de **2** (δ 1,4–3,8; 500 MHz; CDCl₃).

Tabela 3. Dados de RMN de **2** em CDCl₃^a

C	δ_C^b	gHMQC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	145,4 s	–	H-4; H-7	–
3	148,8 s	–	H-4; H-5; H-7	–
4	122,6 d	7,02 d (8,0)	H-5	H-5
5	120,7 d	6,85 d (8,0)	H-1'	H-4
6	152,7 s	–	H-4; H-5; H-1'; H-2'	–
7	18,6 q	2,48 s	–	–
1'	37,0 t	2,68 t (7,5)	H-5; H-2'; H-3'	H-2'
2'	30,1 t	1,66 quint. (7,5)	H-1'; H-3'; H-4'	H-1'
3'	29,7 t	1,28 m	H-1'; H-2'; H-4'; H-5'	–
4'	28,9 t	1,33 m	H-2'; H-3'; H-5'; H-6'	H-5'
5'	23,7 t	1,59 quint. (7,5)	H-4'; H-6'	H-4'; H-6'
6'	42,6 t	2,38 t (7,5)	H-4'; H-5'	H-5'
7'	211,7 s	–	H-5'; H-6'; H-8'; H-9'	–
8'	42,7 t	2,41 t (7,5)	H-9'; H-10'	H-9'
9'	23,4 t	1,61 quint. (7,5)	H-8'; H-10'; H-11'	H-8'; H-10'
10'	25,3 t	1,39 m	H-8'; H-9'; H-11'; H-12'	H-9'
11'	32,3 t	1,59 quint. (6,5)	H-9'; H-10'; H-12'	H-12'
12'	62,5 q	3,67 t (6,5)	H-10'; H-11'	H-11'

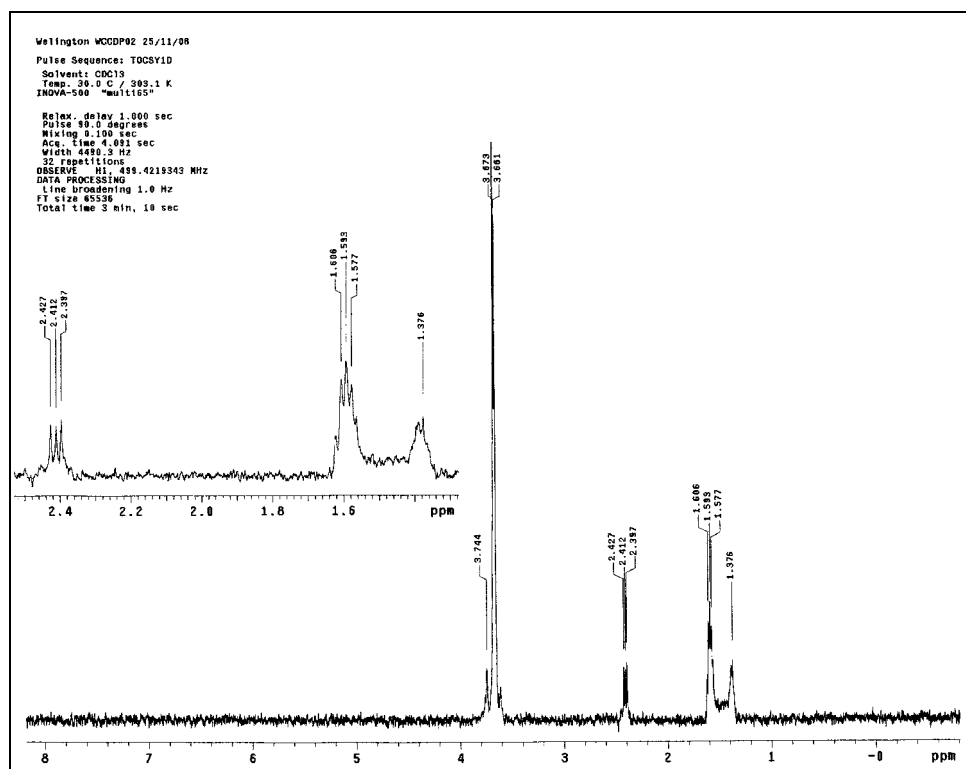
^a Experimento de RMN ¹H e ¹³C realizado a 500 e 125 MHz, respectivamente.

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

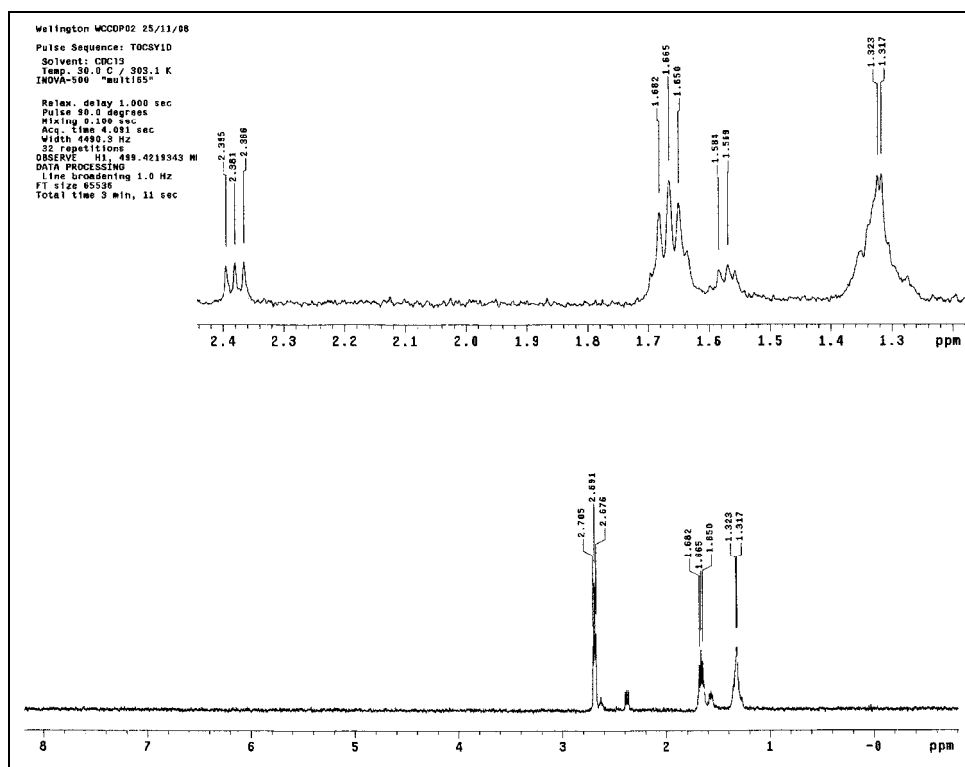
**Figura 22.** Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **2**.

Através do experimento de RMN de TOCSY 1D, onde é observada a transferência de magnetização entre os hidrogênios vicinais, foi irradiado H-12' (δ 3,67) e observada a transferência de magnetização através de H-11' (δ 1,59), H-10' (δ 1,39), H-9' (δ 1,61) e H-8' (2,41) (Espectro 55). Em seguida foi irradiado H-1' (δ 2,68) e

observada à transferência de magnetização através de H-2' (δ 1,66), H-3' (δ 1,28), H-4' (δ 1,33), H-5' (δ 1,59) e H-6' (δ 2,38) (Espectro 56). Foi possível ainda observar com clareza a multiplicidade de alguns desses sinais.



Espectro 55. Espectro de RMN de TOCSY 1D de **2**, irradiando H-12' (δ 3,67; 500 MHz; CDCl₃).



Espectro 56. Espectro de RMN de TOCSY 1D de **2**, irradiando H-1' (δ 2,68; 500 MHz; CDCl_3).

4.2.3. Elucidação estrutural do alcalóide **3**

A substância **3** isolada na forma de um óleo amarelo apresentou características alcaloidicas após análise por CCD e revelação com o reagente de Dragendorff, sendo sua estrutura química inédita na literatura (Figura 232). Foi denominada de *4'-multijuguinato de metila*.

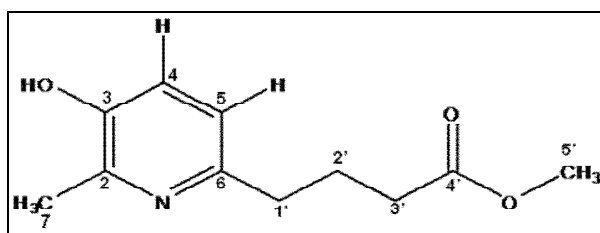
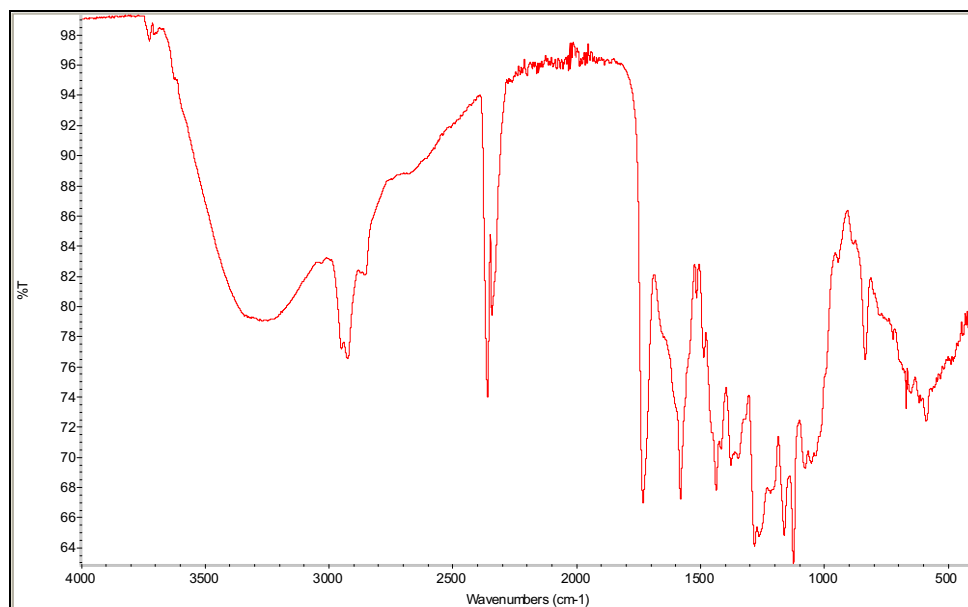


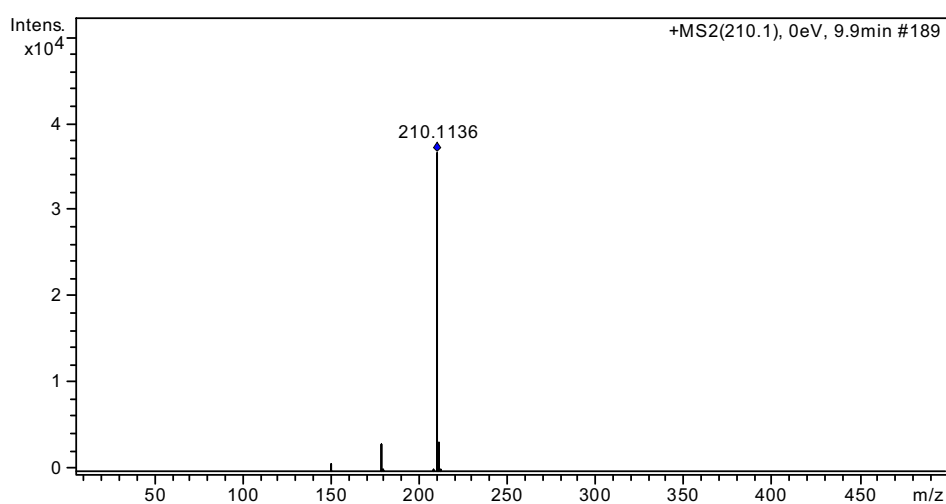
Figura 23. Estrutura química do alcalóide **3**.

As bandas de absorção na região IV foram atribuídas para os grupos funcionais hidroxílicos (3387 cm^{-1}), carbonílico $\text{C}=\text{O}$ (1720 cm^{-1}) e o anel piridínico (1598 , 1500 e 1460 cm^{-1}) (Espectro 57). Quando submetida à análise por EM de alta resolução, modo

positivo foi possível estabelecer sua fórmula molecular como sendo $C_{11}H_{15}NO_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a cinco. O pico referente ao íon *quasi*-molecular (*aduto com próton*) foi observado em m/z 210,1136 $[M+H]^+$, calculado para $C_{11}H_{16}NO_3^+$, 210,1125 (Espectro 58). Na região de UV, o espectro mostrou duas absorções máximas: uma em 222 nm ($\epsilon = 5185$) e 286 nm ($\epsilon = 3014$).



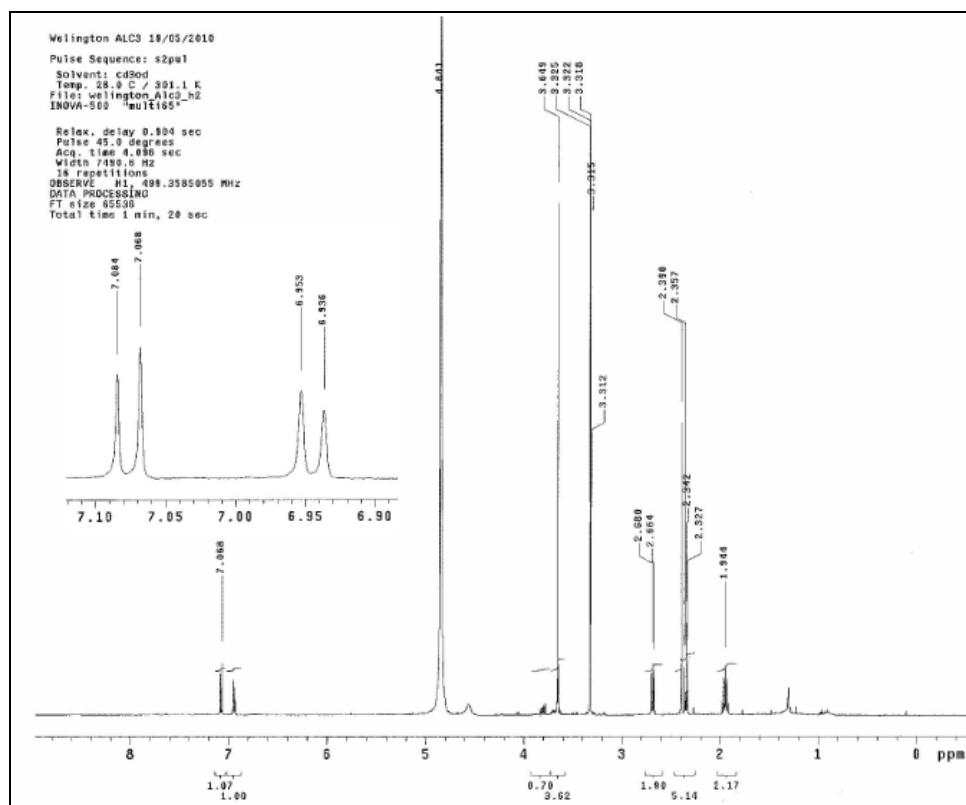
Espectro 57. Espectro na região de IV do alcalóide **3**.



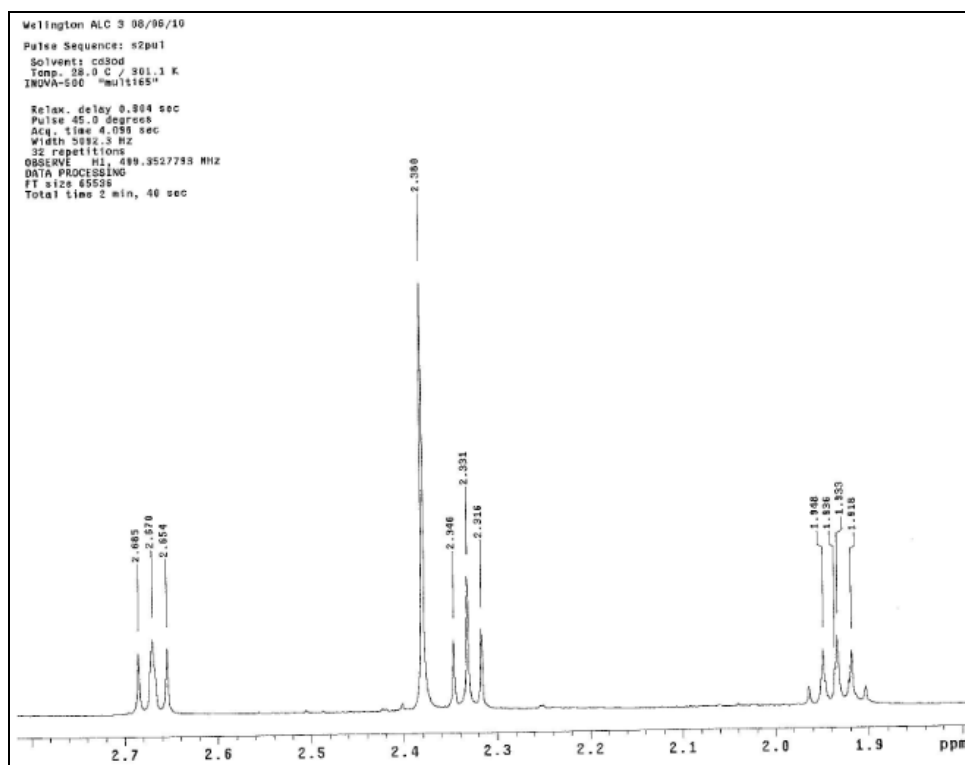
Espectro 58. IES-EM alta resolução do alcalóide **3**.

Da análise do espectro de RMN de 1H foi observado a presença de dois dubletos δ 6,95 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,01 (1H, $J = 8,0$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos na

posição *orto*, um singlete em δ 2,39 (3H), característico de metila ligada a um sistema aromático e um singlete em δ 3,65 (3H) que pode ser inferido a um grupo metoxílico no final da cadeia. Foram observados ainda dois tripletos; δ 2,69 (2H) e δ 2,33 (2H) e um quintupletto em δ 1,96 (2H). (Espectro 59 e 60; Tabela 4).

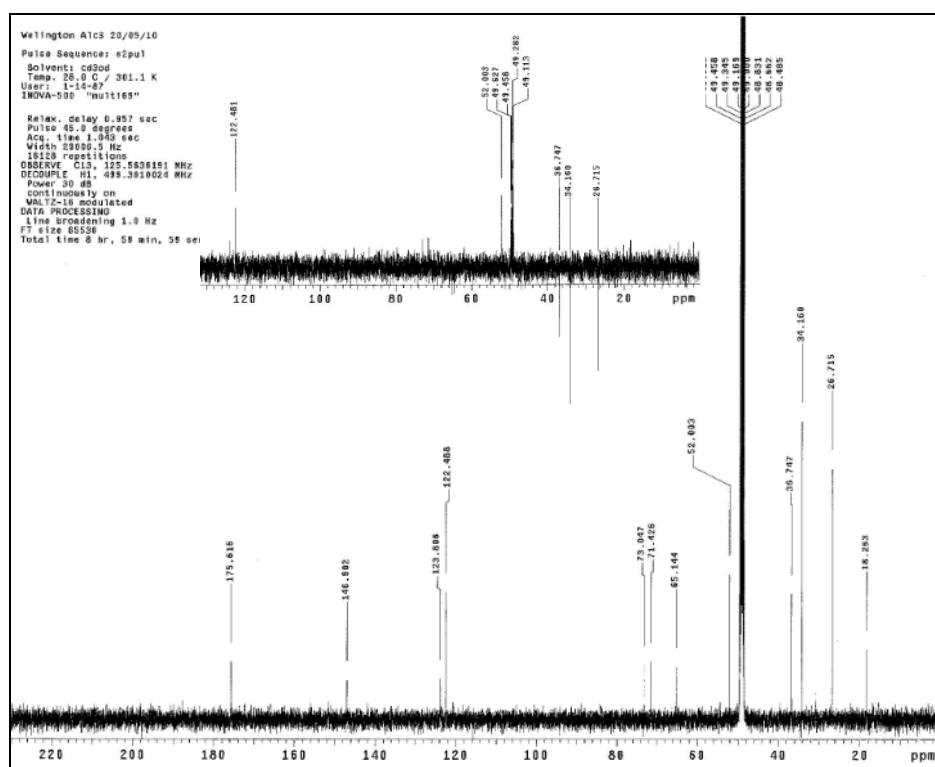


Espectro 59. Espectro de RMN de ^1H de **3** (500 MHz, CH_3OD).

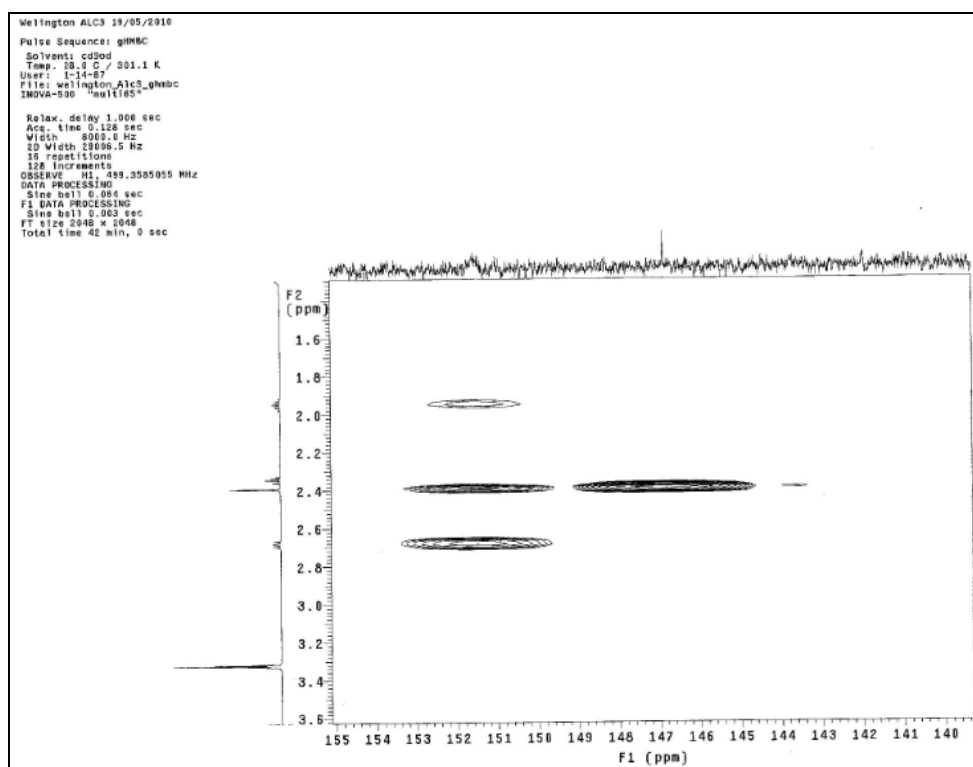


Espectro 60. Ampliação do espectro 59 (δ 1,8–2,7).

Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar apenas três sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo um quaternário (δ 146,9), com deslocamento químico característico de carbono ligado a átomos mais eletronegativos e dois metílicos em δ 122,5 e 123,8. Por meio dos mapas de contorno gHMBC observou-se mais dois sinais referentes a carbonos aromáticos, sendo ambos quaternários (δ 151,6 e δ 151,8) (Espectro 62). Foi observado ainda a presença de um grupo metílico em δ 18,2, um carbonílico em δ 175,6, três metilênicos absorvendo em δ 26,7, δ 34,2 e δ 36,7 e um sinal correspondente a um grupo metoxílico em δ 50,2 (Espectro 61; Tabela 4). Comparando os sinais referentes aos carbonos aromáticos a literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) entre os hidrogênios *orto*, caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.

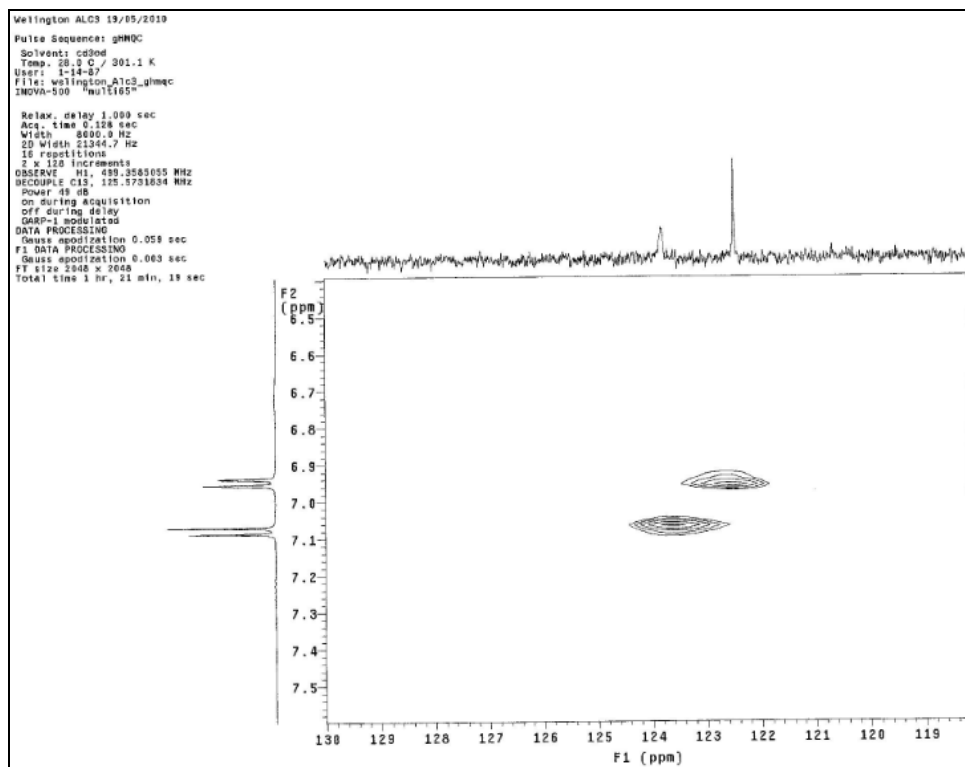


Espectro 61. Espectro de RMN ^{13}C de **3** (500 MHz, CH_3OD).

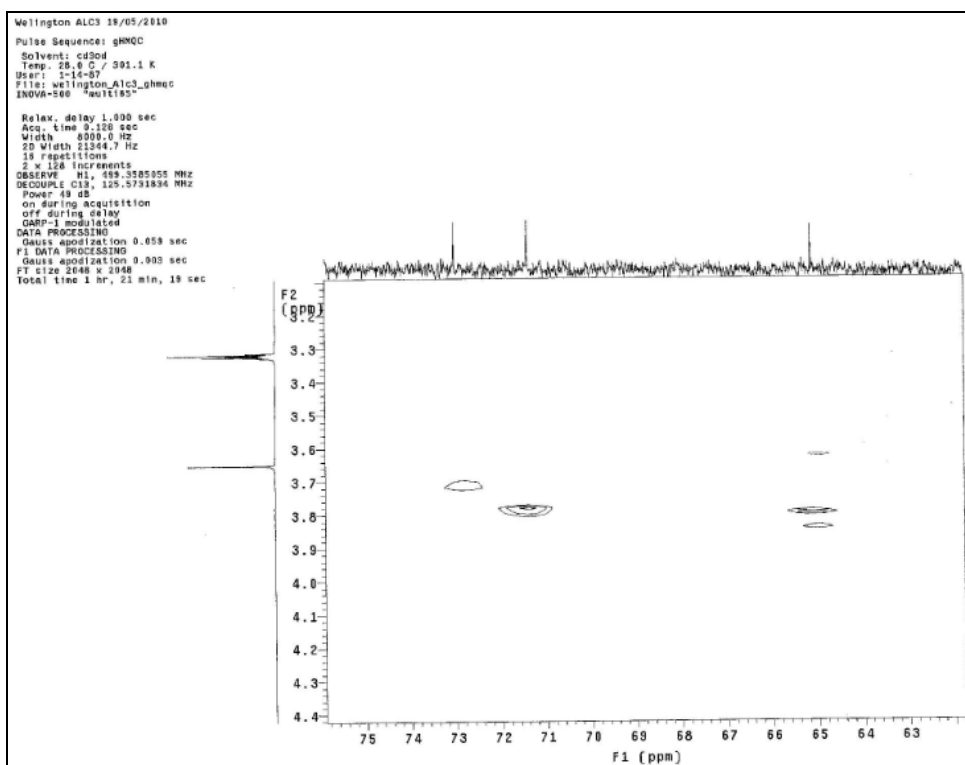


Espectro 62. Mapa de contorno gHMBC de **3** (δ 140 – 155; 500 MHz; CH_3OD).

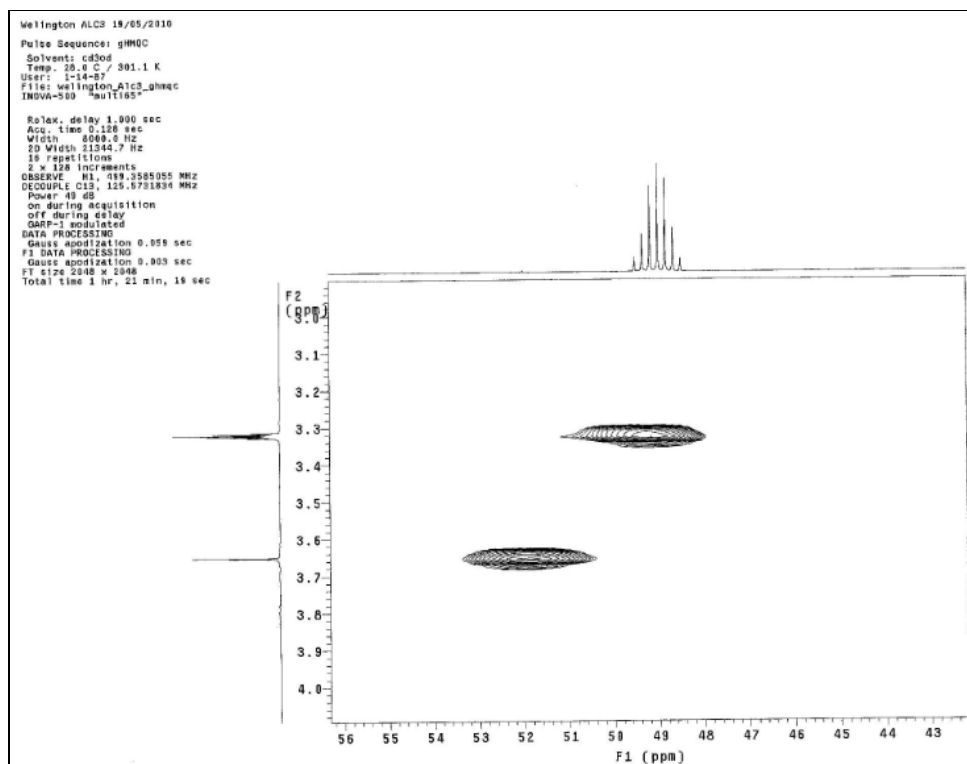
A partir das correlações gHMQC foi possível relacionar os sinais de hidrogênios com os seus respectivos carbonos (Espectros 63-66; Tabela 4).



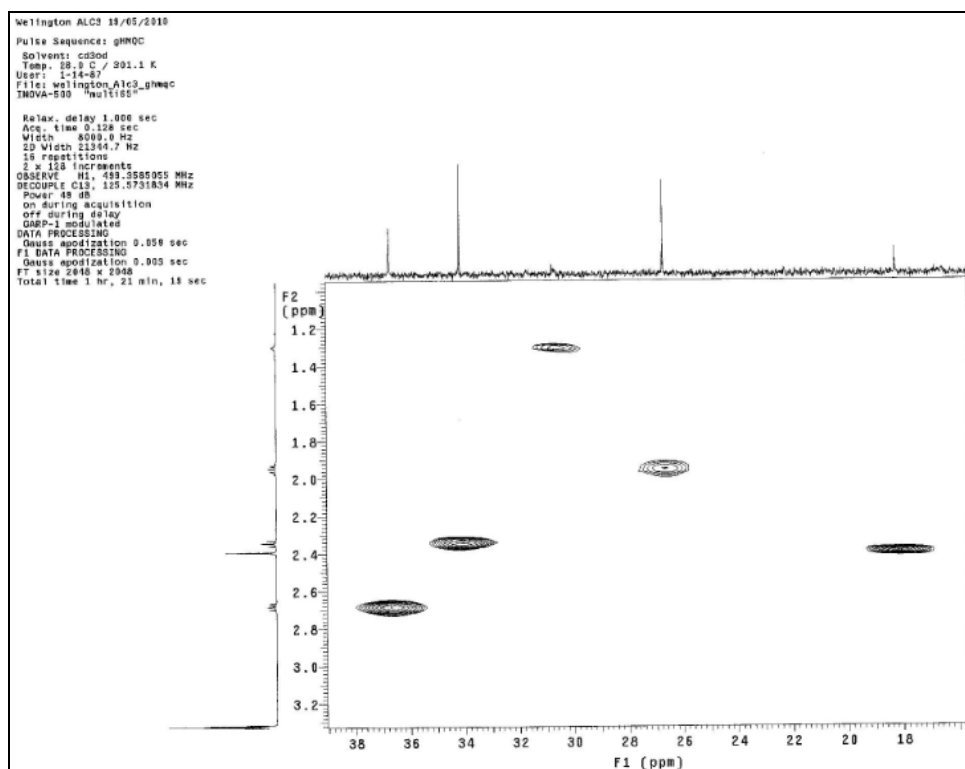
Espectro 63. Mapa de contorno gHMQC de **3** (δ 119 – 130; 500 MHz; CH₃OD).



Espectro 64. Mapa de contorno gHMOC de **3** (δ 63 – 75; 500 MHz; CH₃OD).

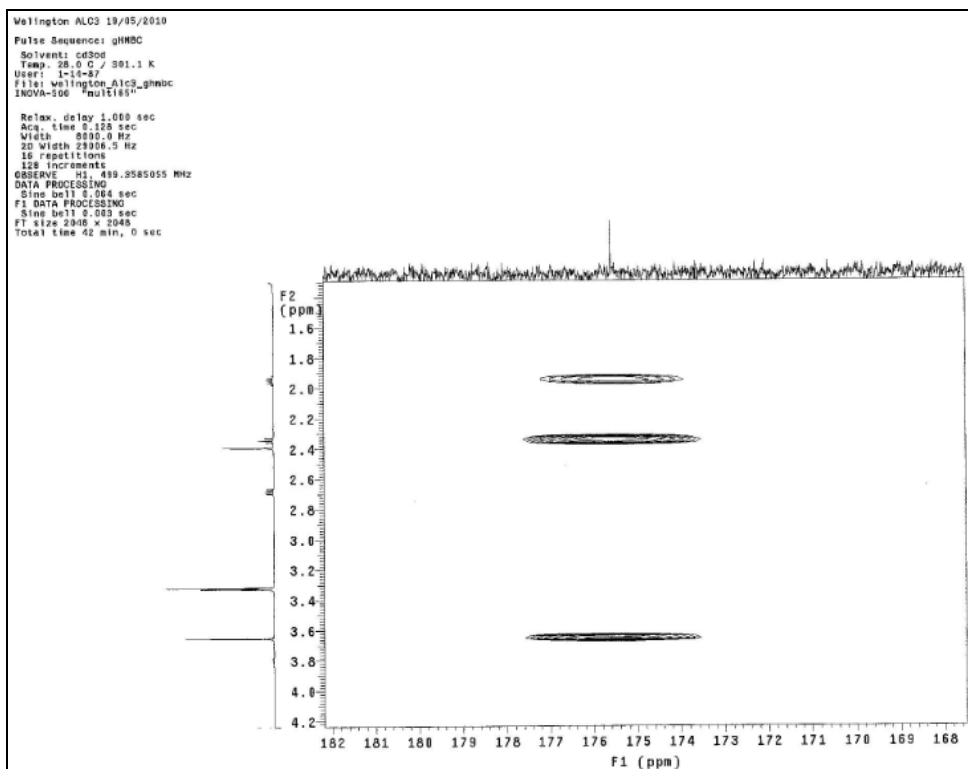


Espectro 65. Mapa de contorno gHMOC de **3** (δ 43 – 56; 500 MHz; CH₃OD).

