



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ROSIMEIRE BORGES MOREIRA LACERDA**

**ESTUDO QUÍMICO DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS PRESENTES EM  
*Senna spectabilis* (Fabaceae) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

**UBERLÂNDIA**

**2017**

**ROSIMEIRE BORGES MOREIRA LACERDA**

**ESTUDO QUÍMICO DOS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS PRESENTES EM  
*Senna spectabilis* (Fabaceae) E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

**UBERLÂNDIA**

**2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

L131e Lacerda, Rosimeire Borges Moreira, 1980-  
2017 Estudo químico dos alcaloides piperidínicos presentes em Senna spectabilis (Fabaceae) e avaliação da atividade leishmanicida / Rosimeire Borges Moreira Lacerda. - 2017.  
100 f. : il.

Orientador: Marcos Pivatto.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Alcalóides - estudos - Teses. 3. Moléculas - descobertas científicas - Teses. 4. Plantas medicinais - Teses. I. Pivatto, Marcos. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em  
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 248/PPQUI.

DATA: 27/01/2017

DISCENTE: Rosimeire Borges Moreira Lacerda

MATRÍCULA: 11422QMI011

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico dos alcaloides piperidínicos presentes em *Senna spectabilis* (Fabaceae).

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Projeto Universal CNPq n. 449846/2014-8: Isolamento, modificação estrutural e avaliação do potencial antimarialárico dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina e derivados semissintéticos. Projeto Universal FAPEMIG n. CEX – APQ-02481-14: Obtenção de derivados semissintéticos dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina e avaliação do potencial antimarialárico.

Às quatorze horas do dia vinte e sete de janeiro do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Cláudia Quintino da Rocha, da Universidade Federal do Maranhão, Raquel Maria Ferreira de Sousa e Marcos Pivatto, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho . será Estudo Químico dos Alcaloides Piperidínicos Presentes em Senna spectabilis (Fabaceae) e Avaliação da Atividade Leishmanicida.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Cláudia Quintino da Rocha

Profª Dra. Cláudia Quintino da Rocha

UFMA

Raquel Lava

Profª Dra. Ráquel Maria Ferreira de Sousa

UFU

Orientador(a): Prof. Dr. Marcos Pivatto – IQUFU

Universidade Federal de Uberlândia - Avenida Joás Náves de Ávila, nº 2121, Bairro Santa Mônica - 38.408-144 - Uberlândia - MG

+55 - 34 - 3239-4385

cpgquimica@ufu.br

<http://www.cpgquimica.iq.ufu.br>

**ROSIMEIRE BORGES MOREIRA LACERDA**

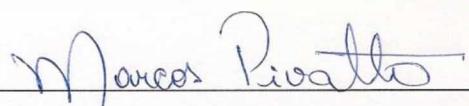
**Estudo químico dos alcaloides piperidínicos presentes em *Senna spectabilis* (Fabaceae) e  
avaliação da atividade leishmanicida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

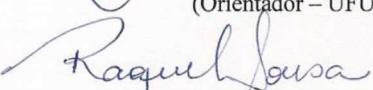
Área de concentração Química Orgânica.

Uberlândia, 27 de janeiro de 2017.

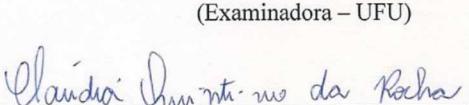
Banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcos Pivatto

(Orientador – UFU)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Raquel Maria Ferreira de Sousa

(Examinadora – UFU)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Cláudia Quintino da Rocha

(Examinadora – UFMA)

Dedico este trabalho ao meu pai,  
Sebastião Borges de Melo, saudades eternas...

## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa na minha vida concluída e não poderia deixar de agradecer a vocês que contribuíram para que este trabalho fosse concluído. Foram muitas idas e vindas, choros, risadas, enfim, contei com pessoas que foram verdadeiros “anjos”. Assim, gostaria de agradecer:

A **Deus**, que todos os dias de minha vida me deu forças para nunca desistir.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Marcos Pivatto**, pela orientação. Mesmo chegando sem me conhecer direito, você abriu as portas, como um pai que abre os braços para receber um filho. Só tenho a agradecer aos seus ensinamentos (pessoais e acadêmicos), orientações, palavras de incentivo, puxões de orelha, paciência e dedicação. Nunca vou esquecer que devemos ter “zelo” em tudo que fazemos.

Aos meus pais **Sebastião** e **Luzia**, meu porto seguro, sempre acreditaram na minha capacidade e me deram forças para continuar. Pai, como eu gostaria que o senhor estivesse aqui para comemorar comigo...

Às minhas filhas **Luiza** e **Laura**, minhas princesas, que a cada volta me recebiam com o sorriso aberto, beijos e abraços apertados, combustíveis para continuar e nunca desistir. Amo vocês!

Ao meu grande amor, **Denis**, por estar ao meu lado nos melhores e piores momentos da minha vida. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

Aos meus irmãos **Ângela**, **Solange**, **Romero** e **Valmir** pela torcida. Em especial quero agradecer à minha irmã **Ângela** por cuidar das minhas filhas quando estava ausente, você se tornou vovó sem querer! E ao meu irmão **Valmir**, “Dim” Deco, muito obrigada por buscá-las no colégio inúmeras vezes me deixando tranquila para estudar.

À minha sobrinha **Juliana**, segunda mãe das minhas princesas, não tenho palavras para agradecer e expressar minha gratidão por você cuidar delas com tanto carinho e amor.

Ao meu sobrinho **Yoshikasu**, por comprar os lanches e ajudar a vó Luzia a cuidar da Luiza e da Laura. Sei que não foi fácil, mas, com certeza, valeu a pena!

À **Maria Perpétua de Oliveira Ramos**, minha “mãezona”, você me ensinou os primeiros passos para descobrir as “moleculinhas”, seus ensinamentos me ajudaram demais. Mesmo distante você esteve perto.

À minha amiga, companheira de todas as horas e irmã de coração, **Thamires**, muito obrigada pelas conversas, risadas, ajudas e companheirismo, você foi um presente de Deus nesta etapa da minha vida. Ah! E muitos choros que foram inevitáveis nesta jornada.

Ao **Mário**, amigo que jamais vou esquecer. Obrigada pelos incentivos e ensinamentos na parte experimental e por acreditar que tudo daria certo no final, mesmo quando a esperança era quase nula. Pelos ouvidos que escutaram tantas reclamações, choros e pelas risadas que

amenizavam o stress diário. Desculpa por todas as brincadeiras, mas sem elas o laboratório ficaria sem vida.

As minhas irmãs científicas: *Michelle* obrigada por tudo e desculpas pelas brincadeiras e *Marília*, a caçulinha do grupo, obrigada por tudo.

À *Kerley*, sempre muito organizada, foi a responsável pela minha preparação para o mestrado. Foram quase seis meses, sempre que eu escapava das aulas você me ligava para repor as horas perdidas. Pena que sua hora ainda não chegou, mas estou na torcida.

À *Patrícia*, sempre na torcida, vibrou comigo em cada etapa do processo. Muito obrigada por cada dica principalmente a da “boiada”: “quando a boiada descer você desce”... e eu fiquei esperando e não vi nada e fui parar sei lá aonde. Mas valeu o mapa que você fez para eu chegar na UFU, mesmo com ele ainda me perdi.

À *Carla* e à *Alessandra*, não tenho palavras para agradecer e expressar minha gratidão por vocês terem me acolhido durante esses dois anos. Vocês são muito especiais!

Ao *Éder Santana*, professor que fiz parte do meu estágio na licenciatura e hoje somos amigos e companheiros de estudo e de viagem. Obrigada por estar comigo nessa etapa da minha vida e pelos conselhos que foram valiosos. Ah! Pelos vidinhos também, não poderia esquecer.

À *Elis Regina, Mirley, Dalva e Éder Dias*, amigos que mesmo longe vibraram comigo a cada conquista.

Ao meu “anjo grande”, *Irmão Claudino* e à *Cláudia Betânia* obrigada por cada conselho e por olhar as minhas filhas na chegada ao colégio quando estava ausente.

Ao *Colégio Marista de Patos de Minas* e ao *Colégio Nossa Senhora das Graças*, muito obrigada pelos dias dispensados para dedicação aos meus estudos.

A *todos os colegas* que fazem parte do *NuPPeN* muito obrigada pela grande amizade que fizemos e pelos momentos que compartilhamos.

Aos *professores do NuPPeN*, que através dos seus conhecimentos me ajudaram na realização deste trabalho.

Ao pessoal da limpeza por manterem o laboratório sempre limpo.

Muito obrigada a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho!

Quando se admira um mestre, o coração  
dá ordens à inteligência para aprender as  
coisas que o mestre sabe. “Aprendo  
porque amo, aprendo porque admiro”.  
(Rubem Alves)

## RESUMO

O Brasil é detentor de uma das maiores biodiversidades do planeta e neste sentido não podemos abdicar desta posição privilegiada para o estudo químico dos produtos naturais visando à descoberta de novas moléculas bioativas. Ao longo do território nacional são encontrados seis biomas que apresentam uma grande diversidade de plantas. Neste trabalho, *Senna spectabilis* (Fabaceae) foi selecionada para o estudo químico por apresentar alcaloides piperidínicos do tipo 2,6-dialquil-piperidin-3-óis, raros na natureza e com grande potencial farmacológico. O estudo foi realizado a partir do extrato etanólico das flores e os compostos isolados foram submetidos aos ensaios para avaliação da atividade leishmanicida e citotoxicidade. Inicialmente, o extrato etanólico das flores de *S. spectabilis* foi submetido à extração líquido-líquido com *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila. As frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), onde foi constatado que a fração clorofórmio apresentou maior número de alcaloides com diferentes  $R_f$ s. Esta fração foi submetida a cromatografia em coluna (CC), de onde foi obtida a mistura dos homólogos (–)-cassina (**1**) e (–)-espectralina (**6**), que foram separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando detector de *light scattering*. Estes compostos foram submetidos aos experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas de alta resolução com ionização por *eletrospray* (IES-EM) para determinação das suas estruturas. Ao longo do fracionamento cromatográfico foram obtidas duas misturas de compostos homólogos (**61a** e **61b** e **62a** e **62b**), mais polares que os alcaloides **1** e **6**. Devido a pequena quantidade de massa, estes metabólitos foram identificados por EM-IES. Também foi obtida uma fração com uma mistura de alcaloides de polaridade menor que **1** e **6**, que foi submetida a CCD preparativa, de onde foi possível obter uma mistura dos alcaloides homólogos (–)-3-*O*-acetilcassina (**13**) e (–)-3-*O*-acetilespectralina (**14**) que foram separados por CLAE-*light scattering*. Os compostos isolados foram submetidos ao ensaio para avaliação da atividade leishmanicida utilizando cepas do parasita *Leishmania amazoniensis*, sendo que **6** e **13** apresentaram valores de IC<sub>50</sub> promissores (IC<sub>50</sub> 15,81 ± 0,47 µg mL<sup>–1</sup> e 30,25 ± 1,74 µg mL<sup>–1</sup>, respectivamente), quando comparados com o padrão positivo anfotericina B (0,29 ± 0,01 µg mL<sup>–1</sup>). A partir do ensaio de citotoxicidade, foi observado que o alcaloide **6** apresenta certa toxicidade (CC<sub>50</sub> 66,67 ± 9,68 µg mL<sup>–1</sup>), porém, a partir do cálculo do índice de seletividade (IS), foi possível constatar que os compostos avaliados apresentam atividade leishmanicida em concentrações não citotóxicas.

**Palavras-chave:** *Senna spectabilis*, alcaloides piperidínicos, (–)-cassina, (–)-espectralina, (–)-3-*O*-acetilcassina, (–)-3-*O*-acetilespectralina, atividade leishmanicida e citotoxicidade.

## ABSTRACT

Brazil holds one of the greatest biodiversity on the planet and in this sense we cannot give up this privileged position for the chemical study of natural products for the discovery of new bioactive molecules. Along the national territory are six biomes that present a great diversity of plants. In this work, *Senna spectabilis* (Fabaceae) was selected for the chemical study because it presents 2,6-dialkyl-piperidin-3-ol type piperidine alkaloids, rare in nature and with great pharmacological potential. The study was carried out from the ethanolic extract of the flowers and the isolated compounds were submitted to the tests to evaluate the leishmanicidal activity and cytotoxicity. Initially, the ethanolic extract of *S. spectabilis* flowers was submitted to liquid-liquid extraction with *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate. The fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC), where it was found that the chloroform fraction had a higher number of alkaloids with different *R*<sub>f</sub>s. This fraction was subjected to column chromatography (CC), from which the mixture of (–)-cassine (**1**) and (–)-spectaline (**6**) homologues were obtained, which were separated by high performance liquid chromatography (HPLC) using *light scattering* detector. These compounds were submitted to nuclear magnetic resonance (NMR) experiments and high resolution mass spectrometry with *electrospray* ionization (ESI-MS) to determine their structures. During the chromatographic fractionation, two mixtures of homologous compounds (**61a** and **61b** and **62a** and **62b**) were obtained, more polar than alkaloids **1** and **6**. Due to the small amount of mass, these metabolites were identified by ESI-MS. Furthermore, a fraction with a mixture of alkaloids less polar than **1** and **6** was also obtained, which was subjected to preparative TLC, and was possible to obtain a mixture of the homologous alkaloids (–)-3-*O*-acetylcassine (**13**) and (–)-3-*O*-acetylspectaline (**14**) which were separated by HPLC-*light scattering*. The isolated compounds were tested for leishmanicidal activity using strains of the parasite *Leishmania amazoniensis*, with **6** and **13** showing promising IC<sub>50</sub> values (IC<sub>50</sub> 15.81 ± 0.47 µg mL<sup>–1</sup> e 30.25 ± 1.74 µg mL<sup>–1</sup>, respectively), when compared to the positive control amphotericin B (0.29 ± 0.01 µg mL<sup>–1</sup>). From the cytotoxicity assay, it was observed that alkaloid **6** presents some toxicity (CC<sub>50</sub> 66.67 ± 9.68 µg mL<sup>–1</sup>), but from the calculation of the selectivity index (SI), it was possible to verify that the evaluated compounds presented leishmanicidal activity at non-cytotoxic concentrations.

**Keywords:** *Senna spectabilis*, piperidine alkaloids, (–)-cassine, (–)-spectaline, (–)-3-*O*-acetylcassine, (–)-3-*O*-acetylspectaline, leishmanicidal activity and cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Senna spectabilis</i>	23
Figura 2 – Folhas e flores (A), frutos (B) e sementes (C) de <i>S. spectabilis</i> .	24
Figura 3 – Cascas (A) e madeira (B) de <i>S. spectabilis</i> .	24
Figura 4 – Alcaloides piperidínicos isolados/identificados em espécies <i>Senna/Cassia</i> .	26
Figura 5 – Estruturas de outros compostos isolados das folhas da espécie <i>S. spectabilis</i> .	27
Figura 6 – Ciclos nitrogenados presentes nos principais alcaloides.	28
Figura 7 – Classificação dos alcaloides de acordo com Henriques et al. (2003): verdadeiro ( <b>41</b> ), protoalcaloide ( <b>42</b> ) e pseudoalcaloide ( <b>43</b> ).	29
Figura 8 – Alcaloides que apresentam diferentes atividades biológicas.	31
Figura 9 – Proposta para a biossíntese do alcaloide piperidínico peletierina.	32
Figura 10 – Alcaloides isolados de fontes naturais.	33
Figura 11 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de <i>Senna spectabilis</i> .	41
Figura 12 – CCD das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de <i>Senna spectabilis</i> .	44
Figura 13 – Fracionamento do extrato etanólico das flores de <i>S. spectabilis</i> .	45
Figura 14 – CCD da frações reagrupadas A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub> e A <sub>3</sub> (FE: sílica, FM: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH (9,5:0,5:0,5) e revelador: ICPt).	46
Figura 15 – EM-IES-(+) em alta resolução da fração A <sub>2</sub> .	47
Figura 16 – EM-EM-(+) do alcaloide <b>1</b> presente na fração A <sub>2</sub> .	47
Figura 17 – EM-EM-(+) do alcaloide <b>6</b> presente na fração A <sub>2</sub> .	47
Figura 18 – Cromatograma da fração A <sub>2</sub> em coluna analítica.	48
Figura 19 – Cromatograma da fração A <sub>2</sub> em coluna semipreparativa.	48
Figura 20 – Cromatograma do alcaloide <b>1</b> em coluna analítica.	49
Figura 21 – Cromatograma do alcaloide <b>6</b> em coluna analítica.	49
Figura 22 – CCD das frações coletadas de RMe07 (FE: sílica, FM: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH (9,5:0,5:0,5) e revelador: ICPt).	50
Figura 23 – EM-IES-(+) em alta resolução da fração RMe07-F <sub>18-20</sub> .	50
Figura 24 – EM/EM-(+) do alcaloide <b>61a</b> presente na fração RMe07-F <sub>18-20</sub> .	51

Figura 25 – EM/EM-(+) do alcaloide <b>61b</b> presente na fração RMe07-F <sub>18-20</sub> .	51
Figura 26 – Proposta de fragmentação para os alcaloides <b>61a</b> e <b>61b</b> .	52
Figura 27 – Cromatograma da fração RMe07-F <sub>18-20</sub> em coluna analítica.	53
Figura 28 – CCD das frações coletadas de RMe08 (FE: sílica, FM: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH (9,5:0,5:0,5) e revelador: ICℓPt).	53
Figura 29 – EM-IES-(+) em alta resolução da fração RMe08-F <sub>8-12</sub> .	54
Figura 30 – EM/EM-(+) do alcaloide <b>62a</b> presente na fração RMe08-F <sub>8-12</sub> .	54
Figura 31 – Proposta de fragmentação para o alcaloide <b>62a</b> .	55
Figura 32 – Cromatograma e CCD da fração RMe08-F <sub>8-12</sub> em coluna analítica.	55
Figura 33 – CCD dos homólogos <b>13</b> e <b>14</b> após a CCDP (FE: sílica, FM: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH (9,5:0,5:0,5) e revelador ICℓPt).	56
Figura 34 – Cromatograma dos homólogos <b>13</b> e <b>14</b> em coluna analítica.	56
Figura 35 – Cromatograma do alcaloide <b>13</b> em coluna analítica.	57
Figura 36 – Cromatograma do alcaloide <b>14</b> em coluna analítica.	57
Figura 37 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>13</b> .	58
Figura 38 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>14</b> .	58
Figura 39 – EM/EM-(+) do alcaloide <b>13</b> .	59
Figura 40 – EM/EM-(+) do alcaloide <b>14</b> .	59
Figura 41 – CCD dos alcaloides <b>1</b> e <b>6</b> (FE: sílica, FM: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:NH <sub>4</sub> OH (99:01:0,5) e revelador: ICℓPt).	60
Figura 42 – IES-EM alta resolução do alcaloide <b>1</b> .	60
Figura 43 – IES-EM alta resolução do alcaloide <b>6</b> .	61
Figura 44 – Espectro na região do IV (pastilha de KBr) do alcaloide <b>1</b> .	62
Figura 45 – Espectro na região do IV (pastilha de KBr) do alcaloide <b>6</b> .	62
Figura 46 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do alcaloide <b>1</b> (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).	65
Figura 47 – Ampliação do espectro 46 ( $\delta$ 1,15–2,15) do alcaloide <b>1</b> .	65
Figura 48 – Ampliação do espectro 46 ( $\delta$ 2,30–3,90) do alcaloide <b>1</b> .	66
Figura 49 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do alcaloide <b>1</b> (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD).	66
Figura 50 – Ampliação do espectro 49 ( $\delta$ 10,0–76,0), alcaloide <b>1</b> .	67
Figura 51 – Ampliação do espectro 50 ( $\delta$ 13,0–38,0), alcaloide <b>1</b> .	67
Figura 52 – Ampliação do espectro 51 ( $\delta$ 29,2–31,3), alcaloide <b>1</b> .	68

Figura 53 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT 135 (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcaloide <b>1</b> .	68
Figura 54 – Ampliação do espectro 53 ( $\delta$ 29,8–31,0), alcaloide <b>1</b> .	69
Figura 55 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do alcaloide <b>6</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	69
Figura 56 – Ampliação do espectro 55 ( $\delta$ 1,20–2,20) do alcaloide <b>6</b> .	70
Figura 57 – Ampliação do espectro 55 ( $\delta$ 2,40–3,90) do alcaloide <b>6</b> .	70
Figura 58 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do alcaloide <b>6</b> (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	71
Figura 59 – Ampliação do espectro 58 ( $\delta$ 12,0–76,0), alcaloide <b>6</b> .	71
Figura 60 – Ampliação do espectro 59 ( $\delta$ 29,2–31,3), alcaloide <b>6</b> .	72
Figura 61 – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ DEPT 135 (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcaloide <b>6</b> .	72
Figura 62 – Ampliação do espectro 61 ( $\delta$ 29,85–30,95), alcaloide <b>6</b> .	73
Figura 63 – CCD dos alcaloides <b>13</b> e <b>14</b> (FE: sílica, FM: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$ (9,5:0,5:0,5) e revelador: $\text{IClPt}$ ).	73
Figura 64 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>13</b> .	74
Figura 65 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide <b>14</b> .	74
Figura 66 – Espectro na região do IV (filme) do alcaloide <b>13</b> .	75
Figura 67 – Espectro na região do IV (filme) do alcaloide <b>14</b> .	76
Figura 68 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do alcaloide <b>13</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	78
Figura 69 – Ampliação do espectro 68 ( $\delta$ 1,00–2,20) do alcaloide <b>13</b> .	78
Figura 70 – Ampliação do espectro 69 ( $\delta$ 2,35–3,45) do alcaloide <b>13</b> .	79
Figura 71 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do alcaloide <b>13</b> (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	79
Figura 72 – Ampliação do espectro 71 ( $\delta$ 8,0–76,0), alcaloide <b>13</b> .	80
Figura 73 – Ampliação do espectro 72 ( $\delta$ 17,0–45,0), alcaloide <b>13</b> .	80
Figura 74 – Ampliação do espectro 73 ( $\delta$ 29,3–31,3), alcaloide <b>13</b> .	81
Figura 75 – Espectro de RMN de DEPT 135 (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcaloide <b>13</b> .	81
Figura 76 – Ampliação do espectro 75 ( $\delta$ 29,75–30,75), alcaloide <b>13</b> .	82
Figura 77 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do alcaloide <b>14</b> (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	82
Figura 78 – Ampliação do espectro 77 ( $\delta$ 0,7–2,2), alcaloide <b>14</b> .	83
Figura 79 – Ampliação do espectro 77 ( $\delta$ 2,3–3,7), alcaloide <b>14</b> .	83
Figura 80 – Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do alcaloide <b>14</b> (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).	84
Figura 81 – Ampliação do espectro 80 ( $\delta$ 14,0–80,0), alcaloide <b>14</b> .	84

Figura 82 – Ampliação do espectro 81 ( $\delta$ 22,0–36,0), alcaloide <b>14</b> .	85
Figura 83 – Ampliação do espectro 82 ( $\delta$ 29,5–31,3), alcaloide <b>14</b> .	85
Figura 84 – Espectro de RMN de DEPT 135 (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) do alcaloide <b>14</b> .	86
Figura 85 – Ampliação do espectro 84 ( $\delta$ 29,20–31,70), alcaloide <b>14</b> .	86
Figura 86 – Alcaloides <b>1</b> e <b>6</b> .	87
Figura 87 – Alcaloides <b>13</b> e <b>14</b> .	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies do gênero <i>Cassia</i> utilizadas na medicina popular.	19
Tabela 2 – Classes de alcaloides e seus aminoácidos precursores.	32
Tabela 3 – Reagentes/solventes utilizados.	36
Tabela 4 – Equipamentos disponíveis para realização deste trabalho.	36
Tabela 5 – Frações da extração líquido-líquido do extrato etanólico e seus rendimentos.	43
Tabela 6 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ dos alcaloides <b>1</b> e <b>6</b> .	64
Tabela 7 – Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ dos alcaloides <b>13</b> e <b>14</b> .	77
Tabela 8 – Configuração absoluta de <b>1</b> e <b>6</b> .	87
Tabela 9 – Configuração absoluta de <b>13</b> e <b>14</b> .	87
Tabela 10 – Avaliação da atividade leishmanicida dos alcaloides isolados.	88

## LISTA DE SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
BHI	Brain Heart Infusion
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica para se obter 50 % de atividade
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Exploratória Diferencial)
EM	Espectrometria de Massas
EM/EM	Espectrometria de Massas sequencial
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
HOAc	Ácido Acético
IClPt	Iodocloroplatinato
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento em Hz
PTFE	Politetrafluoroetileno
R <sub>f</sub>	Fator de Retenção
RMeF	Rosimeire Mestrado Fração
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
TMS	Tetrametilsilano
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
δ	Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	17
1.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA FABACEAE	17
1.2 <i>Senna spectabilis</i>	23
1.3 METABÓLITOS ISOLADOS DE <i>Senna spectabilis</i>	25
1.4 ALCALOIDES	28
1.5 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA	33
<b>2 OBJETIVOS</b>	35
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	36
3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS	36
3.2 CROMATOGRAFIA	37
3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada	37
3.2.2 Preparo do revelador de iodocloroplatinato	37
3.2.3 Cromatografia em Coluna	37
3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	37
3.3 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS	38
3.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	40
3.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO	40
3.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA	41
3.6.1 Citotoxicidade	41
3.6.2 Atividade leishmanicida	42
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	43
4.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO	43
4.2 ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	43
4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES	59
4.3.1 Homólogos (–)-cassina (1) e (–)-espectralina (6)	59
4.3.2 Homólogos (–)-3-O-acetyl cassina (13) e (–)-3-O-acetyl spectralina (14)	73
4.4 CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS ALCALOIDES 1, 6, 13 E 14	87
4.5 AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA E CITOTOXIDADE	88
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	90
<b>REFERÊNCIAS</b>	91

## 1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade até os dias atuais, o homem sempre utilizou as plantas medicinais como meio de cura para as suas enfermidades, seja para recuperar a saúde ou reestabelecer o equilíbrio do corpo e da mente (MACIEL et al., 2002; PINTO et al., 2002; VIEGAS et al., 2006b). Um dos primeiros relatos do uso das plantas medicinais está registrado nas escrituras sagradas e no papiro de Ebers (PINTO et al., 2002). O conhecimento das plantas pelos povos primitivos e indígenas pode ser considerado um fator fundamental para entender o potencial que as plantas possuem. O conhecimento das propriedades terapêuticas através do entendimento da utilização das plantas torna possível o desenvolvimento de novos medicamentos mais potentes que possam ser utilizados para a cura das enfermidades (BARREIRO; BOLZANI, 2009; MACIEL et al., 2002; VIEGAS et al., 2006b).

É estimado que existam no Brasil cerca de 120.000 espécies de plantas, sendo detentor de uma grande reserva vegetal (CARVALHO, 2004). Com a grandeza de seu litoral, de sua flora e sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não podemos abdicar dessa vocação para o estudo dos produtos naturais (PINTO et al., 2002). O uso de técnicas rápidas e precisas, capazes de detectar, isolar e identificar constituintes químicos presentes em diversas matrizes tem auxiliado na descoberta de novos compostos com arquiteturas moleculares que possam inspirar o desenvolvimento de novos fármacos (DI STASI, 1996; PINTO et al., 2002).

Dentre as diversas espécies da família Fabaceae, *Senna spectabilis* tem se destacado devido aos estudos que mostram o grande potencial químico-farmacológico apresentado pelos alcaloides piperidínicos do tipo 2,6-dialquil-piperidin-3-óis, raros na natureza (VIEGAS JUNIOR et al., 2004, 2005a, 2005b, 2007). Neste trabalho foi realizado o estudo químico do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis* visando a obtenção dos alcaloides majoritários (−)-cassina (**1**) e (−)-espectralina (**6**), assim como, a obtenção de novos metabólitos. Vale destacar que dentre os alcaloides obtidos, a (−)-3-*O*-acetilcassina (**13**) foi isolada pela primeira vez.

### 1.1 PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DA FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae comprehende cerca de 727 gêneros e aproximadamente 19325 espécies, distribuídas em todo o planeta, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais. É uma das mais representativas nos ecossistemas brasileiros, com 2735 espécies e 212 gêneros,

onde encontram-se ervas, arbustos e trepadeiras, além de árvores de pequeno e grande porte (JOLY, 1998; LEWIS et al., 2005; LIMA, 2016). É utilizada como alimento, madeira de lei, ornamentação e adubação verde devido a sua capacidade de fixação de nitrogênio pelas bactérias simbiontes de suas raízes (CÓRDULA, 2008).

Esta família, a terceira maior dentre as Angiospermas, era conhecida anteriormente como Leguminosae, mas de acordo com a nova classificação taxonômica passou a ser denominada Fabaceae e está subdividida em três subfamílias: Papilionoideae (28 tribos e 13.800 espécies), Mimosoideae (4 tribos e 3.270 espécies) e Caesalpinoideae (4 tribos e 2.250 espécies) (CÓRDULA, 2008; LEWIS et al., 2005; VALLE et al., 2006).

A subfamília Papilionoideae é a maior e a mais importante economicamente, merecendo destaque as espécies como a soja (*Glycine max*), o feijão (*Phaseolus* spp.), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a ervilha (*Pisum sativum*), o grão de bico (*Cicer arietinum*) e a alfafa (*Medicago sativa*). Compreende desde espécies herbáceas até espécies arbóreas distribuídas por todos os territórios dos cinco continentes (CARDOSO et al., 2012).

Mimosoideae é a segunda maior subfamília distribuída nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas incluindo espécies arbóreas, arbustivas, lianas e herbáceas (LEWIS et al., 2005). No Brasil possui aproximadamente 824 espécies e 37 gêneros dos quais se destacam *Acácia*, *Mimosa* e *Ingá* (LIMA et al. 2016).

A subfamília Caesalpinoideae compreende cerca de 150 gêneros, muito bem representada no Brasil destacando o gênero *Cassia/Senna*, que possui mais de 600 espécies incluindo arbustos, árvores e ervas. As flores destas espécies são principalmente amarelas (JOLY, 1998). Possui diversas propriedades biológicas e farmacológicas (AYO, 2010; CHANDA et al., 2012; SILVA et al. 2005). Com a alteração do sistema de classificação taxonômica, várias espécies do gênero *Cassia* mudaram para *Senna*, outras continuam *Cassia* e algumas com sinonímia *Senna*. Esta mudança causou alguns transtornos nos estudos químicos e farmacológicos anteriores da espécie *Senna spectabilis* que foi erroneamente identificada como *C. leptophylla* em estudos anteriores (VIEGAS JUNIOR et al., 2006a). A Tabela 1 reúne dados sobre o uso tradicional e trabalhos científicos descrevendo resultados farmacológicos de algumas espécies destes gêneros.

**Tabela 1** – Espécies do gênero *Cassia* utilizadas na medicina popular.

Espécie	Uso tradicional	Propriedades farmacológicas comprovadas	Referências
<i>C. abbreviata</i>	Dores abdominais e de dente.	Contra doenças venéreas e bactericida.	Mongalo e Mafoko (2013).
<i>C. absus</i>	Antitumoral e anti-asmática.		Mondal (2015)
<i>C. acutifolia</i>	Purgativa.	Purgativa.	Mascolo et al. (1998)
<i>C. alata</i>	Tóxica para o gado, anti-ulcerogênica, contra doenças de pele, eczemas, bronquite, anti-asmática, antibacteriana e anti-helmíntica.	Abortiva, anti-malária, antiviral, antifúngica, antioxidante, antiinflamatória, purgativa, hepatoprotetora, antimicrobiana, estimulante de crescimento vegetal, antidiabético, antipirético e efeitos tóxicos.	Ehiowemwenguan et al. (2014); Varghese et al. (2013); Okwu e Uchenna (2009); Fernand et al. (2008); Viana et al. (2008); Samy e Ignacimuthu (2000).
<i>C. angustifolia</i>	Purgativa, laxativa e contra doenças cutâneas.	Antitumoral, anti-inflamatória e antibacteriana.	Cuéllar et al. (2001); Kinjo et al. (1994); Lemli et al. (1981)
<i>C. aurantifolia</i>		Antibiótica, antimalária, antitumoral, purgativa, ação cardiovascular, neuronal e bactericida.	Evans et al. (2002)
<i>C. auriculata</i>	Adstringente, anti-helmíntica, antidiabética, ativa em desordens urinárias, contra conjuntivites e antibacteriana.	Bactericida, fungicida e antidiabética.	Kainsa, Kumar e Rani (2012); Samy e Ignacimuthu (2000); Ali et al. (1999)
<i>C. biflora</i>	Contra tumores quelóides, picadas de insetos e anti-reumática.		Meena e Kalidhar (1998b)
<i>C. birostris</i>		Antioxidante.	Vila et al. (2003)
<i>C. corymbosa</i>	Mutagênica.		Ferreira e Vargas (1999)
<i>C. didymobotrya</i>		Antimalária e antimicrobiana.	Korir et al. (2012); Alemayehu et al. (1996)
<i>C. eucalyptus</i>		Antibiótica, antimalária, antitumoral, purgativa, ação cardiovascular, neuronal e bactericida.	Evans et al. (2002)
<i>C. fistula</i>	Purgativa, repelente de insetos, anti-reumática, anti-inflamatória, hipoglicemiante, antidermatite, anti-ofídica, antibacteriana, antiviral, antifúngica e ornamental.	Antifúngica e antiúlcera.	Paguigan et al. (2014); Kainsa, Kumar e Rani (2012); Bahorun et al. (2005); Samy e Ignacimuthu (2000)
<i>C. floribunda</i>	Nutricional.		Mondal (2015)

<i>C. frandis</i>	Antifúngica.	Samy e Ignacimuthu (2000)
<i>C. grandis</i>	Purgativa, anti-anêmica, adstringente, expectorante, sedativa.	Ferreira e Vargas (1999); Meena e Kalidhar (1998a)
<i>C. hirsuta</i>	Febres, cólicas uterinas, dores estomacais, retenção de urina.	Joshua e Chiletugo (2010); Rao et al. (1999)
<i>C. hirta</i>		Evans et al. (2002)
<i>C. holosericea</i>	Antimicrobiana.	Ali et al. (1999)
<i>C. itálica</i>	Purgativa, contra gota, inibidor biliar, anti-reumática e parasiticida.	Ali et al. (1999); Jain et al. (1997)
<i>C. jahni</i>	Purgativa.	Mendez (1971)
<i>C. kleinii</i>	Purgativa, hepatoprotetora.	Mondal (2015)
<i>C. laevigata</i>	Contra dores de ouvido, alopecia, doenças biliares, cólera, expectorante, purgativa, uso oftálmico.	Jones et al. (2000)
<i>C. macranthera</i>	Laxante, brinquedos de madeira.	Silva et al. (2014)
<i>C. martiana</i>	Laxante, abortivo e antitussígeno.	Macedo et al. (2009) e Agra et al. (2008)
<i>C. multijuga</i>	Antibiótica, contra infecções dérmicas e uso oftálmico.	Francisco et al. (2012).
<i>C. nigrigans</i>	Anti-ulcerogênica, antidiarreica, vermífuga, anti-reumática, contraceptiva.	Nwafor e Okwuasaba (2001); Akah et al. (1998)
<i>C. noname</i>	Diurética, tônica.	Hatano et al. (1997, 1999)
<i>C. obtusa</i>	Antipirética, antidiabética, antidiarreica, uso oftálmico e contra doenças cutâneas.	Sekar et al. (1999)
<i>C. obtusifolia</i>	Abortivo, reumatismo, purgativa, diurética, aumenta acuidade visual, contra doenças oculares e hepatite, muito ativa contra larvas de mosquitos, tóxico para bovinos.	Zhang et al. (2014); Xu et al. (2012); Wu et al. (2010); Agra et al. (2008)

<i>C. occidentalis</i>	Purgativa, tônica hepática, bactericida, antipirética, antitumoral, expectorante, anti-inflamatória, diurética, antifúngica, neurotóxica para bovinos, febrífugo, laxante, bebida como café, estomáquico.	Bactericida, fungicida, antiviral, hepatoprotetora, antimalária, antiinflamatória, antioxidante, tóxica para cabras e gestantes, crianças, cavalos, ratos, coelhos, bovinos e aves, citotóxica, larvicida, analgésica, antipirética, anticâncer, antidepressiva.	Kaur et al. (2014); Silva et al. (2011); Li et al. (2012); Yadav et al. (2010); Sreejith et al. (2010); Kim et al. (2009); Samy e Ignacimuthu (2000); Kim et al. (1971)
<i>C. petersiana</i>	Anti-sífilis, bactericida, antiviral, antitussígena, antipirética, contra gonorréia, purgativa, contra dores estomacais, antihelmíntica, contra infecções cutâneas, inseticida.	Inibitória de lipases.	Samy e Ignacimuthu (2000)
<i>C. purpurea</i>	Antimicrobiana.	Bactericida e fungicida.	Ali et al. (1999)
<i>C. putibunda</i>	Antimicrobiana.	Citotóxica.	
<i>C. quinquangulata</i>		Antihipertensiva e bactericida.	Li et al. (2001)
<i>C. reticulata</i>	Reumatismo, doenças do fígado, dermatite.	Antioxidante, antifúngica, antimalária.	Lizcano et al. (2010); Santos et al. (2008)
<i>C. rugosa</i>	Vermífugo, antiofídico, feridas, impingens.	Antifúngica.	Barbosa et al. (2004); Fenner et al. (2006).
<i>C. roxburghii</i>	Antimicrobiana.	Bactericida e fungicida.	Ali et al. (1999)
<i>C. siamea</i>	Purgativa, malária.	Bactericida, fungicida, antiviral, antioxidante, antidiabética, antilipidêmica, analgésica, antiinflamatória, antipirética, antiúlcera.	Kumar et al. (2010); Oshimi et al. (2009); Thongsaard et al. (1996).
<i>C. spectabilis</i>	Gripes, resfriados, laxativo, amenorreia, anemia, prisão de ventre, insônia, ansiedade, epilepsia, malária, disenteria, dor de cabeça.	Analgesica, anti-inflamatória, inibitória de superóxido, anestésica, antimalária, anticolinesterásica, sedativo, anticonvulsivo, antimicrobiana, antioxidante e esquistomicida.	Viegas et al. (2004); Viegas Junior et al. (2004, 2005a, 2005b, 2007); Silva et al. (2010); Silva et al. (2011a), Jothy et al. (2012); Silva et al. (2012); melo et al. (2014); Pivatto et al. (2005 e 2014); Castro et al. (2016)
<i>C. tora</i>	Diurética, anti-astênica, antibacteriana, contra doenças cutâneas e eczemas, correção da visão.	Hepatoprotetora, citoprotetora, fungicida, bactericida, antimutagênica e anti-inflamatória.	Mandal (2015), Samy e Ignacimuthu (2000)
<i>C. torosa</i>	Contra picadas de insetos, tônica, digestiva.	Citotóxica e anti-inflamatória.	Mandal (2015)

---

*C. trachypus* Antimicrobiana.

*C. zeylanicum* Anti-ulcerogênica e anti-alérgica.

---

Fonte: adaptado VIEGAS JUNIOR et al., 2006a.

## 1.2 *Senna spectabilis*

*Senna spectabilis* (sin. *Cassia spectabilis*) (Figura 1), é conhecida por vários nomes populares, dependendo da região: são-joão, cássia-do-nordeste, canafistula-de-besouro e pau-de-ovelha podendo atingir uma altura de 6–9 m, com tronco de 30–40 cm de diâmetro (LORENZI, 2002; MELO et al., 2014). É uma árvore nativa da África, América Central e América do Sul, porém encontrada em diversas regiões dos países africanos tropicais e subtropicais, como a Colômbia e Brasil. Considerada de porte médio, é ideal para arborização de ruas, o que já vem sendo feito em muitas cidades brasileiras (JOTHY et al., 2012; LORENZI, 2002; SILVA et al., 2010b, 2010c). Na região semiárida do nordeste do Brasil é utilizada como forragem para ovinos e caprinos por apresentar alto valor nutricional servindo de recurso alternativo no período de seca (SANTOS et al., 2013).

**Figura 1 – *Senna spectabilis*.**

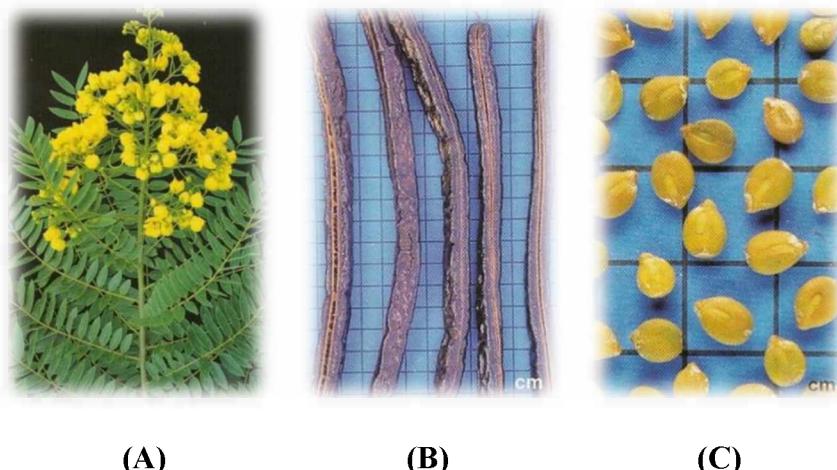


Fonte: a autora (Rua Manoel Ascenço Batista; bairro Santa Mônica; coordenadas: latitude S18.91638°, longitude O48.22765°, altitude 61 m; Cidade: Uberlândia).

