

**unesp**



**Universidade Estadual Paulista – Unesp  
Instituto de Química – Araraquara**

“Júlio de Mesquita Filho”



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

## **Dissertação de Mestrado**

**Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla***

**Marcos Pivatto  
(Mestrando)**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani  
Co-Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa**

**Araraquara, 2005**

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

**Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla***

**Marcos Pivatto**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani  
Co-Orientador: Prof. Dr. Ian Castro-Gamboa**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química – Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, como requisito para a obtenção do título de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em Química, área de concentração Química Orgânica.*

Araraquara  
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

P693e Pivatto, Marcos  
Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla* / Marcos Pivatto. – Araraquara : [s.n], 2006  
135 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química  
Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani  
Co-orientador: Ian Castro-Gamboa

1. Produtos naturais. 2. Alcalóides. 3. Alcalóides piperidínicos. 4. Perfil alcaloídico. I. Título.

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

MARCOS PIVATTO

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

Araraquara, 01 de dezembro de 2005.

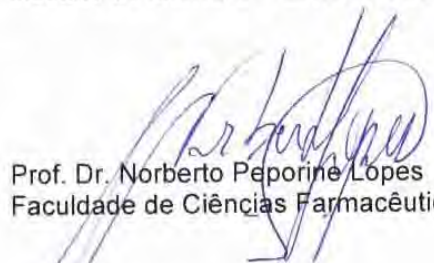
BANCA EXAMINADORA



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



Profª Drª Dulce Helena Siqueira Silva  
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Norberto Peporino Lopes  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto

## Dados Curriculares

### 1 DADOS PESSOAIS

Nome: **Marcos Pivatto**

Nascimento: 16/01/1979, Corbélia/PR - Brasil

CPF: 914738451-49

RG: 3511018-8114935

### 2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2003 - 2005 Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla*. Ano de obtenção: 2005.

Orientador: Vanderlan da Silva Bolzani.

Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.

1999 - 2003 Graduação em Química Bacharelado.

Universidade Federal de Mato Grosso, UFMT, Mato Grosso, Brasil.

Título: Estudo da sorção do inseticida endossulfan e seu metabólito sulfato de endossulfan em solos do tipo Glei Húmico e Latossolo Vermelho Amarelo.

Orientador: Dr<sup>a</sup> Eliana Freire Gaspar de Carvalho Dorés.

Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPQ, Brasil.

### 3 ATUAÇÃO PROFISSIONAL

#### Universidade Federal de Mato Grosso - UFMT

##### Vínculo institucional

2000 - 2003 Vínculo: Bolsista de Iniciação Científica, Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC - CNPq/UFMT, Carga horária: 20 h semanais, Regime: Dedicção exclusiva.

##### Atividades

8/2002 - 7/2003 Outra atividade técnico-científica, Departamento de Química.

##### Atividades realizadas

1. Bolsista de Iniciação Científica.

8/2000 - 4/2003 Estágio, Departamento de Química.

##### Estágios realizados

1. Estágio no Grupo de Estudos de Poluentes Ambientais, envolvendo Análise de Resíduos de Biocidas.

8/2001 - 7/2002 Outra atividade técnico-científica, Departamento de Química.

##### Atividades realizadas

1. Bolsista de Iniciação Científica.

8/2000 - 7/2001 Outra atividade técnico-científica, Departamento de Química.

##### Atividades realizadas

1. Bolsista de Iniciação Científica.

## **4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA**

### **4.1 PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **4.1.1 Resumos simples em anais de eventos**

- 1 PIVATTO, Marcos; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; VILLA, Ricardo Dalla; SHERWINSKI, Sônia Lima; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Avaliação do grau de contaminação dos recursos hídricos do Pantanal por biocidas e metais. In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2001, Cuiabá. Anais do IX Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2001. p. 83-83.
- 2 VILLA, Ricardo Dalla; ALVES, Bety Virgínia; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; PIVATTO, Marcos; SHERWINSKI, Sônia Lima; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Determinação de DDT em solo do Galpão Sanitário da Funasa - MT. In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2001, Cuiabá. Anais do IX Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2001. p. 77-77.
- 3 ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; PIVATTO, Marcos; VILLA, Ricardo Dalla; SHERWINSKI, Sônia Lima; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Determinação de DDT total em agentes da Funasa - Distrito de Cáceres - MT. In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2001, Cuiabá. Anais do IX Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2001. p. 82-82.
- 4 SHERWINSKI, Sônia Lima; ALVES, Bety Virgínia; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; VILLA, Ricardo Dalla; PIVATTO, Marcos; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Resíduos de pesticidas organoclorados no leite pasteurizado comercializado na região de Cuiabá - MT. In: IX ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2001, Cuiabá. Anais do IX Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2001. p. 78-78.
- 5 PIVATTO, Marcos; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MARTINS, Eucarlos de Lima; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Avaliação do potencial de contaminação do ambiente por biocidas devido ao seu uso em áreas de lavoura de algodão. In: X ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Cuiabá. Anais do X Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2002. p. 63-63.
- 6 ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MARTINS, Eucarlos de Lima; PIVATTO, Marcos; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Avaliação do Potencial de Contaminação do ambiente por biocidas devido ao seu uso em áreas de lavoura de algodão. In: X ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Cuiabá. Anais do X Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2002. p. 62-62.
- 7 VILLA, Ricardo Dalla; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MARTINS, Eucarlos de Lima; PIVATTO, Marcos; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Avaliação do potencial de contaminação do ambiente por biocidas devido ao seu uso em áreas de lavoura de algodão. In: X ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Cuiabá. Anais do X Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2002. p. 65-65.
- 8 VILLA, Ricardo Dalla; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MARTINS, Eucarlos de Lima; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; PIVATTO, Marcos; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Determinação de DDT em solo do galpão sanitário da Funasa em Varzea-Grande - MT. In: X ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2002, Cuiabá. Anais do X Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2002. p. 64-64.

- 9 PIVATTO, Marcos; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MARTINS, Eucarlos de Lima; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Estudo da adsorção do inseticida endossulfan e seu metabólito sulfato de endossulfan em solo do tipo Glei Húmico. In: II ECOQ/XII ECODEQ - IQ/UNB, 30/09 a 02/10/2002, 2002, Brasília. 2002.
- 10 MARTINS, Eucarlos de Lima; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; PIVATTO, Marcos; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de. Estudo da adsorção dos inseticidas clorpirifós e lambda-cialotrina em solos Glei Húmico e Latossolo coletados em Mato Grosso. In: II ECOQ/XII ECODEQ - IQ/UNB, 30/09 a 02/10/2002, 2002, Brasília. 2002.
- 11 ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; PIVATTO, Marcos; MARTINS, Eucarlos de Lima; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Estudo de adsorção de herbicidas utilizados na lavoura de algodão em solo Glei Húmico. In: II ECOQ/XII ECODEQ - IQ/UNB, 30/09 a 02/10/2002, 2002, Brasília. 2002.
- 12 PIVATTO, Marcos; SILVA, Sebastião Claudino da; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; MARTINS, Eucarlos de Lima; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de. Estudo da sorção do inseticida endossulfan e seu metabólito sulfato de endossulfan em solos do tipo Glei Húmico e Latossolo Vermelho Amarelo. In: XI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Cuiabá. Anais do XI Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2003. p. 52-52.
- 13 SANTOS, Denise Grazielle Gois; DORES, Eliana Freire Gaspar de Carvalho; SILVA, Sebastião Claudino da; PIVATTO, Marcos; ABREU, Adley Bergson Gonçalves de; MARTINS, Eucarlos de Lima; CARBO, Leandro; CUNHA, Marcelo Luiz Ferreira. Estudo das interações sortivas do herbicida atrazina em Latossolo Vermelho Amarelo. In: XI ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2003, Cuiabá. Anais do XI Encontro de Iniciação Científica. Cuiabá: UFMT, 2003. p. 51-51.
- 14 PIVATTO, Marcos; GAMBOA, Ian Castro; VIEGAS JUNIOR, Cláudio; FURLAN, Maysa; SILVA, Dulce Helena Siqueira; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Estudo químico dos frutos de *Senna spectabilis* visando o Isolamento de novos alcalóides piperidínicos bioativos. In: 28<sup>a</sup> REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2005, Poços de Caldas - MG. Química para o Desenvolvimento Sustentável e Inclusão Social. Ipiranga - SP: Copsy, 2005. p. PN-09.
- 15 PIVATTO, Marcos; CROTTI, Antônio Eduardo Miller; VIEGAS JUNIOR, Cláudio; REZENDE, Amanda de; GAMBOA, Ian Castro; YONG, Maria Claudia Marx; SILVA, Dulce Helena Siqueira; BOLZANI, Vanderlan da Silva; LOPES, Norberto Peporine. Structural elucidation of bioactive piperidine alkaloid co-metabolites from *Senna spectabilis* ESI-MS and ESI-MS/MS. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON NATURAL PRODUCTS RESEARCH 46TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF PHARMACOGNOSY, 2005, Corvallis - Oregon - EUA. *Frontiers in Bioorganic and Natural Products Chemistry*. Corvallis: American Society of Pharmacognosy, 2005. p. 171-171.

#### **4.1.2 Artigos completos publicados em periódicos**

- 1 PIVATTO, Marcos; CROTTI, Antônio Eduardo Miller; LOPES, Norberto Peporine; CASTRO-GAMBOA, Ian; REZENDE, Amanda de; VIEGAS JUNIOR, Cláudio; YOUNG, Maria Cláudia Marx; FURLAN, Maysa; BOLZANI, Vanderlan da Silva. 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*, Brasil, v. 16, n. 6B, p. 1431-1438, 2005.

## **4.2 PRODUÇÃO TÉCNICA**

### **4.2.1 Demais tipos de produção técnica**

- 1 PIVATTO, Marcos. Vetores e Geometria Analítica. 1999. (Monitoria).
- 2 PIVATTO, Marcos. Química Analítica I. 2000. (Monitoria).
- 3 PIVATTO, Marcos. Química Orgânica I. 2001. (Monitoria).
- 4 PIVATTO, Marcos. Química Orgânica I. 2002. (Monitoria).

## **5 INDICADORES DE PRODUÇÃO**

### Produção bibliográfica

Artigos publicados em periódicos - 1  
Completos - 1

Trabalhos em eventos - 15  
Resumos - 15

### Produção técnica

Demais tipos de produção técnica - 4



*A meu pai,  
que nunca mediu  
esforços para que  
meu sonho  
se realizasse*

## Agradecimentos

O aprendizado foi muito mais que a dissertação de mestrado, os ensinamentos da academia foram imprescindíveis, mas a convivência do dia-dia com os colegas, professores, companheiros e amigos, foi o que me fez crescer e aprender verdadeiramente o que este período significou em minha vida. Conversas, desacertos, teimosias, alegrias, tristezas momentos de dificuldades fizeram de mim um pouco melhor e isso eu agradeço a cada um que participou dessa caminhada que só está começando.

Agradeço:

- à prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanderlan da Silva Bolzani, pessoa enérgica que as vezes assusta com seu jeito duro, mas que guarda dentro de si uma mãe responsável por todos os seus alunos, querendo sempre o melhor de cada um. Obrigado pela orientação, confiança e carinho.
- ao prof. Dr. Ian Castro-Gamboa (tio), quando o chão desaparecia dos meus pés foi você que me mostrou que por mais dolorosa que fosse a perda o conforto de uma palavra amiga torna a dor suportável. Obrigado pela co-orientação, amizade e carinho.
- aos membros da banca examinadora Dulce Helena Siqueira Silva e Norberto Peporine Lopes a quem admiro e considero um amigo, profissional exemplar responsável e dinâmico.
- aos técnicos Alberto Camilo Alécio e Nivaldo Boralle pelos excelentes espectros de massas e RMN, respectivamente, pelas discussões e dúvidas esclarecidas, a tia Hélia pelo carinho e amizade.
- Em nome de alguns, agradeço aos colegas e amigos do Departamento de Química Orgânica: Adriana (Kbção), Mariana Carrara Cafêu, Marcelo Telascrea, Geraldo, Helder, Jonas, Luciana de Ávila, Andreinha, Débora Baldoqui, Viviane, Maria Amélia, Patrícia Pauleti, Nina, Renata Sordi, Ioanis, Marcos (Tomate), do Departamento de Química Analítica Gilbert, Elias, Cláudio, Emanuel, prof. Massao, pelos conselhos e amizade.
- aos funcionários do Instituto de Química UNESP – Araraquara, pelo convívio, suporte e disposição em ajudar.

- aos meus “irmãos” Cláudio Viegas Júnior, Patrícia Pauleti, Camila Kissi Higa, Luis Octávio Regasini, obrigado por agüentarem minhas teimosias. Aprendi muito com vocês!
- à Amanda pelo carinho e amizade. Você é uma pessoa especial que apareceu na minha vida. Tia, te gosto de grande!!!
- às meninas da república Crocólis: Dani, Cecília, Fer e ao agregado Binha. Quando a saudade de casa apertava a amizade e carinho de vocês fez a diferença. Valeu pelos churrascos, almoços, bolos... . Adoro vocês!!!
- aos amigos de república (Cuiabanos) Adriano Buzutti de Siqueira e Danilo Luiz Flumignan, pelos momentos de descontração, discussões, alegrias e amizade. Se não foram tão bons no futebol, foram grandes amigos.
- aos amigos de Mineiros: Roberto César, Armando, Gideone, Luciana, Tinta, Mirela, Júlio César, Maysa, Camila, Baterinha, Diego, Galvani, Lilia, que mesmo a distância fizeram parte da minha vida.
- à minha mãe Marisa Pivatto, minha irmã Jackeline Kelly Pivatto, minhas tias Maria Estér Acadroli Carvalho e Marizete Acadroli Santos e minha avó Otacília Ida Acadroli pelas orações, carinho e amor incondicional. Vocês são o alicerce da minha vida!
- àqueles que mesmo de passagem deixaram um pouco de si, obrigado! Se levaram alguma coisa de mim, devolvam!!! rrsrrsrs

à Deus por ter colocado essas  
pessoas em minha vida.

---

**“O que prevemos raramente ocorre,  
o que menos esperamos geralmente acontece”**

Benjamin Disraeli

---

## Resumo

O presente trabalho objetivou o estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e o estudo comparativo do perfil alcaloídico entre *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla*, outra espécie vegetal relatada como fonte de alcalóides piperidínicos. O estudo fitoquímico dos frutos de *S. spectabilis* forneceu 4 alcalóides piperidínicos: cassina (**1**), 3-*O*-acetil-cassina (**20**), 3-*O*-feruloil-cassina (**18**) e um estereoisômero da cassina (**19**), cujas configurações, relativa e absoluta, ainda não foram determinadas. Dentre estes, somente a cassina (**1**) já era conhecida e foi isolada, em nosso grupo de pesquisa, como o alcalóide majoritário das flores da mesma espécie. Estes alcalóides foram avaliados quanto às atividades seqüestradora de radicais livres (DPPH) e inibidora da enzima acetilcolinesterase. As substâncias **1**, **2** e **4** apresentaram forte atividade anticolinesterásica, com concentração inibitória mínima semelhante à galantamina, utilizada como padrão positivo. Quanto à atividade seqüestradora de radicais livres, o único que apresentou leve estabilização do radical foi o derivado feruloil piperidínico (**18**), quando comparado com a rutina, utilizada como padrão positivo. Entretanto, a maior concentração do alcalóide não atingiu a concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>), observada para a rutina. O estudo do perfil químico entre as espécies *S. spectabilis* e *C. leptophylla* foi inicialmente baseado em experimentos comparativos de cromatografia em camada delgada e ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Os resultados obtidos demonstraram que somente os extratos das flores e frutos de *S. spectabilis* apresentavam substâncias alcaloídicas como metabólitos detectáveis. Por outro lado, a análise por espectrometria de massas permitiu evidenciar metabólitos alcaloídicos piperidínicos em ambas as espécies estudadas, levando-nos a concluir sobre a importância desta técnica na bioprospecção de metabólitos minoritários.

## Abstract

The present work aimed the phytochemical study of the fruits of *Senna spectabilis* and a comparative analysis of the alkaloid profile between *S. spectabilis* and *Cassia leptophylla*, another species reported as a source of piperidine alkaloids. The phytochemical study of the fruits of *S. spectabilis* furnished 4 piperidine alkaloids: cassine (**1**), 3-*O*-acetyl-cassine (**20**), 3-*O*-feruloyl-cassine (**18**) and a stereoisomer of cassine (**19**), whose absolute and relative configurations were not established yet. Among these, only cassine (**1**) was already known and it had been previously isolated as the major alkaloid of the flowers in the same species. These alkaloids were evaluated for their potential as free radical scavengers towards DPPH and acetylcholinesterase inhibitors. Substances **1**, **2** and **4** showed strong activity in inhibition of acetylcholinesterase, with a minimum inhibitory concentration similar to galantamina, used as a reference compound. In the free radical scavenger assay, compound **18** was the only active, showing a slightly radical stabilization, when compared with the rutina, used as a reference compound. However, the largest concentration of the alkaloid didn't reach the inhibitory concentration for 50% (IC<sub>50</sub>), obtained by rutina. The chemical profile study between *S. spectabilis* and *C. leptophylla* species was initially based on comparative experiments using thin layer chromatography, and proton nuclear magnetic resonance. The results indicated that alkaloidal metabolites were present only in the *S. spectabilis* extracts. On the other hand, analysis by tandem mass spectrometry revealed the presence of piperidine alkaloids in both species, leading us to conclude the relevance of this technique in bioprospecting of minority metabolites.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1. Considerações gerais sobre o posicionamento taxonômico <i>Cassia/Senna</i> e seus usos na medicina popular .....	26
1.2. Descrição botânica de <i>Senna spectabilis</i> e <i>Cassia leptophylla</i> .....	28
<i>Senna spectabilis</i> .....	28
<i>Cassia leptophylla</i> .....	30
1.3. Alcalóides piperidínicos .....	31
1.3.1. Proposta biossintética para os alcalóides piperidínicos .....	34
1.4. Espécies de <i>Senna</i> e/ou <i>Cassia</i> como fontes de alcalóides piperidínicos.....	35
1.5. Considerações gerais sobre a espectrometria de massas ionização por <i>electrospray</i> .....	38
2. OBJETIVOS .....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	40
3.1. Instrumentação .....	40
3.2. Materiais Utilizados.....	41
3.2.1. Solventes.....	41
3.2.2. Cromatografia.....	41
3.3. Reveladores Utilizados.....	42
3.3.1. Revelador de Iodocloroplatinato .....	42
3.3.2. Revelador Dragendorff.....	42
3.3.3. Revelador de Anisaldeído.....	43
3.3.4. Iodo Sublimado .....	43
3.4. Preparo do Material Vegetal.....	43
3.5. Partição líquido/líquido .....	44
3.6. Preparo das amostras para CLAE.....	44
3.7. Extração ácido/base .....	45
3.8. Avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica .....	46
3.8.1. Ensaio espectrofotométrico com 2,2-difenil-picrilhidrazina (DPPH).....	46
3.8.2. Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	47
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	50
4.1. Estudo fitoquímico dos frutos de <i>Senna spectabilis</i> .....	50
4.2. Elucidação estrutural dos alcalóides isolados.....	53
4.2.1. Elucidação estrutural do alcalóide <b>1</b> .....	53
Proposta de configuração relativa para o alcalóide <b>1</b> .....	69
4.2.2. Elucidação estrutural do alcalóide <b>20</b> .....	70
Proposta de configuração relativa para o alcalóide <b>20</b> .....	87
4.2.3. Elucidação estrutural do alcalóide <b>18</b> .....	87
Proposta de configuração relativa para o alcalóide <b>18</b> .....	105
4.2.4. Elucidação estrutural do alcalóide <b>19</b> .....	106
4.3. Ensaio antioxidante com DPPH .....	120
4.4. Avaliação da atividade anticolinesterásica.....	121
4.5. Análise do perfil alcaloídico de <i>Senna spectabilis</i> e <i>Cassia leptophylla</i> .....	122
4.5.1. Cromatografia em Camada Delgada, RMN de <sup>1</sup> H, CLAE-UV e EM.....	122
5. CONCLUSÕES.....	129
<i>Perspectivas</i> .....	130
6 REFERÊNCIAS.....	131

## Lista de Figuras

Figura 1. Glicosídeo do ácido salicílico (salicilina), produto natural isolado de <i>Salix alba</i> e os derivados sintéticos: ácido salicílico e ácido acetil salicílico .....	24
Figura 2. <i>Senna spectabilis</i> : detalhes da planta, flores, frutos, sementes, casca e madeira .....	29
Figura 3. <i>Senna spectabilis</i> : espécime cultivado no IQ–UNESP Araraquara, de onde foram coletados as flores e frutos. ....	29
Figura 4. <i>Cassia leptophylla</i> : detalhes da planta, flores, frutos, sementes, casca e madeira. ....	30
Figura 5. Morfina, alcalóide isolado do látex da papoula de <i>Papaver somniferum</i> .....	31
Figura 6. Coniína, alcalóide isolado de <i>Conium maculatum</i> , causador da morte do filósofo grego Sócrates no ano de 399 a.C. ....	32
Figura 7. Atropina, isolada de <i>Hyoscyamus niger</i> .....	32
Figura 8. Tubocurarina, isolada de <i>Strychnos castelnaeana</i> , utilizada pelos índios nas flechas para a caça .....	33
Figura 9. Proposta de biogênese para os alcalóides da coniína a partir da lisina .....	34
Figura 10. Hipótese biossintética para os alcalóides da cicuta com base nos estudos de marcação isotópica e de degradação.....	35
Figura 11. Alcalóides piperidínicos isolados de espécies de <i>Senna/Cassia</i> .....	37
Figura 12. Partição do extrato dos frutos do espécime <i>S. spectabilis</i> .....	44
Figura 13. Pré-tratamento das amostras, extração de substâncias lipofílicas.....	45
Figura 14. Esquema modificado de extração ácido/base para o isolamento dos alcalóides piperidínicos .....	46
Figura 15. Reação de redução do radical DPPH .....	47
Figura 16. Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição de AChE.....	48
Figura 17. Reação da AChE com acetato de 1-naftila e subsequente formação do corante azóico roxo no bioensaio em CCD .....	49
Figura 18. Esquema de purificação da fração SSFr – CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> .....	52
Figura 19. Cromatograma da sub-fração PMC.01 F28-30. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex LC18 5 µm, 250 x 4,6 mm, fase móvel: 5 a 100% de ACN – HOAc 5%, (30 min), fluxo: 1 mL/min, detecção: UV 254 nm.....	52
Figura 20. Correlações <sup>1</sup> H– <sup>13</sup> C observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide 1 .....	67



Figura 21. Proposta de fragmentação para o alcalóide <b>1</b> e seu homólogo.....	69
Figura 22. Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide <b>20</b> .....	85
Figura 23. Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide <b>18</b> .....	102
Figura 24. Proposta de fragmentação para o alcalóide <b>18</b> e seu homólogo.....	104
Figura 25. Correlações $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide <b>19</b> .....	118
Figura 26. Curva analítica do ensaio antioxidante do alcalóide <b>18</b> .....	121
Figura 27. Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica: a) alc. <b>18</b> ; b) alc. <b>19</b> ; c) alc. <b>1</b> ; d) alc. <b>20</b> e e) controle galantamina.....	121
Figura 28. Bioautografia em placa de sílica, avaliação da CIM para os alcalóides inibidores de AChE .....	122
Figura 29. Cromatoplasmas comparando o perfil alcaloídico da extração ácido/base (1, 2, 3, 4), e das matrizes tratadas conforme item 3.6 (1', 2', 3', 4'), com os padrões isolados de <i>S. spectabilis</i> ( $\text{SiO}_2$ GF <sub>254</sub> ; $\text{CHCl}_3$ :MeOH: $\text{NH}_4\text{OH}$ ; 9:1:0,25; ICIPt). .....	123
Figura 30. Cromatoplasma comparativa da fração alcaloídica da extração ácido/base com os alcalóides isolados de <i>S. spectabilis</i> , observada sob lâmpada de UV 365 nm e em seguida revelada com ICIPt ( $\text{SiO}_2$ GF <sub>254</sub> ; $\text{CHCl}_3$ :MeOH: $\text{NH}_4\text{OH}$ ; 9:1:0,25). 123	
Figura 31. Estrutura dos alcalóides isolados de <i>S. spectabilis</i> .....	126

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Material vegetal dos espécimes coletados. ....	50
Tabela 2. Dados de RMN <sup>1</sup> H e gCOSY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>1</b> .....	58
Tabela 3. Dados de RMN <sup>13</sup> C, DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide <b>1</b> .....	61
Tabela 4. Dados de RMN <sup>1</sup> H e gCOSY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>20</b> .....	71
Tabela 5. Dados de RMN <sup>13</sup> C, DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide <b>20</b> .....	75
Tabela 6. Dados de RMN <sup>1</sup> H e gCOSY (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>18</b> .....	93
Tabela 7. Dados de RMN <sup>13</sup> C, DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide <b>18</b> .....	98
Tabela 8. Dados de RMN <sup>1</sup> H e gCOSY (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do alcalóide <b>19</b> .....	110
Tabela 9. Dados de RMN <sup>13</sup> C, DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide <b>19</b> .....	115
Tabela 10. Ensaio antioxidante, variação percentual da absorbância (%ΔA).....	120
Tabela 11. Frações alcaloídicas da extração ácido/base.....	124
Tabela 12. Determinação das fórmulas e massas moleculares por EM de alta resolução. .....	128

## Lista de Espectros

Espectro 1. Espectro na região do IV (KBr), do alcalóide <b>1</b> .....	53
Espectro 2. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>1</b> .....	55
Espectro 3. Ampliação do espectro 2 ( $\delta$ 1,0–1,5) do alcalóide <b>1</b> .....	56
Espectro 4. Ampliação do espectro 2 ( $\delta$ 1,7–2,4) do alcalóide <b>1</b> .....	56
Espectro 5. Ampliação do espectro 2 ( $\delta$ 2,5–3,5) do alcalóide <b>1</b> .....	57
Espectro 6. Mapa de contorno gCOSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>1</b> .....	59
Espectro 7. Ampliação do espectro 6 ( $\delta$ 1,0–1,8) do alcalóide <b>1</b> .....	60
Espectro 8. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>1</b> .....	62
Espectro 9. Ampliação do espectro 8 ( $\delta$ 15,0–70,0), alcalóide <b>1</b> .....	62
Espectro 10. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT 135 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>1</b> .....	63
Espectro 11. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>1</b> .....	64
Espectro 12. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide <b>1</b> .....	65
Espectro 13. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide <b>1</b> .....	66
Espectro 14. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide <b>1</b> .....	66
Espectro 15. IES-EM (modo positivo) do alcalóide <b>1</b> .....	68
Espectro 16. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular $m/z = 298$ do alcalóide <b>1</b> .....	68
Espectro 17. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular $m/z = 326$ , homólogo do alcalóide <b>1</b> ...	68
Espectro 18. Espectro de NOESY 1D (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), irradiando o hidrogênio $\delta$ 2,71 do alcalóide <b>1</b> .....	69
Espectro 19. Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>20</b> .....	70
Espectro 20. Ampliação do espectro 19 ( $\delta$ 2,4–4,8) do alcalóide <b>20</b> .....	71
Espectro 21. Mapa de contorno gCOSY (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>20</b> .....	72
Espectro 22. Ampliação do espectro 21 ( $\delta$ 1,0–3,0) do alcalóide <b>20</b> .....	73
Espectro 23. Ampliação do espectro 21 ( $\delta$ 1,3–2,2) do alcalóide <b>20</b> .....	74
Espectro 24. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>20</b> .....	76
Espectro 25. Ampliação do espectro 24, alcalóide <b>20</b> .....	76
Espectro 26. Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT 135 (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>20</b> .....	77
Espectro 27. Ampliação do espectro 26 ( $\delta$ 20,0–70,0) do alcalóide <b>20</b> .....	77
Espectro 28. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide <b>20</b> .....	78
Espectro 29. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 16,0–32,0) do alcalóide <b>20</b> .....	79
Espectro 30. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 40,0–75,0) do alcalóide <b>20</b> .....	80

Espectro 31. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), do alcalóide <b>20</b> .....	81
Espectro 32. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 16,0–34,0), do alcalóide <b>20</b> .....	82
Espectro 33. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 16,0–32,0) do alcalóide <b>20</b> .....	83
Espectro 34. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 45,0–70,0) do alcalóide <b>20</b> .....	84
Espectro 35. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 170,0–215,0) do alcalóide <b>20</b> .....	85
Espectro 36. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular $m/z = 340$ do alcalóide <b>20</b> .....	86
Espectro 37. IES-EM/EM íon <i>quasi</i> -molecular $m/z = 326$ , homólogo do alcalóide <b>20</b> .....	86
Espectro 38. Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), irradiando o hidrogênio $\delta$ 2,91, do alcalóide <b>20</b> .....	87
Espectro 39. Espectro na região do IV (KBr), do alcalóide <b>18</b> .....	88
Espectro 40. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>18</b> .....	89
Espectro 41. Ampliação parcial ( $\delta$ 1,1 – 3,0) do espectro 40, alcalóide <b>18</b> .....	90
Espectro 42. Ampliação parcial ( $\delta$ 2,5 – 5,0) do espectro 40, alcalóide <b>18</b> .....	91
Espectro 43. Ampliação parcial ( $\delta$ 6,4 – 7,8) do espectro 40, alcalóide <b>18</b> .....	92
Espectro 44. Mapa de contorno gCOSY ( $\delta$ 1,0–5,0) do alcalóide <b>18</b> .....	94
Espectro 45. Mapa de contorno gCOSY ( $\delta$ 6,3–7,8) do alcalóide <b>18</b> .....	95
Espectro 46. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>18</b> .....	96
Espectro 47. Ampliação parcial ( $\delta$ 24,0–31,0) do espectro 46, alcalóide <b>18</b> .....	96
Espectro 48. Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>18</b> .....	97
Espectro 49. Ampliação parcial ( $\delta$ 23,0–31,0) do espectro 48, alcalóide <b>18</b> .....	97
Espectro 50. Mapa de contorno gHMQC ( $\delta$ 14,0–34,0; 500 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) do alcalóide <b>18</b> .....	99
Espectro 51. Mapa de contorno gHMQC ( $\delta$ 40,0–73,0) do alcalóide <b>18</b> .....	99
Espectro 52. Mapa de contorno gHMQC ( $\delta$ 105,0–149,0) do alcalóide <b>18</b> .....	100
Espectro 53. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 20,0–75,0) do alcalóide <b>18</b> .....	100
Espectro 54. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 108,0–172,0) do alcalóide <b>18</b> .....	101
Espectro 55. Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$ 140,0–214,0) do alcalóide <b>18</b> .....	101
Espectro 56. Experimento de NOESY 1D (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), irradiando os hidrogênios do grupo metoxílico em $\delta$ 3,93 do alcalóide <b>18</b> .....	102
Espectro 57. Espectro de IES–EM (modo positivo) do alcalóide <b>18</b> .....	103
Espectro 58. Espectro de IES-EM/EM do íon <i>quasi</i> -molecular $m/z = 474$ do alcalóide <b>18</b> .....	103
Espectro 59. Espectro de IES-EM/EM do íon <i>quasi</i> -molecular $m/z = 502$ , homólogo do alcalóide <b>18</b> .....	104

Espectro 60. Espectro de NOESY 1D (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), irradiando o hidrogênio δ 2,99 do alcalóide <b>18</b> .....	105
Espectro 61. Espectro na região do IV (KBr), do alcalóide <b>19</b> .....	106
Espectro 62. Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do alcalóide <b>19</b> .....	107
Espectro 63. Ampliação parcial (δ 1,0–2,4) do espectro 62, alcalóide <b>19</b> .....	108
Espectro 64. Ampliação parcial (δ 2,8–3,8) do espectro 62, alcalóide <b>19</b> .....	109
Espectro 65. Mapa de contorno gCOSY (δ 1,1–3,8) do alcalóide <b>19</b> .....	111
Espectro 66. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do alcalóide <b>19</b> .....	112
Espectro 67. Ampliação parcial (δ 19,0–65,0) do espectro 66, alcalóide <b>19</b> .....	113
Espectro 68. Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do alcalóide <b>19</b> ...	114
Espectro 69. Ampliação parcial (δ 15,0–65,0) do espectro 68, alcalóide <b>19</b> .....	114
Espectro 70. Mapa de contorno gHMQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD), do alcalóide <b>19</b> .....	116
Espectro 71. Mapa de contorno gHMQC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD), do alcalóide <b>19</b> .....	116
Espectro 72. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD), do alcalóide <b>19</b> .....	117
Espectro 73. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD), do alcalóide <b>19</b> .....	117
Espectro 74. Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD), do alcalóide <b>19</b> .....	118
Espectro 75. Espectro de IES-EM (modo positivo) do alcalóide <b>19</b> .....	119
Espectro 76. Espectro de IES-EM/EM do íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> = 298 do alcalóide <b>19</b> .....	119
Espectro 77. Espectro de IES-EM/EM do íon <i>quasi</i> -molecular <i>m/z</i> = 326 do alcalóide <b>19</b> .....	119
Espectro 78. Perfil alcalóidico por RMN <sup>1</sup> H das frações alcalóidicas da extração ácido/base das flores e frutos de <i>S. spectabilis</i> .....	124
Espectro 79. Perfil alcalóidico por RMN <sup>1</sup> H das frações alcalóidicas da extração ácido/base das flores e folhas de <i>C. leptophylla</i> .....	125
Espectro 80. IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) das flores de <i>S. spectabilis</i> (ni = não identificado) .....	127
Espectro 81. IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) dos frutos de <i>S. spectabilis</i> (ni = não identificado) .....	127
Espectro 82. IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) das flores de <i>C. leptophylla</i> (ni = não identificado) .....	127
Espectro 83. IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) das folhas de <i>C. leptophylla</i> (ni = não identificado) .....	128

## Lista de Abreviaturas

AAS – Ácido Acetil Salicílico

AB-CLF1 – Extração ácido/base da matriz *C. leptophylla* flores

AB-CLFo – Extração ácido/base da matriz *C. leptophylla* folhas

AB-SSF1 – Extração ácido/base da matriz *S. spectabilis* flores

AB-SSFr – Extração ácido/base da matriz *S. spectabilis* frutos

AChE – acetilcolinesterase

ACN – acetonitrila

AcOEt – acetato de etila

aq. – aquoso

CCDC – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CC – cromatografia em coluna

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

*d* – duplete

DPPH – 2,2-difenil-picrilhidrazina

*dq* – duplo quadruplete

EECL-F1 – extrato etanólico *Cassia leptophylla* flores

EECL-Fo – extrato etanólico *Cassia leptophylla* folhas

EESS-F1 – extrato etanólico *Senna spectabilis* flores

EESS-Fr – extrato etanólico *Senna spectabilis* frutos

EM – Espectrometria de massas

FE – Fase Estacionária

FM – Fase Móvel

gCOSY – Gradient COrrrelation SpectroscopY

gHMBC – Gradient Heteronuclear Multiple Bond Coherence

gHMQC – Gradient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

Hex – hexano

HOAc – ácido acético

HTS – high through-put screening

IC<sub>50</sub> – Concentração de substância teste que sequestre 50% do radical livre DPPH

IClPt – revelador Iodocloroplatinato

IES – Ionização por electrospray

IV – Espectroscopia na região do Infravermelho

MeOH – metanol

m – multiplete

$v_{as}$  – estiramento assimétrico

$v_s$  – estiramento simétrico

*n*-BuOH – *n*-butanol

NOESY – Nuclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais

RMN de  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio Um

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

*s* – simpleto

*sl* – simpleto largo

SNC – Sistema Nervoso Central

*J* – constante de acoplamento (em Hertz)

TEA – trietilamina

*t* – tripleto

$\delta$  – deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

## 1. INTRODUÇÃO

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

Numerosas etapas marcaram a evolução da arte de curar, porém, torna-se difícil delimitá-las com exatidão, já que a medicina esteve por muito tempo associada às práticas mágicas, místicas e ritualísticas, muitas vezes até considerando as plantas como sendo seres espirituais. Nas origens da história, a noção das plantas com ação terapêutica e tóxica passou a ser objeto de interesse. Arqueólogos encontraram partes de plantas tidas como medicinais em túmulos pré-históricos. No ano de 1975, no território atual do Iraque, foi descoberto um esqueleto humano de quase 60 mil anos de idade e junto a este, foi encontrada petrificada pequena quantidade de pólen concentrado de achilea e jacinto, utilizados até hoje pelos camponeses da região (MIGUEL; MIGUEL, 2000).

Já no ano 3000 a.C., a China dedicava-se ao cultivo de plantas medicinais. Sabe-se também que, desde 2300 a.C., os egípcios, assírios e hebreus cultivavam diversas ervas e traziam de suas expedições tantas outras. Com estas plantas, chegavam a criar purgantes, vermífugos, diuréticos, cosméticos e especiarias culinárias, além de líquidos e gomas utilizados em mumificação (MARTINS et al., 2003).

Na Grécia antiga, as plantas juntamente com o seu valor terapêutico ou tóxico eram muito conhecidas. Hipócrates (460-377 a.C.), denominado o “Pai da Medicina”, reuniu em sua obra “Corpus Hipocratium” a síntese dos conhecimentos médicos de seu tempo, indicando para cada enfermidade o remédio vegetal e o tratamento adequado. No começo da Era Cristã, Dioscórides enumerou em seu tratado, “De Materia Medica”, mais de 500 drogas de origem vegetal, descrevendo o emprego terapêutico de muitas delas (MARTINS et al., 2003).

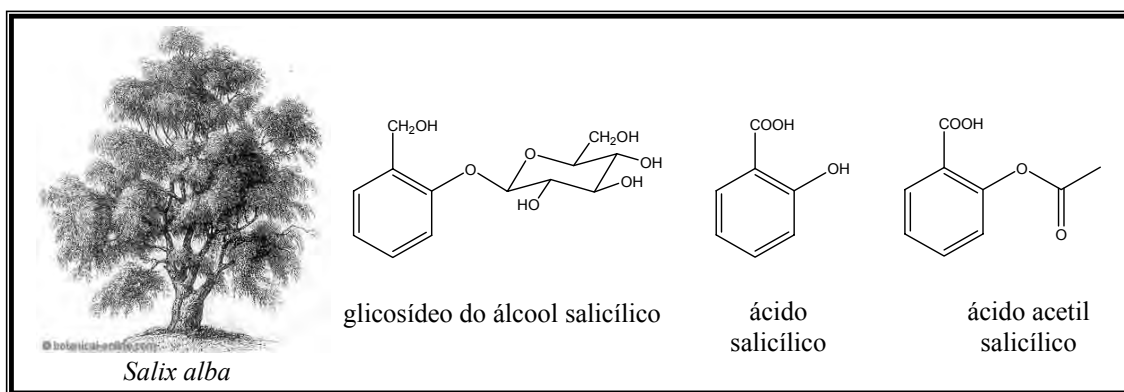
Na Idade Média, a medicina e o estudo das plantas medicinais estagnaram-se por um longo período. Os eventos históricos que surgiram na Europa, como a ascensão e



queda do Império Romano e o fortalecimento da Igreja Católica, exerceram enorme influência sobre todo conhecimento existente na época, incluindo as informações acerca de plantas medicinais. Muitos dos escritos dos filósofos gregos foram esquecidos ou mesmo perdidos, para serem parcialmente recuperados apenas no início do século XVI (MARTINS et al., 2003). Segundo Phillipson (2001), alguns mosteiros europeus mantiveram viva a literatura medicinal, mas fora desses locais propagava-se o folclore, normalmente com rituais mágicos.

No seu processo de evolução, a arte de curar recebeu poderoso impulso dos alquimistas. Dentre os quais destaca-se Paracelso, que lançou as bases da medicina natural e foi um dos principais responsáveis pelo avanço da terapêutica do século XVI (MARTINS et al., 2003). Mas foi a partir do final do século XVIII e início do século XIX, com a consolidação da Química como disciplina científica moderna, que os estudos com plantas medicinais ganharam impulso. Os princípios ativos passaram a ser isolados das plantas medicinais e suas estruturas determinadas. Estabelecia-se assim o paradigma ocidental, que apenas um simples e único composto ativo apresenta os efeitos farmacológicos definidos (YUNES; CALIXTO, 2001).

O ano de 1828 passou a ser um marco para a história da Química de Produtos Naturais. Buchner, estudando as cascas de *Salix alba* (Figura 1), isolou pela primeira vez o princípio ativo responsável pelas propriedades farmacológicas dessa planta, o glicosídeo do álcool salicílico (Figura 1). Inicia-se assim, a história do analgésico mais vendido no mundo. Em 1860, Kolbe e Lauteman sintetizam o ácido salicílico (Figura 1) e seu sal sódico a partir do fenol. Felix Hofman, em 1898, sintetizou um composto de caráter menos ácido, acetilando o grupo hidroxila na posição *orto*, descobrindo assim o tão usado ácido acetil salicílico (AAS) (Figura 1). Era a obtenção do primeiro fármaco sintético, oriundo da otimização de um produto natural, através de uma correlação de estrutura e propriedade química, com possibilidade de ser usado de forma maciça, devido à facilidade de sua síntese e de seu baixo custo (YUNES; CALIXTO, 2001).



**Figura 1.** Glicosídeo do ácido salicílico (salicilina), produto natural isolado de *Salix alba* e os derivados sintéticos: ácido salicílico e ácido acetil salicílico

Assim estavam lançadas as bases da química medicinal moderna. Nos anos seguintes surgiriam novos fármacos de origem sintética. A química de produtos naturais, passaria do âmbito único e exclusivo das plantas a englobar também os insetos, microrganismos (fungos, bactérias, etc), animais, minerais e organismos marinhos como fontes naturais de modelos moleculares a fármacos (SOEJARTO, 1996).

A partir da segunda metade do século XX, novas técnicas analíticas, incluindo equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas e Cromatografia, passaram a constituir ferramentas fundamentais para o isolamento e determinação estrutural dos compostos naturais, inclusive os bioativos, de maneira rápida, reprodutível e com isso diminuir o tempo experimental despendido no procedimento fitoquímico. Acompanhando esse processo, foram desenvolvidas as tecnologias de *screening* em larga escala (HTS = high trough-put *screening*) permitindo a análise de até cem mil compostos num único dia em relação a determinados alvos biológicos (YUNES; CALIXTO, 2001).

As técnicas avançadas de HTS dependem da análise de um grande número de compostos os quais podem ser obtidos ou por química combinatória ou pela quimiodiversidade produzida pela natureza. Deve ser mencionado que a primeira, tão propalada no final do século passado, ainda não conseguiu, pelo menos até o presente, seu objetivo de ser a principal fonte de diversidade de estruturas moleculares, uma vez que este é um requisito fundamental na pesquisa farmacêutica visando atingir diferentes alvos biológicos. Diante dos resultados pouco produtivos da química combinatória, os cientistas voltaram seus estudos para os produtos naturais, considerando que durante os milhões de anos de evolução biológica a seleção natural foi capaz de produzir

substâncias complexas, quase que impossíveis de serem obtidas por um processo de química combinatória (YUNES; CALIXTO, 2001).

Apesar da flora mundial constituir uma importante fonte de matéria-prima para a busca de substâncias com estruturas e ação farmacológica inéditas, esta riqueza vegetal responde apenas com a produção de cerca de 120 fármacos em uso clínico (SOEJARTO, 1996). Outro dado marcante sobre as plantas floríferas refere-se ao último levantamento publicado por Verpoorte et al. (1998), demonstrando que das 34.847 espécies quimicamente estudadas, 30% apresentaram alguma atividade biológica. Se considerarmos este dado estatístico e a quantidade de espécies ainda sem qualquer estudo, é possível especular o isolamento de no mínimo um milhão de metabólitos secundários a partir de fontes vegetais (VERPOORTE et al., 1998).

Pelos comentários apresentados, o valor agregado dos medicamentos de origem vegetal não pode ser desconsiderado. Acredita-se que a venda mundial destes medicamentos movimenta, anualmente, um comércio em torno de US\$ 22 bilhões (HARVEY et al., 1998). Segundo Matos (1997), na década de 1970, 41% das receitas médicas prescritas nos Estados Unidos continham uma ou mais substâncias de origem vegetal. No Brasil, em 1994, 5,5% do mercado de medicamentos vendidos em farmácias (US\$ 212 milhões) correspondiam às vendas de medicamentos contendo exclusivamente princípios ativos de origem vegetal (FERREIRA, 1998).

O Brasil, com aproximadamente 22% de todas as angiospermas, ainda possui uma das maiores biodiversidades do planeta, mesmo contabilizando o alto índice de devastação que vem ocorrendo na Amazônia, Mata Atlântica e Cerrado. Apesar dessa enorme variedade de plantas, muitas das quais com aplicação medicinal, apenas uma pequena parcela teve algum estudo químico ou biológico realizado. Assim, a exploração racional da biodiversidade brasileira, mesmo na era pós-genômica, é um tema recorrente e merece investimento objetivando a busca de novos fármacos (BOLZANI et al., 1999).

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. No contexto nacional, a pesquisa de bioprospecção, com certeza, possibilitará a identificação de uma maior variedade de metabólitos secundários bioativos, uma vez que muitas famílias de plantas estão associadas a classes específicas de substâncias, sendo que inúmeras espécies continuam sem qualquer estudo químico e/ou biológico (SOEJARTO, 1996).

Entre os estudos químicos e biológicos da flora paulista, principalmente da Mata Atlântica e do Cerrado, destacam-se aqueles sobre o “*Estudo Químico e Biológico de Rubiaceae Brasileiras*”, no final da década de 80. O projeto teve como objetivo não só conhecer a composição química das várias espécies de Rubiaceae destes biomas, mas também detectar substâncias antifúngicas potenciais. Ao longo de quinze anos, mais de trinta espécies de Rubiaceae tiveram suas composições químicas, atividades antifúngica e antitumoral avaliadas (BOLZANI et al., 1999).

Em 1999, o programa interdisciplinar Biota-FAPESP (Conservação e Utilização da Biodiversidade do Estado de São Paulo, <http://www.biota.org.br>) foi criado com o objetivo de mapear e catalogar de maneira racional toda a biodiversidade remanescente do Estado de São Paulo. Dentre os vários projetos inseridos neste programa encontra-se o “*Conservação e uso sustentável da diversidade vegetal do Cerrado e Mata Atlântica: Diversidade química e prospecção de fármacos potenciais*” que vem sendo desenvolvido pelo Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE).

### **1.1. Considerações gerais sobre o posicionamento taxonômico *Cassia/Senna* e seus usos na medicina popular**

Com o novo sistema de classificação taxonômica adotado para a família Leguminosae, várias espécies de *Cassia* foram incluídas no grupo *Senna*, outras continuaram como *Cassia* e algumas continuam como sinônima de *Senna*. Esta família, uma das maiores dentre as Angiospermae, pela nova classificação passou a ser denominada Fabaceae e está subdividida em três subfamílias: Mimosoideae, Faboideae e Caesalpinioideae. Nesta última, estão incluídos os gêneros *Cassia* e *Senna*, bastante estudados, devido à importância de seus usos na medicina popular (RIBEIRO et al., 1999).

Mulchandani e Hassarajani (1977), estimavam o conhecimento de cerca de 200 espécies pertencentes ao gênero *Cassia*. Segundo Agarkar e Jadge (1999), existem hoje mais de 600 espécies, entre arbustos, árvores e ervas. Com as recentes modificações na classificação das leguminosas, o gênero *Cassia*, diminuiu devido à mudança de posição taxonômica de várias espécies de *Cassia* para *Senna*. Com base nos estudos de morfologia floral principalmente, algumas espécies de *Cassia* continuam com a sua

posição inalterada, muito embora, várias ainda continuem como sendo sinonímia de *Senna*.