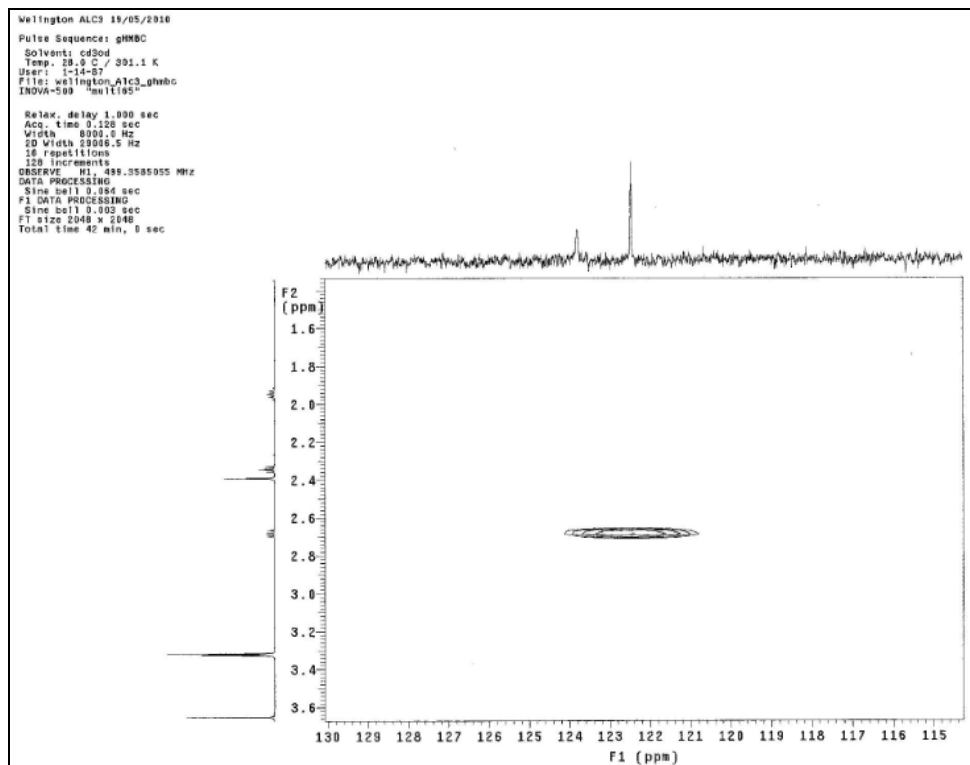


Espectro 66. Mapa de contorno gHMBC de **3** (δ 18 – 38; 500 MHz; CH₃OD).

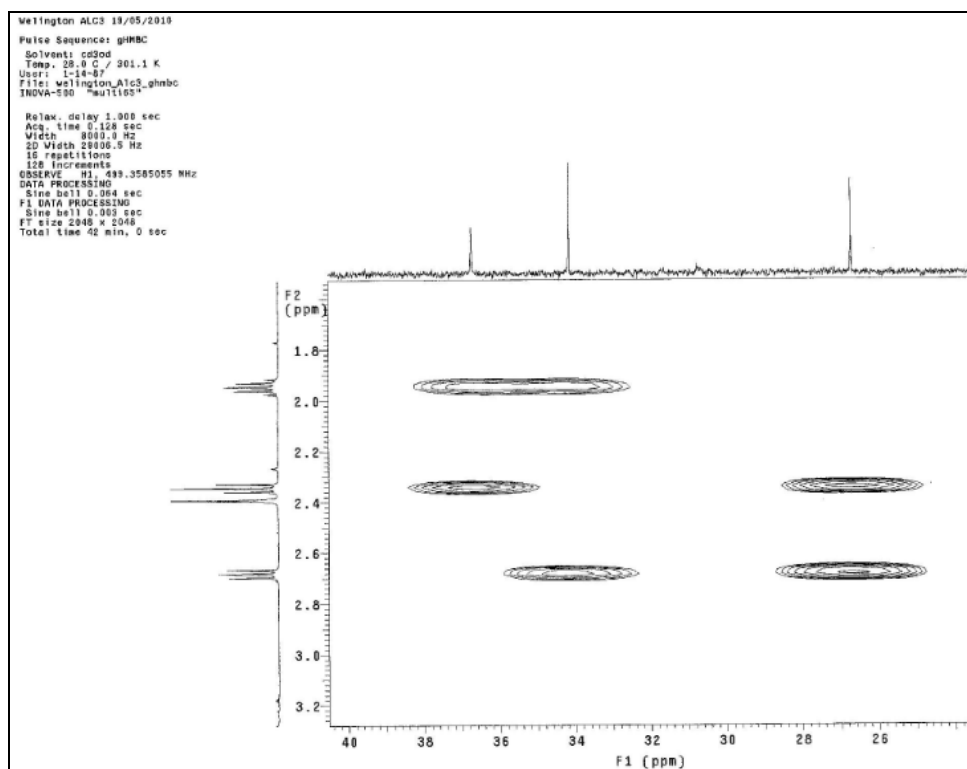
Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as seguintes correlações: H-4 (δ 7,01) e C-2 (3J , 146,9), C-5 (2J , 122,5) e C-6 (3J , 151,6). Outras correlações observadas foram entre H-5 (δ 6,95) e C-3 (3J , 151,8), C-4 (2J , 123,8) e C-1' (3J , 36,7), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de um grupo hidroxílico. Outras correlações observadas em relação ao anel piridínico foram entre H-7 (δ 2,39) e C-2 (2J , 146,9) e C-3 (3J , 151,8) (Espectros 62, 67, 68 e 69, Figura 24, Tabela 4). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,69) e C-5; C-6 e H-2' (δ 1,96) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6 no sistema aromático. A linearidade da cadeia foi evidenciada a partir das correlações entre os metilênicos, sendo elas entre H-1' e C-2' (2J , 26,7) e C-3' (3J , 34,2); H-2' e C-1' (2J , 36,7), C-3' (2J , 34,2) e C-4' (3J , 175,6); H-3' e C-4' (2J , 175,6). A correlação 3J entre H-5' (δ 50,2) e C-4', ajudam a confirmar a posição do grupo carbonílico em C-4' (Espectros 67-69, Figura 24, Tabela 4).



Espectro 67. Mapa de contorno gHMBC de **3** (δ 168 – 182; 500 MHz; CH₃OD).

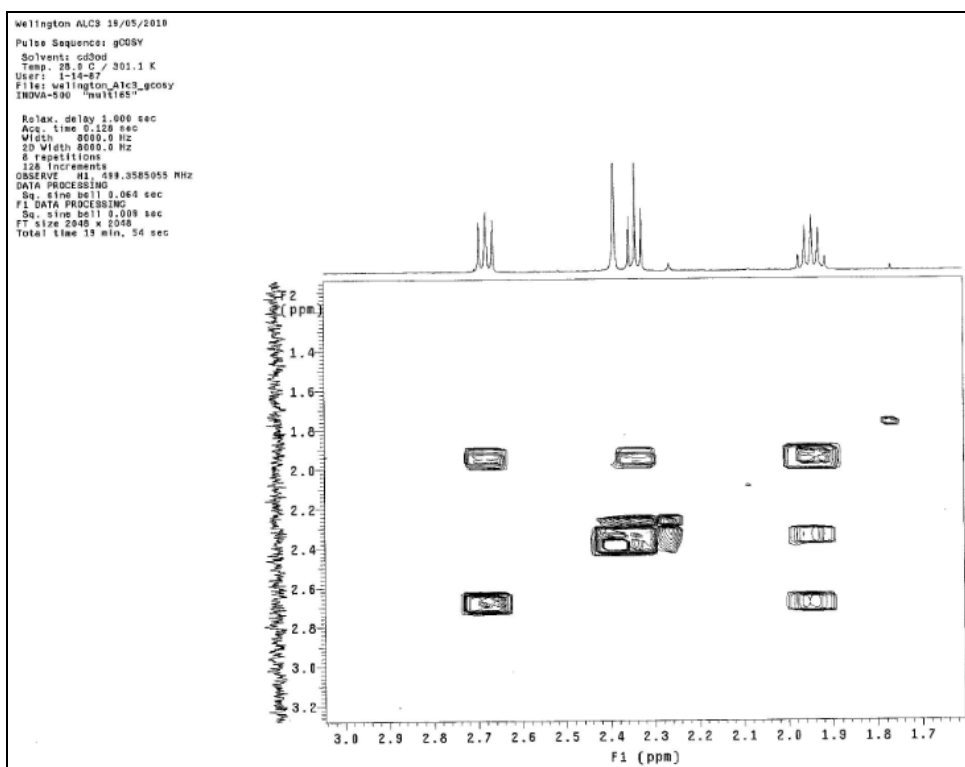


Espectro 68. Mapa de contorno gHMBC de **3** (δ 115 – 130; 500 MHz; CH₃OD).

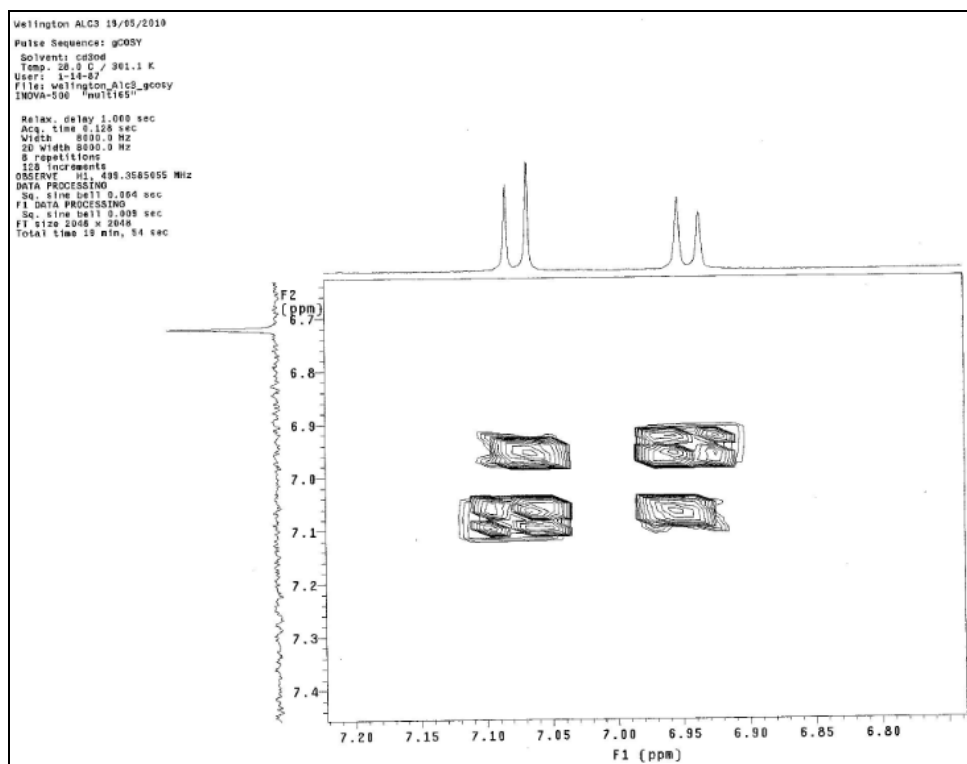


Espectro 69. Mapa de contorno gHMBC de **3** (δ 26 – 40; 500 MHz; CH₃OD).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, destacando-se as correlações entre H-1' e H-2', H-2' e H-3' (Espectros 70 e 71, Tabela 4).



Espectro 70. Mapa de contorno gCOSY de **2** (δ 1,4–3,0; 500 MHz; CDCl_3).



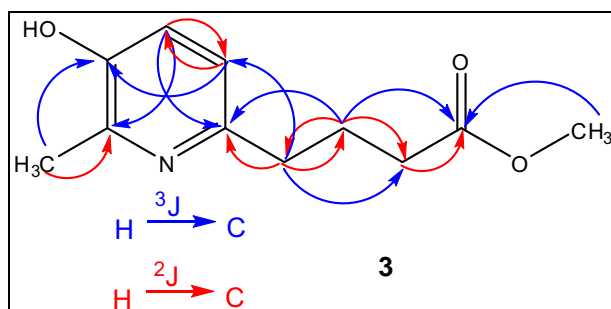
Espectro 71. Mapa de contorno gCOSY de **2** (δ 6,8–7,2; 500 MHz; CDCl_3).

Tabela 4. Dados de RMN de **3** em CH₃OD^a

C	δ _C	gHMQC δ _H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	146,9 s	–	H-4; H-7	–
3	151,8 s	–	H-5; H-7	–
4	123,8 d	7,01 d (8,0)	H-5	H-5
5	122,5 d	6,95 d (8,0)	H-4; H-1'	H-4
6	151,6 s	–	H-4; H-1'; H-2'	–
7	18,3 q	2,39 s	–	–
1'	36,7 t	2,69 t (7,5)	H-5; H-2'; H-3'	H-2'
2'	26,7 t	1,96 quint. (7,5)	H-1'; H-3'	H-1'; H-3'
3'	34,2 t	2,35 t (H-1'; H-2'	H-2'
4'	175,6 s	–	H-2'; H-3'; H-5'	–
5'	50,2 q	3,65 s	–	–

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

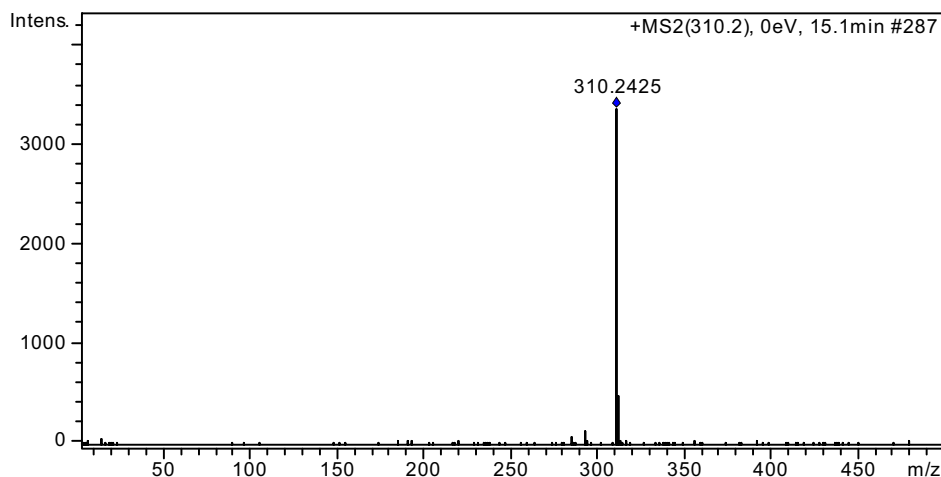
^b Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.

**Figura 24.** Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **3**.

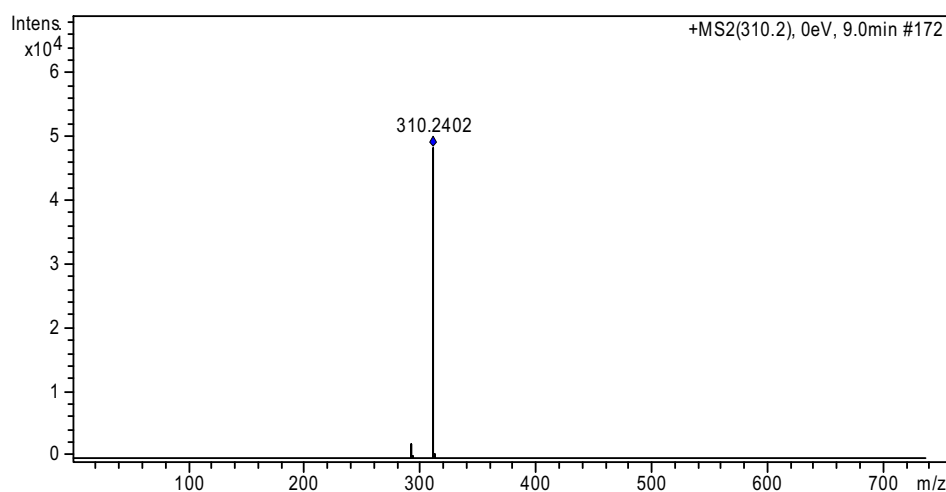
4.2.4. Qual a relação estrutural entre os alcalóides **1a** e **1b** isolados?

Por meio dos resultados da separação dos alcalóides **1a** e **1b** por CLAE e a proximidade dos tempos de retenção, a possibilidade de semelhança estrutural é muito grande. Para isso, os dois alcalóides foram submetidos às análises espectroscópicas e espectrométricas para evidenciar tal diferença. Inicialmente ambos foram submetidos à análise por EM de alta resolução, no modo positivo. A partir dos resultados obtidos foi possível estabelecer a fórmula molecular para ambos os alcalóides como sendo C₁₈H₃₁NO₃, com índice de deficiência de hidrogênio igual a quatro. Os picos referentes aos íons *quasi*-moleculares [M⁺H]⁺ (*adutos com prótons*) foram observados em *m/z*

310,2425 (ALC 1a) e m/z 310,2402 (ALC 1b) calculados para $C_{18}H_{32}NO_3^+$, 310,2377 (Espectros 72 e 73).



Espectro 72. IES-EM alta resolução do alcalóide **1a**.

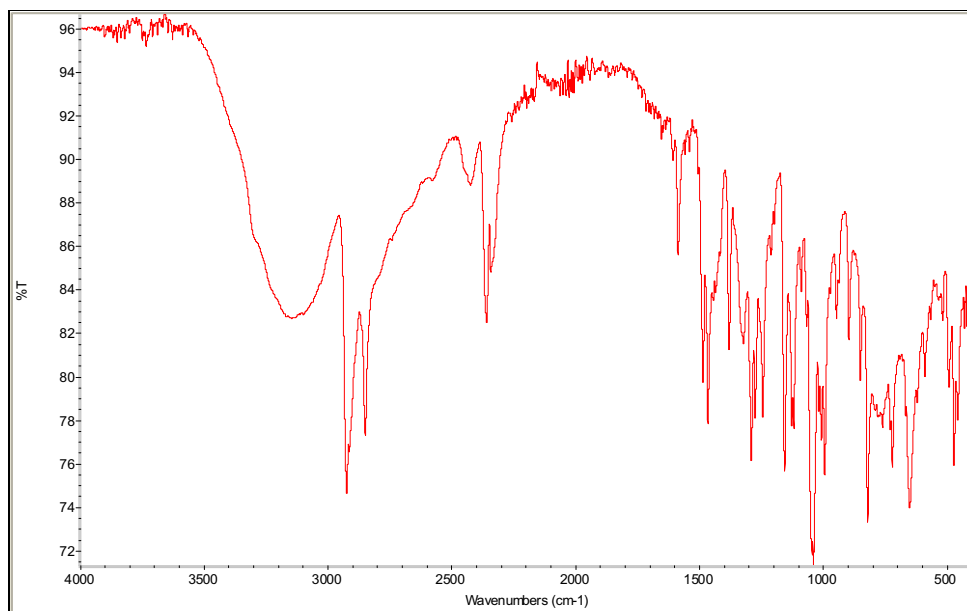


Espectro 73. IES-EM alta resolução do alcalóide **1b**.

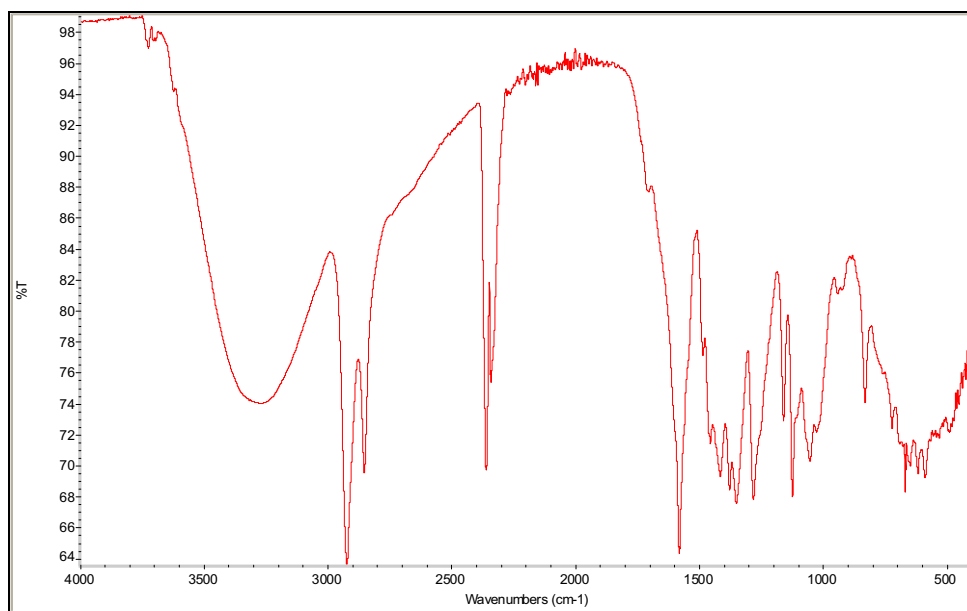
Tal resultado evidencia que os alcalóides **1a** e **1b** podem apresentar uma possível isomeria, sendo ela constitucional ou estereoquímica, uma vez que a massa molecular é idêntica.

Da análise dos espectros na região IV, as bandas de absorção (para os dois alcalóides) foram atribuídas para os grupos funcionais hidroxílicos (3401 cm^{-1}) e o anel piridínico (1596 , 1501 e 1495 cm^{-1}) (Espectros 74 e 75). Na região de UV, o espectro mostrou duas absorções máximas em 222 nm ($\epsilon = 7391$ e $\epsilon = 6448$) e 287 nm ($\epsilon = 5008$

e $\epsilon = 4391$), respectivamente para o ALC 1a e 1b. De acordo com esses resultados, não se pode afirmar nada sobre a possível relação estrutural. Assim sendo, ambos os alcalóides foram submetidos à análise de RMN.



Espectro 74. Espectro na região de IV do alcalóide **1a**.



Espectro 75. Espectro na região de IV do alcalóide **1b**.

Quando a substância alcaloídica **1a**, isolada na forma de um sólido branco e ainda não descrita na literatura, foi submetida á análise por RMN, os resultados interpretados proporcionaram elucidar a sua fórmula estrutural sendo:

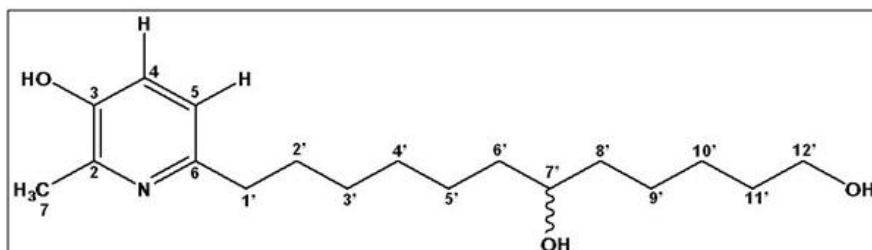
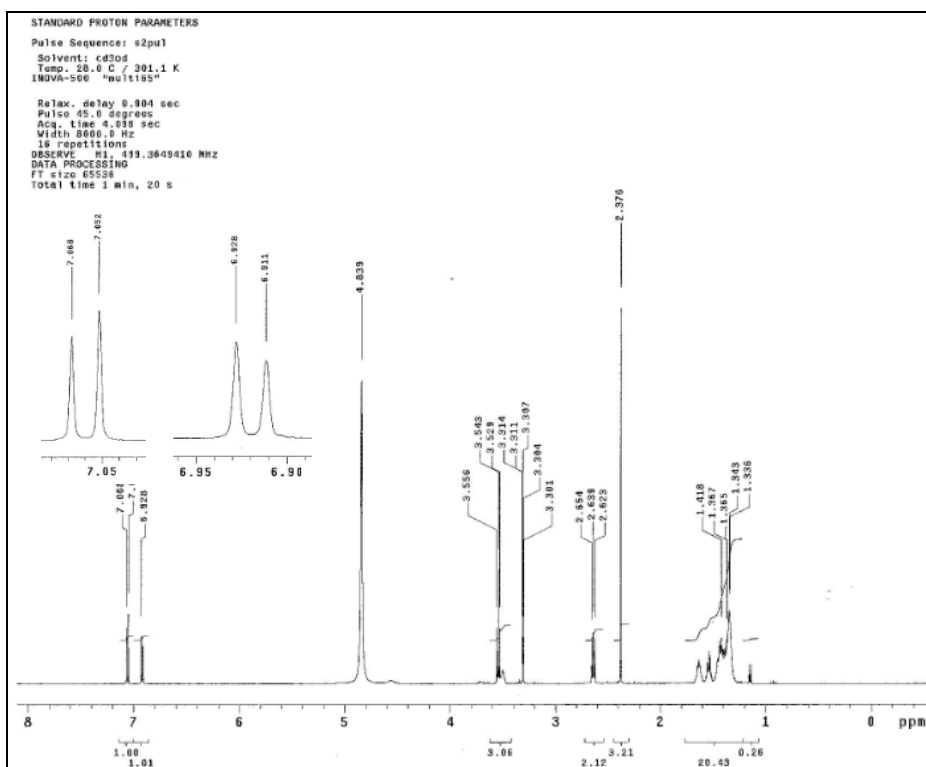
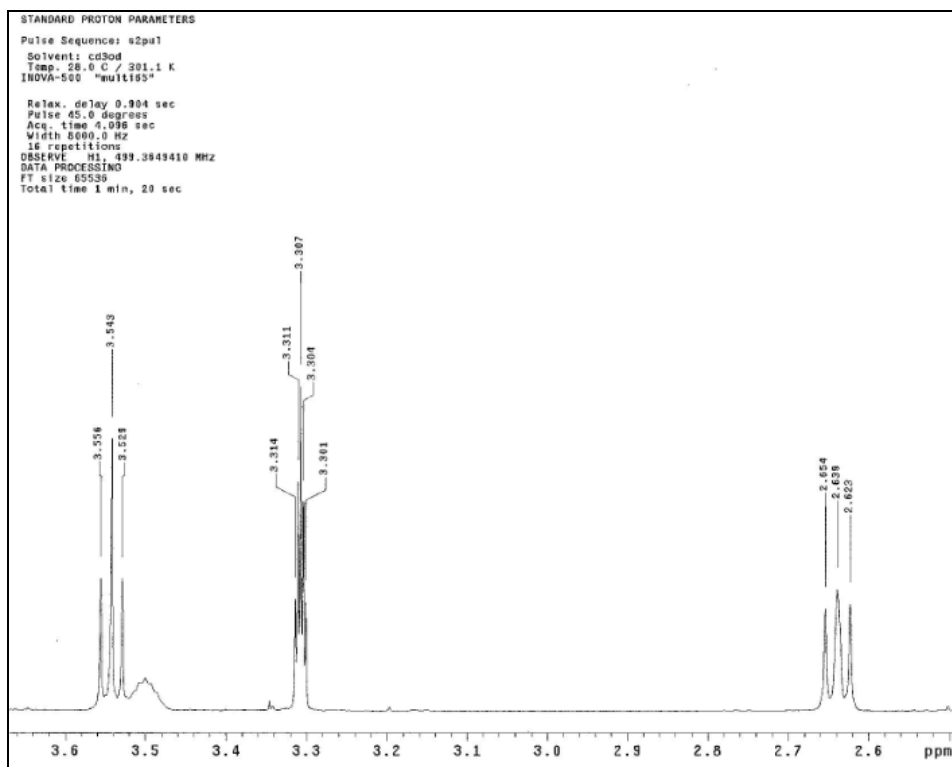


Figura 25. Estrutura química do alcalóide **1a**.

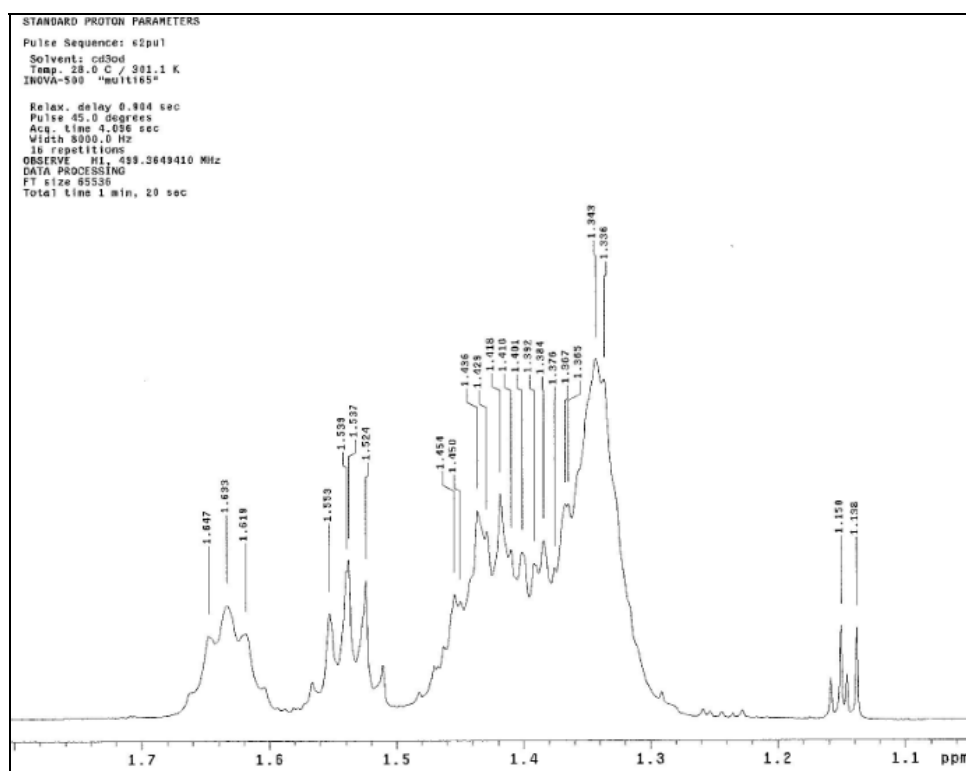
A análise do espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos δ 6,93 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,01 (1H, $J = 8,0$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos na posição *orto*, um singlete em δ 2,38 (3H), característico de um grupo metílico ligado a um sistema aromático e um triplete em δ 3,56 (2H) referente a um hidroximetilênico ligado a um metilênico. Foram observados ainda um triplete; δ 2,65 (2H), três quintupletos em; δ 1,65 (2H), δ 1,55 (2H) e δ 3,50 (1H), que se referente a um hidroximetínico; e dois multipletos em δ 1,37 e δ 1,43 (Espectros 76-78; Tabela 5).



Espectro 76. Espectro de RMN de ^1H de **1a** (500 MHz, CH_3OD).

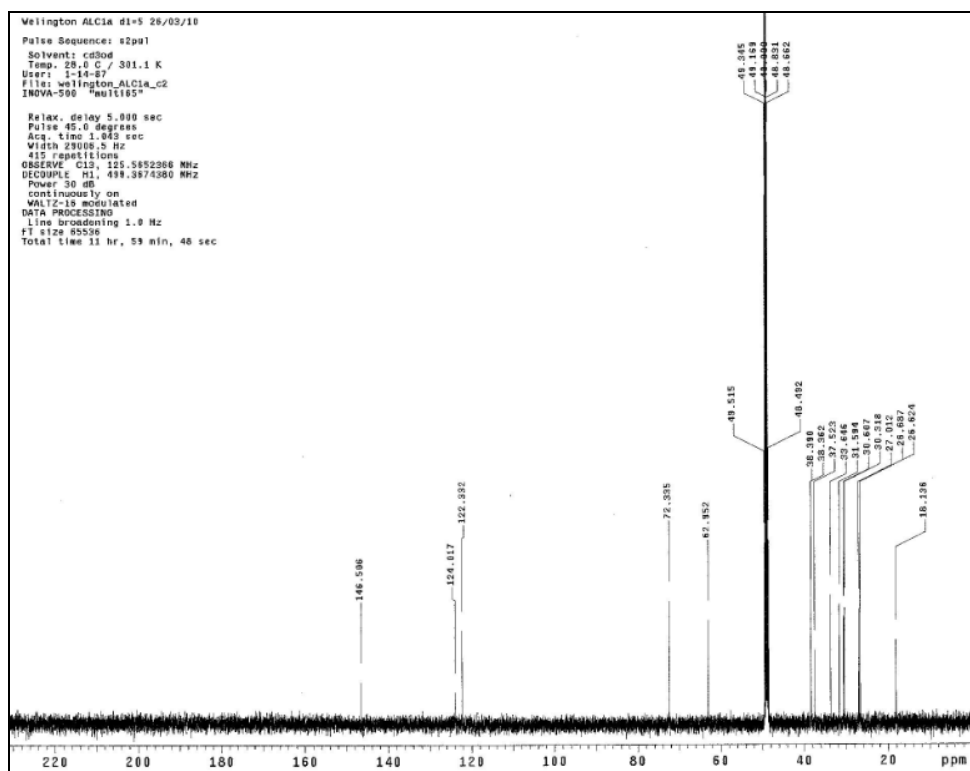


Espectro 77. Ampliação do espectro 76 (δ 3,6–2,6).

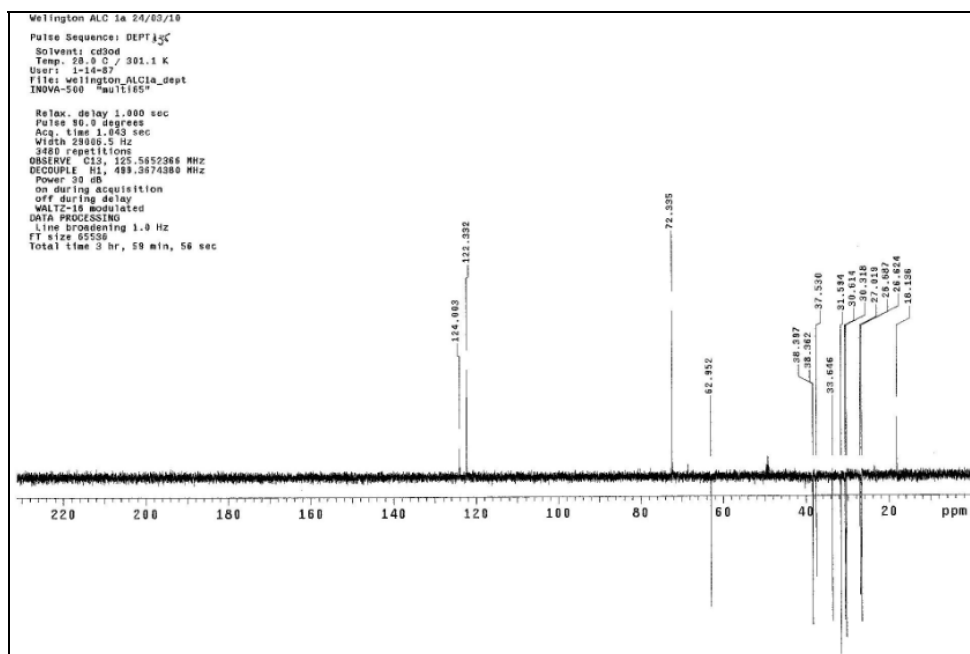


Espectro 78. Ampliação do espectro 76 (δ 1,7–1,1).

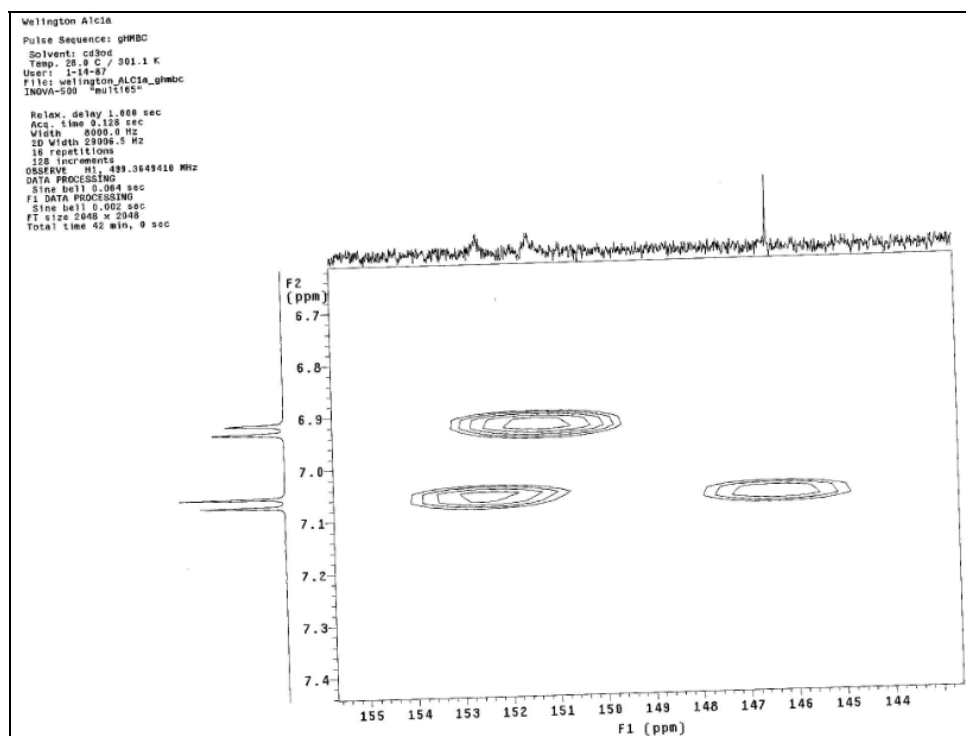
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar apenas três sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo um quaternário (δ 146,5), com deslocamento químico característico de carbono ligado a átomos mais eletronegativos e dois metínicos δ 122,3 e 124,0 (Espectros 79, 80 e 81). Por meio dos mapas de contorno gHMBC observou-se mais dois sinais referentes a carbonos aromáticos, sendo ambos quaternários (δ 151,5 e δ 152,8). Foi observada ainda a presença de um grupo metílico δ 18,2, um hidroximetilênico (δ 62,5), um hidroximetínico em δ 72,3 e dez metilênicos, sugerindo uma cadeia linear com um grupo hidroxílico ligado no meio e ao último carbono (Espectro 79 e 80; Tabela 5). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com os encontrados na literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.