Suas folhas (Figura 2) são compostas pinadas, com 10–20 cm de comprimento. As flores são amarelas, dispostas em inflorescências terminais. O fruto é um legume cilíndrico

indeiscente. Muito encontrada no nordeste na caatinga. Ocorre preferencialmente em solos mais profundos, bem drenados e de razoável fertilidade. Produz anualmente grande quantidade de sementes. Floresce durante os meses de dezembro-abril e os frutos amadurecem nos meses de agosto-setembro (LORENZI, 2002).

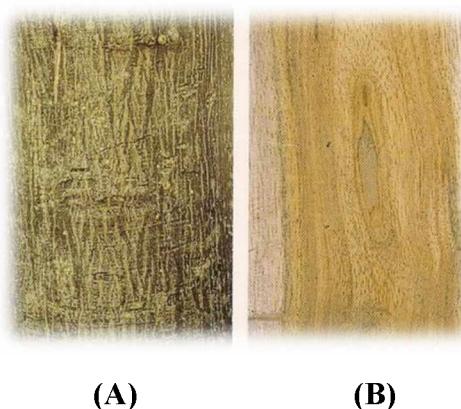
**Figura 2** – Folhas e flores (A), frutos (B) e sementes (C) de *S. spectabilis*.



Fonte: LORENZI, 2002.

De acordo com Lorenzi (2002) a madeira (Figura 3) de *S. spectabilis* é moderadamente pesada e durável quando protegida da umidade, sendo mole e pouco compacta. Devido às limitações de tamanho é aproveitada apenas para confecção de objetos leves, caixotaria e como lenha e carvão.

**Figura 3** – Cascas (A) e madeira (B) de *S. spectabilis*.



Fonte: LORENZI, 2002.

Na medicina popular, as cascas, as folhas e as sementes de *S. spectabilis* são descritas para o tratamento de doenças como prisão de ventre, insônia, ansiedade, epilepsia, malária, disenteria e dor de cabeça (MELO et al., 2014; SILVA et al., 2011a ; SILVA et al., 2010). Também é descrita como laxante, analgésica, anti-inflamatória e antiulcerogênica (PIVATTO et al., 2005; SILVA et al., 2012; VIEGAS et al., 2004).

Existem diversos artigos relatando a importância de *S. spectabilis* no que diz respeito as atividades biológicas do extrato etanólico e de misturas de alcaloides piperidínicos isolados desta planta como a atividade anticolinesterásica (VIEGAS JUNIOR et al., 2004; VIEGAS JUNIOR et al., 2005a; VIEGAS JUNIOR et al., 2005b; VIEGAS JUNIOR et al., 2007), sedativa e anticonvulsiva (SILVA et al., 2011a), antimicrobiana e antioxidante (JOTHY et al., 2012), sobre o sistema nervoso central (OLIVEIRA SILVA et al., 2011; SILVA et al., 2010a), leishmanicida (MELO et al., 2014), antimalárica (PIVATTO et al., 2014) e esquistossomicida (CASTRO et al., 2016).

### 1.3 METABÓLITOS ISOLADOS DE *Senna spectabilis*

O alcaloide (–)-cassina (**1**) foi o primeiro a ser isolado das folhas de *C. excelsa* por Highet em 1964 (Figura 4). Sua estrutura e estereoquímica foram discutidas e propostas várias vezes, mas só em 1966 que Rice e Coke conseguiram determiná-las. Christofidis e Jadot (1976) isolaram novamente a (–)-cassina (**1**) e também a (–)-6-*iso*-carnavalina (**2**), a (–)-espectalinina (**3**), a 6-*iso*-cassina (**4**) e a (+)-espectalina (**5**) dos extratos das sementes de *C. spectabilis*. Os metabólitos **1** e **9** também foram identificadas nas flores de *C. jahni* por Mendez (1971), que relatou o uso como purgativo pelos habitantes dos Andes Venezuelanos (PIVATTO, 2005; VIEGAS et al., 2006a).

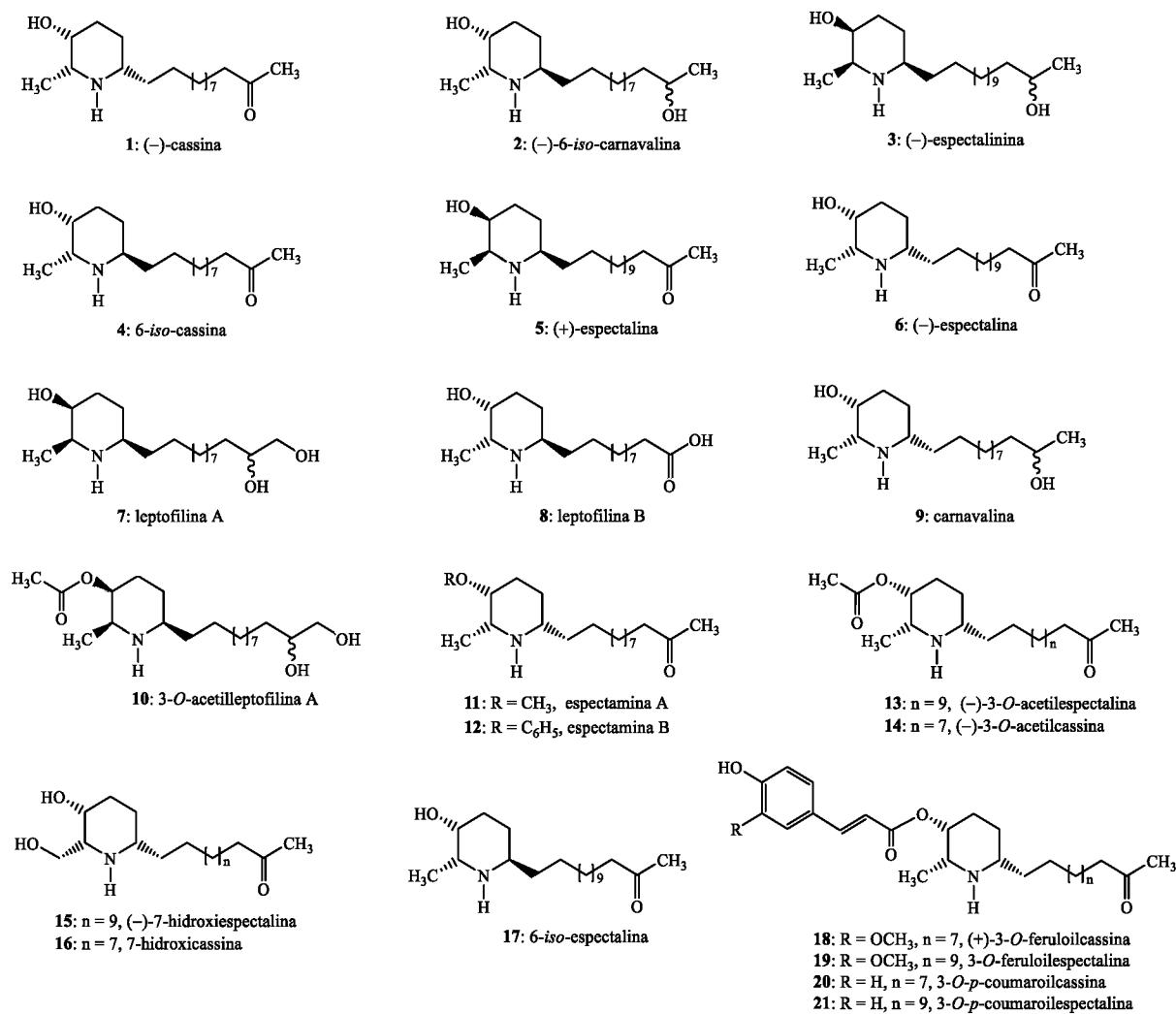
Bolzani (1995) descreveu o estudo químico das folhas de *C. spectabilis*, no qual relata o isolamento de sete alcaloides piperidínicos (–)-espectalina (**6**), leptofilina-A (**7**), leptofilina-B (**8**), carnavalina (**9**), 3-acetilleptofilina-A (**10**), (–)-espectalinina (**3**) e 6-*iso*-carnavalina (**2**) (Figura 4). Os alcaloides **3**, **7**, **10** mostraram resultados positivos na inibição seletiva do desenvolvimento de linhagens mutantes de *S. cerevisiae* e ainda demonstraram citotoxicidade seletiva, o que é um indicativo da atividade antitumoral.

Em 2003, Kamo e colaboradores isolaram do extrato metanólico de *C. spectabilis*, coletadas na África, dois alcaloides piperidínicos inéditos as espectaminas A (**11**) e B (**12**). Estes metabólitos foram avaliados em modelos utilizando macrófagos e xantina oxidase, o que demonstrou resultado positivo na inibição da produção de ânions superóxido (espécies

químicas que podem estar associadas à inflamação, câncer e hipertensão), sendo que o alcaloide **11** foi mais potente que seu análogo **12**.

Viegas Junior e colaboradores (2004) isolaram das flores de *S. spectabilis* três novos alcaloides (**13**, **16** e **17**) (Figura 4), além do alcaloide **6** que já havia sido isolado anteriormente. Em seguida, Pivatto e colaboradores (2005), realizaram um estudo com os frutos e flores de *S. spectabilis* utilizando a espectrometria de massas *tandem* com ionização por *electrospray* (IES-EM/EM), que permitiu a identificação de séries homólogas de alcaloides piperidínicos (**1**, **6**, **3**, **9**, **13–21**) (Figura 4). Dos frutos verdes de *S. spectabilis* também foram isolados os alcaloides **6**, **13** e **18** (Figura 4) (VIEGAS JUNIOR et al., 2007).

**Figura 4 – Alcaloides piperidínicos isolados/identificados em espécies *Senna/Cassia*.**



Fonte: adaptado Pivatto, 2010.

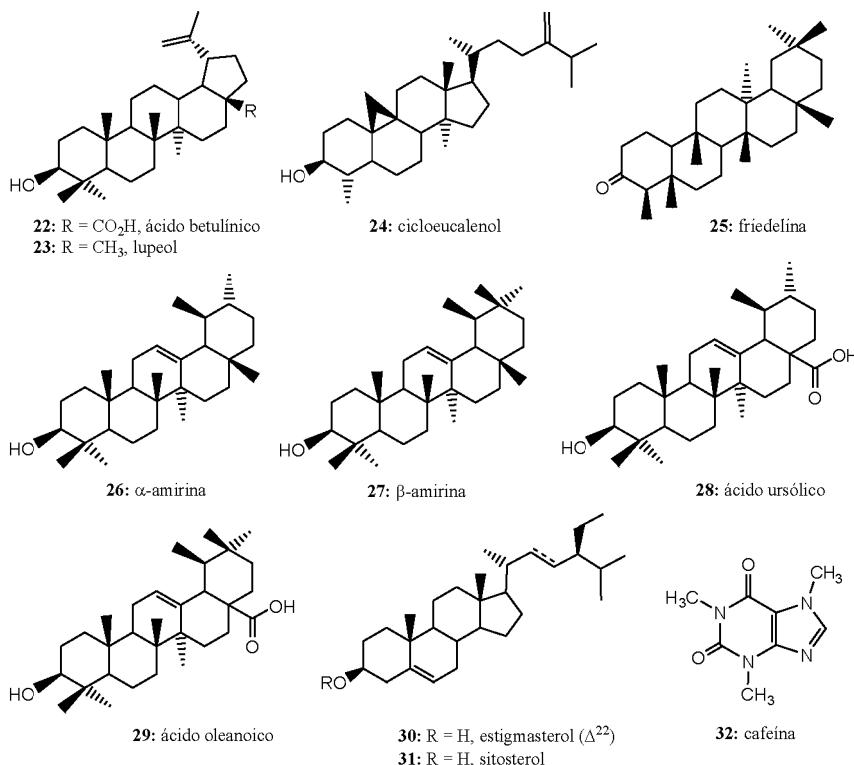
Recentemente os alcaloides homólogos **1** e **6** e dois derivados semissintéticos *(–)-3-O-acetilespectalina* (**13**) e *(–)-3-O-acetyl cassina* (**14**) (Figura 4), foram submetidos a ensaios *in*

*vitro* e *in vivo* de inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima relacionada a doença de Alzheimer. Devido aos resultados promissores estes compostos foram inseridos em um estudo mais aprofundado que se encontra em fase pré-clínica (VIEGAS JUNIOR et al.; 2004, 2005a, 2005b, 2007).

Pivatto e colaboradores (2014) submeteram os alcaloides **1** e **6** e os derivados **13** e **14**, a um ensaio empregando culturas de eritrócitos, infectadas com *Plasmodium falciparum*, um teste específico para avaliação da atividade antimalárica, que apresentou resultados bastante promissores. Dentre as substâncias avaliadas, os alcaloides **1** e **6** foram mais potentes que os derivados semissintéticos **13** e **14**, quando comparados com o padrão cloroquina.

Além dos alcaloides piperidínicos, um estudo químico recente das folhas de *S. spectabilis* descreveu o isolamento e a identificação de oito triterpenos pentacíclicos encontrados pela primeira vez nesta espécie, são eles: ácido betulínico (**22**), lupeol (**23**), cicloeucalenol (**24**) e friedelina (**25**) (na forma pura) e  $\alpha$ -amirina (**26**),  $\beta$ -amirina (**27**), ácido ursólico (**28**) e oleanoico (**29**) (na forma de misturas). Foram identificadas também duas misturas de esteroides, o estigmasterol (**30**) e o  $\beta$ -sitosterol (**31**), na forma livre e glicosilada, além da cafeína (**32**), um alcaloide, inédito neste gênero *Senna* (Figura 5) (SILVA et al., 2010).

**Figura 5** – Estruturas de outros compostos isolados das folhas da espécie *Senna spectabilis*.

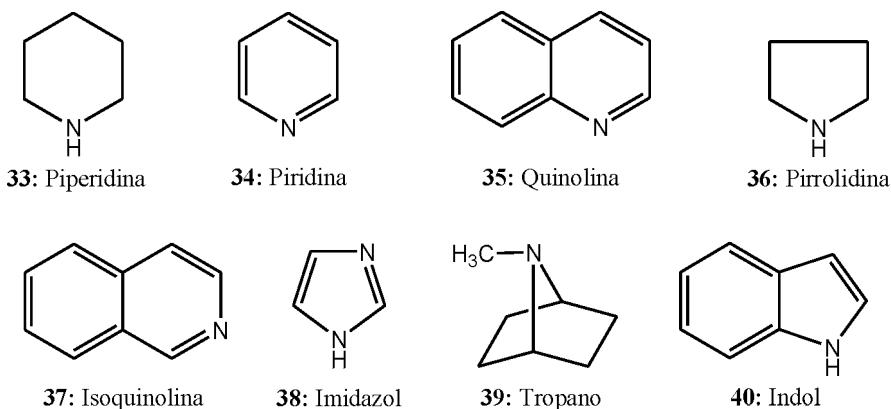


Fonte: SILVA, et al., 2010.

## 1.4 ALCALOIDES

O termo alcaloide foi utilizado pela primeira vez pelo boticário alemão W. Meibner, em 1819, ao verificar que essas substâncias se comportavam como “álcalis” (ANISZEWSKI, 2007). O termo álcali é derivado do árabe *al-quali*, denominação vulgar para planta da qual a soda cáustica ( $\text{NaOH}$ ) foi originalmente obtida (HENRIQUES et al., 2003). Meibner considerava os alcaloides compostos nitrogenados farmacologicamente ativos (ANISZEWSKI, 2007), encontrados predominantemente nas angiospermas (HENRIQUES et al., 2003), em diferentes partes dos vegetais e geralmente combinados com ácidos orgânicos e taninos (Figura 6) (ALONSO, 2008).

**Figura 6 – Ciclos nitrogenados presentes nos principais alcaloides.**



Fonte: a autora.

Os alcaloides são compostos básicos que possuem propriedades químicas semelhantes às da amônia por apresentarem um átomo de nitrogênio que contém um par de elétrons não-compartilhado. O grau de basicidade varia muito, dependendo da estrutura da molécula, da presença e da localização de outros grupos funcionais (ROBBERS et al., 1997). Por possuírem um caráter de base fraca, são convertidos na forma de sal em soluções aquosas de ácidos minerais, e quando tratados com soluções alcalinas, o nitrogênio libera o íon hidrogênio formando uma amina livre facilitando a sua extração e isolamento de outros constituintes vegetais (HENRIQUES et al., 2003).

Em sua maioria, os alcaloides são pouco hidrossolúveis, mas os sais formados na reação com ácidos geralmente são solúveis. São em geral solúveis em éter, clorofórmio ou outros solventes imiscíveis em água de baixa polaridade, nos quais, porém, os sais dos alcaloides são insolúveis, permitindo o isolamento, a purificação e até mesmo a quantificação

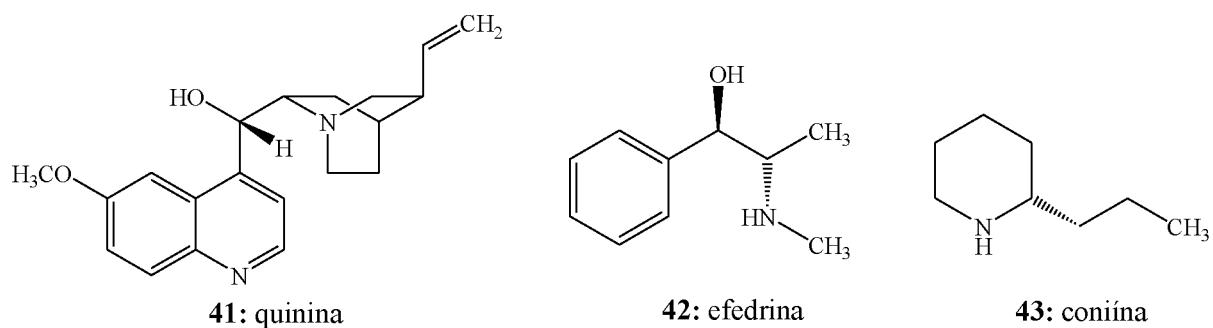
dos mesmos. A maioria deles são sólidos cristalinos, embora alguns sejam amorfos e geralmente têm gosto amargo (ANISZEWSKI, 2007; ROBBERS et al., 1997).

Com o desenvolvimento da química orgânica e o avanço dos estudos da química de produtos naturais, foi encontrada certa dificuldade na distinção da classe dos alcaloides para o que são aminas complexas. Diante disso, em 1983, Pelletier formulou a seguinte definição: “*Um alcaloide seria uma substância orgânica cíclica contendo um nitrogênio em um estado de oxidação negativo e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos*” (HENRIQUES et al., 2003). Assim, de acordo com esta definição, vários compostos nitrogenados seriam excluídos, tais como: aminas simples, aminoácidos, peptídeos, proteínas, ácidos nucléicos, nucleotídeos, porfirinas, vitaminas e compostos nitro e nitroso.

De acordo com Henriques et al. (2003) os alcaloides podem ser classificados em:

- ✓ Verdadeiros: apresentam um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico sendo classificado de acordo com o seu sistema anelar, como por exemplo a quinina (**41**) (Figura 7).
- ✓ Protoalcaloides: possuem um átomo de nitrogênio não-pertencente a um sistema heterocíclico, como por exemplo a efedrina (**42**) (Figura 7).
- ✓ Pseudoalcaloides: são compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos, como por exemplo a coniína (**43**) (Figura 7).

**Figura 7** – Classificação dos alcaloides de acordo com Henriques et al. (2003): verdadeiro (**41**), protoalcaloide (**42**) e pseudoalcaloide (**43**).



Fonte: a autora.

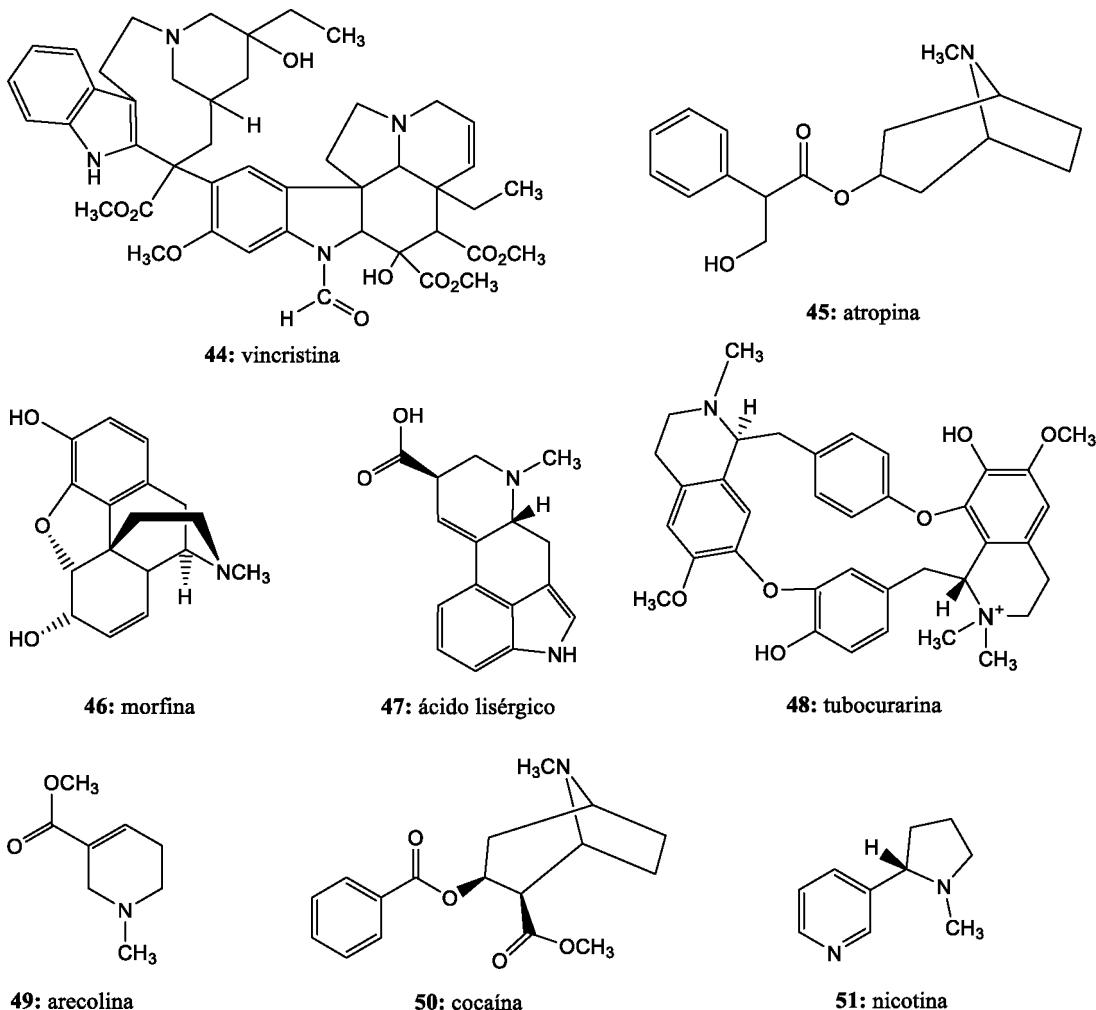
Atualmente não existe uma definição que compreenda todos os alcaloides, porque do ponto de vista químico, bioquímico ou fisiológico, não representam um grupo homogêneo de compostos (ANISZEWSKI, 2007; HENRIQUES et al., 2003).

Muitas das nomenclaturas utilizadas para os alcaloides são derivadas do nome popular ou científico da planta que os produzem, do nome do organismo que o originou, da sua atividade fisiológica ou do nome do seu descobridor, mas por convenção, todos os nomes devem apresentar o sufixo “ina”.

Nas plantas os alcaloides são produzidos como mecanismo de defesa, por isso o gosto amargo, sendo armazenados nas organelas celulares. São encontrados principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em fungos, bactérias e animais, como sapos e salamandras. Podem atuar como agentes reguladores de crescimento e substâncias de reserva (ANISZEWSKI, 2007; DEWICK, 2009).

De acordo com Robbers et al. (1997) muitos alcaloides exercem efeitos fisiológicos sobre os organismos sendo importantes agentes terapêuticos. Dentre eles merecem destaque os alcaloides: quinina (**41**), utilizada para o tratamento da malária, a vincristina (**44**), utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer, a morfina (**46**) usada para o alívio da dor em pacientes terminais, e a atropina (**45**), que é um inibidor competitivo das ações da acetilcolina, podendo ser utilizada como midriática, antiespasmódica e antidoto para várias intoxicações (Figura 8). Além destes, o ácido lisérgico (precursor do LSD) (**47**), presente no fungo do esporão do centeio, a tubocurarina (**48**), presente no curare e a coniina (**43**) presente na cicuta, são considerados alcaloides venenosos. Outros metabólitos desta classe apresentam potentes efeitos sobre o sistema nervoso central, como a arecolina (**49**), a cafeína (**32**), a cocaína (**50**) e a nicotina (**51**) (Figura 8).

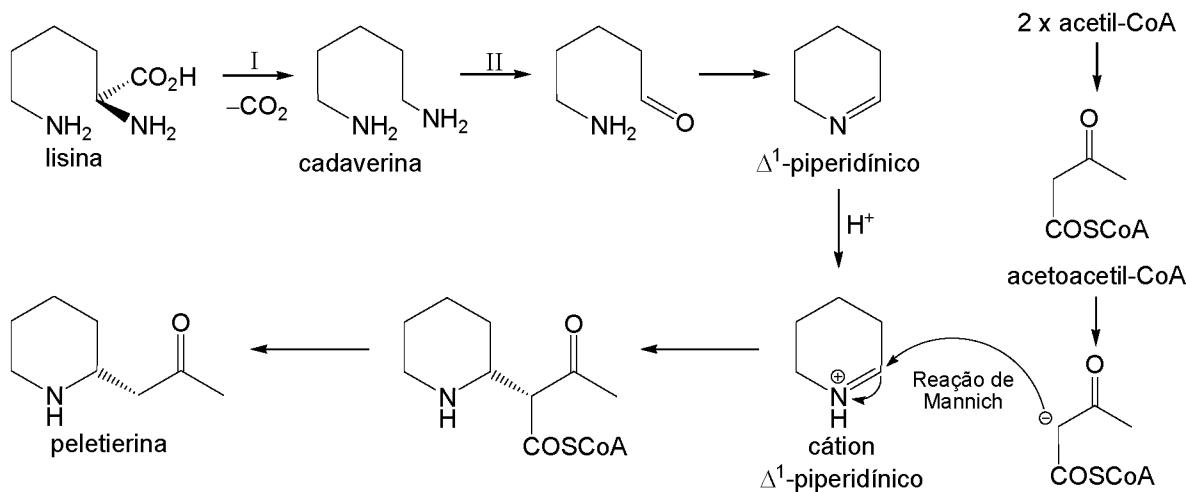
**Figura 8 – Alcaloides que apresentam diferentes atividades biológicas.**



Fonte: a autora.

A Figura 9 mostra um esquema geral da biossíntese dos alcaloides piperidínicos que ocorre através de uma sequência de reações de descarboxilação e transaminação oxidativa que utiliza a lisina e acetil-CoA como precursores. Durante a descarboxilação (I) o esqueleto carbônico da lisina é mantido intacto, ocorrendo apenas a eliminação do carbono do ácido carboxílico, levando a formação da cadaverina. Em seguida ocorre uma desaminação (II) formando um aldeído que é convertido em um intermediário  $\Delta^1$ -piperidínico. Este atua como eletrófilo e reage com um carbânion numa reação de Mannich, levando a formação do alcaloide peletierina (DEWICK, 2009; ROBBERS et al., 1997).

**Figura 9 – Proposta para a biossíntese do alcaloide piperidínico peletierina.**



Fonte: Dewick, 2009.

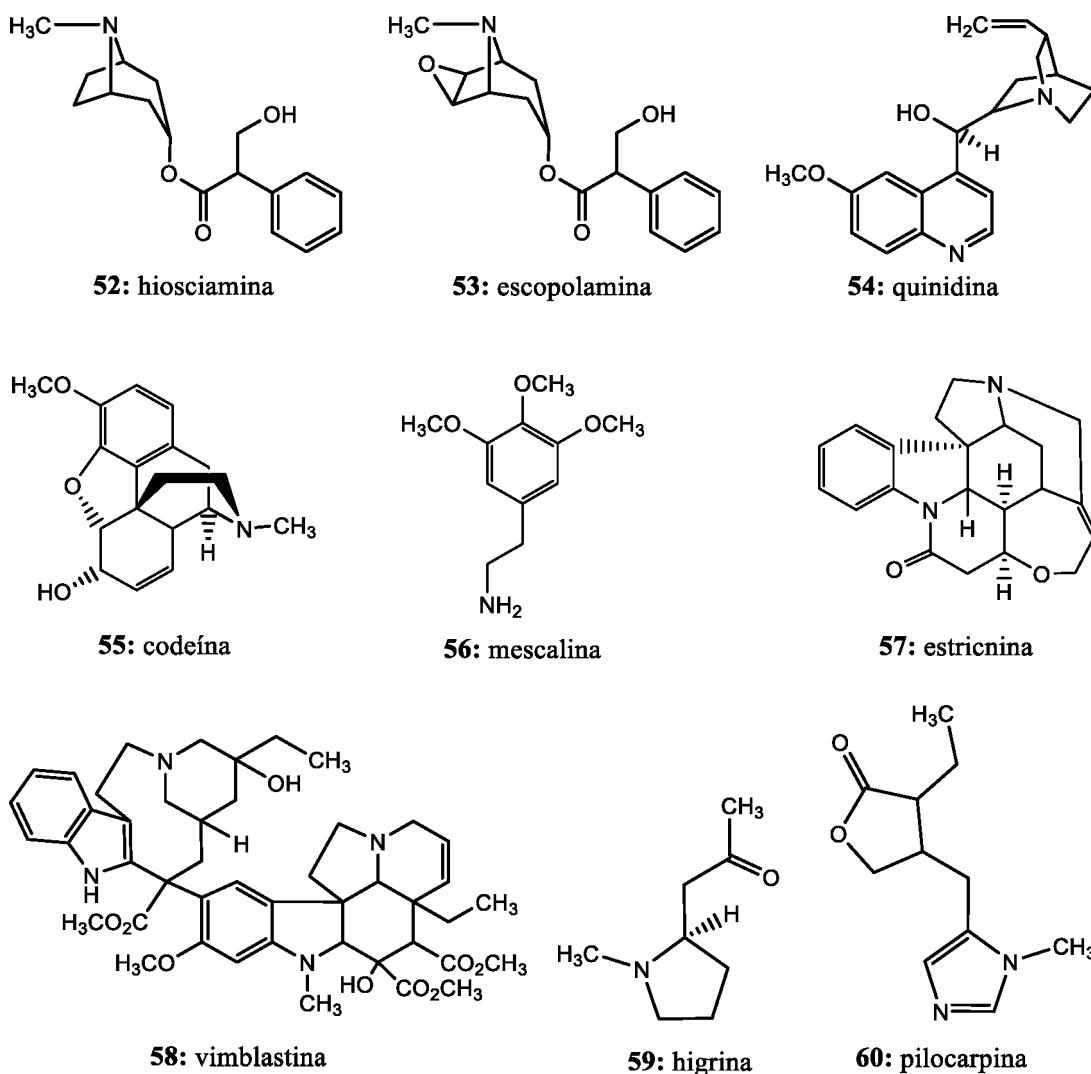
Segundo Aniszewski (2007) e Dewick (2009), os principais aminoácidos precursores da biossíntese dos alcaloides são os proteicos, como por exemplo, a lisina, a tirosina, o triptofano e a histidina; e os não proteicos como a ornitina e o ácido antranílico (Tabela 2).

**Tabela 2 – Classes de alcaloides e seus aminoácidos precursores.**

Classes de alcaloides	Aminoácido Precursor	Exemplos (Figura 10)
Piperidínicos	Lisina	coniina (43), cassina (1), espectralina (6)
Tropânicos	Ornitina	hiosciamina (52), escopolamina (53)
Quinolínicos	Ácido antranílico	quinidina (54), quinina (41)
Isoquinolínicos	Tirosina	morfina (46), codeína (55), mescalina (56)
Indólicos	Triptofano	estriçnina (57), vimblastina (58), vincristina (44)
Pirrolidínicos	Ornitina	nicotina (51), higrina (59)
Imidazólicos	Histidina	pilocarpina (60)

Fonte: Adaptado de Robbers et al., 1997.

**Figura 10 – Alcaloides isolados de fontes naturais.**



Fonte: a autora.

### 1.5 ATIVIDADE ANTIPROTOZOÁRIA

São consideradas como doenças negligenciadas as 17 doenças tropicais causadas por agentes infecciosos e parasitários (vírus, protozoários, bactérias e helmintos) distribuídos pelo planeta, especialmente entre as populações pobres da África, Ásia e da América Latina. Anualmente, nestes países, a mortalidade chega em torno de 500 mil a 1 milhão de indivíduos acarretando um enorme impacto na qualidade de vida, na perda de produtividade, no agravamento da pobreza e gerando alto custo nos tratamentos medicos. Dentre as doenças negligenciadas estão a leishmaniose e a doença de Chagas que afetam cerca de 12 milhões de pessoas no mundo (GARCIA et al., 2011; OLIVEIRA, 2013; RANGEL, 2010; WERNECK et al., 2011).

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por cerca de vinte espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos por fêmeas hematófagas dos mosquitos flebotomíneos (mosquitos da areia), que afeta também outros animais (cachorros e roedores). As principais formas da leishmaniose são a tegumentar e a visceral (MAGALHÃES, 2010; REIMÃO, 2012; SOUZA, 2010).

Nas regiões da África, América Latina e no sudeste da Ásia predominam a leishmaniose visceral (LV) conhecida como calazar, que é a forma mais grave da doença, que ataca os órgãos internos levando a surtos irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do figado e quando não tratada pode levar à morte em até dois anos. A leishmaniose tegumentar (LT) ou cutânea é a forma mais comum ocorrendo em regiões do mediterrâneo e América causando úlceras no rosto, braços e pernas deixando cicatrizes profundas e desfigradoras (MAGALHÃES, 2010; WHO, 2016).

Em 88 países, existem cerca de 12 milhões de pessoas infectadas por uma das formas de leishmaniose, sendo que os mais afetados são o Brasil, Bangladesh, Índia, Etiópia, Quênia e Sudão. Dos casos de leishmaniose na América Latina, cerca de 90% ocorrem no Brasil principalmente em crianças. Para o tratamento das diversas formas de leishmaniose são utilizados os antimoniais pentavalentes injetáveis: *N*-metilglucamina (Glucantime®), utilizados nos países de língua francesa, espanhola e portuguesa, já nos países de língua inglesa é utilizado o estibogluconato de sódio (Pentostan®), considerados como fármacos de primeira escolha. No Brasil, como tratamentos alternativos, são utilizados os fármacos anfotericina B ou pentamidina, classificados como de segunda escolha, sendo utilizados na terapia em combinação ou nos casos de contraindicação, resistência ou intolerância aos antimoniais. O tratamento com esses medicamentos é longo, caro, e podem causar cardiotoxicidade, pancreatite e nefrotoxicidade, além da crescente resistência dos parasitas a estes medicamentos (MARTHY; ROSENTHAL, 2002; NALEVAIKO et al., 2011; RANGEL, 2010).

Dentro deste contexto, pesquisas para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes e que não apresentem efeitos colaterais no tratamento da leishmaniose são muito importantes. Associada a esta necessidade, a ampla diversidade química e biológica dos alcaloides presentes em plantas, nos motivou ao estudo químico de *S. spectabilis* visando o isolamento de novos metabólitos que pudessem ser avaliados nos ensaios de atividade leishmanicida.

## 2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi realizar o estudo químico do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*, bem como avaliar a atividade leishmanicida e a citotoxicidade dos compostos obtidos.

Os objetivos específicos são:

- ✓ Isolar os alcaloides majoritários (–)-cassina e (–)-espectalina a partir do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis*;
- ✓ Isolar outros metabólitos minoritários na espécie;
- ✓ Analisar a atividade leishmanicida dos metabólitos isolados frente ao protozoário *Leishmania amazonensis* em ensaio *in vitro*;
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica dos metabólitos isolados no ensaio *in vitro* utilizando células Vero.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os solventes e reagentes utilizados foram de grau PA e/ou HPLC e de grau técnico purificados por destilação fracionada, quando necessário (Tabela 3).

**Tabela 3** – Reagentes/solventes utilizados.

Reagente	Marca
Acetato de etila PA	Vetec
Acetona PA	Vetec
Ácido acético PA	Vetec
Ácido hexacloroplatínico IV PA	Vetec
Clorofórmio PA	Vetec
Hexano PA	Vetec
Hidróxido de amônio PA	Vetec
Iodeto de potássio PA	Vetec
Metanol PA	Vetec
Metanol HPLC	Sigma-aldrich
Ácido hexacloroplatínico (IV)	Vetec

Fonte: a autora.

O Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos básicos (Tabela 4).

**Tabela 4** – Equipamentos disponíveis para realização deste trabalho.

Equipamento	Marca	Modelo
Balança analítica	Shimadzu	AUW220D
Rotaevaporador	Ika	RV 10
Liofilizador	Terroni	LS3000

Fonte: a autora.

## 3.2 CROMATOGRAFIA

### 3.2.1 Cromatografia em Camada Delgada

As cromatografias em camada delgada comparativa (CCD) foram realizadas em placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência ( $UV_{254}$ ) 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel).

As placas utilizadas na cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas com uma mistura de 25 g de sílica gel 60 (Vetec) e 45 mL de água destilada. A aplicação da mistura foi feita sobre placas de vidro de 10 e 20 × 20 cm com uma espessura de 1,0 mm através de espalhador Quickfit. Estas foram secas a temperatura ambiente por um período de aproximadamente 1 h e em seguida foram ativadas em estufa a 120 °C por 2 h.

### 3.2.2 Preparo do revelador de iodocloroplatinato

O revelador foi preparado de acordo com Touchstone e Dobbins (1978) e Wagner e Bladt (2001).

**Solução A:** Solução aquosa 5% (m/m) do ácido hexacloroplatínico (IV) [ $H_2(PtCl_6) \cdot 6H_2O$ ] (Vetec) ou do sal hexacloroplatinato de potássio [ $K_2(PtCl_6)$ ] (Vetec).

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

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

### 3.2.3 Cromatografia em Coluna

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

- ✓ Sílica gel ( $SiO_2$ ) para cromatografia (63–200 µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich.
- ✓ Sílica gel ( $SiO_2$ ) para cromatografia flash (40–63 µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich.

### 3.2.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas num cromatógrafo a líquido de alta eficiência semipreparativo, modelo SHIMADZU LC-6AD com

injetor automático modelo SIL-10AF e degaseificador DGU-20A5E, sistema de bomba binário LC-6AD, forno CTO20A, coletor de frações FRC-10A, detectores de UV/VIS por arranjo de diodo (DAD, modelo SPD-M20A) e por espalhamento de luz (ELSD - *evaporative light scattering detector*, modelo ELSD-LTII).

Para o desenvolvimento dos métodos de separação foram utilizadas as colunas e respectivos métodos:

- Analítica Phenomenex Lunna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) protegida pela respectiva pré-coluna, fase móvel: água acidificada com ácido acético (0,1%, v/v) (fase móvel A) e metanol (fase móvel B). Foi utilizado o seguinte sistema gradiente de solventes: 35–100% de B (0–30 min); 100% de B (30–35 min); 100–35% de B (35–40 min); 35% de B (40–50 min); fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado foi de 50,0 µL. Foram preparadas amostras em metanol (1,0 mg/mL) e filtradas em membranas de politetrafluoetileno (PTFE) 0,45 µm.
- Semipreparativa Phenomenex Synergi Hydro-RP C18 80 Å Axia Packed (100 × 21,20 mm, 4 µm). Fase móvel: água acidificada com ácido acético (0,1%, v/v) (fase móvel A) e metanol (fase móvel B). O sistema gradiente de solventes foi 35–65% de B (0–18 min); 65–100% de B (18–20 min); 100% (20–23 min); 100–35% de B (23–27 min); 35% (27–35 min), fluxo de 8,0 mL min<sup>-1</sup> e o volume injetado foi de 50,0 µL. Foram preparadas amostras em metanol (200,0 mg/mL) e filtradas em membranas de politetrafluoetileno (PTFE) 0,45 µm.

### 3.3 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS

As análises espectrométricas foram realizadas através dos seguintes equipamentos:

- ✓ Espectrômetro de massas de alta resolução micrOTOF-Q II (Bruker Daltonics), com fonte de ionização por *electrospray* no NPPNS, FCFRP/USP/Ribeirão Preto. As amostras foram solubilizadas em metanol/água (7:3) e introduzidas utilizando uma seringa (100 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 180 µL hora<sup>-1</sup>. A ionização foi realizada com gás nebulizante (N<sub>2</sub>) a 130 psi, sendo o gás secante aquecido a 180 °C com fluxo de 4 L min<sup>-1</sup> e no capilar foi aplicada uma energia de 3,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

- ✓ Espectrômetro de massas de alta resolução QTOF (Agilent, modelo 6520 B), com fonte de ionização por electrospray no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras foram solubilizadas em metanol/água (4:1) e introduzidas utilizando seringa (100  $\mu\text{L}$ ), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200  $\mu\text{L hora}^{-1}$ . A ionização foi realizada com gás nebulizante a 58 psi, sendo o gás secante aquecido a 200 °C com fluxo de 8 L  $\text{min}^{-1}$  e no capilar foi aplicado 4,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

As análises de espectrometria de massas realizadas neste projeto foram em equipamento de alta resolução, sendo os resultados observados nos EM comparados com aqueles obtido do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas), utilizados para calcular o erros em ppm. Para isso foi utilizada a equação abaixo:

$$E_{\text{ppm}} = \left[ \frac{(\text{massa exata} - \text{massa experimental})}{\text{massa exata}} \right] 10^6$$

As análises espectroscópicas foram realizadas no IQ-UFU, campus de Santa Mônica através dos seguintes equipamentos:

- ✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla) do laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU, operando em frequências de 400 e 100 MHz para os núcleos de hidrogênio e carbono, respectivamente. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando TMS como padrão interno ( $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ).
- ✓ Aparelho de infravermelho com transformada de Fourier da marca Shimadzu, modelo IRPrestige-21. Foram feitas 20 varreduras na resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$  na faixa de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  no laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU. Foram preparados discos utilizando KBr como suporte na razão de 1:50 (m/m).
- ✓ Espectrofotômetro FT-IR Frontier Single Range – MIR da marca Perkin Elmer, na faixa de 220 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Foram utilizadas as substâncias isoladas (alcaloides) no estado sólido, com a utilização do acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de diamante no Laboratório de Fotoquímica e Ciência de Materiais (LAFOT-CM).