Esta confusão taxonômica entre os dois gêneros é um problema para os estudos químicos e farmacológicos que o NuBBE está realizando com a espécie *Senna spectabilis*, erroneamente identificada em nossos estudos anteriores como *Cassia leptophylla*.

Dentre as espécies dos gêneros *Cassia/Senna* mais estudadas, cerca de vinte e seis são relatadas como fontes de derivados antracênicos, substâncias descritas como responsáveis pelas atividades dos extratos de *C. fistula* (sinonímia *Senna fistula*), *C. sophera* (sinonímia *S. sophera*), *C. alata* (sinonímia *S. alata*), *C. obtusifolia* (sinonímia *S. obtusifolia*), *C. tora* (sinonímia *S. obtusifolia*), *C. angustifolia* (*S. angulata*), *C. autifolia*, *C. nodosa* (sinonímia *C. javanica*) e *C. cinnamon*, bastante estudadas devido aos relatos de seu uso popular no tratamento de diabetes, infecções microbianas e virais, febre, parasitoses, inflamações, asma e feridas da pele (AGARKAR; JADGE, 1999).

Recentemente, algumas espécies dos gêneros *Cassia* e *Senna* vêm despertando maior interesse para estudos químicos e farmacológicos, devido ao seu uso popular em países do continente asiático e africano, principalmente na Índia e na China. Nestes países, formulações medicamentosas com plantas destes gêneros são utilizadas no tratamento de uma série de enfermidades em substituição ao tratamento alopático convencional. Isto se deve, principalmente, ao fato de que em alguns destes países a renda *per capita* é muito baixa, levando a população ao uso de plantas para o tratamento de suas doenças (SAMY; IGNACIMUTHU; SEN, 1998; SAMY; IGNACIMUTHU, 2000).

Nos ecossistemas brasileiros, tanto o gênero *Cassia* como *Senna* são muito freqüentes, sendo que na região sudeste algumas espécies são bastante apreciadas devido à beleza de suas flores, sendo muito utilizadas como plantas ornamentais (LORENZI, 1998). Na região norte, são bastante empregadas em medicamentos caseiros, como é o caso da canafistula (*C. fistula*), utilizada como purgativo (MATOS, 2000). Bhakta et al. (1999) relataram ainda o uso desta espécie no tratamento de infecções bacterianas, doenças de pele, reumatismo e desordens hepáticas. Recentemente, Ingkaninan et al. (2003) relataram a atividade inibidora de acetilcolinesterase no extrato preparado com raízes desta planta.

## 1.2. Descrição botânica de *Senna spectabilis* e *Cassia leptophylla*

### *Senna spectabilis*

*Senna spectabilis* (Figuras 2 e 3) é uma planta arbórea, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), sub-família Caesalpinioideae, conhecida popularmente como são-joão, cássia-do-nordeste, canafistula-de-besouro e pau-de-ovelha, possuindo como sinônimas botânicas *Cassia spectabilis* (VIEGAS JUNIOR et al., 2004), ou *Cassia excelsa* Schrad. (LORENZI, 1998). É decídua<sup>1</sup>, heliófita<sup>2</sup>, seletiva xerófito<sup>3</sup>, pioneira e característica do nordeste semi-árido (caatinga), mas também é comum no cerrado do estado de São Paulo. Ocorre preferencialmente em solos mais profundos, bem drenados e de razoável fertilidade (LORENZI, 1998).

Pode atingir de 6–9 m de altura, com tronco de 30–40 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas pinadas<sup>4</sup>, tendo de 10–20 pares de folíolos de 2–4 cm de comprimento. Sua madeira, devido às limitações de tamanho, é aproveitada apenas para a confecção de objetos leves, caixotaria, lenha e carvão. A árvore é ornamental durante o longo período em que permanece florida, podendo ser empregada com sucesso no paisagismo em geral. Pelo porte pequeno e beleza de sua florada, é ideal para arborização de ruas, o que já vem sendo feito em muitas cidades do Estado de São Paulo. O período de floração ocorre durante os meses de dezembro–abril, já a maturação dos frutos ocorre nos meses de agosto–setembro (LORENZI, 1998).

---

<sup>1</sup> decídua: vegetal que perde suas folhas numa estação específica do ano.

<sup>2</sup> heliófita: vegetal que necessita da luminosidade solar para o desenvolvimento.

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

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





**Figura 2.** *Senna spectabilis*: detalhes da planta, flores, frutos, sementes, casca e madeira (LORENZI, 1998).

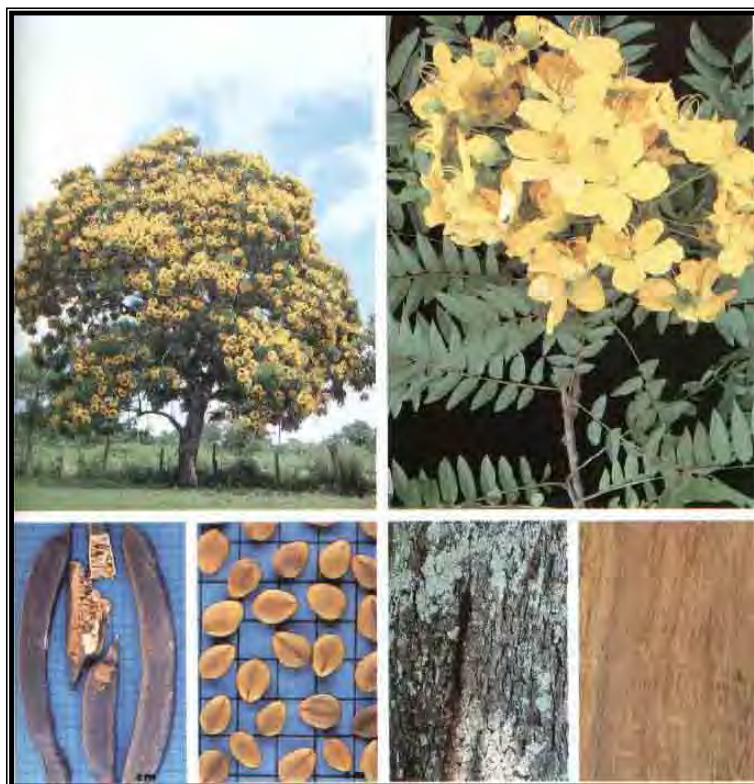


**Figura 3.** *Senna spectabilis*: espécime cultivado no IQ–UNESP Araraquara, de onde foram coletados as flores e frutos.

## *Cassia leptophylla*

*Cassia leptophylla* Vog. é uma planta arbórea, pertencente à família Fabaceae (Leguminosae), sub-família Caesalpinioideae, conhecida popularmente como falso-barbatimão (Figura 4). É perenifólia, heliófita e característica de formações secundárias das florestas situadas em regiões altas, como as florestas de pinhais dos estados do Paraná e de Santa Catarina, sendo encontrada raramente no interior da mata primária densa. Apresenta dispersões irregulares e descontínuas, sendo bastante adaptada à insolação direta (LORENZI, 1998).

Pode atingir de 8–10 m de altura, com tronco de 30–40 cm de diâmetro. Suas folhas são compostas pinadas, tendo de 8–12 pares de folíolos de 3–5 cm de comprimento. Sua madeira é moderadamente pesada, compacta, dura e moderadamente durável, pode ser empregada para obras leves como caixotaria, confecção de brinquedos, laminados, etc. Suas flores cobrem toda a copa, apresentando coloração amarela intensa, excelente para o paisagismo em geral. O período de floração ocorre durante os meses de novembro–janeiro, já a maturação dos frutos ocorre nos meses de junho–julho (LORENZI, 1998).



**Figura 4.** *Cassia leptophylla*: detalhes da planta, flores, frutos, sementes, casca e madeira (LORENZI, 1998).



### 1.3. Alcalóides piperidínicos

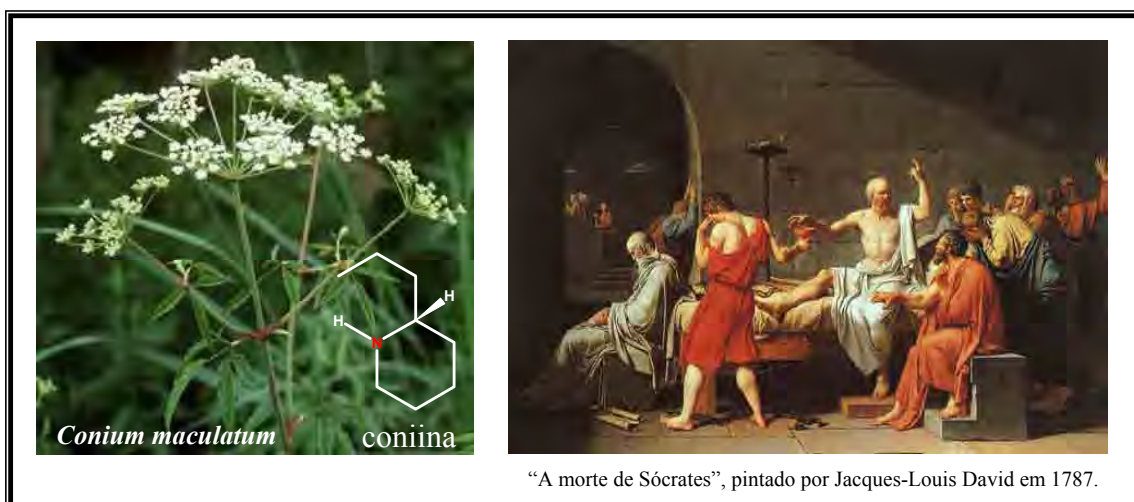
O estudo dos alcalóides teve início em 1806, quando o farmacêutico alemão Friedrich Serturner isolou pela primeira vez do ópio de *Papaver somniferum* a morfina (alusão à Morpheus, deus dos sonhos na mitologia grega), cuja fórmula estrutural só foi proposta em 1925, por Robinson (Figura 5) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; YUNES; CALIXTO, 2001).



**Figura 5.** Morfina, alcalóide isolado do látex da papoula de *Papaver somniferum*

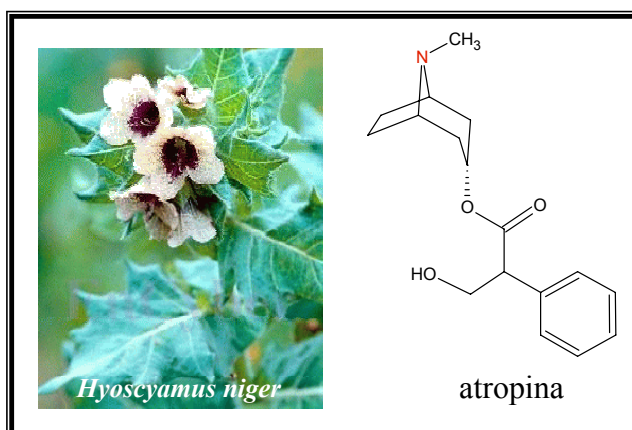
O termo alcalóide foi cunhado em 1819 pelo farmacêutico alemão Carl Meissner, lingüisticamente derivado da palavra árabe *al-qali*, denominação vulgar da planta da qual a soda foi originalmente obtida, representa os compostos nitrogenados farmacologicamente ativos encontrados predominantemente nas angiospermas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

O uso de extratos vegetais contendo alcalóides como medicamentos, venenos e em poções mágicas, pode ser observado desde os primórdios da civilização. Um exemplo clássico é a bebida preparada à base de cicuta, contendo o alcalóide coníina, utilizada em execuções na Grécia antiga, como no caso do filósofo Sócrates no ano de 399 a.C. (Figura 6) (BOER, 1950).



**Figura 6.** Coniina, alcalóide isolado de *Conium maculatum*, causador da morte do filósofo grego Sócrates no ano de 399 a.C. (BOER, 1950)

Durante o Império Romano, Lívia, esposa do Imperador Augusto, eliminava seus inimigos e adversários políticos assassinando-os em banquetes com o uso secreto de beladona, fonte do alcalóide atropina o qual era adicionado aos alimentos (SIMÕES et al., 2003). A rainha Cleópatra utilizava extratos de *Hyoscyamus niger*, fonte de atropina, para dilatar suas pupilas e parecer mais sedutora a seus rivais políticos (Figura 7) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).



**Figura 7.** Atropina, isolada de *Hyoscyamus niger* (SIMÕES et al., 2003)

No Brasil, os índios da bacia Amazônica utilizavam o extrato seco da planta conhecida como curare (*Strychnos castelnaeana*), contendo o alcalóide tubocurarina, para preparar dardos e flechas envenenados a serem empregados na caça e nas guerras (Figura 8) (PINTO, 1995).



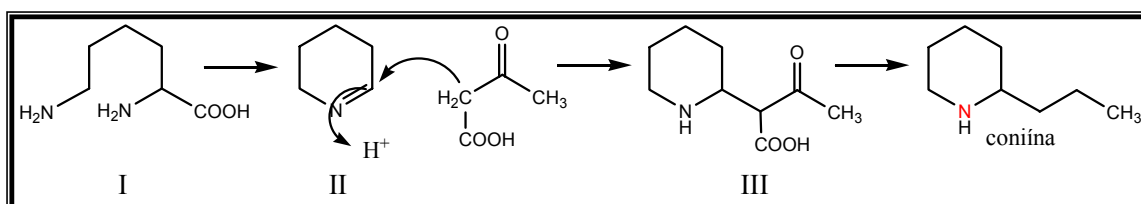
**Figura 8.** Tubocurarina, isolada de *Strychnos castelnaeana*, utilizada pelos índios nas flechas para a caça (PINTO, 1995)

Desde a descoberta da morfina, mais de 12 000 alcalóides já foram isolados. Este vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, representa cerca de 20% das substâncias naturais descritas (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Pelletier tentando estabelecer uma definição para essa classe de substâncias formulou que: *Um alcalóide seria uma substância orgânica, de origem natural, cíclica, contendo nitrogênio num estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos.* Essa definição, porém, excluiria compostos nitrogenados tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso. Outras definições foram cunhadas por diferentes pesquisadores, contudo até o momento nenhuma se apresentou completamente abrangente (SIMÕES et al., 2003).

Alcalóides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcalóides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. As substâncias com o átomo de nitrogênio não-pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas de protoalcalóides. Compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcalóides (SIMÕES et al., 2003).

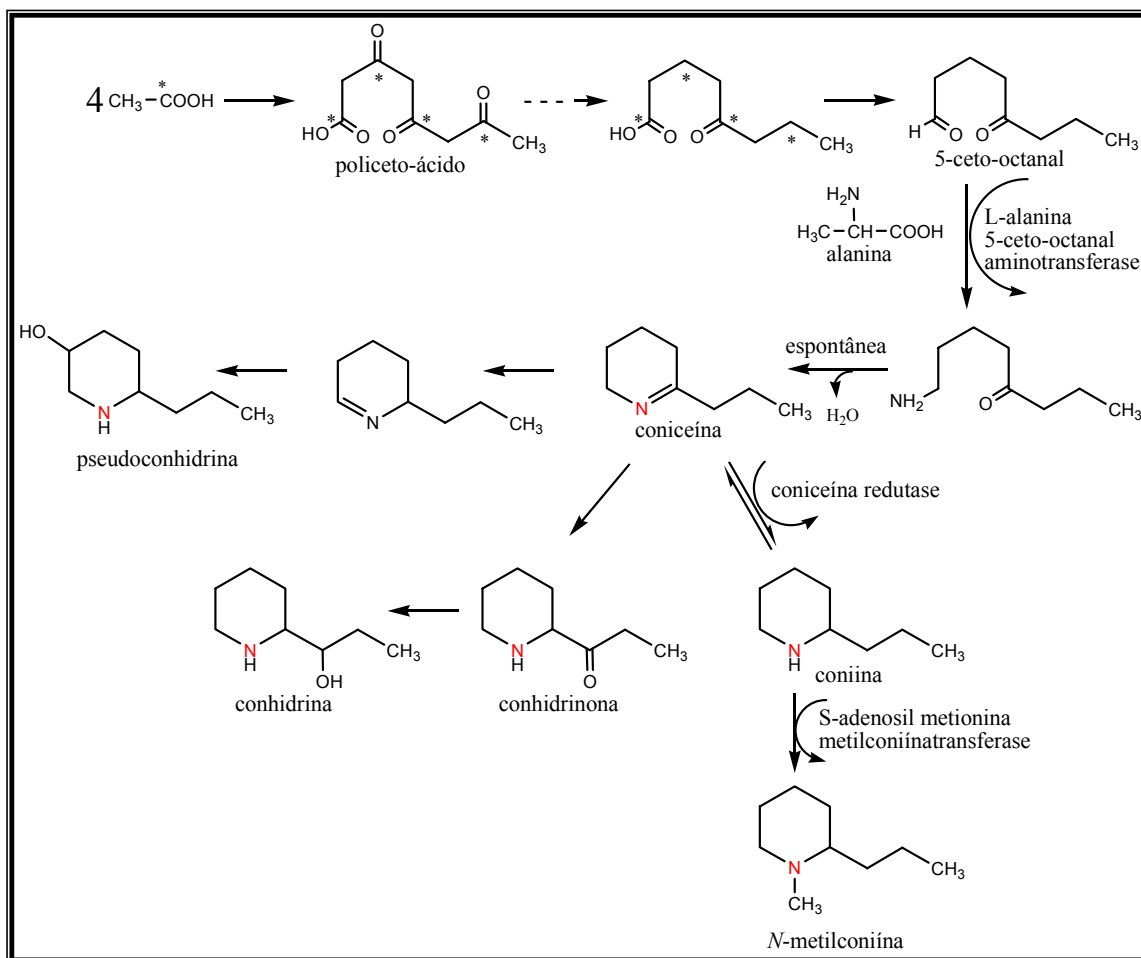
### 1.3.1. Proposta biossintética para os alcalóides piperidínicos

Os alcalóides piperidínicos apresentam uma grande diversidade química, sendo metabolizados por animais, microrganismos e plantas (O'DONOVAN; KEOGH, 1968). Devido a essa diversidade torna-se difícil estabelecer uma rota biossintética comum a todos esses sistemas. Devido ao conhecimento milenar das propriedades da cicuta (*Conium maculatum* L., Figura 6), seus alcalóides têm sido alvo de vários estudos ao longo dos anos, com o objetivo de estabelecer a rota biossintética responsável por essa classe de metabólitos nas plantas superiores. Segundo Robinson (1917), a lisina (I) seria o precursor do anel piperidínico naconiína (Figura 9). Uma etapa de desaminação, seguida de descarboxilação do amino ácido I levariam a um intermediário  $\Delta^1$ -piperidínico (II). Condensação de II com ácido acetoacético levaria ao intermediário III, que após reação de descarboxilação seguida de redução levaria a coniína. No entanto, estudos utilizando compostos marcados mostraram insignificante atividade atribuída aos alcalóides (LEETE, 1964). Schiedt e Hoss conseguiram comprovar a incorporação de *L*-lisina- $^{14}\text{C}$  na coniína, entretanto estudos de degradação não foram realizados para determinar se o radioisótopo estava presente no anel piperidínico (LEETE, 1964). Isso levou a suposição que a radioatividade observada na coniína poderia ser atribuída à metabolização da *L*-lisina- $^{14}\text{C}$  para unidades radioativas de acetato e em seguida incorporação pela coniína (LÓPEZ; CID; BIANCHINI, 1999).



**Figura 9.** Proposta de biogênese para os alcalóides da coniína a partir da lisina

Também foram realizados experimentos com acetatos marcados (radioisótopos), mostrando que estes eram incorporados à cadeia piperidínica, indicando assim, como precursor biossintético, uma cadeia policetílica de oito átomos de carbono linearmente ligados por quatro unidades de acetato. O nitrogênio seria então incorporado pela molécula por meio de reações enzimáticas, como mostra a Figura 4. Estudos de degradação foram realizados para confirmação desta hipótese (LEETE, 1964).



**Figura 10.** Hipótese biossintética para os alcalóides da cicuta com base nos estudos de marcação isotópica e de degradação (LEETE, 1964)

Desta forma poucos estudos sobre a biossíntese dos alcalóides 3-piperidinóis-2,6-dissubstituídos, são descritos na literatura. No entanto, acredita-se que esses sejam sintetizados pela mesma rota biossintética estabelecida para os alcalóides da cicuta (Figura 4) (BEVAN; OGAN, 1964; MULCHANDANI; HASSARAJANI, 1977; BRUNETON, 1999).

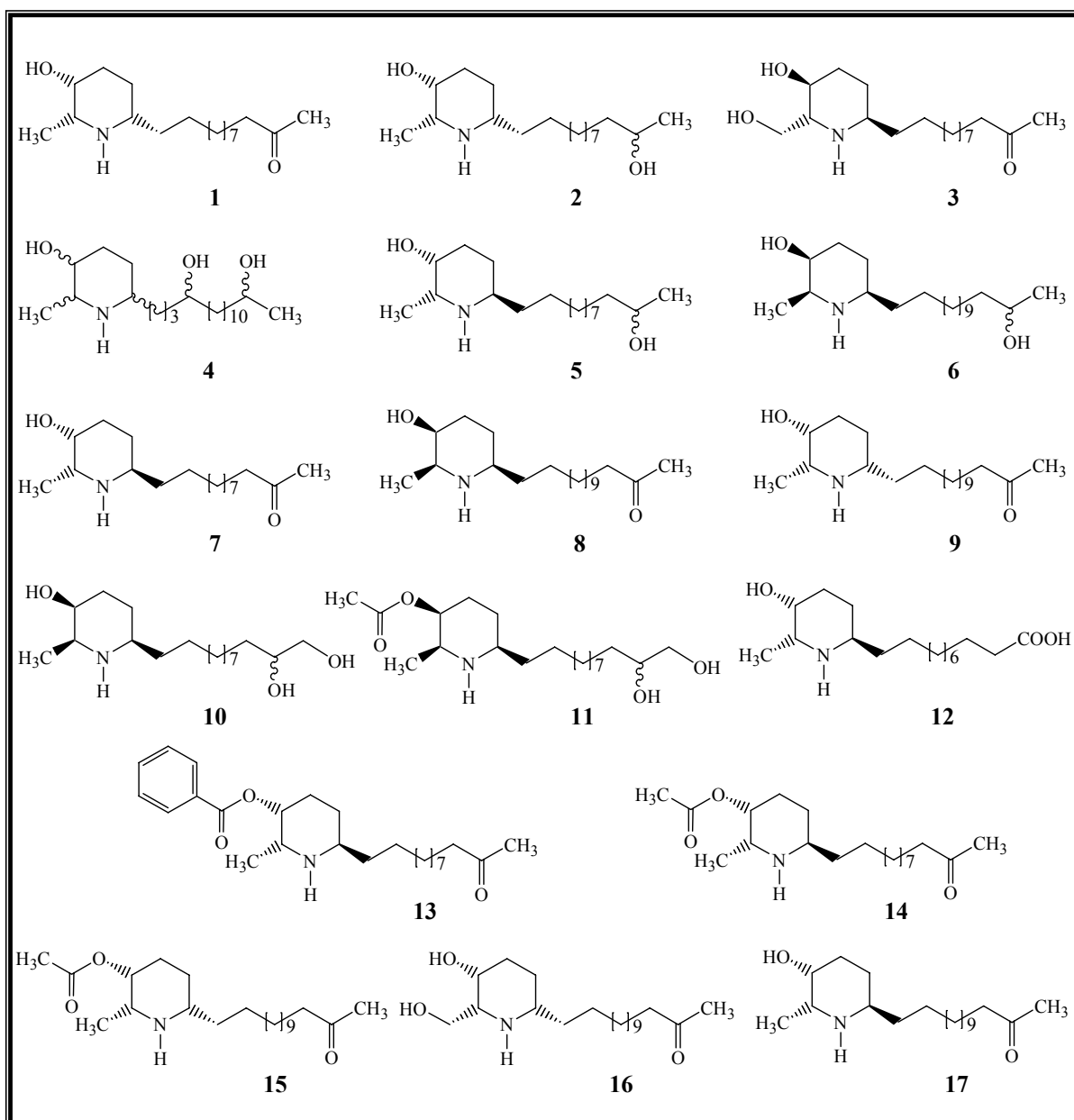
#### 1.4. Espécies de *Senna* e/ou *Cassia* como fontes de alcalóides piperidínicos.

Em 1964, foi isolada, pela primeira vez, a (-)-cassina (1) (Figura 11), presente nas folhas de *C. excelsa* (HIGHET, 1964). Sua estrutura molecular e estereoquímica foram discutidas e propostas por Highet e Highet (1966), mas a configuração absoluta só foi estabelecida por Rice e Coke (1966). Em 1967, Lythgoe e Vernengo estudando um espécime de *C. carnaval* Speg. isolaram das folhas desta planta quatro alcalóides,

sendo a cassina o alcalóide majoritário e outros três inéditos: carnavalina (2), (+)-prosopinona (3) e o alcalóide D (4), cuja estereoquímica não foi definida (LYTHGOE et al., 1972). Posteriormente, Christofidis et al. (1977), estudando os extratos de *C. spectabilis* reisolou a cassina. Também foram isoladas a (-)-6-iso-carnavalina (5), a (-)-espectalinina (6), 6-iso-cassina (7) e a (+)-espectalina (8) (Figura 11). Em 1971, a cassina e a carnavalina foram identificadas nas flores de *C. jahnii*, utilizada na medicina popular dos Andes Venezuelanos como purgativo (MENDEZ, 1971). Além destes, neste mesmo espécime também foram encontrados compostos antraquinônicos, bastante conhecidos pelo poder laxativo.

Um estudo de triagem biológica feito com espécies de leguminosas no estado de São Paulo levou à seleção de *Senna spectabilis*, uma espécie já relatada como fonte de alcalóides piperidínicos (CHRISTOFIDIS et al., 1977; LYTHGOE et al., 1972). Estes resultados, aliados ao fato de que alcalóides deste tipo são de particular interesse científico devido às suas propriedades farmacológicas, estimularam Bolzani et al. (1995) a investirem no estudo químico das folhas desta espécie. Foram isolados sete alcalóides piperidínicos: (-)-espectalina (9), leptofilina A (10), 3-*O*-acetil-leptofilina A (11), leptofilina B (12), (-)-espectalinina (6), carnavalina (2) e 6-iso-carnavalina (5) (Figura 11), sendo que as substâncias 9, 10 e 11 apresentaram atividade citotóxica seletiva em cepas de *S. cerevisiae* com deficiência no reparo do DNA, sendo indicativo de atividade antitumoral potencial (BOLZANI et al., 1995).

Em estudos recentes, Kamo et al. (2003), isolaram de um espécime de *C. spectabilis* coletada na África, dois alcalóides piperidínicos inéditos: espectaminas A (13) e B (14) (Figura 11), identificados como inibidores específicos de ânion superóxido em macrófagos. Viegas Junior et al. (2004), estudando as flores de *C. spectabilis*, isolaram três novos alcalóides chamados de: (-)-3-*O*-acetil-espectalina (15), (-)-7-hidroxi-espectalina (16) e 6-iso-espectalina (17), além da (-)-espectalina (9), já conhecida (Figura 11). A continuidade deste estudo pelo grupo demonstrou que *S. spectabilis* biossintetiza uma grande variedade destes alcalóides, e que alguns, também apresentaram atividade analgésica, antiinflamatória e no SNC como é o caso dos alcalóides inibidores de acetilcolinesterase (AChE) (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 2003; VIEGAS JUNIOR et al., 2005)



**Figura 11.** Alcalóides piperidínicos isolados de espécies de *Senna/Cassia*

### 1.5. Considerações gerais sobre a espectrometria de massas ionização por *electrospray*

Um espectrômetro de massas pode ser entendido, como um instrumento contendo uma fonte de íons, um separador ou filtro de massas (massa/carga –  $m/z$ ) e um detector. Embora, existam várias estratégias para a separação e detecção, a etapa de ionização é aquela com maior número de diferentes estratégias. Amostras sólidas, líquidas ou gasosas contendo espécies voláteis ou não e com interesses voltados desde a análise elementar até a composição de proteínas, requerem diferentes processos de ionização. Nesse contexto, surgiu a ionização por *electrospray* como uma alternativa para a geração de íons a partir de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida (MORAES; LAGO, 2003).

O *electrospray* foi sugerido como um possível modo de ionização para espectrometria de massas por Dole em 1968. No entanto, seus experimentos não foram convincentes, pois estes visavam a análise de espécies poliméricas, como poliestireno, que não estão ionizados em solução. Foi somente em 1984 que Yamashida e Fenn demonstraram a aplicabilidade da fonte de *electrospray* como um método de ionização branda (MORAES; LAGO, 2003).

Segundo Pinto et al. (2002), foi a partir da década de 90 que a técnica de *electrospray* se desenvolveu e seu emprego se estendeu às análises de moléculas termolábeis, complexos organo-metálicos e moléculas de elevada massa molecular incluindo polímeros e proteínas.

A versatilidade da técnica de *electrospray*, permitindo o acoplamento com técnicas cromatográficas como a CLAE ou ainda a análise seqüencial (*tandem*), têm se desenvolvido e possibilitando estudos qualitativos e quantitativos ou mesmo de determinações moleculares (PINTO et al., 2002).



## 2. OBJETIVOS

- 1) Estudo dos frutos de *Senna spectabilis* visando o isolamento de novos alcalóides piperidínicos bioativos.
- 2) Verificação da atividade inibidora de acetilcolinesterase e seqüestradora de radicais livres, pelos alcalóides isolados de *S. spectabilis*.
- 3) Estudo comparativo de *S. spectabilis* e *Cassia leptophylla* para obtenção do perfil micromolecular destas duas espécies.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Instrumentação

As análises espectrométricas foram realizadas utilizando-se os seguintes equipamentos:

- ✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelos AC-200F (4,7 Tesla), operando em frequência de 200 MHz para os núcleos de hidrogênio e 50 MHz para o carbono.
- ✓ 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. As colunas utilizadas foram: Phenomenex LC18 5  $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm e Phenomenex Phenyl-Hexyl 5 $\mu\text{m}$ , 250 x 4,6 mm.
- ✓ Espectrômetro de massas de baixa resolução do tipo triplo quadrupolo (Quattro-LC, Micromass, Manchester, UK). As amostras foram introduzidas utilizando uma seringa de fluxo (10  $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Após análise das condições experimentais, o capilar foi aquecido e polarizado a 250°C e 3kV. Aplicou-se um cone de energia constante de 20V para a extração dos íons e os dados de massas finais foram adquiridos no modo positivo.
- ✓ Espectrofotômetro na região do infravermelho da marca Nicolet, modelo IMPACT 400. As pastilhas foram preparadas utilizando KBr como suporte.
- ✓ Ponto de fusão foi 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

### 3.2.1. Solventes

- ✓ Acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ): Mallinkrodt Chromar<sup>®</sup> HPLC
- ✓ Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ): J. T. Baker; Baker Analyzed<sup>®</sup> HPLC
- ✓ Ácido acético glacial ( $\text{H}_3\text{CCO}_2\text{H}$ ): Quemis P.A. ACS
- ✓ Ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ): Quemis P.A. ACS
- ✓ Éter etílico ( $(\text{CH}_3\text{CH}_2)_2\text{O}$ ): Synth P.A. ACS
- ✓ Cloreto de metileno ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ): Synth P.A. ACS
- ✓ Clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ): Synth P.A. ACS
- ✓ Hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ): Synth P.A. ACS
- ✓ Trietilamina ( $(\text{H}_3\text{CCH}_2)_3\text{N}$ ) 99% ACROS Organics
- ✓ Solventes grau técnico, purificados em destilador semi-industrial com coluna de fracionamento (4 m de altura): hexano, acetato de etila, etanol, metanol, acetona.
- ✓ Água deionizada em aparelho da marca Milli-Q plus
- ✓ Solventes deuterados:
  - Clorofórmio-*d* 99,8% ACROS Organics
  - Metanol-*d*<sub>4</sub> 99,8% Cambridge Isotope Laboratories, Inc

### 3.2.2. Cromatografia

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

- ✓ Alumina neutra ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) Sigma
- ✓ Sílica gel ( $\text{SiO}_2$ ) para cromatografia flash (0,035 – 0,070 mm, diâmetro de poro ca 6 nm) ACROS Organics

Para a cromatografia em camada delgada foram utilizadas as seguintes fases estacionárias:

- ✓ Placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV<sub>254</sub>) 0,20 mm de espessura
- ✓ Placas comerciais de alumina (UV<sub>254</sub>) 0,20 mm de espessura Macherey-Nagel
- ✓ 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 secas 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 Utilizados**

As visualizações em placas cromatográficas utilizaram os seguintes reveladores (TOUCHSTONE, 1978):

#### **3.3.1. Revelador de Iodocloroplatinato**

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatínico (IV) (H<sub>2</sub>(PtCl<sub>6</sub>).6H<sub>2</sub>O).

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

Solução spray: Misturar uma parte da Sol. A com nove partes da Sol. B e diluir com volume igual de água.

Resultados: Detecta alcalóides

#### **3.3.2. Revelador Dragendorff**

Solução A: 0,85 g de subnitrito de bismuto (BiONO<sub>3</sub>) 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 uma parte da solução estoque, duas partes de ácido acético e dez partes de água.

Resultados: Detecta alcalóides

### **3.3.3. Revelador de Anisaldeído**

Anisaldeído/HOAc/MeOH/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1:20:170:10).

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

Resultado: Revelador universal.

### **3.3.4. Iodo Sublimado**

Utilizou-se câmara de vidro saturada por vapor de Iodo sólido (I<sub>2</sub>).

Resultado: Revelador universal.

## **3.4. Preparo do Material Vegetal**

O material vegetal de *Cassia leptophylla* foi coletado no Instituto de Botânica de São Paulo, no qual está depositada a exsicata sob o n° SP 370 916. A coleta do material vegetal de *Senna spectabilis* foi feita no Instituto de Química de Araraquara e sua exsicata está depositada no Instituto de Botânica de São Paulo sob o n° SP 370 917.

Os materiais foram separados em folhas e flores de *C. leptophylla* e flores e frutos de *S. spectabilis* (Tabela 1). Como sugerido por Simões et al. (2003), as folhas e flores de *C. leptophylla* e flores de *S. spectabilis* foram secas em estufa provida de sistema de circulação forçada de ar por um período de cinco a seis dias à temperatura de 40 °C. Em seguida foram triturados em moinho de facas e submetidos a extração com etanol. Os frutos de *S. spectabilis* foram triturados verdes e em seguida preparado o extrato etanólico.

O processo de extração e concentração foi repetido cinco vezes, com intervalo de aproximadamente cinco dias entre uma extração e outra, obtendo-se assim os quatro extratos mostrados na Tabela 1.

### 3.5. Partição líquido/líquido

Para o estudo dos frutos de *S. spectabilis* foi inicialmente adotado um procedimento de partição líquido/líquido do extrato etanólico (EESS-Fr). Foram dissolvidos cem gramas deste extrato em metanol/água (4:1) e submetidos a partição líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, sucessivamente (Figura 12).

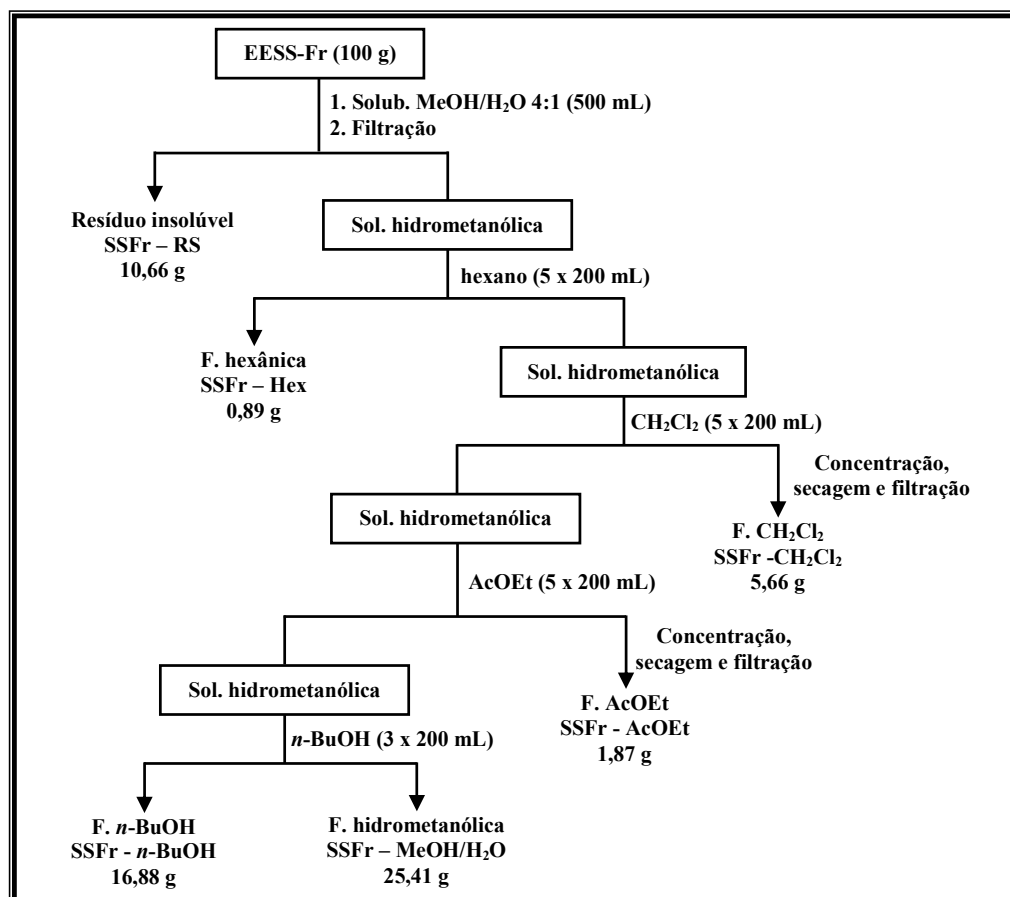
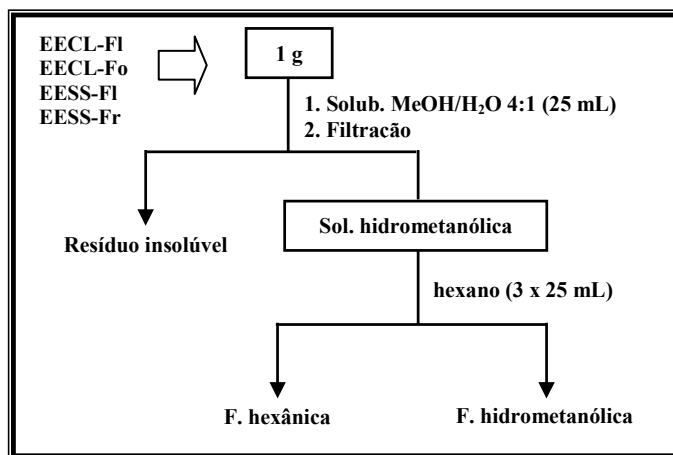


Figura 12. Partição do extrato dos frutos do espécime *S. spectabilis*

### 3.6. Preparo das amostras para CLAE

O pré-tratamento das amostras foi feito segundo o esquema da Figura 13, onde foi tomado um grama de cada um dos extratos descritos na Tabela 1. Depois de tratados, foi retirada uma alíquota de cada uma das frações, agora isentas de substâncias lipofílicas. Foram preparadas soluções de concentração 1 mg/mL, as quais foram mantidas em repouso por um período de 12 h em eppendorf. Em seguida, foi feita nova filtração utilizando um sistema constituído de uma seringa adaptada com uma

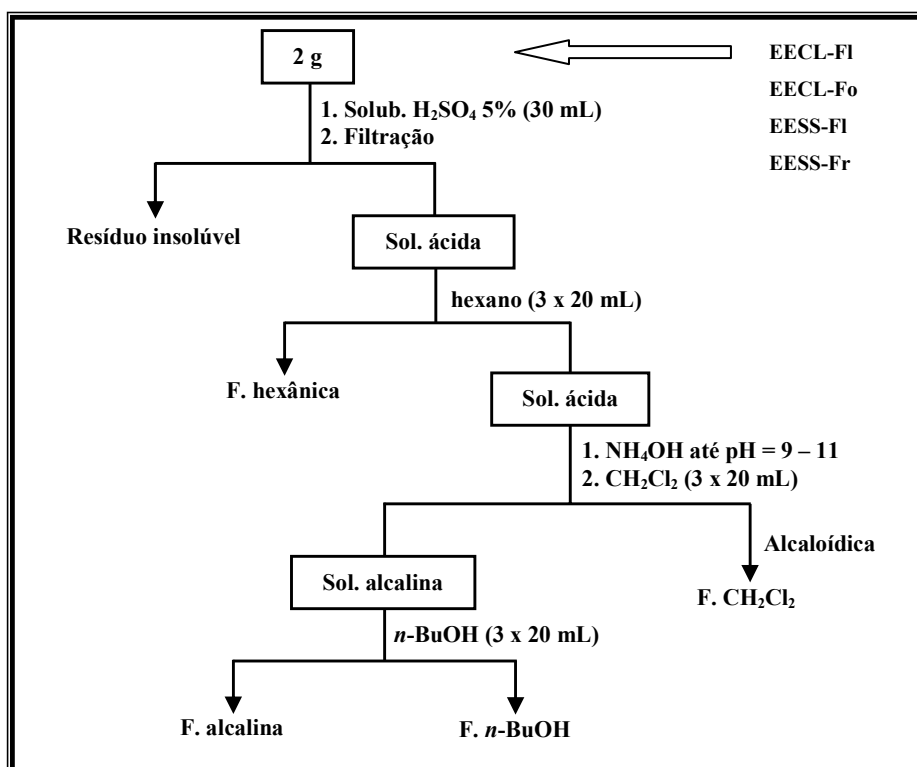
membrana de politetrafluoroetileno (PTFE), diâmetro de poro de 0,45 µm da marca Gelman, coletando o filtrado em frasco de 1,5 mL.



**Figura 13.** Pré-tratamento das amostras, extração de substâncias lipofílicas

### 3.7. Extração ácido/base

A extração ácido/base foi feita segundo o esquema da Figura 14, partindo-se de 2 g de cada um dos extratos descritos na Tabela 1, até a obtenção da fração alcaloídica CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (alcalóides totais) (SRIPHONG et al., 2003).



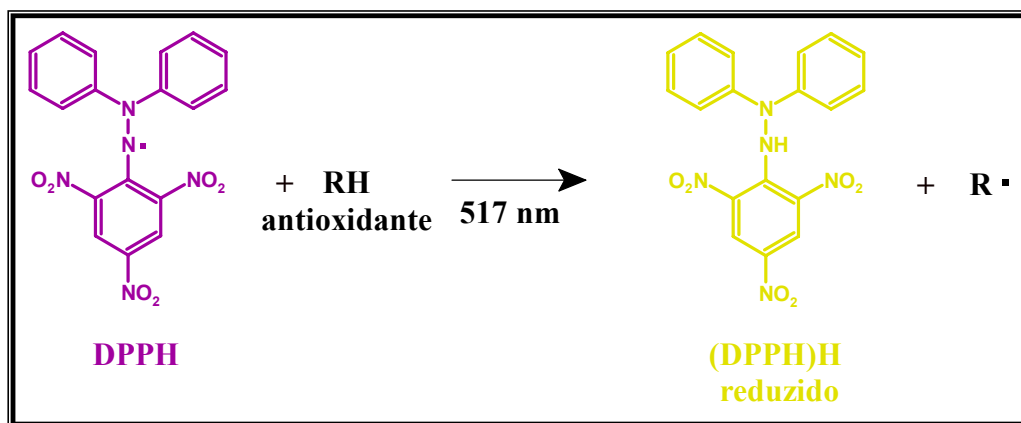
**Figura 14.** Esquema modificado de extração ácido/base para o isolamento dos alcalóides piperidínicos (SRIPHONG et al., 2003),

### 3.8. Avaliação das atividades antioxidante e anticolinesterásica

#### 3.8.1. Ensaio espectrofotométrico com 2,2-difenil-picrilhidrazina (DPPH)

Em solução, o radical DPPH apresenta cor violeta intensa que é consequência do elétron desemparelhado (radical livre estável). Esse radical tem um máximo de absorção em 517 nm, um decréscimo na absorbância devido à ligação com um hidrogênio radicalar, cedido pela espécie antioxidante, e consequente estabilização do radical é indicado pela mudança de cor violeta para amarelo (Figura 15) (SON; LEWIS, 2002).





**Figura 15.** Reação de redução do radical DPPH

Foram preparadas soluções metanólicas de diferentes concentrações (15, 30, 60, 120 e 180  $\mu\text{M}$ ) de cada uma das substâncias a serem analisadas (1 mL). Como fonte de radicais livres foi utilizada uma solução metanólica de DPPH (100  $\mu\text{M}$ , 2 mL). Foram misturadas em tubo de ensaio, sendo que mistura reacional apresentou as seguintes concentrações 5, 10, 20, 40 e 60  $\mu\text{M}$  num volume final de 3 mL. Os ensaios foram realizados em triplicata e as leituras da absorbância realizadas depois de 30 minutos. Como padrão positivo foi utilizado o flavonóide rutina, nas mesmas condições descritas. Os resultados foram plotados numa curva analítica de absorção pela concentração. Todos os alcalóides isolados foram submetidos ao ensaio.

### 3.8.2. Avaliação da atividade anticolinesterásica

O ensaio quali e quantitativo por bioautografia (Cromatografia em Camada Delgada – CCD) consiste no desenvolvimento de uma cromatoplaça da substância em análise, juntamente com um controle positivo inibidor da enzima acetilcolinesterase (AChE) (galantamina, Figura 16). Para os ensaios quantitativos (Concentração Inibitória Mínima – CIM) foram aplicadas quantidades conhecidas e em ordem decrescente de massa, do controle e da amostra, objetivando encontrar a menor quantidade inibidora de AChE, que possa ser observada visualmente. Após o desenvolvimento da cromatografia, a placa foi borrifada com a solução da enzima AChE (6,66 U) (Solução A) e o solvente evaporado com secador de cabelo. A placa cromatográfica 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 (indicação de inibição da reação enzimática), sobre um fundo de coloração roxa indica que houve inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase. A Figura 17 mostra um esquema das reações que se sucedem até o aparecimento da coloração na cromatoplaça (MARSTON; KISSLING; HOSTETTMANN, 2002).