Espectro 79. Espectro de RMN ^{13}C de **1a** (500 MHz, CH_3OD).



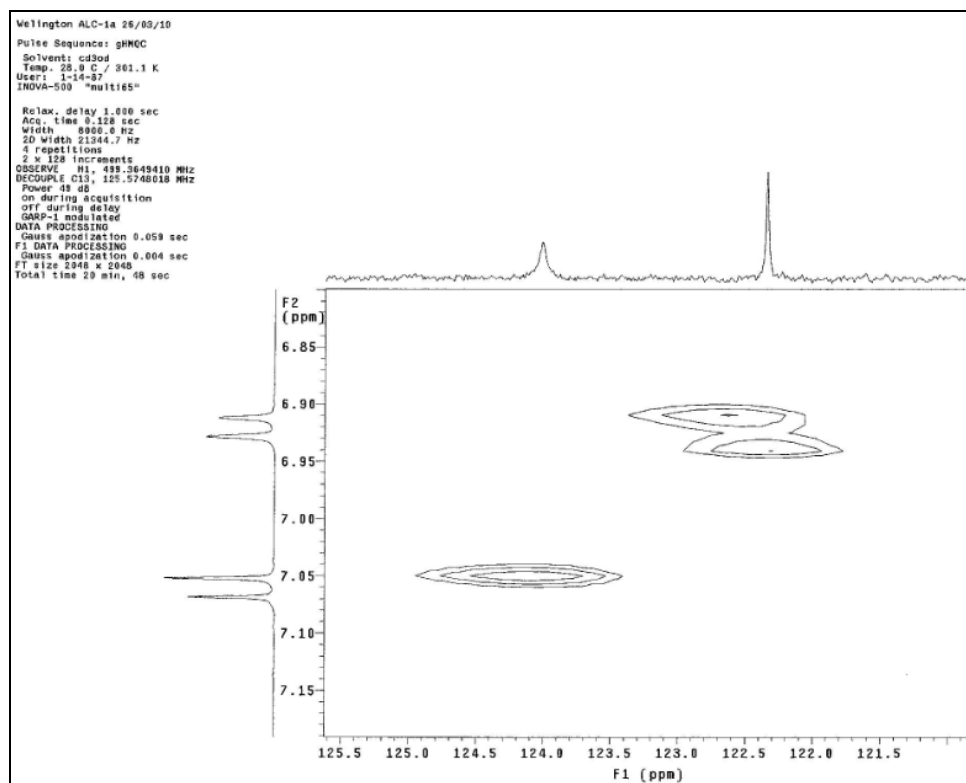
Espectro 80. Espectro de RMN DEPT 135 de **1a** (500 MHz, CH_3OD).



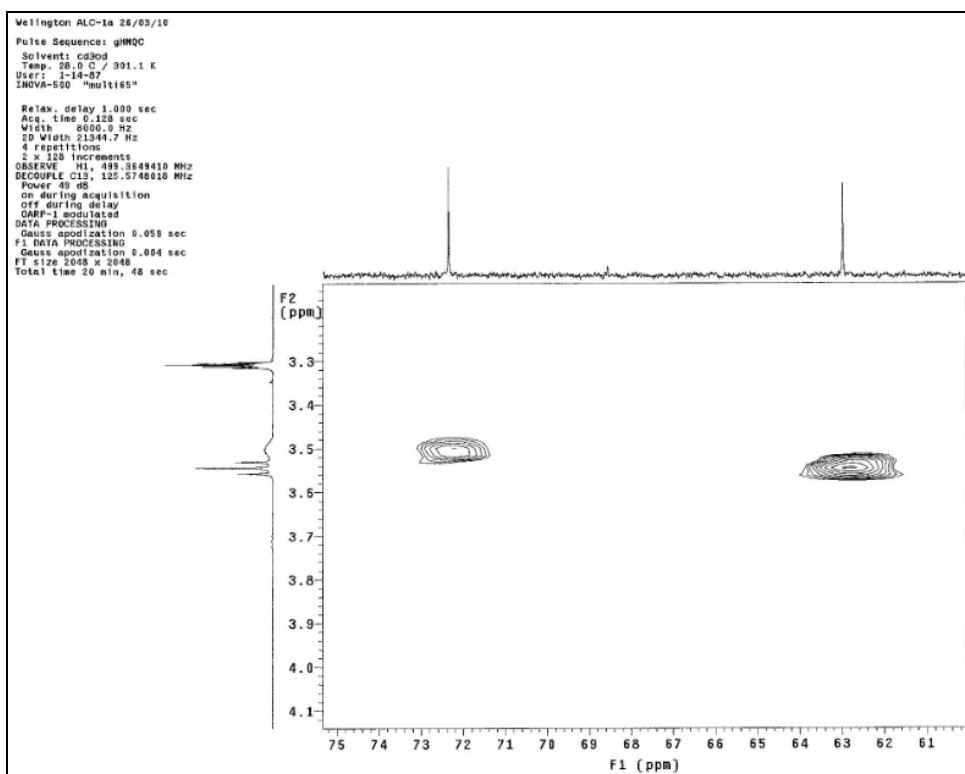
Espectro 81. Mapa de contorno gHMBC de **1a** (δ 144 – 155; 500 MHz; CH₃OD).

A partir dos experimentos de gHMBC foi possível correlacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Espectros 82-84, Tabela 5). Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,01) e C-2 (3J , 146,5), C-5 (2J , 122,3) e C-6 (3J , 152,8) (Espectros 85-87). Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,93) e C-3 (3J , 151,5), C-4 (2J , 124,0), C-6 (2J , 152,8) e C-1' (3J , 37,5), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de um grupo hidroxílico. Outras correlações observadas em relação ao anel piridínico foram entre H-7 (δ 2,37) e C-2 (2J , 146,5) e C-3 (3J , 151,5) (Espectros 85-87, Figura 26, Tabela 5). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,65) e C-5 e H-2' (δ 1,64) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6 no sistema aromático. A linearidade da cadeia foi evidenciada a partir das correlações entre os metilênicos, que dentre as principais destacam-se aquelas entre H-5' (3J , 1,43), H-6' (2J , 1,37), H-8' (2J , 1,43) e H-9' (3J , 1,37) com o hidroximetínico (δ 72,3), além da correlação entre H-7' (2J , 3,50) com o C-8' (δ 38,4), justificando assim a posição do hidroximetínico em C-7'. Correlações entre o hidroximetilênico (H-12', δ 3,56) e C-10' (3J , 27,0) e C-11' (2J , 33,6) e entre H-10' (δ 1,37) e C-8' (3J , 38,4), C-9' (2J , 26,6), C-11'

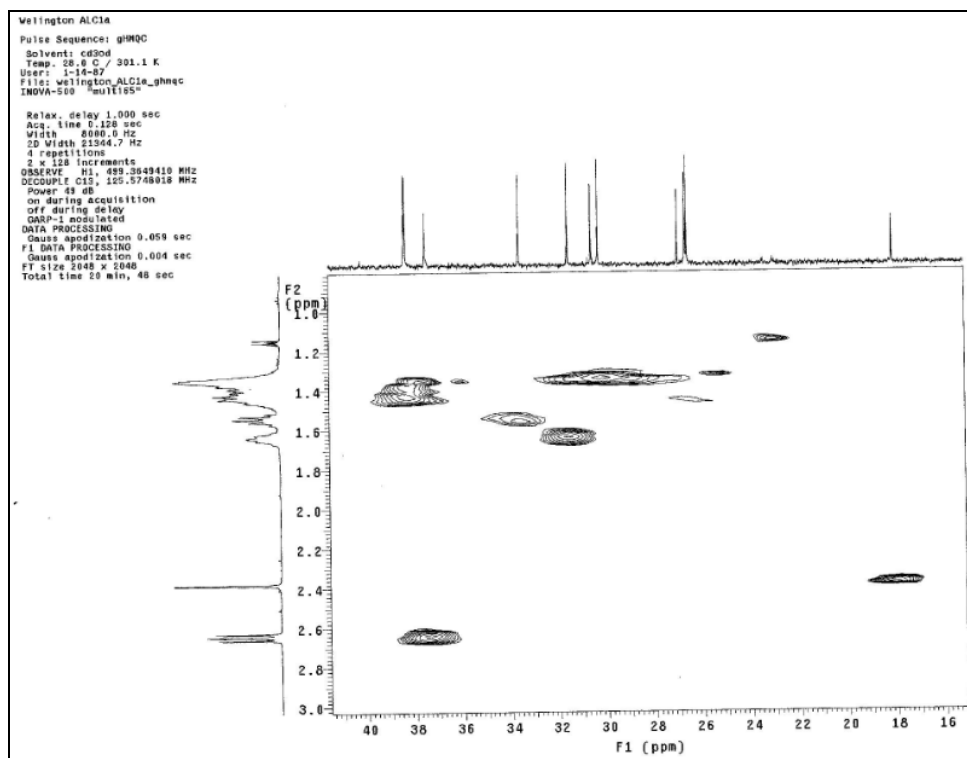
(³J, 33,6) e C-12' (³J, 62,9) corroboram para a linearidade da cadeia e a posição do hidroximetínico (C-7') (Espectros 85-87, Figura 26, Tabela 5).



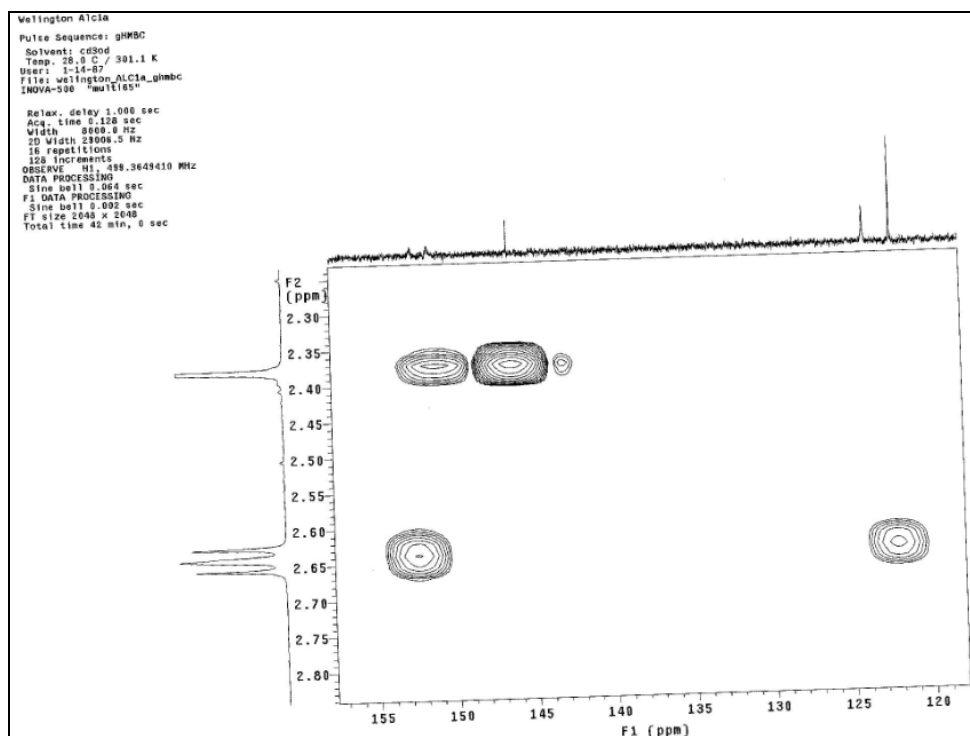
Espectro 82. Mapa de contorno gHMQC de **1a** (δ 121,5 – 125,5; 500 MHz; CH₃OD).



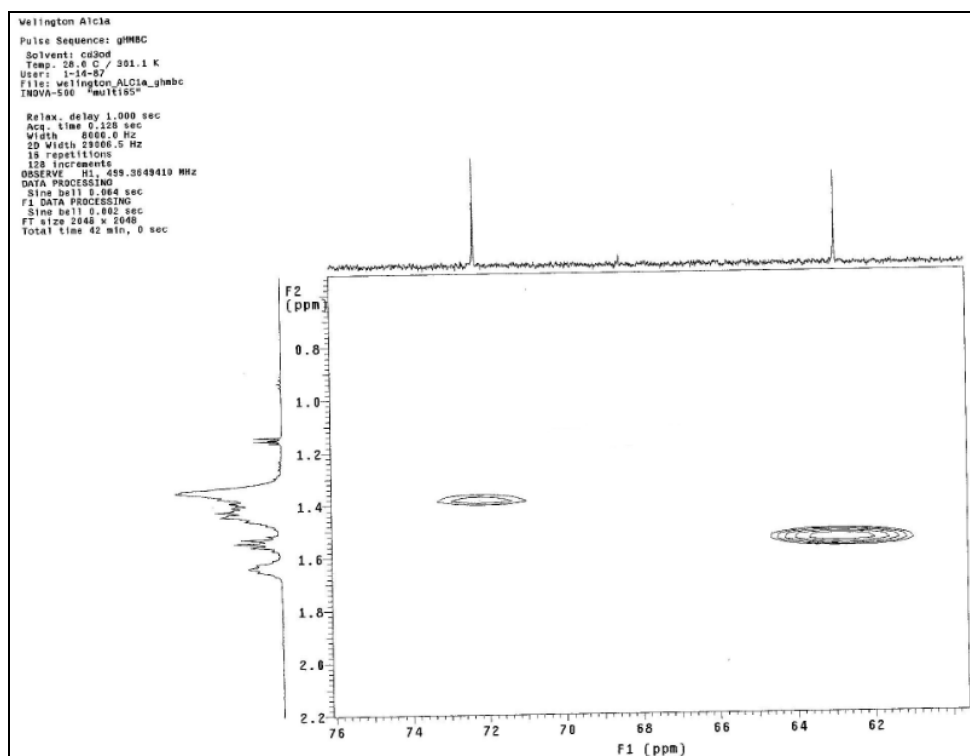
Espectro 83. Mapa de contorno gHMQC de **1a** (δ 61 – 75; 500 MHz; CH₃OD).



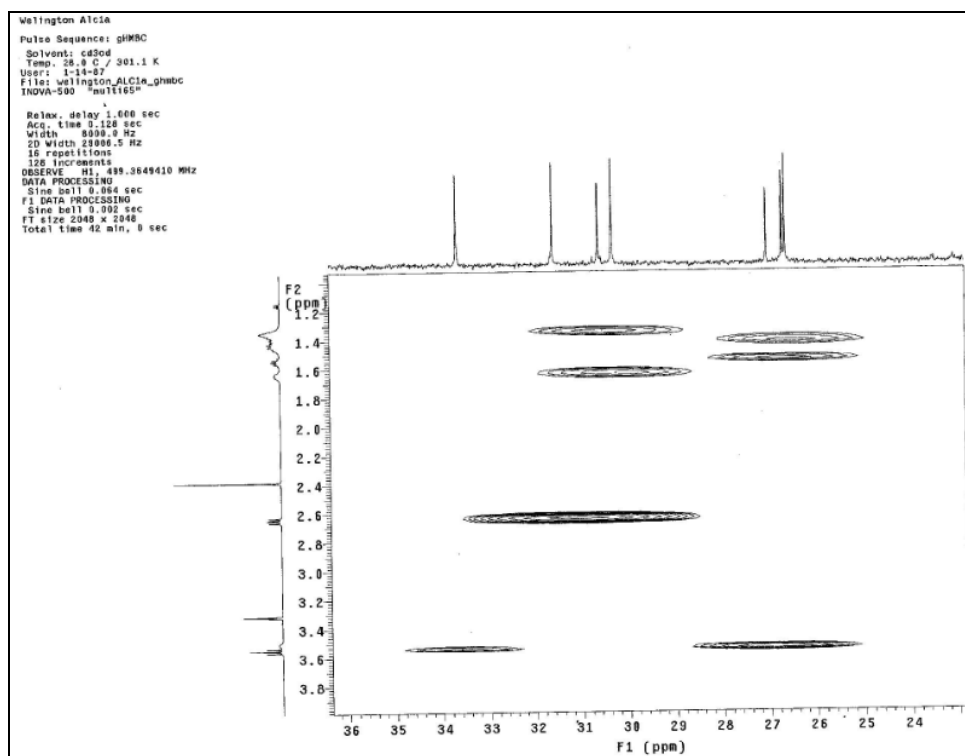
Espectro 84. Mapa de contorno gHMQC de **1a** (δ 16 – 40; 500 MHz; CH₃OD).



Espectro 85. Mapa de contorno gHMBC de **1a** (δ 120 – 155; 500 MHz; CH₃OD).

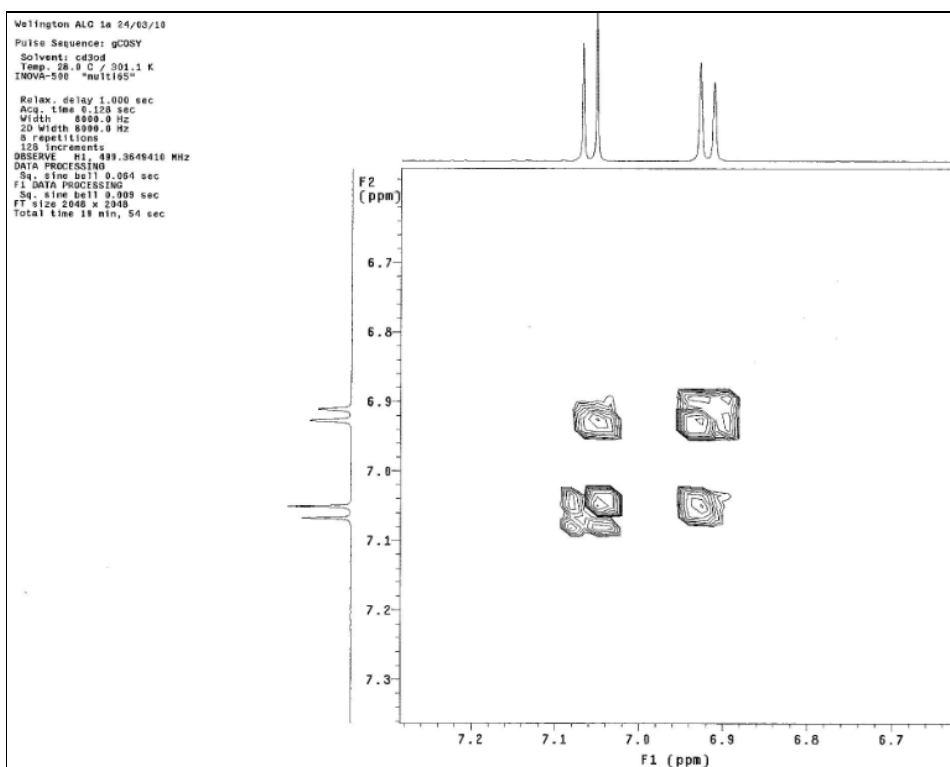


Espectro 86. Mapa de contorno gHMBC de **1a** (δ 62 – 76; 500 MHz; CH₃OD).

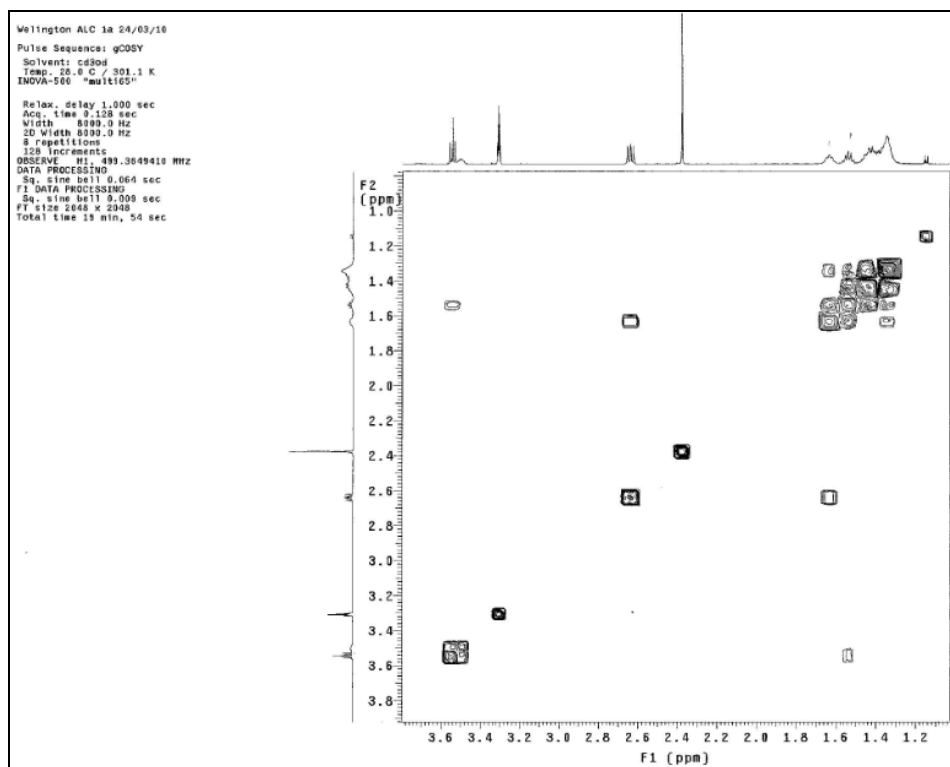


Espectro 87. Mapa de contorno gHMBC de **1a** (δ 24 – 36; 500 MHz; CH₃OD).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, destacando-se as correlações entre H-1' e H-2', H-2' e H-3', H-4' e H-5', H-5' e H-6', H-6' e H-7', H-8' e H-7', H-8' e H-9', H-10' e H-11', H-11' e H-12' (Espectros 88 e 89, Tabela 5).



Espectro 88. Mapa de contorno gCOSY de **1a** (δ 6,7–7,2; 500 MHz; CDCl_3).



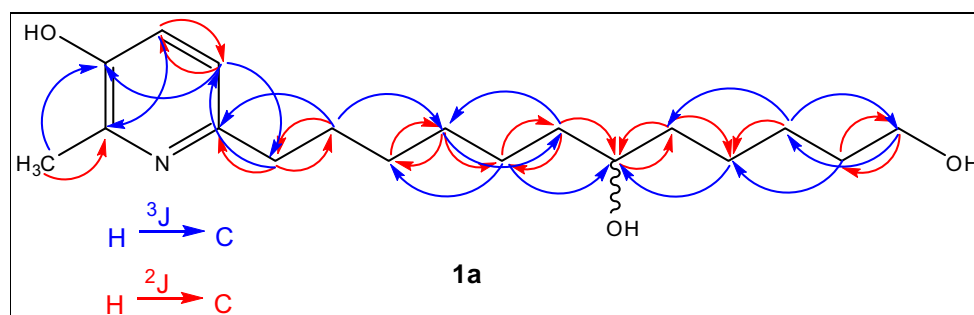
Espectro 89. Mapa de contorno gCOSY de **1a** (δ 1,2–3,6; 500 MHz; CH_3OD).

Tabela 5. Dados de RMN de **1a** em CH₃OD^a

C	δ_C^b	gHMQC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	146,5 s	–	H-4; H-7	–
3	151,5 s	–	H-5; H-7	–
4	124,0 d	7,01 d (8,0)	H-5	H-5
5	122,3 d	6,93 d (8,0)	H-4; H-1'	H-4
6	152,8 s	–	H-4; H-1'; H-2'	–
7	18,1 q	2,37 s	–	–
1'	37,5 t	2,65 t (7,5)	H-5; H-2'	H-2'
2'	31,6 t	1,64 quint. (7,5)	H-1'; H-3'	H-1'; H-3'
3'	30,6 t	1,37 m	H-4'; H-5'	H-2'
4'	30,3 t	1,43 m	H-2'; H-3'; H-5'; H-6'	H-5'
5'	26,6 t	1,43 m	H-3'; H-4'; H-6'; H-7'	H-4'; H-6'
6'	38,4 t	1,37 m	H-4'; H-5'; H-7'	H-5'; H-7'
7'	72,3 d	3,50 m	H-5'; H-6'; H-8'; H-9'	H-5'; H-8'
8'	38,4 t	1,43 m	H-9'; H-10'	H-7'; H-9'
9'	26,6 t	1,37 m	H-8'; H-10'; H-11'	H-8'
10'	27,0 t	1,37 m	H-8'; H-9'; H-11'; H-12'	H-11'
11'	33,6 t	1,55 quint. (6,5)	H-9'; H-12'	H-10'; H-12'
12'	62,9 q	3,56 t (6,5)	H-10'; H-11'	H-11'

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

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

**Figura 26.** Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **1a**.

Para o alcalóide **1b**, que foi isolado também na forma de um sólido branco e inédito na literatura, após a análise dos espectros de RMN evidenciou que a estrutura

química é idêntica ao alcalóide **1a** (Figura 27). Tal resultado pode indicar uma possível relação enantiomérica entre os dois compostos.

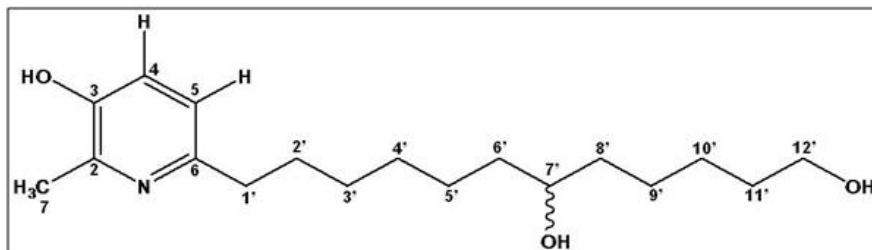
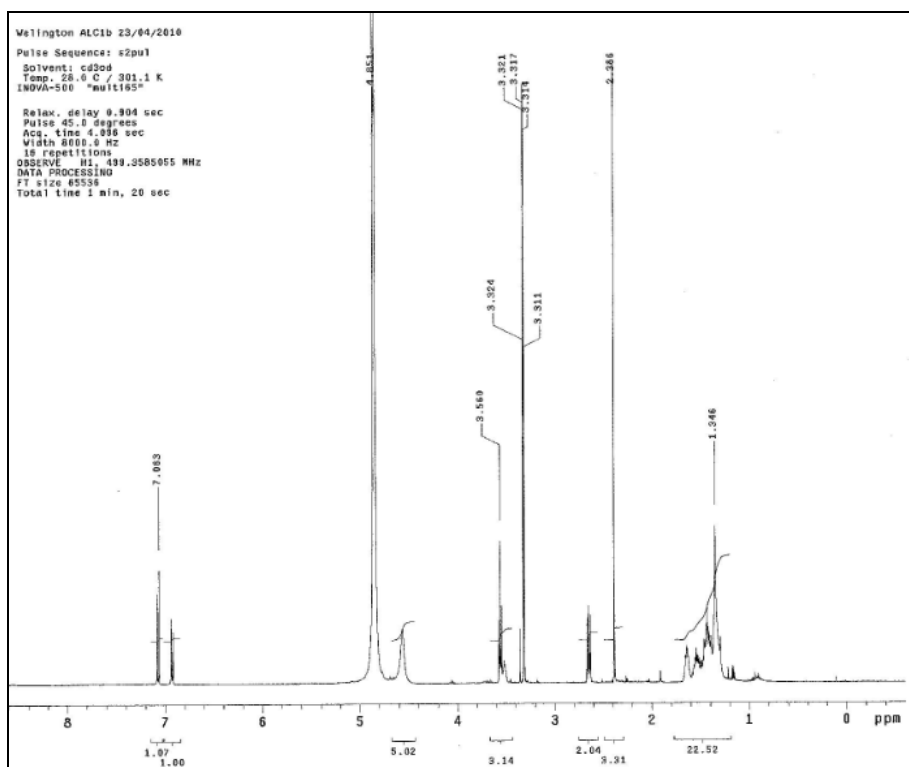
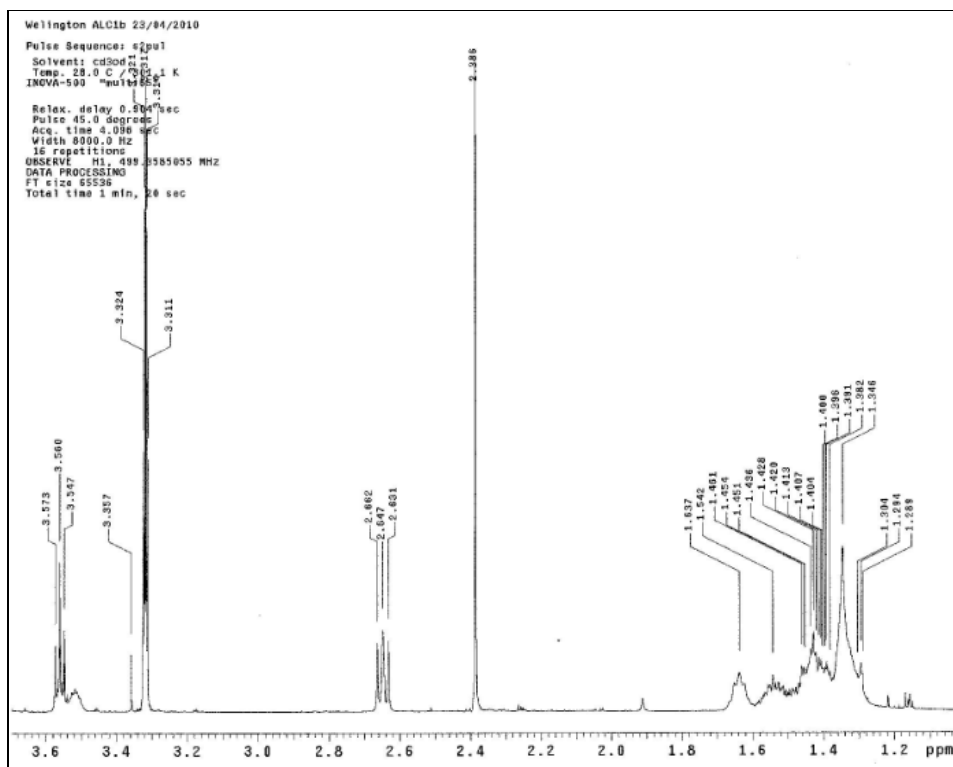


Figura 27. Estrutura química do alcalóide **1b**.

A análise do espectro de RMN de ^1H apresentou dois dubletos δ 6,84 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,08 (1H, $J = 8,0$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos em posição *orto*, um singlete em δ 2,38 (3H), característico de um grupo metílico ligado a um sistema aromático e um triplete em δ 3,57 (2H) referente a um hidroximetilênico ligado a um metilênico. Foram observados ainda um triplete; δ 2,66 (2H), dois quintupletos em; δ 1,64 (2H) e δ 1,55 (2H); e três multipletos em δ 3,50 (1H) que se referente a um hidroximetínico, δ 1,36 e δ 1,43 (Espectro 90 e 91; Tabela 6). Todos os sinais no espectro de RMN de ^1H são muito semelhantes ao do ALC 1a.

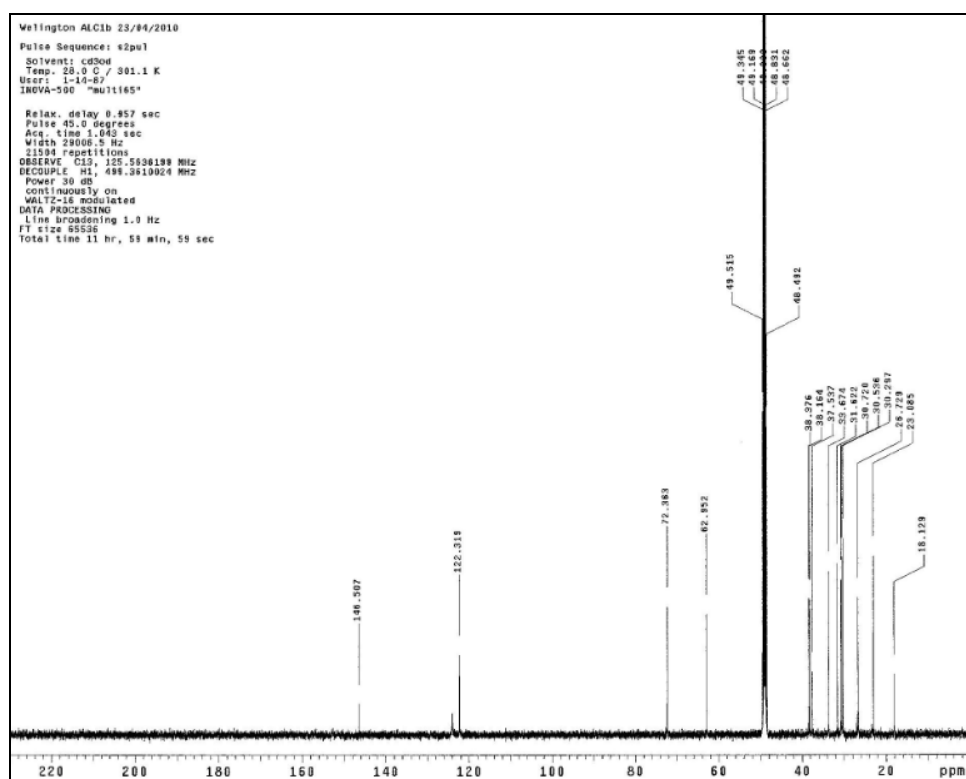


Espectro 90. Espectro de RMN de ^1H de **1b** (500 MHz, CH_3OD).

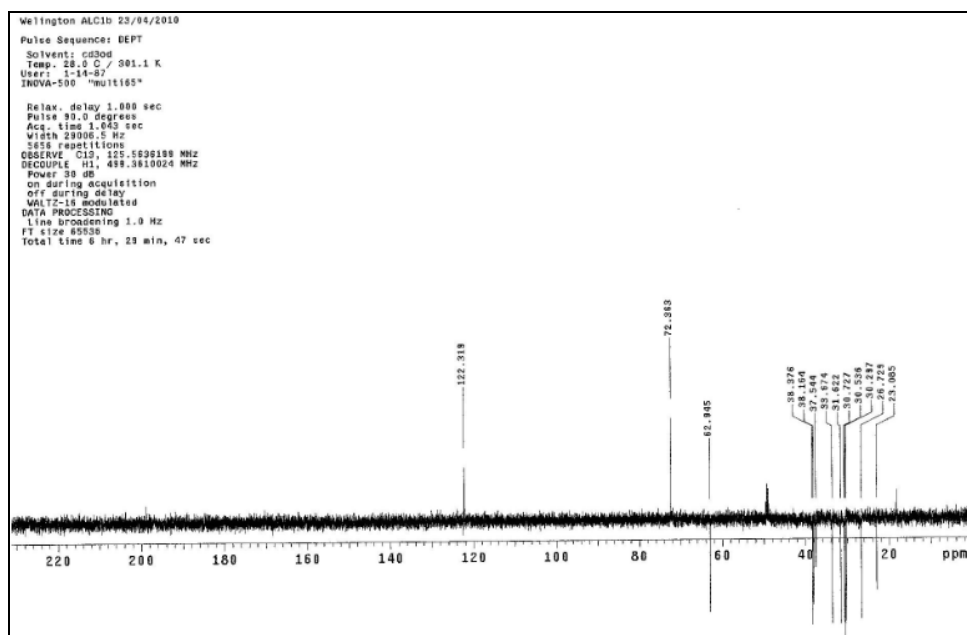


Espectro 91. Ampliação do espectro 90 (δ 1,2–3,6).