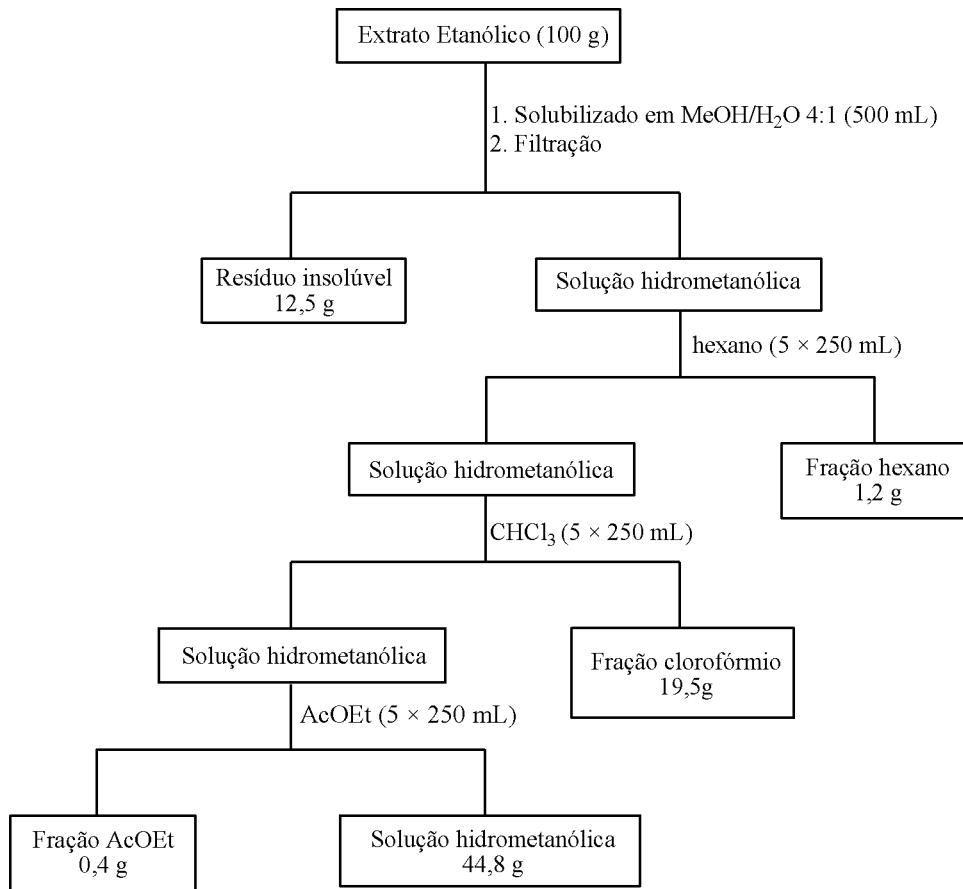
### 3.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As flores de *Senna spectabilis* foram coletadas no terminal rodoviário de Araraquara (julho de 2010) e uma exsicata foi enviada para a Profª. Inês Cordeiro, do Instituto de Botânica de São Paulo, que fez a autenticação do espécime. Foi coletado 38 Kg de flores que foram secas em estufa com circulação de ar por cinco dias. Em seguida as flores (7,9 Kg) foram trituradas em moinho de facas e submetidas à extração por maceração com etanol por um período de sete dias até a filtração e evaporação do solvente em rotaevaporador. Este procedimento foi repetido por cinco vezes obtendo 1,9 Kg de extrato etanólico. A coleta das flores e o preparo do extrato etanólico foram realizados pelo prof. Dr. Marcos Pivatto.

### 3.5 EXTRAÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO

Uma alíquota de 100,0 g do extrato etanólico, foi dissolvida em 500 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (4:1) e em seguida filtrada em papel de filtro. O filtrado foi submetido à extração líquido-líquido, com solventes de polaridade crescentes: *n*-hexano (250 mL × 5), clorofórmio (250 mL × 5) e acetato de etila (250 mL × 5), de onde foram obtidas cinco frações para cada solvente (Figura 11). Os solventes das frações foram removidos por destilação em rotaevaporador sob pressão reduzida e banho a 40 °C. A fração hidrometanólica foi submetida a destilação e em seguida liofilizada para remoção da água remanescente.

**Figura 11 – Extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis*.**



Fonte: a autora.

### 3.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios para determinar a atividade citotóxica e leishmanicida foram realizados no Laboratório de Biologia Celular de Tripanossomatídeos do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU em Uberlândia coordenado pelo Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva. Os ensaios foram realizados de acordo com as metodologias descritas por MARTINS et al. (2015).

#### 3.6.1 Citotoxicidade

As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido e diluídas com DMEM (suplementado com 10% de soro fetal bovino), até se formar uma solução estoque de  $640 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A análise foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços. Foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de solução com as células ( $1 \times 10^6$  células em 10 mL) em cada poço e

incubado por 6 horas em estufa à 37 °C, com 5% CO<sub>2</sub> sob atmosfera úmida, para que as células aderissem ao fundo do poço.

Em seguida foi retirado todo o meio de cultura e adicionada a amostra nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg mL<sup>-1</sup>, preparadas a partir da solução estoque, sendo que a concentração de dimetilsulfóxido não excedeu 1%. Os controles de crescimento, negativo (100% células lisadas), solvente e das amostras foram também preparados. Posteriormente, a placa foi incubada durante 48 horas à 37 °C, com 5% CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. Depois desse tempo foi adicionado 10 µL de uma solução de resazurina 3 mM em PBS a cada poço e incubados novamente durante 24 h nas mesmas condições. No final desse período, utilizou um espectrofotômetro de microplaca para determinar a absorbância de cada poço em 595 nm.

Os resultados das absorbâncias e a viabilidade celular foi calculada em função do controle de crescimento. Para a determinação da concentração citotóxica de 50% (CC<sub>50</sub>) foi construído um gráfico de dose resposta com regressão não linear. Todos os testes foram realizados em triplicata.

### *3.6.2 Atividade leishmanicida*

As amostras foram solubilizadas em dimetilsulfóxido e diluídas com caldo BHI, até se formar uma solução estoque de 640 µg mL<sup>-1</sup>. O teste de viabilidade celular foi realizado utilizando a fase promastigota de *L. amazonensis* (cepa PH8). A análise foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, sendo testadas as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg mL<sup>-1</sup>, preparadas a partir da solução estoque, sendo que a concentração de dimetilsulfóxido não excedeu 1%. O volume final em cada poço foi de 100 µL, sendo 20 µL de inóculo ( $1 \times 10^8$  parasitas em 2 mL) e 80 µL da amostra. Controles de crescimento, positivo, solvente e da amostra foram preparadas em cada placa.

A placa preparada foi incubada durante 48 h a 25 °C, logo após esse tempo, foi adicionado 2 µL da solução de resazurina 3 mM em PBS a cada poço e incubados novamente durante 24 h a 25 °C. Em seguida, utilizou um espectrofotômetro de microplaca para determinar a absorbância de cada poço em 595 nm. A partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle de crescimento. Para a determinação da concentração necessária para inibir 50% dos parasitas (IC<sub>50</sub>) foi construído um gráfico de dose resposta utilizando regressão não linear. Os testes foram realizados em triplicata.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO

Depois de secas, as frações obtidas da extração líquido-líquido (item 3.6), foram pesadas e calculados os rendimentos (Tabela 5). Analisando a massa retida no papel de filtro (resíduo) (12,5 g), a massa obtida nas frações hexano (1,2 g), clorofórmio (19,5 g), acetado de etila (0,4 g) e hidrometanólica (44,8 g), foi obtido como massa total 81,7 g (78,4%) (perda de massa 18,3 g) (Tabela 5 e Figura 11). Essa diferença de massa foi atribuída ao solvente (etanol) presente no extrato etanólico. Para confirmação, uma alíquota de 1,0 g (triplicata) foi mantida em liofilizador até que todo o solvente fosse retirado. Depois de liofilizado foi obtido um “resíduo” de 0,8 mg, que corrobora com a proposta de que aproximadamente 20% da massa total do extrato era do solvente, o que está de acordo com a quantidade de massa “perdida” ao longo do processo de extração.

**Tabela 5** – Frações da extração líquido-líquido do extrato etanólico e seus rendimentos.

Fração	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexano	1,2	1,2
Clorofórmio	19,5	19,5
Acetato de etila	0,4	0,4
Hidrometanólica	44,8	44,8
Resíduo insolúvel	12,5	12,5
<b>Total</b>	<b>78,4</b>	<b>78,4</b>

Fonte: a autora.

### 4.2 ESTUDO QUÍMICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO

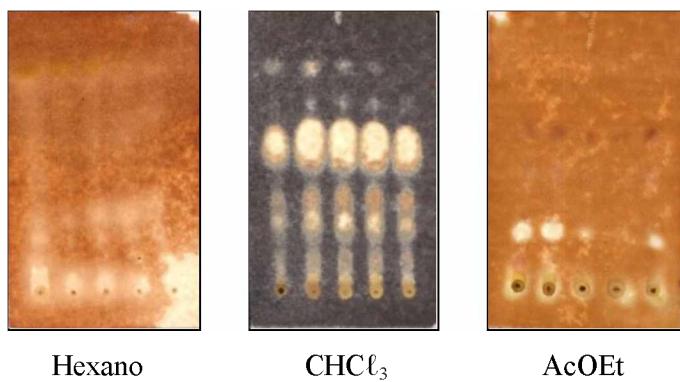
As frações obtidas da extração líquido-líquido foram monitoradas e agrupadas depois de analisadas por CCD utilizando como fase estacionária (FE) sílica 60 G com indicador de fluorescência ( $UV_{254}$ ) e como sistema de solvente uma mistura de  $CHCl_3:MeOH:NH_4OH$  na proporção de 9:1:0,25.

O hidróxido de amônio foi adicionado à fase móvel para diminuir as interações entre os grupos silanóis (Si–OH), sítios com caráter ácido, presentes na sílica e os alcaloides que são substâncias com caráter básico. Assim, o  $NH_4OH$  atua como amina competitidora

diminuindo a retenção dos alcaloides facilitando o desenvolvimento destes metabólitos na cromatoplaca (McCALLEY, 2002; PAHL et al., 1997; PIVATTO, 2005).

As chromatoplasas foram avaliadas em câmara de UV<sub>254</sub> e em seguida reveladas com ICℓPt (Figura 12). A inspeção em câmara de UV<sub>254</sub> não possibilitou verificar a presença dos alcaloides devido à ausência de grupos cromóforos nas suas estruturas.

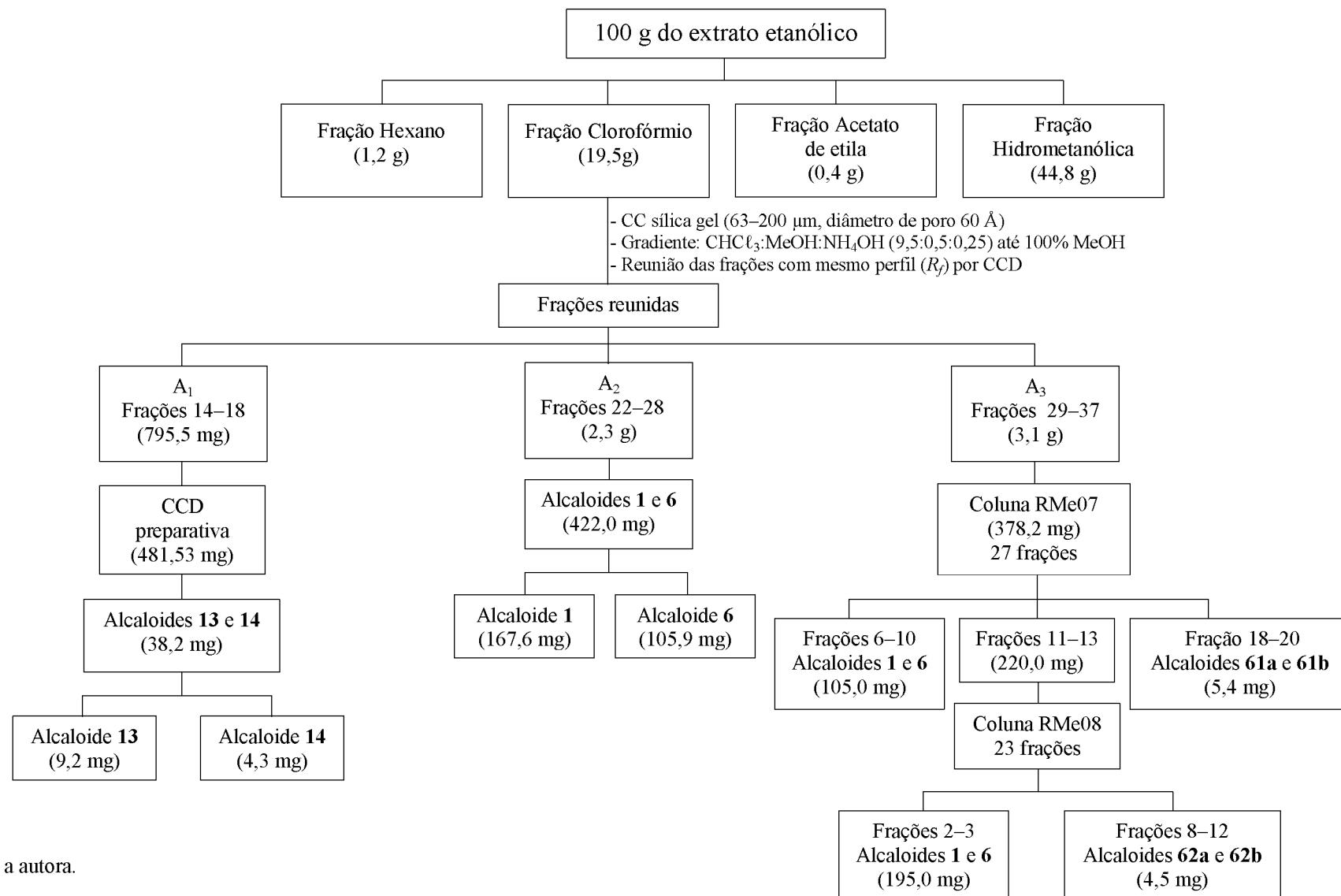
**Figura 12 – CCD das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis*.**



Fonte: a autora.

Na análise por CCD, foi possível observar que a fração CHCl<sub>3</sub> foi a que apresentou maior quantidade de alcaloides. A fração AcOEt também apresentou alcaloides, porém, em menor quantidade (Tabela 6). Assim, a fração CHCl<sub>3</sub> foi submetida a processos cromatográficos para a purificação dos alcaloides, os quais estão resumidos na Figura 13 e discutidos posteriormente.

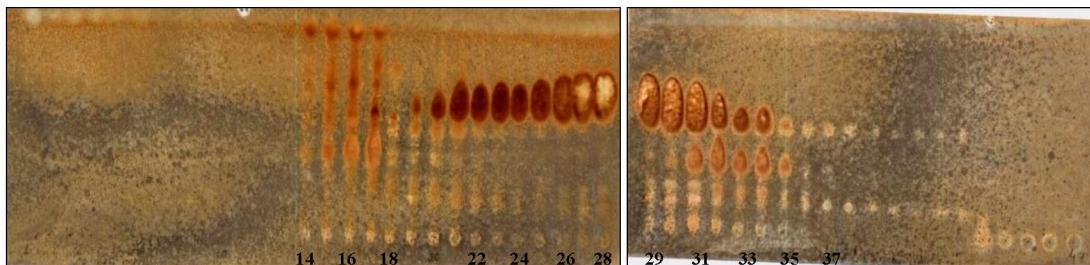
**Figura 13 – Fracionamento do extrato etanólico das flores de *S. spectabilis*.**



Fonte: a autora.

A fração  $\text{CHCl}_3$  (19,5 g) foi submetida à cromatografia em coluna (CC). Foi utilizada uma coluna ( $h = 15$  cm de FE e  $\varnothing = 4,0$  cm) empacotada com 74 g de sílica gel (63–200  $\mu\text{m}$  e diâmetro de poro 60 Å) e sistema de solvente em modo gradiente iniciando com  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9,5:0,5:0,25) até 100% de MeOH. Este procedimento cromatográfico foi repetido cinco vezes até que toda a fração  $\text{CHCl}_3$  (19,5 g) fosse submetida a CC (Figura 13). As frações coletadas foram reagrupadas em: A<sub>1</sub> (RMe06-F<sub>14–18</sub>) (795,5 mg), A<sub>2</sub> (RMe06-F<sub>22–28</sub>) (2,3 g) e A<sub>3</sub> (RMe06-F<sub>29–37</sub>) (3,1 g), de acordo com a similaridade dos valores de  $R_f$ , observados por CCD (Figura 14). A fração A<sub>2</sub> (2,3 g) apresentou apenas uma mancha na cromatoplaca, referente a mistura dos alcaloides **1** e **6**.

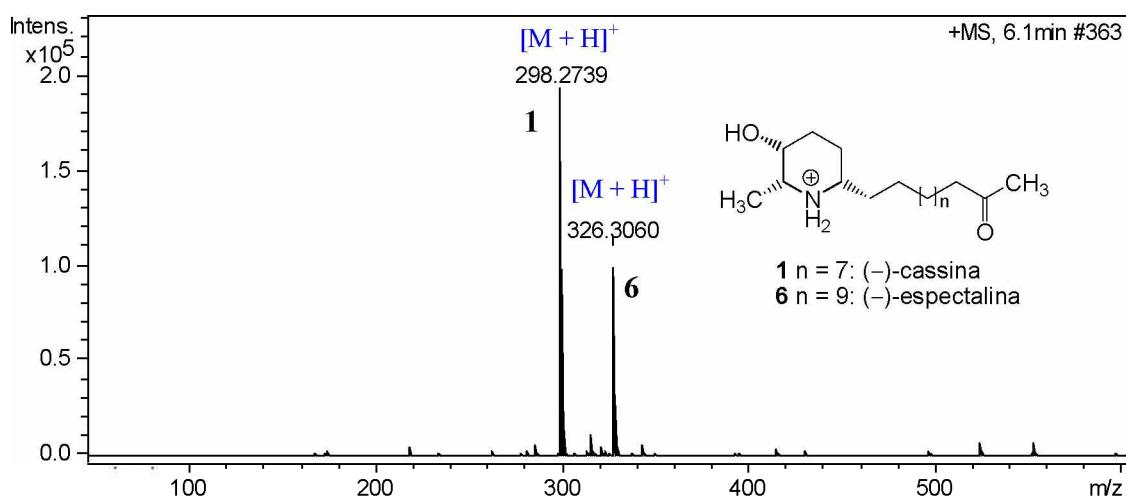
**Figura 14** – CCD da frações reagrupadas A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> e A<sub>3</sub> (FE: sílica, FM:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9,5:0,5:0,5) e revelador: ICPt).



Fonte: a autora.

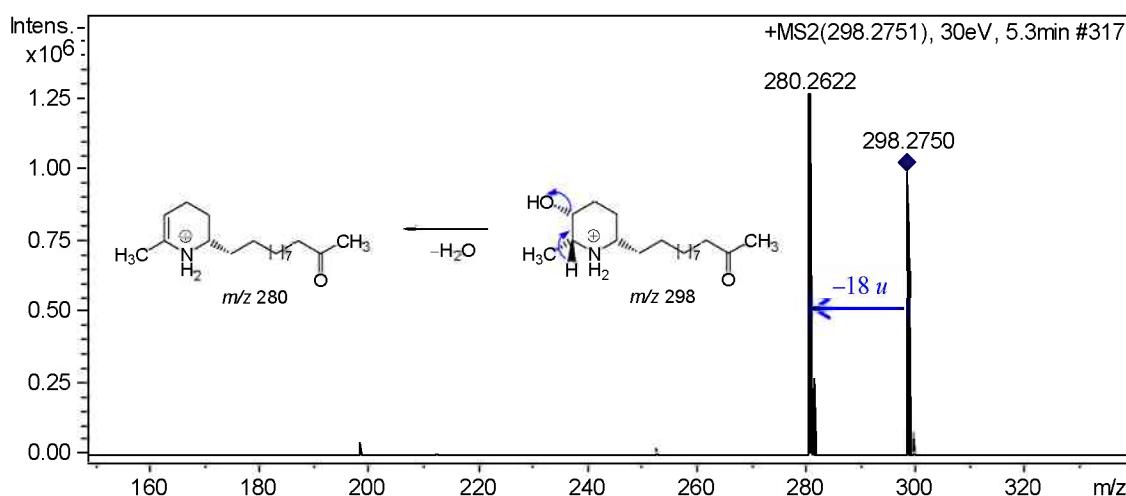
A fração A<sub>2</sub> (2,3 g) foi analisada por espectrometria de massas em alta resolução com ionização por *electrospray* (EM-IES), o que permitiu verificar a presença de dois sinais de  $m/z$  298,2739 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup> e 326,3060 [ $\text{M} + \text{H}$ ]<sup>+</sup>, calculados para  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2^+$ , 298,2741 ( $\Delta -0,7$  ppm) e  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NO}_2^+$ , 326,3054 ( $\Delta 1,8$  ppm), respectivamente, que de acordo com a literatura foram atribuídos aos metabólicos (–)-cassina (**1**) e (–)-espectralina (**6**). Estes compostos diferenciam em duas unidades metilênicas (28  $u$ ) na cadeia lateral em C-6 (Figura 15). Quando o sinal de  $m/z$  298 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foi observado um fragmento de  $m/z$  280, atribuído à eliminação neutra de uma molécula de água (18  $u$ ) (Figura 16). Padrão de fragmentação semelhante foi observado quando o sinal de  $m/z$  326 foi submetido à EM/EM (Figura 17).

**Figura 15 – EM-IES-(+) em alta resolução da fração A<sub>2</sub>.**



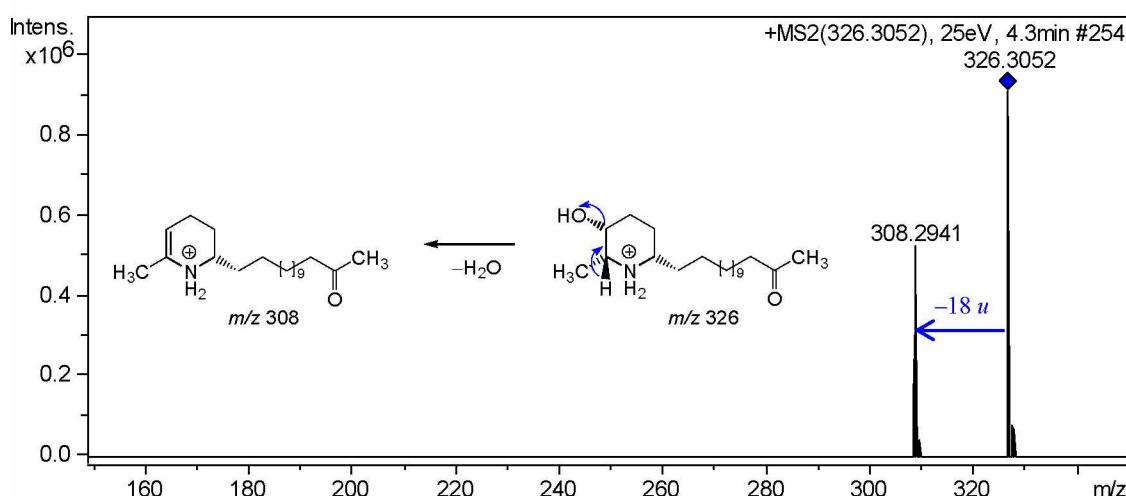
Fonte: a autora.

**Figura 16 – EM/EM-(+) do alcaloide 1 presente na fração A<sub>2</sub>.**



Fonte: a autora.

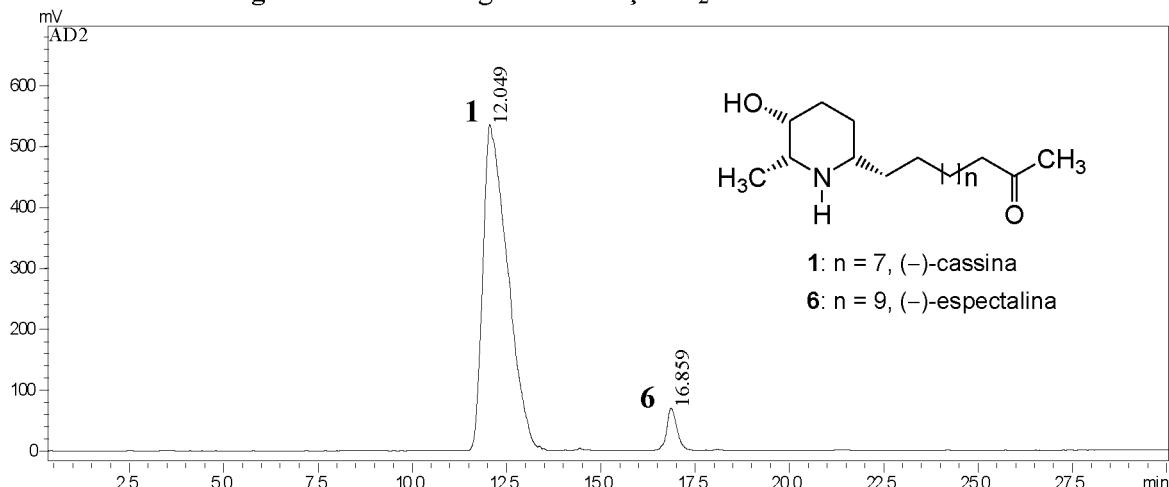
**Figura 17 – EM/EM-(+) do alcaloide 6 presente na fração A<sub>2</sub>.**



Fonte: a autora.

A análise da fração A<sub>2</sub> por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector por espalhamento de luz (*Light Scattering*) possibilitou a separação dos homólogos **1** (*t<sub>R</sub>* 12,0 min) e **6** (*t<sub>R</sub>* 16,8 min) (Figura 18). Como **6** é ligeiramente mais apolar que **1**, devido a maior cadeia lateral em C-6, assim apresentou tempo de retenção maior em fase reversa.

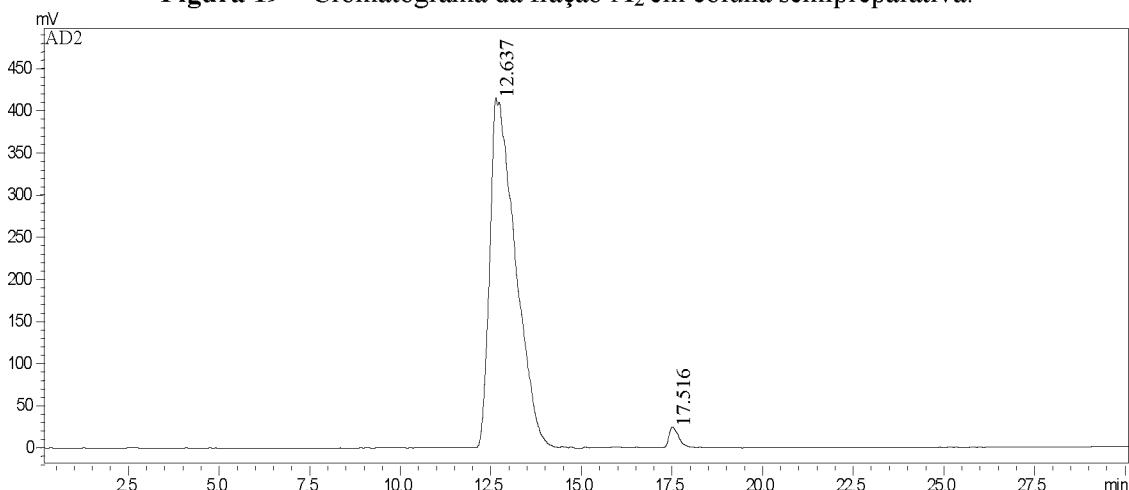
**Figura 18 – Cromatograma da fração A<sub>2</sub> em coluna analítica.**



Fonte: a autora.

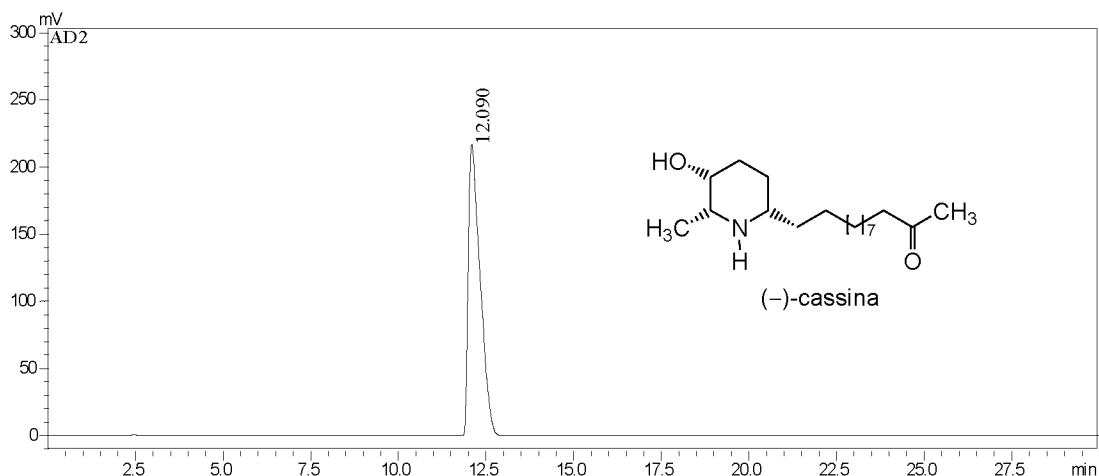
Em seguida, a fração A<sub>2</sub> foi submetida à CLAE semipreparativo, que permitiu separar os homólogos **1** e **6** (Figura 19). Depois de separados, os homólogos **1** (*t<sub>R</sub>* 12,1 min, 167,6 mg) e **6** (*t<sub>R</sub>* 16,6 min, 105,9 mg com) foram analisados em CLAE analítico para confirmar a separação (Figuras 20 e 21). A diferença de massa entre os dois homólogos pode ser evidenciada pela intensidade dos picos cromatográficos, sendo que **1** é o metabólito majoritário (Figura 19).

**Figura 19 – Cromatograma da fração A<sub>2</sub> em coluna semipreparativa.**



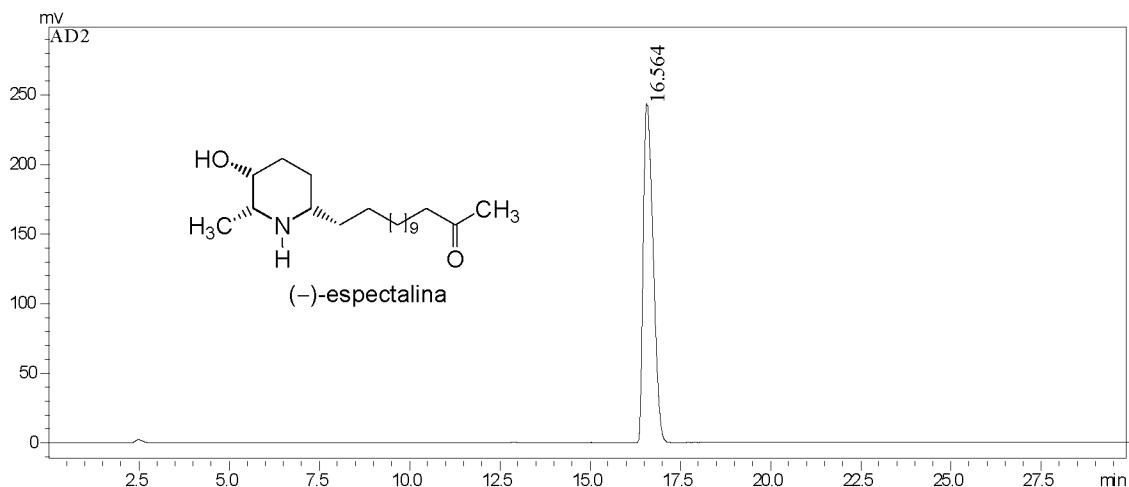
Fonte: a autora.

**Figura 20 – Cromatograma do alcaloide 1 em coluna analítica.**



Fonte: a autora.

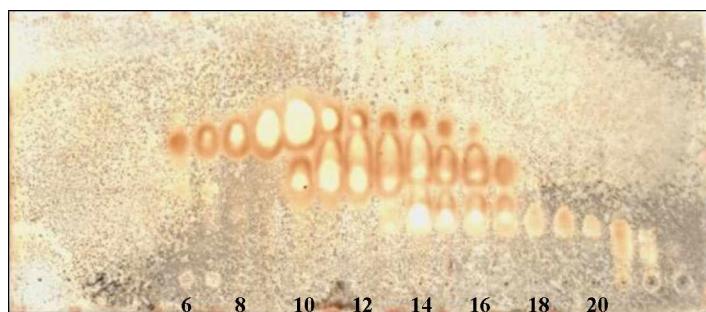
**Figura 21 – Cromatograma do alcaloide 6 em coluna analítica.**



Fonte: a autora.

A fração A<sub>3</sub> (378,2 mg) foi submetida a CC flash ( $h = 20$  cm de fase estacionária e  $\varnothing = 2,0$  cm) utilizando como FE sílica (30,05 g) (40–63  $\mu\text{m}$ , diâmetro de poro 60  $\text{\AA}$ ). A eluição foi feita em modo isocrático utilizando  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9,5:0,5:0,25), obtendo 27 frações. A análise por CCD permitiu reagrupar as frações RMe07-F<sub>6–10</sub> (mistura de **1** e **6**), RMe07-F<sub>11–13</sub> (220,0 mg) e RMe07-F<sub>18–20</sub> (5,4 mg), de acordo com as similaridades dos valores de  $R_f$  (Figura 22).

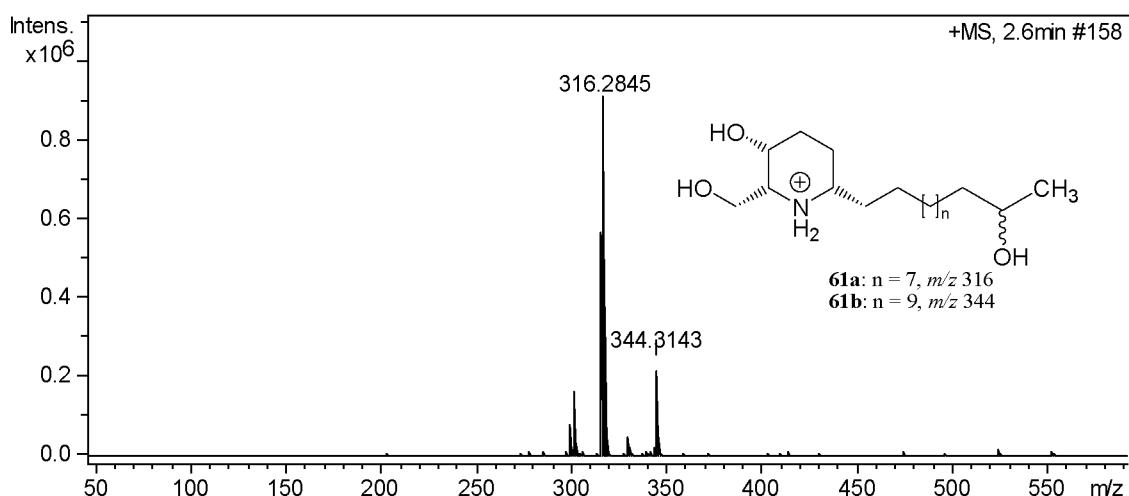
**Figura 22** – CCD das frações coletadas de RMe07 (FE: sílica, FM: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9,5:0,5:0,5) e revelador: IC lPt).



Fonte: a autora.

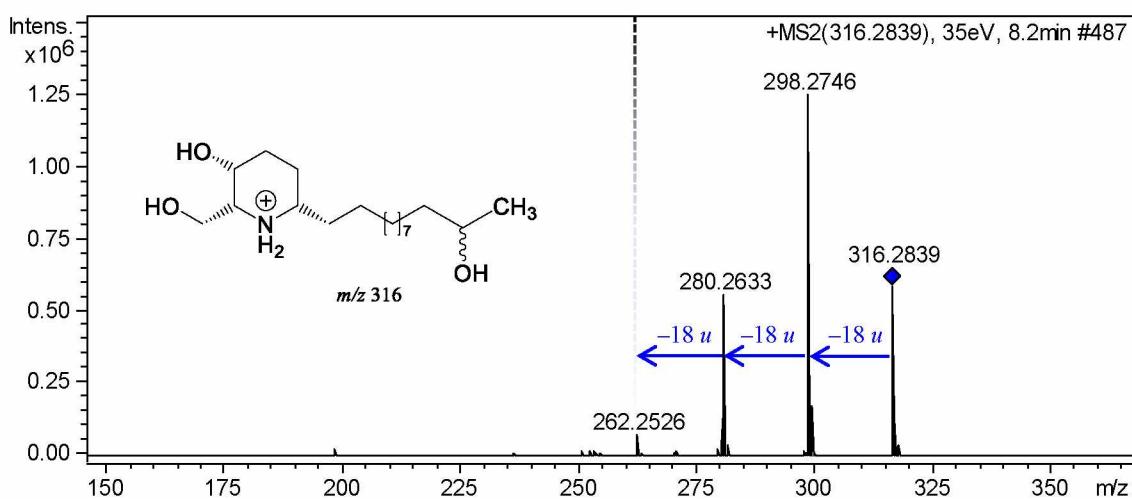
O EM referente à fração RMe07-F<sub>18-20</sub> apresentou dois sinais em *m/z* 316,2845 [M + H]<sup>+</sup> e 344,3143 [M + H]<sup>+</sup>, calculados para C<sub>18</sub>H<sub>38</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>, 316,2846 ( $\Delta$  -0,3 ppm) e C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>3</sub><sup>+</sup>, 344,3159 ( $\Delta$  -4,6 ppm), respectivamente, que foram atribuídos aos metabólicos **61a** e **61b** (Figura 23). Estes compostos diferenciam entre si em duas unidades metilênicas (28 *u*) na cadeia lateral em C-6, assim como **1** e **6**. Quando o sinal de *m/z* 316 foi submetido à análise por EM/EM, foram observados três fragmentos de *m/z* 298, 280 e 262 (Figura 24), atribuídos a eliminações neutras de três moléculas de água (18 *u*), que corroboram para a proposta estrutural do alcaloide **61a** (Figura 26). Padrão de fragmentação semelhante foi observado para a proposta estrutural do alcaloide **61b**, quando o sinal de *m/z* 344 foi submetido à análise por EM/EM (Figuras 25 e 26).

**Figura 23** – EM-IES-(+) em alta resolução da fração RMe07-F<sub>18-20</sub>.



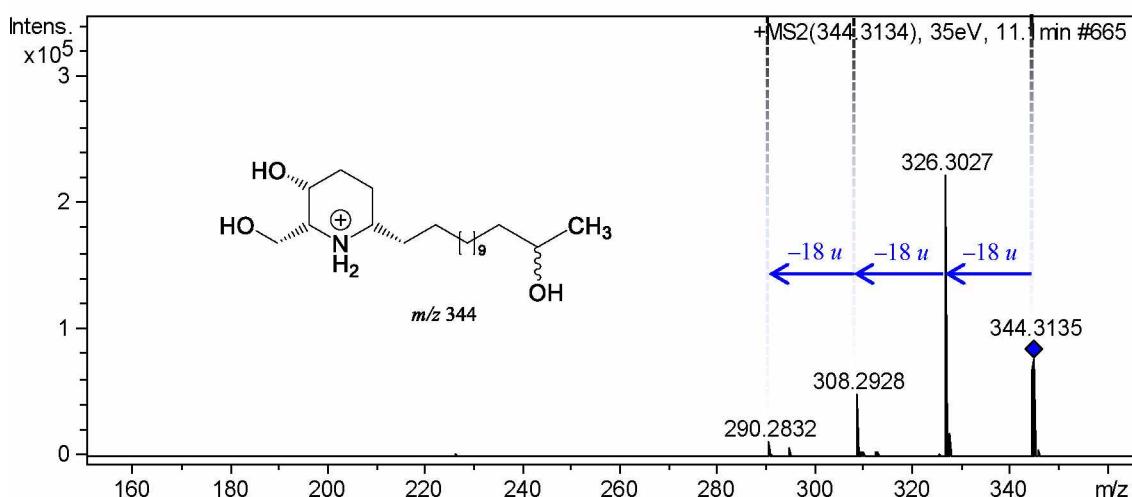
Fonte: a autora.