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

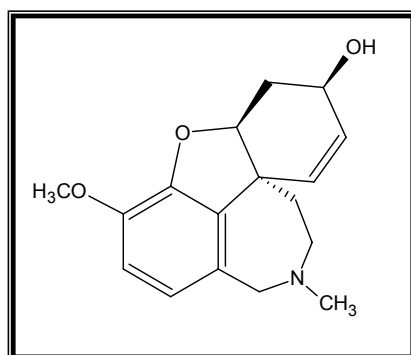
**Soluções:**

**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;

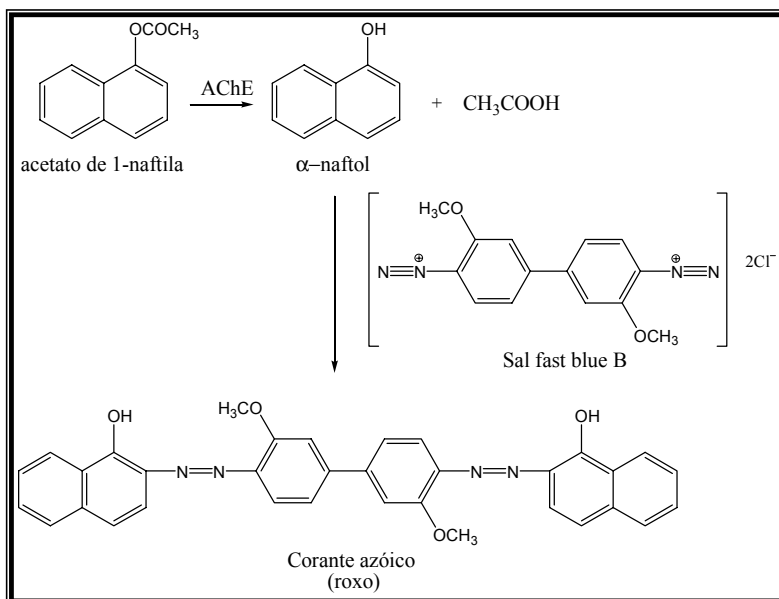
**Solução B:** 250 mg de acetato de 1-naftila em 100 mL de etanol;

**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**.



**Figura 16.** Galantamina, controle positivo nos ensaios de inibição de AChE



**Figura 17.** Reação da AChE com acetato de 1-naftila e subsequente formação do corante azóico roxo no bioensaio em CCD

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das matrizes de *S. spectabilis* e *C. leptophylla* foram preparados os extratos descritos na Tabela 1. As folhas e flores de *C. leptophylla* e as flores de *S. spectabilis* foram secas em estufa por um período de cinco a seis dias em temperatura de 40 °C. Em seguida foram triturados em moinho de facas e submetidos à extração com etanol. Os frutos de *S. spectabilis* foram coletados verdes devido ao processo de maturação levar ao apodrecimento da grande maioria. Logo após a coleta, foram triturados em liquidificador e submetidos à extração com etanol. O processo de extração e concentração foi repetido cinco vezes, com intervalo de aproximadamente cinco dias entre uma extração e outra, obtendo-se assim os quatro extratos mostrados na Tabela 1. Foi possível observar o baixo rendimento no preparo dos mesmos, o que pode levar a necessidade de grandes quantidades do material vegetal, caso existam micromoléculas ativas minoritárias.

**Tabela 1.** Material vegetal dos espécimes coletados.

Espécime	massa do mat. veg. seco (g)	Sigla do extrato	massa de extrato (g)	Rendimento (%)
<i>Cassia leptophylla</i> – flores	285,30	EECL-FI	63,53	22,27
<i>Cassia leptophylla</i> – folhas	1 294,05	EECL-Fo	69,92	5,40
<i>Senna spectabilis</i> – flores	950,38	EESS-FI	184,03	19,36
<i>Senna spectabilis</i> – frutos	7 983,09*	EESS-Fr	675,71	8,46

\* massa do material vegetal verde

### 4.1. Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis*

Inicialmente o extrato etanólico dos frutos de *S. spectabilis* (EESS-Fr) foi submetido à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) para confirmação da presença de alcalóides, classe essa já isolada anteriormente das flores desse mesmo espécime. Foram utilizadas cromatoplasas de sílica ou alumina, eluente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_3$  (9:1:0,25) e revelador de Dragendorff ou Iodocloroplatinato (IClPt), indicadores da presença de alcalóides. Confirmada a presença dos mesmos, 100 g de EESS-Fr foram submetidos a partição líquido/líquido, conforme descrito no item 3.4 (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

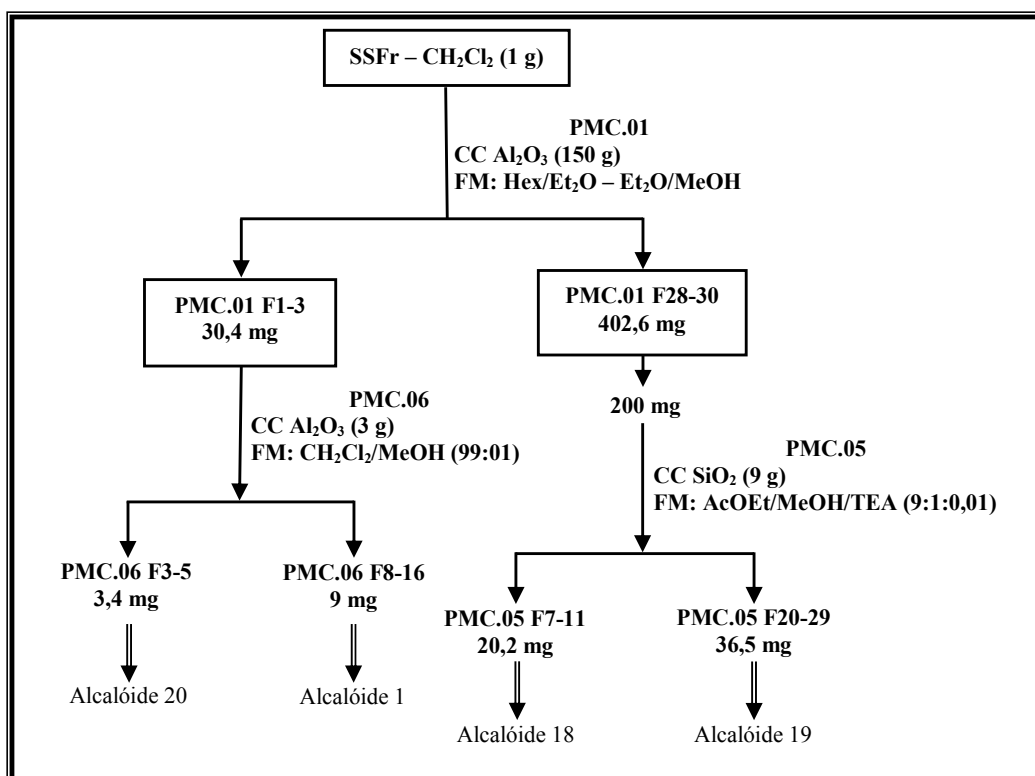
Uma observação a ser feita é que a somatória das massas obtidas no processo de partição é bem menor que a massa de partida, o que pode ser explicado pela presença de solvente no extrato inicial, uma vez que o mesmo não foi concentrado até a secura, enquanto que para as frações obtidas da partição houve a eliminação quase que total do solvente.

A análise por CCDC das frações da partição indicou que a maior concentração de alcalóides estava na fração  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , chamada de SSFr –  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5,66 g). Dessa fração (1 g), foi submetido a cromatografia em coluna (CC), utilizando como fase estacionária (FE) alumina neutra (150 g). A eluição foi feita em gradiente de Hex/ $\text{Et}_2\text{O}$  1:1 até 100% de  $\text{Et}_2\text{O}$ , seguida de  $\text{Et}_2\text{O}$  /MeOH 100:0 até 100% de MeOH, obtendo-se assim um total de 30 sub-frações. A análise por CCDC permitiu reagrupar as sub-frações em 7 grupos, sendo PMC.01 F1-3 e PMC.01 F.20-28 as que apresentaram misturas de alcalóides em quantidade suficiente para serem novamente submetidos a processos de fracionamento (Figura 18).

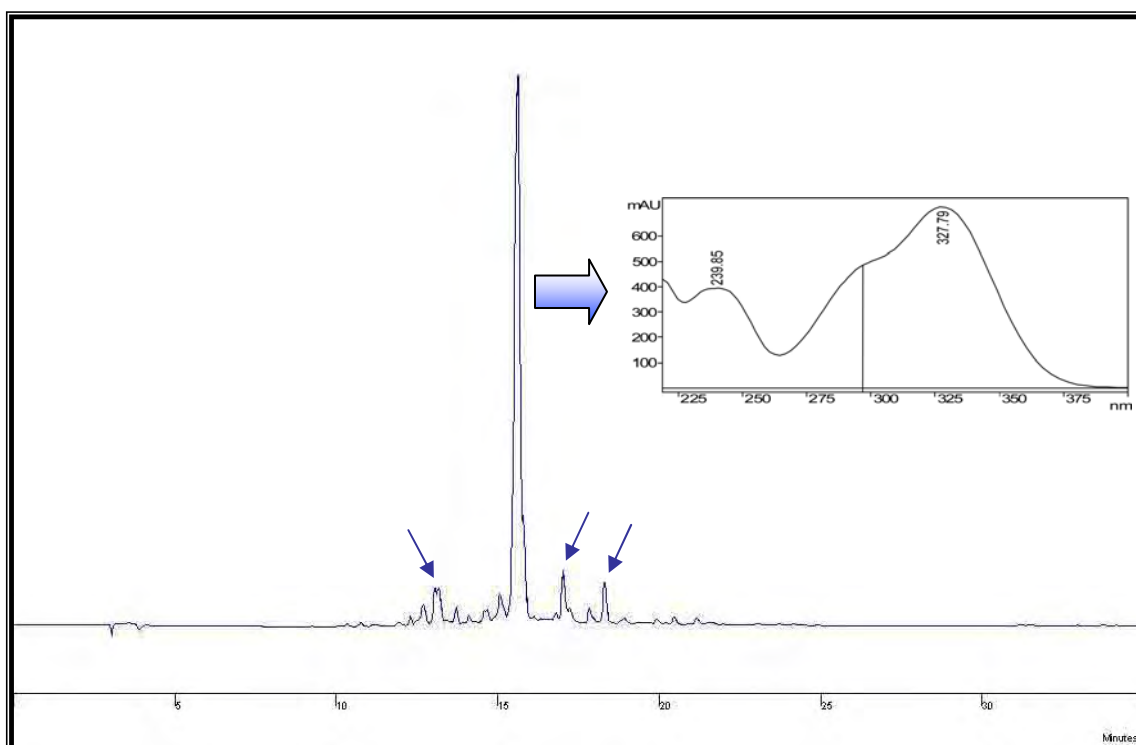
A sub-fração PMC.01 F1-3 (30,4 mg) apresentou uma mistura de dois alcalóides, os quais foram separados por CC (PMC.06), utilizando como FE alumina neutra (3 g), sistema de solvente ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /MeOH 99:01) otimizado em CCD, mantido até a eluição da primeira substância (alcalóide **20**). Em seguida foi aumentada a polaridade gradativamente até a eluição da segunda substância (alcalóide **1**) (Figura 18).

A sub-fração PMC.01 F28-30 (402,6 mg) apresentou absorção significativa sob lâmpada na região do ultravioleta (UV). Essa fração foi analisada por CLAE, indicando a presença de pelo menos quatro substâncias com espectros na região do UV bastante semelhantes (Figura 19). Parte dessa sub-fração (200 mg), foi submetida a CC (PMC 05), utilizando como FE sílica gel (9 g). O sistema de solvente foi otimizado em CCD e consiste em AcOEt/MeOH/TEA 9:1:0,01.

Sendo os alcalóides substâncias com caráter básico, sua separação se torna extremamente difícil quando se utiliza sílica como FE, devido aos grupos silanóis, sítios com caráter ácido, reterem fortemente essas micromoléculas. Para diminuir esse tipo de interação (silanóis e os alcalóides), foi adicionado trietilamina (TEA) à fase móvel (amina competidora), diminuindo assim a retenção dos alcalóides e facilitando a separação (McCALLEY, 2002; PAHL et al., 1997). Foram coletadas 50 sub-frações as quais foram reunidas por CCDC. Desse fracionamento foram isolados os alcalóides **18** e **19** como mostra o esquema da Figura 18.



**Figura 18.** Esquema de purificação da fração SSFr – CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

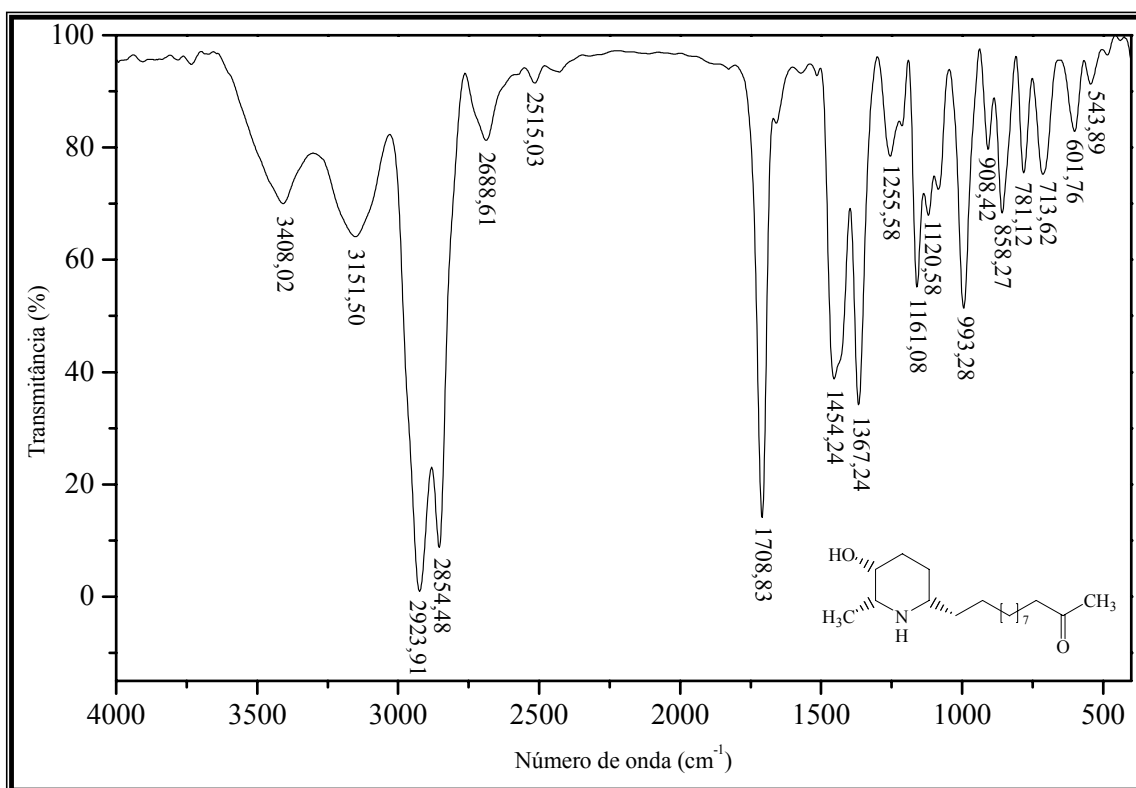


**Figura 19.** Cromatograma da sub-fração PMC.01 F28-30. Condições cromatográficas: coluna Phenomenex LC18 5 μm, 250 x 4,6 mm, fase móvel: 5 a 100% de ACN – HOAc 5%, (30 min), fluxo: 1 mL/min, detecção: UV 254 nm

## 4.2. Elucidação estrutural dos alcalóides isolados

### 4.2.1. Elucidação estrutural do alcalóide 1

O alcalóide **1** foi isolado como um sólido de coloração amarela pálida, apresentando um ponto de fusão entre 52-55 °C. A análise do espectro na região do infravermelho (IV), permitiu identificar uma banda em 3408  $\text{cm}^{-1}$ , proveniente do estiramento do grupo O–H livre. O estiramento do grupo –OH ligado foi observado em 3152  $\text{cm}^{-1}$ , como uma banda larga, indicando que a função estaria participando de uma ligação de hidrogênio intramolecular. Não foi possível observar a banda proveniente do estiramento do grupo amino secundário, provavelmente sobreposta pelas bandas do grupo hidroxila. Os estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos C–H alifáticos foram visíveis em  $\nu_{\text{as}}$  2924 e  $\nu_{\text{s}}$  2854  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda relativa ao estiramento da função carbonila (C=O) de cetona foi observada em  $\nu$  1709  $\text{cm}^{-1}$ , assim como as absorções relativas às deformações angulares assimétricas em  $\nu$  1454 e simétricas em  $\nu$  1367 do grupo metila (Espectro 1).



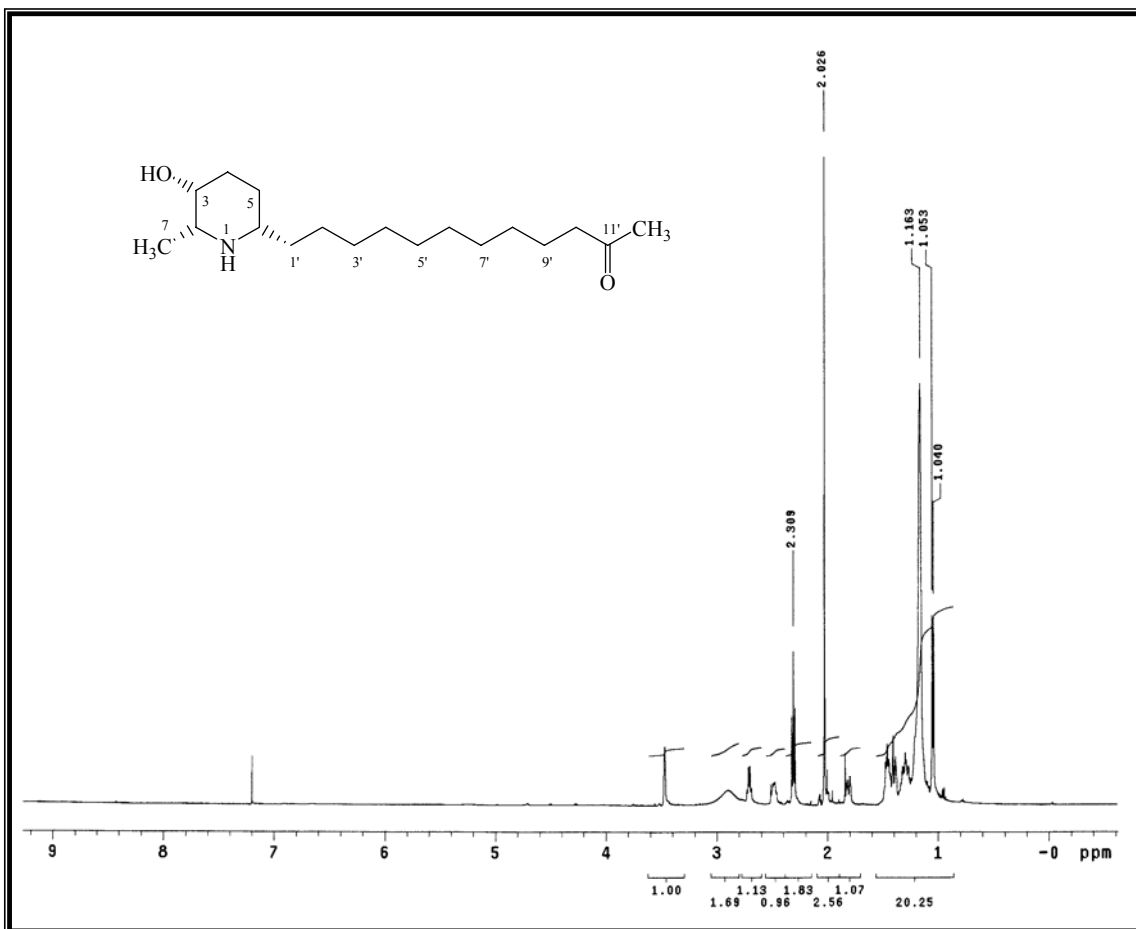
**Espectro 1.** Espectro na região do IV (KBr), do alcalóide **1**

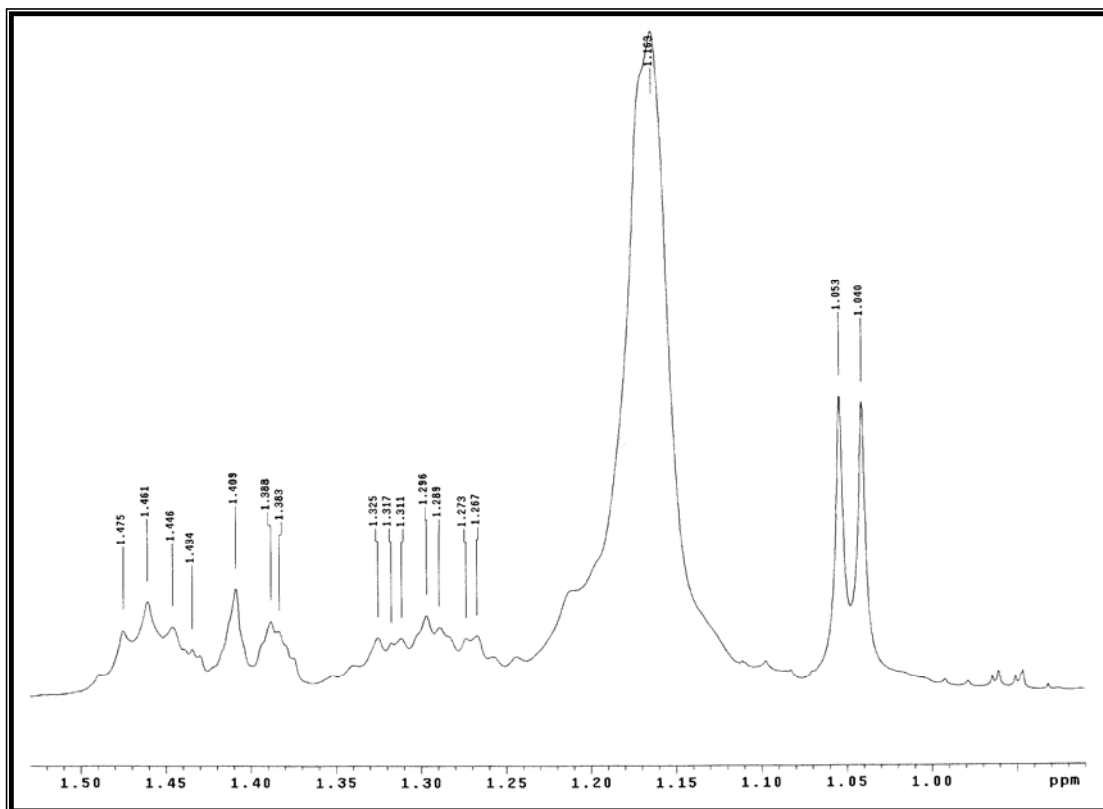
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide 1 (Espectro 2), permitiu identificar um simpleto largo em  $\delta$  3,47, referente ao H-3 hidroximetínico. Um duplo quadrupletto em  $\delta$  2,71, integrando para um hidrogênio, foi atribuído a H-2, o qual apresentou somente acoplamento com H-7 ( $J = 6,5$  Hz), Tabela 2.

A extremidade da cadeia lateral, funcionalizada por um grupamento metil-cetona foi identificada pela presença de um tripleto em  $\delta$  2,31, integrando para dois hidrogênios e um simpleto em  $\delta$  2,03 integrando para três hidrogênios, que foram atribuídos a 2 H-10' e 3 H-12', respectivamente. Esta dedução foi confirmada pelo mapa de contorno gHMBC (Espectro 12), que mostrou as interações  $^3J$  de H-10' e H-12' com C-12' e C-10', respectivamente. O dupletto em  $\delta$  1,05, integrando para três hidrogênios acoplando com H-2 no mapa de contorno gCOSY (Espectro 6), foi atribuído a H-7. Os sinais relativos aos hidrogênios da cadeia lateral encontram-se sobrepostos na região de  $\delta$  1,16 (Tabela 2).

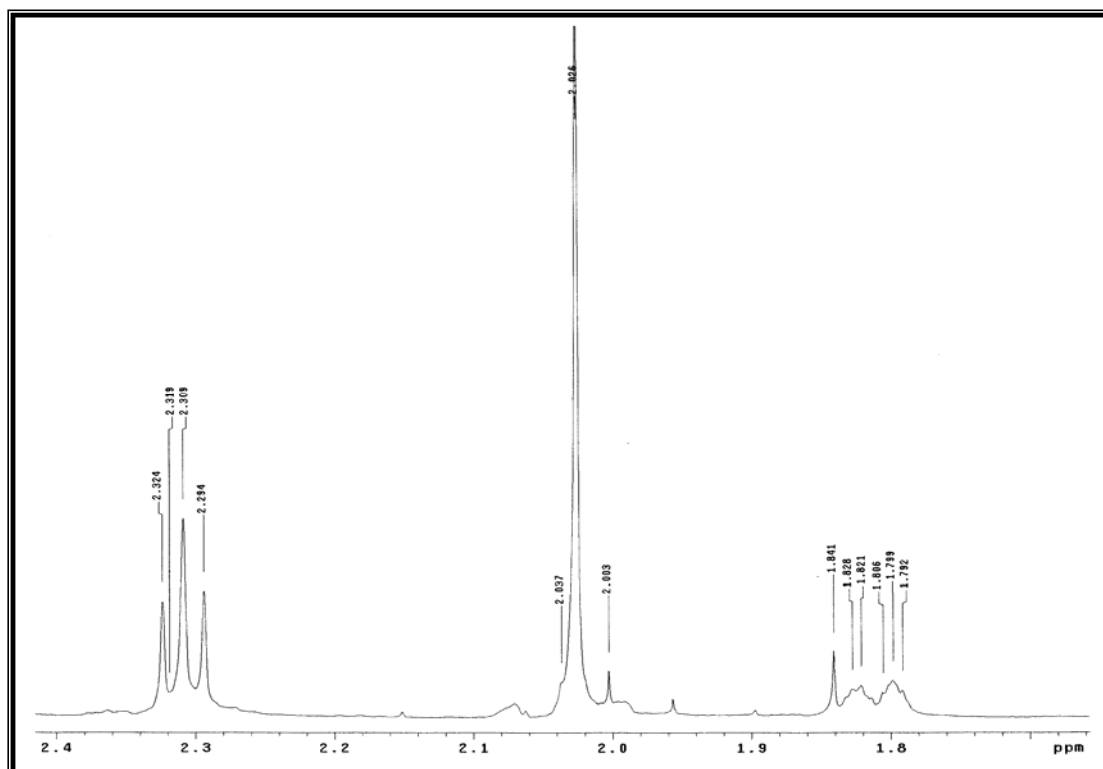
O comprimento da cadeia lateral foi primeiramente proposto com base no valor da integral de hidrogênios em  $\delta$  1,16, (18 hidrogênios) correlacionados aos metilenos da cadeia, pela análise simultânea dos dados do mapa de contorno gHMQC (Espectro 11),  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Espectros 8, 9 e 10).



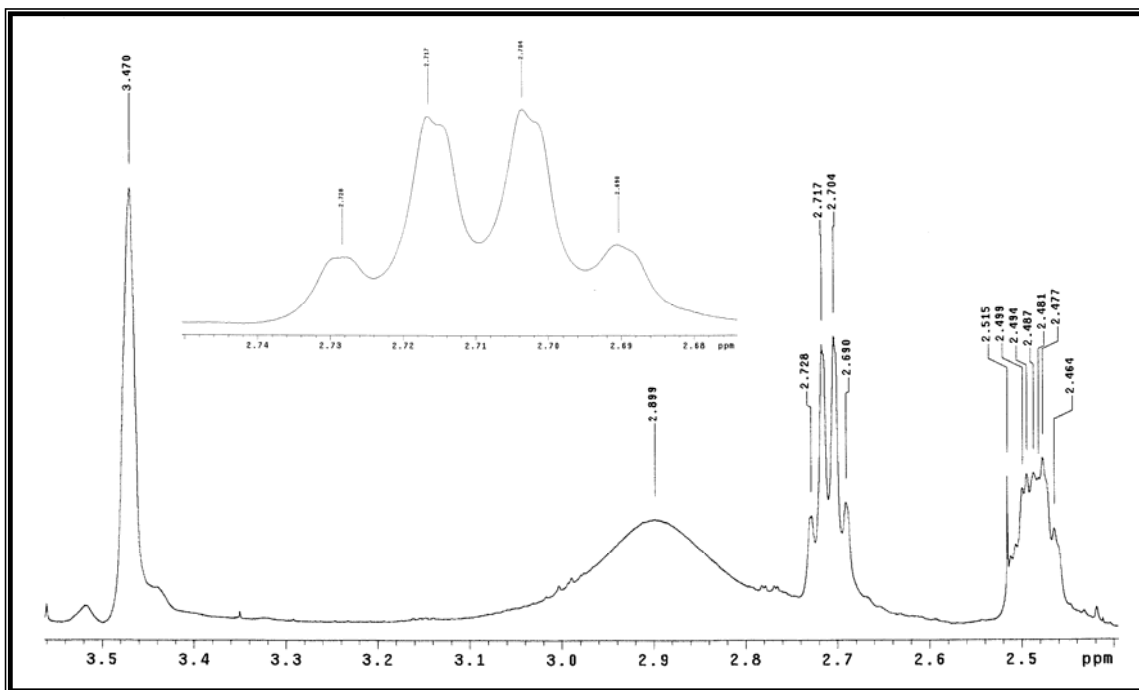




**Espectro 3.** Ampliação do espectro 2 ( $\delta$  1,0–1,5) do alcalóide 1



**Espectro 4.** Ampliação do espectro 2 ( $\delta$  1,7–2,4) do alcalóide 1

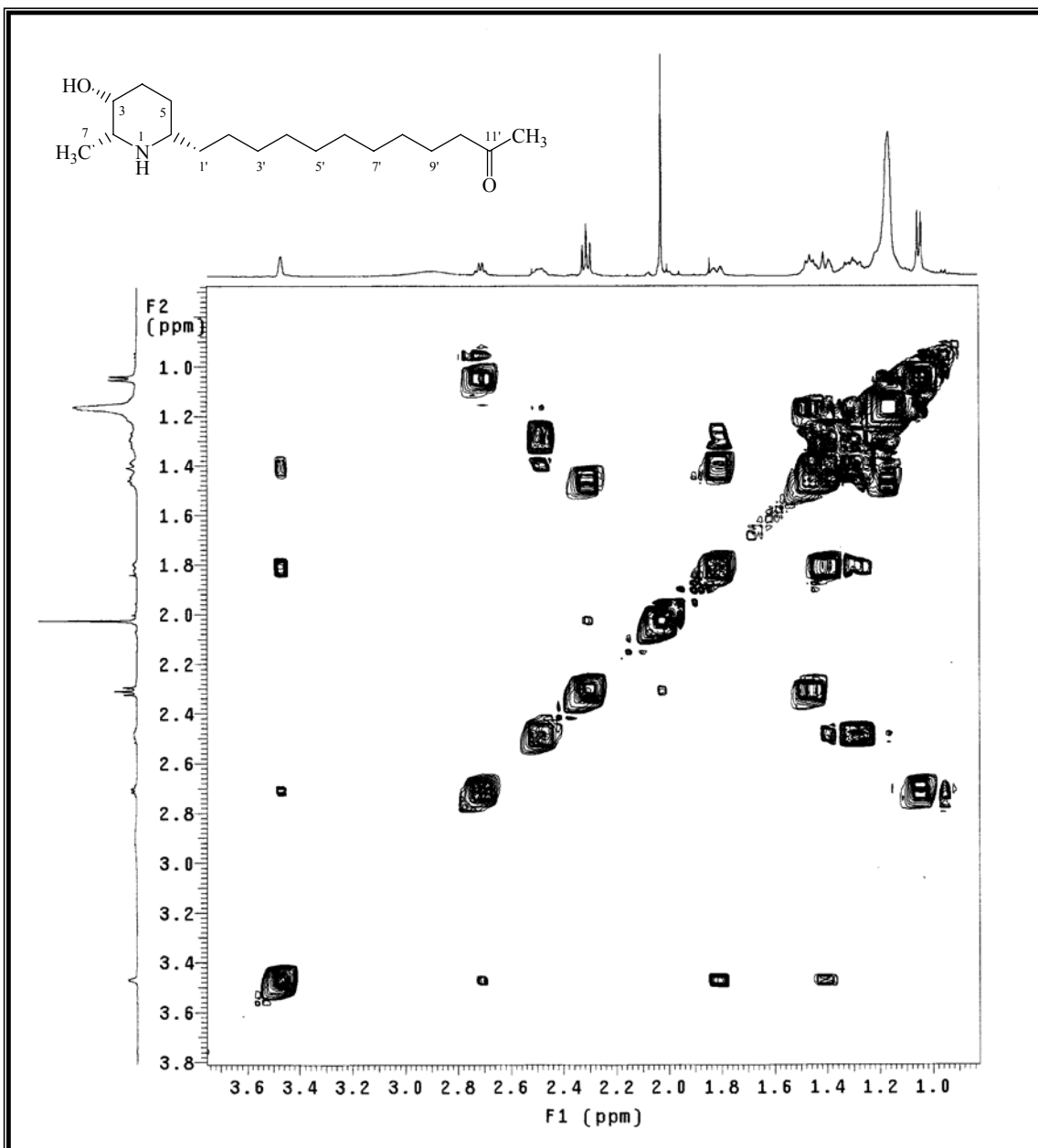


**Espectro 5.** Ampliação do espectro 2 ( $\delta$  2,5–3,5) do alcalóide 1

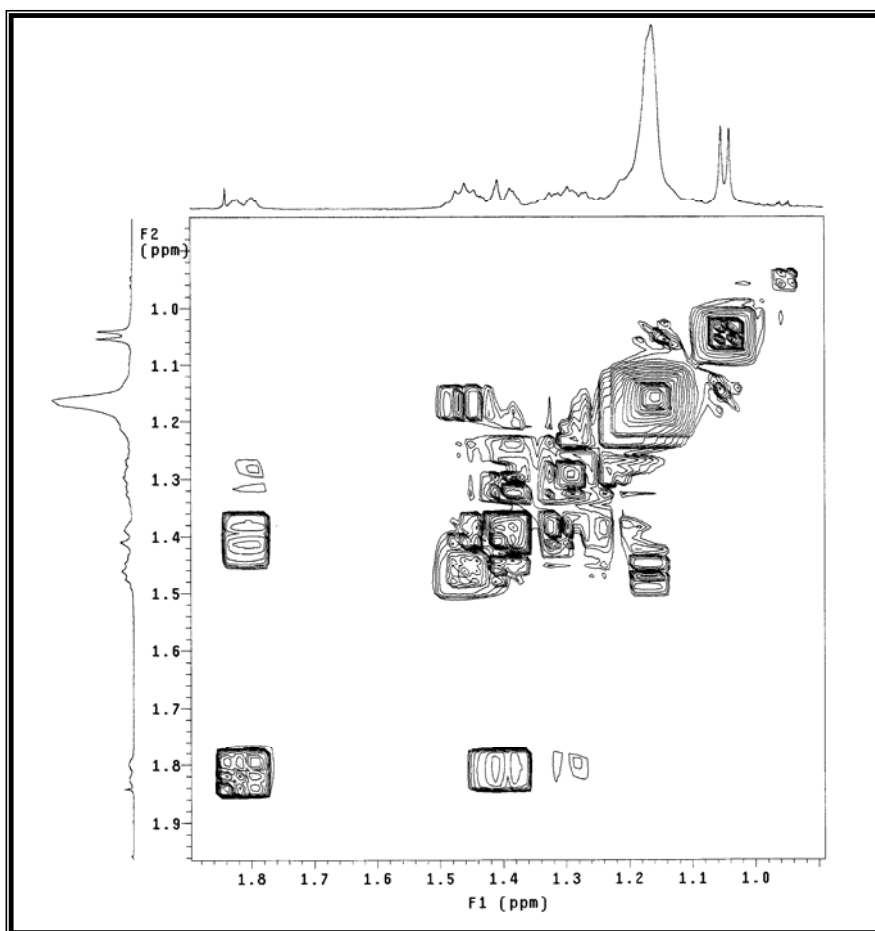
**Tabela 2.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e gCOSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide **1**<sup>a, b, c</sup>

Posição	$\delta_{\text{H}}$ , m, <i>J</i>	gCOSY
2	2,71 dq (6,5; 1,0)	H-7
3	3,47 sl	H-4a, H-4b, H-2
4a	1,82 m	H-3, H-4b, H-5a, H-5b
4b	1,41 m	H-3, H-4a, H-5a, H-5b
5a	1,40 m	H-4a, H-4b, H-5b, H-6
5b	1,30 m	H-4a, H-4b, H-5a, H-6
6	2,48 m	H-5a, H-5b, H-1'
7	1,05 d (6,5)	H-2
1'	1,30 m	H-6, H-2'-8'
2'- 8'	1,16 sl	H-1', H-10'
9'	1,46 m	H-10', H-2'-8'
10'	2,31 t (7,5)	H-9', H-12'
11'	-----	-----
12'	2,03 s	H-10'

<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno<sup>b</sup> Constantes de acoplamento (*J*), expressas em Hz<sup>c</sup> m = multiplicidade



**Espectro 6.** Mapa de contorno gCOSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide 1



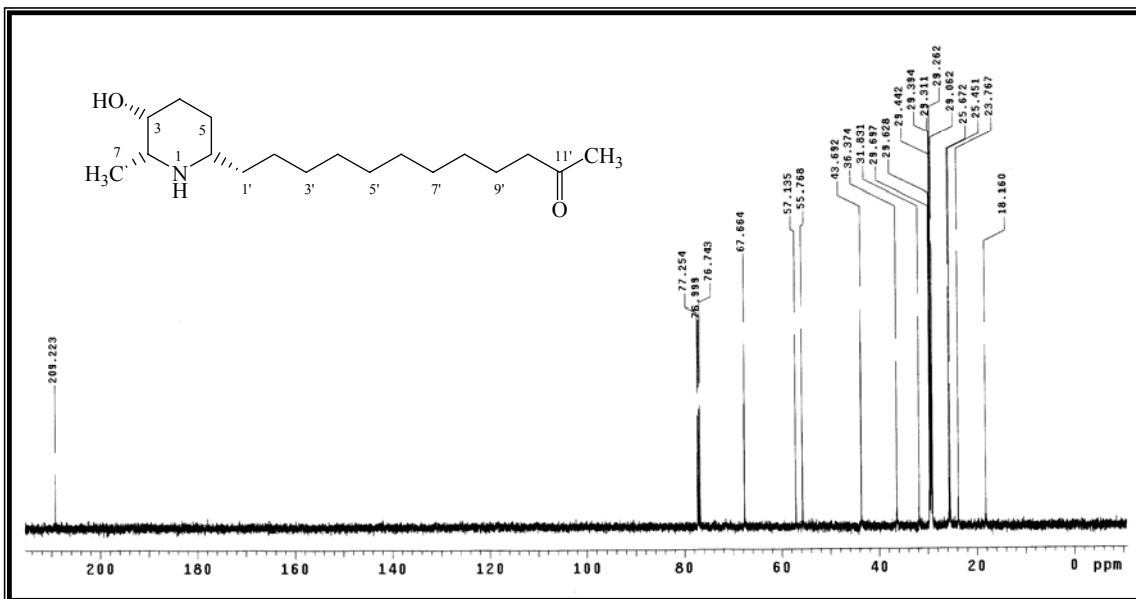
**Espectro 7.** Ampliação do espectro 6 ( $\delta$  1,0–1,8) do alcalóide **1**

A atribuição dos carbonos do alcalóide **1** (Tabela 3), foi realizada conforme os dados obtidos dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Espectros 8, 9 e 10), e da análise simultânea dos dados dos espectros de gHMQC (Espectro 11) e de  $^1\text{H}$  (Espectros 2, 3, 4 e 5). O tamanho da cadeia lateral foi estimada pelo número de átomos de carbono observados nos espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Espectros 8, 9 e 10), sendo constituída por dez metilenos, uma carbonila e uma metila.

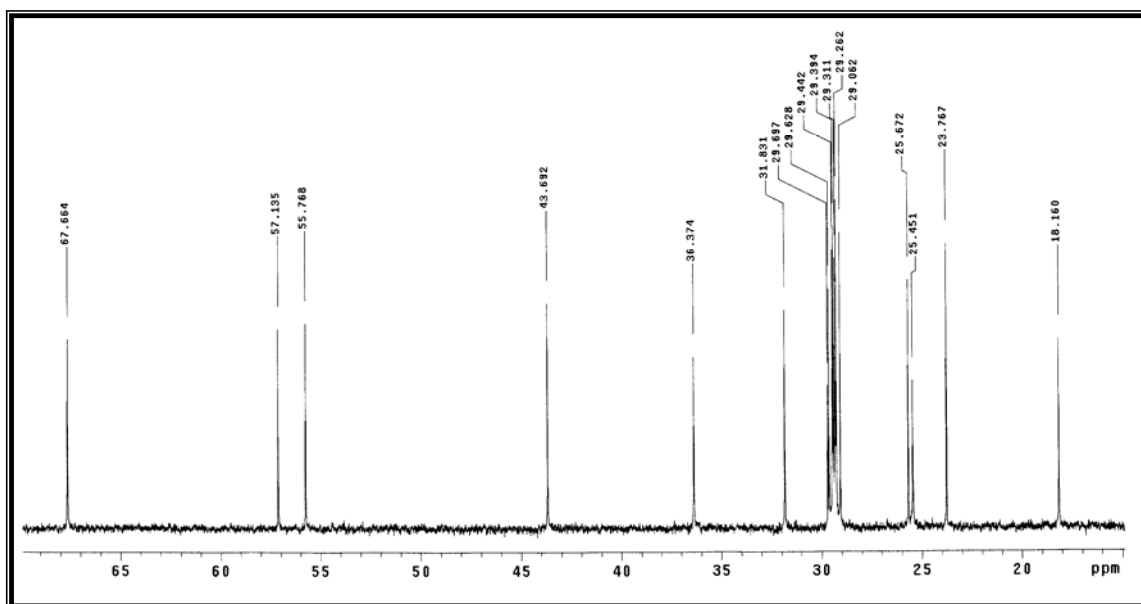
**Tabela 3.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide **1**<sup>a</sup>

Posição	$\delta_{\text{C}}$	DEPT 135	gHMQC	gHMBC
2	55,8	CH	2,71	H-7, H-4a
3	67,7	CH	3,47	H-7
4	31,8	CH <sub>2</sub>	1,82	H-5a
5	25,7	CH <sub>2</sub>	1,40	H-3, H-1'
6	57,1	CH	2,48	H-1', H-5b
7	18,2	CH <sub>3</sub>	1,05	H-2
1'	36,4	CH <sub>2</sub>	1,30	H-3'-8'
2'	25,4	CH <sub>2</sub>	1,16	H-1'
3'-8'	29,1-29,4	CH <sub>2</sub>	1,19	H-9', H-10'
9'	23,8	CH <sub>2</sub>	1,46	H-3'-8', H-10'
10'	43,7	CH <sub>2</sub>	2,39	H-9', H-12'
11'	209,2	C	----	H-10', H-12'
12'	29,7	CH <sub>3</sub>	2,03	H-10'