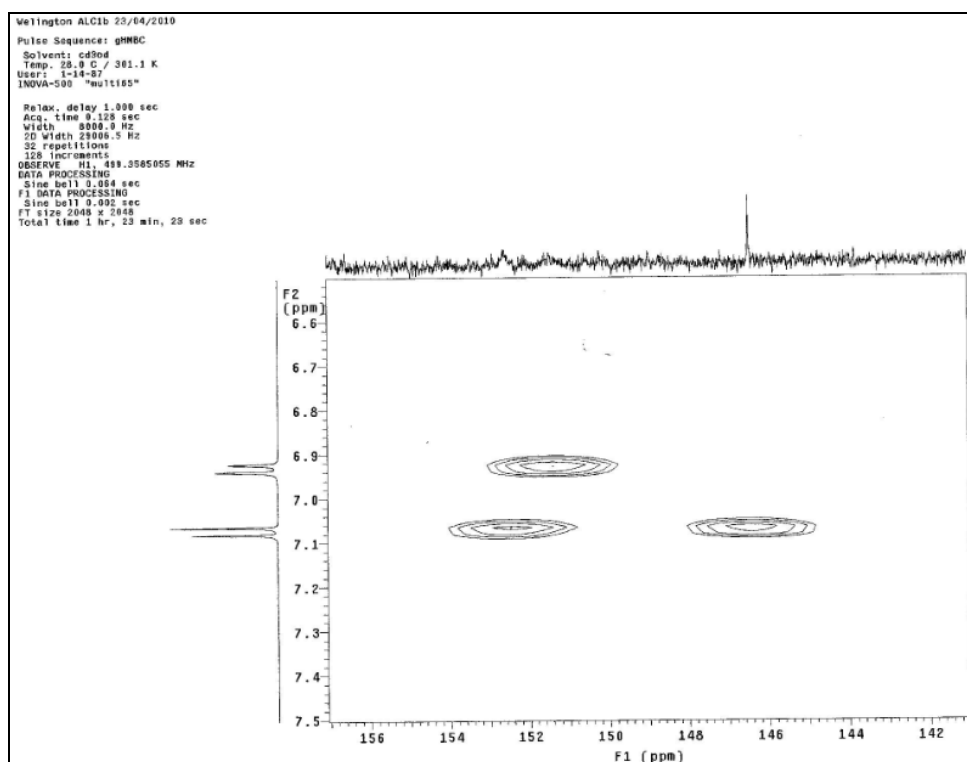
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar apenas três sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo um quaternário (δ 146,5), com deslocamento químico característico de carbono ligado a átomos mais eletronegativos e dois metínicos δ 122,3 e 124,0 (Espectros 92 e 93). Por meio dos mapas de contorno gHMBC observou-se mais dois sinais referentes a carbonos aromáticos, sendo ambos quaternários (δ 151,4 e δ 152,4) (Espectro 94). Foi observada ainda a presença de um grupo metílico δ 18,1, um hidroximetilênico (δ 62,9), um hidroximetínico em δ 72,4 e dez metilênicos, sugerindo uma cadeia linear com um grupo hidroxílico ligado no meio e ao último carbono (Espectros 92 e 93; Tabela 6). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com os encontrados na literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.



Espectro 92. Espectro de RMN ^{13}C de **1b** (500 MHz, CH_3OD).



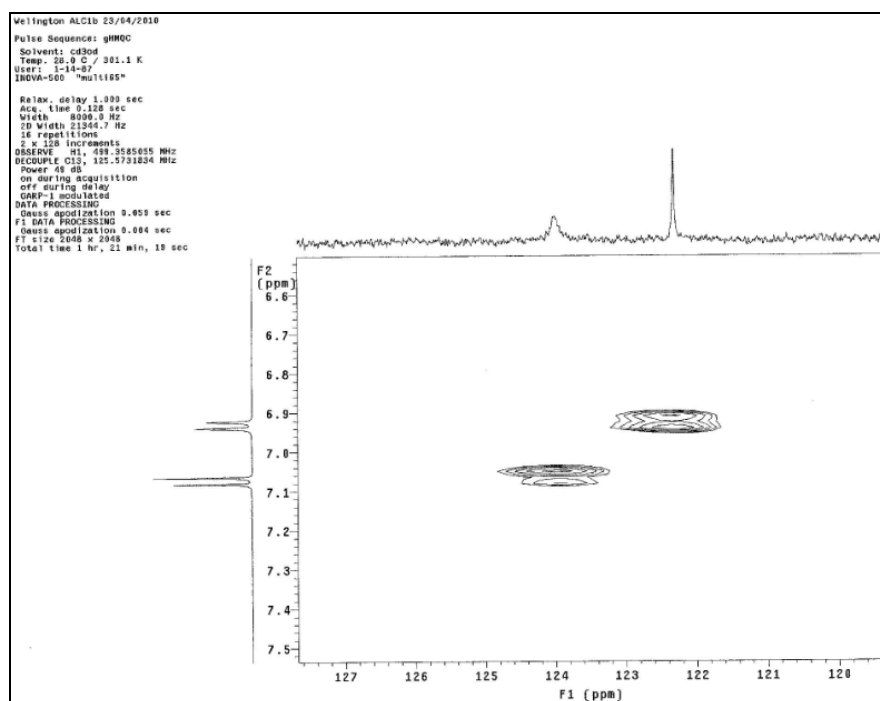
Espectro 93. Espectro de RMN DEPT 135 de **1b** (500 MHz, CH₃OD).



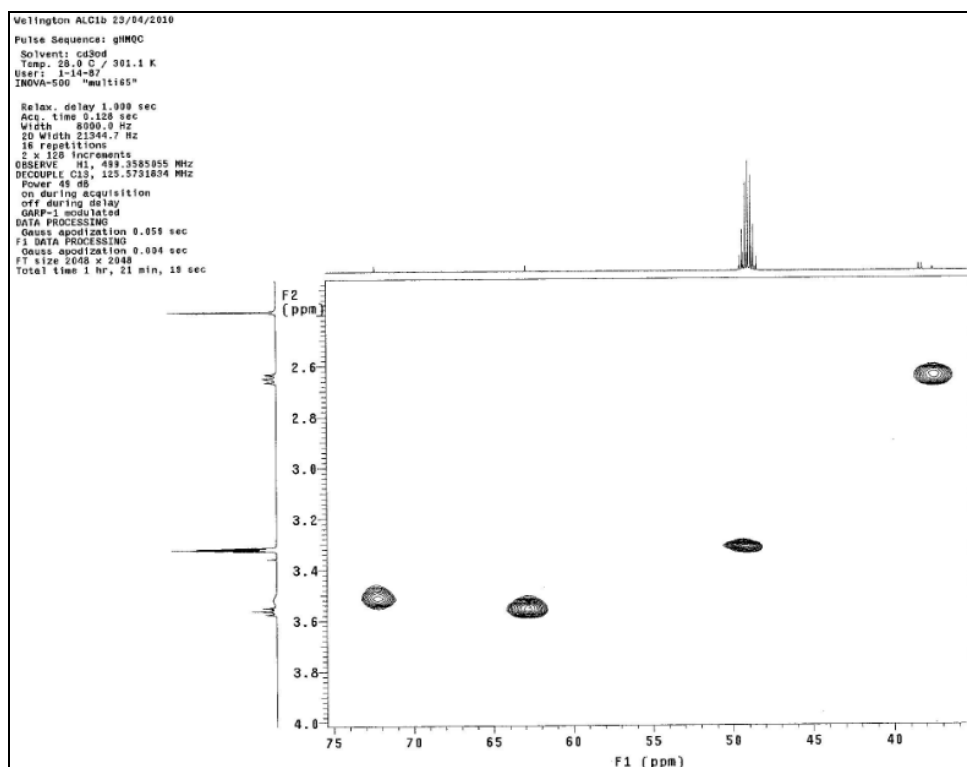
Espectro 94. Mapa de contorno gHMBC de **1b** (δ 142–156; 500 MHz; CH₃OD).

A partir dos experimentos de gHMBC foi possível correlacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Espectros 95-97, Tabela 5). Para as atribuições dos

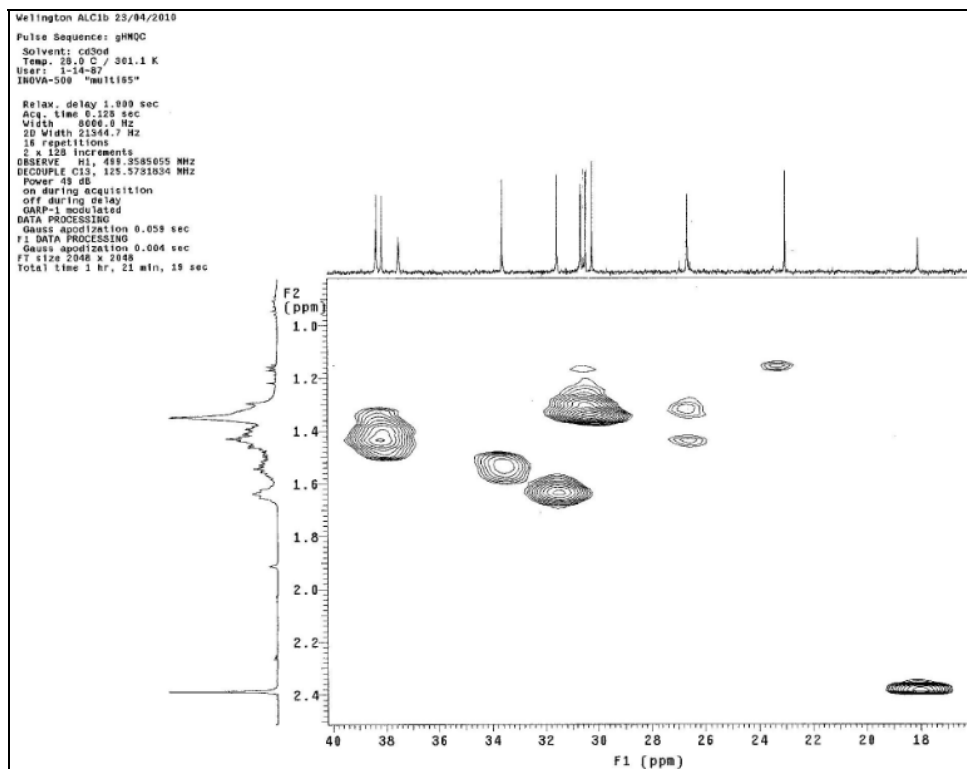
hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,08) e C-2 (3J , 146,5), C-5 (2J , 122,3) e C-6 (3J , 152,4) (Espectro 98). Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,84) e C-3 (3J , 151,4), C-4 (2J , 124,0), C-6 (2J , 152,4) e C-1' (3J , 37,5), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de um grupo hidroxílico. Outras correlações observadas em relação ao anel piridínico foram entre H-7 (δ 2,38) e C-2 (2J , 146,5) e C-3 (3J , 151,4) (Espectros 98, 99 e 100, Figura 28, Tabela 6). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,66) e C-5 e H-2' (δ 1,64) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6 no sistema aromático. A linearidade da cadeia foi evidenciada a partir das correlações entre os metilênicos, que dentre as principais destacam-se aquelas entre H-5' (3J , 1,43), H-6' (2J , 1,36), H-8' (2J , 1,43) e H-9' (3J , 1,36) com o hidroximetínico (δ 72,4), além da correlação entre H-7' (2J , 3,50) com o C-8' (δ 38,3), justificando assim a posição do hidroximetínico também em C-7'. Correlações entre o hidroximetilênico (H-12', δ 3,57) e C-10' (3J , 27,0) e C-11' (2J , 33,7) e entre H-10' (δ 1,36) e C-8' (3J , 38,1), C-9' (2J , 26,6), C-11' (3J , 33,7) e C-12' (3J , 62,9) corroboram para a linearidade da cadeia e a posição do hidroximetínico (C-7) (Espectros 98-100, Figura 28, Tabela 6).



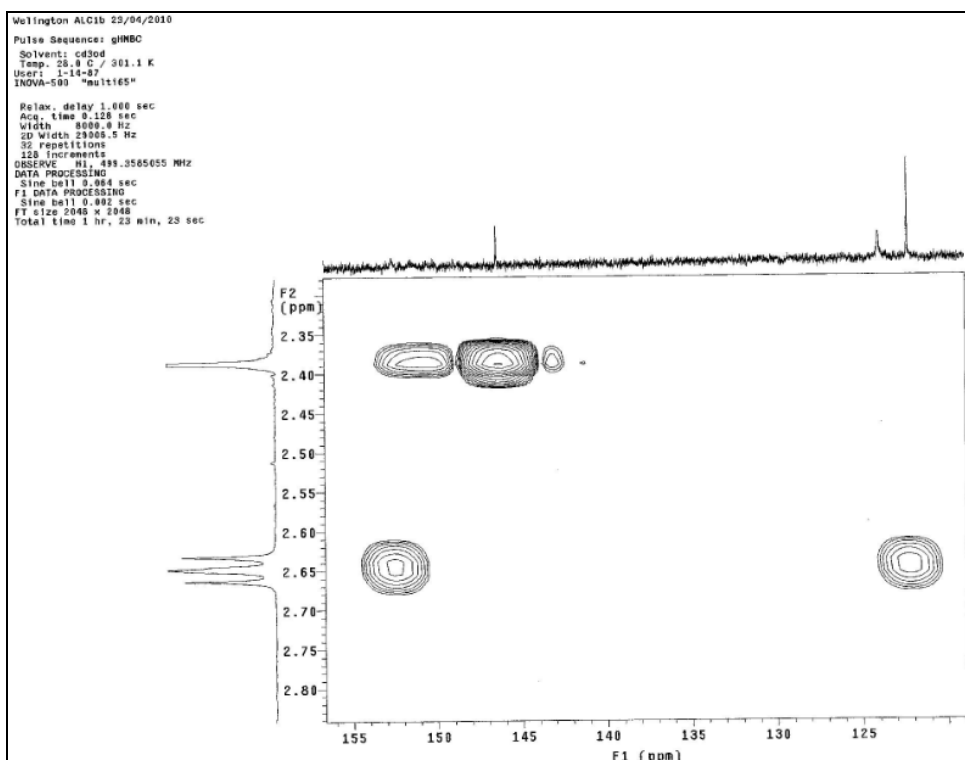
Espectro 95. Mapa de contorno gHMBC de **1b** (δ 120 – 127; 500 MHz; CH₃OD).



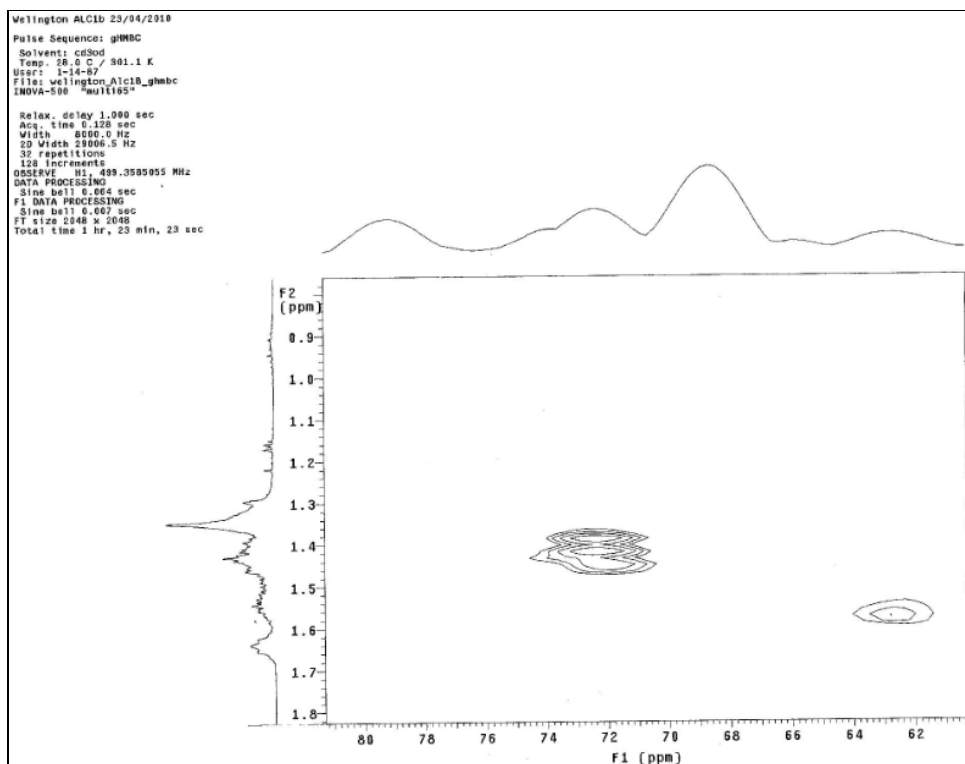
Espectro 96. Mapa de contorno gHMOC de **1b** (δ 40 –75; 500 MHz; CH₃OD).



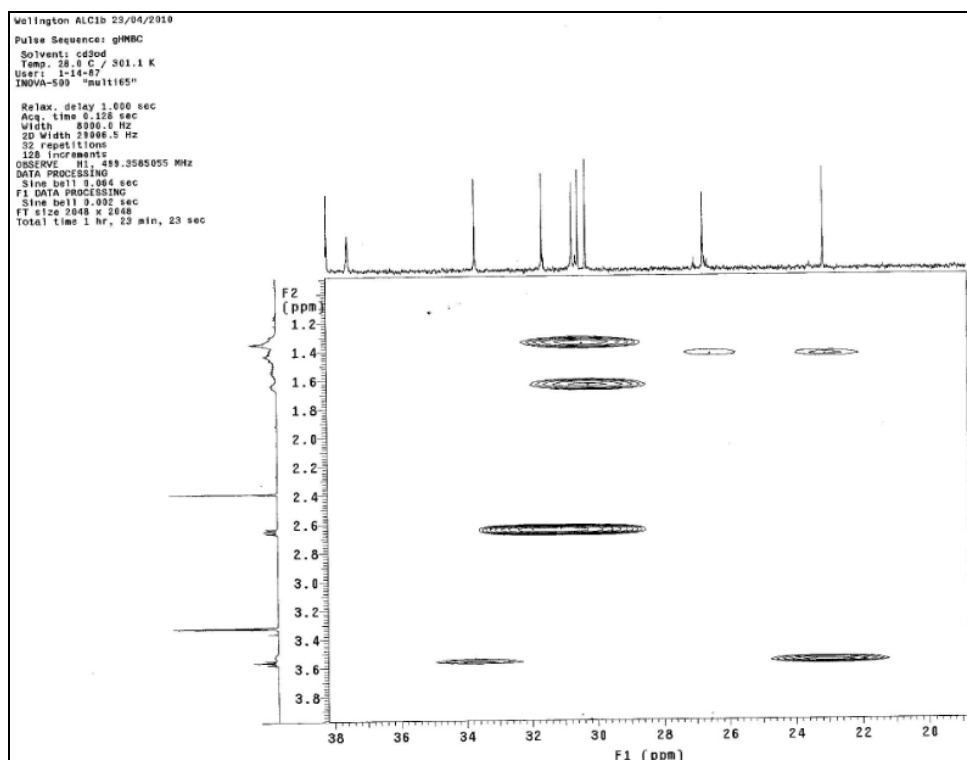
Espectro 97. Mapa de contorno gHMOC de **1b** (δ 18 – 40; 500 MHz; CH₃OD).



Espectro 98. Mapa de contorno gHMBC de **1b** (δ 125–155; 500 MHz; CH₃OD).

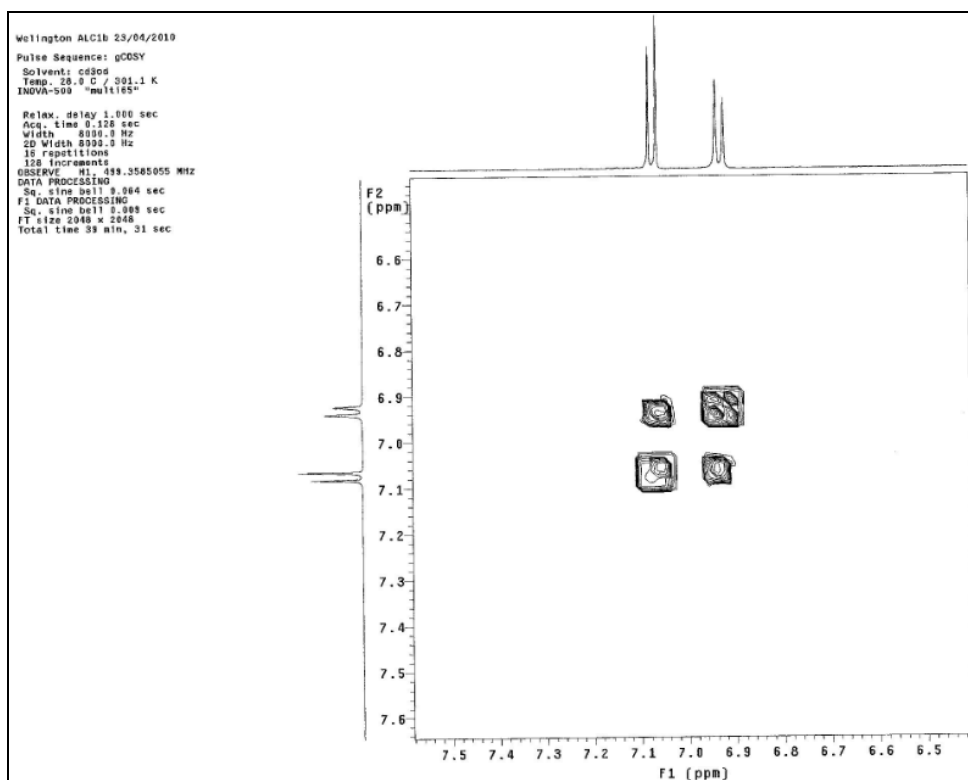


Espectro 99. Mapa de contorno gHMBC de **1b** (δ 62–80; 500 MHz; CH₃OD).

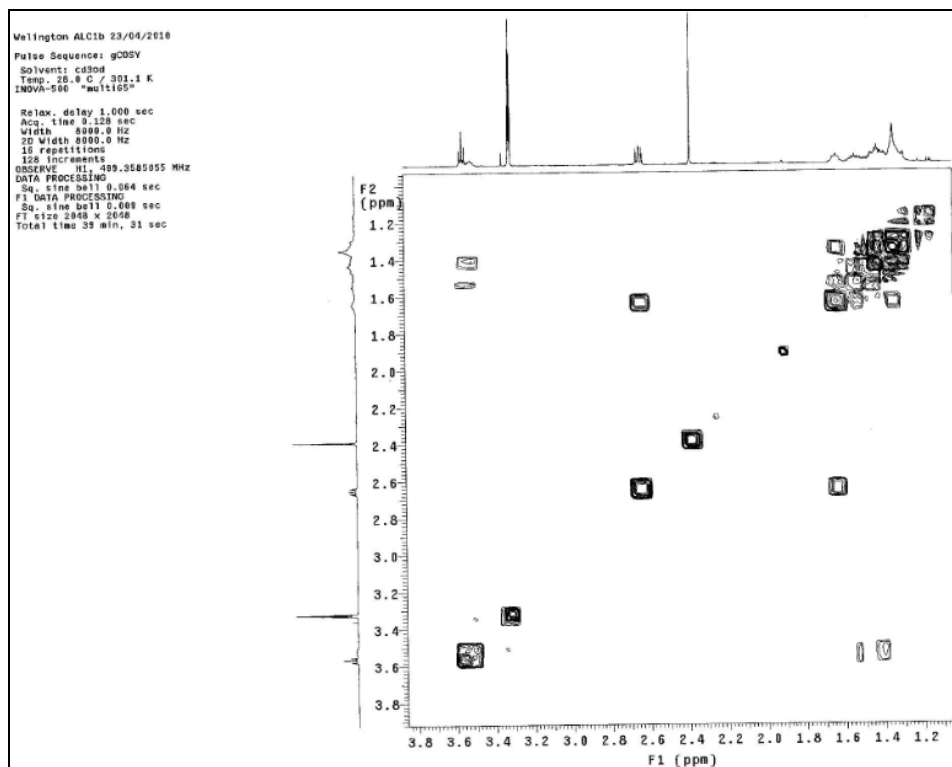


Espectro 100. Mapa de contorno gHMBC de **1b** (δ 26–38; 500 MHz; CH₃OD).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico e a linearidade da cadeia lateral em C-6, destacando-se as correlações entre H-1' e H-2', H-2' e H-3', H-4' e H-5', H-5' e H-6', H-6' e H-7', H-8' e H-7', H-8' e H-9', H-10' e H-11', H-11' e H-12' (Espectros 101e 102 , Tabela 6).



Espectro 101. Mapa de contorno gCOSY de **1b** (δ 6,5–7,5; 500 MHz; CH₃OD).



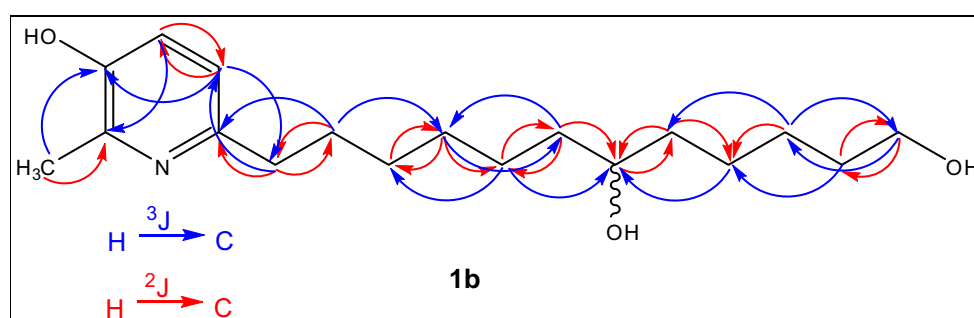
Espectro 102. Mapa de contorno gCOSY de **1b** (δ 1,2–3,8; 500 MHz; CH₃OD).

Tabela 6. Dados de RMN de **1b** em CH₃OD^a.

C	δ_C^b	gHMQC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	146,5 s	–	H-4; H-7	–
3	151,4 s	–	H-5; H-7	–
4	124,0 d	7,08 d (8,0)	H-5	H-5
5	122,3 d	6,84 d (8,0)	H-4; H-1'	H-4
6	152,4 s	–	H-4; H-1'; H-2'	–
7	18,1 q	2,38 s	–	–
1'	37,5 t	2,66 t (7,5)	H-5; H-2'	H-2'
2'	31,6 t	1,64 quint. (7,5)	H-1'; H-3'	H-1'; H-3'
3'	30,6 t	1,36 m	H-4'; H-5'	H-2'
4'	30,3 t	1,43 m	H-2'; H-3'; H-5'; H-6'	H-5'
5'	26,7 t	1,43 m	H-3'; H-4'; H-6'; H-7'	H-4'; H-6'
6'	38,3 t	1,36 m	H-4'; H-5'; H-7'	H-5'; H-7'
7'	72,4 d	3,50 m	H-5'; H-6'; H-8'; H-9'	H-5'; H-8'
8'	38,1 t	1,43 m	H-9'; H-10'	H-7'; H-9'
9'	26,6 t	1,36 m	H-8'; H-10'; H-11'	H-8'
10'	27,0 t	1,36 m	H-8'; H-9'; H-11'; H-12'	H-11'
11'	33,7 t	1,54 quint. (6,5)	H-9'; H-12'	H-10'; H-12'
12'	62,9 q	3,57 t (6,5)	H-10'; H-11'	H-11'

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

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

**Figura 28.** Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **1b**.

Como as estruturas químicas dos alcalóides **1a** e **1b**, de acordo com as análises dos dados espectroscópicos e espectrométricos foram idênticas, e ambos apresentam apenas um centro estereogênico, é possível que as estruturas apresentem uma relação

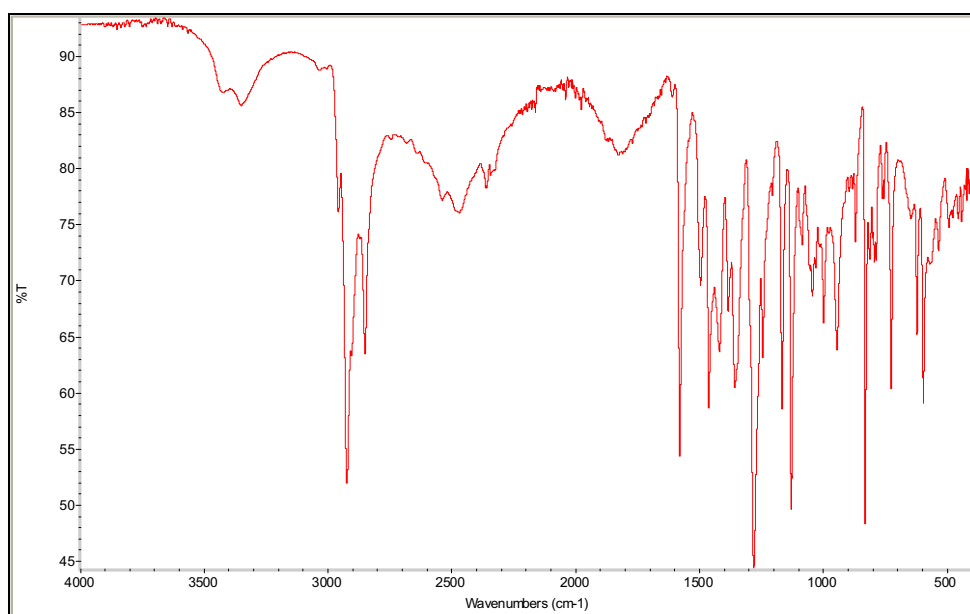
enantiomérica. Para intentar explicar tais resultados e buscar outras evidências, foi realizado o experimento para avaliar o comportamento das substâncias em relação à luz *plano-polarizada*, para conhecer a rotação específica de cada um. Os resultados indicaram um $[\alpha_D^{27,4}] = -13,4^u$ e $[\alpha_E^{27,5}] = -17,1^e$ para o ALC 1a e ALC 1b, respectivamente, na concentração de 0,10 g/100 mL.

De acordo com esses valores, pode-se dizer que esses alcalóides não são enansiômeros, mas podem apresentar algum tipo de isomeria constitucional, como por exemplo, a troca da posição do grupo hidroxílico em C-7'. Sendo assim, é preciso mais evidências experimentais para se propor qual a relação isomérica entre as duas estruturas, a qual não possível realizar ainda.

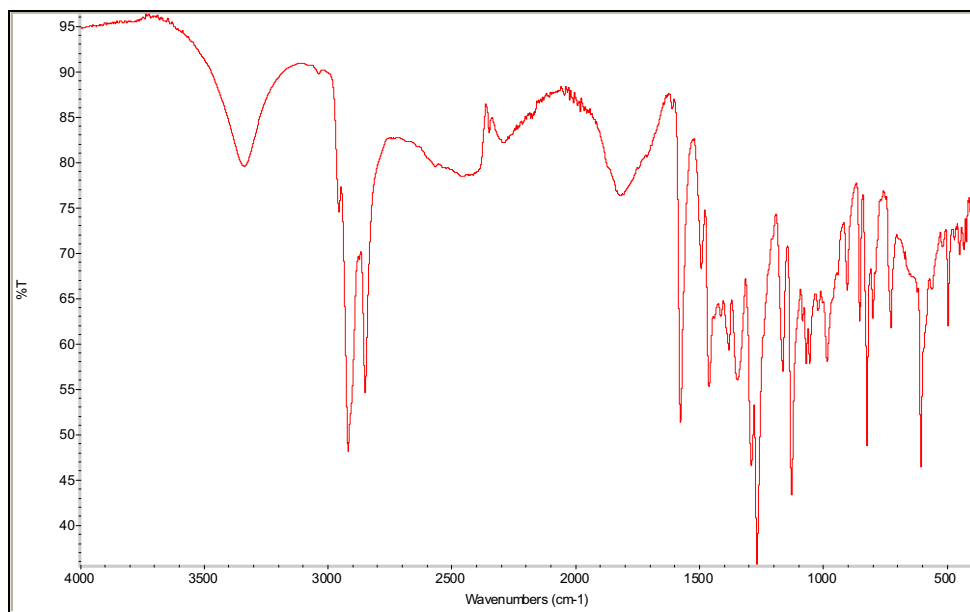
4.2.5. Qual a relação estrutural entre os alcalóides 4a e 4b isolados?

De acordo com os resultados apresentados por CLAE, sobretudo a proximidade dos tempos de retenção e a intensidade do pico, os alcalóides **4a** e **4b** também podem possuir algum tipo de isomeria ou serem um par homólogo. Para propor com a relação, ambas as substâncias foram submetidas às análises de absorção na região do IV e UV, a análise por EM e por RMN.

Os dados fornecidos pela absorção na região do IV de ambos os alcalóides forneceram as seguintes informações: presença de grupos funcionais hidroxílicos com absorção em 3390 cm^{-1} , uma deformação axial C–O em 1037 cm^{-1} uma absorção em 1598 , 1509 e 1480 cm^{-1} que foi atribuída para o anel aromático, caracterizando, portanto, um anel piridínico (Espectros 103 e 104). Na região de UV, o espectro mostrou duas absorções máximas, sendo uma em 222 nm ($\epsilon = 7491$ e $\epsilon = 9237$) e 287 nm ($\epsilon = 5714$ e $\epsilon = 6957$), respectivamente para o ALC 4a e 4b.



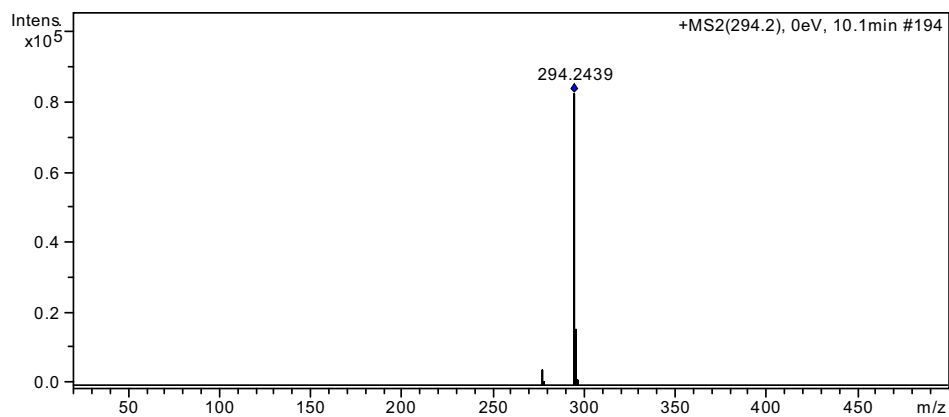
Espectro 103. Espectro na região de IV do alcalóide **4a**.



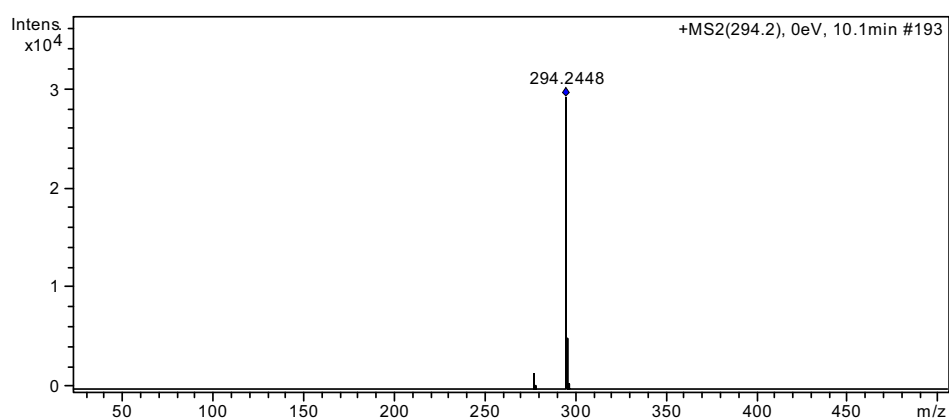
Espectro 104. Espectro na região de IV do alcalóide **4b**.

Os resultados obtidos por meio dos espectros de massas evidenciaram que os alcalóides **4a** e **4b** possuem algum tipo de isomeria, sendo esta constitucional ou estereoquímica. Isto porque foi possível instituir a fórmula molecular como sendo $C_{18}H_{31}NO_2$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a quatro para os dois alcalóides. Os picos referentes aos íons *quasi*-molecular $[M+H]^+$ (*adutos com prótons*)

foram observados em m/z 294,2439 (ALC 4a) e 294,2448 (ALC 4b) e calculados para $C_{18}H_{31}NO_2^+$, 294,2428 (Espectros 105 e 106).



Espectro 105. IES-EM alta resolução do alcalóide **4a**.



Espectro 106. IES-EM alta resolução do alcalóide **4b**.

A partir da análise dos espectros de RMN, foi possível elucidar a estrutura dos dois alcalóides. O alcalóide **4a** foi isolado na forma de um sólido branco, sendo sua estrutura inédita na literatura (Figura 29).