**Figura 24 – EM/EM-(+) do alcaloide **61a** presente na fração RMe07-F<sub>18-20</sub>.**



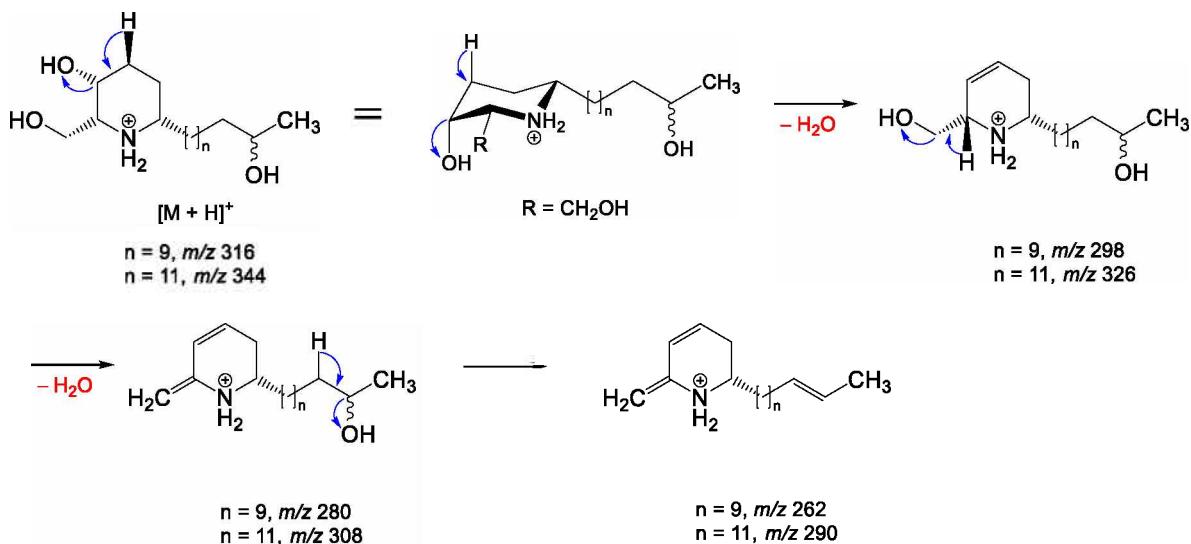
Fonte: a autora.

**Figura 25 – EM/EM-(+) do alcaloide **61b** presente na fração RMe07-F<sub>18-20</sub>.**



Fonte: a autora.

**Figura 26 – Proposta de fragmentação para os alcaloides 61a e 61b.**

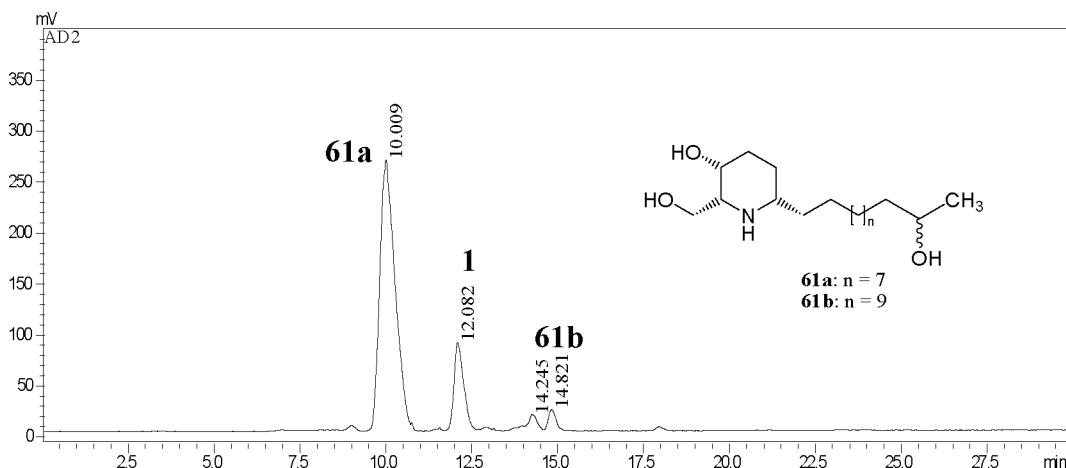


Fonte: a autora.

De acordo com a proposta de fragmentação (Figura 26), é possível observar que a conformação em cadeira do ciclo piperidina na qual a hidroxila (C-3) e o hidrogênio (H-4) estão nas posições axiais (antiperiplanares), o que favorece a reação de eliminação. Na sequência, a eliminação de outra molécula de água forma um sistema de duplas conjugadas. Na eliminação da terceira molécula de água novamente está representado o hidrogênio e a hidroxila antiperiplanares formando um alceno dissustituído (SOLOMONS; FRYHLE, 2001).

Posteriormente a fração RMe07-F<sub>18-20</sub> (5,4 mg) foi submetida a análise por CLAE analítico (Figura 27), que permitiu observar que a CC não foi eficiente na separação dos metabólitos, devido a presença de outros compostos com  $t_R$  na mesma região do cromatograma. O cromatograma mostra um pico intenso ( $t_R$  10,0 min, **61a**), anterior ao do alcaloide **1** ( $t_R$  12,1 min). Este alcaloide é mais polar que **1**, o que corrobora com a proposta estrutural para **61a** que deve ter o mesmo número de carbonos da cadeia lateral em C-6. Também foram observados a presença de outros sinais de baixa intensidade no cromatograma que não foram identificados.

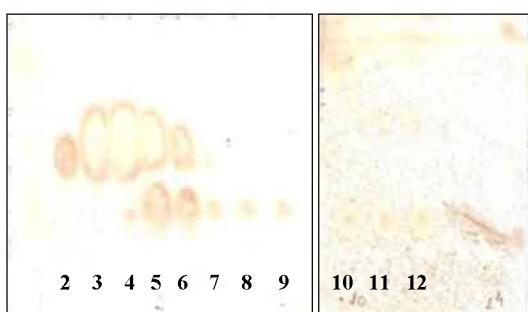
**Figura 27** – Cromatograma da fração RMe07-F<sub>18–20</sub> em coluna analítica.



Fonte: a autora.

A fração RMe07-F<sub>11–13</sub> (220,0 mg) foi submetida a CC flash utilizando sílica como fase estacionária (40–63 µm, diâmetro de poro 60 Å) ( $h = 20$  cm,  $\varnothing = 2$  cm e  $m_{\text{SiO}_2} = 30,0$  g). A eluição foi feita inicialmente com CHCl<sub>3</sub>:NH<sub>4</sub>OH (10:0,25) (500 mL) e em seguida a força de eluição foi aumentada gradativamente com adição de MeOH até chegar em um sistema de solventes que consistiu de CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9,5:0,5:0,25). Este sistema de solventes foi mantido até a eluição dos alcaloides (coletadas 23 frações). Em seguida foi feito um gradiente até 100% de MeOH para limpeza da coluna. A análise por CCD permitiu reagrupar as frações RMe08–F<sub>2–3</sub> (**1** e **6**) e RMe08–F<sub>8–12</sub> (4,5 mg), de acordo com a similaridade dos valores de  $R_f$  (Figura 28).

**Figura 28** – CCD das frações coletadas de RMe08 (FE: sílica, FM: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9,5:0,5:0,5) e revelador: IC lPt).

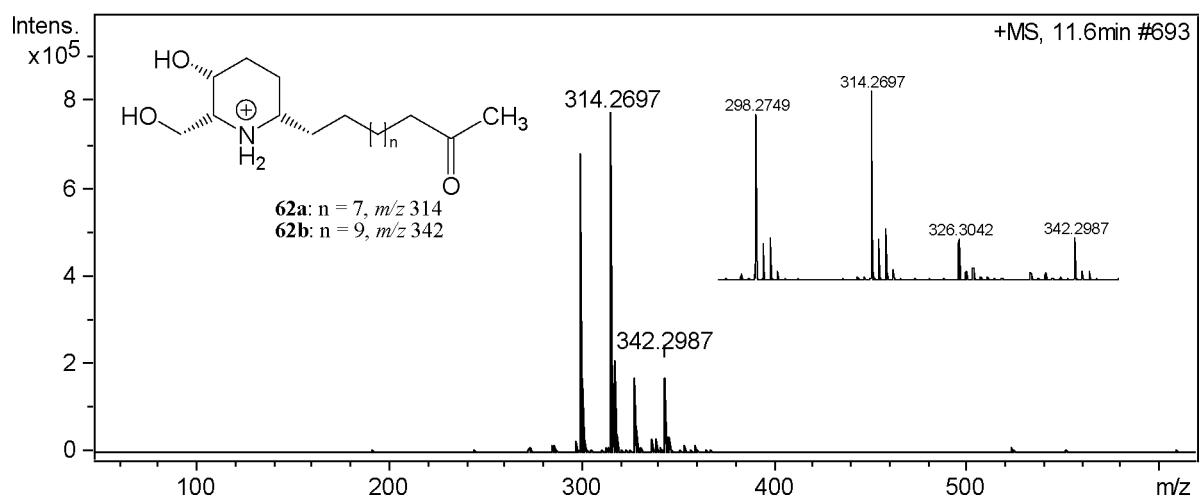


Fonte: a autora.

O EM referente à fração RMe08-F<sub>8–12</sub> apresentou quatro sinais de  $m/z$  298,2749 [M + H]<sup>+</sup>, 314,2697 [M + H]<sup>+</sup>, 326,3042 [M + H]<sup>+</sup> e 342,2987 [M + H]<sup>+</sup>, calculados para

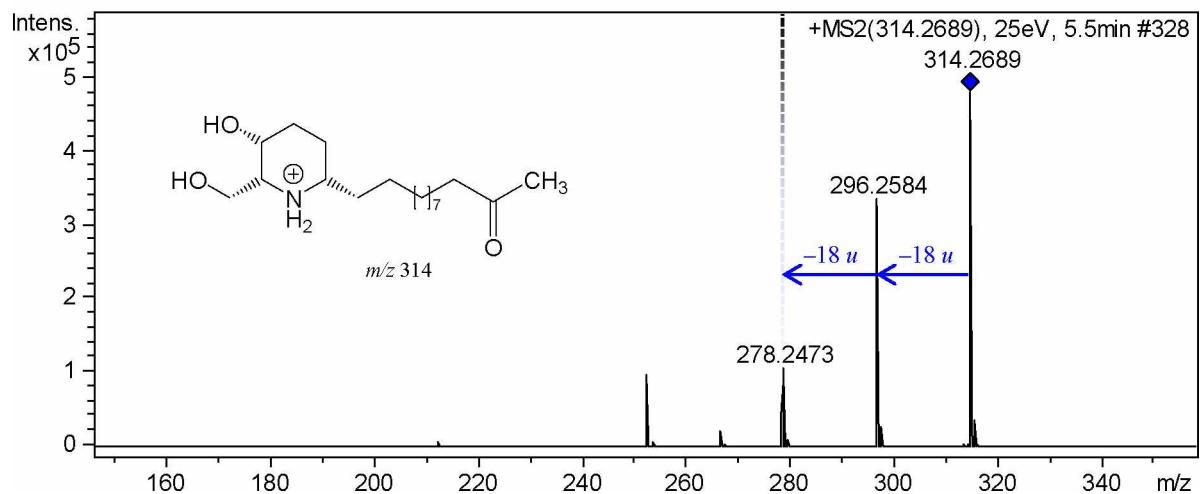
$\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2^+$ , 298,2741 ( $\Delta$  2,7 ppm);  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_3^+$ , 314,2690 ( $\Delta$  2,2 ppm);  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NO}_2^+$ , 326,3054 ( $\Delta$  -3,7 ppm) e  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NO}_3^+$ , 342,3003 ( $\Delta$  -4,7 ppm), respectivamente, que foram atribuídos aos metabólitos **1**, **62a**, **6** e **62b** (Figura 29). Os compostos **62a** e **62b**, assim como **1** e **6** diferenciam em duas unidades metilênicas (28  $u$ ) na cadeia lateral em C-6. Quando o sinal de  $m/z$  314 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foram observados dois fragmentos de  $m/z$  296 e 278 (Figura 30), atribuídos a eliminações neutras de duas moléculas de água (Figura 31).

**Figura 29 –** EM-IES-(+) em alta resolução da fração RMe08-F<sub>8-12</sub>.



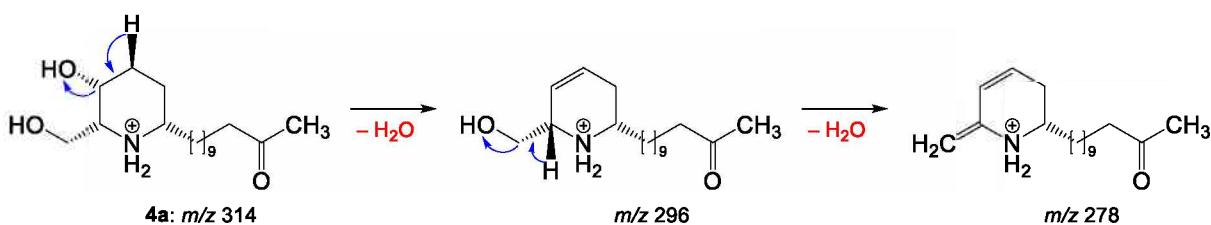
Fonte: a autora.

**Figura 30** – EM/EM-(+) do alcaloide **62a** presente na fração RMe08-F<sub>8-12</sub>.



Fonte: a autora

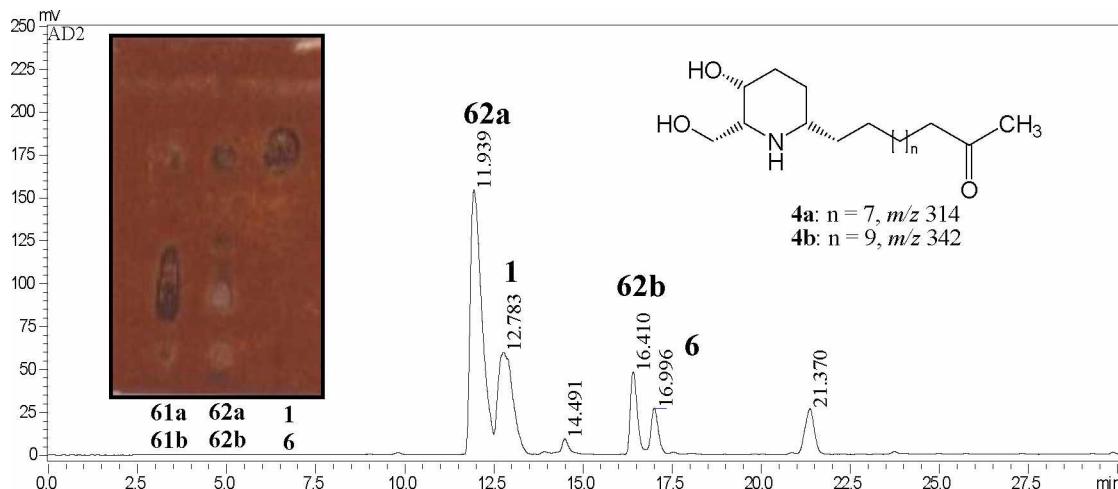
**Figura 31 – Proposta de fragmentação para o alcaloide **62a**.**



Fonte: a autora.

O cromatograma da sub-fração RMe08-F<sub>8-12</sub> mostrou a presença de vários alcaloides (Figura 32). Os picos com *t*<sub>R</sub> 11,93 min e *t*<sub>R</sub> 16,41 min, são referentes a dois homólogos (**62a** e **62b**) mais polares que **1** e **6**, porém menos polares que os alcaloides **61a** e **61b**, já identificados anteriormente por EM.

**Figura 32 – Cromatograma e CCD da fração RMe08-F<sub>8-12</sub> em coluna analítica.**



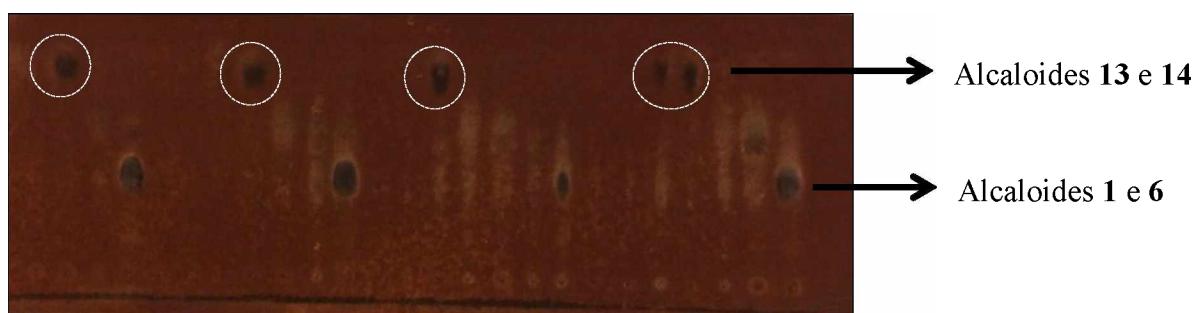
Fonte: a autora.

A fração A<sub>1</sub> (481,5 mg) contendo os alcaloides de baixa polaridade foi submetida a CCD preparativa. A amostra foi aplicada em oito placas preparativas e desenvolvidas com um sistema de solventes CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NH<sub>4</sub>OH (9,0:1,0:0,5). Para identificar a região da placa contendo os metabólitos, parte de cada placa foi revelado com IClPt. Na sequência foi feita a raspagem da sílica contendo os alcaloides, que foi coletada em bêquer e solubilizada em metanol. Em seguida o material foi filtrado e o solvente rotaevaporado. Os compostos obtidos foram analisados por CCD e reagrupados de acordo com a similaridade dos valores de *R*<sub>f</sub> (Figura 33) de onde foi possível obter a mistura dos alcaloides homólogos apolares (**13** e **14**) (38,2 mg). Da separação por CCDP também foi obtida a mistura dos homólogos **1** e **6**, além

de outros alcaloides obtidos em pequenas quantidades, que não permitiram análises posteriores.

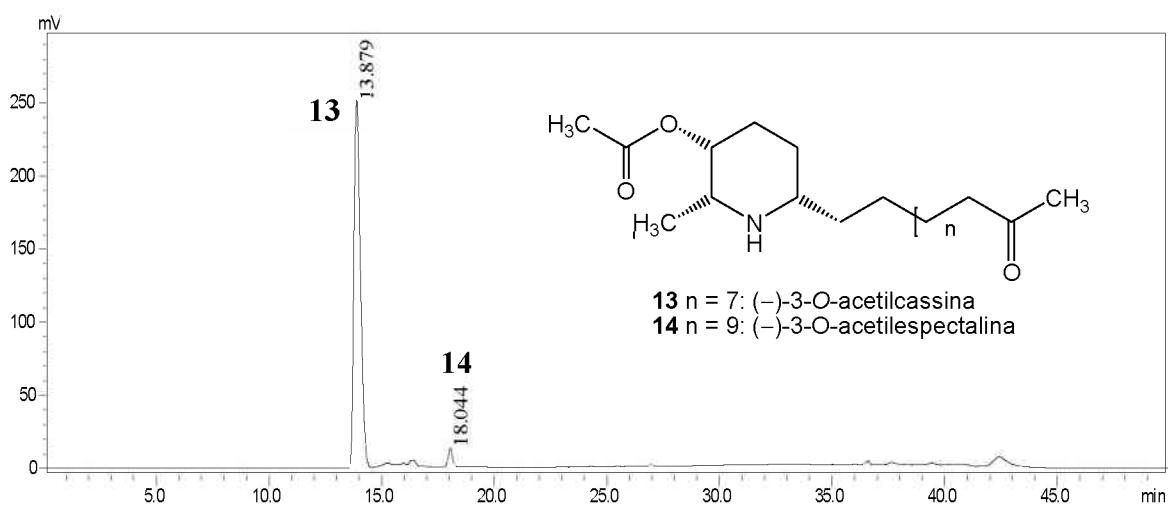
A mistura dos alcaloides **13** e **14** foi analisada por CLAE com detector por espalhamento de luz (*Light Scattering*) (Figura 34). Foi possível observar a presença de dois picos ( $t_R$  13,9 min (**13**) e  $t_R$  18,0 min (**14**)) que de acordo com a literatura (PIVATTO, 2010) são referentes a mistura dos homólogos (*-*)-3-*O*-acetilcassina (**13**) e (*-*)-3-*O*-acetilespectalina (**14**) que foram separados por CLAE semipreparativo com  $t_R$  13,5 min (9,2 mg) e  $t_R$  17,0 min (4,3 mg), respectivamente (Figuras 35 e 36). Ao analisar a ordem de eluição dos alcaloides **13** e **14** em CLAE, o metabólito **14**, por ser mais apolar que seu homólogo devido aos dois grupos metilênicos a mais na cadeia lateral, apresenta menor velocidade de eluição e consequentemente maior tempo de retenção, devido a maiores interações com a FE ( $C_{18}$ ) em relação ao metabólito **13**.

**Figura 33** – CCD dos homólogos **13** e **14** após a CCDP (FE: sílica, FM:  $CHCl_3:MeOH:NH_4OH$  (9,5:0,5:0,5) e revelador ICfPt).



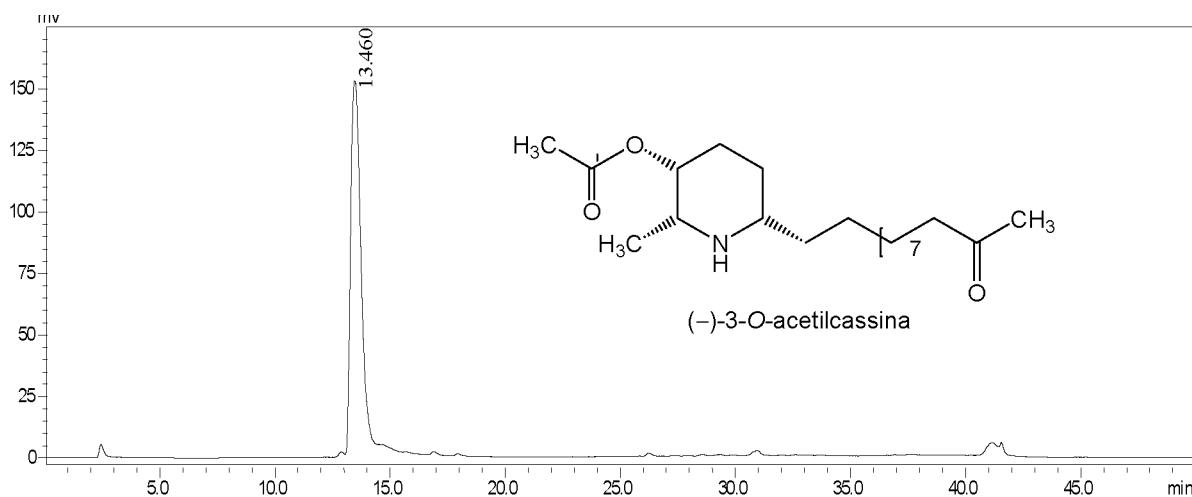
Fonte: a autora.

**Figura 34** – Cromatograma dos homólogos **13** e **14** em coluna analítica.



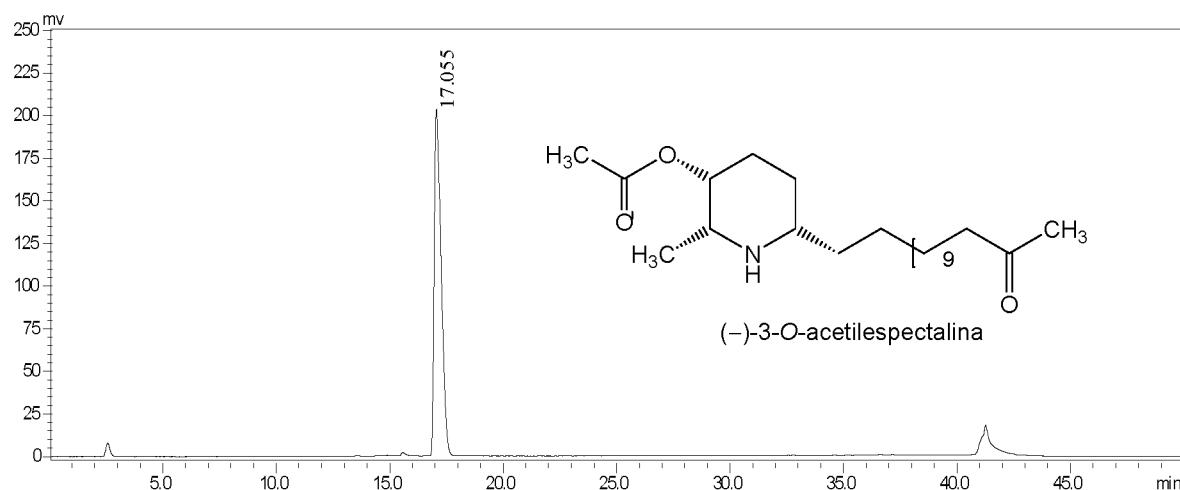
Fonte: a autora.

**Figura 35 – Cromatograma do alcaloide 13 em coluna analítica.**



Fonte: a autora.

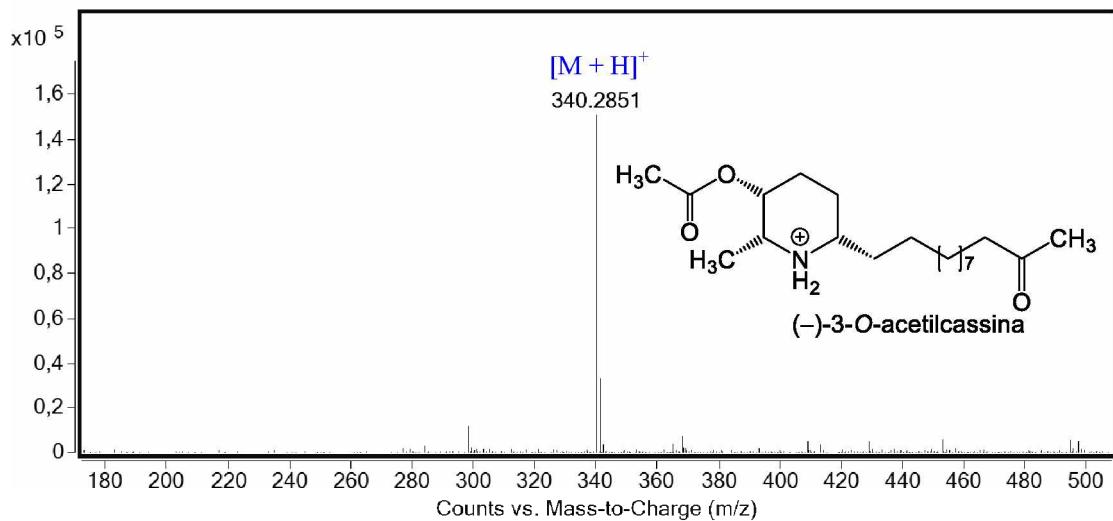
**Figura 36 – Cromatograma do alcaloide 14 em coluna analítica.**



Fonte: a autora.

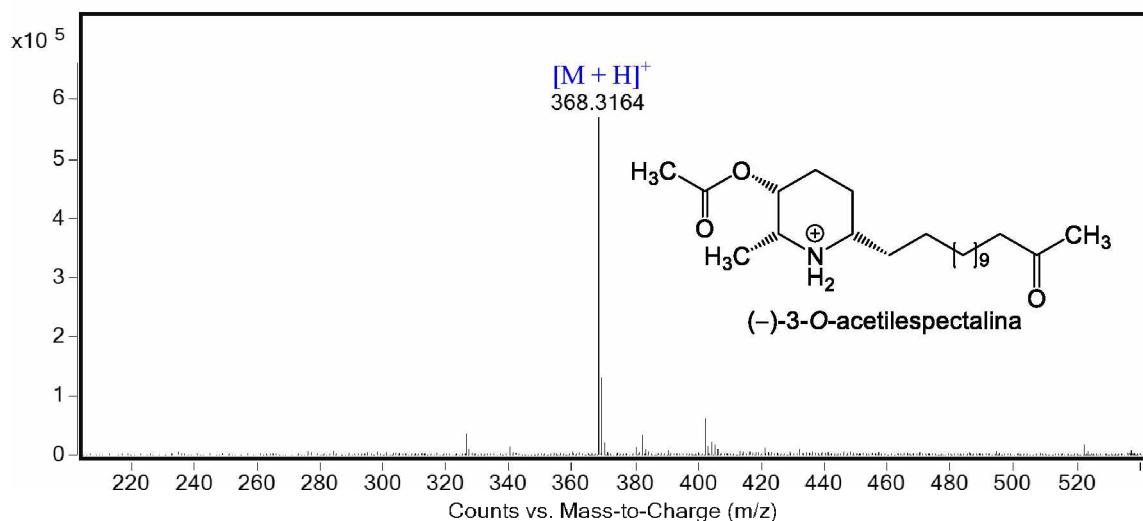
Os homólogos **13** e **14** foram analisados por espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (EM-IES), o que permitiu observar a presença dos sinais de  $m/z$  340,2851  $[M + H]^+$  e 368,3164  $[M + H]^+$ , calculados para  $C_{20}H_{38}NO_3^+$ , 340,2852 ( $\Delta$  0,29 ppm) e  $C_{22}H_{42}NO_3^+$ , 368,3165 ( $\Delta$  0,27 ppm), respectivamente. Estes sinais foram atribuídos aos metabólitos **13** e **14** que também diferenciam em duas unidades metilênicas (Figuras 37 e 38). Quando o sinal de  $m/z$  340 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foi observado um fragmento de  $m/z$  280, atribuído à eliminação do grupo acetil (60  $u$ ) (Figura 39). Padrão de fragmentação semelhante foi observado quando o sinal de  $m/z$  368 foi submetido à EM/EM (Figura 40).

**Figura 37 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide 13.**



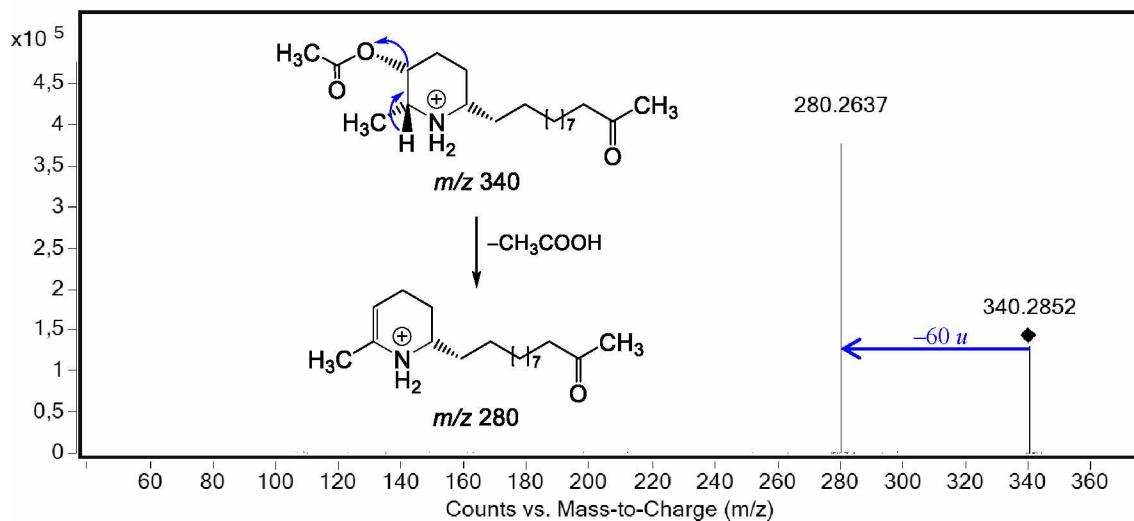
Fonte: a autora.

**Figura 38 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide 14.**



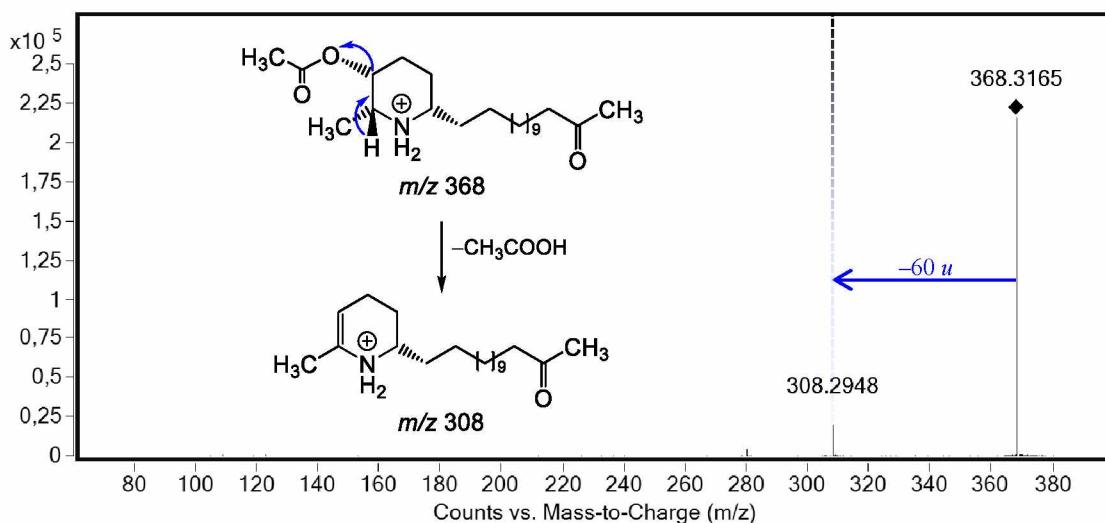
Fonte: a autora.

**Figura 39 – EM/EM-(+) do alcaloide 13.**



Fonte: a autora.

**Figura 40 – EM/EM-(+) do alcaloide 14.**



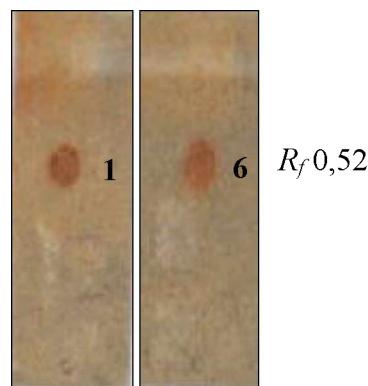
Fonte: a autora.

#### 4.3 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES

##### 4.3.1 Homólogos (-)-cassina (1) e (-)-espectralina (6)

Os alcaloides **1** (167,6 mg) e **6** (105,9 mg) foram isolados como sólidos amorfos de coloração branco-amarelado. Na CCD apresentaram teste positivo para ICℓPt ( $R_f$  0,52) (Figura 41).

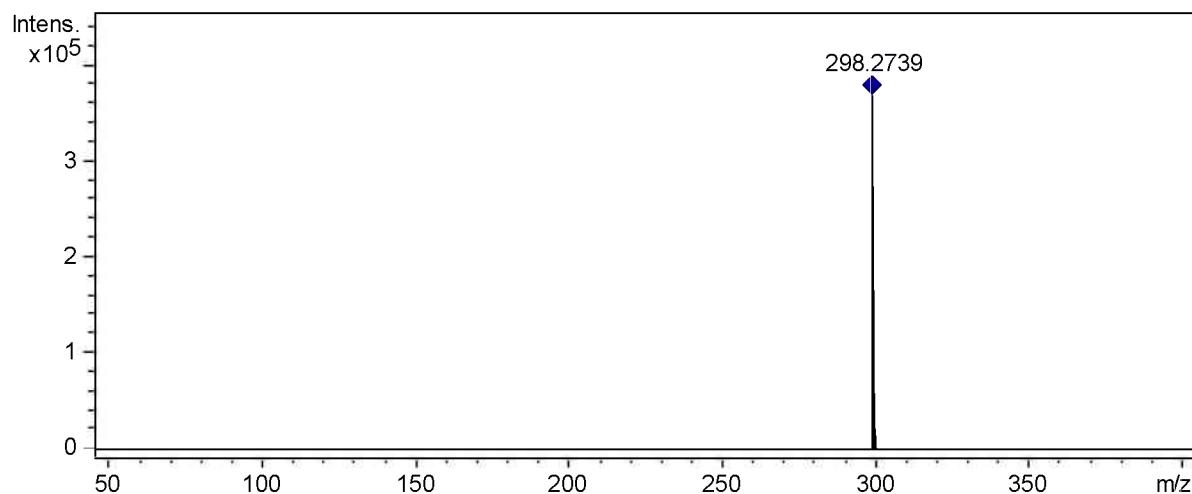
**Figura 41** – CCD dos alcaloides **1** e **6** (FE: sílica, FM:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (99:01:0,5) e revelador:  $\text{IClPt}$ ).



Fonte: a autora.

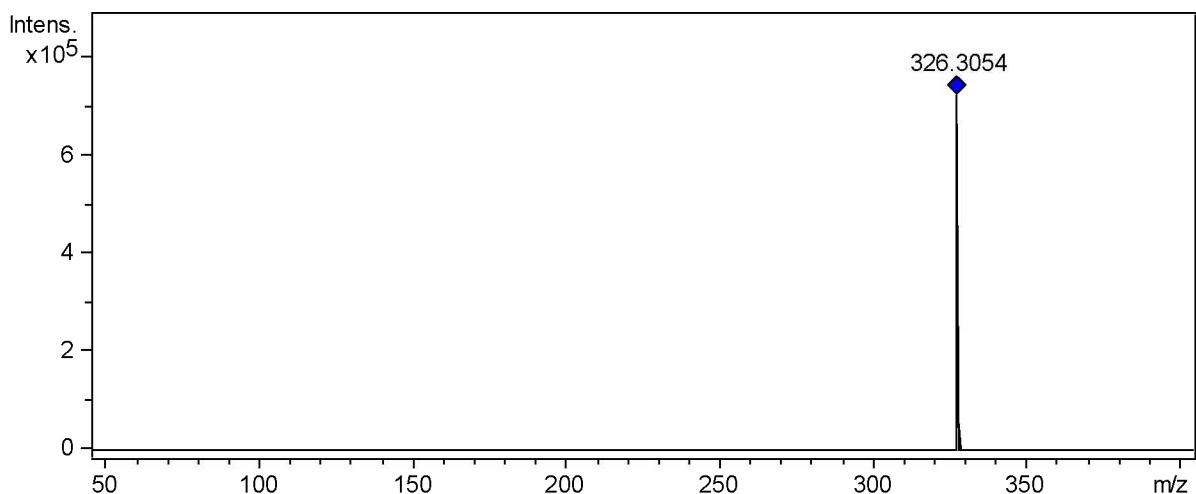
Os alcaloides **1** e **6** foram submetidos à análise por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, que possibilitou estabelecer as fórmulas moleculares  $\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{NO}_2$  e  $\text{C}_{20}\text{H}_{39}\text{NO}_2$ , respectivamente, com índices de deficiência de hidrogênio igual a dois. Os sinais referentes às moléculas protonadas foram observados em  $m/z$  298,2739  $[\text{M} + \text{H}]^+$  e 326,3054  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , calculados para  $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{NO}_2^+$ , 298,2741 ( $\Delta -0,7$  ppm) e  $\text{C}_{20}\text{H}_{40}\text{NO}_2^+$ , 326,3054 ( $\Delta 0$  ppm), respectivamente (Figuras 42 e 43).

**Figura 42** – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **1**.



Fonte: a autora.

**Figura 43 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide 6.**

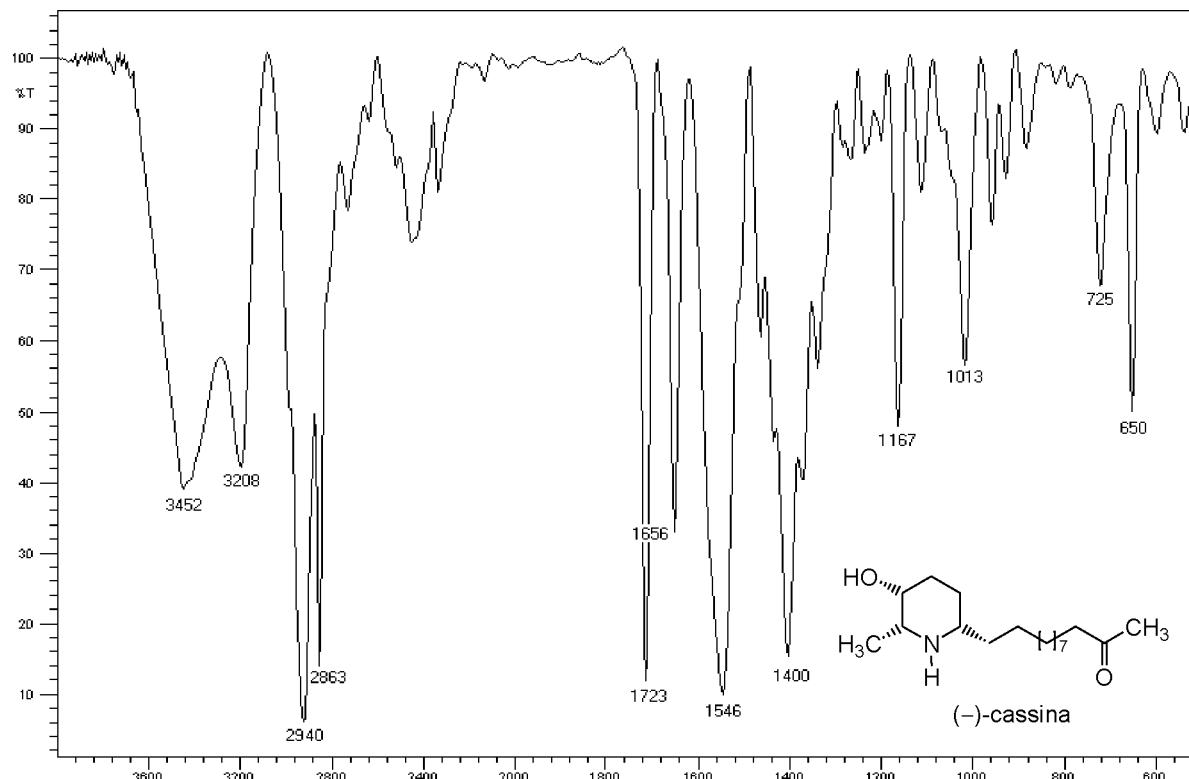


Fonte: a autora.