<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

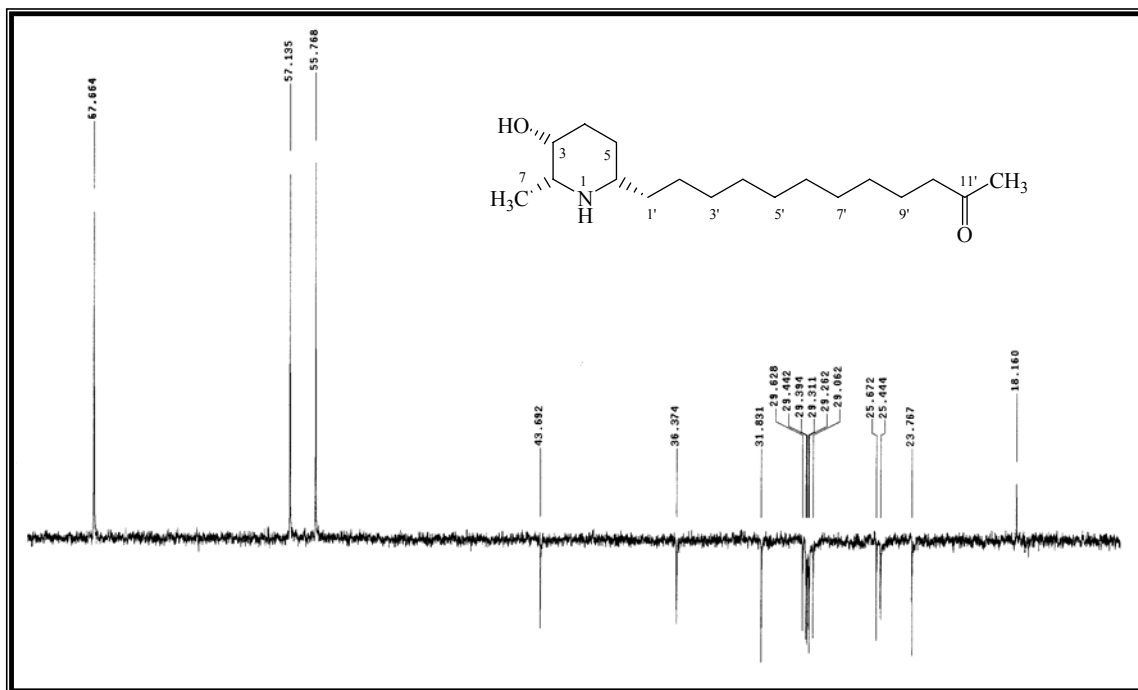


**Espectro 8.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide 1

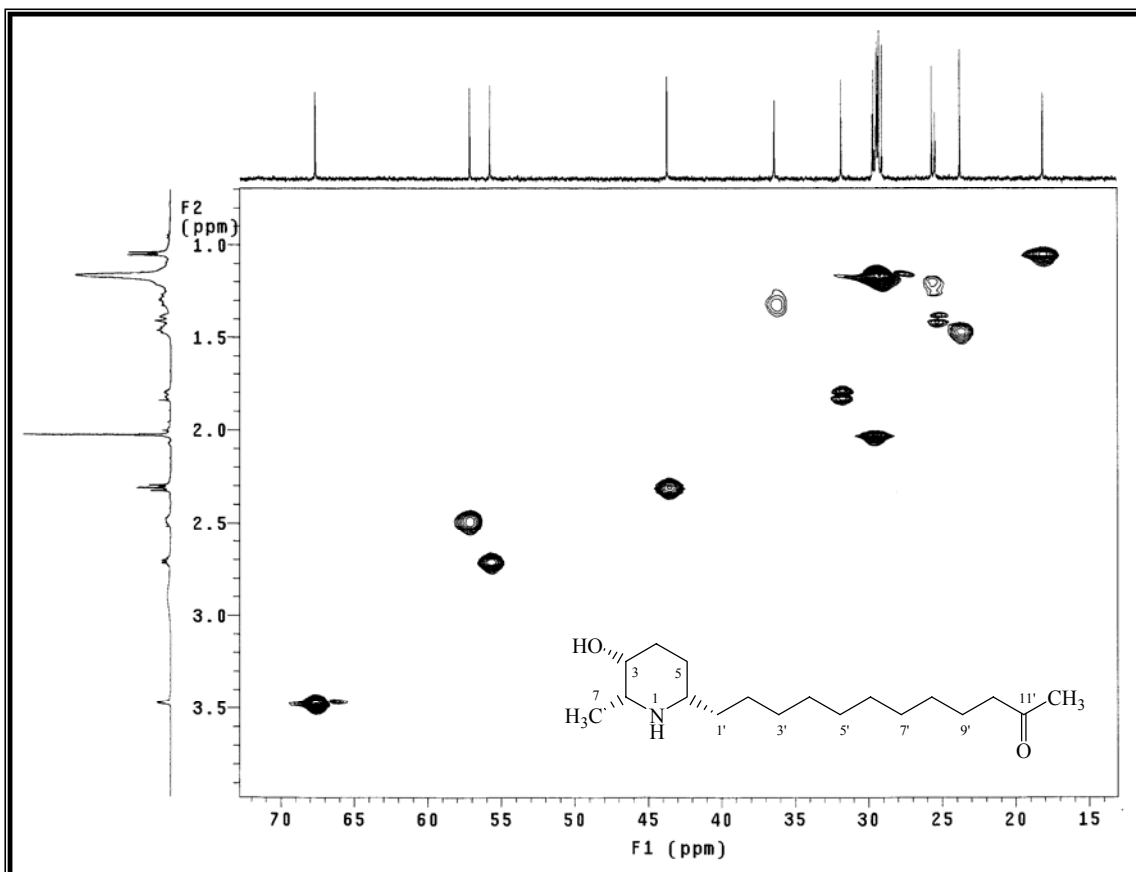


**Espectro 9.** Ampliação do espectro 8 ( $\delta$  15,0–70,0), alcalóide 1

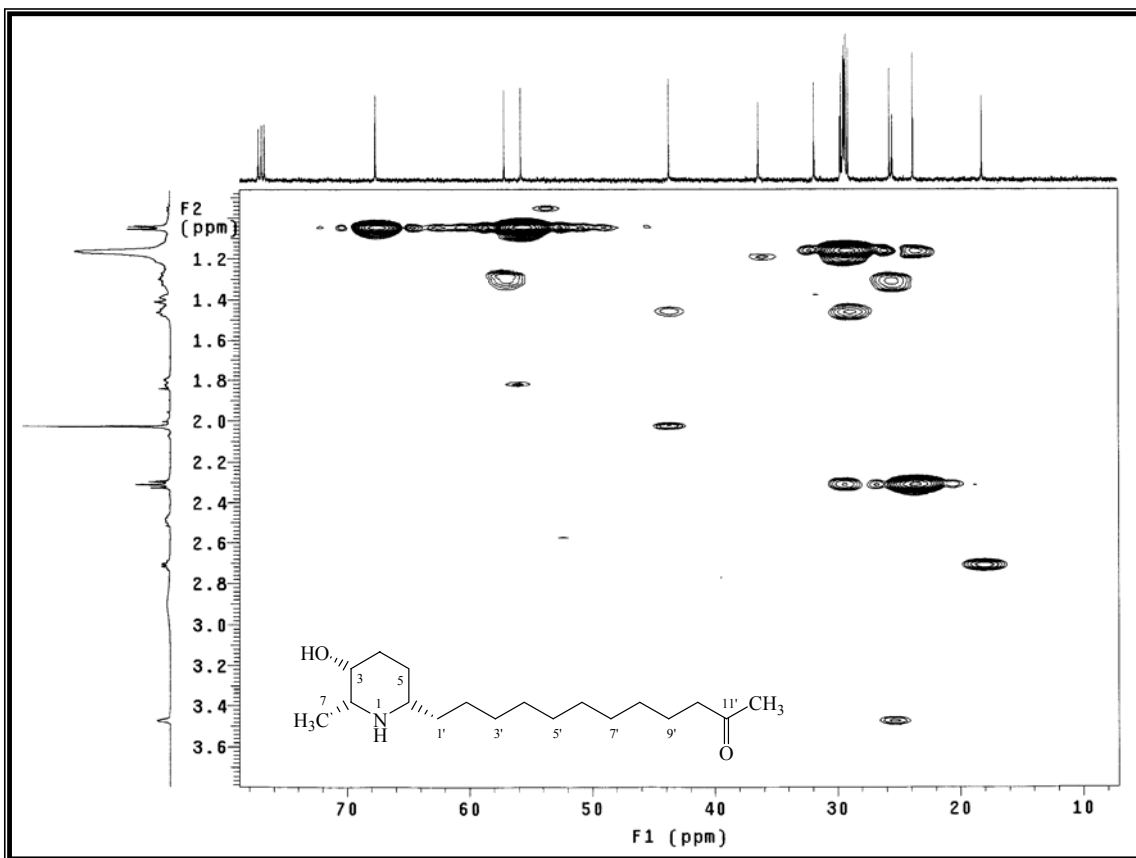




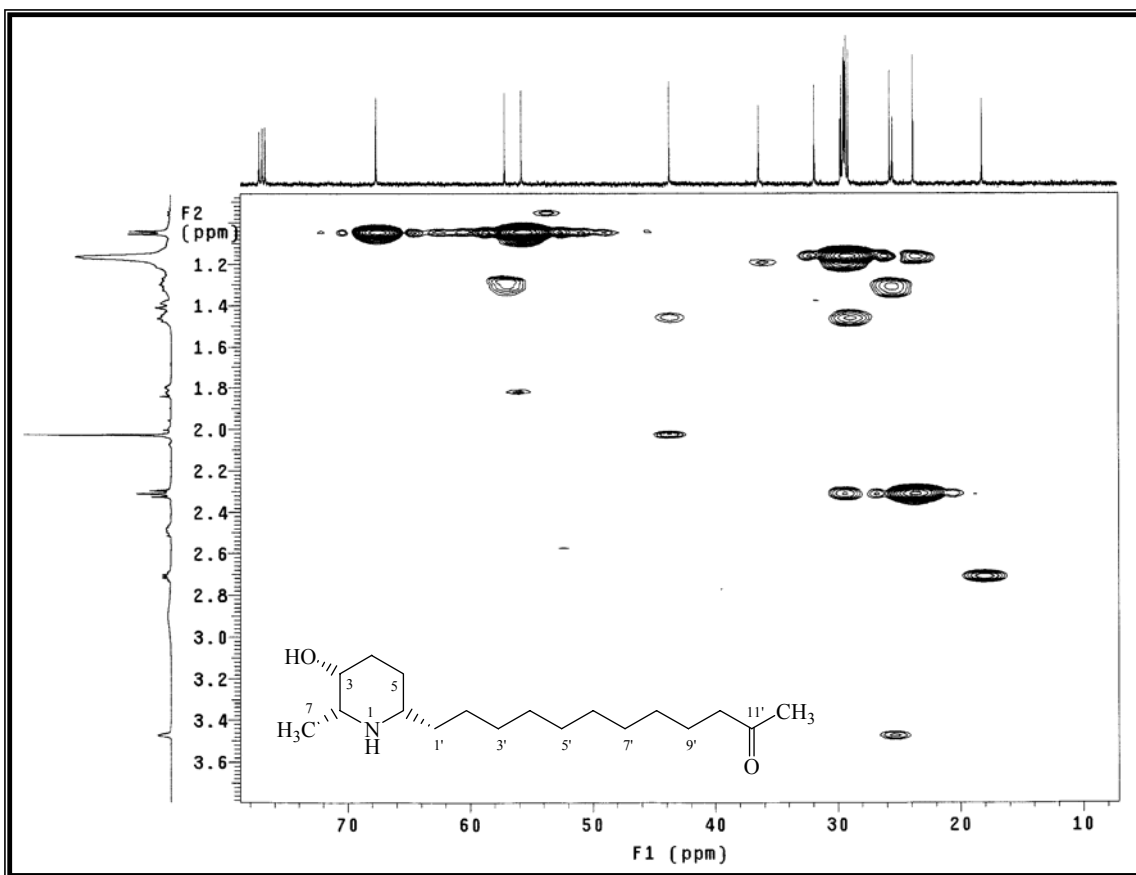
**Espectro 10.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do alcalóide **1**



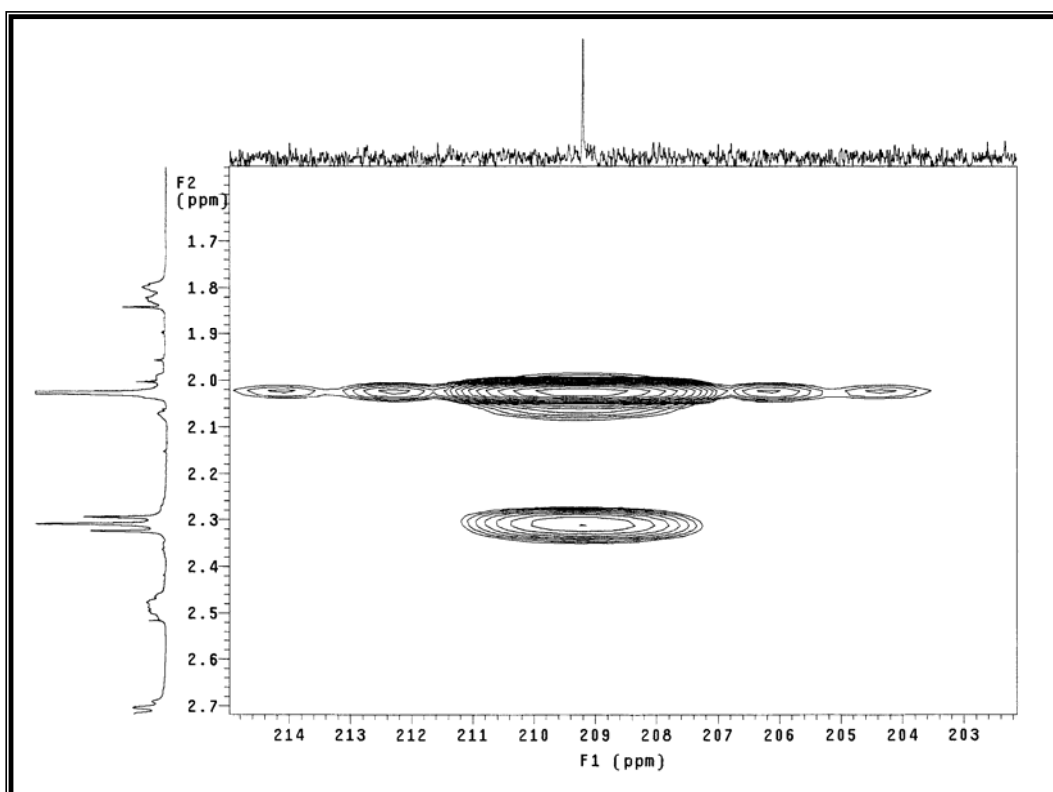
**Espectro 11.** Mapa de contorno gHMQC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide **1**



**Espectro 12.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide **1**

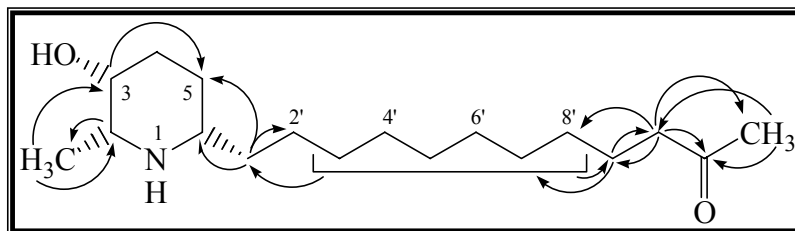


**Espectro 13.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), do alcalóide 1



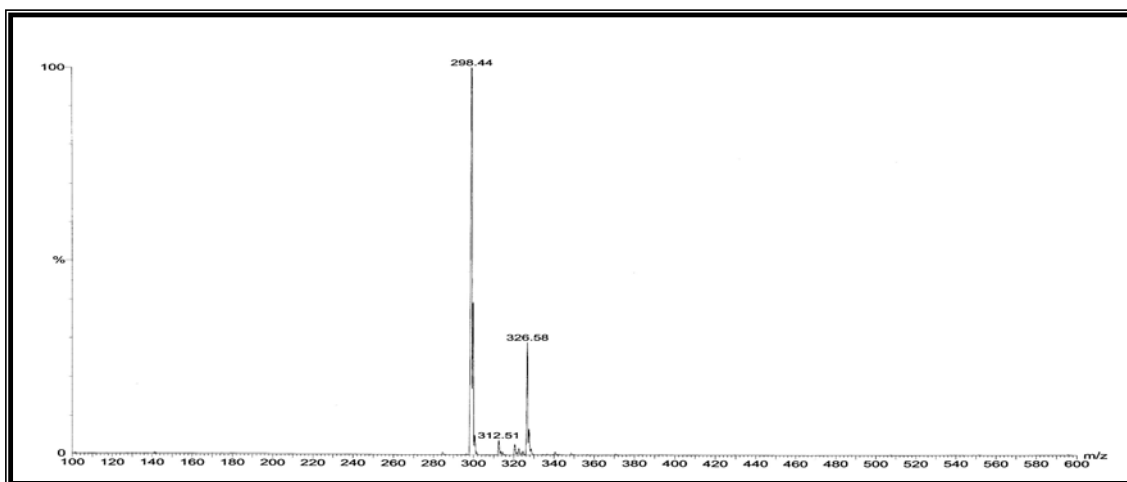
**Espectro 14.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), do alcalóide 1

Na Figura 20 são mostradas algumas correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , obtidas do mapa de contorno gHMBC do alcalóide **1**.

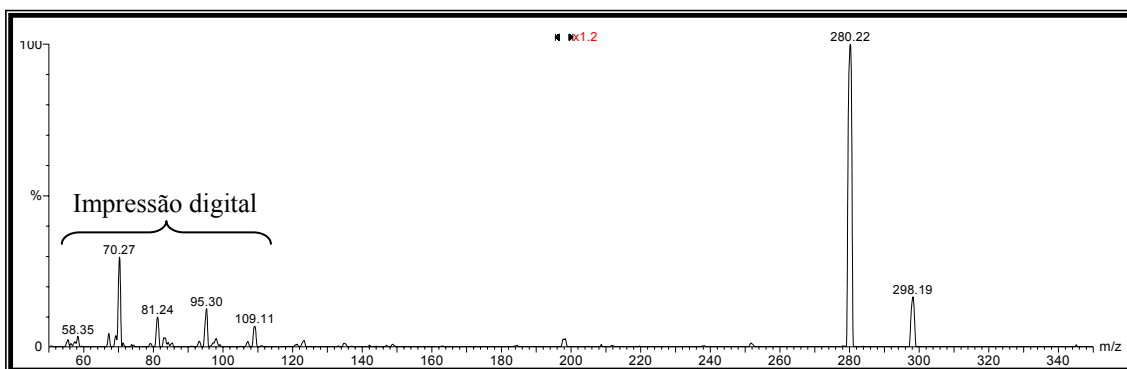


**Figura 20.** Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide **1**

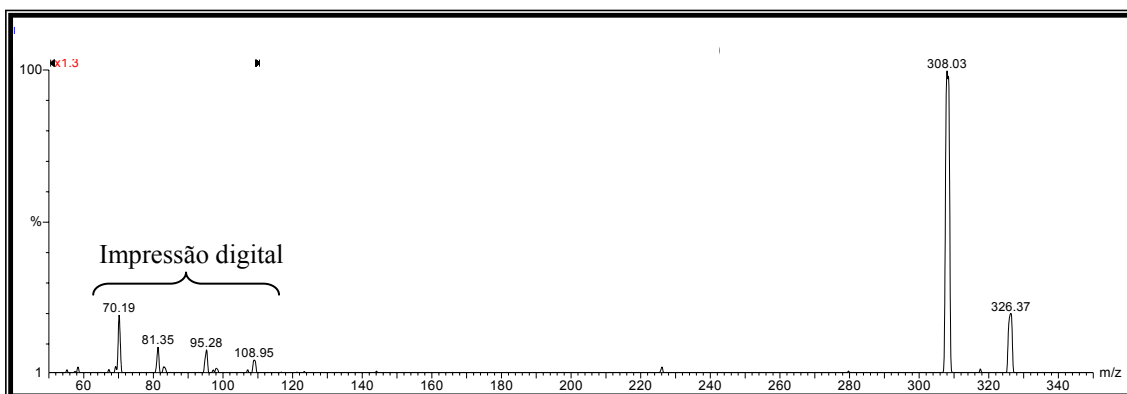
A Análise do espectro de massas (Espectro 15), juntamente com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT, levaram a propor a fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ . O experimento foi realizado no modo positivo com ionização por *electrospray* (IES), com a amostra solubilizada em  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1). O espectro apresentou pico base  $m/z = 298$ , que corresponde ao pico do íon *quasi*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , dado este que confirma o valor da cadeia lateral em C-6 como sendo constituída por 12 átomos de carbono: dez metilênos, uma carbonila e uma metila (Espectros 15 e 16). Isso indica que no espectro de carbono, na região de  $\delta$  29,1–29,4 (C-3' a C-8'), existem 6 metilenos, compatíveis com os observados no espectro de DEPT. O íon  $m/z = 298$  foi selecionado e submetido a fragmentação, produzindo como pico base o fragmento do íon *quasi*-molecular  $m/z = 280$ , que foi atribuído à eliminação neutra de uma molécula de água ( $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ ), que se dá por dissociação induzida por colisão (DIC), ou seja, colisão das moléculas do gás (Ar) com os íons formados no *electrospray*. Para esse caso mais especificamente sobre o átomo de hidrogênio beta, antiperiplanar à hidroxila, como mostra o esquema de fragmentação da Figura 21. Também foi possível observar que existe, em menor proporção (cerca de 33%), um homólogo do alcalóide **1**, com massa molecular 325 que possui dois metilenos a mais (28 uma), evidenciado pelo pico do íon *quasi*-molecular  $m/z = 326$ ,  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (Espectro 17). Quando selecionado e submetido à EM apresentou fragmentação com perda de água, e uma região de impressão digital semelhante ao do alcalóide **1** (Figura 21).



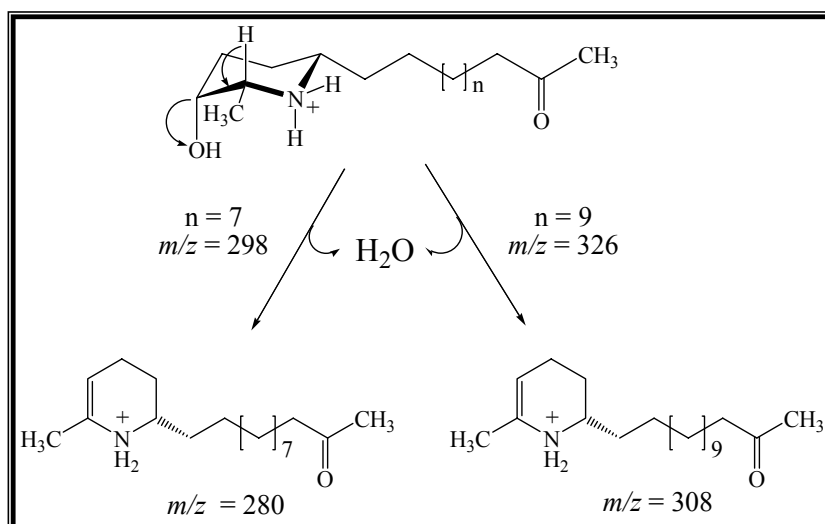
**Espectro 15.** IES-EM (modo positivo) do alcalóide **1**



**Espectro 16.** IES-EM/EM íon *quasi*-molecular  $m/z = 298$  do alcalóide **1**



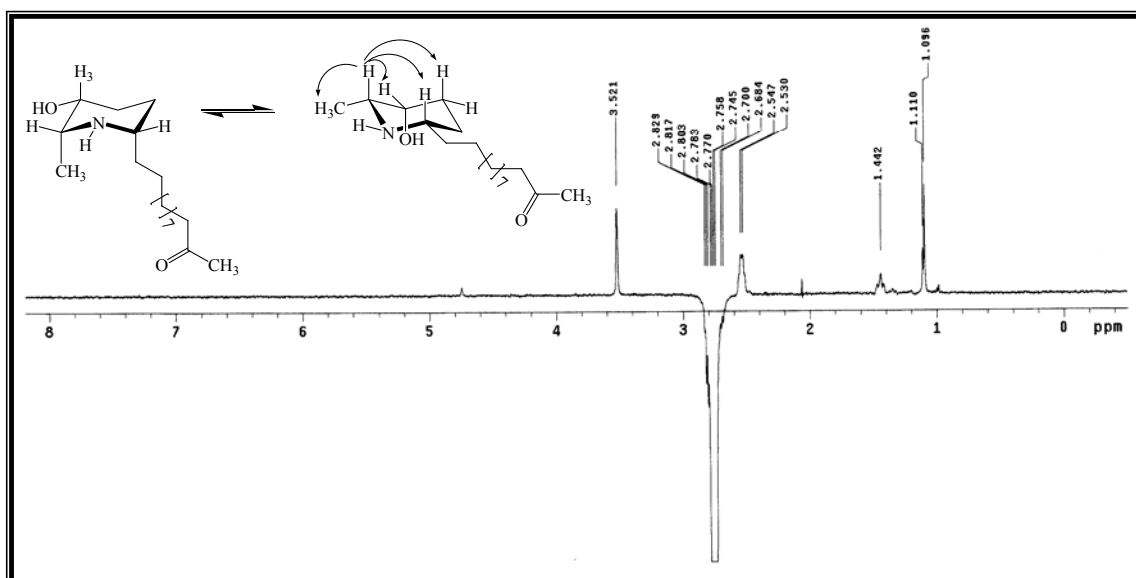
**Espectro 17.** IES-EM/EM íon *quasi*-molecular  $m/z = 326$ , homólogo do alcalóide **1**



**Figura 21.** Proposta de fragmentação para o alcalóide **1** e seu homólogo

### Proposta de configuração relativa para o alcalóide **1**

A configuração relativa do alcalóide **1**, foi proposta com base no experimento de NOESY 1D (Espectro 18). Quando irradiado o hidrogênio H-2 ( $\delta$  2,71), foi possível observar as correlações com os hidrogênios H-3, H-4b e H-7 ( $\delta$  3,47; 1,41 e 1,05 respectivamente), indicando que esses estavam em posição relativa alfa ou beta ao plano do anel. A análise das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3, indicou acoplamento axial/equatorial ( $J_{ae} = 1$  Hz;  $\alpha = 60^\circ$ ), quando comparado com a curva de Karplus.

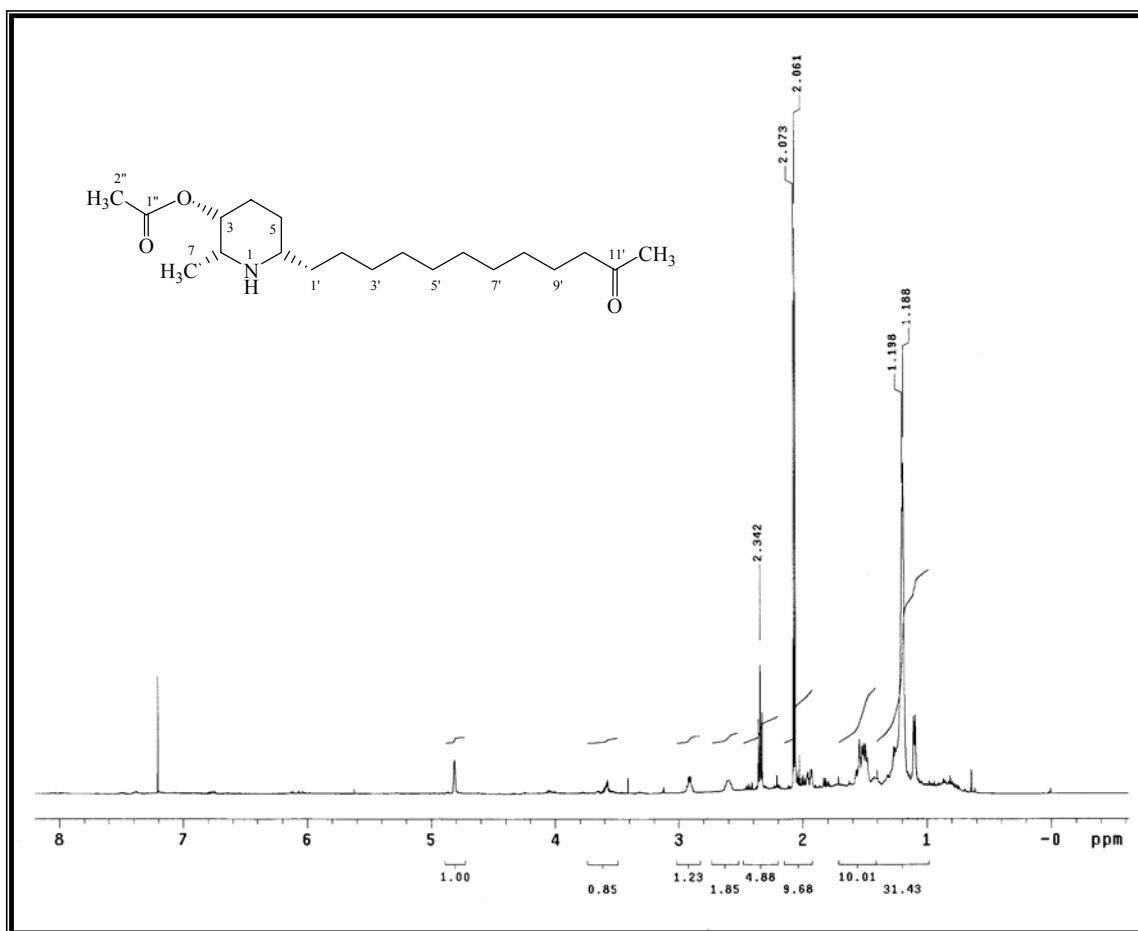


**Espectro 18.** Espectro de NOESY 1D (500 MHz,  $CDCl_3$ ), irradiando o hidrogênio  $\delta$  2,71 do alcalóide **1**

#### 4.2.2. Elucidação estrutural do alcalóide 20

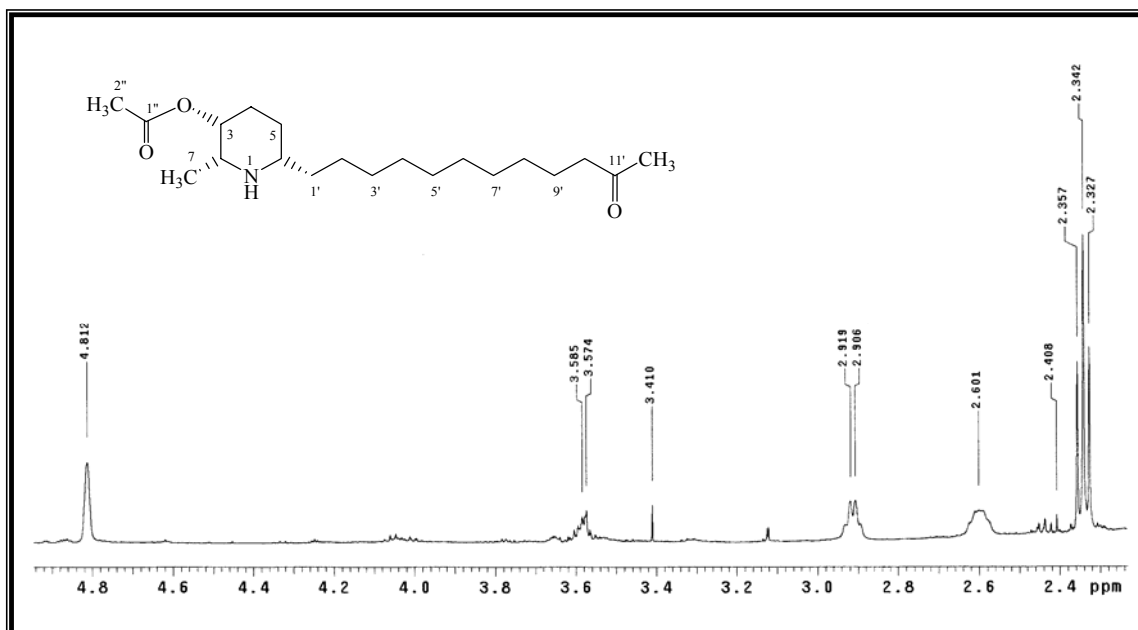
O alcalóide **20** foi isolado como um óleo de coloração amarelo claro.

A análise do alcalóide **20** por RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 19) permitiu a identificação de dois simpletos em:  $\delta$  2,06 (integrando para 3H) e  $\delta$  2,07 (integrando para 3H) que foram atribuídos aos hidrogênios de duas metilas, uma metil cetona no final da extensão da cadeia lateral em C-6 e a outra relativa ao éster ligado no C-3 do anel, respectivamente. Os demais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  são característicos do núcleo piperidínico 2,6-dissubstituído, semelhantes aos da cassina **1**, cujas atribuições estão descritas nas Tabelas 4 e 5.



**Espectro 19.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide **20**





**Espectro 20.** Ampliação do espectro 19 ( $\delta$  2,4–4,8) do alcalóide 20

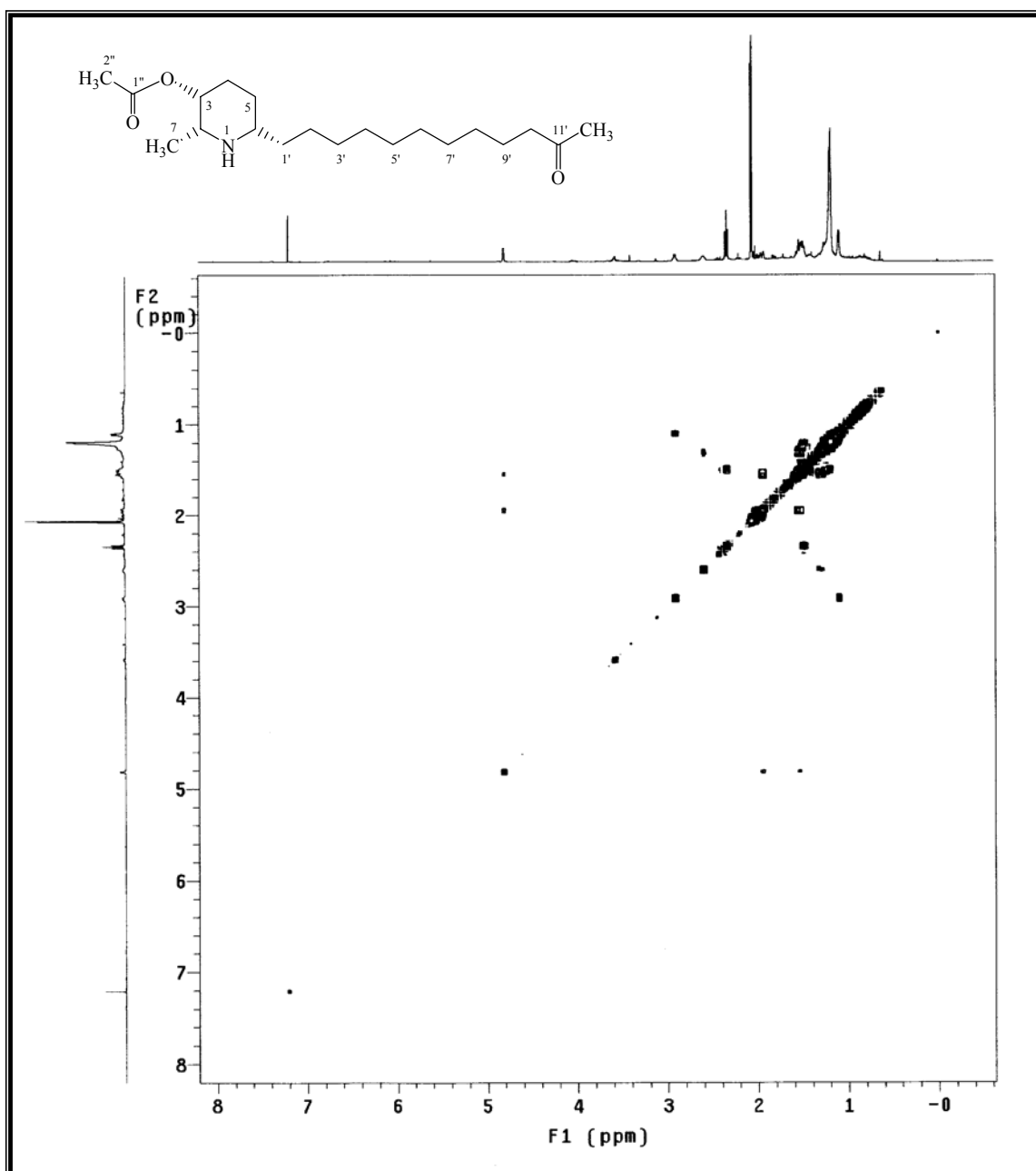
**Tabela 4.** Dados de RMN <sup>1</sup>H e gCOSY (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do alcalóide 20<sup>a, b, c</sup>

Posição	$\delta_H$ , m, <i>J</i>	gCOSY
2	2,91 q (6,5)	H-7
3	4,81 s	H-4a, H-4b
4a	1,96 m	H-3, H-4b, H-5a, H-5b
4b	1,52 m	H-3, H-4a, H-5a, H-5b
5a	1,52 m	H-4a, H-4b, H-5b
5b	1,48 m	H-4a, H-4b, H-5a
6	2,60 m	H-1'
7	1,10 d (6,5)	H-2
1'	1,30 m	H-6
2'- 8'	1,19 sl	H-9'
9'	1,49 m	H-2'-8', H-10'
10'	2,34 t (7,5)	H-9'
11'	-----	-----
12'	2,06 s	-----
1''	-----	-----
2''	2,07 s	-----

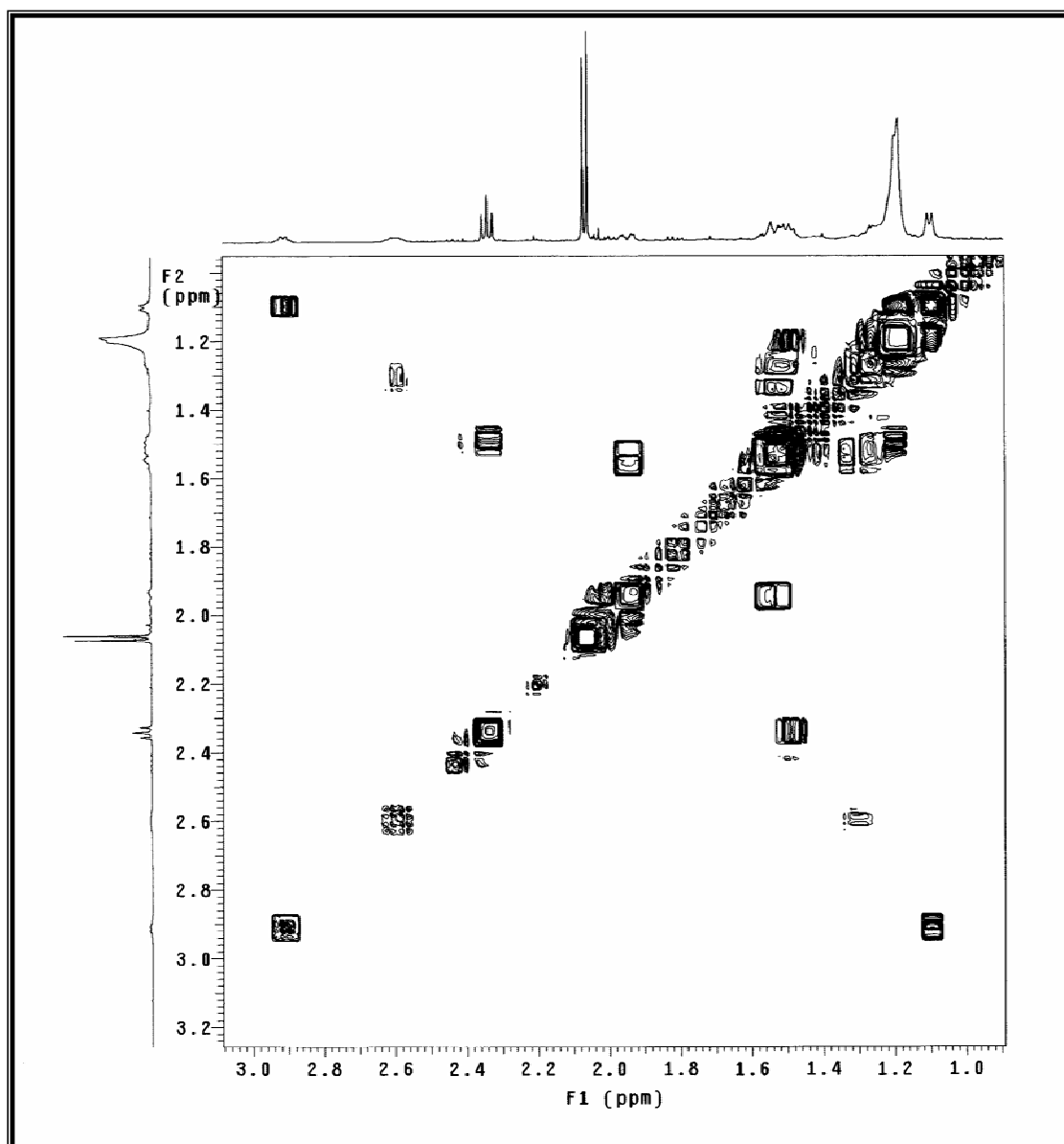
<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

<sup>b</sup> Constantes de acoplamento (*J*), expressas em Hz

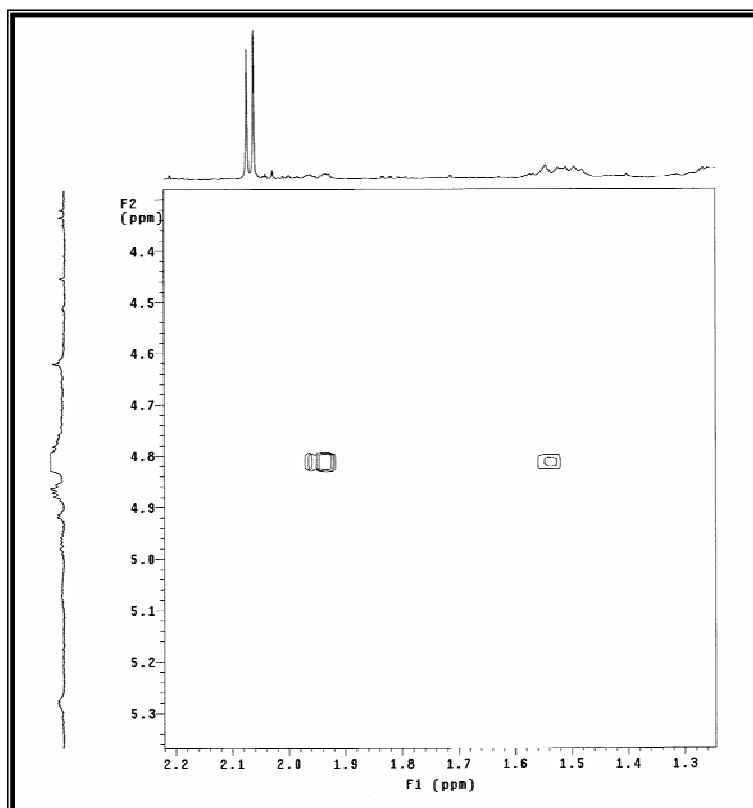
<sup>c</sup> m = multiplicidade



**Espectro 21.** Mapa de contorno gCOSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide 20



**Espectro 22.** Ampliação do espectro 21 ( $\delta$  1,0–3,0) do alcalóide **20**



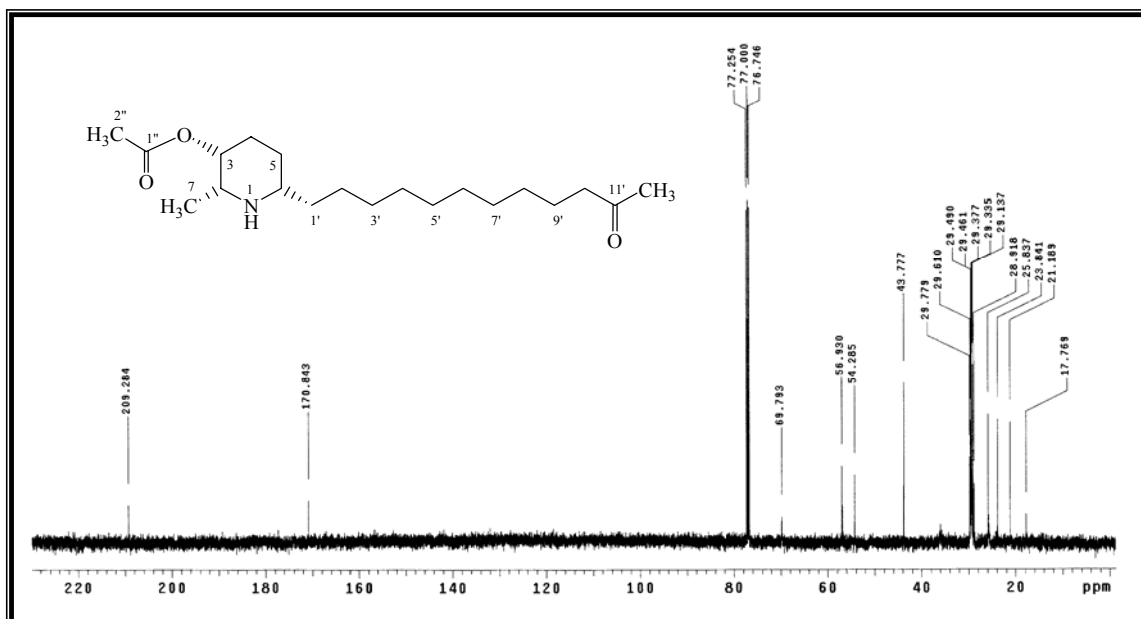
**Espectro 23.** Ampliação do espectro 21 ( $\delta$  1,3–2,2) do alcalóide **20**

A atribuição dos carbonos do alcalóide **20** (Tabela 5), foi realizada conforme os dados obtidos dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Espectros 24, 25, 26 e 27), e da análise simultânea dos dados dos espectros de gHMQC (Espectros 28, 29 e 30) e de  $^1\text{H}$  (Espectros 19 e 20). O tamanho da cadeia lateral foi estimada pelo número de átomos de carbono observados nos espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Espectros 24, 25, 26 e 27), sendo constituída por dez metilenos, uma carbonila e uma metila.