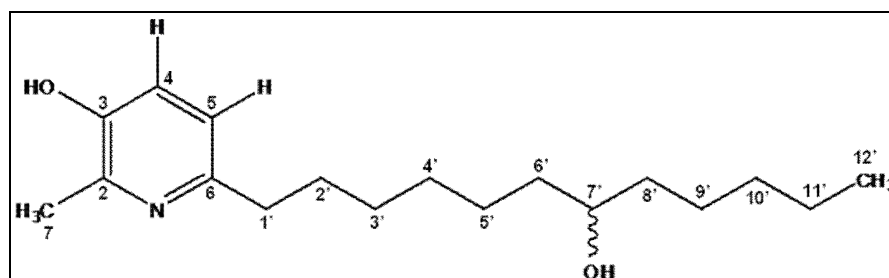
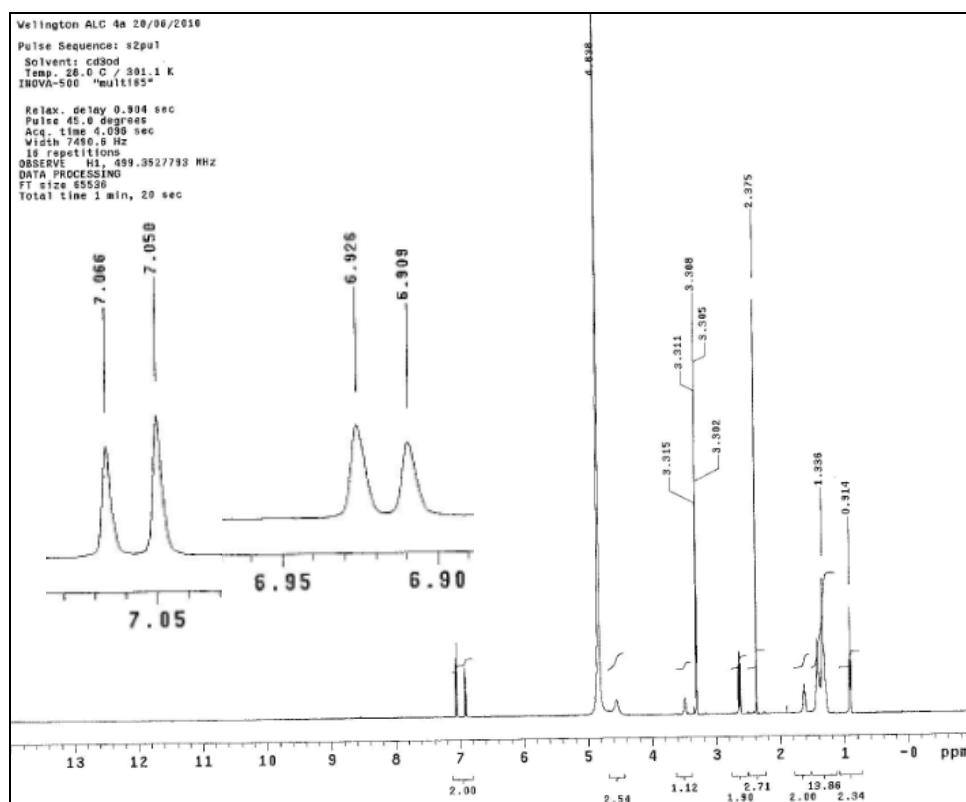
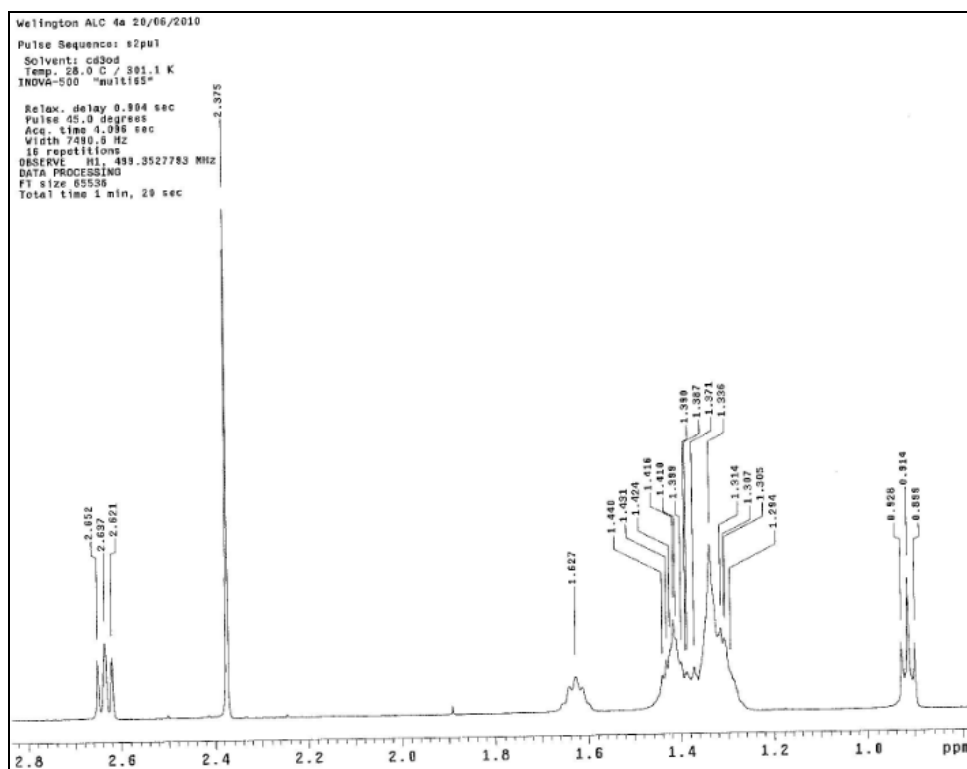


Figura 29. Estrutura química do alcalóide **4a**.

Com a interpretação dos espectros de RMN ^1H foi possível identificar dois dubletos δ 6,93 (1H, $J=8,0$ Hz) e δ 7,06 (1H, $J=8,0$ Hz), indicando hidrogênios aromáticos em posição *orto*, um singlete em δ 2,38 (3H), característico de grupo metílico ligado a um sistema aromático e um triplete em δ 0,94 (3H) referente a um grupo metílico ligado a um metilênico. Foram observados ainda um triplete; δ 2,65 (2H), dois quintupletos em δ 1,65 (2H) e δ 3,50 (1H), referente a um hidroximetínico; e dois multipletos em δ 1,33 e δ 1,42 (Espectros 107 e 108; Tabela 7).

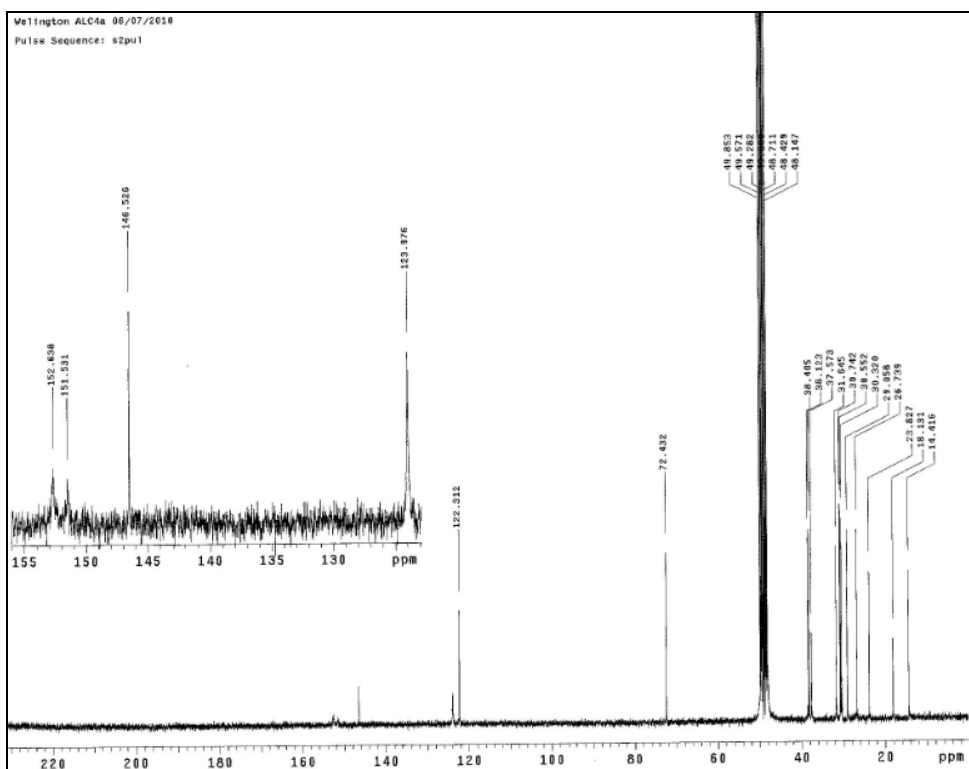


Espectro 107. Espectro de RMN de ^1H de **4a** (500 MHz, CH_3OD).

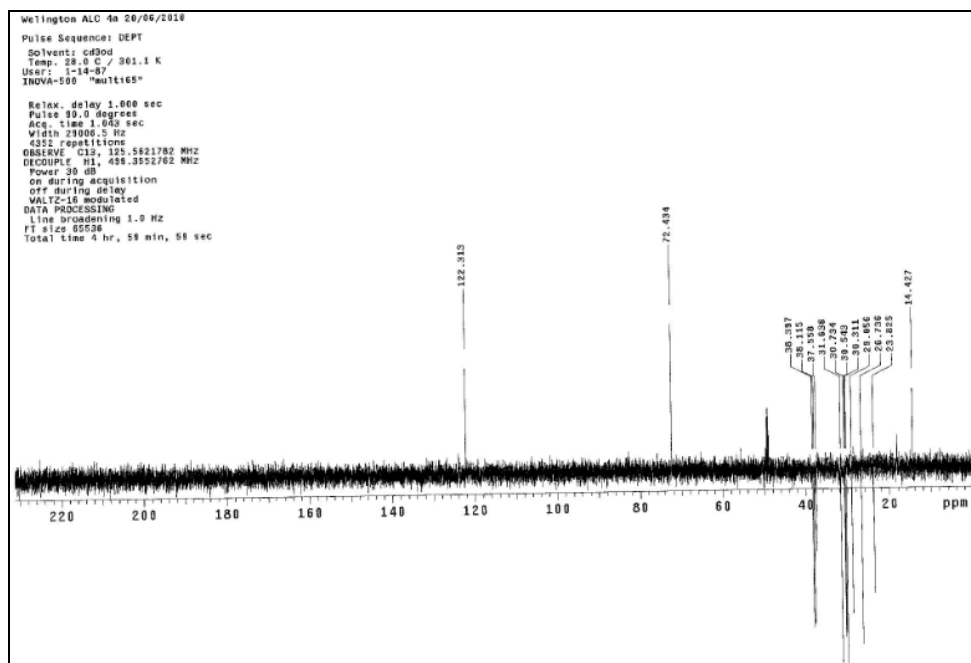


Spectro 108. Ampliação do espectro 107 (δ 1,0 – 2,8).

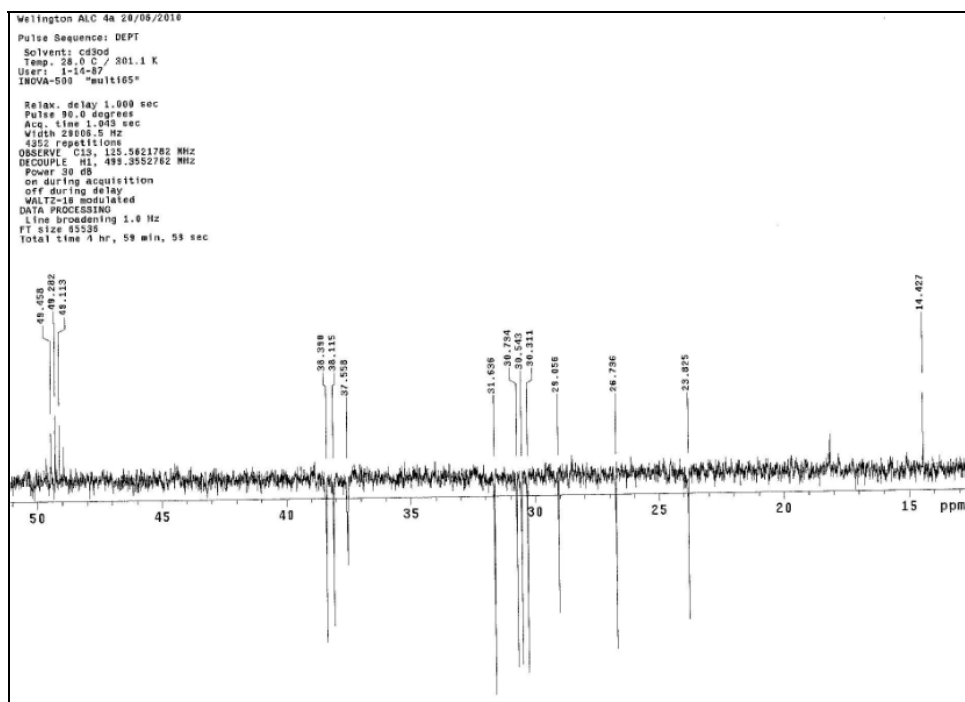
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar cinco sinais na região dos carbonos aromáticos, sendo três quaternários (δ 146,5; 151,5 e 152,6), com deslocamento químico característico de carbonos ligados a átomos mais eletronegativos e dois metínicos δ 122,3 e 123,9 (Espectro 109). Foi observado ainda à presença de dois grupos metílicos δ 14,4 e δ 18,1, um hidroximetílico em δ 72,4 e dez metilênicos, sugerindo uma cadeia linear longa (Espectros 110 e 111; Tabela 7). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com os encontrados na literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.



Espectro 109. Espectro de RMN ^{13}C de **4a** (500 MHz, CH_3OD).



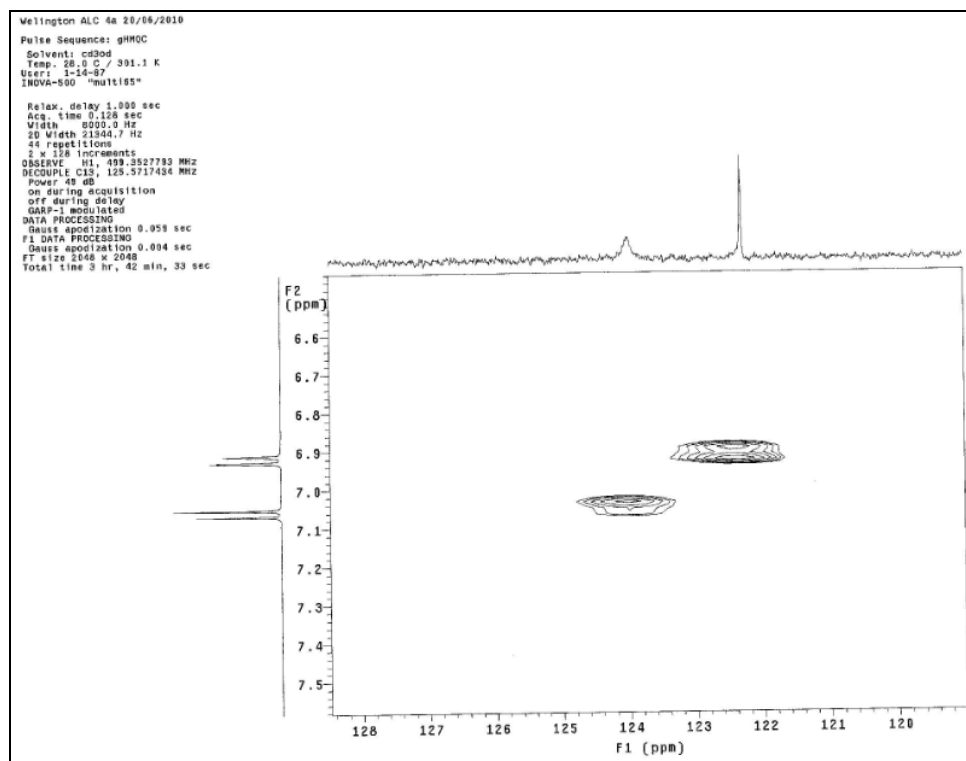
Espectro 110. Espectro de RMN DEPT 135 de **4a** (500 MHz, CH_3OD).



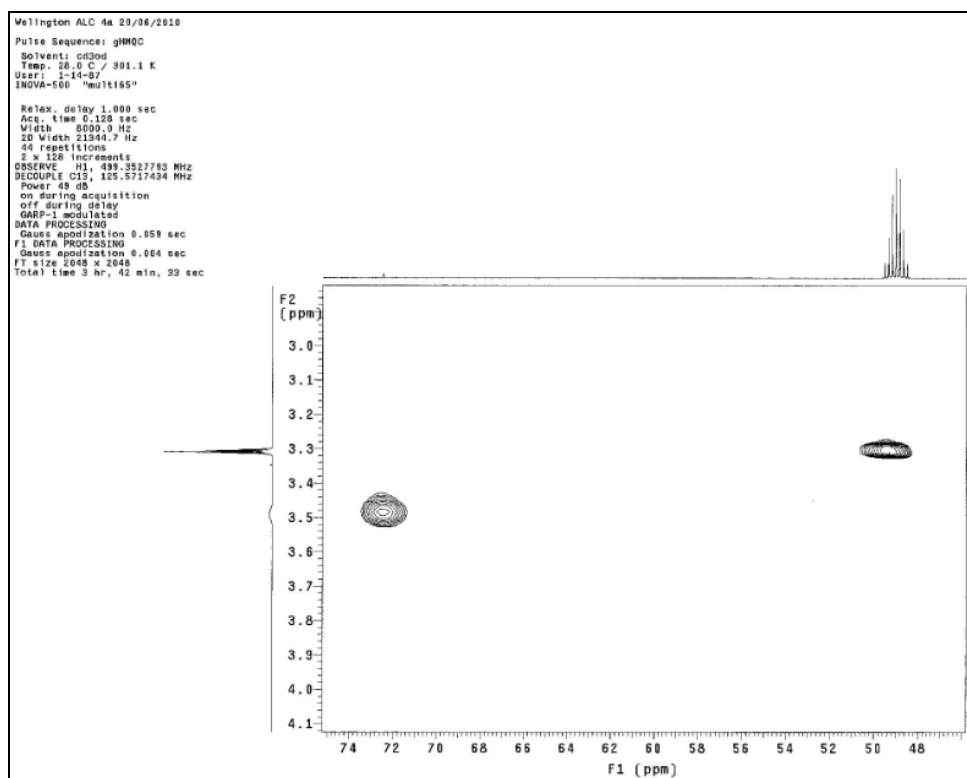
Espectro 111. Ampliação do espectro 110 (δ 15 – 50, 500 MHz, CH₃OD).

A partir dos experimentos de gHMQC foi possível correlacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Espectros 112-115, Tabela 7). Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,06) e C-2 (3J , 146,5), C-5 (2J , 122,3) e C-6 (3J , 152,6). Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,93) e C-3 (3J , 151,5), C-4 (2J , 123,9) e C-1' (3J , 37,5), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de um grupo hidroxílico. Outras correlações observadas em relação ao anel piridínico foram entre H-7 (δ 2,38) e C-2 (2J , 146,5) e C-3 (3J , 151,5) (Espectros 116, 117, 118 e 119, Figura 30, Tabela 7). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,65) e C-5 e H-2' (δ 1,65) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6 no sistema aromático. A linearidade da cadeia foi evidenciada a partir das correlações entre os metilênicos, destacando-se as correlações entre H-5' (3J , 1,33), e H-9' (3J , 1,42) com o hidroximetínico (δ 72,4), justificando assim a posição do hidroximetínico em C-7'. Correlações entre o grupo metílico ligado a um metilênico (H-12', δ 0,94) e C-10' (3J , 30,3) e C-11' (2J , 23,8) e entre H-10' (δ 1,33) e C-8' (3J , 38,4), C-9' (2J , 26,7) e C-12'

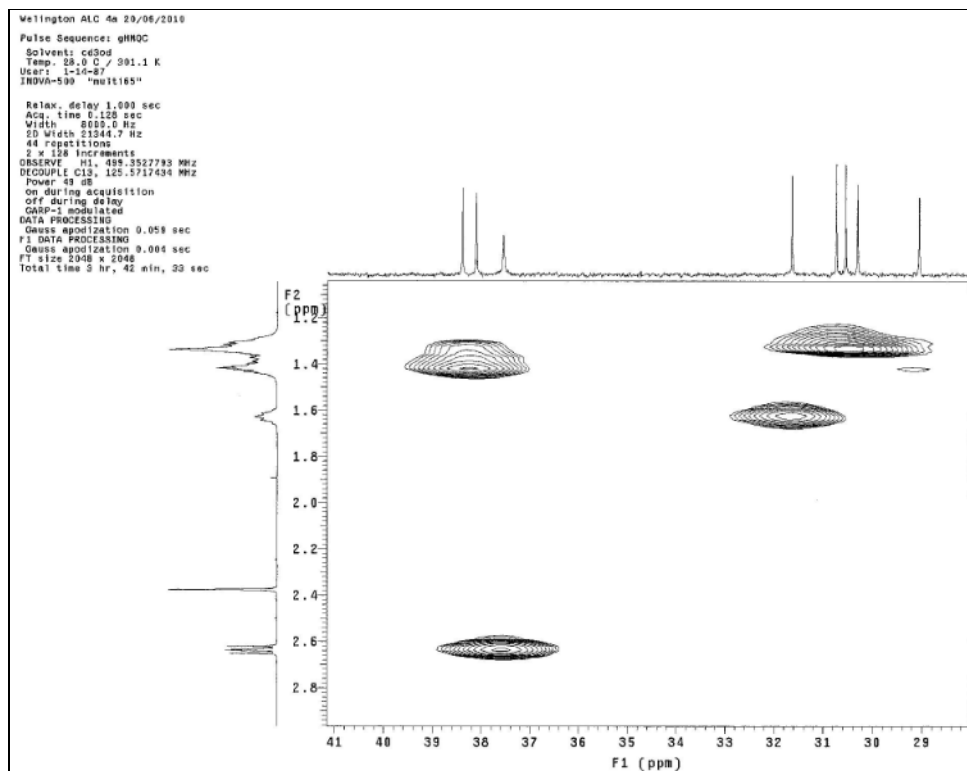
(3J , 14,4) corroboram para a linearidade da cadeia e a posição do hidroximetínico em C-7 (Espectros 116, 117,118 e 119, Figura 30, Tabela 7).



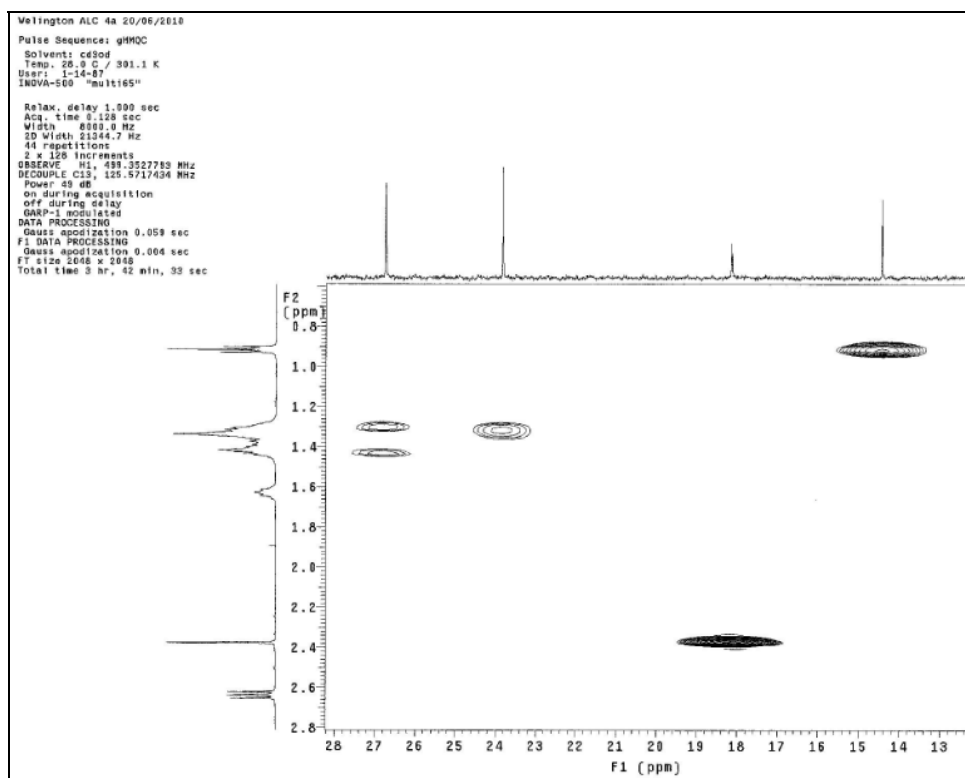
Espectro 112. Mapa de contorno gHMBC de **4a** (δ 120 – 128; 500 MHz; CH₃OD).



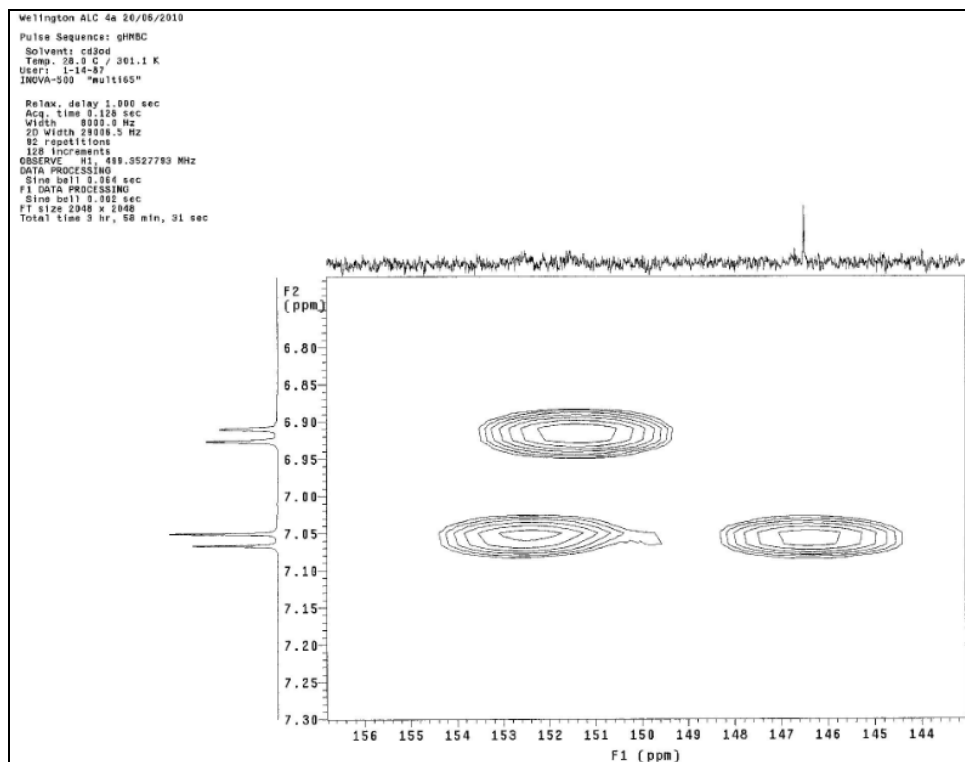
Espectro 113. Mapa de contorno gHMOC de **4a** (δ 48 – 74; 500 MHz; CH₃OD).



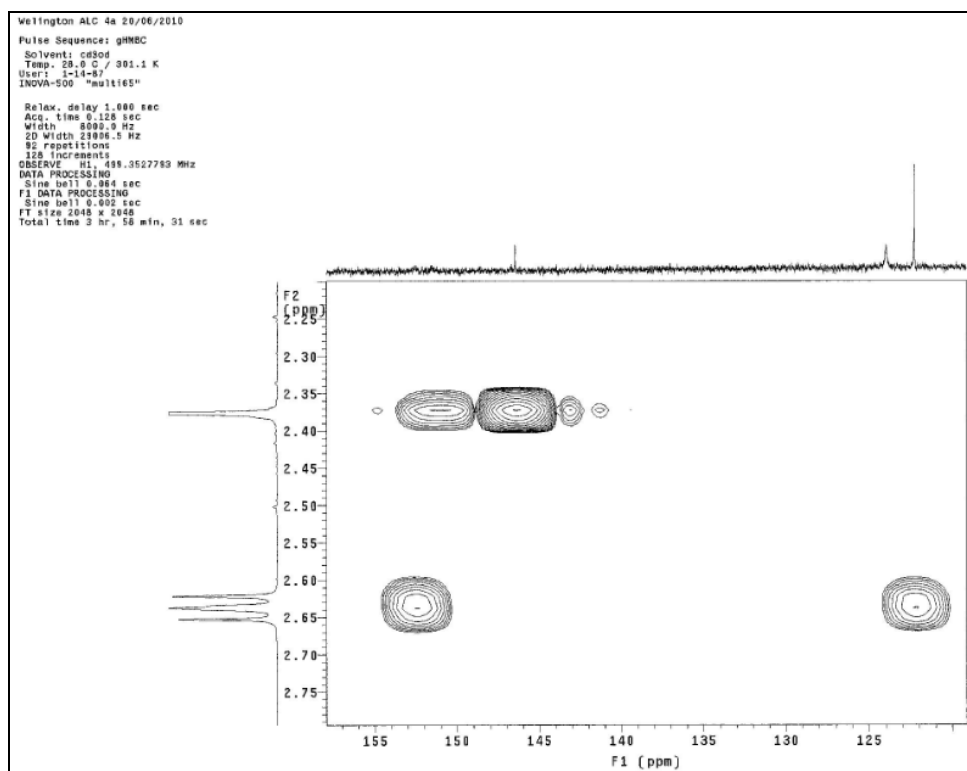
Espectro 114. Mapa de contorno gHMOC de **4a** (δ 29 – 41; 500 MHz; CH₃OD).



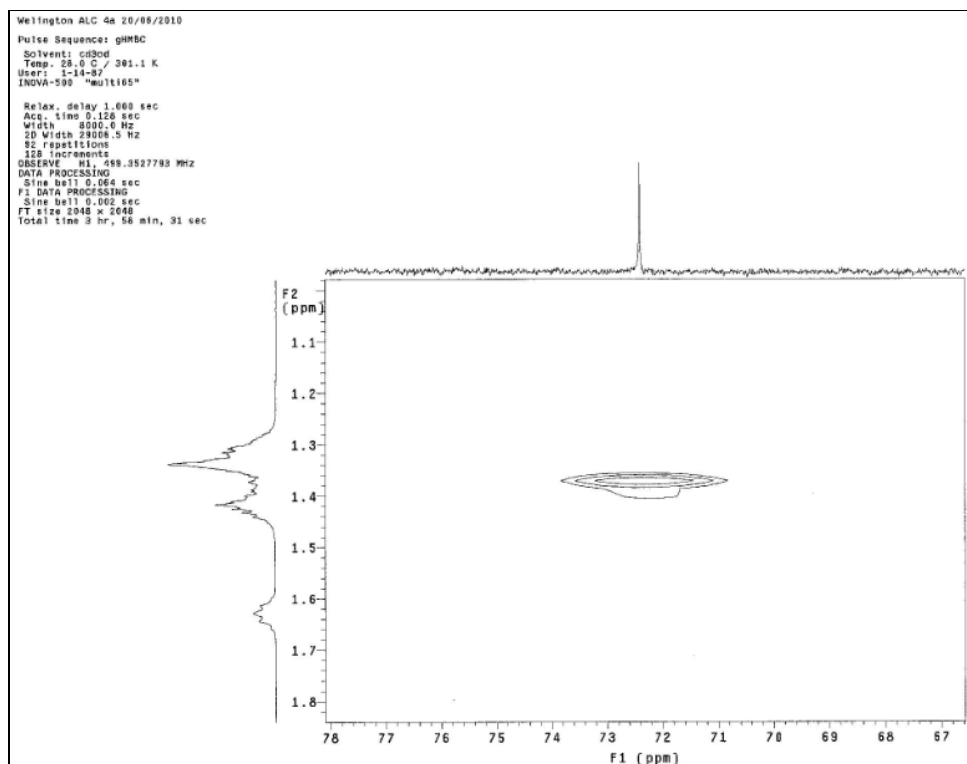
Espectro 115. Mapa de contorno gHMOC de **4a** (δ 13 – 28; 500 MHz; CH_3OD).



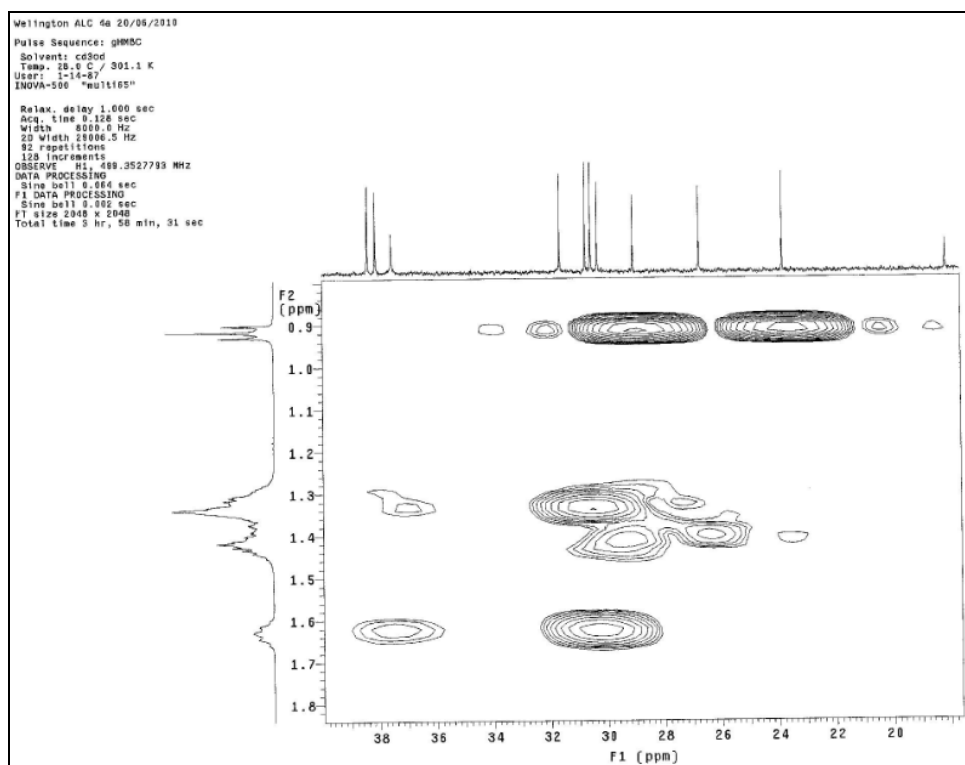
Espectro 116. Mapa de contorno gHMBC de **4a** (δ 144–156; 500 MHz; CH_3OD).



Espectro 117. Mapa de contorno gHMBC de **4a** (δ 125–155; 500 MHz; CH₃OD).

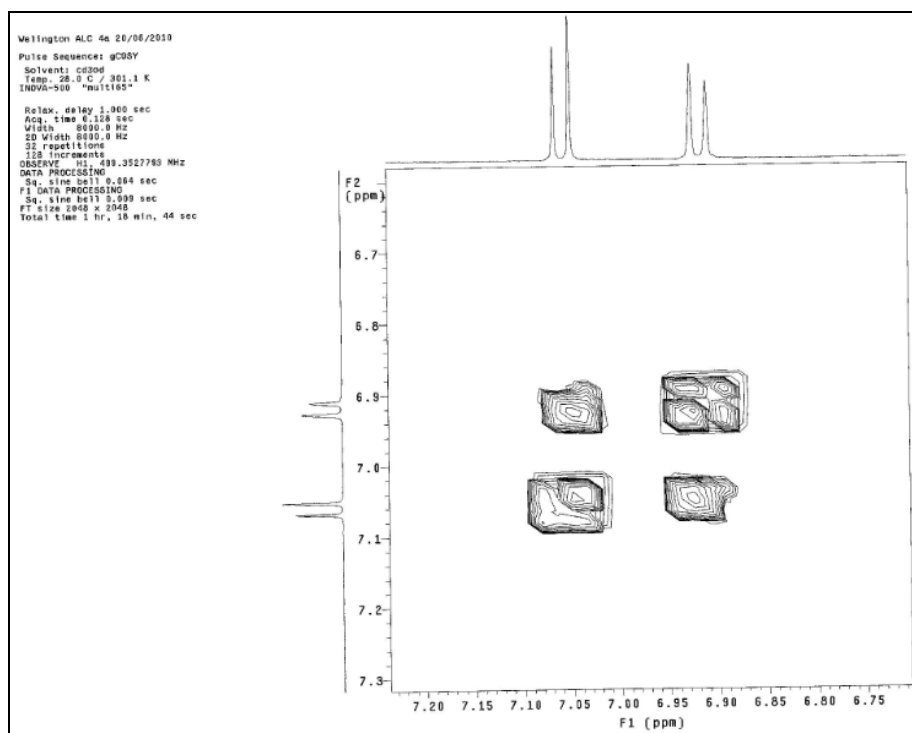


Espectro 118. Mapa de contorno gHMBC de **4a** (δ 67–78; 500 MHz; CH₃OD).