A análise do espectro na região do infravermelho do alcaloide **1** (Figura 44), permitiu observar uma banda em  $1723\text{ cm}^{-1}$  que foi atribuída ao estiramento de C=O evidenciando a presença da função cetona. As bandas em  $1167$  e  $3452\text{ cm}^{-1}$  foram atribuídas aos estiramentos de C–O e de O–H, respectivamente, e são compatíveis com a função álcool. A banda relativa ao estiramento da função amina (N–H) foi observada em  $3208\text{ cm}^{-1}$ . Por ser uma única banda de baixa intensidade a amina pode ser classificada em secundária. As absorções em  $2863\text{ cm}^{-1}$  e em  $2940\text{ cm}^{-1}$  são indicativas de estiramentos simétrico e assimétrico, respectivamente, de C–H alifáticos. A presença de C–H em  $1400\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de metila, enquanto que em  $1546\text{ cm}^{-1}$  ( $\delta\text{C–H}$ ) indica a presença de CH<sub>2</sub> (BARBOSA, 2013; PAVIA et al. 2010).

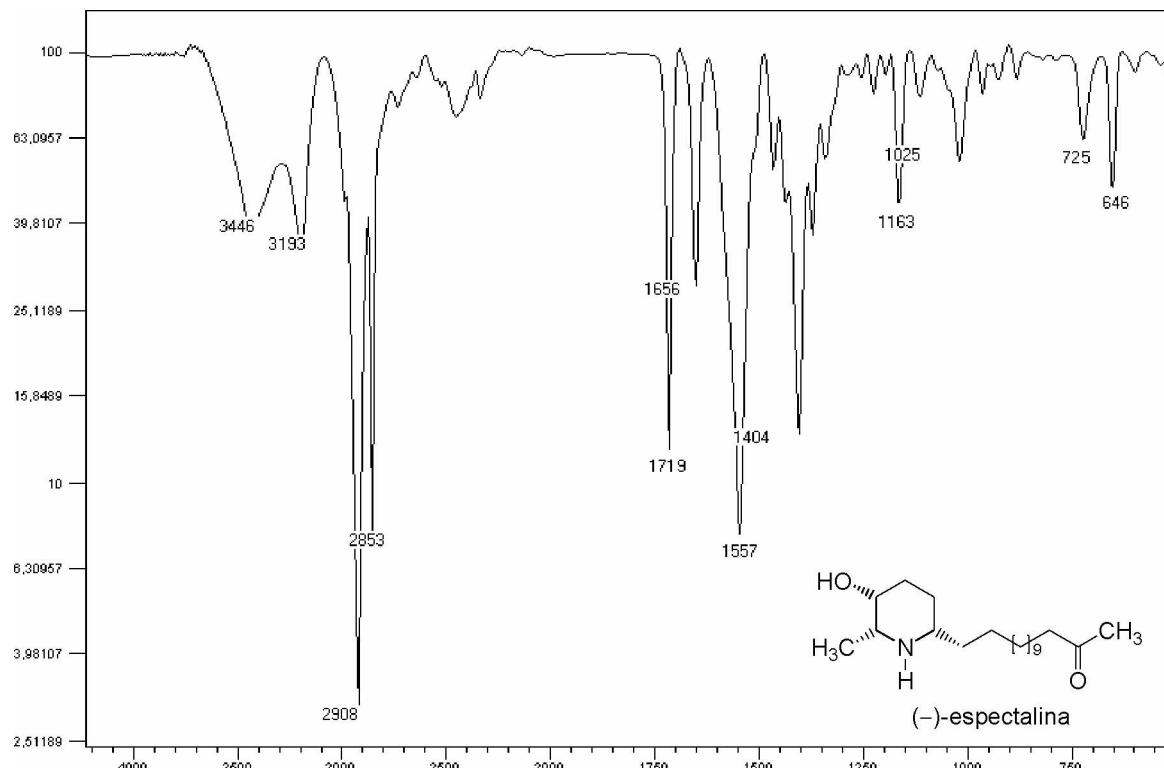
Um padrão de bandas semelhantes foi observado no espectro de IV do alcaloide **6** (Figura 45).

**Figura 44 – Espectro na região do IV (pastilha de KBr) do alcaloide 1.**



Fonte: a autora.

**Figura 45 – Espectro na região do IV (pastilha de KBr) do alcaloide 6.**



Fonte: a autora.

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  para o alcaloide **1** (Figura 46), permitiu identificar a presença de um tripleto em  $\delta$  2,47, integrando para dois hidrogênios, e um singuleto em  $\delta$  2,13, integrando para três hidrogênios, que foram atribuídos aos H $10'$  e H $12'$ , respectivamente, localizados na cadeia lateral (Figuras 47 e 48). Os sinais observados em  $\delta$  3,21 (H $2$ , dq), 3,82 (H $3$ , m) e 3,03 (H $6$ , m), caracterizam o anel piperidínico (Figura 48), o que está de acordo com os dados da literatura (Tabela 6). Também foi observado no espectro de RMN  $^1\text{H}$  dois singletos em  $\delta$  4,88 (OH) e 1,89 (CH $_3$ ), que foram atribuídos à presença de água e ácido acético como contaminantes.

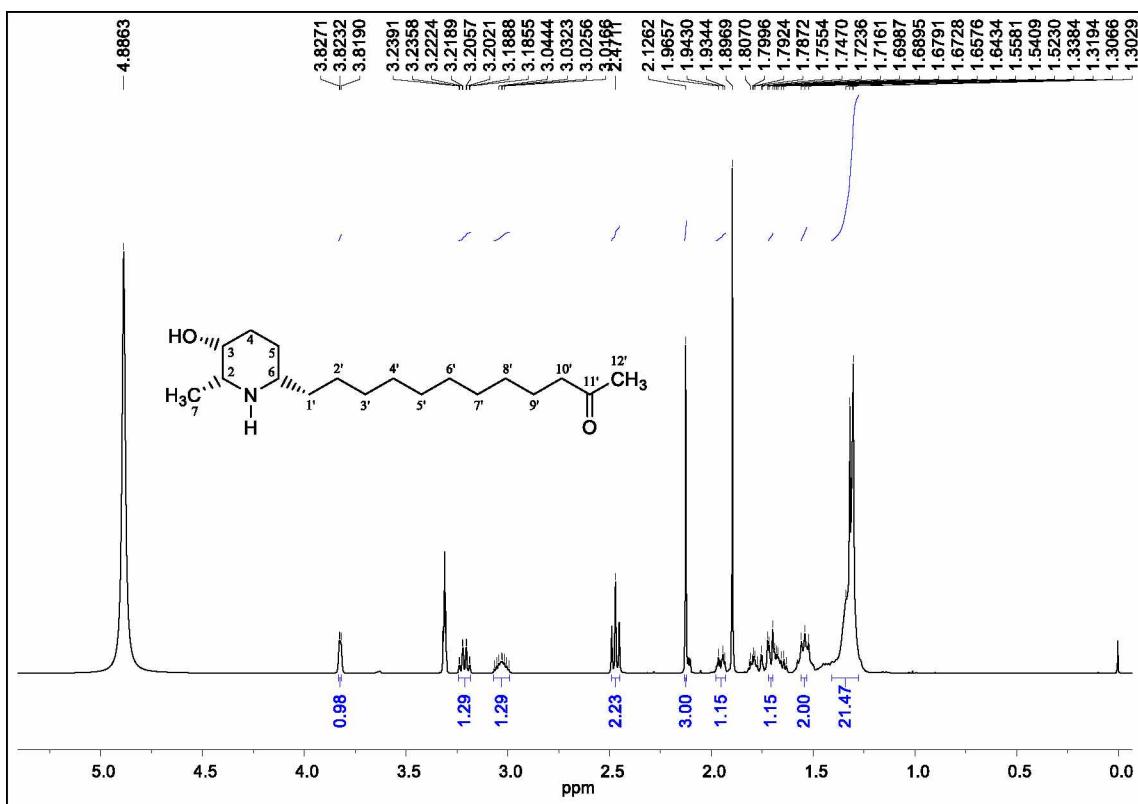
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 49) o anel piperidínico foi caracterizado pela presença dos sinais em  $\delta$  58,39; 65,70 e 57,21 relativos aos carbonos C $2$ , C $3$  e C $6$ , respectivamente (Figura 50). A carbonila do grupo metil-cetona, localizada na cadeia lateral, foi caracterizada pelo sinal em  $\delta$  212,10. Os sinais em  $\delta$  15,72 e 29,85 foram atribuídos aos carbonos das metilas C $7$  e C $12'$ , respectivamente. Na região de  $\delta$  30,28–30,83 ocorre a sobreposição dos sinais provenientes dos carbonos metilênicos C $3'$ –C $8'$  (Figuras 51 e 52) (Tabela 6). O tamanho da cadeia lateral foi estimado analisando o número de sinais correspondentes aos metilenos observados nos espectros de  $^{13}\text{C}$  (Figuras 51 e 52) e DEPT 135 (Figuras 53 e 54) formada por dez metilenos, uma carbonila e uma metila. A principal diferença entre os alcaloides **1** e **6** está no tamanho da cadeia lateral em C $6$ , sendo que em **6** são observados dois sinais adicionais na região dos carbonos metilênicos (Figura 60).

**Tabela 6** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos alcaloides **1** e **6**.

posição	(-)-cassina ( <b>1</b> )				(-)-espectralina ( <b>6</b> )			
	(a autora)		(Pivatto, 2010)		(a autora)		(Pivatto, 2010)	
	$^1\text{H}$ (400 MHz, em $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz, em $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ (500 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ (125 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ (400 MHz, em $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz, em $\text{CD}_3\text{OD}$ ) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ (500 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ (125 MHz, em $\text{CDCl}_3$ ) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>
2	3,21 dq (6,7; 1,4)	58,39 (CH)	2,80 dq (7,0; 1,5)	56,40 (CH)	3,20 dq (6,7; 1,4)	57,41 (CH)	2,78 dq (7,0; 1,5)	56,35 (CH)
3	3,82 m	65,70 (CH)	3,60 m	67,88 (CH)	3,82 m	65,95 (CH)	3,59 m	67,97 (CH)
4a	1,95 m		1,90 m		1,95 m		1,90 m	
4b	1,72 m	34,63 ( $\text{CH}_2$ )	1,63 m	32,51 ( $\text{CH}_2$ )	1,68 m	31,07 ( $\text{CH}_2$ )	1,63 m	32,57 ( $\text{CH}_2$ )
5	1,32 m	26,09 ( $\text{CH}_2$ )	1,37 m	26,77 ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	26,32 ( $\text{CH}_2$ )	1,36 m	26,79 ( $\text{CH}_2$ )
6	3,03 m	57,21 (CH)	2,60 m	57,83 (CH)	3,03 m	58,61 ( $\text{CH}_2$ )	2,58 m	57,79 ( $\text{CH}_2$ )
7	1,32 d (6,7)	15,72 ( $\text{CH}_3$ )	1,12 d (7,0)	18,07 ( $\text{CH}_3$ )	1,31 d (6,7)	15,99 ( $\text{CH}_3$ )	1,10 d (7,0)	18,16 ( $\text{CH}_3$ )
1'	1,32 m	35,02 ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	37,23 ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	34,84 ( $\text{CH}_2$ )	1,35 m	37,34 ( $\text{CH}_2$ )
2'	1,32 m	24,62 ( $\text{CH}_2$ )	1,43 m	25,91 ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	24,85 ( $\text{CH}_2$ )	1,40 m	26,01 ( $\text{CH}_2$ )
3'	1,32 m	30,28 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	30,55 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,46 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,51 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
4'	1,32 m	30,24 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	30,50 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,48 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,61 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
5'	1,32 m	30,31 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	30,58 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,57 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,67 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
6'	1,32 m	30,32 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	30,60 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,60 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,67 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
7'	1,32 m	30,21 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	30,23 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,67 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,70 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
8'	1,32 m	30,83 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,30 m	30,83 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,48 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,58 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
9'	1,54 m	23,40 ( $\text{CH}_2$ )	1,54 m	24,88 ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,22 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,24 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
10'	2,47 t (7,2)	44,07 ( $\text{CH}_2$ )	2,46 t (7,5)	44,31 ( $\text{CH}_2$ )	1,31 m	30,68 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )	1,29 m	30,86 <sup>c</sup> ( $\text{CH}_2$ )
11'	–	212,10 (C)	–	212,20 (C)	1,54 m	23,67 ( $\text{CH}_2$ )	1,55 m	24,89 ( $\text{CH}_2$ )
12'	2,13 s	29,85 ( $\text{CH}_3$ )	2,12 s	29,76 ( $\text{CH}_3$ )	2,47 t (7,6)	44,30 ( $\text{CH}_2$ )	2,46 t (8,0)	44,32 ( $\text{CH}_2$ )
13'	–	–	–	–	–	212,31 (C)	–	212,21 (C)
14'	–	–	–	–	2,13 s	29,79 ( $\text{CH}_3$ )	2,12 s	29,76 ( $\text{CH}_3$ )

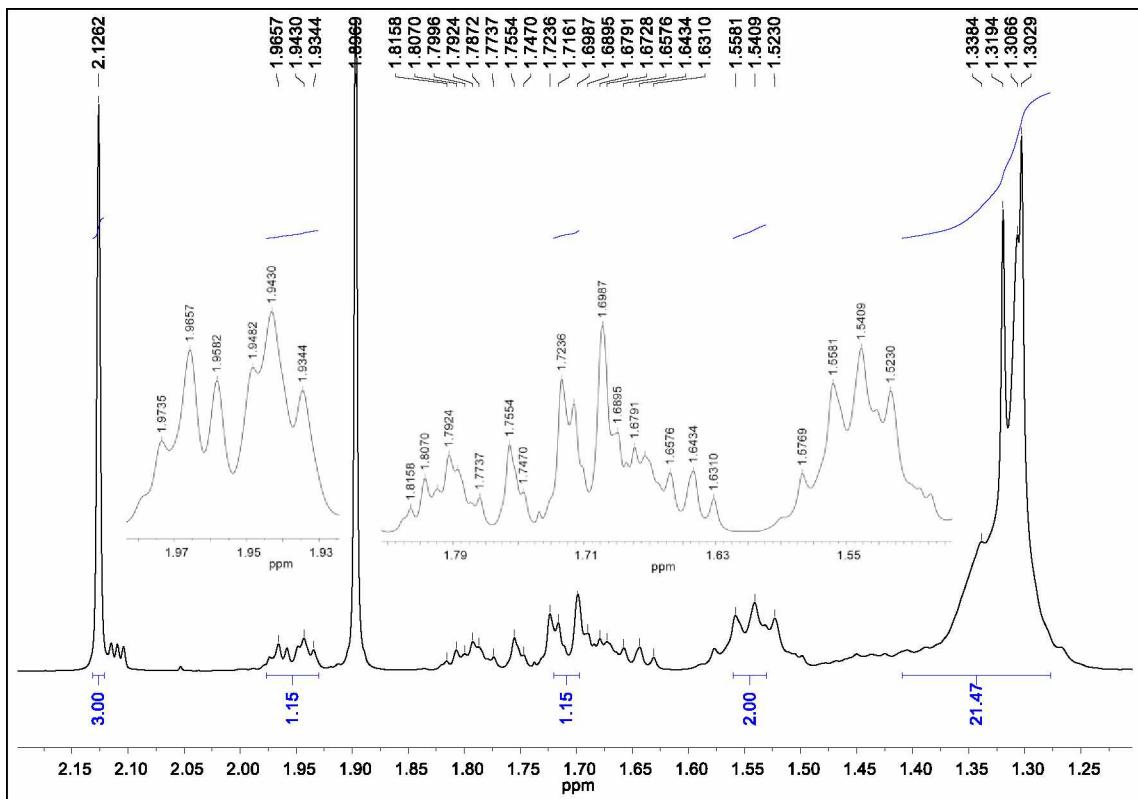
<sup>a</sup>Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em relação ao padrão interno TMS. <sup>b</sup>Multiplicidade: s (singleto); d (dublet); t (triplet); m (multiplet). <sup>c</sup>Deslocamento químico calculado no ChemDraw Ultra v. 12.

**Figura 46 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcaloide 1 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**



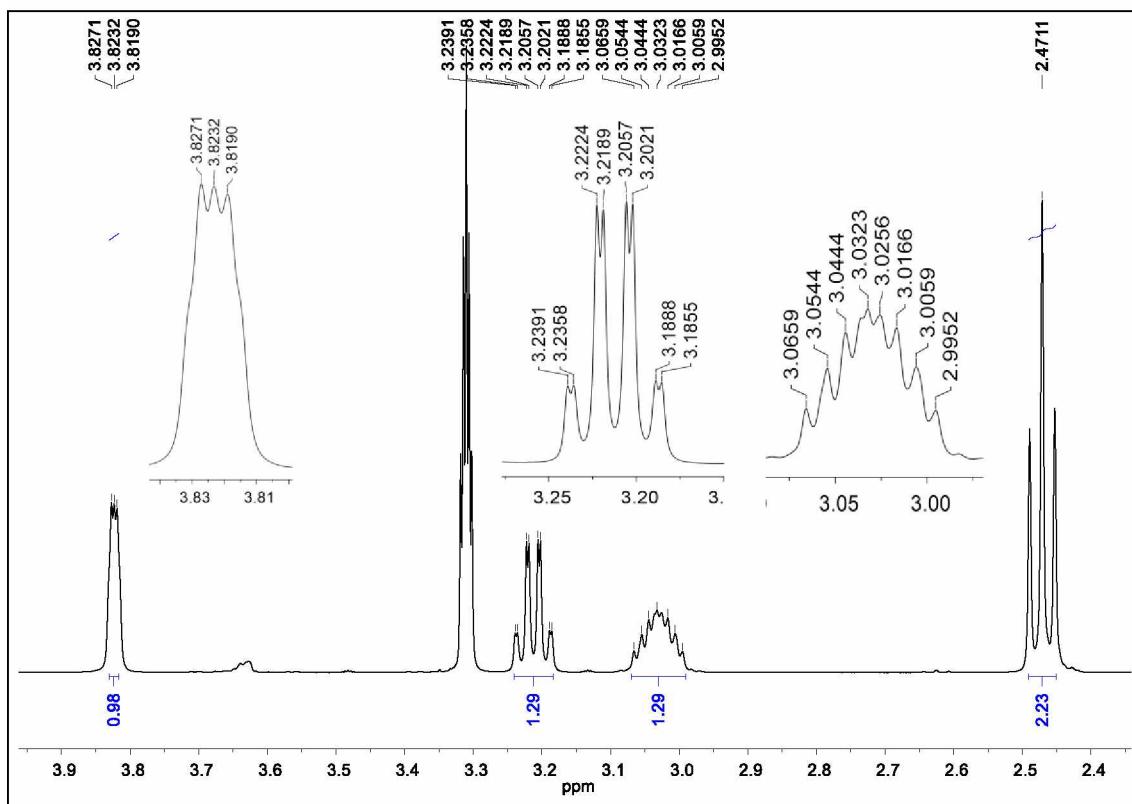
Fonte: a autora.

**Figura 47 - Ampliação do espectro 46 ( $\delta$  1,15–2,15) do alcaloide 1.**



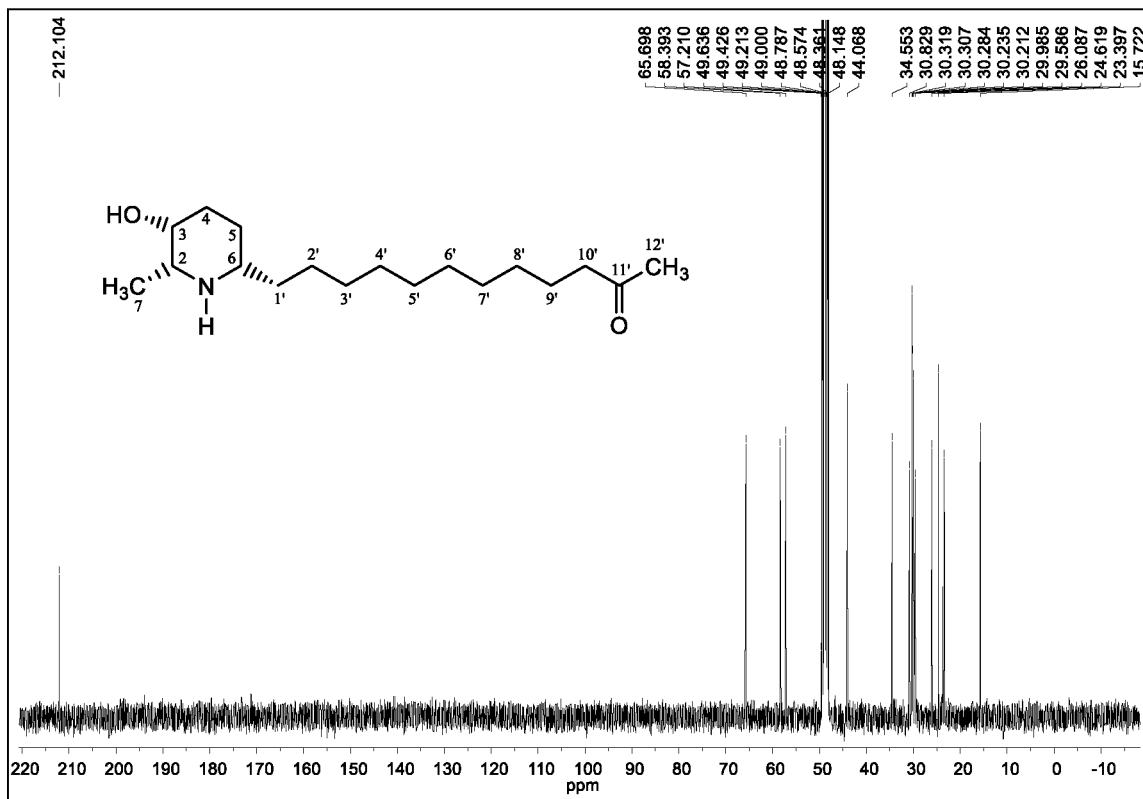
Fonte: a autora.

**Figura 48** – Ampliação do espectro 46 ( $\delta$  2,3–3,9) do alcaloide 1.



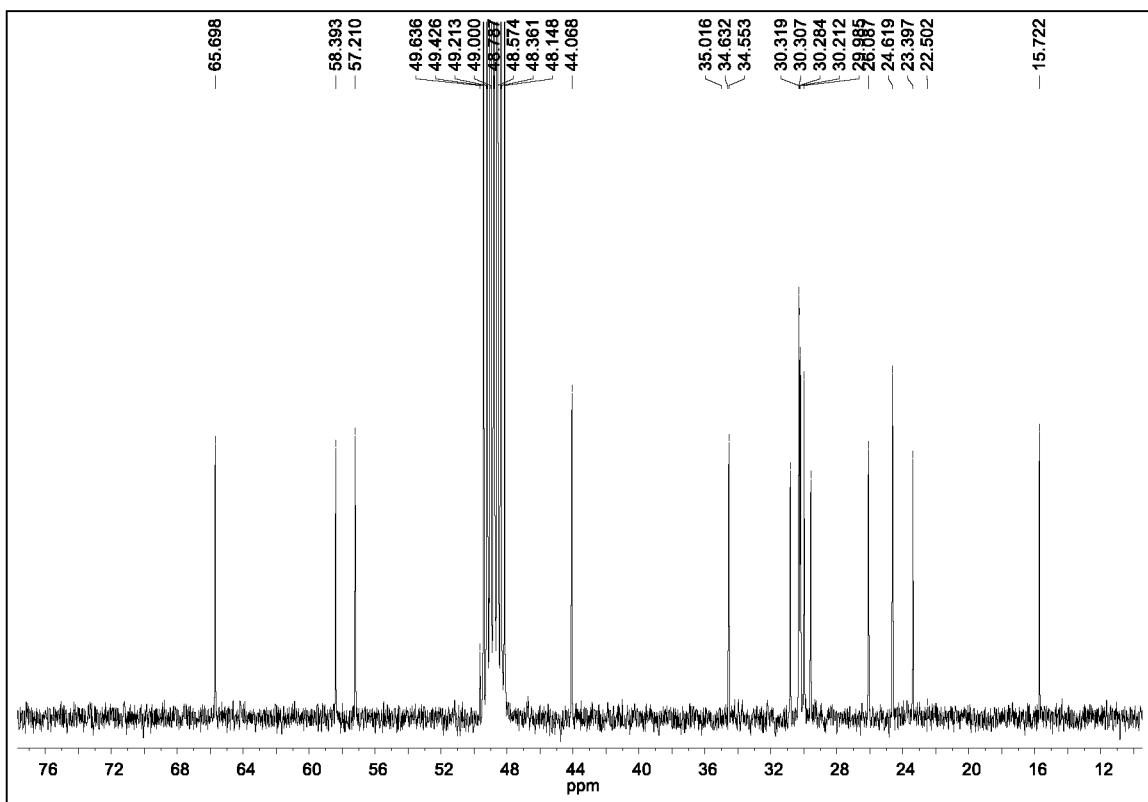
Fonte: a autora.

**Figura 49** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do alcaloide **1** (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



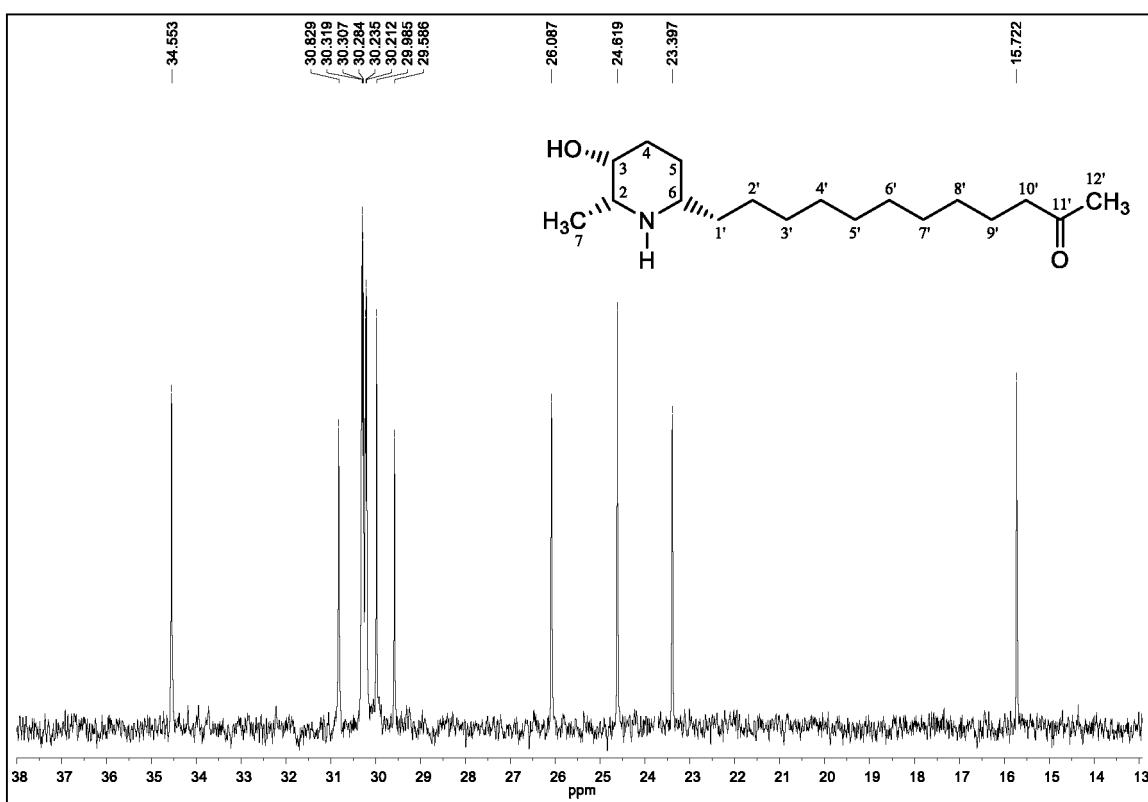
Fonte: a autora.

**Figura 50 – Ampliação do espectro 49 ( $\delta$  10,0–76,0), alcaloide 1.**



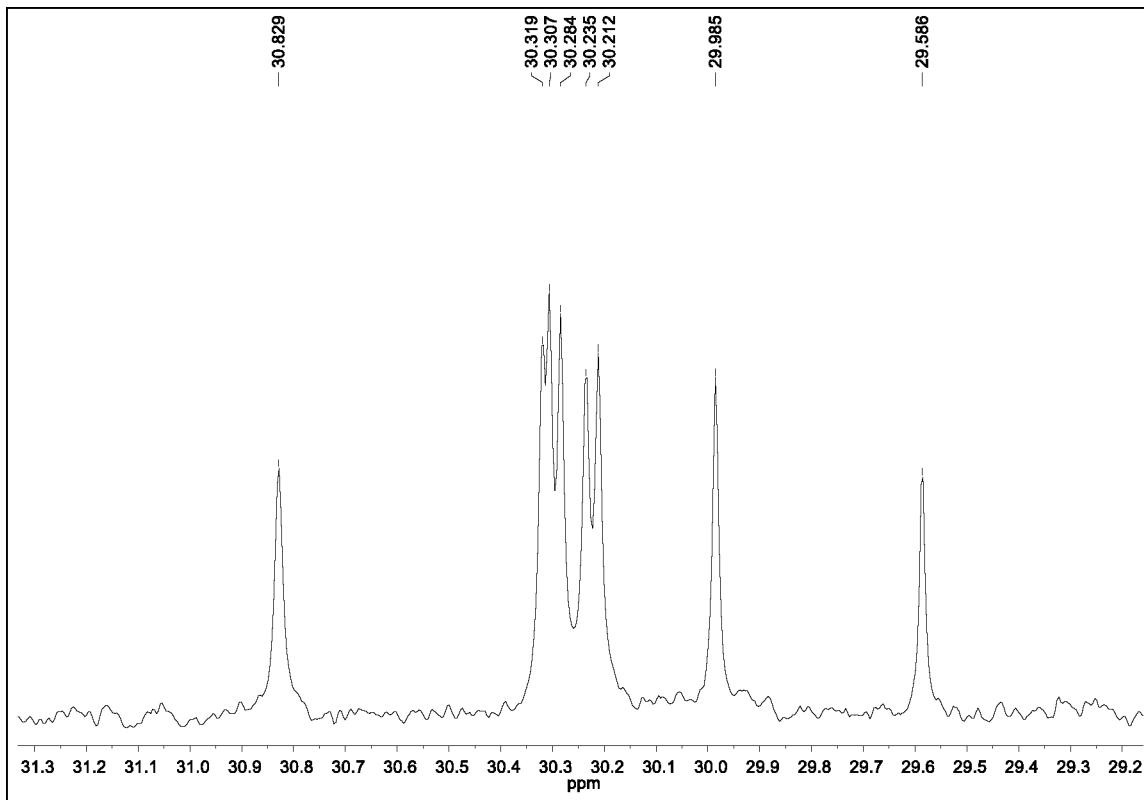
Fonte: a autora.

**Figura 51 – Ampliação do espectro 50 ( $\delta$  13,0–38,0), alcaloide 1.**



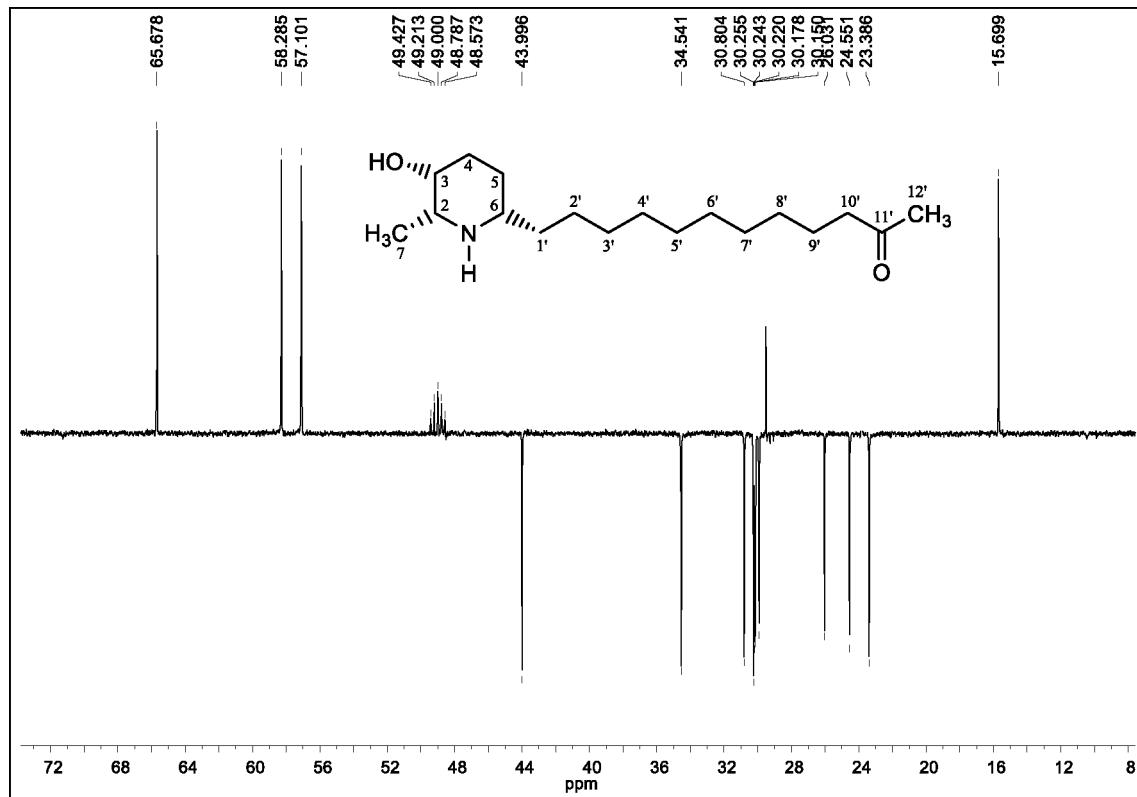
Fonte: a autora.

**Figura 52 – Ampliação do espectro 51 ( $\delta$  29,2–31,3), alcaloide 1.**



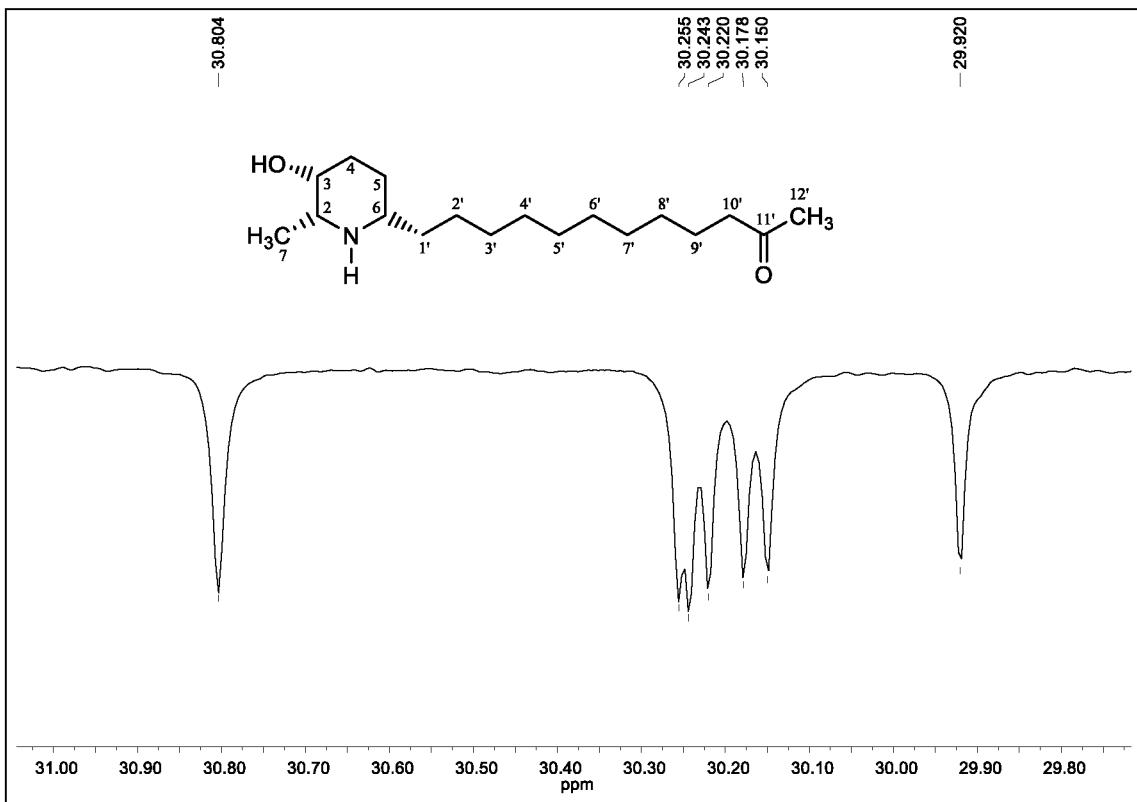
Fonte: a autora.

**Figura 53 – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcaloide 1.**



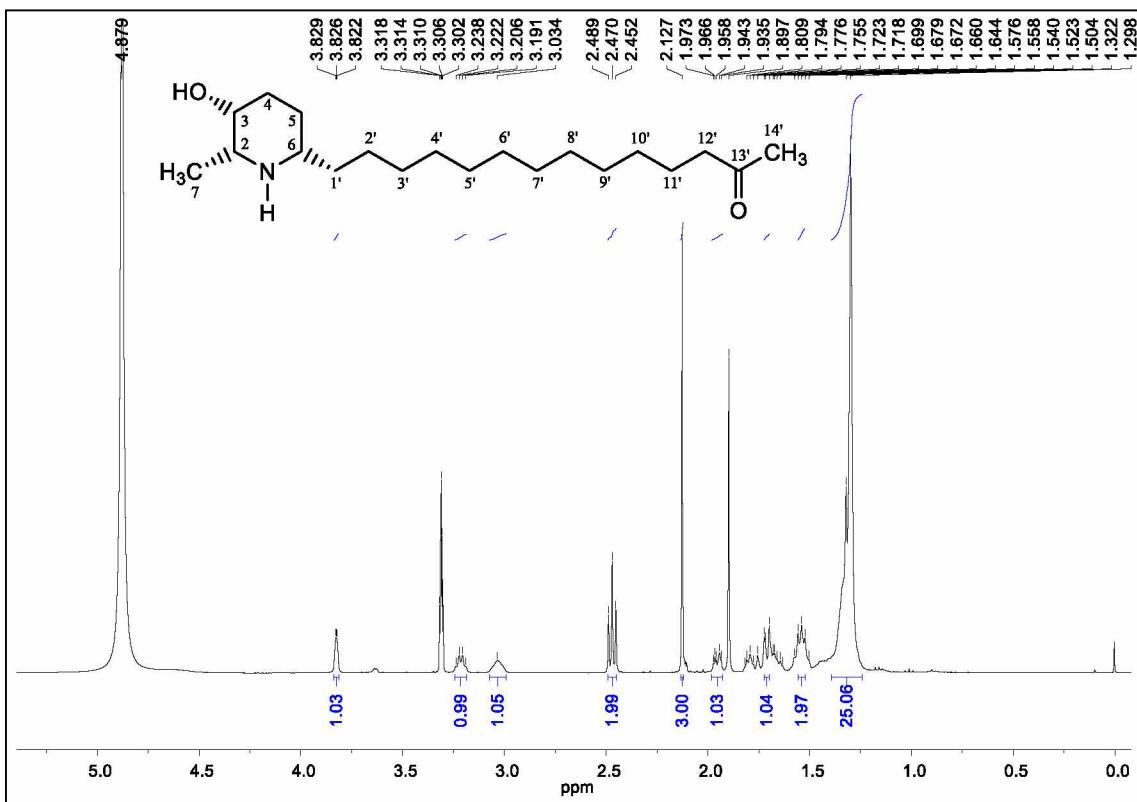
Fonte: a autora.