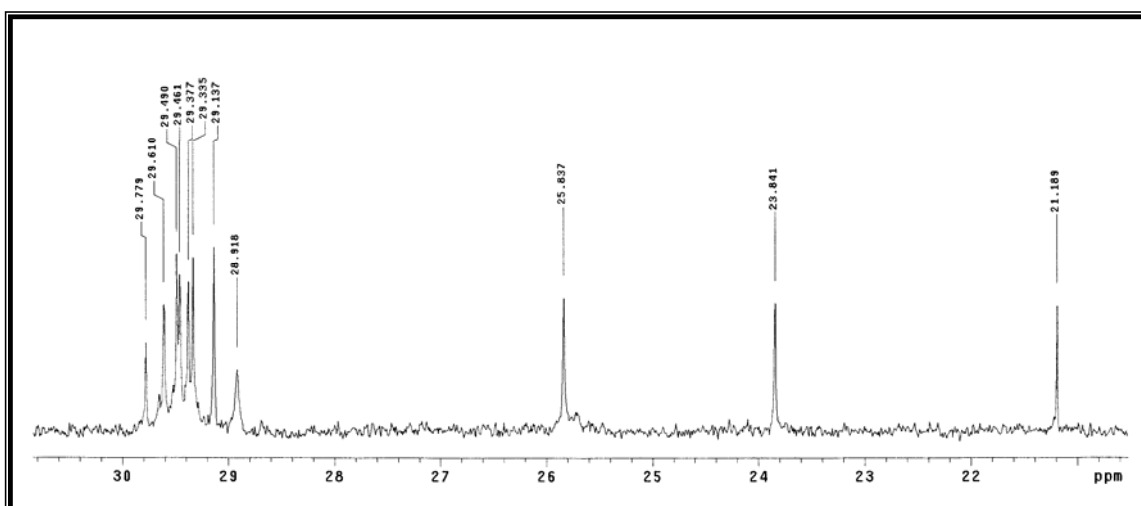
**Tabela 5.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide **20**<sup>a</sup>

Posição	$\delta_{\text{C}}$	DEPT 135	gHMQC	gHMBC
2	54,3	CH	2,91	H-7
3	69,8	CH	4,81	H-7
4	28,9	CH <sub>2</sub>	1,96; 1,52	H-5a, H-5b,
5	25,8	CH <sub>2</sub>	1,52; 1,48	no
6	56,9	CH	2,60	no
7	17,8	CH <sub>3</sub>	1,10	H-2
1'	35,6	CH <sub>2</sub>	no	no
2'	25,2	CH <sub>2</sub>	1,19	H-3'-8'
3'- 8'	29,1-29,6	CH <sub>2</sub>	1,19	H-2'-8', H-9', H-10'
9'	23,8	CH <sub>2</sub>	1,49	H-10'
10'	43,8	CH <sub>2</sub>	2,34	H-2'-8', H-12'
11'	209,3	C	-----	H-10', H-12'
12'	29,8	CH <sub>3</sub>	2,06	-----
1''	170,8	C	-----	H-2''
2''	21,2	CH <sub>3</sub>	2,07	-----

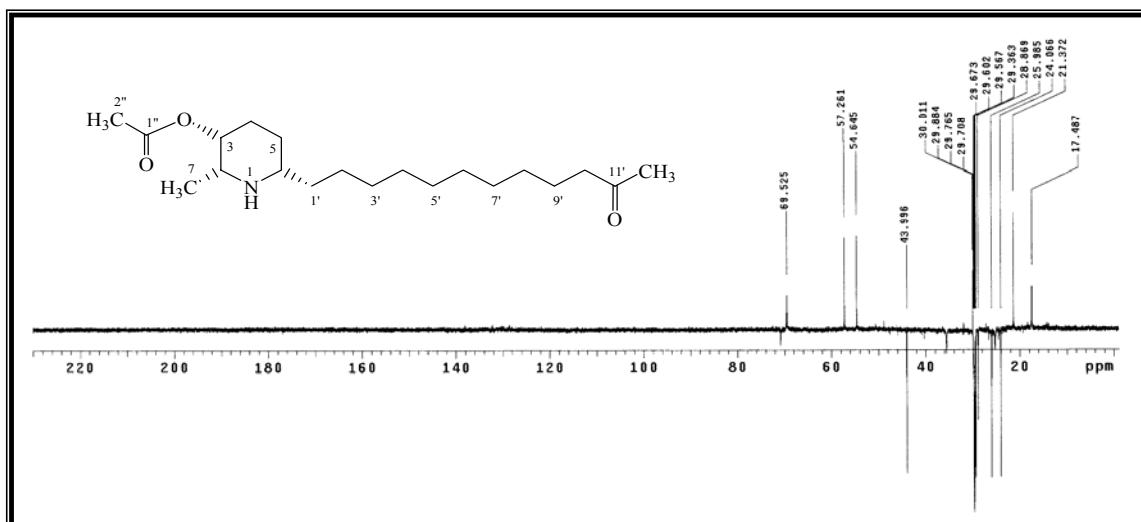
<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno  
no = não observado



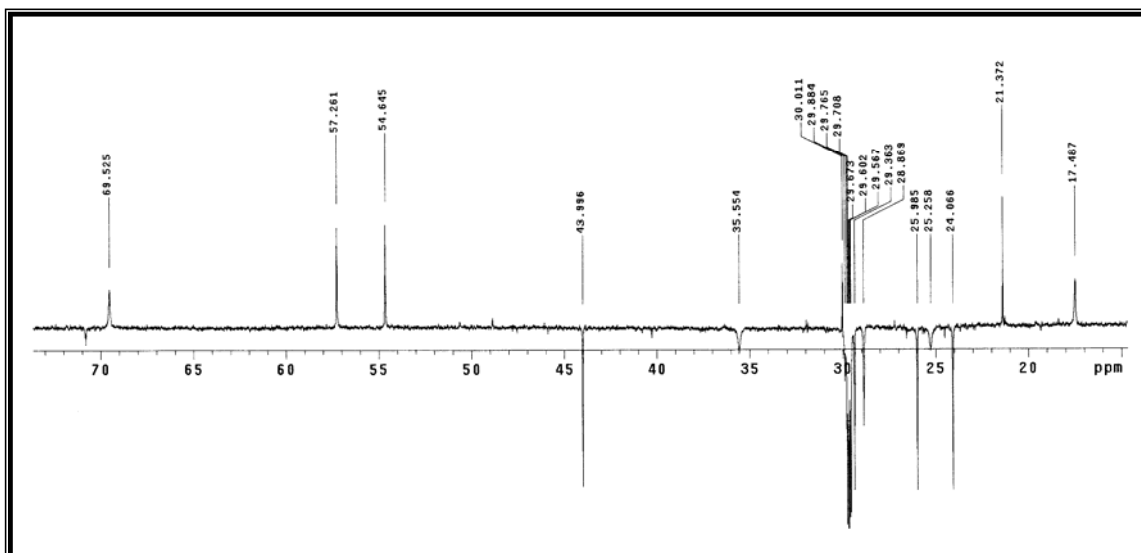
**Espectro 24.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide **20**



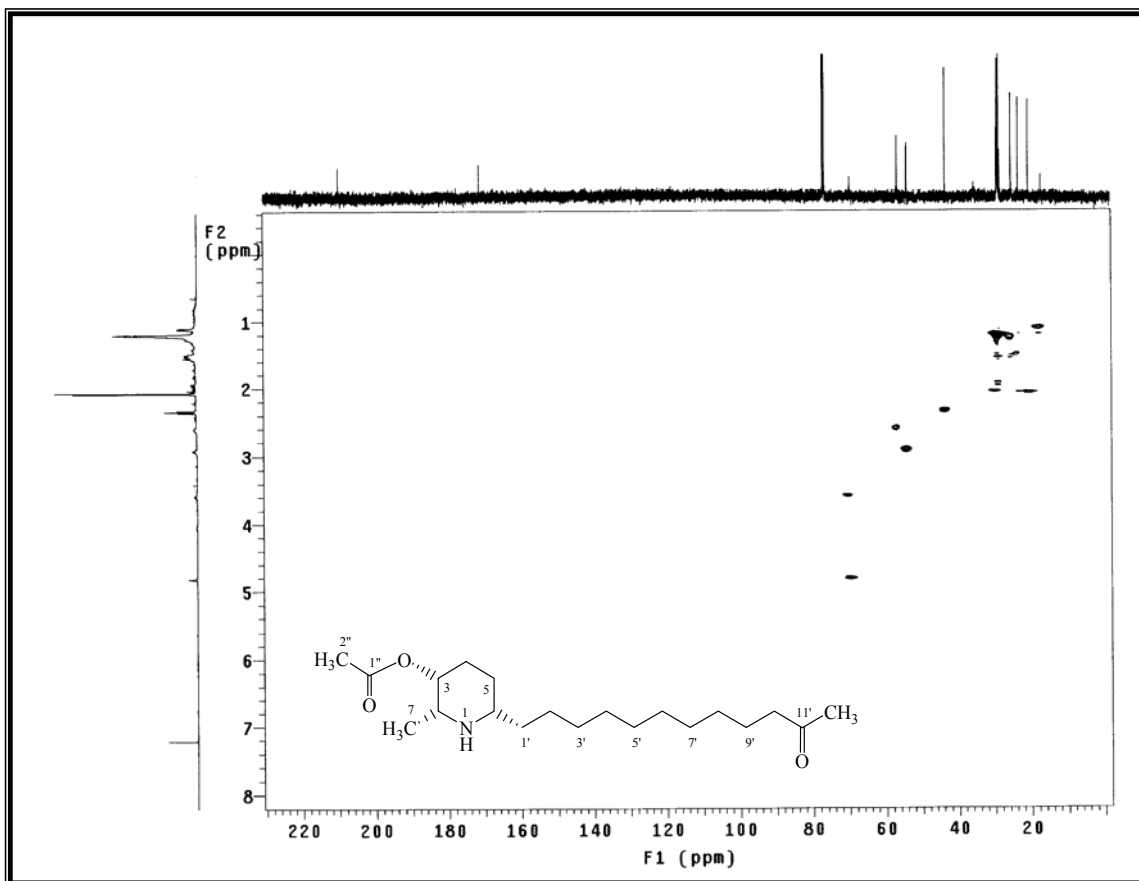
**Espectro 25.** Ampliação do espectro 24, alcalóide **20**



**Espectro 26.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do alcalóide **20**

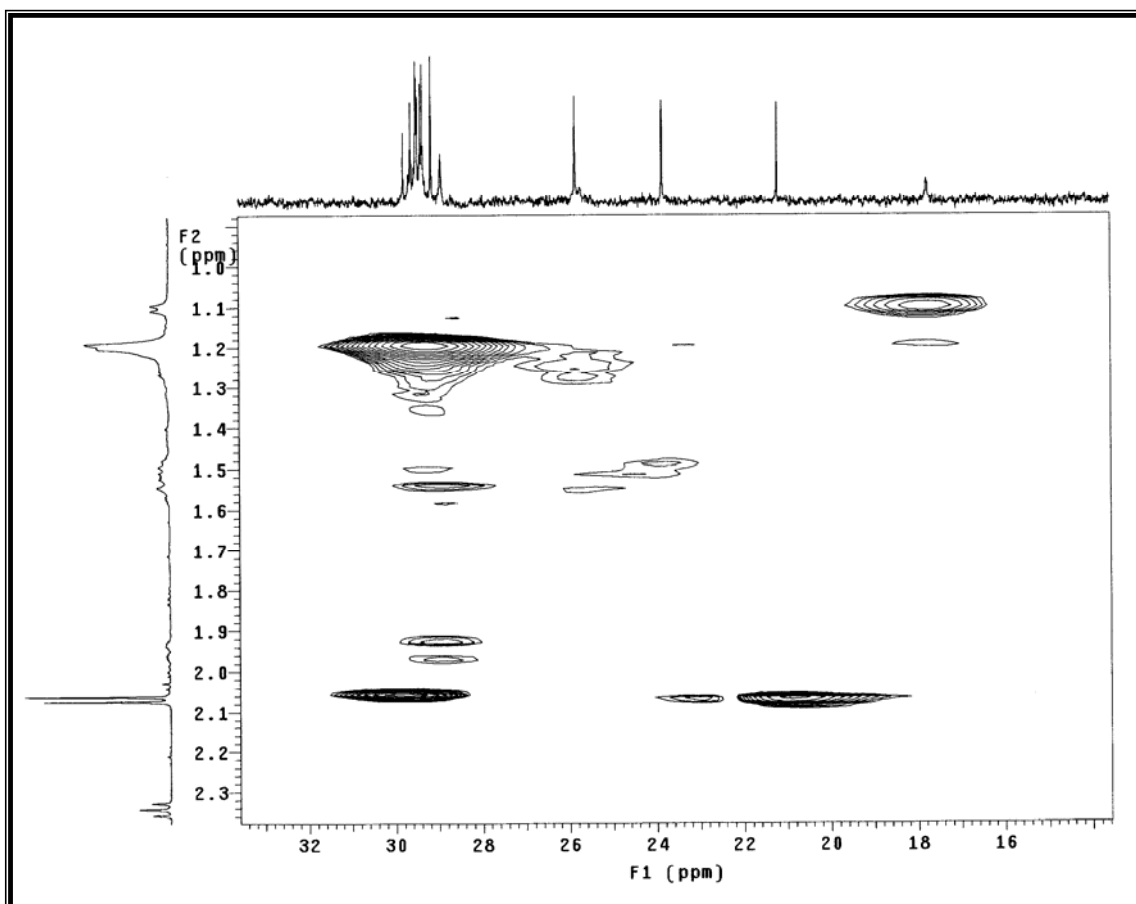


**Espectro 27.** Ampliação do espectro 26 ( $\delta$  20,0–70,0) do alcalóide **20**

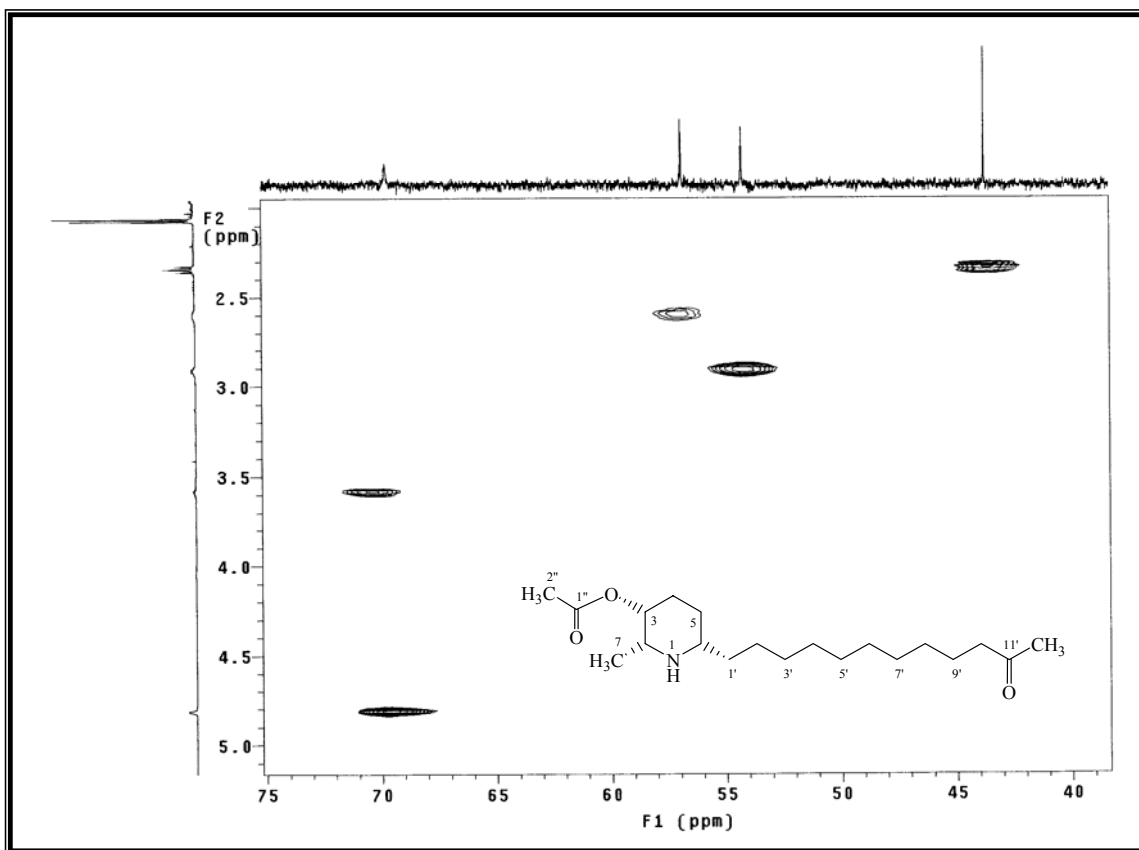


**Espectro 28.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide **20**

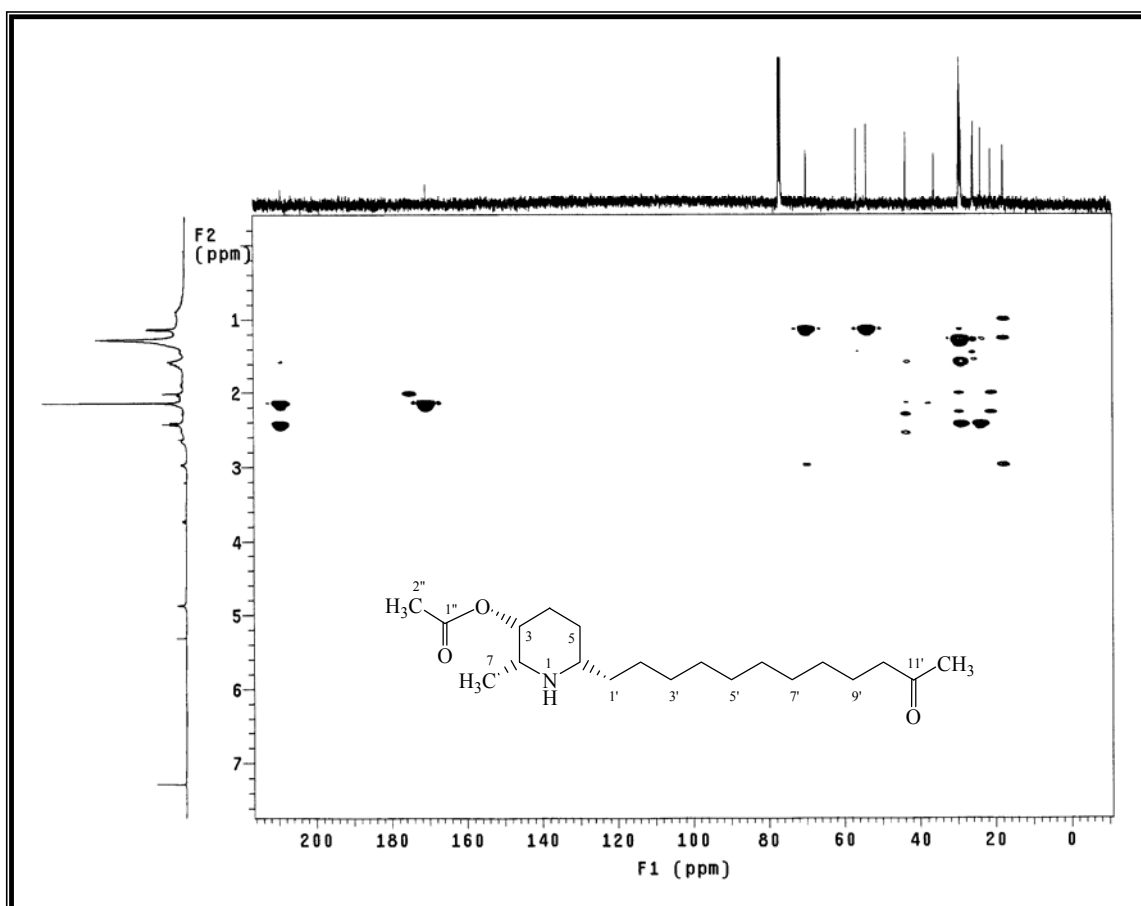




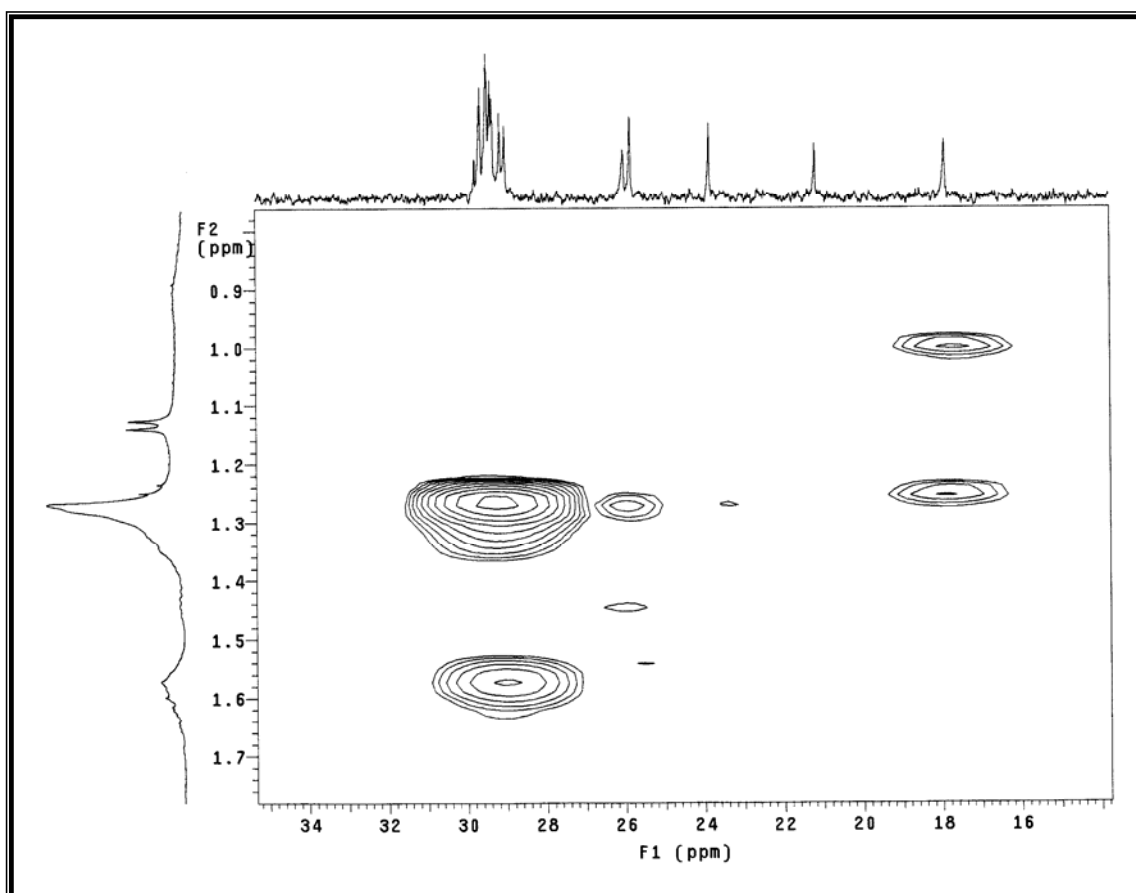
**Espectro 29.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  16,0–32,0) do alcalóide **20**



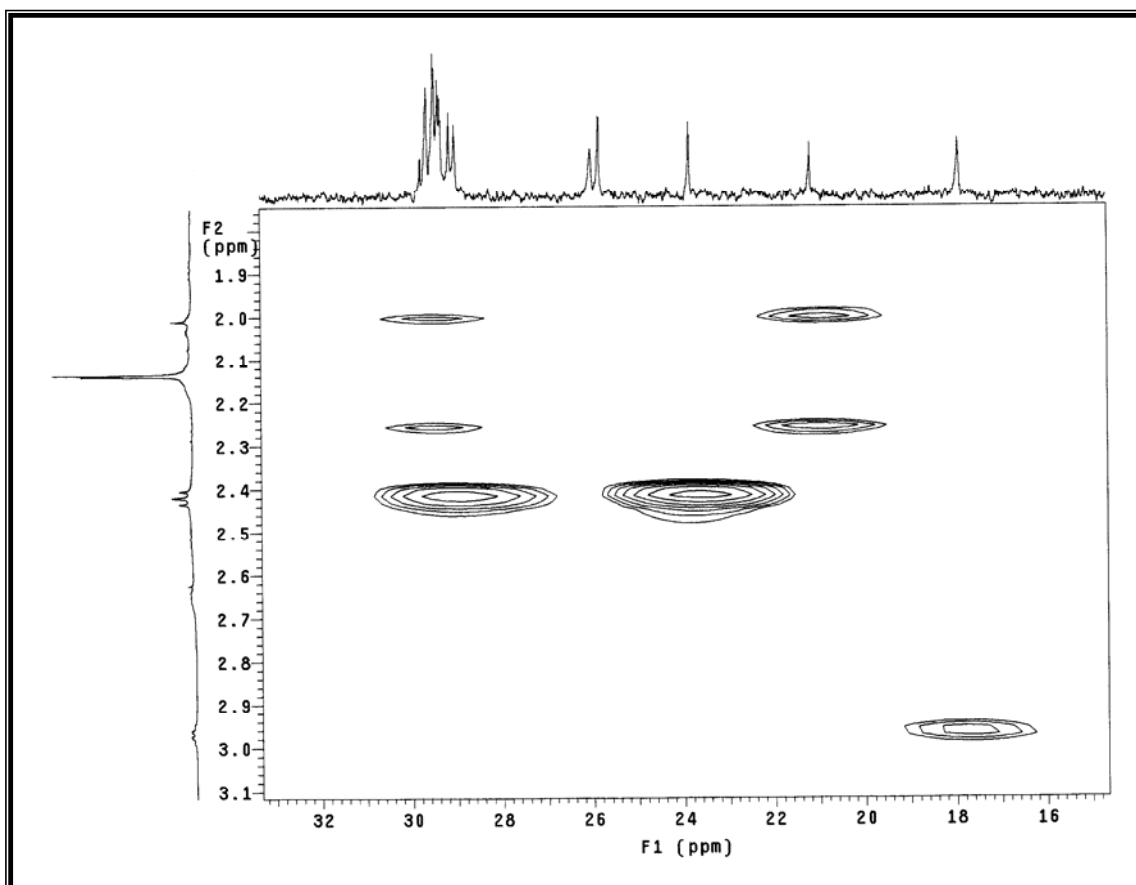
**Espectro 30.** Mapa de contorno gHMQC ( $\delta$  40,0–75,0) do alcalóide **20**



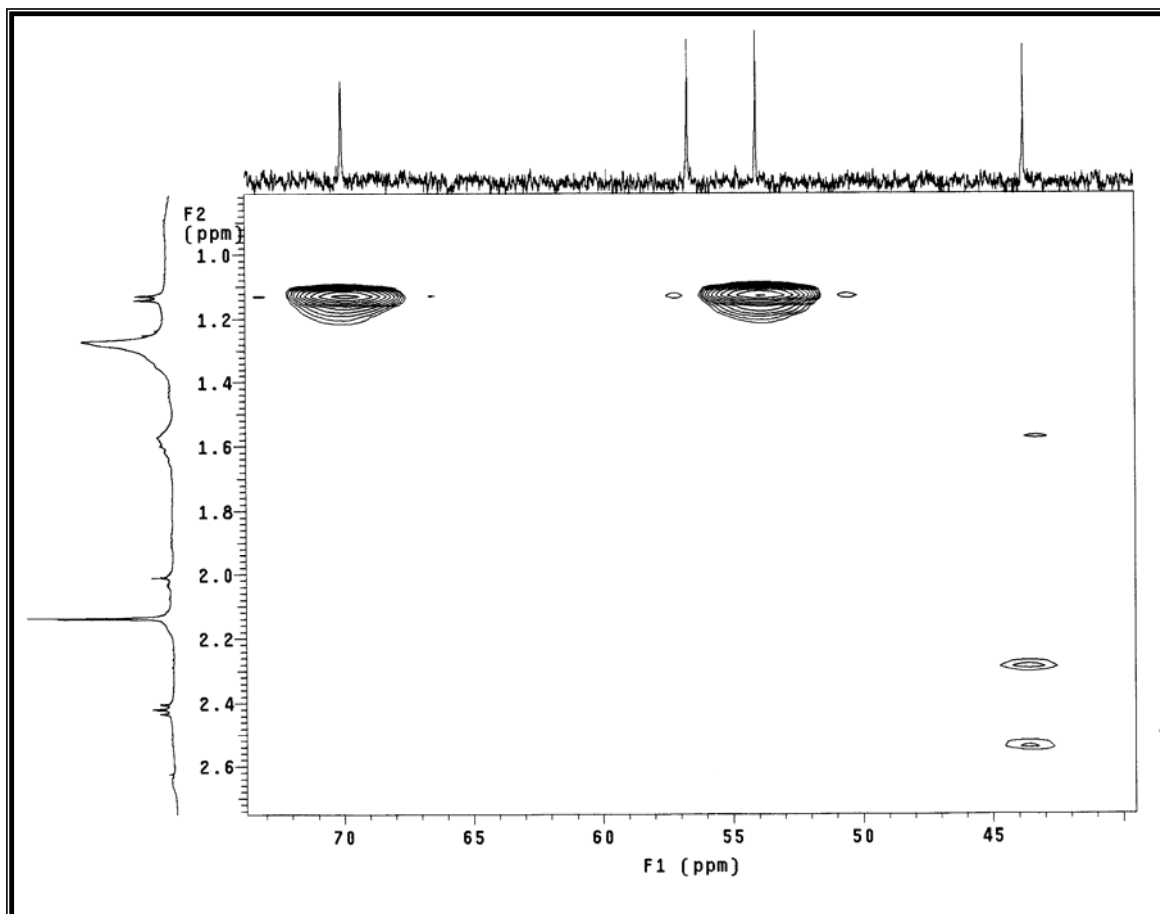
**Espectro 31.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide **20**



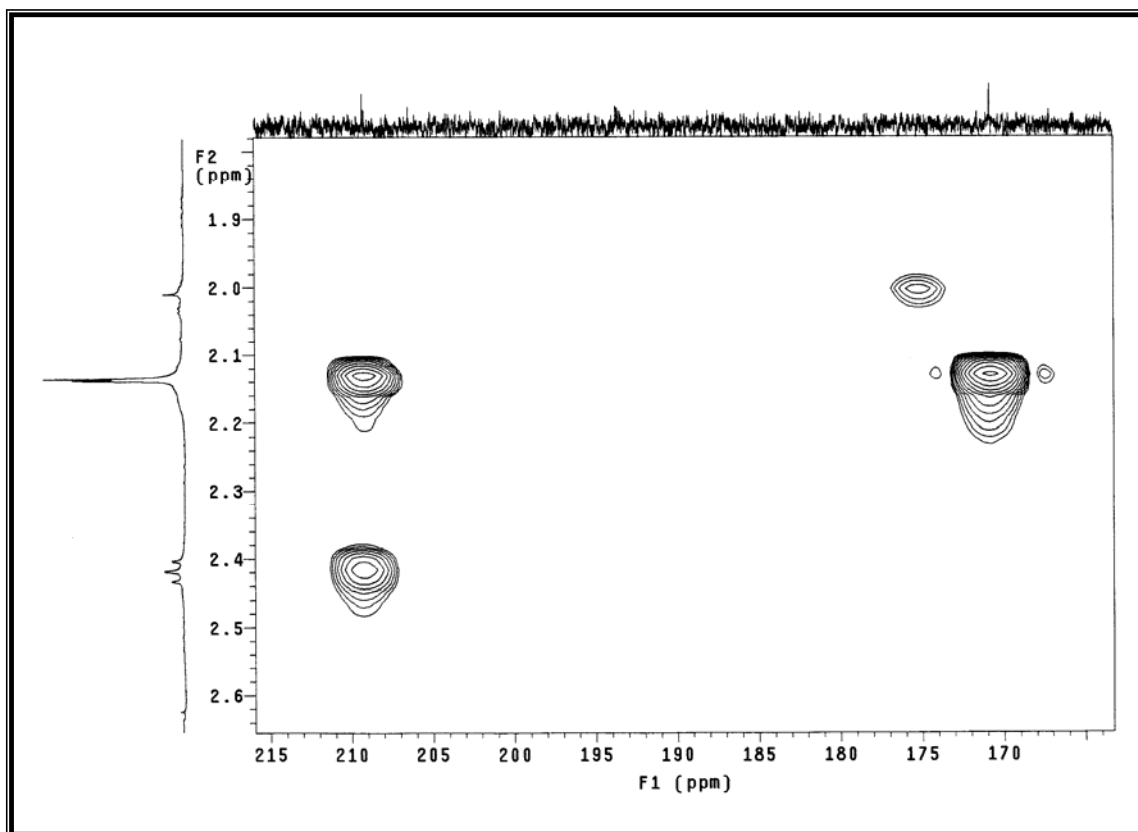
**Espectro 32.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  16,0–34,0), do alcalóide **20**



**Espectro 33.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  16,0–32,0) do alcalóide **20**

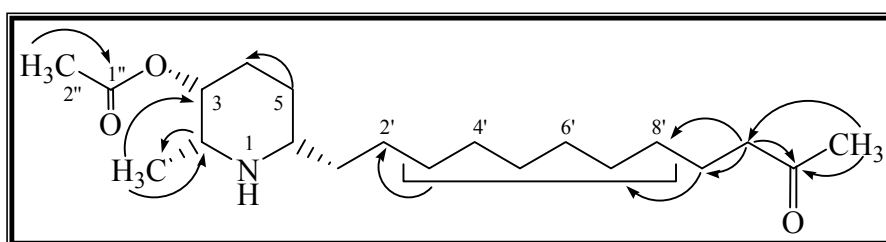


**Espectro 34.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  45,0–70,0) do alcalóide **20**



**Espectro 35.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  170,0–215,0) do alcalóide **20**

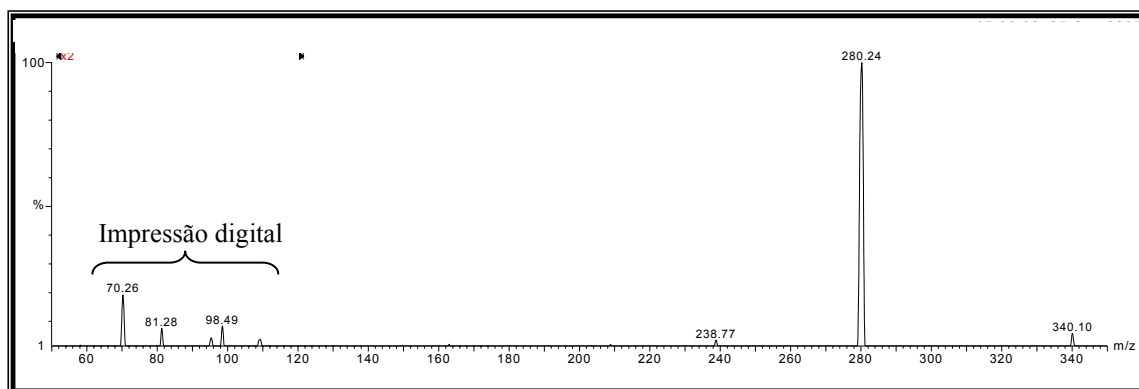
Na Figura 22 são mostradas algumas correlações  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$ , obtidas do mapa de contorno gHMBC do alcalóide **20**.



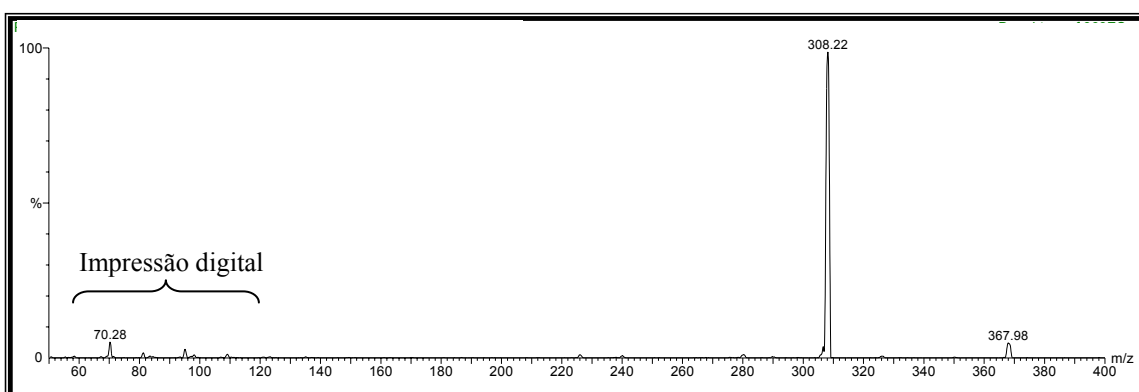
**Figura 22.** Correlações  $^1\text{H}$ – $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide **20**

A Análise do espectro de massas (Espectro 36), juntamente com os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT, levaram a propor a fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{NO}_2$ . O experimento foi realizado no modo positivo com ionização por *electrospray* (IES), com a amostra solubilizada em  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1). O espectro tem como pico do íon *quasi*-molecular

$[M + H]^+$  em  $m/z = 340$  e pico base em  $m/z = 280$ , estes dados confirmavam o valor da cadeia lateral em C-6 como sendo constituída por 12 átomos de carbono: dez grupos metilênicos, uma carbonila e um grupo metílico (Espectro 36). O fragmento do íon *quasi*-molecular em  $m/z = 280$  foi atribuído à eliminação neutra de uma molécula de água ( $[M + H - H_2O]^+$ ). Também foi possível observar a existência de um homólogo superior do alcalóide **20** com massa molecular 367 que possui dois grupos metilênicos a mais (28 uma), evidenciado pelo pico do íon *quasi*-molecular  $m/z = 368$ , que corresponde a  $[M + H]^+$  (Espectro 37). Este foi submetido ao EM/EM apresentou fragmentação com perda da acetila semelhante a perda de água do alcalóide **20** (Figura 21).



**Espectro 36.** IES-EM/EM íon *quasi*-molecular  $m/z = 340$  do alcalóide **20**

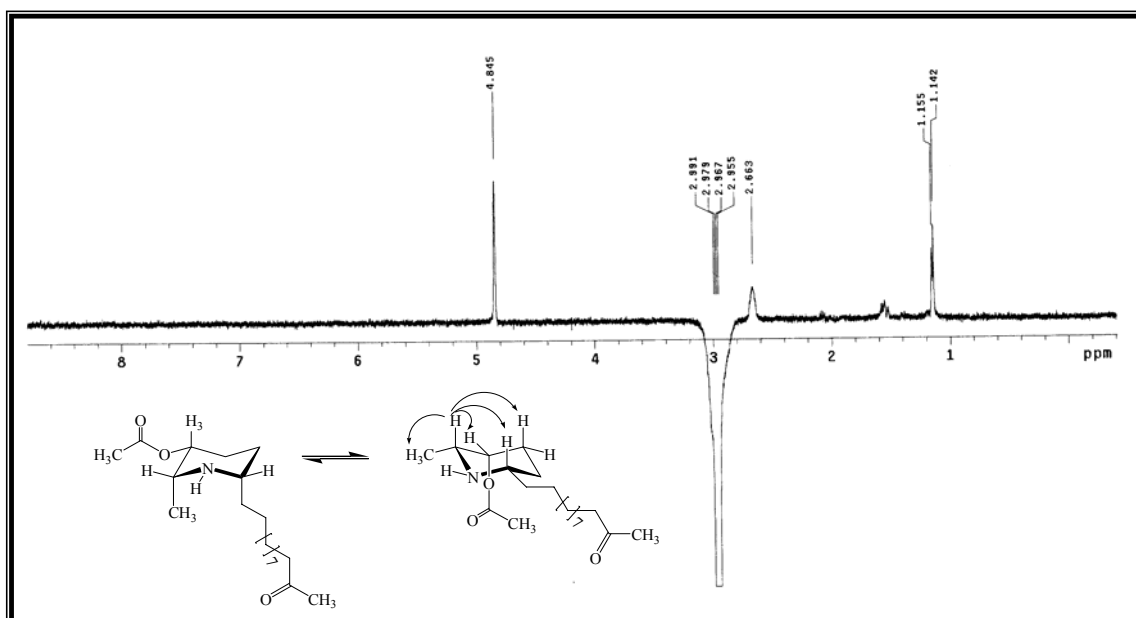


**Espectro 37.** IES-EM/EM íon *quasi*-molecular  $m/z = 326$ , homólogo do alcalóide **20**



## Proposta de configuração relativa para o alcalóide 20

A configuração relativa do alcalóide **20** foi proposta com base no experimento de NOESY 1D (Espectro 38). Quando irradiado o hidrogênio H-2 ( $\delta$  2,71), foi possível observar as correlações com os hidrogênios H-3, H-4b e H-7 ( $\delta$  3,47; 1,41 e 1,05 respectivamente), indicando que esses estão do mesmo lado, abaixo ou acima (alfa ou beta) ao plano do anel. A análise das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3, indica acoplamento axial/equatorial ( $J_{ae} = 1$  Hz;  $\alpha = 60^\circ$ ), quando comparado com a curva de Karplus.

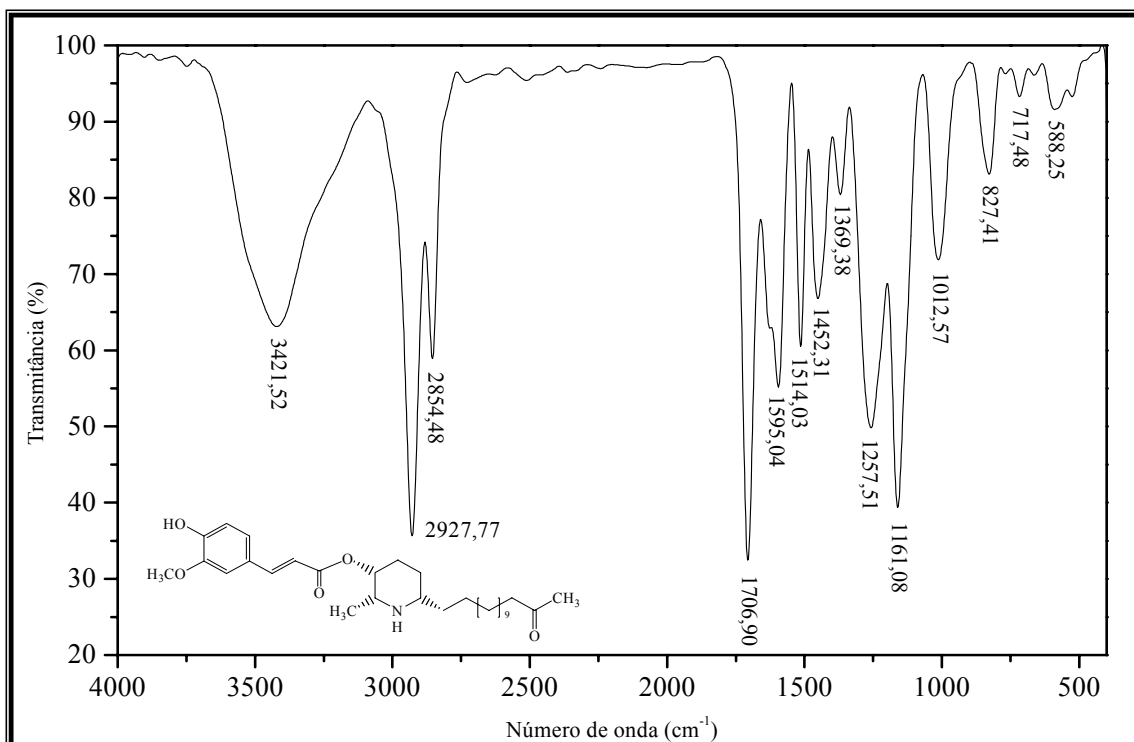


**Espectro 38.** Espectro de NOESY 1D (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), irradiando o hidrogênio  $\delta$  2,91, do alcalóide **20**

### 4.2.3. Elucidação estrutural do alcalóide 18

O alcalóide **18** foi isolado como um óleo de coloração amarelo intenso. A análise do espectro na região do IV permitiu identificar uma banda em  $3422\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento dos grupos N-H e O-H (provavelmente sobrepostos). Os estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos C-H alifáticos foram visíveis em  $\nu_{as} 2924$  e  $\nu_s 2854\text{ cm}^{-1}$  respectivamente. Em  $1707\text{ cm}^{-1}$  foi observado banda referente ao estiramento do grupo C=O, seguida de uma banda em  $\nu 1595$  atribuída aos

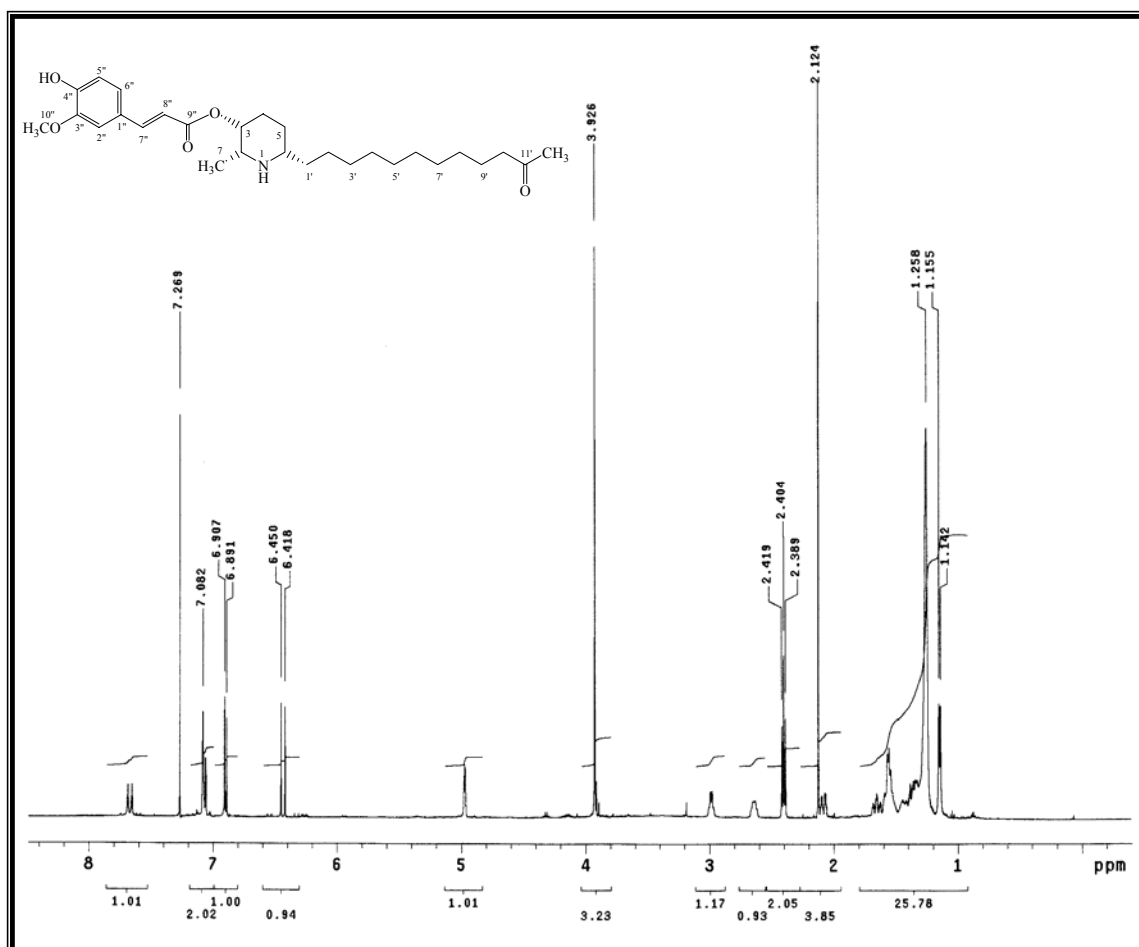
estiramentos das ligações C=C do anel aromático. Em  $\nu$  1452 e  $\nu$  1369  $\text{cm}^{-1}$  observaram-se as bandas relativas às deformações angulares  $\delta_{\text{as}}$  e  $\delta_{\text{s}}$  dos grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$ , respectivamente e em  $\nu$  1258  $\text{cm}^{-1}$  a banda de deformação angular no plano de C–H, seguida da banda em  $\nu$  1161  $\text{cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento C–O (Espectro 39).



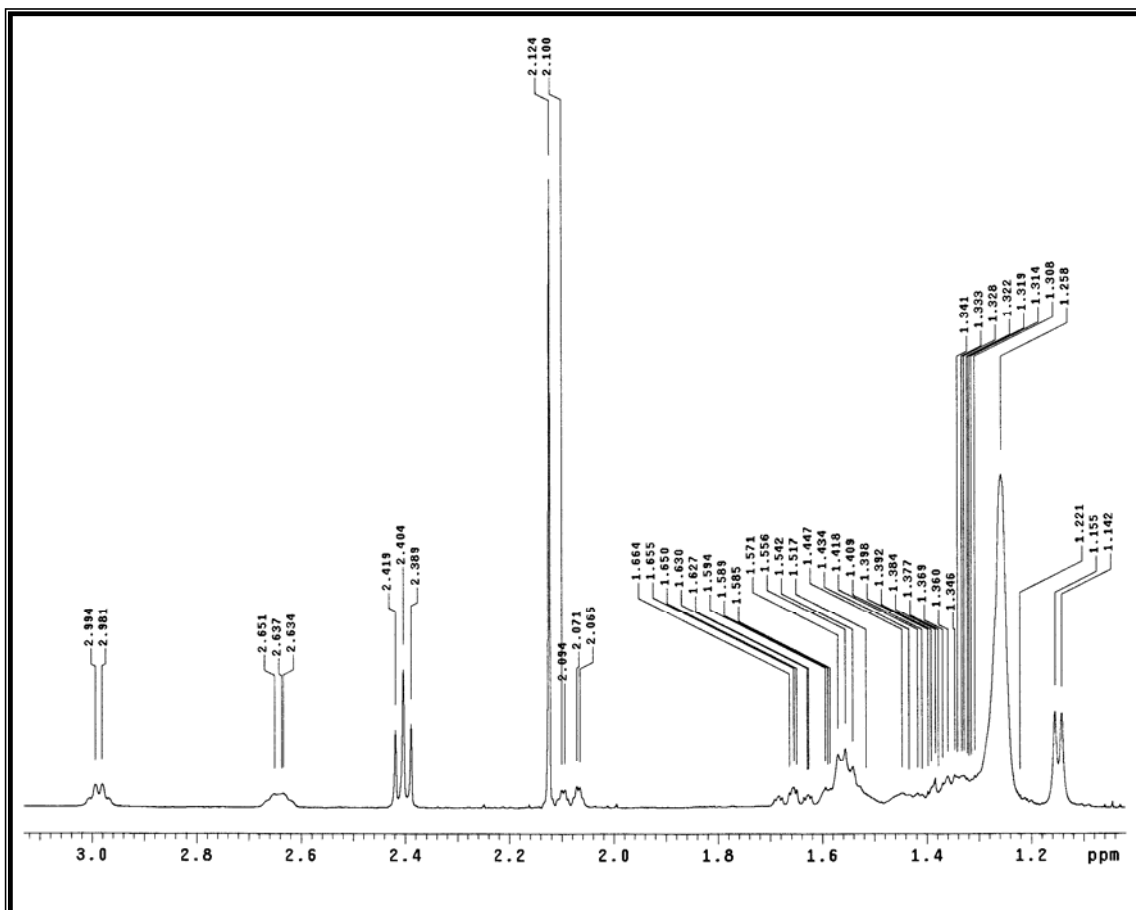
**Espectro 39.** Espectro na região do IV (KBr), do alcalóide **18**

A análise do alcalóide **18** por RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 40) permitiu a identificação dos sinais em  $\delta$  7,67 (1H, d,  $J = 16$  Hz) e  $\delta$  6,43 (1H, d,  $J = 16$  Hz) que foram atribuídos a dois hidrogênios olefinicos vicinais (H-7" e H-8") com configuração *trans*. Os sinais em  $\delta$  7,08 (1H, d,  $J = 2$  Hz),  $\delta$  7,07 (1H, dd,  $J = 2,0$  e 8,0 Hz) e  $\delta$  6,90 (1H, d,  $J = 8,0$  Hz), foram atribuídos a um sistema aromático 1,3,4-trissubstituído. Pelas constantes de acoplamento medidas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Espectro 40, Tabela 6) e pelo mapa de contorno  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  gCOSY (Espectro 44), estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios H-2", H-6" e H-5", respectivamente. O sinal em  $\delta$  4,98 (1H, sl) foi caracterizado para H-3. Em  $\delta$  3,93 observou-se um sinal integrando para três hidrogênios, característico de um grupo metoxila ligado ao anel aromático o qual foi atribuído a H-10". Os demais sinais de RMN de  $^1\text{H}$  são característicos do núcleo

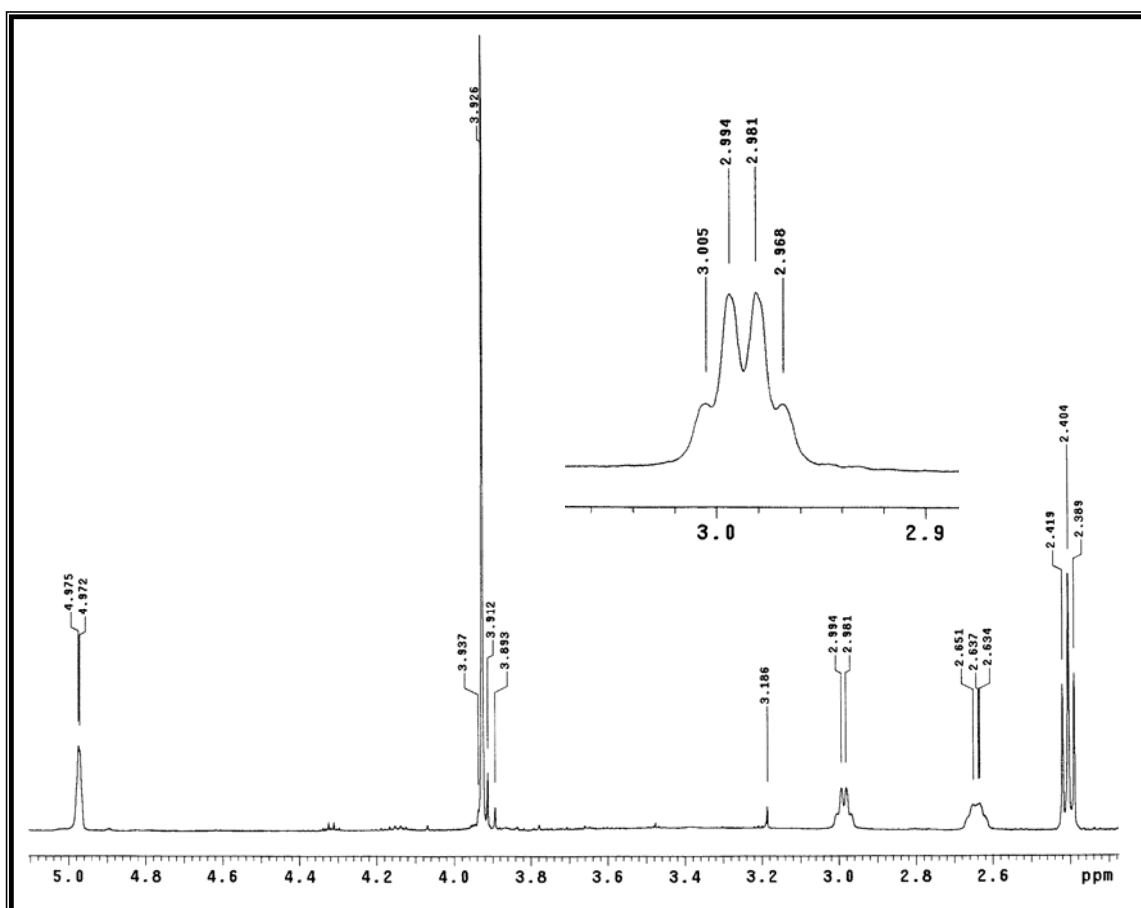
piperidínico 2,6-dissubstituído, semelhantes aos da cassina **1**, cujas atribuições estão descritas nas Tabelas 6 e 7.