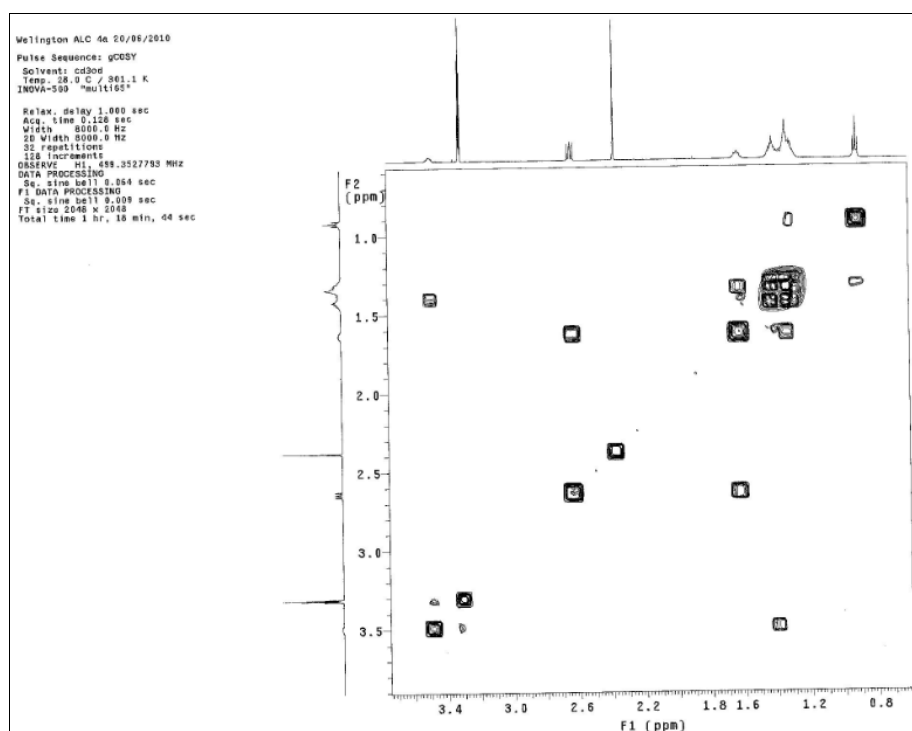


Espectro 119. Mapa de contorno gHMBC de **4a** (δ 20–38; 500 MHz; CH₃OD).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico, a linearidade da cadeia lateral em C-6 e a posição do hidroximetínico em C-7. As principais correlações são entre H-1' e H-2', H-2' e H-3', H-4' e H-5', H-6' e H-7', H-8' e H-7', H-8' e H-9', H-10' e H-11', H-11' e H-12' (Espectros 120 e 121, Tabela 7).



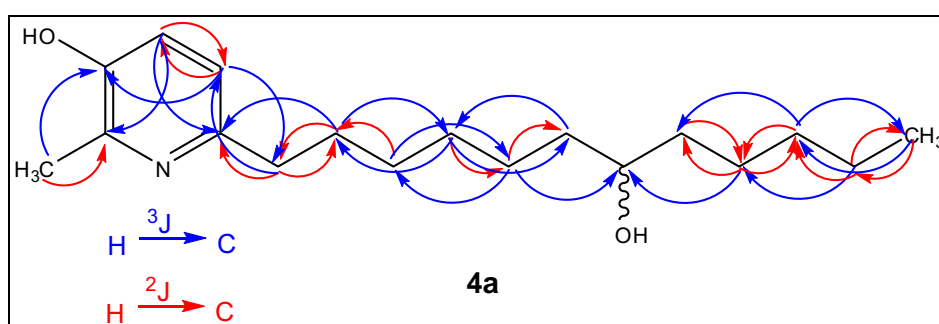
Espectro 120. Mapa de contorno gCOSY de **4a** (δ 6,75–7,20; 500 MHz; CH₃OD).



Espectro 121. Mapa de contorno gCOSY de **4a** (δ 0,8–3,4; 500 MHz; CH₃OD).

Tabela 7. Dados de RMN de **4a** em CH₃OD^a

C	δ_C^b	gHMQC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	146,5 s	–	H-4; H-7	–
3	151,5 s	–	H-5; H-7	–
4	123,9 d	7,01 d (8,0)	H-5	H-5
5	122,3 d	6,93 d (8,0)	H-4; H-1'	H-4
6	152,6 s	–	H-4; H-1'; H-2'	–
7	18,1 q	2,38 s	–	–
1'	37,5 t	2,65 t (7,5)	H-5; H-2'	H-2'
2'	31,6 t	1,65 quint. (7,5)	H-1'; H-3'	H-1'; H-3'
3'	30,5 t	1,33 m	H-5'	H-2'
4'	30,7 t	1,42 m	H-2'; H-5'	H-5'
5'	29,0 t	1,33 m	H-3'; H-4'	H-4'
6'	38,1 t	1,42 m	H-4'; H-5'	H-7'
7'	72,4 d	3,50 m	H-5'; H-9'	H-6'; H-8'; H-9'
8'	38,4 t	1,33 m	H-9'; H-10'	H-7'; H-9'
9'	26,7 t	1,42 m	H-8'; H-10'	H-7'; H-8'
10'	30,3 t	1,33 m	H-9'; H-11'; H-12'	H-11'
11'	23,6 t	1,33 m	H-12'	H-12'
12'	14,4 q	0,94 t (6,5)	H-10'; H-11'	H-11'

^a Experimento de RMN ¹H e ¹³C realizado a 500 e 125 MHz, respectivamente.^b Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.**Figura 30.** Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **4a**.

O alcalóide **4b** também é um sólido branco e de acordo os resultados interpretados dos espectros de RMN, obteve-se uma estrutura química idêntica ao ALC **4a** (Figura 31). Essa constatação permite inferir que eles são um par enansiômérico ou

apresentam uma isomeria constitucional, como por exemplo, a mudança na posição do grupo hidroxílico em C-7', porém, não se pode afirmar sem outras evidências.

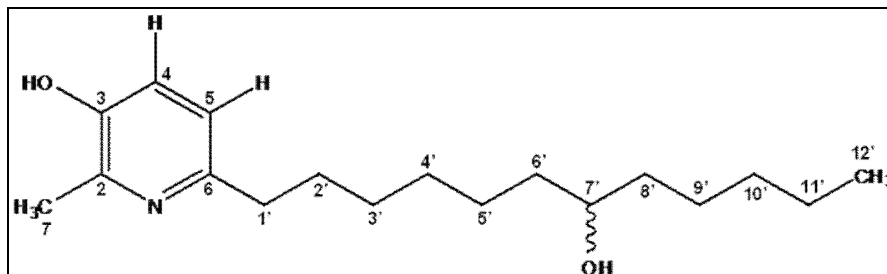
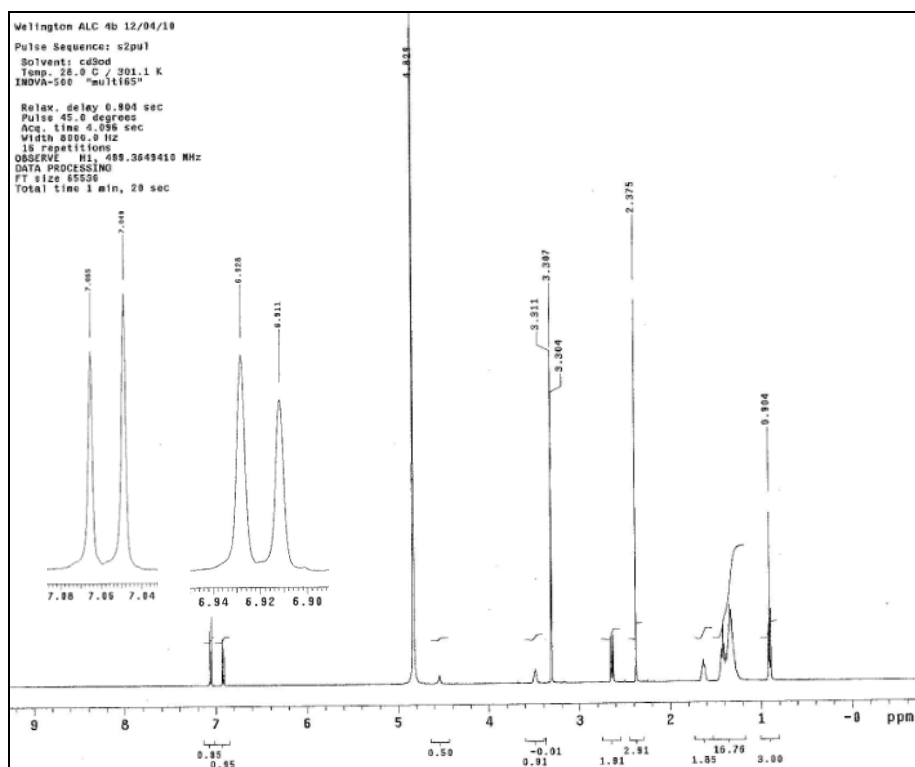
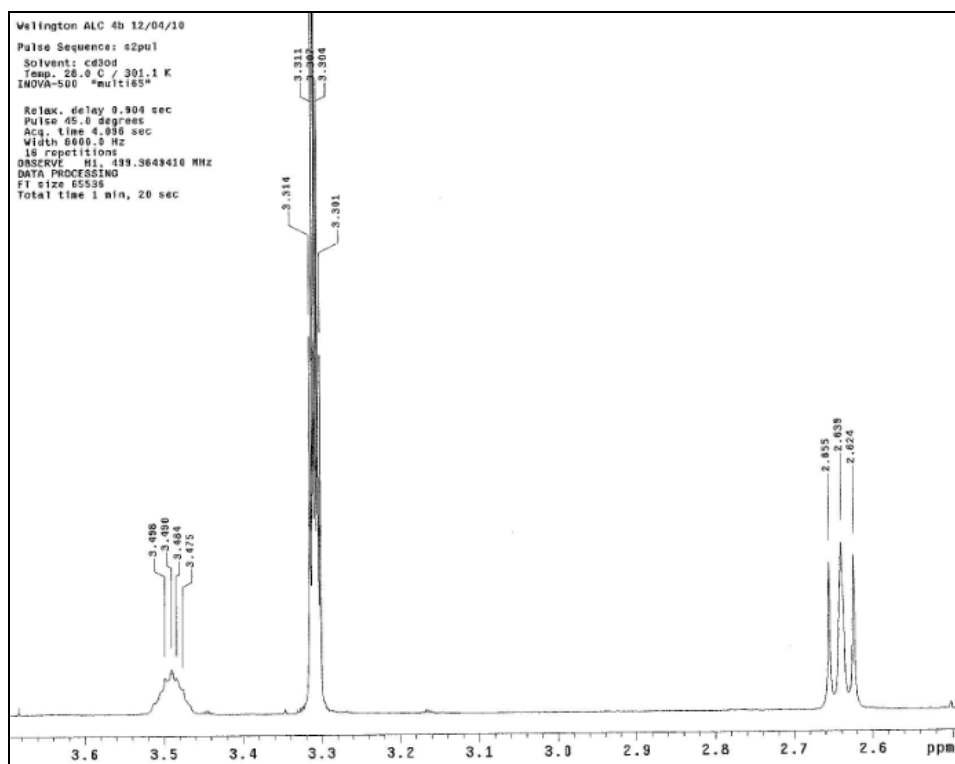


Figura 31. Estrutura química do alcalóide **4b**.

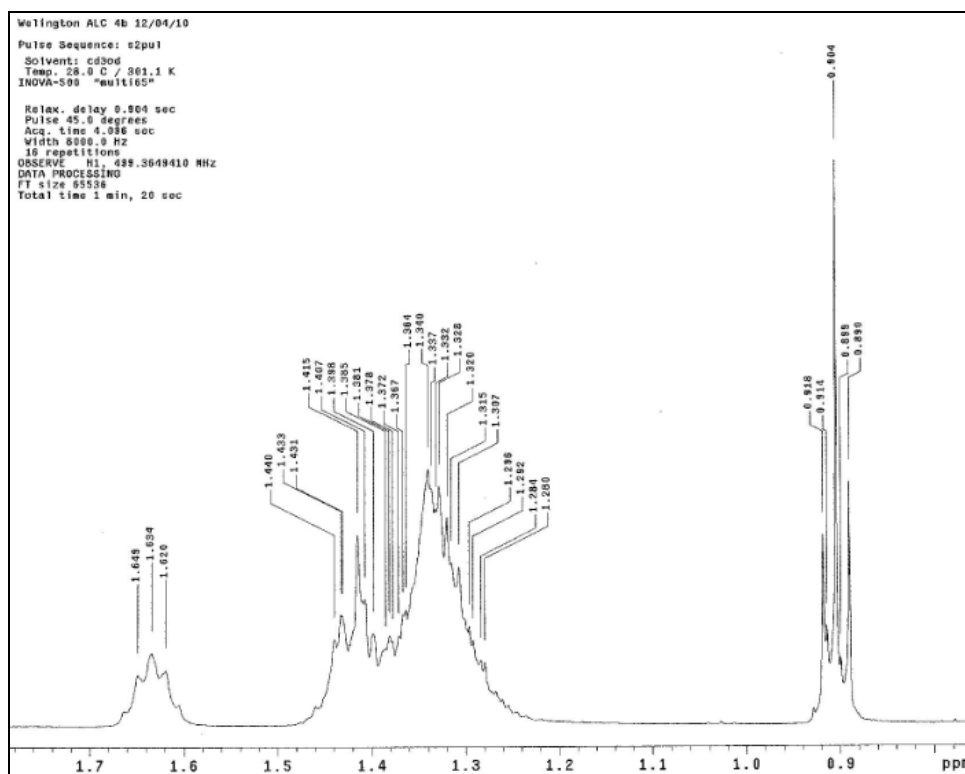
A análise do espectro de RMN de ¹H apresentou dois dubletos δ 6,93 (1H, $J = 8,0$ Hz) e δ 7,01 (1H, $J = 8,0$ HZ), indicando hidrogênios aromáticos na posição *orto*, um singlete em δ 2,38 (3H), característico de grupo metílico ligado a um sistema aromático e um tripleto em δ 0,92 (3H) referente a um grupo metila ligado a um metilênico. Foram observados ainda um tripleto; δ 2,66 (2H), dois quintupletos em δ 1,65 (2H) e δ 3,50 (1H), referente a um hidroximetínico; e dois multipletos em δ 1,36 e δ 1,44 (Espectros 122–124; Tabela 8).



Espectro 122. Espectro de RMN de ^1H de **4b** (500 MHz, CH_3OD).

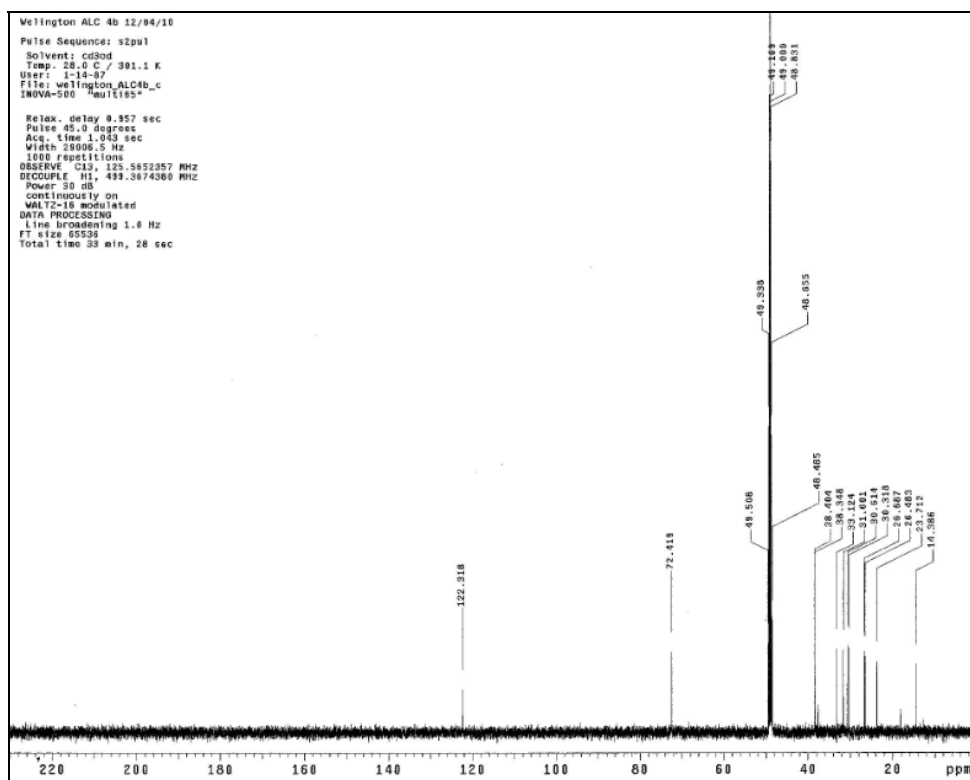


Espectro 123. Ampliação do espectro 107 (δ 2,6–3,6).

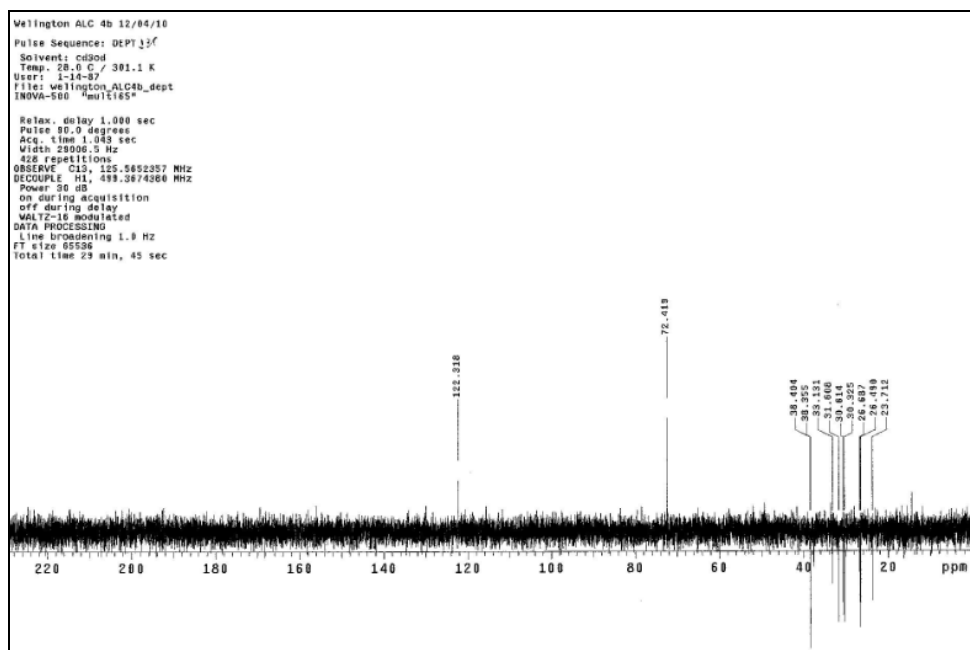


Espectro 124. Ampliação do espectro 107 (δ 0,9–1,7).

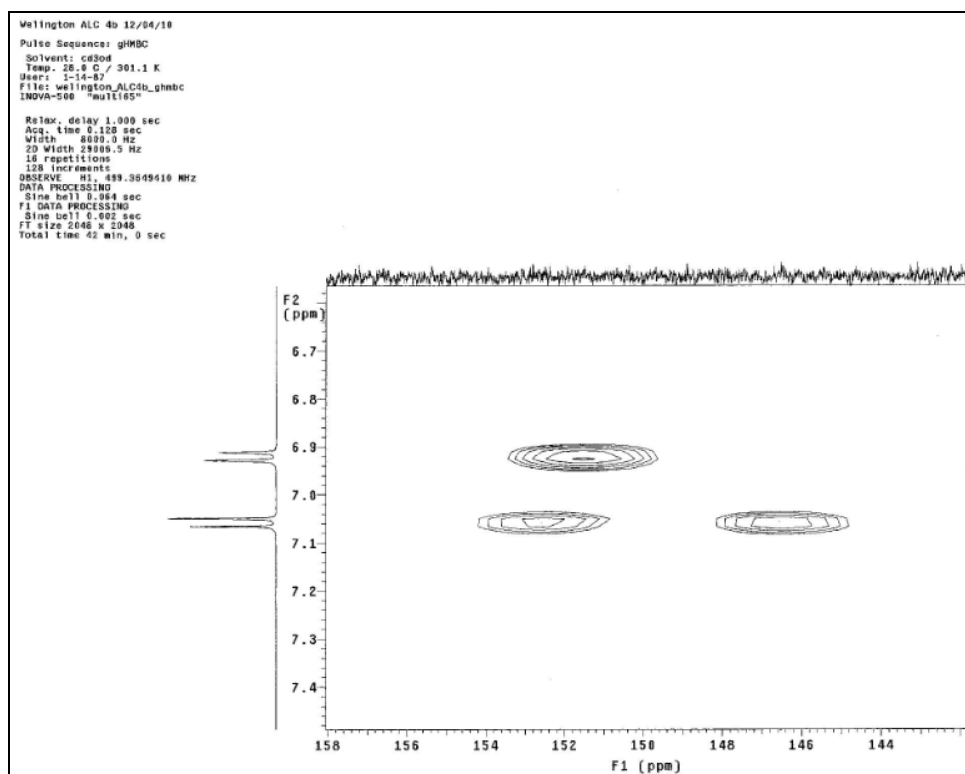
Nos espectros de ^{13}C , DEPT 90 e 135 foi possível observar apenas um sinal na região dos carbonos aromáticos, sendo um metínico em δ 122,3. Por meio dos mapas de contorno gHMBC e gHMQC observou-se mais quatro sinais referentes a carbonos aromáticos, sendo três quaternários (δ 146,4; δ 151,4 e δ 152,2) com deslocamento químico característico de carbono ligado a átomos mais eletronegativos; e um metínico com absorção em δ 124,0. Foi observado ainda à presença de dois grupos metílicos em δ 14,4 e δ 18,1, um hidroximetínico em δ 72,4 e dez metilênicos, sugerindo uma cadeia linear longa (Espectros 125–127; Tabela 8). Quando comparados os sinais dos carbonos aromáticos com os encontrados na literatura (SILVERSTEIN e WEBSTER, 2000), foi possível observar que são característicos de um sistema piridínico substituído. Esses dados aliados ao valor da constante de acoplamento (8,0 Hz) caracterizam o núcleo piridínico 2, 3, 6-trissubstituído.



Espectro 125. Espectro de RMN ^{13}C de **4b** (500 MHz, CH_3OD).



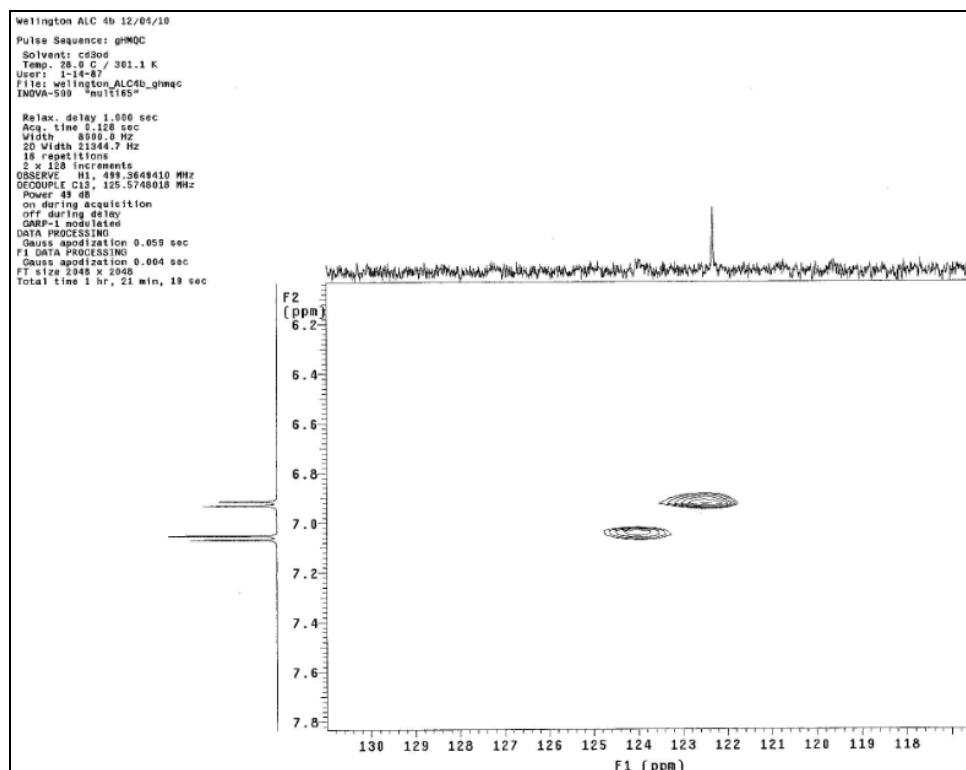
Espectro 126. Espectro de RMN DEPT 135 de **4b** (500 MHz, CH_3OD).



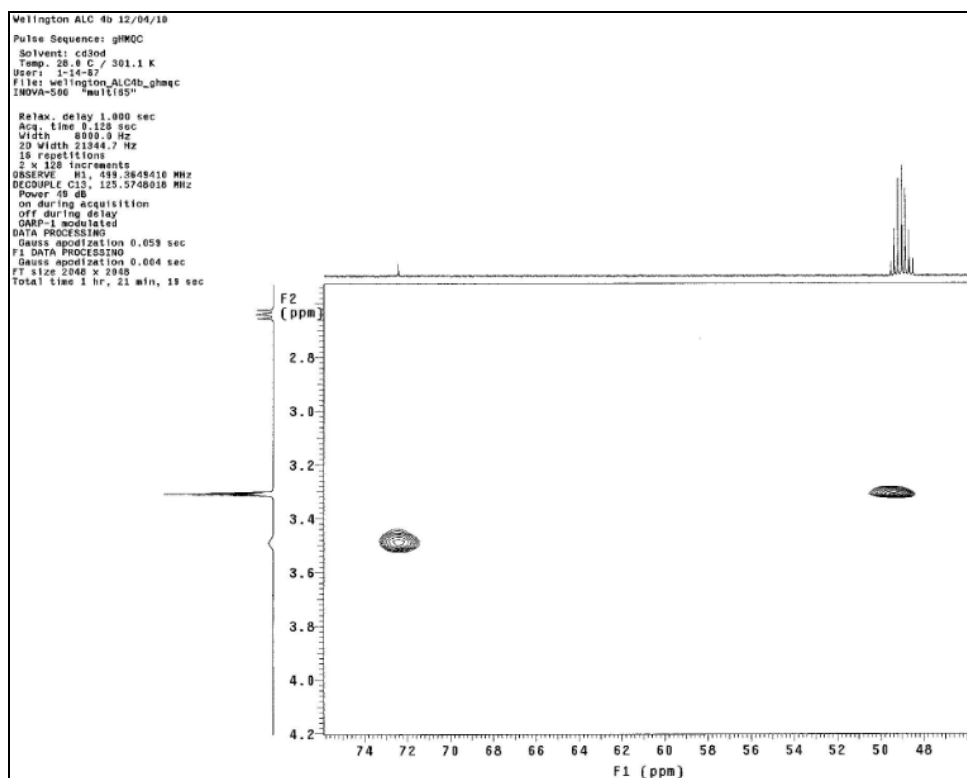
Espectro 127. Mapa de contorno gHMBC de **4b** (δ 144–158; 500 MHz; CH₃OD).

A partir dos experimentos de gHMBC foi possível correlacionar os hidrogênios aos seus respectivos carbonos (Espectros 128-131, Tabela 8). Para as atribuições dos hidrogênios e carbonos do anel piridínico, foram analisados os mapas de contorno gHMBC, onde foram observadas as correlações entre H-4 (δ 7,01) e C-2 (3J , 146,4), C-5 (2J , 122,3) e C-6 (3J , 152,2). Também foram observadas correlações entre H-5 (δ 6,93) e C-3 (3J , 151,4), C-4 (2J , 124,0) e C-1' (3J , 37,5), sendo que a desproteção em C-3 é justificada pela presença de um grupo hidroxílico. Outras correlações observadas em relação ao anel piridínico foram entre H-7 (δ 2,38) e C-2 (2J , 146,4) e C-3 (3J , 151,4) (Espectros 132, 133 e 134, Figura 32, Tabela 8). A partir das constatações anteriores e das correlações entre H-5 e C-1', H-1' (δ 2,66) e C-5 e H-2' (δ 1,65) e C-6 foi possível concluir que a cadeia linear era o substituinte em C-6 no sistema aromático. A linearidade da cadeia foi evidenciada a partir das correlações entre os metilênicos, destacando-se as correlações entre H-5' (3J , 1,36), e H-9' (3J , 1,44) com o hidroximetínico (δ 72,4), justificando assim a posição do hidroximetínico em C-7'. Correlações entre o grupo metílico ligado a um metilênico (H-12', δ 0,92) e C-10' (3J , 33,1) e C-11' (2J , 23,7) e entre H-10' (δ 1,36) e C-8' (3J , 38,3), C-9' (2J , 26,6) e C-12'

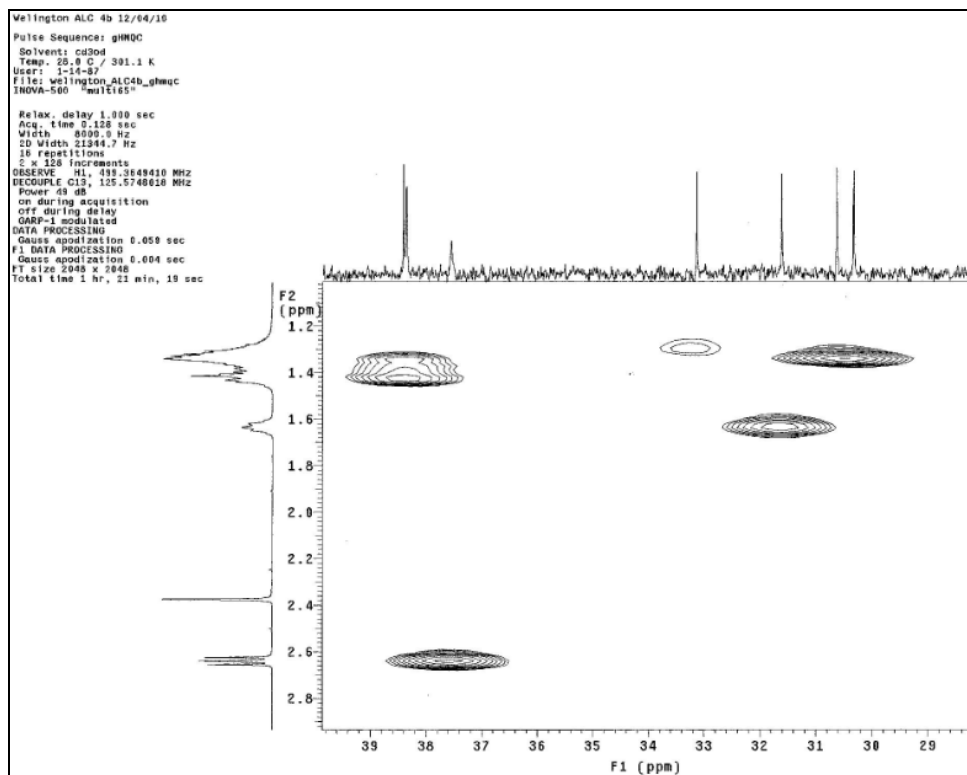
(3J , 14,4) corroboram para a linearidade da cadeia e a posição do hidroximetínico em C-7 (Espectros 132, 133 e 134, Figura 32, Tabela 8).



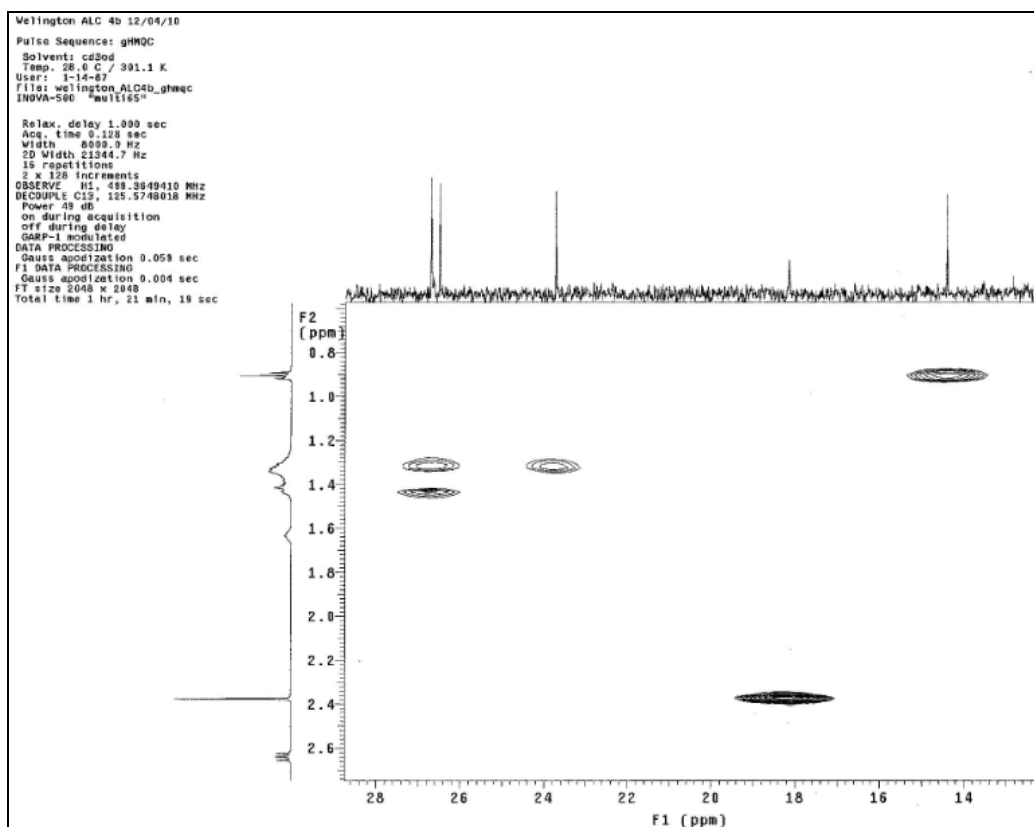
Espectro 128. Mapa de contorno gHMTC de **4b** (δ 118 – 130; 500 MHz; CH_3OD).



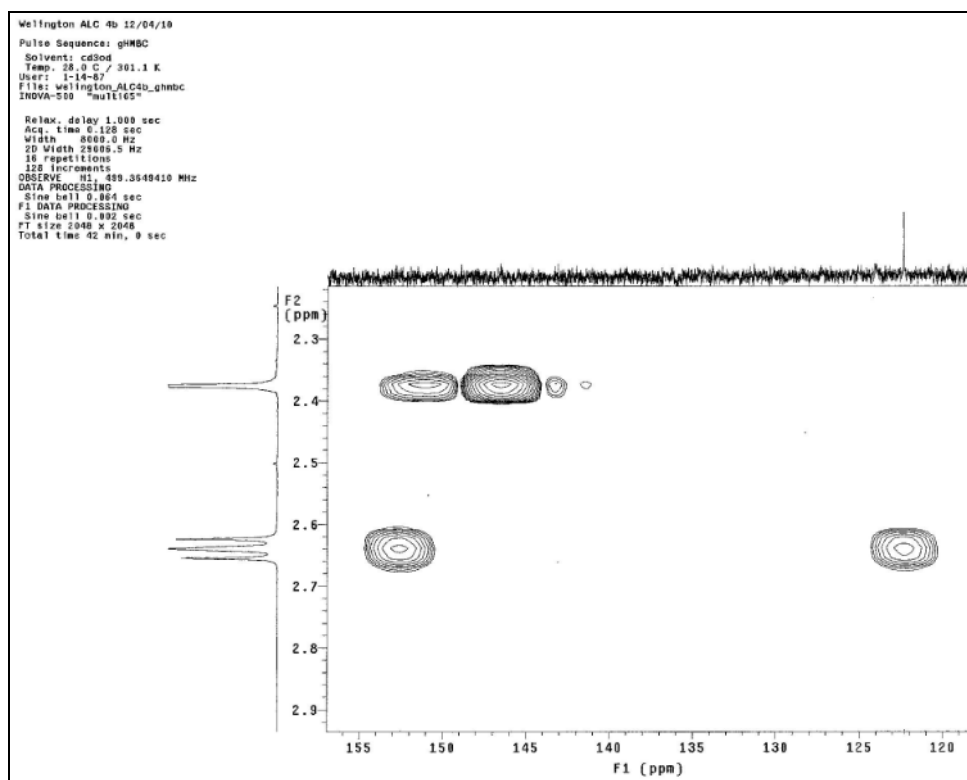
Espectro 129. Mapa de contorno gHMOC de **4b** (δ 48 – 74; 500 MHz; CH₃OD).



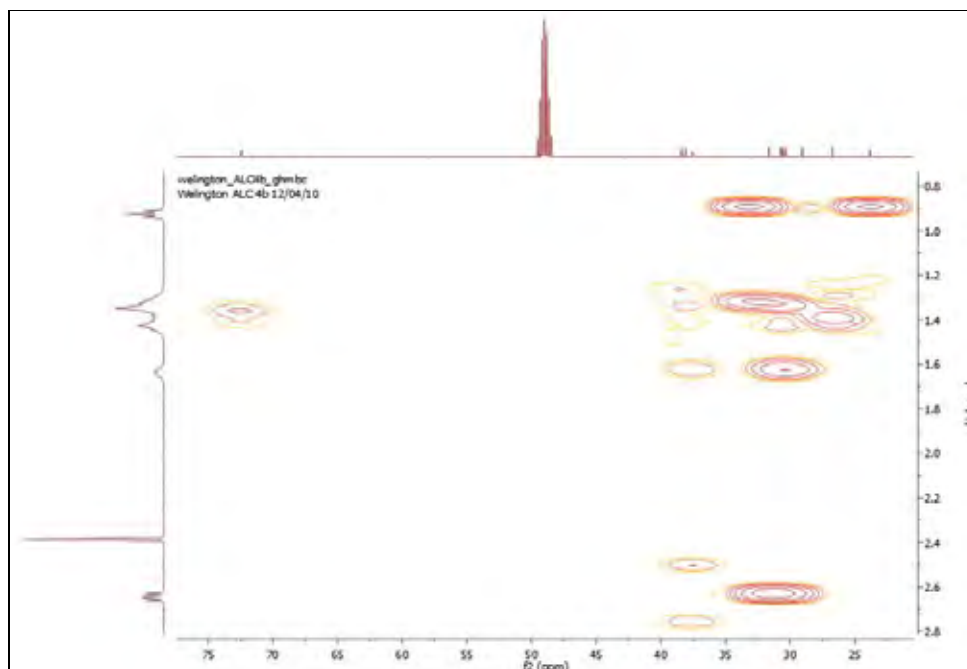
Espectro 130. Mapa de contorno gHMOC de **4b** (δ 29 – 39; 500 MHz; CH₃OD).