**Figura 54 – Ampliação do espectro 53 ( $\delta$  29,8–31,0), alcaloide 1.**



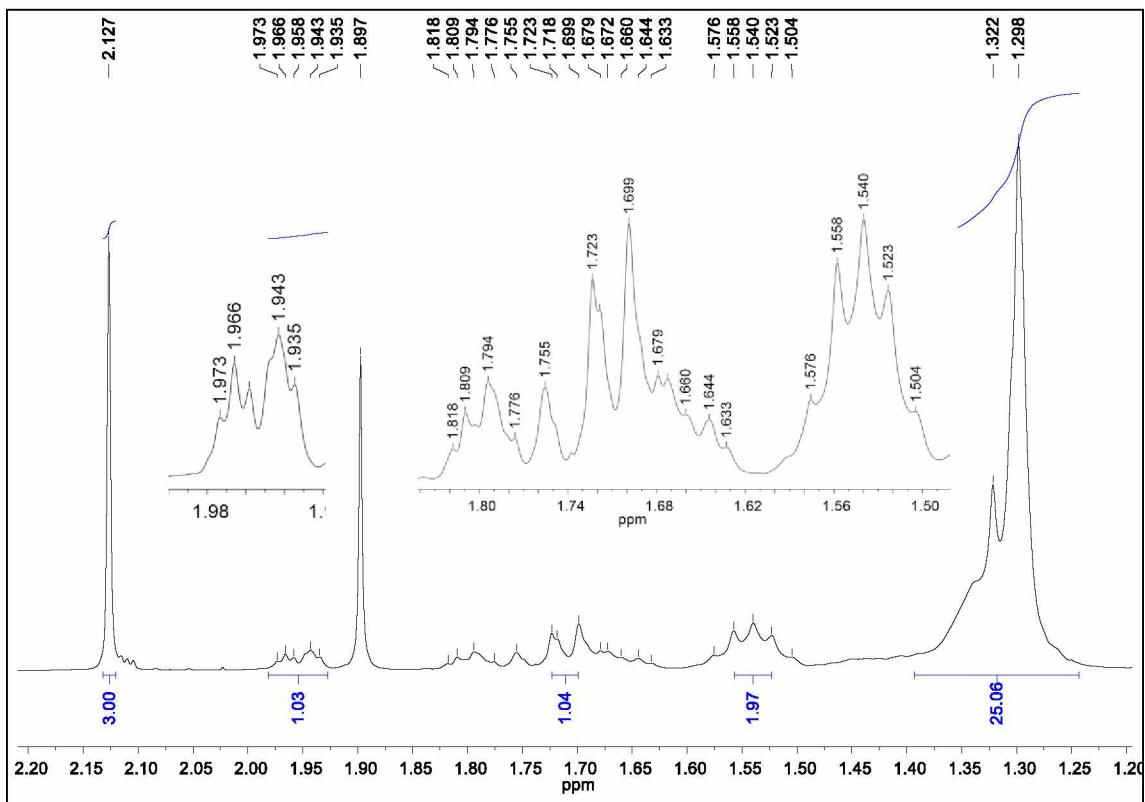
Fonte: a autora.

**Figura 55 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcaloide 6 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**



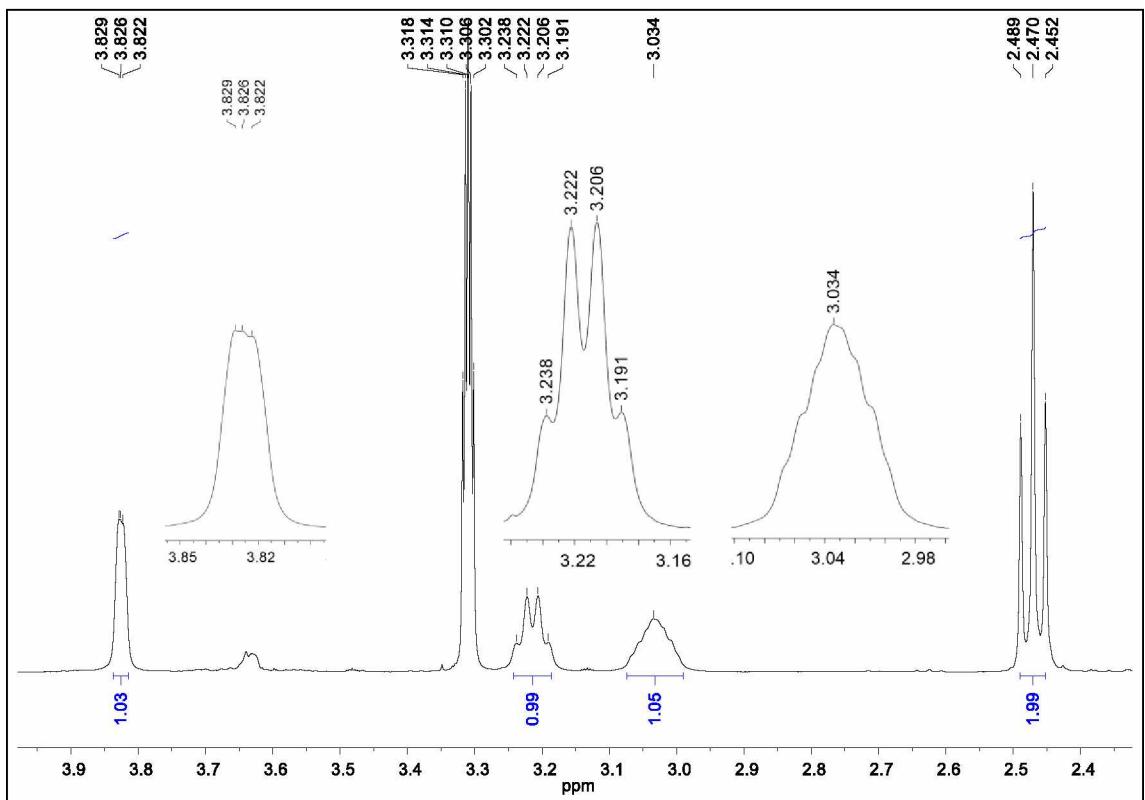
Fonte: a autora.

**Figura 56 – Ampliação do espectro 55 ( $\delta$  1,20–2,20) do alcaloide 6.**



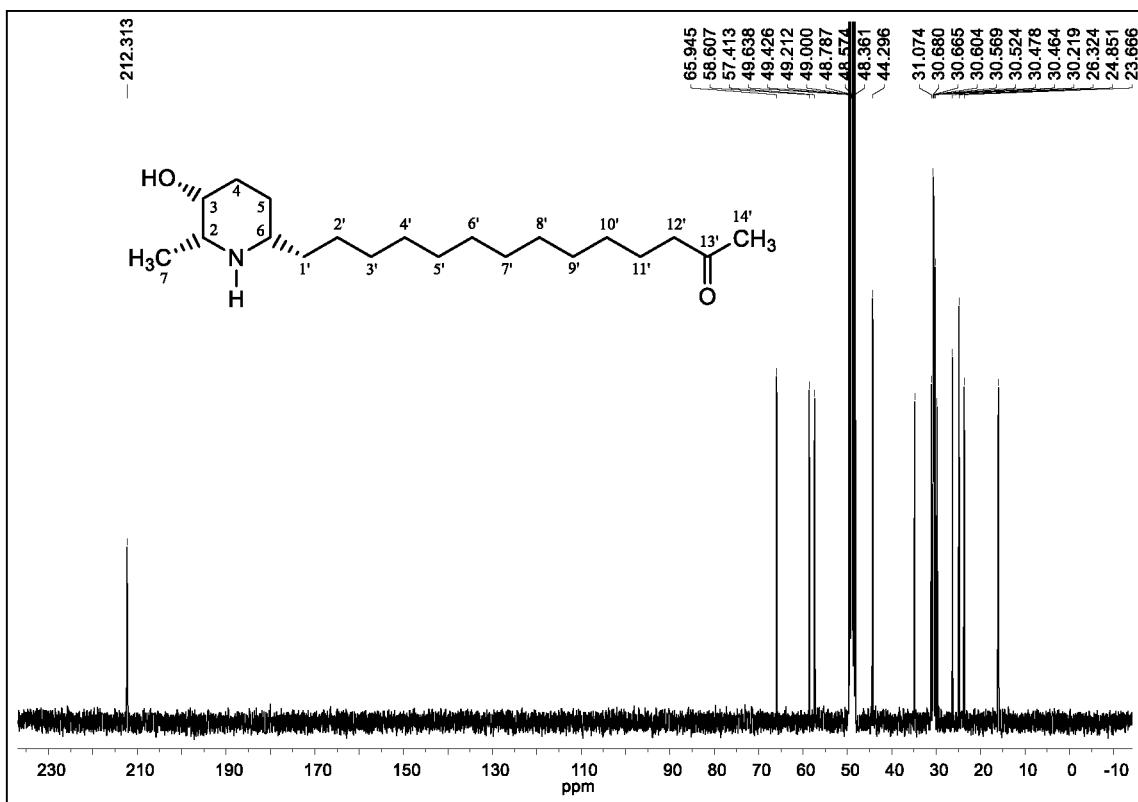
Fonte: a autora.

**Figura 57 – Ampliação do espectro 55 ( $\delta$  2,4–3,9) do alcaloide 6.**



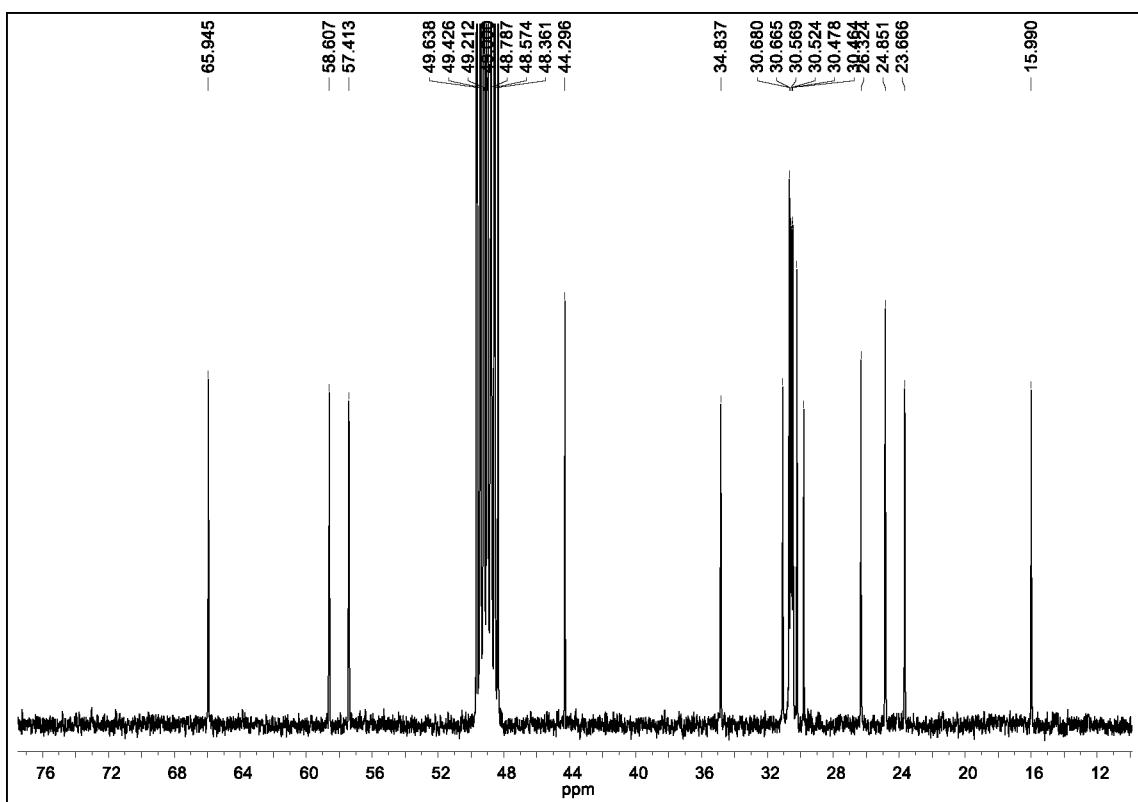
Fonte: a autora.

**Figura 58 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do alcaloide 6 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**



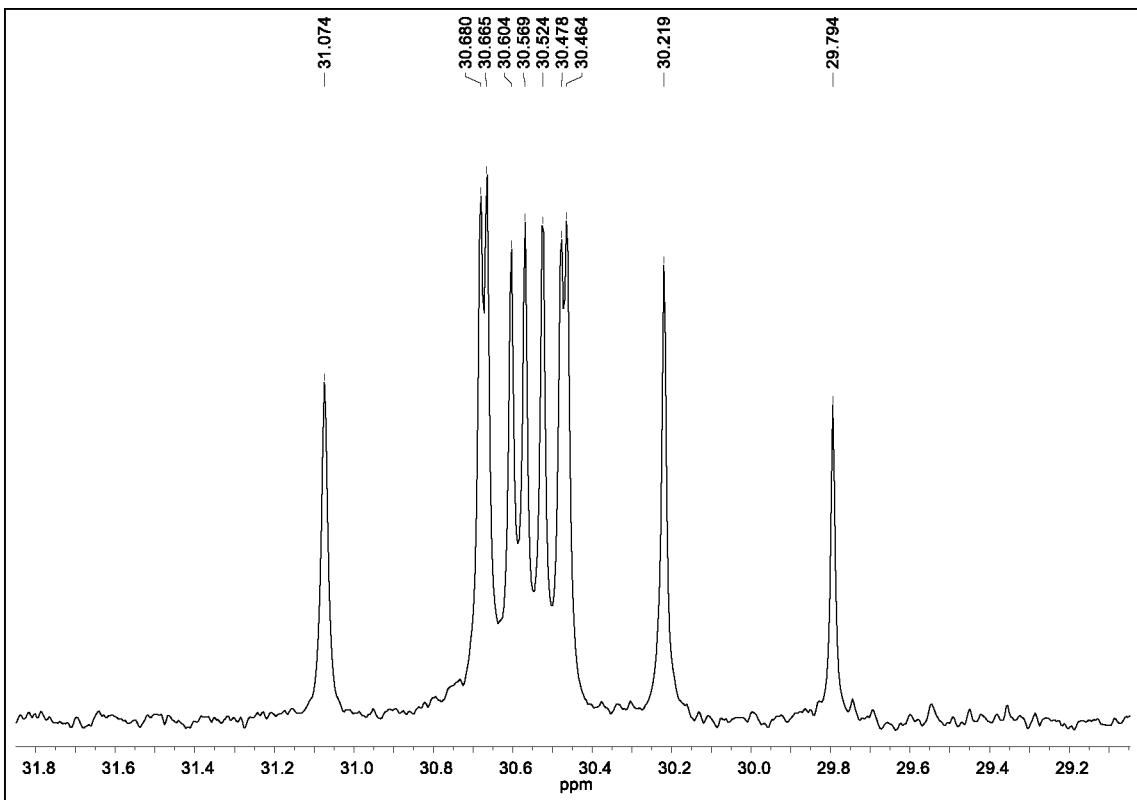
Fonte: a autora.

**Figura 59 – Ampliação do espectro 58 ( $\delta$  12,0–76,0), alcaloide 6.**



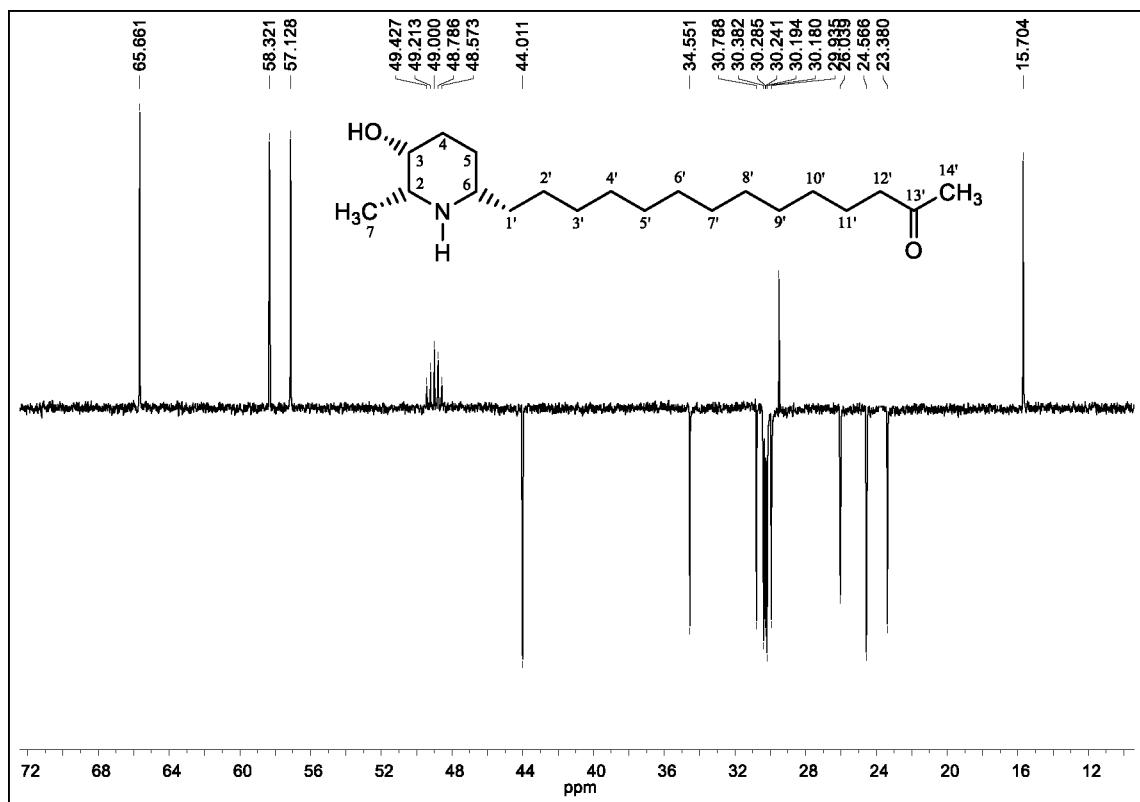
Fonte: a autora.

**Figura 60 – Ampliação do espectro 59 ( $\delta$  29,2–31,8), alcaloide 6.**



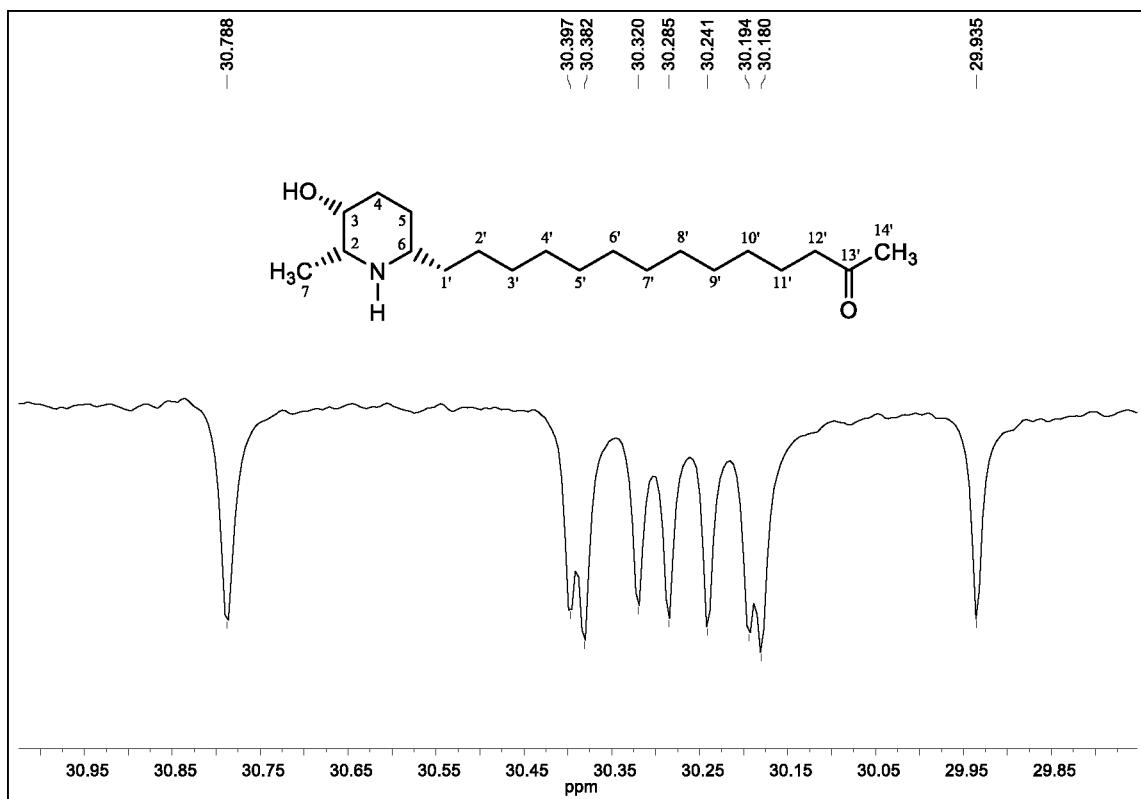
Fonte: a autora.

**Figura 61 – Espectro de RMN de DEPT 135 (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) do alcaloide 6.**



Fonte: a autora.

**Figura 62 – Ampliação do espectro 61 ( $\delta$  29,85–30,95), alcaloide 6.**

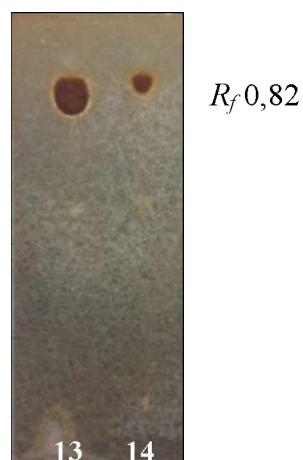


Fonte: a autora.

#### 4.3.2 Homólogos (–)-3-O-acetyl cassina (13) e (–)-3-O-acetyl espectralina (14)

Os homólogos **13** (9,2 mg) e **14** (4,3 mg) foram isolados como óleos de coloração amarela, que apresentaram teste positivo quando analisados por CCD e revelados com IC $\ell$ Pt ( $R_f$  0,82) (Figura 65).

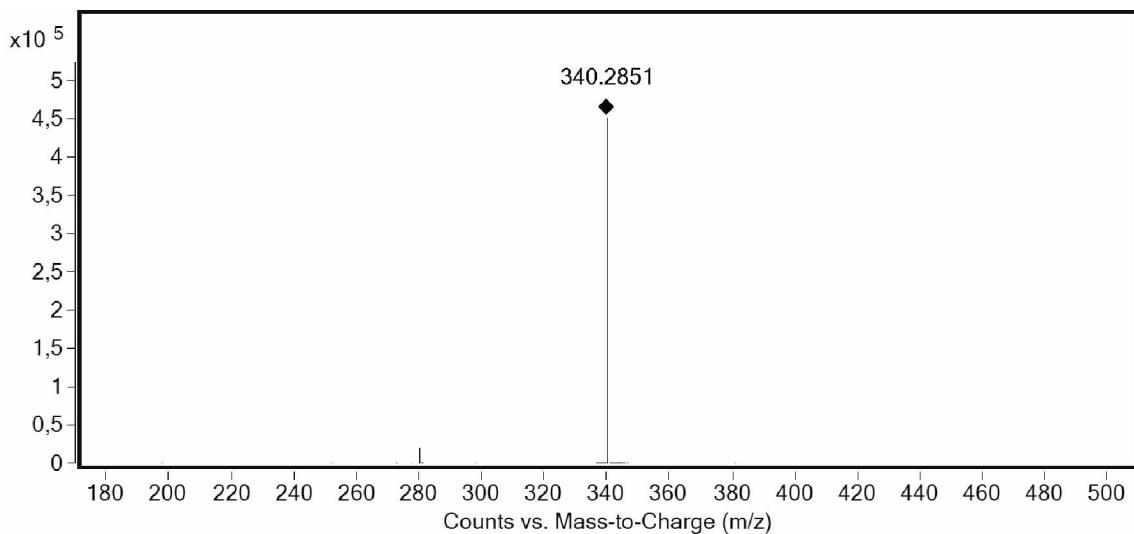
**Figura 63 – CCD dos alcaloides 13 e 14 (FE: sílica, FM:  $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NH}_4\text{OH}$  (9,5:0,5:0,5) e revelador: IC $\ell$ Pt).**



Fonte: a autora.

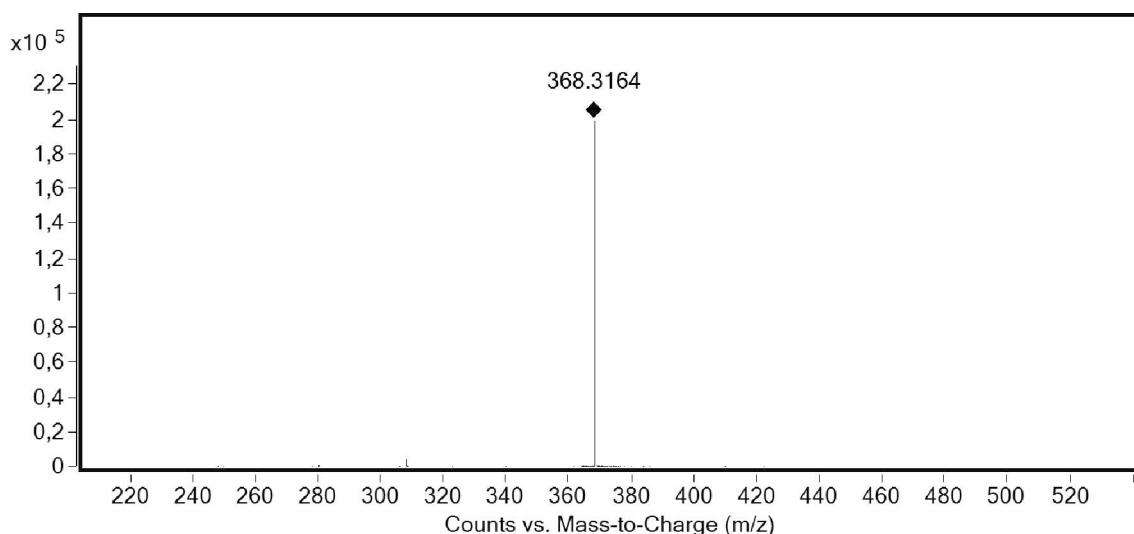
A análise dos alcaloides **13** e **14** por espectrometria de massas de alta resolução, modo positivo, possibilitou estabelecer as fórmulas moleculares  $C_{20}H_{37}NO_3$  e  $C_{22}H_{41}NO_3$ , respectivamente, com índices de deficiência de hidrogênio igual a três. Os sinais referentes às moléculas protonadas foram observados em  $m/z$  340,2851  $[M + H]^+$  e 368,3164  $[M + H]^+$ , calculados para  $C_{20}H_{38}NO_3^+$ , 340,2852 ( $\Delta$  0,29 ppm) e  $C_{22}H_{42}NO_3^+$ , 368,3165 ( $\Delta$  0,27 ppm), respectivamente (Figuras 64 e 65).

**Figura 64 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **13**.**



Fonte: a autora.

**Figura 65 – EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **14**.**

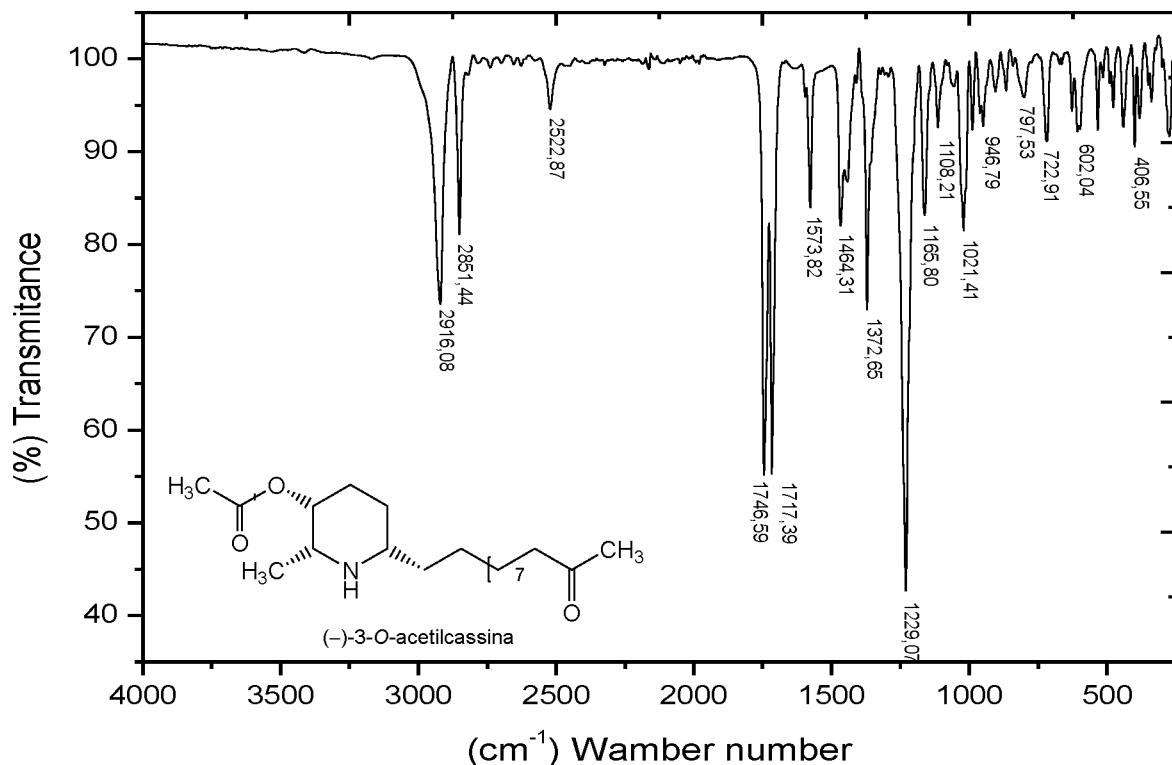


Fonte: a autora.

Nos espectros (Figuras 66 e 67) na região do infravermelho dos alcaloides **13** e **14** foi possível observar a ausência da banda alargada do estiramento referente à O-H de álcool. No espectro de IV do alcaloide **13**, foi possível observar uma banda na região de  $1746\text{ cm}^{-1}$ , proveniente do estiramento de C=O, que associada com a banda em  $1229\text{ cm}^{-1}$  de C-O, corroboram para a presença da função éster. A presença de uma banda de C=O na região de  $1717\text{ cm}^{-1}$  evidencia a função cetona. Foi observada uma banda em  $1573\text{ cm}^{-1}$ , que foi atribuída ao estiramento de N-H, que foi correlacionada com a amina secundária do anel piperidínico. As bandas em  $2916$  e  $2851\text{ cm}^{-1}$  foram correlacionadas com os estiramendos assimétrico e simétrico, respectivamente, dos grupos C-H alifáticos (BARBOSA, 2013; PAVIA et al. 2010).

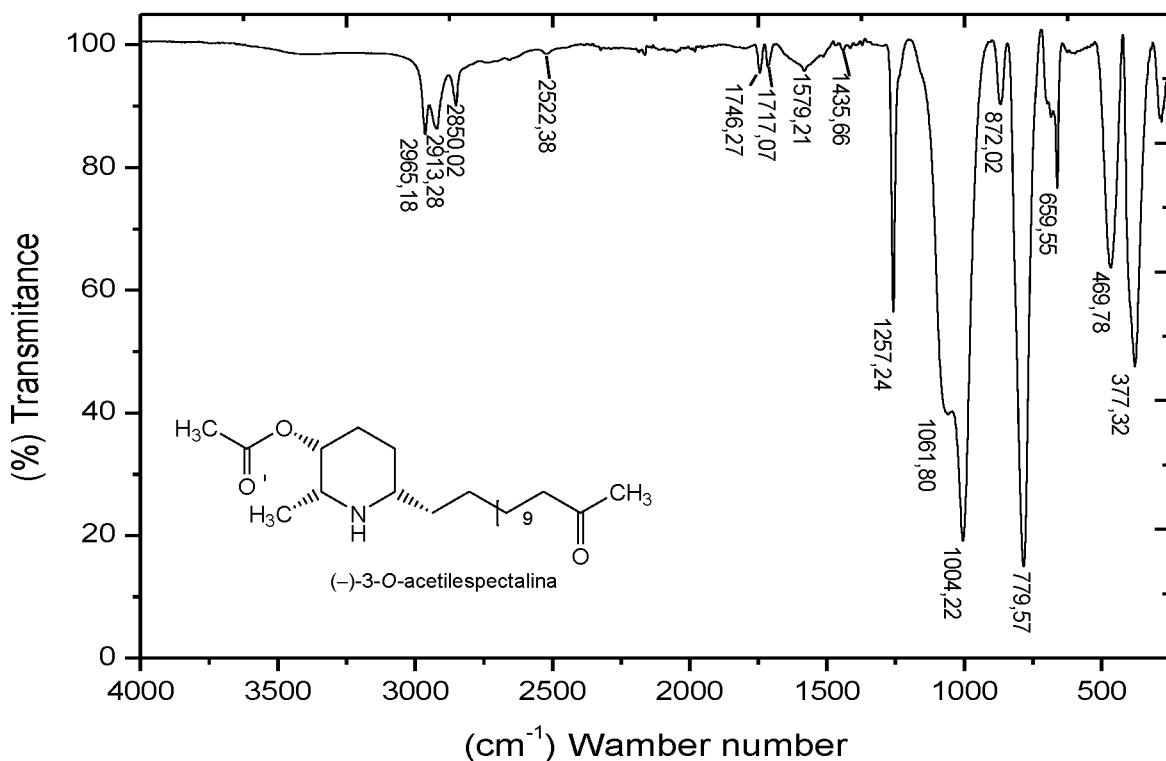
Um padrão de bandas semelhantes foi observado no espectro de IV do alcaloide **14** (Figura 67) (BARBOSA, 2013; PAVIA et al. 2010). As bandas observadas neste espectro estão em baixa intensidade, o que pode ser justificado pela pequena quantidade de amostra utilizada na análise.

**Figura 66** – Espectro na região do IV (filme) do alcaloide **13**.



Fonte: a autora.

**Figura 67** – Espectro na região do IV (filme) do alcaloide **14**.



Fonte: a autora.

A análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos alcaloides **13** e **14** (Figuras 68-85) permitiu observar que existe uma grande similaridade nos deslocamentos químicos com aqueles dos alcaloides **1** e **6** (Tabelas 6 e 7). Porém, adicionalmente nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram observados os sinais em  $\delta$  2,10 (3H, s) (**13**) e  $\delta$  2,13 (3H, s) (**14**), característicos dos grupos metila (C-2'') (Figuras 68 e 78). Os sinais referentes a estes carbonos também foram observados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  20,93 (Figuras 72 e 73) e 20,70 (Figura 81), respectivamente. Adicionalmente também foram observados os sinais em  $\delta$  172,35 (**13**) e 171,24 (**14**), atribuídos as carbonilas dos grupos ésteres (C-1'') (Figuras 71 e 80) (Tabela 7).

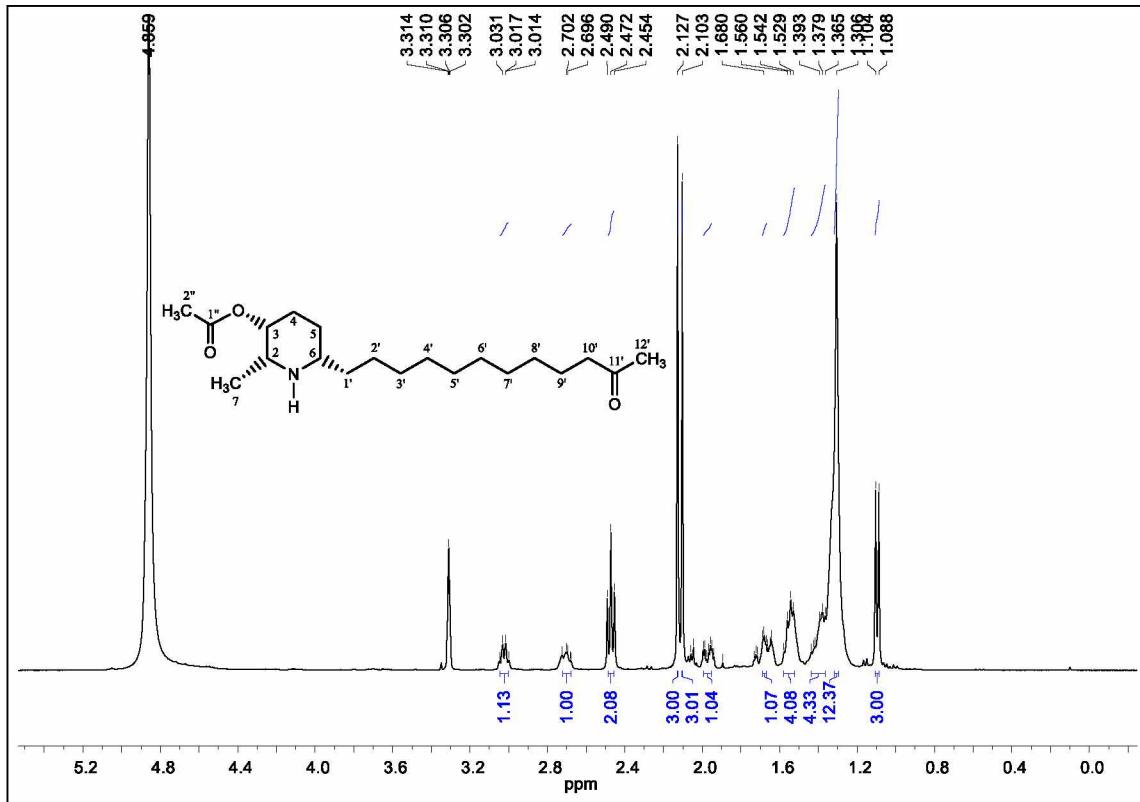
O tamanho da cadeia lateral de **13** e **14** foi determinado pelo número de sinais observados nos espectros de  $^{13}\text{C}$  e DEPT (Figuras 71, 75, 80 e 84) na região dos metilenos (Figuras 73, 74 e 76; 81–83 e 85). Os deslocamentos químicos atribuídos para os alcaloides **13** e **14** estão compilados na Tabela 7 e estão de acordo com dados descritos na literatura.

**Tabela 7** – Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  dos alcaloides **13** e **14**.

posição	(-)-3-O-acetilcassina ( <b>13</b> )				(-)-3-O-acetilespectalina ( <b>14</b> )			
	(a autora)		(Pivatto, 2010)		(a autora)		(Pivatto, 2010)	
	$^1\text{H}$ (400 MHz, em CD <sub>3</sub> OD) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz, em CD <sub>3</sub> OD) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ (500 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ (125 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ (400 MHz, em CD <sub>3</sub> OD) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz, em CD <sub>3</sub> OD) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ (500 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) $\delta_{\text{H}}^a$ mult. <sup>b</sup> ( <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ (125 MHz, em CDCl <sub>3</sub> ) $\delta_{\text{C}}^a$ (mult.) <sup>b</sup>
2	3,02 dq (6,7; 1,4)	55,77 (CH)	2,89 dq (6,5; 2,0)	53,95 (CH)	3,13 dq (6,7; 1,4)	55,77 (CH)	2,90 dq (7,0; 1,5)	54,00 (CH)
3	4,86 sl	71,14 (CH)	4,82 q (2,0)	70,58 (CH)	4,86 sl	69,15 (CH)	4,83 q (2,0)	70,56 (CH)
4a	1,97 m		2,0 m		1,69 m		2,00 m	
4b	1,68 m	26,77 (CH <sub>2</sub> )	1,62 m	29,16 (CH <sub>2</sub> )	1,69 m	28,02 (CH <sub>2</sub> )	1,62 m	29,19 (CH <sub>2</sub> )
5a	1,55 m		1,52 m		1,54 m		1,58 m	
5b	1,55 m	29,55 (CH <sub>2</sub> )	1,50 m	26,81 (CH <sub>2</sub> )	1,54 m		1,58 m	26,78 (CH <sub>2</sub> )
6	2,70 m	57,84 (CH)	2,56 m	56,63 (CH)	2,58 m	58,50 (CH <sub>2</sub> )	2,57 m	56,68 (CH <sub>2</sub> )
7	1,09 d (6,7)	17,60 (CH <sub>3</sub> )	1,06 d (6,5)	18,50 (CH <sub>3</sub> )	1,29 m (6,7)	17,28 (CH <sub>3</sub> )	1,08 d (6,5)	18,49 (CH <sub>3</sub> )
1'a	1,38 m		1,43 m		1,29 m		1,36 m	
1'b	1,38 m	36,90 (CH <sub>2</sub> )	1,35 m	37,08 (CH <sub>2</sub> )	1,29 m	34,65 (CH <sub>2</sub> )	1,36 m	37,01 (CH <sub>2</sub> )
2'	1,38 m	26,40 (CH <sub>2</sub> )	1,35 m	25,96 (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	26,27 (CH <sub>2</sub> )	1,28 m	25,98 (CH <sub>2</sub> )
3'	1,31 sl	30,22 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,35 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,44 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,40 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
4'	1,31 sl	30,57 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,49 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,53 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,58 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
5'	1,31 sl	30,61 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,51 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,67 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,70 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
6'	1,31 sl	30,56 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,40 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,60 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,61 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
7'	1,31 sl	30,51 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,35 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,57 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,58 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
8'	1,31 sl	30,78 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,73 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,51 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,45 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
9'	1,55 m	24,85 (CH <sub>2</sub> )	1,57 m	23,86 (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,43 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,35 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
10'	2,47 t (7,3)	44,30 (CH <sub>2</sub> )	2,42 t (7,5)	43,79 (CH <sub>2</sub> )	1,29 sl	30,75 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )	1,27 sl	29,76 <sup>c</sup> (CH <sub>2</sub> )
11'	–	212,30 (C)	–	209,28 (qC)	1,54 m	24,85 (CH <sub>2</sub> )	1,56 m	23,89 (CH <sub>2</sub> )
12'	2,12 s	29,80 (CH <sub>3</sub> )	2,14 s	29,79 (CH <sub>3</sub> )	2,47 t (7,6)	44,29 (CH <sub>2</sub> )	2,42 t (7,5)	43,83 (CH <sub>2</sub> )
13'	–	–	–	–	–	212,33 (C)	–	209,29 (qC)
14'	–	–	–	–	2,15 s	29,79 (CH <sub>3</sub> )	2,14 s	28,82 (CH <sub>3</sub> )
1"	–	172,35 (C)	–	171,00 (qC)	–	171,24 (C)	–	171,01 (C)
2"	2,10 s	20,93 (CH <sub>3</sub> )	2,12 s	21,27 (CH <sub>3</sub> )	2,13 s	20,70 (CH <sub>3</sub> )	2,12 s	21,29 (CH <sub>3</sub> )

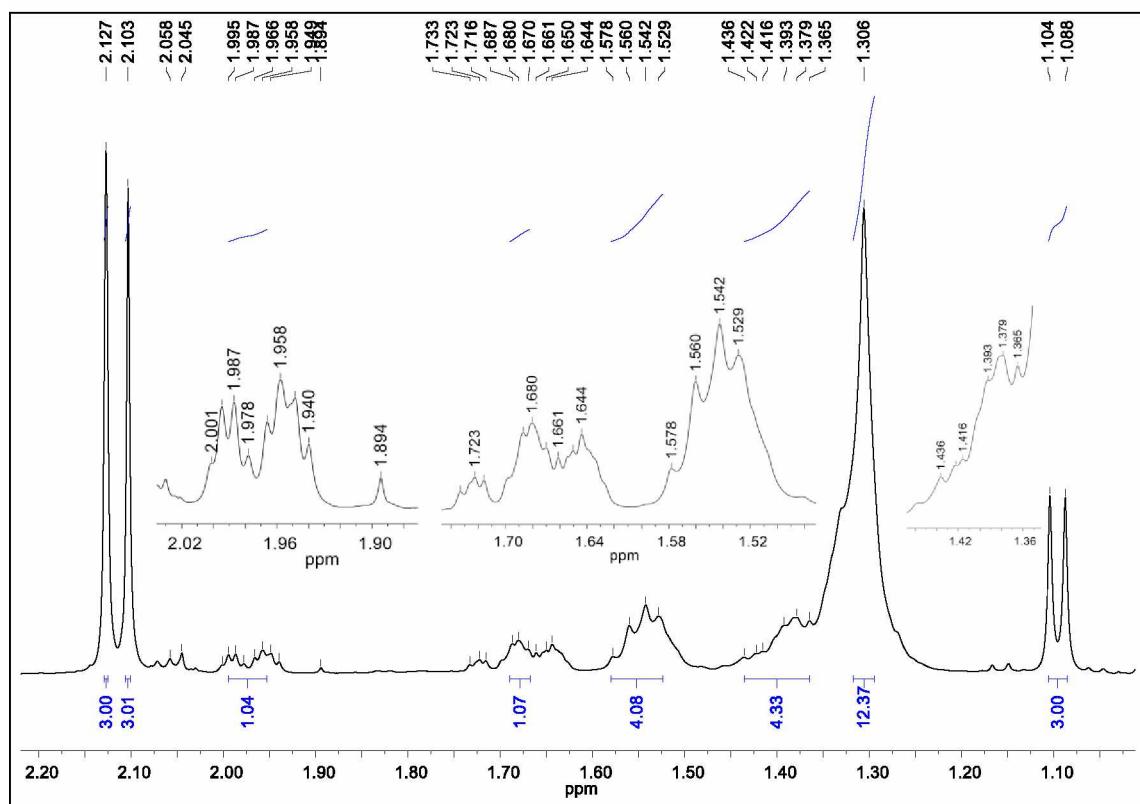
<sup>a</sup>Deslocamentos químicos ( $\delta$ ) em relação ao padrão interno TMS ( $\delta$  0,00 ppm). <sup>b</sup>Multiplicidade: s (singleto); sl (singleto largo); d (dubleto); t (tripleto); m (multipleto).<sup>c</sup>Deslocamento químico calculado no *ChemDraw Ultra v. 12*.