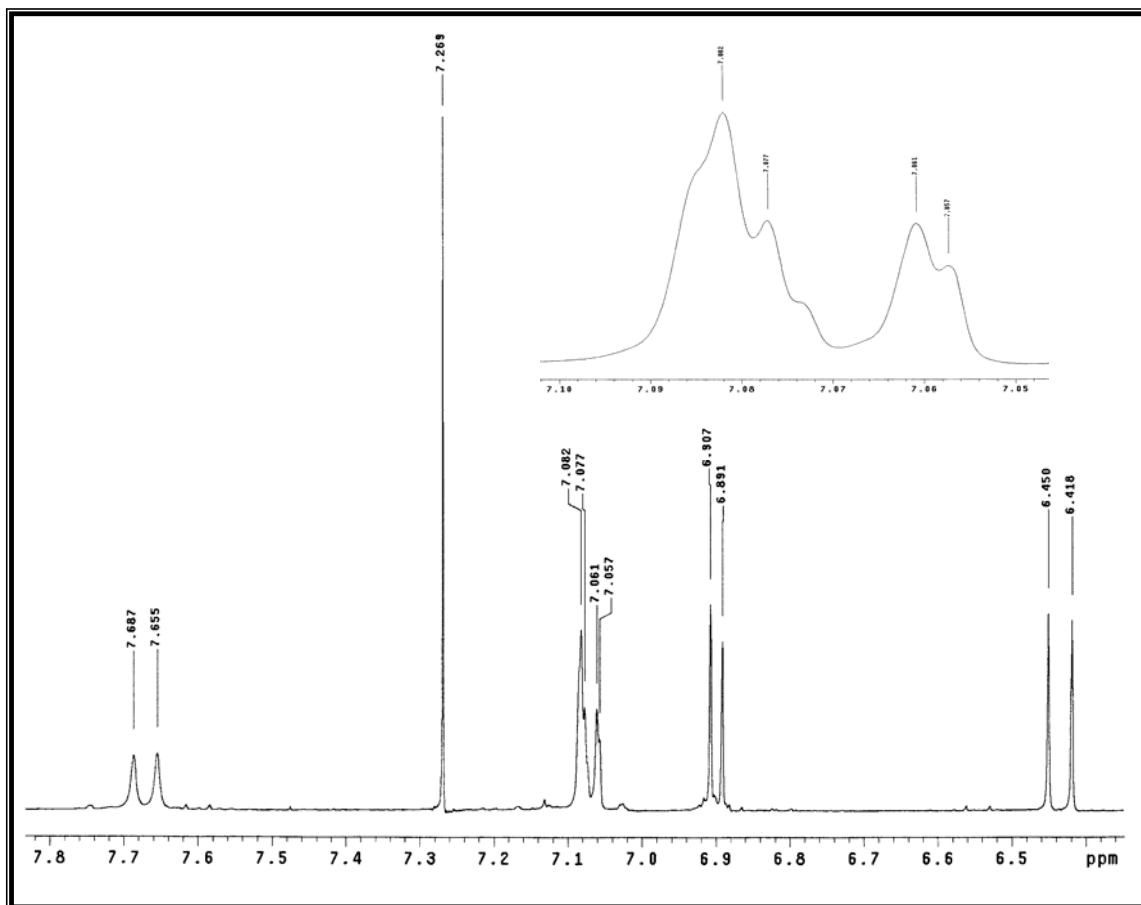
**Espectro 40.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do alcalóide **18**



**Espectro 41.** Ampliação parcial ( $\delta$  1,1 – 3,0) do espectro 40, alcalóide **18**



**Espectro 42.** Ampliação parcial ( $\delta$  2,5 – 5,0) do espectro 40, alcalóide **18**

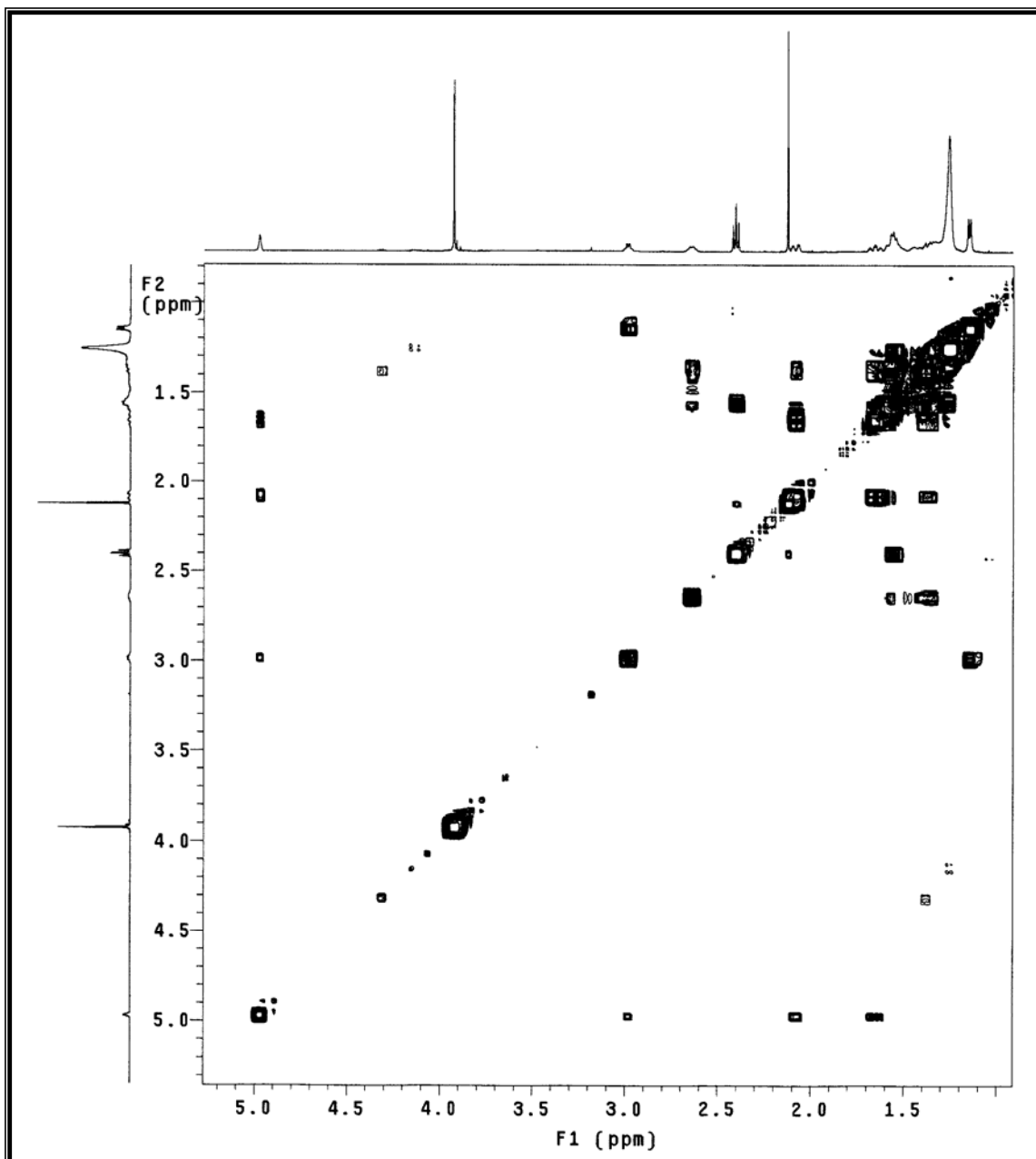


**Espectro 43.** Ampliação parcial ( $\delta$  6,4 – 7,8) do espectro 40, alcalóide 18

**Tabela 6.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e gCOSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide **18**<sup>a, b, c</sup>

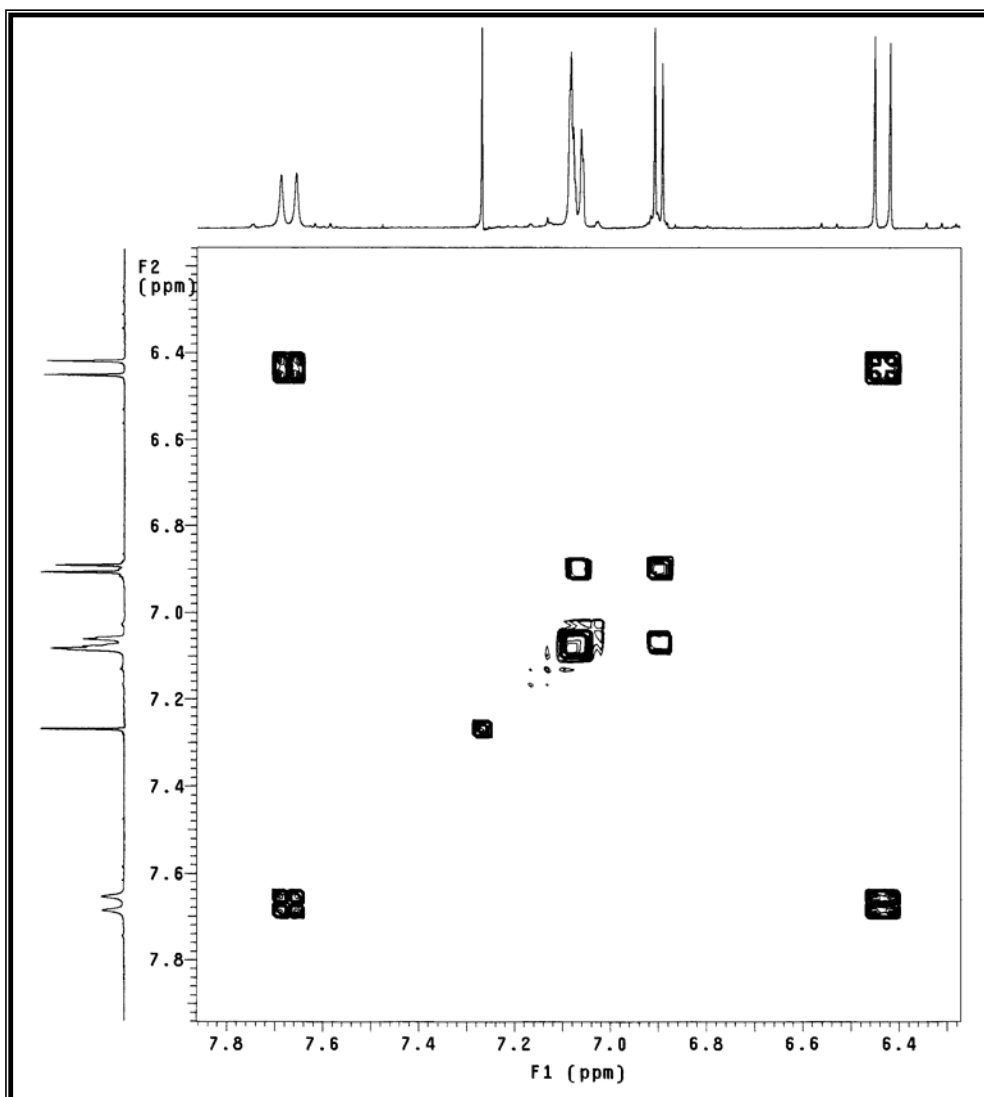
Posição	$\delta_{\text{H}}$ , m, <i>J</i>	gCOSY
2	2,99 dq (1,5; 6,5)	H-7
3	4,98 sl (1,5)	H-2, H-4a, H-4b
4a	2,07 m	H-3, H-4b, H-5a, H-5b
4b	1,65 m	H-3, H-4a, H-5a, H-5b
5a	1,59 m	H-4a, H-4b, H-5b, H-6
5b	1,38 m	H-4a, H-4b, H-5a, H-6
6	2,64 m	H-5a, H-5b
7	1,15 d (6,5)	H-2
1'	1,56 m	H-2'-8'
2'- 8'	1,26 sl	H-1', H-9'
9'	1,56 m	H-2'-8', H-10'
10'	2,40 t (7,5)	H-9', H-12'
11'	-----	-----
12'	2,08 s	H-10'
1''	-----	-----
2''	7,08 d (2,0)	-----
3''	-----	-----
4''	-----	-----
5''	6,90 d (8,0)	H-6''
6''	7,07 dd (2,0; 8,0)	H-5''
7''	7,67 d (16,0)	H-8''
8''	6,43 d (16,0)	H-7''
9''	-----	-----
10''	3,93 s	-----

<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno<sup>b</sup> Constantes de acoplamento (*J*), expressas em Hz, <sup>c</sup> m = multiplicidade



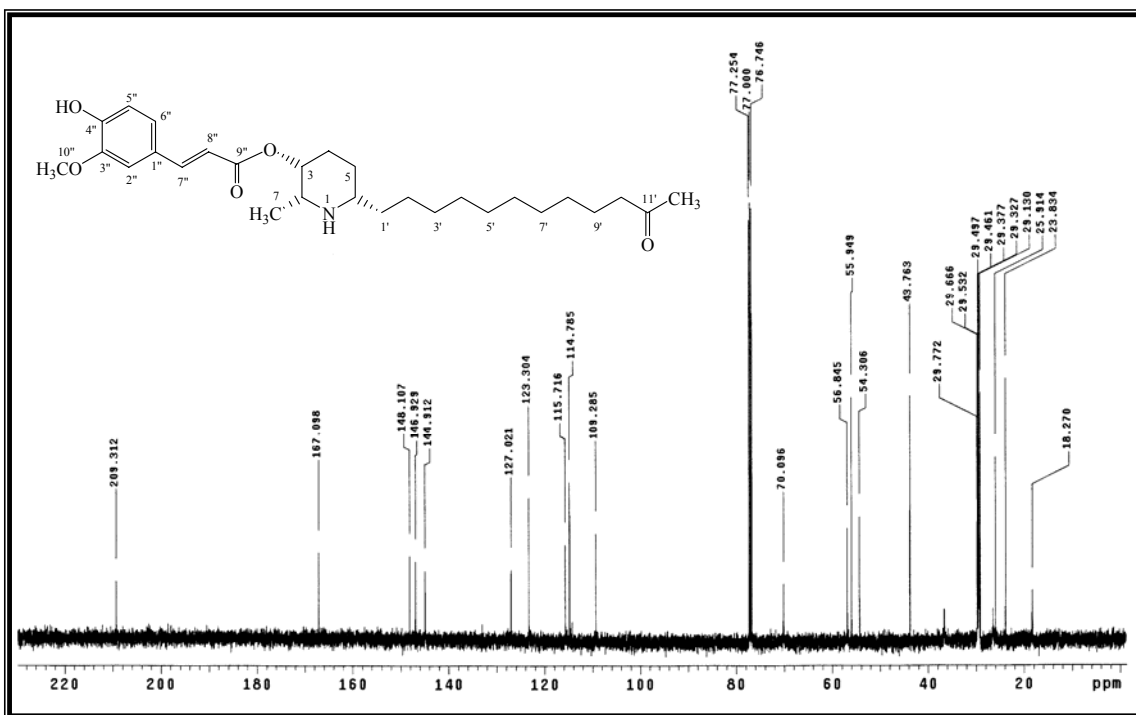
**Espectro 44.** Mapa de contorno gCOSY ( $\delta$  1,0–5,0) do alcalóide 18



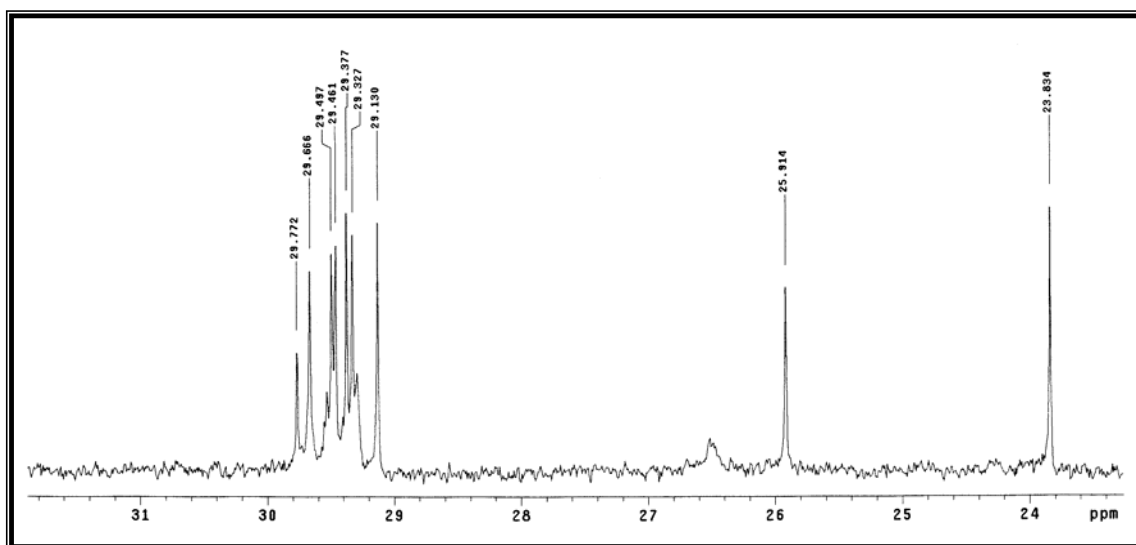


**Espectro 45.** Mapa de contorno gCOSY ( $\delta$  6,3–7,8) do alcalóide **18**

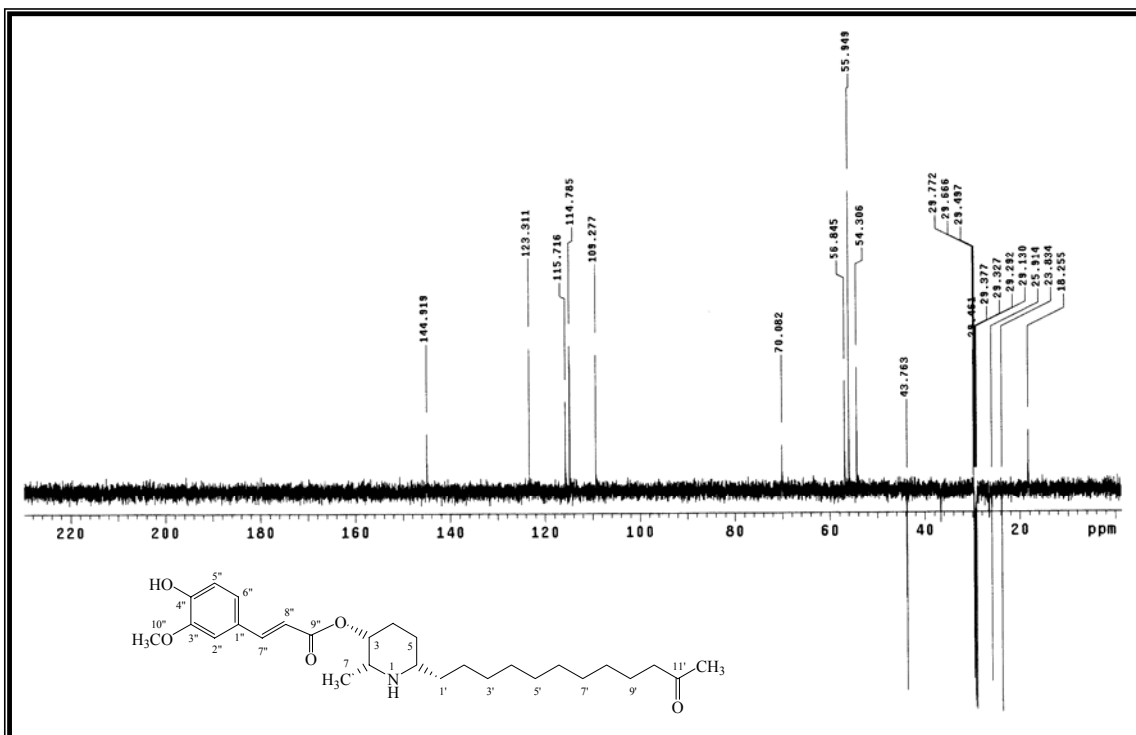
Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Espectro 46) e DEPT 135 (Espectro 48) mostraram a presença de 5 carbonos quaternários, 8 carbonos metínicos, 6 carbonos metilênicos (vários sinais aparecem sobrepostos na região de  $\delta$  29,1 – 29,7) e 3 carbonos metílicos. A atribuição dos carbonos do alcalóide **18** está compilada na Tabela 5 e estão em conformidade com os dados dos mapas de contorno gHMQC (Espectros 50, 51 e 52) e gHMBC (Espectros 53, 54 e 55).



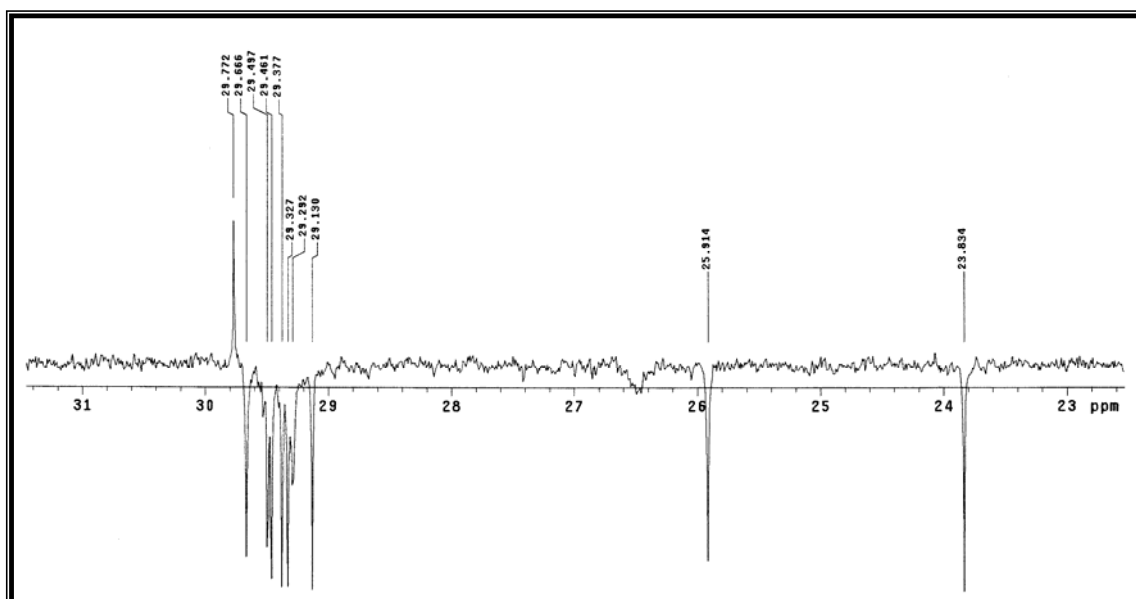
**Espectro 46.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do alcalóide **18**



**Espectro 47.** Ampliação parcial ( $\delta$  24,0–31,0) do espectro 46, alcalóide **18**



**Espectro 48.** Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do alcalóide **18**

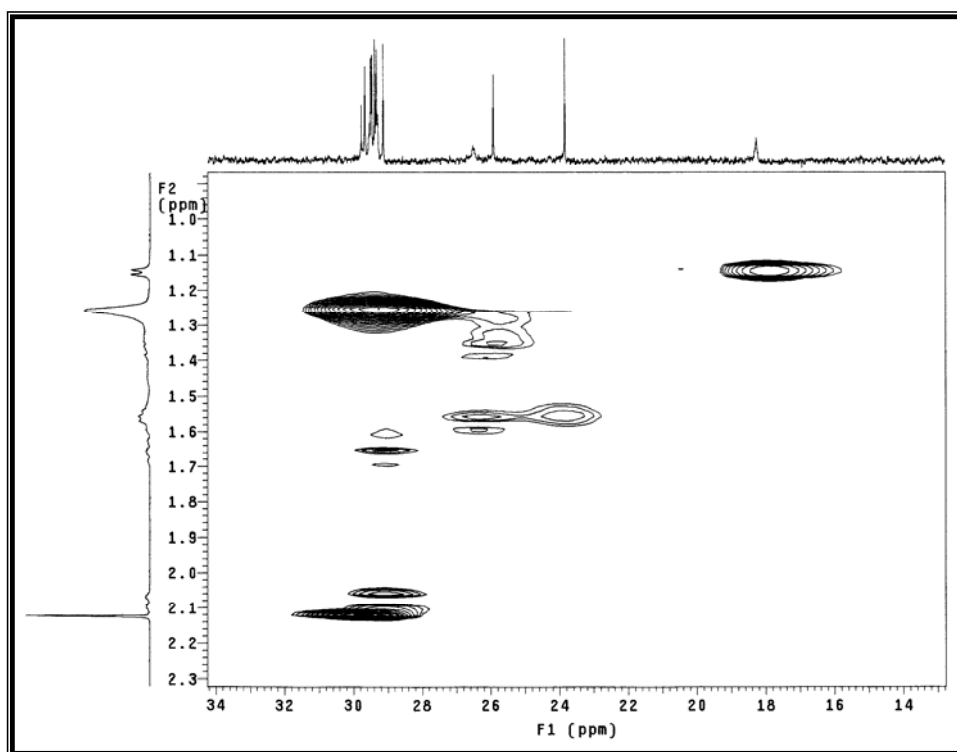


**Espectro 49.** Ampliação parcial ( $\delta$  23,0–31,0) do espectro 48, alcalóide **18**

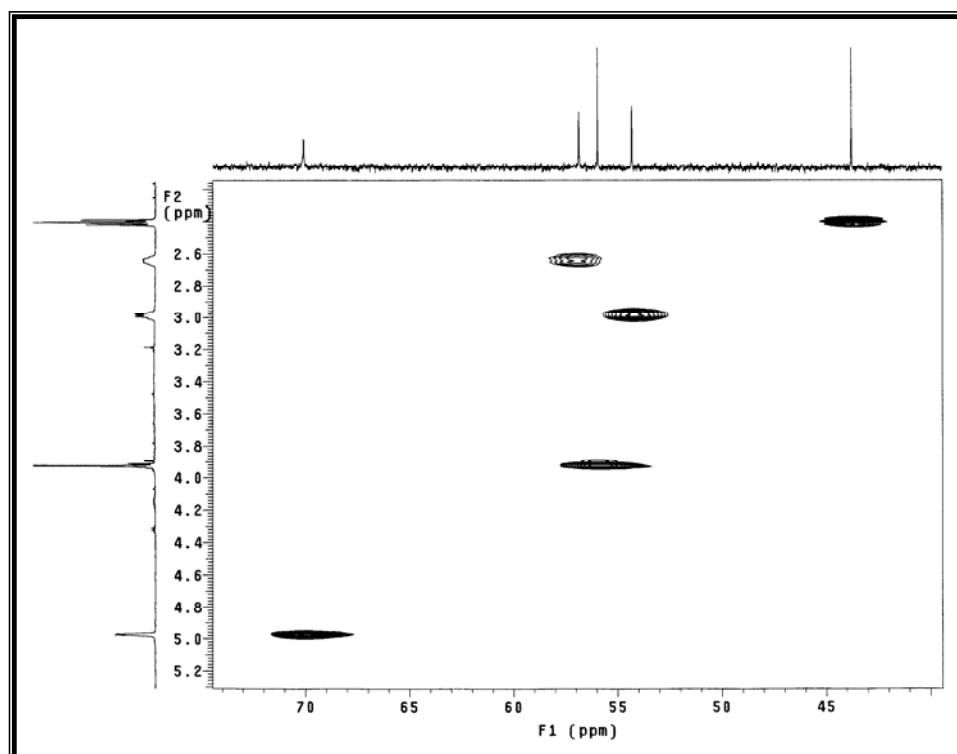
**Tabela 7.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide **18**<sup>a</sup>

Posição	$\delta_{\text{C}}$	DEPT 135	gHMQC	gHMBC
2	54,3	CH	2,99	H-7
3	70,1	CH	4,98	H-2, H-7
4	29,1	CH <sub>2</sub>	2,07; 1,65	H-5a, H-5b,
5	25,9	CH <sub>2</sub>	1,38; 1,59	no
6	56,8	CH	2,64	no
7	18,3	CH <sub>3</sub>	1,15	H-2
1'	37,0	CH <sub>2</sub>	no	no
2'	26,5	CH <sub>2</sub>	1,28	no
3'-8'	29,3-29,7	CH <sub>2</sub>	1,26	H-1', H-3'-8', H-9'
9'	23,8	CH <sub>2</sub>	1,56	H-3'-8', H-10'
10'	43,8	CH <sub>2</sub>	2,33	H-3'-8', H-9', H-12'
11'	209,4	C	-----	H-9', H-10', H-12'
12'	29,8	CH <sub>3</sub>	2,12	H-10'
1''	127,0	C	-----	H-2'', H-5'', H-6'', H-8''
2''	109,3	CH	7,08	H-6'', H-7''
3''	146,9	C	-----	H-2'', H-5'', H-10''
4''	148,1	C	-----	H-2'', H-5'', H-6''
5''	114,8	CH	6,90	H-6''
6''	123,3	CH	7,07	H-2'', H-5'', H-7''
7''	144,9	CH	7,67	H-2'', H-6''
8''	115,7	CH	6,43	-----
9''	167,0	C	-----	H-7'', H-8''
10''	55,9	CH <sub>3</sub>	3,93	-----

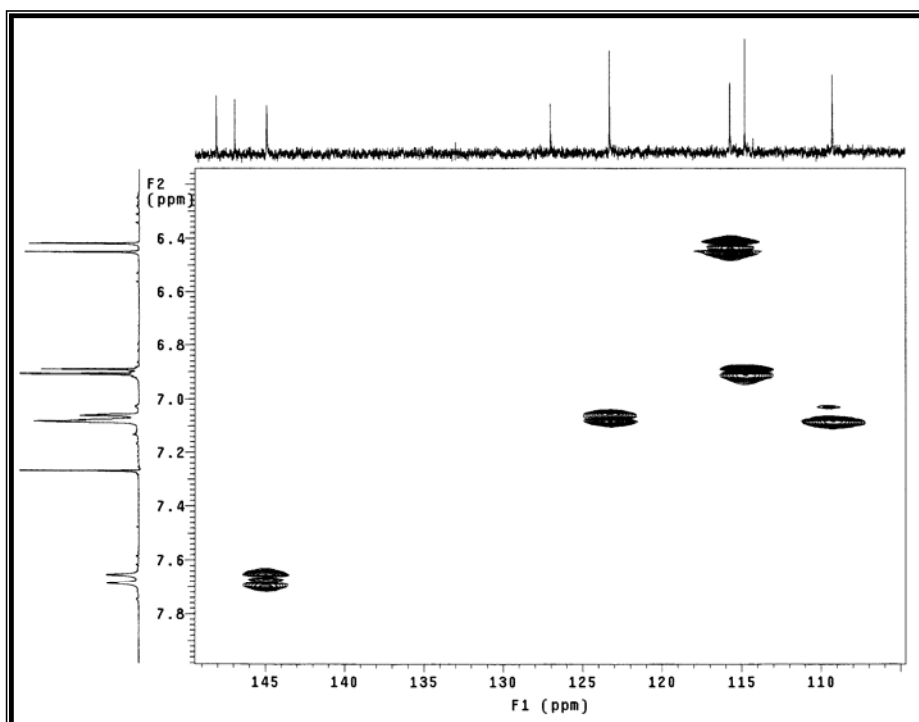
<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno  
no = não observado



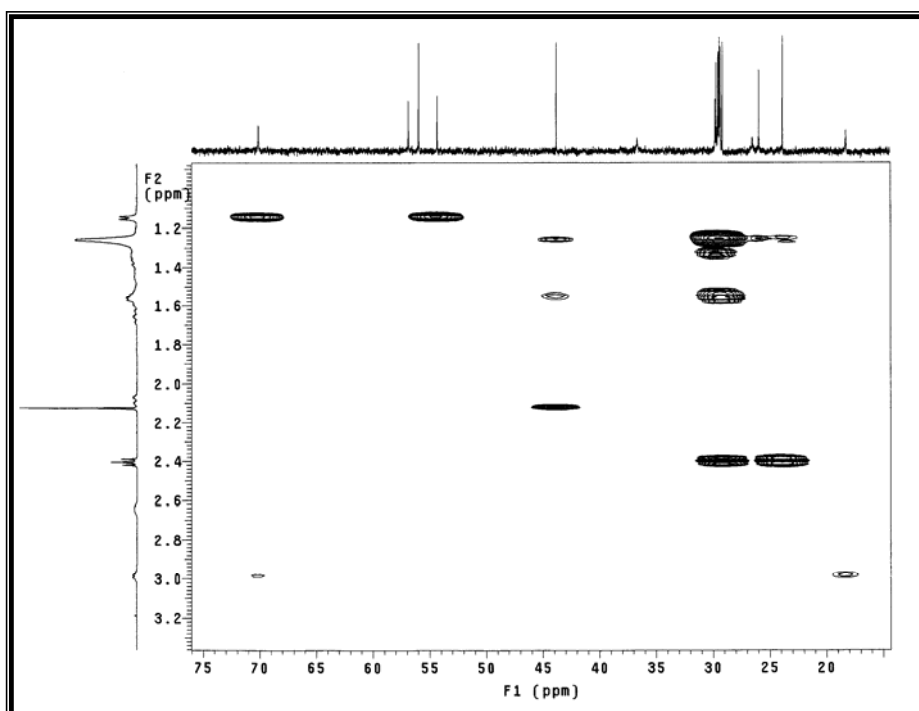
**Espectro 50.** Mapa de contorno gHMQC ( $\delta$  14,0–34,0; 500 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) do alcalóide 18



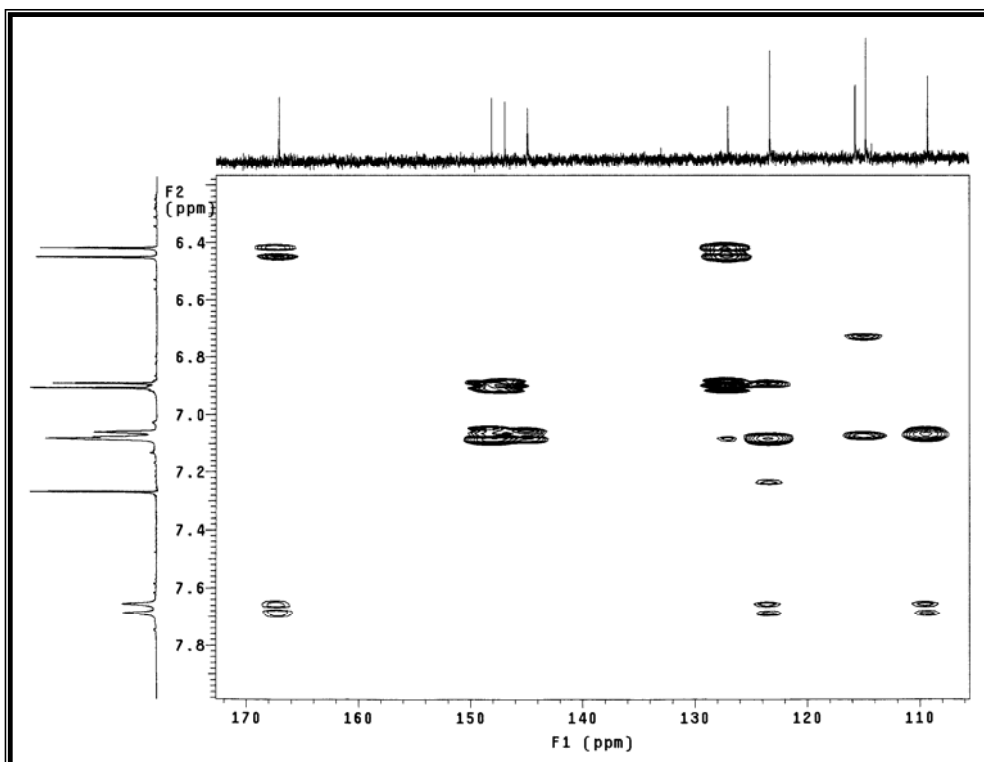
**Espectro 51.** Mapa de contorno gHMQC ( $\delta$  40,0–73,0) do alcalóide 18



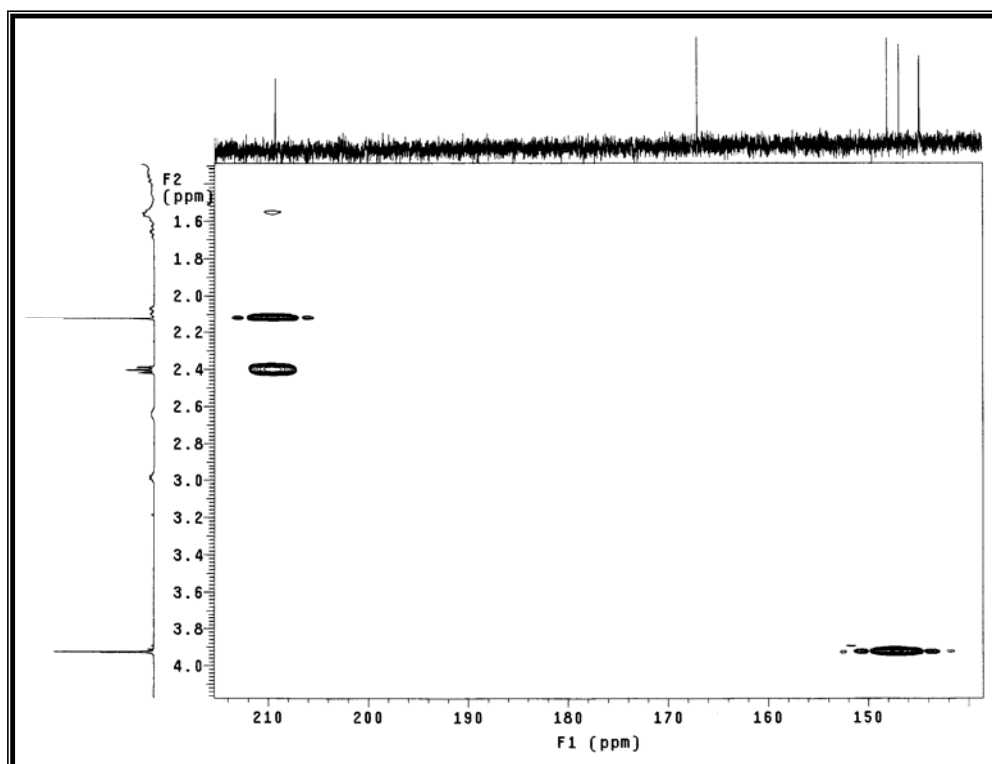
**Espectro 52.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  105,0–149,0) do alcalóide **18**



**Espectro 53.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  20,0–75,0) do alcalóide **18**

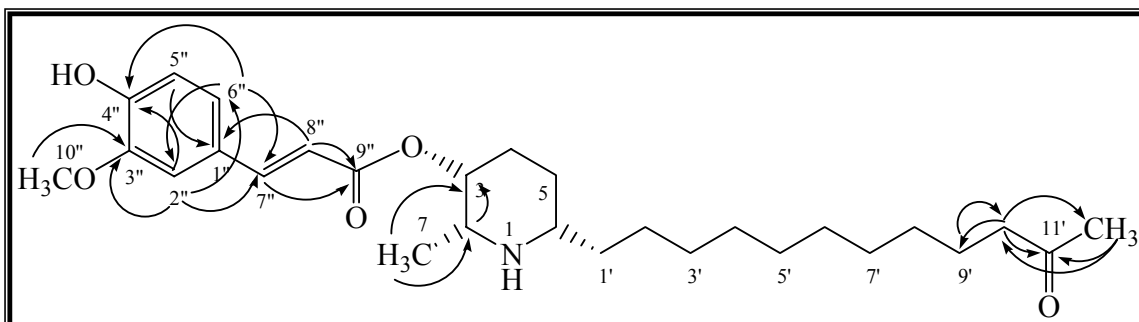


**Espectro 54.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  108,0–172,0) do alcalóide **18**



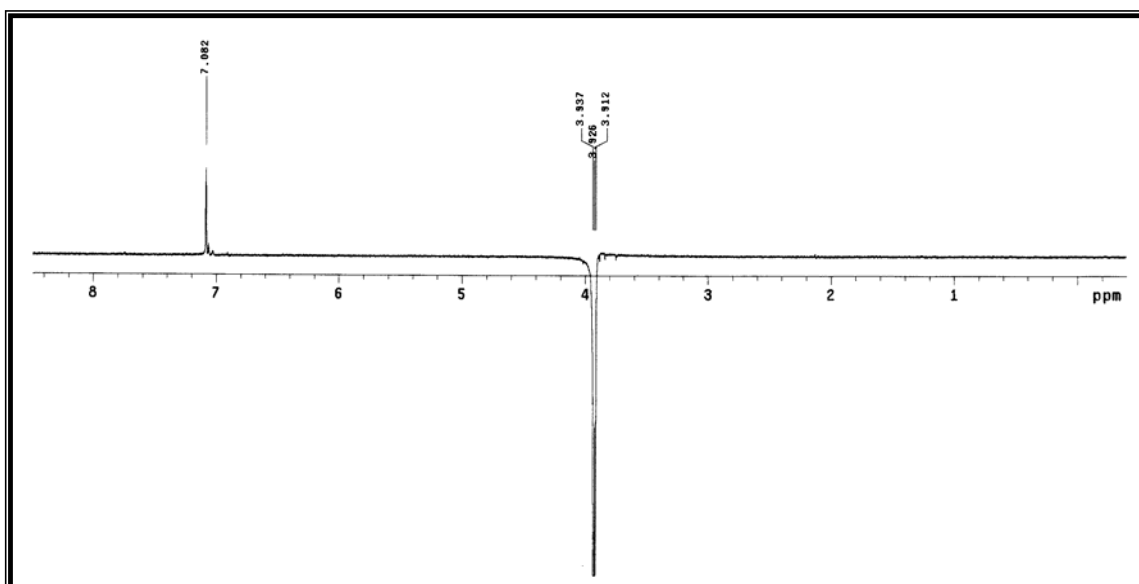
**Espectro 55.** Mapa de contorno gHMBC ( $\delta$  140,0–214,0) do alcalóide **18**

Na Figura 23 são mostradas algumas das correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ , observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide **18**.



**Figura 23.** Correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide **18**

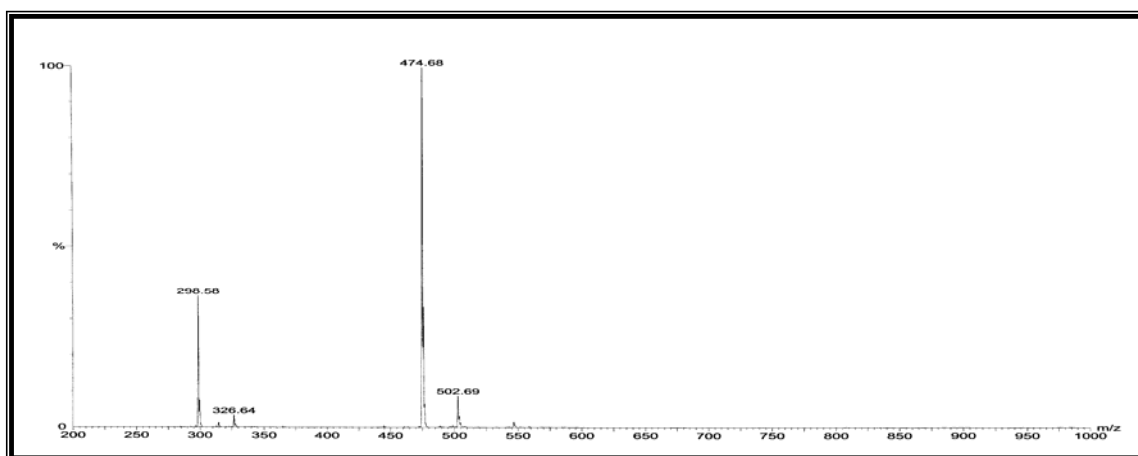
As posições da metoxila e da hidroxila, substituintes do anel aromático, foram estabelecidas pelo experimento de NOESY 1D (Espectro 56). Foram irradiados os hidrogênios da metoxila e observado apenas uma correlação com o hidrogênio H-2'', indicando assim que a metoxila encontra-se na posição 3 (*orto*) e a hidroxila na posição 4 (*para*), em relação ao substituinte olefínico. Este substituinte, com a metoxila na posição 3, é bastante conhecido na literatura (ácido ferúlico) e os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  são idênticos aos descritos (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1985).