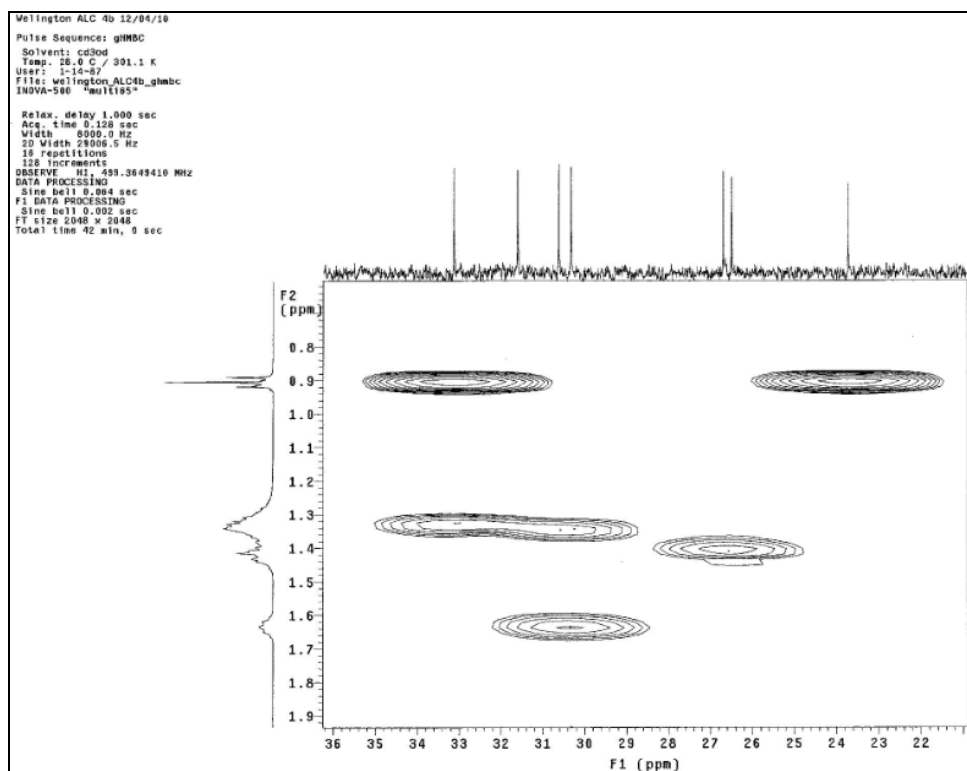
Espectro 131. Mapa de contorno gHMQC de **4b** (δ 14–28; 500 MHz; CH₃OD).



Espectro 132. Mapa de contorno gHMBC de **4b** (δ 120–155; 500 MHz; CH₃OD).

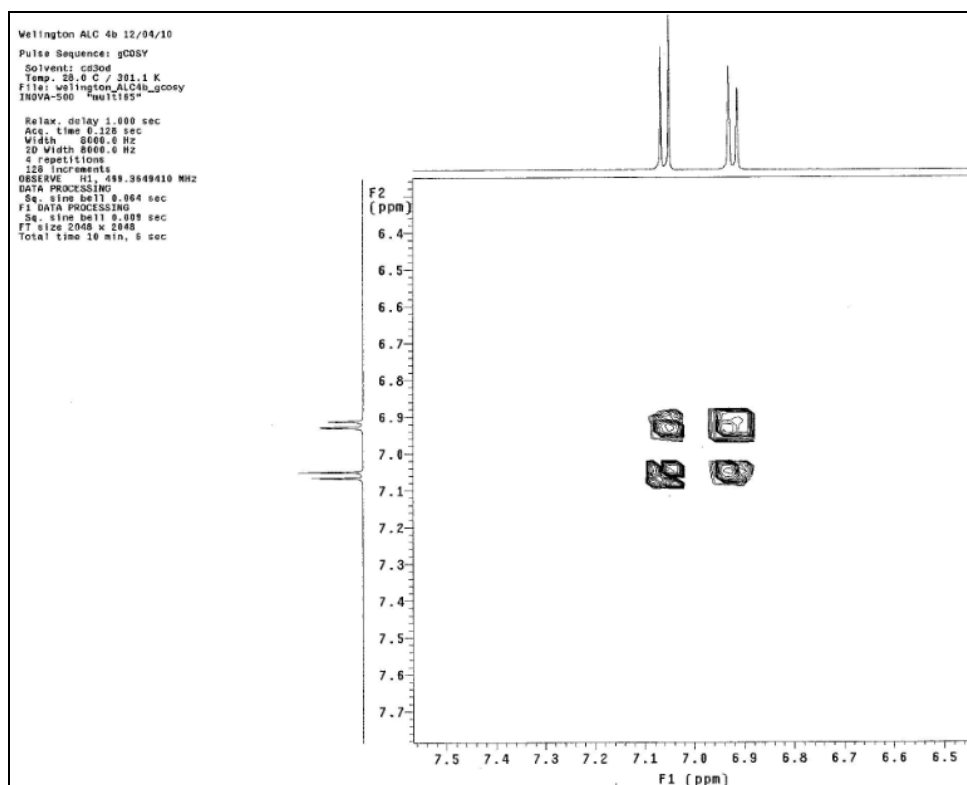


Espectro 133. Mapa de contorno gHMBC de **4b** (δ 25–75; 500 MHz; CH₃OD).

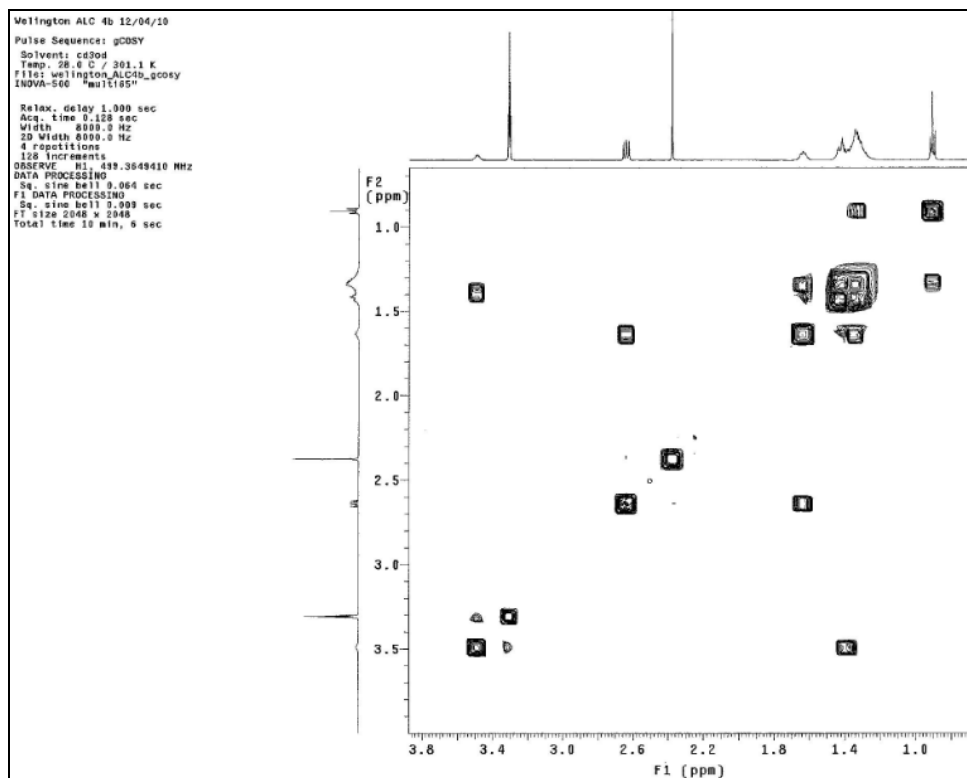


Espectro 134. Mapa de contorno gHMBC de **4b** (δ 22–36; 500 MHz; CH₃OD).

As correlações observadas no mapa de contorno gCOSY confirmam a relação *orto* dos hidrogênios do anel piridínico, a linearidade da cadeia lateral em C-6 e a posição do hidroximetínico em C-7. As principais correlações são entre H-1' e H-2', H-2' e H-3', H-4' e H-5', H-6' e H-7', H-8' e H-7', H-8' e H-9', H-10' e H-11', H-11' e H-12' (Espectros 135 e 136, Tabela 8).



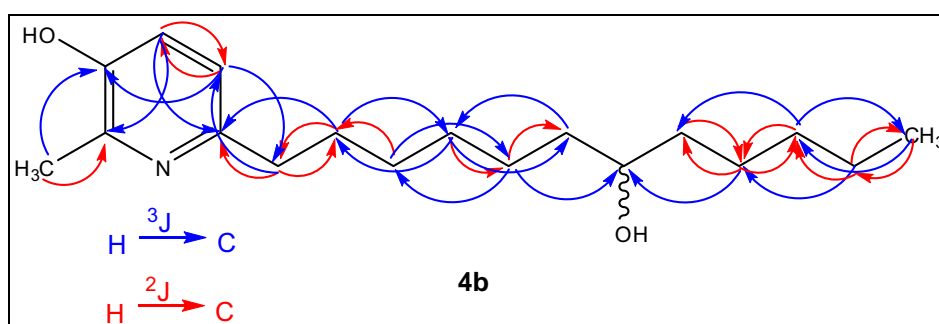
Espectro 135. Mapa de contorno gCOSY de **4b** (δ 6,5–7,5; 500 MHz; CH₃OD).



Espectro 136. Mapa de contorno gCOSY de **4b** (δ 1,0–3,8; 500 MHz; CH₃OD).

Tabela 8. Dados de RMN de **4b** em CH₃OD^a

C	δ_C^b	gHMBC δ_H (J em Hz)	gHMBC	gCOSY
2	146,4 s	–	H-4; H-7	–
3	151,4 s	–	H-5; H-7	–
4	124,0 d	7,01 d (8,0)	H-5	H-5
5	122,3 d	6,93 d (8,0)	H-4; H-1'	H-4
6	152,2 s	–	H-4; H-1'; H-2'	–
7	18,1 q	2,38 s	–	–
1'	37,5 t	2,66 t (7,5)	H-5; H-2'	H-2'
2'	31,6 t	1,65 quint. (7,5)	H-1'; H-3'	H-1'; H-3'
3'	30,6 t	1,36 m	H-5'	H-2'
4'	30,4 t	1,44 m	H-2'; H-5'	H-5'
5'	26,5 t	1,36 m	H-3'; H-4'	H-4'
6'	38,4 t	1,44 m	H-4'; H-5'	H-7'
7'	72,4 d	3,50 m	H-5'; H-9'	H-6'; H-8'; H-9'
8'	38,3 t	1,36 m	H-9'; H-10'	H-7'; H-9'
9'	26,6 t	1,44 m	H-8'; H-10'	H-7'; H-8'
10'	33,1 t	1,36 m	H-9'; H-11'; H-12'	H-11'
11'	23,7 t	1,36 m	H-12'	H-12'
12'	14,4 q	0,92 t (6,5)	H-10'; H-11'	H-11'

^a Experimento de RMN ¹H e ¹³C realizado a 500 e 125 MHz, respectivamente.^b Deslocamentos químicos (δ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno.**Figura 32.** Correlações H–C observadas no mapa de contorno gHMBC de **4b**.

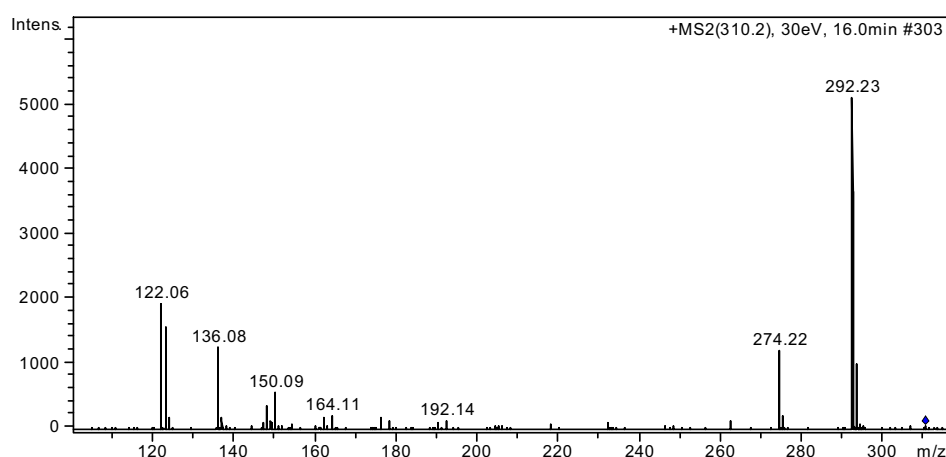
Assim como os alcalóides **1a** e **1b**, o par ALC 4a e 4b também apresentaram a mesma estrutura química. Para isso, ambas as substâncias foram submetidas ao

experimento de rotação específico para verificar o desvio da *luz plano-polarizada* pelo centro estereogênico presente na estrutura. Os valores obtidos foram: $[\alpha_D^{27,9}] = -19,8^\circ$ para o alcalóide **4a** e $[\alpha_D^{29,1}] = +15,7^\circ$ para o alcalóide **4b**, na concentração de 0,10 g/100 mL. Esse resultado indica que cada composto desvia a *luz plano-polarizada* para um sentido, tendo, portanto, uma relação enansiomérica entre os alcalóides **4a** e **4b**.

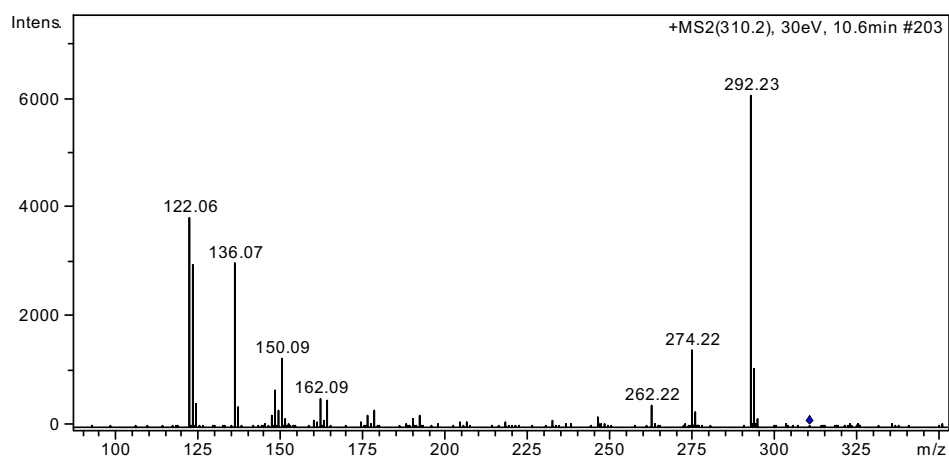
4.3. Espectrometria de massas com ionização por electrospray e as propostas de fragmentações dos alcalóides isolados

Quando os alcalóides isolados foram submetidos à EM/EM foi possível identificar alguns fragmentos que corroboram para a elucidação estrutural descrita acima. A maioria dos fragmentos foi característica para todos os alcalóides, destacando a eliminação neutra de água, quando a estrutura do composto apresentara um grupo hidroxílico e a eliminação neutra de uma molécula de eteno ($\text{CH}_2=\text{CH}_2$), referente às quebras da cadeia carbônica lateral.

Para os alcalóides **1a** e **1b** (íon *quasi*-molecular m/z 310) destaca as fragmentações neutra de água, formando os íons m/z 292 e 274 (duas eliminações de água) e os fragmentos m/z 122 e m/z 123 com uma eliminação neutra da cadeia lateral e uma cisão homolítica entre os carbonos C-1' e C-2' (Espectros 137 e 138). As demais propostas de fragmentações estão descritas na Figura 33.



Espectro 137. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 310 do alcalóide **1a**.



Espectro 138. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 310 do alcalóide **1b**.

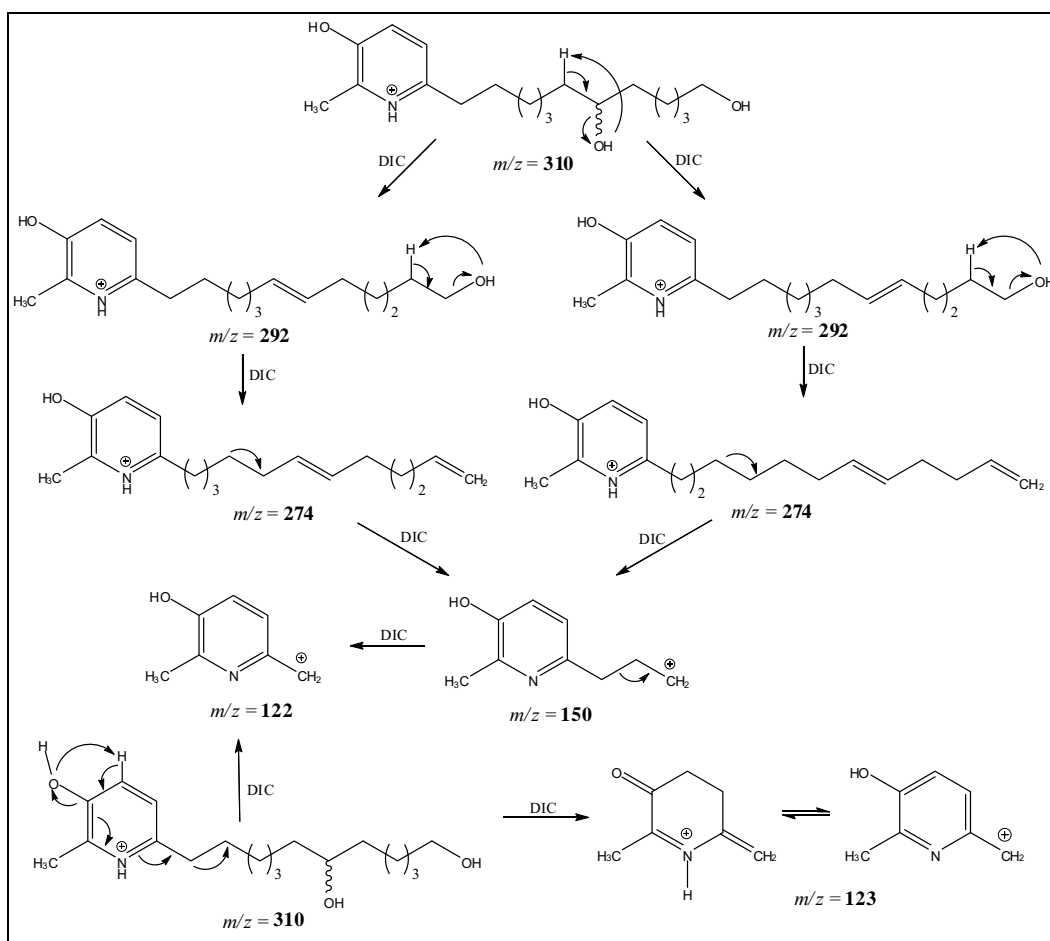
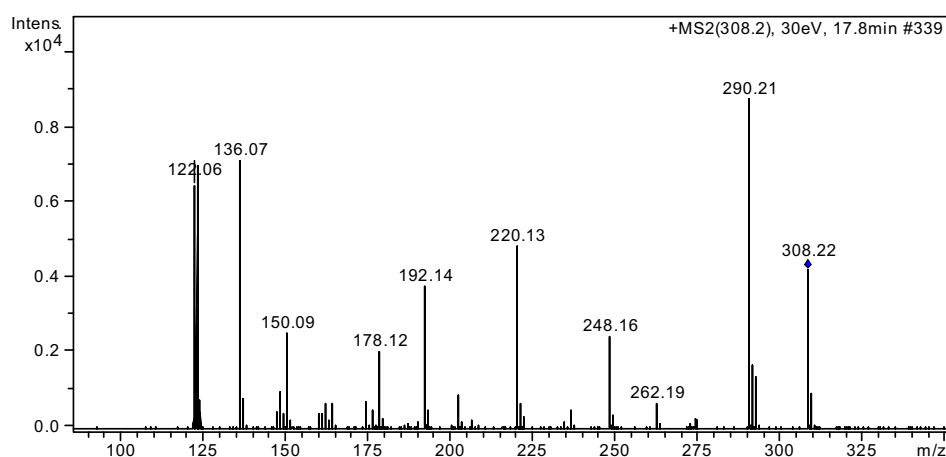


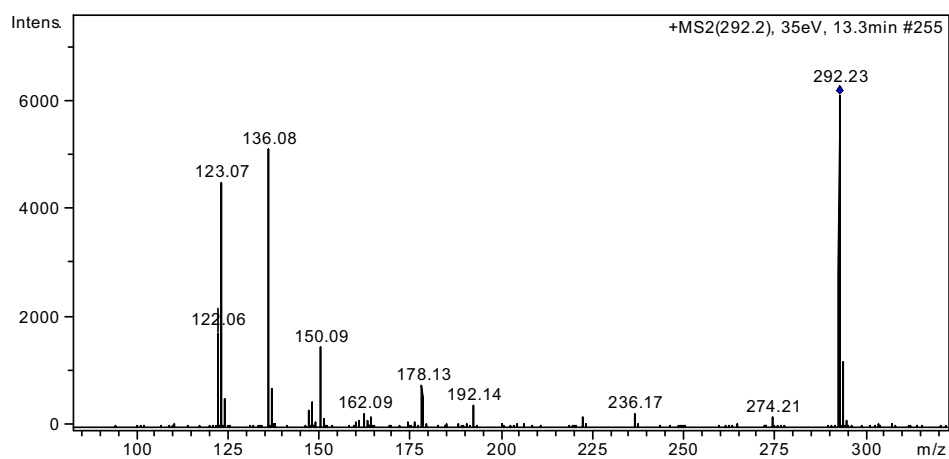
Figura 33. Proposta de fragmentação para os alcalóides **1a** e **1b**.

Os alcalóides **2** (m/z 308) e **5** (m/z 292) também apresentaram uma eliminação neutra de água (Espectros 139 e 140). A intensidade do pico para o alcalóide **2** (m/z 290) foi mais intensa porque essa eliminação ocorreu a partir de um grupo hidroxílico da cadeia lateral, enquanto para o **5** essa eliminação é proveniente da hidroxila ligada ao anel piridínico, com a formação de um íon piridíno. Esta formação é mais difícil de acontecer, porém, a baixa intensidade do fragmento m/z 274 justifica-se. Os fragmentos m/z 122 e m/z 123 também são formados e as demais propostas de fragmentações estão descritas na Figura 34.

As mesmas fragmentações são propostas o par **4a** e **4b** (m/z 294, Espectros 141 e 142). Uma eliminação neutra de água proveniente de um grupo hidroxílico ligado ao meio da cadeia carbônica, fornecendo o íon m/z 276 com grande intensidade; e os íons m/z 122 e 123 originado da eliminação neutra da cadeia lateral, além das eliminações neutras de eteno da cadeia lateral, fornecendo os demais fragmentos (Figura 35).



Espectro 139. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 308 do alcalóide **2**.



Espectro 140. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 292 do alcalóide **5**.

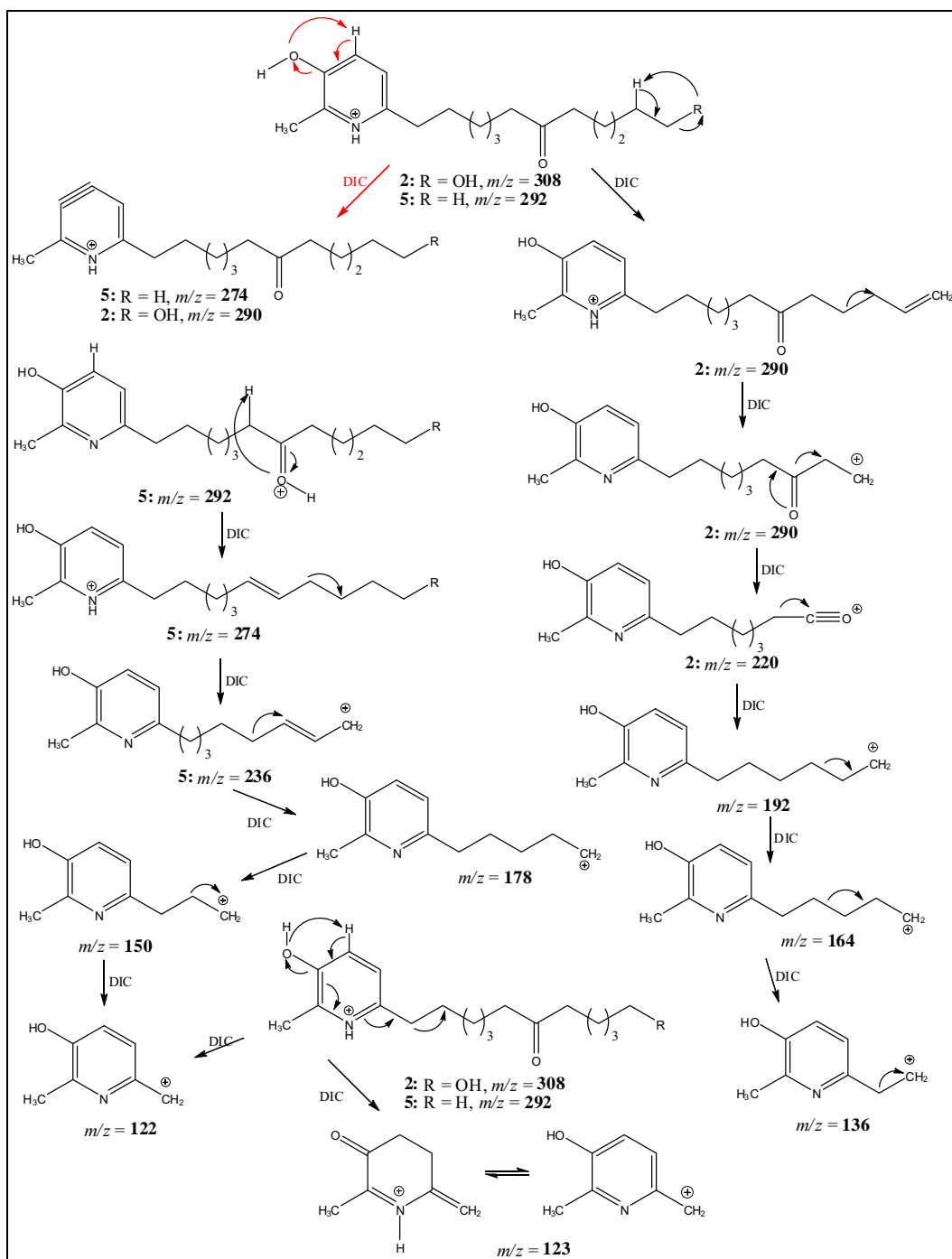
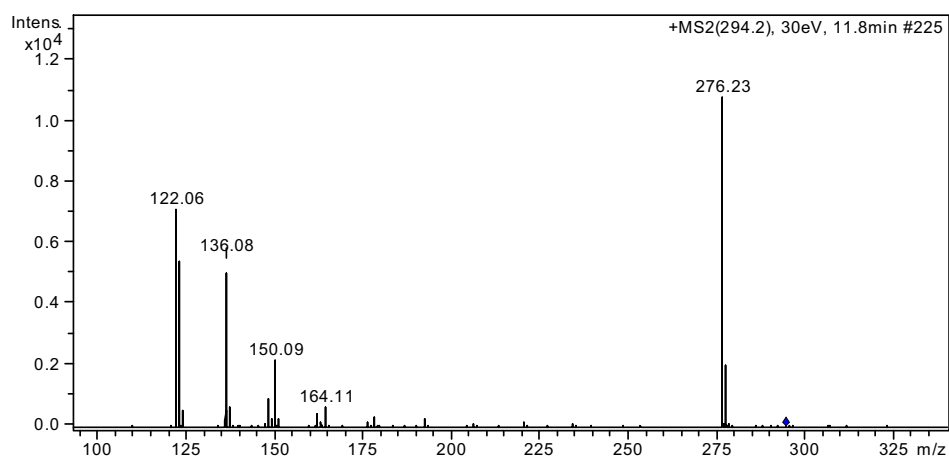
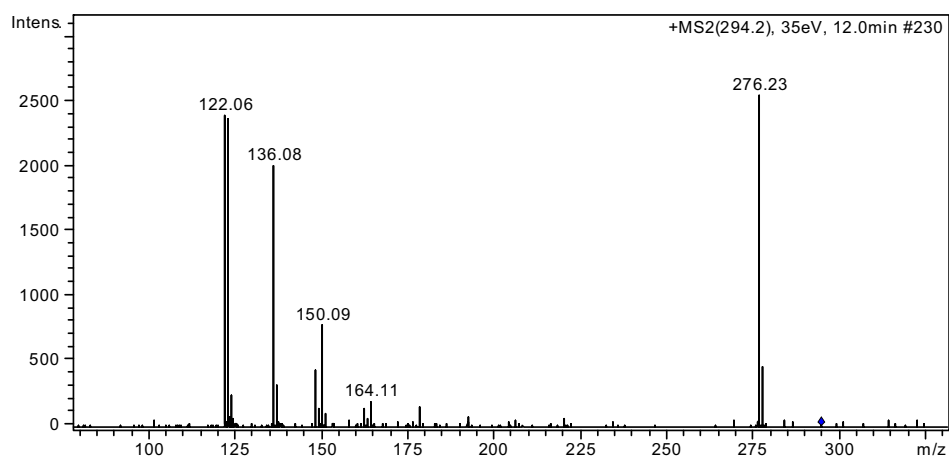


Figura 34. Proposta de fragmentação para os alcalóides 2 e 5.



Espectro 141. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 294 do alcalóide **4a**.



Espectro 142. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 294 do alcalóide **4b**.

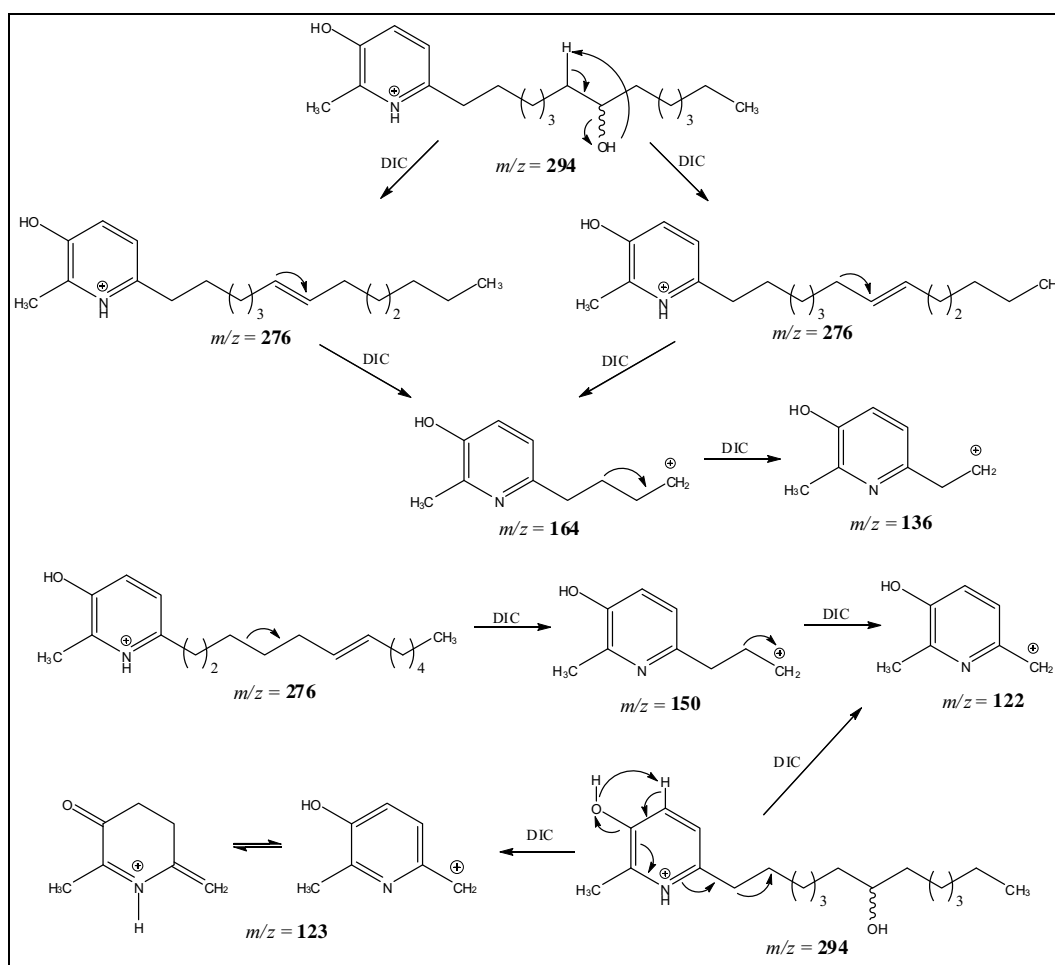
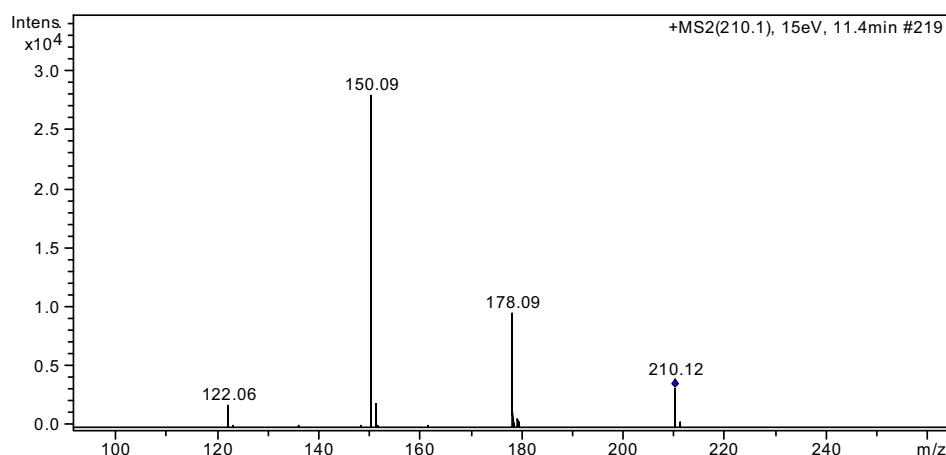


Figura 35. Proposta de fragmentação para os alcalóides **4a** e **4b**.

Os fragmentos proveniente da EM/EM do alcalóide **3** (m/z 210) foram parecidos com os outros alcalóides, porém, uma menor quantidade de fragmentos foi observada porque a cadeia carbônica lateral é menor (Espectro 143). Os íons formados foram m/z 178, com a formação de um íon acílio; m/z 150 com eliminação neutra de uma molécula de monóxido de carbono e m/z 122, oriundo da eliminação neutra da cadeia carbônica e quebra homolítica entre os C-1' e C-2' (Figura 36).



Espectro 143. IES-EM/EM íon *quasi*-molecular m/z 210 do alcalóide **3**.

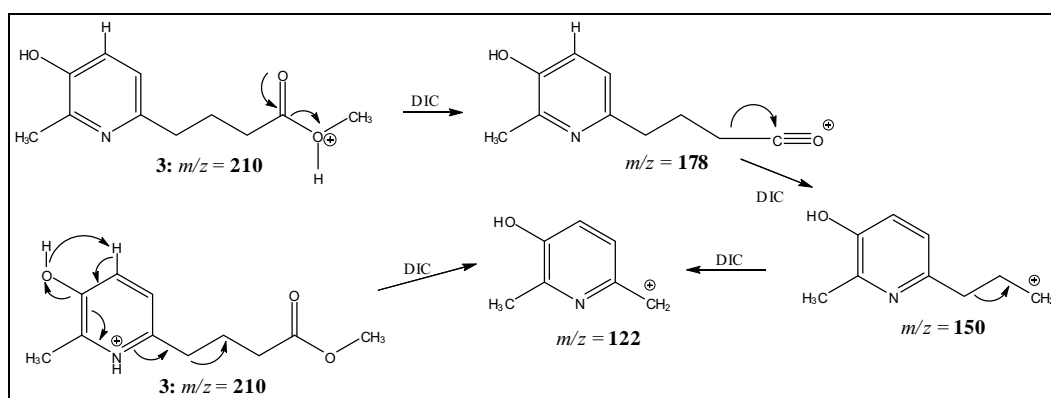


Figura 36. Proposta de fragmentação para o alcalóides **3**.