**Figura 68** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcaloide **13** (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



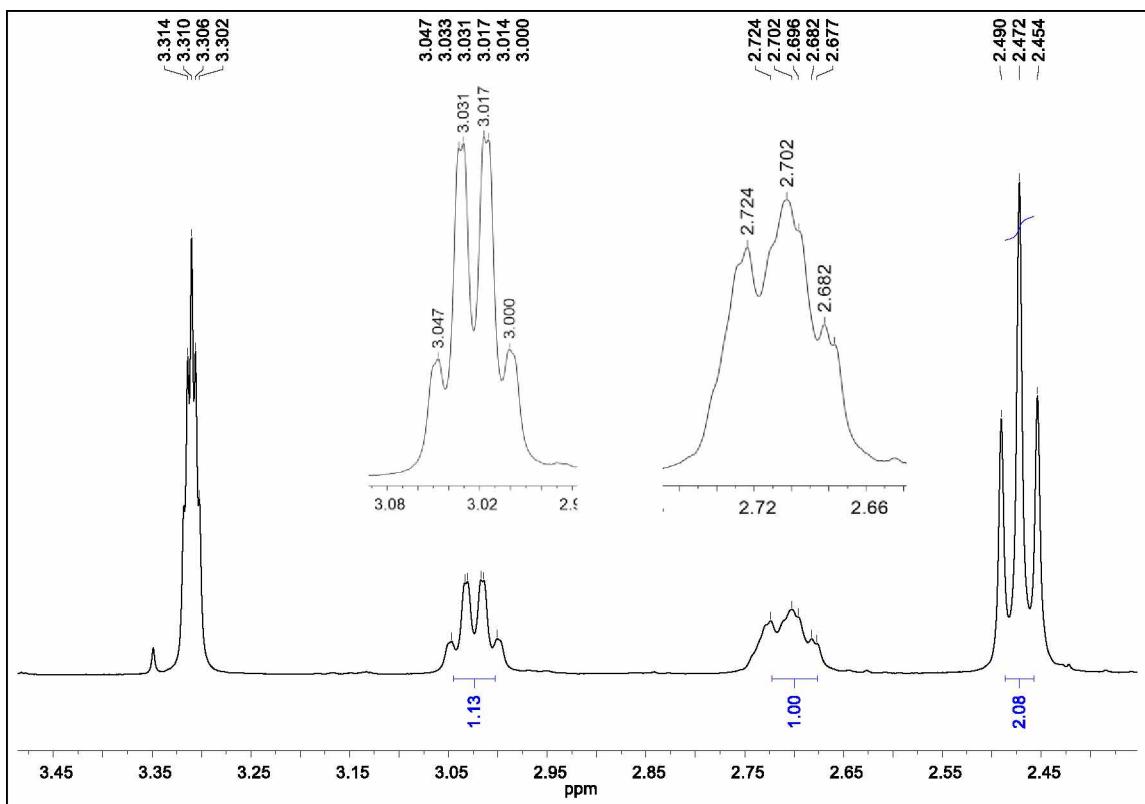
Fonte: a autora.

**Figura 69** – Ampliação do espectro 68 ( $\delta$  1,00–2,20) do alcaloide 13.



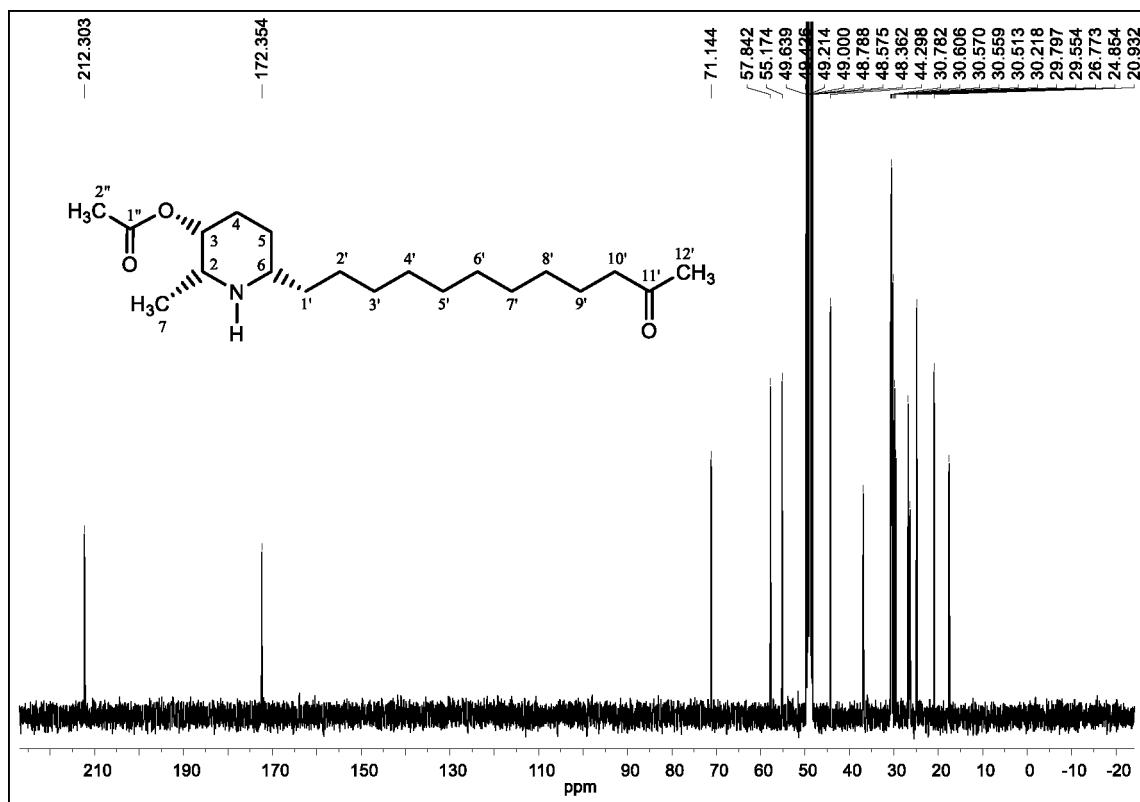
Fonte: a autora.

**Figura 70** – Ampliação do espectro 68 ( $\delta$  2,35–3,45) do alcaloide 13.



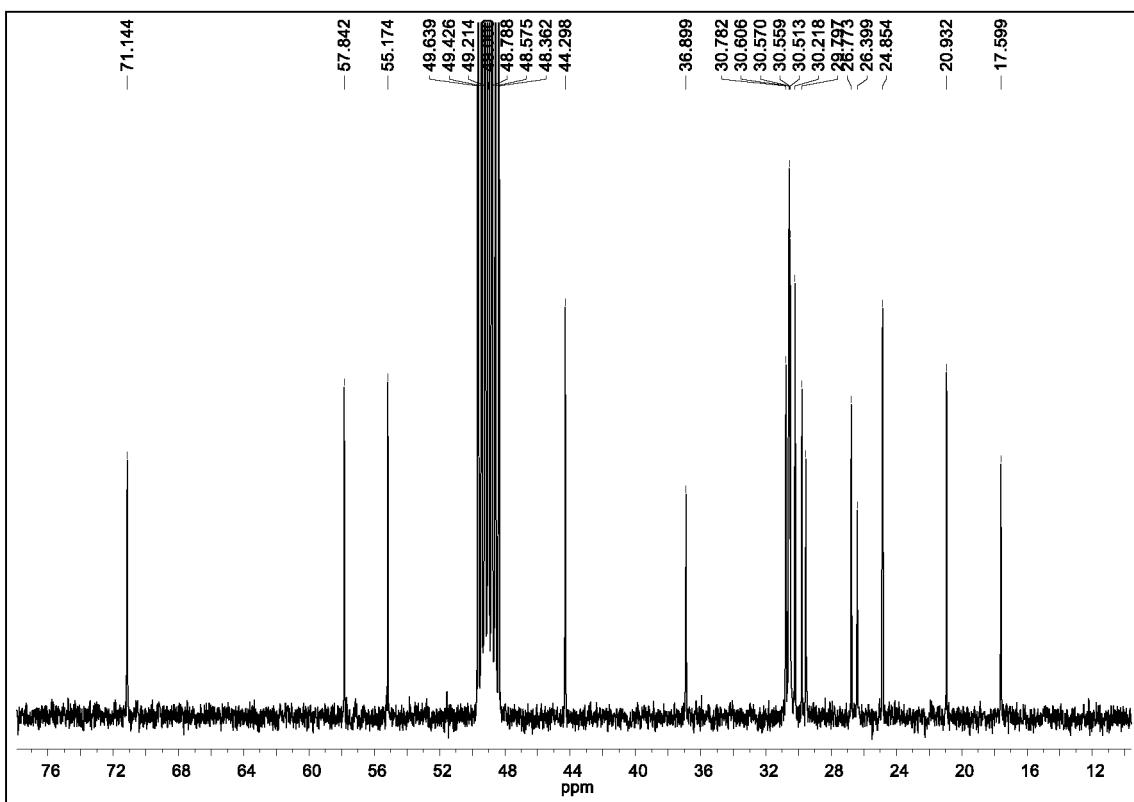
Fonte: a autora.

**Figura 71** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do alcaloide 13 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



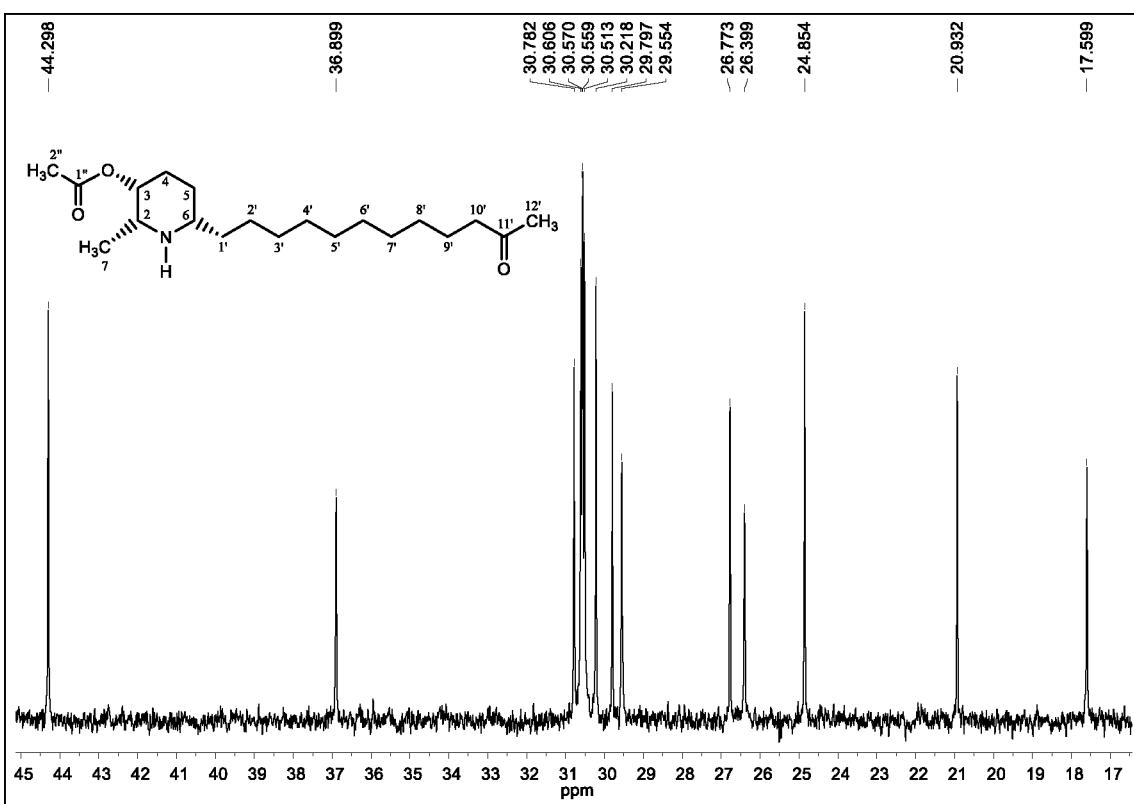
Fonte: a autora.

**Figura 72 – Ampliação do espectro 71 ( $\delta$  8,0–76,0), alcaloide 13.**



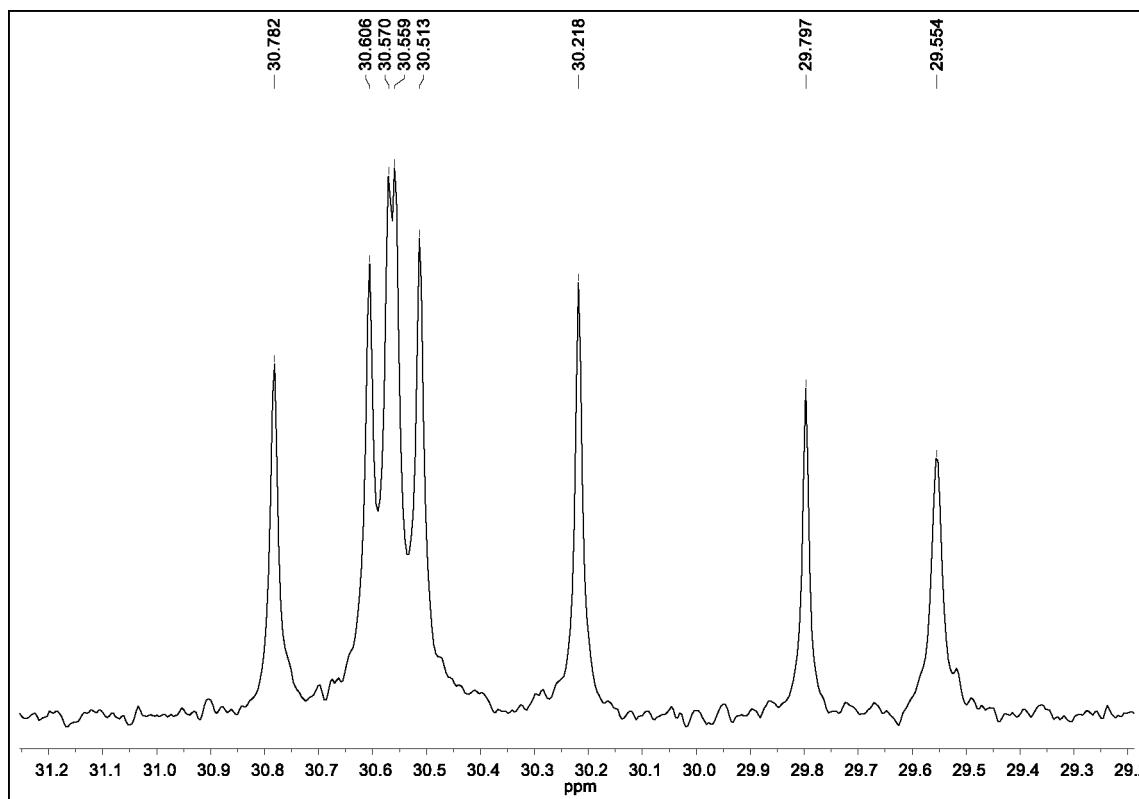
Fonte: a autora.

**Figura 73 – Ampliação do espectro 72 ( $\delta$  17,0–45,0), alcaloide 13.**



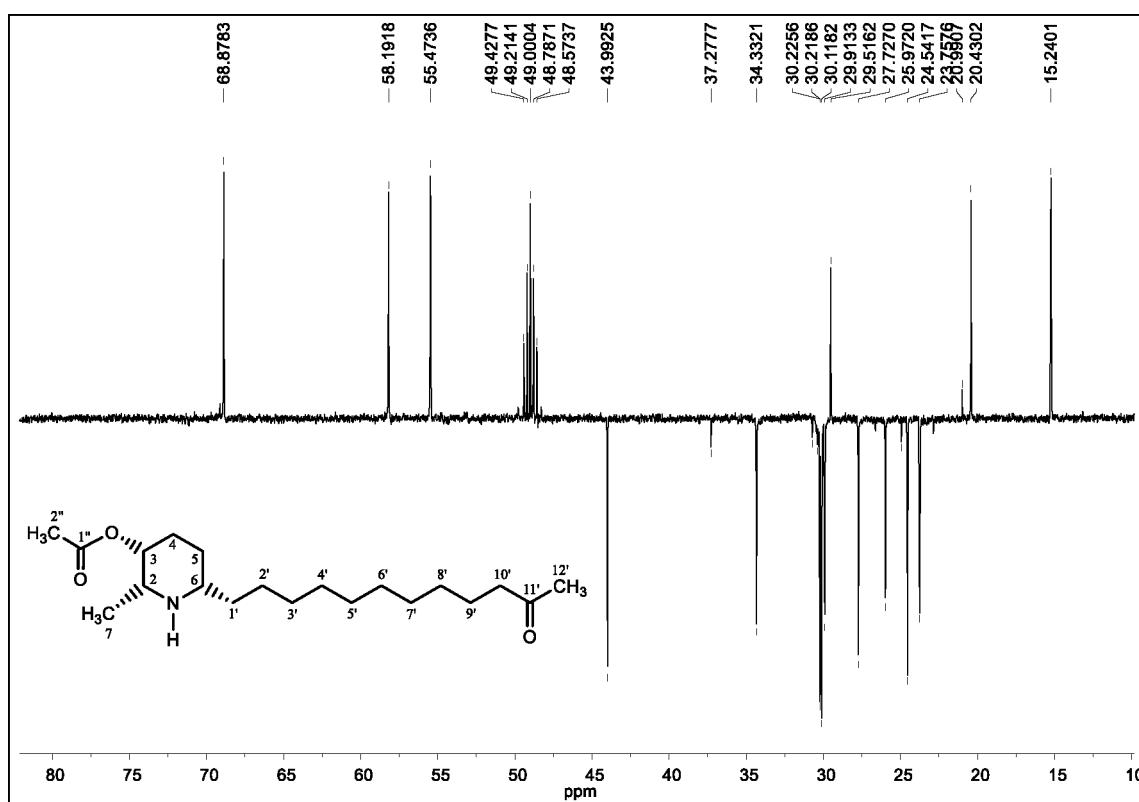
Fonte: a autora.

**Figura 74 – Ampliação do espectro 73 ( $\delta$  29,3–31,3), alcaloide 13.**



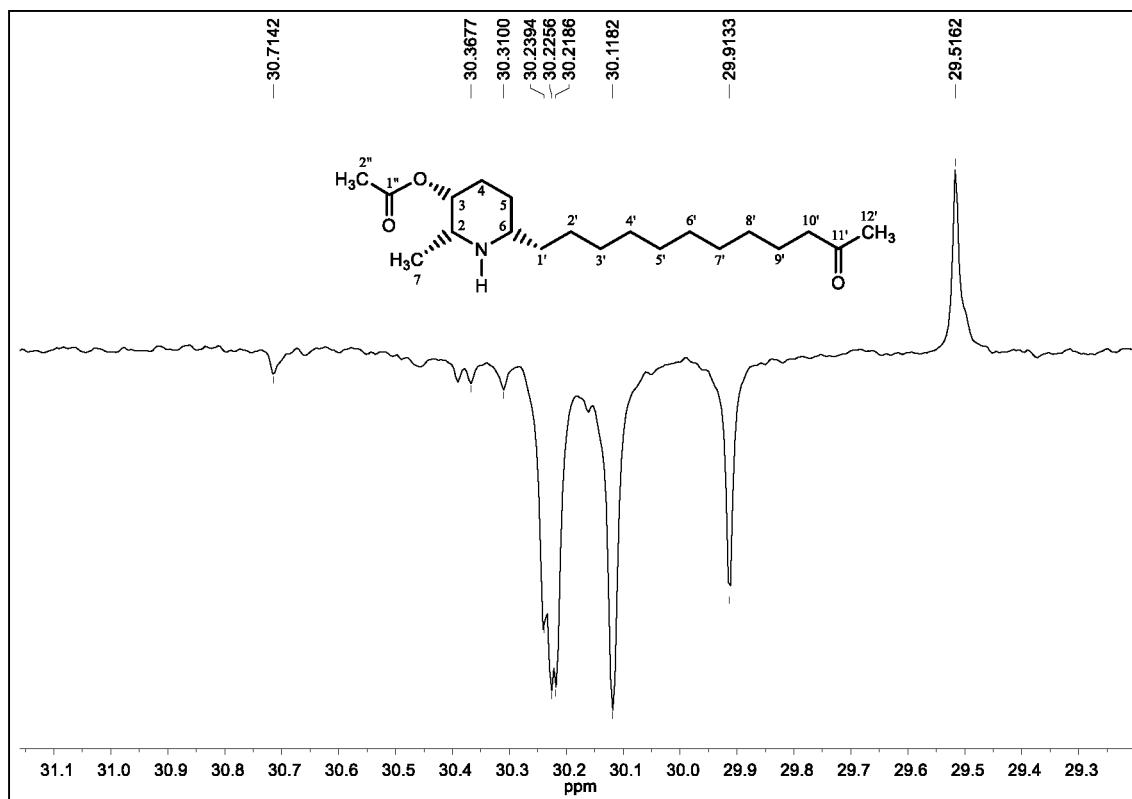
Fonte: a autora.

**Figura 75 – Espectro de RMN de DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcaloide 13.**



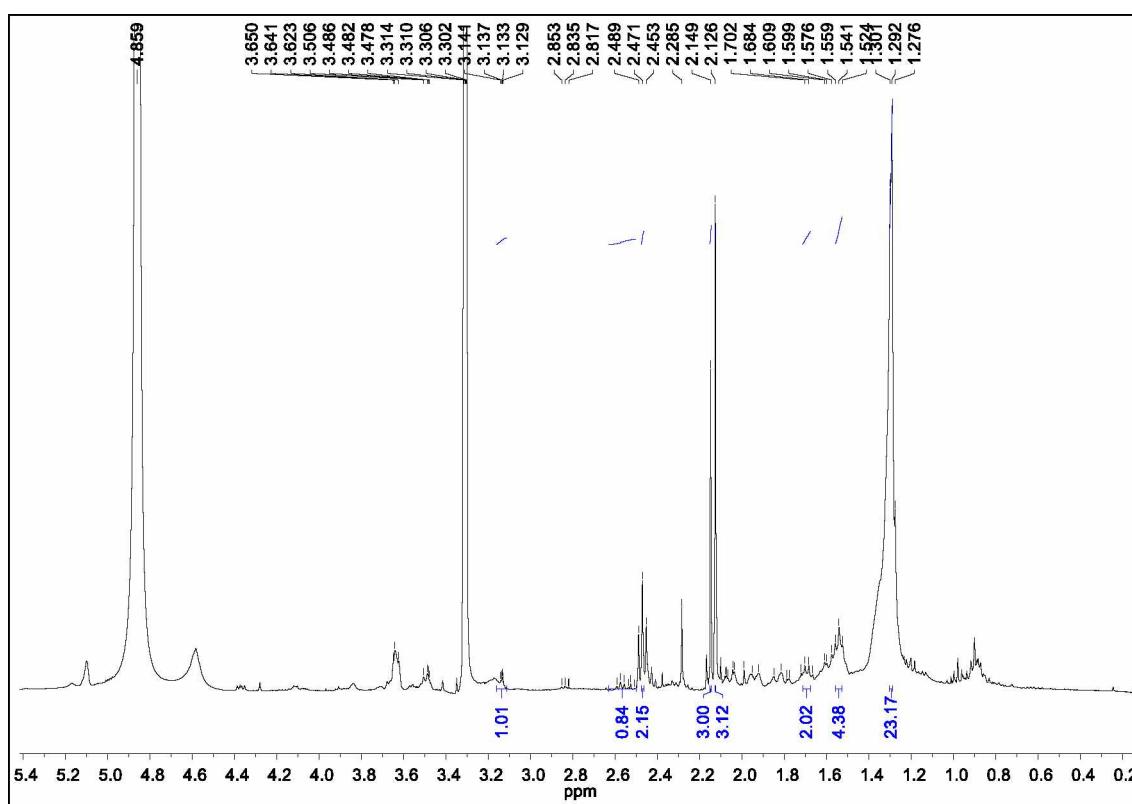
Fonte: a autora.

**Figura 76 – Ampliação do espectro 75 ( $\delta$  29,75–30,75), alcaloide 13.**



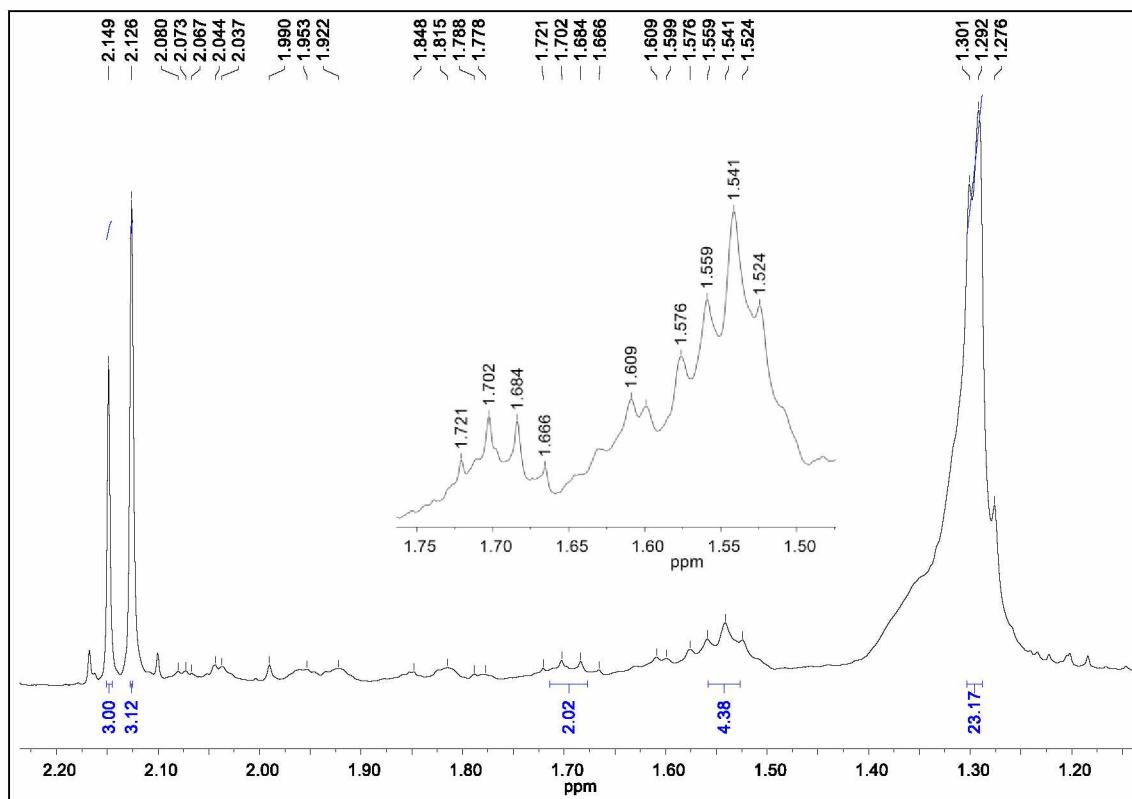
Fonte: a autora.

**Figura 77 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do alcaloide 14 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**



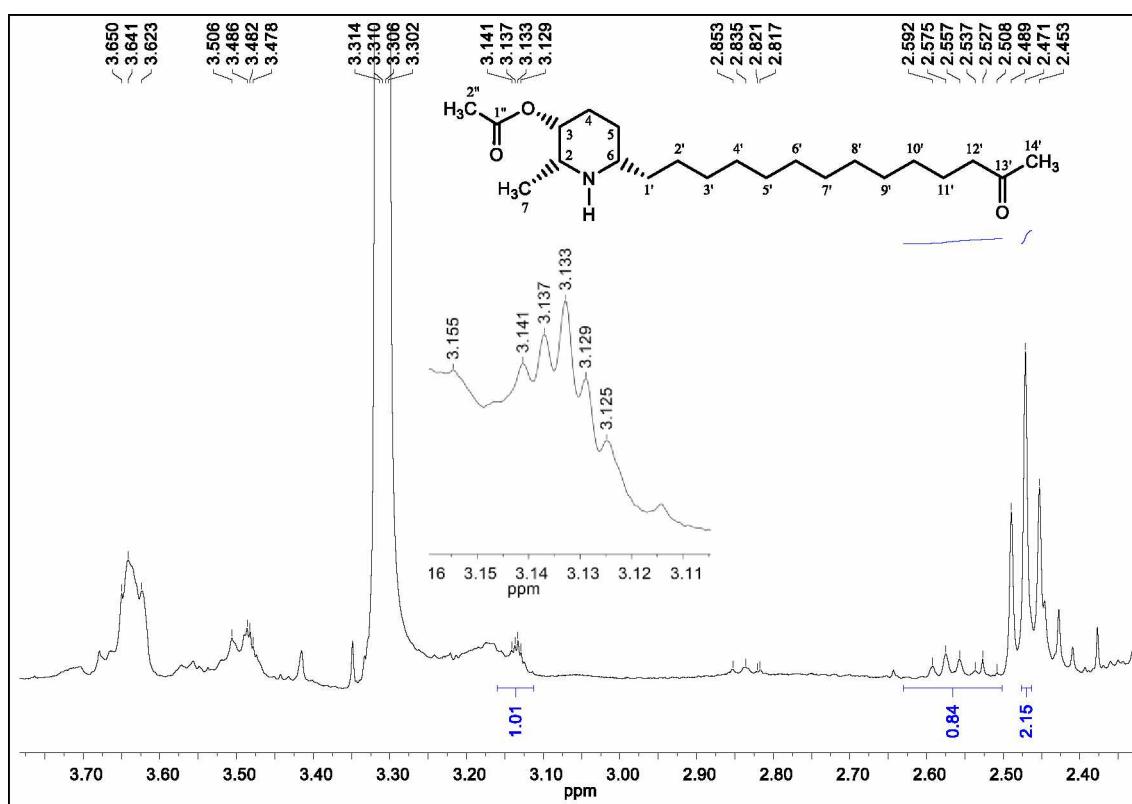
Fonte: a autora.

**Figura 78 – Ampliação do espectro 77 ( $\delta$  0,7–2,2), alcaloide 14.**



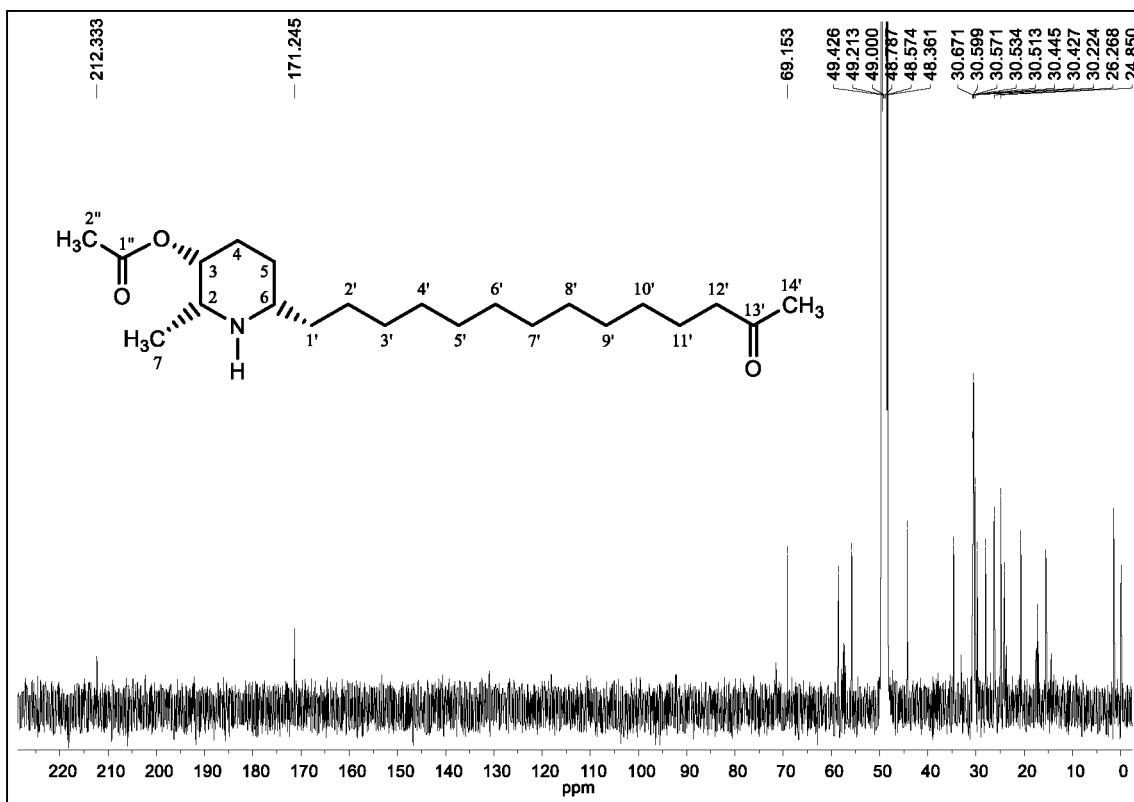
Fonte: a autora.

**Figura 79 – Ampliação do espectro 77 ( $\delta$  2,3–3,70), alcaloide 14.**



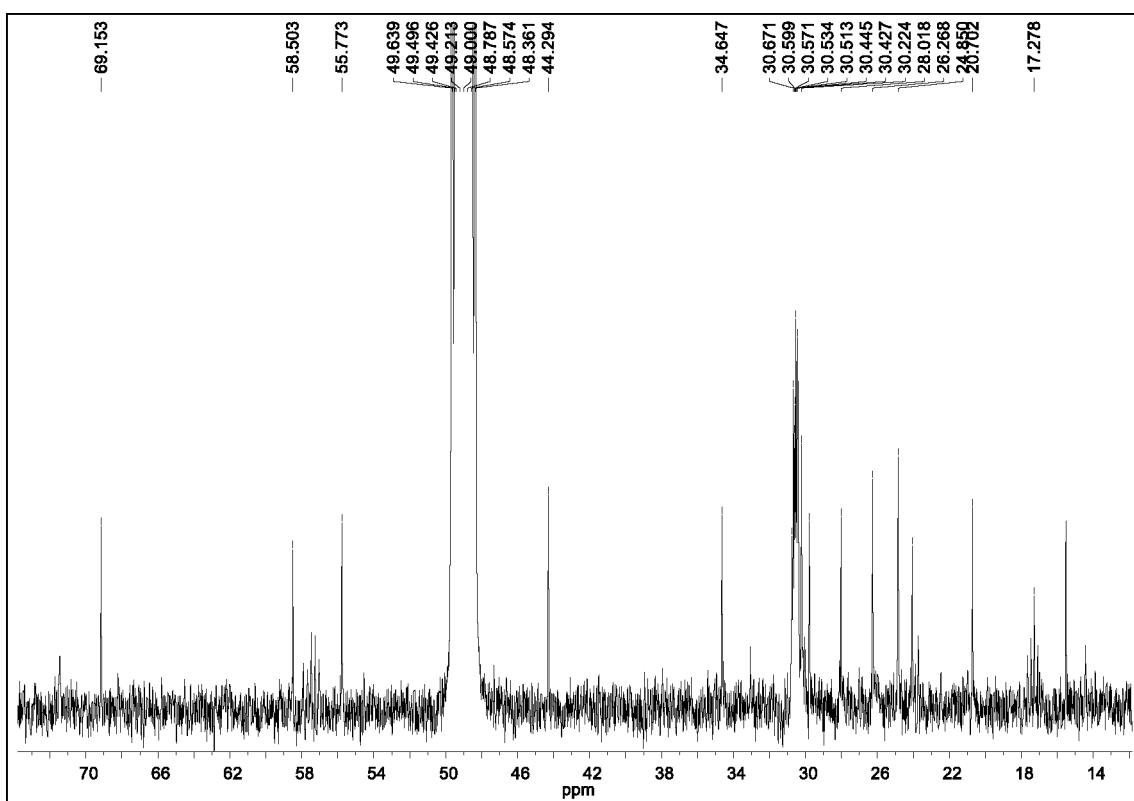
Fonte: a autora.

**Figura 80 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do alcaloide 14 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).**



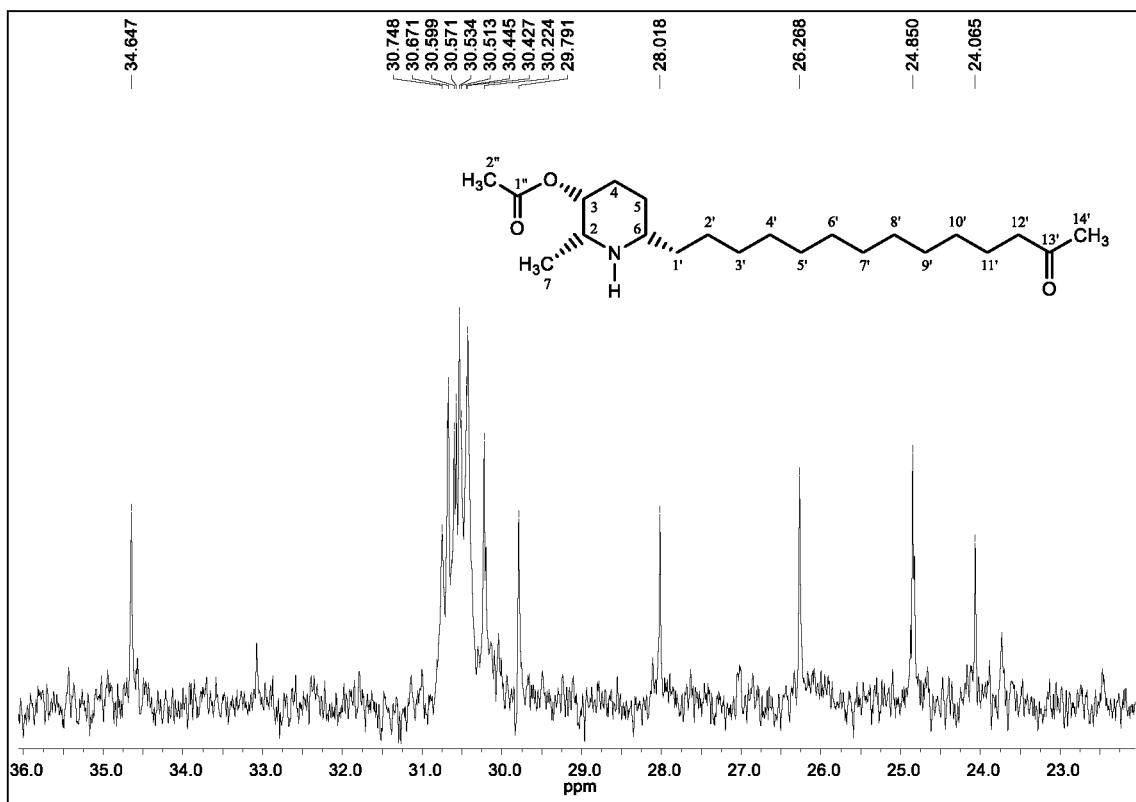
Fonte: a autora.