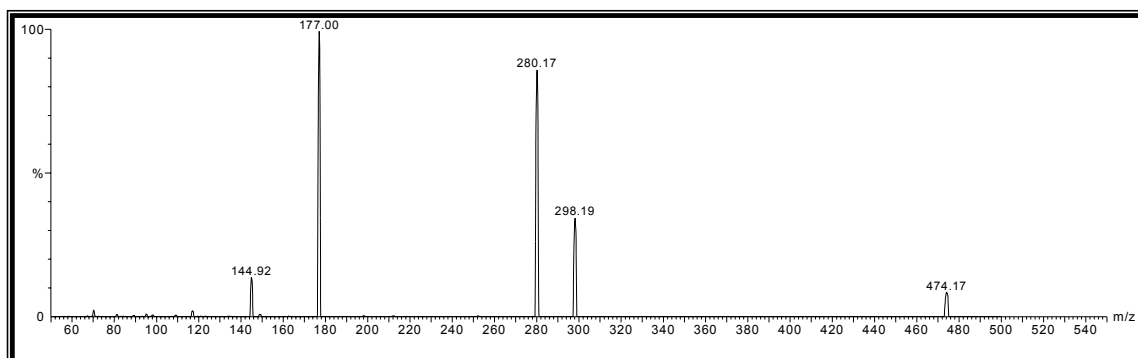
**Espectro 56.** Experimento de NOESY 1D (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), irradiando os hidrogênios do grupo metoxílico em  $\delta$  3,93 do alcalóide **18**



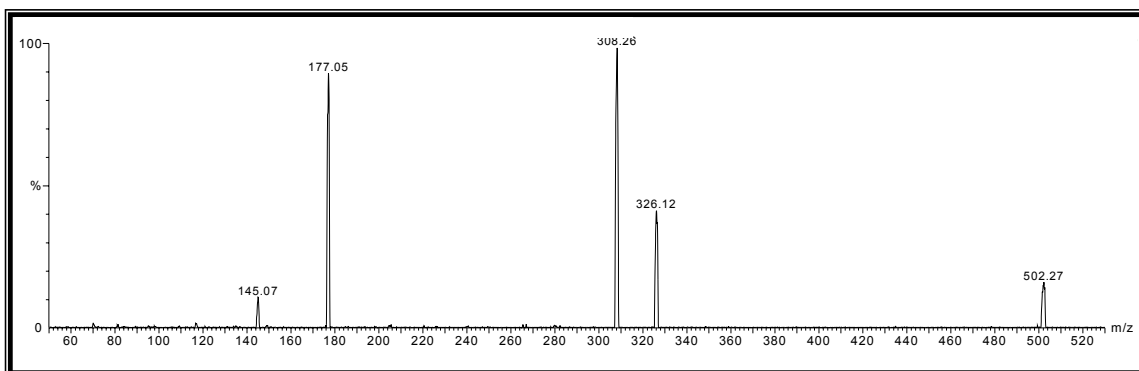
A Análise do espectro de massas (Espectro 40), RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT, conduziram à fórmula molecular  $\text{C}_{28}\text{H}_{43}\text{NO}_5$ . O experimento foi realizado no modo IES positivo com a amostra solubilizada em  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (4:1). O espectro apresentou o pico base em  $m/z = 474$ , que corresponde ao pico do íon *quasi*-molecular  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (Espectro 57). Esse íon quando submetido EM apresenta fragmentos em  $m/z = 298$ , 280, 177 e 144 (Espectro 58), como mostra o esquema de fragmentação na Figura 24. Também foi possível observar que existe um homólogo dessa substância com massa molecular 501 que corresponde a dois metilenos a mais (28 uma), evidenciado pelo pico de íon *quasi*-molecular em 502 que corresponde a  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (Espectro 59). Esse pico quando submetido a EM apresentou fragmentação semelhante ao alcalóide **18** (Figura 24).



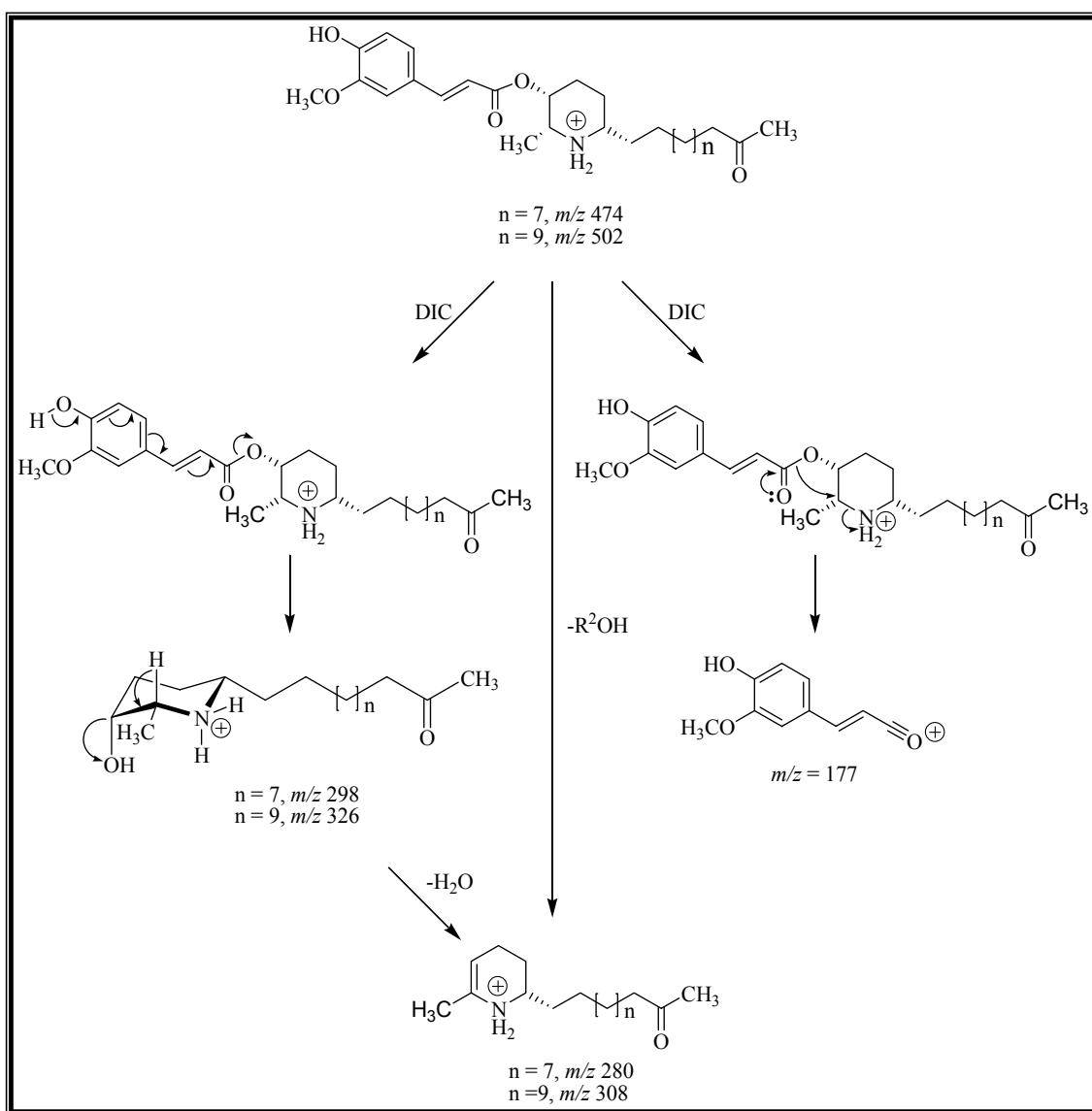
**Espectro 57.** Espectro de IES-EM (modo positivo) do alcalóide **18**



**Espectro 58.** Espectro de IES-EM/EM do íon *quasi*-molecular  $m/z = 474$  do alcalóide **18**



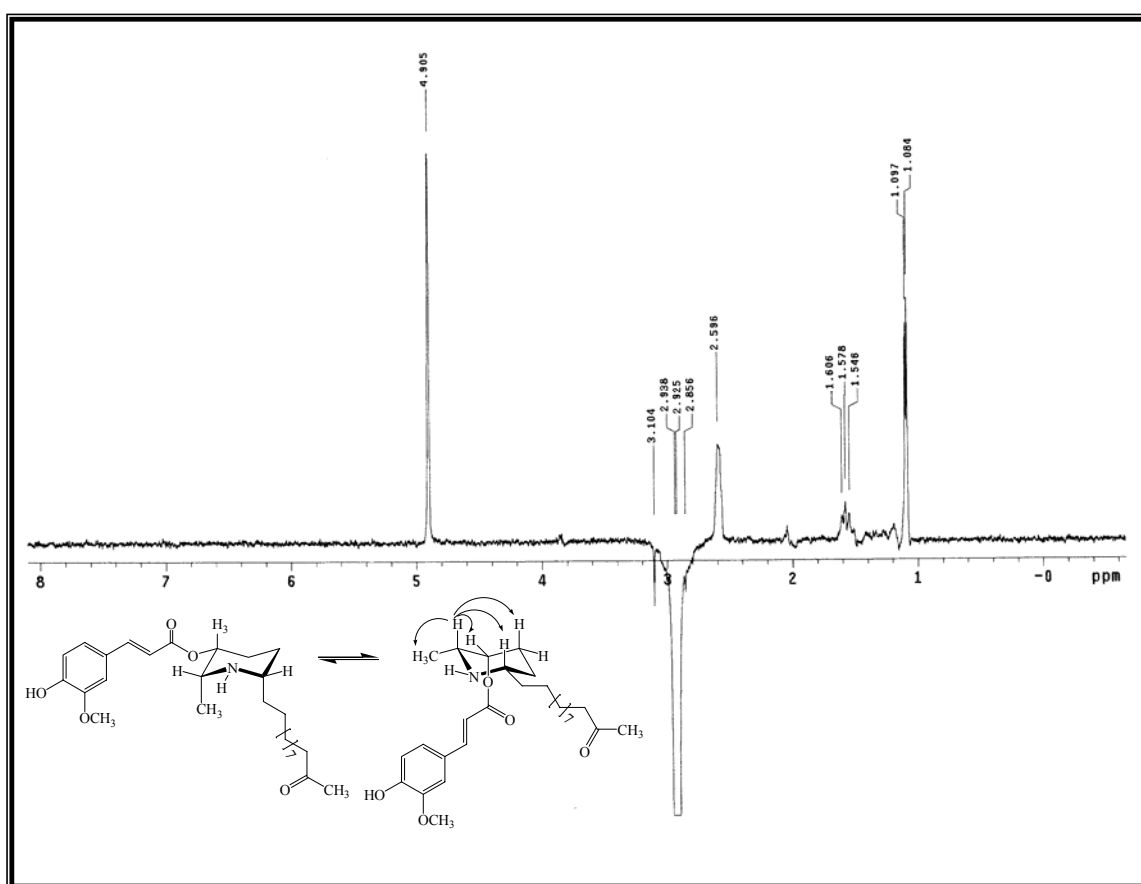
**Espectro 59.** Espectro de IES-EM/EM do íon *quasi*-molecular  $m/z = 502$ , homólogo do alcalóide **18**



**Figura 24.** Proposta de fragmentação para o alcalóide **18** e seu homólogo

## Proposta de configuração relativa para o alcalóide 18

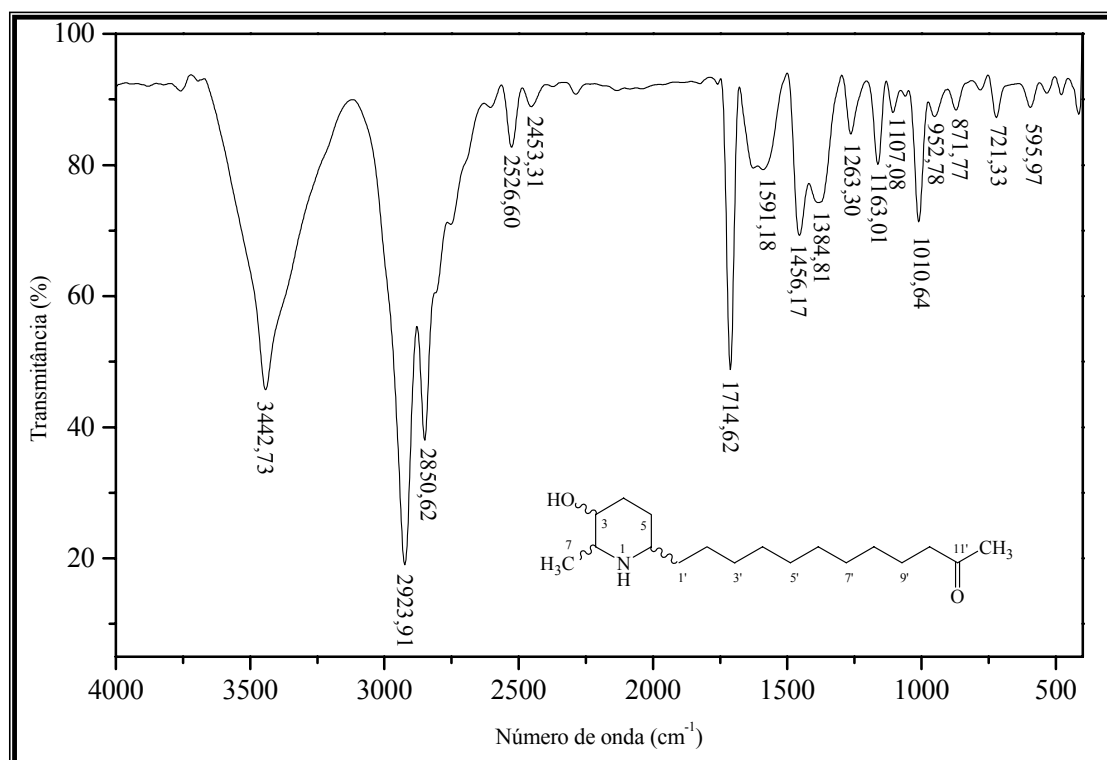
A configuração relativa do alcalóide **18** foi proposta com base no experimento de NOESY 1D (Espectro 60). Quando irradiado o hidrogênio H-2 ( $\delta$  2,99), foi possível observar as correlações com os hidrogênios H-3, H-4b, H-6 e H-7 ( $\delta$  4,98; 1,65; 2,64; e 1,15 respectivamente), indicando que esses estavam em posição relativa alfa ou beta ao plano do anel. A análise das constantes de acoplamento entre os hidrogênios H-2 e H-3, indicou acoplamento axial/equatorial ( $J_{ae} = 1,5$  Hz;  $\alpha = 60^\circ$ ), quando comparado com a curva de Karplus.



**Espectro 60.** Espectro de NOESY 1D (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), irradiando o hidrogênio  $\delta$  2,99 do alcalóide **18**

#### 4.2.4. Elucidação estrutural do alcalóide 19

O alcalóide **19** é um sólido de coloração branca, que funde a 142-145 °C. A análise do espectro no IV permitiu identificar uma banda em  $\nu$  3443  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de um grupo amino secundário, sobreposta por uma banda larga proveniente do estiramento do grupo O–H livre. A sobreposição das bandas é sugerida devido ao estreitamento da banda em seu ponto de menor transmitância, característico de amina primária. Os estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos C–H alifáticos foram visíveis em  $\nu_{\text{as}}$  2924 e  $\nu_{\text{s}}$  2851  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. A banda relativa ao estiramento C=O de cetona foi observada em  $\nu$  1715  $\text{cm}^{-1}$ , assim como as absorções relativas às deformações angulares assimétrica em  $\nu$  1456 e simétrica em  $\nu$  1385 do grupo metila (Espectro 61).

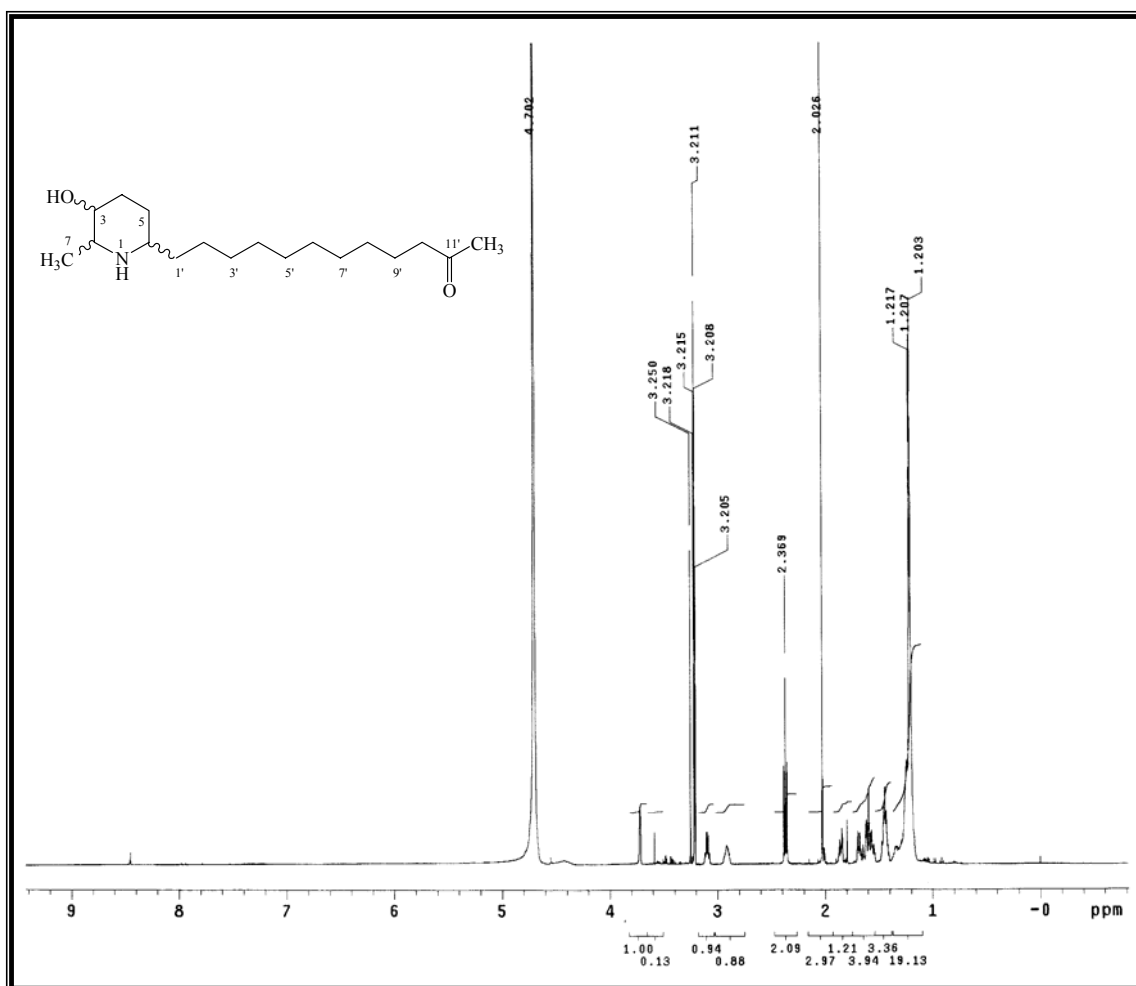


**Espectro 61.** Espectro na região do IV (KBr), do alcalóide **19**

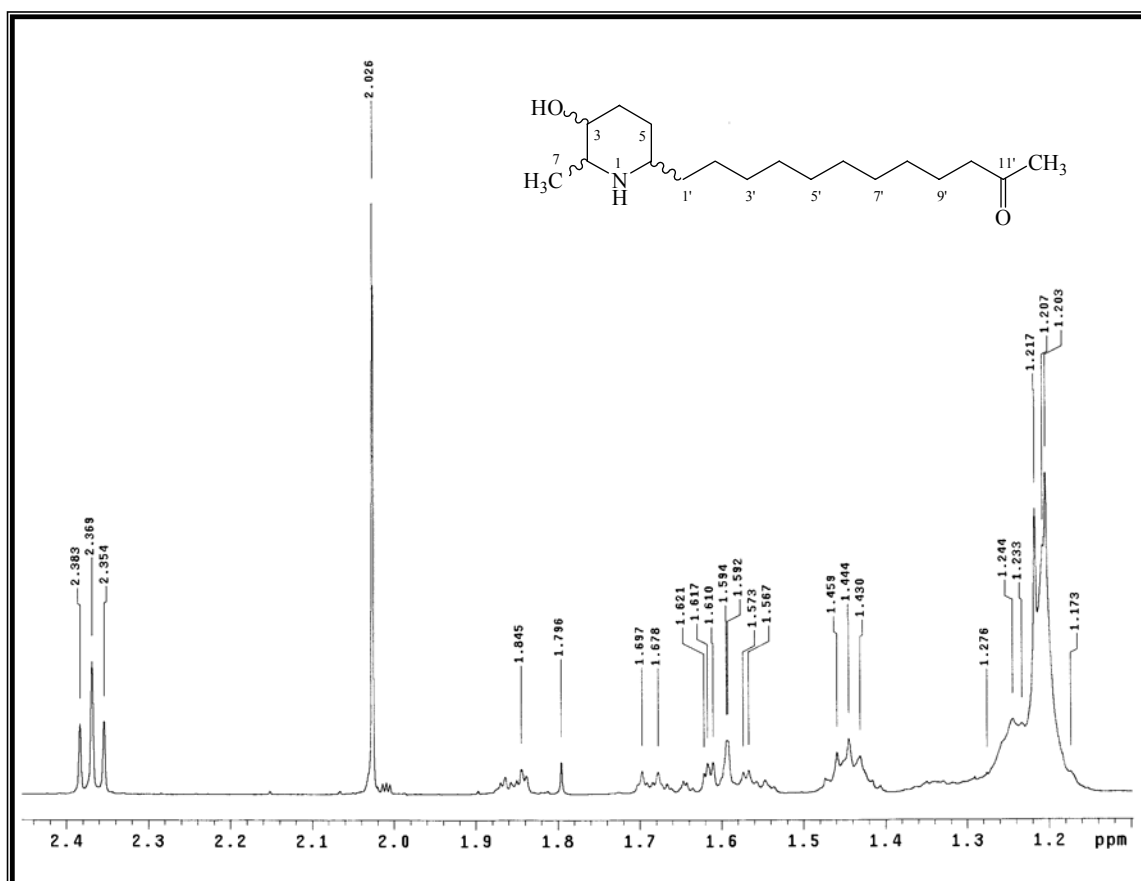
A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), do alcalóide **19** (Espectro 62), permitiu identificar um duplete largo em  $\delta$  3,72 ( $J = 1,5$  Hz), referente ao H–3 hidroximetínico. Um duplo quadruplete em  $\delta$  3,10, integrando para um hidrogênio,

foi atribuído a H-2, o qual apresentou acoplamento com H-3 e H-7 ( $J = 1,5$  e  $6,5$  Hz, respectivamente), Tabela 8.

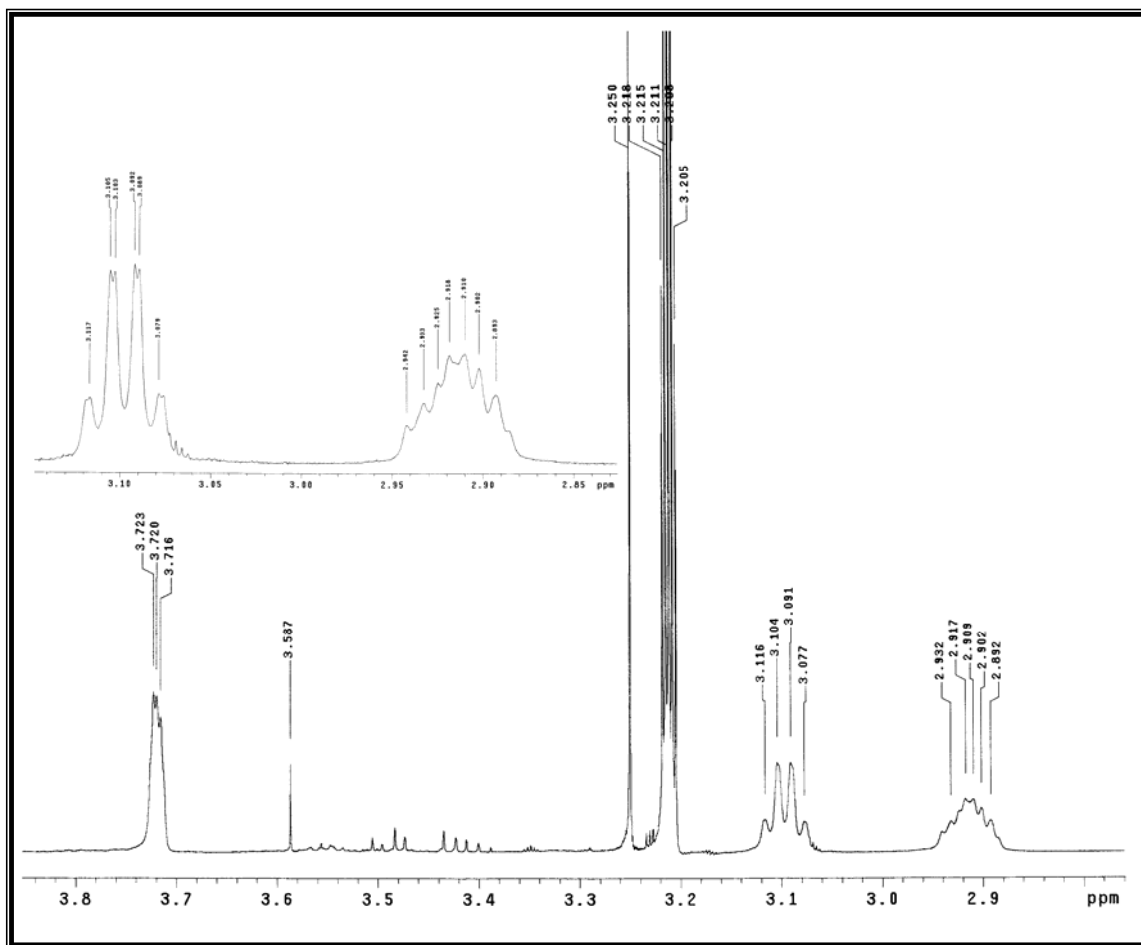
A extremidade da cadeia lateral, funcionalizada por um grupo metil-cetona foi identificada pela presença de um tripleto em  $\delta 2,37$ , integrando para dois hidrogênios e um simpleto em  $\delta 2,03$  integrando para três hidrogênios, que foram atribuídos a H-10' e H-12', respectivamente. Esta dedução foi confirmada pelo mapa de contorno gHMBC (Espectro 72), que mostrou as interações  $^3J$  de H-10' e H-12' com C-11'. O duplete em  $\delta 1,22$ , integrando para três hidrogênios, mostrou acoplamentos com H-2 no mapa de contorno gCOSY (Espectro 65), sendo atribuído a H-7. Os sinais relativos aos hidrogênios da cadeia lateral encontram-se sobrepostos na região de  $\delta 1,20$  (Tabela 8).



**Espectro 62.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcalóide 19



**Espectro 63.** Ampliação parcial ( $\delta$  1,0–2,4) do espectro 62, alcalóide 19



**Espectro 64.** Ampliação parcial ( $\delta$  2,8–3,8) do espectro 62, alcalóide **19**

**Tabela 8.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e gCOSY (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcalóide **19**<sup>a, b, c</sup>

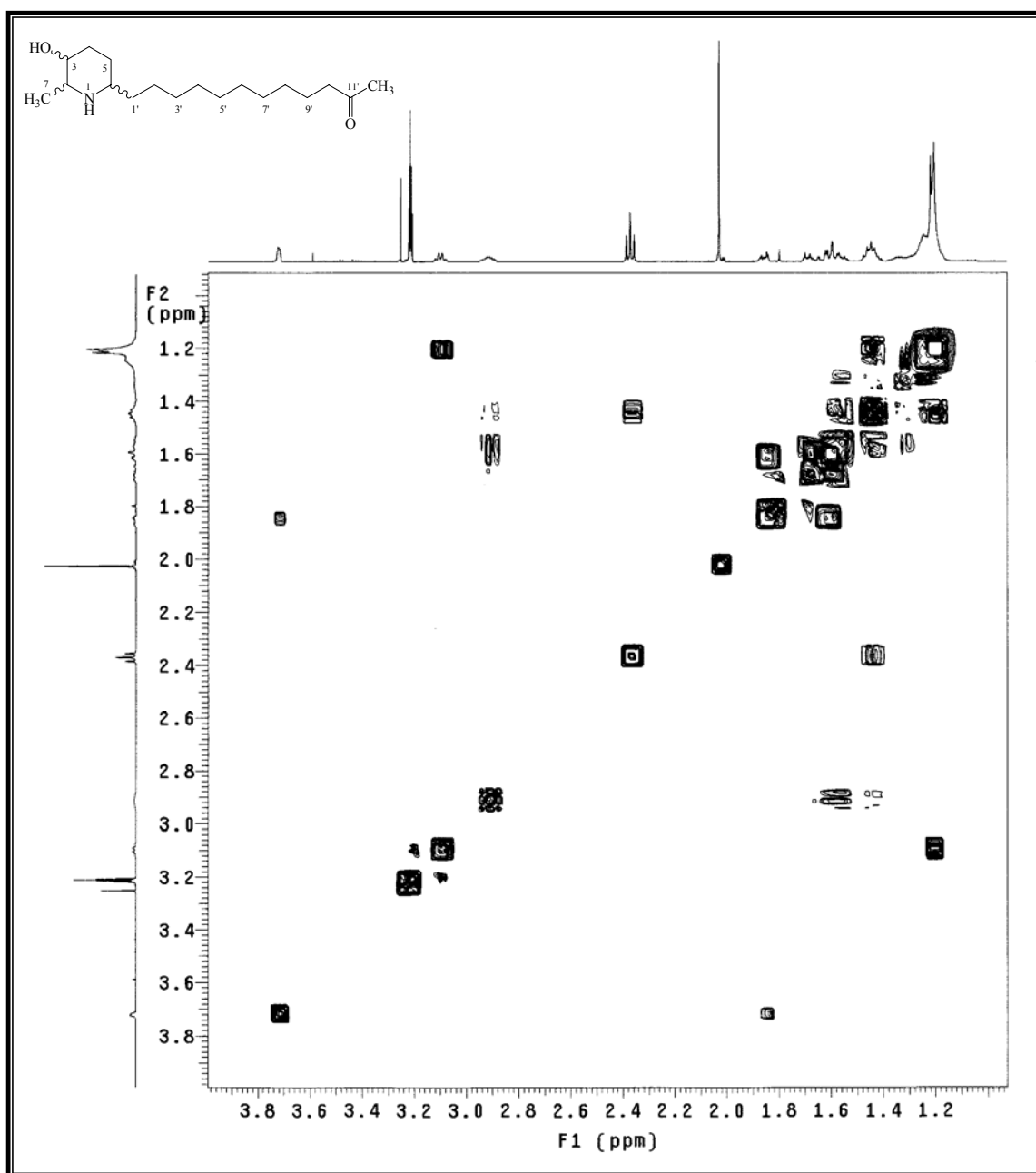
Posição	$\delta_{\text{H}}$ , m, <i>J</i>	gCOSY
2	3,10 dq (6,5)	H-7
3	3,72 m	H-4 <sup>a</sup>
4a	1,84 m	H-3, H-4b, H-5 <sup>a</sup>
4b	1,59 m	H-4a, H-5a, H-5b
5a	1,59 m	H-4a, H-4b, H-5b, H-6
5b	1,44 m	H-5a, H-6
6	2,91 m	H-5a, H-5b
7	1,22 d (6,5)	H-2
1'	1,57 m	H-6
2'- 8'	1,20 sl	H-9'
9'	1,44 m	H-2'-8', H-10'
10'	2,37 t (7,5)	H-9'
11'	-----	-----
12'	2,03 s	-----

<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno

<sup>b</sup> Constantes de acoplamento (*J*), expressas em Hz

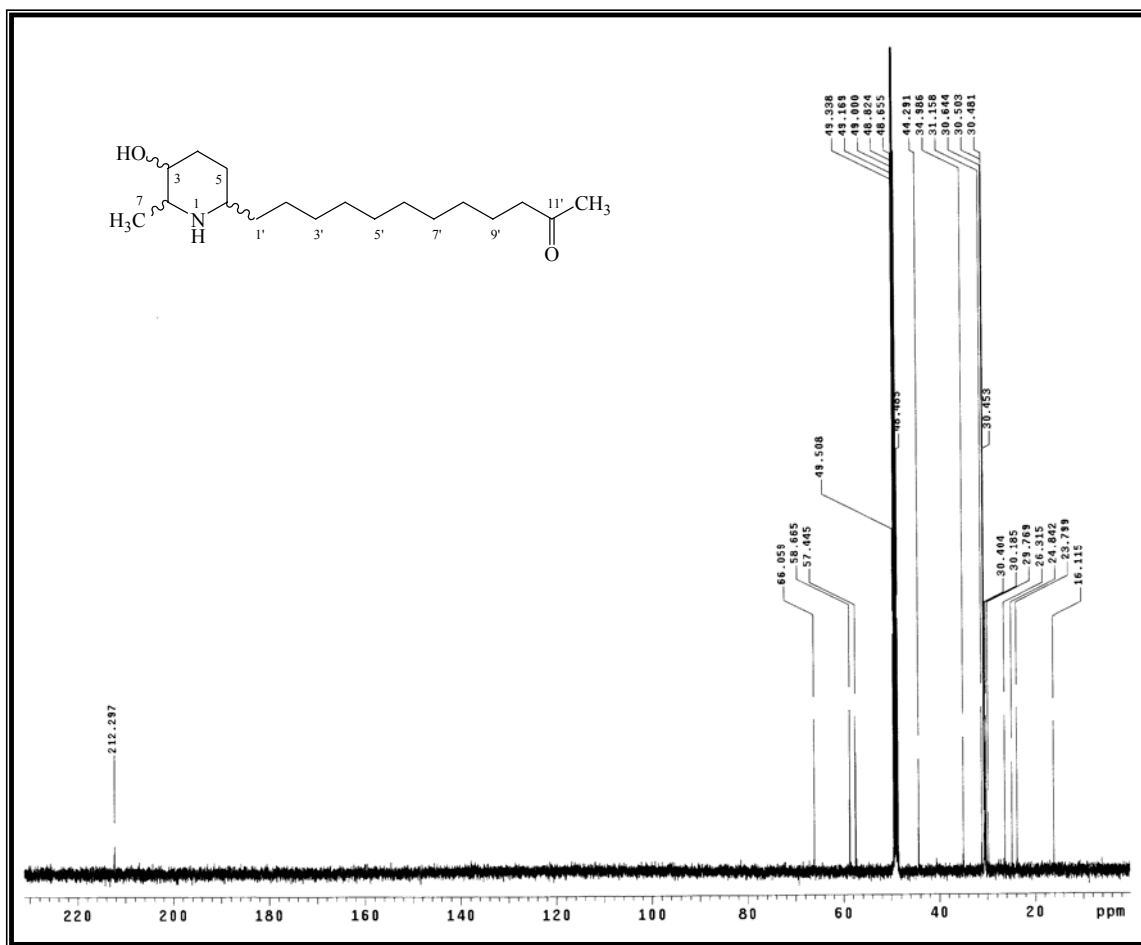
<sup>c</sup> m = multiplicidade



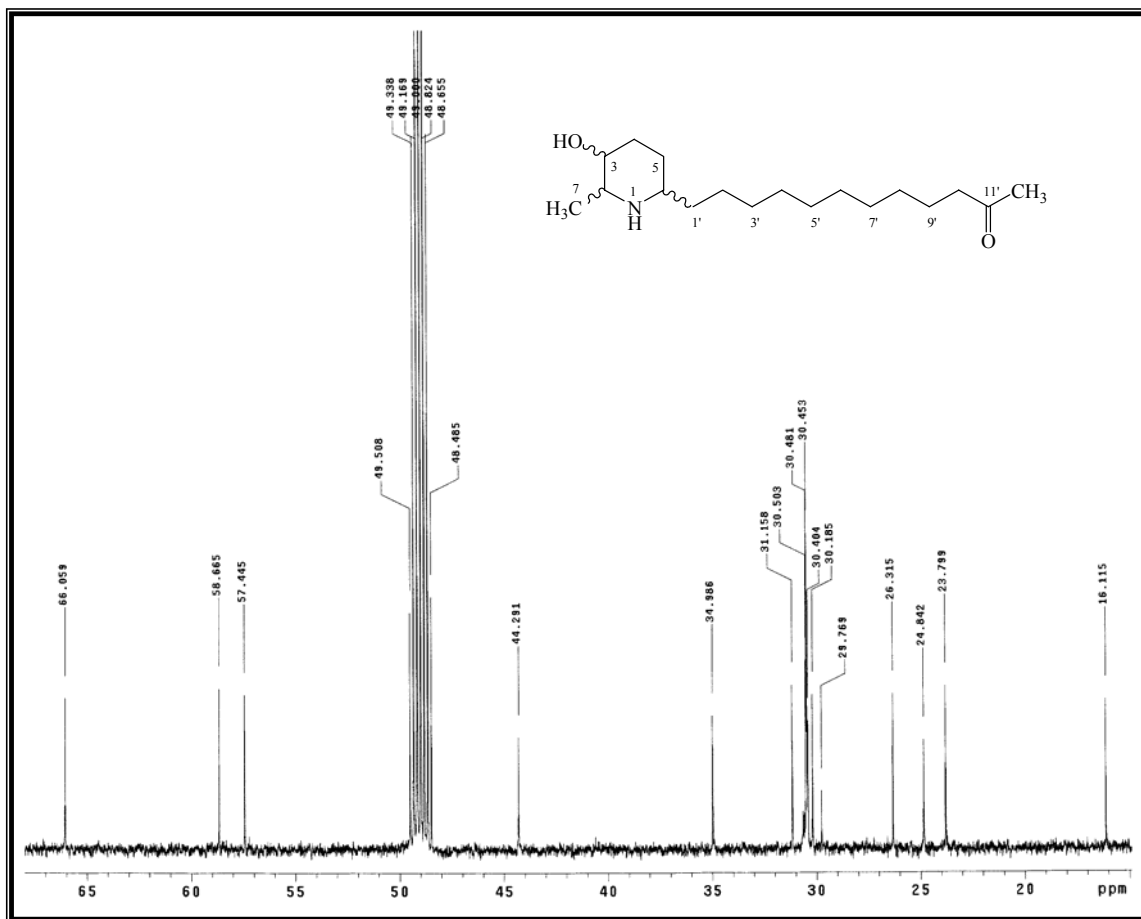


**Espectro 65.** Mapa de contorno gCOSY ( $\delta$  1,1–3,8) do alcalóide **19**

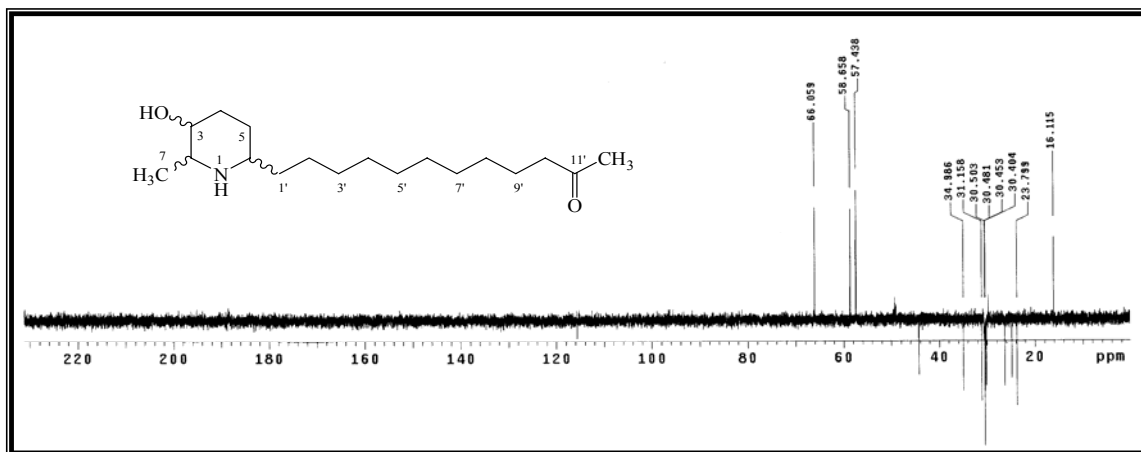
A atribuição dos carbonos do alcalóide **19** (Tabela 9), foi realizada conforme os dados obtidos dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135 (Espectros 66, 67, 68 e 69), e da análise simultânea dos dados dos espectros de gHMQC (Espectro 70 e 71) e de  $^1\text{H}$  (Espectros 62, 63 e 64). Podemos observar na região de  $\delta$  29,1–29,4 a sobreposição dos sinais provenientes dos metilenos, dificultando assim a determinação da cadeia lateral (C–6), do anel piperidínico.



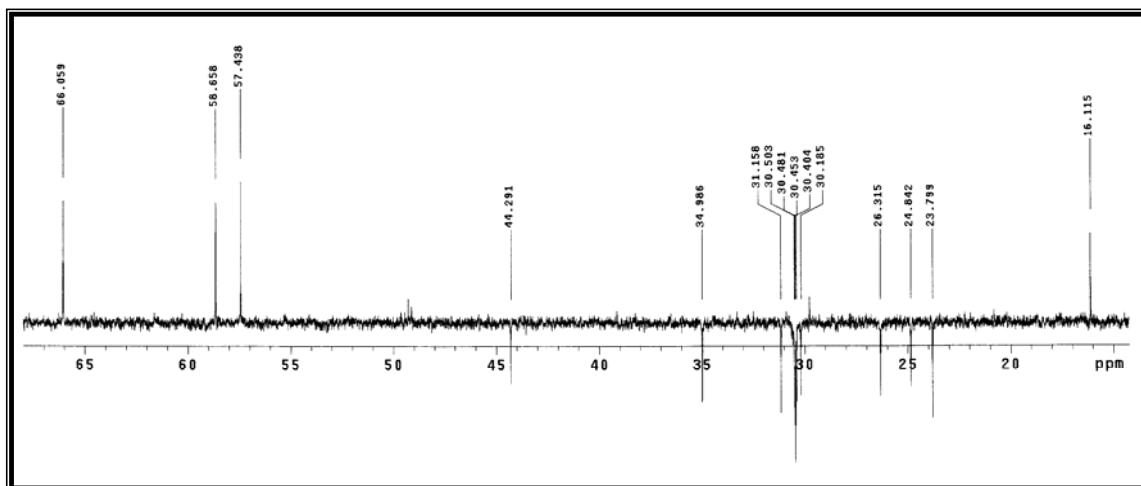
**Espectro 66.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do alcalóide 19



**Espectro 67.** Ampliação parcial ( $\delta$  19,0–65,0) do espectro 66, alcalóide 19



**Espectro 68.** Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do alcalóide 19

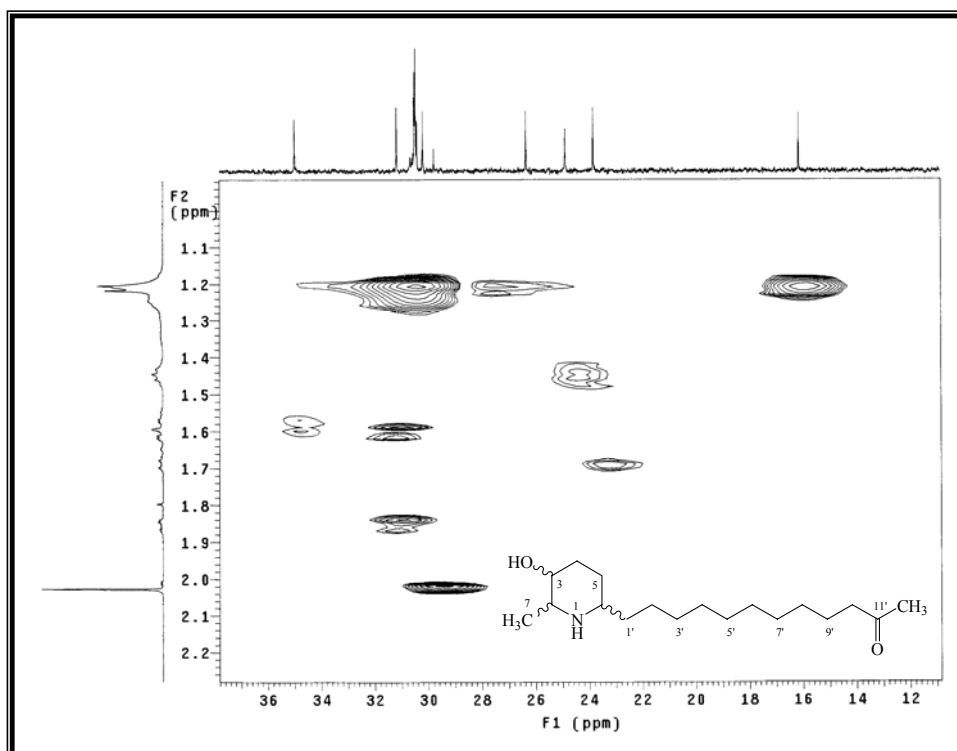


**Espectro 69.** Ampliação parcial ( $\delta$  15,0–65,0) do espectro 68, alcalóide 19

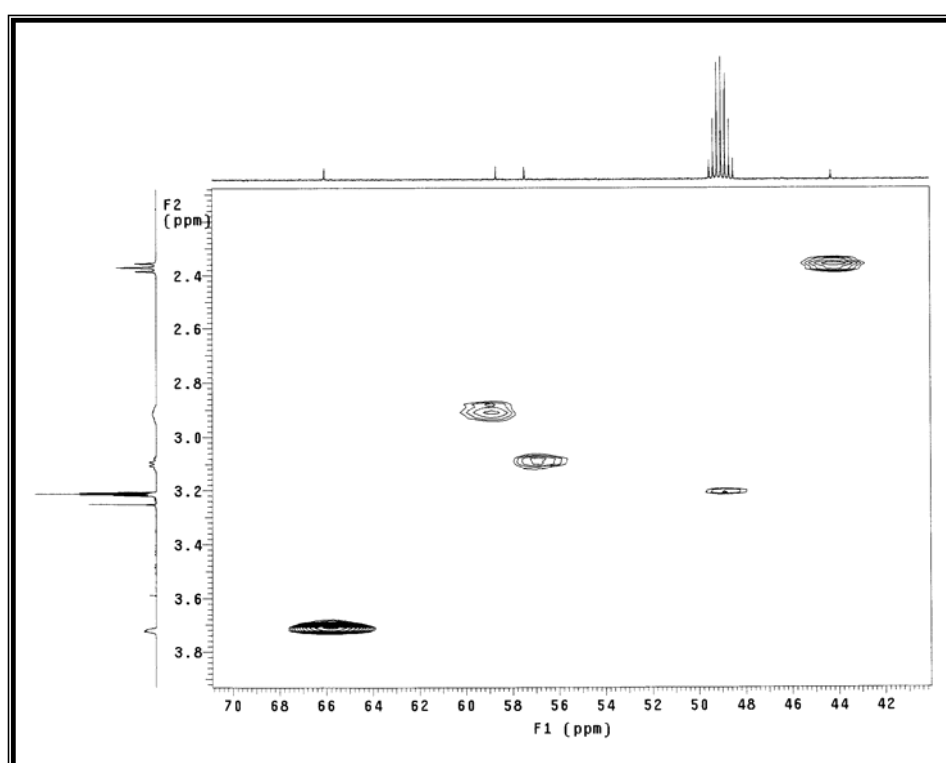
**Tabela 9.** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, gHMQC e gHMBC do alcalóide **19**<sup>a</sup>

Posição	$\delta_{\text{C}}$	DEPT 135	gHMQC	gHMBC
2	57,4	CH	3,10	H-7, H-4a
3	66,0	CH	3,72	H-7
4	31,2	CH <sub>2</sub>	1,84; 1,59	no
5	24,8	CH <sub>2</sub>	1,44	H-3'-10'
6	58,7	CH	2,91	H-4b, H-5a
7	16,1	CH <sub>3</sub>	1,22	H-2
1'	35,0	CH <sub>2</sub>	1,57	no
2'	26,3	CH <sub>2</sub>	1,20	H-3'-8'
3'- 8'	30,2-30,5	CH <sub>2</sub>	1,20	H-3'-8', H-9'
9'	23,8	CH <sub>2</sub>	no	H-3'-8', H-10'
10'	44,3	CH <sub>2</sub>	2,37	H-9', H-12'
11'	212,3	C	-----	H-9', H-10', H-12'
12'	29,8	CH <sub>3</sub>	2,03	H-10'