4.4. Avaliação da atividade anticolinesterásica dos alcalóides isolados

Visto os bons resultados observados no ensaio anticolinesterásico que os alcalóides piperidínicos isolados de *Senna spectabilis* pelo grupo NuBBE apresentaram (BOLZANI, 1995; VIEGAS JUNIOR et al, 2004, 2005 e 2007; PIVATTO et al, 2005), e a importância que os inibidores de acetilcolinesterase possuem no combate a doença de Alzheimer, que afeta mais de quatro milhões de pessoas idosas somente no Estados Unidos, podendo chegar aproximadamente a oitenta milhões de pessoas no mundo em 2050 (HAMPEL, 2011; MARSTON, KISSLING e HOSTETTMANN, 2002), optou-se em realizar tal bioensaio. Inicialmente foi avaliada a fração alcaloídica para saber se os alcalóides apresentavam alguma atividade. Para esse ensaio preliminar, foi utilizado para comparação, o controle positivo galantamina (0,01 μg , figura 37).

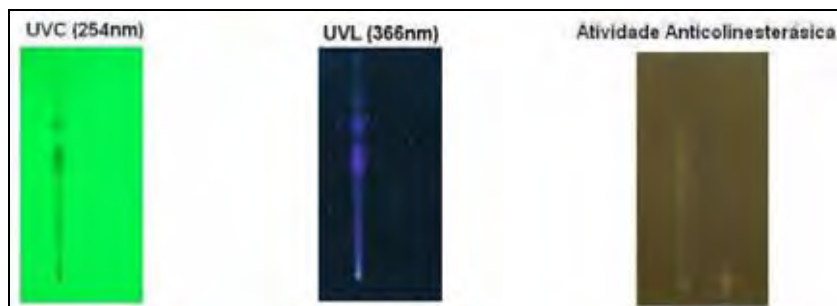


Figura 37. Ensaio qualitativo em CCD da atividade anticolinesterásica da fração alcalóidica.

Como apareceram as manchas brancas características sobre o fundo roxo, isto indica que houve inibição da enzima acetilcolinesterase. Visto esses resultados preliminares, todos os alcalóides isolados foram submetidos ao bioensaio para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM). O ensaio em CCD sugeriu atividade moderada para os compostos **2** (CIM 0,18 μg), **5** (CIM 0,75 μg) e **4b** (CIM 0,75 μg); e atividade baixa para os compostos **1a** (CIM 1,50 μg), **1b** (CIM 6,00 μg), **3** (CIM 3,00 μg), **4a** (CIM 1,5 μg) quando comparado com a fisostigmina (controle positivo, 0,05 μg) (Figuras 38 e 39).

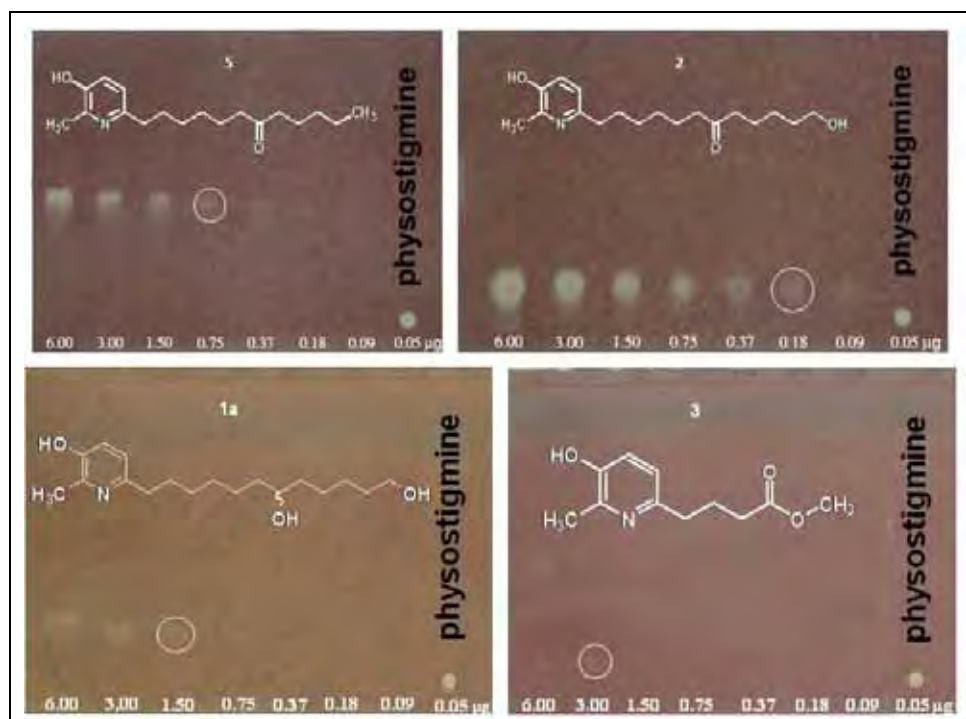


Figura 38. Ensaio qualitativo em CCD da atividade anticolinesterásica dos alcalóides **1a**, **2**, **3** e **5**.

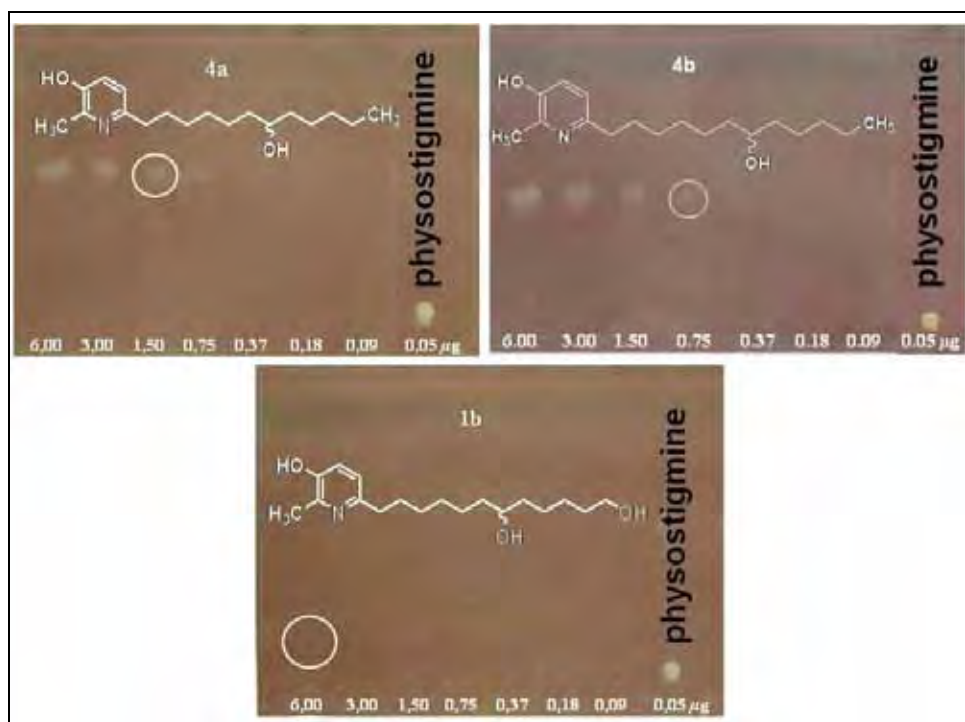


Figura 39. Ensaio qualitativo em CCD da atividade anticolinesterásica dos alcalóides **1b**, **4a** e **4b**.

Tabela 9. Valores de concentração inibitória mínima dos alcalóides piridínicos isolados.

Substância pura	Concentração Inibitória Mínima (μg)
12'-hidroxi-7'-multijuguinol (1a)	1,50
12'-hidroxi-7'-multijuguinol (1b)	6,00
12'-hidroxi-7'-multijuguinona (2)	0,18
4'-multijuguinato de metila (3)	3,00
7'-multijuguinol (4a)	1,50
7'-multijuguinol (4b)	0,75
7'-multijuguinona (5)	0,75

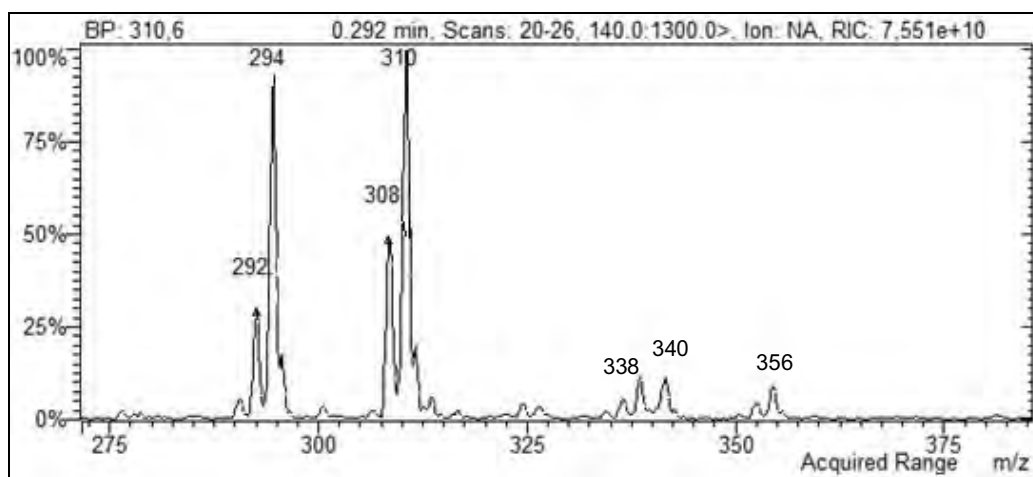
Dos resultados supracitados na tabela 9, pode-se destacar os valores obtidos pelas substâncias *12'-hidroxi-7'-multijuguinona (2)*, *7'-multijuguinol (4b)* e *7'-multijuguinona (5)*. Tais informações são importantes porque indicam possíveis protótipos de inibidores de acetilcolinesterase, provenientes de produtos naturais para se buscar novos fármacos para a doença de Alzheimer.

Outro aspecto relevante e tão importante quanto uma atividade elevada é o fato de indicar que outras estruturas químicas possam ser testadas e modificadas

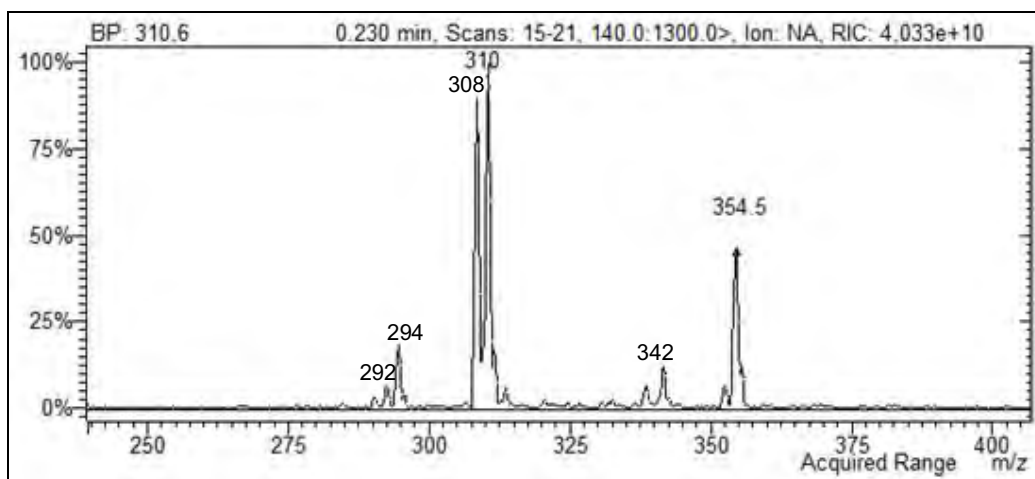
estruturalmente para, posteriormente, serem reavaliadas. Isto pode promover um banco de dados de estruturas químicas, incentivando estudos de modelagem molecular para buscar novos fármacos ou pelo menos uma forma básica que atue na inibição da enzima acetilcolina.

4.5. Perfil alcaloídico de *Senna multijuga* por EM e CLAE

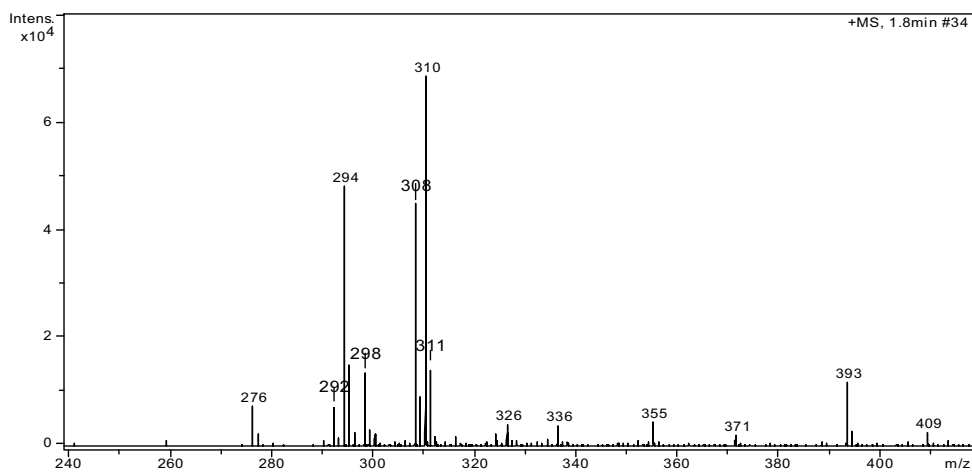
Visando verificar a produção de alcalóides nas demais partes da planta (folhas, flores, frutos e galhos), a fração enriquecida nos alcalóides foi submetida à análise por EM e CLAE. Analisando os espectros de massas da fração alcaloídica dos diferentes órgãos foi possível notar que todos os picos referentes aos íons *quasi*-moleculares dos alcalóides isolados estão presentes, exceto o pico para alcalóide **3** devido à baixa intensidade em relação aos demais. Observa-se também que a fração referente às folhas, os picos de m/z 294 e m/z 310 (ALC 4a e 4b e ALC 1a e 1b, respectivamente) são os mais intensos. Para as frações dos galhos e dos frutos, os picos mais intensos correspondem aos alcalóides **1a**, **1b** e **2**, enquanto para as flores os picos com maior intensidade obedecem aos alcalóides **1a**, **1b**, **2**, **4a** e **4b** respectivamente (Espectros 144-147).



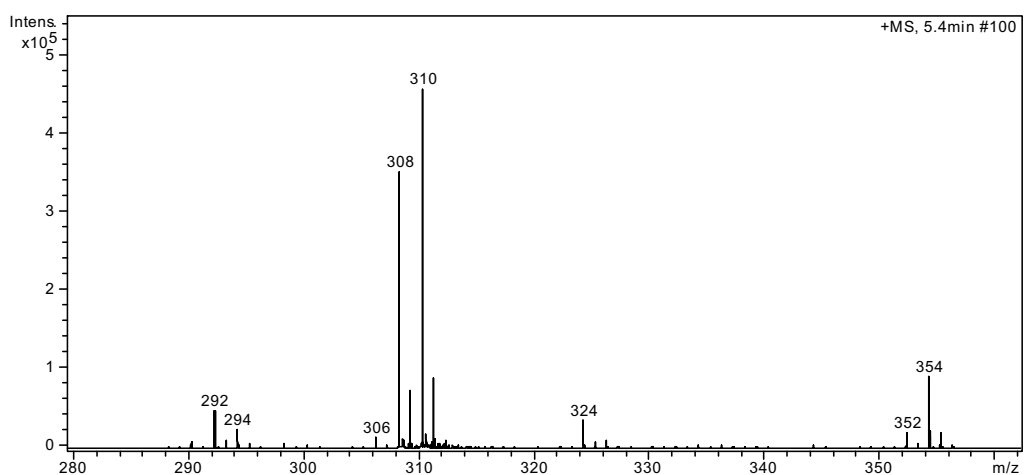
Espectro 144. IES-EM da fração alcaloídica referente às folhas.



Espectro 145. IES-EM da fração alcaloídica referente aos galhos.



Espectro 146. IES-EM da fração alcaloídica referente às flores.



Espectro 147. IES-EM da fração alcaloídica referente aos frutos.

Quando as frações foram analisadas por CLAE, também foi observado a presença dos alcalóides isolados por meio da comparação dos tempos de retenção e da semelhança do espectro de absorção na região do UV, no qual todos os alcalóides possuem os mesmos comprimentos de onda máximos. Assim como a análise do perfil por EM, os cromatogramas das frações alcaloídicas praticamente não mostraram o pico referente ao alcalóide **3**, além das diferentes frações apresentarem maior intensidade para alguns alcalóides específicos (Figuras 40-47 e Espectro 148).

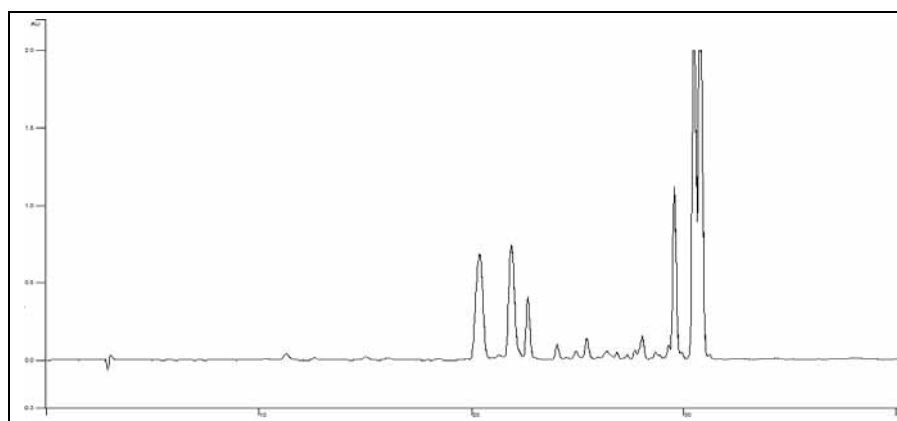


Figura 40. Cromatograma da fração alcaloídica referente às folhas; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

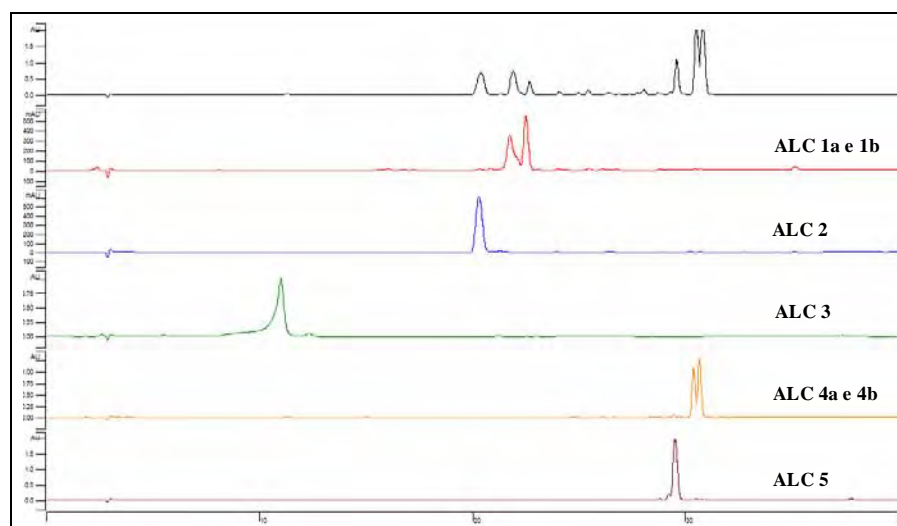


Figura 41. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração das folhas e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

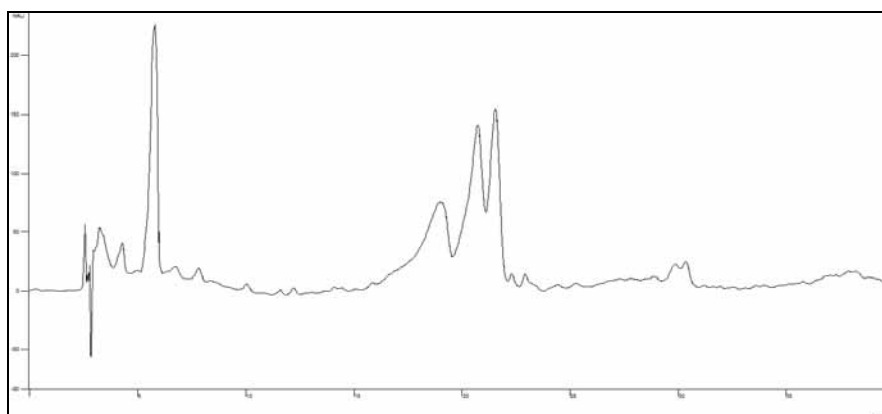


Figura 42. Cromatograma da fração alcaloídica referente aos galhos; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

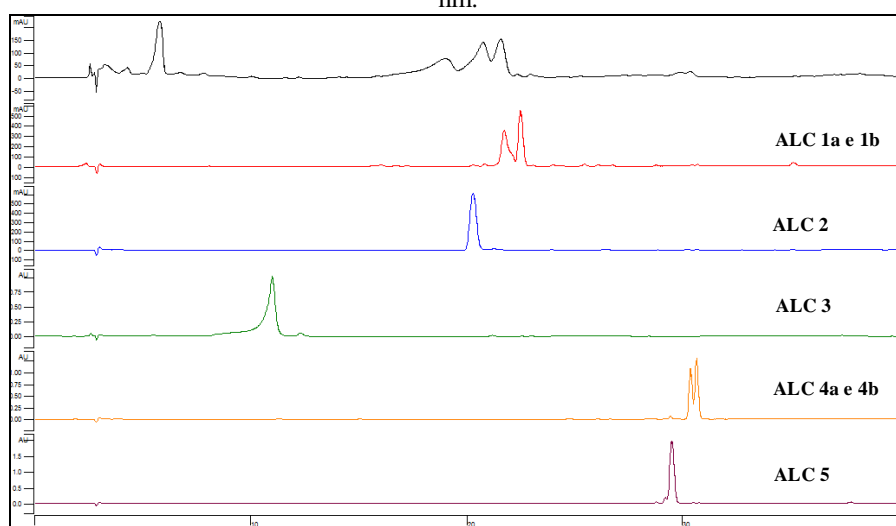


Figura 43. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração dos galhos e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

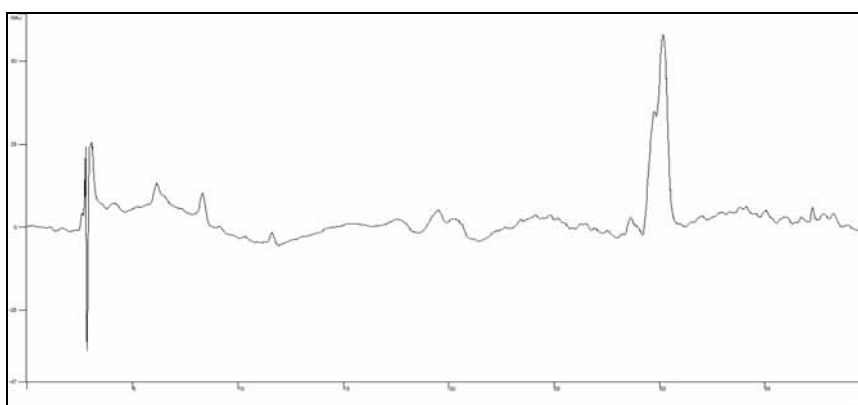


Figura 44. Cromatograma da fração alcaloídica referente às flores; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH – H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

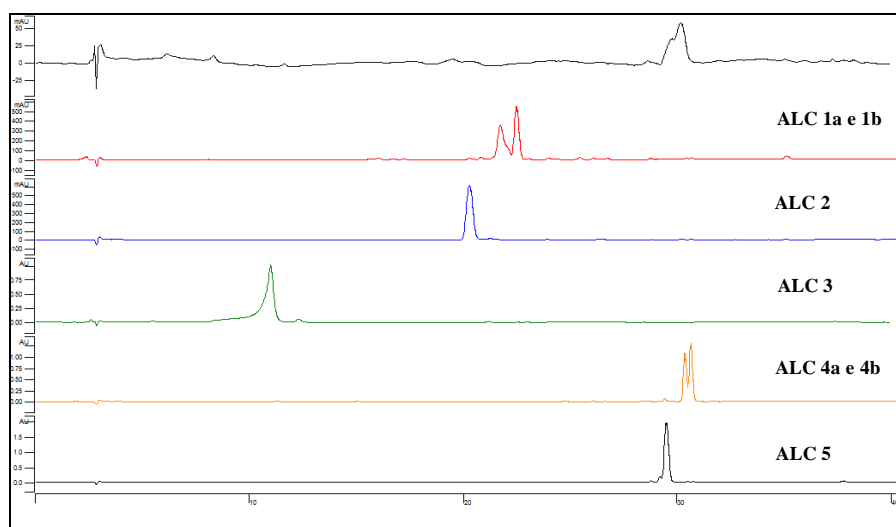


Figura 45. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração das flores e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH - H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

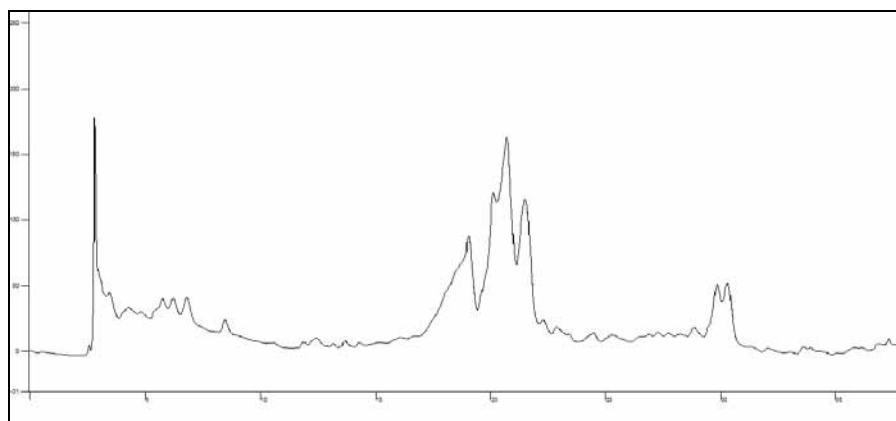


Figura 46. Cromatograma da fração alcaloídica referente aos frutos; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH - H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.

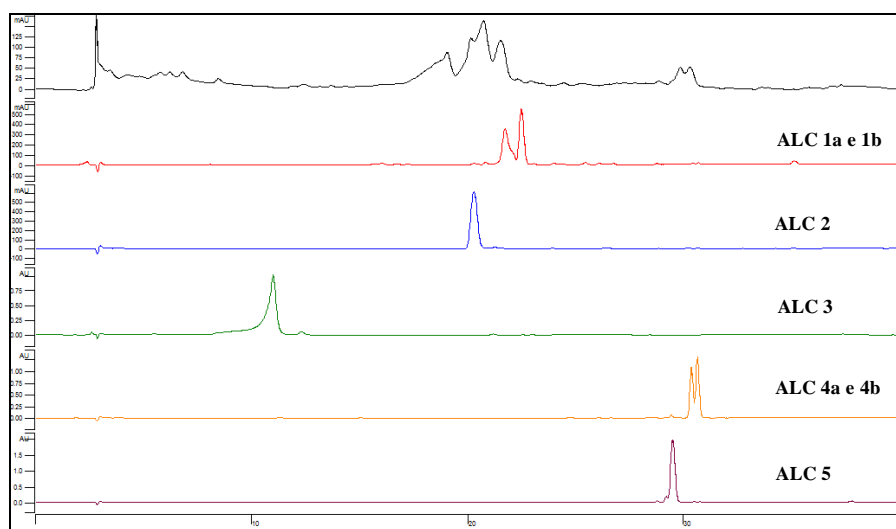
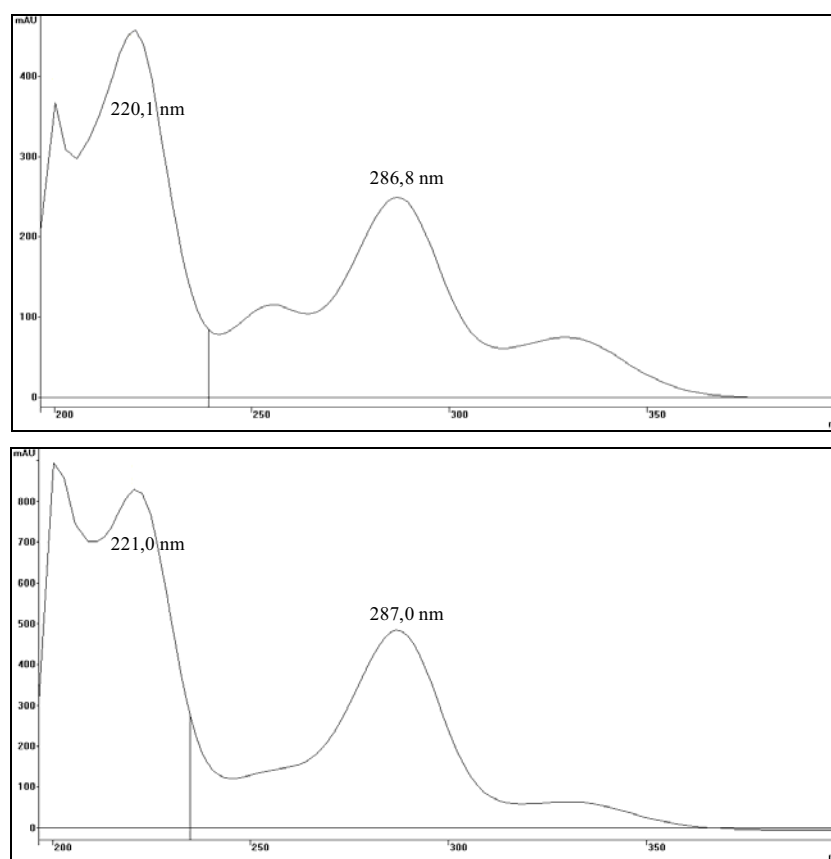


Figura 47. Cromatogramas de comparação dos tempos de retenção entre a fração dos frutos e os alcalóides isolados; gradiente (40 min), 35 - 100% de MeOH - H₂O, C = 1,0 mg/mL, vol. Inj. 20 µL, fluxo: 1,0 mL/min e detector UV 286 nm.



Espectro 148. Comparação entre as absorções na região do UV entre as frações alcaloídicas e os alcalóides isolados.

5 CONCLUSÕES

Baseado nos questionamentos feitos inicialmente (Por que pesquisar a *Senna multijuga* e o que estudar?), esse trabalho se baseou em um estudo fitoquímico, especificamente, voltado para os metabólitos da classe alcaloídica que estão presentes na espécie. Através dessa atividade, notou-se a grande importância das técnicas cromatográficas modernas e convencionais (por exemplo, a CCDP) que permitiu o isolamento dos alcalóides **2** e **5**, inéditos na literatura e com uma pureza considerável, possibilitando a elucidação estrutural das duas estruturas de maneira inequívoca. Tais alcalóides foram denominados de *12'-hidroxi-7'-multijuguinona* e *7'-multijuguinona*.

Utilizando a técnica de CLAE, foi possível isolar e purificar os demais alcalóides, sobretudo os pares com tempos de retenção muito próximos. Esses alcalóides foram identificados por **1a** e **1b** (*12'-hidroxi-7'-multijuginol*) e **4a** e **4b** (*7'-multijuginol*). Além desses, o alcalóide **3** também foi isolado e purificado utilizando a técnica CLAE e nomeado de *4'-multijuginato de metila*. Vale ressaltar que esses alcalóides são inéditos na literatura.

A espectroscopia e a espectrometria foram ferramentas primordiais para a elucidação estrutural de todos os alcalóides. Em relação aos pares **1a** e **1b** (mesma estrutura química) e **4a** e **4b** (estrutura química idêntica) foi necessário avaliar a rotação específica que o centro estereogênico apresentava. Com esses resultados, pode-se prever que o par **1a** e **1b** possuem uma isomeria constitucional, pois a rotação para ambos foi positiva. Para o par **4a** e **4b**, o experimento de rotação específica mostrou que os alcalóides desviam a luz para sentidos opostos. Isto evidencia uma relação enantiomérica entre eles. Ademais, os dois pares também podem ser epímeros, apresentando tanto uma isomeria constitucional (por exemplo, a mudança da posição do grupo hidroxílico secundário em C-7') como uma relação enantiomérica referente ao centro estereogênico.

Após a avaliação da atividade anticolinesterásica, os resultados indicaram atividades moderadas para os alcalóides **2**, **5** e **4b** e baixas para os alcalóides **1a**, **1b**, **3** e **4a**. Vale ressaltar que são testes preliminares e que ainda não são conclusivos sobre uma provável inibição ou não, porém, são indícios que os produtos naturais podem e continuam sendo substâncias valiosas para serem utilizadas como protótipos fármacos. Em relação ao acúmulo de alcalóides nas demais partes da planta, o perfil alcaloídico

traçado indica que todas as substâncias isoladas estão presentes nos outros órgãos, contudo, por meio da análise qualitativa, nota-se que as quantidades diferem de órgão para órgão na espécie *S. multijuga*.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. Pereirina: o primeiro alcalóide isolado e identificado foi a pereirina? **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009.

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.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais potencialidades e uso da madeira. Brasília, DF: EMBRAPA- CNPF/SPI, 1994. 640 p.

CORREIA, C. R. D. **Síntese estereosseletiva de alcalóides e N-heterociclos**. São Carlos: Ed. UFSCar. 2001. 97 p.

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

DAVIDE, A. C.; FARIA, J. M. R.; BOTELHO, S. A. **Propagação de espécies florestais**. Belo Horizonte: CEMIG/UFLA/FAEPE, 1995. 45 p.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: Ed. UNESP, 1995. 230 p.

DUBEY, P.; GUPTA, P. C. A new flavonol glycoside from seeds of *Cassia multijuga*. **Planta Medica**, v. 38, p. 165-168, 1980.

ETKIN, N. L.; ELISABETSKY, E. Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: the future of ethnopharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 23-26, 2005.

FRANCISCO, W. **Estudo químico das flores de *Senna multijuga* (Fabaceae)**. 2008. 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GERTSCH, J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 2, p. 177-183, 2009.

GRAZA, B.; FALQUETA, J.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacology, sustainable development and cooperation: the importance of gathering clinical data during field surveys. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 3, p. 635-638, 2010.

HIGHET, R. J. Alkaloids of *Cassia* species. I. cassine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 471-474, 1964.

HUMPEL, C. Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. **Trends in Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 26-32, 2011.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade 1980-250**. Brasília, DF, 2008. 93p.

KIM, H. S. Do not put too much value on conventional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 37-39, 2005.

MARCHESI, V. T. Alzheimer's dementia begins as a disease of small blood vessels, damaged by oxidative-induced inflammation and dysregulated amyloid metabolism: implications for early detection and therapy. **The FASEB Journal**, v. 25, p. 5-13, 2011.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 51-54, 2002.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

OBOLSKIY, D.; PISCHEL, I.; SIRIWATANAMETANON, N.; HEINRICH, M. *Garcinia mangostana* L.: a phytochemical and pharmacological review. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 8, p. 1047-1065, 2009.

PIVATTO, M. **Estudo das vias biossintéticas dos alcalóides 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, M. C. M.; FURLAN, M.; BOLZANI,

V. S. Electrospray ionization mass spectrometry screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

SEIDL, C. **Pesquisa de substâncias naturais inibidoras da Acetilcolinesterase**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

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

SERRANO, M. A. R.; PIVATTO, M.; FRANCISCO, W.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; LOPES, E. M. C.; LOPES, M. N.; YONG, M. C. M.; BOLZANI, V. S. Acetylcholinesterase inhibitory pyridine alkaloids of the leaves of *Senna multijuga*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 3, p. 482-484, 2010.

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

SINGH, J. Phytochemical investigation of *Cassia multijuga*. **Planta Medica**, v. 41, n. 4, p. 397-399, 1981.

SINGH, J. Two chromone glycosides from *Cassia multijuga*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 5, p. 1177-1179, 1982.

SRIPHONG, L.; SOTANAPHUN, U.; LIMSIRICHAIKUL, S.; WETWITAYAKLUNG, P.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PUMMANGURA, S. Cytotoxic alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Planta Medica**, v. 69, n. 11, p. 1054-1056, 2003.

TIWARI, R. D.; SINGH, J. Anthraquinones and anthraquinone glycosides from the roots of *Cassia multijuga*. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 38b, p.1136-1137, 1983.

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

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 915-926, 2005a.

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

VIEGAS JUNIOR, C.; REZENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTRO-GAMBÔA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1289, 2006.

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