**Figura 81 – Ampliação do espectro 80 ( $\delta$  14,0–80,0), alcaloide 14.**



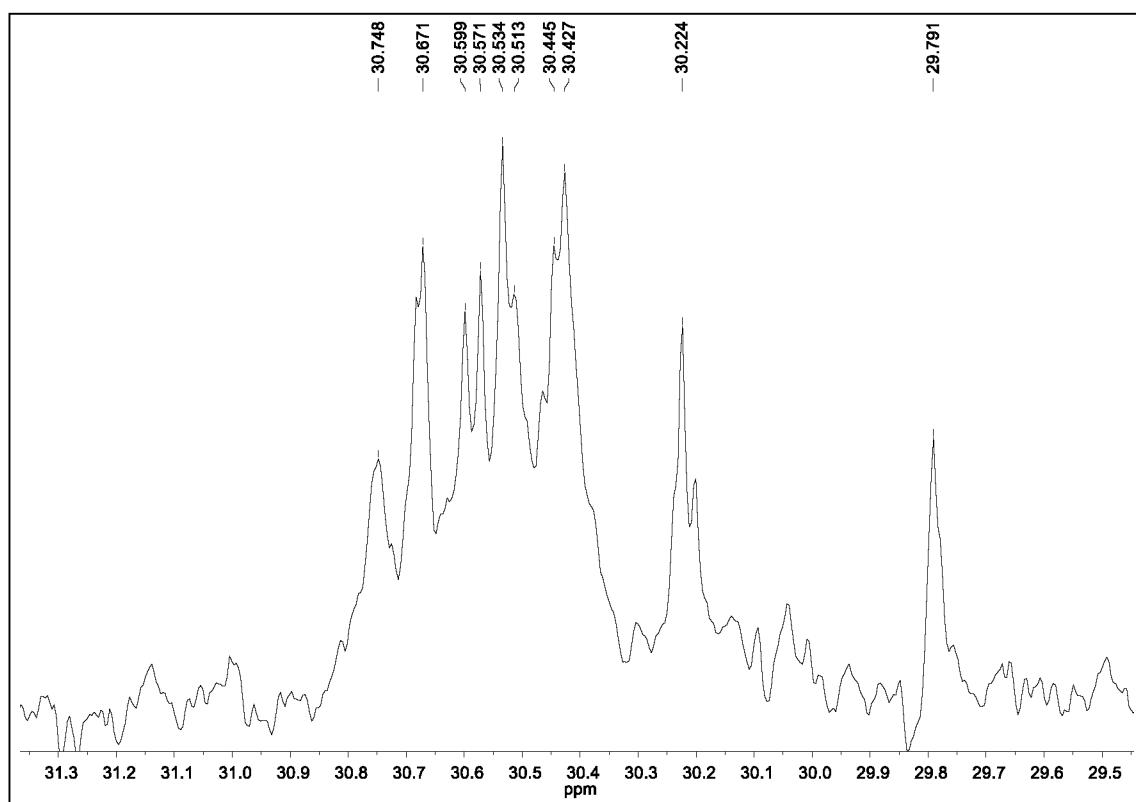
Fonte: a autora.

**Figura 82 – Ampliação do espectro 81 ( $\delta$  22,0–36,0), alcaloide 14.**



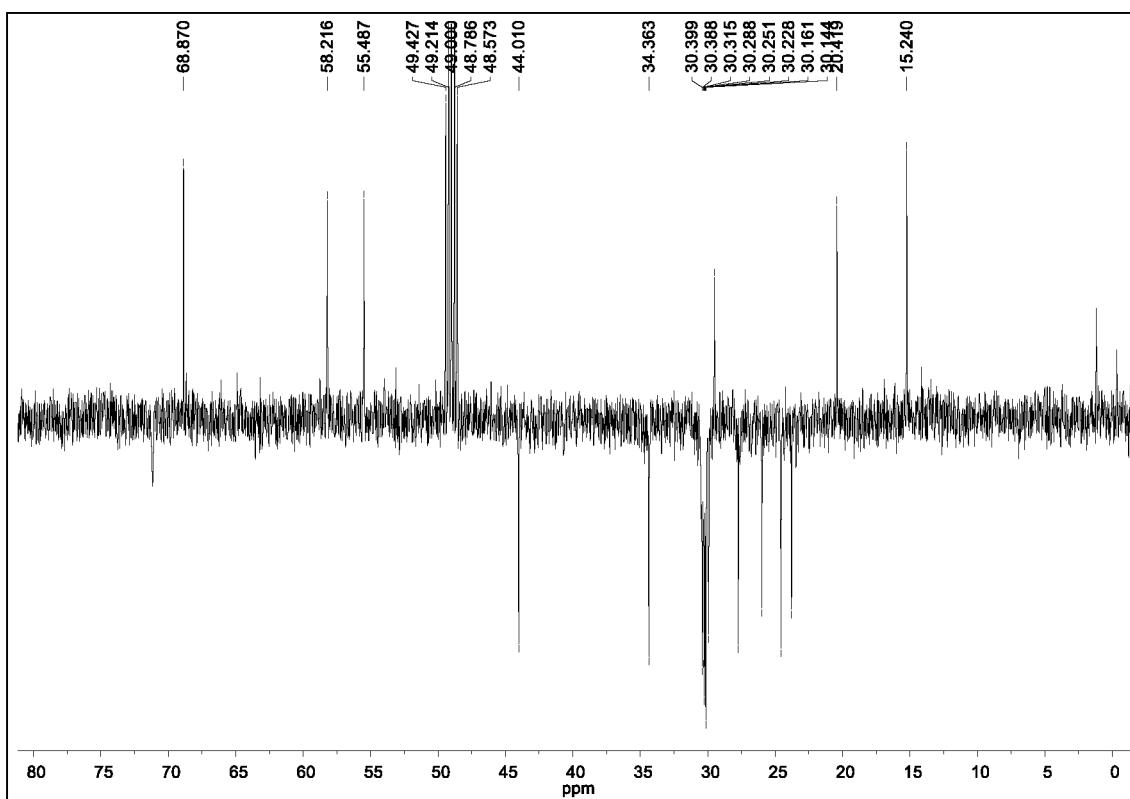
Fonte: a autora.

**Figura 83 – Ampliação do espectro 82 ( $\delta$  29,5–31,3), alcaloide 14.**



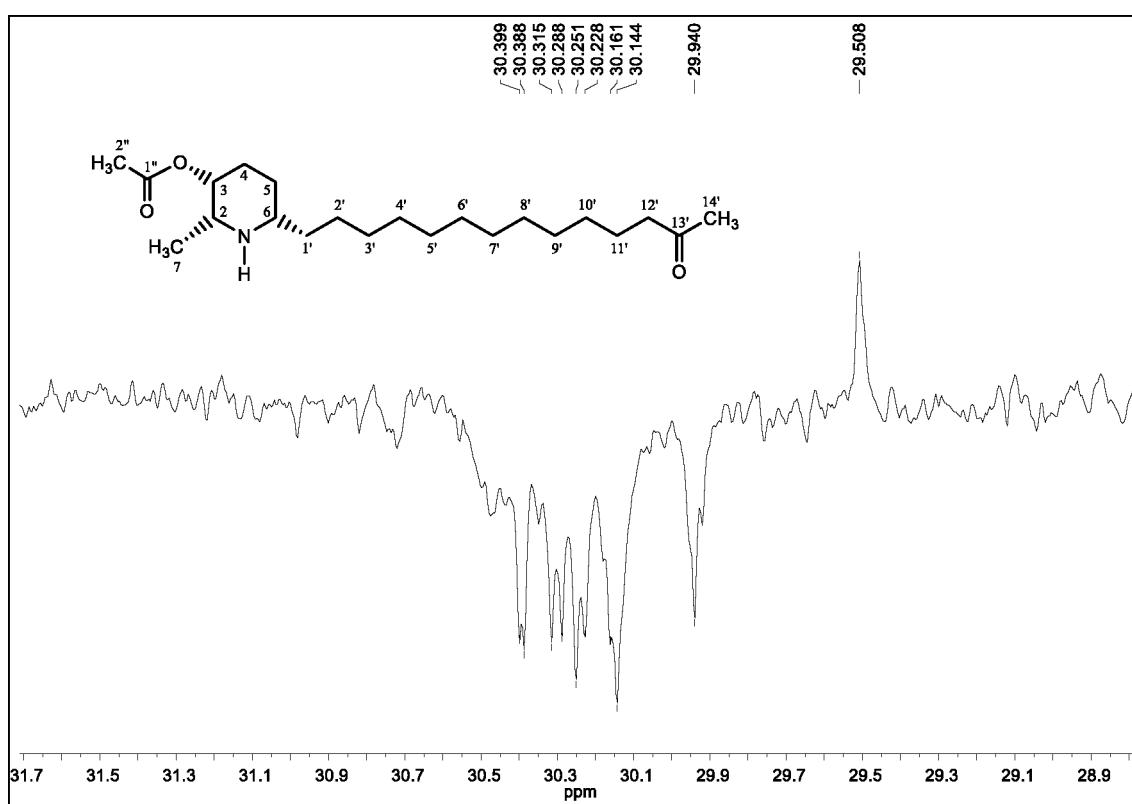
Fonte: a autora.

**Figura 84** – Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) do alcaloide **14**.



Fonte: a autora.

**Figura 85** – Ampliação do espectro 84 ( $\delta$  28,90–31,70), alcaloide **14**.

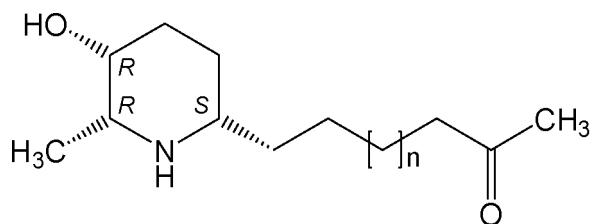


Fonte: a autora.

#### 4.4 CONFIGURAÇÃO ABSOLUTA DOS ALCALOIDES 1, 6, 13 E 14

A configuração absoluta dos alcaloides **1**, **6**, **13** e **14** (Figuras 86 e 87) foi proposta com base nos dados de polarimetria, comparados com aqueles descritos na literatura, uma vez que estes compostos já foram isolados anteriormente (Tabelas 8 e 9).

**Figura 86 – Alcaloides 1 e 6.**

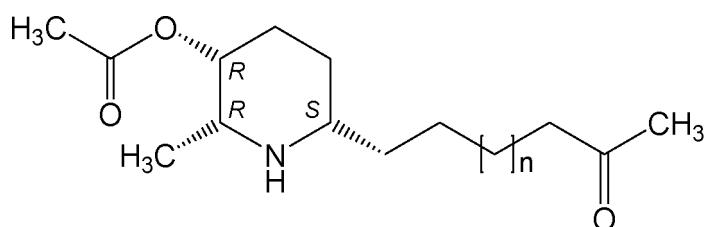


**1** n = 7: (–)-cassina  
**6** n = 9: (–)-espectralina

**Tabela 8 – Configuração absoluta de 1 e 6.**

	(–)-cassina (HIGHET, 1964)	(–)-espectralina (BOLZANI, 1995)	(–)-cassina (PIVATTO, 2010)	(–)-espectralina (PIVATTO, 2010)	<b>1</b>	<b>6</b>
<b>Rotação específica</b>	$[\alpha]_D^{25} -0,60$ (c 8,00 EtOH)	$[\alpha]_D^{25} -8,20$ (c 0,32 CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D^{25} -0,62$ (c 8,00 EtOH)	$[\alpha]_D^{25} -3,35$ (c 1,00 CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D^{25} -2,5$ (c 4,00, MeOH)	$[\alpha]_D^{25} -5,0$ (c 2,00, MeOH)

**Figura 87 – Alcaloides 13 e 14.**



**13** n = 7: (–)-3-O-acetyl cassina  
**14** n = 9: (–)-3-O-acetyl espectralina

**Tabela 9 – Configuração absoluta de 13 e 14.**

	(–)-3-O-cassina (VIEGAS JUNIOR et al., 2004)	(–)-3-O-cassina (PIVATTO, 2010)	(–)-3-O-espectralina (PIVATTO, 2010)	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>Rotação específica</b>	$[\alpha]_D^{25} -16$ (c 0,19 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	$[\alpha]_D^{25} -3,45$ (c 0,29 MeOH)	$[\alpha]_D^{25} -2,96$ (c 0,14 MeOH)	$[\alpha]_D^{25} -14$ (c 4,00, MeOH)	$[\alpha]_D^{25} -3,5$ (c 2,00, MeOH)

#### 4.5 AVALIAÇÃO LEISHMANICIDA E CITOTOXIDADE

Melo e colaboradores (2014) verificaram que a mistura dos alcaloides (–)-cassina (**1**) e (–)-espectralina (**6**), apresentaram atividade significativa contra o parasita *Leishmania major* ( $IC_{50} = 24,9 \pm 1,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sem toxicidade contra células hospedeiras. Este resultado promissor despertou nosso interesse para a avaliação da atividade leishmanicida e a citotoxicidade dos metabólitos, assim como dos demais obtidos neste trabalho (**13** e **14**), porém na forma pura. *Leishmania amazonenses* foi escolhido por ser a espécie associada à doença mais amplamente distribuída no Brasil (DORVAL et al., 2006).

Os dados da atividade leishmanicida e citotoxicidade foram obtidos a partir dos gráficos de viabilidade celular. Os resultados obtidos para os alcaloides **1**, **6**, **13** e **14** foram correlacionados através do cálculo do índice de seletividade (IS) (Tabela 10).

**Tabela 10** – Avaliação da atividade leishmanicida dos alcaloides isolados.

Compostos	<i>L. amazonensis</i> $IC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	Célula Vero $CC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	IS <sup>a</sup>
(–)-cassina ( <b>1</b> )	$25,18 \pm 0,59$	$249,27 \pm 20,32$	0,99
(–)-espectralina ( <b>6</b> )	$15,81 \pm 0,47$	$66,67 \pm 9,68$	0,62
(–)-3- <i>O</i> -acetilcassina ( <b>13</b> )	$30,25 \pm 1,74$	$356,81 \pm 25,90$	1,07
(–)-3- <i>O</i> -acetilespectralina ( <b>14</b> )	$25,95 \pm 3,44$	$273,51 \pm 24,48$	1,02
Anfotericina B	$0,29 \pm 0,01$	—	—

<sup>a</sup>Índice de seletividade.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, os alcaloides **6** e **14** são mais potentes **1** e **13** uma vez que os valores de  $IC_{50}$  foram menores. Isso significa que, neste ensaio é necessária menor concentração da amostra para inibir 50% dos parasitas. No ensaio de citotoxicidade o metabólito **6** apresentou a maior toxicidade, evidenciado pelo menor valor de  $CC_{50}$ , ou seja, mesmo em baixas concentrações ele consegue inibir 50% das células.

O tamanho da cadeia lateral e a presença do grupo acetil são característica estruturais que podem estar relacionadas com as variações nos valores da atividade leishmanicida contra *L. amazonensis* e citotoxicidade. Foi possível observar uma maior potência nos compostos **6** e **14**, que apresentam a maior cadeia lateral, que também foram mais tóxicos em comparação com os homólogos **1** e **13**. A presença do grupo acetil na posição 3-*O* dos compostos **13** e **14** causou um decréscimo, tanto na atividade leishmanicida quanto na citotoxicidade.

Assim, para correlacionar os resultados da atividade leishmanicida e da citotoxicidade, foi calculado o índice de seletividade através da equação:  $SI = \log[CC_{50} (\text{Vero cells})/IC_{50}]$

(*L. amazonensis*)] (CASE et al., 2006). Quanto maior o valor de IS, mais seletivo é o composto na inibição da *L. amazonensis* versus células Vero (citotoxicidade). Segundo Case et al. (2006), quanto mais próximo número 2 forem os valores positivos, maior será a atividade dos compostos frente aos parasitas e menor será a sua toxicidade. Vale ressaltar que neste tipo de ensaio esse parâmetro tem bastante relevância para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos. Valores negativos são um indicativo de que os compostos apresentam maior toxicidade do que atividade sobre o parasita. Dentro deste contexto o alcaloide **13** apresentou o melhor resultado de IS, mas todos os compostos avaliados apresentaram valores positivos, mostrando um caráter promissor para a busca de novos fármacos mais eficientes e que não apresentem efeitos colaterais no tratamento da leishmaniose.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico do extrato etanólico das flores de *Senna spectabilis* permitiu o isolamento de quatro alcaloides, (–)-cassina (**1**), (–)-espectralina (**6**), (–)-3-*O*-acetilcassina (**13**) e (–)-3-*O*-acetilespectralina (**14**), que tiveram suas estruturas elucidadas a partir dos dados espectroscópicos e espectrométricos. Vale destacar este é o primeiro relato do isolamento do alcaloide **13**.

Além dos metabólitos isolados também foram identificadas séries homólogas dos alcaloides **61a**, **61b**, **62a** e **62b**, que devido as pequenas quantidades de massas obtidas, não foi possível o isolamento. No entanto a espectrometria de massas com ionização por *electrospray* provou ser uma importante ferramenta para a identificação destes compostos mesmo quando em matrizes complexas.

A CCD preparativa foi uma técnica rápida e eficiente para a obtenção da mistura dos homólogos **13** e **14**.

A separação dos pares homólogos (**1** e **6**) e (**13** e **14**) utilizando a CC de sílica foi pouco eficiente, o que pode ser constatado posteriormente pelos mesmos valores de  $R_f$  apresentados pelos homólogos. Dentro deste contexto a CLAE acoplada a detector *light scattering* foi uma ferramenta extremamente importante para a separação dos metabólitos desta classe, que não apresentam cromóforos. Os alcaloides **1** (167,6 mg), **6** (105,9 mg), **13** (9,2 mg) e **14** (4,3 mg) purificados por CLAE foram submetidos a análise por espectrometria de massas de alta resolução para confirmação das fórmulas moleculares e posteriormente analisados por RMN para elucidação das estruturas.

Os resultados obtidos a partir da avaliação leishmanicida e citotoxicidade permitiram verificar que dos alcaloides **6** e **13** apresentaram os melhores resultados contra *Leishmania amazoniensis*, sendo que **6** foi mais citotóxico. Assim, os compostos testados demonstram caráter promissor para a continuidade dos estudos visando o desenvolvimento de novos fármacos mais eficientes e que não apresentem efeitos colaterais no tratamento da leishmaniose.

## REFERÊNCIAS

- ALEMAYEHU, G.; HAILU, A.; ABEGAZ, B. M. Bianthraquinones from *Senna didymobotrya*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1423–1425, 1999.
- ALI, M. S.; AZHAR, I.; AMTUL, Z.; AHMAD, V. U.; USMANGANI, K. Antimicrobial screening of some Caesalpiniaceae. **Fitoterapia**, v. 70, n. 3, p. 299–304, 1999.
- AGRA, M. F.; SILVA, K. N.; BASÍLIO, I. J. L. D.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Levantamento das plantas medicinais usadas na região nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 472–508, 2008.
- AKAH, P. A.; ORISAKWE, O. E.; GAMANIEL, K. S.; SHITTU, A. Evaluation of Nigerian traditional medicines: II. Effects of some Nigerian folk remedies on peptic ulcer. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 2, p. 123–127, 1998.
- ALONSO, J. **Fitomedicina:** curso para profissionais da área de saúde. São Paulo: Editora Pharmabooks, 2008, 195 p.
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids – secrets of life.** Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Holanda, Elsevier: 2007, 334 p.
- AYO, R. G. Phytochemical constituents and bioactivities of the extracts of *Cassia nigricans* Vahl.: A review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 14, p. 1339–1348, 2010.
- BAHORUN, T.; NEERGHEEN, V. S.; ARUOMA, O. I. Phytochemical constituents of *Cassia fistula*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 13, p. 1530–1540, 2005.
- BARBOSA, F. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Anthraquinones and naphthopyrones from *Senna rugosa*. **Biochemical Systematical Ecology**, v. 32, p. 363–365, 2004.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos.** Viçosa: Ed. UFV, 2013, 189 p.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.
- BOLZANI, V. S.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929–5934, 1995.
- CARDOSO, D.; QUEIROZ, L. P.; PENNINGTON, R. T.; LIMA, H. C.; FONTY, E.; WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M. Revisiting the phylogeny of papilionoid legumes: new insights from comprehensively sampled Early-branching lineages. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 12, 2012.
- CARVALHO, José Carlos Tavares. **Fitoterápicos Anti-Inflamatórios:** Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, 2004, 479 p.
- CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F.

Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006.

CASTRO, A. T.; CASTRO; A. P.; SILVA, M. S.; SOUZA, I. M. M.; MARTINS-SOUZA, R. L.; CHAGAS-PAULA, D. A.; COELHO, L. F. L.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; VIEGAS JUNIOR, C.; MARQUES, M. J. *In vivo* evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts, fractions and major 3-hydroxy-2,6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184–4190, 2016.

CHANDA, S.; KANERIA, M.; BARAVALIA, Y. Antioxidant and antimicrobial properties of various polar solvent extracts of stem and leaves of four *Cassia* species. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 10, p. 2490–2503, 2012.

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.

CÓRDULA, E. **Distribuição e diversidade de leguminosae em áreas de caatinga no município de Mirandiba – PE**. 2008. 163 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco.

CUÉLLAR, M. J.; GINER, R. M.; RECIO, M. C.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J. L. Topical anti-inflammatory activity of some Asian medicinal plants used in dermatological disorders. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 221–229, 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal naturals products: a biosynthetic approach**. 3. ed., John Wiley & Sons Ltd, 2009. 546 p.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: SP, 1996, 9–86 p.

DORVAL, M. E. M. C.; OSHIRO, E. T.; CUPOLLILO, E.; CASTRO, A. C. C.; ALVES, T. P. Occurrence of American tegumentary leishmaniasis in the Mato Grosso do Sul State associated to the infection for *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 43–46, 2006.

EHIOWEMWENGUAN, G.; INETIANBOR, J. E.; YAKUBU, J. M. Antimicrobial qualities of *Senna alata*. **IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, v. 9, n. 2, p. 47–52, 2014.

EVANS, C. E.; BANSO, A.; SAMUEL, O. A. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*: an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 1, p. 21–24, 2002.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369–394, 2006.

FERNAND, V. E.; DINH, D. T.; WASHINGTON, S. J.; FAKAYODE, S. O.; LOSSO, J. N.; RAVENSWAAY, R. O. V.; WARNER, I. M. Determination of Pharmacologically Active Compounds in Root Extracts of *Cassia alata* L. by use of High Performance Liquid Chromatography. **Talanta**, v. 74, n. 4, p. 896–902, 2008.

FERREIRA, I. C. F. S; VARGAS, V. M. F. **Mutagenicity of Medicinal Plant Extracts in *Salmonella*/microsome Assay.** *Phytother. Res.* v.13, p. 397–400, 1999.

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

GARCIA, L. P.; MAGALHÃES, L. C. G.; ÁUREA, A. P.; SANTOS, C. F.; ALMEIDA, R. F. **Epidemiologia das doenças negligenciadas no Brasil e gastos federais com medicamentos.** Brasília: IPEA, 2011.

HATANO T.; YAMASHITA A.; HASHIMOTO T.; ITO H., KUBO N.; YOSHIYAMA M.; SHIMURA S.; ITOH Y.; OKUDA T.; YOSHIDA T. Flavan dimers with lipase inhibitory activity from *Cassia nomame*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 893–900, 1997.

HATANO, T.; UEBAYASHI, H.; ITO, H.; SHIOTA, S.; TSUCHIYA, t.; YOSHIDA, T. Phenolic constituents of Cassia seeds and antibacterial effect of some naphthalenes and anthraquinones on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 47, n. 8, p. 1121–1127, 1999.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5 ed. Florianópolis: Ed. UFSC, 2003, Cap. 29, p. 765–791.

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

JAIN, S. C.; JAIN, R.; SHARMA, R. A.; CAPASSO, F. Pharmacological investigation of *Cassia italica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 58, n. 2, p. 135–142, 1997.

JOLY, Aylthon Brandão. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal.** 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998, 778 p.

JONES L.; BARTHOLOMEW B.; LATIF Z.; SARKER S. D.; NASH R. J. Constituents of *Cassia laevigata*. **Fitoterapia**, v. 71, p. 580–583, 2000.

JOSHUA, P. E.; CHILETUGO, O. F. Hepatoprotective effect of ethanolic Leaf extract of *Senna hirsuta* (*Cassia hirsuta*) against carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>) intoxication in rats. **Journal of Pharmacy Research**, v. 3, n. 2, p. 310–316, 2010.

JOTHY, S. L.; TOREY, A.; DARAH, I.; CHOONG, Y. S.; SARAVANAN, D.; CHEN, Y.; LATHA, L. Y.; DEIVANAI, S.; SASIDHARAN, S. *Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn: a promising traditional herb in health improvement. **Molecules**, v. 17, p. 10292–10305, 2012.

KAINSA, S.; KUMAR, P.; RANI, P. Pharmacological potentials of *Cassia auriculata* and *Cassia fistula* plants: A review. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 9, p. 408–417, 2012.

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.

KASHIWABARA, Y. B.; PAIVA, R. M. R. A.; NAKAOKA, V. Y.; SILVA, E. S.; KASHIWABARA, G. B. The Chagas Disease – A literature review. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research – BJSCR**, v. 4, n. 3, p. 49–52, 2013.

KAUR, I.; AHMAD, S.; HARIKUMAR, S. L. Pharmacognosy, phytochemistry and pharmacology of *Cassia occidentalis* Linn. **International Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Research**, v. 6, n. 2, p. 151–155, 2014.

KIM, H. L.; CAMP, B. J.; GRIGSBY, R. D. Isolation of *N*-methylmorpholine from the seeds of *Cassia occidentalis* L. (coffee senna). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 19, n. 1, p. 198–199, 1971.

KIM, D. H.; HYUN, S. K.; YOON, B. H.; SEO, J. H.; LEE, K. T.; CHEONG, J. H.; JUNG, S. Y.; JIN, C.; CHOI, J. S.; RYU, J. H. Gluco-obtusifolin and itsaglycon, obtusifolin, attenuate scopolamineinduced memory impairment. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 111, p. 110–116, 2009.

KINJO, J.; IKEDA, T.; WATANABE, K.; NOHARA, T. An anthraquinone glycoside from *Cassia angustifolia* leaves. **Phytochem**, v. 37, n. 6, p. 685–1687, 1994.

KORIR, R. K.; MUTAI, C.; KIYUKIA, C.; BII, C. Antimicrobial activity and safety of two medicinal plants traditionally used in bomet district of Kenya. **Research Journal Medicinal Plant**, v. 6, n.5, p. 370–382, 2012.

KUMAR, S.; KUMAR, V.; PRAKASH, O. Antidiabetic and anti-lipemic effects of *Cassia siamea* leaves extract in streptozotocin induced diabetic rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 3, p. 871–873, 2010.

LEMLI, J.; TOPPET, S.; CUVEELE, J.; JANSEN, G. Naphthalene glycosides in *Cassia Senna* and *Cassia angustifolia*. **Planta Médica**, v. 43, n. 9, p. 11–17, 1981.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens, Kew**, 2005.

LI, X. C.; DUNBAR, D. C.; ELSOHLY, H. N.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. A newnaphthopyrone derivative from *Cassia quinquangulata* and structural revision of quinquangulin and its glycosides. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 9, p. 1153–1156, 2001.

LI, S. F.; DI, Y. T.; LUO, R. H.; ZHENG, Y. T.; WANG, Y. H.; FANG, X.; ZHANG, Y.; LI, L.; HE, H. P.; LI, S. L.; HAO, X. J. Cycloartane Triterpenoids from *Cassia occidentalis*. **Planta Medica**, v. 78, n. 8, p. 821–827, 2012.

LIMA, H.C. 2000. **Leguminosas arbóreas da Mata Atlântica: uma análise da riqueza, padrões de distribuição geográfica e similaridades florísticas em remanescentes florestais**

**do Estado do Rio de Janeiro.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIMA, H.C. Fabaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 14 Out. 2016.

LIZCANO, L. J.; BAKKALI , F.; RUIZ-LARREA, M. B.; RUIZ-SANZ, J. I. Antioxidant activity and polyphenol content of aqueous extracts from Colombian Amazonian plants with medicinal use. **Food Chemistry**, n. 119, v. 4, p. 1566–1570, 2010.

LORENZI, Harri. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. 2<sup>a</sup> ed. Nova Odessa, S P: Instituto Plantarum, 2002, v. 2, 384 p.

MACEDO, E. M. S.; WIGGERS, H. J.; SILVA, M. G. V.; BRAZ-FILHO R.; ANDRICOPULO A. D.; MONTANARI C. A. A New Biantanon Glycoside as Inhibitor of *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 947–953, 2009.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n.3, p. 429–438, 2002.

MAGALHÃES, Jorge Lima de. **Estratégia governamental para internalização fármacos e medicamentos em doenças negligenciadas**. 2010. 253 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Escola de Química – EQ.

MARTHY, P.; ROSENTHAL, E. Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. **Expert Opin Pharmacother**, v. 3, p. 1101–1108, 2002.

MARTINS, M. M.; DE AQUINO, F. J. T., DE OLIVEIRA, A.; NASCIMENTO, E. A. D.; CHANG, R.; BORGES, M. S.; MELO, G. B.; SILVA, C. V.; MACHADO, F. C.; MORAIS, S. A. L. Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliiana* (Less) Druce (Asteraceae). **Journal of essential oil-bearing plants (JEOP)** v. 18, n. 3, p. 561–569, 2015.

MASCOLO, N.; CAPASSO, R.; CAPASSO, F. **Senna. A safe and effective drug**. Phytotherapy Research, v. 12, p. 143–145, 1998.

MEENA, R.; KALIDHAR, S. B. Chemical examination of the stems of *Cassia grandis* L. **Indian J Pharm Sciense**, v. 60, n. 1, p. 59–60, 1998a.

MEENA, R.; KALIDHAR, S. B. Section B, Organic including Medicinal. **Indian Journal of Chemistry**, v. 37, n. 12, p. 1314–1315, 1998b.

MELO, G. M. A.; SILVA, M. C. R.; GUIMARÃES, T. P.; PINHEIRO, K. M.; MATTA, C. B.; QUEIROZ, A. C.; PIVATTO, M.; BOLZANI, V. S.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; VIEGAS JUNIOR, C. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3,

p. 277–281, 2014.

MENDEZ, A. M. Aliphatic alcohols,  $\beta$ -sitosterols and alkaloids in *Cassia jahnnii*. **Phytochemistry**, n. 10, v. 9, p. 2255–2256, 1971.

MONDAL, A. Phenolic constituents and traditional uses of *Cassia* (Fabaceae) plants: An update. **Signpost Open Access Journal Organic & Biomolecular Chemistry**. v. 3, n. 3, p. 93–141, 2015.

MONGALO, N. I.; MAFOKO, B. J. *Cassia abbreviata* Oliv. A review of its ethnomedicinal uses, toxicology, phytochemistry, possible propagation techniques and pharmacology. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, n. 45, p. 2901–2906, 2013.

MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2185–2197, 2001.

NALEVAIKO, P.C.; MELO, R. T.; MONTEIRO, G. P.; COELHO, L. R.; MENDONÇA, E. P.; FREITAS, E. A.; ROSSI, D. A. Leishmaniose no Brasil – Importância e perspectivas. **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 14, Ed. 161, Art. 1088, 2011.

NWAFOR, P. A.; OKWUASABA, F. K. Effect of methanolic extract of *Cassia nigricans* leaves on rat gastrointestinal tract. **Fitoterapia**, v. 72, n. 3, p. 206–214, 2001.

OLIVEIRA, L. F. G. **A inovação em medicamentos da biodiversidade no Brasil: o caso “Leishmaniose”**. 2013. 62 p. Monografia (Instituto de Tecnologia de Fármacos – Fiocruz) – Rio de Janeiro, RJ.

OLIVEIRA SILVA, F.; SILVA, M. G.; FENG, D.; DE FREITAS, R. M. Evaluation of central nervous system effects of iso-6-cassine isolated from *Senna spectabilis* var. *excelsa* (Schrad) in mice. **Fitoterapia**, v. 82, n. 2, p. 255–259, 2011.

OKWU, D. E.; UCHENNA, N. F. Exotic multifaceted medicinal plants of drugs and pharmaceutical industries. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 25, p. 7271–282, 2009.

OSHIMI, S.; DEGUCHI, J.; HIRASAWA, Y.; EKASARI, W.; WIDYAWARUYANTI, A.; WAHYUNI, T. S. Cassiarins C-E, antiplasmodial alkaloids from the flowers of *Cassia siamea*. **Jounal of Natural Products**, v. 72, n. 10, p. 1899–1901, 2009.

PAGUIGAN, N. D.; CASTILLO, D. H. B.; CHICHIOCO-HERNANDEZ, C. L. Anti-ulcer activity of leguminosae plants. **Arq Gastroenterol**, v. 51, n. 1, p. 64–68, 2014.

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

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

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

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

RANGEL, E. T. **Atividade antiprotozoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma do Cerrado, com ênfase em *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2010. 131 p. Tese (Doutorado em Ciência da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília.

RAO, K. V.; DAMU, A. G.; JAYAPRAKASAM, B.; GUNASEKAR, D. Flavonol glycosides from *Cassia hirsuta*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 2, p. 305–306, 1999.

REIMÃO, J. Q. **Estudo da atividade anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma cruzi* de bloqueadores de canal de cálcio, furazolidona e buparvaquona: reposicionamento, associação de fármacos e formulações lipossomais**. 2012. 272 p. Tese (Doutorado em Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública) - Programa de Pós-Graduação Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo.

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

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotecnologia**. São Paulo: Editorial Premier, 1997, 372 p.

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, n. 1, p. 63-71, 2000.

SANTOS, R. N.; SILVA, M. G. V.; BRAZ FILHO, R. Constituintes químicos do caule de *Senna reticulata* Willd. (Leguminosae). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 1979-1981, 2008.

SANTOS, M. F; NETO, R. B. Araújo; NASCIMENTO, M. P. S. B. C.; LIMA, P. S. C. Determination of the genetic diversity among accessions of *Senna spectabilis* (canafistula) by using RAPD markers. **Journal online GMR Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 4, p. 6149–6155, 2013.

SEKAR, M.; PRASAD, K. J. R.; SIDDURAJU, P.; JANARDHANAN, K. New anthraquinones from *Cassia obtusa*. **Fitoterapia**, v. 70, n. 3, p. 330–332, 1999.

SILVA, J. G. A.; MONTEIRO, J. A.; FERREIRA, E. B.; SAMPAIO, C. G.; SILVA, M. G. V. Total phenolic content, antioxidant and anticancer activities of four species of *Senna Mill*. From Northeast Brazil. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 7, p. 199–202, 2014.

SILVA, D. H. S.; VIEGAS JUNIOR, C.; SANTOS, L. A.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; CASTRO, N. G.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectalina, cassina e análogos

semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da Doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38–46, 2010.

SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; CERQUEIRA, G. S.; SABINO, E. B.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; FREITAS, R. M. Central nervous system effects of Iso-6-spectraline isolated from *Senna Spectabilis* var. *Excelsa* (Schrad) in Mice. **Journal of Young Pharmacists : JYP**, v. 3, n. 3, p. 232–6, 2011a.

SILVA, F. O.; SILVA, M. G. V.; CERQUEIRA, G. S.; SABINO, E. B.; ALMEIDA, A. A. C.; COSTA, J. P.; FREITAS, R. M. Iso-6-spectraline effects on convulsions induced in epilepsy models. **Journal of Young Pharmacists**, v. 3, n. 3, p. 232–236, 2011b.

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

SILVA, G. H.; TELES, H. L.; TREVISON, H. C.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H.; EBERLIN, M. N.; HADDAD, R.; COSTA-NETO, C. M.; ARAÚJO, A. R.; New bioactive metabolites produced by *Phomopsis cassiae*, an endophytic fungus in *Cassia spectabilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 67, p. 1964–1969, 2006.

SILVA, M. G. B.; ARAGÃO, T. P.; VASCONCELOS, C. F. B.; FERREIA, P. A.; ANDRADE, B. A.; COSTA, I. M. A.; COSTA-SILVA, J. H.; WANDERLEY, A. G.; LAFAYETTE, S. S. L. Acute and subacute toxicity of *Cassia occidentalis* L. stem and leaf in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 341–346, 2011.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. 7. ed., Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2001, v. 1, 645 p.

SOUZA, W. **Doenças negligenciadas**. Academia Brasileira de Ciências, 2010. 56 p.

SREEJITH, G.; LATHA, P. G.; SHINE, V. J.; ANUJA, G. I.; SUJA, S. R.; SINI, S.; SHYAMA, S.; PRADEEP, S.; SHIKHA, P.; RAJASEKHARAN, S. Anti-allergic, anti-inflammatory and anti-lipidperoxidant effects of *Cassia occidentalis* Linn. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 494–498, 2010.

THONGSAARD, W.; DEACHAPUNYA, C.; PONGSAKORN, S.; BOYD, E. A.; BENNETT, G. W.; MARSDEN, C. A. Barakol: A potential anxiolytic extracted from *Cassia siamea*. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 53, n. 3, p. 753–758, 1996.

TOUCHSTONE, J.C.; DOBBINS, M.F. **Practice of thin layer chromatography**. New York: John Wiley, 1978, p. 161–223.

VALLE, A. E. Leguminosaceae. In: GIULIETTI, A. M.; QUEIROZ, L. P. de. Plantas da Caatinga: Perfil Botânico, Fitoquímica e Atividade Biológica. **Associação plantas do Nordeste**, Recife, v. 4. 2006.

VARGHESE, G. K.; BOSE, L.V.; HABTEMARIAM, S. Antidiabetic components of *Cassia alata* leaves: Identification through  $\alpha$ -glucosidase inhibition studies. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 3, p. 345–349, 2013.

- VIANA, M. G.; ALBURQUERQUE, C. C.; MEDEIROS, E. V.; VIANA, F. A.; SILVA, K. M. B. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monosporascus cannonballus*. **Ciências Agrotécnica**, v. 32, n. 5, p. 1387–1393, 2008.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M.; BARREIRO, E. J.; YOUNG, M. C. M.; TOMAZELA, D.; EBERLIN, M. N. Further bioactive piperidine alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 908–910, 2004.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. New anti-Alzheimer drugs from biodiversity: the role of the natural acetylcholinesterase inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, p. 915–926, 2005a.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; PIMENTEL, L. S.; CASTRO, N. G.; CABRAL, R. F.; COSTA, R. S.; FLOYD, C.; ROCHA, M. S.; YOUNG, M. C.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. New selective acetylcholinesterase inhibitors designed from natural piperidine alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4184–4190, 2005b.
- VIEGAS JUNIOR, C.; RESENDE, A.; SILVA, D. H. S.; CASTROGAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J.; MIRANDA, A. L. P.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S.; YOUNG, M. C. M. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279–1286, 2006a.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006b.
- VIEGAS JUNIOR, C.; SILVA, D. H. S.; PIVATTO, M.; REZENDE, A.; CASTROGAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; MURALEEDHARAN, G. N. Lipoperoxidation and cyclooxygenase enzyme inhibitory piperidine alkaloids from *Cassia spectabilis* green fruits. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 2026–2028, 2007.
- VILA, J.; MOLLINEDO P.; STERNER, O. Estudio fitoquímico y actividad antioxidante de *Senna birostris*. **Revista Boliviana de Química**, v. 20, p. 49–52, 2003.
- WAGNER, H.; Bladt, S. **Plant Drug Analysis**; A Thin Layer Chromatography Atlas; Springer, Ltd: Berlim, 1996, p 3–5.
- XU, L.; CHAN, C. O.; LAU, C. C.; MOK, D. K. W.; CHEN, S. Simultaneous determination of eight anthraquinones in *Semen Cassiae* (a seed of *Cassia obtusifolia*) by HPLC-DAD. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 4, p. 110–115, 2012.
- YADAV, J. P.; ARYA, V.; YADAV, S.; PANGHAL, M.; KUMAR, S.; DHANKHAR, S. *Cassia occidentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. **Fitoterapia**, v. 81, p. 223–230, 2010.
- WERNECK, G. L.; HASSELMANN, M. H.; GOUVÉA, T. G. Panorama dos estudos sobre nutrição e doenças negligenciadas no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 1, p. 39–62, Jan. 2011.

WHO - World Health Organization. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. ([http://www.who.int/neglected\\_diseases/2010report/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/2010report/en/)), acesso em 25 de novembro de 2016.

WU, X. H.; RUAN, J. L.; CHENG, C. R.; WU, Z. W.; GUAN, S. H.; TAO, S. J.; XU, P. P.; GUO, D. A. Benzyl- $\beta$ -resorcylates from *Cassia obtusifolia*. Fitoterapia, v. 81, n. 6, p. 617–620, 2010.

ZHANG, W. D.; WANG, P. Y.; WANG, Y.; WANG, S. Q.; WANG, X. J. Simultaneous determination of aurantio-obtusin, chrysoobtusin, obtusin and 1-desmethylobtusin in rat plasma by UHPLC-MS/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 23, p. 369–374, 2014.