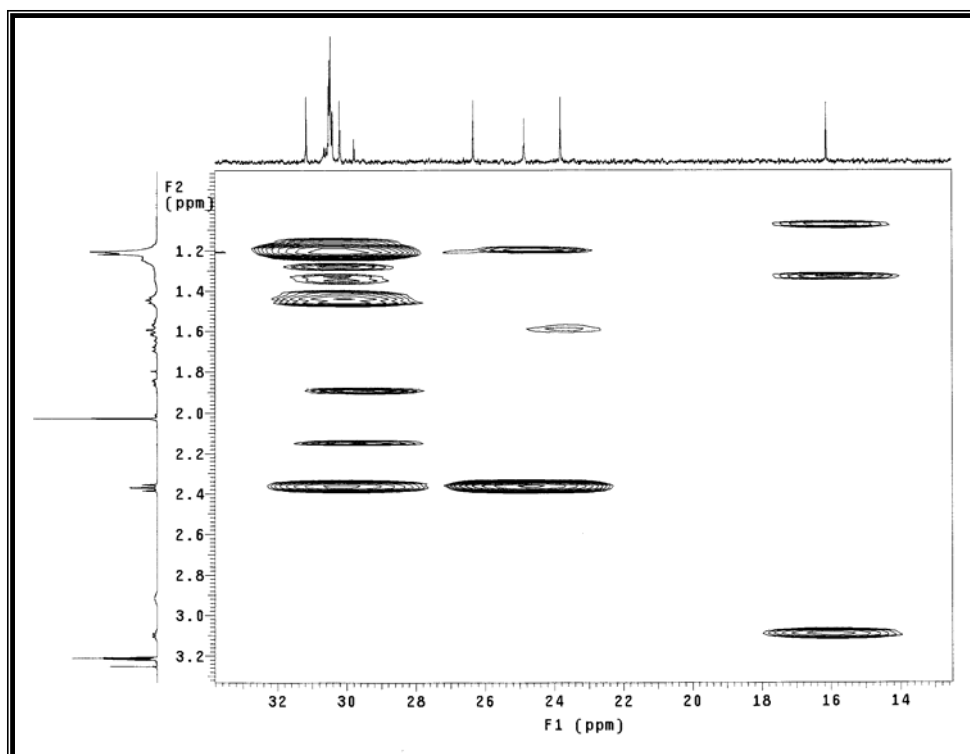
<sup>a</sup> Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em ppm, em relação ao TMS como padrão interno  
no = não observado



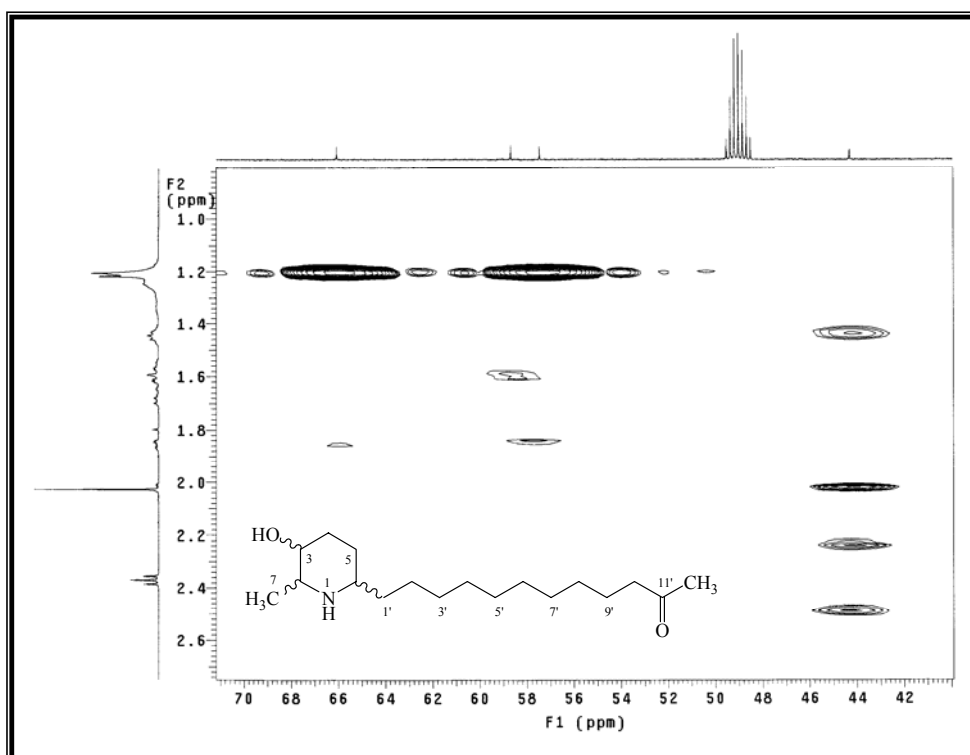
**Espectro 70.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), do alcalóide **19**



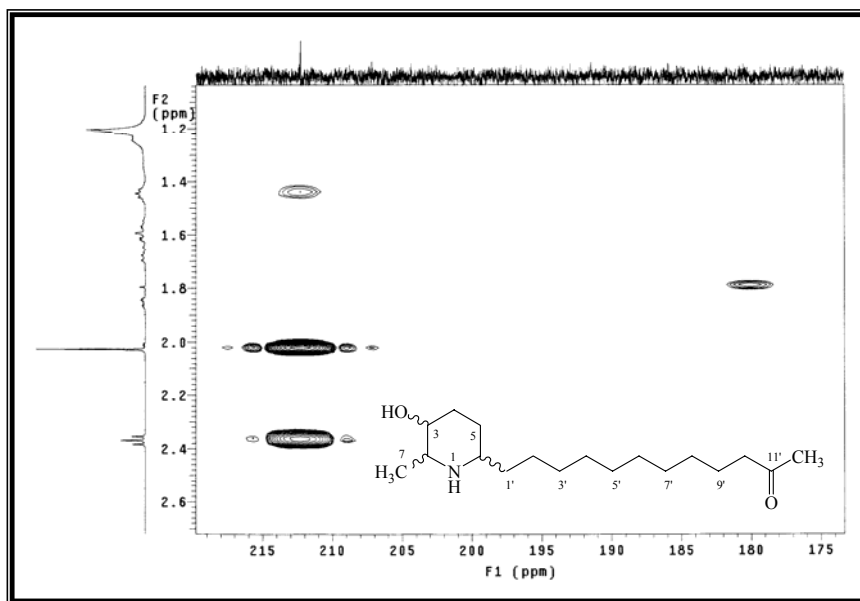
**Espectro 71.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), do alcalóide **19**



**Espectro 72.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), do alcalóide **19**

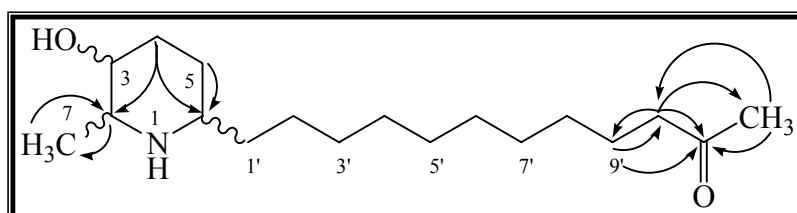


**Espectro 73.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), do alcalóide **19**



**Espectro 74.** Mapa de contorno gHMBC (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD), do alcalóide **19**

Na Figura 25 são mostradas algumas correlações <sup>1</sup>H – <sup>13</sup>C, observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide **19**.

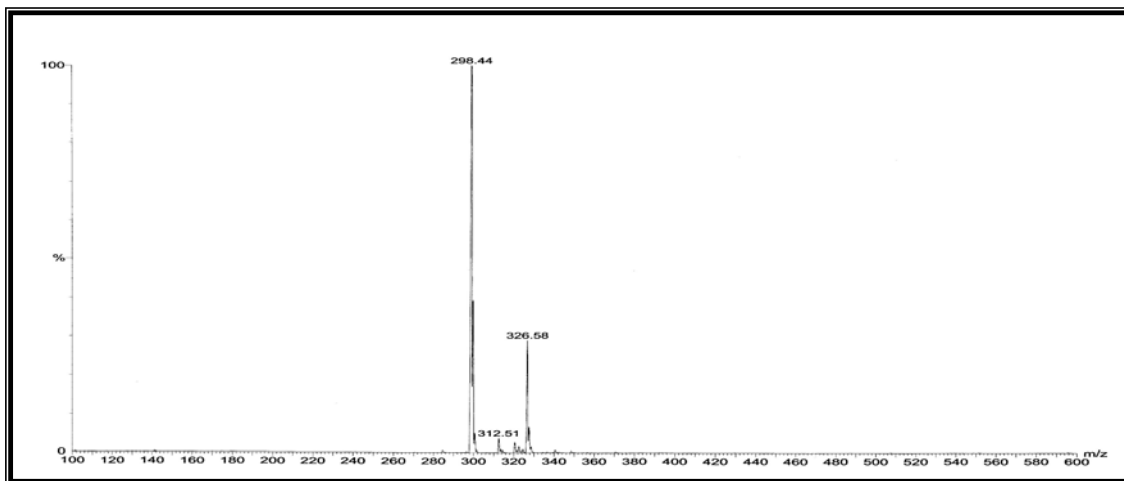


**Figura 25.** Correlações <sup>1</sup>H–<sup>13</sup>C observadas no mapa de contorno gHMBC do alcalóide **19**

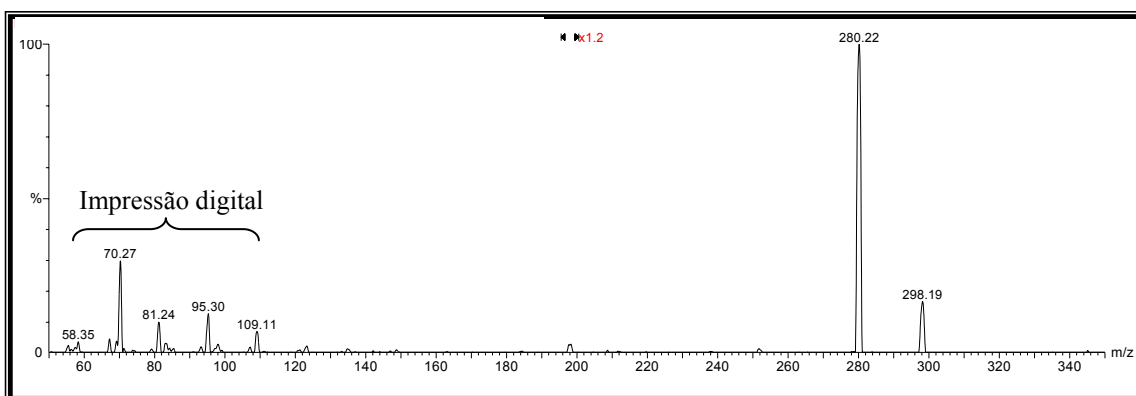
A Análise do espectro de massas (Espectro 75), RMN de <sup>13</sup>C e DEPT, conduziram à fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>35</sub>NO<sub>2</sub>. O experimento foi realizado no modo IES positivo com a amostra solubilizada em MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1). O espectro apresentou pico base em *m/z* = 298, semelhante ao da cassina e também mostrou pico em *m/z* = 326, sugerindo a coexistência de outro composto homólogo com massa molecular igual 325. Quando submetidas a EM essas moléculas apresentam fragmentações iguais às da cassina e seu homólogo (Espectros 76 e 77). A proposta de fragmentação é semelhante a da cassina (Figura 21), porém não é possível afirmar que o hidrogênio eliminado seja o H-2, uma vez que a estereoquímica relativa não foi definida, sabendo-se que esse



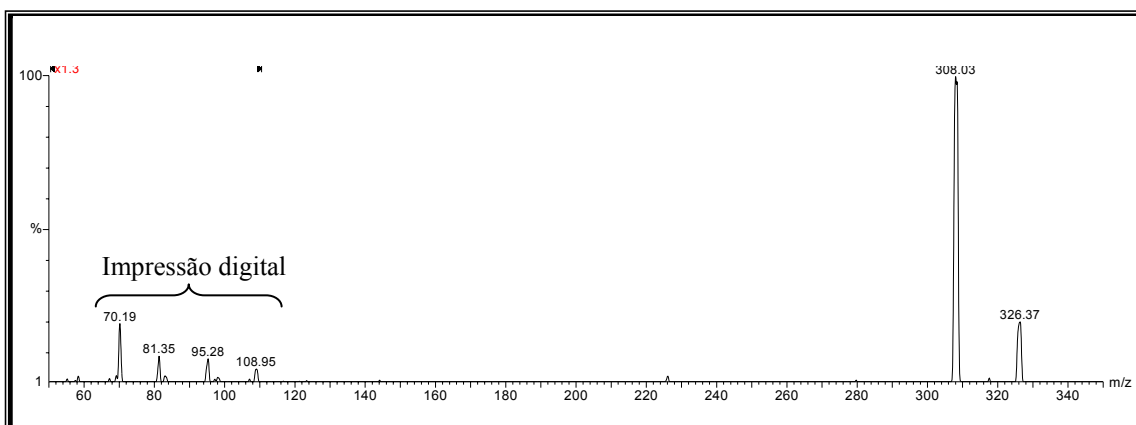
hidrogênio pode não estar anti à hidroxila, o que levaria à eliminação do hidrogênio na posição quatro do anel mais favorável, anti à hidroxila.



**Espectro 75.** Espectro de IES-EM (modo positivo) do alcalóide **19**



**Espectro 76.** Espectro de IES-EM/EM do íon *quasi*-molecular  $m/z = 298$  do alcalóide **19**



**Espectro 77.** Espectro de IES-EM/EM do íon *quasi*-molecular  $m/z = 326$  do alcalóide **19**

### 4.3. Ensaio antioxidante com DPPH

Os quatro alcalóides isolados foram avaliados quanto ao potencial sequestrador de radicais livres, como descrito no item 3.7.1. Os valores das variações percentuais das absorvâncias (% $\Delta A$ ), observadas para as substâncias que têm propriedades antioxidantes, foram calculados segundo a fórmula:

$$\% \Delta A = (A_0 - A/A_0) \times 100$$

onde:

$A_0$  = Absorvância do DPPH diluído (2 mL da sol. DPPH + 1 mL de MeOH)

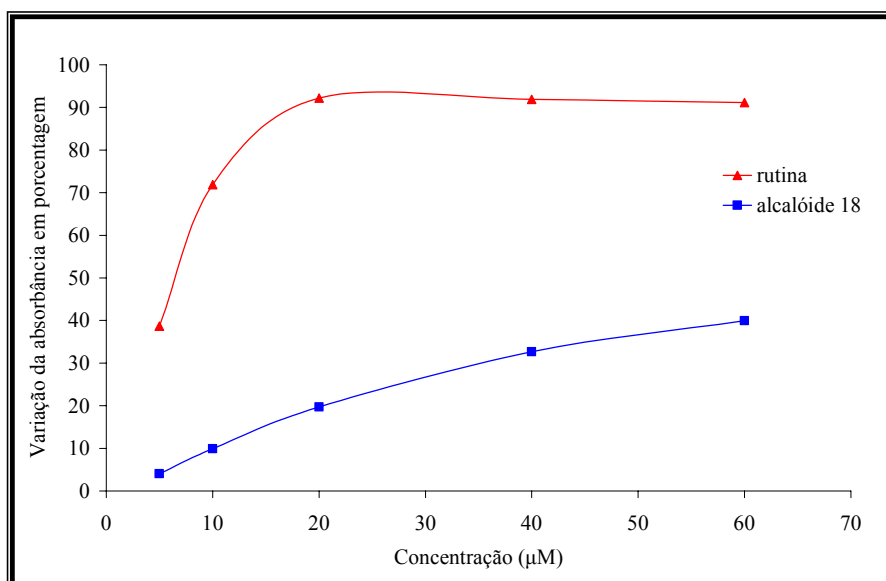
$A$  = Leitura da absorvância para cada concentração

O crescimento da % $\Delta A$  é diretamente proporcional ao potencial sequestrador de radicais livres (Tabela 10).

**Tabela 10.** Ensaio antioxidante, variação percentual da absorvância (% $\Delta A$ )

Concentração ( $\mu M$ )	Alcalóide 18 % $\Delta A$	Rutina (padrão positivo) % $\Delta A$
60	40	91
40	33	92
20	20	92
10	10	72
5	4	39

Os alcalóides **1**, **19** e **20** não apresentaram decréscimo na absorção do DPPH nas concentrações preparadas, indicando assim que estas substâncias não exercem ação antioxidante. O alcalóide **18** apresentou um pequeno decréscimo na absorção como mostra a curva analítica da Figura 26. Mesmo assim o decréscimo foi tão sutil que a maior concentração do alcalóide não alcançou a concentração inibitória de 50% do radical ( $IC_{50}$ ), observada para a rutina.



**Figura 26.** Curva analítica do ensaio antioxidante do alcalóide **18**

#### 4.4. Avaliação da atividade anticolinesterásica

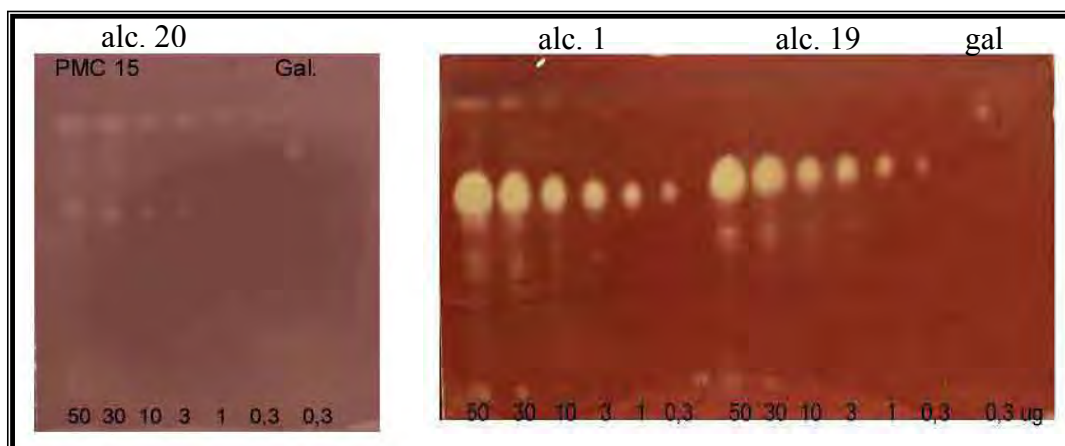
Inicialmente foi feita análise qualitativa, com finalidade de avaliação da atividade anticolinesterásica pelos alcalóides isolados. Sendo que os alcalóides **1**, **19** e **20** apresentaram halos de inibição da enzima (Figura 27).



**Figura 27.** Avaliação qualitativa da atividade anticolinesterásica: a) alc. **18**; b) alc. **19**; c) alc. **1**; d) alc. **20** e e) controle galantamina

Em seguida foram feitas as análises quantitativas de verificação da concentração inibitória mínima (CIM) para os alcalóides que apresentaram atividade no ensaio

qualitativo. As CIMs foram de 1; 0,3 e 0,3  $\mu\text{g}$  para os alcalóides **20**; **1** e **19** respectivamente (Figura 28). Neste tipo de ensaio os alcalóides apresentaram atividade anticolinesterásica tão potente quanto o próprio padrão (galantamina, 0,3  $\mu\text{g}$ ), principalmente **1** e **19**.



**Figura 28.** Bioautografia em placa de sílica, avaliação da CIM para os alcalóides inibidores de AChE

#### 4.5. Análise do perfil alcaloídico de *Senna spectabilis* e *Cassia leptophylla*

##### 4.5.1. Cromatografia em Camada Delgada, RMN de $^1\text{H}$ , CLAE-UV e EM

Primeiramente foi feito um estudo de perfil por CCD, onde foram solubilizando pequenas quantidades das matrizes tratadas (item 3.6) e aplicando em cromatoplaça de sílica, eluída com sistema de solvente  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9:1:0,25). Após revelação com os reagentes de Dragendorff e ICIpt, observou-se que somente as matrizes de *S. spectabilis* apresentaram resultado positivo para os alcalóides estudados (Figura 29).

Como as reações gerais para identificação de alcalóides baseiam-se na formação de complexos insolúveis (precipitado), resultados falso-positivos são bastante comuns. Como sugerido por Simões et al. (2003), uma extração ácido/base (item 3.7), feita previamente pode reduzir os contaminantes e conseqüentemente facilitar a revelação dos alcalóides nas matrizes (Figura 29 e 30).



**Figura 29.** Cromatoplasas comparando o perfil alcaloídico da extração ácido/base (1, 2, 3, 4), e das matrizes tratadas conforme item 3.6 (1', 2', 3', 4'), com os padrões isolados de *S. spectabilis* ( $\text{SiO}_2$  GF<sub>254</sub>;  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:NH<sub>4</sub>OH; 9:1:0,25; ICIpt).



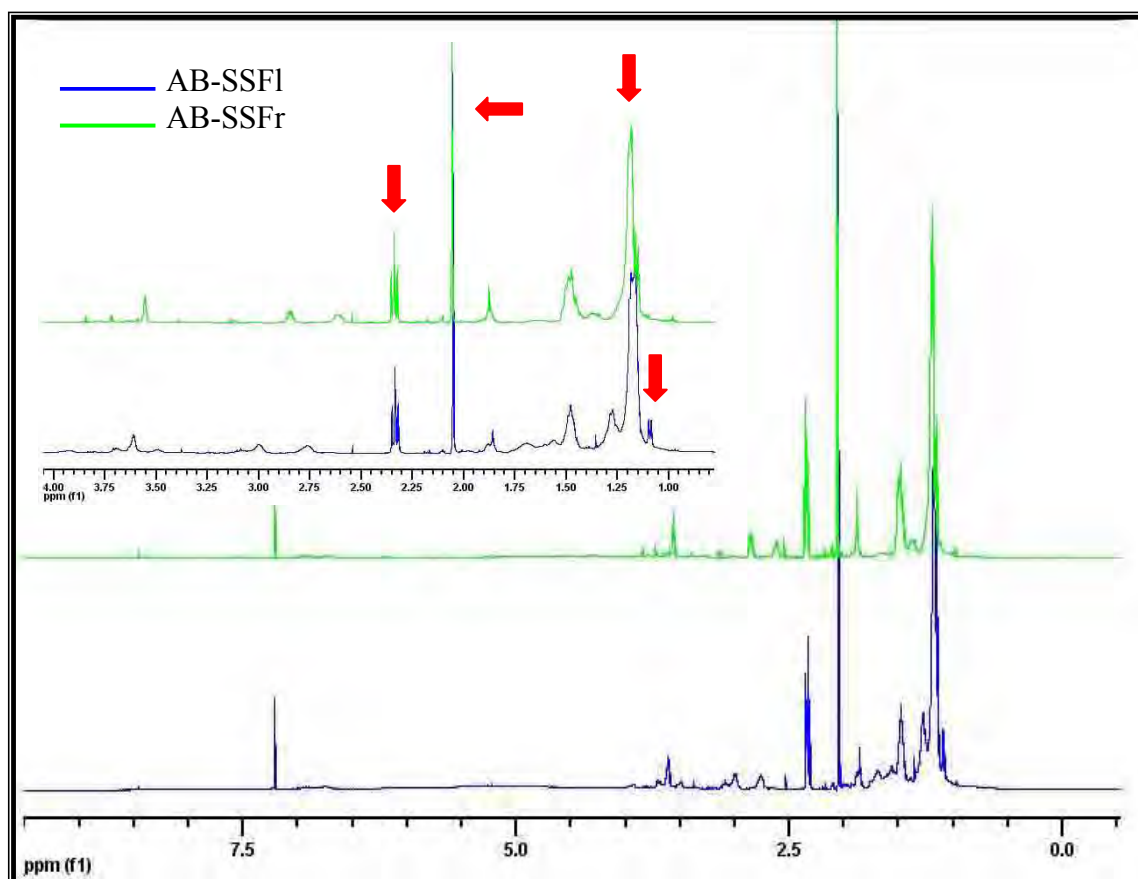
**Figura 30.** Cromatoplasca comparativa da fração alcaloídica da extração ácido/base com os alcalóides isolados de *S. spectabilis*, observada sob lâmpada de UV 365 nm e em seguida revelada com ICIpt ( $\text{SiO}_2$  GF<sub>254</sub>;  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:NH<sub>4</sub>OH; 9:1:0,25).

Mesmo depois da extração ácido/base não foi possível identificar alcalóides nas matrizes de *C. leptophylla*, utilizando a CCD. Foi observado um baixo rendimento das frações alcaloídicas da extração ácido/base, para as matrizes de *C. leptophylla* (Tabela 11), o que nos levou a acreditar que esta espécie não apresentava alcalóides na sua constituição metabólica.

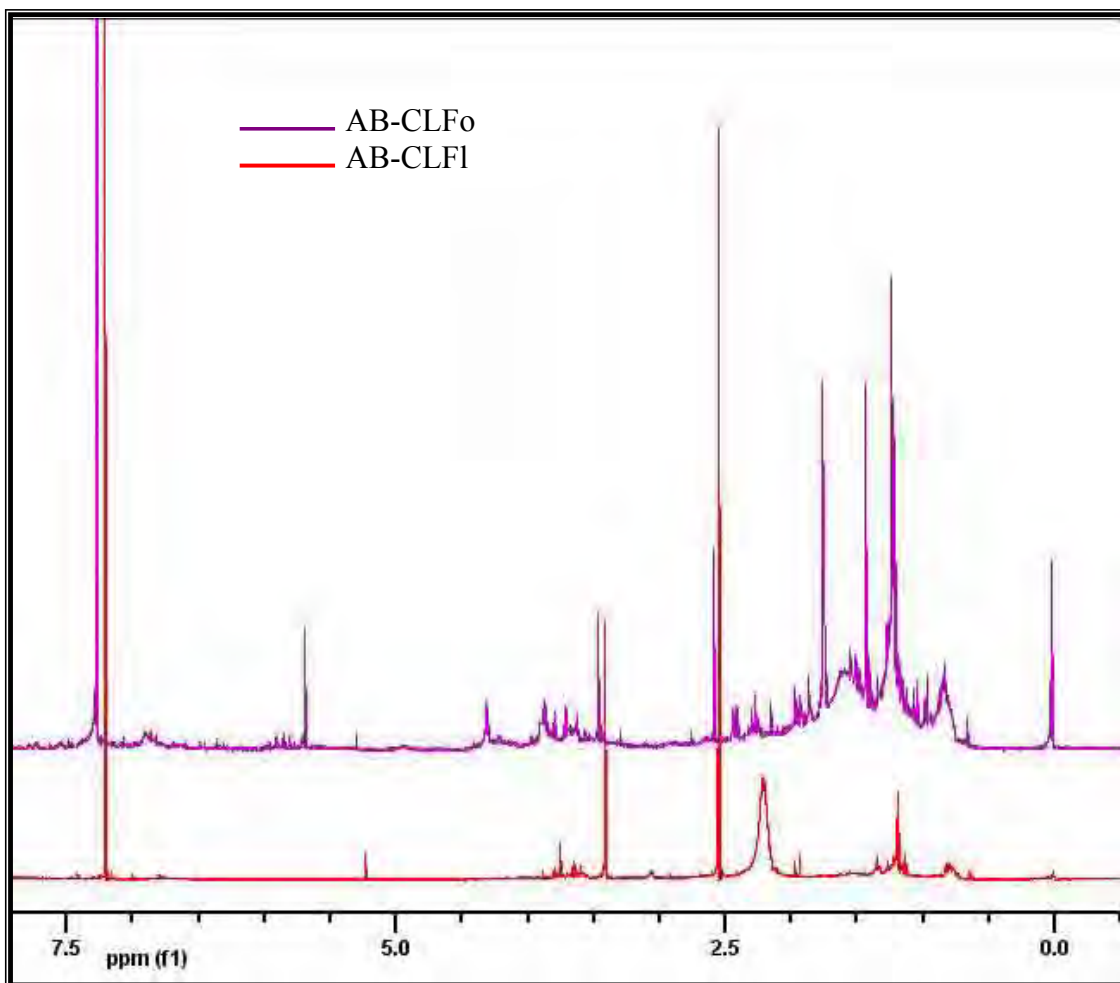
**Tabela 11.** Frações alcalóidicas da extração ácido/base, segundo item 3.7

Fração alcalóidica (F. CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Massa (mg)
AB-CLF1	24,0
AB-CLFo	8,6
AB-SSFr	121,6
AB-SSF1	272,7

As matrizes da Tabela 11 foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H, onde foram selecionados alguns sinais característicos dos piperidinóis 2,6-dissubstituídos: metila vizinha a carbonila em  $\delta$  2,06 (simpleto), metileno vizinho à carbonila em  $\delta$  2,35 (triplete), metilenos da extensão da cadeia lateral em  $\delta$  1,20 (simpleto largo), metila no C-2 do anel piperidínico em  $\delta$  1,10 (duplete), e analisados nas matrizes dos dois espécimes, sendo estes sinais observados somente nas matrizes de *S. spectabilis*, dado este que corrobora para a inexistência dos alcalóides no espécime de *C. leptophylla* (Espectros 78 e 79).



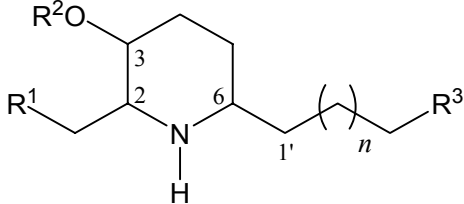
**Espectro 78.** Perfil alcalóidico por RMN <sup>1</sup>H das frações alcalóidicas da extração ácido/base das flores e frutos de *S. spectabilis*



**Espectro 79.** Perfil alcalóidico por RMN  $^1\text{H}$  das frações alcalóidicas da extração ácido/base das flores e folhas de *C. leptophylla*

Em seguida as amostras tratadas segundo o esquema do item 3.6 e 3.7 foram diluídas em MeOH para uma concentração de 1 mg/mL e analisadas por CLAE-UV. Devido a ausência de cromóforos nesses alcalóides não foi possível detectá-los.

As amostras da extração ácido/base (item 3.7), foram então diluídas em MeOH:H<sub>2</sub>O (4:1) e analisadas por espectrometria de massas *tandem*, ionização por *electrospray* (IES-EM/EM), injeção direta. Inicialmente foi criado um banco de dados com todos os alcalóides isolados neste estudo, algumas frações semipuras e alguns isolados em estudos anteriores (Figura 31). A presença dos alcalóides foi confirmada nas quatro matrizes das duas espécies, como mostram os Espectros 80, 81, 82 e 83.

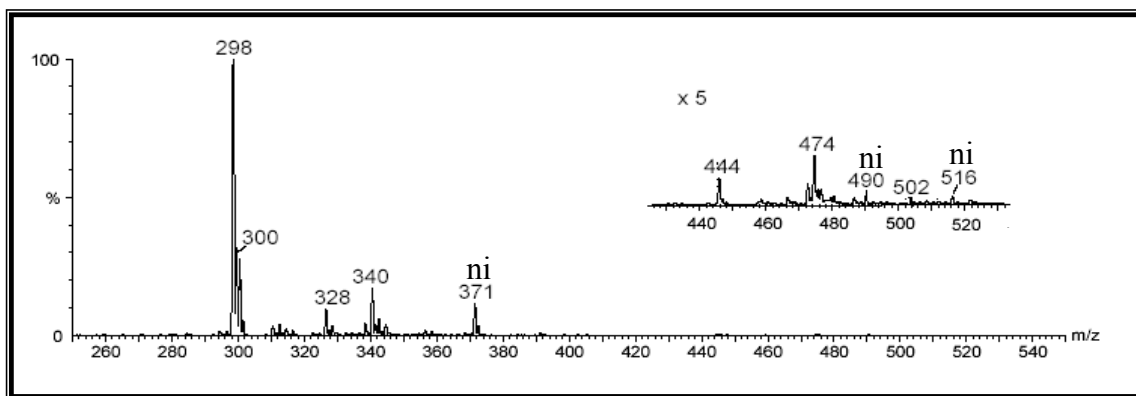


	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	<i>n</i>	M. M.
<b>1</b>	H	H	-COCH <sub>3</sub>	8	297
<b>1a</b>	H	H	-COCH <sub>3</sub>	10	325
<b>16a</b>	OH	H	-COCH <sub>3</sub>	8	313
<b>16</b>	OH	H	-COCH <sub>3</sub>	10	341
<b>20</b>	H	-COCH <sub>3</sub>	-COCH <sub>3</sub>	8	339
<b>20a</b>	H	-COCH <sub>3</sub>	-COCH <sub>3</sub>	10	367
<b>2</b>	H	H	-CH(OH)CH <sub>3</sub>	8	299
<b>2a</b>	H	H	CH(OH)CH <sub>3</sub>	10	327
<b>21</b>	H	<i>p</i> -cumaroil	-COCH <sub>3</sub>	8	443
<b>21a</b>	H	<i>p</i> -cumaroil	-COCH <sub>3</sub>	10	471
<b>18</b>	H	feruloil	-COCH <sub>3</sub>	8	473
<b>18a</b>	H	feruloil	-COCH <sub>3</sub>	10	501

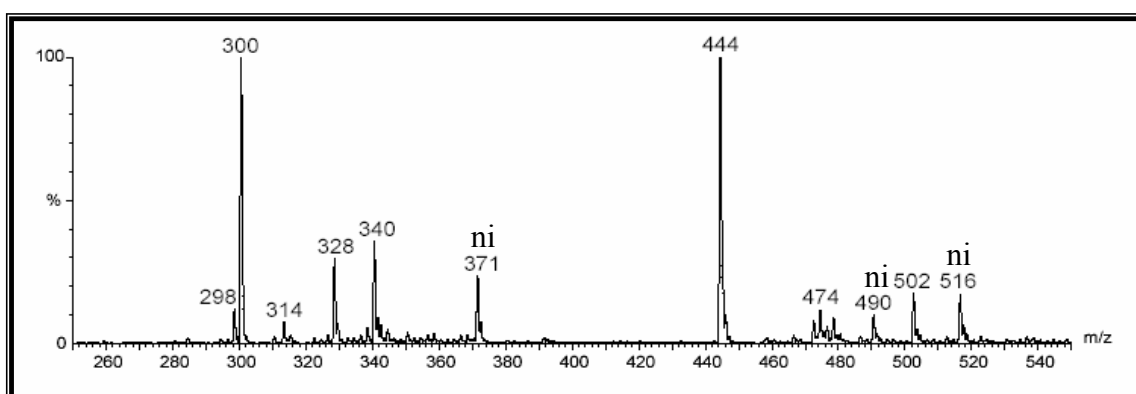
**Figura 31.** Estrutura dos alcalóides isolados de *S. spectabilis*

Devido a sensibilidade da técnica foi possível detectar a presença desses alcalóides nas quatro matrizes, como mostram os Espectros 80, 81, 82 e 83. As massas dos alcalóides foram confirmadas por espectrometria de massas de alta resolução (Tabela 12).

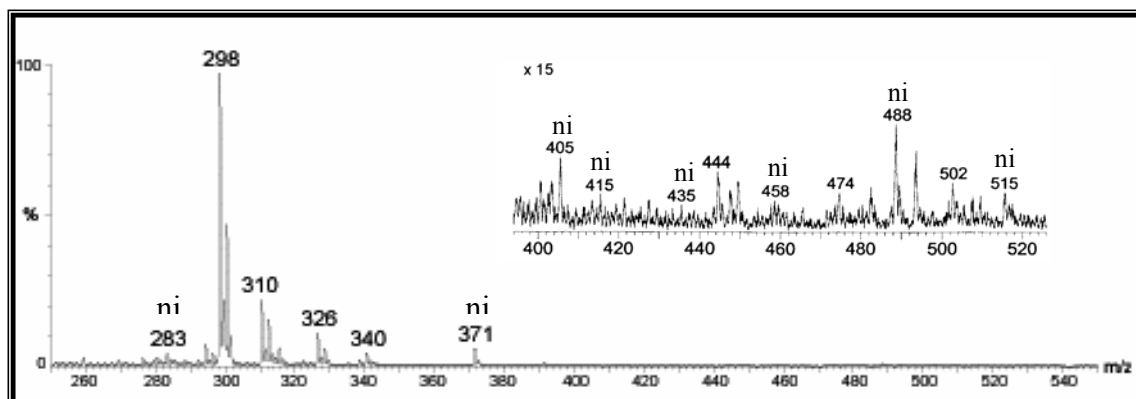




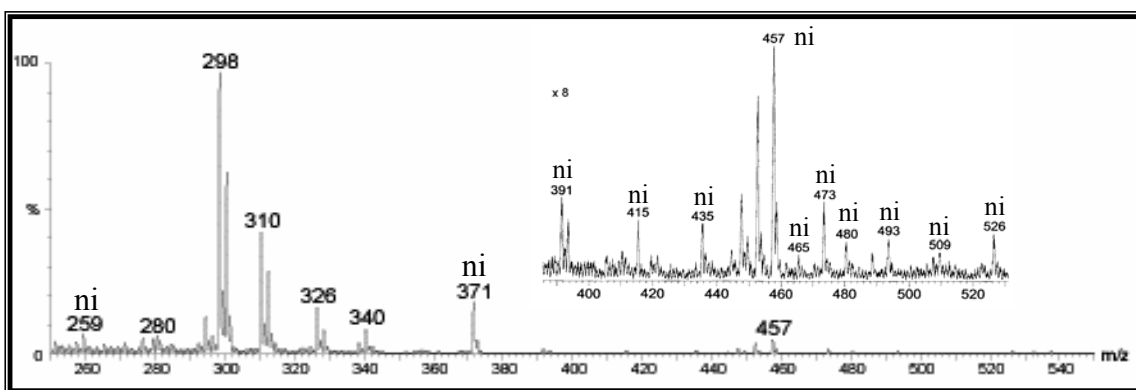
**Espectro 80.** IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) das flores de *S. spectabilis* (ni = não identificado)



**Espectro 81.** IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) dos frutos de *S. spectabilis* (ni = não identificado)



**Espectro 82.** IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) das flores de *C. leptophylla* (ni = não identificado)



**Espectro 83.** IES-EM fração alcaloídica (ácido/base) das folhas de *C. leptophylla* (ni = não identificado)

**Tabela 12.** Determinação das fórmulas e massas moleculares por EM de alta resolução.

Íon	Fórmula	Massa calculada	Massa experimental	Erro (ppm)
[ <b>1</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	298.2746	298.2758	+4.0
[ <b>1a</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	326.3059	326.3073	+4.2
[ <b>16a</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	314.2695	314.2676	-6.0
[ <b>16</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	342.3008	342.2990	-5.2
[ <b>20</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	340.2852	340.2864	+3.5
[ <b>20a</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>22</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	368.3165	368.3147	-4.8
[ <b>2</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	300.2903	300.2914	+3.6
[ <b>2a</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	328.3216	328.3223	+2.1
[ <b>21</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>27</sub> H <sub>42</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	444.3114	444.3129	+3.3
[ <b>21a</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>29</sub> H <sub>46</sub> NO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	472.3427	472.3412	-3.1
[ <b>18</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>28</sub> H <sub>44</sub> NO <sub>5</sub> <sup>+</sup>	474.3219	474.3198	-4.4
[ <b>18a</b> + H] <sup>+</sup>	C <sub>30</sub> H <sub>48</sub> NO <sub>5</sub> <sup>+</sup>	502.3532	502.3511	-4.1

## 5. CONCLUSÕES

A espécie *Senna spectabilis* se caracteriza pela diversidade estrutural dos alcalóides piperidínicos biossintetizados, com variações no tamanho da cadeia lateral, estereoquímica, formas reduzidas ou mesmo derivados substituídos, como ésteres na posição C-3 do anel, os quais foram isolados ou detectados por espectrometria de massas *tandem*, como é o caso dos homólogos de cadeia maior. Desse estudo resultaram três novos alcalóides chamados de 3-*O*-acetil-cassina, 3-*O*-feruloil-cassina e um estereoisômero da cassina (alcalóide 19), cuja estereoquímica ainda não foi determinada, mas devido a diferença no ponto de fusão e no espectro de infravermelho, aliada a baixa solubilidade em solventes apolares, sugerem uma estereoquímica diferente da cassina. Além dos alcalóides isolados foi detectado, por IES-EM/EM, um derivado 3-*O*-(*p*-cumaroil)-cassina, também inédito. Também foi possível observar que os alcalóides majoritários nas flores e frutos diferenciam-se apenas em dois hidrogênios, levando-nos a concluir que nas flores são mais oxidados que aqueles dos frutos e que existe ainda uma predominância de metabólitos com a cadeia lateral contendo 12 átomos de carbono, sobre aqueles de 14 átomos.

A espectrometria de massas IES EM-EM permitiu determinar o tamanho da cadeia lateral na posição C-6, como sendo constituída por dez metilenos e uma metil cetona, confirmando assim que os derivados de cadeia menor são majoritários. Os homólogos de cadeia maior (vinte e oito u.m.a. correspondendo a dois metilenos), só foram detectados devido a sensibilidade da espectrometria de massas e aos avanços dessa técnica possibilitando a seleção de íon no modo de fragmentação (EM-EM).

Apesar de Bruneton (1999) ter definido estes alcalóides como desprovidos de interesse terapêutico, em função de ensaios de *screenings* anticolinesterásicos, foi possível observar que, três, dos quatro alcalóides isolados, apresentavam essa atividade, em concentrações equivalentes às da substância usada como referência (galantamina).

Nos ensaios de atividade antioxidante (ensaio com DPPH), não foi possível observar atividade significativa, o que pode ser justificado pela ausência de grupos doadores de átomos de H com baixa entalpia de dissociação.

Do estudo comparativo entre *C. leptophylla* e *S. spectabilis* foi possível observar a presença de alcalóides nos dois espécimes estudados (*S. spectabilis* e *C. leptophylla*), quando analisados por espectrometria de massas. Algumas limitações impossibilitaram as análises por outras técnicas, como a ausência de cromóforos, impedindo a análise por

CLAE-UV, a baixa sensibilidade da CCD ou mesmo a limitante do RMN  $^1\text{H}$ . Essas técnicas, porém, serviram para determinar um perfil quantitativo dos alcalóides nos dois espécimes estudados, sendo encontrados em grande quantidade nas matrizes do espécime *S. spectabilis* e na forma de traços nas matrizes de *C. leptophylla*, os quais são de gêneros diferentes. Braz Filho (1980), já chamou a atenção para a difícil tarefa de classificação taxonômica baseada somente nas características morfológicas, mais difícil ainda se torna a classificação quando as espécies têm perfis químicos semelhantes, diferenciando na quantidade, como aconteceu neste caso.

### ***Perspectivas***

Os resultados obtido por nosso grupo de pesquisa no estudo químico de *S. spectabilis* indicam que esta espécie ainda merece maior investigação, buscando:

- ✓ Determinar as estereoquímicas relativa e absoluta dos alcalóides isolados.
- ✓ Estudos de biossíntese para este tipo de alcalóides.
- ✓ Estudo fitoquímico do espécime *C. leptophylla*, uma vez que o NuBBE vem investindo nos estudos de mapeamento químico das espécies *Senna/Cassia*.
- ✓ Estudos com os frutos de *S. spectabilis*, priorizando o isolamento dos alcalóides minoritários utilizando CLAE com detector de espalhamento de luz.
- ✓ Estudos de modificação estrutural, visando potencializar a atividade inibidora de AChE.

## 6 REFERÊNCIAS

AGARKAR, S. V.; JADGE, D. R. Phytochemical and pharmacological investigation of genus *Cassia*: a review. *Asian Journal of Chemistry*, v. 11, n. 2, p. 295-299, 1999.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; MIRANDA, A. L. P. DE; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Antinociceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. *Planta Medica*, v. 69, p. 795-799, 2003.

BEVAN, C. W. L.; OGAN, A. U. Studies on west African medicinal plants – I. Biogenesis of carpaine in *Carica papaya* Linn. *Phytochemistry*, v. 3, p. 591-594, 1964.

BHAKTA, T.; MUKHERJEE, P. K.; MUKHERJEE, K.; BANERJEE, S.; MANDAL, S. C.; MAITY, T. K.; PAL, M.; SAHA, B. P. Evaluation of hepatoprotective activity of *Cassia fistula* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 66, p. 277-282, 1999.

BOER, J. DE. The death of Socrates. A historical and experimental study on the actions of coniine and *Conium maculatum*. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie*, v. 83, n. 4, p. 473-490, 1950.

BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. *Tetrahedron*, v. 51, n. 21, p. 5929-5934, 1995.

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

BRAZ FILHO, R.; FIGUEIREDO, U. S. DE; GOTTLIEB, O. R.; MOURÃO, A. P. Rotenóides em *Lonchocarpus longifolius*. *Acta Amazonica*, v. 10, n. 4, p. 843-844, 1980.

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

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

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

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.

FERREIRA, S. H. *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 132 p.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Hydroxycinnamic acid esters from *Polygala chamaebuxus*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 8, p. 1793-1797, 1985.

HARVEY, A. L.; WATERMAN, P. G. The continuing contribution of biodiversity to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, v. 1, n. 1, p. 71-76, 1998.

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

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

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

INGKANINAN, K.; TEMKITTHAWON, P.; CHUENCHOM, K.; YUYAEM, T.; THONGNOI, W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 261-264, 2003.

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

LEETE, E. Biosynthesis of the hemlock alkaloids. The incorporation of acetate-1-C<sup>14</sup> into coniine and conhydrine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, n. 12, p. 2509-2513, 1964.

LYTHGOE, D.; VERNENGE, M. J. Alkaloids from *Cassia carnaval* Speg.: cassine and carnavaline. *Tetrahedron Letters*, v. 12, p. 1133-1137, 1967.

LYTHGOE, D.; BUSCH, A.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGE, M. J. Minor alkaloids from *Cassia carnaval*. *Anales de la Asociación Química Argentina*, v. 60, p. 317-321, 1972.

LÓPEZ, T. A.; CID, M. S.; BIANCHINI, M. L. Biochemistry of hemlock (*Conium maculatum* L.) alkaloids and their acute and chronic toxicity in liverstock. A review. *Toxicon*, v. 37, p. 841-865, 1999.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. v. 1, p. 151, 167.

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

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. DE; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. *Plantas medicinais: do cultivo a terapêutica*. 6. ed. Petrópolis: Vozes, 2003. 247 p.

MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 140 p.

MATOS, F. J. DE A. *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. 2. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária/UFC, 2000. 344 p.

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

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

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

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. DO. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. *Química Nova*, v. 26, n. 4, p. 556-563, 2003.

MULCHANDANI, N. B.; HASSARAJANI, S. A. Cassinicine, a new alkaloid and anthraquinones from *Cassia spectabilis* and their biogenetic relationship. *Planta Medica*, v. 32, p. 357-361, 1977.

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

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

PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 56, p. 237-243, 2001.

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

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.

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

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

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

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S.; SEN, A. Screening of 34 Indian medicinal plants for antibacterial properties. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 62, p. 173-181, 1998.

SAMY, R. P.; IGNACIMUTHU, S. Antibacterial activity of some folklore medicinal plants used by tribals in western ghats of India. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 63-71, 2000.

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

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 51, p. 1-15, 1996.

SON, S.; LEWIS, B. A. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: structure-activity relationship. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 468-472, 2002.



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

VERPOORT, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, v. 3, n. 5, p. 232-238, 1998.

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

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

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